

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TANJA JAKOŠ

NOVI ZAVIRALCI CISTEINSKE PEPTIDAZE KATEPSINA X
NOVEL INHIBITORS OF CYSTEINE PEPTIDASE CATHEPSIN X

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem. in somentorstvom doc. dr. Urše Pečar Fonović, univ. dipl. biol. Meritve in eksperimente smo izvajali v laboratoriju Katedre za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo.

Zahvala

Poleg izbire tematike ki navdušuje, je za uspešno opravljeno raziskovalno delo pomemben mentor, ki navdihuje. Tako bi se na začetku želela zahvaliti prof. dr. Janku Kosu, ker je prisluhnil mojim željam in me zavzeto usmerjal na poti do cilja. Iskrena hvala tudi somentorici doc. dr. Urši Pečar Fonović, ki je skupaj s prof. Kosom skrbno bdela nad mojim delom, za razumevanje, spodbudo in nasvete. Njej in asist. Ani Mitrović se zahvaljujem za odgovore na številna vprašanja ter neprecenljivo pomoč v laboratoriju.

Posebna zahvala velja mojim bližnjim, družini, ki me je vseskozi podpirala, ter mojemu življenjskemu sopotniku Primožu, za njegovo brezpogojno ljubezen, zaradi katere se zdijo vse stvari v življenju neskončno lepše in lažje.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem. in somentorstvom doc. dr. Urše Pečar Fonović, univ. dipl. biol.

Tanja Jakoš

VSEBINA

VSEBINA.....	I
KAZALO SLIK.....	III
KAZALO TABEL.....	III
KAZALO ENAČB.....	III
POVZETEK.....	IV
ABSTRACT.....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VIII
1 UVOD.....	1
1.1 CISTEINSKI KATEPSINI.....	1
1.2 STRUKTURA KATEPSINA X.....	1
1.3 INTERAKCIJA KATEPSINA X Z INTEGRINSKIMI RECEPTORJI IN VPLIV NA CELICE IMUNSKEGA SISTEMA.....	4
1.4 KATEPSIN X IN RAK.....	5
1.5 KATEPSIN X IN NEVRODEGENERATIVNI PROCESI.....	7
1.6 ENDOGENI IN EKSOGENI INHIBITORJI CISTEINSKIH KATEPSINOV.....	8
1.7 VIRTUALNO REŠETANJE – UČINKOVITO ORODJE ZA ODKRIVANJE NOVIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN.....	10
2 NAMEN DELA.....	12
3 MATERIALI IN METODE.....	13
3.1 MATERIALI.....	13
3.1.1 Aparature.....	13
3.1.2 Pufri.....	13
3.1.3 Encimi in substrati.....	15
3.1.4 Inhibitorji.....	16
3.1.5 Gojišča, pufri in kemikalije uporabljene pri delu s sesalskimi celicami.....	16
3.2 METODE.....	18
3.2.1 Encimska kinetika.....	18
3.2.2 Delo s sesalskimi celičnimi kulturami.....	21

4	REZULTATI.....	27
4.1	Izbor inhibitorjev katepsina X	27
4.2	Določanje K_i in IC_{50} izbranih spojin za katepsin X	35
4.3	Določanje K_i za katepsine B, H, L in S	35
4.4	Ugotavljanje vpliva inhibitorjev na celično viabilnost	36
4.5	Vpliv izbranih inhibitorjev na celično migracijo	38
5	RAZPRAVA	40
6	SKLEP.....	46
7	LITERATURA.....	47

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematska predstavitev prokatepsina X.	3
Slika 2: Princip določanja encimske aktivnosti z uporabo fluorogenih substratov.	18
Slika 3: Shema nanosa vzorcev na mikrotitrsko ploščo pri določanju K_i	20
Slika 4: Princip določanja celične viabilnosti z uporabo reagenta MTS.	23
Slika 5: Shema nanosa vzorcev na mikrotitrsko ploščo pri testiranju vpliva spojin na celično viabilnost.	24
Slika 6: Shematska predstavitev CIM plošče v prečnem prerezu.	25
Slika 7: Delež relativne aktivnosti katepsina X ob dodatku potencialnih inhibitorjev.	32
Slika 8: Skupni rezultati obeh testiranj za izbrane spojine, pri katerih je bil relativni delež inhibicije $> 0,6$	33
Slika 9: Skupni rezultati obeh testiranj za izbrane spojine, pri čemer so izvzete avtofluorescirajoče spojine.	33
Slika 10: Vpliv izbranih spojin na celično viabilnost.	37
Slika 11: Rezultati preučevanja vpliva inhibitorjev na migracijo celic PC-3.	38

KAZALO TABEL

Tabela I: Sestava aktivacijskega pufru za katepsin X.	19
Tabela II: Strukture izbranih inhibitorjev s podano relativno molekularno maso, odstotkom inhibicije in porazdelitvenim koeficientom ($\log P$).	34
Tabela III: Konstante in mehanizem inhibicije izbranih spojin za katepsin X.	35
Tabela IV: Konstante in mehanizem inhibicije spojin 85 in 120 za katepsine H, L, S in B.	35
Tabela V: Rezultati testiranja vpliva inhibitorjev na celično migracijo.	38

KAZALO ENAČB

(Enačba 1).....	22
-----------------	----

POVZETEK

Poglobljene raziskave zadnjih nekaj desetletij so razkrile, da delujejo encimi iz družine lizosomskih cisteinskih proteaz kot pomembne signalne molekule. Zaradi svojih specifičnih fizioloških funkcij in vpletenosti v patoloških procesih predstavljajo zanimive tarče pri zdravljenju osteoporoze, kroničnih vnetij, raka ter nevrodegenerativnih bolezni. V primerjavi z večino ostalih cisteinskih katepsinov je katepsin X edinstven, saj izkazuje zgolj eksopeptidazno aktivnost. Nahaja se predvsem v celicah centralnega živčnega in imunskega sistema, kjer je sposoben modulirati adhezivne lastnosti teh celic. Njegovo povišano izražanje spodbuja invazijo in proliferacijo tumorskih celic pri različnih vrstah raka. Neustrezno delovanje katepsina X je povezano tudi z napredovanjem nevrodegenerativnih procesov.

Reverzibilni nizkomolekularni proteazni inhibitorji so najbolj ustrezna rešitev za zdravljenje bolezni, ki so povezane s prekomerno proteolitično aktivnostjo. Poleg terapevtske uporabe so inhibitorji nepogrešljivi tudi kot orodje za raziskovanje bioloških vlog proteaz, odkrivanju njihovih specifičnih substratov in mehanizma delovanja. V okviru magistrske naloge smo zato želeli odkriti inhibitorje katepsina X, ki bi se poleg reverzibilnega mehanizma delovanja odlikovali še z odlično selektivnostjo, visoko učinkovitostjo in ki hkrati ne bi bili toksični za celice.

Pri delu smo izhajali iz knjižnice spojin, ki je obsegala 611 molekul in je bila pripravljena s pomočjo virtualnega rešetanja. Za vsako spojino smo določili njeno sposobnost za inhibicijo katepsina X. Na ta način smo odkrili 6 spojin, ki so bile sposobne pri 50 μM koncentraciji zmanjšati aktivnost katepsina X vsaj za 40 %. Tem spojinam smo določili kinetične parametre (K_i in IC_{50}) ter mehanizem inhibicije. Ugotovili smo, da strukturno sorodni spojini **85** in **120** močno prekašata ostale, saj imata konstanto inhibicije v nizkem mikromolarnem območju. V naslednjem koraku smo določili K_i še za sorodne katepsine B, H, L in S, s čimer smo potrdili selektivnost inhibicije za spojini **85** in **120**. V nadaljevanju smo proučili učinek inhibitorjev **85** in **120** na celično migracijo s pomočjo funkcijskega *in vitro* testa na celični liniji PC-3. Predhodno smo na isti celični liniji pokazali, da inhibitorji niso citotoksični. Izkazalo se je, da je le spojina **120** zmožna pomembno zmanjšati gibljivost celic PC-3. Na podlagi dobljenih rezultatov zato trdimo, da je molekula **120** nova spojina vodnica, ki bo pripomogla k odkritju še boljših selektivnih inhibitorjev katepsina X.

KLJUČNE BESEDE: katepsin X, selektivni inhibitorji, tumorska invazija

ABSTRACT

Over recent decades a lot of research showed that lysosomal cysteine proteases have a significant role in cell signaling. Their specific functions in physiological as well as in pathological conditions imply that they could be of a great value in treating diseases like cancer, neurodegenerative disorders, chronic inflammations, osteoporosis and more.

Unlike most other cysteine cathepsins cathepsin X exhibits unique exopeptidase activity. It is predominantly confined to cells of the central nervous and immune system and is capable of modulating adhesive properties of these cells. Cathepsin X is upregulated in several types of cancer where it can enhance invasion and proliferation of tumor cells. Its aberrant activity is also responsible for promoting neurodegeneration.

Reversible small molecular inhibitors are the most convenient solution to treat conditions associated with excessive proteolytic activity. Besides their therapeutic applications, inhibitors are also valuable tool in scientific research to reveal specific substrates, define catalytic mechanisms and gain insight in biological role of the enzymes. Therefore, the aim of our work was to discover potent, highly selective cathepsin X inhibitors that would bind reversibly and would be non-cytotoxic as well.

A library of 611 compounds was assembled using virtual screening. For each compound we assessed capability to inhibit cathepsin X activity. The initial screen using 50 μM concentration revealed 6 compounds that were capable of diminishing cathepsin X activity for at least 40 %. We determined IC_{50} , K_i and mode of inhibition for these potential inhibitors. Structurally related compounds **85** and **120** greatly outperformed the others, since their K_i was found to be in low micromolar range. In the next step we confirmed that compounds **85** and **120** are selective inhibitors of cathepsin X by determining K_i for related cathepsins: B, H, L, and S. Finally, we studied the effect of cathepsin X inhibitors **85** and **120** on cell migration using *in vitro* tests and PC-3 cell line. In addition, cell viability study was performed by which non-toxicity of the inhibitors was proved. It was found out that only compound **120** significantly reduced migratory potential of PC-3 cells. Therefore, we propose compound **120** to be a novel lead compound which can serve to discover even more potent selective inhibitors of cathepsin X.

KEYWORDS: cathepsin X, selective inhibitors, tumor invasion

SEZNAM OKRAJŠAV

AB	Alzheimerjeva bolezen
Abz	2-aminobenzoil
AK	aminokislina
ALS	amiotrofična lateralna skleroza
AMC	7-amino-4-metilkumarin
cDNA	komplementarna DNA
CIM	celična invazija in migracija
DC	dendritične celice
DMEM	Eagleovo gojišče, prilagojeno po Dulbeccu
DMSO	dimetil sulfoksid
Dnp	2,4-dinitrofenil
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
F12	Hamova mešanica hranil
FBS	fetalni goveji serumski albumin
FMS	fenazin metosulfat
IC ₅₀	koncentracija inhibitorja, ki za 50 % zmanjša hitrost encimske reakcije
ICAM	medcelična adhezivna molekula (intercellular adhesion molecule)
IGF	inzulinu podobni rastni dejavnik (insulin-like growth factor)
KAT	katepsin
K _i	disociacijska konstanta kompleksa encim-inhibitor
K _i '	disociacijska konstanta kompleksa encim-substrat-inhibitor
LFA-1	s funkcijo limfocitov povezan antigen-1 (lymphocyte function-associated antigen-1)
Mac-1	makrofagni antigen-1 (macrophage antigen-1)
mRNA	informacijska RNA
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2h- tetrazolijeva sol
NK	naravne celice ubijalke
PBS	fosfatni pufer z NaCl
SD	standardna deviacija

VCAM	žilna celična adhezijska molekula (vascular cell adhesion molecule)
ZCM	zunajcelični matriks

1 UVOD

1.1 CISTEINSKI KATEPSINI

Katepsini so glavna skupina lizosomskih hidrolaz in se glede na katalitski mehanizem delijo na tri skupine: aspartatne (katepsina D in E), serinske (katepsina A in G) ter cisteinske katepsine. Sprva je veljalo prepričanje, da je njihova glavna naloga nespecifična končna razgradnja proteinov v lizosomih. Od tod tudi njihovo poimenovanje, saj beseda kathepsin v grščini pomeni prebaviti. Za optimalno aktivnost potrebujejo rahlo kislo in reducirajoče okolje, ki se nahaja ravno v lizosomih. Sčasoma so se pojavili dokazi, da se nahajajo tudi v drugih celičnih predelkih (citosol, jedro, ob celični membrani) in celo zunajcelično. Podrobnejše raziskave njihove funkcije so pokazale, da imajo veliko bolj specifične vloge, prek katerih so vpleteni v regulacijo številnih fizioloških ter patoloških procesov. [1]

Katepsin X (imenovan tudi katepsin P in Z) je eden izmed 11-ih cisteinskih katepsinov poleg katepsinov B, C, L, F, H, K, O, S, V in W. Katepsini B, H, L in C so prisotni v vseh tkivih, medtem ko so preostali izraženi v specifičnih tipih celic. Klasifikacija MEROPS ga uvršča v klan CA cisteinskih proteaz in družino C1 papainu podobnih encimov. Večina cisteinskih katepsinov je endopeptidaz, saj cepijo peptidno vez v notranjosti substrata. Katepsin B ima poleg endopeptidazne še dodatno dipeptidil karboksipeptidazno aktivnost in katepsin H hkrati deluje tudi kot mono aminopeptidaza. Katepsina C in X sta edina predstavnika, ki izkazujejo zgolj eksopeptidazno aktivnost. Prvi je aminopeptidaza in katepsin X je mono karboksipeptidaza. Proteinske kristalne strukture so razkrile, da imajo eksopeptidazno delujoči katepsini dodatne strukture, ki zaprejo del vezavnega mesta, in so sposobni prek elektrostatskih interakcij stabilizirati končno amino skupino ali karboksilat. Pri katepsinu B in X to omogoča dodatna zanka v strukturi, pri katepsinu C in H pa deli verige propetida. [2]

1.2 STRUKTURA KATEPSINA X

V primerjavi z ostalimi katepsini je bil katepsin X odkrit relativno pozno. Njegovo kodirajoče zaporedje je bilo določeno l. 1998. Katepsin X se prepiše v 303 aminokislinskih ostankov dolg prepro-protein. [3, 4] N-končno signalno zaporedje usmerja sintetiziran peptid do endoplazmatskega retikuluma, kjer potečejo posttranslacijske modifikacije,

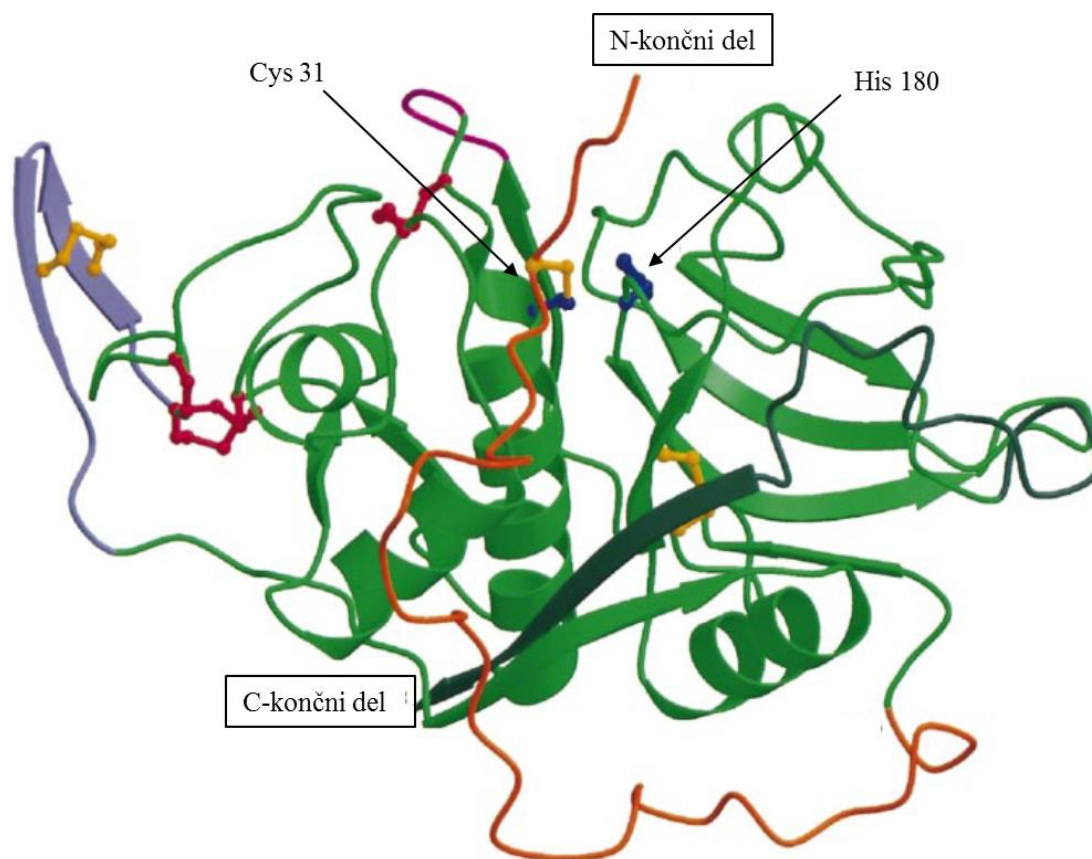
vključno z glikozilacijo. Sledi vstop v Golgijev aparat in vezava na manoza-6-fosfatne receptorje, ki se skupaj s svojim tovorom zaprejo v vezikle ter transportirajo do lizosomov. [5]

Struktura katepsina X je podobna ostalim pripadnikom družine. Po obliki je globularen protein sestavljen iz dveh domen, ki skupaj tvorita stene aktivnega mesta v obliki črke V. Prevladujoča sekundarna struktura v N-končni domeni je α -vijačnica, medtem ko C-končna domena tvori β -strukturo. Obe domeni prispevata po eno aminokislino (AK) katalitične enote, Cys31 in His180. [6] Proteolitična cepitev lahko poteče zaradi tvorbe tiolat-imidazolnega ionskega para med katalitičnima AK. Po nukleofilnem napadu tiolatne skupine se nastali oksianion stabilizira prek vodikovih vezi s skupinami NH Gln22 in Cys31, ki tvorita oksianionsko luknjo. Hkrati se protoniran imidazol obrne tako, da prenese proton na dušik hidrolizirane peptidne vezi. Po razcepu peptidne vezi novonastali aaminski del substrata izpodrine molekula vode in nato kot nukleofil cepi še tioestrsko vez med preostankom substrata in encima. [7]

Poleg podobnosti ima katepsin X nekaj edinstvenih strukturnih značilnosti. Prva zelo očitna razlika je nenavadno kratka proregija, ki je z dolžino zgolj 38 aminokislinskih ostankov daleč najkrajša med katepsini (proregija katepsina B ima 62 AK, katepsina C 206 AK). V nasprotju z ostalimi proregijami, ki se prek α -vijačnic pritrjujejo na katalitično enoto encima, proregija katepsina X ne vsebuje sekundarnih struktur. Proregija je sicer namenjena regulaciji katalitične aktivnosti, saj sega v aktivno mesto in ga zapira. Njena veriga poteka v nasprotni smeri kot peptidni substrat, zato je aktivno mesto ne more cepiti in je na ta način katalitična aktivnost encima inhibirana. Posebnost pri katepsinu X je, da je njegov propeptidni del stabiliziran prek kovalentne disulfidne vezi med cisteinom Cys10p in Cys31 v aktivnem mestu. Prav tako katepsin X ni sposoben avtokatalitične aktivacije. Pretvorba neaktivne oblike v delujoč encim poteka pod vplivom katepsina L v reducirajočem okolju lizosomov.

V strukturi zrelega proteina izstopata dva aminokislinska vstavka v N-končni domeni. Daljša zanka (Cys109-Asn123) se nahaja na delu, kjer pri ostalih katepsinih ni veliko sekundarnih struktur. Proti-vzporedna β -lasnica se pri katepsinu X izteguje stran od proteina in ni v kontaktu z ostalimi deli encima. Nima vpliva na katalitično funkcijo encima, saj je daleč stran od aktivnega mesta, lahko pa bi sodelovala pri interakciji z ostalimi proteini ali deli celice.

Drugi vstavek, ki vsebuje le 3 aminokisliline (Ile24-Pro25-Gln26), je mnogo pomembnejši za funkcijo encima. Nahaja se med Gln22, ki je del oksianionske luknje, ter Cys31 v katalitičnem mestu (Gln22-His-**Ile-Pro-Gln**-Try-Cys-Gly-Ser-Cys31). Ta regija je sicer zelo ohranjena pri ostalih katepsinih, saj daje aktivnem mestu značilnosti, ki so ključne za endopeptidazno aktivnost (Gln-Gly-Xxx-Cys-Gly-Xxx-Cys). Vrinjeni tripeptid, ki so ga poimenovali mini zanka, pri katepsinu X vpliva na strukturo vezavnega žepa in s tem na vezavo substrata. Zaradi mini zanke sta stranski verigi His23 in Tyr27 podaljšani proti aktivnemu mestu in na ta način bistveno zmanjšata velikost vezavnega žepa S2'. Protoniran imidazolni obroč His23 stabilizira karboksilat substrata. Ta specifičnost v strukturi vezavnega mesta pojasnjuje eksopeptidazno delovanje katepsina X. [2, 3, 6, 8]



Slika 1: Shematska predstavitev prokatepsina X: proregija je svetlo rjava, encim je v zeleni barvi, njegovih 25 C-končnih aminokislinskih ostankov je predstavljenih v temno zeleni barvi, mini-zanka je rožnata, večji vstavek je modre barve in disulfidne vezi so obarvane v rdeči barvi (ohranjene) ter rumeni barvi (edinstvene). V temno modri barvi sta predstavljena Cys31 in His180 v aktivnem mestu. [6]

Glede na zgodnejše analize, ki so merile izražanje mRNA in cDNA, naj bi bil katepsin X porazdeljen v različnih tkivih. Kasneje se je izkazalo, da se na proteinski ravni izraža v bistveno manjšem obsegu. Omejen je na celice imunskega sistema: monocite, makrofage in dendritične celice, prisoten pa je tudi v možganih: predvsem v celicah mikroglie in v astrocitih. [9, 10] V nadaljevanju bomo opisali, kako lahko spremembe v njegovi fiziološki funkciji vodijo v moteno delovanje imunskega sistema in pripomorejo k razvoju nevrodegenerativnih procesov ter rakavih obolenj.

1.3 INTERAKCIJA KATEPSINA X Z INTEGRINSKIMI

RECEPTORJI IN VPLIV NA CELICE IMUNSKEGA SISTEMA

Prokatepsin X vsebuje RGD (Arg-Gly-Asp), medtem ko njegova zrela oblika ECD (Glu-Cys-Asp) vezavne motive, prek katerih interagira z integrinskimi molekulami. Integrini so glavna skupina transmembranskih receptorjev, ki vežejo sestavine zunajceličnega matriksa (glikoproteinske molekule kot so kolagen, fibronektin, laminin) in celične receptorje (kot npr. ICAM, VCAM-1) ter imajo ključno vlogo pri celični adheziji. So heterodimerni glikoproteini iz dveh podenot alfa in beta in imajo tri značilne strukturne enote: veliko zunajcelično domeno, transmembransko vijačnico alfa ter citoplazemski rep. Prek integrinov poteka dvosmerna komunikacija med notranjostjo celice in njenim okoljem. Zaradi posrednega vpliva na celične signalne poti so integrini mnogo več kot zgolj adhezijske molekule. [11]

V povezavi z zrelim katepsinom X je pomembna skupina integrinov β_2 , ki je specifična za celice imunskega odziva - levkocite. Katepsin X z zaporedno cepitvijo štirih C-končnih aminokislinskih ostankov s citoplazemskega repa podenote β_2 integrinskega receptorja modulira njegovo afiniteto. Cepitev integrinskega repa zmoti vezavna mesta za različne regulatorne in strukturne proteine, kot sta talin in α -aktinin, kar izzove reorganizacijo citoskeleta in morfološke spremembe, ki so povezane z migracijo imunskih celic. [12, 13]

Katepsin X na makrofagih in dendritičnih celicah uravnava delovanje integrinskega receptorja Mac-1. Prek aktivacije Mac-1 na makrofagih spodbuja njihovo adhezijo in fagocitozo ter zavira T-celično proliferacijo. [14] Katepsin X je kot aktivator Mac-1 pomemben tudi v procesu zorenja dendritičnih celic (DC). DC so glavne antigen predstavitvene celice in v svoji nezreli obliki skrbijo predvsem za vzdrževanje periferne

tolerance limfocitov T. Ob stiku s tujim antigenom migrirajo v limfatično tkivo, kjer dozoriijo, in postanejo sposobne sprožiti imunski odziv prek aktivacije limfocitov T. Med procesom zorenja postanejo DC polarizirane celice, na svojem vodilnem robu tvorijo podosome in se intenzivno pritrjujejo na zunajcelični matriks (ZCM). Te spremembe so povezane s prenosom katepsina X proti plazemski membrani in aktivacijo receptorja Mac-1. Po končanem procesu zorenja se katepsin X sprosti z receptorja Mac-1, ki preide nazaj v neaktivno stanje, pri čemer se zrele DC odcepijo. V primeru, da je delovanje katepsina X zavrto, DC ne dozoriijo in ostanejo anergične. [15]

Tudi funkcija limfocitov T je odvisna od delovanja integrinskega receptorja. LFA-1 prek adhezije z ICAM-1 na endotelnih celicah, antigen predstavitevni celicah in drugih tarčnih celicah uravnava ekstravazacijo in migracijo limfocitov T ter nastanek imunološke sinapse. Čeprav je koncentracija katepsina X v limfocitih nižja kot v makrofagih, ima enako pomembne učinke na morfološke spremembe. Katepsin X s cepitvijo citoplazemskega repa LFA-1 vpliva na jakost povezave aktinskega citoskeleta z ZCM in vodi usmerjeno migracijo limfocitov T. Povezava LFA-1 in katepsina X je še posebej izrazita v izrastkih zastajajočega dela celice, uropodih. [12, 13] Katepsin X lahko spodbudi tudi izjemno podaljšanje teh izrastkov tako, da prek ti. nano cevki tvori mrežo povezav za prevajanje signalov med limfociti T. [16]

Izkazalo se je, da indukcija prekomernega izražanja katepsina X v limfocitih T povzroči pospešeno migracijo in povečano invazivnost teh celic. Povišane ravni katepsina X je moč zaslediti tudi pri nekaterih tipih raka, zato je na mestu domneva, da je napačno regulirana aktivnost receptorjev β_2 eden od vzrokov za spremenjene adhezivne in migracijske lastnosti tumorskih celic. [17] Mehanizmi nastanka raka zaradi nepravilnega delovanja katepsina X so vsekakor raznoliki in niso omejeni zgolj na spremenjene adhezivne sposobnosti tumorskih celic zaradi delovanja na integrinske receptorje.

1.4 KATEPSIN X IN RAK

Proteaze imajo pomembno vlogo pri razvoju in napredovanju tumorjev. Prekomerno delovanje cisteinskih proteaz je bilo dokazano pri različnih tipih raka in je povezano s slabo napovedjo poteka bolezni. Podobno velja za katepsin X, kar lahko sklepamo že iz njegovega genskega zapisa, saj se nahaja na regiji 20q13, ki se zelo aktivno prepisuje pri

raku. [18] Povišane ravni proteina so odkrili najprej pri želodčnem raku in raku prostate. [19, 20] Pri pljučnem raku so našli večje količine proteina v infiltriranih imunskih celicah. [9] Za hepatocelularni karcinom je značilno povišano izražanje tako mRNA kot proteina. Prekomerno izražanje gena so odkrili tudi pri agresivni obliki malignega melanoma. [21, 22]

Pri nekaterih vrstah raka lahko koncentracija katepsina X v telesnih tekočinah in tkivih odraža klinično sliko ter potek bolezni. Pri raku dojke je mogoče razlikovati med vnetno in ne-vnetno obliko raka. Pri slednji so v serumu prisotne značilno višje koncentracije katepsina X. [23] Višje koncentracije katepsina X so prisotne tudi v cistični tekočini epiteljskega raka jajčnikov, vendar ne korelirajo s kliničnimi parametri. [24] Slabša prognoza je bila ugotovljena za bolnike s hepatocelularnim karcinomom, ki imajo izmerjene višje ravni mRNA, in za bolnike s pljučnim ter kolorektalnim rakom, z visokimi serumskimi koncentracijami katepsina X. [22, 25, 26]

V literaturi je predstavljenih več različnih mehanizmov, prek katerih katepsin X spodbuja onkogenezo.

Katepsin X uravnava funkcijo intergrinskih receptorjev in posledično lahko spremeni adhezivne lastnosti tumorskih celic. Tega je zmožen tako v obliki proencima, (z zunajcelično vezavo na integrine $\alpha_v\beta_5$ in $\alpha_v\beta_3$), kot tudi v svoji zreli obliki, kjer deluje znotrajcelično in cepi citoplazemski rep integrinskih receptorjev β_2 . [27, 28] Na ta način tumorskim celicam olajša migracijo skozi zunajcelični matriks in poveča njihovo invazivnost ter sposobnost metastaziranja. Profilin-1 je še en pomemben substrat katepsina X. Pripisujejo mu tumor supresorsko vlogo, saj pomembno zmanjša gibljivost celic. Podobno kot pri integrinih β_2 , katepsin X s skrajšanjem C-končnega dela profilina-1 odstrani vezavno mesto za ligande, prek katerih deluje na polimerizacijo aktina. [29]

Tumorske celice doživijo vrsto morfoloških in funkcijskih sprememb, ki jim olajšajo prodiranje v okoliška in tudi bolj oddaljena tkiva. Katepsin X ob prekomernem izražanju spodbudi prehod celic iz epitelne v mezenhimsko obliko. Pri tem se prekinejo stiki med celicami in bazalno membrano zaradi izgube povezovalnih proteinov (E-kadherina) in tesnih stikov. Celice hkrati postanejo vretenaste, lahko gibljive in bolj odporne na apoptozo. [22]

Katepsin X spodbuja tudi tumorsko proliferacijo. Z utišanjem izražanja katepsina X neonatalne človeške kožne fibroblastne celice postanejo senescentne. Celična senescenca je dober varovalni mehanizem, ki nasprotuje razvoju raka s tem, da zaustavi napredovanje celičnega cikla. [30] Možna razlaga spodbujevalnega učinka, ki ga ima katepsin X na celično razmnoževanje, je ojačanje signalne poti, ki jo posreduje IGF. [31] Katepsin X tudi poveča preživetje tumorskih celic prek zaviranja apoptoze. [32]

In vitro poskusi na celičnih linijah kažejo, da zaviranje katepsina X uspešno zmanjša invazivno sposobnost tumorskih celic. Pri tem je potrebno upoštevati, da je delovanje cisteinskih proteaz redundantno in da se njihove tumor promotorske vloge dopolnjujejo, kar je moč opaziti na *in vivo* mišjih modelih. Pri miših z enojno delecijo bodisi katepsina B bodisi katepsina X se je izkazalo, da napredovanje tumorja ni bilo bistveno upočasnjeno. Učinkovita je bila šele delecija obeh katepsinov. [33]

1.5 KATEPSIN X IN NEVRODEGENERATIVNI PROCESI

Lizosomske proteaze so pomembne za normalen razvoj in plastičnost možganskih nevronov. Med staranjem lahko spremembe v njihovi koncentraciji in mestu delovanja spodbudijo nastanek nevrodegenerativnih bolezni. [10]

Na mišjem modelu je bilo potrjeno, da je katepsin X prisoten v vseh celičnih tipih centralnega živčnega sistema, najbolj pa je izražen v celicah glie. S starostjo in v prisotnosti nevrodegenerativnih procesov pride do povečane tvorbe in aktivnosti encima ter prerazporeditve v citosol celice. Povečane ravni katepsina X so našli v celicah glie znotraj degeneriranih področij mišjih modelov z amiotrofično lateralno sklerozo (ALS). V možganih transgenih mišjih modelov Alzheimerjeve bolezni (AB) in za paciente z AB je značilno povečana akumulacija katepsina X okoli senilnih plakov. [34, 35] Na celičnem modelu Parkinsonove bolezni, se je ob izpostavljenosti oksidativnemu stresu, povzročenemu s 6-hidroksidopaminom, ki inducira apoptozo nevronov, povečalo izražanje katepsina X [36]. Skupna značilnost nevrodegenerativnih bolezni kot je Parkinsonova, Alzheimerjeva bolezen in ALS je aktivacija celic mikroglie. Aktivirana mikroglia lahko deluje nevroprotektivno z izločanjem nevrotrofičnih dejavnikov, po drugi strani pa dodatno prispeva k nevrodegeneraciji z izločanjem vnetnih dejavnikov in tudi lizosomskih proteaz, vključno s katepsinom X. Zaščitni dejavniki so sposobni spodbuditi rast, diferenciacijo,

preživetje in obnovo nevronske celice. [10, 35, 36] Med njimi je pomembna γ -enolaza, ki deluje prek aktivacije fosfatidilinozitol 3-kinazne (PI 3-K) in z mitogenom aktivirane protein kinazne (MAPK) signalne poti ter tako zmanjšuje oksidativni stres, zavira apoptozo in spodbuja preživetje nevronov. Proteolitično delovanje katepsina X izniči zaščitno funkcijo γ -enolaze. S tem, ko z njenega C-končnega dela odcepi dipeptid, zmoti povezavo γ -enolaze z γ 1-sintrofinom, ki je nujna za prenos γ -enolaze k celični membrani. [34]

Katepsin X presnavlja tudi proteine s poli-Q zaporedji, ki so nagnjeni k agregaciji in kopičenju v nevronih. V primeru Huntingtonove bolezni s tvorbo krajših poli-Q fragmentov iz proteina huntingtina poveča njegovo citotoksičnost. [37] Po drugi strani pa skupaj s katepsinom L sodeluje pri lizosomski razgradnji poli-Q peptidov in celice varuje pred njihovimi škodljivimi učinki. [38]

1.6 ENDOGENI IN EKSOGENI INHIBITORJI CISTEINSKIH KATEPSINOV

Proteaze so zaradi svoje katalitične sposobnosti gonilna sila pomembnih biokemičnih procesov v organizmu. Njihovo delovanje zato ni prepuščeno naključju, ampak je skrbno uravnavano. Prva regulacija se izvaja že na nivoju transkripcije in skrbi, da se sintetizira ravno prav encima in v pravem trenutku. Sintetizirani prekurzorji običajno vsebujejo signalna zaporedja za pravilno razvrščanje na mesto delovanja. Dodatno obliko zaščite pred neustreznim delovanjem predstavlja sinteza v neaktivni obliki in kontrolirana aktivacija. Za uravnoteženje encimskih procesov poskrbijo endogeni inhibitorji. Nazadnje, ko encimi izvršijo svojo nalogo, so ustrezno deaktivirani. Encimsko aktivnost cisteinskih katepsinov lahko zavira splošni peptidazni inhibitor α 2-makroglobulin, nekateri predstavniki tiropinov, serpinov, med najpomembnejše endogene zaviralce pa sodijo cistatini. [2]

Cistatini so naddružina evolucijsko sorodnih endogenih proteinov, ki na kompetitiven način reverzibilno in nespecifično inhibirajo cisteinske proteaze. Glede na strukturno podobnost se še naprej ločijo v več podtipov. Tip I vključuje dva znotrajcelično delujoča predstavnika, stefina A in B. Naslednja skupina so cistatini tipa II, ki se od stefinov razlikujejo v tem, da vsebujejo disulfidna mostova, se izločajo v zunajcelični prostor in se lahko glikozilirajo. Kininogeni (tip III) tudi vsebujejo domene, ki lahko inhibirajo papainu

podobne proteaze. Običajno so cistatini prisotni v citoplazmi in zunajcelični tekočini, medtem ko se njihove tarče nahajajo predvsem v lizosomih. Zaradi te delitve si lahko predstavljamo, da cistatini delujejo kot zavora v sili. Lovijo tiste proteaze, ki so pobegnile z mesta delovanja ali tiste, ki jih izločajo patogeni organizmi. Nekatere cistatine lahko imunske in rakave celice internalizirajo in nakopičijo tudi v lizosomih. [39] Biološki pomen cistatinov se odraža pri vseh procesih, kjer delujejo cisteinske proteaze: od razgradnje proteinov, pretvarjanja hormonov, resorpcije kosti, razvoja vnetja, sodelovanja pri predstavitvi antigenov in T celičnem imunskem odzivu, obrambe pred virusnimi in bakterijskimi okužbami itn. Fiziološko preprečujejo prekomerno aktivnost katepsinov, njihove koncentracije pa so spremenjene pri patoloških stanjih, kot so imunske, nevrodegenerativne in rakave bolezni. Za stefin B in cistatin C je bila ugotovljena povezava z nalaganjem amiloidnih plakov pri Alzheimerjevi bolezni. Povišane koncentracije in zaščitno delovanje stefinov so opazili pri rakavih bolnikih. Nasprotno so pri raku koncentracije cistatinov tipa II nižje in njihova zaščitna vloga je okrnjena. [40]

Izjema med sekretornimi cistatini tipa II je cistatin F, ki ga v znatnih količinah najdemo v fizioloških pogojih tudi znotrajcelično v lizosomih, kjer lahko regulira proteazno aktivnost katepsinov. Cistatin F je prisoten le v celicah imunskega sistema: citotoksičnih limfocitih T, naravnih celic ubijalkah, monocitih in dendritičnih celicah. Zaradi mestno in časovno specifičnega načina izražanja se predvideva, da sodeluje pri regulaciji imunskega odziva. Med cistatinom F (imenovanim tudi levkocistatin) in katepsinom X obstaja posredna povezava. V dendritičnih celicah cistatin F najverjetneje deluje inhibitorno na katepsin L in posledično vpliva na proteolitično aktivacijo prokatepsina X ter sosledno aktivacijo integrinskega receptorja Mac-1. Cistatin F je pomemben tudi za citotoksično delovanje naravnih celic ubijalk (NK). Glavna naloga NK je uničevanje tumorskih in z virusom okuženih celic. Tarčne celice lahko prek svojih celičnih receptorjev ali z izločanjem provnetnih citokinov izničijo citotoksično delovanje celic naravnih ubijalk, pri čemer igra pomembno vlogo cistatin F, ki z zaviranjem katepsinov C in H prepreči aktivacijo grancimov. [41, 42]

Znanih je že kar nekaj eksogenih zaviralcev cisteinskih katepsinov. Bogat vir proteinskih in neproteinskih molekul predstavlja živi svet (živali, mikroorganizmi, rastline in glive), v uporabi so tudi monoklonska protitelesa ter nizkomolekularni sintezni inhibitorji. Izolacija epoksisukcinilnega inhibitorja E-64 (L-trans-epoksisukcinil-levcilamido(4-

gvanidino)butana) iz glive *Aspergillus japonicus* je pomenila velik preboj pri odkrivanju biološke vloge cisteinskih katepsinov. Ker reagira izključno s cisteinom v aktivnem mestu papainu podobnih proteaz, se uporablja kot splošni indikator aktivnosti cisteinskih katepsinov. Njegovo ogrodje je služilo za sintezo specifičnih inhibitorjev z dodanimi lastnostmi, ki so izboljšale prehajanje prek celične membrane (AMS36 je primer specifičnega inhibitorja za katepsin X). [40] Zaradi ireverzibilnega mehanizma inhibicije sicer niso primerni za uporabo v klinični praksi. Reaktivni epoksidni obroč se po nukleofilnem napadu tiolne skupine cisteina v aktivnem mestu odpre in z njim tvori tioestrsko vez. Elektrofila 'bojna glava' se lahko veže na nukleofilne skupine ostalih peptidaz ali proteinov. Neželeni učinki, ki izvirajo iz nespecifične, ireverzibilne vezave na netarčne proteine, so razlog, da je iskanje potrebno usmeriti k odkrivanju reverzibilnih inhibitorjev. [43]

1.7 VIRTUALNO REŠETANJE – UČINKOVITO ORODJE ZA ODKRIVANJE NOVIH ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Pri odkrivanju novih učinkovin v farmacevtski industriji uporaba kombinatorične kemije in rešetanja visoke zmogljivosti veljata za zlati standard. Na ta način je možno generirati velike in raznolike knjižnice spojin, ki so podvržene avtomatiziranemu testiranju aktivnosti glede na tarče. Poleg visokih stroškov je slabost tega pristopa tudi ta, da je iskanje omejeno na molekule, ki so fizično prisotne v zbirki spojin. Konec 80. let prejšnjega stoletja se je pojavil koncept virtualnega rešetanja (VR), ki je v zadnjem desetletju postal sestavni del procesa odkrivanja biološko aktivnih učinkovin. Ključna ideja VR je, da z ustreznim selekcijskim postopkom *in silico* razvrstimo spojine iz zbirke glede na potencialno aktivnost in na ta način zmanjšamo nabor spojin, ki ga testiramo *in vitro*. Dodatna prednost VR je, da lahko iskanje razširimo na spojine, ki jih ustvarimo z dizajnom *de novo* in na spojine, ki so del virtualnih baz podatkov. Tak primer je ZINC, prosto dostopna podatkovna baza, ki vsebuje preko 35 milijonov dobavljivih spojin. Spojine so zapisane v več različnih formatih, ki ustrezajo potrebam različnih aplikacij VR, kot npr. iskanje po podobnostih, iskanje po podstrukturah, filtriranje po lastnostih ali sidranje. Uporabnost VR ni samo v iskanju potencialnih zadetkov, ampak se s pridom izkorišča tudi pri optimizaciji in izboljševanju lastnosti spojin vodnic. [44, 45]

Glede na predhodno znanje o biološki tarči, lahko pri virtualnem reševanju uporabimo dva različna pristopa. VR je možno izvesti bodisi na osnovi poznavanja strukture znanih ligandov bodisi na osnovi 3-D strukture tarče. Natančno strukturo tarče običajno pridobimo z rentgensko kristalografijo, lahko jo razrešimo tudi s pomočjo NMR ali predvidimo z uporabo homolognega modeliranja. Informacija o strukturi tarče omogoča, da izvedemo molekulsko sidranje ali prepoznamo pomembna mesta za interakcijo z ligandom in zasnujemo farmakoforni model. Molekulsko sidranje je najbolj uporabljana tehnika, pri kateri s pomočjo računalniškega programa prilegamo molekulo v vezavni žep in nato z uporabo cenilne funkcije molekule rangiramo glede na jakost vezave. Druga možnost je, da uporabimo znanje o ligandih in povežemo njihove strukturne in fizikalno-kemijske lastnosti z biološko aktivnostjo. Tako lahko na osnovi strukture ligandov razvijemo farmakoforni model ali izvedemo iskanje po podobnosti. [46, 47]

2 NAMEN DELA

Katepsin X predstavlja zanimivo terapevtsko tarčo, saj je njegovo prekomerno izražanje povezano z razvojem rakavih obolenj in nevrodegenerativnih procesov. Že obstoječi nizkomolekularni inhibitorji katepsina X zaradi omejene selektivnosti in svoje ireverzibilne narave ter posledično ozkega terapevtskega okna niso primerni za uporabo v klinični praksi. Namen magistrske naloge je iz knjižnice spojin izbrati inhibitorje, ki bodo na reverzibilen način selektivno inhibirali katepsin X in bodo hkrati netoksični za celice.

Na začetku bomo s testiranjem encimske kinetike prečesali knjižnico spojin in za vsako spojino ocenili sposobnost inhibicije katepsina X. Za najbolj obetavne spojine bomo izračunali kinetična parametra K_i in IC_{50} ter določili mehanizem inhibicije. Spojine, ki bodo imele K_i v nizkem mikromolarnem območju, bomo nato testirali za selektivnost napram katepsinom B, L, H in S. V drugem delu magistrske naloge bomo preverili učinke izbranih inhibitorjev na celičnem modelu raka prostate. Najprej bomo na celični liniji PC-3 določili vpliv inhibitorjev na preživetje celic. Nazadnje bomo ugotavljali v kolikšni meri lahko izbrani inhibitorji zavrejo migracijo celic PC-3.

V okviru magistrske naloge želimo poiskati nov inhibitor, ki bi ga odlikovala dobra selektivnost za katepsin X.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Aparature

- analitska tehnica AB104 Mettler toledo, Greifensee, Švica
- avtomatska multikanalna pipeta Biohit, Helsinki, Finska
- avtomatske pipete Biohit, Helsinki, Finska
- celični inkubator CB 210 Binder Binder, Tuttlingen, Nemčija
- centrifuga Heraeus Megafuge 16R Thermo Scientific, Rochester, NY, ZDA
- citometer za štetje celic Tiefe Depth profandeur – Thomba Brand, Wertheim, Nemčija
- bralec mikrotitrskih plošč Tecan Safire²™ Tecan Group Ltd., Männedorf, Švica
- inkubator WTB Binder Binder, Tuttlingen, Nemčija
- komora z laminarnim pretokom zraka PIO SMBC 183AV, PIO LFVP9 Iskra, Ljubljana, Slovenija
- magnetno mešalo Rotamix 550MM Tehnica, Železniki, Slovenija
- mikroskop Nikon TMS-F Nikon, Tokyo, Japonska
- pH meter Hanna instruments, Woonsocket, Rhode Island, ZDA
- pipete Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- tehnica PB 3001 Mettler toledo, Greifensee, Švica
- vibracijski mešalnik Vibromix 10 Tehnica, Železniki, Slovenija
- xCELLigence RT-CA DP System Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija

3.1.2 Pufri

100 mM acetatni pufer za katepsin X in katepsin L, pH 5,5

0,45 g Ocetna kislina

3,48 g Natrijev acetat

0,50 g PEG 8000

Z destilirano vodo dopolnimo do 500ml in uravnamo pH na 5,5.

100 mM fosfatni pufer za katepsin H, pH 6,8

3,71 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

3,29 g Na_2HPO_4 , brezvodni

0,50 g PEG 8000

Z destilirano vodo dopolnimo do 500ml in uravnamo pH na 6,8.

60 mM acetatni pufer za eksopeptidazno aktivnost katepsina B, pH 5,0

0,65 g Ocetna kislina

1,58 g Natrijev acetat

0,50 g PEG 8000

Z destilirano vodo dopolnimo do 500ml in uravnamo pH na 5,0.

100 mM fosfatni pufer za endopeptidazno aktivnost katepsina B, pH 6,0

6,07 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

1,07 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

0,50 g PEG 8000

Z destilirano vodo dopolnimo do 500ml in uravnamo pH na 6,0.

100 mM fosfatni pufer za katepsin S, pH 6,5

13,9 ml 1M K_2HPO_4

36,1 ml 1M KH_2PO_4

0,50 g PEG 8000

Z destilirano vodo dopolnimo do 500ml.

Za pripravo 50 ml 1 M raztopin K_2HPO_4 oziroma KH_2PO_4 potrebujemo:

6,81 g KH_2PO_4 , oziroma

8,71 g K_2HPO_4

Aktivacijski pufri za katepsine (1,5 mM EDTA in 5 mM L-cistein)

30,29 mg L-cistein

27,90 mg EDTA

Dopolnimo do 50 ml z osnovnim pufrom za
posamezen katepsin in dodamo 5 μl Triton-X 100.

Kemikalije za pripravo pufrov:

- | | |
|--|-----------------------------------|
| - Natrijev acetat, brezvodni | Merck, Darmstadt, Nemčija |
| - PEG 8000 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| - L-cistein | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| - EDTA | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| - Triton-X 100 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| - Ocetna kislina | Merck, Darmstadt, Nemčija |
| - NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| - Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| - K ₂ HPO ₄ | J.T. Baker, Deventer, Nizozemska |
| - KH ₂ PO ₄ | J.T. Baker, Deventer, Nizozemska |

3.1.3 Encimi in substrati

Encimi:

- rekombinantni človeški katepsin B (*E. coli*)
- nativni človeški katepsin H, izoliran iz človeških jeter
- rekombinantni človeški katepsin L (*E. coli*)
- rekombinantni človeški katepsin S (*P. pastoris*)
- rekombinantni človeški katepsin X (*P. pastoris*)

Substrati:

- | | |
|---|--|
| - Abz-FEK(Dnp)-OH
(Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH) | Zidar N., katedra FK (Puzer et al, 2005) |
| - Abz-GIVRAK(Dnp)-OH
(Abz-Gly-Ile-Val-Arg-Ala-Lys(Dnp)-OH) | Bachem, Bubendorf, Švica |
| - Z-RR-AMC (Z-Arg-Arg-AMC) | Calbiochem, Darmstadt, Nemčija |
| - R-AMC (Arg-AMC) | Biomol, Farmingdale, NY, ZDA |
| - Z-FR-AMC (Z-Phe-Arg-AMC) | Bachem, Bubendorf, Švica |
| - Z-VVR-AMC (Z-Val-Val-Arg-AMC) | Biomol, Farmingdale, NY, ZDA |

3.1.4 Inhibitorji

- | | |
|---------|---|
| - E-64 | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |
| - AMS36 | Zidar N., katedra FK (Sadaghiani et al, 2007) |
| - DMSO | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA |

3.1.5 Gojišča, pufri in kemikalije uporabljene pri delu s sesalskimi celicami

Celična linija raka prostate PC-3 (ATCC: CRL-1435, Manassas, USA).

Osnovno gojišče:	DMEM / F-12 (1:1)	
Kompletno gojišče:	44 ml DMEM 44 ml F-12 10 ml FBS 1 ml L-glutamin 1 ml penicilin/streptomycin	Gibco™ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, ZDA Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Brezserumsko gojišče:	DMEM / F-12 (1:1) 1% L-glutamin 1% penicilin/streptomycin	

PBS z 0,02 % EDTA

537 μ l 0,5 M EDTA
50 ml PBS
450 ml Destilirana voda
Sterilno filtriramo.

Ostale kemikalije:

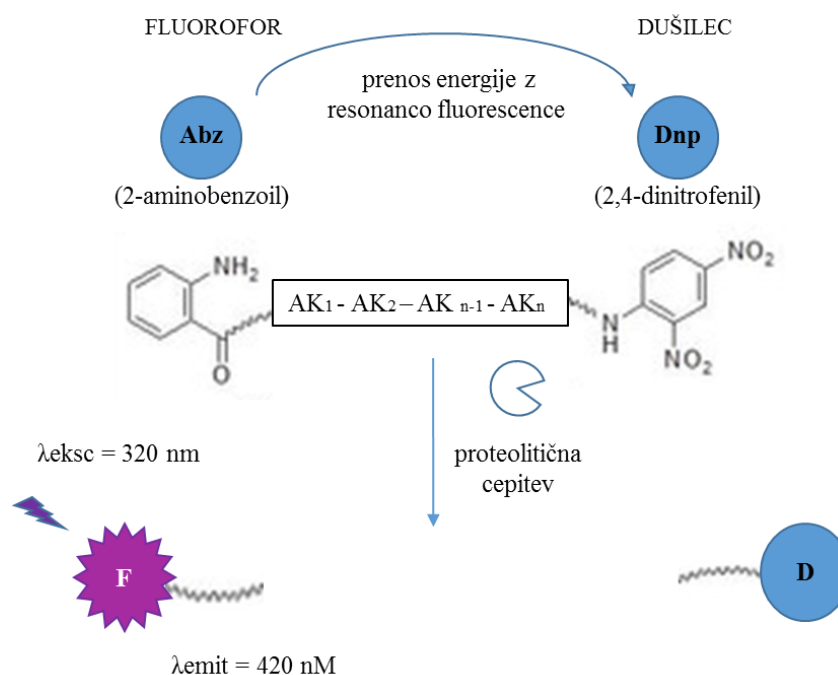
- Tripsin Gibco™ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA ZDA
- Fibronektin Calbiochem, Darmstadt, Nemčija
- Nigrozin Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA

3.2 METODE

3.2.1 Encimska kinetika

3.2.1.1 Testiranje encimske aktivnosti katepsina X ob dodatku potencialnih inhibitorjev

Osnova testa encimske aktivnosti katepsina X je razgradnja specifičnega substrata Abz-FEK(Dnp)-OH. Substrat je sestavljen iz treh delov: fluorofora, oligopeptida, ki vsebuje cepitveno mesto, in dušilca. Pri cepitvi substrata se sprosti fluorofor, kar zaznamo kot porast fluorescence.



Slika 2: Princip določanja encimske aktivnosti z uporabo fluorogenih substratov. [48]

Potencialne inhibitorje smo pripravili v 1 mM koncentraciji z raztapljanjem v DMSO. Encim smo redčili v aktivacijskem pufru* in aktivirali 5 min pri 37°C v vodni kopeli. Po končani inkubaciji smo encim takoj dodali v reakcijsko zmes in nemudoma začeli z meritvijo. Reakcija je potekala v vdolbinicah črne mikrotitrne plošče Nunclon™ Delta Surface (Nunc™, Thermo Scientific, Rochester, NY, ZDA).

V vsako vdolbinico smo napipetirali po 5 μl substrata (končna koncentracija 5,9 μM) ter 5 μl inhibitorja (končna koncentracija 50 μM). Tik pred meritvijo na spektrofluorimetru Tecan Safire²™ smo dodali 90 μl aktiviranega encima (končna koncentracija 20 nM) in takoj začeli spremljati nastajanje fluorescenčnega produkta pri valovni dolžini 420 nm \pm 5 nm. Valovna dolžina vzbujanja je bila 320 nm \pm 5 nm in temperatura merilne celice je bila 37°C. Pri vsaki plošči se je izvedlo 100 ciklov meritev z minimalnim intervalom. Za vsako

spojino smo izvedli meritev v dveh paralelkah (tj. dve enaki reakcijski zmesi v dveh vdolbinicah mikrotitrne plošče) in vzeli povprečje obeh meritev.

Pri vsakem poskusu smo dodali še naslednje kontrolne reakcije:

Pozitivna kontrola:

- 90 μl encima (končna koncentracija 20 nM)
- 5 μl substrata (končna koncentracija 5,9 μM)
- 5 μl inhibitorja E-64 (končna koncentracija 10 μM)

Negativna kontrola:

- 90 μl encima (končna koncentracija 20 nM)
- 5 μl substrata (končna koncentracija 5,9 μM)
- 5 μl DMSO

Slepa kontrola:

- 90 μl aktivacijskega pufru brez encima
- 5 μl substrata (končna koncentracija 5,9 μM)
- 5 μl DMSO

Tabela I: Sestava aktivacijskega pufru za katepsin X.

*Aktivacijski pufer za katepsin X	Sestava:
1.5 mM EDTA	27,9 mg
5 mM L-cistein	30,3 mg
0,01 % Triton-X 100	5 μl
Osnovni pufer za katepsin X (100 mM acetatni pufer, pH 5,5)	Dopolnimo do 50 ml.

3.2.1.2 Določanje konstante inhibicije izbranim spojinam za katepsin X

Za določanje K_i izbranih inhibitorjev smo v vdolbinice mikrotitrne plošče napipetirali 5 μl posamezne spojine v 6 različnih (končnih) koncentracijah: 20 μM , 40 μM , 60 μM , 80 μM , 100 μM in 200 μM . Za vsako posamično koncentracijo spojine smo dodali 5 μl substrata Abz-FEK(Dnp)-OH v treh različnih koncentracijah: 3,25 μM , 6,5 μM in 13 μM . Encim smo predhodno redčili v aktivacijskem pufru, ga 5 minut aktivirali v vodni kopeli pri 37°C in takoj po končani inkubaciji dodali po 90 μl encima v reakcijsko zmes (končna koncentracija 20 nM). Z bralcem Tecan Safire²™ smo merili fluorescenco razpadnega produkta, ki je nastajal pri proteolitični cepitvi substrata s katepsinom X. Pogoji meritev so

bili naslednji: valovna dolžina vzbujanja: 320 nm ± 5nm, emitirana valovna dolžina: 420 nm ± 5 nm, temperatura: 37°C, trajanje: 100 ciklov z minimalnim intervalom. Vse reakcije so bile izvedene dvakrat v dveh ponovitvah.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	slepa kontrola (substrat + DMSO + aktivacijski pufer)												
B	negativna kontrola (substrat + DMSO + katX v aktivacijskem pufru)												
C	s P o j i n a	20 µM	s P o j i n a	20 µM	s P o j i n a	20 µM							
D		40 µM		40 µM		40 µM							
E		60 µM		60 µM		60 µM							
F		80 µM		80 µM		80 µM							
G		100 µM		100 µM		100 µM							
H		200 µM		200 µM		200 µM							
		<i>substrat - 3,25 µM</i>		<i>substrat - 6,5 µM</i>		<i>substrat - 13,0 µM</i>							

Slika 3: Shema nanosa vzorcev na mikrotitrsko ploščo pri določanju K_i za katepsin X.

3.2.1.3 Določanje konstante inhibicije za katepsine L, H, S in B

Določanje K_i sorodnim katepsinom je potekalo po enakem principu, kot je opisano zgoraj za katepsin X.

Ponovno smo vsako spojino testirali pri šestih različnih koncentracijah: 20 µM, 40 µM, 60 µM, 80 µM, 100 µM in 200 µM.

Za katepsin L smo dodali 5 µl substrata Z-FR-AMC v treh različnih koncentracijah: 0,5 µM, 1 µM in 4 µM. Encim smo aktivirali na enak način kot katepsin X. Tik pred meritvijo smo dodali 90 µl encima v končni koncentraciji 0,5 nM.

Za katepsin H smo dodali 5 µl substrata Z-R-AMC v treh različnih koncentracijah: 20 µM, 80 µM in 160 µM. Encim smo aktivirali na enak način kot katepsin X. Tik pred meritvijo smo dodali 90 µl encima v končni koncentraciji 3,0 nM.

Za katepsin S smo dodali 5 µl substrata Z-VVR-AMC v treh različnih koncentracijah: 0,5 µM, 1 µM in 1,5 µM. Encim smo aktivirali na enak način kot katepsin X. Tik pred meritvijo smo dodali 90 µl encima v končni koncentraciji 50 nM.

Za endopeptidazno aktivnost katepsina B* smo dodali 5 µl substrata Z-RR-AMC v treh različnih koncentracijah: 60 µM, 180 µM in 360 µM. Encim smo aktivirali na enak način kot katepsin X. Tik pred meritvijo smo dodali 90 µl encima v končni koncentraciji 0,15 nM.

Pogoji meritev (pri uporabi fluorofora AMC): valovna dolžina vzbujanja: 380 nm, emitirana valovna dolžina: 460 nm, temperatura: 37°C, trajanje: 100 ciklov z minimalnim intervalom.

Za eksopeptidazno aktivnost katepsina B* smo dodali 5 µl substrata Abz-GIVRAK-Dnp(OH) v treh različnih koncentracijah: 1 µM, 3 µM in 6 µM. Encim smo aktivirali na enak način kot katepsin X. Tik pred meritvijo smo dodali 90µl encima v končni koncentraciji 0,64 nM. Pogoji meritev: enaki kot pri katepsinu X.

3.2.1.4 Določanje IC_{50} inhibitorjem katepsina X

Pri določanju IC_{50} smo uporabili spojine v nižjih koncentracijah: 0,5 µM, 1 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM in v višjih koncentracijah: 50 µM, 100 µM, 250 µM, 500 µM in 1000 µM. Spojinam smo dodali substrat (končna koncentracija 3,25 µM) in tik pred meritvijo še aktiviran encim (končna koncentracija 20 nM). Meritev smo za vsako spojino izvedli dvakrat z dvema ponovitvama.

3.2.2 Delo s sesalskimi celičnimi kulturami

Uporabljali smo celice raka prostate PC-3 (ATCC, CRL-1435). Delo je potekalo v skladu s sterilnimi tehnikami gojenja v komori z laminarnim pretokom zraka. Gojišča smo predhodno segreli na temperaturo 37°C v vodni kopeli.

3.2.2.1 Odmrznitev celic

Kriovialo celic PC-3 smo vzeli iz tekočega dušika in jo potopili v vodno kopel (37°C) za 2 minuti. Celice smo prenesli v centrifugirko, dodali 5 ml gojišča in centrifugirali 5 min pri 2000 rpm. Gojišče smo odstranili, pelet s celicami pa suspendirali v svežem gojišču ter prenesli v posodo za gojenje celic. Celice so rastle v inkubatorju pri 37°C in 5% CO₂, dokler niso dosegle ustrezne gostote (približno 80%), da smo jih bodisi precepili bodisi uporabili za poskuse.

3.2.2.2 Precepljanje celic

Celicam je bilo potrebno vsake 2 dni zamenjati gojišče oziroma jih precepiti približno enkrat tedensko, da niso prerastle dna posodice. Najprej smo odstranili staro gojišče, nato smo celice dvakrat sprali s 5 ml PBS in pufer po spiranju zavrgli. Celice smo odlepili z dna posode z dodatkom 5 ml 0,01 % tripsina, pripravljenega v 0,02% EDTA v PBS. Po tem, ko

* Določanje konstante inhibicije za eksopeptidazno in endopeptidazno aktivnost katepsina B je bilo izvedeno na Katedri za farmacevtsko biologijo (Urša Pečar Fonovič).

smo tripsin enakomerno porazdelili po dnu, smo celice 5-10 min inkubirali v inkubatorju. Pod mikroskopom smo preverili uspešnost odlepljanja. Če so bile celice okrogle in so plavale, smo dodali 3 ml svežega gojišča, z njim dobro sprali dno in vsebino posode prenesli v centrifugirko. Celice smo centrifugirali 5 min pri 2000 rpm, zavrgli supernatant, pelet pa suspendirali v 1 ml gojišča. Če smo celice precepljali, smo 1/5 suspendiranih celic prenesli v svežo posodico z 8 ml svežega gojišča. V kolikor smo celice potrebovali za poskus, smo jih prešteli in uporabili ustrezno koncentracijo glede na namen in zahteve poskusa.

3.2.2.3 Štetje celic

Od 1 ml celične suspenzije smo odvzeli 10 μ l in dodali 90 μ l gojišča ter 100 μ l 0,2 % raztopine barvila nigrozina. Nato smo 10 μ l dobro premešanega celičnega pripravka nanesli na vsako stran Bürker-Türkove števne komore (tj. stekelce, ki vsebuje dve vdolbinici z vgravirano mrežo standardnih dimenzij). Pod svetlobnim mikroskopom smo prešteli število živih (neobarvanih) celic, ki so se nahajale znotraj površine, omejene s stranicami vgraviranega kvadrata. Celice smo prešteli na obeh straneh, nato smo stekelce očistili in še enkrat ponovili postopek. Izračunali smo povprečje štirih štetij in izračunali koncentracijo celic (število celic v 1 ml) po naslednji enačbi:

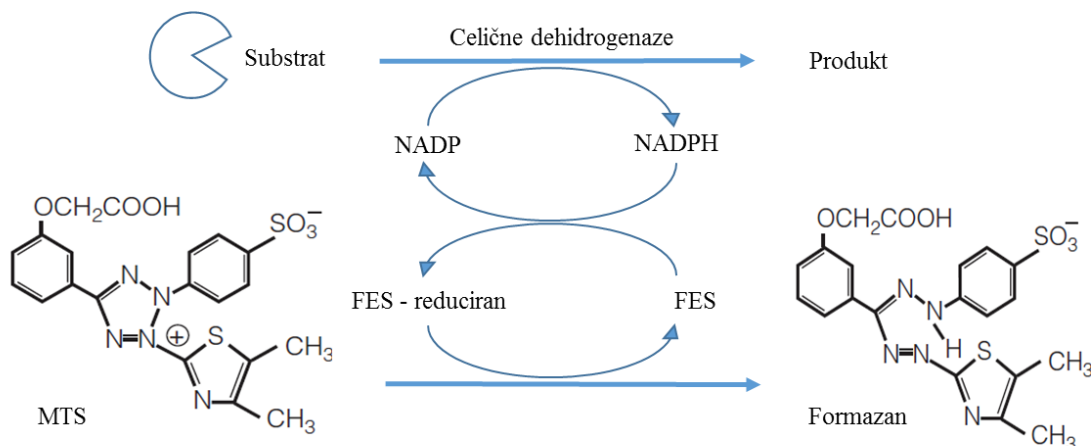
(Enačba 1)

kjer je n oznaka za povprečje štirih štetij, 10 faktor, s katerim množimo zaradi redčenja celic z gojiščem, 2 faktor, s katerim množimo zaradi redčenja z nigrozinom, in v faktor, s katerim množimo upoštevajoč volumen števne komore.

3.2.2.4 Test citotoksičnosti

S testom citotoksičnosti smo preučevali vpliv izbranih spojin na preživetje celic PC-3. V ta namen smo uporabili kolorimetrični test, ki temelji na redukciji tetrazolijeve spojine (MTS) v obarvan formazanski produkt. Do pretvorbe pride le v prisotnosti metabolno aktivnih celic pod vplivom NADPH oziroma NADH, ki ju proizvajajo celični encimi dehidrogenaze. Količino nastalega formazanskega produkta merimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 490 nm. Izmerjena absorbanca je sorazmerna številu živih celic. Izbrali smo reagent CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, ZDA), ki vsebuje 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-

sulfofenil)-2H-tetrazolijevo sol (MTS) in reagent za sklapljanje elektronov fenazin etosulfat (FES). [49]



Slika 4: Princip določanja celične viabilnosti z uporabo reagenta MTS. [49]

Poskus smo izvedli v treh korakih.

1. dan: nacelitev celic v ustrezni koncentraciji.

Celice smo tripsinizirali, jih prešteli in izračunali njihovo koncentracijo. V vdolbinice sterilne prozorne mikrotitrne plošče z ravnim dnom smo nanесли 100 μl celic v koncentraciji 6,5 x celic/ml. Prazne vdolbinice na obodu plošče smo zapolnili s sterilno destilirano vodo, da bi preprečili izhlapevanje gojišča v inkubatorju in s tem spremembe v koncentraciji.

2. dan: menjava gojišča in dodatek testnih spojin.

Vsako spojino smo testirali v štirih različnih končnih koncentracijah: 10 μM , 5 μM , 2,5 μM in 1 μM . Najprej smo pripravili spojine v 1000 x višjih koncentracijah (10 mM, 5 mM, 2,5 mM in 1mM) z redčenjem v DMSO. Nato smo odpipetirali po 1 μl tako pripravljenih delovnih raztopin in jih redčili z 999 μl gojišča. S tem smo se izognili preveliki vsebnosti DMSO, koncentracija le-tega pa je bila v vsaki testirani vdolbinici enaka (0,1%). Zatem smo iz vdolbinic mikrotitrne plošče s pipeto odstranili gojišče in ga nadomestili s 100 μl svežega gojišča z dodanimi testnimi spojinami. Za vsako koncentracijo testne spojine smo izvedli 2 ponovitvi. Kot slepa kontrola je služilo gojišče brez celic s testno spojino v najvišji koncentraciji. Negativno kontrolo so predstavljale celice, inkubirane v gojišču brez dodane spojine, oziroma celice, inkubirane z gojiščem, ki mu je bil dodan DMSO. Celice smo v prisotnosti spojin inkubirali 24 ur.

3. dan: dodatek reagenta MTS in meritev absorbance.

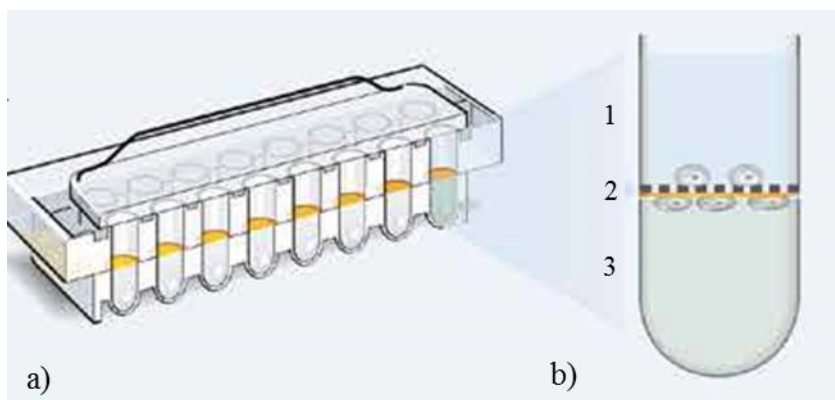
Po 24-urni inkubaciji celic s testnimi spojinami smo v vsako vdolbinico dodali 12,5 μ l reagenta MTS. Celice smo 60 min inkubirali z reagentom in nato pomerili absorbanco na bralcu Tecan Safire²™.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Gojišče		Ce lice		Celice + DMSO						
C		Gojišče + 85		Gojišče + 120		Gojišče + 51		Gojišče + 248		Gojišče + 250		
D		spojina 85	10 μ M	spojina 120	10 μ M	spojina 51	10 μ M	spojina 248	10 μ M	spojina 250	10 μ M	
E	5 μ M		5 μ M		5 μ M		5 μ M		5 μ M			
F	2,5 μ M		2,5 μ M		2,5 μ M		2,5 μ M		2,5 μ M		2,5 μ M	
G		gojišče + 498		spojina 498	10 μ M		5 μ M		2,5 μ M			
H												

Slika 5: Shema nanosa vzorcev na mikrotitrsko ploščo pri testiranju vpliva spojin na celično viabilnost. Z modro barvo je označena slepa kontrola (ozadje) in z zeleno negativna kontrola.

3.2.2.5 Vpliv inhibitorjev na celično migracijo

Za spremljanje celične migracije smo uporabili sistem xCELLigence Real-Time Cell Analyzer Dual Plate (RTCA DP) Instrument (ACEA Biosciences), ki omogoča kontinuirano merjenje celoten čas eksperimenta. Osnova sistema je plošča CIM, sestavljena iz zgornjega in spodnjega dela, ki nalegata drug na drugega tako, da tvorita 16 vdolbinic. Dno zgornjega dela plošče je mikroporozna polietilentereftalatna membrana, ki razdeli vsako vdolbinico na dva dela. Posebnost plošče CIM je gosta, razvejana mreža zlatih mikroelektrod, ki so vgrajene na spodnji del membrane. Ko pridejo celice v stik s površino elektrode, naraste električna upornost (impedanca), kar instrument zabeleži kot porast celičnega indeksa. Sprememba celičnega indeksa je odvisna od številčnosti in viabilnosti celic, njihove oblike ter jakosti adhezije.



Slika 6: a) Shematska predstavitev CIM plošče v prečnem prerezu. b) Ponazoritev posamične vdolbinice: 1 – zgornji del, v katerega nanesemo celice, 2 – mikroporozna membrana z mrežo elektrod, 3 – spodnji del, kamor dodamo kemoatraktant. [50]

Poskus smo izvajali v kontroliranih pogojih v inkubatorju s 5 % CO₂ in pri temperaturi 37°C. V prvem koraku smo obe strani membrane prekrili s fibronektinom, da bi olajšali in pospešili pritrjevanje celic PC-3. To smo storili tako, da smo na spodnji del membrane nanesli po 30 µl fibronektina v koncentraciji 10 µg/ml. Po 30 minutah inkubacije v laminariju smo ploščo obrnili in nanesli po 50 µl fibronektina enake koncentracije še na zgornjo stran membrane. Ploščo (tj. zgornji del plošče CIM) smo pustili 2 uri v inkubatorju, nato pa smo iz vdolbinic odstranili fibronektin in jih sprali s PBS (50 µl).

V naslednjem koraku smo izvedli meritev ozadja. V luknjice spodnjega dela plošče CIM smo napipetirali 180 µl kompletnega gojišča z dodanimi spojinami v 10 µM koncentraciji. Hkrati smo testirali dve izbrani testni spojini, spojino AMS36, ki je znani inhibitor katepsina X (pozitivna kontrola), in DMSO, ki je služil kot negativna kontrola. V luknjice zgornjega dela plošče smo nanesli 100 µl brezserumskega gojišča z dodanimi spojinami v dvakrat višji koncentraciji. Serum, ki je sestavina kompletnega gojišča, deluje kot kemoatraktant in spodbuja migracijo celic preko membrane. Ploščo smo nato vpeli v aparaturo in po 15 minutah pomerili ozadje.

Vmes smo pripravili celice. Te morajo biti v logaritemski fazi rasti in 24 ur pred poskusom gojene v brezserumskem gojišču. Na ploščo CIM smo nanesli po 100 µl celične suspenzije s koncentracijo 40 000 celic / 100 µl. Končna koncentracija v vsaki vdolbinici je torej bila 20 000 celic / vdolbinico. Prostore med vdolbinicami plošče CIM smo zapolnili s sterilno destilirano vodo, da bi preprečili izhlapevanje gojišča. Ploščo smo vpeli v aparaturo in po 10 minutah začeli z meritvijo, ki je potekala vsakih 15 minut nadaljnjih 72 h. Za vsako spojino smo izvedli poskus dvakrat v štirih ponovitvah.

3.2.2.6 Obdelava podatkov

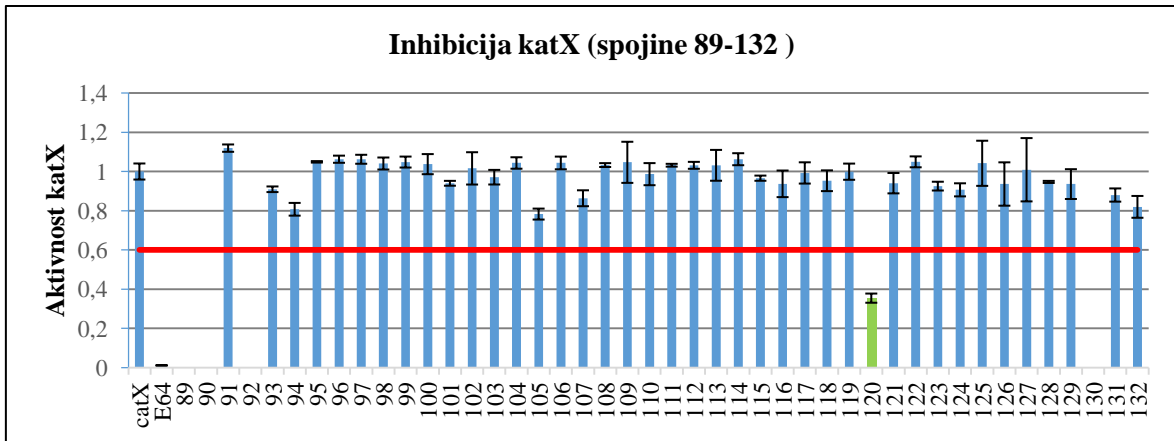
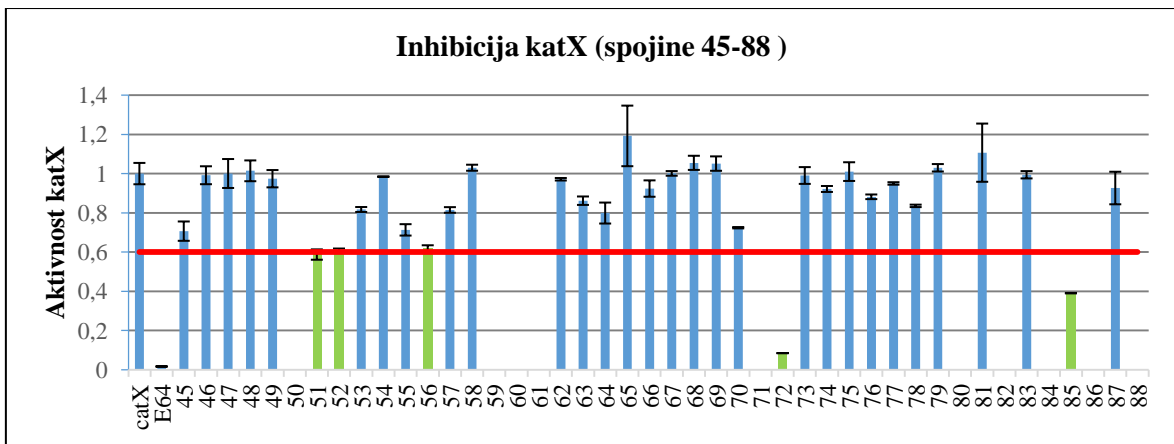
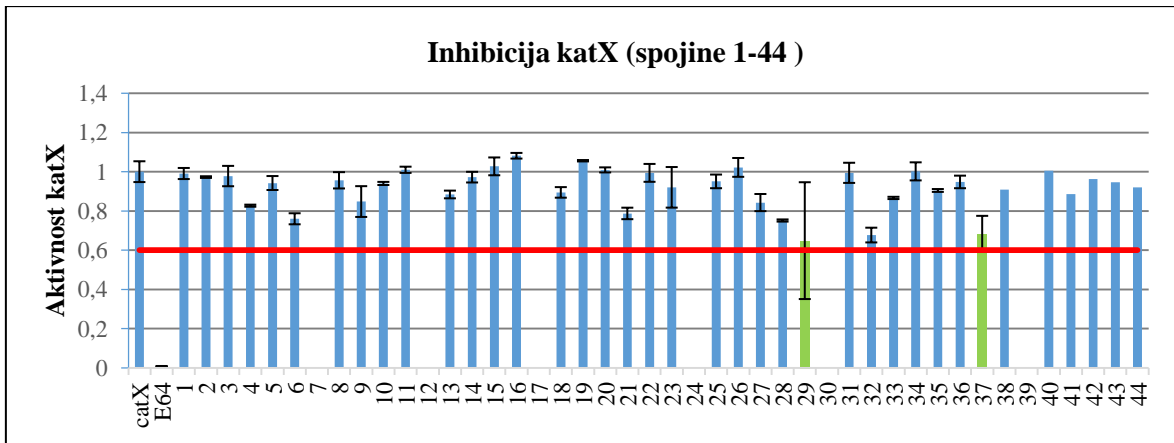
K_i in IC_{50} smo določali z uporabo programske opreme SigmaPlot® 11, Enzyme Kinetics Module™ 1.3. Podatke, ki smo jih pridobili med poskusom migracije, smo analizirali s programom RTCA Software. Za statistično vrednotenje rezultatov smo uporabili dvostranski Studentov t-test, pri čemer so vrednosti p manjše od 0.05 pomenile statistično značilno razliko med testno spojino in kontrolo.

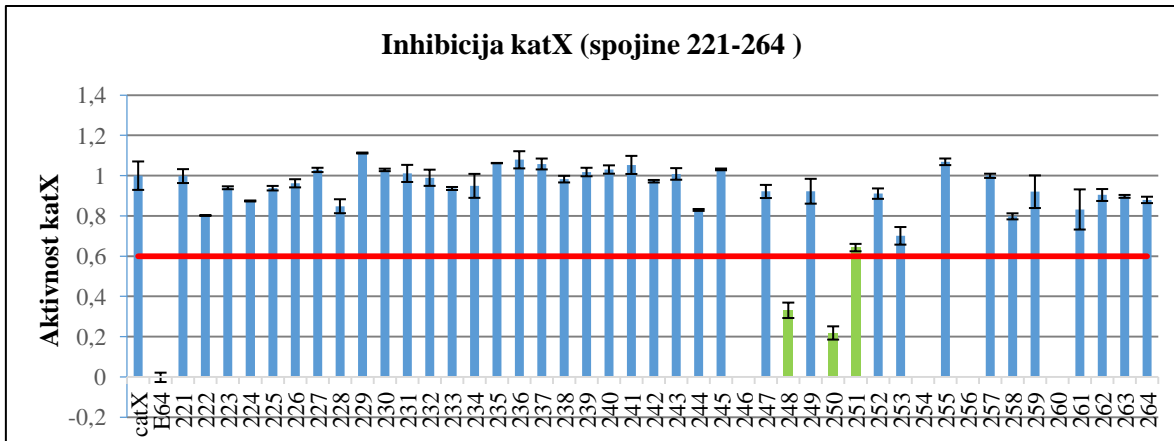
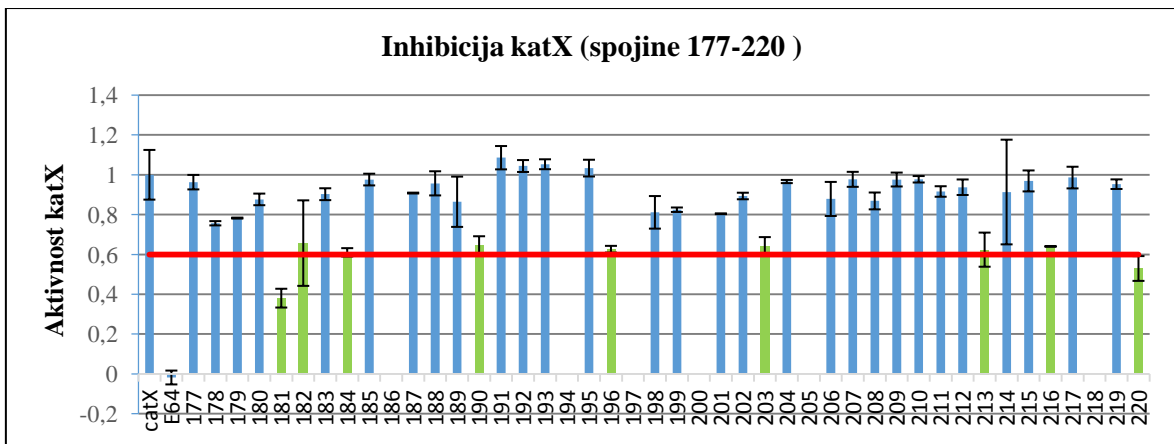
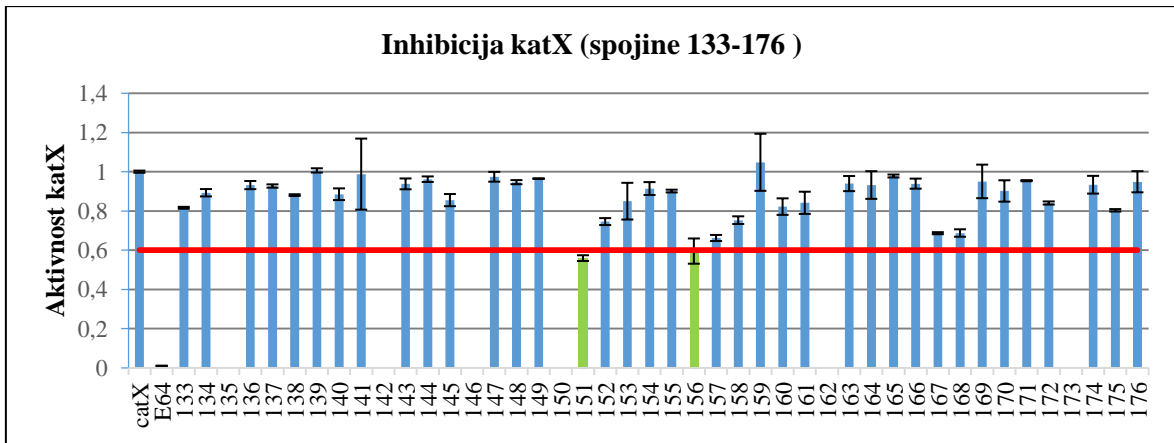
4 REZULTATI

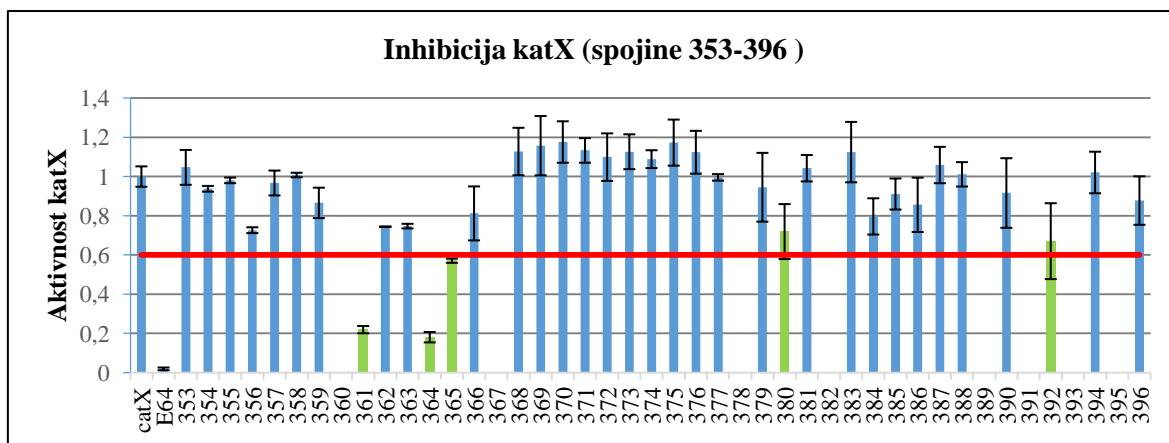
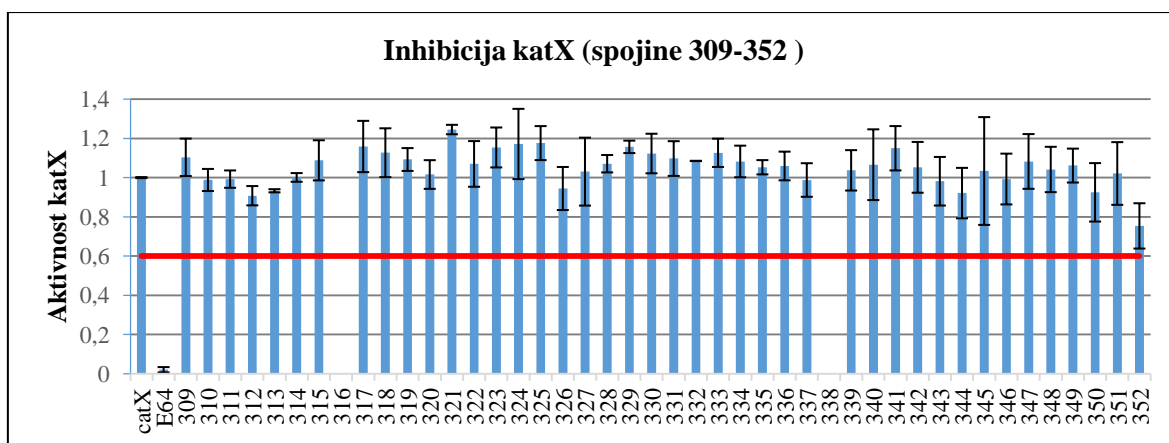
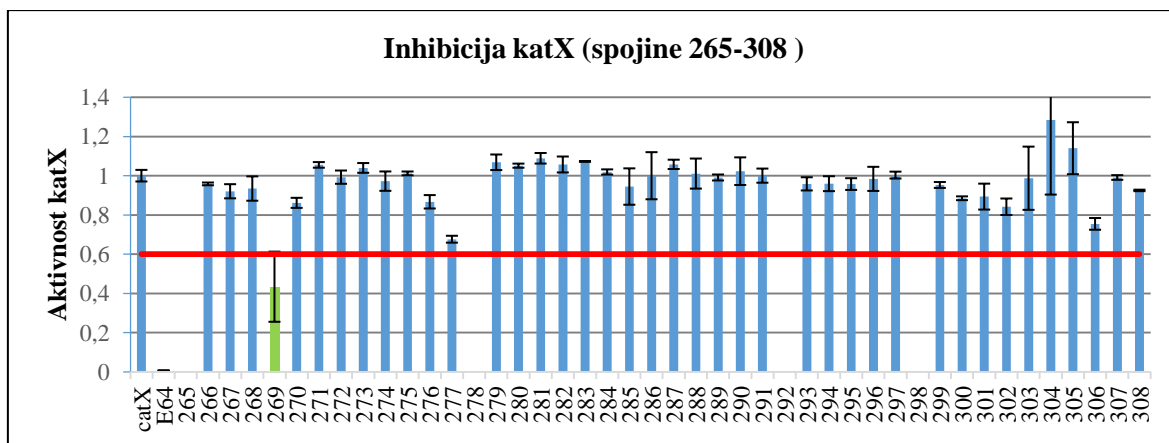
4.1 Izbor inhibitorjev katepsina X

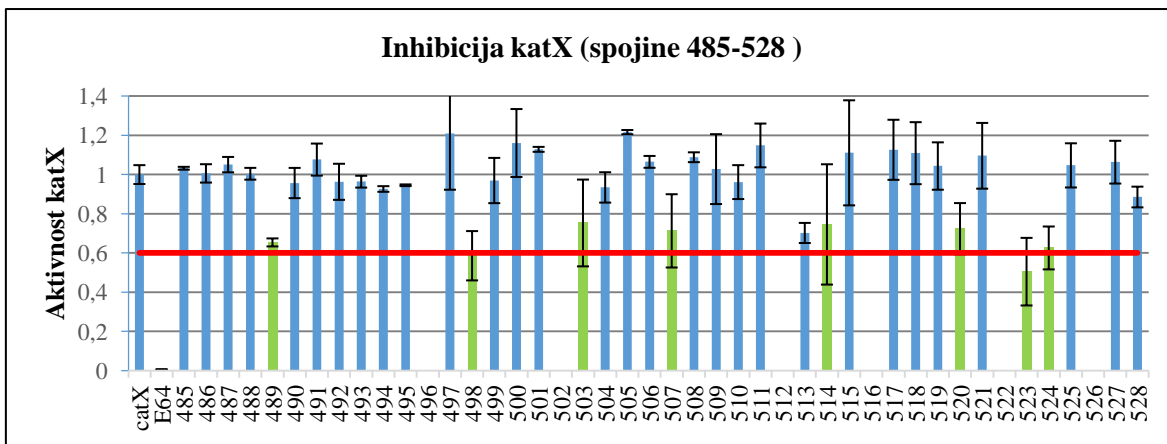
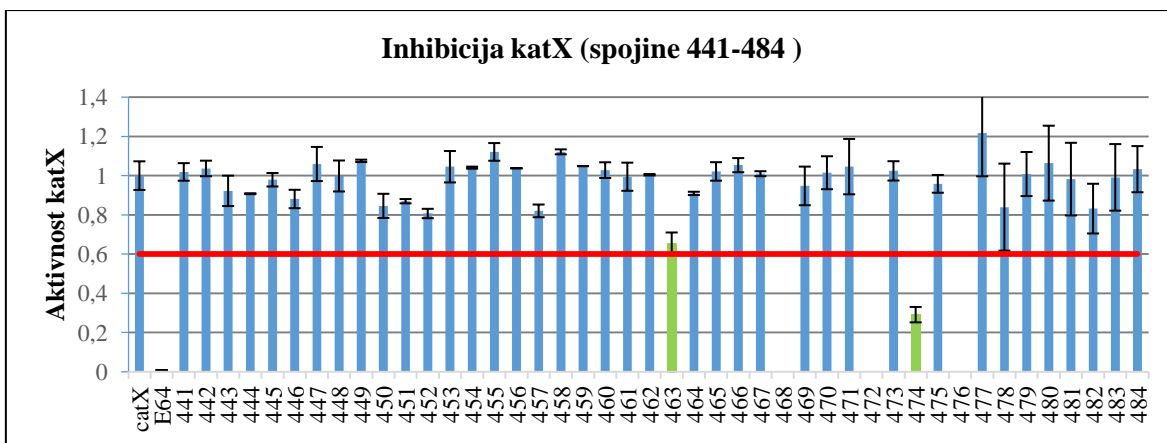
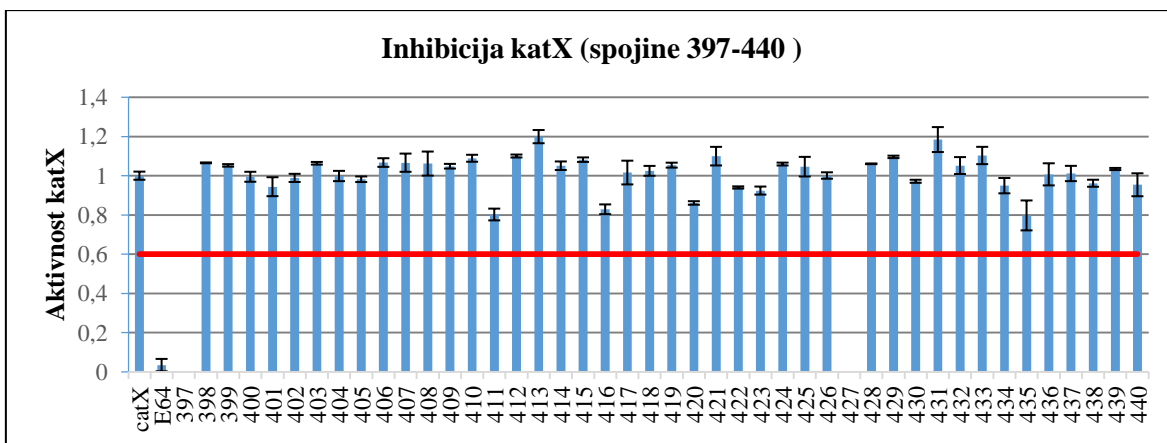
Iz knjižnice spojin Katedre za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo je bilo z uporabo *in silico* metode prileganja spojin v aktivno mesto katepsina X izbranih 579 potencialnih inhibitorjev katepsina X. Poleg tega so na Katedri za farmacevtsko kemijo s pomočjo virtualnega rešetanja identificirali še 32 dodatnih spojin iz knjižnice ZINC. Prvih 579 spojin so sintetizirali na Katedri za farmacevtsko kemijo, medtem ko smo drugi set spojin (VR1 - VR32) naročili pri naslednjih proizvajalcih: ChemBridge, Enamine, Vitas-M in Princeton BioMolecular Research. Spodobnost teh spojin za zaviranje aktivnosti encima katepsina X smo določali ob prisotnosti specifičnega substrata Abz-FEK(Dnp)OH. Testiranje smo za vsako spojino izvedli v dveh ponovitvah in od vsake meritve odšteli vrednost slepe kontrole (DMSO in substrat v aktivacijskem pufru brez encima). Za vsako spojino smo izračunali povprečje obeh meritev. Meritvi, ki smo jo dobili za negativno kontrolo (DMSO in substrat v aktivacijskem pufru z encimom), smo pripisali vrednost encimske aktivnosti 1. Ostale rezultate smo normalizirali glede na to vrednost. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili uveljavljen inhibitor E-64, ob prisotnosti katerega je katepsin X praktično neaktiven. Spodaj so prikazani rezultati v obliki stolpčnih diagramov, ki predstavljajo relativni delež ohranjene encimske aktivnosti katepsina X za vsako od 611 spojin posebej (Slika 7). Na grafih je prikazan tudi standardni odklon dveh ponovitev.

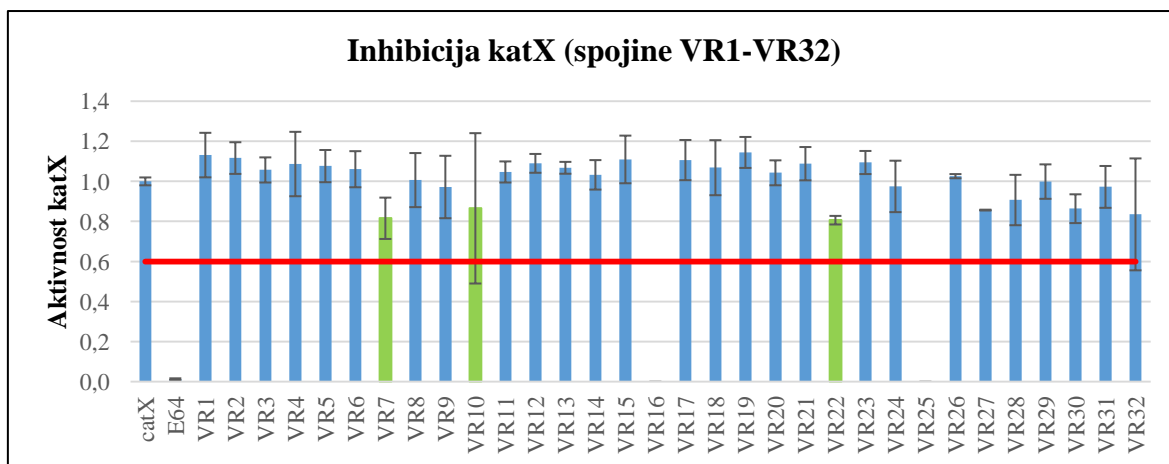
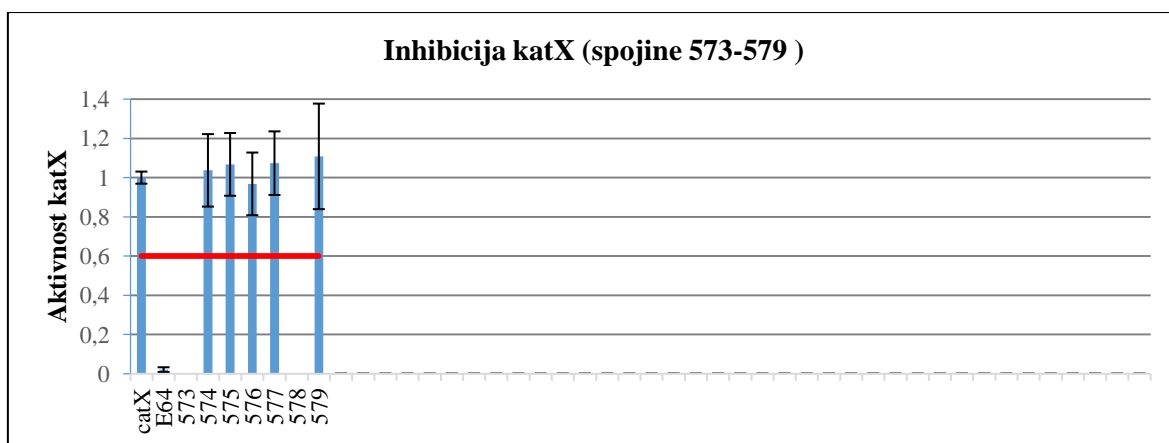
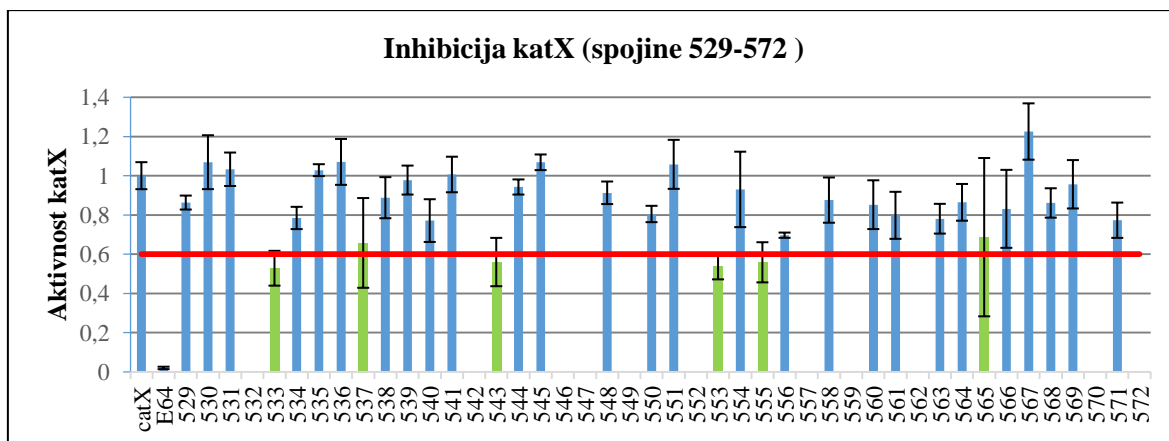
Opomba: Za nekatere spojine s to metodo encimske kinetike nismo uspeli pridobiti rezultata in so ostale neovrednotene (prazni prostori na diagramih), večinoma zato, ker fluorescirajo že same po sebi. Za nekatere od njih smo izvedli testiranje v odsotnosti encima in potrdili avtofluorescenco pri valovni dolžini, nastavljeni na bralcu.







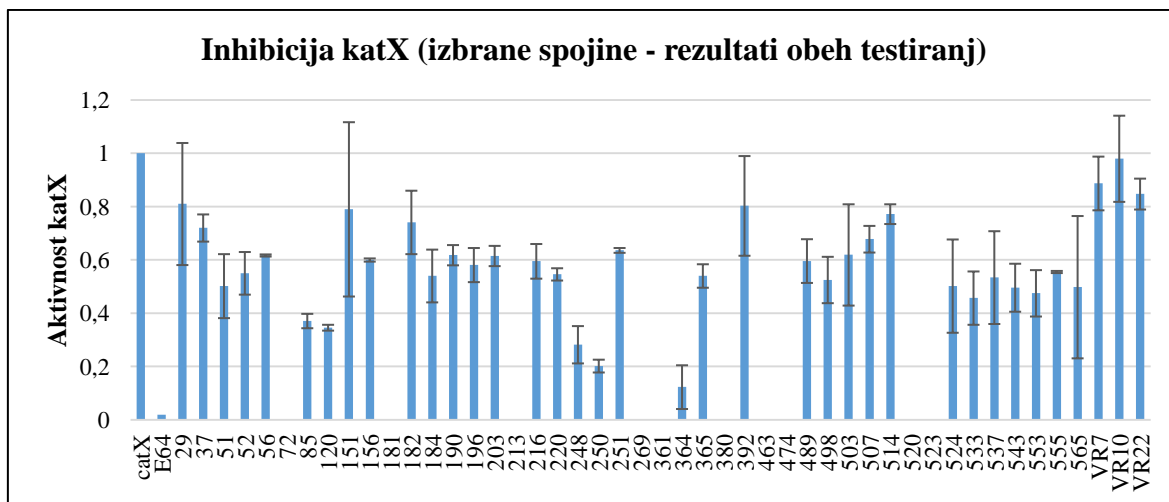




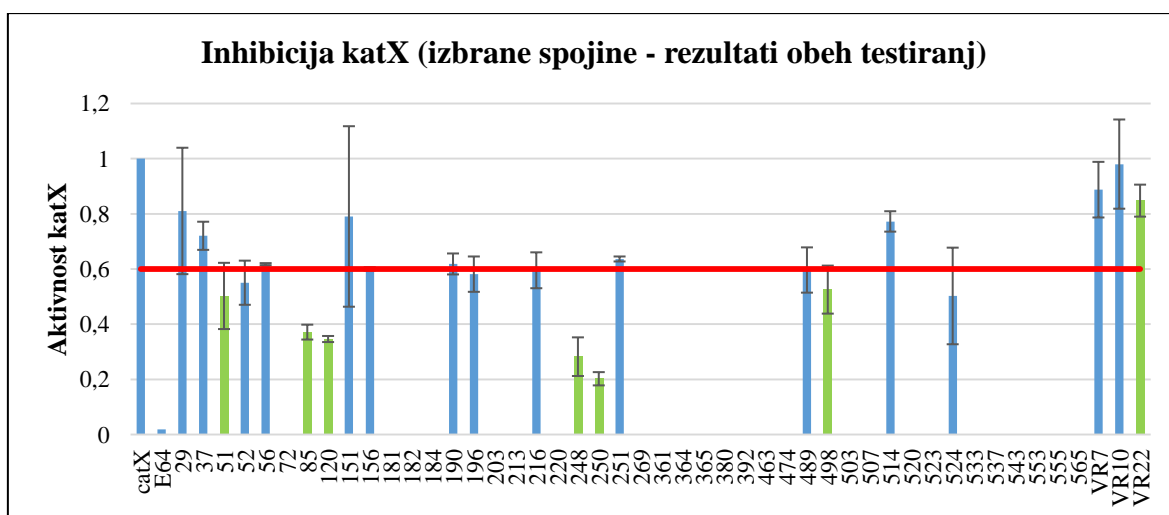
Slika 7: Delež relativne aktivnosti katepsina X ob dodatku potencialnih inhibitorjev (spojine 1-579 in VR1-VR32). Vrednosti predstavljajo povprečne vrednosti dveh meritev \pm standardna deviacija.

Za nadaljnjo obravnavo so nas zanimala spojine, ki so najbolj znižale aktivnost katepsina X. Arbitrarno mejo smo potegnili pri 0,6 (tj. 60 % ohranjene aktivnosti katepsina X oziroma 40 % inhibicija). Izbrali smo 44 spojin iz prvega seta in 3 spojine iz drugega seta (na diagramih označene z zeleno barvo) ter ponovili testiranje pod enakimi pogoji. Spodaj

so prikazani stolpčni diagrami s skupnimi rezultati vseh štirih meritev za vsako spojino s prikazanimi standardnimi odkloni (Slika 9).



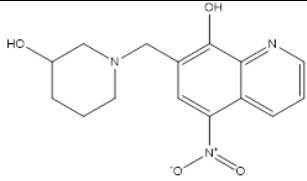
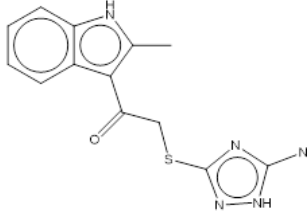
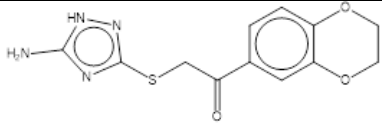
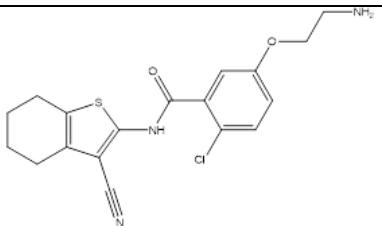
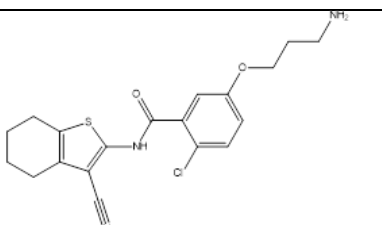
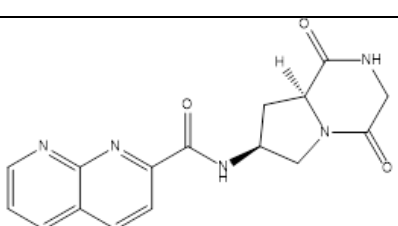
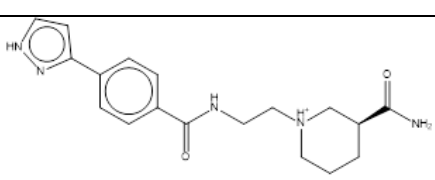
Slika 8: Skupni rezultati obeh testiranj za izbrane spojine, pri katerih je bil relativni delež inhibicije > 0,6.



Slika 9: Skupni rezultati obeh testiranj za izbrane spojine, pri čemer so izvzete avtofluorescirajoče spojine.

Po končanem selekcijskem postopku smo iz začetnega nabora spojin izluščili naslednje spojine: **51, 85, 120, 248, 250, 498** in **VR22** (na sliki 9 so označene z zeleno barvo). Vse spojine so bile sposobne zmanjšati encimsko aktivnost za vsaj 50 % razen spojine **VR22**. Ta spojina je bila kljub zgolj 15 % inhibiciji encima vključena z namenom, da ovrednotimo vsaj enega predstavnika iz drugega seta spojin.

Tabela II: Strukture izbranih inhibitorjev s podano relativno molekularno maso, odstotkom inhibicije in porazdelitvenim koeficientom (logP). Porazdelitveni koeficient je bil izračunan s programom Molinspiration (www.molinspiration.com).

Spojina	Struktura	M [g/mol]	% inhibicije	logP
51		303,31	50 %	1,38
85		287,34	63 %	1,63
120		292,31	65 %	0,77
248		375,87	72 %	2,94
250		389,90	80 %	3,21
498		325,32	52 %	-0,96
VR22		341,42	15 %	-2,44

4.2 Določanje K_i in IC_{50} izbranih spojin za katepsin X

Iz začetnega širokega nabora spojin smo odbrali molekule, ki so sposobne inhibirati katepsin X. Tem spojinam smo določili IC_{50} in K_i oziroma K_i' ter tip inhibicije. Kot najboljša inhibitorja sta se pokazali spojini **85** in **120**, ki sta imeli najnižjo vrednost IC_{50} ($37,0 \mu\text{M}$ za spojino **85** in $21,6 \mu\text{M}$ za spojino **120**) ter K_i ($38,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ za spojino **85** in $29,2 \pm 2,4 \mu\text{M}$ za spojino **120**). Spojine **51**, **250**, **248** in **498** so se izkazale kot šibkejši inhibitorji z bistveno večjimi vrednostmi obeh parametrov. Za spojino **VR22** smo odkrili, da praktično ne vpliva na encimsko aktivnost katepsina X. Za vse spojine smo določili enak, nekompetitivni tip inhibicije.

Tabela III: Konstante in mehanizem inhibicije izbranih spojin za katepsin X.

Spojina	% inhibicije	IC_{50} [μM]	K_i [μM]	K_i' [μM]	Tip inhibicije
51	50%	162,6	$190,0 \pm 18,5$		nekompetitivni
85	63%	37,0	$38,4 \pm 0,2$		nekompetitivni
120	65%	21,6	$29,2 \pm 2,4$		nekompetitivni
248	72%	337,6	$259,7 \pm 31,9$		nekompetitivni
250	80%	307,3	$230,2 \pm 2,9$		nekompetitivni
498	52%	614,2	135,9		nekompetitivni
VR22	15%	/	/		/

4.3 Določanje K_i za katepsine B, H, L in S

Pri odkrivanju novih inhibitorjev encima je poleg jakosti izrednega pomena tudi njihova selektivnost. Zato nas je zanimalo, kakšen vpliv imajo izbrani inhibitorji na encimsko aktivnost sorodnih katepsinov. Na enak način kot za katepsin X, smo določili vrednosti K_i oziroma K_i' spojin **85** in **120** za katepsine B, H, L in S. Pri katepsinu B, ki v odvisnosti od pH izkazuje ekso- oziroma endopeptidazno aktivnost, smo določili K_i za obe aktivnosti.

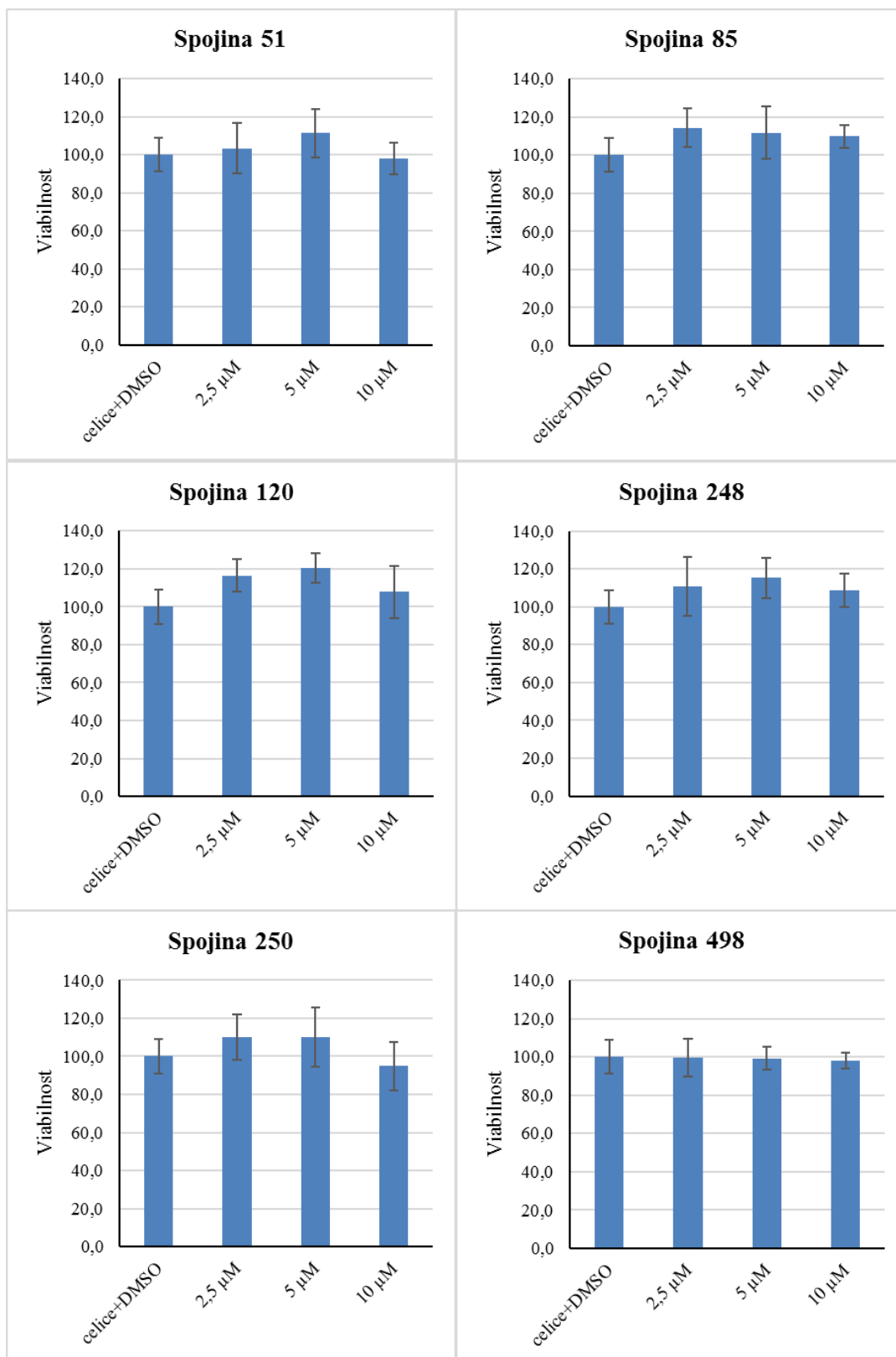
Tabela IV: Konstante in mehanizem inhibicije spojin **85** in **120** za katepsine H, L, S in B.

Spojina 85	Spojina 120
------------	-------------

<i>Encim: Katepsin H (3 nM)</i>					
<i>Substrat: R-AMC</i>					
K_i [μ M]	K_i' [μ M]	Tip inhibicije	K_i [μ M]	K_i' [μ M]	Tip inhibicije
$1872,9 \pm 240,1$		nekompetitivni	$483,1 \pm 0,6$		kompetitivni
<i>Encim: Katepsin L (0,5 nM)</i>					
<i>Substrat: Z-FR-AMC</i>					
K_i [μ M]	K_i' [μ M]	Tip inhibicije	K_i [μ M]	K_i' [μ M]	Tip inhibicije
$974,9 \pm 100,6$		kompetitivni	$902,2 \pm 89,7$		kompetitivni
<i>Encim: Katepsin S (50 nM)</i>					
<i>Substrat: Z-VVR-AMC</i>					
K_i [μ M]	K_i' [μ M]	Tip inhibicije	K_i [μ M]	K_i' [μ M]	Tip inhibicije
>1000			$462,8 \pm 42,9$		nekompetitivni
<i>Encim: Katepsin B – eksopeptidazna aktivnost (0,64 nM)</i>					
<i>Substrat: Abz-GIVRAK(Dnp)-OH</i>					
K_i [μ M]	K_i' [μ M]	Tip inhibicije	K_i [μ M]	K_i' [μ M]	Tip inhibicije
$370,0 \pm 97,9$		nekompetitivni		$210,3 \pm 11,0$	nekompetitivni
<i>Encim: Katepsin B – endopeptidazna aktivnost (0,15 nM)</i>					
<i>Substrat: Z-RR-AMC</i>					
K_i [μ M]	K_i' [μ M]	Tip inhibicije	K_i [μ M]	K_i' [μ M]	Tip inhibicije
>1000			$392,1 \pm 121,1$		kompetitivni

4.4 Ugotavljanje vpliva inhibitorjev na celično viabilnost

Vpliv inhibitorjev na celično viabilnost smo preučevali na celicah PC-3 po 24-urni inkubaciji z različnimi koncentracijami izbranih spojin. Rezultate smo podali v obliki relativnega deleža (%) glede na kontrolo (celice ob dodatku DMSO). Za vse spojine smo izvedli tri ponovitve poskusa v dveh paralelkah. Nobena izmed spojin ni pokazala statistično značilnega zmanjšanja celične viabilnosti pri katerikoli koncentraciji ($p \geq 0,05$).



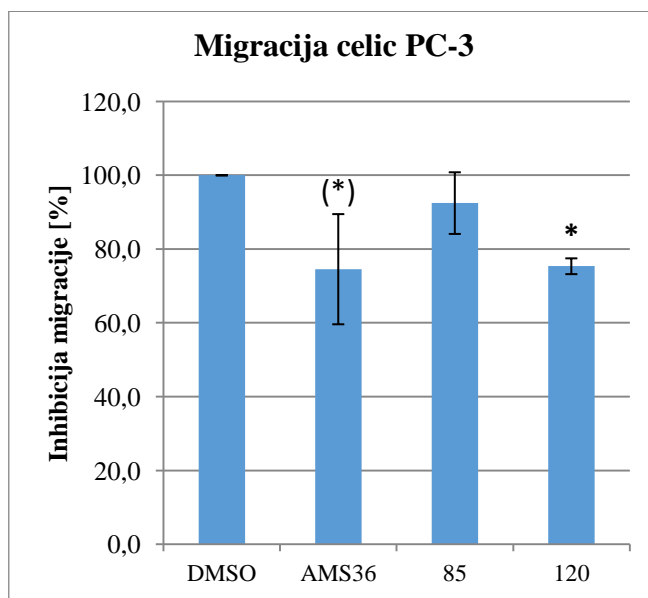
Slika 10: Vpliv izbranih spojin na celično viabilnost pri 2,5 µM, 5 µM in 10 µM koncentraciji (za vsako spojino smo izvedli 3 ponovitve).

4.5 Vpliv izbranih inhibitorjev na celično migracijo

Sposobnost inhibitorjev za zaviranje migracije celic PC-3 smo preverjali na sistemu xCELLigence RTCA-DP System s kontinuiranim merjenjem v časovnem obdobju 72 h od dodatka spojin. Za vsako spojino smo nato določili naklon krivulje v grafu, ki ponazarja celični indeks v odvisnosti od časa. Dobljene vrednosti smo normalizirali glede na rezultat pri celicah z dodanim DMSO, ki je predstavljal negativno kontrolo. Za spojino AMS36 je znano, da zavira celično migracijo, in je služila kot pozitivna kontrola. Poskus smo izvedli dvakrat za vsako spojino v štirih paralelkah. Pri vsakem poskusu smo zanemarili tiste paralelke, ki so odstopale od ostalih meritev. Rezultati obeh poskusov so podani v tabeli V.

Tabela V: Rezultati testiranja vpliva inhibitorjev na celično migracijo. V tabeli je predstavljen relativni odstotek migracije celic PC-3 po dodatku inhibitorjev.

	<i>ponovitve</i>	<i>1. testiranje</i>	<i>2. testiranje</i>	<i>povprečje</i>	<i>SD</i>	<i>t-test</i>
DMSO	3+3	100 %	100 %	100 %	/	/
AMS36	3+4	85,1 %	64,0 %	74,6 %	14,9 %	0,137
85	3+4	98,4 %	86,6 %	92,5 %	8,35 %	0,330
120	4+2	76,9 %	73,8 %	75,4 %	2,14 %	0,00375



Slika 11: Rezultati preučevanja vpliva inhibitorjev na migracijo celic PC-3.

*statistično značilna razlika

(*) statistično značilna razlika je ugotovljena za posamična poskusa

Za spojino **85** v nobenem poskusu nismo dobili statistično značilnega učinka na zmanjšanje migracijske sposobnosti celic PC-3. Nasprotno smo za spojino **120** dokazali statistično pomembno zaviranje migracije celic PC-3 v obeh poskusih ($p \leq 0,05$). Skupni rezultat obeh poskusov za inhibitor AMS36 v nasprotju z našimi pričakovanji ne potrjuje statistično značilnega zaviranja migracije. Vzrok je prevelik standardni odklon med rezultatoma obeh poskusov. Za oba posamična poskusa smo sicer dobili ustrezno značilno razliko za spojino AMS36. Glede na skupni rezultat imata spojina **120** in AMS36 primerljiv vpliv na celično migracijo.

5 RAZPRAVA

Proteaze imajo pomembno vlogo pri celičnem signaliziranju in so vpletene v razvoj različnih patoloških stanj, kot so kardiovaskularne, nevrološke in vnetne bolezni ter rak in osteoporoza. Uravnavanje delovanja proteaz zato predstavlja zanimive terapevtske možnosti. Razvoj novih zdravilnih učinkovin je osredotočen predvsem na zaviranje njihove prekomerne proteolitične aktivnosti. V vsakdanji klinični uporabi tako lahko najdemo kar nekaj proteaznih inhibitorjev. Med njimi so gotovo najbolj uveljavljeni zaviralci angiotenzinske konvertaze, ki se uspešno uporabljajo pri zdravljenju hipertenzije. Pomembna skupina so tudi inhibitorji trombina in faktorja X za preprečevanje tromboze. Inhibitorji proteaze HIV so nepogrešljivi v terapiji AIDS-a. Po neuspešnem poskusu uvedbe metaloproteinaznih inhibitorjev v zdravljenje rakavih bolezni, se danes na tem področju uporabljajo le učinkovine iz skupine inhibitorjev proteasoma (primer je bortezomib). [51] V zadnjem času se pojavlja vse več dokazov, da je družina cisteinskih katepsinov ključno povezana z neoplastičnimi spremembami. Njihovi visoko specifični inhibitorji se kažejo kot obetavna terapevtska strategija za določene vrste raka. Terapevtski potencial specifičnih cisteinskih inhibitorjev so prepoznale različne farmacevtske družbe. Trenutno v kliničnih študijah preizkušajo varnost in učinkovitost sinteznih inhibitorjev katepsina K in S. Glede na spodbudne rezultate v tretji fazi preizkušanj, lahko na tržišču kmalu pričakujemo prvi nizkomolekularni peptidomimetični inhibitor katepsina K, imenovan odanacatib, ki bo namenjen zdravljenju osteoporoze. Dobro kaže tudi inhibitorjem katepsina S, saj njihovo uporabnost že potrjujejo pri zdravljenju avtoimunih bolezni (revmatoidni artritis, psoriza) in nevropatske bolečine. [52, 53]

V povezavi z rakavimi boleznimi je bil največ pozornosti deležen katepsin B. Podobno kot pri katepsinih L in S njegova endopeptidazna aktivnost spodbuja prekinitev celičnih stikov in razgradnjo zunajceličnega matriksa, kar omogoči razsoj tumorskih celic po telesu. Katepsin X z edinstvenim mehanizmom delovanja dopolnjuje tumorsko migracijo in invazijo. Medtem ko prej omenjene proteaze rakavim celicam utirajo pot skozi tkivo, katepsin X aktivira integrinske receptorje, ki uravnavajo adhezijo in migracijo celic. [54] Aktivnost katepsina X regulirajo endogeni inhibitorji, cistatini. Ti so splošni neselektivni proteazni inhibitorji in zato neprimerni za terapevtsko uporabo. [55] Po modelu molekule E-64, splošnega inhibitorja cisteinskih peptidaz [56], je bil sintetiziran za katepsin X specifični nizkomolekularni inhibitor AMS36, vendar ima zaradi ireverzibilne vezave

majhne možnosti, da se uveljavi v kliniki [57]. Omejeno uporabnost imajo tudi mišja monoklonska protitelesa (2F12 – delujejo proti zreli obliki katepsina X in 3B10 – delujejo proti proencimu in aktivni obliki katepsina X), ki so bila razvita v raziskovalne namene, saj ne zmorejo prehajati v celice. [14] V literaturi nismo našli nobenih podatkov o obstoju drugih nizkomolekularnih inhibitorjev katepsina X, ki bi bili hkrati visoko selektivni in reverzibilni. V okviru magistrske naloge smo zato želeli zapolniti to vrzel in v ta namen identificirati spojine, ki lahko služijo kot vodnice za nadaljnji razvoj reverzibilnih inhibitorjev katepsina X.

V prvem delu magistrske naloge smo z uporabo encimske kinetike ugotavljali intrinzično aktivnost 611 spojin napram katepsinu X. Da bi preprečili lažno pozitivne rezultate, smo v vse reakcijske zmesi dodali 0,01% Tritona-X 100 in s tem izključili možnost promiskuitetne inhibicije. Izmed testiranih spojin smo izbrali tiste, ki so pri 50 μM koncentraciji dosegle 40 % relativne inhibicije. Takih je bilo 6 spojin. Delovanje katepsina X je najbolj zavrla spojina **250** (80 % relativne inhibicije), sledi spojina **248** z 72 % inhibicije, spojini **120** in **85** s 65 % in 63 % inhibicije ter spojina **51**, ki je zmanjšala encimsko aktivnost katepsina X za 50 %. Za primerjavo smo izbrali ireverzibilni inhibitor E-64, ki je v vseh poskusih praktično v celoti zavrl delovanje katepsina X (~100 % inhibicija). Večjo inhibicijsko sposobnost spojine E-64 lahko pripišemo razliki v mehanizmu delovanja. E-64 prek elektrofilne skupine reagira s cisteinom v aktivnem mestu in z ireverzibilno vezavo trajno onemogoči katalitično delovanje encima. V bioloških sistemih je za obnovitev funkcije potrebna sinteza novega encima. Težava ireverzibilnih inhibitorjev je ta, da so običajno slabše selektivni, saj radi reagirajo z ostalimi nukleofili. Lahko se pojavijo neželeni učinki zaradi netarčne vezave na druge proteine, prisotno pa je tudi tveganje za nastanek alergenih haptenov. Ireverzibilni vezalci so tako kljub večji učinkovitosti manj zaželeni v razvoju zdravilnih učinkovin. [51]

S pomočjo začetnega preliminarnega encimsko-kinetičnega testa smo prečesali velik nabor spojin in ga zožili na obvladljivo število spojin za nadaljnje testiranje. Identificirali smo 6 spojin z visokim potencialom, da se izkažejo kot reverzibilni inhibitorji katepsina X. Nekaterih spojin sicer nismo mogli ovrednotiti. Razlog leži v zasnovi kinetičnega testa, ki temelji na merjenju intenzitete sproščene svetlobe pri valovni dolžini 420 nm. Z ločenim poskusom (rezultati niso prikazani) smo ugotovili, da določene spojine avtofluorescirajo

pri omenjeni valovni dolžini in tako izmerjeni signal ne odraža dejanske aktivnosti katepsina X.

V naslednjem koraku smo bolj poglobljeno proučili najbolj obetavne spojine. Spojinam **51**, **85**, **120**, **250**, **248** in **498** smo določili kinetične parametre – vrednost K_i in IC_{50} – ter mehanizem inhibicije. Med primerjavo strukturnih formul spojin smo opazili, da se med njimi nahajata dva para strukturnih analogov. Med seboj sta si zelo podobni spojini **85** in **120** ter spojini **250** in **248**. Če bi imela ena izmed spojin znotraj para precej nižji K_i od druge, bi posumili, da ima tista strukturna značilnost, ki ju dela različni, bistven vpliv na afiniteto do tarče.

Glede na odstotek relativne inhibicije v preliminarnem encimsko-kinetičnem testu so si spojine sledile po naslednjem vrstnem redu: **250** > **248** > **120** ~ **85** > **51** ~ **498**. Po določanju K_i se je ta vrstni red zamenjal. Prvo mesto sta zasedli spojini **85** in **120**, ki imata kar za en velikostni razred manjšo konstanto inhibicije od ostalih kandidatnih spojin. K_i je pri obeh spojinah v nizkem mikromolarnem območju ($38,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ za spojino **85** in $29,2 \pm 2,4 \mu\text{M}$ za spojino **120**). Naslednja po vrsti je spojina **498**, ki je glede na vrednost K_i ($135,9 \mu\text{M}$) približno 4-krat slabši inhibitor v primerjavi s **85** in **120**. Sledi spojina **51** ($K_i = 190,0 \mu\text{M}$), **250** ($K_i = 230,2 \mu\text{M}$) in **248** ($K_i = 259,7 \mu\text{M}$). Za vse spojine smo določili nekompetitivni tip inhibicije. Glede na parameter IC_{50} si spojine sledijo v enakem vrstnem redu kot so razvrščene glede na K_i z izjemo spojine **498**, ki je glede na parameter IC_{50} najslabši inhibitor izmed šesterice, glede na K_i pa je na tretjem mestu.

V drugem delu magistrske naloge smo ugotavljali ali spojine delujejo inhibitorno tudi na nekatere druge predstavnike cisteinskih katepsinov. V ta namen smo za spojini **85** in **120** z uporabo specifičnih substratov določili K_i in mehanizem inhibicije še za katepsine B, H, L in S. Navedeni encimi se razlikujejo med seboj v katalitičnem mehanizmu. Katepsina L in S sta endopeptidazi, medtem ko imata katepsina B in H dvojen način delovanja. V kislih pogojih katepsin B odcepi dipeptid s C-konca substrata, katepsin H pa v glavnem deluje kot aminoeksopeptidaza. [2] Zaradi podobnega načina delovanja smo pričakovali najmanjšo razliko med K_i katepsina X in katepsina B, testiranega pod pogoji za eksopeptidazno aktivnost.

Iz rezultatov je razvidno, da je spojina **85** približno 49-krat bolj selektivna za katepsin X kot za katepsin H, 25-krat bolj kot za katepsin L ter več kot 26-krat bolj kot za katepsin S

in katepsin B v pogojih, kjer ima endopeptidazno aktivnost. Ista spojina je 10-krat boljša pri inhibiciji katepsina X kot pri inhibiciji eksopeptidazne aktivnosti katepsina B. Za spojino **120** velja, da približno 17-krat bolj inhibira katepsin X kot katepsin H, 31-krat bolj kot katepsin L, 16-krat bolj kot katepsin S, 7-krat bolj kot eksopeptidazno in 13-krat bolj kot endopeptidazno delujoč katepsin B. Ugotovili smo, da spojina **85** praktično ne vpliva na aktivnost katepsina S, L, H in endopeptidazno delujočega katepsina B ($K_i > 1000 \mu\text{M}$). Za spojino **120** smo pri teh katepsinih določili nekoliko manjše K_i , vendar še vedno en velikostni razred višje od K_i , določene pri katepsinu X ($K_i \sim 500 \mu\text{M}$ za kat H, S in endopeptidazno aktiven kat B, $K_i \sim 1000$ za kat L). V skladu s pričakovanji smo za obe spojini pri določevanju selektivnosti opazili najmanjše razlike v K_i pri eksopeptidazno aktivnem katepsinu B ($K_i \sim 400 \mu\text{M}$ za spojino **85** oziroma $K_i \sim 200 \mu\text{M}$ za spojino **120**). Na podlagi dobljenih rezultatov lahko za obe spojini trdimo, da izkazujeta odlično selektivnost. Selektivnost zdravilnih učinkovin je v klinični uporabi pomembna za zagotavljanje ustreznega varnostnega profila in za preprečitev netarčnega delovanja. Na previdnost pri uporabi neselektivnih inhibitorjev opozarjajo neuspele klinične študije z metaloproteinaznimi inhibitorji, ki, ne samo da niso dosegli pričakovanega terapevtskega učinka, ampak so tudi izzvali resne neželene učinke zaradi neselektivnega delovanja tako na tumor promotorske kot tudi zaščitne metalopeptidaze. [58] Čim večja selektivnost je prav tako zaželena pri uporabi inhibitorjev v raziskovalne namene. Njihova uporaba bistveno prispeva k razumevanju katalitičnih mehanizmov, odkrivanju substratov in razjasnitvi bioloških funkcij proteaz. [59] Hkrati smo na ta način lahko prepričani, da res preučujemo zgolj učinke izbrane tarče. V primeru cisteinskih katepsinov je to še posebej pomembno, saj so njihove vloge prepletene in delovanje redundantno. Poskusi *in vivo* na gensko spremenjenih miših so pokazali, da je učinek katepsinov X in B na tumorsko rast in razvoj aditiven. Poleg tega so se rakave celice sposobne prilagoditi in ob zaviranju delovanja katepsina B kompenzatorno povečati izražanje katepsina X oziroma obratno. [33, 60]

S tem, ko smo potrdili specifičnost inhibitorjev, smo zagotovili, da so rezultati funkcijskih testov, ki smo jih izvedli v nadaljevanju, posledica izključno inhibicije katepsina X. Različne raziskave potrjujejo, da inhibicija katepsina X zavira napredovanje tumorja *in vivo* in učinkovito zmanjšuje migracijo tumorskih celic *in vitro*. V nadaljevanju magistrske naloge smo preizkusili, če so tega zmožne tudi naše spojine. V ta namen smo preučevali

vpliv spojin **85** in **120** na zmanjšanje migracijske sposobnosti celične linije PC-3, ki predstavlja model raka prostate.

Preden smo prešli na funkcijske teste na celicah, smo želeli izključiti potencialne toksične učinke inhibitorjev. Po 24-urni inkubaciji celic PC-3 s spojinami **51**, **85**, **120**, **248**, **250** in **498** v koncentraciji 2,5 μM , 5 μM in 10 μM smo določili metabolično aktivnost celic z uporabo reagenta MTS v treh samostojnih ponovitvah. Izkazalo se je, da spojine pri navedenih koncentracijah ne vplivajo na viabilnost celic PC-3 ($p \geq 0,05$). S tem smo tudi zavrnilo možnost, da bi bilo zmanjšanje celične migracije v nadaljnjih poskusih posledica citotoksičnega delovanja testnih spojin. Relativni delež viabilnosti je bil praktično vedno večji od 100 % ob dodatku inhibitorjev. Znano je, da katepsin X poveča proliferacijo tumorskih celic. Akkari et al. so z uporabo reagenta MTT na celicah BTC po 72 urah pokazali statistično značilen padec proliferacije pri celični liniji z utišanem katepsinom X. [54] Zanimivo bi bilo preveriti, ali bi se viabilnost še povečala pri daljšem času inkubacije celic z inhibitorji.

Nazadnje smo s kontinuiranim spremljanjem migracije s sistemom xCELLigence ovrednotili učinek inhibitorjev **85** in **120** na celice PC-3. Izbrana celična linija izkazuje visoko in specifično povečanje aktivnosti katepsina X. [29] Kot referenčno spojino smo uporabili AMS36, za katerega je bilo že pokazano, da pomembno zmanjša migracijo celic PC-3. Tudi naši poskusi so potrdili, da AMS36 ustavlja celično migracijo in jo zmanjša za 25,4 %. Pri rezultatih obeh bioloških ponovitev smo sicer dobili velike standardne odklone, zaradi česar nismo ugotovili statistično značilne razlike, ki bi kazala na zmanjšanje inhibicije. Vendar je iz obeh posamičnih meritev razvidno, da spojina AMS36 vpliva na celično migracijo. Kot razlog za velike standardne odklone navajamo občutljivost poskusa, saj vsaka minimalna sprememba pri izvedbi prispeva k razliki. Do napake pride pri štetju celic, kar pomeni, da so pri vsaki ponovitvi nanešene nekoliko različne koncentracije celic, obenem so se celice pri vsaki ponovitvi razlikovale v številki pasaže ipd. Obe spojini **85** in **120** sta pri 10 μM koncentraciji pripomogli k zmanjšanju celične migracije, vendar je bil učinek spojine **85** zanemarljiv ($p \geq 0,05$). Spojina **120** je po drugi strani pomembno (za $24,6 \pm 2,1$ %) zmanjšala migracijo celic PC-3, kar je v podobnem obsegu kot pri uporabi inhibitorja AMS36. Uvedba specifičnih inhibitorjev sama po sebi najverjetneje ne zmore popolnoma zaustaviti metastaziranja tumorskih celic, saj lahko v tem primeru izkoriščajo alternativne mehanizme prek indukcije ostalih proteaz. Več koristi bi verjetno prinesla

uporaba kombinirane terapije inhibitorjev katepsinov skupaj s citotoksičnimi kemoterapevtiki. Pogosto namreč tumorske celice postanejo odporne na kemoterapijo. Oksidativni stres privablja makrofage, ki poleg citokinov in rastnih faktorjev sproščajo tudi večje količine katepsinov in na ta način zavarujejo tumorske celice. [58]

Spojini **85** in **120** sta v kinetičnih testih pokazali relativno visoko afiniteto in aktivnost napram katepsinu X. Spojina **120** je bila z zaviranjem delovanja katepsina X sposobna celo zelo dobrega ustavljanja migracije celic *in vitro*. Ugodne fizikalno-kemijske lastnosti so drugi pomemben vidik, zaradi katerega verjamemo, da predstavljata spojini **85** in **120** dobro izhodišče za razvoj novih inhibitorjev katepsina X. Nizka molekulska masa ($M_r = 287,34$ za spojino **85** in $M_r = 292,31$ za spojino **120**) omogoča nadaljnje modifikacije strukture za izboljšanje farmakodinamičnih in farmakokinetičnih lastnosti. Vrednost porazdelitvenega koeficienta spojine **85** ($\log P = 1,63$) nakazuje na ugodne hidro-lipofilne lastnosti, ki so potrebne za ustrezno porazdelitev in prehajanje inhibitorjev v celice. Spojina **120** ima bolj hidrofilni značaj, njen $\log P$ znaša $0,77$. Na podlagi osnovnega skeleta spojini **85** in **120** bi s spreminjanjem posameznih molekularnih fragmentov lahko zasnovali še močnejše selektivne inhibitorje katepsina X.

Rezultati naših poskusov odkrivajo, da se med zadetki virtualnega rešetanja nahajajo biološko aktivne spojine. Še več, naši inhibitorji delujejo že pri nizkih koncentracijah. Njihova bistvena prednost v primerjavi z že znanimi inhibitorji katepsina X je reverzibilni mehanizem inhibicije. Ozko terapevtsko okno namreč omejuje uporabnost ireverzibilnih vezalcev v farmakoterapiji. Identificirane molekule z ekonomskega vidika in tudi po učinkovitosti prekašajo makromolekularne inhibitorje – monoklonska protitelesa. Čeprav so protitelesa zelo specifična, jih je težje dostaviti na mesto delovanja (tumorsko tkivo) in so brez učinka, če se njihova tarča nahaja znotraj celice. Iz strukturne podobnosti inhibitorjev **85** in **120** lahko sklepamo, da smo odkrili osnovni skelet, ki bo omogočil bolj usmerjeno iskanje optimalnega inhibitorja katepsina X. V okviru magistrske naloge smo preizkušali vpliv inhibitorjev na napredovanje tumorskih celic. Ker ima katepsin X pomembno vlogo tudi v nevronskih celicah, saj s cepitvijo γ -enolaze pospešuje nevrodegeneracijo, bo zanimivo ugotoviti, če novo odkriti inhibitorji delujejo zaščitno tudi pri tem patološkem procesu. Dosedanje poskuse in funkcijske teste *in vitro* bi končno lahko nadgradili še z rezultati na *in vivo* modelih.

6 SKLEP

V prvem delu magistrske naloge smo z uporabo encimsko-kinetičnih testov prečesali knjižnico spojin in izbrali spojine, ki so učinkovito zavirale delovanje rekombinantnega človeškega katepsina X. Kot najboljša inhibitorja sta se izkazali spojini **85** in **120**. Za obe spojini smo določil nekompetitiven mehanizem inhibicije in konstanto inhibicije v nizkem mikromolarnem območju ($38,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$ za spojino **85** in $29,2 \pm 2,4 \mu\text{M}$ za spojino **120**). Potrdili smo tudi selektivnost izbranih spojin za inhibicijo katepsina X napram katepsinom B, H, L in S. V drugem delu smo preizkušali vpliv spojin na celično preživetje in ugotovili, da spojine niso citotoksične. Nazadnje smo pokazali, da spojina **120** uspešno zavira migracijo tumorskih celic. Odkritje spojine **120** nas je privedlo do nove spojine vodnice, ki bo služila kot osnova za razvoj še močnejših selektivnih in reverzibilnih inhibitorjev katepsina X.

7 LITERATURA

1. Fonović M. in Turk B.: Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2014. 1840(8): 2560-2570.
2. Turk V., Stoka V., Vasiljeva O., Renko M., Sun T. *in sod.:* Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 2012. 1824(1): 68-88.
3. Nagler D.K. in Menard R.: Human cathepsin X: a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Lett* 1998. 434(1-2): 135-139.
4. Santamaria I., Velasco G., Pendas A.M., Fueyo A. in Lopez-Otin C.: Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J Biol Chem* 1998. 273(27): 16816-16823.
5. Pišlar A., Perišić Nanut M. in Kos J.: Lysosomal cysteine peptidases – Molecules signaling tumor cell death and survival. *Seminars in Cancer Biology* 2015. 35: 168-179.
6. Sivaraman J., Nägler D.K., Zhang R., Ménard R. in Cygler M.: Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine1. *Journal of Molecular Biology* 2000. 295(4): 939-951.
7. Rzychon M., Chmiel D. in Stec-Niemczyk J.: Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochim Pol* 2004. 51(4): 861-873.
8. Guncar G., Klemencic I., Turk B., Turk V., Karaoglanovic-Carmona A. *in sod.:* 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): 305-313.
9. Kos J., Sekirnik A., Premzl A., Zavašnik Bergant V., Langerholc T. *in sod.:* Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Experimental Cell Research* 2005. 306(1): 103-113.
10. Pišlar A. in Kos J.: Cysteine Cathepsins in Neurological Disorders. *Molecular Neurobiology* 2013. 49(2): 1017-1030.
11. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts *in sod., Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. Integrius. 2002, Garland Science: New York.
12. Kos J., Jevnikar Z. in Obermajer N.: The role of cathepsin X in cell signaling. *Cell Adhesion & Migration* 2009. 3(2): 164-166.
13. Jevnikar Z., Obermajer N. in Kos J.: LFA-1 fine-tuning by cathepsin X. *IUBMB Life* 2011. 63(9): 686-693.
14. Obermajer N., Premzl A., Zavašnik Bergant T., Turk B. in Kos J.: Carboxypeptidase cathepsin X mediates β 2-integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells. *Experimental Cell Research* 2006. 312(13): 2515-2527.

15. Obermajer N., Svajger U., Bogyo M., Jeras M. in Kos J.: Maturation of dendritic cells depends on proteolytic cleavage by cathepsin X. *J Leukoc Biol* 2008. 84(5): 1306-1315.
16. Obermajer N., Jevnikar Z., Doljak B., Sadaghiani A.M., Bogyo M. *in sod.*: Cathepsin X-mediated β 2 integrin activation results in nanotube outgrowth. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2009. 66(6): 1126-1134.
17. Jevnikar Z., Obermajer N., Bogyo M. in Kos J.: The role of cathepsin X in the migration and invasiveness of T lymphocytes. *J Cell Sci* 2008. 121(Pt 16): 2652-2661.
18. Hidaka S., Yasutake T., Takeshita H., Kondo M., Tsuji T. *in sod.*: Differences in 20q13.2 copy number between colorectal cancers with and without liver metastasis. *Clin Cancer Res* 2000. 6(7): 2712-2717.
19. Krueger S., Kalinski T., Hundertmark T., Wex T., Kuster D. *in sod.*: Up-regulation of cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *J Pathol* 2005. 207(1): 32-42.
20. Nägler D.K., Krüger S., Kellner A., Ziomek E., Menard R. *in sod.*: Up-regulation of cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *The Prostate* 2004. 60(2): 109-119.
21. Rumpler G., Becker B., Hafner C., McClelland M., Stolz W. *in sod.*: Identification of differentially expressed genes in models of melanoma progression by cDNA array analysis: SPARC, MIF and a novel cathepsin protease characterize aggressive phenotypes. *Exp Dermatol* 2003. 12(6): 761-771.
22. Wang J., Chen L., Li Y. in Guan X.Y.: Overexpression of cathepsin Z contributes to tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2011. 6(9): e24967.
23. Decock J., Obermajer N., Vozelj S., Hendrickx W., Paridaens R. *in sod.*: Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin X and cystatin C in sera of patients with early-stage and inflammatory breast cancer. *Int J Biol Markers* 2008. 23(3): 161-168.
24. Kolwijck E., Kos J., Obermajer N., Span P.N., Thomas C.M. *in sod.*: The balance between extracellular cathepsins and cystatin C is of importance for ovarian cancer. *Eur J Clin Invest* 2010. 40(7): 591-599.
25. Zhang X., Hou Y., Niu Z., Li W., Meng X. *in sod.*: [Clinical significance of detection of cathepsin X and cystatin C in the sera of patients with lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 2013. 16(8): 411-416.
26. Vizin T., Christensen I.J., Wilhelmsen M., Nielsen H.J. in Kos J.: Prognostic and predictive value of cathepsin X in serum from colorectal cancer patients. *BMC Cancer* 2014. 14: 259.
27. Lechner A.M., Assfalg-Machleidt I., Zahler S., Stoeckelhuber M., Machleidt W. *in sod.*: RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin α v β 3 mediates cell-adhesive properties. *J Biol Chem* 2006. 281(51): 39588-39597.
28. Kos J., Vižin T., Fonović U.P. in Pišlar A.: Intracellular signaling by cathepsin X: Molecular mechanisms and diagnostic and therapeutic opportunities in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 2015. 31: 76-83.

29. Pecar Fonovic U., Jevnikar Z., Rojnik M., Doljak B., Fonovic M. *in sod.*: Profilin 1 as a target for cathepsin X activity in tumor cells. *PLoS One* 2013. 8(1): e53918.
30. Kraus S., Bunsen T., Schuster S., Cichoń M.A., Tacke M. *in sod.*: Cellular senescence induced by cathepsin X downregulation. *European Journal of Cell Biology* 2011. 90(8): 678-686.
31. Kraus S., Fruth M., Bunsen T. in Nagler D.K.: IGF-I receptor phosphorylation is impaired in cathepsin X-deficient prostate cancer cells. *Biol Chem* 2012. 393(12): 1457-1462.
32. Teller A., Jechorek D., Hartig R., Adolf D., Reißig K. *in sod.*: Dysregulation of apoptotic signaling pathways by interaction of RPLP0 and cathepsin X/Z in gastric cancer. *Pathology - Research and Practice* 2015. 211(1): 62-70.
33. Sevenich L., Schurigt U., Sachse K., Gajda M., Werner F. *in sod.*: Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010. 107(6): 2497-2502.
34. Hafner A., Glavan G., Obermajer N., Živin M., Schliebs R. *in sod.*: 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): 604-614.
35. Wendt W., Zhu X.-R., Lübbert H. in Stichel C.C.: Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice. *Experimental Neurology* 2007. 204(2): 525-540.
36. Pišlar A.H., Zidar N., Kikelj D. in Kos J.: Cathepsin X promotes 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of PC12 and SH-SY5Y cells. *Neuropharmacology* 2014. 82: 121-131.
37. Ratovitski T., Chighladze E., Waldron E., Hirschhorn R.R. in Ross C.A.: Cysteine proteases bleomycin hydrolase and cathepsin Z mediate N-terminal proteolysis and toxicity of mutant huntingtin. *J Biol Chem* 2011. 286(14): 12578-12589.
38. Bhutani N., Piccirillo R., Hourez R., Venkatraman P. in Goldberg A.L.: Cathepsins L and Z are critical in degrading polyglutamine-containing proteins within lysosomes. *J Biol Chem* 2012. 287(21): 17471-17482.
39. Perisic Nanut M., Sabotic J., Jewett A. in Kos J.: Cysteine cathepsins as regulators of the cytotoxicity of NK and T cells. *Front Immunol* 2014. 5: 616.
40. Magister S. in Kos J.: Cystatins in immune system. *J Cancer* 2013. 4(1): 45-56.
41. Magister S., Tseng H.C., Bui V.T., Kos J. in Jewett A.: Regulation of split anergy in natural killer cells by inhibition of cathepsins C and H and cystatin F. *Oncotarget* 2015. 6(26): 22310-22327.
42. Colbert J.D., Matthews S.P., Kos J. in Watts C.: Internalization of exogenous cystatin F suppresses cysteine proteases and induces the accumulation of single-chain cathepsin L by multiple mechanisms. *J Biol Chem* 2011. 286(49): 42082-42090.
43. Kos J., Mitrovic A. in Mirkovic B.: The current stage of cathepsin B inhibitors as potential anticancer agents. *Future Med Chem* 2014. 6(11): 1355-1371.

44. Kumar V., Krishna S. in Siddiqi M.I.: Virtual screening strategies: Recent advances in the identification and design of anti-cancer agents. *Methods* 2015. 71: 64-70.
45. Danishuddin M. in Khan A.U.: Structure based virtual screening to discover putative drug candidates: Necessary considerations and successful case studies. *Methods* 2015. 71: 135-145.
46. Lyne P.D.: Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discovery Today* 2002. 7(20): 1047-1055.
47. Drwal M.N. in Griffith R.: Combination of ligand- and structure-based methods in virtual screening. *Drug Discovery Today: Technologies* 2013. 10(3): e395-e401.
48. *FRET Substrates Bachem*. 2012 (citirano; Dostopno na: https://www.bachem.com/fileadmin/user_upload/pdf/Monographs/FRET_Substrate_s.pdf).
49. *CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay System Technical Bulletin*. 2012 (citirano; Dostopno na: <https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol/>).
50. *RTCA DP Instrument Operator's Manual* 2013 (citirano 17.5. 2016); Dostopno na: <http://sydney.edu.au/medicine/bosch/facilities/molecular-biology/tissue-culture/RTCA%20DP%20System%20Operator%20Manual%20v3.pdf>.
51. Turk B.: Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 2006. 5(9): 785-799.
52. Löser R. in Pietzsch J.: Cysteine cathepsins: their role in tumor progression and recent trends in the development of imaging probes. *Frontiers in Chemistry* 2015. 3.
53. Palermo C. in Joyce J.A.: Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2008. 29(1): 22-28.
54. Akkari L., Gocheva V., Kester J.C., Hunter K.E., Quick M.L. *in sod.*: Distinct functions of macrophage-derived and cancer cell-derived cathepsin Z combine to promote tumor malignancy via interactions with the extracellular matrix. *Genes Dev* 2014. 28(19): 2134-2150.
55. Barrett A.J.: The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomedica biochimica acta* 1986. 45(11-12): 1363-1374.
56. Hanada K. T.M.e.a.: Isolation and characterisation of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry* 1978. 42(3): 523-528.
57. Sadaghiani A.M., Verhelst S.H., Gocheva V., Hill K., Majerova E. *in sod.*: Design, synthesis, and evaluation of in vivo potency and selectivity of epoxysuccinyl-based inhibitors of papain-family cysteine proteases. *Chem Biol* 2007. 14(5): 499-511.
58. Olson O.C. in Joyce J.A.: Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response. *Nat Rev Cancer* 2015. 15(12): 712-729.
59. Löser R. in Pietzsch J.: Cysteine cathepsins: their role in tumor progression and recent trends in the development of imaging probes. *Frontiers in Chemistry* 2015. 3: 37.

60. Vasiljeva O., Papazoglou A., Kruger A., Brodoefel H., Korovin M. *in sod.*: Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res* 2006. 66(10): 5242-5250.