

TARČE

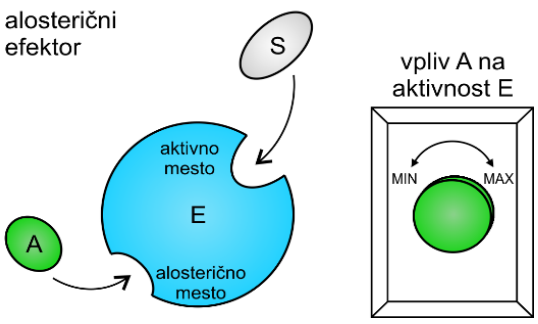
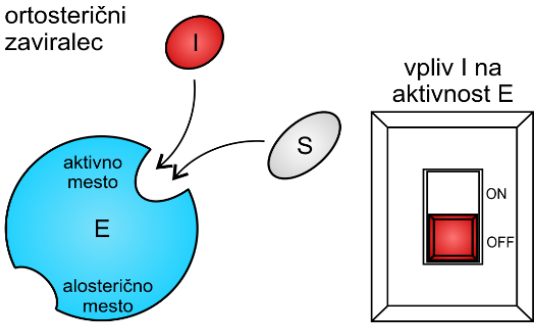
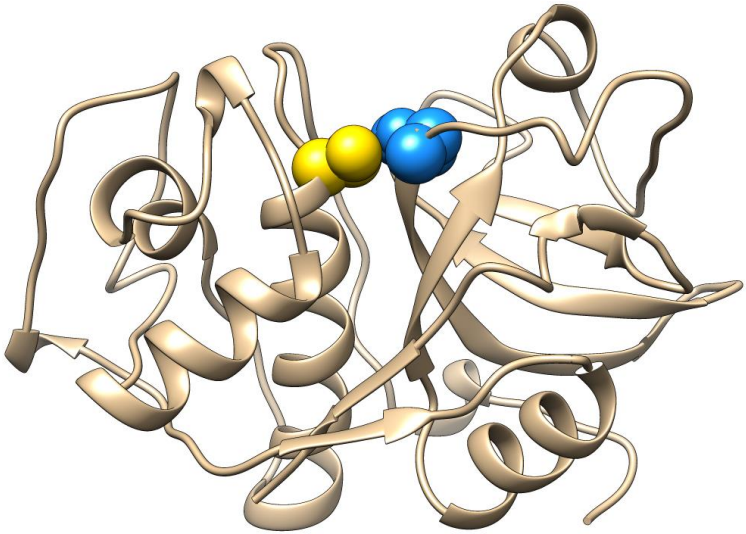
- ↪ človeške papainu podobne peptidaze = cisteinski katepsini
- ↪ cisteinske peptidaze – katalitična diada Cys-His
- ↪ lokalizacija: lizosom, ZCM, jedro, citosol, mitohondrij
- ↪ monomerni encimi, masa okoli 25 kDa
- ↪ regulacija s proteinskimi inhibitorji (cistatini, tiropini)

CILJI

- ↪ identifikacija in karakterizacija sintetičnih alosteričnih efektorjev
- ↪ karakterizacija mehanizmov prenosa alosteričnih signalov
- ↪ identifikacija endogenih alosteričnih efektorjev pri človeku

ZAKAJ ALOSTERIJA?

- ↪ alosterični efektorji omogočajo bolj natančno uravnavanje aktivnosti



Marko



Tjaša Goričan

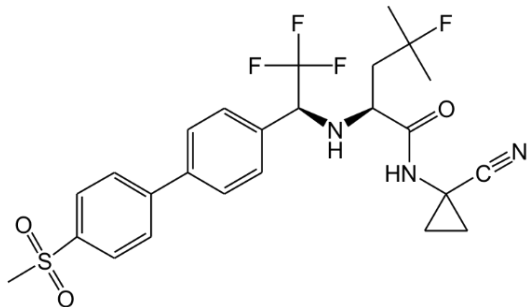


Mateja Rebernik

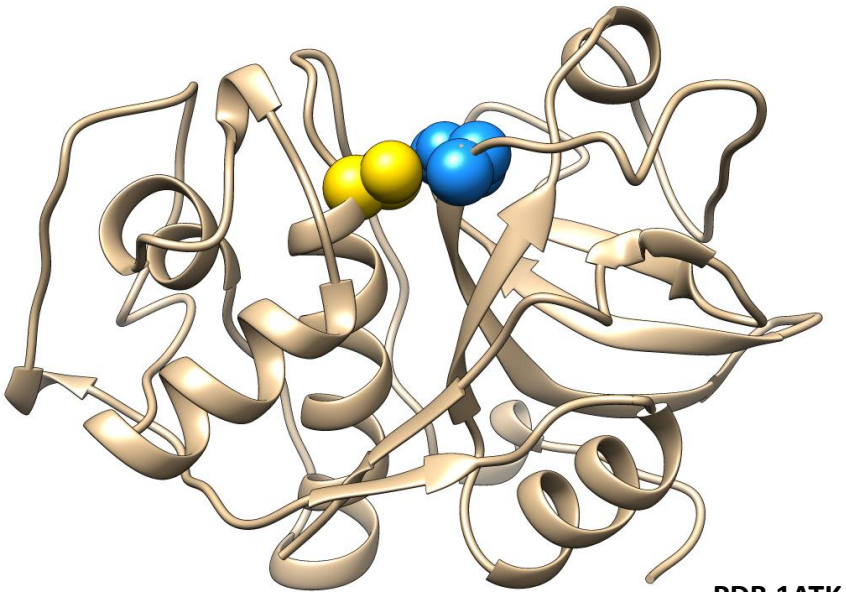
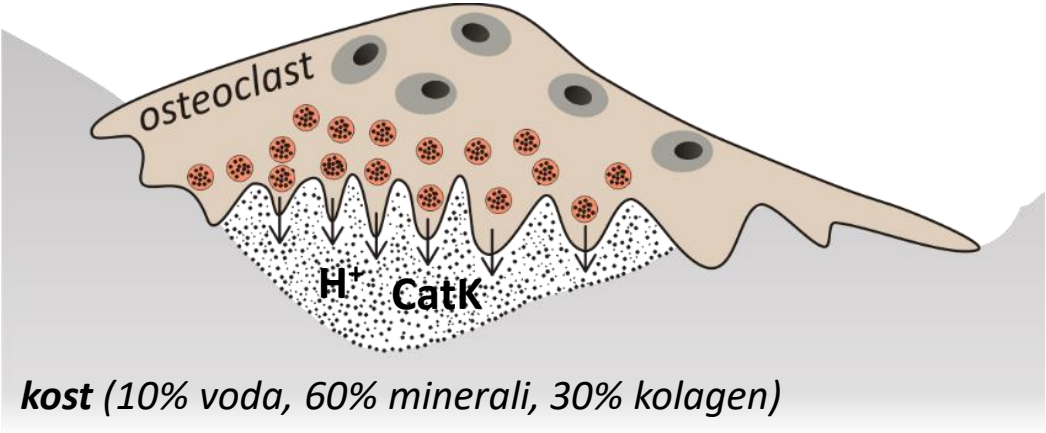
KATEPSIN K – naš prvi modelni encim

Ozadje:

- poglavitna peptidaza pri preoblikovanju kosti – osteoklasti ga sproščajo v resorpcijsko lakuno na stiku s kostjo, katepsin K nato razgradi kostni kolagen
- Strukturno gledano je tipična papainu podobna endopeptidaza
- posebnost - sprejme Pro ostanke na poziciji P2 substrata
- Cepi trojno vijačnico kolagenov – tega je zmožnih le nekaj peptidaz
- genske okvare, povišana aktivnost → bolezni
- Tarča za zdravljenje osteoporoze



Odanacatib (Merck) – inhibitor katepsina K, veže se v aktivno mesto



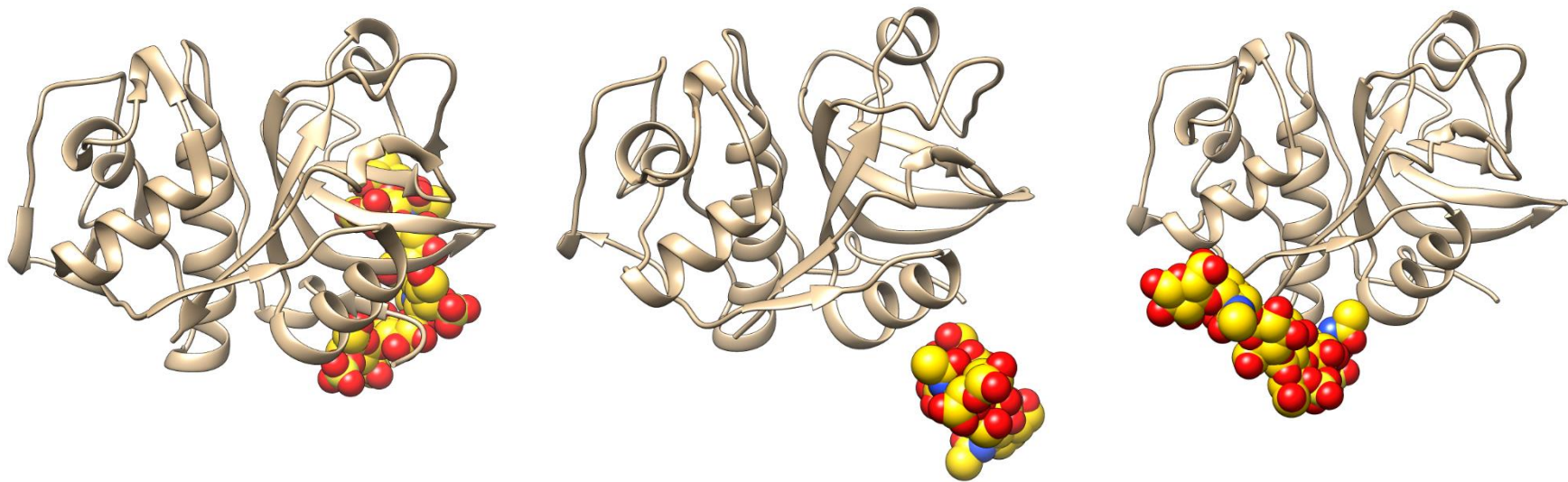
PDB 1ATK

ALOSTERIČNA REGULACIJA KATEPSINA K Z GLIKOZAMINOGLIKANI (GAGi)

Prvi znan primer alosterične regulacije papainu podobnih peptidaz. GAGi povišajo kolagenazno aktivnost katepsina K¹

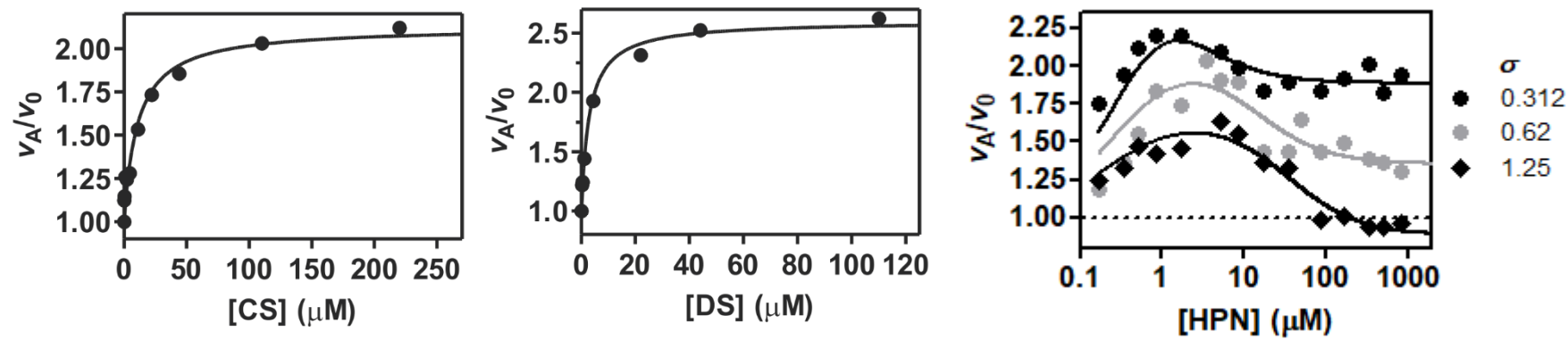
Za hondroitinsulfat in dermatansulfat je znanih več vezavnih mest na katepsinu K^{2,3} (desno).

Veže tudi heparansulfat/heparin.

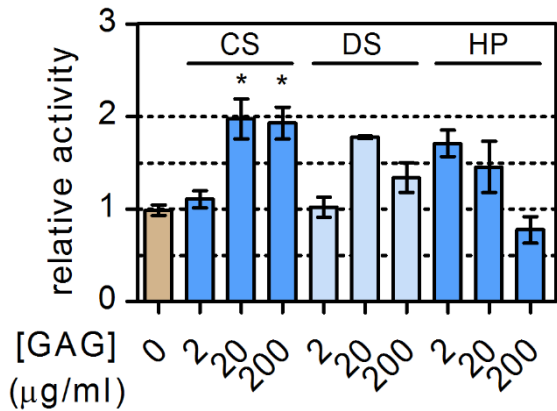


Glikozaminoglikani so alosterični aktivatorji katepsina K.⁴

Kinetične meritve s sintetičnim substratom⁴.



Kolagenazna aktivnost katepsina K v prisotnosti GAG⁵.



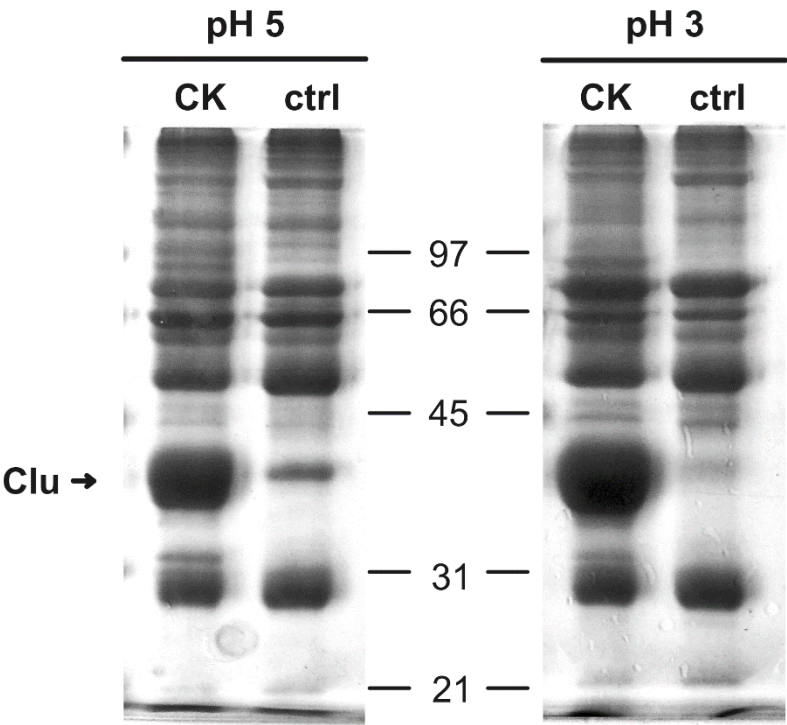
¹Li in sod. 2000. *Biochemistry*. 39; ²Li in sod. 2008. *J Mol Biol*. 383. 3Aguda in sod. 2014. *PNAS*. 111. ⁴Novinec in sod. 2010. *Biochem J*. 429. ⁵Novinec in sod. 2016. *Febs Lett*. 590

ALOSTERIČNA REGULACIJA KATEPSINA K S KLAŠTERINOM

Zunajcelični šaperon klasterin veže katepsin K pri pH 7.4 in ga stabilizira

Identifikacija z afinitetno kromatografijo krvnega seruma na catK-E64-sefarozi (desno)

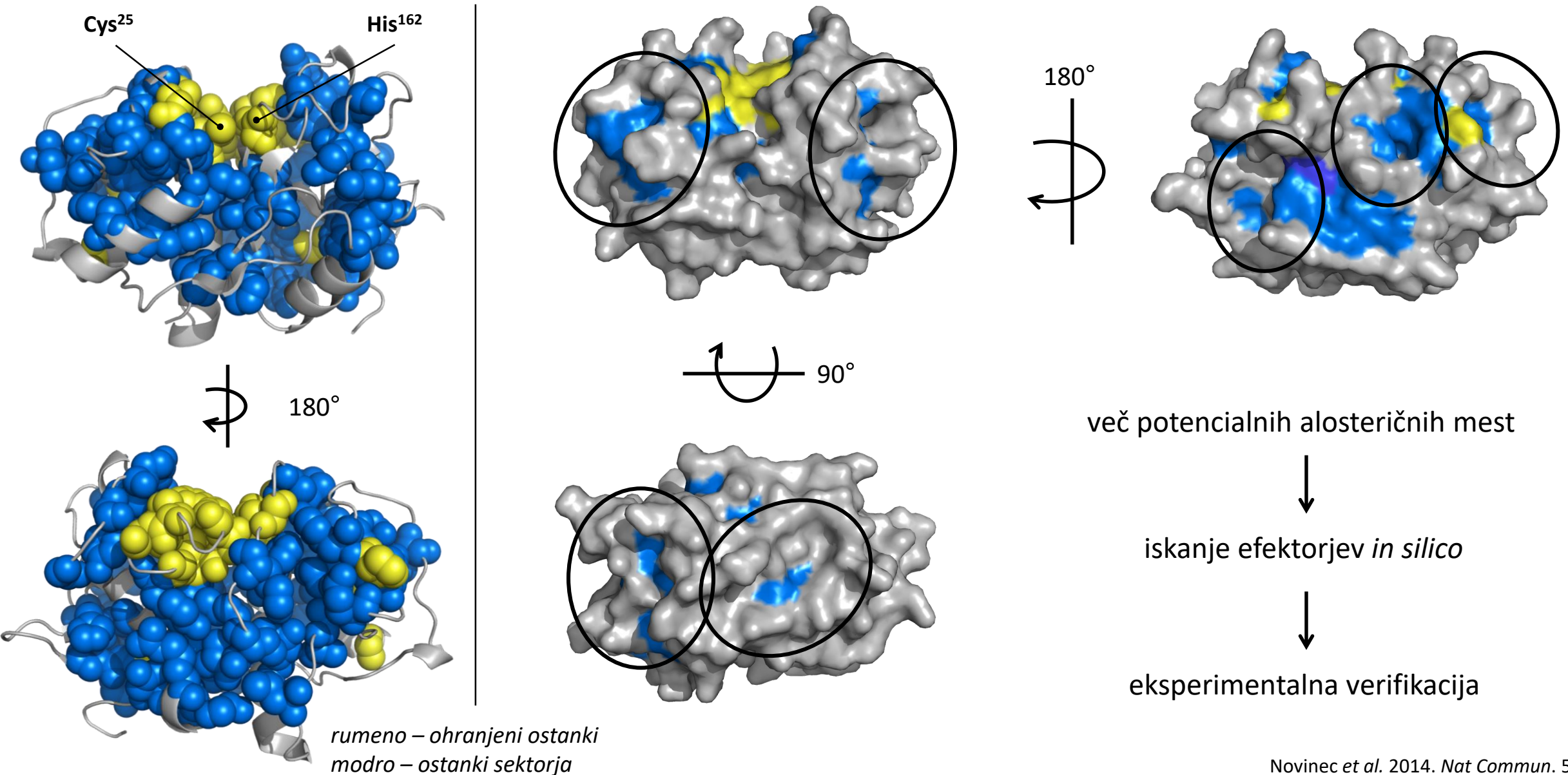
$K_d = 0,5 \text{ nM}$



	Half life fast (min)	Percent fast	Half life slow (min)	Percent slow
Enzyme only	7.0 ± 0.7	100	–	–
Enzyme + clusterin	15 ± 2	82	100 ± 15	18
Enzyme + elastin	32 ± 2	100	–	–
Enzyme + elastin + clusterin	167 ± 8	100	–	–

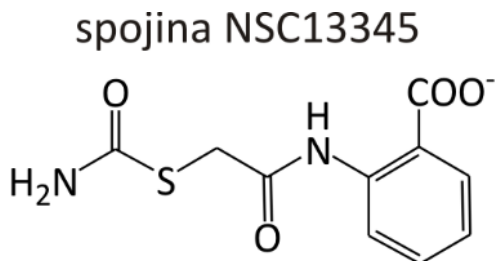
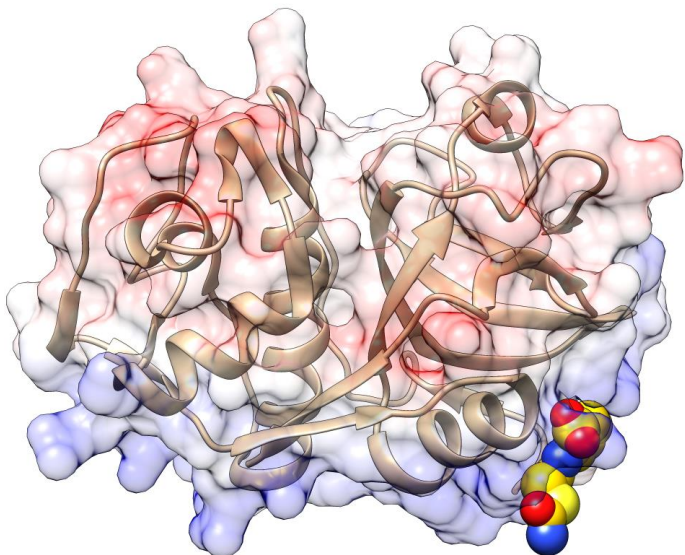
ALOSTERIČNA REGULACIJA PAPAINU PODOBNIH PEPTIDAZ Z MALIMI MOLEKULAMI

Napoved alosteričnih mest na papainu podobnih peptidazah z iskanjem evolucijsko soodvisnih omrežij ostankov = **proteinskih sektorjev**.
Modelni encim je **katepsin K**.



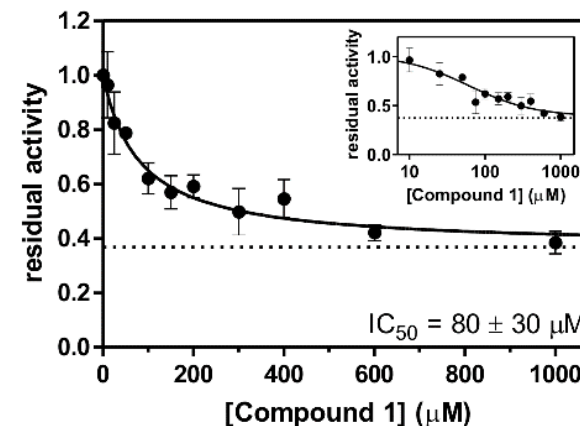
ALOSTERIČNA REGULACIJA KATEPSINA K Z MALIMI MOLEKULAMI

Prvi opisan malomolekulski alosterični efektor katepsina K

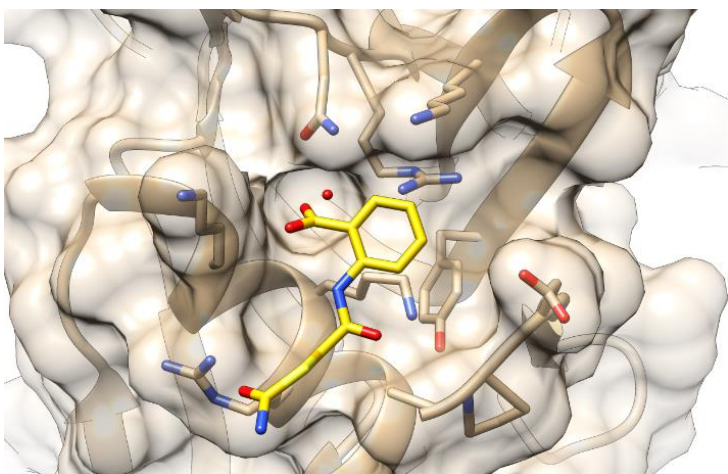


Spojina se veže na eno izmed dveh računalniško predvidenih vezavnih mest (levo in spodaj levo). Ima različne vplive na hidrolizo substratov – popolnoma inhibira razgradnjo kolagena, razgradnjo ostalih substratov inhibira delno.

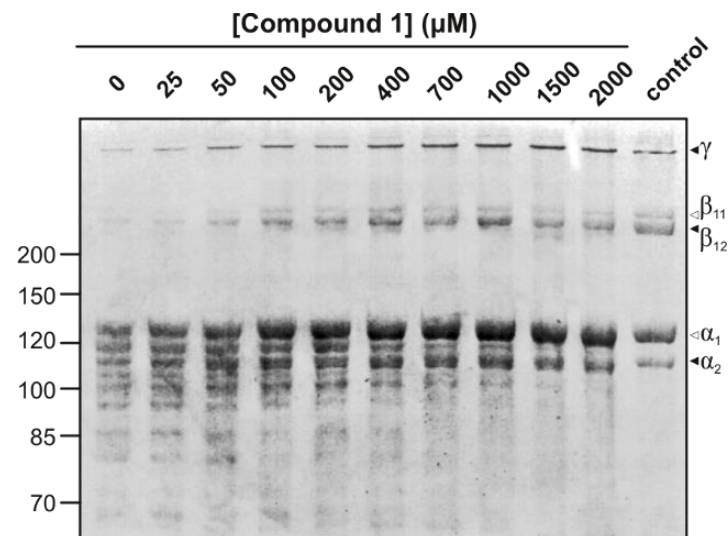
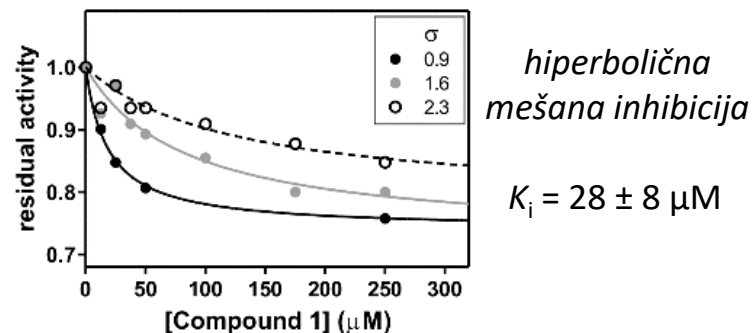
Substrat: **azokazein** (z azo barvilom označen kazein)



Substrat: **topen kolagen** (iz telečje kože)



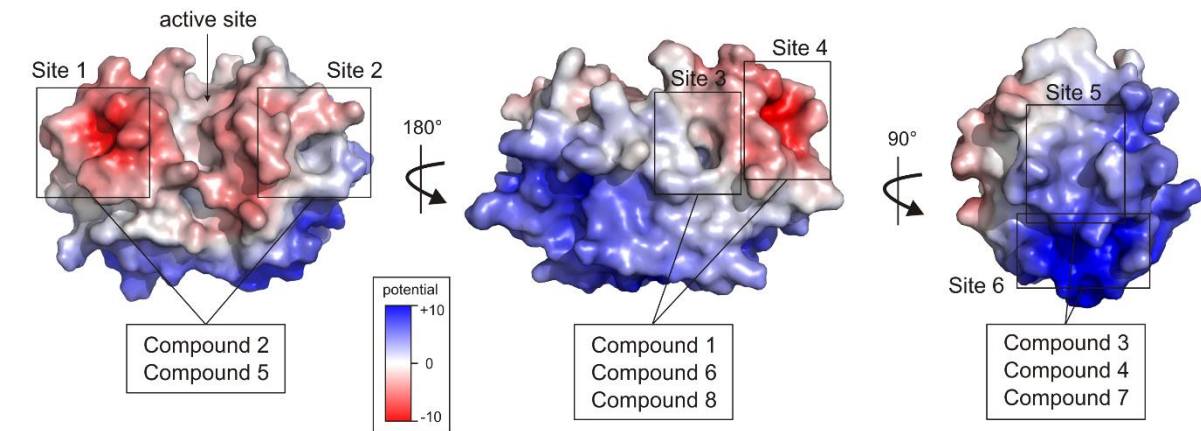
Substrat: **Abz-HPG|GPQ-EDDnp** (sintetičen FRET substrat specifičen za katepsin K)



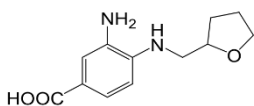
ALOSTERIČNA REGULACIJA KATEPSINA K Z MALIMI MOLEKULAMI

Kinetična karakterizacija še osmih efektorjev katepsina K identificiranih na osnovi računalniških metod

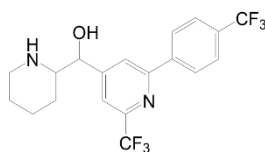
Strukture spojin in računalniško predvidena možna vezavna mesta



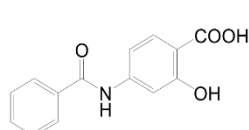
Compound 1



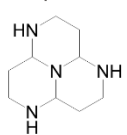
Compound 2



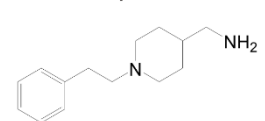
Compound 3



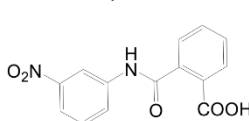
Compound 5



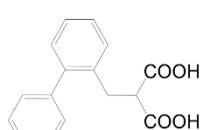
Compound 6



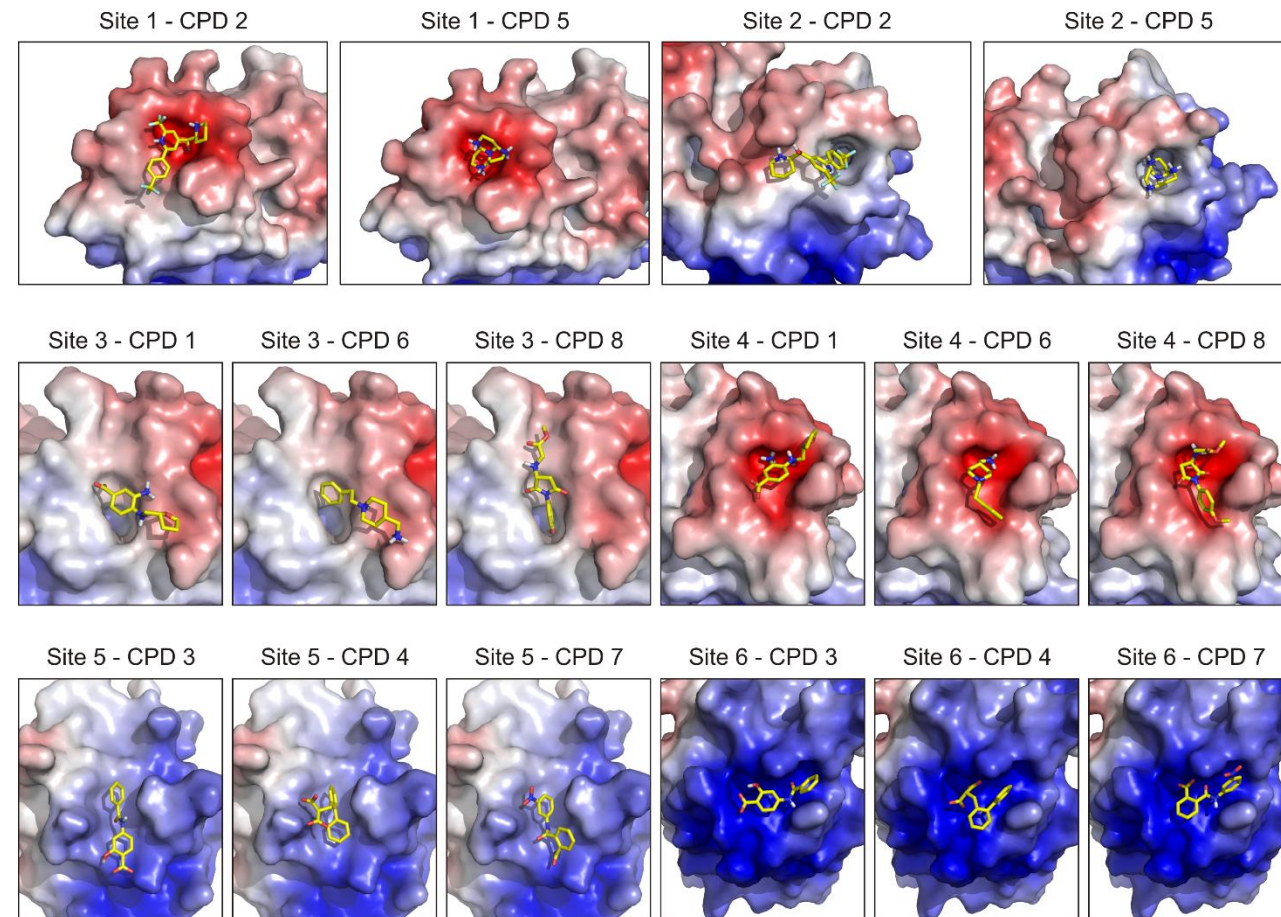
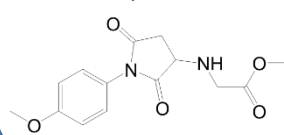
Compound 7



Compound 4



Compound 8

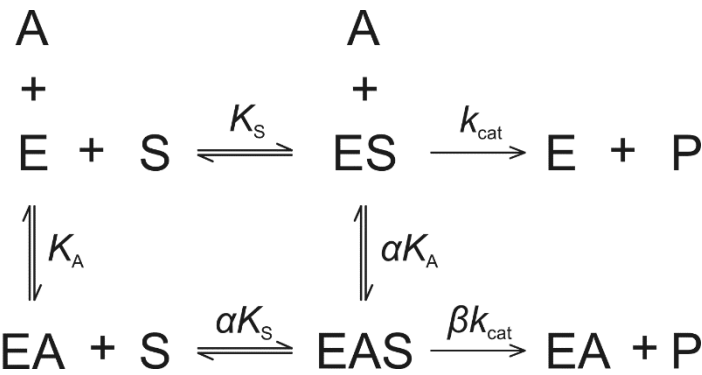


*s spojinama smo delo
nadaljevali (glej nadaljevanje)*

ALOSTERIČNA REGULACIJA KATEPSINA K Z MALIMI MOLEKULAMI

Kinetična karakterizacija še osmih efektorjev katepsina K identificiranih na osnovi računalniških metod

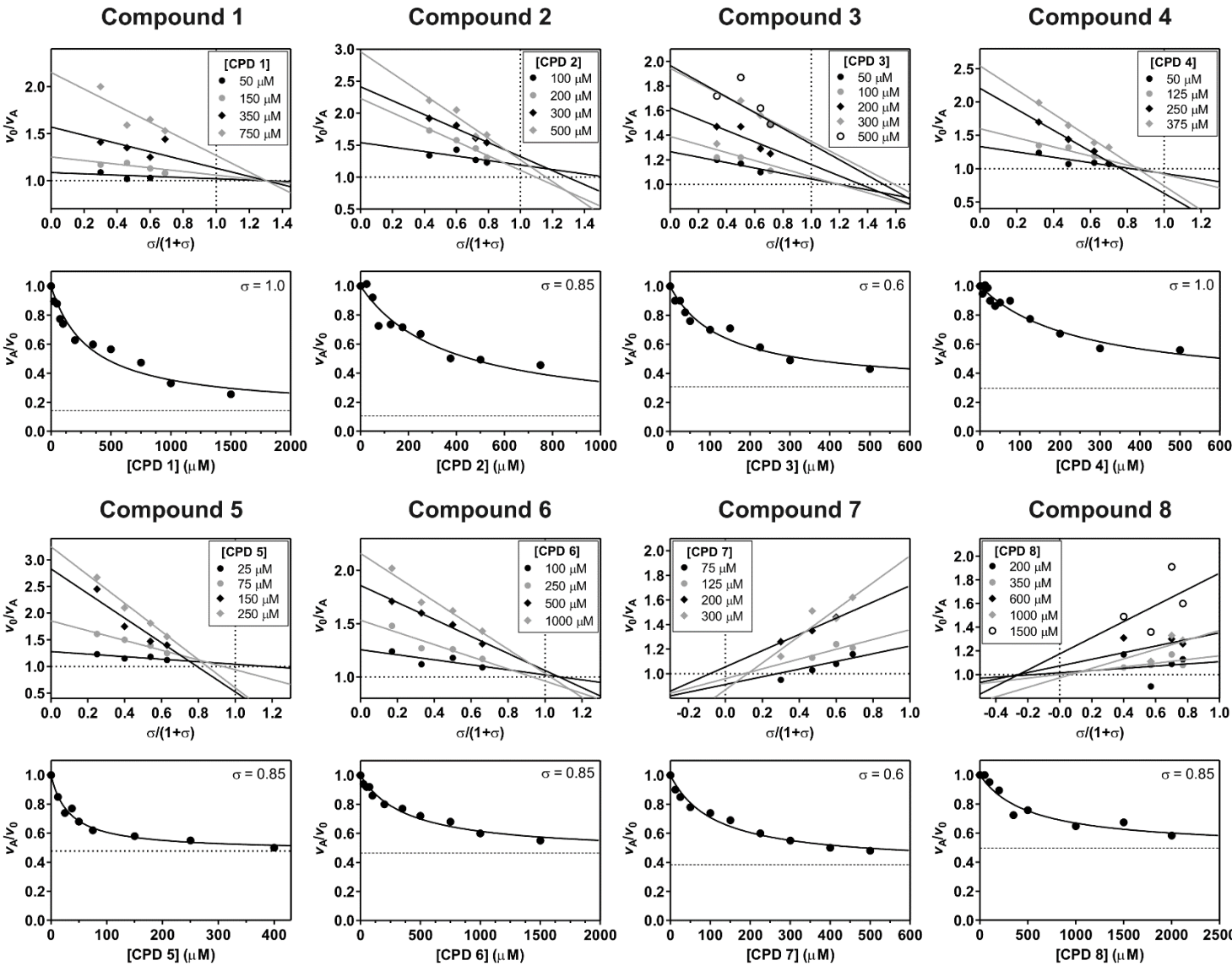
Model



Izračunani parametri

Substrate	Z-FR ↓ AMC		
	α^1	β^1	K_A (μM)
Compound 1	6.7±3.0	0.55±0.25	190±20
Compound 2	7.2±0.5	0.74±0.13	150±50
Compound 3	1.7±0.5	0.44±0.22	110±20
Compound 4	5.6±1.2	1.5±0.3	100±40
Compound 5	4.8±1.5	1.5±0.2	20±5
Compound 6	3.0±0.2	1	270±50
Compound 7	0.19±0.03	0.19±0.03	290±20
Compound 8	0.31±0.06	0.31±0.06	1100±200

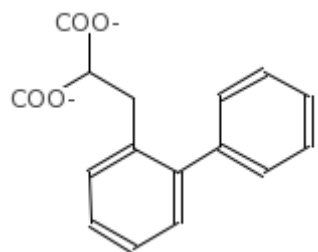
Diagrami



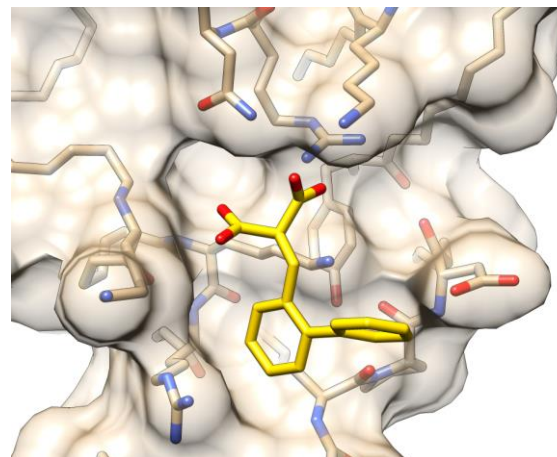
ALOSTERIČNA REGULACIJA KATEPSINA K Z MALIMI MOLEKULAMI

Strukturna in funkcijska karakterizacija efektorja NSC94914 (spojina 4 v prejšnjem delu)

NSC94914

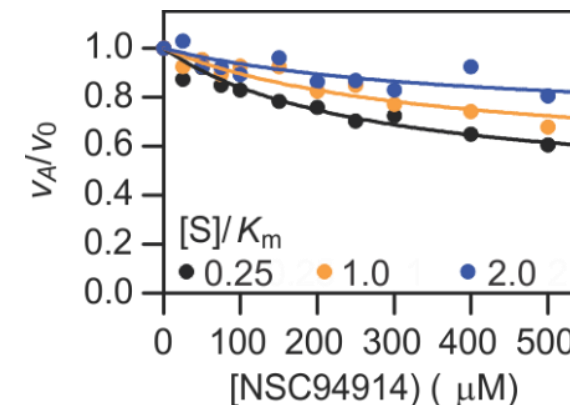


Kristalna struktura – spojina se veže na isto mesto kot NSC13345, tudi to je bilo pravilno računalniško napovedano.



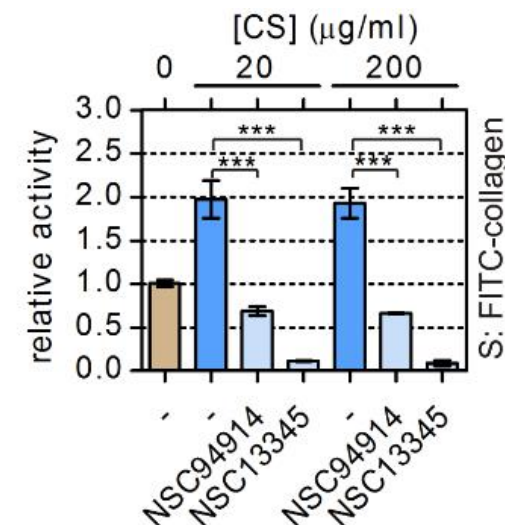
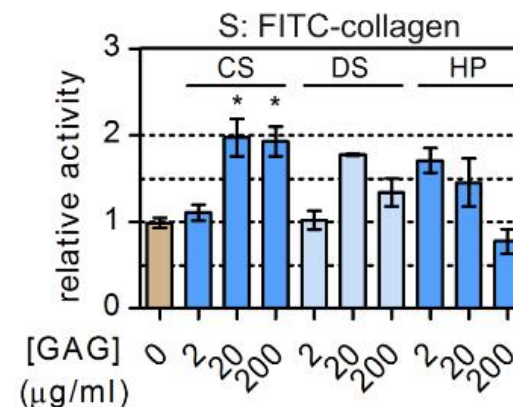
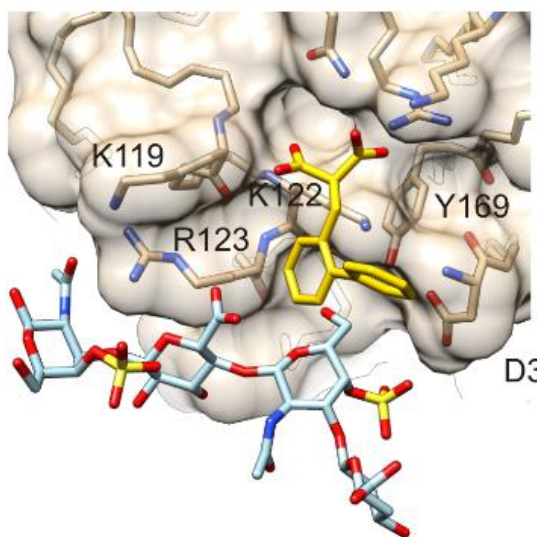
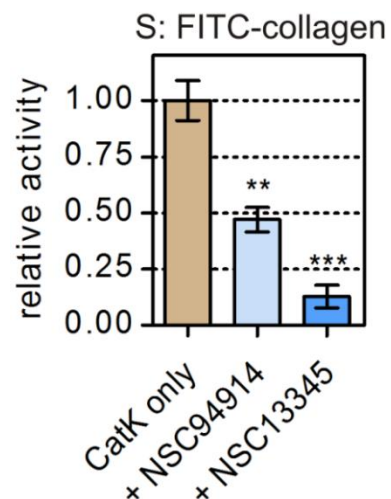
Testiranje s sintetičnim substratom

$$K_i = 100 \pm 20 \mu\text{M}$$



V nasprotju z NSC13345, je NSC94914 delni inhibitor hidrolize kolagena

S tem mestom interagira tudi hondroitinsulfat. Pokazali smo, da obe spojini delujeta inhibitorno tudi v prisotnosti le-tega.

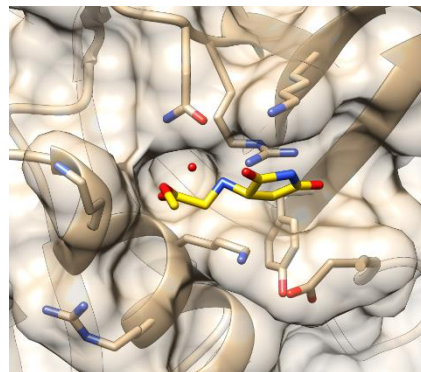
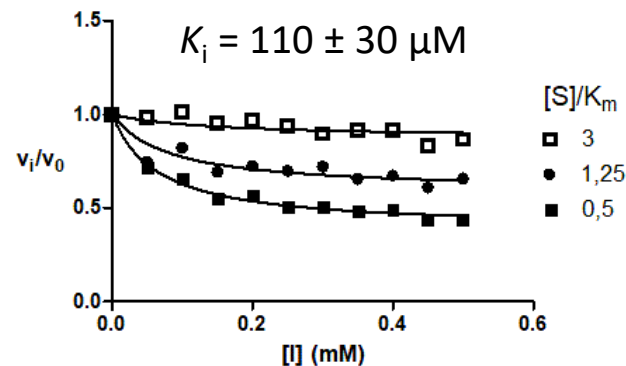
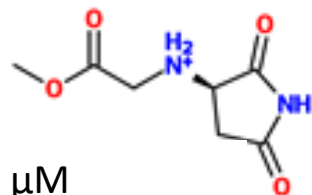


ALOSTERIČNA REGULACIJA KATEPSINA K Z MALIMI MOLEKULAMI

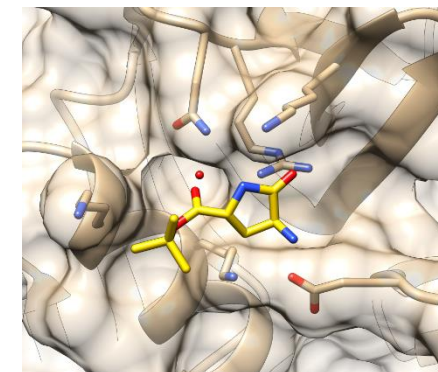
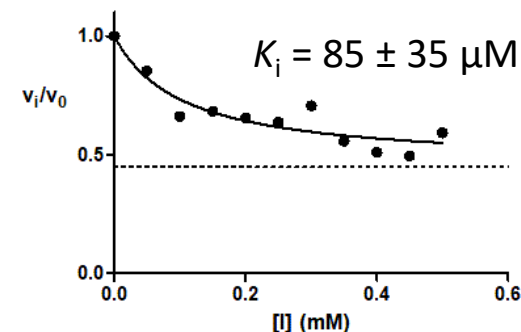
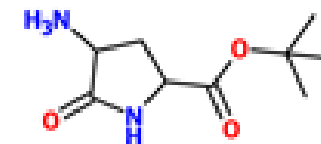
Tjaša Goričan. Magistrsko delo. 2016

Karakterizacija novih efektorjev katepsina K – v sodelovanju s Katedro za organsko kemijo (prof. Svete)

Su-Gly-OMe
fragment spojine 8

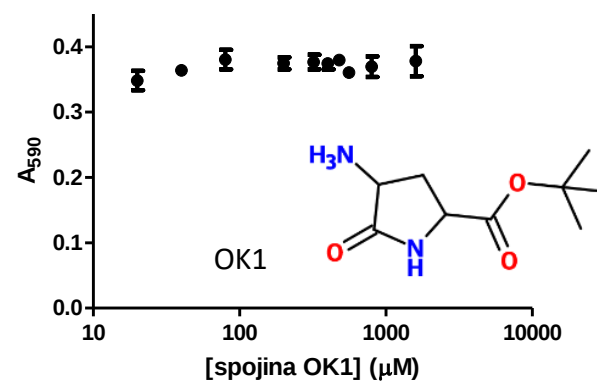
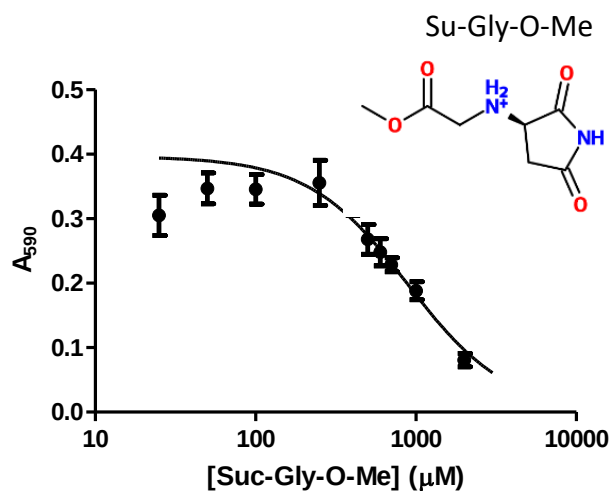


piroglutamat OK1

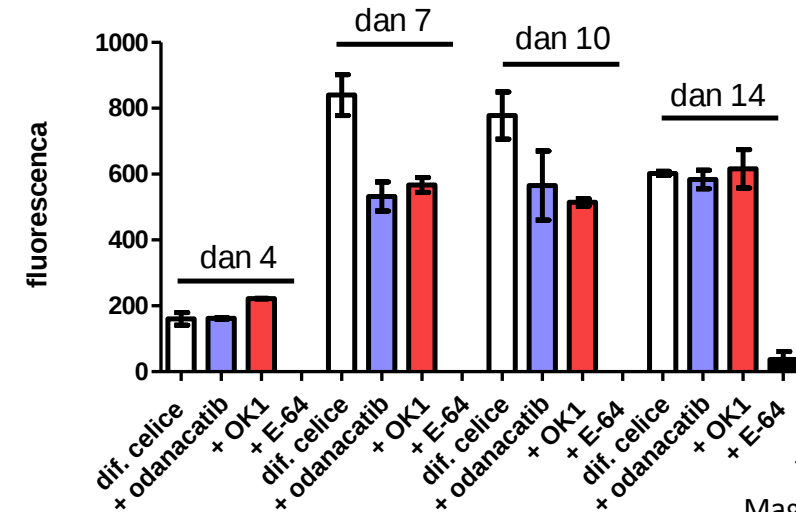


TESTIRANJE V KULTURI DIFERENCIRANIH CELIC U937 (podobne osteoklastom)

citotoksičnost – MTT test – meri metabolično aktivnost celic

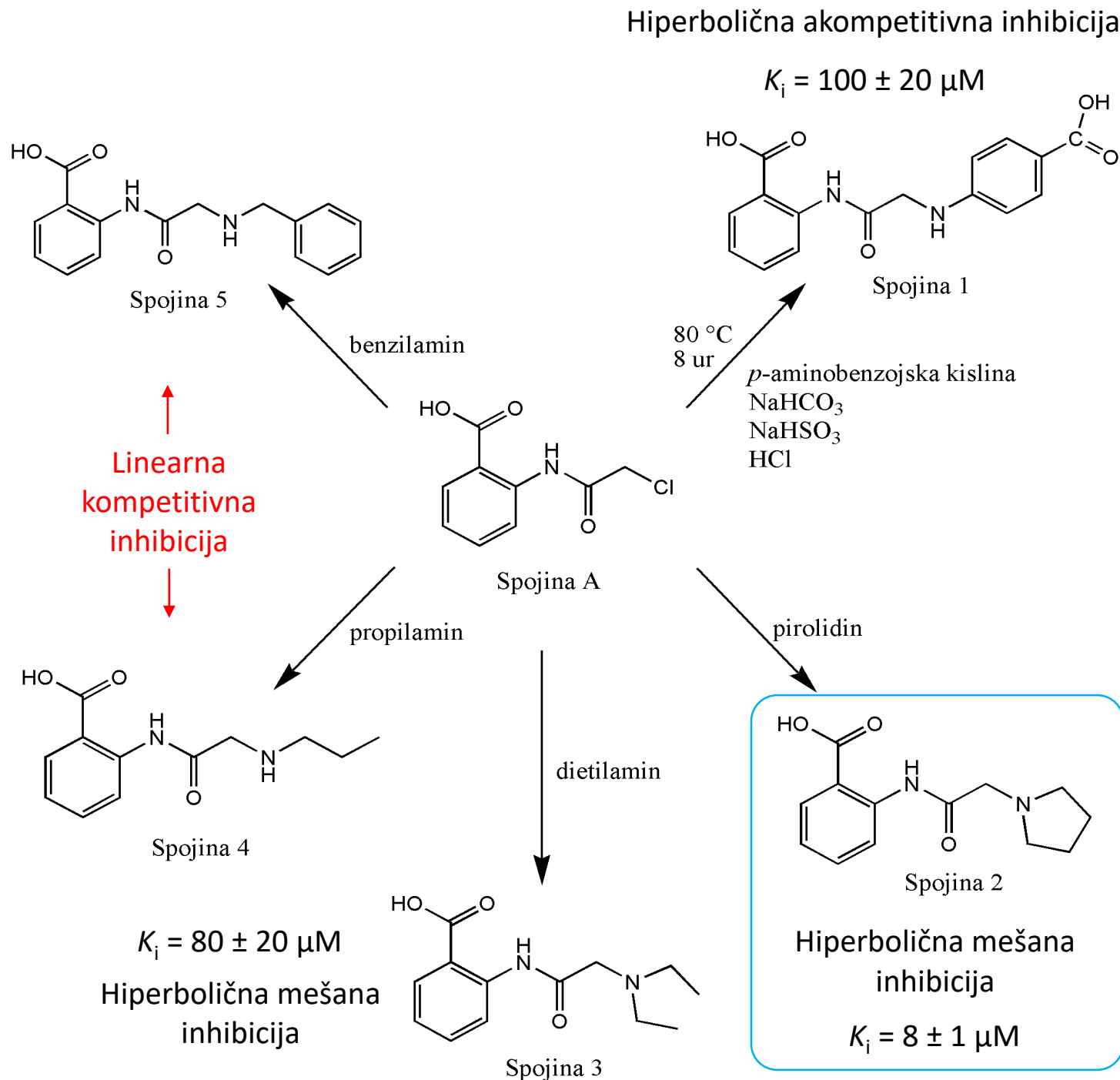
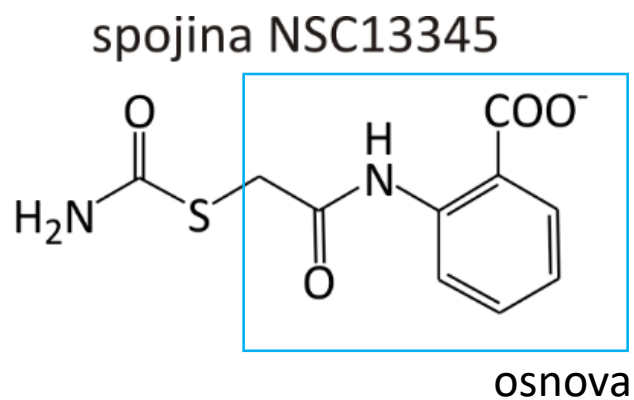
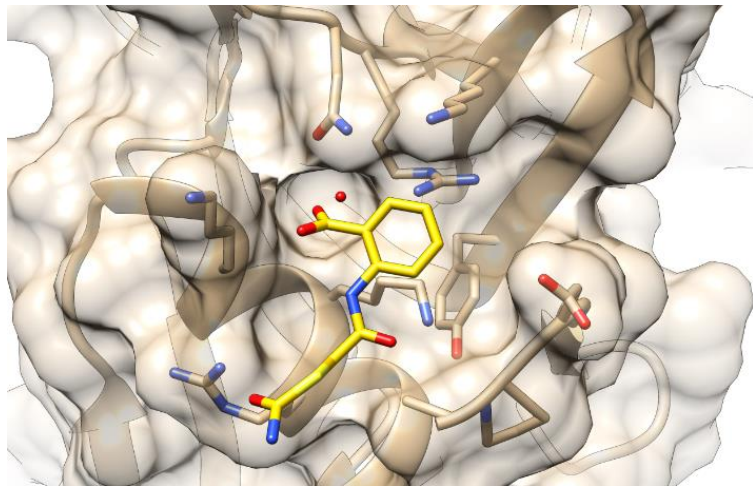


Zunajcelična proteolitična aktivnost – Z-FR-AMC

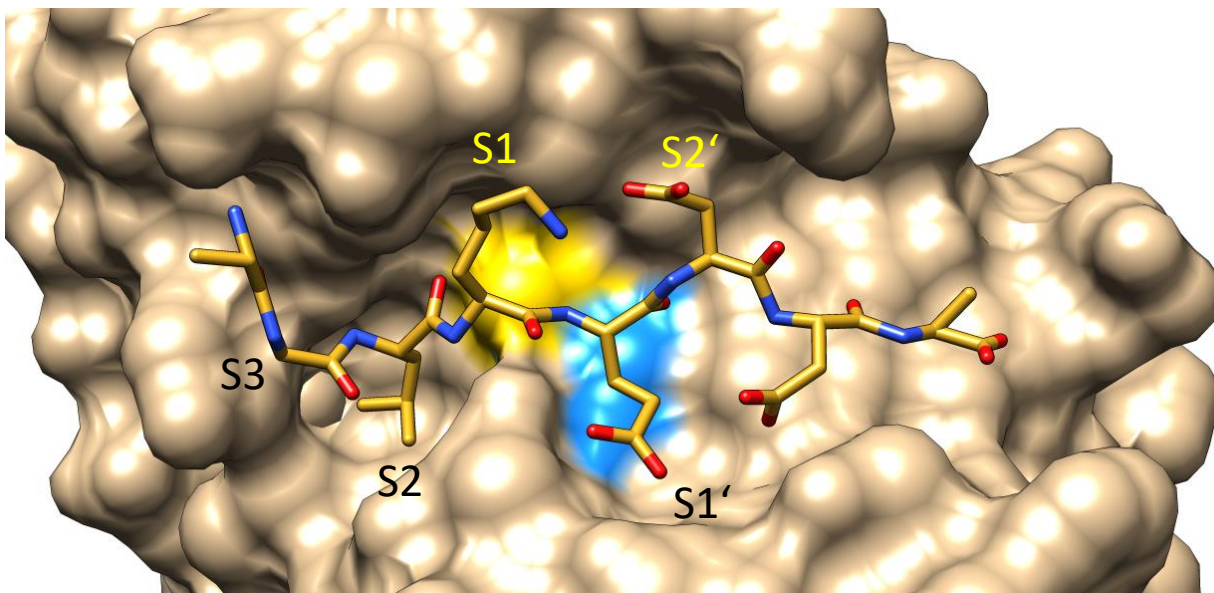


OPTIMIZACIJA SPOJINE NSC13345

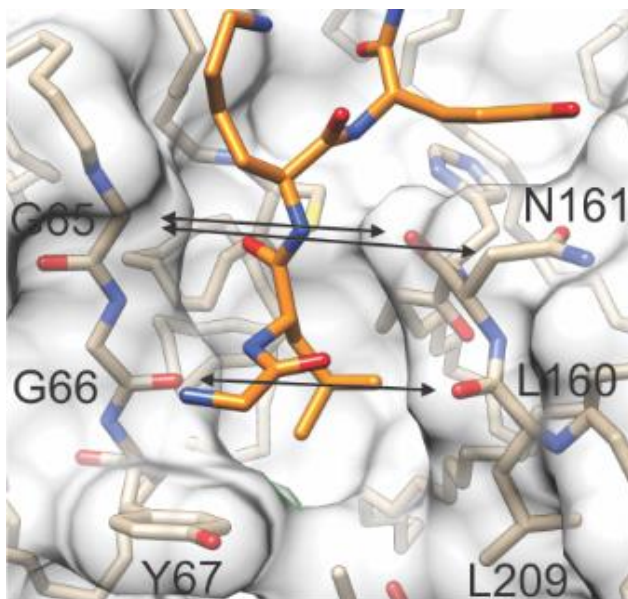
Ana Grom. Magistrsko delo. 2017



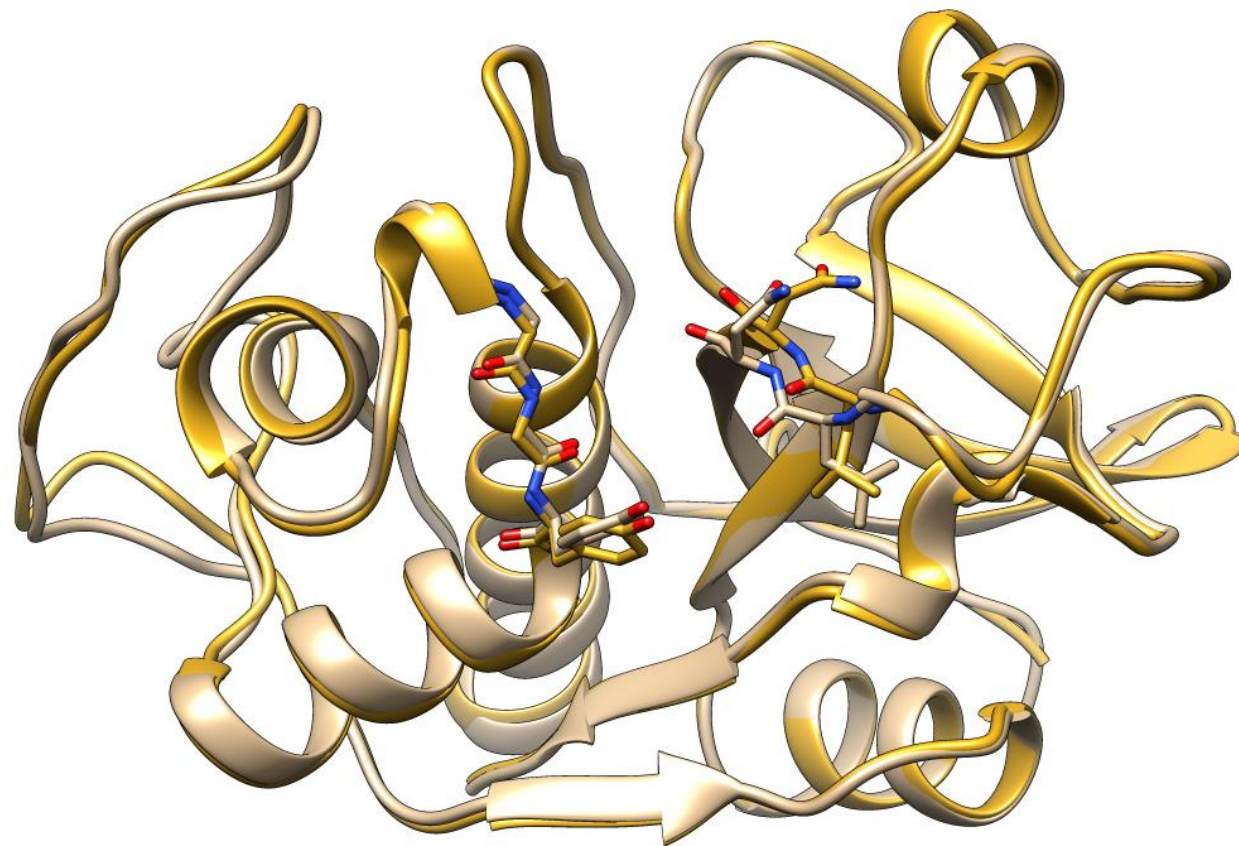
KAKO DELUJE ALOSTERIJA V KATEPSINU K?



Najožji del aktivnega mesta je reža, ki tvori S2 in S1 mesti.



Katepsin K obstaja v dveh konformacijah, ki se razlikujeta v širini S2-S1 reže in s tem afiniteti do substrata

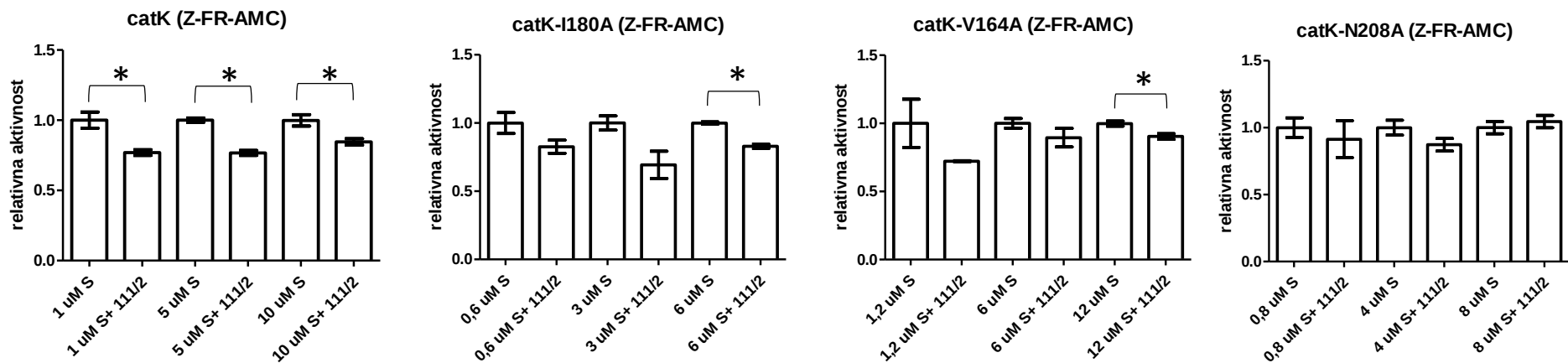
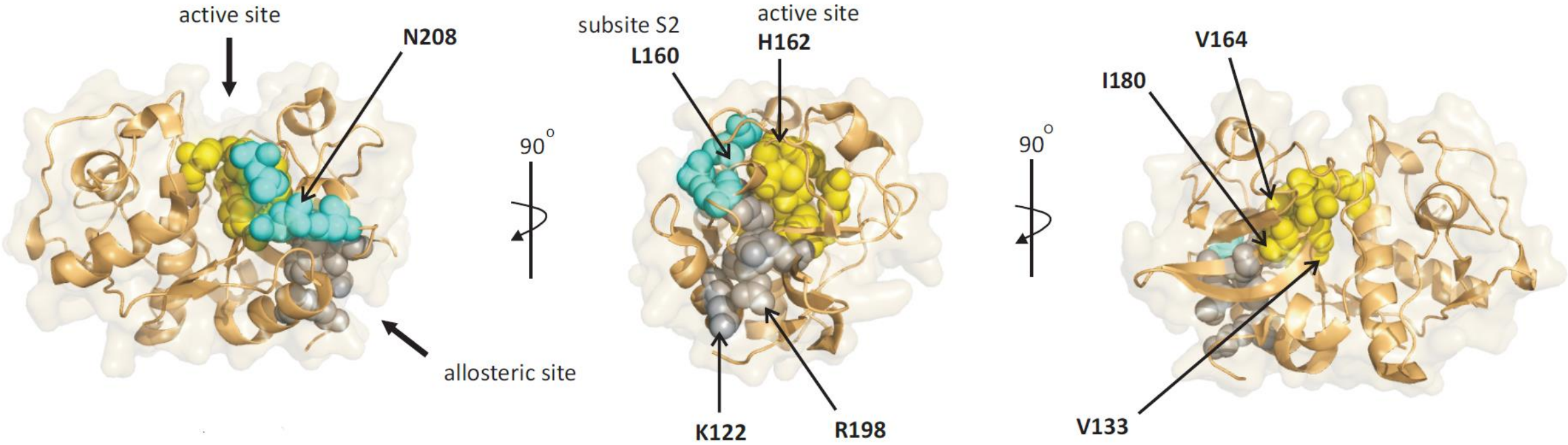


rjava – T stanje – ožja reža, nižja afiniteta do S
rumena – R stanje – širša reža, višja afiniteta do S

Glikozaminoglikani stabilizirajo R stanje, mali inhibitorji stabilizirajo T stanje.

KAKO DELUJE ALOSTERIJA V KATEPSINU K?

Prenos signala od alosteričnega do aktivnega mesta – Tjaša Goričan – delo v okviru doktorske disertacije – v teku



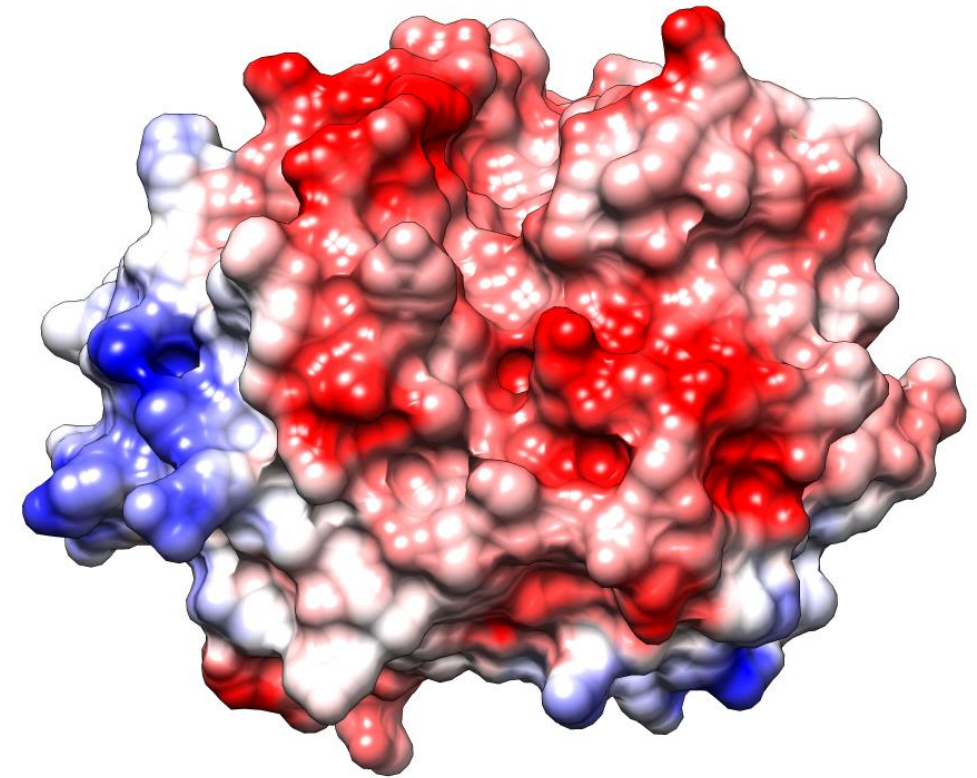
KAJ PA OSTALI KATEPSINI?

- Interagirajo z glikozaminoglikani

GAG v lizosomu inhibirajo encime pri nizkem pH

Katepsin B – stabiliziran s heparinom/heparansulfatom v ECM, kinetično deluje heparin kot delni akompetitivni inhibitor

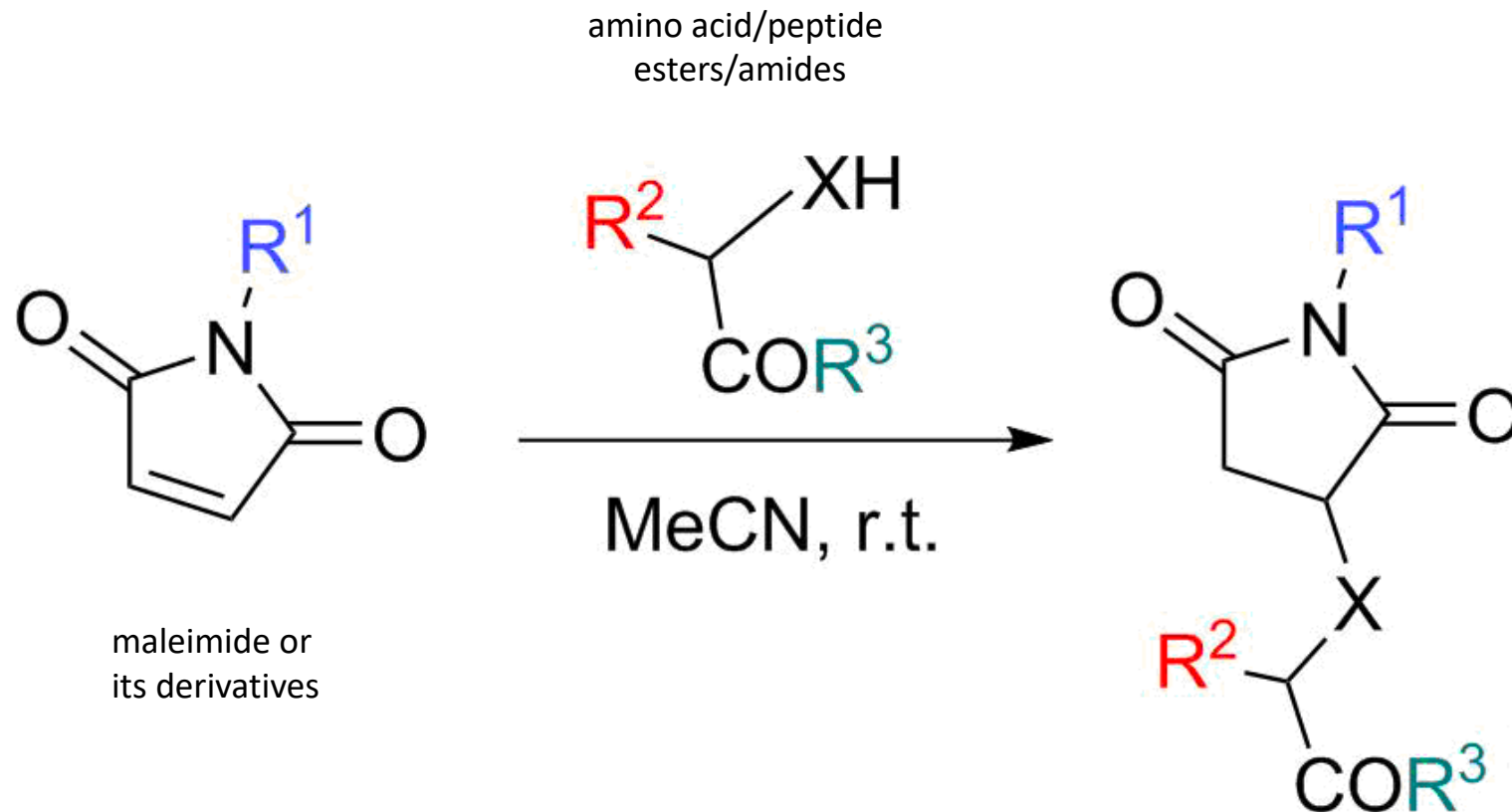
Hondroitinsulfat vpliva na aktivnost katepsina S



- Obstajajo neinhibitorni vezavni partnerji, npr. katepsin B/aneksin
- Evolucijska ohranjenost identificiranih omrežij!
- Tudi ostale lahko alosterično reguliramo z mali molekulami *in vitro*

OPTIMIZACIJA SPOJINE SU-GLY-O-ME

Tjaša Goričan – delo v okviru doktorske disertacije – v teku



Tjaša je pripravila knjižnico spojin, katere testiramo na inhibitorno aktivnost proti različnim katepsinom. Tjaša testira katepsina K in S, trije diplomanti pa trenutno testirajo katepsine L (Ana Obaha), V (Urban Hribar) in B (Tina Turel).

Su-Gly-OMe

$R^1 = \text{H}$

$R^2 = \text{H}$

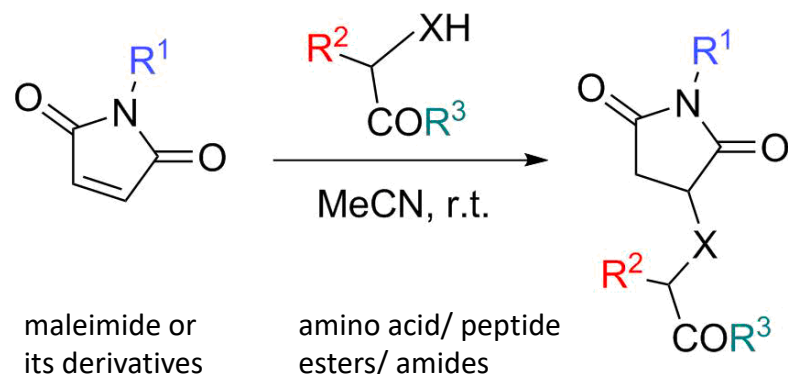
$R^3 = \text{OMe}$

$X = \text{NH}$

RATIONAL DESIGN OF OPTIMIZED ALLOSTERIC EFFECTORS OF CATHEPSINS K AND S BASED ON SUCCINIMIDE-GLYCINATE SCAFFOLD

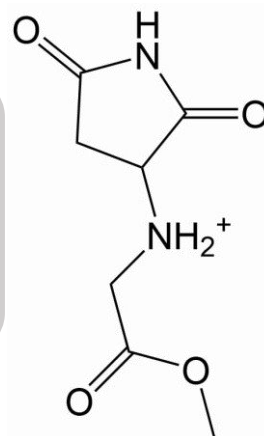
Tjaša Goričan, Nejc Petek, Jurij Svete, Marko Novinec

Faculty of Chemistry and Chemical Technology, UL

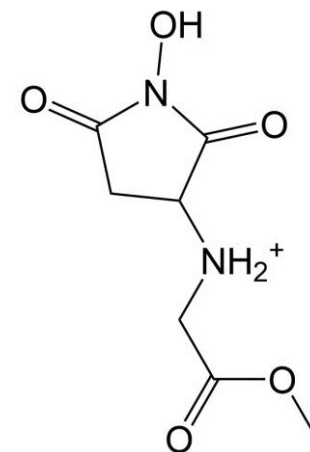


Su-Gly-OMe

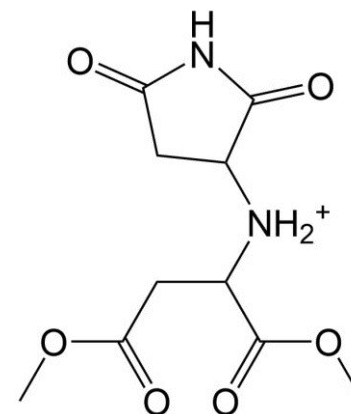
$R^1 = \text{H}$
 $R^2 = \text{H}$
 $R^3 = \text{OMe}$
 $X = \text{NH}$



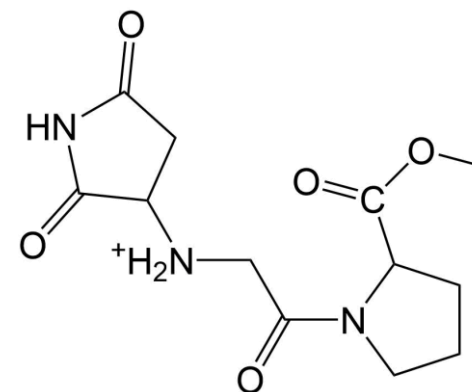
site of diversification	inhibitor	IC ₅₀ [mM]		selectivity for cathepsin K/S
		cathepsin K	cathepsin S	
	Su-Gly-OMe	0.14 ± 0.08	1.1 ± 0.1	cathepsin K
R ¹	OH	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	none
R ²	CH ₂ COOMe	0.23 ± 0.07	0.3 ± 0.1	
	CH ₂ COOMe (diastereomer)	0.04 ± 0.03	0.2 ± 0.1	cathepsin S
	CH ₂ CH ₂ COOMe	2.1 ± 0.3	0.4 ± 0.2	
	Bn	mM range	0.6 ± 0.2	none
R ³	NH ₂	~ 1	~ 0.6	
	Gly-OMe	0.22 ± 0.07	0.22 ± 0.06	
	Glu-(OMe) ₂	~ 0.6	0.3 ± 0.1	
	Pro-OMe	0.03 ± 0.02	3 ± 1	cathepsin K
	Phe-NH ₂	0.26 ± 0.09	0.29 ± 0.09	none



↑ afiniteta za katepsin S



↑ afiniteta za katepsina K in S



↑ afiniteta in selektivnost za katepsin K