

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Bernarda ZORKO

**IZRAŽANJE IN DOLOČITEV LASTNOSTI
AVTOFAGINOV Atg4.1 IN Atg4.2 IZ PARAZITA
*TRYPANOSOMA CRUZI***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Bernarda ZORKO

**IZRAŽANJE IN DOLOČITEV LASTNOSTI AVTOFAGINOV
Atg4.1 IN Atg4.2 IZ PARAZITA *TRYPANOSOMA CRUZI***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EXPRESSION AND CHARATERIZATION OF Atg4.1 AND
Atg4.2 PROTEINS FROM PARASITE *TRYPANOSOMA
CRUZI***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Institutu Jožef Stefan in sicer v laboratorijih na raziskovalnem odseku za Biokemijo, molekularno in strukturno biologijo B1.

Študijska komisija univerzitetnega študija biologije je dne 14.05.2010 za mentorja naloge imenovala prof. ddr. Borisa Turk za somentorja prof. dr. Grega Anderluha in za recenzenta prof. dr. Petra Mačka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: dr. Rok KOSTANJŠEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. ddr. Boris TURK

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Katedra za biokemijo

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH

Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Peter MAČEK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 27.9.2012

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tisku 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.

BERNARDA ZORKO

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 576.89:577(043.2)=163.6

KG Avtofagina 4.1 in 4.2 / avtofagija / *Trypanosoma cruzi* / Chagasova bolezen / cisteinske proteaze / Atg8.1 / sintetični substrati -ACC, -AFC / molekulsko kloniranje / Hofmeistrove soli

AV ZORKO Bernarda

SA Boris Turk (mentor) / Maček Peter (recenzent)

KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2012

IN IZRAŽANJE IN DOLOČITEV LASTNOSTI AVTOFAGINOV Atg4.1 IN Atg4.2
IZ PARAZITA *TRYPANOSOMA CRUZI*

TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)

OP XI, 64 str., 1 pregl., 28 sl., 58vir.

IJ sl

JI sl / en

AI Cisteinski proteazi TcAtg4.1 in TcAtg4.2 sodelujeta pri oblikovanju avtofagosomov ter skrbita za normalen potek avtofagije. Sta atraktivni tarči za razvoj inhibitorjev, s katerimi bi preperečili diferenciacijo parazita *T. cruzi* v različne infektivne oblike ter posledično pojav Chagasovega obolenja. V naši raziskavi smo s tehnologijo rekombinantne DNA in drugim ekspresijskim vektorjem izboljšali obstoječi sistem izražanja avtofaginov. Dokazali smo, da sta izolirani proteazi aktivni na naraven substrat TcAtg8.1. Ac-STFG-AFC pa se je izkazal kot najboljši fluorogeni substrat za TcAtg4.2. Z daljšanjem polipeptidne verige sintetičnih substratov se je povečevala tudi encimska aktivnost TcAtg4.2. Dodatek Hofmeistrovih soli je prav tako zvišal encimsko aktivnost TcAtg4.2.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDK 576.89:577(043.2)=163.6
CX Autophagin Atg4.1 and Atg 4.2 / autophagy / *Trypanosoma cruzi* / Chagas disease / cysteine protease / Atg8.1 / substrates-ACC-AFC / molecular cloning / Hofmeister salts
AU ZORKO Bernarda
AA Boris Turk (supervisor) / Maček Peter (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2012
TI EXPRESSION AND CHARATERIZATION OF Atg4.1 AND Atg4.2 PROTEINS FROM PARASITE *TRYPANOSOMA CRUZI*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 64 p., 1 tab., 28 fig., 58 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Cysteine proteases TcAtg4.1 and TcAtg4.2 play an important role in the autophagosome formation and autophagy regulation. The development of autophagin inhibitors would enable prevention of *T. cruzi* differentiation and, possibly, the emergence of Chagas disease. In our study, we improved the existing system of autophagin expression using DNA recombinant technology and a new expression vector. We demonstrated that both autophagins cleave their natural substrate TcAtg8.1. TcAtg4.2 also processes fluorogenic synthetic substrates and Ac-STFG-AFC was found to be the most optimal. Extension of the polypeptide chain of synthetic substrates, as well as Hofmeister salts, increased the activity of TcAtg4.2.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 AVTOFAGIJA	4
2.1.1 Potek avtofagije	5
2.1.2 Vloga avtofagije pri preobrazbi parazita <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
2.2 <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	6
2.2.1 Strukture in procesi, ki pomagajo parazitom pri diferenciaciji in invaziji	9
2.3 CHAGASOVA BOLEZEN ALI JUŽNOAMERIŠKA TRIPANOSOMIOZA	9
2.4 PROTEAZE.....	12
2.4.1 Delitev proteaz.....	12
2.4.2 Vezavna mesta za substrat.....	13
2.4.3 Cisteinske proteaze	14
2.4.3.1 Avtofagini	14
2.5 PROTEINI DRUŽINE ATG8.....	16
2.5.1 Konjugacija Atg4 in Atg8	18
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 MATERIALI	20
3.1.1 Kemikalije	20
3.1.2 Komercialni kompleti reagentov in drugi reagenti	21
3.1.3 Pufri in raztopine	22
3.1.4 Gojišča	25
3.1.5 Encimi, plazmidi.....	25
3.1.6 Gostiteljske bakterijske kulture	26
3.1.7 Seznam laboratorijske opreme.....	26
3.2 METODE.....	28
3.2.1 Molekulsко kloniranje.....	28

3.2.1.1 Izolacija plazmidne DNA iz bakterijskih DH5 α celičnih kultur	28
3.2.1.2 Določanje koncentracije in čistosti plazmidne DNK	28
3.2.1.3 Agarozna gelska elektroforeza	28
3.2.1.4 Izolacija DNA iz agarognega gela.....	29
3.2.1.5 Priprava plazmidne DNA za izražanje avtofaginov Atg4.1 v <i>E.coli</i>	29
3.2.1.5.1 Namnožitev genov TcAtg4.1 s PCR.....	29
3.2.1.5.2 Restrikcija TcAtg4.1 in plazmida pGEX-2T	30
3.2.1.5.3 Ligacija TcAtg4.1 in plazmida pGEX-2T	31
3.2.1.5.4 Kontrola ligacije z restriktivno analizo	31
3.2.2 Delo z bakterijami	32
3.2.2.1 Transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH5 α , BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS	32
3.2.2.2 Poskusno izražanje avtofaginov 4.1 in 4.2 v bakteriji <i>Escherichia coli</i> (optimizacija pogojev)	33
3.2.2.2.1 pET vektor za ekspresijo	34
3.2.2.2.2 pGEX-2T - vektor za ekspresijo proteinov z GST repom	35
3.2.3 Izolacija in analiza proteinov	35
3.2.3.1 Priprava vzorcev za poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)	35
3.2.3.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)	35
3.2.3.3 Izolacija z Ni-NTA kromatografijo	36
3.2.3.4 Merjenje encimske aktivnosti na naravnem substratu (TcAtg8.1)	37
3.2.3.5 Merjenje encimske aktivnosti na fluorogenih sintetičnih substratih	38
4 REZULTATI	40
4.1 Kloniranje TcATG4.1 v plazmid pGEX-2T	40
4.1.1 Priprava avtofagina TcAtg4.1 z verižno reakcijo s polimerazo in njegova restrikcija in restrikcija plazmida pGEX-2T	40
4.1.2 Kloniranje PCR produktov TcAtg4.1 v plazmid pGEX-2T	40
4.1.2 Kloniranje PCR produktov TcAtg4.1 v plazmid pGEX-2T	41
4.2 IZRAŽANJE TcATG4.1 IN TcATG4.2 V BAKTERIJI <i>E. COLI</i>	42
4.3 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE VZORCEV	45

4.4 AKTIVNOST AVTOFAGINOV NA NARAVEN SUBSTRAT	46
4.4.1 Cepitev substrata TcAtg8.1 z avtofaginom TcAtg4.1	46
4.4.2 Cepitev substrata TcAtg8.1 z avtofaginom TcAtg4.2	47
4.5 AKTIVNOST AVTOFAGINA TcATG4.2 NA FLOUROGENE SINTETIČNE SUBSTRATE	48
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	53
5.1 IZRAŽANJE AVTOFAGINOV	53
5.2 AKTIVNOST AVTOFAGINOV NA NARAVNI SUBSTRAT TcATG8.1	55
5.3 AKTIVNOST AVTOFAGINA TcATG4.2 NA FLOUROGENE SINTETIČNE SUBSTRATE	56
5.4 SKLEPI.....	59
6 POVZETEK.....	60
7 VIRI	61

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:
Izbira antibiotikov za selektivno LB oz. TB gojišče glede na različne kombinacije kompetentnih celic in plazmidov, ter njihove končne koncentracije v gojišču..... 33

KAZALO SLIK

Slika 1: Potek avtofagije.....	5
Slika 2: Življenjski krog parazita <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
Slika 3: Načini vstopa parazita <i>T. cruzi</i> v sesalske celice	8
Slika 4: Ocena števila ljudi okuženih s <i>T. cruzi</i> v letu 2009.	10
Slika 5: Katalitski mehanizmi proteaz.....	13
Slika 6: Vezavna mesta za substrat v aktivnem mestu encima.....	13
Slika 7: Kristalna struktura človeškega avtofagina HsAtg4B	15
Slika 8: A) Kristalna struktura ubikvitina.....	17
Slika 9: Atg8 s prikazanima hidrofobnima žepoma W in L.....	17
Slika 10: Konjugacijski sistem Atg8-PE	18
Slika 11: Shematični prikaz mehanizma indukcije izražanja rekombinantnega proteina v <i>E. coli</i> z IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktoranozid).	34
Slika 12: Agarozna gelska elektroforeza (0,8 % gel) rezanih produktov PCR in rezanega plazmida pGEX-2T.....	40
Slika 13: Agarozna gelska elektroforeza (0,8 % ge) s <i>Pst</i> I-rezanih plazmidov pGEX-2T z vstavljenim zapisom za TcAtg4.1.	41
Slika 14: Poliakrilamidna gelska elektroforeza TcAtg4.1 v prisotnosti NaDS (12,5 % gel) bakterijskih lizatov pripravljenih po postopku iz poglavja 3.2.3.1.	42
Slika 15: Poliakrilamidna gelska elektroforeza TcAtg4.2 v prisotnosti NaDS (12,5 % gel) bakterijskih lizatov pripravljenih po postopku iz poglavja 3.2.3.1.	43

Slika 16: Poliakrilamidna gelska elektroforeza GST – TcAtg4.1 v prisotnosti NaDS (12,5 % gel) bakterijskih lizatov pripravljenih po postopku iz poglavja 3.2.3.1.....	44
Slika 17: NaDS-PAGE (12,5 % gel) vzorcev po Ni-NTA kromatografiji	45
Slika 18: NaDS – PAGE (15 % gel) cepitve TcAtg8.1 s TcAtg4.1	46
Slika 19: NaDS-PAGE(15 % gel) cepitev TcAtg8.1 s TcAtg4.2	47
Slika 20: Razgradnja substrata Ac-EFTG-AFC pri dveh različnih koncentracijah natrijevega in amonijevega citrata.....	48
Slika 21: Razgradnja substrata Ac-GFTG-AFC pri dveh različnih koncentracijah natrijevega in amonijevega citrata.....	48
Slika 22: Razgradnja substrata Ac-NFTG-AFC pri dveh različnih koncentracijah natrijevega in amonijevega citrata.....	49
Slika 23: Razgradnja substrata Ac-STFG-AFC pri dveh različnih koncentracijah natrijevega in amonijevega citrata.....	49
Slika 24: Razgradnja substratov Ac-ETFG-AFC, Ac-GTFG-AFC, Ac-NTFG-AFC, Ac-STFG-AFC pri 1 M amonijevim citratu.....	50
Slika 25: Razgradnja tetrapetida Ac-EFTG-ACC pri dveh različnih koncentracijah natrijevega in amonijevega citrata in polovični količini avtofagina TcAtg4.2.	50
Slika 26: Razgradnja heksapeptida Ac-SQEFTG-ACC pri dveh različnih koncentracijah natrijevega in amonijevega citrata in polovični količini avtofagina TcAtg4.2.	51
Slika 27: Razgradnja oktapeptida Ac-YASQEFTG-ACC pri dveh različnih koncentracijah natrijevega in amonijevega citrata in polovični količini avtofagina TcAtg4.2.	51
Slika 28: Razgradnja tetra-, heksa- in oktapeptida pri 1M amonijevim citratu in polovični količini avtofagina TcAtg4.2.....	52

SEZNAM OKRAJŠAV

A _(260 nm)	absorbanca merjena pri valovni dolžini 260 nm
A _(280 nm)	absorbanca merjena pri valovni dolžini 280 nm
ACC	fluorofor 7-amino-4-karbamoilmetilkumarin
Ac-ETFG-ACC	acetil-Glutamin-Triptofan-Fenil-Glicin-7-amino-4-karbamoilmetilkumarin
Ac-ETFG-AFC	acetil-Glutamin-Triptofan-Fenil-Glicin-7-amino-4-trifluorometilkumarin
Ac-GTFG-AFC	acetil-Glycin-Triptofan-Fenil-Glicin-7-amino-4-trifluorometilkumarin
Ac-NTFG-AFC	acetil-Asparagin-Glutamin-Triptofan-Fenil-Glicin-7-amino-4-trifluorometilkumarin
Ac-STFG-AFC	acetil-Serin-Glutamin-Triptofan-Fenil-Glicin-7-amino-4-trifluorometilkumarin
Ac-SQETFG-ACC	acetil-Serin-Glutamin-Glutamin-Triptofan-Fenil-Glicin-7-amino-4-karbamoilmetilkumarin
Ac-YASQETFG-ACC	acetil-Try-Alanin-Serin-Glutamin-Glutamin-Triptofan-Fenil-Glicin-7-amino-4-karbamoilmetilkumarin
AFC	flourofor 7-amino-4-trifluorometilkumarin
AIM	interakcijski motiv proteinov družine Atg8
APS	amonijev persulfat
Atg	avtofagin
ATP	adenozin trifosfat
BSA	goveji serumski albumin
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
DUB	deubikvitinirajoči encimi
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina

FPLC	hitra proteinska tekočinska kromatografija (angl. <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>)
GPI	glikozilfosfatidilinozitolna sidra
GST	glutation S-transferaza
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktosid
LB	bogato gojišče Luria-Bertani
NaDS	natrijev dodecil sulfat
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS
Ni-NTA	afinitetna nikelj-kelatna kromatografija
OD ₅₅₀	optična gostota kulture pri 550 nm
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	fosfatni pufer
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PE	fosfatidiletanolamin
PIP3	fosfatidilinozitol (3,4,5)-trifosfat
pufrer A	vezavni pufer za Ni-NTA kromatografijo in tudi lizirni pufer
pufrer B	elucijski pufer za Ni-NTA kromatografijo
RNA	ribonukleinska kislina
<i>T.cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TAE	Tris acetatni pufer
TcAtg4.1	avtofagin 1 iz parazita <i>T. cruzi</i>
TcAtg4.2	avtofagin 2 iz parazita <i>T. cruzi</i>
Tween-20	polioksietilensorbitan, anionski detergent
WHO	svetovna zdravstvena organizacija

1 UVOD

Avtofagija je evolucijsko ohranjen proces, prisoten tako pri višjih kot tudi pri enoceličnih evkariontih. Pri avtofagiji se s pomočjo lizosomov in/ali vakuol razgrajujejo odvečni in poškodovani organeli ter sestavine lastne citoplazme. Pomembna je pri številnih fizioloških procesih kot so prilagoditve organizma na stres, ohranjanje znotrajcelične homeostaze in diferenciacija celic (Levine, 2008). Pri višjih evkariontih sta potek in njena regulacija razmeroma dobro preučena, medtem ko je o avtofagiji v primitivnih evkariontih znanega manj.

Enocelični bičkar *Trypanosoma cruzi* je povzročitelj Chagasovega obolenja. Bolezen, značilna za predel Latinske Amerike, je dosmrtna in življenjsko nevarna (Lima in sod., 2010). Življenjski cikel parazita vključuje štiri razvojne stopnje, ki omogočajo preživetje parazita ob prehodu iz insektnih v sesalske gostitelje (De Souza, 2002). Dokazano je bilo tudi, da je avtofagija nujno potrebna pri prehodu iz replikativne v infektivno razvojno stopnjo, ki je ključna za preživetje parazita v gostiteljskem organizmu (Alvarez in sod., 2008b).

Cisteinski proteazi avtofagin-1 (TcAtg4.1) in -2 (TcAtg4.2) imata pri procesu nastajanja avtofagosomov eno izmed ključnih vlog, zato predstavlja atraktivni tarči za razvoj inhibitorjev. Z identifikacijo sintetičnih inhibitorjev za avtofagina bi lahko preprečili proces avtofagije in diferenciacijo parazita ter ustavili življenjski cikel parazita. Tako bi preprečili njegovo razmnoževanje in s tem nastanek in razvoj bolezni (Alvarez in sod., 2008b).

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Številne raziskovalne skupine si prizadevajo odkriti nove terapevtske učinkovine za zdravljenje Chagasove bolezni, saj imajo trenutno uporabljene terapije preveč stranskih učinkov in je zato iskanje novih terapevtskih tarč nujno. Atraktivne tarče za razvoj učinkovin, ki preprečujejo okužbo gostiteljev s parazitom *T. cruzi*, predstavljajo z avtofagijo povezani proteini, med katere sodita tudi cisteinski proteazi TcAtg4.1 in TcAtg4.2, ki sta ključni za potek avtofagije v parazitu.

Cilj diplomske naloge je bil biokemijska karakterizacija avtofaginov TcAtg4.1 in TcAtg4.2 iz parazita *T. cruzi*, ki bi omogočila nadaljnje iskanje specifičnih avtofaginskih inhibitorjev.

Izolirati smo želeli zadostne količine obeh avtofaginov in njuno aktivnost preveriti s cepitvijo naravnega substrata TcAtg8.1. Nato smo s cepitvami flourogenih sintetičnih substratov želeli določiti substratno specifičnost aktivnih avtofaginov in vpliv različnih soli na aktivnost encimov. Poznavanje biokemijskih lastnosti avtofaginov bi lahko v nadalnjih fazah raziskav omogočilo iskanje majhnih molekul, ki bi specifično inhibirale delovanje obeh proteaz. Inhibitorje bi nato lahko uporabili za razvoj terapevtskih učinkovin za preprečevanje infekcije ljudi s *T. cruzi* in zdravljenje Chagasove bolezni pri že okuženih ljudeh. Predvsem za zdravljenje kroničnih faz je razvoj novih zdravil zaradi neučinkovitosti trenutno obstoječih, nujno potreben.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

V diplomskem delu smo želeli preveriti naslednje hipoteze:

- S tehnologijo rekombinantne DNA in prenosom genskega zapisa za oba avtofagina v drug ekspresijski vektor lahko izboljšamo obstoječi sistem (glej Alvarez in sod., 2008a) za izražanje genov za avtofagin-1 in avtofagin-2 iz parazita *T. cruzi*.
- Izražena rekombinantna encima TcAtg4.1 in TcAtg4.2 cepita naravne in sintetične substrate.

2 PREGLED OBJAV

2.1 AVTOFAGIJA

Avtofagija je evolucijsko ohranjen proces, ki omogoča preživetje organizma, ko je izpostavljen različnim oblikam stresa (stradanje, hormonska signalizacija, okužba s patogeni, sevanje,...) (Kourtis in Tavernarakis, 2009, Levine in Kroemer, 2008). Zaradi ključne vloge pri ohranjanju celične homeostaze jo najdemo tako pri enoceličnih kot tudi pri večceličnih evkariontih (Till in Subramani, 2010). Z avtofagijo celice razgrajujejo in reciklirajo svoje lastne sestavine, kot so poškodovane in odvečne proteine in proteinske aggregate. Prav tako se odstranjujejo tudi celične komponente, ki so prevelike za razgradnjo v proteosomu (odvečni ali poškodovani celični organeli). Je tudi mehanizem, ki omogoča pravilno delovanje prirojenega in pridobljenega imunskega sistema (pravilen imunski odziv na mikrobne okužbe in zaviranje nastanka tumorjev). Tako je avtofagija s svojim delovanjem odločilnega pomena za zaščito celic pred različnimi boleznimi, kot so rak, nevrodegenerativne bolezni in okužbe s patogeni.

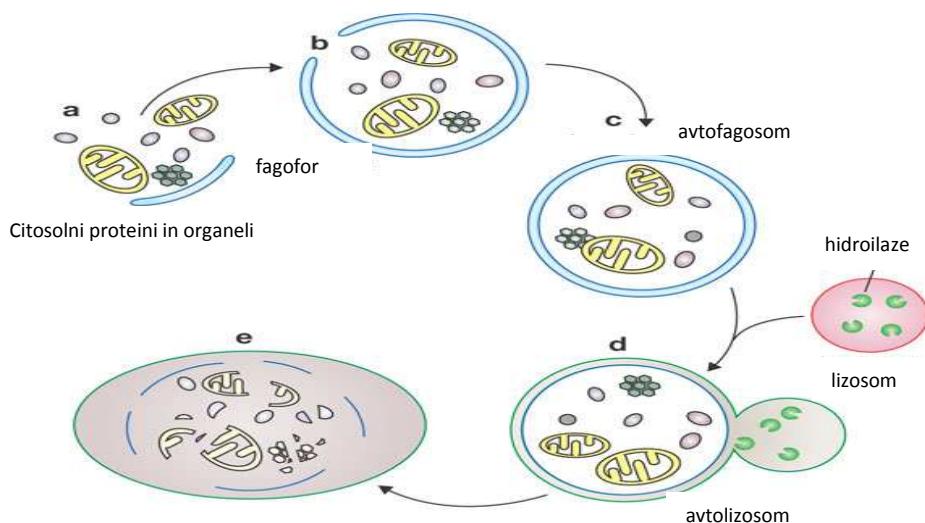
Avtofagija poteka na nizki, bazalni ravni v vseh celicah in vzdržuje celično ravnovesje. V času celičnega stradanja se avtofagija močno poveča. Celica si s samorazgradnjo lastnih komponent zagotovi dovolj energije v obliki ATP (Alvarez in sod., 2008a, Kourtis in Tavernarakis, 2009) in ustvarja proste amino- in maščobne kisline, ki se reciklirajo in uporabijo pri sintezi novih makromolekul, ključnih za prilagoditev na stres (Levine in Kroemer, 2008, Sugawara in sod., 2005, Kourtis in Tavernarakis, 2009). Če se razmere ne izboljšajo, se samorazgradnja nadaljuje in nastopi avtofagi tip celične smrti (Geng in Klionsky, 2008, Kourtis in Tavernarakis N., 2009, Levine in Kroemer, 2008).

Avtofagija je odgovorna tudi za diferenciacijo celic in odstranjevanje odvečnih celičnih komponent med razvojem organizma. Ključna je pri preobrazbi številnih parazitov in insektov v različne razvojne stopnje in je eden izmed faktorjev, ki vpliva na hitrost staranja. V večceličnih organizmih lahko nekateri znotrajcelični patogeni mikrobi spremenijo proces avtofagije in ga izkoristijo sebi v prid. Posledica okužbe gostitelja s patogeni je nastanek nepravilnosti v poteku avtofagije, ki se odrazi v obliki bolezni

(Sugawara in sod., 2005, Alvarez in sod., 2008a, He in Klionsky, 2009, Kourtis in Tavernarakis, 2009).

2.1.1 Potek avtofagije

Fagofor, nastajajoči membranski dvosloj, začne obdajati celične komponente namenjene za razgradnjo. Ko fagofor obda tarčo, nastane avtofagosom, vezikel sestavljen iz dvoje membran. Zunanja membrana avtofagosoma se zlige z lizosomsko membrano in nastane avtolizosom. Notranja membrana slednjega se skupaj s tovorom s pomočjo kislih lizosomskih hidrolaz razgradi (He in Klionsky, 2009 Alvarez in sod., 2008a, Alvarez in sod., 2008b, Geng in Klionsky, 2008, Reggiori in Klionsky, 2005).



Slika 1: Potek avtofagije (povzeto po Xie in Klionsky, 2007)
a - citosolne proteine in organele začne obdajati fagofer. b-c – nastanek avtofagosoma in njegovo zlitje z lizosomom ter nastanek avtolizosoma – d. e – razgrajena vsebina avtolizosoma.

Pri indukciji avtofagije, oblikovanju, širitvi in zorenju avtofagosomov sodelujejo z avtofagijo povezani (Atg) proteini. Pri avtofagiji sodelujeta dva ubikvitinu podobna proteina, ki imata pomembno vlogo v zgodnjih fazah nastajanja avtofagosoma. Prvi je Atg12, ki je podoben ubikvitinu in se s pomočjo proteina Atg7 in Atg10 pripne na protein Atg5. Nastane konjugat Atg12-Atg5, ki tvori kompleks s proteinom Atg16. Proteinski kompleks Atg12-Atg5-Atg16 tvori prehodni plašč, ki omogoča deformiranje fagoftora pri

procesu nastajanja avtofagosomskih veziklov. Konjugat olajša tudi lipidacijo Atg8 in usmerja njen pravilno lokalizacijo v celici (Geng in Klionsky, 2008). Drugi ubikvitinupodoben protein, ki omogoča širitev fagofora in nastanek avtofagosoma je Atg8. Proteaza Atg4 cepi protein Atg8 blizu C-konca, pri čemer se izpostavi glicinski preostanek. C-končni glicin se nato v nizu reakcij kovalentno veže na (PE). Tako so prej citosolni proteini Atg8 tesno povezane z membranami. Še preden se avtofagosom zlige z lizosomom, se vsi proteinski kompleksi, vključno z Atg8, odcepijo z zunanjne membrane vezikla in se sprostijo v citosol, kjer so na voljo za uporabo pri nastanku novih avtofagosomov. Atg8 vezan na PE je verjetno ključni protein, ki omogoča širitev fagoorne membrane, katere količina korelira z velikostjo avtofagosomov (Geng in Klionsky, 2008, Alvarez in sod., 2008a).

2.1.2 Vloga avtofagije pri preobrazbi parazita *Trypanosoma cruzi*

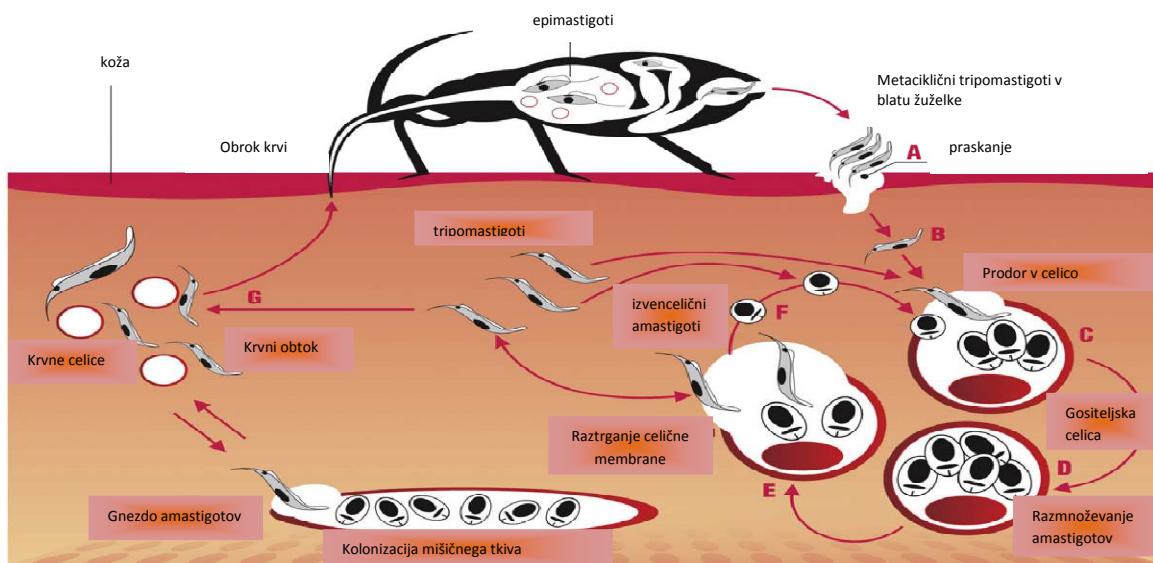
Povzročitelju Chagasove bolezni, parazitu *Trypanosoma cruzi*, proces avtofagije predstavlja ključni mehanizem preživetja epimastigotov v času stradanja, ki lahko traja več kot 12 mesecev, ko se ti nahajajo v zadnjem delu črevesja insektov. Prav tako je nujno potrebna med procesom diferenciacije parazita v različne razvojne stopnje. Proses zahteva hitro in obsežno razgradnjo proteinov in recikliranje gradnikov za sintezo novih molekul (Alvarez in sod., 2008a, Alvarez in sod., 2008b).

2.2 TRYPANOSOMA CRUZI

Trypanosoma cruzi je znotrajcelični protozojski parazit z zapletenim življenjskim krogom (shematski prikaz na Sliki 2.8) (Lima in sod., 2010, De Souza, 2002, Kosec in sod., 2006). Ima štiri glavne razvojne faze (metaciklične tripomastigote, amastigote, tripomastigote in epimastigote) in dva gostitelja (stenice *Triatoma sp.* in sesalce).

Metaciklični tripomastigoti, ki so zelo gibljivi, vstopijo v sesalskega gostitelja skozi poškodovano kožo ali sluznico in se naselijo v celicah mišic, živčnega sistema in retikuloendotelnega sistema. Paraziti se v gostiteljski celici sprva nahajajo v parazitoftorni vakuoli, od koder preidejo v citoplazmo. V njej se tripomastigoti spremenijo v deleče se

amastigote. Ti rastejo in se delijo. Proses replikacije poteka do devet generacij. Po zaključenem ciklu pomnoževanja, se amastigoti diferencirajo nazaj v tripomastigote ter raztrgajo plazemske membrane celice. Prosti tripomastigoti tako lahko okužijo sosednje celice in se po krvnem obtoku razširijo po telesu in kolonizirajo tudi druge organe (Lima in sod., 2010, De Souza, 2002, Tanowitz in sod., 2009, Urbina, 2010, Epting in sod., 2010).



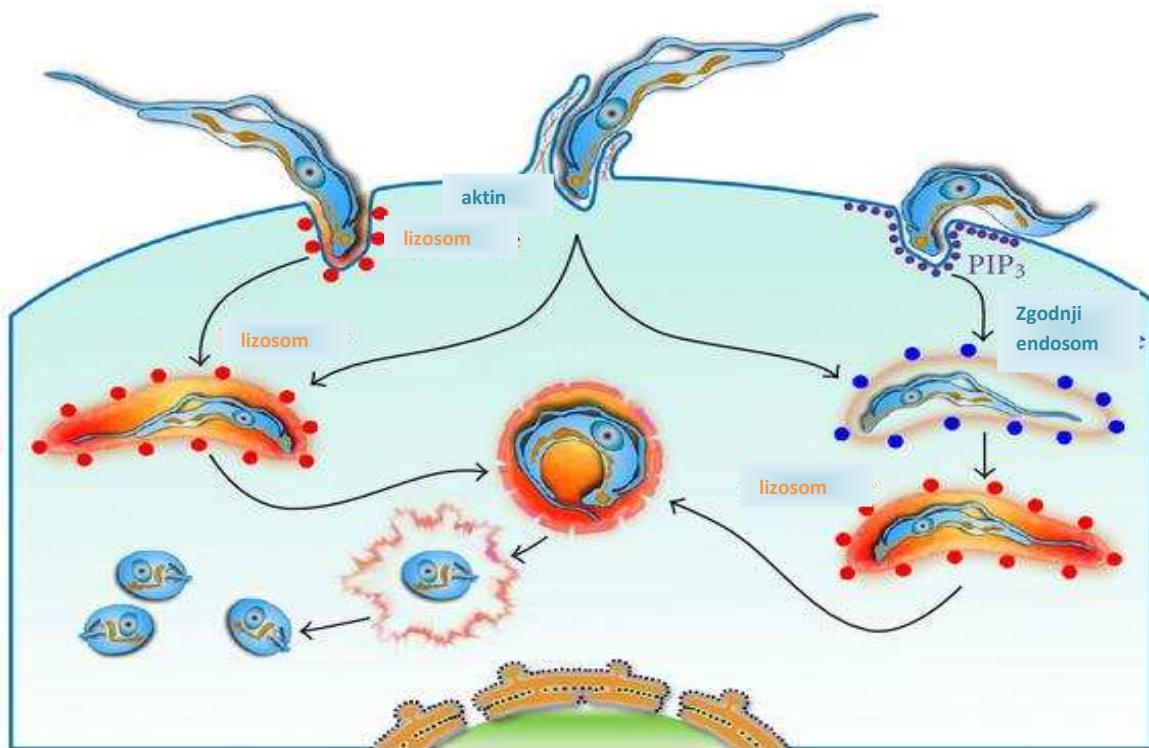
Slika 2: Življenjski krog parazita *Trypanosoma cruzi* (Lima in sod., 2010)

A - prikaz vnosa metacikličnih tripomastigotov v gostitelja s praskanjem. B-F vstop parazita v gostiteljsko celico in spremjanje tripomastigotov v deleče se amastigote. Ti v gostiteljskih celicah rastejo in se delijo. G - po zaključenem ciklu pomnoževanja parazita, se amastigoti diferencirajo nazaj v tripomastigote, ki se po krvnem obtoku razširijo po telesu.

Stenice (*Triatoma sp.*), ki se prehranjujejo s krvjo sesalcev, zaužijejo s tripomastigoti okuženo kri. V srednjem delu črevesja insekt se parazit diferencira v epimastigote, ki se začnejo intenzivno podvojevati. V zadnjem delu črevesa se njihovo podvojevanje ustavi. Poteče diferenciacija v infektivne metaciklične tripomastigote, ki lahko ponovno vstopijo v sesalskega gostitelja in ga okužijo. Diferenciacijo v infektivno obliko sproži pomanjkanje hranil v zadnjem delu črevesja. Po 3 do 4 tednih se med prehranjevanjem žuželke s krvjo novega sesalskega gostitelja, paraziti izločijo v blatu žuželk blizu mesta ugriza (Alvarez in sod., 2008a, Alvarez in sod., 2008b, De Souza, 2002, Kosec in sod., 2006, Tanowitz in sod., 1992). S praskanjem srbečega mesta ugriza se parazit prenese do poškodovane povrhnjice in tam ponovno vstopi v sesalskega gostitelja in zaključi svoj krog. V telo jih

lahko vnesemo tudi preko sluznice z okuženo hrano, kuhinjskim priborom ali rokami (Tanowitz in sod., 1992, Barrett in sod., 2003).

Makrofagi sesalskega gostitelja skušajo preprečiti okužbo gostiteljskega organizma s fagocitozo parazita, vendar ravno s svojim delovanjem parazitu omogočijo vstop v celico. Na Sliki 2.9 so prikazani trije načini vstopa parazita v gostiteljsko celico. Od Ca^{2+} -odvisna eksocitoza lizosomov na plazemsko membrano omogoča vstop po fagocitozni poti. Od aktina odvisna pot omogoča vdor parazita skozi širitev plazemske membrane. Parazit vstopi v gostiteljsko celico s pomočjo endocitoze. Okoli njega nastane parazitoforna vakuola, ki se zlije z lizosomom. Parazit lahko vstopi v gostiteljsko celico tudi na delu membrane, kjer se kopiči PIP_3 . Te molekule povzročijo invaginacijo membrane, ki popolnoma obda *T. cruzi*. Nastane zgodnji endosom (De Souza in sod., 2010).



Slika 3: Načini vstopa parazita *T. cruzi* v sesalske celice (povzeto po De Souza in sod., 2010).

Slika prikazuje tri načine vstopa parazita v gostiteljsko celico. Od leve proti desni so prikazani: vstop po fagocitozni poti, vstop s pomočjo endocitoze in vstop z invaginacijo membrane, ki popolnoma obda *T. cruzi*. V celici nastane zgodnji endosom ali/nato lizosom.

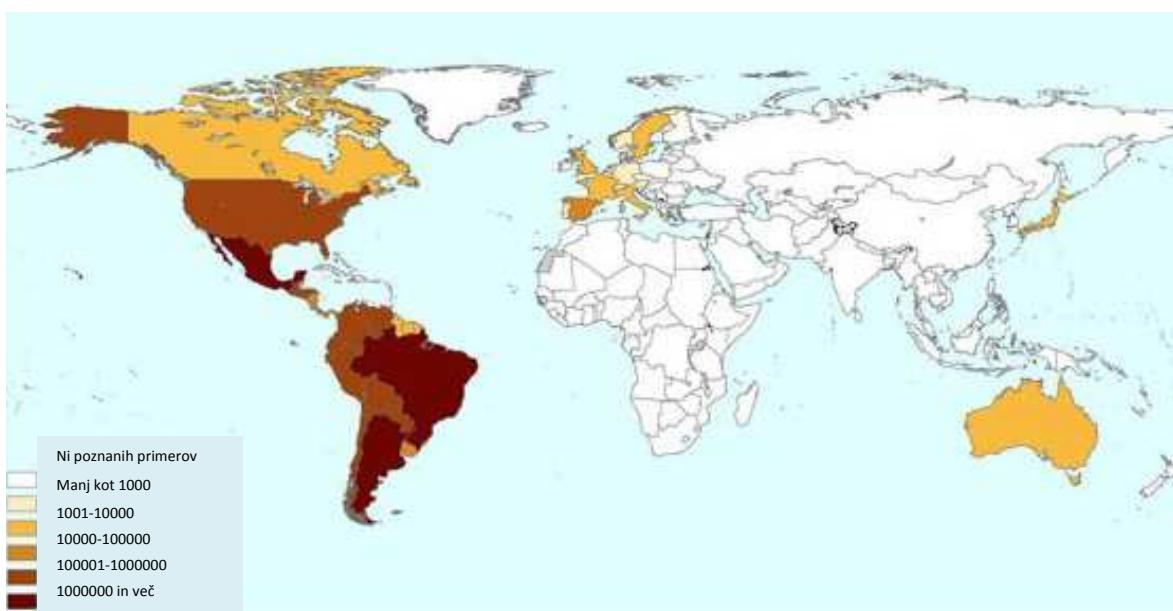
2.2.1 Strukture in procesi, ki pomagajo parazitom pri diferenciaciji in invaziji

Na površini parazita se nahajajo glikoproteini mucinskega tipa, za katere se domneva, da poleg varovanja površine parazita omogočajo tudi adhezijo na gostiteljske celice in imajo vlogo pri maskiranju pred imunskim odzivom gostitelja (Rassi in sod., 2007). Z glikoproteini se pritrdijo na glikozilfosfatidilinozitolna (GPI) sidra (Tanowitz in sod., 1992, Rassi in sod., 2007). GPI-sidra naj bi pomagala pri iskanju mikrodomen lipidov na membrani gostiteljske celice ter tako omogočila okužbo makrofagov gostitelja (Epting in sod., 2010, Hong in Kinoshita 2009).

2.3 CHAGASOVA BOLEZEN ALI JUŽNOAMERIŠKA TRIPANOSOMIOZA

Leta 1909 je Carlos Chagas odkril parazita *Trypanosoma cruzi*, povzročitelja Chagasove bolezni. (Tanowitz in sod., 2009, Coura in Borges- Pereira, 2010).

Bolezen predstavlja zelo velik zdravstveni problem v državah Latinske Amerike. Izmed vseh parazitskih obolenj ravno zaradi te bolezni umre največ bolnikov (Abad-Francha in sod., 2010, Lima in sod., 2010). Z globalizacijo in migracijo latinskoameriških prebivalcev je bolezen dosegela svetovne razsežnosti. V ne-endemičnih državah predstavljajo večinski delež obolelih ravno migranti. Bolezen je tako prisotna tudi na severnoameriškem kontinentu, v Evropi (predvsem bolivijski migranti), v Avstraliji in na Japonskem (Bern in sod, 2007, Schmunis in Yadon, 2010). Ocenjujejo, da je s *T. cruzi* okuženih že med 16 in 18 milijonov ljudi po vsem svetu. Za posledicami obolenja vsako leto umre tudi do 50 000 ljudi (Lima in sod., 2010, WHO, 2008).



Slika 4: Ocena števila ljudi okuženih s *T. cruzi* v letu 2009.

Vir: http://www.treachagas.org/cp_chagas_background.aspx

Največ okuženih je na področju Latinske Amerike.

V endemičnih področjih predstavljajo vire okužbe neposredni stiki ljudi z okuženo (*Triatoma sp.*), okužena hrana, transfuzija (prisotna tudi v ne-endemičnih državah), transplantacija in kongenitalni prenos (Schmunis in Yadon, 2010, Coura in sod., 2010, Coura, 2007, Gascon in sod., 2010).

Chagasova bolezen je v začetni, akutni fazì običajno ne-simptomatična. Parazit je še prisoten v krvi, zato lahko okužbo dokažemo z mikroskopskim pregledom sveže krvi oziroma kateregakoli primernega vzorca barvanega po metodi Giemsa. Diagnoza v kronični fazi temelji na odkrivanju specifičnih protiteles, ki se vežejo na antigene parazita *T. cruzi*. Običajno je prvi znak, ki se pojavi ob okužbi, splošno slabo počutje. Tega lahko spremljajo tudi vročina, diareja in otekle bezgavke. V hujših primerih lahko pride do povečanja jeter in vranice, miokarditisa in meningoencefalitisa. Karakteristična znaka za to obolenje sta znak Romana in šagom. Znak Romana je viden kot otekлина okoli očesa in enostranski konjunktivitis. Če je vstopno mesto parazita koža, nastali oteklini pravimo šagom. (Miles in sod., 2003, Coura in Borges-Pereira, 2010, Tanowitz in sod., 1992). Klinični znaki se začnejo kazati šest do deset dni po infekciji in trajajo en do dva meseca (Barrett in sod., 2003, Rassi in sod., 2007). Do hujših zapletov prihaja predvsem zaradi

močne vnetne reakcije. Proti parazitu, ki je že razširjen po telesu, se borijo levkociti, vključno z eozinofilci in makrofagi, ki sproščajo vnetne mediatorje, kot so citokini in dušikov oksid (NO). Vnetna reakcija sproži uničenje mišičnih celic in nevronov okuženih s *T. cruzi* (Tanowitz in sod. 2009, Tanowitz in sod. 1992). Hujše oblike bolezni so najpogostejše pri otrocih starih med prvim in petim letom. Večina akutnih bolnikov se z zdravili pozdravi v roku 3 do 4 mesecev, a je potrebno s terapijo nujno začeti že v tej fazi. Ker je bolezen pogosto neizrazita in brez očitnih simptomov, se z zdravljenjem pogosto prične prepozno. Nezdravljeni okuženi posamezniki tako vstopijo v kronično fazo in ostanejo okuženi vse življenje (Bern in sod. 2007, Gascon in sod., 2010). Od 70 do 80 % kroničnih bolnikov nikoli ne razvije simptomov in znakov bolezni. Pri 20-30 % bolnikov pa se v nekaj letih oz. desetletjih pokažejo spremembe, ki so vidne v klinični sliki. Običajno prizadenejo srce ali prebavila (Bern in sod., 2007, Coura in Borges-Pereira, 2010). Najhujši možni zapleti so motnje srčnega ritma, aritmije ventrikla, tromboembolije, srčno popuščanje in nenadna smrt. Za spremembe prebavil sta značilna megakolon in megaezoagus (Gascon in sod., 2010). Patogeneza bolezni še vedno ni povsem jasna. Na njen potek najverjetneje vpliva dolgotrajna prisotnost parazita v telesu, proti kateremu se neprestano bori tudi imunski sistem (Miles in sod., 2003).

Zdravljenje Chagasove bolezni je zelo problematično. Na voljo imamo le dve zdravili, nifurtimox (Lampit; Bayer 2502) in benznidazol (Radamil; Roche 7-1051), ki sicer zmanjšata resnost akutne bolezni, a sta neučinkovita pri zdravljenju kronične okužbe (Tanowitz in sod., 1992). Ker ju je potrebno uživati dalj časa, lahko zaradi svoje toksičnosti povzročita tudi hude stranske učinke. Zgodnje zdravljenje z benznidazolom ali nifurtimoxom zagotavlja skoraj 100 % stopnjo ozdravitve pri dojenčkih in približno 60-80% pri otrocih, vendar učinkovitost upada s trajanjem okužbe. Pacienti z dolgotrajnim obolenjem imajo manj kot 10 % možnost ozdravitve, saj je učinkovitost zdravil odvisna od trajanja okužbe (Tanowitz in sod., 2009).

2.4 PROTEAZE

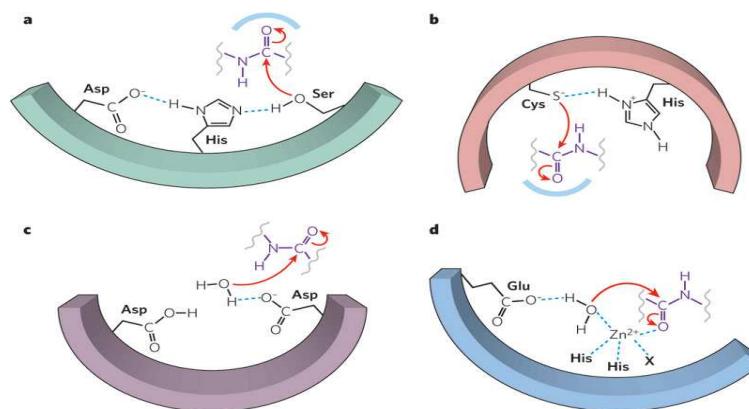
Proteaze (imenovane tudi peptidaze) so proteolizni encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi v proteinskem substratu (Atkinson in sod., 2009, Turk, 2006). Ti encimi predstavljajo približno 2 % vseh izraženih proteinov (Sajid in McKerrow, 2002). S proteolizo (tj. razgradnjo proteinov) so proteaze vključene v regulacijo celičnega cikla, proliferacije, celične smrti, podvajanja DNA, preoblikovanja tkiv, homeostaze, celjenja ran in imunskega odziva (Turk in sod., 2012).

2.4.1 Delitev proteaz

Proteaze so velike med deset kDa do več sto kDa (Sajid in McKerrow, 2002). Sodobna razdelitev proteaz temelji na evolucijski povezanosti in mehanizmu delovanja, zato peptidaze delimo v skupine glede na različne kriterije: mesto cepitve polipeptidne verige, optimalni pH delovanja in katalitski mehanizem. Glede na mesto cepitve ločimo eksopeptidaze, ki cepijo peptidno verigo na N- ali C-konca in endopeptidaze, ki cepijo peptidno vez znotraj proteinske molekule.

Glede na katalitski mehanizem jih delimo na:

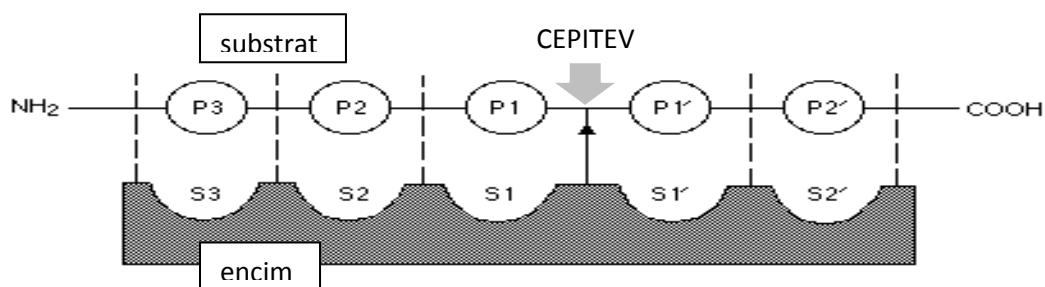
- cisteinske peptidaze (v aktivnem mestu sta cistein in histidin),
- aspartatne peptidaze (v aktivnem mestu sta dve asparaginski kislini),
- serinske peptidaze (v aktivnem mestu sta serin in histidin),
- treoninske peptidaze (v aktivnem mestu je treonin),
- metalopeptidaze (za delovanje potrebujejo kovinske ione: Co^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+})
- peptidaze neznanega katalitskega tipa (Enzyme nomenclature, 1984).



Slika 5: Katalitski mehanizmi proteaz: a) serinske, b) cisteinske, c) aspartatne, d) metalopeptidaze (Erez in sod., 2009).

2.4.2 Vezavna mesta za substrat

Schecher in Berger sta leta 1967 definirala vezavna mesta za substrat na papainu kot modelni endopeptidazi. Aminokislinski ostanki substrata vezani v aktivno mesto encima so z njegovega N-konca proti C-koncu poimenovani s P3, P2, P1, P'1, P'2, P'3, itd. Mesto cepitve polipeptidne verige v substratu se nahaja med aminokislinskima ostankoma P1 in P'1. Vezavna mesta za substrat v encimu pa so poimenovana S1, S2, S3, S'1, S'2, S'3 itd. in ležijo nasproti pripadajočim aminokislinskim ostankom substrata (Slika 6). Struktura substratnega vezavnega mesta na encimu določa, kateri aminokislinski ostanki substrata se lahko vežejo na posamezna vezavna mesta v aktivnem mestu proteaze.



Slika 6: Vezavna mesta za substrat v aktivnem mestu encima (definicija po Schecher in Berger, 1967) Aminokislinski ostanki substrata poimenovani s P3, P2, P1, P'1, P'2, P'3. Mesto se nahaja med P1 in P'1. Vezavna mesta za substrat na encimu pa so poimenovana S1, S2, S3, S'1, S'2, S'3.

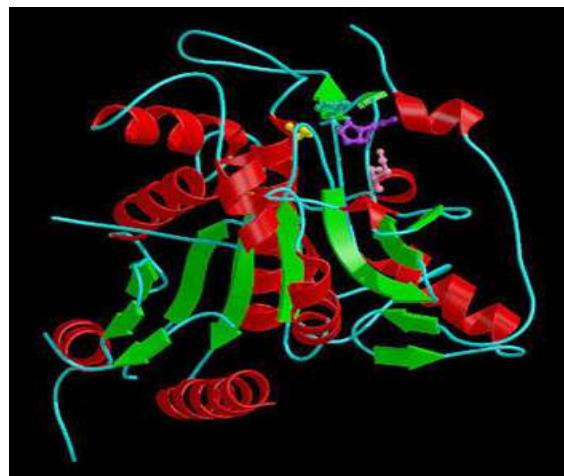
2.4.3 Cisteinske proteaze

Cisteinske proteaze so v naravi vsesplošno razširjene. Najdemo jih pri evkariontskih in prokariontskih organizmih ter virusih. V aktivnem mestu cisteinskih proteaz se nahaja katalitični par cistein in histidin. Žveplo v cisteinu je nukleofil, ki se prvi približa peptidni vezi in katalizira razcep substratne molekule. Histidin pa ima vlogo baze, ki sprejme proton (Sajid in McKerrow, 2002).

Glede na podobnost v aminokislinskem zaporedju cisteinske proteaze delimo na 8 klanov. Najobsežnejša je družina papainu - podobnih encimov, ki sodi v klan CA in družino C1. V družino papainu podobnih encimov spadajo papain in druge rastlinske endopeptidaze, kot so aktinidin, bromelain in kimopapain, cruzipain in podobne parazitske proteaze ter lizosomski katepsini (Turk in sod., 2000). Malo manjša, a za raziskovalce prav tako zanimiva, pa je tudi družina C54, v katero spadajo avtofagini (cisteinske proteaze Atg4). Avtofagini igrajo ključno vlogo v procesu avtofagije, ki je ključna za preživetje enoceličnih kot tudi večceličnih evkariontskih organizmov (Mottram in sod., 2004).

2.4.3.1 Avtofagini

Avtofagini (ali tudi proteaze Atg4) so citosolni papainu-podobni encimi, ki sodijo v klan CA cisteinskih proteaz. Tako kot vsi ostali encimi tega klana so sestavljeni iz dveh domen, med katerima se nahaja aktivno mesto. Leva (L) domena je pretežno grajena iz α -vijačnic, desno domeno (R) pa gradijo predvsem β -strukture (Slika 7, Turk in sod., 2000). Manjša domena z α -vijačnicami je najverjetneje potrebna pri interakciji s substrati, na večji pa se nahaja aktivno mesto, ki je zakrito z regulatorno zanko (Merops. Family C54. Summary for family C54).



Slika 7: Kristalna struktura človeškega avtofagina HsAtg4B (Merops. Summary for peptidase C54.003: autophagin-1)

Avtofagini cepijo substrat Atg8, ki nato sodeluje pri oblikovanju avtofagosomov. Pri sesalcih najdemo štiri homologe cistenske proteaze Atg4: Atg4A-D (Till in Subramani, 2010). Proteaze Atg4 cepijo substrat Atg8 blizu C-konca in ga tako aktivirajo. Aktiviran Atg8 (LC3-I) ima na C-koncu izpostavljen glicin, ki se v nadalnjih reakcijah poveže s fosfatidiletanolaminom (PE) v lipidnem dvosloju fagofora (lipidiran LC3-II). Po nastanku vezikla Atg4 z zunanje membrane avtofagosoma odcepi Atg8, ki se lahko ponovno uporabi pri nastanku novih avtofagosomov. Tako ima Atg4 poleg endopeptidazne tudi izopeptidazno oz. deubikvitinirajočo aktivnost, podobno deubikvitinirajočim (DUB) encimom, ki odcepljajo ubikvitinske molekule s substratov, namenjenih za razgradnjo s proteosomom. Lipidacija in delipidacija Atg8 sta ključnega pomena za nastajanje in oblikovanje avtofagosomov ter normalen potek avtofagije (Alvarez in sod., 2008a, Kosec in sod., 2006, Till in Subramani, 2010, Nakatogawa in sod., 2007, Sugawara in sod., 2005).

Genom *Trypanosome cruzi* nosi zapis za dva homologa avtofaginov, avtofagin-1 (TcAtg4.1) in avtofagin-2 (TcAtg4.2) (Kosec in sod., 2006). Avtofagini se izražajo v vseh štirih razvojnih stopnjah *T. cruzi*: v epimastigotih, matacikličnih tripomastigotih, amastigotih in tripomastigotih (Alvarez in sod., 2008a).

Alvarez in sod. (2008a, 2008b) so dokazali, da so nizke koncentracije avtofaginov TcAtg4.1 oz. TcAtg4.2 zadostne za procesiranje Atg8. Poleg procesiranja pa sta oba avtofagina sposobna tudi dekonjugacije Atg8 s PE. TcAtg4.1 ima 10000 krat višjo proteolitično aktivnost kakor TcAtg4.2, zato TcAtg4.2 v celici najverjetneje služi kot rezervni sistem, čeprav ne izključujejo možnosti, da sodeluje v procesiranju substratov in / ali dekonjugaciji drugih ubikvitinu podobnih proteinov.

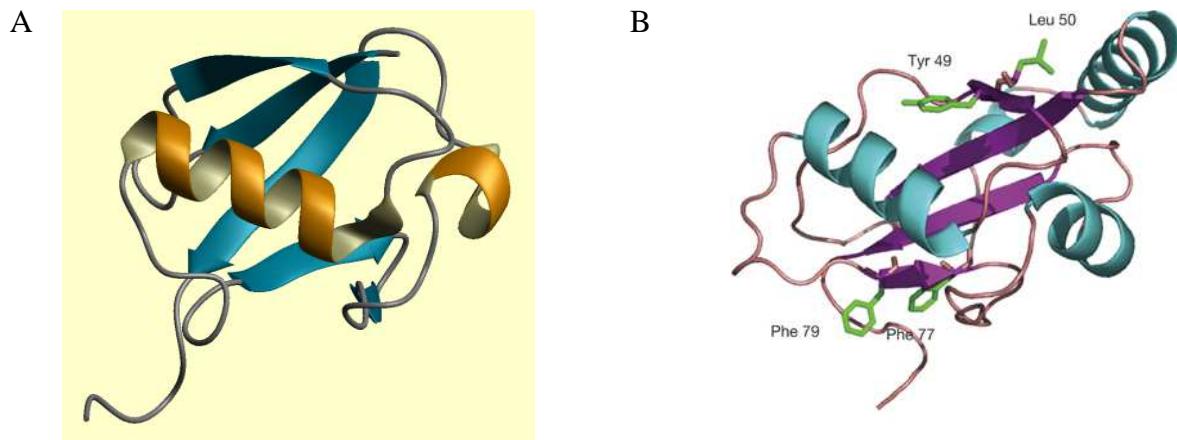
2.5 PROTEINI DRUŽINE Atg8

Ubikvitin in njemu podobni proteini (kamor sodijo tudi proteini iz družine Atg8) sodelujejo pri posttranslacijski modifikaciji proteinov. Ti majhni regulatorni proteini urejajo delovanje svojih ciljnih proteinov, in sicer tako da:

- označijo tiste, ki so namenjeni za razgradnjo v proteosomu,
- skrbijo za interakcije z ostalimi proteini,
- določajo njihov položaj v celici (Nakatogawa in sod., 2007).

Pri sesalcih najdemo šest homologov proteina Atg8, ki spada v dve poddružini, MAP1LC3 poddružino (LC3A, LC3B in LC3C) in GABARAP poddružino (GABARAP, GATE-16/GABARAPL2 in ATG8L/GABARAPL1) (Li in sod., 2011), v *T. cruzi* pa dva homologa TcAtg8.1 in TcAtg8.2. TcAtg8.1 je funkcionalen homolog proteinu Atg8 iz kvasovk in proteinu LC3 pri sesalcih in se uporablja kot avtofagosomski marker za spremljanje nivoja avtofagije v parazitu (Nakatogawa in sod., 2007, Alvarez in sod., 2008a).

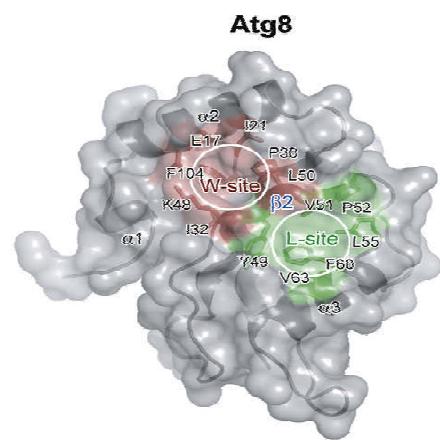
Protein Atg8 ima poleg regije s podobnim vzorcem zvitja kot ubikvitin (Slika 8 A), še dve vijačnici, ki se nahajata na N-koncu proteina (Sugawara in sod., 2005, Noda in sod. 2010) (Slika 8 B). Vijačnici sta posebnost proteinov družine Atg8, po katerih jih ločimo od ostalih ubikvitinu podobnih proteinov. Vsi proteini družine Atg8 imajo izpostavljenou β-strukturo (β 2), ki je odgovorna za povezovanje z avtofagini. Atg8 se z avtofaginom poveže preko interakcijskega motiva proteinov družine Atg8 (AIM).



Slika 8: A) Kristalna struktura ubikvitina (Bolton in sod., 2001).

B) Kristalna struktura Atg8. Aminokislini F77 in F79 sta ključni pri interakciji z Atg4 (Amar in sod., 2006)

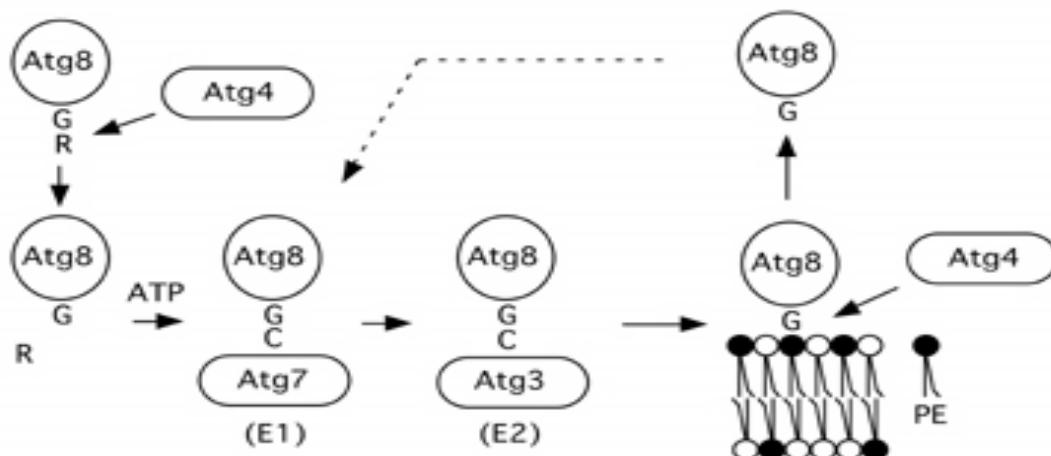
Molekule Atg-8 imajo v bližini β 2-strukture dva hidrofobna žepa. Slika 9 prikazuje W-mesto, ki ga sestavljajo stranske verige Glu17, Ile21, Pro30, Ile32, Lys48, Leu50 in Phe104, L-mesto pa sestavljajo stranske verige Tyr49, Val51, Pro52, Leu55, Phe60, in Val63. Žepa (predvsem W) predstavljata ohranjeni del homologih proteinov iz družine Atg8, ki je odgovoren za povezovanje z nekaterimi ključnimi proteini, ki sodelujejo v procesu avtofagije (Noda in sod. 2010).



Slika 9: Atg8 s prikazanimi hidrofobnima žepoma W in L (Noda in sod. 2010).

2.5.1 Konjugacija Atg4 in Atg8

Slika 10 prikazuje cepitev substrata Atg8 (LC3) z avtofaginom Atg4. Cepitev poteka med Gly116 in Arg117. Po aktivaciji Atg8 se na C-koncu izpostavi glicin. Ta tvori tioestersko vez s Cys-507 na proteinu Atg7, ki omogoči konjugacijo aktivirane Atg8 s proteinom Atg3 (Geng in Klionsky, 2008, Nakatogawa in sod., 2007, Sugawara in sod., 2005, Alvarez in sod. 2008a, Noda in sod. 2010). Atg3 tvori izopeptidno vez med substratom Atg8 in fosfatidiletanolaminom (PE) v fosfolipidnem dvosloju nastajajočega avtofagosoma. Atg8 vezan na PE je trdno povezan in zasidran v membrano (Kosec in sod., 2006, Till in Subramani, 2010) in omogoča hemifuzijo membran in povečanje avtofagosomov. Tesna povezava med molekulami Atg8 in PE na različnih membranah približa dva lipidna dvosloja, povzroči njuno deformacijo in omogoči hemifuzijo dveh lipidnih dvoslojev (Nakatogawa in sod., 2007).



Slika 10: Konjugacijski sistem Atg8-PE (National Institute for Basic Biology, 2004)

Po nastanku avtofagosoma se Atg8 sprosti s PE. Za cepitev kompleksa Atg8-PE poskrbi proteaza Atg4 in s tem omogoči sproščanje Atg8 nazaj v citosol. Ta reakcija je pomembna za recikliranje proteina Atg8. Konjugacijski cikel Atg8, vključno z odcepitvijo Atg8 z membrane avtofagosoma, igra pomembno vlogo pri regulaciji avtofagije (Geng in Klionsky, 2008, Nakatogawa in sod., 2007).

Ko je v celici in njenem okolju prisotnih dovolj hranil, se večina Atg8 nahaja v citosolni, nekonjugirani obliki povsod v citoplazmi. Pomanjkanje hranil v okolju in celici in posledično stradanje pospeši nastajanje avtofagosomov in proces avtofagije (Alvarez in sod. 2008a, Kourtis in Tavernarakis, 2009). Ob povečanem nastajanju avtofagosomov se večina Atg8 pretvori v PE-konjugirano obliko in se nahaja na membrani avtofagosomov (Geng in Klionsky, 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Kemikalija:	Proizvajalec in država porekla:
Agaroza NA	Pharmacia, Švedska
Akrilamid	Serva, Nemčija
APS	Serva, Nemčija
BSA (goveji serumski albumin)	New England Biolabs, UK
Coomassie brilliant blue R-250	Pharmacia, Švedska
DMSO	Merk, Nemčija
DNA označevalca:	
GeneRuler 1kb DNA ladder	MBI Fermentas, Litva
GeneRuler 100 bp DNA ladder Plus	MBI Fermentas, Litva
DTT (ditiotreitol)	Serva, Nemčija
E-64	Peptide Research Institute, Japonska
EDTA	Serva, Nemčija
Etanol, 96%	Carlo Erba, Italija
Glicerol, 100%	Carlo Erba, Italija
Glukoza	Carlo Erba, Italija
Goveji serumski albumin (BSA)	New England Biolabs
HCl, 36%	Carlo Erba, Italija
Imidazol	Fluka, Nemčija
IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopyranozid)	Sigma, ZDA
Kemikalije za PCR (dNTP, MgCl ₂)	MBI Fermentas, Litva
Kvasni ekstrakt	Sigma, ZDA
Metanol	Carlo Erba, Italija
NaCH ₃ COO (natrijev acetat)	Kemika, Hrvaška

NaCl	Carlo Erba, Italija
Na ₃ citrat	Carlo Erba, Italija
(NH ₄) ₂ citrat	Carlo Erba, Italija
NaDS (<i>natrijev dodecil sulfat</i>)	Pierce Chemical, ZDA
Na ₂ HPO ₄ X 2H ₂ O	Serva, Nemčija
NaH ₂ PO ₄ X 2H ₂ O	Serva, Nemčija
NaOH	Carlo Erba, Italija
Ocetna kislina (CH ₃ COOH)	Carlo Erba, Italija
PageRuler	MBI Fermentas, Litva
Pepton	Sigma, ZDA
PBS	Fluka, Nemčija
Tween-20	Fluka, Nemčija
TEMED (tetrametiletilendiamin)	Serva, Nemčija
Tris/HCl	Serva, Nemčija
Triton X-100	Serva, Nemčija

3.1.2 Komercialni kompleti reagentov in drugi reagenti

- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA)
- JETquick Miniprep Plasmid Spin Kit (Genommed GmbH, Nemčija)
- 6x Loading dye Solution (MBI Fermentas Life Sciences, ZDA)
- T4DNA-ligazni pufer (New England Biolabs, Velika Britanija)
- Overnight Exress Instant Tb medium (Novagen, Nemčija)
- PageRulerTM Prestained Protein Ladder (MBI fermentas Life Science, ZDA)

3.1.3 Pufri in raztopine

6x nanašalni pufer za NaDS-PAGE (za 10 ml)

0,363 g Tris (300 mM)

0,3 g NaDS (100 mM)

0,112 g EDTA (40 mM)

1,83 g DTT (1,2 M)

6 ml glicerol (60% (v/v))

30 mg bromfenol modro

Pufer PBS

2,5 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O

7,5 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O

145 mM NaCl

Elektroforezni pufer za NaDS-PAGE

25 mM Tris

192 mM glicin

0,1% NaDS

Lizirni pufer

50 mM Tris/HCl, pH 7,6

150 mM NaCl

0,1% Triton X-100

20 mM Vezavni Pufer A za Ni-NTA kromatografijo pH 7,4 in tudi lizirni pufer

20 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O

500 mM NaCl

20 mM imidazol

500 mM Elucijski Pufer B za Ni-NTA kromatografijo pH 7,4

20 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O

500 mM NaCl

500 mM imidazol

Dializni pufer

50 mM Tris/HCl, pH 7,6

150 mM NaCl

Pufri za cepitve sintetičnih substratov:

1. 25 mM Tris/HCl, pH 7,6

5 mM EDTA

2. 25 mM Tris/HCl, pH 7,6

5 mM EDTA

0,5 M Na₃ citrat

3. 25 mM Tris/HCl, pH 7,6

5 mM EDTA

1 M Na₃ citrat

4. 25 mM Tris/HCl, pH 7,6

5 mM EDTA

0,5 M (NH₄)₂ citrat

5. 25 mM Tris/HCl, pH 7,6

5 mM EDTA

1M (NH₄)₂ citrat

Pufer za barvanje gelov

0,5 % Barvilo Coomassie Blue r-250

50 % metanol

10 % ocetna kislina

Pufer za razbarvanje gelov

50 % metanol

10 % ocetna kislina

0,8 % agarozni gel

0,48 g agaroze

60 ml Sybr safe

Zbiralni gel

3,075 ml dH₂O

1,25 ml 1,5 mM Tris/HCl; pH 6,8

625 µl akril/bisakrilamida

0,05 ml NaDS

10 µl TEMED

20 µl APS

12,5 % ločevalni gel

4,270 ml dH₂O

2,5 ml 0,5 mM Tris/HCl; pH 8,8

3,13 ml akril/bisakrilamida

0,10 ml NaDS

20 µl TEMED

40 µl APS

15 % ločevalni gel

3,65 ml dH₂O

2,5 ml 0,5 mM Tris/HCl; pH 8,8

3,75 ml akril/bisakrilamida

0,10 ml NaDS

20 µl TEMED

40 µl APS

3.1.4 Gojišča

- LB (bogato gojišče Luria-Bertani): 10 g kazeinskega hidrolizata, 10 g NaCl in 5 g kvasnega ekstrakta, do 1 L dH₂O, pH smo z NaOH umerili na vrednost 7,4.
- LBA: LB gojišče s 50 µg/ml ampicilina
- LBAC: LB gojišče s 50 µg/ml ampicilina in 25 µg/ml kloramfenikola
- LBK: LB gojišče s 25 µg/ml kanamicina
- LBKC: LB gojišče s 25 µg/ml kanamicina in 25 µg/ml kloramfenikola
- TB avtoinducirajoče gojišče: 60 g TB suhega gojišča, 1 L dH₂O in 12,6 ml 80% glicerola. Po kuhanju smo ohlajenemu gojišču dodali še 25 ml glukoze in po potrebi ustrezne antibiotike. pH umerimo na 7,0.
- TBA gojišče s 50 µg/ml ampicilina
- TBAC gojišče s 50 µg/ml ampicilina in 25 µg/ml kloramfenikola
- TBK gojišče s 100 µg/ml kanamicina
- TBKC gojišče s 100 µg/ml kanamicina in 25 µg/ml kloramfenikola

3.1.5 Encimi, plazmidi

BamHI (New England Biolabs, Velika Britanija)

EcoRI (New England Biolabs, Velika Britanija)

PstI (New England Biolabs, Velika Britanija)

XmaI (New England Biolabs, Velika Britanija)

T4 DNA-ligaza (New England Biolabs, Velika Britanija)

T7 DNA polimeraza (Promega, ZDA)

pET-28a

pGEX-2T

Rekombinantni avtofagin *T.cruzi*, pET-28a::*TcAtg4.1* (dr. Dejan Caglič)

Rekombinantni avtofagin *T.cruzi*, pET-28a::*TcAtg4.2* (dr. Dejan Caglič)

Rekombinantni protein *T.cruzi*, pET-28a::*TcAtg8.1* (dr. Dejan Caglič)

Rekombinantni protein *T.cruzi*, pET-28a::*TcAtg8.2* (dr. Dejan Caglič)

Rekombinantni avtofagin *T.cruzi*, pGEX-2T::*TcAtg4.1* (pripravila sama)

3.1.6 Gostiteljske bakterijske kulture

Escherichia coli sev DH5α

Escherichia coli sev BL21[DE3]

Escherichia coli sev BL21[DE3]pLysS

3.1.7 Seznam laboratorijske opreme

0,5 ml mikrocentrifugirke (Costar, ZDA)

1,5 ml mikrocentrifugirke (Costar, ZDA)

15 ml centrifugirke (Bibbly Sterilin, Velika Britanija)

50 ml centrifugirke (Bibbly Sterilin, Velika Britanija)

Aparatura za PCR 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem)

Avtomatske pipete 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000µl (Eppendorf, Nemčija)

Bralnik mikrotiterskih plošč TECAN Saphire (Tecan, Švica)

Centrifuga Centrikon H-401 (Kontron, Švedska)

Centrifuga RC 5C plus (Sorvall)

Centrifuge Eppendorf 5402, 5410, 5415R, 5417R (Eppendorf, Nemčija)

Črna mikrotitrská plošča s 96 luknícami (Costar, ZDA)

Digitalni fotoaparat C-4040 Zoom (Olympus)

Kadička za agarozno elektroforezo Easy Cast Electrophoresis System Model #81A (Owl Scientific Inc., ZDA)

Kadička za poliakrilamidno elektroforezo BioRad (BioRad, ZDA)

Magnetna mešala (MM-530) (Tehtnica Železniki, Slovenija)

Nanodrop ND-1000 (Babtech International, Velika Britanija)

Napajalnik za agarozno elektroforezo Power Pac P25 (Biometrija, Nemčija)

Napajalnik za elektroforezo Lightning Volt™ Power Supply Model OSP-300) (Owl Separation System, ZDA)

pH-meter MP 220 (Mettler Toledo, ZDA)

Poliesterske petrijevke premera 10 cm

Sistem FPLC (angl. Fast Protein Liquid Chromatography: Akta, Amersham)

Spektrofotometer Lambda 18 (Perkin Elmer, ZDA)
Spektrofotometer Ultraspec 1000E (Pharmacia Biotech, Švedska)
Steklene erlenmajerice-mešalne 100, 250, 500, 2000 ml
Stresalnik Rotamax (Heidolph Instrumenst, Velika Britanija)
Ultrafilter Amicon 8200 (Millipore, ZDA)
UV-luč (Cole Palmer 0814, ZDA)
Vodna kopel RM6 (Lauda, Nemčija)

3.2 METODE

3.2.1 Molekulsко kloniranje

3.2.1.1 Izolacija plazmidne DNA iz bakterijskih DH5α celičnih kultur

Iz prekonočnih bakterijskih kultur (glej točko 3.2.2.1), smo s komercialnim kompletom reagentov JETquick Miniprep Plasmid Spin Kit (Genomed, Nemčija) po navodilih proizvajalca izolirali plazmidno DNA.

3.2.1.2 Določanje koncentracije in čistosti plazmidne DNA

Na spektrofotometru Nanodrop smo s programom Nucleic acid določili koncentracijo izolirane plazmidne DNA.

Za določitev čistosti plazmidne DNA smo vzorec 200-krat redčili z dH₂O. Merili smo absorpcijo pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm. Iz izmerjenih absorbanc smo izračunali koncentracijo DNA v vzorcu. Za izračun koncentracije DNA smo upoštevali, da absorbanci 1,0 ustreza koncentracija 50 µg/ml dvoverižne DNA v vzorcu.

Čistost izolirane plazmidne DNA smo preverili tako, da smo izračunali razmerje absorbance A (260 nm)/ A (280 nm). Če izolirana DNA ne vsebuje nečistoč, je razmerje večje od 1,7.

3.2.1.3 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozno gelsko elektroforezo smo uporabljali za restrikcijsko analizo in detekcijo DNA. Pripravljali smo 0,8 % gele. Zatehtali smo agarozo v prahu, ji dodali 1x TAE pufer z dodanim Sybr Safe barvilom. S segrevanjem v mikrovalovni pečici smo raztopili agarozo. Raztopino smo malo ohladili in vlili v kadičko za agarozno gelsko elektroforezo, vstavili glavniček in počakali, da se gel ohladi in polimerizira.

Vzorcem in DNA standardu (GeneRuler 1kb DNA ladder, GeneRuler 100 bp DNA ladder Plus, MBI Fermentas Life Sciences) smo dodali 6-kratni nanašalni pufer (6x Loading Dye Solution, MBI Fermentas Life Sciences) in jih nanesli v žepke na gelu. Elektroforezo smo izvajali pri konstantni napetosti 100 mV približno 45 minut. Po končani elektroforezi smo pod UV lučjo preverili, če imamo ustrezne DNA fragmente.

3.2.1.4 Izolacija DNA iz agaroznega gela

Iz gela, osvetljenega z UV lučjo, smo izrezali del, ki je vseboval ustrezen DNA fragment. DNA smo po navodilih proizvajalca očistili s kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Technical Bulletin No. 308).

3.2.1.5 Priprava plazmidne DNA za izražanje avtofaginov Atg4.1 v *E.coli*

Ker z ekspresijskim vektorjem pET-28a::TcAtg4.1 nismo uspeli dobiti zadostnih količin topnega (aktivnega) avtofagina TcAtg4.1 (večino smo dobili v obliki inkluzijskih teles), smo gen preklonirali v ekspresijski vektor pGEX-2T, v katerem se izbrani genski produkt izraža v fuziji s Glutation S-transferazo (GST), ki pomaga pri pravilnem zvijanju tarčnega proteina.

3.2.1.5.1 Namnožitev genov TcAtg4.1 s PCR

Reagenti za reakcijsko zmes:

- 5 µl (10x) pufra za T7 DNA polimerazo z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 0,25 µl smiselnega oligonukleotidnega začetnika:
-5'-GA GGA TCC ATG GAG TGG TTG AAA ATT G-3'
 - 0,25 µl protismiselnega oligonukleotidnega začetnika:
-5'-GA GAA TTC CTA CTC CGC CAC GT-3'
 - 1 µl 4x dNTP (10 mM)
 - 38,2 µl dH₂O
 - 0,3 µl T7 DNA-polimeraze

- 1 µl plazmidne DNA pET-28a::TcAtg4.1(matrica)
- 4 µl MgCl₂ (25 mM)

Skupaj: 50 µl

Postopek:

V centrifugirki za PCR smo zmešali vse reagente za reakcijsko zmes. PCR-reakcijo smo izvedli pri naslednjih pogojih:

začetna denaturacija: 95 °C → 2 minuti

5 ciklov: (95 °C → 30 sekund, 43 °C → 1 minuta, 72 °C → 1,5 minute)

25 ciklov: (95 °C → 30 ssekund, 57 °C → 1 minuta, 72 °C → 1,5 minute)

končni korak: 72 °C → 10 minut

4 °C → ∞

3.2.1.5.2 Restrikcija TcAtg4.1 in plazmida pGEX-2T

Restrikcija z BamHI:

29 µl dH₂O

15 µl TcAtg4.1 ali pGEX-2T

5 µl pufra BamHI z BSA

1 µl encima BamHI

Skupaj: 50 µl

Restrikcija z EcoRI:

29 µl dH₂O

15 µl TcAtg4.1 ali pGEX-2T

5 µl pufra EcoRI

1 µl encima EcoRI

Skupaj: 50 µl

Reakcijsko mešanico smo inkubirali 3 ure (*BamHI*) oz. 4 ure (*EcoRI*) pri 37 °C. Nato smo DNA očistili s kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. S pomočjo agarozne gelske elektroforeze smo preverili, ali je restrikcija potekla. Očiščen vzorec smo zaporedno rezali še z drugim encimom (*EcoRI* oz. *BamHI*).

3.2.1.5.3 Ligacija TcAtg4.1 in plazmida pGEX-2T

Reakcijska mešanica:

7 ali 10 µl pGEX-2T/*EcoRI/BamHI*
4 ali 3 µl produkta PCR/*EcoRI/BamHI*
2 µl 10X T4 ligacijskega pufra
0,5 µl DNA-ligaze
6,5 ali 4,5 µl dH₂O
Skupaj: 20 µl

Mešanico smo preko noči shranili pri 4 °C in jo nato inkubirali še 1 uro pri 37 °C.

50 µl celic DH5α bakterije *Escherichia coli* smo transformirali z 10 µl ligacijske mešanice po že objavljenem postopku (Hanahan, 1983). Kolonije, ki so preko noči zrastle na plošči LBA, smo precepili v 5 ml tekočega LBA gojišča in vcepek preko noči stresali pri 37 °C. Naslednji dan smo z uporabo kompleta Wizard Plus MiniPrep (Promega) po navodilih proizvajalca izolirali plazmidno DNA.

3.2.1.5.4 Kontrola ligacije z restriktionsko analizo

Kontrolo ligacije smo izvedli z restriktionsko analizo. Reakcijska mešanica:

14,5 µl dH₂O
7 µl pGEX-2T::TcAtg4.1
2,5 µl pufra 3 (NEB)
1 µl encima *PstI*
Skupaj: 25 µl

Restrikcija je potekala 3 ure pri 37 °C. Po končani restrikciji smo mešanico nanesli na agarozno gelsko elektroforezo.

Encim *PstI* reže enkrat na plazmidu in enkrat na insertu. Pri uspešni ligaciji smo na agroznem gelu dobili 2 fragmenta, pri klonih, kjer ni prišlo do vstavitve inserta v plazmid, pa en fragment. Pozitivne vzorce smo nato poslali še na analizo nukleotidnega zaporedja.

3.2.2 Delo z bakterijami

3.2.2.1 Transformacija kompetentnih celic *E. coli* DH5α, BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS

Transformacijo kompetentnih celic smo izvedli po delno prilagojenem Hanahovem postopku (1983).

Že predhodno pripravljene kompetentne bakterijske celice *E. coli* so shranjene v zamrzovalniku na -80 °C. 50 µl na ledu odtaljene celične suspenzije smo prenesli v 4 sterilne 1,5 ml mikrocentrifugirke. V tri mikrocentrifugirke smo dodali plazmidno DNA (1µl), v četrto, ki je služila kot kontrolni vzorec, pa plazmidne DNA nismo dodali. Celice smo na ledu inkubirali še približno 30 minut in potem izvedli topotni šok z inkubacijo vzorcev 30 sekund v vodni kopeli s temperaturo 42 °C. Po šoku smo celice inkubirali še 2 minuti na ledu. Tako pripravljenim celicam smo dodali 200 µl sterilnega LB gojišča brez antibiotikov in jih 1 uro stresali pri 180 obr./minuto in 37 °C. Po inkubaciji smo celično suspenzijo nacepili na plošče LB z ustreznim antibiotikom (glej Preglednico 1). Označene plošče preko noči inkubirali pri 37 °C.

Naslednji dan smo eno kolonijo iz vsake plošče precepili v označene sterilne epruvete s 5 ml tekočega LB gojišča z ustreznim antibiotikom (glej Preglednico 1) in kulture preko noči inkubirali v stresalniku pri 37 °C.

Preglednica 1: Izbira antibiotikov za selektivno LB oz. TB gojišče glede na različne kombinacije kompetentnih celic in plazmidov, ter njihove končne koncentracije v gojišču.

PLAZMID	KOMPETENTNE CELICE		
	DH5α	BL21(DE3)	BL21(DE3)pLysS
pET-28a::TcAtg8.1	Kanamicin (30 µg/ml)	Kanamicin (30 µg/ml)	Kanamicin (30 µg/ml), Kloramfenikol (25 µg/ml)
pET-28a::TcAtg8.2	Kanamicin (30 µg/ml)	Kanamicin (30 µg/ml)	Kanamicin (30 µg/ml), Kloramfenikol (25 µg/ml)
pET-28a::TcAtg4.1	Kanamicin (30 µg/ml)	Kanamicin (30 µg/ml)	Kanamicin (30 µg/ml), Kloramfenikol (25 µg/ml)
pET-28a::TcAtg4.2	Kanamicin (30 µg/ml)	Kanamicin (30 µg/ml)	Kanamicin (30 µg/ml), Kloramfenikol (25 µg/ml)
pGEX-2T::TcAtg4.1	Ampicilin (100µg/ml)	Ampicilin (100 µg/ml)	Ampicilin (100 µg/ml), Kloramfenikol (25µg/ml)
pGEX-2T::TcAtg4.2	Ampicilin (100 µg/ml)	Ampicilin (100 µg/ml)	Ampicilin (100 µg/ml), Kloramfenikol (25µg/ml)

3.2.2.2 Poskusno izražanje avtofaginov 4.1 in 4.2 v bakteriji *Escherichia coli* (optimizacija pogojev)

Pri poskusnem izražanju smo uporabili naslednja seva bakterije *E. coli*:

- BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS

in ekspresijske vektorje:

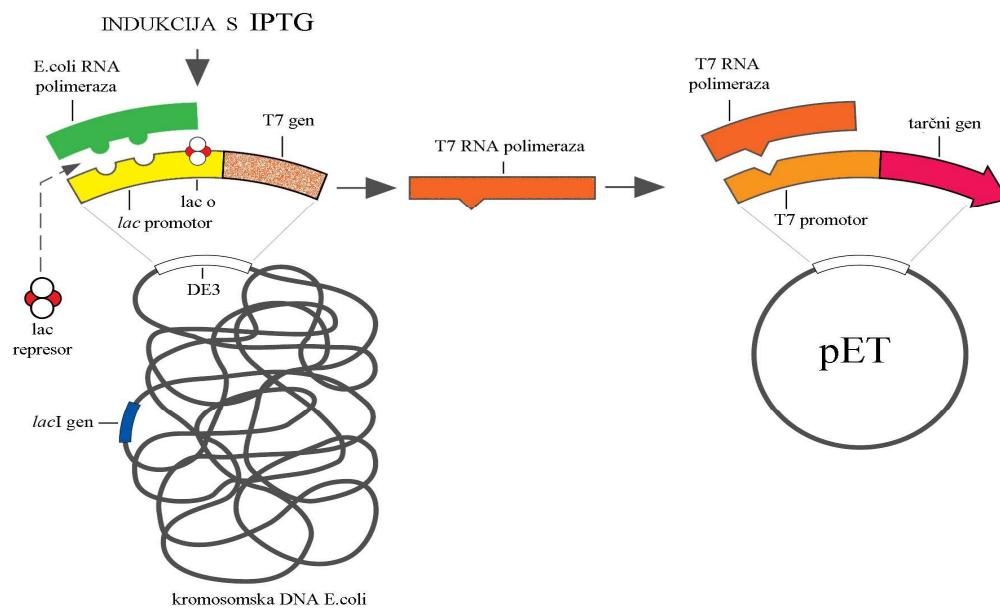
- pET-28a in pGEX-2T.

V tekoče LB oz. TB gojišče z ustreznimi antibiotiki smo nacepili prekonočno kulturo bakterij *E.coli*, transformiranih s plazmidi, ki so nosili zapis za avtofagin TcAtg4.1 oziroma TcAtg4.2. Razmerje med inokulumom in gojiščem je bilo 1:50. Po približno 2-3 urah inkubacije pri 220 obr./minuto in 37 °C, je optična gostota kulture pri 550 nm (OD₅₅₀) dosegla vrednost med 0,5-1,0. Ko so vzorci dosegli ustrezne optične gostote, smo jih ohladili. Izražanje rekombinantnih proteinov smo inducirali z dodatkom 0,5 mM oz. 1 mM izopropil-β-D-1-tiogalaktoranozida (IPTG). Nadaljnja inkubacija kultur je potekala pri

različnih temperaturah (10, 12, 15, 18, 20 in 25 °C). Gojenim kulturam smo v različnih časovnih intervalih (3, 4, 5, 6, 8 in več ur) odvzeli del vzorca in ga pripravili za NaDS-PAGE (glej točko 3.2.3.1). Vmesne vzorce smo do analize shranjevali na -20 °C. Po opravljeni analizi (glej točke od 3.2.3.1 do 3.2.3.3) smo določili optimalne pogoje za izražanje topnih (aktivnih) avtofaginov v večjem obsegu.

3.2.2.2.1 pET vektor za ekspresijo

V pET-sistem spada set različnih pET vektorjev, ki so namenjeni kloniranju in izražanju rekombinantnih proteinov v bakteriji *E.coli*. Izražanje tarčnih genov v pET plazmidih je pod kontrolo bakteriofagnega T7 promotorja in se inducira ob prisotnosti T7 RNA-polimeraze v bakterijski celici. Aktivnost le-te je ob popolni indukciji tako velika, da se večina celičnih virov preusmeri v sintezo tarčnega proteina. Indukcija izražanja rekombinantnih proteinov v bakterijski celici se sproži z dodatkom IPTG. IPTG inaktivira lac-represor, kar omogoči vezavo RNA-polimeraze *E. coli* na lac-promotor in prepis T7 RNA-polimeraze (Slika11).



Slika 11: Shematični prikaz mehanizma indukcije izražanja rekombinantnega proteina v *E. coli* z IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopyranozid). IPTG inaktivira lac-represor, kar omogoči vezavo RNA-polimeraze *E. coli* na lac-promotor in prepis T7 RNA-polimeraze. Slednja omogoča prepis tarčnega proteina na plazmidu pET, ki je pod kontrolo T7-promotorja [Novagen, 2006]. Vektor nosi rezistenco na kanamicin.

3.2.2.2.2 pGEX-2T - vektor za ekspresijo proteinov z GST repom

Tudi pri ekspresijskih vektorjih pGEX-2T sprožimo indukcijo rekombinantnih proteinov z dodatkom IPTG. Vektor nosi zapis za glutation S-transferazo (GST). GST vezan na tarčni protein lahko z nevtralizacijo elektrofilnih mest pomaga pri pravilnem zvitju proteina, kar poveča delež le-te, hkrati pa olajša tudi njeno čiščenje (Walker in sod., 2001). Vektor nosi rezistenco na ampicilin.

3.2.3 Izolacija in analiza proteinov

3.2.3.1 Priprava vzorcev za poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)

- Za analizo celičnih lizatov smo uporabili 1×10^8 celic. Vzorec smo centrifugirali 5 minut pri 20.000 g. Supernatant smo odpipetirali in k usedlini dodali 20 μl 1x NaDS nanašalnega pufra.
- Za analizo topnih proteinov smo uporabili 5×10^9 celic. Vzorec smo centrifugirali 5 minut pri 20.000 g. Supermatant smo odpipetirali in k sedimentu dodali 400 μl lizirnega pufra, celice smo razbili z ultrazvokom. Homogenat smo centrifugirali 10 minut pri maksimalnih obratih v centrifugi Eppendorf 5417R (Eppendorf, Nemčija). Vzorec za NaDS-PAGE smo pripravili tako, da smo zmešali 9 μl vzorca dodali 4 μl 6x NaDS nanašalnega pufra in 12 μl dH₂O.

Vzorce z dodanim pufrom za NaDS-PAGE smo kuhalili 5 minut pri 100 °C.

3.2.3.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)

NaDS-PAGE je elektroforezna tehnika, ki se uporablja določanje molekulske mase ter ločevanje proteinov na osnovi njihove velikosti (dolžine polipeptidne verige). NaDS je

anionski detergent, ki se veže na protein in ga denaturira. Proteini postanejo negativno nabiti in v električnem polju potujejo proti pozitivnemu polu. Skozi zamrežen poliakrilni gel potujejo manjši proteini hitreje kakor večji in se zato posledično med seboj ločijo. Molsko maso proteina določimo glede na mobilnost proteinskih standardov z zanimimi molskimi masami.

Najprej smo med dve stekleni ploščici, ki sta bili vpeti v stojalo, vlili 12,5 % oziroma 15% ločevalni poliakrilamidni gel (do približno 1,5-2 cm pod zgornjim robom). Na vrh gela smo nanesli butanol, tako da se je zgornji rob gela poravnal. Ko je gel polimeriziral, smo butanol odlinili, preostanek pa popivnali s papirnato brisačo. Nato smo prostor med ploščicama do vrha zapolnili še z zbiralnim gelom (za pripravo obeh gelov glej točko 3.1.3) in vstavili glavniček. Ko je gel dokončno polimeriziral, smo ga skupaj s stekelci prenesli v elektforezno kadičko, ga vpeli, nalili elektforezni pufer in odstranili glavniček. Za kontrolo velikosti smo v enega od žepkov nanesli proteinske standarde PageRuler (MBI Fermentas, Litva), v ostale pa predhodno pripravljene proteinske vzorce (glej točko 3.2.3.1). Elektroforeza je potekala pri stalnem toku 30 mA/gel, toliko časa, da je spodnja fronta (barvilo v nanašальнem pufru) priprovala do spodnjega roba stekelc in ga prešla. Gel smo prenesli v raztopino za barvanje. Zaobarvanje proteinov v gelu smo uporabljali 0,5 % raztopino Coomassie Brilliant Blue. Po barvanju je sledilo razbarvanje z razbarvalnimi pufri (glej točko 3.1.3).

3.2.3.3 Izolacija z Ni-NTA kromatografijo

Zaradi težavnega čiščenja endogenih kot tudi neoznačenih rekombinantnih proteinov iz kompleksnih proteinskih vzorcev lahko pri kloniranju genskih zapisov v različne ekspresijske sisteme omogočimo prepisovanje tarčnih proteinov v fuziji z različnimi priveski na N- ali C- koncu, ki omogočajo hitro in enostavno čiščenje rekombinantnih proteinov. Oba avtofagina (TcAtg4.1 in TcAtg4.2), katerih zapis se nahaja v ekspresijskem vektorju pET28A, pri prepisu genskega zapisa v protein tvorita fuzijo s histidinskim priveskom (šest zaporednih histidinov) na N- koncu polipeptidne verige. Histidinski privesek omogoča čiščenje rekombinantnih proteinov na afinitetni nikelj-kelatni (Ni-NTA) kromatografiji, kjer šest histidinov tvori koordinacijsko spojino z Ni^{2+} ioni. Tako se

rekombinantni proteini, označeni s histidinskim priveskom vežejo na nosilec, ostali proteini pa se sperejo. Ob povečanju koncentracije imidazola, le-ta izpodrine histidine in prekine vezi med histidini in Ni^{2+} ioni. Rekombinantni protein se eluirajo z nosilca.

Za izolacijo avtofaginov Atg4.1 in Atg4.2 smo uporabili Pufer A za nanašanje vzorca (20 mM imidazol) in Pufer B za elucijo vzorca (500 mM imidazol).

Celično biomaso smo s centrifugiranjem 20 minut pri 4000 g in 4 °C ločili od gojišča in supernatant odstranili. Na gram mokre biomase smo dodali 3 ml pufra A in celice resuspendirali. Suspenzijo smo na ledu ohladili in jo nato razbili z ultrazvokom. Soniciranje je potekalo 10 minut z intervali 30 sekund soniciranja in 30 sekund pavze pri 40-odstotni moći. Lizate smo nato 50 minut centrifugirali pri 4 °C in 5000 g. Supernatant smo prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirke in ga centrifugirali še 10 minut pri 25.000 g in 4 °C. Kromatografijo smo opravili s pomočjo sistema FPLC (angl. *Fast Protein Liquid Chromatography*, Akta, Amersham, Švedska). Supernatant smo s pomočjo peristaltične črpalke nanesli na kolono HisTrap FF (GE Healthcare), ki je vsebovala 5 ml nosilca z vezanimi Ni^{2+} . Nevezane proteine smo sprali s pufrom A, vezane pa najprej s 5 % pufrom B. Sledila je še elucija iskanih proteinov s 50 % pufrom B.

Vzorce smo nato centrifugirali v koncentratorjih Ultrafilter Amicon 8200 (Millipore, ZDA) z velikostjo por 10.000 Da, pri 6000 g in 4 °C. Poleg koncentriranja, smo vzorce tudi dializirali. Vzorce smo do merjenja encimske aktivnosti zamrznili na -20 °C.

3.2.3.4 Merjenje encimske aktivnosti na naravnem substratu (TcAtg8.1)

Pri izražanju rekombinantnih proteinov v ekspresijskih sistemih se proteini izražajo v dveh oblikah, pravilno zviti (aktivni) ter nepravilno zviti (neaktivni). Aktivnost očiščenih rekombinantnih avtofaginov TcAtg4.1 in TcAtg4.2 smo preverili z razgradnjo naravnega substrata TcAtg8.1. Pripravili smo reakcijsko mešanico, ki je vsebovala 5 µl naravnega substrata, 25 µl dializnega pufra, DTT s končno koncentracijo 1 mM in 10 µl encima Atg4.2 oziroma Atg4.1. Vzorce smo premešali in jih inkubirali pri 37 °C. Reakcijo smo zaustavili v različnih časovnih presledkih: vzorec s TcAtg4.1: 0 minut, 30 minut, 60 minut,

120 minut in vzorec s TcAtg4.2: 0 ur, 4 ure, 9 ur in 22 ur). Cepitev smo ustavili z dodatkom 6x NaDS nanašalnega pufra in kuhanjem vzorcev 5 minut na 100 °C. Tako pripravljeni vzorce smo nanesli na NaDS-PAGE, kjer smo uporabili 15 % ločevalni gel.

3.2.3.5 Merjenje encimske aktivnosti na fluorogenih sintetičnih substratih

Razpoložljive metode spremeljanja encimske aktivnosti so v preteklosti temeljile na detekciji cepitev naravnih substratov z metodo NaDS-PAGE. Ta metoda je časovno zelo potratna in le delno kvantitativna. Zaradi naraščajočih zahtev po učinkovitejših, hitrejših in občutljivejših metodah detekcije encimske aktivnosti so bile razvite številne tehnike, ki omogočajo spremeljanje encimske aktivnosti rekombinantnih in tudi endogenih proteinov s pomočjo fluorogenih substratov. Aktivnost encimov se določa z merjenjem sprememb v fluorescenci, ki je posledica razgradnje specifičnih fluorogenih substratov (Harris in sod., 2000). Avtofagin cepi izključno substrate, ki imajo na mestu P1 aminokislino glicin (G) in na P2 fenilalanin (F), na P3-P8 pa dopušča širši spekter aminokislinskih preostankov. Za določanje encimske aktivnosti smo pri eksperimentih uporabili sintetične tetra-, heksa- in oktapeptide, ki imajo enako aminokislinsko zaporedje kot sesalski homolog LC3. Na C-koncu sintetičnih peptidov sta pripeta fluorofora AFC oz. ACC. Pri merjenju encimske aktivnosti avtofagina TcAtg4.2 smo v reakcijski pufer dodali Hofmeistrove soli. Hofmeistrove soli so definirane kot soli, ki lahko povzročijo preureditev prvega ovoja vodnih molekul okoli encima in/ali substrata in s tem inducirajo konformacijske spremembe, ki vplivajo na povečano encimsko aktivnost (Drag in sod., 2008).

Merili smo encimsko aktivnost proteina TcAtg4.2 na sledeče fluorogene substrate:

- Ac-ETFG-AFC
(acetil-Glu-Thr-Phe-Gly-7-amino-4-trifluorometilkumarin),
- Ac-GTFG-AFC
(acetil-Gly-Thr-Phe-Gly-7-amino-4-trifluorometilkumarin),
- Ac-NTFG-AFC
(acetil-Asn-Thr-Phe-Gly-7-amino-4-trifluorometilkumarin),
- Ac-STFG-AFC

- (acetil-Ser-Thr-Phe-Gly-7-amino-4-trifluorometilkumarin),
- Ac-ETFG-ACC
(acetil-Glu-Thr-Phe-Gly-7-amino-4-karbamoilmelilkumarin),
 - Ac-SQETFG-ACC
(acetil-Ser-Gln-Glu-Thr-Phe-Gly-7-amino-4-karbamoilmelilkumarin),
 - Ac-YASQETFG-ACC
(acetil-Try-Ala-Ser-Gln-Glu-Thr-Phe-Gly-7-amino-4-karbamoilmelilkumarin).

V črnih mikrotiterskih ploščah s 96 luknjicami (Greiner) smo pripravili reakcijsko mešanico, ki je vsebovala: 125 µl 25 mM Tris/HCl pufra (pH 7,6) z 1 mM DTT in kozmotropnimi solmi (0,5 M in 1 M Na citrat ter 0,5 M in 1 M $(\text{NH}_4)_2$ citrat) ter 10 µl encima TcAtg4.2. Po dodatku encima k reakcijskemu pufru smo zmes premešali in inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. K reakcijski mešanici smo po končani inkubaciji dodali še 15 µl 200 µM substrata in začeli meriti encimsko aktivnost v fluorimetru za mikrotiterske plošče Safire, Tecan (Švica).

Spremljali smo spremjanje fluorescence po času pri konstantni temperaturi in koncentraciji encima: $(dF/dt)_{E,T}$. Merjenje fluorescence (fluorimeter za mikrotiterske plošče Safire, Tecan, Švica) je potekalo pri 37 °C med 20 do 30 minut.

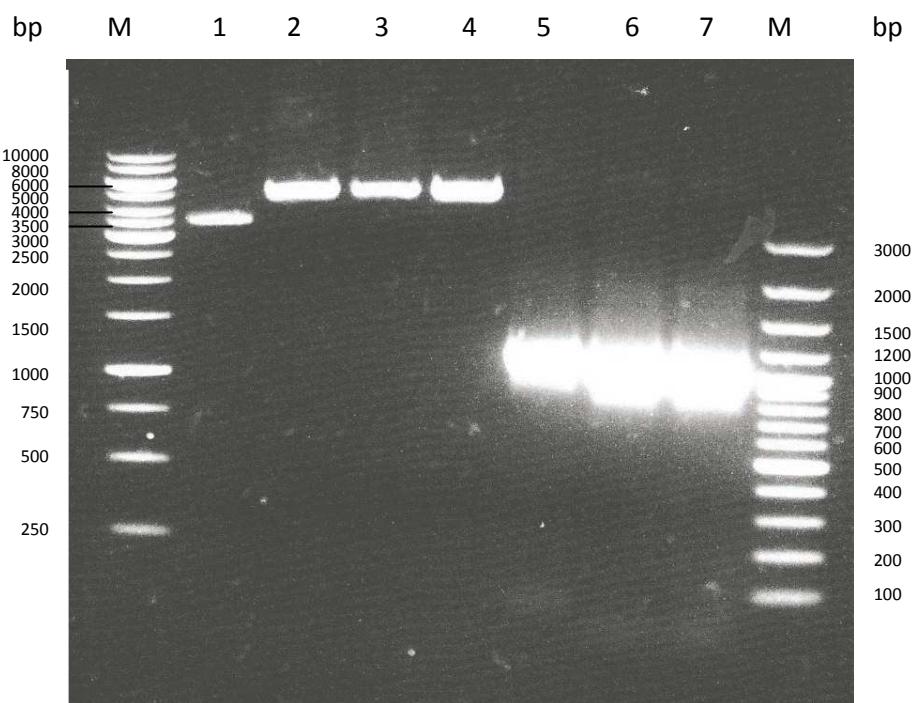
Necepljeni sintetični substrati, ki vsebujejo AFC (7-amino-4-trifluorometilkumarin) fluorofor pri valovni dolžini vzbujanja 350 nm emitirajo svetlobo pri valovni dolžini z emisijskim maksimumom pri valovni dolžini 450 nm. Po odcepnu AFC fluorofora s sintetičnega peptida pride do sprememb v vzbujevalnih in emisijskih maksimumih AFC fluorofora na valovne dolžine 400 nm in 505 nm. Sintetični substrat, ki vsebuje ACC (7-amino-4-karbamoilmelilkumarin) fluorofor pa po cepitvi pri vzbujanju pri 355 nm emitira fluorescenčni signal pri 460 nm. Naraščajoč fluorescenčni signal pri spremenjenih valovnih dolžinah je sorazmeren s količino cepljenega substrata in se uporablja za preučevanje encimske aktivnosti.

4 REZULTATI

4.1 KLONIRANJE TcAtg4.1 V PLAZMID pGEX-2T

4.1.1 Priprava avtofagina TcAtg4.1 z verižno reakcijo s polimerazo in njegova restrikcija in restrikcija plazmida pGEX-2T

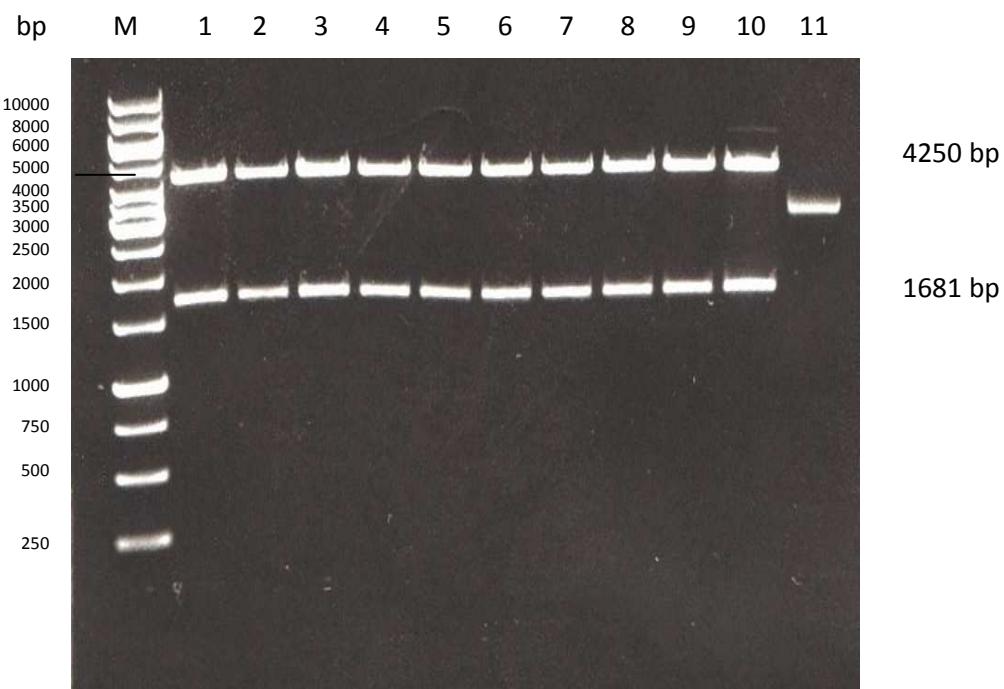
Z metodo verižne reakcije s polimerazo smo uspešno pomnožili fragment, ki nosi genski zapis za TcAtg 4.1. Iz prekonočnih kultur bakterijskih celic smo uspešno izolirali plazmid pGEX-2T. PCR produkt in plazmid pGEX-2T smo rezali z restriktionskima encimoma EcoRI in BamHI. Uspešnost PCR in restrikcije smo preverili z nanosom vzorcev na agarozno gelsko elektroforezo.



Slika 12: Agarozna gelska elektroforeza (0,8 % gel) rezanih produktov PCR in rezanega plazmida pGEX-2T. Na gel smo nanesli (od leve proti desni): M – standard (1kb lestvica), žepek 1 – nerezan pGEX-2T, žepka 2-4 – rezan pGEX-2T, žepek 5 – rezan TcAtg4.2, žepka 6 in 7 – rezan TcAtg4.1, M – standard (100bp lestvica).

4.1.2 Kloniranje PCR produktov TcAtg4.1 v plazmid pGEX-2T

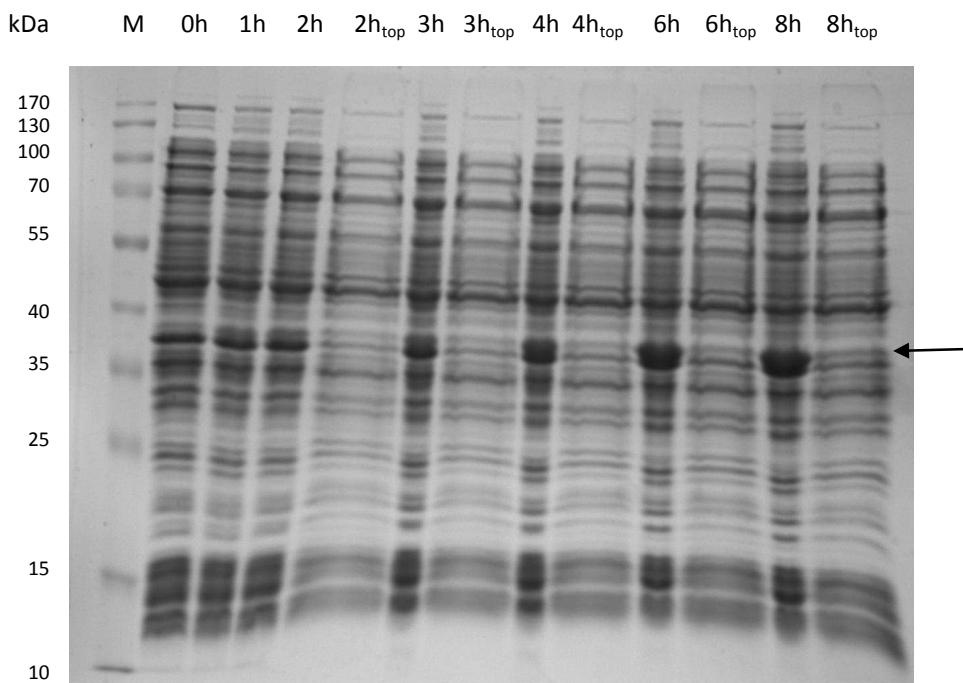
Rezan PCR produkt smo s pomočjo DNA-ligaze vstavili v plazmid pGEX-2T in ligacijsko mešanico transformirali v kompetentne celice *E.coli* DH5α. Uspešnost smo preverili z uporabo encima *PstI*, ki razreže plazmidno DNA s pravilno vstavljenim zapisom za TcAtg4.1 na dva fragmenta (4250 in 1681 bp). Analiza restrikcij na agarozni gelski elektroforezi je pokazala, da vseh 10 vektorjev pGEX-2T nosi pravilno vstavljen zapis za TcAtg4.1. Izbrane vzorce smo poslali še na analizo nukleotidnega zaporedja. Klone s pravilnim zapisom za TcAtg4.1 smo uporabili za izražanje v ekspresijskih sevih *E.coli*.



Slika 13: Agarozna gelska elektroforeza (0,8 % ge) s *PstI*-rezanih plazmidov pGEX-2T z vstavljenim zapisom za TcAtg4.1. Označene so teoretične veikosti fragmentov po restrikciji s *PstI*. Na gel smo nanesli (od leve proti desni): M - standard (1kb lestvica), žepki 1-10 - 10 različnih klonov rezanega pGEX-2T::TcAtg4.1., žepek 11 - nerezan pGEX-2T. Sklepamo lahko, da je bila ligacija plazmida pGEX-2T s TcAtg4.1 uspešna.

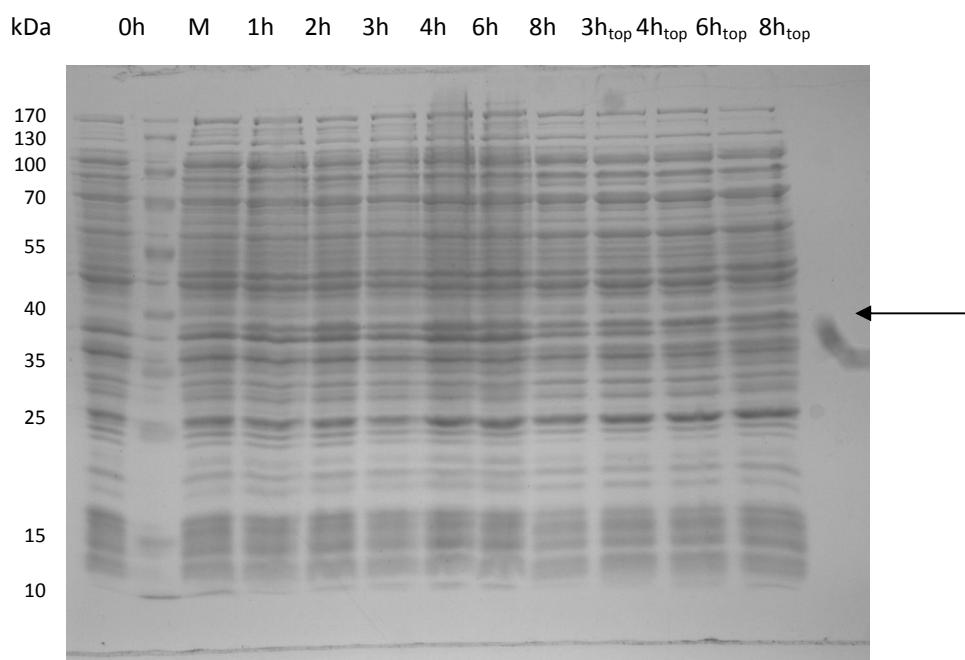
4.2 IZRAŽANJE TcAtg4.1 IN TcAtg4.2 V BAKTERIJI Escherichia coli

Vektor pET-28a::TcAtg4.1 smo transformirali v kompetentne celice *E. coli* BL21(DE3). Z NaDS-PAGE smo analizirali vzorce celičnih lizatov pred indukcijo in v različnih časovnih intervalih po dodatku induktorja IPTG in stresanju pri 18 °C. Že po 1 uri gojenja bakterijske kulture v prisotnosti IPTG smo opazili odebelitev lise pri molski masi okoli 37 kDa. Le ta ustreza masi rekombinantnega TcAtg4.1. Lisa je prisotna tako v totalnih celičnih lizatih, v katerih so prisotne netopne in tudi topne oblike proteinov, kot tudi v topni frakciji celičnih lizatov, v kateri so prisotni le proteini v topni obliki. Količina izraženega TcAtg4.1 s časom narašča in je največja po 8 urah gojenja pri 18 °C.



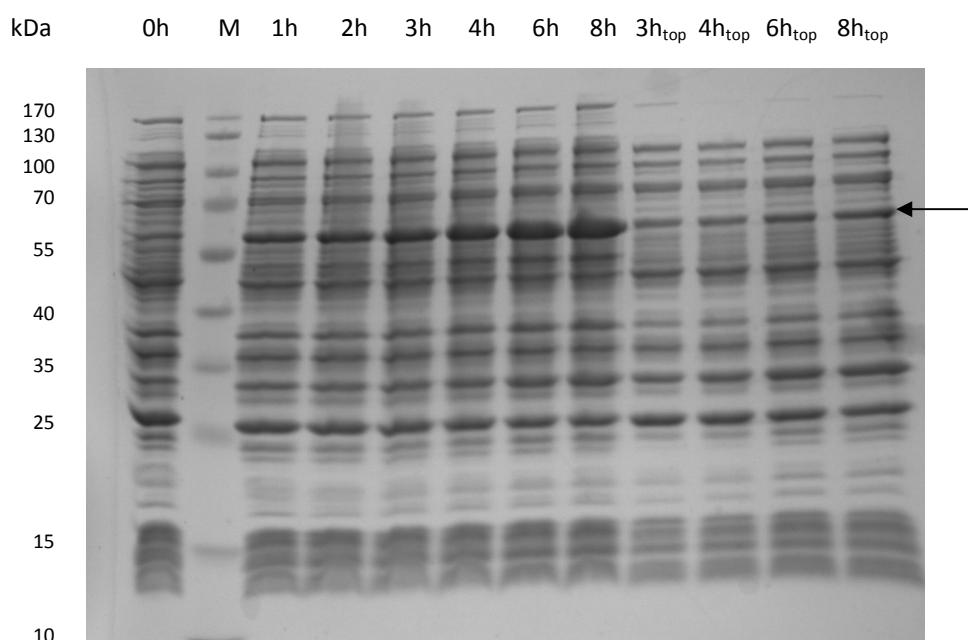
Slika 14: Poliakrilamidna gelska elektroforeza proteina TcAtg4.1 v prisotnosti NaDS (12,5 % gel) bakterijskih lizatov pripravljenih po postopku iz poglavja 3.2.3.1. Nanosi na gel: M-standard (molske mase v kDa), 0h – celični lizat pred indukcijo, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h – totalni celični lizati (prisotni proteini v topni in netopni oblikih), 2h_{top}, 3h_{top}, 4h_{top}, 6h_{top}, 8h_{top} – topne frakcije celičnih lizatov. S puščico je označena teoretična molska masa proteina TcAtg4.1~37 kDa.

Protein TcAtg4.2 smo izrazili v bakterijskem sevu *E. coli* BL21(DE3)plyS. Tudi tokrat smo optimizirali pogoje izražanja TcAtg4.2 in vzorce celičnih lizatov analizirali z NaDS-PAGE. Bakterijsko kulturo smo gojili do $OD_{550} = 1$, jo ohladili in ohlajeni dodali IPTG (končna koncentracija IPTG je 5 mM). Gojenje kulture smo nadaljevali pri 25 °C. 6 ur po indukciji z IPTG je v topni frakciji lisa z molsko maso okoli 39 kDa najizrazitejša in pripada rekombinantnemu TcAtg4.2.



Slika 15: Poliakrilamidna gelska elektroforeza proteina TcAtg4.2 v prisotnosti NaDS (12,5 % gel) bakterijskih lizatov pripravljenih po postopku iz poglavja 3.2.3.1. Nanosi na gel: 0h – celični lizat pred indukcijo, M-standard (velikosti v kDa), 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h – totalni celični lizati (prisotne proteini v topni in netopni obliki), 3h_{top}, 4h_{top}6h_{top}, 8h_{top} – topne frakcije celičnih lizatov. S puščico je označena teoretična molska masa proteina TcAtg4.2~39kDa.

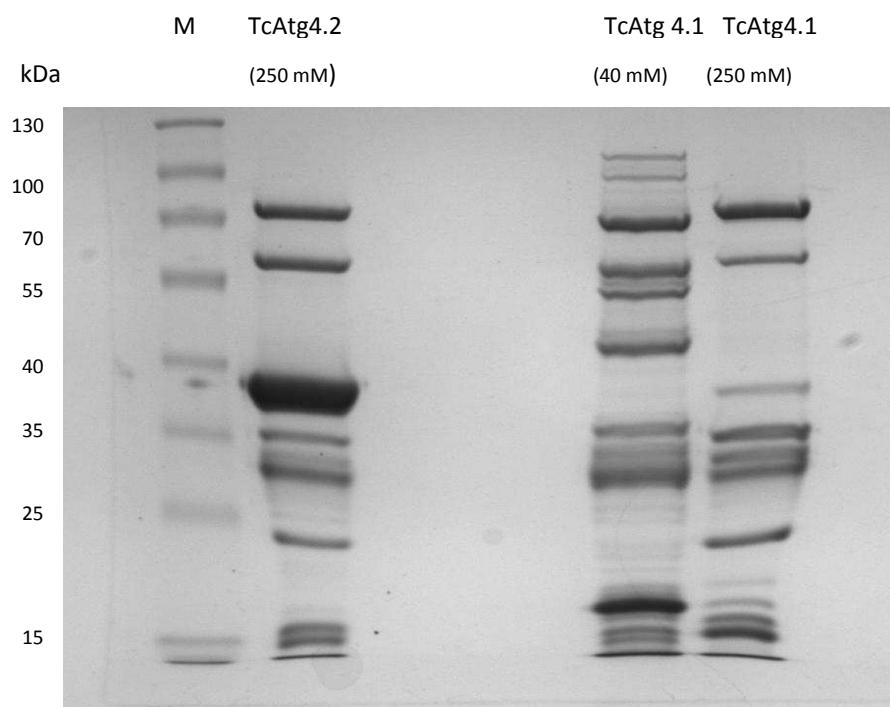
Avtofagin TcAtg4.1 smo preklonirali tudi v vektor pGEX-2T, saj je bila ekspresija v večjem obsegu v vektorju pET-28a nezadostna za nadaljnje delo. Vzorec smo inducirali pri OD~1 in spremljali rast celic še nadalnjih 8 ur pri 18 °C. Ekspresija pGEX-2T::TcAtg4.1 je bila najizrazitejša v celicah BL21(DE3)lysS, in sicer 8 ur po indukciji z IPTG. Teoretična molska masa proteina z GST TcAtg4.1 je ~59 kBp, kar ustreza lisi, ki je postajala vse močnejša.



Slika 16: Poliakrilamidna gelska elektroforeza GST – TcAtg4.1 v prisotnosti NaDS (12,5 % gel) bakterijskih lizatov pripravljenih po postopku iz poglavja 3.2.3.1. Nanosi na gel: 0h – celični lizat pred indukcijo, M – standard (velikosti v kDa), 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h – totalni celični lizati (prisotni proteini v topni in netopni obliki), 3h_{top}, 4h_{top}, 6h_{top}, 8h_{top} – topne frakcije celičnih lizatov. S puščico je označena teoretična molska masa fuzijskega proteina GST – TcAtg4.1~59 kDa.

4.3 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE VZORCEV

Na kolono z vezanim Ni²⁺ smo nanesli vzorce, ki smo jih pripravili po postopku ki je opisan v poglavju 3.2.3.3. V vzorcih, ki smo jih sprali z 250 mM imidazolom, sta se eluirala avtofagina TcAtg4.1 in TcAtg4.2. Z uporabo Ni-NTA kromatografije smo dobili očiščene in skoncentrirane vzorce želenih proteinov, ki smo jih nato uporabili za nadaljnje delo.



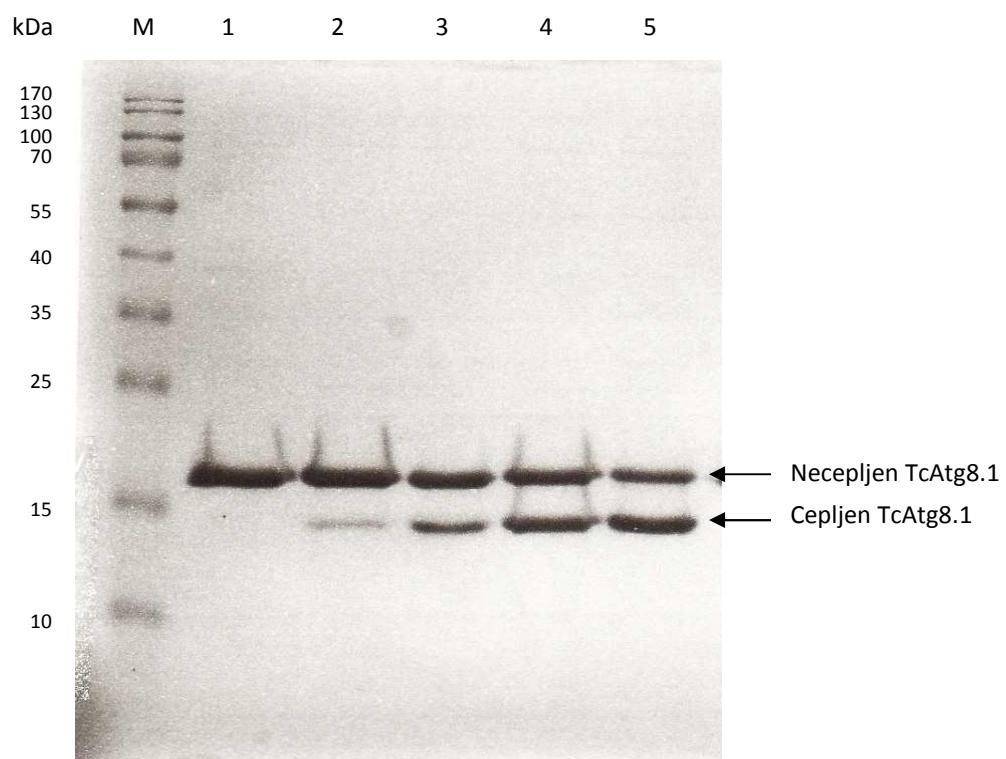
Slika 17: NaDS-PAGE (12,5 % gel) vzorcev po Ni-NTA kromatografiji

Nanosi na gel: M-standard (velikosti v kDa), TcAtg4.2 (250 mM) ~39kDa, TcAtg 4.1 (40 mM) ~37kDa, TcAtg4.1 (250 mM) ~37kDa

4.4 AKTIVNOST AVTOFAGINOV NA NARAVEN SUBSTRAT

4.4.1 Cepitev substrata TcAtg8.1 z avtofaginom TcAtg4.1

Že majhne koncentracije proteaze TcAtg4.1 (od 0,75 do 75 ng) so zadostne za procesiranje substrata TcAtg8.1 (Alvarez in sod., 2008b). Necepljen TcAtg8.1 ima molsko maso 16 kDa, ki se ob cepitvi zmanjša na približno 14 kDa. Po NaDS-PAGE se cepitev substrata vidi kot dodatna lisa, ki se pojavi pod substratom (16 kDa) in ima molsko maso približno 14 kDa.



Slika 18: NaDS – PAGE (15 % gel) cepitive TcAtg8.1 s TcAtg4.1

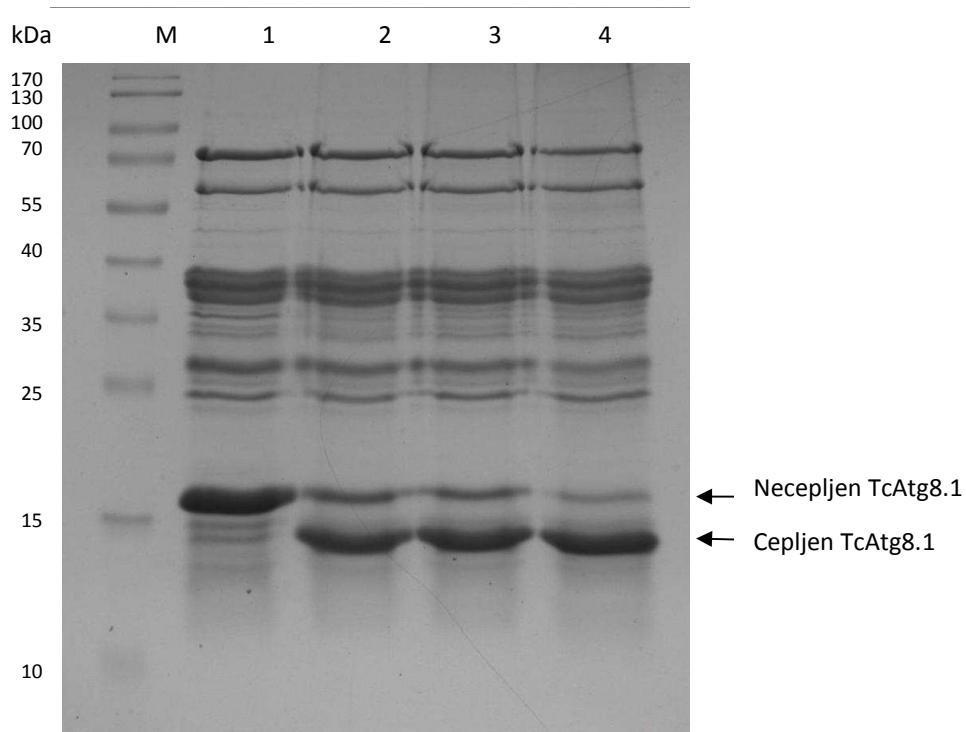
Nanosi na gel: M - standard (velikosti v kDa),

- 1 - vzorec TcAtg4.1+TcAtg8.1 po 0 minutah inkubacije
- 2 - vzorec TcAtg4.1 +TcAtg8.1 po 10 minutah inkubacije
- 3 - vzorec TcAtg4.1 +TcAtg8.1 po 30 minutah inkubacije
- 4 - vzorec TcAtg4.1 +TcAtg8.1 po 60 minutah inkubacije
- 5 - vzorec TcAtg4.1 +TcAtg8.1 po 120 minutah inkubacije

S puščico je označen substrat pred in po cepitvi.

4.4.2 Cepitev substrata TcAtg8.1 z avtofaginom TcAtg4.2

Aktivnost TcAtg4.2 je v primerjavi z encimsko aktivnostjo TcAtg4.1 manjša. Za cepitev substrata smo zato potrebovali avtofagin v višjih koncentracijah. Alvarez in sod., 2008b so pokazali, da je za cepitev potrebnih od 0,1 do 1 µg TcAtg4.2. Podaljšali smo tudi čas inkubacije. Tudi pri tej cepitvi na NaDS-PAGE opazimo dodatno liso velikosti 14 kDa, ki ustreza cepljenemu naravnemu substratu. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je izoliran encim aktiven.



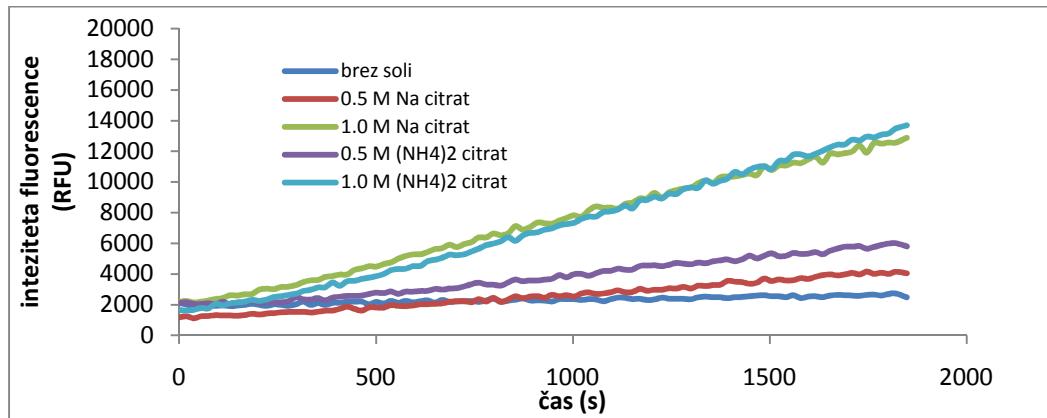
Slika 19: NaDS-PAGE(15 % gel) cepitev TcAtg8.1 s TcAtg4.2

Nanosi na gel: M - standard (velikosti v kDa),

- 1 - vzorec TcAtg4.2 +TcAtg8.1 po 0 minutah inkubacije
- 2 - vzorec TcAtg4.2 +TcAtg8.1 po 4 urah inkubacije
- 3 - vzorec TcAtg4.2 +TcAtg8.1 po 9 urah inkubacije
- 4 - vzorec TcAtg4.2 +TcAtg8.1 po 22 urah inkubacije

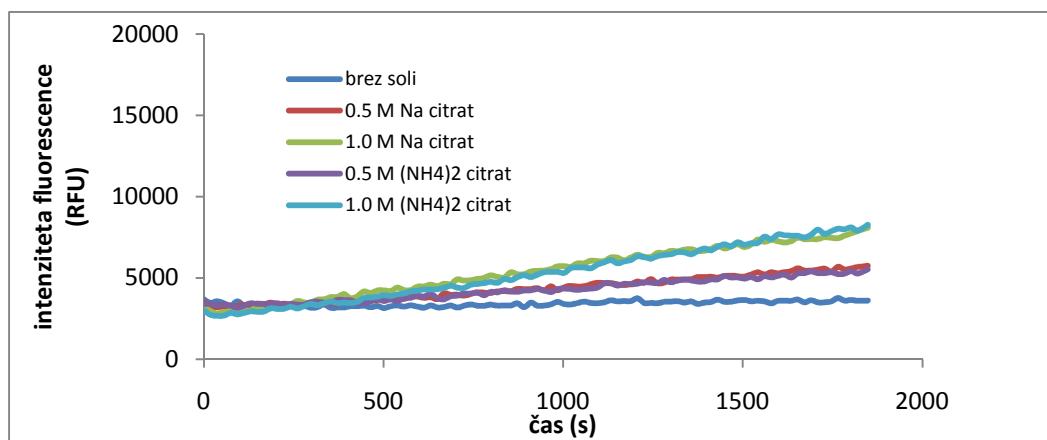
S puščico je označen substrat pred in po cepitvi.

4.5 AKTIVNOST AVTOFAGINA TcAtg4.2 NA FLOUROGENE SINTETIČNE SUBSTRATE



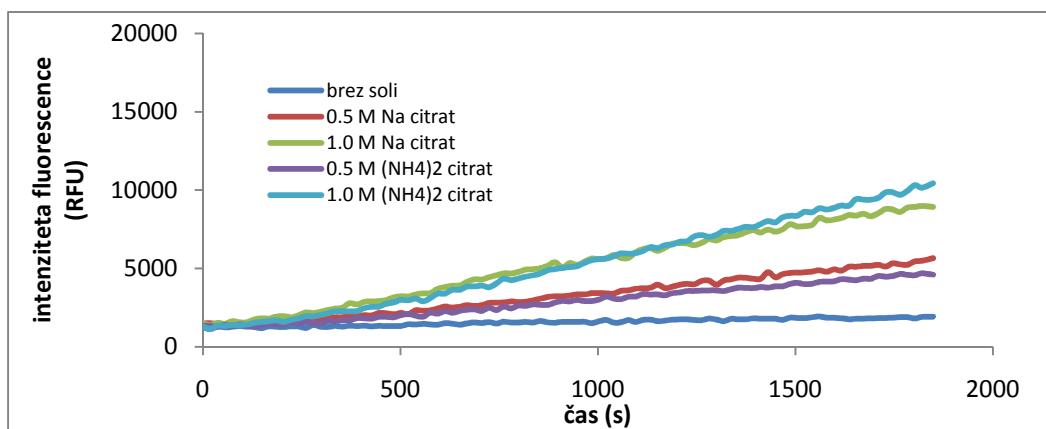
Slika 20: Razgradnja substrata Ac-EFTG-AFC s TcAtg4.2 pri dveh različnih koncentracijah natrijevega in amonijevega citrata. Koncentracija TcAtg4.2 je bila $0,11\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Iz Slike 20 je razvidno, da ima TcAtg4.2 največjo katalitično aktivnost v prisotnosti 1.0 M natrijevega citrata oz. 1.0 M amonijevega citrata. V reakcijski mešanici, kjer soli ni bilo, je katalitična aktivnost encima ostala nespremenjena.



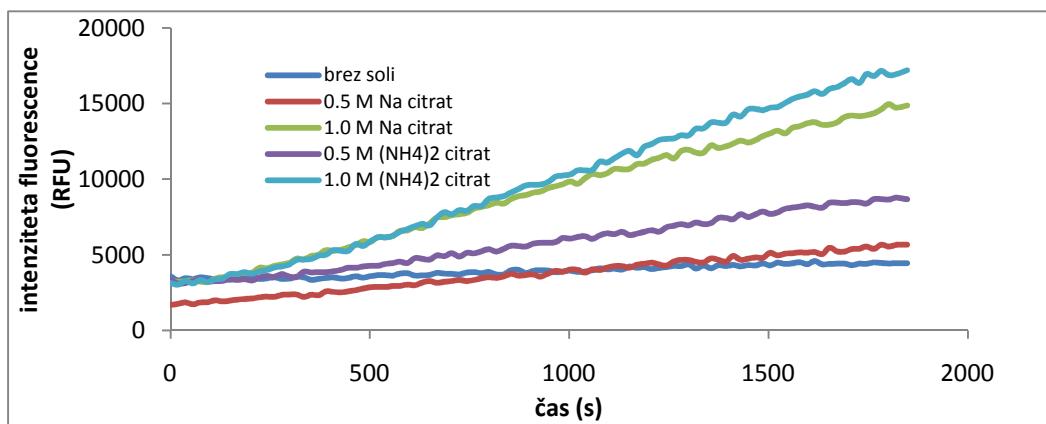
Slika 21: Razgradnja substrata Ac-GFTG-AFC s TcAtg4.2 pri dveh različnih koncentracijah natrijevega in amonijevega citrata. Koncentracija TcAtg4.2 je bila $0,11\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Tudi pri razgradnji substrata Ac-GTFG-AFC (Slika 21) je imel TcAtg4.2 največjo katalitično aktivnost v prisotnosti 1.0 M natrijevega citrata oz. 1.0 M amonijevega citrata.



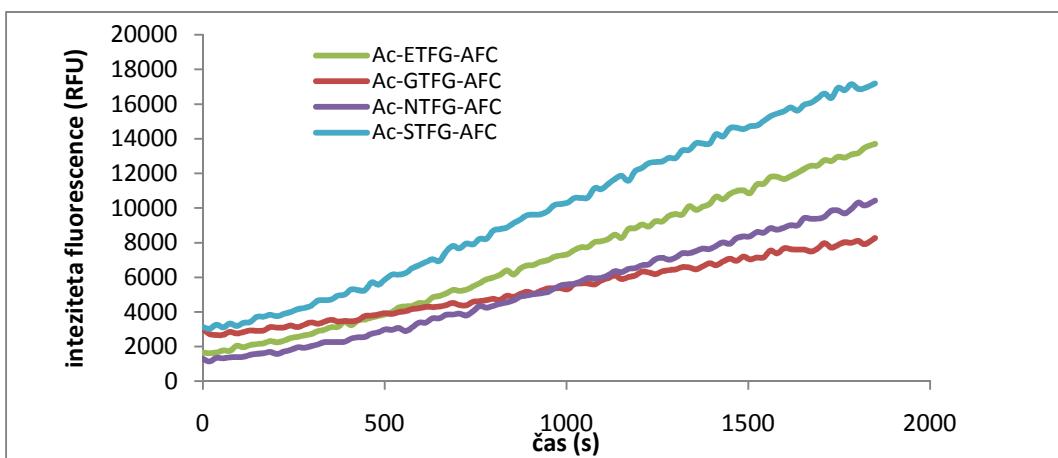
Slika 22: Razgradnja substrata Ac-NFTG-AFC s TcAtg4.2 pri dveh različnih koncentracijah natrijevega in amonijevega citrata. Koncentracija TcAtg4.2 je bila $0,11\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Pri razgradnji substrata Ac-NTFG-AFC (Slika 22) je bil avtofagin prav tako najaktivneši v prisotnosti 1.0 M natrijevega citrata oz. 1.0 M amonijevega citrata.



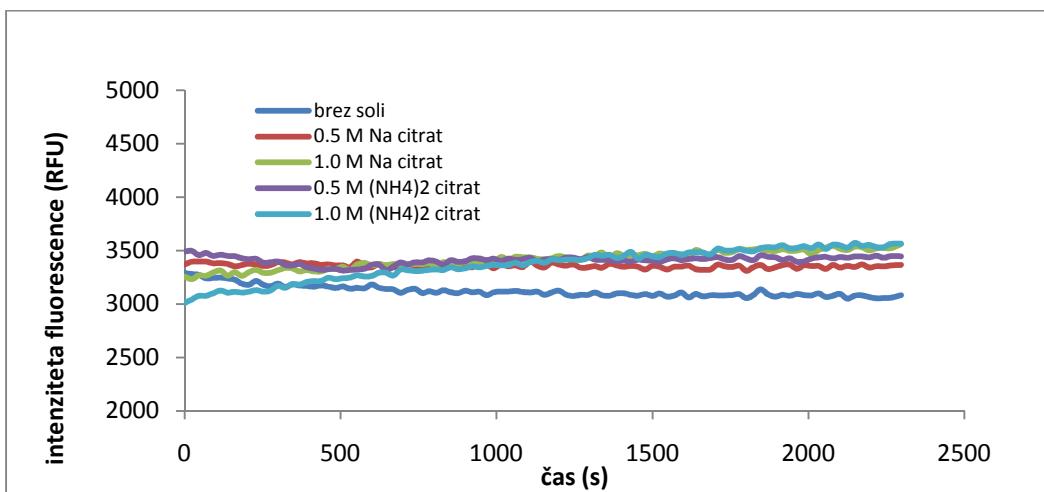
Slika 23: Razgradnja substrata Ac-STFG-AFC s TcAtg4.2 pri dveh različnih koncentracijah natrijevega in amonijevega citrata. Koncentracija TcAtg4.2 je bila $0,11\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Kot že pri prejšnjih treh cepitvah je tudi pri cepitvi substrata Ac-STFG-AFC (Slika 23) ob prisotnosti 1.0 M natrijevega citrata oz. 1.0 M amonijevega citrata imel avtofagin TcAtg4.2 najvišjo katalitsko aktivnost.



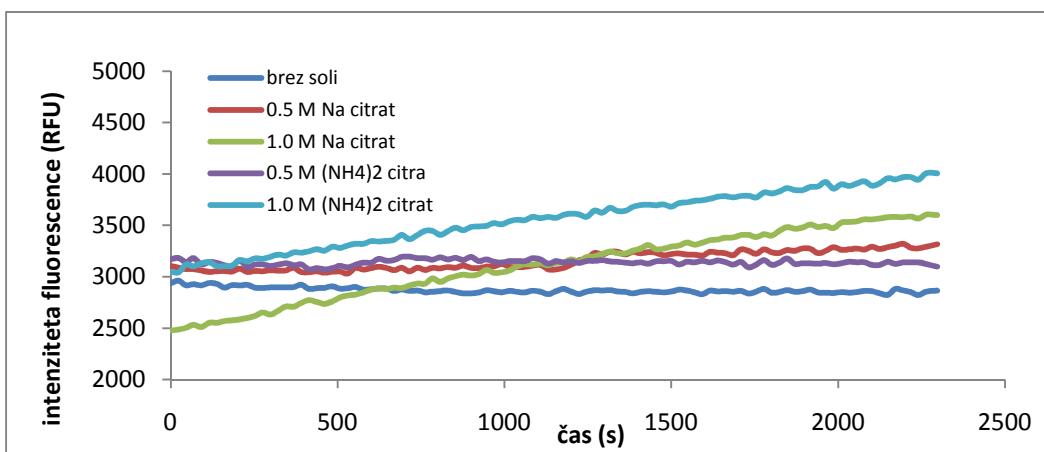
Slika 24: Razgradnja substratov Ac-ETFG-AFC, Ac-GTFG-AFC, Ac-NTFG-AFC, Ac-STFG-AFC s TcAtg4.2 koncentracije $0,11\mu\text{g}/\mu\text{l}$, pri 1 M amonijevim citratu.

Iz Slike 24 je razvidno, da se je pri 1M amonijevim citratu, kjer je bila cepitev najmočnejša, kot najboljši substrat izkazal Ac-STFG-AFC.



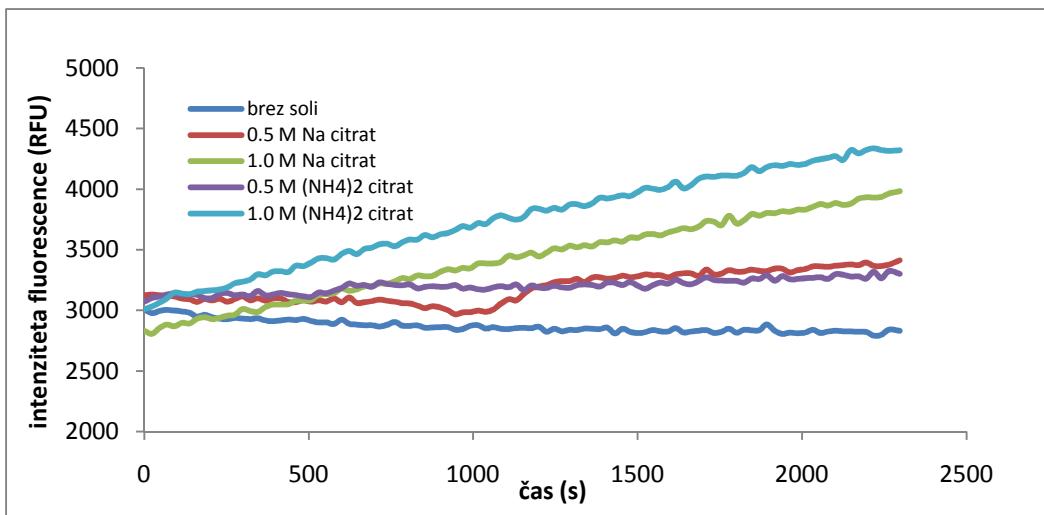
Slika 25: Razgradnja tetrapetida Ac-EFTG-ACC pri dveh različnih koncentracijah natrijevega in amonijevega citrata in polovični količini avtofagina TcAtg4.2.

Prepolovljena količina TcAtg4.2 v reakcijski mešanici je bila prenizka, da bi lahko zaznali cepitev sintetičnega substrata Ac-ETFG-ACC. Ob dodatku 1 M natrijeve oz. amonijeve soli se je aktivnost encima povečala minimalno.



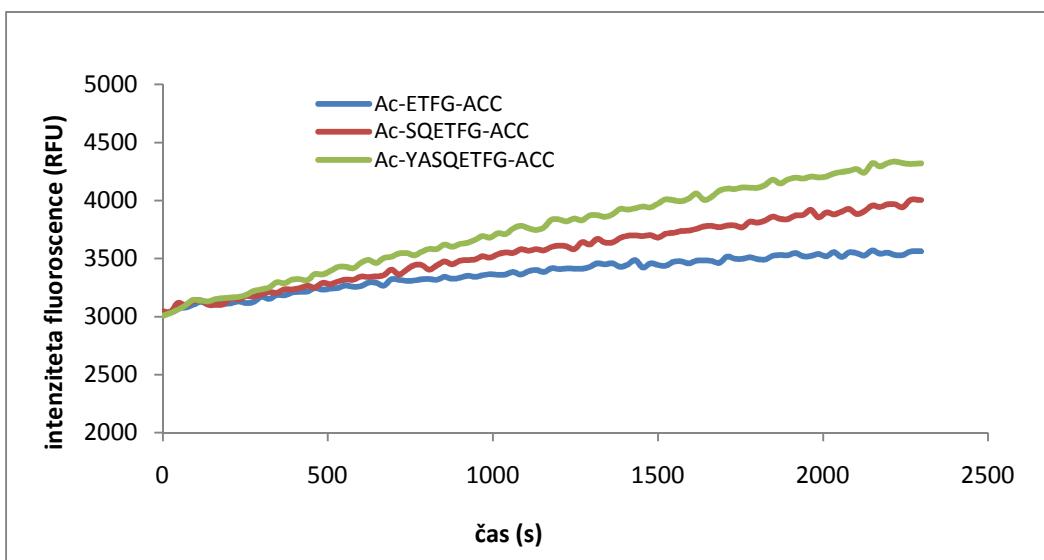
Slika 26: Razgradnja heksapeptida Ac-SQEFTG-ACC pri dveh različnih koncentracijah natrijevega in amonijevega citrata in polovični količini avtofagina TcAtg4.2.

Ob podaljšanju tetrapeptidnega substrata EFTG za dva dodatna aminokislinska ostanka (SQETFG) smo klub zmanjšani količini encima TcAtg4.2 v prisotnosti 1M soli lahko izmerili cepitev sintetičnega heksapeptida (Slika 26).



Slika 27: Razgradnja oktipeptida Ac-YASQEFTG-ACC pri dveh različnih koncentracijah natrijevega in amonijevega citrata in polovični količini avtofagina TcAtg4.2.

Aktivnost encima na oktipeptid YASQETFG se je v prisotnosti 1M Hofmeistrovih soli še povečala v primerjavi s cepitvijo substrata brez soli (Slika 27).



Slika 28: Razgradnja tetra-, heksa- in oktapeptida pri 1M amonijevim citratu in polovični količini avtofagina TcAtg4.2.

Na Sliki 28 je razvidno da se z dolžino peptidne verige veča tudi encimska aktivnost. Prikazana je cepitev ETFG, SQETFG IN YASQETFG pri 1 M NH4 citratu.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Avtofagija je proces, ki omogoča preživetje celic, ko nastopijo različne oblike stresa. Je eden od faktorjev, ki vplivajo na vzdrževanje homeostaze v telesu. Omogoča tudi diferenciacijo ter preobrazbo številnih organizmov. Nepravilnosti v delovanju se kažejo v razvoju številnih bolezni, kot so nastanek raka, nevrodegenerativnih bolezni in okužbe s patogeni. Pri parazitu *Trypanosoma cruzi*, ki povzroča Chagasovo obolenje, predstavlja ključni mehanizem preživetja epimastigotov v času stradanja, sodeluje pa tudi pri diferenciaciji parazita v vse štiri razvojne stopnje. Pri avtofagiji sodelujejo z avtofagijo povezani proteini, med katere sodijo tudi avtofagini. Avtofagini so cisteinske proteaze, ki omogočajo pravilen potek avtofagije. Namenski našega dela je bil izolirati zadostne količine proteinov Atg4.1 in Atg4.2 in preveriti njuno aktivnost na naravnem substratu Atg8.1 ter fluorogenih sintetičnih substratih. Dobljeni rezultati bi tako lahko v prihodnosti olajšali določanje kinetičnih lastnosti avtofaginov in razvoj selektivnih inhibitorjev zanke.

5.1 IZRAŽANJE AVTOFAGINOV

Vektor pET-28a se uporablja za izražanje proteinov v ekspresijskih sevih bakterije *Escherichia coli* (seva BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS). V proteinskem profilu bakterijskega lizata smo po indukciji z IPTG dobili močno izražanje obeh avtofaginov (Slika 14 in 15). Večji delež avtofagina TcAtg4.1 v ekspresijskih bakterijah seva BL21(DE3) se je nepravilno zvila. Posledično so se tvorili agregati v obliki inkluzijskih teles, kar je razvidno iz Slike 14, kjer je lisa velikosti 37 kDa pri vzorcu totalnega lizata veliko močnejša od tiste, kjer je bila nanešena topna frakcija bakterijskega lizata. Za zmanjšanje deleža netopnih proteinov, smo celice gojili pri različnih temperaturah (Schendel, 1998) (10, 12, 15, 18, 20 in 25 °C), izražanje rekombinantnih avtofaginov inducirali pri različnih optičnih gostotah (OD₅₅₀ od 0,5 do 1,5), z različnimi koncentracijami IPTG-ja, ter različnih časovnih dolžinah izražanja. Tako kot Alvarez s sodelavci leta 2008a, smo tudi mi prišli do podobnih ugotovitev. Najboljši pogoj za izražanje avtofagina TcAtg4.1 so indukcija izražanja rekombinantnih proteinov z 0,5 mM IPTG in 8-urno gojenje ekspresijskih celic pri 18 °C.

S temi pogoji smo pridobili le manjše količine topnega TcAtg4.1 (Slika 17). S pomočjo rekombinantne tehnologije smo zato genski zapis za TcAtg4.1 preklonirali v nov ekspresijski vektor pGEX-2T (Slika 12 in 13). Leta 1988 sta Smith in Johnson uvedla pGEX vektorje za ekspresijo proteinov v fuziji z proteinom glutation S-transferazo (GST). Ta vektor je zaradi visoke stopnje izražanja rekombinantnih proteinov, povečanja deleža pravilno zvitih proteinov in olajšanega čiščenja le-teh s pomočjo GST-afinitetne kromatografije, postal široko uporabljan sistem za ekspresijo proteinov (Frangioni in Neel, 1993, Aatsinki in Rajaniemi, 2005, Strugnell in sod., 1997). S pomočjo pGEX-2T vektorja smo uspeli izboljšati izražanje proteina TcAtg4.1 v aktivni topni obliki (glej sliko 16). Ekspresija je potekala v sevu BL21(DE3)pLysS bakterije *E. coli*, kjer je nadzor nad izražanjem vstavljenega zaporedja večji kakor v BL21(DE3) celicah. Vzorec, ki smo ga do OD₅₅₀ ~ 1 gojili pri 37 °C, smo ohladili in z 0,5 mM IPTG inducirali izražanje fuzijskega proteina GST-TcAtg4.1 ter celice gojili 8 ur pri 18 °C (Slika 16). Med GST proteinom in TcAtg4.1 proteinom se nahaja prepoznavno mesto za proteazo trombin, s pomočjo katerega lahko odcepimo GST molekulo in tako izoliramo čisti rekombinantni protein (Sun in Budde, 1995). Zaradi pomanjkanja ustreznih kolon za kromatografijo z izolacijo našega avtofagina nismo nadaljevali.

Majhno količino topnega TcAtg4.1, ki smo jih pridobili s pomočjo pET-sistema, smo uporabili za preverjanje aktivnosti avtofagina na naravnemu substratu TcAtg8.1.

Kakor pri TcAtg4.1 smo tudi pri ekspresiji TcAtg4.2 našli optimalne pogoje izražanja. Največ topnega avtofagina smo pridobili v sevu *E.coli* BL21(DE3). Bakterijsko kulturo smo gojili na 37 °C do OD₅₅₀ ~ 1, kulturo ohladili in inducirali izražanje TcAtg4.2 z 0,5 mM IPTG.

Na sliki 16 se lisa pri molski masi ~ 39 kDa po indukciji z IPTG začne povečevati. Omenjena lisa ustreza velikosti avtofagina TcAtg4.2. Ekspresija želenega proteina v topni obliku je najizrazitejša po 6 urah gojenja pri 25 °C. Po ekspresiji je sledilo čiščenje in izolacija proteina s pomočjo Ni-NTA kromatografije (Slika 17). Nečistoče v vzorcu, čiščenem s pomočjo Ni-NTA kromatografije smo odstranili z gelsko izključitveno kromatografijo, ki ločuje proteine na osnovi razlik v velikosti in obliki molekul. Na sliki 17

vidimo zelo močno liso, ki predstavlja rekombinantni protein TcAtg4.2. Na podlagi rezultatov smo lahko sklepali, da smo našli optimalne pogoje za ekspresijo in čiščenje zadostnih količin TcAtg4.2, s katerim smo lahko proučevali aktivnost avtofagina TcAtg4.2 na naravni substrat Atg8 in sintetične substrate.

5.2 AKTIVNOST AVTOFAGINOV NA NARAVNI SUBSTRAT TcAtg8.1

Protein TcAtg8.1 v parazitu *T.cruzi* je naravni substrat za oba avtofagina Atg4 (Alvarez in sod., 2008b). Avtofagini proteolitično cepijo substrat Atg8 na mestu med Gly116 in Arg117. Arginin se skupaj s C-koncem sprosti, na C-koncu proteina Atg8 pa se izpostavi glicin. Gly116 proteina Atg8 tvori z amino skupino fosfatidiletanolamina (PE) kovalentno izopeptidno vez in pomaga pri hemifuziji liposomov, kar omogoča rast avtofagosomov (Nakatogawa in sod., 2007). Tako so avtofagini in protein družine Atg8 ključni za pravilen potek avtofagije in tako vplivajo na preživetje parazita med stradanjem in njegovo diferenciacijo.

Zaradi 10000 krat manjše proteolitične aktivnosti proteina TcAtg4.2 Alvarez in sod. predvidevajo, da ima TcAtg4.1 pri cepitvi TcAtg8.1 glavno vlogo. TcAtg4.2 lahko njegovo vlogo prevzame v primeru, ko je TcAtg4.1 v celici odsoten ali nefunkcionalen (Alvarez in sod., 2008b).

Encimska aktivnost proteaze TcAtg4.1 je zelo visoka, kar so dokazali že Alvarez in sod., (2008b). Za procesiranje naravnega substrata namreč zadostujejo že majhne koncentracije encima. Na sliki 18 je razvidno, da je količina TcAtg4.1 (~37kDa) na NaDS gelčku komaj zaznavna, a je kljub temu zadostovala za cepitev substrata že v 2 urah. Cepitev zaznamo kot dodatno liso velikosti približno 14 kDa, ki se pojavi pod necepljeno obliko substrata pri 16 kDa. Iz rezultatov sklepamo, da smo izolirali aktivno obliko avtofagina TcAtg4.1, ki lahko cepi naravni substrat TcAtg8.1.

Za cepitev naravnega substrata TcAtg8.1 smo zaradi manjše proteolitične aktivnosti proteina TcAtg4.2 potrebovali večje količine encima (Slika 19; glej liso pri velikosti ~ 39kDa), podaljšali pa smo tudi čas inkubacije. Iz Slike 19 je razvidno, da se je večji del

substrata cepil že po 4 urah inkubacije s TcAtg4.2. Po 22 urah inkubacije pa je bila cepljena tudi preostala količina substrata.

Dokazali smo, da sta izolirana avtofagina aktivna na naravni substrat in da je encimska aktivnost TcAtg4.2 nižja od encimske aktivnosti Atg4.1. Ker nam avtofagina 4.1 ni uspelo izolirati v večjih količinah, smo za nadaljnje delo in preverjanje aktivnosti na sintetičnih substratih uporabili le TcAtg4.2.

5.3 AKTIVNOST AVTOFAGINA TcAtg4.2 NA FLOUROGENE SINTETIČNE SUBSTRATE

Preverjanje aktivnosti na fluorogenih sintetičnih substratih nam omogoča biokemijsko karakterizacijo, s katero lahko določamo substratno specifičnost proteaz (Drag in sod., 2008). Aktivnost encima določamo z merjenjem sprememb v intenziteti fluorescence, ki nastane pri razgradnji specifičnega fluorogenega substrata z znano kemijsko strukturo. Določanje encimske specifičnosti s sintetičnimi substrati zaradi velike občutljivosti metode omogoča, hitro zaznavanje sprememb, ki nastanejo zaradi proteolitični aktivnosti encimov. Spremembe v emisijskih maksimumih cepljenih substratov tako omogočajo spremeljanje aktivnosti encima v realnem času. Z majhno količino encima lahko tako v kratkem času s pomočjo substratne knjižnice določimo zanj najbolj idealne substrate. Z identifikacijo optimalnih substratov je pot za iskanje potencialnih inhibitorjev lažja (Harris in sod. 2000). Selektivni inhibitorji za avtofagine, razviti na osnovi optimalnih sintetičnih substratov, bi lahko v nadalnjih fazah raziskav predstavljal orodje pa preprečevanje okužb ljudi s parazitom *T. cruzi* in s tem tudi nastanka Chagasove bolezni ter za zdravljenje že okuženih ljudi.

Avtofagin cepi substrate, ki imajo na mestu P1 glicin. Ob cepitvi sintetičnih substratov se sprosti fluorofor, ki emitira svetlobo pri spremenjenih valovnih dolžinah. Intenziteta signala se povečuje prenosorazmerno z aktivnostjo encima. Za povečevanje encimske aktivnosti (Drag in sod., 2008) smo v reakcijsko mešanico dodali Hofmeistrove soli, ki naj bi spremenile konformacijo encima oziroma substrata in tako vplivale na hitrost proteolize. Efekt Hofmeisterjevih ionov je izrazitejši pri višjih koncentracijah soli (Yang in sod.,

2010). Tudi z našimi poskusi (glej Slike 20 - 23 in 26 - 27) smo pokazali, da Hofmeistrove soli vplivajo na povečanje encimske aktivnosti. Pri višji koncentraciji soli v reakcijski mešanici je prišlo do izrazitega povišanja intenzitete signala, značilnega za odcepljen fluorofor. Tako je aktivnost avtofagina pri cepitvi vseh sintetičnih substratov najvišja ravno pri 1 M natrijevem citratu in 1 M amonijevem citratu. Vpliv Hofmeistrovih ionov na encimsko aktivnost encima smo potrdili z merjenjem encimske aktivnosti v odsotnosti Hofmeistrovih soli, pri kateri smo zaznali le šibko proteolitično aktivnost ali pa do spremembe fluorescenčne intenzitete sploh ni prišlo (glej Slike 20 – 27, razen 24). Predvidevamo, da imajo proteini v reakcijskih mešanicah z dodanimi solmi bolj urejeno strukturo in je avtofagin v teh pogojih zato bolj aktiven. Proteolitična aktivnost pada z zaporedjem kozmotropnih anionov v vrtnem redu: $\text{citrat}_3^- > \text{SO}_4^- > \text{S}_2\text{O}_3^- > \text{HPO}_2^- > (\text{OH}^-, \text{F}^-) > \text{Ac}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{ClO}_4^- > \text{I}^-$ ter kozmotropnih kationov v vrstnem redu: $\text{N(CH}_3)_4^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Al}^{3+} > \text{Gua}^+$ (Collins, 2004 in Baldwin, 1996). Učinki posameznih ionov v raztopini so aditivni. Tako soli, ki so nastale s kombiniranjem kozmotropnih kationov in anionov, različno izražajo Hofmeisterov efekt na aktivnost encimov (Collins 2004).

Aktivnost avtofagina TcAtg4.2 smo testirali na peptidnih substratih, ki so imeli aminokislinsko zaporedje na mestih P1, P2 in P3 identično aminokislinskemu zaporedju naravnih substratov (P1-glicin, P2-fenilalanin in P3- treonin). Aminokislinski ostanki na četrti poziciji pa so se spremenjali. Tako smo testirali štiri sintetične substrate (Ac-GTGF-AFC, Ac-STFG-AFC, Ac-NTFG-AFC in Ac-ETFG-AFC), ki so se razlikovali v aminokislinskem ostanku na mestu P4 (Slike 20 - 24). Tetapeptidni substrat, ki je na P4 imel serin (Ac-STFG-AFC), se je izkazal kot najbolj optimalen substrat za protein TcAtg4.2 (Slika 24). Substrata Ac-ETFG-AFC in Ac-NTFG-AFC je TcAtg4.2 cepil malo šibkeje, substrat Ac-GTGF-AFC pa je bil cepljen najšibkeje. Fluorescenčna intenziteta, ki je odraz aktivnosti encima, se je v prisotnosti amonijevega citrata glede na aktivnost avtofagina TcAtg4.2 v odsotnosti Hofmeistrovih ionov povečala za približno 8 krat. Na podlagi tega lahko sklepamo, da je avtofagin najbolj aktiven ravno na sintetični substrat Ac-STFG-AFC, ki ima aminokislinsko zaporedje podobno naravnemu substratu TcAtg8.2 (SAFG).

Z daljšanjem peptidne verige sintetičnih substratov smo opazovali vpliv dolžine polipeptidne verige na hitrost razgradnje substrata. Pri eksperimentih smo uporabili tetra-, heksa-, in oktapeptide. Aminokislinsko zaporedje podaljšanih sintetičnih substratov je bilo identično aminokislinskemu zaporedju v človeškem homologu naravnega substrata Atg8. Izkazalo se je, da se z daljšanjem aminokislinskega zaporedja povečuje tudi afiniteta avtofagina do substrata. Fluorescenčna intenziteta je bila najvišja ravno pri substratu z 8 aminokislinskimi ostanki. Tako lahko zaključimo, da se z daljšanjem polipeptidne veriga substrata povečuje tudi proteolitska aktivnost proteina TcAtg4.2.

Na podlagi naših eksperimentov lahko trdimo, da je očiščena rekombinantna proteaza TcAtg4.2 aktivna in cepi naravni substrat TcAtg8.1. Prav tako cepi tudi sintetične substrate. Pri iskanju optimalnega sintetičnega substrata smo dokazali, da avtofagin TcAtg4.2 najbolje cepi tetrapeptidni substrat Ac-STFG-AFC, ki ima na mestu P4 aminokislino serin, ki se ujema z aminokislino na mestu P4 v naravnem substratu TcAtg8.2. Prav tako smo dokazali, da se z daljšanjem polipeptidne verige povečuje tudi encimska aktivnost avtofagina.

5.4 SKLEPI

Uspeli smo izboljšati ekspresijo obeh proteinov glede na prejšnje objave

Dokazali smo, da sta izolirana avtofagina aktivna in da cepita naravni substrat TcAtg8.1. Encimska aktivnost TcAtg4.2 je nekoliko nižja kakor encimska aktivnost Atg4.1.

- Proteaza TcAtg4.2 cepi sintetične substrate. Kot najbolj optimalen substrat se je izkazal Ac-STFG-AFC.
- Proteaza TcAtg4.2 ima največjo aktivnost ravno pri sintetičnem substratu katerega zaporedje aminokislin je identično zaporedju aminokislin naravnega TcAtg8.2 substrata.
- Z daljšanjem polipeptidne verige sintetičnih substratov, se povečuje tudi aktivnost avtofagina TcAtg4.2.
- Hofmeistrove soli izboljšajo encimsko aktivnost.

6 POVZETEK

Cisteinski proteazi TcAtg4.1 in TcAtg4.2, ki sodelujeta pri oblikovanju avtofagosomov ter skrbita za normalen potek avtofagije, sta dobri tarči za načrtovanje inhibitorjev. Avtofagija je ključna pri diferenciaciji parazita *T. cruzi* v različne infektivne oblike. Z razvojem inhibitorjev za avtofagine bi tako lahko preprečili diferenciacijo in razmnoževanje parazita ter posledično nastanek in razvoj Chagasovega obolenja.

Namen diplomske naloge je bil s tehnologijo rekombinantne DNA in prenosom genskega zapisa za oba avtofagina v drug ekspresijski vektor izboljšati obstoječi sistem za izražanje genov za TcAtg4.1 in TcAtg4.2. Z biokemijsko karakterizacijo proteaz TcAtg4.1 in TcAtg4.2 s pomočjo flourogenih sintetičnih substratov smo želeli določiti substratno specifičnost proteaz in raziskati vpliv različnih soli na aktivnost encimov. Poznavanje lastnosti proteaz bo olajšalo iskanje specifičnih inhibitorjev zanje.

Ekspresijo obeh proteinov smo uspeli izboljšati. Dokazali smo, da sta izolirani proteazi aktivni na naraven substrat TcAtg8.1. Ponovno se je izkazalo, da je encimska aktivnost Atg4.2 je nekoliko nižja kakor encimska aktivnost Atg4.1 pri cepitvi naravnega substrata TcAtg8.1. S TcAtg4.2 smo preverili tudi aktivnost proteina na sintetične substate. Med testiranimi se je kot najbolj optimalen izkazal substrat Ac-STFG-AFC. Pokazali smo tudi, da se z daljšanjem polipeptidne verige sintetičnih substratov, povečuje tudi encimska aktivnost TcAtg4.2. Dodatek Hofmeistrovih soli zviša encimsko aktivnost, kar zasledimo kot izrazito povišanja intenzitete signala.

7 VIRI

- Aatsinki J. T. in Rajaniemi H. J. 2005. An alternative use of basic pGEX vectors for producing N- and C-terminal fusion proteins for production and affinity purification of antibodies. *Protein Expression Purification* 40: 287-291
- Abad-Francha F., Santos W. S., Schofield J. S. 2010. Research needs for Chagas disease prevention. *Acta Tropica* 115: 44-54
- Alvarez V. E., Kosec G., Sant'Anna C., Turk V., Cazzulo J. J., Turk B. 2008a. Autophagy isinvolved in nutritional stress response and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (6): 3454-3464
- Alvarez V. E., Kosec G., Sant'Anna C., Turk V., Cazzulo J. J., Turk B. 2008b. Blocking autophagy to prevent parasite differentiation. A possible new strategy for fighting parasitic infections? *Autophagy* 4 (3): 361-363
- Amar N., Lustig G., Ichimura Y., Ohsumi Y., Elazar Z. 2006. Two newly identified sites in the ubiquitin-like protein Atg8 are essential for autophagy. *European Molecular Biology Organization reports* 7 (6): 635-642
- Atkinson H. J., Babbit P. C., Sajid M. 2009. The global cysteine peptidase landscape in parasites. *Trends in Parasitology* 25 (12): 573-581
- Barrett M. B., Burchmore R. J. S., Stich A., Lazzari J. O., Frasch A. C., Cazzulo J. J., Krishna S. 2003. The trypanosomiases. *The Lancet* 362: 1469-1480
- Bern C., Montgomery S. P., Herwaldt B. L., Rassi Jr. A., Marin-Neto J. A., Dantas R. O., Maguire J. H., Acquatella H., Morillo C., Kirchhoff L. V., Gilman R. H., Reyes P. A., Salvatella R., Moore A. C. 2007. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States; a systematic review. *The Journal of the American Medical Association* 298(18): 2171-2181
- Bolton D., Evans P. A., Stott K., Broadhurst R. W. 2001. Structure and properties of a dimeric N-terminal fragment of human ubiquitin. *Journal of Molecular Biology* 314 (4): 773-787.
- Collins K.D. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and crystallization process. *Elsevier Methods* 2004; 34: 300-311
- Coura J. R. 2007. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 102 (1): 113-122

- Coura J. R., Borges-Pereira J. 2010. Chagas disease: 100 years after its discovery.
A systemic review. *Acta Tropica* 115: 5-13
- De Souza W., Uliisses de Carvalho T. M., Santos Barrias E. 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*, Volume 2010: 295394-295412
- De Souza, W. 2002. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design* 8: 269-285
- Drag M., Mikolajczyk J., Bekes M., Reyes-Turcu F. E., Ellman J. A., Wilkinson K. D., Salvesen G. S. 2008. Positional-scanning fluorogenic substrate libraries reveal unexpected specificity determinants of deubiquitinating enzymes (DUBs). *Biochemical Journal* 415(3): 367-375.
- Epting C. L., Coates B. M., Engman D. M. 2010. Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology* 126: 283-291
- Erez E., Fass D., Bibi E. 2009. How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* 459: 371-378
- Frangioni J. V. in Neel B. G. 1993. Solubilization and purification of enzymatically active glutathione S-transferase (pGEX) fusion proteins. *Analytical biochemistry* 210 (1): 179-187.
- Gascon L., Bern C., Pinazo M.-J. 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica* 115: 22-27
- Geng J. in Klionsky D. J. 2008. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. *European Molecular Biology Organization* 9 (9): 859-864
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166: 557-580
- Harris J.L., Backes B.J., Leonetti F., Mahrus S., Ellman J.A. in Craik C.S. 2000. Rapid and General Profiling of Protease Specificity by Using Combinatorial Fluorogenic Substrate Libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (14): 7754-7759
- He C. in Klionsky D. J. 2009. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annual Review of Genetics* 43: 67-93
- Hong Y. in Kinoshita T. 2009. Trypanosome Glycosylphosphatidylinositol Biosynthesis. *Korean Journal of Parasitology* 47 (3): 197-204

- Kosec G., Alvarez V., Cazzulo J. J., 2006. Cysteine proteinases of *Trypanosoma cruzi*: from digestive enzymes to programmed cell death mediators. *Biocell* 30 (3): 479-490
- Kourtis N. in Tavernarakis N. 2009. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death and Differentiation* 16: 21-30
- Levine B. in Kroemer G. 2008. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* 132 (1): 27-42
- Li M., Hou Y., Wang J., Chen X., Shao Z.-M., Yin X-M. 2011. Kinetics Comparisons of Mammalian Atg4 Homologues Indicate Selective Preferences toward Diverse Atg8 Substrates. *The Journal of biological chemistry* 28: 7327-7338.
- Lima F. M., Oliveira P., Mortara R. A., Silveira J. F., Bahia D. 2010. The challenge of Chagas' disease: Has the human pathogen, *Trypanosoma Cruzi* learnt how to modulate signaling events to subvert host cells? *New Biotechnology* 27 (6): 837-843
- Merops. Family C54. Summary for family C54
<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=C54> (2.5.2011)
- Merops. Summary for peptidase C54.003: autophagin-1. Structure.
<http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/structure?mid=C54.003> (2.5.2011)
- Miles M. A., Feliciangeli M. D., Rojas de Arias A. 2003. American trypanosomiasis (Chagas' Disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *British Medical Journal* 326: 1444-1448
- Mottram J. C., Coombs G. H. in Alexander J. 2004. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. *Current Opinion in Microbiology* 7: 375-381
- Nakatogawa H., Ichimura Y., Ohsumi Y. 2007. Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell* 130: 165-178
- National Institute for Basic Biology. Division of Molecular Cell Biology. Annual Report 2004 http://www.nibb.ac.jp/annual_report/2004/090.html (3.5.2011)
- Noda N. N., Ohsumi Y., Inagaki F. 2010. Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 584: 1379-1385

- Rassi A. Jr., Rassi A., Rassi S. G. 2007. Predictors of mortality in chronic Chagas disease. *Circulation* 115: 1101-1108
- Reggiori F. in Klionsky D. J. 2005. Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Current Opinion in Cell Biology* 17: 415-422
- Sajid M., McKerrow J. H. 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and Biochemical Parasitology* 120: 1-21
- Schechter I., Berger A. 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 27: 157-162
- Schendel P.F. 1998. Expression of proteins in *Escherichia coli*. Overview of protein Expression in *E.coli*. *Current Protocols in Molecular Biology* 3; edited by Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K. Chapter 16, Suplement 41: 16.1.1-16.1.3.
- Schmunis G. A., Yadon Z. E. 2010. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica* 115: 14-21
- Smith D. B. in Johnson K. S. 1988. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67(1): 31-40.
- Strugnell S. A., Wiefling B. A., DeLuca H. F. 1997. A Modified pGEX Vector with a C-Terminal Histidine Tag: Recombinant Double-tagged Protein Obtained in Greater Yield and Purity. *Analytical biochemistry* 254: 147-149.
- Sugawara K., Suzuki N. N., Fujioka Y., Mizushima N., Ohsumi Y., Inagaki F. 2005. Structural Basis for the Specificity and Catalysis of Human Atg4B Responsible for Mammalian Autophagy. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (48): 40058-40065
- Sun G. in Budde R. J. A. 1995. A modified pGEX expression system that eliminates degradation products and thrombin from the recombinant protein. *Analytical Biochemistry* 231: 458-460.
- Tanowitz H. B., Kirchhoff L. V., Simon D., Morris S. A., Weiss L. M., Wittner M. 1992. Chagas' Disease. *Clinical Microbiology Review* 5 (4): 400-419
- Tanowitz H. B., Machado F. S., Jelicks L. D., Shirani J., Campos de Carvalho A. C., Spray D. C., Factor S. M., Kirchhoff L. V., Weiss L. M. 2009. Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-induced heart disease (Chagas disease). *Progres in Cradiovascular disease* 51 (6): 524-539

- Taylor J. B., Oliver J., Sherrington R., Pemble S. E. 1991. Structure of human glutathione S-transferase class Mu genes. *J Biochem*, 274: 587- 593
- Till A. in Subramani S. 2010. A balancing act for autophagin. *The Journal of Clinical Investigation* 120 (7): 2273-2276
- Tukr B. 2006. Targeting proteases: Successes, failures and future prospects. *Nature Reviews Drug Discovery* 5: 785-799
- Turk B., Turk D. in Turk V. 2012. Protease signalling: the cutting edge. *The EMBO Journal* 31: 1630-1643,
- Turk B., Turk D., Turk V. 2000. Lysosomal cysteine proteases: More than scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477: 98-111
- Urbina J. A. 2010. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica* 115: 55–68
- WHO, World Heath Organization. 2008. Chagas disease: control and elimination. Report of the Secretariat. Executive board 124/17: 1-4.
- WHO, World Health Organisation. 2002. Control of Chagas disease. Second Report of the WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series 905: 1–109
- Xie Z. in Klionsky D. J. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations *Nature Cell Biology* 9: 1102-1109
- Yang Z., Liu X.-J., Chen C., Halling P. J. 2010. Hofmeister effects on activity and stability of alkaline phosphatase. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1804 (4): 821-828.

ZAHVALA

Diplomsko delo sem opravljala na Odseku za biokemijo, molekularno in struktурно biologijo Instituta Jožef Stefan pod mentorstvom prof. ddr. Borisa Turka. Najlepše se mu zahvaljujem za priložnost premagovanja izzivov, ki jih je diplomska naloga nudila, za vso pridobljeno znanje in izkušnje ter vodstvo in usmeritve pri samem delu.

Za natančen in kritičen pregled se zahvaljujem prof.dr. Petru Maček.

Za pomoč, številne nasvete, spodbudo, ideje in svetovanje v vseh fazah raziskave se zahvaljujem dr. Dejanu Caglič. Zahvala za pomoč in sodelovanje gre tudi Jeleni Rajković.

Za prijetno delovno vzdušje se zahvaljujem vsem ki smo se srečevali na hodnikih, laboratorijih in ostalih prostorih tega odseka.

Tudi staršem ter bratu in sestri gre zahvala za podporo in bolj ali manj uspešno spodbujanje.

Tudi dragemu Tomažu hvala za vso oporo in spodbudo, da mi je diplomo na koncu le uspelo napisati.