

VPLIV N-GLIKOZILACIJE NA DELOVANJE PLAZEMSKE GLUTAMAT KARBOKSIPEPTIDAZE

Dejan Suban

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija, februar 2012

Komisija za oceno doktorske disertacije:

*Prof. ddr. Boris Turk, predsednik, Odsek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo,
Institut »Jožef Stefan«, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana*

*Prof. dr. Hrvoje Petković, član, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva
ulica 101, 1000 Ljubljana*

*Prof. dr. Veronika Stoka, član, Odsek za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo,
Institut »Jožef Stefan«, Jamova cesta 39, 1000 Ljubljana*

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Dejan Suban

**VPLIV N-GLIKOZILACIJE NA
DELOVANJE PLAZEMSKÉ GLUTAMAT
KARBOKSIPEPTIDAZE**

Doktorska disertacija

**EFFECT OF N-GLYCOSYLATION ON
PLASMA GLUTAMATE
CARBOXYPEPTIDASE FUNCTION**

Doctoral Dissertation

Mentor: Prof. dr. Vito Turk

Somentor: dr. Iztok Dolenc

Ljubljana, Slovenija, februar 2012

Kazalo

Povzetek.....	IX
Abstract	XI
Seznam kratic.....	XIII
1 Uvod	1
1.1 Ščitnica	1
1.2 Tiroglobulin.....	2
1.3 Ščitnična hormona T3 in T4.....	3
1.3.1 Pregled <i>in vitro</i> študij razgradnje Tg ter sproščanja tiroksina	4
1.3.2 Pregled <i>in vivo</i> študij ter celičnih študij sproščanja tiroksina.....	4
1.4 Celična linija FRTL-5	5
1.5 Peptidaze	6
1.5.1 Katepsini – lizosomski proteolitični encimi	6
1.6 Vloga katepsinov v ščitnici	8
1.6.1 Katepsin C.....	8
1.7 Metaloproteinaze	10
1.7.1 Plazemska glutamat karboksipeptidaza	10
1.7.2 Drugi proteini družine M28	11
1.8 Endogeni proteinski inhibitorji	12
1.9 Sintetični inhibitorji	13
1.10 Vezikularni transport	14
1.11 Glikozilacija.....	15
1.11.1 N-glikozilacija	15
1.11.2 Usmerjanje proteinov v vezikle	17
2 Namen dela	19
3 Materiali in metode	21
3.1 Materiali in reagenti	21
3.1.1 Materiali.....	21
3.2 Čiščenje in identifikacija človeškega rekombinantnega PGCP.....	21
3.2.1 Čiščenje rekombinantnega PGCP	21
3.2.2 Določanje koncentracije proteinov.....	22
3.2.2.1 Spektrofotometrično določanje koncentracije proteinov	22
3.2.2.2 Določanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi	22
3.3 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS	23

3.3.1 Določevanje dipeptidazne aktivnosti	23
3.3.1.1 Meritve inhibicije rekombinantnega encima	23
3.4 Priprava cDNK proteinov za heterologno izražanje v sesalskih celicah	24
3.4.1 Načrtovanje oligonukleotidov	24
3.4.1.1 Načrtovanje oligonukleotidov za pripravo divjega tipa PGCP in njegove aktivne katalitske oblike s fuzijskim proteinom	24
3.4.1.2 Načrtovanje oligonukleotidov za pripravo katepsina C s fuzijskima proteinoma	24
3.4.1.3 Načrtovanje oligonukleotidov za pripravo deglikozilacijskih mutantov.....	25
3.4.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	25
3.4.3 Ligacija, transformacija, čiščenje in preverjanje zaporedij.....	26
3.4.4 Priprava večkratnih deglikozilacijskih mutantov	26
3.5 Utišanje izražanja gena PGCP	27
3.6 Metode dela s celicami	28
3.6.1 Gojenje celic HEK 293	28
3.6.2 Gojenje celic FRTL-5	28
3.6.3 Transficiranje celic	29
3.6.4 Precepljanje in tripsiniziranje celic.....	29
3.6.5 Zamrzovanje in odmrzovanje celic.....	29
3.6.6 Priprava popolnega celičnega lizata s pufrom RIPA.....	29
3.6.7 Priprava popolnega celičnega lizata s pufrom NP-40.....	30
3.7 <i>In vitro</i> cepitev tiroglobulina z katepsinom C	30
3.8 <i>In vitro</i> deglikozilacija PGCP in katepsina C	30
3.9 Polsuhi prenos proteinov iz poliakrilamidnega gela na PVDF membrano v električnem polju.....	30
3.10 Detekcija proteinov po Westernu	31
3.11 Imunodetekcija	31
3.12 Določanje aminokislinskega zaporedja.....	31
3.13 Merjenje aktivnosti katepsina C	31
3.14 Določevanje prostega T4 z ELISA testom.....	32
3.15 Visokotlačna kromatografija z obrjenima fazama (RP-HPLC)	32
3.16 Določanje vsebnosti joda	32
3.17 Imunocitokemija.....	32
3.18 Imunohistokemija mišjih rezin ščitnice	33
4 Rezultati	35
4.1 Priprava rekombinantnih proteinov.....	35
4.1.1 Priprava rekombinantnih fuzijskih proteinov PGCP s fluorescenčnim proteinom	35
4.1.2 Priprava deglikozilacijskih mutantov PGCP.....	36
4.1.2.1 Napoved potencialnih N-glikozilacijskih mest v aminokislinskem zaporedju PGCP.....	36
4.1.2.2 Priprava klonirnih vektorjev deglikozilacijskih mutantov PGCP.....	36
4.1.2.3 Analiza uspešnosti mutacije gena za PGCP s pomočjo agarozne elektroforeze in preverjanja nukleotidnega zaporedja.....	37
4.1.2.4 Priprava vektorjev za izražanje deglikozilacijskih mutantov PGCP v sesalskih celicah.....	38

4.1.2.5	Fluorescenčna mikroskopija prehodno transficiranih HEK 293 celic	40
4.1.2.6	Izražanje deglikozilacijskih mutantov PGCP v fuziji z zelenim fluorescenčnim proteinom v HEK 293 celicah in njihovo izločanje v gojišče.....	40
4.1.2.7	Izražanje deglikozilacijskih mutantov PGCP v fuziji z zelenim fluorescenčnim proteinom v FRTL-5 celicah in njihovo izločanje v gojišče.....	42
4.1.3	Rekombinantni PGCP izražen v insektnih celicah <i>Sf9</i>	43
4.1.3.1	Čiščenje rekombinantnega PGCP	43
4.1.3.2	Določevanje aktivnosti rekombinantnega PGCP in učinkovitost čiščenja PGCP	44
4.1.3.3	Vpliv kloridnega iona na aktivnost rekombinantnega PGCP.....	45
4.1.3.4	Meritve inhibicije rekombinantnega PGCP.....	45
4.1.3.5	Določanje aminokislinskega zaporedja rekombinantnega PGCP.....	46
4.1.3.6	<i>In vitro</i> deglikozilacija rekombinantnega PGCP	46
4.1.4	Priprava rekombinantnega katepsina C v fuziji s fluorescenčnim proteinom	47
4.1.4.1	Restriksijska analiza in preverjanje nukleotidnega zaporedja konstruktov PGCP in katepsina C.....	47
4.2	Expresija PGCP in katepsina C v FRTL-5 celicah.....	48
4.2.1	Transfekcija cDNK PGCP s fuzijskim proteinom v FRTL-5 celicah.....	48
4.2.2	Transfekcija cDNK katepsina C s fuzijskim proteinom v FRTL-5 celicah.....	49
4.2.3	Imunolokalizacija endogenega PGCP in endogenega katepsina C v FRTL-5 celicah	50
4.3	Glikozilacija endogenega PGCP in katepsina C	52
4.3.1	Deglikozilacija z Endo H in PNGazo F.....	52
4.3.2	Vpliv TSH, inzulina in somatostatina na izražanje N-acetilglukozaminil transferaze I v podganjih tirocitih	53
4.3.3	Vpliv prisotnosti TSH, inzulina in somatostatina na izločanje PGCP in katepsina C v iz FRTL-5 celic	53
4.3.3.1	Vpliv prisotnosti TSH, inzulina in somatostatina na aktivnost katepsina C v lizatu in gojišču FRTL-5 celic.....	53
4.3.3.2	Dipeptidazna aktivnost na substrat Ser-Met v gojišču FRTL-5 celic	54
4.4	<i>In vitro</i> cepitev tiroglobulina	55
4.4.1	<i>In vitro</i> cepitev tiroglobulina s katepsinom C.....	55
4.4.2	Sproščanje tiroksina pri <i>in vitro</i> cepitvi Tg s katepsinom C.....	56
4.4.3	Sproščanje tiroksina pri <i>in vitro</i> cepitvi Tg s katepsinom C in PGCP	56
4.4.4	Cepitev Tg s katepsinom C in PGCP na HPLC z reverzno fazo	57
4.4.5	Določanje vsebnosti joda	57
4.5	<i>Ex vivo</i> cepitev tiroglobulina v gojišču FRTL-5 celic	58
4.5.1	Sproščanje tiroksina v gojišču FRTL-5 celic ter vpliv dodanih inhibitorjev na njegovo sproščanje.....	58
4.5.2	Utišanje gena za PGCP	59
4.6	Imunohistokemija mišje ščitnice	60
5	Razprava.....	63
6	Zaključki.....	71
7	Zahvale.....	73

8 Literatura in viri.....	75
Kazalo slik.....	93
Kazalo preglednic.....	99
Priloge.....	101

Povzetek

Plazemska glutamat karboksipeptidaza (PGCP) je metalopeptidaza, ki hidrolizira dipeptide na proste aminokislino. V študijah žleze ščitnice je bilo ugotovljeno, da encim sodeluje pri sproščanju hormona tiroksina (T4) iz tiroglobulina (Tg). Iz primarne strukture človeškega PGCP je napovedanih pet potencialnih N-glikozilacijskih mest.

V okviru doktorskega dela smo preučevali vpliv sprememb N-glikozilacije na lokalizacijo encima PGCP in s tem na delovanje izven celice. Zaradi fiziološke pomembnosti smo raziskovali vlogo PGCP pri izvenceličnem sproščanju T4.

V študiji smo uporabili mestno specifično mutagenozo na cDNK PGCP tako, da smo mutirali asparagin na mestih zaporedja 61, 179, 353, 356 in 396 v alanin. S tem smo preprečili N-glikozilacijo. Pripravili smo devet mutantov z zelenim fuzijskim proteinom, začevši z enojnimi ter prešli na mutiranje vseh petih potencialnih glikozilacijskih mest. Ekspresija transficiranih celičnih linij HEK 293 in FRTL-5 je prikazala, da se po izražanju usmerijo v vezikle, z uporabo imunoloških metod pa smo ugotovili, da se proteini izločajo v medij.

Rekombinantni PGCP smo pripravili v bakulovirusnem sistemu ter ga uporabili za karakterizacijo. Rekombinantni encim smo očistili in dobili 8 mg proteina na 1l gojišča. Pokazali smo, da ima PGCP hibriden ali kompleksen tip N-glikozilacije. Po čiščenju smo ugotovili, da je izolirani encim aktiven. Encim je cepil dipeptid Ser-Met, v prisotnosti EDTA, DTPA in bestatina pa je bila njegova aktivnost inhibirana. Pri delovanju encima smo opazili tudi aktivacijski učinek kloridnega iona.

Eksopeptidaza katepsin C odceplja dipeptide z N-terminalnega dela substratov. PGCP hidrolizira dipeptide na posamezne aminokislino. Podganje ščitnične celice (FRTL-5) smo uporabili za določevanje znotrajcelične lokalizacije obeh encimov z imunološkimi metodami. Encima sta kolokalizirala s PDI, markerjem za endoplazemski retikulum, in z Golgin-97, markerjem za Golgijev aparat, deloma pa z LAMP-2, markerjem lizosomov.

Študije na ščitničnih celicah so dokazale, da sta bila PGCP in katepsin C tudi izločena v medij. Izločanje aktivnega katepsina C je bilo stimulirano s hormoni TSH, inzulinom in/ali somatostatinom. Aktivnost katepsina C smo merili v gojišču s specifičnim substratom Gly-Phe-4βMNA.

Analiza deglikozilacije je pokazala, da ima izločen PGCP hibriden oz. kompleksen tip N-glikozilacije. Pri deglikozilaciji PGCP iz lizata smo opazili minimalno zmanjšanje molske mase, kar nakazuje na vsebnost visoko manozne glikozilacije.

Ugotovili smo, da so hormoni TSH, inzulin in somatostatin FRTL-5 celicam povzročili zvišanje izražanja N-acetilglukozaminil transferaze I (GnT1), ki je odgovorna za začetek hibridne ali kompleksne glikozilacije.

Pri skupnem delovanju PGCP in katepsina C smo dokazali, da omogočata časovno linearno sproščanje hormona tiroksina iz tiroglobulina. *In vitro* poskusi cepitve prašičjega Tg s katepsinom C so povzročili skrajšanje N-terminalnega dela molekule za 12 aminokislin. Med odstranjenimi dipeptidi je bil tudi dipeptid s tiroksinom. Katepsin C ni cepil novonastalega N-terminalni dela, ki se je začel z Arg-Pro-. Z uporabo visokotlačne kromatografije z obrnjenima fazama smo dokazali, da so produkti cepitev katepsina C

nadalje hidrolizirani s PGCP.

Ob dodatku prašičjega Tg v gojišče celic FRTL-5 se je sprostil tiroksin, sproščanje pa je bilo zmanjšano ob dodatku sintetičnih inhibitorjev cisteinskih in metalo proteinaz.

S pripravo imunohistokemijskih rezin mišjih ščitnic, ki so prikazale prisotnost PGCP in katepsina C v epiteljskih celicah foliklov, smo pokazali smiselnost podatkov pridobljenih iz poskusov opravljenih na celičnih kulturah ter iz *in vitro* študij.

Abstract

Plasma glutamate carboxypeptidase (PGCP) is a metalloproteinase. It is able to hydrolyze dipeptides into free amino acids. The enzyme is involved in the release of hormone thyroxin (T4) from Thyroglobulin (Tg), as suggested by thyroid gland studies. Prediction from the primary structure of human PGCP suggests the presence of five potential N-glycosylation sites.

In this thesis we present a study of changing the N-glycosylation of PGCP, and how this modification influences the localization of PGCP and its extracellular role. The physiological relevance of PGCP was examined by studying the liberation of extracellular thyroxin.

Using site-directed mutagenesis of PGCP asparagines on sites 61, 179, 353, 356 and 396 were mutated to alanine to prevent glycosylation. A set of nine mutants were prepared with one to five times mutated glycosylation sites, each fused with green fluorescent protein. Expression in transfected HEK 293 and FRTL-5 cell lines showed vesicular localization. Secretion of the mutants was detected using immunological methods.

Recombinant PGCP was used for protein characterization. Baculovirus expression system yielded pure and active PGCP (8 mg/l medium). The recombinant protein was shown to contain a hybrid or complex type of N-glycosylation. The enzyme was able to cleave the dipeptide Ser-Met, but its activity was inhibited in the presence of EDTA, DTPA or bestatin. An activation effect of chloride ions was recognized.

Cathepsin C, an exopeptidase, removes dipeptides from the N-terminus of substrates, and PGCP hydrolyses dipeptides to amino acids. Fischer rat thyroid cells (FRTL-5) were used to determine the intracellular distribution of the two enzymes by immunological methods. The enzymes were observed to colocalize with PDI and Golgin-97, markers of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, respectively, but their presence in lysosomes was rare, as shown by the marker, LAMP-2.

PGCP and cathepsin C were secreted from FRTL-5 thyroid cells into the medium. Secretion of active cathepsin C was stimulated by TSH, insulin and/or somatostatin, as determined by hydrolysis of the specific substrate, Gly-Phe-4 β MNA.

Hybrid or complex type of N-glycosylation was shown, when glycosylation of the secreted PGCP was analyzed. Deglycosylation of intracellular PGCP led to a small decrease in molecular mass, indicating the presence of high mannose N-glycosylation.

Further we show that, in FRTL-5 cell line, TSH, insulin, and/or somatostatin induce up-regulation of N-acetylglucosaminyltransferase 1, the enzyme responsible for the initiation of biosynthesis of hybrid and complex N-glycosylation of proteins.

Acting together, PGCP and cathepsin C are able to liberate the hormone thyroxin from thyroglobulin in a linear, time dependent manner. *In vitro* experiments proved that cathepsin C removes up to 12 amino acids from the N-terminus of porcine thyroglobulin, including a dipeptide with thyroxin on position 5. The newly formed N-terminus, Arg-Pro-, was not hydrolyzed further by cathepsin C. Using reverse phase HPLC, we showed that products yielded by cathepsin C were further hydrolyzed by PGCP.

When released enzymes were secreted they were able to liberate thyroxin from porcine thyroglobulin added to the medium. This liberation can be reduced by synthetic inhibitors of cysteine proteinases and metalloproteinases.

To support data obtained from *in vitro* studies and cell culture experiments immune-labeled slices of mouse thyroid gland were performed to show the presence of investigated enzymes, PGCP and cathepsin C, in epithelial cells of follicles.

Seznam kratic

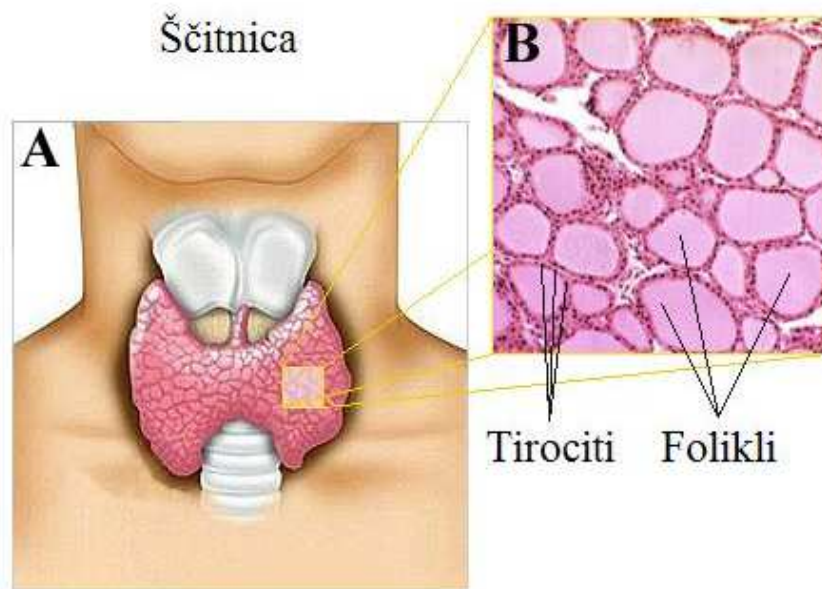
Asn	=	asparagin
APS	=	amonijev persulfat
B ^{-/-}	=	celice z izbitim genom za katepsin B
Bestatin	=	([2S,3R]-3-Amino-2-hidroksi-4-fenilbutanoil)-L-levcin
C ^{-/-}	=	celice z izbitim genom za katepsin C
cAMP	=	ciklični adenzin monofosfat
COS-1	=	ledvične celice afriške zelene opice -African green monkey kidney
Cys	=	cistein
DAPI	=	4',6-diamidino-2-fenilindol
DIT	=	dijodotirozin
DMEM	=	po Dulbeccu spremenjen medij Eagle
DMSO	=	dimetil sulfoksid
DTPA	=	dietilen triamin pentaocetna kislina
DTT	=	ditiotreitol
E-64	=	N-(trans-Epoksisucinil)-L-levcin 4-guanidinobutilamid
E-64c	=	(2S,3S)-trans-Epoksisucinil-L-levcilamido-3-metilbutan
E-64d	=	(2S,3S)-trans-Epoksisucinil-L-levcilamido-3-metilbutan etil ester
EDTA	=	etilendiamin tetraacetat
ER	=	endoplazmatski retikulum
FBS	=	fetalni goveji serum; fetal bovine serum
FRTL-5	=	celice podganje ščitnice - Fischer rat thyroid line 5
GA	=	Golgijev aparat
Gal	=	galaktoza
GFP	=	zeleni fluorescenčni protein – green fluorescent protein
GlcNAc	=	N-acetil-D-glukozamin
GnT1	=	N-acetilglukozaminil transferaza I
GnT3	=	N-acetilglukozaminil transferaza III
Hek 293	=	človeške embrionalne ledvične celice
J774	=	celična linija mišjih makrofagov J774
K ^{-/-}	=	celice z izbitim genom za katepsin K
L ^{-/-}	=	celice z izbitim genom za katepsin L
Man	=	manoza
Man6P	=	manoza 6 fosfat
MHC class II	=	poglavitni histokompatibilnostni kompleks drugega razreda
MIT	=	monojodotirozin
MPR	=	manoza 6 fosfat receptor
MPR300	=	manoza 6 fosfat receptor (300kDa) kationsko neodvisen
MPR46	=	manoza 6 fosfat receptor (46kDa) kationsko odvisen
mRNA	=	sporočilna ribonukleinska kislina
NaDS	=	natrijev dodecil sulfat
NP40	=	nonilfenilpolietilen glikol
PAGE	=	poliakrilamidna gelska elektroforeza

PBS	=	s fosfatom zapufrana raztopina soli
PFA	=	paraformaldehid
PGCP	=	plazma glutamat karboksipeptidaza
Ser	=	serin
Sia	=	sialinska kislina
T3	=	trijodotironin
T4	=	tiroksin
TEMED	=	N, N, N', N'-tetrametilendiamin
TFA	=	trifluorocetna kislina
Tg	=	tiroglobulin
Thr	=	treonin
TPO	=	peroksidaza ščitnice
TRIS	=	tris (hidroksimetil) aminometan
Triton X-100	=	polietilen glikol-mono-[p-(1,1,3,3,-tetrametilbutil)-fenil] eter
TSH	=	tirotropin - thyroid stimulating hormone
Tween 20	=	polioksietilensorbitan
Tyr	=	tirozin
UCE	=	N-acetilglikozamil-1-fosfodiester-alfa-N-acetilglukozamidaza

1 Uvod

1.1 Ščitnica

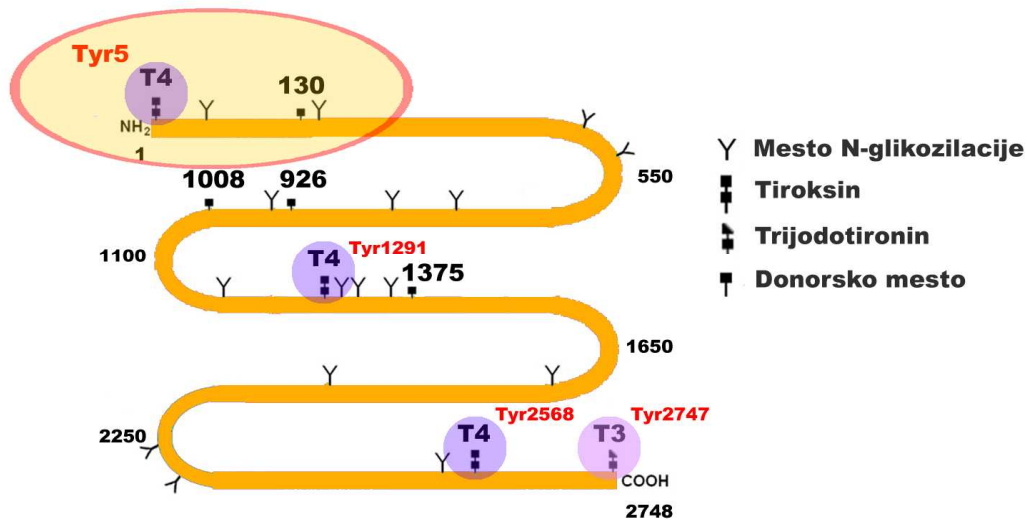
Ščitnica (*Glandula thyroidea*) je organ endokrinega sistema, ki se nahaja v vratu pod grlom. Njena vloga pri vretenčarjih se izraža v sposobnosti zbiranja joda in njegovega shranjevanja v tiroglobulinu. Žleza je metuljaste oblike, ki jo sestavljata dva režnja, ki bočno obdajata sapnik. Tkivo ščitnice je sestavljeno iz dveh vrst celic z notranjim izločevanjem, folikularne celice in parafolikularne celice (celice C). Folikularne celice, imenovane tudi tirociti, predstavljajo večino tkiva in obdajajo mešičke ali lumne v katere se shranjujejo ščitnični hormoni v koloidni obliki tiroglobulina (Slika 1). Med folikularnimi celicami, ki obdajajo lumne, se nahajajo parafolikularne (celice C). Te so v manjših skupinah in so neodvisne od tirocitov. Izločajo hormon kalcitonin, ki zmanjšuje in kontrolira kalcij v krvi in preprečuje izločanje mineralov iz kosti. Kalcitonin spodbuja tudi izločanje kalcija in fosfatov v ledvicah, tako da zavre njuno reabsorpcijo. Deluje nasprotno od hormona, ki se imenuje parathormon (PTH), in ga izločajo žleze obščitnice.



Slika 1: *Shematski prikaz in histološki preparat ščitnice (Glandula thyroidea)*. A) Ščitnica se nahaja v vratu pod grlom. B) Histološki preparat prikazuje sloj ščitnice. Označene so celice ščitnice-tirociti in folikli, ki jih tvorijo (povzeto po: Shutterstock, 2011).

1.2 Tiroglobulin

Gen za človeški tiroglobulin (Tg) je lociran na kromosomu 8 (Ieiri, 1994). Sinteza proteina se prične s tvorbo signalne sekvence, dolžine 19 aminokislin, kar ga usmeri v endoplazemski retikulum. Po sekreciji iz tirocitov se nalaga v mešičkih ščitnice v visokih koncentracijah (Balasubramaniam in Deiss Jr, 1965; Roche in Michel, 1951). Protein predstavlja med 20 % in 30 % koloida v koncentracijskem območju 100–400 mg/ml (Venkatesh in Deshpande, 1999). Visoka koncentracija je predpogoj za vzdrževanje konstantne ravni ščitničnih hormonov, nekakšen rezervoar, iz katerega se po potrebi spročajo hormoni. Tg je bil izoliran in okarakteriziran iz različnih organizmov in je predmet različnih raziskav (Hoshino in Ui, 1970). Ima molekulsko maso 660 kDa, sedimentacijski koeficient $S^{\circ}_{20,w}$ 19.4 S (Edelhoc, 1960) in izoelektrično točko (pI) med 4.4 in 4.7 (Tarutani in Shulman, 1971). Kvarтерна struktura nativnega Tg kaže, da je sestavljen iz dveh enakih monomer velikosti 330 kDa, od katerih vsaka tvori 4-8 podenot (Marriq in sod., 1977). Številne študije prikazujejo podobnost aminokislinskega zaporedja različnih vrst organizmov (Hoshino in Ui, 1970; Spiro, 1970). N-terminalna analiza proteina prikazuje ali aparagin ali aspaginsko kislino kot začetno aminokislino (Spiro, 1970). Tg je glikojodoprotein. Sladkorji omogočajo pravilno zvitje, sintezo hormonov, antigenost, transport in recikliranje proteina (Baudry in sod., 1996; Fenouillet in sod., 1986; Mallet in sod., 1995). Aminokislinska sekvenca človeškega Tg vsebuje 20 potencialnih glikozidacijskih mest od katerih samo 4 niso glikozilirana (Rawitch in sod., 1993; Yang in sod., 1996). Kompleksna glikozilacija Tg vsebuje različne sladkorje. Značilnost Tg je visoka vsebnost karbohidratov, ki predstavlja od 8 % do 10 % mase celotne molekule (Ui, 1973).



Slika 2: Shematski prikaz polipeptidne verige tiroglobulina. Prikazana so N-glikozilacijska mesta (Y), hormonegenska mesta akceptorjev (T4 in T3) in donorjev tirozinskih ostankov.

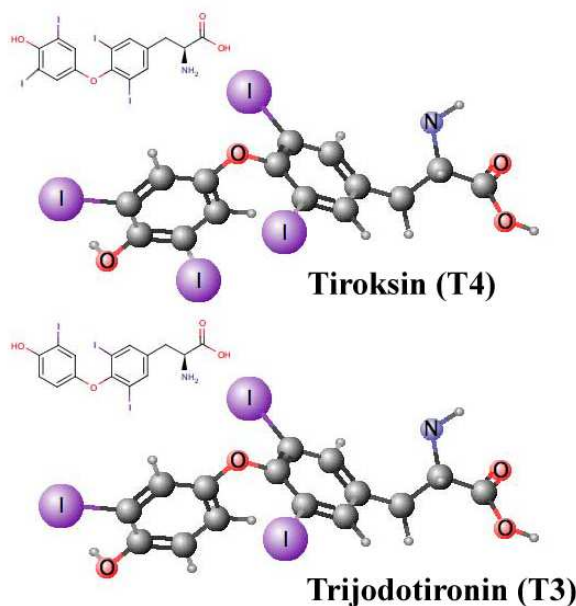
Vloga Tg se izraža predvsem kot zaloga joda, ki se kopiči na tirozinih. Jodiranje makromolekule ni enakomerno. Vrednosti se gibljejo med 0,1 % in 2,0 % iz različnih organizmov (Sorimachi in Ui, 1974). Tg vsebuje štiri jodoaminokislino: L-3,5,3',5' tetrajodotironin ali tiroksin (T4), L-3,5,3' trijodotironin (T3), L-3,5 diiodotirozine (DIT) and L-3 monojodotirozin (MIT) (Edelhoc, 1960). Ko je bila določena mRNK Tg so

lahko določili tudi hormonogenska mesta (Di Lauro in sod., 1985; Malthiéry in Lissitzky, 1985) (Slika 2). Skupaj s študijami proteolitične razgradnje v različnih vrstah nakazujejo, da so tiroksinska mesta večinoma nameščena na terminalnih delih molekule (Dunn in Dunn, 1982).

1.3 Ščitnična hormona T3 in T4

Ščitnična hormona T3 in T4 imata pomembno vlogo v nadzoru metabolizma celotnega organizma. Hormona uravnava rast in razvoj, povečujeta bazalno presnovo ter posegata v metabolizem proteinov, lipidov in ogljikovih hidratov. Pospešujeta tudi delovanje srca. Tiroksin gre po krvi v različne organe, kjer se pretvori v T3 in postane hiperaktiven hormon (Bolton in sod., 2008; Braverman in sod., 1970).

Podrobno so preučevali oblikovanje ščitničnih hormonov (T3 in T4). Hormonogeneza poteka s preusmeritvijo donorja jodotirozina na akceptor jodotirozina. Palumbo s sodelavci (Palumbo in sod., 1990) je dokazal prisotnost blizu 70 tirozilnih ostankov primernih za iodinacijo v podganjem Tg, pri katerem ima Tyr5 z N-terminalnega dela največjo amfiniteto za jodiranje in je prvi akceptor, ki je popolnoma jodiran. Najpogostejše donorsko mesto je tirozin na 130 mestu (Try130) za hormonsko akceptorsko mesto Tyr 5 (Slika 2) (Dunn in sod., 1998; Xiao in sod., 1995). Druga donorska mesta v prohormonu so Tyr 926, 986 ali 1008 in 1375 (Ohmiya in sod., 1990).



Slika 3: Modelni prikaz ščitničnih hormonov tiroksina in trijodotironina. Hormona se razlikujeta v številu jodov vezanih na molekulo. S sivo je označeno ogljikovodikovo ogrodje. Jod je označen z vijolično barvo (povzeto po: Bolton in sod., 2008).

Proces poteka po naslednjem vrstnem redu. Tirociti najprej sintetizirajo glikoprotein tiroglobulin (Tg), ki se shranjuje v folikularni lumen v obliki koloida (Venkatesh in Deshpande, 1999). Na zunanji celični membrani se deli Tg jodirajo ter nastanejo monojodidi, diiodidi, trijodotironini (T3) ali tiroksini (T4) (Slika 3) (Roche in Michel, 1951). Ob stimulaciji ščitnice s hormonom TSH se začne razgradnja Tg in sproščanje

ščitničnih hormonov T3 in T4 v kri. Ko je dosežena zadostna koncentracija, se vzpostavi negativna povratna zanka in zmanjša izločanje hormona TSH in posledično tudi zmanjša izločanje T3 in T4.

1.3.1 Pregled *in vitro* študij razgradnje Tg ter sproščanja tiroksina

Sinteza Tg je bila že podrobno opisana (Cody, 1984), medtem ko mehanizem procesiranja še ni popolnoma znan. Prve *in vitro* študije cepitve Tg sta opravila Balasubramaniam in Deiss (Balasubramaniam in Deiss Jr, 1965). Iz kunčjih ščitnic sta izolirala lizosomske cisteinske endopeptidaze in ugotovila cepitev Tg. Iz ekstrakta jima je uspelo izolirati že prej poznan encim katepsin D (Balasubramaniam in Deiss Jr, 1965). Njihovo delo *in vitro* študij je nadaljevala skupina raziskovalca Dunna, ki je izolirala katepsin D iz kunčjih ščitnic ter ugotavljala njegovo delovanje na Tg. Ugotovili so, da katepsin D cepi Tg, vendar pa ne sprošča tiroksina (Dunn in sod., 1991b). Iz ščitničnega ekstrakta so izolirali še druge endopeptidaze cisteinskega tipa. Najprej so prepoznali samo katepsin B, kasneje pa so poleg katepsina B delno izolirali tudi encim, ki naj bi ustrezal katepsinu H (Dunn in Dunn, 1982).

Uchiyama je v rezinah ščitnice z imunohistokemijo ugotovil kolokalizacijo katepsina L s katepsinom B in na osnovi tega zaključil, da je tudi katepsin L vključen v procesiranje Tg (Uchiyama in sod., 1989), kar je Dunn kasneje potrdil (Dunn in sod., 1991a). Nadaljevanje dela na razgradnji Tg je vodilo do določitve mesta cepitve makromolekule s katepsini B, D in L (Dunn in sod., 1991a). Pri proučevanju vpliva eksopeptidaz katepsina B, DPPII in PGCP na razgradnjo Tg so uporabili N-terminalni peptid kunčjega Tg. Fragment je vseboval vodilno tiroksinsko mesto na mestu 5. Katepsin B je verjetno deloval kot endopeptidaza in kot eksopeptidaza tako, da je sproščal dipeptid T4-Gln. Dipeptid predstavlja 5. in 6. aminokislino tiroglobulinske verige in vsebuje tiroksin. Avtorji so pokazali, da sama dipeptidaza PGCP ni imela vpliva na 20kDa peptid, ampak je delovala v kombinaciji s katepsinom B ter sproščala T4 iz dipeptida T4-Gln. Ugotovili so, da proteaza DPPII ni cepila 20-kDa fragmenta, se je pa povečalo sproščanje hormona iz celotnega Tg. Sproščanje so dokazali z uporabo I¹²⁵, s katerim so jodirali Tg (Dunn in sod., 1996).

Pred kratkim je bila objavljena *in vitro* študija, v kateri so opazovali proteolitični potencial katepsinov B, K, L in S pri cepitvi Tg. Z uporabo fizioloških pogojev, s katerimi so simulirali okolje endosomov, lizosomov in luminalnega prostora, so katepsini proizvedli različne fragmente Tg. Katepsini B, K in L so samostojno in uspešno delovali le v endo/lizosomskih pogojih (Jordans in sod., 2009). Pri zunajceličnih pogojih pa je tiroksin uspešno sproščal le katepsin S, oz. ostali katepsini v prisotnosti katepsina S kar je pokazalo nujno prisotnost katepsina S.

1.3.2 Pregled *in vivo* študij ter celičnih študij sproščanja tiroksina

Zanimivo je, da so prve zunajcelične cepitve Tg zaznali pri njegovem odstranjevanju iz krvotoka (Brix in Herzog, 1994). Cepljeni produkti Tg se namreč nahajajo tudi v krvnem obtoku vretenčarjev in drugih tkivih (Lisi in sod., 2002). Odstranjevanje poteka v jetrih preko makrofagov. V *ex vivo* študijah so inkubirali Tg z makrofagi (J774), pri čemer so zaznali sproščanje tiroksina (Brix in Herzog, 1994). To se je začelo s sekrecijo peptidaz in nadaljevalo preko endocitične poti. Sproščanje T3 je potekalo večinoma intracelularno v lizosomih. Dotlej je veljalo, da process cepitve Tg poteka izključno v lizosomih.

Pomembno je bilo odkritje vpliva tirotropina (TSH) na izražanje tiroidne tiolne

endopeptidaze (Dunn in Dunn, 1987). TSH stimulira izločanje tako proencima kot tudi zrele oblike katepsina B (Linke in sod., 2002b) in katepsina D (Metaye in sod., 1997). Raziskave vloge katepsina B v delovanju ščitnice so pokazale, da transkripcijo poleg TSH poveča tudi forskolin in ionomicin (Phillips in sod., 1989). Kisli fibroblastični rastni faktor pa poveča transkripcijo katepsina D (Chanoine in sod., 1992). Da bi raziskovalci spremljali potek izločanja so uporabili fuzijski protein (GFP) s katepsinom B. Pot katepsina B so spremljali na tirociti, pri čemer je encim najprej potoval v endo/lizosome, kjer je dozorel in se nato sprostil v zunajcelični prostor (Linke in sod., 2002a).

Tg je v lumnu, ki ga obdajajo tirociti, v obliki koloida in je medsebojno kovalentno povezan. Pred endocitozo se mora pretvoriti v topno obliko, kar opravijo proteaze. Z imunodetekcijo in citokemijskimi študijami so odkrili prisotnost katepsinov B, L in D ter tudi proteolitično aktivnost katepsina B v nevtralnem pH na zunanji apikalni membrani celic (Brix in sod., 1996; Lemansky in sod., 1998). Ob apikalni membrani ščitničnih celic v folikularnem lumnu se je nahajal tudi katepsin K. Aktivni rekombinantni katepsin K je sprostil tiroksin iz Tg z omejeno proteolizo pri nevtralnem pH (Tepel in sod., 2000).

Raziskave ščitnice na miših z izbitim posameznim genom za katepsine B, K ali L ali dvojico genov katepsinov B in K ali K in L so pokazale, da preostali katepsini do neke mere prevzamejo vlogo manjkajočih. Tako se je zvišal nivo izraženega katepsina L pri miših $K^{-/-}$ ali $B^{-/-}/K^{-/-}$. Vendar pa so raziskave pokazale, da je pri miših z izbitim genom za katepsin $B^{-/-}$ ali $L^{-/-}$ prihajalo do nepopolne razgradnje Tg, kar pa pri miših z izbitim genom za katepsin K ni bilo zaznavno. Dvojno izbitje katepsinov K in L je vodilo do znižanega sproščanja prostega hormona, rezultati pa so pokazali vlogo katepsinov B in L pri sproščanju Tg iz koloidne shrambe. Miši $K^{-/-}/L^{-/-}$ so imele zaznavno nižjo raven prostega tiroksina, kar nakazuje, da je za uravnavanje sproščanja tiroksina iz netopnega Tg pomembna kombinacija katepsinov K in L (Friedrichs in sod., 2003).

Na zunanji apikalni membrani tirocitov so našli tudi serinsko peptidazo »Plazminogenu 1 podobno proteazo« (*angl.* P1-like protease). Encim se sintetizira v jetrih in kroži po drugih tkivih (Giraud in sod., 2005). Študije so pokazale sproščanje encima iz tirocitov (Giraud in sod., 2006) ter posledično cepitev ščitnične peroksidaze (TPO) in Tg. Plazminogenu 1 podobna proteaza prispeva k kompleksni regulaciji procesiranja Tg (Giraud in sod., 2007).

1.4 Celična linija FRTL-5

FRTL-5 izvirajo iz 5 do 6 tednov starih Fischer podgan. Iz ščitnice so izolirali primarno celično kulturo in jo nagojili v posebno pripravljene gojišču. S preceptivijo so dobili sekundarno kulturo, ki je obdržala lastnosti primarne. Na ta način se je ohranila kontinuirana in funkcionalna ščitnična celična linija. FRTL-5 se gojijo v modificiranem gojišču Coonove dopolnitve Hamsovega gojišča F-12, ki vsebuje približno 5% telečjega seruma z dodatkom mešanice šestih substanc. Specifičnost celic je njihova hormonska odzivnost, privzemanje joda in tiroglobulinska sinteza (Ambesi Impiombato in sod., 1980), ki je pa nepopolno jodirana (Weiss in sod., 1984). Na celični membrani imajo hormonske receptorje. Med njimi najbolj izstopa TSH-receptor. Nanj vpliva hormon TSH, ki vpliva na adenilatno ciklazno aktivnost (cAMP) in sproščanje ščitničnih hormonov. Ugotovili so, da se forskolin in avtoimunska protitelesa vežejo na TSH-receptor in sprožijo podobne procese kot TSH (Ambesi Impiombato in Villone, 1987). Podvojevalni čas celic je od 24 do 48 ur. Celice lahko tvorijo 3D strukture, ki posnemajo ščitnične folikle. Prekomerna konfluentnost vodi do kontaktne inhibicije. Celice so bile pogosto uporabljene in dobro preučevane kot model delovanja žleze ščitnice.

1.5 Peptidaze

Peptidaze, znane tudi kot proteaze, proteinaze ali proteolizni encimi, spadajo v skupino hidrolaz. Kot že ime pove, katalizirajo razgradnjo peptidne vezi in s tem dosežejo hidrolizo polipeptidne verige proteinov na manjše peptide oziroma njihovo popolno razgradnjo na posamezne aminokisljine.

Obstajajo različne razdelitve proteaz. Najpogosteje se uporabljata dve razdelitvi:

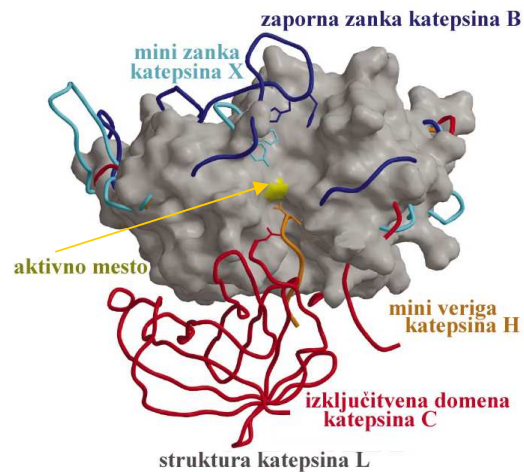
- razvrstitev po *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)*,
- razdelitev glede na evolucijsko povezanost in mehanizem delovanja (po Merops-u).

Razvrstitev proteinaz po NC-IUBMB je osredotočena na mesto cepitve polipeptidne verige. Glede na mesto cepitve ločimo eksopeptidaze, ki cepijo polipeptidno verigo na N- ali C- koncu in endopeptidaze, ki cepijo peptidno vez nekje znotraj polipeptidne verige.

Novejša razdelitev po Merops-u temelji na poznavanju strukture encimov in njihovi evolucijski povezanosti. Razdelitev obsega tri nivoje. Takšna razdelitev omogoča povezavo proteinaz v *klane*, ki vsebujejo tiste encime, ki izhajajo iz enega evolucijskega prednika in imajo podobno terciarno strukturo z delnim ujemanjem v aminokislinskem zaporedju okoli aktivnega mesta, nimajo pa homolognega aminokislinskega zaporedja. Klani so povezani v skupine peptidaz z istim mehanizmom delovanja (cisteinske, serinske, aspartatne, metalo peptidaze, itd.). Klani so razdeljeni na *družine* na temelju podobnih aminokislinskih sekvenc. Najnižji nivo pa obsegajo peptidaze, t.j. posamezni encimi (Rawlings in sod., 2010). Baza podatkov se neprestano obnavlja, zato si je najsodobnejšo verzijo mogoče ogledati na spletu pod »MEROPS the peptidase database« merops.sanger.ac.uk/index.html.

1.5.1 Katepsini – lizosomski proteolitični encimi

Cisteinske proteaze, v starejši literaturi imenovane tudi tiolne proteaze, so bile najdene v virusih, bakterijah, glivah, rastlinah in živalih. Najpomembnejše cisteinske proteaze v sesalcih so citoplazemski kalpaini in lizosomski katepsini. Ime katepsini sta vpeljala Willstätter in Bamann leta 1929, da bi definirala proteaze, ki so aktivne v kislem pH-ju, vendar se razlikujejo od pepsina. Dandanes se izraz katepsini uporablja na splošno za lizosomske proteaze z optimalnim delovanjem v rahlo kislem pH-ju. Sem pa spadajo serinske proteaze (katepsin A in katepsin G, kljub temu, da ni lizosomska proteaza), aspartatne proteaze (katepsin D in katepsin E) in 11 človeških cisteinskih proteaz (katepsini B, C, F, H, K, L, O, S, V, X in W) (Turk, V. in sod., 2012).



Slika 4: Modelni prikaz prekrivanja eksopeptidaznih kathepsinov na osnovi strukture kathepsina L. Na osnovi strukture kathepsina L so dodane: zaporna zanka kathepsina B, mini zanka kathepsina X, mini veriga kathepsina H in izključitvena domena kathepsina C (povzeto po: Turk, D. in sod., 2001).

Preglednica 1: Pregled kathepsinov po družini in delovanju. Poznamo 15 človeških kathepsinov, od teh jih je 11 cisteinskih in po dve serinski in aspartatni. Večinoma imajo endopeptidazno aktivnost (Turk, V. in sod., 2012).

Kathepsin	Družina	Delovanje
A	serinska	karboksipeptidaza
B	cisteinska	endopeptidaza / karboksipeptidaza
C	cisteinska	dipeptidilpeptidaza
D	aspartatna	endopeptidaza
E	aspartatna	endopeptidaza
F	cisteinska	endopeptidaza
G	serinska	endopeptidaza
H	cisteinska	aminopeptidaza
K	cisteinska	endopeptidaza
L	cisteinska	endopeptidaza
O	cisteinska	predvidena endopeptidaza (ni dokazana)
S	cisteinska	endopeptidaza
V	cisteinska	endopeptidaza
X	cisteinska	karboksimonopeptidaza
W	cisteinska	predvidena endopeptidaza (ni dokazana)

Kathepsini se sintetizirajo kot neaktivni proencimi, ki so glikozilirani in usmerjeni v lizosomske vezikle preko manoze 6-fosfat receptorja (Chwieralski in sod., 2006). Aktivacija proencimov v katalitično aktivne encime poteka v lizosomih (Ishidoh in Kominami, 2002). Tako postanejo aktivni in ne potrebujejo dodatnih konformacijskih sprememb. Večina cisteinskih kathepsinov je endopeptidaz, razen eksopeptidaz kathepsinov C, H in X (Slika 4). Kathepsin B lahko deluje kot endopeptidaza ali kot dipeptidil karboksipeptidaza zaradi njegove zaporne zanke (Aronson in Barrett, 1978). Kathepsin X je karboksipeptidaza in odceplja eno aminokislino s C-terminalnega dela substrata (Klemencic in sod., 2000; Nagler in sod., 1999; Puzer in sod., 2005). Kathepsin H je aminopeptidaza, ker odceplja po en aminokislinski ostanek z N-terminalnega dela

proteina (Koga in sod., 1992). Katepsin C odstranjuje dipeptide z N-terminalnega dela substrata in je tako dipeptidil peptidaza (Planta in sod., 1964).

Aktivnost katepsinov je regulirana preko različnih mehanizmov, kot so regulacija sinteze, inhibicija endogenih inhibitorjev in pH stabilnost (Turk, B. in sod., 2000; Vasiljeva in Turk, 2008). Čeprav so katepsini aktivni pri nevtralnem pH, je njihova življenska doba kratka in so nagnjeni k razvitju ter se inaktivirajo (Turk, B. in sod., 1995; Turk, B. in Stoka, 2007). Vsekakor je lahko ta čas podaljšan, če je protein v kompleksu z inhibitorjem ali substratom.

Poleg glavne vloge v lizosomskem recikliranju proteinov, so katepsini udeleženi tudi v množici fizioloških in patoloških procesov, kot na primer zorenju Poglavitnega histokompatibilnostnega kompleksa drugega razreda (PHK II) (*angl.* MHC clas II complex), resorpciji kosti, diferenciaciji keratinocitov, napredovanju tumorjev in metastaz, revmatoidnem artritisu, osteoartritisu, aterosklerozi, apoptozi in drugo (Vasiljeva in sod., 2007).

1.6 Vloga katepsinov v ščitnici

1.6.1 Katepsin C

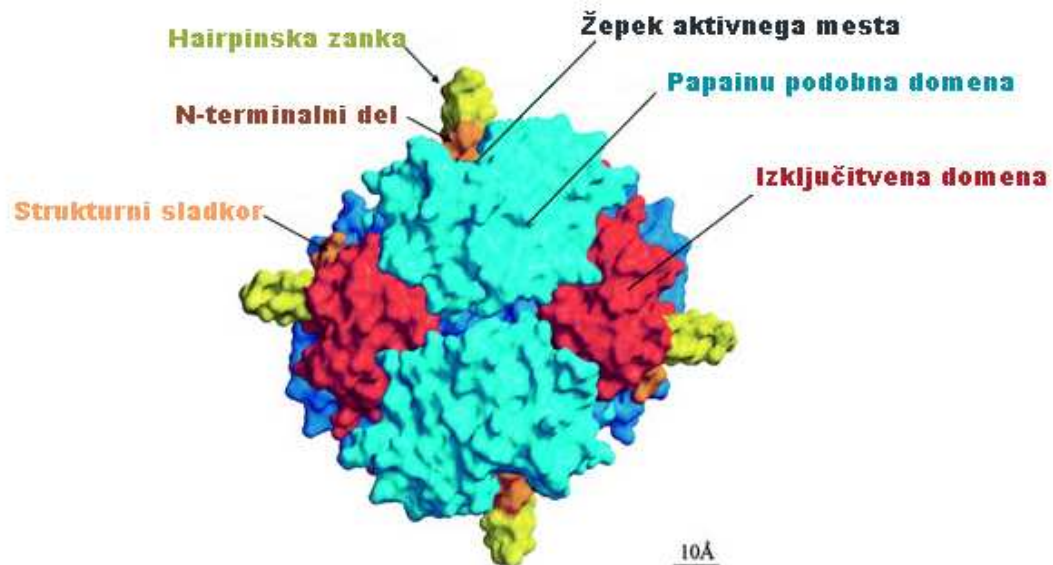
Katepsin C (EC 3.4.14.1) je lizosomska cisteinska proteaza iz družine papaina (klan CA, družina C1, poddružina C1A) (Rawlings in sod., 2010). Katepsin C je bil prvi opisan katepsin, saj sta ga Gutmann in Fruton že leta 1948 opisala kot intracelularno peptidazo, ki cepi kimotripsinski substrat, glicil-L-fenilalanil-amid (Gutman in Fruton, 1948). Kmalu so ugotovili, da so glicil-L-fenilalanil-p-nitroanilid in odgovarjajoči 2-naftilamidi dobri substrati (Planta in Gruber, 1963), vendar pa encim ne more cepiti L-lizil-L-alanil-2-naftilamida (McDonald in sod., 1968). Encim ima nizko specifičnost in cepi dipetide z N-terminalnega dela peptidnega substrata, dokler ne razgradi celotnega substrata ali pa ko se v aminokislinskem zaporedju pojavi na N-terminalnem delu bazična aminokislina (lizin ali arginin), oz. prolin na predzadnjem mestu (Bondebjerg in sod., 2005; Kam in sod., 2004; McDonald in sod., 1969; McGuire in sod., 1992; Pedersen in sod., 1999). V kislem lizosomskem okolju je dipeptidil peptidaza, saj je sposoben odstraniti dipeptid z N-terminalnega dela polipeptidne verige (Turk, B. in sod., 1998). Katepsin C lahko deluje pri višjem pH tudi kot transferaza in katalizira reverzno reakcijo (McGuire in sod., 1992; Planta in sod., 1964).

Gen za človeški katepsin C se nahaja na kromosomu 11q14, dolg je 44,1 kb in je sestavljen iz 7 eksonov (Pham, C.T.N. in sod., 1997). Celotno sekvenco so določili s pomočjo cDNK (Paris in sod., 1995). Preprokatepsin C je sestavljen iz vodilnega peptida (24 AK), izločitvene domene (110 AK), inhibitornega peptida (96 AK) in katalitske domene (343 AK), ki je homologna papainovi družini. Katalitska domena je sestavljena iz težke verige (164 AK) in lahke verige (69 AK) (Paris in sod., 1995). Encim velikosti 200 kDa je sestavljen iz štirih enakih podenot (Slika 5). Vsaka podenota je sestavljena iz izključitvene domene in katalitske domene (Dolenc in sod., 1995). Izključitvena domena je vključena v oblikovanje tetramere (Cigič in sod., 1998; Dahl in sod., 2001).

Aktivacija katepsin C ne poteče kot avtokatalizirana proteoliza, ampak pa so potrebne druge proteaze, kot so katepsin L ali S (Dahl in sod., 2001). Ko pa je encim aktiviran, ga lahko cepi tudi katepsin B (Rowan in sod., 1992) in druge lizosomske cisteinske proteaze (Turk, B. in sod., 2000).

Katepsin C je edinstvena proteaza v papainski družini zaradi svoje tetramerne strukture

(Turk, D. in sod., 2001). Katepsin C ima štiri aktivna mesta, od katerih lahko vsako veže po eno molekulo cistatina (Dolenc in sod., 1996). Aktivna mesta so na zunanosti molekule, kar je nasprotno od drugih proteolitičnih encimskih makromolekul, sestavljenih iz več podenot, kot so proteasom (Lowe in sod., 1995), bleomicin hidrolaza (Joshua-Tor in sod., 1995) in triptaz (Pereira in sod., 1998). Ti encimi imajo aktivno mesto v notranosti oligomerne molekule. Katepsin C je tudi edini papainu podoben encim, ki potrebuje kloridne ione za aktivnost (McDonald in sod., 1966).



Slika 5: *Kristalna struktura katepsina C*. Kristalna struktura prikazuje tetramerno obliko encima. Vsaka podenota je sestavljena iz papainu podobne domene in izključitvene domene. Označni so tudi strukturni sladkor, harpinska zanka in žepek aktivnega mesta (povzeto po: Turk, D. in sod., 2001).

Določitev kristalne strukture katepsina C je omogočila vpogled v specifičnost encima. Prisotnost izključitvene domene blokira aktivno mesto razpoke na S2 mestu, pri čemer deluje karboksilna skupina stranske verige Asp1 kot sidriščni ostanek za N-terminalno aminokislino substrata. Na prvem mestu je v vseh znanih ortologih katepsina C ohranjena asparaginska kislina. V mesto S2 se veže stranska veriga N-terminalne aminokislinske substrata (Olsen in sod., 2001; Turk, D. in sod., 2001).

Genetske študije so razkrile, da se izguba funkcije z mutacijami na genu za katepsin C pokaže že v zgodnji mladosti v obliki periodontitisa in palmoplantarnega keratodermija, značilno za Haim–Munk in Papillon–Lefevre sindroma (Allende in sod., 2001; Hart in sod., 2000a; Hart in sod., 2000b; Toomes in sod., 1999). Do bolezni pride zaradi nepopolnega procesiranja nekaterih neidentificiranih proteaz.

Poskusi na celičnih linijah, ki so izvirale iz miši z okvarjenim genom za katepsina C, so pokazali, da ne aktivirajo skupine serinskih proteaz iz granul imunskih (citotoksični T-limfociti, celice ubijalke - natural killer cells) in inflamatornih celic (neutrofilne, mast cells), ki so vključene v obrambne mehanizme (Pham, C.T. in Ley, 1999; Wolters in sod., 2001). Kasneje pa so dokazali, da limfociti iz miši z izbitim genom za katepsin C (Katepsin C^{-/-}) vsebujejo aktivni grancim B in ubijajo celice podobno kot v divjem tipu miši. To spoznanje je privedlo do ugotovitve, da so dodatni encimi prisotni pri procesiranju grancima B. Pri testiranju morebitnih encimov so vključili dipeptidil

peptidazo II (DPP II) in katepsin H. Raziskave so pokazale, da katepsin H uspešno aktivira grancim B, medtem ko DPP II nima vloge (D'Angelo in sod., 2010; Sutton in sod., 2007). Pri limfocitih, kjer sta bila odsotna oba katepsina (C in H) prihaja do aktivacije granzima B, kar nakazuje na prisotnost drugih encimov pri tem procesu.

1.7 Metaloproteinaze

1.7.1 Plazemska glutamat karboksipeptidaza

Plazemska glutamat karboksipeptidaza (EC 3.4.17.-) je metaloproteinaza iz družine M28. Do odkritja plazemske glutamat karboksipeptidaze (PGCP) je prišlo, ko je McDonald s sodelavci leta 1969 preučeval cepitev α -kortikotropina (glukagon) z izoliranim in dobro očiščenim katepsinom C iz podganjih jeter in goveje vranice. Zasedil je nastanek petih dipeptidov (Ser-Tyr, Ser-Met, Glu-His, Phe-Arg in Trp-Gly), ki so po določenem času razpadli na proste aminokislinske ostanke (McDonald in sod., 1969). Podrobno je analiziral očiščen katepsin C in ugotovil, da je bila v vzorcu primes drugega encima z dipeptidazno aktivnostjo. Novi encim je dobro hidroliziral dipeptid Ser-Met, zato ga je poimenoval Ser-Met dipeptidaza. Izkazalo se je, da je encim učinkovito cepil tudi druge dipeptide. Ker so ga našli v lizosomih, so ga preimenovali v lizosomsko dipeptidazo (McDonald in sod., 1972). Njegovo delovanje je bilo zelo selektivno, saj je cepil le dipeptide s prostim N in C terminalnim delom. Po drugi strani pa je enako učinkovito cepil dipeptide s hidrofobnim ali bazičnim aminokislinskim preostankom. Med preučevanjem procesiranja Tg je Dunn s sodelavci ugotovil, da je plazemska glutamat karboksipeptidaza v tirociti prisotna v lizosomih in da je udeležena pri cepitvi in sproščanju tiroksina (Dunn in sod., 1996). V podganjih jetrnih celicah so isti encim poimenovali Lal-1 (*angl.* liver annexin-like protein) (Della Fazia in sod., 2002). Dolenc in Mihelič sta dipeptidazo izolirala iz človeških ledvic in določila primarno strukturo (Dolenc in Mihelic, 2003). Po primerjavi aminokislinskega zaporedja sta ugotovila, da je zelo podobna plazemski glutamat karboksipeptidazi izolirani iz človeške krvne plazme in placente (Gingras in sod., 1999). Po razkritju človeškega genoma so odkrili, da imata encima isto nukleotidno zaporedje, zato je encim dobil usklajeno ime. Danes je priznано ime plazemska glutamat karboksipeptidaza, pogostoma pa je uporabljeno krajše ime PGCP (Gingras in sod., 1999), ki ima poznano nukleotidno zaporedje človeške lizosomske dipeptidaze (LDP) (Bethesda, 2011; Dolenc in Mihelic, 2003).

Gen za človeški PGCP se nahaja na kromosomu 8q22.1 in je sestavljen iz osmih eksonov. Encim se sintetizira kot enoveržni preproencim velikosti 50 kDa (472AK), ki je sestavljen iz vodilnega peptida (20AK), inhibitornega peptida (24AK) in katalitske domene (428AK) homologne družini M28 z aktivnim mestom na Glu336 (Slika 6) (Dolenc in Mihelic, 2003; Gingras in sod., 1999). Zrela oblika proteina lahko dimerizira (Dolenc in sod., 2007). Protein so našli tako v lizosomskih izvlečkih kakor tudi zunajcelično (Della Fazia in sod., 2002; Dunn in sod., 1996; Gingras in sod., 1999; McDonald in sod., 1972).

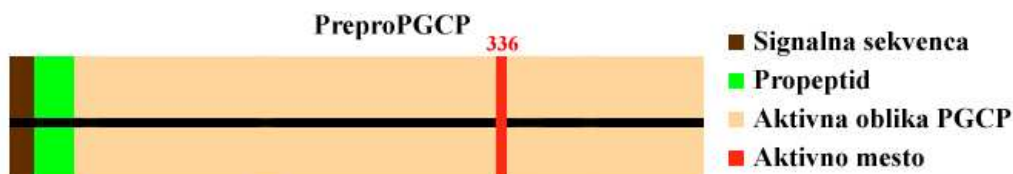
PGCP je dipeptidaza, ki cepi dipeptide s prostimi N- in C-terminalnimi deli. PGCP ima optimalni pH delovanja v kislem pH okrog 5,5 in izoelektrično točko pri 5,4. Je metaloproteinaza, ki potrebuje 2 cinkova (Zn^{2+}) iona v aktivnem mestu, ki jih lahko nadomesti z magnezijevimi, manganovimi ali kobaltovimi ioni, a se pri tem se aktivnost zmanjša.

Do sedaj je bil encim izražen v različnih sistemih. V manjših količinah so ga izrazili v COS-1 celicah (Gingras in sod., 1999). Rekombinantni protein je bil izražen tudi v

našem laboratoriju v bakterijskih celicah. (Dolenc in sod., 2007). Prekomerno izražanje encima je vodilo do nabiranja v netopnih inkluzijskih telescih. Pri iskanju pogojev za zvižanje v topno obliko so ugotovili, da je potrebna odcepitev propeptida za dimerizacijo. Da bi pridobili topni encim so ga izrazili tudi v insektnih celicah (Zajc in sod., 2011).

Poleg študij razgradnje substratov, so raziskovalci ugotovili, da PGCP inhibirajo splošni nespecifični inhibitorji metaloproteinaz, ko so kelatorji EDTA, EGTA, DTPA in 1,10-fenantrolin; citratni in fosfatni pufri, bestatin in kovinski ioni Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} in Fe^{3+} (McDonald in sod., 1972; Zajc in sod., 2011). Specifični inhibitorji PGCP niso znani.

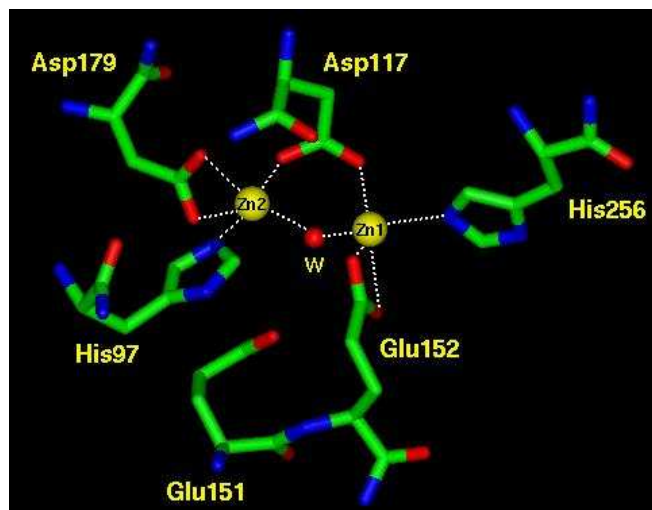
O vlogi PGCP v bioloških procesih je malo znanega. Študije regeneracije jeter so pokazale, da je izražanje PGCP med procesom proliferacije natančno regulirano (Della Fazia in sod., 2002). Pri študijah raka na jetrih, ki nastane zaradi virusa hepatitis C, so dokazali, da je encim močno povišan tudi v krvi, kar bi lahko omogočilo, da PGCP postane eden pomembnejših označevalcev pri krvnih preiskavah za določevanje bolezni (Smith in sod., 2003). Zanimivo je odkritje, povezano s položajem na kromosomu. Možno je namreč, da je PGCP povezana z migreno, vendar odkritja še niso mogli potrditi niti popolnoma zavreči (Maher in Griffiths, 2011). Pred kratkim pa so ugotovili, da se čebelji ortolog PGCP nahaja tudi v matičnem mlečku (Han in sod., 2011).



Slika 6: Shema plazemske glutamat karboksipeptidaze. PGCP.

1.7.2 Drugi proteini družine M28

Družina metalopeptidaz M28 (po MEROPS-u) spada v klan MH. Večinoma vključuje aminopeptidaze in karboksipeptidaze. V družino spadajo tudi nepeptidazni homologi, med katerimi je najbolj poznan transferin receptor protein (Seligman in sod., 1979). Peptidaze te družine vsebujejo cinkova iona (Zn^{2+}) v aktivnem mestu. Vsak cinkov ion je tetraedrično koordiniran v kompleksu s tremi amino kislinami in aktivirano vodo. En aspartatni ostanek veže oba kovinska iona. Ligandi obeh cinkov se pojavljajo v zaporedju His97 (II), Asp117 (I and II), Glu152 (I), Asp179 (II) in His256 (I) (Slika 7), kjer rimske številke označujejo kovinski ion, ki se veže. Pri tvorbi aktivnega mesta sodeluje tudi Glu151 (Chevrier in sod., 1996).



Slika 7: Shema kristalne strukture aktivnega mesta Aminopeptidaze Ap1. Shema prikazuje aktivno mesto aminopeptidaze *Aeromonas proteolytica* (aminopeptidaza Ap1) (Chevrier in sod., 1996).

Aminopeptidaze v tej družini so bile opisane kot bakterijske leucil aminopeptidaze. Aminopeptidaza Y in IAP aminopeptidaza najboljše sproščata bazične aminokisljine. Glutamat karboksipeptidaza II cepi C-terminalne glutamate (Luthi-Carter in sod., 1998). Plazemska glutamat karboksipeptidaza pa učinkovito hidrolizira dipeptide (Dolenc in Mihelic, 2003).

Terciarna struktura je bila določena za aminopeptidazo S (Almog in sod., 1993), aminopeptidazo Ap1 (Chevrier in sod., 1994), transferin receptor (nepeptidazni homolog) (Lawrence in sod., 1999), glutamat karboksipeptidazo II (Davis in sod., 2005) in AM-1 aminopeptidazo (Akioka in sod., 2006). Aminopeptidaza Ap1 je predstavnica družinske strukture, ki prikazuje šest trakov β -plošč, ki jih obkrožajo α -heliksi (Chevrier in sod., 1994).

Glutamat karboksipeptidaza II ima mnoge spojivne oblike zato jo poznamo tudi pod imeni NAALADaza (*angl.* N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase) in PSMA (*angl.* prostate-specific membrane antigen). NAALADaza razgrajuje pomemben dipeptidni neurotransmiter karnozin (Lambert in Mitchell, 2007). Encim je poznan kot označevalec raka prostate in znotrajcelična oblika je lahko odgovorna za odpornost tumorskih celic na Metotreksát (staro ime: ametopterín) (Heston, 1997; Rawlings in Barrett, 1997).

Splošni inhibitorji vključujejo kovinske kelatorje (EDTA, DTPA) in 1,10-phenanthrolin. Aminopeptidaze inhibirata bestatin in amastatin (Wilkes in Prescott, 1985). Glutamat karboksipeptidazo II inhibira tudi menjava glutamata s fosfonil glutamatom (Jackson in sod., 1996).

1.8 Endogeni proteinski inhibitorji

Encimski inhibitorji so molekule, ki se vežejo na encime in znižajo ali zavrejo njihovo aktivnost. Vezava inhibitorja v aktivno mesto encima preprečuje razgradnjo substratov. Poznamo reverzibilne in ireverzibilne inhibitorje. Encimski inhibitorji so lahko naravni in so vključeni v regulacijo metabolizma. Med naravne endogene inhibitorje katepsinov spadajo predstavniki naddružine cistatinov, tiropinov in še nekateri drugi (Turk, B. in sod., 2002).

Naddružina cistatinov je sestavljena iz treh družin in sicer stefini, cistatini in kininogeni. Družine endogenih inhibitorjev cistatinov se razlikujejo po afiniteti do encima. Inhibicija je reverzibilna in kompetitivna (Anastasi in sod., 1983). Tem družinam je bila v zadnjem času priključena še četrta družina neinhibitornih proteinov, ki vključuje s histidini bogate glikoproteine (*angl.* Histidine-rich glycoprotein - HRG). Cistatini in kininogeni so zunajcelični inhibitorji medtem pa so stefini znotrajcelični, citoplazemski inhibitorji (Turk, V. in Bode, 1991). Ker so člani naddružine cistatinov vpleteni v mehanizme, odgovorne za nadzor znotraj in zunajcelične proteinske razgradnje, imajo vlogo preprečevalcev pred nezaželjeno proteolizo (Mason in sod., 1987).

Poleg navedenih prištevamo k endogenim inhibitorjem cisteinskih katepsinov še druge, strukturno bolj oddaljene inhibitorje cisteinskih katepsinov tiropine in p21 (produkt onkogenega c-Ha-ras) (Hiwasa in sod., 1987) in ekvistatin (inhibitor iz morske veternice) (Turk, B. in sod., 1997) Pomemben zunajcelični inhibitor endopeptidaz vseh štirih razredov je tudi α -makroglobulin (Starkey in sod., 1982; Twining, 1994).

1.9 Sintetični inhibitorji

Aminopeptidaze katalizirajo cepitev aminokislin z N-terminalnega dela proteina ali peptidnega substrata. Za njihovo inhibicijo se običajno uporablja bestatin in njegovi derivati. Bestatin [3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutyryl-L-leucine] je nizkomolekularni dipeptid, ki temelji na aminokislinah fenilalaninu in levcinu (Suda in sod., 1976).

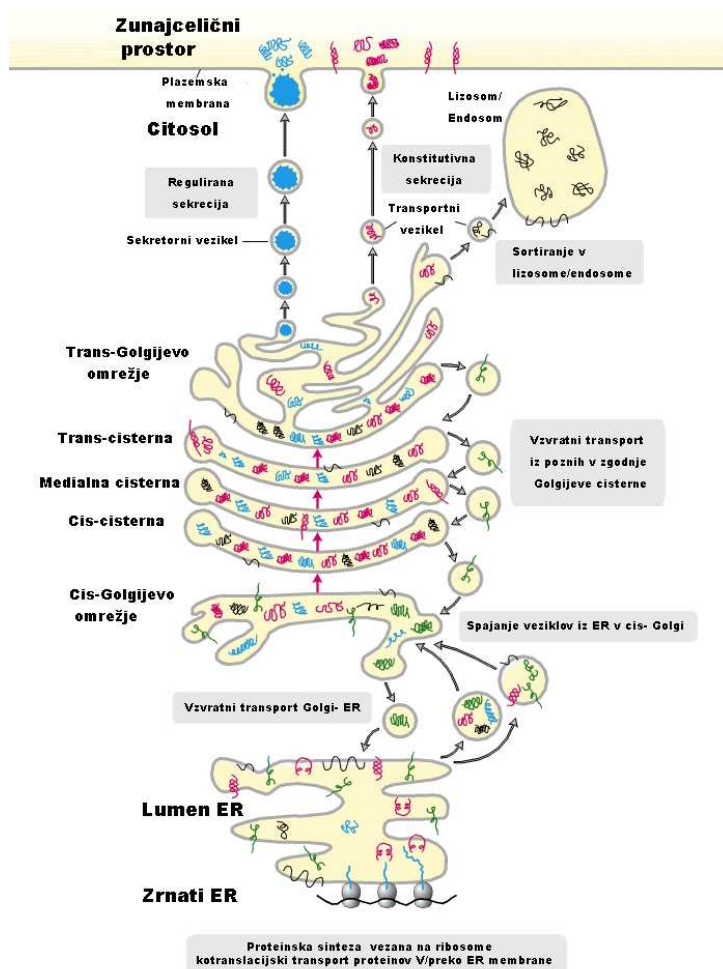
Način vezave bestatina na levcin aminopeptidazo je podoben tetraedričnemu intermediatu, ki se ustvari pri hidrolizi peptidne vezi. Bestatin se veže na aktivno mesto s svojo alfa-amino skupino, hidroksilna skupina pa koordinira cinkov ion, ki se nahaja v vezavnem mestu. Njegova stranska veriga fenilalanina se stabilizira z van der Waals-ovimi interakcijami, kjer se ustvari terminalni hidrofobni žep. Levcilna stranska veriga se veže v drugi hidrofobni žep. Vodikova vez pa se vključuje v aktivno mesto (Burley in sod., 1991). Pri proučevanju NAALADaze (glutamat karboksipeptidaza II) iz poganjih možganov, so ugotovili, da bestatin v koncentraciji 290 μ M učinkovito inhibira omenjeno dipeptidazo (Robinson in sod., 1987).

Drugi odkriti inhibitorji, uporabljajo drugačne molekularne mehanizme in vsebujejo mnogo tipov derivatov dipeptidov (diazometil ketonov, vinil sulfonov, semikarbazidov) (Bondebjerg in sod., 2005; Kam in sod., 2004). Nekateri od njih se vežejo na katalitični cisteinski ostanek in tako inaktivirajo encim. Sintetični inhibitor E-64 [L-trans-epoksisucinil-L-levcilamido-[4-gvanidino]butan] in njegovi derivati imajo široko specifičnost do cisteinskih proteaz. E-64 so izolirali leta 1978 iz glive *Aspergillus japonicus* TPR-64 (Hanada in sod., 1978). Pri nadaljnjih študijah je Barret s sodelavci ugotovil, da E-64 uspešno inaktivira papain in cisteinske katepsine B, H in L v koncentraciji 10 μ M, medtem ko je inhibicija katepsina C šibkejša (Barrett in sod., 1982). Da bi naredili učinkovitejši inhibitor, so sintetizirali novo obliko imenovano E-64c, ki je bila od 100 do 1000 krat učinkovitejša (Tamai in sod., 1986). Ker pa ne E-64 in E-64c nista bila membransko permeabilna so znanstveniki sintetizirali njihov analog E-64d, ki lahko prehaja celično membrano (McGowan in sod., 1989).

S pomočjo katepsina C so opravili študije hidrolize dipeptidnih substratov, z namenom, da bi pridobili potrebne informacije za načrtovanje boljših inhibitorjev (Tran in sod., 2002). Med poznanimi specifičnimi inhibitorji je Gly-Phe-CHN₂ (Gly-Phe-diazometan), ki ima inhibitornost $k_{obs}/[I] 10^{-4} M^{-1}s^{-1}$ (Green in Shaw, 1981; Kam in sod., 2004; Tran in sod., 2002), čeprav njegova uporaba v terapevtske namene ni primerna ker vsebuje nestabilno diazometil ketonsko skupino (Kam in sod., 2004).

1.10 Vezikularni transport

Prevajanje (translacija) RNK je proces pri katerem se sporočilna RNK (mRNK) prevede v zaporedje aminokislin. Proces se začne na ribosomih v citosolu. V kolikor ima mRNK signalno zaporedje, ki je sestavljeno iz okoli 20 aminokislin in vsebuje hidrofobne aminokislinske ostanke na N-terminalnem delu molekule, se veže nanj delec, ki prepozna signal (SRP, *angl.* signal recognition particle), ki ustvari kompleks. Zaustavi se translacija in kompleks se prenese na endoplazmatski retikulum (ER), kjer se sprost SRP. Ribosom se veže na translokacijski kompleks v ER membrani. Translacija se nadaljuje v notranjosti ER. Ko translacija poteče, se signalno zaporedje odcepi in nastali protein se sprost v lumen ER. V lumnu ER se verige pravilno zvijejejo s pomočjo šaperonov. Nepravilno zviti proteini gredo v razgradnjo. V ER se začne translacijska modifikacija N-glikozilacija, ki poteče na specifičnih asparaginskih mestih. Proteini iz ER se preko vezikularnega transporta prenesejo v Golgijev aparat (GA) na cis strani, kjer potekajo ostale postranslacijske modifikacije. Ena najpomembnejših modifikacij je glikozilacija. Od transgolgijevega mrežja se odcepljajo transportni vezikli, ki prenašajo novonastale proteine v lizosome ali na plazemsko membrano ter sekretorni vezikli, ki prenašajo protein v zunajcelični prostor (Lodish in sod., 2000; Reynaud in Simpson, 2002).



Slika 8: Shematski prikaz sinteze in transporta proteinov. Shema prikazuje možne transportne poti po celici. (povzeto po: Lodish in sod., 2000).

V določenih celičnih tipih (na primer živčne celice in acinarne celice pankreasa) so nekateri proteini shranjeni v sekretornih veziklih in se sprostijo samo ob določenih živčnih ali hormonskih signalih (regulirana sekrecija). V ostalih celicah, v kolikor proteini ne gredo v endo/lizosomske kompartmente, se določeni proteini gibljejo proti celični membrani v transportnih veziklih in se nepretrgoma izločajo (konstitutivna sekrecija). Vzporedno poteka tudi vzvratni transport preko malih veziklov, ki se vračajo nazaj v GA in v ER (Reynaud in Simpson, 2002).

1.11 Glikozilacija

Glikozilacija je posttranslacijska modifikacija, ki omogoča vezavo sladkorjev na protein, kar vpliva na pravilno zvijanje, stabilnost, biološko aktivnost, metabolizem, lokalizacijo in interakcije med celicami (Hounsell in sod., 1996; Jenkins in sod., 1996; Stanley, 1992). Poznamo štiri skupine glikozilacije, glede na vezavo na aminokislinski ostanek.

- N-glikozilacija,
- O-glikozilacija,
- C-manozilacija,
- Glikozilfosfatidilinozitolna sidra (GPI).

Celotna sinteza je nadzorovana preko specifičnih encimov, ki delujejo v pravilnem vrstnem redu in času in so prisotni v različnih količinah v točno določenih delih endoplazmatskega retikuluma (ER) in Golgijevega aparata (GA). Vsak specifični celični protein v organizmu vsebuje svoje specifične procesne encime. Tako lahko ima isti protein, pripravljen v individualnem celičnem tipu, drugačne karbohidratne verige.

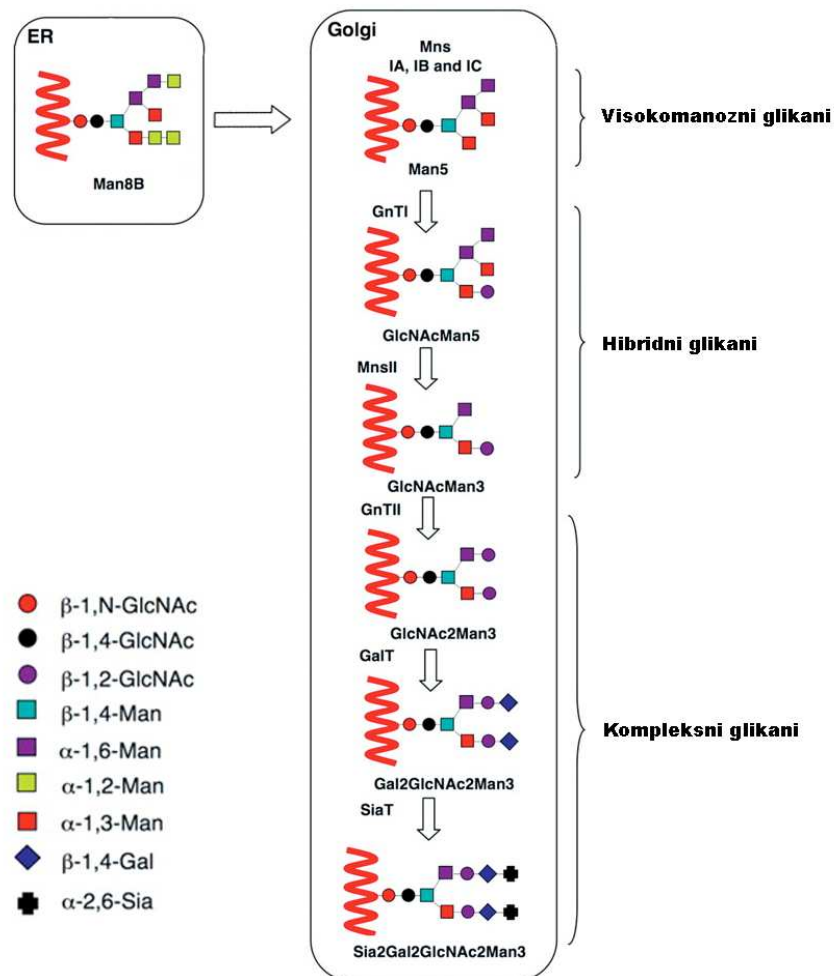
1.11.1 N-glikozilacija

Pri proteinih, ki imajo signalni peptid dolžine 20 do 25 aminokislinskih ostankov, se sinteza usmeri v lumen zrnatega endoplazmatskega retikuluma, signalni peptid pa se odstrani s signalno peptidazo. N-glikozilacija je kotranslacijska modifikacija, ki poteka samo na asparaginskem ostanku na peptidnih skupnih zaporedjih (*angl.* consensus sequence) Asn-X-Ser ali Asn-X-Thr, kjer je X lahko katerakoli aminokislina razen prolina, čeprav imajo nižjo dovezetnost za kisle aminokisliline in levcin (Gavel in Vonheijne, 1990; Kasturi in sod., 1997; Kasturi in sod., 1995; Shakin Eshleman in sod., 1996). Potrjenih je bilo samo dve tretjini potencialnih N-glikoziliranih skupnih zaporedij Asn-X-Ser/Thr (Apweiler in sod., 1999). Preferenčno oligosaharid transferaze (OST) izberejo Thr pred Ser v Asn-X-Thr/Ser zaporedju (Nilsson in von Heijne, 2000). Ugotovljena je bila tudi sekvenca Asn-X-Cys, ki pa se redkeje pojavlja. N-glikozilacija poteka sočasno s sintezo proteina in je pomembna za pravilno zvijanje proteinov. Nepravilno zviti protein prepozna šaperonski protein kalneksin ali kalretikulin (Parodi, 2000), ki se veže na glukozni ostanek. Nepravilno zviti proteini se izločijo iz ER v citosol, kjer jih razgradi proteasom.

Poznamo tri glavne tipe N-glikozilacije:

- visokomanozni tip,
- kompleksni tip in
- hibridni tip.

Visokomanozni tip ima poleg dveh N-acetilglukozamidov še najmanj 3 manoze. Nima pa drugih vrst sladkorjev, kot jih ima kompleksni tip. Poleg dveh N-acetilglukozamidov ima vsa manozna mesta zasedena še z drugimi vrstami sladkorjev. V kolikor je na razvejani verigi kombinacija obeh, tako prostih manoznih ostankov kot tudi drugih sladkorjev, govorimo o hibridnem tipu (Taylor in Drickamer, 2006).



Slika 9: Shematski prikaz N-glikozilacije. Postopna tvorba različnih tipov glikanov (povzeto po Hamilton in sod. 2006).

Če na visokomanozni tip delujejo razne transferaze sladkorjev dobimo hibridno ali kompleksno N-glikozilacijo (Hamilton in sod., 2006). Kompleksna glikozilacija poteče v sredinskem delu GA. Encim, preko katerega potekajo vse ostale modifikacije in je tako iniciator razvejane glikozilacije, je N-acetilglukozaminil transferaza I (EC 2.4.101) (GnT1) (Yip in sod., 1997; Yoko-O in sod., 2003). Protein kodira gen MGAT1. Encim doda GlcNAc na končni manozni ostanek, temu sledi delovanje okoli 200 specifičnih encimov (N-acetilglukozaminil transferaze, galaktozil transferaze in sialil transferaze), ki v zaporedju dodajajo in odstranjujejo specifične sladkorje (Varki in Kornfeld, 1983). Vrsten red delovanja N-acetilglukozaminil transferaze III (GnT3) in manozidaze II, določa tip N-glikozilacije. V primeru, da najprej deluje GnT3 pride do hibridnega tipa N-glikozilacije, v nasprotnem pa do kompleksnega tipa.

1.11.2 Usmerjanje proteinov v vezikle

Ko nastane visokomanozni tip N-glikozilacije, se lahko v Golgijevem aparatu protein nadalje sprocesa kar določi lokalizacijo. Pomemba in specifična stopnja pri usmerjanju proteinov v vezikle je modifikacija visokomanozних oligosaharidov s fosforilacijo. Fosforilirani oligosaharidi so strukturno heterogeni in vsebujejo eno ali dve fosfatni skupini. Manoza-6-fosfat (Man6P) je prepoznavni signal za specifična receptorja, ki usmerjata encime v lizosome. Nastanek Man6P katalizirata dva encima. Najprej deluje N-acetilglikozamin-1-fosfotransferaza (GlcNAc-1-fosfotransferaza), ki veže GlcNAc-1-fosfat iz UDP-GlcNAc na izbrane C6 hidroksilne skupine manoz (Lazzarino in Gabel, 1989). Mono in difosforilirane manoze so lahko dodane na različna mesta oligosaharida v α -1,3 in α -1,6 verigi (Goldberg in Kornfeld, 1981; Varki in Kornfeld, 1983). Da receptorji prepoznajo označevalec Man6P je potrebna še cepitev kompleksa. N-acetilglikozamil-1-fosfodiester-alfa-N-acetilglukozamidaza (UCE) odstrani N-acetilglukozamidni ostanek iz fosfodiestera in izpostavi Man6P označevalec. Tako pripravljeni proteini se lahko v trans-GA vežejo na receptor. Obstajata dva specifična Manoza-6-fosfat receptorja (MPR). Manjši ima molekulsko maso 46 kDa in je kationsko odvisen (MPR46), večji, z molekulsko maso 300 kDa (MPR300) pa je kationsko neodvisen. Razen po velikosti se razlikujeta v vezavnih lastnostih, nivoju izražanja, tkivnih specifičnostih in transportnih funkcijah (Dahms in sod., 2008). Oba MPR sta tip I transmembranskih glikoproteinov.

Po vezavi proteina na receptor se tvori vezikel, ki je obdan s klatrinom. Vezikel se združi z endo/lizosomskim veziklom, ki zaradi nizkega endosomalnega pH sprosti encim iz kompleksa MPR, receptor pa se recilkira nazaj v GA (Bräulke in Bonifacino, 2009). Nekateri lizosomski encim se izognejo vezavi na MPR v GA in se izločijo iz celice.

2 Namen dela

Vloga in delovanje ščitničnih hormonov T₄ in T₃ v fizioloških in tudi v patoloških procesih je dokaj poznana. Pomembna sta za pravilno delovanja srčne, pljučne in nevrološke funkcije med homeostazo in boleznijo. Manj znan pa je mehanizem sproščanja obeh hormonov iz tiroglobulina. Ne poznamo natančno mesta, kjer poteka cepitev, niti ne poznamo vseh encimov, ki razgrajujejo tiroglobulin in omogočijo sproščanje ščitničnih hormonov v kri. Vlogo N-glikozilacije pri proteinih, ki sodelujejo v procesiranju T₄ in T₃, so raziskovali na tiroglobulinu, TSH, ne pa na proteinazah. Pomembno je natančno razumeti molekularne mehanizme pri sproščanju ščitničnih hormonov pri normalnem delovanju celic, kar bi nam omogočilo razumeti delovanje pri patoloških stanjih.

Namen doktorskega dela je, da povežemo dosedanje znanje z našimi raziskavami in ugotovimo, kako vpliva sprememba N-glikozilacije na lokalizacijo encima plazemska glutamat karboksipeptidaza (PGCP) in s tem na delovanje izven celice. Zaradi fiziološke pomembnosti smo raziskali vlogo PGCP pri izvenceličnem sproščanju tiroksina (T₄).

Naše hipoteze so obsegale naslednje predpostavke:

- N-glikozilacija vpliva na znotrajcelično lokalizacijo oziroma na izločanje plazemske glutamat karboksipeptidaze iz celic.
- Katepsin C in plazemska glutamat karboksipeptidaza delujeta zunajcelično in procesirata tiroglobulin. Njuno delovanje in izločanje naj bi bilo usklajeno in natančno regulirano.
- Katepsin C katalizira hidrolizo N-terminalnega dela tiroglobulina in odceplja dipeptide, vključno z dipeptidom s tiroksinom na petem mestu proteina. Plazemska glutamat karboksipeptidaza pa hidrolizira nastali dipeptid.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali in reagenti

3.1.1 Materiali

Mišja in kunčja protitelesa proti človeškemu PGCP so bila pripravljena v našem laboratoriju, monoklonska protitelesa proti človeškemu katepsinu C, ki označujejo težko verigo katepsina C, so bila kupljena pri Santa Cruz (USA), anti-GnT1 protitelesa so bila kupljena pri Sigma (ZDA), kunčja anti-PDI in anti-Golgin-97 so bila kupljena pri Abcam (Velika Britanija). Sekundarna kozja proti kunčja in kozja proti mišja protitelesa konjugirana z Alexa Fluor[®]488 ali Alexa Fluor[®]546 so bila kupljena pri Dianova (Germany). Vsi drugi reagenti, razen posebej omenjenih, so bili proizvod Sigma-Aldrich (ZDA).

3.2 Čiščenje in identifikacija človeškega rekombinantnega PGCP

V našem laboratoriju je bil pripravljen in izražen človeški rekombinanti PGCP (Zajc in sod., 2011) v insektnih celicah *Sf9* preko bakulovirusnega ekspresijskega sistema. Šesti dan ekspresije je bilo gojišče odvzeto in pripravljeno za nadaljnjo obdelavo. Protein smo čistili s kombinacijo različnih tekočinskih kromatografij ter ga okarakterizirali. Vsa čiščenja, vključno s predhodnimi koraki, so bila narejena pri sobni temperature, razen v pripisanih primerih.

3.2.1 Čiščenje rekombinantnega PGCP

Brezserumski nemoten supernatant (400 ml), ki je vseboval rekombinanten encim, je bil centrifugiran šesti dan po infekciji. Rekombinantni PGCP v supernatantu smo najprej čistili na hidroksiapatitni koloni. Kolono smo predhodno uravnovežili s pufrom (0,05 M NaH₂PO₄ pufer pH 5,9; 0,2 M NaCl). Po nanosu vzorca smo z istim pufrom odstranili nevezane proteine pri približnem pretoku 1 ml/min. Izpiranje smo kontrolirali z merjenjem absorbance pri 280 nm in ga nadaljevali, dokler se vrednost ni ustalila blizu ničle. Nato smo vezane proteine eluirali z elucijskim pufrom (0,5 M NaH₂PO₄ pufer, pH 5,9, 0,2 M NaCl) pri pretoku 0,5 ml/min. Eluiran proteinski vzorec smo združili in dializirali preko noči pri 4 °C proti dializnemu pufru (20 mM Tris/HCl pufer, pH 7,0).

Sledila je anionsko izmenjevalna kromatografija na MonoQ[™]-Sephacrose (GE Healthcare, ZDA) z uporabo tekočinske kromatografije za hitro ločevanje proteinov (FPLC - fast protein liquid chromatography). Kolona je bila predhodno uravnovežena z nanašalnim pufrom (20 mM Tris/HCl buffer, pH 7,5). Protein smo eluirali z linearnim gradientom 0 do 0,5 M NaCl v nanašalnem pufru v 30 minutah pri pretoku 1 ml/min. Frakcije z dipeptidazno aktivnostjo (opisano v razdelku 3.3.1) na dipeptidni substrat Ser-Met smo združili in čistili naprej.

Sledilo je čiščenje z uporabo gelske kromatografije na FPLC. Za ločevanje smo uporabili kolono Superdex™ 200 HR (GE Healthcare, ZDA). Za elucijo smo uporabili pufer (20 mM Tris/HCl pufer, pH 7,5; 0,15 M NaCl) pri pretoku 0,5 ml/min. Zbirali smo frakcije velikosti okrog 100 kDa in jim testirali encimsko aktivnost na dipeptid Ser-Met.

Za ločevanje aktivne oblike PGCP od neaktivne smo uporabili afinitetno kromatografijo na koloni Phe–Leu–sefaroza (Gingras in sod., 1999; Pshezhetsky in Potier, 1994). Gel za afinitetno kromatografijo smo pripravili po navodilih proizvajalca za vezavo dipeptida. En gram epoksi aktivirane sefaroze (GE Healthcare, ZDA) smo izpirali na steklenem filtru z 200 ml destilirane vode in inkubirali s 5 ml 0,25 M dipeptidom Phe–Leu (Sigma, ZDA). Ta je bil raztopljen v 0,02 M NaOH. Vezava je potekala 24 ur pri 37 °C pri stalnem mešanju. Neaktivirane epoksi skupine smo blokirali z nadaljnjo 4 urno inkubacijo gela v 1 M etanolaminu, pH 10,8. Pripravljen gel smo nanесли v stekleno kolono in spirali z destilirano vodo, 0,1 M natrijevim bikarbonatnim pufrom, pH 8,0 in 20 mM natrijevim acetatnim pufrom, pH 4,75; z dodatkom 0,15 M NaCl.

Kolono z dipeptid-sefarozo smo uravnotežili z 20 mM natrijev acetatnim puferom, pH 4,75; 0,15M NaCl. Vzorec po gelski kromatografiji, ki je vseboval PGCP (6 ml), je bil predhodno nakisan na pH 4,75 z dodatkom približno 2 ml 0,1 M natrijevega acetatnega pufra, pH 3,5, ki je vseboval 1 M NaCl. Mešanico smo centrifugirali (16,000 rpm, 4 °C) 5 minut in supernatant nanесли na kolono. Nevezane proteine smo izpirali s kolone s 30 ml izpiralnega pufra. Vezani PGCP je bil eluiran z afinitetne kolone z 20 mM Tris/HCl pufrom, pH 7,5. Aktivni PGCP se je izločil v enem samem vrhu v prvih 2 ml elucijskega pufra. PGCP smo skoncentrirali na 3 mg/ml z Amicon® Ultra 10K (Milipore, Irska).

Po vsakem koraku čiščenja smo analizirali proteine z NaDS-PAGE analizo in prenosu po Westernu. Čisti aktivni PGCP je bil nestabilen in encim je izgubil aktivnost v dveh dneh. Nasprotno pa je bil proencim stabilen po zamrzovanju na -20 °C.

3.2.2 Določanje koncentracije proteinov

3.2.2.1 Spektrofotometrično določanje koncentracije proteinov

Absorbanco smo merili pri valovni dolžini 280 nm na spektrofotometru Lambda 11 (Perkin Elmer, ZDA) v kiveti iz kremenovega stekla širine 1 cm. S poenostavitvijo Lambert-Beerovega zakona smo preko absorbance izračunali koncentracijo proteinov med posameznimi stopnjami čiščenja.

3.2.2.2 Določanje koncentracije proteinov po Bradfordovi metodi

Po potrebi smo uporabili metodo za določevanje koncentracije proteina po Bradfordu. Princip temelji na nastanku obarvanih kompleksov med kislom raztopino barvila Coomassie Blue in aminokislinskimi ostanki proteinov. V plastični kiveti smo zmešali 100 µl primerno redčenega vzorca v vodi in 1 ml Bradfordovega reagenta ter inkubirali 5 min pri sobni temperaturi. Izmerili smo absorbanco pri 595 nm na spektrofotometru Lambda 11 (Perkin Elmer, ZDA). Kot slepi vzorec smo uporabili vodo. Iz predhodno pripravljene umeritvene krivulje, pripravljene z govejim serumskim albuminom, smo odčitali koncentracijo, ko je bila absorbanca v linearnem območju pri A_{595} med 0,2 in 1,0.

3.3 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS

Elektroforeza z dodanim denaturantom natrijevim dodecilsulfatom (NaDS) je potekala na 12,5 % poliakrilamidnih gelih debeline 1 mm. Za kontrolo velikosti smo nanесли proteinske standarde 1811# (Fermentas, Litva). Pred nanosom smo vzorcem dodali nanašalni pufer (100 mM TRIS, 200 mM DTT, 4 % NaDS, 0,2 % bromfenol modro, 20 % glicerol) in segrevali za 5 minut pri 100 °C. Elektroforeza je potekala na aparaturi Miniprotean II (Bio-Rad, ZDA) pri konstantnem toku 35 mA/gel, dokler barvilo iz pufra ni potovalo do spodnjega dela gelov. Po končani elektroforezi smo gel pripravili za nadaljne poskuse. Za obarvanje proteinov v gelu smo uporabljali 0,2 % raztopino Coomassie Brilliant Blue. Z metodo smo ugotavljali čistost rekombinantnih proteinov.

Elektroforezo smo uporabili tudi kot prvo stopnjo za prenos na PVDF membrano pri določanju aminokislinskega zaporedja. Z metodo smo ločevali proteine celičnih lizatov in gojišč, ki smo jih nato s prenosom po Westernu prenesli na nitrocelulozno NC-45 membrano (Serva, Nemčija).

3.3.1 Določevanje dipeptidazne aktivnosti

Aktivnost PGCP smo merili na spektrofluorimetru Perkin-Elmer LS-50 (ZDA). Uporabljali smo kivete iz kremenovega peska in merili pri valovni dolžini eksitacije 390 nm in emisije 475 nm. Fluorescenco smo določili z merjenjem začetne hitrosti hidrolize fluorogenega substrata Ser–Met (Sigma, Velika Britanija) pri 37 °C. Ena enota je definirana kot količina encima potrebnega za pretvorbo 1 μmola substrata na minuto pod opisanimi pogoji. Postopek merjenja dipeptidazne aktivnosti rekombinantnega PGCP in vzorcev gojišča smo naredili na sledeči način. V 910 μl reagenčnega pufra (0,1 M natrijev acetatni pufer, pH 5,5), ki je vseboval 15 mM cinkovega acetata, smo dodali 25 μl vzorca z encimom. V tako pripravljeno zmes smo dodali 25 μl 10 mM substrata Ser–Met. Na začetku vsake dve minuti in kasneje na 10 min do približno ene ure smo odstranili iz reakcije po 20 μl reagenčne zmesi in reakcijo ustavili z dodatkom 700 μl 20 mM natrijevega boratnega pufra, pH 8,5. Nato smo dodali 50 μl fluoreskamina s koncentracijo 0,2 mg/ml (Floram® Roche, Švica). Vsebino kivete smo takoj premešali in izmerili absorbanco vzorca pri 475 nm.

Kontrolo smo izvedli na enak način, le da smo dodali substrat po prekinitvi reakcije z boratnim pufrom. Kvalitativni test za aktivnost PGCP je bil validiran z dodatkom NaCl v koncentracijah do 0,2 M. Naklon premice skozi točke, ki smo jih dobili z meritvami predstavlja kvalitativni test za aktivnost rekombinantnega PGCP.

3.3.1.1 Meritve inhibicije rekombinantnega encima

Znižanje aktivnosti PGCP ob prisotnosti inhibitorjev metaloproteinaz smo merili pri končnih koncentracijah 0,25 mM EDTA, 0,1 mM and 1 mM DTPA (dietilen-triamin pentaocetna kislina), 0,25 mM bestatin. Dodatno smo opazovali vpliv karnozina in tiroksina (T4) na aktivnost PGCP. Raztopina karnozina je bila 0,25 mM, medtem ko je bila koncentracija tiroksina 10 μM.

3.4 Priprava cDNK proteinov za heterologno izražanje v sesalskih celicah

S pomočjo metod molekularne biologije smo za pripravo izražanja večjih količin proteinov v sesalskih celicah pripravili rekombinantne plazmide, ki so vsebovali zapis za cDNK zelenih encimov. Za kloniranje smo uporabili vektor za kloniranje pGEM[®]-T Easy (Promega, ZDA). Za izražanje rekombinantnega gena in njegovih mutantov pa ekspresijske vektorje pcDNA3.1(-) (Invitrogen, ZDA), pEGFP-N2 (Clontech, ZDA) in pDsRED-Monomer-N1 (Clontech, ZDA). Izbrani vektorji za izražanje so nam omogočili izražanje našega encima brez ali s fuzijskim proteinom v sesalskih celicah HEK 293 in FRTL-5.

3.4.1 Načrtovanje oligonukleotidov

3.4.1.1 Načrtovanje oligonukleotidov za pripravo divjega tipa PGCP in njegove aktivne katalitske oblike s fuzijskim proteinom

Za izvedbo raziskav smo pripravili divji tip PGCP, z rdečim fuzijskim proteinom (pDSRed-monomer-N1 red fluorescent protein RFP) in njegovo katalitsko mutanto z zelenim fuzijskim proteinom (pEGFP-N2 green fluorescent proteinom GFP). Na osnovi znanega nukleotidnega zaporedja (Bethesda, 2011; Dolenc in Mihelic, 2003) smo načrtovali smerna in protismerna oligonukleotida, ki se prilegata začetnemu 5' oziroma 3' koncu PGCP. Začetni oligonukleotid je bil sestavljen iz štrlečega konca, restrikcijskega mesta za *Xho*I, Kozakovo sekvenco in prilegajoči 5' del signalnega zaporedja PGCP (oligonukleotid PGCP-N1). Protismerni oligonukleotidi so se razlikovali, ker je divji tip vseboval stop kodon za vektor pcDNA3.1(-), vektorja pDSred-monomer-N1 in pEGFP-N2 pa imata zamaknjem bralni okvir glede na pcDNA3.1. Oligonukleotidi so sestavljeni iz 3' konca zaporedja PGCP, po potrebi odstranjenim stop kodonom in restrikcijskega mesta za *Kpn*I. S pomočjo programa »Insilico.ehu.es –DNA to protein translation« smo preverili pravilnos bralnega okvirja (Bikandi in sod., 2004).

Preglednica 2: Načrtovani oligonukleotidi za pripravo PGCP brez ali s fuzijskim proteinom.

Preglednica prikazuje začetni oligonukleotid (PGCP-N1) in tri končne, ki se razlikujejo v stop kodonu (odebeljeno) in bralnem okvirju (odebeljeno in podčrtano) Poševno in podčrtano je označeno restrikcijsko mesto za *Xho*I ali *Kpn*I.

Ime oligonukleotida	Zaporedje oligonukleotidov	restrikcijsko mesto
PGCP-N1	5'- ACAT <u>CTCGAGGCC</u> CCACCATGAAATTCCTTATC - 3'	<i>Xho</i> I
PGCP-red	5'- GTGTAGGT <u>ACCCCGGAC</u> CTAGGCAGCATTTC - 3'	<i>Kpn</i> I
PGCP-green	5'- GTGTAGGT <u>ACCCCGGAC</u> CTAGGCAGCATTTC - 3'	<i>Kpn</i> I
PGCP-Stop	5'- GTAGGT <u>ACCCTAGGAC</u> CTAGGCAGCATTTC - 3'	<i>Kpn</i> I

3.4.1.2 Načrtovanje oligonukleotidov za pripravo katepsina C s fuzijskima proteinoma

Pripravili smo tudi katepsin C s fuzijskima proteinoma GFP in RFP. Postopek priprave je podoben postopku opisanem v razdelku (3.4.1.1), le da smo pri načrtovanju uporabili zaporedje za katepsin C.

Preglednica 3: Načrtovani oligonukleotidi za pripravo katepsina C s fuzijskim proteinom. V preglednici vidimo en začetni oligonukleotid (KC-N1) in dva končna oligonukleotida, ki se razlikujeta v bralnem okvirju (velike črke). Podčrtano je restrikcijsko mesto za *XhoI* in *KpnI*.

Ime oligonukleotida	Zaporedje oligonukleotidov	restrikcijsko mesto
KC-N1	5'- gacatctc <u>gagc</u> gccaccatgggtgctgggcct - 3'	<i>XhoI</i>
KC-Cg	5'- gtaggtacc <u>cccaatttaggaattgggtg</u> - 3'	<i>KpnI</i>
KC-Cr	5'- gtaggtacc <u>C</u> ccaatttaggaattgggtg - 3'	<i>KpnI</i>

3.4.1.3 Načrtovanje oligonukleotidov za pripravo deglikozilacijskih mutantov

Pred načrtovanjem začetnih oligonukleotidov za glikozilacijskih mutantov, smo preverili potencialna glikozilacijska mesta. Uporabili smo program "NETGLY" (Blom in sod., 2004). Na osnovi dobljenih potencialnih mest smo sestavili oligonukleotide. Triplet nukleotidov za asparagin smo spremenili v triplet za alanin, kar je zahtevalo spremembo dveh nukleotidov. Ker sta mesti 353 in 356 zelo blizu, smo pripravili oligonukleotida, ki sta hkrati zajemali obe mutaciji.

Preglednica 4: Načrtovani oligonukleotidi za pripravo glikozilacijskih mutantov PGCP. V prvem stolpcu je tako podano mutirano mesto cDNK proencima (številka), ker je asparagin (N) spremenjen v alanin (A). V drugem stolpcu pa so nanizani pari oligonukleotidov, ki so potrebni za pripravo mestno specifične mutacije. Z veliki črkami so označeni spremenjeni nukleotidi.

Mutirano mesto	Zaporedje parov smernih in protismernih oligonukleotidov
N61A	5'-tatggtaaagcccagGCcagatcctatgagcga- 3' 5'-tcgctcataggatctgGCctgggctttaccata- 3'
N179A	5'-aaccaaccttacatcGCtactcaaggacgggtg- 3' 5'-caccgtccttgagtagGCgatgtaaggttggtt- 3'
N353A	5'-cagttacacaaggtaGCTattccaactacagt- 3' 5'-actgtagtggaaataGCTaccttggtgtaactg- 3'
N356A	5'-aaggtaaatatttccGCctacagtctggtgatg- 3' 5'-catcaccagactgtagGCggaatatttacctt- 3'
N396A	5'-ctgctgcagcccctcGCTatcactcaggtcctg- 3' 5'-caggacctgagtgataGCgaggggctgcagcag- 3'
N353A/N356A	5'-aaggtaGCTatttccGCctacagtctggtgatg- 3' 5'-catcaccagactgtagGCggaataGCTacctt- 3'

3.4.2 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

S pomočjo verižne reakcije s polimerazo smo pomnoževali cDNK načrtovanih konstruktov PGCP, katepsina C in načrtovanih mutantov PGCP z opisanimi oligonukleotidi. Za matrično cDNK smo uporabili dednino za PGCP in katepsin C pripravljenih na našem oddelku (Dolenc in Mihelic, 2003; Paris in sod., 1995). V 2,5 µl 10X reakcijskega pufra smo dodali 1,0 µl matrične cDNK, po 0,6 µl 10 µM (100 µM v primeru priprave mutantov s pomočjo mestno specifične mutageneze) 5'-smernega in 3'-protismerni mutagenega oligonukleotida, 1,0 µl 10 mM zmesi dNTP, 0,5 µl Pfu DNK polimeraze (2,5 U/µl, Fermentas, Litva) ter dopolnili z dH₂O do končnega volumna 25µl. Za verižno reakcijo s polimerzo smo uporabili aparaturo »2720 Thermal cycler« proizvajalca Applied Biosystems (Velika Britanija)

V spodnji tabeli je prikazan program, ki smo ga uporabili pri verižni reakciji s

polimerazo (PCR) za pripravo načrtovanih konstruktov PGCP, katepsina C in načrtovanih mestno specifičnih mutantov PGCP.

Preglednica 5: Program PCR za pripravo cDNK načrtovanih konstruktov. Opisani so procesi, ki so potrebni pri namnoževanju dednine pri določenih temperaturah za določen čas v optimalnih ponovitvah (število ciklov). 1) Vrednosti za konstrukte PGCP. 2) Vrednosti za konstrukte katepsina C. 3) Vrednosti za pripravo mestno specifične mutageneze.

Proces	T (°C)	čas (min)	število ciklov
denaturacija dvoverižne DNK	95	3	1
denaturacija dvoverižne DNK	95	1	} 30 ^{1,2} / 18 ³
prileganje začetnih oligonukleotidov	48 ¹ / 52 ² / 55 ³	1	
podaljševanje verige	72	3 ^{1,2} / 14 ³	
končno podaljševanje verige	72	10 ^{1,2} / 14 ³	1
ohlajevanje	4	∞	

Za pripravo dvojnega mutanta N353A-N356A smo namesto matrične cDNK divjega tipa PGCP uporabili predhodno mutiran N353A. Podobno smo naredili za trojni mutant N353A-N356A-N396A (N3xA), pri tem da matrično cDNK je predstavljala prej omenjen dvojni mutant.

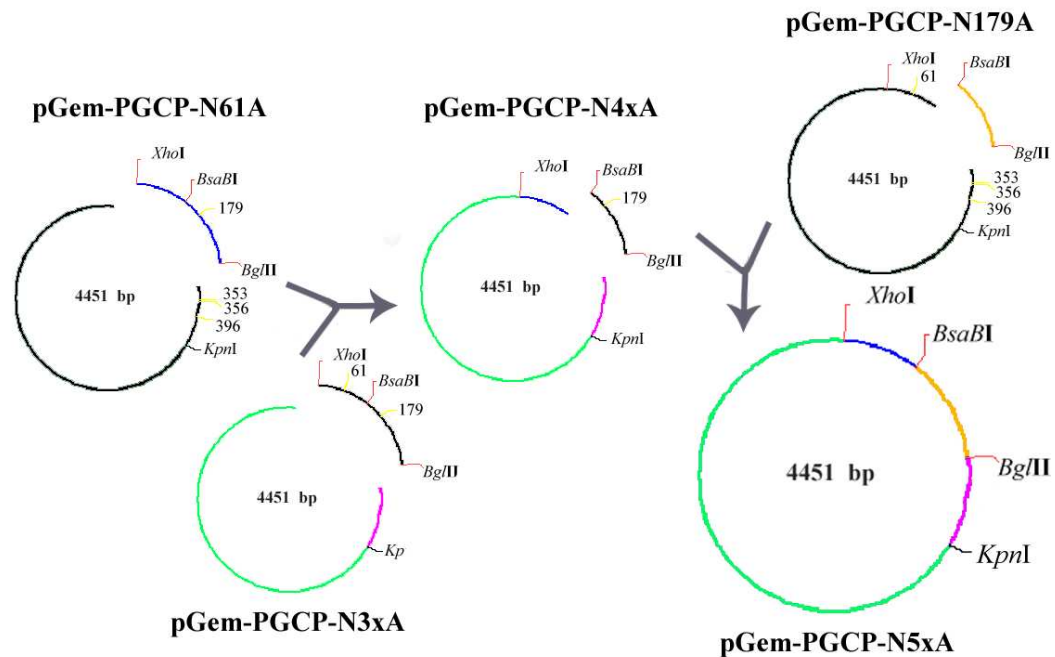
3.4.3 Ligacija, transformacija, čiščenje in preverjanje zaporedij

Dobljene PCR produkte smo vstavili v vektor pGEM®-T-Easy (Promega, ZDA) po navodilih proizvajalca (Wang, H. in Perry, 2011). Ligacija je potekala 4 ure na sobni temperaturi. Dobljeno rekombinantno cDNK smo s transformacijo s temperaturnim šokom vstavili v bakterijske celice *Escherichia coli*, seva DH5α (Invitrogen, ZDA). V primeru priprave mutantov specifične mutageneze smo PCR produkt inkubirali 90 minut z dodatkom 0,5 μl *DpnI* (Fermentas, Litva). Zmes smo brez čiščenja transformirali v bakterijskih celicah *E. coli* DH5α.

Naslednji dan smo izbrane kolonije prenesli v tekoče gojišče z ustreznim antibiotikom in ob stresanju inkubirali preko noči na 37 °C. Temu je sledila izolacija plazmidne DNK z uporabo komercialnega kita "The Wizard® Plus Minipreps DNA Purification (Promega, ZDA) po navodilih proizvajalca. Del vzorca očiščene plazmidne cDNK smo poslali na določevanje nukleotidnega zaporedja v MacroGen (J. Koreja).

3.4.4 Priprava večkratnih deglikozilacijskih mutantov

Pri pripravi četvernega mutanta N61A-N353A-N356A-N396A (N4xA) in peternega, oz. popolnega (N5xA) mutanta, smo se poslužili tehnik molekularnega kloniranja. Najprej smo pripravili četverni mutant. Plazmidno cDNK trojnega mutanta (N3xA) in enojnega mutanta (N61A) smo rezali z restriksijskima endonukleazama *XhoI* in *BglIII* po navodilih proizvajalca (New England Biolabs, Velika Britanija). Z agarozno elektroforezo smo ločili DNK fragmente. Iz 0,8 % agaroznega gela smo izrezali fragmenta velikosti okrog 1000 bp, in 3500 bp in ju očistili s kitom "WIZARD®SV Gel and PCR Clean-Up System" po navodilu proizvajalca (Promega, ZDA). Sledila je ligacija fragmentov v razmerju 3:1 (f-1000:f-3500) s T4 DNK ligazo (New England Biolabs, Velika Britanija) po navodilu proizvajalca. Tako pripravljen plazmid smo transformirali v bakterijske celice *E. coli* DH5α in iz nekaj izbranih kolonij smo izolirali plazmidne DNK ter jim preverili nukleotidno zaporedje (MacroGen, J. Koreja).



Slika 10: Shematski prikaz četvernega in peternege mutanta v vektorju pGem-T-Easy. Postopek priprave mutantov s pomočjo orodij molekularnega kloniranja.

V primeru priprave peternege mutanta pa je bil zgoraj opisan postopek ponovljen. Namesto trikratnega mutanta in enojnega N61A mutanta sta bila uporabljena štirikatni mutant in enojni N179A mutant ter restriktazi *BsaBI* in *BglII*.

3.5 Utišanje izražanja gena PGCP

Pri pripravi kratkih nukleotidnih zaporedij (siRNK) za utišanje gena za podganji PGCP smo sledili navodilom proizvajalca vektroja pSilencer3.1.puro Ambion (ZDA). Najprej smo poiskali 21-nukleotidno zaporedno ciljno-tarčno mRNK, ki se začne z zaporedjem AA. Pri tem smo si pomagali s programom »siRNA Target Finder«, ki se nahaja na internetni strani proizvajalca (www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) (Ambion, ZDA). Program nam je ponudil 114 zadetkov. Strategija iskanja je bazirana na opazovanjih raziskovalcev instituta Max Planck (Elbashir in sod., 2001), kjer siRNK na 3'privesku morata biti UU nukleotida. Pri izbiri smo upoštevali navodila proizvajalca, da je vsebnost nukleotidov GC med 30 % in 50 %. Izbrali smo tri zaporedja na različnih delih molekule. Izbrana zaporedja smo nato primerjali z znanimi podganjimi genomskimi bazami. Na podlagi oznake tarčnega gena program ponudi več potencialno učinkovitih nukleotidnih zaporedij siRNK za utišanje gena. Izbrali smo tri različna zaporedja (preglednica 6). Izbrali smo tudi primerno negativno kontrolo siRNK, ki nima homologije z geni vretenčarjev, ima pa primerljiv delež parov GC z izbranimi molekulami siRNK.

Izbrana smerna in protismerna zaporedja smo nato sestavili v zankasto shRNK (*angl.* short hairpin RNA) po navodilih proizvajalca (Ambion, Velika Britanija) ter shRNK vstavili v plazmid pSilencer3.1.puro. Dobljen plazmid smo s transfekcijskim reagentom vstavili v FRTL-5 celice po postopku opisanem v razdelku 3.6.3. Za določevanje vpliva na utišanje izražanje gena v celicah FRTL-5 smo pripravili tri različne molekule shRNK in jih preverili v dveh ponovitvah.

Preglednica 6: *Načrtovani oligonukleotidi za pripravo shRNK*. V prvem stolpcu je podana označba naključno izbranih zaporedij RNK. V drugem stolpcu so značeni uporabljeni pari za pripravo srvektorjev.

Mutirano mesto	Zaporedje parov smernih in protismernih oligonukleotidov
shRNK1	5'- agcttttccaaaaagaggggaagattgtgtttatctcttgaata - 3' 5'- gatccgaggggaagattgtgtttattcaagagataaacaacaatc - 3'
shRNK2	5'- agcttttccaaaaagctatatacaagagtgggtgtctcttgaaca - 3' 5'- gatccgctatatacaagagtgggttcaagagacaccactcttgt - 3'
shRNK3	5'- agcttttccaaaaacaagaaggaagaacctgttctcttgaaac - 3' 5'- gatccgcaagaaggaagaacctgttcaagagaacaaggttctt - 3'

3.6 Metode dela s celicami

3.6.1 Gojenje celic HEK 293

Celično linijo človeških embrionalnih celic ledvic (HEK 293), dobljeno iz Evropske zbirke celičnih kultur (European Collection of cell Culture - ECACC, UK), smo gojili v DMEM gojišču obogatenu z 10 % govejim serumom (FBS: fetal bovine serum), v kombinaciji z antibiotikoma (100 U/ml penicilin in 100 mg/ml streptomycin). Celice smo inkubirali na 37 °C v z vodno paro nasičeni atmosferi ob prisotnosti 5 % CO₂. Gojišče smo zamenjevali dvakrat do trikrat na teden ali po potrebi za vzdrževanje optimalnih pogojev rasti. Dva dni po precepljanju smo zamenjali gojišče in ga za metabolične poskuse nadomestili s svežim brez-serumskim gojiščem, ki je vseboval Nutridomo-SP (Roche, Švica). Vse poskuse s HEK 293 celicami smo naredili v pasažah od 6 do 12.

3.6.2 Gojenje celic FRTL-5

Celično linijo podganjih ščitničnih celic (FRTL-5), dobljeno iz Evropske zbirke celičnih kultur (European Collection of cell Culture - ECACC, UK), smo gojili v dopolnjenem F-12 Ham Coon-ovem modificiranem gojišču obogatenu s 5 % telečjim serumom (NCF: newborn calf serum), 10 mM natrijev hidrogen karbonatu (NaHCO₃) in mešanico šestih substanc (6H: 1 mU/ml goveji TSH, 2 µg/ml goveji inzulin, 5 nM hidrokortizon, 5 µg/ml transferin, 10 ng/ml somatostatin, and 2 ng/ml L-glicil-histidil-lizin) v kombinaciji z antibiotikoma (100 U/ml penicilin in 100 mg/ml streptomycin) ter antifungicidom 2 µg/ml amfotericin B. Celice smo inkubirali na 37 °C v z vodno paro nasičeni atmosferi ob prisotnosti 5 % CO₂. Gojišče smo menjavali dvakrat tedensko ali po potrebi za vzdrževanje optimalnih pogojev rasti. Dva dni po precepljanju smo zamenjali gojišče in ga za metabolične poskuse nadomestili s svežim brez-serumskim gojiščem, ki je vseboval Nutridomo-SP (Roche, Švica) v prisotnosti šestih (6H) ali treh (3H: 5 nM hidrokortizon, 5 µg/ml transferin in 2 ng/ml L-glicil-histidil-lizin) mešanicah. Vse poskuse s FRTL-5 celicami smo naredili v pasažah od 4 do 10.

3.6.3 Transficiranje celic

Celično linijo človeških zarodnih celic ledvic (HEK 293) ali celično linijo podganjih ščitničnih celic (FRTL-5) smo nagojili do 70 % konfluentnosti. Plazmide z vstavljenjo cDNK zelenega encima (končna koncentracija 2 µg cDNK na 2 ml gojišča) smo razredčili v 100 µl gojišča opti-MEM® (Invitrogen, ZDA) ter dodali 4 µl FuGENE® 6 Transfection Reagent (Roche, Švica) ter pustili 15 minut. Nato smo mešanico previdno dodali celicam. Po 8 urah smo celicam zamenjali gojišče s svežim.

3.6.4 Precepljanje in tripsiniziranje celic

Celicam smo odstranili gojišče in jih dvakrat sprali s 5 ml 1x PBS (Lonza, Velika Britanija). Dodali smo jim na 37 °C ogret TrypLE Select® (Gibco, Velika Britanija) in jih pustili v inkubatorju za 15 min, oziroma dokler se niso vse celice odlepili od površine. Celice smo resuspendirali v 1:1 mešanici F-12 ali DMEM gojišča in PBS (145 mM NaCl, 3 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O, 8 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O, pH = 7,2) ter jih prenesli v 15 mililitrsko centrifugirko in jih centrifugirali za 5 min na 1000 rpm. Odsesali smo odvečno mešanico ter jih resuspendirali v 1 ml svežega gojišča. Običajno smo jih razdelili v razmerju 1:4 celice proti mediju oziroma različno število celic v različne posode odvisno od poskusa, ki smo ga načrtovali.

3.6.5 Zamrzovanje in odmrzovanje celic.

Pri zamrzovanju smo konfluentnim celicam odstranili gojišče, jih sprali s PBS ter jih tripsinizirali. Odlepljenim celicam smo dodali mešanico gojišča in PBS (1:1), ter jih centrifugirali za 5 minut pri 1000 rpm. Supernatant smo odstranili, celice pa resuspendirali v ohlajenem zamrzovalnem gojišču (10 % DMSO, 40 % NCF ali FBS, 50 % F-12 ali DMEM gojišču) in jih prenesli v zamrzovalne vialice ter jih shranili čez noč v zamrzovalnik na -80°C ter smo jih shranili naslednji dan v tekoči dušik. Pri odmrzovanju smo vzeli celice iz tekočega dušika in jih na hitro odtalili, prenesli v 15 ml centrifugirke z 10 ml PBS, ter jih centrifugirali 5 min pri 1000 rpm. PBS smo odstranili in celice resuspendirali v novem popolnem F-12 ali DMEM gojišču ter prenesli v različne rastne petrijevke.

3.6.6 Priprava popolnega celičnega lizata s pufrom RIPA

Gojišče in odlepljene celice smo prenesli v 15 ml centrifugirko in centrifugirali 5 minut na 1000 rpm. Celice smo nato dvakrat sprali v ohlajenem PBS pufri in jih tripsinizirali (3.6.4). Celični pelet smo resuspendirali v 400 µl pufru RIPA (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % deoksiholna kislina, 0,1 % NaDS) ter jih inkubirali 5-10 min na ledu. Nato smo jih 10 min centrifugirali v na 4 °C ohlajeni centrifugi pri 14000 rpm. Supernatant smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko ter zamrznili na -80 °C oziroma takoj uporabili. Pripravljene lizate pufru RIPA smo uporabili za imunodetekcijo proteinov, vpliv hormonov, merjenje katepsinske aktivnosti ali določanje prostega tiroksina (T4).

3.6.7 Priprava popolnega celičnega lizata s pufrom NP-40

Postopek priprave je podoben kot pri prejšnjem razdelku (3.6.6). Namesto pufera RIPA je bil uporabljen pufer NP-40 (20 mM Tris/HCl, pH 8,0; 137 mM NaCl, 10 % glicerol, 1 % NP-40), kar nam je omogočilo pripravo lizatov za deglikozilacijske študije.

3.7 *In vitro* cepitev tiroglobulina z katepsinom C

Tiroglobulin iz prašičje ščitnice je sodelavec izoliral na našem oddelku po objavljenem postopku (Herzog in sod., 1992). 50 µg Tg smo inkubirali z 0,25 µg katepsina C v pufru, ki simulira pogoje zunajceličnega matriksa (Jordans in sod., 2009) (pripravljen z mešanjem 6,9 ml 200 mM citronske kisline, 87,1 ml 200 mM natrijevega fosfata ter 9,58 mg L-cisteina) pri pH 7,2. Inkubacija je potekala 2 uri in 24 ur pri 37 °C. Človeški rekombinantni katepsin C je bil pripravljen v našem laboratoriju.

3.8 *In vitro* deglikozilacija PGCP in katepsina C

Deglikozilirali smo endogene proteine lizata pripravljenega s pufrom NP-40 iz celic in brez serumskega gojišča obogatene z Nutridomo-SP (Roche, Švica). Odstranili smo N-vezane glikane z endoglikozidazama PNGazo F ali Endo H (New England Biolabs, Velika Britanija). Deglikozilacija je potekala pod reducirajočimi pogoji. Sledili smo navodilom proizvajalca in uporabili priložene kemikalije. Vzeli smo 9 µl lizata in mu dodali 1 µl D1 pufera. Sledilo je 10 minutna inkubacija pri 100 °C. Raztopini smo dodali 2 µl G5 pufera (Endo H) oziroma G7 pufera (PNGaza F) ter po 1 µl vsakega deglikozilacijskega encima. V primeru PNGaze F smo dodali še 2 µl 1 % raztopine NP-40 ter oboje dopolnili do 20 µl z dH₂O. Vse reakcije so potekale v duplikatih. Deglikozilirani lizati in gojišča smo karakterizirali preko NaDS poliakrilamidne gelske elektroforeze in prenosa po Westernu z imunokemijskimi metodami.

3.9 Polsuhi prenos proteinov iz poliakrilamidnega gela na PVDF membrano v električnem polju

Pripravljene gele za prenos na PVDF membrano smo starali 24 ur na temperaturi 4°C, da so se oksidirali prosti radikali, ki bi se vezali na N-terminalni del proteina in tako preprečili njegovo degradacijo. Pri elektroforeznem prenosu smo uporabili aparaturo za polsuhi prenos proteinov (Owl Separation Systems, ZDA). Sequi-Blot PVDF membrano (Bio-Rad, ZDA), ki smo jo predhodno aktivirali za 1 minuto z metanolom. V sestavljeno aparaturo smo na anodo položili filter papir, ovlažen s pufrom (25 mM TRIS, 8 mM glicin, 0,04 % NaDS, 20 % metanol), PVDF-membrano, gel, filter papir in pokrili s katodo, ki je hkrati pokrov aparature. Prenos je trajal 2 uri pri sobni temperaturi in toku 35 mA. Po končanem prenosu smo membrano barvali z barvalno raztopino (0,1 % Comasie Blue Brilliant R250, 40 % MeOH, 0,5 % CH₃COOH) ter jo razbarvali z razbarvalno raztopino (50 % (v/v) MeOH). Na koncu smo membrano sprali z dH₂O in jo sušili na zraku. Vidne proteinske lise smo izrezali iz membrane in jih uporabili za določevanje aminokislinskega zaporedja.

3.10 Detekcija proteinov po Westernu

Po končani NaDS-PAGE smo proteine prenesli na nitrocelulozno membrano (Sigma, ZDA). Za prenos po Westernu smo uporabili aparaturo za polsuhi prenos proteinov (Owl Separation Systems, ZDA). V sestavljeno aparaturo smo na anodo položili filter papir, ovlažen s pufrom (25 mM TRIS, 8 mM glicin, 0,04 % NaDS, 20 % metanol), nitrocelulozno membrano, gel, filter papir in pokrili s katodo, ki je tudi pokrov aparature. Prenos je trajal 2 uri pri sobni temperaturi in toku 35 mA.

3.11 Imunodetekcija

Po končanem prenosu smo nezasedena vezavna mesta na nitrocelulozni membrani blokirali s 3 urno inkubacijo v blokirnem pufu (5 % posneto mleko v prahu, 0,1 % Tween, v PBS pufu). V pufu za blokiranje smo redčili tudi vsa protitelesa. Membrano smo inkubirali s primarnimi protitelesi preko noči pri 4 °C ali 2 h pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo membrano 6 krat sprali s PBS-om, vsakič po 15 min, nato je sledila 2 urna inkubacija v raztopini sekundarnih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, ZDA). Membrano smo ponovno spirali s PBS. Primarna protitelesa smo redčili: 1/1000 za aktin, GnT1, katepsin C in PGCP. Sekundarna protitelesa smo redčili 1/3000 v blokirnem pufu (antikunčja, antimišja in antikožja protitelesa). Proteine na membrani smo detektirali s pomočjo sistema na osnovi kemoluminescence. Uporabili smo reagent ElectroChemiLuminescence ECL (GE Healthcare, Germany) po navodilih proizvajalca. Detekcija je potekala na fotografskih filmih (Kodak, ZDA). Razvijanje fotografskih filmov pa je potekalo avtomatsko na aparaturi SRX-101A (Konica Minolta, ZDA).

3.12 Določanje aminokislinskega zaporedja

Za določanje aminokislinskega zaporedja na N-terminalnem delu proteina smo uporabljali avtomatizirano Edmanovo metodo na sekvenatorju Procise 492A (Applied Biosystems, ZDA). Končni produkti Edmanove degradacije, feniltiohidantoinski derivati aminokislin so bili analizirani na aminokislinskem analizatorju (Applied Biosystems, ZDA) na koloni PTH C18, velikosti 2,1 mm x 220 mm. Analizo smo spremljali pri 259 nm.

3.13 Merjenje aktivnosti katepsina C

Aktivnost katepsina C smo merili fluorimetrično z določanjem cepitve substrata Gly-Phe-4MβNA (Bachem, Švica). Celice smo gojili na ploščah z 12 vdolblincami s 500 μl gojišča. Za merjenje aktivnosti gojišča smo jemali 150 μl vzorca. Za merjenje aktivnosti lizata smo celice raztapljali v 150 μl nedenaturirajočega pufra, ki je vseboval 0,5 % detergenta Nonident N-40 (Roche, Švica). V mikrotitrsko črno ploščo (Greiner, Nemčija) smo nanegli po 50 μl vzorca in ga za eno minuto zmešali z reakcijskim pufrom (100 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 6,0). Nato smo dodali substrat, da je bila njegova končna koncentracija 200 μM (koncentracija DMSO-ja je bila 1%). Fluorescenco smo merili na fluorimetru Safire (Tecan, Švica) takoj po dodatku substrata pri valovni dolžini vzbujanja 335 nm ter valovni dolžini emisije 415 nm. Aktivnost encima smo izračunali iz naklona hitrosti razgradnje substrata.

3.14 Določevanje prostega T4 z ELISA testom

Prosti tiroksin (fT4) smo merili z encimskim imunskim testom (ELISA). Uporabljali smo komercialni kit »ELISA - Free T4 kit« (Calbiogen, ZDA) po navodilih proizvajalca. Občutljivost testa je bila 0,05 ng/dl. Intra in inter test CVs sta bila 3,4 % in 6,3 %. Statistična signifikantnost raziskovalnih podatkov je bila narejena s Student-ovim t-testom. Za vse analize $p < 0,05$ je bila sprejeta kot signifikantna verjetnost nivoja. FRTL-5 celice smo uporabili za določevanje sproščanja tiroksina iz dodanega prašičjega Tg. Prašičji Tg, ki smo ga dodali v gojišče celične kulture je imel končno koncentracijo 30 nM. Po 1 uri inkubacije smo merili koncentracijo tiroksina, ki se je sprostil v medij. Pri sproščanju smo po potrebi dodali posamezne inhibitorje E-64 (10 μ M) E-64d (10 μ M), EDTA (250 μ M), DTPA (1 mM) in Gly-Phe-CHN₂ (10 μ M), ali njihove kombinacije. Diagnostični kit smo uporabili tudi za zaznavanje sproščanja v *in vitro* poskusih. V 500 μ l pufra, ki oponaša pogoje zunajceličnega matriksa (pH 7,2) (Jordans in sod., 2009), ki smo ga pripravili iz 6,9 ml 200 mM citronske kisline, 87,1 ml 200 mM natrijevega fosfata ter 9,58 mg L-cisteina, smo razredčili Tg (1,5 μ M) in ga inkubirali 1 uro s katepsinom C (10 nM). Drugič v prisotnosti PGCP (10 nM).

3.15 Visokotlačna kromatografija z obrjenima fazama (RP-HPLC)

Vzorec razgradnje Tg s katepsinom C ali v kombinaciji katepsin C/PGCP smo naredili, kot je opisano v razdelku 3.7.

Reakcijo smo prekinili z odstranitvijo proteinov s filtriranjem na Amicon Ultracel 10K (Millipore, Irska). Produkte razgradnje smo spremljali s HPLC sistemom (Waters, ZDA) na koloni Symmetry c18 3,5 μ m; 4,6 x 75 mm (Waters, ZDA) uravnoteženi z 0,1 % (v/v) TFA v dH₂O. Elucijo smo izvedli z 20 minutnim gradientom acetonitrila od 0 % do 50 % v 0,085 % TFA in jo spremljali z detektorjem Waters detector (Waters, ZDA).

3.16 Določanje vsebnosti joda

Analični postopek določevanje vsebnosti joda v organskih spojinah temelji na osnovi izkoriščanja njegove katalitične sposobnosti v redukcijski reakciji med Arzenom As(III) in Cerijem Ce(IV). V reakciji Cerij preide iz (IV) v (III) valentno obliko ($Ce^{4+} + e \rightarrow Ce^{3+}$). Pri tem preide barva iz rumenooranžne v brezbarvno raztopino. Merili smo intenziteto upadanja barve pri 410 nm. Postopek je prvič opisal Palumbo (Palumbo in sod., 1982).

100 μ g Tg smo inkubirali v prisotnosti 0,5 μ g katepsina C (pogoji opisani pri 3.7). Po 4 urni inkubaciji smo cepljen Tg oborili s 4 M amonijevem sulfatom in ga tretirali z bromovico v kislem. Reakciji smo dodali cerijevo in kasneje še arzenijevo raztopino in merili upad barve na spektrofotometru pri 410 nm. S pomočjo umeritvene krivulje smo določili mmol joda na mol Tg. Za negativno kontrolo smo uporabili vodo namesto katepsina C.

3.17 Imunocitokemija

Celice smo gojili na 15 mm krovnih stekelcih (Electron Microscopy Sciences, ZDA) na plošči z 12 vdolbinicami. Ob 60 % do 80 % konfluentnosti, smo jim odsesali gojišče in jih dvakrat sprali s PBS pufrom. Fiksirali smo jih 15 minut na sobni temperaturi s 4 % PFA (paraformaldehid) raztopljenem v PBS pufu. Celice smo nato blokiral za eno uro v serumskem blokirnem pufu (3 % goveji serumski albumin: BSA, 0,1 % Triton[®]X-100,

raztopljena v PBS pufri), da smo preprečili nespecifično vezavo. V istem pufri smo redčili protitelesa za označevanje antigenov. Uporabili smo primarna kunčja in mišja protitelesa proti PGCP, katepsinu C, LAMP-2, PDI, Golgin-97, N-acetilglukozaminil transferazi I, aktinu. Celice smo inkubirali s primarnimi protitelesa za eno uro. Sledilo je šestkratno spiranje s PBS pufrom in enourna inkubacija redčenih (1:2500) sekundarnih protiteles. Sekundarna protitelesa so bila mišja ali kunčja konjugirana s fluoroforoma Alexa Fluor 488 (zelena fluorescenca) ali Alexa Fluor 546 (rdeča fluorescenca) (Molecular Probes, ZDA). Po končnem spiranju smo stekelcam dodali SlowFade (Molecular Probes, ZDA) in jih namestili na objektna stekelca ter jih utrdili z lakom. Kot negativno kontrolo smo namesto primarnih oz. sekundarnih protiteles uporabili pufer za blokado. Vzorce celic smo analizirali z invertnim fluorescenčnim mikroskopom Olympus IX-81 (Olympus, Japonska) z objektivoma 60× (N.A. = 1,4) in 100× (N.A. = 1,35). Fluorescenco smo vzbujali s fluorescenčno žarnico (50 W), napolnjeno z živosrebrnimi parametri. Za opazovanje fluorescence Alexa Fluor 488 smo uporabljali vzbujevalni filter Ex 450/490, dikroično zrcalo, ki prepušča valovne dolžine, večje od 495 nm, in emisijski filter Em 500/550. Fluorescenco Alexa Fluor 546 smo opazovali s pomočjo vzbujevalnega filtra Ex 516/555, dikroičnega zrcala, ki prepušča valovne dolžine, večje od 565 nm, in emisijskega filtra Em 574/648. Mikroskop je bil opremljen z digitalno kamero C10600-10B ORCA-R2 (Hamamatsu Photonics, Japonska). Slike smo analizirali s programsko opremo za snemanje in obdelavo slik Imaging Software for Life Science Microscopy Cell (Olympus, Japonska).

3.18 Imunohistokemija mišjih rezin ščitnice

Histološke rezine ščitnice FVB miši smo pripravili v našem histolaboratoriju. Izrezane ščitnice 4 miši smo fiksirali preko noči v 10 % formalinu. Dehidrirali smo jih s pomočjo tkivnega procesorja "Shandon Tissue Processor" (Shandon GmbH, Nemčija) ter jih vkalupili s parafinom na Microm EC 350 Paraffin Embedding Station (Microm, Belgija). Rezali smo 5 µm debele rezine in jih barvali z ABC (Avidin Biotin Complex) imunohistokemijsko metodo.

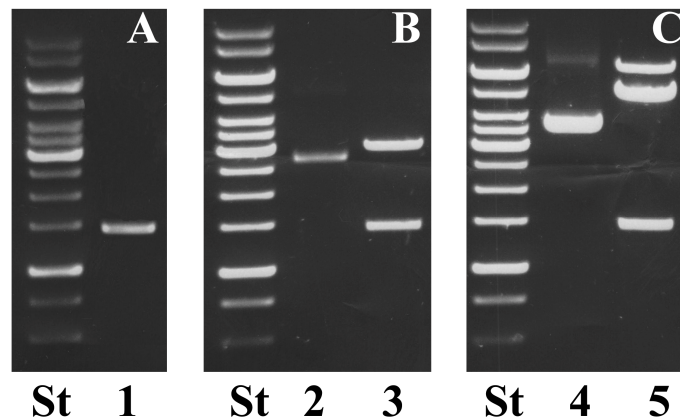
Za imunohistološke preparate, ki smo jih opazovali z imunofluorescenco smo najprej izrezali ščitnico in jo na hitro zamrznili v tekočem dušiku. S kriotonom (Cryotom AS620 Shandon, Nemčija) smo narezali 5 µm rezine. Za označevanje smo uporabili primarna kunčja protičloveška protitelesa za katepsin C in PGCP redčena 1:100. Za detekcijo pa smo uporabili sekundarna Alexa Fluor® 488 (Invitrogen; Velika Britanija) razredčena 1:500. Po končnem spiranju smo dodali SlowFade z DAPI (Molecular Probes, ZDA). Vzorce smo pregledovali na fluorescenčnem mikroskopu Olympus IX 81 (Olympus, Japonska). Fluorescenco DAPI smo opazovali s pomočjo filtra U-61010 DAPI/FITC/Cy3 (Chroma Technology, ZDA). Mikroskop je bil opremljen z digitalno kamero C10600-10B ORCA-R2 (Hamamatsu Photonics, Japonska). Slike smo obdelovali s pomočjo programa Imaging Software for Life Science Microscopy Cell (Olympus, Japonska).

4 Rezultati

4.1 Priprava rekombinantnih proteinov

4.1.1 Priprava rekombinantnih fuzijskih proteinov PGCP s fluorescenčnim proteinom

Rekombinantni protein PGCP in njegove mutante smo pripravili v fuziji z zelenim ali rdečim fluorescenčnim proteinom. Za pomnoževanje cDNK PGCP s pomočjo PCR smo uporabili klon IMAGp998M20148 kupljen pri RZDP (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH). Namnožen produkt smo vstavili v klonirni vektor pGEM-T-Easy in novonastali plazmid namnožili v klonirnih celicah DH5 α . Po preverjanju nukleotidnega zaporedja, smo gen za PGCP vstavili v vektor pDsRed-N1. Slika 11 prikazuje posamezne stopnje v pripravi fuzijskega proteina z rdečim fluorescenčnim proteinom. Podobno smo pripravili konstrukt za katepsin C s fuzijskim proteinom.



Slika 11: Priprava rekombinantnega proteina PGCP s fuzijskim proteinom. A) PCR PGCP; B) Restriksijska analiza PGCP vstavljenega v vektor pGEM-T-Easy; C) Restriksijska analiza PGCP vstavljenega v vektor pDsRed-monomer-N1. Restriksijska analiza (3, 5) je bila opravljena s restriksijskima enimoma *XhoI* in *KpnI*.

4.1.2 Priprava deglikozilacijskih mutantov PGCP

4.1.2.1 Napoved potencialnih N-glikozilacijskih mest v aminokislinskem zaporedju PGCP

Na osnovi aminokislinskega zaporedja (Dolenc in Mihelic, 2003; Gingras in sod., 1999) smo z računalniškim programom NetNGlyc (Blom in sod., 2004) določili potencialna N-glikozilacijska mesta, kjer upošteva algoritem iskanja Asn v zaporedju Asn-X-Ser/Thr, kjer X ni prolin. Rezultati so pokazali, da ima lahko človeški PGCP pet glikozilacijskih mest (Slika 12). Potencialna mesta glikozilacije so Asn61, Asn179, Asn353, Asn356 in Asn396. Računalniški program ni upošteval redkega skupnega zaporedja, ki tudi lahko določa potencialno mesto glikozilacije Asn-X-Cys, zato smo ga ročno iskali. V aminokislinskem zaporedju PGCP ni bilo prisotno.

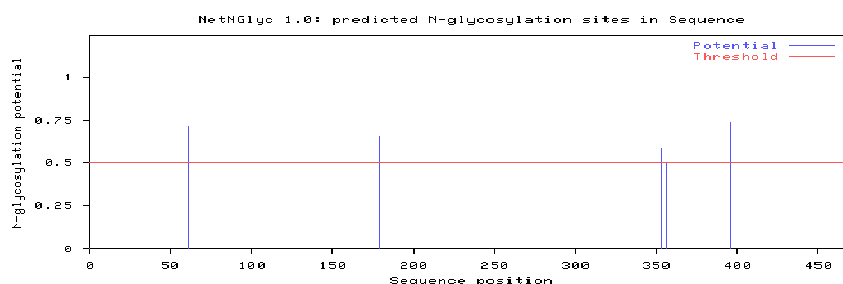
```

MKFLTFAFFGQSVLLSLCSGKAICRQIGISRTTFEIEEIASCGDVATAITSLAVYGGKQNSYERLALIVDTVGGRLSG      8D
SKNLEKAIQIMYQNLQDDGLEKVVLEPVRIPHWERGHESAVMLEPPIHKIATILGLOSSIGTFEGGITAEVILVVTSFDELQ    16D
RRASENRGKTVVYHQEYIISRTVQRTQGVAAKYGALASLIRSVASFETYSPTGIGQEVQDGVFPIPTACITVEDAE      24D
MISEMNSHGIKIVIQIIRGAKTYFDIDFNTVAEITGSKYFEQVVLVSGELDSNDVGGGAMDGGGAFISWEALSLEKDL    32D
GLRPRKTRLRVINTAEQGGVGAIPQYQYQLHRVNIISNYSLVNESDAQTFPLFTGLQPTGSEKARATIMEEVMSLLQPLNITQV  40D
LSHGEGTDINFWIQAGVFGASLLDDLYRYFFHHSHGDTMTVMDEKQNNVRAAVNAVVSYYVADMEEHLFRS
.....E.....      8D
.....N.....      16D
.....N.....      24D
.....E.N.....N.....      32D
.....E.N.....N.....      40D
.....E.....      48D

```

(Threshold=0.5)

Seqname	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyco result
Sequence	61 NRSY	0.7150	(9/9)	++
Sequence	179 NISR	0.6542	(8/9)	+
Sequence	353 NISN	0.5891	(6/9)	+
Sequence	356 NISL	0.5008	(5/9)	+
Sequence	396 NITQ	0.7274	(9/9)	++



Slika 12: Potencialna mesta N-glikozilacije encima PGCP. Z rdečo barvo so označeni asparaginski ostanki, ki tvorijo peptidno skupno zaporedje (Asn-Xaa-Ser/Thr) (označeno z modro), kjer obstaja več kot 50 odstotna verjetnost, da bi lahko prišlo do N-glikozilacije. Številke predstavljajo aminokislinske ostanke vključno s signalno sekvenco. Označena mesta so Asn61, Asn179, Asn353, Asn356 in Asn396.

4.1.2.2 Priprava klonirnih vektorjev deglikozilacijskih mutantov PGCP

Na osnovi izračuna potencialnih glikozidacijskih mest smo pripravili mutante, ki so predstavljeni v preglednici 7.

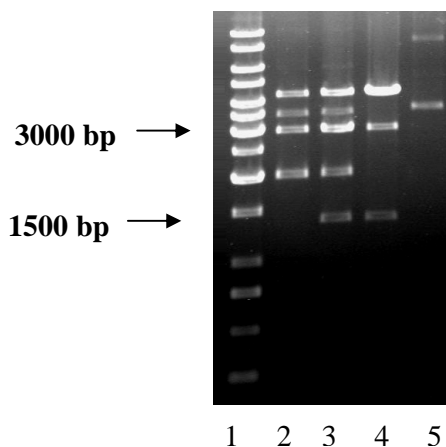
Preglednica 7: Pregled pripravljenih konstruktov deglikozilacijskih mutantov PGCP z zelenim fuzijskim proteinom. Preglednica prikazuje pripravljene cDNK mutantov za transfekcijo v sesalske celice.

Mutante PGCP z zelenim fuzijskim proteinom	OPIS
PGCP-N61A	mutirano 61 mesto aa zaporedja
PGCP-N179A	mutirano 179 mesto aa zaporedja
PGCP-N353A	mutirano 353 mesto aa zaporedja
PGCP-N356A	mutirano 356 mesto aa zaporedja
PGCP-N396A	mutirano 396 mesto aa zaporedja
PGCP-2x (PGCP-N353A/N356A)	dvojna mutacija na mestih 353 in 356
PGCP-3x (PGCP-N353/356/396A)	trojna mutacija na mestih 353, 356 in 396
PGCP-4x (PGCP-N61/353/356/396A)	četverna mutacija na mestih 61/353/356/396
PGCP-5x (PGCP-N61/179/353/356/396A)	peterna mutacija PGCP

Deglikozilacijske mutante encima PGCP smo pripravljali v klonirnih vektorjih pGEM-PGCP z uporabo PCR namnoževanja z mestno specifično mutagenozo. Postopek je opisan v razdelku 3.4.4 .

4.1.2.3 Analiza uspešnosti mutacije gena za PGCP s pomočjo agarozne elektroforeze in preverjanja nukleotidnega zaporedja

Priprava konstruktov z mestno specifično mutagenozo PCR namnoževanja je potekala kot je opisano v 3.4.2 in je v vseh primerih mutacij dala produkt v nizkih koncentracijah. Po transformaciji smo ga namnožili v klonirnih celicah in preverili ali vsebuje vključek primerne velikosti. Primer restrikcijske analize za dokazovanje prisotnosti gena odgovarjajoče velikosti v plazmidu je prikazan na sliki 13.

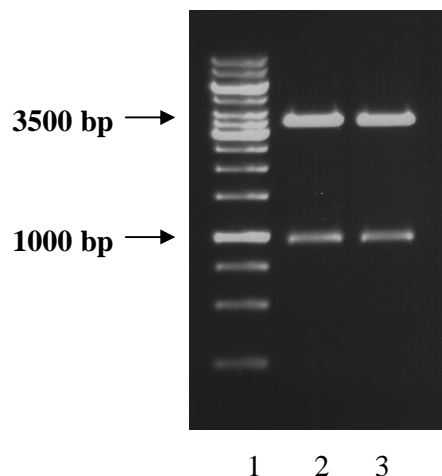


Slika 13: Restrikcijska analiza enojnih mutantov. Restrikcijska analiza enojnih deglikozilacijskih mutantov z restriktazama *XhoI* in *KpnI* na 0,8 % agaroznem gelu. Preverili smo vstavev fragmenta v vektor. Zmes fragmentov DNK standardnih velikosti (stolpec 1), v stolpcih 2, 3, 4 in 5 so nanešeni zprodukti *XhoI* in *KpnI* rezanih klonov. Fragment velikosti približno 1500 bp je zaporedje cDNK PGCP, fragment pri približno 3000 bp je lineariziran vektor, v katerega je bil vstavljen fragment. Klon 4 predstavlja pravilno vstavljen gen.

Ostali geni z enojnimi mutacijami, ki so navedeni v preglednici 4, ter z dvojno

mutacijo so bili pripravljene na enak način. Gen, ki je vseboval trojno mutacijo je bil pripravljen podobno, le da smo mutacije vnesli na že prej pripravljenem mutantu. Pri pripravi teh mutantov, ki sta vsebovala (Preglednica 4) več mutacij smo uporabili primerne restrikcijske encime ter sestavili ustrezne spremenjene gene (Slika 14).

Pri pripravi četvernega in peternega mutant (opisano v 3.4.4) smo uporabili tehnike molekularnega kloniranja.



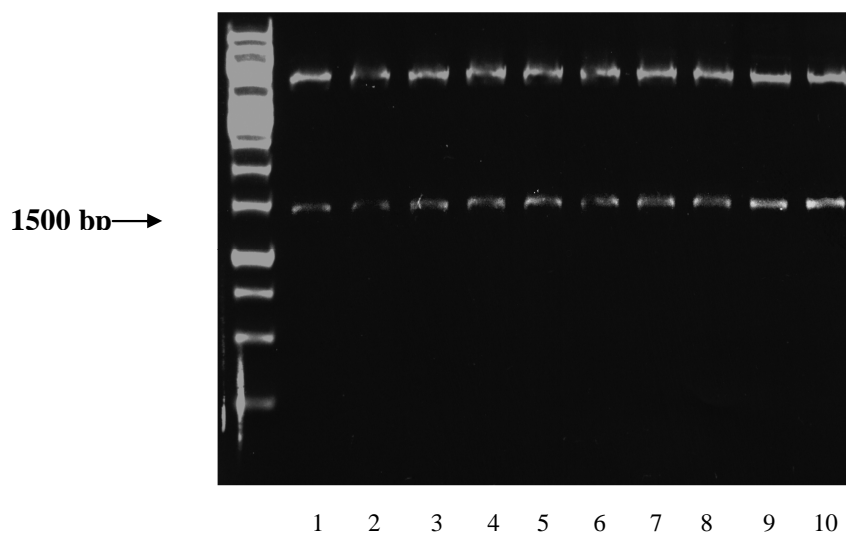
Slika 14: Restrikcijska analiza priprave četvernega mutant. Restrikcijska analiza z restriktažama *XhoI* in *BglIII* na 0,8 % agaroznem gelu. Rezan fragment 1) pGem-PGCP-N61A (1000 bp) smo ligirali z rezanim fragmentov 2) (pGem-PGCP-N3xA) (3500 bp). Na ta način smo dobili pGem-PGCP-N4xA.

Peterni mutant smo pripravili na podoben način. Namesto restrikcijskega encima *XhoI* smo uporabili restriktazo *BsaBI* (glej Slika 10).

Vsem mutantom smo preverili nukleotidna zaporedja (Macrogen, J. Koreja), da smo potrdili uspešnost vnosa željenih mutacij ter odsotnost neželjenih mutacij.

4.1.2.4 Priprava vektorjev za izražanje deglikozilacijskih mutantov PGCP v sesalskih celicah

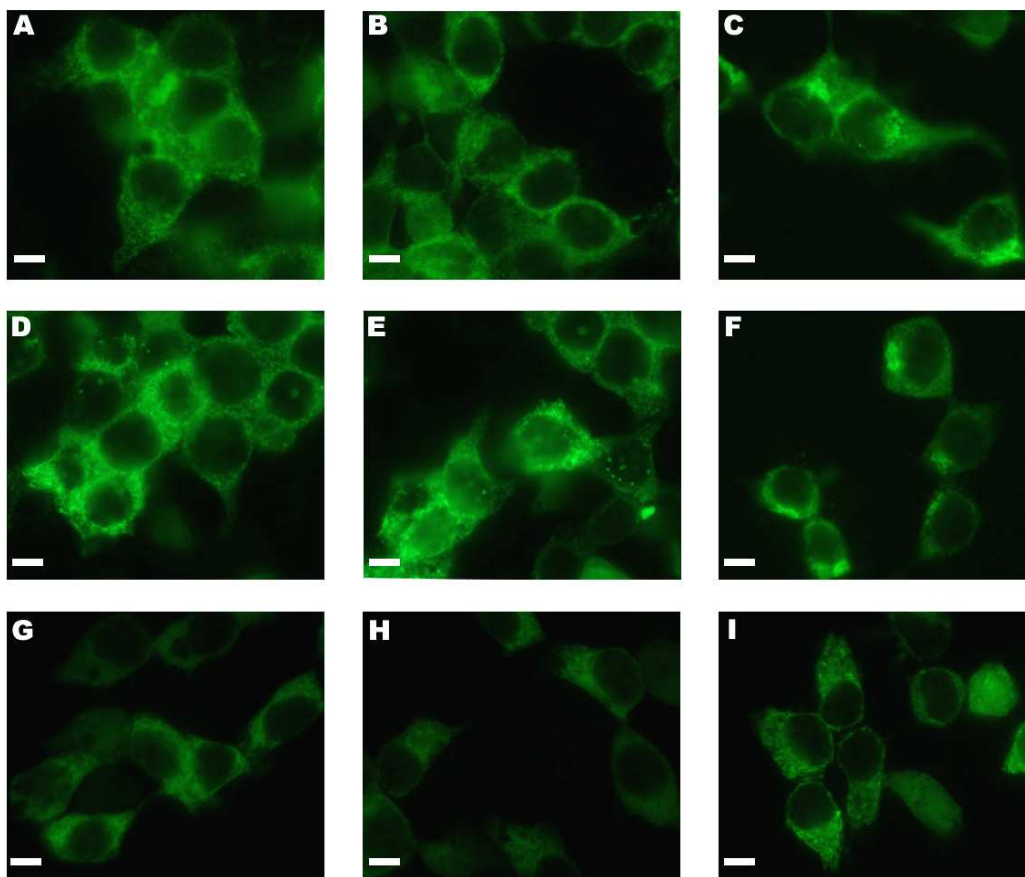
Deglikozilacijske mutante encima PGCP ki smo jih pripravili v klonirnem vektorju pGEM-T-easy, smo preklonirali v ekspresijski vektor pEGFP-N2. Pripravljene vektorje smo preverili z restrikcijsko analizo z restriktažama *KpnI* in *XhoI*. Nanešeni so po vrstnem redu kot je označeno v preglednica 7. Dobljena velikost vključka je približno 1500 bp, kar potrjuje uspešnost vnosa v plazmid (Slika 15).



Slika 15: Restriksijska analiza *cDNK PGCP* mutantov. Restriksijska analiza deglikozilacijskih mutantov z restriktazama *XhoI* in *KpnI* na 0,8 % agaroznem gelu. Preverili smo prisotnost inserta okrog 1500 bp, ki predstavlja *cDNK PGCP* v vektorju pEGFP-N2 *cDNK* si sledijo po vrstenm redu 1) N61A; 2) N179A; 3) N353A; 4) N356A; 5) N396A 6) N353A/N356A; 7) N353/356/396A; 8) N61/353/356/396A; 9) N61/179/353/356/396A in 10) divji tip *PGCP-GFP*.

4.1.2.5 Fluorescenčna mikroskopija prehodno transficiranih HEK 293 celic

Celice HEK 293 smo transficirali s pripravljenimi mutanti PGCP v fuziji z zelenim fluorescenčnim proteinom. Celice smo gojili v mikrotitrskih ploščah z dvanajstimi vdolbinami. V vdolbine smo predhodno vstavili stekelca in tako omogočili celicam, da so na njih rasla. Tretji dan po transfekciji smo pripravili citološke preparate ter jih opazovali na fluorescenčnem mikroskopu (Slika 16). Izrazile so se vse mutante.

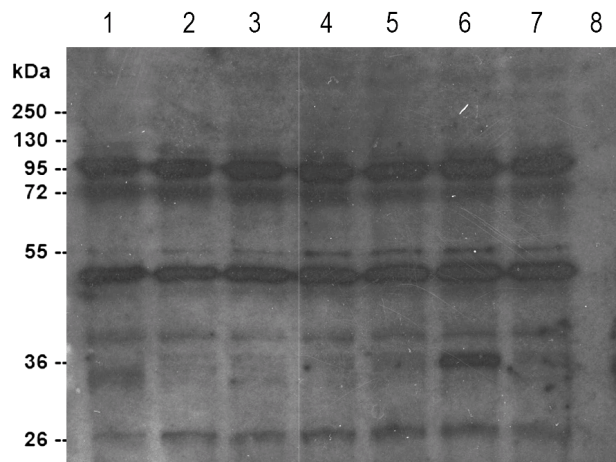


Slika 16: *Transfekcija celic HEK 293 po 72-ih urah.* Transfekcija celic HEK 293, ki izražajo aktivno PGCP ter posamezne deglikozilacijske mutante, vse z zelenim fluorescenčnim fuzijskim proteinom po 72 urah rasti. Transficirane celice HEK 293 smo opazovali na fluorescenčnem mikroskopu Olympus XI in celice slikali s CCD kamero. A) Mutant N61A ; B) Mutant N179A; C) Mutant N353A; D) Mutant N356A; E) divji tip PGCP s GFP F) Mutant N396A; G) Mutant N3xA; H) Mutant N4xA; I) Mutant N5xA. Črtica predstavlja 10µm.

4.1.2.6 Izražanje deglikozilacijskih mutantov PGCP v fuziji z zelenim fluorescenčnim proteinom v HEK 293 celicah in njihovo izločanje v gojišče

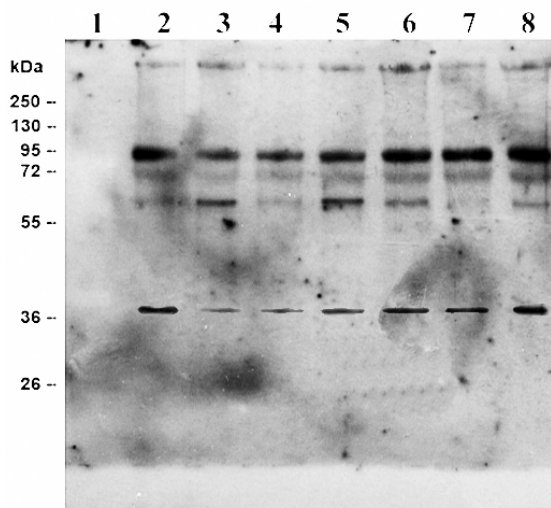
Pripravili smo celične lizate iz transficiranih HEK 293 celic z deglikozilacijskimi mutanti v fuziji z zelenim fluorescenčnim proteinom in smo jih analizirali z NaDS elektroforezo in detektirali po Western prenosu s kunčjimi protitelesi proti zelenemu

fluorescenčnemu proteinu. Močne lise kažejo na visoko izražanje fuzijskih proteinov (Slika 17).



Slika 17: Imunološka detekcija prisotnosti deglikozilacijskih mutantov v celičnem lizatu HEK 293 *celic*. Prisotnost fuzijskega proteina PGCP-GFP smo opazovali s protitelesi proti zelenemu fluorescenčnemu proteinu. 1) N61A; 2) N179A; 3) N353A; 4) N356A; 5) N396A; 6) petkratni mutant; 7) PGCP-GFP; 8) kontrola brez transfekcije.

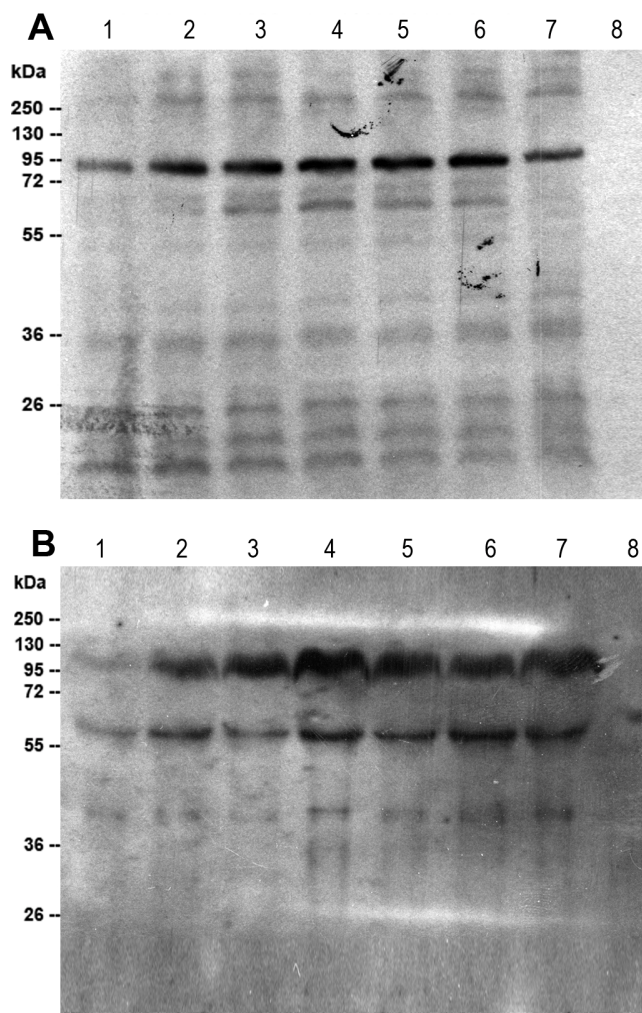
Analiza gojišča z NaDS-PAGE in detekcija mutantov PGCP v fuziji z zelenim fluorescenčnim proteinom po prenosu po Westernu z uporabo kunčjih protiteles proti zelenemu fluorescenčnemu proteinu je pokazala, da so se vsi mutanti izločali v gojišče (Slika 18).



Slika 18: Imunodetekcija transficiranih deglikozilacijskih mutantov PGCP v gojišču HEK 293 *celic*. Prisotnost fuzijskega proteina PGCP-GFP smo opazovali s protitelesi proti zelenemu fluorescenčnemu proteinu. 1) kontrola brez transfekcije; 2) N61A; 3) N179A; 4) N353A; 5) N356A; 6) N396A; 7) petkratni mutant; 8) PGCP-GFP.

4.1.2.7 Izražanje deglikozilacijskih mutantov PGCP v fuziji z zelenim fluorescenčnim proteinom v FRTL-5 celicah in njihovo izločanje v gojišče

FRTL-5 celice smo transficirali z deglikozilacijskimi mutanti ter po 72-ih urah pripravili celične lizate. Ugotovili smo, da je tudi v tirocitih izražanje posameznih deglikozilacijskih mutantov močno, a ne enakomerno (Slika 19A). Fuzijski proteini imajo sposobnost izločanja v gojišče, pri čemer smo opazili pojav nastanka dodatnih lis velikosti, ki odgovarjajo PGCP brez fuzijskega proteina GFP (Slika 19B). Izločanje proteinov je neenakomerno in ne sovпада povsod z intenziteto lis v lizatu.



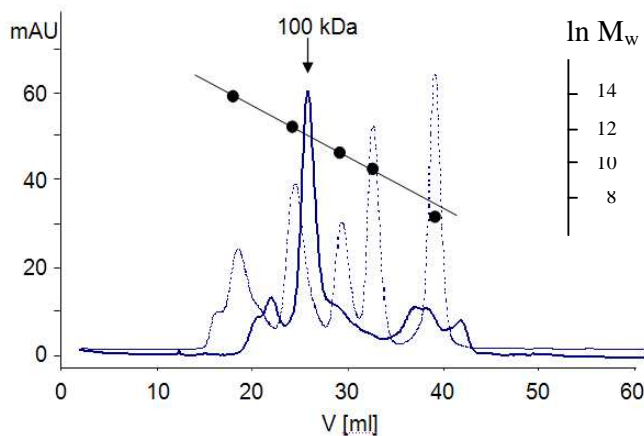
Slika 19: Imunodetekcija prehodno transficiranih deglikozilacijskih mutantov PGCP v celičnem lizatu in gojišču FRTL-5: Transfekcija celic s posameznimi deglikozilacijskimi mutanti in detekcija PGCP z kunčjimi protitelesi proti človeškemu PGCP. 1) N61A; 2) N179A; 3) N353A; 4) N356A; 5) N396A; 6) petkratna mutacija; 7) PGCP-GFP; 8) kontrola brez transfekcije. (A) Slika predstavlja celični lizat. (B) Slika predstavlja proteine izločene v gojišče.

4.1.3 Rekombinantni PGCP izražen v insektnih celicah *Sf9*

Rekombinantni protein je bil izražen v insektnih celicah *Sf9* z uporabo bakulovirusnega ekspresijskega sistema (Zajc in sod., 2011). Ekspresijski vektor s cDNK človeškega PGCP in celice za izražanje rekombinantnega encima je pripravila sodelavka Tajana Zajc na našem odseku. Rekombinantni PGCP, ki se je izločal v gojišče, smo očistili z različnimi kromatografskimi metodami, kot je opisano v nadaljevanju.

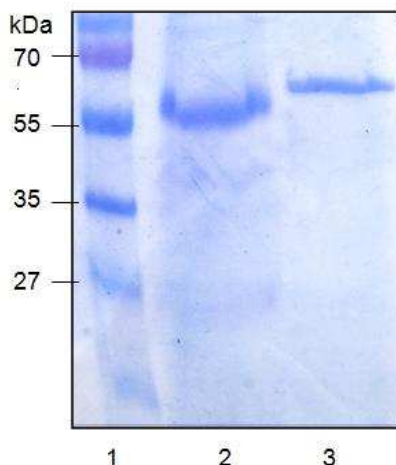
4.1.3.1 Čiščenje rekombinantnega PGCP

Bakulovirusni ekspresijski sistem z uporabo *Sf9* insektnih celic nam je omogočal izločanje rekombinantnega PGCP v gojišče. S centrifugiranjem gojišča smo odstranili celice in dobili bister supernatant, ki smo ga direktno, brez dialize, nanесли na hidroksiapatitno kolono, spirali nevezane proteine in s povišano koncentracijo fosfatnega pufru eluirali vezane proteine. Vzorce z najvišjimi absorbcami smo združili in dializirali preko noči pri 4 °C ter jih nadalje čistili z anionsko izmenjevalno kromatografijo na FPLC sistemu. Frakcije z dipeptidazno aktivnostjo (način merjenja dipeptidazne aktivnosti je opisan v razdelku 3.3.1) smo zbrali in nadalje čistili z uporabo gelske kromatografije na FPLC sistemu. Zbirali smo frakcije okrog 100 kDa in jih testirali na dipeptidazno aktivnost. PGCP je bil eluiran v retenzijskem volumnu, ki odgovarja molekulske masi okrog 100 kDa (Slika 20).



Slika 20: Superpozicija elucijskih kromatogramov rekombinantnega PGCP in proteinskih standardov za določevanje molekulske mase na koloni za gelsko kromatografijo Superdex-200. Na kromatogramu je z odebeljeno črto označen eluiran PGCP, s črtkano črto so označeni standardni proteini (tiroglobulin 667 kDa, gamma globulin 158 kDa, ovalbumin 44 kDa, mioglobin 17 kDa in vitamin B12 1,35 kDa). Na sliki je prikazana logaritemska odvisnost elucije standardnih proteinov od njihove molekulske mase ter določena masa za PGCP.

Z uporabo afinitetne kromatografije na koloni Phe–Leu–sefaroza smo dokončno ločili PGCP od nečistoč. PGCP se je izločil v enem samem vrhu v prvih 2 ml elucijskega pufru. Encimu smo določili tudi dipeptidazno aktivnost na substrat Ser–Met. Po vsakem koraku čiščenja smo analizirali proteine z NaDS–PAGE analizo in prenosom po Westernu.



Slika 21: NaDS-PAGE očiščenega rekombinantnega človeškega PGCP. Stolpec 1, proteinski molekularni standardi; stolpec 2, zrela oblika PGCP z molekularno maso 55 kDa; stolpec 3, pro-PGCP z molekularno maso 60–65 kDa.

PGCP smo skoncentrirali do koncentracije 3 mg/ml in ga nanegli na NaDS-PAGE (Slika 21). Končni očiščeni PGCP je vseboval 3 mg aktivnega encima iz 400 ml gojišča, kar predstavlja donos okoli 8 mg/l. Čisti aktivni PGCP je bil nestabilen in encim je izgubil aktivnost v dveh dneh. Nasprotno pa je bil proencim stabilen ter smo ga zamrznili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.3.2 Določevanje aktivnosti rekombinantnega PGCP in učinkovitost čiščenja PGCP

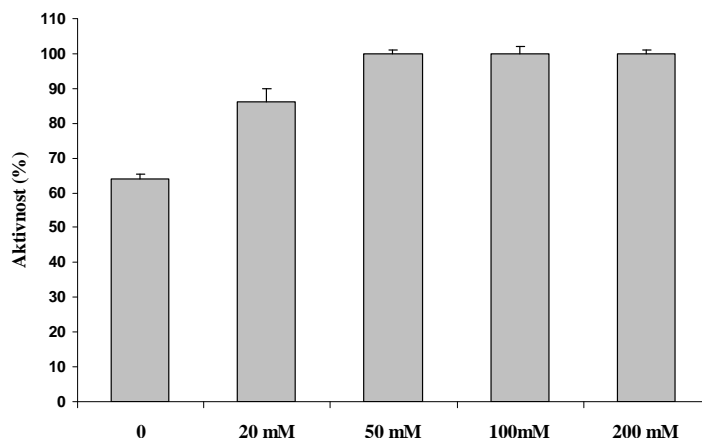
Določevanje aktivnosti PGCP je bilo opravljeno po vsaki stopnji čiščenja (preglednica 8). Postopek temelji na cepitvi dipeptida Ser-Met, ki ga po reakciji označimo s fluorskaminom. (opisano v razdelku 3.3.1). Slabost te metode je nizka občutljivost. Za ugotavljanje aktivnosti encima je potrebna hidroliza vsaj 30 odstotkov substrata.

Preglednica 8: Učinkovitost čiščenja rekombinantnega PGCP. Preglednica prikazuje učinkovitost postopka čiščenja. ^aKoncentracija proteina je bila določena z metodo po Bradfordu. ^bEncimska aktivnost je bila določena z dipeptidnim substratom, kot je navedeno. ^cEna enota (U) je količina encima PGCP, ki katalizira razgradnjo 1 μmol substrata Ser-Met na minuto.

Čiščenje postopki	Celokupni protein ^a (mg)	Celokupna aktivnost ^{bc} (U)	Specifična aktivnost (U/mg)	Koef. čiščenja	Donos (%)
gojišče	610	16,400	27	1	100
hidroksiapatitna	157	10,200	65	2,4	41
anionsko-izm.	37	2920	79	2,9	34
gelska kromat.	9	2200	245	9,1	11

4.1.3.3 Vpliv kloridnega iona na aktivnost rekombinantnega PGCP

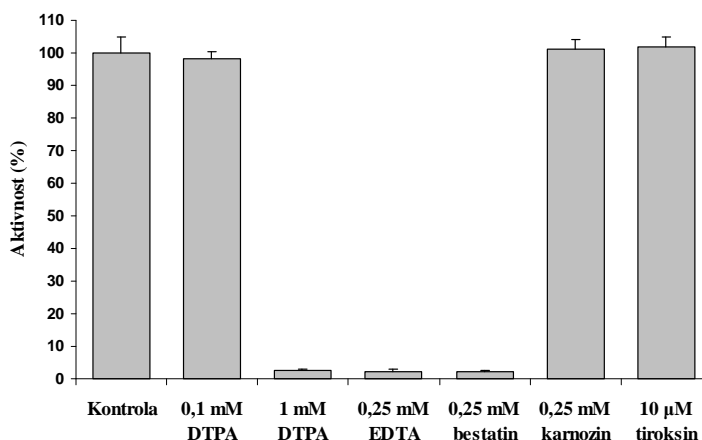
Vpliv kloridnih ionov na aktivnost PGCP smo določali v prisotnosti različnih koncentracij NaCl in aktivnosti primerjali z aktivnostjo vzorca brez dodatka NaCl. 20 mM raztopina NaCl je povečala dipeptidazno aktivnost PGCP za okoli 20 odstotkov, 50 mM koncentracija NaCl pa za približno 40 odstotkov. Višje koncentracije niso bistveno zvišale ali znižale aktivnosti (Slika 22).



Slika 22: Vpliv koncentracije kloridnih ionov na aktivnost PGCP: Stoplci označujejo različne koncentracije kloridnih ionov: 0 (brez), 20 mM, 50 mM, 100 mM in 200 mM NaCl v reagenčnem pufu.

4.1.3.4 Meritve inhibicije rekombinantnega PGCP

Vpliv inhibitorjev metaloproteinaz EDTA, DTPA in bestatina na aktivnost PGCP smo določili s končnimi koncentracijami naslednjih inhibitorjev 0,25 mM EDTA, 0,1 mM in 1 mM DTPA, 0,25 mM bestatin. Aktivnost smo primerjali tudi z 0,25 mM karnozinom in 10 μ M tiroksinom (Slika 23).

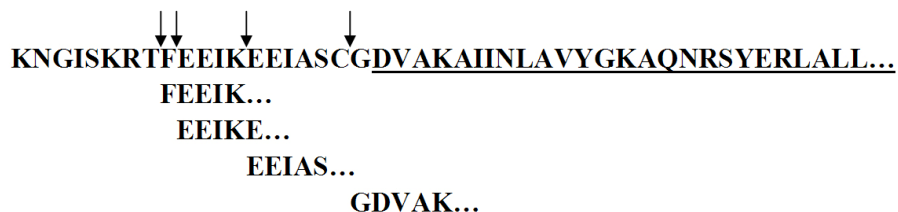


Slika 23: Aktivnost PGCP v prisotnosti inhibitorjev DTPA, EDTA, bestatin ter substanc karnozina in tiroksina. Pri 0,1 mM koncentraciji DTPA aktivnost PGCP ni zmanjšana, pri 10x višji koncentraciji 1 mM DTPA in 0,25 mM EDTA pa se zniža aktivnost na nekaj odstotkov. Bestatin učinkovito inhibira PGCP pri koncentraciji 0,25 mM. Vpliva na aktivnost 0,25 mM karnozina in 10 μ M tiroksina nismo zaznali.

Ugotovili smo, da 0,1 mM DTPA ne inhibira PGCP, medtem ko 1 mM DTPA in 0,25 mM EDTA močno inhibirata encim. Visoko stopnjo inhibicije smo zaznali pri 0,25 mM bestatinu. Dodatno smo opazovali vpliv 0,25 mM karnozina in 10 μ M tiroksina (T4) na aktivnost PGCP. V obeh primerih inhibicije nismo zaznali.

4.1.3.5 Določanje aminokislinskega zaporedja rekombinantnega PGCP

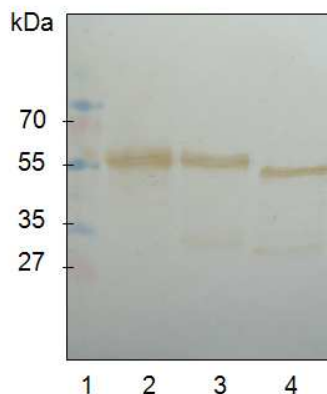
Plazmidni vektor za heterologno izražanje PGCP v insektnih celicah je vseboval vključek z zapisom za človeški gen. Med izražanjem proteina so encimi insektnih celic aktivirali PGCP. S preverjanjem N-terminalnega dela izraženega PGCP smo določili novonastala mesta na aminokislinskem zaporedju rekombinantnega proteina. Ugotovili smo, da je pri aktivaciji rekombinantnega PGCP z encimi insektnih celic prišlo do nespecifičnih cepitev propeptida encima. Novonastali aminoterminalni konci so na mestu 9 (FEEIK...), na mestu 10 (EEIKE...), na mestu 14 (Eeias...) in na mestu 19 (GDVAK...). Na sliki 24 so ponazorjeni novonastali intermediati aktivacije PGCP zaradi nespecifičnega skrajševanja propeptidnega dela encima.



Slika 24: *N-terminalno aminokislinska zaporedja očiščenega PGCP*. Experimentalno določena zrela oblika encima izoliranega PGCP je podčartana. Puščice označujejo cepitvena mesta na propeptidnem delu encima, ki tvorijo novonastale amino konce. Cepitve potečejo v gojišču po izražanju proteina v bakulovirosem sistemu.

4.1.3.6 *In vitro* deglikozilacija rekombinantnega PGCP

Rekombinantni PGCP izražen v insektnih celicah je glikoziliran. Vrsto glikozilacije smo določali z uporabo endodeglikozidaz Endo H in PNGaze F. Lisa pri 55 kDa rekombinantnega PGCP se pri cepitvi z EndoH ne spremeni. Cepitev s PNGazo F pa povzroči opazno znižanje mase encima, kar pomeni, da je protein hibridno ali kompleksno glikoziliran (Slika 25).



Slika 25: *Deglikozilacija rekombinantnega PGCP izraženega v insektnih celicah*. Stolpec 1, standardni proteini za določevanje molekulske mase; stolpec 2, rekombinantni PGCP; stolpec 3, deglikozilacija z Endo H; stolpec 4, deglikozilacija s PNGazo F.

4.1.4 Priprava rekombinantnega katepsina C v fuziji s fluorescenčnim proteinom

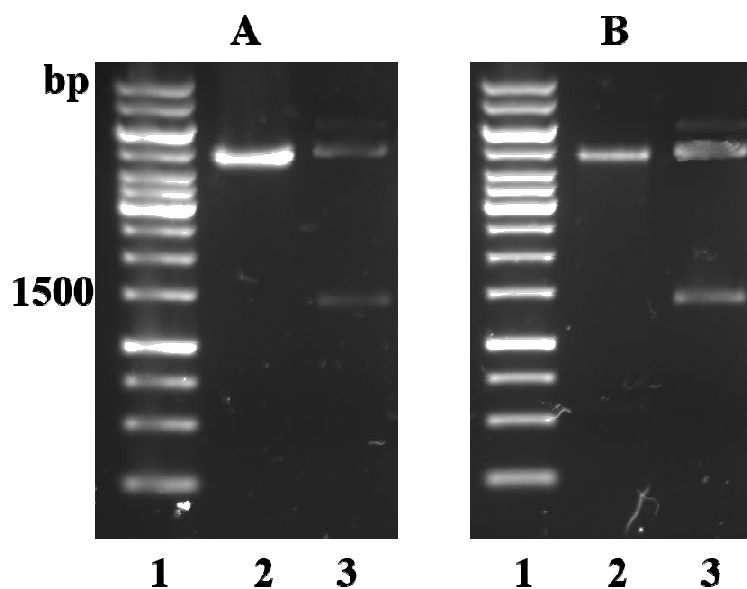
Rekombinantni človeški katepsin C smo pripravili v fuziji z zelenim ali rdečim fluorescenčnim proteinom. Za pomnoževanje s pomočjo PCR smo uporabili cDNK iz našega laboratorija (Paris in sod., 1995). Namnožen produkt smo vstavili v klonirni vektor pGEM-T-Easy ter novonastali plazmid namnožili v klonirnih celicah DH5 α . Po preverjanju nukleotidnega zaporedja, smo gen za katepsin C vstavili v vektorja pEGFP-N2 in pDsRed-N1. Poimenovanje nastalih konstruktov je predstavljeno v preglednici 9.

Preglednica 9: *Pregled pripravljenih fuzij katepsina C s fluorescenčnim proteinom*. Preglednica prikazuje pripravljene ekspresijske vektorje za transfekcijo v sesalske celice.

Ime konstrukta	OPIS
KatC-RFP	človeški katepsin C z rdečim fluorescenčnim fuzijskim proteinom
KatC-GFP	človeški katepsin C z zelenim fluorescenčnim fuzijskim proteinom

4.1.4.1 Restriksijska analiza in preverjanje nukleotidnega zaporedja konstruktov PGCP in katepsina C

Slika 26 prikazuje restriksijsko analizo konstruktov KatC-GFP (26A) in KatC-RFP (26B). Uporabili smo restriksijska encima *Xho*I in *Kpn*I.



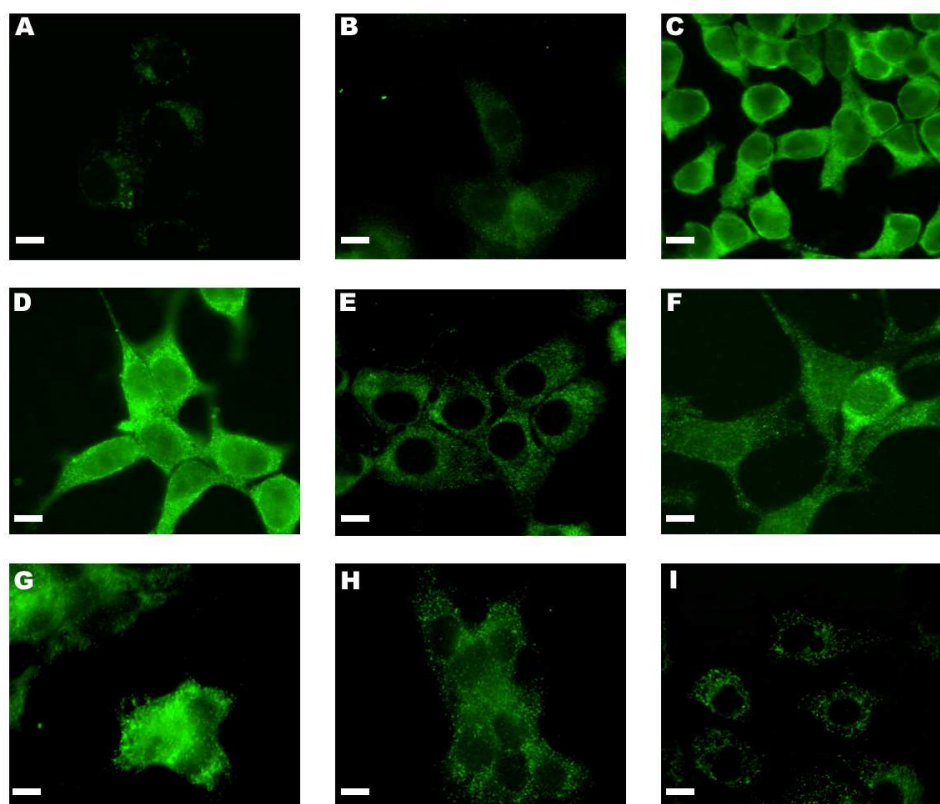
Slika 26: Agarozna elektroforeza restriksijske analize katepsina C s fuzijskima fluorescenčnima proteinoma. V 1 stolpcu so nanešeni standardi. V 2 stolpcu je nanešen zligiran pEGFP-KatC (A) oziroma pDsRed-KatC (B). V tretjem pa vektorja rezana s restriktazama *Xho*I in *Kpn*I. Fragment okrog 1500 prikazuje cDNK človeškega katepsina C.

Po določitvi prisotnosti vključka v velikosti gena za KatC smo vključku preverili tudi nukleotidno zaporedje v podjetju MacroGen (Južna Koreja).

4.2 Ekspresija PGCP in katepsina C v FRTL-5 celicah

4.2.1 Transfekcija cDNK PGCP s fuzijskim proteinom v FRTL-5 celicah

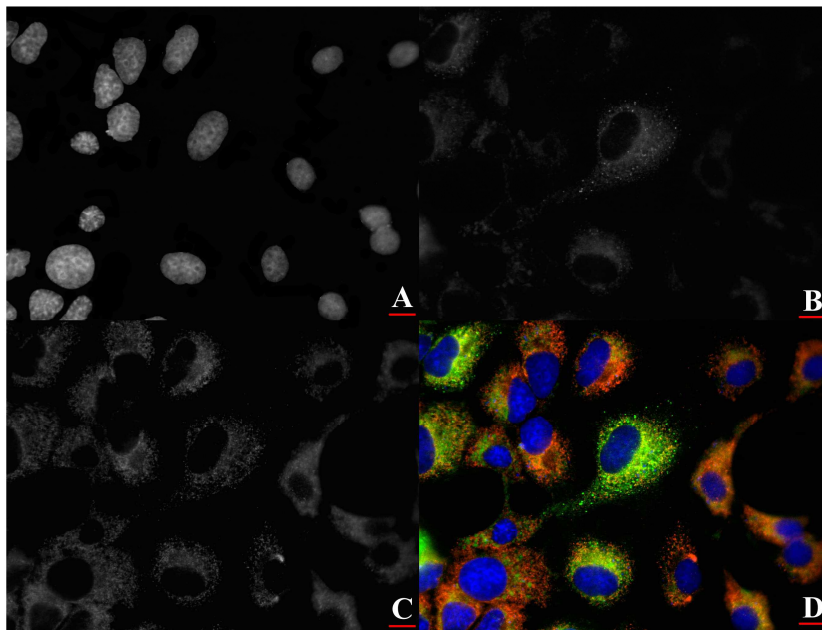
Celice FRTL-5 smo transficirali s pripravljenimi mutanti PGCP v fuziji z zelenim fluorescenčnim proteinom. Celice smo gojili v mikrotitrskih ploščah z dvanajstimi vdolbinami. V vdolbine smo predhodno vstavili objektna stekelca in tako omogočili celicam, da so na njih rasla. Tretji dan po transfekciji smo pripravili citološke preparate ter jih opazovali na fluorescenčnem mikroskopu (Slika 27). Izrazile so se vse mutante.



Slika 27: *Transfekcija celic FRTL-5 po 72-ih urah.* Transfekcija celic FRTL-5, ki izražajo aktivno PGCP ter posamezne deglikozilacijske mutante, vse z zelenim fluorescenčnim fuzijskim proteinom po 72 urah rasti. Transficirane celice FRTL-5 smo opazovali na fluorescenčnem mikroskopom Olympus XI in celice slikali s CCD kamero. A) mutant N61A ; B) mutant N179A; C) mutant N353A; D) mutant N356A; E) divji tip PGCP s GFP F) mutant N396A; G) mutant N3xA; H) mutant N4xA; I) petkratni mutant. Črtica predstavlja 10 µm.

4.2.2 Transfekcija cDNK katepsina C s fuzijskim proteinom v FRTL-5 celicah

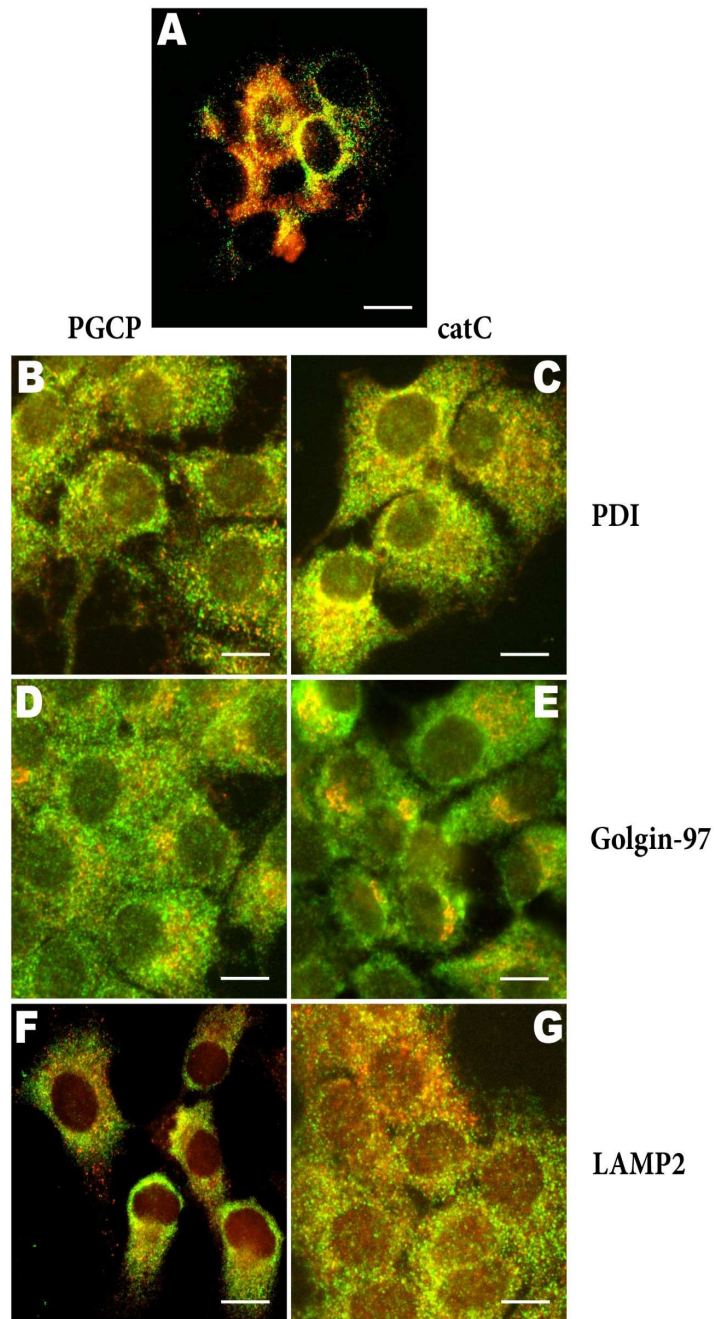
Plazmida z zapisom za katepsin C s fluorescenčnima fuzijskima proteinoma smo uporabili za transfekcijo v FRTL-5 celicah, ki smo jih gojili na stekelcih. Tretji dan po transfekciji smo celice fiksirali in jihoznačevali z imunocitokemijskimi metodami. Kot označevalec za jedra (Slika 28A) smo uporabili barvilo DAPI. Uspešno transficirane celice s pEGFP-KatC-GFP so vidne na sliki 28B. S kunčjimi proti človeškim PGCP protitelesi smo označili PGCP, kjer smo kot sekundarna protitelsa uporabili kozja proti kunčja protitelesa konjugirana z Alexa Fluor 546 (emitira rdečo barvo) (Slika 28C) Transfekcija KatC-GFP v FRTL-5 celicah pokaže kolokalizacijo obeh proteinov, kar lahko opazujemo na fluorescenčnem mikroskopom (Slika 28D). Slike smo obdelovali s pomočjo programa Imaging Software for Life Science Microscopy Cell (Olympus, Japonska).



Slika 28: Kolokalizacijske študije transficiranega katepsina C s fluorescenčnim fuzijskim proteinom GFP in s PGCP. V celicah, kjer je bila transfekcija uspešna, sta proteina kolokalizirana. A) Celična jedra označena z barvilom DAPI; B) Transficirane celice, ki izražajo katepsin C z zelenim fuzijskim proteinom. C) imunocitološko barvanje s protitelesi proti PGCP, ki so označena preko sekundarnih kozjih anti kunčjih protiteles konjugiranimi z Alexa Fluor 546 (emitira rdečo barvo); D) Združene slike A, B in C s pomočjo programa Imaging Software for Life Science Microscopy Cell (Olympus, Japonska). Črtica predstavlja 10 μm .

4.2.3 Imunolokalizacija endogenega PGCP in endogenega katepsina C v FRTL-5 celicah

Izražanje endogenega PGCP in endogenega katepsina C v podganjih tirocitih smo lahko opazovali po označevanju z imunocitokemijskimi metodami na fluorescenčnem mikroskopu. Pri tem smo uporabljali mešanico šestih spojin (6H), potrebnih za proliferacijo celic. Granulirano porazdelitev obeh encimov po celici smo spremljali s specifičnimi protitelesi (Slika 29). Pri tem smo uporabljali mešanico šestih spojin (6H), potrebnih za proliferacijo celic. Granulirano porazdelitev obeh encimov po celici smo spremljali s specifičnimi protitelesi (Slika 29). Delna kolokalizacija obeh proteinov je vidna v večini veziklov (Slika 29A). Podrobnejši pogled na znotrajcelično strukturo organel, ki smo jo dosegli z obarvanjem označevalcev organel, pokaže da sta oba encima prisotna v endoplazmatskem retikulumu (Slika 29 B, C) ter Golgijevem aparatu (Slika 29 D, E), le redko pa sta prisotna v lizosomih (Slika 29 F, G).

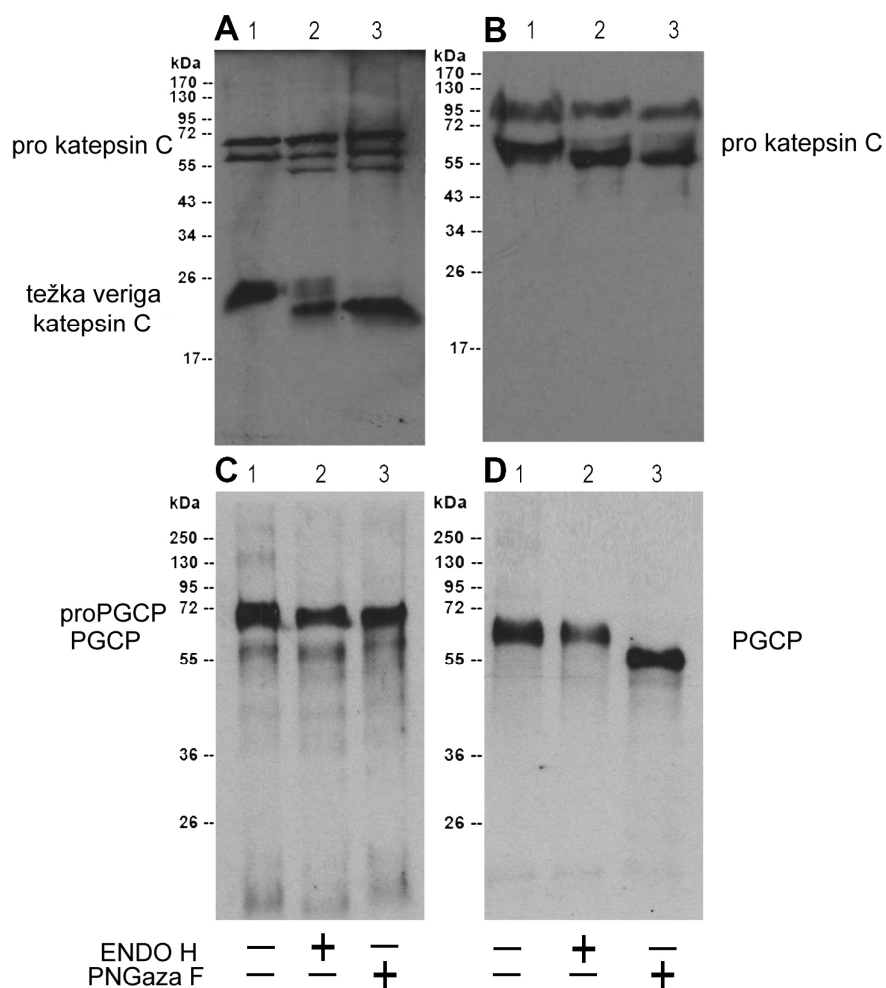


Slika 29: Kolokalizacijske študije endogenega PGCP in endogenega katepsina C z označevalci PDI, Golgin 97 in LAMP2. (A) PGCP (Alexa 488, zelena) in katepsin C (Alexa 546, rdeča) sta večinoma kolokalizirana, vendar ne popolnoma; (B) PGCP (Alexa 488, zelena) se nahaja v endoplazmatskem retikulumu, ki je označen s PDI (Alexa 546, rdeča); (C) v istih organelah se nahaja tudi katepsin C (Alexa 488, zelena); (D) PGCP (Alexa 488, zelena) je kolokaliziran z Golginom-97 (Alexa 546, rdeča); (E) tudi katepsin C (Alexa 488, zelena) je lokaliziran v Golgijevem aparatu, ki je označen z Golginom-97 (Alexa 546, rdeča); (F) PGCP (Alexa 488, zelena) se le redko nahaja v lizosomih, ki so označeni z LAMP2 (Alexa 546, rdeča); (G) tudi katepsin C (Alexa 488, zelena) in LAMP2 (Alexa 546, rdeča) sta le deloma kolokalizirana. Črtica predstavlja 10 μ m.

4.3 Glikozilacija endogenega PGCP in Katepsina C

4.3.1 Deglikozilacija z Endo H in PNGazo F

Z uporabo imunoloških metod za detekcijo proteinov smo ugotovili, da se endogena PGCP in Katepsin C poleg granulirane porazdelitve v celicah (Slika 30 A in C) tudi močno izločata iz FRTL-5 celic pod vplivom TSH, inzulina in somatostatina (Slika 30 B in D). V odsotnosti teh treh hormonov izločanja nismo detektirali. Z uporabo deglikozilacijskih encimov Endo H in PNGaze F smo ugotovili, da obe deglikozidazi delujeta na Katepsin C, ki se nahaja v lizatu tirocitov (Slika 30A).

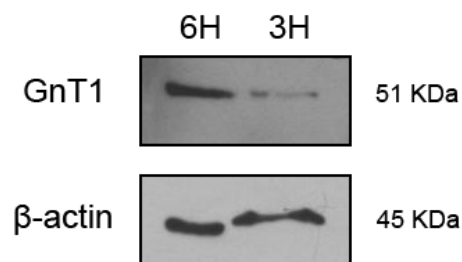


Slika 30: Lokalizacija endogeno izraženega PGCP in Katepsina C v podganjih tirociti v prisotnosti TSH, inzulina in somatostatina v gojišču ter tipa njune glikozilacije z uporabo Western blota in ustreznih protiteles. Na vseh slikah je v stolpcu 1 netretiran protein, v stolpcu 2 je nanešen protein, ki smo ga obdelali z Endo H deglikozidaso, v stolpcu 3 je nanešen protein, ki smo ga obdelali s PNGazo F. (A) endogeno izraženi Katepsin C v celičnem lizatu; (C) endogeno izraženi PGCP v celičnem lizatu; (B) endogeno izraženi Katepsin C izločen v gojišče celic, (D) endogeno izraženi PGCP izločen v gojišče celic.

Za PGCP je znižanje molekulske mase zaradi deglikozilacije premajhno, da bi dajali zaključke (Slika 30C). Za PGCP in katepsin C, ki sta izločena iz celic v gojišče pa lahko z zagotovostjo trdimo le, da odstrani sladkorje PNGaza F s PGCP (Slika 30D), pri katepsinu C pa se ne vidi njegova aktivna oblika, razlike molekulske mase pri deglikozilaciji pa so premajhne (Slika 30B). Iz dobljenih rezultatov lahko trdimo, da ima PGCP, ki se nahaja ekstracelularno predvsem hibridno ali kompleksno glikozilirani tip N-glikozilacije ter da ima intracelularni katepsin C manozni tip N-glikozidacije.

4.3.2 Vpliv TSH, inzulina in somatostatina na izražanje N-acetilglukozaminil transferaze I v podganjih tirocitih

Zaradi različnega tipa N-glikozilacije na PGCP v gojišču in katepsinu C v celicah smo preverili nivo izražanja N-acetilglukozaminil transferaze I (GnT1) v FRTL-5 celicah v odvisnosti od prisotnosti TSH, inzulina in somatostatina. Ta encim je odgovoren za modifikacijo N- vezanih sladkorjev na proteinih iz manoznega tipa v hibridni, oz. kompleksni tip glikozilacije, saj je iniciatorski encim v mreži reakcij dodajanja sladkorjev na glikoproteine (Yip in sod., 1997; Yoko-O in sod., 2003). Primerjali smo nivo izražanja GnT1 v celicah FRTL-5 gojenih v minimalnem gojišču potrebnem za preživetje celic (3H) in popolnem gojišču (6H), ki omogoča izločanje proteinov. Imunodetekcija celičnega lizata podganjih tirocitov z Western prenosom po NaDS-PAGE z uporabo protiteles proti GnT1 je pokazala veliko višje izražanje GnT1 v 6H gojišču, v primerjavi s 3H gojiščem (Slika 31).



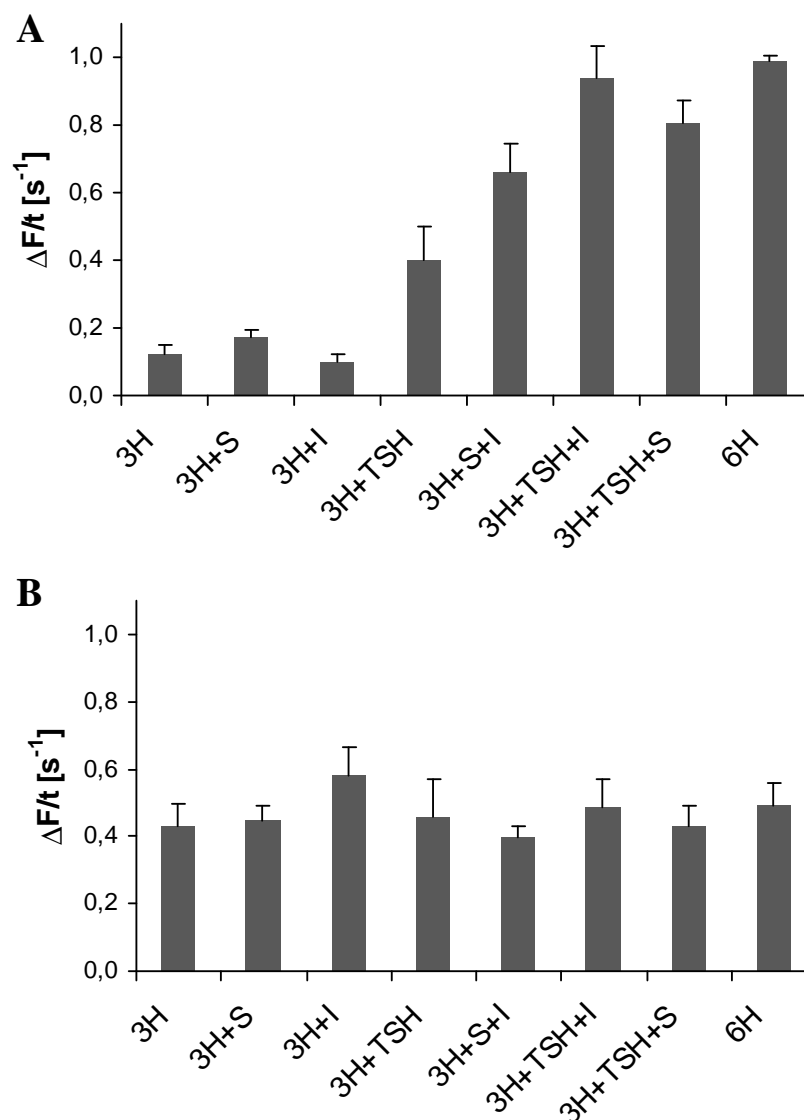
Slika 31: Vpliv TSH, inzulina in somatostatina na izražanje N-acetilglukozaminil transferaze I v podganjih tirocitih. Prisotnost TSH, inzulina in somatostatina v gojišču povzroči povišanje nivoja izražanja GnT1 v FRTL-5 celicah.

4.3.3 Vpliv prisotnosti TSH, inzulina in somatostatina na izločanje PGCP in katepsina C v iz FRTL-5 celic

4.3.3.1 Vpliv prisotnosti TSH, inzulina in somatostatina na aktivnost katepsina C v lizatu in gojišču FRTL-5 celic

Izločanje katepsina C iz podganjih tirocitov v gojišče smo potrdili z imunološkimi metodami, vendar na sliki 30B prepoznamo le prekursorsko obliko katepsina C, ne pa zrele oblike encima. Fluorimetrično sledenje razgradnje substrata Gly-Phe-4M β NA je pokazalo, da je v odsotnosti TSH, inzulina in somatostatina v gojišču (3H) le nizka aktivnost katepsina C, ki pa se močno poveča ob dodatku teh treh hormonov (6H) (Slika 32A). Za razliko od gojišča se nivo aktivnega katepsina C znotraj celic ob prisotnosti vseh

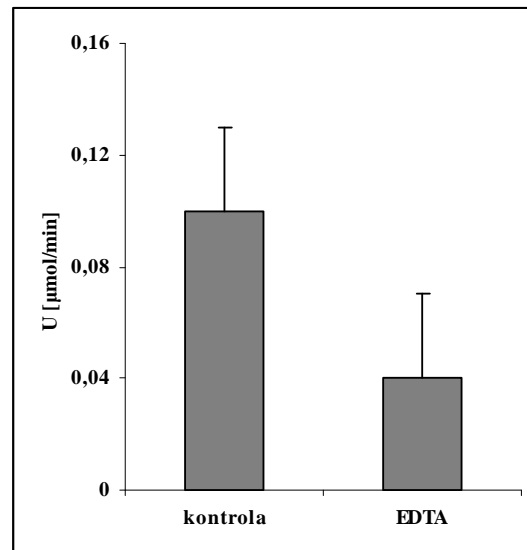
hormonov (6H) le rahlo dvigne (Slika 32B).



Slika 32: Vpliv prisotnosti TSH, inzulina in somatostatina na aktivnost endogeno izraženega katepsina C podganjih tirocitov v gojišču in celičnem lizatu. Aktivnost katepsina C v gojišču in v celičnem lizatu smo merili s specifičnim fluorogenim substratom Gly-Phe-4MβNA v odsotnosti TSH, inzulina in somatostatina (3H), oz. v njihovi prisotnosti (6H). (A) aktivnost katepsina C v gojišču; (B) aktivnost katepsina C v celičnem lizatu.

4.3.3.2 Dipeptidazna aktivnost na substrat Ser-Met v gojišču FRTL-5 celic

Za merjenje aktivnosti PGCP zaenkrat še ni poznan noben fluorogen ali drugi specifičen substrat. Zato smo se omejili na preverjanje dipeptidazne aktivnosti v gojišču na dipeptidni substrat Ser-Met. Meritve dipeptidazne aktivnosti v lizatih 3H in 6H ter v gojišču 3H niso merodajne, smo pa lahko zasledili dipeptidazno aktivnost v gojišču, ko so bili prisotni TSH, inzulin in somatostatin. Slika 33 prikazuje dipeptidazno aktivnost 6H gojišča ter delno inhibicijo aktivnosti v prisotnosti 0,25 mM EDTA.



Slika 33: Dipeptidazna aktivnost določena v gojišču FRTL-5 celic ob prisotnosti TSH, inzulina in somatostatina. Dipeptidazna aktivnost je bila določena na substrat Ser-Met. Inhibicija dipeptidazne aktivnosti v prisotnosti 0,25 mM EDTA.

4.4 *In vitro* cepitev tiroglobulina

4.4.1 *In vitro* cepitev tiroglobulina s katepsinom C

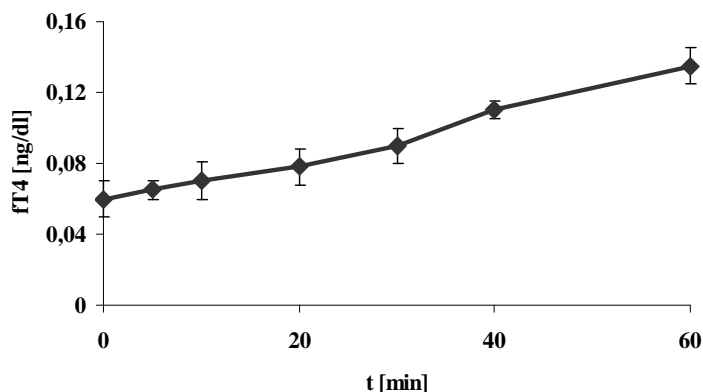
Pokazali smo, da se je katepsin C izločil iz podganjih tirocitov, kjer lahko pride v stik s tiroglobulinom (Tg) in povzroči procesiranje N-terminalnega dela. Analiza *in vitro* reakcije rekombinantnega katepsina C in Tg izoliranega iz prašičjih ščitnic potrjuje zmožnost katepsina C, da krajša amino terminalni del Tg. Na sliki 34 je rezultat določitve N-terminalnega zaporedja aminokislin Tg pred reakcijo, s puščicami pa po interakciji z rekombinantnim katepsinom C. Podaljšan čas cepitve iz dveh ur na 20 ur ter sprememba kislosti reakcije iz pH 7,2 na pH 6,0 ni spremenila rezultatov cepitve.



Slika 34: Postopna cepitev N-terminalnega dela prašičjega Tg s katepsinom C. Pri cepitvi prašičjega Tg smo detektirali različna N-terminalna zaporedja. Najkrajši fragment je bil za 12 AK krajši od zrelega dela Tg. Tiroksinsko mesto Tyr5 je označeno s prvo črko Y. Najkrajši terminalni dela je označen s črkama RP.

4.4.2 Sproščanje tiroksina pri *in vitro* cepitvi Tg s katepsinom C

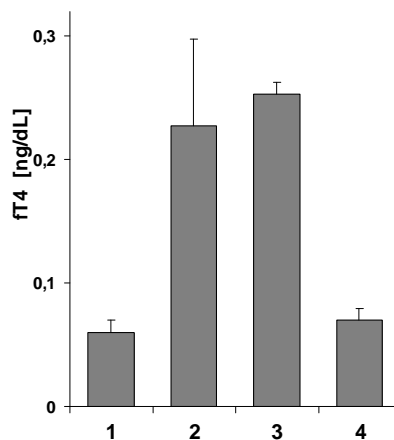
Krajšanje amino terminalnega dela prašičjega tiroglobulina v prisotnosti rekombinantnega katepsina C smo spremljali tudi z zasledovanjem koncentracije sproščenega tiroksina. Časovna odvisnost koncentracije sproščenega tiroksina je bila narejena z uporabo ELISA diagnostičnega kita za prosti tiroksin (*angl.* Free T4 Elisa diagnostic kit) in je prikazana na sliki 35.



Slika 35: Časovna odvisnost sproščanja tiroksina pri *in vitro* cepitvi tiroglobulina s katepsinom C. Katepsin C sprošča tiroksin z N-terminalnega dela tiroglobulina. Detekcija tiroksina je bila narejena z uporabo ELISA diagnostičnega kita za prosti tiroksin.

4.4.3 Sproščanje tiroksina pri *in vitro* cepitvi Tg s katepsinom C in PGCP

In vitro sproščanje tiroksina z N-terminalnega dela tiroglobulina s katepsinom C smo primerjali z *in vitro* sproščanjem tiroksina iz tiroglobulina z obema encimoma, katepsinom C in PGCP.

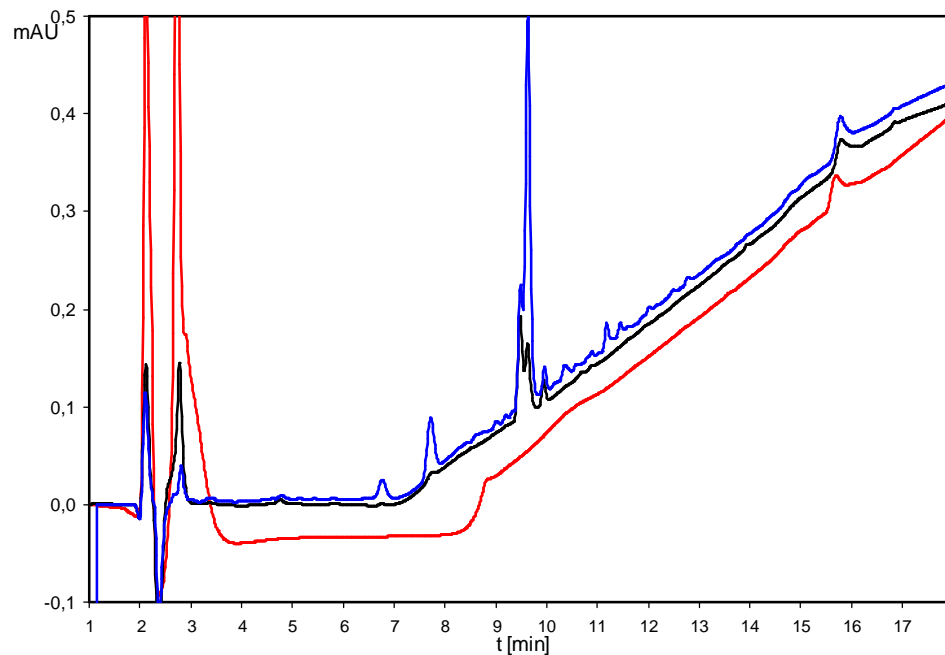


Slika 36: *In vitro* sproščanje tiroksina z N-terminalnega dela tiroglobulina. Čas reakcije cepitve je bil eno uro pri pH 7,2. Detekcija sproščenega tiroksina je bila narejena z uporabo ELISA diagnostičnega kita za prosti tiroksin. (1) Kontrola, vzorec Tg brez prisotnih encimov; (2) vzorec Tg v prisotnosti katepsina C; (3) vzorec Tg v prisotnosti katepsina C in PGCP; (4) vzorec Tg v prisotnosti katepsina C, PGCP ter inhibitorja cisteinskih proteinaz E-64d.

Tudi v tem primeru smo detektirali sproščeni hormon z uporabo ELISA diagnostičnega kita za prosti tiroksin. Ugotovili smo, da je razlika v rezultatu med cepitvijo Tg s katepsinom C ali s katepsinom C in PGCP minimalna (Slika 36). Na sliki je prikazana tudi ustavitev reakcije cepitve tiroglobulina v prisotnosti inhibitorja cisteinskih proteinaz E-64d.

4.4.4 Cepitev Tg s katepsinom C in PGCP na HPLC z reverzno fazo

Sproščanje dipeptidov z N-terminalnega dela tiroglobulina v prisotnosti katepsina C in nadaljno hidrolizo nastalih dipeptidov s PGCP smo spremljali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Ločevanje dipeptidov je potekalo na analitični ravni z uporabo kolone z reverzno fazo pri gradientu od 0 % do 50 % acetonitrila v vodi ob prisotnosti 0,085 % TFA. Sproščanje produktov cepitve s kolone smo spremljali pri 254 nm. Na sliki 37 lahko vidimo nastale dipeptide pri cepitvi tiroglobulina s katepsinom C in spremenjen kromatogram, ko je prisoten še PGCP.



Slika 37: *In vitro* cepitev tiroglobulina v prisotnosti katepsina C ter katepsina C in PGCP. Rdeča črtkana črta prikazuje necepljen tiroglobulin. Črna črta prikazuje tiroglobulin cepljen s katepsinom C, Modra črta prikazuje cepitev tiroglobulina s katepsinom C in PGCP.

4.4.5 Določanje vsebnosti joda

Z merjenjem sproščanje joda pri cepitvi tiroglobulina s katepsinom C smo lahko kvantificirali delež tiroksina, ki se nahaja na N-terminalnem delu tiroglobulina. Cepitev Tg je potekala v pogojih podobnim ščitničnemu lumnu (Jordans in sod., 2009). 24 urna cepitev Tg s katepsinom C je bila dovolj dolga, da je encim odstranil ves tiroksin z N-terminalnega dela Tg. Na osnovi umeritvene krivulje smo določili, da je na N-terminalnem delu od 20 % do 22% vsega joda (Preglednica 10).

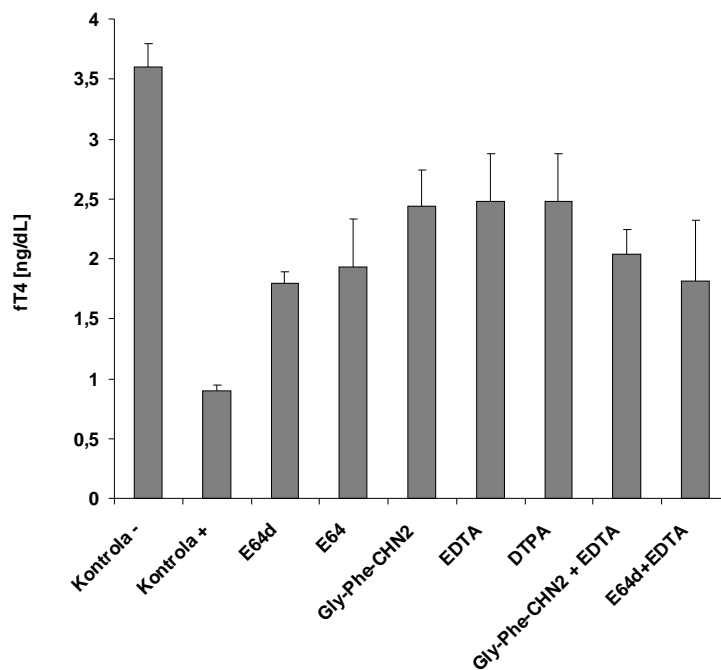
Preglednica 10: Vsebnosti joda v procesiranem in neprocesiranem tiroglobulinu s katepsinom C. Aktivni katepsin C je cepil Tg in sproščal jod pri različnih pH-jih. V neprocesiranem in procesiranem Tg smo določali ostanek joda. Razlika med neprocesiranim in procesiranim Tg pomeni jod, ki se je sprostil z N-terminalnega dela molekule tiroglobulina. Vsebnosti prikazujejo, da je od 20 % do 22 % vsega joda v tiroglobulinu na N-terminalnem delu molekule.

pH	Netretiran Tg (mmol J/ mol Tg)	Tretiran Tg (mmol J/ mol Tg)
7,2	20±0,5	16±0,5
6,0	19±0,5	15±0,5

4.5 *Ex vivo* cepitev tiroglobulina v gojišču FRTL-5 celic

4.5.1 Sproščanje tiroksina v gojišču FRTL-5 celic ter vpliv dodanih inhibitorjev na njegovo sproščanje

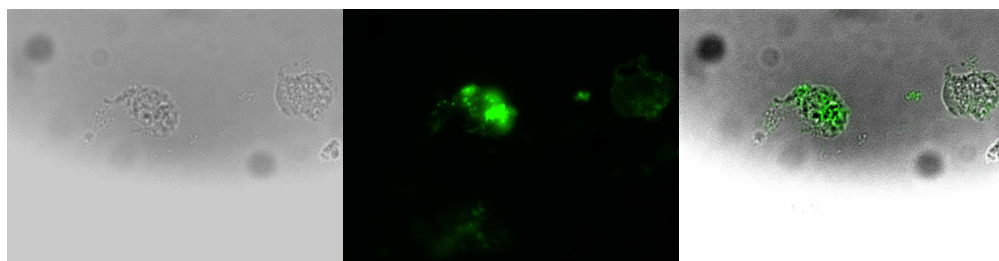
Cepitev dodanega prašičjega tiroglobulina in posledično sproščanje tiroksina v gojišču FRTL-5 celic zaradi endogeno izraženih proteinaz smo spremljali z uporabo ELISA diagnostičnega kita za prosti tiroksin. Podganji tirociti sproščajo v gojišče veliko število proteinaz, zato smo potrebovali za ocenitev deleža katepsina C in metaloproteinaz specifične inhibitorje. Slika 38 predstavlja količino tiroksina, ki se je sprostil iz dodanega prašičjega tiroglobulina. Inhibitor cisteinskih proteinaz E-64d je sposoben preiti celično membrano in inhibirati tudi znotrajcelično razgradnjo tiroksina, za razliko od E-64, ki ne more prodreti v celico in je omejen na interakcijo s sekretornimi proteinazami. Oba zmanjšata sproščanje tiroksina za približno polovico. Specifični inhibitor katepsina C, Gly-Phe-CHN₂, zmanjša sproščanje tiroksina za dobro tretjino. Kelatorja kovinskih ionov EDTA in DTPA, ki inhibirata metaloproteinaze in ne moreta prodreti v celico, znižata nivo hormona za enak delež kot inhibitor katepsina C. Kombinacija Gly-Phe-CHN₂ in EDTA inhibira sproščanje tiroksina na polovico. EDTA pa v kombinaciji z E-64d skoraj nima vpliva.



Slika 38: Sproščanje tiroksina iz tiroglobulina s proteinazami, ki se sprostijo iz podganjih tirocitov ter vpliv različnih inhibitorjev. Sproščanje tiroksina v gojišču FRTL-5 celic zaradi endogeno izraženih proteinaz smo spremljali z uporabo ELISA diagnostičnega kita za prosti tiroksin. Dodani inhibitorji v času meritev niso imeli učinka na proliferacijo celic.

4.5.2 Utišanje gena za PGCP

Za dipeptidazo PGCP ne poznamo specifičnega substrata ali inhibitorja, s katerim bi lahko sledili delovanju encima. Zato smo pripravili FRTL-5 celice in utišali izražanje gena za PGCP (Slika 39). V naši raziskavi smo izbrali med tremi zaporedno različnimi molekulami shRNK, ki so komplementarne molekulam mRNA, ki zapisujejo PGCP. Za kontrolno molekulo smo izbrali molekulo shRNK, z zaporedjem, ki nima komplementarnosti v genih vretenčarjev.

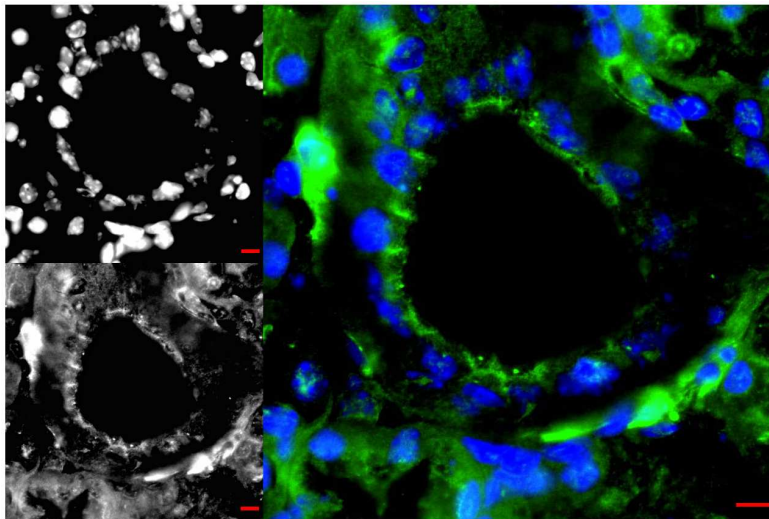


Slika 39: Utišanje izražanja gena PGCP. Na sliki lahko primerjamo izražanje PGCP v neutišani in utišani celici. Imunocitološko označevanje celice je bilo izvedeno z kunčjimi protitelesi proti človeškemu PGCP in konjugiranimi sekundarnimi protitelesi (Alexa Fluor 488).

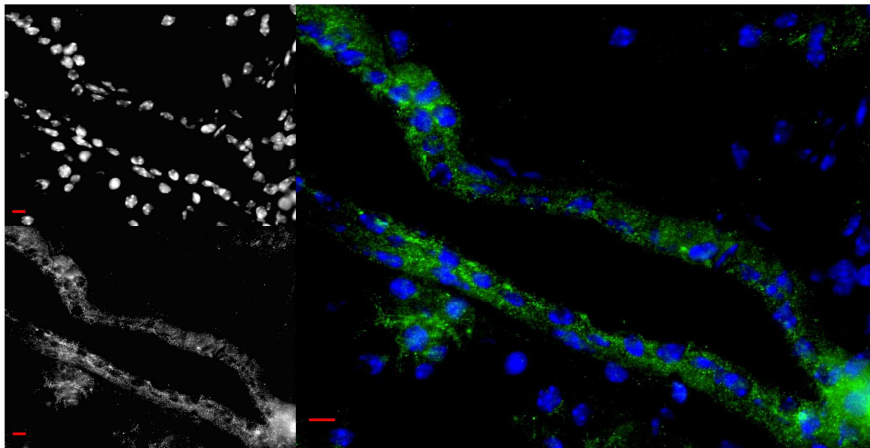
Po ločeni transfekciji treh različnih shRNK v FRTL-5 celice smo preverili njihov učinek na tarčno mRNK. Število živih celic FRTL-5 se je prvi dan po transfekciji hitro znižalo v primerjavi z netretirano skupino celic, skupino celic tretirano s transfekcijskim reagentom in s skupino s kontrolno shRNK. Po petih dneh se je preživelost celic drastično zmanjšala in prisotne so bile le še maloštevilne posamezne celice. Rezultat nakazuje, da je gen za PGCP pomemben za delovanje in preživetje celic.

4.6 Imunohistokemija mišje ščitnice

Z uporabo celične kulture podganjih celic, smo lahko raziskovali molekularni mehanizem delovanja PGCP in katepsina C na tiroglobulin in njuno vlogo pri sproščanju tiroksina. Za dokaz prisotnosti PGCP in katepsina C v folikularnih celicah ščitnice smo pripravili imunohistološke preparate mišjih ščitnic. Iz FVB miši smo izrezali ščitnico in jo zamrznili v tekočem dušiku. Zamrznjeno tkivo smo rezali na 5 μ m debele rezine in jih označili s primarnimi protitelesi proti PGCP ali katepsinu C ter sekundarnimi kozjimi proti kunčnimi protitelesi, konjugiranimi z Alexa Fluor 488 (emitira zeleno barvo). Jedra smo označili z DAPI (emitira modro barvo). Na slikah je vidna prisotnost PGCP (Slika 40) oz. katepsina C (Slika 41) v tkivu ščitnice. Izrazito sta encima prisotna v tirocitih ob apikalnem delu celične membrane. V preostalih celicah vezivnega tkiva pa je bil signal zmanjšan.

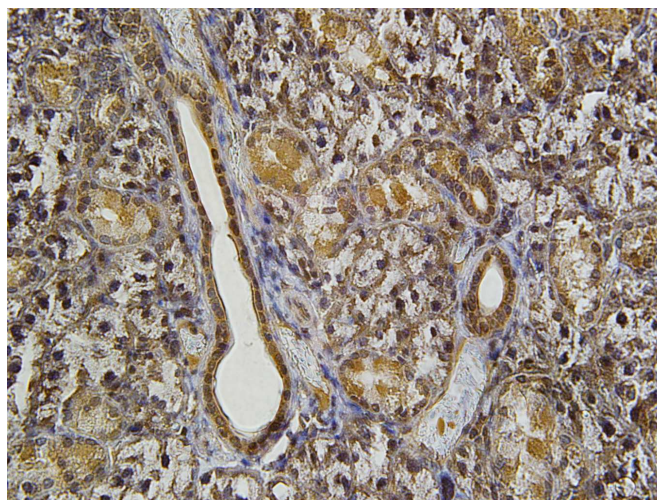


Slika 40: Krio imunohistološki preparat mišje ščitnice. PGCP je označen z zeleno barvo. Z modro so označena jedra.



Slika 41: *Krio imunohistološki preparat miške ščitnice. Katepsin C je označen z zeleno. Z modro so označena jedra.*

Pripravili smo tudi imunohistološke rezine za barvanje s tehniko ABC. S kunčjimi protitelesi usmerjenimi proti PGCP smo označili vzorec. Vidimo, da so protitelesa zaznala prisotnost PGCP v tirocitih okrog folikularnega lumna (Slika 42).



Slika 42: *Barvanje ščitnice s ABC tehniko. Z rjavo barvo so označena kunčja protitelesa proti PGCP. Iz slike vidimo, da je PGCP bolj zastopan v tirocitih, okrog ščitničnega folikla.*

5 Razprava

Glikozilacija ima pomembno vlogo pri različnih celičnih funkcijah. Poleg dobro poznanih vlog N-glikanov pri proteinskem zvitju, usmerjanju in izločanju (Helenius in Aebi, 2001; Varki, 1993), N-glikozilacija vpliva na razvoj organizma, homeostazo, protein-protein interakcije in sodeluje pri celičnem signaliziranju (Ioffe in Stanley, 1994; Lau in sod., 2007). Sprememba v oligosaharidni strukturi je povezana z različnimi fiziološkimi in patološkimi procesi, kot so celična diferenciacija, celična migracija, interakcije med gostiteljem in patogenimi organizmi ter transmembranskim signaliziranjem in sproščanjem lizosomskih encimov v zunajcelični prostor (Guo in sod., 2003; Ioffe in Stanley, 1994; Linke in sod., 2002b; Saxon in Bertozzi, 2001; Wang, X.C. in sod., 2006).

Namen doktorskega dela je povezati dosedanje znanje ter ugotoviti, kako vpliva sprememba glikozilacije na lokalizacijo encima in s tem na njegovo delovanje izven celice. Kot primer fiziološke pomembnosti smo raziskali vlogo plazemske glutamat karboksipeptidaze (PGCP) pri izvenceličnem sproščanju tiroksina.

Plazemska glutamat karboksipeptidaza (PGCP) je metaloproteinaza, ki cepi dipeptide na proste aminokisliline (McDonald in sod., 1969). Protein je poznan že vrsto let, le da so ga imenovali z različnimi imeni, kot npr. Ser-Met dipeptidaza (McDonald in sod., 1972), ali kasneje lizosomska dipeptidaza (LDP) (McDonald in Schwabe, 1977), ko so encim zasledili v lizosomih. Raziskovalci so odkrili fiziološko pomembnost PGCP v ščitnici, kjer sodeluje pri sproščanju hormona tiroksina (Dunn in sod., 1996), da se nahaja izvencelično (Gingras in sod., 1999) ter da sta lizosomska dipeptidaza in PGCP ista encima, le drugačno poimenovana (Bethesda, 2011; Dolenc in Mihelic, 2003).

Za boljšo karakterizacijo delovanja proteina v celici in izven nje, smo pripravili več cDNK za izražanje v različnih sistemih. Do sedaj poznamo dva poskusa izražanja PGCP (Dolenc in Mihelic, 2003; Gingras in sod., 1999). Protein, ki so ga izrazili v sesalskih celicah, ni bil namenjen čiščenju temveč znotrajceličnemu sledenju. (Gingras in sod., 1999). Raziskovalci z izražanjem v bakterijskih celicah so pridobili veliko količino proteina, a žal netopnega (Dolenc in sod., 2007).

Priprava PGCP kot fuzijskega proteina z zelenim ali rdečim fluorescenčnim proteinom nam omogoča sledenje molekule. Za pripravo deglikozilacijskih mutantov smo uporabili uspešno pripravljen gen za PGCP, v fuziji z rdečim fluorescenčnim proteinom ter v laboratoriju že pripravljen PGCP, v fuziji z zelenim fluorescenčnim. Iz aminokislinskega zaporedja je razvidno, da PGCP vsebuje pet potencialnih mest N-glikozilacije (Slika 12). Zato smo pripravili posamezne mutacije in nekaj njihovih kombinacij (Preglednica 4). Po transfekciji HEK 293 celic s temi mutanti smo ugotovili, s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa, da se vsi mutanti izražajo (Slika 16). Opazili smo manjše razlike v zadrževanju v določenih organelih. Le-te bodo predmet kasnejših raziskav, saj je potrebno te razlike opazovati s konfokalnim mikroskopom, da bi lahko določili točno lokalizacijo izraženega proteina. Fuzijski protein smo lahko sledili tudi z uporabo imunoloških metod. Ugotovili smo, da je izražanje v celici vezikularno razporejeno (Slika 17). Tudi HEK 293 celice so izločale fuzijski protein v medij, pri tem smo opazili, da se del GFP molekul odcepi od PGCP-GFP (Slika 18). Uporaba podganjih tirocitov (FRTL-5 celice) za transfekcijo fuzijskega PGCP nam je dala podoben rezultat (Slika 19), le da je prisotna

nižja količina proteina z mutacijo na mestu 61 (N61A), tako v celičnem lizatu, kot v gojišču. Odcepitev dela fluorescenčnega proteina nam je otežila delo, zato kasneje nismo več uporabili fluorescenčnega proteina za študije lokalizacije, ampak smo se omejili na detekcijo s protitelesi.

Pridobili smo čist in aktivni PGCP, ki smo ga potrebovali za karakterizacijo encimskega delovanja. Topno obliko izražene dipeptidaze smo dosegli z izražanjem v insektnih celicah s pomočjo bakulovirusnega sistema (Zajc in sod., 2011). Z hidroksiapatitno kromatografijo smo dosegli velik izkoristek izolacije, saj smo lahko na kolono direktno nanесли gojišče, na katero se je vezal izraženi PGCP. Ugotovili smo, da se izločil encim na gelski kromatografiji, pri molekularni masi 100 kDa, kar nakazuje na prisotnost homodimerne oblike v mediju (Slika 20). Zelo učinkovita je bila afinitetna kromatografija na Phe-Leu-sefarozi. Metodo vezave encima na imobiliziran dipeptid je vpeljal Pshezhetsky za izolacijo katepsina A (Pshezhetsky in Potier, 1994). Dipeptid-sefaroza je odstranila vse nečistoče. Ugotovili smo, da je procesiranje proteina izraženega v bakulovirusnem sistemu nepopolno. Pri določanju aminokislinskega terminalnega zaporedja smo zasledili, da je prisotnih več intermediatnih oblik (Slika 24), ki pa jih nismo uspeli ločiti. So pa znane intermediatne oblike nekaterih podobnih, heterologno izraženih encimov (Hartley in Bennett, 2009; Nirasawa in sod., 1999). Aktivacijo z različno dolgimi ostanki propeptida so določili še dvema encimoma iz družine M28, kamor spada tudi PGCP, aminopeptidazi Ap1 (Hartley in Bennett, 2009) in aminopeptidazi AC (Nirasawa in sod., 1999). Oba encima ohranita po izražanju in aktivaciji del propeptida.

PGCP smo izolirali v relativno veliki količini (8 mg/l gojišča), vendar je bil encim nestabilen in smo ga morali sproti izolirati, da smo ga uporabili za encimske teste.

Bakulovirusni sistem je zelo učinkovit pri izražanju človeških proteinov. Se pa razlikuje v N-glikozilaciji, ki je v časih zelo pomembna. Tako nekateri oligosaharidi vsebujejo samo tri ali celo dva manozna ostanka (Altmann in sod., 1999). Razlika je najbolj opazna pri lizosomskih encimih, ki vsebujejo visoko manozne sladkorje. Pri človeških proteinih, ki se izločajo, je razlika manjša, saj je v obeh primerih prisotna hibridna ali kompleksna glikozilacija. PGCP, izražen v insektnih celicah, vsebuje hibriden ali kompleksen tip N-glikozilacije (Slika 25) in smo lahko sladkorje odcepili s PNGazo F, ne pa z EndoH endoglikozidazo, ki odceplja visoko manozne sladkorje (Tarentino, A. L. in sod., 1985; Tarentino, Anthony L. in Maley, 1974).

Izoliranemu PGCP smo določili nekatere lastnosti, ki so potrdile podobnost izoliranemu encimu iz človeških ledvic (Dolenc in Mihelic, 2003). Encim je bil sposoben katalizirati hidrolizo dipeptida Ser-Met, hidroliza pa se je ustavila v prisotnosti EDTA, DTPA in bestatina (Slika 23). Zanimivo je, da imajo kloridni ioni aktivacijski učinek na dipeptidazo (Slika 22). Podoben učinek kloridnih ionov so opazili pri delovanju katepsina C (McDonald in sod., 1966).

V nadaljevanju smo se usmerili na raziskave, ki pojasnjujejo molekularno delovanje PGCP. Narava encima je kataliziranje hidroliziranja dipeptidov. Delovanja dipeptidaz v celicah ne poznamo in se omejujemo na dejstvo, da so dipeptidaze verjetno zadnji člen v razgradnji proteinov do aminokislin.

Zaradi dejstva, da PGCP hidrolizira dipeptide, je najenostavneje karakterizirati sistem, kjer PGCP deluje skupaj z encimom, ki sprošča dipeptide s konca polipeptidne verige. Delovanje PGCP smo povezali s katepsinom C (dipeptidil peptidazo I), ki odceplja dipeptide z N-terminalnega dela proteinov (Gutman in Fruton, 1948). Tako smo pripravili rekombinantni katepsin C v fuziji s fluorescenčnim proteinom. Kolokalizacijo PGCP in katepsina C v fuziji s RFP smo pripravili s transfekcijo v FRTL-5 celicah in ugotovili, da

sta kolokalizirana.

Visok nivo izražanja obeh encimov nam je omogočil, da smo lahko spremljali njuno prisotnost v podganjih tirocitih z uporabo imunocitokemijskih metod s pomočjo fluorescenčnega mikroskopa (Slika 30). Pri tem smo uporabili specifična poliklonska protitelesa, sekundarna protitelesa pa so bila konjugirana z različnima fluoroforoma. Oba encima sta prisotna v veliki količini v endoplazemskem retikulumu (ER). Velik delež obeh proteinov namreč kolokalizira s protein disulfid izomerazo (PDI). Prisotnost v ER so do sedaj pokazali tudi pri drugih lizosomskih katepsinih, npr. za katepsin B (Spiess in sod., 1994), katepsin H (Nishimura in Kato, 1987) in katepsin W (Wex in sod., 2001). Podrobnejši pogled na znotrajcelično porazdelitev, s poudarkom na nahajanju v endoplazemskem retikulumu večine endosomsko-lizosomskih proteinov, se nahaja na spletni strani projekta »The Human Protein Atlas« www.proteinatlas.org (Uhlen in sod., 2010). PGCP in katepsin C kolokalizirata tudi z Golginom-97, markerjem Golgijevega aparata, saj sta močno prisotna tudi v predelu celic (Slika 30), kjer poteka končna stopnja N-glikozilacije in se določa o tipu N-glikozilacije proteinov (Varki, 1993). Da sta encima glikozilirana, so že pokazali (Dahl in sod., 2001; Gingras in sod., 1999). Prisotnosti obeh encimov pa nismo zasledili v lizosomih, saj ne kolokalizirata z LAMP-2 proteinom, markerjem lizosomov. Ko smo primerjali kolokalizacijo obeh proteinov v FRTL-5 celicah, smo ugotovili, da se nahajata skupaj v ER in GA, ne pa v vseh veziklih. Ker ti vezikli niso lizosomi in smo opazili, da se encima izločata iz celic (Slika 30), smo zaključili, da se izločata z različnimi sekretornimi organelami. Obstaja namreč več vrst sekretornih veziklov, ki jih grobo razdelimo v dva tipa izločanja (Brunner in sod., 2009; Kim in sod., 2006). Nekateri vezikli se izločajo kontinuirano, drugi vezikli pa se pričnejo izločati po stimulaciji celic. V našem primeru je očitno, da gre za drugi tip izločanja, saj je za sekrecijo potrebna stimulacija s TSH, inzulinom in/ali somatostatinom (Slika 32). Ko smo opazovali prisotnost katepsina C in PGCP v 3H gojišču (hidrokortizon, transferin, Gly-His-Lys) z uporabo NaDS-PAGE in prenosa po Westernu, ju nismo zasledili. Dodatek treh hormonov (TSH, inzulin, somatostatin) k 3H gojišču sproži njuno izločanje iz celice (Slika 32). Podobno se obnaša tudi katepsin B, saj se izloča iz celic v prisotnosti 6H v gojišču (Linke in sod., 2002b). Aktivni katepsin C v celicah in njegovo izločanje v gojišče smo lahko zasledovali s specifičnim fluorogenim substratom Gly-Phe-4βMNA (Planta in Gruber, 1963). Te možnosti nismo imeli za PGCP, saj zaenkrat ne poznamo specifičnega niti fluorogenega, niti kromogenega substrata za ta encim. Primerjava aktivnosti katepsina C ob prisotnosti komponent, potrebnih za preživetje celic (3H) ter hormonov, ki sprožijo izločanje lizosomskih proteinaz (TSH, inzulin, somatostatin) prikazuje, da sta za povišano izločanje potrebna le dva od hormonov. Prisotnost inzulina pri izločanju iz tiroidnih celic je skoraj tako pomembna kot prisotnost TSH. Ni pa nujna, saj v primeru, ko smo zamenjali inzulin s somatostatinom, vidimo le malo nižjo aktivnost katepsina C v mediju (Slika 32).

PGCP in katepsin C nista edini cisteinski proteinazi, ki se izločata iz tirocitov pod vplivom 6H. Katepsin K, L in B se izločajo tako iz človeških epitelijskih celic ščitnice, kot tudi iz FRTL-5 celic (Brix in sod., 2001; Linke in sod., 2002a; Linke in sod., 2002b; Tepel in sod., 2000). Avtorji člankov so pokazali, da se katepsini pod vplivom hormonov ne usmerijo v lizosome, ampak se transportirajo na apikalno stran tirocitov, kar povzroči njihovo izločanje v folikle pod fiziološkimi pogoji.

Pomembnost N-glikozilacije proteinov opazimo v izražanju raznih funkcij glikozilacije (Ohtsubo in Marth, 2006). Ker sodeluje med drugim tudi pri prenosu proteinov po celici in izločanju iz celic (Bidey in sod., 1984), smo predpostavili, da je za izločanje PGCP in katepsina C odgovorna sprememba glikozilacije iz visoko manozne v hibridno oziroma v kompleksno glikozilacijo. Deglikozilacijo visoko manozne oblike N-glikozilacije

proteinov smo dosegli z odcepljanjem N-vezanih sladkorjev z endoglikozidazo Endo H, ker cepi samo visoko-manozne oligosaharide, ni pa sposobna odstraniti drugih dveh tipov sladkorjev (glikozilacije) (Tarentino, Anthony L. in Maley, 1974). Hibridne oziroma kompleksne oligosaharide lahko s proteinov odstrani PNGaza F, ki cepi ne glede na sestavo oligosaharidov (Tarentino, A. L. in sod., 1985).

Analiza glikozilacije s pomočjo NaDS-PAGE in prenosom po Westernu, nam prikazuje, da vsebuje PGCP, ki je izločen v gojišče, hibriden, oz. kompleksen tip N-glikozilacije (Slika 30). Proteinu, ki se je nahajal v celicah, nismo natančno določili tipa N-glikozilacije, saj je bila razlika v molskih masah po odstanitvi sladkorjev minimalna, kar lahko pomeni, da je N-glikozilacija visoko manozna. Hibriden in kompleksen tip N-glikozilacije pokaže veliko večjo razliko v masi (Slika 30). Pri analizi katepsina C iz gojišča smo zaznali le pro-obliko encima z molekulsko maso 50 kDa. Razlike v masi zaradi deglikozilacije z EndoH in PNGazo F smo zaznali v primerjavi z originalno maso proteina, vendar je le-ta tako nizka, da nismo uspeli ugotoviti tipa glikozilacije. V celicah smo lahko detektirali tudi zrel encim, ki je sestavljen iz treh verig (Dolenc in sod., 1995). Ker so bila poliklonska protitelesa narejena proti težki verigi katepsina C, z maso okoli 25 kDa, smo opazili zmanjšanje mase zaradi deglikozilacije z Endo H in PNGazo F. To nakazuje, da vsebuje katepsin C znotraj celice visoko manozen tip N-glikozilacije.

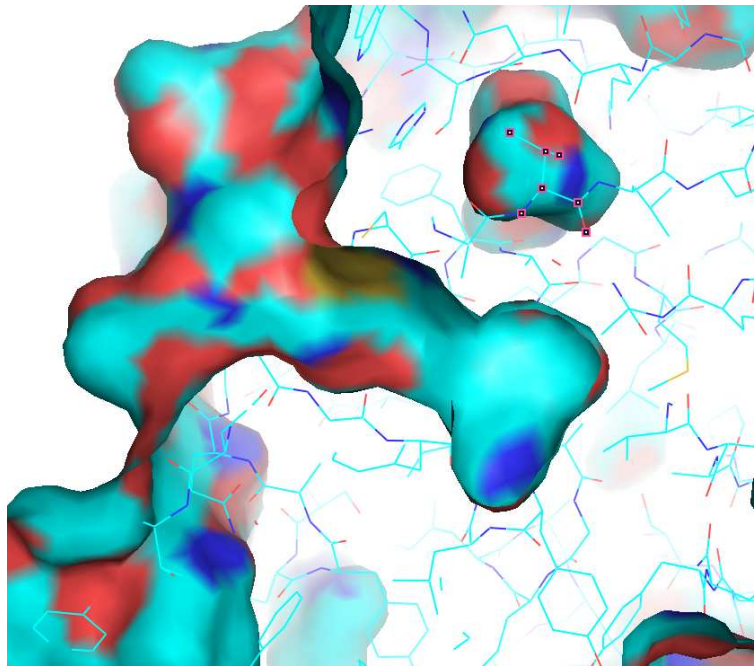
Razlike v tipu N-glikozilacije nastanejo zaradi delovanja vrste encimov v medialnem golgiju (Varki, 1993). Encim, ki je odgovoren za začetek hibridne ali kompleksne glikozilacije, je N-acetilglukozaminil transferaza I (GnT1). Kodirana je z Mgat1 genom (Ioffe in Stanley, 1994; Metzler in sod., 1994). Tako smo z uporabo NaDS-PAGE in prenosa po Westernu ugotovili, da je izražanje GnT1 v celicah, ki rastejo v 3H gojišču veliko nižje, kot pa v 6H gojišču (Slika 31). TSH, inzulin in somatostatin povečajo izražanje transferaze v FRTL-5 celicah, ta pa začne kaskado sladkornih transferaz in hidrolaz (Lau in sod., 2007), kar se kaže v sproščanju lizosomskih encimov iz celic.

Do sedaj smo pokazali, da sprememba glikozilacije PGCP in katepsina C omogoči njuno izločanje iz FRTL-5 celic, kar pomeni, da se v ščitnici lahko encima izločata v notranjost foliklov, kjer se nahaja tudi tiroglobulin. V notranjosti foliklov je fiziološki pH okrog pH 7,2. *In vitro* študije so pokazale, da so lizosomski encimi v nevtralnem okolju, v nasprotju s kislim pH okolice, manj stabilni, kot na primer katepsin L, ki je stabilen le nekaj sekund v kolikor ni prisotna visoka koncentracija substrata ali inhibitorja (Turk, B. in sod., 1993; Turk, B. in sod., 1999). Tudi aktivnost lizosomskih proteinaz, ki so maksimalno aktivne v rahlo kislem pH, se v nevtralnem zelo zniža. Pred kratkim so pokazali, da so cisteinski katepsini B, K in L aktivni v kislem okolju, medtem ko je v nevtralnem pH aktiven le katepsin S (Jordans in sod., 2009). Po predhodnem delovanju katepsina S na tiroglobulin so sposobni sproščanja tiroksina iz tiroglobulina tudi katepsini B, K in L. Za katepsin C so pokazali celo, da spremeni naravo svojega delovanja in v nevtralnem postane transferaza ter dodaja dipeptide na N-terminalni del peptidov (McGuire in sod., 1992; Planta in sod., 1964).

Do sedaj še ni bilo objavljene študije, ki bi vključevala delovanje katepsina C, so pa že pokazali, da lahko PGCP sodeluje pri hidrolizi dipeptida s tiroksinom, ki se sprostijo iz tiroglobulina (Dunn in sod., 1996). Po ugotovitvi, da se po indukciji s hormoni oba proteina izločata iz celice, nas je zanimalo, ali je sploh možna cepitev tiroglobulina s katepsinom C in ali so razlike cepitve zaradi nevtralnega pH, v primerjavi z optimalnim rahlo kislim okoljem. Šele ko katepsin C odcepi dipeptid s tiroksinom z N-terminalnega dela tiroglobulina, lahko PGCP nadaljuje hidrolizo dipeptida do prostega tiroksina.

Hormon tiroksin je nestandardna aminokislina in derivat tirozina. Ker stranska veriga aminokislina vsebuje dva fenilna obroča, ki sta dodatno še štirikrat jodirana, lahko

njegova velikost predstavlja sterično oviro za encim. Katepsin C mora sprejeti in prepoznati substrat ter biti sposoben katalize hidrolize peptidne vezi. Da je katepsin C tega sposoben, smo lahko predpostavili iz njegove strukture (Turk, D. in sod., 2001). Dipeptidil peptidaza ima v primerjavi z drugimi encimi papainove družine zelo globok hidrofobni S2 aktivni žep, na dnu katerega mora biti kloridni ion, da je encim polno aktiven (Slika 43). V ta žep sede stranska veriga N-terminalne aminokislina substrata. Karakterizacije aktivnosti katepsina C prikazujejo, da je lahko kloridni ion, ki je potreben za polno aktivnost encima, uspešno nadomeščen z jodidnim ionom (Gorter in Gruber, 1970).



Slika 43: Aktivno mesto katepsina C. Na osnovi objavljene strukture katepsina C (Turk, D. in sod., 2001) vidimo zelo globoko aktivno mesto S2, kamor se vsede stranska veriga N-terminalne aminokislina substrata.

Človeški tiroglobulin je edina aktivna molekula, ki vsebuje jodidne jone, ti pa se nahajajo na hormonogenih mestih (Sorimachi in sod., 1974). Tudi prašičji tiroglobulin vsebuje tiroksin na petem mestu, po odcepitvi signalne sekvence, saj je ohranjenost aminokislinskega zaporedja tiroglobulina zelo visoka med posameznimi organizmi (Slika 44).

Katepsin C ne more odcepiti dipeptida, kadar se nahaja na N-terminalnem delu Arg, niti kadar je na drugem mestu Pro. V primeru tiroglobulina pa se pojavi kombinacija obeh aminokislin pri vseh višjih vretenčarjih, ki imajo tiroglobulin.

Tiroksin na N-terminalnem delu tiroglobulina ima verjetno najpomembnejšo vlogo od vseh tiroksinov na makromolekuli (Dunn in sod., 1998). Če upoštevamo, da ima tiroglobulin le tri mesta, ki so polno jodirana (Dedieu in sod., 2011), vidimo, da je delovanje katepsina C in PGCP zelo pomembno pri sproščanju tiroksina. Tudi merjenje količine sproščenega joda pri delovanju katepsina C je pokazalo, da se sprosti približno petina vsega joda.

1	[Homo sapiens]	1	NIFEYQVDAQPLR	CELQRETAFLKQADYVVPQCAEDGSFQ	40
2*	[Pan troglodytes]	1	40
3	[Macaca mulatta]	1R.....	40
4	[Macaca fascicularis]	1R.....	40
5*	[Nomascus leucogenys]	1M.....	40
6*	[Callithrix jacchus]	1R.....T.....	40
7	[Sus scrofa]	1R...R.....	40
8	[Bos taurus]	1R...RE.....	40
9	[Mus musculus]	1K...E...S.....	40
10	[Rattus norvegicus]	1K...DE...S.....	40
11	[Capra hircus]	1R...AR.E.....	40
12	[Canis lupus familiaris]	1R...G.E.....Y.	40
13	[Cavia porcellus]	1R...RME.I...S.....	40
14*	[Loxodonta africana]	1M.....R...RE...S...R	40
15	[Heterocephalus glaber]	1K...TRMN.I...S.....	40
16	[Gallus gallus]	1T.S.....K...TGGET...S...Q.R	40
17*	[Monodelphis domestica]	1E.S.....Q...KE.HI...LA..R.R	40
18	[Oryctolagus cuniculus]	1Q...MQSLMXSQPXGVSXXSQPACE	40
19	[Trachemys scripta]	1AEF.....ELAETGLNLLLELYDLLTAEGSYEE	40

Slika 44: Primerjava človeškega N-terminalnega dela tiroglobulina z zaporedji iz različnimi živalskih vrst. Predstavljenih je prvih 40 aminokislin z N-terminalnega dela tiroglobulina. Znak * označuje napovedano aminokislinsko sestavo. Znak ♂ označuje le znani del zaporedja. Vrste si sledijo: 1) Človek; 2) Navadni šimpanz; 3) Rezus opica; 4) Dolgorepi makak; 5) Belolični gibbon; 6) Navadna marmozetka; 7) Divji prašič; 8) Domače govedo; 9) Hišna miš; 10) Siva podgana; 11) Domača Koza; 12) Domači pes; 13) Morski prašiček; 14) Afriški savanski slon; 15) Goli peskar; 16) Domača kokoš; 17) Brazilski kratkorepi oposum; 18) Divji kunec; 19) Želva rdečevratka

Pri delovanju Katepsina C na tiroglobin se odcepi tudi dipeptid, ki vsebuje tiroksin. Časovna odvisnost sproščanja tiroksina, ki smo ga merili z diagnostičnim kitom Elisa Free T4 in je posledica krajšanja N-terminalnega dela tiroglobulina s Katepsinom C, poteka linearno (Slika 35). Se pa sproščanje ne spremeni bistveno ob prisotnosti PGCP (Slika 36). Da lahko PGCP cepi dipeptid T4-Gln in sprost hormone so pokazali s HPLC analizo (Dunn in sod., 1996). Ker je diagnostični kit za prosti tiroksin (ELISA free T4) zaznal tudi dipeptid T4-Gln, nas je zanimalo, če je PGCP sploh aktiven na produkte cepitev tiroglobulina s Katepsinom C. *In vitro* cepitev tiroglobulina s Katepsinom C je dala produkte, ki smo jih ločevali na koloni C18 z reverzno fazo. Sprememba elucijskega kromatograma v prisotnosti PGCP nam prikazuje, da je PGCP aktiven in sposoben cepiti vse produkte, ki jih je tvoril Katepsin C (Slika 37). Tiroksin ne vpliva na aktivnost PGCP, niti na aktivnost Katepsina C. Zaključili smo, da diagnostični kit prepozna tako hormone tiroksin, kot tudi dipeptid s tiroksinom (T4-Gln).

Z imunohistokemijskimi metodami smo pripravili rezine mišjih ščitnic. Po označevanju s protitelesi proti PGCP in Katepsinom C smo ugotovili, da se oba encima nahajata v folikularnih celicah ščitnice (tirocitih), kar pomeni, da se izločata iz celic v lumen (Slika 40, Slika 41 in Slika 42).

Sproščanje tiroksina iz tiroglobulina smo potrdili v gojišču podganjih tirocitov (FRTL-5), ki smo jim dodali prašičji tiroglobulin. FRTL-5 celice namreč niso sposobne jodirati tiroglobulina, zato moramo za poskuse dodajati tiroglobulin izoliran iz drugih organizmov. S pomočjo raznih inhibitorjev (Slika 38) smo ugotovili, da Katepsin C sprosti okoli 30% tiroksina, medtem ko cisteinske proteinaze skupaj sprostijo okoli 60% tiroksina. Inhibitor metaloproteinaz zmanjša sproščanje tiroksina za okoli 30%. Z merjenjem dipeptidazne aktivnosti v gojišču celic in inhibicije metaloproteinaz z EDTA

pa smo videli, da so prisotne tudi druge dipeptidaze, ne le metaloproteinaze, med katere spada PGCP. Potrdili smo, da gre pri cepitvi Tg sodeluje relativno veliko število proteaz različnih katalitičnih tipov, kar priča o kompleksnosti procesa spročanja tiroksina.

Ker ne poznamo specifičnega inhibitorja niti substrata za PGCP, smo poskusili utišati izražanje PGCP in s tem kvantificirati vpliv PGCP. Pripravili smo tri pare oligonukleotidov, ki so se vezala na različna mesta mRNK. Metoda ni primerna, saj so vsi pripravljene konstrukti sprožili celično smrt, kar potrjuje na velik pomen PGCP pri delovanju celic.

Sprememba visoko manozne glikozilacije lizosomskih encimov v celicah ščitnice pod kontrolo TSH, v sodelovanju z inzulinom, sprosti izločanje lizosomskih encimov iz celic pod fiziološkimi pogoji. Za sproščanje tiroksina to pomeni, da ni potrebna endocitoza tiroglobulina, ampak reakcija poteče že v lumnu foliklov ščitnice. Sproščanje lizosomskih encimov iz celic zaradi spremembe glikozilacije omogoča bolj kontrolirano sproščanje tiroksina iz tiroglobulina in s tem lažjo regulacijo njegovega nivoja. Iz vseh dostopnih podatkov lahko sklepamo, da je proces sproščanja tiroksina koordiniran z več različnimi proteinazami. Proces sproščanja tiroksina je uravnan z aktivnostjo proteinaz v foliklih. Lizosomski encimi niso obstojni v nevtralnem pH (Turk, V. in sod., 2012) in se njihova aktivnost izven celic niža, dokler ni potrebe za dvig aktivnosti. Takrat povišan nivo TSH preko spremembe N-glikozilacije inducira sekrecijo lizosomskih encimov iz celic v lumen foliklov.

Za boljše razumevanje sproščanja lizosomskih encimov iz celice, je potrebnih še več raziskav. Zelo verjetno je, da obstajajo prenosni proteini, ki pa še niso bili odkriti.

6 Zaključki

V sklopu doktorskega dela, kjer smo preučevali vpliv N-glikozilacije na delovanje plazemske glutamat karboksipeptidaze v sistemu zunajceličnega procesiranja prohormona tiroglobulina smo ugotovili:

- Katepsin C in PGCP delujeta zunajcelično na tiroglobulin in sodelujeta pri sproščanju tiroksina *in vivo* ter v celični kulturi FRTL-5.
- Katepsin C katalizira hidrolizo N-terminalnega dela prašičjega tiroglobulina in odceplja največ 12 aminokislin, med drugim tudi dipeptid s tiroksinom na mestu 5.
- Encima katepsin C in PGCP se iz FRTL-5 celic izločata po različnih sekretornih veziklih pod vplivom TSH, inzulina in somatostatina.
- TSH, inzulin in/ali somatostatin prisotni v gojišču vplivajo na izražanje N-acetilglukozaminil transferaze I.
- Hormon tiroksin nima vpliva na aktivnost rekombinantnega PGCP ali rekombinantnega katepsina C.
- Rekombinanti PGCP ne cepi dipeptidnega nevrottransmitterja karnozina.

7 Zahvale

Največja zahvala gre vsekakor mojemu mentorju **dr. Iztoku Dolencu**, ki me je sprejel za svojega in mi tako omogočil raziskovanje na Institutu Jožef Stefan. Brez njega bi bila moja raziskovalna pot mnogo težja, najverjetneje pa tudi popolnoma drugačna. Zahvaljujem se mu za dobro sodelovanje, strokovno pomoč, kritičen pregled in tehtne predloge pri izdelavi doktorske disertacije.

Velika zahvala gre tudi fakultetnemu mentorju, akademiku, **prof. dr. Vitu Turku** za njegov osebni pristop, prijazen odziv ter za spodbudne besede. Zahvaljujem se mu tudi za strokovne napotke, pomoč pri pripravi predstavitev in teoretične nasvete pri raziskavah ter strokovno kritičen pregled izdanih člankov in doktorske naloge.

Še posebej gre zahvala tudi **prof. ddr. Borisu Turku**, predstojniku odseka Biokemije, Molekularne in Strukturne Biologije, za vse ponujene priložnosti v raziskovalnem delu. Zahvaljujem se mu tudi za kritične pripombe in strokovne diskusije.

Komisiji v sestavi **prof. ddr. Boris Turk**, **prof. dr. Hrvoje Petković**, **prof. dr. Veronika Stoka** se zahvaljujem za potrpežljivost in kritičnost pri pregledu moje doktorske naloge.

Prof. dr. Rogerju Painu se zahvaljujem za njegov hiter pregled in kritične pripombe angleških besedil. Hvala tudi za pregled angleškega povzetka k doktorski disertaciji.

Za uvajanje v delo s celičnimi kulturami in tehnikami molekularne biologije ter neposredno sodelovanje se zahvaljujem tudi **Tajani Zajc**. Zahvaljujem se ji tudi za ekspresijo rekombinantnega katepsina C in plazemske glutamat karboksipeptidaze. Zahvaljujem se tudi **dr. Mihi Renku** za pripravo prašičjega tiroglobulina. Hvala **Georgiju Mikhailovu** s katerimi sem sodeloval in mi je bil v veliko pomoč pri pripravi imunohistoloških rezin ščitnice in **Ani Miklavžin** za pomoč pri pripravi konstruktov. Skupaj smo reševali marsikatero metodološke in tehnične zagate ter imeli kvalitetne diskusije o tem.

Hvala vsem sodelavcem, ki so s svojim znanjem in izkušnjami kakorkoli pomagali pri izvedbi eksperimentalnega dela. Še posebej hvala **Vidi** in **Mojci**, za nesebično pomoč, s svojimi konstruktivnimi komentarji in prijetne trenutke, ki smo jih preživeli skupaj.

In nenazadnje, hvala moji družini - vama, mama **Vera** in tata **Rado**, ker sta verjela vame in me spodbujala ter vsem ostalim za ljubezen in podporo. Iskrena hvala tudi **Alešu**, za vso pomoč, za razumevanje ter za številne lepe trenutke, ki so razbremenili in prevetrili moje misli.

Tata, hvala ti. Vedi, da te pogrešam in v srcu te vedno nosim s seboj.

8 Literatura in viri

- Akioka, M.; Nakano, H.; Horikiri, A.; Tsujimoto, Y.; Matsui, H.; Shimizu, T.; Nakatsu, T.; Kato, H.; Watanabe, K. Overexpression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a proline-specific aminopeptidase from *Aneurinibacillus sp* strain AM-1. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications* **62**, 1266–268 (2006).
- Allende, L. M.; García-Pérez, M. A.; Moreno, A.; Corell, A.; Carasol, M.; Martínez-Canut, P.; Arnaiz-Villena, A. Cathepsin C gene: First compound heterozygous patient with Papillon-Lefèvre syndrome and a novel symptomless mutation. *Human Mutation* **17**, 152–153 (2001).
- Almog, O.; Greenblatt, H. M.; Spungin, A.; Benmeir, D.; Blumberg, S.; Shoham, G. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of *Streptomyces griseus* aminopeptidase. *Journal of Molecular Biology* **230**, 342–344 (1993).
- Altmann, F.; Staudacher, E.; Wilson, I. B. H.; Marz, L. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconjugate Journal* **16**, 109–123 (1999).
- Ambesi Impiombato, F. S.; Parks, L. A. M.; Coon, H. G. Culture of hormone-dependent functional epithelial-cells from rat thyroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 3455–3459 (1980).
- Ambesi Impiombato, F. S.; Villone, G. The FRTL-5 thyroid-cell strain as a model for studies on thyroid cell-growth. *Acta Endocrinologica* **115**, 242–245 (1987).
- Anastasi, A.; Brown, M. A.; Kembhavi, A. A.; Nicklin, M. J. H.; Sayers, C. A.; Sunter, D. C.; Barrett, A. J. Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases - improved purification from egg-white, characterization, and detection in chicken serum. *Biochemical Journal* **211**, 129–138 (1983).
- Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochimica et Biophysica Acta* **1473**, 4–8 (1999).
- Aronson, N. N.; Barrett, A. J. Specificity of cathepsin-B - hydrolysis of glucagon at C-terminus by a peptidyl-dipeptidase mechanism. *Biochemical Journal* **171**, 759–765 (1978).

- Balasubramaniam, K.; Deiss Jr, W. P. Characteristics of thyroid lysosomal cathepsin. *Biochimica et Biophysica Acta* **110**, 564–575 (1965).
- Barrett, A. J.; Kembhavi, A. A.; Brown, M. A.; Kirschke, H.; Knight, C. G.; Tamai, M.; Hanada, K. L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogs as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochemical Journal* **201**, 189–198 (1982).
- Baudry, N.; Lejeune, P.-J.; Niccoli, P.; Vinet, L.; Carayon, P.; Mallet, B. Dityrosine bridge formation and thyroid hormone synthesis are tightly linked and are both dependent on N-glycans. *FEBS Letters* **396**, 223–226 (1996).
- Bethesda, M. D. The NCBI handbook; National Library of Medicine (US). National Center for Biotechnology Information
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_057218.1 (dostop: junij 2011).
- Bidey, S. P.; Chiovato, L.; Day, A.; Turmaine, M.; Gould, R. P.; Ekins, R. P.; Marshall, N. J. Evaluation of the rat-thyroid cell strain FRTL-5 as an *in vitro* bioassay system for thyrotropin. *Journal of Endocrinology* **101**, 269–276 (1984).
- Bikandi, J.; San Millán, R.; Rementeria, A.; Garaizar, J. *In silico* analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR, and endonuclease restriction. *Bioinformatics* **22**, 798–799 (2004).
- Blom, N.; Sicheritz-Ponten, T.; Gupta, R.; Gammeltoft, S.; Brunak, S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**, 1633–1649 (2004).
- Bolton, E.; Wang, Y.; Thiessen, P. A.; S.H., B. (ur.). *Annual Reports in Computational Chemistry PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities* (American Chemical Society, Washington, DC, 2008).
- Bondebjerg, J.; Fuglsang, H.; Valeur, K. R.; Kaznelson, D. W.; Hansen, J. A.; Pedersen, R. O.; Krogh, B. O.; Jensen, B. S.; Lauritzen, C.; Petersen, G.; Pedersen, J.; Naerum, L. Novel semicarbazide-derived inhibitors of human dipeptidyl peptidase I (hDPPI). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**, 4408–4424 (2005).
- Braulke, T.; Bonifacino, J. S. Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **1793**, 605–614 (2009).
- Braverman, L. E.; Ingbar, S. H.; Sterling, K. Conversion of thyroxine (T4) to triiodothyronine (T3) in athyreotic human subjects. *Journal of Clinical Investigation* **49**, 855–864 (1970).

- Brix, K.; Herzog, V. Extrathyroidal release of thyroid-hormones from thyroglobulin by J774 mouse macrophages. *Journal of Clinical Investigation* **93**, 1388–1396 (1994).
- Brix, K.; Lemansky, P.; Herzog, V. Evidence for extracellularly acting cathepsins mediating thyroid hormone liberation in thyroid epithelial cells. *Endocrinology* **137**, 1963–1974 (1996).
- Brix, K.; Linke, M.; Tepel, C.; Herzog, V. Cysteine proteinases mediate extracellular prohormone processing in the thyroid. *Biological Chemistry* **382**, 717–725 (2001).
- Brunner, Y.; Schwartz, D.; Coute, Y.; Sanchez, J. C. Proteomics of regulated secretory organelles. *Mass Spectrometry Reviews* **28**, 844–867 (2009).
- Burley, S. K.; David, P. R.; Lipscomb, W. N. Leucine aminopeptidase - bestatin inhibition and a model for enzyme-catalyzed peptide hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 6916–6920 (1991).
- Chanoine, J. P.; Stein, G. S.; Braverman, L. E.; Shalhoub, V.; Lian, J. B.; Huber, C. A.; Devito, W. J. Acidic fibroblast growth-factor modulates gene-expression in the rat-thyroid *in vivo*. *Journal of Cellular Biochemistry* **50**, 392–399 (1992).
- Chevrier, B.; Dorchymont, H.; Schalk, C.; Tarnus, C.; Moras, D. The structure of the *Aeromonas proteolytica* aminopeptidase complexed with a hydroxamate inhibitor - Involvement in catalysis of Glu151 and two zinc ions of the co-catalytic unit. *European Journal of Biochemistry* **237**, 393–398 (1996).
- Chevrier, B.; Schalk, C.; Dorchymont, H.; Rondeau, J. M.; Tarnus, C.; Moras, D. Crystal-structure of *Aeromonas proteolytica* aminopeptidase - a prototypical member of the co-catalytic zinc enzyme family. *Structure* **2**, 283–291 (1994).
- Chwieralski, C.; Welte, T.; Bühling, F. Cathepsin-regulated apoptosis. *Apoptosis* **11**, 143–149 (2006).
- Cigič, B.; Krizaj, I.; Kralj, B.; Turk, V.; Pain, R. H. Stoichiometry and heterogeneity of the pro-region chain in tetrameric human cathepsin C. *Biochimica et Biophysica Acta* **1382**, 143–150 (1998).
- Cody, V. Thyroglobulin and thyroid hormone synthesis. *Endocrine Research* **10**, 73–88 (1984).
- D'Angelo, M. E.; Bird, P. I.; Peters, C.; Reinheckel, T.; Trapani, J. A.; Sutton, V. R. Cathepsin H is an additional convertase of pro-granzyme B. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 20514–20519 (2010).

- Dahl, S. W.; Halkier, T.; Lauritzen, C.; Dolenc, I.; Pedersen, J.; Turk, V.; Turk, B. Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry* **40**, 1671–1678 (2001).
- Dahms, N. M.; Olson, L. J.; Kim, J. J. P. Strategies for carbohydrate recognition by the mannose 6-phosphate receptors. *Glycobiology* **18**, 664–678 (2008).
- Davis, M. I.; Bennett, M. J.; Thomas, L. M.; Bjorkman, P. J. Crystal structure of prostate-specific membrane antigen, a tumor marker and peptidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5981–5986 (2005).
- Dedieu, A.; Gaillard, J. C.; Pourcher, T.; Darrouzet, E.; Armengaud, J. Revisiting iodination sites in thyroglobulin with an organ-oriented shotgun strategy. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 259–269 (2011).
- Della Fazia, M. A.; Piobbico, D.; Bartoli, D.; Castelli, M.; Brancorsini, S.; Magni, M. V.; Servillo, G. Lal-1: a differentially expressed novel gene during proliferation in liver regeneration and in hepatoma cells. *Genes to Cells* **7**, 1183–1190 (2002).
- Di Lauro, R.; Obici, S.; Condliffe, D. The sequence of 967 amino acids at the carboxyl-end of rat thyroglobulin. Location and surroundings of two thyroxine-forming sites. *European Journal of Biochemistry* **148**, 7–11 (1985).
- Dolenc, I.; Mihelic, M. Purification and primary structure determination of human lysosomal dipeptidase. *Biological Chemistry* **384**, 317–320 (2003).
- Dolenc, I.; Pain, R.; Turk, V. Presence of the propeptide on recombinant lysosomal dipeptidase controls both activation and dimerization. *Biological Chemistry* **388**, 47–51 (2007).
- Dolenc, I.; Turk, B.; Kos, J.; Turk, V. Interaction of human cathepsin C with chicken cystatin. *FEBS Letters* **392**, 277–280 (1996).
- Dolenc, I.; Turk, B.; Pungercic, G.; Ritonja, A.; Turk, V. Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 21626–21631 (1995).
- Dunn, A. D.; Corsi, C. M.; Myers, H. E.; Dunn, J. T. Tyrosine 130 is an important outer ring donor for thyroxine formation in thyroglobulin. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 25223–25229 (1998).
- Dunn, A. D.; Crutchfield, H. E.; Dunn, J. T. Proteolytic processing of thyroglobulin by

- extracts of thyroid lysosomes. *Endocrinology* **128**, 3073–3080 (1991a).
- Dunn, A. D.; Crutchfield, H. E.; Dunn, J. T. Thyroglobulin processing by thyroidal proteases - major sites of cleavage by cathepsin-B, cathepsin-D, and cathepsin-L. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 20198–20204 (1991b).
- Dunn, A. D.; Dunn, J. T. Thyroglobulin degradation by thyroidal proteases: Action of thiol endopeptidases *in vitro*. *Endocrinology* **111**, 290–298 (1982).
- Dunn, A. D.; Dunn, J. T. Thiol thyroglobulin hydrolase (TGH) and cathepsin-B (CB) attack different regions of the thyroglobulin molecule. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **65**, 1079–1079 (1987).
- Dunn, A. D.; Myers, H. E.; Dunn, J. T. The combined action of two thyroidal proteases releases T4 from the dominant hormone-forming site of thyroglobulin. *Endocrinology* **137**, 3279–3285 (1996).
- Edelhoch, H. The properties of thyroglobulin. I. The effects of alkali. *The Journal of biological chemistry* **235**, 1326–1334 (1960).
- Elbashir, S. M.; Martinez, J.; Patkaniowska, A.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo Journal* **20**, 6877–6888 (2001).
- Fenouillet, E.; Fayet, G.; Hovsepian, S. Immunochemical evidence for a role of complex carbohydrate chains in thyroglobulin antigenicity. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 15153–15158 (1986).
- Friedrichs, B.; Tepel, C.; Reinheckel, T.; Deussing, J.; von Figura, K.; Herzog, V.; Peters, C.; Saftig, P.; Brix, K. Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *Journal of Clinical Investigation* **111**, 1733–1745 (2003).
- Gavel, Y.; Vonheijne, G. Sequence differences between glycosylated and nonglycosylated Asn-X-Thr ser acceptor sites - implications for protein engineering. *Protein Engineering* **3**, 433–442 (1990).
- Gingras, R.; Richard, C.; El-Alfy, M.; Morales, C. R.; Potier, M.; Pshezhetsky, A. V. Purification, cDNA cloning, and expression of a new human blood plasma glutamate carboxypeptidase homologous to N-acetyl-aspartyl-alpha-glutamate carboxypeptidase/prostate-specific membrane antigen. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 11742–11750 (1999).
- Giraud, A.; Chabaud, O.; Lejeune, P. J.; Barbaria, J.; Mallet, B. The plasminogen-like molecule apically secreted by epithelial thyroid cells is sulfated. *Biochemical and*

- Biophysical Research Communications* **346**, 746–750 (2006).
- Giraud, A.; Dicristofaro, J.; De Micco, C.; Lejeune, P. J.; Barbaria, J.; Mallet, B. A plasminogen-like protein, present in the apical extracellular environment of thyroid epithelial cells, degrades thyroglobulin *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 1000–1004 (2005).
- Giraud, A.; Lejeune, P. J.; Barbaria, J.; Mallet, B. A plasminogen-like protease in thyroid rough microsomes degrades thyroperoxidase and thyroglobulin. *Endocrinology* **148**, 2886–2893 (2007).
- Goldberg, D. E.; Kornfeld, S. The phosphorylation of beta-glucuronidase oligosaccharides in mouse P388D1 cells. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 3060–3067 (1981).
- Gorter, J.; Gruber, M. Cathepsin C - an allosteric enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* **198**, 546–555 (1970).
- Green, G. D. J.; Shaw, E. Peptidyl diazomethyl ketones are specific inactivators of thiol proteinases. *Journal of Biological Chemistry* **256**, 1923–1928 (1981).
- Guo, H. B.; Lee, I.; Kamar, M.; Pierce, M. N-acetylglucosaminyltransferase V expression levels regulate cadherin-associated homotypic cell-cell adhesion and intracellular signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 52412–52424 (2003).
- Gutman, H. R.; Fruton, J. S. On the proteolytic enzymes of animal tissues; an intracellular enzyme related to chymotrypsin. *Journal of Biological Chemistry* **174**, 851–858 (1948).
- Hamilton, S. R.; Davidson, R. C.; Sethuraman, N.; Nett, J. H.; Jiang, Y.; Rios, S.; Bobrowicz, P.; Stadheim, T. A.; Li, H.; Choi, B. K.; Hopkins, D.; Wischnewski, H.; Roser, J.; Mitchell, T.; Strawbridge, R. R.; Hoopes, J.; Wildt, S.; Gerngross, T. U. Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science* **313**, 1441–1443 (2006).
- Han, B.; Li, C. X.; Zhang, L.; Fang, Y.; Feng, M.; Li, J. K. Novel royal jelly proteins identified by gel-based and gel-free proteomics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 10346–10355 (2011).
- Hanada, K.; Tamai, M.; Yamagishi, M.; Ohmura, S.; Sawada, J.; Tanaka, I. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry* **42**, 523–528 (1978).
- Hart, T. C.; Hart, P. S.; Michalec, M. D.; Zhang, Y.; Firatli, E.; Van Dyke, T. E.;

- Stabholz, A.; Zlorogorski, A.; Shapira, L.; Soskolne, W. A. Haim-Munk syndrome and Papillon-Lefevre syndrome are allelic mutations in cathepsin C. *Journal of Medical Genetics* **37**, 88–94 (2000a).
- Hart, T. C.; Hart, P. S.; Michalec, M. D.; Zhang, Y.; Marazita, M. L.; Cooper, M.; Yassin, O. M.; Nusier, M.; Walker, S. Localisation of a gene for prepubertal periodontitis to chromosome 11q14 and identification of a cathepsin C gene mutation. *Journal of Medical Genetics* **37**, 95–101 (2000b).
- Hartley, M.; Bennett, B. Heterologous expression and purification of *Vibrio proteolyticus* (*Aeromonas proteolytica*) aminopeptidase: A rapid protocol. *Protein Expression and Purification* **66**, 91–101 (2009).
- Helenius, A.; Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364–2369 (2001).
- Herzog, V.; Berndorfer, U.; Saber, Y. Isolation of insoluble secretory product from bovine thyroid - extracellular storage of thyroglobulin in covalently cross-linked form. *Journal of Cell Biology* **118**, 1071–1083 (1992).
- Heston, W. D. W. Characterization and glutamyl preferring carboxypeptidase function of prostate specific membrane antigen: A novel folate hydrolase. *Urology* **49**, 104–112 (1997).
- Hiwasa, T.; Yokoyama, S.; Ha, J. M.; Noguchi, S.; Sakiyama, S. C-HA-RAS gene-products are potent inhibitors of cathepsin-B and cathepsin-L. *FEBS Letters* **211**, 23–26 (1987).
- Hoshino, T.; Ui, N. Comparative studies on the properties of thyroglobulins from various animal species. *Endocrinologia Japonica* **17**, 521–533 (1970).
- Hounsell, E. F.; Davies, M. J.; Renouf, D. V. O-linked protein glycosylation structure and function. *Glycoconjugate Journal* **13**, 19–26 (1996).
- Ieiri, T. Thyroglobulin (Tg) gene and familial Tg synthesis defect. *Nippon rinsho Japanese journal of clinical medicine* **52**, 869–874 (1994).
- Ioffe, E.; Stanley, P. Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase-I activity die at midgestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 728–732 (1994).
- Ishidoh, K.; Kominami, E. Processing and Activation of Lysosomal Proteinases. *Biological Chemistry* **383**, 1827–1831 (2002).

- Jackson, P. F.; Cole, D. C.; Slusher, B. S.; Stetz, S. L.; Ross, L. E.; Donzanti, B. A.; Trainor, D. A. Design, synthesis, and biological activity of a potent inhibitor of the neuropeptidase N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase. *Journal of Medicinal Chemistry* **39**, 619–622 (1996).
- Jenkins, N.; Parekh, R. B.; James, D. C. Getting the glycosylation right: Implications for the biotechnology industry. *Nature Biotechnology* **14**, 975–981 (1996).
- Jordans, S.; Jenko-Kokalj, S.; Kuhl, N. M.; Tedelind, S.; Sendt, W.; Bromme, D.; Turk, D.; Brix, K. Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions. *BMC Biochemistry* **10**, 23 (2009).
- Joshua-Tor, L.; Xu, H. E.; Johnston, S. A.; Rees, D. C. Crystal-structure of a conserved protease that binds DNA - the bleomycin hydrolase, GAL6. *Science* **269**, 945–950 (1995).
- Kam, C. M.; Gotz, M. G.; Koot, G.; McGuire, M.; Thiele, D.; Hudig, D.; Powers, J. C. Design and evaluation of inhibitors for dipeptidyl peptidase I (Cathepsin C). *Archives of Biochemistry and Biophysics* **427**, 123–134 (2004).
- Kasturi, L.; Chen, H. G.; ShakinEshleman, S. H. Regulation of N-linked core glycosylation: Use of a site-directed mutagenesis approach to identify Asn-Xaa-Ser/Thr sequons that are poor oligosaccharide acceptors. *Biochemical Journal* **323**, 415–419 (1997).
- Kasturi, L.; Eshleman, J. R.; Wunner, W. H.; Shakineshleman, S. H. The hydroxy amino acid in an Asn-X-Ser/Thr sequon can influence N-linked core glycosylation efficiency and the level of expression of a cell-surface glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 14756–14761 (1995).
- Kim, T.; Gondre-Lewis, M. C.; Arnaoutova, I.; Loh, Y. P. Dense-core secretory granule biogenesis. *Physiology* **21**, 124–133 (2006).
- Klemencic, I.; Carmona, A. K.; Cezari, M. H. S.; Juliano, M. A.; Juliano, L.; Guncar, G.; Turk, D.; Krizaj, I.; Turk, V.; Turk, B. Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. *European Journal of Biochemistry* **267**, 5404–5412 (2000).
- Koga, H.; Mori, N.; Yamada, H.; Nishimura, Y.; Tokuda, K.; Kato, K.; Imoto, T. Endopeptidase and aminopeptidase activities of rat cathepsin-H. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **40**, 965–970 (1992).

- Lambert, L. A.; Mitchell, S. L. Molecular evolution of the transferrin receptor/glutamate carboxypeptidase II family. *Journal of Molecular Evolution* **64**, 113–128 (2007).
- Lau, K. S.; Partridge, E. A.; Grigorian, A.; Silvescu, C. I.; Reinhold, V. N.; Demetriou, M.; Dennis, J. W. Complex N-glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell* **129**, 123–134 (2007).
- Lawrence, C. M.; Ray, S.; Babyonyshev, M.; Galluser, R.; Borhani, D. W.; Harrison, S. C. Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. *Science* **286**, 779–782 (1999).
- Lazzarino, D. A.; Gabel, C. A. Mannose processing is an important determinant in the assembly of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 5015–5023 (1989).
- Lemansky, P.; Brix, K.; Herzog, V. Iodination of mature cathepsin D in thyrocytes as an indicator for its transport to the cell surface. *European Journal of Cell Biology* **76**, 53–62 (1998).
- Linke, M.; Herzog, V.; Brix, K. Trafficking of lysosomal cathepsin B-green fluorescent protein to the surface of thyroid epithelial cells involves the endosomal/lysosomal compartment. *Journal of Cell Science* **115**, 4877–4889 (2002a).
- Linke, M.; Jordans, S.; Mach, L.; Herzog, V.; Brix, K. Thyroid stimulating hormone upregulates secretion of cathepsin B from thyroid epithelial cells. *Biological Chemistry* **383**, 773–784 (2002b).
- Lisi, S.; Marino, M.; Pinchera, A.; Mazzi, B.; Di Cosmo, C.; Sellari-Franceschini, S.; Chiovato, L. Thyroglobulin in orbital tissues from patients with thyroid-associated ophthalmopathy: Predominant localization in fibroadipose tissue. *Thyroid* **12**, 351–360 (2002).
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, L. S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. (ur.). *Golgi and Post-Golgi Protein Sorting and Proteolytic Processing Molecular Cell Biology (4th edition)* (W. H. Freeman, New York, 2000).
- Lowe, J.; Stock, D.; Jap, R.; Zwickl, P.; Baumeister, W.; Huber, R. Crystal-structure of the 20s proteasome from the *Archaeon acidophilum* at 3.4-Angstrom resolution. *Science* **268**, 533–539 (1995).
- Luthi-Carter, R.; Barczak, A. K.; Speno, H.; Coyle, J. T. Molecular characterization of human brain N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase (NAALADase). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **286**, 1020–1025 (1998).

- Maher, B. H.; Griffiths, L. R. Identification of molecular genetic factors that influence migraine. *Molecular Genetics and Genomics* **285**, 433–446 (2011).
- Mallet, B.; Lejeune, P. J.; Baudry, N.; Niccoli, P.; Carayon, P.; Franc, J. L. N-glycans modulate *in vivo* and *in vitro* thyroid hormone synthesis: Study at the N-terminal domain of thyroglobulin. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 29881–29888 (1995).
- Malthiéry, Y.; Lissitzky, S. Sequence of the 5'-end quarter of the human-thyroglobulin messenger ribonucleic acid and of its deduced amino-acid sequence. *European Journal of Biochemistry* **147**, 53–58 (1985).
- Marriq, C.; Rolland, M.; Lissitzky, S. Polypeptide chains of 19-S thyroglobulin from several mammalian species and of porcine 27-S iodoprotein. *European Journal of Biochemistry* **79**, 143–149 (1977).
- Mason, R. W.; Gal, S.; Gottesman, M. M. The identification of the major excreted protein (MEP) from a transformed mouse fibroblast cell-line as a catalytically active precursor form of cathepsin-L. *Biochemical Journal* **248**, 449–454 (1987).
- McDonald, J. K.; Reilly, T. J.; Zeitman, B. B.; Ellis, S. Cathepsin C: a chloride-requiring enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **8**, 771–775 (1966).
- McDonald, J. K.; Reilly, T. J.; Zeitman, B. B.; Ellis, S. Dipeptidyl Arylamidase II of the Pituitary. *Journal of Biological Chemistry* **243**, 2028–2037 (1968).
- McDonald, J. K.; Schwabe, C. *Proteinases in mammalian cells and tissues: Intracellular exopeptidases*. Barrett, A. J. (ur.). (Elsevier, Amsterdam, NL, 1977).
- McDonald, J. K.; Zeitman, B. B.; Ellis, S. Detection of a lysosomal carboxypeptidase and a lysosomal dipeptidase in highly-purified dipeptidyl aminopeptidase-I (cathepsin-C) and elimination of their activities from preparations used to sequence peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **46**, 62–70 (1972).
- McDonald, J. K.; Zeitman, B. B.; Reilly, T. J.; Ellis, S. New observations on the substrate specificity of cathepsin C (dipeptidyl aminopeptidase I). Including the degradation of beta-corticotropin and other peptide hormones. *Journal of Biological Chemistry* **244**, 2693–2709 (1969).
- McGowan, E. B.; Becker, E.; Detwiler, T. C. Inhibition of calpain in intact platelets by the thiol protease inhibitor E-64d. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **158**, 432–435 (1989).
- McGuire, M. J.; Lipsky, P. E.; Thiele, D. L. Purification and characterization of Dipeptidyl peptidase-I from human spleen. *Archives of Biochemistry and Biophysics*

- 295**, 280-288 (1992).
- Metaye, T.; Kraimps, J. L.; Goujon, J. M.; Fernandez, B.; Quellard, N.; Ingrand, P.; Barbier, J.; Begon, F. Expression, localization, and thyrotropin regulation of cathepsin D in human thyroid tissues. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **82**, 3383–3388 (1997).
- Metzler, M.; Gertz, A.; Sarkar, M.; Schachter, H.; Schrader, J. W.; Marth, J. D. Complex asparagine-linked oligosaccharides are required for morphogenic events during postimplantation development. *Embo Journal* **13**, 2056–2065 (1994).
- Nagler, D. K.; Zhang, R. L.; Tam, W.; Sulea, T.; Purisima, E. O.; Menard, R. Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry* **38**, 12648–12654 (1999).
- Nilsson, I.; von Heijne, G. Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 17338–17343 (2000).
- Nirasawa, S.; Nakajima, Y.; Zhang, Z. Z.; Yoshida, M.; Hayashi, K. Intramolecular chaperone and inhibitor activities of a propeptide from a bacterial zinc aminopeptidase. *Biochemical Journal* **341**, 25–31 (1999).
- Nishimura, Y.; Kato, K. Intracellular-transport and processing of lysosomal cathepsin-H. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **148**, 329–334 (1987).
- Ohmiya, Y.; Hayashi, H.; Kondo, T.; Kondo, Y. Location of dehydroalanine residues in the amino acid sequence of bovine thyroglobulin. Identification of 'donor' tyrosine sites for hormonogenesis in thyroglobulin. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 9066–9071 (1990).
- Ohtsubo, K.; Marth, J. D. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell* **126**, 855–867 (2006).
- Olsen, J. G.; Kadziola, A.; Lauritzen, C.; Pedersen, J.; Larsen, S.; Dahl, S. W. Tetrameric dipeptidyl peptidase I directs substrate specificity by use of the residual pro-part domain. *FEBS Letters* **506**, 201–206 (2001).
- Palumbo, G.; Gentile, F.; Condorelli, G. L.; Salvatore, G. The earliest site of iodination in thyroglobulin is residue number 5. *Journal of Biological Chemistry* **265**, 8887–8892 (1990).
- Palumbo, G.; Tecce, M. F.; Ambrosio, G. A nonincinerative rate-sensing method for the determination of iodine in iodoproteins. *Analytical Biochemistry* **123**, 183–189 (1982).

- Paris, A.; Strukelj, B.; Pungercar, J.; Renko, M.; Dolenc, I.; Turk, V. Molecular cloning and sequence analysis of human preprocathepsin C. *FEBS Letters* **369**, 326–330 (1995).
- Parodi, A. J. Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochemical Journal* **348**, 1–13 (2000).
- Pedersen, J.; Lauritzen, C.; Madsen, M. T.; Dahl, S. W. Removal of N-terminal polyhistidine tags from recombinant proteins using engineered aminopeptidases. *Protein Expression and Purification* **15**, 389–400 (1999).
- Pereira, P. J. B.; Bergner, A.; Macedo-Ribeiro, S.; Huber, R.; Matschiner, G.; Fritz, H.; Sommerhoff, C. P.; Bode, W. Human beta-tryptase is a ring-like tetramer with active sites facing a central pore. *Nature* **392**, 306–311 (1998).
- Pham, C. T.; Ley, T. J. Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 8627–8632 (1999).
- Pham, C. T. N.; Armstrong, R. J.; Zimonjic, D. B.; Popescu, N. C.; Payan, D. G.; Ley, T. J. Molecular cloning, chromosomal localization, and expression of murine dipeptidyl peptidase I. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 10695–10703 (1997).
- Phillips, I. D.; Black, E. G.; Sheppard, M. C.; Docherty, K. Thyrotropin, forskolin and ionomycin increase cathepsin-B messenger-RNA concentrations in rat-thyroid cells in culture. *Journal of Molecular Endocrinology* **2**, 207–212 (1989).
- Planta, R. J.; Gorter, J.; Gruber, M. The catalytic properties of cathepsin C. *Biochimica et Biophysica Acta* **89**, 511–519 (1964).
- Planta, R. J.; Gruber, M. A simple estimation of cathepsin C using a new chromogenic substrate. *Analytical Biochemistry* **5**, 360–362 (1963).
- Pshezhetsky, A. V.; Potier, M. Direct affinity purification and supramolecular organization of human lysosomal cathepsin A. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **313**, 64–70 (1994).
- Puzer, L.; Cotrin, S. S.; Cezari, M. H. S.; Hirata, I. Y.; Juliano, M. A.; Stefe, L.; Turk, D.; Turk, B.; Juliano, L.; Carmona, A. K. Recombinant human cathepsin X is a carboxymonopeptidase only: a comparison with cathepsins B and L. *Biological Chemistry* **386**, 1191–1195 (2005).
- Rawitch, A. B.; Pollock, H. G.; Yang, S. X. Thyroglobulin glycosylation: Location and

- nature of the N-linked oligosaccharide units in bovine thyroglobulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **300**, 271–279 (1993).
- Rawlings, N. D.; Barrett, A. J. Structure of membrane glutamate carboxypeptidase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1339**, 247–252 (1997).
- Rawlings, N. D.; Barrett, A. J.; Bateman, A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research* **38**, D227–D233 (2010).
- Reynaud, E. G.; Simpson, J. C. Navigating the secretory pathway - Conference on exocytosis membrane structure and dynamics. *Embo Reports* **3**, 828–833 (2002).
- Robinson, M. B.; Blakely, R. D.; Couto, R.; Coyle, J. T. Hydrolysis of the brain dipeptide N-acetyl-l-aspartyl-l-glutamate - identification and characterization of a novel N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase activity from rat-brain. *Journal of Biological Chemistry* **262**, 14498–14506 (1987).
- Roche, J.; Michel, R. *Advances in Protein Chemistry (Volume IV): Natural and artificial iodoproteins*. Anson, M. L.; Edsall, J. T. and Kenneth, B. (ur.). (Academic Press, New York, 1951).
- Rowan, A. D.; Mason, P.; Mach, L.; Mort, J. S. Rat procathepsin-B - proteolytic processing to the mature form invitro. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 15993–15999 (1992).
- Saxon, E.; Bertozzi, C. R. Chemical and biological strategies for engineering cell surface glycosylation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17**, 1–23 (2001).
- Seligman, P. A.; Schleicher, R. B.; Allen, R. H. Isolation and characterization of the transferrin receptor from human-placenta. *Journal of Biological Chemistry* **254**, 9943–9946 (1979).
- Shakin Eshleman, S. H.; Spitalnik, S. L.; Kasturi, L. The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 6363–6366 (1996).
- Smith, M. W.; Yue, Z. N.; Geiss, G. K.; Sadovnikova, N. Y.; Carter, V. S.; Boix, L.; Lazaro, C. A.; Rosenberg, G. B.; Bumgarner, R. E.; Fausto, N.; Bruix, J.; Katze, M. G. Identification of novel tumor markers in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer Research* **63**, 859–864 (2003).
- Sorimachi, K.; Ui, N. Comparison of the iodoamino acid distribution in thyroglobulins obtained from various animal species. *General and Comparative Endocrinology* **24**, 38–43 (1974).

- Spiess, E.; Bruning, A.; Gack, S.; Ulbricht, B.; Spring, H.; Trefz, G.; Ebert, T. Cathepsin-B activity in human lung-tumor cell-lines - ultrastructural-localization, pH sensitivity, and inhibitor status at the cellular-level. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **42**, 917–929 (1994).
- Spiro, M. J. Studies on the protein portion of thyroglobulin. Amino acid compositions and terminal amino acids of several thyroglobulins. *Journal of Biological Chemistry* **245**, 5820–5826 (1970).
- Stanley, P. Glycosylation engineering. *Glycobiology* **2**, 99–107 (1992).
- Starkey, P. M.; Fletcher, T. C.; Barrett, A. J. Evolution of alpha-2-macroglobulin - the purification and characterization of a protein homologous with human - macroglobulin from plaice (*Pleuronectes-platessa l*) plasma. *Biochemical Journal* **205**, 97–104 (1982).
- Suda, H.; Takita, T.; Aoyagi, T.; Umezawa, H. Structure of bestatin. *Journal of Antibiotics* **29**, 100–101 (1976).
- Sutton, V. R.; Waterhouse, N. J.; Browne, K. A.; Sedelies, K.; Ciccone, A.; Anthony, D.; Koskinen, A.; Mullbacher, A.; Trapani, J. A. Residual active granzyme B in cathepsin C-null lymphocytes is sufficient for perforin-dependent target cell apoptosis. *Journal of Cell Biology* **176**, 425–433 (2007).
- Tamai, M.; Matsumoto, K.; Omura, S.; Koyama, I.; Ozawa, Y.; Hanada, K. *In vitro* and *in vivo* inhibition of cysteine proteinases by EST, a new analog of E-64. *Journal of Pharmacobio-Dynamics* **9**, 672–677 (1986).
- Tarentino, A. L.; Gomez, C. M.; Plummer, T. H. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide - N-glycosidase-F. *Biochemistry* **24**, 4665–4671 (1985).
- Tarentino, A. L.; Maley, F. Purification and Properties of an endo- β -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces griseus*. *Journal of Biological Chemistry* **249**, 811–817 (1974).
- Tarutani, O.; Shulman, S. Properties of carbohydrate-stripped thyroglobulin: II. Heterogeneity in sialic acid content in thyroglobulin subfractions. *Biochimica et Biophysica Acta* **236**, 384–390 (1971).
- Taylor, M. E.; Drickamer, K. (ur.). *Introduction to Glycobiology* (Oxford University Press, Oxford; New York, 2006).
- Tepel, C.; Bromme, D.; Herzog, V.; Brix, K. Cathepsin K in thyroid epithelial cells:

- sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin. *Journal of Cell Science* **113**, 4487–4498 (2000).
- Toomes, C.; James, J.; Wood, A. J.; Wu, C. L.; McCormick, D.; Lench, N.; Hewitt, C.; Moynihan, L.; Roberts, E.; Woods, C. G.; Markham, A.; Wong, M.; Widmer, R.; Ghaffar, K. A.; Pemberton, M.; Hussein, I. R.; Temtamy, S. A.; Davies, R.; Read, A. P.; Sloan, P.; Dixon, M. J.; Thakker, N. S. Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nature Genetics* **23**, 421–424 (1999).
- Tran, T. V.; Ellis, K. A.; Kam, C. M.; Hudig, D.; Powers, J. C. Dipeptidyl peptidase I: Importance of proenzyme activation sequences, other dipeptide sequences, and the N-terminal amino group of synthetic substrates for enzyme activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **403**, 160–170 (2002).
- Turk, B.; Bieth, J. G.; Björk, I.; Dolenc, I.; Turk, D.; Cimerman, N.; Kos, J.; Čolič, A.; Stoka, V.; Turk, V. Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* **376**, 225–230 (1995).
- Turk, B.; Dolenc, I.; Lenarcic, B.; Krizaj, I.; Turk, V.; Bieth, J. G.; Bjork, I. Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity. *European Journal of Biochemistry* **259**, 926–932 (1999).
- Turk, B.; Dolenc, I.; Turk, V. *Handbook of Proteolytic Enzymes: Dipeptidyl-peptidase I*. Rawlings, N. D. and Woessner, J. F., Jr (ur.). (Academic Press, London, UK, 1998).
- Turk, B.; Stoka, V. Protease signalling in cell death: Caspases versus cysteine cathepsins. *FEBS Letters* **581**, 2761–2767 (2007).
- Turk, B.; Turk, D.; Salvesen, G. S. Regulating cysteine protease activity: Essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Current Pharmaceutical Design* **8**, 1623–1637 (2002).
- Turk, B.; Turk, D.; Turk, V. Lysosomal cysteine proteases: More than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta* **1477**, 98–111 (2000).
- Turk, B.; Turk, V.; Turk, D. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biological Chemistry* **378**, 141–150 (1997).
- Turk, B.; Dolenc, I.; Turk, V.; Bieth, J. G. Kinetics of the pH-induced inactivation of human cathepsin L. *Biochemistry* **32**, 375–380 (1993).

- Turk, D.; Janjic, V.; Stern, I.; Podobnik, M.; Lamba, D.; Dahl, S. W.; Lauritzen, C.; Pedersen, J.; Turk, V.; Turk, B. Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): Exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases. *Embo Journal* **20**, 6570–6582 (2001).
- Turk, V.; Bode, W. The cystatins: Protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Letters* **285**, 213–219 (1991).
- Turk, V.; Stoka, V.; Vasiljeva, O.; Renko, M.; Sun, T.; Turk, B.; Turk, D. Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta* **1824**, 68–88 (2012).
- Twining, S. S. Regulation of Proteolytic Activity in Tissues. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 315–383 (1994).
- Uchiyama, Y.; Watanabe, T.; Watanabe, M.; Ishii, Y.; Matsuba, H.; Waguri, S.; Kominami, E. Immunocytochemical localization of cathepsin-B, cathepsin-H, cathepsin-L, and T4 in follicular cells of rat-thyroid gland. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **37**, 691–696 (1989).
- Uhlen, M.; Oksvold, P.; Fagerberg, L.; Lundberg, E.; Jonasson, K.; Forsberg, M.; Zwahlen, M.; Kampf, C.; Wester, K.; Hober, S.; Wernerus, H.; Bjorling, L.; Ponten, F. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nature Biotechnology* **28**, 1248–1250 (2010).
- Ui, N. Neutral and amino sugar composition of thyroglobulin. Comparison of the compositions of different fractions of hog thyroglobulin and of thyroglobulins from various animal species. *Journal of Biochemistry* **74**, 593–599 (1973).
- Varki, A. Biological roles of oligosaccharides - all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97–130 (1993).
- Varki, A.; Kornfeld, S. The spectrum of anionic oligosaccharides released by "endo-beta-N-acetylglucosaminidase-H from glycoproteins - structural studies and interactions with the phosphomannosyl receptor. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 2808–2818 (1983).
- Vasiljeva, O.; Reinheckel, T.; Peters, C.; Turk, D.; Turk, V.; Turk, B. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Current Pharmaceutical Design* **13**, 385–401 (2007).
- Vasiljeva, O.; Turk, B. Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression: Apoptosis versus tumour invasion. *Biochimie* **90**, 380–386 (2008).

- Venkatesh, S. G.; Deshpande, V. A comparative review of the structure and biosynthesis of thyroglobulin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **122**, 13–20 (1999).
- Wang, H.; Perry, S. E. pGEM®-T Easy Vector System is an Easy Tool for Preparing Gel Shift Probes. Promega Corporation
<http://www.promega.com/hr/resources/articles/pubhub/enotes/pgemt-easy-vector-system-is-an-easy-tool-for-preparing-gel-shift-probes/> ((dostop: junij 2011).
- Wang, X. C.; Gu, J. G.; Ihara, H.; Miyoshi, E.; Honke, K.; Taniguchi, N. Core fucosylation regulates epidermal growth factor receptor-mediated intracellular signaling. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 2572–2577 (2006).
- Weiss, S. J.; Philp, N. J.; Grollman, E. F. Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid. *Endocrinology* **114**, 1090–1098 (1984).
- Wex, T.; Buhling, F.; Wex, H.; Gunther, D.; Malfertheiner, P.; Weber, E.; Bromme, D. Human cathepsin W, a cysteine protease predominantly expressed in NK cells, is mainly localized in the endoplasmic reticulum. *Journal of Immunology* **167**, 2172–2178 (2001).
- Wilkes, S. H.; Prescott, J. M. The slow, tight-binding of bestatin and amastatin to aminopeptidases. *Journal of Biological Chemistry* **260**, 3154–3162 (1985).
- Wolters, P. J.; Pham, C. T. N.; Muilenburg, D. J.; Ley, T. J.; Caughey, G. H. Dipeptidyl peptidase I is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 18551–18556 (2001).
- Xiao, S.; Pollock, H. G.; Taurog, A.; Rawitch, A. B. Characterization of hormonogenic sites in an N-terminal, cyanogen bromide fragment of human thyroglobulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **320**, 96–105 (1995).
- Yang, S. X.; Pollock, H. G.; Rawitch, A. B. Glycosylation in human thyroglobulin: Location of the N-linked oligosaccharide units and comparison with bovine thyroglobulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **327**, 61–70 (1996).
- Yip, B.; Chen, S. H.; Mulder, H.; Hoppener, J. W. M.; Schachter, H. Organization of the human beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I gene (MGAT1), which controls complex and hybrid N-glycan synthesis. *Biochemical Journal* **321**, 465–474 (1997).
- Yoko-O, T.; Wiggins, C. A. R.; Stolz, J.; Peak-Chew, S. Y.; Munro, S. An N-acetylglucosaminyltransferase of the Golgi apparatus of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* that can modify N-linked glycans. *Glycobiology* **13**, 581–589 (2003).

Zajc, T.; Suban, D.; Rajkovic, J.; Dolenc, I. Baculoviral expression and characterization of human recombinant PGCP in the form of an active mature dimer and an inactive precursor protein. *Protein Expression and Purification* **75**, 119–126 (2011).

Kazalo slik

Slika 1: <i>Shematski prikaz in histološki preparat ščitnice (Glandula thyroidea)</i> . A) Ščitnica se nahaja v vratu pod grlom. B) Histološki preparat prikazuje sloj ščitnice. Označene so celice ščitnice-tirociti in folikli, ki jih tvorijo (povzeto po: Shutterstock, 2011).	1
Slika 2: <i>Shematski prikaz polipeptidne verige tiroglobulina</i> . Prikazana so N-glikozilacijska mesta (Y), hormonegenska mesta akceptorjev (T4 in T3) in donorjev tirozinskih ostankov.	2
Slika 3: <i>Modelni prikaz ščitničnih hormonov tiroksina in trijodotironina</i> . Hormona se razlikujeta v številu jodov vezanih na molekulo. S sivo je označeno ogljikovodikovo ogrodje. Jod je označen z vijolično barvo (povzeto po: Bolton in sod., 2008).....	3
Slika 4: <i>Modelni prikaz prekrivanja eksopeptidaznih katepsinov na osnovi strukture katepsina L</i> . Na osnovi strukture katepsina L so dodane: zaporna zanka katepsina B, mini zanka katepsina X, mini veriga katepsina H in izključitvena domena katepsina C (povzeto po: Turk, D. in sod., 2001).....	7
Slika 5: <i>Kristalna struktura katepsina C</i> . Kristalna struktura prikazuje tetramerno obliko encima. Vsaka podenota je sestavljena iz papainu podobne domene in izključitvene domene. Označni so tudi strukturni sladkor, harpinska zanka in žepek aktivnega mesta (povzeto po: Turk, D. in sod., 2001).	9
Slika 6: <i>Shema plazemske glutamat karboksipeptidaze</i> . PGCP.....	11
Slika 7: <i>Shema kristalne strukture aktivnega mesta Aminopeptidaze Ap1</i> . Shema prikazuje aktivno mesto aminopeptidaze <i>Aeromonas proteolytica</i> (aminopeptidaza Ap1) (Chevrier in sod., 1996).	12
Slika 8: <i>Shematski prikaz sinteze in transporta proteinov</i> . Shema prikazuje možne transportne poti po celici. (povzeto po: Lodish in sod., 2000).	14
Slika 9: <i>Shematski prikaz N-glikozilacije</i> . Postopna tvorba različnih tipov glikanov (povzeto po Hamilton in sod. 2006).....	16
Slika 10: <i>Shematski prikaz četvernega in peternega mutanta v vektorju pGem-T-Easy</i> . Postopek priprave mutantov s pomočjo orodij molekularnega kloniranja.	27
Slika 11: <i>Priprava rekombinantnega proteina PGCP s fuzijskim proteinom</i> . A) PCR PGCP; B) Restrikcijaska analiza PGCP vstavljenega v vektor pGEM-T-Easy; C) Restrikcijaska analiza PGCP vstavljenega v vektor pDsRed-monomer-N1. Restrikcijaska analiza (3, 5) je bila opravljena s restrikcijaskima enimoma <i>XhoI</i> in <i>KpnI</i>	35

- Slika 12: *Potencialna mesta N-glikozilacije encima PGCP*. Z rdečo barvo so označeni asparaginski ostanki, ki tvorijo peptidno skupno zaporedje (Asn-Xaa-Ser/Thr) (označeno z modro), kjer obstaja več kot 50 odstotna verjetnost, da bi lahko prišlo do N-glikozilacije. Številke predstavljajo aminokislinske ostanke vključno s signalno sekvenco. Označena mesta so Asn61, Asn179, Asn353, Asn356 in Asn396. 36
- Slika 13: *Restriksijska analiza enojnih mutantov*. Restriksijska analiza enojnih deglikozilacijskih mutantov z restriktazama *XhoI* in *KpnI* na 0,8 % agaroznem gelu. Preverili smo vstavitve fragmenta v vektor. Zmes fragmentov DNK standardnih velikosti (stolpec 1), v stolpcih 2, 3, 4 in 5 so nanešeni zprodukti *XhoI* in *KpnI* rezanih klonov. Fragment velikosti približno 1500 bp je zaporedje cDNK PGCP, fragment pri približno 3000 bp je lineariziran vektor, v katerega je bil vstavljen fragment. Klon 4 predstavlja pravilno vstavljen gen. 37
- Slika 14: *Restriksijska analiza priprave četvernega mutantata*. Restriksijska analiza z restriktazama *XhoI* in *BglII* na 0,8 % agaroznem gelu. Rezan fragment 1) pGem-PGCP-N61A (1000 bp) smo ligirali z rezanim fragmentom 2) (pGem-PGCP-N3xA) (3500 bp). Na ta način smo dobili pGem-PGCP-N4xA. 38
- Slika 15: *Restriksijska analiza cDNK PGCP mutantov*. Restriksijska analiza deglikozilacijskih mutantov z restriktazama *XhoI* in *KpnI* na 0,8 % agaroznem gelu. Preverili smo prisotnost inserta okrog 1500 bp, ki predstavlja cDNK PGCP v vektorju pEGFP-N2 cDNK si sledijo po vrstnem redu 1) N61A; 2) N179A; 3) N353A; 4) N356A; 5) N396A 6) N353A/N356A; 7) N353/356/396A; 8) N61/353/356/396A; 9) N61/179/353/356/396A in 10) divji tip PGCP-GFP. 39
- Slika 16: *Transfekcija celic HEK 293 po 72-ih urah*. Transfekcija celic HEK 293, ki izražajo aktivno PGCP ter posamezne deglikozilacijske mutante, vse z zelenim fluorescenčnim fuzijskim proteinom po 72 urah rasti. Transficirane celice HEK 293 smo opazovali na fluorescenčnem mikroskopu Olympus XI in celice slikali s CCD kamero. A) Mutant N61A ; B) Mutant N179A; C) Mutant N353A; D) Mutant N356A; E) divji tip PGCP s GFP F) Mutant N396A; G) Mutant N3xA; H) Mutant N4xA; I) Mutant N5xA. Črtica predstavlja 10µm. 40
- Slika 17: *Imunološka detekcija prisotnosti deglikozilacijskih mutantov v celičnem lizatu HEK 293 celic*. Prisotnost fuzijskega proteina PGCP-GFP smo opazovali s protitelesi proti zelenemu fluorescenčnemu proteinu. 1) N61A; 2) N179A; 3) N353A; 4) N356A; 5) N396A; 6) petkratni mutant; 7) PGCP-GFP; 8) kontrola brez transfekcije. 41
- Slika 18: *Imunodetekcija transficiranih deglikozilacijskih mutantov PGCP v gojišču HEK 293 celic*. Prisotnost fuzijskega proteina PGCP-GFP smo opazovali s protitelesi proti zelenemu fluorescenčnemu proteinu. 1) kontrola brez transfekcije; 2) N61A; 3) N179A; 4) N353A; 5) N356A; 6) N396A; 7) petkratni mutant; 8) PGCP-GFP. 41
- Slika 19: *Imunodetekcija prehodno transficiranih deglikozilacijskih mutantov PGCP v celičnem lizatu in gojišču FRTL-5*: Transfekcija celic s posameznimi deglikozilacijskimi mutanti in detekcija PGCP z kunčjimi protitelesi proti človeškemu PGCP. 1) N61A; 2) N179A; 3) N353A; 4) N356A; 5) N396A; 6) petkratna mutacija; 7) PGCP-GFP; 8) kontrola brez transfekcije. (A) Slika predstavlja celični lizat. (B) Slika predstavlja proteine izločene v gojišče. 42

- Slika 20: *Superpozicija elucijskih kromatogramov rekombinantnega PGCP in proteinskih standardov za določevanje molekulske mase na koloni za gelsko kromatografijo Superdex-200.* Na kromatogramu je z odebeljeno črto označen eluiran PGCP, s črtkano črto so označeni standardni proteini (tiroglobulin 667 kDa, gamma globulin 158 kDa, ovalbumin 44 kDa, mioglobin 17 kDa in vitamin B12 1,35 kDa). Na sliki je prikazana logaritemska odvisnost elucije standardnih proteinov od njihove molekulske mase ter določena masa za PGCP.....43
- Slika 21: *NaDS-PAGE očiščenega rekombinantnega človeškega PGCP.* Stolpec 1, proteinski molekularni standardi; stolpec 2, zrela oblika PGCP z molekularno maso 55 kDa; stolpec 3, pro-PGCP z molekularno maso 60–65 kDa.....44
- Slika 22: *Vpliv koncentracije kloridnih ionov na aktivnost PGCP:* Stoplci označujejo različne koncentracije kloridnih ionov: 0 (brez), 20 mM, 50 mM, 100 mM in 200 mM NaCl v reagenčnem pufri.45
- Slika 23: *Aktivnost PGCP v prisotnosti inhibitorjev DTPA, EDTA, bestatin ter substanc karnozina in tiroksina.* Pri 0,1 mM koncentraciji DTPA aktivnost PGCP ni zmanjšana, pri 10x višji koncentraciji 1 mM DTPA in 0,25 mM EDTA pa se zniža aktivnost na nekaj odstotkov. Bestatin učinkovito inhibira PGCP pri koncentraciji 0,25 mM. Vpliva na aktivnost 0,25 mM karnozina in 10 μ M tiroksina nismo zaznali.45
- Slika 24: *N-terminalno aminokislinska zaporedja očiščenega PGCP.* Experimentalno določena zrela oblika encima izoliranega PGCP je podčrtana. Puščice označujejo cepitvena mesta na propeptidnem delu encima, ki tvorijo novonastale amino konce. Cepitve potečejo v gojišču po izražanju proteina v bakulovirusnem sistemu.46
- Slika 25: *Deglikozilacija rekombinantnega PGCP izražene v insektnih celicah.* Stolpec 1, standardni proteini za določevanje molekulske mase; stolpec 2, rekombinantni PGCP; stolpec 3, deglikozilacija z Endo H; stolpec 4, deglikozilacija s PNGazo F.46
- Slika 26: *Agarozna elektroforeza restrikcijske analize katepsina C s fuzijskima fluorescenčnima proteinoma.* V 1 stolpcu so nanešeni standardi. V 2 stolpcu je nanešen zligiran pEGFP-KatC (A) oziroma pDsRed-KatC (B). V tretjem pa vektorja rezana s restriktažama *Xho*I in *Kpn*I. Fragment okrog 1500 prikazuje cDNK človeškega katepsina C.47
- Slika 27: *Transfekcija celic FRTL-5 po 72-ih urah.* Transfekcija celic FRTL-5, ki izražajo aktivno PGCP ter posamezne deglikozilacijske mutante, vse z zelenim fluorescenčnim fuzijskim proteinom po 72 urah rasti. Transficirane celice FRTL-5 smo opazovali na fluorescenčnem mikroskopom Olympus XI in celice slikali s CCD kamero. A) mutant N61A ; B) mutant N179A; C) mutant N353A; D) mutant N356A; E) divji tip PGCP s GFP F) mutant N396A; G) mutant N3xA; H) mutant N4xA; I) petkratni mutant. Črtica predstavlja 10 μ m.....48

- Slika 28: *Kolokalizacijske študije transficiranega katepsina C s fluorescenčnim fuzijskim proteinom GFP in s PGCP*. V celicah, kjer je bila transfekcija uspešna, sta proteina kolokalizirana. A) Celična jedra označena z barvilom DAPI; B) Transficirane celice, ki izražajo katepsin C z zelenim fuzijskim proteinom. C) imunocitološko barvanje s protitelesi proti PGCP, ki so označena preko sekundarnih kozjih anti kunčjih protiteles konjugiranimi z Alexa Fluor 546 (emitira rdečo barvo); D) Združene slike A, B in C s pomočjo programa Imaging Software for Life Science Microscopy Cell (Olympus, Japonska). Črtica predstavlja 10 μm 49
- Slika 29: *Kolokalizacijske študije endogenega PGCP in endogenega katepsina C z označevalci PDI, Golgin 97 in LAMP2*. (A) PGCP (Alexa 488, zelena) in katepsin C (Alexa 546, rdeča) sta večinoma kolokalizirana, vendar ne popolnoma; (B) PGCP (Alexa 488, zelena) se nahaja v endoplazmatskem retikulumu, ki je označen s PDI (Alexa 546, rdeča); (C) v istih organelah se nahaja tudi katepsin C (Alexa 488, zelena); (D) PGCP (Alexa 488, zelena) je kolokaliziran z Golginom-97 (Alexa 546, rdeča); (E) tudi katepsin C (Alexa 488, zelena) je lokaliziran v Golgijevem aparatu, ki je označen z Golginom-97 (Alexa 546, rdeča); (F) PGCP (Alexa 488, zelena) se le redko nahaja v lizosomih, ki so označeni z LAMP2 (Alexa 546, rdeča); (G) tudi katepsin C (Alexa 488, zelena) in LAMP2 (Alexa 546, rdeča) sta le deloma kolokalizirana. Črtica predstavlja 10 μm 51
- Slika 30: *Lokalizacija endogeno izraženega PGCP in katepsina C v podganjih tirocitih v prisotnosti TSH, inzulina in somatostatina v gojišču ter tipa njune glikozilacije z uporabo Western blota in ustreznih protiteles*. Na vseh slikah je v stolpcu 1 netretiran protein, v stolpcu 2 je nanešen protein, ki smo ga obdelali z Endo H deglikozidaso, v stolpcu 3 je nanešen protein, ki smo ga obdelali s PNGazo F. (A) endogeno izraženi katepsin C v celičnem lizatu; (C) endogeno izraženi PGCP v celičnem lizatu; B) endogeno izraženi katepsin C izločen v gojišče celic, (D) endogeno izraženi PGCP izločen v gojišče celic. 52
- Slika 31: *Vpliv TSH, inzulina in somatostatina na izražanje N-acetilglukozaminil transferaze 1 v podganjih tirocitih*. Prisotnost TSH, inzulina in somatostatina v gojišču povzroči povišanje nivoja izražanja GnT1 v FRTL-5 celicah. 53
- Slika 32: *Vpliv prisotnosti TSH, inzulina in somatostatina na aktivnost endogeno izraženega katepsina C podganjih tirocitov v gojišču in celičnem lizatu*. Aktivnost katepsina C v gojišču in v celičnem lizatu smo merili s specifičnim fluorogenim substratom Gly-Phe-4M β NA v odsotnosti TSH, inzulina in somatostatina (3H), oz. v njihovi prisotnosti (6H). (A) aktivnost katepsina C v gojišču; (B) aktivnost katepsina C v celičnem lizatu. 54
- Slika 33: *Dipeptidazna aktivnost določena v gojišču FRTL-5 celic ob prisotnosti TSH, inzulina in somatostatina*. Dipeptidazna aktivnost je bila določena na substrat Ser-Met. Inhibicija dipeptidazne aktivnosti v prisotnosti 0,25 mM EDTA. 55
- Slika 34: *Postopna cepitev N-terminalnega dela prašičjega Tg s katepsinom C*. Pri cepitvi prašičjega Tg smo detektirali različna N-terminalna zaporedja. Najkrajši fragment je bil za 12 AK krajši od zrelega dela Tg. Tiroksinsko mesto Tyr5 je označeno s prvo črko Y. Najkrajši terminalni dela je označen s črkama RP. 55

- Slika 35: Časovna odvisnost sproščanja tiroksina pri *in vitro* cepitvi tiroglobulina s katepsinom C. Katepsin C sprošča tiroksin z N-terminalnega dela tiroglobulina. Detekcija tiroksina je bila narejena z uporabo ELISA diagnostičnega kita za prosti tiroksin. 56
- Slika 36: *In vitro* sproščanje tiroksina z N-terminalnega dela tiroglobulina. Čas reakcije cepitve je bil eno uro pri pH 7,2. Detekcija sproščenega tiroksina je bila narejena z uporabo ELISA diagnostičnega kita za prosti tiroksin. (1) Kontrola, vzorec Tg brez prisotnih encimov; (2) vzorec Tg v prisotnosti katepsina C; (3) vzorec Tg v prisotnosti katepsina C in PGCP; (4) vzorec Tg v prisotnosti katepsina C, PGCP ter inhibitorja cisteinskih proteinaz E-64d. 56
- Slika 37: *In vitro* cepitev tiroglobulina v prisotnosti katepsina C ter katepsina C in PGCP. Rdeča črtkana črta prikazuje necepljen tiroglobulin. Črna črta prikazuje tiroglobulin cepljen s katepsinom C, Modra črta prikazuje cepitev tiroglobulina s katepsinom C in PGCP. 57
- Slika 38: Sproščanje tiroksina iz tiroglobulina s proteinazami, ki se sprostijo iz podganjih tirocitov ter vpliv različnih inhibitorjev. Sproščanje tiroksina v gojišču FRTL-5 celic zaradi endogeno izraženih proteinaz smo spremljali z uporabo ELISA diagnostičnega kita za prosti tiroksin. Dodani inhibitorji v času meritev niso imeli učinka na proliferacijo celic. 59
- Slika 39: Utišanje izražanja gena PGCP. Na sliki lahko primerjamo izražanje PGCP v neutišani in utišani celici. Imunocitološko označevanje celice je bilo izvedeno z kunčjimi protitelesi proti človeškemu PGCP in konjugiranimi sekundarnimi protitelesi (Alexa Fluor 488). 59
- Slika 40: Krio imunohistološki preparat mišje ščitnice. PGCP je označen z zeleno barvo. Z modro so označena jedra. 60
- Slika 41: Krio imunohistološki preparat mišje ščitnice. Katepsin C je označen z zeleno. Z modro so označena jedra. 61
- Slika 42: Barvanje ščitnice s ABC tehniko. Z rjavo barvo so označena kunčja protitelesa proti PGCP. Iz slike vidimo, da je PGCP bolj zastopan v tirocitih, okrog ščitničnega folikla. 61
- Slika 43: Aktivno mesto katepsina C. Na osnovi objavljene strukture katepsina C (Turk, D. in sod., 2001) vidimo zelo globoko aktivno mesto S2, kamor se vsede stranska veriga N-terminalne aminokislinske substrata. 67
- Slika 44: Primerjava človeškega N-terminalnega dela tiroglobulina z zaporedji iz različnimi živalskih vrst. Predstavljenih je prvih 40 aminokislin z N-terminalnega dela tiroglobulina. Znak * označuje napovedano aminokislinsko sestavo. Znak □ označuje le znani del zaporedja. Vrste si sledijo: 1) Človek; 2) Navadni šimpanz; 3) Rhesus opica; 4) Dolgorepi makak; 5) Belolični gibbon; 6) Navadna marmozetka; 7) Divji prašič; 8) Domače govedo; 9) Hišna miš; 10) Siva podgana; 11) Domača Koza; 12) Domači pes; 13) Morski prašiček; 14) Afriški savanski slon; 15) Goli peskar; 16) Domača kokoš; 17) Brazilski kratkorepi oposum; 18) Divji kunec; 19) Želva rdečevratka 68

Kazalo preglednic

Preglednica 1: <i>Pregled katepsinov po družini in delovanju</i> . Poznamo 15 človeških katepsinov, od teh jih je 11 cisteinskih in po dve serinski in aspartatni. Večinoma imajo endopeptidazno aktivnost (Turk, V. in sod., 2012).....	7
Preglednica 2: <i>Načrtovani oligonukleotidi za pripravo PGCP brez ali s fuzijskim proteinom</i> . Preglednica prikazuje začetni oligonukleotid (PGCP-N1) in tri končne, ki se razlikujejo v stop kodonu (odebeljeno) in bralnem okvirju (odebeljeno in podčrtano) Poševno in podčrtano je označeno restriksijsko mesto za <i>XhoI</i> ali <i>KpnI</i>	24
Preglednica 3: <i>Načrtovani oligonukleotidi za pripravo katepsina C s fuzijskim proteinom</i> . V preglednici vidimo en začetni oligonukleotid (KC-N1) in dva končna oligonukleotida, ki se razlikujeta v bralnem okvirju (velike črke). Podčrtano je restriksijsko mesto za <i>XhoI</i> in <i>KpnI</i>	25
Preglednica 4: <i>Načrtovani oligonukleotidi za pripravo glikozilacijskih mutantov PGCP</i> . V prvem stolpcu je tako podano mutirano mesto cDNK proencima (številka), ker je asparagin (N) spremenjen v alanin (A). V drugem stolpcu pa so nanizani pari oligonukleotidov, ki so potrebni za pripravo mestno specifične mutacije. Z veliki črkami so označeni spremenjeni nukleotidi.....	25
Preglednica 5: <i>Program PCR za pripravo cDNK načrtovanih konstruktov</i> . Opisani so procesi, ki so potrebni pri namnoževanju dednine pri določenih temperaturah za določen čas v optimalnih ponovitvah (število ciklov). 1) Vrednosti za konstrukte PGCP. 2) Vrednosti za konstrukte katepsina C. 3) Vrednosti za pripravo mestno specifične mutageneze.....	26
Preglednica 6: <i>Načrtovani oligonukleotidi za pripravo shRNK</i> . V prvem stolpcu je podana označba naključno izbranih zaporedij RNK. V drugem stolpcu so značeni uporabljene pari za pripravo srvektorjev.....	28
Preglednica 7: <i>Pregled pripravljenih konstruktov deglikozilacijskih mutantov PGCP z zelenim fuzijskim proteinom</i> . Preglednica prikazuje pripravljene cDNK mutantov za transfekcijo v sesalske celice.....	37
Preglednica 8: <i>Učinkovitost čiščenja rekombinantnega PGCP</i> . Preglednica prikazuje učinkovitost postopka čiščenja. ^a Koncentracija proteina je bila določena z metodo po Bradfordu. ^b Encimska aktivnost je bila določena z dipeptidnim substratom, kot je navedeno. ^c Ena enota (U) je količina encima PGCP, ki katalizira razgradnjo 1 μ mol substrata Ser-Met na minuto.....	44
Preglednica 9: <i>Pregled pripravljenih fuzij katepsina C s fluorescenčnim proteinom</i> . Preglednica prikazuje pripravljene ekspresijske vektorje za transfekcijo v sesalske celice.....	47

Preglednica 10: *Vsebnosti joda v procesiranem in neprocesiranem tiroglobulinu s katepsinom C*. Aktivni katepsin C je cepil Tg in sproščal jod pri različnih pH-jih. V neprocesiranem in procesiranem Tg smo določali ostanek joda. Razlika med neprocesiranim in procesiranim Tg pomeni jod, ki se je sprostil z N-terminalnega dela molekule tiroglobulina. Vsebnosti prikazujejo, da je od 20 % do 22 % vsega joda v tiroglobulinu na N-terminalnem delu molekule..... 58

Priloge

V času doktorske disertacije sta bila objavljena naslednja raziskovalna članka, ki se nanašata na doktorsko disertacijo:

¹Suban, D.; Zajc, T.; Renko, M.; Turk, B.; Turk, V. and Dolenc, I. Cathepsin C and plasma glutamate carboxypeptidase secreted from Fischer rat thyroid cells liberate thyroxin from the N-terminus of thyroglobulin. *Biochimie* **94**, 719–726 (2012).

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2011.10.018>

Biochimie :

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/03009084>

²Zajc, T.; Suban, D.; Rajkovic J. and Dolenc, I. Baculoviral expression and characterization of human recombinant PGCP in the form of an active mature dimer and an inactive precursor protein. *Protein Expression and Purification* **75**, 119–126 (2011).

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pep.2010.10.005>

Protein Expression and Purification:

<http://www.sciencedirect.com/science/journal/10465928>

¹Številka dovoljenja (License number) založnika Elsevier Limited za objavo zgornjega originalnega članka v prilogah doktorskega dela je 2846980042377 z vsebujočim tekstom: "Reprinted from Publication *Biochimie*, 94, Suban, D.; Zajc, T.; Renko, M.; Turk, B.; Turk, V. and Dolenc, I., Cathepsin C and plasma glutamate carboxypeptidase secreted from Fischer rat thyroid cells liberate thyroxin from the N-terminus of thyroglobulin, 719-726, Copyright (2012), with permission from Elsevier."

²Številka dovoljenja (License number) založnika Elsevier Limited za objavo zgornjega originalnega članka v prilogah doktorskega dela je 2846980143566. z vsebujočim tekstom: "Reprinted from Publication *Protein Expression and Purification*, 75, Zajc, T.; Suban, D.; Rajkovic J. and Dolenc, I., Baculoviral expression and characterization of human recombinant PGCP in the form of an active mature dimer and an inactive precursor protein, 119-126, Copyright (2011), with permission from Elsevier."



Research paper

Cathepsin C and plasma glutamate carboxypeptidase secreted from Fischer rat thyroid cells liberate thyroxin from the N-terminus of thyroglobulin

Dejan Suban, Tajana Zajc, Miha Renko, Boris Turk, Vito Turk, Iztok Dolenc*

Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, Jožef Stefan Institute, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 June 2011

Accepted 30 October 2011

Available online 20 November 2011

Keywords:

Cathepsin C

PGCP

Thyroglobulin

Thyroxin

Proteolysis

ABSTRACT

The release of a thyroid hormone from thyroglobulin is controlled by a complex regulatory system. We focused on the extracellular action of two lysosomal enzymes, cathepsin C (catC, dipeptidyl peptidase I) and PGCP (lysosomal dipeptidase), on thyroglobulin, and their ability to liberate the hormone thyroxin. Cathepsin C, an exopeptidase, removes dipeptides from the N-terminus of substrates, and PGCP hydrolyses dipeptides to amino acids. *In vitro* experiments proved that cathepsin C removes up to 12 amino acids from the N-terminus of porcine thyroglobulin, including a dipeptide with thyroxin on position 5. The newly formed N-terminus, Arg-Pro-, was not hydrolysed further by cathepsin C. Cell culture experiments with FRTL-5 cell line showed localization of cathepsin C and PGCP and their secretion into the medium. Secretion of the active cathepsin C from FRTL-5 cells is stimulated by TSH, insulin, and/or somatostatin. The released enzymes liberate thyroxin from porcine thyroglobulin added to media. The hormone liberation can be reduced by synthetic inhibitors of cysteine proteinases and metalloproteinases. Additionally, we show that TSH, insulin, and/or somatostatin induce up-regulation of N-acetylglucosaminyltransferase 1, the enzyme responsible for the initiation of biosynthesis of hybrid and complex N-glycosylation of proteins.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Regulation of mammalian development depends on the liberation of the thyroid hormones triiodothyronine (T3) and thyroxin (T4) and on maintenance of their constant levels [1]. Their release from the thyroid gland is controlled by a complex regulatory system. Thyroglobulin (Tg) is a protein in the thyroid gland that provides the physical backbone for the synthesis of these thyroid hormones. It is produced exclusively by the thyroid gland. Following synthesis, and transport through endoplasmic reticulum and Golgi apparatus, where glycosylation, and phosphorylation occur, the protein is secreted into the lumen of thyroid follicles, where it is pooled and covalently cross-linked. Additional post-

translational modifications of Tg such as sulfatation, oxidation, and iodination take place at the cell colloid interface [2]. The iodination of tyrosyl residues leads to the iodine-rich mature form of Tg. Very recent studies on Tg iodination showed only three T4 homonogenic sites [3], the most important being on position 5 at the N-terminus of the protein [4].

The intracellular route of micro-vesicles that contain Tg has been traced [5], showing that some Tg molecules are transported through early endosomes to lysosomes [6]. *In vitro* experiments showed that various endo-lysosomal proteinases cleave Tg and liberate hormones [7,8]. The hormone depleted Tg molecules are also cleaved at other discrete sites resulting in structural alterations. The polypeptides however remaining bound together [9]. The acidic pH in the organelles provides a suitable environment for the action of lysosomal proteinases to degrade proteins [10,11]. Hydrolysis of Tg is probably controlled by the macromolecule itself [9,12]. Tg is a modular protein, containing 11 domains of Tg type-1 repeats [13] that are also present in some thyroprotein inhibitors of cysteine and aspartic proteinases [14–16]. After initial cleavage of Tg by lysosomal proteinases, structural alterations probably result in the exposure of Tg type-1 repeats [17,18], which then act as inhibitors and protect Tg from uncontrolled action of proteinases.

Initial studies of Tg degradation were limited to degradation in an acidic environment. However cathepsins B and L, found on the

Abbreviations: T3, triiodothyronine; T4, thyroxin; Tg, thyroglobulin; TSH, thyroid stimulating hormone or thyrotropin; 3H, three components added; 6H, six components added; catC, cathepsin C; PGCP, blood plasma glutamate carboxypeptidase; FRTL-5, Fischer Rat Thyroid Low Serum 5%; GnT1, α -13-mannosylglycoprotein 2- β -N-acetylglucosaminyltransferase 1 protein; Mgat1, α -13-mannosyl-glycoprotein 2- β -N-acetylglucosaminyltransferase 1 gene; DTPA, diethylene triamine pentaacetic acid; E-64, [(2S,3S)-3-carboxyoxirane-2-carbonyl]-L-leucyl-4-(guanidobutyl)amide L-trans-epoxy succinyl-L-leu- α -agmatine; E-64d, [(2S,3S)-3-carboxyoxirane-2-carbonyl]-L-leucine(3-methylbutyl)amide.

* Corresponding author. Tel.: +386 1 47 73 776; fax: +386 1 47 73 984.

E-mail address: iztok.dolenc@ijs.si (I. Dolenc).

cell surface of the thyrocytes, were able to liberate thyroxin [19]. Extracellular action of lysosomal enzymes requires them to be secreted from thyrocytes and to be active at neutral pH. It was shown that thyroid stimulating hormone (TSH) regulates extracellular proteolysis of Tg by enhancing the rate of exocytosis of lysosomal proteins at the apical pole of thyrocytes [20]. Cysteine cathepsins B, K, L and S are localized in the endo-lysosomal system of thyroid epithelial cells. Additionally, they are present in the extracellular space, on the apical pole of thyrocytes and within the follicular lumen of the thyroid gland [17,20–23].

In *in vitro* degradation studies of Tg it was shown that the release of thyroxin is the result of concerted action of cathepsin B and lysosomal dipeptidase I, now known as plasma glutamate carboxypeptidase (PGCP) [7]. It is well established that catC, an unusual oligomeric enzyme from the papain family [24,25], removes dipeptides sequentially from the N-termini of granzymes A and B, elastase, cathepsin G, and chymase from T cells, NK cells, neutrophils and mast cells respectively [26]. CatC is localized in endo-lysosomal compartments, although it has also been detected in an apical extracellular lacuna [27].

Plasma glutamate carboxypeptidase is localized in vesicular compartments, as well as being secreted to extracellular space [28]. When isolated from human kidney [29] it was found to be identical to the enzyme isolated from human placenta [28]. Human PGCP is a metallopeptidase with five potential glycosylation sites [28], whose activity depends on dimerization [30]. It has been reported to be a carboxypeptidase [28], although earlier described as a dipeptidase [7]. The enzyme isolated from thyroid gland has the ability to release the hormone from T4-Gln [7]. It is predicted to play a role in hepatitis C virus associated hepatocellular carcinoma, because of its high levels in the plasma of patients with this disease [31]. The enzyme has been heterologously expressed in mammalian cells [28], in *Escherichia coli* [30], and in a baculovirus system [32].

In the present study we have investigated the release of the hormone thyroxin by the action of catC and PGCP secreted from FRTL-5 cells.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Rabbit and mouse antibodies directed against human PGCP were prepared in our laboratory, monoclonal anti-human catC antibodies mapping to the heavy chain of catC, and anti-LAMP2 were from Santa Cruz (USA), anti-GnT1 antibodies were from Sigma (Germany), rabbit anti-PDI, and anti Golgin-97 antibodies were from Abcam (UK), HRPO conjugated goat anti rabbit and goat anti mouse antibodies were from Jackson ImmunoResearch (UK), goat anti rabbit and goat anti mouse antibodies were Alexa Fluor 488 (green) and Alexa Fluor 546 (red) conjugated secondary antibodies from Dianova (Germany). E-64 and E-64d were from PeptaNova (Germany), DTTPA was from Sigma (Germany), Gly-Phe-CHN₂, Gly-Phe-4MβNA, and Ser-Met were from Bachem (Switzerland). All other reagents, unless otherwise stated, were from Sigma (Germany).

2.2. Cell culture and treatment conditions

Fischer Rat Thyroid Low Serum 5% (FRTL-5) cells from the European Collection of Cell Culture (ECACC, UK), were maintained in F-12 Ham Coon's modified medium with 5% newborn calf serum, 10 mM NaHCO₃, and a six component mix (1 mU/ml bovine TSH, 2 μg/ml bovine insulin, 5 nM hydrocortisone, 5 μg/ml transferrin, 10 ng/ml somatostatin, and 2 ng/ml L-glycyl-histidyl-lysine) with the combination of 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 2 μg/ml Amphotericin B. Where stated, a three component mix

(5 nM hydrocortisone, 5 μg/ml transferrin, and 2 ng/ml L-glycyl-histidyl-lysine) was used. Unless otherwise specified, stock flasks were transferred for culture twice weekly or as required, to maintain optimal cell growth. Two days after the onset of cultures, the medium was withdrawn and replaced for metabolic experiments with fresh "serum-free" medium containing Nutridoma-SP (Roche, Germany) in the presence of a three or six component mixture. The cells were maintained in a 37 °C humidified incubator with 5% CO₂.

2.3. Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed by the following procedure. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and blocked with 3% BSA in permeabilizing buffer (0.1% Triton X-100, 3% BSA in PBS) for 1 h. After incubation with primary antibodies for 1 h, cells were washed with PBS buffer followed by 1 h incubation with conjugated secondary antibodies. Slides were mounted with ProLong Gold antifade reagent (Invitrogen, Germany). All immunolabelled proteins were detected and visualized with an Olympus IX81 microscope (Olympus, Japan).

2.4. Western blot analysis

Total proteins were electrophoresed in 12.5% SDS-PAGE gel, transferred to nitrocellulose NC-45 membranes (Serva, Germany), and probed with specific antibodies. Immunoreactive polypeptides were detected by chemiluminescence using enhanced Electro-Chemiluminescence (ECL) reagents (GE Healthcare, Germany) developed on films (Kodak, USA).

2.5. *In vitro* deglycosylation of PGCP and cathepsin C

To remove N-linked glycans, endoglycosidases PNGase F (New England Biolabs, UK) or EndoH (New England Biolabs, UK) were used under reducing conditions according to the manufacturer's instructions. All reactions were performed in duplicate. Deglycosylated lysates and media were characterized by SDS-PAGE analysis and Western blotting.

2.6. Cathepsin C activity assay

CatC activity was measured fluorometrically by monitoring hydrolysis of Gly-Phe-4MβNA (Bachem, Switzerland) as described [24], with the following modification. Cells were grown in a 12-well plate with 500 μl medium supplemented with several components (1 mU/ml bovine TSH, 2 μg/ml bovine insulin, 5 nM hydrocortisone, 5 μg/ml transferrin, 10 ng/ml somatostatin, and 2 ng/ml L-glycyl-histidyl-lysine). For the activity measurement 150 μl of medium was sampled. Cells were dissolved in 150 μl of non-denaturing buffer supplemented with 0.5% detergent Nonidet P-40 (Roche, Germany), and 50 μl was sampled. Each sample of the enzyme was mixed with reaction buffer (100 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, pH 6.0) and, after 1 min, substrate was added to a final concentration of 200 μM (final concentration of DMSO was 1%). Product release was then monitored continuously at excitation and emission wavelengths of 335 and 415 nm. Each measurement was repeated at least five times and results were averaged.

2.7. *In vitro* cleavage of Tg with cathepsin C

Porcine Tg was isolated according to [33]. 50 μg of Tg was mixed with 0.25 μg of catC in a two-component buffer system of 200 mM citric acid and 200 mM dibasic sodium phosphate as described in [8] and incubated at 40 °C for 2 and 24 h. Liberated free thyroxin levels were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the ELISA free T4 kit (Calbiotech, USA) according to

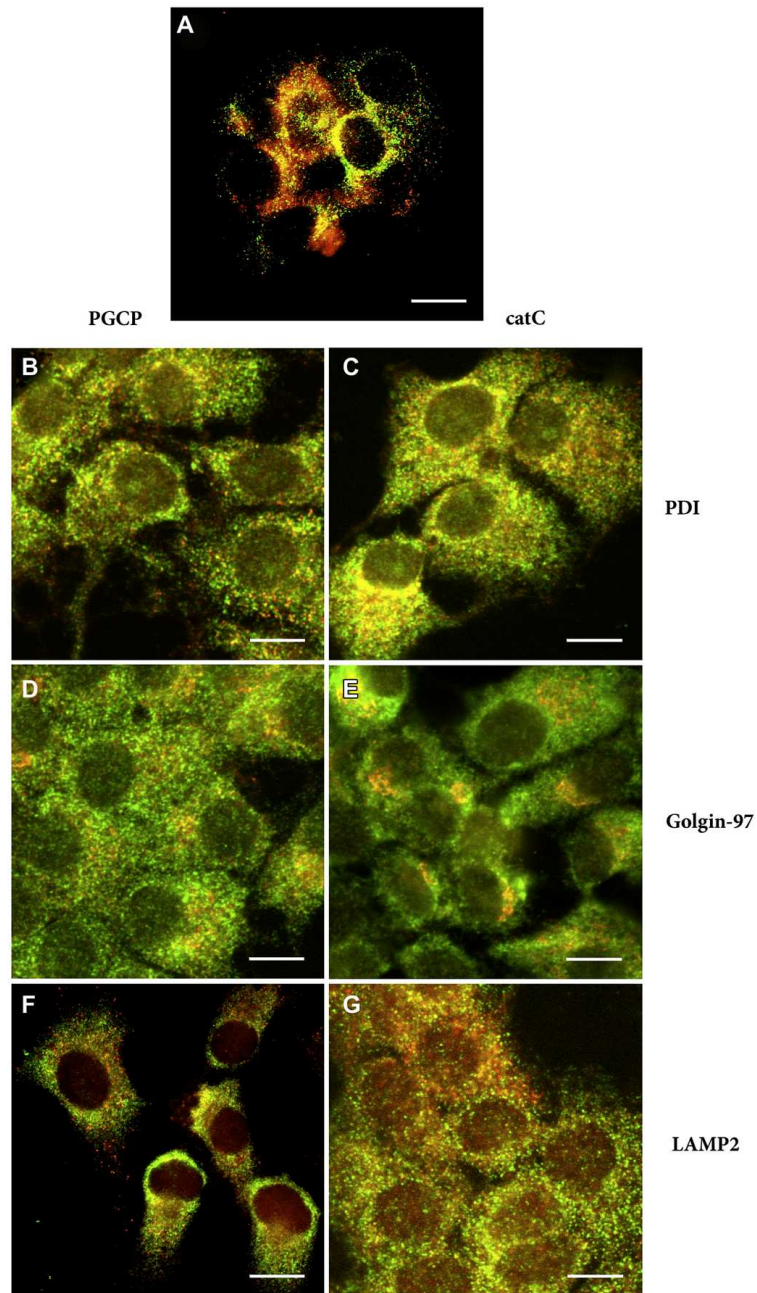


Fig. 1. Localization of PGCP and cathepsin C in FRTL-5 cells. The enzymes are partially colocalized (A). Co-localization is seen in endoplasmic reticulum (B, C) and in Golgi (D, E). Delivery to lysosomes was rare (F, G), because both enzymes were secreted. Bars represent the micrometre (μm) scale.

the manufacturer's instructions. Absorbance was measured on Tecan Safire fluorescent plate reader (Tecan, Switzerland). Each measurement was repeated at least five times. Arithmetic average and the intra- and inter-assay CVs (Coefficients of Variability) were calculated from raw data. Human catC was expressed as reported [34].

2.8. N-Terminal sequencing

The protein band of degraded Tg on SDS-PAGE gel was electroblotted onto a polyvinylidene difluoride Sequi-Blot membrane (Bio-Rad, USA). The membrane was stained with 0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 (Merck, Germany) in 40% (v/v) ethanol and 1% (v/v) acetic acid, and destained with 50% (v/v) ethanol. The N-terminal sequence was determined on an Applied Biosystems liquid phase Sequenator model 475 A, connected on-line to a 120A phenylthiohydantoin-derivative analyser from the same manufacturer.

2.9. Reverse-phase HPLC analysis

The removal of dipeptides from Tg by catC, and their subsequent hydrolysis was followed by RP-HPLC (Waters, USA). Dipeptides were separated on an analytical scale using a 4.6 × 7.7 mm SymmetryC18 3.5 column (Waters, USA). The column was equilibrated with 10 column volumes of water containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) at a flow rate of 1 ml/h. 100 µl of sample was loaded on the column which was washed with an additional two column volumes of equilibration solvent. Bound cleavage products were eluted with a linear gradient (2–50%) of acetonitrile with 0.85% TFA. Cleavage products were detected by absorbance at 215 nm.

2.10. Free T4 assay

Free thyroxin levels were measured by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the ELISA free T4 kit (Calbio-tech, USA) according to the manufacturer's instructions. Each measurement was repeated at least five times. Arithmetic average and the intra- and inter-assay CVs (Coefficients of Variability) were calculated from raw data. The sensitivity of the assay was 0.05 ng/dl. The intra- and inter-assay CVs were 3.4 and 6.3%, respectively. The statistical significance of the experimental results was determined by Student's *t*-test. For all analyses, $p < 0.05$ was accepted as a significant probability level. FRTL-5 cells were used for cell culture experiments on thyroxin liberation from Tg. Porcine Tg was added to cell culture medium at a final concentration of 30 nM. The concentration of free T4 was measured after 1 h incubation. When inhibitors were used, their concentrations were: 10 µM E-64, 10 µM E-64d, 250 µM EDTA, 1 mM DTPA, 10 µM Gly-Phe-CHN2.

Thyroxin liberation in *in vitro* experiments was determined with the diagnostic kit. Final concentrations of Tg, catC, and PGCP were 1.5 µM, 10 nM, and 10 nM, respectively. Human PGCP was expressed as reported [32].

2.11. Dipeptidase activity

Dipeptidase activity was determined by assay as described [32]. 100 µl of 6H supplemented cell culture medium was added to the reaction mixture at 37 °C and the non-hydrolysed dipeptide Ser-Met (Sigma, Germany) was determined. One unit was defined as the amount of enzyme required to convert 1 µmol of substrate per minute under the described conditions. Inhibition of dipeptidase activity was measured in the presence of 20 mM EDTA. Each measurement was repeated five times and results were averaged.

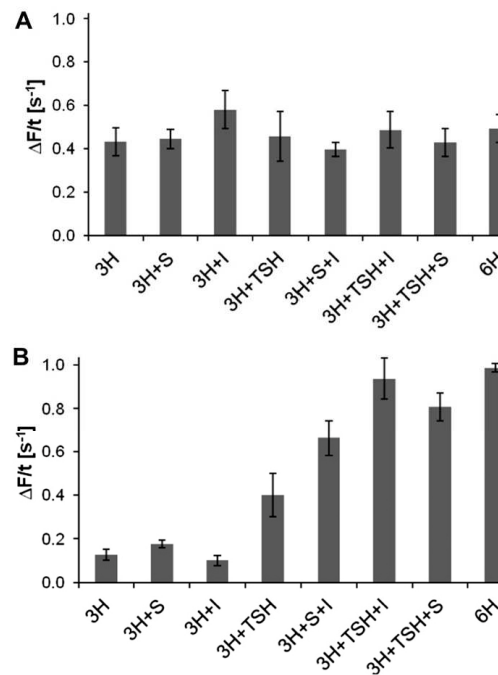


Fig. 2. Control of active cathepsin C by components added to the media, monitored by the hydrolysis of the specific substrate Gly-Phe-4MBNA. All samples include hydrocortisone, transferrin and L-glycyl-histidyl-lysine (3H). Addition of thyrotropin (TSH), insulin (I), and/or somatostatin (S) is marked. (A) Intracellular activity of catC under the control of added components. (B) Secretion of active catC under the control of added components.

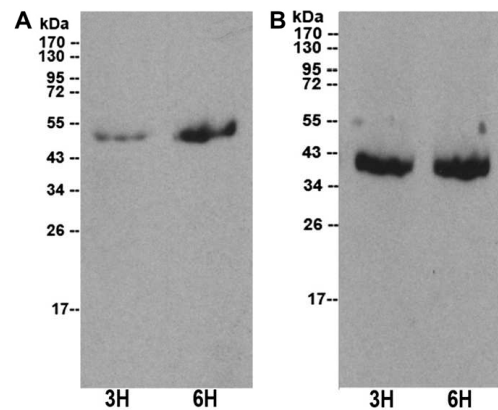


Fig. 3. Expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase 1 (GnT1), the starting enzyme in complex *N*-glycosylation, under the presence of three (3H) or six components (6H) supplemented to the media. (A) TSH, insulin and/or somatostatin induced up-regulation of *N*-acetylglucosaminyltransferase 1 expression, while the level of β -actin remained constant. (B) β -actin remained constant.

2.12. Iodine content determination

The procedure used for determining iodine content is based on treatment of the sample with bromine in an acidic solution, followed by measuring the rate of decrease of the cerium (IV) colour due to iodine as published [35], with the following modifications. 100 µg of Tg was combined with 0.5 µg catC under conditions described for *in vitro* cleavage in Section 2.7. Proteins were precipitated with 4 M ammonium sulphate, and the precipitant dissolved in water, then acidified. A blind sample was performed in the same way, except that no catC was added.

3. Results and discussion

In the present study we show the extracellular action of two lysosomal enzymes, catC and PGCP, on Tg and their ability to liberate a thyroid hormone, thyroxin from position 5 of Tg. It is known that only three fully iodinated hormonogenic sites on thyroglobulin are occupied by iodine [3]. Tyrosine 5 is the preferential thyroxin forming site in all vertebrate species examined and its importance has been shown [4,36]. The involvement of PGCP and cathepsin B in

the release of thyroxin from Tg has been shown *in vitro* [7], but the participation of catC has not previously been reported.

The role of PGCP and catC in Tg hydrolysis was demonstrated, using FRTL-5 cells. The endogenous distribution of both enzymes in the cells was observed by fluorescence microscopy, using specific antibodies. PGCP and catC were observed to be partially colocalized in the cells (Fig. 1A). They were enriched, particularly in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus (Fig. 1B–E), organelles where N-glycosylation of proteins takes place. N-glycosylation of catC and PGCP has already been reported [28,34]. N-glycosylated proteins in lysosomes have the same dependence on the ER – Golgi network localization as classically secreted proteins. Subsequently, multiple pathways and endosomal stations in trafficking routes exist for lysosomal and secretory proteins. Indeed, PGCP and catC are rarely directed into lysosomes (Fig. 1F and G). They were even segregated in different vesicles of secretory nature.

Secretion of endosomal–lysosomal enzymes from FRTL-5 cells was realized by using six components: (6H) TSH, insulin, hydrocortisone, transferrin, somatostatin, L-glycyl-histidyl-lysine in the medium [23]. The intracellular accumulation of glycosylated PGCP observed with three components (3H) hydrocortisone, transferrin

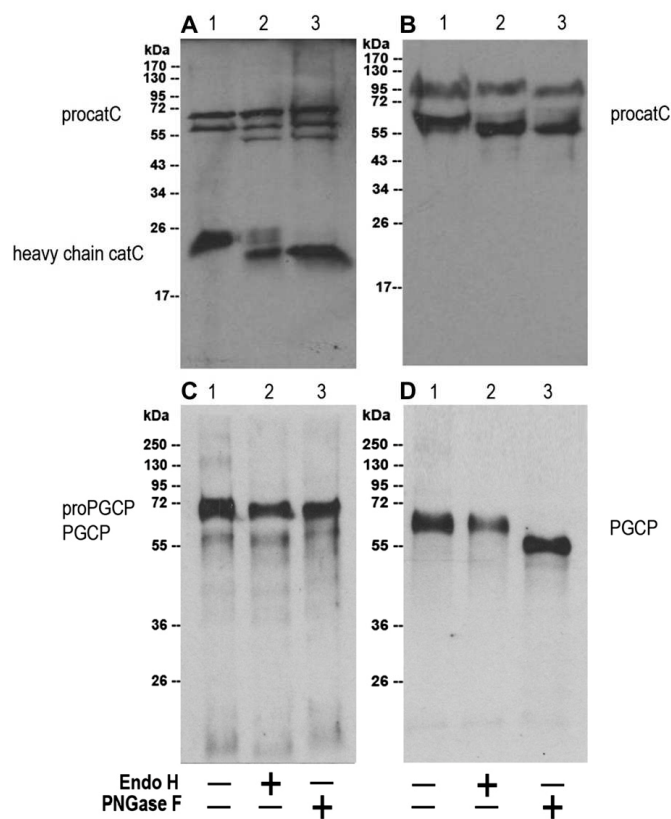


Fig. 4. Deglycosylation and Western blot of cathepsin C and PGCP in FRTL-5 cells and their secretion from the cells. EndoH deglycosylation of catC and PGCP enzymes from cell lysates (A, C) indicates the presence of high-mannose N-glycosylation. The secreted cathepsin C (B) showed only the proenzyme form of the protein. The secreted PGCP (D) hybrid or complex N-glycosylation, as determined by endoglycosidase PNGase F.

and L-glycyl-histidyl-lysine was accompanied by significantly decreased secretion. When only 3H were present in the culture medium secretion of catC or PGCP was not detected by Western blot. When activity was monitored by the specific substrate Gly-Phe-4MβNA however, secretion of catC was detected in the presence of 3H and also found to be greater in the presence of 6H. No difference in catC activity was observed in lysates, except on addition of insulin to 3H medium, where catC activity was increased (Fig. 2A). Observing the influence of TSH, insulin, and/or somatostatin on the secretion of catC from FRTL-5 cells however showed that cathepsin C activity is higher when two of these three components are included in 3H media (Fig. 2B). These findings clearly demonstrate that catC and PGCP are directed out of cells under the control of TSH, insulin, and/or somatostatin (Fig. 4B and D), similarly as reported for some cathepsins. Secretion of cysteine cathepsins B, K, L from thyroid epithelial cells has been shown in thyroid gland and from FRTL-5 cells [17,20,21,23]. The cathepsins were shown to have been excluded from the endosomal–lysosomal trafficking route and were transported to the apical pole of thyrocytes. This resulted in subsequent secretion to the extracellular follicle lumen under physiological conditions [21].

As N-glycosylation has been shown to be important for a variety of functions of glycoproteins, including trafficking, we speculated that the secretion of endosomal–lysosomal enzymes is caused by the complex N-glycosylation of proteins. The enzyme responsible for the initiation of biosynthesis of hybrid and complex glycosylation is N-acetylglucosaminyltransferase 1 (GnT1), encoded by the *Mgat1* gene [37,38]. We checked for expression of the protein in FRTL-5 cells in the presence of 6H and compared it to that where 3H were used. We found an increase in GnT1 expression when all six components were added to the medium of FRTL-5 cells (Fig. 3). To focus on the nature of N-glycosylation of catC or PGCP in cell lysates and in media, Western blot analysis was performed following enzymatic deglycosylation (Fig. 4). The intracellular catC and PGCP were deglycosylated with EndoH and PNGase F. However, only PNGase F was effective in deglycosylating the secreted PGCP. This indicates that the intracellular forms of PGCP and catC were modified mainly by mannose-type glycans, whereas the secreted PGCP was modified by hybrid or complex type oligosaccharide chains. The Western blot for catC showed the enzyme to be present only in the precursor form. The difference in molecular weight due to deglycosylation was too small to draw significant conclusions. Nevertheless, the low amount of active enzyme was detected in the medium using the specific fluorogenic substrate Gly-Phe-4MβNA, as shown in Fig. 2.

Lysosomal enzymes, such as cathepsin L, are relatively stable at acidic pH, but unstable at neutral or higher pH [39], allowing rapid and continuous activity in the endosomal–lysosomal environment. When exposed to the extracellular milieu they act differently. Recently, it was shown that cathepsins B, L, and K do not liberate thyroxin from Tg at neutral pH without the addition of cathepsin S [8]. The influence of pH can be even greater; for example, catC is able at neutral pH to shift the direction of the reaction from hydrolytic to transferase activity [40]. As shown, the secretion of catC and PGCP from FRTL-5 cells is greatly increased in the presence TSH, insulin and/or somatostatin. However the ability of catC to hydrolyse Tg has never been shown. We therefore performed *in vitro* experiments to show the functionality of catC at neutral pH. The ability of catC to remove the N-terminal amino acids from isolated porcine Tg at pH 7.2, as well as at pH 6.0, demonstrated that catC is an appropriate enzyme to release thyroxin from Tg. The conditions in the experiment were chosen to simulate the natural environments in thyroid follicle lumen and in endosomal conditions, as is recommended for enzyme action *in vitro* [8]. N-Terminal sequencing of the product resulted in progressive truncation of Tg.

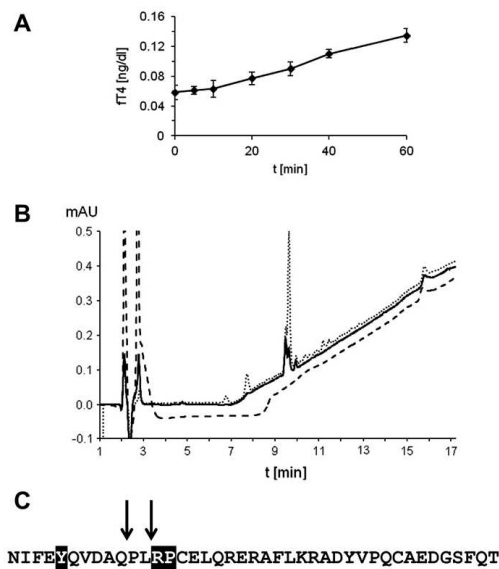


Fig. 5. Gradual cleavage of the N-terminal part of porcine thyroglobulin by human cathepsin C. (A) Time depended liberation of thyroxin from thyroglobulin by cathepsin C. Thyroxin was assayed with the free T4 Elisa diagnostic kit. (B) HPLC analysis of thyroglobulin (dashed line), its hydrolysis with cathepsin C (dotted line) or its hydrolysis with cathepsin C and PGCP (solid line). (C) N-Terminus of porcine thyroglobulin. Newly formed terminals after cleavage with cathepsin C are marked by arrows, as determined by protein sequence analysis. Thyroxin on position 5 is marked as an inverse Y. The reaction is stopped at Arg-Pro¹⁴, marked by inverse RP.

Dipeptides were removed rapidly, as observed using the ELISA free T4 kit (Fig. 5A) and HPLC analysis (Fig. 5B), from the N-terminal part of Tg, including the thyroxin on Tyr5 (Fig. 5C). The reaction was terminated at Arg¹³-Pro¹⁴. Higher concentrations or prolonged action of catC did not cleave Tg any further. Termination of Tg hydrolysis by catC is expected, since substrates having a terminal arginyl residue with a penultimate prolyl residue are resistant to

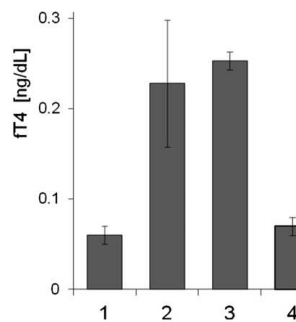


Fig. 6. Liberation of free thyroxin by cathepsin C and PGCP from porcine thyroglobulin *in vitro*. Porcine thyroglobulin was treated for 1 h at pH 7.2 without enzymes (1), or with recombinant human cathepsin C (2) or with cathepsin C and PGCP (3). Liberation was stopped by adding 10 mM E-64d (4). Thyroxin was assayed with the free T4 Elisa diagnostic kit.

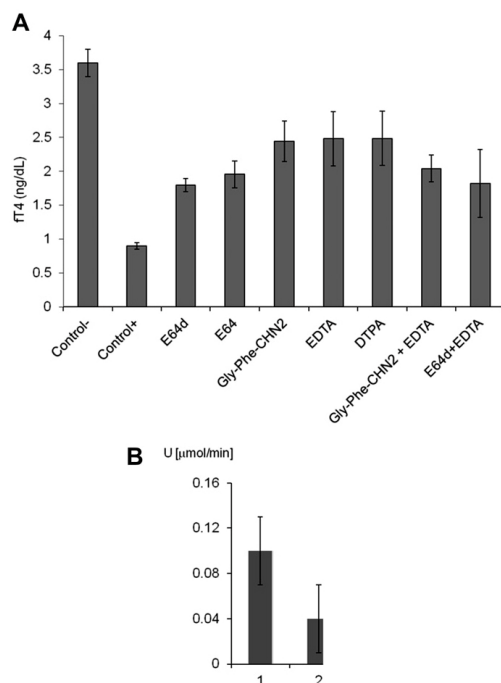


Fig. 7. (A) Free thyroxine liberated from porcine thyroglobulin in the presence of inhibitors in cell culture experiments using FRTL-5 cells. Thyroglobulin was added to the cell culture and the liberation of thyroxine was observed. Control – represents the level of released hormone without inhibitors. Control + represents the level of thyroxine at the beginning of incubation ($t = 0$). Thyroxine was assayed with the free T4 Elisa diagnostic kit. (B) (1) Hydrolysis of the substrate Ser-Met in medium proved dipeptidase activity. (2) EDTA reduced dipeptidase activity. One unit is defined as the amount of enzyme required to convert 1 μ mol of substrate per minute.

cleavage by catC [41]. Sequence comparison of Tgs from higher vertebrates indicates that they possess conserved N-terminal sequences, including thyroxine on position 5, and could be expected in all higher vertebrates.

The structure of the thyroxine molecule suggests that an enzyme with a very particular active site pocket is required for docking of the substrate. The ability of catC to liberate thyroxine can in fact be explained by the structure of its active site [42]. The active site cleft is designed to bind the N-terminal amino acid of the substrate at the S2 binding site. This site comprises a deep hydrophobic pocket with a chloride ion at the bottom. The thyroxine can thus be accepted correctly and the dipeptide with its large residue cleaved. The level of the released thyroxine was measured with Free T4 Elisa diagnostic kit assay (Fig. 6). Addition of PGCP made only a small difference in rate, because the kit was unable to distinguish between free T4 and T4-Gln. However, it has already been shown that the dipeptide T4-Gln is rapidly degraded by PGCP [7]. Possible feedback inhibition of catC with thyroxine, as additional regulation, was considered. However, when thyroxine in 5 mM concentration was added to active catC, no inhibition was observed. Additionally, the effectiveness of N-terminal hydrolysis of Tg by catC was confirmed by determination of released iodine. Measuring iodine content before and after the enzyme action on Tg showed that catC

released 20–25% of the iodine. The result emphasizes the importance of catC in thyroxine liberation from position 5 at the N-terminus of Tg (Fig. 5).

Secretion of proteinases from FRTL-5 cells is required for the liberation of thyroxine from Tg, however, the cells are not capable of iodinating the hormone residues within the Tg they synthesize [43], therefore porcine Tg was added to the medium. The ability of catC and PGCP secreted from the cells to liberate thyroxine was evaluated in cell culture experiments. The released hormone was quantified by the diagnostic kit Free T4. The ratio of catC to PGCP was determined using general inhibitors of cysteine proteinases E-64 and cell permeable E-64d, and of metalloproteinases (cell non-permeable EDTA and DTPA), and the specific inhibitor of catC (Gly-Phe-CHN2) (Fig. 7). We observed no influence of inhibitors on cell viability. Comparing the residual proteolytic activities after application of inhibitors, it is evident that E-64d and EDTA cannot abolish the action of proteinases on Tg. Other types of proteinases are obviously present, however we can conclude that involvement of catC in the process is important, because more than half of the activity ascribed to cysteine proteinases is attributed to catC, based on inhibition by its specific inhibitor. The substrate Ser-Met was used to confirm dipeptidase activity in the FRTL-5 cell culture medium (Fig. 7B).

In conclusion, it is difficult to speculate about the contribution of a particular proteinase to thyroxine liberation. Nevertheless, the experiments presented here provide evidence that PGCP and catC may indeed have an important role in this process. Furthermore, our data support the earlier findings about the secretion of endosomal/lysosomal enzymes to the medium, controlled by six components (6H). The mechanism of release of these enzymes is still not known. Understanding this mechanism should increase our understanding of the proteolysis that results in the liberation of thyroid hormones.

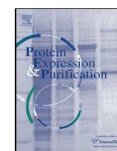
Acknowledgements

We thank Prof. Roger Pain and Prof. Veronika Stoka for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Slovenian Research Agency research program P1-0140 (Boris Turk).

References

- [1] L.E. Braverman, R.D. Utiger, Werner and Ingbar's the Thyroid: A Fundamental and Clinical Text, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000.
- [2] V. Deshpande, S.G. Venkatesh, Thyroglobulin, the prothyroid hormone: chemistry, synthesis and degradation, *Biochem. Biophys. Acta* 1430 (1999) 157–178.
- [3] A. Dedieu, J.C. Gaillard, T. Pouchet, E. Darrouzet, J. Armengaud, Revisiting iodination sites in thyroglobulin with an organ-oriented shotgun strategy, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 259–269.
- [4] A.D. Dunn, C.M. Corsi, H.E. Myers, J.T. Dunn, Tyrosine 130 is an important outer ring donor for thyroxine formation in thyroglobulin, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 25223–25229.
- [5] F. Bernier-Valentin, Z. Kostrouch, R. Rabilloud, Y. Munari-Silem, B. Rousset, Coated vesicles from thyroid cells carry iodinated thyroglobulin molecules. First indication for an internalization of the thyroid prohormone via a mechanism of receptor-mediated endocytosis, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 17373–17380.
- [6] Z. Kostrouch, Y. Munari-Silem, F. Rajas, F. Bernier-Valentin, B. Rousset, Thyroglobulin internalized by thyrocytes passes through early and late endosomes, *Endocrinology* 129 (1991) 2202–2211.
- [7] A.D. Dunn, H.E. Myers, J.T. Dunn, The combined action of two thyroidal proteases releases T4 from the dominant hormone-forming site of thyroglobulin, *Endocrinology* 137 (1996) 3279–3285.
- [8] S. Jordans, S. Jenko-Kokali, N.M. Kuhl, S. Tedelind, W. Sendt, D. Bromme, D. Turk, K. Brix, Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions, *BMC Biochemistry* 10 (2009) 23.
- [9] B. Rousset, S. Selmi, H. Bornet, P. Bourgeat, R. Rabilloud, Y. Munari-Silem, Thyroid hormone residues are released from thyroglobulin with only limited alteration of the thyroglobulin structure, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 12620–12626.
- [10] B. Turk, V. Turk, Lysosomes as "suicide bags" in cell death: myth or reality? *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 21783–21787.

- [11] V. Turk, B. Turk, D. Turk, Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities, *EMBO J.* 20 (2001) 4629–4633.
- [12] M. Mihelic, D. Turk, Two decades of thyroglobulin type-1 domain research, *Biol. Chem.* 388 (2007) 1123–1130.
- [13] F. Molina, M. Bouanani, B. Pau, C. Granier, Characterization of the type-1 repeat from thyroglobulin, a cysteine-rich module found in proteins from different families, *Eur. J. Biochem.* 240 (1996) 125–133.
- [14] B. Lenarcic, V. Turk, Thyroglobulin type-1 domains in equistatin inhibit both papain-like cysteine proteinases and cathepsin D, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 563–566.
- [15] T. Ogrinc, I. Dolenc, A. Ritonja, V. Turk, Purification of the complex of cathepsin L and the MHC class II-associated invariant chain fragment from human kidney, *FEBS Lett.* 336 (1993) 555–559.
- [16] T. Bevec, V. Stoka, G. Pungercic, I. Dolenc, V. Turk, Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L, *J. Exp. Med.* 183 (1996) 1331–1338.
- [17] K. Brix, M. Linke, C. Tepel, V. Herzog, Cysteine proteinases mediate extracellular prohormone processing in the thyroid, *Biol. Chem.* 382 (2001) 717–725.
- [18] G. Pungercic, I. Dolenc, M. Dolinar, T. Bevec, S. Jenko, S. Kolaric, V. Turk, Individual recombinant thyroglobulin type-1 domains are substrates for lysosomal cysteine proteinases, *Biol. Chem.* 383 (2002) 1809–1812.
- [19] K. Brix, P. Lemansky, V. Herzog, Evidence for extracellularly acting cathepsins mediating thyroid hormone liberation in thyroid epithelial cells, *Endocrinology* 137 (1996) 1963–1974.
- [20] M. Linke, V. Herzog, K. Brix, Trafficking of lysosomal cathepsin B-green fluorescent protein to the surface of thyroid epithelial cells involves the endosomal/lysosomal compartment, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 4877–4889.
- [21] C. Tepel, D. Bromme, V. Herzog, K. Brix, Cathepsin K in thyroid epithelial cells: sequence, localization and possible function in extracellular proteolysis of thyroglobulin, *J. Cell Sci.* 113 (Pt 24) (2000) 4487–4498.
- [22] B. Friedrichs, C. Tepel, T. Reinheckel, J. Deussing, K. von Figura, V. Herzog, C. Peters, P. Saftig, K. Brix, Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 1733–1745.
- [23] M. Linke, S. Jordans, L. Mach, V. Herzog, K. Brix, Thyroid stimulating hormone upregulates secretion of cathepsin B from thyroid epithelial cells, *Biol. Chem.* 383 (2002) 773–784.
- [24] I. Dolenc, B. Turk, G. Pungercic, A. Ritonja, V. Turk, Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 21626–21631.
- [25] A. Paris, B. Strukelj, J. Pungercar, M. Renko, I. Dolenc, V. Turk, Molecular cloning and sequence analysis of human preprocathepsin C, *FEBS Lett.* 369 (1995) 326–330.
- [26] C.T. Pham, T.J. Ley, Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999) 8627–8632.
- [27] R. Baron, L. Neff, W. Brown, P.J. Courtoy, D. Louvard, M.G. Farquhar, Polarized secretion of lysosomal enzymes: co-distribution of cation-independent mannose-6-phosphate receptors and lysosomal enzymes along the osteoclast exocytic pathway, *J. Cell Biol.* 106 (1988) 1863–1872.
- [28] R. Gingras, C. Richard, M. El-Alfy, C.R. Morales, M. Potier, A.V. Pshchetsky, Purification, cDNA cloning, and expression of a new human blood plasma glutamate carboxypeptidase homologous to N-acetyl-aspartyl-alpha-glutamate carboxypeptidase/prostate-specific membrane antigen, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 11742–11750.
- [29] I. Dolenc, M. Mihelic, Purification and primary structure determination of human lysosomal dipeptidase, *Biol. Chem.* 384 (2003) 317–320.
- [30] I. Dolenc, R. Pain, V. Turk, Presence of the propeptide on recombinant lysosomal dipeptidase controls both activation and dimerization, *Biol. Chem.* 388 (2007) 47–51.
- [31] M.W. Smith, Z.N. Yue, G.K. Geiss, N.Y. Sadovnikova, V.S. Carter, L. Boix, C.A. Lazaro, G.B. Rosenberg, R.E. Bumgarner, N. Fausto, J. Bruix, M.G. Katze, Identification of novel tumor markers in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma, *Cancer Res.* 63 (2003) 859–864.
- [32] T. Zajc, D. Suban, J. Rajkovic, I. Dolenc, Baculoviral expression and characterization of human recombinant PGCP in the form of an active mature dimer and an inactive precursor protein, *Protein Expr. Purif.* 75 (2011) 119–126.
- [33] V. Herzog, U. Berndorfer, Y. Saber, Isolation of insoluble secretory product from bovine thyroid: extracellular storage of thyroglobulin in covalently cross-linked form, *J. Cell Biol.* 118 (1992) 1071–1083.
- [34] S.W. Dahl, T. Halkier, C. Lauritzen, I. Dolenc, J. Pedersen, V. Turk, B. Turk, Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing, *Biochemistry* 40 (2001) 1671–1678.
- [35] G. Palumbo, M.F. Tecce, G. Ambrosio, A nonincinerative rate-sensing method for the determination of iodine in iodoproteins, *Anal. Biochem.* 123 (1982) 183–189.
- [36] J.T. Dunn, A.D. Dunn, Thyroglobulin: chemistry and biosynthesis and proteolysis, in: L.E. Braverman, R.D. Utiger (Eds.), *Werner and Ingbar's The Thyroid*, Lippincott-Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000, pp. 91–104.
- [37] M. Metzler, A. Gertz, M. Sarkar, H. Schachter, J.W. Schrader, J.D. Marth, Complex asparagine-linked oligosaccharides are required for morphogenic events during post-implantation development, *EMBO J.* 13 (1994) 2056–2065.
- [38] E. Ioffe, P. Stanley, Mice lacking N-acetylglucosaminyltransferase I activity die at mid-gestation, revealing an essential role for complex or hybrid N-linked carbohydrates, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 728–732.
- [39] B. Turk, I. Dolenc, B. Lenarcic, I. Krizaj, V. Turk, J.G. Bieth, I. Bjork, Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity, *Eur. J. Biochem.* 259 (1999) 926–932.
- [40] B. Cigic, R.H. Pain, Location of the binding site for chloride ion activation of cathepsin C, *Eur. J. Biochem.* 264 (1999) 944–951.
- [41] J.K. McDonald, B.B. Zeitman, T.J. Reilly, S. Ellis, New observations on the substrate specificity of cathepsin C (dipeptidyl aminopeptidase I), including the degradation of beta-corticotropin and other peptide hormones, *J. Biol. Chem.* 244 (1969) 2693–2709.
- [42] D. Turk, V. Janjic, I. Stern, M. Podobnik, D. Lamba, S.W. Dahl, C. Lauritzen, J. Pedersen, V. Turk, B. Turk, Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases, *EMBO J.* 20 (2001) 6570–6582.
- [43] S.J. Weiss, N.J. Philp, E.F. Grollman, Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid, *Endocrinology* 114 (1984) 1090–1098.



Baculoviral expression and characterization of human recombinant PGCP in the form of an active mature dimer and an inactive precursor protein

Tajana Zajc, Dejan Suban, Jelena Rajković, Iztok Dolenc*

Department of Biochemistry and Molecular and Structural Biology, J. Stefan Institute, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 May 2010
and in revised form 7 October 2010
Available online 14 October 2010

Keywords:

Recombinant PGCP
Dipeptidase
Expression
Purification
Proteolytic activity

ABSTRACT

The human-blood plasma glutamate carboxypeptidase (PGCP) is a proteinase that acts on the unsubstituted N- and C-termini of dipeptides. It has been suggested that this PGCP is involved in the release of thyroxine. Furthermore, research has suggested that its activity is up-regulated in hepatitis-C-virus-infected patients with hepatocellular carcinoma. In this study expressed human PGCP in the baculovirus expression system was produced by a Sf9 insect cell line with aim to prepare sufficient amounts of active recombinant enzyme for a subsequent biological characterization. Recombinant PGCP was expressed and secreted into the medium in the form of an inactive proenzyme. It was gradually converted into an active form in the medium after three days, with the highest expression of the active form on day six. The protein was sequentially purified by a combination of various liquid chromatographies, such as hydroxyapatite, ion exchange, and gel chromatography, and as final step with affinity chromatography on Phe-Leu-Sepharose. The human PGCP was purified as an active enzyme in the dimer form and as inactive precursor protein. The dipeptidase activity was confirmed by measuring the hydrolysis of the Ser-Met dipeptide at a slightly acidic pH.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The human PGCP (blood plasma glutamate carboxypeptidase) is a metalloproteinase belonging to the M28 family of the MH clan [1]. The peptidase family M28 contains aminopeptidases and carboxypeptidases. All the enzymes are cocatalytic zinc metalloproteinases, where each zinc ion is coordinated with three amino acid ligands and water milieu. Two additional residues, an Asp and a Glu, are important for catalysis [2]. The aminopeptidases of the family are able to release a variety of unsubstituted N-terminal amino acids. IAP aminopeptidase [3] and aminopeptidase Y [4] preferentially release basic amino acids. Carboxypeptidases from M28, glutamate carboxypeptidase II [5] and plasma glutamate carboxypeptidase [6], efficiently hydrolyze dipeptides and each was formerly believed to be only a dipeptidase. The inhibitors of the family illustrate the two roles of the catalytic zinc ions, i.e., stabilization of the tetrahedral intermediate and the activation of the water molecule. EDTA and 1,10-phenanthroline, as the metal chelators, are general inhibitors of the family. In addition, glutamate carboxypeptidase II is inhibited by replaced phosphonylglutamates [7]. The most characterized enzyme of the family is glutamate carboxypeptidase II. It is also known as a marker in prostate cancer and an intracellular form may be responsible for the cell resistance of some tumors to methotrexate, the antifolate drug used in cancer treatment [8]. The tertiary structures have only been confirmed

for aminopeptidase S [9], glutamate carboxypeptidase II [10], and aminopeptidase Ap1 [11].

PGCP requests Zn^{2+} ions for activity, which is common to all the members of the metalloproteinase gene family. It has been shown that the protein is a homodimer glycoprotein with a molecular mass of about 100 kDa, determined under native conditions [6], and 56 kDa under denaturing conditions [12]. The recombinant PGCP, expressed without propeptide, was able to form the dimer [13], and it was demonstrated that PGCP has carboxypeptidase activity [12]. However, it was also shown that PGCP more efficiently catalyzes the hydrolysis of dipeptides with unsubstituted terminals [6].

The exact physiological substrates of PGCP are unknown, although this enzyme may play an important role in the hydrolysis of circulating peptides [12]. It was suggested that PGCP participates in the thyroid gland in the release of the hormone thyroxine (3,5,3,5-tetraiodothyronine) from the 660 kDa thyroglobulin [14]. PGCP also takes part in hepatitis-C-virus-associated hepatocellular carcinoma [15]. The authors showed a pronounced up-regulation of the enzyme in the bloodstream of about 60–70% of all the tumors. Due to the possibility of a serological analysis of the hepatitis-C-virus-infected patients with hepatocellular carcinoma, the PGCP might be a good candidate as a target for a diagnostic marker. In addition, the results of animal studies on rats indicated that PGCP is involved in liver regeneration when its expression is finely regulated during proliferation [16].

High levels of PGCP were found in plasma [12] and in the thyroid gland [14]. The protein was isolated from a bovine spleen and a rat liver [17], a human placenta [12], human kidneys [6],

* Corresponding author. Fax: +386 1 4773984.
E-mail address: iztok.dolenc@ijs.si (I. Dolenc).

and a thyroid gland [14]. It was expressed in small quantities in African green monkey kidney cells COS-1 [12]. A Western Blot analysis showed that the proenzyme was synthesized as a precursor of 62 kDa and within six hours activated to a mature form of 56 kDa, containing two Asn-linked oligosaccharide chains. PGCP was also expressed in bacteria without propeptide in an insoluble form and refolded in a high salt concentration [13]. However, all these methods resulted in poor yields.

Here, we present for the first time a successful expression and purification of the mature form of human PGCP from baculovirus-infected insect cells. The recombinant protein was purified through different chromatographic columns, resulting in the yield of a high-purity protein of 8–10 mg/l. Such a yield allows us to conduct a further biological characterization and structural studies.

Materials and methods

Materials

The oligonucleotide primers were synthesized by Eurofins MWG Operon (Germany) and the restriction enzymes were from New England Biolabs, UK. The plasmid pFastBac1, *Escherichia coli* DH10Bac cells, and insect cell lines Sf9 were purchased from Invitrogen, Germany. The insect cell-culture medium HyQ SFX – Insect MP was from Thermo Scientific, Germany. The hydroxyapatite resin was from HA Ultrogel; Pall Corporation, USA. All the other chromatography media and the FPLC system were from GE Healthcare, USA. The gel filtration standards were from Bio-Rad, USA. The dialysis tubes were from Serva, Germany.

cDNA cloning of PGCP

The cDNA encoding preproPGCP from human clone DNA (RZDP, Germany) was used as a template to amplify the human PGCP (1.4 kb) using the polymerase chain reaction. The 5'-sense primer (5'-ATCTCGAGCGCCACCATGAAATTCCTTATCTTCG-3') introduced a consensus Kozak translation initiation sequence (underlined) and a *XhoI* restriction site to facilitate cloning. The 3'-antisense primer (5'-TAGGTACCCCTAGGACCTAGGCA GCATTC-3') introduced a *KpnI* restriction site after the stop codon. The fragment was digested with *XhoI* and *KpnI* and cloned into the pFastBac1 expression vector. The nucleotide sequence was confirmed by DNA sequencing.

Site-directed mutagenesis E336G of PGCP

A mutation of glutamic acid in the predicted active site of PGCP into glycine (merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famwrap/famcards/aln/m28b_xal.htm) was done. The sets of oligonucleotides, each harboring a mutation for a single amino acid, were used (5'-GCTCTGGACTGCAGGAGACAAGGTGGAG-3', 5'-CTCCACCTGTTCTCCTGCAGTCCAGAGC-3'). The amplification of the pFastBac1 vector comprising the gene for the PGCP was performed. The polymerase chain reaction products were treated with the restriction enzyme *DpnI* to digest the parental template DNA. The reaction mixture was directly transformed into *E. coli* for amplification. Sequencing analysis was performed to verify the mutation. The expression was carried out following the same procedural way as is described for the original protein.

Insect cell culture

The Sf9 insect cells were maintained and propagated at 27 °C in either a monolayer or as 400 ml suspension cultures in roller bottles (1–2 l volume). The suspension cultures were grown at a constant orbital shaking speed of 97 rpm in a filtered, serum-free,

liquid medium, without the addition of fetal bovine serum. The stock cells grown in suspension were seeded at 1×10^6 cells/ml and the cells were passaged every 2–3 days while still in the log phase ($4\text{--}6 \times 10^6$ cells/ml). The viable cell counts were determined by Trypan blue exclusion (Sigma) and cultures with viabilities below 97%. The cell density at the time of infection was 2.5×10^6 cells/ml.

Preparation of recombinant baculovirus

The recombinant viruses were analyzed for their ability to express active PGCP. The transfection of the Sf9 cells with the pFastBac1-PGCP and the pFastBac1 as a control was performed according to the manufacturer's instructions (Bac-to-Bac, BEVS Manual, Invitrogen). The virus extracted from well-isolated plaques was used to infect the Sf9 cells in the culture and the samples of the culture medium were used to produce the stocks. Selected isolates were purified by one additional round of plaque purification, and the master virus stocks were prepared by a subsequent amplification on the Sf9 cells in the culture medium. The high titer viral stocks (from $10^7\text{--}10^8$ pfu/ml) used for the production of recombinant PGCP were obtained by amplification on the Sf9 cells in the suspension using the multiplicity of infection MOI = 0.01–1.05. The virus titers were determined by plaque assay.

Expression of recombinant mature PGCP in insect cells

For the optimization of the experiments, a 2 ml culture of Sf9 cells in the monolayer (6-well plates) was infected with the recombinant baculovirus. The cell densities at the time of infection were varied in the range 1×10^6 to 2×10^6 cells/ml. For the optimization assay, the multiplicity of infection (MOI) at 2, 5 and 10 pfu/ml was used. The cells were harvested at regular intervals from day 1 to day 8 and samples were collected and analyzed for PGCP activity on each day from day 1. The PGCP enzyme activity was measured in the clarified medium (14,000g, 2 min) but not in the cell extracts. The crude extracts were prepared by resuspension of the cell pellets in the Sf9 lysis buffer (20 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, and pH 7.5), mixed on ice, and centrifuged at 14,000g for 30 min. The media and supernatants (crude extracts) were analyzed by SDS-PAGE and Western Blot for the recombinant PGCP expression.

In the purification procedure, the recombinant PGCP was expressed in a 400 ml suspension culture. The cells were seeded to a density of 2.5×10^6 cells/ml with a viability above 98% and infected with an MOI of 10 with the recombinant human PGCP baculovirus. The infected cells were harvested at 1–8 days post-infection. After six days post-infection the culture medium was purified from the cells and collected by centrifugation (10,000g, 7 min, at room temperature).

Expression of recombinant pro-PGCP in insect cells

The whole procedure was performed in the same way as described for the mature recombinant PGCP, except that the cells were harvested on day three post-infection to obtain the precursor form of PGCP.

Purification of recombinant PGCP

The serum-free and clarified supernatant (400 ml) containing the recombinant enzyme was collected on the 6th day after infection. The recombinant PGCP in the supernatant was first purified by the hydroxyapatite column. All the purifications, including subsequent steps, were performed at room temperature, if not

declared differently. The column was pre-washed with 2 l of wash buffer (0.05 M NaH₂PO₄ buffer, pH 5.9, 0.2 M NaCl). After loading of the sample (with a flow rate of approximately 1 ml/min), unbound proteins were washed away until the absorbance at 280 nm, measured against the buffer, fell to zero. After washing, the proteins were eluted with an elution buffer (0.5 M NaH₂PO₄ buffer, pH 5.9, 0.2 M NaCl) at a flow rate of 0.5 ml/min, with monitoring absorbance at 280 nm. The highest absorbance samples were collected and dialyzed overnight at 4 °C against 20 mM Tris/HCl buffer, pH 7.0.

The dialyzed sample after the hydroxyapatite chromatography was further purified by anion exchange chromatography on a Mono-Q Sepharose using FPLC. The column was pre-washed with the elution buffer (20 mM Tris/HCl buffer, pH 7.5, 0.5 M NaCl) and pre-equilibrated with the equilibration buffer (20 mM Tris/HCl buffer, pH 7.5). The proteins were eluted with a linear gradient of the equilibration buffer to the elution buffer in 30 min at a flow rate of 1 ml/min. The fractions with dipeptidase activity against the dipeptide Ser–Met were collected, concentrated and further purified.

The next step of the purification was gel filtration chromatography on the FPLC. The pool from the anion exchange chromatography was separated in the gel filtration FPLC using a Superdex 200 HR column. The running buffer used for the protein elution was 20 mM Tris/HCl, pH 7.5, containing 0.15 M NaCl at a flow rate of 0.1 ml/min. Fractions of about 100 kDa were collected and assayed for PGCP activity.

To completely separate the active form of PGCP from the inactive, affinity chromatography was performed on the Phe–Leu–Sepharose column. The binding of the dipeptide to the matrix was slightly modified from the described method [18]. One gram of Epoxy-activated Sepharose (GE Healthcare) was washed on a glass filter with 200 ml of distilled water and incubated for 24 h at 37 °C with 5 ml of 0.25 M Phe–Leu dipeptide (Sigma) in 0.02 M NaOH, under constant stirring. Unreacted epoxy groups were blocked by the further incubation of the gel in 1 M ethanolamine, pH 10.8, for 4 h. The prepared gel was put in a glass column and washed with distilled water, 0.1 M sodium bicarbonate buffer, pH 8.0 and 20 mM sodium acetate buffer, pH 4.75, with 0.15 M NaCl.

The purification of the PGCP in the Phe–Leu–Sepharose column was performed in a similar way to that described in [12]. The dipeptide-Sepharose was equilibrated with the wash buffer (20 mM sodium acetate buffer, pH 4.75, containing 0.15 M NaCl). The concentrated PGCP fraction (6 ml) was acidified to pH 4.75 with the addition of approximately 2 ml of 0.1 M sodium acetate buffer, pH 3.5 which included 1 M NaCl. The mixture was centrifuged (16,000 rpm, 4 °C) for 15 min and applied to the pre-washed column. The unbound proteins were washed from the column with 30 ml of the wash buffer. The adsorbed PGCP was eluted from the affinity column with 20 mM Tris/HCl buffer, pH 7.5. The PGCP activity was eluted as a single peak in the first 2 ml of the elution buffer. The PGCP was concentrated to 3 mg/ml. Typically, the final yield of high-purity PGCP was 3 mg of active enzyme per 400 ml of culture media, which corresponds to 8–10 mg/l. Purification efficiency of the recombinant PGCP is shown in Table 1.

Each step of the purification process was analyzed by SDS–PAGE analysis and Western Blotting. The pure active form of the PGCP was unstable and the protein lost activity within 2 days. In contrast, the proenzyme was stable after freezing at –20 °C.

Enzyme activity assay

The PGCP activity was measured on a Perkin-Elmer LS-50 spectrofluorimeter using 96-well titration plates at excitation and

emission wavelengths of 390 and 475 nm, respectively. The fluorescence was determined by spectrofluorimeter measurements of the initial rate of hydrolysis of the fluorogen substrate Ser–Met (Sigma) at 37 °C. One unit was defined as the amount of enzyme required to convert 1 μmol of substrate per minute under the described conditions. To measure the activity of the samples from the culture medium the assay was performed as follows: to 25 μl of enzyme solution 910 μl of 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5 including 15 mM zinc acetate was added, followed by the supplementation of 25 μl of 10 mM substrate Ser–Met. The samples of 20 μl were collected at the beginning of every two minutes, and later on every 10 min, for about 1 h. At each incubation time the reaction was stopped by the addition of 700 μl of 20 mM sodium borate buffer, pH 8.5, and 50 μl of fluorescamine solution (0.2 mg/ml) was added. The contents in the tube were immediately mixed and the change in absorbance at 475 nm was measured. The control was tested in the same way, except that the substrate was added after the borate buffer. A qualitative test for PGCP activity of the sample represents the difference in fluorescence between the sample and its blind probe.

The effect of chloride ions on dipeptide hydrolysis with PGCP was validated by addition of NaCl in concentration up to 0.2 M. The inhibition of PGCP was measured with final concentrations of following inhibitors: 0.25 mM EDTA buffer, 0.1 mM and 1 mM DTPA (diethylenetriamine pentaacetic acid), 0.25 mM bestatin. Additionally, the effects of carnosine as well as the thyroid hormone, thyroxine, on the PGCP activity were examined. The solution concentration of carnosine was 0.25 mM, whereas the concentration of thyroxine was 10 μM. An impact of different divalent metal ions on activity was observed. Final 5 mM reaction solutions of CoCl₂, CdCl₂, MgCl₂, MnCl₂, or CuSO₄ were used to compare the activity to above described 5 mM zinc acetate solution in the buffer.

In Vitro Maturation of PGCP Pro-Form

The pro-PGCP activation assay was the same as the above-described enzyme-activity assay, and 2 μg of cathepsin L (or cathepsin B, or cathepsin K) was added together with 2 mM DTT. The reaction was stopped after 5 min. Control assays were prepared without cathepsin or without pro-PGCP.

Deglycosylation of recombinant PGCP

Expressed recombinant PGCP was deglycosylated under denaturing conditions with Endo H and PNGase F according to the manufacturer's recommended protocol (NEB, UK). The resulted protein was analyzed using Western blot.

Mass spectrometry analysis

Purified proteins were applied to SDS–PAGE and the bands were excised and prepared for identification using mass spectrometry. The protein bands were reduced by DTT, alkylated and digested by trypsin. The digested samples were analyzed using a MSD Trap XCT ultra mass spectrometer (Agilent) coupled to an Agilent 1200 HPLC unit. The database searches were performed using the NCBI nr protein database and the Spectrum Mill database search algorithm.

N-terminal amino acid analysis

The N-terminal sequencing was carried out using automated Edman degradation with an Applied Biosystems liquid pulse sequencer 475 A (USA) connected online to a phenylthiohydantoin analyzer 120 A from the same manufacturer.

Table 1
Purification efficiency of the recombinant PGCP.

Purification steps	Total protein ^a (mg)	Total activity ^{b,c} (U)	Specific activity (U/mg)	Fold purification	Yield (%)
Culture media	610	16,400	27	1	100
Hydroxyapatite column	157	10,200	65	2.4	41
Anion exchange chromatography	37	2920	79	2.9	34
Gel filtration chromatography	9	2200	245	9.1	11

^a Protein concentration was determined by Bradford protein assay.

^b Enzyme activity was determined with the dipeptide substrate Ser–Met as described in "Materials and methods".

^c One unit (U) is the amount of enzyme PGCP that catalyzes the reaction of 1 μmol of substrate Ser–Met per minute.

Results and discussion

Expression strategy for recombinant human PGCP

So far, two descriptions of the preparation of the enzyme have been reported. A mammalian cell culture system [12] was not used for the protein purification, whereas the bacterial expression system yielded insoluble material [13]. Here, the production of recombinant human-blood plasma glutamate carboxypeptidase (PGCP) using the baculovirus expression system was demonstrated. The baculovirus expression system has a number of potential benefits, including high level expression, correct folding, post translational modification and the production of biologically active proteins for analysis. One of the potential disadvantages of this system is the virus lytic system, when proteases are released into the medium by the insect host cells, and the resulting proteolysis could be a problem for a secreted recombinant PGCP protein [19]. Therefore, in the experiments a serum-free medium was used, thus reducing the level of extraneous proteins in the culture medium and facilitating the purification of the secreted recombinant products.

PGCP is a lysosomal metallopeptidase of 472 amino acids and has the unique physiological characteristics of catalyzing the hydrolysis of dipeptides with unsubstituted terminals on the amino acids, which indicates its involvement in protein turnover [6]. Due to the potential problems of recombinant PGCP, fast proteolysis and/or autolysis, the use of a secreting baculovirus system was applied. The transfer vector pFastBac–PGCP was constructed to carry the sequence encoding the entire preproenzyme. As a precaution to preserve full activity, no tags for simplified purification were fused to the PGCP. It is known that the protein terminals could be involved in substrate recognition, as in some exopeptidases. The N-terminal Asp of the polypeptide chain of cathepsin C [20], which is homotetramer [21], positions the substrate into the enzymes active site cleft, which reflects in the dipeptidylaminopeptidase activity [22]. The C-terminal of the human glutamate carboxypeptidase II, from the same protease family, was found to be critical to the hydrolytic activity of the enzyme. The tag attached to the C-terminal seriously reduced the enzyme activity [23]. Later it was shown that C-terminal truncation disrupts the PSMA dimerization [10]. Any similar behavior of the PGCP would result in the influence of a fusion tag on the protein's termini, and would interrupt the enzyme activity.

Optimization of recombinant PGCP expression

Experiments were carried out to determine the optimum conditions for recombinant PGCP expression in terms of cell type, cell density, medium, multiplicities of infection (MOI), and time of harvest. Good results were achieved with Sf9 suspension cells grown in a serum-free medium. However, the High Five insect cells have a tendency to form aggregates. Consequently, the serum-free medium reduces the level of extraneous proteins in the culture medium and facilitates the purification of the secreted recombinant products. By optimizing the batch size, the MOI, and the time of

harvest, the conditions were obtained for a reproducible protein expression of human recombinant PGCP. A freshly prepared virus was used for the optimization of the full-length PGCP expression. A MOI of 2, 5 and 10 in time-course experiments was applied on monolayer cultures of the Sf9 insect cells. Regular intervals started on day 1 and lasted until day 8, and the total and viable cell counts were monitored. The yield of PGCP in all the multiplicities was elevated. However, a slight increase was evident at MOI 10. After being analyzed by SDS–PAGE and Western Blot, the detected PGCP had a protein band with an apparent Mw at 60–65 kDa and an additional row of lower molecular bands in the 55 kDa region (Fig. 1). The protein cleavage, which yielded an active protein, was observed in serum-free conditions when the cell viability was low (<50%). The baculovirus expression system used does not require multiple rounds of plaque purification due to the absence of the parental virus DNA during a site-specific transposition to generate the recombinant bacmid DNA according to the manufacturer's manual (Bac-to-Bac, Invitrogen). Therefore, one round of plaque purification was carried out, as suggested in the manual, which amplifies the recombinant virus from a single viral clone in order to remove any non-recombinant virus that may be present. One round of plaque purification was found to improve the reproducibility of the results. Positive samples clearly turned yellow after incubation at 37 °C for 24–48 h, while negative controls (from plaques of wild-type pFastBac1) were only slightly colored. The test revealed that most of the plaques forming viruses led to an expression of the active recombinant PGCP.

Expression of recombinant PGCP in insect cells

The cultures of suspension Sf9 insect cells were infected with the recombinant baculovirus obtained from pFastBac1, using MOI

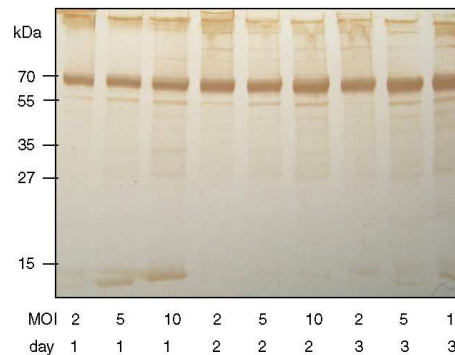


Fig. 1. The expression of human PGCP performed in monolayer insect Sf9 cells was optimized by MOI and time and followed by Western Blot. The expressions of the pro-form and mature form of PGCP are seen at 60–65 kDa and a thin band at 55 kDa, respectively. The expressed PGCP was first observed after three days at different multiplicities of infection (2, 5 and 10).

10. The expression was analyzed by Western Blot, using a polyclonal antibody raised against the PGCP. The pellets coming from pFastBac-PGCP infected insect cells between the 1st and the 8th day were analyzed, washed to remove residues in the cell culture, and lysed by the Sf9 lysis buffer. After centrifugation, as judged by SDS-PAGE and Western Blot, no PGCP remained in insoluble fractions, but a large amount of PGCP was discovered in the medium. Overexpressed bands for an approximate molecular weight of 60–65 kDa and 55 kDa were detected in the culture medium and corresponded to the pro-PGCP and the mature PGCP (Fig. 2). A similar level of secreted pro-PGCP was obtained for the first three days post-infection. The expression peak of mature PGCP was obtained in the medium of Sf9 infected cells after day 3 until day 8, as a band of Mw of about 55 kDa. Comparing our data to the fluorograph of pulse chase labeling and of PGCP expressed in COS-1 cells [12] show the same electrophoresis pattern. In both experiments the proenzyme is rapidly transferred into a mature form. The non-cellular accumulation of expressed PGCP indicated that the native human signal peptide was efficiently recognized by the insect cells. No expression was found in the uninfected cell extracts.

When the expressions of PGCP in the monolayer culture (Fig. 1) and the suspension culture (Fig. 2) were compared, a much higher accumulation of pro-PGCP in the monolayer culture was observed.

Purification and identification of the human recombinant mature PGCP

The main goal was to produce purified recombinant human PGCP in sufficient quantities for further characterization and structural studies of this interesting, but unexplored, enzyme. The mature enzyme was purified six days after infection. Optimization of the infection and the purification conditions was essential to obtain a substantial, reproducible yield of recombinant PGCP. The protein was purified by a combination of various liquid chromatographies. After removing the cells, the medium was directly applied to hydroxyapatite chromatography. PGCP was bound to the resin under a low phosphate concentration, and eluted with a high phosphate concentration. Pooled and dialyzed fractions were then applied to anion exchange chromatography. The elution with a salt gradient gave a high purification yield. During this purification step the active PGCP was separated from the majority of the inactive proteins. An additional purity was reached with the gel filtration chromatography. The protein composition and the purity of the fractions from the gel filtration chromatography were analyzed by SDS-PAGE (Fig. 3) and Western Blot analysis. The mass-spectrometry analyses proved that the purified protein was PGCP. When these fractions were analyzed for dipeptidase activity, an active protein peak with a retention time corresponding to a Mw

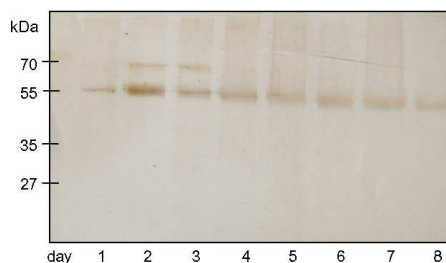


Fig. 2. Time course of human PGCP expression, followed by Western Blot, was observed after eight days in a suspension insect Sf9 cells. The expression of the pro-form of PGCP is seen at 60–65 kDa for the first three days. The protein is converted to the mature form (55 kDa). This activation is rapid from day four on, which means that proenzyme is not seen anymore.

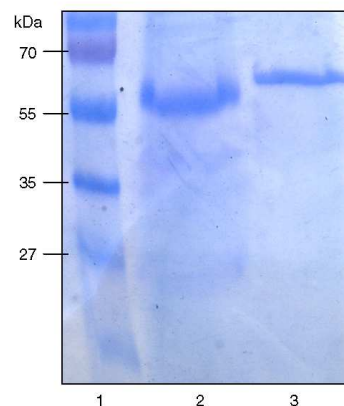


Fig. 3. SDS-PAGE of purified recombinant human PGCP after gel chromatography column. Line 1, molecular weight standards; line 2, mature PGCP with molecular weight 55 kDa; line 3, pro-PGCP with molecular weight 60–65 kDa.

of about 100 kDa was observed (Fig. 4), indicating that the active PGCP consists of two subunits. This Mw corresponds to previously published data [6,12]. The N-terminal amino acid sequence analysis showed a mixture of different truncated N-terminal sequences of PGCP, which represents intermediates between the pro-PGCP and the mature PGCP (Fig. 5).

Similar to the PGCP, aminopeptidase Ap1 [24] and the aminopeptidase AC [25], members of the same M28 family, show the appearance of these intermediates from the proenzyme of the enzyme. Whether the intermediate forms of PGCP affect the dipeptidase activity remains unclear. When a purified sample from the gel chromatography step was applied to the Phe-Leu-Sepharose column, the enzyme activity was highly increased. The active PGCP was completely separated from impurities (Fig. 3). However, the highly purified enzyme was unstable and rapidly lost enzyme activity.

Deglycosylation of recombinant PGCP

Deglycosylation of the recombinant protein was performed with Endo H and PNGase F. The change in the molecular weight

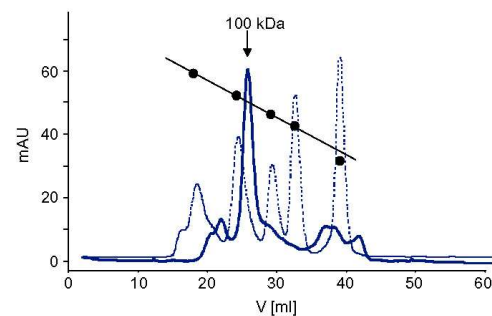


Fig. 4. Gel filtration chromatography on the Superdex-200 column and the molecular-weight analysis of mature PGCP. On the lower panel is the chromatogram of eluted mature PGCP (solid line) and the superimposed chromatogram of standard proteins (dotted line). The calculation diagram is shown using gel filtration standards (thyroglobulin 667 kDa, gamma globulin 158 kDa, ovalbumin 44 kDa, myoglobin 17 kDa, and vitamin B12 1.35 kDa). The enzyme is eluted as a dimer with a molecular mass 100 kDa.

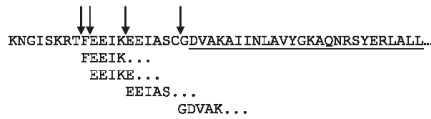


Fig. 5. The N-terminal amino acid sequence analysis shows isolated mature PGCP with different cleavage points (arrows) of maturation. The experimentally determined mature enzyme from isolated PGCP is underlined. The different truncation, as result of activation, is caused by the unspecific action of insect protease(s) on the expressed protein.

produced with PNGase F shows a complex or hybrid N-glycosylation structure of the recombinant PGCP (Fig. 7).

Purification and identification of the human recombinant pro-PGCP

Additionally, the pro-PGCP was isolated (Fig. 3), using the same purification techniques as described above, but with one minor change. To achieve a higher yield of pro-form, a three-day expression was used. The inactive PGCP eluted on the gel filtration at a later retention time, with a Mw of about 50 kDa (data not shown).

Activation of pro-PGCP into mature form

The dipeptidase activity of the PGCP was assayed for the cleavage of the dipeptide substrate Ser–Met during purification and activation from pro-PGCP procedures. The disadvantage of the method is its low sensitivity. More than 30% of the substrate should be hydrolyzed to detect the activity. The enzyme activity is higher in the presence of chloride ions (Fig. 6). As PGCP is a metalloproteinase, we observed the substrate degradation in the presence of different divalent metal ions. Zn^{2+} ions have the highest impact here. Mn^{2+} and Co^{2+} ions restored approximately one fifth of the zinc activity. No activity of PGCP was detected using Mg^{2+} , Cu^{2+} or Cd^{2+} ions. These results show that the PGCP activity

can be modulated by the identity of the divalent metal ion. Several chelating reagents are able to remove catalytic ions. The inhibitory effect of 0.25 mM EDTA buffer demolished the enzyme activity immediately. Diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA), a membrane impermeable metal chelator, which can be used in cell secretion experiments, also inhibited the enzyme efficiently at 1 mM concentration. A ten times lower concentration of the same inhibitor showed no effect. In Fig. 6 is shown that bestatin, a small molecular weight dipeptide, strongly inhibits PGCP. Bestatin is used as a drug and can prolong the disease-free interval and survival period in adult acute or chronic leukemia [30]. Carnosine has the same peptide backbone as bestatin [31], but shows neither influence on Ser–Met hydrolysis, nor is it degraded. PGCP is involved in the processing of the thyroid hormone, thyroxine, from thyroglobulin [14], therefore a possible inhibition feedback effect of the hormone was investigated. Anyhow, there was no change in Ser–Met degradation at 10 μ M thyroxine concentration.

As shown in Fig. 2, the PGCP was activated after secretion into the media. Autoactivation would require endopeptidase activity. The PGCP possesses only dipeptidase and carboxypeptidase activity [6,12,17], indicating that autoactivation will not proceed. However, insect cells express several endogenous cathepsin-like activities, which are secreted and could function as activators of proenzymes. They are good candidates for the maturation and activation of PGCP [19]. The expression of the procathepsin C in insect cells resulted in the successful activation to mature cathepsin C by cathepsin L [26]. In view of these results, the activation of the purified PGCP precursor was performed by recombinant cathepsins B, L, and K in a slightly acidic environment (Fig. 6). Human recombinant cathepsins B, L, and K were expressed in bacteria or yeast and purified, as reported in [27–29]. The activation, using cathepsin L, was only partially successful, due to the low activity yield from the precursor form. On the other site, using cathepsin B and K, we could not detect any maturation, indicating that these two enzymes might not be involved in the maturation process of PGCP.

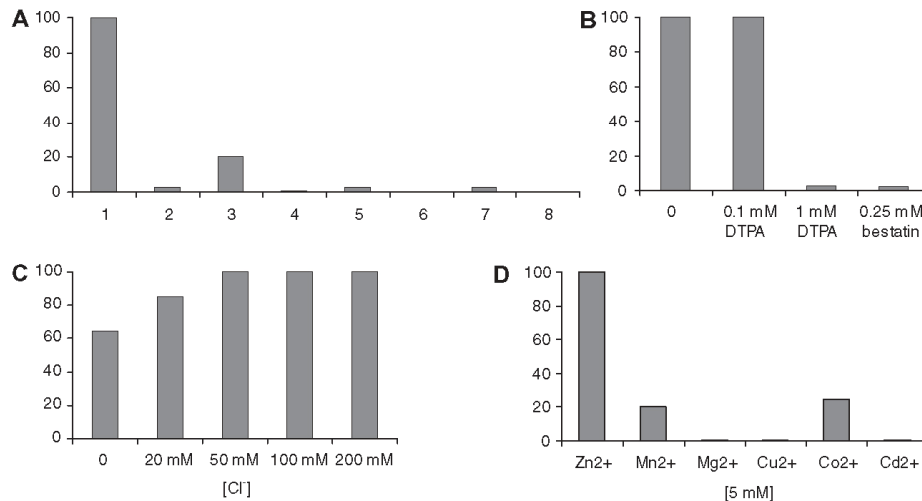


Fig. 6. (A) Purified pro-PGCP was activated by the recombinant human cathepsins L, B, and K in a slightly acidic environment. Relative activities are presented. Line 1, recombinant mature PGCP; line 2, recombinant pro-PGCP; line 3, pro-PGCP activated with cathepsin L; line 4, cathepsin L; line 5, pro-PGCP activated with cathepsin B; line 6, cathepsin B; line 7, pro-PGCP activated with cathepsin K; line 8, cathepsin K. (B) Inhibition of PGCP with DTPA and bestatin. (C) The influence of increasing concentration of chloride ions on PGCP activity. (D) The influence of 5 mM concentration of different divalent ions on PGCP activity.

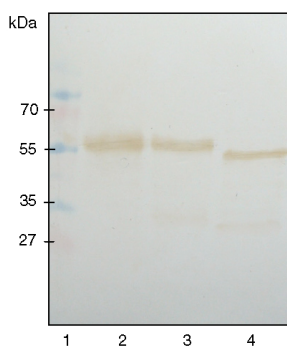


Fig. 7. Deglycosylation of recombinant PGCP expressed in insect cells Sf9. Line 1, molecular weight standards; line 2, recombinant PGCP; line 3, deglycosylation with Endo H; line 4, deglycosylation with PNGase.

It was shown previously that dimer formation is required for the completion of the activation process [13]. Based on the pro-PGCP processing, a plausible mechanism for PGCP maturation can be assumed. Zymogene monomers, which are formed during the biosynthesis, are transported to the medium. Catalytic processing of the zymogene is initiated by the cleavage in the region of the monomer propeptide. This cleavage results in the removal of the propeptide. The dimerization process simultaneously occurs with the activation of the enzyme [13]. These results may stimulate further studies on the activation of pro-PGCP *in vivo* and the possible impact of this process on the dipeptide hydrolysis.

Site-directed mutagenesis E336G

The glutamic acid on position 336 (E336) of PGCP is an analogue to the glutamic acid 151 (E151) of the aminopeptidase from *Vibrio proteolyticus* from the same family M28 [24]. It has been shown that this amino acid is catalytically essential for the substrate hydrolysis. E151 acts as the general acid/base during the catalytic mechanism of peptide hydrolysis. Substitution of E151 with histidine resulted in an active enzyme, but substrate hydrolysis

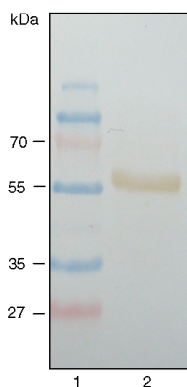


Fig. 8. Expression of recombinant PGCP mutant E336G in insect cells Sf9. The expression was performed four days in a suspension insect Sf9 cells and analyzed by Western Blot. The expressed mutant was unable to hydrolyze the dipeptide Ser-Met.

was much slower [32]. Site-directed mutagenesis of the analogue active site residue in glutamate carboxypeptidase II into glutamine had a similar effect [33]. Both residue changes yielded functional proteins and during substrate hydrolysis they still have a role of a proton shuttles to the leaving group of the substrate. No mutation into non-reactive amino acid (e.g. glycine) has been performed so far. The mutant E336G of PGCP was expressed in insect cells (Fig. 8) with the same procedure as for the principal protein (see above). The activity assay on the substrate Ser-Met showed that the expressed protein was inactive. The experiment demonstrated that the glutamic acid also in the PGCP functions as proton shuttle removing a proton from the zinc-bound catalytic water and, during or after substrate cleavage, transfers it to the leaving group as was proposed for glutamate carboxypeptidase II [33]. The mutation on position 336 of PGCP into glycine interrupted the shuttle process and the enzyme became inactive.

In conclusion, the baculovirus expression system in Sf9 insect cells can be efficiently used for the production of soluble and active human PGCP. The purification procedure resulted in an active enzyme and sufficient quantities to carry out further functional and structural studies.

Acknowledgments

We thank Dr. Marko Fonovič for technical support with the mass-spectrometry analysis. We thank Prof. Vito Turk for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Slovenian Research Agency research program P1-0140 led by Dr. Boris Turk.

References

- [1] N.D. Rawlings, F.R. Morton, C.Y. Kok, J. Kong, A.J. Barrett, MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Research* 36 (2008) D320–D325.
- [2] B. Chevrier, H.D'Orchymont, C. Schalk, C. Tarnus, D. Moras, The structure of the *Aeromonas proteolytica* aminopeptidase complexed with a hydroxamate inhibitor: Involvement in catalysis of Glu151 and two zinc ions of the co-catalytic unit, *European Journal of Biochemistry* 237 (1996) 393–398.
- [3] D.K. Agrawal, B.L. Wanner, A phoA structural gene mutation that conditionally affects formation of the enzyme bacterial alkaline phosphatase, *Journal of Bacteriology* 172 (1990) 3180–3190.
- [4] H.B.v.d. Hazel, C.K.-B. Morten, R.W. Jakob, Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases, *Yeast* 12 (1996) 1–16.
- [5] R. Luthi-Carter, A.K. Barczak, H. Speno, J.T. Coyle, Molecular characterization of human brain N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase (NAALADase), *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 286 (1998) 1020–1025.
- [6] I. Dolenc, M. Mihelič, Purification and primary structure determination of human lysosomal dipeptidase, *Biological Chemistry* 384 (2003) 317–320.
- [7] P.F. Jackson, D.C. Cole, B.S. Slusher, S.L. Stetz, L.E. Ross, B.A. Donzanti, D.A. Trainor, Design, synthesis, and biological activity of a potent inhibitor of the neuropeptidase N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase, *Journal of Medicinal Chemistry* 39 (1996) 619–622.
- [8] N.D. Rawlings, A.J. Barrett, Structure of membrane glutamate carboxypeptidase, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology* 1339 (1997) 247–252.
- [9] H.M. Greenblatt, O. Almog, B. Maras, A. Spungin-Bialik, D. Barra, S. Blumberg, G. Shoham, *Streptomyces griseus* aminopeptidase: X-ray crystallographic structure at 1.75 Å resolution, *Journal of Molecular Biology* 265 (1997) 620–636.
- [10] M.J. Davis, M.J. Bennett, L.M. Thomas, P.J. Bjorkman, Crystal structure of prostate-specific membrane antigen. A tumor marker and peptidase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005) 5981–5986.
- [11] S. Rowsell, R.A. Pauptit, A.D. Tucker, R.G. Melton, D.M. Blow, P. Brick, Crystal structure of carboxypeptidase G2. A bacterial enzyme with applications in cancer therapy, *Structure* 5 (1997) 337–347.
- [12] R. Gingras, C. Richard, M. El-Alfy, C.R. Morales, M. Potier, A.V. Pshezhetsky, Purification, cDNA cloning, and expression of a new human blood plasma glutamate carboxypeptidase homologous to N-acetyl-aspartyl-alpha-glutamate carboxypeptidase/prostate-specific membrane antigen, *Journal of Biological Chemistry* 274 (1999) 11742–11750.
- [13] I. Dolenc, R. Pain, V. Turk, Presence of the propeptide on recombinant lysosomal dipeptidase controls both activation and dimerization, *Biological Chemistry* 388 (2007) 47–51.
- [14] A.D. Dunn, H.E. Myers, J.T. Dunn, The combined action of two thyroidal proteases releases T4 from the dominant hormone-forming site of thyroglobulin, *Endocrinology* 137 (1996) 3279–3285.

- [15] M.W. Smith, Z.N. Yue, G.K. Geiss, N.Y. Sadovnikova, V.S. Carter, L. Boix, C.A. Lazaro, G.B. Rosenberg, R.E. Bumgarner, N. Fausto, J. Bruix, M.G. Katze, Identification of novel tumor markers in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma, *Cancer Research* 63 (2003) 859–864.
- [16] M.A. Della Fazio, D. Piobbico, D. Bartoli, M. Castelli, S. Brancorsini, M.V. Magni, G. Servillo, Lal-1: a differentially expressed novel gene during proliferation in liver regeneration and in hepatoma cells, *Genes to Cells* 7 (2002) 1183–1190.
- [17] K.J. McDonald, B.B. Zeitman, S. Ellis, Detection of a lysosomal carboxypeptidase and a lysosomal dipeptidase in highly-purified dipeptidyl aminopeptidase I (cathepsin C) and the elimination of their activities from preparations used to sequence peptides, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 46 (1972) 62–70.
- [18] A.V. Pshchetsky, M. Potier, Direct affinity purification and supramolecular organization of human lysosomal cathepsin A, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 313 (1994) 64–70.
- [19] D. Broemme, F.S. Nallaseeth, B. Turk, Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases, *Methods* 32 (2004) 199–206.
- [20] A. Paris, B. Strukelj, J. Pungercar, M. Renko, I. Dolenc, V. Turk, Molecular cloning and sequence analysis of human preprocathepsin C, *FEBS Letters* 369 (1995) 326–330.
- [21] I. Dolenc, B. Turk, G. Pungercar, A. Ritonja, V. Turk, Oligomeric structure and substrate induced inhibition of human cathepsin C, *Journal of Biological Chemistry* 270 (1995) 21626–21631.
- [22] D. Turk, V. Janjic, I. Stern, M. Podobnik, D. Lamba, S.W. Dahl, C. Lauritzen, J. Pedersen, V. Turk, B. Turk, Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): Exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases, *EMBO Journal* 20 (2001) 6570–6582.
- [23] C. Barinka, P. Mlcochova, P. Sacha, I. Hilgert, P. Majer, B.S. Slusher, V. Horejsi, J. Konvalinka, Amino acids at the N- and C-termini of human glutamate carboxypeptidase II are required for enzymatic activity and proper folding, *European Journal of Biochemistry* 271 (2004) 2782–2790.
- [24] M. Hartley, B. Bennett, Heterologous expression and purification of *Vibrio proteolyticus* (*Aeromonas proteolytica*) aminopeptidase: a rapid protocol, *Protein Expression and Purification* 66 (2009) 91–101.
- [25] S. Nirasawa, Y. Nakajima, Z.Z. Zhang, M. Yoshida, K. Hayashi, Intramolecular chaperone and inhibitor activities of a propeptide from a bacterial zinc aminopeptidase, *Biochemical Journal* 341 (1999) 25–31.
- [26] S.W. Dahl, T. Halkier, C. Lauritzen, I. Dolenc, J. Pedersen, V. Turk, B. Turk, Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing, *Biochemistry* 40 (2001) 1671–1678.
- [27] R. Kuhelj, M. Dolinar, J. Pungercar, V. Turk, The preparation of catalytically active human cathepsin B from its precursor expressed in *Escherichia coli* in the form of inclusion bodies, *European Journal of Biochemistry* 229 (1995) 533–539.
- [28] M. Dolinar, D.B. Maganja, V. Turk, Expression of full-length human procathepsin L cDNA in *Escherichia coli* and refolding of the expression product, *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 376 (1995) 385–388.
- [29] C.J. Linnevers, M.E. McGrath, R. Armstrong, F.R. Mistry, M.G. Barnes, J.L. Klaus, J.T. Palmer, B.A. Katz, D. Bromme, Expression of human cathepsin K in *Pichia pastoris* and preliminary crystallographic studies of an inhibitor complex, *Protein Science* 6 (1997) 919–921.
- [30] K. Ota, N. Ogawa, Randomized controlled study of chemioimmunotherapy with bestatin of acute nonlymphocytic leukemia in adults, *Biomedicine and Pharmacotherapy* 44 (1990) 93–102.
- [31] J.F. Lenney, S.C. Peppers, C.M. Kucera-Orallo, R.P. George, Characterization of human tissue carnosinase, *Biochemical Journal* 228 (1985) 653–660.
- [32] K.P. Bzymek, A. Moulin, S.I. Swierczek, D. Ringe, G.A. Petsko, B. Bennett, R.C. Holz, Kinetic, Spectroscopic, and X-ray Crystallographic Characterization of the Functional E151H Aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica*, *Biochemistry* 44 (2005) 12030–12040.
- [33] H.S. Speno, R. Luthi-Carter, W.L. Macias, S.L. Valentine, A.R.T. Joshi, J.T. Coyle, Site-directed mutagenesis of predicted active site residues in glutamate carboxypeptidase II, *Molecular Pharmacology* 55 (1999) 179–185.