

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARCELA MEŠKO

**VREDNOTENJE REVERZIBILNIH SINTEZNIH ZAVIRALCEV
KATEPSINA X NA LPS-CELIČNEM MODELU PARKINSONOVE
BOLEZNI**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARCELA MEŠKO

**VREDNOTENJE REVERZIBILNIH SINTEZNIH ZAVIRALCEV
KATEPSINA X NA LPS-CELIČNEM MODELU PARKINSONOVE
BOLEZNI**

**EVALUATION OF REVERSIBLE SYNTHETIC CATHEPSIN X
INHIBITORS IN LPS-CELL MODEL OF PARKINSON'S DISEASE**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

Magistrsko naložko sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, pod mentorstvom doc. dr. Anje Pišlar, mag. farm. Eksperimentalno delo sem opravljala v laboratorijih Katedre za farmacevtsko biologijo. Reverzibilni sintezni zaviralcii katepsina X so bili sintetizirani na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo.

ZAHVALA

Za veliko mero strokovnosti in potrpežljivosti se zahvaljujem mentorici, doc. dr. Anji Pišlar mag. farm. Hvala za zaupanje in danost vpogleda v srčno predanost raziskovalnemu delu.

Velika zahvala gre tudi mojim najbližnjim, predvsem mojima staršema in sestri Moniki, ki so me brezpogojno podpirali vsa leta študija.

Hvala tudi vsem prijateljem, zaradi katerih mi bodo študentska leta ostala v najčudovitejšem spominu.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Anje Pišlar, mag. farm. Naloga je del programa Farmacevtska biotehnologija: znanost za zdravje, P4-0127, pod vodstvom prof. dr. Janka Kosa. dipl. biokem.

Marcela Meško

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
KAZALO SLIK.....	IV
KAZALO PREGLEDNIC.....	V
KAZALO ENAČB	V
POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
KLJUČNE BESEDE (angl. Keywords)	IX
SEZNAM OKRAJŠAV.....	X
OZNAKE AMINOKISLIN	XIII
1 UVOD.....	1
1.1 NEVRODEGENERACIJA.....	1
1.1.1 Vloga mikroglije pri nevrodegeneraciji.....	1
1.1.2 Parkinsonova bolezen.....	2
1.2 CISTEINSKI KATEPSINI.....	4
1.2.1 Katepsin X	6
1.2.2 Lokalizacija in funkcija katepsina X	7
1.2.3 Mehanizmi nevrodegeneracije katepsina X.....	8
1.3 INHIBITORJI CISTEINSKIH KATEPSINOV	10
1.3.1 Endogeni inhibitorji cisteinskih proteaz.....	10
1.3.2 Ireverzibilni in reverzibilni sintezni zaviralci katepsina X.....	10
2 NAMEN DELA.....	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 Reagenti	14
3.1.2 Izbrani zaviralci katepsina X	15

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

3.1.3	Laboratorijska oprema	15
3.1.4	Pufri	17
3.1.5	Gojišča	18
3.1.6	Celične linije	19
3.1.6.1	Celična linija BV2	19
3.1.6.2	Celična linija SH-SY5Y	19
3.1.6.3	Odmrzovanje celičnih linij BV2 in SH-SY5Y	19
3.1.6.4	Gojenje celičnih linij BV2 in SH-SY5Y	19
3.1.6.5	Tripsinizacija	20
3.1.6.6	Štetje celic	20
3.1.6.7	Zamrzovanje celične linije BV2 in SH-SY5Y	20
3.2	METODE	21
3.2.1	Spektroskopija	21
3.2.1.1	Spektrofotometrično določanje celičnega preživetja z reagentom MTS	21
3.2.1.2	Določanje koncentracije proteinov po metodi DC (angl. detergent compatible)	22
3.2.1.3	Določanje aktivnosti katepsina X v celičnem lizatu	24
3.2.1.4	Določanje koncentracije NO v supernatantih mikroglije	24
3.2.1.5	Določanje aktivnosti kaspaze-3 v celičnih lizatih	25
3.2.2	Pretočna citometrija	26
3.2.2.1	Določanje citotoksičnosti	26
3.2.2.2	Določanje koncentracije citokinov	27
3.2.2.3	Določanje deleža apoptočnih celic	28
3.2.3	Statistično vrednotenje rezultatov	29
4	REZULTATI	30
4.1	VREDNOTENJE REVERZIBILNIH SINTEZNIH ZAVIRALCEV KATEPSINA X NA CELIČNI LINIJI MIKROGLIJE	30

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

4.1.1	Vpliv zaviralcev katepsina X na celično živost celic mikroglije.....	30
4.1.2	Vpliv zaviralcev na aktivnost katepsina X v celicah mikroglije	31
4.2	POSTAVITEV MODELA AKTIVIRANE MIKROGLIJE Z UPORABO REAGENTA LPS.....	33
4.2.1	Določitev prisotnosti NO v supernatantih aktivirane mikroglije.....	33
4.2.2	Določitev prisotnosti vnetnih citokinov v supernatantih aktivirane mikroglije	
	34	
4.3	VPLIV ZAVIRALCEV KATEPSINA X NA RAVEN VNETNIH DEJAVNIKOV V SUPERNATANTIH AKTIVIRANE MIKROGLIJE.....	35
4.3.1	Raven NO v supernatantih aktivirane mikroglije ob prisotnosti spojin z7 in z9	
	36	
4.3.2	Raven IL-6 in TNF- α v supernatantu aktivirane mikroglije ob prisotnosti spojin z7 in z9.....	36
4.4	VPLIV ZAVIRALCEV KATEPSINA X NA PREŽIVETJE AKTIVIRANE MIKROGLIJE	38
4.4.1	Vpliv spojin z7 in z9 na preživetje stimuliranih celic BV2.....	38
4.4.2	Vpliv spojin z7 in z9 na apoptozo stimuliranih celic BV2.....	39
4.5	Vpliv zaviralcev katepsina X na degeneracijo nevronskih celic, posredovano z aktivirano mikroglijo	41
5	RAZPRAVA.....	44
6	SKLEPI.....	50
7	LITERATURA	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz celice mikroglije, označene s specifičnim protitelesom proti Iba 1 (7)	2
Slika 2: Lewy-jevo telesce znotraj možganske celice v črnem jedru, označeno s puščico (13)	3
Slika 3: Shema aktivacije mikroglije (5)	4
Slika 4: Kristalna struktura molekule katepsina X (29)	7
Slika 5: AMS36 - specifični ireverzibilni zaviralec katepsina X (14).....	9
Slika 6: Mehanizem delovanja katepsina X v nevrodegeneraciji, povzročeni z vnetjem (16)	10
Slika 7: Splošni zaviralec cisteinskih katepsinov E-64 (38).....	11
Slika 8: Prikaz celične linije BV2 (41).....	19
Slika 9: Princip testa z reagentom MTS (46)	22
Slika 10: Princip določanja citokinov (54).....	28
Slika 11: Vpliv zaviralcev katepsina X na živost celic BV2, vrednoten z reagentom MTS30	
Slika 12: Vpliv zaviralcev katepsina X na preživetje celic BV2, vrednoten z reagentom PI	31
Slika 13: Vpliv izbranih zaviralcev na aktivnost katepsina X v celicah BV2.....	32
Slika 14: Koncentracija NO v supernatantih celic BV2 po stimulaciji z reagentom LPS... ..	34
Slika 15: Koncentracija vnetnih citokinov v supernatantih LPS-stimuliranih celic BV2 ...	35
Slika 16: Vpliv izbranih zaviralcev katepsina X na raven NO v supernatantih celic BV2 po stimulaciji z LPS.....	36
Slika 17: Vpliv izbranih zaviralcev katepsina X na raven IL-6 (a) in TNF- α (b) v supernatantih celic BV2 po stimulaciji z LPS	37
Slika 18: Vpliv izbranih zaviralcev katepsina X na delež PI-pozitivnih celic BV2 po stimulaciji z reagentom LPS.....	38
Slika 19: Vpliv izbranih zaviralcev katepsina X na delež apoptočnih celic BV2 po stimulaciji z reagentom LPS.....	40
Slika 20: Vpliv izbranih zaviralcev katepsina X na aktivnost kaspaze-3 v celicah BV2 po stimulaciji z reagentom LPS.....	41
Slika 21: Vpliv zaviralcev katepsina X na celično preživetje nevronske celične linije SH-SY5Y	42

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Seznam uporabljenih reagentov in topil z navedenim proizvajalcem.....	14
Preglednica II: Strukture izbranih zaviralcev katepsina X s konstantami zaviranja (K_i) katepsina X (40)	15
Preglednica III: Seznam laboratorijske opreme z navedenim proizvajalcem.....	15
Preglednica IV: Seznam uporabljenih pufrov in njihova sestava.....	17
Preglednica V: Uporabljena gojišča in njihova sestava.....	18

KAZALO ENAČB

Enačba 1: Štetje celic.....	20
-----------------------------	----

POVZETEK

Prekomerna aktivacija celic mikroglije vodi do pretiranega vnetnega odziva, ki navsezadnje povzroči degeneracijo nevronov v centralnem živčnem sistemu. Cisteinska proteaza katepsin X se omenja kot encim, ki se poleg vnetnih dejavnikov sprošča iz aktivirane mikroglije in prispeva k procesom nevrodegeneracije, ki so med drugim značilni tudi za Parkinsonovo bolezen. V novejših raziskavah so ugotovili, da irreverzibilen in specifičen zaviralec katepsina X, AMS36, pomembno zmanjša aktivacijo celic mikroglije ter s tem posredovano nevronsko smrt. Slednje prikazuje katepsin X kot potencialno terapevtsko tarčo v nevrodegenerativnih obolenjih. V okviru magistrske naloge smo zato s pomočjo celične linije mikroglije BV2 ovrednotili učinkovitost novih sinteznih reverzibilnih in specifičnih zaviralcev katepsina X na aktivacijo mikroglije. Ugotovili smo, da zaviralci katepsina X z7, z9 in sp120 ne posredujejo toksičnega učinka na celice BV2 ter da samo zaviralca z7 in z9 značilno zmanjšata aktivnost katepsina X v celicah BV2. V sklopu magistrske naloge smo ovrednotili njun vpliv na aktivacijo mikroglije. Z uporabo lipopolisaharida (LPS) smo postavili LPS-celični model, s katerim smo ponazorili aktivacijo mikroglije in uspešnost slednje potrdili z določanjem sproščenih vnetnih dejavnikov v supernatantu po stimulaciji celic BV2 z LPS. Nato smo najprej preverili učinkovitost zaviralcev na zmanjšanje sproščanja vnetnih oziroma nevrotoksičnih dejavnikov. Ugotovili smo, da sta raven dušikovega oksida v supernatantu stimuliranih celic BV2 značilno zmanjšala oba zaviralca, medtem ko se je pri določanju ravni sproščenih citokinov interlevkina-6 in tumor nekrotizirajočega dejavnika α zaviralec z7 izkazal za učinkovitejšega. Nadalje smo v magistrski nalogi ovrednotili vpliv zaviralcev na zmanjšano preživetje celic BV2, posredovano z LPS stimulacijo. Oba zaviralca sta izkazovala zaščitno vlogo, saj sta značilno zmanjšala delež mrtvih celic, ki močno naraste po stimulaciji celic BV2 z LPS. Hkrati sta imela vpliv tudi na aktivnost kaspaze-3, saj sta tako z7 kot tudi z9 značilno zmanjšala njeni aktivacijo, povišano po stimulaciji celic z LPS. Zaznali smo tudi zmanjšan delež apoptotičnih celic v prisotnosti obeh zaviralcev, kar nakazuje, da sta zaviralca učinkovito upočasnila aktivacijo mikroglije ter s tem vnetni odziv, pri čemer pa se je v vseh testih kot bolj učinkovit izkazal zaviralec z7. Zaključimo lahko, da sta učinkovitost pri zmanjšanju poškodb nevronskih celic, posredovanih z aktivirano mikroglijo, pokazala oba zaviralca, z7 in z9, kar ponovno potrjuje uporabnost reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X pri zdravljenju z vnetjem posredovanih nevrodegenerativnih bolezni, kot je Parkinsonova bolezen.

ABSTRACT

Overstimulation of microglial cells causes an exaggerated inflammatory response, leading to degeneration of neurons in the central nervous system. Along with inflammatory stimuli, a cysteine protease cathepsin X is also released by activated microglial cells and contributes to the process of neurodegeneration, which are characteristic of Parkinson's disease. A recent study on cathepsin X reported that AMS36, a specific and irreversible inhibitor of cathepsin X significantly reduced microglial activation and subsequently neuronal cell death. The mentioned study thus suggests cathepsin X as a potential therapeutic target in neurodegenerative diseases. Therefore, as part of the Master's thesis we evaluated the efficiency of new reversible and specific synthetic inhibitors of cathepsin X on microglial BV2 cell line, and their effect on microglial activation. Investigated cathepsin X inhibitors z7, z9 and sp120 did not display a toxic effect on BV2 cells. Furthermore, cathepsin inhibitors z7 and z9 were the only ones that showed significant reduction of cathepsin X activity in BV2 cells. Hence, the rest of the Master's work focused on the effect of z7 and z9 on microglial activation. Using lipopolysaccharide (LPS), we established an LPS-cell model, to replicate microglial activation and validated it by determination of inflammatory mediators present in the supernatant of activated microglial BV2 cells following LPS stimulation. Further, we assessed the ability of cathepsin X inhibitors to reduce the levels of inflammatory mediators released from stimulated BV2 cells. Our findings suggest that both cathepsin X inhibitors were able to significantly reduce the levels of nitric oxide in the supernatant of stimulated BV2 cells; however, z7 inhibitor proved to be more effective at reducing the levels of cytokines interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha. Additionally, we also evaluated the effect of cathepsin X inhibitors on diminished BV2 cell survival that is mediated by LPS stimulation. Inhibitors, z7 and z9, displayed a protective effect and significantly reduced the amount of cell death as a result of LPS-stimulation of BV2 cells. Likewise, both inhibitors also exhibited an effect on caspase-3. Following stimulation with LPS, z7 and z9 significantly reduced the activity of caspase-3, as well as the proportion of apoptotic cells in the cell culture. Thus, evaluated cathepsin X inhibitors were able to reduce activation of microglial cells and subsequently ameliorate the inflammatory response, where the inhibitor z7 exerted more prominent effect. The latter was also evident in studying the protective effect of inhibitors on neuronal degeneration, as a consequence of activation of microglial cells, which defines reversible synthetic inhibitors of cathepsin X as an important

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

therapeutic tool in the treatment of inflammation-mediated neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease.

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

KLJUČNE BESEDE (angl. *Keywords*)

Reverzibilni zaviralci	»angl. <i>Reversible inhibitors</i> «
Katepsin X	»angl. <i>Cathepsin X</i> «
Lipopolisaharid	»angl. <i>Lipopolsaccharide</i> «
Nevrodegeneracija	»angl. <i>Neurodegeneration</i> «
Parkinsonova bolezen	»angl. <i>Parkinson's disease</i> «

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

SEZNAM OKRAJŠAV

2F12	specifično mišjo monoklonsko protitelo proti katepsinu X
6-OHDA	6-hidroksidopamin (angl. <i>6-hydroxydopamine</i>)
Ac-DEVD-AFC	N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-trifluorometilkumarin (angl. <i>N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-trifluoromethylcoumarin</i>)
ATP	adenozintrifosfat (angl. <i>adenosine triphosphate</i>)
BSA	goveji serumski albumin (angl. <i>bovine serum albumin</i>)
BV2	nesmrtna mišja celična linija, ki izraža fenotip celic mikroglije
CHAPS	3-[(3-holamidopropil)dimetilamonijev]-1-propansulfonat (angl. <i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>)
CŽS	centralni živčni sistem
DC	združljivo z detergentom (angl. <i>detergent compatible</i>)
DMEM	gojišče za celične kulture (angl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	dimetilsulfoksid (angl. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
DNK	deoksi-ribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	ditiotreitol (angl. <i>dithiothreitol</i>)
EDTA	etilendiaminetetraocetna kislina (angl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FALS	fotodetektor, ki omogoča zapis »prednjega sisanja« (angl. <i>forward angle light scatter</i>)
FBS	fetalni goveji serum (angl. <i>fetal bovine serum</i>)
HLA-DR	human levkocitni antigen, povezan z antigenom D (angl. <i>human leukocyte antigen – antigen D related</i>)
Iba-1	vezavna adapterska molekula 1, ionizirana s kalcijem (angl. <i>ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>)
IFN-γ	interferon-γ (angl. <i>interferon gamma</i>)

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

IL-1β	interlevkin-1 β (angl. <i>interleukin-1 beta</i>)
IL-2	interlevkin-2 (angl. <i>interlukin-2</i>)
IL-4	interlevkin-4 (angl. <i>interleukin-4</i>)
IL-6	interlevkin-6 (angl. <i>interleukin-6</i>)
IL-10	interlevkin-10 (angl. <i>interleukin-10</i>)
IL-17A	interlevkin-17A (angl. <i>interleukin-17A</i>)
K_i	disociacijska konstanta kompleksa encim-zaviralec
LAF	laminarni pretok traka (angl. <i>laminar air flow</i>)
LPS	lipopolisaharid (angl. <i>lipopolysaccharide</i>)
MAPK	z mitogenom aktivirana proteinska kinaza (angl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MMP-3	matriks metaloproteinaza-3 (angl. <i>matrix metalloproteinase-3</i>)
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetranedzol (angl. <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium</i>)
NADH	nikotin amid adenin dinukleotid (angl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NADPH	nikotin amid adenin dinukleotid fosfat (angl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>)
NED	N-1-naftil etilendiamin dihidroklorid (angl. <i>N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride</i>)
NO	dušikov oksid (angl. <i>nitric oxide</i>)
obr/min	obrat na minuto
PB	Parkinsonova bolezen
PBS	fosfatni pufer z NaCl (angl. <i>phosphate buffered saline</i>)

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

PE	fikoeritrin (angl. phycoerythrin)
PI	propidijev jodid (angl. <i>propidium iodide</i>)
PIPES	piperazin-N,N'-bis(2-etansulfonska kislina) (angl. <i>piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>)
RALS	fotodetektor, ki omogoča zapis »transkega sisanja« (angl. <i>right angle light scatter</i>)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (angl. <i>reactive oxygen species</i>)
SH-SY5Y	nesmrtna celična linija celic perifernega živčevja
siRNA	kratka interferenčna ribonukleinska kislina (angl. <i>small interfering ribonucleic acid</i>)
TLR	Toll-u podobni receptorji (angl. <i>Toll like receptors</i>)
TNF-α	tumor nekrotizirajoči faktor α (angl. <i>tumor necrosis factor alpha</i>)

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

OZNAKE AMINOKISLIN

Arg	R	arginin
Asp	D	aspartat, asparginska kislina
Cys	C	cistein
Gln	Q	glutamin
Glu	E	glutamat, glutaminska kislina
Gly	G	glicin
His	H	histidin
Ile	I	izolevcin
Lys	K	lizin
Phe	F	fenilalanin
Pro	P	prolin
Tyr	Y	tirozin
Val	V	valin

1 UVOD

1.1 NEVRODEGENERACIJA

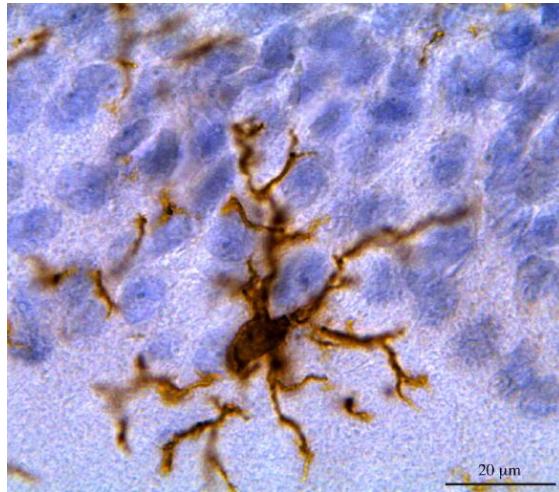
Patološki procesi, kot so oksidativni stres, programirana celična smrt, motnje v ubikvitin-proteasomskem in lizosomskem sistemu ter vnetje centralnega živčnega sistema (CŽS) vodijo do bolezenskih sprememb, ki so značilne za nevrodegenerativna obolenja. Mednje v glavnem prištevamo Alzheimerjevo, Parkinsonovo in Huntingtonovo bolezen ter amiotrofično lateralno sklerozu. Njihova skupna značilnost je predvsem disfunkcija oziroma nepravilno delovanje in degeneracija nevronov v območjih možganov, specifičnih za posamezno bolezen. Kljub številnim raziskavam še vedno ni ustreznega zdravila, ki bi preprečilo dolgotrajno prizadetost in nazadnje tudi smrt več tisočih pacientov, obolelih za eno izmed uničujočih bolezni CŽS, zato je vidna težnja po odkrivanju spojin, ki bi vsaj upočasnile napredovanje nevrodegenerativnih procesov (1, 2).

Vzorec vnetja CŽS najdemo v številnih nevrodegenerativnih boleznih. Pri tem se pojavijo značilne patološke spremembe, ki zajemajo povečano nastajanje citokinov, povečano prepustnost krvno-možganske pregrade, infiltracijo imunskih celic ter povečano aktivacijo celic glije. Vse to prispeva k poškodbam in nazadnje tudi k selektivni izgubi nevronov ter napredovanju nevrodegenerativnih bolezni. Raziskovalci posebno pozornost namenjajo mikroglijji, ki velja za osrednjega akterja vnetja CŽS (3). Aktivacija mikroglije in posledični vnetni odziv ključno prispevata k patogenezi številnih nevrodegenerativnih bolezni, zato ima razumevanje osnovnih karakteristik mehanizma aktivacije celic mikroglije ter posledične progresivne nevrotoksičnosti pomembno terapevtsko vrednost (4).

1.1.1 Vloga mikroglije pri nevrodegeneraciji

Celice mikroglije so makrofagom podobne celice z razčlenjeno morfologijo, ki izvirajo iz matičnih celic mieloidne vrste in predstavljajo približno 12 % vseh možganskih celic. V normalnih in zdravih možganih je mikroglija v mirujočem stanju, kjer aktivno nadzoruje okoliško tkivo in je v stalni pripravljenosti, da se ob morebitnih znakih grožnje CŽS preobrazi v aktivno stanje (5, 6). Mikroglija, tako v mirujočem kot tudi v aktivnem stanju izraža razne proteine oziroma označevalce na površini membrane, ki jih izkoriščamo za njeno detekcijo, na primer Iba-1, CD11b, CD68, HLA-DR in druge (7).

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

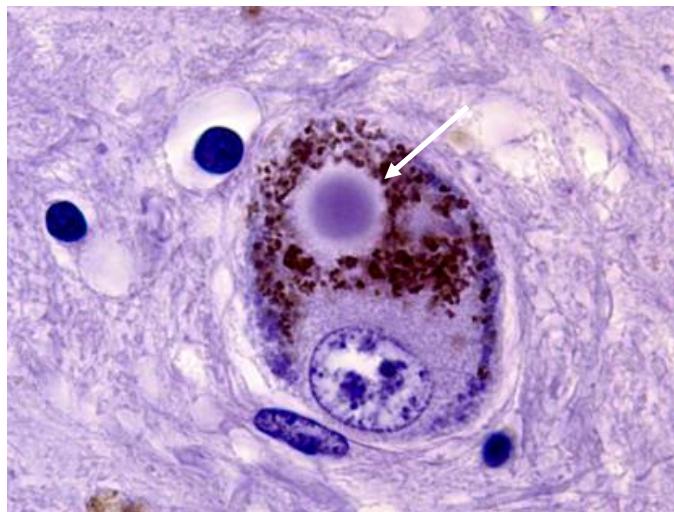


Slika 1: Prikaz celice mikroglije, označene s specifičnim protitelesom proti Iba-1 (7)

Ishemija, travme, infekcije, nevrodegenerativne bolezni ali spremenjena nevronska aktivnost pripeljejo do porušenja homeostaze v možganih. To izzove hitro in korenito preobrazbo mikroglije iz mirujočega v njeno aktivno stanje z ameboidno obliko celic, spremenjenim genskim izražanjem, spremenjenim funkcionalnim delovanjem in sproščanjem citotoksičnih vnetnih mediatorjev, kot so superoksid, dušikov oksid (NO), tumor nekrotizirajoči faktor α (TNF- α), interlevkin-6 (IL-6) ter nekateri drugi (5, 6, 8). Ti spodbudijo močan imunski odziv, ki pripelje do kroničnega vnetnega odziva in posledične izgube nevronov (9). Primarna naloga aktivirane mikroglije je podpora in zaščita integritete CŽS (6), kar izkazuje predvsem s sproščanjem nevrotrofičnih faktorjev, kot so živčni rastni dejavnik, nevrotrofin-3 in nevrotrofični dejavnik možganskega izvora. Ti nudijo trofično podporo zdravim nevronom (10, 11), kar predstavlja pomemben dejavnik, ki preprečuje prekomerni vnetni odziv CŽS in posledično nevrodegeneracijo. Še vedno pa ostaja odprto vprašanje, do katere meje je aktivacija mikroglije dejansko koristna in v prid možganski homeostazi oziroma pod kakšnimi pogoji ter preko katerih mehanizmov celice mikroglije preprečujejo ali zatrejo oziroma pospešijo napredovanje določenih bolezni CŽS, kot je na primer Parkinsonova bolezen (PB) (6).

1.1.2 Parkinsonova bolezen

PB je progresivna nevrodegenerativna bolezen, za katero so značilne tri poglavitne patološke lastnosti: agregacija α -sinukleina v nevronih, t.i. Lewy-jeva telesca in Lewy-jevi nevriti, motena aktivacija imunskega odziva v črnem jedru in degeneracija dopaminergičnih nevronov v nigrostriatni regiji, kjer posledično pride tudi do pomanjkanja dopamina (4, 12).



Slika 2: Lewy-jevo telesce znotraj možganske celice v črnem jedru, označeno s puščico (13)

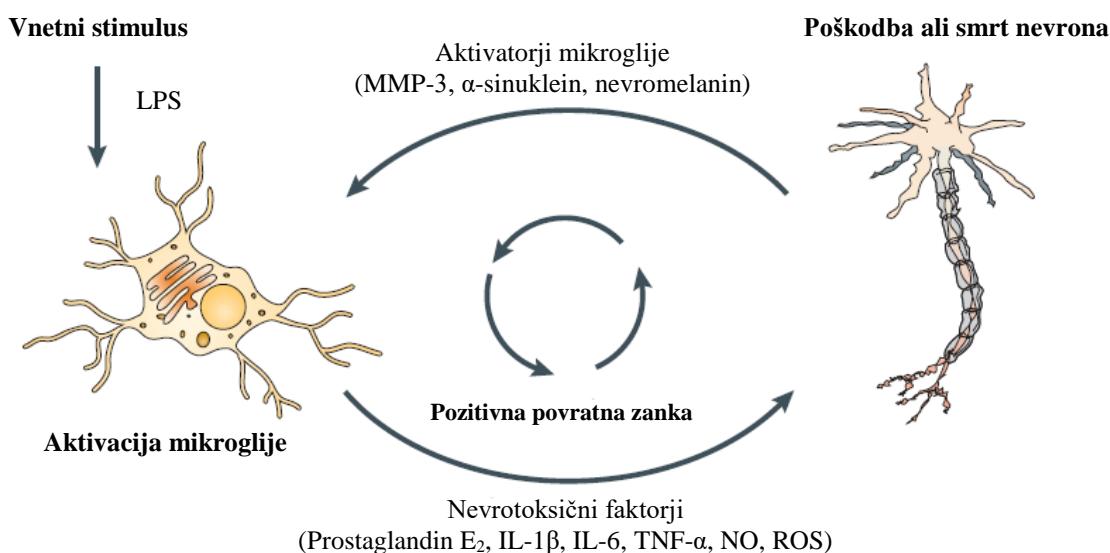
Motorični simptomi PB, kot so tremor v mirovanju, mišična rigidnost, bradikinezija in motnje ravnotežja, se pojavijo šele pri napredovalih oblikah bolezni, ko v črnem jedru že pride do ireverzibilne izgube dopaminergičnih nevronov. V zadnjih raziskavah so se osredotočili tudi na ne-motorične simptome, ki se pojavijo v zgodnji fazi PB, in h katerim prištevamo hipozmijo, gastrointestinalne spremembe ter motnje spanja. Vzroki za slednje so sicer neznani, ampak v nekaterih študijah so poročali o delni povezavi s patologijo α -sinukleina. Tako še vedno ostaja nejasno, ali ima vnetni odziv poglavito vlogo tudi v zgodnjih fazah PB (12).

Aktivacija mikroglije in posledično progresivno vnetje v CŽS na splošno pomembno prispevata k patogenezi PB (4, 12). Vprašanje je, kaj je tisto, kar na začetku sproži nenadzorovan cikel vnetnega odziva in degeneracije nevronov. V nekaterih raziskavah so poročali, da bi mikroglija lahko bila neposredno aktivirana s prekomerno izraženim in nepravilno zvitim proteinom, α -sinukleinom, ki ga sproščajo nevronske celice. *In vivo* študije so namreč pokazale, da se α -sinuklein sprošča tudi v zunajcelični prostor, poleg tega, da se agregati α -sinukleina z ekso- ter endocitozo prenašajo med nevroni, kar vodi do nastanka že omenjenih znotrajceličnih vključkov oziroma Lewy-jevih telesc (12).

V raziskavah so v *post-mortem* možganih pacientov s PB kot znak aktivacije mikroglije v črnem jedru, kjer je bila izguba dopaminergičnih nevronov največja, pokazali prisotnost HLA-DR in CD11b-pozitivnih celic. Prav tako so v možganih odkrili povišane ravni vnetnih mediatorjev, kot so TNF- α , IL-1 β , IL-6, reaktivne kisikove zvrsti (ROS), eikozanoide, povišano raven NO v cerebrospinalni tekočini pacientov s PB ter povišano raven izražanja

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

inducibilne dušikov oksid sintaze (iNOS) znotraj črnega jedra (4). *In vitro* študije so pokazale, da imajo pri spodbujanju nevrodegenerativnih procesov, prisotnih pri PB, poleg aktivirane mikroglije pomembno vlogo tudi poškodovani nevroni, saj sproščajo vrsto faktorjev, ki naj bi dodatno aktivirali mikroglijo. Matriks metaloproteinaza-3 (MMP-3), α -sinuklein in nevromelanin so se izkazali kot dejavniki, ki se izločajo iz poškodovanih dopaminergičnih nevronov ter dodatno spodbujajo nastanek in sproščanje ROS iz prekomerno aktivirane mikroglije (5).



Slika 3: Shema aktivacije mikroglije (5)

Vedno več je dokazov, da aktivirana mikroglija sproži sintezo in izločanje lizosomskih proteaz, cisteinskih katepsinov, med njimi tudi katepsina X (14, 15, 16). Vloga slednjega je bila pokazana na celičnem modelu aktivirane mikroglije, ki posnema procese, prisotne pri PB. Zaviranje delovanja katepsina X v celicah mikroglije se je izkazalo za nevroprotективno (16), kar nakazuje na pomembno vlogo katepsina X pri nevrodegenerativnih boleznih s spremljajočim vnetnim odzivom, kar je značilnost poteka PB.

1.2 CISTEINSKI KATEPSINI

Cisteinski katepsini se kot proteazni encimi prvenstveno nahajajo v celičnih organelih, obdanih z membrano, ki se imenujejo lizosomi. Ti delujejo kot presnovni sistem vsake posamezne celice in so odgovorni za razgradnjo proteinov in nekaterih drugih makromolekul (17). Proteaze glede na skupnega prednika razvrščamo v klane, ki so sestavljeni iz več

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

posameznih družin. Cisteinske katepsine uvrščamo v klan CA oziroma v družino cisteinskih peptidaz C1a. Družine v istem klanu so si podobne predvsem v terciarni strukturi, posamezne proteaze pa so združene v družine na podlagi homologije aminokislinskega zaporedja. Cisteinski katepsini sestavljam največjo katepsinsko družino z 11 proteazami, in sicer B, C, L, F, H, K, O, S, V, X in W (18, 19), med njimi najdemo tako endo- kot tudi eksopeptidaze. Večina cisteinskih katepsinov je endopeptidaz, medtem ko katepsin B poleg endopeptidazne aktivnosti lahko izkazuje tudi eksopeptidazno aktivnost kot peptidil-dipeptidaza, endopeptidaza katepsin H pa aminopeptidazno aktivnost. Poleg katepsina B, sta eksopeptidazi tudi katepsina C in X, pri čemer katepsin C izkazuje aminopeptidazno aktivnost, katepsin X pa deluje kot karboksi-monopeptidaza ali karboksi-dipeptidaza (18, 20).

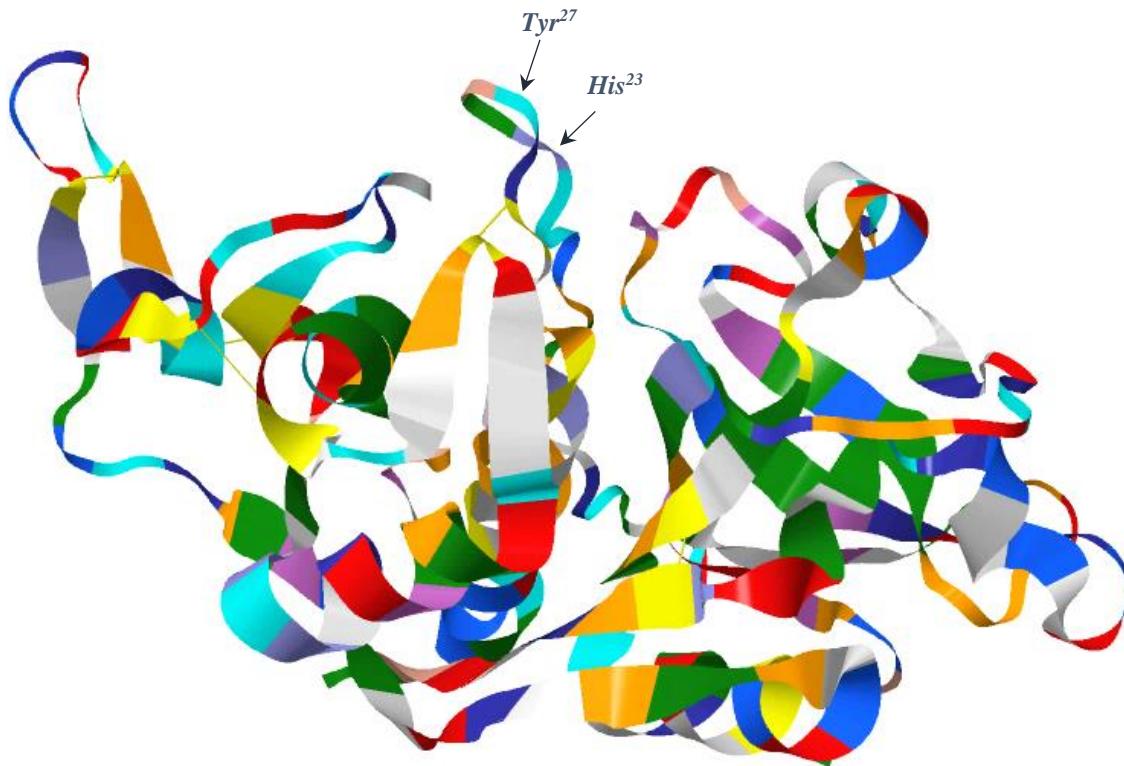
Večina lizosomskih encimov je kislih hidrolaz, aktivnih samo pri kislem pH-ju ($\text{pH} \sim 5$) in nestabilnih v nevtralnem okolju citoplazme ($\text{pH}=7,2$). S tem je dosežena dvojna zaščita pred nekontrolirano razgradnjo vsebine citosola, saj bi v primeru poškodovane lizosomske membrane sproščene kisle hidrolaze izgubile aktivnost (17). Za katepsine, kot pripadnike lizosomskih encimov, velja enako. Edina izjema je katepsin S, ki naj bi tudi pri nevtralnem pH-ju ohranil večino svoje aktivnosti (21). Kljub temu so odkrili pomembne funkcije katepsinov tudi zunaj celic in v drugih predelih znotraj njih, kot so sekretorni vezikli, citosol in jedro (22). To se seveda ni ujemalo z dotedanjim dejstvom, da so cisteinski katepsini odgovorni samo za nespecifično razgradnjo proteinov v kislem okolju lizosomov. V zadnjem času cisteinske katepsine poleg razgradnje proteinov povezujejo z vrsto fizioloških procesov, hkrati pa jim pripisujejo tudi pomembno vlogo v raznih patoloških obolenjih (2, 23). Izbrane vloge so povezane tudi z njihovo omejeno tkivno porazdelitvijo, ki je značilna predvsem za katepsine S, V in K (24). Katepsinom tako med drugim pripisujejo vlogo pri procesiranju proteinov, nevropeptidov in hormonov, glavnega histokompatibilnega kompleksa, pri predstavljavi antigenov, remodelizaciji kosti, apoptozi in diferenciaciji keratinocitov (2). Po drugi strani lahko motnja normalne encimske aktivnosti vodi do bolezenskih stanj in lizosomske cisteinske proteaze pri tem niso nobena izjema (24). Vsako nepravilno uravnavanje v izražanju katepsinov ali njihovi proteolitični aktivnosti namreč zmoti celično homeostazo, to pa je pogosto razlog za zunajcelično lokalizacijo katepsinov (25). Slednje tako povezujejo s številnimi obolenji, kot je razvoj in napredovanje tumorjev,

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

vnetni odziv, luskavica, mišična distrofija, ateroskleroza, revmatoidni artritis, osteoporiza, akutni pankreatitis in nevrodegeneracija (2).

1.2.1 Katepsin X

Katepsin X je zadnji odkriti član družine cisteinskih peptidaz. Poseduje številne edinstvene karakteristike, ki encimu doprinesajo značilne lastnosti in zaradi katerih se jasno razlikuje od drugih cisteinskih katepsinov. Ima zelo kratko proregijo, ki vsebuje 38 aminokislinskih ostankov, v primerjavi s katepsinom B, ki jih ima 62 in katepsinom C, ki jih vsebuje 206. Proregija katepsina X vsebuje cisteinski ostanek Cys^{10p}, ki bi lahko, tako kot pri katepsinu B in H, imel posebno vlogo pri uravnavanju lastne katalitične aktivnosti. Prav tako so na proregiji odkrili zaporedje RGD (Arg-Gly-Asp), ki v proteinih, kot je fibronektin, služi kot prepoznavno mesto za receptorje na celični površini - integrine. Aktivni katepsin X ima kar 11 cisteinskih ostankov, s katerimi lahko tvori najmanj 5 disulfidnih vezi. Naslednja posebna značilnost encima sta dva peptidna vključka, in sicer je prvi sestavljen iz treh aminokislín His-Ile-Pro in se nahaja med Gln²² oksianionske luknje ter cisteinom v aktivnem mestu in drugi, sestavljen iz 15 aminokislinskih ostankov, ki naj bi bil pomemben za njegovo karboksi-dipeptidazno aktivnost (26). Lokacija gena za katepsin X je prav tako posebna in se razlikuje od ostalih do takrat poznanih katepsinov in se nahaja na 20. kromosому regije q13 (27). Na splošno cisteinske proteaze pri delovanju uporabljajo molekulo vode, ki kot nukleofil napade karbonilno skupino v amidni vezi pri čemer sta v aktivnem mestu encima ključnega pomena aminokislinska ostanka Cys³¹ in His¹⁸⁰, ki ju imenujejo katalitična diada. Pri katepsinu X je podobno, saj je katepsin X monomer sestavljen iz leve in desne domene, ki sta na vrhu ločeni in tvorita žep v obliki črke V, v kateri sta omenjeni aminokislini aktivnega mesta (28). Kristalna struktura katepsina X podaja njegovo posebnost, in sicer »mini-zanko«, sestavljeno iz treh aminokislinskih ostankov, ki so usmerjeni v aktivno mesto encima. Tyr²⁷ na eni strani zanke tvori površino za vezavo substrata v S1 žep, His²³ na drugi strani pa naj bi moduliral karboksi-monopeptidazno ozziroma karboksi-dipeptidazno aktivnost s preklapljanjem med dvema različnima konformacijama stranske verige (28).



Slika 4: Kristalna struktura molekule katepsina X. Na sredini, v zgornjem delu slike, je vidna »mini zanka« med Tyr^{27} in His^{23} . Z rumenimi palčkami so označene disulfidne vezi znotraj molekule (29).

1.2.2 Lokalizacija in funkcija katepsina X

Na začetku so domnevali, da je katepsin X vespresto prisoten v tkivih in so mu zato pripisovali vlogo običajnega zaščitnega encima, ki je v različnih celicah vključen v nespecifični katabolizem znotrajceličnih proteinov v sklopu endo-lizosomskega sistema. Kljub temu pa niso izključili možnosti, da zaradi tega katepsin X ne bi mogel posedovati specifične funkcije v organizmu (26). Pripisovali so mu tudi vlogo pri razvoju tumorjev, saj so pokazali, da je prisoten v vrsti humanih rakavih celičnih linijah in v primarnih tumorjih (27). Potem ko so pričeli proučevati prisotnost in raven katepsina X s pomočjo specifičnih monoklonskih protiteles proti katepsinu X, so začela na dan prihajati nova dognanja o njegovem porazdelitvenem profilu v tkivih. Najvišje ravni katepsina X so našli v bronhialnih epitelijskih celicah, alveolarnih makrofagih, pro-monocitni celični liniji U-937, v monocitih in dendritičnih celicah. Pokazali so tudi, da je raven katepsina X pravzaprav nizka v primarnih tumorjih in malignih celičnih linijah ter izključili njegovo vlogo pri razgradnji zunajceličnega matriksa, ki tumorskim celicam omogoča invazijo, migracijo in metastaziranje. Funkcijo katepsina X so potem takem, glede na povišano izražanje v imunskih celicah, povezovali z vnetnim in imunskim odzivom in ne z razvojem ter

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

napredovanjem raka (30). Povišano raven katepsina X so nadalje odkrili v želodčni sluznici ob infekciji z bakterijo *Helicobacter pylori* (31) ter v plazmi pacientov z obsežnimi travmatološkimi poškodbami (32). Kasneje so v raziskavi na mišjih možganih ugotovili, da je katepsin X izražen tudi v večini možganskih celic. Prisoten je že v zgodnjem razvoju, nivo izražanja in aktivnost v nevronskih celicah pa se s starostjo še povečuje. Na mišjem modelu Alzheimerjeve bolezni so pokazali povišano izražanje katepsina X v okolini amiloidnih plakov, ki so znak patogeneze te bolezni, slednje izražanje pa je bilo omejeno predvsem na celice mikroglije (33, 34). Podobno izražanje katepsina X so opazili tudi na mišjem modelu amiotrofične lateralne skleroze (33), kar vse skupaj nakazuje na pomembno vlogo katepsina X v nevrodgenerativnih procesih. Pripisujejo mu tudi vpletenost v vnetni odziv, povezan z nevrodgeneracijo. V vnetni odziv so vključene dendritične celice, ki v patoloških okoliščinah infiltrirajo v možgane ter prispevajo k napredovanju in vztrajanju vnetnega odziva. Povišano raven katepsina X so tako pokazali v dendritičnih celicah v možganih, kar potrjuje vpletenost encima v vnetni proces, prisoten v CŽS (35). Slednje potrjujejo najnovejše raziskave, kjer so pokazali pomembno vlogo katepsina X pri aktivaciji mikroglije in posredovanega vnetnega odziva, ki vodi v degeneracijo nevronskih celic (16).

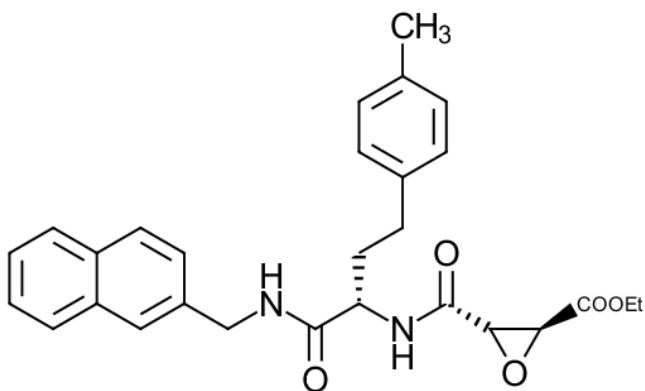
1.2.3 Mehanizmi nevrodgeneracije katepsina X

Povečano izražanje katepsina X v nevronskih celicah, ki so v fazi staranja ali pa so podvržene degenerativnim procesom, in v celicah glij pri nevrodgenerativnih obolenjih, kot tudi njegovo povečano izražanje in izločanje po aktivaciji mikroglije, nakazuje na pomembno vlogo katepsina X pri nevrodgenerativnih boleznih (15, 33). V nevronskih celicah in mikrogliji je tarča delovanja katepsina X γ -enolaza, glikolitični encim, ki izkazuje nevrotrofičnim dejavnikom podobno delovanje. Slednji omogočajo preživetje, proliferacijo, diferenciacijo, regeneracijo in vzdrževanje nevronov ter njihovih specifičnih povezav, zato so nevrotrofični dejavniki pomembni pri nevrodgenerativnih boleznih, saj s svojim delovanjem zaščitijo poškodovane nevrone pred nadaljnjam propadom in spodbujajo njihovo regeneracijo. Katepsin X s proteolitično cepitvijo C-terminalnega dipeptida γ -enolaze izniči njeno nevrotrofično in nevroprotektivno delovanje, zavralci katepsina X pa preprečijo razgradnjo γ -enolaze in tako ohranijo njeno nevrotrofično aktivnost v nevronskih celicah, kar se odraža v spodbujeni rasti nevritov in povečanem preživetju nevronskih celic (34, 36).

Pomembno vlogo katepsina X v nevrodgenerativnih procesih potrjujejo tudi rezultati na 6-hidroksidopaminskem (6-OHDA) celičnem modelu, saj zaviranje katepsina X zmanjša

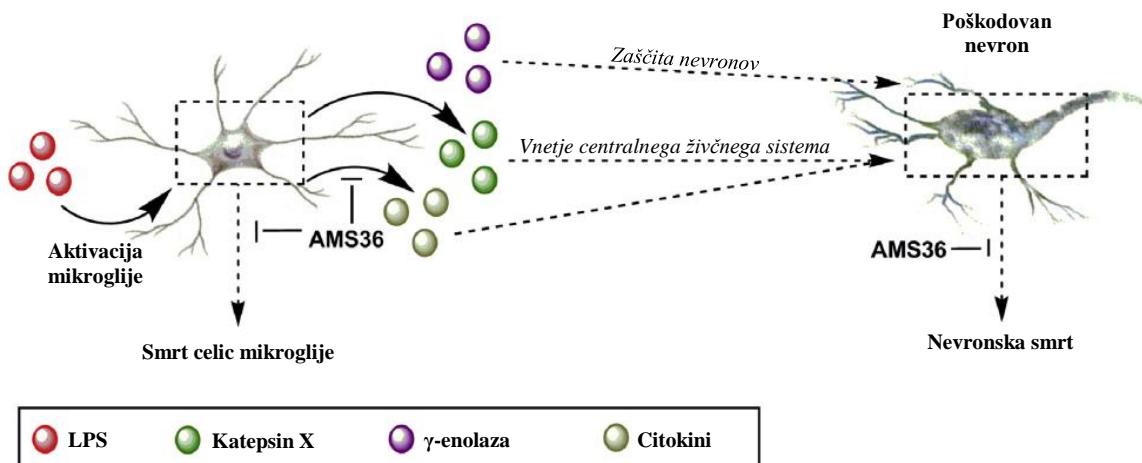
Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

apoptozo dopaminergičnih nevronov in zaščiti nevronske celice pred toksičnim delovanjem 6-OHDA (14). Hkrati so na celičnem modelu PB pokazali, da stimulacija celic mikroglije z lipopolisaharidom (LPS) povzroči povečano izražanje in aktivnost katepsina X kot tudi njegovo izločanje iz celic mikroglije. Zaviranje slednjega s specifičnim ireverzibilnim zaviralcem AMS36 pa zavre aktivacijo mikroglije in posledično zmanjša propad nevronskih celic.



Slika 5: Specifični ireverzibilni zaviralec katepsina X AMS36 (14)

Zaviralec AMS36 je tako značilno zmanjšal nastajanje in sproščanje NO, ROS in vnetnih citokinov, kot sta IL-6 in TNF- α , iz aktivirane mikroglije. Zaviranje delovanja katepsina X z AMS36 je zavrlo tudi celično smrt in apoptozo celic mikroglije preko zmanjšane aktivnosti kaspaze-3 ter tudi preko inhibicije MAPK (angl. *mitogen-activated protein kinase*) signalne poti. Značilno zmanjšanje z aktivirano mikroglijo posredovane nevrotoksičnosti se je pokazalo tudi na ko-kulturnem modelu mikroglije in nevronskih celic. Zaviranje katepsina X je tako pomemben pristop pri zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni, povezanih z vnetnim odzivom. Slednje pa postavlja zaviralce katepsina X kot potencialne učinkovine upočasnjevanja ali pa zavrtja patogeneze nevrodegeneracije (16).



Slika 6: Mehanizem delovanja katepsina X v nevrodegeneraciji, povzročeni z vnetjem (16)

1.3 INHIBITORJI CISTEINSKIH KATEPSINOV

1.3.1 Endogeni inhibitorji cisteinskih proteaz

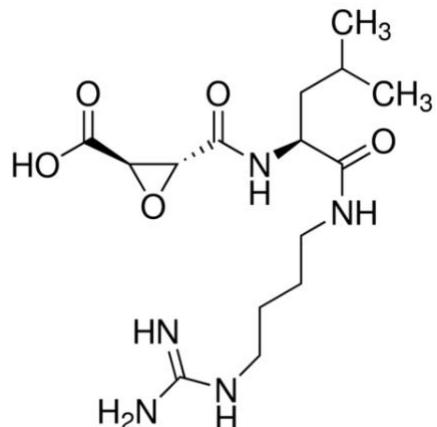
Med najbolj znane endogene inhibitorje cisteinskih proteaz spadajo cistatini, tiropini in serpini. Superdružina cistatinov je evolucijsko sorodna cisteinskim proteazam in velja za njihove glavne endogene inhibitorje (25). Delimo jih na cistatine tipa I ali stefine, ki delujejo v citosolu in jedru celic, cistatine tipa II, ki se izločajo v zunajcelični prostor ter na kininogene ali cistatine tipa III, ki so večfunkcionalni endogeni inhibitorji in se pretežno nahajajo v krvni plazmi (2). Na splošno se cistatini močno vežejo na cisteinske proteaze C1 družine, razen na katepsin X (23). Poglavitna vloga cistatinov je regulacija presežne proteazne aktivnosti katepsinov v celicah in tudi zunaj njih. Mutacija gena za cistatin in posledično porušeno ravnotežje med katepsini in endogenimi inhibitorji vodi do resnih nevroloških motenj, kar poudarja pomen njihove vloge pri uravnavanju proteolitične aktivnosti, ki je ključna za normalno delovanje nevronov in njihovih povezav (2).

1.3.2 Irreverzibilni in reverzibilni sintezni zaviralci katepsina X

Zaradi pomembnih regulatornih sposobnosti proteaz ter njihove vloge v različnih patoloških procesih, predvsem pri rakavih in nevrodegenerativnih obolenjih, se te omenjajo kot potencialne terapevtske tarče (19). Cistatini, kot splošni in neselektivni inhibitorji proteaz, bi pri pacientih povzročili stranske učinke, zato so se pri raziskovanju novih zaviralcev usmerili k sinteznim spojinam, ki bi specifično zavirale samo določen katepsin (2). Sčasoma so tako odkrili vrsto sinteznih zaviralcev cisteinskih katepsinov, ampak število tistih, ki bi specifično zavirale samo katepsin X, je še vedno zelo omejeno. Splošni irreverzibilni

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

zaviralec cisteinskih katepsinov, derivat epoksisukcinila E-64, izoliran iz glive *Aspergillus japonicus* (37), ki selektivno alkilira cisteinske ostanke v aktivnem mestu in ostane kovalentno vezan na encim (38), se ni izkazal kot močan zaviralec katepsina X.



Slika 7: Splošni zaviralec cisteinskih katepsinov E-64 (38)

Njegov derivat nPrNH-(2S,3S)tEps-Ile-OH prav tako izkazuje relativno nizko inhibitorno moč napram katepsinu X. Naslednji epoksisukcinilni derivat, sintetiziran po modelu zaviralca E-64 je AMS36, ki je v tumorskem tkivu pokazal dobro selektivnost za katepsin X, medtem ko so v drugih tkivih, kot so podganja jetra in ledvice, opazili očitno navzkrižno reaktivnost s katepsinom B. Kljub temu se AMS36 pogosto uporablja kot specifičen zaviralec katepsina X, največkrat vzporedno s specifičnim monoklonskim protitelesom proti katepsinu X 2F12 ali pa z utišanjem gena za katepsin X s specifično siRNA (angl. *small interfering ribonucleic acid*) (14, 37). Zaviralec katepsina X se je izkazal za spojino z nevroprotективnim delovanjem, saj je preko zaviranja katepsina X zmanjšal degeneracijo dopaminerigičnih celic posredovano s 6-OHDA (14). Prav tako je zaviralec AMS36 v nedavni raziskavi preko zmanjšanja aktivacije mikroglije, izkazoval zaščitni učinek na nevronske celice. Kot rezultat njegovega delovanja se je med drugim zmanjšala aktivnost kaspaze-3, aktivacija MAPK, povečalo se je celično preživetje in raven nevrotrofične γ -enolaze (16). Vendar pa zaradi omejene selektivnosti in ireverzibilnega mehanizma delovanja ter posledično ozkega terapevtskega okna AMS36 ni primeren za uporabo na pacientih. Ireverzibilni zaviralci namreč trajno zavrejo delovanje encima, kar pomeni, da se morajo encimi na novo sintetizirati in so poleg tega tudi slabše selektivni, saj so nagnjeni k vezavi na netarčne proteine. Potencialno terapevtsko uporabnih zaviralcev katepsina X tako nismo zasledili v dosedanji literaturi. Nadaljnje raziskave so zato usmerjene v iskanje novih,

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

reverzibilnih zaviralcev, ki bodo nizko molekularni, selektivni, visoko učinkoviti ter netoksični za celice, saj kot takšni predstavlajo najustreznejšo rešitev zdravljenja bolezni, ki so rezultat prekomerne aktivnosti proteaz (39).

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

2 NAMEN DELA

Katepsin X je cisteinska proteaza, ki je vključena v vrsto fizioloških ter patoloških procesov v človeškem organizmu. Ima pomembno vlogo pri aktivaciji mikroglije v CŽS in posledičnem vnetnem odzivu, ki sproži nevrodegenerativne procese.

Namen magistrske naloge je ovrednotiti učinkovitost reverzibilnih sinteznih specifičnih zaviralcev katepsina X, in sicer spojin z7, z9 in sp120 na celičnem modelu, ki posnema procese, prisotne pri Parkinsonovi bolezni.

Pri tem bomo uporabili celično linijo mikroglije BV2, ki jo bomo v prvem delu magistrske naloge stimulirali z reagentom LPS ter preverili uspešnost njene aktivacije z določanjem vnetnih dejavnikov v supernatantih aktivirane mikroglije. V nadaljevanju bomo na postavljenem modelu z določanjem vnetnih dejavnikov v supernatantih celic BV2 ovrednotili vpliv zaviralcev na aktivacijo mikroglije, posredovane z LPS, ter z določanjem celičnega preživetja, aktivnosti kaspaze-3 in apoptoze celic BV2, ovrednotili vpliv zaviralcev katepsina X na toksično delovanje LPS.

V zadnjem delu magistrske naloge bomo na celičnem modelu ko-kultur, mikroglije in nevronske celice, z določanjem celičnega preživetja preverili zaščitni vpliv zaviralcev katepsina X na degeneracijo nevronske celice, spodbujeno preko aktivirane mikroglije.

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Reagenti

Reagenti in topila, ki smo jih uporabljali pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge, so navedeni v Preglednici I. Pripravljeni so bili po navodilih proizvajalca in njihova čistota je presegala 97,0%.

Preglednica I: Seznam uporabljenih reagentov in topil z navedenim proizvajalcem

Reagent	Proizvajalec, država
Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH	Jiangsu Vcare Pharmatech Co, Kitajska
Ac-DEVD-AFC	Bachem, Švica
CHAPS	Sigma-Aldrich, ZDA
ditiotritol (DTT)	Sigma-Aldrich, ZDA
DMEM	Gibco, ZDA
DMSO	Sigma-Aldrich, ZDA
EDTA	Sigma-Aldrich, ZDA
fetalni goveji serum (FBS)	Gibco, ZDA
goveji serumski albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, ZDA
komplet reagentov Annexin V-FITC/PI	Sigma-Aldrich, ZDA
komplet reagentov: DC™ Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, ZDA
komplet reagentov: Griess Reagent System	Promega, ZDA
komplet reagentov: Mouse TH1/Th2/Th17	BD Biosciences, ZDA
Cytokine Kit	
L-glutamin	Sigma-Aldrich, ZDA
lipopolisaharid (LPS)	Sigma-Aldrich, ZDA
MTS	Promega, ZDA
nigrozin	Sigma-Aldrich, ZDA
PBS pufer	Sigma-Aldrich, ZDA
PEG 8000	Sigma-Aldrich, ZDA
penicilin/streptomycin	Sigma-Aldrich, ZDA
PI	Invitrogen, ZDA
sukroza	Sigma-Aldrich, ZDA
tripsin	Sigma-Aldrich, ZDA
Triton X-100	Fluka, ZDA

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

3.1.2 Izbrani zaviralci katepsina X

Zaviralci katepsina X, ki smo jih uporabili pri izvajanju eksperimentalnega dela magistrske naloge, so navedeni v preglednici II. Sintetizirani so bili na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za Farmacijo. Čistota zaviralca z7 je bila 98 % in zaviralca z9 96 %.

Preglednica II: Strukture izbranih zaviralcev katepsina X s konstantami zaviranja (K_i) katepsina X (40)

Spojina	Struktura	K_i (μM)
sp120		$29,20 \pm 2,44$
z7		$8,78 \pm 0,39$
z9		$2,45 \pm 0,05$

3.1.3 Laboratorijska oprema

Laboratorijski material in naprave, ki smo jih potrebovali za izvedbo eksperimentalnega dela magistrske naloge, so navedeni v Preglednici III.

Preglednica III: Seznam laboratorijske opreme z navedenim proizvajalcem

Laboratorijska oprema	Proizvajalec, država
avtomatska multikanalna pipeta	Biohit, Finska
avtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija Biohit, Finska
celični inkubator CO2 CB 210	Binder, Nemčija
centrifuga Eppendorf 5804R	Eppendorf, Nemčija

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

centrifuga HERAEVS Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, ZDA
čitalec mikrotitrskih plošč Tecan Safire ²	Tecan Group Ltd., Švica
centrifugirke	TPP, Velika Britanija
hladilnik (+4°C)	LTH, Slovenija
inkubator WTB BINDER	Binder, Nemčija
krioviale	Corning Costar, ZDA
LAF komora PIO SMBC 183AV	Iskra PIO, Slovenija
mikrocentrifugirke (epice)	Starstedt, Nemčija
mikroskop (inverttni)	Olympus, ZDA
mikrotitrskie plošče	Corning Costar, ZDA
naprava za sonificiranje	Mikro+polo, Slovenija
nastavki za pipete	Starstedt, Nemčija
plastenke za gojenje celičnih kultur	TPP, Velika Britanija
posoda s tekočim dušikom (-196°C)	Labmode Ltd., Velika Britanija
pretočni citometer Attune NxT	Thermo Fisher Scientific, ZDA
pretočni citometer BD FACS	BD Biosciences, ZDA
programska oprema FlowJo	FlowJo, ZDA
števna komora Bürker-Türk	BRAND, Nemčija
vibracijsko mešalo VIBROMIX 104ev	Tehtnica, Slovenija
vodna kopel (37°C)	Keison Products, Velika Britanija
zamrzovalnik (-20°C)	Gorenje, Slovenija
zamrzovalnik (-80°C)	Gorenje, Slovenija

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

3.1.4 Pufri

V Preglednici IV so navedeni pufri, ki smo jih uporabljali za izvedbo eksperimentalnega dela magistrske naloge. Pufre smo pripravili po spodaj navedeni sestavi, jih shranjevali pri 4°C in jih pred uporabo sterilno prefiltrirali.

Preglednica IV: Seznam uporabljenih pufrov in njihova sestava

PUFER	SESTAVA PUFRA
<i>Lizirni pufer za katepsin X</i>	0,05 M Na-acetat (pH = 5,5) 1 mM EDTA 0,1 M NaCl 0,25 % Triton X-100
<i>Lizirni pufer za kaspaze</i>	0,1 % Triton X-100 100 mM fosfatni pufer (pH=6,0) 1,3 mM EDTA 100 mM NaCl
<i>Aktivacijski pufer za katepsin X</i>	100 mM acetat (pH=5,5) 0,1 % PEG 8000 5mM DTT 1,5 mM EDTA
<i>Aktivacijski pufer za kaspaze</i>	20 mM PIPES (pH=7,2) 10 % sukroze 0,1 % CHAPS 1 mM EDTA 100 mM NaCl

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

3.1.5 Gojišča

V Preglednici V so navedena gojišča, ki smo jih uporabljali za izvedbo eksperimentalnega dela magistrske naloge. Gojišča smo pripravili po spodaj navedeni sestavi, jih shranjevali pri 4°C in jih pred uporabo sterilno prefiltrirali.

Preglednica V: Uporabljeni gojišča in njihova sestava

GOJIŠČE	SESTAVA GOJIŠČA
Gojišče za celice BV2 in SH-SY5Y	88 mL aDMEM 10 mL FBS 1,0 mL penicilin/streptomycin 1,0 mL L-glutamin Gojišče hranimo v hladilniku pri 4°C.
Brezserumsko gojišče za celice BV2	98 mL aDMEM 1,0 mL penicilin/streptomycin 1,0 mL L-glutamin Gojišče hranimo v hladilniku pri 4°C.
Gojišče za zamrzovanje celic	750 µL osnovnega gojišča aDMEM 600 µL FBS 150 µL DMSO Gojišče hranimo v hladilniku pri 4°C.

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

3.1.6 Celične linije

3.1.6.1 Celična linija BV2

BV2 je nesmrtna mišja adherentna celična linija izolirana iz možganov miši C57BL/6, ki izraža fenotip celic mikroglije, transformirane z v-raf/v-mic rekombinantnim retrovirusom. Celice BV2 izražajo številne lastnosti aktiviranih celic mikroglije, kot je protimikrobna aktivnost in fagocitoza (41).



Slika 8: Prikaz celične linije BV2 (41)

3.1.6.2 Celična linija SH-SY5Y

SH-SY5Y je humana nesmrtna celična linija celic perifernega živčevja (42). Izhaja iz nevroblastomske celične linije SK-N-SH, ki so jo pridobili iz metastaz kostnega tumorja in je primerna za *in vitro* študije nevrotoksičnosti pri PB, saj izraža številne celične označevalce, ki so značilni za dopaminergične nevrone (43, 44).

3.1.6.3 Odmrzovanje celičnih linij BV2 in SH-SY5Y

Zamrznjene celice prenesemo iz tekočega dušika (-196°C) in jih odtalimo na vodni kopeli pri temperaturi 37°C. Ker je celicam dodan toksičen krioprotektant DMSO, je potek dela hiter. Odtaljene celice prenesemo v 8 mL svežega gojišča za celice BV2 in SH-SY5Y ter jih centrifugiramo 5 minut pri 1200 obr/min. Usedlino celic resuspendiramo v 1 mL svežega gojišča ter celično suspenzijo prenesemo v 8 mL svežega gojišča, predhodno segretega na 37°C, v gojiščno plastenko.

3.1.6.4 Gojenje celičnih linij BV2 in SH-SY5Y

Za delitev celic so potrebni optimalni pogoji, zato jih gojimo v za to namenjenem celičnem inkubatorju z idealnimi razmerami za rast celičnih linij s temperaturo 37°C, atmosfero, nasičeno z vlogo ter 95% O₂ in 5% CO₂. Celice gojimo v gojiščni plastenki. Na 2-3 dni

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

izrabljeno gojišče zamenjamo z novim oziroma celice precepimo, ko dosežemo 70-80 % konfluentnost. Pri tem je adherentne celice potrebno odlepiti od podlage, pri čemer se poslužimo postopka tripsinizacije.

3.1.6.5 *Tripsinizacija*

Celice speremo s približno 5 mL PBS z dodatkom 0,02 % EDTA (PBS/EDTA), da odstranimo gojišče, ki bi kasneje lahko zaviralo delovanje tripsina. Nato dodamo 5 mL PBS/EDTA in 20 µL 0,05 % tripsina ter inkubiramo 10 minut pri 37°C. Pod invertnim mikroskopom preverimo, če so se celice odlepile in nadaljujemo z dodatkom gojišča direktno v gojiščno plastenko, da zavremo nadaljnjo delovanje tripsina. Vsebino prenesemo v centrifugirko in centrifugiramo 5 minut pri 1200 obr/min. Celice resuspendiramo v 1 mL svežega gojišča in odvzamemo ustrezni volumen suspenzije za štetje celic in predvidene nadaljnje poskuse.

3.1.6.6 *Štetje celic*

Za štetje celic k 50 µL homogene celične suspenzije dodamo 50 µL 0,02 % raztopine nigrozina, barvila, ki črno obarva le mrtve celice. Žive celice preštejemo s pomočjo Bürker-Türkove števne komore pod invertnim mikroskopom. Število celic v celični suspenziji smo izračunali s pomočjo spodaj navedene enačbe (Enačba 1).

$$N = 2 \times N' \times 10^4 / mL$$

Enačba 1: Štetje celic

N = število celic v 1 mL homogene celične suspenzije

N' = povprečno število pod mikroskopom preštetih celic

3.1.6.7 *Zamrzovanje celične linije BV2 in SH-SY5Y*

Ko se celice v gojiščni plastenki dovolj namnožijo, jih določen delež zamrznemo. Po tripsinizaciji celice centrifugiramo 5 minut pri 1200 obr/min in celično usedlino resuspendiramo v 1 mL svežega gojišča za zamrzovanje. Celično suspenzijo prenesemo v kriovialo, dodamo ustrezno količino DMSO in vialo s celicami zamrznemo pri -80°C ter jo čez 72-96 ur prenesemo v posodo s tekočim dušikom (-196°C).

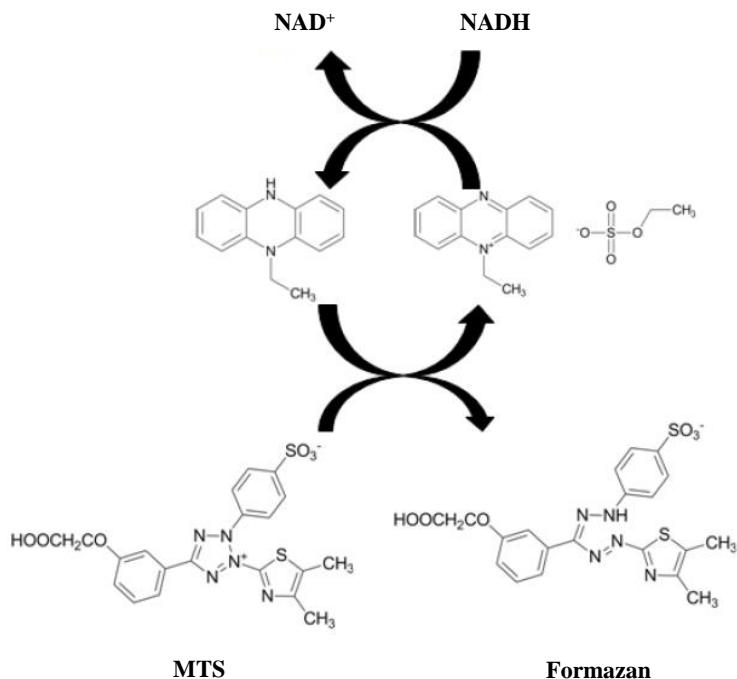
3.2 METODE

3.2.1 Spektroskopija

Spektroskopske metode temeljijo na razlikah v optičnih lastnostih molekul v različnih območjih elektromagnetnega spektra. Molekule, v odvisnosti od strukture in okolja, ki jih obdaja, absorbirajo svetlobo, ki je premo sorazmerna z njihovo koncentracijo. Prisotnost večjih delcev v vzorcu sipa svetlobo, zato merimo absorpcijo samo bistrim raztopinam. Posamezne molekule imajo različne absorpcijske spektre. S spektroskopijo lahko zasledujemo tudi kemijske reakcije s spremljjanjem razgradnje ustreznih substratov, kar je posebej uporabno v encimatiki (45).

3.2.1.1 *Spektrofotometrično določanje celičnega preživetja z reagentom MTS*

Spojino MTS ali 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol zaradi omejene celične permeabilnosti uporabljam v kombinaciji z intermediatnim akceptorjem elektronov fenazin etosulfatom. MTS spada med sintetizirane tetrazolijeve reducente, ki jih metabolično aktivne oziroma žive celice preko NADPH ali NADH dehidrogenaznih encimov pretvorijo vobarvani vodotopni formazan. Količina formazana je sorazmerna s številom živih celic in ga spektrofotometrično določimo pri valovni dolžini 492 nm (46).



Slika 9: Princip testa z reagentom MTS. Intermediatni akceptor elektronov, fenazin etosulfat, prenese elektron iz NADH do reagenta MTS, da nastane vodotopni formazan (46).

Izvedba določanja celičnega preživetja:

Celice BV2 nasadimo na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami, tako da v posamezno vdolbinico nanesemo po 100 µL celične suspenzije z ustrezno gostoto ($5 \times 10^3/100 \mu\text{L}$ gojišča). Celice naslednji dan tretiramo z zaviralci katepsina X (z7, z9 in sp120) pri koncentracijah 1-20 µM v brezserumskem gojišču (100 µL raztopine/vdolbinico), kot kontrolo uporabimo DMSO enakih koncentracij. Po 24 urah dodamo 10 µL reagenta MTS in po 60-minutni inkubaciji pomerimo absorbanco pri valovni dolžini 492 nm z avtomatskim čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan Safire². Rezultate prikažemo kot delež preživelih celic glede na posamezno kontrolo DMSO.

3.2.1.2 Določanje koncentracije proteinov po metodi DC (angl. detergent compatible)

Princip določanja koncentracije proteinov po metodi DC temelji na reakciji med bazično raztopino bakrovega tartrata (reagent A) z dodanim natrijevim dodecilsulfatom (reagent S), in proteini, kar vodi do redukcije Folinovega reagenta (reagent B). Redukcija reagenta B vodi do nastanka reduciranih spojin, ki imajo značilno modro barvo z maksimalno absorbanco pri 750 nm. Razvoj modre barve je predvsem posledica oksidiranih aromatskih aminokislinskih ostankov tirozina in triptofana. Za točno določitev koncentracije proteinov

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

rabimo umeritveno krivuljo s standardom BSA, ki ga pripravimo v istem pufru kot vzorce (47).

Priprava lizatov:

Celice BV2 nasadimo na ploščo s 6 vdolbinicami pri ustreznih gostotih (5×10^5 /2 mL gojišča). Naslednji dan jih predtretiramo z zavirci katepsina X (z7, z9 in sp120) pri koncentracijah 5 in 10 μM za 1 uro v brezserumskem gojišču. Za nadaljnjih 24 ur jih stimuliramo z reagentom LPS, ki ga pripravimo po navodilih proizvajalca (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Po končani inkubaciji celice tripsiniziramo, dodamo pufer PBS (1 mL), jih prenesemo v mikrocentrifugirke ter centrifugiramo 5 minut pri 2000 obr/min. Celično usedlino resuspendiramo v 1 mL PBS pufra ter še enkrat centrifugiramo 5 minut pri 2000 obr/min. Nazadnje dodamo lizirni pufer za katepsin X z namenom določanja aktivnosti katepsina X oziroma lizirni pufer za kaspaze z namenom določanja aktivnosti kaspaze-3, katerega volumen je sorazmeren z velikostjo pelete na dnu mikrocentrifugirke, kar vizualno ocenimo. Lizate zatem zamrznemo pri -80°C, da še dodatno popokajo celične membrane in se sprostijo celični proteini. Po odmrznitvi na ledu lizate soniciramo 1 x 10 sekund in jih 30 minut pustimo na led. Na koncu jih še enkrat centrifugiramo 15 minut pri 4°C in 15000 obr/min, da peletiramo delce in ostanke razkrojenih celic. Supernatante z izluženimi znotrajceličnimi proteini nato prenesemo v označene mikrocentrifugirke in jih znova zamrznemo pri -80°C, pripravljene za nadaljnje poskuse.

Izvedba določanja koncentracije proteinov za namen merjenja aktivnosti katepsina X in aktivnosti kaspaze-3:

Za določanje koncentracije proteinov uporabimo komplet reagentov, ki jih sestavljajo reagent A (bazična raztopina bakrovega tartrata), reagent B (Folinov reagent) in reagent S (natrijev dodecilsulfat). Pripravljene celične lizate vzamemo iz zamrzovalnika pri -80°C in jih odtalimo na led. Odvzamemo po 4 μL posameznega celičnega lizata in dodamo 8 μL ustreznega lizirnega pufra. Količino proteinov določamo s pomočjo standarda BSA. Standardne raztopine pripravimo v lizirnem pufru pri koncentracijah 0,2-1,5 mg/mL. Pred nanosom vzorcev na plošče, pripravimo še reagent A', in sicer na 1 mL reagenta A dodamo 20 μL reagenta S. Na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami napipetiramo po 5 μL standardov in redčenih vzorcev v duplikatih. V vse vdolbinice nato dodamo 25 μL reagenta A' in zatem še 200 μL reagenta B. Ploščo na koncu narahlo potresememo in z iglo popokamo

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

mehurčke, ki bi lahko zmotili naše meritve. Po 15 minutah z avtomatskim mikrotitrskim čitalcem plošč Tecan Safire² izmerimo absorbanco pri valovni dolžini 750 nm. S pomočjo umeritvene krivulje standarda BSA izračunamo koncentracijo proteinov v celičnih lizatih.

3.2.1.3 Določanje aktivnosti katepsina X v celičnem lizatu

Aktivnost katepsina X določamo z intramolekularno vezanim fluorogenim substratom Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH, specifičnim za katepsin X. Substrat je sestavljen iz fluorofora, oligopeptida in dušilca. Po cepitvi se fluorofor sprosti, kar zaznamo kot porast fluorescence, ki jo pri 420 nm kontinuirano merimo s spektrofotometričnem čitalcem mikrotitrskih plošč (20).

Pri merjenju aktivnosti katepsina X je za pridobitev primerljivih in reprezentativnih rezultatov pomembno, da imamo v vseh vzorcih enako celokupno koncentracijo proteinov, saj ne sme priti do razlik aktivnosti na račun različne koncentracije, pač pa na račun delovanja posameznih zaviralcev.

Izvedba določanja aktivnosti katepsina X:

Celice BV2 nasadimo na ploščo s 6 vdolbinicami pri ustrejni gostoti ($5 \times 10^5 / 2 \text{ mL}$ gojišča) in naslednji dan tretiramo z zaviralci katepsina X (z7, z9 in sp120) pri koncentracijah 5 in $10 \mu\text{M}$ za 24 ur v brezserumskem gojišču. Celične lizate pripravimo po zgoraj omenjenem postopku (*Priprava lizatov*) in pomerimo koncentracijo proteinov (*Izvedba določanja koncentracije proteinov*). Celični lizat redčimo v aktivacijskem pufru za katepsin X z dodanim DTT in EDTA do končne koncentracije proteinov $50 \mu\text{g}/200 \mu\text{L}$ ter inkubiramo 10 minut v vodni kopeli pri temperaturi 37°C . Za merjenje aktivnosti katepsina X uporabimo črno mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami, saj gre za fluorescenčno reakcijo in takšna plošča minimizira odsevanje in prekrivanje fluorescence. Na ploščo nanesemo najprej po $5 \mu\text{L}$ substrata Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH redčenega v lizirnem pufru za katepsin X, nato pa dodamo še po $95 \mu\text{L}$ aktiviranega lizata. Fluorescenco merimo kontinuirano 60 minut pri vzbujevalni valovni dolžini 320 nm in oddani pri 420 nm s spektrofotometričnim čitalcem plošč Tecan Safire². Rezultat podamo kot naklon linearne dela krivulje v odvisnosti od časa.

3.2.1.4 Določanje koncentracije NO v supernatantih mikroglij

V kislem okolju NO_2^- reagira s sulfanilamidom in nastali produkt se po dodatku N-1-naftilenetilendiamina dihidroklorida (NED) pretvori v vijoličnoobarvano azo spojino, katere

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

absorbanco izmerimo med 520 in 550 nm. Ker oba reagenta, tako sulfanilamid kot tudi NED, lahko reagirata s samim NO_2^- , je za večjo občutljivost reakcije pomembno, da ju dodamo zaporedoma z vmesnim premorom. Za točno določitev nitrita (NO_2^-), je za vsako posamezno Griess-ovo reakcijo potrebno pripraviti umeritveno krivuljo z nitritnim standardom NaNO_2 , saj je NO_2^- eden izmed primarnih, stabilnih in nehlapnih razpadnih produktov dušikovega oksida (48).

Izvedba določanja koncentracije NO:

Celice BV2 nasadimo na ploščo s 6 ($5 \times 10^5/2 \text{ mL}$ gojišča) ali 24 ($5 \times 10^4/1 \text{ mL}$ gojišča) vdolbinicami. Celice naslednji dan predtretiramo z zaviralci katepsina X (z7 in z9) pri koncentracijah 5 in 10 μM v brezserumskem gojišču za 1 uro in nato stimuliramo z reagentom LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) za nadalnjih 24 ur. Supernatante iz posameznih vdolbinic prenesemo v mikrocentrifugirke ter jih centrifugiramo 5 minut pri 1200 obr/min, da se posedejo celice, ki bi kasneje lahko motile izvedbo same reakcije. Po centrifugiranju supernatante shranimo na -80°C. Reagente za izvedbo Griessove reakcije za 15-30 minut postavimo na sobno temperaturo, saj jih hranimo v hladilniku pri temperaturi 4°C. Za vsak posamezen poskus določanja NO v supernatantih celic s pomočjo Griessove reakcije pripravimo umeritveno krivuljo, tako da iz 0,1 M nitritnega standarda z zaporednim redčenjem v brezserumskem gojišču pripravimo predpisane raztopine standardov s koncentracijami 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13 in 1,56 μM . Na mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami reverzno napipetiramo po 50 μL standardov in vzorcev v duplikatih in zatem v vsako vdolbinico dodamo 50 μL raztopine sulfanilamida in inkubiramo 5-10 minut na sobni temperaturi ter zaščiteno pred svetlobo. Nato dodamo še 50 μL NED raztopine. Po 5-10 minutni inkubaciji pomerimo absorbanco pri 520 nm z avtomatskim čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan Safire². S pomočjo umeritvene krivulje standardov izračunamo koncentracijo nitrita v supernatantih.

3.2.1.5 Določanje aktivnosti kaspaze-3 v celičnih lizatih

Kaspaza-3 je končni izvršitelj programirane celične smrti ali apoptoze (58) in se zato pogosto uporablja kot označevalec apoptoze. Po dodatku tetrapeptidnega sinteznega substrata Ac-DEVD-AFC se sprosti produkt 7-amino-4-trifluorometil kumarin ali AFC, kot rezultat proteolitičnega delovanja kaspaze-3 na vez med aspartatom (D) in AFC. Sproščeni fluorokrom merimo s spektrofotometričnim čitalcem plošč pri vzbujevalni valovni dolžini 405 nm in oddani pri 535 nm (49).

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

Izvedba določanja aktivnosti kaspaze-3:

Celice BV2 nasadimo na ploščo s 6 vdolbinicami pri ustreznih gostotih ($5 \times 10^5 / 2 \text{ mL}$ gojišča) in naslednji dan najprej predtretiramo z zaviralci katepsina X (z7 in z9) pri koncentracijah 5 in 10 μM za 1 uro v brezserumskem gojišču, nato pa celice stimuliramo z reagentom LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) za nadalnjih 24 ur. Celične lizate pripravimo po zgoraj opisanem postopku (*Priprava lizatov*) ter pomerimo koncentracijo proteinov (*Izvedba določanja koncentracije proteinov*). Količino proteinov v celičnih lizatih umerimo z lizirnim pufrom za kaspaze do končne vrednosti 20 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ pufra. Za merjenje oddane fluorescence, uporabljamo črno mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami. Pred začetkom eksperimenta si pripravimo ustrezeno dvojno količino aktivacijskega pufra za kaspaze, saj delamo v duplikatih. V vdolbinice nato nanesemo po 50 μL sveže pripravljenega aktivacijskega pufra in zatem še po 50 μL normiranih lizatov, razen v kontrolo, s katero bomo določili prispevek ozadja in kamor namesto vzorca dodamo 50 μL lizirnega pufra. Inkubiramo 30 minut pri 37°C. Pred merjenjem emitirane fluorescence k vzorcem in kontroli dodamo 10 μL 1 mM substrata za kaspaze-3 Ac-DEVD-AFC in 30 minut kontinuirano merimo intenziteto oddane fluorescence pri 535 nm z avtomatskim čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan Safire². Rezultate predstavimo kot naklon linearne dela krivulje ali porast fluorescence v odvisnosti od časa.

3.2.2 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je metoda, ki se nanaša na individualni prikaz fizikalnih in biokemijskih lastnosti celic. Pri tem suspenzija celic potuje skozi ozek snop laserske svetlobe, ki se odbija oziroma razprši v odvisnosti od strukturnih lastnosti posamezne celice. V pretočnem citometru imamo fotodetektorja FALS (angl. *forward angle light scatter*) in RALS (angl. *right angle light scatter*), ki merita količino razpršene svetlobe. Svetloba se lahko tudi absorbira, če na celice predhodno vežemo fluorokrome. Pri tem fluorescenčni detektorji merijo oddano svetlobo vzbujenih fluorescenčnih barvil. Takšna analiza je nedestruktivna in omogoča procesiranje na deset tisoč celic v sekundi ter sočasno spremeljanje številnih celičnih lastnosti (50, 51).

3.2.2.1 Določanje citotoksičnosti

Propidijev jodid (PI) je fluorescentno barvilo oziroma interkalator, ki se vrine med bazne pare DNK. Pri tem ni permeabilen za membrane živih celic, lahko pa prehaja v celice, ki so bile podvržene celični smrti in imajo poškodovano celično membrano, zato se lahko uporablja za določanje celične smrti. Suspenzijo celic obsevamo z vzbujevalno svetlobo pri

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

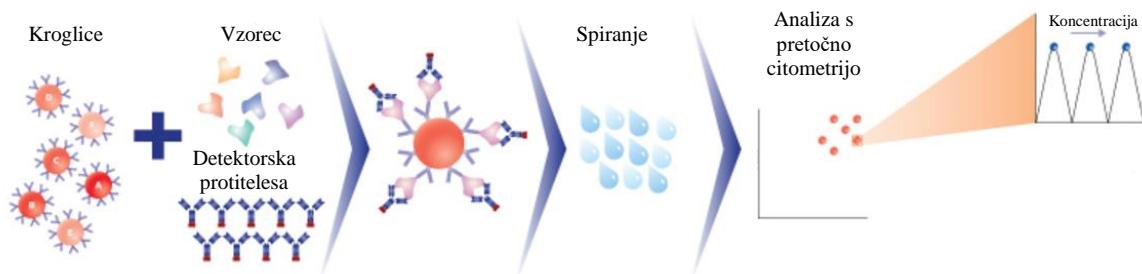
535 nm in nato merimo relativno intenziteto oddane svetlobe pri valovni dolžini 617 nm, ki je sorazmerna z deležem mrtvih celic (52). Rezultate podamo kot delež PI-pozitivnih celic, normiranih na ustrezeno kontrolo DMSO.

Izvedba določanja citotoksičnosti s PI:

Celice BV2 nasadimo na ploščo s 24 vdolbinicami z ustrezeno gostoto (5×10^4 /1 mL gojišča). Po 24 urah jih predtretiramo z zaviralci katepsina X (z7 in z9) pri koncentracijah 5 in 10 μM v brezserumskem gojišču. Po 1 uri jih stimuliramo z reagentom LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ter nadalje inkubiramo 16 in 24 ur. Po slednjih časovnih točkah jih pripravimo na analizo s pretočnim citometrom. Celice najprej tripsiniziramo, jih prenesemo v epruvete in speremo z 1 mL na 37°C ogretega PBS. Suspenzijo celic centrifugiramo 5 minut na 2000 obr/min, zavrzemo supernatant in usedlino celic resuspendiramo v 250 μL ogretega PBS. V posamezno epruveto, razen v kontrolno, dodamo 5 μL PI, 15 minut inkubiramo pri 37°C ter nato vzorce pomerimo s pretočnim citometrom Attune NxT in rezultate obdelamo s programsko opremo FlowJo.

3.2.2.2 Določanje koncentracije citokinov

Raven citokinov določamo z uporabo kompleta s kroglicami za določanje posameznih citokinov kot so interlevkin-2 (IL-2), interlevkin-4 (IL-4), interlevkin-6 (IL-6), interferon- γ (IFN- γ), TNF- α , interlevkin-17A (IL-17A) in interlevkin-10 (IL-10). Vsaka kroglica ima specifično velikost in fluorescenco ter je konjugirana s protitelesi, specifičnimi za posamezen citokin. Po inkubaciji kroglic z vzorci oziroma supernatanti in s PE-konjugiranimi detektorskimi protitelesi nastanejo kompleksi, ki jih pomerimo s pretočnim citometrom. PE-konjugirano protitelo oddaja fluorescentni signal, ki je sorazmeren s količino vezanega analita. Rezultat podamo kot koncentracijo določenega citokina v vzorcu v pg/mL (53).



Slika 10: Princip določanja citokinov (54)

Izvedba določanja koncentracije citokinov:

Na mikrotitrsko ploščo s 6 ($5 \times 10^5 / 2 \text{ mL gojišča}$) ali 24 ($5 \times 10^4 / 1 \text{ mL gojišča}$) vdolbinicami nasadimo celice BV2, ki jih naslednji dan 1 uro predtretiramo z zaviralci katepsina X (z7 in z9) pri koncentracijah 5-20 μM v brezserumskem gojišču ter jih nato stimuliramo z reagentom LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) za dodatnih 24 ur. Sproščene citokine nato določamo v celičnih supernatantih, ki smo jih centrifugirali 5 min pri 1200 obr/min ter jih shranili pri -80°C. V epruvete prenesemo po 20 μL raztopine s kroglicami za posamezen citokin (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A in IL-10). Dodamo 20 μL posameznega supernatanta in na koncu še 20 μL detekcijskega reagenta. Vsebino kontrolnega vzorca pripravimo na enak način, namesto supernatanta pa dodamo 20 μL brezserumskega gojišča. Inkubiramo 2 uri zaščiteno pred svetljobo, nato dodamo 0,5 mL PBS in centrifugiramo 5 minut pri 300 obr/min. Pelete resuspendiramo v 300 μL pufra ter pomerimo s pretočnim citometrom BD FACS. Rezultate analiziramo s programsko opremo FlowJo.

3.2.2.3 Določanje deleža apoptotičnih celic

Kombinacija kompleta reagentov Aneksin V-FITC in PI nam omogoča, da obenem določimo delež živih celic, zgodnje apoptotičnih, pozno apoptotičnih in nekrotičnih celic. V živih celicah se fosfatidilserin s pomočjo od Mg-ATP odvisne aminofosfolipidne transferaze prenese na notranjo stran lipidnega dvosloja. V zgodnji fazi apoptoze pa v celicah pride do izgube fosfolipidne asimetrije. Fosfatidilserin se tako prenese na zunanj stran celične membrane in postane dostopen za detekcijo s pomočjo komercialno dostopnih reagentov, ki vežejo prosti fosfatidilserin. Določamo ga s kompletom Aneksin V-FITC (Aneksin V, konjugiran s fluorokromom fluorescein izotiociantom (FITC)), ki pri merjenju s pretočnim citometrom oddaja zeleno fluorescenco. Hkrati smo uporabili tudi reagent PI, ki prehaja samo v celice, ki so podvržene celični smrti in ga zaznamo kot rdečo fluorescenco (55).

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

Izvedba določanja deleža apoptočnih celic:

Na ploščo s 24 vdolbinicami nasadimo celice BV2 (5×10^4 /1 mL gojišča). Naslednji dan jih predtretiramo 1 uro z zavirci katepsina X (z7 in z9) pri koncentraciji $10 \mu\text{M}$ v brezserumskem gojišču. Čez 1 uro jih stimuliramo z reagentom LPS ($1 \mu\text{g/mL}$) in inkubiramo nadaljnjih 24 ur. Nato izvedemo tripsinizacijo, celice speremo z 2 mL PBS pufra ter jih centrifugiramo 5 min pri 2000 obr/min. Zavržemo supernatant in celice resuspendiramo v $350 \mu\text{L}$ vezalnega pufra ter dodamo $3,5 \mu\text{L}$ Aneksina V-FITC in $7,0 \mu\text{L}$ PI. Vzorce inkubiramo pri sobni temperaturi in zaščitene pred svetlobo 10 minut, nato jih pomerimo s pretočnim citometrom Attune NxT in delež posameznih subpopulacij celic analiziramo s programsko opremo FlowJo.

3.2.3 Statistično vrednotenje rezultatov

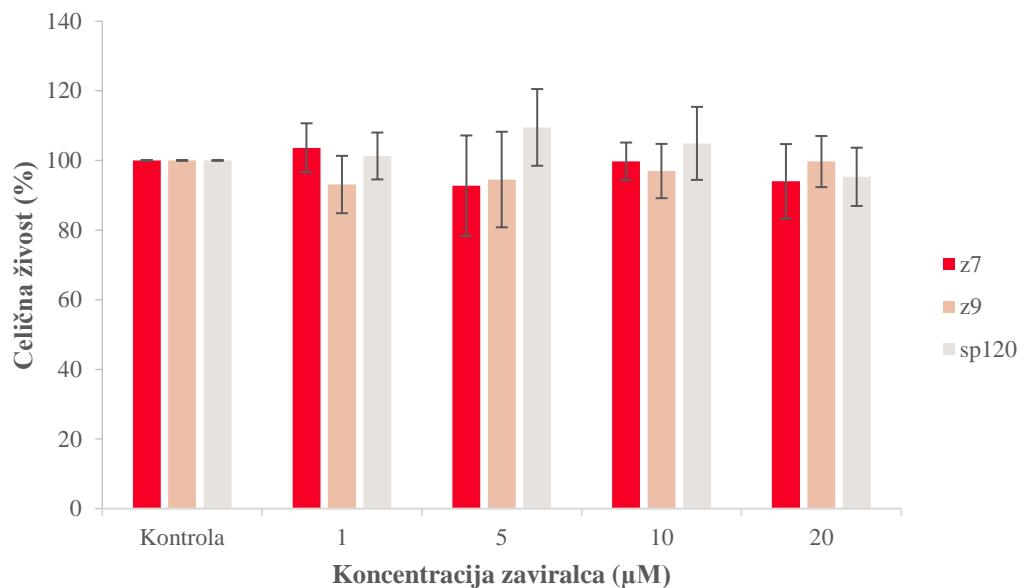
Statistično ovrednotene rezultate smo prikazali kot povprečno vrednost več (n) neodvisnih bioloških meritev \pm standardna deviacija (SD). Razlike med vzorci smo analizirali z uporabo statistične metode dvostranskega Student t-testa dveh neodvisnih vzorcev, pri čemer smo upoštevali predpostavko o neenakosti varianc. S t-testom smo izračunali P vrednosti in razlike med vzorci ovrednotili kot statistično značilne, če je bila vrednost $P < 0,05$, kar smo označili z zvezdico (*) pred P. Analiza je bila izvedena s pomočjo programske opreme Microsoft Excel 2016.

4 REZULTATI

4.1 VREDNOTENJE REVERZIBILNIH SINTEZNIH ZAVIRALCEV KATEPSINA X NA CELIČNI LINIJI MIKROGLIJE

4.1.1 Vpliv zaviralcev katepsina X na celično živost celic mikroglije

Toksičnost reverzibilnih zaviralcev z7, z9 in sp120 smo najprej preverili na celični liniji BV2 s testom celične živosti. Celice BV2 smo tretirali z zavirci katepsina X (z7, z9 in sp120) in po določenem času dodali reagent MTS. Nato smo izmerili absorbance iz katerih smo izračunali delež preživelih celic in jih podali normirano na ustrezeno DMSO kontrolo. Slednja je predstavljala 100 % živost celic. Poskus smo izvajali v štirih paralelkah. Rezultati, podani kot povprečje \pm SD, so reprezentativni petim neodvisnim poskusom in so prikazani na Sliki 11.



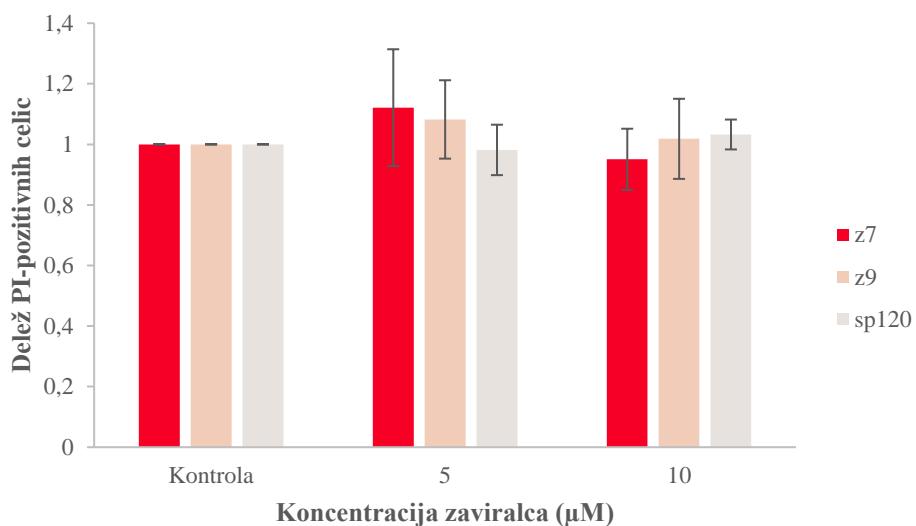
Slika 11: Vpliv zaviralcev katepsina X na živost celic BV2, vrednoten z reagentom MTS

Celice BV2 smo tretirali z zavirci katepsina X (z7, z9 in sp120) pri koncentracijah 1, 5, 10 in 20 μM . Po 24 urah smo z reagentom MTS ocenili celično živost. Rezultati so prikazani kot povprečje deleža živih celic \pm SD petih neodvisnih poskusov.

S preliminarnim poskusom vrednotenja celične živosti smo pokazali, da noben izmed testiranih zaviralcev katepsina X ni izkazal značilnega vpliva na živost celic BV2. Iz tega sklepamo, da zavirci z7, z9 in sp120 pri izbranih koncentracijah (1, 5, 10 in 20 μM) po 24 urah inkubacije ne izražajo toksičnega učinka na celično linijo BV2.

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

Nadalje smo citotoksičnost zaviralcev katepsina X oziroma njihov vpliv na živost celic BV2 proučevali še s pomočjo pretočne citometrije ob uporabi interkalatorskega reagenta PI. Celice BV2 smo tretirali z zaviralci katepsina X (z7, z9 in sp120). Po določenem času smo celice označili z reagentom PI in izmerili oddano fluorescenco iz katere smo izračunali delež PI-pozitivnih celic, ki ponazarja delež mrtvih celic. Poskus smo izvedli v dveh paralelkah. Rezultati so prikazani kot povprečje deleža PI-pozitivnih celic glede na kontrolo DMSO ± SD treh neodvisnih poskusov, ki jih prikazuje Slika 12.



Slika 12: Vpliv zaviralcev katepsina X na preživetje celic BV2, vrednoten z reagentom PI

Celice BV2 smo tretirali z zaviralci katepsina X (z7, z9 in sp120) pri koncentracijah 5 in 10 μM . Po 24 urah smo določili delež PI-pozitivnih oziroma mrtvih celic. Rezultate smo podali kot delež kontrole celic DMSO in predstavljajo povprečje treh neodvisnih poskusov ± SD.

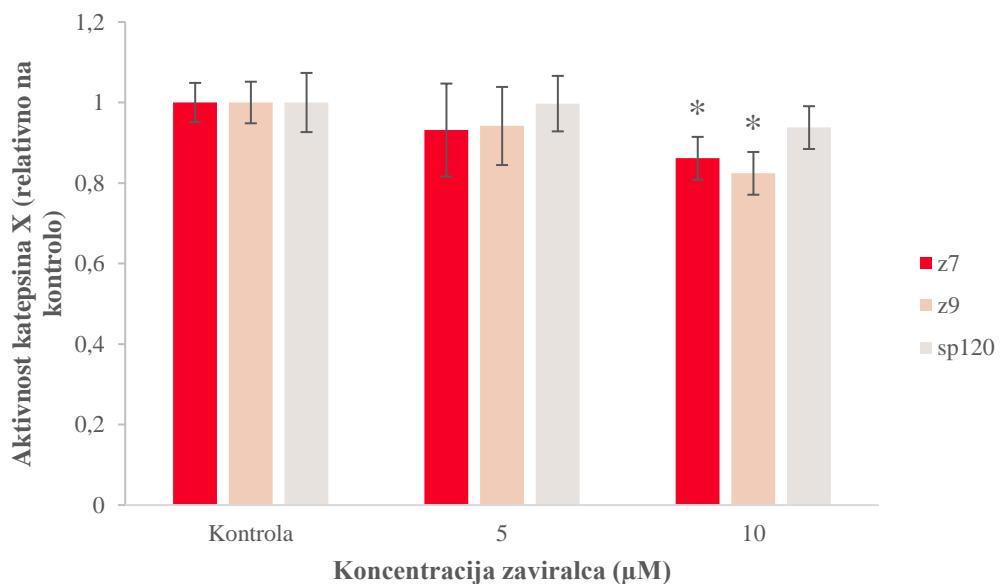
Zaviralci katepsina X pri koncentracijah 5 in 10 μM niso povzročili značilnih razlik v živosti celic BV2 v primerjavi s kontrolo oziroma DMSO. Potrdimo lahko rezultate predhodno izvedenega testa MTS, da zaviralci z7, z9 in sp120 pri izbranih koncentracijah ne izkazujejo toksičnega delovanja na celicah mikroglije BV2.

4.1.2 Vpliv zaviralcev na aktivnost katepsina X v celicah mikroglije

Potem ko smo dokazali, da izbrani zaviralci niso citotoksični za celice BV2, smo se usmerili v proučevanje njihovega zaviralnega delovanja na katepsin X v celicah mikroglije. Slednje smo preverili z uporabo specifičnega substrata za katepsin X in fluorimetrično določali njegovo aktivnost.

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

BV2 celice smo tretirali z zaviralci katepsina X (z7, z9 in sp120). Po določenem času smo v pridobljenih celičnih lizatih določili koncentracijo proteinov in jih z aktivacijskim pufom za katepsin X umerili za določanje aktivnosti encima. Po dodatku specifičnega substrata za katepsin X smo iz oddane fluorescence izračunali naklon krivulje in vrednosti normirali na ustrezno kontrolo DMSO. Rezultati predstavljajo povprečje štirih neodvisnih poskusov \pm SD in so prikazani na Sliki 13.



Slika 13: Vpliv izbranih zaviralcev na aktivnost katepsina X v celicah BV2

Celice BV2 smo tretirali z zaviralci katepsina X (z7, z9 in sp120) pri koncentracijah 5 in 10 μM v brezserumskem gojišču. Po 24 urah smo aktivnost katepsina X fluorimetrično določili s specifičnim substratom za katepsin X Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH ter rezultate predstavili kot povprečje aktivnosti katepsina X, normiranih na kontrolo DMSO \pm SD štirih neodvisnih meritev. * $P < 0,05$ glede na kontrolo.

Zaviralci katepsina X pri 5 μM koncentraciji v celicah BV2 niso povzročili značilnega zmanjšanja aktivnosti katepsina X v primerjavi s kontrolnim vzorcem. Pri koncentraciji 10 μM je bilo značilno zmanjšanje encimske aktivnosti ugotovljeno za spojini z7 in z9, medtem ko spojina sp120 tudi pri koncentraciji 10 μM ni izkazovala značilnega zaviralnega delovanja na aktivnost katepsina X v celicah mikroglije. V nadaljevanju smo zato na celičnem modelu PB ovrednotili le spojini z7 in z9.

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

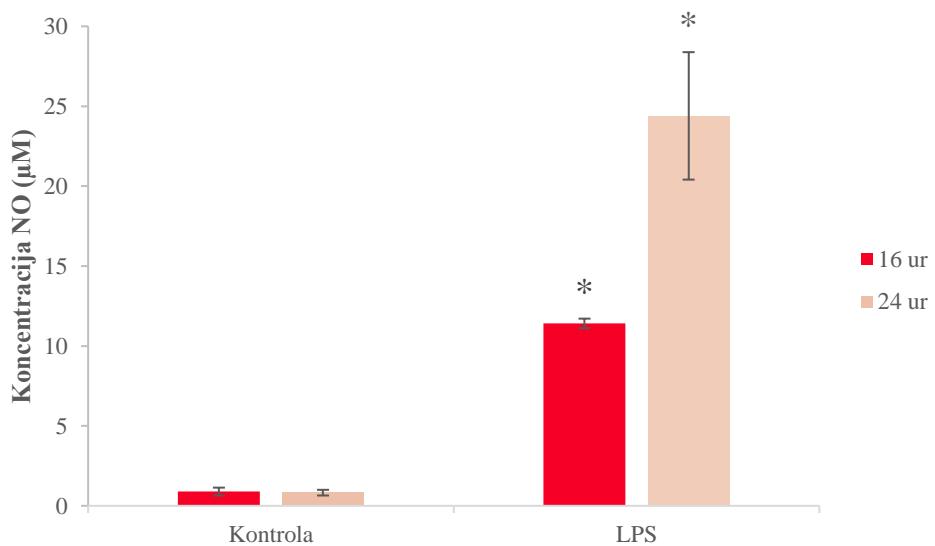
4.2 POSTAVITEV MODELJA AKTIVIRANE MIKROGLIJE Z UPORABO REAGENTA LPS

LPS je komponenta celične stene po Gramu negativnih bakterij (5) in vnetni stimulant, ki smo ga uporabili, da bi ponazorili procese vnetnega odziva oziroma aktivacije mikroglije, prisotne v nevrodegenerativnih procesih, ki so značilni za PB (12).

Na začetku smo morali dokazati ustreznost LPS-celičnega modela za nadaljnjo vrednotenje zaščitnega delovanja zaviralcev katepsina X. Celice BV2 smo stimulirali z reagentom LPS pri koncentraciji, za katero je znano, da sproži najbolj izrazito aktivacijo mikroglije in pri kateri aktivirana mikroglija izloči največjo količino katepsina X, in sicer je to $1 \mu\text{g/mL}$ (16). Kontrolo so predstavljale nestimulirane celice BV2. Uspešnost postavitve modela aktivirane mikroglije smo nato preverili z določanjem sproščenih mediatorjev vnetja, in sicer z določanjem ravni NO, IL-6 in TNF- α v supernatantih stimuliranih celic BV2. Raven NO smo v celičnih supernatantih pomerili po 16 in 24 urah, raven IL-6 in TNF- α pa le po 24 urah tretiranja z reagentom LPS. Časovne točke smo določili glede na raziskave Fakultete za farmacijo in tudi ostale predhodne objave, kjer je že časovno in koncentracijsko ovrednoten vpliv reagenta LPS na raven oziroma koncentracijo vnetnih mediatorjev (16).

4.2.1 Določitev prisotnosti NO v supernatantih aktivirane mikroglije

V supernatantih stimuliranih celic BV2 smo spektrofotometrično določili koncentracijo NO, saj je povišana raven preiskovanega vnetnega dejavnika značilna za aktivirano mikroglijo (31). Pri tem smo v pripravljeni supernatante celic BV2 zaporedoma dodali reagente testa Griess, in sicer sulfanilamid in NED-reagent. Pri določenih časovnih točkah smo nato izmerili absorbance in izračunali koncentracijo NO. Poskus smo izvedli v dveh paralelkah. Rezultati so predstavljeni kot povprečje \pm SD dveh neodvisnih poskusov in so prikazani na Sliki 14.



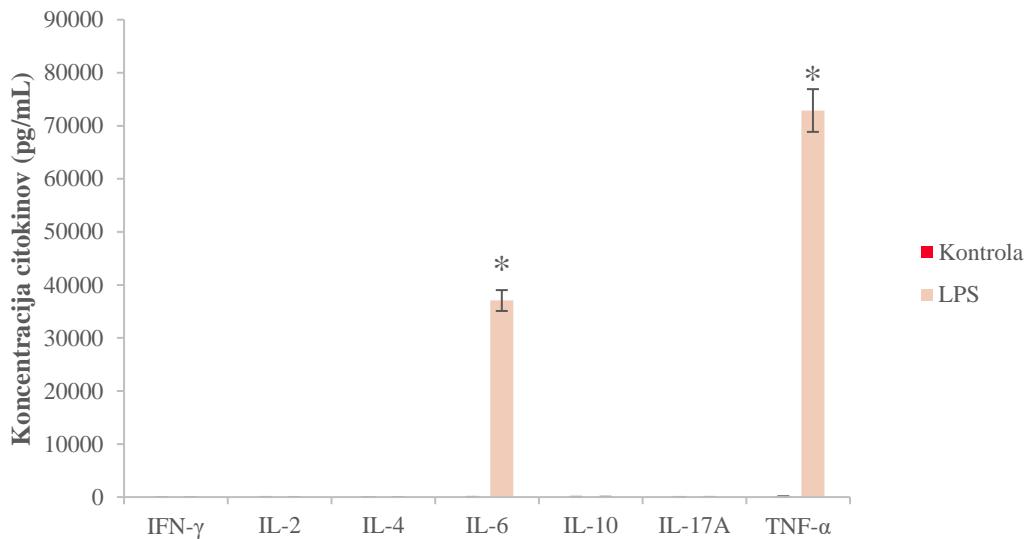
Slika 14: Koncentracija NO v supernatantih celic BV2 po stimulaciji z reagentom LPS

Celice BV2 smo stimulirali z reagentom LPS pri koncentraciji $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ v brezserumskem gojišču. Po 16 in 24 urah smo odvzeli supernatante in preverili raven NO s testom Griess. Rezultati so prikazani kot povprečje koncentracije $\text{NO} \pm \text{SD}$ dveh neodvisnih poskusov. * $P < 0,05$ glede na kontrolo.

Raven NO se je po stimulaciji z reagentom LPS znatno povišala pri obeh časovnih točkah. Po 24 urah je bila raven vnetnega mediatorja še višja kot po 16 urah. Iz rezultatov smo zaključili, da je koncentracija NO s časom naraščala in da je postavitev LPS-celičnega modela bila uspešno izvedena oziroma, da smo pri danih pogojih dosegli zadostno aktivacijo mikroglijje z reagentom LPS (16).

4.2.2 Določitev prisotnosti vnetnih citokinov v supernatantih aktivirane mikroglijje

Dodatno smo v supernatantih celic BV2 določali še raven vnetnih citokinov IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A in IL-10. Po dodatku PE-konjugiranih detektorskih protiteles smo s pretočno citometrijo izmerili oddano fluorescenco in s programsko opremo FlowJo izračunali koncentracije (pg/mL) analitov v vzorcih. Poskus smo izvedli v dveh paralelkah. Rezultati so prikazani na Sliki 15 in predstavljajo povprečno vrednost koncentracije citokinov $\pm \text{SD}$.



Slika 15: Koncentracija vnetnih citokinov v supernatantih LPS-stimuliranih celic BV2

Celice BV2 smo stimulirali z reagentom LPS ($1 \mu\text{g/mL}$). Po 24 urah smo s kompletom reagentov za določanje citokinov IL-2, IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-17A in IL-10 in uporabi pretočnega citometra določili njihovo koncentracijo (pg/mL) v supernatantih aktiviranih celic mikroglije. Izvedli smo en poskus v dveh paralelkah ter rezultate podali kot povprečje $\pm \text{SD}$. * $P < 0,05$ glede na kontrolo.

Nestimulirane celice BV2 sproščajo minimalno koncentracijo analiziranih vnetnih citokinov. Po aktivaciji celic z reagentom LPS se je znatno povečala samo raven IL-6 in TNF- α , kot prikazuje Slika 15. Glede na njuno ključno vlogo v vnetnem odzivu aktivirane mikroglije smo lahko potrdili ustreznost LPS-celičnega modela za nadaljnjo proučevanje učinkovitosti zaviralcev katepsina X na zmanjšano aktivacijo mikroglije (16).

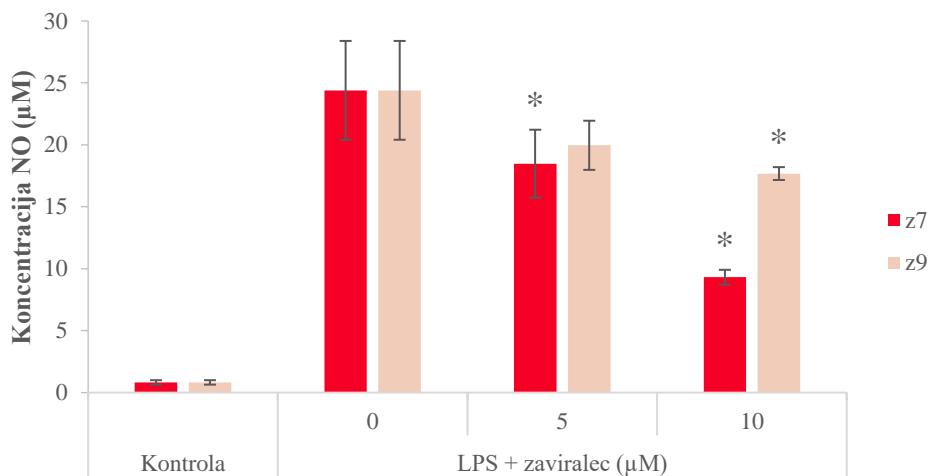
4.3 VPLIV ZAVIRALCEV KATEPSINA X NA RAVEN VNETNIH DEJAVNIKOV V SUPERNATANTIH AKTIVIRANE MIKROGLIJE

Pri vrednotenju zaviranja encimske aktivnosti katepsina X v celicah mikroglije sta se kot optimalna zaviralca izkazali spojini z7 in z9, medtem ko spojina sp120 ni izkazovala značilnega vpliva na zmanjšanje aktivnosti katepsina X in smo jo zato v nadaljevanju izključili iz vrednotenja učinkovitosti reverzibilnih zaviralcev katepsina X. Pokazali smo tudi ustrezeno aktivacijo celic BV2 po stimulaciji z reagentom LPS, ki je bila bolj znatna po 24 urah stimulacije. V nadaljevanju smo zato na postavljenem LPS-celičnem modelu pri tej časovni točki ovrednotili učinkovitost spojin z7 in z9 na zmanjšanje vnetnega odziva.

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

4.3.1 Raven NO v supernatantih aktivirane mikroglije ob prisotnosti spojin z7 in z9

Pripravo supernatantov smo izvedli tako, da smo celice BV2 predtretirali z zaviralcem katepsina X (z7 in z9) in zatem stimulirali z reagentom LPS. Po določenem času smo zbranim vzorcem dodali reagente testa Griess in iz dobljenih absorbanc določili raven NO. Poskus smo izvajali v dveh paralelkah. Rezultati na Sliki 16 so predstavljeni kot povprečje ± SD dveh neodvisnih poskusov.



Slika 16: Vpliv izbranih zaviralcev katepsina X na raven NO v supernatantih celic BV2 po stimulaciji z LPS

Celice BV2 smo predtretirali s spojinama z7 in z9 (5 in 10 μM) za 1 uro in jih nato stimulirali z reagentom LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Po 24 urah smo s kompletom regentov po Griess-u določili koncentracijo NO v supernatantih stimulirane mikroglije. Rezultate smo predstavili kot povprečje ± SD dveh neodvisnih poskusov. * $P < 0,05$ glede na LPS (0 μM zaviralca).

Raven NO se je po stimulaciji z reagentom LPS znatno povečala, kar je značilno za aktivirano mikroglijo. Zaviralec z7 je izkazoval statistično značilen vpliv na zmanjšanje ravni vnetnega mediatorja tako pri koncentraciji 5 μM kot tudi pri 10 μM , kjer je bilo opazno zmanjšanje ravni NO v supernatantu celic BV2 stimuliranih z reagentom LPS. Zaviralec z9 je značilen vpliv na zmanjšanje ravni NO posreduoval samo pri višji koncentraciji (10 μM).

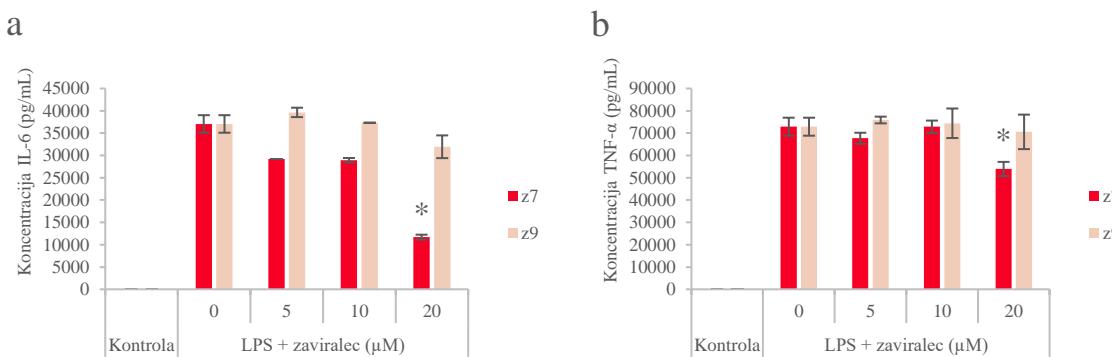
4.3.2 Raven IL-6 in TNF- α v supernatantu aktivirane mikroglije ob prisotnosti spojin z7 in z9

V nadaljevanju smo učinkovitost zaviralcev z7 in z9 preverili tudi z določanjem ravni citokinov v supernatantih celic BV2 po stimulaciji z reagentom LPS. Vzorce supernatantov

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

v katerih smo določali koncentracijo vnetnih citokinov IL-6 in TNF- α smo pripravili na isti način kot vzorce supernatantov, v katerih smo določali raven NO.

K raztopini kroglic specifičnih za IL-6 in TNF- α smo dodali supernatante vzorcev in na koncu še s PE-konjugirana detektorska protitelesa. Po inkubaciji smo s pretočno citometrijo pomerili oddano fluorescenco in s programsko opremo FlowJo izračunali koncentracije citokinov, ki smo jih podali v pg/mL. Poskus smo izvajali v dveh paralelkah. Rezultate smo predstavili kot povprečje \pm SD in so grafično prikazani na Sliki 17.



Slika 17: Vpliv izbranih zaviralcev katepsina X na raven IL-6 (a) in TNF- α (b) v supernatantih celic BV2 po stimulaciji z LPS

Celice BV2 smo za 1 uro predtretirali s spojinama z7 in z9 pri koncentracijah 5, 10 in 20 μ M v brezserumskem gojišču ter nato stimulirali z LPS (1 μ g/ml). Po 24-urni stimulaciji smo z merjenjem na pretočnem citometru določili koncentracijo IL-6 (a) in TNF- α (b) v supernatantih aktiviranih celic mikroglije. Rezultate smo prikazali kot povprečno koncentracijo (pg/mL) vnetnih citokinov \pm SD. *P < 0,05 glede na LPS (0 μ M zavirala).

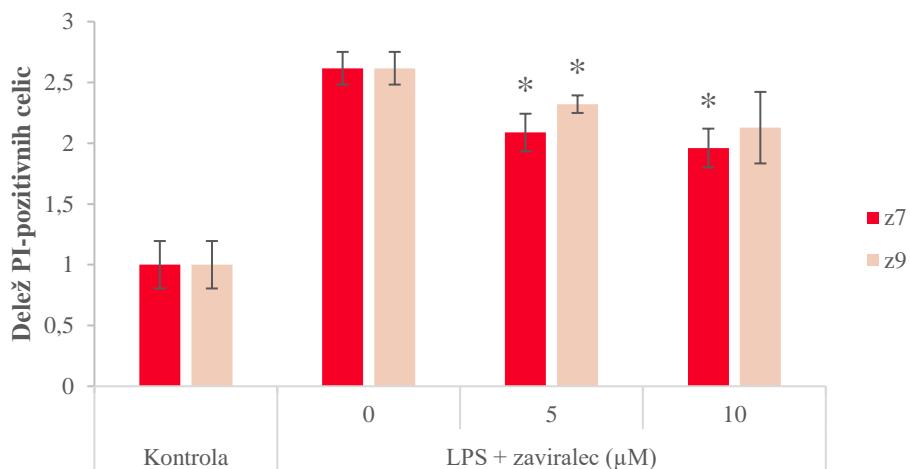
Stimulacija celic BV2 z reagentom LPS je povzročila znatno sproščanje vnetnih citokinov IL-6 ter TNF- α iz aktivirane mikroglije. Zaviralca z7 in z9 pri 5 in 10 μ M koncentracijah nista značilno vplivala na zmanjšanje ravni IL-6 in TNF- α (Slika 17a in 17b). Vpliv na zmanjšanje izločanja vnetnih citokinov smo zato preverili še pri višji koncentraciji, ki se ni toksična za celice BV2, in sicer pri 20 μ M, kjer je zaviralec z7 učinkovito zmanjšal izločanje IL-6 iz aktivirane mikroglije (Slika 17a), značilen vpliv pa je izkazal tudi pri znižanju ravni TNF- α (Slika 17b). Spojina z9 tudi pri 20 μ M koncentraciji ni izkazala zaščitnega delovanja oziroma značilnega učinka na zmanjšanje ravni IL-6 oziroma TNF- α (Slika 17a in 17b).

4.4 VPLIV ZAVIRALCEV KATEPSINA X NA PREŽIVETJE AKTIVIRANE MIKROGLIJE

Prekomerno sproščanje vnetnih mediatorjev kot tudi katepsinov iz aktiviranih celic mikroglije vodi do njihovega zmanjšanega preživetja, kar so pokazali tudi na LPS-celičnem modelu. Vzrok zmanjšanega preživetja mikroglije je sprožitev procesa apoptoze oziroma programirane celične smrti (16, 56). V nadaljevanju smo tako želeli preveriti vpliv izbranih reverzibilnih zaviralcev katepsina X na zmanjšano preživetje celic BV2, posredovan po stimulaciji LPS, in preveriti vpliv spojin na proces apoptoze izvane z LPS-stimulacijo.

4.4.1 Vpliv spojin z7 in z9 na preživetje stimuliranih celic BV2

Ugoden vpliv zaviralcev katepsina X na preživetje celic BV2 smo preverjali z interkalatorskim reagentom PI. Celice BV2 smo predtretirali z zaviralcem katepsina X (z7 in z9) in nato stimulirali z reagentom LPS. Po določenem času smo celice označili s PI in nato iz oddanih fluorescenc izračunali delež PI-pozitivnih celic, ki smo ga normirali na kontrolo DMSO. Poskus smo izvedli v dveh paralelkah. Rezultati so prikazani kot povprečje deleža PI-pozitivnih celic glede na kontrolo DMSO \pm SD dveh neodvisnih poskusov, ki jih prikazuje Slika 18.



Slika 18: Vpliv izbranih zaviralcev katepsina X na delež PI-pozitivnih celic BV2 po stimulaciji z reagentom LPS

Celice BV2 smo priraščali tekom noči in naslednji dan predtretirali s spojinama z7 in z9 (5 in 10 μ M) v brezserumskem gojišču, in nadalje stimulirali z LPS (1 μ g/ml). Po 24 urah stimulacije smo celice označili s PI ter pripravljeni vzorce pomerili s pretočnim citometrom. Rezultati so podani kot

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

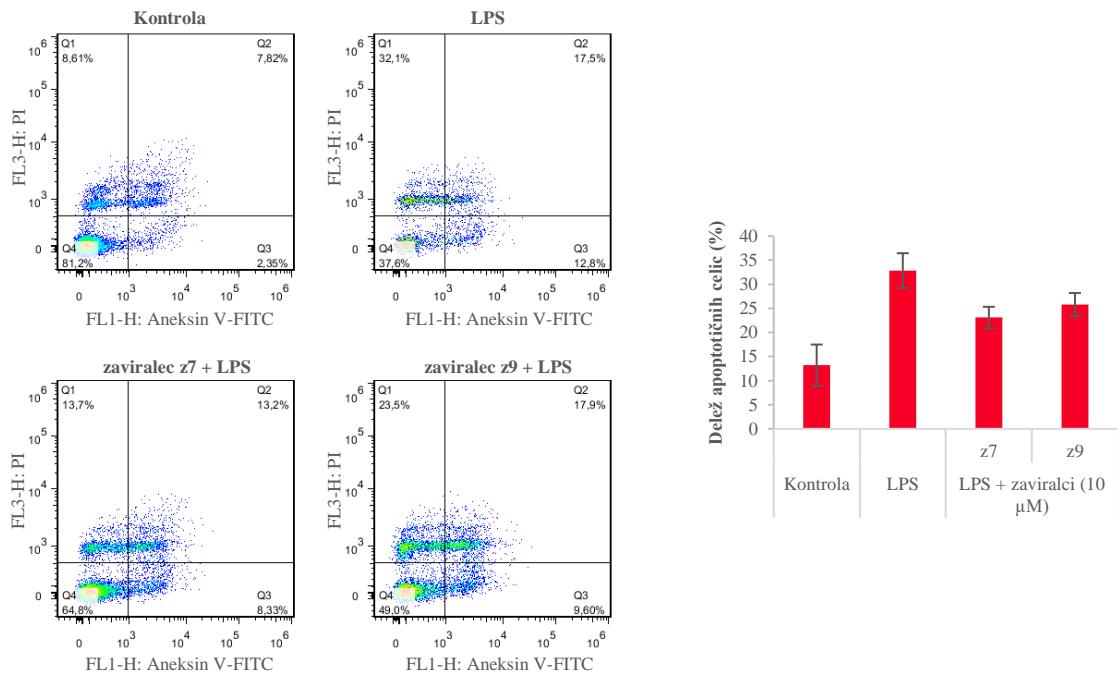
*povprečje deleža PI-pozitivnih celic, normiranih na ustrezeno kontrolo DMSO ± SD dveh neodvisnih poskusov, ki smo jih izvedli v dveh paralelkah. *P < 0,05 glede na LPS (0 µM zaviralca).*

Pomembno zmanjšanje deleža PI-pozitivnih celic nakazuje na zaščitno vlogo spojin na preživetje celic aktivirane mikroglije. Iz grafa na Sliki 18 je razvidno, da spojina z7 pri obeh uporabljenih koncentracijah značilno zmanjša delež PI-pozitivnih celic, ki je povišan po stimulaciji celic BV2 z reagentom LPS, pri tem je učinek bolj znaten pri višji, 10 µM koncentraciji. Zaviralec z9 je učinkovitost izkazal samo pri 5 µM koncentraciji.

4.4.2 Vpliv spojin z7 in z9 na apoptozo stimuliranih celic BV2

Reagent LPS povzroči smrt celic mikroglije preko mehanizma programirane celične smrti oziroma apoptoze (56). Pri tem ima vlogo tudi katepsin X, saj je njegova inhibicija zmanjšala delež celic, ki so bile podvržene apoptotični smrti (16). V nadaljevanju smo ugotavliali ali imata zaviralca katepsina X vpliv na delež posameznih subpopulacij celic po stimulaciji celic BV2 z reagentom LPS. V ta namen smo celice BV2 predtretirali s spojinama z7 in z9 in nato stimulirali z reagentom LPS. Za določanje deleža celičnih subpopulacij smo celice označili z barvili Aneksin V-FITC, ki oddaja zeleno fluorescenco in PI, ki oddaja rdečo fluorescenco, kar nam omogoča določitev deleža živih celic (Aneksin V-FITC-neg/PI-neg; kvadrant Q4), zgodnje apoptotičnih celic (Aneksin V-FITC-poz/PI-neg; kvadrant Q3), pozno apoptotičnih (Aneksin V-FITC-poz/PI-poz; kvadrant O2) ter nekrotičnih celic (Aneksin V-FITC-neg/PI-poz; kvadrant Q1). Poskus smo izvedli v dveh paralelkah. S pretočnim citometrom smo izmerili posamezne deleže celičnih subpopulacij, rezultate analizirali s programsko opremo FlowJo ter jih predstavili na Sliki 19 skupaj z grafom, ki prikazuje povprečje ± SD poskusa.

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.



Slika 19: Vpliv izbranih zaviralcev katepsina X na delež apoptotičnih celic BV2 po stimulaciji z reagentom LPS

Celice BV2 smo predtretirali s spojinama z7 in z9 pri koncentraciji 10 µM v brezserumskem gojišču za 1 uro in jih nato stimulirali z LPS (1 µg/ml) za nadalnjih 24 ur. Po označevanju celic z Aneksin V-FITC in PI smo s pretočnim citometrom pomerili deleže posameznih subpopulacij celic. Iz tega smo preračunali celokupen delež apoptotičnih celic (Aneksin V-FITC-poz), ki so predstavljeni grafu desno. Poskus smo izvedli v dveh paralelkah in ga podali kot povprečje deleža apoptotičnih celic ± SD.

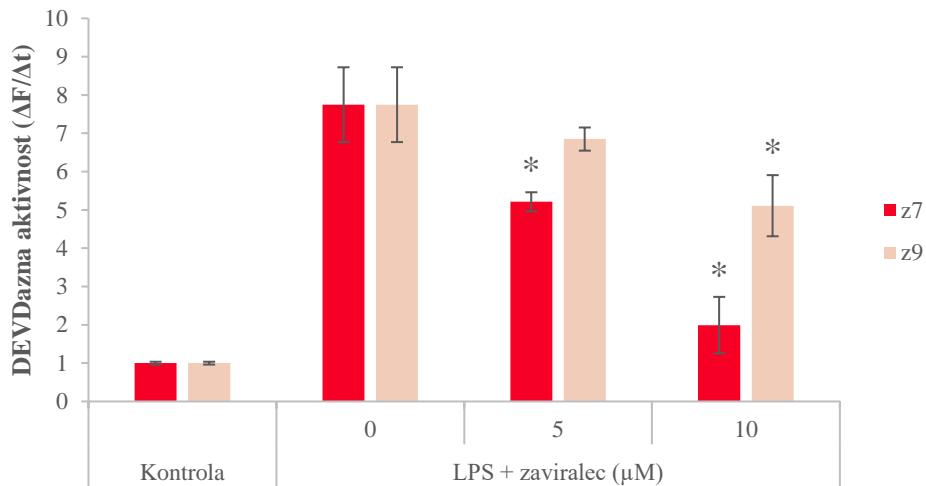
Po stimulaciji z reagentom LPS, se je celokupni delež apoptoze celic BV2 znatno povečal, medtem ko sta spojini z7 in z9 le delno zmanjšali celokupni delež apoptotičnih celic, predvsem na račun zmanjšanja deleža celic v fazi zgodnje apoptoze.

LPS sproži apoptizo celic mikroglije preko aktivacije kaspaze-3, ki je izvršilna kaspaza v procesu apoptoze (57, 58). Zato smo v nadaljevanju preverili, ali zaviralca katepsina X zmanjšata tudi aktivnost kaspaze-3, ki je povišana v celicah mikroglije kot posledica stimulacije z reagentom LPS.

Pri tem smo celice BV2 predtretirali z zaviralci katepsina X (z7 in z9) in zatem stimulirali z reagentom LPS. Po pripravi celičnih lizatov smo umerili koncentracijo proteinov in dodali substrat za kaspazo-3 (Ac-DEVD-AFC). Iz dobljenih absorbanc smo izračunali aktivnost kaspaze-3 in rezultate prikazali kot naklon linearnega dela krivulje v odvisnosti od časa.

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

Rezultati predstavljajo povprečje \pm SD dveh neodvisnih poskusov ter so prikazani na Sliki 20.



Slika 20: Vpliv izbranih zaviralcev katepsina X na aktivnost kaspaze-3 v celicah BV2 po stimulaciji z reagentom LPS

Celice BV2 smo predtretirali 1 uro s spojinama z7 in z9 (5 in 10 μM), ter nato stimulirali z LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) za nadalnjih 24 ur. Pripravili smo lizate ter pomerili aktivnost kaspaze-3 z uporabo specifičnega substrata za kaspazo-3 Ac-DEVD-AFC. Rezultati so predstavljeni kot spremembu fluorescence v odvisnosti od časa ($\Delta F/\Delta t$) in so podani kot povprečje \pm SD dveh neodvisnih poskusov, izvedenih v dveh paralelkah. * $P < 0,05$ glede na LPS (0 μM zaviralca).

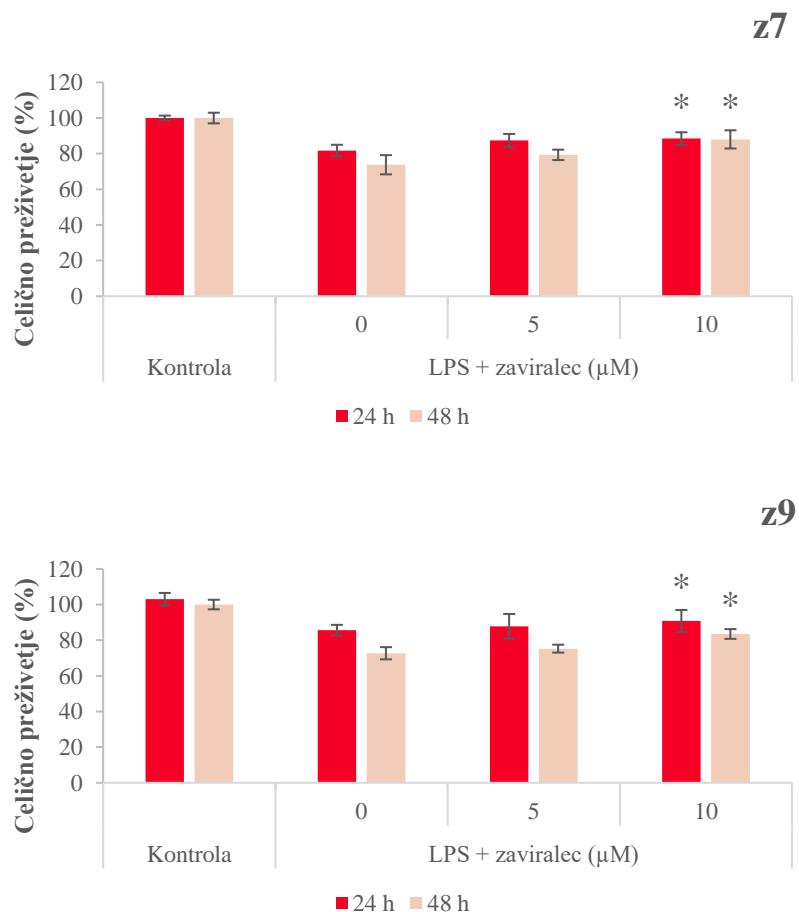
Aktivnost kaspaze-3 v celicah BV2 se je znatno povišala 24 ur po stimulaciji z reagentom LPS, medtem ko je prisotnost spojine z7 značilno zmanjšala povišano aktivnost kaspaze-3 pri obeh uporabljenih koncentracijah, 5 in 10 μM , pri čemer pa je bila bolj učinkovita višja koncentracija spojine, kot je prikazano na Sliki 20. Spojina z9 je značilen učinek na aktivnost kaspaze-3 posredovala samo pri višji koncentraciji in sicer pri 10 μM . Vsi rezultati skupaj nakazujejo na sposobnost izbranih zaviralcev katepsina X, da zavrejo aktivacijo mikroglije kot tudi delno zmanjšajo apoptozo celic mikroglije, kar vodi v zmanjšan vnetni odziv in morebitno zmanjšano nevrodegeneracijo.

4.5 Vpliv zaviralcev katepsina X na degeneracijo nevronskih celic, posredovano z aktivirano mikroglijo

Aktivirana mikroglija preko sproščanja vnetnih mediatorjev in posledičnega vnetnega odziva vodi do nevrodegenerativnih procesov, kar se odraža v odmiranju nevronov (15). V

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

zadnjem delu magistrske naloge smo zato z uporabo zaviralcev katepsina X ovrednotili njihov zaščitni učinek na preživetje nevronskih celičnih linij SH-SY5Y. V ta namen smo celice BV2 predtretirali s spojinama z7 in z9. Po stimulaciji z reagentom LPS smo pridobljene supernatante celic BV2 prenesli na celice SH-SY5Y in s testom MTS preverili delež živosti nevronskih celic, ki smo jih podali normirano na ustrezno kontrolo. Poskus smo izvedli v štirih paralelkah. Rezultati so grafično prikazani na Sliki 21 in predstavljajo povprečje deleža preživelih celic SH-SY5Y dveh neodvisnih meritev, glede na kontrolo ± SD.



Slika 21: Vpliv zaviralcev katepsina X na celično preživetje nevronskih celičnih linij SH-SY5Y

Na celičnem modelu ko-kultur mikroglijce celic BV2 in nevronskih SH-SY5Y celic, smo z zaviralcema z7 in z9 pri koncentracijah 5 in 10 μM preverili zaščitni vpliv na degeneracijo nevronskih celic, posredovano preko aktivirane mikroglijce. Celično preživetje celic SH-SY5Y smo pomerili z reagentom MTS po 24- in 48-urni inkubaciji s supernatanti LPS-stimuliranih celic BV2 v odsotnosti oziroma prisotnosti z7 (a) in z9 (b). Rezultate smo podali kot delež preživelih celic, glede na ustrezno

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

*kontrolo supernatanta celic BV2, in prikazujejo povprečje dveh neodvisnih meritev $\pm SD$. *P < 0,05 glede na LPS (0 μM zaviralca).*

Rezultati celičnega preživetja nevronskih celic SH-SY5Y po izpostavitvi supernatantu aktivirane mikroglije so pokazali, da z LPS-stimulirane celice BV2 povzročijo smrt nevronskih celic v odvisnosti od časa inkubacije, saj je bil delež mrtvih celic SH-SY5Y po 48 urah tretiranja s supernatanti aktivirane mikroglije opazno večji. Oba zaviralca pa sta izkazovala nevroprotективno delovanje, saj sta delno zmanjšala smrt nevronskih celic, posredovano s supernatantom aktivirane mikroglije, pri čemer pa smo statistično značilen vpliv opazili le pri koncentraciji 10 μM obeh zaviralcev. Slednji rezultati nakazujejo na zaščitno delovanje zaviralcev katepsina X pred degeneracijo nevronskih celic, posredovano z vnetnimi dejavniki.

5 RAZPRAVA

Katepsin X je cisteinska proteaza, ki izraža karboksipeptidazno aktivnost (20). Ob odkritju so mu najprej pripisali vlogo proteaze, ki sodeluje pri presnovi znotrajceličnih proteinov v sklopu endo-lizosomskega sistema (26). Danes vemo, da se katepsin X nahaja pretežno v imunskih (30) in nevronskih celicah (33). Povečano raven njegovega izražanja in aktivnost so odkrili predvsem v nevronih, ki so bili podvrženi fazi staranja ali degenerativnim procesom v glija celicah pri amiotrofični lateralni sklerozi in Alzheimerjevi bolezni (33). Zadnje raziskave pa nakazujejo tudi na vlogo katepsina X v nevrodegenerativnih procesih povezanih z vnetnimi dejavniki, kar je značilno za patogenezo PB. Pri slednji ima v vnetnem odzivu glavno vlogo aktivirana mikroglija (4). Aktivirane celice mikroglije namreč sproščajo nevrotoksične vnetne dejavnike, na primer citokine, hkrati pa izločajo tudi katepsine, ki skupaj prispevajo k degeneraciji in izgubi nevronskih celic (5, 15). Izločanje iz aktivirane mikroglije je bilo pokazano tudi za katepsin X (15, 16) in povezava katepsina X z vnetno posredovano nevrodegeneracijo je spodbudila razvoj novih spojin, ki bi preko zmanjšanja njegove aktivnosti zmanjšale tudi aktivacijo celic mikroglije in s tem potek nevrodegenerativnih procesov. Kljub temu je obseg terapevtsko uporabnih zaviralcev katepsina X zelo omejen (37). AMS36 je specifičen ireverzibilen zaviralec katepsina X, ki izkazuje *in vitro* zaščitne učinke preko zmanjšanja aktivacije mikroglije in zmanjšane smrti dopaminergičnih nevronskih celic (14, 16). Zaradi slabe topnosti spojine kot tudi ireverzibilnega delovanja pa je težja po novih specifičnih reverzibilnih zavircih katepsina X, ki bi bili primerni tudi za *in vivo* testiranja (39).

Namen naše raziskave je bil ovrednotiti delovanje novih reverzibilnih zaviralcev katepsina X in sicer spojin z7, z9 in sp120 (40) na celični liniji mikroglije BV2, z namenom njihove uporabnosti v nadaljnjih *in vivo* testiranjih na živalskih modelih z inducirano patogenezo PB. Najprej smo morali določiti citotoksični profil zaviralcev katepsina X na celicah BV2 in za nadaljnje vrednotenje izbrati netoksične koncentracije. V nadaljevanju smo preverili vpliv zaviralcev pri izbranih koncentracijah na aktivacijo mikroglije ter preživetje aktivirane mikroglije. V zadnjem delu eksperimentalnega dela magistrske naloge pa smo preverili vpliv zaviralcev katepsina X na z aktivirano mikroglijo-posredovano smrt nevronskih celic.

Z začetnim preliminarnim poskusom smo na celicah BV2 preverili citotoksičnost zaviralcev katepsina X s testom celičnega preživetja ob uporabi reagenta MTS ter naknadno še z uporabo interkalatorskega reagenta PI. Poskus z reagentom MTS je pokazal, da zaviraliči z7,

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

z9 in sp120 pri koncentracijah 1, 5, 10 in 20 μM ne izkazujejo značilnega toksičnega učinka na celično linijo BV2. Vpliv zaviralcev na preživetje celic BV2 pri izbranih koncentracijah za nadaljnje poskuse (5 in 10 μM) smo dodatno preverili še z barvanjem s PI, ki se interkalira le v jedro mrtvih celic. Pri slednjem poskusu prav tako nismo dobili značilnega povišanja v deležu PI-počitivnih celic v primerjavi s kontrolnim vzorcem.

Poleg netoksičnih koncentracij zaviralcev katepsina X smo želeli določiti tudi njihovo učinkovitost reverzibilnega zavrtja aktivnosti tarčnega encima. Pri tem poskusu smo po delovanju zaviralcev z7, z9 in sp120 uporabili specifični substrat za določanje aktivnosti katepsina X, Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH, in ugotovili, da je bila aktivnost katepsina X značilno zmanjšana samo po delovanju zaviralcev z7 in z9 pri 10 μM koncentraciji. Ker pri spojni sp120 nismo zaznali značilne inhibicije aktivnosti katepsina X, smo spojino sp120 v nadaljnjih funkcionalnih testih izključili iz vrednotenja. Kljub temu bi bilo delovanje spojine sp120 smiselno preveriti pri višjih koncentracijah, saj se je v nedavni raziskavi izkazala kot selektiven in relativno močan zaviralec katepsina X in so jo označili kot novo spojino vodnico za nadaljnjo načrtovanje novih reverzibilnih zaviralcev katepsina X (39).

Izbrana zaviralca z7 in z9 smo v nadaljevanju ovrednotili na celičnem modelu aktivirane mikroglij. Aktivacija mikroglij v možganih je do neke mere zaželena, saj ob dražljajih in poškodbah sprošča nevrotrofične dejavnike, ki so s svojim delovanjem v oporo preostalim zdravim nevronom (10). Škoda nastane ob njeni prekomerni aktivaciji, ko pride do kroničnega vnetnega odziva s presežno koncentracijo sproščenega superoksida, NO, TNF- α in IL-6 (5, 8). LPS je vnetni stimulant, s katerim lahko aktiviramo celice mikroglij in posnemamo procese vnetja v CŽS. LPS se pri tem veže na enega izmed TLR (angl. *Toll like receptor*) receptorjev, natančneje na TLR4, preko katerega sproži aktivacijo signalnih poti, ki privedejo do aktivacije mikroglij (5).

V nadaljevanju magistrske naloge smo z namenom ponazoritve opisanih procesov uporabili stimulant LPS za aktivacijo celic mikroglij BV2. Za potrditev ustreznosti modela smo po stimulaciji v celičnih supernatantih določili raven sproščenih mediatorjev vnetja. Po izvedenih poskusih smo ugotovili, da se je raven NO značilno povečala že po 16 urah stimulacije celic BV2 z LPS ter da je po 24 urah še dodatno narastla. Izmed vnetnih citokinov sta se znatno povišali koncentraciji IL-6 in TNF- α , raven ostalih pa se ni razlikovala v primerjavi s celicami, ki jih nismo stimulirali z LPS. Ker so se povišali mediatorji, ki jih prištevamo h kazalcem aktivirane mikroglij, smo lahko potrdili uspešno postavitev LPS-

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

celičnega modela in nadaljevali z vrednotenjem zaviralcev z7 in z9 na zmanjšanje aktivacije mikroglije in s tem vnetnega odziva.

Zaviranje aktivacije mikroglije bi lahko služilo kot ključni pristop pri zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni, posredovanih z vnetjem. V nedavni raziskavi so z irreverzibilnim zavircem katepsina X, AMS36, dokazali njegov vpliv na zmanjšanje presežne količine NO, ki velja za kazalca aktivirane mikroglije ter posrednika NO-odvisne apoptoze. Prav tako so se po delovanju irreverzibilnega zavirala zmanjšale povišane ravni vnetnih citokinov IL-6 in TNF- α . Vnetni citokin IL-6, ki sicer posreduje preživetje, diferenciacijo in rast nevronov, po drugi strani zmanjša nevrogenezo v hipokampusu, zaradi česar ga prištevamo k mediatorjem vnetja. Enako velja za TNF- α , ki neposredno ali posredno, preko spodbujanja nastanka NO in prostih radikalov povzroči smrt celic glije. Zavrtje nastajanja in izločanja NO, IL-6 in TNF- α iz celic mikroglije tako prispeva k zmanjšanju nevrotoksičnega delovanja aktivirane mikroglije (16).

V magistrski nalogi smo zato preverili vpliv zaviralcev katepsina X, z7 in z9, na znižanje ravni vnetnih dejavnikov v supernatantih stimuliranih celic BV2 in ugotovili, da sta obe spojini, tako pri koncentraciji 5 μ M, kot tudi pri 10 μ M, značilno zmanjšali raven NO v supernatantu stimuliranih celic BV2. Pri določanju vnetnih citokinov v prisotnosti zaviralcev katepsina X smo dobili nekoliko nepričakovan rezultat, saj zavirala z7 in z9 nista izkazovala enakega učinka na raven povišanih citokinov IL-6 in TNF- α , ki je posledica LPS stimulacije celic BV2. Zaviralec z7 se je izkazal kot učinkovitejši pri zmanjšanju ravni tako IL-6 kot TNF- α in učinek je bil najbolj znaten pri koncentraciji 20 μ M, medtem ko zaviralec z9 pri nobeni izmed uporabljenih koncentracij ni izkazoval vpliva na zmanjšanje ravni citokinov. Z danimi rezultati smo sicer lahko potrdili nedavne izsledke raziskave, da zavrtje katepsina X zmanjša sproščanje vnetnih mediatorjev (16), vendar pa so rezultati vrednotenja reverzibilnih zaviralcev pokazali le delni učinek na zmanjšanje aktivacije mikroglije, zato smo se v nadaljevanju osredotočili v preverjanje vpliva zaviralcev na preživetje mikroglije po njeni aktivaciji.

Zmanjšano preživetje celic mikroglije po stimulaciji z reagentom LPS se bistveno izboljša po zavrtju katepsina X oziroma po dodatku γ -Eno peptida, ki posnema C terminalni del γ -enolaze (16). Delovanje γ -enolaze uravnava katepsin X s cepitvijo dipeptida na C-terminalnem delu in tako izniči njeno nevrotrofično delovanje. To nakazuje na ključno vlogo katepsina X v celični smerti, ki je povezana z nevrotrofičnim delovanjem γ -enolaze (16, 36).

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

V magistrski nalogi smo zato s reagentom PI preverili preživetje celic mikroglije BV2 po stimulaciji z LPS v prisotnosti zaviralcev z7 in z9. Zaviralec z7 je značilno povečal preživetje celic mikroglije pri koncentracijah 5 in 10 μM , pri čemer je z9 posredoval značilne učinke le pri koncentraciji 5 μM . Pri koncentraciji 20 μM pa tako z7 kot z9 nista zmanjšala povisane deleža PI-pozitivnih celic BV2 po stimulaciji z LPS, (*rezultati niso prikazani v nalogi*), kar je v nasprotju z rezultati, dobljenimi pri določanju ravni citokinov v prisotnosti zaviralcev z7 in z9.

V raziskavah so ugotovili, da LPS preko aktivacije receptorja TLR4 sproži apoptozi. Aktivacija mikroglije po stimulaciji z LPS povzroči sproščanje NO, ta pa deluje kot poglavitni avtokrini mediator, ki vodi do NO-odvisne ali indirektne poti apoptoze (56). Nadalje so dognali, da vnetni stimulus sproži apoptozi celic še preko indirektne poti apoptoze, ki ni povezana s produkcijo NO, pač pa nastopi direktno z aktivacijo kaspaze-11. Kakorkoli, obe poti nazadnje sprožita aktivacijo kaspaze-3, ki vodi do končnega propada celic (57). V signalno kaskado apoptoze so namreč vključene sprožilne kaspaze, ki apoptozne procese spodbudijo, in izvršilne kaspaze, ki apoptozo izvršijo. Med izvršilne kaspaze uvrščamo tudi kaspazo-3, ki je ena glavnih kaspaz, katere aktivacija vodi do procesa apoptoze (58).

V nadaljevanju magistrske naloge smo tako preverili vpliv zaviralcev z7 ter z9 na aktivnost kaspaze-3 ter delež apoptotičnih celic po stimulaciji z LPS. Z uporabo tetrapeptidnega sinteznega substrata, ki pri interakciji s kaspazo-3 sprosti fluorogeni produkt, smo določali njeno aktivnost. Po stimulaciji celic BV2 z LPS v prisotnosti zaviralcev z7 in z9 so rezultati merjenja aktivnosti kaspaze-3 pokazali, da se je aktivnost le-te značilno zmanjšala tako pri 5 μM kot tudi pri 10 μM koncentraciji zavirala z7. Značilen rezultat smo dobili tudi z zaviralcem z9 in sicer pri 10 μM . Ker sta oba zavirala katepsina X vplivala na aktivnost kaspaze-3, ki je ključna pri sprožitvi apoptoze, smo v nadaljevanju preverili še vpliv zaviralcev na apoptozi celic BV2, ki je močno spodbujena po stimulaciji z LPS. Ugotovili smo, da se celokupni delež apoptotičnih celic po tretiranju z zaviralcema z7 in z9 le delno zmanjšal v primerjavi s celicami, ki smo jih samo stimulirali z reagentom LPS. Po pričakovanju se je največji vpliv zaviralcev katepsina X pokazal pri zmanjšanju deleža populacije celic v fazi zgodnje apoptoze, kakor so ugotovili tudi pri ireverzibilnem zaviralu AMS36 (16).

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

V zadnjem delu magistrske naloge smo želeli pokazati morebitne učinke reverzibilnih zaviralcev katepsina X na zaščito nevronskih celic, ki so podvržene vnetnim dejavnikom aktivirane mikroglije. Sproščeni toksični dejavniki iz aktivirane mikroglije namreč spodbudijo imunski odziv, ki vodi do kroničnega vnetnega odziva v CŽS in posledične izgube nevronov, kar prispeva k patogenezi nevrodegenerativnih bolezni (15). Z vnetjem-posredovano nevrodegeneracijo so povezali tudi s katepsinom X, saj je njegova ireverzibilna inhibicija posredovala zaščitne učinke na nevronске celice v *in vitro* modelu ko-kultur mikroglije in nevronskih celic (16).

V naši raziskavi smo postavili enak ko-kulturni model celic mikroglije BV2 in nevronskih celic SH-SY5Y, ki posedujejo številne značilnosti dopaminergičnih nevronov in so zato primerne za vrednotenje učinkov pri raziskovanju PB (44). Supernatante celic BV2, ki smo jih 24 ur stimulirali z LPS v odsotnosti oziroma prisotnosti zaviralcev z7 in z9 (5 in 10 µM), smo prenesli na nevronsko celično linijo SH-SY5Y. Pri tem velja omeniti, da LPS *in vitro* ni neposredno toksičen za nevrone, pač pa je za to potrebna prisotnost celic mikroglije, ki preko vnetnega odziva in oksidativnega stresa prispevajo k poškodbam dopaminergičnih nevronov (12). Po določenem času inkubacije nevronskih celic s supernatanti aktivirane mikroglije smo ovrednotili celično preživetje SH-SY5Y celic. Izkazalo se je, da aktivirana mikroglija spodbudi smrt nevronskih celic, slednja pa je bila delno preprečena v prisotnosti tako zaviralca z7 kot tudi z9. Slednji rezultati nakazujejo na učinkovitost zaviralcev katepsina X z7 in z9 pri zmanjševanju nevrotoksičnega delovanja aktivirane mikroglije.

Proučevana zaviralca katepsina X sta pokazala različne vplive na zmanjšanje aktivacije celic mikroglije. Pri tem je tako z7 kot tudi z9 pokazal značilen vpliv na zmanjšanje sproščanja vnetnega mediatorja NO ter različen učinek na zmanjšanje ravni vnetnih citokinov IL-6 in TNF- α , kjer se je bolje izkazal zaviralec z7. Pri proučevanju vpliva na povečanje deleža preživelih celic mikroglije po stimulaciji z LPS sta učinkovitost pokazala oba zaviralca, prav tako pri zmanjšanju aktivnosti kaspaze-3. Spojini z7 in z9 nista značilno zmanjšali deleža apoptočnih celic, vendar pa je bil vpliv spojin na zmanjšanje deleža apoptočnih celic opazen. Hkrati sta oba zaviralca izkazovala delno zaščitno vlogo pri smerti nevronskih celic, posredovano z aktivirano mikroglijo.

Vse skupaj nakazuje na dejstvo, da zaviralca katepsina X izkazujeta potencial pri zmanjševanju aktivacije mikroglije in s tem vnetnega odziva kot tudi pri zmanjševanju

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

nevrodegeneracije, posredovane preko aktivacije mikroglije, pri čemer se je spojina z7 izkazala kot bolj učinkovit zaviralec katepsina X *in vitro*.

6 SKLEPI

- Zaviralci katepsina X z7, z9 in sp120 pri koncentracijah 1, 5, 10 in 20 μM ne posredujejo toksičnega učinka na celice BV2 in le zaviralca z7 ter z9 značilno zmanjšata aktivnost katepsina X v celicah BV2.
- Raven NO v supernatantu stimuliranih celic BV2 je značilno zmanjšana v prisotnosti zaviralcev z7 in z9, medtem ko se je pri določanju ravni sproščenih citokinov IL-6 in TNF- α zaviralec z7 izkazal za učinkovitejšega.
- Zaviralca z7 in z9 sta značilno povečala preživetje celic BV2 ter zmanjšala aktivacijo kaspaze-3. Prav tako sta zaviralca izkazala vpliv na zmanjšanje deleža apoptočnih celic.
- Značilen zaščitni vpliv na nevronsko celično linijo SH-SY5Y smo opazili tako pri zaviralcu z7 kot tudi z9, in sicer pri koncentraciji 10 μM .
- Reverzibilna zaviralca katepsina X izkazujeta učinkovitost pri zmanjševanju aktivacije mikroglije in z njo povezane degeneracije nevronskih celic, kar opredeljuje reverzibilne sintezne zaviralce katepsina X kot pomembna terapevtska orodja pri zdravljenju z vnetjem posredovanih nevrodegenerativnih bolezni, kot je PB.

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

7 LITERATURA

1. Dugger BN in Dickson DW: Pathology of Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harbor perspectives in biology 2017; doi: 10.1101/cshperspect.a028035.
2. Pišlar A in Kos J: Cysteine Cathepsins in Neurological Disorders. Molecular Neurobiology 2014; 49(2): 1017-30.
3. Fan K, Li D, Zhang Y, Han C, Liang J, Hou C, Xiao H, Ikenaka K in Ma J: The induction of neuronal death by up-regulated microglial cathepsin H in LPS-induced neuroinflammation. Journal of Neuroinflammation 2015; 12: 54.
4. Qian L, Flood PM in Hong J-S: Neuroinflammation is a key player in Parkinson's disease and a prime target for therapy. Journal of Neural Transmission 2010; 117(8): 971-9.
5. Block ML, Zecca L in Hong J-S: Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. Nature reviews. Neuroscience 2007; 8(1): 57-69.
6. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M in Verkhratsky A: Physiology of microglia. Physiological Reviews 2011; 91(2): 461-553.
7. Korzhevskii DE in Kirik OV: Brain microglia and microglial markers. Neuroscience and Behavioral Physiology 2016; 46(3): 284-290.
8. González-Scarano F in Baltuch G: Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. Annual Review of Neuroscience 1999; 22: 219-40.
9. Minghetti L: Role of inflammation in neurodegenerative diseases. Current Opinion in Neurology 2005; 18(3): 315-21.
10. Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S in Kurihara T: Neurotrophin secretion from cultured microglia. Journal of Neuroscience Research 2001; 65(4): 322-31.
11. Schindowski K, Belarbi K in Buée L: Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. Genes, Brain and Behavior 2008; 7(1): 43-56.
12. Pradhan S in Andreasson K: Commentary: Progressive inflammation as a contributing factor to early development of Parkinson's disease. Experimental Neurology 2013; 241: 148-55.
13. <http://neuropathology-web.org/chapter9/chapter9dPD.html>, povzeto aprila, 2017
14. Hafner Pišlar A, Zidar N, Kikelj D in Kos J: Cathepsin X promotes 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of PC12 and SH-SY5Y cells. Neuropharmacology 2014; 82: 121-31.

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

15. Wendt W, Schulten R, Stichel CC in Lübbert H: Intra - versus extracellular effects of microglia-derived cysteine proteases in a conditioned medium transfer model. *Journal of Neurochemistry* 2009; 110(6): 1931-41.
16. Pišlar A, Božić B, Zidar N in Kos J: Inhibition of cathepsin X reduces the strength of microglial-mediated neuroinflammation. *Neuropharmacology* 2017; 114: 88-100.
17. Cooper GM, Hausman RE: *The Cell: A Molecular Approach*, 6. izdaja, Sinauer Associates, Sunderland (MA), Boston University, 2013; 412-414, 335-339.
18. Podatkovna baza MEROPS, <http://merops.sanger.ac.uk/>, povzeto aprila 2017
19. Vozelj S, Obermajer N in Kos J: Proteaze in njihovi inhibitorji v telesnih tekočinah kot diagnostični in prognostični tumorski kazalci. *Farmacevtski vestnik* 2007; 58: 133-138.
20. Puzer L, Cotrin SS, Cezari MH, Hirata IY, Juliano MA, Stefe I, Turk D, Turk B, Juliano L in Carmona AK. Recombinant human cathepsin X is a carboxymonopeptidase only: a comparision with cathepsins B and L. *Biological chemistry* 2005; 386(11): 1191-5.
21. Kirschke H, Wiederanders B, Brömmel D in Rinne A: Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *The Biochemical Journal* 1989; 264(2): 467-73.
22. Reiser J, Adair in Reinheckel T: Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *The Journal of Clinical Investigation* 2010; 120(10): 3421-31.
23. Kos J, Vižin T, Pečar Fonović U, Pišlar A: Intracellular signaling by cathepsin X: Molecular mechanisms and diagnostic and therapeutic opportunities in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 2015; 31: 76-83.
24. Turk V, Turk B in Turk D: Lysosomal cysteine proteases: Facts and opportunities. *The EMBO Journal* 2001; 20(17):4629-33.
25. Stoka V, Turk V in Turk B: Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration, *Ageing Research Reviews* 2016; 32: 22-37.
26. Nägler DK in Ménard R: Human cathepsin X: A novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Letters* 1998; 434(1-2): 135-9.
27. Santamaría I, Velasco G, Pendás AM, Fueyo A in López-Otín C: Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

- chromosomal location. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(27):16816-23.
28. Gunčar G, Klemenčič I, Turk B, Turk V, Karaoglanovic-Carmona K, Juliano L in Turk D: Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Structure* 2000; 8(3): 305-13.
29. <http://www.rcsb.org>, povzeto aprila 2017
30. Kos J, Sekirnik A, Premzl A, Zavašnik Bergant V, Langerholc T, Turk B, Werle B, Golouh R, Repnik U, Jeras M in Turk V: Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Experimental Cell Research* 2005; 306(1): 103-13.
31. Krueger S, Kalinski T, Hundertmark T, Wex T, Küster D, Peitz U, Ebert M, Nägler DK, Kellner U, Malfertheiner P, Naumann M, Röcken C in Roessner A: Up-regulation of cathepsin X in Helicobacter pylori gastritis and gastric cancer. *The Journal of Pathology* 2005; 207(1): 32-42.
32. Nägler DK, Lechner AM, Oettl A, Kozaczynska K, Scheuber H-P, Gippner-Steppert C, Bogner V, Biberthaler P in Jochum M: An enzyme-linked immunosorbent assay for human cathepsin X, a potential new inflammatory marker. *Journal of immunological methods* 2006; 308(1-2): 241-50.
33. Wendt W, Zhu X-R, Lübbert H, Stichel CC: Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice. *Experimental Neurology* 2007; 204(2): 525-40.
34. Hafner A, Glavan G, Obermajer N, Živin M, Schliebs R in Kos J: Neuroprotective role of γ -enolase in microglia in a mouse model of Alzheimer's disease is regulated by cathepsin X. *Aging Cell* 2013; 12(4): 604-14.
35. Stichel CC in Luebbert H: Inflammatory processes in the aging mouse brain: Participation of dendritic cells and T-cells. *Neurobiology of Aging* 2007; 28(10): 1507-21.
36. Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, Fonović Pečar U in Kos J: Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009; 41(8-9): 1685-96.

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

37. Obermajer N, Švajger U, Bogyo M, Jeras M in Kos J: Maturation of dendritic cells depends on proteolytic cleavage by cathepsin X. *Journal of Leukocyte biology* 2008; 84(5): 1306-15.
38. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B in Turk D: Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1824(1): 68-88.
39. Jakoš T: Novi zaviralci cisteinske peptidaze katepsina X. Magistrska naloga; Ljubljana, 2016.
40. Pečar Fonović U, Mitrović A, Knez D, Jakoš T, Pišlar A, Brus B, Doljak B, Stojan J, Gobec S in Kos J. Identification and characterization of the first reversible and selective cathepsin X inhibitors. *Scientific Reports* 2017; odposlano v revijo.
41. Bocchini V, Mazzolla R, Barluzzi R, Blasi E, Sick P in Kettenmann H: An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells. *Journal of Neuroscience Research* 1992; 31(4): 616-21.
42. Hafner A: Vloga γ 1-sintropina pri posredovanju s katepsinom X uravnavane nevrotrofične aktivnosti γ -enolaze. Diplomska naloga; Ljubljana, 2009.
43. https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2266.aspx?geo_country=si#generalinformation, povzeto aprila 2017
44. Kovalevich J in Langford D: Considerations for the use of SH-SY5Y neuroblastoma cells in neurobiology. *Methods in molecular biology* 2013; 1078: 9-21.
45. Anderluh G, Maček P, Sepčić K, Turk T: Eksperimentalne metode v biokemiji, Študentska založba, Ljubljana, 2009: 91-102
46. Sittampalam GS in Coussens NP: Assay Guidance Manual, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004; 305-314.
47. <http://www.bio-rad.com/en-us/product/dc-protein-assay>, povzeto aprila 2017
48. <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/griess-reagent-system-protocol/>, povzeto aprila 2017
49. https://www.bdbiosciences.com/documents/Bioimaging_AppNote_Apoptosis.pdf, povzeto aprila 2017
50. Chang L: Chemical Cytometry, 1. izdaja, Wiley-VCH, Weinheim, 2010; 1-2.
51. Pečar Fonović U, Obermajer N, Jevnikar Z, Mirković B, Rojnik M in Kos J: Vaje iz farmacevtske biokemije, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana 2009; 118-122.

Meško M. Vrednotenje reverzibilnih sinteznih zaviralcev katepsina X na LPS-celičnem modelu Parkinsonove bolezni. Magistrska naloga.

52. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/P3566>, povzeto aprila 2017
53. <http://www.bdbiosciences.com/us/applications/research/bead-based-immunoassays/cba-kits/mouse-th1th2th17-cytokine-kit/p/560485> povzeto aprila 2017
54. https://www.bdbiosciences.com/in/research/bcell/techniques/intrace_cyto.jsp, povzeto aprila 2017
55. <http://www.sigmaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/apoafbul.pdf>, povzeto aprila 2017
56. Lee P, Lee J, Kim S, Lee M-S, Yagita H, Kim SY, Kim H in Suk K: NO as an autocrine mediator in the apoptosis of activated microglial cells: correlation between activation and apoptosis of microglial cells. *Brain Research* 2001; 892(2): 380-5.
57. Lee J, Hur J, Lee P, Kim JY, Cho N, Kim SY, Kim H, Lee M-S in Suk K: Dual role of inflammatory stimuli in activation-induced cell death of mouse microglial cells: Initiation of two separate apoptotic pathways via induction of interferon regulatory factor-1 and caspase-11. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(35): 32956-65.
58. Mcllawain DR, Berger T in Mak TW: Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2013; 5(4): a008656.