

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tadeja PAPLER

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA HEMOPEKSINU
PODOBNEGA PROTEINA IZ BUKOVEGA OSTRIGARJA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tadeja PAPLER

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA HEMOPEKSINU
PODOBNEGA PROTEINA IZ BUKOVEGA OSTRIGARJA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A HEMOPEXIN-LIKE
PROTEIN FROM OYSTER MUSHROOM**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo, Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti, Univerze v Ljubljani in na Centru za masno spektrometrijo, Odsek za znanosti o okolju, Institut Jožef Stefan, Ljubljana.

Študijska komisija univerzitetnega študija biologije je na senatu dne 14.6.2012 za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Petra Mačka, za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčič in za predsednico komisije prof. dr. Marjano Regvar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marjana REGVAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof.dr. Peter MAČEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof.dr. Kristina SEPČIČ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 6.11.2012

Podpisana se strinjam z objavo svoje diplomske naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji. Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tadeja Papler

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

UDK 577.1:543.384:582.28(043.2)=163.6

KG bukov ostrigar/hemopeksinski motiv/Ni-NTA kromatografija/ostreolizin

A/Pleurotus ostreatus/vezavni partner

AV PAPLER, Tadeja

SA MAČEK, Peter (mentor) / SEPČIČ, Kristina (recenzentka)

KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2012

IN IZOLACIJA IN KARAKETRIZACIJA HEMOPEKSINU PODOBNEGA
PROTEINA IZ BUKOVEGA OSTRIGARJA

TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)

OP XII, 40 str., 10 preg., 8 sl., 25 vir.

IJ sl

JI sl/an

AI Namen diplomskega dela je bil izolirati vezavnega partnerja proteina ostreolizina A iz bukovega ostrigarja ter okarakterizirati njuno interakcijo, da bi s tem morebiti osvetlili funkcijo ostreolizina A v organizmu. S pomočjo Ni-NTA kromatografije nam je poleg ostreolizina A uspelo izolirati še neznan 25 kDa protein, za katerega smo sprva sklepali, da je vezavni partner ostreolizina A. Analize z masno spektrometrijo so protein uvrstile v družino proteinov s hemopeksinu podobnimi domenami (PF00045). Drugi predstavniki te proteinske družine so bili do sedaj že izolirani iz kraljestva bakterij, rastlin ali živali, ta pa je prvi protein s hemopeksinskim motivom izoliran iz glive. Metoda izolacije tako nativnega kot rekombinantnega proteina se je izkazala za ponovljivo, učinkovito in donosno. Kontrolni poskus pa je našo hipotezo, da je protein vezavni partner ostreolizina A, ovrgel.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dn

DC 577.1:543.384:582.28(043.2)=163.6

CX oyster mushroom/Hemopexin motif/Ni-NTA chromatography/ostreolysin
A/Pleurotus ostreatus/binding partner

AU PAPLER, Tadeja

AA MAČEK, Peter (supervisor) / SEPČIČ, Kristina (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2012

TI ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A HEMOPEXIN-LIKE
PROTEIN FROM OYSTER MUSHROOM

DT Graduation thesis (University studies)

NO XII, 40 p., 10 tab., 8 fig., 25 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The aim of this thesis was to isolate a binding partner of the protein ostreolysin A from the oyster mushroom and to characterize their interaction, in order to shed some light on ostreolysin's A function. Using Ni-NTA chromatography, we isolated not only ostreolysin A but also an unknown 25-kDa protein, which was initially considered as ostreolysin's A binding partner. Analysis by mass spectrometry classified this protein in a family of proteins with similar hemopexin domains (PF00045). While the other members of this protein family have so far been isolated from the kingdoms of bacteria, plants or animals, this is the first protein with a hemopexin motif isolated from fungi. Isolation methods of native and recombinant protein have proven to be repeatable, efficient and profitable. However, control experiment didn't confirm the isolated protein to be a binding partner of ostreolysin A.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
OKRAJŠAVE IMEN AMINOKISLIN	XII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI DIPLOMSKEGA DELA	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 EGEROLIZINSKA DRUŽINA PROTEINOV	3
2.1.1 Ostreolizin	3
2.2 HEMOPEKSINSKA NADDRUŽINA PROTEINOV	4
2.2.1 Hemopeksinski motiv	4
2.2.2 Razširjenost	4
2.2.3 Biološka vloga proteinov s hemopeksinskim motivom	7
2.2.3.1 Bakterija <i>Photorhabdus luminiscens</i>	7
2.2.3.2 Rastlinski semenski albumini	7
2.2.3.3 Limunektin	7
2.2.3.4 Nektinepsin	8
2.2.3.5 Lubricin	8
2.2.3.6 Vitronektin	8
2.2.3.7 Matrične metaloproteinaze (matrix metalloproteinases, MMPs)	8
3 MATERIALI IN METODE	10
3.1 MATERIAL	10
3.1.1 Kemikalije	10
3.1.2 Kompleti kemikalij	11
3.1.3 Aparature	11

3.1.4	Laboratorijski pribor	12
3.1.5	Gojišča.....	12
3.1.6	Raztopine.....	13
3.1.7	Encimi	14
3.1.8	Bakterijski sevi.....	14
3.1.9	Geli za elektroforezo	15
3.2	METODE DELA.....	16
3.2.1	Izolacija rekombinantnega proteina	16
3.2.1.1	Priprava kompetentnih celic	16
3.2.1.2	Transformacija kompetentnih celic.....	16
3.2.1.3	Priprava lizata iz transformiranih kompetentnih celic	16
3.2.1.4	Ni-NTA kromatografija.....	17
3.2.1.5	Dializa	18
3.2.2	Izolacija nativnega proteina	18
3.2.2.1	Priprava vodnega ekstrakta iz bukovega ostrigarja (<i>P. ostreatus</i>)	18
3.2.2.2	Ni-NTA kromatografija.....	18
3.2.3	Zasledovanje izražanja genskih konstruktov	19
3.2.3.1	Obarjanje s trikloroocetno kislino (TCA)	19
3.2.3.2	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS	19
3.2.3.3	Agarozna elektroforeza	19
3.2.3.4	Določanje koncentracije proteina	20
3.2.3.4.1	Določanje koncentracije z bicinoninsko-kislinskim testom (BCA)	20
3.2.3.4.2	Določanje koncentracije z NanoDrop sistemom.....	20
3.2.4	Izolacija plazmida	21
3.2.5	Kloniranje	21
3.2.6	Karakterizacija	22
3.2.6.1	Masna spektrometrija	22
3.2.6.1.1	Priprava vzorcev za masno spektrometrijo	23
3.2.6.1.2	ESI-MS	23
3.2.6.1.3	Določanje aminokislinskega zaporedja	23

4	REZULTATI	24
4.1	POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA OB PRISOTNOSTI NaDS	24
4.2	MERITVE KONCENTRACIJE PROTEINA V VZORCU Z NanodDrop SISTEMOM.....	27
4.3	AGARozNA GELSKA ELEKTROFOREZA.....	28
4.4	DOLOČANJE AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA.....	29
4.5	Ni-NTA KROMATOGRFIJA EKSTRAKTA BUKOVEGA OSTRIGARJA.....	30
4.6	MASNA SPEKTROMetriJA.....	31
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	33
5.1	RAZPRAVA	33
5.2	SKLEPI.....	35
6	POVZETEK	36
7	VIRI	37
	ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Slika 1: NaDS elektroforeza vzorcev ob izolaciji rekombinantnega proteina s hemopeksinu podobnim motivom.	24
Slika 2: NaDS elektroforeza vzorcev ob izolaciji rekombinantnega ostreolizina A.	25
Slika 3: NaDS elektroforeza.	26
Slika 4: Agarozna gelska elektroforeza.	28
Slika 5: Aminokislinsko zaporedje.	29
Slika 6: Merjenje optične gostote vzorcev pri spiranju Ni-NTA kolone.	30
Slika 7: Masna spektrometrija.	31
Slika 8: Masna spektrometrija; določitev molekulske mase.	32

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Pregled izbranih predstavnikov naddružine hemopeksinu podobnih proteinov	6
Preglednica 2 : Kemikalije	10
Preglednica 3: Kompleti kemikalij	11
Preglednica 4: Aparature	11
Preglednica 5: Gojišča	12
Preglednica 6: Rastopine.....	13
Preglednica 7: Encimi	14
Preglednica 8: Elektroforezni geli	15
Preglednica 9: Potek PCR reakcije.	21
Preglednica 10: Meritve koncentracije proteina z Nanodrop sistemom	27

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- A_{280} – absorbanca pri valovni dolžini 280 nm
AEBSF – aminoetil benzensulfonil fluorid hidroklorid
Amp – ampicilin
APS – amonijev persulfat
BCA – bicinhoninsko-kislinski reagent
BSA – goveji serumski albumin
 CaCl_2 – kalcijev diklorid
cDNA – komplementarna deoksiribonukleinska kislina (ang. complementary deoksiribonucleic acid)
 dH_2O – destilirana voda
DTT – ditiotreitrol
E. coli – *Escherichia coli*
EDTA – etilendiaminotetraocetna kislina
EtOH – etanol
Hx – hemopeksin
IPTG – izopropil β -D-tiogalaktozid
kDa – kilodalton
LB – gojišče Luria Bertani
LMW – nizkomolekularni proteinski standard
MAC – membranski litični kompleks (ang. membrane attack complex)
MilliQ – ultra prečiščena deionizirana voda
mRNA – prenašalna ribonukleinska kislina (ang. messenger ribonucleic acid)
 Na_2HPO_4 – dinatrjev hidrogenfosfat
NaCl – natrijev klorid
NaDS – natrijev dodecil sulfat
NaDS PAGE – poliakrilamidna elektroforeza ob prisotnosti natrijevega dodecil sulfata
Ni-NTA – nikljeva nitrilotriocetna kislina (ang. nickel-nitrilotriacetic acid)
 OD_{600} – optična gostota merjena pri valovni dolžini 600 nm
Oly – ostreolizin
pDNA – plazmidna deoksiribonukleinska kislina

PlyA – pleurotolizin A

PlyB – pleurotolizin B

PMSF – fenilmetilsulfonil fluorid

RPC – kromatografija na reverzni fazi (ang. reverse phase chromatography)

SOB – obogateno gojišče (ang. super optimal broth)

TEMED – tetrametilen diamin

TRIS – 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol

OKRAJŠAVE IMEN AMINOKISLIN

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginska kislina	Asp	D
Cistein	Cys	C
Glutaminska kislina	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glicin	Gly	G
Histidin	His	H
Izolevcin	Ile	I
Levcin	Leu	L
Lizin	Lys	K
Metionin	Met	M
Fenilalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Treonin	Thr	T
Triptofan	Trp	W
Tirozin	Tyr	Y
Valin	Val	V

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*) je zelo razširjena užitna goba. Kultivirali so jo že med drugo svetovno vojno, danes pa njenega micelija ne uporabljajo več le v prehrabene namene, temveč je goba zanimiva tudi iz biotehnološkega vidika. Vsebuje namreč mnoge biološko aktivne snovi. Med drugimi naj bi v suhi masi vsebovala do 2,8 % lovastatina, ki znižuje stopnjo holesterola v krvi.

Leta 2002 so Berne in sod. iz bukovega ostrigarja izolirali ostreolizin (Oly), ki spada v egerolizinsko družino proteinov (PF06355). Ta 15 kDa protein naj bi bil, podobno kot nekateri drugi proteini te družine, sposoben v membranah eritrocitov tvoriti transmembranske pore premera okoli 4 nm (Sepčić in sod., 2003), vendar pa njegova primarna vloga v celici še ni znana.

Znano je, da nekateri egerolizini delujejo kot enokomponentni citolizini (Yokota in sod, 1977), medtem ko pleurotolizin A in erilizin A za citolitično aktivnost potrebujejo še proteinsko komponentno B (Tomita in sod., 2004; Shibata in sod., 2010). Nedavno so pokazali, da tudi nativni Oly razen prevladujočega egerolizinskega proteina (Oly A) vsebuje primesi 59-kDa proteinske komponente (komponenta B), ki je nujno potrebna za njegovo membransko aktivnost (Katja Ota, neobjavljeni rezultati). Glede na dokazano dvokomponentno delovanje proteinov te družine se ponuja vprašanje, ali ostreolizin A svojo aktivnost v celici izraža tudi skupaj z nekaterimi drugimi vezavnimi partnerji.

V eni od zadnjih študij so na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo (Biotehniška fakulteta, UL) iz vodnega ekstrakta bukovega ostrigarja uspeli izolirati še neznan 25 kDa protein, ki bi lahko predstavljal vezavnega partnerja ostreolizina A. To diplomsko delo je nadaljevanje omenjene raziskave z namenom, da bi se boljše pojasnila prisotnost in vloga ostreolizina A v bukovem ostrigarju.

1.2 CILJI DIPLOMSKEGA DELA

Cilj diplomskega dela je bil z novo metodo potrditi interakcijo med ostreolizinom A (Oly A) in še neznanim 25 kDa proteinom in razviti novo učinkovito metodo za njegovo izolacijo. Izolirani protein je bilo nadalje potrebno tudi karakterizirati in izraziti rekombinantno obliko v heterolognem ekspresijskem sistemu (*Escherichia coli*).

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevali smo, da je iskani 25 kDa protein s hemopeksinskimi ponovitvami vezavni partner proteina ostreolizina A. Izolacija iskanega hemopeksinskega proteina naj bi potekala s posredno vezavo proteina na Ni-NTA nosilec preko že prej vezanega rekombinatnega ostreolizina A.

2 PREGLED OBJAV

2.1 EGEROLIZINSKA DRUŽINA PROTEINOV

Prisotnost proteinov egerolizinske proteinske družine so do sedaj potrdili pri virusih, bakterijah, glivah, rastlinah (Berne in sod., 2009) in pred kratkim tudi pri insektih (Zhang in sod., 2011). Njihove skupne lastnosti naj bi bile β -strukturiranost, nizka izoelektrična točka, podobna molekulska masa (med 15 in 17 kDa) in stabilnost v širokem pH območju (med 3,5 in 10,5). Njihova biološka vloga še ni pojasnjena, nekateri naj bi interagirali s specifičnimi membranskimi lipidi, permeabilizirali poškodovane in celične membrane ter delovali toksično na poskusne živali (Berne, 2009).

2.1.1 Ostreolizin

Ostreolizin A, 15 kDa predstavnik egerolizinov, je bil izoliran iz bukovega ostrigarja (*P. ostreatus*). V izvornem organizmu se v najvišji koncentraciji pojavlja v rastočih delih bazidiokarpa, še posebno v bazidijih in bazidiosporah, kar je bilo dokazano tudi z imunodetekcijo (Vidic in sod., 2004). Predvidevajo, da egerolizini sodelujejo pri zgoščevanju hif med zorenjem primordijev (Fernandez-Espinar in sod., 1997), vendar pa njihova biološka vloga še vedno ni potrjena (Berne in sod., 2005).

Nativni ostreolizin (Oly A s primesmi 59-kDa proteinske komponente B) prepozna in se specifično veže na s steroli in sfingomielinom bogate membranske domene v tekoči urejeni fazi (l_o) (Lingwood, 2010) ter v membrani tvori pore s premerom okoli 4 nm (Sepčić in sod., 2003). Njegova izooblika pleurotolizin A (PlyA) naj bi bil sfingomielin-specifičen protein, za katerega so pokazali, da je citolitičen v kombinaciji s 59 kDa pleurotolizinom B (PlyB). Skupaj tvorita transmembransko poro v eritrocitni membrani v obliki prstana s funkcionalnim premerom med 3,8 in 5 nm (Tomita in sod., 2004).

2.2 HEMOPEKSINSKA NADDRUŽINA PROTEINOV

Hemopeksinska družina je skupina podobnih proteinov, pri katerih se pojavlja zaporedje aminokislin, podobno hemopeksinskemu.

2.2.1 Hemopeksinski motiv

Hemopeksinski motiv naj bi bil sestavljen iz štirih β -ravnin v obliki štirikrakega propelerja; po dve sosednji enoti naj bi najprej tvorili β -sodček, dva sodčka pa skupaj eno globularno hemopeksinsko domeno. Prvo in četrto enoto propelerja povezujeta cisteinska ostanka z disulfidno vezjo. Prav ta vez igra ključno vlogo pri oblikovanju vezavnega mesta za železo (Piccard, 2007).

Limunektin na primer vsebuje 10 serij hemopeksinu-podobnih ponovitev, od katerih ima vsaka dva cisteinska ostanka, ki bi lahko tvorila disulfidno vez. Zaradi takšne zgradbe Liu in sod. (1991) predvidevajo, da ta protein vsebuje dva ali tri hemopeksinu podobne propelerje.

2.2.2 Razširjenost

V hemopeksinsko naddružino spada že vsaj 544 proteinov, ki vsebujejo hemopeksinu podoben motiv (Piccard in sod. 2007). Med prokarionti so Crennell in sod. leta 2000 identificirali fotopeksina A in B iz patogene bakterije *Photorhabdus luminiscences*. Večina proteinov iz te naddružine pa je evkariontskega izvora: limunektin iz *Limulus amoebocytes* (Liu in sod., 1991), različni albumini, predvsem v semenih stročnic (Jenne, 1991), nektinepsin iz nevroretine, možganov, jeter in črevesa prepelice (*Coturnix coturnix*) (Blancher in sod., 1996) ter številni vitronektini in matrične metaloproteinaze (MMPs) sesalcev (Piccard in sod., 2007).

Veliko razširjenost proteinskega motiva med tako različnimi organizmi so Crennell in sod. leta 2000 poskušali pojasniti na primeru patogene bakterije *Photorhabdus luminescens*, ki živi v simbiozi z nematodi, ki napadajo insekte.

Bakterija lahko pridobi virulenčne faktorje s horizontalnim genskim prenosom, zato obstaja teoretična možnost, da je *Photorhabdus* pridobil evkariontski gen (na primer gen,

odgovoren za odstranjevanje komponent, ki vsebujejo železo) in ga uporabil kot virulenčni faktor (na primer gen, odgovoren za pridobivanje gostiteljevega železa). Nadalje, strukturna podobnost fotopeksina in hemopeksina je lahko osupljiv primer paralelne evolucije, kjer obe, tako prokariontska kot tudi evkariontska molekula opravljata enake funkcije in imata kot rezultat tega ujemajočo sekundarno strukturo. Crennell in sod. predvidevajo, da bi lahko fotopeksina A in B iz bakterije *Photorhabdus* služila za pritrjevanje na površino gostitelja ali za privzem hemu podobnih komponent, ki vsebujejo železo (Crennell, 2000). Kot tretjo možnost za prisotnost proteinov s hemopeksinu podobnim motivom v tako širokem naboru organizmov Jenne (1991) pripisuje obstoju tega motiva, še preden so se kraljestva ločila med seboj.

Preglednica 1: Pregled izbranih predstavnikov naddružine hemopeksinu podobnih proteinov (Piccard, 2007)

Deblo	Vista	Protein	Homologija s hemopeksinom	Funkcija proteina	Funkcija hemopeksinskega motiva	Referenca
Prokarioti	<i>Photobacterium luminescens</i>	fotopoksina A in B	tipičen štirikraki propeler, vsak krak predstavlja hemopeksinu podoben motiv	ni znana	ni znana	Crennell, 2000
Eukarioti	<i>Limulus</i>	limunektin	10 zaporednih hemopeksinu podobnih motivov, vsak z dvema cisteinskima ostanekoma, ki naj bi tvorila disulfidno vez	fosfolipin-vezavni protein, ki veže bakterije, amebocite in mnoge zunanje celične matricne komponente	ni znana	Liu, 1991
	<i>Pisum sativum</i>	albumin PAZ	v celoti sestavljen iz štirih hemopeksinu podobnih motivov, ki naj bi domnevno skupaj oblikovali eno globularno hemopeksinsko domeno	ni znana	ni znana	Jerne, 1991
	<i>Coturnix coturnix</i> , <i>Mus musculus</i>	rektinepsin	aminoterminalni del druge porovitve hemopeksina	ni znana	ni znana	Blancher, 1996
	rmoge	vitronektin	hemopeksin 1 in hemopeksin: 2 domeni	adhezija celice na substrat, interakcija z integrinskimi receptorji in prtoicini serpinske družine, inhibicija MAC (membrane attack complex)	veže sulfatid, fosfatidilserin, holesterol-3-sulfat, kolagen tipa 1, β -endorfin, heparin, komplementni kompleks, <i>Streptococcus pyogenes</i>	Jerne, 1987; Yoneda, 1998; Liang, 1999
	rmoge	lubricin	hemopeksinu podobni motivi	glavno mazivo v pregibnih stikih, zaščita hrustančnih površin	ni znana	Rhee, 2005
	rmoge	hemangiopietin	hemopeksinu podobni motivi	rastni faktor primitivnih hematopoetičnih in endotelinih celic	ni znana	Liu, 2004
	rmoge	superficial zone prtein	hemopeksinu podobni motivi	spodbuja rast megakariocitnih kolonij	ni znana	Flannery, 1999
	rmoge	Matrične metaloproteinaze (MMPs)	širje hemopeksinski ostanke tvorijo globularno hemopeksinsko domeno	proteoliza različnih substratov		Massova, 1998

2.2.3 Biološka vloga proteinov s hemopeksinskim motivom

Ker je hemopeksinski motiv prisoten v številnih med seboj zelo različnih si organizmih in molekulah, je zato tudi funkcija molekul s tem motivom zelo različna.

2.2.3.1 Bakterija *Photorhabdus luminiscens*

Glavna predstavnika prokariotskih proteinov s hemopeksinu podobnim motivom sta fotopeksina A in B bakterije *Photorhabdus luminiscens*. Bakteriji pomagata pri pritrjevanju na površino gostitelja ali pa iz gostitelja pridobivata hemu podobne komponente, ki vsebujejo železo (Crennell, 2000).

2.2.3.2 Rastlinski semenski albumini

Prvi opisan protein s hemopeksinskim zvitjem pri rastlinah je bil citosolni protein albumin (PA2) iz grahovitih semen (*Pisum sativum*) (Harris in Croy, 1985; Jenne, 1991). Podobne proteine so odkrili tudi v drugih rastlinah, vključno s *Cicer arietinum* (Kolberg in sod., 1983; Vioque in sod., 1998), *Lathyrus sativus* (Qureshi in sod., 2006; Gaur in sod., 2010), *Lens culinaris* (Scarafoni, 2011) in *Vigna unguiculata* (Chanana in sod., 2004). Glavni vlogi rastlinskih hemopeksinskih proteinov naj bi bili biosinteza spermina (Vigeolas in sod., 2008; Gaur in sod., 2010) in regulacija oksidativnega stresa (Gaur in sod., 2010).

2.2.3.3 Limunektin

Limunektin je 54 kDa velik protein, izoliran iz amebocit *Limulosa*. Ta fosfoholin-vezavni protein naj bi vezal bakterije, amebocite in mnoge zunajcelične matrične komponente (Liu in sod., 1991).

2.2.3.4 Nektinepsin

Blancher in sod. (1996) so v nevrotetini, jetrih, možganih in črevesju prepelice (*Coturnix coturnix*) ter v mišji retini odkrili cDNA in mRNA, ki naj bi domnevno pripadali proteinu nektinepsinu. Ugotovitev, da je aminokislinsko zaporedje v šestdesetih odstotkih identično človeškemu vitronektinu ter da ima homologne dele z matričnimi metaloproteinazami, nakazuje na to, da tudi ta protein vsebuje hemopeksinupodobne domene.

Predvidevajo, da ta protein igra pomembno vlogo v zgodnjem embrionalnem razvoju, za natančnejše razumevanje njegovega delovanja pa bodo potrebne še nadaljnje študije.

2.2.3.5 Lubricin

Gen proteoglikan 4 (*PRG4*) kodira proteoglikane lubricin, hemangiopoetin (rastni faktor primitivnih celic hematopoetičnih in endotelnih celičnih linij) in protein površinske sklepne cone (prekurzor stimulativnega faktorja megakariocit). Ti proteini naj bi sodelovali pri regulaciji osifikacije (Marcelino in sod., 1999; Ikegawa in sod., 2000), vsi pa naj bi tudi vsebovali hemopeksinu podobne domene (Rhee in sod., 2005; Liu in sod., 2004; Flannery, 1999).

Lubricin je glavno sklepno mazivo. Izločajo ga celice sinovicite in hondrocite, njegova vloga pa je zaščita hrustančnih površin pred poškodbami.

2.2.3.6 Vitronektin

Človeški vitronektin je glikoprotein, ki se nahaja v plazmi in zunajceličnem matriksu. Ima več funkcij, med drugim služi za pritrjevanje celic na substrat. Ob tem reagira s proteini serpinske družine in integrinskimi receptorji. Z vezavo na MAC (ang. membrane attack complex) preprečuje membranske poškodbe (Jenne, 1991; Schwartz in sod., 1999).

2.2.3.7 Matrične metaloproteinaze (matrix metalloproteinases, MMPs)

MMPs je velika poddružina proteinov, zelo dobro proučenih pri vretenčarjih, čeprav jih najdemo tudi pri nižjih živalih in rastlinah. Poznamo kar 23 človeških MMPs, ki delujejo kot večdomenski encimi. Sestavljeni so iz pro-, katalitične in Zn^{2+} -vezavne domene. Ključno vlogo igrajo v mnogih fizioloških in patoloških procesih, kot so preoblikovanje

zunajceličnega matriksa, vnetja, nastajanje kosti in celjenje ran, njihovo neusklajeno delovanje pa lahko privede do rakavih obolenj ali revmatoidnega artritisa (Piccard in sod., 2007).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije

V preglednici 2 so zbrane kemikalije, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu.

Preglednica 2 : Kemikalije

<i>Kemikalija</i>	<i>Proizvajalec</i>	<i>Država</i>
4-kloro-1-naftol	Sigma	ZDA
Aceton	Merck	Nemčija
AEBSF	Sigma	ZDA
Agar	Merck	Nemčija
Agaroz	Sigma	ZDA
Ampicilin	Sigma	ZDA
APS	BioRad	ZDA
BCA Protein Assay Reagent A/B	Pierce	ZDA
Benzamidin	Sigma	ZDA
Bromfenol modro	Sigma	ZDA
BSA	Sigma	ZDA
CaCl ₂	Merck	Nemčija
Coomassie Blue	BioRad	ZDA
Dializne vrečke (Mw 6-8 kDa)	Spectrapor	ZDA
DTT	Sigma	ZDA
EDTA	Merck	Nemčija
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas	Kanada
Glicerol	Merck	Nemčija
Glicin	Merck	Nemčija
Imidazol	Sigma	ZDA
IPTG	Sigma	ZDA
LB	Sigma	ZDA
Ledocetna kislina	Merck	Nemčija
Metanol	Merck	Nemčija
NaCl	Merck	Nemčija
NaDS	Merck	Nemčija
NaH ₂ PO ₄	Merck	Nemčija
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas	Kanada
PMSF	Sigma	ZDA
Poliakrilamid	BioRad	ZDA
SOB	Difco Laboratories	ZDA
TEMED	Sigma	ZDA
Tris	Merck	Nemčija
Tris-HCl	Merck	Nemčija
β-merkaptolanol	Sigma	ZDA

3.1.2 Kompleti kemikalij

V preglednici 3 so zbrani kompleti kemikalij, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu.

Preglednica 3: Kompleti kemikalij

<i>Kit</i>	<i>Proizvajalec</i>	<i>Država</i>
Gel Extracion Kit	Fermentas	Kanada
Gene JET Plasmid Miniprep Kit	Fermentas	Kanada
PCR Master Mix	Fermentas	Kanada
PCR Purification Kit	Fermentas	Kanada
Rapid DNA Ligation Kit	Fermentas	Kanada

3.1.3 Aparature

V preglednici 4 so zbrane aparature, ki smo jih uporabili pri raziskovalnem delu.

Preglednica 4: Aparature

<i>Naprava</i>	<i>Proizvajalec</i>	<i>Država</i>
Ap. za agarozno elektroforezo	Amersham Pharmacia Biotech	Anglija
Ap. Za SDS-PAGE	BioRad	ZDA
Centrifuga Sigma 3 K30	Sigma	Nemčija
Centrifuga Centric 322A	Tehtnica	Slovenija
Čitalec mikrotitrskih plošč	MRX, Dynex Technologies	Nemčija
Elvehjem-Potterjev homogenizer	Tehtnica	Slovenija
Gospodinjski mešalec	Iskra	Slovenija
Inkubacijski stresalnik	Stovall Life Science	ZDA
Magnetno mešalo IKA	KEFO	Slovenija
Namizni termoblok	Eppendorf	Nemčija
NanoDrop	Thermo Scientific	ZDA
Analitska tehtnica	Sartorius	Nemčija
Orbitalni mešalnik Vibromix	Tehtnica	Slovenija
pH meter	Mettler Toledo	Nemčija
Tehtnica	Sartorius	Nemčija
Sonikator Vibra Cell	Sonics	ZDA
Stresalnik	Stovall Life Science	ZDA
UV/VIS spektrofotometer UV2101	Shimadzu	Japonska
Zamrzovalnik	Liebherr	Nemčija
Mikrovalovna pečica	Sharp	Japonska

3.1.4 Laboratorijski pribor

- Aluminijasta folija in PVC vrečke;
- avtomatske pipete (Eppendorf, Nemčija);
- cepilne zanke (eze);
- filtri za injekcijske brizge (0,22 µm);
- injekcijske brizge;
- laboratorijska steklovina (erlenmajerice, čaše, menzure, epruvete);
- laboratorijske rokavice;
- mikrocentrifugirke (1.500 µl; Eppendorf, Nemčija);
- odlagalniki;
- parafilm
- pincete, škarje, spatule, žličke, steklene palčke;
- plastične banjice;
- plastične petrijevke;
- plinski gorilnik;
- stojala za epruvete;

3.1.5 Gojišča

Sestavine za gojišča smo ustrezno zatehtali, raztopili v destilirani vodi ter avtoklavirali (15 minut pri 121 °C). Gojišča z agarjem smo po končanem avtoklaviranju ohladili in jih aseptično nalili v plastične petrijevke. Po potrebi smo pred nalivanjem dodali še antibiotik.

Preglednica 5: Gojišča

<i>Gojišče</i>	<i>Sestava</i>
Tekoče LB gojišče	25 g/L LB (10 g/L kazeinski hidrolizat, 5 g/L kvasni ekstrakt, 10 g/L NaCl) v dH ₂ O
Trdno LB gojišče	25 g/L LB (10 g/L kazeinski hidrolizat, 5 g/L kvasni ekstrakt, 10 g/L NaCl) 15 g/L agar v dH ₂ O
Tekoče SOB gojišče	28 g/L SOB (5 g/L kvasni ekstrakt, 186 g/L KCl, 4 g/L MgSO ₄ , 0,5 g/L NaCl, 20 g/L tripton) v dH ₂ O

3.1.6 Raztopine

Zatehtane sestavine za raztopine smo dodali k večini potrebne destilirane vode (ali drugega topila), raztopili na magnetnem mešalu ter umerili ustrezen volumen. Po potrebi smo raztopino prefiltrirali (z 0,22 μm filtrom) ali umerili pH (z 1 M ali 0,5 M raztopinama NaOH oziroma HCl).

Preglednica 6: Raztopine

<i>Raztopina</i>	<i>Sestava</i>
Pufer za eritrocite	20 mM Tris 130 mM NaCl v dH ₂ O (pH 7,4)
Fiziološka raztopina	0,9 % NaCl v dH ₂ O
Dializni pufer	20 mM Tris-HCl v dH ₂ O (pH 8,0)
10-kratni TAE pufer za agarozno elektroforezo	10 mM EDTA 400 mM Tris-HCl 10% ledocetna kislina v dH ₂ O (pH 8,0)
10-kratni pufer za elektroforezo v prisotnosti NaDS	1,29 M glicin 35 mM NaDS 25 mM Tris v dH ₂ O
Pufer za lizo	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM imidazol v dH ₂ O (pH 4,5 pH 5,9 in pH 8,0)
Pufer za spiranje	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 25 mM imidazol v dH ₂ O (pH 8,0)
Pufer za izpiranje	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 300 mM imidazol v dH ₂ O (pH 8,0)

Se nadaljuje

Preglednica 7: Raztopine Nadaljevanje

<i>Raztopina</i>	<i>Sestava</i>
CaCl ₂ -Tris-glicerol (50 mL)	0,367 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O 5 mL glicerola 10 mL 50 mM Tris (pH 7,5) sterilno prefiltrirano
AEBSF	0,12 g v 1 mL EtOH
PMSF	0,087 g v 1 mL EtOH
Benzamidin	0,15 g v 1 mL MilliQ
DNaza	0,01 g v 1 mL MilliQ
RNaza	0,01 g v 1 mL MilliQ
5x lizocim (50 mg/mL)	50 mg v 1 mL MilliQ
IPTG (1 M)	2,38 g v 10 mL MilliQ sterilno prefiltrirano
Ampicilin (100 mg/mL)	1g v 10 mL MilliQ sterilno prefiltrirano

3.1.7 Encimi

Preglednica 7: Encimi

<i>Encim</i>	<i>Proizvajalec</i>	<i>Država</i>
Lizocim	Sigma	ZDA
Dnaza	Sigma	ZDA
Rnaza	Fermentas	Kanada

3.1.8 Bakterijski sevi

- *E. coli* DH5α
- *E. coli* BL21 (DE3)

3.1.9 Geli za elektroforezo

Agarozno gelsko elektroforezosmo izvedli z metodo, opisano v Daniel Voytas: Agarose Gel Electrophoresis. Gele za elektroforezo v prisotnosti NaDS smo izvedli z metodo po Laemmliju.

Preglednica 8: Elektroforezni geli

<i>Gel</i>	<i>Sestava</i>
Agarozni gel	40 mL 1x TAE pufra 0,32 g agaroze 2 μ L etidijevega bromida
NaDS-PAGE ločevalni gel (12 %)	1,8 mL akrilamid 3,104 mL dH ₂ O 0,75 mL 3 M Tris puffer 40 μ L 10 % NaDS 300 μ L 1,5 % APS 6 μ L TEMED
NaDS-PAGE nanašalni gel	0,5 mL akrilamid 2,945 mL dH ₂ O 1,25 mL 0,5 M Tris pufra 50 μ L 10 % NaDS 250 μ L 1,5 % APS 5 μ L TEMED

3.2 METODE DELA

3.2.1 Izolacija rekombinantnega proteina

3.2.1.1 Priprava kompetentnih celic

Bakterijsko kolonijo *E. coli* smo z LB plošče precepili v 50 mL SOB medija ter inkubirali na stresalniku pri 300 obratih na minuto in 37 °C. Ko je optična gostota celic pri valovni dolžini 600 nm dosegla vrednost okoli 0,5, smo celično suspenzijo prenesli v sterilno centrifugirko. Najprej smo 10 minut inkubirali na ledu, nato pa 10 minut centrifugirali pri 4000 obratih na minuto in pri 4°C. Supernatant smo po centrifugiranju odstranili, bakterijsko usedlino pa resuspendirali v 8 mL ledeno hladnega 0,1 M CaCl₂. Centrifugiranje smo ponovili pri enakih pogojih kot prvič, sprane celice pa nato resuspendirali v 1,8 mL raztopine CaCl₂-Tris-glicerol. Suspenzijo tako pripravljenih celic smo odpipetirali po 100 µL v sterilne mikrocentrifugirke, jih zamrznili v tekočem dušiku ter jih shranili pri -80 °C.

3.2.1.2 Transformacija kompetentnih celic

Transformacija je najbolj razširjen način vnosa proste DNA v genom kompetentne celice. 100 µL kompetentnih celic (shranjenih pri -80 °C) smo najprej 30 minut inkubirali na ledu, nato smo dodali 1 µL pDNA ter na ledu inkubirali še nadaljnjih 30 minut. Toplotni šok smo izvedli tako, da smo mikrocentrifugirko za 100 s prestavili na vodno kopel z 42 °C. Po 2 minutni inkubaciji na ledu smo dodali 300 µL LB gojiščater 1 uro inkubirali na termobloku pri 37 °C in ob stalnem stresanju. Transformirane celice smo nacepili na LB ploščo z ustreznimi antibiotiki (Amp) ter inkubirali preko noči pri 37 °C, da so kolonije zrasle.

3.2.1.3 Priprava lizata iz transformiranih kompetentnih celic

S plošče smo eno kolonijo precepili v 50 mL LB gojišča z ustreznim antibiotikom in gojili 18 ur na stresalniku pri 37 °C, da so bakterije dosegle logaritemsko fazo rasti. Tako pripravljen vcepek smo naprej nacepili po 10 mL v 8-krat po 500 mL LB gojišča z ustreznim antibiotikom. Pri optični gostoti celic pri valovni dolžini 600 nm (OD₆₀₀) okoli

0,6 (po približno 4 urah) smo celice inducirali z dodatkom 0,5 mL 1 M IPTG ter gojili še okoli 3 ure, da je celična suspenzija dosegla vrednost OD₆₀₀ okoli 2,5.

Prvič smo centrifugirali 30 minut pri 13.000 obratov na minuto in 4 °C, nato pa smo usedline združili v eno stehtano centrifugirko ter centrifugirali še 90 minut pri 15.500 obratih na minuto in 4 °C. Ko smo vse gojišče odstranili, smo lahko stehali skupno maso usedline. Celice smo čez noč shranili v zamrzovalni skrinji, saj nastanek kristalov v celicah poškoduje celične membrane in tako olajša nadaljnje postopke izolacije proteina.

Odmrznjeno bakterijsko usedlino smo resuspendirali v pufru za lizo (2 mL pufru na 1 g usedline) ter dodali še benzamidin, DNazo, RNazo, β-merkaptotanol, PMSF, AEBSF in lizocim.

Mešanico smo inkubirali 30 minut na ledu, nato pa homogenizirali s sonikacijo na ledu. Centrifugirali smo 30 minut pri 15.500 obratih na minuto in 4 °C. Supernatant smo shranili, usedlino pa po enakem postopku kot prvič resuspendirali, sonicirali in centrifugirali še dvakrat. Usedlino smo nato zavrgli, vse tri supernatante pa združili skupaj in prefiltrirali z 0,22 μm filtrom.

3.2.1.4 Ni-NTA kromatografija

QiaGen mešanico smo pred uporabo 3-krat sprali s pufrom za lizo, da smo odstranili etanol, v katerem je bil nosilec shranjen. Dodali smo prefiltriran lizat, dobro premešali in inkubirali 20-30 minut pri 4 °C ob stalnem mešanju. Po 5-minutnem centrifugiranju pri 3.000 obratih na minuto in 4 °C smo falkonko za 5 minut postavili navpično, da se je nosilec usedel na dno. Lizat smo previdno odpipetirali v drugo falkonko in pazili, da nismo odpipetirali nosilca. Postopke centrifugiranja, usedanja nosilca in pipetiranja smo ponovili še 7-krat: 3-krat s po 10 mL pufru za lizo, 1-krat s 5 mL pufru za spiranje in 3-krat z 10 mL pufru za izpiranje. Tako na koncu dobimo frakcije FT ("flow through", prosti pretok), L1, L2, L3 ("lysis", liza), W ("wash", spiranje), E1, E2 in E3 ("elution", izpiranje). Vsebnost proteinov v teh frakcijah smo preverili z elektroforezo na 12 % NaDS-PAGE. Frakcije E1, E2 in E3 smo združili in dializirali, da smo odstranili imidazol.

3.2.1.5 Dializa

Dializne vrečke s porami, ki prepuščajo delce velikosti od 6 do 8 kDa smo najprej odrezali na primerno dolžino in za 30 minut dali v dH₂O, da smo odstranili konzervanse. Eluirane proteinske frakcije smo nato prenesli v dializne vrečke in dializirali proti 20 mM Tris puftru pri 4 °C ob stalnem mešanju. Puffer smo 3-krat zamenjali in sicer približno na vsake 4 ure. Pred uporabo smo malo pufra shranili v mikrocentrifugirko, da smo lahko po dializi točneje izmerili koncentracijo proteina na sistemu NanoDrop.

3.2.2 Izolacija nativnega proteina

3.2.2.1 Pripravavodnega ekstrakta iz bukovega ostrigarja (*P. ostreatus*)

Ekstrakt smo pripravljali po ustaljenem postopku (Berne in sod., 2002). Desetim g mladega micelija bukovega ostrigarja smo dodali 15 mL eritrocitnega pufra in 0,8 mL PMSF. Za homogenizacijo smo uporabili gospodinjski multipraktik in nato še Elvehjem-Potterjev homogenizer. Centrifugiranje je potekalo 30 minut pri 15.500 obratih na minuto in 4 °C. Sediment smo zavgli, supertanat pa prefiltrirali preko 2 mm filtra in mu odčitali volumen.

3.2.2.2 Ni-NTA kromatografija

Ni-NTA očiščevalni sistem se uporablja za čiščenje s histidinom označenih rekombinantnih proteinov iz bakterijskega lizata, saj je močno selektiven in ima visoko afiniteto za proteine s 6-kratnim histidinskim ostankom.

Na 1 mL s pufrom za lizo spranega nosilca Ni-NTA QiaGen smo vezali 1 mg rekombinantnega proteina s 3-urno inkubacijo na mešalu v hladni sobi (pri 4 °C). Nosilec smo ponovno sprali s pufrom za lizo ter dodali 10 mL prefiltriranega lizata iz gobe *P. ostreatus*. Prekonočna inkubacija je potekala na mešalu v hladni sobi.

Kolono smo postavili navpično, da se je nosilec usedel na dno kolone, nato pa s počasnim pretokom začeli zbirati frakcije z volumnom 1 mL v mikrocentrifugirke. Hkrati smo frakcijam merili absorbcijo na spektrofotometru pri valovni dolžini 280 nm (A_{280}). Še preden se je lizat spustil pod nivo nosilca, smo dodali puffer za lizo s pH 8,0 ter z njim

spirali, dokler ni bila vrednost A_{280} manjša od 0,01. Takrat smo na nosilec nanegli 4 mL pufra za lizo pH 5,9, spet sprali z 10 mL pufra za lizo pH 8,0, nato izpirali še s 4 mL pufra za lizo pH 4,5 ter na koncu znova sprali s pufrom za lizo pH 8,0. Po eno frakcijo z najvišjo vrednostjo A_{280} iz vsakega izpiranja (pri pH 5,9 in pri pH 4,5) smo ustrezno količino koncentrirali s TCA in preverili vsebnost proteinov z elektroforezo na 12 % NaDS-PAGE.

3.2.3 Zasledovanje izražanja genskih konstruktov

3.2.3.1 Obarvanje s trikloroocetno kislino (TCA)

Proteinskemu vzorcu, ki smo ga obarjali, smo dodali enako količino 50 % TCA kot smo imeli vzorca. Mešanico smo 10 minut inkubirali na ledu, nato pa centrifugirali 15 minut pri 13.200 obratih na minuto in 4 °C. Supernatant smo previdno odstranili, mikrocentrifugirko pa sprali s 300 μ L ledeno hladnega acetona. Vzorec smo ponovno 10 minut inkubirali na ledu in centrifugirali pod enakimi pogoji. Aceton smo odpipetirali, da pa smo se znebili vsega acetona, smo odprte mikrocentrifugirke še segrevali na termobloku na 37 °C. Oborino smo resuspendirali v dH₂O in dodali barvilo za NaDS elektroforezo.

3.2.3.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS

Gel za NaDS-PAGE smo vlili med dve stekelci in sicer najprej ločevalni gel, ko se je ta strdil pa še nanašalnega. Na vrhu stekelc smo vstavili glavniček, ki smo ga pred uporabo odstranili. V nastale vdolbinice smo odpipetirali masni standard (PageRuler Prestained Protein Ladder) ter proteinske vzorce z dodanim 5x SDS + 0,5 M DTT. Elektroforeza je potekala eno uro v 1-kratnem NaDS-PAGE pufri in pri 120 V. Gel smo nato sprali z destilirano vodo, barvali z Coomassie Blue barvilom ter ponovno z destilirano vodo sprali z gela odvečno barvilo.

3.2.3.3 Agarozna elektroforeza

Gel smo pripravili tako, da smo v 40 mL 1-kratnega TAE pufra v mikrovalovni pečici raztopili 0,32 g agaroze. Primerno ohlajeni mešanici smo dodali še 2 μ L etidijevega bromida ter v posodici z glavničkom gel pustili okoli 30 minut, da se je strdil. Preko gela smo nalili 1-kratni TAE pufer, po odstranitvi glavnička pa v vdolbinice odpipetirali

lestvico (GeneRuler 1kb DNA Ladder) in s primerno redčenim barvilom (6x Loading Dye) zmešane vzorce plazmidov. Elektroforeza je potekala 50 minut pri 90 V, 400 mA in 100 W.

3.2.3.4 Določanje koncentracije proteina

3.2.3.4.1 Določanje koncentracije z bicinhoninsko-kislinskim testom (BCA)

Za določanje koncentracije proteina v vzorcu smo uporabljali tudi bicinhoninsko-kislinski (BCA) proteinski test (Pierce, ZDA). Za vsak vzorec smo pripravili po dve paralelki in sicer iz 950 μL mešanice reagentov A in B v razmerju 50:1 ter 50 μL vzorca. Pri kontroli smo namesto vzorca reagentoma dodali destilirano vodo. Tako pripravljene vzorce smo inkubirali 30 minut pri 37 $^{\circ}\text{C}$, nato pa z mikročitalcem izmerili vrednost absorpcije pri 562 nm. Koncentracijo proteinov smo izračunali iz umeritvene krivulje za goveji serumski albumin (BSA).

3.2.3.4.2 Določanje koncentracije z NanoDrop sistemom

Na nosilec smo najprej odpipetirali 2 μL pufra, v katerem so bili proteini raztopljeni, ter skalibrirali napravo, nato pa še 2 μL vzorca. Pred vsakim merjenjem smo nosilec očistili z destilirano vodo. Iz izmerjene vrednosti smo nato izračunali koncentracijo proteina po naslednjem postopku:

$$A_{280} = \epsilon \cdot c \cdot l$$

pri čemer je :

A_{280} ...absorbanca pri valovni dolžini 280 nm

ϵ ...absorpcijski (ekstinkcijski) koeficient za določano snov

c ...koncentracija določane snovi

l ...dolžina svetlobne poti skozi snov.

3.2.4 Izolacija plazmida

Izolacija plazmidov iz prekonočne kulture transformiranih bakterij *E.coli* je potekala s kompletom Gene JET Plasmid Miniprep Kit (Fermentas, Kanada) po navodilih poizvajalca. Ustreznost velikosti plazmidov smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

3.2.5 Kloniranje

S kompletom PCR Master Mix (Fermentas) smo pripravili reakcijsko zmes:

- 100 μ L Dream Taq Green PCR Master Mix
- 1,6 μ L Plo5 HX+ (100 μ M)
- 1,6 μ L Plo5 HX- long/short (100 μ L)
- 1 μ L pCR 2,1 – HX (240 ng/ μ L)
- do 200 μ L avtoklavirane MilliQ

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je potekala po zaporedju v tabeli.

Preglednica 98: Potek PCR reakcije.

	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Trajanje</i>
1. začetna denaturacija	95	5 min
2. sledi 30 ciklov:		
denaturacija	95	1 min
vezava začetnih oligonukleotidov	59	1 min
podaljševanje verige	72	1 min
3. končno podaljševanje verige	72	7 min
4. zaustavitev sinteze	4	∞

Agarozna gelska elektroforeza je potekala po ustaljenem postopkuopisanem v Daniel Voytas: Agarose Gel Electrophoresis. Fragmente smo z gela očistili s kompletom Gel Extracion Kit (Fermentas). Za restrikcijo smo pripravili naslednjo mešanico:

- 10 μ L HX long/short (1 μ g)
- 5 μ L 10x Fast Dig. Buffer
- 2,5 μ L BamHI
- 2,5 μ L MluI

30 μ L MilliQ

Rezan gen smo očistili s PCR Purification Kit (Fermentas) po priloženih navodilih.

Ligacija je potekala po navodilih za ligacijo Rapid DNA ligation Kit (Fermentas).

Ligacijska mešanica:

10 μ L pET8c(BamHI/MluI) (100ng)

5 μ L HX-long/short (75ng)

4 μ L 5x rapid ligation buffer

1 μ L T4 DNA ligase

Plazmide pET8c + HX-long/short smo transformirali v kompetentni sev DH5 α (glej 3.2.1.2). LBA plošče smo preko noči inkubirali na 37°C, naslednji dan pa precepili vsako v po 3 tekoča LB gojišča.

3.2.6 Karakterizacija

3.2.6.1 Masna spektrometrija

Masna spektrometrija je občutljiva analizna metoda, s katero lahko na osnovi analize ionov, nastalih iz neke molekule, določimo njeno strukturo, izmerimo molekulsko maso in opredelimo molekulsko formulo. Masni spektrometer loči ione v plinski fazi glede na razmerje med njihovo maso in nabojem (m/z). Običajno poteka ločitev (razklon, disperzija) ionov v homogenem magnetnem polju (masni spektrometer na magnetni razklon), lahko pa jo dosežemo tudi v visokofrekvenčnih električnih poljih (kvadrupolni masni spektrometri), na osnovi časa preleta ionov. Bistveni sestavni deli masnega spektrometra so: ionski izvor, analizator, detektor in procesor za obdelavo podatkov. Ionizacija lahko poteka na več različnih načinov, večinoma pa se za biokemijske analize uporabljata ionizacija z razprševanjem raztopin v električnem polju (ESI) in ionizacija z desorpcijo ionov iz trdnega matriksa s pomočjo laserske svetlobe (MALDI).

3.2.6.1.1 Priprava vzorcev za masno spektrometrijo

Vzorci smo pred analizo s tandemsko masno spektrometrijo ločili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo. Gel smo obarvali s Commasie Blue barvilom, trikrat sprali s 30% metanolom, ter shranili v 0,5% očetni kislini. Preiskovani fragment smo izrezali iz gela ter prenesli v silikonizirane epruvete. Z večkratnim dodajanjem 100 μ L 25 mM raztopine NH_4HCO_3 v 50 % acetonitrilu smo gel razbarvali, nato pa ga prekrili s tripsinsko raztopino. Sledila je 10-minutna rehidracija gela pri 4 °C, nato pa prekonočna inkubacija pri 37 °C v 25 mM raztopini NH_4HCO_3 . Vodno suspenzijo smo prenesli v nove epruvete, koščkom gela pa dodali 30 μ L 50 % acetonitrila v 5 % mravljični kislini. Raztopino smo dali za 30 minut na krožno mešalo, nato 5 minut sonicirali in postopek ponovili. Topilo smo odparili do končnega volumna 10 μ L. Ves postopek smo izvedli z rokavicami, da smo preprečili kontaminacijo vzorcev s keratinom.

3.2.6.1.2 ESI-MS

Za določitev molekulske mase proteinov v vzorcih smo izvedli ESI-MS na masnem spektrometru Q-Tof Premier (Waters-Micromass, VB). Q-Tof Premier je kvadrupolni, ortogonalno pospešeni tandemski masni spektrometer z analizatorjem za čas preleta ionov (TOF).

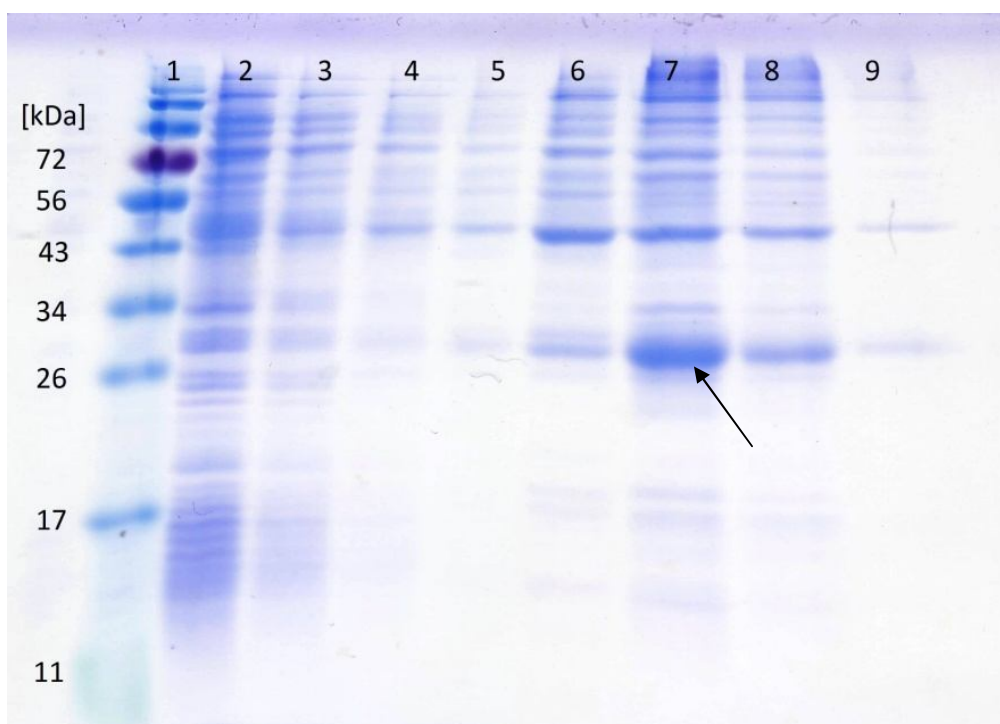
3.2.6.1.3 Določanje aminokislinskega zaporedja

Proteine smo analizirali z tandemsko masno spektrometrijo na 1100 Series LC HPLC-Chip /MSD Trap XCT Ultra masnem spektrometru (Agilent Technologies, ZDA).

4 REZULTATI

4.1 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA OB PRISOTNOSTI NaDS

Izolacija rekombinantnega proteina His₆-Hx z molekulsko maso 25 kDa je potekala z vezavo bakterijskega lizata na Ni-NTA nosilec ter spiranjem z različnimi pufri: pufrom za lizo (frakcije L1, L2 in L3), pufrom za spiranje (frakcija W) in pufrom za izpiranje (frakcije E1, E2 in E3). Na gelu vidimo, v katerih frakcijah je največ proteina in kako njegova količina z izpiranjem pada.



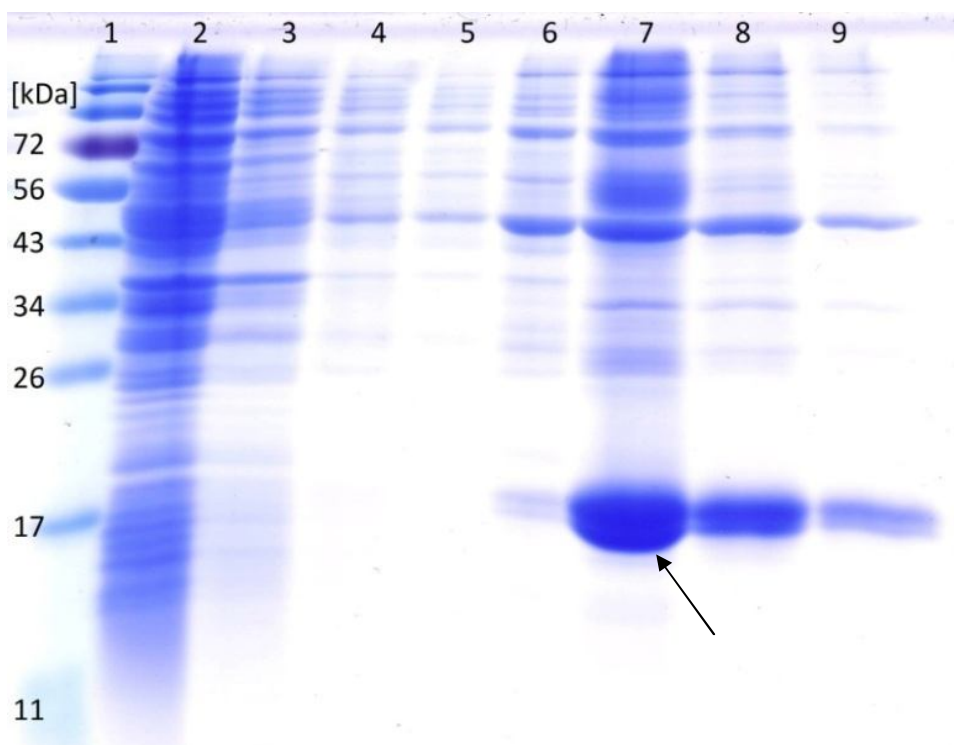
Slika 1: NaDS elektroforeza vzorcev ob izolaciji rekombinantnega proteina s hemopeksinu podobnim motivom.

Na gel smo nanegli:

- 1 – masni standard,
- 2 – FT = »flow through« ali bakterijski ekstrakt spušen preko kolone (0,5μL),
- 3-5 – L1, L2 in L3 = »lysis« ali frakcije zbrane ob spiranju kolone s pufrom za lizo (3μL),
- 6 – W = »wash« ali frakcija zbrana ob spiranju kolone s pufrom za spiranje (5μL),
- 7-9 – E1, E2, E3 = »elution« ali frakcije zbrane ob spiranju kolone s pufrom za izpiranje (10μL).

S puščico je označen lisa, ki prikazuje prisotnost rekombinantnega hemopeksinskega proteina (His₆-Hx) v frakcijah po izpiranju Ni-NTA kolone.

Izolacija rekombinantnega proteina His₆-OlyA je potekala z vezavo bakterijskega lizata na Ni-NTA nosilec ter spiranjem z različnimi pufri: pufrom za lizo (frakcije L1, L2 in L3), pufrom za spiranje (frakcija W) in pufrom za izpiranje (frakcije E1, E2 in E3). Na gelu se vidi v katerih frakcijah je največ proteina in kako njegova količina z izpiranjem pada.



Slika 2: NaDS elektroforeza vzorcev ob izolaciji rekombinantnega ostreolizina A.

Na gel smo nanесли:

1 – masni standard,

2 – FT = »flow through« ali bakterijski ekstrakt spuščен preko kolone (0,5μL),

3-5 – L1, L2 in L3 = »lysis« ali frakcije zbrane ob spiranju kolone s pufrom za lizo (3μL),

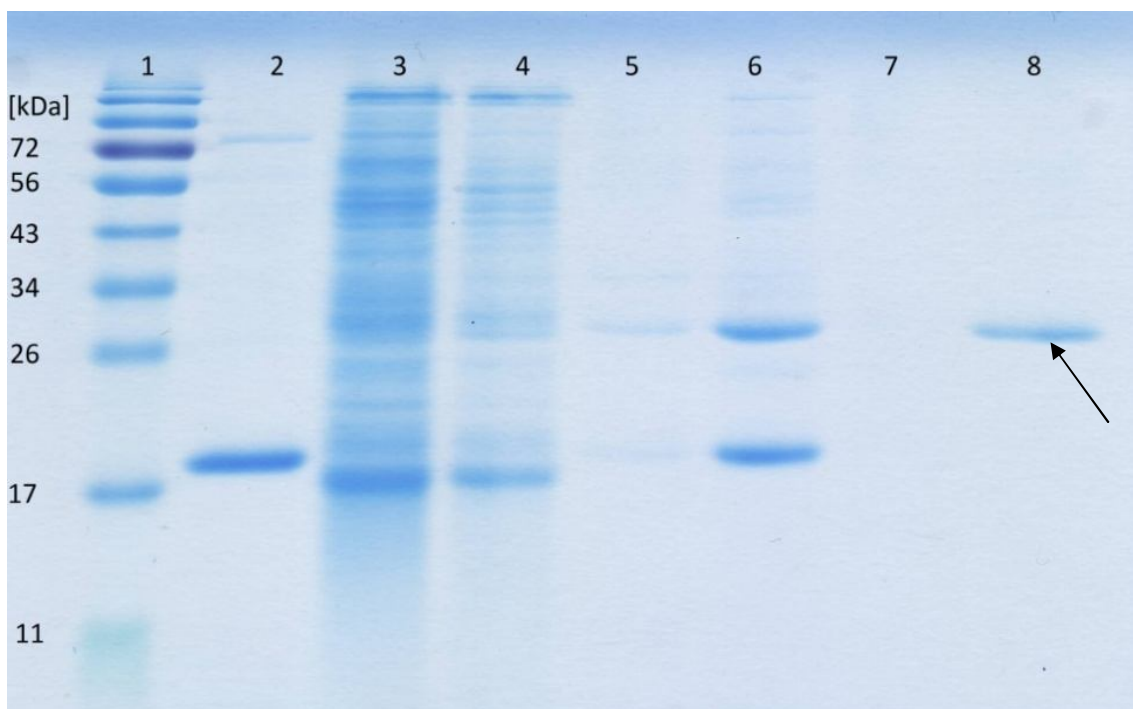
6 – W = »wash« ali frakcija zbrana ob spiranju kolone s pufrom za spiranje (5μL),

7-9 – E1, E2, E3 = »elution« ali frakcije zbrane ob spiranju kolone s pufrom za izpiranje (10μL).

S puščico je označena lisa, ki prikazuje prisotnost rekombinantnega ostreolizina A (His₆-OlyA) v frakcijah po izpiranju Ni-NTA kolone.

Preverjanje čistosti frakcij in prisotnosti proteinov v njih po spiranju z Ni-NTA kolone z NaDS-PAGE elektroforezo je jasno pokazalo:

- a) čistost frakcij po spiranju s kolone (5-8) v primerjavi z nanešenim lizatom (3),
- b) prisotnost rekombinantnega ostreolizina (5 in 6 v primerjavi z 2) in neznanega 25 kDa proteina (v 5,6 in 8),
- c) prisotnost neznanega 25 kDa proteina v kontrolnem poskusu (8), ki ovrže hipotezo o domnevem vezavnem partnerju.



Slika 3: NaDS elektroforeza. Na gel smo nanesli: 1 – masni standard, 2 – rekombinantni ostreolizin A (His₆-OlyA; 1 µL), 3 – ekstrakt bukovega ostrigarja (Plo5; 2 µL), 4 – FT (2µL). Vzorca 5 in 6 pripadata spiranju Ni-NTA kolone, na katero je bil najprej vezan rekombinantni OlyA, preko njega pa še ekstrakt bukovega ostrigarja in sicer: 5 – spiranje s pufrom s pH 5,9 (500µL vzorca), 6 – spiranje s pufrom s pH 4,5 (75 µL vzorca). Vzorca 7 in 8 pripadata kontrolnemu spiranju ekstrakta bukovega ostrigarja direktno vezanega na Ni-NTA kolono in sicer: 7 – spiranje s pufrom s pH 5,9 (200 µL vzorca), 8 – spiranje s pufrom s pH 4,5 (150 µL vzorca). S puščico je označena lisa na gelu, ki je potrdila prisotnost 25 kDa proteina v kontrolnem poskusu.

4.2 MERITVE KONCENTRACIJE PROTEINA V VZORCU Z Nanodrop SISTEMOM

Preverjanje vsebnost izoliranih proteinov v posameznih stopnjah spiranja z nosilca Ni-NTA z NanoDrop sistemom kaže, kako koncentracija proteinov v frakcijah z izpiranjem pada.

Preglednica 10: Meritve koncentracije proteina z Nanodrop sistemom v različnih stopnjah spiranja z nosilca. E1, E2, E3 = »elution« ali frakcije zbrane ob izpiranju kolone s pufrom za izpiranje (prvo, drugo in tretje izpiranje nosilca).

	c rOlyA (ng/ μ L)	c rHis ₆ -Hx (ng/ μ L)
E1	0,59	0,33
E2	0,15	0,13
E3	0,04	0,05

4.3 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA

Z agarozno elektroforezo smo preverili vstavitev inserta velikosti okoli 400 baznih parov v plazmid velik 5,5 kbp. Skupna velikost konstrukta 6 kbp zaradi krožne oblike ustreza 3,5 kbp na agaroznem gelu.



Slika 4: Agarozna gelska elektroforeza. Na gel smo nanesti: 1 – 1kb DNA lestvica, in 2 – vzorec izoliranega plazmida (2 μ L).

4.4 DOLOČANJE AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA

Določanje aminokislinskega zaporedja proteinov z metodo tandemске masne spektrometrije je prikazano na sliki 5.

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100     *      120     *      14
HXLT1L : MSTPARAAFLRPGKPEECYFFQGDQYIRMLITPGATNDKLLYGPAKIMDEWPSLKQAGFNSIDACLSPKDDSEVYFFSGDQYCLIKVVPSSNDKIITGPKSIADYWP
HX-LTL2_T7 : MSTPARAAFLRPGKPEECYFFQGDQYIRMLITPGATNDKLLYGPAKIMDEWPSLKQAGFNSIDACLSPKDDSEVYFFSGDQYCLIKVVPSSNDKIITGPKSIADYWP
HX-LTL3_T7 : MSTPARAAFLRPGKPEECYFFQGDQYIRMLITPGATNDKLLYGPAKIMDEWPSLKQAGFNSIDACLSPKDDSEVYFFSGDQYCLIKVVPSSNDKIITGPKSIADYWP
HX-LTL9_T7 : MSTPARAAFLRPGKPEECYFFQGDQYIRMLITPGATNDKLLYGPAKIMDEWPSLKQAGFNSIDACLSPKDDSEVYFFSGDQYCLIKVVPSSNDKIITGPKSIADYWP
MSTPARAAFLRPGKPEECYFFQGDQYIRMLITPGATNDKLLYGPAKIMDEWPSLKQAGFNSIDACLSPKDDSEVYFFSGDQYCLIKVVPSSNDKIITGPKSIADYWP
SLKKGFTTLEEVFSPRGDGETYCFKDSN : 139

0      *      160     *      180     *      200     *      220     *      240     *
HXLT1L : YCRIFVPGTLDESLMNGPTDIQAGWPSLKQVGFSSIDVAVVNYKDPSQVYCFNGNQYARIHVVPGTSDDTVIDGPHDVASRWPALKQAGFYSGEGKSSGLVPRGSELEHHHHHH : 253
HX-LTL2_T7 : YCRIFVPGTLDESLMNGPTDIQAGWPSLKQVGFSSIDVAVVNYKDPSQVYCFNGNQYARIHVVPGTSDDTVIDGPHDVASRWPALKQAGFYSGEGKSSGLVPRGSELEHHHHHH : 253
HX-LTL3_T7 : YCRIFVPGTLDESLMNGPTDIQAGWPSLKQVGFSSIDVAVVNYKDPSQVYCFNGNQYARIHVVPGTSDDTVIDGPHDVASRWPALKQAGFYSGEGKSSGLVPRGSELEHHHHHH : 253
HX-LTL9_T7 : YCRIFVPGTLDESLMNGPTDIQAGWPSLKQVGFSSIDVAVVNYKDPSQVYCFNGNQYARIHVVPGTSDDTVIDGPHDVASRWPALKQAGFYSGEGKSSGLVPRGQPRAPPPPP : 253
YCRIFVPGTLDESLMNGPTDIQAGWPSLKQVGFSSIDVAVVNYKDPSQVYCFNGNQYARIHVVPGTSDDTVIDGPHDVASRWPALKQAGFYSGEGKSSGLVPRGselehhhhh

```

Slika 5: Aminokislinsko zaporedje.

nHX2 (izolirani nativni hemopeksin) kaže **26,26%** pokrivanje peptidnega zaporedja s hemopeksinskim proteinom v podatkovni bazi (podčrtani peptidi se ujemajo s podatki v bazi):

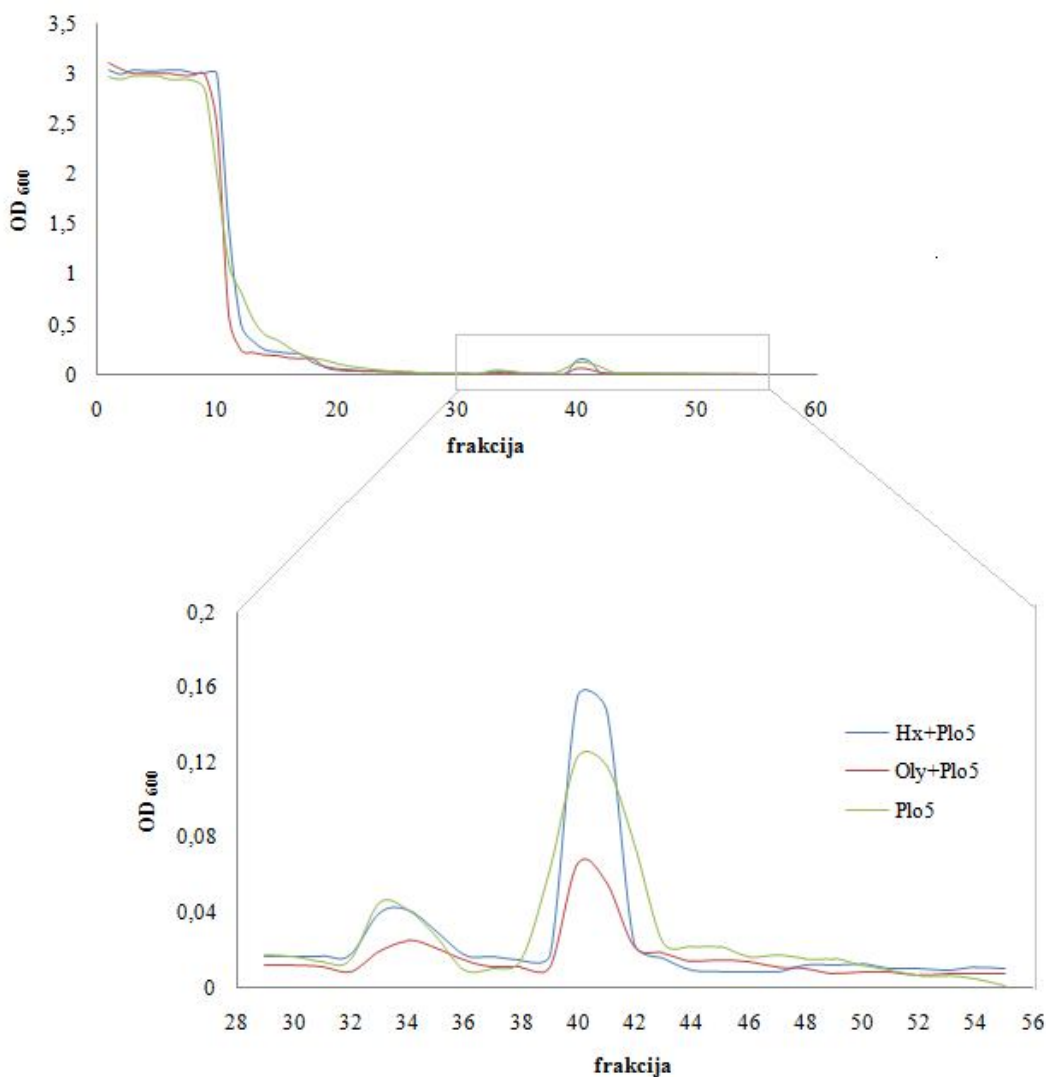
MDSGEIRATPARAAFLRPGKPEECYFFQGDQYIRMLITPGATNDKLLYGP
AKIMDEWPSLKQAGFNSIDACLSPKDDSEVYFFSGDQYCLIKVVPSSN
DKIITGPKSIADYWPSLKKGFTTLEEVFSPRGDGETYCFKDSNYCRIK
FVPGTLDESLMNGPTDIQAGWPSLKQVGFSSIDVAVVNYKDPSQVYCFNG
NQYARIHVVPGTSDDTVIDGPHDVASRWPALKQAGFY

Pleos_His₆-rHX (izolirani rekombinantni hemopeksin) kaže **84%** pokrivanje peptidnega zaporedja s hemopeksinskim proteinom v podatkovni bazi (podčrtani peptidi se ujemajo s podatki v bazi):

MDSGEIRATPARAAFLRPGKPEECYFFQGDQYIRMLITPGATNDKLLYGP
AKIMDEWPSLKQAGFNSIDACLSPKDDSEVYFFSGDQYCLIKVVPSSN
DKIITGPKSIADYWPSLKKGFTTLEEVFSPRGDGETYCFKDSNYCRIK
FVPGTLDESLMNGPTDIQAGWPSLKQVGFSSIDVAVVNYKDPSQVYCFNG
NQYARIHVVPGTSDDTVIDGPHDVASRWPALKQAGFY

4.5 Ni-NTA KROMATOGRAFIJA EKSTRAKTA BUKOVEGA OSTRIGARJA

Na grafu se vidi potek spiranja proteinov z Ni-NTA nosilca. Prvih deset frakcij ima veliko optično gostoto na račun spiranja ekstrakta iz kolone, vrhova pri frakcijah 33 in 40 pa sta posledici spiranja proteinov z nosilca zaradi znižanja pH.



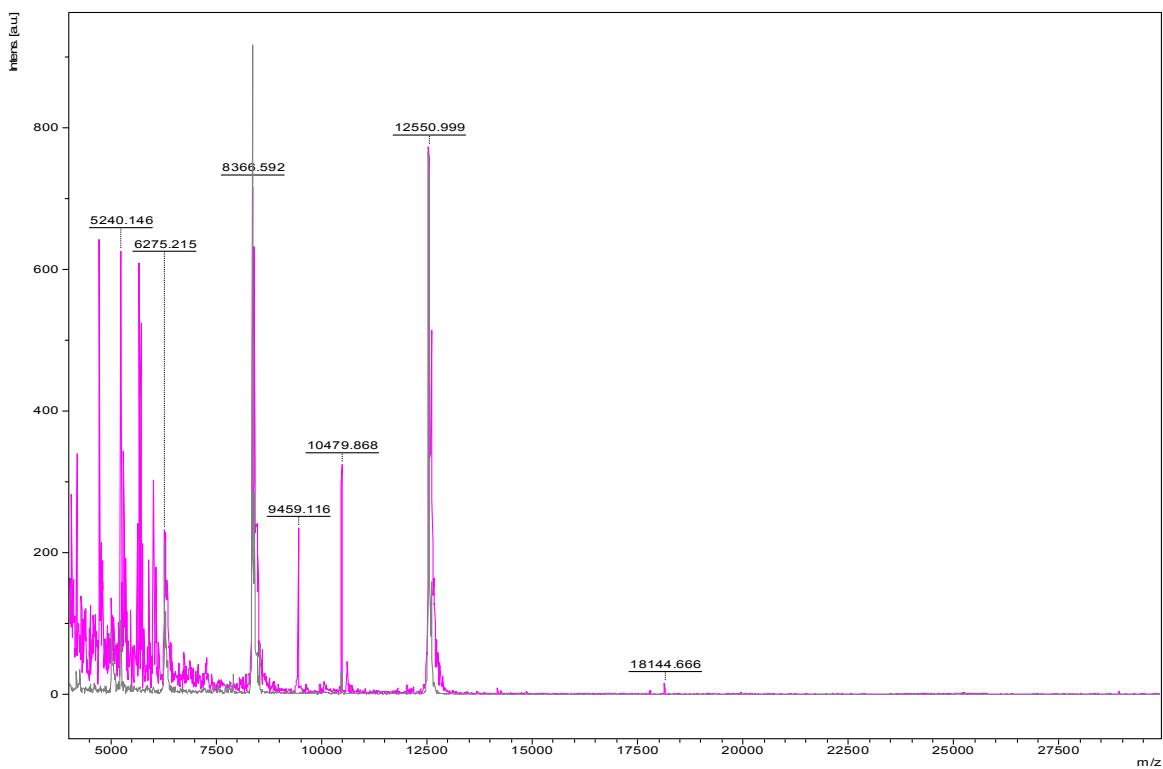
Slika 6: Merjenje optične gostote vzorcev pri spiranju Ni-NTA kolone. Frakcije 1-10 predstavljajo spiranje ekstrakta bukovega ostrigarja, frakcije 32-34 spiranje Ni-NTA kolone s pufrom s pH 5,9, frakcije 39-41 s pH 4,5, pri ostalih pa smo spirali s pufrom s pH 8,0. Hx + Plo5 prikazuje rezultat psokusa, pri katerem smo na nosilec predhodno vezali rekombinantni protein s hemopeksinu podobnimi ponovitvami ter nato še lizat bukovega ostrigarja. Oly + Plo5 prikazuje rezultat psokusa, pri katerem smo pred vezavo lizata na kolono vezali rekombinantni ostreolizin A, Plo5 pa je negativna kontrola, pri kateri smo preko kolone direktno spustili lizat.

4.6 MASNA SPEKTROMETRIJA

Analize masne spektrometrije so bile opravljene na Inštitutu Jožef Stefan in so prikazane na slikah 7 in 8 (izsek slike 7).

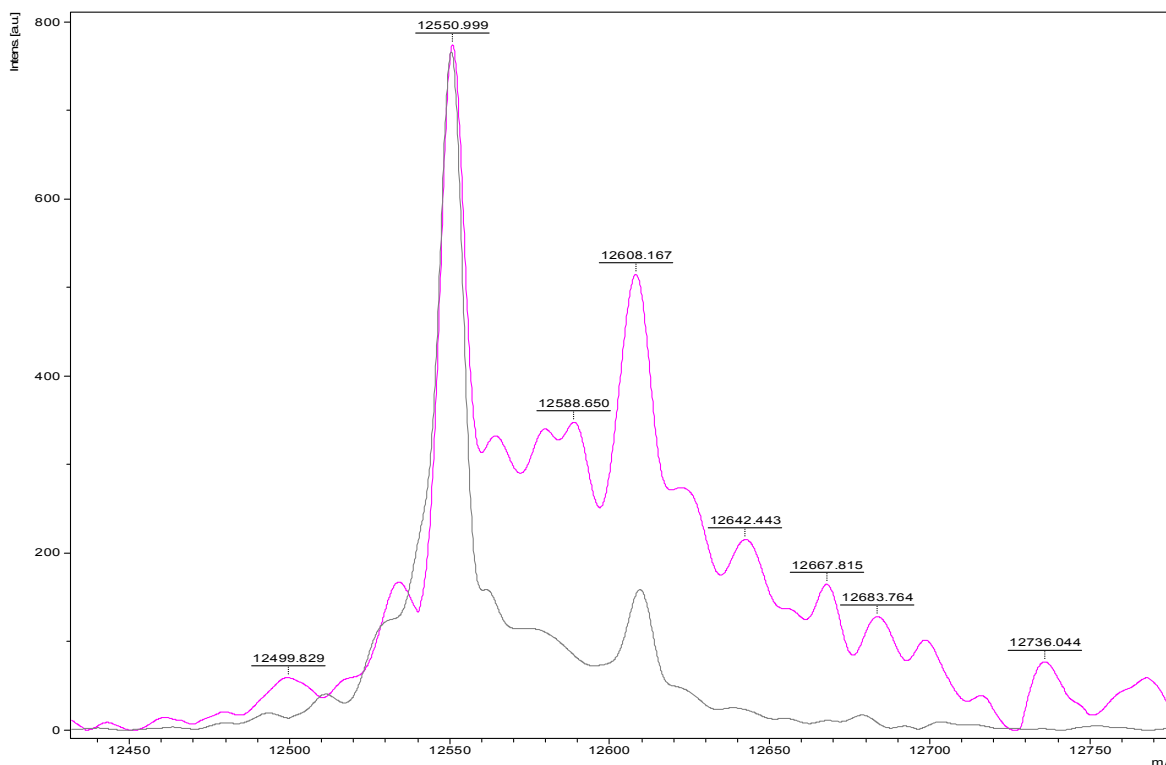
Vzorec 1 (roza; vrh 20.802): hemopeksin po Ni-NTA-koloni z His₆-OlyA

Vzorec 2 (siv; vrh 20.664): hemopeksin po Ni-NTA-koloni brez OlyA (direktna vezava na Ni-NTA)



Slika 7: Masna spektrometrija. Prekrivanje vzorcev 1 (roza; hemopeksin po Ni-NTA-koloni z vezanim His₆-OlyA) in 2 (siv; direktno vezan hemopeksin na Ni-NTA kolono).

Določitev molekulske mase (M):



Slika 8: Masna spektrometrija; določitev molekulske mase vzorcev. Prekrivanje vzorcev 1 (roza; hemopeksin po Ni-NTA-koloni z vezanim His₆-OlyA) in 2 (siv; direktno vezan hemopeksin na Ni-NTA kolono): glede na spektre je videti, da gre za enak protein.

Določitev molekulske mase (M):

Vzorec 1 (roza; vrh 20.802), hemopeksin po Ni-NTA-koloni z vezanim His₆-OlyA:

$$(M+2H)^{2+} = 12550.999 \text{ m/z}$$

M ≈ 25.101 Da

Vzorec 2 (siv; vrh 20.664), hemopeksin po Ni-NTA-koloni brez OlyA (direktna vezava na Ni-NTA):

$$(M+2H)^{2+} = 12550.556 \text{ m/z}$$

M ≈ 25.101 Da

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Leta 2002 so Berne in sod. iz bukovega ostrigarja izolirali protein ostreolizin, ki spada v družino egerolizinov. Proteini te družine so si med seboj zelo podobni. Vsi so β -strukturirani, imajo nizko izoelektrično točko in podobne molekulske mase ter so stabilni v širokem pH območju (Sakaguchi in sod., 1975; Berne in sod., 2005).

Nekateri proteini iz te družine imajo antitumorske, antiproliferativne in antibakterijske učinke, zato bi bili lahko potencialno uporabni za zaščito pred aterosklerozo ali kot cepivo (Berne in sod., 2009). Glivni egerolizini bi bili lahko zanimivi tudi iz komercialnega in biotehnološkega vidika, saj verjetno sodelujejo v zgodnjih fazah razvoja in zorenja gob, boljše poznavanje njihove genetike in celičnih procesov pa bi lahko izboljšalo kultivacijo kulinarično zanimivih vrst.

Ostreolizin se, kot verjetno tudi nekateri drugi egerolizini, specifično veže na s steroli bogate membranske domene, za razliko od drugih pa zaznava tudi kombinacijo dveh glavnih membranskih komponent – holesterola in sfingomielina (Sepčić in sod., 2004). Zaradi te lastnosti bi bil lahko uporaben v molekularno bioloških študijah kot označevalec lipidnih mikrodomen.

Kljub velikemu številu do zdaj izoliranih egerolizinov je njihova biološka vloga v izvornih organizmih slabo poznana. Nekateri naj bi delovali kot citolizini kot na primer egerolizin, ostreolizin in Asp-hemolizin (Berne in sod., 2002; Yokota in sod., 1977), medtem ko pleurotolizin A in erilizin A za citolitično aktivnost potrebuje še proteinsko komponentno B. To je nedavno bilo dokazano tudi za ostreolizin, katerega nativni izolat predstavlja zmes Oly A, kontaminiran z 59-kDa proteinsko komponento B v sledovih (Katja Ota, neobjavljeni rezultati). Glede na to, da predstavniki te družine dokazano lahko delujejo kot dvokomponentni sistem, smo z namenom raziskovanja vloge ostreolizina A v bukovem ostrigarju v okviru diplomske naloge želeli izolirati in okarakterizirati še druge morebitne vezavne partnerje tega proteina.

Izolacija nativnega domnevnega vezavnega partnerja iz vodnega ekstrakta bukovega ostrigarja je potekala z Ni-NTA kromatografijo s predhodno vezavo rekombinantnega ostreolizina A na nosilec. Največ proteina, za katerega smo sprva domnevali, da se je vezal na ostreolizin A in bi lahko predstavljal vezavnega partnerja, se je z nosilca spralo pri pH 4,5 (slika 6). Toda negativna kontrola je prav tako vsebovala ta neznani protein ter tako ovrgla našo predhodno hipotezo (slika 3). Protein se je torej vezal direktno na nosilec kolone in ne preko ostreolizina. Se je pa Ni-NTA kromatografija izkazala kot preprosta in učinkovita metoda izolacije tega proteina, ne le rekombinantnega, temveč tudi nativnega.

Nadaljne analize izoliranega proteina z masno spektrometrijo so potrdile, da gre za 25 kDa protein, vseboval pa naj bi tudi hemopeksinu podoben motiv. V naddružino proteinov s tem motivom spada že preko 500 proteinov (Piccard in sod. 2007). Crennell in sod. so leta 2000 identificirali fotopeksina A in B iz patogene bakterije *Photorhabdus luminiscenses*. Večina proteinov iz te naddružine je evkariontskega izvora; limunektin iz amebocit *Limulus* (Liu in sod., 1991), različni albumini, predvsem iz semen stročnic (Jenne, 1991), nektinepsin iz nevroretine, možganov, jeter in črevesa prepelice (*Coturnix coturnix*) (Blancher in sod., 1996) ter številni vitronektini in matrične metaloproteinaze (MMPs) sesalcev (Piccard in sod., 2007). Ta protein pa je prvi protein s hemopeksinu podobnim motivom, ki je izoliran iz glive.

Izolirani protein s hemopeksinu podobnim motivom torej ni vezavni partner ostreolizina, zato bodo za proučevanje njegove vloge v organizmu potrebne še nadaljnje študije.

5.2 SKLEPI

- Izolirani 25 kDa velik protein bukovega ostrigarja (*P. ostreatus*) spada v hemopeksinsko naddružino PF00045.
- Izolirani protein je prvi nativni protein s hemopeksinu podobnimi ponovitvami izoliran iz glive.
- Izolirani protein ni vezavni partner ostreolizina A (OlyA) iz egerolizinske družine proteinov.
- Izolacija nativnega proteina s hemopeksinu podobnimi ponovitvami je možna direktno iz vodnega ekstrakta z Ni-NTA kromatografijo, brez dodatnih rekombinantnih vezavnih partnerjev.
- Izolacija rekombinantnega proteina je možna z izražanjem plazmida transformiranega v kompetentni sev *E.coli* ter čiščenjem proteina z Ni-NTA kromatografijo.
- Nekaj proteina se z Ni-NTA nosilca spere že pri pH 5,9, vendar je optimalno območje pH za spiranje tega proteina okoli pH 4,5.
- Metoda izolacije s pomočjo Ni-NTA kromatografije je ponovljiva in učinkovita tako za izolacijo rekombinantnega kot tudi nativnega proteina.

6 POVZETEK

Z diplomskim delom smo želeli raziskati vlogo proteina ostreolizina A (OlyA) v gobi bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*). Ta okoli 15 kDa velik protein je bil izoliran že leta 2002 (Berne in sod.), vezal naj bi se na sterole v sterolno-sfingomielinskih kompleksih (Sepčič in sod., 2004) in v eritrocitnih membranah tvoril pore s funkcionalnim premerom 4 nm (Sepčič in sod., 2003) v prisotnosti 59-kDa proteinske podenote B (Katja Ota, neobjavljeni rezultati). Ker pa njegova primarna funkcija v organizmu še vedno ni razjasnjena, smo v ta namen želeli izolirati morebitnega vezavnega partnerja. Z Ni-NTA kromatografijo smo iz lizata gobe poleg ostreolizina A izolirali še neznan 25 kDa velik protein ter ga glede na masno analizo in peptidno zaporedje uvrstili v hemopeksinsko naddružino PF00045. Organizmi, iz katerih so bili do sedaj izolirani predstavniki te družine, spadajo med bakterije, rastline in živali, ta protein pa je prvi izoliran iz predstavnika gliv. Metoda izolacije proteina se je izkazala za preprosto, ponovljivo in učinkovito. Vloga ostreolizina A pa še naprej ostaja nerazjasnjena, saj izolirani hemopeksinski protein ni bil potrjen kot njegov vezavni partner. Za razumevanje vloge ostreolizina A v bukovem ostrigarju bodo tako potrebne še nadaljnje raziskave.

7 VIRI

Berne S, Lah L., Sepčič K. 2009. Aegerolysins: structure, function and putative biological role. *Protein Science*, 18: 694-706

Berne S., Sepčič K., Anderluh G., Turk T., Maček P., Poklar Ulrih N. 2005. Effect of pH on the Pore Forming Activity and Conformational Stability of Ostreolysin, a Lipid Raft-Binding Protein from the Edible Mushroom *Pleurotus Ostreatus*. *Biochemistry*, 44: 11137-11147

Crennell S. J., Tickler P. M., Bowen D. J. 2000. The predicted structure of photopexin from *Photobacterium* shows the first haemopexin-like motif in prokaryotes. *FEMS Microbiology Letters*, 191: 139-144

Flannery C. R., Hughes C. E., Schumacher B. L., Tudor D., Aydelotte M. B., Kuettner K. E., Caterson B. 1999. Articular cartilage superficial zone protein (SZP) is homologous to megakaryocyte stimulating factor precursor and is a multifunctional proteoglycan with potential growth-promoting, cytoprotective, and lubricating properties in cartilage metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 254:535-541

Gaur V., Qureshi I. A., Chanana V., Salunka D. M. 2010. Crystal Structure and Functional Insights of Hemopexin Fol Protein from Grass Pea. *Plant Physiology*, 152: 1842-1850

Gaur V., Qureshi I. A., Singh A., Chanana V., Salunka D., M. 2010. The structure of a haemopexin-fold protein from cow pea (*Vigna unguiculata*) suggests functional diversity of haemopexins in plants. *Acta Crystallographica Section F*, 67: 193-200

Ikegawa S., Sano M., Koshizuka Y., Nakamura Y. 2000. Isolation, characterization and mapping of the mouse and human PRG4 (proteoglycan 4) genes. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 90:291-297

Jenne D. 1991. Homology of placental protein and pea seed albumin 2 with vitronectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266: 14813-14821

Karlsson M., Olson A., Stenlid J. 2003. Expressed sequences from the basidiomycetous tree pathogen *Heterobasidion annosum* during early infection of Scots pine. *Fungal Genetics and Biology*, 39:51-59

Liu T., Lin Y., Cislo T., Minetti C. A. S. A., Baba J. M. K., Liu T. Y. 1991. Limunectin, a phosphocholine-binding protein from *Limulus* amebocytes with adhesion-promoting properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 266: 14813-14921

Liu Y. J., Lu S. H., Xu B., Yang R. C., Ren Q., Liu B., Li B., Lu M., Yan F. Y., Han Z. B., Han Z. C. 2004. Hemangiopoetin, a novel human growth factor for the primitive cells of both hematopoietic and endothelial cell lineages. *Blood*, 103:4449-4456

Marcelino J., Carpten J. D., Suwairi W. M., Gutierrez O. M., Schwartz S., Robbins C., Sood R., Makalowska I., Baxevanis A., Johnstone B., et.al. 1999. CACP, encoding a secreted proteoglycan, is muted in camptodactyly-arthropathy-coxa vara-pericarditis syndrome. *Nature Genetics*, 23:319-322

Pedroche J., Yust M. M., Lqari H., Megias C., Giron-Calle J., Alaiz M., Millan F., Vioque J. 2005. Chickpea pa2 albumin binds hemin. *Plant Science*, 168: 1109-1114

Piccard H., Van den Steen P. E., Opdenakker G. 2007. Hemopexin domains as multifunctional liganding modules in matrix metalloproteinases and other proteins. *Journal of Leukocyte Biology*, 81: 870-892

Rhee D. K., Marcelino J., Baker M., Gong Y., Smits P., Lefebvre V., Jay G. D., Stewart M., Wang H., Warman M. L., Carpten J. D. 2005. The secreted glycoprotein lubricin protects cartilage surfaces and inhibits synovial cell overgrowth. *Journal of Clinical Investigation*, 115:622-631

Sakaguchi O., Shimada H., Yokota K. 1975. Purification and characteristics of hemolytic toxin from *Aspergillus fumigatus*. Japanese Journal of Medical Science and Biology, 28: 328-331

Scarafoni A., Gualtieri E., Barbiroli A., Carpen A., Negri A., Duranti M. 2011. Biochemical and Functional Characterization of an Albumin Protein Belonging to the Hemopexin Superfamily from *Lens culinaris* Seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59: 9637-9644

Schwartz I., Seger D., Shaltiel S. 1999. Vitronectin. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 31:539-544

Shibata T., Kudou M., Hoshi Y., Kudo A., Nanashima N., Miyairi K. 2010. Isolation and characterization of a novel two-component hemolysin, erylysin A and B, from an edible mushroom, *Pleurotus eryngii*. Toxicon, 56:1436-1442.

Sepčić K., Berne S., Rebolj K., Batista U., Plemenitaš A., Šentjurec M., Maček P. 2004. Ostreolysin, a pore-forming protein from the oyster mushroom, interacts specifically with membrane cholesterol-rich lipid domains. FEBS Letters, 575: 81-85

Vidic I., Berne S., Drobne D., Maček P., Frangež R., Turk T., Štrus J., Sepčić K. 2004. Temporal and spatial expression of ostreolysin during development of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). Mycological Research, 109: 377-382

Vigeolas H., Chinoy C., Zuther E., Blessington B., Geigenberger P., Domoney C. 2007. Combined Metabolomic and Genetic Approaches Reveal a Link between the Polyamine Pathway and Albumin 2 in Developing Pea Seeds. Plant Physiology, 146: 74-82

Voytas D.: Agarose Gel Electrophoresis: Current Protocols in Molecular Biology. Published Online: 1 May 2001 DOI: 10.1002/0471142727.mb0205as51

Yokota K, Shimada H., Kamaguchi O. 1977. Studies on the toxin of *Aspergillus fumigatus*; Purification and some properties of hemolytic toxin (asp-hemolysin) from filtrates and mycelia. *Microbiology and Immunology*, 21:11-22

Zhang S., Clark K. D., Strand M. R. 2011. The protein P23 identifies capsule-forming plasmatocytes in the moth *Pseudoplusia includens*. *Developmental and Comparative Immunology*, 35:501-510

ZAHVALA

Hvala mentorju prof. dr. Petru Mačku in recenzentki prof. dr. Kristini Sepčić za spodbudne besede in hiter pregled diplomske naloge. Najlepša hvala Katji Ota za vse nasvete in potrpežljivo usmerjanje skozi raziskovalno delo. Hvala tudi vsem ostalim sodelavcem Katedre za biokemijo za pomoč in nasvete. Hvala dr. Adrijani Leonardi in dr. Dušanu Žigonu z Inštituta Jožef Stefan za meritve na masnem spektrometru. Najlepša hvala domačim za vso podporo tekom študija. Hvala prijateljem in sošolcem za mnoge nepozabne trenutke. Hvala mojemu Sašu za potrpežljivost med izdelavo diplomske naloge.