

Dei lysosomale cysteinproteasane legumain og cathepsin B i apoptose

Eilen Tunglund



Mastergradsoppgåve i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematiske-naturvitenskaplege fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

15. mai 2008

Dei lysosomale cysteinproteasane legumain og cathepsin B i apoptose

Eilen Tunland



Mastergradsoppgåve i farmasi

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Farmasøytisk institutt

Det matematiske-naturvitenskaplege fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

15. mai 2008

Rettleiarar:

Professor Rigmor Solberg

Professor Harald Thidemann Johansen

Forord

Denne mastergradsoppgåva vart utført i tidsrommet august 2007 til mai 2008 med professor Rigmor Solberg og professor Harald Thidemann Johansen som rettleiarar. Eg er svært takksam for at dei har introdusert meg for dette spennande og interessante forskingsfeltet på ein så inspirerande måte. Dei fortener ein stor takk for god rettleiing og ekte engasjement gjennom heile arbeidet, og for verdifulle tilbakemeldingar under skriveprosessen.

Eg vil rette ein stor takk til avdelingsingeniør Hilde Nilsen for opplæring og god hjelp på labben, og for alltid å vere tilstades for spørsmål. Takk til tilsette ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap på ZEB for opplæring og hjelp ved fluorescensmikroskopering. Takk til professor Trond Vidar Hansen ved Avdeling for farmasøytisk kjemi som gav oss tilgang til PAC-1. Takk til professor Eva Skovlund ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap for statistiske innspel. Takk til alle tilsette ved avdelinga for varm inkludering i det sosiale fellesskapet i fjerde etasje.

Eg vil vidare takke alle medstudentar i fjerde etasje for koselige og kjekke månadar under arbeidet med oppgåva. Ikkje minst vil eg seie tusen takk for oppmuntring, gode råd og hjelp ved større og mindre utfordringar.

Til slutt vil eg takke familie og venner for omtanke og støtte, og ikkje minst min kjære Roar for stort tolmod og tiltru.

Oslo, 15. mai 2008

Eilen Tunglund

Innhald

FORKORTINGAR.....	6
SAMANDRAG	8
1. INNLEIING	9
1.2 CELLEDØD.....	9
1.2.1 Nekrose.....	9
1.2.2 Apoptose.....	10
1.3 LYSOSOMER	14
1.3.1 Lysosomer i celledød.....	14
1.4 PROTEASAR	17
1.4.1 Cathepsiner	18
1.4.2 Casparar	19
1.4.3 Legumain.....	19
1.5 DØDSSTIMULERANDE STOFF	21
1.5.1 Staurosporin.....	21
1.5.2 PAC-1.....	22
1.5.3 L-Leucyl-L-leucin metylester.....	23
1.6 MÅL MED OPPGÅVA.....	24
2. MATERIALER OG METODE.....	26
2.1 KJEMIKALER OG REAGENSER.....	26
2.2 UTSTYR.....	28
2.3 CELLEDYR KING	29
2.3.1 Tining	29
2.3.2 Dyrking, splitting og teljing	29
2.4 CELLEFORSØK TIL ENZYMAKTIVITETSMÅLING	30
2.4.1 Utsåing og stimulering.....	30
2.4.2 Hausting.....	30
2.4.3 Måling av totalprotein.....	31
2.4.4 Måling av legumainaktivitet.....	31
2.4.5 Måling av cathepsin B-aktivitet.....	32
2.4.6 Måling av caspase-3-aktivitet	32
2.4.7 Databehandling.....	33
2.5 CELLEFORSØK TIL VIABILITETSMÅLING.....	33
2.5.1 Utsåing og stimulering.....	33
2.5.2 Måling av viabilitet	34
2.5.3 Databehandling.....	34
2.6 CELLEFORSØK TIL FARGING	34

2.6.1	<i>Utsåing og stimulering</i>	34
2.6.2	<i>Cellekjernefarging</i>	35
2.6.3	<i>Lysosomfarging</i>	35
2.7	STATISTIKK	36
3.	RESULTATER	37
3.1	STAUROSPORIN- OG PAC-1-INDUSERT CELLEDØD	37
3.2	LYSOSOMALE PROTEASAR SI ROLLE I STAUROSPORIN- OG PAC-1-INDUSERT CELLEDØD.....	42
3.3	CELLEDØD INDUSERT AV LYSOSOMAL PERMEABILITET	45
4.	DISKUSJON	50
4.1	VAL AV CELLER OG DØDSSTIMULI	50
4.2	VAL AV METODAR.....	52
4.3	VAL OG EFFEKT AV PROTEASEINHIBITORAR	54
4.4	EFFEKT AV LEU-LEU-OME I PMA-STIMULERTE THP-1 CELLER.....	55
4.5	STAUROSPORININDUSERT CELLEDØD	56
4.6	PAC-1-INDUSERT CELLEDØD	58
4.7	LYSOSOMALE PROTEASAR I APOPTOSE	61
5.	KJELDER	63
	VEDLEGG	67

Forkortingar

<i>Forkorting</i>	<i>Forklaring (engelsk)</i>
Ac-DEVD-AMC	N-acetyl-aspartat-glutamat-valin-aspartat-7-amino-4-metylkumarin
AIF	apoptoseinduserande faktor
Ala	alanin
Apaf-1	apoptoseaktiverande faktor-1 (apoptotic protease activating factor)
APC	antigenpresenterande celle
Asn	asparagin
Asp	aspartat
CA-074Me	L-trans-epoksysuksinyl-isoleucin-prolin-metylester propylamid
cmk	klorometylketon
Cys	cystein
disc	dödsinduserande signalkompleks
DPPI	dipeptidylpeptidase-I
DTT	ditiotreititol
E-64d	L-trans-epoksysuksinyl-leusin-3-metylbutylamid-etylester
FADD	Fas-assosiert dödsdomene
FBS	fötalt bovint serum, kalveserum
fmk	fluormetylketon
His	histidin
IAP	apoptoseinhibitor (Inhibitor of Apoptosis)
IL	interleukin
Leu-Leu-OMe	L-leucyl-L-leucin-metylester
LMP	lysosomal membranpermeabilitet
LPS	lipopolysakkarid
MHC	vevstypekomplekset (major histocompatibility complex)
ox-LDL	oksidert "low density lipoprotein"
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	fosfatbuffra saltvatn
PI	propidiumiodid
PMA	forbol-12-myristat-13-acetat

ROS	frie oksygenradikal (reactive oxygen species)
TNFR	tumornekrosefaktorreseptor
TNF- α	tumornekrosefaktor- α
Z-Ala-Ala-Asn-AMC	benzyloksykarbonyl-alanin-alanin-asparagin-7-amino-4-metylkumarin
Z-Arg-Arg-AMC	benzyloksykarbonyl-arginin-arginin-7-amino-4-metylkumarin
Z-DEVD-cmk	benzyloksykarbonyl-aspartat-glutamat-valin-aspartat-klorometylketon

Samandrag

Apoptose vert ofte sett på som caspase-avhengig celledød, men det er òg vist at apoptose kan vere avhengig av lekkasje av lysosomale cysteinproteasar til cytosol. Dette er vist for cathepsin B, men ikkje for den lysosomale cysteinproteasen legumain. Legumain liknar caspasane i både aminosyresekvens og struktur, noko som gjer det naturleg å tru at denne proteasen kan delta i apoptose ved lekkasje til cytosol. Målet med denne oppgåva var å studere legumain og (cathepsin B) i apoptose induisert av ulike dødsstimuli.

PMA-stimulerte THP-1 celler vart dyrka i tre døgn før behandling med dødsstimuli i ulike tider. Det vart primært gjort forsøk med dødsstimulia Leu-Leu-OMe, staurosporin og PAC-1, med eller utan inhibitorane CA-074Me og Z-DEVD-cmk. Behandla celler vart studert i fluorescensmikroskop for å kartleggje morfologiske endringar. Cellekjernen vart studert etter farging med Hoechst 33342 og PI, og lysosoma vart studert etter farging med LysoTracker Red. Celleviabiliteten vart målt med MTS-assay og legumain-, cathepsin B- og caspase-3-aktivitet vart bestemt spektrofotometrisk med spesifikke fluorescerande substrat.

Behandling av THP-1 celler med Leu-Leu-OMe resulterte i permeable lysosommembranar, fullstendig undertrykking av legumain- og cathepsin B-aktivitet, og caspase-3-aktivering. Celledøden vart karakterisert som caspase-avhengig og legumain- og cathepsin B-uavhengig apoptose. Staurosporin induiserte òg caspase-3-aktivering, men det vart ikkje observert permeable lysosommembranar eller endring i aktiviteten til verken legumain eller cathepsin B. Staurosporinindusert celledød var uavhengig av både caspase-3 og legumain/cathepsin B. I både Leu-Leu-OMe- og staurosporinindusert apoptose vart det likevel observert kraftigare aktivering av caspase-3 etter hemming av legumain og cathepsin B, noko som kan tyde på ein hemmande effekt av lysosomale proteasar på denne caspasen. Auka caspase-3-aktivitet og celledød vart òg observert etter behandling med PAC-1, men dødsprosessen kunne vanskeleg kategoriserast morfologisk som apoptose. PAC-1 induiserte ein reduksjon i cathepsin B- (og legumain-) aktivitet sjølv om det ikkje vart registrert permeable lysosomer, men lite tyda likevel på at dødsprosessen var avhengig av desse lysosomale proteasane så vel som caspase-3. Leu-Leu-OMe, staurosporin og PAC-1 induiserte celledød i THP-1 celler via truleg ulike mekanismar. Ei deltakande rolle for legumain (og cathepsin B) i dødsprosessane vart ikkje påvist, men det trengs fleire studiar for å kartleggje dette med sikkerheit.

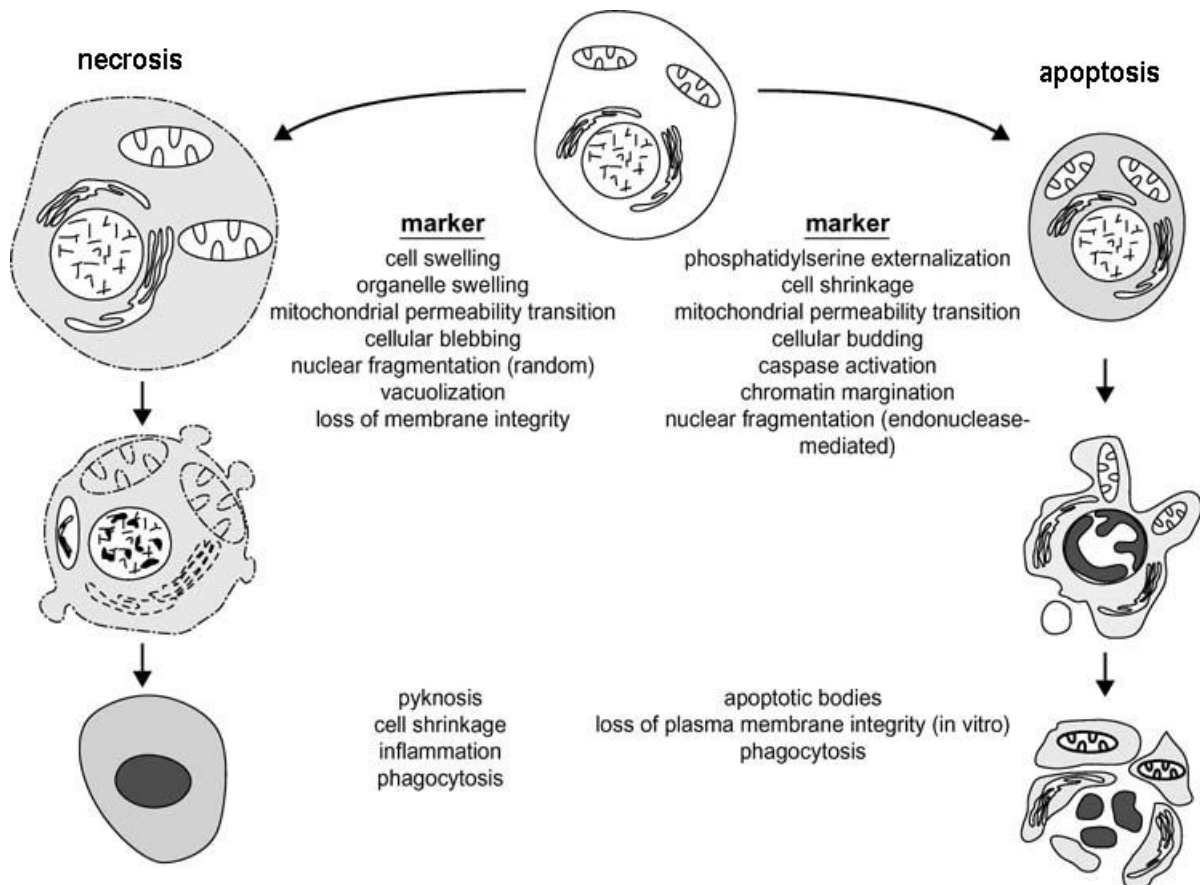
1. Innleiing

1.2 Celledød

I eit menneske døyr det fleire millionar celler kvart sekund [1]. Erytrocyttane står for ein stor del av dødsfalla med 250 milliardar døde celler kvar dag. Fornying av hud og tarmendotel resulterer òg i enorme daglege tal på celledød. Allereie frå eit foster er åtte celler stort, startar celledødsprosessar som er viktige for utviklinga av organa. Celledød spelar med andre ord ei sentral fysiologisk rolle i utvikling, homeostase og aldring. I patologiske tilstandar vil òg celledød spele ei viktig rolle. Enten i plutslege skadar, som til dømes ved hudforbrenning, eller ved tap av celledødskontroll, som ved nevrodegenerative sjukdommar [2]. Det finst ei rekke ulike typar celledød, og ei rekke ulike måtar å kategorisere dei på. Ein komité sett saman av ekspertar på området ("the Nomenclature Committee on Cell Death", NCCD) vart i 2005 samde om at klassifisering av ulike typar celledød må skje på bakgrunn av cella sine morfologiske endringar [3]. Det er denne klassifiseringa som vert forsøkt nytta i denne oppgåva, og fokuset vil her vere på celledødstypane apoptose og nekrose (figur 1.1). Kor vidt ei celle undergår nekrose eller apoptose, kjem an på type dødssignal, kva type vev, i kva utviklingsfase vevet er i og det fysiologiske miljøet [4].

1.2.1 Nekrose

Nekrose er ein ukontrollert celledød som ikkje krev energi. Den involverer oftast større områder med celler, og vert sett på som ein toksisk prosess. Denne dødsforma vert sett i gang av forhold utanfor cella, forhold som enten påverkar energitilgangen i cella eller som resulterer i direkte skade på cellemembranen [4]. Nekrosen endar med cellulært ødem og øydelagde organeller, som resulterer i at cellemembranen sprekk. Celleinnhaldet kan då lekke ut og sette i gang inflammasjon i vevet [5]. Det er svært lite kondensering av kromatinet i cellekjernen, men DNA vert degradert og kjernen fragmentert [6].



Figur 1.1. Skjematisk framstilling av dei endringane som skjer med ei apoptotisk og ei nekrotisk celle. Ei nekrotisk celle swell, organellane swell, kjernen vert tilfeldig fragmentert og cellemembranen sprekk. Denne dødsprosessen vil kunne gje inflammasjon i vevet. Ei apoptotisk celle vil skrumpe og cellemembranen vert bulka. Kromatinet vert kondensert og kjernen fragmentert. Til slutt vil det dannast apoptotiske lekamar som vert fagocyttert (modifisert frå [6]).

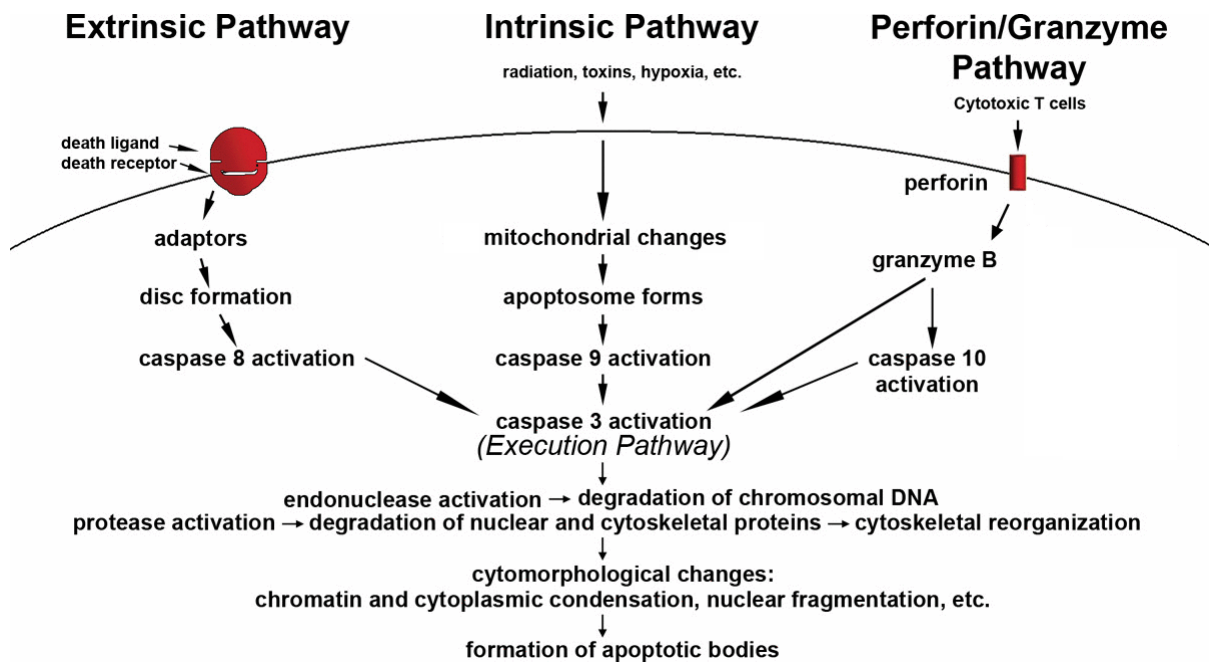
1.2.2 Apoptose

I levande multicellulære organismar skjer det stadig celledeling og celledød. Ein strengt kontrollert balanse mellom desse to prosessane er heilt naudsynt for å unngå patologiske tilstandar som til dømes kreft og nevrodegenerative sjukdommar [5]. Den kontrollerte forma for celledød vert med eit sams namn kalla programmert celledød. Det finst ulike former for programmert celledød, men apoptose er nok den mest undersøkte og best karakteriserte forma. Sams for desse kontrollerte celledødsformene, er at dette er ordna og energikrevjande prosessar som ikkje resulterer i inflammasjon og vevsskade på same måte som den meir kaotiske dødsprosessen nekrose [4].

Uttrykket apoptose vart introdusert av Kerr, Wyllie and Currie i byrjinga av 1970-åra [7], der det vart nytta for å skildre ein bestemt morfologisk dødsprosess. Denne dødsprosessen vert initiert av ei rekke ulike stimuli som sett i gang ein mengde hendingar som til slutt endar opp med at cella døy, vert fragmentert og fagocyttert [4]. Tradisjonelt har cysteinproteasane caspasane fått ein avgjerande plass i apoptoseprosessen. Dei caspasane som deltek i apoptose vert delt inn i initiatorcaspasar og effektorcaspasar. Initiatorcaspasane (caspase-2, -8, -9 og -10) vert aktiverte tidleg i dødsprosessen, og kan då aktivere effektorcaspasane (caspase-3, -6 og -7). Effektorcaspasane kløyver ei rekke substrat, og fullfører dermed dødsprosessen [8]. Alle caspasane føreligg som proenzym i cytosol, og krev aktivering ved spalting før dei kan delta i apoptoseprosessen [9].

Dei morfologiske endringane som skjer med celler som undergår apoptose, kan studerast ved hjelp av ulike mikroskoperingsteknikkar. I tidleg fase kan ein sjå at cellene skrumpar og at kjernen vert mindre. Dette er eit resultat av at cytosolen vert tettare, organellane meir tettpakka og at kromatinet vert kondensert (pyknose). Seinare kan ein sjå at plasmamembranen vert bulka ("blebbing") og kjernen fragmentert (karyorrhexis), før det til slutt vert danna apoptotiske lekamar ("budding"). Desse apoptotiske lekamane inneheld cytoplasma med tettpakka organellar, med eller utan kjernefragmenter, omringa av ein intakt plasmamembran. Desse strukturane vert fjerna ved fagocytose og degradert i fagolysosom. Apoptose resultere ikkje i inflammasjon slik som nekrose. Dette fordi innhaldet i den apoptotiske cella ikkje vert sleppt ut ekstracellulært. Den døde cella vert raskt eliminert av fagocyterande celler og fagocytane frigjer heller ingen inflammatoriske cytokiner [4].

Apoptosemekanismane er komplekse, involverer kaskadar av hendingar og krev energi. Det er vanleg å skilje mellom "intrinsic"- og "extrinsic"-aktiveringsveg, men i praksis er desse tett bunde til kvarandre og spelar ofte si rolle saman (figur 1.2). I tillegg til desse aktiveringsvegane, finst det ein tredje som kan utløyast av cytotoxicke CD8+ T-celler. Denne vert kalla perforin/granzym-aktiveringsveg for apoptose, og spelar ei viktig rolle i immunsystemet [4].



Figur 1.2. Oversikt over dei ulike tradisjonelle apoptose aktiveringsvegane. "Extrinsic"-aktiveringsveg startar med binding av ligand til ekstracellulært domene på dødsreseptoren. Reseptoren rekrutterer cytosoliske adaptorprotein og procaspase-8. Saman dannar dei eit dødsinduserande signalkompleks (disc), der denne initiatorcaspasen vert aktivert. "Intrinsic"-aktiveringsveg startar med signal som påverkar permeabiliteten av mitokondriemembranen, slik at ulike proapoptotiske faktorar kan setjast fri til cytosol. Apoptosomet som då vert danna i cytosol, fungerer som ei plattform der caspase-9 kan aktivast. Perforin/granzym-aktiveringsveg vert initiert av cytotoxiske T-celler som dannar porer i cellemembranen til målcella, der ulike proapoptotiske mediatorar kan strøyme gjennom. Desse mediatorane kan blant anna aktivere caspase-10. Alle desse vegane aktiverer ein initiatorcaspase, som vidare kan aktivere effektorcaspasar, som caspase-3. Når denne caspasen er aktivert startar alle dei degraderingsprosessane som vil føre til dei morfologiske endringane som er karakteristiske for apoptose. Til slutt vert det danna apoptotiske lekamar som kan fagocyterast av naboceller eller makrofagar (modifisert frå [4]).

"Extrinsic"-aktiveringsveg for apoptose involverer transmembrane dødsreseptorar, som til dømes tumornekrosefaktorreseptor (TNFR) og Fas-reseptor. Desse reseptorane har eit intracellulært domene som vert kalla dødsdomene. Når liganden, som til dømes tumornekrosefaktor- α (TNF- α) og Fas-ligand, bind seg ekstracellulært til reseptoren, vil reseptoren oligomerisere og rekruttere det cytosoliske proteinet Fas-assosiert dødsdomene (FADD). Reseptorkomplekset og FADD vil saman med procaspase-8 danne dødsinduserande signalkompleks (disc), der procaspase-8 vert autoaktivert. Caspase-8 kan aktivere effektorcaspasar som caspase-3, og andre proapoptotiske faktorar som til dømes Bcl-2-familieprotein Bid [8]. Aktivering av Bid dannar ein link mellom "extrinsic"-og

”intrinsic”-aktiveringsveg då dette proteinet, via aktivering av andre Bcl-2 familieprotein, Bax/Bak, påverkar mitokondriepermeabiliteten [10].

”**Intrinsic**”-aktiveringsveg for apoptose involverer mitokondria. Denne forma for apoptose kan òg starte med eit signal frå utsida av cella, men ein dødsreseptor er ikkje involvert. Fråver av enkelte vekstfaktorar, hormon og cytokiner (kalla negative signaler) vil kunne programere cella til å undergå apoptose. Positive apoptosesignaler, som til dømes stråling, toksiner og frie radikal, vil direkte sette i gang denne dødsprosessen. Sams for begge desse typane signal, er at dei indirekte vil påverke mitokondriemembranen slik at små porer vert opna. Det transmembrane potensialet forsvinn og proapoptotiske protein vert friset til cytosol [4]. Mitokondriepermeabiliteten er kontrollert av protein i Bcl-2-familien. I denne familien finn vi antiapoptotiske protein som til dømes Bcl-2, og proapoptotiske protein som til dømes Bid, Bax og Bak. Apoptotiske signal vil forskyve balansen slik at det er dei proapoptotiske proteina som får utspele si rolle, og dette gjer at mitokondriemembranen vert permeabel. Gjennom den permeable membranen vert ulike proapoptotiske faktorar sett fri frå mitokondria. Når cytokrom C vert friset, kan det binde seg til det cytosoliske proteinet apoptoseaktiverande faktor-1 (Apaf-1), og saman dannar dei då eit apoptosom som kan aktiverer caspase-9. Denne initiatorcaspasen kan i neste rekke aktivere effektorcaspasar. Antagonistar som hemmar apoptoseinhibitor (IAP) vert òg friset frå mitokondria. IAP har ein hemmande effekt på aktiverte caspasar, og verkar difor som apoptose inhibitorar. Apoptoseinduserande faktor (AIF) og endonuklease G translokalisere frå mitokondria til kjernen, der dei sørgjer for DNA-fragmentering og kromatin kondensering [8].

Perforin/granzym-aktiveringsveg for apoptose er ein av mekanismane cytotoksiske CD8+ T-celler brukar for å ta hand om celler med antigen på overflata, som til dømes kreftceller og virusinfiserte celler. T-cellene friset perforin på overflata til den antigenberande cella. Dette proteinet vil danne transmembrane porer i cellemembranen, der T-cella kan sende inn granuler. Desse granulene inneheld blant anna serinproteasane granzym A og B, som kan aktivere caspase-uavhengig apoptose, fremme mitokondrieaktiveringsveg for apoptose og aktivere caspase-3 direkte. Slik vert målcella med antigenet programmert til å undergå apoptose [4].

Effektorfasen i apoptosen er lik for alle aktiveringsvegane, noko som gjer at biokjemiske og morfologiske endringar i cella er uavhengig av type aktivering [11]. Effektorcaspasane

aktiverer enzym som mellom anna bryt ned kjernen og cytoskjelett protein, og kløyver protein som er essensielle for celledødsfunksjon [4]. Dei store strukturelle endringane som skjer med ei celle som undergår apoptose visar seg òg på overflata. Fosfolipidlaget vert asymmetrisk og fosfatidylserin og annexin I vert translokalisert til celleoverflata. Naboceller og fagocytter kjenner att desse endringane i cellemembranen på apoptotiske celler, og kan då eliminere dei døde cellene ved fagocytose [8].

1.3 Lysosomer

Alle mammalske celler inneheld lysosomer. Dette er runde organellar omslutta av ein dobbel membran av fosfolipid, og dei har ein diameter på omlag 1 μm . Lysosoma inneheld enzym som deltek i nedbryting av protein, polysakkarider, nukleinsyrer og lipider. Når cella tek inn makromolekyler via endocytose og fagocytose, vil endosoma og fagosoma fusjonere med lysosommembranen og dermed avlevere makromolekyla. Andre organellar i cella som er ikkje-funksjonelle, kan òg bringast til lysosoma der dei vert nedbrotne. Dei lysosomale enzyma bryt ned det dei får levert, og lysosoma kan setje fri aminosyrer, monosakkarider og fettysyrer til cytosol. Slik fungerer desse organellane som cella sin resirkuleringsstasjon. Dei lysosomale enzyma er stabile ved den sure pH-en som er i lysosoma ($\text{pH} \leq 5$). Skulle enzyma lekke ut i cytosol der pH-en er høgare ($\text{pH} \approx 7$), vil dei med tida verte inaktivererte [12].

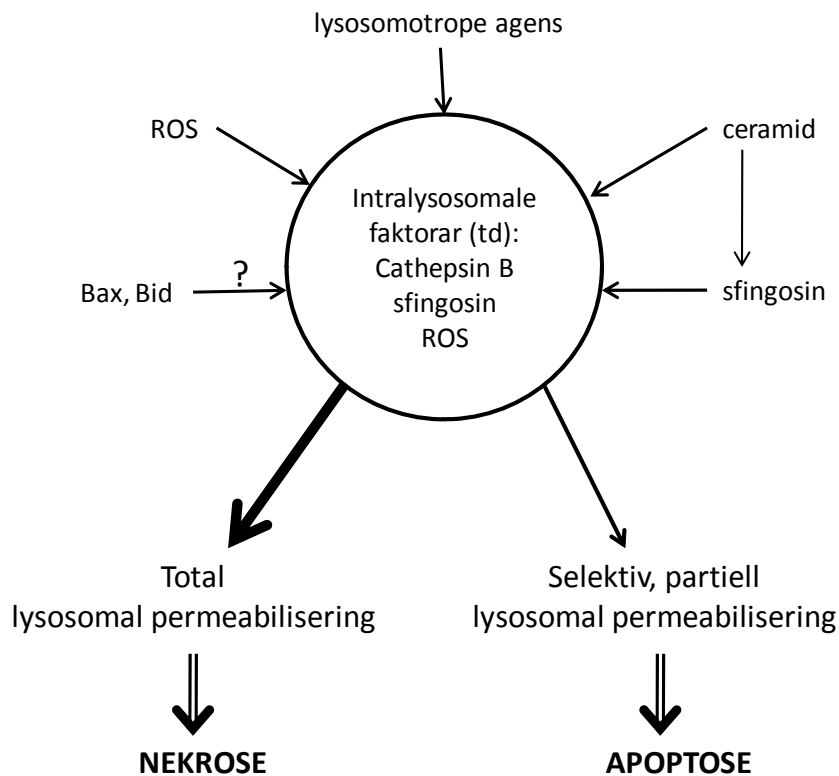
1.3.1 Lysosomer i celledød

I lang tid har ein tenkt at lysosoma og lysosomale enzym i hovudsak spelar ei rolle i nekrotisk celledød, der dei deltek med ikkje-spesifikk degradering av intracellulære protein. Deira rolle i apoptose har vore avgrensa til naboceller og fagocytter si nedbryting av apoptotiske celler [13]. I dei seinare åra er det derimot blitt større aksept for at lysosoma og lysosomale enzym spelar ei meir spesifikk og viktig rolle i sjølve apoptoseprosessen. Lysosomal aktiveringsveg for apoptose er avhengig av lekkasje av lysosomale proteasar til cytosol der desse sett i gang dødsprosessen [14]. Denne lekkasje kan både vere ein nedstraums prosess i apoptose, men det kan òg vere initierande for dødsprosessen. At det har teke så lang tid før denne aktiveringsvegen for apoptose er blitt kjent, kjem truleg av at metodane som tradisjonelt har vore brukt for å avdekke reaksjonsmekanismar har vore for

lite spesifikke. I tillegg vil den lysosomale membranen sjå intakt ut sjølv om lysosomale enzym lekk ut i cytosol [13].

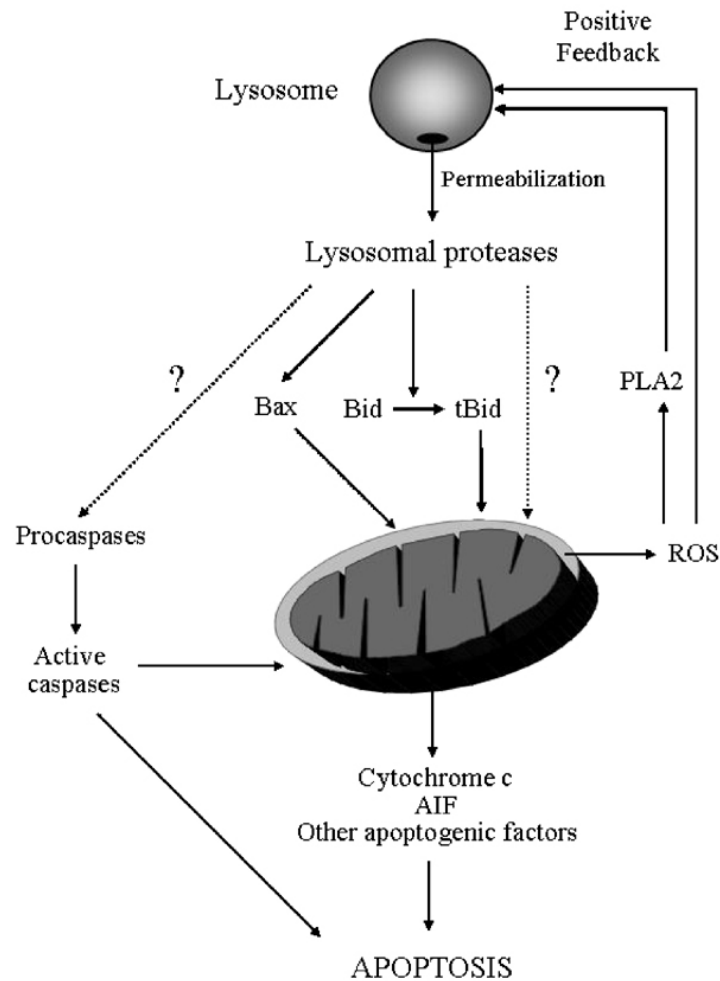
I kva grad lysosoma induserer ein nekrotisk eller apoptotisk dødsprosess vert bestemt ut frå grad av lysosomal membranpermeabilitet (LMP). Avgrensa permeabilitet over membranen gjer at små mengder enzym kjem ut i cytosol og dødsprosessen vert kontrollert og apoptotisk. Dersom heile organellen derimot bryt saman, vil store mengder lysosomale enzym lekke ut i cytosol og cella vil døy nekrotisk [14].

For at lysosomale enzym skal kunne aktivere apoptose, er det ein føresetnad at dei kjem seg ut i cytosol. Mange mekanismar for LMP er føreslått, og det kan sjå ut som om dei varierer mellom ulike celletypar og stimuli (Figur 1.3). Sfingosin, som vert oppregulert ved TNF- α stimuli, kan akkumulere i lysosomer der det kan verke som ein detergent på membranen og føre til permeabilitet. Sfingosin vert danna i prosesseringa av ceramid, som i seg sjølv har vore føreslått som kandidat for LMP. Oksidativt stressindusert celledød har òg vist lysosomal destabilisering. Både TNF- α og lipopolysakkarid (LPS) fører til generering av den frie oksygenradikalet (ROS) hydrogenperoksid (H_2O_2), som kan indusere lysosomal lekkasje direkte. ROS kan i tillegg aktivere fosfolipase A2 som degraderer fosfolipider og dermed destabiliserer intracellulære membranar [14]. I tillegg kan lysosomale enzym påverke mitokondria til å produsere ROS, noko som fører til ein ”feedback loop” som kan gje vidare lysosomal membranpermeabilitet [15]. Det vert òg spekulert i om proapoptotiske protein i Bcl-2 familien (Bax, Bid) kan danne porer i lysosommembranen på tilsvarande måte som dei gjer i mitokondriemembranen ved apoptose. I tillegg til slike ekstralysosomale signal, vil det òg kunne vere forhold intralysosomalt som kan gje LMP. Det er blant anna vist at hemming av den lysosomale cysteinproteasen cathepsin B hindrar TNF- α -indusert LMP. Dette gjer det sannsynleg at proteasar ikkje berre kan lekke ut i cytosol ved LMP, men at dei òg kan indusere permeabilitet [14].



Figur 1.3. Stimuli som kan resultere i lysosomal membranpermeabilitet. Stimuli som ROS, ceramid, sfingosin og lysosomotrope agens kan indusere LMP både ekstra- og intralysosomalt. Det er vist destabiliserande effekt på membranen av lysosomale proteasar (cathepsin B). Det vert òg spekulert i om proapoptotiske Bcl-2-liknande protein (Bax, Bid) kan danna porer i lysosommembranen på tilsvarande måte som i mitokondriemembranen. Kraftige stimuli vil resultere i ein øydelagt membran, og store mengder enzym friset til cytosol. Dødsprosessen vert då nekrotisk. Selektiv og avgrensa permeabilitet vil resulterer i apoptose (modifisert frå [14]).

Det ser ut til at lysosomale enzym kan initiere caspase-uavhengig og -avhengig apoptose (Figur 1.4). Mykje talar for at lysosomale proteasar, som til dømes cathepsiner, kan påverke mitokondria slik at desse friset proapoptotiske signal som cytokrom C og AIF. Dette kan truleg skje direkte, men meir sannsynlig via aktivering av cytosoliske protein som til dømes Bid og Bax. Som nevnt tidlegare vil mitokondria kunne produsere og frisetje ROS ved lysosomal påverknad, og dermed skape ein positiv "feedback" som resulterer i endå større grad av LMP. *In vitro* forsøk har òg vist at cathepsiner i nokon grad kan aktivere casparar direkte, men ikkje casparar som deltek i apoptoseprosessen. Mange mekanismar for lysosomal apoptose er føreslått, men mykje er framleis uklart [14].

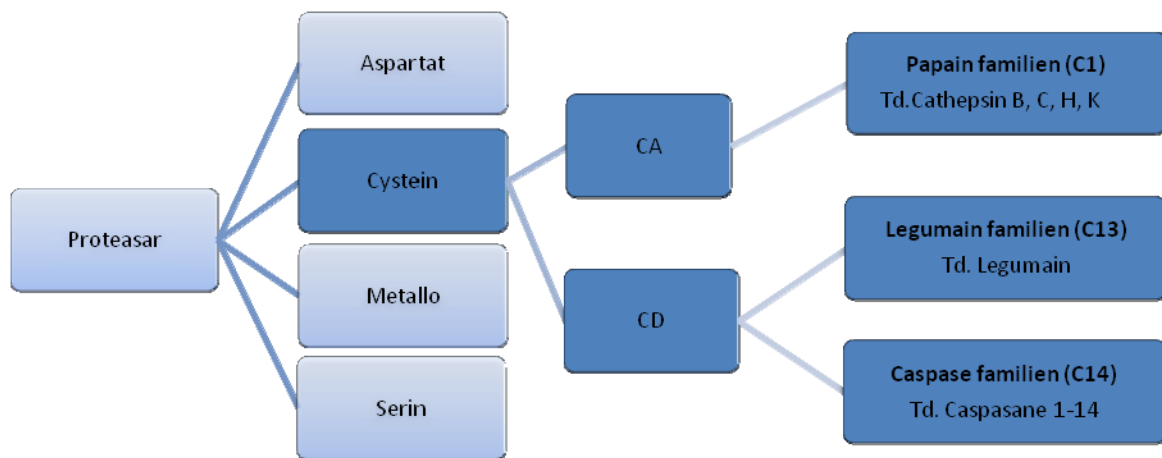


Figur 1.4. Signalvegar i lysosomavhengig apoptose. LMP resulterer i frisetjing av lysosomale proteasar til cytosol. Der kan enzyma aktivere proapoptotiske protein som Bid og Bax, som igjen kan påvirke mitokondriemembranen slik at cytokrom C, AIF og andre proapoptotiske faktorar vert friset. Mitokondria kan òg produsere og setje fri ROS som kan forsterke lysosomal permeabilitet, eventuelt via fosfolipase A2, slik at det vert danna ein positiv "feedback loop". Det er òg føreslått at lysosomale enzym direkte kan både påvirke mitokondriemembranen og aktivere ulike caspasear [14].

1.4 Proteasar

Enzym som hydrolyserer peptidbindingar, vert med eit samleord kalla proteasar. Proteasar vert òg kalla peptidasar, proteinasar og proteolytiske enzym. Det er i dag identifisert 617 ulike proteasar i menneske. Denne enorme gruppa av enzym vert delt inn i fire hovudgrupper; cystein-, serin-, metallo- og aspartatproteasar, ut frå deira katalytiske mekanisme. Desse gruppene kan vidare delast inn i ulike klanar på bakgrunn av enzyma si utfolding i rommet, og kvar klan kan igjen delast inn i ulike familiar (Figur 1.5). Proteasane

innafor ein familie er statistisk signifikant like i deira aminosyresekvens [16]. I denne oppgåva skal vi sjå nærmare på cysteinproteasar.



Figur 1.5. Klassifisering av proteasar. Proteasane kan delast inn i fire hovudgrupper ut frå deira katalytiske eigenskapar. Desse kan igjen delast inn i ulike klanar, som igjen kan delast inn i ulike familiar. I familiane C1, C13 og C14 finn ein mange viktige humane proteasar.

Cysteinproteasane har aminosyra cystein i det aktive sete, og utgjør ei av dei største proteasegruppene. Dei er delt inn i ni klanar og til saman over 50 familiar [16]. Tidleg viste ein at papain(C1)-familien og caspasane (C14-familien) var representert i pattedyr. Cysteinproteasen legumain (C13-familien) vart ikkje identifisert i pattedyr før 1997 [17]. Legumain og caspasane har svært lik aminosyresekvens og struktur, og er difor plassert i same klan, CD [18].

1.4.1 Cathepsiner

Ei rekke proteasar har fått navnet cathepsin. Dei aller fleste av desse er cysteinproteasar, men det finst òg cathepsiner med aminosyrene serin (cathepsin G) og aspartat (cathepsin D) i det katalytiske setet. Cathepsina som er cysteinproteasar (cathepsin B, C, F, H, K, L, O, S, V, W og X) vert plassert i klan CA og i papain (C1)-familien [16]. Dei fleste cathepsina (B, C, F, H, L, O og X) er representert i alle vev, men høgast konsentrasjon finn ein i lever og nyrer. Dette er proteasar som vert syntetisert som inaktive proenzym, men som vert aktive i lysosoma der dei deltek i hydrolyse av ulike protein. I tillegg til å ha ei viktig rolle i generell lysosomal degradering av protein, deltek dei i blant anna antigenpresentasjon via vevstypekomplekset MHC-klasse II, beinremodellering, differensiering av keratinocytter,

reproduksjon og apoptose. Cathepsin C spelar ei heilt avgjerande rolle i T-celle mediert apoptose, ved at proteasen aktiverer granzym A og B. Cathepsin B, ein av dei best kjente proteasane i denne familien, vert frisettt frå lysosoma i TNF- α industert apoptose, og sett i gang signalvegane som endar med at cella døy. I tillegg til å delta i desse normale fysiologiske prosessane, vert cathepsina oppregulert ved kreft. I kreftutviklinga spelar dei ei rolle i svulstvekst, invasjon og metastasering [19].

1.4.2 Caspasar

Det er identifisert 11 ulike caspasar i menneske. Dei er alle cysteinproteasar og tilhøyrar klanen CD og familien C14 [16]. Dei er svært spesifikke og kløyver substrat etter aminosyra aspartat, og difor namnet caspasar, som er ei forkorting for *cystein aspartat-speifikke proteasar* [9]. Caspasane vil normalt opphalde seg i cytosol som inaktive proenzym. Dei vert aktiverte ved at det skjer ei kløyving karboksyterminalt for aminosyra aspartat (Asp) [16]. Nokre av caspasane vert aktiverte i store samansette kompleks, som til dømes apotosom og disc. Medan andre caspasar vert aktiverte ved at aktive caspasar kløyvar dei [20]. Caspasane vert delt inn i ulike grupper på bakgrunn av deira struktur og funksjon. Dei inflammatoriske caspasane (caspase-1, -4 og -5) deltek i aktiveringa av ulike cytokiner (td interleukina IL-1 β og IL-18), som spelar ei viktig rolle i immunreaksjonar og inflammasjon [21]. Caspase-14 er involvert i differensiering av keratinocytar, medan dei resterande caspasane er aktørar i apoptoseprosessen [9].

1.4.3 Legumain

På 1980- og 1990-talet var det stor interesse for proteasar og deira rolle i proteinnedbryting i planter. I 1987 vart ein cysteinprotease, proteinase B, funnen i spirande fôrvikke frø (*Vicia sativa*). Denne proteasen kløyva substrat spesifikt karboksyterminalt for aminosyra asparagin (Asn) [22]. Seinare vart den same proteasen òg funnen i spirande bønner frå planten *Vigna aconitifolia*, og enzymet vart då kalla legumain. Etter isolering og reinsing, vart enzymet sin spesifisitet for substrat med innhald av asparagin stadfesta, og saman med andre funn resulterte arbeidet i at legumain vart klassifisert som ein cysteinprotease [23]. Legumain er òg kjent frå parasitten *Schistosoma mansoni*, der det kan sjå ut som om enzymet er involvert i degraderinga av hemoglobin [24]. Mot slutten av 1990-åra fann ein legumain òg i pattedyr. Chen og medarbeidarar klona, isolerte og karakteriserte enzymet frå

human placenta og frå grisenyrer. Etter å ha studert ei rekke vev frå ulike artar, viste dei at legumain er mest aktivt i nyrer, etterfølga av milt og lever. I hjerte og hjerne fann dei svært låg enzymaktivitet [17]. I tillegg er det vist at dei fleste kreftsvulstar uttrykker legumainaktivitet [25]. Studium av subcellulære fraksjonar av rotte og mus, har vist høgast legumainaktivitet i lysosoma [26]. Desse funna stemmer bra overens med tidleg kunnskap, der ein fann at legumain var mest aktivt ved sur pH [23].

Den biologiske funksjonen til legumain i menneske veit ein litt om etterkvart. Det er vist at legumain spelar ei rolle som inhibitor i danninga av osteoklaster og hindrar beinresorpsjon [27]. Det kan òg sjå ut til at legumain spelar ei rolle ved prosessering av enkelte antigen, som til dømes tetanustoksinet, i antigenpresenterande celler. Dette prosesserte antigenet kan så presenterast for CD4⁺ T-celler via MHC-klasse II-kompleks, for så å setje i gang ein immunreaksjon [28]. Andre har funne at legumain spelar ei rolle i fortjukkinga av hud og hårfolliklar [29]. I kreftceller ser det ut til at legumainaktivitet er assosiert med invasivitet og metastasering [25]. Det er òg vist at makrofagar i ustabile aterosklerotiske plakk har auka legumainaktivitet, og det er føreslått at legumain spelar ei rolle i destabiliseringa av slike plakk [30]. Antigenpresenterande celler (APC), som til dømes makrofager uttrykker høg legumainaktivitet. Den humane monocytære cellelinja THP-1 uttrykker i utgangspunktet lite aktivitet. Når desse cellene vert stimulerte med ein forbolester, differensierer dei til å verte makrofagliknande celler. Desse makrofagliknande cellene har markant auka legumainaktivitet [31].

Genet for humant legumain er 1393 basepar, noko som kodar for eit protein på 433 aminosyrer. Det aktive enzymet er noko mindre, då det vert prosessert både N og C terminalt [17]. Legumain er i varierende grad glykosylert, noko som gjer at proteasen si molekylvekt kan variere mellom ulike organismar [26].

For alle cysteinproteasar er den katalytiske aktiviteten knyta til aminosyrene cystein (Cys) og histidin (His) i det aktive setet. For legumain er His¹⁵⁰ og Cys¹⁹¹ identifisert som dei avgjerande aminosyrene for aktivitet. Sekvensen i det aktive setet, **His**-glycin-spacer-alanin-**Cys**, finn ein igjen i ei rekke andre cysteinproteasar, blant anna i caspasefamilien (C14) [32].

Legumain vert transkribert som eit inaktivt enzym. Aktiveringa av enzymet skjer gjennom posttranslasjonell prosessering der pH og autoaktivering er involvert. Fyrst skjer det ei kløyving C-terminalt etter aminosyra Asn³²³, der proenzymet på 56 kDa blir til eit inaktivt

produkt på 47 kDa. Vidare skjer det ei kløyving N-terminalt etter aminosyra Asp²⁵, ved låg pH (3,5-4,5), der resultatet vert eit aktivt enzym på 46 kDa. *In vivo* skjer det raskt ei vidare prosessering av dette proteinet til eit framleis aktivt enzym med storleiken 36 kDa. Truleg deltek andre lysosomale proteasar i denne siste kløyvinga for å få det aktive legumain i levande celler [33].

Legumain kløyver spesifikt substrat som inneheld aminosyra asparagin, og eit fluorescerande syntetisk substratet med innhald av denne aminosyra vert difor nytta til å måle legumain sin enzymaktivitet spektrofotometrisk [23]. Ulike endogene substrat for enzymet er òg etter kvart blitt identifisert. Det ser ut til at legumain kan degradere fibronektin, ein av dei viktigaste komponentane i ekstracellulær matriks, både *in vitro* og i nyre proksimaltubulære celler frå mus [34]. I andre museforsøk, har ein sett at legumain spelar ei rolle i prosessering av andre lysosomale proteasar, som til dømes cathepsin B, H og L [35]. Det er òg vist at legumain kan aktivere metalloproteasen gelatinase A. Denne proteasen spelar ei rolle i angiogenese og metastasering ved kreftutvikling [36].

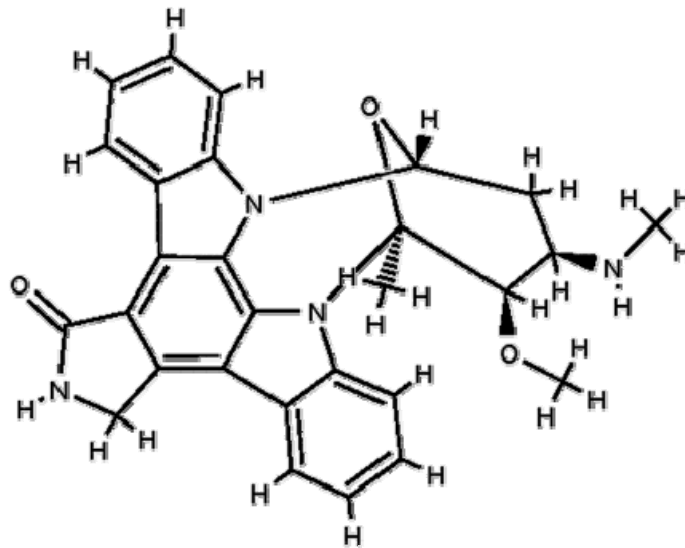
Då legumain i planter vart reinsa og karakterisert i 1993, fann dei at enzymet ikkje vart hemma av dei vanleg brukte cysteinprotease-inhibitorane E-64 og kyllingcystatin [23]. Legumain frå pattedyr derimot lar seg hemme av eggekvite cystatin, men ikkje av E-64 [17]. Cystatina finn ein òg i menneske, og dei utgjer ei gruppe på 12 potente proteaseinhibitorar. Dei er fordelt enten intracellulært, ekstracellulært eller intravaskulært, og spelar ei viktig rolle i regulering av aktiviteten til enkelte cysteinproteasar. Det er berre dei ekstracellulære cystatina C, E/M og F som ser ut til å kunne inhibere legumain, og deira dissosiasjonskonstantar er etter tur 0,20, 0,0016 og 10 nM. Desse hemmarane er relativt lite spesifikke, noko som gjer at dei òg hemmar andre proteasar [37].

1.5 Dødsstimulerande stoff

1.5.1 Staurosporin

Staurosporin er eit alkaloid isolert frå bakterien *Streptomyces staurosporeus* (figur 1.6). Stoffet er cellerpermeabelt og verker som ein potent inhibitor av proteinkinasar [38]. I utgangspunktet vart stoffet funne som ein rein proteinkinase C-inhibitor, men etter kvart har

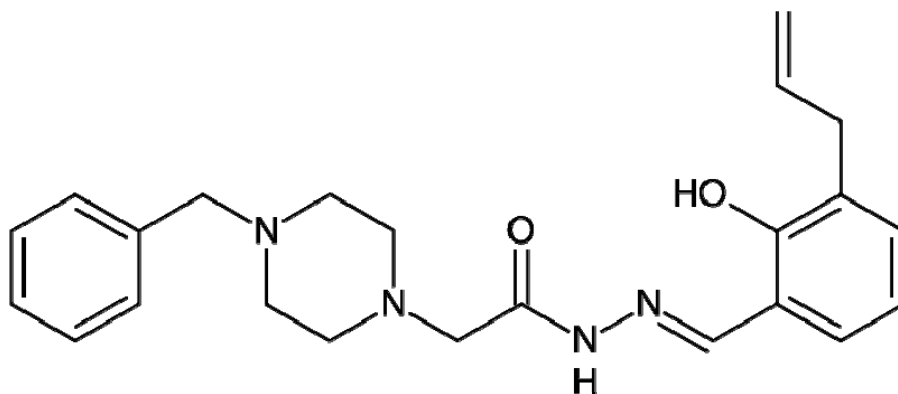
ein sett at den hemmande effekten er meir generell. Hemming av proteinkinasar resulterer i celledød, og staurosporin vert nytta i ei rekke cellelinjer for å indusere “intrinsic”-apoptose [39, 40]. Når denne dødsinduseren vert sett til THP-1 celler kan ein etter kort tid sjå tydelege teikn på apoptose [41]. Allereie fire timar etter tilsetjing kan ein i makrofagliknande celler sjå at cellemembranen vert bulka (“blebbing”) og at cella skrumpar. Etter behandling med staurosporin (500 nM) i åtte timar har ein funne at nær 60 % av cellene er døde. Cellene har då fleire apoptotiske kjenneteikn, blant anna auka caspaseaktivitet.



Figur 1.6. Staurosporin sin strukturformel, $C_{28}H_{26}N_4O_3$. Molekylvekt 466,5 g/mol [38].

1.5.2 PAC-1

Interessa for å finne substansar som kan indusere apoptose er stor, då det er behov for nye og betre behandlingalternativ for ei rekke sjukdommar der apoptose er undertrykka (td. kreft). I 2006 oppdaga Putt og medarbeidarar eit molekyl av kring 20 500 kandidatar [42], som *in vitro* såg ut til å selektivt aktivere procaspase-3. Dette molekylet, PAC-1 (figur 1.7), induserte apoptose i ei rekke kreftcellelinjer. I ei human promyelocytisk leukemisk cellelinje (HL-60) fann ein blant anna kromatinkondensering, kløyving av poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) og bulking av cellemembranen etter behandling med PAC-1. Dersom caspaseinhibitor (z-VAD-fmk) vart nytta saman med PAC-1, såg ein ingen teikn til apoptose. Ut frå deira funn, foreslår forfattarane at dette vesle molekylet kan indusere apoptose ved direkte aktivering av procaspase-3 [42].



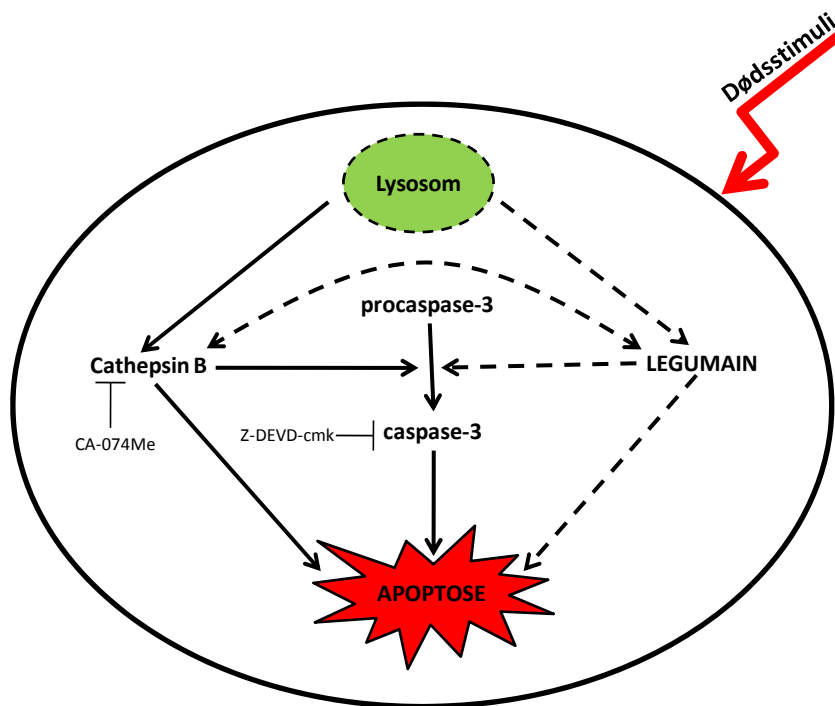
Figur 1.7. PAC-1 sin strukturformel, $C_{23}H_{26}N_4O_2$. Molekylvekt 392,5 g/mol [42].

1.5.3 L-Leucyl-L-leucin metylester

L-Leucyl-L-leucin metylester (Leu-Leu-OMe) vert teken opp i celler med reseptormediert endocytose via ein ukjent dipeptidtransportør. I cellene vert Leu-Leu-OMe polymerisert av den lysosomale proteasen dipeptidylpeptidase I (DPPI, cathepsin C) til produktet (Leu-Leu)_n-OR₃, der $n \geq 3$ [43]. Denne polymeren kan permeabilisere lysosommebranen og indusere apoptotisk celledød. Mikroskopering av lymfocytar og myeloide celler etter tilsetjing av Leu-Leu-OMe, har vist celler med apoptotiske kjenneteikn som kromatinkondensering og kjernefragmentering [44]. I HL-60 celler vart det etter behandling med Leu-Leu-OMe (200 μ M) i ein time funne kraftig auke i caspase-3-aktivitet, og redusert cellestorleik etter fire timar [45]. Forsøk på THP-1 celler har vist at Leu-Leu-OMe fører til ein doseavhenging nedgang i celleviabilitet målt ved MTT-assay. Konsentrasjonar på 0,1 mg/ml (295 μ M) Leu-Leu-OMe gav kring 40 % tap av celleviabilitet, medan 1 mg/ml førte til fullstendig død [46].

1.6 Mål med oppgåva

Apoptose er svært viktig i utvikling og i prosessen for å oppretthalde normal fysiologi. Dersom kontrollen over denne forma for celledød kjem i ubalanse, vil det kunne oppstå ulike patologiske tilstandar [4]. Apoptose har lenge vore sett på som ein caspase-avhengig celledød, men i seinare tid har det òg blitt vist at apoptose kan vere avhengig av lysosomale cysteinproteasar [14]. Lysosommembranen vert permeabel etter behandling med ulike apoptoseinduserande stoff, noko som resulterer i lekkasje av proteasar til cytosol (figur 1.8). I cytosol er det blant anna vist at den lysosomale cysteinproteasen cathepsin B kan aktivere caspase-avhengig og -uavhengig apoptose [5]. Lekkasje av legumain til cytosol og deltaking i apoptose er derimot ikkje tidlegare blitt studert. Legumain er svært lik caspasane i både aminosyresekvens og struktur [32], noko som gjer det naturleg å tru at denne proteasen kan delta i apoptose ved lekkasje til cytosol.



Figur 1.8. Lysosomale cysteinproteasar i apoptose. Ulike dødsstimuli kan føre til permeable lysosommembranar og lekkasje av lysosomale proteasar til cytosol. Det er kjent at cathepsin B i cytosol kan vere involvert i caspase-avhengig og -uavhengig apoptose. Det er derimot ukjent om legumain kan lekke ut i cytosol og delta i apoptoseprosessen. Det er òg uvisst om cathepsin B og legumain eventuelt påverkar kvarandre i cytosolen. Ved hjelp av spesifikke proteaseinhibitorar skal legumain si rolle i apoptose studerast.

Målet med denne oppgåva er å studere om den lysosomale cysteinproteasen legumain er involvert i apoptose induisert av ulike dødsstimuli. Apoptoseprosesser avhengig av cathepsin B er som nevnt kjent, og denne proteasen vil derfor bli brukt som ein kontroll i denne oppgåva.

Celledød vil bli studert i den humane monocytære cellelinja THP-1 etter stimulering med forbol-12-myristat-13-acetat (PMA). Ved å differensiere desse monocyttane med PMA til makrofagliknande celler, er det vist kraftig oppregulering av legumainaktivitet [31]. Til å inducere død vil det bli brukt ulike kjente dødsstimuli som aktiverer apoptose via ulike mekanismar, og celledød vil bli kvantifisert ved hjelp av MTS-viabilitetsmåling. Ulike mikroskoperingsteknikkar saman med ulike fluorescerande fargestoff vil bli brukt for å studere integriteten til lysosommembranar, kjernemorfologi og cellestrukturendringar, for å forsøke å klassifisere dødsforma. Aktiviteten til cysteinproteasane legumain, cathepsin B og caspase-3 vil bli målt spektrofotometrisk med fluorescerande substrat ved ulike tidspunkt i dødsprosessen. Ved hjelp av spesifikke proteaseinhibitorar vil det bli forsøkt å kartlegge korleis den enkelte proteasen verkar inn på dødsprosessen, og dermed klargjere rolla til legumain i apoptose.

2. Materialer og metode

2.1 Kjemikaler og reagenser

2-Merkaptoetanol (M7522)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Benzyloksykarbonyl-alanin-alanin-asparagin-7-amino-4-metylkumarin, Z-Ala-Ala-Asn-NHMec	Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK
Benzyloksykarbonyl-arginin-arginin-7-amino-4-metylkumarin, Z-Arg-Arg-AMC (I-1135)	Bachem, Bubendorf, Sveits
Benzyloksykarbonyl-aspartat-glutamat-valin-aspartat-klorometylketon, Z-DEVD-cmk, (N-1580)	Bachem, Bubendorf, Sveits
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (500-0006)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Bovint serumalbumin, BSA (23209)	Thermo Scientific, Rockford, USA
CellTiter 96 [®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, MTS (G3580)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
CHAPS (C3023-1G)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Dimetylsulfoksid, DMSO (2931)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Dimetylsulfoksid, DMSO til cellarbeid (D2650)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Dinatriumetylendiamintetraacetat, Na ₂ EDTA (00 064)	Ferak Berlin, Berlin, Tyskland
Dinatriumhydrogenfosfat dihydrat, Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (28029.292)	VWR Prolabo, Fontenay, Frankrike
Ditiotreitol, DTT (43817)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Eddiksyre, C ₂ H ₄ O ₂ (20 104.298)	Prolabo, Fontenay, Frankrike
Forbol-12-myristat-13-acetat, PMA (P 1585)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Fungizone (PAA P11-001)	Bristol-Meyers Squibb, NY, USA
Føtalt kalveserum, FBS gold (PAA A15-649)	PAA Laboratories, Pasching, Australia

Glukose (G8644)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Glyserol 99,5 % (24388.249)	AR-Prolabo, Fontenays S/Bois, Frankrike
HEPES (H3375-250G)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
HEPES til celloarbeid (H0887)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Hoechst 33342, trihydroklorid, trihydrat (H1399)	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
L-leucyl-L-leucin metylester, H-Leu-Leu-OMe·HBr (G-2550)	Bachem, Bubendorf, Sveits
L-trans-epoksysuksinyl-isoleucin-prolin-metylesterpropylamid, CA-074Me (N-1660)	Bachem, Bubendorf, Sveits
L-trans-epoksysuksinyl-leusin-3-metylbutylamid-etyler, E-64d (N-1650)	Bachem, Bubendorf, Sveits
LysoTracker Red DND-99 (L7528)	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
N-acetyl-aspartat-glutamat-valin-aspartat-7-amino-4-metylkumarin, Ac-DEVD-AMC (I-1660)	Bachem, Bubendorf, Sveits
Natriumdihydrogenfosfat hydrat, NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (6346)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumklorid, NaCl (1.06404.1000)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Natriumpyruvat (11360-039)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
n-oktyl-beta-D-glukopyranosid (08001)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
PAC-1 (20 mM i DMSO)	Trond Vidar Hansen, Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo, Oslo, Norge
Penicillin-Streptomycin (P0781)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Propidium iodid, PI (P4868)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
RPMI 1640 medium med glutamin og natriumbikarbonat (PAA E15-840)	PAA Laboratories, Pasching, Australia
Sitronsyre, C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O (1.00244.1000)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Staurosporin (S 6942)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA
Trinatriumcitrat dihydrat, C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O (6448)	Merck, Darmstadt, Tyskland

Trypanblått (17262-25)	Merck, Darmstadt, Tyskland
------------------------	----------------------------

2.2 Utstyr

Bürker teljekammer	Assistant, Sontheim, Tyskland
Corning 75 cm ² dyrkningsflaske (3275)	Corning, NY, USA
Costar 6-brønnarsbrett (3506)	Corning, NY, USA
Costar 96-brønnarsbrett, svart (3915)	Corning, NY, USA
Esco class II type A2 Biohazardsafety LAF-benk	Esco, Singapore
Holten Lamin Air LAF-benk	Medinor, Oslo, Norge
Kubota 2010 sentrifuge	Medinor, Oslo, Norge
Leica DMLS	Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar, Portugal
Nikon Eclipse TE 300 DV fluorescens mikroskop med filter UV-2A og G-2A	Nikon, Kawasaki, Kanagawa, Japan
Nunc 96-brønnarsbrett (260836)	Nunc, Roskilde, Danmark
Nunc 96-brønnarsbrett, Nunclon overflate, steril (167008)	Nunc, Roskilde, Danmark
Olympus CKX41 lysmikroskop	Olympus, Tokyo, Japan
SPOT Advanced programvare	Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA
SPOT RT farge digitalkamera 2.2.1	Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA
Techne Dri-Block DB-2A varmeblokk	Techne, Cambridge, England
Universal 32 R sentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Tyskland
VibraCell sonikator	Sonics & materials, Danbury, CT, USA
Wallac 1420 Victor ³ Multilabel counter	PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA
Wallac WorkOut programvare	PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA

2.3 Celledyrking

I dette arbeidet vart det nytta THP-1 celler frå American Type Culture Collection (ATCC TIB-202, Rockville, MD, USA). Dette er monocyttliknande celler, isolert frå perifert blod frå ein 1-års gamal gut med akutt monocyttær leukemi. Desse cellene doblar seg i laupet av 26 timar og vert dyrka ved 37 °C og 5 % CO₂. Ved stimulering med forbolesteren forbol-12-myristat-13-acetat (TPA/PMA) vil cellene differensiere til adherente, makrofagliknande celler.

Alt arbeid med celler vart utført i lafbenk med vertikal laminær luftstraum og med bruk av aseptisk arbeidsteknikk, for å hindre mikrobiell kontaminering.

2.3.1 Tining

THP-1 cellene vart oppbevart på flytande nitrogen, nedfrose i medium tilsatt 5 % (v/v) DMSO. Cellene vart tina på vassbad ved 37 °C i ca 40-60 sekund, og 1 ml av den optina cellesuspansjonen vart overført til ei 75 cm² dyrkingsflaske og etterfylt med 9 ml THP-1 medium. Vekstmediet (THP-1 medium) er RPMI 1640 medium tilsatt 4,5 g/l glukose, 10 mM HEPES, 1 mM natriumpyruvat, 0,05 mM 2-mercaptoethanol, 10 % føtalt kalveserum (FBS gold), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin og 2,5 µg/ml fungizone [47]. Cellene vart dyrka over natta ved 37 °C og 5 % CO₂, før dei vart overført til eit 15 ml røyr og spunne ned ved 150 g i 5 minutt. Medium vart soge av, cellepelleten resuspendert i 10 ml nytt vekstmedium og cellesuspansjonen overført til ei ny dyrkningsflaske.

2.3.2 Dyrking, splitting og teljing

Cellene vart dyrka ved 37 °C og 5 % CO₂, og nytt medium vart tilsett omkring kvar tredje dag. Cellesuspansjonen vart splitta når konsentrasjonen var nær 1x10⁶ celler/ml. Cellene vart då telt (sjå under), og 1x10⁶ celler overført til ny flaske saman med 10 ml nytt THP-1 medium. Etter inkubering i omkring 3 dagar, vart det tilsett 10 ml nytt medium til flaska. Splitting skjedde ein gong i veka.

Cellekonsentrasjonen vart bestemt ved hjelp av eit Bürkers teljekammer. Eit likt volum cellesuspansjon og filtrert 0,4 % trypanblått i isotont saltvatn vart blanda, og eit passe volum tilsett teljekammeret. Levande celler (ikkje farga blå) i begge diagonalane i to teljekammer

vart telt, og gjennomsnittet bestemt. Ut frå dette snittet vart cellekonsentrasjonen rekna ut ved hjelp av formelen vist under.

$$\text{Cellekonsentrasjon (levande celler/ml)} = ((\text{Gjennomsnittleg teljetal} \times 4,2) / 100) \times 10^6$$

Når cellekonsentrasjon var bestemt, vart ønska mengde celler tatt ut av flaska. Cellene vart spunne ned i ein sentrifuge ved 150 g i 5 minutt, og medium soge av før resuspending i nytt THP-1 medium til ønska cellekonsentrasjon.

2.4 Celleforsøk til enzymaktivitetsmåling

Innhald i bufferar og løysningar brukt i forsøk til enzymaktivitetsmåling er oppgitt i vedlegg.

2.4.1 Utsåing og stimulering

Teljing og bestemming av cellekonsentrasjon vart utført som skildra over, før resuspending etter sentrifugering til konsentrasjonen $0,5 \times 10^6$ celler/ml. Det vart sådd ut $0,5 \times 10^6$ THP-1 celler per brønn i 6-brønnsbrett, og dei vart stimulert med 40 ng/ml PMA i 24 timar. Cellene som då var adherente, vart vaska tre gonger med 1 ml RPMI, før tilsetjing av 2 ml nytt medium i kvar brønn. Cellene vart så inkubert i 72 timar før byting av medium og tilsetjing av ulike stoff. Behandla celler vart sett til vidare inkubering før hausting ved ulike tidspunkt.

2.4.2 Hausting

Hausteprosedyre var avhengig av kva enzymaktivitet som skulle målast.

Hausting til legumain- og cathepsin B-aktivitetsmåling: Mediet vart avpipetert og cellene vaska tre gonger med 1 ml fosfatbuffra saltvatn (PBS), før 0,5 ml lysisbuffer vart sett til kvar brønn. Cellelysate vart overført til eppendorfrøyr før gjennomføring av tre fryse-tine syklusar. Cellene vart då raskt nedfrosne ved $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, før rask tining på varmeblokk ved $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Til slutt vart prøvane sentrifugert ved 10 000 g og $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 5 minutt. Supernatanten vart avpipetert og sett på is eller frosen ved $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, før måling av totalprotein og enzymaktivitet.

Hausting til caspase-3-aktivitetsmåling: Mediet vart avpipetert og cellene vaska ein gong med 1 ml iskald PBS, før 1,8-2 ml caspasebuffer med 10 mM DTT vart sett til kvar brønn. Bretta vart sett på is inntil dei vart sonikert i 20 sekund per brønn ved amplitude 40. Lysatet vart overført til eppendorfrøyr før sentrifugering ved 10 000 g og 4 °C i 5 minutt. Supernatanten vart avpipetert og sett på is eller frosen (-20 °C) før måling av totalprotein og enzymaktivitet.

2.4.3 Måling av totalprotein

For å finne konsentrasjon av totalprotein i cellelysatprøvane, vart Bio-Rad Protein Assay nytta. Dette assayet er basert på ein metode av Bradford [48], og går ut på å måle absorbans. Når Coomassie-fargestoff i sur løysing bind seg til protein, vil absorpsjonsmaksimum endre seg frå 465 nm til 595 nm.

Fargestoffet (Protein Assay Dye Reagent Concentrate) vart fortynna med destillert vatn og filtrert gjennom eit membranfilter (0,22 µm). Ei fortynningsrekke av bovint serum albumin i relevant buffer (lysisbuffer eller caspase-3-buffer) vart laga for konsentrasjonsområdet 0-300 µg/ml og 0-75 µg/ml. Desse fortynningane vart nytta som standardar i assayet. Det vart fordelt 10 µl prøve og albuminfortynningar i duplikat på ei blank 96-brønnars mikrotiterplate. Deretter vart det tilsett 200 µl fortynna fargestoff (1:5). Ved svært låge proteinkonsentrasjonar vart det tilsett 50 µl prøve og albuminfortynningar (0-75 µg/ml) og 150 µl fortynna fargestoff (fortynna 4:15). Plata med tilsetjingane vart inkubert ved romtemperatur i 5 minutt, før absorbansen vart målt i ein mikroplateleser ved 595 nm. Ei standardkurve av albuminfortynningane vart nytta for å finne totalkonsentrasjon av protein i cellelysatprøvane.

2.4.4 Måling av legumainaktivitet

Legumainaktivitet vart målt med ein mikrotiterplatemetode. I denne metoden vert eit spesifikt fluorescerande substrat for legumain tilsett prøvane, og endring i fluorescens vert målt over tid. Assaybufferen er tilsett reduksjonsmiddelet (DTT) som gjer cysteinproteasane aktive [17, 49].

Det vart fordelt 20 µl prøve eller ”blank” (lysisbuffer) i triplikat på ei svart 96-brønnars mikrotiterplate. Deretter vart 100 µl assaybuffer med 1 mM DTT og pH 5,8 tilsett kvar

brønn av ein autoinjektor, og det vart godt blanda. For å sikre DTT induisert aktivering av proteasen, vart plata med prøve og buffer ståande i 10 minutt ved 30 °C før tilsetjing av substrat. Så vart 50 µl fluorescerande substrat Z-Ala-Ala-Asn-NHMec tilsett kvar brønn til ein sluttkonsentrasjon på 10 µM, før det vart målt kinetikk ved hjelp av programvaren WorkOut ved 30 °C i ein mikroplateleser. Det vart gjort 10 fluorescensmålingar, med eit minutt pause mellom kvar måling. Enzymaktiviteten vart uttrykt som endring i fluorescens per tid ($\Delta F/s$), og er stigningstalet til den brattaste regresjonskurva basert på 5 påfølgande målingar.

2.4.5 Måling av cathepsin B-aktivitet

Cathepsin B-aktivitet vart òg målt ved hjelp av ein mikroplatemetode. Prinsippet bak metoden er som for måling av legumainaktivitet. Eit spesifikt fluorescerande substrat som vert spalta av cathepsin B vert tilsett, og endring i fluorescens vert målt over tid. Assaybufferen er tilsett reduksjonsmiddelet DTT som gjer cysteinproteasen aktiv [50, 51].

Det vart fordelt 20 µl prøve eller ”blank” (lysisbuffer) i triplikat på ei svart 96-brønnars mikrotiterplate. Deretter vart 100 µl prøvebuffer tilsett kvar brønn og alt vart godt blanda. Prøvebufferen vart laga ved å fortynne aktiveringsbuffer (pH 5,5) tilsatt DTT med destillert vatn i forholdet 6:10. Sluttkonsentrasjonen av DTT i prøvebufferen vart då 4,8 mM. For å sikre DTT-indusert aktivering av proteasen, vart plata med prøve og buffer ståande i 10 minutt ved 30 °C, før tilsetjing av 50 µl fluorescerande substrat. Substratet Z-Arg-Arg-AMC vart tilsett kvar brønn til ein sluttkonsentrasjon på 20 µM. Fluorescens vart målt i ein mikroplateleser ved 30 °C, og data behandla i programvaren WorkOut. Det vart gjort 10 målingar, med eit minutt pause mellom kvar måling. Enzymaktiviteten vart uttrykt som endring i fluorescens per tid ($\Delta F/s$), og er stigningstalet til den brattaste regresjonskurva basert på 5 påfølgande målingar.

2.4.6 Måling av caspase-3-aktivitet

Ein mikroplatemetode vart òg nytta for å måle caspase-3-aktivitet. Eit spesifikt fluorescerande substrat som vert spalta av caspase-3 vert tilsett, og endring i fluorescens vert målt over tid. Caspasebufferen er tilsett reduksjonsmiddelet DTT og har pH 7,4, noko som gjer at aktiverte caspasar vert verande aktive [42].

Det vart fordelt 120 μl prøve og ”blank” (caspasebuffer med DTT) i triplikat på ei svart 96-brønnars mikrotiterplate. Deretter vart 50 μl fluorescerande substrat Ac-DEVD-AMC tilsett kvar brønn til ein sluttkonsentrasjon på 20 μM . Fluorescens vart målt i ein mikroplateleser ved 30 °C, og data behandla i programvaren WorkOut. Det vart gjort 10 målingar med 6 minutt pause mellom kvar måling. Enzymaktiviteten vart uttrykt som endring i fluorescens per tid ($\Delta F/s$), og er stigningstalet til den brattaste regresjonskurva basert på 5 påfølgande målingar.

2.4.7 Databehandling

Ved enzymaktivitetsmålingar vart aktivitet bestemt i cellelysatsprøvar og i kontrollar (”blank”) med relevante bufferar (lysisbuffer eller caspase-3-buffer). Ved behandling av data vart aktiviteten i ”blank” trekt frå aktiviteten i cellelysatsprøvar. Denne nye enzymaktivitetsverdien vart så korrigert for mengde totalprotein i prøven. Resultata vart presentert som enzymaktivitet ($\Delta F/s$) per μg protein i absolutte verdier eller normaliserte i forhold til kontrollceller (ikkje-behandla celler).

Enzymaktiviteten i denne oppgåva vart målt med fluorescerande substrat. Desse spesifikke substrata vert spalta av dei undersøkte proteasane, og er svært spesifikke. Det kan likevel ikkje utelukkast at dei òg vert spalta av andre enzym. Når det i denne oppgåva vert skrivne om legumainaktivitet, er det difor meint aktivitet av proteasar som spaltar substratet Z-Ala-Ala-Asn-NHMec. Uttrykket cathepsin B-aktivitet vert nytta for total proteaseaktivitet mot substratet Z-Arg-Arg-AMC og caspase-3-aktivitet vert nytta for total proteaseaktivitet mot substratet Ac-DEVD-cmk.

2.5 Celleforsøk til viabilitetsmåling

2.5.1 Utsåing og stimulering

Cellene vart telt og konsentrasjonen bestemt, før sentrifugering og resuspending til konsentrasjonen 1×10^6 celler/ml. Det vart sådd ut 1×10^5 THP-1 celler i triplikat i 96-brønnarsbrett, og cellene vart stimulert med 40 ng/ml PMA i 24 timar. Cellene som då var adherente vart vaska tre gonger med 100 μl RPMI, før tilsetjing av 200 μl nytt medium.

Cellene vart så inkubert i 72 timar før byting av medium og tilsetjing av ulike stoff. Cellene vart sett til vidare inkubering før viabilitetmåling ved ulike tidspunkt.

2.5.2 Måling av viabilitet

Eit MTS-kit (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) vart nytta for å måle celleviabilitet. Denne metoden baserer seg på å måle metabolsk aktivitet i cellene. NADPH eller NADH som vert danna av dehydrogenase enzym under cellemetabolisme, reduserer MTS til formazan. Mengde formazan vert kvantifisert ved absorbansmåling ved 490 nm og er direkte proporsjonalt med talet på levande celler [52].

Celler og blanke prøvar på 96-brønnarsbrettet vart tilsett 20 µl MTS-reagens. Brettet vart sett til inkubering ved 37 °C og 5 % CO₂ i ein time før absorbans vart målt ved 490 nm i ein mikroplateleser.

2.5.3 Databehandling

I viabilitetsforsøk vart absorbansen målt i brønner med celler og i brønner utan celler ("blank"). "Blank" innehaldt medium og eventuelt ulike løysemiddel, og tilsvarte dermed væske samansetninga i brønner med celler. Absorbansen i "blank" vart trekt frå absorbansen i brønner med celler, og denne korrigerte verdien vart nytta ved vidare kalkulasjonar av celleviabilitet. Resultata vart normalisert i forhold til kontrollcellene (ikkje-behandla celler) i kvart enkelt forsøk, og statistisk analyse utført som skildra under.

2.6 Celleforsøk til farging

2.6.1 Utsåing og stimulering

Cellene vart telt og konsentrasjonen bestemt før sentrifugering og resuspending til konsentrasjonen $0,5 \times 10^6$ celler/ml. Det vart sådd ut $0,5 \times 10^6$ THP-1 celler per brønn i 6-brønnars brett, og cellene vart stimulerte med 40 ng/ml PMA i 24 timar. Cellene som då var adherente, vart vaska tre gonger med 1 ml RPMI før tilsetjing av 2 ml nytt medium. Cellene

vart så inkubert i 72 timar før bytting av medium og tilsetjing av ulike stimuli. Cellene vart sett til vidare inkubering før farging ved ulike tidspunkt.

2.6.2 Cellekjernefarging

Cellekjernane vart farga med dei fluorescerande fargestoffa Hoechst 33342 og propidiumiodid (PI). Hoechst 33342 er cellerpermeabel og bind til dobbeltråda DNA. Fargestoffet absorberer energi (eksiterer) med bølgjelengda 350 nm, og har eit emisjonsmaksimum på 461 nm. Cellekjernar farga med Hoechst 33342 vil difor lyse blått [53]. PI setter seg mellom basane i DNA, men kan òg farge RNA. PI er ikkje cellepermeabel, og vil difor ikkje kunne farge DNA i celler med intakt cellemembran. Dette fluorescerande fargestoffet eksiterer ved 535 nm, og avgjer energien att i form av lys med bølgjelengda 617 nm. Cellekjernar farga med PI vil difor sende ut rødt lys [54].

Hoechst 33342 vart tilsett cellene direkte i cellebrønnen til ein sluttkonsentrasjon på 0,1 µg/ml. Brettet vart ståande til inkubering i romtemperatur i 20 minutt før mikroskopering med fluorescensmikroskop. Tre minutt før mikroskoperinga starta vart PI tilsett i dei same brønnane til ein sluttkonsentrasjon på 0,46 ng/ml. Cellekjernane farga med Hoechst 33342 vart studert gjennom eit UV-2A filter (Nikon) som slepp gjennom UV-lys med bølgjelengda 330-380 nm. Cellekjernar farga med PI vart studert gjennom eit G-A2 filter (Nikon) som slepp gjennom grønt lys med bølgjelengda 510-560 nm. Cellene vart studert i eit fluorescensmikroskop, gjennom eit 40x forstøringsobjektiv. Cellene vart fotografert med eit digitalt fargekamera kopla til SPOT Advanced programvare.

2.6.3 Lysosomfarging

Det fluorescerande fargestoffet LysoTracker Red DND-99 vart nytta for å studere cellene sine lysosom. Denne svake basen er protonert ved nøytral pH, noko som gjer at den er cellepermeabel. LysoTracker vert oppkonsentrert i sure organeller, inkludert lysosoma, ved at den vert protonert og dermed mistar sin evne til å fritt passere membranar. LysoTracker Red DND-99 absorberer lys med bølgjelengde 577 nm, og avgjev energien att i form av lys med bølgjelengde 590 nm. Lysosoma som vert farga vil difor sende ut oransje-rødt lys [55].

LysoTracker Red DND-99 vart tilsett cellene direkte i cellebrønnen til ein sluttkonsentrasjon på 75 nM. Brettet vart sett til inkubering ved 37 °C i ein time, før mikroskopering i eit

fluorescensmikroskop. Lysosoma farga med LysoTracker vart studert gjennom eit G-2A filter (Nikon) som berre slepp gjennom lys med bølgjelengda 510-560 nm. Cellene vart inspisert gjennom eit 40x forstøringsobjektiv, og fotografert med eit digitalt fargekamera kopla til SPOT Advanced programvare.

2.7 Statistikk

Det vart i denne oppgåva nytta to ulike statistiske metodar for å analysere resultatane. Wilcoxon's test for parsamanlikning er ein ikkje-parametrisk metode som samanliknar differansen mellom par av observasjonar. Nullhypotesen vart formulert som ingen effekt av behandling. Denne vart forkasta til fordel for den alternative hypotesen (effekt av behandling), dersom p-verdien var mindre enn signifikansnivået.

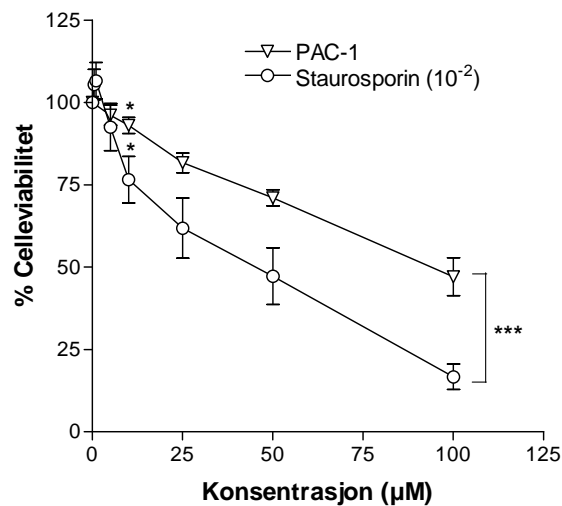
Der observasjonane hadde tendens til lineær samanheng vart statistisk analyse utført med lineær regresjon. Denne metoden baserer seg på å finne den rette linja som er best tilpassa datasettet og vidare estimere stigningstalet. Nullhypotesen vart formulert som ingen stigning på regresjonskurva (stigningstall=0), og denne vart forkasta ved p-verdiar mindre enn signifikansnivået. Alternativ hypotese var formulet som stigningstall forskjellig frå null. Signifikansnivået vart sett til 0,05 i begge statistikkmetodane.

Ved presentasjon av resultatane vil signifikante forskjellar merkerast med stjerner i figurane. Enkel stjerne (*) uttrykker signifikans i forhold til kontroll testa ved Wilcoxon's test for parsamanlikning. Signifikans ved lineær regresjon vert merka med dobbelt stjerne (**) eller for samanlikning av to kurver med trippel stjerne (***). I teksten vert det oppgitt punkttestimat for signifikante resultatane og p-verdi.

3. Resultater

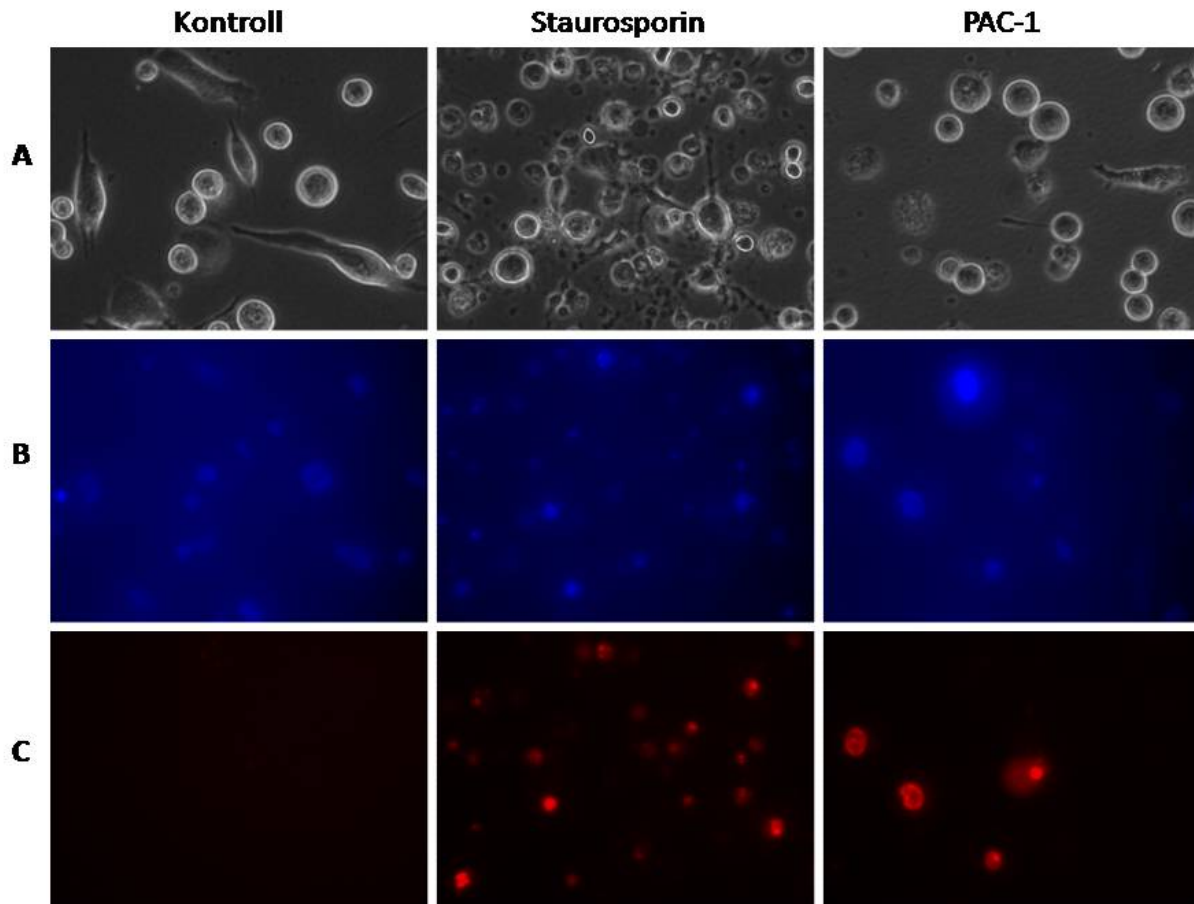
3.1 Staurosporin- og PAC-1-indusert celledød

For å studere om staurosporin og PAC-1 inducerer død i PMA-stimulerte THP-1 celler, vart celleviabiliteten målt ved hjelp av eit MTS-assay. Resultata viste at celleviabiliteten vart redusert ved aukande konsentrasjon av både staurosporin og PAC-1 (figur 3.1). Det vart observert statistisk signifikant reduksjon i celleviabilitet etter behandling med 100 nM staurosporin (viabilitetsgjennomsnitt: 77 %, $p = 0,0156$) eller 10 μM PAC-1 (viabilitetsgjennomsnitt: 93 %, $p = 0,0313$) i 24 timar. Høgare dosar førte til ein endå kraftigare reduksjon i viabiliteten. Staurosporinbehandling gav likevel ein signifikant ($p=0,081\%$) meir omfattande nedgang i celleviabilitet enn behandling med PAC-1, og EC_{50} -verdiane etter tur vart estimert til å vera på kring 500 nM og 100 μM . Naive THP-1 celler viste ein tilsvarande reduksjon i viabilitet etter behandling med PAC-1 i eit døgn (resultater ikkje vist, $n=3$ à tre parallellar).



Figur 3.1. Staurosporin og PAC-1 sin effekt på celleviabilitet, dose-respons etter inkubering i 24 timar. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 24 timar) vart vaska og dyrka i 72 timar før tilsetjing av staurosporin (0, 5, 10, 50, 100, 250, 500 og 1000 nM) eller PAC-1 (0, 5, 10, 25, 50 og 100 μM). Etter 24 timar vart MTS-reagens tilsett, og absorbansen (490 nm) vart målt etter ein time. Data er normalisert i forhold til kontrollcellene, og viser gjennomsnitt \pm SEM ($n=5-6$ à tre parallellar). * indikerer $p < 0,05$ i forhold til kontroll (Wilcoxon's test for parsamanlikning), *** indikerer $p < 0,05$ for forskjellen mellom linjene (lineær regresjon).

Korttidsviabilitetsforsøk indikerte kring 10 % død etter 3-5 timars behandling med staurosporin (500 nM) og mellom 5 og 20 % død etter behandling med PAC-1 (100 μ M) (Resultat ikkje vist, n=1 à tre parallellar).



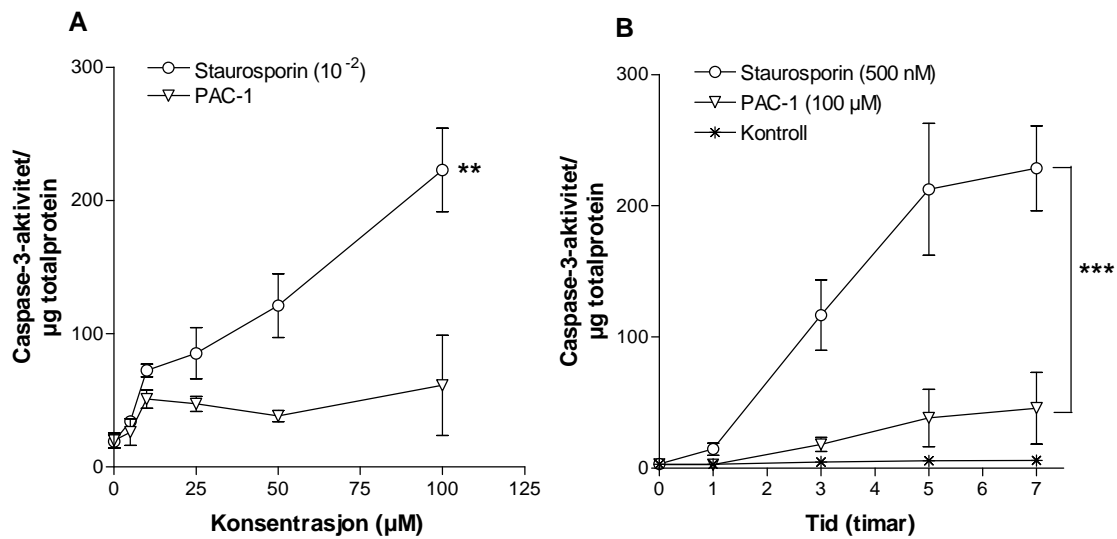
Figur 3.2. Morfologiske endringar i THP-1 celler etter tilsetjing av staurosporin eller PAC-1. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 24 timar) vart vaska og dyrka i 72 timar før behandling i fem timar med staurosporin (500 nM) eller PAC-1 (100 μ M). (A) Synleg lys og fasekontrast. (B) Cellekjernar farga med Hoechst 33342 (0,1 μ g/ml, 20 minutt), UV-2A filter. (C) Cellerkjernar farga med PI (0,46 μ g/ml, 3 minutt), G-A2 filter. Alle bileta vart tekne med 40x forstørring.

Visuell inspisering av PMA-stimulerte THP-1 celler i mikroskop, viste adherente og runde celler med kraftige utstikkarar (figur 3.2A, kontroll). Etter tilsetjing av staurosporin og PAC-1 vart cellene mindre adherente og deira morfologi vart endra. Etter inkubering med 50 nM staurosporin eller 50 μ M PAC-1 i 24 timar, var det tydeleg færre adherente celler og fleire lause celler. Dei staurosporinbehandla cellene som framleis var adherente, hadde skrumpa inn og mista sine forgreiningar (bilete ikkje vist). Desse morfologiske endringane var òg tydelege allereie etter staurosporinbehandling (500 nM) i fem timar (figur 3.2A). Mikroskopi

viste då mange små celler omgitt av små fragmenter. PAC-1-tilsetjing til PMA-stimulerte THP-1 celler enda òg med at cellene mista sine forgreiningar (figur 3.2A). Cellene vart tydeleg avrunda etter fem timar med PAC-1 (100 μ M), men dei vart ikkje så små som etter behandling med staurosporin.

For å studere kjernemorfologi etter tilsetjing av staurosporin og PAC-1, vart cellene farga med Hoechst 33342 og PI (figur 3.2B og C). Dette er fluorescerande fargestoff som bind til nukleinsyrene i cellekjernen. Hoechst 33342 er cellepermeabel, og farger kjernar i celler med intakt cellermembran eller permeabel cellemembran. PI er ikkje cellepermeabel, og farger kun kjernar der cellemembranen er permeabel. Ved hjelp av desse fargestoffa vart det forsøkt å studere kjernediameter, grad av kjernefragmentering og kromatinkondensering i cellene. Cellene vart studert i 6-brønnars plastbrett, noko som gjorde inspiseringa vanskeleg då plasten spreidde lyset. Likevel vart enkelte observasjonar gjort. Kontrollceller farga med Hoechst 33342 viste at PMA-stimulerte THP-1 celler hadde store kjernar, som ikkje vart farga av PI. Celler behandla med staurosporin (500 nM) i fem timar hadde mindre kjernar enn kontrollcellene, og det vart observert både kromatinkondensering og kjernefragmentering. Dei fleste av desse små kjernane vart farga av både Hoechst 33342 og PI, noko som tyda på permeabel cellemembran. Cellekjernane etter behandling med PAC-1 (100 μ M) i fem timar var store. Det kunne antydast kromatinkondensering og fragmenterte kjernar, men i mindre grad enn etter behandling med staurosporin. Nokre lot seg farge av både Hoechst 33342 og PI, men dei fleste vart berre farga av Hoechst 33342.

Auka aktivitet av caspase-3 vert ofte observert ved apoptose. For å vidare kartleggje staurosporin- og PAC-1-indusert død i PMA-stimulerte THP-1 celler, vart difor caspase-3-aktivitet målt ved hjelp av det fluorescerande substratet Ac-DEVD-AMC. Cellene vart behandla med ulike konsentrasjonar av staurosporin eller PAC-1 i 24 timar før lysing og aktivitetsmåling (figur 3.3A). Resultata viste ein statistisk signifikant doseavhengig auke i caspase-3-aktivitet etter staurosporinbehandling (stigningstall: 1,95 +/- 0,23, $p < 0,01\%$). Caspase-3-aktiviteten i cellelysate av celler behandla med PAC-1 viste derimot ingen signifikant auke. Trenden synte noko auka aktivitet i forhold til kontrollcellene, men stor spreing og få data gjorde vidare analyse vanskeleg.

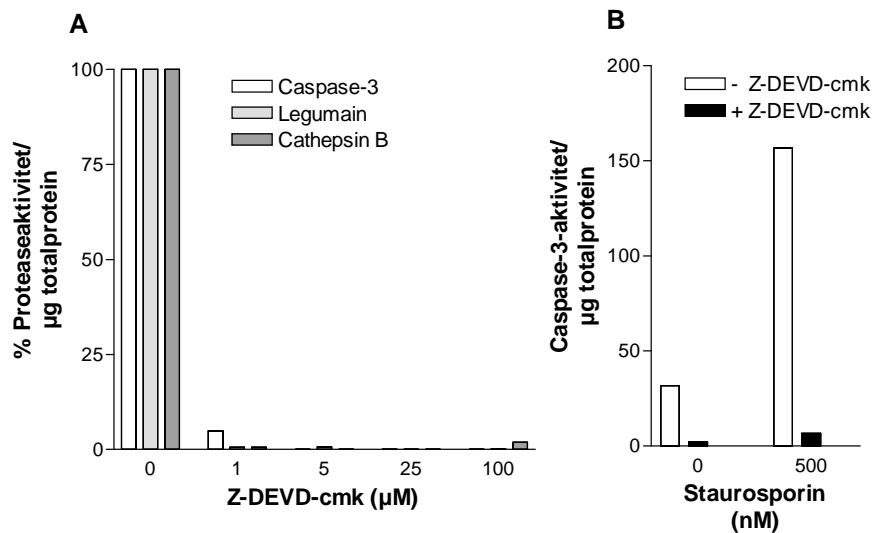


Figur 3.3. Caspase-3-aktivitet etter behandling med staurosporin eller PAC-1 i (A) ulike dosar eller (B) ulike tider. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 24 timar) vart vaska og dyrka i 72 timar før behandling med (A) staurosporin (0, 50, 100, 250, 500 og 1000 nM) eller PAC-1 (0, 5, 10, 25, 50 og 100 µM) i 24 timar, og (B) staurosporin (500 nM) eller PAC-1 (100 µM) i 0, 1, 3, 5 og 7 timar. Cellene i begge forsøka vart lysert ved sonikering, og cellelysate vart analysert for caspase-3-aktivitet ved spalting av Ac-DEVD-AMC ($\Delta F/s$), samt totalprotein (μg). Data viser gjennomsnitt \pm SEM ($n=3-7$ à to parallelar). ** indikerer $p<0,05$ (lineær regresjon), *** indikerer $p<0,05$ for forskjellen mellom linjene (lineær regresjon).

Aktivering av caspaser kan skje tidleg i apoptoseprosessen, og 500 nM staurosporin og 100 µM PAC-1 vart nytta for å sjå korleis aktiviteten endra seg over eit kortare tidsrom (figur 3.3B). Staurosporinbehandling gav statistisk signifikant auke i caspase-3-aktivitet i dette tidsrommet (stigningstall: 36,1 \pm 5,02, $p<0,01$ %). Allereie etter tre timar var det kraftig auke i staurosporinindusert caspase-3-aktivitet, og etter sju timar var gjennomsnittleg aktivitet høgare enn etter behandling i 24 timar (figur 4.3A). Behandling med PAC-1 resulterte òg i signifikant auke i caspase-3-aktivitet (stigningstall: 6,84 \pm 2,45, $p=1,52$ %) (figur 3.3A). Denne auken var likevel signifikant lågare enn aktiviteten etter staurosporinbehandling ($p<0,01$ %). Etter sju timar vart PAC-1-indusert aktivitet estimert til å vere kring 20 % av staurosporinindusert aktivitet. Etter behandling i fem timar med PAC-1 (100 µM) var gjennomsnittleg caspase-3-aktivitet på same nivå som etter 24 timars behandling.

For å studere i kva grad desse dødsprosessane er avhengige av caspase-3, vart caspase-3-inhibitoren Z-DEVD-cmk nytta. Inhibitoren sin evne til å hemme cysteinproteasar vart fyrst kartlagt ved hjelp av aktivitetsmålingar. Cellelysate av celler behandla med 500 nM

staurosporin (24 timar) vart tilsett ulike konsentrasjonar Z-DEVD-cmk (figur 3.4A). Resultatet indikerte 95 % hemming av caspase-3-aktivitet etter tilsetjing av 1 μM inhibitor. Ved denne konsentrasjonen vart òg legumain- og cathepsin B-aktivitet fullstendig undertrykt.

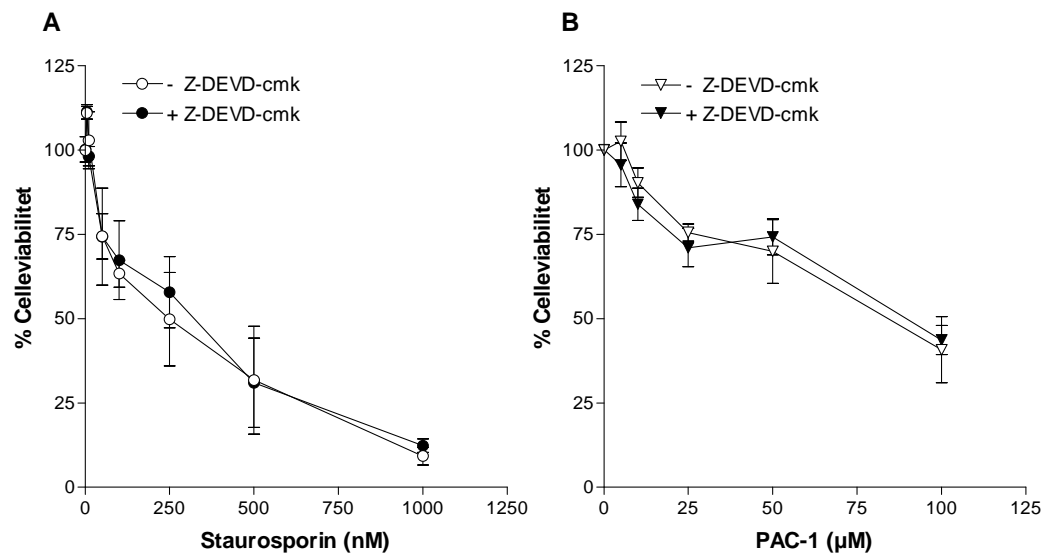


Figur 3.4. Z-DEVD-cmk sin effekt på proteaseaktivitet i (A) cellelysate eller (B) levande celler. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 24 timar) vart vaska og dyrka i 72 timar før vidare behandling. Hausting etter 24 timar og lysing med enten lysisbuffer og fryse-tining (legumain- og cathepsin B-aktivitet) eller sonikering (caspase-3-aktivitet). (A) Cellelysate av celler behandla med staurosporin (500 nM), tilsatt Z-DEVD-cmk (0, 1, 5, 25 og 100 μM) og analysert for legumain- (med Z-Ala-Ala-Asn-NHMec), cathepsin B- (med Z-Arg-Arg-NHMec) og caspase-3-aktivitet (med Ac-DEVD-AMC). (B) Celler behandla med staurosporin (0 og 500 nM) med eller utan Z-DEVD-cmk (100 μM), og analysert for caspase-3-aktivitet. Data viser gjennomsnittet av proteaseaktivitet ($\Delta\text{F/s}$) i forhold til totalprotein (μg) \pm SEM (n=1 à to parallellar). Normaliserte data for aktivitet i cellelysate (A), absolutte data for aktivitet i celler (B).

Behandling av levande PMA-stimulerte THP-1 celler med staurosporin (500 nM) og Z-DEVD-cmk (100 μM) i 24 timar, resulterte i liten grad av hemming av legumain- og cathepsin B-aktivitet (Resultat ikkje vist, n=1 à to parallellar). Caspase-3-aktiviteten vart derimot kraftig hemma ved denne inhibitorkonsentrasjonen (figur 3.4B). Ut frå desse resultatata vart 100 μM Z-DEVD-cmk nytta for å vidare studere kva effekt hemming av caspase-3-aktivitet har på staurosporin- og PAC-1-indusert celledød.

Som vist i figur 3.3B var caspase-3-aktiviteten tydeleg auka etter behandling med staurosporin eller PAC-1 i fem timar. Tilsetjing av Z-DEVD-cmk (100 μM) saman med staurosporin (500 nM) eller PAC-1 (100 μM) indikerte likevel ingen endring i cellelevabilitet

(MTS) etter fem timar (Resultat ikkje vist, $n=1$ à tre parallellar). Etter behandling i 24 timar vart det heller ikkje observert endringar i celleviabiliteten ved tilsetjing av Z-DEVD-cmk (figur 3.5). Dei PMA-stimulerte THP-1 cellene døydde like mykje med Z-DEVD-cmk tilstades som med staurosporin eller PAC-1 åleine.

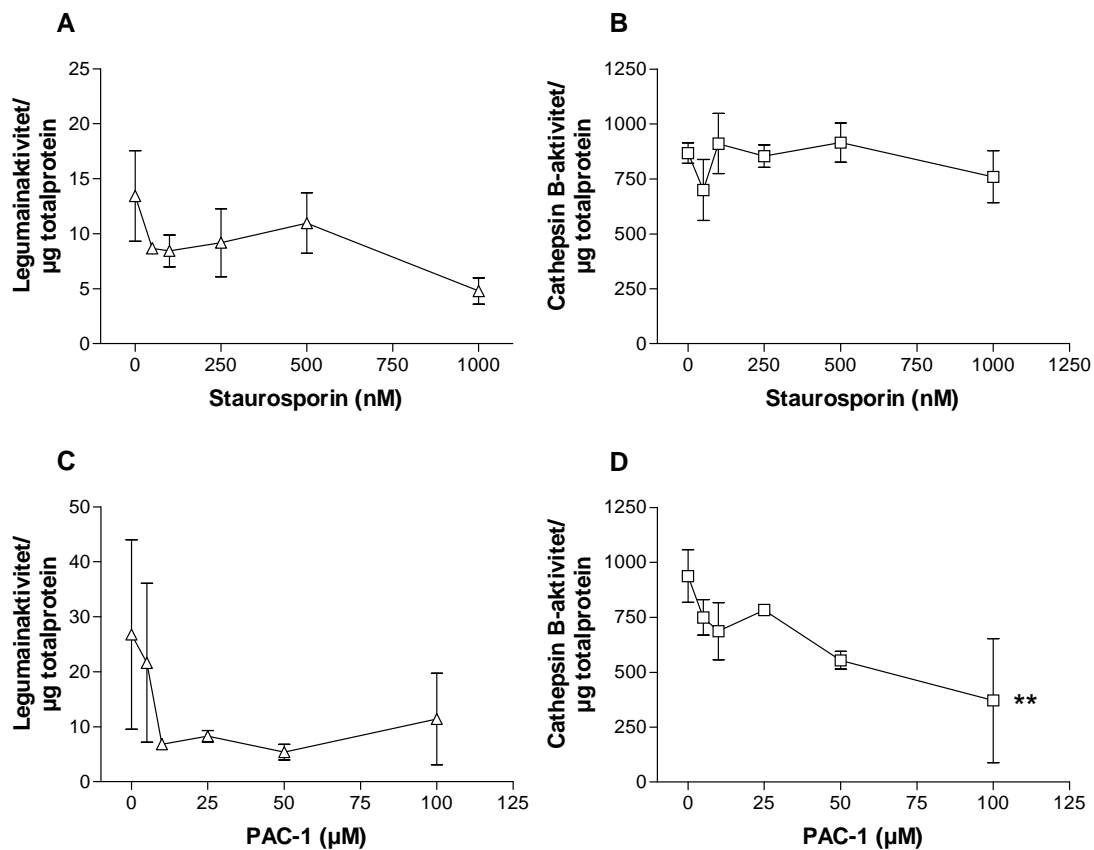


Figur 3.5. Effekt av staurosporin eller PAC-1 på celleviabilitet med eller utan Z-DEVD-cmk. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 24 timar) vart vaska og dyrka i 72 timar før tilsetjing av (A) staurosporin (0, 5, 10, 50, 100, 250, 500 og 1000 nM) med eller utan Z-DEVD-cmk (100 µM) eller (B) PAC-1 (0, 5, 10, 25, 50 og 100 µM) med eller utan Z-DEVD-cmk (100 µM). MTS-reagens vart sett til etter 24 timar og absorbans (490 nm) målt etter ein time. Data er normalisert i forhold til ubehandla kontrollceller, og viser gjennomsnitt \pm SEM ($n=2$ à tre parallellar).

3.2 Lysosomale proteasar si rolle i staurosporin- og PAC-1-indusert celledød

For å vidare karakterisere staurosporin- og PAC-1-indusert celledød i PMA-stimulerte THP-1 celler, vart aktiviteten til dei lysosomale proteasane legumain og cathepsin B studert ved hjelp av spesifikke fluorescerande substrat. Etter korttidsbehandling med staurosporin (500 nM og 1000 nM) i 0-6 timar, skjedde det ingen endring med verken legumain- eller cathepsin B-aktiviteten (Resultater ikkje vist, $n=1$ à to parallellar). Etter behandling i 24 timar med ulike konsentrasjonar staurosporin vart det heller ikkje observert signifikante endringar i aktiviteten til desse proteasane (figur 3.6A og B). Behandling med PAC-1 i 24

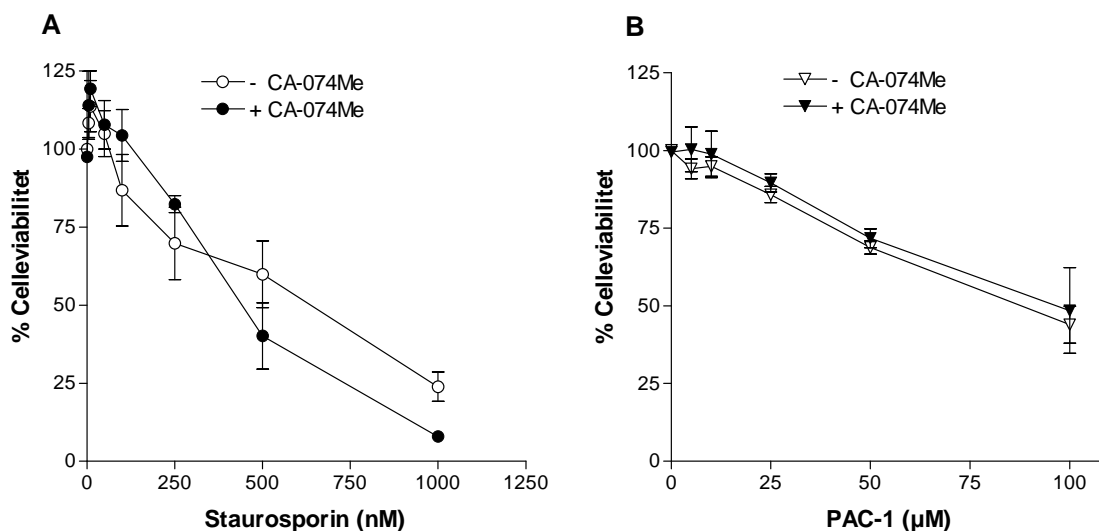
timar gav ingen signifikante endringer i legumainaktiviteten (figur 3.6C). Det kan likevel sjå ut som om det ved PAC-1-behandling vert redusert proteaseaktivitet, men det er store variasjonar i målingane ved enkelte konsentrasjonar. Figur 3.6D viser at cathepsin B-aktiviteten vart statistisk signifikant redusert ved aukande konsentrasjonar av PAC-1 (stigningstall: $-4,78 \pm 1,62$, $p=1,15\%$).



Figur 3.6. Legumain- og cathepsin B-aktivitet etter behandling med ulike konsentrasjonar staurosporin eller PAC-1. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 24 timar) vart vaska og dyrka i 72 timar før tilsetjing av (A), (B) staurosporin (0, 50, 100, 250, 500 og 1000 nM) eller (C), (D) PAC-1 (0, 5, 10, 25, 50 og 100 µM). Inkubering i 24 timar før lysering ved fryse-tinging i lysisbuffer. Legumain- (spalting av Z-Ala-Ala-Asn-NHMec) og cathepsin B-aktivitet (spalting av Z-Arg-Arg-AMC) vart målt, samt totalprotein. Data viser gjennomsnitt av proteaseaktivitet (ΔF /sekund) i forhold til totalprotein (μg) \pm SEM ($n=2-6$ à to parallellar). ** indikerer $p<0,05$ (lineær regresjon).

For å studere om den lysosomale cysteinproteasen cathepsin B spelar ei rolle i staurosporin- og PAC-1-indusert celledød, vart inhibitoren CA-074Me nytta. CA-074Me er skildra i

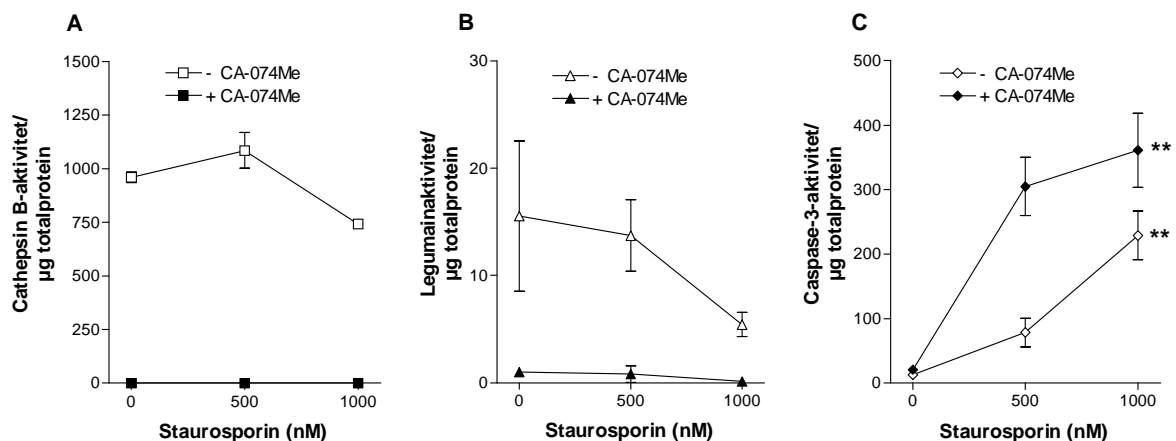
litteraturen som ein spesifikk hemmar av cathepsin B i andre biologiske system. Enzymaktivitetsmålingar i PMA-stimulerte THP-1 celler indikerte at 50 μM inhibitor hemma all cathepsin B-aktivitet (Resultat ikkje vist, $n=1$ à to parallellar). Dose-respons viabilitetsstudiar i cellenen indikerte vidare at konsentrasjonar opp til 50 μM CA-074Me i 24 timar var bra tolerert (Resultat ikkje vist, $n=1$ à tre parallellar). Ut frå desse resultat vart 50 μM CA-074Me brukt i viabilitetsforsøk der PMA-stimulerte THP-1 celler vart behandla med staurosporin eller PAC-1 i ulike konsentrasjonar (figur 3.7). Resultata viste ingen signifikante skilnader i viabilitet mellom celler behandla med berre staurosporin eller celler behandla med både staurosporin og CA-074Me (figur 3.7A). Behandling med PAC-1 gav tilsvarande resultat (figur 3.7B). Viabilitetsmålingar gjort etter behandling i tre og fem timar indikerte heller ingen effekt av CA-074Me på staurosporin- (500 nM) eller PAC-1-indusert (100 μM) celledød (Resultat ikkje vist, $n=1$ à tre parallellar).



Figur 3.7. Effekten av staurosporin eller PAC-1 med eller utan CA-074Me på celleviabilitet. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 24 timar) vart vaska og dyrka i 72 timar før tilsetjing av (A) staurosporin (0, 5, 10, 50, 100, 250, 500 og 1000 nM) eller (B) PAC-1 (0, 5, 10, 25, 50 og 100 μM) med eller utan CA-074Me (50 μM). MTS-reagens vart sett til etter 24 timar og absorbans (490 nm) målt etter ein time. Data er normalisert i forhold til ubehandla kontrollceller, og viser gjennomsnitt \pm SEM ($n=3$ à tre parallellar).

Endring i cysteinproteaseaktivitet 24 timar etter tilsetjing av CA-074Me (50 μM) og staurosporin (500 og 1000 nM) vart vidare studert i PMA-stimulerte THP-1 celler. Cathepsin B-aktiviteten vart totalt hemma av inhibitoren (figur 3.8A). Overraskande vart òg

legumainaktiviteten kraftig hemma av CA-074Me (figur 3.8B). Caspase-3-aktiviteten auka derimot statistisk signifikant i celler behandla med både CA-074Me og staurosporin (stigningstall: 0,34 +/- 0,074, p=0,26%). Auken var ikkje signifikant forskjellig frå behandling med staurosporin åleine, men var signifikant parallellforskoven (p=0,00363). Caspase-3-aktiviteten var altså høgare i celler behandla med både staurosporin og CA-074Me enn i celler behandla med staurosporin åleine.

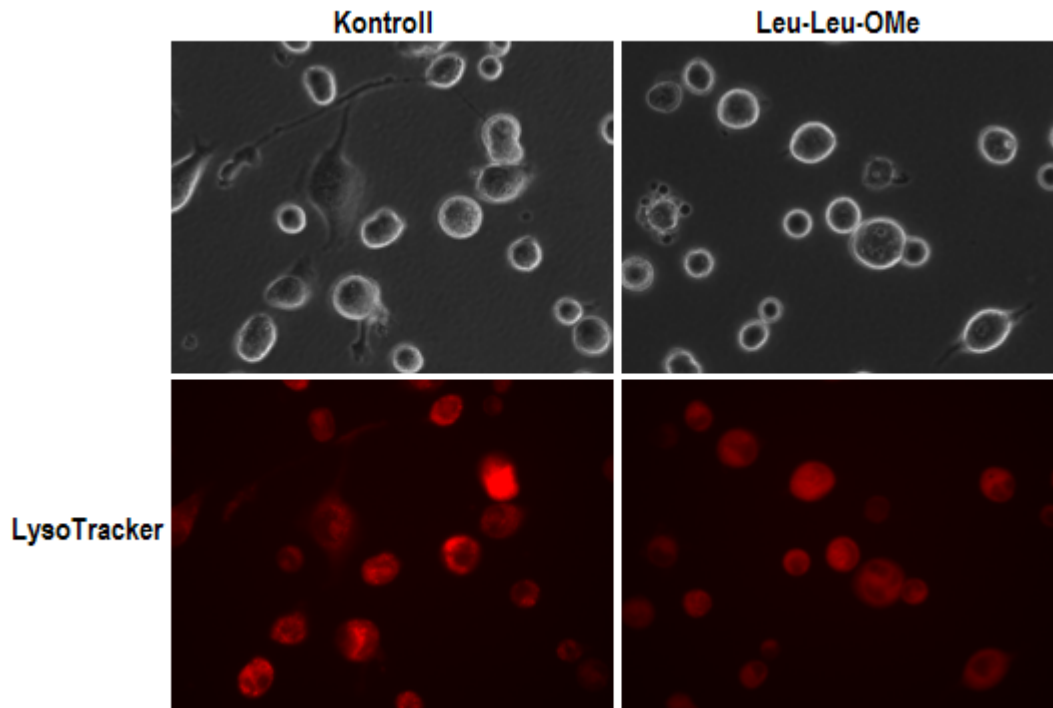


Figur 3.8. Effekt av staurosporin med eller utan CA-074Me på proteaseaktivitet. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 24 timar) vart vaska og dyrka i 72 timar før tilsetjing av staurosporin (0, 500 og 1000 nM) med eller utan CA-074Me (50 μM). (A) Legumain- (spalting av Z-Ala-Ala-Asn-NHMec) og (B) cathepsin B-aktivitet (spalting av Z-Arg-Arg-AMC) vart målt etter lysering ved fryse-tinging i lysisbuffer. (C) Caspase-3-aktivitet (spalting av Ac-DEVD-AMC) vart målt etter lysering ved soniking i caspasebuffer. Data viser gjennomsnittleg proteaseaktivitet ($\Delta F/s$) i forhold til totalprotein (μg) +/- SEM (n=3 å to parallellar). ** indikerer p<0,05 (lineær regresjon).

3.3 Celledød induisert av lysosomal permeabilitet

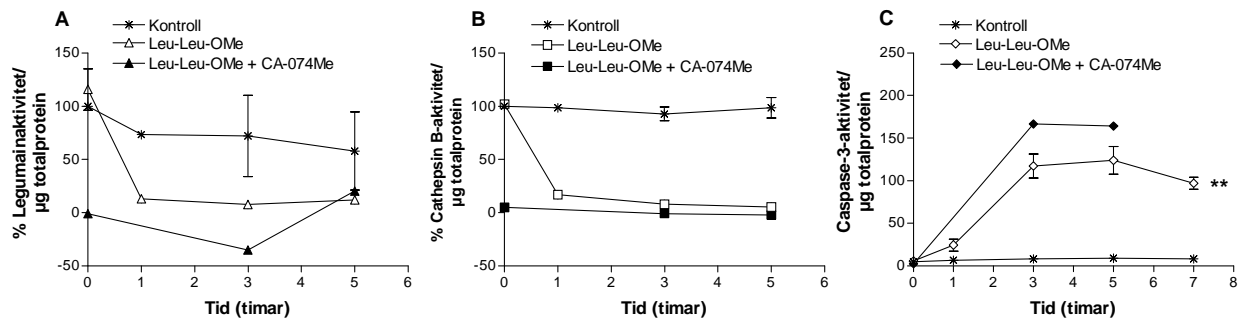
Leu-Leu-OMe er eit cellepermeabelt stoff som påverkar lysosommembranen slik at den vert permeabel. For å sjå om dette stoffet påverkar lysosoma i PMA-stimulerte THP-1 celler, vart det fluorescerande fargestoffet LysoTracker Red (DND-99) brukt saman med mikroskopering. LysoTracker vert oppkonsentrert i sure organeller, inkludert lysosomer, og vil ved emisjon sende ut rødt lys. I kontrollceller lyste lysosoma opp som små raude og tydeleg avgrensa områder (figur 3.9). Celler behandla med Leu-Leu-OMe (500 μM) i ein

time mista desse avgrensa raude områda, og vart i staden meir diffust gjennomfarga rødt. Mikroskopering med synleg lys viste òg at Leu-Leu-OMe påverka cellene slik at morfologien vart endra (figur 3.9). Det vart mellom anna observert danning av runde strukturar på celleoverflata (sjå seinare).



Figur 3.9. Effekt av Leu-Leu-OMe på lysosomal permeabilitet etter ein times behandling. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 24 timar) vart vaska og dyrka i 72 timar før tilsetjing av Leu-Leu-OMe (0 og 500 μ M) og LysoTracker Red (75 nM). Etter ein time vart cellene mikroskopert med synleg lys og fasekontrast (øvt) eller med filteret G-2A (LysoTracker; nederst). Alle bileta vart tekne med 40x forstørring.

Farging med LysoTracker viste at behandling med Leu-Leu-OMe i ein time resulterte i permeable lysosomer i PMA-stimulerte THP-1 celler. Dersom lysosoma vert permeable, vil lysosomalt innhald kunne lekke ut i cytosol. Lysosomale cysteinproteasar krev sur pH for aktivitet, og vil difor verte inaktiverte i den tilnærma nøytrale pH-en som er i cytosol. For å studere dette vidare, vart det målt aktivitet av legumain og cathepsin B i PMA-stimulerte THP-1 celler etter behandling med 500 μ M Leu-Leu-OMe (figur 3.10A og B). Etter behandling i ein time indikerte resultatata at både legumain- og cathepsin B-aktiviteten vart kraftig redusert. Aktiviteten vart verande på om lag 10 % ved målingar etter tre og fem timar. Tilsetjing av CA-074Me (50 μ M) i tillegg til Leu-Leu-OMe, undertrykte både legumain- og cathepsin B-aktiviteten fullstendig allereie ved start (tid 0).

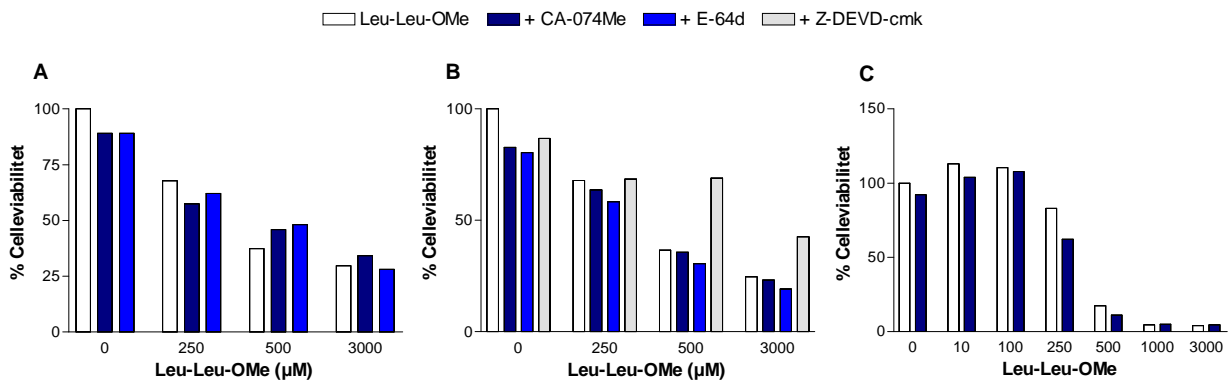


Figur 3.10. Effekt av Leu-Leu-OMe på proteaseaktivitet med eller utan CA-074Me. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 24 timar) vart vaska og dyrka i 72 timar før tilsetjing av Leu-Leu-OMe (500 μ M) med eller utan CA-074Me (50 μ M). (A) og (B) Cellene vart hausta etter 0, 1, 3 og 5 timar og lysert ved fryse-tining i lysisbuffer, før måling av legumain- (spalting av Z-Ala-Ala-Asn-NHMec) og cathepsin B-aktivitet (spalting av Z-Arg-Arg-AMC). (C) Hausting etter 0, 1, 3, 5, og 7 timar og lysering ved sonikering i caspasebuffer, før måling av caspase-3-aktivitet (spalting av Ac-DEVD-AMC). Data viser gjennomsnittleg proteaseaktivitet ($\Delta F/s$) i forhold til totalprotein (μ g) \pm SEM (n=1-3 à 2 parallellar). Normaliserte data for legumain- og cathepsin B-aktivitet, absolutte data for caspase-3-aktivitet. ** indikerer $p < 0,05$ (lineære regresjon).

Vidare vart det undersøkt om Leu-Leu-OMe-indusert lysosomal lekkasje hadde effekt på caspase-3-aktivitet. PMA-stimulerte THP-1 celler vart behandla med Leu-Leu-OMe (500 μ M) over eit korttidsintervall, med eller utan CA-074Me (figur 3.10C). Leu-Leu-OMe induserte ein signifikant auke i caspase-3-aktivitet i dette tidsintervallet (stigningstall: 16,4 \pm 4,12, $p=0,21$ %). Etter behandling i ein time steig aktiviteten gradvis til toppen var nådd etter tre til fem timar. Etter sju timar var aktiviteten noko lågare enn etter tre timar. Gjennomsnittet av aktiviteten ved fem timar var i underkant av 125 $\Delta F/s/\mu$ g totalprotein. Dette er noko lågare enn etter behandling med 500 nM staurosporin (i overkant av 210 $\Delta F/s/\mu$ g totalprotein; figur 3.3B), men høgare enn etter 100 μ M PAC-1-behandling (i underkant av 40 $\Delta F/s/\mu$ g totalprotein; figur 3.3B). Tilsetjing av CA-074Me i tillegg til Leu-Leu-OMe indikerte ei endå kraftigare aktivering av caspase-3. Desse funna likna aktivitetsdata frå celler behandla med staurosporin og CA-074Me (figur 3.7C).

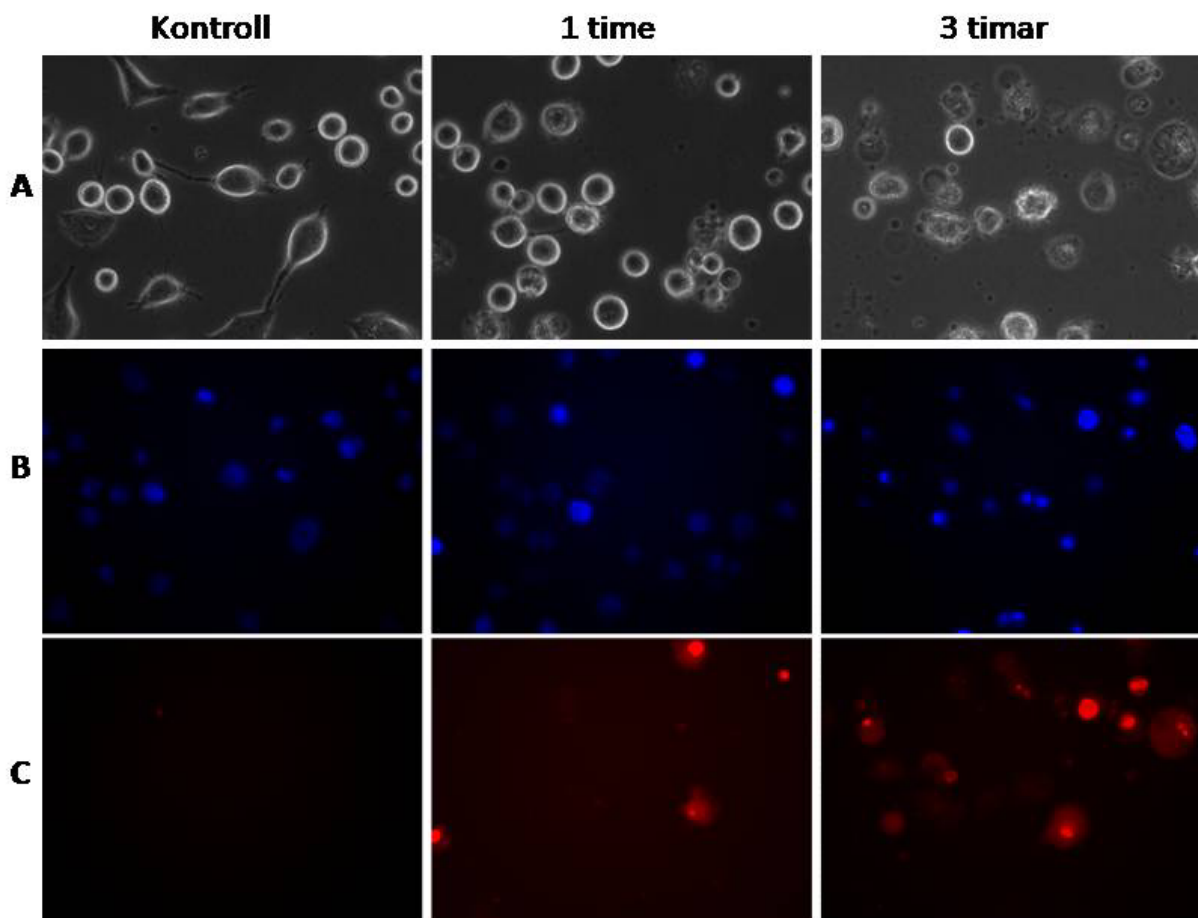
Leu-Leu-OMe hadde effekt på lysosoma og aktiviteten til dei undersøkte cysteinproteasane. Det var difor ynskjeleg å vidare undersøke effekten av stoffet på THP-1 cellene sin viabilitet. Resultata viste ein doseavhengig reduksjon i celleviabilitet etter både 3, 5 og 24 timars behandling (figur 3.11). Behandling i tre og fem timar med Leu-Leu-OMe (500 μ M) indikerte kring 60 % celledød (figur 3.11A og B). Tilsetjing av inhibitorane CA-074Me eller E-64d påverka ikkje Leu-Leu-OMe-indusert celledød. Tilsetjing av Z-DEVD-cmk til cellene

hadde derimot effekt på celledød. Resultata indikerte at denne inhibitoren reduserte Leu-Leu-OMe-indusert celledød med kring 50 %. Figur 3.11C viser viabilitetsdata etter behandling i 24 timar med ulike konsentrasjonar Leu-Leu-OMe. Det vart estimert kring 80 % celledød etter behandling med 500 μM Leu-Leu-OMe i eit døgn. Tilsetjing av CA-074Me indikerte ingen effekt på Leu-Leu-OMe-indusert celledød.



Figur 3.11. Effekten av Leu-Leu-OMe på celleviabilitet ved tidspunkta (A) 3, (B) 5 eller (C) 24 timar med eller utan ulike inhibitorar. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 24 timar) vart vaska og dyrka i 72 timar før tilsetjingar. (A) Leu-Leu-OMe (0, 250, 500 og 3000 μM) åleine eller saman med enten CA-074Me (50 μM) eller E-64d (50 μM). (B) Leu-Leu-OMe (0, 250, 500, 3000 μM) åleine eller saman med enten CA-074Me (50 μM), E-64d (50 μM) eller Z-DEVD-cmk (100 μM). (C) Leu-Leu-OMe (0, 10, 100, 250, 500, 1000 og 3000 μM) åleine eller saman med CA-074Me (50 μM). MTS-reagens vart sett til etter (A) 2, (B) 4 eller (C) 24 timar, og absorbans (490 nm) målt etter ein time. Data er normalisert i forhold til ubehandla kontrollceller, og viser gjennomsnitt \pm SEM ($n=1$ à 3 parallellar).

For å nærmare karakterisere dødsprosessen indusert av Leu-Leu-OMe, vart cellekjernane studert i fluorescensmikroskop etter farging med Hoechst 33342 og PI (figur 3.12). Etter behandling med Leu-Leu-OMe (500 μM) i ein time vart få cellerkjerner farga med PI, medan mange kjerner vart farga med Hoechst (figur 3.12B). Nokre av kjernane farga med Hoechst lyste svært kraftig, noko som kan tyde på kromatinkondensering. Andre kjerner viste kjernefragmentering med delte cellekjerner. Mikroskopering med synleg lys viste celler som hadde mista sine forgreiningar. Som nemnt tidlegare, hadde enkelte celler sirkulære strukturar på overflata. Etter behandling i fem timar, var cellene sin morfologi endå tydelegare endra (figur 3.12C). Cellene var då mindre runde, og mikroskopi synte mange små korn og fragmenter mellom cellene. Det var mange fleire PI-farga cellekjerner enn etter tre timar, men det var framleis mogleg å sjå fragmenterte cellekjerner og kondensert kromatin.



Figur 3.12. Morfologiske endringar etter behandling med Leu-Leu-OMe i ein eller tre timar. PMA-stimulerte THP-1 celler (40 ng/ml, 24 timar) vart vaska og dyrka i 72 timar før tilsetjing av Leu-Leu-OMe (0 og 500 μ M). Hoechst 33342 (0,1 μ g/ml) vart tilsett etter 40 min, PI (0,46 μ g/ml) etter 57 min, og mikroskopering etter ein og tre timar. Cellen vart studert med synleg lys og fasekontrast, UV-2A-filter (Hoechst33342) og G-A2-filter (PI). Alle bileta vart tekne med 40x forstørring.

4. Diskusjon

Celledød kan grovt delast inn i nekrose og apoptose. Nekrose er ein ukontrollert dødsprosess som ikkje krev energi. Celler som dør ved nekrose er karakterisert ved ødem og øydelagte organeller. Cellemembranen sprekk og celleinnhaldet lekk ut i ekstracellulært rom der det fører til inflammasjon. Apoptose er ei kontrollert dødsform som krev energi. Apoptotiske celler er karakterisert ved at dei skrumpar, får kondensert kromatin og fragmenterte kjernar. Plasmamembranen som under heile prosessen er intakt vert etter kvart bulka og avsnøra, slik at det vert danna apoptotiske lekamar. Desse strukturane vert fjerna ved fagocytose. Cellulært innhald slepp aldri ut i det ekstracellulære rommet under prosessen, noko som gjer at apoptose ikkje fører til inflammasjon [6].

Tradisjonelt har caspasane fått ei avgjerande rolle i apoptose. Caspasane er cysteinproteasar som føreligg som proenzym i cytosol, og dei vert aktiverte i kaskadar av hendingar initiert av ulike dødsstimuli. Aktiverte caspasar sett i gang ei rekke prosessar som resulterer i dei hendingane som er karakteristiske for apoptoseprosessen. I seinare tid har òg lysosoma og dei lysosomale enzyma fått ei viktigare rolle i denne forma for celledød. Avgrensa lysosomal permeabilisering resulterer i kontrollert frisetjing av proteasar til cytosol, der dei kan setje i gang ulike prosessar som endar med caspaseavhengig eller -uavhengig apoptose [14].

Apoptose er viktig i reguleringa av normal fysiologi, men spelar òg ei avgjerande rolle i patofysiologiske prosessar som til dømes nevrodegenerative sjukdommar [5]. Det er difor av stor interesse å kartleggje fleire av mekanismane som er involvert i denne forma for celledød. I denne oppgåva vart det studert om den lysosomale cysteinproteasen legumain er involvert i apoptose. Legumain og caspasane er plassert i same proteaseklan, men på grunn av stor homologi i deira aminosyresekvens kunne dei òg vore plassert i same familie [32]. Denne likskapen gjer det lett å førestille seg at legumain i cytosol kan delta i prosessar der caspasane spelar ei rolle.

4.1 Val av celler og dødsstimuli

I denne oppgåva vart den monocyttære cellelinja THP-1 nytta for å studere apoptose. Desse monocyttane differensierer til makrofagliknande celler når dei vert stimulerte med

forbolesteren PMA. PMA-stimulerte THP-1 celler liknar i stor grad kroppen sine egne makrofagar i morfologi og eigenskapar, og dei sluttar å proliferere og vert adherente til plast [56]. Når THP-1 celler differensierer til å bli meir makrofagliknande, er det blitt vist ei kraftig oppregulering av legumainuttrykk [31]. PMA-stimulerte THP-1 celler er difor ei eigna cellelinje til studering av legumainfunksjon.

Makrofagar er ei stor gruppe av fagocytterande celler som utgjør ein viktig del av immunsystemet. Dei er med på å oppretthalde normal fysiologi, men er òg involvert i patologiske tilstandar som aterosklerose [57]. Apoptose av makrofager er viktig i blant anna patogenesen til aterosklerose, og spelar ei rolle i inflammasjon, danning av ustabile plakk og trombose [58]. Opptak av oksidert "low density lipoprotein" (ox-LDL) omdannar makrofagar til lipidrike skumceller som er involvert i sjukdomsprosessen [58], og anna arbeid i vår forskningsgruppe studerer legumainuttrykket i celler etter behandling med ox-LDL. Som eit ledd i dette arbeidet vart det forsøkt å studere apoptose induisert av høge dosar ox-LDL i PMA-stimulerte THP-1 celler. Viabilitetsmålingar etter behandling med inntil 100 µg/ml ox-LDL viste ingen celledød (resultat ikkje vist, n=1 à tre parallellar), og ox-LDL vart difor ikkje studert vidare i denne oppgåva.

Arterosklerose er som nemnt ein inflammatorisk sjukdom og i litteraturen finst det døme på apoptose induisert av inflammatoriske mediatorar. I fibrosarcoma celler (WEHI-S) førte behandling med TNF- α til ein cathepsin B-avhengig apoptose [59]. Denne inflammatoriske mediatoren vart difor testa ut i PMA-stimulerte THP-1 celler, men viabilitetsmålingar viste ingen teikn til celledød (resultat ikkje vist, n=1 à tre parallellar). Denne observasjonen vart nyleg bekrefta i litteraturen der det vart føreslått at PMA-stimulerte THP-1 celler har utvikla beskyttande mekanismar mot TNF- α -indusert celledød [60], og av anna arbeid utført ved vår forskningsgruppe (S.B. Omar, personleg meddeling). Denne inflammatoriske mediatoren vart difor ikkje brukt vidare i denne oppgåva.

I litteraturen er det vist apoptose i PMA-stimulerte THP-1 celler etter behandling med ei rekke ulike stimuli. Behandling med LPS er eit eksempel som har vist apoptoseinduserande effekt i cellene. Denne effekten vart ikkje observert i vårt laboratorium (resultat ikkje vist, n=1 à tre parallellar). Effektiv indusering av celledød vart derimot funne etter behandling med Leu-Leu-OMe, staurosporin og PAC-1, og desse vart difor nytta i vidare forsøk.

Lysosomal permeabilitet og apoptose er tidlegare blitt vist ved å behandle THP-1 celler med Leu-Leu-OMe [46]. Dette dødsstimuliet vart difor nytta for å inducere lysosomal apoptose i denne oppgåva. Staurosporin er ein svært mykje brukt induser av ”intrinsic”-apoptose, og er tidlegare blitt brukt i PMA-stimulerte THP-1 celler [41]. Litteraturen viser at celler behandla med denne dødsinduseren utviklar typiske morfologiske endringar som er karakteristiske for apoptose, samt aktivering av caspasar [39, 40, 61]. PAC-1 er ein heilt ny substans som er vist å ha aktiverande effekt på procaspase-3 og dødsinduserande effekt i celleforsøk [42]. Då denne substansen ikkje tidlegare har vore studert i THP-1 celler, var det av interesse å studere effekten i desse cellene. I oppgåva er det altså nytta tre dødstimulerande stoffer som aktiverer apoptose via ulike mekanismar. Ved å behandle THP-1 cellene med desse ulike stoffene og deretter studere lysosoma og aktiviteten til legumain og cathepsin B var lysosomalt bidrag i desse ulike dødsmechanismane kartlagt.

4.2 Val av metodar

I denne oppgåva er celleviabilitet målt med eit MTS-assay. Metabolsk aktive celler reduserer MTS til det farga produktet formazan, som vert kvantifisert ved absorbansmåling (490 nm). Denne metoden skal vere like påliteleg som den eldre MTT-metoden, men mindre arbeidskrevjande [52]. Likevel er det tidlegare vist svakheiter ved metoden som kan påverke utfallet av viabilitetsmålinga. Patel og medarbeidarar har vist at det etter inkubering i tre døgn i godt fukta inkubator er ein betydeleg forskjell i tap av væske (fordamping) mellom brønnane på eit 96-brønnars brett [62]. Auka væsketap vil gje høgare konsentrasjon av fargestoffet formazan, og dermed høgare absorbansmåling og dermed auka viabilitet.

I viabilitetsforsøka i denne oppgåva er det tilsatt MTS-reagens seinast eit døgn etter at cellene fekk nytt medium og aktuell behandling. Forsøksbrettet vart under heile forsøket oppbevart ved 37 °C og 5 % CO₂ i ein godt fukta inkubator, og absorbans vart målt ein time etter MTS-tilsetjinga. Skilnaden i fordamping frå brønnane på 96-brønnars brett vart vist etter tre gonger så lang inkuberingstid som den brukt i oppgåva, og det er difor lite sannsynleg at resultatata i våre viabilitetsforsøk har blitt påverka av denne problematikken. At denne type forsøk manglar korrigeringsfaktor for totalprotein kan heller vere eit problem, og det vart observert til tider stor variasjon i absorbansmåling. For å overkomme variasjon i forsøksoppsettet vart det difor nytta normaliserte data ved presentasjon av resultat frå

viabilitetsforsøk. Prøvane vart då uttrykt i prosent i forhold til kontrollen i kvart enkelt forsøk.

For å gje eit betre samanliknbart mål på enzymaktivitet, vart den spesifikke aktiviteten i kvar prøve korrigert for mengde totalprotein i prøven. Mengde totalprotein vart målt med eit kolorimetrisk proteinassay (BioRad) basert på Bradford. Fargestoffet coomassieblått endrar absorpsjonsmaksimum ved binding til protein, og ved hjelp av ei standardkurve vert då mengde totalprotein i prøven bestemt. I produsenten sin protokoll framgår det at absorbansmåling skal skje minst fem minutt etter tilsetjing av fargestoff-fortynninga, og at systemet er stabilt i inntil ein time etter tilsetjinga [63]. I proteinmålingar under arbeidet med denne oppgåva vart det observert variasjon i denne målemetoden. Metoden var følsam for nøyaktig kor mange minutt prøven med fargestoff vart ståande før absorbansmåling og kva type standardkurve som vart nytta. Dette gjer at bestemminga av mengde totalprotein i prøven kan varierer mellom parallelle forsøk. Dette kan vere ei mogleg forklaring på avvika som vart registrert i enzymaktivitetsdata mellom parallelle forsøk. Dette vil truleg likevel ikkje gje systematiske feil, då metoden fungerte fint innafor kvart enkelt forsøk og statistisk analyse vart utført på par av observasjonar (sjå seinare).

I biologisk forsøkssamanheng kan det inntreffe dag-til-dag variasjonar og det er difor naudsynt å gjere statistisk analyse for par av observasjonar. Ein slik analyse tek høgde for variasjonar i forsøksoppsettet. Då det i denne oppgåva er for få data til å teste for normalfordeling, vart den ikkje-parametrisk metoden Wilcoxon's test for parsamanlikning nytta [64]. Denne statistiske analysen krev minimum seks observasjonar for å eventuelt kunne vise signifikante forskjellar, og blei berre nytta der det var tilstrekkeleg med data. For resterande forsøk vart lineær regresjon nytta der det vart testa for om stigningstalet til regresjonskurva var signifikant forskjellig frå null. Lineær regresjon er ein forenkla statistisk metode som forutsetter lineære samanhengar i datamaterialet, noko som ikkje alltid er tilfellet i biologisk samanheng. Gjennomtenkt bruk av denne statistiske analysen vil likevel kunne gje nytting informasjon om trendar i datamaterialet.

I denne oppgåva er det altså ikkje utført alle ønska statistiske analyser fordi det på grunn av tidsaspektet ikkje var mogleg å genere tilstrekkeleg med data. For å trekke sikre konklusjonar ut frå resultata trengs det difor fleire studiar.

4.3 Val og effekt av proteaseinhibitorar

I denne oppgåva vart det nytta ulike proteaseinhibitorar for å kartleggje den enkelte cysteinproteasen sin effekt ved celledød. For å kartleggje om apoptosen var avhengig eller uavhengig av caspasar, vart inhibatoren Z-DEVD-cmk nytta. Denne inhibatoren er ein irreversibel hemmar av caspase-3 og vert mykje brukt for å studere rolla til effektorcaspasar i apoptosemekansimar [65]. I litteraturen vert spesifisiteten til slike effektive metylketon-caspasehemmarar diskutert, og det er vist at mange av dei i stor grad hemmar andre cysteinproteasar i tillegg til caspasane ved vanleg brukte inhibitor konsentrasjonar (50-100 μM) [65, 66]. I denne oppgåva vart det observert fullstendig hemming av både legumain- og cathepsin B-aktivitet etter tilsetjing av Z-DEVD-cmk (100 μM) til THP-1 cellelysat. Ingen effekt av inhibatoren på aktiviteten til desse lysosomale cysteinproteasane vart derimot registrert i PMA-stimulerte THP-1 celler. Årsaka til ulik grad av hemming i levande celler og cellelysat kan forklarast ved at denne inhibatoren er dårleg cellepermeabel [65]. Då dårleg permeabilitet kan vere eit problem med klorometylketon- (cmk-) inhibitorar i celleforsøk, vert ofte det betre permeable fluormetylketonet (fmk) av same inhibitor (Z-DEVD-fmk) nytta. Fmk-inhibitorar resulterer på den andre sida i større grad av uspesifikk hemming av til dømes cathepsiner. Fullstendig hemming av caspase-3-aktivitet samtidig som det ikkje vart observert effekt på legumain- og cathepsin B-aktivitet gjer at Z-DEVD-cmk ser ut til å fungere som ein selektiv caspase-3-inhibitor i PMA-stimulerte THP-1 celler.

For å hemme cathepsin B-aktivitet vart den spesifikke inhibatoren CA-074Me nytta. Denne cellepermeable proinhibitoren vert kløyva av esterasar intracellulært, og hemmaren CA-074 vert då aktiv [67]. I celleforsøk (fibroblaster) har inhibatoren vist 95 % hemming av cathepsin B og bare partiell hemming av andre cathepsiner [67]. I denne oppgåva vart fullstendig hemming av cathepsin B observert etter behandling av PMA-stimulerte THP-1 celler med CA-074Me. Overraskande vart det i tillegg observert total hemming av legumainaktivitet i dei same cellene. Ein slik hemmande effekt på legumainaktivitet er ikkje publisert tidlegare eller sett i andre cellelinjer (PC-12 og HEK-293) ved vår forskningsgruppe. Kromatografisk metode for analyse av molekylvekt har vidare vist at aktivt legumain i PMA-stimulerte THP-1 celler er mindre enn vanleg (29 kDa vs 36 kDa). Redusert molekylvekt og uvanleg hemmingsmønster med CA-074, E-64 og cystatin M-kondisjonert medium stiller spørsmål om legumain i PMA-stimulerte THP-1 celler har ei anna form enn i andre humane celler (Z.A. Ali, personleg meddeling). Mykje tydar i alle fall

på at CA-074Me ikkje er ein selektiv hemmar av cathepsin B i denne cellelinja. Funn i THP-1 celler etter bruk av denne inhibatoren er difor eit resultat av at både cathepsin B og legumain er hemma.

4.4 Effekt av Leu-Leu-OMe i PMA-stimulerte THP-1 celler

Leu-Leu-OMe vert teken opp i celler ved reseptormediert endocytose og polymerisert av den lysosomale proteasen DPPI. Polymeren (Leu-Leu)_n-OMe påverkar lysosommebrannen slik at den vert lekk og lysosomalt innhald kan lekke ut i cytosol [45]. Allereie etter behandling av PMA-stimulerte THP-1 celler med Leu-Leu-OMe (500 µM) i ein time, vart det i denne oppgåva observert lekkasje frå lysosoma ved mikroskopering. Desse observasjonane er tidlegare gjort i blant anna HL-60 celler ved tilsvarande Leu-Leu-OMe-konsentrasjon etter like lang behandlingstid [45]. Behandling med Leu-Leu-OMe førte vidare til ein rask doseavhengig nedgang i THP-1 cellene sin viabilitet, noko som òg er observert av Sawada og medarbeidarar i ustimulerte THP-1 celler [46]. Når lysosommembrannen vert lekk vil lysosomalt innhald lekke ut i cytosol og indusere celledød. Omfattande lysosomal ruptur vil gje massiv frisetjing frå lysosoma og cellene vil døye ved nekrose, medan selektiv permeabilitet vil resultere i avgrensa frisetjing til cytosol og dermed apoptotisk celledød [13].

Ved mikroskopering av THP-1 cellene etter behandling i ein time med Leu-Leu-OMe vart det observert teikn til bulking av cellemembranen og cellekjernane viste tendens til kromatinkondensering og kjernefragmentering. Andre har i tillegg vist DNA-fragmentering i tilsvarande celler etter korttidsbehandling (15 minutt) med Leu-Leu-OMe [44]. Dei morfologiske endringane etter behandling med dette lysosomotrope stoffet indikerer at THP-1 cellene døyr ved apoptose. Auka aktivitet av caspase-3 kort tid etter tilsetjing av Leu-Leu-OMe og auka celleviabilitet ved hemming av caspase-3 tydar vidare på at dette er ein caspaseavhengig apoptose. I litteraturen finn ein tilsvarande indikasjonar på at Leu-Leu-OMe fører til ein caspaseavhengig apoptose i andre cellelinjer [45].

Leu-Leu-OMe gjer altså lysosoma permeable i PMA-stimulerte THP-1 celler, og lekkasje av lysosomalt innhald resulterer i morfologiske endringar og aktivering av caspase-3. Kva som skjer etter at lysosoma er blitt permeable og før desse kjenneteikna ved caspaseavhengig apoptose vert observert, er framleis usikkert. For å studere om legumain og cathepsin B

deltak i prosessen, vart deira proteaseaktivitet målt etter at cellene var blitt behandla med Leu-Leu-OMe. Allereie etter ein time var både legumain- og cathepsin B-aktiviteten redusert med kring 90 %. Aktiviteten og stabiliteten til desse lysosomale proteasane er pH-avhengig. Legumain er mest aktiv ved pH rett over 6, men er samtidig svært ustabil ved denne pH-en [17]. Cathepsin B er mest aktiv ved pH mellom 7,5-8, men vert inaktivert og irreversibelt denaturert i dette pH-området [68, 69]. Lekkasje av legumain og cathepsin B ut i cytosol etter Leu-Leu-OMe-indusert lysosomal permeabilitet, vil difor truleg ende med pH-indusert inaktivering av proteasane. Dette fordi pH i cytosol er på kring 7,4.

Andre faktorar i cytosol vil òg kunne vere med på å hemme legumain- og cathepsin B-aktiviteten ved lysosomal lekkasje. Dei intracellulære proteaseinhibitorane cystatin A og B hemmer mellom anna cathepsin B i cytosol, men i liten grad legumain. Cystatin C, E/M og F er ekstracellulære cystatiner med hemmande effekt på legumain, og vil difor normalt ikkje ha hemmande effekt på proteasar i cytosol [37]. Anna arbeid ved vår forskingsgruppe har likevel vist at legumainaktivitet vert hemma i celler som har oppregulert uttrykk av cystatin M, eller som vert dyrka i medium med høgt innhald av cystatin M (Z.A. Ali, personleg meddeling). Sjølv om desse lysosomale proteasane likevel skulle vere aktive i cytosol for ei kort tid, indikerer viabilitetsdata der cathepsininhibitorane CA-074Me og E-64d er tilstades at desse proteasane ikkje har avgjerande rolle i dødsprosessen.

Leu-Leu-OMe induserer celledød etter å ha gjort lysosoma permeable i PMA-stimulerte THP-1 celler. Morfologiske endringar og aktivitetsmålingar indikerer at cellene døyr ved caspase-avhengig apoptose. Det har ikkje lykkast å påvise ei avgjerande rolle for legumain og cathepsin B i denne dødsprosessen, men at dei har ei deltakande rolle kan likevel ikkje utelukkast.

4.5 Staurosporinindusert celledød

Staurosporin er ein cellepermeabel hemmar av ei rekke ulike proteinkinasar [38]. Stoffet vert nytta i ulike cellelinjer for å indusere "intrinsic"-apoptose, og resulterer i mellom anna caspase-3-aktivering og morfologiske endringar i cellekjerna [39, 40]. I denne oppgåva vart det vist ein doseavhengig staurosporinindusert reduksjon i viabiliteten til PMA-stimulerte THP-1 celler. Mikroskopering av cellekjernane viste kjernefragmentering og kondensert kromatin. Vidare vart det observert redusert cellediameter, tendens til bulking av

cellemembranen, lause cellefragmenter og permeable cellemembranar. Andre kan bekrefte bulka cellemembran og redusert cellestorleik i tilsvarande forsøk med staurosporinbehandla PMA-stimulerte THP-1 celler [41]. Dei overnemnte observasjonane er typiske karakteristika for celler som døyr ved apoptose, med unntak av permeabel cellemembran. Tap av cellemembranintegritet tidleg i celledødsprosessen vert ofte nytta for å skilje mellom apoptose og nekrose. I *in vitro* forsøk der det ikkje er fagocyterande celler tilstades vil det likevel kunne observerast permeable cellemembranar seint i ein apoptoseprosess. Permeabel cellemembran etter eit elles apoptotisk dødsforlaup kan tyde på sekundær nekrose [6]. Mange kjenneteikn ved apoptose vart observert ved mikroskopering av cellene og den permeable cellemembranen er difor mest sannsynleg eit resultat av sekundær nekrose. Dei morfologiske endringane tydar på at staurosporin induserer apoptose i PMA-stimulerte THP-1 celler.

I litteraturen er det skriva om ei rekke ulike mekanismar for staurosporinindusert apoptose. Lysosoma og lysosomale proteasar har i fleire studiar ei sentral rolle. Bidere og medarbeidarar observerte lysosomal lekkasje av proteasar til cytosol før caspaseaktivering etter korttidsbehandling av aktiverte T-lymfocytar med staurosporin [70]. Det er tidlegare vist at avgrensa frisetjing av lysosomale proteasar kan finne stad utan at farging av lysosomer (LysoTracker) viser permeabilitet [70]. Manglande funn av permeable lysosomer ved fluorescensmikroskopering kan difor ikkje åleine nyttast som bevis for intakt lysosommembran. I PMA-stimulerte THP-1 celler vart det ikkje observert nokon nedgang i aktiviteten til dei lysosomale cysteinproteasane legumain og cathepsin B etter behandling med staurosporin. Som tidlegare diskutert vil lysosomale proteasar i cytosol med tida verte inaktiverte av pH eller cystatiner. Ingen funn av permeable lysosommembranar ved fluorescensmikroskopering og manglande proteaseinaktivering indikerer difor at staurosporin ikkje resulterer i stor grad av permeable lysosomer i PMA-stimulerte THP-1 celler.

Det vert vist i denne oppgåva kraftig auke i caspase-3-aktivitet kort tid etter tilsetjing av staurosporin til PMA-stimulerte THP-1 celler. Økt caspase-3-aktivitet etter staurosporinbehandling er tidlegare vist i fleire andre cellelinjer [39, 61]. Bruk av den spesifikke cathepsin B-inhibitoren CA-074Me i staurosporinbehandla THP-1 celler førte til ei endå kraftigare auke i caspase-3-aktivitet. Ved vår forskningsgruppe er det òg observert tilsvarande auke i caspase-3-aktivitet etter bruk av inhibitoren på staurosporinbehandla PC-

12 celler (R. Solberg, personleg meddeling) og etter behandling av THP-1 celler med Leu-Leu-OMe. Det er tidlegare vist at cathepsin B ikkje direkte kan aktivere caspasar [71], men det er ikkje tidlegare vist hemmande effekt av lysosomale cysteinproteasar på caspase-3-aktivitet. Aktiviteten til caspasane er i cella under streng kontroll. Caspase-3-aktiviteten vert hemma av proteiner i IAP-familien, og proteina i IAP-familien vert hemma ved mitokondriepermeabilisering [20]. Det kan tenkast at cathepsin B er involvert i oppretthaldinga av aktiviteten til desse apoptosehemmande proteina. Det trengs fleire studiar for å kunne bekrefte eventuelle effektar av cathepsin B på caspase-3. Auka aktivitet av caspase-3 etter hemminga av cathepsin B førte likevel ikkje til kraftigare reduksjon i THP-1 cellene sin viabilitet.

Apoptose kan vere avhengig eller uavhengig av caspasar. Staurosporinindusert apoptose i PMA-stimulerte THP-1 celler førte til auka caspase-3-aktivitet, men den spesifikke hemmaren Z-DEVD-cmk hadde ingen effekt på reduksjonen i celleviabilitet. Desse resultatane tydar på at staurosporinindusert celledød er caspase-uavhengig. Det er tidlegare vist i staurosporinbehandla U937 celler (monocyttar) at hemming av caspasar endrar dødsprosessen frå å vere berre apoptotisk til å variere mellom nekrotisk og apoptotisk celledød [61]. Caspasehemming i hepatocyttar gjev ingen reduksjon i staurosporinindusert celledød, men òg i desse cellene skjer det eit skifte frå apoptose til nekrose [39].

Funna i denne oppgåva indikerer at staurosporin induserer apoptose i PMA-stimulerte THP-1 celler. Behandlinga resulterer i aktivert caspase-3, men dødsprosessen er ikkje caspase-3-avhengig. Hemming av cathepsin B og legumain gjev endå kraftigare caspase-3 aktivering, men heller ikkje denne proteasen er avgjerande for celledød. Ut frå litteraturen er det rimeleg å anta at staurosporin kan indusere apoptose i THP-1 celler via ei rekke ulike mekanismar, og at celledøden kan skifte mellom apoptose og nekrose.

4.6 PAC-1-indusert celledød

Putt og medarbeidarar identifiserte i 2006 molekylet PAC-1 som dei hevda hadde direkte aktiverande effekt på procaspase-3 [42]. Kort tid etter vart det i litteraturen diskutert kor vidt dette molekylet faktisk er ein direkte procaspase-3-aktivator [72]. I ei rekke forsøk er det vist at behandling med PAC-1 resulterer i ei aktivering av caspase-3 før blant anna mitokondriestabilisering, kromatinkondensering, bulking av cellemembranen og celledød

[42]. I denne oppgåva vart det vist ein doseavhengig reduksjon i celleviabilitet i både PAC-1-behandla PMA-stimulerte THP-1 celler og i ustimulerte THP-1 celler. Tilsvarande er òg sett i PC-12 celler ved vår forskningsgruppe (R. Solberg, personleg meddeling). Det kan sjå ut som om PAC-1 er meir potent i THP-1 celler enn i PC-12 celler, noko som vert bekrefta av originalarbeidet der dei har gjort tilsvarande forsøk på samanliknbare cellelinjer. U937 celler (monocyttar tilsvarande ustimulerte THP-1 celler) har høgare konsentrasjon av procaspase-3 enn PC-12 celler, og kan difor vere meir sensitiv for PAC-1-indusert celledød [42]. Ved mikroskopering av behandla THP-1 celler vart det observert avrunda celler, der enkelte hadde permeable cellemembranar. Cellekjernane var like store som kjernane i ubehandla celler og enkelte hadde tendens til kondensert kromatin, men ingen kjernefragmentering vart observert. På bakgrunn av dei observasjonane som vart gjort ved mikroskopering er det vanskeleg å antyde type celledød.

Ei sikkerheitskappe ligg over aktiveringssetet til procaspase-3, og hindrar dermed at caspasen autoaktiverer. Den hypotetiske verkemekanismen for PAC-1 er at molekylet har kjemiske funksjonelle grupper som er positivt lada ved fysiologisk pH. Desse kan interagere med dei tre aspartata i sikkerheitskappa slik at denne vert broten, og autoaktivering av caspasen er då mogleg. I HL-60 celler vart caspase-3-aktivitet registrert kort tid etter tilsetjing av PAC-1. Denne aktiviteten vart observert før mitokondriestabilisering, noko som tydar på at dette skjer svært tidleg i dødsprosessen [42]. I denne oppgåva er det vist auke i caspase-3-aktivitet kort tid etter tilsetjing av PAC-1 i PMA-stimulerte THP-1 celler. I motsetnad til PC-12 celler der PAC-1-indusert toksisitet vart redusert ved generell hemming av caspaser [42], viste viabilitetsforsøk i THP-1 celler ingen effekt av spesifikk hemming av caspase-3-aktivitet. Caspaseavhengig død i PC-12 celler og caspaseuavhengig død i THP-1 celler kan tyde på at PAC-1 induserer død via ulike mekanismar i ulike cellelinjer. Dette vert bekrefta i litteraturen der det er observert nekroseliknande død etter PAC-1-behandling av celler som ikkje uttrykker procaspase-3 [72, 73].

Ein reduksjon i cathepsin B-aktivitet vert vist i denne oppgåva etter PAC-1-behandling av PMA-stimulerte THP-1 celler. Dette kan tyde på at lysosoma spelar ei rolle i mekanismen for PAC-1-indusert celledød. Som nemnt tidlegare, vil lysosomal ruptur og lekkasje av proteasar frå lysosom til cytosol ende med inaktivering av enzymaktivitet over tid. Ein avgrensa PAC-1-indusert permeabilisering av lysosommembranen kan difor forklare den observerte reduksjonen av cathepsin B-aktivitet. Tilsvarande effekt på legumainaktivitet vart

ikkje observert i denne cellelinja. Humant aktivt legumain er publisert til å ha noko større molekylmasse (36 kDa) enn cathepsin B (30 kDa) [33, 74]. Denne forskjellen i molekylmasse kan vere ei forklaring på at det ved ein eventuell avgrensa PAC-1-indusert lysosomal permeabilitet berre blir frisett cathepsin B til cytosol. Anna arbeid ved vår forskningsgruppe har nyleg vist at molekylvekta til legumain i PMA-stimulerte THP-1 celler er mindre (29 kDa) enn i andre humane cellelinjer (36 kDa), og mindre enn molekylvekta til cathepsin B (Z.A. Ali, personleg meddeling). Desse resultatata gjer det difor lite sannsynleg at det er forskjellen i storleiken til legumain og cathepsin B som er årsaka til den observerte skilnaden i proteaseaktivitet etter behandling med PAC-1. Cathepsin B spelar truleg likevel ikkje ei avgjerande rolle i mekanismen for PAC-1-indusert celledød i THP-1 celler, då inhibatoren CA-074Me ikkje hadde nokon effekt i viabilitetsforsøk. Signifikant PAC-1-indusert nedgang i legumainaktivitet vart som nemnt ikkje vist i THP-1 celler. Store variasjonar i aktivitetmålingane gjer at ein reduksjon likevel ikkje kan utelukkast, og fleire studiar trengs for å kartleggje dette betre.

Ved vår forskningsgruppe er det gjort tilsvarande forsøk på PAC-1-behandla PC-12 celler (R. Solberg, personleg meddeling). I denne cellelinja vart det funne ein tydeleg PAC-1-indusert reduksjon i både legumain- og cathepsin B-aktivitet. Introduksjon av spesifikk cathepsin B-inhibitor (CA-074Me) i PAC-1-behandla celler gav auka celleviabilitet. Desse resultatata indikerer at den lysosomale proteasen cathepsin B spelar ei sentral rolle i PAC-1-indusert celledød i PC-12 celler. Det er tidlegare vist at PAC-1 ikkje kan aktivere procaspase-3 i cellelysate, noko som burde kunne forventas med tanke på verkemekanismen for molekylet [72]. Desse observasjonane perikar på at lysosomalt bidrag er nødvendig for PAC-1-indusert aktivering av caspase-3 og celledød.

Ved samanlikning av PAC-1-induserte effektar i THP-1 og PC-12 celler er det store forskjellar. PAC-1 er meir potent til å indusere celledød i THP-1 celler enn i PC-12 celler, medan caspase-3-aktiviteten er kraftigast i PC-12 celler. Hemming av denne caspasen i THP-1 celler har ingen effekt på PAC-1-indusert celledød, mens det i PC-12 celler gjev auka celledød. Vidare kan det ved å samanlikne resultatater frå vår forskningsgruppe med resultatater presentert av Putt og medarbeidarar visast store variasjonar mellom ulike forskingsmiljø [42]. I originalartikkelen vert det i PC-12 celler vist 50 % død etter inkubering i tre døgn med 1,25 μ M PAC-1. I vår forskningsgruppe vart det funne 20 % død etter behandling i eit døgn med konsentrasjonen 100 μ M PAC-1 i PC-12 celler. Vidare vart det funne motsette

resultat på PAC-1-indusert toksisitet ved hemming av caspasar. I litteraturen vert det som nevnt tidlegare diskutert kor vidt PAC-1 kan aktivere procaspase-3. Den sterke samanhengen mellom auka konsentrasjon av PAC-1 og auka aktivitet av caspase-3 publisert av Putt og medarbeidarar [42] har heller ikkje latt seg reprodusera [72]. Alle desse variasjonane tydar på at det er ulik sensitivitet for PAC-1-indusert død i ulike cellelinjer og at dødsmechanismane kan variere. I tillegg kan det sjå ut som om at måling av PAC-1-induserte effektar er sensitive for forsøksoppsett og målemetode, noko som kan forklare variasjonar mellom ulike laboratorium.

PAC-1 induserer celledød i PMA-stimulerte THP-1 celler. Auka caspase-3-aktivitet vart observert, men det ser likevel ikkje ut til at dette er ein caspaseavhengig død. Effekten på cathepsin B (og legumain) indikerer at lysosoma deltek i PAC-1-indusert celledød, men heller ikkje desse er avgjerande for død. Kor vidt PAC-1 resulterer i apoptose eller nekrose i THP-1 celler kan vanskelig bestemast ut frå resultata i denne oppgåva.

4.7 Lysosomale proteasar i apoptose

Proteasar stasjonert i lysosoma bryt ned ulike makromolekyler og deltek på den måten i celledødsforma autofagi eller ved fagocytose av apoptotiske lekamar [1]. For at lysosomale proteasar skal kunne delta i den tidlege fasen i apoptoseprosessen er frisetjing til cytosol blitt vist som ein avgjerande faktor [13]. I denne oppgåva er det vist at det er stort sannsyn for at dei lysosomale proteasane legumain og cathepsin B lekk ut i cytosol etter behandling av PMA-stimulerte THP-1 celler med Leu-Leu-OMe. Få data tydar på at desse proteasane lekk ut i cytosol etter behandling med PAC-1 eller staurosporin, men det kan likevel ikkje utelukkast som nemnt tidlegare. Lekkasje av lysosomale proteasar til cytosol kan observerast sjølv om lysosommembranen framstår som intakt [13, 70].

På tross av ugunstig pH og uttrykk av cystatiner, er det tidlegare blitt vist at lysosomale proteasar kan bli verande aktive i alt frå minutt til timar i cytosol [14]. Det har tidlegare blitt vist at cathepsin B sett fri til cytosol kan indusere kløyving av det proapoptotiske proteinet Bid, som igjen kan påverke mitokondrieporabilitet og cytokromfrisetjing [75]. Cathepsin B har i litteraturen fått ei avgjerande rolle i apoptose indusert av ulike stimuli, og denne proteasen vart difor nytta som ein kontroll i denne oppgåva. Proteasar i legumainfamilien har til no berre fått ei rolle i programmert celledød i planter [76]. Legumain kløyvar substrat

spesifikt karboksyterminalt for aminosyra asparagin [23]. Ved låg pH ($\text{pH} < 4,5$) er det likevel vist at legumain kan kløyve substrat ved aminosyra aspartat, og dermed få ein caspaseliknande substratspesifisitet [33]. Dette skjer truleg fordi det ved sur pH skjer ei protonering av sidekjeda i aspartat slik at denne vert lik sidekjeda i asparagin. Den store likskapen i aminosyresekvens og struktur mellom legumain og caspasar [32], samt moglegheita til å kunne ha liknande substratspesifisitet, gjer det svært sannsynleg at òg legumain kan delta i apoptose. Det har til no ikkje blitt identifisert ei rolle for legumain i mammalske celler som døyr ved denne forma for celledød, og resultatane i denne oppgåva kan heller ikkje gje eit svar på dette, men det trengs fleire studiar.

5. Kjelder

1. Galluzzi, L., et al., *Cell death modalities: classification and pathophysiological implications*. Cell Death and Differentiation, 2007. **14**(7): p. 1237-1243.
2. Lockshin, R.A. and Z. Zakeri, *Cell death in health and disease*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2007. **11**(6): p. 1214-1224.
3. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death*. Cell Death and Differentiation, 2005. **12**: p. 1463-1467.
4. Elmore, S., *Apoptosis: A review of programmed cell death*. Toxicologic Pathology, 2007. **35**(4): p. 495-516.
5. Bröker, L.E., F.A.E. Kruyt, and G. Giaccone, *Cell Death Independent of Caspases: A Review*. Clinical Cancer Research, 2005. **11**(9): p. 3155-3162.
6. Cummings, B.S. and R.G. Schnellmann, *Measurement of Cell Death in Mammalian Cells*. Current Protocols in Pharmacology, 2004(12.8).
7. Kerr, J.F.R., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis - Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics*. British Journal of Cancer, 1972. **26**(4): p. 239-&.
8. Jin, Z.Y. and W.S. El-Deiry, *Overview of cell death signaling pathways*. Cancer Biology & Therapy, 2005. **4**(2): p. 139-163.
9. Turk, B. and V. Stoka, *Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins*. Febs Letters, 2007. **581**(15): p. 2761-2767.
10. Sharpe, J.C., D. Arnoult, and R.J. Youle, *Control of mitochondrial permeability by Bcl-2 family members*. Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2004. **1644**(2-3): p. 107-113.
11. Johansson, A.C., et al., *Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine*. Cell Death and Differentiation, 2003. **10**(11): p. 1253-1259.
12. Nelson, D.L. and M.M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3 ed. 2000, New York: Worth Publishers.
13. Kroemer, G. and M. Jäätelä, *Lysosomes and autophagy in cell death control*. Nature Reviews Cancer, 2005. **5**(11): p. 886-897.
14. Guicciardi, M.E., M. Leist, and G.J. Gores, *Lysosomes in cell death*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2881-2890.
15. Chwieralski, C.E., T. Welte, and F. Bühling, *Cathepsin-regulated apoptosis*. Apoptosis, 2006. **11**(2): p. 143-149.
16. Rawlings, N.D., F.R. Morton, and A.J. Barrett, *MEROPS: the peptidase database*. 2008.
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. Barrett, A.J. and N.D. Rawlings, *Evolutionary lines of cysteine peptidases*. Biological Chemistry, 2001. **382**(5): p. 727-733.
19. Berdowska, I., *Cysteine proteases as disease markers*. Clinica Chimica Acta, 2004. **342**(1-2): p. 41-69.
20. Lavrik, I.N., A. Golks, and P.H. Kramer, *Caspases: pharmacological manipulation of cell death*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(10): p. 2665-2672.
21. Cornelis, S., et al., *Inflammatory caspases: Targets for novel therapies*. Current Pharmaceutical Design, 2007. **13**(4): p. 367-385.
22. Shutov, A.D. and I.A. Vaintraub, *Degradation of Storage Proteins in Germinating-Seeds*. Phytochemistry, 1987. **26**(6): p. 1557-1566.

23. Kembhavi, A.A., et al., *The 2 Cysteine Endopeptidases of Legume Seeds - Purification and Characterization by Use of Specific Fluorometric Assays*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1993. **303**(2): p. 208-213.
24. Sajid, M. and J.H. McKerrow, *Cysteine proteases of parasitic organisms (vol 120, pg 1, 2002)*. Molecular and Biochemical Parasitology, 2002. **121**(1): p. 159-159.
25. Liu, C., et al., *Overexpression of legumain in tumors is significant for invasion/metastasis and a candidate enzymatic target for prodrug therapy*. Cancer Research, 2003. **63**(11): p. 2957-2964.
26. Chen, J.M., et al., *Cloning and expression of mouse legumain, a lysosomal endopeptidase*. Biochemical Journal, 1998. **335**: p. 111-117.
27. Choi, S.J., et al., *Identification of human asparaginyl endopeptidase (legumain) as an inhibitor of osteoclast formation and bone resorption*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(39): p. 27747-27753.
28. Watts, C., et al., *Asparaginyl endopeptidase: case history of a class II MHC compartment protease*. Immunological Reviews, 2005. **207**: p. 218-228.
29. Zeeuwen, P., et al., *Evidence that unrestricted legumain activity is involved in disturbed epidermal cornification in cystatin M/E deficient mice*. Human Molecular Genetics, 2004. **13**(10): p. 1069-1079.
30. 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.
31. Almløf, M., et al., *Legumain expression and activity increases in the differentiating THP-1 cells*, Farmasøytisk institutt, universitetet i Oslo: oslo.
32. Chen, J.-M., et al., *Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases*. Febs Letters, 1998. **441**(3): p. 361-365.
33. 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.
34. 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.
35. Shirahama-Noda, K., et al., *Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(35): p. 33194-33199.
36. Chen, J.M., et al., *Activation of progelatinase A by mammalian legumain, a recently discovered cysteine proteinase*. Biological Chemistry, 2001. **382**(5): p. 777-783.
37. Abrahamson, M., M. Alvarez-Fernandez, and C.M. Nathanson, *Cystatins*, in *Proteases and the Regulation of Biological Processes*. 2003. p. 179-199.
38. Proteinkinase.de, *Staurosporine*. 2006.
39. Feng, G.P. and N. Kaplowitz, *Mechanism of staurosporine-induced apoptosis in murine hepatocytes*. American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 2002. **282**(5): p. G825-G834.
40. Zhang, B.F., et al., *Staurosporine induces apoptosis in NG108-15 cells*. Acta Pharmacologica Sinica, 2003. **24**(7): p. 663-669.
41. Voth, D.E., D. Howe, and R.A. Heinzen, *Coxiella burnetii inhibits apoptosis in human THP-1 cells and monkey primary alveolar macrophages*. Infection and Immunity, 2007. **75**(9): p. 4263-4271.
42. Putt, K.S., et al., *Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy*. Nature Chemical Biology, 2006. **2**(10): p. 543-550.
43. Thiele, D.L. and P.E. Lipsky, *The Action of Leucyl-Leucine Methyl-Ester on Cytotoxic Lymphocytes Requires Uptake by a Novel Dipeptide-Specific Facilitated Transport-*

- System and Dipeptidyl Peptidase-I Mediated Conversion to Membranolytic Products.* Journal of Experimental Medicine, 1990. **172**(1): p. 183-194.
44. Thiele, D.L. and P.E. Lipsky, *Apoptosis Is Induced in Cells with Cytolytic Potential by L-Leucyl-L-Leucine Methyl-Ester.* Journal of Immunology, 1992. **148**(12): p. 3950-3957.
 45. Uchimoto, T., et al., *Mechanism of apoptosis induced by a lysosomotropic agent, L-Leucyl-L-leucine methyl ester.* Apoptosis, 1999. **4**(5): p. 357-362.
 46. Sawada, T., et al., *Inhibition of L-leucine methyl ester mediated killing of THP-1, a human monocytic cell line, by a new anti-inflammatory drug, T614.* Immunopharmacology, 2000. **49**(3): p. 285-294.
 47. Promochem, L. *Cell Biology TIB-202.* Product Description 2006 [cited 2007 14.08]; Available from: <http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm>.
 48. Bradford, M.M., *Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding.* Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
 49. 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.
 50. Barrett, A.J. and H. Kirschke, *Cathepsin-B, Cathepsin-H, and Cathepsin-L.* Methods in Enzymology, 1981. **80**: p. 535-561.
 51. Werle, B., et al., *Assessment of Cathepsin-L Activity by Use of the Inhibitor Ca-074 Compared to Cathepsin-B Activity in Human Hung Tumor-Tissue.* Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 1995. **376**(3): p. 157-164.
 52. Promega. *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay.* Technical Bulletin 2005 [cited 2008 20.08]; Available from: <http://www.promega.com/tbs/tb245/tb245.pdf>.
 53. Molecular_Probes. *Hoechst Stains.* Manuals & Product Inserts 2005 [cited 2008 28.02]; Available from: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp21486.pdf>.
 54. Molecular_Probes. *Propidium Iodide Nucleic Acid Stain.* Manuals & Product Inserts 2006 [cited 2008 28.03]; Available from: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp01304.pdf>.
 55. Molecular_Probes. *LysoTracker and LysoSensor Probes.* Manuals & Product Inserts 2007 [cited 2008 28.02]; Available from: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07525.pdf>.
 56. Auwerx, J., *The Human Leukemia-Cell Line, Thp-1 - a Multifaceted Model for the Study of Monocyte-Macrophage Differentiation.* Experientia, 1991. **47**(1): p. 22-31.
 57. Naito, M., *Macrophage differentiation and function in health and disease.* Pathology International, 2008. **58**(3): p. 143-155.
 58. Tabas, I., *Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis - The importance of lesion stage and phagocytic efficiency.* Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2005. **25**(11): p. 2255-2264.
 59. Foghsgaard, L., et al., *Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor.* Journal of Cell Biology, 2001. **153**(5): p. 999-1009.
 60. Lee, S.Y., R.P. Cherla, and V.L. Tesh, *Simultaneous induction of apoptotic and survival signaling pathways in macrophage-like THP-1 cells by Shiga toxin 1.* Infection and Immunity, 2007. **75**(3): p. 1291-1302.
 61. Imre, G., et al., *Cystein cathepsin and Hsp90 activities determine the balance between apoptotic and necrotic cell death pathways in caspase-compromised U937 cells.* Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2007. **1773**(10): p. 1546-1557.
 62. Patel, M.I., R. Tuckerman, and Q.H. Dong, *A pitfall of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium (MTS) assay due to*

- evaporation in wells on the edge of a 96 well plate*. Biotechnology Letters, 2005. **27**(11): p. 805-808.
63. Laboratories, B.-R. *Bio-Rad Protein Assay*. 1994 [cited 2008 30.05]; Available from: <http://www.technomedica.com/publikazii/belur/Bio-Rad.pdf>.
 64. Laake, P. and E. Skovlund, eds. *Statistisk analyse av kontinuerlige data*. 1 ed. Forskningsmetode i medisin og biofag, ed. H. Benestad and P. Laake. 2005, Gyldendal Akademisk: Oslo.
 65. Rozman-Pungercar, J., et al., *Inhibition of papain-like cysteine proteases and legumain by caspase-specific inhibitors: when reaction mechanism is more important than specificity*. Cell Death and Differentiation, 2003. **10**(8): p. 881-888.
 66. Schotte, P., et al., *Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases*. Febs Letters, 1999. **442**(1): p. 117-121.
 67. Buttle, D.J., et al., *Ca074 Methyl-Ester - a Proinhibitor for Intracellular Cathepsin-B*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1992. **299**(2): p. 377-380.
 68. Khouri, H.E., et al., *A Model to Explain the Ph-Dependent Specificity of Cathepsin B-Catalyzed Hydrolyzes*. Biochemical Journal, 1991. **275**: p. 751-757.
 69. Turk, B., et al., *Human Cathepsin-B Is a Metastable Enzyme Stabilized by Specific Ionic Interactions Associated with the Active-Site*. Biochemistry, 1994. **33**(49): p. 14800-14806.
 70. Bidere, N., et al., *Cathepsin D triggers bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(33): p. 31401-31411.
 71. Stoka, V., et al., *Lysosomal Protease Pathways to Apoptosis - Cleavage of Bid, not procaspases, is the most likely route*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(5): p. 3149-3157.
 72. Denault, J.-B., et al., *Small molecules not direct activators of caspases*. Nature Chemical Biology, 2007. **3**(9): p. 519.
 73. Hergenrother, P.J., K.S. Putt, and J.S. Sandhorst, *Small molecules not direct activators of caspases - Reply*. Nature Chemical Biology, 2007. **3**(9): p. 520-520.
 74. Moin, K., et al., *Human Tumor Cathepsin-B - Comparison with Normal Liver Cathepsin-B*. Biochemical Journal, 1992. **285**: p. 427-434.
 75. Cirman, T., et al., *Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(5): p. 3578-3587.
 76. Piszczek, E. and W. Gutman, *Caspase-like proteases and their role in programmed cell death in plants*. Acta Physiologiae Plantarum, 2007. **29**(5): p. 391-398.

Vedlegg

Bufferar og løysningar

THP-1 dyrkingsmedium

RPMI 1640 medium med 2 mM glutamine og 1,5 g/l Na bikarbonat	500 ml
Glukose (10 %)	22,5 ml
HEPES 1 M	5 ml
Natriumpyrovat 100 med mer	5 ml
2-merkaptoetanol 14,3 M	1,7 µl
FBS	50 ml
Penicillin 10 000 U/ml + streptomycin 10 mg/ml	5 ml
Fungizone (amphotericin B) 250 µg/ml	5 ml

1 x PBS (fostatbuffra saltvatn)

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

Lysisbuffer

Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O	100 mM
Na ₂ (EDTA)	1 mM
n-oktyl-β-D-glukopyranosid	1 % (w/v)
pH	5,8

Legumainassaybuffer

C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O	8,3005 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	21,537 g
Na ₂ EDTA	0,3722 g
CHAPS	0,1 g
pH	5,8

	Vedlegg
dH ₂ O	Ad 1,0 l
DTT (tilsett rett før bruk)	1 mM
<i>Legumainsubstrat (34 µM)</i>	
Z-Ala-Ala-Asn-NHMec (2,5 mM i DMSO)	0,2 ml
Legumainassaybuffer	14,5 ml
<i>Cathepsin B aktiveringsbuffer</i>	
Eddiksyre 100 %	5,75 ml
Na ₂ EDTA	0,745 g
pH	5,5
dH ₂ O	Ad 0,5 l
DTT (tilsett rett før bruk)	8 mM
<i>Cathepsin B-substrat (68 µM)</i>	
Z-Arg-Arg-AMC (1 mM i DMSO)	0,68 ml
dH ₂ O	Ad 10 ml
<i>Caspasebuffer</i>	
HEPES	2,38 g
NaCl	1,688 g
EDTA	7,44 mg
CHAPS	0,2 g
Glyserol	20 ml
pH	7,4
dH ₂ O	Ad 200 ml
DTT (tilsett rett før bruk)	10 mM
<i>Caspase-3-substrat</i>	
Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AMC (Ac-DEVD-AMC)	0,68 ml
Caspasebuffer	Ad 10 ml