

POVZETEK

Človeška katepsina K in S sta člana družine papainu podobnih peptidaz z zelo podobnima terciarnima strukturama. V človeškem telesu imata številne fiziološke vloge, pri čemer je najpomembnejša biološka vloga katepsina K razgradnja kolagenskih vlaken kostnega tkiva, medtem ko ima katepsin S zelo pomembno fiziološko vlogo pri regulaciji predstavitve antigenov. Katepsina K in S morata biti ustrezno regulirana, saj njuni povečani encimski aktivnosti lahko prispevata k napredovanju številnih bolezni. Glede na to, da so nekateri inhibitorji katepsinov K in S dosegli klinične faze razvoja, ta dva encima predstavljata pomembni potencialni terapevtski tarči za razvoj zdravilnih učinkovin. Ciljanje evolucijsko manj ohranjenih alosteričnih mest bi lahko omogočilo bolj selektivno inhibicijo, ki bi povzročala manj stranskih učinkov, kar bi tako predstavljalo alternativni način za terapevtske namene.

Hiperbolični inhibitor katepsina K, metil [(3*RS*)-2,5-dioksopirolidin-3-il]glicinat (**3a**), smo podrobneje okarakterizirali in pokazali, da je selektiven na katepsin K glede na človeške katepsine B, L, S in V. Glede na to, da je **3a** imel šibek inhibitorni učinek tudi na katepsin S, smo na njegovi osnovi zasnovali in pripravili potencialne inhibitorje katepsinov K in S, ki bi se z večjo afiniteto in bolj selektivno vezali na posamezen encim. Tistim z največjo potentnostjo smo določili njihove točnejše vrednosti afinitet ter mehanizme delovanja. Namen raziskovalnega dela je bil tudi, da bi na osnovi superpozicije terciarnih struktur človeških katepsinov K in S in na osnovi potencialnih alosteričnih poti človeškega katepsina K, predvidenih s simulacijami molekularne dinamike, načrtali in pripravili mutantne oblike teh dveh encimov ter identificirali aminokislinske ostanke, ki so pomembni za njuno alosterično regulacijo.

Načrtali in pripravili smo spojine s substituenti na dveh mestih za diverzifikacijo sukcinimidnega ogrodja spojine **3a**. Med njimi smo spojino metil [(3*R*)-2,5-dioksopirolidin-3-il]-*L*-treoninat (**R-3c**) okarakterizirali kot hiperbolični inhibitor katepsina S ter ji z rentgensko strukturno analizo določili absolutno (2*S*,3*R*,3'*R*)-konfiguracijo. Nato smo načrtali in pripravili ciklične derivate spojine **R-3c** ter med štirimi derivati spojino (3'*RS*)-3-{[(1*S*,2*R*)-2-hidroksicikloheksil]amino}pirolidin-2,5-dion ((**1S,2R**)-**7**) identificirali in okarakterizirali kot hiperbolični in selektivni inhibitor katepsina S z največjo potentnostjo. Z meritvami encimske kinetke smo pokazali, da hiperbolični inhibitorji katepsina K oz. S, in sicer spojine **3a**, **R-3c** in (**1S,2R**)-**7**, delujejo po podobnih mehanizmih kot alosterična efektorja katepsina K. Na ta način smo identificirali in okarakterizirali prva malomolekulska hiperbolična inhibitorja katepsina S (**R-3c** in (**1S,2R**)-**7**). Poleg tega smo potrdili del hipoteze raziskovalnega dela, saj smo dokazali, da spojina (**1S,2R**)-**7** selektivno inhibira katepsin S glede na katepsin K. Mehanizmi delovanja, ki smo jih določili tem spojinam, so v skladu z rezultati testiranj spojin na razgradnjo makromolekulskih substratov s katepsinoma K in S. Hiperbolični inhibitorji **3a**, **R-3c** in (**1S,2R**)-**7** imajo potencial za nadaljnji razvoj do spojin vodnic, uporabnih v raziskovalne namene.

Načrtali in pripravili smo mutantne oblike katepsinov K in S z ostanki zamenjanimi z ostankom alanina v predvideni alosterični poti in v alosteričnem mestu katepsina K ter v homolognem mestu katepsina S. Pokazali smo, da sta ostanka v alosterični poti N202 in N208 pomembna za alosterično komunikacijo katepsina K med alosteričnim mestom in mestom S2.