

## POVZETEK

Človeška dipeptidil-peptidaza I (DPPI, tudi katepsin C; EC 3.4.14.1) je lizosomska cisteinska peptidaza iz družine papainu podobnih peptidaz. Za razliko ostalih članov družine v aktivni obliki ni monomer, ampak tetramer. Vsaka podenota je sestavljena iz katalitične in izključitvene domene, ki sta med seboj nekovalentno povezani. Izključitvena domena sterično ovira vezavo substrata v aktivno mesto in posledično določa eksopeptidazno aktivnost DPPI. Biološke vloge DPPI obsegajo nespecifično razgradnjo proteinov kakor tudi specifične naloge, npr. procesiranje cimogenov efektorskih serinskih peptidaz v celicah imunskega sistema. Ker je prekomerna aktivnost slednjih povezana z vnetnimi boleznimi je inhibicija DPPI ena izmed strategij farmacevtske industrije za zdravljenje teh bolezni.

Namen te disertacije je bil identificirati in okarakterizirati prve modifikatorje, ki vplivajo na aktivnost DPPI z vezavo izven aktivnega mesta. V ta namen smo pripravili rekombinantni človeški encim DPPI v celicah HEK293T in prvič tudi v *E. coli* v topni obliki. Ugotovili smo, da je prvi v aktivni obliki tetramer (DPPI<sub>tet</sub>), drugi pa monomer (DPPI<sub>mono</sub>). Encima imata razen pretvorbenega števila  $k_{cat}$  za sintetični substrat H-Gly-Phe-AMC in konstante hitrosti vezave ireverzibilnega inhibitorja E-64 podobne lastnosti. Z analizo delovanja obeh oblik DPPI smo dokazali, da oligomerna struktura ni nujna za aktivnost encima. Ker sta oligomerna zgradba in izključitvena domena edinstveni med katepsini, smo v bakterijskem ekspresijskem sistemu pripravili tudi DPPI brez izključitvene domene (DPPI $\Delta$ EX). Encim smo uspešno aktivirali in dokazali, da se po aktivaciji obnaša kot endopeptidaza, in ne več kot eksopeptidaza, kot je značilno za celoten encim DPPI, njena substratna specifičnost pa je podobna kot pri ostalih katepsinih. Katalitična domena DPPI je torej ohranila endopeptidazno aktivnost.

Z molekulskim umeščanjem *in silico* ter eksperimentalnim testiranjem večjega števila spojin smo identificirali in kinetično okarakterizirali enajst modifikatorjev aktivnosti DPPI, ki glede na določene kinetične mehanizme ne tekmujejo s substratom za vezavo v aktivno mesto. Dve spojini sta imeli različni afiniteti za vezavo na obe obliki DPPI. S-[(2-gvanidino-4-tiazol)metil] izotiourea je delovala kot linearen mešan inhibitor s prevladujočim akompetitivnim karakterjem z višjo afiniteto za DPPI<sub>mono</sub>. Spojina Su-His-OMe, ki je delovala kot hiperbolični kompetitivni inhibitor pa je imela višjo afiniteto za DPPI<sub>tet</sub>. Ta spojina se glede na računalniške napovedi veže na mesto, ki je homologno enemu izmed alosteričnih mest katepsina K, njeno vezavo na to mesto pa smo eksperimentalno potrdili tudi s točkovnimi mutantami DPPI<sub>mono</sub>. Nasprotno je 2-[(3-nitrofenil)karbamoil]benzojska kislina imela podobni afiniteti za DPPI<sub>mono</sub> in DPPI<sub>tet</sub>, mehanizem delovanja spojine pa se je med obema oblikama razlikoval. Z identifikacijo in karakterizacijo teh modifikatorjev smo dokazali, da je aktivnost DPPI lahko regulirana z vezavo modifikatorjev izven aktivnega mesta in da ima tetramerna struktura lahko vpliv na regulacijo encimske aktivnosti.