

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Biochemie a patobiochemie



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

**Regulace aktivity katepsinu K pomocí reaktivních inhibičních molekul využitelných
v biomedicíně**

Regulation of cathepsin K activity by reactive inhibitory molecules applicable in biomedicine

Mgr. Jakub Benýšek

Praha, 2022

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Zdeněk Kleibl, Ph.D.

Školící pracoviště: Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v. v. i.

Flemingovo náměstí 2, Praha 6, 166 10

Školitel: RNDr. Michael Mareš, CSc.

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

Obsah:

Seznam zkratk	1
Abstrakt	2
Abstract	3
1. Úvod	4
2. Cíle práce.....	5
4. Materiál a metody.....	6
4.1 Materiál a laboratorní výbava	6
4.2 Metody	7
4.2.1 Metody molekulární biologie	7
4.2.2 Biochemické metody.....	7
4.2.3 Enzymologické metody.....	7
4.2.4 Metody rentgenové krystalografické analýzy	7
5. Výsledky a diskuse.....	8
6. Závěr.....	13
Literární zdroje.....	14

Seznam zkratek

Å	Ångström, 10^{-10} m
ABP	sonda pro detekci aktivní formy enzymu (z angl. „Activity-based Probes“)
AMC	7-amino-4-mehtylkumarin
Cbz	benzyloxykarbonyl
IC ₅₀	koncentrace inhibitoru potřebná k dosažení 50 % inhibice aktivity enzymu
E-64	N-(trans-Epoxysukciny)-L-leucin-4-guanidinobutylamid
KatK	katepsin K
iKatK	aktivační intermediát (meziprodukt) katepsinu K
mKatK	maturní forma katepsinu K
Ki	inhibiční konstanta
PDB	databáze proteinových struktur (z angl. “Protein Data Bank”)
RMSD	střední kvadratická odchylka (z angl. “Root Mean Square Deviation”)
RP-HPLC	vysokotlaká chromatografie na reverzní fázi (z angl. „Reverse Phase High Performace Liquid Chromatography“)
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

Abstrakt

Lidský katepsin K (KatK) je lysozomální cysteinová proteasa exprimovaná především v osteoklastech. Fyziologická funkce spočívá v degradaci extracelulární kostní matrix, kde je nejúčinnějším enzymem pro štěpení kolagenu. Zvýšená enzymatická aktivita KatK je spojena s osteoporózou a dále revmatoidní artritidou a osteoartritidou. Proto je KatK cílovou molekulou pro léčbu uvedených patologií a k jeho regulaci jsou vyvíjena chemoterapeutika na bázi proteasových inhibitorů. Tato práce se zabývá reaktivními peptidomimetickými a nízkomolekulárními inhibitory KatK typu thiadiazolů, vinylketonů a cyanohydrazidů. Soustředí se zejména na určení vazebného módu selektivních inhibitorů a charakterizaci jejich interakcí s aktivním místem KatK. Přístupy rentgenostrukturní analýzy jsou kombinovány s výpočetní chemií, enzymologickou analýzou a buněčnými testy k objasnění vztahu mezi strukturou a biochemickou aktivitou těchto inhibitorů. Získané výsledky přinášejí významné informace pro navrhování a optimalizaci nových vysoce účinných a selektivních inhibitorů KatK určených pro vývoj potenciálních léčiv a diagnostických sond.

Klíčová slova: katepsin K, proteasa, inhibitor, 3D struktura, osteoporóza

Abstract

Human cathepsin K (KatK) is a lysosomal cysteine protease expressed predominantly in osteoclasts. It is the most effective enzyme for collagen breakdown and its physiological function lies in the degradation of the extracellular bone matrix. Increased enzymatic activity of KatK is associated with osteoporosis, rheumatoid arthritis, and osteoarthritis. This makes KatK a target for the treatment of pathologies, and chemotherapeutics based on protease inhibitors are being developed for its regulation. This work deals with reactive peptidomimetic and low molecular weight inhibitors of KatK namely thiadiazoles, vinyl ketones, and cyanohydrazides. It focuses mainly on the determination of the binding mode of selective inhibitors and characterization of their key interactions with the active site of KatK. Crystallographic structural analysis was combined with approaches of computational chemistry, enzymological analysis, and cell-based assays to elucidate the relationship between structure and biochemical activity of the investigated inhibitors. The obtained results provide important information for the design and optimization of new highly effective and selective KatK inhibitors as potential drugs and diagnostic probes.

Keywords: cathepsin K, protease, inhibitor, 3D structure, osteoporosis

1. Úvod

Katepsin K je lysozomální proteasa z rodiny papainu, která se řadí do třídy cysteinových proteas. Jedná se o enzym exprimovaný především v osteoklastických buňkách a je klíčový při procesu resorpce kostní tkáně a remodelace složek extracelulární matrix. Katepsin K je schopen jako jediná savčí proteasa degradovat kolagen typu I, který je hlavním strukturním elementem kostní tkáně. Dysbalance enzymové aktivity této proteázy vede k celé řadě patologií. Příkladem je rozvoj nádorových onemocnění, zánět či neadekvátní imunitní odpověď. Proteolytickou degradací extracelulární matrix přispívá k rozvoji osteoporózy, která je jedním z nejčastějších onemocnění pohybového aparátu. Osteoporóza se vyznačuje řídnutím a zvýšenou křehkostí kostní tkáně a postihuje převážně ženy v postmenopauzálním věku. Dále katepsin K přispívá k rozvoji fibrózy srdeční a plicní tkáně či zánětlivých onemocnění osteoartrózy a revmatoidní artritidy. Zvýšená hladina exprese katepsinu K byla též prokázána u celé řady nádorových onemocnění, jakými jsou například rakovina prsu, plic, prostaty a melanomu, kde podporuje migraci nádorových buněk s následnou tvorbou metastáz do kostní tkáně. Z těchto důvodů je katepsin K atraktivní cílovou molekulou pro vývoj nových chemoterapeutik, která umožní snížení jeho enzymové aktivity. V současné době není komerčně dostupný žádný terapeutický prostředek tohoto typu a vyvíjené látky několika farmaceutických firem neprošly úspěšně klinickými studiemi. Disertační práce je zaměřena na katepsin K a regulaci jeho enzymové aktivity s využitím nových specifických peptidomimetických a nízkomolekulárních inhibitorů a dále na fluorescenčně značené aktivní sondy, určené pro diagnostiku patologií spojených s katepsinem K.

2. Cíle práce

Cysteinová proteasa katepsin K (KatK) je cílovou molekulou pro léčbu osteoporózy a artritidy pomocí chemoterapeutik na bázi proteasových inhibitorů. Práce je zaměřena na identifikaci nových inhibitorů KatK a zejména na určení vazebného módu selektivních inhibitorů cílených na aktivní místo KatK. Cílem je přinést nové poznatky o vztahu mezi strukturou a biochemickou aktivitou inhibitorů, které umožní design účinných selektivních inhibitorů KatK jako potenciálních léčiv a molekulárních diagnostických sond pro detekci KatK.

Dílčí cíle práce jsou následující:

1) Připravit rekombinantní KatK a jeho jednotlivé aktivační formy. Testovat inhibiční vlastnosti studovaných inhibitorů za pomoci enzymologických metod.

2) Připravit kovalentní komplexy KatK s inhibitory, krystalizovat je a popsat rentgenostrukturální analýzou.

3) Určit vazebný mód inhibitorů podle 3D struktury komplexů. Integrovat strukturální data s výsledky získanými pomocí výpočetních metod, inhibičních analýz a buněčných testů.

4) Výše uvedeným způsobem studovat tři skupiny kovalentních inhibitorů se zaměřením na: (i) funkční interakci 1,2,4 thiadizolů s KatK, (ii) využití vinylketonů pro konstrukci fluorescenčních sond k detekci KatK, (iii) vztah struktury a funkce cyanohydrazidů, patřících mezi nejlepší známe inhibitory KatK.

4. Materiál a metody

4.1 Materiál a laboratorní vybava

Disertační práce vznikla s využitím přístrojového vybavení laboratoří Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (ÚOCHB AV ČR, v.v.i) a ve spolupráci se zahraničními výzkumnými institucemi.

Plazmid pUC57 obsahující úsek DNA a kódující zymogen lidského KatK (Uniprot P43235) byl syntetizován firmou (GenScript, USA).

Sady inhibitorů poskytli M. Gütschow, Universität Bonn (Německo) a P. Majer (skupina medicínální chemie), ÚOCHB AV ČR, v.v.i. Syntetické inhibitory E-64 a E-64d (Sigma-Aldrich, ČR) byly zakoupeny.

Fluorescenčně značený substrát Cbz-Gly-Pro-Arg-AMC byl zakoupen od firmy (Bachem, Švýcarsko).

Myší monoklonální protilátky proti lidskému KatK byly zakoupeny od firmy (Santa Cruz Biotechnology, USA) a sekundární koží značené protilátky anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, ČR)

Buněčná linie lidského osteosarkomu (U2-OS) poskytla H. Mertlíková-Kaiserová (skupina biochemické farmakologie), ÚOCHB AV ČR, v.v.i.

Sady komerčních krystalizačních roztoků byly zakoupeny od firem Molecular Dimensions (UK) a Jena Bioscience (Německo)

Sběr difrakčních dat pro rentgenovou strukturní analýzu byl proveden na rentgenové difrakční stanici MicroMax-007 HF Microfocus (Rigaku, Japonsko) na ÚOCHB AV ČR, v.v.i. a na synchrotronu Bessy II electron storage ring (Helmholtz Zentrum, Německo).

4.2 Metody

4.2.1 Metody molekulární biologie

V disertační práci byly použity následující metody molekulární biologie: příprava expresních plazmidů pro rekombinantní expresi KatK, transformace do buněk *E. coli*, elektroporací do buněk *P. pastoris*, selekce klonů a optimalizace rekombinantní exprese.

4.2.2 Biochemické metody

V disertační práci byly použity následující hlavní biochemické metody: elektroforetická separace proteinů pomocí SDS-PAGE, detekce KatK na polyvinylidfluoridové membráně metodou western blot pomocí specifických monoklonálních protilátek, analýza N-koncové sekvence proteinů metodou Edmanova odbourávání, mapováním peptidových fragmentů hmotnostní spektrometrií, stanovení koncentrace proteinu, peptidových substrátů a inhibitorů aminokyselinovou analýzou.

4.2.3 Enzymologické metody

V disertační práci byly použity následující enzymologické metody: měření aktivity KatK pomocí fluorogenního peptidového substrátu na fluorescenční čtečce. Stanovení kinetických parametrů pro inhibitory. Kinetické parametry byly získány nelineární regresí v programech GraFit či GraphPad. Koncentrace aktivního KatK byla stanovena metodou titrace aktivního místa ireverzibilním inhibitorem E-64.

4.2.4 Metody rentgenové krystalografické analýzy

Příprava stabilních komplexů KatK-inhibitor, identifikace a optimalizace krystalizačních podmínek v uspořádání visící a sedící kapky, řešení 3D struktur a analýza vazebného módu inhibitorů. Difrakční data byla procesována programem XDSGUI. Řešení 3D struktur komplexů bylo provedeno s využitím programů z balíčku CCP4. Knihovna geometrických a sterických charakteristik pro ligandy byla konstruována programem AceDRG. Vyřešené 3D struktury komplexů byly graficky editovány za pomoci programu PyMol. Analýza vazebného módu inhibitorů a charakterizace interagujících zbytků enzymu byla provedena programy CONTACT a PLIP.

5. Výsledky a diskuse

Výsledky této disertační práce jsou shrnuty celkem ve třech publikovaných pracích v zahraničních impaktovaných časopisech. Disertační práce obsahuje také data, která doplňují hlavní prezentované výsledky formou příloh k jednotlivým publikacím (supplementary).

V autorské **publikaci č. 1** (Pomeislová et al. 2021) byly poprvé experimentálně testovány a charakterizovány inhibiční vlastnosti syntetických nízkomolekulárních sloučenin s 1,2,4-thiadiazolovou reaktivní skupinou vůči lidskému KatK. Tyto sloučeniny byly klasifikovány jako irverzibilní kovalentní inhibitory, které tvoří disulfidický adukt s thiolovou skupinou proteasy. Sada 21 sloučenin obsahovala šest sloučenin s výraznou účinností inhibice KatK pod hranici 50 % zbytkové enzymatické aktivity a tyto látky vykazovaly hodnotu IC_{50} v mikromolárních koncentracích. Nejúčinnější derivát **10a** substituovaný na dusíku N5 měl hodnotu $IC_{50} = 2,63 \pm 0,31 \mu\text{M}$. Publikace identifikovala substituované sloučeniny s 1,2,4-thiadiazolovým heterocyklem jako účinné inhibitory KatK a rozšiřuje tak spektrum potenciálního využití této skupiny látek. Deriváty byly již dříve popsány jako inhibitory cysteinového katepsinu B (Leung-Toung et al. 2003), který je studován v souvislosti s léčbou Alzheimerovy choroby (Bernstein and Keilhoff 2018) nebo jako regulátory medicíně zajímavých enzymů s vazebnými místy obsahujícími cysteinové zbytky jako je GSK-3 β (Martinez 2002; Pomeislová et al. 2021). Reaktivní skupina 1,2,4-thiadiazolu a popsané závislosti mezi strukturou a aktivitou studovaných derivátů otevírají cestu pro další design odvozených inhibitorů KatK s optimalizovanými funkčními vlastnostmi. Pro další racionální design zatím scházejí informace na úrovni 3D struktur, které zatím nebyly publikovány pro relevantní thiadiazolové ligandy kromě teoretických simulací (Vega-Tejido et al. 2014).

V autorské **publikaci č. 3** (Benýšek et al 2022) byl poprvé popsán strukturní mechanismus interakce nové skupiny vysoce selektivních peptidomimetických inhibitorů KatK vybavených cyanohydrazidovou reaktivní skupinou, které vykazují vynikající inhibiční účinnost s hodnotami K_i v až pikomolární oblasti koncentrací. Cyanohydrazidy představují zřejmě dosud nejpokročilejší design reverzibilních kovalentních inhibitorů KatK a tato práce se zabývá dvěma hlavními chemotypy označovanými jako azadipeptidové nitrily a 3-cyano-3-aza- β -aminokyseliny. Vznikly nahrazením C α H skupiny konvenčně používaných karbanitrilů (jako jsou např. dříve vyvíjená léčiva odanacatib a balicatib) atomem dusíku v P1 pozici inhibitorů a další stabilizací této skupiny substitucemi. V případě azadipeptidových

nitrilů je cyanohydrazidová reaktivní skupina umístěna terminálně a představitelem těchto látek je inhibitor **Gü1303** s hodnotou $K_i = 0,91$ nM (Frizler et al. 2011). Pro dosažení vyšší selektivity vůči KatK byla reaktivní skupina umístěna centrálně do molekuly inhibitoru, aby byla možná interakce i s indexovanými podmiesty enzymu, a tak byly odvozeny inhibitory typu 3-cyano-3-aza- β -aminokyselin. Jejich představitelem je inhibitor **Gü2602** s hodnotou $K_i = 0,013$ nM (Schmitz et al. 2014). Disertační práce přináší první strukturní analýzu vazebného módu těchto dvou prototypových inhibitorů.

Inhibitory s cyanohydrazidovou skupinou mohou být obecně atropochirální. V případě cyanohydrazidové skupiny jde o substituovanou vazbu N–N. Inhibitor **Gü1303** má dusíkové atomy NMe–NMe methylované a sousední vazba CO–NMe je u nenavázaného inhibitoru v *E*-konfiguraci (Jílková et al. 2021). Po navázání do aktivního místa enzymu dochází ke konformační změně na *Z*-konfiguraci. Stejný efekt byl pozorován i v případě interakce azadipeptidového nitrilu s katepsinem B z motolice *Schistosoma mansoni* (SmCB1), který je cílovou molekulou pro léčbu schistosomózy (Jílková et al. 2021). V případě **Gü2602** je vazba NH–NMe pouze částečně methylovaná, a tak nepředstavuje atropochirální centrum, jak bylo prokázáno pomocí NMR dat (Ottersbach et al. 2012). Na sousední vazbě CO–NH proto nedochází ke konverzi konfigurace během vazby. Rozdíl v konformaci navázaného a nenavázaného inhibitoru se u **Gü1303** a **Gü2602** odráží i v jejich odlišném kinetickém chování (viz příloha k publikaci č. 3). V případě **Gü1303** byla určena kinetika typická pro tzv. pomalu vázající inhibitory, kdy dochází k pomalému ustálení rovnováhy mezi enzymem, inhibitorem a výsledným komplexem z důvodu konformační změny inhibitoru. Tato změna byla prokázána jako krok kontrolující kinetiku a získané výsledky jsou tak v souladu s dříve publikovaným článkem o kinetice inhibice SmCB1 pomocí azadipeptidového nitrilu (Jílková et al. 2021). Oproti tomu inhibitor **Gü2602** vykazuje kinetiku tzv. rychle vázajících inhibitorů, což odpovídá absenci časově náročné konformační změny během vazby. Tak se tento inhibitor podobá v kinetice a konfiguraci konvenčním karbanitrilovým inhibitorům (Jílková et al. 2021).

Rozdílné umístění reaktivní skupiny mezi inhibitory **Gü1303** a **Gü2602** se odráží i v rozdílném obsazení vazebných podmíst na KatK. **Gü1303** s terminálně umístěnou reaktivní skupinou cílí vazebná podmiesta S1 až S3 a na základě analýzy B-faktorů (teplotních faktorů) se jedná o rigidní inhibitor. Naproti tomu **Gü2602** s centrálně umístěnou reaktivní skupinou obsazuje primárně vazebné podmísto S2 a svým flexibilním segmentem *N*-benzyl-*N*-methylacetamidu (zvláště jeho benzylovou skupinou) vytváří dvě alternativní

konformace. Ty jsou směřovány buď do podmísta S1 nebo S2'. Konformace v podmístě S1 je ta hlavní, která byla pozorovaná v krystalové struktuře, kde je zřejmě upřednostněna stabilizací pomocí přídatných intramolekulárních kontaktů a krystalografických kontaktů se sousedními molekulami. Pro konformaci v podmístě S2' jsou důkazy v mapě elektronových hustot a zejména byla prokázána metodami výpočetní chemie. Přístup molekulárního modelování obecně odhalil sadu možných variací v orientaci pro obě základní konformace a potvrdil vysokou flexibilitu této části inhibitoru **Gü2602**. V této souvislosti je také zajímavé zmínit autorskou **publikaci č. 2** (Lemke et al. 2021), kde bylo popsáno umístění flexibilní benzylové skupiny do S2' podmísta KatK a její funkční význam u jiného typu inhibitoru.

Zvýšená flexibilita inhibitoru **Gü2602** je možným vysvětlením pro jeho výjimečné inhibiční vlastnosti s účinností v pikomolární oblasti. Lze předpokládat, že konformační flexibilita (na hranici mezi indexovanými a neindexovanými podmísty) poskytuje entropickou výhodu v celkové energetice vazby na KatK. Je známo, že ztráta konformační entropie po navázání na enzym nepříznivě přispívá k volné vazebné energii (Chia-en et al. 2007). Dalším významným faktorem pro vazbu **Gü2602** je stabilizace komplexu sítí vodíkových interakcí, kde klíčovou roli hraje interakce amidového dusíku NH na reaktivní skupině inhibitoru s Asn161 v podmístě S2. Deriváty **Gü2602**, které mají tento dusík methylovaný a tudíž netvoří interakci, vykazují dramatický pokles inhibiční účinnosti o několik řádů (Schmitz et al. 2014).

Kromě komplexů inhibitorů **Gü1303** a **Gü2602** s maturní formou KatK (mKatK) byly také strukturně charakterizovány komplexy s aktivačním meziproduktem (iKatK). Ten vzniká v průběhu autokatalytické konverze nekativního zymogenu na plně aktivovaný maturní enzym a tento proces je spojen s proteolytickým odstraněním kovalentně spojené propeptidové domény. Nyní byla poprvé popsána struktura iKatK, která obsahuje vedle hlavní katalytické domény nekovalentně asociovaný fragment reziduálního propeptidu (v rozsahu Glu5p až Ser83p). Na rozdíl od struktury zymogenu (Sivaraman et al. 1999) u iKatK zbytkový propeptid pouze částečně překrývá aktivní místo enzymu a blokuje převážně podmísto S1'. Katalytické centrum iKatK se tak již stává přístupné pro ligand. Zde je vidět rozdíl oproti aktivačnímu meziprojektu katepsinu SmCB1, ve kterém je katalytické centrum stále blokováno reziduálním propeptidem a proteasa v této formě je neaktivní (Jílková et al. 2014).

Bylo prokázáno, že iKatK váže **Gü2602** a **Gü1303** analogickým způsobem, jaký byl pozorován u jejich komplexů s mKatK. To ukazuje, že aktivní místo iKatK je pro inhibitory plně přístupné ve všech potřebných vazebných podmístech a může být jimi regulováno. Tento závěr dále podporují výsledky testování **Gü2602** a **Gü1303** v autoaktivačním testu *in vitro* se

zymogenní formou KatK. Ten prokázal, že oba inhibitory silně potlačují autokatalytickou konverzi zymogenu na maturní formu, která probíhá jako bimolekulární reakce katalyzovaná funkčními formami mKatK/iKatK. Tento závěr je v souladu s předchozími studiemi o mechanismu autoaktivace cysteinových katepsinů (Vernet et al. 1991; Pungercar et al. 2009).

Závěrem byla prokázána schopnost inhibitorů **Gü2602** a **Gü1303** regulovat KatK na buněčném modelu s využitím buněčné linie osteosarkomu. Pro vizualizaci KatK byla použita fluorescenčně značená sonda **25** z autorské **publikace č. 2** (Lemke et al. 2021) která se selektivně váže do aktivního centra KatK a kompetuje o vazbu s inhibitory. Oba inhibitory silně potlačily značení KatK, což dokazuje dobrou permeabilitu inhibitorů pro vstup do buňky a efektivní interakci s cílovým enzymem. Všechna získaná data ukazují inhibitory **Gü2602** a **Gü1303** jako účinné regulátory aktivního KatK a to jak přímou interakcí, tak cílením na aktivační proces, který enzym generuje.

Využití selektivních inhibitorů pro konstrukci fluorescenčních sond detekujících aktivní KatK

Selektivní vizualizace aktivních forem jednotlivých proteas v rámci komplexního proteomu má zásadní význam pro pochopení regulace proteolytických systémů a jejich dysbalance během patologií. Z terapeutického hlediska má důležité využití v diagnostice, zejména pro lokalizaci tkání s patologicky zvýšenými aktivitami proteasových markerů nebo pro monitorování redukováných aktivit cílových proteas po podání léčiv na bázi proteasových inhibitorů. Jednoduchým molekulárním nástrojem pro vizualizaci aktivity proteas jsou selektivní fluorogenní substráty, kde ovšem může dojít ke zkreslení výsledků při lokalizaci signálu vlivem difuze značeného štěpeného produktu (Kasperkiewicz 2021). Alternativním přístupem je použití značených sond (ABP) na bázi selektivních proteasových inhibitorů, které se váží do aktivního místa proteasy a umožňují tak specifickou detekci aktivní formy enzymu (Bogyo 2010; Sanman and Bogyo 2014). Tyto sondy jsou v současné době předmětem intenzivního výzkumu ve spojitosti s diagnostikou patologií. Příkladem jsou aktivní sondy pro detekci katepsinu L u rakoviny prsu (Poreba et al. 2018) nebo pro analýzu působení katepsinu B u Alzheimerovy choroby (Poreba et al. 2019).

Příspěvkem k autorské **publikaci č. 2** (Lemke et al. 2021) bylo objasnění vazebného módu první peptidomimetické aktivní sondy pro selektivní detekci KatK. Tato sonda je odvozena ze struktury inhibitoru vybaveného vinylketonovou reaktivní skupinou, která se kovalentně ireverzibilně váže do katalytického centra KatK mechanismem Michaelovy

nukleofilní adice. Na základě dat z rentgenové strukturní analýzy komplexu sondy s KatK byly objasněny klíčové interakce v aktivním místě KatK. Sonda obsahovala v P1' pozici zásadní dibenzylaminový segment, který cílil benzylové skupiny na dvě podmísta S1' a S2', a byl zodpovědný za vynikající účinnost a selektivitu. O interakcích inhibitorů v těchto indexovaných vazebných podmístech KatK je z krystalografických studií známo doposud málo. Dřívější studie se substráty ukazují, že jsou zde akceptovány aromatické aminokyseliny (Alves et al. 2003).

Na opačné straně sondy je umístěn fluorofor cyanin 5, který pro nízkou kvalitu map elektronových hustot nemohl být strukturně popsán. To naznačuje jeho flexibilitu a předpokládanou orientaci ven z aktivního místa. Pro posouzení, zdali fluorescenční značka neovlivňuje celkovou vazbu sondy v aktivním místě, byl analyzován i komplex KatK s prekurzorovým inhibitorem bez fluoroforu. Výsledná superpozice obou struktur a distribuce kontaktů potvrdila, že síť klíčových interakcí je analogická. Získaná data umožňují konstrukci dalších derivátů například s jinými fluorofory či detekčními značkami v této poloze bez ztráty vazebných vlastností modifikovaných sond.

Funkční vlastnosti aktivní sondy byly úspěšně testovány v kontextu komplexního proteomu pomocí značení buněčných lyzátů a značení buněk lidského osteosarkomu. Fluorescenční mikroskopie a analýza buněk po separaci na SDS-PAGE ukazuje, že navržená sonda vstupuje do buňky až do lysozomo/endozomálního systému, kde značí aktivní formu KatK. Tato sonda představuje tak účinný nástroj pro citlivou a selektivní detekci KatK.

6. Závěr

Disertační práce se zabývala cysteinovou proteasou katepsinem K (KatK), který je cílovou molekulou pro léčbu osteoporózy a artritidy pomocí chemoterapeutik na bázi proteasových inhibitorů. V rámci práce byly studovány tři skupiny syntetických kovalentních inhibitorů KatK nízkomolekulárního a peptidomimetického charakteru. Zjištěny byly nové poznatky o mechanismu inhibiční regulace KatK a vztahu mezi strukturou a aktivitou inhibitorů této proteasy. Získané výsledky mají využití při vývoji účinných selektivních chemoterapeutik a molekulárních diagnostických sond.

Výsledky jsou shrnuty ve třech publikacích, které byly publikovány v mezinárodních odborných časopisech a v přiložené formě jsou součástí této práce. Disertační práce přináší nové poznatky o mechanismu inhibice KatK a předložené výsledky poslouží k návrhu nové generace vysoce selektivních a účinných chemoterapeutik.

Zadané cíle práce byly splněny a hlavní získané výsledky jsou:

1) Byl připraven rekombinantní KatK a jeho jednotlivé aktivační formy (zymogen, aktivační intermediát a maturní enzym).

2) Testováním knihovny nízkomolekulárních inhibitorů na bázi 1,2,4 thiadizolů byla identifikována nová třída inhibitorů KatK.

3) Pro sadu peptidomimetických inhibitorů na bázi vinylketonů a cyanohydrazidů byly připraveny komplexy s KatK, nalezeny jejich krystalizační podmínky a byla určena 3D struktura celkem šesti komplexů pomocí rentgenostrukturní analýzy.

4) Strukturní analýzou byl určen vazebný mód peptidomimetických vinylketonů a cyanohydrazidů a byly popsány klíčové interakce mezi inhibitorem a aktivním místem KatK. Poprvé byla určena struktura aktivačního meziprojektu KatK a jeho inhibiční interakce. Mezi charakterizovanými inhibitory je jeden z nejlepších známých inhibitorů KatK a unikátní inhibiční sonda pro detekci KatK.

5) Byly odvozeny vztahy struktury a funkce studovaných inhibitorů na základě integrace strukturních dat s výsledky získanými pomocí výpočetních metod, inhibičních analýz a buněčných testů.

Literární zdroje

- Alves, M. F., L. Puzer, S. S. Cotrin, M. A. Juliano, L. Juliano, D. Brömme and A. K. Carmona. 2003. 'S3 to S3' subsite specificity of recombinant human cathepsin K and development of selective internally quenched fluorescent substrates', *Biochem J*, 373: 981-86.
- Bernstein, H. G., and G. Keilhoff. 2018. 'Putative roles of cathepsin B in Alzheimer's disease pathology: The good, the bad, and the ugly in one?', *Neural Regen Res*, 13: 2100-01.
- Bogyo, M. 2010. 'Finding enzymes that are actively involved in cancer', *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 2379-80.
- Desmarais, S., W. C. Black, R. Oballa, S. Lamontagne, D. Riendeau, P. Tawa, L. T. Duong, M. Pickarski, and M. D. Percival. 2008. 'Effect of cathepsin k inhibitor basicity on in vivo off-target activities', *Mol Pharmacol*, 73: 147-56.
- Drake, M. T., B. L. Clarke, M. J. Oursler, and S. Khosla. 2017. 'Cathepsin K Inhibitors for Osteoporosis: Biology, Potential Clinical Utility, and Lessons Learned', *Endocr Rev*, 38: 325-50.
- Frizler, M., F. Lohr, N. Furtmann, J. Klas, and M. Gütschow. 2011. 'Structural optimization of azadipeptide nitriles strongly increases association rates and allows the development of selective cathepsin inhibitors', *J Med Chem*, 54: 396-400.
- Chia-en, A. C., W. Chen, and M. K. Gilson. 2007. 'Ligand configurational entropy and protein binding', *Proc Natl Acad Sci*, 104: 1534-39.
- Jílková, A., M. Horn, J. Fanfrlík, J. Kuppers, P. Páchl, P. Řezáčová, M. Lepšík, P. Fajtová, P. Rubešová, M. Chanová, C. R. Caffrey, M. Gütschow, and M. Mareš. 2021. 'Azanitrile Inhibitors of the SmCB1 Protease Target Are Lethal to *Schistosoma mansoni*: Structural and Mechanistic Insights into Chemotype Reactivity', *ACS Infect Dis*, 7: 189-201.
- Jílková, A., M. Horn, P. Řezáčová, L. Marešová, P. Fajtová, J. Brynda, J. Vondrášek, J. H. McKerrow, C. R. Caffrey, and M. Mareš. 2014. 'Activation route of the *Schistosoma mansoni* cathepsin B1 drug target: structural map with a glycosaminoglycan switch', *Structure*, 22: 1786-98.
- Kasperkiewicz, P. 2021. 'Peptidyl Activity-Based Probes for Imaging Serine Proteases', *Front Chem*, 9: 639410.
- Lemke, C., J. Benýšek, D. Brajtenbach, C. Breuer, A. Jílková, M. Horn, M. Buša, L. Ulrychova, A. Illies, K. F. Kubatzky, U. Bartz, M. Mareš, and M. Gütschow. 2021. 'An Activity-Based Probe for Cathepsin K Imaging with Excellent Potency and Selectivity', *J Med Chem*, 64: 13793-806.
- Leung-Toung, R., J. Wodzinska, W. Li, J. Lowrie, R. Kukreja, D. Desilets, K. Karimian, and T. F. Tam. 2003. '1,2,4-thiadiazole: a novel Cathepsin B inhibitor', *Bioorg Med Chem*, 11: 5529-37.
- Lu, J., M. Wang, Z. Wang, Z. Fu, A. Lu, and G. Zhang. 2018. 'Advances in the discovery of cathepsin K inhibitors on bone resorption', *J Enzyme Inhib Med Chem*, 33: 890-904.
- Makras, P., S. Delaroudis, and A. D. Anastasilakis. 2015. 'Novel therapies for osteoporosis', *Metabolism*, 64: 1199-214.
- Martinez, A., M. Alonso, A. Castro, C. Pérez, and F. J. Moreno. 2002. 'First non-ATP competitive glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) inhibitors: thiadiazolidinones (TDZD) as potential drugs for the treatment of Alzheimer's disease', *J Med Chem*, 45: 1292-99.
- Ottersbach, P. A., G. Schnakenburg, and M. Gütschow. 2012. 'Induction of chirality: experimental evidence of atropisomerism in azapeptides', *Chem Commun*, 48: 5772-4.
- Panwar, P., S. Law, A. Jamroz, P. Azizi, D. Zhang, M. Ciufolini, and D. Brömme. 2018. 'Tanshinones that selectively block the collagenase activity of cathepsin K provide a novel class of ectosteric antiresorptive agents for bone', *Br J Pharmacol*, 175: 902-23.

- Pomeislová, A., M. Otmar, P. Rubešová, J. Benýšek, M. Matoušová, H. Mertlíková-Kaiserová, R. Pohl, L. Poštová Slavětínská, K. Pomeisl, and M. Krečmerová. 2021. '1,2,4-Thiadiazole acyclic nucleoside phosphonates as inhibitors of cysteine dependent enzymes cathepsin K and GSK-3beta', *Bioorg Med Chem*, 32: 115998
- Poreba, M., K. Groborz, M. Vizovisek, M. Maruggi, D. Turk, B. Turk, G. Powis, M. Drag, and G. S. Salvesen. 2019. 'Fluorescent probes towards selective cathepsin B detection and visualization in cancer cells and patient samples', *Chem Sci*, 10: 8461-77.
- Poreba, M., W. Rut, M. Vizovisek, K. Groborz, P. Kasperkiewicz, D. Finlay, K. Vuori, D. Turk, B. Turk, G. S. Salvesen, and M. Drag. 2018. 'Selective imaging of cathepsin L in breast cancer by fluorescent activity-based probes', *Chem Sci*, 9: 2113-29.
- Pungerčar, J. R., D. Caglič, M. Sajid, M. Dolinar, O. Vasiljeva, U. Požgan, D. Turk, M. Bogyo, V. Turk, and B. Turk. 2009. 'Autocatalytic processing of procathepsin B is triggered by proenzyme activity', *FEBS J*, 276: 660-8.
- Sanman, L. E., and M. Bogyo. 2014. 'Activity-based profiling of proteases', *Annu Rev Biochem*, 83: 249-73.
- Schmitz, J., A. M. Beckmann, A. Dudic, T. Li, R. Sellier, U. Bartz, and M. Gütschow. 2014. '3-Cyano-3-aza-beta-amino Acid Derivatives as Inhibitors of Human Cysteine Cathepsins', *ACS Med Chem Lett*, 5: 1076-81.
- Sivaraman, J., Lalumière, M., Ménard, R., Cygler, M. 1999. 'Crystal structure of wild-type human procathepsin K', *Protein Sci*, 8: 283-90.
- Vega-Tejido, M. A., S. E. Maluf, C. R. Bonturi, J. R. Sambrano, and O. N. Ventura. 2014. 'Theoretical insight into the mechanism for the inhibition of the cysteine protease cathepsin B by 1,2,4-thiadiazole derivatives', *J Mol Model*, 20: 2254.
- Vernet, T., H. E. Khouri, P. Laflamme, D. C. Tessier, R. Musil, B. J. Gour-Salin, A. C. Storer, and D. Y. Thomas. 1991. 'Processing of the papain precursor. Purification of the zymogen and characterization of its mechanism of processing', *J Biol Chem*, 266: 21451-57.

Seznam publikací doktoranda, které jsou podkladem k disertační práci

Publikace č. 1

Pomeislová, A., M. Otmar, P. Rubešová, **J. Benýšek**, M. Matoušová, H. Mertlíková-Kaiserová, R. Pohl, L. Poštová Slavětínská, K. Pomeisl, and M. Krečmerová. 2021. '1,2,4-Thiadiazole acyclic nucleoside phosphonates as inhibitors of cysteine dependent enzymes cathepsin K and GSK-3beta', *Bioorg Med Chem*, 32: 115998

Publikace č. 2

Lemke, C., **J. Benýšek**, D. Brajtenbach, C. Breuer, A. Jílková, M. Horn, M. Buša, L. Ulrychova, A. Illies, K. F. Kubatzky, U. Bartz, M. Mareš, and M. Gütschow. 2021. 'An Activity-Based Probe for Cathepsin K Imaging with Excellent Potency and Selectivity', *J Med Chem*, 64: 13793-806.

Publikace č. 3

Benýšek J., M. Buša M, P. Rubešová, J. Fanfrlík , M. Lepšík, J. Brynda, Z. Matoušková, U. Bartz, M. Horn, M. Gütschow and M. Mareš. (2022). 'Highly potent inhibitors of cathepsin K with a differently positioned cyanohydrazide warhead: structural analysis of binding mode to mature and zymogen-like enzymes' *J Enzyme Inhib Med Chem*. (accepted)

Publikace bez vztahu k tématu disertační práce (odborné příspěvky)

Benýšek J. (2019) 'Cysteinové proteasy jako cílové molekuly v biomedicíně' *Biopropect*, 2:40-44

Benýšek J. (2019) 'Parazitární cysteinové proteasy a jejich funkce v lidských patologiích' *Biopropect*, 3: 61-64