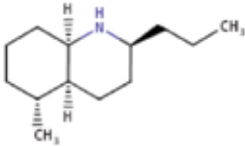
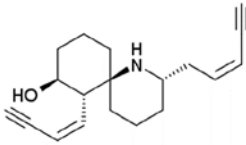


## Zgradba pomembnejših toksinov v izločkih žab podrevnic in njihovo delovanje

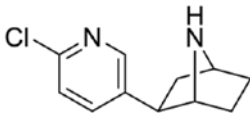
- Pumiliotoksin C (modulator delovanja napetostno odvisnih kanalčkov  $\text{Na}^+$ ).



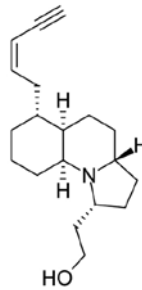
- Histrionikotoksin (nekompetitivni zaviralec nikotinskega tipa acetilholinskih receptorjev - nAChR)



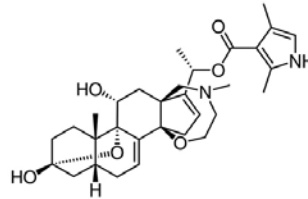
- Epibatidin (agonist nekaterih podtipov nAChR in mAChR v centralnem in perifernem živčevju)



- Gefirotoksin (agonist muskarinskega tipa acetilholinskih receptorjev – mAChR)



- Batrahotoxin (modulator delovanja napetostno odvisnih kanalčkov  $\text{Na}^+$  na motoričnih živcih)



Uravnavanje encimov s ciljanjem alosteričnih mest: primer katepsina K • Kemija

# Uravnavanje encimov s ciljanjem alosteričnih mest: primer katepsina K

Tjaša Goričan, Marko Novinec

Zdravilne učinkovine večinoma delujejo tako, da uravnavajo delovanje bioloških molekul v telesu. Pogosto so njihove tarče encimi, to je beljakovine, ki delujejo kot katalizatorji kemijskih reakcij v telesu. Vsi encimi žal niso enako dovzetni za uravnavanje, zdravilne učinkovine pa morajo imeti tudi

čim manj stranskih učinkov v telesu. Zato je v razvoju novih učinkovin potrebnih veliko znanja o sami tarči ter tudi dobršna mera iznajdljivosti. V zadnjih letih se v načrtovanju učinkovin uveljavlja načelo ciljanja tako imenovanih alosteričnih mest na površini encimov, ki so namenjena prav uravnavanju

njihovega delovanja in so oddaljena od aktivnih mest, kjer poteka encimska kataliza. V prispevku bova avtorja predstavila svoje raziskovalno delo na področju alosteričnega uravnavanja cisteinske peptidaze katepsina K, enega ključnih encimov v presnovi kosti in pomembne tarče za zdravljenje osteoporoze. Naše delo je usmerjeno v razumevanje molekularnih mehanizmov v tem procesu in v razvoj učinkovin za uporabo v raziskovalne in medicinske namene.

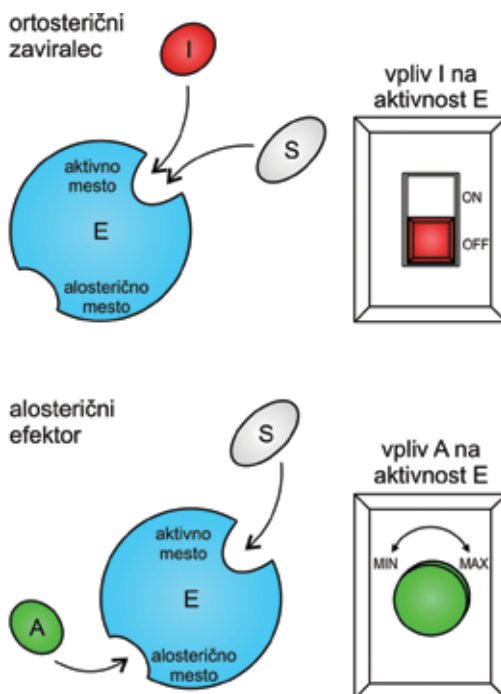
### Nekaj besed o alosteriji

Beljakovine oziroma proteini opravijo večino dela v bioloških sistemih, kakršno je človeško telo. Med njimi veliko skupino predstavljajo encimi, ki katalizirajo vse kemijske reakcije v sistemu. Naše telo njihovo delovanje natančno uravnava. Pomen uravnavanja se pokaže takrat, ko notranji nadzor popusti, njihovo nenadzorovano delovanje pa privede do različnih bolezni. Encimi so velike in kompleksno zgrajene molekule, aktivna mesta, kjer poteka kataliza, pa predstavljajo le majhen del njihove strukture. Poleg njih so v številnih encimskih molekulah (in tudi ostalih proteinih na splošno) odkrili dodatna mesta, ki so prostorsko oddaljena od aktivnih in sodelujejo v uravnavanju njihovega delovanja. Za ponazoritev prostorske oddaljenosti teh uravnalnih mest od aktivnih so jih poimenovali alosterična mesta. Beseda »alosteričen« izvirava iz grških besed »allos« in »stereos«. Zvezo »alosterično mesto« lahko prevedemo kot mesto z drugačno prostorsko organizacijo atomov, s čimer ponazorimo, da se na to mesto vežejo drugačne molekule kot na ak-

tivno mesto. V najenostavnejšem primeru molekula encima vsebuje eno aktivno in eno alosterično mesto. Njeno delovanje je uravnavano tako, da vezava uravnalne molekule oziroma efektorja na alosterično mesto spremeni prostorsko razporeditev atomov v aktivnem mestu in s tem spremeni njeno biološko aktivnost. Primer takšnega proteina je katepsin K, o katerem bo več govora v nadaljevanju.

### Alosterija v medicini

Alosterično uravnavanje je zlasti pogosto v procesih celične presnove, kjer je tudi najboljše preučeno, raziskave zadnjih desetletij pa kažejo, da je alosterija verjetno prisotna pri skoraj vseh proteinih. Tega se zavedajo tudi raziskovalci, ki razvijajo nove zdravilne učinkovine, tako da se ciljanje alosteričnih mest uveljavlja kot pomemben pristop v uravnavanju nepravilno delujočih encimov in ostalih proteinov. Tak pristop je alternativa uveljavljenemu pristopu, kjer učinkovina, imenovana ortosterični zaviralec, zavre de-



*Slika 1: Shematska primerjava vpliva ortosteričnega zaviralca (I) in alosteričnega efektorja (A) na delovanje encima (E) na substrat (S), prikazana z analogijo različnih vrst stikal za luč.*

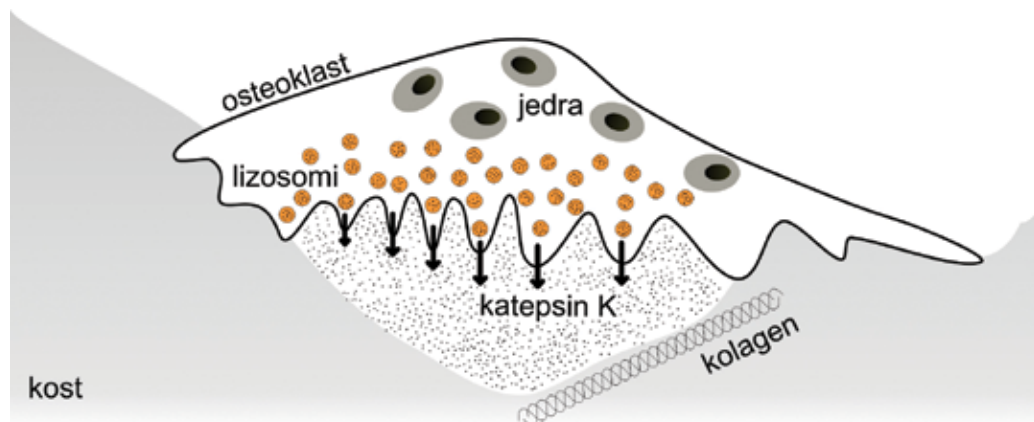
lovanje encima tako, da tekmuje s substratom za vezavo v aktivno mesto. V primerjavi s slednjimi imajo alosterični efektorji vsaj v teoriji nekatere bistvene prednosti, med drugim lahko ne le zavrejo delovanje tarče, temveč povzročijo širši spekter sprememb njene aktivnosti. Kot je prikazano na sliki 1, lahko primerjavo med obojimi ponazorimo s preprostim primerom iz vsakdanjega življenja, in sicer z razliko med navadnim in zatemnilnim stikalom za luč. S prvim lahko luč le vklopimo in izklopimo, z drugim pa lahko natančno nadziramo, koliko svetlobe bo osvetljevalo prostor. Podobno lahko z ortosteričnimi zaviralci le popolnoma ugasnemo delovanje proteina, z alosteričnimi efektorji pa lahko aktivnost proteina natančno uravnavamo. Z uporabo slednjih lahko delovanje proteina popolnoma zavremo, znižamo ali pa tudi povišamo, česar z ortosteričnimi zaviralci ne moremo doseči. Zlasti znižanje encimske aktivnosti s tako imenovanimi delnimi zaviralci je pomembna prednost, saj lahko s takšnim načinom uravnavanja znižamo bolezensko povišano aktivnost encima, pri tem pa ohranimo del njegove aktivnosti, ki je pomemben za normalno delovanje telesa. Prva uporabljena učinkovina v široki uporabi, ki uravnava encimsko

aktivnost preko alosteričnih mehanizmov, je bil imanitib, ki ga je razvilo podjetje Novartis in ga trži pod imenom Glivec. Učinkovina deluje kot zaviralec encima Abelsonove tirozinske kinaze, ki je prekomerno aktivna pri nekaterih vrstah levkemije in povzroča nenadzorovano razmnoževanje rakavih celic. Pričakujemo lahko, da se bo uporaba alosteričnih učinkovin s časom povečala. Takšne učinkovine so zlasti privlačne v primerih, ko z ortosteričnimi zaviralci želenega učinka ni mogoče doseči ali pa imajo slednji neželene stranske učinke. Seveda pa mora biti ciljani protein dovzeten za ta način uravnavanja. Na tem mestu lahko zgoraj uporabljeno analogijo dodatno razširimo z ugotovitvijo, da tako, kot ni vsaka sijalka primerna za uporabo z zatemnilnim stikalom, tako tudi vsak encim ni dojemljiv za alosterično uravnavanje. Za uspešen razvoj moramo torej nujno preučiti molekulske mehanizme alosterije v preiskovanih encimih.

### Nekaj besed o katepsinu K

Katepsin K uvrščamo med peptidaze, torej encime, ki razgrajujejo druge proteine v manjše fragmente, tako da cepijo peptidno vez med aminokislinskimi ostanki, ki proteine gradijo. Natančneje ga uvrščamo v

*Slika 2: Ilustracija delujočega osteoklasta na površini kostnine. Celica ustvari zaprto območje, imenovano resorpcijska lakuna, v katero izloči encime iz lizosomov. Med slednjimi je katepsin K edini, ki lahko cepi celotna kolagenska vlakna, zaradi česar ima zelo pomembno vlogo pri razgradnji kostnega tkiva.*



družino papainu podobnih cisteinskih peptidaz, ki so v naravi zelo razširjene in jih najdemo tako pri človeku kot pri živalih, rastlinah in tudi pri bakterijah. Ti encimi se pri človeku in živalih nahajajo v celičnih organelih lizosomih, kjer je njihova temeljna vloga razgradnja proteinov. Za katepsin K je znano, da ima poleg slednje tudi druge fiziološke vloge. Lahko se namreč izloča iz celic v okolje zunaj celic, kjer razgrajuje sestavine zunajceličnega okolja, kot so na primer kolageni, elastini in proteoglikani, ki se vežejo v aktivno mesto katepsina K in tako predstavljajo substrate zanj. Poleg tega ima tudi druge vloge v človeškem telesu. Pomemben je na primer v maščobnem tkivu, kjer sodeluje pri adipogenezi, to je tvorbi maščobnih celic, in v ščitnici, kjer je pomemben za sproščanje ščitničnega hormona tiroksina iz prohormona tiroglobulina. Najpomembnejšo vlogo pa ima katepsin K pri razgradnji kostnine, kar je tako pri človeku kot pri drugih vretenčarjih pomembno za odstranjevanje starega in poškodovanega kostnega tkiva.

Pri človeku je katepsina K največ v kosteh, in sicer v večjedrnih celicah osteoklastih, ki se nahajajo na površini kostnega tkiva oziroma kostnine. Slednja je zgrajena iz dveh sestavin, in sicer anorganskega dela, sestavljenega iz mineralov kalcijevega fosfata v obliki hidroksiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), in organskega dela, katerega v približno devetdesetih odstotkih gradijo vlakna proteina kolagena tipa I. Za nastanek kostnine so odgovorne celice osteoblasti. Nasprotno osteoklasti kostnino razgrajujejo. Proces razgradnje oziroma resorpcija kosti poteka tako, da se celice osteoklasti pritrdijo na površino kosti, pri čemer med njimi in kostjo nastane izolirano okolje, imenovano resorpcijska laka (slika 2). V ta prostor osteoklasti izločijo klorovodikovo kislino, ki raztopi minerale, in lizosomske encime, ki razgradijo organski del kosti. Med temi encimi je najpomembnejši katepsin K, ki je edini med njimi sposoben cepiti celotna kolagenska vlakna kosti

in ima tako eno izmed osrednjih vlog v tem procesu. Ko osteoklasti svoje delo dokončajo, jih nadomestijo osteoblasti, ki nastale vrzeli v kosteh zapolnijo z novo kostnino. Na ta način se staro in poškodovano kostno tkivo ves čas odstranjuje in nadomešča z novim. Ocenjujejo, da se vsako leto človeku obnovi deset odstotkov okostja, torej se v povprečju vsakih deset let celotno človekovo okostje nadomesti z novim.

Katepsin K se v celicah izraža kot proencim, to je neaktivna oblika encima, in se nato aktivira pri nizkem pH v lizosomih do aktivne oblike. Na njegovo aktivnost vplivata redoks potencial in pH, saj je aktivna oblika katepsina K optimalno aktivna v reducirajočem okolju in pri nizkem pH, in sicer med 5,0 in 7,0, kakršen je v lizosomih. V citosolu in v zunajceličnem okolju njegovo aktivnost uravnavajo tudi proteini, na primer cistatini, stefini, kininogeni in tirocini, ki delujejo kot tekmujoči ortosterični zaviralci, saj se lahko vežejo v aktivno mesto katepsina K, pri čemer tekmujejo s substratom za vezavo in posledično zavrejo delovanje encima. Za katepsin K je znano, da je lahko uravnavan tudi alosterično, pri čemer njegovo delovanje poleg naravnih alosteričnih efektorjev lahko uravnavamo tudi preko nekaterih umetno sintetiziranih malih molekul, ki se vežejo na alosterično mesto tega encima.

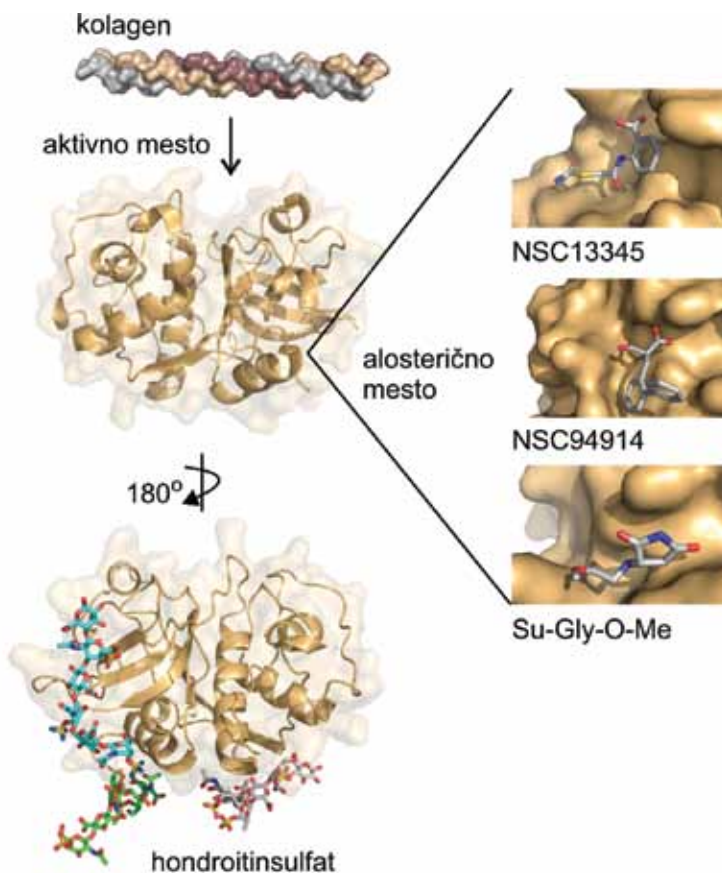
### **Katepsin K je obetajoča tarča za razvoj zdravil**

Kot rečeno, je za dobrobit organizma pomembno, da je delovanje encimov ustrezno uravnavano. Pomen tega procesa se pokaže tudi v primeru katepsina K. Povečana aktivnost tega encima je namreč povezana s številnimi boleznimi, med katerimi so najbolj v ospredju prav tiste, ki so povezane z okostjem. Poudariti velja zlasti osteoporozo, ki jo zaznamuje postopno zmanjševanje kostne mase, kar privede do povečanega tveganja za zlome kosti. Osteoporozo je posledica pretiranega delovanja osteoklastov ter

posledično katepsina K, zato ne preseneča, da ta že nekaj časa velja za obetavno tarčo za njeno zdravljenje. Zdravil, ki bi ciljala katepsin K, še ni na tržišču. V razvoju je bilo več ortosteričnih zaviralcev katepsina K za zdravljenje osteoporoze, a so razvoj večine žal morali ustaviti. Najobetavnejši zaviralec je pod imenom Odanacatib razvijalo ameriško podjetje Merck Sharp & Dohme Corp. Učinkovina je sprva dajala zelo dobre rezultate, a so razvoj po obsežnih kliničnih študijah ustavili, saj naj bi pri bolnikih povečala verjetnost za pojav srčne kapi. Edini zaviralec katepsina K, ki je trenutno še v kliničnih testiranjih, je MIV-711 švedskega podjetja Medivir, in sicer kot potencialna učinkovina za zdravljenje osteoartritisa, kroničnega vnetja sklepov. Prvi klinični testi so pokazali, da je zdravljenje z MIV-711 varno, nadaljnje študije pa bodo morale potrditi še njegovo učinkovitost.

### Alosterično uravnavanje katepsina K

Kot alternativo ortosteričnim zaviralcem v našem raziskovalnem delu preučujemo take, ki bodo delovanje encima zavirali preko alosteričnih mehanizmov. Ker je bil obstoj alosterije pri katepsinu K in sorodnih encimih ob začetku našega dela skoraj popolnoma neznan, je bila večina našega dosedanjega dela vezanega na preučevanje mehanizmov alosteričnega uravnavanja, v prihodnosti pa bomo to znanje uporabili za načrtovanje alosteričnih učinkovin, ki bodo potencialno uporabne tako v medicinske kot raziskovalne namene. Danes poznamo več naravnih in sintetičnih alosteričnih efektorjev katepsina K, ki na različne načine interagirajo z njim (slika 3). Prve raziskave s tega področja so pokazale, da je katepsin K v človeškem te-



*Slika 3: Prostorska struktura katepsina K z označenim aktivnim mestom in alosteričnimi mesti. V aktivno mesto tega encima se lahko veže njegov naravni substrat kolagen. Na različna alosterična mesta pa se lahko vežejo tako naravni alosterični efektorji katepsina K, na primer hondroitinsulfat, kot tudi nekatere sintetične male molekule (NSC13345, NSC94914 in Su-Gly-O-Me).*

lesu alosterično uravnavan z glikozaminoglikani (GAGi), dolgimi linearnimi polisaharidi z gostim negativnim nabojem, ki interagirajo s pozitivno nabito površino katepsina K. Skupina kanadskih raziskovalcev je pokazala, da se glikozaminoglikani lahko vežejo na več mest na katepsinu K, ki so oddaljena od aktivnega mesta, hkrati pa se lahko na vsako verigo glikozaminoglikana veže več molekul katepsina K, s čimer dobimo večje oligomerne agregate encima. Najpomembnejši glikozaminoglikan za vezavo katepsina K naj bi bil hondroitin-4-sulfat (C4S), zanimivo pa je, da njegova prisotnost deluje na katepsin K spodbujevalno in znatno poveša delovanje encima na kolagen. Mi smo vpliv teh interakcij podrobneje preučili, določili in glikozaminoglikane opisali kot prve znane alosterične efektorje pri tej družini encimov. Ugotovili smo tudi, da je vpliv glikozaminoglikanov na aktivnost katepsina K odvisen od pH in od tipa glikozaminoglikana, saj na primer C4S pri nizkem pH (vrednosti okoli 5,0) pospeši razgradnjo kolagena, pri nevtralnih vrednostih pH med 7,0 in 7,5 pa jo zavira, medtem ko drug glikozaminoglikan, heparin, deluje ravno obratno. Glikozaminoglikani ne vplivajo samo na aktivnost tega encima, ampak tudi na njegovo stabilnost, hkrati pa imajo raznolike vplive tudi na razgradnjo drugih proteinskih substratov.

Glikozaminoglikani so nedvomno pomembni pri kompleksnem uravnavanju katepsina K v človeškem telesu, a zaradi svoje funkcijske raznolikosti niso najprimernejši kandidati, na podlagi katerih bi lahko razvijali alosterične zaviralce. Zato smo se lotili iskanja novih molekul, ki bodo imele natančno določljiv učinek na katepsin K. Z uporabo računalniških metod smo analizirali celotno družino papainu podobnih peptidaz in na podlagi te analize napovedali več potencialnih alosteričnih mest na površini katepsina K. Na ta mesta smo nato računalniško umestili knjižnico več kot sto tisoč spojin, izmed katerih smo nato okoli dvesto najboljših izbrali za poskusno testiranje, med

njimi pa je bilo približno petnajst takšnih, ki so dejansko vplivale na aktivnost katepsina K. Dve izmed najbolj obetavnih spojin NSC13345 ([2-(2-karbamoilsulfanilacetil)-amino]benzojska kislina) in NSC94914 ([2-bifenilmetil]malonska kislina) smo okarakterizirali tudi strukturno in ugotovili, da se vežeta na novo alosterično mesto na spodnji desni strani katepsina K (slika 3). Obe delujeta kot delna zaviralca encima, torej encimsko aktivnost znižata, a je ne zavreta popolnoma. Kljub temu, da se obe vežeta na isto alosterično mesto, imata nekoliko drugačen učinek na encim, saj spojina NSC13345 zavre razgradnjo kolagena za osemdeset odstotkov, spojina NSC94914 pa le za petdeset odstotkov. V zadnjem času smo sintetizirali še tretjo spojino, Su-Gly-O-Me (metil (*R*)-(2,5-dioksopirolidin-3-il)glicinat), ki se veže na to alosterično mesto in deluje podobno kot spojina NSC94914: razgradnjo kolagena zavre za približno petdeset odstotkov. V prihodnosti nameravamo na podlagi te enostavne spojine razviti nove spojine z boljšimi lastnostmi, ki bodo uporabne v raziskovalne in tudi medicinske namene.

Zanimiva je tudi molekulska podlaga uravnavanja preko tega alosteričnega mesta. Poleg malih molekul to alosterično mesto interagira tudi s C4S, ki pa celokupno gledano poveša aktivnost encima. Z vezavo na isto mesto lahko torej različni efektorji dosežejo raznolike učinke na aktivnost katepsina K. Te razlike pripisujemo temu, da vsak efektor na drugačen način interagira z alosteričnim mestom, torej za delovanje nekoga efektorja ni pomembno, zgolj *kam* se veže, ampak tudi, *kako* se veže. Čeprav se to morda sliši presenetljivo, je to dejansko pogost pojav v uravnavanju aktivnosti proteinov. Vzporedno s tem trenutno preučujemo tudi molekulske mehanizme alosteričnih poti pri katepsinu K, to je, preko katerih aminokislinskih ostankov se signal o vezavi alosteričnega efektorja prenese do aktivnega mesta. Z uporabo računalniških metod smo

napovedali možne poti od alosteričnega do aktivnega mesta katepsina K. Te poti sedaj poskušamo tudi eksperimentalno dokazati in s tem v celoti okarakterizirati alosterični mehanizem katepsina K.

#### Literatura:

- Aguda, A. H., Panwar, P., Du, X., Nguyen, N. T., Brayer, G. D., Brömme, D., 2014: *Structural basis of collagen fiber degradation by cathepsin K. Proceedings of the National Academy of the United States of America*, 111: 17474–17479.
- Duong, L. T., Leung, A. T., Langdahl, B., 2016: *Cathepsin K inhibition: a new mechanism for the treatment of osteoporosis. Calcified Tissue International*, 98: 381–397.
- Goričan, T., 2016: *Identifikacija in karakterizacija novih alosteričnih modifikatorjev človeškega katepsina K. Magistrsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.*
- Li, Z., Kienetz, M., Cherney, M. M., James, M. N., Brömme, D., 2008: *The crystal and molecular structures*

- of a cathepsin K: chondroitin sulfate complex. Journal of Molecular Biology*, 383: 78–91.
- Lindsley, C. W., 2014: *2013 Philip S. Portoghesi Medicinal Chemistry Lectureship: drug discovery targeting allosteric sites. Journal of Medicinal Chemistry*, 57: 7485–7498.
- Novinec, M., Kovačič, L., Lenarčič, B., Baici, A., 2010: *Conformational flexibility and allosteric regulation of cathepsin K. Biochemical Journal*, 429: 379–389.
- Novinec, M., Lenarčič, B., 2013: *Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase. Biological Chemistry*, 394: 1163–1179.
- Novinec, M., Korenč, M., Caflisch, A., Ranganathan, R., Lenarčič, B., Baici, A., 2014: *A novel allosteric mechanism in the cysteine peptidase cathepsin K discovered by computational methods. Nature Communications*, 5: 3287.
- Novinec, M., Rebernik, M., Lenarčič, B., 2016: *An allosteric site enables fine-tuning of cathepsin K by diverse effectors. FEBS Letters*, 590: 4507–4518.
- Nussinov, R., Tsai, C. J., 2013: *Allostery in disease and in drug discovery. Cell*, 153: 293–305.



**Tjaša Goričan**, rojena leta 1991, je magistrica biokemije. Na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, kjer je zaposlena kot mlada raziskovalka, se ukvarja z raziskovanjem alosterične komunikacije in z racionalnim načrtovanjem ter sintezo optimiziranih alosteričnih efektorjev človeških katepsinov K in S.



**Marko Novinec**, rojen leta 1980, je doktor znanosti s področja biokemije in molekularne biologije. Zaposlen je kot izredni profesor na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani. Poleg poučevanja se ukvarja z raziskavami na področju biokemije proteinov. Osredotoča se zlasti na mehanizme uravnavanja aktivnosti encimov, med katerimi eno od glavnih tarč predstavlja družina papainu podobnih peptidaz.