

## POVZETEK

Katepsin K je cisteinska peptidaza iz družine papainu podobnih peptidaz, ki se izloča iz osteoklastov in je ključen encim pri preoblikovanju kosti pri vretenčarjih. Trojna vijačnica kolagena, ki predstavlja veliko večino celotne molekule kolagena, je izjemno odporna na proteolitično razgradnjo in jo lahko cepi le omejeno število endogenih peptidaz. Posebnost katepsina K je, da lahko cepi to strukturo na več različnih mestih, mehanizem vezave trojne vijačnice, ki privede do cepitve, pa še ni poznan. Prav slednje je bil glavni namen našega dela, namreč želeli smo okarakterizirati vezavo trojne vijačnice z metodami encimske kinetike, računalniških simulacij in strukturne biologije. Da bi razumeli, zakaj ima katepsin K kolagenazno aktivnost, smo del študije opravili na katepsinu L, ki sicer izkazuje nizko kolagenazno aktivnost, ni pa sposoben cepiti substratov s prolinom na mesu P2, kar je običajno za kolagenaze. V primerjalni študiji obeh katepsinov smo pokazali, da imata oba encima podobno afiniteto do kolagena tipa I in da kolagen tipa I razgradita na podoben način, saj je cepitveni vzorec razgradnih fragmentov primerljiv. Identificirali smo tudi eno izmed cepitvenih mest za katepsin L, ki se na trojni vijačnici nahaja mestu za Gln<sup>24</sup> in je v neposredni bližini cepitvenega mesta katepsina K, Gln<sup>21</sup>. Pokazali smo tudi, da oba encima povzročita sproščanje topnih fragmentov, ki nastanejo kot posledica razgradnje netopnih fibril kolagena. Z zamenjavo aminokislinskih ostankov v okolici aktivnega mesta katepsina L s tistimi, ki jih na istih pozicijah najdemo pri katepsinu K, smo ugotovili, da so samo tri zamenjave (Leu<sup>69</sup>Tyr, Ala<sup>214</sup>Leu in Gly<sup>164</sup>Ala) v okolici žepa S2 dovolj, da postane kolagenazna aktivnost primerljiva z aktivnostjo katepsina K. Tudi cepitveno mesto na trojni vijačnici kolagena tipa I sovpada z mestom cepitve za katepsin K, Gln<sup>21</sup>. Vezavo kolagena I v aktivno mesto smo okarakterizirali z računalniško simulacijo, ki je pokazala, da se tudi pri katepsinu L trojna vijačnica v aktivno mesto veže na način, da se ena od treh verig približa katalitičnemu ostanku, Cys<sup>25</sup>. Pri evolucijsko oddaljenih organizmih kot so nevretenčarji in rastline poznamo primere papainu podobnih peptidaz s kolagenazno aktivnostjo, naši rezultati pa potrjujejo, da je sposobnost cepitve trojne vijačnice intrinzična lastnost papainskega zvitja, specifičnost za prolin na mestu S2 pa to sposobnost poveča. To obenem pomeni, da je kolagenazno aktivnost mogoče obuditi na katepsinih s stabilnim papainu podobnim zvitjem. Tekom študije smo določili še tridimenzionalno strukturo kompleksa neaktivnega mutanta katepsina K<sup>C25S</sup> s 17 aminokislinskim dolгим sintetičnim peptidom z zaporedjem P-P-(G-P-Hyp)<sub>4</sub>-G-P-P. V nasprotju s pričakovanji smo, namesto v aktivnem mestu katepsina K<sup>C25S</sup>, dodatno elektronsko gostoto zaznali na že poznanem alosteričnem regulacijskem mestu encima. Elektronska gostota ustreza dipeptidnemu fragmentu Pro-Hyp, kar nakazuje možnost dodatne alosterične regulacije aktivnosti katepsina K s fragmenti kolagena, ki nastanejo po cepitvi. Zgoraj navedene ter bodoče ugotovitve bodo prispevale k razumevanju delovanja katepsina K v procesih preoblikovanja kosti na molekularnem nivoju. Rezultati naše raziskave so tudi osnova za pripravo novih inhibitorjev katepsina K, ki bodo specifično inhibirali le razgradnjo kolagena, ne pa tudi ostalih bioloških molekul.

**Ključne besede:** katepsin K, katepsin L, kolagen, kolagenazna aktivnost, alosterična regulacija