

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA MITROVIĆ

**VPLIV SELEKTIVNEGA ZAVIRANJA KATEPSINA B V TUMORSKIH  
CELICAH NA RAZGRADNJO ZUNAJCELIČNEGA MATRIKSA IN  
TUMORSKO INVAZIJO**

**INFLUENCE OF SELECTIVE INHIBITION OF CATHEPSIN B IN TUMOR  
CELLS ON EXTRACELLULAR MATRIX DEGRADATION AND TUMOR  
INVASION**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem. in somentorstvom asist. dr. Bojane Mirković, mag. farm.

## **Zahvala**

*Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Janku Kosu za zaupanje pri dodelitvi teme diplomske naloge in za nasvete pri delu ter pisanju.*

*Posebna zahvala gre somentorici asist. dr. Bojani Mirković za potrpežljivost, pripravljenost k nudenju odgovorov in obrazložitev v zvezi z vsemi strokovnimi in delovnimi vprašanji, za vse nasvete, podporo in zaupanje pri raziskovalnem delu ter pri pisanju diplomske naloge.*

*Članoma komisije prof. dr. Albinu Kristlu in asist. dr. Martini Gobec se zahvaljujem za pregled diplomske naloge.*

*Zahvaljujem se asist. dr. Izidorju Sosiču in prof. dr. Stanislavu Gobcu za sintezo derivatov nitroksolina.*

*Hvala tudi vsem ostalim, ki ste kakor koli prispevali k nastanku te diplomske naloge.*

*Prijatelji in sošolci, hvala za vse nepozabne trenutke, ki smo jih skupaj preživeli v času študija in se jih bom vedno z veseljem spominjala.*

*Na koncu pa še prav posebna zahvala staršema in bratu za vso podporo in zaupanje v vseh teh letih. Hvala vam, da ste mi vedno stali ob strani in verjeli vame.*

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem. in somentorstvom asist. dr. Bojane Mirković, mag. farm.

Ana Mitrović

## VSEBINA

Vsebina .....	I
Kazalo slik .....	III
Kazalo tabel .....	IV
Kazalo enačb.....	IV
Povzetek .....	V
Abstract.....	VII
Seznam okrajšav .....	IX
1 Uvod .....	1
1.1 Proteaze.....	1
1.2 Cisteinske proteaze .....	2
1.3 Katepsin B.....	3
1.3.1 Struktura katepsina B .....	3
1.3.2 Mehanizem kataliznega delovanja katepsina B.....	5
1.4 Vloga katepsina B .....	6
1.4.1 Fiziološka vloga katepsina B.....	6
1.4.2 Patološka vloga katepsina B .....	6
1.4.3 Vloga katepsina B pri raku .....	6
1.5 Inhibitorji katepsina B .....	11
1.5.1 Endogeni inhibitorji .....	11
1.5.2 Eksogeni inhibitorji .....	12
2 Namen dela in delovna hipoteza.....	17
3 Materiali in metode.....	18
3.1 Materiali.....	18
3.1.1 Kemikalije in reagenti .....	18
3.1.2 Aparature .....	19
3.1.3 Raztopine .....	20
3.1.4 Encimi.....	21
3.1.5 Inhibitorji .....	21
3.1.6 Gojišča .....	23
3.1.7 Celične linije.....	24

3.2	Metode .....	24
3.2.1	Encimska kinetika .....	24
3.2.2	Gojenje celic .....	25
3.2.3	Odmrzovanje celic .....	26
3.2.4	Tripsinizacija celic.....	26
3.2.5	Štetje celic.....	26
3.2.6	Zamrzovanje celic.....	27
3.2.7	Vpliv inhibitorjev na viabilnost celic .....	27
3.2.8	Zunajcelična razgradnja DQ-kolagena IV .....	28
3.2.9	Znotrajcelična razgradnja DQ-kolagena IV .....	28
3.2.10	Fluorescenčna mikroskopija .....	29
3.2.11	2D <i>in vitro</i> model invazije celic MCF-10A neoT.....	29
3.2.12	3D <i>in vitro</i> model invazije celic MMTV-PyMT .....	30
3.2.13	Statistična obdelava podatkov .....	30
4	Rezultati.....	31
4.1	Encimska kinetika.....	31
4.2	Vpliv inhibitorjev na viabilnost celic.....	34
4.3	Vpliv inhibitorjev na zunajcelično razgradnjo DQ-kolegena IV .....	40
4.4	Vpliv inhibitorjev na znotrajcelično razgradnjo DQ-kolegena IV.....	41
4.5	Vpliv inhibitorjev na razgradnjo DQ-kolagena IV – fluorescenčna mikroskopija.....	43
4.6	Vpliv inhibitorjev na invazijo celic MCF-10A neoT v 2D <i>in vitro</i> modelu tumorske invazije.....	45
4.7	Vpliv inhibitorjev na invazijo celic MMTV-PyMT v 3D <i>in vitro</i> modelu tumorske invazije .....	47
5	Razprava .....	50
6	Sklepi.....	57
7	Literatura .....	58

## KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura katepsina B v eksopeptidazni konformaciji (PDB koda: 1HUC).....	4
Slika 2: Mehanizem kataliznega delovanja katepsina B. ....	5
Slika 3: Strukture epoksisukcinilnih inhibitorjev E-64, CA-074 in CA-074Me. ....	14
Slika 4: A) Struktura nitroksolina, njegova molska masa in porazdelitveni koeficient. B) Struktura kompleksa nitroksolina s katepsinom B (PDB koda: 3AI8).....	16
Slika 5: Shema vezave inhibitorja na encim.....	31
Slika 6: Vpliv spojin <b>1 – 6</b> in CA-074 na viabilnost celic MCF-10A neoT.....	37
Slika 7: Vpliv spojin <b>1 – 6</b> in CA-074 na viabilnost celic MMTV-PyMT.....	40
Slika 8: Delež inhibicije zunajcelične razgradnje DQ-kolagena IV.....	40
Slika 9: Določanje vpliva inhibitorjev na znotrajcelično razgradnjo DQ-kolagena IV s pretočno citometrijo.....	42
Slika 10: Delež inhibicije znotrajcelične razgradnje DQ-kolagena IV. ....	43
Slika 11: Določanje vpliva inhibitorjev na razgradnjo DQ-kolagena IV s fluorescenčno mikroskopijo.....	44
Slika 12: Vpliv inhibitorjev na invazijo MCF-10A neoT celic v 2D <i>in vitro</i> modelu tumorske invazije.....	46
Slika 13: Delež inhibicije invazije MCF-10A neoT celic v 2D <i>in vitro</i> modelu tumorske invazije. ....	47
Slika 14: Vpliv inhibitorjev na invazijo celic MMTV-PyMT v 3D <i>in vitro</i> modelu tumorske invazije.....	48
Slika 15: Vpliv inhibitorjev na invazijo celic MMTV-PyMT v 3D <i>in vitro</i> modelu tumorske invazije.....	49

## **KAZALO TABEL**

Tabela I: Uporabljeni inhibitorji katepsina B, njihovo IUPAC ime, struktura, molska masa in porazdelitveni koeficient. ....	21
Tabela II: Sestava gojišč za gojenje in zamrzovanje celic. ....	23
Tabela III: Konstante in mehanizmi inhibicije katepsina B. ....	33
Tabela IV: Konstante in mehanizmi inhibicije katepsina H in L. ....	34

## **KAZALO ENAČB**

<i>Enačba 1</i> .....	27
<i>Enačba 2</i> .....	30

## POVZETEK

Katepsin B je lizosomska cisteinska proteaza, ki se od ostalih katepsinov razlikuje po tem, da ima endopeptidazno in eksopeptidazno aktivnost. V organizmu ima pomembno vlogo v številnih fizioloških in patoloških procesih in je že znana tarča za načrtovanje novih zdravil za zdravljenje raka. Eksopeptidazna aktivnost katepsina B je povezana z njegovo fiziološko vlogo, endopeptidazna aktivnost pa je povezana predvsem z njegovo patološko vlogo. Slednja je bistvenega pomena pri razgradnji zunajceličnega matriksa in posledično pri tumorski invaziji in metastaziranju.

V okviru diplomske naloge smo najprej ovrednotili vpliv izbranih derivatov nitroksolina na inhibicijo endopeptidazne in eksopeptidazne aktivnosti katepsina B ter njihovo selektivnost za inhibicijo katepsina B napram katepsinoma H in L. Pri tem smo ugotovili, da sta spojini **1** in **2** selektivna inhibitorja endopeptidazne, spojini **3** in **4** pa selektivna inhibitorja eksopeptidazne aktivnosti katepsina B. Spojini **5** in **6** nista izkazovali selektivnosti niti za endopeptidazno niti za eksopeptidazno aktivnost katepsina B, kakor tudi ne selektivnosti za posamezen katepsin B, H ali L.

V nadaljevanju smo s funkcijskimi testi na celični liniji MCF-10A neoT ovrednotili vpliv inhibitorjev na zunajcelično in znotrajcelično razgradnjo proteinov zunajceličnega matriksa ter invazijo celic v 2D *in vitro* modelu celične invazije. Na celični liniji MMTV-PyMT pa smo določili še njihov vpliv na invazijo celic v 3D *in vitro* modelu, ki temelji na implantaciji sferoidov v Matrigel<sup>TM</sup>. Kot najboljši inhibitor se je, tako v encimskih testih kot pri funkcijskih testih na celičnih linijah, izkazala spojina **2**.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo pokazali, da s selektivno inhibicijo endopeptidazne in eksopeptidazne aktivnosti katepsina B specifično zavremo razgradnjo zunajceličnega matriksa in posledično tumorsko invazijo. Ugotovili smo tudi, da so pri inhibiciji razgradnje zunajceličnega matriksa in tumorske invazije na celičnih linijah poleg intrinzične aktivnosti inhibitorjev katepsina B, pomembne tudi njihove hidrolipofilne lastnosti, saj so te ključne za prehajanje inhibitorjev preko celične membrane in inhibicijo katepsina B znotraj celic ter posledično inhibicijo znotrajcelične razgradnje proteinov zunajceličnega matriksa, ki je ključna pri tumorski invaziji.

Ana Mitrović, Diplomaska naloga

*Vpliv selektivnega zaviranja katepsina B v tumorskih celicah na razgradnjo zunajceličnega matriksa in tumorsko invazijo*

---

*Ključne besede*

katepsin B, selektivno zaviranje, derivati nitroksolina, razgradnja zunajceličnega matriksa, tumorska invazija



## ABSTRACT

Cathepsin B is a lysosomal cysteine protease that differs from other cysteine cathepsins that it possesses both endopeptidase and exopeptidase activity. It plays an important role in many physiological and pathological processes and is a validated target in development of new anti-tumour drugs. Exopeptidase activity is associated with physiological role while endopeptidase activity is associated mainly with pathological role of cathepsin B. The latter is involved in extracellular matrix degradation and consequently in tumour invasion and metastasis.

First, we evaluated the potency of selected nitroxoline derivatives against cathepsin B endopeptidase and exopeptidase activity and their selectivity for cathepsin B compared to cathepsins H and L. Compounds **1** in **2** were selective inhibitors of cathepsin B endopeptidase activity, whereas compounds **3** and **4** selectively inhibited its exopeptidase activity. Compounds **5** and **6** did not display selectivity for either cathepsin B endopeptidase or exopeptidase activity or for cathepsins B, H or L.

Next, functional *in vitro* tests using the MCF-10A neoT cell line were used to evaluate the effects of the inhibitors on extracellular and intracellular degradation of extracellular matrix proteins and cell invasion in a 2D *in vitro* cell invasion model. MMTV-PyMT cell line was used to evaluate the inhibition of tumour invasion in a 3D *in vitro* model based on the implantation of spheroids in Matrigel™. Compound **2** was shown to be the best performing inhibitor in enzyme and cell-based functional tests.

Our results confirm that selective inhibition of cathepsin B endopeptidase or exopeptidase activity leads to inhibition of extracellular matrix degradation and consequently tumour invasion. We also showed that hydrophilic properties of inhibitors are important for inhibition of extracellular matrix degradation and tumour invasion, as they are crucial for cell permeability and may be important for inhibition of the intracellular degradation of extracellular matrix that contributes to tumour invasion.

Ana Mitrović, Diplomaska naloga

*Vpliv selektivnega zaviranja katepsina B v tumorskih celicah na razgradnjo zunajceličnega matriksa in tumorsko invazijo*

---

Keywords

cathepsin B, selective inhibition, nitroxoline derivatives, extracellular matrix degradation, tumour invasion

## SEZNAM OKRAJŠAV

Abz	2-aminobenzoil
ADMEM	Advanced DMEM (Eagleovo gojišče, prilagojeno po Dulbeccu, obogateno z normalnimi sestavinami seruma)
AII <sub>t</sub>	aneksin II heterotetramer
AMC	7-amido-4-metilkumarin
CA-074	L-3-trans-(propilkarbamoiloksiran-2-karbonil)-L-izolevcin-L-prolin
CA-074Me	L-3-trans-(propilkarbamoiloksiran-2-karbonil)-L-izolevcin-L-prolin metilni ester
DMEM	Eagleovo gojišče, prilagojeno po Dulbeccu
DMSO	dimetil sulfoksid
Dnp	2,4-dinitrofenil
E-64	L-trans-epoksisukcinil-leucilamido(4-gvanidino)butan
E-64d	L-trans-epoksisukcinil-leucilamido(4-gvanidino)butan etilni ester
EDTA	etilendiaminotetraoetna kislina
EGF	epidermalni rastni dejavnik
FBS	fetusni serum goveda
HIF-1 $\alpha$	s hipoksijo inducirani faktor 1 $\alpha$
$k_{cat}$	katalizna konstanta
$K_i'$	disociacijska konstanta kompleksa encim – substrat – inhibitor (ESI)
$K_i$	disociacijska konstanta kompleksa encim – inhibitor (EI)
$K_M$	Michaelis-Mentenova konstanta
miLogP	porazdelitveni koeficient
MMP	metaloproteaza
mRNA	informacijska RNA
PBS	fosfatni pufer z NaCl
PEG	polietilen glikol
SD	standardna deviacija
TGF- $\beta$	transformirajoči rastni dejavnik $\beta$
TIMP	tkivni inhibitor metaloproteaz
tPA	tkivni aktivator plazminogena

uPA	urokinazni aktivator plazminogena
uPAR	receptor za urokinazni aktivator plazminogena
uPARAP	z receptorjem za urokinazni aktivator plazminogena povezan protein
VEGF	žilni endotelijski rastni dejavnik
Z	benzoioksikarbonil
ZCM	zunajcelični matriks

# 1 UVOD

## 1.1 PROTEAZE

Proteaze (proteinaze, peptidaze ali proteolitični encimi) so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi. V človeškem organizmu je odkritih več kot 553 genov (~2 % genoma), ki kodirajo različne proteaze (1–3). Proteaze lahko razdelimo na več načinov. Glede na katalitsko skupino v aktivnem mestu jih delimo na asparaginske, metalo, cisteinske, serinske, treoninske proteaze in proteaze neznanega tipa (1–3). Ločimo dva bistvena mehanizma katalize. Pri cisteinskih, serinskih in treoninskih proteazah gre za kovalentno katalizo, kjer je nukleofil aminokislinski ostanek, ki je del aktivnega mesta encima. Pri asparaginskih in metaloproteazah pa gre za nekovalentno katalizo, kjer ima vlogo nukleofila aktivirana molekula vode (1, 2). Proteaze lahko cepijo proteine kot eksopeptidaze z N-terminalnega konca (aminopeptidaze) ali s C-terminalnega konca (karboksipeptidaze) in/ali kot endopeptidaze v sredini molekule (1). Proteaze lahko specifično prepoznajo samo eno aminokislinsko zaporedje ali pa nespecifično razgrajujejo različne proteine ter tako delujejo kot promiskuitetne proteaze (2).

Sodobna delitev proteaz je zbrana v zbirki MEROPS. V omenjeni zbirki so proteaze razvrščene v družine na podlagi statistično značilnega ujemanja aminokislinskega zaporedja v tistem delu, ki je najbolj odgovoren za delovanje encima. Družine proteaz so združene v klane, ki združujejo peptidaze s podobnim evolucijskim izvorom, na podlagi podobnosti v terciarni strukturi, ujemanju v razporeditvi katalitičnih ostankov v polipeptidni verigi in aminokislinskem zaporedju okrog aktivnega mesta (3).

Do nedavnega so menili, da je funkcija proteaz predvsem cepitev proteinov, danes pa je znano, da so proteaze pomembne signalne molekule v številnih procesih, nujno potrebnih za življenje, kot so razgradnja proteinov, ovulacija, oploditev, razvoj zarodka, resorpcija kosti, preoblikovanje različnih tkiv, razraščanje nevronov, predstavitev antigenov, uravnavanje celičnega cikla, aktivacija in migracija vnetnih in imunskih celic, hemostaza, celjenje ran, prepisovanje DNA, angiogeneza in apoptoza. Proteazne signalne poti so strogo regulirane in spremembe v njihovi regulaciji lahko vodijo do različnih patoloških stanj, kot so rak, osteoporoza, nevrodegenerativne motnje, kardiovaskularne in vnetne bolezni (1, 2).

## **1.2 CISTEINSKE PROTEAZE**

Cisteinske proteaze so proteaze, pri katerih je v aktivnem mestu kot nukleofil prisoten cistein (3). Razred cisteinskih proteaz je s 143 geni, ki kodirajo cisteinske proteaze, tretji po velikosti za metaloproteazami in serinskimi proteazami (2). Glede na ujemanje v aminokislinskem zaporedju jih delimo v 9 klanov (CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO in CP) in skupino neuvrščenih proteaz, klane pa naprej v družine. Najštevilčnejši je klan CA, ki vsebuje 30 družin. Od teh je največja papainska družina C1, ki se naprej deli še na dve poddružini. V poddružino C1A uvrščamo papain in papainu podobne proteaze, med katere uvrščamo tudi lizosomske cisteinske proteaze ali katepsine (3).

Danes so znana aminokislinska zaporedja 11 človeških katepsinov (B, C, F, H, L, K, O, S, V, W in X) (4, 5). Z izjemo katepsinov S, K, V in W so izraženi v različnih tipih celic. Optimum delovanja imajo v rahlo kislem reducirajočem okolju lizosomov (4, 6–8). Katepsini večinoma delujejo kot endopeptidaze, izjema so katepsini B, C, H in X, ki delujejo kot eksopeptidaze. Katepsina C in H delujeta kot aminopeptidazi, katepsina B in X pa kot karboksipeptidazi (4–7, 9, 10). Pri njih dodatni strukturni element v reži z aktivnim mestom, ki je lahko zaporna zanka v primeru katepsina B in X ali del propeptida v primeru katepsina C in H, preprečuje vezavo daljših substratov in istočasno omogoča dodatne elektrostatske interakcije s C- ali N-terminalnim delom substrata (9). Katepsina B in H poleg eksopeptidazne aktivnosti posedujeta tudi endopeptidazno aktivnost (4, 6, 7, 9–11). Katepsini so udeleženi v številnih fizioloških procesih, kot so razgradnja proteinov, predstavitev antigenov, apoptoza, aktivacija prekursorov proteinov (prohormonov in proencimov), resorpcija kostnega tkiva, diferenciacija keratinocitov, uravnavanje cikla rasti dlak in razmnoževanje (4, 6–8, 11, 12). Nepravilno delovanje katepsinov je povezano s številnimi patološkimi procesi, kot so revmatoidni artritis, osteoartritis, rak, vnetja, nevrodegenerativne motnje (Alzheimerjeva bolezen, multipla skleroza), mišična distrofija, osteoporoza, ateroskleroza, peridontitis, virusne okužbe, vnetne bolezni, akutni pankreatitis, bolezni jeter, pljuč (astma, pljučna fibroza) in srca, diabetes, avtoimunske motnje ter bolezni, ki so posledica nezadostne razgradnje proteinov v lizosomih (4, 7–9, 12, 13). Zaradi svoje vloge v patoloških procesih predstavljajo katepsini obetavne terapevtske tarče in imajo velik potencial kot prognostični kazalci pri raku (6, 8, 9, 14–16).

## 1.3 KATEPSIN B

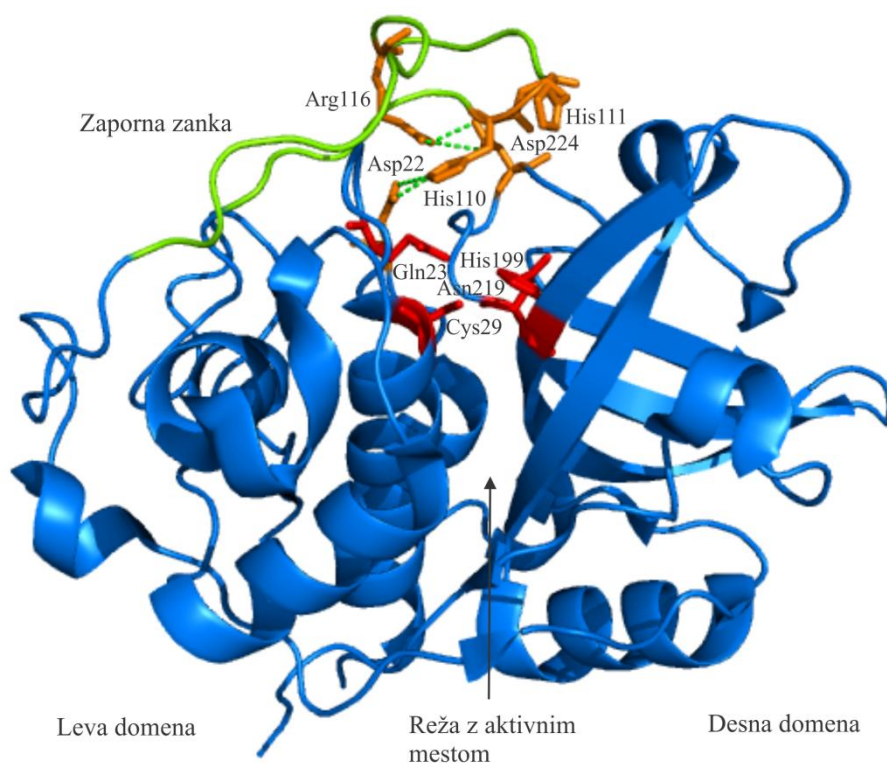
### 1.3.1 Struktura katepsina B

Katepsin B (oznaka po klasifikaciji IUBMB: EC 3.4.22.1) je lizosomska cisteinska proteaza iz družine papaina in njemu podobnih cisteinskih proteaz (klan CA, družina C1, poddružina C1A) (3).

Gen za človeški katepsin B je dolg 26.9 kb in se nahaja na kromosomu 8p22-p23.1 (7, 17). Katepsin B se sintetizira kot 339 aminokislin (37.8 kDa) dolg preprokatepsin B na ribosomih zrnatega endoplazemskega retikuluma. Že ob sintezi pride do cepitve 17 aminokislin dolgega signalnega peptida (10, 18, 19). Prokatepsin B se nato prenese v notranjost zrnatega endoplazemskega retikuluma in do Golgijevega aparata, kjer pride do glikozilacije dveh asparaginskih ostankov in fosforilacije manoznih ostankov. Fosforilacija omogoča vezavo na manozna-6-fosfatne receptorje v *trans* področju Golgijevega aparata, kar omogoči prenos prokatepsina B do endosomov, ki zorijo v primarne in sekundarne lizosome (19). Poleg omenjene poti so v literaturi opisane tudi od manozna-6-fosfata neodvisne poti prenosa katepsina B (7, 20). Med zorenjem se v lizosomih zniža pH, to omogoči disociacijo encima z receptorjev in sproži proteolitično cepitev 62 aminokislin dolgega aktivacijskega propeptida in 6 aminokislin dolgega C-terminalnega propeptida ter aktivacijo encima (18–21). Aktivacija katepsina B lahko poteče kot bimolekularni avtokatalitični dogodek, lahko pa jo katalizirajo različne proteaze, kot so katepsin C, D, G in L, papain, pepsin, nevtrofilna elastaza, tPA in uPA (22–26). Po cepitvi propeptida se katepsin B nahaja v obliki 254 aminokislin dolgega enoverižnega encima (31 kDa). V lizosomih lahko naprej poteče še cepitev dipeptida (aminokislini 127-128), pri čemer nastane dvoverižna oblika encima, ki je sestavljena iz lahke (47 aminokislin, 5 kDa) in težke (205 aminokislin, 25/26 kDa) polipeptidne verige, ki sta med seboj povezani z disulfidno vezjo (10, 18, 19, 21, 27). Večina aktivnega katepsina B se nahaja v obliki dvoverižnega encima (10).

Podobno kot papain je katepsin B sestavljen iz leve in desne domene, povezanih z vmesno režo z aktivnim mestom (10). V levi domeni katepsina B je prisotna zaporna zanka – strukturni element, po katerem se katepsin B razlikuje od papaina in ostalih katepsinov (10, 28). Zaporna zanka, ki se nahaja na vrhu molekule in je sestavljena iz 21 aminokislin (Ile105-Pro126) (10, 21, 25), ovira dostop endopeptidaznega substrata do aktivnega mesta

(10). K temu učinku dodatno doprineseta ionska para Asp22-His110 in Arg116-Arg224, ki pripenjata zaporno zanko na telo encima (10, 29). Zaradi tega je katepsin B slabša endopeptidaza v primerjavi z ostalimi cisteinskimi katepsini (19, 28, 30). Pozitivno nabiti imidazolni skupini His110 in His111, ki se nahajata na vrhu zaporne zanke, tvorita interakcije s C-terminalno karboksilno skupino substrata in sta odgovorni za peptidildipeptidazno (eksopeptidazno) aktivnost katepsina B pri kislem pH (~4.5) (Slika 1) (10, 28, 29). Z naraščanjem pH se poveča endopeptidazna aktivnost katepsina B, saj pride do deprotonizacije histidinskih ostankov, razdrtja solnih mostičkov, ki vežejo zanko na telo encima in posledično do konformacijske spremembe, ki spremeni položaj zaporne zanke in omogoči vezavo endopeptidaznih substratov (10, 28, 30). Katepsin B ima maksimalno endopeptidazno aktivnost pri pH okrog 7.4 (27). Prisotnost zaporne zanke je glavni vzrok, da ima katepsin B eksopeptidazno in endopeptidazno aktivnost (10, 11, 19, 28–30).

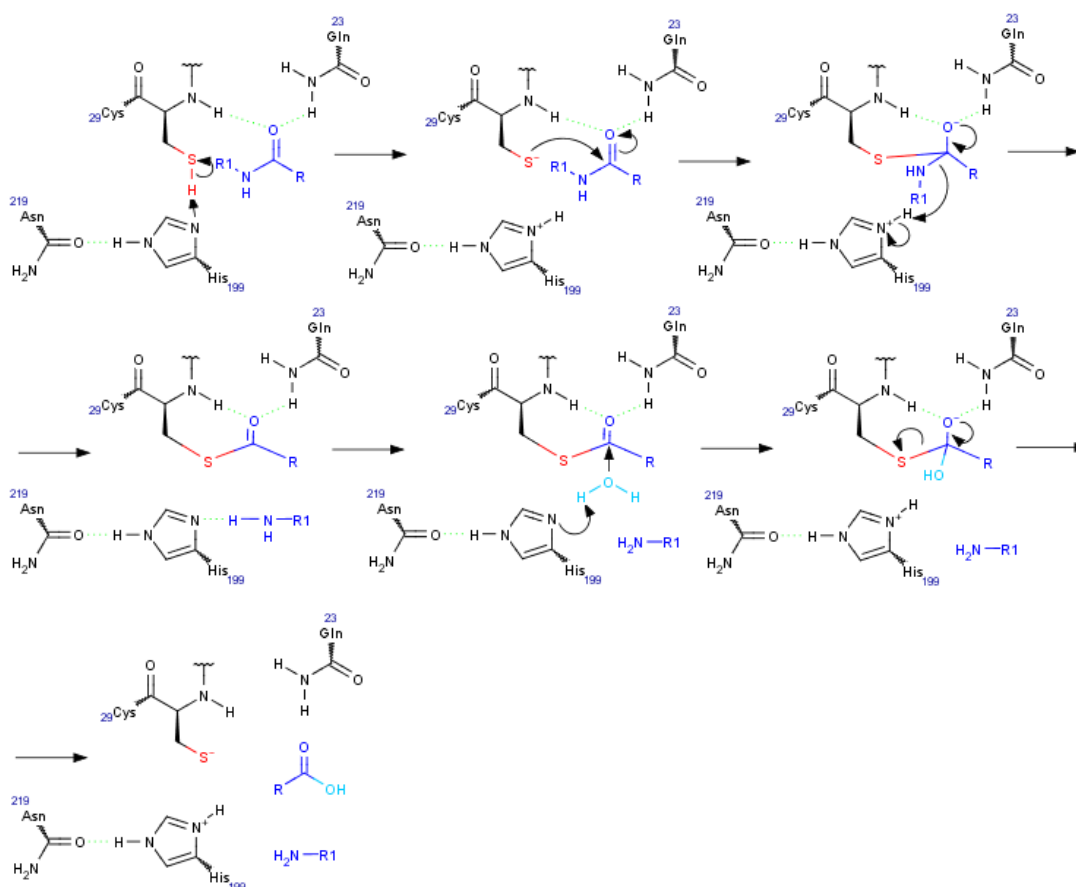


Slika 1: Struktura katepsina B v eksopeptidazni konformaciji (PDB koda: 1HUC). Telo encima je modro, zaporna zanka je označena z zeleno, aminokislini Cys29 in His199, ki tvorita aktivno mesto ter aminokislini Asn219 in Gln23, ki tudi sodelujeta pri hidrolizi peptidne vezi so označene z rdečo, aminokislina Asp22-His110 in Arg116-His111, ki tvorijo ionske pare, ki pripenjajo zaporno zanko na telo encima, in aminokislina His111 so označene z oranžno, vezi med ionskimi pari so označene z zeleno.



### 1.3.2 Mehanizem kataliznega delovanja katepsina B

Aktivno mesto katepsina B tvorita aminokislinska ostanka Cys29 in His199, ki delujeta kot nukleofil in baza (10, 19, 21, 31, 32). Dopolnjuje ga še Asn219, ki tvori vodikovo vez s His199 in je odgovoren za pravilno orientacijo imidazolovega obroča His199 (Slika 1) (10, 31, 32). Tiolna skupina Cys29 in imidazolna skupina His199 tvorita ionski par pri pH 4.0-8.5. Pri tem imidazolna skupina His199 deprotonira tiolno skupino Cys29 in jo aktivira. Cepitev peptidne vezi poteče z nukleofilnim napadom tiolatnega aniona na karbonilni C-atom substrata (19, 32). Pri tem nastane negativno nabit tetraedrični intermedat, ki ga stabilizira oksazolinski žep, ki ga tvorita Gln23 in Cys29 (Slika 1) (10, 31, 32). V naslednjem koraku pride do prenosa protona z imidazolijevega kationa His199 na dušik občutljivi vezi, pri tem se C-terminalni del substrata odcepi, tiolna skupina Cys29 pa ostane acetilirana (19, 32). Nato imidazol His199 polarizira molekulo vode, ki napade karbonilni C-atom aciliranega encima in povzroči nastanek drugega tetraedričnega intermedata ter hidrolizo tioesterske vezi aciliranega encima, kar vodi v sprostitvev cepljenega substrata z encima in ponovno aktivacijo encima (Slika 2) (32).



Slika 2: Mehanizem kataliznega delovanja katepsina B (32, 33).

## **1.4 VLOGA KATEPSINA B**

### **1.4.1 Fiziološka vloga katepsina B**

Katepsin B je v organizmu izražen v različnih tipih celic. Pomembno vlogo ima pri lizosomski razgradnji proteinov. Zaradi endopeptidazne in eksopeptidazne aktivnosti lahko sodeluje tako v začetnih kot tudi v kasnejših stopnjah razgradnje proteinov (19). Katepsin B lahko poleg tega v organizmu opravlja tudi bolj specifične funkcije, kot so sproščanje hormonov ščitnice s proteolitičnim procesiranjem tiroglobulina, aktivacija proencimov  $\beta$ -galaktozidaze, renina in tripsina, kostna resorpcija, predstavitev antigenov, apoptoza, preoblikovanje zunajceličnega matriksa (ZCM), migracija keratinocitov ter zorenje in vzdrževanje integritete centralnega živčnega sistema (8, 19, 34–46).

### **1.4.2 Patološka vloga katepsina B**

Spremembe v delovanju katepsina B so povezane s številnimi patološkimi procesi, kot so rak, bolezni kosti in sklepov (osteoporoza, revmatoidni artritis, osteoartritis), akutni pankreatitis, periodontitis, virusne okužbe, Alzheimerjeva bolezen in vnetne bolezni (8, 13, 19, 38, 47–53).

### **1.4.3 Vloga katepsina B pri raku**

Rak je splošno ime za obsežno skupino različnih bolezni, katerih glavna značilnost je nenadzorovana rast spremenjenih, rakavih celic (54). Rak je za boleznimi obtočil drugi najpogostejši vzrok smrti v Sloveniji (55). Vzroki za nastanek raka so različni, vključujejo genetske dejavnike, vplive okolja in življenjske navade, povzročitelje okužb ter staranje (56). Nastanek in razvoj raka je večstopenjski proces, pri katerem pride do preoblikovanja normalnih, zdravih celic v tumorske celice. Osnovne lastnosti celic, potrebne za nastanek in razvoj tumorskih celic, so ohranjanje proliferativne signalizacije, neodzivnost na dejavnike, ki zavirajo rast, upiranje apoptozi, možnost neomejene celične delitve, sprožitev angiogeneze ter aktivacija invazije in metastaziranja (57, 58). Katepsin B ima pomembno vlogo pri razvoju in napredovanju raka, saj sodeluje pri nastanku in rasti tumorja, angiogenezi in invaziji tumorskih celic ter pri metastaziranju (5, 6, 8, 26).

Pri tumorskih celicah lahko opazimo spremembe v izražanju, lokalizaciji in izločanju katepsina B (5, 6, 8, 24, 26, 59).

Izražanje katepsina B je v tumorjih močno povečano (5, 26, 59, 60). Povečano izražanje v tumorskih celicah je posledica več mehanizmov, ki vključujejo povečano število kopij gena za katepsin B, povečano prepisovanje genske informacije in alternativno spajanje prepisov za encim ali uporabo alternativnih promotorjev, katerih rezultat je bolj učinkovito prevajanje ali spremenjena stabilnost mRNA (5, 24, 59). Izražanje katepsina B je povečano pri raku dojke, jajčnikov, materničnega vratu, prostate, mehurja, debelega črevesa in danke, želodca, trebušne slinavke, požiralnika, pljuč, možganov, glave in vratu, ščitnice ter pri melanomu. Pri teh oblikah raka je povečan tako proteinski nivo katepsina B kot tudi njegova aktivnost (8, 24, 26, 59, 61). Povišane vrednosti mRNA katepsina B so opazili pri raku prostate, debelega črevesa in danke, gliomu in melanomu (59). Izražanje katepsina B v tumorjih ni enakomerno povečano v vseh tumorskih celicah, temveč je predvsem povečano v tumorskih celicah, ki se nahajajo na invazivnih robovih tumorskega tkiva. Le-te so v stiku z ZCM in sodelujejo pri razgradnji bazalne membrane (26, 59, 61). Izražanje katepsina B je regulirano z interakcijami med tumorskimi celicami in celicami strome, kot so fibroblasti, endotelijske celice in celice vnetnega odziva ter prek interakcij celic s proteini ZCM, predvsem s kolagenom tipa I, ki lahko poveča izražanje in izločanje katepsina B (24, 59, 60, 62). Izražanje katepsina B pa ni povečano samo v tumorskih celicah, ampak tudi v s tumorjem povezanih celicah, kot so makrofagi, fibroblasti, epitelne celice in mioepitelne celice (5, 24, 61, 63).

V fizioloških pogojih obstaja ravnovesje med proteazami in njihovimi inhibitorji. Porušenje le-tega igra pomembno vlogo pri razvoju raka (15, 16, 26). Povečano izražanje encima ni uravnano s sočasnim povečanjem izražanja endogenih inhibitorjev, pri čemer se poruši njihovo razmerje, kar lahko vodi v povečano proteolizo in razgradnjo ZCM (6, 16, 26). Poleg tega endogeni inhibitorji slabše zavirajo katepsin B, ki se nahaja v tumorskih celicah, kot katepsin B v normalnih celicah, kar prav tako prispeva k nepravilni regulaciji njegovega delovanja (6).

Katepsin B se v normalnih celicah nahaja znotraj endosomov in lizosomov okrog jedra, kjer deluje kot eksopeptidaza. Pri tumorskih in transformiranih celicah se nahaja tudi v veziklih, razporejenih po celotni citoplazmi, in perifernih področjih celic, vezan na površino celic, ali pa se izloča iz celice v zunajcelično okolje. Katepsin B deluje predvsem kot endopeptidaza pri višjem pH zunajceličnega okolja, kar je pomembno zlasti pri njegovi

patološki vlogi (24, 28–30, 59, 61, 64, 65). Spremembo lokalizacije katepsina B so opazili pri raku dojke, debelega črevesa, požiralnika, želodca, pljuč in ščitnice (24, 59).

Katepsin B se na površini celic nahaja v področju kaveol, to je lipidnih raftov, ki tvorijo uvihke plazemske membrane, bogate s proteinom kaveolinom 1. Prokatepsin B je v kaveolah vezan na p11, lahko verigo aneksin II heterotetramera (AII<sub>t</sub>) (5, 59, 60, 66). Slednji je sestavljen iz dveh podenot lahke verige p11 in dveh podenot težke verige p36 (59, 66). AII<sub>t</sub> lahko veže heparin, kolagen tipa I, tenascin C in serinski proteazi plazminogen ter tPA (59, 60, 66). Poleg omenjenih proteinov se znotraj kaveol nahajajo še  $\beta$ 1-integrin, uPA in receptor za uPA (uPAR) ter metaloproteazi gelatinaza A (MMP-2) in transmembranska metaloproteaza (MT-MMP). Kaveole tako predstavljajo vezavne platforme za proteaze in njihove substrate na površini tumorskih celic ter tako pomembno prispevajo k razgradnji proteinov ZCM in s tem proteolitični aktivnosti na površini tumorskih celic (5, 59, 60, 66). Pomembno vezavno mesto za katepsin B na površini celic predstavljajo tudi glikozaminoglikani, kot je heparan sulfat, ki lahko z inhibicijo eksopeptidazne aktivnosti katepsina B potencira njegovo endopeptidazno aktivnost, ki je povezana z razgradnjo ZCM (59, 67).

Katepsin B se lahko iz tumorskih celic izloča v obliki prokatepsina B ali kot zrel encim, najpogosteje pa se zunaj celic nahaja v aktivni, enoverižni obliki (59, 61). Izločanje prokatepsina B je lahko posledica napak v normalnem razvrščanju lizosomov, kot je na primer odsotnost funkcionalnih manoza-6-fosfatnih receptorjev (59, 68). Takšne napake pa bi verjetno vplivale tudi na izločanje drugih encimov iz lizosomov, zato se predvideva, da je selektivno izločanje prokatepsina B posledica hkratnega povečanega izražanja katepsina B pri raku (59). Eden od možnih mehanizmov izločanja aktivnega katepsina B pa je lizosomska eksocitoza, do katere pride v kislem okolju tumorskega tkiva (59, 65). Lizosomska eksocitoza je prav tako neselektiven proces, kljub temu pa se ob sočasnem povečanju izražanja katepsina B iz tumorskih celic izloča predvsem katepsin B (59).

#### ***1.4.3.1 Katepsin B kot prognostični kazalec***

Katepsin B je lahko prognostični kazalec pri raku dojke, jajčnikov, debelega črevesa in danke, pljuč, možganov, glave in vratu ter pri melanomu (8, 15, 61). Pri teh oblikah raka ga lahko uporabljamo pri ocenjevanju preživetvene dobe, ocenjevanju tveganja za ponovitev bolezni ali smrt in pri spremljanju zdravljenja (8, 61). Višje serumske koncentracije katepsina B so povezane z napredovalimi oblikami bolezni, stopnja

preživetja je pa obratno sorazmerna z aktivnostjo encima (8, 24, 61). Višje koncentracije katepsina B so tako povezane z znatno krajšim preživetjem bolnikov. Višje koncentracije katepsina B so opazili tudi pri predtumorskih spremembah in v tkivih bolnikov s ponovitvijo bolezni po operativni odstranitvi tumorja (8, 24).

#### ***1.4.3.2 Vloga katepsina B pri invaziji in metastaziranju***

Invazija tumorskih celic vključuje pripenjanje tumorskih celic na bazalno membrano, lokalno razgradnjo ZCM in migracijo tumorskih celic skozi preoblikovan ZCM (24). ZCM je kompleksna mreža kolagenov, fibrilarnih glikoproteinov in proteoglikanov, ki določa strukturo tkiva in biološke pogoje v njem ter je v fizioloških pogojih neprehoden za večino celic (26). Da pride do metastaziranja tumorskih celic, morajo biti te sposobne prehoda iz primarnega mesta tumorja v krvne žile, preživetja v krvnem obtoku, prehoda v tarčna tkiva, kjer pride do nastanka sekundarnih tumorjev, invazije v okoliško tkivo in rasti (24, 69).

Katepsin B sodeluje pri invaziji tumorskih celic direktno z razgradnjo ZCM ter indirektno z aktivacijo drugih proteaz, ki razgrajujejo ZCM. Katepsin B direktno razgrajuje proteine ZCM (kolagen tipa IV, laminin in fibronektin) pri nevtralnem in kislem pH (26, 59, 61, 70, 71). V tumorskih tkivih je pH zunajceličnih tekočin v splošnem bolj kisel kot pri normalnih tkivih (24, 26). Katepsin B sodeluje tako pri zunajcelični kot pri znotrajcelični razgradnji ZCM, ki sta obe pomembni pri invaziji tumorskih celic (5, 24, 59, 61, 63, 64, 71, 72).

Pri zunajcelični razgradnji ZCM sodeluje katepsin B, ki je vezan na celično membrano in izločen v zunajcelično okolje (24). Zunaj celice lahko katepsin B aktivira pro-uPA v uPA, ki potem pretvori plazminogen v plazmin. Plazmin lahko razgrajuje proteine ZCM, kot so fibrin, fibronektin, proteoglikani in laminin, ter aktivira metaloproteaze, kot so črevesna kolagenaza (MMP-1), stromelizin-1 (MMP-3), gelatinaza B (MMP-9), metaloelastaza (MMP-12) in kolagenaza-3 (MMP-13) (24, 26, 60). Metaloproteaze lahko razgrajujejo različne komponente ZCM, vključno s kolagenom tipa I in IV in proteoglikani ter tudi aktivirajo druge metaloproteaze (24, 26). Katepsin B lahko poleg indirektno aktivacije metaloproteaz nekatere metaloproteaze, kot so MMP-1 in MMP-3, aktivira tudi direktno (24, 26, 60). Z aktivacijo MMP-3 katepsin B sproži aktivacijsko kaskado MMP-1 in gelatinaze A (MMP-2). Zaradi naštetega je katepsin B pomemben pozitiven regulator sistema pro-uPA/plazminogen in metaloproteaz (24, 26).

Znotrajcelična razgradnja ZCM s katepsinom B poteka v lizosomih po predhodni endocitozi delno razgrajenih komponent ZCM (5, 61, 64, 73). Podobno kot zunajcelična razgradnja tudi znotrajcelična razgradnja ZCM v tumorskih celicah vključuje cisteinske katepsine in uPA/uPAR sistem (5). Proteolitična sistema sta med seboj povezana prek uPARAP/Endo180, proteina iz družine makrofagnih manoznih receptorjev. uPARAP tvori trimolekularni kompleks s pro-uPA in uPAR ter je ključnega pomena za celični privzem kolagena in posledično njegovo razgradnjo v lizosomih s cisteinskimi katepsini (5, 74).

### ***1.4.3.3 Vloga katepsina B pri angiogenezi***

Angiogeneza je proces nastanka novih žil. Pomembna je za rast primarnih tumorjev in pri metastaziranju tumorskih celic (69). Nastanek novih žil je nujen za prehranjevanje in posledično rast tumorjev večjih od 1-2 mm (6, 24). Pri tumorjih, ki so dobro prekrvljeni je večja verjetnost, da tumorske celice vstopijo v krvni obtok in metastazirajo. Predvideva se tudi, da so novonastale žile znotraj tumorjev bolj prepustne za tumorske celice, kar tudi pripomore k lažjemu metastaziranju tumorjev (69). Proces angiogeneze je sestavljen iz proliferacije endotelijskih celic, razgradnje in preoblikovanja ZCM in migracije endotelijskih celic skozi preoblikovan ZCM (69, 75).

Katepsin B je prisoten v endotelijskih celicah novonastalih žil pri raku dojke, prostate, karcinomu in gliomu, ne najdemo pa ga v že obstoječem žilju (24). Velja za pospeševalca angiogeneze, saj z razgradnjo ZCM omogoča migracijo endotelijskih celic. Poleg tega pa lahko vpliva na razpoložljivost dejavnikov angiogeneze, kot je TGF- $\beta$ , ki je ključnega pomena za razvoj novih žil (6, 24, 76). Katepsin B lahko dejavnike angiogeneze aktivira direktno ali indirektno s proteolitičnim sproščanjem dejavnikov angiogeneze iz ZCM (24). Katepsin B pri angiogenezi sodeluje tudi z razgradnjo inhibitorjev metaloproteaz TIMP-1 in TIMP-2 ter tako poveča aktivnost metaloproteaz in posledično angiogenezo (77).

Dokazano je bilo, da lahko katepsin B tudi zavira angiogenezo. Katepsin B s proteolitično razgradnjo kolagena tipa XVIII sprosti endostatin, ki je dejavnik, ki zavira angiogenezo. Poleg tega katepsin B vpliva tudi na zmanjšano izražanje angiogenega dejavnika VEGF preko transkripcijskega faktorja HIF-1 $\alpha$ , ki je odvisen od prisotnosti kisika. Katepsin B zmanjša stabilnost HIF-1 $\alpha$  direktno s proteolitično razgradnjo ali indirektno preko razgradnje proteinov, kot je Hsp190, ki so potrebni za stabilnost HIF-1 $\alpha$ . Katepsin B lahko razgradnjo kolagena tipa XVIII in HIF-1 $\alpha$  aktivira tudi posredno z aktivacijo proteaz, ki direktno razgrajujejo te proteine (76). Proangiogena in antiangiogena aktivnost katepsina B

je odvisna od količine različnih endotelijskih rastnih dejavnikov ter od ravnovesja med temi dejavniki in katepsinom B (71).

## **1.5 INHIBITORJI KATEPSINA B**

### **1.5.1 Endogeni inhibitorji**

Endogeni inhibitorji imajo pomembno vlogo pri uravnavanju aktivnosti cisteinskih katepsinov (78). Med njihove endogene inhibitorje uvrščamo cistatine, propeptidne inhibitorje, tiropine in  $\alpha$ 2-makroglobulin (6, 32, 61, 78).

Cistatini predstavljajo najštevilčnejšo in najbolj opisano naddružino inhibitorjev cisteinskih proteaz, ki zajema veliko število homolognih proteinov (6, 32, 78, 79). Cistatini so reverzibilni kompetitivni, tesno prilegajoči se inhibitorji družine C1 cisteinskih proteaz (6, 79, 80). Endopeptidaze inhibirajo v pikomolarnem območju, eksopeptidaze pa v nanomolarnem območju (6). Glede na različne strukturne podrobnosti, razporeditev v telesu in fiziološko vlogo se delijo na tri družine, poleg teh poznamo še proteine, ki so strukturno podobni cistatinom, vendar niso inhibitorji proteaz (6, 32, 61, 78, 80). Cistatini imajo v svoji strukturi tri ohranjene strukturne motive, ki tvorijo klinasto strukturo in blokirajo aktivno mesto cisteinskih proteaz. Ti strukturni motivi so N-terminalni glicin, zanka glutamin-valin-glicin (Glu-Xaa-Val-Xaa-Gly) in Pro-Trp zanka na C-terminalnem delu (32, 61, 80).

Cistatini tipa 1, stefini, so polipeptidi sestavljeni iz ~100 aminokislin (11 kDa). Ne vsebujejo disulfidnih vezi in signalnega zaporedja ter niso glikozilirani. Najdemo jih predvsem znotraj celic, pojavljajo pa se lahko tudi v telesnih tekočinah (6, 61, 78, 80). Glavna predstavnik sta stefina A in B. Izražanje stefina A je omejeno samo na določene celice, posebno veliko ga je v koži in v nekaterih krvnih celicah, stefin B pa je široko izražen v različnih tipih celic in tkiv (78).

Cistatini tipa 2, cistatini, so večji, sestavljeni iz ~120 aminokislin (13-14 kDa) in vsebujejo dve disulfidni vezi v C-terminalnem delu molekule ter signalni peptid, ki je odgovoren za prehod v zunajcelično okolje (6, 61, 78, 80). Nekateri predstavniki so lahko glikozilirani (80). So zunajcelični inhibitorji, ki jih najdemo v telesnih tekočinah (6, 61, 78). V to skupino uvrščamo cistatine C, D, E/M, F, G (CRES), S, SA in SN (78). Najbolje raziskan cistatin je cistatin C, ki je hkrati tudi najmočnejši zunajcelični inhibitor cisteinskih proteaz (61, 78). Cistatini E/M, F in G (CRES) izkazujejo nizko stopnjo strukturnega ujemanja z

drugimi predstavniki te skupine in bi jih glede na to lahko uvrstili tudi v posebne podskupine (80).

Cistatini tipa 3, kininogeni, so proteini z večjo molekulsko maso (88-114 kDa). Kininogeni so glikozilirani in v svoji strukturi vsebujejo tri zaporedne ponovitve domene cistatinov tipa 2, od katerih lahko samo dve (domeni 2 in 3) inhibirata cisteinske proteaze (6, 61, 78, 80). Kininogene najdemo pretežno v krvi, v manjših koncentracijah pa jih lahko najdemo tudi v drugih telesnih tekočinah (78). Glede na dolžino C-terminalnega dela poznamo tri predstavnike kininogenov, to sta kininogena L in H, ki se razlikujeta v molekulski masi ter kininogen T, ki ga najdemo samo pri podganah (61, 78).

Cistatini imajo poleg svojih inhibitornih učinkov tudi druge učinke, ki lahko prav tako sodelujejo pri uravnavanju tumorjev. Takšen primer je cistatin C, ki interagira s TGF- $\beta$  II receptorjem in onemogoči vezavo TGF- $\beta$ , ki ima močno pro-tumorigeno delovanje. Cistatin fetuin A se je izkazal kot močan promotor rasti tumorskih celic, saj lahko na površini celic stabilizira metaloproteaze in tako poveča njihovo delovanje. Cistatini lahko tako v odvisnosti od posameznih okoliščin različno vplivajo na napredovanje tumorjev (80). Cistatini niso selektivni inhibitorji katepsina B, saj poleg njega inhibirajo tudi druge cisteinske katepsine (6). Zaradi prisotnosti zaporne zanke katepsin B inhibirajo šibkeje od drugih cisteinskih katepsinov (6, 28).

Kot inhibitor katepsina B deluje tudi njegov propeptid, ki je selektivni reverzibilni, počasi delujoči inhibitor (19, 25, 31, 32, 78). V aktivno mesto encima se propeptid veže v nasprotni smeri kot substrat (31, 32, 78). Poleg tega propeptid sodeluje pri pravilnem zvijanju in razvrščanju encima ter ga stabilizira, saj izguba propeptida vodi v nestabilnost encima pri nevtralnem in alkalnem pH in v njegovo ireverzibilno denaturacijo (19, 25, 78).

### **1.5.2 Eksogeni inhibitorji**

Glede na mehanizem delovanja eksogene inhibitorje katepsina B delimo na kovalentne in nekovalentne ter na reverzibilne in ireverzibilne. Razvoj novih inhibitorjev cisteinskih proteaz poteka z rešetanjem velikih knjižnic naravnih ali sinteznih spojin z *in vitro* preverjanjem stopnje inhibicije cisteinskih proteaz (14). Začetnem rešetanju sledi usmerjeno rešetanje manjših knjižnic spojin in modifikacija kemijske strukture zadetkov za doseganje optimalne inhibicije tarč (1, 14). V začetni fazi iskanja novih inhibitorjev se običajno uporablja tudi virtualno rešetanje knjižnic spojin in rešetanje na podlagi fragmentov (1). Inhibitorji imajo lahko širok spekter delovanja ali pa so specifični za

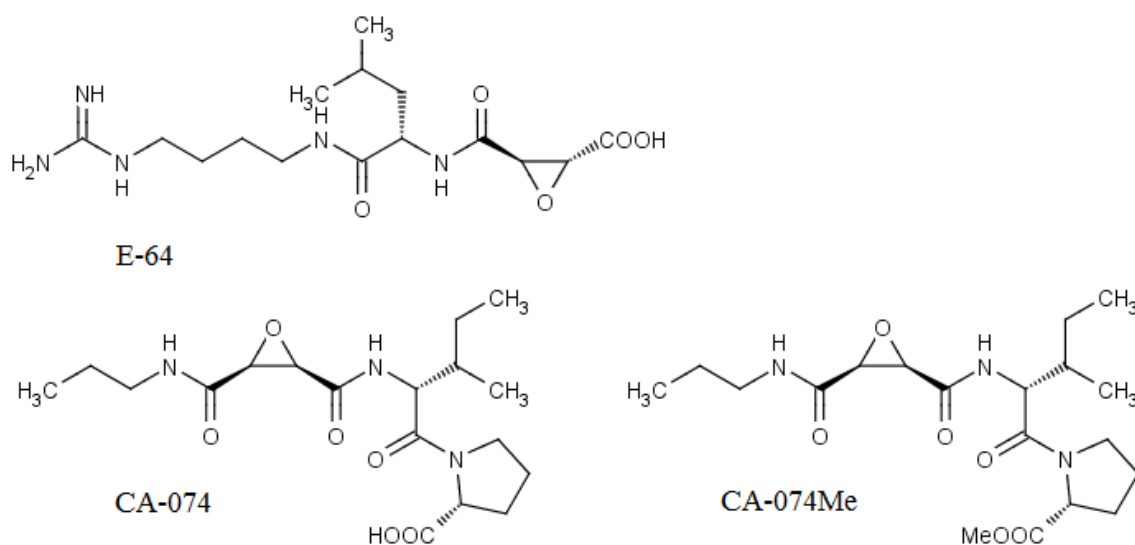


določen encim (14). V svoji strukturi običajno vsebujejo elektrofilne funkcionalne skupine, ki reagirajo s tiolno skupino Cys29 v aktivnem mestu encima. Katepsin B se od ostalih encimov iz papainske družine razlikuje po zaporni zanki, kar se izkorišča tudi pri iskanju specifičnih inhibitorjev katepsina B. Ti v svoji strukturi običajno vsebujejo peptidno zaporedje Leu-Pro-OH, ki interagira s His110 in His111 aminokislinskimi ostanki v zaporni zanki (79).

Inhibitorji katepsina B so lahko naravnega ali sinteznega izvora. Iz kopenskih mikroorganizmov so bili izolirani trije tipi naravnih inhibitorjev katepsinov peptidil aldehidi, aziridinski peptidi in epoksisukcinilni peptidi. Zaradi podobne terciarne strukture in specifičnosti za substrate proteaz iz papainske družine so ti inhibitorji večinoma neselektivni (79).

Epoksisukcinilni peptidi predstavljajo najbolj raziskano skupino inhibitorjev katepsina B (79). Eden prvih odkritih širokospektralnih inhibitorjev cisteinskih katepsinov je kovalentni ireverzibilni inhibitor E-64 (Slika 3), ki so ga izolirali iz plesni *Aspergillus japonicus* (14, 79, 81). Študije so pokazale, da E-64 učinkovito inhibira cisteinske proteaze *in vivo* in da se E-64 ter njegovi analogi v aktivno mesto vežejo v nasprotni smeri kot naravni substrat (14, 79). Epoksisukcinilni del ireverzibilno reagira s tiolno skupino cisteina v aktivnem mestu encima in ga tako inhibira (79, 81). Pri tem nukleofilna tiolna skupina cisteina napade reaktiven epoksidni obroč inhibitorja, ki se odpre, pri čemer pride do nastanka tioesterske kovalentne vezi (82). E-64 ima omejeno selektivnost za različne cisteinske proteaze, poleg cisteinskih katepsinov pa se lahko kovalentno veže tudi na druge sorodne proteaze, kot so kalpainsi. Na podlagi strukture E-64 so pripravili derivate z ožjim spektrom delovanja, ki so bolj selektivni za posamezne katepsine (14, 79). Značilen predstavnik selektivnih ireverzibilnih kovalentnih epoksisukcinilnih inhibitorjev katepsina B je CA-074 (79, 83). CA-074 (Slika 3) in njegovi derivati, ki imajo na epoksidnem obroču vezano estersko ali amidno skupino in hkrati prosto karboksilno skupino na C-terminalnem delu molekule, ki interagira s pozitivno nabitimi His110 in His111 katepsina B, so učinkoviti in selektivni inhibitorji katepsina B (79, 82, 83). CA-074 se veže v aktivno mesto v isti smeri kot substrat in izkazuje nekajkrat večjo selektivnost za inhibicijo katepsina B kot za ostale katepsine (79, 84). Zaradi svoje peptidne strukture in proste karboksilne skupine ne prehaja celične membrane in deluje na zunajcelični ter na membrano vezani katepsin B, nima pa vpliva na znotrajcelični katepsin B (79, 85). Zaradi

tega inhibira samo zunajcelično razgradnjo proteinov ZCM s katepsinom B, ker pa ne vpliva na katepsin B znotraj celic, ne inhibira znotrajcelične razgradnje proteinov ZCM (79, 83, 85). Da bi izboljšali prehajanje preko celične membrane in tako inhibicijo znotrajceličnega katepsina B so pripravili njegov metilni ester CA-074Me (Slika 3). CA-074Me je slabši in manj selektiven inhibitor katepsina B kot CA-074, ki ga nespecifične esteraze po prehodu v celico hidrolizirajo do specifičnega inhibitorja katepsina B CA-074 (85).



Slika 3: Strukture epoksisukcinilnih inhibitorjev E-64, CA-074 in CA-074Me.

Poleg epoksisukcinilnih inhibitorjev med ireverzibilne inhibitorje katepsina B uvrščamo še aziridine, 1,2,4-tiadiazole, aciloksimetilketone,  $\beta$ -laktame, vinil sulfone in organotelurijeve (IV) spojine (14, 79).

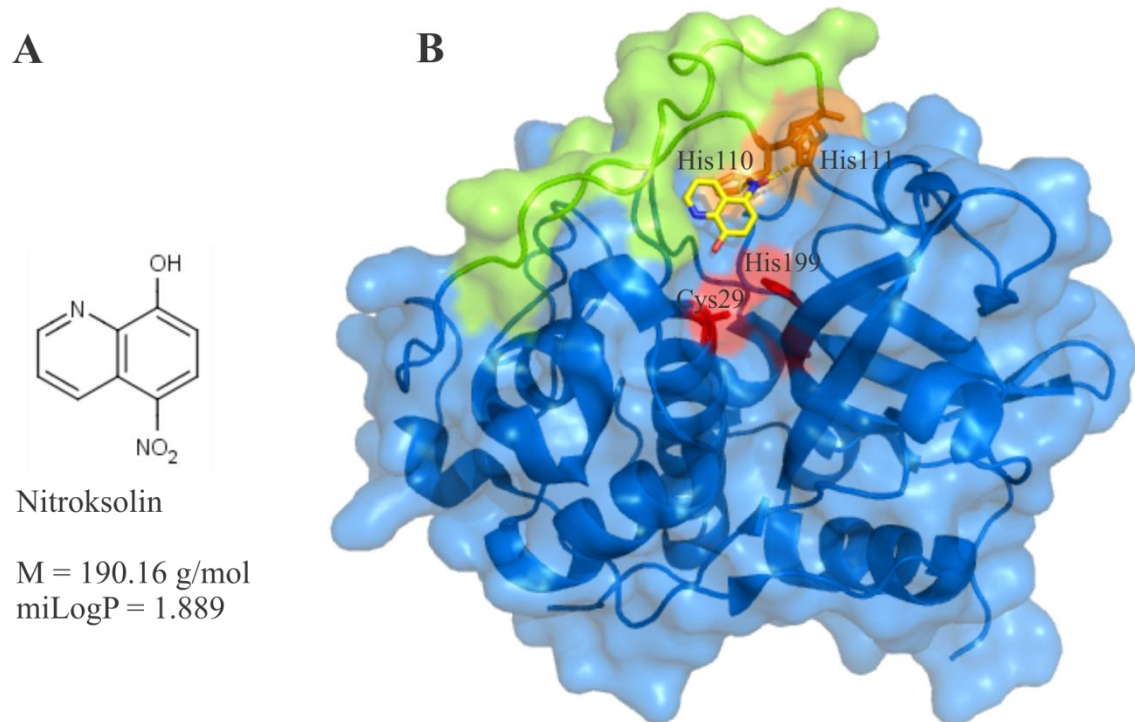
Problem ireverzibilnih inhibitorjev je predvsem selektivnost, saj se zaradi reaktivne skupine v svoji strukturi lahko vežejo tudi na druge proteine. Zaradi tega razloga so manj uporabni v terapiji, imajo pa pomembno vlogo pri proučevanju encimov (1).

Reverzibilni inhibitorji imajo v primerjavi z ireverzibilnimi običajno manjšo toksičnost. Glede na strukturo so reverzibilni inhibitorji alhidi, peptidil alhidi, ketoni, ciklopropenoni, ciklični kompleksi kovin in nitrili. Te spojine se prav tako kovalentno vežejo na katepsin B, vendar z njimi tvorijo reverzibilne intermediate (79).

Glavni problem inhibitorjev, ki v svoji strukturi vsebujejo peptidno zaporedje, tako ireverzibilnih kot tudi reverzibilnih, je slaba biološka uporabnost. Temu pa se lahko izognemo z uporabo nepeptidnih spojin kot proteaznih inhibitorjev (1).

Idealen proteazni inhibitor je nekovalenten reverzibilen inhibitor, ki je bolj selektiven in ima manj stranskih učinkov kot kovalentni inhibitorji (1). Med nekovalentne inhibitorje katepsina B uvrščamo nepeptidne naravne spojine biflavone (79, 86, 87). Ti so učinkoviti selektivni reverzibilni nekovalentni inhibitorji, ki selektivno inhibirajo endopeptidazno aktivnost katepsina B (86, 87). Med nekovalentne in nepeptidne reverzibilne inhibitorje katepsina B prištevamo še [2-[2-(2,4-diokso-1,3-tiazolidin-3-il)etilamino]-2-oksoetil]-2-(furan-2-karbonilamino) acetat, 4,6-bis(benziltio)-1,3,5-triazin-2(1*H*)-one in nitroksolin (88–90).

Nitroksolin (5-nitro-8-hidroksikinolin) (Slika 4A), je dobro znana protimikrobna spojina, ki se uporablja pri terapiji infekcij urinarnega trakta (91). Je nekovalenten reverzibilen inhibitor katepsina B, ki selektivno inhibira endopeptidazno aktivnost katepsina B v nizko mikromolarnem območju. Nitroksolin se veže v S2' podenoto aktivnega mesta katepsina B. Negativno nabita nitro skupina nitroksolina simetrično interagira s His110 in His111 v zaporni zanki encima in je ključnega pomena za njegovo vezavo na katepsin B (Slika 4B). Nitroksolin dobro prehaja celično membrano in tako značilno inhibira zunajcelično in znotrajcelično razgradnjo proteinov ZCM ter tumorsko invazijo. Kot uveljavljena protimikrobna učinkovina ima nitroksolin znano farmakokinetiko, biološko uporabnost in toksikološki profil ter tako predstavlja obetavno izhodišče za razvoj novih inhibitorjev katepsina B, primernih za klinično uporabo (90).



Slika 4: A) Struktura nitroksolina, njegova molska masa in porazdelitveni koeficient. Porazdelitveni koeficient je izračunan s programom Molinspiration ([www.molinspiration.com](http://www.molinspiration.com)). B) Struktura kompleksa nitroksolina s katepsinom B (PDB koda: 3AI8). Nitroksolin je označen z rumeno, aminokislini His110 in His111 sta označeni z oranžno, povezave med nitro skupino in His110 in His111 so označene z rumeno, zaporna zanka je označena z zeleno, aminokislini Cys29 in His199, ki tvorita aktivno mesto, sta označeni z rdečo, telo encima pa je modro.

## 2 NAMEN DELA IN DELOVNA HIPOTEZA

Katepsin B ima eksopeptidazno in endopeptidazno aktivnost, kar je posledica prisotnosti zaporne zanke v njegovi strukturi in po čemer se razlikuje od papaina in ostalih katepsinov. V organizmu ima pomembno vlogo v številnih fizioloških in patoloških procesih in je že znana tarča pri zdravljenju raka. Eksopeptidazna aktivnost katepsina B je povezana z njegovo fiziološko funkcijo znotraj lizosomov, medtem ko je endopeptidazna aktivnost povezana z njegovo patološko vlogo. Slednja je bistvenega pomena pri razgradnji zunajceličnega matriksa in posledično pri tumorski invaziji in metastaziranju. S selektivno inhibicijo endopeptidazne aktivnosti katepsina B bi tako lahko zmanjšali razgradnjo zunajceličnega matriksa in s tem napredovanje raka.

Namen diplomske naloge je ovrednotiti vpliv izbranih derivatov nitroksolina na inhibicijo endopeptidazne in eksopeptidazne aktivnosti katepsina B ter njihov vpliv na razgradnjo zunajceličnega matriksa in posledično tumorsko invazijo.

V prvem delu bomo z encimsko kinetiko določili konstante inhibicije za izbrane inhibitorje napram endopeptidazni in eksopeptidazni aktivnosti katepsina B in napram katepsinoma H in L. V nadaljevanju bomo s funkcijskimi testi na celični liniji MCF-10A neoT določili vpliv inhibitorjev na zunajcelično in znotrajcelično razgradnjo proteinov zunajceličnega matriksa ter njihov vpliv na tumorsko invazijo v 2D *in vitro* modelu celične invazije. Poleg tega bomo s pomočjo celične linije MMTV-PyMT določili še vpliv inhibitorjev na invazijo celic v 3D *in vitro* modelu, ki temelji na implantaciji sferoidov v Matrigel™.

V okviru diplomske naloge bomo skušali potrditi hipotezo, da lahko s selektivno inhibicijo endopeptidazne oziroma eksopeptidazne aktivnosti katepsina B vplivamo na fenotipske lastnosti tumorskih celic.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Kemikalije in reagenti

- Abz-GIVRAK(Dnp)-OH (Abz-Gly-Ile-Val-Arg-Ala-Lys(Dnp)-OH) (Bachem, Bubendorf, Švica)
- Advanced DMEM (Gibco Invitrogen™, Carlsbad, CA, ZDA)
- CA-074 (Peptide Institute, Inc., Osaka, Japonska)
- CA-074Me (Peptide Institute, Inc., Osaka, Japonska)
- DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- DQ-kolagen IV (Gibco Invitrogen™, Carlsbad, CA, ZDA)
- EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- EGF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- F-12 (Gibco Invitrogen™, Carlsbad, CA, ZDA)
- FBS (HyClone, Logan, UT, ZDA)
- fibronektin (Calbiochem, Darmstadt, Nemčija)
- hidrokortizon (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- inzulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- L-cistein (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- Matrigel™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, ZDA)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- natrijev acetat, brezvodni (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- $\text{NaHCO}_3$  (Riedel – deHaën, Seelze, Nemčija)
- nigrozin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- očetna kislina (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)

- PEG 8000 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- penicilin/streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- propidijev jodid (Gibco Invitrogen™, Carlsbad, CA, ZDA)
- R-AMC (Arg-AMC) (Biomol, Farmingdale, NY, ZDA)
- tripsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- Z-FR-AMC (Z-Phe-Arg-AMC) (Bachm, Bubendorf, Švica)
- Z-RR-AMC (Z-Arg-Arg-AMC) (Bachm, Bubendorf, Švica)

### **3.1.2 Aparature**

- analitska tehnica AB104 (Mettler toledo, Greifensee, Švica)
- avtomatska multikanalna pipeta (Biohit, Helsinki, Finska)
- avtomatske pipete (Biohit, Helsinki, Finska)
- centrifuga Heraeus Megafuge 16R (Thermo scientific, Rochester, NY, ZDA)
- centrifugalni koncentrador Capsulefuge PMC-060 (Tomy, Tokio, Japonska)
- CO<sub>2</sub> inkubator (celični inkubator) CB 210 Binder (Binder, Tuttlingen, Nemčija)
- čitalec mikrotitrskih ploščic Tecan Safire<sup>2</sup>™ (Tecan Group Ltd., Männedorf, Švica)
- fluorescenčni mikroskop Olympus IX 81 motorized inverted microscope (Olympus, Center Valley, PA, ZDA)
- inkubator WTB Binder (Binder, Tuttlingen, Nemčija)
- komora z laminarnim pretokom zraka PIO SMBC 183AV, PIO LFVP9 (Iskra, Ljubljana, Slovenija)
- citometer za štetje celic Tiefe Depth profandeur – Thomba (Brand, Wertheim, Nemčija)
- magnetno mešalo Rotamix 550MM (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- mikroskop Nikon TMS-F (Nikon, Tokio, Japonska)
- mikroskop Olympus CKXSP (Olympus, Center Valley, PA, ZDA)
- mikroskop Olympus CX21FS1 (Olympus, Center Valley, PA, ZDA)
- pH meter (Hanna instruments, Woonsocket, Rhode Island, ZDA)
- pipete (Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- pretočni citometer BD FASCcalibur™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, ZDA)
- tehnica PB 3001 (Mettler toledo, Greifensee, Švica)
- vibracijski mešalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

- xCELLigence RT-CA DP System (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija)

### **3.1.3 Raztopine**

#### 100 mM fosfatni pufer za endopeptidazno aktivnost katepsina B, pH=6.0

6.07 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O

1.07 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

0.50 g PEG 8000

S prečiščeno vodo dopolnimo do 500 ml in uravnamo pH na 6.0.

#### 60 mM acetatni pufer za eksopeptidazno aktivnost katepsina B, pH=5.0

0.65 g očetna kislina

1.58 g natrijev acetat

0.50 g PEG 8000

S prečiščeno vodo dopolnimo do 500 ml in uravnamo pH na 5.0.

#### 100mM fosfatni pufer za katepsin H, pH=6.8

3.71 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O

4.12 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

0.50 g PEG 8000

S prečiščeno vodo dopolnimo do 500 ml in uravnamo pH na 6.8.

#### 100 mM acetatni pufer za katepsin L, pH=5.5

0.45 g očetna kislina

3.48 g natrijev acetat

0.50 g PEG 8000

S prečiščeno vodo dopolnimo do 500 ml in uravnamo pH na 5.5.

#### Aktivacijski pufri za katepsine (5 mM cistein, 1.5 mM EDTA)

30.29 mg cistein

27.9 mg EDTA

Dopolnimo s pufrom za ustrezen katepsin do 50 ml.



#### 0.02 % EDTA v PBS

500 ml          PBS

537  $\mu$ l          0.5 M EDTA, pH=8.0

K 500 ml PBS dodamo 0.5 M EDTA in sterilno filtriramo.

#### PBS

1.8 g            Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

0.24 g          KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

8.0 g            NaCl

0.2 g            KCl

S prečiščeno vodo dopolnimo do 1000 ml in uravnamo pH na 7.4.

#### 0.5 M EDTA, pH=8.0

1.86 g          EDTA

S prečiščeno vodo dopolnimo do 10 ml in uravnamo pH na 8.0.

#### F-12

10.63 g        F-12

1.176 g        NaHCO<sub>3</sub>

S prečiščeno vodo dopolnimo do 1000 ml in sterilno filtriramo.

### **3.1.4 Encimi**

- Humani rekombinantni katepsin B (Inštitut Jožef Štefan, Ljubljana, Slovenija)
- Katepsin H (Inštitut Jožef Štefan, Ljubljana, Slovenija)
- Katepsin L (Inštitut Jožef Štefan, Ljubljana, Slovenija)

### **3.1.5 Inhibitorji**

Tabela I: Uporabljeni inhibitorji katepsina B, njihovo IUPAC ime, struktura, molska masa in porazdelitveni koeficient. Porazdelitveni koeficient je izračunan s programom Molinspiration ([www.molinspiration.com](http://www.molinspiration.com)).  
Spojine **1** – **6** so bile sintetizirane na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo.

Spojina	IUPAC ime	Struktura	M [g/mol]	miLogP
CA-074	L-3-trans-(propilkarbamoiloksiran-2-karbonil)-L-izolevcin-L-prolin		383.44	-1.634
CA-074Me	L-3-trans-(propilkarbamoiloksiran-2-karbonil)-L-izolevcin-L-prolin metilni ester		397.47	0.438
1	2-bromo-4-nitronaftalen-1-amin		267.08	3.228
2	2-[[8-hidroksi-5-nitrokinolin-7-il)metil]amino}acetonitril		258.27	1.161
3	1-(4-nitronaftalen-1-il)pirolidin		242.27	3.513
4	8-(4-metilpiperidin-1-il)-5-nitrokinolin		271.32	3.360
5	5-nitro-7-(pirolidin-1-ilmetil)kinolin-8-ol		273.29	2.023
6	7-[(4-metilpiperidil-1-il)metil]-5-nitrokinolin-8-ol		301.34	2.770

### 3.1.6 Gojišča

Tabela II: Sestava gojišč za gojenje in zamrzovanje celic.

Celična linija	MCF-10A neoT	MMTV-PyMT
Osnovno gojišče	ADMEM / F-12 (1:1)	ADMEM
Kompletno gojišče (100 ml)	47 ml F-12 47 ml ADMEM 5 ml FBS 1 ml penicilin/streptomycin 1 ml L-glutamin 100 µl inzulin 50 µl hidrokortizon 40 µl EGF	88 ml ADMEM 10 ml FBS 1 ml penicilin/streptomycin 1 ml L-glutamin
Gojišče za zamrzovanje (1 ml)	250 µl ADMEM 250 µl F-12 400 µl FBS 100 µl DMSO	950 µl osnovno gojišče DMEM 50 µl DMSO
Brezserumsko gojišče	47 ml F-12 47 ml DMEM 1 ml penicilin/streptomycin 1 ml L-glutamin 100 µl inzulin 50 µl hidrokortizon 40 µl EGF	88 ml ADMEM 1 ml penicilin/streptomycin 1 ml L-glutamin

Proizvajalci gojišč in dodatkov za gojišča:

- ADMEM (Gibco Invitrogen™, Carlsbad, CA, ZDA)
- DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- EGF (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- F-12 (Gibco Invitrogen™, Carlsbad, CA, ZDA)
- FBS (HyClone, Logan, UT, ZDA)
- hidrokortizon (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- inzulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)
- L-glutamin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)

- penicilin/streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA)

### **3.1.7 Celične linije**

#### MCF-10A neoT

MCF-10A neoT je s c-Ha-Ras onkogenom transfecirana epiteljska celična linija dojke. Izvira iz humane epiteljske celične linije dojke MCF-10, ki je pridobljena iz tkiva bolnice s fibrocistično boleznijo dojke. Celična linija MCF-10 je v celični kulturi postala spontano nesmrtna. V prisotnosti normalnih količin kalcija raste pritrjena kot celična linija MCF-10A, v odsotnosti kalcija pa raste v suspenziji kot celična linija MCF-10F (92). Celična linija MCF-10A neoT je nastala s kotransfekcijo celic MCF-10A s plazmidom, ki je vseboval gen za rezistenco na neomicin in onkogen c-Ha-Ras z mutacijo humane oblike T24 (93).

#### MMTV-PyMT

MMTV-PyMT je celična linija mišjega modela epiteljskega raka dojke. Preoblikovanje epitelija dojke je posledica izražanja polioma virusa srednjega antigena T (PyMT), ki je pod transkripcijskim nadzorom promotorja mišjega virusa tumorja dojke (MMTV) (94).

## **3.2 METODE**

### **3.2.1 Encimska kinetika**

#### **3.2.1.1 Testiranje inhibitorjev na endopeptidazno aktivnost katepsina B**

V črno mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami Nuncleon™ Delta Surface (Nunc™, Thermo Scientific, Rochester, NY, ZDA) smo dodali 5 µl substrata Z-RR-AMC v treh koncentracijah 60, 180 in 360 µM in 5 µl inhibitorja v sedmih koncentracijah 0, 20, 40, 60, 80, 100 in 200 µM. Reakcijo smo sprožili z dodatkom 90 µl katepsina B s končno koncentracijo 0.1 nM, ki smo ga predhodno inkubirali z aktivacijskim pufrom 5 min pri 37°C. Pri reakciji je prišlo do nastanka fluorescenčnega produkta AMC, ki smo ga na čitalcu mikrotitrskih ploščic Tecan Safire<sup>2</sup>™ neprekinjeno spremljali pri valovni dolžini 460 nm ± 10 nm z vzbujanjem pri valovni dolžini 380 nm ± 20 nm pri 37°C. Vse reakcijske mešanice so vsebovale 5 % (v/v) DMSO. Vse meritve smo izvajali v dveh

paralelah in vsaj dveh ponovitvah. Vrednosti  $K_i$  smo izračunali z uporabo SigmaPlot® 11, Enzyme Kinetics Module™ 1.3.

### **3.2.1.2 Testiranje inhibitorjev na eksopeptidazno aktivnost katepsina B**

V črno mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami Nuncleon™ Delta Surface smo dodali 5  $\mu$ l substrata Abz-GIVRAK(Dnp)-OH v treh koncentracijah 1, 3 in 6  $\mu$ M in 5  $\mu$ l inhibitorja v sedmih koncentracijah 0, 20, 40, 60, 80, 100 in 200  $\mu$ M. Reakcijo smo sprožili z dodatkom 90  $\mu$ l katepsina B s končno koncentracijo 0.6 nM, ki smo ga predhodno inkubirali z aktivacijskim puffrom 5 min pri 37°C. Pri reakciji je prišlo do nastanka fluorescenčnega razpadnega produkta, ki smo ga na čitalcu mikrotitrskih ploščic Tecan Safire<sup>2</sup>™ neprekinjeno spremljali pri valovni dolžini 420 nm  $\pm$  10 nm z vzbujanjem pri valovni dolžini 320 nm  $\pm$  20 nm pri 37°C. Vse reakcijske mešanice so vsebovale 5 % (v/v) DMSO. Vse meritve smo izvajali v dveh paralelah in vsaj dveh ponovitvah. Vrednosti  $K_i$  smo izračunali z uporabo SigmaPlot® 11, Enzyme Kinetics Module™ 1.3.

### **3.2.1.3 Testiranje inhibitorjev na katepsin H in katepsin L**

V črno mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami Nuncleon™ Delta Surface smo dodali 5  $\mu$ l substrata v treh koncentracijah in 5  $\mu$ l inhibitorja v sedmih koncentracijah 0, 20, 40, 60, 80, 100 in 200  $\mu$ M. Za katepsin H smo uporabili substrat R-AMC v koncentracijah 20, 80 in 160  $\mu$ M, za katepsin L pa substrat Z-FR-AMC v koncentracijah 0.5, 1 in 4  $\mu$ M. Reakcijo smo sprožili z dodatkom 90  $\mu$ l katepsina H s končno koncentracijo 3.0 nM oziroma katepsina L s končno koncentracijo 0.5 nM, ki smo ga predhodno inkubirali z aktivacijskim puffrom 5 min pri 37°C. Pri reakciji je prišlo do nastanka fluorescenčnega produkta AMC, ki smo ga na čitalcu mikrotitrskih ploščic Tecan Safire<sup>2</sup>™ neprekinjeno spremljali pri valovni dolžini 460 nm  $\pm$  10 nm z vzbujanjem pri valovni dolžini 380 nm  $\pm$  20 nm pri 37°C. Vse reakcijske mešanice so vsebovale 5 % (v/v) DMSO. Vse meritve smo izvajali v dveh paralelah in vsaj dveh ponovitvah. Vrednosti  $K_i$  smo izračunali z uporabo SigmaPlot® 11, Enzyme Kinetics Module™ 1.3.

## **3.2.2 Gojenje celic**

Celice smo gojili v plastenkah v ustreznem gojišču pri 37°C in v atmosferi, nasičeni z vlago in s 5 % CO<sub>2</sub>. Delo s celicami je vedno potekalo v sterilnih pogojih. Ko so celice

prerastle približno 80 % površine plastenke, smo jih s tripsinizacijo odlepili od podlage in redčili.

### **3.2.3 Odmrzovanje celic**

Celice smo odmrzovali na hitro, tako da smo ampule s celicami potopili v vodno kopel, segreto na 37°C. Na ta način smo preprečili toksične učinke DMSO iz gojišča za zamrzovanje na celice. Odmrznjene celice smo takoj resuspendirali v 10 ml ustreznega kompletnega gojišča in jih centrifugirali 5 min pri 1200 obratih/min in temperaturi 4°C. Po centrifugiranju smo supernatant takoj zavrgli, celice pa resuspendirali v 1 ml ustreznega svežega kompletnega gojišča in jih prenesli v plastenke.

### **3.2.4 Tripsinizacija celic**

S tripsinizacijo smo odlepili celice od podlage, da smo jih lahko redčili in uporabili za nadaljnje poskuse. Celicam smo najprej odstranili gojišče, ga zavrgli in celice sprali s 5 ml PBS, da smo odstranili serum, ki bi lahko inhibiral tripsin. Nato smo celicam dodali 5 ml raztopine 0.05 % tripsina in 0.02 % EDTA v PBS in jih postavili v inkubator za približno 5 min, da so se odlepile od podlage. Odlepljanje celic od podlage smo spremljali pod mikroskopom. Odlepljene celice smo resuspendirali v 5 ml ustreznega kompletnega gojišča, da smo inaktivirali tripsin, in jih centrifugirali 5 min pri 2000 obratih/min. Supernatant smo odlili, celice resuspendirali v 1 ml ustreznega gojišča, jih po potrebi še redčili, prešteli in uporabili za nadaljnje delo.

### **3.2.5 Štetje celic**

Število celic smo določili s citometrom, celice pa smo prešteli pod mikroskopom. 100 µl celične suspenzije smo dodali 100 µl 0.2 % raztopine nigrozina, barvila, ki omogoča ločevanje živih celic z nepoškodovano celično membrano od odmrlih in poškodovanih celic. Nigrozin ne prehaja celične membrane, zato se žive celice z nepoškodovano membrano ne obarvajo, prehaja pa v odmrle in poškodovane celice, ki nimajo selektivnega transporta na membrani, in jih obarva modro. Pod mikroskopom smo prešteli samo žive, neobarvane celice v vsakem kvadrantu posebej in njihovo število izračunali po enačbi (*Enačba 1*).

$$\text{število celic} = (N_1 + N_2) \cdot 0.5 \cdot R \cdot 10^4 \quad (\text{Enačba 1})$$

$N_1, N_2$       število celic v posameznem kvadrantu

$R$             faktor redčitve

$10^4$           faktor izdelovalca komore za štetje celic

### 3.2.6 Zamrzovanje celic

Celice smo tirpsinizirali in jih centrifugirali 5 min pri 2000 obratih/min. Supernatant smo zavrgli, celice pa resuspendirali v 1 ml ustreznega gojišča za zamrzovanje in suspenzijo prenesli v ampule za zamrzovanje. Celice smo postopoma zamrzovali najprej en dan v zamrzovalniku na  $-80^\circ\text{C}$  in nato v tekočem dušiku na  $-196^\circ\text{C}$ . Gojišča za zamrzovanje celic vsebujejo DMSO, ki ima vlogo krioprotektanta in preprečuje nastanek kristalov.

### 3.2.7 Vpliv inhibitorjev na viabilnost celic

Vpliv inhibitorjev na viabilnost celic smo kontinuirano opazovali z merjenjem električne upornosti, izražene kot celični indeks, na aparatu xCELLigence RT-CA DP System. Do spremembe električne upornosti pride, ko se celice pritrjujejo na zlate mikroelektrode, ki se nahajajo na dnu vdolbinic E-plošč. Poskus je potekal v inkubatorju pri  $37^\circ\text{C}$  in v atmosferi nasičeni z vlago in s 5 %  $\text{CO}_2$ . V E-ploščo s 16 vdolbinicami (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija) smo najprej dodali 50  $\mu\text{l}$  ustreznega kompletnega gojišča in pomerili ozadje. Nato smo dodali 100  $\mu\text{l}$  celične suspenzije, s koncentracijo 7500 celic / 100  $\mu\text{l}$  in pustili celice rasti 10 ur, da so prišle v logaritemsko fazo rasti. Aparat je celični indeks izmeril na vsakih 15 min. Po 10-ih urah smo dodali 50  $\mu\text{l}$  inhibitorja v ustreznem kompletnem gojišču s končnimi koncentracijami 1.25, 2.5 in 5.0  $\mu\text{M}$  za celice MCF-10A neoT ter koncentracijama 2.5 in 5.0  $\mu\text{M}$  za celice MMTV-PyMT. Kot negativno kontrolo smo pri poskusu uporabili DMSO. Končni volumen v vdolbinicah je bil 200  $\mu\text{M}$ . Vpliv inhibitorjev na viabilnost celic smo spremljali 72 ur. V vmesne prostore med vdolbinicami E-plošče smo dodali sterilno filtrirano vodo, da smo zmanjšali izhlapevanje gojišča iz vdolbinic. Po 24-ih in 48-ih urah od dodatka inhibitorjev smo poskus začasno prekinili in zamenjali 150  $\mu\text{l}$  gojišča s svežim kompletnim gojiščem z ustrežno koncentracijo inhibitorja. Na ta način smo preprečili, da bi celicam zmanjkalo hranilnih snovi iz gojišča tekom trajanja poskusa. Za vsak inhibitor in vsako koncentracijo smo poskus izvedli v 4 paralelah.

### **3.2.8 Zunajcelična razgradnja DQ-kolagena IV**

V mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami smo nasadili  $5 \cdot 10^4$  celic MCF-10A neoT v kompletnem gojišču in jih inkubirali v celičnem inkubatorju čez noč pri  $37^\circ\text{C}$ , da so se pritrdile. Odstranili smo gojišče in k celicam dodali 100  $\mu\text{l}$  PBS z DQ-kolagenom IV s koncentracijo 10  $\mu\text{g/ml}$  in 5  $\mu\text{M}$  inhibitorja ter inkubirali 6 ur. Kot negativno kontrolo smo pri poskusu uporabili DMSO. Nato smo odvzeli 80  $\mu\text{l}$  PBS in ga prenesli v črno mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami Nuncleon™ Delta Surface. Intenziteto fluorescence, ki se je pojavila kot posledica razgradnje DQ-kolagena IV, smo neprekinjeno spremljali na čitalcu mikrotitrskih ploščic Tecan Safire<sup>2</sup>™ pri valovni dolžini  $515 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$  z vzbujanjem pri valovni dolžini  $495 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$  in pri  $37^\circ\text{C}$ . Za vsak inhibitor smo se vplivu ozadja izognili z uporabo slepega vzorca, ki je imel enako sestavo kot naš vzorec, le da ni vseboval celic. Meritve smo za vsak vzorec izvedli v šestih paralelah in v štirih paralelah za slepe vzorce. Izvedli smo štiri neodvisne ponovitve poskusa.

### **3.2.9 Znotrajcelična razgradnja DQ-kolagena IV**

V ploščo s 24 vdolbinicami smo nasadili  $6 \cdot 10^4$  celic MCF-10A neoT v kompletnem gojišču in jih inkubirali v celičnem inkubatorju čez noč pri  $37^\circ\text{C}$ , da so se pritrdile. Nato smo odstranili gojišče in ga nadomestili z brezserumskim gojiščem, ki je vsebovalo 50  $\mu\text{M}$  inhibitorja. Kot negativno kontrolo smo pri poskusu uporabili DMSO. Po dveh urah inkubacije smo dodali DQ-kolagen IV s koncentracijo 5  $\mu\text{g/ml}$  in inkubirali še 2 uri. Nato smo odstranili gojišče z inhibitorjem in DQ-kolagenom IV, celice sprali s 500  $\mu\text{l}$  0.02 % EDTA v PBS in tripsinizirali celice s 500  $\mu\text{l}$  0.05 % tripsina v 0.02 % EDTA v PBS 5 min pri  $37^\circ\text{C}$ . Odlepljene celice smo nato prenesli v epruvete za pretočno citometrijo, vdolbinice mikrotitrške plošče pa smo še enkrat sprali s 500  $\mu\text{l}$  0.02 % EDTA v PBS, ki smo jih prav tako prenesli v epruvete za pretočno citometrijo. V vsako epruveto smo nato dodali še po 1 ml PBS in centrifugirali 5 min pri 2000 obratih/min. Supernatant smo odlili, celice pa z vibracijskim mešalnikom resuspendirali, dodali 100  $\mu\text{l}$  PBS in 10  $\mu\text{l}$  propidijevega jodida s koncentracijo 100  $\mu\text{g/ml}$  ter postavili epruvete na led. Meritve smo izvedli na pretočnem citometru BD FASCcalibur™, rezultate pa smo obdelali s programom FlowJo 7.6.1. Pri meritvah smo upoštevali samo žive celice s pomočjo propidijevega jodida. Vse meritve smo izvedli v dveh paralelah. Izvedli smo tri neodvisne ponovitve poskusa.



### 3.2.10 Fluorescenčna mikroskopija

Vdolbinice ohlajene plošče za mikroskopijo Lab-Tek™ Chambered Coverglass (NALGENE, Nunc™, Thermo Scientific, Rochester, NY, ZDA) smo prekrili s 40 µl Matrigela™, ki je vseboval 25 µg/ml DQ-kolagena IV in inkubirali 10 min pri 37°C. Dodali smo 400 µl celične suspenzije MCF-10A neoT v brezserumskem gojišču s koncentracijo  $5 \cdot 10^4$  celic/ml, ki je vsebovala še 5 µM inhibitorja in 2 % Matrigela™. Kot negativno kontrolo smo uporabili DMSO. Vzorce smo inkubirali v celičnem inkubatorju pri 37°C in po 24-ih urah opazovali razgradnjo DQ-kolagena IV na fluorescenčnem mikroskopu Olympus IX 81 s programom Cell^R.

### 3.2.11 2D *in vitro* model invazije celic MCF-10A neoT

Vpliv inhibitorjev na invazijo celic MCF-10A neoT smo kontinuirano opazovali s pomočjo aparature xCELLigence RT-CA DP System. Poskus smo izvajali v CIM ploščah s 16 vdolbinicami (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Nemčija), ki omogočajo spremljanje celične invazije in migracije. CIM plošča je sestavljena iz dveh delov, spodnje in zgornje plošče. Do porasta v električni upornosti pride, ko celice invadirajo skozi pore vdolbinic zgornje plošče in se pritrdijo na zlate mikroelektrode, ki se nahajajo na spodnji strani vdolbinic zgornje plošče CIM plošče. Poskus je potekal v inkubatorju pri 37°C in v atmosferi nasičeni z vlago in s 5 % CO<sub>2</sub>. Dan pred poskusom smo celice MCF-10A neoT nasadili v brezserumskem gojišču. Na spodnjo stran vdolbinic zgornje plošče smo najprej nanесли 30 µl fibronektina s koncentracijo 10 µg/ml v PBS, ki je imel vlogo kemoatraktanta. Po 30 min, ko se je fibronectin posušil, smo vdolbinice zgornje plošče prekrili z 20 µl Matrigela™, s koncentracijo 5 mg/ml v brezserumskem gojišču. Zgornjo ploščo smo inkubirali 20 min pri 37°C, da je Matrigel™ polimeriziral. V vdolbinice spodnje plošče smo med tem dodali 180 µl 5 µM inhibitorja v kompletnem gojišču, pri čemer smo kot negativno kontrolo uporabili DMSO. Plošči smo nato previdno združili, v vdolbinice zgornje plošče pa smo nato dodali še 60 µl 5 µM inhibitorja v brezserumskem gojišču, kot negativno kontrolo pa smo uporabili DMSO. Ko smo pomerili ozadje, smo nato v vdolbinice zgornje plošče dodali še  $3 \cdot 10^4$  MCF-10A neoT celic v 80 µl brezserumskega gojišča. V vmesne prostore med vdolbinicami CIM plošče smo dodali sterilno filtrirano vodo, da smo zmanjšali izhlapevanje gojišča iz vdolbinic. Vpliv inhibitorjev na inhibicijo invazije smo spremljali 72 ur, pri čemer je aparat izmeril celični indeks vsakih 15 min. Za vsak inhibitor smo poskus izvedli v štirih paralelah.

### 3.2.12 3D *in vitro* model invazije celic MMTV-PyMT

Vpliv inhibitorjev na invazijo celic MMTV-PyMT smo opazovali v 3D *in vitro* modelu na sferoidih, ki smo jih implantirali v Matrigel™. Sferoide smo pripravili po metodi viseče kapljice. 20 µl celične suspenzije MMTV-PyMT (250 celic/kapljico) smo nanegli na pokrove petrijevk, ki smo jih nato obrnili in z njimi zaprli petrijevke. V te smo predhodno napipetirali 10 ml vode, da smo preprečili izhlapevanje gojišča iz kapljic tekom inkubacije. Po 4-ih dneh inkubacije so se v kapljicah izoblikovali sferoidi. Vdolbinice ohlajenih plošč za mikroskopijo Lab-Tek™ Chambered Coverglass smo najprej prekrili s 70 µl Matrigela™ s koncentracijo 5 mg/ml v brezserumskem gojišču, ki je vseboval 5 µM inhibitorja. Po 5 min inkubacije pri 37°C smo na Matrigel™ nanegli sferoide, ki smo jih nato prekrili s 70 µl Matrigela™ z enako sestavo kot pri spodnji plasti. Po 20 min inkubaciji pri 37°C smo dodali še 400 µl kompletnega gojišča s 5 µM inhibitorja. Kot negativno kontrolo smo pri poskusu uporabili DMSO. Dimenzije sferoidov smo spremljali 3 dni v 24 urnih intervalih s svetlobnim mikroskopom Olympus, opremljenim z okularjem z mikrometrom. Volumen sferoidov smo izračunali na podlagi dimenzij sferoidov po enačbi (*Enačba 2*).

$$V = (\pi \cdot d_{\max} \cdot d_{\min} \cdot d_{\min}) / 6 \quad (\text{Enačba 2})$$

V        volumen sferoida

$d_{\max}$     največji premer sferoida

$d_{\min}$     najmanjši premer sferoida

Sferoide smo po 72-ih urah posneli še na mikroskopu Olympus IX 81 s programom Cell<sup>^</sup>R.

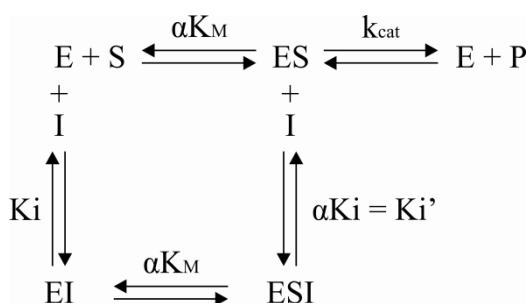
### 3.2.13 Statistična obdelava podatkov

Pri obdelavi rezultatov smo z dvostranskim Studentovim t-testom preverjali, ali je prišlo do značilnih odstopanj med vrednostmi dobljenimi z uporabo inhibitorjev in vrednostmi dobljenimi z uporabo DMSO, ki smo ga uporabljali kot negativno kontrolo. Odstopanja smo šteli za značilna kadar so bile  $p$  vrednosti dvostranskega Studentovega t-testa manjše od 0.05.

## 4 REZULTATI

### 4.1 ENCIMSKA KINETIKA

S pomočjo encimske kinetike smo določili konstante in mehanizem inhibicije izbranih inhibitorjev napram aktivnosti katepsinov B, H in L. Vrednosti  $K_i$  predstavljajo disociacijsko konstanto kompleksa encim – inhibitor (EI), vrednosti  $K_i'$  pa disociacijsko konstanto kompleksa encim – substrat – inhibitor (ESI) (Slika 5).



Slika 5: Shema vezave inhibitorja na encim.  $K_M$  označuje Michaelis-Mentenovo konstanto,  $k_{cat}$  je katalizna konstanta,  $K_i$  predstavlja disociacijsko konstanto,  $\alpha$  predstavlja stopnjo, do katere vezava inhibitorja vpliva na afiniteto encima do substrata, E označuje encim, S substrat, I inhibitor, P produkt, ES kompleks encim – substrat, EI kompleks encim – inhibitor in ESI kompleks encim – substrat – inhibitor (95).

Vpliv inhibitorjev na katepsin B smo določali z uporabo substratov Z-RR-AMC in Abz-GIVRAK(Dnp)-OH. Substrat Z-RR-AMC se uporablja za določanje endopeptidazne aktivnosti katepsina B, medtem ko se substrat Abz-GIVRAK(Dnp)-OH uporablja pri določanju eksopeptidazne aktivnosti katepsina B (87, 88, 90).

Kot najbolj učinkovita inhibitorja endopeptidazne aktivnosti katepsina B sta se izkazali spojini **1** in **2**, ki sta imeli najnižji vrednosti konstant inhibicije ( $32.2 \pm 6.2 \mu\text{M}$  za spojino **1** in  $8.0 \pm 0.5 \mu\text{M}$  za spojino **2**) (Tabela III). V obeh primerih je šlo za akompetitivni tip inhibicije, kar nakazuje, da sta se spojini vezali na kompleks ES in ne na prosti encim. Spojine **3**, **4**, **5** in **6** so se izkazale za slabše inhibitorje endopeptidazne aktivnosti katepsina B, saj so imele višje vrednosti  $K_i$  oziroma  $K_i'$  kot spojini **1** in **2** (Tabela III). Pri spojini **3** je šlo za mešani tip inhibicije, kjer je inhibitor izkazoval večjo afiniteto do prostega encima kot do kompleksa ES. Spojine **4**, **5** in **6** so bile nekompetitivni inhibitorji endopeptidazne aktivnosti katepsina B in so se na prosti encim in kompleks ES vezale z enako afiniteto.

Najbolj učinkoviti spojini pri inhibiciji eksopeptidazne aktivnosti sta bili spojini **3** in **4** z najnižjimi vrednostmi konstant  $K_i$  oziroma  $K_i'$  ( $52.1 \pm 0.5 \mu\text{M}$  za spojino **3** in  $27.3 \pm 2.8$

$\mu\text{M}$  za spojino **4**) med testiranimi spojinami (Tabela III). Upoštevajoč konstante inhibicije za endopeptidazno aktivnost, sta bili ti spojini 3.1-krat (spojina **3**) in 5.1-krat (spojina **4**) bolj selektivni za inhibicijo eksopeptidazne aktivnosti. Spojini **1** in **2**, ki sta bili najbolj učinkovita inhibitorja endopeptidazne aktivnosti, sta se obratno izkazali za najmanj učinkovita inhibitorja eksopeptidazne aktivnosti ( $192.1 \pm 37.3 \mu\text{M}$  za spojino **1** in  $300.7 \pm 21.2 \mu\text{M}$  za spojino **2**). Spojina **1** je tako bila 6.0-krat, spojina **2** pa kar 37.6-krat bolj selektivna za inhibicijo endopeptidazne kot eksopeptidazne aktivnosti katepsina B. Spojini **5** in **6** sta inhibirali eksopeptidazno aktivnost približno enako močno kot endopeptidazno aktivnost in sta kot taki neselektivna inhibitorja endopeptidazne in eksopeptidazne aktivnosti katepsina B (Tabela III). Vse spojine so pri uporabi substrata Abz-GIVRAK(Dnp)-OH izkazale nekompetitivni tip inhibicije. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da sta spojini **1** in **2** selektivna inhibitorja endopeptidazne aktivnosti katepsina B, spojini **3** in **4** selektivna inhibitorja eksopeptidazne aktivnosti katepsina B, spojini **5** in **6** pa nista selektivni za endopeptidazno oziroma eksopeptidazno aktivnost katepsina B.

Selektivnost inhibitorjev za katepsin B smo preverili s testiranjem inhibitorjev na katepsin H (EC 3.4.22.16), ki ima aminopeptidazno aktivnost, in katepsin L (EC 3.4.22.16), ki ima endopeptidazno aktivnost (4–7, 9, 11). Vpliv inhibitorjev na katepsin H smo določali z uporabo substrata R-AMC, vpliv inhibitorjev na katepsin L pa smo določili z uporabo substrata Z-FR-AMC. Pri tem smo ugotovili, da gre pri inhibiciji katepsina H pri spojinah **1** in **3** za akompetitivni tip inhibicije, pri spojinah **2**, **4** in **6** za nekompetitivni tip inhibicije in pri spojini **5** za mešani tip inhibicije z večjo afiniteto do kompleksa ES kot do prostega encima (Tabela IV). Vrednosti  $K_i$  oziroma  $K_i'$  so bile pri spojinah **1** in **2** značilno višje kot pri inhibiciji endopeptidazne aktivnosti katepsina (11.0-krat višje za spojino **1** in 16.1-krat višje za spojino **2**) in podobnega velikostnega razreda kot pri inhibiciji eksopeptidazne aktivnosti katepsina B. Pri spojinah **3** in **4** so bile vrednosti  $K_i$  oziroma  $K_i'$  pri inhibiciji katepsina H 4.8-krat višje za spojino **3** in 8.1-krat višje za spojino **4** kot pri inhibiciji eksopeptidazne aktivnosti katepsina B ter podobnega velikostnega razreda kot pri inhibiciji endopeptidazne aktivnosti katepsina B. Vrednosti  $K_i$  oziroma  $K_i'$  pri spojinah **5** in **6** so bile podobne tistim, dobljenim pri inhibiciji endopeptidazne in eksopeptidazne aktivnosti katepsina B. Pri inhibiciji katepsina L so vse spojine izkazovale kompetitivni tip inhibicije, kar nakazuje, da so se pri tem vse spojine vezale le na prosti encim in ne na kompleks ES.

Vrednosti  $K_i$  so bile pri inhibiciji katepsina L pri vseh spojinah v istem velikostnem razredu kot tiste, dobljene za inhibicijo katepsina H.

Iz tega lahko sklepamo, da so spojine **1**, **2**, **3** in **4** selektivne za katepsin B, spojini **5** in **6** pa nista selektivni za posamezen katepsin B, H ali L.

Tabela III: Konstante in mehanizmi inhibicije katepsina B. Vrednosti predstavljajo povprečno vrednost  $\pm$  SD (n = 2). Meritve smo izvajali v dveh paralelah in vsaj dveh ponovitvah.

Substrat	Endopeptidazna aktivnost			Eksopeptidazna aktivnost		
	Z-RR-AMC			Abz-GIVRAK(Dnp)-OH		
Spojina	$K_i$ [ $\mu$ M]	$K_i'$ [ $\mu$ M]	Mehanizem inhibicije	$K_i$ [ $\mu$ M]	$K_i'$ [ $\mu$ M]	Mehanizem inhibicije
Nitroksolin (90)	154.4 $\pm$ 26.7	39.5 $\pm$ 2.8	Mešana inhibicija	271.8 $\pm$ 22.8		Nekompetitivna inhibicija
1	-	32.2 $\pm$ 6.2	Akompetitivna inhibicija	192.1 $\pm$ 37.3		Nekompetitivna inhibicija
2	-	8.0 $\pm$ 0.5	Akompetitivna inhibicija	300.7 $\pm$ 21.2		Nekompetitivna inhibicija
3	162.2 $\pm$ 44.9	239.6 $\pm$ 48.1	Mešana inhibicija	52.1 $\pm$ 0.5		Nekompetitivna inhibicija
4	137.9 $\pm$ 23.5		Nekompetitivna inhibicija	27.3 $\pm$ 2.8		Nekompetitivna inhibicija
5	84.2 $\pm$ 1.8		Nekompetitivna inhibicija	144.8 $\pm$ 16.0		Nekompetitivna inhibicija
6	112.1 $\pm$ 0.2		Nekompetitivna inhibicija	113.0 $\pm$ 0.7		Nekompetitivna inhibicija

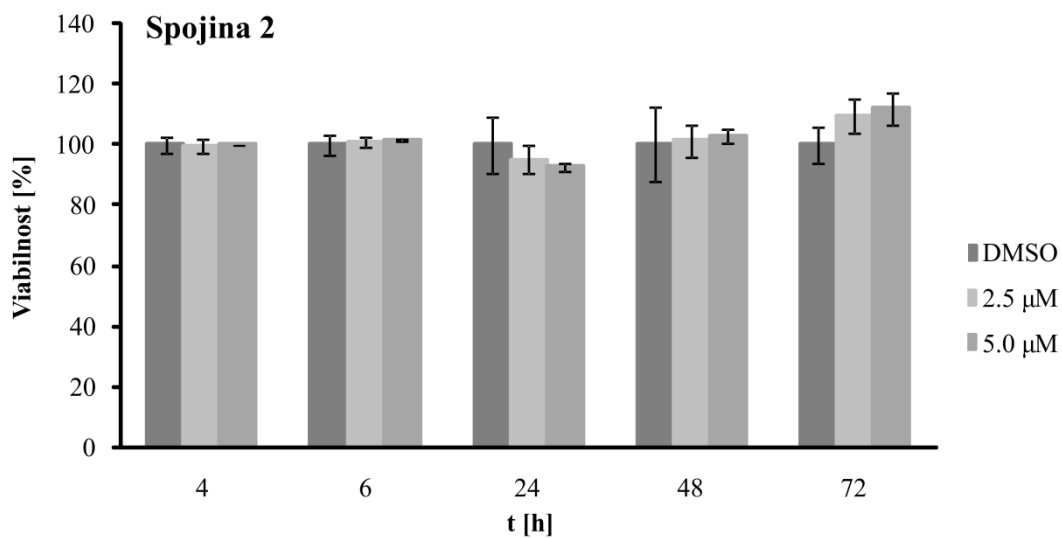
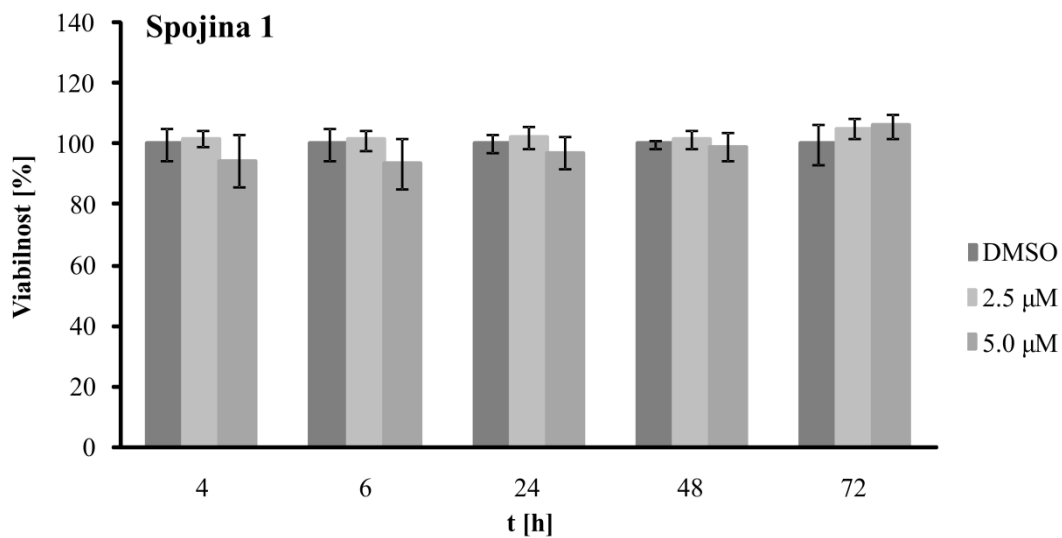
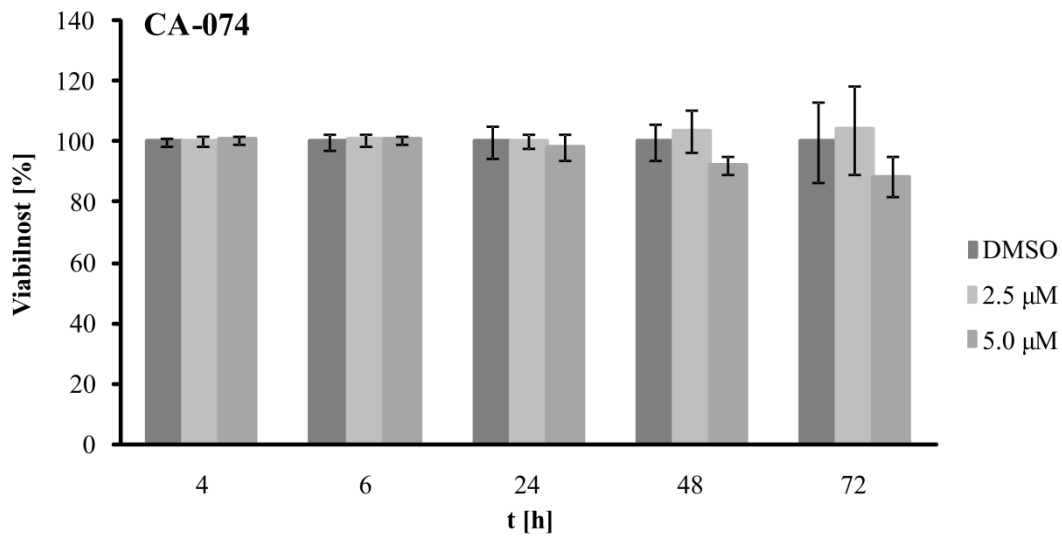
Tabela IV: Konstante in mehanizmi inhibicije katepsina H in L. Vrednosti predstavljajo povprečno vrednost  $\pm$  SD (n = 2). Meritve smo izvajali v dveh paralelah in vsaj dveh ponovitvah.

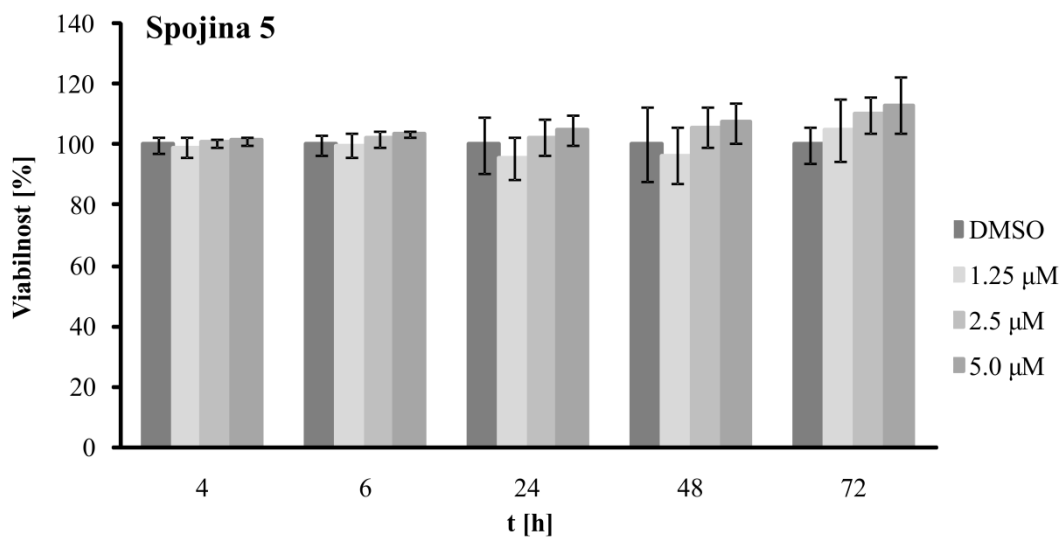
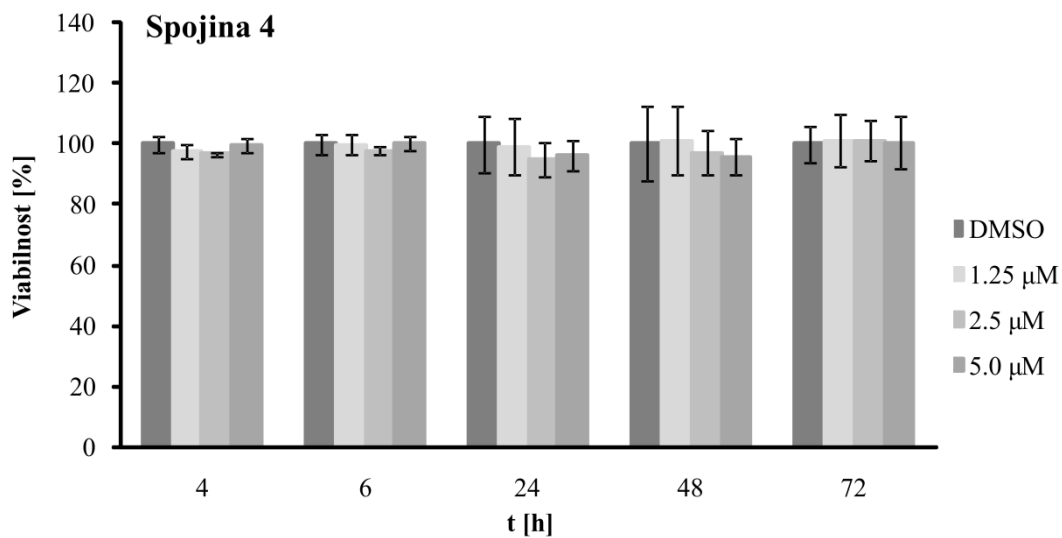
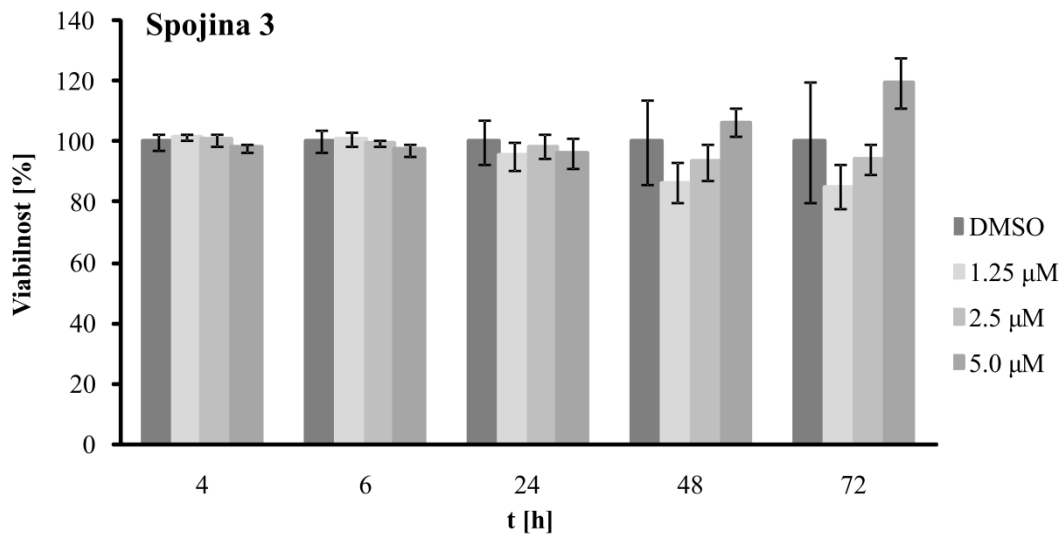
	Katepsin H			Katepsin L		
Substrat	R-AMC			Z-FR-AMC		
Spojina	Ki [ $\mu$ M]	Ki' [ $\mu$ M]	Mehanizem inhibicije	Ki [ $\mu$ M]	Ki' [ $\mu$ M]	Mehanizem inhibicije
Nitroksolin (90)	290.5 $\pm$ 25.0		Nekompetitivna inhibicija	191.3 $\pm$ 12.3		Nekompetitivna inhibicija
1	-	353.7 $\pm$ 37.2	Akompetitivna inhibicija	182.2 $\pm$ 3.7	-	Kompetitivna inhibicija
2	129.0 $\pm$ 5.5		Nekompetitivna inhibicija	124.0 $\pm$ 2.6	-	Kompetitivna inhibicija
3	-	251.4 $\pm$ 32.6	Akompetitivna inhibicija	244.9 $\pm$ 6.4	-	Kompetitivna inhibicija
4	221.2 $\pm$ 36.6		Nekompetitivna inhibicija	155.0 $\pm$ 0.4	-	Kompetitivna inhibicija
5	163.3 $\pm$ 8.6	105.1 $\pm$ 4.8	Mešana inhibicija	107.4 $\pm$ 4.4	-	Kompetitivna inhibicija
6	112.23 $\pm$ 8.55		Nekompetitivna inhibicija	110.3 $\pm$ 11.4	-	Kompetitivna inhibicija

## 4.2 VPLIV INHIBITORJEV NA VIABILNOST CELIC

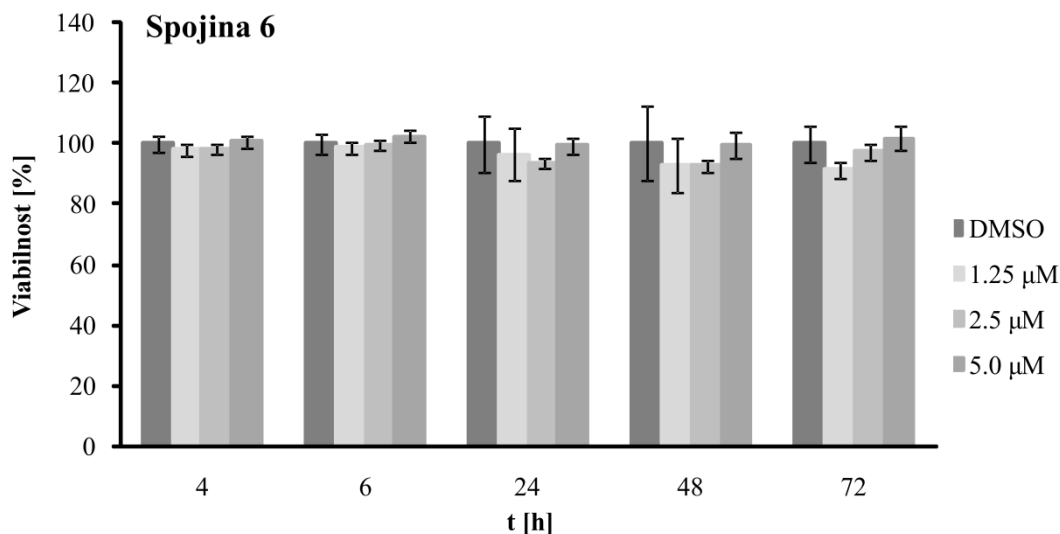
Vpliv inhibitorjev na viabilnost celic MCF-10A neoT in MMTV-PyMT smo opazovali na aparaturi xCELLigence RT-CA DP System. Viabilnost celic, ki smo jo preverili po 4-ih, 6-ih, 24-ih, 48-ih in 72-ih urah po dodatku inhibitorjev, smo podali kot relativno vrednost (%) glede na kontrolo (DMSO).

Spojine **1** – **6** in inhibitor katepsina B CA-074 niso vplivale na viabilnost celic MCF-10A neoT pri koncentracijah in časovnih intervalih, ki smo jih uporabili v funkcionalnih testih na celicah ( $p \geq 0.05$ ) (Slika 6).



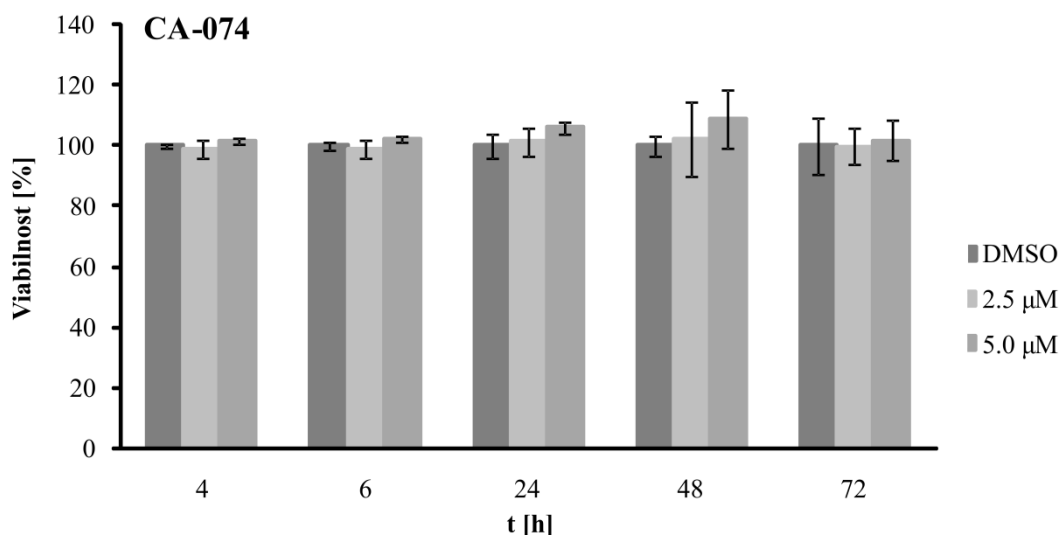


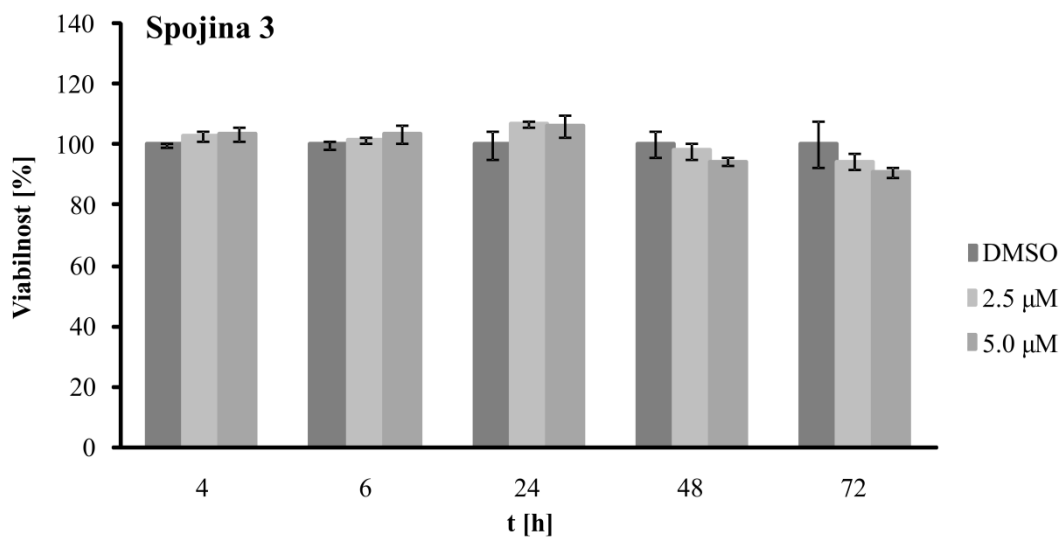
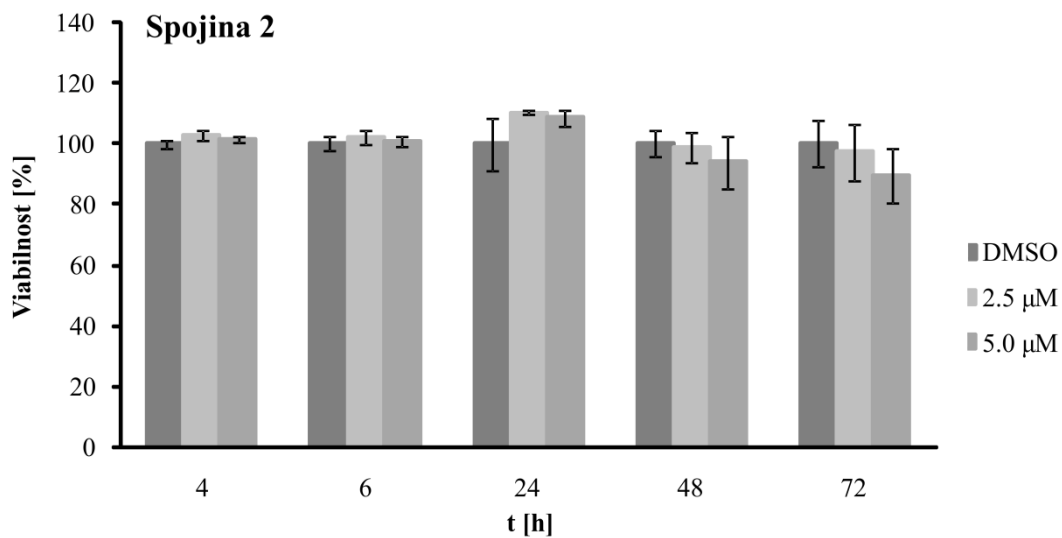
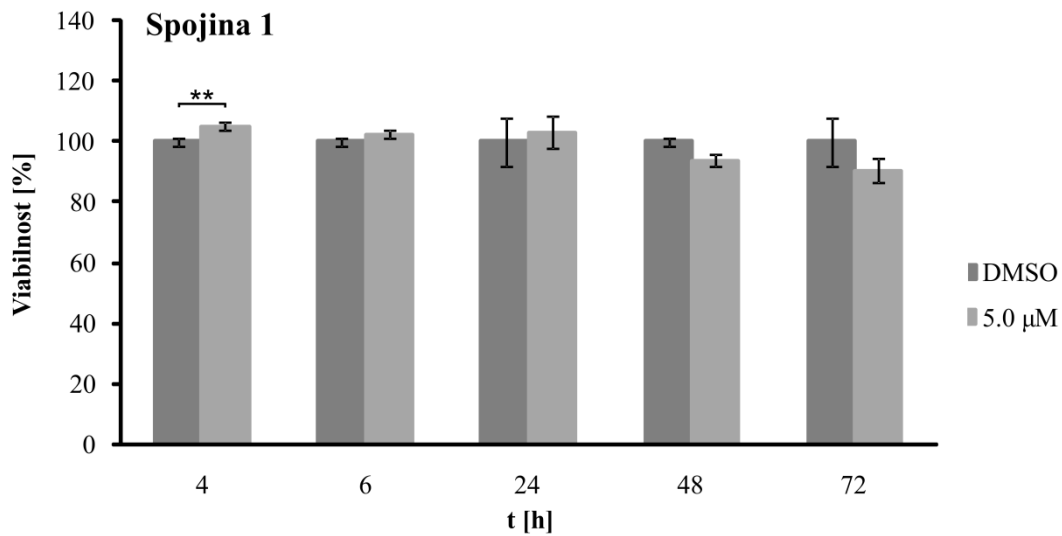


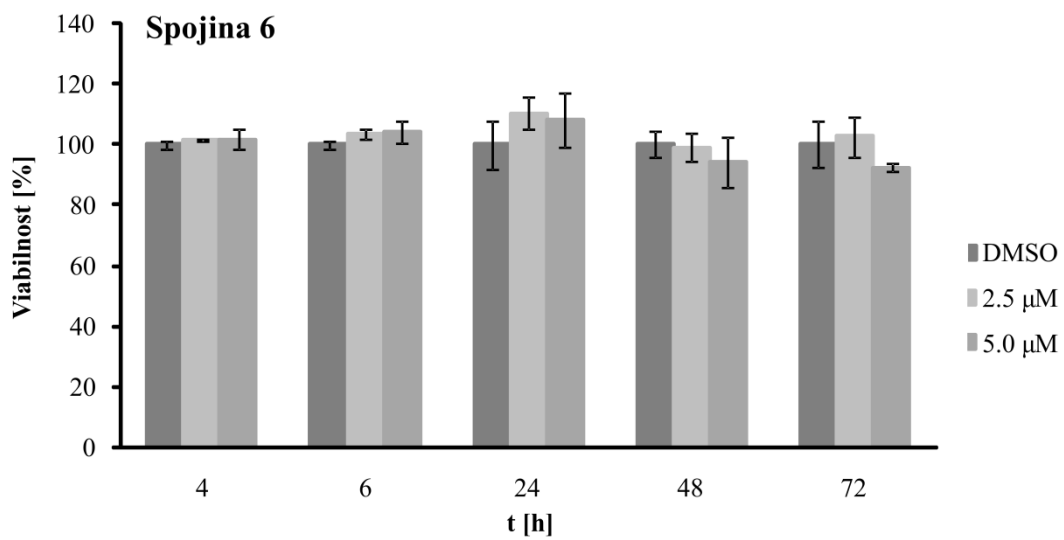
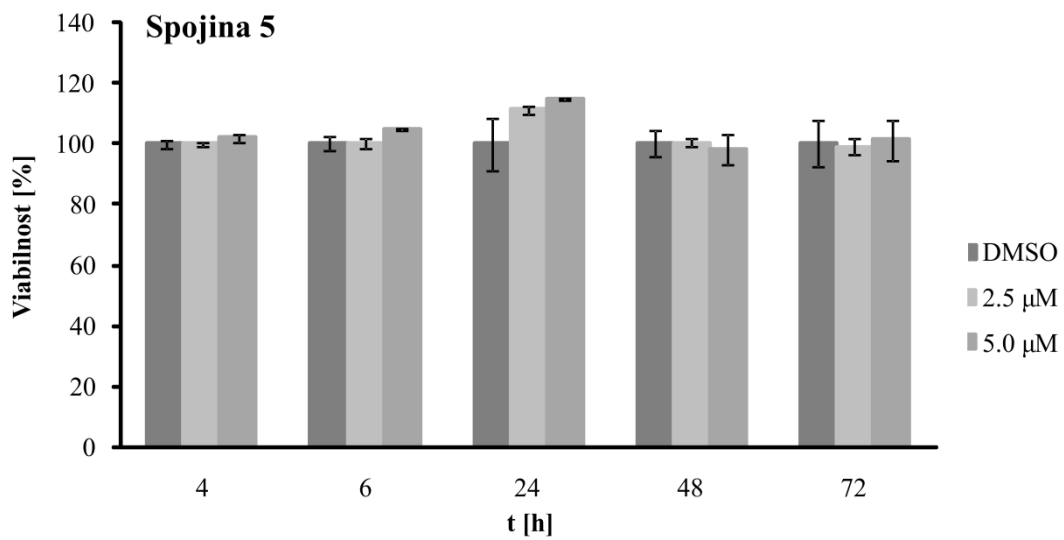
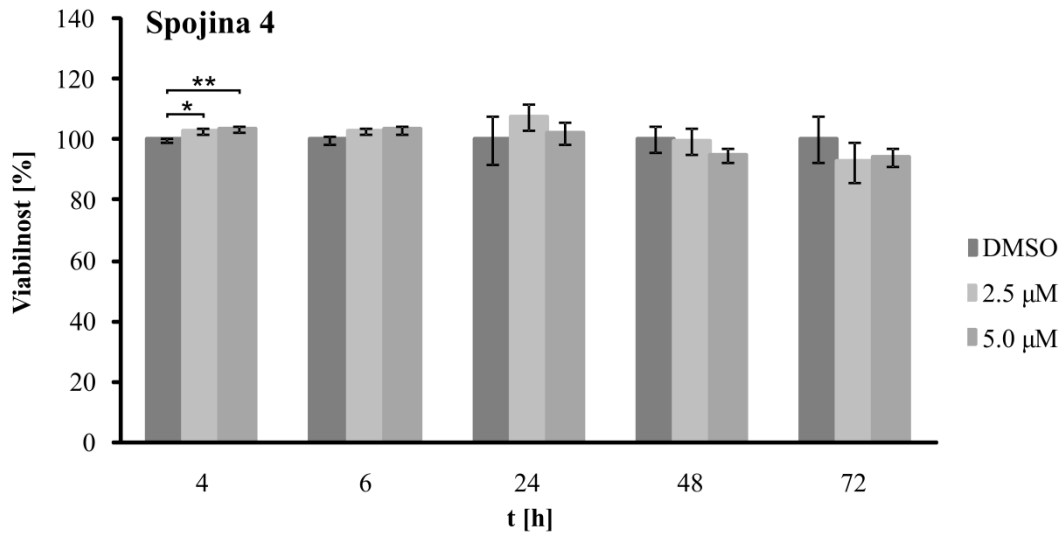


Slika 6: Vpliv spojin 1 – 6 in CA-074 na viabilnost celic MCF-10A neoT. Vrednosti predstavljajo povprečne vrednosti  $\pm$  SD (n = 4). Meritve smo za vsak vzorec izvedli v štirih paralelah.

Spojine 2, 3, 5 in 6 ter inhibitor katepsina B CA-074 niso vplivali na viabilnost celic MMTV-PyMT pri koncentracijah in časovnih intervalih, ki smo jih uporabili v funkcionalnih testih na celicah ( $p \geq 0.05$ ) (Slika 7). Spojini 1 in 4 sta značilno povečali viabilnost celic le po 4-ih urah inkubacije pri uporabljenih koncentracijah. Pri ostalih časovnih intervalih spojini nista izkazovali značilnega učinka na viabilnost celic ( $p \geq 0.05$ ).



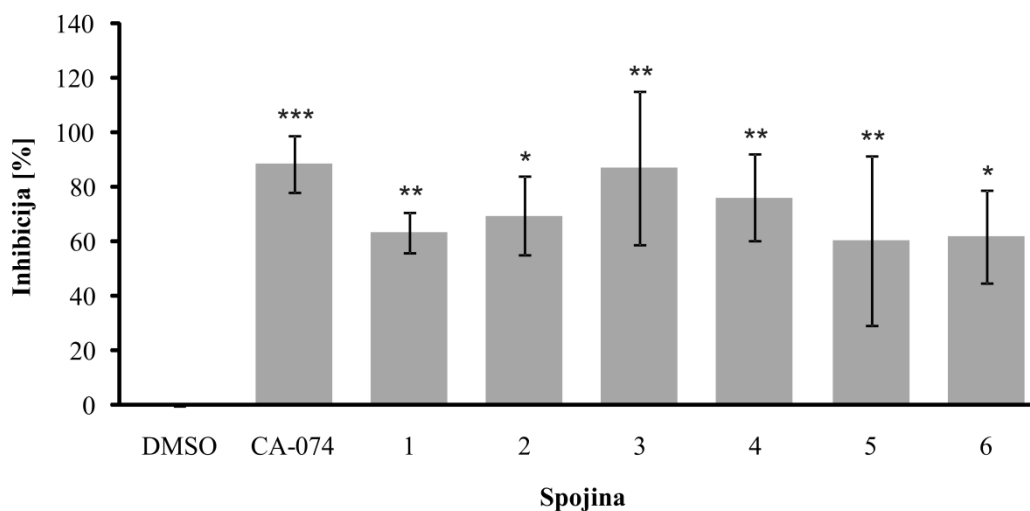




Slika 7: Vpliv spojin **1** – **6** in CA-074 na viabilnost celic MMTV-PyMT. Vrednosti predstavljajo povprečne vrednosti  $\pm$  SD (n = 4). Meritve smo za vsak vzorec izvedli v štirih paralelah. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

### 4.3 VPLIV INHIBITORJEV NA ZUNAJCELIČNO RAZGRADNJO DQ-KOLEGENA IV

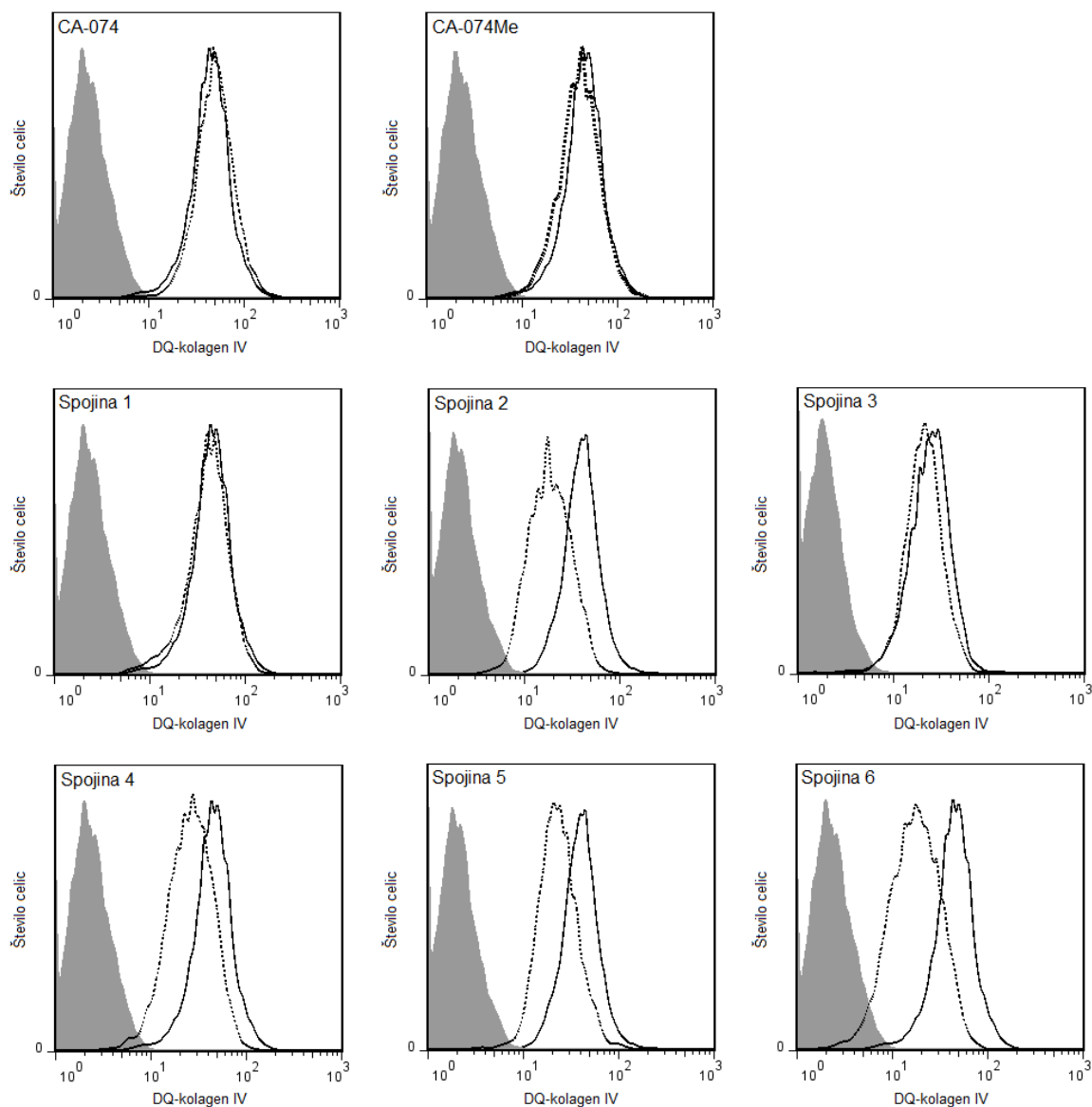
Vpliv inhibitorjev na zunajcelično razgradnjo DQ-kolagena IV smo določali s spektrofotometričnim spremljanjem fluorescence razgradnih produktov DQ-kolagena IV. Dobljene vrednosti smo izrazili kot delež inhibicije zunajcelične razgradnje DQ-kolagena IV glede na DMSO, ki smo ga uporabili kot negativno kontrolo (Slika 8). Kot pozitivno kontrolo smo pri testu uporabili CA-074, ki je značilno inhibiral zunajcelično razgradnjo DQ-kolagena IV ( $88.4 \pm 10.4$  %) in se je izkazal tudi kot najboljši inhibitor zunajcelične razgradnje DQ-kolagena IV med testiranimi spojinami. Spojine **1** – **6** so značilno inhibirale zunajcelično razgradnjo DQ-kolagena IV celic MCF-10A neoT. Kot najboljša inhibitorja sta se izkazali spojin **3** in **4** ( $87.2 \pm 28.4$  % za spojino **3** in  $76.2 \pm 15.8$  % za spojino **4**). Spojina **3** je zunajcelično razgradnjo DQ-kolagena IV inhibirala podobno kot CA-074 in je glede na ostale spojine najboljši inhibitor. Ostale spojine so se v primerjavi s CA-074 izkazale kot nekoliko slabši inhibitorji zunajcelične razgradnje DQ-kolagena IV.



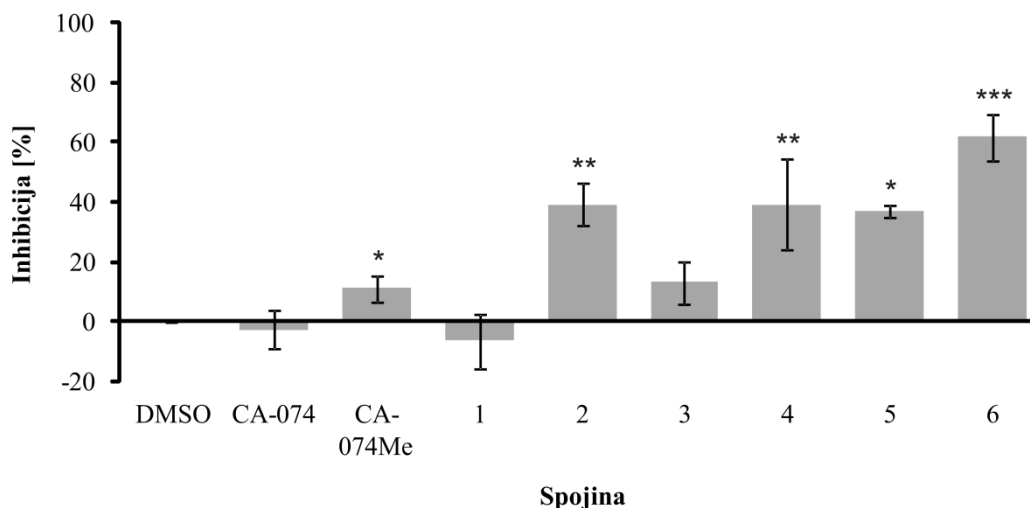
Slika 8: Delež inhibicije zunajcelične razgradnje DQ-kolagena IV. Vrednosti predstavljajo povprečne vrednosti  $\pm$  SD (n = 4). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.4 VPLIV INHIBITORJEV NA ZNOTRAJCELIČNO RAZGRADNJO DQ-KOLEGENA IV

Vpliv inhibitorjev na znotrajcelično razgradnjo DQ-kolagena IV smo določali s pretočno citometrijo. Inhibicijo razgradnje DQ-kolagena IV smo spremljali kot spremembo v intenziteti fluorescence celic, ki so bile gojene v prisotnosti inhibitorjev v primerjavi s celicami, ki smo jih gojili v prisotnosti DMSO (Slika 9). Dobljene vrednosti smo izrazili kot delež inhibicije znotrajcelične razgradnje DQ-kolagena IV glede na vrednosti dobljene v prisotnosti DMSO (Slika 10). Kot pozitivno kontrolo smo v testu uporabili CA-074Me, inhibitor katepsina B, ki prehaja celično membrano, kot negativno kontrolo pa CA-074, ki ne prehaja celične membrane (85). CA-074Me je značilno inhibiral znotrajcelično razgradnjo DQ-kolagena IV ( $11.2 \pm 4.4 \%$ ), medtem ko CA-074 ni imel vpliva na znotrajcelično razgradnjo DQ-kolagena IV ( $-2.5 \pm 6.1 \%$ ). Spojine **2**, **4**, **5** in **6** ( $39.2 \pm 7.1 \%$  za spojino **2**,  $39.1 \pm 15.1 \%$  za spojino **4**,  $36.8 \pm 2.1 \%$  za spojino **5** in  $61.7 \pm 7.5 \%$  za spojino **6**) so značilno inhibirale znotrajcelično razgradnjo DQ-kolagena IV in so se izkazale kot boljši inhibitorji v primerjavi s CA-074Me (Slika 10). Pri teh spojinah lahko opazimo tudi bolj izrazit premik intenzitete fluorescence v levo v primerjavi z intenziteto fluorescence, ki smo jo dobili pri celicah, gojenih v prisotnosti DMSO in tudi v primerjavi s celicami, gojenimi v prisotnosti CA-074Me (Slika 9). Spojini **1** in **3** ( $-6.4 \pm 9.1 \%$  za spojino **1** in  $13.1 \pm 6.9 \%$  za spojino **3**) sta se izkazali kot slabša inhibitorja znotrajcelične razgradnje DQ-kolagena IV, saj le-te nista značilno inhibirala (Slika 10). Slabša inhibicija je razvidna tudi iz manjše spremembe v intenziteti fluorescence v primerjavi s celicami gojenimi v prisotnosti DMSO (Slika 9).



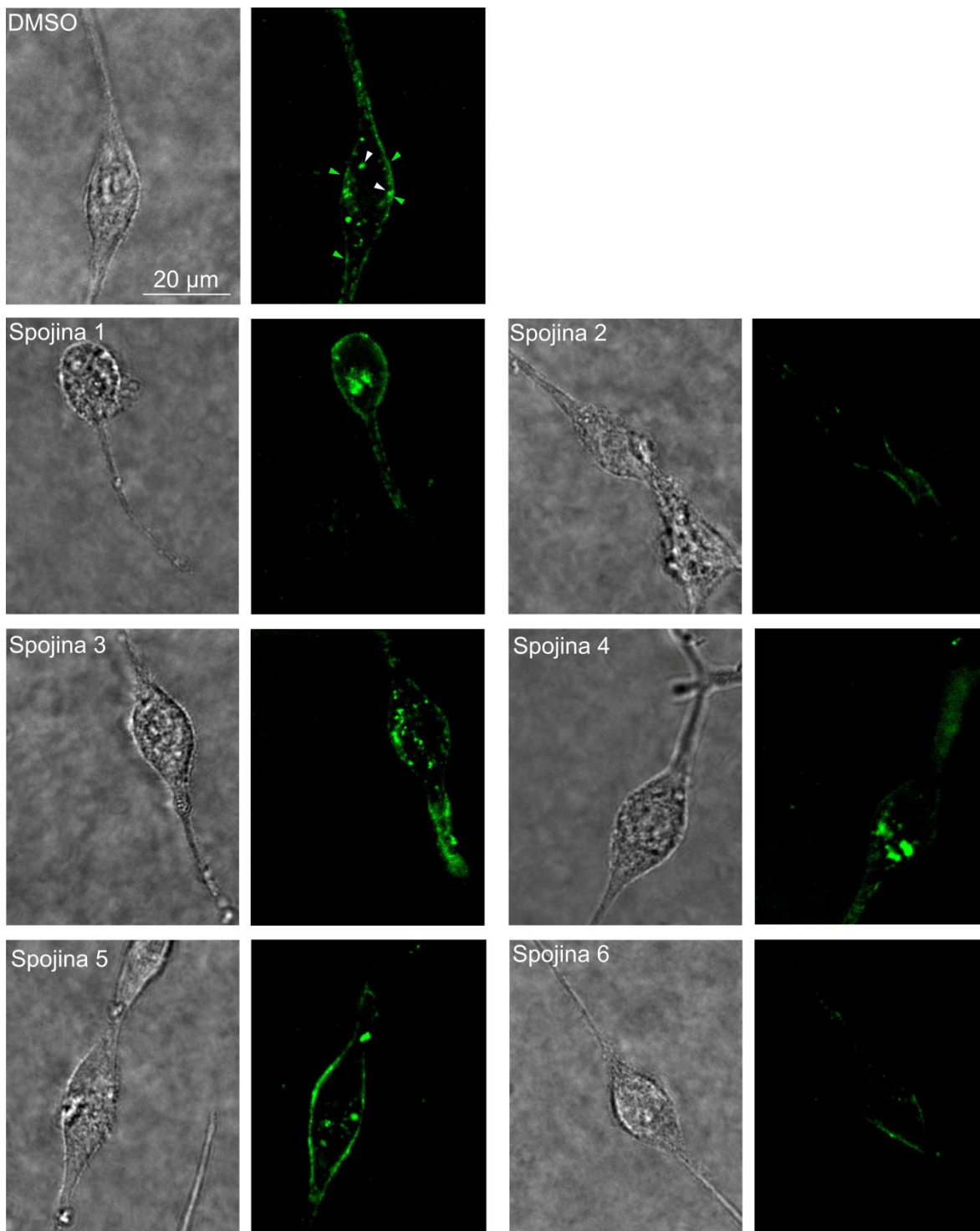
Slika 9: Določanje vpliva inhibitorjev na znotrajcelično razgradnjo DQ-kolagena IV s pretočno citometrijo. Celice, gojene v odsotnosti DQ-kolagena IV, so označene s sivo barvo. Celice, gojene v prisotnosti DQ-kolagena IV in DMSO so označene s polno črno črto, medtem ko so celice, gojene v prisotnosti inhibitorjev, označene s prekinjeno črno črto. Inhibicijo DQ-kolagena IV lahko opazimo kot premik intenzitete fluorescence v levo v primerjavi s celicami, gojenimi v prisotnosti DQ-kolagena IV in DMSO.



Slika 10: Delež inhibicije znotrajcelične razgradnje DQ-kolagena IV. Vrednosti predstavljajo povprečne vrednosti  $\pm$  SD (n=3). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.5 VPLIV INHIBITORJEV NA RAZGRADNJO DQ-KOLAGENA IV – FLUORESCENČNA MIKROSKOPIJA

Vpliv inhibitorjev na zunajcelično in znotrajcelično razgradnjo DQ-kolagena IV smo opazovali tudi s fluorescenčno mikroskopijo (Slika 11). Celice, ki smo jih gojili v prisotnosti DQ-kolagena IV in DMSO so izkazovale tako znotraj- kot zunajcelično razgradnjo DQ-kolagena IV. Če smo k celicam dodali spojine **2**, **4**, **5** in **6**, smo opazili inhibicijo razgradnje znotraj- in zunajcelične razgradnje DQ-kolagena IV, ki je bila vidna kot zmanjšanje intenzitete fluorescence. Spojini **1** in **3** nista izkazovali vidnega učinka na razgradnjo DQ-kolagena IV.

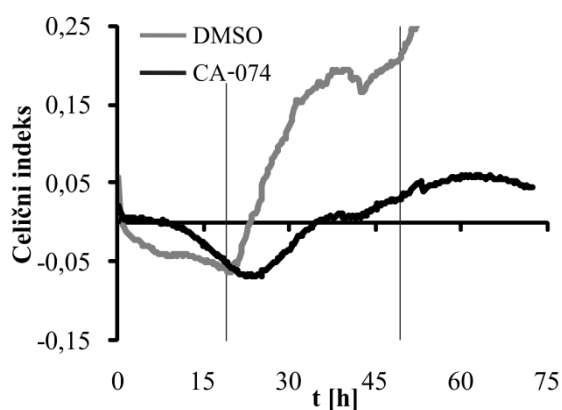


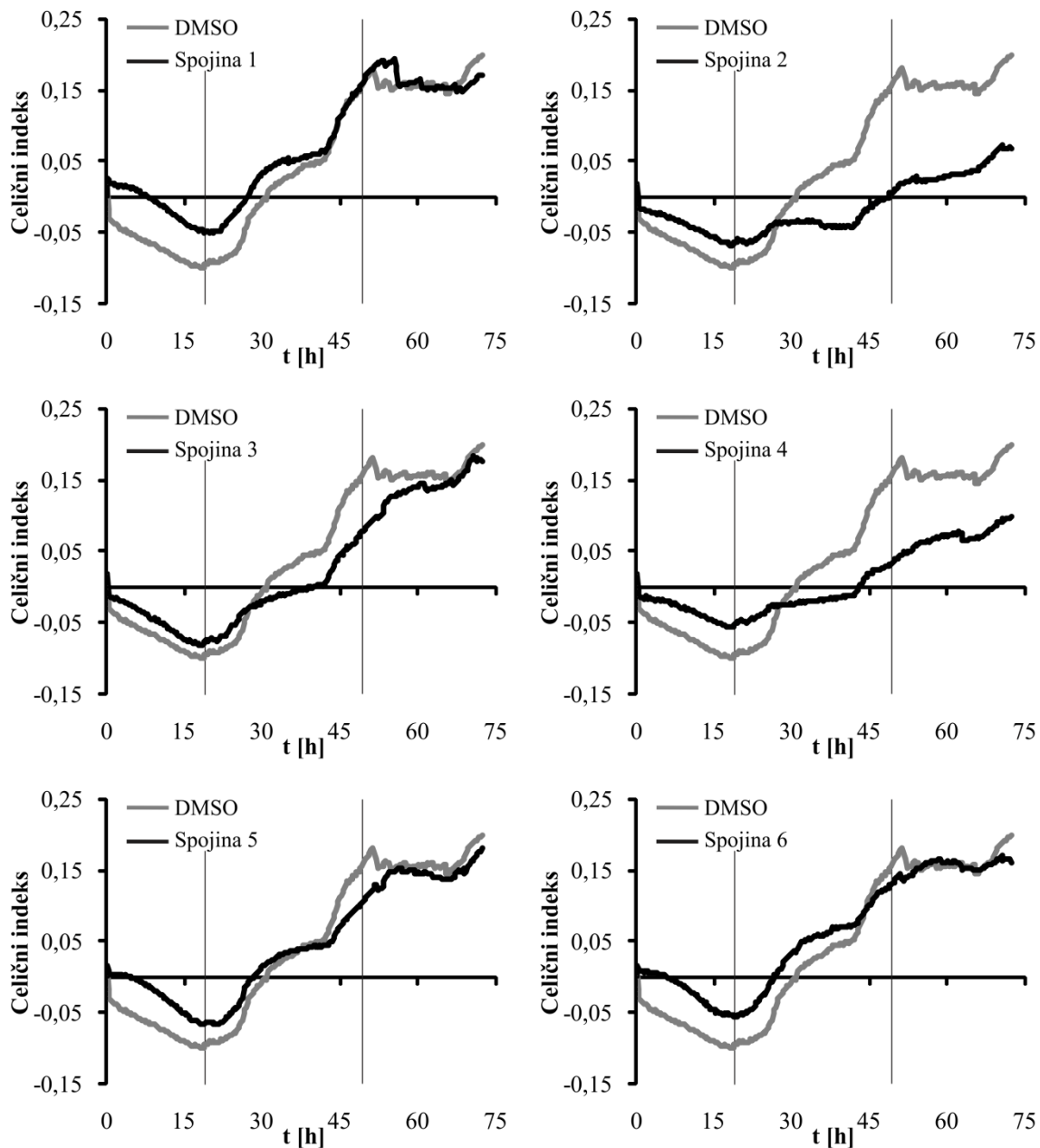
Slika 11: Določanje vpliva inhibitorjev na razgradnjo DQ-kolagena IV s fluorescenčno mikroskopijo. Leve slike so posnete s transmisijsko svetlobo, desne slike pa kažejo fluorescenco po hidrolizi DQ-kolagena IV v zelenem območju vidne svetlobe. Zunajcelična razgradnja DQ-kolagena IV je označena z zeleno puščico, znotrajcelična razgradnja pa z belo puščico. Dolžina oznake je 20 µm.



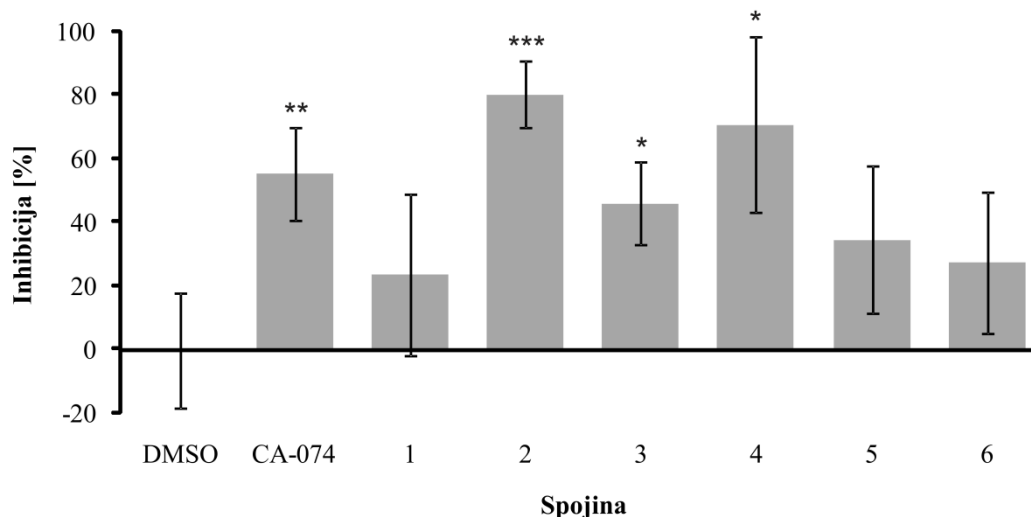
## 4.6 VPLIV INHIBITORJEV NA INVAZIZIJO CELIC MCF-10A NEOT V 2D *IN VITRO* MODELU TUMORSKE INVAZIJE

Vpliv inhibitorjev na tumorsko invazijo v 2D *in vitro* modelu smo opazovali s pomočjo sistema xCELLigence. Le-ta je sestavljen in dveh plošč, ki sta med seboj ločeni s porozno membrano, prekrito s plastjo Matrigela™, ki služi kot model ZCM. Vpliv inhibitorjev na invazijo celic MCF-10A neoT smo podali kot povprečne vrednosti celičnega indeksa v odvisnosti od časa. Pri tem so večje vrednosti celičnega indeksa pomenile več zaznanih celic, torej večji obseg invazije, večji naklon pa je pomenil večjo hitrost tumorske invazije celic (Slika 12). Tumorsko invazijo celic MCF-10A neoT ob prisotnosti inhibitorjev smo podali tudi kot delež inhibicije invazije glede na vrednosti, dobljene z DMSO, ki smo jih uporabili kot negativno kontrolo (Slika 13). Deleže inhibicije invazije smo določili na podlagi naklonov, ki so predstavljali hitrost invazije tumorskih celic. Zunajcelični inhibitor katepsina B CA-074 je po pričakovanjih značilno inhibiral tumorsko invazijo v 2D *in vitro* modelu ( $55.1 \pm 14.7$  %). Kot učinkoviti inhibitorji invazije celic MCF-10A neoT so se izkazale tudi spojine **2**, **3** in **4**, saj so le-to značilno zmanjšale za  $80.3 \pm 10.6$  %,  $46.0 \pm 13.0$  % in  $70.9 \pm 27.6$  %. Pri tem sta spojini **2** in **4** zmanjšali invazijo bolj učinkovito kot CA-074. Spojine **1**, **5** in **6** so ravno tako inhibirale invazijo celic MCF-10A neoT, vendar ne značilno. Pri spojini **1** je inhibicija invazije znašala  $23.6 \pm 25.6$  %, pri spojini **5**  $34.6 \pm 23.2$  % in pri spojini **6**  $27.5 \pm 22.0$  %.





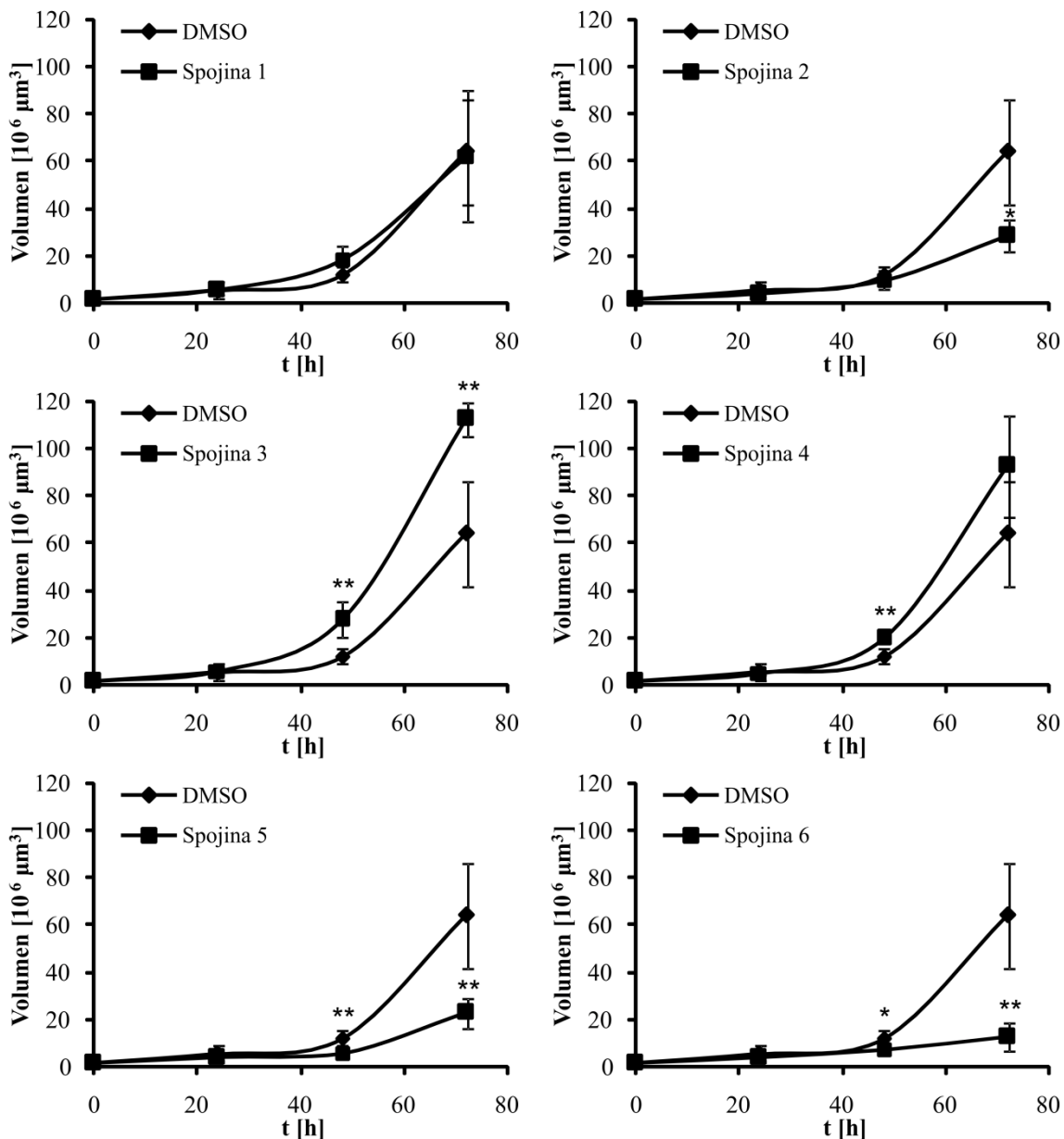
Slika 12: Vpliv inhibitorjev na invazijo MCF-10A neoT celic v 2D *in vitro* modelu tumorske invazije. Vrednosti predstavljajo povprečne vrednosti celičnega indeksa ( $n = 4$ ). Inhibicijo tumorske invazije smo spremljali 72 ur.



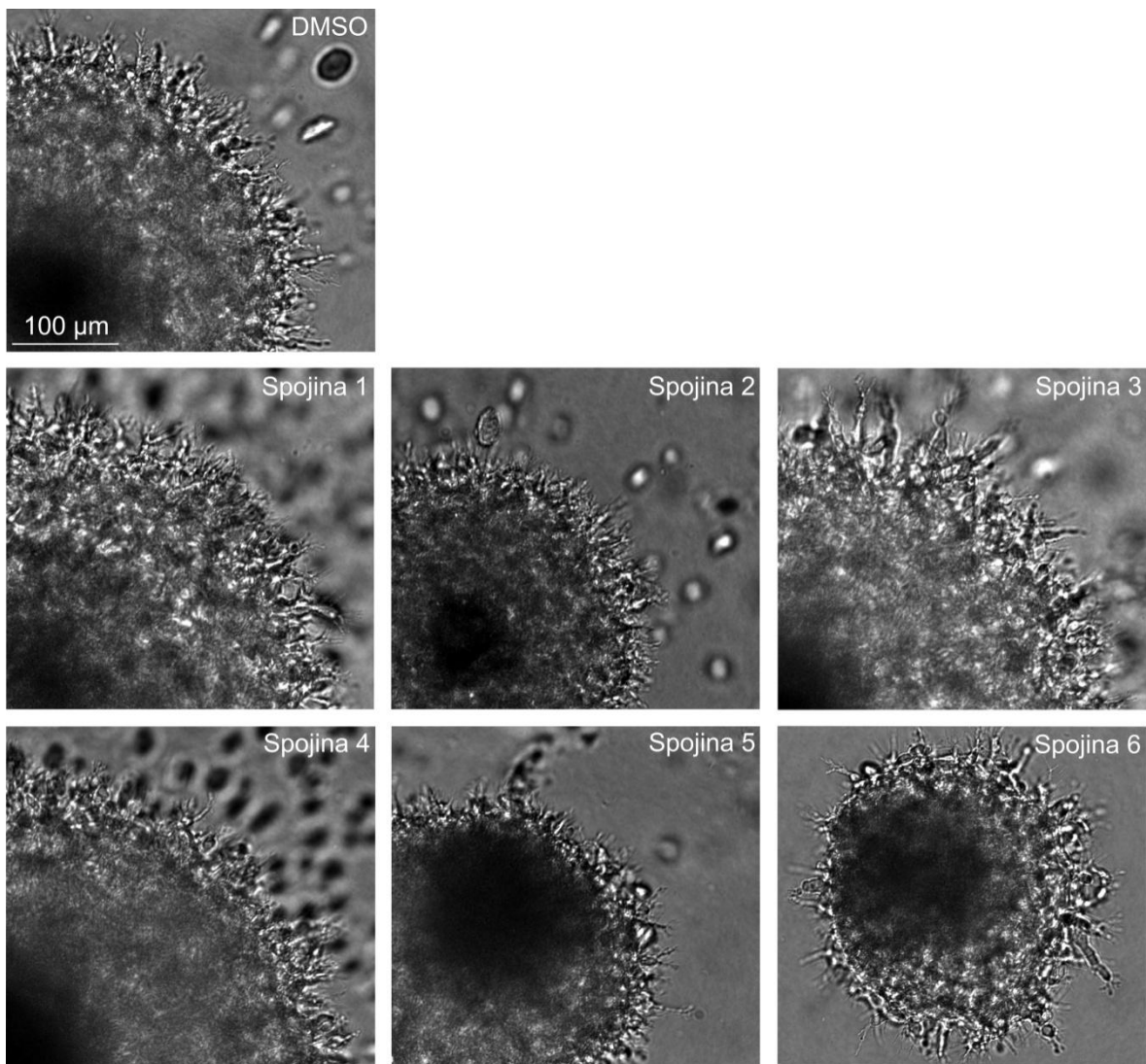
Slika 13: Delež inhibicije invazije MCF-10A neoT celic v 2D *in vitro* modelu tumorske invazije. Vrednosti predstavljajo povprečne vrednosti  $\pm$  SD (n = 4). \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### 4.7 VPLIV INHIBITORJEV NA INVAZIJO CELIC MMTV-PYMT V 3D *IN VITRO* MODELU TUMORSKE INVAZIJE

Vpliv inhibitorjev na invazijo celic MMTV-PyMT smo spremljali v 3D *in vitro* modelu, ki temelji na implantaciji sferoidov v Matrigel™, ki služi kot model ZCM. Sferoide smo pripravili z metodo viseče kapljice, njihovo rast pa smo po implantaciji spremljali po 24-ih, 48-ih in 72-ih urah s pomočjo svetlobnega mikroskopa, opremljenega z okularjem z mikrometrom (Slika 14). Reprezentativne slike sferoidov smo posneli po 72-ih urah po implantaciji (Slika 15). V poskusu, kjer smo kot kontrolo uporabili DMSO, so celice na robu sferoida invadirale v okoliški Matrigel™ in na ta način tvorile specifičen vzorec invazije okrog prvotnega sferoida (Slika 15). Kot dobri inhibitorji invazije celic MMTV-PyMT v 3D *in vitro* modelu tumorske invazije so se izkazale spojine **2**, **5** in **6**, saj so značilno zmanjšale volumen sferoidov in obseg invazije celic okrog prvotnega sferoida v primerjavi z DMSO po 72-ih urah (Slika 14 in Slika 15). Volumen sferoidov ob prisotnosti spojin **5** in **6** je bili značilno manjši od kontrolnih vrednostih že po 48-ih urah. Spojine **1**, **3** in **4** niso zmanjšale invazije celic MMTV-PyMT v Matrigel™. Medtem ko se volumen sferoidov v prisotnosti spojine **1** ni značilno razlikoval od sferoidov v prisotnosti DMSO po 72-ih urah, sta spojini **3** in **4** celo povečali volumen sferoidov v primerjavi s kontrolo (DMSO).



Slika 14: Vpliv inhibitorjev na invazijo celic MMTV-PyMT v 3D *in vitro* modelu tumorske invazije. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .



Slika 15: Vpliv inhibitorjev na invazijo celic MMTV-PyMT v 3D *in vitro* modelu tumorske invazije. Dolžina oznake je 100 µm.

## 5 RAZPRAVA

Katepsin B je lizosomska cisteinska proteaza, ki ima v organizmu pomembno vlogo v številnih fizioloških in patoloških procesih (8, 19). Med drugim ima pomembno vlogo tudi pri razvoju in napredovanju tumorjev (5, 6, 8, 26). Od papaina in ostalih katepsinov se razlikuje po prisotnosti zaporne zanke, strukturnega elementa, ki se nahaja na vrhu molekule in je glavni vzrok, da ima katepsin B endopeptidazno in eksopeptidazno aktivnost (10, 19, 28–30). Pri kislem pH, ko je zaporna zanka pripeta na telo encima, ima katepsin B eksopeptidazno aktivnost. Zaradi tega se v literaturi eksopeptidazno aktivnost pogosto povezuje z njegovo fiziološko funkcijo znotraj lizosomov (10, 28, 29). Z naraščanjem pH pride do konformacijske spremembe zaporne zanke in do povečanja endopeptidazne aktivnosti katepsina B (10, 28, 30). Zaradi tega endopeptidazno aktivnost katepsina B povezujejo z zunajceličnim katepsinom B, ki je povezan z razgradnjo ZCM. Slednja je pomembna pri angiogenezi, tumorski invaziji in metastaziranju ter jo zato pogostokrat enačijo s patološko vlogo katepsina B (24, 26, 28, 30, 59, 67). Katepsin B je potrjena tarča pri zdravljenju rakavih obolenj, vendar kljub številnim raziskavam v klinični uporabi še ni učinkovitih inhibitorjev katepsina B (79). Med drugimi je bil kot inhibitor katepsina B identificiran nitroksolin, ki se je izkazal kot učinkovit nekovalentni reverzibilni inhibitor katepsina B, ki selektivno inhibira endopeptidazno aktivnost katepsina B v nizko mikromolarnem območju. Na podlagi funkcijskih *in vitro* celičnih testov se je izkazalo, da nitroksolin dobro prehaja celično membrano in tako značilno inhibira zunajcelično in znotrajcelično razgradnjo ZCM ter tumorsko invazijo. Nitroksolin je bil v nadaljevanju uporabljen kot osnova za načrtovanje in sintezo novih nekovalentnih inhibitorjev katepsina B (90). V preliminarnih encimskih testih so se nekatere spojine izkazale kot boljši inhibitorji katepsina B kot nitroksolin.

V prvem delu diplomske naloge smo z encimsko kinetiko določili konstante inhibicije za izbrane derivate nitroksolina napram endopeptidazni in eksopeptidazni aktivnosti katepsina B (4–7, 9, 11). Z uporabo endopeptidaznega in eksopeptidaznega substrata za katepsin B smo ugotovili, da sta spojini **1** in **2** selektivna inhibitorja endopeptidazne aktivnosti katepsina B. Za razliko od nitroksolina, ki je pri uporabi endopeptidaznega substrata izkazal mešani tip inhibicije (90), sta izkazali akompetitivni tip inhibicije ter se tako vezali na kompleks ES in ne na prosti encim. Mešani tip inhibicije, tako kot nitroksolin (90), je

pri uporabi endopeptidaznega substrata izkazala le spojina **3**. Nadalje smo ugotovili, da sta spojini **3** in **4** selektivna inhibitorja eksopeptidazne aktivnosti katepsina B. Pri uporabi eksopeptidaznega substrata so vse spojine, tako kot nitroksolin (90), izkazovale nekompetitivni tip inhibicije. V primerjavi z nitroksolinom (90) sta spojini **1** in **2** izkazali boljšo endopeptidazno aktivnost in slabšo eksopeptidazno aktivnost, spojini **3** in **4** pa ravno obratno, boljšo eksopeptidazno aktivnost in slabšo endopeptidazno aktivnost (Tabela III). To nakazuje, da so te spojine izkazale bolj selektivno inhibicijo katepsina B kot nitroksolin, in sicer sta bili spojini **1** in **2** bolj selektivni za endopeptidazno aktivnost katepsina B kot nitroksolin, spojini **3** in **4** pa za inhibicijo eksopeptidazne aktivnosti katepsina B kot nitroksolin. Pri spojinah **5** in **6** smo pri uporabi endopeptidaznega in eksopeptidaznega substrata za katepsin B dobili podobne vrednosti konstant inhibicije (Tabela III), kar nakazuje, da ti dve spojini neselektivno inhibirata obe aktivnosti katepsina B. Rezultati, dobljeni z uporabo endopeptidaznega in eksopeptidaznega substrata za katepsin B za spojini **5** in **6**, se nekoliko razlikujejo od rezultatov, dobljenih za ti dve spojini v predhodni študiji (90). V tej študiji je spojina **5** pri uporabi endopeptidaznega substrata izkazala nekoliko slabšo aktivnost ( $117.8 \pm 3.1 \mu\text{M}$ ) v primerjavi z našimi rezultati, pri uporabi eksopeptidaznega substrata pa nekoliko boljšo aktivnost ( $108.2 \pm 13.4 \mu\text{M}$ ) in drugačen mehanizem inhibicije (kompetitivni tip inhibicije) (Tabela III) (90). Za spojino **6** so v tej študiji sicer dobili pri uporabi endopeptidaznega in eksopeptidaznega substrata podobne vrednosti konstant inhibicije ( $129.8 \pm 3.5 \mu\text{M}$  za endopeptidazno aktivnost in  $116.2 \pm 15.4 \mu\text{M}$  za eksopeptidazno aktivnost katepsina B), kot smo jih dobili v našem primeru, vendar je v tej študiji spojina **6** pri uporabi eksopeptidaznega substrata, tako kot spojina **5**, izkazala kompetitivni tip inhibicije za razliko od naših rezultatov, kjer je izkazala nekompetitivni tip inhibicije (Tabela III) (90). Kljub razlikam pa so bile vrednosti konstant inhibicije dobljene v obeh primerih v istem velikostnem razredu. Spojini **5** in **6** sta v primerjavi z nitroksolinom (90) izkazali boljšo eksopeptidazno in slabšo endopeptidazno aktivnost in sta tako izkazali slabše selektivno delovanje za endopeptidazno in eksopeptidazno aktivnost katepsina B kot nitroksolin (90).

Nato smo s pomočjo encimske kinetike določili konstante inhibicije derivatom nitroksolina napram katepsinoma H in L. Katepsin H zaradi propeptidnega dela deluje kot aminopeptidaza (eksopeptidaza), katepsin L pa, tako kot večina ostalih katepsinov, deluje kot endopeptidaza (4–7, 9, 11). Pri uporabi substrata za katepsin H so spojine izkazovale

različne tipe inhibicije. Nekompetitivni tip inhibicije, tako kot pri nitroksolinu (90), so izkazovale spojine **2**, **4** in **6**. Pri uporabi substrata za katepsin L, kjer je nitroksolin prav tako izkazal nekompetitivni tip inhibicije (90), so vse naše uporabljene spojine izkazovale kompetitivni tip inhibicije. To nakazuje, da se vse spojine vežejo le na prosti encim in ne na kompleks ES. Spojine **1**, **2**, **3** in **4** so, v primerjavi z nitroksolinom (90), izkazale večjo selektivnost za inhibicijo katepsina B kot za inhibicijo katepsinov H in L. Spojini **5** in **6** sta izkazovali boljšo aktivnost pri inhibiciji katepsinov H in L kot nitroksolin in sta tako, v primerjavi z nitroksolinom (90), izkazovali slabše selektivno delovanje za posamezen katepsin B, H ali L.

Katepsin B ima pomembno vlogo v različnih procesih, povezanih z razvojem in napredovanjem tumorjev (5, 6, 8, 26). Med drugim z razgradnjo ZCM sodeluje tudi pri invaziji tumorskih celic (24, 26, 59, 71). Pri razgradnji ZCM v tumorskih celicah katepsin B sodeluje pri zunajcelični in znotrajcelični razgradnji ZCM (5, 24, 26, 59, 61, 64, 71). Pri zunajcelični razgradnji ZCM sodeluje katepsin B, ki je vezan na celično membrano in izločen iz tumorske celice v zunajcelično okolje (24). Do znotrajcelične razgradnje ZCM s katepsinom B pa prihaja v lizosomih po predhodni endocitozi delno razgrajenih komponent ZCM (5, 61, 64, 73). V nadaljevanju diplomske naloge smo zato s funkcijskimi testi na celični liniji MCF-10A neoT ovrednotili vpliv inhibitorjev na zunajcelično in znotrajcelično razgradnjo proteinov ZCM ter njihov vpliv na tumorsko invazijo v 2D *in vitro* modelu celične invazije. S pomočjo celične linije MMTV-PyMT pa smo določili še vpliv inhibitorjev na invazijo celic v 3D *in vitro* modelu, ki temelji na implantaciji sferoidov v Matrigel™.

Najprej smo na obeh uporabljenih celičnih linijah MCF-10A neoT in MMTV-PyMT določili vpliv inhibitorjev na viabilnost celic. S tem smo želeli izključiti možnost, da je zmanjšanje razgradnje ZCM in tumorske invazije posledica citotoksičnosti uporabljenih inhibitorjev. Pri obeh celičnih linijah v uporabljenih koncentracijah in časovnih intervalih noben od inhibitorjev ni vplival na viabilnost celic (Slika 6 in Slika 7). V nadaljevanju zato lahko trdimo, da je zmanjšanje razgradnje ZCM in invazije celic ob uporabi inhibitorjev posledica njihovega delovanja na katepsin B in ne njihove citotoksičnosti.

ZCM je kompleksna mreža kolagenov, fibrilarnih glikoproteinov in proteoglikanov (26). Kot model razgradnje proteinov ZCM smo zato uporabili DQ-kolagen IV, ki je sestavni del bazalne membrane in je za raziskovalne namene označen s fluoresceinom. Ob njegovi



proteolitični razgradnji se sprošča fluorescein, katerega fluorescenco lahko spremljamo z različnimi tehnikami, kot so fluorescenčna mikroskopija, pretočna citometrija in spektrofluorimetrija. V testih smo kot kontroli uporabljali že uveljavljena inhibitorja katepsina B CA-074 in CA-074Me (83, 85).

Med izbranimi inhibitorji katepsina B se je kot najučinkovitejša pri funkcijskih *in vitro* testih na celičnih linijah izkazala spojina **2**, ki je bila že v encimskih testih najučinkovitejša pri inhibiciji endopeptidazne aktivnosti katepsina B. Spojina **2** je značilno inhibirala tako zunajcelično kot znotrajcelično razgradnjo proteinov ZCM (Slika 8 in Slika 10), kar je bilo razvidno tudi pod fluorescenčnim mikroskopom (Slika 11). Iz naštetega lahko sklepamo, da spojina **2** inhibira zunajcelični in znotrajcelični katepsin B, kar je dokaz, da ima, podobno kot nitroksolin, ugodne hidrolipofilne lastnosti ter lahko prehaja celično membrano (90). Poleg tega je spojina **2** učinkovito inhibirala tudi invazijo celic MCF-10A neoT in MMTV-PyMT v 2D in 3D *in vitro* modelih tumorske invazije (Slika 13 in Slika 14). Spojina **2** se je izkazala kot boljši inhibitor tumorske invazije kot CA-074 v 2D *in vitro* modelu celične invazije (Slika 13). Vzrok za to je verjetno v tem, da spojina **2** inhibira tako zunajcelično kot znotrajcelično razgradnjo proteinov ZCM, medtem ko CA-074 inhibira znotrajcelično razgradnjo proteinov ZCM šele po daljši izpostavljenosti celic (72). Spojina **2** se je izkazala tudi kot boljši inhibitor invazije v primerjavi z nitroksolinom v 2D *in vitro* modelu tumorske invazije (90). Selektivna inhibicija endopeptidazne aktivnosti katepsina B tako uspešno zmanjša obseg zunaj- in znotrajcelične razgradnje ZCM ter s tem invazije celic v 2D in 3D *in vitro* modelu tumorske invazije, s čimer smo potrdili vlogo endopeptidazne aktivnosti katepsina B pri tumorski invaziji.

Poleg tega smo ugotovili, da za učinkovito inhibicijo razgradnje ZCM in tumorske invazije ni pomembna le inhibicija endopeptidazne aktivnosti katepsina B, ampak so pri tem zelo pomembne tudi hidrolipofilne lastnosti inhibitorjev in njihovo porazdeljevanje v celice. To je lepo razvidno pri spojini **1**, ki se je v encimskih testih izkazala kot učinkovit selektiven inhibitor endopeptidazne aktivnosti katepsina B, pri funkcijskih testih na celičnih linijah pa ni pokazala pričakovanega delovanja. Spojina **1** je pri celičnih testih učinkovito inhibirala le zunajcelično razgradnjo proteinov ZCM (Slika 8), ni pa imela vpliva na inhibicijo znotrajcelične razgradnje proteinov ZCM in inhibicijo invazije celic v 2D in 3D *in vitro* modelu tumorske invazije (Slika 10, Slika 13 in Slika 14). Iz tega lahko sklepamo, da spojina **1** inhibira le zunajcelični katepsin B. Slednje lahko pripišemo njenim neugodnim

hidrolipofilnim lastnostim. Za razliko od CA-074, ki je močno polarna spojina in zaradi tega ne prehaja celične membrane (79, 83, 85), je spojina **1** lipofilna, kar je razvidno tudi iz njenega porazdelitvenega koeficienta (Tabela I). Temu lahko pripišemo morebitno slabšo topnost in posledično slabšo inhibicijo katepsina B, poleg tega pa je možno, da se spojina **1** zaradi lipofilne narave pri prehodu celične membrane v njej zadržuje in posledično ne vstopa v celico in lizosome, kjer bi inhibirala znotrajcelični katepsin B. Že v predhodnih študijah na nitroksolinu in njegovih analogih so ugotovili, da ima hidroksilna skupina na mestu 8, kljub temu da ne tvori direktnih interakcij s katepsinom B, pomembno vlogo pri njegovi inhibiciji. Njena odstranitev, zaradi zmanjšanja hidrofilnosti in posledično topnosti spojine, bistveno prispeva k upadu inhibicije katepsina B (90). Spojina **1** ima v svoji strukturi namesto hidroksilne amino skupino, istočasno ima kinolonski obroč zamenjan z naftalenskim, na mestu 7 pa ima vezan brom. Vsi ti elementi prispevajo k nižji hidrofilnosti molekule v primerjavi z nitroksolinom. Spojina **1** je tako dokaz, da za delovanje inhibitorjev na celicah ni pomembna le njihova selektivnost za inhibicijo endopeptidazne aktivnosti katepsina B in njihova jakost, ampak so pri tem ključne tudi hidrolipofilne lastnosti spojin, ustreznost polarnosti spojin in možnost prehajanja v celice, saj le-te odločajo, ali se bo spojina pravilno porazdeljevala in ali bo prišla do mesta, kjer bi lahko delovala in izkazala svoj učinek.

Pri funkcijskih testih na celičnih linijah so tudi spojine, za katere smo ugotovili, da so bodisi selektivni inhibitorji eksopeptidazne aktivnosti katepsina B, bodisi neselektivni inhibitorji katepsina B, izkazovale učinke pri inhibiciji razgradnje ZCM in tumorske invazije. Spojini **3** in **4**, ki sta selektivna inhibitorja eksopeptidazne aktivnosti katepsina B, sta tako značilno inhibirali zunajcelično razgradnjo proteinov ZCM in invazijo celic v 2D *in vitro* modelu tumorske invazije (Slika 8 in Slika 13), nista pa inhibirali invazije celic v 3D *in vitro* modelu tumorske invazije (Slika 14). Spojina **4** je poleg tega značilno inhibirala znotrajcelično razgradnjo proteinov ZCM, medtem ko je spojina **3** pri znotrajcelični razgradnji proteinov ZCM izkazovala slabšo inhibicijo (Slika 10). Vrednosti inhibicije pri spojini **3** so bile sicer podobne vrednostim, dobljenimi s spojino CA-074Me, ki je znotrajcelični inhibitor katepsina B (85), vendar kljub temu le-ta ni bila značilna. Spojini **3** in **4** sta poleg spojine **1** med uporabljenimi spojinami najbolj nepolarni, saj imata med izbranimi spojinami najvišja porazdelitvena koeficienta (Tabela I). To je verjetni razlog za odsotnost inhibicije invazije celic v 3D *in vitro* modelu tumorske invazije zaradi

slabše topnosti in posledično slabšega porazdeljevanja v sferoide. Znano je, da sferoidi predstavljajo model neožiljenih stopenj tumorjev in se bolj reprezentativno odzivajo na anti-tumorno terapijo kot njihovi 2D analogi (96). Lipofilnost spojin **3** in **4** je posledica zamenjave hidroksilne skupine na mestu 8 z večjo nasičeno hidrofobno skupino. Ker se ti dve spojini razlikujeta od ostalih uporabljenih inhibitorjev v ravno tem strukturnem elementu, je verjetno le-ta odgovoren tudi za njihovo selektivnost za eksopeptidazno aktivnost katepsina B. Spojina **3** ima, tako kot spojina **1**, odstranjen obročni dušik in kinolonski obroč zamenjan z naftalenskim. Ker sta ti dve spojini hkrati tudi najslabša inhibitorja znotrajcelične razgradnje proteinov ZCM, bi iz tega lahko sklepali, da ima, poleg polarnosti spojine, tudi obročni dušik v kinolonskem obroču pomembno vlogo pri prehajanju inhibitorjev v celice in inhibiciji katepsina B znotraj celic. Spojini **3** in **4** sta, kljub svoji selektivnosti za eksopeptidazno aktivnost katepsina B, ohranili določeno stopnjo inhibicije razgradnje ZCM, čeprav slednjo v literaturi pripisujejo predvsem endopeptidazni aktivnosti katepsina B (28, 30, 67). Naši rezultati tako potrjujejo vpletenost tudi eksopeptidazne aktivnosti katepsina B v procese razgradnje proteinov ZCM in tumorske invazije. Slednje je v skladu z izsledki raziskave, ki je pokazala kompenzatorno vlogo za karboksipeptidazi katepsina B in X pri tumorski invaziji in tudi da karboksipeptidazna vloga katepsinov značilno prispeva k tumorski invaziji (97, 98).

Razgradnjo ZCM in tumorsko invazijo v testih izvedenih na celičnih linijah sta inhibirali tudi spojini **5** in **6**. Ti spojini nista selektivni za endopeptidazno oziroma eksopeptidazno aktivnosti katepsina B, niti za posamezen katepsin B, H ali L. Strukturno sta spojini **5** in **6** najbolj podobni nitroksolinu in spojini **2**, od katerih se razlikujeta le po substituentu na mestu 7 kinolonskega obroča. Na mestu 7 imata spojini vezan večji hidrofobni nenasičeni substituent, ki se veže v S1' podmesto katepsina B in z njim tvori hidrofobne interakcije ter tako boljše inhibira eksopeptidazno aktivnost encima v primerjavi z nitroksolinom (90). Pri funkcijskih testih na celičnih linijah sta spojini **5** in **6** značilno inhibirali zunajcelično in znotrajcelično razgradnjo proteinov ZCM ter invazijo celic v 3D *in vitro* modelu tumorske invazije (Slika 8, Slika 10 in Slika 14). Pri invaziji celic v 2D *in vitro* modelu tumorske invazije je ob prisotnosti spojin **5** in **6** sicer prišlo do inhibicije invazije, vendar le-ta ni bila značilna (Slika 13). Spojini tako inhibirata zunaj- in znotrajcelični katepsin B, na podlagi česar lahko sklepamo, da imata tudi ugodne hidrolipofilne lastnosti. Le-te se še posebej odražajo pri inhibiciji invazije na 3D *in vitro* celičnem modelu na sferoidih, saj sta se ti dve

spojini, poleg spojine **2** in nitroksolina, za katerega je bilo delovanje dokazano že v predhodni študiji (90), edini izkazali kot učinkoviti. Dobra učinkovitost spojin **5** in **6** je, poleg njihovih ugodnih hidrolipofilnih lastnosti, lahko posledica tudi njihovega sinergističnega delovanja na katepsina H in L, saj izkazujeta podobno aktivnost za inhibicijo aktivnosti katepsinov H in L kot za inhibicijo aktivnosti katepsina B.

Pri zagotavljanju ugodnih hidrolipofilnih lastnosti je najverjetneje ključnega pomena hidroksilna skupina na mestu 8 kinolonskega obroča. Vse uporabljene spojine, ki so imele ta strukturni element, to so spojine **2**, **5** in **6** ter nitroksolin (90), so imele nižji porazdelitveni koeficient in so bile bolj hidrofilne, so značilno inhibirale invazijo celic v 3D *in vitro* celičnem modelu. Spojine brez hidroksilne skupine, to so spojine **1**, **3** in **4**, pa so imele višje porazdelitvene koeficiente in so bile bolj lipofilne, na invazijo celic v 3D *in vitro* celičnem modelu niso vplivale. Na podlagi rezultatov, dobljenih za spojin **5** in **6**, ki sta imeli najvišje konstante inhibicije katepsina B in najmanjšo selektivnost pri encimskih testih, pri celičnih testih pa sta učinkovito inhibirali razgradnjo ZCM in tumorsko invazijo, lahko zaključimo, da je poleg nizkih konstant inhibicije, dobljenih pri encimskih testih, za učinkovito delovanje inhibitorjev pri funkcijskih testih na celicah pomembno tudi njihovo porazdeljevanje v celicah, njihove hidrolipofilne lastnosti, saj so le-te ključne, da inhibitor pride do mesta delovanja. Kljub temu pa spojin **5** in **6** zaradi svoje neselektivnosti za endopeptidazno in eksopeptidazno aktivnost katepsina B ter za katepsina H in L nista primerni kot inhibitorja katepsina B.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da na začetku postavljena hipoteza, da lahko s selektivno inhibicijo endopeptidazne oziroma eksopeptidazne aktivnosti katepsina B vplivamo na fenotipske lastnosti tumorskih celic in tako zavremo razgradnjo ZCM in posledično tumorsko invazijo, drži. Hkrati pa smo ugotovili, da so pri inhibiciji razgradnje ZCM in tumorske invazije na celičnih linijah, poleg intrinzične aktivnosti inhibitorjev katepsina B, pomembne tudi njihove hidrolipofilne lastnosti, saj so te ključne za prehajanje inhibitorjev preko celične membrane in inhibicijo katepsina B znotraj celic ter posledično inhibicijo znotrajcelične razgradnje proteinov ZCM, ki tudi ključno prispeva k tumorski invaziji. Kot potencialne nove inhibitorje katepsina B tako predlagamo istočasne inhibitorje endopeptidazne in eksopeptidazne aktivnosti katepsina B, ki bi hkrati imeli tudi ugodne hidrolipofilne lastnosti.

## 6 SKLEPI

- Spojini 1 in 2 sta selektivna inhibitorja endopeptidazne aktivnosti katepsina B, spojini 3 in 4 sta selektivna inhibitorja eksopeptidazne aktivnosti katepsina B, spojini 5 in 6 pa nista selektivni niti za endopeptidazno niti za eksopeptidazno aktivnost katepsina B niti za posamezen katepsin B, H ali L.
- Kot najboljši inhibitor med uporabljenimi spojinami se je, tako v encimskih testih kot pri funkcijskih testih na celičnih linijah, izkazala spojina 2.
- S selektivno inhibicijo endopeptidazne in eksopeptidazne aktivnosti katepsina B lahko specifično zavremo razgradnjo zunajceličnega matriksa in posledično tumorsko invazijo.
- Pri inhibiciji razgradnje zunajceličnega matriksa in tumorske invazije na celičnih linijah so poleg intrinzične aktivnosti inhibitorjev katepsina B, pomembne tudi njihove hidrofilno-lipofilne lastnosti, saj so te ključne za prehajanje inhibitorjev preko celične membrane in inhibicijo katepsina B znotraj celic ter posledično inhibicijo znotrajcelične razgradnje proteinov zunajceličnega matriksa, ki tudi ključno prispeva k tumorski invaziji.

## 7 LITERATURA

1. Turk B: Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 785–99.
2. Puente XS, Sánchez LM, Overall CM, López-Otín C: Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Gen* 2003; 4: 544–58.
3. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A: MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: D343–50.
4. Turk V, Turk B, Turk D: Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J* 2001; 20: 4629–33.
5. Mohamed MM, Sloane BF: Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 764–75.
6. Turk V, Turk B, Guncar G, Turk D, Kos J: Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. *Adv Enzyme Regul* 2002; 42: 285–303.
7. Turk B, Turk D, Turk V: Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 98–111.
8. Berdowska I: Cysteine proteases as disease markers. *Clin Chim Acta* 2004; 342: 41–69.
9. Turk D, Guncar G: Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003; 59: 203–13.
10. Musil D, Zucic D, Turk D, Engh RA, Mayr I, Huber R, Popovic T, Turk V, Towatari T, Katunuma N, Bode W: The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J* 1991; 10: 2321–30.
11. Barrett AJ, Kirschke H: Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol* 1981; 80 Pt C: 535–61.
12. Conus S, Simon HU: Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem Pharmacol* 2008; 76: 1374–82.
13. Dickinson DP: Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13: 238–75.

14. Palermo C, Joyce JA: Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2008; 29: 22–8.
15. Lah TT, Kos J: Cysteine proteinases in cancer progression and their clinical relevance for prognosis. *Biol Chem* 1998; 379:125–30.
16. Kos J, Werle B, Lah T, Brunner N: Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer. *Internat J Biol Markers* 2000; 15: 84–9.
17. Fong D, Chan MM, Hsieh WT, Menninger JC, Ward DC: Confirmation of the human cathepsin B gene (CTSB) assignment to chromosome 8. *Hum Genet* 1992; 89: 10–2.
18. <http://www.uniprot.org/uniprot/P07858> (citirano 12. marec 2013)
19. Mort JS, Buttle DJ: Cathepsin B. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 715–20.
20. Tanaka Y, Tanaka R, Kawabata T, Noguchi Y, Himeno M: Lysosomal cysteine protease, cathepsin B, is targeted to lysosomes by the mannose 6-phosphate-independent pathway in rat hepatocytes: site-specific phosphorylation in oligosaccharides of the proregion. *J Biochem* 2000; 128: 39–48.
21. Turk D, Podobnik M, Kuhelj R, Dolinar M, Turk V: Crystal structures of human procathepsin B at 3.2 and 3.3 Angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett* 1996; 384: 211–4.
22. Rozman J, Stojan J, Kuhelj R, Turk V, Turk B: Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process. *FEBS Lett* 1999; 459: 358–62.
23. Rowan AD, Mason P, Mach L, Mort JS: Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form in vitro. *J Biol Chem* 1992; 267: 15993–9.
24. Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF: Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* 2000; 291: 113–35.
25. Podobnik M, Kuhelj R, Turk V, Turk D: Crystal structure of the wild-type human procathepsin B at 2.5 Å resolution reveals the native active site of a papain-like cysteine protease zymogen. *J Mol Biol* 1997; 271: 774–88.

26. Skrzydlewska E, Sulkowska M, Koda M, Sulkowski S: Proteolytic-antiproteolytic balance and its regulation in carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1251–66.
27. Linebaugh BE, Sameni M, Day NA, Sloane BF, Keppler D: Exocytosis of active cathepsin B enzyme activity at pH 7.0, inhibition and molecular mass. *Eur J Biochem* 1999; 264: 100–9.
28. Illy C, Quraishi O, Wang J, Purisima E, Vernet T, Mort JS: Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J Biol Chem* 1997; 272: 1197–202.
29. Krupa JC, Hasnain S, Nägler DK, Ménard R, Mort JS: S2' substrate specificity and the role of His110 and His111 in the exopeptidase activity of human cathepsin B. *Biochem J* 2002; 361: 613–9.
30. Nägler DK, Storer AC, Portaro FC, Carmona E, Juliano L, Ménard R: Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. *Biochemistry* 1997; 36: 12608–15.
31. Cygler M, Mort JS: Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie* 1997; 79: 645–52.
32. Rzychon M, Chmiel D, Stec-Niemczyk J: Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochim Pol* 2004; 51: 861–73.
33. Markt P, McGoohan C, Walker B, Kirchmair J, Feldmann C, De Martino G, Spitzer G, Distinto S, Schuster D, Wolber G, Laggner C, Langer T: Discovery of novel cathepsin S inhibitors by pharmacophore-based virtual high-throughput screening. *J Chem Inf Model* 2008; 48: 1693–705.
34. Brix K, Lemansky P, Herzog V: Evidence for extracellularly acting cathepsins mediating thyroid hormone liberation in thyroid epithelial cells. *Endocrinology* 1996; 137: 1963–74.
35. Linke M, Herzog V, Brix K: Trafficking of lysosomal cathepsin B-green fluorescent protein to the surface of thyroid epithelial cells involves the endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Sci* 2002; 115: 4877–89.
36. Okamura-Oho Y, Zhang S, Callahan JW, Murata M, Oshima A, Suzuki Y: Maturation and degradation of beta-galactosidase in the post-Golgi compartment are regulated by cathepsin B and a non-cysteine protease. *FEBS Lett* 1997; 419: 231–4.



37. Jutras I, Reudelhuber TL: Prorenin processing by cathepsin B in vitro and in transfected cells. *FEBS Lett* 1999; 443: 48–52.
38. Halangk W, Lerch MM, Brandt-Nedelev B, Roth W, Ruthenbueger M, Reinheckel T, Domschke W, Lippert H, Peters C, Deussing J: Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 2000; 106: 773–81.
39. Hill PA, Buttle DJ, Jones SJ, Boyde A, Murata M, Reynolds JJ, Meikle MC: Inhibition of bone resorption by selective inactivators of cysteine proteinases. *J Cell Biochem* 1994; 56: 118–30.
40. Zhang T, Maekawa Y, Hanba J, Dainichi T, Nashed BF, Hisaeda H, Sakai T, Asao T, Himeno K, Good RA, Katunuma N: Lysosomal cathepsin B plays an important role in antigen processing, while cathepsin D is involved in degradation of the invariant chain in ovalbumin-immunized mice. *Immunology* 2000; 100: 13–20.
41. Guo X, Dhodapkar KM: Central and overlapping role of Cathepsin B and inflammasome adaptor ASC in antigen presenting function of human dendritic cells. *Hum Immunol* 2012; 73: 871–8.
42. Guicciardi ME, Miyoshi H, Bronk SF, Gores GJ: Cathepsin B knockout mice are resistant to tumor necrosis factor-alpha-mediated hepatocyte apoptosis and liver injury: implications for therapeutic applications. *American J Pathol* 2001; 159: 2045–54.
43. Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, Elling F, Leist M, Jäättelä M: Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 2001; 153: 999–1010.
44. Büth H, Wolters B, Hartwig B, Meier-Bornheim R, Veith H, Hansen M, Sommerhoff CP, Schaschke N, Machleidt W, Fusenig NE, Boukamp P, Brix K: HaCaT keratinocytes secrete lysosomal cysteine proteinases during migration. *Eur J Cell Biol* 2004; 83: 781–95.
45. Büth H, Luigi Buttigieg P, Ostafe R, Rehders M, Dannenmann SR, Schaschke N, Stark H-J, Boukamp P, Brix K: Cathepsin B is essential for regeneration of scratch-wounded normal human epidermal keratinocytes. *Eur J Cell Biol* 2007; 86: 747–61.

46. Felbor U, Kessler B, Mothes W, Goebel HH, Ploegh HL, Bronson RT, Olsen BR: Neuronal loss and brain atrophy in mice lacking cathepsins B and L. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 7883–8.
47. Hashimoto Y, Kakegawa H, Narita Y, Hachiya Y, Hayakawa T, Kos J, Turk V, Katunuma N: Significance of cathepsin B accumulation in synovial fluid of rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 334–339.
48. Berardi S, Lang a, Kostoulas G, Hörler D, Vilei EM, Baici A: Alternative messenger RNA splicing and enzyme forms of cathepsin B in human osteoarthritic cartilage and cultured chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1819–31.
49. Van Acker GJD, Saluja AK, Bhagat L, Singh VP, Song AM, Steer ML: Cathepsin B inhibition prevents trypsinogen activation and reduces pancreatitis severity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 283: G794–800.
50. Kaznelson DW, Bruun S, Monrad A, Gjerløv S, Birk J, Röpke C, Norrild B: Simultaneous human papilloma virus type 16 E7 and cdk inhibitor p21 expression induces apoptosis and cathepsin B activation. *Virology* 2004; 320: 301–12.
51. Burster T, Giffon T, Dahl ME, Björck P, Bogyo M, Weber E, Mahmood K, Lewis DB, Mellins ED: Influenza A virus elevates active cathepsin B in primary murine DC. *Int Immunol* 2007; 19: 645–55.
52. Hook V, Toneff T, Bogyo M, Greenbaum D, Medzihradszky KF, Neveu J, Lane W, Hook G, Reisine T: Inhibition of cathepsin B reduces beta-amyloid production in regulated secretory vesicles of neuronal chromaffin cells: evidence for cathepsin B as a candidate beta-secretase of Alzheimer's disease. *Biol Chem* 2005; 386: 931–40.
53. Hook V, Funkelstein L, Wegrzyn J, Bark S, Kindy M, Hook G: Cysteine Cathepsins in the secretory vesicle produce active peptides: Cathepsin L generates peptide neurotransmitters and cathepsin B produces beta-amyloid of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1824:89–104.
54. [http://www.onko-i.si/za\\_javnost\\_in\\_bolnike/osnovna\\_dejstva\\_o\\_raku/](http://www.onko-i.si/za_javnost_in_bolnike/osnovna_dejstva_o_raku/) (citirano 12. marec 2013)
55. [http://www.stat.si/letopis/2012/04\\_12/04-13-12.htm](http://www.stat.si/letopis/2012/04_12/04-13-12.htm) (citirano 12. marec 2013)
56. Peto J: Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 2001; 411: 390–5.

57. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646–74.
58. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70.
59. Roshy S, Sloane BF, Moin K: Pericellular cathepsin B and malignant progression. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22: 271–86.
60. Lah TT, Durán Alonso MB, Van Noorden CJ: Antiprotease therapy in cancer: hot or not? *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6: 257–79.
61. Kos J, Lah TT: Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol Rep* 1998; 5: 1349–61.
62. Koblinski JE, Dosescu J, Sameni M, Moin K, Clark K, Sloane BF: Interaction of human breast fibroblasts with collagen I increases secretion of procathepsin B. *J Biol Chem* 2002; 277: 32220–7.
63. Sameni M, Dosescu J, Moin K, Sloane BF: Functional imaging of proteolysis: stromal and inflammatory cells increase tumor proteolysis. *Mol Imaging* 2003; 2: 159–75.
64. Premzl A, Zavasnik-Bergant V, Turk V, Kos J: Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. *Exp Cell Res* 2003; 283: 206–14.
65. Rozhin J, Sameni M, Ziegler G, Sloane BF: Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res* 1994; 54: 6517–25.
66. Mai J, Finley RL, Waisman DM, Sloane BF: Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 12806–12.
67. Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, Rizzi CC, Faljoni-Alario a, Carmona E, Juliano L, Nader HB, Tersariol IL: Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem* 2001; 276: 944–51.
68. Lorenzo K, Ton P, Clark JL, Coulibaly S, Mach L: Invasive properties of murine squamous carcinoma cells: secretion of matrix-degrading cathepsins is attributable to a deficiency in the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *Cancer Res* 2000; 60: 4070–6.

69. Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA: General mechanisms of metastasis. *Cancer* 1997; 80: 1529–37.
70. Buck MR, Karustis DG, Day NA, Honn KV, Sloane BF: Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J* 1992; 282 (Pt 1): 273–8.
71. Premzl A, Turk V, Kos J: Intracellular proteolytic activity of cathepsin B is associated with capillary-like tube formation by endothelial cells in vitro. *J Cell Biochem* 2006; 97: 1230–40.
72. Szpaderska AM, Frankfater A: An intracellular form of cathepsin B contributes to invasiveness in cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3493–500.
73. Ahram M, Sameni M, Qiu RG, Linebaugh B, Kirn D, Sloane BF: Rac1-induced endocytosis is associated with intracellular proteolysis during migration through a three-dimensional matrix. *Exp Cell Res* 2000; 260: 292–303.
74. Kjølner L, Engelholm LH, Høyer-Hansen M, Danø K, Bugge TH, Behrendt N: uPARAP/endo180 directs lysosomal delivery and degradation of collagen IV. *Exp Cell Res* 2004; 293: 106–116.
75. Carmeliet P: Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9: 653–60.
76. Im E, Venkatakrishnan A, Kazlauskas A: Cathepsin B regulates the intrinsic angiogenic threshold of endothelial cells. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 3488–500.
77. Kostoulas G, Lang A, Nagase H, Baici A: Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *FEBS Lett* 1999; 455: 286–90.
78. Dubin G: Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:653–69.
79. Frlan R, Gobec S: Inhibitors of cathepsin B. *Curr Med Chem* 2006; 13: 2309–27.
80. Ochieng J, Chaudhuri G: Cystatin superfamily. *J Health Care Poor Underserved* 2010; 21: 51–70.
81. Hanada K, Tamai M, Yamagishi M, Ohmura S, Sawada J, Tanaka I: Isolation and characterization of E 64, a new thiol protease inhibitor. *Agric Biol Chem* 1978; 42: 523–528.
82. Watanabe D, Yamamoto A, Tomoo K, Matsumoto K, Murata M, Kitamura K, Ishida T: Quantitative evaluation of each catalytic subsite of cathepsin B for

- inhibitory activity based on inhibitory activity-binding mode relationship of epoxysuccinyl inhibitors by X-ray crystal structure analyses of complexes. *J Mol Biol* 2006; 362: 979–93.
83. Murata M, Miyashita S, Yokoo C, Tamai M, Hanada K, Hatayama K, Towatari T, Nikawa T, Katunuma N: Novel epoxysuccinyl peptides. Selective inhibitors of cathepsin B, in vitro. *FEBS Lett* 1991; 280: 307–10.
84. Yamamoto A, Hara T, Tomoo K, Ishida T, Fujii T, Hata Y, Murata M, Kitamura K: Binding mode of CA074, a specific irreversible inhibitor, to bovine cathepsin B as determined by X-ray crystal analysis of the complex. *J Biochem* 1997; 121: 974–7.
85. Buttle DJ, Murata M, Knight CG, Barrett AJ: CA074 methyl ester: a proinhibitor for intracellular cathepsin B. *Arch Biochem Biophys* 1992; 299:377–80.
86. Pan X, Tan N, Zeng G, Zhang Y, Jia R: Amentoflavone and its derivatives as novel natural inhibitors of human Cathepsin B. *Bioorg Med Chem* 2005; 13: 5819–25.
87. Zeng GZ, Pan XL, Tan NH, Xiong J, Zhang YM: Natural biflavones as novel inhibitors of cathepsin B and K. *Eur J Med Chem* 2006; 41: 1247–52.
88. Schenker P, Alfarano P, Kolb P, Caflisch A, Baici A: A double-headed cathepsin B inhibitor devoid of warhead. *Protein Sci* 2008; 17: 2145–55.
89. Sosič I, Mirković B, Turk S, Štefane B, Kos J, Gobec S: Discovery and kinetic evaluation of 6-substituted 4-benzylthio-1,3,5-triazin-2(1H)-ones as inhibitors of cathepsin B. *Eur J Med Chem* 2011; 46: 4648–56.
90. Mirković B, Renko M, Turk S, Sosič I, Jevnikar Z, Obermajer N, Turk D, Gobec S, Kos J: Novel mechanism of cathepsin B inhibition by antibiotic nitroxoline and related compounds. *ChemMedChem* 2011; 6: 1351–6.
91. Murugasu-Oei B, Dick T: In vitro activity of the chelating agents nitroxoline and oxine against *Mycobacterium bovis* BCG. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18: 579–82.
92. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD, Brenz R, McGrath CM, Russo J, Pauley RJ, Jones RF, Brooks SC: Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res* 1990; 50: 6075–86.

93. Basolo F, Elliott J, Tait L, Chen XQ, Maloney T, Russo IH, Pauley R, Momiki S, Caamano J, Klein-Szanto AJ: Transformation of human breast epithelial cells by c-Ha-ras oncogene. *Mol Carcinog* 1991; 4: 25–35.
94. Guy CT, Cardiff RD, Muller WJ: Induction of mammary tumors by expression of polyomavirus middle T oncogene: a transgenic mouse model for metastatic disease. *Mol Cell Biol* 1992; 12: 954–61.
95. Copeland RA: Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists. Wiley-Interscience, New York, 2005: 43-81
96. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK: Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 2003; 83: 173–80.
97. Vasiljeva O, Papazoglou A, Krüger A, Brodoefel H, Korovin M, Deussing J, Augustin N, Nielsen BS, Almholt K, Bogyo M, Peters C, Reinheckel T: Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Res* 2006; 66: 5242–50.
98. Sevenich L, Schurigt U, Sachse K, Gajda M, Werner F, Müller S, Vasiljeva O, Schwinde A, Klemm N, Deussing J, Peters C, Reinheckel T: Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 2497–502.