

Encimi – obetavne tarče za razvoj novih zdravil

Krištof Fortuna

Encimologija je veja biokemije, ki se ukvarja s preučevanjem encimov. Pri mnogih bolezenskih stanjih, zlasti tumorjih, je med drugimi encimi povišana tudi aktivnost encima katepsina X. Z zaviranjem aktivnosti encimov s pomočjo zaviralcev (inhibitorjev) lahko zdravimo te bolezni. Iskanje novih encimskih zaviralcev je kompleksen proces, ki zahteva inovativne pristope. S premišljenim načinom smo uspeli narediti pomemben korak na poti iskanja novih zaviralcev katepsina X kot potencialnih zdravilnih učinkovin.

Proteini so najštevilčnejše in po funkciji najbolj raznolike molekule v celicah. Sestavljeni so iz aminokislin, ki so med seboj povezane s peptidnimi oziroma amidnimi vezmi, in se razlikujejo po velikosti (največji človeški protein je titin, ki ga najdemo v mišicah, sestavljen je iz kar 27.000 aminokislin). V celicah se proteini lahko nahajajo v jedru, citoplazmi ali pa na/v celični membrani. Glede na vlogo jih razdelimo v več razredov. Strukturni proteini v celici opravljajo oporno funkcijo (na primer keratin in kolagen). Transportni proteini služijo za prenos snovi (na primer hemoglobin po krvi prenaša ki-

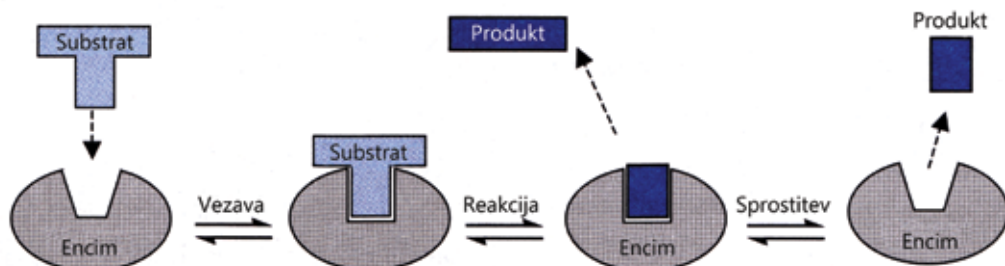
sik, lipoproteini lipide, membranski proteini prenašajo snovi preko membran). Proteini, ki se vežejo na DNA, uravnavajo izražanje genov (na primer receptorji steroidnih hormonov), proteini, udeleženi pri obrambi, so protitelesa oziroma imunoglobulini. Primera proteinov, ki s spreminjanjem kemijske energije v mehansko omogočajo gibanje, sta miozin in aktin v mišicah. Proteini za prenos signala so med drugimi tudi receptorji (na primer receptor za inzulin). Med vsemi proteinskimi molekulami pa najpomembnejšo vlogo v metabolizmu in uravnavanju procesov opravljajo encimi.

Encimi so biološki katalizatorji, ki v celicah pospešujejo biokemijske reakcije (na primer tako, da reaktante pravilno orientirajo), ki so pod fiziološkimi pogoji sicer izrazito počasne. Encimsko katalizirana reakcija se začne z vezavo substrata na encim, kjer preko vmesnega stanja poteče reakcija. Novonastali produkt se nato sprosti iz aktivnega mesta, encim pa iz reakcije izstopi nespremenjen.

Hitrosti encimskih reakcij so sicer omejene, vendar so znane reakcije, ki so celo

Grafični prikaz encimske reakcije.

Povzeto po Graham, L. P., 2013: An introduction to medicinal chemistry (peta izdaja).



10^{11} -krat hitreje kot brez encima. Zaradi velike kompleksnosti metabolnih poti (zaporedij več biokemijskih reakcij) v organizmu encimi navadno delujejo v skupinah. Kot primer omenimo glikolizo, pri kateri glukoza, ki ima skelet iz šestih ogljikovih atomov, razpade v dve molekuli s skeletom iz treh ogljikovih atomov (piruvat), pri tem pa nastaja energija v obliki molekule ATP. V glikolizo je vključenih deset različnih encimov.

Encime lahko glede na vrsto reakcije, ki jo katalizirajo, razdelimo v šest skupin. Oksidoreduktaze katalizirajo oksidacije in redukcije – reakcije, pri katerih se prenašajo elektroni (na primer laktat dehidrogenaza), transferaze katalizirajo prenos funkcionalne skupine iz ene molekule na drugo (na primer protein kinaze), hidrolaze katalizirajo

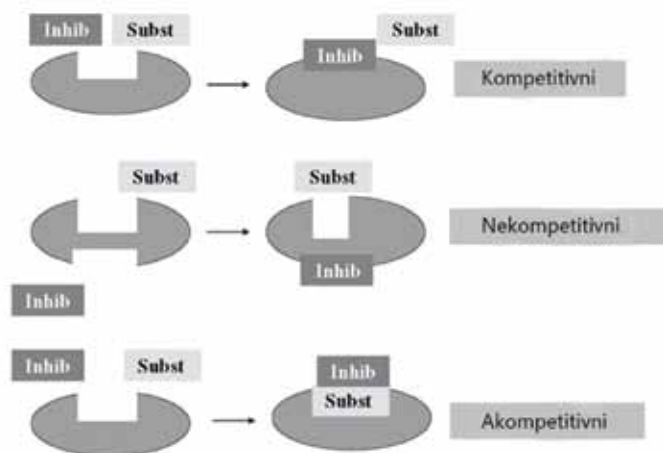
hidrolitični razcep vezi – hidrolizo (na primer ATPaze), izomeraze pa pretvorbo enega izomera v drugega s prenosom skupin znotraj molekule (na primer fosfoglukomutaza). Liaze oziroma sintaze katalizirajo tvorbo različnih vezi brez potrebne dodatne kemijske energije (na primer karboanhidraza), ligaze oziroma sintetaze pa pri tem porabljajo kemijsko energijo v obliki ATP (na primer glutamin sintetaza).

Encimi za svoje delovanje pogosto potrebujejo tudi neaminokislinske sestavine. To so kofaktorji – organske molekule ali kovinski ioni, ki s svojimi kemijskimi lastnostmi sodelujejo pri kataliziranju različnih reakcij. Prostetične skupine so v aktivnem mestu prisotne stalno, koencimi pa se tja vežejo le začasno, ko poteka reakcija. Med kovinskimi ioni so najpogostejši železovi, magnezijevi, cinkovi in še nekateri drugi.

Aktivno mesto je žep ali vdolbina na encimu, kjer poteka kataliza vezanega(-ih) substrata(-ov). Ponavadi kaže bolj hidrofobne lastnosti kot površje encima, saj mnoge reakcije ne bi mogle potekati ob prisotnosti vode. Aminokisliline, ki sestavljajo aktivno mesto, s šibkimi interakcijami vežejo molekulo substrata ali pa so vključene v sam mehanizem katalize. Aktivno

Skupina	Tip reakcije
1 Oksidoreduktaze	<p>○ = Redukcijski ekvivalent</p> <p>Ared + Box ⇌ Aox + Bred</p>
2 Transferaze	<p>A-B + C ⇌ A + B-C</p>
3 Hidrolaze	<p>A-B + H₂O ⇌ A-H + B-OH</p>
4 Liaze (sintaze)	<p>A + B ⇌ A-B</p>
5 Izomeraze	<p>A ⇌ Iso-A</p>
6 Ligaze (sintetaze)	<p>A + B + XTP ⇌ A-B + XDP</p> <p>X = A, G, U, C</p>

Šest skupin encimov s shematsko prikazanimi reakcijami. Povzeto po Koolman, J., in sod., 2005: Color Atlas of Biochemistry.



Prikaz delovanja glavnih tipov encimskih zaviralcev (inhibitorjev). Povzeto po http://what-when-how.com/wp-content/uploads/2012/08/tmp9db750_thumb.png dne 10. julija 2016.

mesto je selektivno (prepozna skupino podobnih substratov) ali specifično (prepozna le eno vrsto substrata).

Med substrate, na katere delujejo encimi, sodijo hranila, ki jih encimi najprej razgradijo na manjše gradbene enote. Te celica nato uporabi za izgradnjo snovi, ki jih potrebuje. To so lahko ogljikovi hidrati, lipidi, proteini ali nukleinske kisline. Z oksidacijo hranil, pri kateri prav tako sodelujejo encimi, pa celica pridobiva energijo.

Dobro poznavanje delovanja encimov omogoča njihovo najrazličnejšo uporabo na različnih področjih, na primer v živilstvu in industriji. Aktualna je na primer uporaba proteaz, ki jih dodajajo pralnim praškom, da razgradijo madeže trave in krvi. Zares pomembna pa je uporabnost encimov pri odkrivanju in zdravljenju različnih bolezni. Pri mnogih rakavih obolenjih (ter drugih boleznih) so namreč odkrili občutno povečano koncentracijo nekaterih encimov. Pri boleznih, kjer je delovanje encimov prekomerno, lahko encimsko aktivnost uravnavamo z zaviralci. Encimski zaviralci so spojine, ki znižajo hitrost encimsko kataliziranih reakcij in so lahko reverzibilni ali ireverzibilni. Podobno kot substrati so tudi zaviralci lahko specifični ali selektivni. Ireverzibilni zaviralci tvorijo kovalentne vezi v aktivnem mestu encima, s čimer ga trajno inaktivirajo. Primer takega zaviralca je acetilsalicilna

kislina, ki se kot glavna zdravilna učinkovina nahaja na primer v aspirinu. Reverzibilni zaviralci se na encim vežejo s šibkimi interakcijami in koncentracijsko odvisno zmanjšujejo encimsko aktivnost, saj ne ostanejo v aktivnem mestu, temveč se iz njega stalno umikajo. V terapiji so zaželeni močni reverzibilni zaviralci, saj z njihovo množino lahko vplivamo na moč zaviralnega (inhibitornega) delovanja. V splošnem poznamo tri glavne tipe reverzibilnih zaviralcev: kompetitivne, nekompetitivne in akompetitivne zaviralce. Kompetitivni zaviralec je strukturno podoben substratu in z njim tekmuje za aktivno mesto encima, nekompetitivni zaviralec se veže na drugem (alosteričnem) delu encima in preko verižnega premika kemijskih vezi vpliva na katalitično delovanje encima, akompetitivni zaviralec pa se na encim veže, ko je substrat že v aktivnem mestu encima (veže se na kompleks encim-substrat), s tem pa upočasni encimsko reakcijo.

Raziskovanje zaviralcev katepsina X

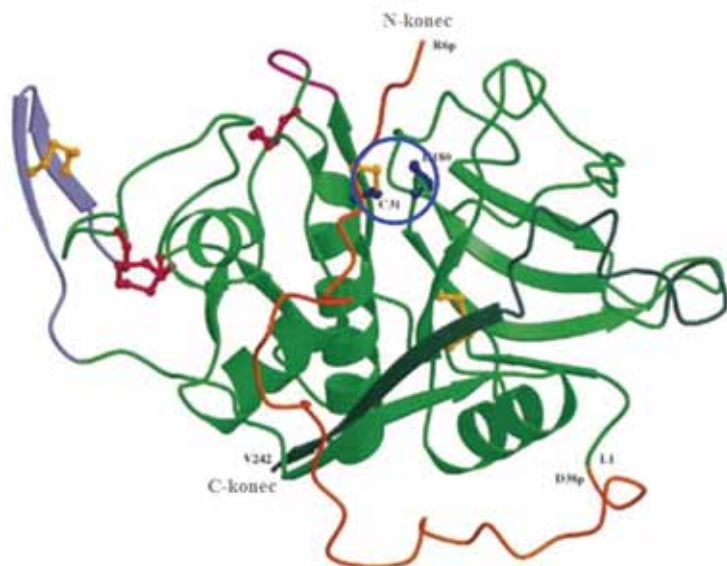
Razvoj novih zdravil je zahteven in dolgotrajen proces, v katerem je po določitvi biološke tarče za določeno bolezen treba razviti primerno metodo za iskanje zdravilne učinkovine in to tudi najti. Naše raziskovanje, ki smo ga opravljali v laboratorijih Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, je temeljilo

na preučevanju zaviralcev encima katepsina X, ki sodi v družino proteaz.

Proteaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi v polipeptidni verigi. Udeležene so pri uravnavanju pomembnih bioloških procesov, kot so preoblikovanje tkiv, angiogeneza (nastajanje novih žil), imunski odziv, oploditev, razvoj zarodka, rast in staranje. Sodelujejo tudi pri delitvi, selitvi in vstopanju v tkiva (invazija) tako pri normalnih kot rakavih celicah, njihova aktivnost v zdravih celicah pa je skrbno nadzorovana z aktivatorji in zaviralci. Pri številnih boleznih, kot so ateroskleroza, revmatoidni artritis, multipla skleroza, diabetes, Alzheimerjeva bolezen, mišična distrofija, nevrološke motnje, osteoporozna, alergične reakcije in rak, pa je delovanje proteaz prekomerno ali nepravilno. Njihova povečana prisotnost v tkivih ali serumu bolnikov zato predstavlja pomemben diagnostični in prognostični potencial. V primerih povečane aktivnosti proteaz – predvsem pri nekaterih rakavih obolenjih – intenzivno iščejo nove specifične proteazne zaviralce.

Katepsini so skupina lizosomskih proteaz, ki jih delimo glede na aminokislino v njihovi

vem aktivnem mestu. Katepsin X v aktivnem mestu vsebuje aminokislino cistein, zato ga uvrščamo v razred cisteinskih proteaz. Sodeluje predvsem pri razgradnji telesu lastnih in tujih proteinov v kislem okolju lizosomov. V višjih koncentracijah je katepsin X prisoten v pljučih, jetrih, ledvicah, trebušni slinavki, debelem črevesju, maternici, jajčnikih, perifernih levkocitih, prostati, tankem črevesju in vranici. Izražen je tudi v celicah imunskega sistema, predvsem v monocitih, makrofagih in dendritičnih celicah, kar kaže na njegovo pomembno vlogo v procesih vnetja in imunskega odgovora. V povišanih koncentracijah je prisoten pri raku prostate, želodca, dojke, ledvic, in melanomu, kjer je vpleten pri rasti in napredovanju tumorjev. Kljub temu, da mehanizem delovanja katepsina X pri rakavih obolenjih še ni pojasnjen, je znano, da ta ne vključuje razgradnje proteinov zunajceličnega okolja, kar je značilno za ostale katepsine. Pri tumorjih so kot substrat katepsina X do sedaj odkrili tumorski zaviralec profilin-1, protein, ki sodeluje pri vezavi na aktin in vpliva na zgradbo citoskeleta. Z odcepljenimi aminokisljinami profilin-1 ni več sposoben zavirati rasti tu-



Shematski prikaz strukture prokatepsina X. Legenda: proregija (svetlo rjava barva), aktivni encim (zelena barva), končnih 25 AK (temno zelena barva). Z modro barvo je obkroženo aktivno mesto. Povzeto po Sivaraman, J., in sod., 2000: Crystal Structure of Human Procathepsin X: A Cysteine Protease with the Proregion Covalently Linked to the Active Site Cysteine.

morskih celic. Povečana aktivnost katepsina X je prisotna tudi v osrednjem živčnem sistemu pri bolnikih z živčnodegenerativnimi obolenji, kot je Alzheimerjeva bolezen.

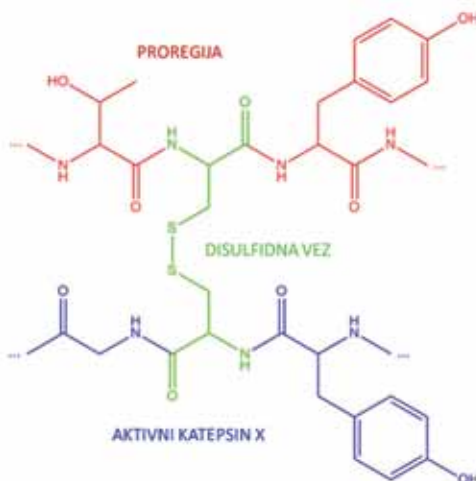
Človeški katepsin X ima zanimive strukturne in funkcionalne lastnosti, ki ga razlikujejo od ostalih cisteinskih katepsinov. Aktivni (zreli) encim predstavlja 242 aminokislin. Edinstvenost katepsina X v primerjavi z ostalimi katepsini je v končnih 25 aminokislinah, ki se ne ujemajo z nobenim do sedaj znanim proteinskim zaporedjem. Proregija katepsina X je najkrajša med vsemi proregijami cisteinskih katepsinov, saj jo sestavlja le 38 aminokislin. Prokatepsin X je neaktivna oblika encima, ki ima v aktivnem mestu vezano proregijo, ki prav tako vsebuje cistein. Ta se z disulfidno vezjo poveže s cisteinom v aktivnem mestu encima. Proteinska disulfidna vez (tudi S-S vez ali disulfidni most) je kovalentna vez med tiolnima skupinama (-SH) dveh cisteinov.

Najbolj znani zaviralec cisteinskih proteaz, in s tem tudi katepsina X, je E64 (trans-epoksikuscinil-L-levcilamido-(4-gvanidino)butan). Ta se v lizosomih z zelo reaktivno epoksi skupino kovalentno, selektivno in

ireverzibilno veže v aktivno mesto katepsina X. AMS36 je specifični zaviralec katepsina X, ki se prav tako kot E64 v aktivno mesto katepsina X veže kovalentno in ireverzibilno z epoksi skupino. Tako E64 kot AMS36 sta modelna zaviralca katepsina X, ki ju uporabljamo zgolj v raziskovalne namene v biokemiji. V terapiji pa se zaviralci katepsina X še ne uporabljajo. Z modeliranjem *in silico* sta bila na Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani tripeptida Thr-Cys-Ser (TCS) in Thr-Cys-Thr (TCT) zasnovana kot potencialna reverzibilna zaviralca katepsina X. Za osnovo je bila vzeta proregija prokatepsina X. S tem ko slednja prekriva aktivno mesto encima, onemogoči dostop substratom. Z modeliranjem krajših peptidov, ki vsebujejo cistein, bi poleg tvorbe disulfidne vezi dosegli tudi popolno prileganje v aktivno mesto katepsina X. Slabost krajših peptidov v primerjavi s proregijo je v manjšem številu interakcij z encimom, prednost pa v tem, da se v aktivno mesto bolj prilegajo.

Pristop k iskanju novih zaviralcev

Z uporabo substrata, ki ga katepsin X razgradi na merljivi produkt, smo optimizirali encimsko metodo za preizkušanje novih



Disulfidna vez (zelena barva) med cisteinom v aktivnem mestu (modra barva) in cisteinom v proregiji (rdeča barva). Narisano s programom ChemBio3D Ultra - različica 12.0, CambridgeSoft.

potencialnih encimskih zaviralcev. Optimizirana metoda pomeni uporabo najmanjših možnih množin encima in substrata, torej znižanje stroškov raziskav, in omogoča reševanje visokih zmogljivosti, s čimer lahko izmed več deset tisoč spojin identificiramo aktivne molekule. Z optimizirano metodo smo preizkušali dva potrjena zaviralca katepsina X, AMS36 in E64, ter ugotavljali, ali je encimska metoda primerna. Izračunali smo relativne zaviralne aktivnosti omenjenih zaviralcev glede na različne reakcijske parametre. Ker je znano, da sta zaviralca AMS36 in E64 ireverzibilna, saj vsebujeta reaktivno epoksi skupino, smo pričakovali dobre zaviralne aktivnosti pri obeh. Prvič smo tudi določili zaviralni aktivnosti dveh novih potencialnih zaviralcev – tripeptidov TCS in TCT. Disulfidna vez, ki jo tripeptida tvorita s cisteinom v aktivnem mestu

encima, je v reducirajočih pogojih (preprečujejo ponovno vezavo prorengije z aktivnim mestom) reverzibilna, zato smo pričakovali nižje zaviralne aktivnosti kot pri AMS36 in E64.

Naše raziskovanje je temeljilo na pipetiranju raztopin encima, substrata in zaviralcev na vdolbinice na mikrotitrski ploščici, na kateri je potekala analiza. Ker katepsin X za svoje delovanje potrebuje reducirajoče okolje, smo delovnim raztopinam dodali tudi L-cistein. Med optimizacijo metode smo preizkušali različna razmerja med encimom in substratom.

Za preizkušanje novih potencialnih zaviralcev se uporabljajo sintezni substrati, ki jih katepsin X cepi podobno kot druge polipeptidne substrate. Njihov sestavni del je fluoroformna skupina, ki po vzbuditvi cepljenega produkta oddaja svetlobo. Specifičen

Shematski prikaz sestavnih delov encimske metode. Narisano s programom Microsoft Office Powerpoint.

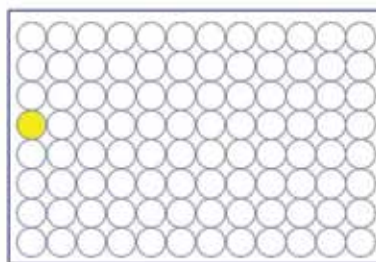
katepsin X:

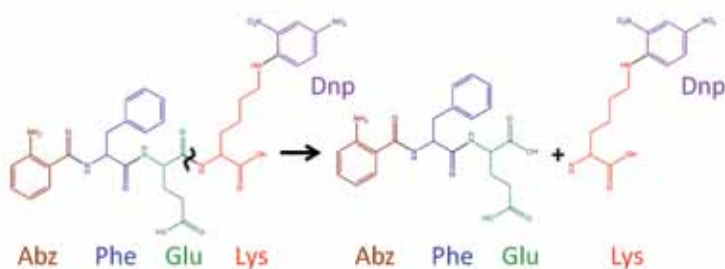


potencialni inhibitor:

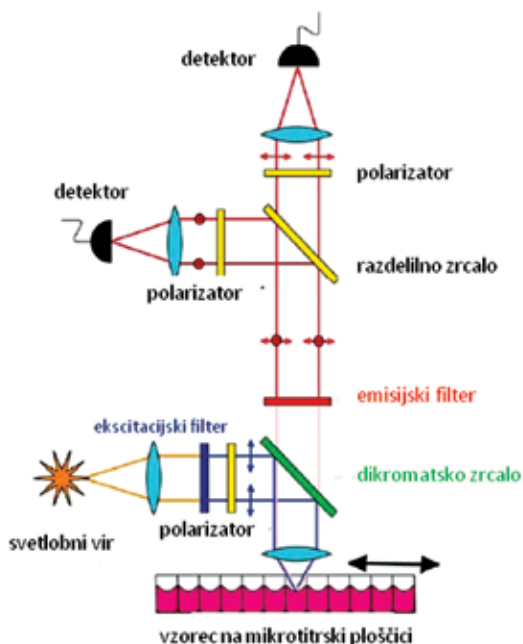


substrat:





Grafični prikaz encimske cepitve substrata; črna krivuljka prikazuje vez, ki jo cepi katepsin X. Narisano s programom ChemBio3D Ultra - različica 12.0, CambridgeSoft.



Princip merjenja fluorescence. Povzeto po https://www.semrock.com/Data/Sites/1/semrockpdfs/whitepaper_fluorescencepolarizationinlifesciences.pdf dne 10. julija 2016.

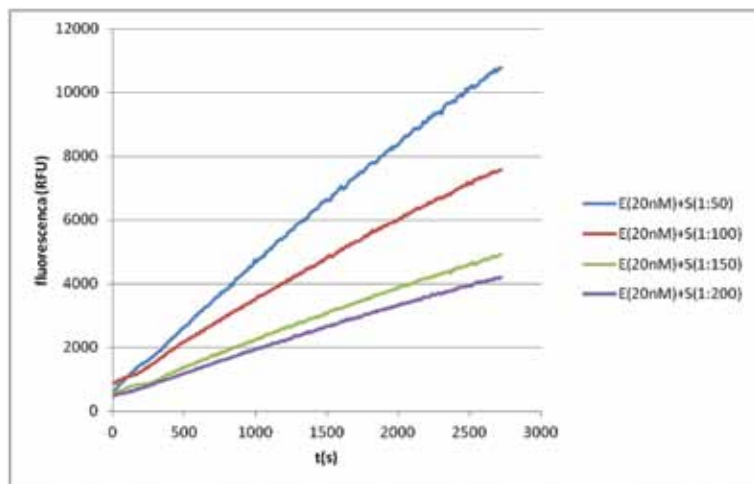
substrat katepsina X je spremenjen tripeptid Abz-Fenilalanin-Glutamat-Lizin(Dnp)-OH (Abz = orto-aminobenzojska kislina; Dnp = 2,4-dinitrofenilni ostanek). Ta vsebuje Abz, ki oddaja energijo v obliki svetlobe (fluorescence) po vzburjanju (ekscitaciji) s svetlobo valovne dolžine 320 nanometrov. Substrat vsebuje tudi dušilec fluorescence – Dnp, ki absorbira energijo, ki jo oddaja Abz. Absorpcija je mogoča, ko sta Abz in Dnp na pravi razdalji. Ko katepsin X cepi substrat med Glu in Lys, Dnp ni več na pravi razdalji in zato ne absorbira oddane svetlobe in to lahko izmerimo spektrofotometrično, izrazimo pa jo z relativno fluorescenčno enoto (RFU).

Za določitev aktivnosti katepsina X smo uporabili spektrofotometrični čitalec mikrotitrskih ploščic. Ta pošlje svetlobo z valovno dolžino 320 nanometrov skozi vzorec, nato pa izmeri količino oddane svetlobe pri valovni dolžini 420 nanometrov.

Rezultati raziskovanja

Določitev optimalnih razmerij med encimom in substratom za določanje zaviralcev in izračun relativne zaviralne aktivnosti sta temeljila na naraščanju fluorescence v odvisnosti od časa. Primer je prikazan na grafu spodaj.

Osnovno raztopino substrata s koncentracijo 8,34 mikromola (μM) na liter smo redčili v

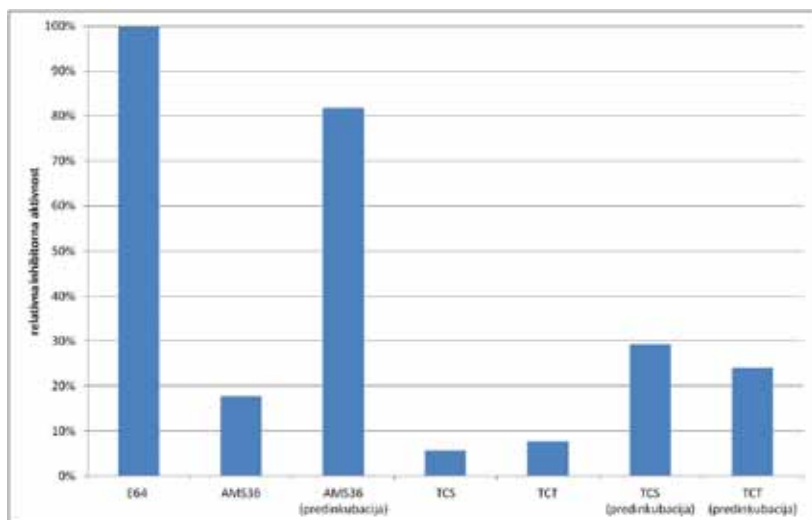


Encimska aktivnost 20 nM katepsina X.

razmerjih 1 : 50, 1 : 100, 1 : 150 in 1 : 200. Pri vseh prikazanih kombinacijah so bile kinetične krivulje na grafu linearne, kar pomeni, da bi bile potencialno vse primerne za določanje zaviralne aktivnosti (pogoj za to je namreč dovolj dolg linearni del). Naklon vsake krivulje predstavlja hitrost reakcije – manjši kot je naklon, manjša je hitrost. Pri nižjih koncentracijah substrata so nakloni premic manjši. Kljub temu, da vse krivulje vsebujejo dovolj dolg linearni del, pa hitrosti reakcij še vseeno ne smejo biti prenizke, da ne pride do napačno določene zaviralne aktivnosti. Zato smo kot kombinaciji z op-

timalnim razmerjem med encimom in substratom določili 30 nM raztopino encima z redčenjem osnovne raztopine substrata 1 : 50 in 20 nM raztopino encima z redčenjem osnovne raztopine substrata 1 : 100. Določanje zaviralne aktivnosti je temeljilo na teh dveh kombinacijah.

V nadaljevanju smo potrdili ustreznost encimske metode in dokazali, da zaviralec E64 popolnoma zavre (99,9-odstotno) delovanje katepsina X. Nepričakovano pa smo ugotovili slabo zaviralno aktivnost (17,6-odstotno) zaviralca AMS36. Dokazali smo, da je problem najverjetneje predstavljal



Prikaz izračunanih zaviralnih (inhibitornih) aktivnosti za že znana ireverzibilna inhibitorja E64 in AMS36 ter tripeptida TCS in TCT.

L-cistein, ki tekmuje z zaviralcem za aktivno mesto encima. Metodo smo zatorej še dodatno optimizirali tako, da smo L-cistein v delovno raztopino dodali čisto na koncu, da je imel zaviralec dovolj časa, da se je vezal v aktivno mesto encima – temu pravimo predinkubacija encima z zaviralcem. Zatem je tudi AMS36 pokazal zelo dobro (81,1-odstotno) zaviralno aktivnost.

Pokazalo se je, da L-cistein tekmuje tudi s tripeptidoma TCS in TCT, saj smo najprej določili šibke zaviralne aktivnosti (5,6-odstotno za TCS in 7,6-odstotno za TCT). Po uporabi predinkubacije encima z zaviralcem pa sta bili izračunani obetavni zaviralni aktivnosti – 29,2-odstotna za TCS in 24,0-odstotna za TCT.

Zaključek

Optimizirana metoda je sedaj primerna za izvedbo rešetanja visokih zmogljivosti velikih molekulskih zbirk. Zatorej lahko predstavlja uporabno in racionalno orodje pri iskanju novih učinkovin, ki bi zmanjšale aktivnost katepsina X, kar je tudi cilj raziskovalcev v farmacevtski industriji. Izmerjeni zaviralni aktivnosti tripeptidov TCS in TCT vsekakor predstavljata dobro začetno točko za nadaljnji razvoj in optimizacijo njune strukture, s čimer bi lahko dosegli reverzibilne zaviralce katepsina X z visoko zaviralno aktivnostjo. Namesto že znanih ireverzibilnih zaviralcev, ki v terapiji niso uporabni, bi bili tako primernejši za terapijo različnih bolezni, predvsem rakavih in nevrodegenerativnih obolenj.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem dr. Bojanu Doljaku s Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani za prijazno mentorstvo v celotnem procesu pisanja raziskovalne naloge, pomoč, uvajanje v delo ter strokovni pregled naloge. S tem mi je omogočil, da sem docela izkusil, kako poteka delo znanstvenika v laboratoriju. Iskreno se zahvaljujem tudi somentorici mag. Tončki Požek – Novak.

Slovar manj znanih besed:

Aminokislina. Osnovna gradbena enota beljakovin (lahko je v L- ali pa D-konfiguraciji; v telesu najdemo le L-aminokislino).

Epoksi skupina. Zelo reaktivna skupina, ki vsebuje kisik, vezan na dva ogljikova atoma.

Lizosom. Celični organel s kislno vsebino, kjer poteka razgradnja proteinov.

Modeliranje in silico. Iskanje interakcij med encimi in molekulami s pomočjo računalnika.

Okrajšave Thr, Cys, Ser. Aminokislino treonin, cistein, serin.

Proregija. Začetni del encima, ki onemogoča dostop substrata v aktivno mesto.

Relativna zaviralna (inhibitorna) aktivnost. Odstotek zmanjšanja hitrosti encimske reakcije z zaviralcem v primerjavi z reakcijo brez zaviralca.

Tripeptid. Kratka beljakovina, sestavljena iz treh aminokislin.

Viri in literatura:

Graham, L. P., 2013: *An introduction to medicinal chemistry (fifth edition)*. Oxford: Oxford University Press.

Boyer, R. F., 2005: *Temelji biokemije*. Ljubljana: Študentska založba.

Aeble, W., 2007: *Enzymes in Industry*. Weinheim: WILEY-VCH.

Devlin, T. M., 2011: *Textbook of biochemistry: with clinical correlations (seventh edition)*. ZDA: WILEY-VCH.

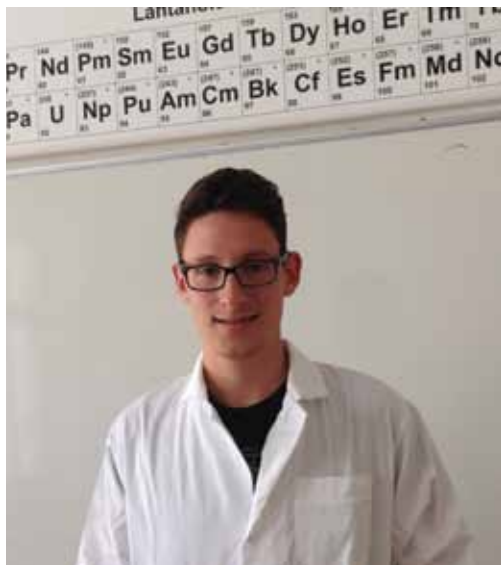
Price, N. C., in sod., 2009: *Fundamentals of enzymology: the cell and molecular biology of catalytic proteins (third edition)*. Oxford: Oxford University Press.

Koolman, J., in sod., 2005: *Color Atlas of Biochemistry*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Kos, J., in sod., 2009: *The role of cathepsin X in cell signalling*. *Cell Adhesion & Migration* 3. 2: 1–3.

Sivaraman, J., in sod., 2000: *Crystal Structure of Human Procathepsin X: A Cysteine Protease with the Proregion Covalently Linked to the Active Site Cysteine*. *Journal of Molecular Biology*, 295: 939–951.

Kos, J., in sod., 2014: *Intracellular signalling by cathepsin X: Molecular mechanisms and diagnostic and therapeutic opportunities in cancer*. *Seminars in Cancer Biology*, 1044–579X.



Predstavitev avtorja

Krištof Fortuna je že v osnovnošolskih klopetih spoznal, kako zelo ga privlačijo naravoslovne znanosti, med njimi predvsem kemija. Šolanje je nadaljeval na Škofijski klasični gimnaziji v Šentvidu, tretji in četrti letnik pa je končal na Mednarodni šoli Gimnazije Bežigrad, kjer je opravil mednarodno maturo. V okviru slednje je nastalo tudi pričujoče raziskovalno delo s področja farmacije – vede, ki Krištofu z vidika raziskovanja in izboljševanja življenja pomeni velik izziv za prihodnost. Trenutno je študent drugega letnika Medicinske fakultete v Ljubljani, zelo pa ga zanima kirurgija. V prostem času se ukvarja s tenisom in plezanjem, igra pa tudi klavir in orgle.

Analizna kemija in medicina • Akutna promielocitna levkemija in arzenov trioksid

Akutna promielocitna levkemija in arzenov trioksid

Luka Petravič, Jon Škerlj in Špela Turk

V okviru srednješolske raziskovalne naloge smo se trije dijaki z Gimnazije Novo mesto vključili v raziskovalno delo na področju zdravljenja akutne promielocitne levkemije z arzenovim trioksidom (ATO), ki poteka v sodelovanju Instituta Jožef Stefan in Univerzitetnega kliničnega centra v Ljubljani. Pridobili smo veliko znanja o medicini in analizni kemiji. Akutna promielocitna levkemija je rakava bolezen krvotvornega tkiva, kjer pride do razraščanja nezrelih belih krvnih celic – promielocitov. Iz znanstvene literature je znano, da je arzenov trioksid učinkovito zdravilo v boju proti akutni promielocitni levkemiji in da se v telesu pretvori ter izloči z urinom v obliki arzenita (As(III)), arzenata (As(V)), monometil ar-

zenove kisline (MMA) in dimetil arzenove kisline (DMA) (Šlejkovec in sod., 2016). V naši raziskovalni nalogi smo zato želeli potrditi prisotnost teh metabolitov v urinu pacientke, zdravljene z arzenom, in njihove koncentracije glede na čas odvzema vzorca, torej pred infuzijo zdravila in po njej. Ker so lahko povišane koncentracije arzena prisotne tudi v hrani, smo pri kontrolnih vzorcih prostovoljcev določili koncentracije celokupnega arzena in arzenobetaina.

Akutna promielocitna levkemija

Akutna promielocitna levkemija je maligna rakava bolezen krvotvornega tkiva, kjer pride do razraščanja nezrelih belih krvnih celic – promielocitov. Njihova prekomerna razrast