



Masarykova cesta 16, 1000 Ljubljana

T: 01 400 52 00

F: 01 400 53 21

## **Povzetek projekta »Vloga proteaznih inhibitorjev pri zaščiti in regeneraciji nevronov v nevrodegenerativnih procesih«**

### 1. PODATKI O OPERACIJI

OPERACIJA (ISARR šifra)	OP13.2.1.8.01.0045
Naziv operacije:	Raziskovalci na začetku kariere-2013-UL FFa-702

### 2. VSEBINSKO POROČILO O OPERACIJI

#### I. Opis operacije

Glavni izsledki raziskav, ki so bili pridobljeni v okviru raziskovalnega projekta so sledeči: i.) katepsin X preko aktivacije znotrajceličnih signalnih poti spodbudi nevrodegeneracijo nevronskih celic, kar smo pokazali na 6-OHDA in LPS celičnih modelih, ii.) specifični inhibitor katepsina X zavre delovanje encima in izkazuje nevroprotektivno delovanje, iii.) s pomočjo virtualnega rešetanja smo odkrili spojine, ki izkazujejo močnejšo reverzibilno inhibicijo katepsina X od že znanega ireverzibilnega inhibitorja AMS36, iv.) na in vivo modelih smo pokazali povišano izražanje in aktivnost katepsina X v striatumu in črnem jedru. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo na pomembnost inhibicije katepsina X v nevrodegenerativnih procesih, specifični inhibitorji katepsina X pa predstavljajo korak bližje k uspešnemu zdravljenju nevrodegenerativnih bolezni.

#### II. Doseženi rezultati operacije

V prvem raziskovalnem sklopu smo si postavili cilj, da opredelimo vlogo katepsina X v nevrodegenerativnih procesih s pomočjo ustreznih celičnih modelov. Postavili smo LPS celični model z uporabo nevronskih SH-SY5Y celic kot tudi model ko-kultur. Na postavljenih modelih smo ovrednotili izražanje kot tudi lokalizacijo katepsina X. Na nivoju celične signalizacije smo pokazali vpletenost katepsina X v nevrodegenerativne procese spodbujene z vnetjem oz LPS-om. Pokazali smo, da katepsin X spodbudi nevrodegeneracijo nevronskih celic, medtem ko je specifični inhibitor katepsina X izkazoval nevroprotektivno vlogo, kar smo pokazali na nivoju celične viabilnosti nevronskih celic, aktivacije preživetvenih signalnih molekul, deaktivacije kaspaz in

reorganizaciji aktinskega citoskeleta, ki je ključni dejavnik za proces nevrítogeneze. Glede na potek dela v prvem raziskovalnem sklopu in pridobljene rezultate, lahko rečemo, da smo zastavljene cilje v tem sklopu realizirali.

V drugem raziskovalnem sklopu smo si postavili cilj, da naredimo izbor specifičnih inhibitorjev katepsina X z uporabo strukturno podprtega virtualnega rešetanja spojin iz znane knjižnice spojin. Izbrane spojine oz potencialne inhibitorje smo testirali na aktivnost katepsina X in najbolj obetavne inhibitorje izbrali za nadaljnja celična testiranja, kot sta celično preživetje in polimerizacija aktinskih filamentov nevronske celice. Tudi v tem raziskovalnem sklopu smo bili uspešni pri svojem delu in sami realizaciji, saj smo dobili dve spojini, ki izkazujeta boljše inhibitorne lastnosti kot do sedaj poznani ireverzibilni inhibitor katepsina X.

V tretjem sklopu raziskovalnega projekta smo ovrednotili izbrane inhibitorje katepsina X, predvsem inhibitor AMS36, pri zaščiti in regeneraciji nevronske celice na in vitro modelih. Pokazali smo vlogo katepsina X v neurodegeneraciji, povzročeni s 6-hidroksidopaminom (6-OHDA). Pokazali smo, da spremembe v povečanem nivoju izražanja katepsina X in njegovi aktivnosti prispevajo k apoptozi nevronske celice, inhibicija katepsina X s specifičnim inhibitorjem pa te procese izniči in varuje nevronske celice pred njihovim propadanjem. Z izsledki raziskav, ki označujejo inhibitorje katepsina X kot potencialne učinkovine za zdravljenje neurodegenerativnih bolezní smo realizirali načrt dela zastavljen v raziskovalnem sklopu 3.

V zadnjem sklopu raziskovalnega projekta smo ovrednotili inhibitorje katepsina X na in vivo modelih neurodegeneracije. Najprej smo postavili modela neurodegeneracije, LPS in 6-OHDA, na katerih smo ovrednotili izražanje katepsina X kot tudi njegovo aktivnost. Hkrati smo ovrednotili tudi inhibicijo katepsina X v možganih podgan po stereotaktičnem injiciranju inhibitorja AMS36. Z izsledki raziskav, ki kažejo na povišano izražanje katepsina X v striatumu na LPS podganjem modelu in povišano izražanje katepsina X v črnem jedru na 6-OHDA podganjem modelu kot tudi zadostno inhibicijo katepsina X v možganih smo uspešno realizirali del načrta zastavljenega v raziskovalnem sklopu 4. V tem sklopu smo si zastavili tudi opredelitev in vivo učinkov obetavnih inhibitorjev katepsina X pri zaščiti in regeneraciji nevronov. Postavili smo LPS+/-AMS36 model za proučevanje neuroprotektivnega učinka inhibitorja katepsina X in uspešno pripravili rezine ter ustrezna barvanja za nadaljnje proučevanje delovanja inhibitorja. Za končno oceno vpliva inhibitorja katepsina X na propad dopaminergičnih nevronov pa nam je zaradi nastopa porodniškega dopusta raziskovalke zmanjkalo časa, zato bodo izsledki raziskav o neuroprotektivnem delovanju potencialnega inhibitorja katepsina X objavljeni s časovnim zamikom.