

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

DIPLOMSKO DELO

Polona Klemenčič

Ljubljana, 2019

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

VISOKOŠOLSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM KEMIJSKA
TEHNOLOGIJA

**Vpliv izbranih peptidnih in proteinskih inhibitorjev na
aktivnost nekaterih algnih metakaspaz tipov I, II in III**

DIPLOMSKO DELO

Polona Klemenčič

MENTORICA: doc. dr. Marina Klemenčič

Ljubljana, 2019

IZJAVA O AVTORSTVU

diplomskega dela

Spodaj podpisana Polona Klemenčič sem avtorica diplomskega dela z naslovom Vpliv izbranih peptidnih in proteinskih inhibitorjev na aktivnost nekaterih algnih metakaspaz tipov I, II in III.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je diplomsko delo rezultat mojega raziskovalnega dela pod mentorstvom doc. dr. Marine Klemenčič;
- sem poskrbela, da so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem diplomskem delu, navedena oziroma citirana v skladu z navodili;
- se zavedam, da je plagiatorstvo, v katerem so tuje misli oziroma ideje predstavljene kot moje lastne, kaznivo po zakonu (Zakon o avtorski in sorodnih pravicah – uradno prečiščeno besedilo (ZASP-UPB3) (Ur. list RS, št. 16/2007));
- sem poskrbela za slovnično in oblikovno korektnost diplomskega dela;
- je elektronska oblika diplomskega dela identična tiskani obliki diplomskega dela.

V Ljubljani,

Podpis avtorice:

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici, doc. dr. Marini Klemenčič, za prevzem mentorstva, vso strokovno pomoč in pozitiven odnos pri nastajanju diplomskega dela.

Velika zahvala gre tudi izr. prof. dr. Marku Dolinarju za temeljit pregled diplomskega dela in predloge za izboljšavo.

Zahvaljujem se tudi osebju na Katedri za biokemijo in ostalim študentom za prijaznost in pomoč v laboratoriju.

Zahvala gre tudi moji družini, ki me je potrpežljivo podpirala in spodbujala ves čas študija.

Vpliv izbranih peptidnih in proteinskih inhibitorjev na aktivnost nekaterih algnih metakaspaz tipov I, II in III

Povzetek:

Proteaze so hidrolaze, ki jih najdemo pri rastlinah, živalih in mikroorganizmih in omogočajo znotrajcelično in zunajcelično razgradnjo proteinov. V splošnem jih delimo v štiri večje skupine, in sicer metaloproteaze, aspartatne, serinske in cisteinske proteaze. Aktivnost slednjih kontrolirajo njihovi endogeni inhibitorji, najbolj pogosti so cistatini, tirocini in α 2-makroglobulin. Vrsta cisteinskih proteaz so tudi kaspaze. V celicah so prisotne kot prokaspaze v neaktivni obliki. Za njihovo aktivacijo je nujna proteolitična cepitev na dveh mestih.

Metakaspaze so edini kaspazni homologi, ki poleg domene p20 vsebujejo tudi domeno p10. Od kaspaz se razlikujejo po tem, da za svojo katalitično aktivnost ne potrebujejo oligomerizacije. Metakaspaze najdemo pri glivah, praživalih in rastlinah. Sodelujejo v procesu programirane celične smrti in uravnavajo celično homeostazo. Glede na položaj domen p20 in p10 v polipeptidni verigi poznamo metakaspaze tipa I, tipa II in zaenkrat še najmanj raziskan, tip III.

Namen moje diplomske naloge je bil ugotoviti, kako intenzivno različni inhibitorji zavirajo aktivnost posameznega tipa metakaspaze. Uporabili smo metakaspazo tipa II, CrMC2, iz alge *Chlamydomonas reinhardtii* ter metakaspazo tipa I, GtMC1, in metakaspazo tipa III, GtMC2, iz organizma *Guillardia theta*. Preizkusili smo sedem različnih inhibitorjev: antipain, levpeptin, E-64, FFR-CMK, Z-VAD, PMSF in serpin. Teste encimskih aktivnosti smo izvedli pri pH 8,0 v prisotnosti kalcijevih ionov. Aktivnost encima smo spremljali z merjenjem fluorescence, pri čemer smo kot substrat uporabili FR-AMC. Rezultati so pokazali, da so vsi inhibitorji razen serpina podobno učinkovito zavirali delovanje posameznega tipa metakaspaze. Serpin je učinkovito zaviral le delovanje GtMC1. Kot najmočnejši inhibitor vseh treh tipov metakaspaz se je izkazal FFR-CMK, sledita pa mu antipain in levpeptin. Na podlagi naše raziskave lahko trdimo, da GtMC1, CrMC2 in GtMC2 najmanj zavirajo inhibitorji PMSF, E-64 in Z-VAD.

Ključne besede: metakaspaza, proteoliza, inhibicija, serpin

The influence of selected peptide and protein inhibitors on the activity of some algal type I, II and III metacaspases

Abstract:

Proteases are hydrolases found in plants, animals and microorganisms. They enable intracellular and extracellular degradation of proteins. In general, proteases divided into four major groups: metalloproteases, aspartatic, serine and cysteine proteases. The activity of the latter is controlled by their endogenous inhibitors, the most common being cystatins, thypopins, and α 2-macroglobulin. Among the best characterized cysteine proteases are caspases. They are present in cells as procaspases in an inactive form and depend on autoproteolytic cleavage and dimerization for their activity.

Metacaspases are the only caspase homologues that besides the p20 domain also contain the p10 domain. Unlike caspases, metacaspases do not require oligomerization for their catalytic activity. These proteases are found in fungi, protozoa and plants. They participate in the process of programmed cell death and regulate cellular homeostasis. Depending on the position of the p20 and p10 domains in the polypeptide chain, type I, type II and, the least studied, type III metacaspases are known.

The aim of this study was to determine to what extent various inhibitors inhibit the activity of each of the three metacaspase types. For this we used a type II metacaspase, CrMC2, from the algae *Chlamydomonas reinhardtii* and type I metacaspase, GtMC1, and type III metacaspase, GtMC2, from the algae *Guillardia theta*. As inhibitors antipain, leupeptin, E-64, FFR-CMK, Z-VAD-FMK, PMSF and serpin were tested. Enzyme activity measurements were performed at pH 8.0 in the presence of calcium ions. The activity of enzymes was monitored by fluorescence measurement using FR-AMC as the substrate. The results showed that all inhibitors but serpin exhibited similar inhibition towards each of the three metacaspase types. Serpin, on the other hand, effectively inhibited only the activity of GtMC1. FFR-CMK was the most potent inhibitor for all three metacaspase types, followed by antipain and leupeptin. PMSF, E-64 and Z-VAD exhibited little inhibitory effect towards any of the three metacaspase types.

Keywords: Metacaspase, Proteolysis, Inhibition, Serpin

Kazalo

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Uvod..... | 1 |
| 1.1 | Proteaze..... | 1 |
| 1.1.1 | Metakaspaze..... | 4 |
| 1.2 | Inhibitorji..... | 5 |
| 1.2.1 | Antipain..... | 5 |
| 1.2.2 | Levpeptin..... | 6 |
| 1.2.3 | E-64..... | 6 |
| 1.2.4 | FFR-CMK..... | 7 |
| 1.2.5 | Z-VAD-FMK..... | 7 |
| 1.2.6 | PMSF..... | 8 |
| 1.2.7 | Serpin..... | 8 |
| 2 | Namen dela..... | 11 |
| 3 | Eksperimentalni del..... | 13 |
| 3.1 | Kemikalije..... | 13 |
| 3.2 | Aparature in oprema..... | 13 |
| 3.3 | Pufer..... | 13 |
| 3.4 | Encimi..... | 14 |
| 3.5 | Substrat..... | 14 |
| 3.6 | Inhibitorji..... | 14 |
| 3.7 | Priprava mikrotitrskih plošč za analizo..... | 15 |
| 3.8 | Fluorescenčna spektroskopija..... | 16 |
| 4 | Rezultati in razprava..... | 19 |
| 5 | Zaključek..... | 23 |
| 6 | Seznam uporabljenih virov..... | 25 |

Seznam uporabljenih kratic in simbolov

| | |
|----------|--|
| AMC | 7-amino-4-metilkumarin |
| AtMC1 | metakaspaza tipa I rastline <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| CARD | domena za oligomerizacijo in aktivacijo kaspaz |
| CrMC2 | metakaspaza tipa II alge <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> |
| Da | Dalton, enota za molekulsko maso, ki ustreza 1/12 mase ¹² C |
| DD | efektorska domena smrti |
| DED | domena smrti |
| DMF | dimetilformamid |
| DMSO | dimetilsulfoksid |
| DTT | ditiotreitol |
| E-64 | (1S,2S)-2-(((S)-1-((gvandin butil) amonij)-4-metil-1-oksopentan karbamoil) ciklopropan |
| FFR-CMK | Phe-Phe-Arg-klorometilketon |
| GtMC1 | metakaspaza tipa I alge <i>Guillardia theta</i> |
| GtMC2 | metakaspaza tipa III alge <i>Guillardia theta</i> |
| LdMC | metakaspaza tipa I bičkarja <i>Leishmania donovani</i> |
| MaOC1 | ortokaspaza iz cianobakterije <i>Microcystis aeruginosa</i> |
| PMSF | fenilmetil-sulfonilfluorid |
| PRR | domena, bogata s prolini |
| TaeMCAII | metakaspaza tipa II rastline <i>Triticum aestivum</i> |
| TPCK | tozil-fenilalanil klormetilketon |
| TPR | domena s tetratrikopeptidnim motivom |

Tris 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
Z-VAD-FMK N-benziloksikarbonil-Val-Ala-Asp(O-Me) fluormetilketon

1 Uvod

1.1 Proteaze

Proteaze spadajo v razred encimov, ki jih imenujemo hidrolaze in katalizirajo razcep peptidne vezi s hidrolizo. Proteaze, ki jih imenujemo tudi peptidaze ali proteolitični encimi [1], katalizirajo razgradnjo proteinov v manjše peptide, oziroma jih razgradijo do prostih aminokislinskih ostankov. Pogosto delujejo selektivno, kar pomeni, da posamezna proteaza cepi polipeptidno verigo glede na specifično zaporedje aminokislin pod vplivom določenih pogojev [2, 3].

Proteaze najdemo pri rastlinah, živalih in mikroorganizmih, kjer omogočajo znotrajcelično in zunajcelično razgradnjo proteinov. Pri človeku geni, ki zapisujejo za proteaze, predstavljajo približno 2 % genoma. Ti encimi so ključnega pomena pri številnih bioloških procesih, npr. pri regulaciji in aktivaciji proencimov in prohormonov, celični migraciji, celični rasti in procesu programirane celične smrti ali apoptoze. Posledično igrajo pomembno vlogo tudi pri raznih boleznih. Povečano delovanje proteaz je dokazano pri raznih vrstah raka, Alzheimerjevi bolezni in pri vnetnih boleznih, kot sta revmatoidni artritis in paradontalna bolezen ter pri okužbah z virusi, na primer pri virusu HIV [1,2,4]. Zdravljenje omenjenih bolezni bi lahko potekalo z inhibicijo delovanja teh encimov. Določeni inhibitorji zavirajo le določene tipe proteaz [4].

Glede na mesto cepitve peptidne vezi proteaze delimo na endopeptidaze in eksopeptidaze. Eksopeptidaze razdelimo glede na velikost odcepljenih fragmentov in glede na mesto cepitve peptidne vezi, endopeptidaze pa se razlikujejo po funkcionalni skupini v aktivnem mestu. Po klasifikacijskemu sistemu MEROPS, peptidaze glede na katalitski mehanizem delimo v klane, ki združujejo proteaze s podobno terciarno strukturo. Družine proteaz znotraj klanov sestavljajo encimi s skupnimi predniki, ki pa so se evolucijsko tako spremenili, da se ujemajo le še v delu aminokislinskega zaporedja [2,4]. V splošnem proteaze razdelimo v štiri velike razrede: metaloproteaze, aspartatne, serinske in cisteinske proteaze. Vsak razred se naprej deli v klane in družine [4].

Metaloproteaze so v splošnem eksopeptidaze, ki sodelujejo predvsem v procesih razgradnje zunajceličnega matriksa. Sodelujejo pri razvoju zarodka, morfogenezi, tudi v patoloških procesih in razgradnji ter preoblikovanju tkiv. Naslednja skupina, aspartatne proteaze, so izključno endopeptidaze in so najbolj učinkovite v kislem pH. Pomembni aspartatni proteazi v farmacevtski industriji sta renin, ki je odgovoren za nastanek hipertenzije, in pepsin, proteaza želodčnega soka, ki sodeluje pri prebavi proteinov [5]. Serinske proteaze so najbolj raziskane proteaze, tako pri bakterijah kot tudi pri evkariontih, kjer na primer varujejo celice pred infekcijami, zmanjšujejo nastajanje

krvnih strdkov in igrajo pomembno vlogo pri oploditvi. Primer serinske proteaze je kimotripsin, ki se sintetizira v trebušni slinavki [6].

Cisteinske proteaze so proteaze, ki so odgovorne so za številne biokemijske procese v celici. Aktivnost cisteinskih proteaz kontrolirajo njihovi endogeni inhibitorji, pri človeku so to cistatini, tiropini in α 2-makroglobulin [2, 7].

Kaspaze so skupine cisteinskih proteaz, ki so ključnega pomena pri uravnavanju apoptoze, najbolj raziskane oblike programirane celične smrti pri živalih. Specifično cepijo peptidno verigo za aspartatom, na mestu P1. V celicah so navadno prisotne kot prokaspaze, torej v neaktivni obliki [8, 9]. Znani sta dve vrsti kaspaz; prva skupina so že omenjene apoptotske kaspaze, druga pa so vnetne kaspaze. Za aktivacijo kaspaz je nujna proteolitična cepitev na dveh mestih. Najprej pride do odcepitev proverege, poteče pa tudi cepitev med domenama p20 in p10. Aktivno kaspazo sestavljata dva heterodimera – dve mali in dve veliki podenoti. Skupina vnetnih kaspaz, kamor spada prva izolirana kaspaza, kaspaza 1, sodeluje pri procesiranju citokinov in ne sodeluje pri apoptozi [8].

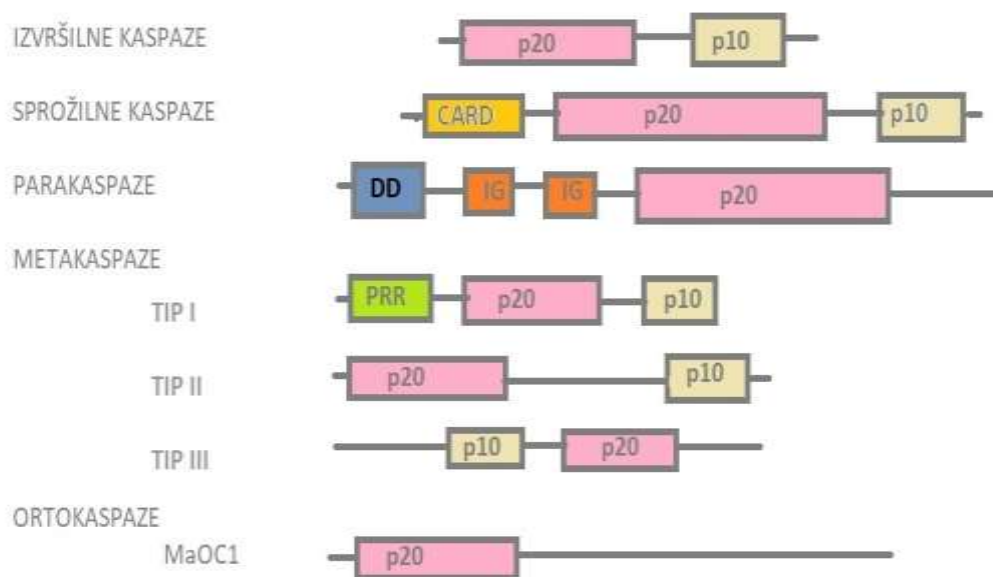
Apoptoske kaspaze delimo na izvršilne in sprožilne. Sprožilne kaspaze imajo, za razliko od izvršilnih, poleg domen p20 in p10, ki sta ključni za proteolitično aktivnost, še N-končno prodomeno, ki vsebuje eno izmed domen CARD ali DED (slika 1). To sta domeni, ki omogočata aktivacijo sprožilne kaspaze s predhodno oligomerizacijo. Preko domen CARD in DED se sprožilne kaspaze med seboj povežejo v apoptosome. Domena p20 je večja in ima maso približno 20 kDa, manjša domena p10 pa 10 kDa. Kot že omenjeno, proteolitična cepitev teh dveh domen aktivira izvršilne kaspaze [10, 11].

Predstavniki strukturno homolognih skupin kaspaz, metakaspaze in parakaspaze, vsebujejo domeno p20 z značilnim kaspaznim zvitjem in katalitično diado, ki jo sestavljata cistein in histidin. Metakaspaze so edini kaspazni homologi, ki poleg domene p20 vsebujejo tudi domeno p10 (slika 1). Metakaspaze in parakaspaze spadajo v družino proteaz C14B, klana CD cisteinskih proteaz. Domena p20 je prisotna tudi v tretji skupini, ortokaspazah, ki pa so zaenkrat še slabše raziskana skupina kaspaz [12, 13].

Parakaspaze, ki jih najdemo pri živalih in glivah sluzovkah, poleg domene p20 vsebujejo tudi eno ali več domen smrti DD in več imunoglobulinskih domen na N-koncu proteina (slika 1) [14]. Raznolikost prisotnih domen je odvisna od vrste in razvitosti organizma. Ena izmed najbolj raziskovanih parakaspaz je človeška parakaspaza MALT1, ki je prisotna pri cepitvi različnih molekul, ki sodelujejo pri uravnavanju apoptoze. Encim se aktivira z oligomerizacijo in cepi substrate za argininom. Med procesom ne pride do avtoproteolitične cepitve encima. Za svojo aktivnost ne potrebujejo kalcija, ki je ključnega pomena za delovanje metakaspaz [10, 14].

Predstavniki tretje podskupine strukturnih homolognih kaspaz, ortokaspaze, imajo le domeno p20, ne pa tudi domene p10 (slika 1). Tudi ortokaspaze so člani družine C14B,

ki pripada klanu CD proteaz [13]. Najdemo jih pri prokariontih, tako bakterijah kot arhejah, kot tudi pri nekaterih vrstah evkariontskega fitoplanktona. Rastline in zelene alge jih nimajo [15]. Glede na to, da so ortokaspaze dobro zastopane pri α -proteobakterijah, ki naj bi bile predhodniki mitohondrijev, lahko tako razložimo evlucijski izvor kaspaz [10, 13]. Kljub temu, da ortokaspaze nimajo domene p10, pa so C-končno od domene p20 lahko prisotne še druge domene. Ortokaspaze so tako edini kaspazni homologi s to lastnostjo. Vloga teh domen naj bi bila pretežno signalizacija med proteini. Obstajajo tudi primeri, kjer je domena p20 prisotna na zunanji strani celične membrane, torej so ortokaspaze lahko tudi transmembranski proteini. Posebnost ortokaspaz je tudi to, da sta aminokislini histidin in cistein včasih zamenjani z tirozinom oziroma serinom, glutaminom, glicinom ali asparaginom [10]. V cianobakteriji *Microcystis aeruginosa* PCC 7806 je bilo do sedaj prepoznanih šest domnevnih genov, ki kodirajo proteine, podobne kaspazam [13].



Slika 1: Organizacija domen pri kaspazah in kaspazam podobnih proteinih. Shema prikazuje prisotnost domen pri kaspazah in parakaspazah v mnogoceličarjih, metakaspaz v rastlinah in kremenastih algah ter bakterijske ortokaspaze [13]. Iz slike je razvidno, da sprožilne kaspaze poleg domene p20 in p10 vsebujejo tudi domeno CARD (rdeče obarvana; lahko tudi domeno DED). CARD in DED sta domeni, ki omogočata aktivacijo sprožilne kaspaze [11, 13]. Pri parakaspazah je prisotna še (modro obarvana) domena DD - domena smrti in več imunoglobulinskih domen IG na N-koncu proteina, ki sta obarvani rdeče [14]. Metakaspaze tipa I imajo lahko dodatno, na shemi zeleno obarvano domeno, PRR, ki je bogata s prolinskimi ponovitvami [13]. Slika je le simbolični prikaz in ne odraža dejanskega razmerja velikosti med domenami (povzeto po viru [13]).

1.1.1 Metakaspaze

Metakaspaze so kaspazni homologi pri rastlinah, glivah in algah, ki igrajo pomembno vlogo pri programirani celični smrti [15, 16]. Sodelovanje pri procesu programirane celične smrti je ena izmed prvotno znanih nalog kaspaznih homologov, toda raziskave so pokazale, da je vloga metakaspaz ravno tako pomembna tudi za uravnavanje celične homeostaze pri fizioloških procesih, pri celični diferenciaciji in pri celičnemu staranju [17]. Kot je razvidno iz slike 1, delimo metakaspaze glede na položaj domen p20 in p10 v polipeptidni verigi v tri skupine. Metakaspaza tipa I ima poleg osnovnih domen še N-končno domeno, kjer je lahko prisotno s prolino bogato območje (angl. Proline Rich Repeat, PRR). Za metakaspaze tipa II je značilna podaljšana povezovalna zanka med domenama p20 in p10, ki je dolga od 90 do 150 aminokislin. Pri metakaspazah tipa III lahko opazimo obratno zaporedje domen p20 in p10. Na N-končnem delu je torej najprej domena p10, nato pa sledi domena p20 [13, 15]. Negativno nabiti aminokislinski ostanki v domeni p10 so značilni za vse tri tipe metakaspaz [17]. Tako kot parakaspaze in ortokaspaze tudi metakaspaze cepijo substrate za bazičnima aminokislinskima ostankoma, argininskim in lizinskim, na mestu P1 [10].

Metakaspaza tipa I je najbolj zastopan tip metakaspaz, saj jo najdemo pri največjem številu organizmov: proteobakterijah, cianobakterijah, kvasovkah, protistih, algah in vseh vrstah rastlin. Metakaspaza tipa II je prisotna samo pri zelenih evkariontskih organizmih: rastlinah in pri zelenih algah. Posebnost metakaspaz tipa III je da jih najdemo samo pri organizmih, ki so nastali v procesu sekundarne endosimbioze [15].

Vsi tipi metakaspaz so v celicah prisotni v obliki neaktivnih proencimov. Katalitična aktivnost metakaspaz je najvišja pri pH-vrednostih med 6 in 8, vsi tipi metakaspaz pa za svojo aktivnost potrebujejo tudi prisotnost kalcijevih ionov v milimolarnem koncentracijskem območju [10, 18]. Pri metakaspazah tipa II je prisotnost kalcija ključna za cepitev za ohranjenimi argininskimi oziroma lizinskimi ostanki na N-končnem delu povezovalne regije med domenama p20 in p10, s čimer se encim avtokatalitično aktivira [18]. Za aktivacijo metakaspaze tipa I avtoproteolitična cepitev ni potrebna. V nekaterih primerih je sicer bila opažena proteolitična cepitev metakaspaze tipa I, vendar pa ta ni pogoj za njeno avtokatalitično aktivnost [19, 20].

Raziskave nedavno odkritih metakaspaz tipa III – predstavnik je GtMC2 iz alge *Guillardia theta*, so razložile od kalcija odvisno aktivnost metakaspaz: regijo v domeni p10, ki vsebuje veliko negativno nabitih aminokislinskih ostankov, je mogoče najti le pri metakaspazah in ne pri ostalih kaspaznih homologih, katerih aktivnost ni odvisna od prisotnosti kalcijevih ionov. Raziskave so tudi pokazale, da so metakaspaze tipa III funkcionalno podobne metakaspazam tipa I. Tudi pri tem tipu metakaspaz namreč pride do katalitične aktivnosti po odcepitvi N-končnega dela encima. Za to je potrebna prisotnost kalcijevih ionov v nizkih milimolarnih koncentracijah [21].

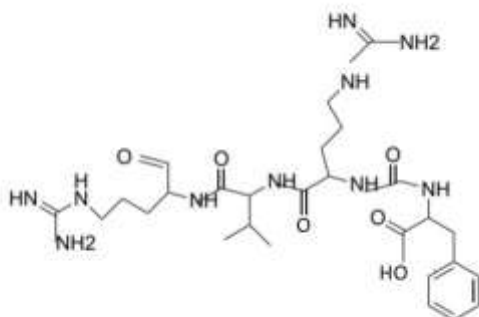
1.2 Inhibitorji

Encimi v tkivih in celicah ne reagirajo le s substrati. Tam so prisotne razne druge molekule, ki lahko vplivajo na delovanje encimov. Ene izmed njih so tudi inhibitorji, ki zavirajo aktivnost encimov. Ta proces izrabljamo tudi v raziskovalne namene, ko želimo encime namerno inhibirati z namenom preučevanja delovanja inhibitorjev oziroma encimov. Veliko zdravil in toksinov deluje po principu inhibicije encimov. Glede na način delovanja inhibitorja na encim ločimo dve skupini inhibitorjev, ireverzibilne in reverzibilne. Ireverzibilni inhibitor se kovalentno ali pa z močno nekovalentno vezjo poveže s funkcionalno skupino aminokislina encima. Rezultat je kemično spremenjen encim, ki ni več katalitično aktiven – je trajno deaktiviran. Še posebno so na kemične modifikacije z ireverzibilnimi inhibitorji občutljivi aminokislinski ostanki serina, cisteina ter histidina. Reverzibilni inhibitor se za razliko od ireverzibilnega inhibitorja poveže z encimom s šibkejšimi nekovalentnimi vezmi in le začasno zaustavi njegovo delovanje. Encim ni katalitično aktiven le takrat, ko je nanj vezan reverzibilni inhibitor [3].

1.2.1 Antipain

Antipain je oligopeptid, ki so ga izolirali iz aktinomicet. To so bakterije, ki so biotehnoško zanimive, saj proizvajajo antibiotike, kot je streptomycin. Inhibitor antipain je primeren za reverzibilno zaviranje delovanja serinskih in cisteinskih proteaz [22]. Reverzibilni inhibitor se veže na encim, a se od njega lahko tudi odcepi. Največkrat se antipain uporablja kot zaviralec tripsina in papaina, v manjši meri tudi plazmina. Ob njegovi izolaciji v 70-ih letih prejšnjega stoletja je bil to prvi naravni peptid, ki vsebuje ureilensko skupino. Njegov mehanizem delovanja je tvorba hemiacetalne vezi med karbonilno skupino inhibitorja in serinskim ali cisteinskim ostankom v aktivnem mestu proteaze (slika 2) [22].

Antipain hranimo v alikvotih pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in je uporaben do 9 mesecev. Je akutno toksičen, draži oči, kožo in dihala. Poleg vode je topen tudi v metanolu in DMSO-ju [22].

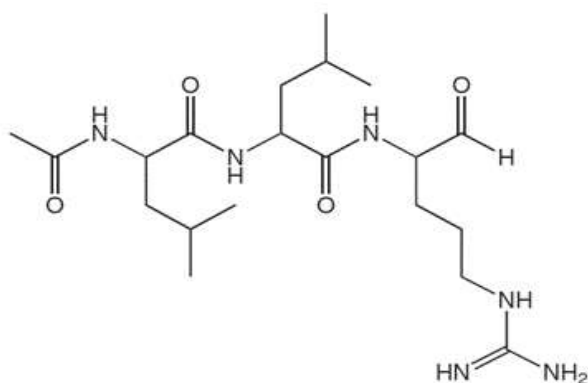


Slika 2: Strukturna formula antipaina (povzeto po viru [23]).

1.2.2 Levpeptin

Levpeptin je zaviralec serinskih in cisteinskih proteaz [24]. Je reverzibilni inhibitor [25]. Pogosto ga uporabljamo kot zaviralca katepsinov, kalpainov in tripsina. Uporablja se v poskusih namenjenih preučevanju proteinov, encimov, aminokislin in neuropeptidov. V medicini je poznan kot zaviralec malarije [25].

Levpeptin tako kot antipain izoliramo iz aktinomicet. Je majhen peptid, ki ga sestavljajo tri aminokisljine. Aminska skupina spojine nosi tudi acetilno skupino. Karboksilna skupina se razlikuje od ostalih peptidov in proteinov, saj ima namesto karbonylnega dela aldehidno skupino [25]. Levpeptin se topi v vodi, ocetni kislini, DMF-ju in etanolu [26].

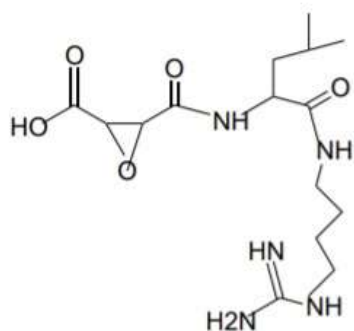


Slika 3: Strukturna formula levpeptina [27].

1.2.3 E-64

Prvo specifično vpletenost cisteinskih proteaz v procesu programirane celične smrti so raziskovalci zaznali, ko je že dobro poznan inhibitor cisteinskih proteaz, E-64, ob prisotnosti anorganskega ogljika zavrl avtolizo v planktonskem enoceličarju *Peridinium gatunese* [28]. Za razliko od antipaina in levpeptina, ki izhajata iz aktinomicet, so E-64 izolirali iz ekstrakta glive *Aspergillus violaceofuscus*. Od njiju se loči po svoji specifičnosti, saj zavira le cisteinske proteaze, kot je na primer papain. E-64 je odlična potencialna komponenta za zdravila, ki se uporabljajo pri zdravljenju bolezni, kjer je glavni vzrok visoka vrednost aktivnosti cisteinskih proteaz [29, 25].

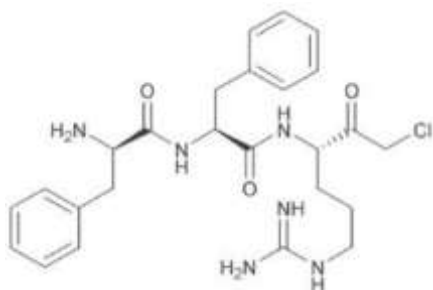
E-64 je ireverzibilen, močan in visoko selektiven inhibitor cisteinskih proteaz in ne reagira s funkcionalno tiolno skupino neproteaznih encimov. Aktivni del, trans-epoksisukcinilna skupina inhibitorja, se ireverzibilno veže na aktivno tiolno skupino cisteinske proteaze in nastane tioesterska povezava (slika 4). Inhibitor E-64 je primeren za uporabo v študijah *in vivo*, ker je zelo specifičen in skoraj ni toksičen. Stabilen je v območju od pH 2 do pH 10. V prisotnosti amonijaka ali klorovodikove kisline je nestabilen. Raztaplja se v vodi in DMSO-ju [30].



Slika 4: Strukturna formula E-64 (povzeto po viru [30]).

1.2.4 FFR-CMK

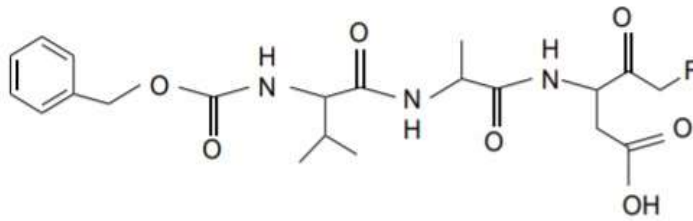
FFR-CMK spada v skupino ireverzibilnih inhibitorjev serinskih in cisteinskih proteaz [31]. Klormetilna skupina kovalentno reagira z aktivnim mestom cisteinske proteaze pri čemer se odcepi klor [33]. FFR-CMK uspešno zavira trombin, encim v krvni plazmi, ki ima glavno vlogo pri strjevanju krvi [31, 32]. Po enakem principu deluje tudi inhibitor TPCK, saj ravno tako spada v skupino klormetilketonov in zavira kimotripsin, prebavni encim, ki se sintetizira v trebušni slinavki [33].



Slika 5: Strukturna formula FFR-CMK.

1.2.5 Z-VAD-FMK

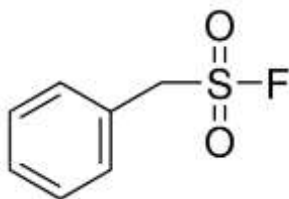
Z-VAD-fluormetilketon se, tako kot E-64 in FFR-CMK, ireverzibilno veže na encim in ga deaktivira. Slika 6 prikazuje njegovo strukturo. Prvotno je bil namenjen za medicinsko rabo, toda citotoksičnost presnovnega derivata FMK je omejila njegov potencial [34]. Topen je v DMSO-ju ali acetonitrilu. V raztopini hitro razpade, zato je nujno, da si ga ob uporabi pripravljamo sprti in le toliko, kolikor ga bomo porabili [35].



Slika 6: Strukturna formula Z-VAD-FMK (povzeto po viru [35]).

1.2.6 PMSF

PMFS ali fenilmetil-sulfonilfluorid je inhibitor večine serinskih proteaz, učinkovit pri pripravi celičnih lizatov, saj prepreči, da serinske proteaze, ki se ob lizi celic sprostijo, nespecifično razgradijo proteine. Raztopine z PMSF običajno pripravljamo v brezvodnem etanolu ali izopropanolu tik pred uporabo, saj je življenjska doba PMSF-ja ob neustreznih pogojih lahko zelo kratka [36, 37]. PMSF se veže specifično na serinski ostanek v aktivnem mestu, fluor se odcepi (slika 7). Stranski produkt pri reakciji je vodikov fluorid, ki ob stiku z vlago ali tkivi deluje jedko in strupeno. Razkraja tudi steklo. Zaradi tega je ob stiku z inhibitorjem PMSF obvezna uporaba rokavic, laboratorijski inventar pa mora biti plastičen [37, 38].



Slika 7: Strukturna formula PMSF [39].

1.2.7 Serpin

Izmed vseh uporabljenih inhibitorjev pri tej nalogi je serpin edini, ki je protein. Za zaviranje tarčnih encimov serpini izrabljajo spremembe v konformaciji molekul [40]. Serpini večinoma zavirajo serinske proteaze, poznamo pa tudi serpine, ki zavirajo delovanje kaspaz in papainu podobnih cisteinskih proteaz. Serpini so s 330–500 aminokislinami relativno velike molekule. Serpin sestavljajo tri β ploskve (A, B in C) ter 8-9 α vijačnic [41]. Za njihovo aktivnost je ključna zanka, ki je z oranžno barvo prikazana na sliki 8. Gene, ki zapisujejo serpinom podobne proteine, najdemo pri živalih, rastlinah, poksivirusih, bakterijah in arhejah [41].

Serpini s proteazami načeloma tvorijo ireverzibilne komplekse, toda včasih se vez pretrga, serpin ostane razcepljen, encim pa postane spet aktiven. Zaviralni mehanizem pri serpinu je mnogo bolj zapleten kot pri ostalih inhibitorjih proteaz, saj ne teče po principu ključ-ključavnica [40].



Slika 8: Struktura serpina. Z oranžno barvo je prikazana aktivna zanka, ki se veže v aktivno mesto proteaze in tako inhibira njeno delovanje. PDB: 1K9O.

Ljudje naj bi imeli 36 serpinov in približno 9 serpinom podobnih genov [41]. Kopičenje serpinov v endoplazemskemu retikulumu celic, ki izločajo serpin, lahko povzroča bolezni, na primer cirozo jeter zaradi polimerizacije serpina1 ali dedno demenco zaradi polimerizacije nevroserpina. Večina prokariontov v svojih genomih vsebuje zapis le za en serpin [41].

2 Namen dela

Cilj moje diplomske naloge je bil ugotoviti, kako nekateri pogosto uporabljeni inhibitorji vplivajo na delovanje metakaspaz GtMC1, CrMC2 in GtMC2. Zanimalo nas je, kakšna bo aktivnost encimov v prisotnosti posameznega inhibitorja, pri čemer smo vedeli, da manjša izmerjena fluorescenca pomeni nižjo aktivnost encima in torej kaže na bolj učinkovit inhibitor. Diplomsko delo temelji na naslednjih dveh hipotezah:

- (1) Vsi inhibitorji, razen Z-VAD-FMK, bodo zavirali aktivnost vseh treh tipov metakaspaz.
- (2) Inhibitor serpin bo zaviral le delovanje GtMC1.

3 Eksperimentalni del

3.1 Kemikalije

Pri laboratorijskem delu smo uporabili naslednje reagente:

- Tris (Sigma)
- NaCl (Gram-Mol)
- CaCl₂ (Sigma-Aldrich)
- DTT (Thermo Fisher Scientific)
- 37 % HCl (Sigma-Aldrich)
- Z-Phe-Arg-AMC (PeptaNova)

3.2 Aparature in oprema

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili naslednjo opremo:

- tehtnica WLC2/A2 (RADWAG)
- pH meter (Mettler Toledo)
- analogni vibracijski mešalnik (Fisher Scientific)
- čitalec mikrotitrskih plošč Infinite 200 PRO (Tecan)
- polistirenske mikrotitrsko plošče (Greiner 96)

3.3 Pufer

Pripravila sem 100 ml pufera z naslednjo sestavo:

- 20 mM Tris/HCl (pH = 8)
- 150 mM NaCl
- 5 mM DTT
- 10 mM CaCl₂

Pufer sem pripravila tako, da sem izračunala maso posameznega reagenta. Izračunane mase sem natehtala v čašo in jih raztopila v deionizirani vodi na okvirni volumen 80 ml. Raztopini sem pH s HCl uravnala na 8,0, saj je rahlo bazično okolje pogoj za encimsko aktivnost metakaspaz. Pogoj za delovanje metakaspaz je tudi prisotnost kalcijevih ionov zato smo dodali CaCl₂.

Računi:

$$m(\text{Tris}) = c * V * M = 0,02 \text{ M} * 0,1 \text{ l} * 121,44 \text{ g mol}^{-1} = 0,243 \text{ g}$$

$$m(\text{NaCl}) = c * V * M = 0,150 \text{ M} * 0,1 \text{ l} * 58,44 \text{ g mol}^{-1} = 0,877 \text{ g}$$

$$m(\text{DTT}) = c * V * M = 0,005 \text{ M} * 0,1 \text{ l} * 154,25 \text{ g mol}^{-1} = 0,077 \text{ g}$$

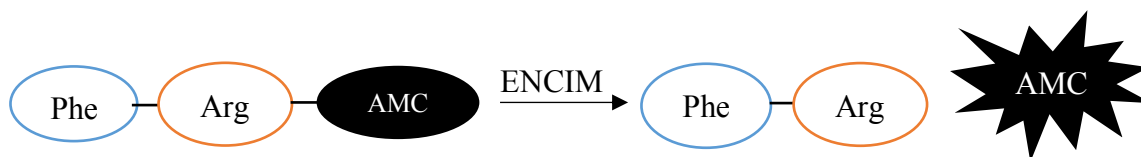
$$m(\text{CaCl}_2) = c * V * M = 0,01 \text{ M} * 0,1 \text{ l} * 147 \text{ g mol}^{-1} = 0,147 \text{ g}$$

3.4 Encimi

Uporabili smo predhodno izolirane encime, metakaspaze treh tipov; GtMC1, CrMC2 in GtMC2. Izhodiščna koncentracija vseh encimov je bila 1 mg/ml.

3.5 Substrat

Uporabili smo komercialno dostopen substrat (Bachem, Švica), ki je sestavljen iz aminokislinskih ostankov fenilalanina in arginina ter molekule AMC. Substrat deluje tako, da v necepljeni obliki ne fluorescira, ko pa pride do cepitve vezi med argininom in AMC, se AMC sprosti in fluorescira (slika 9). Če imamo v reakciji še inhibitor, je fluorescenca odvisna od moči inhibicije: bolj kot je inhibitor uspešen pri vezavi na encim, manj encima je aktivnega in manjša je fluorescenca.



Slika 9: Cepitev substrata ob delovanju encima. Na levi strani AMC ne fluorescira, na desni fluorescira.

3.6 Inhibitorji

Uporabili smo sedem različnih inhibitorjev:

- antipain (1 mM) (Sigma-Aldrich)
- levpeptin (1 mM) (Sigma-Aldrich)
- E-64 (20 mM) (Sigma-Aldrich)
- FFR-CMK (1 mM) (Bachem)
- Z-VAD-FMK (1 mM) (Bachem)
- PMSF (1 mM) (Sigma-Aldrich)
- serpin (100 μM) (predhodno pripravljen, rekombinantno izražen protein, iz organizma *Chlamydomonas reinhardtii*, ki ga je pripravila doc. dr. Marina Klemenčič)

3.7 Priprava mikrotitrskih plošč za analizo

Pripravila sem tri mikrotitrške plošče, saj nas je zanimala aktivnost treh različnih tipov proteaz. Končni volumen raztopine v vsaki jamici mikrotitrške plošče je bil 150 μ l. Substrat sem v pufru razredčila tako, da je bila njegova koncentracija v mikrocentrifugirki 5 μ M. Shema pipetiranja mikrotitrške plošče je prikazana v tabeli 1. Vsa pipetiranja sem izvedla v treh tehničnih replikatih. V prve tri jamice sem tako odpipetirala 150 μ l raztopine substrata in pufra, kar smo pri merjenju aktivnosti encima uporabili kot vrednosti ozadja. Sledilo je pipetiranje 149 μ l raztopine pufra in substrata ter 1 μ l encima. Vrednost aktivnosti v tej jamici smo upoštevali kot 100 % aktivnost encima. Za določanje aktivnosti encima v prisotnosti posameznih inhibitorjev sem k 1 μ l encima in 147,5 μ l substrata ter pufra dodala še 1,5 μ l posameznega inhibitorja. Končna koncentracija inhibitorja v raztopini je bila 10 μ M oz. 1,5 μ M v primeru serpina. Končne koncentracije posameznega encima so prikazane v tabeli 2. Pri analizi rezultatov smo upoštevali povprečje treh meritev.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|--|---|---|---|----|----|
| A | PUFER + SUBSTRAT (150 μ l) | | | PUFER+ SUBSTRAT (150 μ l) ENCIM (1 μ l) | | | PUFER (149 μ l) ENCIM (1 μ l) | | | | | |
| B | PUFER + SUBSTRAT (147,5 μ l) ENCIM (1 μ l) <i>ANTIPAIN (1,5 μl)</i> | | | PUFER + SUBSTRAT (147,5 μ l) ENCIM (1 μ l) <i>LEVPEPTIN (1,5 μl)</i> | | | PUFER + SUBSTRAT (147,5 μ l) ENCIM (1 μ l) <i>E-64 (1,5 μl)</i> | | | PUFER + SUBSTRAT (147,5 μ l) ENCIM (1 μ l) <i>FFR-CMK (1,5 μl)</i> | | |
| C | PUFER + SUBSTRAT (147,5 μ l) ENCIM (1 μ l) <i>Z-VAD-FMK (1,5 μl)</i> | | | PUFER + SUBSTRAT (147,5 μ l) ENCIM (1 μ l) <i>PMSF (1,5 μl)</i> | | | PUFER + SUBSTRAT (147,5 μ l) ENCIM (1 μ l) <i>SERPIN (1,5 μl)</i> | | | | | |

Tabela 1: Shema pipetiranja raztopin v jamice mikrotitrške plošče.

| Encim | Molska masa [g/mol] | Začetna masna koncentracija [g/l] | Odmerjen volumen encima [μ l] | Končni volumen v jamici mikrotitrne plošče [μ l] | Končna množinska koncentracija encima [μ M] |
|-------|---------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---|--|
| GtMC1 | 31253 | 1 | 1 | 150 | 0,21 |
| CrMC2 | 43786 | 1 | 1 | 150 | 0,15 |
| GtMC2 | 43003 | 1 | 1 | 150 | 0,15 |

Tabela 2: Prikaz končnih množinskih koncentracij encimov v reakcijskih mešanica.

3.8 Fluorescenčna spektroskopija

Za merjenje fluorescence in posredno določanje aktivnosti encima smo uporabili čitalnik Tecan Infinite 200 PRO, ki je namenjen merjenju fluorescence mikrotitrskih plošč. Fluorescenco smo vzbujali z monokromatsko svetlobo valovne dolžine 383 nm in spremljali emisijo pri 455 nm.

Spektroskopske metode izkoriščajo optične lastnosti snovi oziroma molekul v različnih območjih elektromagnetnega spektra za kvantitativno ali kvalitativno analizo. Pri fluorescenci izkoriščamo lastnost, da ob ekscitaciji s svetlobo določene valovne dolžine vzorci oddajajo svetlobo druge, daljše valovne dolžine. Del energije se sproti v obliki fotonov z manjšo energijo oziroma daljšo valovno dolžino, preostala energija pa se odda v obliki toplote. Oddano energijo zaznamo kot emisijski spekter – fluorescenco. Vsaka molekula ima značilno valovno dolžino, s katero vzbudimo molekulo in navadno tudi značilen emisijski spekter s svojimi maksimumi. V primerjavi z absorpcijskimi maksimumi se ti gibljejo pri večjih valovnih dolžinah svetlobnega spektra. Pri merjenju fluorescence lahko naletimo na lastno fluorescenco molekule ali pa uvedeno fluorescenco, kadar na makromolekulo vežemo majhno fluorescentno molekulo z namenom raziskovanja makromolekule. Fluorescenčna spektroskopija je uporabna tehnika za spremljanje lastnosti encimskega aktivnega centra, denaturacije proteinskih molekul ter določanje sprememb v proteinskih konformacijah zaradi vezave ligandov, kot so substrat, kofaktor, aktivator ali inhibitor, pod pogojem, da so pri tem posredno ali neposredno prisotni triptofanski ali tirozinski aminokislinski ostanki. Fluorescenca je v primerjavi z običajno absorpcijo mnogo bolj občutljiva in specifična. Na fluorescenco lahko vplivamo

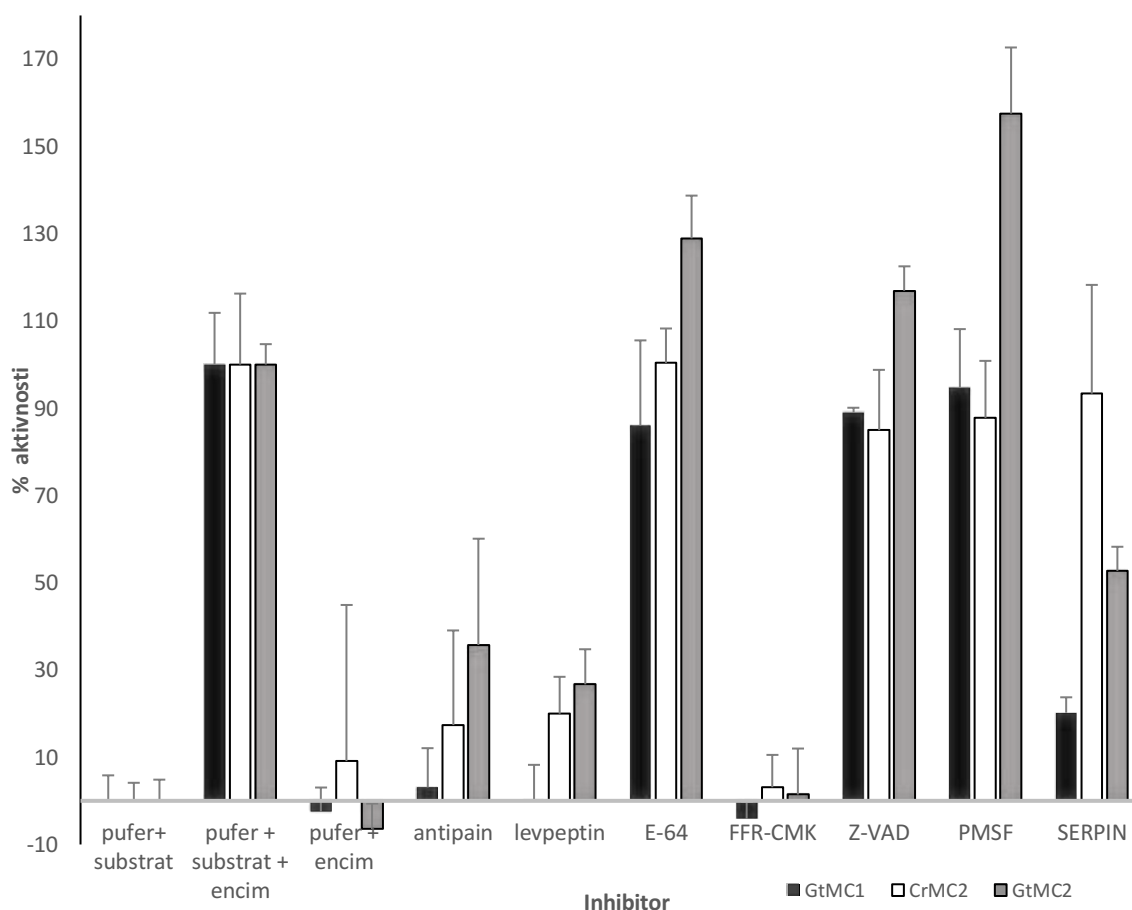
s spreminjanjem dejavnikov, kot so koncentracija snovi, polarnost, prisotnost ligandov, pH in temperatura. Zaradi tega lahko dobimo več informacij o strukturi molekule, vezavnih mestih, interakciji s topilom in sposobnosti spreminjanja konformacije kot pri analizah na osnovi absorbcije [42].

Naprava, ki se uporablja za merjenje fluorescence je spektrofluorimeter. S svetlobo določene valovne dolžine osvetlimo vzorec v kiveti. Emitirana svetloba gre pravokotno skozi emisijski monokromator in pade na detektor. V našem primeru smo uporabili spektrofluorimeter, ki meri fluorescenco na mikrotitrskih ploščah in ga imenujemo čitalnik mikrotitrskih ploščic. Uporablja se, kadar imamo več vzorcev, ki jih snemamo pri enakih pogojih.

Ploščo z raztopinami smo vstavili v čitalnik mikrotitrskih plošč. Nastavili smo ustrezno valovno dolžino vzbujanja in označili območje jamic, ki jim želimo izmeriti fluorescenco. Po nekaj minutah smo dobili rezultate. Izmerjene vrednosti čitalec izpiše v formatu, ki omogoča vnos podatkov v program Excel, kjer smo podatke tudi obdelali.

4 Rezultati in razprava

Namen moje diplomske naloge je bil ugotoviti, v kakšni meri različni inhibitorji zavirajo delovanje treh tipov metakaspaz, metakaspaze tipa I in III iz organizma *Guillardia theta* ter metakaspaze tipa II iz alge *Chlamydomonas reinhardtii*. Testirali smo sedem različnih inhibitorjev. Predvidevali smo, da bodo vsi inhibitorji razen Z-VAD-FMK zavirali vse tri tipe metakaspaz. Za serpin smo predvidevali, da bo inhibiral le encimsko aktivnost metakaspaze tipa I. Aktivnost smo določili na podlagi izmerjenih fluorescenc s čitalnikom mikrotitrskih ploščic. S tem smo vseh jamicah ploščice pomerili skoraj istočasno, kar pomeni, da so v testu bili vzorci izpostavljeni enakim pogojem. Vrednosti aktivnosti posamezne metakaspaze ob prisotnosti inhibitorjev so prikazane na sliki 10.



Slika 10: Prikaz aktivnosti metakaspaz tipa I, II in III ob prisotnosti posameznih inhibitorjev. Na ordinatni osi je prikazana aktivnost encima. Črno obarvani stolpci prikazujejo aktivnost GtMC1, beli CrMC2 in sivi GtMC2.

Kot smo pričakovali, Z-VAD-FMK ni inhibiral nobenega izmed treh tipov metakaspaz. Gre za inhibitor, ki namreč inhibira kaspaze. Ravno tako nobenega tipa metakaspaz nista inhibirala E-64 in PMSF. Zanimivo je, smo pri vseh treh inhibitorjih zaznali celo povečano

delovanje GtMC2 v njihovi prisotnosti, pri PMSF-ju celo za 60 %. Neučinkovitost PMSF-ja je razumljiva, saj je v splošnem namenjen zaviranju serinskih proteaz; zanj je značilno tudi koncentracijsko območje delovanja od 0,1 do 1 mmol/l, koncentracija inhibitorjev pri naši izvedbi pa je znašala 10 $\mu\text{mol/l}$. Rezultati so skladni s predhodnimi študijami na tem področju. Pri zaviranju TaeMCAII, metakaspaze tipa II iz organizma *Triticum aestivum* (navadna pšenica), sta inhibitorja PMSF in E-64 ravno tako kot v našem primeru inhibirala omenjeno metakaspazo tipa II v manjši meri in njeno aktivnost zmanjšala na 76 % oziroma 89 % [43]. E-64 je tako kot v našem primeru tudi v drugi predhodni raziskavi zmanjšal aktivnost LdMC, metakaspaze tipa I iz bičkarja *Leishmania donovani*, na 90 % [44]. Razlika je le v koncentraciji inhibitorja, saj je bila v tej študiji desetkrat višja kot v našem primeru. Glede na to bi lahko rekli, da koncentracija inhibitorja E-64 ne odraža bistvenega vpliva na njegovo delovanje. V raziskavi z LdMC so testirali tudi inhibitor Z-VAD-FMK, ki je ravno tako pri desetkrat višji koncentraciji zmanjšal aktivnost metakaspaze tipa I v zelo majhni meri, za približno 20 % [44]. Vpliv E-64, PMSF in Z-VAD-FMK so testirali tudi na ortokaspazi MaOC1 iz organizma *Microcystis aeruginosa*. Vsi trije inhibitorji so ortokaspazo inhibirali zanemarljivo malo [13].

Antipain in levpeptin sta oba reverzibilna zaviralca serinskih in cisteinskih proteaz. Na njuno podobnost kažejo tudi naši rezultati, saj oba zavirata vse tri tipe metakaspaz s skoraj enako intenziteto. Razlikujeta se v prisotnosti funkcionalne skupine; levpeptin ima namesto karbonilnega dela aldehidno skupino, ki očitno na metakaspaze deluje močnejše. Zelo učinkovito, še posebej levpeptin, zavirata metakaspazo tipa I. Levpeptin je aktivnost GtMC1 praktično popolnoma ustavil. Da sta učinkovita inhibitorja dokazuje tudi njuna aktivnost pri inhibiciji metakaspaze tipa II. Najmanj, a še vedno dovolj intenzivno, sta inhibirala delovanje metakaspaze tipa III. Antipain in levpeptin sta se tudi v preteklih raziskavah izkazala kot učinkovita. Levpeptin je aktivnost metakaspaze tipa II, TaeMCAII, zmanjšal za 88 % [43]. Dobro se je izkazal tudi pri zaviranju delovanja metakaspaze tipa I, LdMC, ki pa je bil pri koncentraciji 2 μM za pol manj aktiven kot pri koncentraciji 10 μM [44]. V tej raziskavi so na istem tipu metakaspaze preizkusili tudi antipain, ki pa je pri nižji koncentraciji kot levpeptin, LdMC inhibiral močnejše. Pri 1 μM koncentraciji se je aktivnost metakaspaze spustila na le 10 % [44]. Tudi pri testiranju inhibitorjev na ortokaspazi MaOC1 je antipain zmanjšal aktivnost metakaspaze še malenkost bolj kot levpeptin [13].

FFR-CMK se je izkazal kot najbolj učinkovit zaviralec aktivnosti vseh treh tipov metakaspaz. Delovanje metakaspaz zatira v večji meri kot antipain ali levpeptin. Zanimivo je, da učinkovito deluje na vseh treh tipih. Popolnoma je inhibiral delovanje GtMC1. Odlično se je izkazal tudi pri zaviranju ortokaspaze MaOC1, saj je izmed vseh uporabljenih inhibitorjev v raziskavi njeno aktivnost zmanjšal v največji meri [13]. V predhodnih raziskavah so na TaeMCAII in LdMC testirali inhibitor TLCK, ki izhaja iz iste skupine kot FFR-CMK [43, 44]. V prvi študiji je TLCK aktivnost TaeMCAII

zmanjšal za 43 %, v drugi pa je aktivnost LdMC ob delovanju inhibitorja TLCK s koncentracijo 0,2 μ M padla na 30 %, v prisotnosti 1 μ M TLCK pa se je aktivnost LdMC izničila [44]. Našo prvo hipotezo smo tako delno potrdili: vsi inhibitorji razen serpina so imeli enak vpliv na delovanje vseh treh metakaspaz. Poleg Z-VAD-FMK pa delovanja metakaspaz nista bistveno inhibirala tudi PMSF ter E-64.

Naša druga hipoteza je bila, da bo inhibitor serpin zaviral le GtMC1. Ta hipoteza je potrjena v celoti. CrMC2 in GtMC2 sta presegli 50 % aktivnosti kljub prisotnosti inhibitorja. Inhibitorji iz skupine serpinov večinoma zavirajo serinske proteaze, le nekateri zavirajo tudi cisteinske proteaze. Očitno je, da serpin v našem primeru deluje zelo specifično in zavira le metakaspazo tipa I. Najbolj aktivna je ostala metakaspaza CrMC2. Tudi pri drugi hipotezi so naše ugotovitve skladne s predhodnim raziskovanjem na tem področju. Dokazano je bilo, da inhibitor AtSERPIN1 zavira AtMC1, metakaspazo tipa I iz organizma *Arabidopsis thaliana* [45].

5 Zaključek

Cilj diplomske naloge je bil ugotoviti, kako različni inhibitorji cisteinskih proteaz zavirajo delovanje metakaspaz GtMC1, CrMC2 in GtMC2. Predvidevali smo, da bo vsak posamezni inhibitor zmanjšal aktivnost vseh treh encimov, razen Z-VAD-FMK, ki ne bo zaviral nobenega tipa metakaspaze. Druga hipoteza je bila, da bo inhibitor serpin zaviral le metakaspazo tipa I. Skozi raziskovalno delo smo prvo hipotezo potrdili deloma in drugo v celoti. Z merjenjem fluorescence smo določili aktivnost encimov v prisotnosti posameznih inhibitorjev. Rezultati kažejo, da je najbolj učinkovit inhibitor, ki močno zmanjša aktivnost vseh treh tipov metakaspaz, FFR-CMK. Ugotovitev je skladna s predhodno opravljenimi raziskavami na tem področju. Temu inhibitorju po intenziteti zaviranja aktivnosti metakaspaz sledita antipain in levpeptin, ki sta si po izvoru in strukturi zelo podobna. Pričakovano so aktivnost metakaspaz najmanj inhibirali Z-VAD-FMK, E-64 in PMSF. E-64 in PMSF sta se kot šibka zaviralca metakaspaz izkazala že v predhodnih študijah inhibicije metakaspaz. Omenjene inhibitorje bi bilo zanimivo preizkusiti še pri različnih koncentracijah in na metakaspazah drugih organizmov.

6 Seznam uporabljenih virov

- [1] N.D. Rawlings, G.S. Salvesen.: Handbook of proteolytic enzymes. 3.izd., Oxford: Elsevier 2013, str. li.
- [2] J. Kos, N. Obermajer, S. Vozelj: Proteaze in njihovi inhibitorji v telesnih tekočinah kot diagnostični in prognostični tumorski kazalci. *Farmaceutski vestnik*. **2007**, 58(5), str. 133–138.
- [3] R. Boyer: Temelji biokemije. Ljubljana: Študentska založba 2005, str. 141–142, 374–377.
- [4] N.M. Hooper: Proteases: a primer. *Essays in Biochemistry*. 2002, 38, str. 1–8.
- [5] T. Požek. *Karakterizacija saharopepsinu podobne aspartatne proteaze iz gobe Clitocybe nebularis*. Ljubljana: Fakulteta za farmacijo UL 2010, diplomsko delo.
- [6] J.J. Nietzel: Enzyme catalysis: the serine proteases. **2010**, 3(9), str. 21.
- [7] M. Rzychon, D. Chmiel, J. Stec-Niemczy: Modes of inhibition of cysteine proteases. 2004, 51, str. 861 – 873.
- [8] J. Pižem, A. Cör: Kaspaze. *Medicinski razgledi*. **2001**, 40(3), str. 283–291.
- [9] A. Flütsch, M.G. Gütter: Proteases in deathpathways: Proteases: structure and function. K. Brix, W. Stöcker (ur.), Dunaj: Springer 2014, str. 272–279.
- [10] V. Štrancar: *Osnovna biokemijska karakterizacija metakaspaze tipa 2 modelnega algnega organizma Chlamydomonas reinhardtii*. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo UL 2018, diplomsko delo.
- [11] R.V. Talanian, C. Quinlan, S. Trautz, M.C. Hackett, J.A. Mankovich, D. Banach, T. Ghayur, K.D. Brady, W.W. Wong: Substrate specificities of caspase family Proteases. *Journal of Biological Chemistry*. **1997**, 269, str. 30761–30764.
- [12] M. Klemenčič, M. Novinec, M. Dolinar: Karakterizacija ortokaspaze iz cianobakterije *Microcystis aeruginosa* PCC7806, prokariontskega homologa kaspaz. *Kemijske znanosti*. Ljubljana: Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo UL 2015, str. 107–108.

- [13] M. Klemenčič, M. Novinec, M. Dolinar: Orthocaspases are proteolytically active prokaryotic caspase homologues: the case of *Microcystis aeruginosa*. *Molecular Microbiology*. **2015**, 98(1), str. 142–150.
- [14] A.G. Uren, K. O'Rourke, L.A. Aravind, M.T. Pisabarro, S. Seshagiri, E.V. Koonin, V.M. Dixit: Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular Cell*. **2000**, 4, str. 961–967.
- [15] C.J. Choi, J.A. Berge: New types of metacaspases in phytoplankton reveal diverse origins of cell death proteases. *Cell Death & Disease*. **2013**, 4, str. 1–7.
- [16] L. Tsiatsiani, F. Van Breusegem, P. Gallois, A. Zaviyalov, E. Lam: Metacaspases. *Cell death and differentiation*. 2011, 18(8), str. 1279–1288.
- [17] M. Klemenčič, C. Funk: Structural and functional diversity of caspase homologues in non-metazoan organisms. *Protoplasma*. **2017**, 255, str. 387–397.
- [18] E. Lam, Y. Zhang: Regulating the reapers: Activating metacaspases for programmed cell death. *Trends in Plant Science*. **2012**, 17(8), str. 487-494.
- [19] N. Sánchez Coll, D. Vercammen, A. Smidler, C. Clover, F. Van Breusegem, J. L Dangl, P. Epple: Arabidopsis type I metacaspases control cell death. *Science*. **2010**, 330, str. 1393-1397.
- [20] C. X. Moss, G. D. Westrop, L. Juliano, G. H. Coombs, J. C. Mottram: Metacaspase 2 of *Trypanosoma brucei* is a calcium-dependent cysteine peptidase active without processing. *FEBS Letters*. **2007**, 581(29), str. 5635-563.
- [21] M. Klemenčič, C. Funk: Type III metacaspase: Calcium dependant activity proposes new function for the p10 domain. *New Phytologist*. **2018**, 218(3), str. 1179-1191.
- [22] *ANTIPAIN*. Merck. www.merckmillipore.com/INTL/en/product/Antipain,M_M_NF-EI3 (pridobljeno 13. jul. 2019).
- [23] *Antipain*. Enzo life sciences. <http://www.enzolifesciences.com/ALX-260-093/antipain/> (pridobljeno 20. jul. 2019).
- [24] T.Ratajczak, T.Luc, A.M. Samec, R. Hähnel: The influence of leupeptin, molybdate and calcium ions on estrogen receptor stability. *FEBS Letters*. **1981**, 136(1), str. 115–118.

- [25] *LEUPEPTIN: Applications in life science research*. AG scientific. <https://agscientific.com/blog/2019/06/leupeptin-applications> (pridobljeno 08. julij 2019).
- [26] *Leupeptin*. ChEBI. <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:6426> (pridobljeno 13. jul. 2019).
- [27] *Leupeptin*. Peptide Institute, inc. https://www.peptide.co.jp/en/catalog/f-cat?k_code=4041-v (pridobljeno 20. jul. 2019).
- [28] J. Tao, B. Sha: Structural Insight into the protective role of P58(IPK) during unfolded protein response. *Methods in Enzymology*. **2011**, 490, str. 259–270.
- [29] K. Hanada, M. Tamai, M. Yamagishi, S. Ohmura, J. Sawada, I. Tanaka: Isolation and characterization of E-64, a New thiol protease inhibitor. 1978, 42(3), str. 523-528.
- [30] *E-64*. Sigma Aldrich. www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e3132?lang=en®ion=SI (pridobljeno 10. jul. 2019).
- [31] *Z-FA-FMK*. Wikipedia, the free encyclopedia. <https://en.wikipedia.org/wiki/Z-FA-FMK> (pridobljeno 17. jul. 2019).
- [32] *Trombin*. Wikipedia, the free encyclopedia. <https://en.wikipedia.org/wiki/Trombin> (pridobljeno 17. jul. 2019).
- [33] *TPCK*. Wikipedia, the free encyclopedia. https://en.wikipedia.org/wiki/Tosyl_phenylalanyl_chloromethyl_ketone (pridobljeno 17. jul. 2019).
- [34] C.J. Van Noorden: The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochemica*. **2001**, 103(3), str. 241-51.
- [35] *Z-VAD-FMK*. Enzo life sciences. <http://www.enzolifesciences.com/ALX-260-020/z-vad-fmk/> (pridobljeno 14. jul. 2019).
- [36] W.J. van Venrooij, R.N. Maini: PMSF and Protease Inhibition (appendix). *Manual of Biological Markers of Diseases*. Springer, 1996, str. 21.
- [37] G.T. James: Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. *Analytical Biochemistry*. **1978**, 86:2, str. 574–579.
- [38] P.A. Frey, A.D. Hegeman: *Enzymatic reaction mechanisms*. New York: Oxford University Press 2007, str. 499–500.

- [39] *PMSF*. Sigma Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/pmsfro?lang=en®ion=SI> (pridobljeno 20. jul. 2019).
- [40] M.C. Pearce, R.N. Pike, A.M. Lesk, S.P. Bottomley: Serpin conformations. Molecular and cellular aspects of the serpinopathies and disorders in serpin activity. G. A. Silverman, D. A. Lomas (ur.). ZDA: World scientific publishing. 2007, vol. 2, str. 35 – 49.
- [41] R.H. Law, Q. Zhang, S. McGowan, A.M. Buckle, G.A. Silverman, W. Wong, C.J. Rosado, C.G. Langendorf, R.N. Pike, P.I. Bird, J.C. Whistock: An overview of the serpin superfamily. *Genome Biology*. **2006**, 7(5):216, str. 216–216.5. .
- [42] G. Anderluh, P. Maček, K. Sepčič, T. Turk: Eksperimentalne metode v biokemiji. Ljubljana: Študentska založba, zbirka Scripta 2009, str. 91–101.
- [43] E. Piszczek & M. Dudkiewicz & M. Mielecki: Biochemical and bioinformatic characterization of type II metacaspase protein (TaeMCAII) from wheat. *Plant Molecular Biology Reporter*. **2012**, 30, str. 1338–1347.
- [44] N. Lee, S. Gannavaram, A. Selvapandiyani, A. Debrabant: Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. *Eukaryotic Cell*. **2007**, 6 (10), str. 1745–1757.
- [45] S. L. Asqui, D. Vereammen, I. Serrano, M. Valls, S. Rivas, F. Van Breusegem, F. L. Conlon, J.L. Dangl, N.S. Coll. AtSERPIN1 is an inhibitor of the metacaspase AtMC1 – mediated cell death and autocatalytic processing *in planta*. *New Phytologist*. **2018**, 218, str. 1156–1166.