

# POMEN CISTEINSKIH PEPTIDAZ PRI NEURODEGENERATIVNIH BOLEZNIH

## IMPORTANCE OF CYSTEINE PEPTIDASES IN NEURODEGENERATIVE DISORDERS

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Lara Bolčina, mag.farm.<sup>1</sup>  
prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.<sup>1, 2</sup>  
izr. prof. dr. Anja Pišlar, mag. farm.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani,  
Aškerčeva cesta 7, 1000 Ljubljana

<sup>2</sup> Inštitut Jožef Stefan,  
Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: bolcina.lara@gmail.com

## 1 UVOD

Peptidaze so proteolitični encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi (1). Sprva je bila vloga peptidaz poznana le pri razgradnji proteinov v prebavni verigi, kasneje pa se je izkazalo, da je njihova vloga v človeškem organizmu bistveno kompleksnejša (1). Peptidaze s svojim delovanjem uravnavajo številne biološke procese v organizmu, kot so

## POVZETEK

Živčni sistem predstavlja široko raziskovalno področje za razvoj novih učinkovin, primernih za zdravljenje nevroloških in neurodegenerativnih bolezni. Pri tem imajo pomembno vlogo cisteinske peptidaze in drugi lizosomski proteini, ki s svojim delovanjem vplivajo na sintezo in razgradnjo možganskih peptidov ter tako regulirajo številne fiziološke in patološke procese v organizmu. Ključni pomen pri z vnetjem povezani neurodegeneraciji ima aktivirana mikroglia, ki s sproščanjem cisteinskih peptidaz vpliva na razvoj Alzheimerjeve in Parkinsonove bolezni. Proteolitično aktivnost cisteinskih peptidaz lahko regulirajo endogeni ali eksogeni zaviralci; slednji odpirajo možnosti za razvoj novih terapevtskih pristopov za zdravljenje neurodegenerativnih bolezni.

## KLJUČNE BESEDE:

Alzheimerjeva bolezen, cisteinski katepsini, neurodegeneracija, Parkinsonova bolezen, vnetni odziv

## ABSTRACT

The nervous system represents a broad field of potential pharmacological targets suitable for the development of new compounds for the treatment of neurological and neurodegenerative diseases. To date, a lot of research has focused on the role of cysteine peptidases, which play an important role in degradation of brain peptides playing either a neuroprotective or neurodegenerative role. Activated microglia has a significant role in inflammation-related neurodegeneration. By releasing cysteine cathepsins it promotes the development of Alzheimer's and Parkinson's disease. The proteolytic activity of cysteine cathepsins can be regulated by endogenous or exogenous inhibitors. Exogenous inhibitors open up possibilities for the development of new therapeutic approaches for the treatment of neurodegenerative diseases.

## KEY WORDS:

Alzheimer's disease, cysteine cathepsins, inflammation, neurodegeneration, Parkinson's disease

imunski odziv, celična delitev in celična smrt, podvojevanje DNA, sodelujejo pri preoblikovanju in razgradnji zunajceličnega matriksa, pri vzdrževanju hemostaze ter pri celjenju ran (1).



Poznavanje njihove fiziološke vloge je pomembno za razumevanje njihove vpletenosti v patološke procese (1). Peptidaze se pretežno nahajajo v vezikularnem sistemu endosomov/lizosomov, najdemo pa jih tudi v jedru, citosolu, na celični membrani ali v zunajceličnem prostoru (2). Glede na mesto hidrolize peptidne vezi peptidaze razdelimo na endopeptidaze in eksopeptidaze. Prve cepijo peptidno vez znotraj polipeptidne verige proteinov, druge pa na N-koncu (aminopeptidaze) oziroma C-koncu (karboksipeptidaze) polipeptidne verige (3). Glede na katalitsko skupino v aktivnem mestu jih razdelimo na serinske, cisteinske, aspartatne, glutamatne, asparaginske, treoninske, metalopeptidaze in peptidaze mešanega tipa (4).

## 2 CISTEINSKE PEPTIDAZE

Najobsežnejšo skupino peptidaz predstavljajo cisteinske peptidaze, del teh pa so lizosomske cisteinske peptidaze, ki jih krajše imenujemo kar katepsini. Mednje uvrščamo 11 človeških cisteinskih katepsinov (katepsini B, C, F, H, K, L, O, S, V, X in W) (4). Večina izmed njih je endopeptidaz (katepsini F, K, L, O, S, V), medtem ko eksopeptidazno aktivnost izkazujeta katepsina C (aminopeptidaza) in X (karboksimonopeptidaza). Katepsina B in H izkazujeta tako endopeptidazno kot tudi eksopeptidazno aktivnost. Ustrezno delovanje in aktivnost katepsinov zagotavlja rahlo kislo okolje znotraj lizosomov, njihova inaktivacija, z izjemo katepsina S, pa poteče pri nevtralnem pH v citosolu in zunajceličnem okolju (5).

Večina cisteinskih peptidaz je prisotnih v vseh tkivih, medtem ko je izražanje drugih značilno za določena tkiva, kjer imajo specifično vlogo pri različnih procesih v organizmu (6). Zaradi slednjega mora biti za normalno fiziološko delovanje katepsinov njihova aktivnost skrbno uravnavana na več ravneh, saj lahko povečana proteolitična aktivnost privede do patoloških stanj, kot so razvoj in napredovanje raka, srčno-žilne, vnetne in nevrodegenerativne bolezni (1). V zadnjem desetletju so cisteinskim peptidazam pripisali pomembno vlogo pri razvoju in napredovanju nevrodegenerativnih bolezni, med katerimi sta najpogostejši Parkinsonova in Alzheimerjeva bolezen. Patološke spremembe v možganih so povezane s pospešenim upadanjem kognitivnih in spominskih funkcij, ki jih spremljata spremenjeno izražanje in aktivnost cisteinskih peptidaz. V normalnih fizioloških pogojih se katepsini B, F, H in L nahajajo po celotnem centralnem živčnem sistemu (CŽS), preostale katepsine pa najdemo le v določenih možganskih celicah (7, 8). Katepsina C in S najdemo pretežno v celicah mikroglije, katepsin V pa v možganski skorji in hipokampusu (7). Mesta izražanja in delovanje posameznih cisteinskih peptidaz, značilnih za centralni živčni sistem, so povzeti v preglednici 1.

## 3 CISTEINSKE PEPTIDAZE V NEVRODEGENERATIVNIH PROCESIH

Motnje v povečanem izražanju katepsinov in njihovo sproščanje iz lizosomov lahko vodijo v razvoj nevrodegenerativnih procesov, ki lahko povzročijo nastanek in razvoj Alzhei-

**Preglednica 1:** Mesta izražanja in biološka vloga posameznih cisteinskih peptidaz v centralnem živčnem sistemu (6, 7, 9, 10).

**Table 1:** Locations and biological roles of cysteine peptidases in the central nervous system (6, 7, 9, 10).

Cisteinska peptidaza	Mesto izražanja	Biološka vloga
Katepsin B	nevroni, mikroglija	razgradnja proteinov zunajceličnega matriksa (kolagen tipa IV, laminin, fibronektin), delitev celic, razvoj nevronov
Katepsin C	nevroni	regulacija delovanja nevronov
Katepsin F	nevroni	razgradnja celičnih proteinov, lipidov
Katepsin H	astrociti	sintheza, metabolizem in inaktivacija neuropeptidov
Katepsin L	nevroni, astrociti, mikroglija	biosinteza peptidnih nevrotransmitorjev (neuropeptid Y, dinorfin, holecitokinin)
Katepsin S	mikroglija	predstavitev antigenov, komunikacija mikroglija-nevroni
Katepsin V	nevroni	biosinteza peptidnih nevrotransmitorjev (neuropeptid Y, enekfalin)
Katepsin X	nevroni, astrociti, mikroglija, oligodendrociti	razgradnja celičnih proteinov, biosinteza bradikinina, regulacija apoptoze

merjeve in Parkinsonove bolezni, tauopatije in Huntingove bolezni. Okvara vezikularnega lizosomske/endosomskega sistema v možganskih celicah je povezana z aktivacijo mikroglije, ki največkrat vodi v propad nevronov (7, 11, 12). Pro-vnetni mediatorji, ki jih sprošča aktivirana mikroglija, hitro sprožijo nadaljnjo aktivacijo okoliških celic mikroglije in astrocitov, kar vodi do vnetja v centralnem živčnem sistemu. Po drugi strani pa propadajoči nevroni v svojo okolico sproščajo številne dejavnike, ki vzdržujejo nadaljnjo aktivacijo mikroglije. To ustvarja vzajemno razmerje med aktivacijo mikroglije in smrtjo nevronov, ki skupno prispevata k napredovanju nevrodegenerativnih procesov (6).

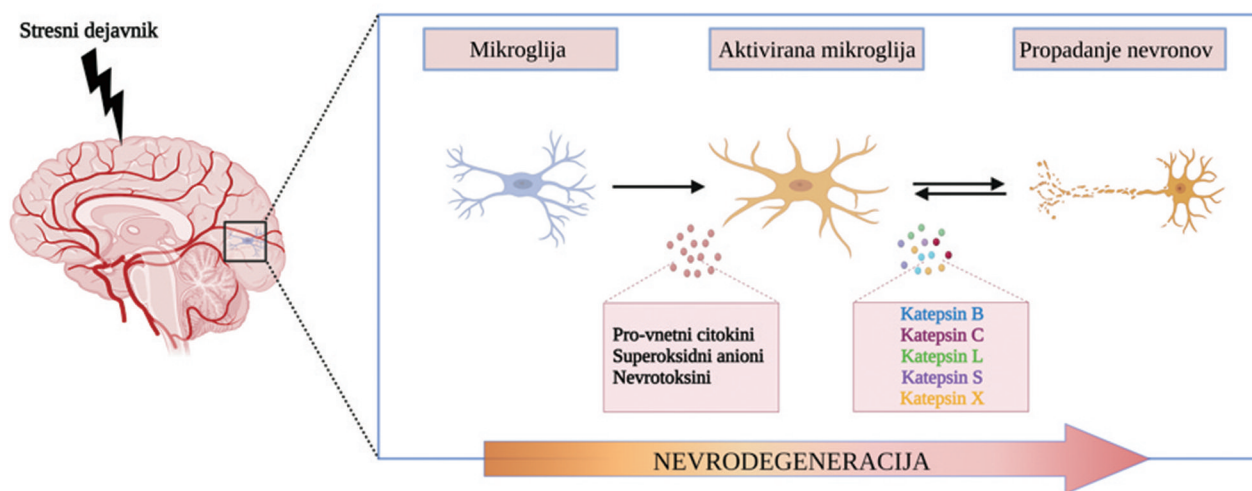
### 3.1 AKTIVACIJA MIKROGLIJE

Vzrok za propadanje nevronov in posledično za razvoj nevrodegenerativnih boleznih je povezan z vnetnimi procesi, ki se dogajajo v centralnem živčnem sistemu. Pri tem imajo pomembno vlogo celice mikroglije, prirojene imunske celice možganov, ki jim pravimo tudi imunski sistem možganov. Pri aktivaciji mikroglije so udeležene številne molekule, kot so endogeni vnetni mediatorji, nevrotoksini ter eksogene patogene bakterije in virusi (6, 7, 13). Aktivirana mikroglija se odzove na možgansko poškodbo s sproščanjem vnetnih citokinov, ki s fagocitozo odstranjujejo poškodovane celice (7, 14). Poleg vnetnih citokinov aktivirana mikroglija v svojo okolico izloča tudi superoksidne anione in nevrotoksine kot tudi katepsine B, C, L, S in X. Ti se sproščajo iz aktivi-

rane mikroglije in so odgovorni za propad aksonskih in mielinskih proteinov, za pretvorbo proteinskih prekursorjev v aktivne peptidne neurotransmitorje, za razgradnjo proteinov zunajceličnega matriksa ter za ojačenje apoptoznih signalnih poti, s čimer sprožijo smrt nevronov (7, 12, 15) (slika 1).

### 3.2 PROPAD NEVRONOV

Katepsini, ki se sprostijo iz aktivirane mikroglije, s svojo aktivnostjo preko različnih signalnih poti vplivajo na možgansko vnetje, ki povzroči smrt nevronov. Udeleženi so pri procesih avtolize, celični nekrozi, pri razgradnji celičnega matriksa ter so mediatorji programirane celične smrti (16). Zunajcelični katepsini B, L in X spodbujajo možgansko vnetje preko aktivacije jedrnega dejavnika kapa B (NF- $\kappa$ B), katepsin B lahko dodatno povzroči smrt nevronov preko spodbujenega izražanja in izločanja intelektina 1 $\beta$  ter preko cepitve proapoptotičnega proteina Bid. Katepsin C spodbuja nastajanje kemokinov, medtem ko katepsin S z razgradnjo komponent zunajceličnega matriksa povzroči migracijo mikroglije (6). Pomembno vlogo v nevrodegenerativnih boleznih ima tudi katepsin X. V fizioloških pogojih je njegovo izražanje omejeno na celice imunskega sistema, kot so monociti, makrofagi in dendritične celice (17, 18). Izražanje katepsina X in njegova proteolitična aktivnost pa se močno poveča pri nevrodegenerativnih procesih, zlasti v glija celicah in staranih nevronih (19–21).



**Slika 1:** Aktivacija celic mikroglije in z njo povezana nevrodegeneracija. Sprožilci vnetja izzovejo aktivacijo celic mikroglije, ki s sproščanjem toksičnih molekul in katepsinov povzročijo poškodbo in propad nevronov, kar vodi v razvoj nevrodegenerativnih boleznih (7, 14).

**Figure 1:** Microglial cell activation and neurodegeneration. Inflammatory triggers provoke the activation of microglial cells, which are responsible for the release of toxic molecules and cathepsins that cause neuronal damage leading to neurodegenerative diseases (7, 14).

Na mišjem modelu Alzheimerjeve bolezni so dokazali povišano izražanje katepsina X v celicah mikroglije, ki obdajajo amiloidne plake (19–21), kjer med drugim sodeluje pri cepitvi C-končnega dela  $\gamma$ -enolaze. S cepitvijo zadnjih dveh aminokislin  $\gamma$ -enolaze katepsin X zavre njeno nevrotrofično in nevroprotektivno aktivnost (8, 20, 21). Poleg tega so na celičnem modelu Parkinsonove bolezni nakazali njegovo vlogo pri apoptozi nevronov, povzročeni z nevrotoksinom 6-hidroksidopaminom, kjer naj bi sodeloval pri aktivaciji signalne poti NF- $\kappa$ B (7).

## 4 CISTEINSKE PEPTIDAZE V NEURODEGENERATIVNIH BOLEZNIH

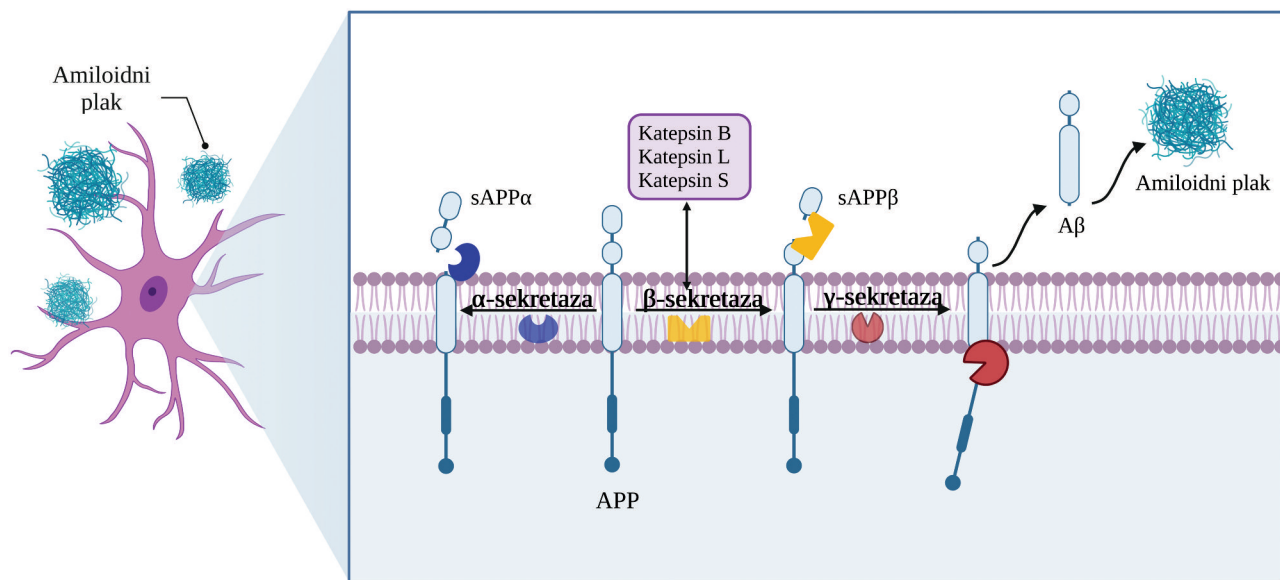
Nevrodegenerativne bolezni, kot sta Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen, prizadenejo desetine milijonov ljudi po vsem svetu. S staranjem svetovnega prebivalstva se bo število bolnikov s temi boleznimi še povečevalo. Zaradi naraščajočega števila bolnikov predstavljajo nevrodegenerativne motnje velik zdravstveni in ekonomski zalogaj, večja pa se tudi povpraševanje po novih terapijah za njihovo

preprečevanje in zdravljenje. Zaradi slednjega je izrednega pomena poznavanje patogenih dejavnikov, ki prispevajo k razvoju teh bolezni, med katere spadajo tudi cisteinski katepsini (1, 6, 12).

### 4.1 VLOGA CISTEINSKIH KATEPSINOV PRI ALZHEIMERJEVI BOLEZNI

Alzheimerjeva bolezen je najpogostejša neurodegenerativna bolezen in je glavni vzrok za razvoj demence pri starostnikih. Bolezen povzroči kognitivne napake, ki v prvi vrsti vplivajo na spomin, funkcijo presoje, izražanja in predstave. Zaradi njene čedalje večje pojavnosti je v središču številnih raziskav. Bolezen so prvič opisali leta 1906, ko je nemški zdravnik Alois Alzheimer pri obdukciji možganov bolnice z znaki demence opazil nenavadne usedline okrog in znotraj živčnih celic, ki jih danes imenujemo senilni oz. amiloidni plaki. V stoletju od takrat so znanstveniki naredili velik napredek pri razumevanju, kako Alzheimerjeva bolezen vpliva na možgane, in se naučili, kako izboljšati življenje prizadetim posameznikom in družinam (22).

Na molekulskem nivoju so za patogenezo Alzheimerjeve bolezni značilne vnetne in oksidativne spremembe neuro-



**Slika 2:** Vloga katepsinov pri procesiranju amiloida  $\beta$  (A $\beta$ ). Cepitev amiloidnega prekursorskega proteina (APP) z  $\beta$ -sekretazo in nato z  $\gamma$ -sekretazo povzroči nastanek amiloida  $\beta$ , pri čemer katepsini B, L in S izkazujejo  $\beta$ -sekretazno aktivnost. Nastali fragmenti amiloida  $\beta$  tvorijo škodljive oligomere, ki se združujejo v amiloidne plake (12, 23).

**Figure 2:** The role of cathepsins in the amyloid beta processing (A $\beta$ ). The cleavage of amyloid precursor protein (APP) by  $\beta$ -secretase and subsequently by  $\gamma$ -secretase results in the production of an amyloid beta. Cathepsins B, L and S display  $\beta$ -secretase activity. The externally released amyloid beta fragments form toxic oligomers that are eventually packaged in amyloid plaques (12, 23).

nov ter nepravilna zvitja proteinov. Spremembe vodijo v propad sinaptičnih stikov in smrt neuronov, ki se kopičijo v amiloidnih plakih. Eden izmed glavnih proteinov, odgovornih za nastanek amiloidnih plakov, je amiloid  $\beta$ , polipeptid, ki nastane s proteolitično cepitvijo amiloidnega prekursor-skega proteina (11, 12). Za proteolitično cepitev slednjega v toksični fragment amiloida  $\beta$  so v večji meri odgovorne  $\alpha$ -,  $\beta$ - in  $\gamma$ -sekretaze, pri čemer katepsini B, L in S izkazujejo proteolitično aktivnost  $\beta$ -sekretaz (12, 23) (slika 2).

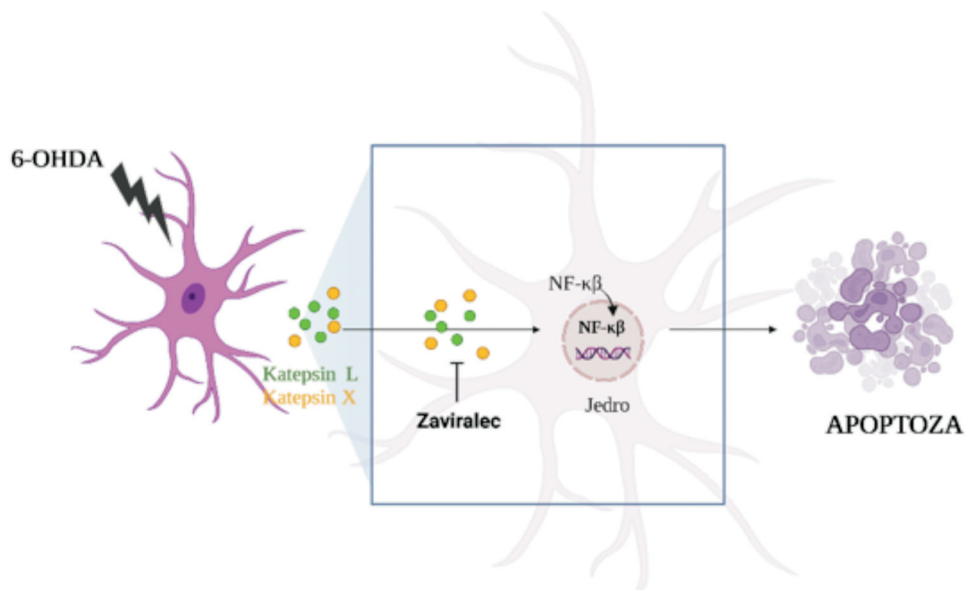
V patologiji Alzheimerjeve bolezni je udeležen tudi katepsin X. Nastajanje amiloidnih plakov izzove aktivacijo mikroglije, pri čemer pride do sproščanja vnetnih citokinov, toksinov in katepsinov, med drugimi tudi katepsina X, ki izniči nevroprotektivno delovanje  $\gamma$ -enolaze, ki sicer s svojim delovanjem v veliki meri zmanjša toksično delovanje amiloida  $\beta$  (21, 24). Na živalskih modelih z Alzheimerjevo boleznijo so zaviralci cisteinskih peptidaz izkazali terapevtski potencial, saj so zmanjšali nastajanje amiloida  $\beta$  v celicah in izboljšali pomanjkanje spomina (23). V raziskavi na mišjem modelu z Alzheimerjevo boleznijo je zaviranje katepsina B z ireverzibilnim zaviralcem cisteinskih peptidaz E-64d in sorodnim zaviralcem katepsina B, CA074Me, pokazalo zmanjšano nastajanje amiloida  $\beta$  in znatno izboljšanje zna-

kov izgube spomina (25, 26), prav tako je tudi izbitje gena za katepsin B pri miših zmanjšalo nastajanje amiloidnih plakov (27). Zaradi teh ugotovitev in poznavanja delovanja cisteinskih katepsinov pri amiloidogenih neurodegenerativnih procesih predstavljajo katepsini obetavne terapevtske tarče za razvoj zaviralcev, s katerimi bi lahko preprečili ali upočasnili napredek Alzheimerjeve bolezni (23).

## 4.2 VLOGA CISTEINSKIH KATEPSINOV PRI PARKINSONOVI BOLEZNI

Parkinsonova bolezen, druga najpogostejša neurodegenerativna bolezen, ki prizadene predvsem telesno gibanje bolnika, se odraža s tremorjem v mirovanju, mišični rigidnosti in upočasnjeni gibljivosti (28). Zanj je značilno propadanje dopaminergičnih neuronov v črnem jedru (*substantia nigra*) in posledično pomanjkanje dopamina (15, 28). Natančni mehanizmi, ki vodijo v propad možganskih celic pri PB še niso znani, eden izmed možnih vzrokov za njihov propad pa je povezan z aktivacijo mikroglije, kot odziv na vnetne procese, ki spremljajo neurodegeneracijo (7).

Na celičnem modelu *in vitro*, ki z uporabo 6-hidroksidopamina posnema nevropatološka in biokemijska stanja, zna-



**Slika 3:** Molekularni mehanizem preprečevanja apoptoze s specifičnimi zaviralci cisteinskih peptidaz. Izpostavljenost 6-hidroksidopaminu (6-OHDA) poveča izražanje in aktivnost katepsinov L in X, njuna inhibicija s specifičnimi zaviralci pa zmanjša aktivacijo NF- $\kappa$ B in njegov prehod v jedro celice ter posledično apoptozo celic (15, 29).

**Figure 3:** Molecular mechanism of the suppression of apoptosis by specific inhibitors of cysteine peptidases. Exposure to 6-hydroxydopamine (6-OHDA) increase the protein levels and activity of cathepsins L and X. Their inhibition suppresses the NF- $\kappa$ B activation, its translocation to the nucleus and consequently cell apoptosis (15).



čilna za Parkinsonovo bolezen, so pokazali pomembno vlogo nekaterih cisteinskih peptidaz pri s 6-hidroksidopaminom spodbujeni apoptozi dopaminergičnih nevronov. 6-hidroksidopamin poveča izražanje in aktivnost katepsina L, ki je s sodelovanjem v signalni poti NF- $\kappa$ B udeležen pri apoptozi dopaminergičnih nevrnskih celic. Zaviranje katepsina L v humanih nevroblastomskih celicah z ireverzibilnim zaviralcem Z-FY(t-Bu)-DMK je zmanjšalo spodbujeno apoptozo in s tem propad nevrnskih celic (29).

Prav tako so pokazali povečano izražanje katepsina X v poškodovanih dopaminergičnih nevronih na celičnem modelu *in vitro* kot tudi hemiparkinsonskem modelu Parkinsonove bolezni *in vivo* (15, 30, 31). Zaviranje aktivnosti katepsina X tako *in vitro* kot *in vivo* z ireverzibilnim epoksisukcinilnim zaviralcem AMS36 je izkazalo zaščitno delovanje preko zmanjšane apoptoze dopaminergičnih celic (7, 31, 32), hkrati pa se je zaviralec katepsina X izkazal za učinkovitega pri zaviranju vnetnega odziva aktivirane mikroglije, ki posredno vodi v apoptozo in propad nevronov (slika 3) (15). Slednje nakazuje pomembno vlogo cisteinskih katepsinov, predvsem katepsinov L in X, pri degeneraciji in propadu dopaminergičnih nevronov v črnem jedru, kar je značilno za potek Parkinsonove bolezni (15).

Med eksogenimi zaviralci sta se kot učinkovita sintezna ireverzibilna zaviralca izkazali spojini E-64d in CA074, ki preko zaviranja katepsina B zmanjšujeta ravni toksičnega fragmenta amiloida  $\beta$  v možganih. Zaviralec katepsina L, Z-FY(t-Bu)-DMK, značilno zmanjša apoptozo, sproženo s 6-hidroksidopaminom. Podobno tudi ireverzibilni epoksicinilni zaviralec katepsina X, AMS36, izkazuje zaščito zoper s 6-hidroksidopaminom inducirano nevrodegeneracijo (7). V fazi raziskovanja so trenutno tudi nekateri triazolni derivati, ki so se v raziskavah *in vitro* izkazali kot selektivni in reverzibilni zaviralci katepsina X (35).

Trenutno so v predkliničnih in kliničnih raziskavah zaviralci z nitrilnimi skupinami (11). Zaviralci katepsina K so se v tretji fazi kliničnega razvoja izkazali za učinkovite pri zdravljenju osteoporoze, zaviralce katepsina S v kliničnih raziskavah vrednotijo za zdravljenje luskavice, nevropatične bolečine in Chronove bolezni, zaviralci katepsinov B, L in S pa so v predkliničnih raziskavah za zdravljenje rakavih bolezni in ateroskleroze (11, 36).

Razvoj zaviralcev cisteinskih peptidaz se povečuje, saj narašča razumevanje biološke vloge katepsinov in mehanizmov delovanja pri posameznih patoloških procesih, iskanje zaviralcev pa je čedalje bolj usmerjeno v iskanje selektivnejših, nekovalentnih in reverzibilnih zaviralcev.

## 5 ZAVIRALCI CISTEINSKIH PEPTIDAZ IN NJHOVA TERAPEVTSKA UPORABA

Nekontrolirano izražanje in aktivnost cisteinskih peptidaz lahko povzroči motnje v celični homeostazi, zato je potrebno natančno uravnavanje njihovega delovanja (11). Glavni regulatorji aktivnosti cisteinskih peptidaz v telesu so endogeni zaviralci, njihovo povečano aktivnost pri patoloških procesih pa lahko dodatno uravnavamo z uporabo eksogenih zaviralcev (11). Med endogene zaviralce uvrščamo cistatine, tiropine, propeptidne zaviralce in  $\alpha$ 2-makroglobulin (1, 33). Najpomembnejši med njimi so cistatini (34). Endogeni zaviralci katepsinov so splošni zaviralci in niso selektivni za posamezen katepsin, zato niso tako primerni za terapevtske namene. Za ta namen preiskujejo nove eksogene, sintezne zaviralce.

Razvoj sinteznih zaviralcev cisteinskih peptidaz je napredoval z razumevanjem njihove biološke vloge. Eksogeni zaviralci so lahko proteinske in neproteinske molekule, izolirane iz živali, mikroorganizmov, rastlin in gliv, nevtralizirajoča monoklonska protitelesa ter nizkomolekularne sintezne spojine (3).

## 6 SKLEP

Cisteinske peptidaze s svojim delovanjem uravnavajo fiziološke procese v organizmu, hkrati pa pomembno prispevajo k nekaterim patološkim stanjem. Številne patološke nepravilnosti povzročijo motnje v proteolitični aktivnosti katepsinov in njihovo sproščanje iz lizosomov, kar ima za posledico razvoj nevrodegenerativnih procesov, ki vodijo do Alzheimerjeve, Parkinsonove, Huntingove bolezni in tauopatije. Nevrodegeneracija in z njo povezana aktivacija mikroglije sta glavna dejavnika v patogenezi nevrodegenerativnih bolezni. Katepsini, ki se sproščajo iz mikroglije, so pomembni pro-vnetni mediatorji, ki s svojim delovanjem povzročijo propad nevronov. Zaradi njihove udeležnosti v številnih patoloških procesih natančno poznavanje njihove biološke vloge predstavlja izhodišče za razvoj novih molekularnih orodij, s katerimi bi lahko uravnavali njihovo aktivnost. Pričakujemo, da bo zasnova selektivnih in reverzibilnih zaviralcev cisteinskih katepsinov izboljšala na peptidaze usmerjeno terapijo in izboljšala zdravljenje bolnikov z nevrodegenerativnimi motnjami.

# 7 LITERATURA

1. Turk B. Targeting proteases: Successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(9):785–99.
2. Obermajer N, Doljak B, Kos J. Cysteine cathepsins: Regulators of antitumour immune response. *Expert Opin Biol Ther.* 2006;6(12):1295–309.
3. Kos J, Mitrović A, Mirković B. The current stage of cathepsin B inhibitors as potential anticancer agents. Vol. 6, *Future Medicinal Chemistry, Future Science*; 2014. p. 1355–71.
4. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D624–32.
5. Turk B, Dolenc I, Turk D, Kos J, Čolič A, Stoka V, et al. Regulation of the Activity of Lysosomal Cysteine Proteinases by pH-Induced Inactivation and/or Endogenous Protein Inhibitors, Cystatins. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1995;376(4):225–30.
6. Pišlar A, Bolčina L, Kos J. New insights into the role of cysteine cathepsins in neuroinflammation. Vol. 11, *Biomolecules.* 2021.
7. Pišlar A, Kos J. Cysteine cathepsins in neurological disorders. *Mol Neurobiol.* 2014;49(2):1017–30.
8. Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, Fonović UP, Kos J. Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(8–9):1685–96.
9. Tran A, Silver J. Cathepsins in neuronal plasticity. *Neural Regen Res.* 2021 Jan 1;16(1):26.
10. Ni J, Lan F, Xu Y, Nakanishi H, Li X. Extralysosomal cathepsin B in central nervous system: Mechanisms and therapeutic implications. *Brain Pathol.* 2022;e13071.
11. Stoka V, Turk V, Turk B. Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Res Rev.* 2016;32:22–37.
12. Haque A, Banik N, Ray S. New Insights into the Roles of Endolysosomal Cathepsins in the Pathogenesis of Alzheimers Disease: Cathepsin Inhibitors as Potential Therapeutics. *CNS Neurol Disord - Drug Targets.* 2008;7(3):270–7.
13. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: Uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Jan;8(1):57–69.
14. Lull ME, Block ML. Microglial Activation and Chronic Neurodegeneration. *Neurotherapeutics.* 2010;7(4):354–65.
15. Pišlar AH, Zidar N, Kikelj D, Kos J. Cathepsin X promotes 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of PC12 and SH-SY5Y cells. *Neuropharmacology.* 2014;82:121–31.
16. Leist M, Ja M, Lundbeck HAS, Valby D-. Triggering of apoptosis by cathepsins. 2001;324–6.
17. Kos J, Sekirnik A, Premzl A, Bergant VZ, Langerholc T, Turk B, et al. Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp Cell Res.* 2005 May 15;306(1):103–13.
18. Kos J, Jevnikar Z, Obermajer N. The role of cathepsin X in cell signaling. *Cell Adhes Migr.* 2009;3(2):164–6.
19. Wendt W, Zhu XR, Lübbert H, Stichel CC. Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice. *Exp Neurol.* 2007;204(2):525–40.
20. Pišlar AH, Kos J. C-terminal peptide of  $\gamma$ -enolase impairs amyloid- $\beta$ -induced apoptosis through p75NTR signaling. *NeuroMolecular Med.* 2013;15(3):623–35.
21. Hafner A, Glavan G, Obermajer N, Živin M, Schliebs R, Kos J. Neuroprotective role of  $\gamma$ -enolase in microglia in a mouse model of Alzheimer's disease is regulated by cathepsin X. *Aging Cell.* 2013;12(4):604–14.
22. Hasanbasic S, Jahic A, Karahmet E, Sejranic A, Prnjavorac B. THE ROLE OF CYSTEINE PROTEASE IN ALZHEIMER DISEASE. *Mater Sociomed.* 2016;28(3):235.
23. Schechter I, Ziv E. Cathepsins S, B and L with aminopeptidases display  $\beta$ -secretase activity associated with the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biol Chem.* 2011;392(6):555–69.
24. Hafner A, Obermajer N, Kos J.  $\gamma$ -Enolase C-terminal peptide promotes cell survival and neurite outgrowth by activation of the PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling pathways. *Biochem J.* 2012;443(2):439–50.
25. Hook VYH, Kindy M, Hook G. Inhibitors of cathepsin B improve memory and reduce  $\beta$ -amyloid in transgenic Alzheimer disease mice expressing the wild-type, but not the Swedish mutant,  $\beta$ -secretase site of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem.* 2008;283(12):7745–53.
26. Hook G, Hook V, Kindy M. The cysteine protease inhibitor, E64d, reduces brain amyloid- $\beta$  and improves memory deficits in alzheimer's disease animal models by inhibiting cathepsin B, but not BACE1,  $\beta$ -secretase activity. *J Alzheimer's Dis.* 2011;26(2):387–408.
27. Hook VYH, Kindy M, Reinheckel T, Peters C, Hook G. Genetic cathepsin B deficiency reduces  $\beta$ -amyloid in transgenic mice expressing human wild-type amyloid precursor protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;386(2):284–8.
28. Hook VYH. Protease pathways in peptide neurotransmission and neurodegenerative diseases. *Cell Mol Neurobiol.* 2006;26(4–6):449–69.
29. Xiang B, Fei X, Zhuang W, Fang Y, Qin Z, Liang Z. Cathepsin L is involved in 6-hydroxydopamine induced apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Res.* 2011;1387:29–38.
30. Pišlar A, Tratnjek L, Glavan G, Živin M, Kos J. Upregulation of cysteine protease cathepsin X in the 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease. *Front Mol Neurosci.* 2018;11(November):1–12.
31. Pišlar A, Tratnjek L, Glavan G, Zidar N, Živin M, Kos J. Neuroinflammation-Induced Upregulation of Glial Cathepsin X Expression and Activity in vivo. *Front Mol Neurosci.* 2020;13:0–2.
32. Pišlar A, Božić B, Zidar N, Kos J. Inhibition of cathepsin X reduces the strength of microglial-mediated neuroinflammation. *Neuropharmacology.* 2017;114:88–100.
33. Fonović M, Turk B. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2014;1840(8):2560–70.
34. Breznik B, Mitrović A, T. Lah T, Kos J. Cystatins in cancer progression: More than just cathepsin inhibitors. *Biochimie.* 2019;166:233–50.
35. Fonović UP, Mitrović A, Knez D, Jakoš T, Pišlar A, Brus B, et al. Identification and characterization of the novel reversible and selective cathepsin X inhibitors. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–11.
36. Kramer L, Turk D, Turk B. The Future of Cysteine Cathepsins in Disease Management. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(10):873–98.