

## 12. vaja: Naloga

Proučujemo lizosomsko razgradnjo proteinov, za kar kot modelni organizem uporabljamo *Caenorhabditis elegans*, posebej pa nas zanimajo homologe človeških papainu podobnih cisteinskih peptidaz. Podrobneje bi radi preučili najbolj podobno peptidazo pri tem organizmu in sicer želimo:

- preveriti njeno lokalizacijo,
- sklepati na posttranslacijske modifikacije in procesiranje ter le-to primerjati s človeškimi homologe (tudi strukturno – glej spodaj),
- ugotoviti, kateri aminokislinski ostanki so neposredno udeleženi pri katalizi,
- analizirati molekularno površino v smislu porazdelitve naboja, še posebej v bližini aktivnega mesta, s čimer lahko približno napovemo substratno specifičnost te peptidaze,
- splošne strukturne podobnosti/razlike med človeškimi peptidazami tega tipa in tem homologom pri *C. elegans*.

Napovedane lastnosti želimo preveriti tudi eksperimentalno in sicer bomo za ta namen peptidazo iz *C. elegans* pripravili v rekombinantni obliki. Kot prvi korak pri molekularnem kloniranju želimo s PCR pomnožiti segment DNA, ki vsebuje zapis za celotno peptidazo (brez 5'- in 3'-UTR) – potrebujemo torej začetne oligonukleotide.

### Odgovor

Če ne vemo, moramo najprej ugotoviti katere so človeškemu papainu podobne cisteinske peptidaze. V bazi UniProt poiščemo zapis za papain in uporabimo orodje Blastp, da poiščemo podobna zaporedja v človeku. Med zadetki je več različnih katepsinov (angl. cathepsin), vendar vsi katepsini niso cisteinske peptidaze. Kateri katepsin je najbolj podoben je zelo odvisno od vnosa, ki ga uporabimo za iskanje (celoten protein, brez signalnega peptida ali samo zrele oblike). Najbolj podoben katepsin izberemo kot vnos za iskanje z Blastp po proteinih v *C. elegans*. Zopet, odvisno od izbire katepsina, je odvisno kateri protein bo na prvem mestu. V glavnem boste našli bodisi »Protein CPL-1«, bodisi »Gut-specific cysteine proteinase – CPR-1»

O lokalizaciji lahko več izvemo iz vnosa v UniProt-u, če je le ta izpopolnjen. V nasprotnem primeru lahko glede na lastnosti aminokislinskega zaporedja sklepamo ali gre za znotrajcelični, zunajcelični ali transmembranski protein. S pomočjo spletnih orodij lahko ugotovimo ali aminokislinsko zaporedje vsebuje transmembranski regijo in ali vsebuje signalni peptid. Signalni peptid in transmembranska regija nakazujeta na transmembranski protein, zgolj signalni peptid pa na zunajcelični protein.

O posttranslacijskih modifikacijah, konkretno o glikozilaciji, lahko sklepamo s pomočjo napovedi spletnega orodja NetNGlyc, o procesiranju pa na podlagi homologije s človeškim proteinom – tako ugotovimo, če protein vsebuje tudi propeptid.

Če želimo izvedeti kateri aminokislinski ostanki so neposredno udeleženi pri analizi je najbolje primerjati strukturo našega proteina s strukturo katepsina, za katerega je položaj aminokislinskih ostankov v aktivnem mestu znan. Da to lahko storimo najprej potrebujemo model, ki ga zgradimo z enim izmed orodij, ki so namenjene gradnji modelov. Pri tem je najbolje, če kot ogrodje (template) eksplicitno navedemo strukturo človeškega katepsina, ki smo ga že na začetku uporabili za iskanje s pomočjo orodja BlastP. Aminokislinski ostanki, ki so v modelu našega proteina iz *C. elegans*, po poravnavi (alignment) na istem mestu kot aminokislinski ostanki aktivnega mesta človeškega katepsina, so najverjetneje neposredno udeleženi pri katalizi.

Substratno specifičnost napovemo s primerjavo površine modela našega proteina s površino modela človeškega katepsina. Negativno nabite regije ob aktivnem mestu kažejo, da protein cepi za oziroma pred aminokislinskim ostankom s pozitivno nabito stransko skupino. Pozitivne regije ravno obratno, da cepi za oziroma pred aminokislinskim ostankom z negativno nabito stransko skupino, območje brez izrazitega naboja, pa da cepi pred oziroma za aminokislinskim ostankom s stransko skupino brez naboja.

Strukturne podobnosti lahko ugotovimo s prileganjem modela z več strukturami različnih katepsinov. Pri tem pričakujemo, da bo proteinsko jedro v glavnem ohranjeno, zato se osredotočimo predvsem na večje razlike (dodatni ali odsotni elementi sekundarne strukture, velikost zank...).

Ker gre za zadnjo vajo v tem primeru v rešitvah posamezni koraki niso konkretno nakazani. Vsa orodja, ki jih potrebujete za delo, so na voljo med povezavami v spletni učilnici. Konkretno katero orodje je potrebno

**12. vaja** – Papainu podobne peptidaze pri *C. elegans* (Miha Pavšič / maj 2014)

uporabiti, pa je tudi del priprave na kolokvij. V kolikor se bodo pojavila dodatna vprašanja sva asistenta dosegliva na elektronski pošti.