

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maja OREŠNIK

**IZRAŽANJE REKOMBINANTNEGA ČLOVEŠKEGA
KATEPSINA L V KVASOVKI *Pichia pastoris* IN
PRIMERJAVA NJEGOVE SUBSTRATNE
SPECIFIČNOSTI Z REKOMBINANTNIM MIŠJIM
KATEPSINOM L**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Maja OREŠNIK

**IZRAŽANJE REKOMBINANTNEGA ČLOVEŠKEGA KATEPSINA L
V KVASOVKI *Pichia pastoris* IN PRIMERJAVA NJEGOVE
SUBSTRATNE SPECIFIČNOSTI Z REKOMBINANTNIM MIŠJIM
KATEPSINOM L**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**EXPRESSION OF RECOMBINANT HUMAN CATHEPSIN L IN
YEAST *Pichia pastoris* AND COMPARISON OF ITS SUBSTRATE
SPECIFICITY WITH RECOMBINANT MOUSE CATHEPSIN L**

M.Sc. THESIS
Master study programmes

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Biotehnologija. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno na Oddelku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo Inštituta Jožef Stefan.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Borisa Turka in za recenzenta prof. dr. Gregorja Anderluha.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za
agronomijo

Član: prof. dr. Boris Turk
Inštitut Jožef Stefan, Oddelek za biokemijo, molekularno in
strukturno biologijo

Član: prof. dr. Gregor Anderluh
Kemijski inštitut, Laboratorij za molekularno biologijo in
nanobiotehnologijo

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svojega magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Maja Orešnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 606:577.15(043.2)=163.6
KG	proteaze/katepsini/katepsin L/rekombinantni proteini/rak/ <i>Pichia pastoris</i> /substratna specifičnost/encimska aktivnost/peptidne knjižnice
AV	OREŠNIK, Maja
SA	TURK, Boris (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2014
IN	IZRAŽANJE REKOMBINANTNEGA ČLOVEŠKEGA KATEPSINA L V KVASOVKI <i>Pichia pastoris</i> IN PRIMERJAVA NJEGOVE SUBSTRATNE SPECIFIČNOSTI Z REKOMBINANTNIM MIŠJIM KATEPSINOM L
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XI, 64 str., 25 pregl., 20 sl., 55 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Katepsin L sodi med cisteinske katepsine in se v normalnih fizioloških razmerah nahaja v lizosomih in/ali endosomih, kjer je odgovoren za razgradnjo proteinov na manjše enote. Poleg tega njegovo vlogo povezujemo s homeostazo kože in srčnih celic, ter zorenjem nevropeptidov in limfocitov B. Povišano izražanje katepsina L v celicah in njegova prisotnost v zunajceličnem prostoru sovpadata s pojavom nekaterih kožnih bolezni, raka in revmatoidnega artritis. Določanje biokemijskih lastnosti proteinov nam pomaga pri boljšem razumevanju funkcij posameznih proteinov v fizioloških in patofizioloških pogojih. Mednje sodi tudi določanje substratne specifičnosti, na podlagi katere lahko načrtujemo razvoj ustreznih inhibitorjev, ki bi lahko pripomogli k izboljšanju številnih bolezenskih stanj, katerih razvoj sovpada s spremenjenim izražanjem in aktivnostjo encimov. Cilj magistrske naloge je bila priprava rekombinantnega človeškega katepsina L. Za izražanje rekombinantnega človeškega katepsina L smo uporabili kvasovko <i>Pichia pastoris</i> , v katero smo vstavili vektor pPIC9-prokatepsin L. Očiščenemu encimu smo s pomočjo inhibitorja E-64 določili aktivno koncentracijo. Za določanje in primerjavo substratnih specifičnosti rekombinantnega človeškega in mišjega katepsina L na pozicijah P4, P3 in P2 smo uporabili kombinatorno fluorogeno tetrapeptidno substrato knjižnico. Oba encima na mestu P2 preferirata aromatske aminokisline. Človeški katepsin L na poziciji P3 preferira norlevcin, na poziciji P4 pa histidin. Za razliko od človeškega katepsina L pa mišji katepsin najboljše cepi peptide, ki imajo na poziciji P3 levcin in na poziciji P4 alanin.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 606:577.15(043.2)=163.6
CX proteases/cathepsins/cathepsin L/recombinant proteins/cancer/*Pichia pastoris*/
substrate specificity/enzyme activity/peptide libraries
AU OREŠNIK, Maja
AA TURK, Boris
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Master study in Biotechnology
PY 2014
TI EXPRESSION OF RECOMBINANT HUMAN CATHEPSIN L IN YEAST *Pichia*
pastoris AND COMPARISON OF ITS SUBSTRATE SPECIFICITY WITH
RECOMBINANT MOUSE CATHEPSIN L
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XI, 64 p., 25 tab., 20 fig., 55 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Cathepsin L belongs to the group of cysteine cathepsins. Normally it can be found
in lysosomes and endosomes, where it is responsible for the breakdown of proteins
to peptides and amino acids. The role of cathepsin L is also related to homeostasis
in skin and heart cells, processing of neuropeptides and maturation of B-
lymphocytes. Additionally, elevated level of cathepsin L and its presence in
extracellular matrix correlate with the development of certain skin diseases, cancer
and rheumatoid arthritis. Determination of the biochemical properties of the
enzyme, including substrate specificity, is therefore of great importance for
understanding the function of the enzyme in physiological and pathophysiological
conditions. This knowledge may lead to design of new specific inhibitors and
consequently to improvement of life quality of the patients with cathepsin L related
diseases. The main goal of this master thesis was preparation of recombinant
human cathepsin L. For expression of recombinant human cathepsin L we used
yeast *Pichia pastoris* with inserted pPIC9-procathepsin L vector. The active
enzyme concentration was determined using the inhibitor E-64. Substrate
specificities of the recombinant human and mouse cathepsin L in the P2, P3, and
P4 positions were determined using a combinatorial fluorogenic tetrapeptide
substrate library. Both enzymes showed slight preference for aromatic amino acids
in the P2 position. Human cathepsin L prefers norleucine in the P3 position and
histidine in the P4 position, whereas mouse cathepsin L prefers peptides with
leucine in the P3 position and alanine in the P4 position.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	IX
OKRAJŠAVE AMINOKISLIN	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI IN NAMEN DELA	2
1.3 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PROTEAZE.....	3
2.1.1 Cisteinske proteaze.....	3
2.2 KATEPSINI.....	3
2.2.1 Cisteinski katepsini.....	4
2.3 KATEPSIN L	5
2.3.1 Propeptid	7
2.3.2 Fiziološke funkcije katepsina L.....	8
2.3.3 Inhibitorji cisteinskih katepsinov.....	9
2.3.4 Sestava aktivnega mesta.....	10
2.4 RAK.....	11
2.4.1 Razvoj raka in vloga katepsina L.....	11
2.5 SISTEM ZA IZRAŽANJE PROTEINOV	12
2.5.1 Sistem za izražanje proteinov <i>Pichia pastoris</i>	12
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Laboratorijska oprema	15
3.1.1.1 Potrošni material.....	15
3.1.1.2 Naprave.....	16
3.1.2 Organizmi.....	16
3.1.3 Encimi, plazmidi in protitelesa.....	16
3.1.4 Delo s kvasovkami <i>Pichia pastoris</i>	17
3.1.4.1 Založne raztopine za pripravo gojišč.....	17
3.1.4.2 Gojišča.....	18
3.1.5 Pufri in raztopine.....	20
3.1.6 Ostale kemikalije	21
3.1.7 Komercialni kiti in reagent.....	21
3.1.8 Računalniški programi.....	21
3.2 METODE.....	23
3.2.1 Linearizacija plazmidne DNA	23
3.2.2 Elektroporacija <i>P. pastoris</i>	23
3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo na osnovi kolonije	24
3.2.4 Agarozna gelska elektroforeza	25

3.2.5	Poskusno izražanje katepsina L	26
3.2.6	Poliakrilna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata	26
3.2.7	Imunološka detekcija s tehniko prenosa Western	27
3.2.8	Preverjanje encimske aktivnosti katepsina L v vzorcih supernatantov	28
3.2.9	Izražanje proteina v večjem obsegu	29
3.2.10	Čiščenje in aktivacija katepsina L	29
3.2.11	Titracija aktivnih mest.....	30
3.2.12	Primerjava substratnih specifičnosti človeškega in mišjega katepsina L na pozicijah P4, P3 in P2 s pomočjo kombinatorne tetrapeptidne knjižnice.....	31
3.2.12.1	Določanje kinetičnih parametrov človeškega katepsina L za izbrane substrate.	31
4	REZULTATI.....	33
4.1	LINEARIZACIJA VEKTORJA.....	33
4.2	PCR NA OSNOVI KOLONIJE	34
4.3	POSKUSNO IZRAŽANJE KATEPSINA L	34
4.4	PREVERJANJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI KATEPSINA L V VZORCIH SUPERNATANTOV.....	37
4.5	ČIŠČENJE IN AKTIVACIJA KATEPSINA L	38
4.6	IMUNOLOŠKA DETEKCIJA KATEPSINA L S TEHNIKO PRENOSA WESTERN	41
4.7	DOLOČANJE OPTIMALNE KONCENTRACIJE KATEPSINA L	42
4.8	TITRACIJA AKTIVNIH MEST	42
4.9	PRIMERJAVA SUBSTRATNIH SPECIFIČNOSTI ČLOVEŠKEGA IN MIŠJEGA KATEPSINA L NA POZICIJAH SUBSTRATA P4, P3 IN P2 S POMOČJO KOMBINATORNE TETRAPEPTIDNE KNJIŽNICE.....	43
4.10	DOLOČANJE KINETIČNIH PARAMETROV ČLOVEŠKEGA KATEPSINA L S HIDROLIZO IZBRANIH SUBSTRATOV	46
4.10.1	Najboljši substrat iz peptidne podknjižnice P4 Ac-HXFG-ACC.....	47
4.10.2	Najboljši substrat iz peptidne podknjižnice P3 Ac-XLFG-ACC	48
4.10.3	Najboljši substrat iz peptidne podknjižnice P2 Ac-LRWG-ACC	49
5	RAZPRAVA.....	50
5.1	IZRAŽANJE REKOMBINANTNEGA ČLOVEŠKEGA KATEPSINA L.....	50
5.2	SUBSTRATNA SPECIFIČNOST REKOMBINANTNEGA ČLOVEŠKEGA IN MIŠJEGA KATEPSINA L.....	52
6	SKLEPI.....	56
7	POVZETEK (SUMMARY)	57
7.1	POVZETEK.....	57
7.2	SUMMARY	58
8	VIRI	60
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Seznam potrošnih pripomočkov	15
Preglednica 2: Seznam laboratorijske steklovine	15
Preglednica 3: Seznam laboratorijskih naprav	16
Preglednica 4: 10X YNB (13,4 % Kvasna dušikova osnova brez amonijevega sulfata in aminokislin)	17
Preglednica 5: 500X Biotin (0,02 % Biotin)	17
Preglednica 6: 10X Dekstroza (20 % Dekstroza)	17
Preglednica 7: 10X Metanol (5 % Metanol)	17
Preglednica 8: 10X Glicerol (10 % Glicerol)	17
Preglednica 9: 1M Kalijev fostat pufer, pH 6,0	18
Preglednica 10: BMGY	18
Preglednica 11: BMMY	18
Preglednica 12: MD plošče	18
Preglednica 13: YPD plošče	19
Preglednica 14: Seznam pufrov in raztopin	20
Preglednica 15: Seznam ostalih kemikalij	21
Preglednica 16: Seznam komercialnih reagentov in kitov	21
Preglednica 17: Seznam računalniških programov	22
Preglednica 18: Sestava mešanice za restrikcijo vektorja pPIC9-prokatepsin L	23
Preglednica 19: Parametri elektroporacije	24
Preglednica 20: Sestava mešanice za analizo PCR na osnovi kolonije	25
Preglednica 21: Pogoji PCR reakcije	25
Preglednica 22: Karakteristike prenosa Western	28
Preglednica 23: Kinetični parametri encimske aktivnosti na substrat Ac-HXFG-ACC	48
Preglednica 24: Kinetični parametri encimske aktivnosti za substrat Ac-XLFG-ACC	48
Preglednica 25: Kinetični parametri encimske aktivnosti na substrat Ac-LRWG-ACC	49

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Primerjava aminokislinskih zaporedij človeškega in mišjega preprokatepsina L (Cathepsin ..., 2013)	5
Slika 2: Tridimenzionalna struktura prokatepsina L (PDB koda: 1CS8) (Coulombe in sod., 1996)	7
Slika 3: Interakcija substrata in encima v aktivnem mestu (Schechter in sod., 1967)	10
Slika 4: Struktura vektorja pPIC9 (<i>Pichia</i> ..., 2002)	14
Slika 5: Linearizacija vektorja pPIC9	32
Slika 6: PCR na osnovi kolonije	33
Slika 7: Rezultati poskusnega izražanja katepsina L na NaDS-PAGE elektroforetskem gelu (1. gel)	34
Slika 8: Rezultati poskusnega izražanja katepsina L na NaDS-PAGE elektroforetskem gelu (2. gel)	35
Slika 9: Rezultati poskusnega izražanja katepsina L na NaDS-PAGE elektroforetskem gelu (3. gel)	36
Slika 10: Encimske aktivnosti supernatantov odvzetih v posameznih dneh	37
Slika 11: NaDS-PAGE po čiščenju	38
Slika 12: Čiščenje katepsina L z Ni^{2+} kelatno kromatografijo	39
Slika 13: Imunološka detekcija proteina po prenosu Western	40
Slika 14: Določanje optimalne koncentracije encima	41
Slika 15: Primerjava substratne specifičnosti človeškega in mišjega katepsina L na poziciji P4	43
Slika 16: Primerjava substratne specifičnosti človeškega in mišjega katepsina L na poziciji P3	44
Slika 17: Primerjava substratne specifičnosti človeškega in mišjega katepsina L na poziciji P2	45
Slika 18: Michaelis-Mentenov diagram hitrosti cepitve substrata Ac-HXFG-ACC, iz peptidne podknjižnice P4.....	46
Slika 19: Michaelis-Mentenov diagram cepitve substrata Ac-XLFG-ACC, iz peptidne podknjižnice P3.....	47
Slika 20: Michaelis-Mentenov diagram cepitve substrata Ac-LRWG-ACC, iz peptidne podknjižnice P2	48

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

53BP1	vezavni protein 1 za protein p53 (ang. protein 53-binding protein 1)
Ab	protitelo
AGE	agarozna gelska elektroforeza
AK	aminokislina
AOX	alternativna oksidaza (gen)
APC	antigen predstavitvene celice (ang. antigen presenting cells)
BMGY	sestavljeno gojišče z glicerolom in pufrom (ang. buffered glycerol-complex medium)
BMMY	sestavljeno gojišče z metanolom in pufrom (ang. buffered methanol-complex medium)
BRCA-1	gen tipa 1 dovzetnosti za raka dojke tipa 1 (ang. breast cancer susceptibility gene 1)
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumin)
CBB	coomassie brilliant blue
CD	označevalec pripadnosti (ang. cluster of differentiation)
cPCR	PCR na osnovi kolonije (ang. colony PCR)
CTSL	katepsin L (gen)
Da	dalton
dH ₂ O	destilirana voda
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid
DTT	ditrioteitol
E-64	L-trans-epoksisukcinil-levcilamido(4-gvanidino)butan
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EGF	epidermalni rastni faktor (ang. epidermal growth factor)
NaOA	natrijev oksalacetat
FPLC	tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov (ang. fast protein liquid chromatography)
MD	minimalno gojišče z dekstrozo (ang. minimal dextrose medium)
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (ang. major histocompatibility complex)
mRNK	informacijska RNK (ang. messenger RNA)
MCS	polilinkersko mesto (ang. multiple cloning site)
NaDS	natrijev dodecilsulfat
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza (ang. Polyacrylamide gel electrophoresis)
PARP	poli ADP-riboza polimeraza (ang. poly ADP-ribose polymerase)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)

RFU	relativna enota fluorescence (ang. relative fluorescence unit)
RNK	ribonukleinska kislina
TAE	tris-acetat-EDTA
TBS	tris puferna solna raztopina (ang. tris buffered saline)
TCA	trikloroocetna kislina
TNBC	trojno negativni rak dojk (ang. triple-negative breast cancer)
Tris	tris hidroksimetil aminometan
UV	ultravijolična svetloba
WT	prenos western (ang. Western transfer)
YNB	kvasna dušikova osnova (ang. yeast nitrogen base)
YPD	gojišče s kvasnim ekstraktom, peptonom in dekstrozo (ang. yeast extract peptone dextrose medium)

OKRAJŠAVE AMINOKISLIN

C	Cys	cistein
D	Asp	aspartat
E	Glu	glutamat
F	Phe	fenilalanin
G	Gly	glicin
H	His	histidin
I	Ile	izolevcin
K	Lys	lizin
L	Leu	levcin
M	Met	metionin
N	Asn	asparagin
P	Pro	prolin
Q	Gln	glutamin
R	Arg	arginin
S	Ser	serin
T	Thr	treonin
V	Val	valin
W	Trp	triptofan
Y	Tyr	tirozin

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Cisteinski katepsini so sprva veljali za encime, ki v lizosomih nespecifično razgrajujejo proteine, vendar so novejša raziskava pokazale, da njihova vloga še zdaleč ni tako omejena. Spremenjeno izražanje endogenih encimov, tudi cisteinskih katepsinov, vpliva na regulacijo številnih metabolnih poti v celici, katerih rezultat je razvoj bolezenskih stanj, kot so rak in nevrodegenerativne bolezni. Tako je poznavanje vloge encimov v zdravem sistemu bistveno za razumevanje razvoja bolezenskih stanj. Za natančnejšo določitev vloge posameznih encimov v normalnih fizioloških pogojih je potrebna njihova biokemijska karakterizacija, ki lahko v nadaljnjih raziskavah služi kot osnova za morebitne medicinske aplikacije (Turk, 2006).

Kadar govorimo o patofiziologiji cisteinskih katepsinov, gre v večini primerov za njihovo prekomerno izražanje ter tudi usmeritev le-teh v zunajcelični prostor. Njihovo encimsko aktivnost lahko uravnavamo z uporabo inhibitorjev. Glede na število obstoječih proteaz je število njihovih endogenih inhibitorjev neprimerno manjše, zaradi česar je posledično manjša tudi njihova specifičnost (Reiser in sod., 2010). Tako je razvoj sintetičnih inhibitorjev usmerjen v iskanje kemijskih spojin, ki bi specifično inhibirale posamezne proteaze. Za uspešen razvoj specifičnih sintetičnih inhibitorjev je zato potreba natančna karakterizacija aktivnega mesta posameznega encima (Choe in sod., 2006).

Eden izmed biokemijskih parametrov pri karakterizaciji encimov je določanje substratne specifičnosti. Preferenčne aminokisline na posameznih pozicijah lahko določamo s presejanjem substratov iz peptidnih knjižnic, katerih ustreznost je potrebno potrditi tudi s cepitvenimi mesti v naravnih substratih. Ob tem pa se moramo zavedati, da je cepitev substrata s cisteinskim katepsinom morebiti le eden izmed korakov v kaskadi proteaznih reakcij. Zato lahko o realnih posledicah delovanja določenega encima govorimo le, kadar opazujemo njegovo delovanje v živem sistemu. Končni cilj vseh podobnih raziskav je poznavanje vzrokov in mehanizmov nastanka bolezni, njihovo odpravljanje in posledično zviševanje kvalitete življenja posameznika.

1.2 CILJI IN NAMEN DELA

Namen dela je bila priprava rekombinantnega človeškega katepsina L in določitev substratne specifičnosti očiščenega encima. Za izražanje katepsina L smo uporabili sistem za izražanje, kvasovko *Pichia pastoris*.

Cilj magistrske naloge je bila primerjava substratnih specifičnosti človeškega in mišjega katepsina L. Za določanje substratne specifičnosti smo uporabili fluorogeno kombinatno tetrapeptidno knjižnico. Na podlagi dobljenih rezultatov smo določili razlike med substratnima specifičnostima obeh homologov.

1.3 HIPOTEZE

Predvidevali smo, da je s sistemom za izražanje *P. pastoris* možno izraziti zadostne količine pravilno zvitega prokatepsina L, ki po aktivaciji tvori katalitično aktiven katepsin L.

Nadalje smo predvidevali, da se substratni specifičnosti človeškega in mišjega katepsina L razlikujeta.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROTEAZE

Proteaze sodijo v skupino encimov, ki cepijo peptidno vez ter proteine razgrajujejo na manjše enote. Nahajajo se prav v vseh živih organizmih, od virusov do sesalcev. Sprva je veljalo, da je vloga proteaz povezana z razgradnjo proteinov v metabolizmu, kasneje pa je postalo jasno, da imajo pomembno vlogo tudi pri uravnavanju fizioloških procesov ter generiranju in prenosu celičnih signalov. Ob tem je pomembno poudariti tudi dejstvo, da so cepitve substratnih molekul s proteazami ireverzibilne modifikacije (Turk, 2006). Človeški genom nosi zapis za več kot 500 proteaz in več kot 220 njihovih endogenih inhibitorjev (Reiser in sod., 2010).

Kadar proteaza cepi peptidno verigo na enem izmed njenih koncev jo uvrščamo med eksopeptidaze. V kolikor cepitev poteče na N-terminalnem delu verige lahko tako ekspopetidazo poimenujemo tudi aminopeptidaza, v primeru C-terminalnega dela verige pa karboksipeptidaza. Proteaze, ki cepijo substrat sredi peptidne verige spadajo med endopeptidaze. Posamezna proteaza se glede na mesto cepitve lahko uvršča v enega ali več omenjenih razredov (Turk, 2006). Glede na osnovni katalitski mehanizem v aktivnem mestu encima proteaze razvrščamo v pet razredov: serinske, cisteinske, aspartatne, treoninske in metalo proteaze ter endopeptidaze neznanega katalitskega mehanizma (Enzyme..., 2013; Rawlings in sod., 2014).

2.1.1 Cisteinske proteaze

Skupna značilnost vseh cisteinskih proteaz je katalitična diada cistein – histidin, ki se nahaja v aktivnem mestu encima. Cisteinski aminokislinski preostanek ima vlogo nukleofila, histidinski aminokislinski preostanek pa predstavlja splošno bazo za ciljanje protonov (Stoka in sod., 2005). Glede na homologijo in podobnost tridimenzionalne zgradbe so cisteinske proteaze razdeljene v 9 klanov, vsak klan pa se deli v družine encimov (Rawlings in sod., 2014).

2.2 KATEPSINI

Katepsin je skovanka starogrških besed kata (gr. prebaviti) ter hepsein (gr. vreti), in pomeni razgraditi, oziroma razkuhati. Uporablja se za poimenovanje proteaz aktivnih v kislem okolju (Turk in sod., 2003). V normalnih fizioloških pogojih se katepsini nahajajo v endosomih in lizosomih. Glede na tip katalize katepsine delimo na serinske, aspartatne in cisteinske (Reiser in sod., 2010). Med serinske katepsine sodita katepsina A in G, med aspartatne pa katepsina D in E (Reiser in sod., 2010). Največ predstavnikov, kar 11, sodi v

skupino cisteinskih katepsinov (Turk in sod., 2012). Glede na terciarno strukturo katepsini spadajo v klan CA in v družino C1a, kjer se nahajajo papainu podobni encimi. Zreli katepsini so, z izjemo tetramernega katepsina C, majhni monomeri (Turk in sod., 2012). Število katepsinov je verjetno dokončno, saj analize človeškega genoma niso razkrile nobenih dodatnih katepsinov podobnih nukleotidnih zaporedij (Rossi in sod., 2004). Osnovna funkcija katepsinov je znotrajcelična razgradnja proteinov. Poskusi na podlagi tehnologije izbijanja genov so pokazali, da le-ta ni odvisna od delovanja posameznega katepsina temveč vzajemnega delovanja encimov. Poleg tega pa nepravilnosti v izražanju in številne mutacije v genskih zapisih za nekatere katepsine korelirajo z nastankom številnih humanih bolezni (Vasiljeva in sod., 2007).

2.2.1 Cisteinski katepsini

Cisteinski katepsini so najbolj poznana skupina cisteinskih proteaz, kamor se uvrščajo katepsini B, C, F, H, K, L, O, S, V, X, in W (Turk in sod., 2012). Katepsini B, H in L se nahajajo v skoraj vseh sesalskih tkivih (Stoka in sod., 2005), kar nakazuje na nespecifično vlogo pri razgradnji proteinov. Funkcija nekaterih drugih cisteinskih katepsinov pa je veliko bolj specifična in omejena le na določena tkiva. Katepsin S je tako vključen v metabolno pot predstavitve antigenov na poglobitnem histokompatibilnostnem kompleksu (MHC) razreda II, ki se nahaja na antigen predstavitvenih celicah (APC), ki izhajajo iz kostnega tkiva (Honey in sod., 2003). Katepsin K pa se prevladujoče izraža v osteoklastih, kjer je vključen v respiracijo kosti (Lecaille, 2008). Katepsin V se specifično izraža v timusu, testisih in kornei, katepsin W pa v limfocitih T, tipa CD8+ (Bromme in sod., 1999; Linnevers in sod., 1997).

Katepsini F, L, K, O, S in V se glede na mesto cepitve peptidne verige uvrščajo med endopeptidaze. Katepsini B, C, H in X pa so eksopeptidaze. Katepsin C je aminodipeptidaza, katepsin H aminopeptidaza. Na karboksilnem koncu verige cepi katepsin X po en aminokislinski preostanek in katepsin B dva (Stoka in sod., 2005).

Katepsini za svoje optimalno delovanje potrebujejo reducirajoče in rahlo kislo okolje, katerega najdemo v lizosomih. V nevtralnem pH se katepsini ireverzibilno inaktivirajo. Katepsin S je izjema in v nevtralnem do rahlo bazičnem pH ohrani svojo encimsko aktivnost. Pri povečanem izražanju lahko cisteinske katepsine najdemo tudi v zunajceličnem prostoru, kar nakazuje, da pH ni edini faktor, ki vpliva na njihovo aktivnost (Turk in sod., 2012). Ena od značilnosti cisteinskih katepsinov, ki jih ločuje od serinskih ali aspartatnih proteaz je majhno število visoko definiranih vezavnih mest za substrat v aktivnem mestu (Turk in sod., 2003).

2.3 KATEPSIN L

Kirschke in sodelavci so katepsin L prvič izolirali iz tkivnih homogenatov podganjih jeter v sedemdesetih letih 20. stoletja (Kirschke in sod., 1972; Kirschke in sod., 1977).

CTSL, gen za človeški katepsin L, se nahaja na 9. kromosomu, natančneje, v regiji 9q21-22. Sestavlja ga 8 eksonov in 7 intronov. Po prepisu mRNA lahko nastane več spojitenih variant. Katepsin L se sintetizira v obliki preproencima s 333 aminokislinami. Molekulska masa preproencima je 37564 Da. Po cepitvi signalnega zaporedja nastane enoverižen prokatepsin L z maso 38-41 kDa. Ob aktivaciji katepsina L se najprej odcepi propeptid. Enoverižen katepsin L z maso 28 kDa se dokončno procesira v dvoverižno obliko, sestavljeno iz težke in lahke veriga, z masama 24 kDa in 4 kDa (Kirschke, 2013).

1	MNPTLILAAFLGLIASATLTFDHSLEAQWTKWKAMHNRLYGMNEEGWRRRAVWEKNMKMIE	60	P07711	CATL1_HUMAN
1	MNLLLLLAVLCLGTALATPKFDQTFSAEWHQWKSTHRRLYGTNEEEWRRRAIWEKNMRMIQ	60	P06797	CATL1_MOUSE
	** :*:***:*** * ** .*::::*.*: :*: :*.***** ** :*:*****:***:			
61	LHNQYREGKHSFTMAMNAFGDMTSEEFQVMNGFQNRKPRKGKVFQEPFLFYHAPRSVDW	120	P07711	CATL1_HUMAN
61	LHNGEYSNGQHGFSEMEMNAFGDMTNEEFQVMNGYRHKHKKGRLFQEPFLMLKIPKSVDW	120	P06797	CATL1_MOUSE
	** * :*:*.*: * :*:*****.*****:***:*.*: :*:*****: : :*:*****			
121	REKGYVTPVKNQGGCGSCWAFSATGALEGQMFRKTGRLISLSEQNLVDCSGPQGNCGCNG	180	P07711	CATL1_HUMAN
121	REKGCVTVPKNQGGCGSCWAFSASGCLGQMFLKTGKLISLSEQNLVDCSHAQGNQGCNG	180	P06797	CATL1_MOUSE
	**** :*****:***:*.***** :*:*****:***** :*:*****			
181	GLMDYAFQYVQDNGGLDSEESYPYEATEESCKYNPKYSVANDTGFVDIPKQEKALMKAVA	240	P07711	CATL1_HUMAN
181	GLMDFAFYIKENGGLDSEESYPYEAKDGSKYRAEFAVANDTGFVDIPQEKALMKAVA	240	P06797	CATL1_MOUSE
	*****:***:***:*****:*****: : :*****. :*:*****:*****:*****			
241	TVGPISVAIDAGHESFLFYKEGIYFEPDCSSEDMDHGVLVVGYGFESETSDNNKYWLKVN	300	P07711	CATL1_HUMAN
241	TVGPISVAMDASHPSLQFYSSGIYYEPNCSSKNLDHGVLVVGYGEGTDSNNKYWLKVN	300	P06797	CATL1_MOUSE
	*****:***. * : * :*.*****:***:***:*****:*****:*.*:*****			
301	SWGEEWGMGGYVVKMAKDRRNHCGIASAASYPTV-	333	P07711	CATL1_HUMAN
301	SWGSEWGMGGYIKAKDRDNHCGLATASYPVVN	334	P06797	CATL1_MOUSE
	.** :*:***** :*:***** :*:*****. *			

Slika 1: Primerjava aminokislinskih zaporedij človeškega in mišjega preprokatepsina L (Cathepsin ..., 2013)

Aminokislinsko zaporedje mišjega preprokatepsina L (spodaj) je poravnano glede na zaporedje človeškega preprokatepsina L (zgoraj). Na levi strani so oštevilčena prva mesta vsake vrstice, na desni strani pa zadnja mesta, sledi akcesijska številka sekvence in ime proteina. Ujemanje posameznih mest v sekvenci je označeno s simboli “*”, “:” in “.”, pri čemer so povsem ohranjena mesta zaznamovana z “*”, mesta z aminokislinskimi ostriki z zelo podobnimi lastnostmi z “:” in mesta s šibko podobnimi lastnostmi z “.”. Modra barva označuje signalno sekvenco, rdeča pa propeptid.

Na sliki 1 je prikazana primerjava aminokislinskih zaporedij človeškega in mišjega katepsina L. Zaporedji se po dolžini razlikujeta le za en aminokislinski preostanek, identičnost verig pa znaša 71,9 %. 240 aminokislinskih preostankov na posameznih pozicijah je povsem ohranjenih, nadaljnjih 68 aminokislinskih preostankov pa je podobnih. V celotni verigi se največje razlike med zaporedjema pojavljajo v sestavi propeptida. Tudi tu pa so povsem ohranjeni aminokislinski preostanki, ki so pomembni za vzdrževanje globularne oblike N-terminalnega dela propeptida. Mednje spadajo hidrofobni

aminokislinski preostanki, večinoma aromatičnega značaja, ki predstavljajo hidrofobno jedro med obema vijačnicama, ter nabite, hidrofilne aminokisliline, ki tvorijo solne mostičke. Med 96 aminokislinskimi preostanki v propeptidu pride v 10 primerih do zamenjave aminokislin, ki nimajo podobnih lastnosti. Zamenjava med aminokislinami s hidrofilnim in hidrofobnim značajem se pojavi le dvakrat, najbolj pogoste pa so zamenjave med aminokislinami z nevtralno in hidrofilno stransko verigo (Cathepsin ..., 2013).

V delu sekvence, iz katere nastane zrela oblika katepsina L, so pri miših in človeku ohranjena vsa mesta, pomembna za nastanek disulfidnih vezi, glikozilacijo in aminokisliline, ki so sestavni del aktivnega mesta (Cathepsin ..., 2013).

Sinteza preprokatepsina poteka v zrnatem endoplazemskem retikulumu. Z vstopom v lumen endoplazemskega retikuluma se signalno zaporedje odstrani, med potjo skozi Golgijev aparat pa se proencim še dodatno modificira, saj potečeta glikozilacija in manozna fosforilacija, vzpostavijo pa se tudi disulfidne vezi. Encim opremljen z manozna-6-fosfatom nadaljuje pot preko Golgijevega omrežja do njegovega trans dela, kjer se vključi v transportne vezikle in nadaljnjo v lizosome, kjer katepsin L dozori v aktivno obliko (Brix in sod., 2008, Kirschke, 2013).

Cepitev enoverižnega katepsina L na težko in lahko verigo poteče za aminokislino na poziciji 291. Pri miših in podganah je to asparagin, pri človeškem katepsinu L pa je na tem mestu asparaginska kislina (Kirschke, 2013).

Katepsin L lahko razgrajuje širok spekter proteinskih substratov, vključno z encimi, receptorji in transkripcijskimi faktorji. Najraje cepi substrate, ki imajo na poziciji P2 aromatski aminokislinski preostanek in na poziciji P3 hidrofilni aminokislinski preostanek. Encimsko aktivnost katepsina L lahko zaznamo pri pH med 3,0 in 6,5, z optimumom pri pH 5,5 (Kirschke, 2013).



Slika 2: Tridimenzionalna struktura prokatepsina L (PDB koda: 1CS8) (Coulombe in sod., 1996)

Z rumenimi puščicami so označene β -verige, roza barva predstavlja α -vijačnico, vijolična pa zavoje v verigi.

Katepsin L sestavljata dve domeni (slika 2). Na stičišču obeh domen se nahaja reža aktivnega mesta s katalitično diado. Prva domena se nahaja na N- koncu polipeptidne verige in je sestavljena pretežno iz α -vijačnic in katalitičnega cisteina na poziciji 25 (Cys25). Drugo domeno, ki se nahaja na C-koncu, sestavljajo pretežno β -ploskve s katalitičnim histidinom na poziciji 163 (His163). Cisteinski katepsini imajo dokaj podobno zgradbo aktivnega mesta. Razlike v specifičnosti med posameznimi katepsini izhajajo iz stranskih verig, ki obkrožajo režo aktivnega mesta in tako določajo optimalna aminokislinska zaporedja substratov (Coulombe in sod., 1996).

2.3.1 Propeptid

Vsi katepsini, vključno s katepsinom L, se sintetizirajo v obliki neaktivnega proencima, kjer je propeptid zasidran v režo aktivnega mesta in preprečuje njihovo aktivacijo. Tako so

celice zaščitene pred nekontrolirano proteolizo. Poleg preprečevanja encimske aktivnosti je ključen tudi pri pravilnem zvijanju katepsinov ter stabilizaciji v denaturirajočem, nevtralnem oziroma bazičnem okolju (Tao in sod., 1994). Specifična regija prosegmenta tvori del prepoznavnega mesta, ki je potreben za modifikacijo z manoza-6-fosfatom (Coulombe in sod., 1996) ter sodeluje pri vezavi na membrano mikrosomov (McIntyre in sod., 1994).

Propeptid je sestavljen iz N-terminalnega globularnega dela, ki ga sestavljajo tri α -vijačnice (aminokislinski preostanki 1 do 75) in linkerja (aminokislinski preostanki 76 do 95), ki povezuje globularni del propeptida s katepsinom L. Aminokislinski preostanki, ki so med katepsini dobro ohranjeni, so ključnega pomena za ohranjanje tridimenzionalne strukture globularnega dela propeptida. Evolucijsko ohranjeni aromatski aminokislinski preostanki 12p, 15p, 19p, 23p, 35p in alifatski 60p tvorijo hidrofobne interakcije med α -vijačnicama $\alpha 1p$ in $\alpha 2p$. Stabilno strukturo propeptida poleg hidrofobnih interakcij ohranjajo tudi solni mostički znotraj propeptida in hidrofobne interakcije α -vijačnice $\alpha 3p$ s katepsinom L. C-terminalni del propeptida se v iztegnjeni konformaciji razteza preko reže za vezavo substrata in tako uspešno inhibira encimsko aktivnost katepsina L. Usmerjenosti prosegmenta in substrata v reži za vezavo substrata sta si nasprotni (Coulombe in sod., 1996). Vezavo propeptida v režo aktivnega mesta encima posnema tudi široko uporabljeni inhibitor E-64.

Po avtokatalitski cepitvi in ločitvi proregije, ki poteče v kislem okolju, se encim aktivira (Mason in sod., 1985). Prisotnost polianionov, kot je dekstran sulfat, močno pospešijo procesiranje katepsina L in bi lahko pri aktivaciji katepsina L *in vivo* nakazovali na pomembnost interakcij med katepsinom L in komponentami membrane (Coulombe, 1996).

2.3.2 Fiziološke funkcije katepsina L

Poleg razgradnje proteinov znotraj lizosomov ima katepsin L tudi bolj specifične funkcije, ki so pomembne za ohranjanje homeostaze organizmov.

Spira in sodelavci so pokazali, da je ključen pri ohranjanju homeostaze v srčnih celicah (Spira in sod., 2007). Pomembno vlogo ima tudi pri ohranjanju normalne funkcije kože in lasnih mešičkov (Tobin in sod., 2002). Mišji modeli z izbitim genom za katepsin L so kazali znake epidermalne hiperplazije, ki se je razvila kot posledica hiperproliferacije bazalnih keranocitov. V odsotnosti epidermalnega rastnega faktorja (EGF) so keranociti divjega tipa (ctsl+/+) in keranociti z izbitim genom za katepsin L (ctsl-/-) množili podobno hitro. V prisotnosti EGF so keranociti ctsl-/- proliferirali hitreje. Internalizacija in razgradnja radioaktivno označenega EGF je bila v obeh primerih podobna. Vzrok za hitrejšo proliferacijo keranocitov ctsl-/- je povečano recikliranje EGF in njegovega

receptorja na površino celic, ter aktivacija signalne kaskade, ki sproža proliferacijo celic (Reinheckel, 2005).

Nevropeptidi so ključni prenašalci informacij v živčnem sistemu. Poznavanje njihove sinteze je zelo pomembno za razumevanje interakcij med nevronskimi celicami in peptidnimi hormoni ter načinom delovanja slednjih. Proteolitična aktivnost številnih encimov je nepogrešljiva pri biosintezi esencialnih peptidnih nevrotransmitorjev in hormonov. Za pretvorbo pronevropeptidov v nevropeptide v sekretornih veziklih je odgovoren tudi katepsin L. Razumevanje funkcije katepsina L v metaboli poti sinteze in zorenja nevropeptidov bi v prihodnosti lahko vplivalo na razvoj novih analgetikov in izboljšane nadzora nad debelostjo in metabolizmom (Funkelstein, 2010).

Progenični limfociti B nastajajo v kostnem mozgu, kjer dozori do stopnje nezrelih limfocitov B. Nezreli limfociti B zapustijo kostni mozeg in potujejo v vranico, kjer se razvijejo v zrele naivne limfocite B. Ob stiku z antigenom, ki se nahaja na antigen predstavitvenih celicah (APC), se naivna celica B aktivira in diferencira v plazmatke ali spominske limfocite B. V proces predstavljanja antigenov na molekulah MHC razreda II na površini APC so vključeni tudi katepsini. Mišji katepsin L ima pomembno vlogo pri predstavitvi antigenov na molekulah MHC razreda II v timusnih celicah. Sodeluje pri razgradnji invariantne verige p41 ter pri procesiranju peptidnih ligandov, ki se v kompleksu z molekulo MHC razreda II predstavijo na površini perifernih timusnih celic. Poskusi na miših z izbitim genom za CTSL so v vranici in timusu pokazali opazno zmanjšan odstotek celic CD4+, ki je posledica okvare v procesu zgodnje pozitivne selekcije timocit CD4+, ter povečan odstotek celic CD8+ tako v timusu kot tudi v limfnih vozlih. V človeškem telesu isto vlogo opravlja katepsin V (Badano in sod., 2013).

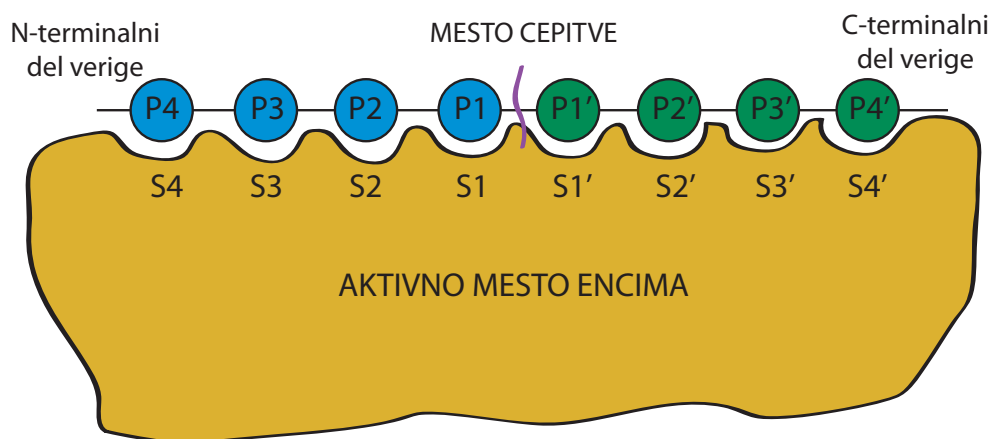
2.3.3 Inhibitorji cisteinskih katepsinov

Glavni regulatorji aktivnosti cisteinskih katepsinov so endogeni proteinski inhibitorji. So kompetitivni in reverzibilni inhibitorji in s svojim delovanjem preprečujejo vezavo substrata v režo aktivnega mesta. Delimo jih na cistatine, tiropine in serpine. Cistatini se glede na podobnost aminokislinskega zaporedja delijo na znotrajcelične stefine in zunajcelične cistatine in kininogene (Turk in sod., 2002). V primeru sproščanja proteaz iz lizosomov in ob vdorih patogenov v telo, kadar le-ti vstopajo s pomočjo cisteinskih proteaz, endogeni inhibitorji preprečujejo nekontrolirano protelizo (Stoka in sod., 2005). Poleg cistatinov so med pomembnejšimi inhibitorji katepsinov še tiropini (Turk in sod., 2002). Med tiropine vključujemo p41 fragment invariantne verige molekul MHC razreda II, ki je v primerjavi s cistatini selektivni inhibitor in inhibira katepsina L (Gunčar in sod., 1999). Serpini so inhibitorji serinskih proteaz, vendar je znano tudi njihovo inhibitorno delovanje na nekatere cisteinske katepsine (Turk in sod., 2002).

Odkritje inhibitorja E-64, (L-trans-epoksisukcinil-levcilamido(4-gvanidino)butana, je bilo zelo pomembno za preučevanje vloge cisteinskih katepsinov. Prvič so ga izolirali iz ekstrakta glive *Aspergillus japonicus* TPR-64 (Hanada in sod., 1978). Molekula selektivno alkilira katalitične cisteine v papainu podobnih proteazah v stehiometričnem razmerju 1:1. Edini predstavnik katepsinske družine, čigar aktivnost se ob prisotnosti E-64 ne zmanjša znatno je katepsin C. E-64, kot tudi njegova različica, ki lahko prehaja skozi celično membrano, E-64d, sta izrednega pomena za razumevanje funkcije in lastnosti cisteinskih katepsinov in se uporabljata za merjenje aktivnosti cisteinskih katepsinov v celičnih lizatih, celičnih kulturah, kot tudi modelnih laboratorijskih organizmih (Turk in sod., 2012).

2.3.4 Sestava aktivnega mesta

Substrat se veže na vezavna mesta v reži aktivnega mesta encima. Hidroliza peptidne vezi v substratu poteče med aminokislinskima preostankoma, ki ju označujemo s P1 in P1'. Mestu P1 v smeri N-terminalnega dela sledijo mesta P2, P3 in P4, v smeri C-terminalnega dela verige pa mesti P2' in P3'. Pripadajoča vezavna mesta v aktivnem mestu encima, ki so v stiku s substratom pa označujemo s simboli S4, S3, S2, S1, S1', S2' in S3'. Shema Schechter-Bergerjeve nomenklature je povzeta na sliki 3. Za določanje substratne specifičnosti encimov so v substratu najbolj pomembna mesta P2, P1 in P1', ki z encimom tvorijo interakcije preko peptidne ter stranskih verig aminokislin, medtem, ko so mesta S4, S3 in S3' z encimom povezana le s stranskimi verigami, ki ne omogočajo tako močne povezave (Choe in sod., 2006).



Slika 3: Interakcija substrata in encima v aktivnem mestu (Schechter in sod., 1967)

2.4 RAK

Rak je bolezen, ki nastane kot posledica dednih ali pridobljenih sprememb dednine v telesnih ali spolnih celicah posameznika. Gre za kopičenje genetskih in epigenetskih sprememb v celicah, ki vplivajo na povečano izražanje onkogenov in zmanjšano izražanje tumor supresorskih genov. Vsem spremembam je skupno, da se zmanjša zmožnost popravljanja poškodb molekule DNK, zniža nivo apoptoze, ter poveča nenadzorovano deljenje celic. Kot posledici nepovratnih sprememb se pojavljata tudi vraščanje spremenjenega tkiva v sosednja ali celo metastaziranje rakavih celic v druge organe bolnikovega telesa (Lankelma in sod., 2010). Od nastanka prvih spremenjenih celic, pa do večjih sprememb, npr. tumorjev, ki jih je moč zaznati, lahko mine tudi več let. Od razvojnega časa pa so odvisne tudi možnosti za okrevanje po bolezni. V rakavo celico se lahko spremeni katerakoli celica v telesu, glede na tip tkiva, v katerem se bolezen pojavi pa jih delimo na karcinome, sarkome, levkemije ter limfome (Zadnik in sod., 2013).

Po podatkih Registra raka Republike Slovenije je bilo konec leta 2009 v Sloveniji za rakom obolelih nekaj več kot 32 tisoč moških in skoraj 45 tisoč žensk. Tako kot v ostalih državah razvitega sveta, kjer je smrt za posledicami raka na 2. mestu, se bolezen tudi pri nas najpogosteje razvije na koži, prsih, prostati ter črevesju (Health..., 2012; Hoyert in sod., 2012; Zadnik in sod., 2013).

2.4.1 Razvoj raka in vloga katepsina L

Za zdravo tkivo je značilno uravnoteženo razmerje med nivojem celičnih delitev in programirano celično smrtjo, apoptozo. V rakastih tkivih, kjer je število delitev povečano, apoptoza pa odsotna, je omenjeno ravnotežje porušeno. Ko tumor doseže določeno velikost, za preživetje potrebuje povečan dotok hranil, za kar je potreben nastanek novih žil. V primeru nižjega izražanja signalnih molekul za pritrditev na celice ali matriks se poveča verjetnost invazije ali migracije celic v druga tkiva, saj celice izgubijo stik s svojim mikrookoljem. Posledica omenjenih procesov je lahko nastanek metastaz, ki so poglavitni vzrok za smrt pri bolnikih z rakom (Lankelma in sod., 2010).

Več raziskav je pokazalo, da je nivo izražanja katepsina L povišan pri raku prsi, pljučnem raku, raku želodca in črevesja, ter pri karcinomih glave in vratu, melanomih in gliomih. Obstaja povezava med povišano vrednostjo katepsina L v celicah in stopnjo malignosti le-teh. Ker izražanje katepsina L v zdravih celicah ostaja nespremenjeno, bi tarčno ciljanje katepsina L lahko predstavljalo priložnost za ciljano zdravljenje malignih celic (Lankelma in sod., 2010).

V razvoj malignih tumorjev so vključeni vsaj štirje procesi: prekomerno namnoževanje celic zaradi zmanjšane apoptoze, angiogeneza, invazija in migracija celic. Povezava med vlogo katepsina L pri procesu apoptoze in angiogeneze še ni povsem

razjasnjena. Vpogled v vlogo katepsina L je otežen tudi zaradi številnih nasprotujočih si študij. Potrebne bodo številne nadaljnje raziskave, ki bodo razkrile povezavo med katepsinom L in apoptozo ter vlogo katepsina L pri procesu angiogeneze. Vloga katepsina L pri invaziji in migraciji celic je bolj razjasnjena (Lankelma in sod., 2010).

E-kadherin je adhezijski protein zunajceličnega matriksa, ki celice povezuje med saboj. Koncentracija katepsina L v okolici rakastih celic je povečana, struktura zunajceličnega matriksa pa uničena, za kar lahko del odgovornosti pripišemo ravno cepitvi E-kadherina s pomočjo katepsina L. Teoretično bi lahko inhibicija katepsina L v tumorskem mikrookolju pozitivno vplivala na zmanjšanje nastajanja tumorskih metastaz, saj bi se zaradi zmanjšane razgradnje zunajceličnega matriksa močno zmanjšal migracijski potencial tumorskih celic v okoliška tkiva (Goncheva in sod., 2006).

2.5 SISTEM ZA IZRAŽANJE PROTEINOV

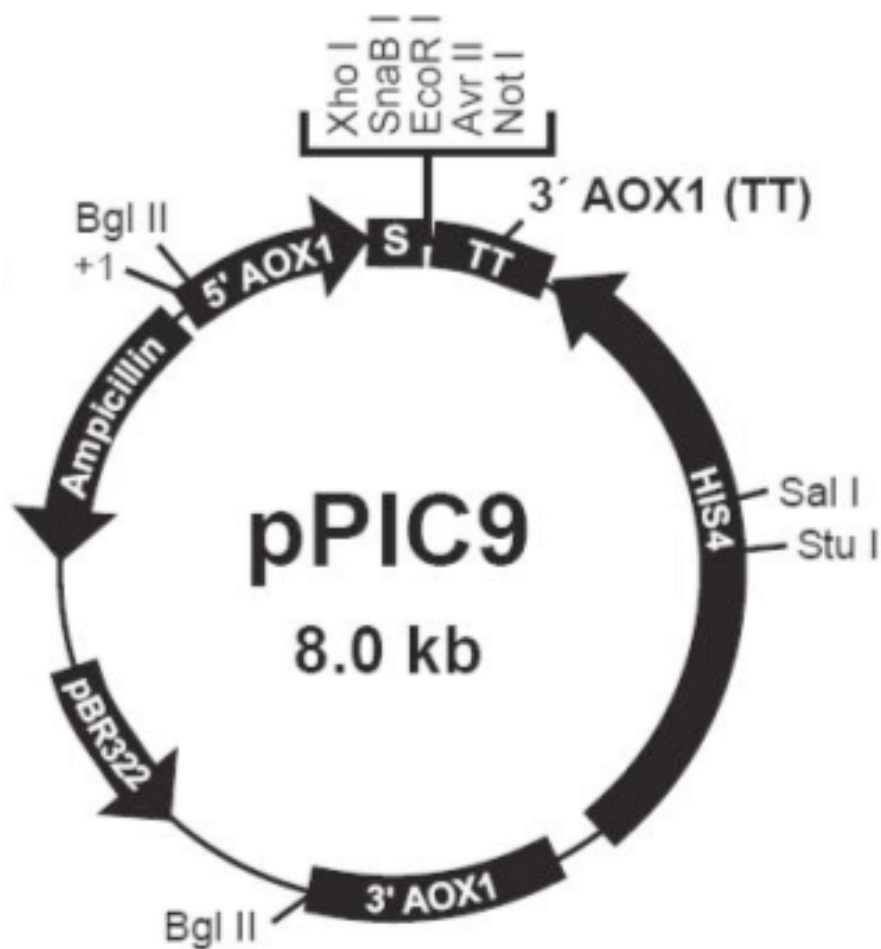
Kvasovka *Pichia pastoris* je eden izmed uveljavljenih sistemov za izražanje heterolognih proteinov (Cregg in sod., 1985). Rokovanje s kvasovkami je enako preprosto kot delo z bakterijskimi kulturami, hkrati pa kvasovke opravljajo tudi kompleksne posttranslacijske modifikacije, ki so značilne za višje evkarionte. Heterologne proteine lahko izražamo tudi s celičnimi kulturami višjih sesalcev ali insektov, vendar je delo s kvasovkami cenejše, preprostejše in hitrejšo. S kvasovko *Pichia pastoris* lahko proteine izražamo v celici ali izven nje. Kvasovka med gojenjem v gojišče izloča zelo majhne količine endogenih proteinov in je zato primerna za izražanje heterolognih proteinov, ki ob izločanju v gojišče ohranijo svojo nativno obliko. Možnost izločanja proteinov v gojišče poenostavi nadaljnje čiščenje rekombinantnih proteinov in je zaradi prihranka časa in denarja zelo zaželena oblika izražanja rekombinantnih proteinov (Higgins in sod., 1998). Dodatno prednost predstavlja tudi velika sorodnost z modelnim organizmom *Saccharomyces cerevisiae* za katerega je bilo razvitih mnogo orodij za genetske modifikacije in se prav tako lahko uporabljajo pri delu s *Pichia pastoris* (Cregg in sod., 2000).

2.5.1 Sistem za izražanje proteinov *Pichia pastoris*

Pichia pastoris je metilotrofna kvasovka, ki lahko kot edini vir ogljika uporablja metanol. Prvi korak v metabolizmu metanola je njegova oksidacija v formaldehid in vodikov peroksid, pri čemer sodeluje encim alkoholna oksidaza. Slabost alkoholne oksidaze je, da ima slabo afiniteto do elementarnega kisika, ki je potreben za potek reakcije. Na slabo učinkovitost encima so se metilotrofne kvasovke prilagodile s sintezo velikih količin alkoholne oksidaze, za kar je odgovoren močan promotor AOX, ki se nahaja pred genskim zapisom za alkoholno oksidazo (Cregg in sod., 2000). Alkoholna oksidaza nastaja s prepisom dveh visoko homolognih genov, AOX1 in AOX2. Za izražanje večine alkoholne oksidaze v celici je odgovoren gen AOX1. Izražanje gena AOX1 je na nivoju prepisa

regulirano z dvostopenjskim procesom. Glukoza je represor in kljub prisotnosti induktorja, metanola zavira prepis. Zato je za optimalno metanolno indukcijo zaželena predhodna rast kvasovk v gojišču, ki vsebuje glicerol, ki ima vlogo depresorja, vendar sam, v odsotnosti metanola, ne zadošča za indukcijo genov *aox1* (Cregg in sod., 2000).

Vektorji za izražanje heterolognih proteinov v *P. pastoris* so si med seboj zelo podobni in vsebujejo regulatorne elemente, ki izhajajo iz *P. pastoris*. Kaseta za izražanje tujega gena v vektorju pPIC9 (slika 4) je sestavljena iz promotorja gena AOX1, ki mu sledi polilinkersko mesto (MCS), ki vsebuje specifična prepoznavna zaporedja za restriksijske endonukleaze *Xho I*, *SnaB I*, *EcoR I*, *Avr II* in *Not I*, preko katerih lahko v vektor vstavimo želeni insert. Polilinkerju sledi terminator transkripcije in je odgovoren za učinkovito procesiranje 3' konca in poliadenilacijo mRNA. Seleksijski marker, ki omogoča selekcijo kvasovk *P. pastoris*, ki so sprejele vektor za izražanje z želenim insertom, je gen HIS4, ki nosi zapis za histidinolno dehidrogenazo. Histidinolna dehidrogenaza je ključni encim biosintezne poti histidina. Kvasovke brez histidinolne dehidrogenaze lahko rastejo na kompleksnem gojišču, za rast na minimalnem gojišču pa je potreben dodatek histidina. Pogoj za delovanje selekcijskega sistema je gostitelj z okvarjenim genom za histidinolno dehidrogenazo. Uspešna integracija genov s plazmida omogoča prepis gena HIS4, s čemer je premagana pomanjkljivost gostitelja. Da pridejo lastnosti selekcijskega sistema do izraza, se kvasovke po transformaciji nacepi na minimalno gojišče. AOX1 3' robna zaporedja usmerjajo integracijo plazmida. Kloniranje, amplifikacija in vzdrževanje plazmida potekajo v bakteriji *E.coli*, zato se na plazmidu nahajata tudi gen za ampicilinsko rezistenco in mesto začetka podvojevanja pBR32 (Cregg, 1985).



Slika 4: Struktura vektorja pPIC9 (*Pichia*..., 2002)

Xho I, SnaB I, EcoR I, Avr II, Not I, Sal I, Stu I, Bgl III – specifična prepoznavna zaporedja za cepitev z restikcijskimi endonukleazami; Ampicillin – gen za rezistenco na ampicilin; 5'AOX1, 3AOX1 – robna zaporedja gena AOX1; TT – terminator transkripcije; HIS4 – gen, ki nosi zapis za alkoholno dehidrogenazo; pBR32 – mesto začetka podvojevanja za rast v bakterijski celici.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijska oprema

3.1.1.1 Potrošni material

Za izvedbo poskusa smo uporabili potrošni material (preglednica 1) in laboratorijsko steklovino (preglednica 2).

Preglednica 1: Seznam potrošnih pripomočkov

Pripomoček	Proizvajalec
Aluminijasta folija	
Avtomatske pipete	Eppendorf, Nemčija
Centrifugalni filter Amicon® Ultra-4	Milipore, ZDA
Črna mikrotiterska plošča s 96 luknjami	Costar, ZDA
Dializno črevo	Serva, Nemčija
Elektroporacijska kiveta	
Film	Kodak, ZDA
Filtni papir	
Glavniček za pripravo AGE gelov	Bio-Rad, ZDA
Kadička za agarozno gelsko elektroforezo	Owl Scientific INC., ZDA
Kadička za NaDS-PAGE elektroforezo	Bio-Rad, ZDA
Mikrocentrifugirke 1,5 ml	Costar, ZDA
Mikrocentrifugirke 2,0 ml	Costar, ZDA
Nastavki za pipete	Eppendorf, Nemčija
Nitrocelulozna membrana	Serva, Nemčija
Papirnate brisače	
Plastična komora za označevanje z Ab	
Polistirenske petrijevke, 10 cm	TRP, Švica
Stojalo za vlivanje NaDS gelov	Bio-Rad, ZDA
Svetlobna kaseta Hypercassette	Amersham Biosciences, Velika Britanija

Preglednica 2: Seznam laboratorijske steklovine

Steklovina	Volumen
Epruvete	10 ml, 20 ml
Čaše	50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml
Steklene petrijevke	150 x 25 mm
Stekleni nastavki za pipete	5 ml, 10 ml
Steklenice	1000 ml
Stresalne erlenmajerice	300 ml, 2000 ml
Erlenmajerice	100 ml, 300 ml, 500 ml, 1000 ml

3.1.1.2 Naprave

Določene dele poizkusov smo izvedli s pomočjo avtomatiziranih laboratorijskih naprav (preglednica 3).

Preglednica 3: Seznam laboratorijskih naprav

Naprava	Proizvajalec
Centrifuga 5804 R	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga Centric 200 R	Tehtnica Železniki, Slovenija
Centrifuga Sorvall™ RC 6 Plus	Thermo Scientific, ZDA
Centrifugalni evaporator Concentrator 5301	Eppendorf, Nemčija
Elektroporator Gene Pulser II	Bio-Rad, ZDA
Fluorimeter Safire	Tecan, Švica
FPLC naprava	
Hladilnik	Electrolux
Inkubator	WTB Binder, Nemčija
Izvor električne napetosti PowerPac™ Basic	Bio-Rad, ZDA
Laboratorijska tehtnica PC 2000	Mettler Toledo, ZDA
Magnetno mešalo Rotamix S 10	Tehtnica Železniki, Slovenija
Mikrovalovna pečica	Sharp, Japonska
Mini centrifuga MC6	Sarstedt, Nemčija
Orbitalni stresalnik Vibromix 40	Tehtnica Železniki, Slovenija
PCR naprava	Perkin Elmer, ZDA
Peristaltična črpalka	
pH meter SevenEasy	Mettler Toledo, ZDA
Razvijalec fotografskih filmov	Konica-Minolta, Japonska
Spektrometer NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific, ZDA
Stresalnik	Tehtnica Železniki, Slovenija
UV luč, UV Transilluminator	UVP, ZDA
Vrtinčnik Labdancer	IKA, Nemčija
WT aparatura	Biometra, Nemčija
Zmrzovalna omara – 20 °C	JKS Refrigeration, Italija
Zmrzovalna skrinja – 80 °C	JKS Refrigeration, Italija

3.1.2 Organizmi

Za izražanje rekombinantnega humanega katepsina L smo uporabili organizem *Pichia pastoris*, sev GS115.

3.1.3 Encimi, plazmidi in protitelesa

Linearizacijo vektorja smo opravili s pomočjo restrikcijske endonukleaze Sac I.

Genski zapis za heterologno izražanje humanega proteina smo v kvasovko *Pichia pastoris* vnesli s pomočju plazmida pPIC9 z insertom za prokatepsin L.

Za imunološko detekcijo s tehniko prenosa Western smo potrebovali zajčja protitelesa proti katepsinu L (primarno protitelo) in kozja anti-zajčja protitelesa IgG (sekundarno protitelo).

3.1.4 Delo s kvasovkami *Pichia pastoris*

3.1.4.1 Založne raztopine za pripravo gojišč

Amonijev sulfat in YNB (preglednica 4) smo s pomočjo magnetnega mešala raztopili v vodi in avtoklavirali. Raztopino smo shranili na 4 °C.

Preglednica 4: 10X YNB (13,4 % Kvasna dušikova osnova brez amonijevega sulfata in aminokislin)

Sestavina	Količina	Proizvajalec
YNB (brez AK in amonijevega sulfata)	34 g	Merck, Nemčija
Amonijev sulfat	100 g	Merck, Nemčija
dH ₂ O	1000 ml	

Biotin (preglednica 5) smo s pomočjo magnetnega mešala raztopili v vodi in sterilno filtrirali in raztopino shranili na 4 °C.

Preglednica 5: 500X Biotin (0,02 % Biotin)

Sestavina	Količina	Proizvajalec
Biotin	20 mg	Sigma, ZDA
dH ₂ O	100 ml	

Glukozo (preglednica 6) smo s pomočjo magnetnega mešala raztopili v vodi in sterilno filtrirali. Pred nadaljnjo uporabo smo raztopino shranili na sobni temperaturi.

Preglednica 6: 10X Dekstroza (20 % Dekstroza)

Sestavina	Količina	Proizvajalec
Dekstroza	200 g	Sigma, ZDA
dH ₂ O	1000 ml	

Metanol (preglednica 7) smo raztopili v vodi in raztopino shranili na 4 °C.

Preglednica 7: 10X Metanol (5 % Metanol)

Sestavina	Količina	Proizvajalec
Metanol	5 ml	Sigma, ZDA
dH ₂ O	95 ml	

Glicerol (preglednica 8) smo s pomočjo magnetnega mešala raztopili v vodi in avtoklavirali. Pred nadaljnjo uporabo smo raztopino shranili na sobni temperaturi.

Preglednica 8: 10X Glicerol (10 % Glicerol)

Sestavina	Količina	Proizvajalec
Glicerol	100 ml	Carlo Erba, Italija
dH ₂ O	900 ml	

K₂HPO₄ in H₂PO₄ (preglednica 9) smo raztopili v vodi in umerili pH na 6,0. Raztopino smo avtoklavirali in shranili na sobni temperaturi.

Preglednica 9: 1M Kalijev fosfat pufer, pH 6,0

Sestavina	Količina	Proizvajalec
1M K ₂ HPO ₄	23 g	Serva, Nemčija
1M KH ₂ PO ₄	118 g	Serva, Nemčija
dH ₂ O	1000 ml	

3.1.4.2 Gojišča

Gojišči BMGY (preglednica 10) in BMMY (preglednica 11) smo pripravili tako, da smo s pomočjo magnetnega mešala v vodi raztopili kvasni ekstrakt in pepton ter raztopini avtoklavirali. V ohlajeni raztopini smo dodali preostale sestavine in ju do uporabe shranili na 4°C.

Preglednica 10: BMGY

Sestavina	Količina	Proizvajalec
Kvasni ekstrakt	10 g	Merck, Nemčija
Pepton	20 g	Merck, Nemčija
1 M Kalijev fosfat, pH 6,0	100 ml	Merck, Nemčija
YNB	100 ml	Formedium, VB
500X Biotin	2 ml	Sigma, ZDA
10X Glicerol	100 ml	Carlo Erba, Italija
dH ₂ O	700 ml	

Preglednica 11: BMMY

Sestavina	Količina	Proizvajalec
Kvasni ekstrakt	10 g	Merck, Nemčija
Pepton	20 g	Merck, Nemčija
1M kalijev fosfat, pH 6,0	100 ml	Merck, Nemčija
10X YNB	100 ml	Formedium, VB
500 x Biotin	2 ml	Sigma, ZDA
10 X Metanol	100 ml	Sigma, ZDA
dH ₂ O	700 ml	

Za pripravo plošč MD smo, s pomočjo magnetnega mešala, YNB in agar (preglednica 12) najprej zmešali z vodo, nato pa raztopino avtoklavirali. V raztopino, ohlajeno na približno

40 °C, smo dodali ostale sestavine, zmešali in vlili plošče. Do uporabe smo jih shranili na 4 °C.

Preglednica 12: Plošče MD

Sestavina	Količina	Proizvajalec
10X YNB	100 ml	Formedium, VB
500X Biotin	2 ml	Sigma, ZDA
10X Dekstroza	100 ml	Sigma, ZDA
dH ₂ O	800 ml	
Agaroza	15 g	Sigma, ZDA

Kvasni ekstrakt in pepton (preglednica 13) smo s pomočjo magnetnega mešala raztopili v vodi in raztopino avtoklavirali. V ohlajeno raztopino smo dodali dekstrozo. Gojišče smo do uporabe hranili na 4 °C.

Preglednica 13: YPD plošče

Sestavina	Količina	Proizvajalec
Kvasni ekstrakt	10 g	Merck, Nemčija
Pepton	20 g	Merck, Nemčija
10X Dekstroza	100 ml	Sigma, ZDA
dH ₂ O	900 ml	

3.1.5 Pufri in raztopine

Preglednica 14 prikazuje pufre in raztopine, ki smo jih uporabili pri rokovanju s heterolognimi proteini.

Preglednica 14: Seznam pufrov in raztopin

Ime	Sestava
AGE nanašalni pufer	0,09 % (m/v) bromfenol modro, 60 % (m/v) glicerol, 60 mM EDTA, 0,09 % (m/v) ksilen cianol FF
Aktivacijski pufer	20 mM NaOAc, 3 mM EDTA; pH 5,5; 5 mM DTT
Blokirna raztopina	5 % (m/v) mleko v prahu, TBS
Elucijski pufer	30 mM Tris, pH 7,5; 0,4 M NaOH, 0,3 M imidazol
NaDS-PAGE elektroforetski pufer	1 % NaDS, 192 mM glicin, 2 mM Tris
NaDS-PAGE koncentracijski gel 4 %	1,8 ml akrilamid, 2,5 ml 0,5 M Tris/HCl, 3,65 ml dH ₂ O, 100 µl 10 % NaDS, 15 µl TEMED, 30 µl APS
NaDS-PAGE ločevalni gel 12,5 %	0,6 ml akrilamid, 1,2 ml 1,5 M Tris/HCl, 3,075 ml dH ₂ O, 50 µl 10 % NaDS, 7,5 µl TEMED, 15 µl APS
NaDS-PAGE nanašalni pufer	NaDS, 125 mM Tris, 1% (m/v) bromfenol modro, 40 % (m/v) glicerol, 2 % (m/v), 200 mM DTT
Pufer za prenos western (WT)	8 mM glicin, 20 % (v/v) metanol, 0,037 % (m/v) NaDS, 25 mM Tris
Pufer za razbarvanje gelov	7 % (v/v) AcOH, 30 % (v/v) EtOH
Raztopina barvila Coomassie brilliant blue	7 % (v/v) AcOH, 30 % (v/v) EtOH, 0,025 % (m/v) CBB R250;
Reakcijski pufer	0,1 M NaOAc, 1 mM EDTA, pH 5,5; 5 mM DTT
TAE pufer	40 mM Tris acetat, pH 8,0; 1 mM EDTA
TBS pufer	50 mM Tris, pH 7,6; 150 mM NaCl
Vezavni pufer	30 mM Tris, pH 7,5; 0,4 M NaOH, 10 mM imidazol

3.1.6 Ostale kemikalije

V preglednici 15 so prikazane ostale kemikalije, ki smo jih uporabili v našem poskusu.

Preglednica 15: Seznam ostalih kemikalij

Kemikalija	Proizvajalec
Aceton	Carlo Erba, Italija
Agaroz	Serva, ZDA
APS	Serva, Nemčija
BSA	
Butanol	Carlo Erba, Italija
DMSO	Merck, Nemčija
dNTP	Thermoscientific, ZDA
DTT	Sigma, ZDA
E-64	Peptide Research Institute, Japonska
MgCl ₂	Serva, Nemčija
MSDS	
Ocetna kislina	Sigma, Nemčija
Sorbitol	Carlo Erba, Italija
TCA	Serva, Nemčija
Tris/HCl	Serva, Nemčija
Z-Phe-Arg-AMC	

3.1.7 Komercialni kiti in reagenti

V preglednici 16 so prikazani komercialno dostopni kiti in reagenti, ki smo jih uporabili tekom poskusa.

Preglednica 16: Seznam komercialnih reagentov in kitov

Komercialni reagenti	Proizvajalec
DNA velikostni standard	MBI Fermentas, Latvija
Taq DNA polimeraza in pufer	Promega, ZDA
Proteinski velikostni standard	MBI Fermentas, Latvija
Kemoluminiscentni reagent	
Peptidne knjižnice	

3.1.8 Računalniški programi

Za analizo podatkov iz poskusov in prikaz rezultatov smo uporabili računalniške programe iz preglednice 17.

Preglednica 17: Seznam računalniških programov

Program	Proizvajalec
Paket Microsoft Office	Microsoft Office
Prism Graph Pad	

3.2 METODE

3.2.1 Linearizacija plazmidne DNA

Pomemben pristop k uspešni transformaciji je linearizacija vektorja. Za linearizacijo vektorja pPIC9-prokatepsin L in uspešno homologno rekombinacijo na mesto AOX1 v genom kvasovke *P. pastoris* smo uporabili restrikcijsko endonukleazo Sac I. Linearna oblika DNA stimulira rekombinacijo in omogoča stabilno vključitev želenih genov v genom kvasovke. Nastanejo His⁺Mut⁺ mutanti.

Za restrikcijo plazmida smo pripravili mešanico, prikazano v preglednici 18.

Preglednica 18: Sestava mešanice za restrikcijo vektorja pPIC9-prokatepsin L

Komponenta	Volumen [μl]
Vektor pPIC9	100
Reakcijski pufer za Sac I	14
BSA (100 mg/ml)	1,4
dH ₂ O	14,6
Sac I	10
Skupni volumen	140

Za potek restrikcije smo mešanico pustili čez noč na 37 °C, nato smo linearizirano plazmidno DNA koncentrirali s centrifugalnim evaporatorjem. Uspešnost linearizacije smo preverjali z agarozno gelsko elektroforezo.

3.2.2 Elektroporacija *P. pastoris*

Elektroporacija je metoda, ki z uporabo napetostnih električnih pulzov omogoča vnos tujega materiala v celice. Za izvedbo elektroporacije smo sledili protokolu proizvajalca kompleta za transformacijo kvasovk (*Pichia*..., 2002):

1. Kvasovke *Pichia Pastoris* smo inokulirali v 5 ml gojišča YPD in jih preko noči stresali na 220 obr./min in 30 °C.
2. 0,5 ml prekonočne kulture iz koraka 1 smo inokulirali v stresalno erlenmajerico s 500 ml svežega gojišča YPD in jih gojili čez noč, da je kultura dosegla OD₆₀₀ = 1,3 - 1,6.
3. Vsebinske stresalne erlenmajerice smo centrifugirali pri 1500 × g in temperaturi 4 °C. Pelet smo resuspendirali v 500 ml sterilne hladne vode.
4. Ponovili smo centrifugiranje iz koraka 3 in pelet resuspendirali v 150 ml sterilne hladne vode.

5. Kvasovke smo centrifugirali pri $1500 \times g$ in temperaturi $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ponovili smo centrifugiranje iz koraka 3 in pelet resuspendirali v 20 ml ledeno hladnega 1 M sorbitola.
6. Ponovili smo centrifugiranje iz koraka 3 in pelet resuspendirali v 1 ml ledeno hladnega 1 M sorbitola, do končnega volumna približno 1,5 ml.
7. Pripravili smo 2 alikvota po 200 μl celic in jima dodali 20 μl predpripravljene linearizirane DNA. Mešanici smo prenesli v ledeno hladni 0,2 cm elektroporacijski kivet.
8. Elektroporacijski kivet smo 5 min inkubirali na ledu.
9. Za elektroporacijo smo uporabili napravo Invitrogen Electroporator II in parametre prikazane v preglednici 19.
10. Takoj po poteku elektroporacije smo v kiveto dodali 1 ml ledeno hladnega 1 M sorbitola. Vsebino kivete smo prenesli v sterilno mikrocetrifugirko.
11. Alikvota po 50 μl , 150 μl in 300 μl smo nanegli na MD plošče.
12. Plošče smo inkubirali pri $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ dokler se na ploščah niso pojavile kolonije kvasovk.
13. Izbrali smo 10 lepo raslih kolonij in jih analizirali z verižno reakcijo s polimerazo (PCR).

Preglednica 19: Parametri elektroporacije

Parameter	Količina
Napetost nabijanja	1500 V
Kapacitanca	50 μF
Upornost	200 Ω

3.2.3 Verižna reakcija s polimerazo na osnovi kolonije

Z analizo z verižno reakcijo s polimerazo na osnovi kolonije (cPCR) smo preverili uspešnost integracije želenega inserta v kvasni genom.

Naredili smo reakcijo PCR, pri kateri smo iz plošče MD prenesli nekaj kvasnih celic iz posamičnih kolonij direktno v reakcijsko mešanico za PCR. Za potrebe reakcije smo pripravili mešanico, prikazano v preglednici 20.

Preglednica 20: Sestava mešanice za analizo PCR na osnovi kolonije

Komponenta	Volumen [μl]
dNTP (2,5 nM)	1,25
Začetni oligonukleotid AOX5'	0,25
Začetni oligonukleotid AOX3'	0,25
PCR pufer	2,5
MgCl ₂	1,5
dH ₂ O	16,6
Taq polimeraza	0,15
Skupni volumen reakcijske mešanice	22,5

Sekvenci uporabljenih začetnih oligonukleotidov sta bili sledeči:

AOX5': 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'

AOX3': 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

Vzorci smo vstavili v PCR napravo in nastavili na program, prikazan v preglednici 21.

Preglednica 21: Pogoji PCR reakcije

Temperatura [°C]	Čas [min]	Št. ciklov
94	3	1
94	0,5	30
5	0,5	
72	1	
72	7	1

3.2.4 Agarozna gelska elektroforeza

Po končani PCR reakciji smo vzorce analizirali z agarozno gelsko elektroforezo (AGE). Na podlagi rezultatov smo izbrali kolonije za nadaljnje delo.

1.) Priprava 0,8 % agaroznega gela

V erlenmajerico smo zatehtali 1 g agaroze in nato dolili še 120 ml 1 × TAE pufru z barvilom SYBR Safe. Erlenmajerico smo v mikrovalovni pečici segrevali, dokler se agaroz ni povsem raztopila. Pripravili smo kadičko za agarozno gelsko elektroforezo in vanjo vlili nekoliko ohlajen gel. V gel smo vstavili glavniček z 20 žepki in počakali, da se je gel ohladil in polimeriziral.

2.) Izvedba AGE

Iz gela smo odstranili glavniček in v kadičko do oznake nalili $1 \times$ TAE pufer. V luknjice smo nanegli DNA standard in vzorce. AGE je potekala pri konstantni električni napetosti 100 V, okoli 45 min.

3.) Analiza

Gel smo analizirali pod UV lučjo. SYBR Safe barvilo se vgrajuje med bazne pare. Po obsevanju z ultravijolično svetlobo (UV) SYBR Safe oddaja zeleno svetlobo z valovno dolžino 525 nm in nam omogoča detekcijo DNA.

3.2.5 Poskusno izražanje katepsina L

S poskusnim izražanjem v majhnem obsegu analiziramo več kvasnih kolonij hkrati. Po končanem postopku izražanja rekombinantnih proteinov je sledila analiza vzorcev in izbira kvasnega klona z najvišjo količino izraženega človeškega katepsina L.

Postopek:

- 1.) Posamezne kolonije smo inokulirali v 5 ml tekočega gojišča BMGY. Epruvete smo stresali preko noči v stresalniku pri 30 °C in 220 obr./min, da so kvasovke dosegle $OD_{600} = 2 - 6$.
- 2.) Epruvete smo centrifugirali 5 min, na $3000 \times g$ in celice resuspendirali ter jih prenesli v stresalne erlenmajerice z 20 ml svežega medija BMMY.
- 3.) Dodali smo 100 % metanol do končne koncentracije 1 %.
- 4.) Stresalne erlenmajerice smo ob stalnem mešanju inkubirali pri temperaturi 30 °C.
- 5.) V naslednjih dneh smo vsakih 24 ur dodali 100 % metanol do končne koncentracije 1 %.
- 6.) Časovni profil izražanja rekombinantnega katepsina L smo spremljali ob časih 24 h, 48 h, 72 h in 96 h tako, da smo iz stresalne erlenmajerice v 1,5 ml centrifugirko sterilno odpipetirali 1 ml gojišča s celicami. Centrifugirko z vzorcem smo centrifugirali in supernatant prenesli v novo 1,5 ml centrifugirko ter jo do analize shranili pri -20 °C.
- 7.) Najprimernejši klon smo določili s pomočjo poliakrilamidne gelske elektroforeze v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS PAGE).

3.2.6 Poliakrilna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata

1.) Priprava vzorcev pred nanosom na gel

Pred nanosom vzorcev na poliakrilno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS PAGE) smo proteine v supernatantu oborili s trikloroocetno kislino (TCA). 900 µl supernatanta iz poskusnega izražanja smo dodali 99 µl 100 % TCA in na ledu inkubirali 30 min. Vzorce smo nato 10 min centrifugirali pri 4 °C in

10000 × g. Supernatant smo previdno odstranili, pelet pa sprali s 500 µl ledeno hladnega acetona. Sledilo je centrifugiranje vzorcev 3 min, na 10000 × g in 4 °C. Spiranje z acetonom in centrifugiranje vzorcev smo ponovili še enkrat. Odlili smo supernatant in pelete posušili na zraku. Posušenim vzorcem smo dodali 25 µl 1 × NaDS PAGE nanašalnega pufra in pelete na vrtinčniku popolnoma raztopili. Vzorce smo 3 min kuhali v vodni kopeli pri 100 °C.

2.) Priprava gela

Na stojalu smo sestavili stekleni ploščici, ločeni z distančnikom in med njiju vlili 12,5 % ločevalni poliakrilamidni gel. Gel smo prelili z butanolom, da se je gladina gela popolnoma poravnala. Ko se je gel strdil, smo butanol odlili, na osnovni gel pa nanесли še 4,0 % koncentracijski gel ter vanj vstavili glavničke. Stekelce s polimeriziranim gelom smo prenesli v elektroforezno kadičko v katero smo dodali ustrezno količino elektroforeznega pufra, odstranili glavničke in v luknjice nanесли proteinske vzorce in velikostni standard.

3.) Izvedba NaDS-PAGE

Elektroforezno kadičko smo izpostavili električnemu toku 35 mA/gel. Čas ločevanja proteinov v električnem polju smo prilagodili glede na potovanje barvila skozi gel. Ko je le-to doseglo spodnji rob stekelca smo električni tok izklopili in gel barvali v barvalni raztopini Coomassie modro.

4.) Barvanje lis z barvilom Comassie Brilliant Blue

V stekleni petrijevki smo zmešali 30 ml predpripravljenega barvila Comassie Brilliant Blue in 30 ml 20 % očetne kisline. Vzorce smo barvali 20 minut. Nato smo gele začeli spirati s pufrom za razbarvanje. Med razbarvanjem smo razbarvalni pufer večkrat zamenjali. Postopek je potekal toliko časa, dokler niso proteinske lise postale jasno vidne.

3.2.7 Imunološka detekcija s tehniko prenosa Western

Prisotnost katepsina L v vzorcu smo želeli potrditi tudi z imunološko detekcijo. Ker je struktura gela neprimerna za označevanje proteinov s protitelesi, smo ločene proteine s pomočjo električnega toka najprej prenesli na nitrocelulozno membrano. Metodo prenosa proteinov iz elektroforetskega gela na membrano imenujemo tehnika prenosa Western.

Pripravili smo nitrocelulozno membrano in 6 filter papirjev v velikosti NaDS-PAGE gelov. Vse komponente smo pred zlaganjem namočili v pufer za prenos Western ter jih nato zložili po sistemu sendviča - trije filter papirji, gel, nitrocelulozna membrana, trije filter papirji. Zložene komponente smo prenesli v aparaturo za prenos Western s pufrom za

prenos Western. Na aparaturu smo pritrdili pokrov in jo priklopili na vir električne napetosti, kjer je potekal prenos proteinov iz NaDS PAGE gela na nitrocelulozno membrano pri konstantnem električnem toku. Parametri prenosa so prikazani v preglednici 22.

Preglednica 22: Karakteristike prenosa Western

Parameter	Količina
Čas	1,5 h
Električni tok	250 mA

Po končanem prenosu smo aparaturu razdrli in membrano prenesli v blokirno raztopino in jo inkubirali 1 uro na sobni temperaturi, s čemer smo se izognili nespecifični vezavi protiteles na membrano. Po končani inkubaciji v blokirni raztopini smo membrano prenesli v raztopino s primarnimi zajčjimi protitelesi proti katepsinu L, redčenimi v $1 \times$ pufru TBS v razmerju 1:2000. Membrano smo inkubirali čez noč na 4°C . Nato smo membrano spirali trikrat po 15 min v $1 \times$ pufru TBS. Sledila je enourna inkubacija membrane na 37°C v raztopini sekundarnih kozjih anti-zajčjih protiteles IgG, redčenih v $1 \times$ pufru TBS v razmerju 1:5000. Po končani inkubaciji smo membrano ponovno sprali dvakrat po 15 min, z $1 \times$ pufrom TBS.

Pripravili smo kemoluminiscenčni reagent ECL tako, da smo zmešali 1 ml ECL reagenta 1 in 1 ml ECL reagenta 2 ter ga enakomerno razporedili po odcejeni membrani. Po eni minuti smo reagent z membrane odcedili ter jo prestavili v svetlobno kaseto. Delo smo nadaljevali v temnici, kjer smo čez membrano položili na svetlobo občutljiv film. Film smo pustili v kaseti 1-2 min in ga nato razvili.

3.2.8 Preverjanje encimske aktivnosti katepsina L v vzorcih supernatantov

Spremljanje encimske aktivnosti temelji na spreminjanju fluorescence fluorogenih substratov po času pri konstantni temperaturi in koncentraciji encima: $(dF/dt)_{E,T}$. Emisijski spektri necepljenih in cepljenih sintetičnih substratov se med seboj razlikujejo, in sicer tako, da se po cepitvi emisijski spektri fluoroforov prestavijo k daljšim valovnim dolžinam. Naraščajoč fluorescenčni signal pri spremenjenih valovnih dolžinah je sorazmeren s količino cepljenega substrata in se uporablja za preučevanje encimske aktivnosti.

Z-Phe-Arg-AMC je fluorogeni substrat, ki se uporablja za določanje katalitične aktivnosti katepsinov B, K in L ter papaina. Po cepitvi substrata z omenjenimi encimi ima sproščen AMC fluorofor vzbujevalni in emisijski maksimum pri valovnih dolžinah 370 nm in 460 nm.

Supernatante, ki smo jih uporabili za analizo z NaDS PAGE smo uporabili tudi za preverjanje encimske aktivnosti katepsina L. V reakcijski pufer (0,1 M NaOAc, 1 mM EDTA, pH 5,5), smo dodali 1 M reducent DTT do končne 5 mM koncentracije in končnega volumna 90 μ L. Mikrotitersko ploščo smo inkubirali 10 min pri 37 °C. Nato smo k reakcijski mešanici dodali po 10 μ L substrata Z-Phe-Arg-AMC in začeli meriti encimsko aktivnost v fluorimetru za mikrotiterske plošče Safire, Tecan (Švica). Reakcijo smo spremljali 10-15 min pri temperaturi 37 °C. Za izražanje katepsina L v večjem obsegu smo izbrali klon pri katerem smo v supernatantu zaznali največjo encimsko aktivnost rekombinantnega katepsina L.

3.2.9 Izražanje proteina v večjem obsegu

Z izražanje katepsina L v večjem obsegu smo izbrali klon *P. pastoris*, ki je med poskusnim izražanjem rekombinantnega proteina, pokazala najboljše rezultate. Najprej smo pripravili prekonočno kulturo. Izbrano kolonijo smo nacepili v 25 ml tekočega medija BMGY in jo preko noči stresali pri 30 °C. Kultura je po 16-18 urah dosegla $OD_{600} = 2 - 6$.

V 2 l stresalno erlenmajerico s 500 ml tekočega medija BMMY smo inokulirali prekonočno kulturo in jo gojili preko noči pri 30 °C, dokler ni dosegla $OD_{600} = 2 - 6$. Celice iz druge prekonočne kulture smo 5 minut centrifugirali pri $300 \times g$. Celični pelet smo resuspendirali v 60 ml medija BMMY. Le-tega smo razdelili v šest 2-litrskih erlenmajeric, po 10 ml v vsako. V vsako erlenmajerico smo dodali še 300 ml tekočega medija BMMY in pričeli s stresanjem pri 30 °C.

Tri dni smo v razmiku 24 ur dodajali 100 % metanol do končne koncentracije 1 % (w/v).

Po treh dneh indukcije smo vsebino erlenmajeric združili in jo 10 min centrifugirali na $6000 \times g$. Supernatante smo prelili v 1 l steklenice in jih shranili na -20 °C. Celične pelete smo zavrgli.

3.2.10 Čiščenje in aktivacija katepsina L

Supernatant smo očistili s pomočjo nikelj kelatne kromatografije za kar smo uporabili napravo za FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography). Princip ločevanja pri nikelj kelatni kromatografiji je afiniteta molekul, bogatih z elektroni, do niklja. Rekombinantni proteini označeni s histidinom, ki ima visoko afiniteto do niklja, so zato idealne tarče za izločanje iz vzorca z nikelj kelatno kromatografijo, saj se vežejo na Ni^{2+} ione v matriksu. Elucijo s histidinskimi repi označenih molekul dosežemo s spiranjem s pufrom s povišano vsebnostjo imidazola. Imidazol tekmuje za vezavna mesta na Ni^{2+} koloni in iz njih izpodrine označene molekule.

Afinitno kromatografijo smo začeli s spiranjem kolone z vezavnim pufrom (30 mM Tris, pH 7,5; 0,4 M NaOH, 10 mM imidazol). Sledilo je nanašanje supernatanta z rekombinantnim proteinom, za kar smo uporabili peristaltično črpalko. Nadaljevali smo s spiranjem z vezavnim pufrom, s čimer smo se znebili vseh neveznih proteinov. Eluat smo zbirali v frakcijah z volumnom ~ 5 ml in sledili meritvam absorbance, dokler se ni ustalila v bližini izhodiščne in kazala konstantno vrednost. Nato smo začeli s spiranjem z elucijskim pufrom, bogatim z imidazolom (30 mM Tris, pH 7,5; 0,4 M NaOH, 0,3 M imidazol). Frakcije z najvišjo vrednostjo absorbance po spiranju z elucijskim pufrom smo preverili z NaDS PAGE.

Po zaključku kromatografije smo aktivne frakcije združili in jih skoncentrirali na amicon filtru cut off 10. Obenem smo menjali tudi pufer. Rekombinantnim proteinom v novem pufru (20 mM NaOAc, 3 mM EDTA, pH 5,5) smo dodali DTT do končne koncentracije 5 mM in ga 2 uri pustili na sobni temperaturi. Z dodatkom DTT smo dosegli aktivacijo encima, čemur smo sledili z odvzemanjem vzorcev v določenih časovnih intervalih. Vzorce smo nanesti na NaDS-PAGE in preverili potek aktivacije.

Dodali smo inhibitor MSDS.

S spektrometrom Nanodrop smo preverili čistost rekombinantnega encima in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 280 nm. Alikvote po 500 µl smo shranili v zamrzovalniku na -80 °C.

3.2.11 Titracija aktivnih mest

E-64 je inhibitor cisteinskih katepsinov, za katerega je značilna sposobnost hitre inaktivacije encimov. Stehiometrično razmerje med katepsinom L in inhibitorjem E-64 je 1:1.

Za določanje aktivne koncentracije katepsina L smo pripravili različne razredčitve inhibitorja E-64 v razmerjih od 0,1:1 do 2:1 v primerjavi s stalno koncentracijo encima. Končna koncentracija encima v reakcijskem pufru (0,1 M NaOAc, 1 mM EDTA, pH 5,5; 5 mM DTT) je bila 50 nM. Reakcijski pufer smo uporabili tudi za razredčitve inhibitorja E-64. V črne mikrotiterske plošče z 96 luknjicami smo dodali 1 µl substrata Z-Phe-Arg-AMC, katerega končna koncentracija je bila 5 µM. V posebnih luknjicah smo v različnih stehiometričnih razmerjih zmešali encim in inhibitor s končnim volumnom 99 µl. Mikrotitersko ploščo smo inkubirali 10 min na 37 °C, nato smo k substratu dodali zmes encima in inhibitorja in na napravi Safire (Tecan) kontinuirano merili encimsko aktivnost katepsina L. Meritev je potekala 10-15 min pri temperature 37 °C. Podatke smo računalniško obdelali in na diagramu prikazali odvisnosti povprečnih hitrosti cepitve

substrata od množinskih koncentracij encima in inhibitorja, iz katerih smo določili odstotek aktivnosti encima in njegovo aktivno koncentracijo.

3.2.12 Primerjava substratnih specifičnosti človeškega in mišjega katepsina L na pozicijah P4, P3 in P2 s pomočjo kombinatorne tetrapeptidne knjižnice

Substratni specifičnosti človeškega in mišjega katepsina L smo preverili na 101 substratu iz kombinatorne tetrapeptidne fluorogene knjižnice. Celotna knjižnica sestoji iz petih različnih podknjižnic; treh podknjižnic za določanje encimske specifičnosti na poziciji P2, ene podknjižnice za določanje encimske specifičnosti na poziciji P3 in ene podknjižnice za določanje encimske specifičnosti na poziciji P4.

Rekombinantni mišji katepsin L smo dobili od dr. Marka Miheliča. Oba ortologa katepsina L smo aktivirali v reakcijskem pufru (0,1 M NaOAc, 1 mM EDTA, pH 5,5; 5 mM DTT) 10 min na 37 °C. V črne mikrotiterske plošče s 96 luknjicami smo nanegli po 1 µl posameznega peptidnega substrata, s končno koncentracijo 200 nM. V luknjice s substrati smo nato dodali še reakcijski pufer z encimom ter začeli z merjenjem encimske aktivnosti v fluorimetru za mikrotiterske plošče Safire (Tecan). Sintetični substrati v kombinatorni knjižnici vsebujejo ACC (7-amino-4-karbamoilmetilkumarin) fluorofor, ki po cepitvi pri vzbujanju pri valovni dolžini 355 nm emitirajo fluorescenčni signal pri 460 nm. Meritev je potekala 10-15 min pri temperaturi 37 °C. Vse meritve smo ponovili trikrat.

3.2.12.1 Določanje kinetičnih parametrov človeškega katepsina L za izbrane substrate

Iz vsake podknjižnice smo izbrali peptid, ki ga je katepsin L cepil najhitreje.

Za določanje Michaelis-Mentenove konstante smo pripravili redčitveno vrsto za vsak posamezen substrat. Faktor redčitve je bil 1,5, od koncentracije substrata 832 µM do 48,7 µM. Substrat smo redčili v DMSO. Vzorce katepsina L smo pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.2.12. Po enakem postopku smo izvedli tudi meritve. Rezultate meritev smo obdelali v računalniških programih Microsoft Excel in Prism Graph Pad, s pomočjo katerih smo določili nekatere statistične vrednosti, ki opisujejo afiniteto katepsina L do preizkušenih substratov.

Statistične vrednosti, ki so nas zanimale so bile K_m , V_{max} in k_{cat}/K_m . Pri dveh nam je na podlagi vnesenih podatkov podal program Prism Graph Pad, konstanto specifičnosti, k_{cat}/K_m , pa smo izračunali po formuli:

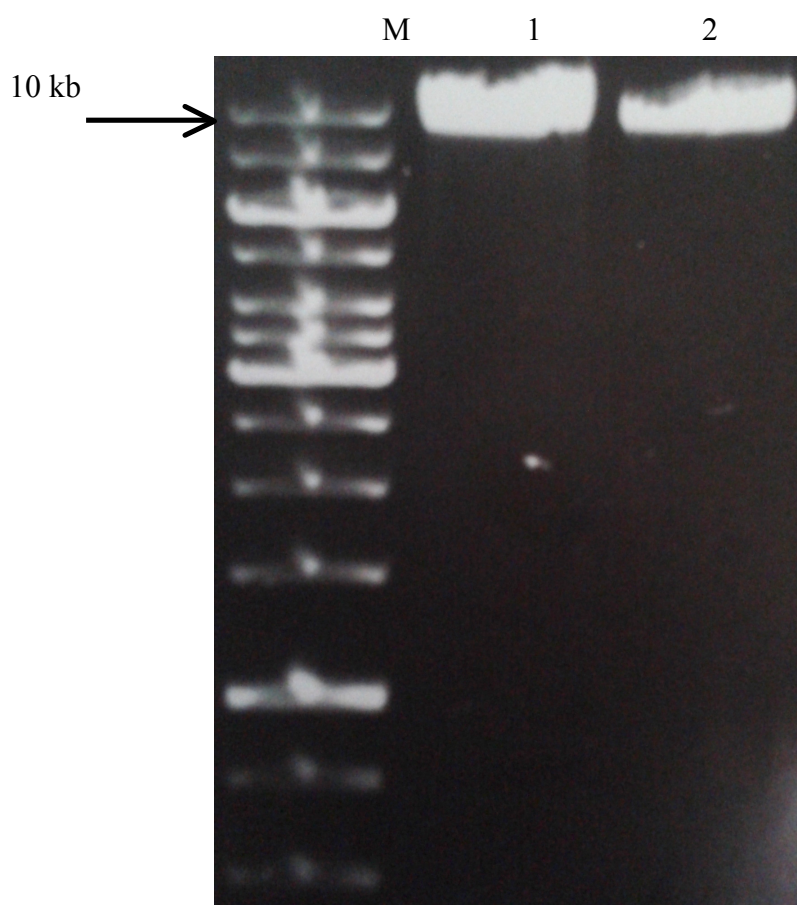
$$k_{cat}/K_m = \text{naklon} / E, \quad \dots (1)$$

pri čemer je E koncentracija encima, naklon pa naklon premice, ki je bil izračunan na podlagi nelinearne regresije razmerja med hitrostjo encimske reakcije in koncentracijo substrata.

4 REZULTATI

4.1 LINEARIZACIJA VEKTORJA

Vektor z insertom pPIC9-prokatepsin L smo linearizirali z restrikcijsko endonukleazo Sac I. Za preverjanje uspešnosti postopka smo na 0,8 % agarozni gel nanesti oba linearizirana vzorca. Sac I cepi vektor pPIC9-prokatepsin L le enkrat, zato smo pričakovali eno liso, ki ustreza velikosti cca. 10 kb, kar ustreza velikosti vektorja pPIC9 z zapisom za prokatepsin L na sliki 5.



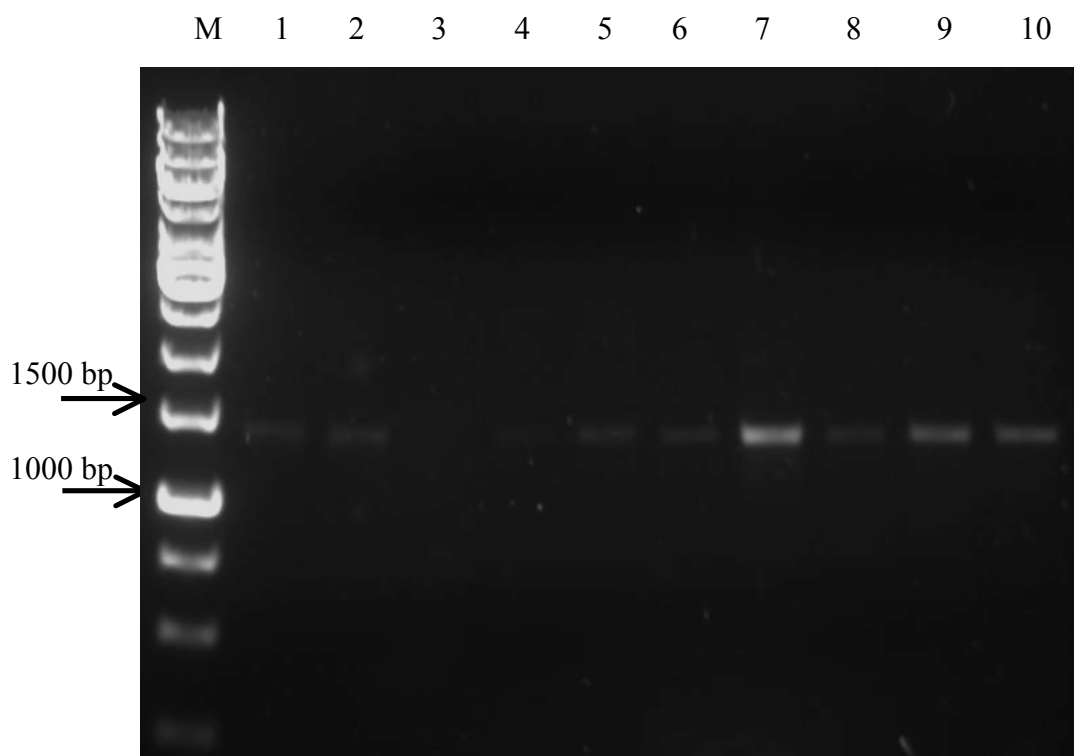
Slika 5: Linearizacija vektorja pPIC9

M: fragmenti standardne velikosti DNA za AGE; 1 –
2: Linearizirana vzorca vektorja pPIC9-prokatepsin L,
oba velikosti cca. 10 kb

4.2 PCR NA OSNOVI KOLONIJE

Lineariziran vektor z zapisom za prokatepsin L smo z elektroporacijo vstavili v celice kvasovk in jih nacepili na plošče MD. Po inkubaciji na 30 °C smo s plošč izbrali 10 dobro raslih kolonij, pri katerih smo z metodo PCR na osnovi kolonije preverjali prisotnost vstavljenega gena. Vzorec smo po končani PCR reakciji nanесли na 0,8 % agarozni gel.

Na sliki 6 lahko vidimo, da je z izjemo vzorca številka 3 prišlo do namnožitve fragmenta pričakovane velikosti ~1500 bp, kar nakazuje na uspešnost integracije genskega zapisa za prokatepsin L v kvasni genom. Pri detektiranju pričakovanega fragmenta smo upoštevali, da se poleg vstavljenega gena prepiše tudi del sekvence vektorja, ki pri izbranih začetnih oligonuklotidih znaša 492 bp.



Slika 6: PCR na osnovi kolonije

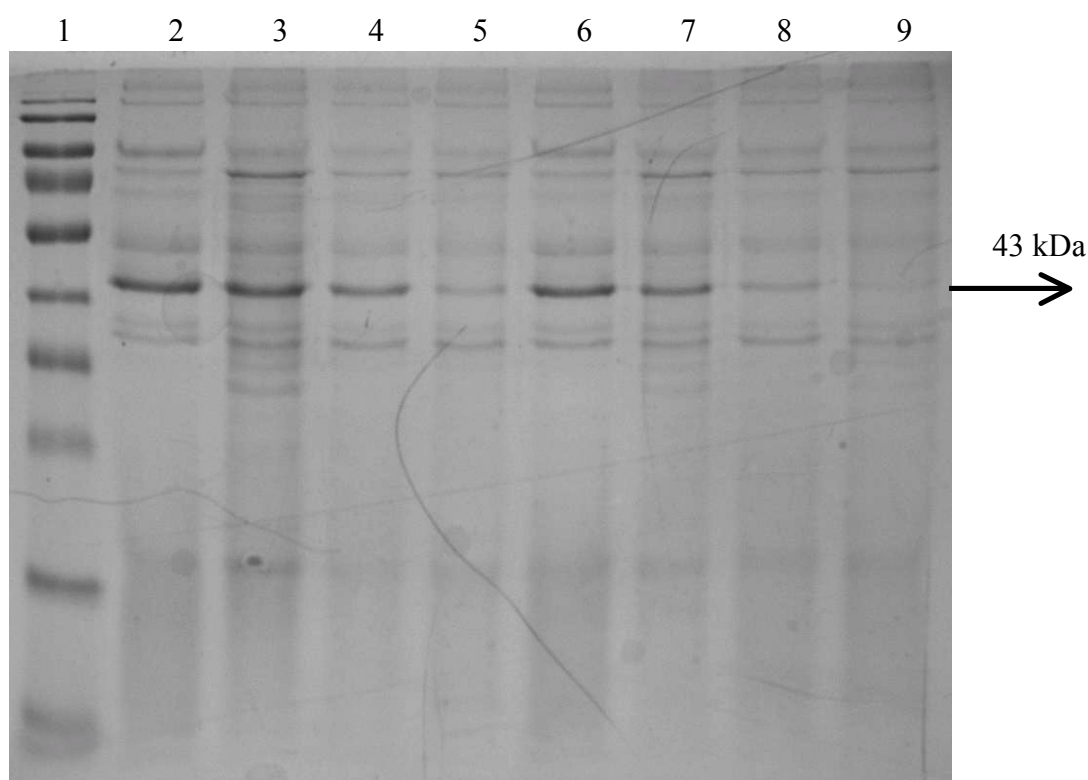
M: fragmenti standardne velikosti DNA za AGE

1 – 10: Vzorci iz posamezne reakcije. Razen pri vzorcu 3, kjer ni prisotne nobene lise, se je pri vseh ostalih vzorcih pojavila ena lisa, velikosti cca. 1500 bp, ki ustreza velikosti prokatepsina L, skupaj z delom vektorja, ki se prevede skupaj z insertom.

4.3 POSKUSNO IZRAŽANJE KATEPSINA L

Na podlagi rezultatov cPCR smo izbrali 6 kvasnih kolonij, v katerih smo poskusno izrazili katepsin L. Kolonijo 3, pri kateri po cPCR nismo dobili DNA fragmenta pri ~1500 bp, smo

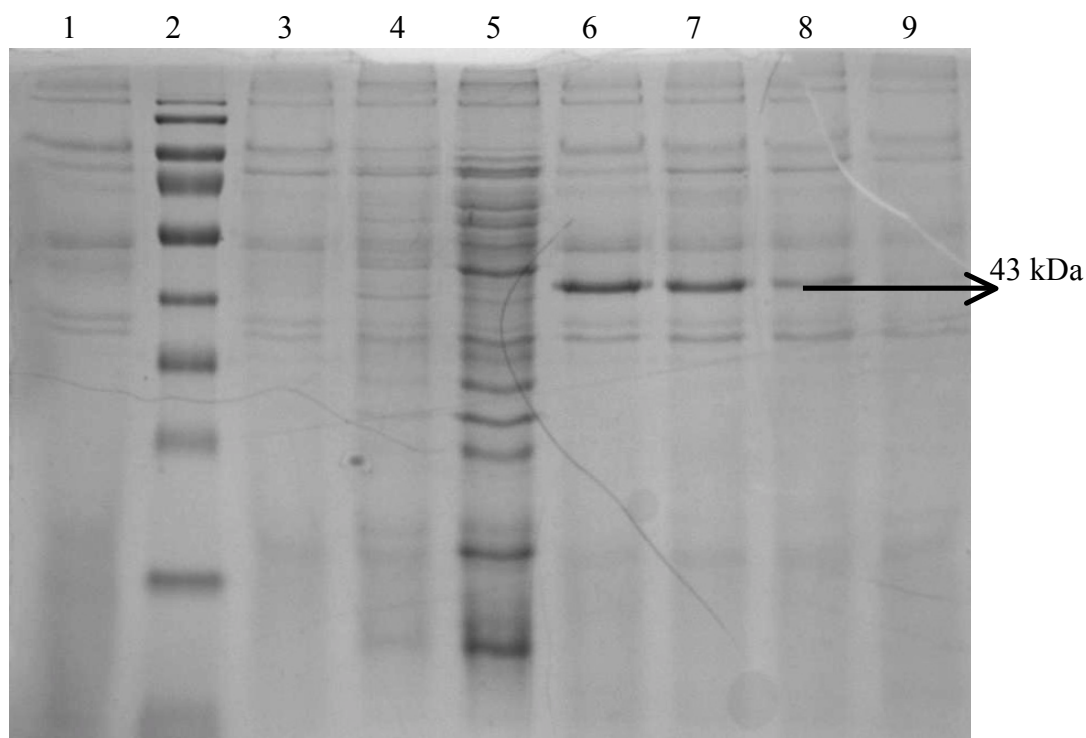
uporabili kot negativno kontrolo. Po končanem eksperimentu smo s TCA oborjene proteinske vzorce nanesti na NaDS-PAGE, rezultati pa so prikazani na slikah 7, 8 in 9. Na podlagi poskusnega izražanja (količina izraženega katepsina L in encimska aktivnost supernatanta na sintetični substrat z-Phe-Arg-AMC) smo se odločili, da za izražanje katepsina L v večjem obsegu izberemo kolonijo št. 7. Katepsin L izražamo tri dni, saj se po tem času katepsin L že lepo izrazi, njegova količina pa se do naslednjega dne ne spremeni bistveno.



Slika 7: Rezultati poskusnega izražanja katepsina L na NaDS-PAGE elektroforetskem gelu (1.gel)

1: Vzorec 1, 1. dan	4: Vzorec 1, 4. dan	7: Vzorec 2, 3. dan
2: Vzorec 1, 2. dan	5: Vzorec 2, 1. dan	8: Vzorec 2, 4. dan
3: Vzorec 1, 3. dan	6: Vzorec 2, 2. dan	9: Proteinski velikostni standard

Prokatepsin L ima maso 38-41 kDa, najmočnejše izraženi proteini pa so glede na položaj lis na gelu, v primerjavi s proteinskim velikostnim standardom nekoliko večji. Pričakujemo, da te lise vendarle prikazujejo prokatepsin L, ki je po gelu potoval počasneje zaradi posttranslacijskih modifikacij. Pri primerjavi poteka izražanja za vzorca 1 in 2 je močnejše izražanje razvidno pri slednjem, saj se prokatepsin L jasneje izrazi že drugi dan. V obeh primerih pa je prisotnost encima zaznavna skozi vse dni izražanja in se s časom viša.

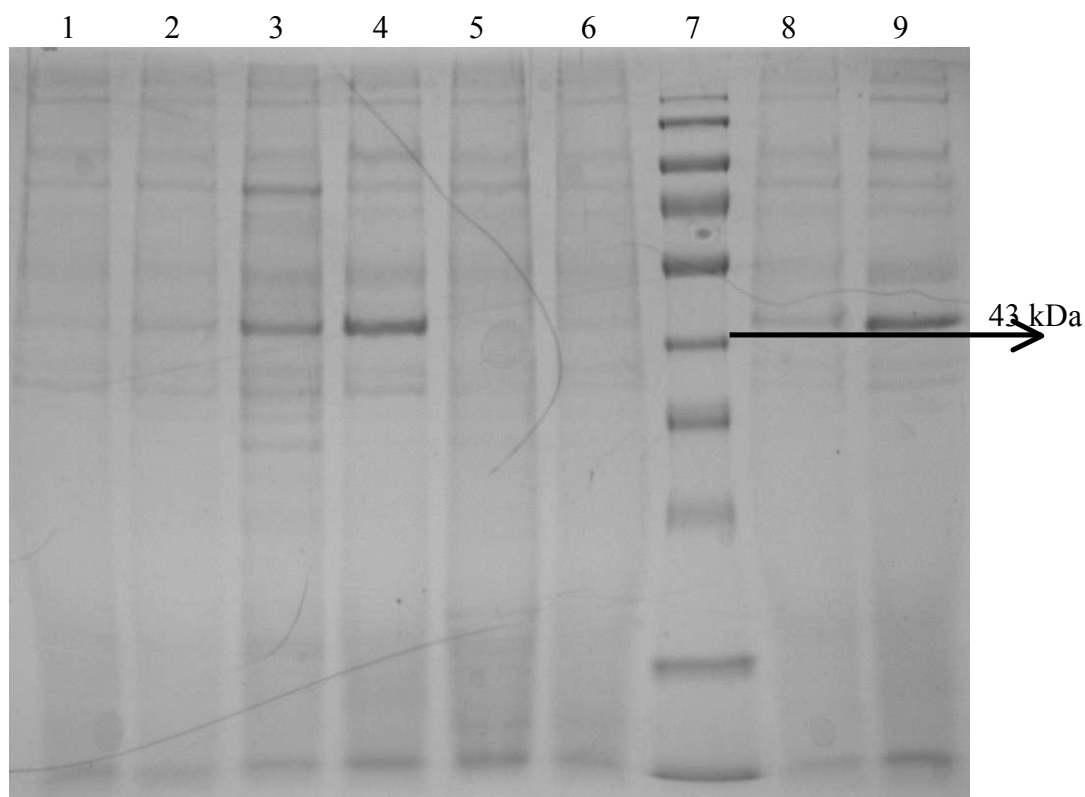


Slika 8: Rezultati poiskusnega izražanja katepsina L na NaDS-PAGE elektroforetskem gelu (2. gel)

1: Vzorec 7, 1. dan	4: Vzorec 7, 4. dan	7: Vzorec 3, 3. dan
2: Vzorec 7, 2. dan	5: Vzorec 3, 1. dan	8: Proteinski velikostni standard
3: Vzorec 7, 3. dan	6: Vzorec 3, 2. dan	9: Vzorec 3, 4. dan

Vzorec 3 je bil edini, pri katerem na AGE gelu po cPCR, nismo zaznali fragmenta in smo ga uporabili kot negativno kontrolo. Na NaDS-PAGE gelu je vidna šibka lisa na mestu, kjer pričakujemo prokatepsin L, le prvi dan izražanja, ostale dni pa je nismo zaznali. Pri vzorcu 7 vidimo na pričakovanem mestu jačanje lise sorazmerno s časom izražanja. Dobro izražene karakteristike prokatepsina L na AGE in NaDS-PAGE gelih so bile povod za izbiro klona 7 za izražanje v večjem obsegu.

4.4 PREVERJANJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI KATEPSINA L V VZORCIH SUPERNATANTOV

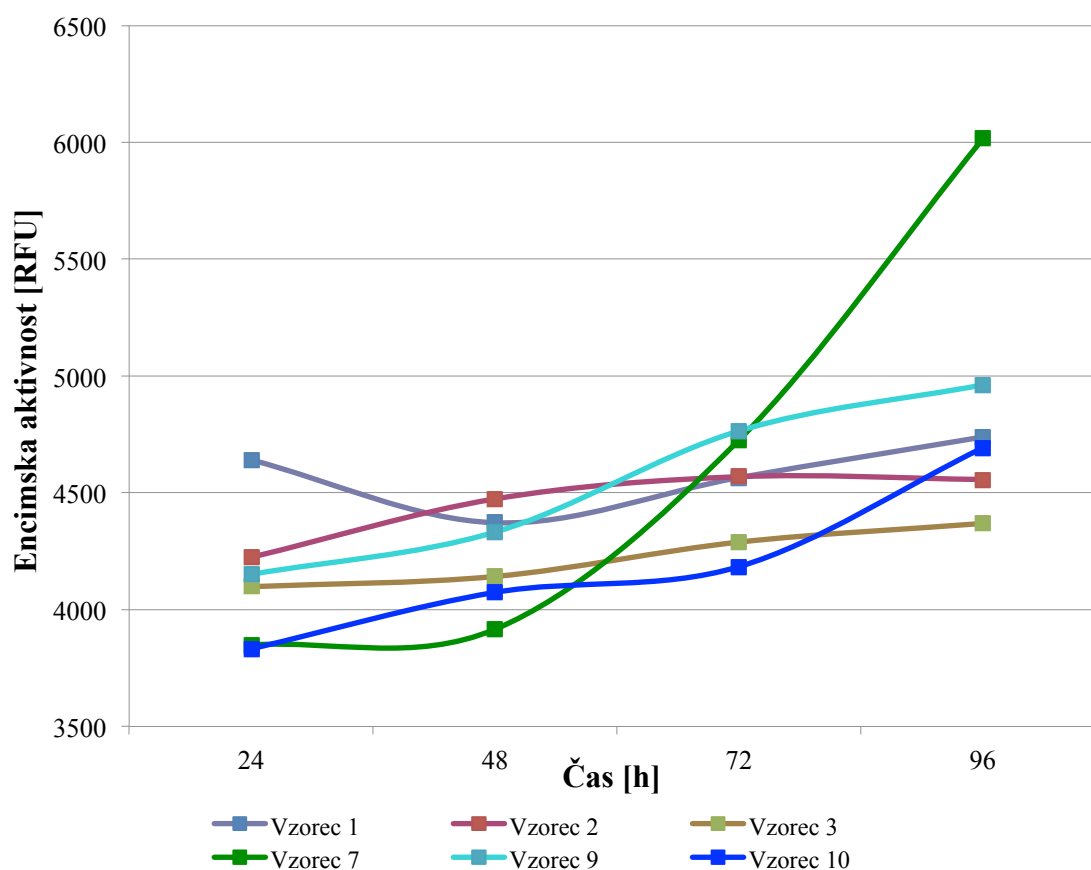


Slika 9: Rezultati poskusnega izražanja katepsina L na NaDS-PAGE elektroforetskem gelu (3. gel)

1: Vzorec 9, 1. dan	4: Vzorec 9, 4. dan	7: Proteinski velikostni standard
2: Vzorec 9, 2. dan	5: Vzorec 10, 1. dan	8: Vzorec 10, 3. dan
3: Vzorec 9, 3. dan	6: Vzorec 10, 2. dan	9: Vzorec 10, 4. dan

Pri vzorcu 9 vidimo naraščanje količine prokatepsina L z dobrim izkoristkom tretjega in četrtega dne. Vzorec 10 je izjema med vsemi vzorci poskusnega izražanja, ki smo jih preverjali na NaDS-PAGE elektroforetskem gelu, saj je lisa na mestu prokatepsina L dobro zaznavna šele četrty dan izražanja.

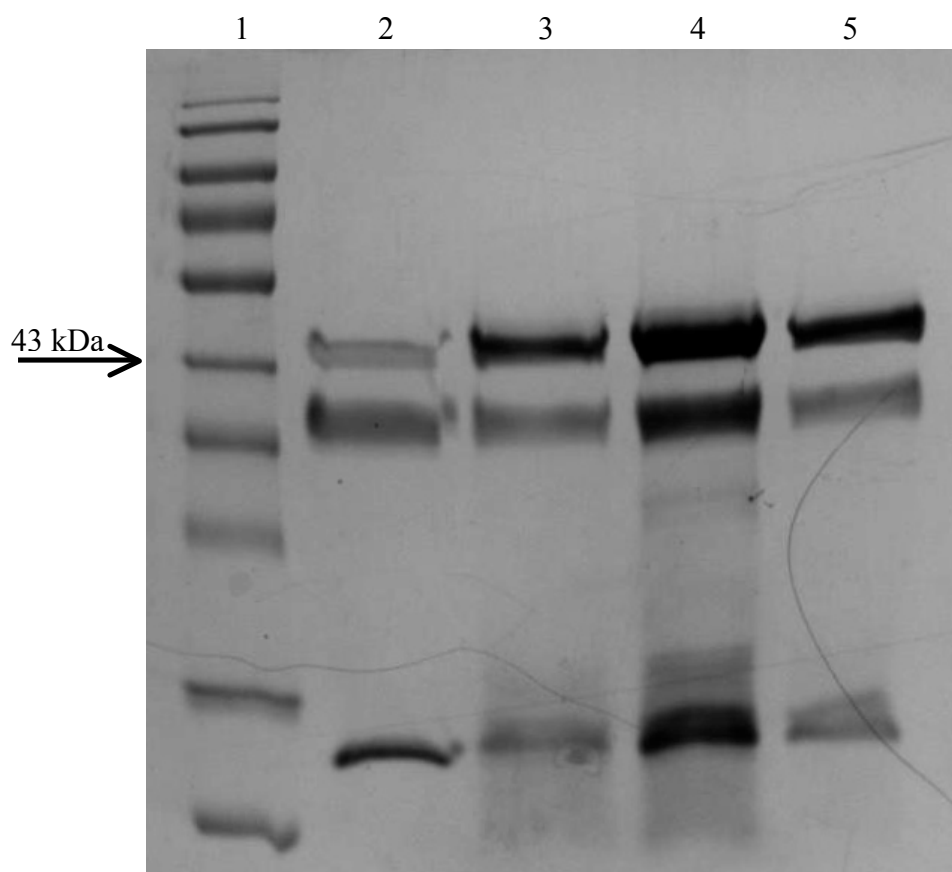
S preverjanjem aktivnosti supernatantov nas je zanimalo ali je rekombinantni katepsin L pravilno zvrt in katalitično aktiven ter po kolikšnem času izražanja (v dnevih) rekombinantega encima zaznamo najvišjo encimsko aktivnost v vzorcu. Aktivnost smo preverjali s cepitvijo substrata Z-Phe-Arg-AMC.



Slika 10: Encimske aktivnosti supernatantov odvzetih v posameznih dneh

4.5 ČIŠČENJE IN AKTIVACIJA KATEPSINA L

Čiščenje katepsina L v supernatantu je potekalo s pomočjo Ni^{2+} kelatne kromatografije, ki smo jo opravili na FPLC napravi. Med procesom čiščenja katepsina L smo shranjevali vse frakcije, ki smo jih po končanem čiščenju analizirali z NaDS PAGE. Rezultati kažejo, da se je s histidinskim repkom označen katepsin L eluiral iz kolone ob spiranju z elucijskim pufrom, bogatim z imidazolom (slika 11: 3-5). Manjšo količino proteina je moč zaznati tudi pri spiranju kolone, kar pomeni, da se je del proteinov na kolono vezal šibkeje in se zato tudi hitreje eluiral. Šibkejša vezava bi lahko bila posledica zasičene ali presežene vezavne kapacitete kolone.



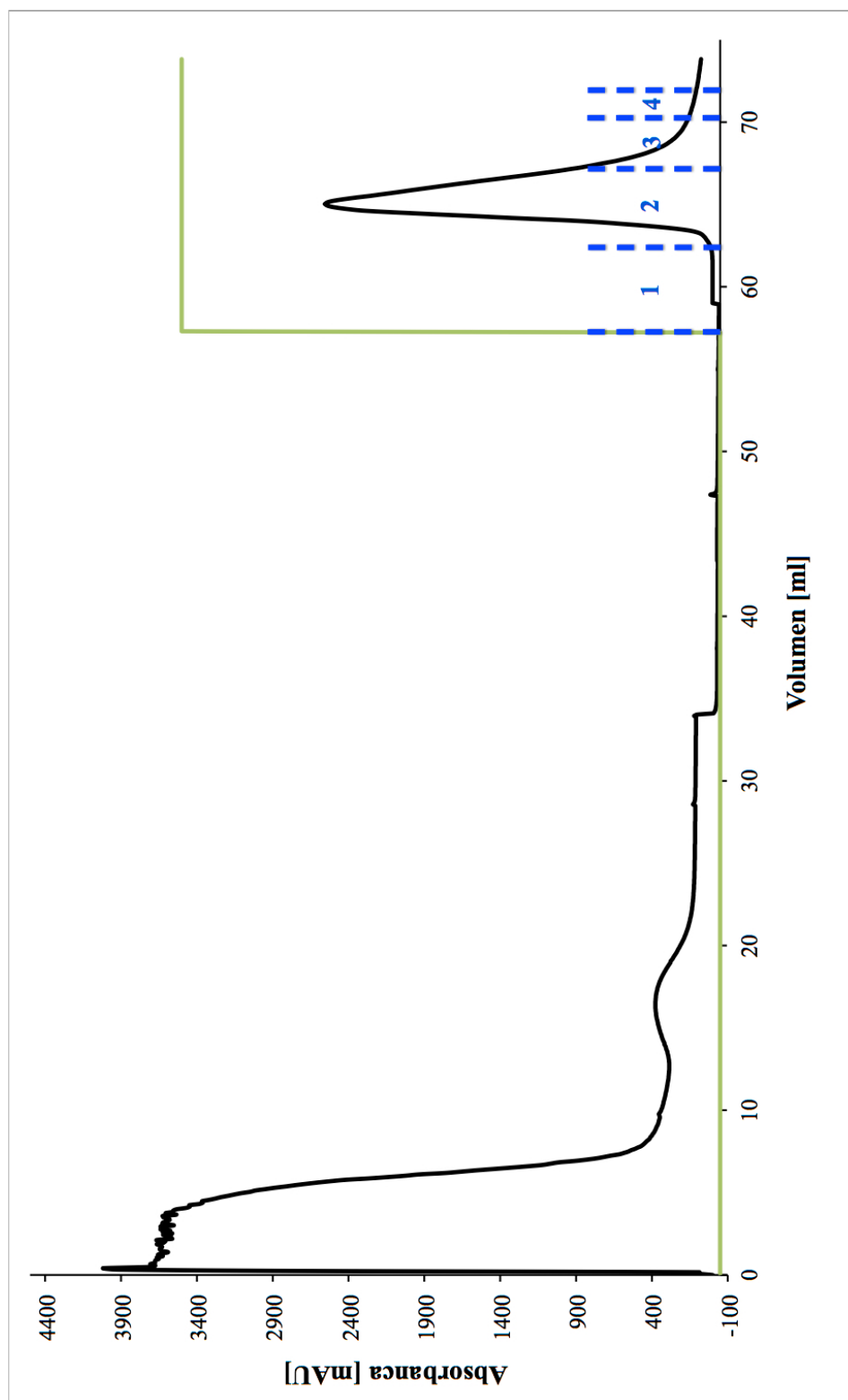
Slika 11: NaDS-PAGE po čiščenju

1: Proteinski velikostni standard

2: "Flow-through"

3-5: Zbirane frakcije 2,3 in 4

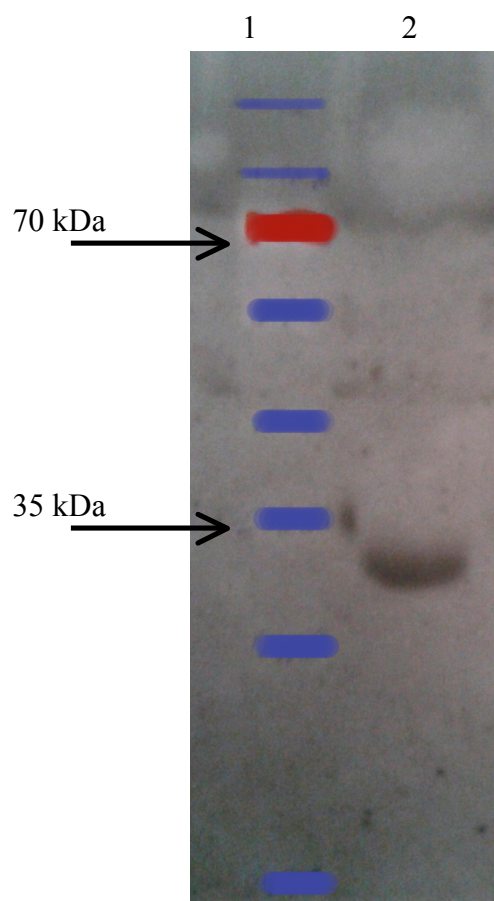
V vsakem stolpcu lahko vidimo lise na treh različnih pozicijah, ki predstavljajo katepsin L v pro obliki, v zreli obliki in odcepljeni pro del. Iz stolpca 2 je razvidno, da se je manjša količina katepsina L s kolone sprala že pri spiranju le-te z vezavnim pufrom (30 mM Tris, pH 7,5; 0,4 M NaOH, 10 mM imidazol), kar nakazuje na šibkejšo vezavo dela proteinov. V stolpcih 3, 4 in 5 so frakcije, ki smo jih zbrali, ko smo ob spiranju kolone z elucijskim pufrom (30 mM Tris, pH 7,5; 0,4 M NaOH, 0,3 M imidazol) zaznali povišano absorbanco in smo sklepali na prisotnost katepsina L.



Slika 12: Čiščenje katepsina L z Ni^{2+} -kelatno kromatografijo
 Z modro barvo so označene odvzete frakcije za kromatografijo, z zeleno barvo pa koncentracija pufra

4.6 IMUNOLOŠKA DETEKCIJA KATEPSINA L S TEHNIKO PRENOSA WESTERN

Glede na velikost fragmentov, ki smo jih zasledili na NaDS PAGE gelu, smo že lahko predvidevali, da je lisa, ki se s daljšanjem časa izražanja debeli, izražen protein katepsin L, kar smo potrdili še z imunološko detekcijo po prenosu Western. Nitrocelulozno membrano s prenesenimi proteini smo tretirali s specifičnimi protitelesi proti katepsinu L. Na sliki 13 je razvidna le ena lisa, katere pozicija glede na velikostni standard ustreza katepsinu L brez pro regije. Glede na to, da smo membrano tretirali s protitelesi specifičnimi za katepsin L, lahko sklepamo, da je bilo naše izražanje rekombinantnega katepsina L uspešno.



Slika 13: Imunološka detekcija proteina po prenosu Western

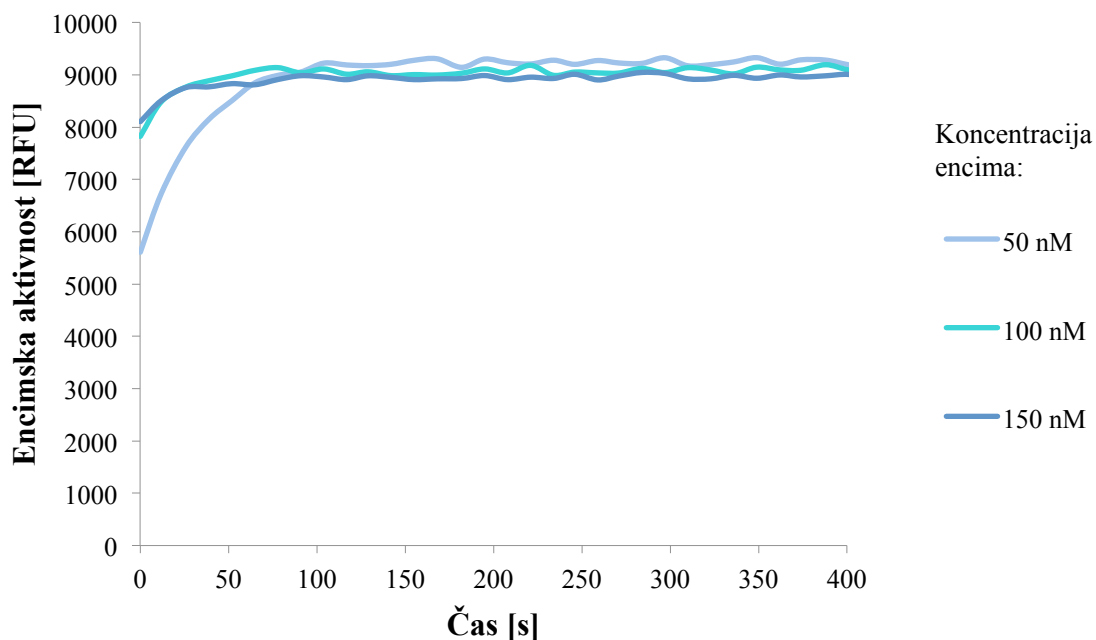
1: Proteinski velikostni standard

2: Vzorec katepsina L

Nitrocelulozno membrano, na katero smo s pomočja električnega toka prenesli proteine iz NaDS-PAGE, smo najprej inkubirali s primarnimi zajčjimi protitelesi proti katepsinu L (čez noč, 4 °C), nato pa s sekundarnimi kozjimi anti-zajčjimi protitelesi IgG (1h, 37 °C). Film smo po tretiranju s kemoluminiscenčnim reagentom postavili na membrano za 1-2 min. V vzorcu smo zaznali zrelo obliko katepsina L.

4.7 DOLOČANJE OPTIMALNE KONCENTRACIJE KATEPSINA L

Za nadaljnje poskuse smo najprej določili optimalno koncentracijo katepsina L za potek encimskih reakcij. Na podlagi podatkov iz slike 14, smo se odločili, da bomo uporabljali 50 nM koncentracijo katepsina L, saj je v preostalih dveh primerih koncentracija encima previsoka, zato se substrat v trenutku popolnoma razgradi in na grafu ne vidimo linearnega dela z maksimalno hitrostjo, potrebnega za določanje kinetičnih parametrov.



Slika 14: Določanje optimalne koncentracije encima

Optimalno koncentracijo katepsina L smo določali s pomočjo fluorimetra za mikrotiterske plošče in substrata Z-Phe-Arg-AMC, ki ima vzbujevalni in emisijski maksimum pri valovnih dolžinah 370 nm in 460 nm.

4.8 TITRACIJA AKTIVNIH MEST

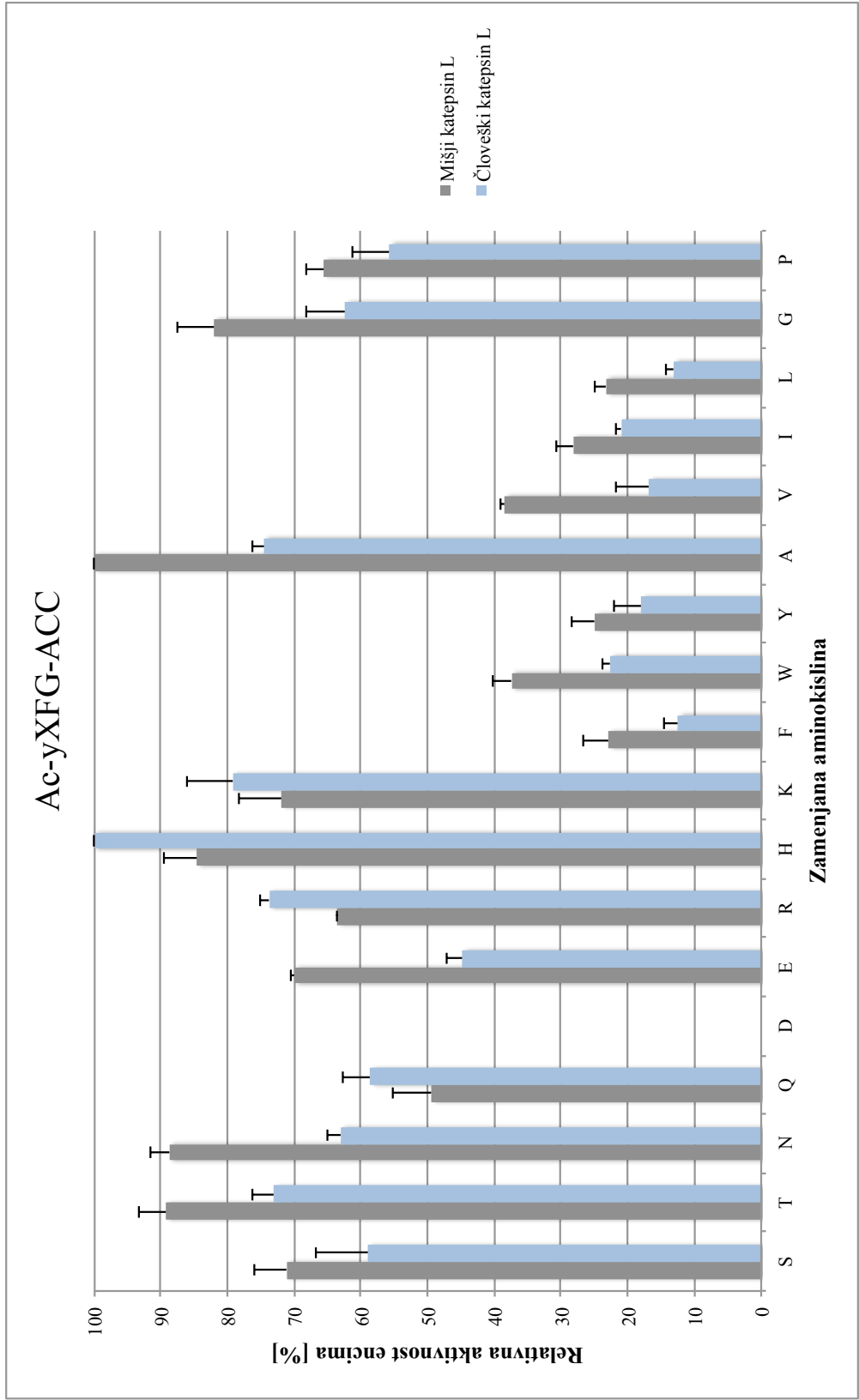
Pri določanju aktivne koncentracije katepsina L smo si pomagali z ireverzibilnim inhibitorjem E-64 in ugotovili, da je bil encim praktično v celoti aktiven.

4.9 PRIMERJAVA SUBSTRATNIH SPECIFIČNOSTI ČLOVEŠKEGA IN MIŠJEGA KATEPSINA L NA POZICIJAH SUBSTRATA P4, P3 IN P2 S POMOČJO KOMBINATORNE TETRAPEPTIDNE KNJIŽNICE

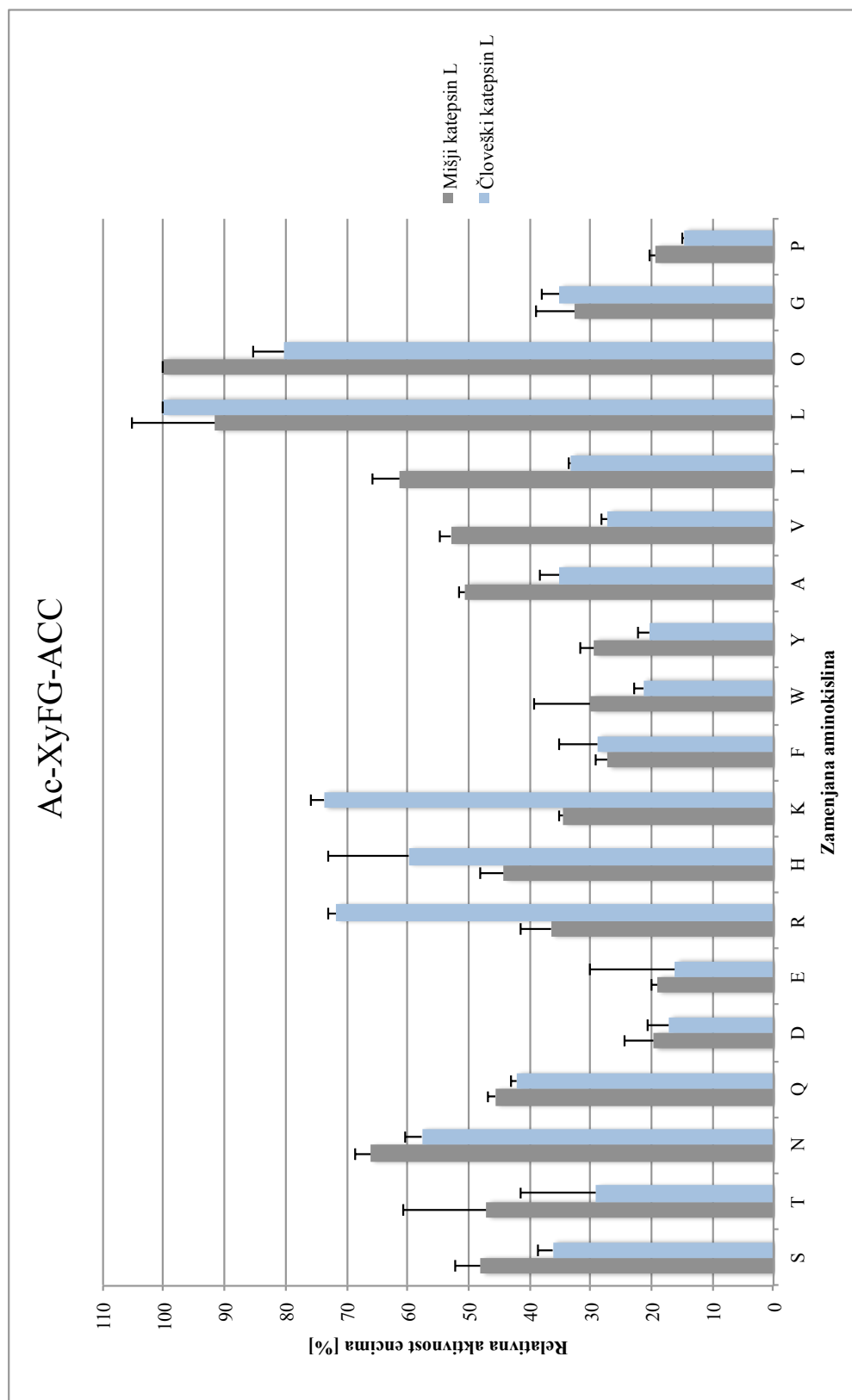
Slike 15, 16 in 17 prikazujejo primerjavo substratnih specifičnosti človeškega in mišjega katepsina L na pozicijah substrata P4, P3 in P2. Za določanje encimske specifičnosti smo uporabili kombinatorno fluorogeno tetrapeptidno knjižnico. Celotna knjižnica sestoji iz petih različnih podknjižnic; treh podknjižnic za določanje encimske specifičnosti na poziciji P2, ene podknjižnice za določanje encimske specifičnosti na poziciji P3 in ene podknjižnice za določanje encimske specifičnosti na poziciji P4. Prikazane vrednosti aktivnosti so povprečni rezultat treh meritev. Substrat pri katerem smo dobili najvišji signal, smo normalizirali na 100 %. Ostali substrati so izraženi v relativnih vrednostih glede na substrat, ki ga je encim cepil najbolje.

V primeru podknjižnic, kjer smo določali encimsko specifičnost na poziciji P2, smo preverili aktivnost encima na treh različnih tetrapeptidnih podknjižnicah s sledečimi aminokislinskimi zaporedji: Ac-LRyG-ACC, Ac-QTyG-ACC in Ac-SEyG-ACC. Relativne distribucije aminokislinskih preferenc glede na najboljši substrat so bile v vseh treh primerih podobne. Na sliki 17 so tako prikazani le rezultati podknjižnice Ac-LRyG-ACC, saj je bila aktivnost katepsina L na substrate iz te podknjižnice višja v primerjavi s substrati iz preostalih dveh podknjižnic.

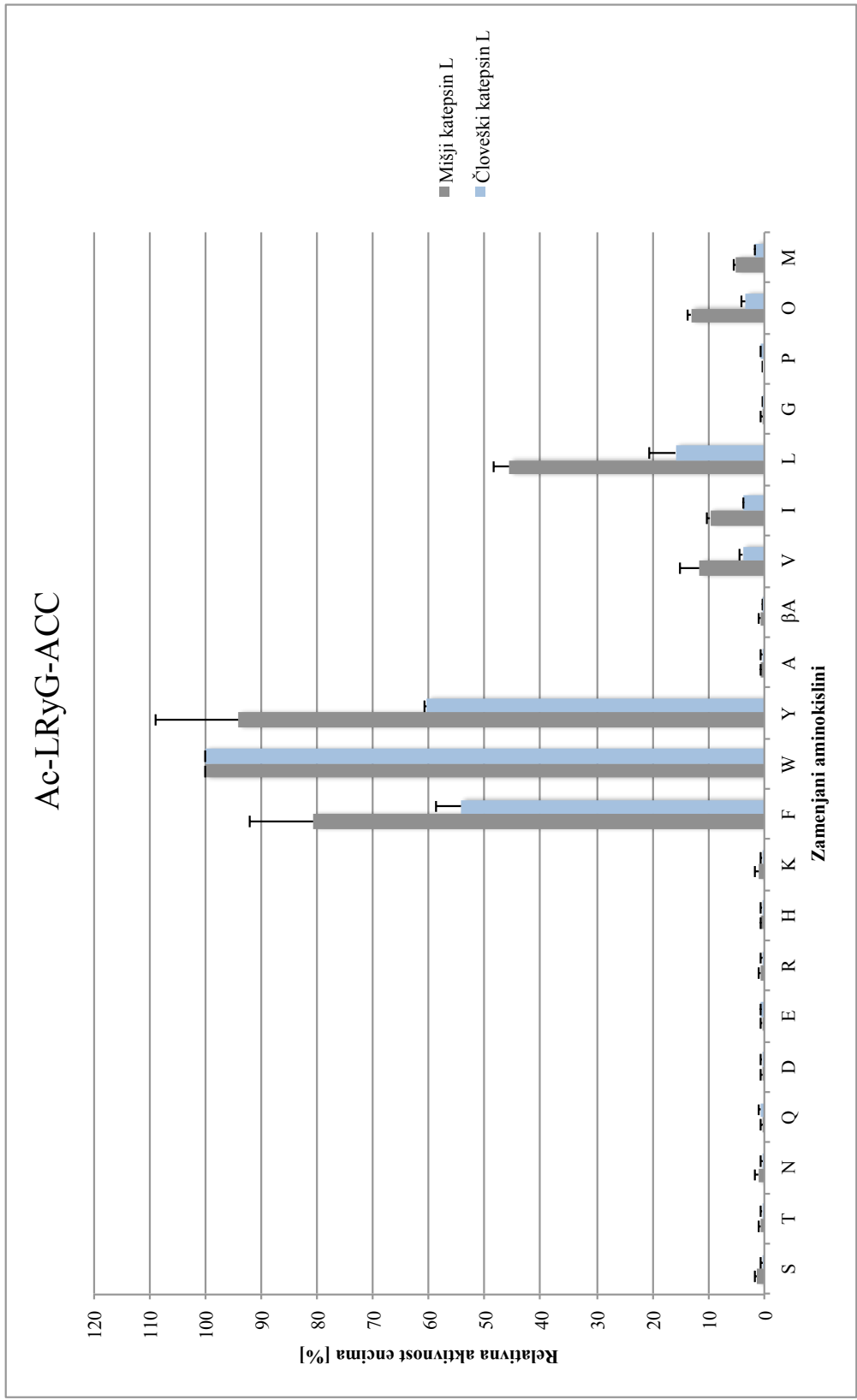
Oznaka X v tetrapeptidnem zaporedju pomeni izokinetično mešanico vseh naravnih aminokislin na poziciji, na kateri se nahaja. Oznaka y v imenu vsake od podknjižnic nadomešča oznako za aminokislino, ki je v posamezni knjižnici variabilna. V kombinatorni knjižnici so uporabljene tudi nenaravne amino kisline s sledečimi oznakami: O – norlevcin; hC – homocikloheksilalanin; hF – homofenilalanin, βA – beta alanin.



Slika 15: Primerjava substratnih specifičnosti človeškega in mišjega katepsina L na poziciji P4



Slika 16: Primerjava substratnih specifičnosti človeškega in mišjega katepsina L na poziciji P3
O - norlevcin



Slika 17: Primerjava substratnih specifičnosti človeškega in mišjega katepsina L na poziciji P2
βA – beta alanin, O – norlevcin

4.10 DOLOČANJE KINETIČNIH PARAMETROV ČLOVEŠKEGA KATEPSINA L S HIDROLIZO IZBRANIH SUBSTRATOV

Iz vsake tetrapeptidne knjižnice smo izbrali substrat, ki ga je človeški katepsin L cepil najboljše. Z dodatnimi meritvami so določili kinetična parametra K_m in k_{cat}/K_m .

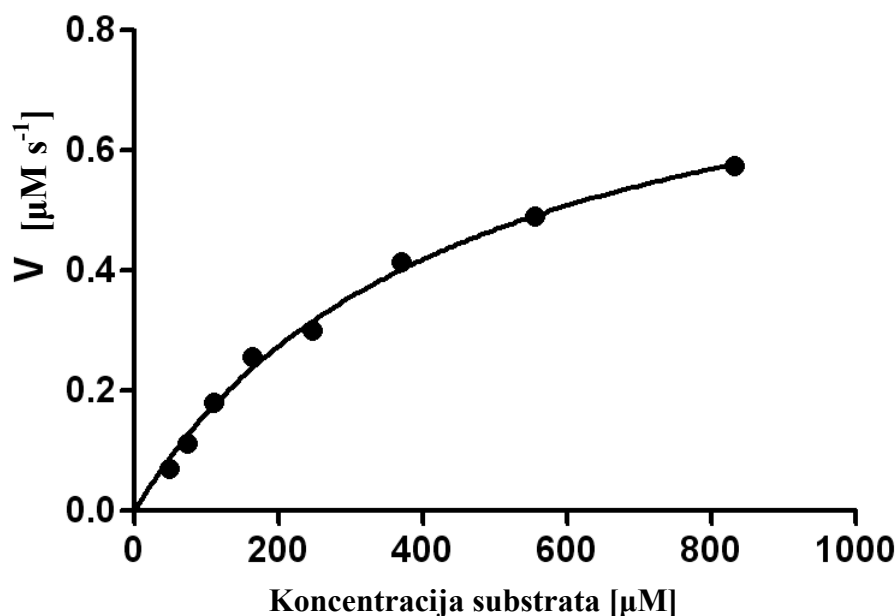
K_m - Michaelisova konstanta, ki je merilo za afiniteto encima do substrata. Višje vrednosti konstante pomenijo nižjo afiniteto encima do substrata. Obratno, nižje vrednosti konstante pomenijo, da encim in substrat tvorita močan kompleks.

V_{max} - največja možna hitrost encimsko katalizirane reakcije pri določeni koncentraciji encima.

k_{cat} – katalitična konstanta, oziroma pretvorbena število, je število molekul substrata, ki jih molekula encima pretvori v neki časovni enoti, ko je encim popolnoma nasičen s substratom.

k_{cat}/K_m – konstanta specifičnosti za primerjavo hitrosti reakcij posameznih parov encimov in substratov.

4.10.1 Najboljši substrat iz peptidne podknjižnice P4 Ac-HXFG-ACC



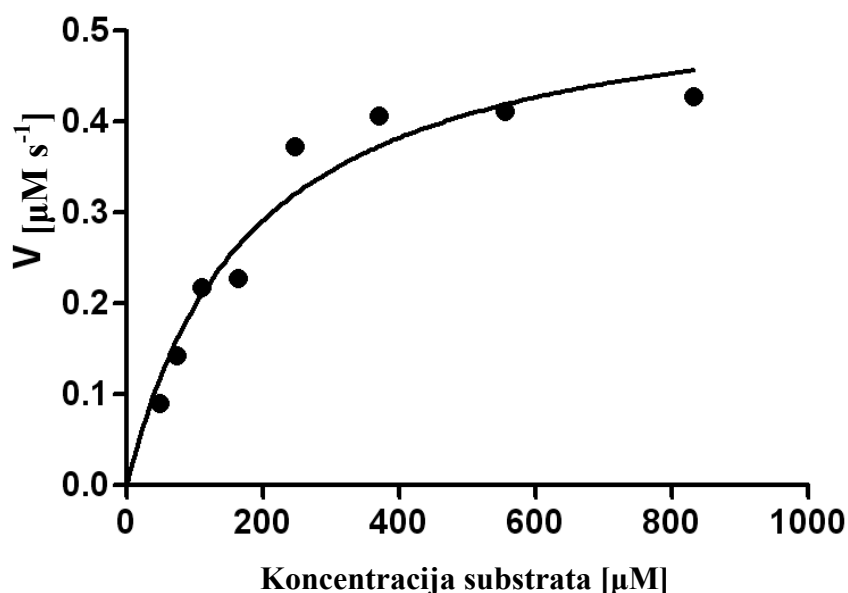
Slika 18: Michaelis-Mentenov diagram cepitve substrata Ac-HXFG-ACC, iz peptidne podknjižnice P4

S pomočjo programov Graph Pad Prism in Microsoft Excel smo določili tudi parametre encimske aktivnosti, ki so prikazani v preglednici 23.

Preglednica 23: Kinetični parametri encimske aktivnosti na substrat Ac-HXFG-ACC

Parameter	Vrednost	St. deviacija
K_m	0,447 mM	0,107 mM
V_{max}	0,888 $\mu\text{M s}^{-1}$	0,108 $\mu\text{M s}^{-1}$
k_{cat}/K_m	2620 $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$	895 $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$

4.10.2 Najboljši substrat iz peptidne podknjižnice P3 Ac-XLFG-ACC



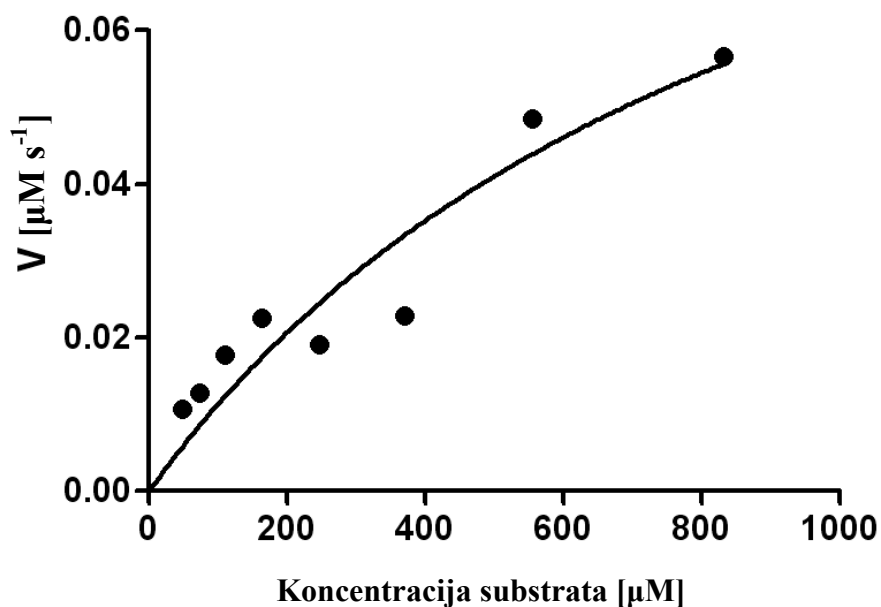
Slika 19: Michaelis-Mentenov diagram hitrosti cepitve substrata Ac-XLFG-ACC, iz peptidne podknjižnice P3

S pomočjo programov Graph Pad Prism in Microsoft Excel smo določili tudi parametre encimske aktivnosti, ki so prikazani v preglednici 24.

Preglednica 24: Kinetični parametri encimske aktivnosti za substrat Ac-XLFG-ACC

Parameter	Vrednost	St. deviacija
K_m	0,182 mM	0,057 mM
V_{max}	0,557 $\mu\text{M s}^{-1}$	0,065 $\mu\text{M s}^{-1}$
k_{cat}/K_m	3190 $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$	414 $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$

4.10.3 Najboljši substrat iz peptidne podknjižnice P2 Ac-LRWG-ACC



Slika 20: Michaelis-Mentenov diagram cepitve substrata Ac-LRWG-ACC, iz peptidne podknjižnice P2

S pomočjo programov Graph Pad Prism in Microsoft Excel smo določili tudi parametre encimske aktivnosti, ki so prikazani v preglednici 25.

Preglednica 25: Kinetični parametri encimske aktivnosti na substrat Ac-LRWG-ACC

Parameter	Vrednost	St. deviacija
K_m	0,967 mM	0,542 mM
V_{max}	0,120 $\mu\text{M s}^{-1}$	0,044 $\mu\text{M s}^{-1}$
k_{cat}/K_m	247 $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$	45,2 $\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$

5 RAZPRAVA

Katepsin L je cisteinska proteaza, ki se nahaja v skoraj vseh tipih celic. V normalnih fizioloških pogojih je prisoten v lizosomih in je vključen v procesiranje in predstavitev antigenov ter v regulacijo celičnega cikla v jedru. V patofizioloških pogojih, kot sta rak in revmatoidni artritis, se njegovo izražanje poveča in ga najdemo tako v citosolu, kot tudi v medceličnem prostoru. Za katepsine je značilna velika sposobnost razgradnje zunajceličnega matriksa (ECM), kar se odzraža tudi pri omenjenih boleznih. S pospeševanjem migracije in invazivnosti tumorskih celic, ki so posledica razgradnje zunajceličnega matriksa in z remodeliranjem tumorskega mikrookolja, je katepsin L vključen v nastanek raka. Do razgradnje kolagena, pomembne komponente ECM, pride tudi znotraj tumorskih celic. Predvideva se, da je katepsin L tudi eden od mediatorjev apoptoze in vpliva na znižanje njene pojavnosti pri raku. Večanje količine katepsina L sovпада z napredkom raka, zato ima sledenje količini katepsina L tudi potencialno biomarkersko uporabnost (Turk in sod., 2012).

Revmatoidni artritis pa je kronično vnetje sklepne maže z infiltriranimi celicami T CD 4+ in antigen predstavitvenimi celicami (APC). Posledica je napredno uničenje sklepnega hrustanca, ki v hujši obliki vodi do izgube funkcije sklepa. Poleg metaloproteinaz, značilnih za nastanek bolezni, sta v sklepni tekočini bolnikov z revmatoidnim artritisom prisotna tudi katepsina B in L (Turk in sod., 2012).

Za določanje biokemijskih lastnosti proteinov, tudi katepsina L, je pomembno, da imamo na voljo zadostno količino proteina. Omejitve pri izolaciji proteinov iz tkiv, kot sta na primer neželena proteoliza in majhna količina izoliranih tarčnih proteinov, so se z razvojem tehnologije rekombinantne DNK in proteinskega inženirstva premostile. Tako so danes na voljo sledeči sistemi za izražanje heterolognih proteinov: grampozitivne bakterije (npr. *Bacillus subtilis*), gramnegativne bakterije (npr. *Escherichia coli*), kvasovke (npr. *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris*), bakulovirusni sistemi (npr. Sf9) in sesalski sistemi (npr. CHO, HEK, COS celice) (Štrukelj in sod., 2007).

5.1 IZRAŽANJE REKOMBINANTNEGA ČLOVEŠKEGA KATEPSINA L

Za izražanje človeškega prokatepsina L smo izbrali na tem področju že uveljavljen organizem kvasovko *Pichia pastoris*. Kvasni sistem za izražanje heterolognih proteinov *Pichia pastoris* omogoča izražanje velikih količin proteinov v kratkem času in z nizkimi stroški. Prav tako rekombinantne proteine posttranslacijsko modificira (glikozilira) in tako poveča njihovo stabilnost in končni izkoristek. Predpripravljen plazmid pPIC9-prokatepsin L smo linearizirali in ga uspešno integrirali v genom kvasovke. Nato smo izbrali 6 klonov *P. pastoris* in s poskusnim izražanjem katepsina L v majhni količini izbrali najprimernejši klon, katerega smo uporabili za nadaljnje poskuse. Vzorčenje izražanja prokatepsina L, ki

se je izločal v gojišče, smo opravili v časovnih intervalih 24 h, 48 h, 72 h in 96 h. Vzorce smo razdelili na dve paralelki. Prvo smo analizirali z NaDS-PAGE (slike 7 - 9). Na teh slikah vidimo, da količina izraženega proteina po dnevih narašča pri vseh vzorcih, razen pri vzorcu 3, kjer se prokatepsin L sploh ni izražal. Drugemu delu alikovota pa smo z uporabo sintetičnega substrata z-Phe-Arg-AMC merili katalitično aktivnost, kar prikazuje slika 10. Razvidno je, da se je v večini primerov encimska aktivnost po treh dneh izražanja ustalila in se tudi do naslednjega dne ni bistveno spremenila. Izjema je bil vzorec številka 7, ki smo ga izbrali za izražanje prokatepsina L v večjem obsegu. Testi stabilnosti katepsina L so pokazali, da aktivna oblika encima pri 37 °C in pH 7,0 izgubi 85 % stabilnosti že v 15 minutah, nasploh pa se aktivnost encima nad pH 6,0 hitro znižuje (Turk in sod., 1993). Da bi katepsin L zavarovali pred razgradnjo med izražanjem v gojišče, smo ga pripravili v obliki prokatepsina L. V cimogenski obliki katepsina L propeptid stabilizira terciarno strukturo, ter inhibira njegovo katalitično aktivnost. Pro regija encima se odcepi v primeru zmanjšanih elektrostatskih interakcij med encimom in propeptidom, kar se zgodi ob znižanju pH vrednosti medija v katerem se nahaja (Coulombe in sod., 1996). Kalijev fosfat regulira pH gojišča BMMY, v katerem smo izražali prokatepsin L, na 6,0. Pri taki pH vrednosti ni pričakovati, da bi se prokatepsin L avtoaktiviral ali se nadalje cepil. Katepsin L smo aktivirali šele po čiščenju in ga nato shranili v pufru, ki ohranja njegovo aktivnost.

Izražanje heterolognih proteinov v stresalnih erlenmijerih je s tehnološkega vidika zelo nenadzorovan proces. Z izjemo nastavljenih temperature in frekvence stresanja nismo tekom izražanja preverjali nobenega od procesnih parametrov, tako da težko sklepamo o razmerah v gojišču in njihovi ustreznosti. V primeru, da bi med pripravo gojišč prišlo do napak, bi to kasneje lahko vplivalo na potek celotnega procesa. Enako velja za dodajanje metanola, ki je ključnega pomena za uspešno izražanje heterolognih proteinov z metilotrofnimi kvasovkami. Metanol smo v poskusni kulturi dodajali v 24-urnih intervalih, nismo pa vedeli v kolikšni meri se je resnično porabil in ali je njegova koncentracija optimalna za izražanje heterolognih proteinov. Iz tega sledi, da je premajhna kontrola procesa morda razlog, da se koncentracija encima iz dneva v dan ne zvišuje skladno. V primeru, da bi se odločili za spremljanje večjega števila procesnih parametrov, bi lahko med izražanjem proteinov kontrolirali tudi pH vrednost gojišča, sestavo gojišča in plinov, ki se izločajo, ter optično gostoto gojišča.

5.2 SUBSTRATNA SPECIFIČNOST REKOMBINANTNEGA ČLOVEŠKEGA IN MIŠJEGA KATEPSINA L

V naravi najdemo 20 osnovnih aminokislin, na katerih so možne dodatne posttranslacijske modifikacije, bodisi v obliki pripetja funkcionalnih skupin, npr. fosforilizacije, acetilacije, metilacije, acilacije, glikolizacije; ali v obliki drugih proteolitičnih cepitev in povezav, npr. tvorbe disulfidnih mostičkov (Mann in sod., 2003). V kompleksni tridimenzionalni strukturi proteinskih substratov so na cepitev najbolj občutljive aminokisliline, ki se nahajajo na površini molekul, kjer se cepitev največkrat zgodi za izpostavljenimi preferenčnimi aminokislinskimi preostanki. Cisteinski katepsini kažejo široko substratno specifičnost. Kljub temu pa substrate preferenčno cepijo za hidrofobnimi in bazičnimi aminokislinskimi preostanki. Ta zakonitost velja tako za naravne kot tudi za sintetične substrate. Z naraščajočim številom rešenih kristalnih struktur cisteinskih katepsinov v kompleksih s substrati oziroma inhibitorji ter z uporabo sintetičnih peptidnih knjižnic, je razumevanje specifičnosti cisteinskih katepsinov izjemno napredovalo. Informacije o substratni specifičnosti nam omogočajo lažje razumevanje biološke funkcije proteaz, kot tudi lažji razvoj primernih substratov in selektivnih inhibitorjev.

Z uporabo kombinatorne fluorogene tetrapeptidne knjižnice smo preverili substratni specifičnosti rekombinantnega človeškega in mišjega katepsina L na mestih P2, P3 in P4. Kombinatorna fluorogena tetrapeptidna knjižnica je imela na mestu P1 vedno glicin, ki glede na študije določanja substratne specifičnosti katepsina L z uporabo sintetičnih peptidnih knjižnic, ni optimalna aminokislina. Človeški katepsin L na tej poziciji preferira pozitivno nabita aminokislinska preostanka arginin in lizin. Strukturne študije so pokazale, da je večji del površine katepsina L, vključno z bližino reže aktivnega mesta, negativno nabit. Zato afiniteta do aminokislin z bazičnimi stranskimi verigami ne preseneča (Turk in sod., 1998). Analiza substratov iz tripsinske knjižnice, ki zaradi narave cepitve s tripsinom ne podaja relevantnih rezultatov ravno o bazičnih aminokislinah, ki jih rezultati ostalih raziskav izpostavljajo, kaže da se na mestu P1 pojavljata tudi glicin in glutamin (Biniossek in sod., 2011). Glutamin, kot optimalno aminokislino na mestu P1, pogosto najdemo tudi pri ostalih cisteinskih proteazah (Choe in sod., 2006). V propeptidu cimogena na mestu 77, ki blokira režo aktivnega mesta, se prav tako nahaja glicin, (Coulombe in sod., 1996), ki je bil fiksiran na poziciji P1 v vseh substratih, ki smo jih uporabili pri določanju substratne specifičnosti katepsina L na mestih P2, P3 in P4. Ker je v naravi v propeptidu na mestu P1 glicin najbolj pogosta aminokislina, glicin na tej poziciji v sintetičnih peptidih najverjetneje nima negativnega vpliva na afiniteto katepsina L do omenjenih substratov.

Rezultati določanja substratne specifičnosti človeškega in mišjega katepsina L so pokazali, da je v obeh primerih aktivnost encimov največja, kadar mesto P2 zaseda aromatska aminokislina (slika 17). Oba homologa katepsina L najboljše cepita substrate, ki imajo na tem mestu triptofan, tesno pa mu sledita fenilalanin in tirozin. Encimsko aktivnost smo

zaznali tudi kadar so bile na mestu P2 alifatske aminokisline, levcin, izolevcin, norlevcin, valin in metionin. Naši eksperimenti potrjujejo predhodne raziskave, ki se brez izjeme strinjajo, da katepsin L na poziciji P2 najbolje tolerira aromatske aminokisline, ki jim sledijo aminokisline s hidrofobnimi alifatskimi stranskimi verigami (Biniossek in sod., 2011; Choe in sod., 2006; Puzer in sod., 2004). Unikatna značilnost katepsina L in njemu podobnih encimov je preferenca do aromatskih aminokislin na mestu P2 in jih loči od drugih cisteinskih katepsinov (Choe in sod., 2006). Tudi številne analize PICS (proteomic identification of protease cleavage site) potrjujejo, da so aromatski aminokislinski preostanki na mestu P2 ključni pri cepitvi substratov s katepsinom L (Biniossek in sod., 2011). Fenilalanin na mestu P2 je močno zaželen tudi pri inhibitorjih ali v propeptidu prokatepsina L, saj se v obeh primerih omenjena aminokislina usede na mesto S2 v reži aktivnega mesta (Coulombe in sod., 1996).

Substratna specifičnost obeh homologov katepsina L na mestu P3 ni tako izrazita. Človeški katepsin L ima na tem mestu najvišjo afiniteto do levcina, mišji pa do njegovega sintetičnega sorodnika, norlevcina (slika 16). Poleg njiju naši rezultati kažejo nekoliko večjo preferenco človeškega katepsina L do aminokislin s pozitivno nabitimi stranskimi verigami, arginina, histidina in lizina. Mišji katepsin L pa poleg najbolj optimalnega lizina sprejema še hidrofobne aminokisline, alanin, valin in izolevcin, ter polarne nenabite aminokisline. Tudi ostale raziskovalne skupine so prišle do enakih zaključkov, da katepsin L na mestu P3 nima izrazite substratne specifičnosti. Choe in sodelavci so s profiliranjem z uporabo kombinatornih peptidnih knjižnic ugotovili, da so razlike med skupinami aminokislin s podobnimi lastnostmi majhne. Tako je katepsin L v podobni meri cepil peptidne substrate, ki imajo na mestu P3 bazični aminokislini, lizin ter arginin, kot tudi hidrofobne alifatske aminokisline, levcin, izolevcin, norlevcin in metionin. V strukturi človeškega katepsina L se v vezavnem žepu S3 nahaja glutamat, aminokislina z negativno nabito stransko verigo, ki je v kontaktu s substratom le preko stranske verige, zato so njene lastnosti tukaj dokaj pomembne. Privlak med nasprotno nabitima koncema aminokislinskih preostankov zato lahko razloži razmeroma visoko encimsko aktivnost, kadar se v substratu na mestu P3 nahajajo bazične aminokisline.

Široka substratna specifičnost cisteinskih katepsinov je, tako kot za mesto P3, značilna tudi za mesto P4. Edina aminokislina, ki na mestu P4 v naših poskusih ni bila primerna je aspartat. Zanimivo je, da oba homologa katepsina L dobro cepita aminokisline, ki imajo polarne stranske verige, tako nenabite kot nabite, pozitivne ali negativne (slika 15). Oba homologa dobro cepita tudi alifatski aminokislini alanin in glicin, ki imata majhni stranski verigi. Do aromatskih aminokislin pa imata oba homologa nizko substratno specifičnost. Tudi ti rezultati se ujemajo z že objavljenimi (Choe in sod., 2006).

Iz vsake izmed treh podknjižnic smo izbrali najboljši substrat in mu določili kinetične parametre. S pomočjo programa Graph Pad Prism smo na podlagi meritev izrisali

Michaelis-Mentenov diagram cepitve substrata Ac-LRWG-ACC s človeškim katepsinom L (slika 20) in izračunali kinetične parametre. Visoka vrednost K_m , nizka maksimalna hitrost in nizka konstanta specifičnosti k_{cat}/K_m kažejo na to, da Ac-LRWG-ACC ni najbolj primeren substrat za katepsin L. Iz diagrama na sliki 20 vidimo, da se pri višjih koncentracijah substrata vrednosti na grafu ne ustalijo, kar kaže na počasno kinetiko cepitve substrata, izredno visoka pa so tudi odstopanja pri izmerjenih K_m vrednostih.

Med substrati, pri katerih smo določali kinetične parametre encimske aktivnosti ima katepsin L pri Ac-HXFG-ACC iz peptidne podknjižnice P4 najvišjo maksimalno hitrost, vendar lahko na podlagi vrednosti ostalih parametrov sklepamo, da tudi ta substrat ne predstavlja najboljšega substrata za katepsin L. Enako potrjuje tudi Michaelis-Mentenov diagram, ki pri višjih koncentracijah substrata še vedno ne dosega konstantnih vrednosti. Najboljše vrednosti kinetičnih parametrov aktivnosti je katepsin L pokazal pri substratu Ac-XLFG-ACC iz peptidne podknjižnice P3. Omenjeni substrat kaže najnižjo vrednost K_m , ter najvišjo vrednost k_{cat}/K_m , izmed vseh treh izbranih substratov, kar je značilnost dobre specifičnosti substrata.

Ne glede na to, da so izbrani substrati v primerjavi z ostalimi predstavniki v peptidnih podknjižnicah kazali zelo visoke encimske aktivnosti, pa se na koncu niso izkazali kot najprimernejši substrati za preverjanje aktivnosti človeškega katepsina L. Glede na majhno število ponovitev ($N=3$) pri določanju kinetičnih parametrov za vse tri najboljše substrate so tudi odstopanja pri statističnih vrednostih pričakovana.

Eden izmed dejavnikov, ki ga pri obdelavi podatkov pri določanju substratne specifičnosti z uporabo sintetičnih substratov ne smemo zanemariti, so fiksirane aminokisline. V vseh treh podknjižnicah je bil na mestu P1 glicin. Podknjižnici P3 in P4 pa sta poleg glicina imeli fiksiran še fenilalanin na mestu P2. Ob primerjavi vrednosti kinetičnih parametrov, ki smo jih določili za najboljše substrate v vsaki podknjižnici, vidimo, da se katalitični parametri med seboj zelo razlikujejo. Sklepamo lahko, da imata za učinkovito vezavo substrata in encima pomembno vlogo tudi mesti P3 in P4. Substrat Ac-LRWG-ACC, iz peptidne podknjižnice P2, ima na mestu P4 levcin, ki pa ne predstavlja preferenčne aminokisline na tej poziciji (slika 15). Tako je za visoko afiniteto encima do določenega substrata pomembna ustrezna kombinacija vseh aminokislin, ki pridejo v stik z aktivnim mestom encima.

Pomen vseh aminokislin v substratni verigi se lepo vidi ob primerjavi izmerjenih kinetičnih parametrov človeškega katepsina L na substrate iz naše kombinatorne peptidne knjižnice in komercialnega substrata Z-FR-AMC. Choe in sodelavci so izmerili, da je vrednost K_m za komercialni substrat 100-krat manjša od vrednosti za substrat Ac-XLFG-ACC, ki se je izkazal kot najbolj specifičen substrat v

naših testih. Za nadaljne študije bi, na podlagi rezultatov kombinatorne tetrapeptidne knjižnice, bil za človeški katepsin L bolj primeren substrat Ac-His-Leu-Trp-Arg-ACC.

6 SKLEPI

- Izražanje in namnožitev rekombinantnega katepsina L v kvasovki *Pichia pastoris* sta bili uspešni.
- Substratni specifičnosti rekombinantnega človeškega in mišjega katepsina L sta dokaj podobni.
- Oba homologa katepsina L najbolje cepita peptide, ki imajo na mestu P2 triptofan. Človeški katepsin L najbolje cepi substrate, ki imajo na mestu P3 levcin in na mestu P4 histidin, mišji katepsin L pa substrate z norlevcinom na mestu P3 in alaninom na mestu P4.
- V primerjavi s komercialnim substratom z-Phe-Arg-AMC imajo najboljši predstavniki iz posameznih peptidnih podknjižnic slabe rezultate pri določanju kinetičnih parametrov, zato sklepamo, da je za dobro aktivnost posameznega substrata pomembna kombinacija vseh mest na substratu, ki so v stiku z encimom.

7 POVZETEK (SUMMARY)

7.1 POVZETEK

Proteaze so skupina encimov, ki cepijo peptidno vez in razgrajujejo proteine na manjše enote. Vrsta proteaz so tudi katepsini, za katere je značilno, da se nahajajo v kislem okolju lizosomov in endosomov (Turk, 2006). Katepsin L je eden izmed 11 predstavnikov cisteinskih katepsinov, ki ima, tako kot vse cisteinske proteaze, v aktivnem mestu katalitično diado cistein – histidin (Turk in sod., 2012). Katepsin L se sintetizira v obliki proencima in se aktivira ob znižanju pH v okolju na 5,5 (Kirschke, 2013). Poleg osnovne funkcije, razgradnje proteinov v lizosomih, ima katepsin L, tudi nekatere specifične lastnosti. V normalnih fizioloških razmerah je vključen v vzdrževanje homeostaze srčnih celic, kože in lasnih mešičkov, metabolizem neuropeptidov in zorjenje imunskih celic (Spira in sod., 2007; Tobin in sod., 2002; Funkelstein, 2010; Badano in sod., 2013). Povišano izražanje katepsina L pa korelira z razvojem bolezenskih stanj. Pri rakavih obolenjih se katepsin L izloča v zunajcelični prostor, kjer njegova katalitična aktivnost prispeva k povečani invazivnosti in metastaziranju rakavih celic. Za regulacijo endogene aktivnosti cisteinskih katepsinov so v organizmu odgovorni endogeni inhibitorji, ki se delijo na cistatine, tiropine in serpine (Turk in sod., 2002). Pri raziskovanju fiziološke vloge cisteinskih katepsinov je imel izredno pomembno vlogo inhibitor E-64, ki se s cisteinskimi katepsini veže v stehiometričnem razmerju 1:1 (Turk in sod., 2012).

Za izražanje rekombinantnega človeškega katepsina L smo izbrali kvasovko *Pichia pastoris*. *P. pastoris* je metilotrofna kvasovka, ki lahko kot edini vir ogljika uporablja metanol. Posledično se za izražanje heterolognih proteinov izkorišča močan promotor za alkoholno dehidrogenazo, ki se aktivira v prisotnosti metanola. Prednosti kvasnega sistema za izražanje so tudi preprosto rokovanje, kompleksne posttranslacijske modifikacije in možnost izločanja proteinov v gojišče (Cregg in sod., 2000). V *P. pastoris* smo z elektroporatorjem vstavili lineariziran plazmid pPIC9-prokatepsin L. S PCR reakcijo na osnovi kolonije smo preverili uspešno integracijo inserta v genom, ter izbrali kolonije za poskusno izražanje. Po 96 urah smo s pomočjo NaDS PAGE elektroforeze in testov aktivnosti dnevno odvzetih vzorcev izbrali klon, ki je pokazal najboljšo aktivnost ter ga pripravili za izražanje v večjem obsegu. Ko smo pridobili večjo količino katepsina L, smo ga očistili z Ni^{2+} -kelatno kromatografijo na napravi FPLC, ga aktivirali in z dodatkom inhibitorja MMTS shranili na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. S pomočjo inhibitorja E-64 smo titrirali aktivna mesta in katepsinu L določili skoraj popolno aktivnost. Na podlagi testov aktivnosti na peptide iz kombinatornih knjižnic smo rekombinantnemu človeškemu in mišjemu katepsinu L preverili substratno specifičnost na mestih P2, P3 in P4. Mesto P2 je pri katepsinu L ključno za določanje substratne specifičnosti. V obeh primerih so bili najboljše cepljeni peptidi, kjer je to mesto zasedal triptofan, sledile so mu aromatske ter hidrofobne aminokisline. Na mestu P3 človeški katepsin L preferira hidrofoben levcin, njegov mišji

homolog pa zelo soroden norlevcin. Človeški katepsin L je poleg levcina kazal še nekoliko višjo encimsko aktivnost pri pozitivno nabitih stranskih verigah, mišji pa pri polarnih nenabitih aminokislinah. S podknjižnico z variabilnim mestom P4 smo ugotovili, da oba encima tolerirata širok specter aminokislin. Oba homologa najboljše cepita substrate z aromatskimi aminokislinami, ter aspartat, valin, levcin in izolevcin. Določanje kinetičnih parametrov za najboljše substrate iz posamezne podknjižnice je pokazalo, da ti substrati niso optimalni za določanje aktivnosti katepsina L. Tudi v primerjavi z komercialnim substratom so pokazali precej slabše rezultate. Ker so za optimalno cepitev tetrapeptidnega substrata pomembna vsa mesta v substratu smo sklenili, da bi glede na naše rezultate, optimalen sintetični substrat imel aminokislinsko zaporedje His-Leu-Trp-Arg.

7.2 SUMMARY

Proteases are a group of enzymes that cleave peptide bond in protein substrates. One of the subgroups of proteases are cysteine cathepsins, which can be normally found in the acidic environment of lysosomes and endosomes (Turk, 2006). Cathepsin L, together with 10 other enzymes, belongs to cysteine cathepins. For all 11 representatives of cysteine cathepsins, as for cysteine proteases in general, it is typical to include a catalytic diade of cysteine and histidine in the core of the active site (Turk et al., 2012). Cathepsin L is synthesized as preproenzyme and is activated in the environment with pH of 5,5 or lower (Kirschke, 2013). The role of cathepsin L is not limited only to protein breakdown in lysosomes, and the enzyme exerts also more specific functions. It is involved in the homeostasis of heart cells, skin and hair follicles, neuropeptide metabolism and immune cells maturation (Spira et al., 2007; Tobin et al., 2002; Funkelstein, 2010; Badano et al., 2013). Elevated levels of cathepsin L expression was often found to correlate with disease development. For example, due to its activity in the extracellular matrix, cancer cells are more invasive and prone to metastasis formation. The catalytic activity of cysteine cathepsins is physiologically regulated by endogenous inhibitors, which are divided into cystatins, thyropins and serpins, and synthetic inhibitors like E-64, which was widely used for determination of physiological role of cysteine cathepsins and is capable of binding to its targets with 1:1 stoichiometry (Turk et al., 2002; Turk et al., 2012).

We choose yeast *Pichia pastoris* to express recombinant human cathepsin L. *P. pastoris* is methylotrophic yeast, known for its ability to use methanol as the only carbon source. When using yeast for heterologic protein expression, we take advantage of the strong promoter for the alcohol dehydrogenase gene, which is activated when methanol is present. Yeast expression system has many advantages, including easy handling, complex posttranslational modifications and the ability to secrete recombinant proteins into the medium (Cregg in sod., 2000). The plasmid pPIC9-procathepsinL was inserted into *P. pastoris* using electroporation. The success of the integration was confirmed with colony

PCR. The best colonies were then selected for trial expression. After 96 hours SDS PAGE electrophoresis and enzyme activity tests were done in order to determine, which clone has the best properties for the large scale expression. When larger quantities of cathepsin L were obtained, the enzyme was purified by Ni^{2+} -chelate chromatography. With the change of buffer the enzyme was activated. After activation MMTS inhibitor was added. Samples were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Activity of the enzyme was determined by titration of the active site with inhibitor E-64. Finally we determined substrate specificity of mouse and human cathepsin L in the P2, P3 and P4 positions using peptides from combinatory libraries. The key to the cathepsin L specificity is the P2 position. In both cases peptides with tryptophan at the P2 position were cleaved best. Peptides with other aromatic and hydrophobic amino acids at this subsite also showed high enzyme activity. Human cathepsin L prefers, at the P3 position, leucine, while mouse cathepsin L prefers leucine's synthetic variant, norleucine. Additionally human cathepsin L showed higher enzyme activities when peptides in the P3 position contained amino acids with positively charged side chains, while mouse cathepsin L preferred more amino acids with polar uncharged side chains. The library with variable P4 position showed broad specificity in both enzymes. In both cases substrates with aromatic amino acids, aspartate, valine, leucine and isoleucine were preferred. For the best substrates of each sub-library kinetic parameters were determined. In comparison to commercially available substrates for cathepsin L and their known characteristics, our best substrates have shown poor results. For optimal cleavage of the tetrapeptide substrate all four positions are important and according to our results the most suitable synthetic substrate for cathepsin L would include the His-Leu-Trp-Arg sequence.

8 VIRI

- Badano M.N., Camicia G.L., Lombardi G., Maglioco A., Cabrera G., Costa H., Meiss R.P., Piazzon I., Nepomnaschy I. 2013. B-cell lymphopoiesis is regulated by cathepsin L. *PloS one*, 8, 4: e61347, doi: 10.1371: 12.str.
- Bevec T., Stoka V., Pungercic G., Dolenc I., Turk V. 1996. Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *The Journal of Experimental Medicine*, 183: 1331-1338
- Binossek M.L., Nagler D.K., Becker-Pauly C., Schilling O. 2011. Proteomic identification of protease cleavage sites characterizes prime and non-prime specificity of cysteine cathepsins B, L, and S. *Journal of Proteome Research*, 10, 12: 5363-5373
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.
- Brix K., Dunkhorst A., Mayer K., Jordans S. 2008. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie*, 90, 2: 194-207
- Bromme D., Li Z., Barnes M., Mehler E. 1999. Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization. *Biochemistry*, 38: 2377-2385
- Cathepsin L. 2013. Universal Protein Resource. The UniProt consortium.
<http://www.uniprot.org/align/2014081792OKLAP82H> (september 2013)
- Choe Y., Leonetti F., Greenbaum D.C., Lecaille F., Bogyo M., Bromme D., Ellman J.A., Craik C.S. 2006. Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 18: 12824-12832
- Coulombe R., Grochulski P., Sivaraman J., Menard R., Mort J.S., Cygler M. 1996. Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *The EMBO Journal*, 15: 5492-5503
- Cregg J.M., Barringer K.J., Hessler A.Y., Madden K.R. 1985. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, 5: 3376-3385
- Cregg J.M., Cereghino J.L., Shi J., Higgins D.R. 2000. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16: 23-52
- Enzyme Nomenclature. 2013. Calgary, Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology: 22 str.
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/cont3b.html> (november 2013)
- Evan I.G., Vousden K.H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411: 342-348

- Gocheva V., Zeng W., Ke D., Klimstra D., Reinheckel T., Peters C., Hanahan D., Joyce J.A. 2006. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes & Development*, 20: 543-556
- Grotsky D.A., Gonzalez-Suarez I., Novell A., Neumann M.A., Yaddanapudi S.C., Croke M., Martinez-Alonso M., Redwood A.B., Ortega-Martinez S., Feng Z., Lerma E., Ramon y Cajal T., Zhang J., Matias-Guiu X., Dusso A., Gonzalo S. 2013. BRCA1 loss activates cathepsin L-mediated degradation of 53BP1 in breast cancer cells. *The Journal of Cell Biology*, 200: 187-202
- Gunčar G., Pungerčič G., Klemenčič I., Turk V., Turk D. 1999. Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *The EMBO Journal*, 18: 793-803
- Hanada K., Tamai M., Yamagishi M., Ohmura S., Sawada J., Tanaka I. 1978. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42, 3: 523-528
- Health at a Glance: Europe 2012. 2012. Pariz, OECD Publishing: 149 str.
- Higgins D.R., Cregg J.M. 1998. Introduction to *Pichia pastoris*. V: *Pichia* protocols. Methods in Molecular Biology. Vol 103. Higgins D.R., Cregg J.M. (eds.). Totowa, Humana Press: 1-15
- Honey K., Rudensky A.Y. 2003. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, 3: 472-482
- Hook V., Funkelstein L., Wegrzyn J., Bark S., Kindy M., Hook G. 2012. Cysteine cathepsins in the secretory vesicle produce active peptides: cathepsin L generates peptide neurotransmitters and cathepsin B produces beta-amyloid of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824: 89-104
- Hoyert D.L., Xu J. 2012. Deaths: preliminary data for 2011. *National Vital Statistics Reports*, 61, 6: 1-51
- Karrer K.M., Peiffer S.L., DiTomas M.E. 1993. Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 3063-3067
- Kirschke H., Langner J., Wiederanders B., Ansorge S., Bohley P. 1972. Intracellular protein degradation. IV. Isolation and characterization of peptidases from rat liver lysosomes. *Acta Biologica et Medica Germanica*, 28, 2: 305-22
- Kirschke H., Langner J., Wiederanders B., Ansorge S., Bohley P. 1977. Cathepsin L. A new proteinase from rat-liver lysosomes. *European Journal of Biochemistry*, 74: 293-301

- Kirschke H. 2013. Cathepsin L. V: Handbook of proteolytic enzymes. Vol. 2. 3rd ed. Rawlings N.D., Salvesen G.S. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 1808-1817
- Lankelma J.M., Voorend D.M., Barwari T., Koetsveld J., Van der Spek A.H., De Porto A.P., Van Rooijen G., Van Noorden C.J. 2010. Cathepsin L, target in cancer treatment? Life Sciences, 86: 225-233
- Lecaille F., Bromme D., Lalmanach G. 2008. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. Biochimie, 90: 208-226
- Linnevers C., Smeekens S.P., Bromme D. 1997. Human cathepsin W, a putative cysteine protease predominantly expressed in CD8⁺ T-lymphocytes. Federation of European Biochemical Societies Letters, 405: 253-259
- Mann M., Jensen O.N. 2003. Proteomic analysis of post-translational modifications. Nature Biotechnology, 21: 255-261
- Mason R.W., Green G.D., Barrett A.J. 1985. Human liver cathepsin L. The Biochemical Journal, 226: 233-241
- McIntyre G.F., Godbold G.D., Erickson A.H. 1994. The pH-dependent membrane association of procathepsin L is mediated by a 9-residue sequence within the propeptide. The Journal of Biological Chemistry, 269: 567-572
- Pichia* Expression Kit. A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. 2002. Carlsbad, Invitrogen: 72 str.
- Pike N.R., Bottomley S.P., Irving J.A., Bird P.I., Whisstock J.C. 2002. Serpins: finely balanced conformational traps. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life, 54: 1-7
- Puzer L., Cotrin S.S., Alves F.M.A., Egborge T., Araujo M.S., Aparecida Juliano M., Juliano L., Bromme D., Carmona A.K. 2004. Comparative substrate specificity analysis of recombinant human cathepsin V and cathepsin L. Archives of Biochemistry and Biophysics, 430: 274-283
- Rawlings N.D., Waller M., Barrett A.J., Bateman A. 2014. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. Nucleic Acids Research, 42: 503-509
- Rege T.A., Fears C.Y., Gladson C.L. 2005. Endogenous inhibitors of angiogenesis in malignant gliomas: nature's antiangiogenic therapy. Neuro-Oncology, 7: 106-121
- Reinheckel T., Hagemann S., Dollwet-Mack S., Martinez E., Lohmueller T., Zlatkovic G., Tobin D.J., Maas-Szabowski N., Peters C. 2005. The lysosomal cysteine protease cathepsin L regulates keratinocyte proliferation by control of growth factor recycling. Journal of Cell Science, 118, 15: 3387-3395

- Reiser J., Adair B., Reinheckel T. 2010. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 120: 3421-3431
- Rossi A., Deveraux Q., Turk B., Sali A. 2004. Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome. *The Journal of Biological Chemistry*, 385: 363-372
- Schechter I., Berger A. 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 27, 2: 157-162
- Spira D., Stypmann J., Tobin D.J., Petermann I., Mayer C., Hagemann S., Vasiljeva O., Guenther T., Schuele R., Peters C., Reinheckel T. 2007. Cell type-specific functions of the lysosomal protease cathepsin L in the heart. *The Journal of Biological Chemistry*, 282, 51: 37045-37052
- Stoka V., Turk B., Turk V. 2005. Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 57: 347-353
- Štrukelj B., Kos J., Bozovičar K., Bratkovič T., Lunder M., Glavač I., Kristl J., Doljak B., Slanc P., Kočevar N. 2007. *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 673 str.
- Tao K., Stearns N.A., Dong J., Wu Q.L., Sahagian G.G. 1994. The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 311: 19-27
- Tobin D.J., Foitzik K., Reinheckel T., Mecklenburg L., Botchkarev V.A., Peters C., Paus R. 2002. The lysosomal protease cathepsin L is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling. *American Journal of Pathology*, 160, 5: 1807-1821
- Turk B., Dolenc I., Turk V., Bieth J.G. 1993. Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry*, 32: 375-380
- Turk B., Turk D., Salvesen G.S., 2002. Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Current Pharmaceutical Design*, 8: 1623-1637
- Turk B. 2006. Targeting proteases: success, failure and future prospects. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 9:785-799
- Turk D., Gunčar G., Podobnik M., Turk B. 1998. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 137-147
- Turk D., Gunčar G. 2003. Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 59, 2: 203-213

- Turk V., Turk B., Turk D. 2001. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO Journal*, 20: 4629-4633
- Turk V., Stoka V., Vasiljeva O., Renko M., Sun T., Turk B., Turk D. 2012. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1824: 68-88
- Van Nierop K., Muller F.M.J., Stap J., Van Noorden C.J.F., Van Eijk M., De Groot C. 2006. Lysosomal destabilization contributes to apoptosis of germinal center B-lymphocytes. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54, 12: 1425–1435
- Vasiljeva O., Reinheckel T., Peters C., Turk D., Turk V., Turk B. 2007. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Current Pharmaceutical Design*, 13: 385-401
- Zadnik V., Primic Žakelj M. 2013. SLORA: Slovenija in rak. Epidemiologija in register raka. Ljubljana, Onkološki inštitut Ljubljana.
<http://www.slora.si> (oktober 2013)

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Borisu Turku, za možnost opravljanja magistrskega dela na Oddelku za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo Instituta Jožef Stefan in konstruktiven pregled končnega izdelka. Zahvala gre tudi ostalim zaposlenim oddelka, ki so pripomogli k uspešni izvedbi laboratorijskega dela. Hvala predvsem Jeleni Rajković, saj brez njenih nasvetov in pomoči pri interpretaciji rezultatov to delo ne bi nastalo.

Prof. dr. Gregorju Anderluhu se zahvaljujem za recenzijo in Simoni Juvan za odzivnost in strokovno pomoč v zaključni fazi priprave magistrskega dela.

Nenazadnje se zahvaljujem vsem mojim bližnjim, ki so mi stali ob strani, ne le med nastankom tega dela, temveč tudi skozi vsa predhodna leta šolanja.