

VLOGA CISTEINSKE PEPTIDAZE KATEPSINA X PRI POLARIZACIJI CELIC MIKROGLIJE

ROLE OF CYSTEINE PEPTIDASE CATHEPSIN X IN MICROGLIA POLARIZATION

AVTORICI / AUTHORS:

Klara Kovačič, mag. farm.¹

izr. prof. dr. Anja Pišlar, mag. farm.²

¹ Lekarna Vir, Čufarjeva ulica 23, 1230 Domžale

² Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
Aškerčeva 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: anja.pislar@ffa.uni-lj.si



POVZETEK

Celice mikroglije so glialne celice centralnega živčnega sistema, podobne makrofagom, ki vzdržujejo homeostazo možganov in so ene izmed najpomembnejših prirojenih celic imunskega sistema centralnega živčevja. Pod vplivom patoloških in imunoloških dražljajev pride do polarizacije mikroglije v pro-vnetni fenotip M1, ki spodbuja procese nevrotanja, ali proti-vnetni fenotip M2, ki izkazuje zaščitno delovanje v možganih. Cisteinski katepsini, ki jih sprošča polarizirana mikroglija fenotipa M1, so vse bolj prepoznani kot pomembni vnetni dejavniki, ki sprožijo signalne poti, kar dodatno vzpodbudi vnetne procese in vodi v nevrodegeneracijo. Med njimi je cisteinska peptidaza katepsin X, ki je že bila prepoznana kot patogeni dejavnik nevrodegeneracije, povzročene z vnetjem, vendar je njena vloga pri polarizaciji mikroglije v posamezen fenotip nepoznana. Rezultati raziskav nakazujejo, da ima katepsin X pomembno vlogo pri polarizaciji mikroglije v pro-vnetni fenotip M1 oziroma proti-vnetni fenotip M2 in predstavlja potencialno terapevtsko tarčo za preprečevanje in zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni, povezanih s prekomernim vnetjem.

KLJUČNE BESEDE:

katepsin X, mikroglija, polarizacija, vnetje, zaviralec katepsina X

ABSTRACT

Microglia are glial cells of the central nervous system, similar to macrophages, which maintain homeostasis of the brain and are among the most important cells of the innate immune system of the central nervous system. Under the influence of pathological and immunological stimuli, a polarization of microglia occurs, either into the pro-inflammatory phenotype M1, which promotes the processes of neuroinflammation, or into the anti-inflammatory phenotype M2, which exhibits a protective function in the brain. Cysteine cathepsins, which are released by polarized microglia of the M1 phenotype are increasingly recognized as important inflammatory factors that trigger signaling pathways that further promote inflammatory processes and lead to neurodegeneration. These include the cysteine peptidase cathepsin X, which has already



been recognized as a pathogenic factor in inflammation-induced neurodegeneration, but whose role in the polarization of microglia into a specific phenotype is still unknown. The obtained results suggest that cathepsin X plays an important role in the polarization of microglia into the pro-inflammatory M1 and the anti-inflammatory M2 phenotype and thus represents a potential therapeutic target for the prevention and treatment of neurodegenerative diseases associated with excessive inflammation.

KEY WORDS:

cathepsin X, cathepsin X inhibitor, inflammation, microglia, polarization

1 UVOD

Celice mikroglije so ene izmed najpomembnejših prirojenih celic imunskega sistema in so porazdeljene po celotnih možganih ter so prve v vrsti pri odzivu na patološke poškodbe (1). V zreli obliki pridobijo specifičen razvejan morfološki fenotip, kjer so v tako imenovanem mirujočem stanju (2). Kot take opravljajo številne pomembne naloge v povezavi z ohranjanjem tkivne homeostaze, vključno z odstranjevanjem toksičnih snovi s fagocitozo, imunskim nadzorom in olajšanjem prenosa informacij preko prenašalcev v nevronske sinapse. Različni fiziološki in patološki dražljaji spodbudijo aktivacijo mikroglije, pri čemer celice mikroglije iz stanja mirovanja polarizirajo v dva fenotipa, fenotip M1 in M2, odvisno od vrste stimulacije (3).

Polarizirana mikroglija fenotipa M1, za katero so značilne ameboidna oblika, visoka mobilnost in močna fagocitna aktivnost, povzroči sproščanje več pro-vnetnih citokinov kot sta tumorje nekrotizirajoči dejavnik α (TNF- α) in interleukin 6 (IL-6) ter reaktivnih kisikovih zvrsti, kemokinov in izražanje inducibilne sintaze dušikovega oksida za nastajanje dušikovega oksida (NO) (4, 5, 6). Na ta način aktivirana mikroglija poskrbi za uničenje patogena in polarizacijo celic T, ki vzpostavijo prilagodljiv imunski sistem (7). Za spodbujanje polarizacije mikroglije v fenotip M1 se tako v pogojih *in vitro* kot tudi *in vivo* uporabljajo različni dražljaji, med drugim interferon γ (IFN- γ) in lipopolisaharid (LPS) (5).

Polarizirana mikroglija fenotipa M2, za katero so značilna tanka in razvejana celična telesa celic mikroglije, pa poveča

izražanje več proti-vnetnih citokinov, med njimi transformirajočega rastnega dejavnika β , interleukinov IL-4 in IL-13, arginaze-1 in membranskega označevalca pripadnosti CD206 (angl. *cluster of differentiation*). S tem izraža svojo vlogo pri alergijskem odzivu, izražanju odstranjevalnih receptorjev (angl. *scavenger receptors*) za fagocitozo, zmanjšanju vnetnih celic, preoblikovanju tkiva in angiogenezi (6, 7). Za spodbujanje polarizacije celic mikroglije v fenotip M2 se uporabljata citokina IL-4 in IL-13. Z nastajanjem proti-vnetnih dejavnikov in z omejevanjem imunskega odziva na patogene mikroglija fenotipa M2 učinkovito zmanjšuje vnetni odziv v centralnem živčnem sistemu ter na ta način prepreči poškodbo tkiva (8, 9).

Nevrovnetje v osnovi predstavlja obrambni mehanizem, ki ščiti možgane pred različnimi dejavniki, kljub temu pa so lahko učinki nevrovnetja na nevrone tako koristni kot tudi škodljivi. Ponavljajoči se vnetni odzivi so škodljivi in vodijo v aktivacijo celic mikroglije v pro-vnetni fenotip M1, pri čemer aktivirana mikroglija predstavlja stalen vir vnetnih citokinov in ostalih vnetnih dejavnikov, ki spodbujajo progresiven propad nevronov, ki vodi v nevrodegenerativna stanja. Poleg omenjenih vnetnih dejavnikov lahko aktivirana mikroglija prekomerno izraža in izloča tudi lizosomske peptidaze, predvsem katepsine, ki so prepoznani kot pomembni patogeni dejavniki vnetnih procesov tekom degenerativnih sprememb v centralnem živčnem sistemu (6).

Lizosomske peptidaze so hidrolitični encimi, ki katalizirajo razgradnjo proteinov. Glede na mesto hidrolize peptidne vezi jih lahko razdelimo na endopeptidaze in eksopeptidaze. Večina jih deluje kot endopeptidaze, ki cepijo peptidne vezi znotraj polipeptidne verige, medtem ko jih le malo deluje kot eksopeptidaze, ki cepijo polipeptidne verige na N- ali C-koncu. Peptidaze glede na katalitično skupino na aktivnem mestu delimo na serinske, cisteinske, aspartatne, glutamatne, asparaginske, treoninske, metalopeptidaze in peptidaze mešanega tipa (6, 10).

Najbolj obsežno skupino lizosomskih peptidaz predstavljajo cisteinske peptidaze, v katero spada 11 katepsinov (katepsini B, C, F, H, K, L, O, S, V, X in W), ki so zelo razširjeni med živimi organizmi. Večina cisteinskih katepsinov (F, K, L, O, S in V) deluje kot endopeptidaze, katepsina C in X delujeta kot eksopeptidazi, medtem ko katepsina B in H izkazujeta tako endopeptidazno kot tudi eksopeptidazno aktivnost. Izražanje cisteinskih katepsinov je odvisno od razporeditve v tkivih in njihove biološke funkcije. Katepsin X deluje kot karboksipeptidaza in se predominantno izraža v imunskih celicah, kot so makrofagi, dendritične celice, limfociti B in naravne celice ubijalke, pokazano pa je bilo tudi njegovo izražanje v mišjih možganskih celicah, predvsem v

nevronih, podvrženih procesu staranja, in celicah mikroglije (6, 10). Višje ravni katepsina X so povezane z različnimi boleznimi, kot so rak, vnetne bolezni, tuberkuloza in z vnetjem povezane nevrodegenerativne spremembe (11). Povišano izražanje katepsina X je bilo pokazano v poškodovanih dopaminergičnih nevronih na celičnem modelu *in vitro* kot tudi *in vivo* na hemiparkinsonskem modelu Parkinsonove bolezni. Hkrati so na vnetnem modelu *in vivo* pokazali povišano izražanje katepsina X v celicah mikroglije na strani lezije v možganih podgan (12, 13, 14). Znatno povečano izločanje katepsina X iz celic mikroglije so opazili kot odgovor na vnetni dražljaj, ki ga povzroči LPS (15, 16). Pomembnost katepsina X pri nevrovnetju je bila nadalje dokazana s pomočjo ireverzibilnega zaviralca katepsina X, AMS36, ki je zavrl sintezo pro-vnetnih molekul in oslabil sproščanje citokinov iz aktivirane mikroglije (16, 17). Kljub temu vloga katepsina X pri nevrovnetju in osnovni mehanizem delovanja do danes ostajata nepojasnjena. Katepsinu X pripisujejo vse pomembnejšo vlogo pri degenerativnih procesih, povezanih z vnetjem, vendar pa njegova natančna vloga pri polarizaciji mikroglije še ni znana.

Namen raziskave je opredeliti raven izražanja in aktivnosti katepsina X v posameznem fenotipu aktivirane mikroglije ter opredeliti njegovo vlogo pri polarizaciji mikroglije v pro-vnetni fenotip M1 oziroma proti-vnetni fenotip M2.

2 METODE

2.1 DELO S CELIČNO LINIJO BV2

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali mišjo adherentno celično linijo BV2 (darilo prof. dr. Biljane Božić Nedeljković, Univerza v Beogradu, Srbija), gojeno v gojišču za celične kulture aDMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific) (angl. *advanced Dulbecco's modified eagle medium*), z izraženimi lastnostmi mikroglije, ki je bila izolirana iz postnatalnih možganov laboratorijskih miši C57BL/6 (18). Celice BV2 smo najprej nacepili na plošče s 6 vdolbinicami z ustrežno gostoto ($2 \times 10^5/1,5$ mL) in jih čez noč inkubirali, da so se pritrdile na podlago. Celice smo naslednji dan stimulirali z reagenti LPS (Sigma-Aldrich) (1 $\mu\text{g/mL}$), IFN- γ (BioLegend) (1 $\mu\text{g/mL}$), IL-4 (BioLegend) (40 ng/mL) in IL-13 (BioLegend) (40 ng/mL) v brez-serumskem gojišču. Za kontrolo smo celice gojili v brez-serumskem gojišču brez dodanih reagentov. V primeru vrednotenja vpliva zaviranja

katepsina X smo celice 1 h pred stimulacijo z reagenti predhodno obdelali z zaviralcem katepsina X AMS36 (10 μM) (Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo) v brez-serumskem gojišču (12). Kot ustrezno kontrolo zaviralcu smo v enakem deležu uporabili dimetilsulfoksid (Sigma-Aldrich). Po stimulaciji smo celice uporabili za nadaljnje poskuse. Stimulirane celice BV2 smo po 24 h opazovali in slikali z invertnim mikroskopom EVOS XL Core (Olympus) v posameznem vidnem polju pri 20-kratni povečavi. Po opazovanju smo odvzeli supernatante celic mikroglije ter iz njih pripravili celične lizate, ki smo jih uporabili za nadaljnje poskuse. Za določanje koncentracije proteinov v celičnih lizatih smo uporabili metodo DC (angl. *detergent compatible*; združljivo z detergentom), ki temelji na reakciji proteinov z bazično raztopino bakrovega tartrata in s Folinovim reagentom. Najprej pride do reakcije med proteini in bakrom pri bazičnem pH, po kateri sledi redukcija Folinovega reagenta, ki jo povzroči nastala spojina v prvi stopnji. Pride do modrega obarvanja produkta, ki je posledica aminokislin tirozina in triptofana, z absorpcijskim maksimumom pri 750 nm (19). Koncentracijo proteinov v celičnih lizatih smo določili po navodilih proizvajalca kompleta reagentov DC (Bio-Rad), pri čemer smo absorbanco izmerili z avtomatskim čitalcem mikrotitrskih plošč Safire² (Tecan) pri valovni dolžini 750 nm. Koncentracije celokupnih proteinov v vzorcih smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo izrisali iz izmerjenih povprečnih absorbanc standardov govejega serumskega albumina (BSA) (Sigma-Aldrich).

2.2 VREDNOTENJE POLARIZACIJE CELIC BV2 V FENOTIP M1/M2

Polarizacijo mikroglije v posamezen fenotip smo preverili z določevanjem označevalca aktivirane mikroglije fenotipa M1 in M2. S testom po Griessu smo določali količino NO v supernatantih stimuliranih celic BV2 posredno preko merjenja nitrita (NO_2^-), ki je značilen za mikroglijo fenotipa M1. Test temelji na reakciji diazotiranja, z uporabo sulfanilamida in N-1-naftiletilendiamin dihidroklorida (Promega) v kislih pogojih, pri kateri pride do nastanka obarvane azo spojine, katere absorbanco merimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 550 nm (20). Vrednosti NO v supernatantih celic mikroglije smo določili po navodilih proizvajalca (Promega). Koncentracije NO v supernatantih smo izračunali s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo izrisali iz izmerjenih povprečnih absorbanc standardov.

Za mikroglijo fenotipa M2 je značilna povišana aktivnost encima arginaze-1 v stimuliranih celicah BV2, katero smo določali z uporabo kompleta reagentov za določanje aktivnosti



arginaze (Sigma-Aldrich). Test temelji na reakciji arginaze z argininom, pri čemer nastane sečnina, ki specifično reagira z barvnim reagentom, da nastane obarvan produkt, ki je proporcionalen aktivnosti arginaze (21). Vzorcem, pripravljenih po navodilih proizvajalca kompleta reagentov, smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 430 nm in izračunali aktivnost arginaze po enačbi, podani s strani proizvajalca.

2.3 IZRAŽANJE IN AKTIVNOST KATEPSINA X V STIMULIRANIH CELICAH BV2

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata smo uporabili za ločbo proteinov pri določanju ravni izražanja katepsina X v stimuliranih celicah BV2. Za detekcijo ločenih proteinov smo uporabili prenos western, pri katerem smo proteine prenesli na nitrocelulozno membrano, ki smo jo nato inkubirali z označenimi protitelesi, specifičnimi za katepsin X. Pri tem smo uporabili dve vrsti protiteles: primarna kozja protitelesa proti katepsinu X (R&D Systems), ki smo jih redčili v razmerju 1 : 100 v 3 % BSA v fosfatnem pufru z natrijevim kloridom (PBS) (Sigma-Aldrich), in sekundarna proti-kozja protitelesa, označena s hrenovo peroksidazo (HRP) (Millipore), ki smo jih redčili v razmerju 1 : 1000 v 3 % BSA v PBS. Z gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazo (GAPDH) smo preverili še enakomernost nanosa vzorcev na gel. Pri tem smo uporabili primarna kunčja protitelesa proti GAPDH (Jackson ImmunoResearch), ki smo jih redčili 10000-krat v 3 % BSA v tris pufru (Riedel-de Haën) z dodanim 0,1 % Tween 20 (Fluka), ter sekundarna proti-kunčja protitelesa, označena s HRP (Millipore), ki smo jih redčili 5000-krat v 5 % mleku (Pomurske mlekarne). Ob dodatku kromogenega substrata je prišlo do nastanka obarvanega kompleksa z encimom, ki smo ga lahko detektirali. Kemiluminescenčni odziv na membrani smo posneli z napravo G-Box, njihovo intenziteto pa smo kvantificirali s pomočjo programske opreme Gene Tools. Rezultate smo normirali na nivo GAPDH in jih prikazali kot relativne vrednosti glede na vzorce ne-stimuliranih kontrolnih celic.

Aktivnost katepsina X v celičnih lizatih smo izmerili z uporabo katepsin X specifičnega fluorogenega substrata Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH (Jiangsu Vcare PharmaTech Co.). Pri tem je prišlo do sprostitve fluorofora, kar smo zaznali kot porast fluorescence, ki smo jo izmerili pri 420 nm v odvisnosti od časa s pomočjo spektrofotometričnega čitalca mikrotitrskih plošč. Rezultate smo podali kot naklon linearnega dela krivulje oziroma fluorescence v odvisnosti od časa.

Izražanje katepsina X v aktivirani mikrogliji in njegovo vezikularno lokalizacijo v lizosomih smo preverili s pomočjo konfokalne mikroskopije. Slednja je mikroskopska tehnika, ki zagotavlja tridimenzionalno optično ločljivost in deluje po principu točkovnega osvetljevanja. Fluorescenčno svetlobo iz posameznih točk vzorca zazna detektor, ki pridobljene informacije s pomočjo računalnika pretvori v sliko ene ravne celice, iz več ravnin pa lahko pridobimo tridimenzionalno sliko celice (22). Stimulirane celice BV2 smo označili s kozjimi protitelesi proti katepsinu X (redčenje 1 : 100 v 3 % BSA v PBS) (Millipore) in kunčjimi protitelesi proti označevalcu lizosomov membranskemu proteinu 1 (redčenje 1 : 500 v 3 % BSA v PBS) (LAMP1; angl. lysosomal-associated membrane protein 1) (Millipore) ter ustreznimi sekundarnimi oslovskimi protitelesi, konjugiranimi s fluorokromoma AlexaFluor555 in AlexaFluor488 (redčenje 1 : 1000 v 3 % BSA v PBS) (Invitrogen). Slike smo posneli s konfokalnim mikroskopom Carl Zeiss LSM 710 na Institutu Jožef Stefan. Za izboljšanje razmerja signal-šum smo uporabili povprečenje signalov, in sicer smo za vsako sliko zajeli 4 zaporedne posnetke. Slike smo analizirali z uporabo programske opreme ZEN 2011.

2.4 STATISTIČNO VREDNOTENJE REZULTATOV

Rezultate smo statistično vrednotili in jih prikazali kot povprečno vrednost neodvisnih bioloških meritev (n) $\pm$ standardna napaka povprečja (SEM). Za analizo več kot dveh vzorcev smo uporabili analizo enosmerne variance (ANOVA). Razlike med dvema vzorcema smo analizirali z uporabo Studentovega t -testa dveh neodvisnih vzorcev z upoštevanjem predpostavke o neenakosti varianc. Če je bila vrednost $P < 0,05$, smo razliko med dvema vzorcema označili kot statistično značilno. Statistično analizo smo izvedli s pomočjo programske opreme Microsoft Excel 365.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Celice mikroglije so rezidenčne imunske celice centralnega živčnega sistema in služijo kot prva obrambna linija, ki zelo hitro zazna patogene, vključno z bakterijami, glivami in virusi (23). Pod takimi pogoji pride do polarizacije mikroglije v fenotip M1 ali M2, pri čemer je potrebno poudariti, da je klasifikacija M1/M2 poenostavitev polarizacije mikroglije,

ki predstavlja ekstremno stanje, in da sta med boleznijo lahko prisotna oba fenotipa, kot tudi vsa vmesna stanja (8, 24). Z raziskavami so pokazali, da polarizirana mikroglija izraža in izloča lizosomske Katepsine, med njimi tudi Katepsin X, ki je cisteinska peptidaza, kateri pripisujejo patogeno vlogo v nevrodegenerativnih procesih (6). Zaradi slednjega smo želeli opredeliti raven izražanja in aktivnost Katepsina X v posameznem fenotipu aktivirane mikroglije ter ovrednotiti njegovo vlogo pri polarizaciji mikroglije v fenotip M1 in M2.

3.1 VREDNOTENJE POLARIZACIJE CELIC BV2 V POSAMEZEN FENOTIP

Vrednotenje vloge Katepsina X pri polarizaciji mikroglije smo pričeli s postavitvijo celičnega modela polarizirane mikroglije, pri čemer smo uporabili celično linijo BV2 in stimulante LPS (1 µg/mL), IFN-γ (1 µg/mL), IL-4 (40 ng/mL) in IL-13 (40 ng/mL) ter ustreznost postavitve modela polarizirane mikroglije v smeri fenotipa M1 oziroma M2 ovrednotili z določanjem ravni pro-vnetnih in proti-vnetnih dejavnikov, ki jih izraža polarizirana mikroglija fenotipa M1 oziroma M2.

Stimulacija celic BV2 z LPS in IFN-γ povzroči spremembo morfologije mikroglije iz okrogle v razvejano obliko, značilno za pro-vnetni fenotip M1, medtem ko pri stimulaciji z IL-4 in IL-13 celice ohranijo ameboidno morfologijo, kar nakazuje na pridobljen proti-vnetni fenotip M2 (slika 1A). Znano je, da je NO dejavnik z mikroglijo posredovane nevrotoksičnosti, pri čemer aktivirana mikroglija spodbuja sočasno nastajanje NO in reaktivnih kisikovih zvrsti, ki pod pro-vnetnimi pogoji povzroči nastanek peroksinitrita, močnega oksidanta, ki povzroči propadanje nevronov (25). V supernatantih stimuliranih celic BV2 z LPS in IFN-γ je prišlo do povišanja koncentracije NO, pri čemer je LPS povzročil znatno večji dvig koncentracije kot IFN-γ. Stimulacija celic z IL-4 in IL-13 na količino NO ni imela vpliva (slika 1B). Arginaza-1 je eden najbolj opredeljenih označevalcev polarizirane mikroglije fenotipa M2, ki pretvarja arginin v ornitin, poliamine in prolin, ki prispevajo k celjenju in preoblikovanju tkiva (8). Ob stimulaciji celic BV2 z IL-4 in IL-13 je prišlo do znatnega povečanja aktivnosti arginaze-1 glede na nestimulirane celice, pri čemer med stimulantoma ni prišlo do večjih razlik v aktivnosti (slika 1C). Po drugi strani stimulacija z LPS in IFN-γ na aktivnost arginaze-1 pričakovano ni imela vpliva. Iz rezultatov je torej razvidno, da LPS in IFN-γ spodbujata polarizacijo mikroglije v pro-vnetni fenotip M1, IL-4 in IL-13 pa v proti-vnetni fenotip M2, kar se ujema z rezultati že znanih raziskav (10).

3.2 VREDNOTENJE IZRAŽANJA IN AKTIVNOSTI KATEPSINA X V STIMULIRANIH CELICAH BV2

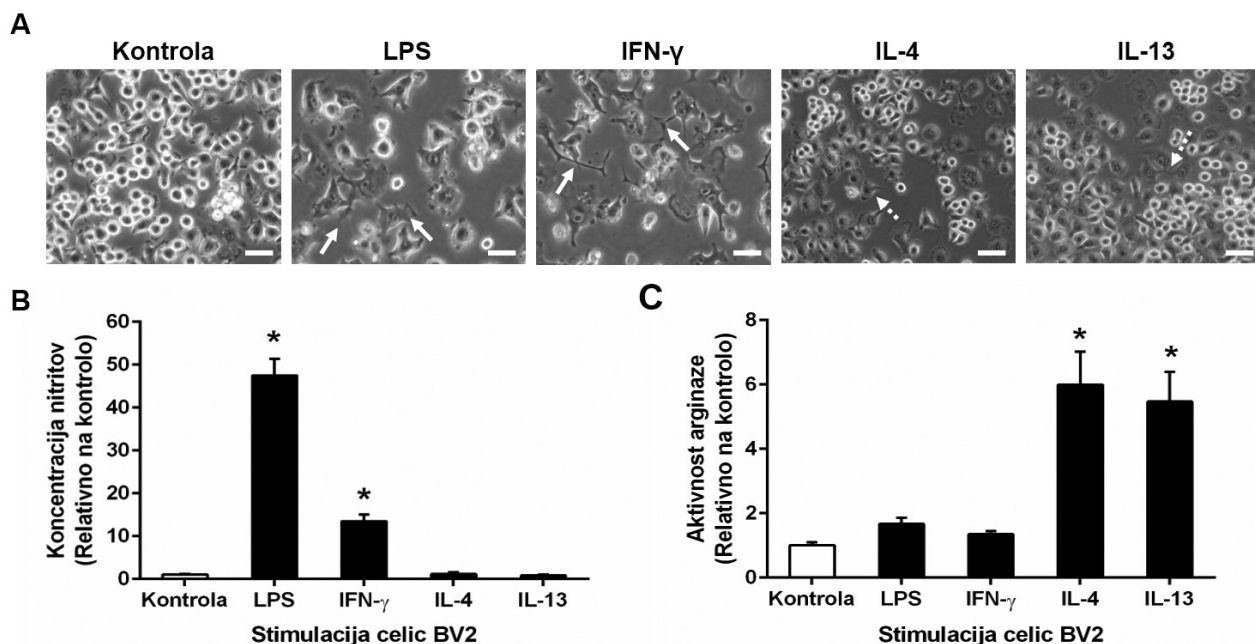
Nadalje smo vrednotili vlogo Katepsina X v polarizirani mikrogliji. Z raziskavami so že pokazali, da je Katepsin X pomemben dejavnik nevrodegeneracije, za katerega so dokazali, da se izraža in izloča iz aktivirane mikroglije kot odziv na poškodbo nevronov in vnetne dražljaje (26, 27), zato smo v nadaljevanju opredelili izražanje in aktivnost Katepsina X v posameznih fenotipih aktivirane mikroglije, fenotipih M1 in M2.

S pomočjo prenosa western smo določili povišano znotrajcelično izražanje Katepsina X v celicah BV2, stimuliranih tako z LPS kot IFN-γ (slika 2A), medtem ko stimulacija celic z IL-4 in IL-13 glede na kontrolo ni povzročila sprememb v izražanju Katepsina X. Nasprotno se je aktivnost Katepsina X po stimulaciji z LPS in IFN-γ zmanjšala, po stimulaciji z IL-4 in IL-13 pa ni prišlo do značilnih sprememb v aktivnosti Katepsina X (slika 2B). Povečano znotrajcelično izražanje Katepsina X je najverjetneje posledica uporabljenih protiteles proti Katepsinu X pri prenosu western, ki prepoznajo vse tri oblike Katepsina X: pre-pro-obliko, pro-obliko in zrelo obliko Katepsina X. Po drugi strani pa je aktivnost izražena z zrelo obliko, ki se po stimulaciji z LPS in IFN-γ sprošča iz celic mikroglije in posledično privede do zmanjšane aktivnosti Katepsina X znotraj celic v primerjavi s stimulacijo z IL-4 in IL-13 (16). Pridobljene rezultate smo želeli še dodatno podkrepiti, zato smo s konfokalnim mikroskopom določili tako izražanje kot tudi vezikularno lokalizacijo Katepsina X, pri čemer smo z označevalcem lizosomov LAMP1 opazovali njegovo lokalizacijo v lizosomih (slika 2C). Opazili smo, da se vezikularna lokalizacija Katepsina X glede na kontrolo po stimulaciji celic BV2 z IL-4 in IL-13 praktično ne spremeni. Po drugi strani je stimulacija celic z LPS in IFN-γ povzročila zmanjšanje lokalizacije Katepsina X v lizosomih, kar potrjuje zgornje rezultate, iz katerih smo predpostavili, da se Katepsin X po stimulaciji sprošča iz celic, kar privede do zmanjšanja njegove znotrajcelične aktivnosti.

3.3 VREDNOTENJE VPLIVA ZAVIRALCA KATEPSINA X NA POLARIZACIJO CELIC BV2

Zaradi škodljivega delovanja cisteinskih Katepsinov v patoloških procesih nevrodegeneracije, povzročene z nevronetjem, predstavljajo zaviralci cisteinskih peptidaz poten-





Slika 1: Vpliv stimulacije celic BV2 na njihovo polarizacijo v fenotip M1 oziroma M2. Celice BV2 smo stimulirali z LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), IFN- γ (1 $\mu\text{g/mL}$), IL-4 (40 ng/mL) in IL-13 (40 ng/mL) v brez-serumskem gojišču 24 ur. (A) Morfologija celic BV2 po končani stimulaciji. Svetlobni invertni mikroskop pri 20-kratni povečavi. Bele puščice prikazujejo razvejan fenotip M1 (LPS, IFN- γ) in ameboiden fenotip M2 (IL-4, IL-13). Slike so reprezentativne vsaj štirih neodvisnih poskusov ($n \geq 4$). (B) Raven NO v supernantih celic BV2 po končani stimulaciji določena z uporabo testa po Griessu. (C) Znotrajcelična aktivnost arginaze-1 po končani stimulaciji določena z uporabo kompleta reagentov za določanje aktivnosti arginaze. Rezultati so prikazani kot povprečje $\pm$ SEM dveh neodvisnih poskusov ($n = 2$), izvedenih v dveh paralelah, relativno glede na kontrolo. Merilo je 40 μm . * $P < 0,05$.

IFN- γ – interferon gama, IL-4 – interleukin-4, IL-13 – interleukin-13, LPS – lipopolisaharid, NO – dušikov oksid, SEM – standardna napaka povprečja

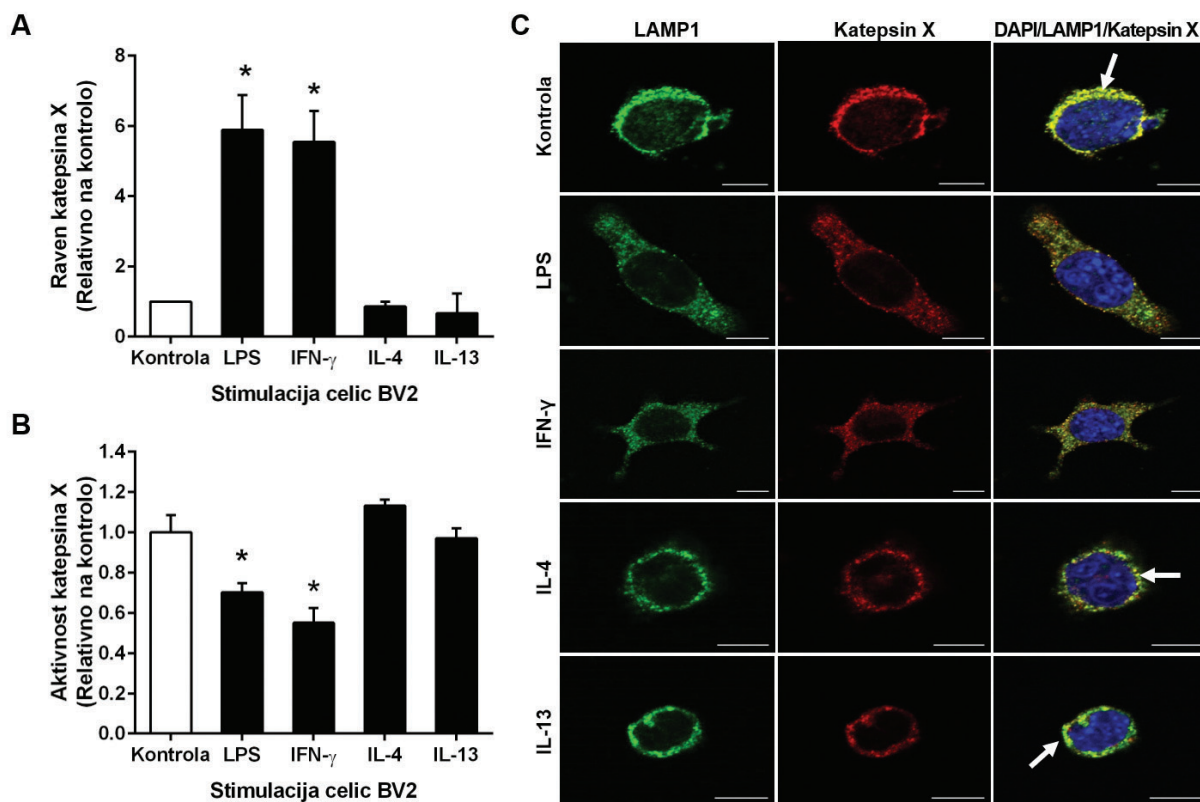
Figure 1: Effect of BV2 cell stimulation on polarization towards M1 and M2 phenotype. BV2 cells were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), IFN- γ (1 $\mu\text{g/mL}$), IL-4 (40 ng/mL) and IL-13 (40 ng/mL) in serum-free medium 24 h. (A) Morphology of BV2 cells after stimulation. Inverted light microscope at 20x magnification. White arrows show the branched M1 phenotype (LPS, IFN- γ) and the amoeboid M2 phenotype (IL-4, IL-13). Images are selected from at least four independent experiments ($n \geq 4$). (B) NO levels in BV2 cells supernatants after stimulation were determined using the Griess test. (C) Intracellular arginase-1 activity after stimulation was determined using the arginase activity assay kit. Results are shown as mean $\pm$ SEM of two independent experiments ($n = 2$) performed in duplicate, relative to control. Scale bar is 40 μm . * $P < 0.05$.

IFN- γ – interferon gamma, IL-4 – interleukin-4, IL-13 – interleukin-13, LPS – lipopolysaccharide, NO – nitric oxide, SEM – the standard error of the mean

cialno terapevtsko orodje za zaviranje njegove prekomerno proteolitske aktivnosti ter za preprečevanje in zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni, ki so povezane s prekomerno aktivacijo mikroglije in posledičnim nevrovnetjem (14, 26). V zadnjem delu raziskovalnega dela smo tako ovrednotili vpliv zaviralca katepsina X AMS36 na polarizacijo mikroglije v posamezen fenotip.

Ob dodatku zaviralca katepsina X AMS36 smo pri stimulaciji celic z LPS in IFN- γ opazili zmanjšano pojavnost razvejane oblike mikroglije v primerjavi s celicami brez prisotnega zaviralca (slika 3A). Po drugi strani prisotnost AMS36

pri stimulaciji z IL-4 in IL-13 ni imela vpliva na spremembo morfologije celic, saj je prevladovala ameboidna oblika mikroglije (slika 3A). Na podlagi pridobljenih rezultatov smo nadalje ovrednotili vpliv AMS36 na označevalca posameznega fenotipa polarizirane mikroglije. Prisotnost zaviralca katepsina X je povzročila znižanje koncentracije NO v supernatantih celic po stimulaciji z LPS in IFN- γ (slika 3B), kar nakazuje na vpliv zaviranja katepsina X na preprečevanje polarizacije v pro-vnetni fenotip M1. Hkrati pa je zaviranje katepsina X dodatno povišalo znotrajcelično aktivnost arginaze-1 po stimulaciji celic z IL-4 in IL-13, pri čemer je

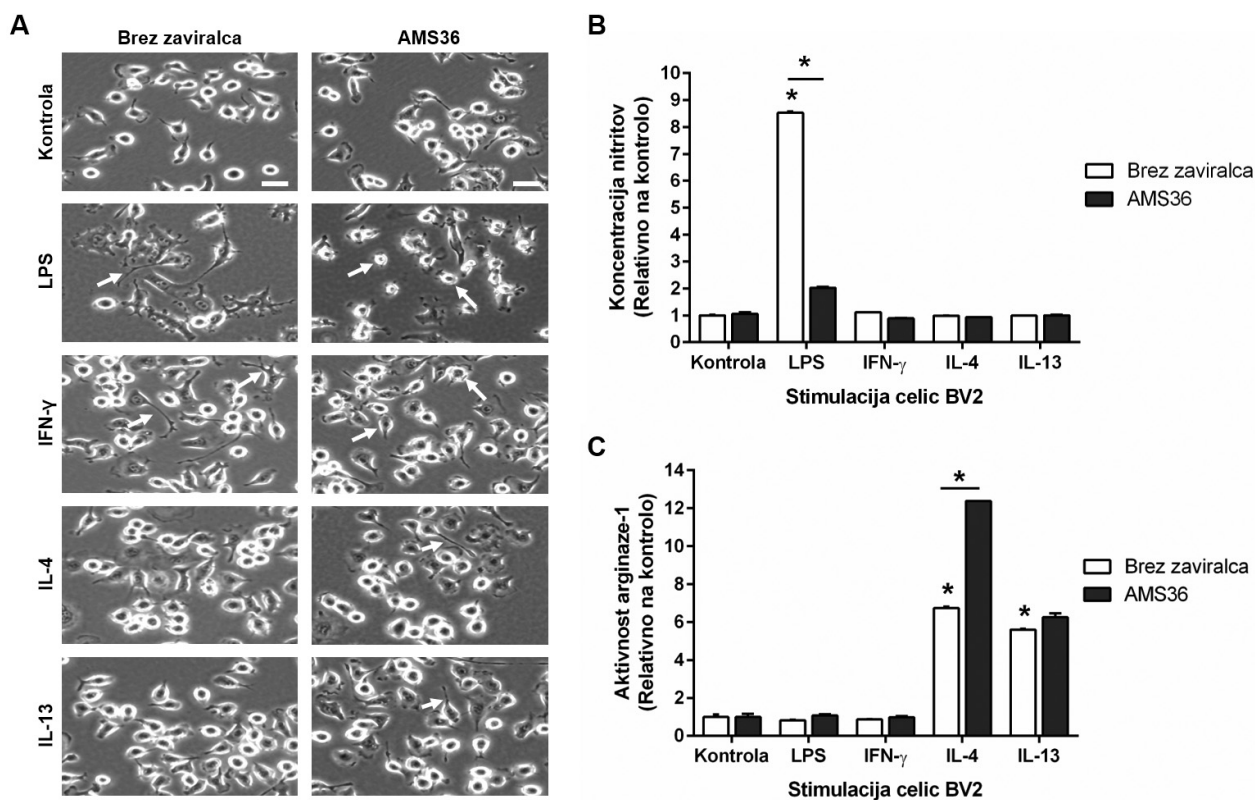


Slika 2: Vpliv stimulacije celic BV2 na izražanje in aktivnost katepsina X. Celice BV2 smo stimulirali z LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), IFN- γ (1 $\mu\text{g/mL}$), IL-4 (40 ng/mL) in IL-13 (40 ng/mL) v brez-serumskem gojišču 24 h. (A) Raven katepsina X določenega s prenosom western na nitrocelulozno membrano. Uporaba specifičnih protiteles proti katepsinu X ter sekundarnih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo. Rezultati so normirani na raven izražanja GAPDH. (B) Aktivnost katepsina X v celičnih lizatih določena z uporabo specifičnega fluorogenega substrata Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH. Rezultati so prikazani kot povprečje $\pm$ SEM dveh neodvisnih poskusov ($n = 2$), izvedenih v dveh paralelah, relativno glede na kontrolo. Kontrola so celice BV2 gojene v brez-serumskem gojišču brez dodanih reagentov. * $P < 0,05$. (C) Lokalizacija katepsina X v lizosomih stimuliranih celic. Vzorci so imunofluorescenčno označeni z raztopino primarnih protiteles proti LAMP1 (zeleno označeno na sliki) in protiteles proti katepsinu X (rdeče označeno na sliki). Jedra so označena z barvilom DAPI (modro označeno na sliki). Konfokalni mikroskop pri 63-kratni povečavi. Bele puščice prikazujejo lokalizacijo katepsina X v lizosomih. Merilo je 20 μm .

DAPI – diamidino-2-fenilindol, GAPDH – gliceralehid-3-fosfat dehidrogenaza, IFN- γ – interferon gama, IL-4 – interleukin-4, IL-13 – interleukin-13, LAMP1 – z lizosomom povezani membranski protein 1, LPS – lipopolisaharid, SEM – standardna napaka povprečja

Figure 2: Effect of BV2 cell stimulation on the expression and activity of cathepsin X. BV2 cells were stimulated with LPS (1 $\mu\text{g/mL}$), IFN- γ (1 $\mu\text{g/mL}$), IL-4 (40 ng/mL) and IL-13 (40 ng/mL) in serum-free medium 24 h. (A) Cathepsin X levels determined by western blotting onto nitrocellulose membranes. Specific antibodies against cathepsin X and secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase were used. The results were normalized to expression level of GAPDH. (B) Cathepsin X activity in cell lysates was determined using the specific fluorogenic substrate Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH after 24-hour stimulation. Results are shown as mean $\pm$ SEM of two independent experiments ($n = 2$) performed in duplicate, relative to control. Control are BV2 cells grown in serum-free medium without added reagents. * $P < 0.05$. (C) Localization of cathepsin X in the lysosomes of stimulated cells. Samples were immunofluorescently labeled with a solution of primary antibodies against LAMP1 (marked in green in the picture) and antibodies against cathepsin X (marked in red in the picture). Nuclei were labeled with DAPI dye (marked in blue in the picture). Confocal microscope at 63x magnification. White arrows show the localization of cathepsin X in lysosomes. Scale bar is 20 μm .

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole, GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, IFN- γ – interferon gamma, IL-4 – interleukin-4, IL-13 – interleukin-13, LAMP1 – lysosomal-associated membrane protein 1, LPS – lipopolysaccharide, SEM – the standard error of the mean



Slika 3: Vpliv zaviralca katepsina X na polarizacijo celic BV2. Celice BV2 smo po predhodni obdelavi z AMS36 (10 μ M) stimulirali z LPS (1 μ g/mL), IFN- γ (1 μ g/mL), IL-4 (40 ng/mL) in IL-13 (40 ng/mL) v brez-serumskem gojišču 24 h. Kot ustrezno kontrolo zaviralcu smo uporabili dimetilsulfoksid. (A) Morfologija celic po končani stimulaciji. Svetlobni invertni mikroskop pri 20-kratni povečavi. Bele puščice prikazujejo razvejan fenotip M1 stimuliranih celic z LPS in IFN- γ brez zaviralca (levi stolpec) in ameboiden fenotip oziroma odsotnost razvejanega fenotipa stimuliranih celic z LPS in IFN- γ ob prisotnosti AMS36 (desni stolpec). (B) Raven NO v supernatantih celic BV2 določen z uporabo testa po Griessu. (C) Znotrajcelična aktivnost arginaze-1 po končani stimulaciji določena z uporabo kompleta reagentov za določanje aktivnosti arginaze. Rezultati so prikazani kot povprečje $\pm$ SEM dveh neodvisnih poskusov ($n = 2$) relativno na kontrolo. Merilo je 40 μ m. * $P < 0,05$. IFN- γ – interferon gama, IL-4 – interleukin-4, IL-13 – interleukin-13, LPS – lipopolisaharid, NO – dušikov oksid, SEM – standardna napaka povprečja

Figure 3: Effect of cathepsin X inhibitor on BV2 cell polarization. After pre-treatment with AMS36 (10 μ M), BV2 cells were stimulated with LPS (1 μ g/mL), IFN- γ (1 μ g/mL), IL-4 (40 ng/mL) and IL-13 (40 ng/mL) in serum-free medium 24 h. Dimethyl sulfoxide was used as a corresponding inhibitor control. (A) Cell morphology after stimulation. Inverted light microscope at 20x magnification. White arrows show the branching M1 phenotype of cells stimulated with LPS and IFN- γ without the inhibitor (left column) and the amoeboid phenotype or absence of the branching phenotype of cells stimulated with LPS and IFN- γ in the presence of AMS36 (right column). (B) NO levels in BV2 cell supernatants determined using the Griess assay. (C) Intracellular arginase-1 activity after stimulation was determined using the arginase activity kit. Results are shown as mean $\pm$ SEM of two independent experiments ($n = 2$) relative to the control. Scale bar is 40 μ m. * $P < 0.05$. IFN- γ – interferon gamma, IL-4 – interleukin-4, IL-13 – interleukin-13, LPS – lipopolysaccharide, NO – nitric oxide, SEM – the standard error of the mean

bilo to povišanje opaznejše pri stimulaciji celic BV2 z IL-4 (slika 3C). Dobljeni rezultati nakazujejo, da zaviranje katepsina X, poleg preprečevanja polarizacije mikroglije v pro-vnetni fenotip M1, spodbuja polarizacijo mikroglije v

proti-vnetni fenotip M2, kar nakazuje na pomembno vlogo zaviranja katepsina X pri preprečevanju in zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni, preko uravnavanja polarizacije mikroglije v fenotip M1 in M2.

4 SKLEP

Raziskave so že pokazale, da samo zaviranje polarizacije mikroglije v pro-vnetni fenotip M1 ni dovolj za učinkovito zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni, saj je za slednje hkrati potrebno tudi spodbujanje polarizacije mikroglije v proti-vnetni fenotip M2 (28). Pokazali smo, da ima kathepsin X pomembno vlogo pri polarizaciji celic mikroglije v fenotip M1 oziroma M2, pri čemer zaviranje kathepsina X zavira polarizacijo mikroglije v fenotip M1, hkrati pa nakazuje na spodbujanje polarizacije mikroglije v fenotip M2, kar bi pomembno doprineslo k preprečevanju progresije nevrodegenerativnih bolezni. Na podlagi teh spoznanj bi bil razvoj spojin, ki bi z zaviranjem kathepsina X uravnale premik polarizacije aktivacije mikroglije v oba fenotipa, M1 in M2, pomemben za preprečevanje in zdravljenje nevrodegenerativnih bolezni, ki so povezane z vnetnimi procesi, za katere je odgovorna tudi aktivirana mikroglija. Rezultati raziskave predstavljajo podlago za nadaljnje raziskave, ki bi vrednotile vpliv zaviranja kathepsina X na uravnavanje polarizacije mikroglije M1 in M2 ter posledično zaščitno vlogo zaviranja cisteinske peptidaze kathepsina X pri nevrodegenerativnih boleznih.

5 LITERATURA

1. Kwon HS, Koh SH. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes. 2020;9.
2. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of Microglia. 2011;461–553.
3. Lowry JR, Klegeris A. Emerging roles of microglial cathepsins in neurodegenerative disease. Brain Res Bull. 2018;139:144–56.
4. Jurga M A, Paleczna M, Kuter Z K. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. 2020;14.
5. Moehle MS, West AB. M1 and M2 Immune Activation in Parkinson's Disease: Foe and Ally? Neuroscience. 2014;59–73.
6. Pišlar A, Bolčina L, Kos J. New insights into the role of cysteine cathepsins in neuroinflammation. Biomolecules. MDPI. 2021.
7. Orihuela R, Mcpherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. Br J Pharmacol. 2016;665.
8. Cherry JD, Olschowka JA, Kerry O'banion M. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. J Neuroinflammation. 2014;11(98).
9. Tsai CF, Chen GW, Chen YC, Shen CK, Lu DY, Yang LY, idr. Regulatory effects of quercetin on M1/M2 macrophage polarization and oxidative/antioxidative balance. Nutrients. 2022;14(1).
10. Hergouth L. Nivo izražanja in aktivnosti cisteinskih kathepsinov S in X na vnetnem modelu nevrodegeneracije. Magistrska naloga; Ljubljana, 2022.
11. Kos J, Vižin T, Fonovi UP, Pišlar A. Intracellular signaling by cathepsin X: Molecular mechanisms and diagnostic and therapeutic opportunities in cancer. Semin Cancer Biol. 2015;31:76–83.
12. Pišlar AH, Zidar N, Kikelj D, Kos J. Cathepsin X promotes 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of PC12 and SH-SY5Y cells. Neuropharmacology. 2014;82:121–31.
13. Pišlar A, Tratnjek L, Glavan G, Živin M, Kos J. Upregulation of cysteine protease cathepsin X in the 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease. Front Mol Neurosci. 2018;11.
14. Pišlar A, Tratnjek L, Glavan G, Zidar N, Živin M, Kos J. Neuroinflammation-Induced Upregulation of Glial Cathepsin X Expression and Activity in vivo. Front Mol Neurosci. 2020;13.
15. Wendt W, Schulten R, Stichel CC, Lübbert H. Intra- versus extracellular effects of microglia-derived cysteine proteases in a conditioned medium transfer model. J Neurochem. 2009;110(6):1931–41.
16. Pišlar A, Božić B, Zidar N, Kos J. Inhibition of cathepsin X reduces the strength of microglial-mediated neuroinflammation. Neuropharmacology. 2017;114:88–100.
17. Pišlar A, Biljana NB, Perić M, Jakoš T, Nace Zidar -, Kos J, idr. Cysteine Peptidase Cathepsin X as a Therapeutic Target for Simultaneous TLR3/4-mediated Microglia Activation. Mol Neurobiol. 2022;2258–76.
18. C8-B4 | ATCC. [cited 2021 Dec 3]. Available from: <https://www.atcc.org/products/crl-2540#detailed-product-information>
19. DC Protein Assay | Bio-Rad Laboratories. [cited 2021 Dec 29]. Available from: <https://www.bio-rad.com/en-si/product/dc-protein-assay?ID=22faf97a-6b8d-4763-8b97-3dc530dcab66>
20. Griess Reagent System. [cited 2021 Dec 4]. Available from: https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/griess-reagent-system-protocol.pdf?rev=8b478e337acd43be863d7787c80ea1c6&sc_lang=en
21. Arginase Activity Assay Kit Catalog Number MAK112. Sigma Aldrich. 2020.
22. Mueller M. Introduction to Confocal Fluorescence Microscopy. 2. izd. Washington: SPIE publications; 2005. 1–82.
23. Lyu J, Xie D, Bhatia TN, Leak RK, Hu X, Jiang X, idr. Microglial/Macrophage polarization and function in brain injury and repair after stroke. CNS Neurosci Ther. 2021;27:515–27.
24. Goldmann T, Prinz M. Role of microglia in CNS autoimmunity. Clin Dev Immunol. 2013;2013.
25. Sierra A, Navascués J, Cuadros MA, Calvente R, Martín-Oliva D. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) in Microglia of the Developing Quail Retina. PLoS One. 2014;9(8):106048.
26. Pišlar A, Božić B, Zidar N, Kos J. Inhibition of cathepsin X reduces the strength of microglial-mediated neuroinflammation. Neuropharmacology. 2017;114:88–100.
27. Wendt W, Schulten R, Stichel CC, Lübbert H. Intra- versus extracellular effects of microglia-derived cysteine proteases in a conditioned medium transfer model. J Neurochem. 2009;110(6):1931–41.
28. Yang Z, Liu B, Yang L en, Zhang C. Platycodigenin as Potential Drug Candidate for Alzheimer's Disease via Modulating Microglial Polarization and Neurite Regeneration. Molecules. 2019;24(18).

