

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Katarina KORUZA

**PRIPRAVA MONOLITNIH KOLON ZA
AFINITETNO KROMATOGRAFIJO NA
MAKROCIPINU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Katarina KORUZA

**PRIPRAVA MONOLITNIH KOLON ZA AFINITETNO
KROMATOGRAFIJO NA MAKROCIPINU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PREPARATION OF MONOLITHIC COLUMNS FOR AFFINITY
CHROMATOGRAPHY ON MACROCYPIN**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Praktični del je bil opravljen na Odseku za biotehnologijo Instituta »Jožef Stefan« v Ljubljani in v podjetju BIA Separations.

Študijska komisija dodiplomskega študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Janka Kosa, za somentorico dr. Jerico Sabotič in za recenzenta doc. dr. Blaža Cigića.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
 Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Janko KOS
 Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo,
 Katedra za farmacevtsko biologijo

Članica: dr. Jerica SABOTIČ
 Institut Jožef Stefan, Odsek za biotehnologijo

Član: doc. dr. Blaž CIGIĆ
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Katarina KORUZA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 577.152.34:543.544:606(043.2)=163.6
KG inhibitor cisteinskih proteaz/orjaški dežnik/*Macrolepiota procera*/makrocipin/
cisteinske proteaze/afinitetna kromatografija/monolitni disk CIM/dinamična
kapaciteta/papain/fižol/*Phaseolus vulgaris*/legumain/ličinke koloradskega hrošča
/Leptinotarsa decemlineata/encimska aktivnost/prebavne proteaze
AV KORUZA, Katarina
SA KOS, Janko (mentor)/SABOTIČ, Jerica (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, študij biotehnologije
LI 2012
IN PRIPRAVA MONOLITNIH KOLON ZA AFINITETNO
KROMATOGRAFIJO NA MAKROCIPINU
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XIV, 87 str., 13 pregl., 30 sl., 93 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI Proteolitični encimi imajo pomembno metabolno in regulatorno vlogo v
bioloških procesih, ki je natančno urejena z različnimi mehanizmi. Molekule in
proteini, ki urejajo delovanje proteaz, so zanimivi za uporabo v biotehnologiji in
mednje sodijo specifični inhibitorji. Makrocipin (Mcp1) je inhibitor cisteinskih
proteaz iz gobe orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*), ki smo ga na različne
načine vezali na monolitne diske CIM (»Convective Interaction Media«).
Pripravili smo uporabno orodje za afinitetno kromatografijo, ki hitro in
enostavno očisti cisteinske proteaze iz različnih virov. Postopek afinitetne
kromatografije smo izboljšali s spremenjanjem pogojev separacije in z različnimi
načini vezave makrocipina 1 na monolitne kolone CIM prek nizkomolekularnih
ročic. Diskom CIM z imobiliziranim makrocipinom 1 smo določili dinamično
kapaciteto vezave s cisteinsko proteazo papain. Za izolacijo tarčnih biomolekul
iz kompleksnih vzorcev smo uporabili disk CIM CDI z Mcp1 in disk CIM z
Mcp1 na glutaraldehidni ročici. Iz izvlečka kalečih fižolovih semen (*Phaseolus*
vulgaris) smo z diskom CIM z Mcp1 izolirali cisteinsko proteazo legumain.
Afinitetno kromatografijo na makrocipinu 1 smo uporabili za določanje tarčnih
biomolekul v izvlečku prebavil ličink koloradskih hroščev (*Leptinotarsa*
decemlineata). Afinitetna kromatografija z inhibitorjem cisteinskih proteaz
makrocipinom 1 na monolitnih diskih CIM je uporabna metoda za izolacijo
cisteinskih proteaz iz različnih virov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC UDK 577.152.34:543.544:606(043.2)=163.6
CX cysteine protease inhibitor/*Macrolepiota procera*/macrocypin/cysteine proteases/
affinity chromatography/CIM disk monolithic columns/dynamic capacity/
papain/bean/*Phaseolus vulgaris*/legumain/Colorado potato beetle larvae/
Leptinotarsa decemlineata/enzymatic activity/digestive proteolytic enzymes/
AU KORUZA Katarina
AA KOS, Janko (supervisor)/SABOTIČ, Jerica (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study Programme of
Biotechnology
PY 2012
TI PREPARATION OF MONOLITHIC COLUMNS FOR AFFINITY
CHROMATOGRAPHY ON MACROCYPIN
DT Graduation thesis (university studies)
NO XIV, 87 p., 13 tab., 30 fig., 93 ref.
LA sl
AL sl / en
AB Proteolytic enzymes play important metabolic and regulatory functions in biological processes. Their activity is exactly regulated with different mechanisms. Molecules and proteins, including specific inhibitors, with ability to regulate proteolytic activity are point of interest in many biotechnological applications. Cysteine protease inhibitor macrocypin 1 (Mcp1) from parasol mushroom (*Macrolepiota procera*) was immobilized via different immobilization chemistries to CIM monolithic disks (»Convective Interaction Media«), to obtain a chromatography tool. An effective method for fast and simple isolation of cysteine proteases from various sources was developed. We optimized the procedure of affinity chromatography by modifying the separation process condition and immobilization of macrocypin 1 with various spacer molecules. Dynamic binding capacities of monolithic CIM disks immobilized with macrocypin 1 were determined with cysteine protease papain. We isolated target biomolecules from complex samples with macrocypin 1 - affinity CIM CDI disc and macrocypin 1 - affinity CIM disks with glutaraldehyde spacer molecule. Legumain from a crude protein extract of germinated bean seeds (*Phaseolus vulgaris*) was subjected to purification with macrocypin 1 - affinity CIM disks. Furthermore target biomolecules from crude protein extract of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) larvae guts were identified with macrocypin 1 – affinity chromatography. CIM monolithic disks immobilized with cysteine protease inhibitor macrocypin 1, proved to be a valuable method for isolation of cysteine proteases from various sources.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	X
Kazalo slik	XI
Okrajšave in simboli	XIII
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 PROTEAZE	3
2.1.1 Cisteinske proteaze	4
2.1.1.1 Papainova družina proteaz C1	4
2.1.1.2 Legumainova družina proteaz C13	4
2.1.1.3 Fiziološka vloga cisteinskih proteaz	5
2.2 PROTEAZNI INHIBITORJI	5
2.2.1 Mikocipini	6
2.2.1.1 Makrocipin 1	7
2.3 INSEKTICIDNI UČINKI MIKOCIPINOV	8
2.4 KROMATOGRAFSKE METODE	9
2.5 AFINITETNA KROMATOGRAFIJA	10
2.5.1 Kromatografski nosilci	11
2.5.1.1 Naravni nosilci	12
2.5.1.2 Sintetični nosilci	12
2.5.2 Imobilizacija ligandov	13

2.6 AFINITETNA MONOLITNA KROMATOGRAFIJA	14
2.6.1 Monolitni disk CIM	14
2.6.2 Imobilizacija ligandov na monolitne diske CIM	15
2.6.2.1 Imobilizacija na skupine epoksi	16
2.6.2.2 Aktivacija s karbonildiimidazolom	16
2.6.3 Imobilizacija ligandov z ročicami	17
2.6.3.1 Sinteza ročice z etilendiaminom	18
2.6.3.2 Sinteza ročice z 1,6 - diaminoheksanom	18
2.6.3.3 Sinteza ročice z glutaraldehidom	19
2.6.3.4 Sinteza ročice z 1,4-butandiol diglicidil etrom	19
2.6.4 Postopek separacije z monolitnimi disk CIM	20
2.6.5 Karakterizacija monolitnih diskov CIM	21
2.6.5.1 Določanje dinamične kapacitete	21
2.7 UPORABA AFINITETNE MONOLITNE KROMATOGRAFIJE	22
3 MATERIALI IN METODE	23
3.1 MATERIALI IN LABORATORIJSKA OPREMA	23
3.1.1 Naravni materiali	23
3.1.2 Plazmidi	23
3.1.3 Protitelesa	23
3.1.4 Bakterijski sevi	23
3.1.5 Gojišča	23
3.1.6 Kemikalije in drobna oprema	24
3.1.7 Pufri in reagenti	26
3.1.8 Oprema	28
3.2 METODE	30
3.2.1 Priprava rekombinantnega makrocipina 1	30
3.2.1.1 Transformacija plazmida pET11::rMcp1 v ekspresijski sev <i>E.coli</i> BL21(DE3)	30
3.2.1.2 Izražanje rekombinantnega makrocipina 1 v bakteriji <i>E. coli</i>	30

3.2.1.3 Izolacija makrocipina 1 iz inkluzijskih telesc	30
3.2.1.4 Gelska filtracija	31
3.2.1.5 Ionsko izmenjevalna kromatografija	32
3.2.1.6 Določanje koncentracije proteinov	32
3.2.1.7 Ultrafiltracija	33
3.2.1.8 Dializa	33
3.2.1.9 Določanje inhibitorne aktivnosti makrocipina 1	34
3.2.2 Priprava diskov CIM z makrocipinom 1	34
3.2.2.1 Imobilizacija makrocipina 1 na disk CIM epoksi	35
3.2.2.2 Imobilizacija makrocipina 1 na disk CIM CDI	35
3.2.3 Optimizacija priprave diskov CIM z makrocipinom 1	35
3.2.3.1 Imobilizacija makrocipina 1 na disk EDA	35
3.2.3.2 Imobilizacija makrocipina 1 na glutaraldehydno ročico	35
3.2.3.3 Imobilizacija makrocipina 1 na 1,6 diaminoheksan	36
3.2.3.4 Imobilizacija makrocipina 1 na 1,4 butandiol diglicidil eter	36
3.2.4 Analize monolitnih diskov CIM z makrocipinom 1	37
3.2.4.1 Določanje dinamične kapacitete diskov CIM z imobiliziranim makrocipinom 1	37
3.2.5 Afinitetna kromatografija z izvlečkom iz fižolovih semen	38
3.2.5.1 Priprava izvlečka iz fižolovih semen	38
3.2.5.2 Afinitetna kromatografija na disku CIM epoksi z makrocipinom 1	39
3.2.6 Afinitetna kromatografija na makrocipinu 1 z izvlečkom iz prebavil ličink koloradskega hrošča	39
3.2.6.1 Priprava vzorca in čiščenje	39
3.2.6.2 Afinitetna kromatografija z diskimi CIM z makrocipinom 1	40
3.2.7 Karakterizacija proteinov	40
3.2.7.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS - PAGE)	40
3.2.7.2 Prenos western	41
3.2.7.3 Določanje encimske aktivnosti s fluorogenim substratom	42

3.2.7.4 Določanje encimske aktivnosti s kromogenimi substrati	42
3.2.7.5 Test encimske aktivnosti s substratom azokazein	43
3.2.7.6 Masna spektrometrija	44
3.2.7.7 Izoelektrično fokusiranje	44
4 REZULTATI	46
4.1 PRIPRAVA AFINITETNE KROMATOGRAFIJE	46
4.1.1 Heterologno izražanje makrocipina 1	46
4.1.2 Čiščenje in karakterizacija makrocipina 1	47
4.1.2.1 Določitev koncentracije makrocipina 1	48
4.2 PRIPRAVA MONOLITNIH DISKOV CIM Z MAKROCIPINOM 1	49
4.2.1 Preverjanje delovanja monolitnih diskov CIM z makrocipinom 1	50
4.2.1.1 Določanje dinamične kapacitete diskov CIM epoksi z rMcp1	50
4.2.1.2 Preverjanje izpiranja makrocipina 1	51
4.2.1.3 Zamenjava elucijske mobilne faze	51
4.2.1.4 Zamenjava mobilne faze	52
4.2.2 Priprava diskov CIM z ročicami	53
4.2.2.1 Določanje kapacitete diskov CIM z rMcp1	54
4.2.2.2 Analiza vezave papaina na diske CIM z rMcp1	56
4.2.2.3 Vpliv pretoka na vezavo papaina	57
4.2.2.4 Določanje dinamične kapacitete diskom CIM z rMcp1 s prečiščenim papainom	58
4.3 UPORABA MONOLITNIH DISKOV Z MAKROCIPINOM 1 ZA IZOLACIJO CISTEINSKIH PROTEAZ IZ KOMPLEKSNIH VZORCEV	60
4.3.1 Izolacija in karakterizacija cisteinskih proteaz iz kalečih semen fižola	60
4.3.1.1 Izolacija cisteinskih proteaz iz semen fižola	60
4.3.1.2 Analiza proteinov z NaDS - PAGE	61
4.3.1.3 Analiza encimske aktivnosti	62
4.3.2 Identifikacija tarčnih proteinov makrocipina 1 iz prebavil ličink koloradskega hrošča	63
4.3.2.1 Gelska filtracija	63

4.3.2.2 Analiza splošne proteolitične aktivnosti in inhibicije prebavnih encimov z mikocipini	64
4.3.2.3 Analiza aktivnosti in inhibicije prebavnih encimov z mikocipini	65
4.3.2.4 Afinitetna kromatografija z monolitnimi diskami CIM z rMcp1	67
4.3.2.5 Priprava vzorcev za masno spektrometrijo	67
4.3.2.6 Masna spektrometrija	68
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	70
5.1 RAZPRAVA	70
5.1.1 Priprava afinitetne kromatografije na monolitnih diskih CIM	70
5.1.2 Izolacija in karakterizacija cisteinskih proteaz iz izvlečka kalečih semen fižola z afinitetno kromatografijo na rMcp1	73
5.1.3 Identifikacija tarčnih proteinov iz prebavil ličink koloradskega hrošča	74
5.2 SKLEPI	76
6 POVZETEK	77
7 VIRI	79

BIBLIOGRAFIJA

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Vrste kromatografij glede na interakcije med stacionarno fazo in komponentami vzorca (Kregar, 1996; Lunder, 2007)	10
Preglednica 2: Kemikalije	24
Preglednica 3: Pufri in reagenti	26
Preglednica 4: Oprema	28
Preglednica 5: Izračun koncentracije [mg/ml] očiščenega rMcp1 po gelski filtraciji in po ionsko izmenjevalni kromatografiji.....	48
Preglednica 6: Pregled uporabljenih pufrov za imobilizacijo rMcp1 na diske CIM epoksi in diske CIM CDI	49
Preglednica 7: Pogoji separacije papaina na diskih CIM z rMcp1	50
Preglednica 8: Kapacitete diskov CIM epoksi z rMcp1	50
Preglednica 9: Kapacitete diskov CIM epoksi z rMcp1 pri različnih pogojih imobilizacije rMcp1	51
Preglednica 10: Pogoji separacije papaina na diskih CIM z rMcp1 po optimizaciji elucijske mobilne faze	52
Preglednica 11: Pogoji separacije po optimizaciji vezne mobilne faze.....	53
Preglednica 12: Dinamične kapacitete diskov CIM z rMcp1	58
Preglednica 13: Z masno spektrometrijo identificirani proteini po afinitetni kromatografiji na disku CIM z rMcp1 na glutaraldehydni ročici	69

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura makrocipina 1 (Sabotič, 2012)	8
Slika 2: Princip afinitetne kromatografije (Sabotič, 2012).....	11
Slika 3: Sinteza monolitnega nosilca GMA – EDMA (Mallik in Hage, 2006).....	15
Slika 4: Imobilizacija liganda na skupine epoksi (Nicoli in sod., 2008).....	16
Slika 5: Aktivacija nosilca s karbonildiimidazolom (Hermanson in sod., 1992).....	17
Slika 6: Sinteza ročice z etilendiaminom (Hermanson in sod., 1992).....	18
Slika 7: Sinteza ročice z 1,6 - diaminoheksanom (Hermanson in sod., 1992).....	19
Slika 8: Sinteza ročice z glutaraldehydom (Hermanson in sod., 1992).....	19
Slika 9: Sinteza ročice z 1,4-butandiol diglicidil etrom (Hermanson in sod., 1992).....	20
Slika 10: Monolitni disk CIM (Švec in sod., 2003)	21
Slika 11: Prebojna krivulja (Podgornik, 1998).....	21
Slika 12: Analiza izražanja rekombinantnega makrocipina 1	46
Slika 13: Čiščenje makrocipina 1 z gelsko filtracijo	47
Slika 14: Čiščenje makrocipina 1 z ionsko izmenjevalno kromatografijo	48
Slika 15: Preverjanje izpiranja rMcp1 z diskov CIM s prenosom western	51
Slika 16: Analiza NaDS - PAGE papaina po izpiranju z NaOH	52
Slika 17: Vpliv koncentracije soli v vezni mobilni fazi na ločevanje papaina z diskom CIM CDI z rMcp1	53
Slika 18: Elucijski diagrami po 10 min nanašanja papaina za monolitne diske CIM imobilizirane z rMcp1	55
Slika 19: Analiza NaDS - PAGE nevezanih in vezanih frakcij na diske CIM z rMcp1	56
Slika 20: Prenos western nevezanih in vezanih frakcij na diske CIM z rMcp1	57

Slika 21: Vpliv pretoka na vezavo papaina na diske CIM z rMcp1	57
Slika 22: Prebojne krivulje za določanje dinamičnih kapacitet diskov CIM z rMcp1	59
Slika 23: Elucijski diagram gelske filtracije izvlečka kalečih semen fižola in prikaz katalitične aktivnosti frakcij s flurogenim substratom Z-Ala-Ala-Asn-AMC.....	61
Slika 24: Analiza NaDS - PAGE izvlečka fižolovih semen po afinitetni kromatografiji na disku CIM epoksi z rMcp1	62
Slika 25: Grafični prikaz specifične aktivnosti legumain po afinitetni kromatografiji na rMcp1 na mg proteina v vzorcu.....	62
Slika 26: Elucijski diagram prebavil ličink koloradskih hroščev po gelski filtraciji in prikaz katalitične aktivnosti frakcij s kromogenim substratom Z-Phe-Arg-pNA	63
Slika 27: Splošna proteolitična aktivnosti in inhibicija proteolitičnih encimov z makrocipini.....	64
Slika 28: Test inhibicije aktivnosti proteaz v frakcijah po gelski filtraciji s kromogenimi substrati, specifičnimi za prebavne proteaze	66
Slika 29: Primerjava elucijskih diagramov afinitetne kromatografije z monolitnimi diskimi CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici	67
Slika 30: Analiza NaDS - PAGE vzorcev po afinitetni kromatografiji z diskom CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici	68

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
AMC	7-amino-4-metil kumarin (ang. 7-amino-4-methyl coumarin)
APS	amonijev persulfat
BANA	N- α -benzoil-D,L-arginil- β -naftilamid
BIS – Tris	bis(2-hidroksi)amino-tris(hidroksimetil)-1,3-propandiol
CDI	karbonil diimidazol
CIM	stacionarna faza s konvektnim prenosom snovi (ang. Convective Interaction Media)
Clt	klitocipin (ang. clitocypin)
CNBr	cianogen bromid
Da	dalton, enota za molekulsko maso, ki ustreza 1/12 mase čistega izotopa ^{12}C
dH ₂ O	destilirana voda
DMSO	dimetil sulfoksid
DTT	ditiotreitol
E-64	trans-epoksi sukcinil-L-levicilamido-(4-gvanidino)-butan
EDA	etilendiamin
EDMA	etilendimetakrilat
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
EtOH	etanol
FPLC	tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov (ang. Fast Protein Liquid Chromatography)
GMA	glicidilmetakrilat
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Performance Liquid Chromatography)
HCl	klorovodikova kislina
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktoperizozid
kDa	kilodalton
l	dolžina optične poti
LB	Luria-Bertani
LBA	Luria-Bertani z dodatkom ampicilina
LMW	nizkomolekularni proteinski standard (ang. low molecular weight standard)
M	molarnost, mol/L
Mcp	makrocipin (ang. macrocypin)
MS	masna spektrometrija
m/z	količnik masa / naboј
mRNA	informacijska RNA (ang. messenger RNA)
NaDS	natrijev dodecil sulfat

NCBI	ang. National Centre for Biotechnology Information
NC-IUBMB	ang. Nomenclature Comitee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
p-Glu-Phe-Leu- <i>p</i> NA	piro-Glu-Phe-Leu-4-nitroanilid
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
pI	izoelektrična točka proteinov
<i>p</i> NA	<i>para</i> -nitroanilid
PVDF	poliviniliden difluorid
rMcp	rekombinantni makrocipin
RFU	relativna sprememba fluorescence (ang. relative fluorescence unit)
SN	supernatant
TCA	trikloroocetna kislina (»trichloroacetic acid«)
TEMED	tertrametiletilendiamin
TET	pufer Tris-EDTA-Triton X-100
Triton X-100	polietenglikol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenileten
Tris	tris-hidroksimetil-aminometan
UV	ultravijolična svetloba
VIS	vidna svetloba
v/v	ml / 100 ml
w/v	g / 100 ml
w/w	g / g
Z-Ala-Ala-Asn-AMC	benzoiloksikarbonil-Ala-Ala-Asn-4-metil-7-kumarilamid
Z-Arg-Arg- <i>p</i> NA	benzoiloksikarbonil-Arg-Arg- <i>p</i> -nitroanilid
Z-Phe-Arg- <i>p</i> NA	benzoiloksikarbonil-Phe-Arg- <i>p</i> -nitroanilid
ε	molarni absorpcijski koeficient

Okrajšave imen aminokislin:

Ala	A	alanin	Ile	I	izolevcin
Arg	R	arginin	Leu	L	levcin
Asn	N	asparagin	Lys	K	lizin
Asp	D	asparaginska kislina	Met	M	metionin
Cys	C	cistein	Pro	P	prolin
Phe	F	fenilalanin	Ser	S	serin
Gly	G	glicin	Tyr	Y	tirozin
Gln	Q	glutamin	Thr	T	treonin
Glu	E	glutaminska kislina	Trp	W	triptofan
His	H	histidin	Val	V	valin

1 UVOD

Proteaze so encimi, ki cepijo peptidne vezi in so prisotne pri vseh organizmih (Barrett in McDonald, 1986). Sodelujejo v osrednjih metabolnih in regulatornih funkcijah bioloških procesov od prebave prehranskih beljakovin do kompleksnih procesov kot so strjevanje krvi, programirana celična smrt, imunski odziv in aktivacija hormonov. Regulacija delovanja proteaz je nujna zaradi njihovih pomembnih funkcij pri delovanju celice, saj lahko nenadzorovano delovanje vodi do različnih patoloških procesov (Sabotič in Kos, 2012). Molekule in proteini, ki proteaze inhibirajo, so primerni za raziskave na področju medicine, kmetijstva in biotehnologije. V medicini se proteazne inhibitorje uporablja za diagnozo in zdravljenje virusnih, bakterijskih, glivičnih in parazitskih okužb, pa tudi za zdravljenje rakavih obolenj, imunoloških, nevrodegenerativnih in kardiovaskularnih bolezni. Proteazni inhibitorji so primerni za zaščito pridelkov pred rastlinskimi patogeni in rastlinojedimi škodljivci, pa tudi za zaščito pred stresnimi dejavniki, kot je suša (Rao in sod., 1998). Proteazni inhibitorji so nujno potrebni pri preprečevanju proteolize med heterologno ekspresijo in ekstrakcijo proteinov v zaključnih procesih. Zaradi vseh naštetih lastnosti imajo proteaze velik pomen v biotehnoloških aplikacijah. Izkoriščajo jih v usnjarski, živilski in farmacevtski industriji, nepogrešljive so v industriji detergentov, opazna pa je tudi njihova vloga v medicinskih raziskavah (Sabotič in Kos, 2012).

Običajno je postopek čiščenja proteaz večstopenjski proces z majhnim končnim izkoristkom. Postopek poenostavimo in izboljšamo, če snov z afiniteto do iskane proteaze vežemo na trdni nosilec (Grzonka in sod., 2007). Inhibitor cisteinskih proteaz makrocipin (Mcp1) je bil izoliran iz gobe orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*) in se je izkazal kot primeren ligand za afinitetno kromatografijo na Sefarozu (Mustar, 2009). Pomanjkljivost kromatografske kolone z makrocipinom 1 na Sefarozu je bila nizka kapaciteta, kar lahko izboljšamo z uporabo monolitnih stacionarnih faz, ki imajo številne prednosti pred klasičnimi kromatografskimi kolonami. Monolitni materiali so ekstremno prepustni in ponujajo izjemno učinkovito separacijo (Barut in sod., 2008).

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je bil pripraviti uporabno kromatografsko orodje za afinitetno kromatografijo na inhibitorju cisteinskih proteaz makrocipinu 1 in ga uporabiti za izolacijo tarčnih biomolekul iz kompleksnih vzorcev. Z različnimi postopki imobilizacije makrocipina 1 na monolitne diske CIM (ang. Convective Interaction Media) in s spremenjanjem pogojev separacijskega procesa, smo želeli določiti optimalne pogoje za ločevanja cisteinskih proteaz. V nadaljevanju smo želeli s pripravljenim kromatografskim orodjem izolirati cisteinsko proteazo legumain iz

izvlečka kalečih semen fižola (*Phaseolus vulgaris*) in določiti tarčne proteine makrocipina 1 iz prebavil ličink koloradskega hrošča (*Leptinotarsa decemlineata*).

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- 1) V primerjavi s Sefarozo so monolitne kolone CIM boljši nosilec za makrocipin 1.
- 2) S cisteinsko proteazo papain lahko določimo kapaciteto monolitnih diskov CIM, imobiliziranih z makrocipinom 1.
- 3) Z nizkomolekularnimi ročicami povečamo kapaciteto afinitetnih monolitnih diskov CIM z makrocipinom 1.
- 4) Afinitetni monolitni disk CIM z makrocipinom 1 so primerni za izolacijo tarčnih molekul iz kompleksnih vzorcev.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROTEAZE

Proteaze ali proteolitični encimi, ki jih imenujemo tudi proteinaze oziroma peptidaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi (Barrett in McDonald, 1986). Cepitev polipeptidne verige lahko vodi do popolne razgradnje proteinskega substrata na posamezne aminokisline. Do selektivnih cepitev proteinov in njihovih poznejših modifikacij, pa pride v primeru specifične cepitve polipeptidne verige (Sabotič in Kos, 2012).

Proteaze se pojavljajo pri vseh organizmih, vključno z bakterijami, arhejami, protisti, glivami, živalmi in virusi in so nujno potrebne za preživetje (Rawlings, 2010). Prav vsesplošna prisotnost proteaz v organizmih nakazuje izjemno pomembno vlogo v esencialnih metabolnih in regulatornih funkcijah bioloških procesov. Vključene so v različna patološka stanja pri živalih in rastlinah in predstavljajo pomemben virulentni faktor patogenih virusov, bakterij, gliv in parazitov (Sabotič in Kos, 2012).

Pomembna je vloga proteaz v farmacevtski industriji, saj so tarčne molekule zdravil za različne bolezni, pa tudi dodatek med pripravo zdravil, ki se počasi razgrajujejo v telesu (Vandeputte-Rutten in Gros, 2002). Proteaze ponujajo širok nabor uporabe v biotehnologiji. V usnjarski industriji uporabljajo proteaze z elastolitičnimi in keratinolitičnimi lastnostmi. V živilski industriji, mlekarstvu in pekarstvu, pa za pripravo proteinskih hidrolizatov, ojačevalcev okusov, mehčanje mesa in pripravo živil z visoko vsebnostjo beljakovin. Alkalne proteaze so nepogrešljive v industriji detergentov. Proteaze uporabljajo tudi v nekaterih ekoloških in bioremediacijskih procesih (Rao in sod., 1998; Sabotič in sod., 2006; Østergaard in Olsen, 2010).

Proteaze razvrščamo na več načinov. Glede na izvor jih delimo na mikrofone, rastlinske in živalske, glede na mesto delovanja pa na znotrajcelične in zunajcelične. Razdelitev glede na mesto cepitve peptidne vezi določa eksoproteaze, ki cepijo peptidno vez v bližini N ali C konca polipeptidne verige, in endoproteaze, ki cepijo znotraj polipeptidne verige (Barrett, 1977). NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) uvršča proteaze med hidrolaze (EC 3.4) in so razdeljene v 14 razredov. Eksoproteaze so tako razvrščene glede na specifičnost odcepljenega fragmenta polipeptidne molekule. Endoproteaze pa so razvrščene na osnovi katalitskih mehanizmov na serinske, cisteinske, aspartatne, glutamatne, treoninske, metaloproteaze in proteaze z neznanim katalitskim mehanizmom (EC3.4 ..., 2012). Novejša razvrstitev proteaz po klasifikacijskem sistemu MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>), glede na strukturno podobnost

hierarhično razvršča proteaze v družine, ki so razdeljene v več klanov (Rawlings in sod., 2004).

2.1.1 Cisteinske proteaze

Cisteinske proteaze katalizirajo hidrolizo peptidnih, amidnih, esterskih, tiol esterskih in tiona esterskih vezi in so prisotne v vseh živih bitjih. So proteini z molekulsko maso med 21 in 30 kDa. Raziskanih je več kot dvajset družin cisteinskih proteaz, med katerimi so številne (papain, bromelain, fikain, živalski katepsini) industrijsko pomembne in zanimive za farmacevtsko industrijo. Po klasifikaciji MEROPS pripada cisteinskim proteazam 13 klanov in 89 družin (MEROPS ..., 2011). Največja in najbolj raziskana je papainova družina C1, ki spada v klan CA (Rawlings, 2010). Večina cisteinskih proteaz se sintetizira v neaktivni obliki s signalnim peptidom in propeptidom na aminskem koncu, pozneje pa se aktivirajo z vsaj delno avtolizo (Grzonka in sod., 2007).

2.1.1.1 Papainova družina proteaz C1

V družino proteaz C1 spadajo številne bakterijske in virusne proteaze, proteaze arhej, praživali, glivne, rastlinske in živalske proteaze, ki so homologne papainu. V družini je več endoproteaz in nekaj eksoproteaz (MEROPS ..., 2011).

Papain je bil izoliran iz surovega lateksa papaje (*Carica papaya*), ki poleg papaina vsebuje še vsaj tri cisteinske proteaze in druge encime (Balls in sod., 1937). Papain je sestavljen iz 212 aminokislin, povezanih s tremi disulfidnimi mostički, njegova molekulsa masa znaša 23,4 kDa. Je relativno bazičen protein z izoelektrično točko pri pH 8,75. Tridimenzionalna struktura kaže, da je sestavljen iz L-domene z α -vijačnico in D-domene z β nagubano ravnino, med katerima je reža z aktivnim mestom (Grzonka in sod., 2007).

2.1.1.2 Legumainova družina proteaz C13

Družina cisteinskih proteaz C13 (legumainova družina) je del klana CD, kamor spadajo številne bakterijske proteaze, proteaze arhej, praživali, gliv, rastlin in živali. Legumaini so Asn-specifične cisteinske proteaze (Bah in sod., 2006), kar je dokaj nenavadno za proteaze in nakazuje na specifične regulatorne funkcije, ki jih opravljajo legumaini v organizmih. Legumaini so značilni za semena, vakuole in celične stene rastlin. Glede na rastlinsko tkivo iz katerega izhajajo, so razdeljeni v tri glavne skupine. Semenski legumaini se sintetizirajo med razvojem semen, vegetativni v vegetativnih organih,

legumaini iz zgodnje embriogeneze pa se izražajo v sadnem tkivu in kotiledonih (Salas in sod., 2008). Legumaine so prvotno izolirali iz semen stročnice *Vigna aconitifolia* (Kembhavi in sod., 1993), pozneje pa še iz zajedalca *Schistosoma mansoni* (Hara-Nishimura in sod., 1993) in tkiv sesalcev (Chen in sod., 1997). Najvišja specifična aktivnost legumaina pri sesalcih je v placenti in ledvicah (Dando in sod., 1999), prisoten pa je še v vranici, jetrih, testisih in timusu (Chen in sod., 1997).

Sesalčji in rastlinski legumaini so z izjemo ricinusovega vsi glikolizirani in se sintetizirajo kot neaktivni prekurzorji (pro-polipeptidi) z N-končnim signalnim peptidom in zrelim encimom, ki ima propeptida na obeh koncih aminokislinske verige. Prolegumain je usmerjen v lizosome ali rastlinsko vakuolo, kjer se aktivira z avtolizo (MEROPS ..., 2011). Zrele rastlinske legumaine sestavlja ena polipeptidna veriga z molekulsko maso od 33 - 39 kDa (Senyuk in sod., 1998). Najvišjo aktivnost legumainov so z legumain - specifičnimi substrati določili pri pH 4,0 do 6,0 pri višjih pH vrednostih pa legumaini denaturirajo. Cisteinske proteaze družine C13 inhibira jodoacetamid in N-etilendiamid (Rawlings, 2010) pa tudi cistatini C, E/M, F in S (Alvarez – Fernandez in sod., 1999).

2.1.1.3 Fiziološka vloga cisteinskih proteaz

Fiziološke vloge cisteinskih proteaz pri rastlinah so zelo različne. Od sinteze in razgradnje skladničnih proteinov med kalitvijo semen in senescence, do programirane celične smrti. Vključene so v signalne poti, ki vplivajo na metabolne procese, hormonsko signaliziranje, celični cikel, embriogenezo, morfogenezo, razvoj cveta in oksidativni stres (Salas in sod., 2008; Sabotič in Kos, 2012).

Cisteinske proteaze pri živalih so vključene v fiziološke procese, kot so morfogeneza, preoblikovanje in ožiljanje tkiv, razvoj živcev, ovulacija, oploditev in vzdrževanje homeostaze. Pomembne so tudi pri celjenju ran, koagulaciji krvi, imunskem odzivu in vnetju, avtofagiji, staranju celic in številnih bolezenskih stanjih (Otto in Schirmeister, 1997; Lopez-Otin in Bond, 2008; Sabotič in Kos, 2012).

2.2 PROTEAZNI INHIBITORJI

Aktivnost proteaz se lahko uravnava z delno proteolizo neaktivnih prekurzorjev, s spremembo lokacije proteaz, s posttranslacijskimi modifikacijami, s spremembo pH raztopine in z inhibitorji (Rawlings, 2010). Proteazni inhibitorji so molekule, ki inhibirajo aktivnost proteaz in so pomembni regulatorji proteolitične aktivnosti v bioloških procesih (Turk in sod., 1997; Rawlings in sod., 2004).

Starejša delitev proteaznih inhibitorjev je razlikovala inhibitorje serinskih proteaz, inhibitorje cisteinskih proteaz, inhibitorje aspartatnih proteaz in inhibitorje metaloproteaz (Laskowski in sod., 2000). Novejšo razdelitev proteaznih inhibitorjev najdemo v podatkovni bazi MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>), kjer so inhibitorji, podobno kot proteaze razdeljeni v družine na osnovi homologije aminokislinskih zaporedij. Glede na terciarno strukturo proteina so družine razdeljene v klane (Rawlings in sod., 2004).

Proteinski proteazni inhibitorji so prisotni v rastlinskih in živalskih tkivih, mikroorganizmih, glivah in praživalih. Izražajo se zunajcelično in znotrajcelično. Večina endogenih inhibitorjev je kompetitivnih, za katere je značilno, da se del molekule prilega aktivnemu mestu encima in se zato specifično in reverzibilno veže na encim. Vezavi substrata in inhibitorja v aktivno mesto se medsebojno izključujeta. Ker gre za reverzibilno inhibicijo se inhibitorji vežejo na encim, a lahko od njega tudi disociirajo. Encim pa je neaktivен le takrat, ko je reverzibilni inhibitor nanj vezan (Boyer, 2005).

2.2.1 Mikocipini

Glede na strukturne homologije vključujemo med inhibitorje cisteinskih proteaz več cistatinov, stefine, kininogene, (Otto in Schirmeister, 1997), čagazine, mikocipine (Renko in sod., 2010), tiropin, družino sojinega Kunitzovega tripsinskega inhibitorja, stafostatin, ekvistatin in druge proteazne inhibitorje (Dubin, 2005). Mikocipini so glivni inhibitorji cisteinskih proteaz. Po klasifikaciji MEROPS spadajo mikocipini v družini I48 in I85. Družino I85 predstavlja klitocipin, identificiran v gobi *Clitocybe nebularis* (Brzin in sod., 2000; Sabotič in sod., 2009). Makrocipin iz gobe *Macrolepiota procera* pa sodi v družino I48 (Sabotič in sod., 2009). Mikocipini, klitocipin iz družine I48 in makrocipini iz družine I85, imajo beta triperesno zvitje, zato sta obe družini vključeni v klan IC v klasifikaciji MEROPS. Beta triperesno zvitje spominja na drevo, kjer deblo sestavlja šest trakov beta v obliki beta sodčka. Korenine drevesa so zanke, ki od spodaj povezujejo trakove beta, krošnja pa je sestavljena iz treh beta plošč in zvite strukture, ki se povezuje s trakovi beta ki sestavljajo deblo (Renko in sod., 2010).

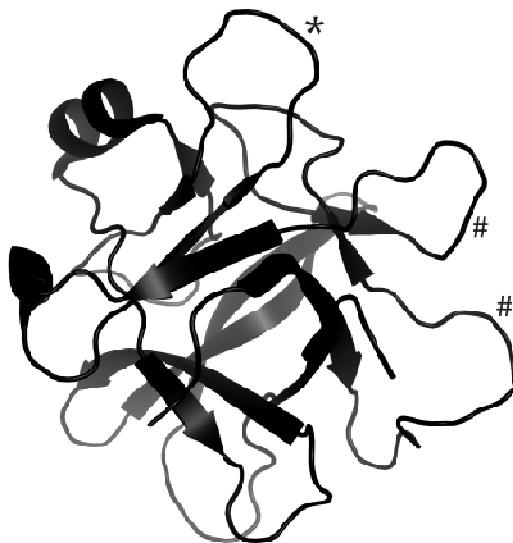
Primerjava zaporedja makrocipinov in klitocipina je pokazala identičnost v samo 20 % aminokislinskega zaporedja (Sabotič, 2007). Glede na podobnost zaporedij so makrocipini razdeljeni v 5 skupin, kjer je identičnost zaporedij znotraj skupin več kot 90 % in med skupinami 75 do 86 % (Sabotič in sod., 2009). Fiziološka vloga makrocipina še ni natančno poznana. Predvidoma sodeluje pri obrambnem odgovoru gob pred plenilskimi žuželkami in parazitskimi mikroorganizmi (Sabotič in sod., 2007; Sabotič in sod., 2009). Mikocipini so manjši, od 16,8 kDa do 20 kDa veliki proteini, ki kažejo izjemno temperaturno stabilnost in so odporni na ekstremne pH (Kidrič in sod.,

2002; Galeša in sod., 2004; Sabotič in sod., 2009). Karakterizacija mikocipinov na genetskem nivoju je pokazala prisotnost genskih družin z visoko variabilnostjo zaporedij (Sabotič in sod., 2009). Pri klitocipinu je variabilnost omejena na določena mesta v zaporedju in ne vpliva na inhibitorno aktivnost, medtem ko kažejo zaporedja makrocipinov večjo raznolikost, kar vpliva tudi na njihov inhibitorni profil (Renko in sod., 2010).

Mikocipini močno inhibirajo različne družine peptidaz, vključno s številnimi papainu podobnimi cisteinskimi proteazami (družina C1) kot so papain in katepsini L, V, S. Slabše inhibirajo katepsin B in H. Serinsko proteazo tripsin (družina S1) izmed štirih poznanih mikocipinov inhibira le makrocipin 4. Mikocipini (klitocipin, makrocipin 1 in 3) inhibirajo tudi legumain (družina C13), pri čemer je za to odgovorno drugo inhibitorno reaktivno mesto kot za inhibicijo papainu podobnih cisteinskih proteaz (Sabotič in sod., 2007; Sabotič in sod., 2009; Renko in sod., 2010).

2.2.1.1 Makrocipin 1

Makrocipin 1 je inhibitor cisteinskih proteaz, ki je bil izoliran iz trošnjakov orjaškega dežnika (*Macrolepiota procera*) in okarakteriziran na biokemijskem in genetskem nivoju. Makrocipinu 1 so določili aminokislinsko zaporedje iz 167 aminokislinskih ostankov ter molekulsko maso okrog 19 kDa. Analiza očiščenega proteina na poliakrilamidni gelski elektroforezi kaže liso z molekulsko maso 21 kDa in izoelektrično točko pri pH 4,8. Makrocipin 1 močno inhibira papain in katepsine L in V, slabše pa inhibira legumain, katepsin S, K, B in H (Sabotič in sod., 2009). Določitev kristalne strukture in mutageneza makrocipinov je omogočila določitev reaktivnih mest inhibitorjev (slika 1) odgovornih za inhibicijo proteaz iz družine C1 in proteaz iz družine C13 (Renko in sod., 2010)



Slika 1: Struktura makrocipina 1 (Sabotič in sod., 2012: 309)

Z # sta označeni zanki, ki sodelujeta pri inhibiciji papainu podobnih proteaz (družina C1). Z * je označena zanka, ki sodeluje pri inhibiciji legumaina (družina C13).

2.3 INSEKTICIDNI UČINKI MIKOCIPINOV

Proteazni inhibitorji so zanimivi za zaščito rastlin pred različnimi biotskimi in abiotiskimi stresi. Žuželke, ki se hranijo z rastlinami, so odvisne od učinkovite razgradnje zaužitih proteinov, ki jih potrebujejo za normalno rast in razvoj (Bolter in Jongsma, 1997). Uporaba proteaznih inhibitorjev, ki preprečujejo razgradnjo proteinov v hrani, je eden izmed možnih načinov za zaščito rastlin pred različnimi škodljivci (Murdock in sod., 1987).

Koloradski hrošč (*Leptinotarsa decemlineata*) je uničajoč škodljivec rastlin krompirja in povzroča veliko škode v kmetijstvu. Najpogostejsi način za zatiranje koloradskih hroščev je uporaba kemičnih insekticidov, vendar hrošči nanje hitro razvijejo odpornost. Biotehniški pristop, kot je izražanje proteaznih inhibitorjev v genetsko modificiranih rastlinah (Haq in sod., 2004) in uporaba interferenčne RNA (Baum in sod., 2007) je alternativa uporabi insekticidov. Ključno pri iskanju novih rešitev za zatiranje koloradskega hrošča je natančno poznавanje delovanja njihovega metabolizma. Znano je, da glavnino proteolitične aktivnosti v prebavilih koloradskega hrošča predstavljajo cisteinske proteaze, prisotne pa so še aspartatne proteaze, serinske proteaze in metaloproteaze (Wolfson in Murdock, 1990). Z dodatkom inhibitorjev v hrano žuželk se lahko upočasni rast in razvoj ličink, zmanjša se plodnost, v nekaterih primerih pa poveča umrljivost žuželk (Murdock in sod., 1987; Bolter in Latoszek-Green, 1997).

Žuželke s poškodbo listov sprožijo obrambni odgovor rastline, ki se med drugim kaže v indukciji in povečani sintezi proteaznih inhibitorjev. Žuželke se na povečano produkcijo inhibitorjev odzovejo s sintezo »adaptivnih« prebavnih proteaz, ki so na te inhibitorje neobčutljive. Prilagoditev žuželk na proteazne inhibitorje v hrani omogoča normalen razvoj in rast žuželk (Jongsma in sod., 1995).

Raziskovalci so koloradske hrošče hrани s krompirjevimi listi s povečanimi koncentracijami endogenih rastlinskih proteaznih inhibitorjev. Opazili so, da so se posledično v prebavilih koloradskih hroščev sintetizirale cisteinske prebavne proteaze, ki so neobčutljive na rastlinske inhibitorje (Jongsma in Bolter, 1997). Iz prebavil adaptiranih koloradskih hroščev so izolirali cisteinske proteaze, ki so jih poimenovali intestaini (Gruden in sod., 2003).

Proteazne inhibitorje iz različnih rastlinskih in živalskih virov so bolj ali manj uspešno uporabili v transgenih rastlinah, odpornih na objedanje ličink koloradskega hrošča (Sabotič in Kos, 2012). V bioloških poskusih so hrani ličinke koloradskega hrošča s hrano z dodatkom rekombinantnega in naravnega klitocipina (Clt) in opazovali kakšen učinek ima na smrtnost in pridobivanje teže ličink. Dodatek klitocipina je negativno vplival na rast in razvoj ličink v odvisnosti od koncentracije inhibitorja in starosti ličink. Klitocipin v hrani ni povečal smrtnosti ličink, razen če je bila koncentracija zelo visoka, medtem ko se negativen vpliv na pridobivanje teže pojavi tudi pri nižji koncentraciji (Sabotič, 2007). Podoben učinek so pokazali tudi pri prehranjevalnih testih z makrocipinom 1.

2.4 KROMATOGRAFSKE METODE

Kromatografija je skupno ime za tehnike ločevanja komponent zmesi. Osnova za ločevanje je porazdelitev posamezne snovi (topljenca) med tekočo (mobilno) in stacionarno (trdno) fazo. Ločevanje je posledica vezave na stacionarno fazo oziroma posledica razlik v topnosti topljenca. Mobilna faza kromatografskega sistema je tekočina ali plin, ki se giblje skozi trdno ali tekočo stacionarno fazo. Kromatografske tehnike se uporablja za separacijo poljubnih količin snovi, za preparativne in analizne namene (Kregar, 1996; Wilson in Walker, 2005; Lunder, 2007). Poznamo več vrst kromatografij, ki se razlikujejo po principih ločevanja (preglednica 1).

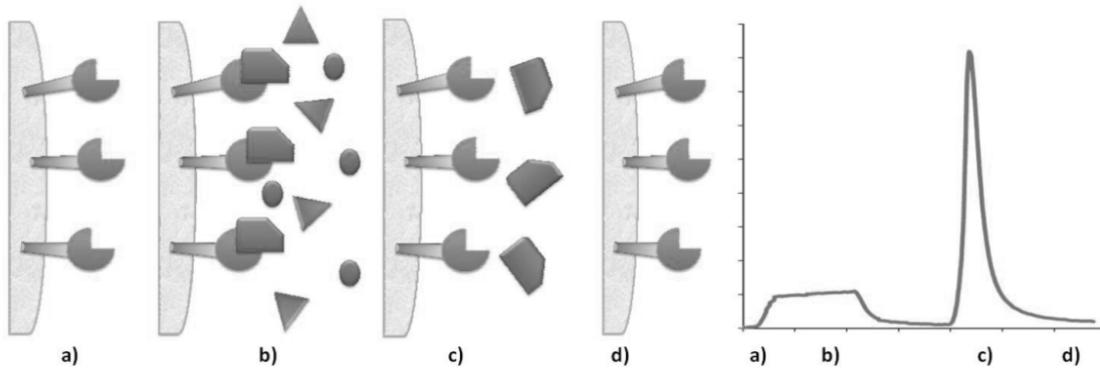
Preglednica 1: Vrste kromatografij glede na interakcije med stacionarno fazo in komponentami vzorca (Kregar, 1996; Lunder, 2007)

Vrsta kromatografije	Princip ločevanja
Adsorpcijska kromatografija	Snovi se razlikujejo glede na moč adsorpcije na stacionarno fazo. Desorbcaja poteka z mobilno fazo.
Porazdelitvena kromatografija	Porazdelitev med stacionarno in mobilno fazo poteka na osnovi razlik v topnosti.
Ionsko izmenjevalna kromatografija	Osnova za ločevanje so elektrostatske interakcije med molekulami v mobilni fazi in nabitimi skupinami stacionarne faze.
Izločitvena kromatografija	Ločevanje poteka na osnovi velikosti molekul (gelska kromatografija).
Afinitetna kromatografija	Razlike v biološki afiniteti do liganda, ki je imobiliziran na stacionarno fazo.

2.5 AFINITETNA KROMATOGRAFIJA

Afinitetna kromatografija je kromatografska tehnika, ki izrablja edinstveno lastnost bioloških molekul, da specifično in reverzibilno vežejo komplementarne substance. Pri tem je biološka molekula imobilizirana na trdno, porozno, inertno podlago ali nosilec (Cuatrecasas, 1970). Afinitetna kromatografija je izjemno učinkovito orodje za visoko selektivno ločevanje antigenov, protiteles, encimov, sladkorjev, glikoproteinov in glikolipidov, imunoglobulinov, peptidov s sposobnostjo vezave kovin in nukleotidov (Hage, 2006; Mallik in Hage, 2006).

Terminologija v afinitetni kromatografiji določa molekulo, ki je kovalentno ali s fizično adsorpcijo imobilizirana na stacionarno fazo kot afinitetni ligand (Cuatrecasas in sod., 1968). Ligand je lahko imobiliziran protein ali encim, zaporedje DNA oziroma RNA, lektin, aminokislina, imunoglobulin, biomimetično barvilo, encimski substrat ali inhibitor ali majhna molekula (Hage, 2006; Healthcare, 2007). Tarčne molekule se v mobilni fazi oziroma pufru nanesajo na kolono z netopnimi polimernimi delci (slika 2). Sestava pufra je navadno določena tako, da omogoča optimalno vezavo med imobiliziranim ligandom in tarčno molekulo, medtem ko ostale molekule iz vzorca zapustijo kolono z nizkim zadrževalnim časom (Mallik in Hage, 2006).



a) Uravnoteženje stacionarne faze v veznem pufru. b) Nanos vzorca na kolono. Tarčne molekule se specifično reverzibilno vežejo na ligand. Nespecifično vezane molekule se sperejo z veznim pufrom. c) Izpiranje s specifično kompeticijo za vezna mesta na ligandu ali z nespecifično spremembou v sestavi pufra sprosti specifično vezane molekule v elucijski pufer. d) Stacionarna faza je ponovno uravnotežena v veznem pufru. Desno: grafični prikaz tipičnega elucijskega diagrama.

Interakcije med ligandom in tarčno molekulo v vzorcu so lahko posledica elektrostatskih ali hidrofobnih interakcij, van der Wallsovih sil ali vodikovih vezi. Zadržane tarčne molekule je mogoče izprati na več načinov:

- Tarčne molekule z zmerno afiniteto za ligand se lahko izpere v izokratskih pogojih, kjer se sestava mobilne faze ne spreminja med izpiranjem.
- Tarčne molekule z močno afiniteto za ligand se izperejo s spremembou mobilne faze ali pogojev na koloni. V večini primerov se nevezni pufer od veznega pufra razlikuje v ionski moči, pH, temperaturi ali polarnosti.
- Pufru z enakim pH, ionsko močjo in temperaturo dodamo kompetitivne molekule, kar sproži biospecifično izpiranje molekul. Kompetitivne molekule se specifično vežejo na zadržano tarčno molekulo ali na imobiliziran ligand in povzročijo izpiranje (Wilson in Walker, 2005; Tetala in van Beek, 2010).

2.5.1 Kromatografski nosilci

Glavna vloga kromatografskega nosilca v afinitetni kromatografiji je imobilizacija liganda (Hage, 2006). Nosilec je material, na katerega lahko kovalentno vežemo biološko specifičen ligand in je netopen v sistemu, kjer je prisotna tarčna molekula (Hermanson in sod., 1992). Glavne značilnosti nosilca so: velika specifična površina, visoka rigidnost in ustrezna oblika delcev, hidrofilnost in prepustnost. Velikost delcev in poroznost sta oblikovani tako, da maksimirata površino primerno za vezavo liganda.

Nosilci v klasični afinitetni kromatografiji, kjer se uporablja nižje pretoke, so netrdni delci z velikimi premeri, kot so agarosa, organski polimer poliuretan in anorganski silika delci z velikim premerom (Hage, 2006). Adsorpcijske zmožnosti teh delcev so omejene s počasno difuzijo biomolekul skozi nosilec, z nizkimi osnimi hitrostmi in večim pritiskom pri manjših delcih. Posledično je dostop večjih molekul do manjših por omejen. Dobre pretočne lastnosti so zaželene za hitro separacijo, saj prihranijo čas, potreben za uravnoteženje, regeneracijo in čiščenje kolone (Champagne in sod., 2007).

Afinitetni nosilci iz trdnejših materialov so primerni za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti – HPLC (»High Performance Liquid Chromatography«) (Hage, 2006). V primerjavi s kromatografijo, ki poteka pri nizkih pretokih, je uporaba HPLC izboljšava tehnike, kjer se mobilna faza pri visokem pritisku pospešeno pretaka skozi kromatografske kolone, v nasprotju s pretakanjem (kapljanjem) pod vplivom gravitacije. Nadaljnji izpopolnitvi pri sistemu HPLC sta tudi izjemno občutljiv detekcijski sistem in popolna avtomatizacija procesa. Razvoj bolj odpornih stacionarnih faz, ki omogočajo hitrejše ločevanje in boljšo resolucijo pojasnjuje vsestransko uporabo sistemov HPLC pri afinitetni kromatografiji (Wilson in Walker, 2005).

Univerzalnega nosilca, ki bi zadovoljil vsem zahtevam ni, so pa tržno dostopni nosilci dobro definirani in se približujejo idealnim. Ti naj bi na površini zagotavljal primerne lastnosti za imobilizacijo afinitetnih ligandov in kemijsko stabilnost za imobilizacijo, adsorpcijo, desorpcijo in regeneracijo (Champagne in sod., 2007). Za nosilce ja zaželena odpornost na termične, mehanske, kemijske in fizikalne spremembe ter odpornost za vezavo mikrobov in encimov na površino (Tetala in van Beek, 2010).

2.5.1.1 Naravni nosilci

Naravni polisaharidi, kot sta agarosa in celuloza zahtevajo kemijsko procesiranje oziroma modifikacijo pred pripravo afinitetne kromatografije (Hermanson in sod., 1992). Za klasično kromatografijo se najpogosteje uporablja modificirana agarosa v obliki kroglic, s tržnim imenom Sefaroza (GE Healthcare). Sefaroza je nenabit, hidrofilen nosilec, bogat s hidroksilnimi skupinami, ki so primerne za kovalentno vezavo ligandov (Affinity ..., 2012). Ločevanje na Sefarozu je učinkovito predvsem za velike tarčne molekule, kot so proteini ali polisaharidi (Hermanson in sod., 1992).

2.5.1.2 Sintetični nosilci

Sintetični nosilci, kot so akrilamidni derivati, metakrilatni derivati, polistiren in njegovi derivati in različne membrane, so narejeni s polimerizacijo funkcionalnih monomerov.

Komercialno dostopni sintetični materiali imajo boljšo fizikalno in kemijsko stabilnost in lahko prenesejo zahtevnejše pogoje separacije v primerjavi z naravnimi polisaharidnimi geli. Sintetični nosilci so narejeni iz monomerov s primarno in sekundarno hidroksilno skupino, ki vzdržuje hidrofilnost in je kompatibilna z večino veznih metod (Hermanson in sod., 1992).

2.5.2 Imobilizacija ligandov

Imobilizacija je omejitev premikanja proteina, biomolekule ali cele celice tako, da lahko izkoriščamo njihovo biološko aktivnost. Kovalentna imobilizacija pripomore k boljši aktivnosti biomolekule, zmanjšanju nespecifičnih adsorpcij in k večji stabilnosti (Wilson in Walker, 2005). V afinitetni kromatografiji je na nosilec vezana molekula ligand, ki reverzibilno veže specifično molekulo in s tem omogoča ločevanje (Affinity ..., 2012). Primeren ligand zagotavlja visoko selektivnost, dobro resolucijo in visoko kapaciteto afinitetne kromatografije. Pogoj za uspešno afinitetno ločitev je biospecifični ligand, ki kljub kovalentni vezavi na trdni nosilec ohrani specifično vezno afiniteto za tarčne molekule. Vez med ligandom in tarčno molekulo mora biti reverzibilna, da omogoča tarčni molekuli elucijo v aktivni obliki. Najpogostejši afinitetni ligandi so protitelesa, antigeni, inhibitorji, tirazinska barvila in metalo-kelati (Hermanson in sod., 1992; Turkova, 1993; Wilson in Walker, 2005; Mallik in Hage, 2006).

Funkcionalne skupine liganda so glavni kriterij za izbor afinitetnega liganda pri izolaciji tarčnega proteina. Funkcionalna skupina liganda ne sme biti vključena v vezno mesto liganda za komplementarno tarčno molekulo, obenem pa mora omogočati vezavo liganda na stacionarno fazo oziroma nosilec (Wilson in Walker, 2005). Najpogostejše funkcionalne skupine, ki to omogočajo so: amino skupine (- NH₂), karboksilne (- COOH), tiolne (- SH), hidroksilne (- OH) in aldehidne (- CHO) skupine (Affinity ..., 2012).

Za učinkovito afinitetno kromatografijo je priporočena ravnotežna disociacijska konstanta K_D med ligandom in tarčno molekulo med 10^{-4} do 10^{-8} M. Ko je disociacijska konstanta znotraj te vrednosti, se lahko poslužujemo različnih metod elucije, s katerimi uspešno izvedemo afinitetno kromatografijo (Affinity ..., 2012).

Ligande v biospecifični kromatografiji lahko razdelimo na monospecifične ligande in ligande, ki so specifični za skupine molekul. Monospecifični ligandi so tisti, ki vežejo eno samo molekulo, na primer monoklonsko protitelo na protein. Asociacijska konstanta monospecifičnega liganda za tarčno molekulo je v tem primeru višja kot za ostale molekule, ki se vežejo šibkeje ali se sploh ne vežejo. Ligandi, ki so specifični za skupine molekul, imajo višjo afiniteto za skupine molekul kot za posamezne molekule. Specifičnost je posledica selektivnosti liganda in izbire elucijskih pogojev (Miller,

2005; Affinity ..., 2012). Poznani so številni pristopi za vezavo ligandov na kromatografske nosilce, ki vključujejo različne kovalentne imobilizacijske metode, vezavo z nizkomolekularnimi ročicami, kot tudi biospecifično adsorpcijo in zamreženje. Kovalentna vezava je najbolj zaželena, saj preprečuje desorpcijo in združuje visoko selektivnost reakcije s kemijskimi in mehanskimi lastnostmi nosilca (Benčina in sod., 2004).

2.6 AFINITETNA MONOLITNA KROMATOGRAFIJA

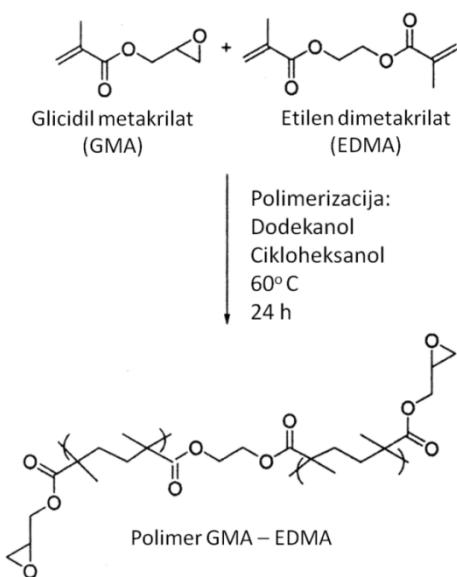
Uporaba selektivnih afinitetnih ligandov na monolitnih stacionarnih fazah je novejša metoda, ki jo poznamo pod imenom afinitetna monolitna kromatografija (Mallik in Hage, 2006). V nasprotju z delčnimi kolonami so monoliti kontinuirani nosilci, ki imajo višjo poroznost. Posledica je večja prepustnost in manjši povratni tlak (Ikegami in Tanaka, 2004). Tudi monolitne nosilce lahko razdelimo v polimerne monolite (organske) in silika monolite (anorganske). Razvoj polimernih monolitov se je začel okrog leta 1980 in nadaljeval vzporedno z razvojem silika monolitov od leta 1990 dalje. Na splošno monoliti vsebujejo pretočne in difuzijske pore ali tako imenovane mikro in mezo pore (Wang, 2010). Poroznost, geometrija in velikost por monolitov, pri določenih pogojih omogočajo ločevanje pri nižjem tlaku. Posledično je možno obratovanje pri višjih pretokih, kar skrajša čas ločevanja in ne vpliva na ločevalne sposobnosti (Barut in sod., 2008).

Monoliti so enostavni za modifikacijo in imobilizacijo različnih ligandov. V primerjavi z delčnimi kolonami monoliti učinkoviteje ločujejo molekule, kar se kaže v ožjih vrhovih elucijskega diagrama (Mallik in Hage, 2006; Wang, 2010). Monoliti so lahko oblikovani v različne oblike in narejeni iz različnih materialov. Trendi v monolitni afinitetni kromatografiji trenutno vodijo v razvoj monolitov iz agaroze, silika gela, kriogela in predvsem monolitov glicidil metakrilat - etilen dimetakrilat (GMA – EDMA) (Mallik in Hage, 2006; Wang, 2010), ki so opisani v nadaljevanju.

2.6.1 Monolitni disk CIM

Za afinitetno monolitno kromatografijo se najpogosteje uporablja monolitne nosilce, zasnovane na kopolimerizaciji glicidil metakrilata (GMA) in etilen dimetakrilata (EDMA), ki so pogosto poimenovani monoliti GMA - EDMA (Wang, 2010). Pripravljeni so s kopolimerizacijo funkcionalnega monomera GMA in zamreževalnim monomerom EDMA v prisotnosti porogena, ki je navadno mešanica dodekanola in cikloheksanola (slika 3). Ob segrevanju je dodan še iniciator polimerizacije. Mešanica je oblikovana v poljubno obliko (disk ali kolona) in zatem polimerizira od 8 do 24 h, pri določeni temperaturi. Po polimerizaciji je monolit odstranjen iz kalupa in vstavljen v

posebno ohišje, ki omogoča spiranje organskih topil in reagentov, ki so ostali po polimerizaciji (Podgornik in Štrancar, 2005; Mallik in Hage, 2006; Wang, 2010). Takšen tip materiala je tudi sestavni del komercialno dostopnih monolitov, poimenovanih CIM® (»Convective Interaction Media«), ki jih proizvaja podjetje BIA Separations.



Slika 3: Sinteza monolitnega nosilca GMA – EDMA (Mallik in Hage, 2006: 1960)

V primerjavi s tradicionalnimi kromatografskimi sistemi so prednosti monolitnih sistemov CIM pri ločevanju in koncentriranju velikih bioloških molekul in virusov, naslednje: boljši masni prenos, enostavna uporaba, zmožnost priprave širokega nabora velikosti por in oblik, enostaven prenos v večje in manjše merilo (angl.: scale-up in scale-down), nizek povratni tlak tudi pri zelo visokih volumskih pretokih brez izgube učinkovitosti in specifičnosti (Podgornik in Štrancar, 2005; Mallik in Hage, 2006). Izjemen potencial za imobilizacijo ligandov na monolite je privedel do uporabe te tehnologije v analitske in preparativne namene (Švec in sod., 2003; Champagne in sod., 2007; Brne in sod., 2009). Monoliti GMA - EDMA imajo na celotni površini proste epoksi skupine, ki omogočajo direktno imobilizacijo številnih ligandov v enem samem koraku (Švec in sod., 2003).

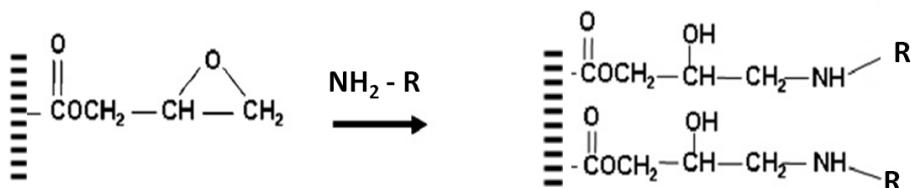
2.6.2 Imobilizacija ligandov na monolitne diske CIM

Pred imobilizacijo liganda je potrebno nosilec kemijsko aktivirati, da nastanejo reaktivne skupine, na katere se veže ligand. Primerno aktivacijo izberemo glede na kemijsko strukturo liganda in pripomore k stabilnejši vezi liganda na nosilec, zmanjša

nespecifične interakcije z nosilcem in ob tem ne spremeni specifičnih lastnosti liganda (Wilson in Walker, 2005). Najpogosteje metode aktivacije so aktivacije s cianobromidom, bis-epoksidom, N'N'-disubstituiranim karbodiamidom, sulfonil kloridom, natrijevim perjodatom, N-hidroksi sukcinimidnim estrom, bisoksiranom, diamini, hidrazini in z reduktivno aminacijo (Hermanson in sod., 1992). V nadaljevanju so predstavljene metode aktivacije, ki so pogoste za imobilizacijo ligandov na monolitne diske in smo jih uporabili za diplomsko delo.

2.6.2.1 Imobilizacija na skupine epoksi

Imobilizacija na skupine epoksi (slika 4) vključuje nukleofilni napad epoksi skupine na nosilcu z amino skupino na ligandu, kar vodi v nastanek stabilne sekundarne aminske vezi (Švec in sod., 2003). Glede na reakcijske pogoje je metoda primerna za imobilizacijo ligandov z aminskimi, sulfhidrilnimi in hidroksilnimi skupinami (Hage, 2006).

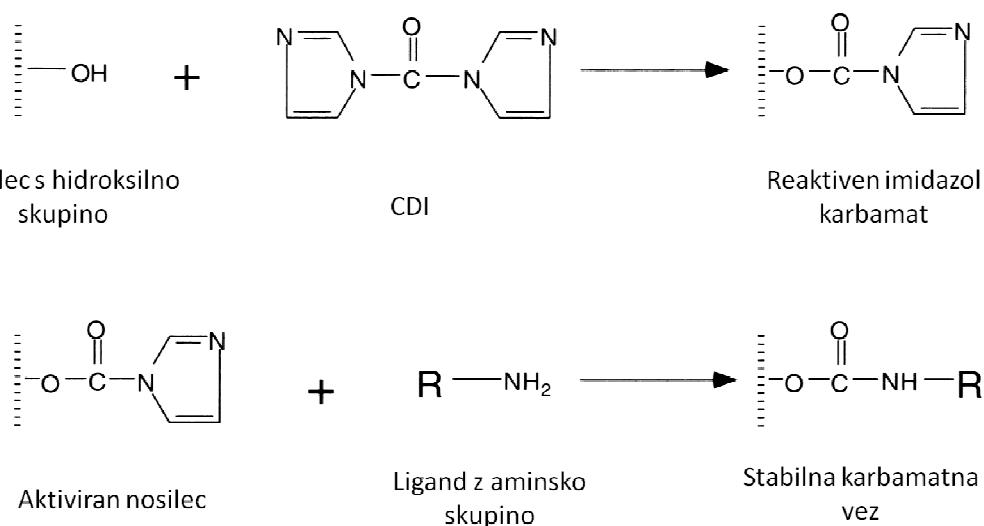


Slika 4: Imobilizacija liganda na skupine epoksi (Nicoli in sod., 2008: 2696)

Nastanek stabilne sekundarne aminske vezi med epoksi skupino na nosilcu in amino skupino na ligandu.

2.6.2.2 Aktivacija s karbonildiimidazolom

Proces aktivacije pri monolitnih diskih GMA - EDMA se začne s preoblikovanjem epoksi skupin v diolne skupine. Te skupine kasneje reagirajo z 1,1'karbonildiimidazolom (CDI) in nastanejo imidazolkarbamatne skupine (slika 5). Tako aktiviran nosilec je primeren za imobilizacijo ligandov s karbamato vezjo, med aktiviranim mestom na nosilcu in primarnim aminom na ligandu (Mallik in Hage, 2006).



Slika 5: Aktivacija nosilca s karbonildiimidazolom (Hermanson in sod., 1992: 66)

Prikaz aktivacije nosilca s karbonildiimidazolom in nastanek stabilne karbamatne vezi med aktiviranim nosilcem in ligandom s prosto aminsko skupino.

2.6.3 Imobilizacija ligandov z ročicami

Uporaba nizkomolekularnih ročic ali distančnikov (ang. »molecular spacer«) je pogosta pri vezavi afinitetnih ligandov na trdne nosilce. Aktivna mesta na ligandu so tako bolj dostopna za tarčne molekule v vzorcu (Cuatrecasas in sod., 1968). Ročice hkrati zmanjšajo sterične interference in preprečijo nespecifične vezave na nosilec med kromatografijo (Hermanson in sod., 1992; Ponomareva in sod., 2010).

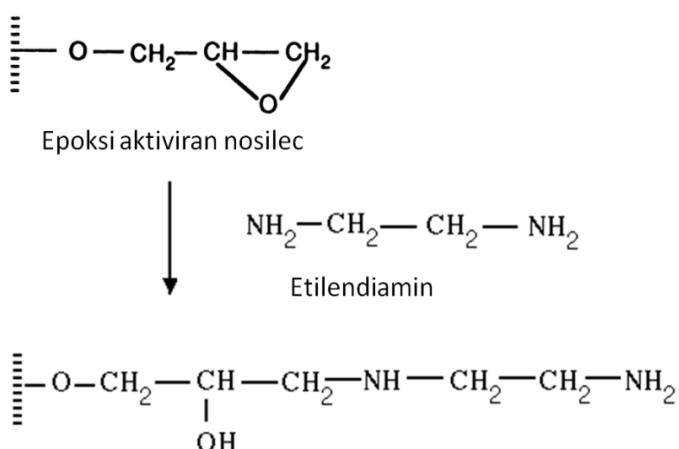
Ročice so molekule z nizko molekularno maso, ki so postavljene med ligand in trdni nosilec. Navadno so linearne ogljikovodikove molekule s funkcionalnimi skupinami za enostavno vezavo na obeh koncih. Eden izmed dveh koncov je imobiliziran na nosilec s primarnim mehanizmom vezave, drugi konec pa je vezan na ligand s sekundarnim mehanizmom vezave. Z ročico imobiliziran ligand stoji stran od površine nosilca na razdalji, ki jo določa dolžina izbrane ročice (Hermanson in sod., 1992; Hage, 2006).

Pri sintezi ročic si želimo izogniti zamreženju polimera, do katerega pride zaradi kovalentnih vezi med molekulami. Ročice namreč vsebujejo reaktivne konce za specifične funkcionalne skupine na proteinih ali drugih molekulah in se lahko povežejo med seboj in tako onemogočajo vezavo liganda in močno zmanjšajo prepustnost polimera (Švec in sod., 2003; Crosslinking ..., 2009). Pri izbiri ročice je potrebno upoštevati tudi hidrofilnost oziroma hidrofobnost ročice in liganda. Hidrofilne so ročice s karbonilnimi in imido skupinami, popolnoma hidrofobne pa so ročice z metilenskimi skupinami (Wilson in Walker, 2005). Komercialno je dostopnih več agaroznih,

celuloznih in poliakrilamidnih nosilcev s širokim izborom ročic in z vezanimi ligandi (Affinity ..., 2012; CIM disk ..., 2012).

2.6.3.1 Sinteza ročice z etilendiaminom

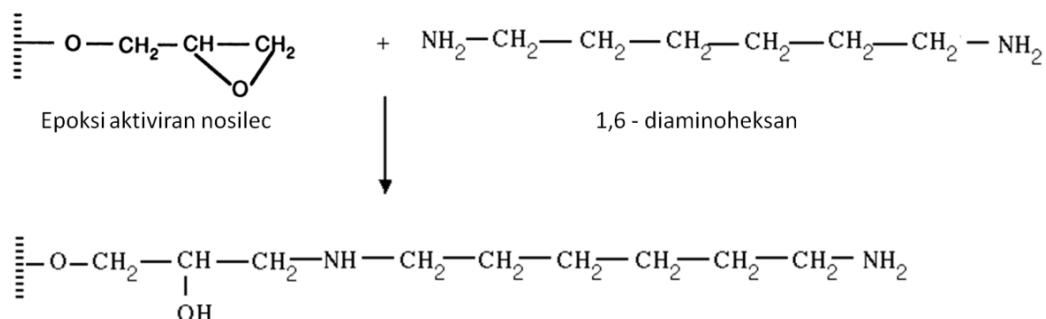
Pri reakciji epoksi skupin z etilendiaminom dobimo nosilec s prostimi primarnimi amino skupinami. V reakciji s karbonilnimi in epoksi skupinami nastane kratka ročica iz dveh C atomov, ki ne povzroča steričnih ovir ali dodatnega zamreženja (Hermanson in sod., 1992; Nicoli in sod., 2008). Reakcijo med epoksi skupino in etilendiaminom prikazuje slika 6.



Slika 6: Sinteza ročice z etilendiaminom (Hermanson in sod., 1992: 72)

2.6.3.2 Sinteza ročice z 1,6 - diaminoheksanom

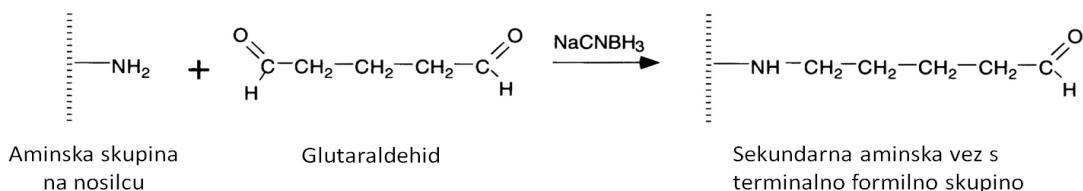
Pri reakciji nosilca z 1,6 - diaminoheksanom dobimo podoben rezultat kot pri reakciji nosilca z etilendiaminom - proste primarne amino skupine na 6 C atomov dolgi, hidrofobni ročici (slika 7). Zaradi dolžine ročice obstaja večja verjetnost, da se terminalna konca molekule vežeta na nosilec, kar povzroči zamreženje in izgubo aktivnih veznih mest. Ročica je primerna za imobilizacijo manjših ligandov (Podgornik, 1998).



Slika 7: Sinteza ročice z 1,6 - diaminoheksanom (Hermanson in sod., 1992: 96)

2.6.3.3 Sinteza ročice z glutaraldehidom

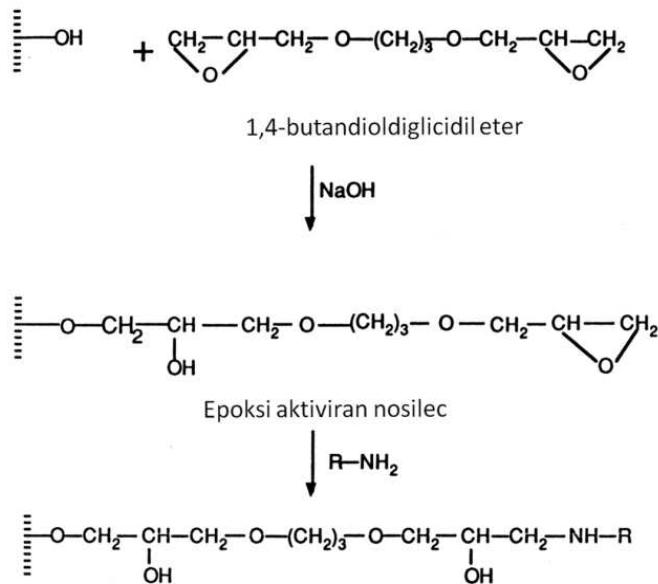
Aktivacijo z glutaraldehidom uporabimo, ko imamo na nosilcu amino skupino in želimo immobilizirati ligand prav tako prek amino skupine. Aldehydna skupina glutaraldehida reagira z amino skupino na nosilcu in nastane Schiffova baza. Z močnim reducentom, kot je natrijev cianoborohidrid (NaBH_3CN), Schiffovo bazo reduciramo in stabiliziramo v kovalentno vez med glutaraldehidom in nosilcem (slika 8). Ročica s petimi ogljikovimi atomi ima prosto aldehydno skupino za vezavo liganda prek amino skupine.



Slika 8: Sinteza ročice z glutaraldehidom (Hermanson in sod., 1992: 78)

2.6.3.4 Sinteza ročice z 1,4-butandiol diglicidil etrom

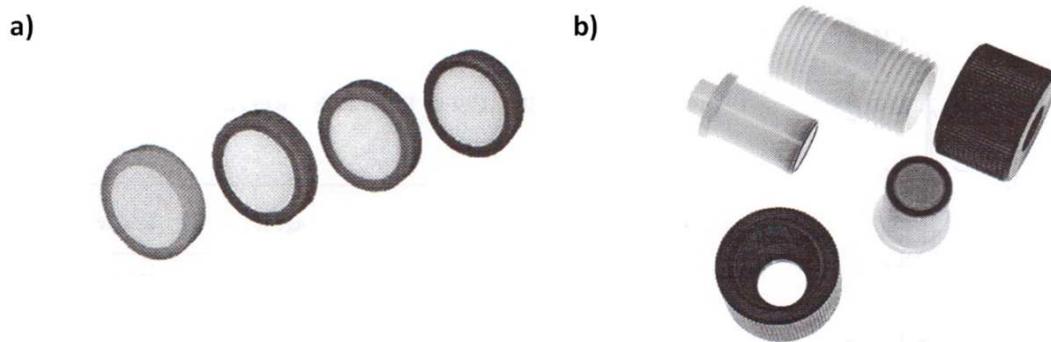
1,4-butandiol diglicidil eter je pogost reagent za oblikovanje ročic za vezavo z aminskim koncem liganda. Daljša hidrofilna ročica nastane z vezavo enega konca 1,4-butandiol diglicidil etra na hidroliziran nosilec s stabilno estersko vezjo (slika 9). Druga terminalna epoksi skupina, lahko reagira z amino, hidroksilnimi ali tiolnimi skupinami liganda. Ker je ročica dolga, lahko pride do dodatnega zamreženja nosilca (Podgornik, 1998).



Slika 9: Sinteza ročice z 1,4-butandiol diglicidil etrom (Hermanson in sod., 1992: 104)

2.6.4 Postopek separacije z monolitnimi diskami CIM

Separacija molekul z monolitnimi diskami CIM (slika 10) poteka z uporabo sistema HPLC in posebnega ohišja (slika 10), v katerega je vstavljen monolitni disk. Monolitne diske CIM se večinoma uporablja za gradientno ločevanje molekul, zato mora imeti sistem HPLC vsaj dve črpalki za mobilne faze, povezani s kapilarimi do mešalne komore in injektorja. Vzorec se na monolitni disk nanaša prek zanke z določenim volumenom. Količino izpranih molekul zazna detektor, povezan z operacijskimi sistemom. Pri kromatografiji z monolitnimi kolonami CIM se uporablja kapilare z notranjim premerom manjšim od 0,5 mm. Prednost monolitnih diskov CIM je izjemno hitro ločevanje, ki lahko traja samo nekaj minut, pri pretoku do 10 ml/min in pri povratnem tlaku nižjem od 5 MPa. Ko je ohišje z diskom CIM povezano s sistemom HPLC, je potrebno disk uravnotežiti v vezni mobilni fazi (vsaj 5x volumen kolone), da se odstranijo nečistoče in zračni mehurčki, ki bi lahko vplivali na ločevanje. Sledi izpiranje vezanih komponent in nečistoč z elucijsko mobilno fazo (vsaj 5x volumen kolone) in spet uravnoteženje v vezni mobilni fazi. Po uravnoteženju je monolitna kolona CIM pripravljena za nanašanje vzorca (CIM disk ..., 2012).

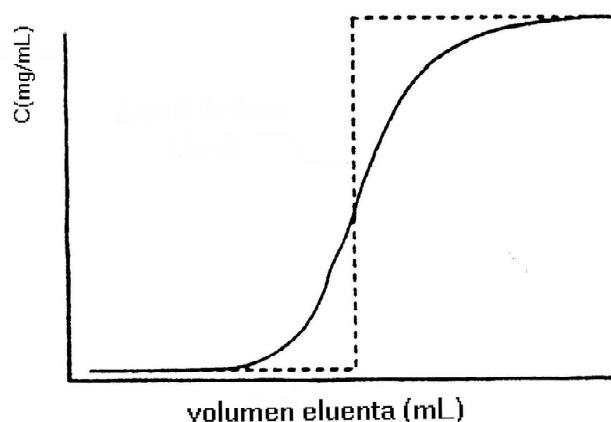


Slika 10: Monolitni disk CIM (Švec in sod., 2003: 53)
Monolitni disk CIM (a) in ohišje za monolitne diske CIM (b).

2.6.5 Karakterizacija monolitnih diskov CIM

2.6.5.1 Določanje dinamične kapacitete

Pomemben parameter ločevanja, je kapaciteta kromatografskega nosilca za tarčno molekulo. Dinamično kapaciteto monolitnih diskov CIM določamo iz prebojne krivulje (slika 11), ko prek afinitetnega diska črpamo raztopino z znano koncentracijo tarčne molekule.



Slika 11: Prebojna krivulja (Podgornik, 1998: 24)

Tarčne molekule se adsorbirajo na aktivno površino stacionarne faze in koncentracija izpranih tarčnih molekul v nevezni frakciji je v idealnem primeru enaka nič. Ko se prek kromatografske kolone prečrpa dovolj raztopine, da je večina aktivnih mest zasedenih,

se tarčne molekule ne morejo več vezati na ligand, kar zazna spektrofotometrični detektor kot povečanje signala. Po določenem času ni več prostih veznih mest in hitrost adsorpcije tarčnih molekul na ligand postane enaka hitrosti desorpcije. Vzpostavi se dinamično ravnotežje in signal detektorja postane konstanten. Dinamično kapaciteto določimo tako, da pri določenem odstotku maksimalne vrednosti signala (v našem primeru pri 50 %) izračunamo maso tarčnih molekul, ki so se vezale na volumen nosilca. Zaželeno je, da so prebojne krivulje čim bolj strme in brez dvojnih prevojev, saj ti kažejo na nepravilnost v tokovnem profilu. Dinamična kapaciteta je odvisna od različnih kromatografskih parametrov; pH mobilne faze, ionske jakosti mobilne faze, temperature mobilne faze in vrste vzorca, pa tudi od linearne hitrosti mobilne faze skozi nosilec (Afeyan in sod., 1990; Podgornik, 1998).

2.7 UPORABA AFINITETNE MONOLITNE KROMATOGRAFIJE

Monolitni disk CIM se uporabljam za hitro ločevanje proteinov v separacijskih procesih, ki izkoriščajo afiniteto molekul, hidrofobne interakcije in izmenjavo ionov. Z monolitnimi diskimi CIM se lahko ločuje in koncentrira nukleinske kisline, peptide, proteine, rekombinantne proteine, monoklonska protitelesa, encime, nanodelce, plazmidno in genomsko DNK do velikosti 200 kDa, viruse in virusne delce (Vodopivec in sod., 2003; Benčina in sod., 2004; Barut in sod., 2008). Monolitne kolone CIM se uporablja tako za preparativne kot analitske namene.

Na monolitne diske CIM so immobilizirali različne afinitetne ligande. Z immobiliziranimi protitelesi (Lim in sod., 2005; Brne in sod., 2009) so izolirali in očistili različne molekule, ki sodelujejo v imunskeih odzivih. Z vezanim proteinom G so očistili IgG iz človeškega serumskega albumina, ki je tako primernejši za proteomske študije (Urbas in sod., 2009). Podobno deluje tudi disk CIM, immobiliziran s proteinom A, ki prav tako veže IgG, razen IgG razreda 3 (Tscheliessnig in Jungbauer, 2009). Z afinitetno kromatografijo na immobiliziranem lektinu konkanavalinu A so izolirali proteine, ki sodelujejo pri specifični glikolizaciji membran nekaterih rakavih celic (Josić in sod., 1998). Immobilizacija histidina na monolitni disk CIM je omogočila čiščenje restrikcijskih encimov ter poliklonskih in monoklonskih protiteles (Champagne in sod., 2007). Z immobilizacijo deoksiribonukleaze in tripsina kot ligandov so preizkusili različne načine vezave encimov na monolitne nosilce CIM. Uporabili so različne aktivacijske postopke monolitnega matriksa in preizkusili uporabo nizkomolekularnih ročic za afinitetno kromatografijo (Benčina in sod., 2004; Nicoli in sod., 2008; Nicoli in sod., 2009). V literaturi še nismo zasledili vezave inhibitorjev ozziroma inhibitorjev cisteinskih proteaz na monolitne diske CIM za izolacijo proteaz iz kompleksnih vzorcev.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI IN LABORATORIJSKA OPREMA

3.1.1 Naravni materiali

- 50 semen navadnega fižola, sorta Zorin (*Phaseolus vulgaris*)

3.1.2 Plazmidi

Plazmid pET11a::rMcp1a iz zbirke plazmidov na Oddelku za biotehnologijo Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani

3.1.3 Protitelesa

- Kozja protitelesa proti kunčjim IgG (Dianova)
- Kunčji serum proti Mcp1 (Rabbit anti McpC 3880, Biogenes)

3.1.4 Bakterijski sevi

Laboratorijski sev iz zbirke sevov na Oddelku za biotehnologijo Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani:

- sev *Escherichia coli* BL21(DE3), genotip: *E. coli* B F⁻ *dcm* *ompT* *hsdS(r_B⁻m_B⁻)* gal λ (DE3)

3.1.5 Gojišča

- Tekoče gojišče Luria-Bertani (LB):
V 1 L destilirane vode smo raztopili 25 g osnove za gojišče LB (10 g triptona, 10 g NaCl in 5 g kvasnega ekstrakta). Gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121°C.
- Trdno gojišče Luria-Bertani z antibiotikom ampicilinom (LBA):
V 1 L destilirane vode smo raztopili 25 g osnove za gojišče LB in 15 g agarja. Gojišče smo po avtoklaviraju ohladili na sobno temperaturo, aseptično dodali 100 µg/ml ampicilina in ga razlili v plastične petrijevke.

3.1.6 Kemikalije in drobna oprema

Preglednica 2: Kemikalije

Proizvajalec	Kemikalije
Amersham Biosciences, ZDA	- označevalec velikosti proteinov pri NaDS-PAGE: LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis
Apollo Scientific, Velika Britanija	- IPTG
AppliChem, Nemčija	- NaCl
Bachem Feinkemikalien, Švica	- Z-Phe-Arg- <i>p</i> NA - P-Glu-Phe-Leu- <i>p</i> NA - Z-Arg-Arg- <i>p</i> NA - Z-Phe-Arg-AMC
BIA Separations, Slovenija	- diskri CIM® - ohišje za diske CIM
Carlo Erba, Italija	- amonijev sulfat - absolutni etanol - glicerol - HCl (37 %) - NaOH - ocetna kislina
Fermentas, Nemčija	- DTT
Fermentas, Litva	- označevalec velikosti molekulskih mas GeneRuler™ DNA Ladder Plus - nanašalni pufer: 6x Loading Dye Solution
Fluka Biochemica, Švica	- akrilamid - CuSO ₄ x 5H ₂ O
GE Healthcare, Švedska	- Coomassie Brilliant Blue (PhastGel Blue G-250) - geli za izoelektrično fokusiranje Phastgel (3-9) - Coomassie Brilliant Blue R-250
Kemika, Hrvaška	- Na ₂ HPO ₄

se nadaljuje

nadaljevanje

Proizvajalec	Kemikalije
Merck, Nemčija	- HCHO - metanol - Na ₂ CO ₃ - TEMED - urea - Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O - NaHCO ₃ - NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O - TCA - DMSO
Milipore, ZDA	- membrana PVDF Immobilon-P ^{SQ}
Peptide Institute, Japonska	- E-64
Pharmacia, Švedska	- Sefarozna (Sepharose CL 4B)
Serva, Nemčija	- APS - citronska kislina - EDTA - HEPES - NaDS - Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O - Tris - Triton X-100 - bromfenol modro - membrana za dializo (Cel® dialysis tubing) - glicin
Sigma, Nemčija	- BANA - papain - Trizma® base
Sigma, ZDA	- agar - ampicilin - CaCl ₂ - kvasni ekstrakt - MgCl ₂

3.1.7 Pufri in reagenti

Preglednica 3: Pufri in reagenti

Pufer / reagent	Sestava
Pufri za izolacijo rMcp	<ul style="list-style-type: none">- pufer TET (50 mM Tris-HCl, 2m M EDTA, 0,1 % TritonX-100, pH 7,5)- pufer TET z 1 M, 3 M, 6 M in 8 M ureo
Gelska filtracija	<ul style="list-style-type: none">- pufer za gelsko filtracijo (0,02 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl, 3 M urea, 1 mM DTT, pH 7,5)- pufer za gelsko filtracijo (0,02 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl, pH 7,5)
Anionska izmenjevalna kromatografija	<ul style="list-style-type: none">- pufer BIS-Tris (0,02 M BIS-Tris, pH 6,0)- pufer BIS-Tris (0,02 M BIS-Tris, 0,6 M NaCl, pH 6,0)
Dializa	<ul style="list-style-type: none">- pufer BIS-Tris (0,02 M BIS-Tris, 0,6 M NaCl, pH 6,0)- pufer BIS-Tris (0,02 M BIS-Tris, pH 6,0)
Priprava izvlečka iz fižolovih semen	<ul style="list-style-type: none">- 1 M natrijev acetat, 0,5 M NaCl, pH 4,5- 0,02 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl, pH 7,5
Določanje inhibitorne aktivnosti rMcp	<ul style="list-style-type: none">- 300 µM Z-Phe-Arg-pNA (Bachem Feinkemikalien, Švica)- fosfatni pufer (0,1 M fosfat, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 6,5)
Priprava monolitnih diskov	<ul style="list-style-type: none">- disk CIM epoksi (BIA Separations d.o.o., Slovenija); disk : 10-GE01-001-001B xy02, premer: 12 mm, debelina: 3 mm, Vd: 0,34 ml- disk CDI (BIA Separations d.o.o., Slovenija); disk : 10-GE01-008-002B cd01, premer: 12 mm, debelina: 3 mm, Vd: 0,34 ml- raztopina za kondicioniranje diskova (0,5 M fosfatni pufer, pH 7,0)- raztopina za inaktivacijo skupin epoksi (0,5 M H₂SO₄)- 10 % (v/v) raztopina glutaraldehida- mobilna faza (0,1 M Tris-HCl, 0,6 M NaCl, pH 7,0)- raztopina za deaktivacijo prostih skupin (1 M monoetanolamin v 0,5 M fosfatnem pufru, pH 8,0)- raztopina za redukcijo Schiffovih baz (0,1 M natrijev cianoborohidrid)- 100 % etilendiamin- emulzija 1,4 butandiol diglicidil etra, 0,6 M NaOH in 0,5 M natrijevega tetrahidridoborata

se nadaljuje

nadaljevanje

Pufer / reagent	Sestava
Afinitetna kromatografija	<ul style="list-style-type: none">- pufer BIS-Tris (0,02 M BIS-Tris, pH 6,0)- vezni pufer (0,1 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl, pH 7,0)- elucijski pufer (0,1 M Tris-HCl, 0,02 M NaOH, pH 12,0)- elucijski pufer (0,1 M glicin, pH 2,0)- raztopina za nevtralizacijo (2 M Tris-HCl, pH 8,0)
Raztopine za prenos western	<ul style="list-style-type: none">- prenašalni pufer TBS (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 0,1 % SDS, 20 % metanol)- blokirni pufer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl in 5 % mleko v prahu)- TBST (25 mM Tris, 192 mM glicin, 0,1 % SDS, 20 % metanol, 0,05 % Tween 20)
Raztopine za NaDS - PAGE	<ul style="list-style-type: none">- pufer za koncentrirni gel: 1,5 M Tris-HCl, pH 6,8- pufer za ločevalni gel: 0,5 M Tris-HCl, pH 8,8- elektroforezni pufer: 29 g/L Tris baze, 144 g/L glicina, 10 g/L NaDS, dH₂O, pH 8,3- nanašalni pufer: 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 2 ml glicerola, 4 ml 10 % NaDS, 0,5 ml 0,1 % bromfenol modro, 1 ml dH₂O- 0,1 % raztopina Coomassie Brilliant Blue: 5 tablet Coomassie PhastGel blue R-350, 200 ml dH₂O in 800 ml etanola- 10 % razbarvalna raztopina: 10 % (v/v) etanola in 5 % (v/v) CH₃COOH- 30 % razbarvalna raztopina: 30 % (v/v) etanola in 10 % (v/v) CH₃COOH- 50 % razbarvalna raztopina: 50 % (v/v) etanola in 12 % (v/v) CH₃COOH- razvijalna raztopina pri barvanju z AgNO₃: 28,5 g Na₂CO₃, 0,5 ml HCHO do 1L dH₂O- reducent pri barvanju z AgNO₃: 1 g K₂Cr₂O₇ na 1 L dH₂O
Komplet reagentov za detekcijo protiteles	<ul style="list-style-type: none">- Lumi-Light^{PLUS} (Roche)
Test encimske aktivnosti s substratom azokazein	<ul style="list-style-type: none">- 0,25 M pufer MES, pH 6,0- 0,4 % azokazein v dH₂O- prekinjevalec 50 % TCA
Raztopine za določanje encimske aktivnosti	<ul style="list-style-type: none">- 300 µM Z-Phe-Arg-pNA, p-Glu-Phe-Leu-pNA, Z-Phe-Arg-pNA, pripravljeni v DMSO- pufer MES (100 mM MES, 100 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 6,5)

3.1.8 Oprema

Preglednica 4: Oprema

Oprema	Proizvajalec
Aparatura za fotografiranje gelov	- Sistem UVItc, UVItc, Velika Britanija
Aparatura za NaDS-PAGE	- Mini-Protean II®, Bio-Rad, ZDA
Avtomatske pipete (10 – 5000 µl)	- Eppendorf, Nemčija
Avtoklav	- Varioklav, H+P Labortechnick GmbH, Nemčija
Avtomatski stresalnik	- Certomat HK, B. Braun Biotech International, ZDA
Centrifuge	- Eppendorf 5424, 5415 R 5804 R, Eppendorf, Nemčija - Sorvall RC-5C Plus, Sorvall, ZDA
Centrifugirke (GSA, GS-3 in SS-34)	- Sarsted, Nemčija
Čitalec mikrotitrskih plošč	- Tecan, Safire, ZDA
FPLC	- Äkta Prime, Amersham Pharmacia Biotech, Švedska (GE Healthcare) - Programska oprema UNICORN
HPLC	- črpalki (Knauer, tip K120) - spektrofotometer (Knauer) - detektor UV-VIS - vmesnik (Knauer), mešalna komora (Knauer) - zanke: 20 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL, 500 µL - programska oprema Eurochrom 2000 (Knauer)
Hladilnik	- Gorenje, Slovenija
Inkubator	- Binder BD 115, Binder, Nemčija
Magnetni mešalnik	- Rotamix SHP-10, Tehnica, Slovenija
Mikrotitrskie plošče	- Corning Life Science, Japonska

se nadaljuje

nadaljevanje

Oprema	Proizvajalec
Masni spektrometer MSD Trap XCT Ultra	- Agilent, ZDA
Multikanalna pipeta	- Biohit, Finska
Napajalnik za elektroforezo	- Power Pack Basic, Bio-Rad, ZDA
Naprava za izoelektrično fokusiranje	- PhastSystemTM (GE Healthcare)
Orbitacijski stresalnik	- Vibromix 10, Tehnica, Slovenija
pH-meter	- Mettler Toledo Seven Easy, ZDA
Sonifikator	- UP200H, Hielscher, Nemčija
Spektrofotometra	- Lambda 25, PerkinElmer, ZDA - NanoDrop ND-2000c, NanoDrop Technologies, ZDA
Tehtnici	- AND GH-252-EC, A&D Instruments, Velika Britanija - Vibra AJH 4200CE, Shinko Denshi Vibra, Japonska
Termoblok	- TS1 Thermo Shaker, Biometra, Nemčija
Ultrafilter	- Amicon 8200, Amicon div., ZDA
Ultraturaks	- ULTRA-TURRAX, IKA-Labortechnik, Nemčija
Vakumski koncentrator	- Speedvac, Savant, ZDA
Vibracijski stresalnik	- EV-202, Tehnica, Slovenija
Vodna kopel	- SW22, Julabo, Nemčija
Zamrzovalnik (-20°C)	- Gorenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-80°C)	- Sanyo MDF-53V, Sanyo Electric Co., Japonska

3.2 METODE

3.2.1 Priprava rekombinantnega makrocipina 1

3.2.1.1 Transformacija plazmida pET11::rMcp1 v ekspresijski sev *E.coli* BL21(DE3)

Uporabili smo predhodno pripravljen plazmidni vektor pET11::rMcp1 z vstavljenim zapisom za inhibitor proteaz iz gobe orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*) makrocipin 1 (Renko in sod., 2010). Vektor smo transformirali v sev *E.coli* BL21(DE3). Kompetentne celice smo odtalili na ledu, dodali 1 µl plazmida, nežno premešali in inkubirali na ledu 30 min. Po tem smo celice izpostavili toplotnemu šoku z inkubacijo v vodi pri 42°C 1 minuto. Nato smo dodali 450 µl tekočega gojišča Luria-Bertani (LB) ter stresali 1 h pri 180 vrt./min pri 37°C. Po 100 µl suspenzije bakterijskih celic smo razmazali na plošče LBA in inkubirali prek noči pri 37°C.

3.2.1.2 Izražanje rekombinantnega makrocipina 1 v bakteriji *E. coli*

Izbrane transformirane seve *E.coli* BL21(DE3)pET11::rMcp1 smo naslednji dan precepili v dve steklenici z 250 ml tekočega gojišča LB z dodanim ampicilinom. Inkubacija je potekala pri 180 vrt./min prek noči pri 37°C. Naslednji dan smo pripravili štiri dvolitrskie erlenmajerice z 250 ml tekočega gojišča LBA. V vsako izmed štirih smo ob plamenu odpipetirali 5 ml prekonočne kulture. Erlenmajerice smo inkubirali pri 37°C ob stresanju 220 vrt./min. Med gojenjem smo spremljali optično gostoto pri 600 nm (A_{600}). Ko je A_{600} po približno 4 h dosegla vrednost med 1,0 in 1,5, smo kulturo inducirali z IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktosid) do končne koncentracije 1,0 mM in nadaljevali z inkubacijo pri 37°C ob stresanju 220 vrt./min še 5 h in ponovno izmerili A_{600} . Kulturo smo prelili v centrifugirke GS-3 ter centrifugirali pri 6000 vrt./min, 15 min pri 4°C v centrifugi Sorvall RC5C plus z rotorjem GS-3. Supernatant smo zavrgli, usedlino pa resuspendirali s pufrom TET (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0,1 % TritonX-100, pH 7,5). Centrifugirke smo sprali s pufrom TET in suspenzije združili do končnih 100 ml suspenzije bakterijskih celic, ki smo jo zamrznili pri - 20°C.

3.2.1.3 Izolacija makrocipina 1 iz inkluzijskih teles

Suspenzijo celic smo počasi odtalili na ledu in celice razbili z ultrazvokom (1 x 5 min in 1 x 10 min pri 24 kHz) z uporabo sonikatorja UP200H (Hielscher, Nemčija). Po sonikaciji smo suspenzijo 15 min centrifugirali pri 8000 vrt./min pri 4°C, v centrifugi

Sorvall RC5C plus z rotorjem GSA. Supernatant smo zavrgli, oborino pa raztopili s pomočjo magnetnega mešala v 70 ml pufra TET z 1 mM DTT pri 4°C. Sledilo je centrifugiranje 15 min pri 8000 vrt./min pri 4°C, rotor GSA. Supernatant smo zamrznili, oborino pa raztopljalji čez noč pri 4°C v 80 ml TET z 1 mM DTT in 1 M ureo. Sledilo je ponovno centrifugiranje, 15 min pri 8000 vrt./min, 15 min pri 4°C, rotor GSA. Supernatant smo zamrznili, oborino pa raztopljalji v 50 ml pufra TET z 1 mM DTT in 3 M ureo pri 4°C. Raztopino smo centrifugirali pri 8000 vrt./min, 15 min pri 4°C, rotor GSA, in supernatant ponovno zamrznili. Oborino smo raztopili v 25 ml pufra TET z 1 mM DTT in 6 M ureo pri 4°C. Spet je sledilo centrifugiranje pri 8000 vrt./min, 15 min pri 4°C, rotor GSA in razapljanje oborine v 10 ml pufra TET z 1 mM DTT in 8 M ureo pri 4°C prek noč. Med postopkom smo shranjevali alikvote (200 µl) vseh supernatantov in suspenzij za nadaljnje analize. Z gelsko filtracijo smo očistili supernatant po tretjem centrifugiranju in združen vzorec supernatantov po četrtem, petem in šestem centrifugiranju.

3.2.1.4 Gelska filtracija

Gelska filtracija je separacijska metoda, ki temelji na ločevanju molekul zaradi razlik v njihovi velikosti. Predpostavlja se, da med separacijo ni elektrostatskih in drugih interakcij med gelom in vzorcem in da so proteini v vzorcu enotne oblike. Stacionarna faza filtracije je zamrežen polimer v obliki gela s poznano velikostjo por. Manjše molekule potujejo skozi gel dalj časa, imajo daljši elucijski čas, ker se zadržujejo med porami polimera. Večje molekule se ne zadržujejo med porami in zato potujejo hitreje ter imajo krajši elucijski čas. Molekule se tako ločijo po padajoči molekulski masi.

Za čiščenje proteinov smo uporabili kolono z višino 113 cm in premerom 4 cm, z nosilcem Superdex S200 (GE Healthcare, Švedska). Nosilec smo pred uporabo pripravili z izpiranje, preko noči s pufrom za gelsko filtracijo (0,02 M Tris-HCl in 0,3 M NaCl, pH 7,5). Pred nanosom vzorca smo kolono izpirali 44 ur z mobilno fazo z reducentom DTT (3M urea, 1 mM DTT, 0,02 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl), pri pretoku 52,8 ml/h. Izvedli smo šest gelskih filtracij, vsako s približno 25 ml vzorca. Ločevanje je potekalo 24 ur pri 4°C s pretokom 52,8 ml/h. Frakcije smo zbirali vsakih 30 min na kolektorju, jim določali koncentracijo z merjenjem A_{280} in jih analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo. Frakcije ki so vsebovale makrocipin, smo po tretjem centrifugiranju združili in jih skoncentrirali z ultrafiltracijo. Prav tako smo združili frakcije, ki s vsebovale makrocipin po četrtem, petem in šestem centrifugiranju, jih skoncentrirali z ultrafiltracijo in dodatno očistili z ionsko izmenjevalno kromatografijo.

3.2.1.5 Ionsko izmenjevalna kromatografija

Ionsko izmenjevalna kromatografija je kromatografska metoda, ki temelji na principu ločevanja glede na elektrostatske interakcije med molekulami z nasprotnim nabojem. Številni biološki materiali, tudi aminokisline in proteini, imajo celokupen naboj, ki je odvisen od izoelektrične točke in pH raztopine. Kationski izmenjevalci so negativno nabiti in zadržujejo pozitivno nabite molekule. Nasprotno, so anionski izmenjevalci pozitivno nabiti in zadržujejo negativno nabite molekule. Selektivno desorpcijo vezanih ionov v eluent dosežemo s spremembou pH in/ali ionske koncentracije ali z afinitetno elucijo, kjer v sistem vnesemo ion, ki ima večjo afiniteto za ionski izmenjevalec in tako izpodrigne vezane ione (Wilson in Walker, 2005).

Za čiščenje rekombinantnega makrocipina smo uporabili kromatografsko kolono, polnjeno z nosilcem DEAE Sephadex (GE Healthcare), ki je šibek anionski izmenjevalec. Za vezno mobilno fazo smo uporabili pufer 0,02 M BIS-Tris, pH 6,0. Vezane proteine smo izprali s tristopenjsko gradientno elucijo z raztopino NaCl. Kromatografsko kolono smo pred nanosom vzorca 24 ur izpirali s puferom (0,02 M BIS-Tris, pH 6,0) pri pretoku 19,5 ml/min. Nanesli smo približno 30 ml vzorca in na kolektorju vsakih 30 min zbirali frakcije (~ 12 ml). Po izpiranju kolone s 500 ml pufera smo uporabili gradient 0 – 0,2 M NaCl v puferu (1 L), zatem 0,2 – 0,6 M NaCl v puferu (200 ml) in 0,6 – 1,0 M NaCl v puferu (200 ml). Nosilec smo popolnoma izprali še z raztopino 1 M NaCl (200 ml). Med ionsko izmenjevalno kromatografijo smo merili absorbanco pri valovni dolžini 280 nm in tako določali vsebnost proteinov v frakcijah. Proteine smo analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo in jim določali inhibitorno aktivnost.

3.2.1.6 Določanje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov smo določali z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 280 nm s spektrofotometrom Lambda 25 (PerkinElmer, ZDA). Absorpcija pri 280 nm se pojavi predvsem zaradi aromatskih aminokislín (triptofan, tirozin in fenilalanin) in disulfidnih vezi. Te aminokisline so prisotne v večini proteinov v podobnem razmerju, zato nam omogočajo oceno koncentracije proteinov v vzorcu. Če poznamo molarni absorpcijski koeficient za protein (ϵ), lahko enostavno izračunamo njegovo koncentracijo v raztopini z Beer-Lambertovim zakonom: $A = \epsilon \times l \times c$, ki pravi da je absorbanca pri 280 nm sorazmerna s koncentracijo snovi, molarnim absorpcijskim koeficientom (ϵ) in dolžino optične poti svetlobnega žarka (l).

$$A = \varepsilon \times l \times c \quad \dots(1)$$

A ...absorbanca

c ... molarna koncentracija snovi v vzorcu [mol/L]

ε ... molarni absorpcijski koeficient [$L/(mol \times cm)$]

l ... dolžina optične poti skozi vzorec [cm]

Za merjenje absorbance smo uporabljali kivete iz kremenovega stekla širine 1 cm. Kot slepi vzorec pri merjenju absorbance smo uporabljali pufer za gelsko filtracijo. Vrednost molarnega absorpcijskega koeficiente za rMcp smo izračunali s pomočjo spletnega programskega orodja ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>). Za rMcp znaša $\varepsilon = 49390 \text{ L}/(\text{mol cm})$.

3.2.1.7 Ultrafiltracija

Ultrafiltracija je membranski separacijski proces, kjer ločevanje poteka na osnovi tlačne razlike na obeh straneh membrane. Pri procesu ultrafiltracije se s pomočjo tlaka v koncentratu skoncentrirajo molekule, ki so večje od velikosti por membrane, medtem ko v filtrat prehajajo manjše molekule in topilo. Ultrafiltracijske membrane so narejene iz različnih materialov in zadržujejo različno velike delce (Lunder, 2007).

Uporabili smo 350 ml ultrafilter (Amicon, ZDA), in membrano (Amicon, ZDA), ki zadržuje molekule, večje od 5000 Da. V ultrafilter smo prelimi vzorec, nepredušno zaprli in priklopili na jeklenko z dušikom, ki ustvari tlak približno 5 barov. Ultrafiltracija je potekala ob konstantnem mešanju z magnetnim mešalom, v hladni sobi pri 4°C. Koncentriranemu vzorcu smo izmerili A_{280} in ga v alikvotih shranili pri -20°C.

3.2.1.8 Dializa

Dializa je proces ločevanja molekul v raztopini, glede na difuzijo skozi polprepustno membrano. Molekule prehajajo s področja z višjo koncentracijo topljencev na področje z nižjo koncentracijo. Soli, sladkorji in manjši peptidi tako prehajajo v pufer izven dializnega črevesa, kar lahko izkoristimo tudi za zamenjavo pufra.

Dializno črevo, ki zadrži molekule z relativno molsko maso večjo od 3,5 kDa (Membra-Cel™ Dialysis tubing Membrane MWCO 3500, premer 22 mm, Serva, Nemčija), smo sprali z destilirano H_2O . Po gelski filtraciji smo frakcije s proteinimi centrifugirali 15 min pri 13000 vrt./min pri 4°C v centrifugi Sorvall RC5C plus z rotorjem SS-34 in prenesli v dializno črevo. Dializa je potekala 24 h v 5 l čaši z 0,02 M pufra Bis-Tris, pH 6,0 ob

konstantnem mešanju z magnetnim mešalom, v hladni sobi pri 4°C. Pufer smo med dializo trikrat zamenjali. Vzorec smo po končani dializi centrifugirali in ga nanesli na kolono za ionsko izmenjevalno kromatografijo.

3.2.1.9 Določanje inhibitorne aktivnosti makrocipina 1

Inhibitorno aktivnost vzorcev smo določali s spremeljanjem znižanja encimske aktivnosti cisteinske proteaze papain (Sigma, Nemčija) s sintetičnim substratom Z-Phe-Arg-*p*NA (Bachem Feinkemikalien, Švica). Test temelji na sproščanju *p*NA (para-nitroanilid), ki ga cepijo encimi s substrata, in ga zaznavamo spektrofotometrično pri valovni dolžini 410 nm.

Inhibitorno aktivnost smo določali v treh elucijskih vrhovih po ionsko izmenjevalni kromatografiji. Na mikrotitrsko ploščo smo odpipetirali predhodno pripravljeno raztopino papaina s pufrom BANA s 5 mM DTT, tako da je bila končna koncentracija papaina 5 µM v volumnu 100 µl. V vdolbinice smo odpipetirali različne količine 100 µM inhibitorja (1 µl, 2 µl, 5 µl, 10 µl, 15 µl) in ploščo inkubirali 10 min pri sobni temperaturi. Z multikanalno pipeto smo dodali 100 µl 200 µM substrata Z-Phe-Arg-*p*NA in inkubirali 10 min pri 37 °C. Po inkubaciji smo na čitalcu Tecan (Safire, ZDA) izmerili absorbanco pri 410 nm. Po enakem postopku smo pripravili slepi vzorec brez papaina in kontrolni vzorec brez inhibitorja.

3.2.2 Priprava diskov CIM z makrocipinom 1

Makrocipin 1 smo na monolitne nosilce imobilizirali z različnimi aktivacijskimi postopki in z različnimi veznimi ročicami. Uporabili smo monolitne diske CIM (»Convective Interaction Media«) (BIA Separations, Slovenija) premera 12 mm in višine 3 mm. Diski CIM združujejo uporabo metakrilatnega poroznega polimernega matriksa in neporoznega prilegajočega nosilca, ki zagotavlja osni pretok skozi disk in onemogoča prepuščanje vzorca ali mobilne faze. Nosilec diska omogoča enostavno izvedbo kromatografije in enostavno povezovanje s HPLC pretočnimi injekcijskimi sistemi (Affinity ..., 2012). Med polimerizacijo monolitnih diskov nastanejo proste epoksi - skupine, ki omogočajo vezavo ligandov. Diski CDI so pripravljeni iz diskov CIM epoksi z dodatno hidrolizacijo z 1,1'karbonildiimidazolom ki povzroči nastanek prostih hidroksilnih skupin (Benčina in sod., 2004).

3.2.2.1 Imobilizacija makrocipina 1 na disk CIM epoksi

Epoksi skupine so funkcionalne skupine monolitov GMA - EDMA, zato lahko imobilizacijo prek epoksi skupin izvedemo neposredno na diskih (Švec in sod., 2003). Pripravili smo tri diske CIM imobilizirane z rMcp1 z uporabo treh pufrov: 0,5 M acetatni pufer (pH 3,0); 0,5 M fosfatni pufer (pH 7,0) in 0,5 karbonatni pufer z 0,3 M NaCl (pH 8,5). Po enourni inkubaciji diska v izbranem pufru smo disk z injekcijo prečrpali z 2,5 ml rMcp1 (2,5 mg/ml) v istem pufru. Disk smo ob stalnem mešanju inkubirali 24 h pri 35°C. Nato smo disk 1 h izpirali z vodo, da bi odstranili nevezane proteine in 1 h inkubirali v 0,5 M H₂SO₄ pri 50°C za inaktivacijo preostalih epoksi-skupin. Disk smo pripravili za uporabo tako, da smo ga 1 h izpirali v mobilni fazi 0,1 M Tris-HCl, 0,6 M NaCl, pH 7,0 pri pretoku 1 ml/min in shranili v istem pufru pri 4°C.

Po enakem postopku smo pripravili še disk CIM epoksi z rMcp1, kjer smo disk CIM med imobilizacijo 24 h inkubirali pri 45°C v 0,5 M fosfatnem pufru, pH 7,0.

3.2.2.2 Imobilizacija makrocipina 1 na disk CIM CDI

Pripravili smo dva diska z uporabo različnega pH vezave. rMcp1 smo kovalentno imobilizirali na disk CIM CDI tako, da smo disk CDI najprej 1 h izpirali z 0,5 M fosfatnim pufrom, pH 7,0 oziroma 0,5 M fosfatnim pufrom pH 3,0 in ga nato prečrpali z 2 ml rMcp1 (2,5 mg/ml) v istem pufru. Potem smo disk inkubirali z rMcp1 24 h pri 45°C ob stalnem mešanju na stresalniku. Nevezan material smo izpirali 1 h z dH₂O pri pretoku 1 ml/min in diske shranili v 0,5 M fosfatnem pufru, pH 7,0 pri 4°C.

3.2.3 Optimizacija priprave diskov CIM z makrocipinom 1

3.2.3.1 Imobilizacija makrocipina 1 na disk EDA

Modifikacija diskov CIM EDA temelji na reakciji epoksi skupine z amino - skupino etilendiamina. Disk CIM epoksi smo 18 h inkubirali v 100 % raztopini etilendiamina pri 30°C. Po končani inkubaciji smo disk CIM izpirali z etanolom in dH₂O in ga imobilizirali z rMcp1 kot je opisano v točki 3.2.2.1.

3.2.3.2 Imobilizacija makrocipina 1 na glutaraldehydno ročico

Komercialno dostopen disk CIM EDA s prostimi aminskimi skupinami smo 1 h inkubirali v 50 mM fosfatnem pufru, pH 8,0 in nato prek noči v 10 % (v/v)

glutaraldehidni raztopini v enakem pufru, ob stalnem mešanju, v temi pri sobni temperaturi. Disk smo naslednji dan izpirali s 50 mM fosfatnim pufrom, pH 8,0 da smo odstranili reagent in disk uravnotežili v 0,5 mM fosfatnem pufru pH 3,0. Imobilizacijo rMcp1 na disk smo izvedli s črpanjem 1,0 ml rMcp1 (2,5 mg/ml) v 50 mM fosfatnem pufru, pH 3,0 ter disk inkubirali 24 h v temi, v isti raztopini ob stalnem mešanju. Po končani imobilizaciji smo disk 1 h izpirali z 0,5 M fosfatnim pufrom, pH 3,0. Za redukcijo nastalih Schiffovih baz smo disk dodatno izpirali 3 h z 0,1 M natrijevim cianoborohidridom in 2 h z 0,5 M fosfatnim pufrom, pH 8,0. Preostanek prostih skupin smo deaktivirali s 3 urno inkubacijo v 1 M monoetanolaminu v 0,5 M fosfatnem pufru, pH 8,0. Preostanek reagentov smo 1 h izprali z dH₂O pri pretoku 1 ml/min in disk shranili v 10 mM fosfatnem pufru pri 4°C.

3.2.3.3 Imobilizacija makrocipina 1 na 1,6 diaminoheksan

Diske epoksi smo 24 h inkubirali v 100 % raztopini 1,6 diaminoheksana pri 65°C in po končani reakciji izpirali 1 h z etanolom in 1 h z dH₂O. Disk s prostimi aminskimi skupinami smo 1 h inkubirali v 50 mM fosfatnem pufru, pH 8,0 in nato preko noči v 10 % (v/v) glutaraldehidni raztopini v enakem pufru ob stalnem mešanju v temi pri sobni temperaturi. Disk smo naslednji dan izprali s 50 mM fosfatnim pufrom, pH 8,0 da smo odstranili reagent. Na proste aldehidne skupine 11 C atomov dolge ročice smo imobilizirali rMcp1 kot pri diskih CIM s prostimi epoksi - skupinami (opisano v 3.2.2.1).

3.2.3.4 Imobilizacija makrocipina 1 na 1,4 butandiol diglicidil eter

Diske CIM epoksi smo najprej 3 h hidrolizirali v 0,5 M H₂SO₄ pri 60 °C, tako so epoksi skupine hidrolizirale v hidroksilne. Po izpiranju z dH₂O smo diske inkubirali v emulziji 1,4 butandiol diglicidil etra, 0,6 M NaOH in 0,5 M natrijevega tetrahidridoborata na stresalniku pri 30 °C. Med inkubacijo hidroksilne skupine na hidroliziranem disku CIM reagirajo s terminalnimi epoksi - skupinami 1,4 butandiol diglicidil etra (1,4-BDGE) in nastane 9 C atomov dolga ročica s prostimi amino skupinami. Ostanek reagentov smo sprali s 50 mM fosfatnim pufrom, pH 8,0. Na proste epoksi - skupine smo vezali rMcp1, kot je opisano v točki 3.2.2.1.

3.2.4 Analize monolitnih diskov CIM z makrocipinom 1

Uspešnost funkcionalne imobilizacije rMcp1 na monolitne diske CIM smo analizirali na sistemu za hitro ločevanje proteinov (ÄKTA™ FPLC™, GE Healthcare) in na sistemu za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC, Knauer) z uporabo cisteinske proteaze papain.

Papain 1 mg/ml iz rastline *Carica papaya* (Sigma) smo raztopili v 0,1 M Tris-HCl, 0,6 M NaCl, pH 7,0. Raztopino papaina smo prek zanke injicirali v ohišje z diskom CIM z rMcp1, pri različnih pretokih, volumnih zanke in koncentracijah raztopine papaina, glede na izkušnje ločevanja na Sefarovi (Mustar, 2009). Za vezni pufer smo uporabili 0,1 M Tris-HCl, 0,6 M NaCl, pH 7,0. Proteine, ki so se zadržali v monolitnem nosilcu zaradi inhibicije z makrocipinom, smo z diska izprali s spremembjo pH z 0,1 M glicinom, pH 2,0. Frakcije smo zbirali v nevtralizacijski pufer, 2 M Tris-HCl pH 8,0 da bi ohranili stabilnost in aktivnost papaina za nadaljnje analize. Detekcija vezanih in nevezanih proteinov je potekala pri 280 nm.

3.2.4.1 Določanje dinamične kapacitete diskov CIM z imobiliziranim makrocipinom 1

Dinamično kapaciteto diskov CIM z vezanim rMcp1 smo določali s prebojno krivuljo papaina. Disk CIM z rMcp1 smo izpirali z nevezno mobilno fazo do konstantnega signala, nato smo nadaljevali izpiranje z vezno mobilno fazo prav tako do konstantnega signala. Raztopino papaina 1 mg/ml s pretokom 1 ml/min smo črpali skozi posamezen disk CIM, dokler nismo dosegli dinamičnega ravnotežja. Temu je sledilo izpiranje z glicinom in nevtralizacija. Ker se je preboj pojavit že kmalu po začetku nanosa, smo predvidevali, da je količina papaina v eluciji do neke mere pogojena s količino papaina v injiciranem vzorcu. Ker nismo poznali deleža aktivnega papaina v surovem vzorcu, smo predvideli da so v vzorcu različne oblike papaina, z različno afiniteto za imobiliziran rMcp1. Papaina in papainu podobne proteaze se namreč sintetizirajo kot neaktivni proencimi z N-terminalno propeptidno regijo, z odstranitvijo katere postane encim aktiven (Rawlings in Barrett, 1994). Da bi pridobili papain v obliki, ki se bolje veže na makrocipin, smo izprane, nevtralizirane frakcije združili in razsolili z uporabo kolone »PD-10 desalting columns« (GE Healthcare) in ponovno nanesli prek zanke na monolitni disk. V tem primeru smo pridobili tipično prebojno krivuljo, kjer se je papain vezal na stacionarno fazo do vzpostavitve dinamičnega ravnotežja (Hage, 2006). Iz prebojne krivulje smo odčitali 50 % vrednosti maksimalnega signala, nato pa izračunali vrednost dinamične kapacitete diskov po enačbi:

$$K_D \left[\frac{mg}{ml} \right] = \frac{(\Phi * t_R - V_m) * C_{spojine}}{V_{d(k)}} \quad ... (2)$$

K_d dinamična kapaciteta [mg spojine/ml nosilca]

Φ pretok mobilne faze [ml/min]

t_r čas pri 50 % preboju [min]

V_m prosti volumen diska [ml]

$V_{d(k)}$ volumen diska oziroma kolone [ml]

C koncentracija spojine [mg/ml]

3.2.5 Afinitetna kromatografija z izvlečkom iz fižolovih semen

3.2.5.1 Priprava izvlečka iz fižolovih semen

Z afinitetno kromatografijo na rMcp1 smo želeli izolirati cisteinske proteaze iz izvlečka fižolovih semen, med katerimi naj bi bila prisotna tudi cisteinska proteaza legumain, ki razgraje skladiščne globuline med kalityvo in po njej (Senyuk in sod., 1998). Semena navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*) sorte Zorin smo uporabili kot vir cisteinskih proteaz. Fižolova semena smo sterilizirali z namakanjem v varikini (5 min). Po izpiranju z dH₂O smo jih 2 uri inkubirali v dH₂O, da so nabreknila. V sterilno petrijevko z navlaženo vato in filter - papirjem smo položili okrog 60 semen, jih pokrili in inkubirali v temi pri 37°C. Po 3 dneh kaljenja smo fižolom odstranili lupino, jih stehtali in jim dodali približno 200 ml pufra (1 M natrijev acetat, 0,5 M NaCl, 1,5 mM EDTA, pH 4,5). Fižole smo zmleli z ultraturaksom (10 min) in homogenat najprej centrifugirali 10 min pri 12000 vrt./min (4°C) v centrifugi Sorval RC5C z rotorjem GSA, potem pa še 40 min pri 8200 vrt./min (4°C). Proteine v supernatantu smo obarjali z amonijevim sulfatom. Ocenili smo volumen supernatanta in dodali amonijev sulfat do 80 % nasičenosti. Po 6 - urnem mešanju smo vzorec inkubirali brez mešanja pri 4°C preko noči. Oborjene proteine smo naslednji dan centrifugirali 30 minut pri 12000 vrt./min (4°C, rotor GSA), supernatant smo zavrgli, oborino pa raztopili v pufru za gelsko filtracijo (0,02 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl, pH 7,5).

Z dializo smo želeli iz vzorca odstraniti amonijev sulfat. Vzorec smo prenesli v dializno črevo, ki zadrži proteine večje od 3,5 kDa (Membra-Cel™ Dialysis tubing Membrane MWCO 3500, premer 22 mm, Serva, Nemčija). Dializa je potekala v pufru za gelsko filtracijo (0,02 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl, pH 7,5). Po dializi smo vzorec centrifugirali 30 min pri 14000 vrt./min (pri 4°C, rotor SS34) in supernatant skoncentrirali z ultrafiltracijo do končnega volumna približno 70 ml. Ultrafiltracija je potekala pri 4°C ob konstantnem mešanju z magnetnim mešalom pri tlaku približno 5 barov.

Izvleček iz fižolovih semen smo dodatno očistili z gelsko filtracijo. Uporabili smo kolono za gelsko filtracijo Superdex S200 (GE Healthcare, Švedska). Pred nanašanjem vzorca smo kolono izpirali 24 h pri pretoku 52,8 ml/h z mobilno fazo (0,02 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl, pH 7,5). Izvedli smo tri gelske filtracije, vsako s približno 25 ml vzorca. Ločevanje je potekalo 24 ur pri 4°C s pretokom 52,8 ml/h. Frakcije smo zbirali vsakih 30 min na kolektorju. Frakcijam smo izmerili A_{280} , jih analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo in določili aktivnost s substratom benzoiloksikarbonil-Ala-Ala-Asn-4-metil-7-kumarilamid (Z-Ala-Ala-Asn-AMC), kot je opisano v 3.2.7.3. Elucijske vrhove, ki so kazali največjo aktivnost smo združili in skoncentrirali z ultrafiltracijo.

3.2.5.2 Afinitetna kromatografija na disku CIM epoksi z makrocipinom 1

Separacijo proteinov iz izvlečka fižolovih semen smo izvedli z afinitetno kromatografijo na disku CIM epoksi z rMcp1, z uporabo sistema FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, GE Healthcare). Na disk smo prek zanke nanesli 200 μ l skoncentriranega vzorca po gelski filtraciji v 0,1 M Tris-HCl, 0,6 M NaCl, pH 7,0 s pretokom 0,2 ml/min. Vezane proteine smo izpirali z 0,1 M glicinom, pH 2,0 in nevtralizirali s pufrom 2 M Tris-HCl, pH 8,0, da bi preprečili samorazgradnjo.

3.2.6 Afinitetna kromatografija na makrocipinu 1 z izvlečkom iz prebavil ličink koloradskega hrošča

3.2.6.1 Priprava vzorca in čiščenje

Zmrznjena prebavila ličink koloradskih hroščev smo v tekočem dušiku homogenizirali v prah in jih raztopili v pufru za gelsko filtracijo (0,02 M Tris-HCl in 0,3 M NaCl, pH 7,5). Po vorteksiranju in hladnem centrifugiraju (15 min, 12000 vrt./min) smo supernatant nanesli na uravnoteženo analitsko kolono z višino 110 cm in premerom 2 cm, napolnjeno z gelom Superdex S200 (GE Healthcare, Švedska). Kot mobilno fazo pri ločevanju smo uporabili pufer 0,02 M Tris-HCl in 0,3 M NaCl, pH 7,5. Gelska filtracija je potekala v hladni sobi pri 4°C. Frakcije z volumnom približno 3 ml, smo zbirali na kolektorju in jim določali absorbance pri valovni dolžini 280 nm na UV/VIS spektrofotometru (Perkin Elmer precisely, Lambda 25, ZDA). Vzorce frakcij smo shranili za poznejše encimske teste. Frakcijam smo izmerili A_{280} in združili tiste z najvišjo vsebnostjo proteinov za afinitetno kromatografijo z diskim CIM z imobiliziranim rMcp1.

3.2.6.2 Afinitetna kromatografija z diskimi CIM z makrocipinom 1

Pripravljen vzorec po gelski filtraciji smo nanesli na disk CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici. Uporabili smo sistem FPLC (Äkta Prime, GE Healthcare). Na disk smo pri pretoku 1 ml/min prek zanke nanesli po 200 µl raztopine vzorca v pufru 0,1 M Tris-HCl, 0,6 M NaCl, pH 7,0 in enak pufer uporabili za mobilno fazo. Vezane proteine smo izprali z 0,1 M glicinom, pH 2,0 in nevtralizirali s puferjem 2 M Tris-HCl, pH 8,0.

3.2.7 Karakterizacija proteinov

3.2.7.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS - PAGE)

Poliakrilamidna gelska elektroforeza je analitska metoda ločevanja proteinov na osnovi potovanja nabitih delcev v električnem polju v zamreženem gelu. Proteine pred nanosom na gel denaturiramo z dodatkom anionskega detergenta (NaDS). Detergent poruši terciarno strukturo proteina in se nespecifično veže na aminokisline, tako da tvori negativno nabit proteinski kompleks. Z dodatkom NaDS je hitrost potovanja proteinov po zamreženem gelu v električnem polju odvisna samo od velikosti.

Pri delu smo uporabljali elektroforezni sistem Mini Protean II (BioRad, ZDA). Elektroforeza je potekala vertikalno in sicer najprej v koncentrirnem gelu, kjer je večja zamreženost in se proteini koncentrirajo. V ločevalnem gelu je zamreženost manjša in poteka ločevanje proteinov glede na velikost. Za 12 % ločevalni gel smo zmešali 4,335 ml vode, 2,5 ml puferja (1,5 M Tris-HCl pH 8,8), 100 µl 10 % NaDS in 3,0 ml 40 % akrilamida/bis (akrilamid in N,N'-metilen bisakrilamid). Zamreženje gela smo inducirali z dodatkom 50 µl 10 % APS (amonijev persulfat) in 15 µl reagenta TEMED in mešanico vlili med 1,5 mm razmaknjeni stekelci v nosilcu. Ravno linijo ločevalnega gela smo zagotovili z dodatkom izopropanola, ki smo ga po polimerizaciji gela (20 do 45 min) odlili in popivnali s filtrnim papirjem. Ostank izopropanola smo sprali z vodo. Na ločevalni gel smo vlili 4 % koncentrirni gel, za katerega smo zmešali 3,168 ml vode, 1,250 ml puferja (0,5 M Tris-HCl pH 8,8), 50 µl 10 % NaDS, 500 µl 40 % akrilamida/bis, 25 µl 10 % APS in 8 µl reagenta TEMED. Koncentrirni gel smo vlili do roba stekelc in v režo med stekelcema vstavili glavniček z desetimi žepki.

Vzorce smo za nanos na gel pripravili tako, da smo vzorcu dodali enako količino nanašalnega puferja (za 10 ml: 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 2,0 ml glicerol, 4,0 ml 10 % NaDS, 1,5 ml vode, malo barvila bromfenol modro in 1 mM DTT) in inkubirali 10

min pri 100°C ter centrifugirali 30 s pri 20000 g v mikrocentrifugirki (Eppendorf 5424, Nemčija).

Po polimerizaciji gela smo odstranili glavniček, stekelca vpeli v nosilec in jih prenesli v aparaturo za elektroforezo, kamor smo vili pufer za elektroforezo (2,9 g/L Tris-HCl, 14,4 g/L glicina, 1 g/L NaDS, pH 8,3). V žepke smo odpipetirali pripravljene vzorce (do 50 µl). Elektroforeza je potekala pri konstantnem toku 30 mA/gel približno 70 min.

Gel smo barvali 30 min v 0,2 % raztopini Coomassie Brilliant Blue, pripravljeni v 80 % etanolu in pred uporabo mešani z 20 % ocetno kislino (CH_3COOH) v razmerju 1:1. Zatem smo gel razbarvali v 30 % razbarvalni raztopini (30 % EtOH, 10 % ocetna kislina) oziroma 10 % razbarvalni raztopini (10 % EtOH, 5 % ocetna kislina) ki smo jo večkrat zamenjali, dokler niso postale proteinske lise razločno vidne.

Če smo zaradi nižjih koncentracij proteinov v vzorcu pričakovali, da bo barvanje z modrim barvilm Coomassie Brilliant Blue neuspešno, smo gele barvali z bolj občutljivimi srebrovimi ioni. Najprej smo gel popolnoma razbarvali v 30 % razbarvalni raztopini, ga 30 s izpiraliz dH₂O, sledila je 15 min inkubacija v vodni raztopini $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ s koncentracijo 1 g/L in ponovno izpiranje z dH₂O. Potem smo gel inkubirali vsaj 20 min v sveže pripravljeni vodni raztopini AgNO_3 s koncentracijo 2 g/L. Gel smo razvijali, dokler se proteinske lise niso razločno videle. Reakcijo vezave srebrovih ionov smo prekinili z dodatkom 2 g citronske kisline. Gele smo dokumentirali s sistemom UVItec (UVItec, Velika Britanija).

3.2.7.2 Prenos western

Za detekcijo izpiranja rMcp1 z diskov CIM smo po končani NaDS - PAGE elektroforezi proteine prenesli na poliviniliden fluorid (PVDF) membrano Immobilon-P^{SQ} (Milipore, ZDA). Membrano v velikosti gela smo najprej 5 min inkubirali v 100 % metanolu, zatem še dvakrat v dH₂O in na koncu v pufru za prenos, kjer smo kalibrirali tudi filter-papir in krpice, ki se jih uporablja pri prenosu western. Pufer za prenos smo pripravili tako, da smo zmešali 100 ml pufra (30 g/L Tris-HCl, 58 g/L glicin) z 200 ml 20 % metanola in 3,75 ml 10 % SDS, ter dopolnili do 1 L z dH₂O. Sistem za prenos western smo sestavili tako, da smo na anodno stran mreže najprej položili krpico, potem 3 plasti filter papirja in nato še gel. Na gel smo položili membrano PVDF Immobilon-P^{SQ} in nanjo še tri plasti filter papirja in krpico, ter anodno mrežo pokrili s katodno mrežo in zaprli z varovalom. Med plastmi membrane in gela, smo odstranili mehurčke, saj ti ovirajo prenos. Mrežo smo vstavili v nosilec kadičke, tako da je bila katodna stran mreže obrnjen proti katodi. Ogrodje smo postavili v kadičko za prenos western (BioRad, ZDA) skupaj s hladilno posodico z ledom in prelili s pufrom za prenos. Prenos je potekal pri konstantnem toku 200 mA 90 min.

Po končanem prenosu smo sistem razstavili in membrano inkubirali 1h v 1 x TBS pufru (50 mM Tris-HCl-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4) s 5 % mlekom v prahu. Tako smo s proteini iz mleka zasedli še prosta vezna mesta na membrani. Inkubacija je potekala 1 h pri sobni temperaturi na stresalniku (60 vrt./min). Membrano smo preko noči pri 4°C inkubirali v pufru TBS s 5 % mlekom v prahu in serumom s protitelesi proti Mcp1 v razmerju 1:10000. Naslednji dan smo membrano izpirali s pufrom TBS, ki smo mu dodali Tween (0,5 ml/1 L) - TBST. Pufer TBST smo menjali vsakih 15 min. Po 2 h izpiranja smo membrano 1 h inkubirali s sekundarnimi protitelesi v razmerju 1:20000 v pufru TBS s 5 % mlekom v prahu. Po inkubaciji smo membrano izpirali še 2 h s pufrom TBST. Detekcijo protiteles smo izvedli s kitom Lumilight^{Plus} (Roche, Švica) po navodilih proizvajalca.

3.2.7.3 Določanje encimske aktivnosti s fluorogenim substratom

Aktivnost legumaina v frakcijah po gelski filtraciji smo spremljali s substratom Z-Ala-Ala-Asn-AMC, kjer fluorometrično pri valovni dolžini ekscitacije 370 nm in emisije 460 nm določamo 7-amino-4-metilkumarin (AMC), ki ga odcepljajo encimi iz substrata. Test smo izvedli v mikrotitrski plošči, v vsako izmed vdolbinic smo odpipetirali različne količine (1 µl; 2 µl; 5 µl; 10 µl in 15 µl) izbranih frakcij in pufra (40 mM citronska kislina, 121 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA s 3 mM DTT, pH 5,8) do 100 µl. V vdolbinice smo z multikanalno pipeto odpipetirali 100 µl substrata Z-Ala-Ala-Asn-AMC (300 µM) v pufru 121 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, pH 5,8 in inkubirali 10 min pri 37 °C. S čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan (Safire, ZDA) smo spremljali nastanek produkta z merjenjem fluorescence pri valovni dolžini ekscitacije 370 nm in emisije 460 nm. Spleti vzorec smo pripravili po enakem postopku brez dodatka frakcije.

3.2.7.4 Določanje encimske aktivnosti s kromogenimi substrati

Pri določanju inhibicije encimske aktivnosti v primeru analize frakcij po gelski filtraciji oziroma analize inhibitorne aktivnosti mikrocipinov ali sintetičnega inhibitorja E-64 smo spremljali zmanjšanje intenzivnosti signala kromogenih substratov: benzoiloksikarbonil-Phe-Arg-*p*-nitroanilida (Z-Phe-Arg-*p*NA), benzoiloksikarbonil-Arg-Arg-*p*-nitroanilida (Z-Arg-Arg-*p*NA) in piro-Glu-Phe-Leu-4-nitroanilida (p-Glu-Phe-Leu-*p*NA) (Bachem Feinkemikalien, Švica). Test temelji na spektrofotometričnem določanju *p*-nitroanilida (*p*NA) pri valovni dolžini 405 nm, ki ga od substrata cepijo proteaze s prekinivijo amidne vezi med Arg oziroma Leu in *p*NA.

Po gelski filtraciji smo frakcijam, ki so predvidoma vsebovale rMcp1 določali inhibicijo aktivnosti papaina s substratom Z-Phe-Arg-*p*NA. Test smo izvajali v mikrotitrski plošči.

V vsako izmed vdolbinic smo odpipetirali 20 µl predhodno pripravljene 50 µM raztopine papaina in 100 µl pufra MES (100 mM MES, 100 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 6,5). V vdolbinice smo odpipetirali različne količine (1 µl; 2 µl; 5 µl; 10 µl in 15 µl) posameznih frakcij in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Po tem času smo v vdolbinice z multikanalno pipeto odpipetirali 100 µl substrata 300 µM Z-Phe-Arg-pNA v pufru 50 mM MES, 5 mM EDTA, pH 6,5 in inkubirali 5 min pri 37°C. S čitalcem mikrotitrskh plošč Tecan (Safire, ZDA) smo izmerili absorbanco pri 405 nm (A_{405}). Splei vzorec smo pripravili po enakem postopku, brez dodatka frakcije in encima (papaina). Kontrolni vzorec smo pripravili po enakem postopku brez dodatka inhibitorja.

Po gelski filtraciji izvlečka iz prebavil ličink koloradskega hrošča, smo frakcijam določali inhibicijo aktivnosti substratov Z-Phe-Arg-pNA, Z-Arg-Arg-pNA, p-Glu-Phe-Leu-pNA. Test smo izvajali v mikrotitrski plošči, v vsako izmed vdolbinic smo odpipetirali 60 µl pufra MES (100 mM MES, 10 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 6,5) in 10 µl 100 µM inhibitorja (Mcp1, Mcp3, Mcp4, Clt) oziroma 1 µl 1 mM E-64. Dodali smo 30 µl frakcij po gelski filtraciji z izvlečkom iz prebavil ličink koloradskega hrošča in predinkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. V vdolbinice smo z multikanalno pipeto odpipetirali 100 µl 300 µM substrata v pufru 50 mM MES, 5 mM EDTA, pH 6,5 in inkubirali pri 37°C. S čitalcem mikrotitrskh plošč Tecan (Safire, ZDA) smo merili absorbanco pri 405 nm po 15 min inkubacije in po 1 h. Splei vzorec smo pripravili po enakem postopku, brez dodatka frakcije. Kontrolni vzorec smo pripravili po enakem postopku brez dodatka inhibitorja in vzorca.

3.2.7.5 Test splošne encimske aktivnosti s substratom azokazein

Encimsko aktivnost smo določali s substratom azokazein po metodi, ki jo je prvi opisal Sarath s sod. (1989). Azokazein je modificiran protein s kromogeno azo skupino. Primeren je za določanje aktivnosti različnih razredov proteaz, zaradi nespecifičnosti in širokega območja pH. Metoda temelji na topnosti kromogenih nizkomolekularnih peptidov, ki nastanejo pri hidrolizi azokazeina z endopeptidazami. Nerazgrajene molekule azokazeina in njihove fragmente po končani inkubaciji vzorca s substratom oborimo s triklorocetno kislino (TCA), količino razgrajenega substrata pa merimo spektrofotometrično, pri valovni dolžini 350 nm glede na slepi vzorec.

300 µl vzorca smo dodali 300 µl pufra (250 mM MES, pH 6,5) in 300 µl 0,4 % azokazeina ter inkubirali 40 min v vodni kopeli pri 37°C. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 200 µl 50 % TCA in inkubirali 30 min na ledu. Po centrifugiraju pri 20000 x g (15 min) smo supernatantu izmerili absorbanco (spektrofotometer Lambda 25, PerkinElmer, ZDA) pri 350 nm glede na slepi vzorec.

Inhibicijo encimske aktivnosti s substratom azokazein smo določali z mikocipini in s sintetičnim inhibitorjem E-64. Test je potekal enako kot je opisano zgoraj, z dodatkom 5 μM inhibitorjev Mcp1, Mcp3, Mcp4, Clt in E-64 v končni koncentraciji 5 μM in predinkubacijo (10 min pri sobni temperaturi) pred dodatkom azokazeina.

3.2.7.6 Masna spektrometrija

Masna spektrometrija je analitično orodje, kjer s pomočjo električnega in magnetnega polja ločimo ione glede na njihov količnik m/z (masa na naboj). S pomočjo masne analize proteinskih fragmentov lahko ugotovimo njihovo aminokislinsko zaporedje in jih identificiramo.

Za analizo proteinov smo uporabili masno spektrometrijo z ionizacijo z elektrorazprševanjem - ESI (angl.: electrospray ionisation), kjer se peptidi ionizirajo v tekočinskem pretoku, ki ga ustvarja aparatura HPLC. Iz kapilare se tekočina razprši v megleico, površina posameznih kapljic pa se ob vstopu v močno elektromagnetno polje nabije. Z izhlapevanjem topila se kapljice manjšajo, naboj na površini pa se povečuje. V električnem polju nabiti proteini potujejo do analizatorja mas, kjer peptide v omejenem prostoru zadržujejo elektrode. Detektor zazna odklane nabitih delcev in jih prikaže v masnem spektru (Wilson in Walker, 2005; Eidhammer, 2007). Za identifikacijo proteinov se uporablja programska oprema, ki eksperimentalno dobljene rezultate primerja s podatki v izbranih podatkovnih bazah. Analizo rezultatov smo izvedli s pomočjo programa Scaffold 3 (Proteome Software).

Vzorec iz prebavil koloradskih hroščev, ki smo ga pridobili z afinitetno kromatografijo na disku CIM z rMcp1 na glutaraldehydni ročici smo analizirali z NaDS - PAGE. Gel NaDS - PAGE smo po elektroforezi pobarvali s Coomassie Brilliant Blue R-250 (GE Healthcare), izrezali močnejše proteinske lise in jih pripravili za masno spektrometrijo po protokolu za razgradnjo v gelu. Protokol vključuje razbarvanje izrezanih proteinskih lis, razgradnjo s tripsinom, ekstrakcijo peptidov, redukcijo in alkilacijo ter sušenje vzorcev. Pripravljene vzorce smo identificirali z masno spektrometrijo. Analizo je izvedel dr. Jure Pohleven z a za biotehnologijo na Inštitutu Jožef Stefan na masnem spektrometru MSD Trap XCT Ultra (Agilent, ZDA).

3.2.7.7 Izoelektrično fokusiranje

Izoelektrično fokusiranje (IEF) je posebna vrsta elektroforeze, ki poteka na šibko zamreženih horizontalnih gelih, prepojenih z amfoliti, ki v stopnji predfokusiranja ustvarijo gradient pH, po katerem se razporedijo proteini iz vzorca glede na

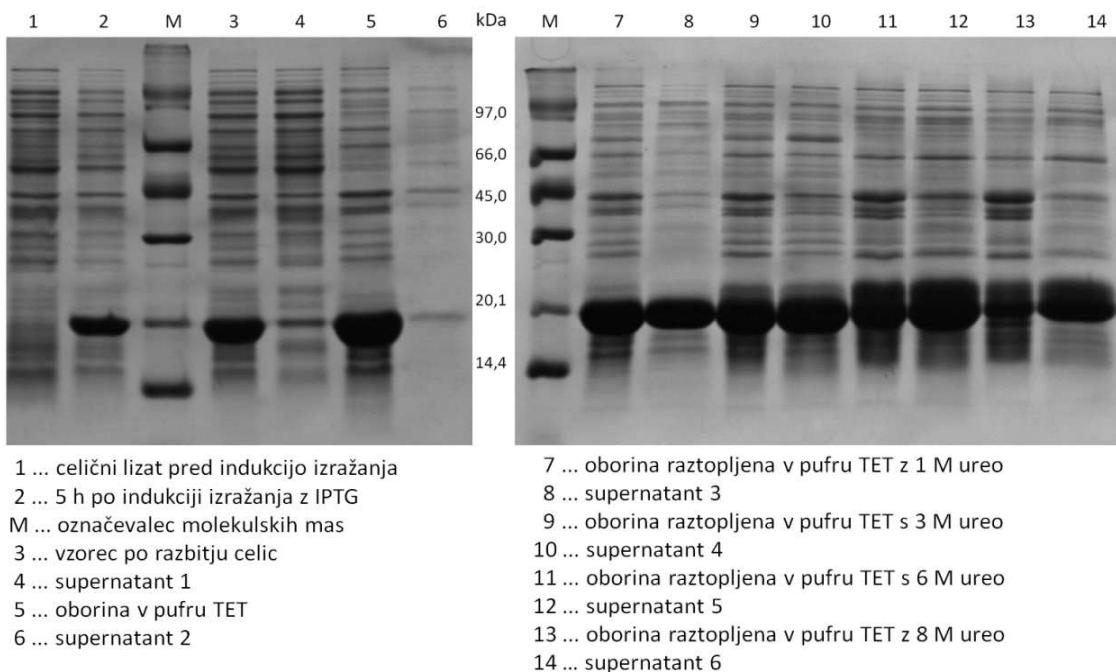
izoelektrično točko proteina. Za IEF smo uporabili aparaturo PhastSystemTM in gele Phastgel (3 - 9) (GE Healthcare). Po končanem izoelektričnem fokusiranju smo gele 5 minut inkubirali v 20 % TCA, da se proteini oborijo. Po inkubaciji (5 min) v razbarvalni raztopini, ki smo jo pripravili z mešanjem metanola, ocetne kisline in dH₂O v razmerju 1 : 3 : 6, smo gele 1 h barvali z raztopino Coomassie Brilliant Blue, ki smo jo v razmerju 1 : 9 pripravili v 30 % EtOH, 10 % ocetni kislini, in 0,1 % raztopini CuSO₄. Gel smo primerno razbarvali z večkratno zamenjavo razbarvalne raztopine, dokler se proteinske lise niso razločno videle. Gele smo dokumentirali s sistemom UVItc (UVItc, Velika Britanija).

4 REZULTATI

4.1 PRIPRAVA AFINITETNE KROMATOGRAFIJE

4.1.1 Heterologno izražanje makrocipina 1

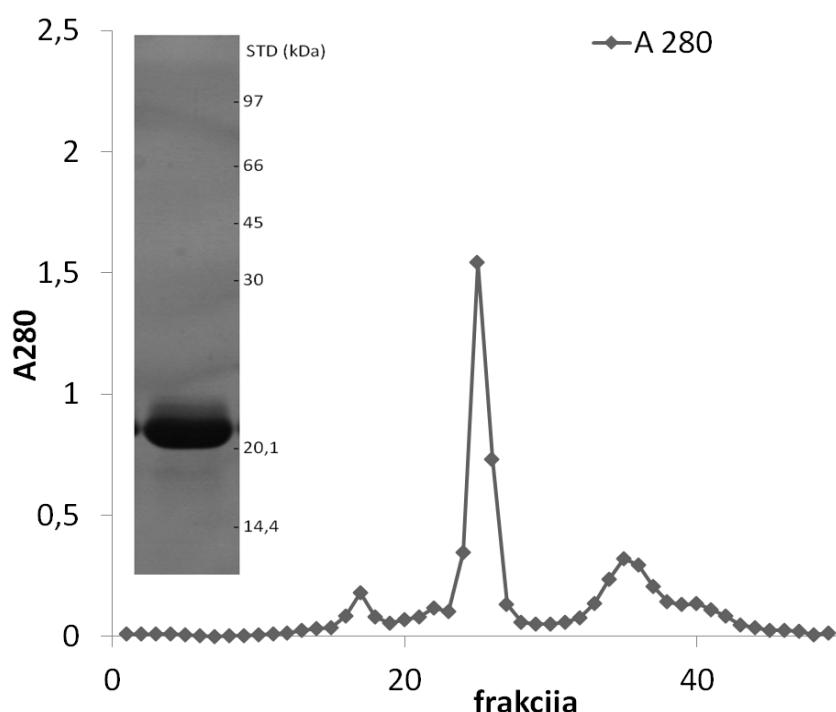
Rekombinantni makrocipin (rMcp1) smo pripravili v bakterijskem ekspresijskem sistemu. Ekspresijski vektor pET11a::rMcp1a smo transformirali v bakterijski sev *E. coli* BL21(DE3), ki omogoča prekomerno izražanje po indukciji z laktoznim analogom IPTG. Pet ur po indukciji z IPTG je bil nivo izražanja proteina povečan, kar je razvidno iz slike 12 - linija 2, kot močnejša lisa pri 21 kDa, kjer smo pričakovali rMcp1. Celice smo po gojenju razbili s sonikacijo. Rekombinantni Mcp1 se je izražal v obliki netopnih inkluzijskih teles, ki smo jih raztopljalji s postopnim zviševanjem koncentracije uree v pufru TET (1 M, 3 M, 6 M in 8 M urea). V nereducirajočih pogojih rMcp1 oblikuje dimere s tvorbo disulfidnih vezi med cisteini (Sabotič in sod., 2009). Z dodatkom reducenta DTT v končni koncentraciji 5 mM, smo preprečili tvorbo dimerov. V nasprotnem primeru, sta na poliakrilamidni elektroforezi v prisotnosti NaDS vidni proteinski lisi pri 21 kDa in pri 42 kDa.



Slika 12: Analiza izražanja rekombinantnega makrocipina 1
Gel NaDS - PAGE (12 % poliakrilamidni gel obarvan z modrim barvilom Coomassie Brilliant Blue).

4.1.2 Čiščenje in karakterizacija makrocipina 1

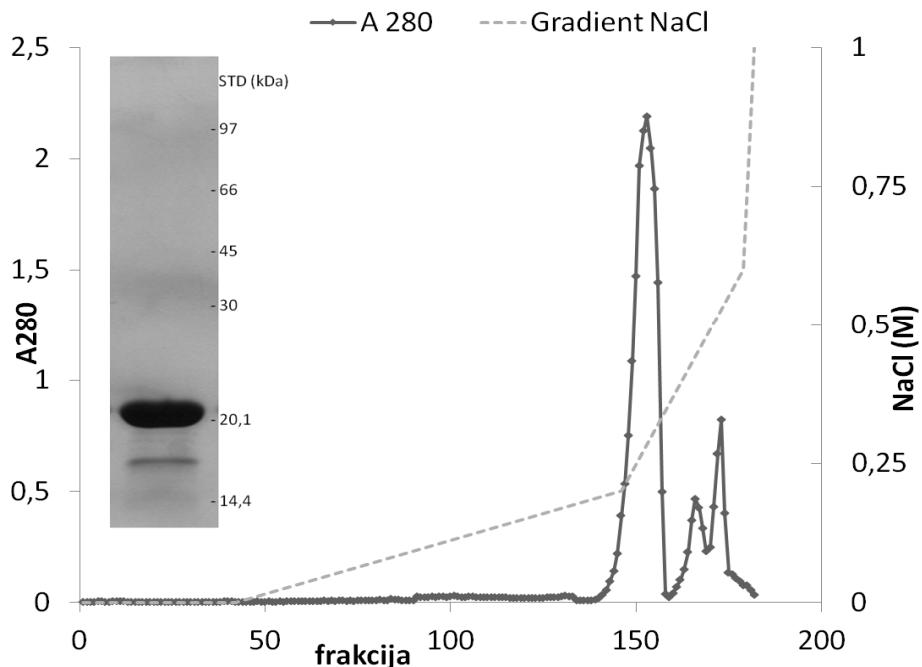
Rekombinantni makrocipin 1 smo čistili z gelsko filtracijo (slika 13) in z ionsko izmenjevalno kromatografijo (slika 14). Frakcijam smo merili absorbanco pri 280 nm in jih določali prisotnost inhibitorja cisteinskih proteaz s testom inhibicije papaina s substratom Z-Phe-Arg-*p*NA. Po gelski filtraciji smo določili največjo specifično aktivnost v drugem kromatografskem vrhu od treh. Frakcije z največjo inhibitorno aktivnostjo smo združili in skoncentrirali z ultrafiltracijo. Ureo smo iz topila odstranili z dializo v dializnem črevesu, ki zadrži proteine, večje od 10 kDa.



Slika 13: Čiščenje makrocipina 1 z gelsko filtracijo

Koncentracija proteinov izmerjena kot absorbanca pri 280 nm za posamezno frakcijo. Slika gela NaDS - PAGE prikazuje proteine v drugem kromatografskem vrhu (12 % poliakrilamidni gel obarvan z modrim barvilm Coomassie Brilliant Blue).

Z gelsko filtracijo očiščen Makrocipin 1 smo nadalje čistili z ionsko izmenjevalno kromatografijo (slika 14). Inhibicijo aktivnosti papaina s substratom Z-Phe-Arg-*p*NA smo določili za vse tri kromatografske vrhove po ionsko izmenjevalni kromatografiji (ni prikazano). Prvi kromatografski vrh je pokazal večjo specifično aktivnost. Za pripravo afinitetnih monolitnih kolon smo uporabili rMcp1, ki smo ga očistili z gelsko filtracijo.



Slika 14: Čiščenje makrocipina 1 z ionsko izmenjevalno kromatografijo

Koncentracija proteinov, izmerjena kot absorbanca pri 280 nm za posamezno frakcijo. Črtkano: gradient NaCl od 0 M do 0,2 M, od 0,2 M do 0,6 M in od 0,6 M do 1,0 M. Slika gela NaDS - PAGE prikazuje proteine v prvem kromatografskem vrhu (12 % poliakrilamidni gel obarvan z modrim barvilkom Coomassie Brilliant Blue).

4.1.2.1 Določitev koncentracije makrocipina 1

Pred vezavo rMcp1 kot liganda na monolitni nosilec smo določili koncentracijo proteinov po Beer-Lambertovem zakonu. Skoncentriranim vzorcem smo izmerili A₂₈₀ in izračunali koncentracijo proteinov (preglednica 5). Iz 1 L bakterijske kulture smo s postopki čiščenja pridobili približno 100 mg očiščenega rMcp1.

Preglednica 5: Izračun koncentracije [mg/ml] očiščenega rMcp1 po gelski filtraciji in po ionsko izmenjevalni kromatografiji

Tip kromatografije	A ₂₈₀	c (mg/ml)	V (ml)
Gelska filtracija	12,892	5,0	20,0
Ionsko izmenjevalna kromatografija	11,425	4,5	13,8

4.2 PRIPRAVA MONOLITNIH DISKOV CIM Z MAKROCIPINOM 1

Na ustrezeno pripravljene monolitne diske CIM smo kovalentno vezali rMcp1. Priprava monolitnih diskov CIM vključuje izpiranje monolitnega materiala po polimerizaciji in kemijsko aktivacijo veznih mest z reagenti. rMcp1 smo kovalentno vezali s prečrpanjem raztopine liganda skozi kolono in inkubacijo, podrobnosti so opisane v metodah pod točko 3.2.2 in 3.2.3.

Pri različnih reakcijskih pogojih (preglednica 6) smo pripravili tri diske CIM epoksi in dva diska CIM CDI. Disk epoksi ima proste epoksi skupine, na katere se z aminsko vezjo veže rMcp1 prek aminskega konca. Prednost diska CIM CDI je hitrejša reakcija med aminskim koncem makrocipina in imidazolnimi skupinami na aktiviranem nosilcu v stabilno karbamatno vez. Imobilizaciji, ki smo ju uporabili, sta enostavni, vendar se pogosto zgodi, da so aktivna mesta imobiliziranega proteina slabo dostopna, kar se odraža v nižji kapaciteti in slabši separaciji (Benčina in sod., 2004; Nicoli in sod., 2008). Z različnimi pufri smo žeelieli poiskati najprimernejše pogoje za vezavo rMcp1 na afinitetni monolitni nosilec.

Preglednica 6: Pregled uporabljenih pufrov za imobilizacijo rMcp1 na diske CIM epoksi in diske CIM CDI

Tip diska CIM, pH	Pufer
epoksi	
pH 3,0	0,5 M acetatni pufer
pH 7,0	0,5 M fosfatni pufer
pH 8,5	0,5 M NaHCO ₃ z 0,3 M NaCl
CDI:	
pH 3,0	0,5 M acetatni pufer
pH 7,0	0,5 M fosfatni pufer

Glede na izkušnje z afinitetno kromatografijo z makrocipinom na Sefarozi (Mustar, 2009), smo določili pogoje separacije (preglednica 7), ki so zagotavljali obstojnost proteinov za nadaljnje analize. Ker imobilizacija in izpiranje z nizkim pH povzročata denaturacijo proteinov, smo izprane frakcije proteinov v najkrajšem možnem času nevtralizirali z 2 M pufrom Tris-HCl, pH 8,0. Učinkovitost in primernost afinitetne kromatografije na monolitnih diskih CIM z vezanim rMcp1 smo preverjali s cisteinsko proteazo papain, ki jo rMcp1 močno inhibira (Sabotič in sod., 2009). Za merilo učinkovitosti separacije smo izbrali dinamično kapacitetno, ki upošteva pretok mobilne faze, čas pri 50 % preboju, prosti volumen diska z ohišjem, volumen diska in koncentracijo spojine v vzorcu (podrobnejši opis pod točko 2.6.5.1).

Preglednica 7: Pogoji separacije papaina na diskih CIM z rMcp1

Pogoji separacije

Vezna mobilna faza: 0,1 M Tris-HCl pH 7,0 z 0,3 M NaCl

Elucijska mobilna faza: 0,02 M NaOH, pH 11,0

Pretok 1 ml/min

Vzorec: 1 mg/ml papain, raztopljen v vezni mobilni fazi

Nevtralizacija izpranih frakcij z 2 M Tris-HCl pH 8,0

4.2.1 Preverjanje delovanja monolitnih diskov CIM z makrocipinom 1

Za določitev ugodnih pogojev separacije smo uporabili osnovni disk CIM epoksi z rMcp1. Preverili smo ali so vezna mesta za papain na kovalentno vezanem rMcp1 dostopna za papain v pufru. Zatem smo določili dinamično kapaciteto diska CIM, morebitno izpiranje rMcp1, najprimernejše pogoje izpiranja in preverili specifičnost interakcij.

4.2.1.1 Določanje dinamične kapacitete diskov CIM epoksi z rMcp1

Dinamično kapaciteto diskov CIM epoksi z rMcp1 smo določali s prebojno krivuljo s papainom, vendar so bile kapacitete zanemarljive (preglednica 8). Na osnovi kapacetit in denaturacijskih pogojev smo določili, da je za reakcije med imobilizacijo rMcp1, najprimernejši 0,5 M fosfatni pufer, pH 7,0.

Preglednica 8: Kapacitete diskov CIM epoksi z rMcp1

pH pufra med imobilizacijo rMcp1	Kapaciteta diska CIM
pH 3,0	0,50 mg/ml
pH 7,0	0,42 mg/ml
pH 8,5	0,29 mg/ml

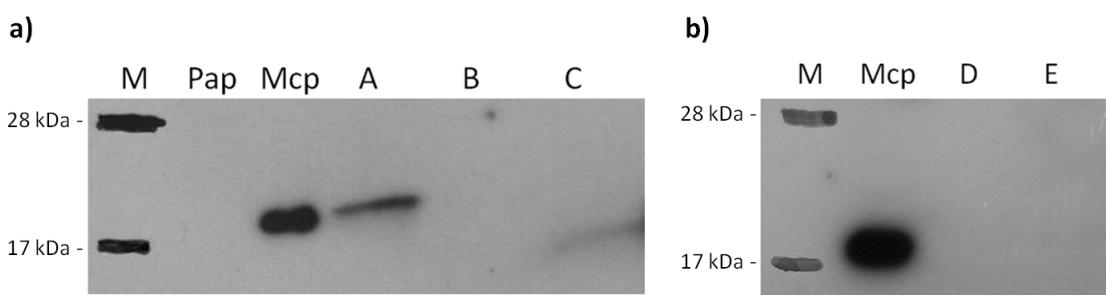
Zaradi nizkih kapacetet, smo pri višji temperaturi z rMcp1 imobilizirali dva nova diska CIM epoksi z inkubacijo v 0,5 M fosfatnem pufru pH 7,0 (preglednica 9). Višjo kapaciteto smo določili pri disku CIM epoksi z rMcp1 pripravljenim z inkubacijo pri 45°C, zato smo ta disk uporabili za vse dodatne analize.

Preglednica 9: Kapacitete diskov CIM epoksi z rMcp1 pri različnih pogojih imobilizacije rMcp1

Tip diska CIM, pH pufra med imobilizacijo rMcp1	Temperatura inkubacije med imobilizacijo rMcp1	Kapaciteta diska CIM
Epoksi, pH 7,0	T = 35°C	0,34 mg/ml
Epoksi, pH 7,0	T = 45°C	0,74 mg/ml

4.2.1.2 Preverjanje izpiranja makrocipina 1

Morebitno izpiranje rMcp1 z diskov CIM, imobiliziranih z rMcp1 pri različnih pogojih, smo preverili s protitelesi proti makrocipinu, s prenosom western. Iz odtisa je razvidno (slika 15), da se je rMcp1 izpiral z diska CIM epoksi, pripravljenega pri pH 3,0 (slika 15 - stolpec A). Z diskov CIM CDI se rMcp1 med afinitetno kromatografijo ni izpiral (slika 15).

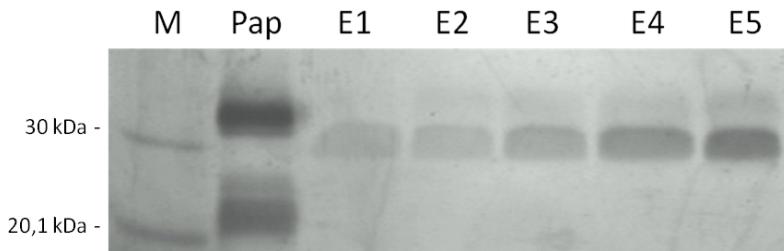


Slika 15: Preverjanje izpiranja rMcp1 z diskov CIM s prenosom western

a) Izpiranje pri diskih CIM epoksi z rMcp1: M – označevalec molekulskih mas; Pap – papain; Mcp – makrocipin 1, A – disk CIM epoksi z rMcp1 pH 3,0; B – disk CIM epoksi z rMcp1 pH 7,0; C – disk CIM epoksi z rMcp1 pH 8,5; b) Izpiranje pri diskih CIM CDI z rMcp1: M – označevalec molekulskih mas, Mcp – makrocipin, D – disk CIM CDI z rMcp1 pH 3,0; E – disk CIM CDI z rMcp1 pH 7,0.

4.2.1.3 Zamenjava elucijske mobilne faze

Določili smo nove elucijske pogoje za afinitetno kromatografijo na diskih CIM z rMcp1, saj smo opazili zmanjšanje aktivnosti papaina po izpiranju z 0,02 M NaOH pH 11,0. Kljub hitri nevtralizaciji je analiza vezanih frakcij papaina na NaDS - PAGE pri izpiranju z NaOH pokazala dve proteinski lis v velikosti okrog 30 kDa (slika 16 – E1 do E5). Elucijsko mobilno fazo 0,02 M NaOH pH 11,0 smo zamenjali z 0,1 M glicinom, pH 2,0 (preglednica 10). Pri izpiranju vezanega papaina v kislih pogojih nismo več opazili dvojnih lis na gelu NaDS – PAGE (slika 19).



Slika 16: Analiza NaDS - PAGE papaina po izpiranju z NaOH

Za izpiranje vezanega papaina z disk CIM epoksi z rMcp1 smo uporabili 0,02 M NaOH, pH 11,0. M – označevalec molekulskih mas; Pap - raztopina papaina v pufru 0,1 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl, pH 7,0, ki smo jo nanesli na afinitetne diske; E1 do E5 – vzorci papaina, ki smo jih z diskov CIM epoksi z rMcp1 izprali z 0,02 M NaOH, pH 11,0.

Preglednica 10: Pogoji separacije papaina na diskih CIM z rMcp1 po optimizaciji elucijske mobilne faze

Pogoji separacije

Vezna mobilna faza: 0,1 M Tris-HCl pH 7,0 z 0,3 M NaCl

Elucijska mobilna faza: 0,1 M glicin pH 2,0

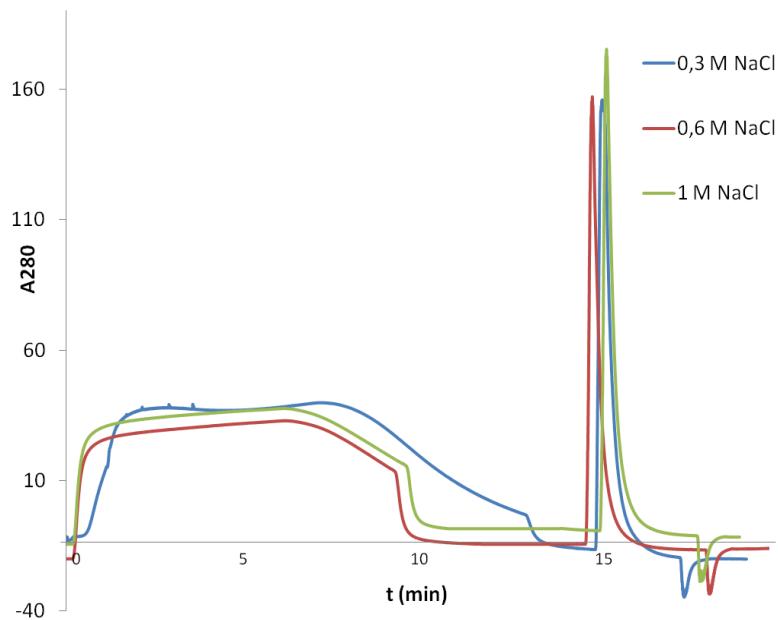
Pretok: 1 ml/min

Vzorec: 1 mg/ml papain, raztopljen v vezni mobilni fazi

Nevtralizacija z 2 M Tris-HCl pH 8,0

4.2.1.4 Zamenjava mobilne faze

Pri določanju kapacitete diskov CIM z rMcp1 smo opazili, da se z daljšim časom nanašanja papaina na disk CIM, poveča elucijski vrh in njegova površina. Predvidevali smo, da je to posledica nečistoč v vzorcu papaina in posledica nespecifičnih interakcij med monolitnim nosilcem in vzorcem. Da bi se izognili nespecifičnim vezavam, smo pripravili tri vezne mobilne faze z različnimi koncentracijami soli (0,1 M Tris-HCl pH 7,0 z 0,3 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl pH 7,0 z 0,6 M NaCl in 0,1 M Tris-HCl pH 7,0 z 1,0 M NaCl) in primerjali površine elucijskih vrhov (slika 17). Večjih razlik nismo opazili, zato smo se odločili za zamenjavo vezne mobilne faze z 0,3 M NaCl z vezno mobilno fazo z 0,6 M NaCl in tako predvidoma zmanjšali vpliv ionskih interakcij pri vezavi (preglednica 11).



Slika 17: Vpliv koncentracije soli v vezni mobilni fazi na ločevanje papaina z diskom CIM CDI z rMcp1

Vezna mobilna faza 0,1 M Tris-HCl pH 7,0 z 0,3 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl pH 7,0 z 0,6 M NaCl in 0,1 M Tris-HCl pH 7,0 z 1,0 M NaCl; elucijska mobilna faza 0,1 M glicin pH 2,0; pretok 1 ml/min; 10 min nanašanja papaina - 1 mg/ml v vezni mobilni fazi.

Preglednica 11: Pogoji separacije po optimizaciji vezne mobilne faze

Pogoji separacije

Vezna mobilna faza: 0,1 M Tris-HCl pH 7,0 in 0,6 M NaCl

Elucijska mobilna faza: 0,1 M glicin, pH 2,0

Pretok: 1 ml/min

Vzorec: 1 mg/ml papain, raztopljen v mobilni fazi A

Nevtralizacija z 2M Tris-HCl, pH 8,0

4.2.2 Priprava diskov CIM z ročicami

Da bi še bolj izpostavili aktivna mesta rMcp1, smo pripravili štiri diske z ročicami ali distančniki (ang. »spacer molecules«). Nizkomolekularna ročica odmakne ligand od nosilca in tako izpostavi vezna mesta liganda ter olajša vezavo večjih tarčnih molekul (Cuatrecasas in sod., 1968).

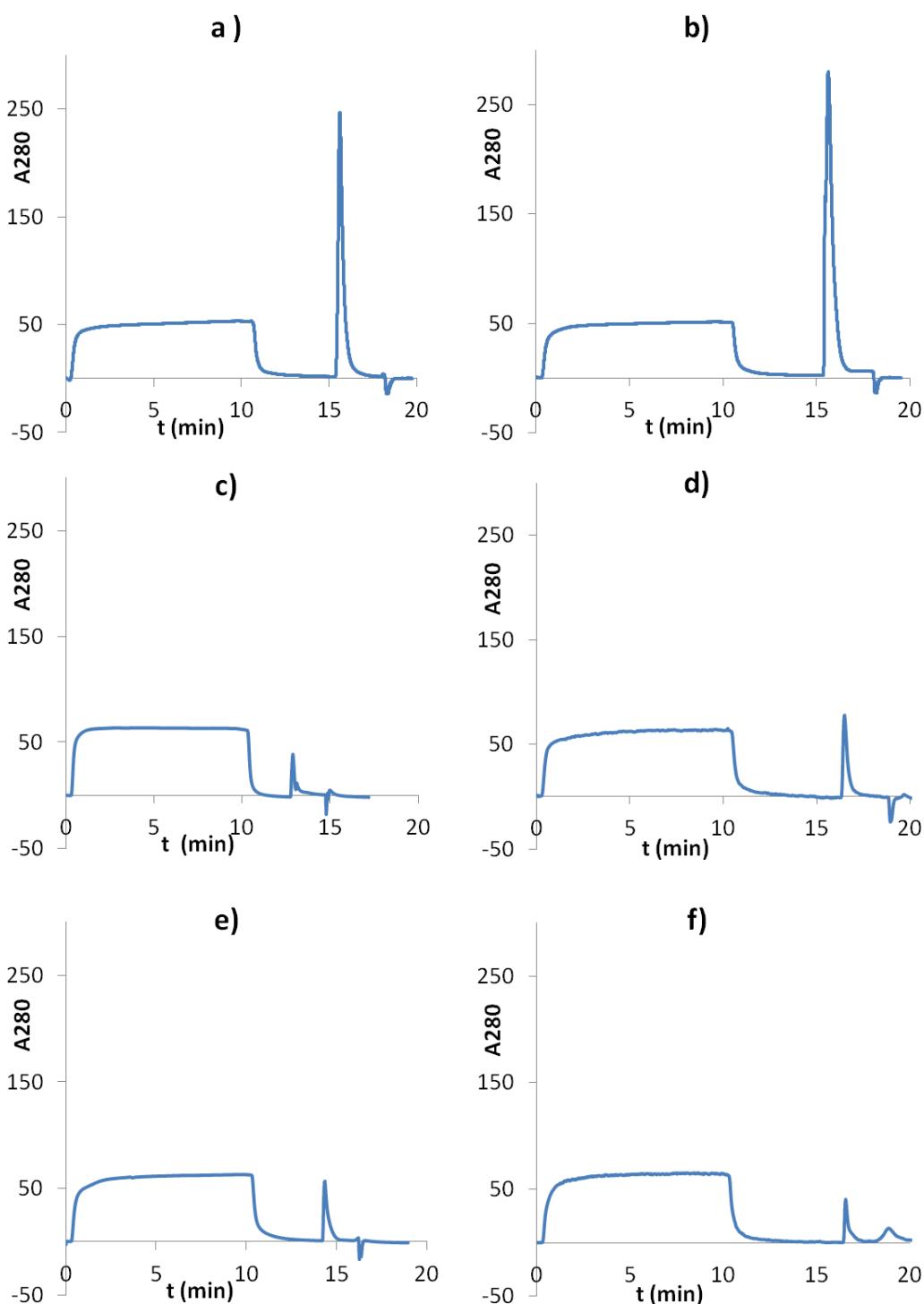
Pripravili smo naslednje diske CIM:

- Disk CIM z rMcp1 na ročici iz etilendiamina (aminska skupina na koncu kraje ročice iz dveh C atomov). Priprava podrobnejše opisana pod točko 2.6.3.1.
- Disk CIM z rMcp1 na daljši ročici iz 1,6 diaminoheksana (aldehidna skupina na koncu ročice). Priprava podrobnejše opisana pod točko 2.6.3.2.
- Disk CIM z rMcp1 na glutaraldehydni ročici (aldehidna skupina na koncu ročice). Priprava podrobnejše opisana pod točko 2.6.3.3.
- Hidroliziran disk CIM z rMcp1 na ročici iz 1,4-butandiol diglicidil etra (epoksi skupina na koncu ročice). Priprava podrobnejše opisana pod točko 2.6.3.4.

4.2.2.1 Določanje kapacitete diskov CIM z rMcp1

Pri vseh diskih CIM smo vsaj nekaj rMcp1 immobilizirali na disk CIM, kar je bil predpogoj za preverjanje afinitete liganda do cisteinske proteaze papain. Uspešnost immobilizacije rMcp1 smo preverili tako, da smo injicirali 10 ml raztopine papaina s koncentracijo 1 mg/ml na posamezen disk CIM z rMcp1 in posneli kromatogram. Papain, ki se je afinitetno vezal na ligand se je izpral v elucijski frakciji. V nasprotnem primeru se je papain izpral skupaj s prostim volumnom diska. Kapaciteto smo določali na enak način, kot za diske CIM epoksi z rMcp1 in diske CIM CDI z rMcp1.

Na osnovi primerjave elucijskih kromatogramov (slika 18), smo se odločili za nadaljevanje optimizacije in karakterizacije za disk CIM CDI z rMcp1 (slika 18 a), disk CIM z rMcp1 na glutaraldehydni ročici (slika 18 b) in disk CIM epoksi z rMcp1 (slika 18 d). Pri teh diskih je rMcp1 vezan na nosilec prek aminske vezi na imidazol-karbamat, aldehydno skupino ali epoksi skupino. Ostali disk (CIM EDA z rMcp1, CIM z rMcp1 na 1,4 BDGE, CIM z rMcp1 na diaminoheksanu) so v primerjavi z omenjenimi kazali slabše karakteristike vezave (slika 18 c, e, f). Zaradi strukture ročice je rMcp1 pri disku CIM EDA in disku CIM z ročico iz diaminoheksana, vezan na nosilec prek karboksilne skupine. Kaže, da vezna mesta, ki rMcp1 immobilizirajo na nosilec prek karboksilnega konca, ne omogočajo zadostne inhibicije in s tem zadrževanja papaina na rMcp1 med nanašanjem z nevezno mobilno fazo. Ročici z 1,4 BDGE in diaminoheksanom sta hidrofobni, kar dodatno ovira vezavo rMcp1 na ročico. Vezna mesta rMcp1 se po immobilizaciji na monolitni disk CIM najbolje ohranijo pri vezavi prek aminskega konca, kot je razvidno iz elucijskih diagramov za disk CIM CDI z rMcp1, disk CIM z rMcp1 na glutaraldehydni ročici in disk CIM epoksi z rMcp1.



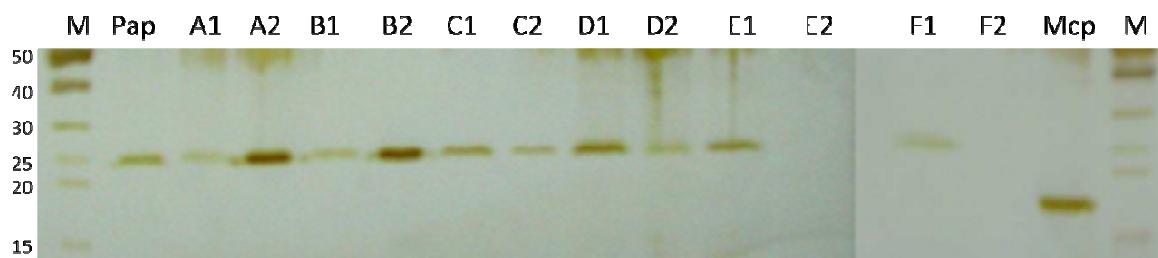
Slika 18: Elucijski diagrami po 10 min nanašanja papaina za monolitne diske CIM immobilizirane z rMcp1

a) Disk CIM CDI z rMcp1; b) Disk CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici; c) Disk CIM z rMcp1 na diaminoheksanski ročici; d) Disk CIM epoksi z rMcp1; e) Disk CIM z rMcp1 na ročici 1,4 BDGE; f) Disk CIM EDA z rMcp1; Pogoji separacije: Vezna mobilna faza 0,1 M Tris-HCl pH 7,0 in 0,6 M NaCl; elucijska mobilna faza 0,1 M glicin pH 2,0; pretok 1 ml/min; 10 min nanašanja papaina (1 mg/ml) v vezni mobilni fazi.

4.2.2.2 Analiza vezave papaina na diske CIM z rMcp1

Z NaDS - PAGE smo analizirali vezane in nevezane frakcije papaina, ki smo ga očistili z afinitetno kromatografijo na monolitnih diskih CIM z rMcp1. Po 5 min nanašanja papaina s koncentracijo 1 mg/ml pri pretoku 1 ml/min, smo vezane proteine izprali z nevezno mobilno fazo. Vzorčili smo tako vezno mobilno fazo kot tudi nevezno mobilno fazo. V primeru specifične vezave papaina na imobiliziran rMcp1, smo pričakovali močnejšo liso izprane frakcije na gelu NaDS - PAGE.

Pri diskih CIM, kjer do vezave ni prišlo (epoksi z rMcp1, z rMcp1 na ročici 1,4-BDGE, EDA z rMcp1, z rMcp1 na diaminoheksanski ročici), smo opazili močnejšo liso pri vzorcu med nanašanjem papaina v vezni mobilni fazi (slika 19 stolpci C1, D1, E1, F1), kot pri izpranih proteinih (slika 19 stolpci C2, D2, E2, F2). Pri disku CIM CDI z rMcp1 in disku z rMcp1 na glutaraldehidni ročici je razvidno, da jev izpranih frakcijah več proteinov (slika 19 stolpca A2, B2), kot v nevezanih frakcijah med nanašanjem (slika 19 stolpca A1, B1).



Slika 19: Analiza NaDS - PAGE nevezanih in vezanih frakcij na diske CIM z rMcp1

Nevezane frakcije smo vzorčili v tretji minutni, od skupno petih minut nanašanja papaina s koncentracijo 1 mg/ml pri pretoku 1 ml/min. Oznake stolpcev: M – označevalec molekulskih mas; Pap – papain (1 mg/ml); A1 – nevezan papain pri disku CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici; A2 – eluat; B1 – nevezan papain pri disku CIM CDI z rMcp1; B2 – eluat; C1 – nevezan papain pri disku CIM epoksi z rMcp1; C2 – eluat; D1 – nevezan papain pri disku CIM z rMcp1 na ročici 1,4 BDGE; D2 – eluat; E1 – nevezan papain pri disku CIM EDA z rMcp1, E2 – eluat; F1 – nevezan papain pri disku CIM z rMcp1 na 1,6 diaminoheksanski ročici; F2 – eluat; Mcp – makrocipin 1. Gel smo barvali s srebrovim nitratom.

Pri analizi z NaDS - PAGE smo opazili lise v velikosti med 40 in 50 kDa, kar bi lahko ustrezalo dimerom makrocipina, zato smo s prenosom western (slika 20) še enkrat preverili ali se rMcp1 izpira iz diskov CIM z rMcp1. Razporeditev vzorcev za prenos western (slika 20) je enaka razporeditvi za analizo NaDS - PAGE (slika 19). Pozitiven signal, ki pomeni izpiranje rMcp1 in njegovo detekcijo s protitelesi proti makrocipinu, smo zaznali samo pri disku CIM z rMcp1 na diaminoheksanski ročici (slika 20 – stolpec F1), kjer gre za vezavo prek karboksilne skupine, hkrati pa ima ta ročica hidrofoben značaj. Imobilizacija makrocipina prek ostalih ročic je bila učinkovitejša, saj ni prišlo do izpiranja.

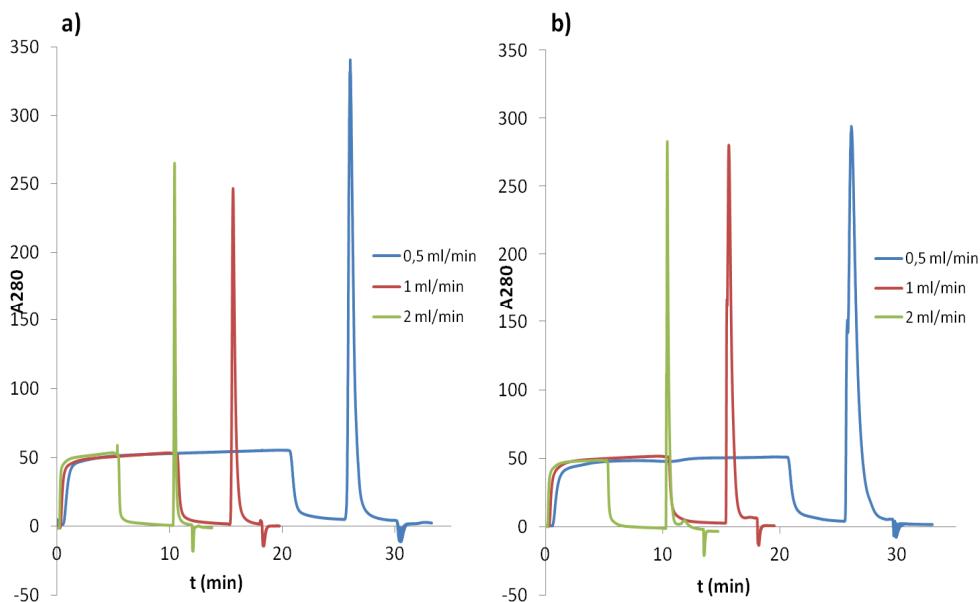


Slika 20: Prenos western nevezanih in vezanih frakcij na diske CIM z rMcp1

Nevezane frakcije smo vzorčili v tretji minut, od skupno petih minut nanašanja papaina s koncentracijo 1 mg/ml pri pretoku 1 ml/min. Oznake vzorcev so enake kot pri sliki 19.

4.2.2.3 Vpliv pretoka na vezavo papaina

Nadaljevali smo z analiziranjem karakteristik diska CIM CDI z rMcp1 in diska CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici. Spreminjali smo kontaktni čas med rMcp1 in papainom s spremenjanjem hitrosti pretoka (0,5 ml/min; 1,0 ml/min; 2 ml/min) za disk CIM CDI z rMcp1 (Slika 21) in disk CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici (Slika 21). Z elucijskega diagrama je razvidno, da daljši zadrževalni čas papaina v disku vpliva na površino elucijskega vrha. Površina elucijskega vrha se nekoliko povečuje z nižanjem pretoka tako pri disku CIM CDI z rMcp1 (Slika 21) kot pri disku CIM z rMcp1 vezanim prek glutaraldehidne ročice (Slika 21).



Slika 21: Vpliv pretoka na vezavo papaina na diske CIM z rMcp1

a) Disk CIM CDI z rMcp1: Vezna mobilna faza 0,1 M Tris-HCl pH 7,0 in 0,6 M NaCl; elucijska mobilna faza 0,1 M glicin pH 2,0; koncentracija papaina 1 mg/ml; pretok 0,5 ml/min; 1 ml/min; 2 ml/min. b) disk CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici: Vezna mobilna faza 0,1 M Tris-HCl pH 7,0 in 0,6 M NaCl; elucijska mobilna faza 0,1 M glicin pH 2,0; koncentracija papaina 1 mg/ml; pretok 0,5 ml/min; 1 ml/min; 2 ml/min.

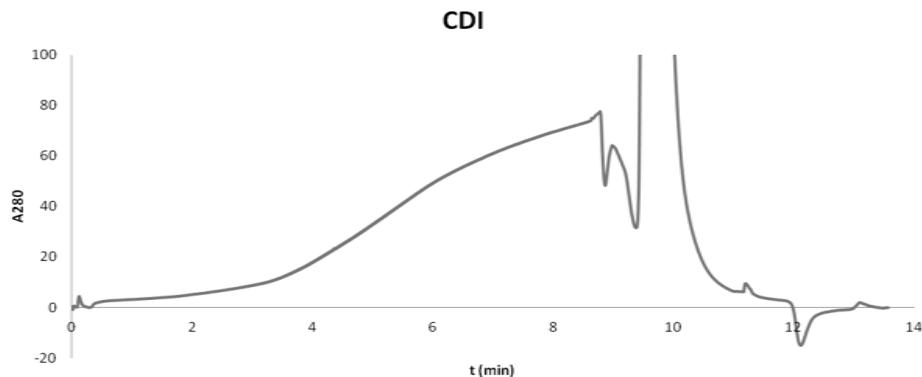
4.2.2.4 Določanje dinamične kapacitete diskov CIM z rMcp1 s prečiščenim papainom

Kapaciteto monolitnih diskov CIM z rMcp1 smo natančneje določili z očiščenim papainom. Pred ponovnim določanjem kapacitet smo zbrali več elucijskih frakcij papaina po 10-minutnem nanašanju na disk CIM CDI z rMcp1. Naš namen je bil pridobiti aktiven papain z ohranjenimi aktivnimi mesti. Frakcijam smo zamenjali topilo (0,1 M glicin pH 2,0) s »PD-10 desalting columns« (GE Healthcare), da bi se izognili vplivu elucijske mobilne faze na papain. Po zamenjavi pufra smo vzorec papaina v vezni mobilni fazi (0,1 M Tris-HCl, 0,6 M NaCl, pH 7,0), nanesli na diske CIM z rMcp1 v pogojih separacije, ki so opisani v preglednici 11. Iz prebojnih krivulj za disk CIM CDI z rMcp1 (slika 22 a), disk CIM z rMcp1 na glutaraldehydni ročici (slika 22 b) in disk CIM epoksi z rMcp1 (slika 22 c) smo določili dinamične kapacitete (preglednica 12) po enačbi (enačba 2). Največjo dinamično kapaciteto, ki nam pove količino papaina (mg), ki se lahko veže na prosta vezna mesta rMcp1 glede na volumen diska CIM, smo določili pri disku CIM z rMcp1 imobiliziranim prek glutaraldehydne ročice.

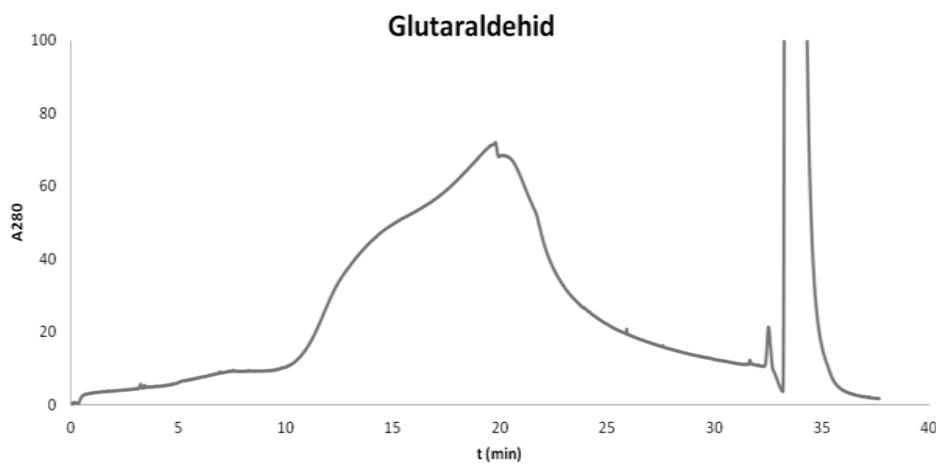
Preglednica 12: Dinamične kapacitete diskov CIM z rMcp1

Disk	Dinamična kapaciteta (mg/ml)
CIM epoksi z rMcp1	0,34 mg/ml
CIM CDI z rMcp1	5,1 mg/ml
CIM z rMcp1 na glutaraldehydni ročici	9,2 mg/ml

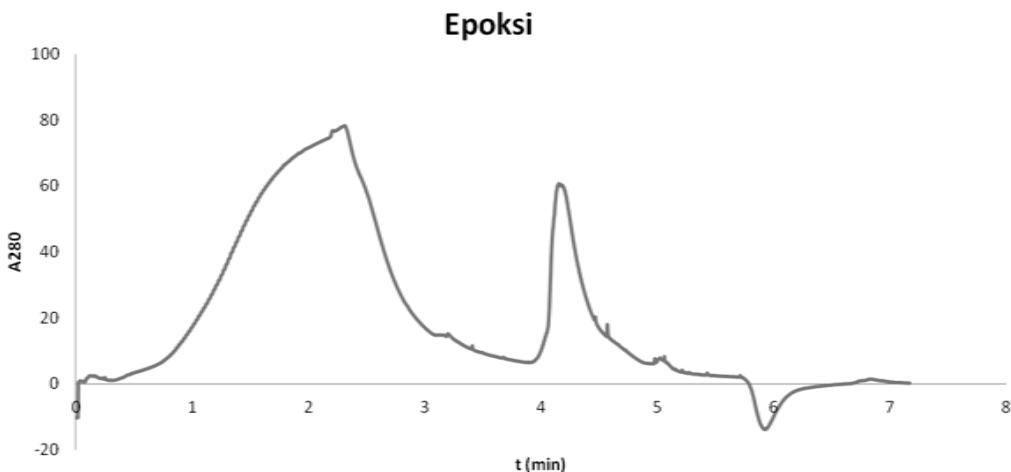
a)



b)



c)



Slika 22: Prebojne krivulje za določanje dinamičnih kapacitet diskov CIM z rMcp1
Odvisnost adsorbance (A_{280}) od časa nanašanja papaina s koncentracijo 1 mg/ml na monolitne diske CIM.
a) disk CIM CDI z rMcp1; b) disk CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici c) disk CIM epoksi z rMcp1.

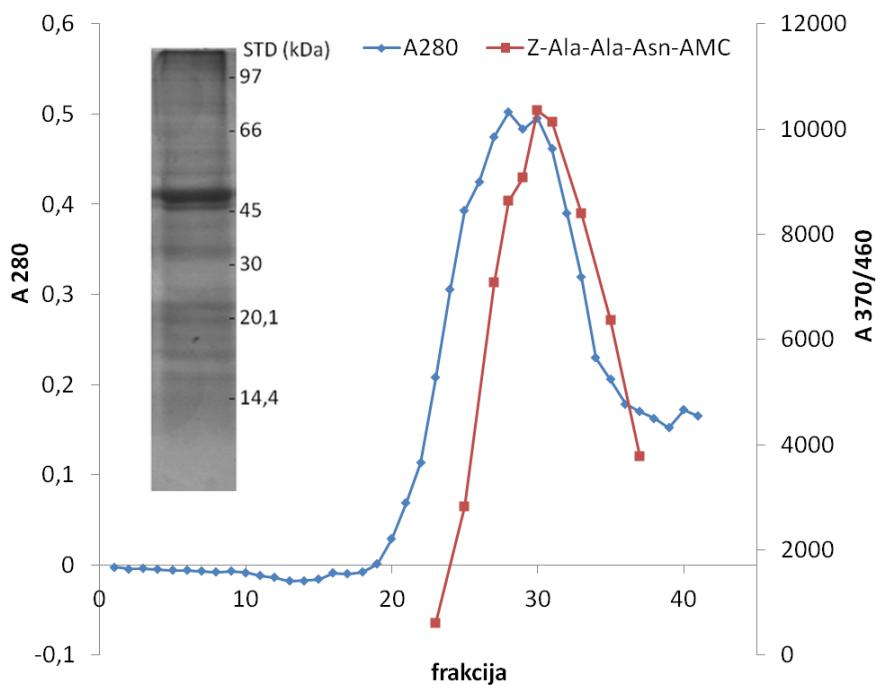
4.3 UPORABA MONOLITNIH DISKOV Z MAKROCIPINOM 1 ZA IZOLACIJO CISTEINSKIH PROTEAZ IZ KOMPLEKSNIH VZORCEV

4.3.1 Izolacija in karakterizacija cisteinskih proteaz iz kalečih semen fižola

Z afinitetno kromatografijo izvlečka kalečih fižolovih semen na rMcp1 smo žeeli izolirati legumain iz kompleksnega vzorca in hkrati preveriti uporabo diskov CIM z rMcp1 za iskanje tarč rMcp1, ki niso papainu podobne proteaze. Vezno mesto na rMcp1 za cisteinsko proteazo legumain, se namreč razlikuje od veznega mesta za papain (slika 1) (Sabotič in sod., 2012).

4.3.1.1 Izolacija cisteinskih proteaz iz semen fižola

Izvleček proteinov smo pripravili iz kalečih semen fižola, saj je znano, da legumaini pri fižolu (*Phaseolus vulgaris*) razgrajujejo založne globuline med kalitvijo in po njej (Senyuk in sod., 1998). Homogenat kalečih fižolov smo poobarjanju proteinov z amonijevim sulfatom očistili z gelsko filtracijo. Po gelski filtraciji smo v frakcijah izmerili proteolitično aktivnost s substratom Z-Ala-Ala-Asn-AMC (slika 23). Frakcije, v katerih je bila izmerjena aktivnost najvišja (27 – 34), smo združili, skoncentrirali z ultrafiltracijo in jih uporabili za afinitetno kromatografijo z diskom CIM epoksi z rMcp1 in diskom CIM CDI z rMcp1. Vzorec proteinov v 0,1 M Tris-HCl pH 7,0 z 0,6 M NaCl smo nanesli na monolitne diske CIM z rMcp1 prek zanke (500 µl). Proteine smo izprali s spremembom pH, z 0,1 M glicinom pH 2,0. Elucijske vrhove smo analizirali z NaDS - PAGE in z encimskimi testi.

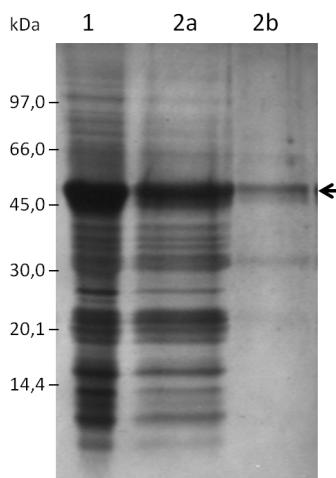


Slika 23: Elucijski diagram gelske filtracije izvlečka kalečih semen fižola in prikaz katalitične aktivnosti frakcij s fluorogenim substratom Z-Ala-Ala-Asn-AMC

Slika gela NaDS - PAGE prikazuje proteine v kromatografskem vrhu (12 % poliakrilamidni gel obarvan z modrim barvilm Coomassie Brilliant Blue).

4.3.1.2 Analiza proteinov z NaDS - PAGE

Z analizo NaDS - PAGE (slika 24) smo potrdili proteine velikosti 48 kDa v izprani frakciji po afinitetni kromatografiji na disku CIM z rMcp1. Poleg lise, ki ustreza legumainu, so na gelu opazne šibke, gosto razporejene lise v velikosti od 30 do 97 kDa. Izolacijo proteolitsko aktivnega legumaina smo potrdili s fluorogenim substratom Z-Ala-Ala-Asn-AMC, ki je specifičen za legumain. Če bi želeli pridobiti čist legumain, bi bili potrebni še dodatni postopki čiščenja.

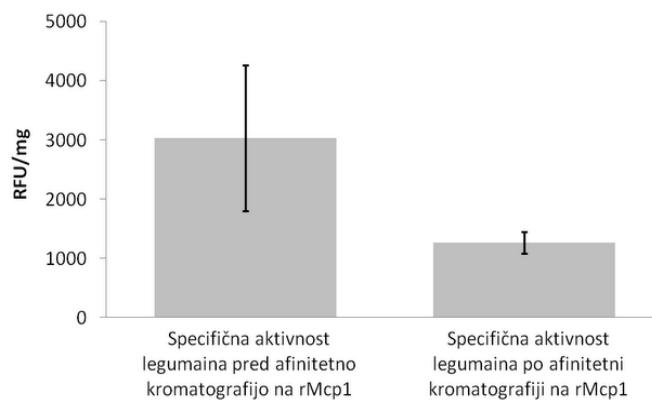


Slika 24: Analiza NaDS - PAGE izvlečka fižolovih semen po afinitetni kromatografiji na disku CIM epoksi z rMcp1

1 – Izvleček iz fižolovih semen, kot smo ga nanesli na monolitne diske CIM z rMcp1; 2a – nevezana frakcija; 2b – vezani proteini izprani z 0,1 M glicinom. Puščica označuje molsko maso legumaina. Gel smo barvali s srebrovim nitratom.

4.3.1.3 Analiza encimske aktivnosti

Encimski testi s fluorogenim substratom Z-Ala-Ala-Asn-AMC so pokazali, da se specifična aktivnost legumaina v izpranih frakcijah po afinitetni kromatografiji na monolitnem disku CIM z rMcp1 zmanjšala za več kot polovico (slika 25). V izbranih pogojih smo izolirali katalitsko aktiven legumain. Za obogatitev le-tega z afinitetno kromatografijo na rMcp1, bi bilo potrebno optimirati pogoje izolacije z diskimi CIM z rMcp1.



Slika 25: Grafični prikaz specifične aktivnosti legumaina po afinitetni kromatografiji na rMcp1 na mg proteina v vzorcu

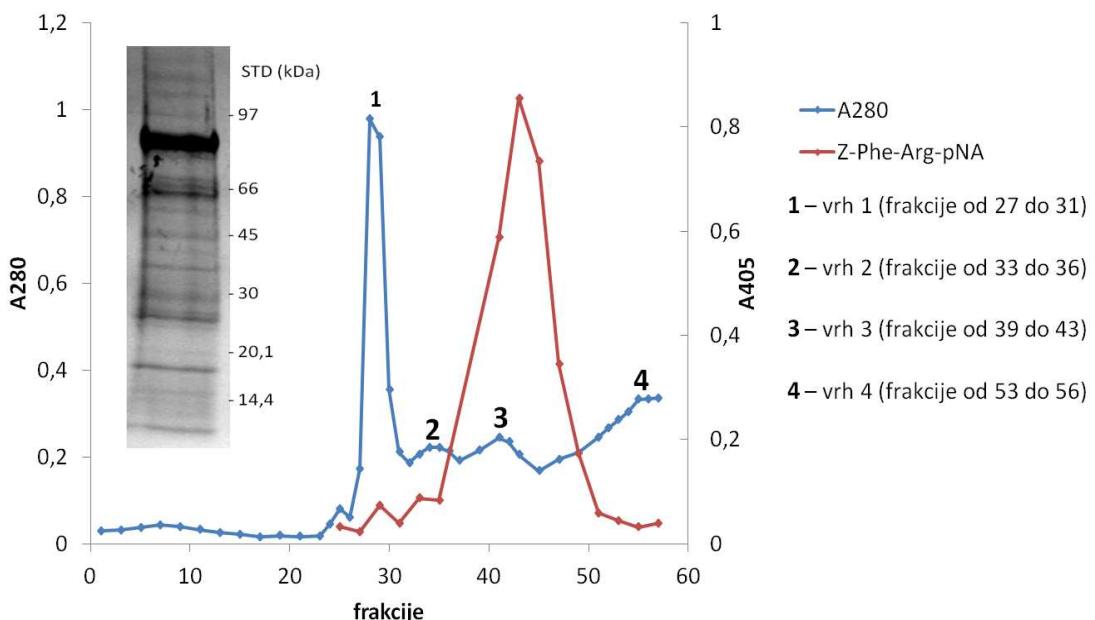
Katalitično aktivnost smo merili s fluorogenim substratom Z-Ala-Ala-Asn-AMC v proteinskih frakcijah po gelski filtraciji in v izpranih frakcijah po afinitetni kromatografiji z diskimi CIM z rMcp1.

4.3.2 Identifikacija tarčnih proteinov makrocipina 1 iz prebavil ličink koloradskega hrošča

Preizkusili smo možnosti uporabe afinitetnih monolitnih diskov CIM z vezanim inhibitorjem cisteinskih proteaz makrocipinom 1 za izolacijo proteaz in drugih tarčnih proteinov iz prebavil ličink koloradskih hroščev.

4.3.2.1 Gelska filtracija

Izvleček iz prebavil ličink koloradskega hrošča smo najprej frakcionirali z gelsko filtracijo. V frakcijah smo spektrofotometrično določali vsebnost proteinov in encimsko aktivnost za kromogeni substrat Z-Phe-Arg-pNA (slika 26). Iz elucijskega diagrama je razvidno, da se izraziti vrh (frakcije 27 – 31, vrh 1 na sliki 26) z visokomolekularnimi proteini ne ujema z vrhom hidrolize substrata Z-Phe-Arg-pNA (frakcije 36 – 49). Substrat Z-Phe-Arg-pNA sicer uporabljamo za določanje aktivnosti papainu podobnih cisteinskih proteaz in serinskih proteaz, kot sta tripsin in kalikrein. Ker v prebavilih koloradskih hroščev prevladujejo papainu podobne cisteinske proteaze, ki imajo običajno molekulsko maso okrog 30 kDa, je najvišja hidrolitična aktivnost substrata Z-Phe-Arg-pNA v srednjemolekularnem območju pričakovana. Med frakcijami 33 in 59 so trije manjši vrhovi (vrh 2, vrh 3 in vrh 4 na sliki 26), na katere smo se osredotočili pri določanju proteolitične aktivnosti s kromogenimi substrati.



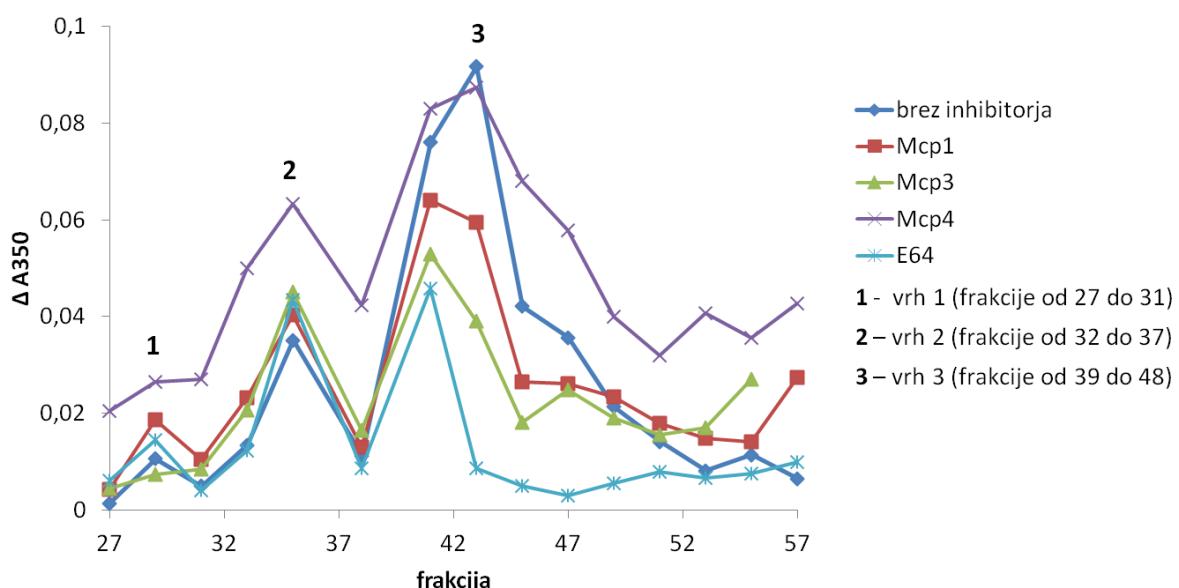
Slika 26: Elucijski diagram prebavil ličink koloradskih hroščev po gelski filtraciji in prikaz katalitične aktivnosti frakcij s kromogenim substratom Z-Phe-Arg-pNA

Slika gela NaDS - PAGE prikazuje proteine v kromatografskem vrhu 1 (12 % poliakrilamidni gel obarvan z modrim barvilm Coomassie Brilliant Blue).

4.3.2.2 Analiza splošne proteolitične aktivnosti in inhibicije prebavnih encimov z makrocipini

Splošno proteolitično aktivnost v posameznih frakcijah po gelski filtraciji izvlečka prebavil ličink koloradskega hrošča smo preverili z azokazeinom, ki je primeren za določanje aktivnosti različnih razredov proteaz (Sarah in sod., 1989). Z grafa aktivnosti posameznih frakcij po gelski filtraciji (slika 27) je razvidno, da smo z azokazeinom določili povečano proteolitično aktivnost v treh vrhovih in sicer z vrhom v frakciji 29, frakciji 35 in frakciji 43. Prvi vrh (slika 27, vrh 1) predstavlja aktivnost visokomolekularnih proteaz, saj smo spektrofotometrično določili visokomolekularne proteine med frakcijami 27 in 31 (slika 26). Vrhova 2 in 3 (slika 27) predstavljata aktivnost nizkomolekularnih proteinov, ki ustrezajo drugemu in tretjemu vrhu po spektrofotometričnem merjenju vsebnosti proteinov po gelski filtraciji (slika 26).

Z dodanimi makrocipini (Mcp1, Mcp3, Mcp4) in sintetičnim inhibitorjem cisteinskih proteaz E-64 smo ugotovili inhibicijo proteolitične aktivnosti v nekaterih frakcijah. Noben izmed makrocipinov ni inhibiral proteaz v vrhovih 1 in 2 (slika 27). Mcp4 pa so delno inhibirali proteolitične encime v vrhu 3, pri čemer je E-64 inhibiral močneje, najbolj izrazito v frakcijah med 45 in 50.



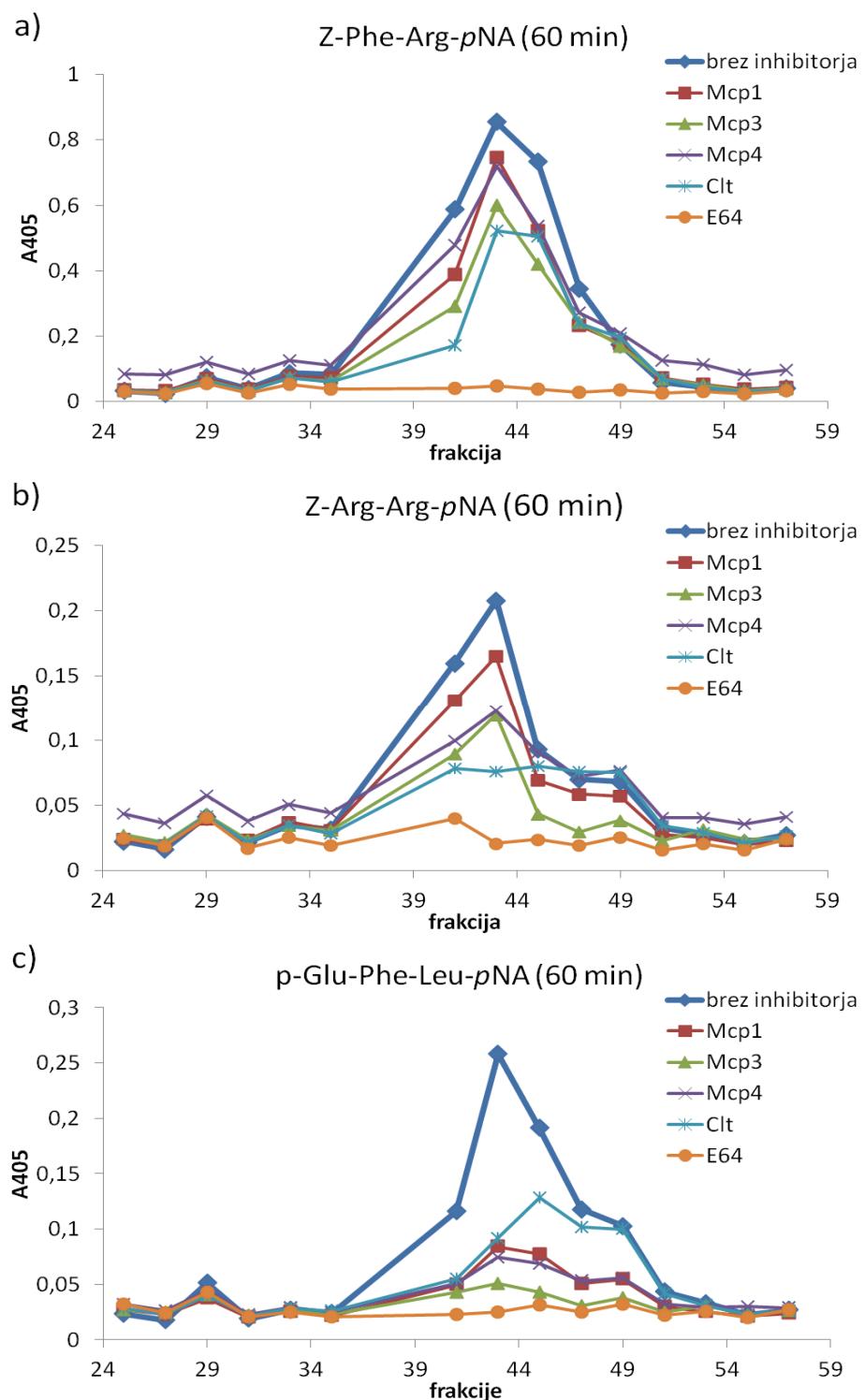
Slika 27: Splošna proteolitična aktivnost in inhibicija proteolitičnih encimov z makrocipini
Pri testu z azokazeinom smo merili spremembo A_{350} v primerjavi s slepim vzorcem. Graf prikazuje spremembo A_{350} glede na frakcije po gelski filtraciji.

4.3.2.3 Analiza aktivnosti in inhibicije prebavnih encimov z mikocipini

S kromogenimi substrati Z-Phe-Arg-*p*NA, Z-Arg-Arg-*p*NA in pGlu-Phe-Leu-*p*NA smo preverili proteolitično aktivnost v frakcijah po gelski filtraciji izvlečka prebavil koloradskega hrošča. Substrati so specifičnimi za posamezne prebavne proteaze, kamor spadajo tudi prebavne cisteinske proteaze koloradskih hroščev – intestaini (Gruden in sod., 2003).

Teste proteolitične aktivnosti kromogenih substratov smo naredili brez dodanih mikocipinov in z dodanimi mikocipini: makrocipinom 1 (Mcp1), makrocipinom 3 (Mcp3), makrocipinom 4 (Mcp4), klitocipinom (Clt); in sintetičnim inhibitorjem cisteinskih proteaz E-64 v 10 µM koncentraciji. Najvišjo proteolitično razgradnjo specifičnih kromogenih substratov smo določili proteazam v frakcijah vrha 3 po gelski filtraciji (slika 26), kar tudi ustreza frakcijam pri proteolitični razgradnji splošnega substrata azokazein (slika 27, vrh 3).

Pri testu aktivnosti s substratom Z-Phe-Arg-*p*NA, ki je specifičen za proteaze, podobne katepsinu L, katepsinu S in katepsinu B, so mikocipini šibko inhibirali razgradnjo kromogenega substrata (slika 28) v frakcijah po gelski filtraciji, ki ustrezano vrhu 1, 2 in 3 (slika 26). E-64 je razgradnjo substrata Z-Phe-Arg-*p*NA popolnoma inhibiral. Prav tako šibko inhibicijo z mikocipini in močno inhibicijo z E-64 smo določili s substratom Z-Arg-Arg-*p*NA (slika 28), ki je specifičen za katepsin B in S ter stebelni bromelain. Razgradnja substrata pGlu-Phe-Leu-*p*NA je specifična za papainu podobne proteaze vključno s papainom, fikainom in stebelnim bromelainom. Dodani mikocipini so razgradnjo substrata pGlu-Phe-Leu-*p*NA močno inhibirali (slika 28), prav tako E-64, vendar razen z E-64 popolna inhibicija ni bila dosežena.

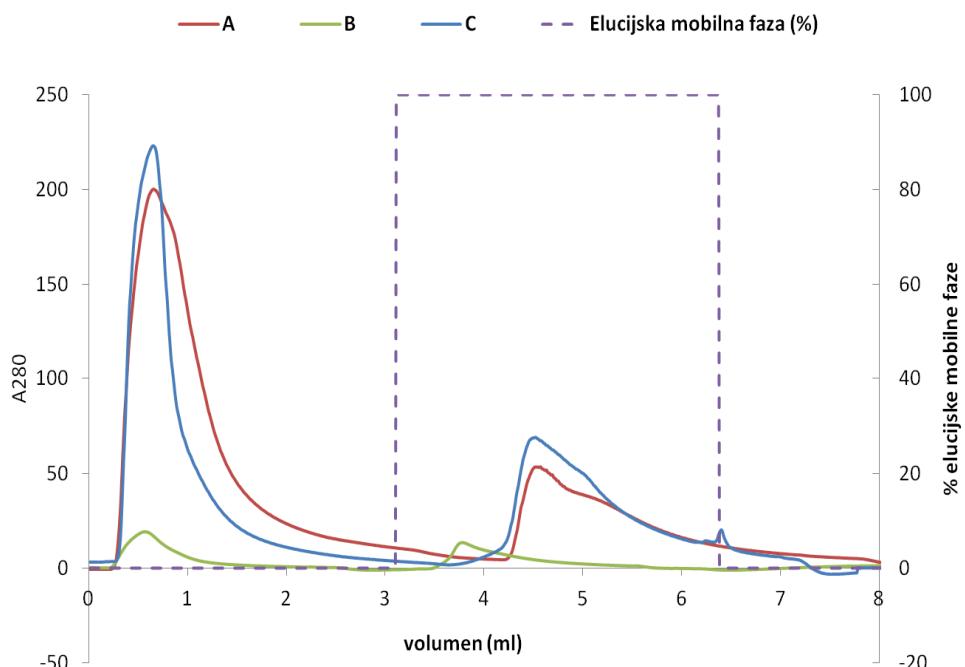


Slika 28: Test inhibicije aktivnosti proteaz v frakcijah po gelski filtraciji s kromogenimi substrati, specifičnimi za prebavne proteaze

a) Inhibicija aktivnosti Z-Phe-Arg-*p*NA po 60 min inkubacije z inhibitorji – makrocipinom 1 (Mcp1), makrocipinom 3 (Mcp3), makrocipinom 4 (Mcp4), klitocipinom (Clt) in sintetičnim inhibitorjem cisteinskih proteaz E-64; b) Inhibicija aktivnosti Z-Arg-Arg-*p*NA 60 min inkubacije z inhibitorji – Mcp1, Mcp3, Mcp4, Clt in E-64; c) Inhibicija aktivnosti pGlu-Phe-Leu-*p*NA 60 min inkubacije z inhibitorji – Mcp1, Mcp3, Mcp4, Clt in E-64.

4.3.2.4 Afinitetna kromatografija z monolitnimi diskimi CIM z rMcp1

Pripravili smo tri vzorce za afinitetno kromatografijo na disku CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici. Glede na spektrofotometrično določeno vsebnost proteinov (slika 26) smo pripravili vzorec, kjer smo združili in skoncentrirali frakcije od 27 do 32 (vzorec A). Posebej smo shranili frakcijo 43 (vzorec B), ki je imela najvišjo proteolitično razgradnjo tako specifičnih kromogenih substratov kot splošnega substrata azokazein. Glede na aktivnost frakcij pri proteolitični razgradnji specifičnih substratov smo združili in skoncentrirali frakcije od 33 do 42 in od 44 do 50 po gelski filtraciji (vzorec C). Vzorce smo nanesli na monolitni disk CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici (slika 29) in vezane frakcije analizirali z NaDS - PAGE in izbrane proteinske lise z masno spektrometrijo.



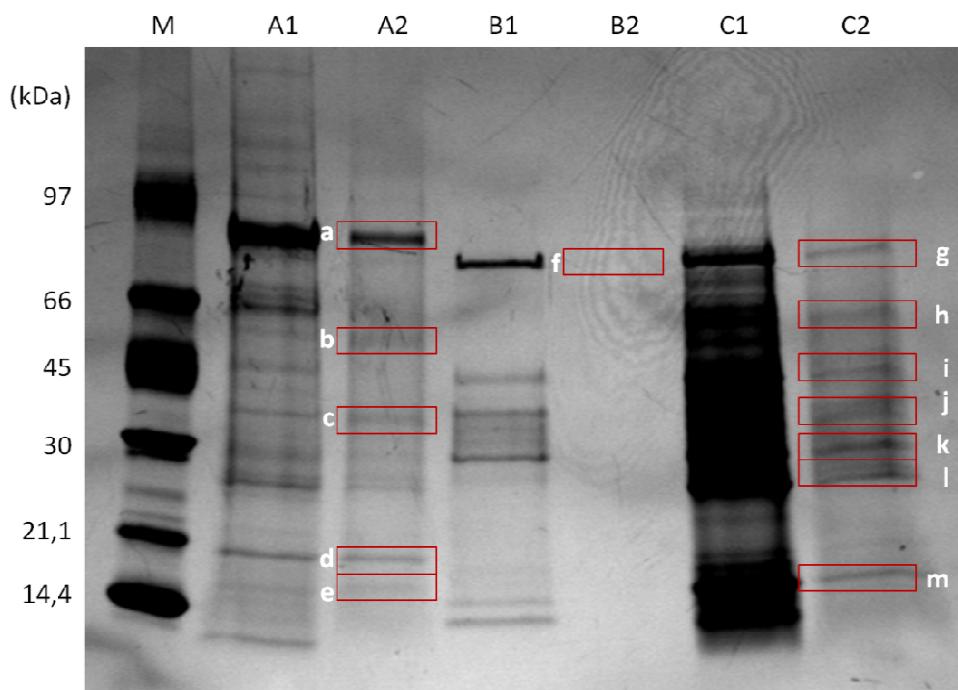
Slika 29: Primerjava elucijskih diagramov afinitetne kromatografije z monolitnimi diskimi CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici

Vzorec A - vsebuje združene in skoncentrirane frakcije od 27 do 32 po gelski filtraciji; vzorec B – frakcija 43 z najvišjo proteolitično aktivnostjo za razgradnjo substratov; vzorec C - vsebuje združene in skoncentrirane frakcije od 33 do 42 in od 44 do 50 po gelski filtraciji.

4.3.2.5 Priprava vzorcev za masno spektrometrijo

Izprane proteine po afinitetni kromatografiji na monolitnih diskih CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici smo analizirali z NaDS - PAGE in barvali z modrim barvilom Coomassie Brilliant Blue (slika 30). Za masno spektrometrijo smo izrezali proteinske

lise vzorcev A2, B2 in C1, ki so sorazmerno močnejše v izpranih frakcijah kot v prvotnem vzorcu (na sliki 30 označeni z rdečim okvirčkom) in jih pripravili za masno spektrometrijo po protokolu za razgradnjo v gelu.



Slika 30: Analiza NaDS - PAGE vzorcev po afinitetni kromatografiji z diskom CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici

Označeno z rdečo - proteinske lise, ki smo jih izrezali za analizo z masno spektrometrijo. M - označevalec molekulskih mas; A1 – vzorec A, vsebuje združene in skoncentrirane frakcije od 27 do 32 po gelski filtraciji; A2 - vezane frakcije vzorca A1; B1 – vzorec B, frakcija z najvišjo proteolitično aktivnostjo za razgradnjo substratov (frakcija 43); B2 – vezane frakcije iz vzorca B1; C – vzorec C, vsebuje združene in skoncentrirane frakcije od 33 do 42 in od 44 do 50 po gelski filtraciji; C2 - vezane frakcije vzorca C1.

4.3.2.6 Masna spektrometrija

Z masno spektrometrijo smo analizirali proteine v vzorcih po afinitetni kromatografiji na disku CIM z makrocipinom 1 na glutaraldehidni ročici (slika 30). V preglednici 13 so prikazani najpogosteje identificirani proteini v vseh vzorcih z ustreznou molekulskou masou glede na mesto v gelu kjer smo jih izrezali. Med proteini so prebavne cisteinske proteaze intestaini A, B, E, D, glikozidne hidrolaze družine 48 in endopoligalakturonaze, ki tudi sodelujejo v adaptaciji ličink na rastlinske obrambne mehanizme, ki se sprožijo z objedanjem rastline.

Preglednica 13: Z masno spektrometrijo identificirani proteini po afinitetni kromatografiji na disku CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici

Številka gena v bazi GenBank	Ime proteina (vrsta)	Število identificiranih peptidov	Molekulska masa proteina v bazi GenBank	Identificirano v vzorcu
2209395A	Diapavzni protein 1 (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	21	83 kDa	a,b, c, d, e, f, i, j,l, m
ADU33353	Protein 48 GH48-2 iz družine glikozidnih hidrolaz (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	20	73 kDa	b, c, f, g, i, j, l, m
ADU33352	Protein 48 GH48-1 iz družine glikozidnih hidrolaz (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	12	72 kDa	b, f, g, i, j, l,
ABK20176	Glutation-S-transferaza GST3 (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	10	21 kDa	1
AAS20591	Prebavna cisteinska proteaza intestain B (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	6	36 kDa	d, e, i, j, l
AAS20592				
ABM55480	Prebavna cisteinska proteaza intestain E (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	5	35 kDa	l, m
ABM55481				
AAN77407	Prebavna cisteinska proteaza intestain A (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	4	36 kDa	c
AAS20589				
AAS20590				
XP_966308	Predviden: ciklofilinu podoben protein (<i>Tribolium castaneum</i>)	3	18 kDa	d,e
ABM55489	Prebavna cisteinska proteaza intestain D (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	3	10 kDa	1
XP_001354162	Predviden: protein GA16624 (<i>Drosophila pseudoobscura pseudoobscura</i>)	2	61 kDa	i, j, l
ADU33363	Endopoligalakturonaza GH28Pect-9 (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	2	40 kDa	1
YP_514865	Citokrom f (<i>Solanum lycopersicum</i>)	2	35 kDa	i, j
A39267	Superoksid dismutaza (EC 1.15.1.1) (Fe) – kodrasti tobak	2	25 kDa	1
BAG41813	Ciklofilin A (<i>Haemaphysalis longicornis</i>)	2	20 kDa	d
NP_001164136	Predviden: profilinu podoben protein (<i>Tribolium castaneum</i>)	2	14 kDa	e
XP_970661				
ABM55492	Prebavna cisteinska proteaza intestain D (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	2	11 kDa	1

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Afinitetna kromatografija velja za enega izmed učinkovitejših postopkov čiščenja proteolitičnih encimov iz kompleksnih vzorcev. Z vezavo primernega liganda na trdni nosilec se večstopenjski proces čiščenja z majhnim končnim izkoristkom skrajša na en sam kromatografski korak. Za izolacijo in čiščenje proteaz so primerni kovalentno vezani ligandi s specifično afiniteto do tarčnega proteina. To so lahko substrati in njihovi analogi, encimi ter različni tipi sintetičnih in naravnih inhibitorjev (Polanowski in sod., 2003).

Iz prostotrosnice *Macrolepiota procera* je bil izoliran inhibitor cisteinskih proteaz makrocipin, ki ima zanimive inhibitorne lastnosti (Sabotič in sod., 2009). Makrocipin je izjemno stabilen pri visokih temperaturah in ekstremnih pH. Močno inhibira papain, katepsina L in V, nekoliko slabše pa katepsine S, K, B in H in legumain. Ne inhibira serinske proteaze tripsin in aspartatne proteaze pepsin (Sabotič in sod., 2009). Makrocipin inhibira cisteinske proteaze na osnovi reverzibilne in kompetitivne vezave molekule v aktivno mesto proteaze, kar zmanjša ali prepreči razgradnjo substrata. Zaradi specifičnosti inhibicije in izjemne stabilnosti je rekombinantni makrocipin 1 primeren ligand za afinitetno kromatografijo, kar so že pokazali z afinitetno kromatografijo na trdem nosilcu Sefarozi (Mustar, 2009). Rekombinantni makrocipin 1 smo preizkusili kot ligand za afinitetno kromatografijo na monolitnih diskih CIM (»Convective Interaction Media«), ki imajo številne prednosti pred kromatografskimi delčnimi kolonami (Tetala in van Beek, 2010).

V prvem delu smo se osredotočili na pripravo monolitnih diskov CIM z makrocipinom 1 z zadovoljivo dinamično kapaciteto. V drugem delu smo preizkusili uporabnost pripravljenega kromatografskega orodja za izolacijo proteaz iz kompleksnih naravnih virov.

5.1.1 Priprava afinitetne kromatografije na monolitnih diskih CIM

Monolitni disk CIM so kromatografski nosilci, ki omogočajo hitro in učinkovito ločevanje ob nizkih padcih tlaka pri visokih pretokih mobilne faze (Štrancar in sod., 2002), kar je posledica monolitne strukture z visoko pretočnimi porami. V primerjavi z delčnimi nosilci, kot je Sefaroza, poteka izmenjava molekul med mobilno in stacionarno fazo pri monolitnih diskih CIM na podlagi konvekcije in ne difuzije, kar poveča učinkovitost kromatografskega orodja. Glavne prednosti uporabe monolitnih diskov CIM so: (i) hitra izvedba ločevanja in s tem zmanjšana možnost deaktivacije

biomolekul, (ii) izpiranje molekul v koncentrirani obliki, (iii) visoka vezna kapaciteta, (iv) neodvisnost ločljivosti in vezne kapacitete od pretoka, (v) linearja zveza padca tlaka in hitrosti mobilne faze, (vi) izjemen potencial za imobilizacijo ligandov in (vii) enostavna uporaba (Josić in sod., 1998; Štrancar in sod., 2002; Champagne in sod., 2007).

Obnašanje in primernost makrocipina 1 za afinitetno kromatografijo na monolitnih nosilcih CIM smo ovrednotili v primerjavi z afinitetno kromatografijo na Sefarozzi, imobilizirani z makrocipinom 1 (Mustar, 2009). Makrocipin 1 so vezali na Sefarozzo, aktivirano s cianogen bromidom, ki reagira s prostimi hidroksilnimi skupinami na Sefarozzi in povzroči nastanek cianatno esterskih vezi, ki vežejo primarne amino skupine liganda (Affinity ..., 2012). Monolitni disk CIM omogočajo številne imobilizacije ligandov, zato smo lahko preizkusili več načinov vezave makrocipina 1. V literaturi najdemo podatke o vezavi manjših proteinov na diske CIM. Za detekcijo sintetičnih zaporedji umetnih virusnih delcev so na diske CIM epoksi vezali tripsinski inhibitor iz soje (Kalashnikova in sod., 2007). Na diske CIM so za različne separacijske postopke že vezali tripsin (Benčina in sod., 2004; Nicoli in sod., 2008), kimotripsin (Ponomareva in sod., 2010), različna protitelesa (Brne in sod., 2009), protein A (Benčina in sod., 2004), protein G (CIM r-Protein ..., 2012), lektin konkanavalin A (Josić in sod., 1998) in druge proteine, ki zadržujejo biomolekule v nosilcu zaradi specifičnih interakcij (Mallik in Hage, 2006).

Rekombinantni makrocipin 1 smo pri različnih vrednostih pH kovalentno vezali s prostimi amino skupinami na osnovne diske CIM epoksi in CIM CDI in preverili njihovo delovanje s cisteinsko proteazo papain. Izpiranje afinitetno vezanega papaina smo dosegli s spremembjo pH mobilne faze in izprane proteine takoj nevtralizirali, da bi ohranili njihovo biološko aktivnost. Z diskom CIM epoksi z rMcp1 smo optimirali uporabo vezne mobilne faze, elucijske mobilne faze in pretoka za afinitetno kromatografijo na makrocipinu 1. Za glavni pokazatelj učinkovitosti delovanja diskov CIM z rMcp1 smo izbrali dinamično kapaciteto, ki upošteva pretok mobilne faze, čas pri 50 % preboju, prosti volumen diska z ohišjem, volumen diska in koncentracijo proteina v vzorcu (Podgornik, 1998). Pove nam največjo količino proteina, ki ga lahko vežemo na prosta vezna mesta liganda, glede na volumen monolitnega diska.

Imobilizacija proteinov na disk CIM epoksi je enostavna, vendar v primeru makrocipina 1 vezno mesto za papain ni bilo dovolj izpostavljen, da bi dosegli zadovoljivo ločevanje. Dinamična kapaciteta diska CIM epoksi z rMcp1 je znašala 0,34 mg papaina na ml diska, kar ni primerno za izolacijo proteinov iz kompleksnih vzorcev, kjer naj bi bila kapaciteta čim višja. Za primerjavo, dinamična kapaciteta komercialno dostopnih diskov CIM z vezanimi proteinom A oziroma proteinom G, znaša več kot 10 mg IgG na ml diska (CIM r-Protein ..., 2012). Z opazovanjem jakosti proteinske lise in velikosti

izpranega papaina na gelu NaDS - PAGE smo določili da je najprimernejša vezna mobilna faza za papain 0,1 M Tris-HCl, pH 7,0 z dodatkom 0,6 M NaCl, ki predvidoma zmanjša vpliv ionskih interakcij med vezavo. Najprimernejša elucijska mobilna faza, ki je ohranila biološko aktivnost papaina po eluciji je bil 0,1 M glicin, pH 2,0. Največjo kapaciteto smo določili pri disku CIM epoksi z rMcp1 kjer smo disk med imobilizacijo inkubirali pri 45°C. Zaradi izjemne stabilnosti makrocipina 1, bi lahko inkubacijsko temperaturo še povišali, vendar smo raje preizkusili druge načine vezave, s katerimi povečamo dinamično kapaciteto. Benčina in sod. (2004) so pri imobilizaciji proteina A na diske CIM določili približno dvakrat večjo dinamično kapaciteto za vezavo proteina A na diske CIM CDI kot za diske CIM epoksi. Imobilizacijo ligandov na diske CIM CDI so predlagali za nestabilne proteine in za uporabo v afinitetni kromatografiji, saj zagotavlja bolj aktiven sistem, hkrati pa je imobilizacija hitrejša in enostavnejša kot vezava na skupine epoksi.

Z nekoliko drugačno sterično orientacijo makrocipina 1 na disku CIM CDI smo izboljšali dostopnost veznih mest za papain. S kemijsko modifikacijo epoksi skupin v imidazol karbamatne skupine smo v optimiranih pogojih dosegli večjo dinamično kapaciteto za papain, ki je znašala 5,1 mg/ml. Imidazol karbamatne skupine nosilca reagirajo z amino skupinami liganda in povežejo nosilec in makrocipin 1 s stabilno karbamatno vezjo. Kot so pokazali z vezavo proteina A, proteina G, IgG, tripsina in deoksiribonukleaze (Benčina in sod., 2004) je vezava prek imidazol karbamatnih skupin ugodnejša za ohranitev biološke aktivnosti proteinov. Funkcionalne skupine na monolitnem materialu so bolj izpostavljene za vezavo ligandov kljub manjšemu številu prostih veznih skupin. Pri epoksidih (disk CIM epoksi) so namreč vezna mesta v notranjosti nosilca in zato že vezani ligandi prekrivajo sicer prosta vezna mesta za ligande v notranjosti por (Josić in sod., 1998; Benčina in sod., 2004).

Makrocipin 1 smo dodatno vezali na diske CIM z nizkomolekularnimi ročicami, ki ligand odmaknejo od površine nosilca (Hermanson in sod., 1992). Da bi poiskali optimalno postavitev liganda in kar najbolj izpostavili aktivna mesta makrocipina 1, smo pripravili diske CIM s štirimi različnimi ročicami iz etilendiamina, diaminoheksana, 1,4-butandiol diglicidil etra in glutaraldehida.

Ročici z etilendiaminom in diaminoheksanom s stabilno aminske vezjo vežeta karboksilni konec liganda na prosto aminske skupino ročice. Ročica iz etilendiamina je zelo kratka, ima samo dva C atoma in zato ne povzroča steričnih ovir za vezavo liganda, do katerih najverjetneje pride pri ročici iz diaminoheksana, ki je 4 C atomov daljša. Ker smo pri ročici iz diaminoheksana pričakovali povečanje kapacitete, smo sklepali, da makrocipin na tej ročici ni dovolj fleksibilen in je posledično vezava papaina v danih pogojih omejena. Z vezavo makrocipina 1 prek karboksilnega konca na daljšo in krajevo ročico smo spremenili orientacijo in izpostavljenost veznih mest liganda. S primerjavo

površine elucijskih diagramov med ločevanjem papaina in z analizo NaDS - PAGE smo potrdili nizko vsebnost papaina v izpranih frakcijah, kar nakazuje na neustrezno izpostavljenost veznih mest makrocipina 1 pri vezavi na disk CIM z omenjenima ročicama. Z odtisom western smo pri disku CIM z ročico iz diaminoheksana potrdili izpiranje makrocipina 1, kar je lahko posledica zamreženja diska CIM. Obstaja namreč verjetnost, da se oba konca ročice vežeta na nosilec, kar povzroči zamreženje monolita in izgubo aktivnih veznih mest (Podgornik, 1998; Gabor, 2005). V tem primeru se ligand ne more kovalentno vezati na ročico.

Ročica z 1,4-butandiol diglicidil etrom ima na prostem koncu epoksi skupino in veže makrocipin 1 z aminskim koncem. Gre za enak princip vezave kot pri osnovnem disku CIM epoksi, vendar je ročica dolga kar 9 C atomov. Iz primerjave elucijskih diagramov ob afinitetni kromatografiji s papainom je razvidno, da je tak način vezave neprimeren za makrocipin 1, predvidoma zaradi zamreženja pretočnih por monolita in nedostopnosti veznih mest za ligande.

Disk CIM z makrocipinom 1 na glutaraldehydni ročici ima na veznem koncu ročice prosto aldehydno skupino na katero se veže aminski konec liganda. Dolžina ročice je 7 C atomov in se jo pogosto uporablja za kovalentno vezavo različnih encimov na monolite (Nicoli in sod., 2008; Ponomareva in sod., 2010). Disku CIM z makrocipinom 1 na glutaraldehydni ročici smo določili skoraj dvakrat večjo dinamično kapaciteto za papain (9,2 mg/ml) kot disku CIM epoksi z makrocipinom 1 (5,1 mg/ml). Od vseh preverjenih načinov vezave makrocipina 1 je najprimernejša prav vezava prek aminskega konca z aldehydno skupino ročice, ki ohranja dostopnost aktivnih mest makrocipina 1. Do podobnih zaključkov so prišli Ponomareva in sod. (2010), ki so primerjali načine vezave kimotripsina na diske CIM. Encimska aktivnost se je najmanj ohranila pri kovalentni vezavi encima neposredno na epoksi skupine diska CIM, najbolj pa pri vezavi na disk CIM prek glutaraldehydne ročice. Podobni so bili tudi rezultati imobilizacije tripsina na diske CIM z glutaraldehydno ročico CIM (Nicoli in sod., 2008).

5.1.2 Izolacija in karakterizacija cisteinskih proteaz iz izvlečka kalečih semen fižola z afinitetno kromatografijo na rMcp1

Z monolitnim diskom CIM CDI z rMcp1 smo iz kalečih fižolovih semen (*Phaseolus vulgaris*) predvidoma izolirali legumain. Legumaini se izražajo v fižolovih semenih v času kalitve in so pomembni za razgradnjo in imobilizacijo skladiščnih proteinov med rastjo (Salas in sod., 2008). Z elektroforeznimi metodami legumaina v izpranih frakcijah nismo mogli potrditi, ker ga zakrije enako velik skladiščni protein fazeolin, ki se na nosilec veže nespecifično. Velike količine fazeolina so zaznali že pri afinitetni kromatografiji z makrocipinom na Sefarozzi (Mustar, 2009), kjer so z masno spektrometrijo potrdili nizko vsebnost legumaina in zelo visoko vsebnost fazeolina.

S sintetičnim substratom za sesalčji legumain Z-Ala-Ala-Asn-AMC, smo potrdili aktivnost legumaina v izpranih frakcijah, vendar se je specifična aktivnost znižala za približno 60 %. Pri pH 2,0 tekom izpiranja je najverjetneje prišlo do inaktivacije legumainov, saj je maksimalna aktivnost legumaina v pH območju od 4,0 do 6,0, pri višjih ali nižjih pH vrednostih legumain denaturira (Rawlings, 2010).

Makrocipini in klitocipin so edini poznani inhibitorji z beta triperesnim zvitjem, ki inhibirajo aktivnost legumainov iz družine C13. Cisteinske proteaze legumaini se strukturno povsem razlikujejo od papainu podobnih cisteinskih proteaz, drugačen pa je tudi njihov inhibitorni mehanizem (Sabotič in sod., 2007, 2009). Inhibitorji cisteinskih proteaz večinoma uporabljajo dve ali tri zanke, ki se vežejo v vezna mesta, pri čemer ne pride do neposredne interakcije z aktivnim mestom. Tako zaprejo dostop do aktivnega mesta cisteinskega ostanka in preprečujejo dostop substratu. Ker je aktivno mesto cisteinskih proteaz na površini in ne v žepu kot na primer pri serinskih proteazah, so reaktivne zanke pri vezavi manj stabilizirane s kemijskimi interakcijami. Vezave so manj specifične, inhibitorji pa se lahko vežejo v različnih orientacijah in ne vedno tako kot bi se vezal substrat. Posledično lahko pride namesto stabilizacije proteinov do njihove razgradnje (Turk, 1999; Turk in sod., 1997; Wang, 2010; Renko in sod., 2010).

V primeru inhibicije legumainov z inhibitorji z beta triperesnim zvitjem, je mehanizem bolj podoben inhibiciji serinskih proteaz, kjer se ena sama zanka inhibitorja veže v žep aktivnega mesta, podobno kot bi se vezal substrat (Renko in sod., 2010; 2012). Usmerjenost makrocipina 1, ki smo ga imobilizirali na disk CIM CDI najverjetneje ni zadostno izpostavljala zank, ki so odgovorne za vezavo v režo z aktivnim mestom pri legumainu. Slaba dostopnost aktivnega mesta za inhibicijo je prispevala k razgradnji legumaina namesto k njegovi stabilizaciji. Skupaj z razgradnjo v nizkem pH po afinitetni kromatografiji na makrocipinu 1, se je aktivnost legumaina v izpranih frakcijah še dodatno zmanjšala. Za bolj učinkovito ločevanje bi lahko preizkusiti diske CIM z rMcp1 na ročicah, predvsem pa spremenili pogoje separacije, ki so bili optimirani za vezavo cisteinske proteaze papain.

5.1.3 Identifikacija tarčnih proteinov iz prebavil ličink koloradskega hrošča

Z namenom identifikacije tarčnih molekul makrocipina 1, ki so povezane z negativnim učinkom na rast in razvoj ličink koloradskega hrošča, smo pripravili vzorec za afinitetno kromatografijo. Prebavila ličink koloradskih hroščev smo frakcionirali z gelsko filtracijo in v frakcijah preverili prisotnost cisteinskih proteaz, ki so prevladujoči proteolitični encimi v prebavilih ličink (Bolter in Jongsma, 1997). Encimsko aktivnost frakcij smo določili s kromogenimi substrati Z-Phe-Arg-pNA, Z-Arg-Arg-pNA, pGlu-Phe-Leu-pNA in z azokazeinom. Proteolitično so najbolj aktivne frakcije v vrhu s srednjemolekularnimi proteini velikosti okrog 30 kDa, kar ustreza velikosti cisteinskih

proteaz. Z dodanimi mikocipini in E-64 smo preverili inhibicijo proteolitične aktivnosti. Mikocipini so šibko inhibirali razgradnjo substrata Z-Phe-Arg-pNA in Z-Arg-Arg-pNA, močneje pa hidrolizo substrata p-Glu-Phe-Leu-pNA, ki je specifičen za papainu podobne proteaze vključno s papainom, fikainom in stebelnim bromelainom. Iz analize aktivnosti in inhibicije sklepamo, da so tarčne proteaze delovanja makrocipina 1 prav cisteinske proteaze, ki hidrolizirajo substrat p-Glu-Phe-Leu-pNA, medtem ko mikocipini za ostale tipe proteaz nimajo močnega inhibitornega učinka.

Prehranjevalni testi ličink s krompirjevimi listi z visoko vsebnostjo mikocipinov so pokazali insekticidni učinek na ličinke koloradskega hrošča (Sabotič, 2007), ki pa še ni popolnoma raziskan. S testi inhibicije aktivnosti smo se omejili na frakcije po gelski filtraciji prebavil ličink koloradskega hrošča (*Leptinotarsa decemlineata*) in z afinitetno kromatografijo na monolitnem disku CIM z rMcp1 na glutaraldehidni ročici potrdili afiniteto za več različnih proteinov. Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo je pokazala, da so najpogosteje tarče makrocipina 1 v prebavilih ličink diapavzni protein 1, glikozidne hidrolaze iz družine 48 in intestaini.

Diapavzni protein je heksamerni skladiščni protein iz hemolimfe hroščev, ki se pojavi v zadnjem stadiju razvoja ličink in med fazo diapavze, ko se upočasnijo življenski procesi. Zagotavlja zалого aminokislin za obdobje ko se ličinke ne hranijo (Koopmanschamp in sod. 1992). Glikozidne hidrolaze, ki so bile druge najpogosteje tarče makrocipina 1 katalizirajo hidrolizo glikozidne vezi med ogljikovimi hidrati in so ključni encimi v različnih celulaznih sistemih (Glycoside ..., 2012). Celulaze sodelujejo pri adaptaciji koloradskih hroščev na odziv krompirja (Petek in sod., 2012). Intestaini so cisteinske proteaze (Gruden in sod., 2003), ki prevladujejo med prebavnimi encimi ličink koloradskega hrošča (Bolter and Jongsma 1995; Wolfson and Murdock 1987) in prav tako sodelujejo pri adaptaciji koloradskih hroščev na rastlinske proteazne inhibitorje, ki jih proizvajajo rastline med objedanjem (Gruden in sod., 2003; Bolter in Jongsma, 1997). Z inhibicijo proteaz (cisteinskih proteaz intestainov) in celulaz (glikozidne hidrolaze iz družine 48) lahko sklepamo, da je negativen učinek na rast in razvoj ličink, ki se hranijo z makrocipinom 1 verjetno posledica tako inhibicije proteolitične aktivnosti kot tudi inhibicije razgradnje ogljikovih hidratov. Taka dvojna aktivnost makrocipinov je še dodatna prednost pri uporabi makrocipinov kot pesticidnih učinkovin. (Istinič in sod. 2012).

5.2 SKLEPI

- V bakterijskem ekspresijskem sistemu smo izrazili rekombinantni makrocipin 1 in ga kovalentno vezali na monolitne diske CIM.
- Preizkusili smo več načinov vezave makrocipina 1 na monolitne diske CIM. Najvišjo dinamično kapaciteto smo dosegli z vezavo aminskega konca makrocipina 1 na aldehidno skupino sedem ogljikovih atomov dolge glutaraldehidne ročice.
- Pripravili smo kromatografsko orodje z dobro poznanimi lastnostmi in dinamično kapaciteto, ki omogoča hitro in natančno ločevanje tarčnih molekul tudi iz kompleksnih vzorcev.
- Iz kompleksnega vzorca izvlečka kalečih semen fižola (*Phaseolus vulgaris*) smo izolirali legumain z afinitetno kromatografijo na disku CIM z makrocipinom 1.
- Z gelsko filtracijo smo frakcionirali proteine iz prebavil ličink koloradskega hrošča (*Leptinotarsa decemlineata*) in v frakcijah preverili prisotnost aktivnosti cisteinskih proteaz in inhibicijo aktivnosti z mikocipini. Mikocipini močno inhibirajo razgradnjo substrata p-Glu-Phe-Leu-pNA, specifičnega za cisteinske proteaze, ki so podobne papainu.
- Tarče makrocipina 1 v prebavilih ličink koloradskih hroščev smo poiskali z afinitetno kromatografijo in jih identificirali z masno spektrometrijo. Makrocipin 1 ima afiniteto za vsaj tri skupine proteinov, med katerimi so diapavzni protein 1, glikozidne hidrolaze iz družine 48 in cisteinske proteaze intestaini, ki sodelujejo v adaptaciji ličink koloradskih hroščev na inhibitorje v hrani.

6 POVZETEK

Proteaze imajo pomembno vlogo v fizioloških in patofizioloških procesih. Njihova izolacija in čiščenje iz kompleksnih vzorcev je običajno zahteven postopek z nizkim končnim izkoristkom. Afinitetna kromatografija, ki izkorišča biološko afiniteto proteaz, poenostavlja postopek čiščenja in omogoča njihovo hitro ločevanje. Priprava afinitetne kromatografije zajema izbor primerrega nosilca in specifičnega liganda z afiniteto za tarčne molekule, ki je kovalentno imobiliziran na nosilec tako, da ohrani biološko aktivnost. Makrocipin 1 je inhibitor cisteinskih proteaz, izoliran iz prostotrosnice *Macrolepiota procera*, ki sodi v družino inhibitorjev cisteinskih proteaz I85 po klasifikaciji MEROPS. Z izjemno stabilnostjo in zanimivimi inhibitornimi lastnostmi je makrocipin 1 primeren ligand za afinitetno kromatografijo. Pripravili smo rekombinantni makrocipin 1 in ga vezali na monolitne diske CIM (»Convective Interaction Media«), ki omogočajo hitro in učinkovito ločevanje proteinov in ponujajo številne možnosti za razmeroma hitro imobilizacijo ligandov. V primerjavi z delčnimi nosilci, kot je Sefaroza, poteka izmenjava molekul med mobilno in stacionarno fazo pri monolitnih diskih CIM na podlagi konvekcije in ne difuzije, kar poveča učinkovitost kromatografskega postopka.

Makrocipin 1 smo na različne načine imobilizirali na monolitne diske CIM in preverili sposobnost vezave s cisteinsko proteazo papain. Določili smo najprimernejše mobilne faze in ustrezen pretok za ločevanje proteinov brez nespecifičnih vezav. Morebitno izpiranje liganda smo preverili s prenosom western in z NaDS – PAGE analizirali vezane in nevezane proteinske frakcije po afinitetni kromatografiji. Z določitvijo dinamične kapacitete, ki je merilo za učinkovitost separacijskega postopka in določa največjo količino proteina, ki ga lahko vežemo na ligand, smo izbrali dva diska CIM, primerna za izolacijo tarčnih proteaz iz kompleksnih vzorcev.

Disku CIM CDI z makrocipinom 1 smo določili dinamično kapaciteto 5,1 mg/ml. Makrocipin 1 je v tem primeru vezan prek aminskih skupin s stabilno karbamatno vezjo. Makrocipin 1 smo na monolitni disk CIM imobilizirali še z nizkomolekularnimi ročicami, ki ligand odmaknejo od površine nosilca in bolj izpostavijo aktivna mesta. Od štirih pripravljenih ročic je samo glutaraldehidna ročica izboljšala vezne lastnosti afinitetne kromatografije. Ostale ročice predvidoma ovirajo vezavo substrata na aktivna mesta inhibitorja ali povzročijo zamreženje monolita, kar onemogoča vezavo liganda. Glutaraldehidna ročica na disku CIM veže aminski konec makrocipina 1 na prosto aldehidno skupino ročice. Tako pripravljenemu disku CIM smo določili dinamično kapaciteto 9,2 mg/ml.

Preizkusili smo možnost uporabe proteinskega inhibitorja makrocipina 1 na monolitnih diskih CIM za izolacijo legumaina iz kalečih fižolovih semen. Prisotnost legumaina v proteinskih frakcijah po afinitetni kromatografiji na makrocipinu 1 smo potrdili s testom aktivnosti na substrat Z-Ala-Ala-Asn-AMC.

Z gelsko filtracijo smo delno očistili izvleček iz prebavil ličink koloradskega hrošča (*Leptinotarsa decemlineata*) in določili proteolitično aktivnost frakcij s specifičnimi kromogenimi substrati in s splošnim substratom azokazeinom. Dodatek inhibitorjev cisteinskih proteaz, mikocipinov je močno inhibiral hidrolizo substrata pGlu-Phe-Leu-pNA, ki ga cepijo papainu podobne proteaze.

Z afinitetno kromatografijo na disku CIM z makrocipinom 1 na glutaraldehidni ročici smo izolirali tarčne proteine iz prebavil ličink koloradskega hrošča in jih identificirali z masno spektrometrijo. Potrdili smo prisotnost cisteinskih prebavnih proteaz intestainov, glikozidnih hidrolaz in diapavznega proteina v prebavilih ličink koloradskega hrošča. Predvidoma so ti proteini tarče delovanja proteaznih inhibitorjev iz prostotrosnic, ki imajo insekticidni učinek na ličinke koloradskega hrošča.

7 VIRI

- Afeyan N.B., Gordon N.F., Mazsaroff I., Varady L., Fulton S.P., Yang Y.B., Regnier F.E. 1990. Flow - through particles for the high - performance liquid chromatographic separation of biomolecules: perfusion chromatography. *Journal of Chromatography*, 519, 1: 1-29
- Affinity Chromatography - Principles and Methods. 2012. London, GE Healthcare: 159 str.
<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-SI/products/affinity-chromatography-ac/> (feb. 2012)
- Alvarez-Fernandez M., Barrett A.J., Gerhartz B., Dando P.M., Ni J., Abrahamson M. 1999. Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 27: 19195-19203
- Bah S., Paulsen B.S., Diallo D., Johansen H.T. 2006. Characterization of cysteine proteases in Malian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 2: 189-198
- Balls A.K., Lineweaver H., Thompson R.R. 1937. Crystalline papain. *Science*, 86, 2234: 379-379
- Barrett A.J. 1977. Proteinases in mammalian cells and tissues. Amsterdam, North Holland Publishing Co.: 735 str.
- Barrett A.J. 1986. An introduction to the proteinases. V: Proteinase Inhibitors. Barrett A. J., Salvesen, G. (eds.). Amsterdam, Elsevier: 3-22
- Barrett A.J., McDonald J.K. 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochemical Journal Letters*, 237: 935-942
http://www.biochemj.org/bj/237/0935/bj2370935_browse.htm (maj 2012)
- Barut M., Podgornik A., Urbas L., Gabor B., Brne P., Vidič J., Plevčak S., Štrancar A. 2008. Methacrylate-based short monolithic columns: enabling tools for rapid and efficient analyses of biomolecules and nanoparticles. *Journal of Separation Science*, 31, 11: 1867-1880

Baum J.A., Bogaert T., Clinton W., Heck G.R., Feldmann P., Ilagan O., Johnson S., Plaetinck G., Munyikwa T., Pleau M., Vaughn T., Roberts J. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25, 11: 1322-1326

Benčina K., Podgornik A., Štrancar A., Benčina M. 2004. Enzyme immobilization on epoxy- and 1,1'-carbonyldiimidazole-activated methacrylate-based monoliths. *Journal of Separation Science*, 27, 10-11: 811-818

Bolter C., Jongsma M.A. 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, 43, 10: 885-895

Bolter C.J., Latoszek-Green M. 1997. Effect of chronic ingestion of the cysteine proteinase inhibitor, E-64, on Colorado potato beetle gut proteinases. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 83, 3: 295-3032

Boyer R.F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 633 str.

Brne P., Lim Y.P., Podgornik A., Barut M., Pihlar B., Štrancar A. 2009. Development and characterization of methacrylate-based hydrazide monoliths for oriented immobilization of antibodies. *Journal of Chromatography, A*, 1216, 13: 2658-2663

Brzin J., Rogelj B., Popovič T., Štrukelj B., Ritonja A. 2000. Clitocypin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 26: 20104-20109

Champagne J., Delattre C., Shanthi C., Satheesh B., Duverneuil L., Vijayalakshmi M.A. 2007. Pseudoaffinity chromatography using a convective interaction media - disk monolithic column. *Chromatographia*, 65, 11/12: 639-648

Chen J.M., Dando P.M., Rawlings N.D., Brown M.A., Young N.E., Stevens R.A., Hewitt E., Watts C., Barrett A.J. 1997. Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 12: 8090-8098

CIM disk monolithic column 0,34 ml instruction manual. 2012. Ajdovščina, BIA Separations: 2 str.
<http://www.biaseparations.com/sp/464/manuals> (jun. 2012)

CIM r-Protein A disk monolithic column, product specific information sheet. 2012.
Ajdovščina, BIA Separations: 2 str.
<http://www.biaseparations.com/pr/257/347/specific-information> (jun. 2012)

Crosslinking reagents technical handbook. 2009. Rockford, Thermo scientific - Pierce protein research products: 48 str.
<http://www.piercenet.com/Objects/View.cfm?Type=Page&ID=FE7F690D-58AE-4342-AE85-BA94DCA642F8> (jan. 2012)

Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C.B. 1968. Selective enzyme purification by affinity chromatography. Proceedings of the National Academy of Sciences, 61, 2: 636-643

Cuatrecasas P. 1970. Protein purification by affinity chromatography. Derivatizations of agarose and polyacrylamide beads. The Journal of Biological Chemistry, 245, 12: 3059-3065

Dando P.M., Fortunato M., Smith L., Knight C.G., McKendrick J.E., Barrett A.J. 1999. Pig kidney legumain: an asparaginyl endopeptidase with restricted specificity. Biochemical Journal, 339: 743-749

Dubin G. 2005. Proteinaceous cysteine protease inhibitors. Cellular and Molecular Life Sciences, 62, 6: 653-669

EC3.4. Acting on peptide bonds (peptidases). 2012. London, NC-IUMB: 1 str.
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4> (dec. 2011)

Eidhammer I., Flikka K., Martens L., Mikalsen S.O. 2007. Computational methods for mass spectrometry proteomics. Chichester, J. Wiley & Sons: 284 str.

Gabor B. 2005. Predpriprava krvne plazme za analizo proteoma z modificiranimi monolitnimi diskami. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 84 str.

Galeša K., Thomas R.M., Kidrič M., Pain R.H. 2004. Clitocypin, a new cysteine proteinase inhibitor, is monomeric: impact on the mechanism of folding. Biochemical and Biophysical Research Communications, 324, 2: 576-578

Glycoside hydrolases family classification. 2012. Marseille, The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): 5 str.
<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html> (sep. 2012).

Gruden K., Popovič T., Cimerman N., Križaj I., Štrukelj B. 2003. Diverse enzymatic specificities of digestive proteases, 'intestains', enable Colorado potato beetle larvae to counteract the potato defence mechanism. *Biological Chemistry*, 384, 2: 305-310

Grzonka Z., Kasprzykowski F., Wiczk W. 2007. Cysteine Proteases. V: Industrial Enzymes, structure, function and application. Polaina J. in MacCabe A. P. (eds.). Dordrecht, Springer: 181-195

Hage D.S. 2006. Handbook of affinity chromatography. 2nd ed. Boca Raton, Taylor & Francis: 944 str.

Haq S.K., Atif S.M., Khan R.H. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 431, 1: 145-159

Hara-Nishimura I., Takeuchi Y., Nishimura M. 1993. Molecular characterization of a vacuolar processing enzyme related to a putative cysteine proteinase of *Schistosoma mansoni*. *The Plant Cell*, 5, 11: 1651-1659

Hermanson G.T., Mallia A.K., Smith P.K. 1992. Immobilized affinity ligand techniques. San Diego, Academic Press: 454 str.

Ikegami T., Tanaka N. 2004. Monolithic columns for high-efficiency HPLC separations. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8, 5: 527-533

Istinič I., Buh Gašparič M., Sabotič J., Gruden K., Brzin J., Žel J. 2011. Uporaba makrocipinov kot pesticidnih učinkovin. Ljubljana, Urad RS za intelektualno lastnino: P-201100304: 26 str.

Jongsma M.A., Bakker P.L., Peters J., Bosch D., Stiekema W.J. 1995. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 17: 8041-8045

Jongsma M.A., Bolter C. 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, 43, 10: 885-895

- Josić D., Schwinn H., Štrancar A., Podgornik A., Barut M., Lim Y.P., Vodopivec M. 1998. Use of compact, porous units with immobilized ligands with high molecular masses in affinity chromatography and enzymatic conversion of substrates with high and low molecular masses. *Journal of Chromatography, A*, 803, 1-2: 61-71
- Kalashnikova I., Ivanova N., Tennikova T. 2007. Macroporous monolithic layers as efficient 3-D microarrays for quantitative detection of virus-like particles. *Analytical Chemistry*, 79, 14: 5173-5180
- Kembhavi A.A., Buttle D.J., Knight C.G., Barrett A.J. 1993. The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific fluorometric assays. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303, 2: 208-213
- Kidrič M., Fabian H., Brzin J., Popovič T., Pain R.H. 2002. Folding, stability, and secondary structure of a new dimeric cysteine proteinase inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297, 4: 962-967
- Koopmanschamp B., Lammers H., de Kort S. 1992. Storage proteins are present in the hemolymph from larvae and adults of the colorado potato beetle. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 20: 119-133
- Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: Biotehnologija - osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 609-632
- Laskowski M., Qasim M.A., Stephen K.L. 2000. Interaction of standard mechanism, canonical pretein inhibitors with serine preteinases. V: Protein - Protein Recognition. Kleanthous C. (ed.). Norwich, Oxford University Press: 228-279
- Lim Y.P., Josić D., Callanan H., Brown J., Hixson D.C. 2005. Affinity purification and enzymatic cleavage of inter-alpha inhibitor proteins using antibody and elastase immobilized on CIM monolithic disks. *Journal of Chromatography, A*, 1065, 1: 39-43
- Lopez-Otin C., Bond J.S. 2008. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 45: 30433-30437
- Lunder M. 2007. Izolacija bioloških učinkovin. V: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos, J. (ur.). Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 114-134

Mallik R., Hage D.S. 2006. Affinity monolith chromatography. *Journal of Separation Science*, 29, 12: 1686-1704

MEROPS: the peptidase database. 2011. London, Wellcome Trust Sanger Institute: 35 str.
<http://merops.sanger.ac.uk/index.shtml> (dec. 2011)

Miller J.M. 2005. Chromatography: concepts and contrasts. 2nd ed. Hoboken, J. Wiley & Sons; 490 str.

Murdock L.L., Brookhart G., Dunn P.E., Foard D.E., Kelley S., Kitch L., Shade R.E., Shukle R.H., Wolfson J.L. 1987. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*: 87, 4: 783-787

Mustar K. 2009. Uporaba makrocipina iz gobe orjaški dežnik na trdnem nosilcu za izolacijo cisteinskih proteaz z afinitetno kromatografijo. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 69 str.

Nicoli R., Gaud N., Stella C., Rudaz S., Veuthey J.L. 2008. Trypsin immobilization on three monolithic disks for on-line protein digestion. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 2: 398-407

Nicoli R., Rudaz S., Stella C., Veuthey J.L. 2009. Trypsin immobilization on an ethylenediamine-based monolithic minidisk for rapid on-line peptide mass fingerprinting studies. *Journal of Chromatography A*, 1216, 13: 2695-2699

Otto H.H., Schirmeister T. 1997. Cysteine proteases and their inhibitors. *Chemical Reviews*, 97, 1: 133-172

Petek M., Turnšek N., Gašparič M. B., Novak M. P., Gruden K., Slapar N., Popovič T., Štrukelj B., Jongasma M. A. 2012. A complex of genes involved in adaptation of *leptinotarsa decemlineata* larvae to induced potato defense. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 79, 3: 153–181

Podgornik A. 1998. Imobilizacija in karakterizacija lastnosti nekaterih encimov in protiteles vezanih na kompaktnem poli-(glicidilmetakrilatnem- etilendimetakrilatnem) nosilcu. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 136 str.

Podgornik A., Štrancar A. 2005. Convective Interaction Media (CIM) - short layer monolithic chromatographic stationary phases. *Biotechnology Annual Review*, 11: 281-333

Polanowski A., Wilińska-Pelc A., Kowalska J., Grybel J., Zelazko M., Wilusz T. 2003. Non-conventional affinity chromatography of serine proteinases and their inhibitors. *Acta Biochimica Polonica*, 50, 3: 765-773

Ponomareva E.A., Kartuzova V.E., Vlakh E.G., Tennikova T.B. 2010. Monolithic bioreactors: effect of chymotrypsin immobilization on its biocatalytic properties. *Journal of Chromatography*, B, 878, 5-6: 567-574

Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 3: 597-635

Rawlings N.D., Tolle D.P., Barrett A.J. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *The Biochemical Journal*, 378, Pt 3: 705-716

Rawlings N.D. 2010. Peptidase inhibitors in the MEROPS database. *Biochimie*, 92, 11: 1463-1483

Rawlings N.D., Barrett A.J. 1994. Families of cysteine peptidases. V: Methods in Enzymology. Barrett A.J. (ed.). San Diego, Academic Press: 461-486

Renko M., Sabotič J., Mihelič M., Brzin J., Kos J., Turk D. 2010. Versatile loops in mycocypins inhibit three protease families. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 1: 308-316

Renko M., Sabotič J., Turk D. 2012. β -trefoil protease inhibitors from the work of Kunitz onward. *The Journal of Biological Chemistry*, 393: 1043-1054

Sabotič J., Gaser D., Rogelj B., Gruden K., Štrukelj B., Brzin J. 2006. Heterogeneity in the cysteine protease inhibitor clitocypin gene family. *The Journal of Biological Chemistry*, 387, 12: 1559-1566

Sabotič J. 2007. Karakterizacija mikrocipinov izbranih vrst prostotrosnic z genskim in proteinskim inženirstvom. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 201 str.

- Sabotič J., Trček T., Popovič T., Brzin J. 2007. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of biotechnology*, 128, 2: 297-307
- Sabotič J., Popovič T., Brzin J. 2009. Aspartic Proteases from Basidiomycete *Clitocybe nebularis*. *Croatica Chemica Acta*, 82, 4: 739-745
- Sabotič J., Popovič T., Puizdar V., Brzin J. 2009. Macrocytins, a family of cysteine protease inhibitors from the basidiomycete *Macrolepiota procera*. *The FEBS Journal*, 276, 16: 4334-4345
- Sabotič J., Koruza K., Gabor B., Peterka M., Barut M., Kos J., Brzin J. 2012. The value of fungal protease inhibitors in affinity chromatography. V: *Affinity Chromatography*. Magdeldin D. S. (ed.). Rijeka, InTech: 308 – 332
- Sabotič J., Kos J. 2012. Microbial and fungal protease inhibitors - current and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93: 1-25
- Salas C.E., Gomes M.T.R., Hernandez M., Lopes M.T.P. 2008. Plant cysteine proteinases: evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry*, 69, 12: 2263-2269
- Sarath G., Motte R.S., Wagner F.W. 1989. Protease assay methods. V: *Proteolytic Enzymes: A practical Approach*. Beynon R. J., Bond J.S. (eds.). Oxford, IRL Press: 25-55
- Senyuk V., Rotari V., Becker C., Zakharov A., Horstmann C., Muntz K., Vaintraub I. 1998. Does an asparaginyl - specific cysteine endopeptidase trigger phaseolin degradation in cotyledons of kidney bean seedlings? *European Journal of Biochemistry*, 258, 2: 546-58
- Štrancar A., Podgornik A., Barut M., Necina R. 2002. Short monolithic columns as stationary phases for biochromatography. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 76: 49-85
- Švec F., Tennikova T.B., Deyl Z. 2003. Monolithic materials: preparation, properties, and applications. Amsterdam, Elsevier: 773 str.
- Tetala K.K.R., van Beek T.A. 2010. Bioaffinity chromatography on monolithic supports. *Journal of Separation Science*, 33, 3: 422-438

Tscheliesnig A., Jungbauer A. 2009. High-performance monolith affinity chromatography for fast quantitation of immunoglobulin G. *Journal of Chromatography, A*, 1216, 13: 2676-2682

Turk B., Turk V., Turk D. 1997. Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biological Chemistry*, 378, 3-4: 141-150

Turk V., Gunčar G., Turk D. 1999. Lysosomal cysteine proteinases: Structure and regulation. V: *Proteases: New Perspectives*. Turk V. (ed.). Berlin, Birkhäuser: 211-224

Turkova J. 1993. *Bioaffinity chromatography*. 2nd ed. Amsterdam, Elsevier: 800 str.

Urbas L., Brne P., Gabor B., Barut M., Strlič M., Petrič T.C., Štrancar A. 2009. Depletion of high-abundance proteins from human plasma using a combination of an affinity and pseudo-affinity column. *Journal of Chromatography, A*, 1216, 13: 2689-2694

Vandeputte-Rutten L., Gros P. 2002. Novel proteases: common themes and surprising features. *Current Opinion in Structural Biology*, 12, 6: 704-708

Vodopivec M., Podgornik A., Berovič M., Štrancar A. 2003. Characterization of CIM monoliths as enzyme reactors. *Journal of Chromatography, B*, 795, 1: 105-113

Wang P.G. 2010. *Monolithic chromatography and its modern applications*. St. Albans, ILM Publications: 648 str.

Wilson K., Walker J.M. 2005. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 6th ed. Cambridge, Cambridge University Press: 783 str.

Wolfson J.L., Murdock L.L. 1990. Diversity in digestive proteinase activity among insects. *Journal of Chemical Ecology*, 16, 4: 1089-1102

Østergaard L.H., Olsen H.S. 2010. Thw mycota industrial applications. V: *Industrial Applications of Fungal Enzymes*. Hofrichter M. (ed.). Berlin, Springer: 269-290

ZAHVALA

Zahvalila bi se somentorici dr. Jerici Sabotič. Hvala za vso pomoč, potrpežljivost spodbudo in priložnosti.

Zahvaljujem se podjetju BIA Separations d.o.o., ki mi je omogočilo izdelavo pomembnega dela diplomske naloge. Za številne nasvete, pomoč v laboratoriju in spodbudo se zahvaljujem dr. Matjažu Peterki, dr. Milošu Barutu in dr. Boštjanu Gaborju.

Iskreno se zahvaljujem mentorju, prof. dr. Janku Kosu za sprejeto mentorstvo in potrpežljivost pri izdelavi diplomske naloge.

Hvala recenzentu, doc. dr. Blažu Cigiću za pregled diplomskega dela.

Hvala celotnemu osebju oddelka Aplikacije pri BIA Separations, za dobro vzdušje in številne resne in manj resne debate.

Velika zahvala gre zaposlenim na najboljšem odseku Instituta »Jožef Stefan« - odseku za biotehnologijo B3. Jure, Špela, Jeri, Aleš, Maja, Simon, Petra, Simona, Sara... zelo lepo je bilo delat (in ne delat) z vami:)

Hvala mojim sošolkam in sošolcem, priateljicam in prijateljem, cimram in cimrom, za pestre "obšolske dejavnosti" in podporo. Top ste:) In hvala tebi Grega...

Mama, tata, Jakob, Helena in ostali sorodniki, hvala ker ste me pozorno spremljali na študijski poti, me spodbujali, podpirali in mi svetovali. Boljši ne bi mogli bit.