

Povzetek

Proteaze so pomembni regulatorji odziva na stres pri rastlinah, vendar točnih mehanizmov njihovega delovanja še ne poznamo. Pokazano je bilo, da so cisteinske proteaze, med katere spadajo metakaspaze, vakuolarni procesivni encimi in papainu podobne cisteinske proteaze, povezane z regulacijo celične smrti pri rastlinah, ki jo lahko sprožijo biotski ali okoljski stres. Enocelična zelena alga *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) je zaradi svojega enostavnega genoma v primerjavi z višjimi rastlinami odličen modelni organizem za proučevanje teh encimov, vendar slabo poznavanje molekularnih lastnosti njenih proteaz zavira nadaljnje raziskave njihovih funkcij.

V tem delu smo proučevali molekularne mehanizme delovanja izbranih s stresom povezanih cisteinskih proteaz alge *C. reinhardtii*. Z biokemijsko karakterizacijo obeh metakaspaz, CrMCA-I in CrMCA-II, smo raziskali optimalne pogoje za cepitev, njuno substratno specifičnost in mehanizem aktivacije, kar bo omogočilo nadaljnje proučevanje njihovih fizioloških funkcij. V sklopu tega dela smo prvi uspešno rekombinantno pripravili in okarakterizirali rastlinsko metakaspazo tipa I. Encim smo pripravili v topni obliki v *E. coli* z odstranitvijo kratke hidrofobne regije, ki jo vsebujejo le rastlinske metakaspaze tipa I. Poleg tega smo testirali novo orodje – sonde za detekcijo aktivnih metakaspaz. Te so selektivno zaznale le metakaspaze v njihovi aktivni obliki, kar nam je omogočilo proučevanje mehanizmov aktivacije in proteoliznega delovanja teh encimov *in vitro*.

Dodatno smo s fluorogenimi substrati, sondami za detekcijo aktivnosti proteaz in proteomskimi analizami preverili, katere cisteinske proteaze so prisotne in aktivne med celično smrtjo, ki se sproži ob dodatku 5 mM vodikovega peroksida (H_2O_2) v *C. reinhardtii*. Uporaba sond za detekcijo metakaspaz je vodila do odkritja nepričakovane aktivnosti prej neopisane papainu podobne proteaze CrCEP1. Ugotovili smo, da lahko proteaza ligira peptide na N-konce proteinov PsbO, PsbP in PsbQ, ki so komponente fotosistema II. S tem smo odkrili dvojno proteazno-transpeptidazno aktivnost CrCEP1 s potencialno fiziološko vlogo.

Predstavljeni rezultati izboljšujejo naše razumevanje obeh metakaspaz *C. reinhardtii* in papainu podobne cisteinske proteaze CrCEP1 ter obenem utirajo pot nadaljnjim raziskavam vloge proteaz pri odzivu *C. reinhardtii* na stres.

Ključne besede:

Chlamydomonas reinhardtii, s stresom povezana celična smrt, metakaspaze, papainu podobne cisteinske proteaze, sonde za detekcijo aktivnih proteaz, transpeptidacija.