



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Roswita GOLČER

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA INHIBITORJEV
CISTEINSKIH PROTEINAZ IZ KRVAVEGA MLEČNIKA
(*Chelidonium majus L.*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF INHIBITOR OF
CYSTEINE PROTEINASES FROM (*Chelidonium majus L.*)**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljena je bila na inštitutu Jozef Stefan in Oddelku za biologijo, Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof.dr. Marina Dermastia

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc.dr. M. Regvar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentor prof.dr. Marina Dermastia
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Somentor: dr. Jože Brzin
Univerza v Ljubljani, Inštitut Jožef Stefan, Oddelek za biokemijo

Član: prof.dr. Maja Kovač
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Avtor: Roswita Golčer

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
- DK UDK 577.15:582.682(043.2)=863
- KG inhibitor / cisteinska proteinaza / *Chelidonium majus* L. / afinitetna kromatografija / stabilnostni testi
- AV GOLČER, Roswita
- SA prof.dr. Marina Dermastia (mentor) / dr. Jože Brzin (somentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Rožna dolina, Cesta VIII/34
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2007
- IN Izolacija in karakterizacija inhibitorjev cisteinskih proteinaz iz krvavega mlečnika (*Chelidonium majus* L.)
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 43 str., 4 pregl., 19 sl., 51 vir.
- IJ sl
- JI sl / en
- AI Iz ekstrakta krvavega mlečnika smo očistili in biokemično okarakterizirali dva proteinska inhibitorja cisteinskih proteinaz. Uporabljali smo klasične metode čiščenja proteinov, specifično afinitetno kromatografijo in gelsko filtracijo, inhibitorna proteina pa smo dokončno ločili na HPLC. Večjemu smo določili molsko maso 16,5 kDa (Cm ICP 16,5), izoelektrično točko pri pH 5.0 in N-terminalno aminokislinsko zaporedje. Je brez signifikantne podobnosti z drugim izoliranim inhibitorjem, z nobenim znanim fitocistatinom in tudi ne z nobenim drugim proteinom iz baze podatkov, torej gre za doslej še neopisan inhibitor. Drugemu inhibitorju (Cm ICP 10) smo določili molsko maso 10 kDa, izoelektrično točko v alkalnem pri pH 9,3 in začetno aminokislinsko zaporedje, ki je v tem delu popolnoma identično zaporedju helidocistatina, ki smo ga pred časom že izolirali v našem laboratoriju. Oba sta, za proteine, neobičajno odporna proti skrajnim pH vrednostim in visoki temperaturi, saj Cm ICP 10 prenese celo kratkotrajno vrenje. Inhibitorna aktivnost je prisotna v vseh delih rastline krvavega mlečnika, pri čemer smo najvišjo aktivnost našli v listih in steblih, sledita korenika in seme.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Dd
- DC UDK 577.15:582.682(043.2)=863
- CX inhibitor / cysteine proteinase / *Chelidonium majus* L. / affinity chromatography / stability assay
- AU GOLČER, Roswita
- AA prof.dr. Marina Dermastia (supervisor) / dr. Jože Brzin (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2007
- TI ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF INHIBITOR OF CYSTEINE PROTEINASES FROM (*Chelidonium majus* L.)
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 43 p., 4 tab., 19 fig., 51 ref.
- LA sl
- AL sl / en
- AB We have isolated and biochemically characterised 2 inhibitors of cysteine proteinase from *Chelidonium majus* L. leaf extract. Classical biochemical methods were used for protein isolation- specific affinity chromatography and gel filtration. Final separation of inhibitory proteins was achieved by HPLC. Larger inhibitor (Cm ICP 16.5) has molecular weight of 16.5 kDa and isoelectrical point at pH 5.0. Its N-terminal sequence showed no significant similarity with the other characterised inhibitor in this study or any other known phytocystatin or any other protein sequence available in public databases, thus we have isolated so far nonidentified inhibitor. Second inhibitor (Cm ICP 10) has MW of 10 kDa and isoelectric point at pH 9.3. Its N-terminal amino acid sequence is 100% identical to the sequence of chelidocystatin, previously isolated in our laboratory. Both inhibitors are unusually stable in extreme pH and high temperatures, Cm ICP 10 remains active also after short incubation at boiling temperature. Inhibitory activity is present in all plant parts. The highest activity was however detected in leaves and stems, followed by seeds and rhizom.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	
Kazalo slik	
Okrajšave in simboli	
1 UVOD IN POSTAVITEV PROBLEMA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 KRVAVI MLEČNIK (<i>Chelidonium majus</i> L.)	2
2.1.1 Nahajališče	3
2.1.2 Opis rastline	3
2.1.3 Zdravilne učinkovine krvavega mlečnika	4
2.2 PEPTIDAZE	5
2.2.1 Delitev peptidaz	5
2.2.2 Cisteinske proteinaze	8
2.3 PROTEINSKI PROTEINAZNI INHIBITORJI	10
2.3.1 Proteinski inhibitorji cisteinskih proteinaz	11
2.3.1.1 Nadružina cistatinov	11
2.3.1.2 Družina sojinega Kunitzovega tripsinskega inhibitorja	13
2.3.1.3 Tiropini	13
2.3.1.4 Mikocipini	14
2.3.1.5 Chagasini	14
2.3.1.6 Propeptidne regije kot inhibitorji	14
2.4 INHIBITORJI PROTEINAZ IZ KRVAVEGA MLEČNIKA	15
2.5 DELOVNE HIPOTEZE	15
2.6 NAMEN NALOGE	15
3 MATERIAL IN METODE	16
3.1 RASTLINSKI MATERIAL	16
3.2 IZOLACIJA FITOCISTATINOV IZ KRVAVEGA MLEČNIKA	16
3.2.1 Priprava ekstrakta	16
3.2.2 Afinitetna kromatografija	16
3.2.2.1 Priprava CM papain – sefaroze	17
3.2.2.2 Izvedba afinitetne kromatografije	17

3.2.3	Gelska kromatografija	18
3.2.3.1	Priprava kolone in izvedba gelske kromatografije	18
3.2.4	HPLC	18
3.3	DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV	19
3.3.1	Merjenje absorbance pri valovni dolžini 280 nm	19
3.3.2	Kvantitativno določanje vsebnosti proteinov po Bradfordu	20
3.4.	ELEKTROFORETSKE METODE	20
3.4.1	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS PAGE)	20
3.4.2	Izoelektrično fokusiranje (IEF)	21
3.5	ES MASNA SPEKTROMetriJA	22
3.6	DOLOČITEV N- TERMINALNEGA ZAPOREDJA	22
3.7	DOLOČANJE PH IN TEMPARATURNE STABILNOSTI	23
3.8	DOLOČANJE INHIBICIJSKIH KARAKTERISTIK	23
3.8.1	Določanje encimske aktivnosti papaina	23
3.8.2	Določanje inhibitorne aktivnosti na papain	24
3.8.3	Določanje aktivnih koncentracij inhibitorjev - titracije	24
4	REZULTATI	26
4.1	IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PROTEINSKIH INHIBITORJEV CISTEINSKIH PROTEINAZ IZ KRVAVEGA MLEČNIKA	26
4.2	KARAKTERIZACIJA INHIBITORJEV	30
4.2.1	Molekulske mase	30
4.2.2	Izoelektrične točke	32
4.2.3	N-terminalno amonokislinsko zaporedje	32
4.2.4	Določanje aktivnih koncentracij	33
4.3	OCENA VSEBNOSTI INHIBITORJEV V RAZLIČNIH DELIH RASTLIN	35
4.4	ŠTUDIJA STABILNOSTI	36
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	38
6	POVZETEK	41
6	SUMMARY	42
7	LITERATURA	43

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Razvrstitev proteinaz glede na mehanizem katalize (Rawlings in Barrett, 1993).	6
Preglednica 2: Družine cisteinskih proteinaz (www.merops.com)	8
Preglednica 3: Uporabljeni standardi	21
Preglednica 4: Kvantitativni potek izolacije	29

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Krvavi mlečnik (<i>Chelidonium majus L.</i>) v naravi	2
Slika 2: Krvavi mlečnik - cvet	3
Slika 3: Krvavi mlečnik	4
Slika 4: Razdelitev peptidaz po IUB (IUB, 1984).	7
Slika 5: Mehanizem delovanja inhibitorjev cisteinskih proteinaz. Primer inhibicije papaina s kurjim cistatinom (Turk in Bode, 1991).	12
Slika 6: Izolacija inhibitorjev cisteinskih proteinaz iz krvavega mlečnika.....	26
Slika 7: Afinitetna kromatografija na CM papain sefarozi. Začetek elucije je s prvo frakcijo. Inhibitorno aktivnost smo določevali z BANA testom, v katerem smo 100 µl frakcije dodali 50 µl (2 µg) papaina. Podrobnosti so opisane v metodah pod točko 3.2.2.....	27
Slika 8: Gelska filtracija inhibitornega vzorca po afinitetni kromatografiji. Pogoji so opisani v metodah po točko 3.2.3.	28
Slika 9: HPLC ločba inhibitornih proteinov dobljenih z afinitetno kromatografijo in gelsko filtracijo. Elucija v 0,1 % trifluoroacetni kislini z 0 – 80 % gradientom acetonitrila.....	29
Slika 10: Očiščena Cm ICP 16,5 (vrh 1), nanos A in Cm ICP 10 (vrh 2), nanos B na SDS – PAGE. STD so standardi za molekularno maso.....	30
Slika 11: Masna spektroskopija. Določanje molskih mas vrha 1 (A) in vrha 2 (B) po ločbi na HPLC. ES masni spektri so posneti pod nativnimi pogoji.....	31
Slika 12: Izoelektrično fokusiranje v pH gradientu 3 – 9: Primerjava Cm ICP 16,5 (nanos A) in Cm ICP 10 (nanos B). STD so proteinski standardi za IEF.....	32
Slika 13: Medsebojno ujemanje N-terminalnih aminokislinskih zaporedij Cm ICP 16,5, Cm ICP 10 in Cm (helidocistatin) (Rogelj s sod., 1998). Identične aminokisliline so uokvirjene.	33
Slika 14: Ujemanje N-terminalnih aminokislinskih zaporedij Dc (cistatin iz korenja) (Rogelj s sod., 1998) in Cm ICP 16,5. Identične aminokisliline so uokvirjene.	33
Slika 15: Titracijska krivulja inhibicije papaina z E-64.....	33
Slika 16: Titracijska krivulja inhibicije papaina s Cm ICP 16,5.....	34
Slika 17: Titracijska krivulja inhibicije papaina z Cm ICP 10.	35
Slika 18: Določanje inhibitorne ekstrakta listov, stebel, korenin in semen s titracijo 2 µg papaina v BANA testu.	36
Slika 19: pH stabilnost inhibitorjev	37
Slika 20: Temperaturna stabilnost inhibitorjev	37

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A_{280} , A_{520} , A_{215}	absorbanca pri valovni dolžini 280 oz. 520 nm
BANA	Bz-DL-Arg-2-NNap
c	molarna koncentracija
cDNA	komplementarna DNA («complementary <u>DNA</u> «)
CM-papain	karboksi metilirani papain
CP	cisteinska proteinaza («cysteine proteinase«)
Da	dalton; enota za molekularno maso, ki ustreza 1/12 mase čistega izotopa ^{12}C
DDT	ditriotreitol
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
E-64	L-trans-epoxysuccinylleucylamido [4-guanidino] butane
EC	encimska klasifikacijska številka («enzyme classification«)
EDTA	etilendiamin tetraacetat
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija («High pressure liquid chromatography«)
ICP	inhibitorji cisteinskih proteinaz («cysteine proteinase inhibitor«)
IE	inhibitorna enota
kDa	kilodalton
K_i	konstanta inhibicije
l	dolžina optične poti
LMW	nizkomolekularni proteinski standardi («low molecular weight standard«)
mRNA	informacijska RNA («messenger RNA«)
NaDS	natrijev dodecil sulfat
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
pI	izoelektrična točka proteinov («point of isoelectricity«)
PTC	fenilizotiocianat
SDS	natrijev dodecil sulfat
TCA	trikloroocetna kislina ???

TRIS tris(hidroksimetil)aminometan (= 2-amino-2(hidroksimetil)-1,3-propandiol)

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 IN POSTAVITEV PROBLEMA

Krvavi mlečnik (*Chelidonium majus L.*) je tradicionalna zdravilna rastlina v evropski in vzhodni medicini. Uporablja se zlasti za odstranjevanje bradavic, ki jih povzročajo virusi (Colombo in Bosiso, 1996).

Poznano je tudi protivirusno delovanje cistatinov, družine inhibitorjev cisteinskih proteinaz, ki inhibitorno delujejo na razmnoževanje tistih tipov virusov, ki pri tvorbi virusne ovojnice uporabljajo cisteinske proteinaze (Kondo *s sod.*, 1992)

Iz krvavega mlečnika je že bil izoliran fitocistatin (helidocistatin) in določen njegov spekter inhibicije cisteinskih proteinaz (Rogelj *s sod.*, 1998) v krvavem mlečniku pa so prisotni še drugi inhibitorni proteini, ki jih je prav tako potrebno očistiti in okarakterizirati.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KRVAVI MLEČNIK (*Chelidonium majus* L.)

Krvavi mlečnik (*Chelidonium majus* L.) uvrščamo v rod *Chelidonium*, družino makovk (*Papaveraceae*). Je trajna zelika, ki zraste tudi do 1 m visoko. Iz kratke korenine požene pokončna stebelca, ki so pri vrhu razvejana. Pritlični in stebelni listi so pernato nacepljeni, jajčasti in neenakomerno nazobčani. Spodnji listi so pecljati, medtem ko so zgornji sedeči. Cela rastlina je porasla z dlačicami. Na koncu vejic so dolgopecljati rumeni cvetovi, ki se združujejo v kobilasta socvetja. Plod je podolgovata mnogosemenska glavica. Rastlina cveti od maja do septembra. Vsi njeni deli vsebujejo rumeno rdeči mleček, ki je neprijetnega vonja, ostrega in grenkega okusa. To je zelo razširjena rastlina, ki raste ob poteh, ograjah, po grobljah, ob zidovih (<http://www.bic-lj.si>).



Slika 1: Krvavi mlečnik (*Chelidonium majus* L.) v naravi

2.1.1 Nahajališče

Krvavi mlečnik rumeno cveti od aprila do konca septembra na suhih, z dušikom bogatih tleh (tudi na starih zidovih in skalovju) po vsej Sloveniji. Razširjen je tudi po zapuščenih krajih po Evropi ter osrednji in severni Aziji, prenesli so ga tudi v severno Ameriko (<http://www.zaplana.net>).



Slika 2: Krvavi mlečnik - cvet

2.1.2 Opis rastline

Cvetovi s štirimi venčnimi listi, dvema čašnima listoma, nadržalo plodnico in mnogo prašniki ter oranžen mleček, ki na zraku potemni (ta mu je dal tudi ime), ga nedvomno uvrščajo med makovke. Od makov ga boste že na prvi pogled ločili po velikosti cvetov (venčni listi krvavega mlečnika so dolgi do 1 centimeter, venčni listi makov pa so precej daljši), loči pa jih tudi zgradba semenske glavice. Ta se pri makih odpira z luknjicami, pri krvavem mlečniku pa z loputama (<http://www.zaplana.net>).



Slika 3: Krvavi mlečnik

2.1.3 Zdravilne učinkovine krvavega mlečnika

Slovenska odredba o razvrstitvi zdravilnih rastlin (Ur. list RS, št.1/99) ga razvršča v kategorijo ZR, ki omeji njegovo rabo na registriana zdravila z režimom izdaje na recept. Vsebuje od 0.1 do 1 odstotka različnih alkaloidov, znanih jih je več kot dvajset, med katerimi so pomembnejši helidonin, berberin, heleritrin in sangvinarin, njihova vsebnost pa je zelo spremenljiva. Helidonin olajša izločanje žolča, ker sprošča gladke mišice žolčevodnih poti, blaži tudi bolečine in pomirja, a šibkeje kot protikrčno zdravilo papaverin. Berberin spodbudi odvajanje žolča, sangvinarin pa lokalno draži tkivo ter nasprotno od helidonina zveča mišično napetost. Več alkaloidov deluje proti bakterijam in virusom. Njihov zdravilni učinek zaradi majhne vsebnosti ni izrazit, to velja toliko bolj za sestavljena zdravila, kjer je krvavi mlečnik navzoč v majhnem deležu. Zelo v čisljih je v kitajski medicini, kjer mu pripisujejo protibolečinske, protivnetne in razstrupljevalne lastnosti ter pomirjevalne proti dražečem kašlju.

Alkoholni izvlečki delujejo zaščitno za podganja jetra (Surjyo s sod. 2002). V rumenkasto oranžnem rastlinskem soku so tudi encimi, ki razgrajujejo beljakovine, kar bi lahko upravičilo mazanje bradavic s svežim mlečkom v ljudski medicini

(<http://www.visia.si/>). Učinek bi lahko pripisali tudi sangvinarinu in heleritrinu, ki zavirata celične delitve. S to lastnostjo bi lahko pojasnili tudi občasno zunanjo rabo droge proti luskavici, čeprav v tem primeru ne velja prezreti možnega neželenega dražilnega učinka. Uporaba čajnega napitka ni običajna. Krvavi mlečnik blaži prebavne krče v zgornjih prebavilih. Slaboten učinek ne upraviči notranje zeliščne rabe, saj koristi ne odtehtajo tveganja, posebno še ob doma pripravljeni drogi z neznano vsebnostjo toksičnih alkaloidnih sestavin, standardiziran čaj pa bi se pri nas lahko izdajal le na recept, če bi bil na voljo kot varno, učinkovito in kakovostno zdravilo. Vsebnost mlečnika v zeliščnih izdelkih na zahodu je majhna, zato ni pričakovati farmacevtske uporabe razen v zdravilih domače lekarne (<http://www.pomurske-lekarne.si>).

2.2 PEPTIDAZE

Proteoliza je encimska razgradnja beljakovin, pri kateri pride do hidrolize ene ali več peptidnih vezi. Proteolitični encimi-proteinaze oziroma peptidaze (EC 3.4, po pravilih International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1984) so hidrolitični encimi, ki v polipeptidih in proteinih cepijo peptidno vez. Lahko delujejo znotraj ali zunaj celice (npr. v prebavilih in telesnih tekočinah). Proteinaze so encimi, ki so povsod navzoči, so posredno ali neposredno udeleženi v katabolnih in anabolnih procesih (Callis, 1995). Lizosomske proteinaze z nespecifično razgradnjo proteinov zagotavljajo vir aminokislin in omogočijo biosintezo proteinov. Proteinaze imajo pri rastlinah številne regulatorne funkcije. Pri kalitvi in senescenci poskrbijo za mobilizacijo proteinskih zalog in tako omogočajo rast novih vegetativnih rastlinskih organov. Pomembne so pri usmerjanju novo nastalih proteinov v tarčne organele znotraj celice, pri spremembah v sestavi proteinov v celičnih procesih, relokalizaciji organskega dušika, znotrajcelični razgradnji denaturiranih, nenormalnih in toksičnih proteinov, kot tudi v procesih, ki spremljajo odziv rastline na abiotske spremembe, ranitev ali napad patogena (Vierstra, 1996).

2.2.1 Delitev peptidaz

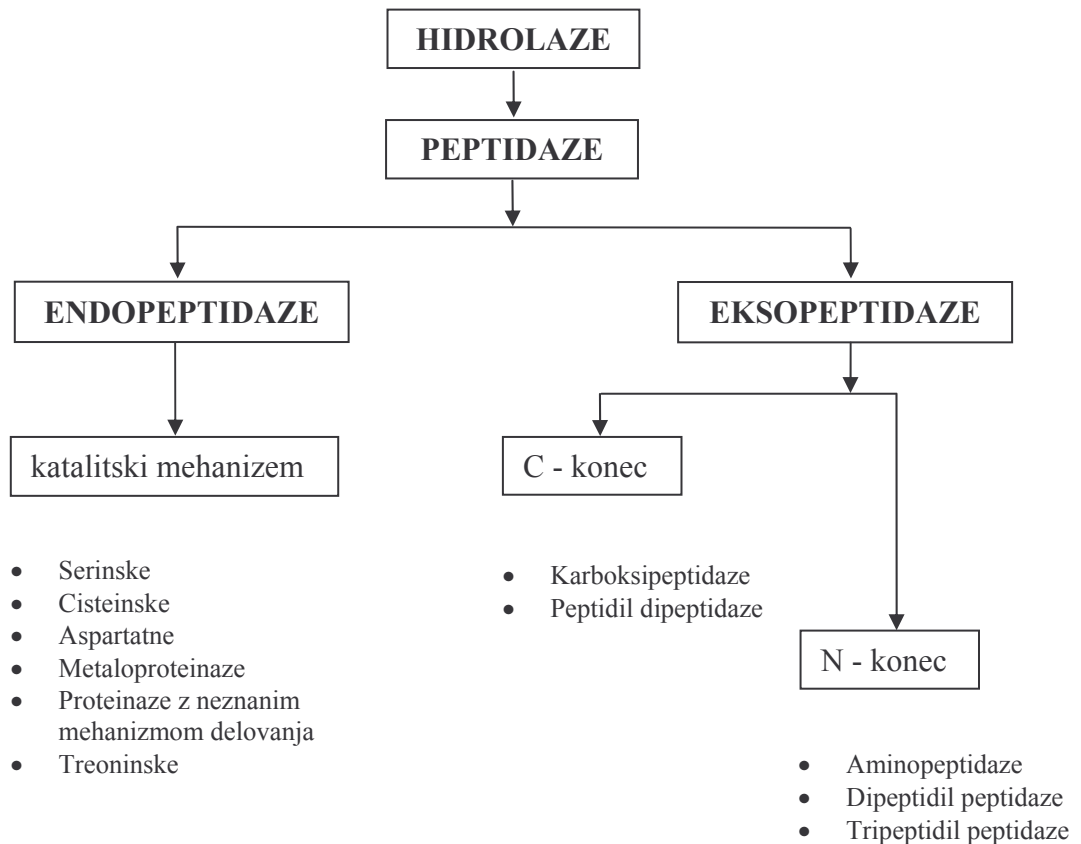
Izraz peptidaze združuje veliko skupino encimov, pri klasifikaciji pa so upoštevani glavni kriteriji:

- izvor (mikrobne, glive, živalske)
- mesto delovanja (ekstra- in intracelularne)
- velikost (visoko- in nizkomolekularne)
- mesto cepitve peptidne vezi na: endopeptidaze (cepijo peptidno vez v notranjosti peptidne verige) in eksopeptidaze (cepijo končno peptidno vez na N ali na C koncu)
- način delovanja (različen katalitski tip)

Najnovejša razdelitev je MEROPS klasifikacija (www.merops.com), ki sta jo osnovala Barrett in Rawlings. Ta klasifikacija razvršča proteinaze na osnovi njihove evolucijske sorodnosti (ujemanje v primarni in terciarni strukturi). MEROPS klasifikacija uvršča peptidaze tako, da je vsaka peptidaza glede kemičnih skupin, ki so udeležene pri katalizi, uvrščena v določen katalitski tip, posamezni tipi pa nadalje v družino. Družine, ki so evolucijsko povezane, so združene v naddružino ali klan (Rawlings in Barrett, 1993).

Preglednica 1: Razvrstitev proteinaz glede na mehanizem katalize (Rawlings in Barrett, 1993).

Skupina proteinaz	število družin v skupini
serinske	49
cisteinske	59
aspartatne	14
metaloproteinaze	52
treoninske	4
glutaminske	1
proteinaze z neznanim mehanizmom delovanja	17



Slika 4: Razdelitev peptidaz po IUB (IUB, 1984).

Endopeptidaze cepijo znotraj peptidne verige in so nadalje razdeljene na osnovi različnih katalitskih mehanizmov na (Barrett, 1994):

- serinske (EC 3.4.21)
- cisteinske (EC 3.4.22)
- aspartatne (EC 3.4.23)
- metaloproteinaze (EC 3.4.24)
- proteinaze z neznanim mehanizmom delovanja (EC 3.4.99)

Eksopeptidaze odcepljajo različno velike fragmente bodisi s karboksilnega, bodisi z amino terminalnega konca polipeptidne molekule in so na podlagi tega razdeljene na aminopeptidaze (EC 3.4.11), dipeptidil peptidaze (EC 3.4.14), tripeptidilpeptidaze (EC 3.4.-), karboksipeptidaze (EC 3.4.6-18), peptidil dipeptidaze (EC 3.4.15), dipeptidaze (EC 3.4.11.3), tripeptidaze (EC 3.4.11.4.) in omega peptidaze (EC 3.4.19) (Barrett, 1994).

2.2.2 Cisteinske proteinaze

Cisteinske proteinaze (CP) so odkrili skoraj v vseh kraljestvih živega sveta; v virusih, glivah, rastlinah, živalih in celo v nekaterih bakterijah (Berti in Storer, 1995). V larvah *Diabrotica virgifera* (škodljivec na koruzi) lahko CP predstavljajo celo do 90 % proteinske aktivnosti (Orr *s sod*, 1994). V aktivnem mestu sta aminokislini cistein in histidin, ki pa v primarni strukturi kažeta različno zaporedje v različnih družinah (Cys/His ali His/Cys). To kaže na to, da vse CP nimajo enotnega evolucijskega izvora (Rawlings in Barrett, 1994).

Preglednica 2: Družine cisteinskih proteinaz (www.merops.com)

Klan	Družina	Tipičen predstavnik	Zaporedje katalitičnih AK
CA	C1	papain	Cys /His
CA	C2	kalpain	Cys
CA	C10	streptopain	Cys /His
CA	C12	ubikvitin C-terminalna hidrolaza UCH-L1 (<i>Homo sapiens</i>)	Cys /His
CA	C19	Ubp1 ubikvitin peptidaza (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Cys /His
PA	C3	pikornain 3C (polio virus)	His/Asp/Ser ali Cys
PA	C4	N1a endopeptidaza (krompirjev virus Y)	His/Asp/Ser ali Cys
PA	C24	endopeptidaza 3C (mačji »calicivirus«)	His/Asp/Ser ali Cys
PA	C30	pikornain podoben 3C (virus mišjega hepatitisa)	His/Asp/Ser ali Cys
PA	C37	procesirajoča peptidaza (Southampton virus)	His/Asp/Ser ali Cys
PA	C38	potencialna procesirajoča peptidaza (»parsnip yellow fleck« v.)	His/Asp/Ser ali Cys
CC	C16	endopeptidaza (mišji virus hepatitisa)	Cys /His
CC	C27	endopeptidaza (Rubella virus)	Cys /His
CC	C23	endopeptidaza (»apple stem pitting« virus)	Cys /His
CC	C29	papainu podobna endopeptidaza 2 (mišji virus hepatitisa)	Cys /His
CC	C31	PCP α endopeptidaza	Cys /His
CC	C32	PCP β endopeptidaza (Lelystad virus)	Cys /His
CC	C33	Nsp2 cisteinska endopeptidaza (virus konjskega artritisa)	Cys /His
CC	C34	potencialna papainu podobna endopept. (ACLS v.)	Cys /His
CC	C35	potencialna papainu pod. endopept. (»apple stem grooving« v.)	Cys /His
CC	C36	papainu podobna endopeptidaza (»beet	Cys /His

		necrotic yellow vein« v.)	
CC	C41	cisteinska proteinaza (virus hepatitis E)	Cys /His
CC	C42	papainu podobna endopeptidaza (»Citrus tisteza« virus)	Cys /His
CD	C14	kaspaza-1	His/Cys
CE	C18	endopeptidaza 2 (virus hepatitis C)	His/Glu ali Asp/Cys
CE	C5	adenovirusna endopeptidaza	His/Cys
CF	C15	piroglutamil-peptidaza I	
-	C11	klostripain	Cys
-	C14	hemoglobinaza	Cys
-	C17	mikrosomska ER60 endopeptidaza	
-	C22	cisteinska proteinaza (<i>Trichomonas vaginalis</i>)	
-	C26	gamma-glutamil hidrolaza	
-	C25	gingipain R (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	
-	C39	procesirajoča peptidaza PedD (<i>Pediococcus acidilactici</i>)	
-	C40	dipeptidil peptidaza VI (<i>Bacillus sphaericus</i>)	

Najbolj je raziskana in poznana papainova naddružina s papainovo družino C1. Glavni razlog je v široki zastopanosti.

Papain (EC 3.4.22.2) je rastlinska cisteinska proteinaza iz lateksa papaje (*Carica papaya*). Papainova naddružina vključuje peptidaze z najrazličnejšimi aktivnostmi, npr: endopeptidaze z nespecifičnim delovanjem, kot je papain, bolj specifične endopeptidaze (glicil endopeptidaza), aminopeptidaze, dipeptidil peptidaze, peptidaze z endo- in eksopeptidazno aktivnostjo in tudi takšne, ki ne kažejo proteolizne aktivnosti (Rawlings in Barrett, 1994). Encimi se sintetizirajo kot preproencimi s podobnim aminokislinskim zaporedjem in terciarno strukturo in optimalno delujejo v rahlo kislem pH (4,5 – 6,5) (Turk s sod., 2002). V vseh predstavnikih sta ohranjeni aminokislini Cys-25 in His-159 (številčenje po papainu), ki sta del aktivnega mesta, za samo katalizo to je, razgradnjo peptidne vezi, pa sta potrebni še dve aminokislini. To sta Gln-19, ki pomaga tvoriti oksanionsko luknjo pri nastanku tetraedričnega intermedata, in Asn-175, ki ohranja imidazolni obroč v primerni poziciji (Storer in Menard, 1994).

2.3 PROTEINSKI PROTEINAZNI INHIBITORJI

Ker so proteinaze vključene v veliko pomembnih intra in ekstracelularnih procesov je nujno, da je njihova aktivnost strogo regulirana. Da ne bi prišlo do neprimerne proteolize, so se razvili mnogi mehanizmi, ki to preprečujejo. Ta kontrola poteka na različnih nivojih. Od regulacije ekspresije proteinaz, njihovega izločanja in zorenja, pH okolja, redoks potenciala pri cisteinskih proteinazah, prisotnosti kovinskih ionov pri metaloproteinazah, do blokade njihove aktivnosti z inhibitorji.

Proteinski inhibitorji proteinaz so prisotni v rastlinskih in živalskih tkivih, mikroorganizmih, glivah in protozojih. Lahko se nahajajo ekstracelularno ali intracelularno. Del njihove molekule se prilega aktivnemu mestu encima in se zato specifično in reverzibilno vežejo na encim. V tem so analogni substratom in tudi mehanizem reakcije je često podoben, le da ne pride do cepitve tako kot pri substratu. Kompleks encim-inhibitor je dodatno stabiliziran s številnimi vodikovimi, ionskimi in hidrofobnimi interakcijami in le počasi disocira (Barrett in sod., 1986; Bode in Huber, 1991).

Finkelstadt je leta 1957 odkril v citosolu podganjih jeter proteine, ki so bili toplotno stabilni in so inhibirali katepsin B in dipeptilpeptidazo. Enajst let kasneje sta Witaker in Fossum (1968) odkrila in delno karakterizirala protein iz jajčnega beljaka piščanca, ki inhibira ficin in papain. Delo sta nadaljevala Keilova in Tomašek (1974, 1975), ki sta ugotovila, da ta protein inhibira tudi katepsin B in dipeptilpeptidazo (kasneje katepsin C). Ker zavira aktivnost cisteinskih proteinaz, za ta protein Barrett predlaga ime cistatin (Barrett, 1981).

Aminokislinsko zaporedje piščančjega cistatina sta neodvisno objavili dve skupini (Turk in sod., 1983 in Schwabe in sod., 1984). Sledile so izolacije in karakterizacije cistatinov iz različnih tkiv mnogih sesalcev, drugih živali in kasneje rastlin, ki so bolj ali manj homologni piščančjemu cistatinu. Kasneje so izolirali inhibitorje, ki se strukturno razlikujejo od cistatinov in so zato vključeni v druge naddružine.

V zadnjem času smo priča izjemnemu razvoju na področju proteinskih inhibitorjev cisteinskih proteinaz. Prototip cistatinov odkrit leta 1960 pa še naprej ostaja najbolj raziskana skupina.

Vedno več je znanega tudi o vlogi inhibitorjev v fizioloških procesih. Kot kaže je vedno ob prisotnosti proteinaze, v nekem procesu, povezan tudi proteinazni regulator oziroma inhibitor. Vloga le tega je najbolj opazna, ko pride do porušanja ravnotežja. Neuravnovešeno delovanje endogenih cisteinskih proteinaz lahko vodi v različna patološka stanja, kot so revmatoidni artritis, multipla skleroza, nevrološke bolezni, tumorji in osteoporoza (Berdowska in Siewinski, 2000). Inhibitorji pa niso pomembni samo pri regulaciji endogenih proteinaznih aktivnosti. Veliko patogenov, virusov, bakterij in parazitov, uporablja proteinaze raznih tipov, da vstopijo v napaden organizem. Zato so proteinazni inhibitorji pogosto del obrambnega mehanizma npr. pri rastlinah

(Green, 1972). Po drugi strani pa patogeni uporabljajo tudi inhibitorje, da se izognejo gostiteljevemu obrambnem mehanizmu.

To vse nam kaže širok spekter in področje delovanja proteinaznih inhibitorjev in proteinaz.

S povečevanjem odkritij na tem področju, se je širilo tudi število podatkov in ustvarila se je podatkovna baza proteinov in inhibitorjev MEROPS (merops. sanger. ac. uk.). Bazi podatkov, ki je v začetku vsebovala samo proteinaze, so dodali novo bazo, ki temelji na zagotavljanju obširnih informacij in enotni klasifikaciji proteinaznih inhibitorjev.

Glede na tip proteinaz, ki jih inhibirajo, delimo inhibitorje na (Laskowski in Kato, 1980):

- inhibitorji serinskih proteinaz,
- inhibitorje cisteinskih proteinaz,
- inhibitorje aspartatnih proteinaz,
- inhibitorje metaloproteinaz.

Vendar nekateri inhibitorji interagirajo tudi z različnimi tipi proteinaz. Zato je novejša delitev po strukturi inhibitorjev.

2.3.1 Proteinski inhibitorji cisteinski proteinaz

V naravi so prisotni proteinski inhibitorji cisteinskih proteinaz, ki jih najdemo v človeku, živalih, rastlinah, bakterijah, glivah in protozojih. Ti inhibitorji tvorijo več naddružin. Družine cistatini, stefini, kininogeni in fitocistatini, sestavljajo naddružino cistatinov, ki tvori trdne komplekse z encimi papainskega tipa (Bode in Huber, 2000; Turk s sod., 2002), so stabilni pri ekstremnih pH (2-12) in pri visokih temperaturah (80-100°C).

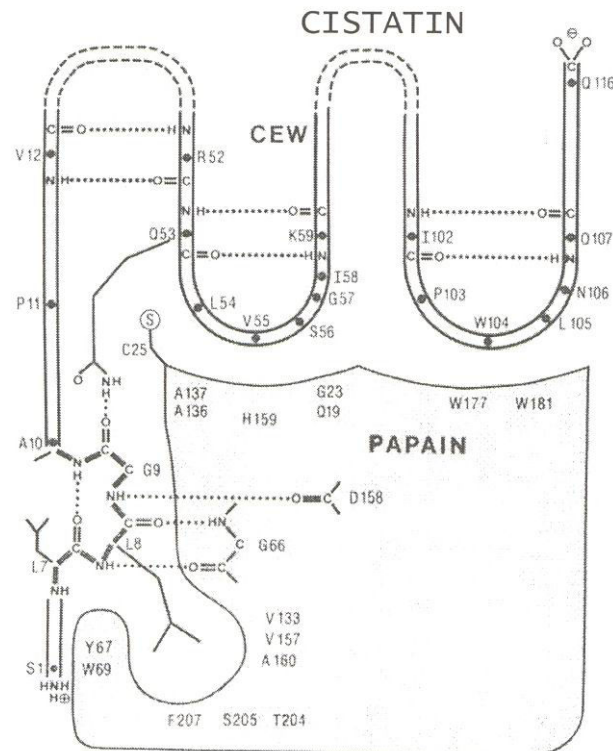
Četrto skupino pa sestavljajo fitocistatini, cistatini izolirani iz rastlin, ki združujejo lastnosti cistatinov in stefinov (Rawlings in Barrett, 1990).

Zelo močan, nekompetitivni in ireverzibilni inhibitor aktivnosti cisteinskih proteinaz papainove družine je E-64 (L-trans-epoxysuccinylleucylamido [4-guanidino] butane), izoliran iz glive *Aspergillus japonicum* (Hanada s sod, 1978), kar kaže na kozmopolitsko zastopanost teh proteinov. Zaradi specifičnosti je pogosto uporabljen v raziskavah, kjer so vključene cisteinske proteaze (Barrett s sod., 1982).

2.3.1.1 Nadružina cistatinov

Reaktivna domena cistatinov v širšem smislu je sestavljena iz dveh sosednjih poddomen, ki dovoljujeta aktivni reži v obliki črke »V«, da se prilagodi aktivnemu mestu cisteinske proteinaze in tam ležečim aminokislinam Cys-25, His-159 in Asn-175. Ne vežejo se direktno na aktivno mesto encima, ampak njegovo delovanje preprečuje sterična ovira,

zaradi kater ne more dostopiti do substrata (Bode in Huber, 2000; Otto in Schirmeister, 1997). Inhibitor ostane nespremenjen (Bode in Huber, 1991). Mehanizem inhibicije so določili s pomočjo kristalne strukture kompleksa med papainom in cistatinom ter med papainom in stefinomB (Stubbs s sod., 1990; Bode in Huber, 2000).



Slika 5: Mehanizem delovanja inhibitorjev cisteinskih proteinaz. Primer inhibicije papaina s kurjim cistatinom (Turk in Bode, 1991).

Stefini so molekule z enojno polipeptidno verigo in z molekularno maso okoli 11 kDa. So brez disulfidnih vezi in niso glikozilirani. Večinoma se nahajajo intracelularno.

Cistatini so bolj kompleksne molekule z molekularno maso okoli 13 kDa. Na C-terminalnem koncu imajo dve disulfidni vezi (Barrett s sod. 1986). Tudi cistatini niso glikozilirani, a se kljub temu nahajajo ekstracelularno, v različnih telesnih tekočinah. Najbolj znani inhibitorji te skupine so kurji cistatin in človeški cistatin (Brzin s sod. 1984).

Kininogeni so visokomolekularni predstavniki cistatinske naddružine. Imajo najbolj kompleksno zgradbo in posledično multifunkcionalno naravo. Vsi so zgrajeni iz lahke in težke verige, ki sta, v zrelem proteinu, povezani z disulfidnimi vezmi in kininom med

njima. So močno glikozilirani, imajo več disulfidnih vezi in njihova mRNA kodira tudi signalno zaporedje.

Fitocistatine uvrščamo v četrto skupino, kjer so tudi rastlinski cistatini, ki imajo nekatere lastnosti živalskih steffinov in cistatinov. So inhibitorji cisteinskih proteinaz, izolirani iz rastlin. Tipična molekulska masa je približno 11 kDa in vsebujejo disulfidne vezi (Rawlings in Barrett, 1990). Prvi cistatinom sorodni protein je iz semen riža izoliral Abe s sodelavci leta 1987 in ga imenoval orizacistatin. Kasneje so iz semen riža izolirali še en cistatinom soroden protein, orizacistatin 2 (Kondo s sod., 1991). Največji po molekulski masi (85 kDa) je multicistatin, izoliran iz krompirja, ki ima več inhibitrnih podenot (Walsh in Strickland, 1993).

2.3.1.2 Družina sojinega Kunitzovega tripsinskega inhibitorja

Iz krompirjevih gomoljev je bila izolirana skupina inhibitorjev cisteinskih proteinaz, strukturno podobna sojinemu Kunitzovem tripsinskem inhibitorju (Križaj s sod., 1993). Obstajajo v več izooblikah s pH med 5,4 in 9,4 ter različnimi inhibitrnimi lastnostmi. Nekateri inhibirajo le cisteinske proteinaze, PCPI 6,6 pa tudi serinski proteinazi tripsin in kimotripsin (Brzin s sod., 1984). Vsebujejo dve disulfidni vezi in za to družino značilno prerogijo. Najbolje je okarakterizirati PCPI 8,3. Inhibitrni spekter tega proteina je zelo širok, saj inhibira tudi nekatere cisteinske proteinaze, ki jih inhibitorji cistatini ne (Rowan s sod., 1990). Večina predstavnikov družine sojinega Kunitzovega tripsinskega inhibitorja inhibira le serinske proteinaze, izolirali pa so tudi proteine, ki lahko inhibirajo serinske in aspartatne proteinaze (Štrukelj s sod., 1992).

2.3.1.3 Tiropini

V skupini tiropinov, glede na njihove inhibitrne lastnosti, poznamo štiri glavne predstavnike: ekvistatin, saksifilin, inhibitor iz iker lososa (ECI) in fragment p41 in variante verige (Lenarčič s sod. 2000a).

Tiroglobulinska domena tipa-1 je strukturni element, ki ga lahko najdemo v mnogih funkcionalno nesorodnih proteinih. Pri nekaterih izmed teh proteinov so dokazali inhibitrno aktivnost cisteinskih proteinaz oziroma od kationov odvisnih proteinaz (Lenarčič in Bevec, 1998). Najbolje sta okarakterizirana Ii fragment, izoliran iz človeških ledvic in ekvistatin, izoliran iz rdeče morske vetrnice (*Anemone equina*). Aktivno mesto teh inhibitorjev še ni poznano. Prav tako ni poznan tudi mehanizem delovanja teh proteinov, ki strukturno niso podobni nobenemu doslej znanemu peptidaznemu inhibitorju. Ii fragment je *in vivo* povezan z molekulo MHC II in njegova funkcija je kontrola procesa izpostavitve antigena. Vsebuje eno tiroglobulinsko domeno tipa-1. Je izredno močan inhibitor katepsina L ter krucipaina (pM območje K_i) ter nekoliko slabši inhibitor papaina in katepsina H (nM območje K_i) (Bevec s sod., 1996).

Ekvistatin, 22k Da velik protein, podobno inhibira nekatere cisteinske proteinaze s K_i v nM oziroma pM območju (Lenarčič *s sod.*, 1997) poleg tega pa inhibira tudi aspartatno proteinazo katepsin D. Sestavljen je iz treh ponovitev tiroglobulinske domene tipa-1. Prva je odgovorna za inhibicijo cisteinskih proteinaz, za inhibicijo aspartatnih proteinaz pa druga ali tretja (Lenarčič *s sod.* 1999). Ekvistatin se je izkazal kot dober inhibitor inducirane cisteinske aktivnosti v adaptiranih prebavilih koloradskega hrošča, kjer so normalno prisotni PI odpovedali (Gruden *s sod.* 1999).

Saksifilin je 91 kDa velik protein, izoliran iz žabe *Rana catesbiana* in veže saksitoksin. Inhibira tri cisteinske proteinaze: papain, človeški katepsin B in katepsin L. Ima dve Thyr-1 domeni, ki obe sodelujeta pri inhibiciji papaina, samo ena od njiju pa pri inhibiciji obeh katepsinov (Lenarčič *s sod.*, 2000b).

2.3.1.4 Mikocipini

Prvi znani in dobro preučeni proteinski inhibitor cisteinskih proteinaz izoliran iz gob je klitocipin, poimenovan po svojem izvoru, bazidomiceti *Clitocybe nebularis* (Brzin *s sod.*, 2000). Molekula klitocipina je monomer, vsebuje veliko prolina in glicina ter β -strukture in je zato stabilna pri visokih temperaturah. Vzorec inhibicije se razlikuje od znanega pri drugih razredih cisteinskih proteinaznih inhibitorjev, saj močno inhibira papain in katepsin L. Inhibira tudi katepsin B in bromelin, ne inhibira pa katepsina H (Kidrič *sod.*, 2002, Dubin, 2005). Izolirano je bilo tudi delno zaporedje cDNA klitocipina (Sabotič *s sod.*, 2005), ki se razlikuje od zaporedja po proteinski izolaciji. To nakazuje, da klitocipin kodira več homolognih genov.

2.3.1.5 Chagasini

Prvi znani inhibitor iz družine chagasinov je inhibitor endogene proteinaze bakterije *Trypanosoma cruzi*. Kasneje so odkrili podobne inhibitorje še pri drugih bakterijah in parazitech (Ridgen D. J., *s sod.* 2002).

2.3.1.6 Propeptidne regije kot inhibitorji

Papainu podobne cisteinske proteinaze se sintetizirajo kot neaktivni prekurzorji. Razlog za to neaktivnost je močna inhibicija N-terminalnih propeptidov. Samo na ciljnih mestih pride do omejene proteolize in disociacije regije, kar omogoči encimom njihovo delovanje (Fox T., *sod.*, 1992). Kasnejše študije so pokazale, da so propeptidi kompetitivni, počasi vezajoči se inhibitorji, ki so kljub širokemu spektru cistatinov, zelo selektivni za encim iz katerega izhajajo.

2.4 INHIBITORJI PROTEINAZ IZ KRVAVEGA MLEČNIKA

Iz krvavega mlečnika so (Rogelj s sod. 1998) izolirali inhibitor, ki močno inhibira papain, kar kaže na to, da spada med inhibitorje cisteinskih proteinaz. Gre za zelo odporen inhibitor, saj prenese obdelavo s kislino pH 4 in bazo pH 11 in tudi po 5 minutnem kuhanju pri 100°C ne izgubi svoje aktivnosti. Poimenovali so ga helidocistatin. Kaže močno inhibitorno aktivnost na katepsin L, papain in katepsin H. Vrednosti inhibicije so značilne za fitocistatine, saj so bile podobne vrednosti inhibicije opažene pri inhibiciji teh encimov z inhibitorjem iz semen fižola (Brzin s sod 1998). Aminokislinsko zaporedje helidocistatina so primerjali s fitocistatini, iz korenja, sončnice, soje in papaje. Največja identičnost se pokazala pri cistatinu iz korenja in sicer 58 %, sledili so cistatin iz semen sončnice (54 %), cistatin iz soje (39 %) in cistatin iz papaje (36 %). Zaradi visoke identičnosti in bazične izoelektrične točke sklepajo, da spada helidocistatin v skupino fitocistatinov in podskupino bazičnih fitocistatinov.

2.5 DELOVNE HIPOTEZE

Edini do sedaj okarakterizirani inhibitor cisteinskih proteinaz je helidocistatin z alkalno izoelektrično točko. Pri delu s *Chelidonium majus* so opazili prisotnost vsaj še dveh inhibitorjev s podobnimi molekulskimi masami, vendar z različno izoelektrično točko. Obstaja velika verjetnost, da so to inhibitorji cisteinskih proteinaz drugačnega tipa in z drugačnimi lastnostmi, kar naj bi dokazala njihova izolacija in karakterizacija.

2.6 NAMEN NALOGE

Cilj diplomskega dela je proučiti vsebnost in lastnosti inhibitorjev cisteinskih proteinaz v ekstraktu krvavega mlečnika in jih primerjati z že poznanim helidocistatinom.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 RASTLINSKI MATERIAL

Rastlinski material smo nabirali v marcu in aprilu na lokaciji nizki Kras. Biološko stanje rastline je bilo pred cvetenjem. Nabirali smo zelene dele rastlin. Posebej smo shranili senena in korenike.

3.2 IZOLACIJA FITOCISTATINOV IZ KRVAVEGA MLEČNIKA

3.2.1 Priprava ekstrakta

Nabrani rastlinski material smo globoko zamrznili pri -20°C , nato smo ga narezali na manjše kose in homogenizirali v homogenizatorju Waring Blendor s pufrom v razmerju 1:3 pri maksimalnih obratih.

Za razbitje biološkega materiala se običajno uporablja homogenizacija, ki se izvaja v pufu, ki zagotavlja optimalne pogoje za stabilnost iskanega proteina. Pri izolaciji inhibitorja iz krvavega mlečka, smo uporabili 0.1M TRIS s pH 7.2 in dodatkom 0.3M NaCl. Homogenat smo nato odcedili na plenični predlogi in tako dobljeni sok centrifugirali v centrifugi RC5C (Sorvall Du Pont Instruments) v rotorju pri 10000 obratih in temperaturi 4°C , 15 minut. Supernatant smo zamrznili pri -20°C , oborino pa zavrgli.

Enak postopek priprave ekstrakta smo uporabili tudi za študijo vsebnosti inhibitorja v listih, stebli in koreniki. Za pripravo ekstrakta iz semen pa smo 10 g suhega semena strli v tekočem dušiku v prah, ga suspendirali v 10 ml pufru za gelsko kromatografijo na magnetnem mešalu čez noč v hladni sobi. Suspenzijo smo centrifugirali v centrifugi RC5C (Sorvall Du Pont Instruments) v rotorju pri 10000 obratih in temperaturi 4°C , 15 minut in pridobili 9,3 ml bistrega supernatanta.

3.2.2 Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija je metoda ločevanja komponent v vzorcu. Temelji na specifičnih interakcijah, ki so značilne v organizmih (npr. encim – substrat, encim – inhibitor, encim – kofaktor, protitelo – antigen). Te interakcije so bolj ali manj specifične, običajno nekovalentne in zato reverzibilne. Eno od komponent imobiliziramo na inerten nosilec, navadno polisaharid. Po nanosu vzorca, ostanejo na kolono vezane le molekule z biološko afiniteto do vezanega liganda. S spiranjem z začetnim pufrom

odstranimo nespecifično vezane snovi. Elucijo vezanih molekul izvedemo s spremembo pH, ionske - moči, dielektrične konstante ali z dodatkom konkurenčnega liganda. Učinkovitost ločbe je odvisna od jakosti interakcije med proteinom in ligandom. Šibka interakcija povzroči slabo vezavo na ligand in s tem slab izkoristek, močna interakcija pa zahteva ostrejšje pogoje elucije, kar lahko povzroči denaturacijo proteina.

3.2.2.1 Priprava CM papain – sefaroze

Reagenti:

- fosfatni pufer za aktivacijo, 0,05 M fosfat pH 6.0 +5mM cistein (za sprostitev – SH skupin)
- raztopina za karboksimetiliranje: 0,05 M jodocetna kislina v pufru za aktivacijo

Postopek:

Pri vezavi papaina (Sigma ZDA) na aktivirano CNBr Sefarozo, smo sledili navodilom proizvajalca (Amersham Pharmacia Biotech). Sledilo je karboksimetiliranje papaina. Gel smo suspendirali v litru 0.05 M fosfatnega pufru pH 6.0, ki je vseboval 5mM cistein. Odnučani gel smo stresali eno uro v preostalem litru 0.05 M fosfatnega pufru z 0.05M jodocetno kislino. Po eni uri smo gel na nuči spirali z 1 litrom vezavnega pufru. CM papain-sefarozo smo hranili v pufru, ki smo ga uporabljali pri afinitetni kromatografiji, na hladnem, pri 4°C, z dodatkom 1M NaCl.

3.2.2.2 Izvedba afinitetne kromatografije

Reagenti:

- vezavni pufer: 0.1 M NaOAc pH 6.5+ 0.5 M NaCl
- raztopina za elucijo: NaOH (0.01M)
- raztopina za nevtralizacijo: 30 % CH₃COOH

Postopek:

Vzorcem smo dodali ustrezno količino NaCl, do 0,5 M raztopine. 100 ml gela smo suspendirali v 500 ml vzorca in vse skupaj stresali 15 min. Gel smo odnučali ter ga temeljito sprali z vezavnim pufrom in ga prenesli v kolono dimenzij 16.5x4.2 cm. Vezane proteine smo eluirali z 0.01M NaOH. Zbirali smo frakcije po 20 ml in jih takoj nevtralizirali z očetno kislino na pH 6.0 – 7.0. Frakcijam smo izmerili absorpcijo pri 280 nm in določili njihovo inhibitorno aktivnost na papain. Aktivne frakcije smo združili ter jih skoncentrirali na ultrafiltru (Amicon, ZDA). Uporabili smo membrano YM-5, ki zadrži proteine večje kot 5 kDa.

3.2.3 Gelska kromatografija

Gelska kromatografija imenovana tudi molekularno sito, je separacijska metoda, ki temelji na ločevanju molekul zaradi razlik v njihovi velikosti. Ob tem se predpostavlja, da ni elektrostatskih in drugih interakcij med gelom in sestavinami vzorca ter da imajo proteini vzorca enotno, sferično obliko, kar pa vedno ne drži. Stacionarna faza je zamrežen polimer v obliki gela, ki ima točno definirano velikost por. Ta porozni gel je običajno dekstran, agaroz, poliakrilamid ali polistiren. Manjše molekule se v pore ujamejo in zato potujejo počasneje ter imajo daljši elucijski čas. Večje molekule pa sploh ne prodrejo v pore in zato potujejo hitreje ter imajo krajši elucijski čas. Molekule se tako ločijo po padajoči molekularni masi.

3.2.3.1 Priprava kolone in izvedba gelske kromatografije

Reagenti:

Elucijski pufer za gelsko kromatografijo:

- 0.1M NaOAc, 0.3M NaCl, 0.001 EDTA, pH 5.5.

Postopek:

Kolono z dimenzijami 1.8x120 cm, smo napolnili z gelom Sephacryl S-200 ter ga uravnotežili z elucijskim pufrom. Nanašali smo alikvote po 5 ml vzorca (koncentriran sok ali koncentrirane aktivne frakcije po afinitetni kromatografiji) in nato eluirali s pufrom s pretokom 9,3 ml/h, frakcije pa zbirali na 20 min s kolektorjem. Frakcijam smo določili koncentracijo proteinov z merjenjem absorbance pri 280 nm in jim izmerili inhibitorno aktivnost na papain.

3.2.4 HPLC

HPLC (High pressure liquid chromatography) v kombinaciji s hidrofobno kolono, ločuje proteine in peptide na principu hidrofobnosti. Vzorec potuje počasneje, če ima na površini več hidrofilnih aminokislin. Pogoji za dobro ločitev, so že delno očiščeni vzorci. Metoda se bistveno ne razlikuje od prej opisanih, razlika je le v bistveno večjih tlakih, ki lahko znašajo tudi več kot 300 barov. HPLC ima lahko kot nosilec tudi gele, ki omogočajo ionsko ali gelsko kromatografijo. Metodo zaznamujejo visoka ločljivost, ponovljivost, hitrost ločbe in občutljivost. Poleg tega je primerna za majhne količine vzorca in ima možnost avtomatizacije.

Ločbo vzorca smo opravili na napravi HP 1100 (Hewlett-Packard, ZDA).

Postopek:

Uporabili smo kolono VYDAC C18 (Alltech; 4,6 x 250 mm), pufer A: 0,1% TFA in pufer B: 0,1% TFA, 90% CH₃CN, pretok 1 ml/min, peptide smo detektirali z merjenjem absorbance pri 215 nm. Vzorec smo topili v pufru A in smo na koloni vezali v pufru A in nato eluirali z gradientom pufru B do 80% acetonitrila. Pretok je bil 1ml/min in peptide smo detektirali z merjenjem absorbance pri 215 nm. Na kolono smo nanesti 20 do 200 µl očiščenega vzorca. Proteinskim frakcijam smo nato izmerili inhibicijo papaina. Po sušenju (Concentrator 5301, Eppendorf) smo aktivni vrh 1 rekromatografirali in mu po ponovnem sušenju določili maso z masno spektrometrijo ter N-terminalno aminokislinsko zaporedje s sekvenciranjem. Vrhu 2 smo prav tako določili N-terminalno zaporedje.

3.3 DOLOČANJE KONCENTRACIJE PROTEINOV

3.3.1 Merjenje absorbance pri valovni dolžini 280 nm

S to metodo lahko določimo koncentracijo proteinov v neobarvanih raztopinah. Izkoriščamo lastnost, da aromatske aminokisliline triptotan (Trp), tirozin (Tyr) in v manjši meri fenilalanin (Phe) in disulfidne vezi absorbirajo svetlobo valovne dolžine 280 nm (torej v UV področju). Metoda je absolutna, kar pomeni, da lahko koncentracijo direktno določimo z merjenjem absorbance. Koncentracija proteina lahko neposredno izračunamo iz Beer – Lambertovega zakona, vendar le, če poznamo molarni absorpcijski koeficient za proteine.

Beer-Lambertov zakon:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c \text{ kjer je}$$

A – absorbanca,

ε – molarni absorpcijski koeficient [$l / mol \cdot cm$]

l – dolžina optične poti

c – molarna koncentracija [mol / l]

Metodo smo uporabili le za relativno določanje proteina v posameznih frakcijah gelske kromatografije. Za direktno določanje koncentracije proteina, bi morali poznati molarni absorpcijski koeficient. Tega bi lahko izračunali, če bi poznali celotno zaporedje proteina ali izmerili, če bi bila na voljo zadostna količina proteina za natančno tehtanje.

Pri delno obarvanih vzorcih iz afinitetne kromatografije, je ta metoda omogočala le grobo oceno koncentracije proteinov. Težave pri tej metodi nastopijo tudi pri vzorcih oziroma raztopinah, ki vsebujejo druge aromatske spojine, saj te ravno tako absorbirajo svetlobo iste valovne dolžine. V takih primerih je določitev vsebnosti proteinov zelo nezanesljivo

ali sploh nemogoče. Absorbanco smo merili na spektrometru Perkin Elmer UV/VIS Lambda 11, proti vodi. Uporabili smo kiveto iz kremenovega stekla širine 1 cm.

3.3.2 Kvantitativno določanje vsebnosti proteinov po Bradfordu

Metoda temelji na dejstvu, da se pri vezavi kisle raztopine Coomassie Brilliant Blue na aromatske aminokislino proteina absorpcijski maksimum barvila, premakne od valovne dolžine 456 nm k 595 nm. V prisotnosti proteinov torej opazimo povečanje absorbance pri 595 nm glede na slepi vzorec, kar je kvantitativno merilo za količino proteinov v vzorcu (Bradford, 1976).

Izvajanje testa:

10 μ l in 20 μ l ustreznega vzorca smo dopolnili z destilirano vodo do 800 μ l in dodali 200 μ l reagenta Bio-Rad (Amersham Pharmacia Biotech). V roku 10-60 minut smo odčitali absorbanco s spektrofotometrom (Lambda 11 Perkin-Elmer) pri valovni dolžini 595 nm proti slepemu vzorcu, ki je bil voda. Uporabljali smo plastične kivete (l=1 cm), ki smo jih občasno spirali z metanolom in se tako ognili napaki zaradi obarvanosti sten kivete.

Koncentracijo proteinov smo določili s pomočjo umeritvene krivulje, ki smo jo naredili z ovalbuminom v območju koncentracij 0-40 μ g/ml.

3.4. ELEKTROFORETSKE METODE

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

Elektroforeza je ločevalna metoda, ki temelji na potovanju nabitih delcev v električnem polju. Običajno je hitrost potovanja odvisna od njihovega celokupnega naboja, velikosti in oblike. V prisotnosti NaDS, pa je hitrost potovanja odvisna samo od velikosti (mase) proteina.

NaDS je anionski detergent, ki poruši nativno konformacijo proteina. Molekula NaDS se nespecifično veže na povprečno dve aminokislini proteina in s tem tvori negativno nabit kompleks. Ker je razmerje med nabojem kompleksa in velikostjo polipeptidne verige in s tem gibljivost kompleksa enaka za vse proteine, bi vsi delci potovali enako hitro. Zato to elektroforezo izvajamo z zamreženim separacijskim gelom, kjer majhne molekule potujejo hitreje kot velike. Metoda je uporabna za določanje relativne molske mase, služi pa tudi za preverjanje čistosti encima med procesom izolacije.

Delali smo na Phast elektroforetskem sistemu, po navodilih proizvajalca (Amersham Pharmacia Biotech). Vzorce smo nanašali na gradientne poliakrilamidne gele PhastGel SDS 8-25 %. 3 μ l vzorca smo dodali enak volumen pufru 0,02 M Tris/HCl, 2 mM EDTA, 5 % NaDS in 0,01 % barvila brom fenol modro in alternativno z istimi dodatki, katerimi je bil dodan še 10 mM DDT. Pred nanosom smo tako pripravljene vzorce 5 min segrevali pri 100°C. Tako smo zagotovili popolno razvitje polipeptidne verige.

Po končani elektroforezi smo gele obarvali z barvilom Coomassie Brilliant Blue. Vzoredno z vzorci smo nanegli zmes nizkomolekularnih proteinskih standardov (LMW calibration kit Amersham Pharmacia Biotech), s pomočjo katerih smo določili relativno molekularno maso proteinov v vzorcu.

Preglednica 3: Uporabljeni standardi

LMW	M [kDa]
fosforilaza B	94
goveji serumski albumin	67
jajčni albumin	43
karboksianhidraza	30
tripsinski inhibitor	20,1
α -laktalbumin	14,4

3.4.2 Izoelektrično fokusiranje (IEF)

To je metoda za določanje izoelektrične točke (pI) proteinov, hkrati pa se lahko uporablja kot kriterij čistosti proteinov. Gel, na katerega nanese vzorec, vsebuje amfoline s pozitivno in negativno nabitimi skupinami. V električnem polju poteče preefokusanje: amfolini potujejo do točke, kjer je njihov celokupni naboj nič in s tem na gelu tvorijo pH gradient. Protein, ki se na ta gel nanese potuje do pH vrednosti, ki ustreza njegovi pI.

IEF smo izvedli na elektroforetskem sistemu Phast, po navodilih proizvajalca. Vzorce smo nanegli na gel Phastgel IEF 3-9. Vzoredno z vzorci smo nanegli standard IEF (pI calibration kit, Amersham Pharmacia Biotech). Po obarjanju proteinov s TCA smo gele obarvali s Coomassie Brilliant Blue G-250. Izoelektrične točke smo določili iz umeritvene krivulje.

3.5 ES MASNA SPEKTROMETRIJA

ES (Electrospray) masna spektrometrija je metoda, ki uporablja »mehko« ionizacijo za določitev molekulske mase organskih spojin. Pogoj je, da je molekula v raztopini v ionski obliki. Če to ni, moramo ionizacijo povzročiti z dodatkom soli ali kisline, ki bodo svoj ionski naboj prenesle na nevtralne molekule, ki jih želimo analizirati in detektirati kot pozitivno ali negativno nabite molekularne ione. Pri proteinih pogosto dobimo številne ione z različno visokim nabojem.

Izvedba:

Posušena vzorca iz HPLC smo raztopili v raztopini voda/metanol (1:1, v/v), ki je vsebovala 1% očetno kislino. Vzorec smo analizirali na masnem spektrometru Autospied Q (Micromass, Manchester, UK).

Spektri so bili dobljeni s skeniranjem od vrednosti razmerja masa/naboj 2000 do 400, v razmaku 10s. Za kalibracijo so uporabili natrijev jodid. Molekularne mase so bile izračunane iz zaporedij različno nabitih protoniranih ionov, ki so nastali iz analiziranega proteina.

3.6 DOLOČITEV N- TERMINALNEGA ZAPOREDJA

Sekvenciranje proteinov je določitev aminokislinskega zaporedja, za kar obstajata dve direktni metodi, masna spektrometrija in Edmanova degradacija. Posredno je možno pridobiti aminokislinsko zaporedje iz znanega zaporedja DNA ali mRNA, ki kodirata ta protein.

Edmanova degradacija poteka tako, da protein (peptid), ki ga sekvenciramo, vežemo na stekleno površino, prevlečeno s polistirenom (kationski polimer). Terminalno aminokislino z reagentom PTC (fenilizotiocianat) v prisotnost 12% trimetilamina, derivatiziramo. Sledi odcepitev in identifikacija s kromatografijo. Pri našem delu smo uporabljali sekvenator Applied Biosystems 492.

Analiza dobljenih N-terminalnih aminokislinskih zaporedij Cm ICP 16,5 in Cm ICP 10. Aminokislinsko zaporedje smo primerjali z N-terminalnimi zaporedji inhibitorjev cisteinskih proteinaz in širše z vsemi drugimi dosegljivimi proteinskimi zaporedji v MEROPS-ovi bazi podatkov (<http://merops.sanger.ac.uk>). Preizkus ujemanja podobnih zaporedij smo izvedli s pomočjo Clustall W algoritma v Bio Edit Sequence Aligment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit.html>).

3.7 DOLOČANJE PH IN TEMPARATURNE STABILNOSTI

Vzorci z inhibitorno aktivnostjo smo v koncentraciji 1 mg/ml predinkubirali 15 min pri 25°C v pufrih različnih pH-jev:

- 0,05M glicin HCl (pH 1.0, 3.0),
- 0,05M Na-acetatnem (pH 5.0),
- 0,05M Na-fosfatnem (pH 7.0),
- Tris HCl pufru (pH 9.0, 11.0),
- 0,05M glicin-NaOH (pH 13.0).

Vzorcem smo uravnali pH ponovno na 7.5 s tem, da smo jih prenesli v 5-kratno količino 0.2 M fosfatnega pufru pH 7.5. Preostalo inhibitorno aktivnost smo merili na testni papain.

Pri določanju temperaturne obstojnosti smo inhibitorne vzorce predinkubirali 15 min v 0.2 M fosfatnem pufru pH 7.5 v temperaturnem intervalu 20 -1000°C v vodni kopeli. Po ohladitvi na 0°C smo preostalo inhibitorno aktivnost vzorcev merili s testnim papainom.

3.8 DOLOČANJE INHIBICIJSKIH KARAKTERISTIK

3.8.1 Določanje encimske aktivnosti papaina

Inhibitorno aktivnost vzorca smo določali z merjenjem znižanja encimske aktivnosti papaina glede na sintetični substrat BANA. Reakcija poteka tako, da papain sprosti 2-naftilamin, ki se raztopljen v neionskem detergentu Brij (BDH) veže na barvni reagent Fast Garnet GBC (Serva). Pri tem nastane rdeče obarvan kompleks, ki absorbira svetlobo valovne dolžine 520nm. Prekinjevalec reakcije je p-kloromerkuribenzojeva kislina.

Reagenti:

Pufer: 0.1M fosfatni pufer pH 7.0 + 1.5mM EDTA

Aktivator: 5mM cistein v pufru

Substrat: 0.1M BANA v DMSO

Barvni reagent: 0.3 mg soli Fast Garnet raztopljene v ml 10 ml 4% Brij 35 (pH 5.5)

Reagent III: 10mM p-kloromerkuribenzojeva kislina + 50mM EDTA v fosfatnem pufru s pH 6.0

Prekinjevalec: barvni reagent + reagent III (1:1)

Postopek:

K encimskemu vzorcu smo dodali aktivator do volumna 300 μ l in predinkubirali 5 minut pri sobni temperaturi, nakar smo dodali 10 μ l substrata in inkubirali 10 minut pri temperaturi 37°C. Reakcijo smo prekinili z dodatkom 500 μ l prekinjevalca, ki smo ga pripravili tik pred uporabo. Po 10 minutah smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 520 nm v zoženih plastičnih kivetah na spektrofotometru Perkin- Elmer Lambda 11 proti slepemu vzorcu, ki je vseboval namesto encima pufer. Pri obarvanih vzorcih smo vrednost slepe probe dobili tako, da smo dodali pekinjevalec pred dodatkom encima. Vsem izmerjenim vrednostim smo odšteli vrednost slepe probe.

3.8.2 Določanje inhibitorne aktivnosti na papain

Encim, ki smo mu dodajali inhibitor in merili zmanjšanje njegove aktivnosti, imenujemo testni encim, v našem primeru je to papain. Vrednost za encimsko aktivnost, ki smo jo določili na način opisan pod (3.8.1.), smo smatrali kot 100 % aktivnost (kontrolno aktivnost). Inhibicijsko aktivnost vzorca pa smo določali pod enakimi pogoji kot encimsko aktivnost, le da smo določeno količino pufera v testnem vzorcu (encim + pufer), nadomestili z enako količino inhibitorja (encim + inhibitor). Dobljeno zmanjšano vrednost encimske hidrolize zaradi dodanega inhibitorja smo podali na dva načina:

a) Kot % inhibicije:

To je zmanjšanje absorpcije med kontrolnim in inhibitornim vzorcem izražen v odstotkih od kontrolne vrednosti. Na ta način smo prikazali predvsem inhibicijo frakcij pri kromatografskih metodah.

b) V inhibitornih enotah določenih s titracijo

Ena inhibitorna enota (IE) je definirana kot tista množina inhibitorja, ki popolnoma inhibira 1 μ g papaina. V tem primeru inhibitor titrira znano količino encima (v našem testu 3 μ g papaina), reakcija je stohiometrična. V primeru, da odvisnost ni linearna po celem območju, lahko množino inhibitorja dobimo z ekstrapolacijo začetnega linearnega dela. Inhibitorne enote smo uporabljali pri določevanju inhibitorne kapacitete vzorcev med posameznimi stopnjami čiščenja. Na tej osnovi so podani izkoristki posameznih stopenj čiščenja.

3.8.3 Določanje aktivnih koncentracij inhibitorjev - titracije

Aktivno koncentracijo inhibitorjev smo določili s titracijo znane količine aktivnega papaina, ki smo jo predhodno določili s titracijo s specifičnim inhibitorjem cisteinskih proteinaz E-64.

V set epruвет smo dali konstantno količino raztopine papaina. Dodali smo aktivator in po 0, 20, 40, 60, 80 in 100 μl 0.05 μM E64. Po 15 minutah inkubacije na sobni temperaturi smo dodali substrat BANA ter preostalo aktivnost papaina določili kot je opisano pod točko 3.8.1. Enako količino papaina smo inkubirali z 0, 10, 20, 30, 40, 50 in 60 μl inhibitorja vrh 1 oziroma z 0, 10, 20, 30, 40, 60, μl 10 krat redčenega inhibitorja vrh 2. Preostalo aktivnost papaina smo določili z BANA substratom.

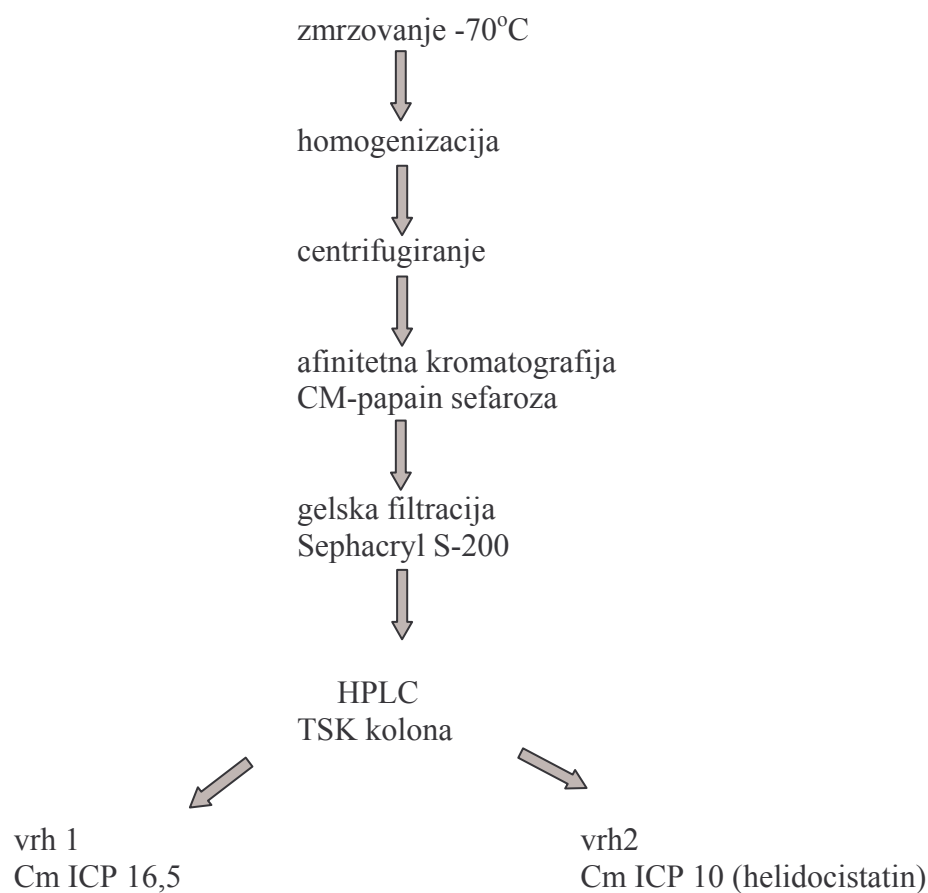
Narisali smo titracijske krivulje, kjer smo aktivnost papaina izraženo z E520 nanašali proti količini dodanega inhibitorja ter z ekstrapolacijo določili količino inhibitorja potrebnega za popolno inhibicijo papaina. Iz titracije z E64 smo z enačbo $V_1c_1=V_2c_2$ najprej izračunali aktivno koncentracijo papaina, nato pa še aktivne koncentracije inhibitorjev.

- V_1 = volumen encima
- c_1 = koncentracija encima
- V_2 = volumen inhibitorja
- c_2 = koncentracija inhibitorja

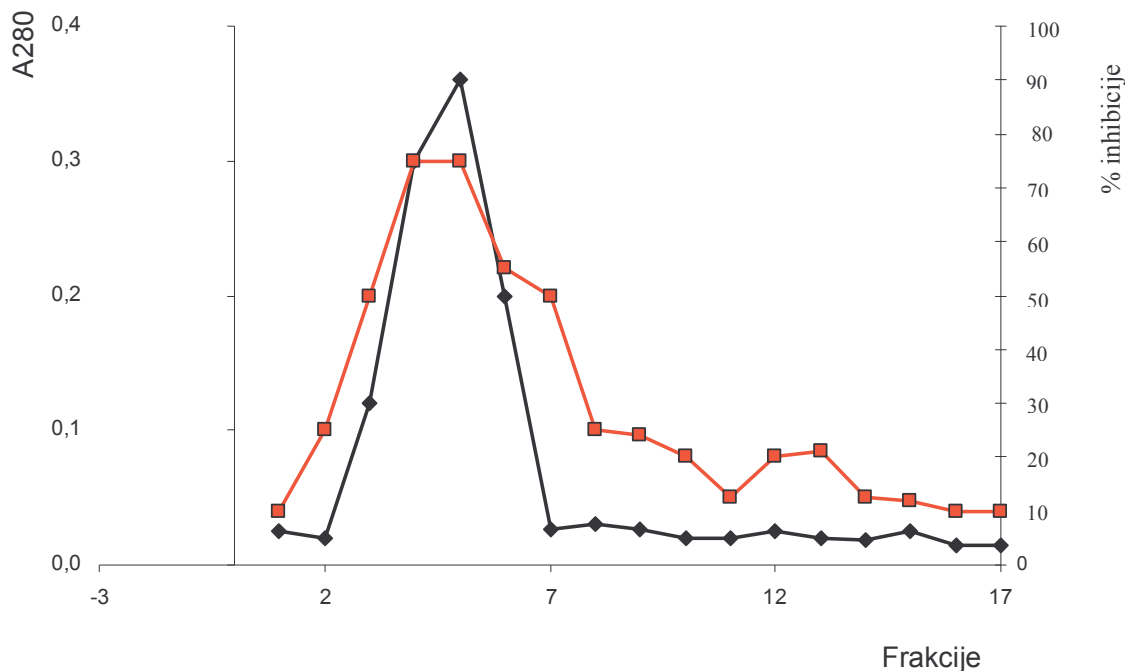
4 REZULTATI

4.1 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PROTEINSKIH INHIBITORJEV CISTEINSKIH PROTEINAZ IZ KRVAVEGA MLEČNIKA

Zaporedne stopnje izolacije so opisane na sliki 6.



Slika 6: Izolacija inhibitorjev cisteinskih proteinaz iz krvavega mlečnika

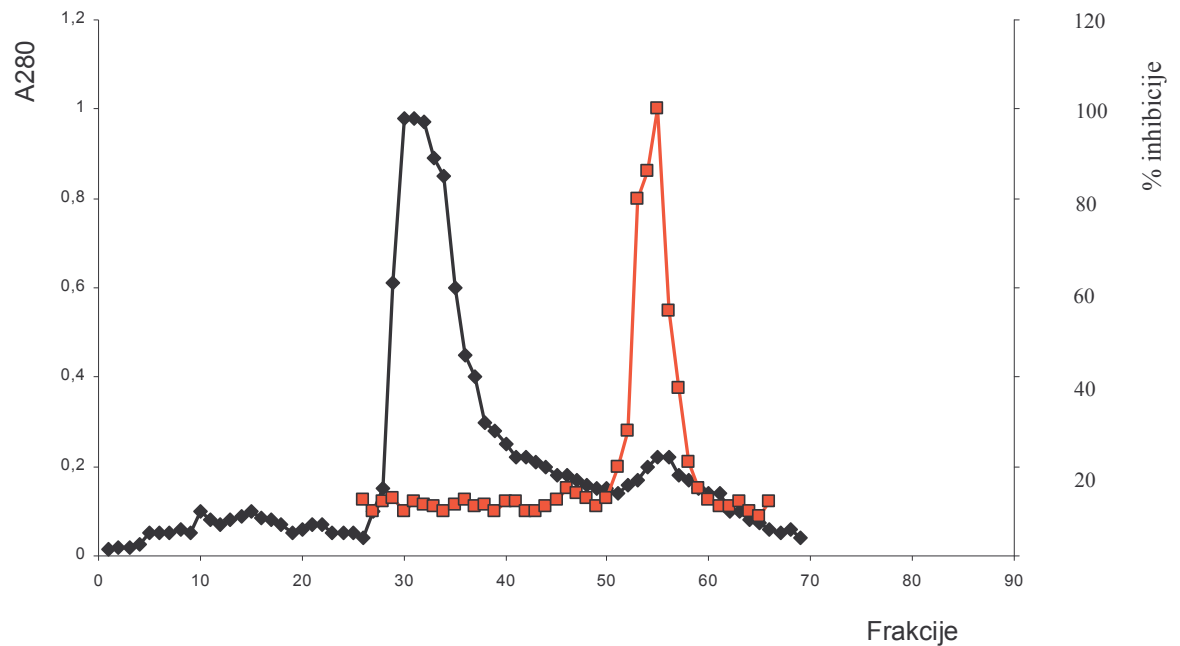


Slika 7: Afinitetna kromatografija na CM papain sefarozi. Začetek elucije je s prvo frakcijo. Inhibitorno aktivnost smo določevali z BANA testom, v katerem smo 100 μ l frakcije dodali 50 μ l (2 μ g) papaina. Podrobnosti so opisane v metodah pod točko 3.2.2.

- ◆ - označuje meritve A₂₈₀
- - označuje določen % inhibicije

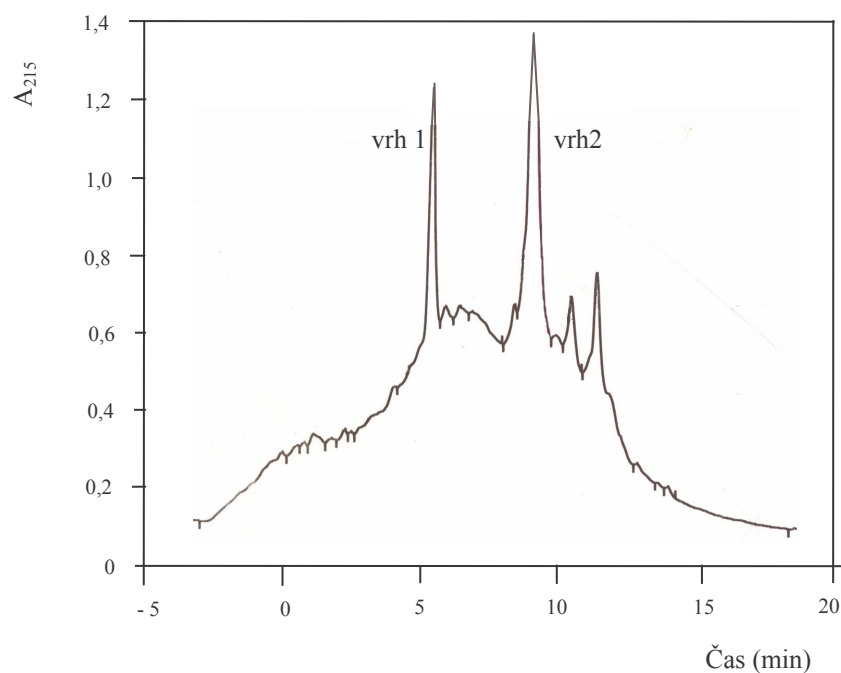
1 kg zelenih delov rastline smo homogenizirali in po centrifugiranju supernatant v alikvotih po 400 ml nanašali na CM-papain sefarozo (slika 7). Večji del inhibitorne aktivnosti se na papain ni vezal (Preglednica 4). Eluirane proteinske vrhove z inhibitorno aktivnostjo smo združevali in koncentrirali na membrani YM3. Celotno količino eluiranih in koncentriranih proteinov smo v naslednji stopnji nanesti na kolono za gelsko filtracijo. Ločba po molskih masah je prikazana na sliki 8. Inhibitorno aktivne frakcije smo ločili od pigmentov in barvil ter večine ostalih proteinov, ki so se eluirali pri visokih molskih masah in niso kazali inhibitorne aktivnosti. Inhibitorni vrh je zadovoljivo ločen, združili smo vrh inhibitorne aktivnosti v frakcijah 50 do 58 (slika 8). Kljub temu pa je vzorec kazal vsebnost kislih in zelo alkalnih proteinov, ki smo jih ločevali z uporabo HPLC hidrofobne kromatografije (slika 9). Ločila sta se dva glavna inhibitorna proteinska vrhova imenovana vrh 1 in vrh 2, ki sta se razlikovala tako po molski masi kot tudi po izoelektrični točki (Sliki 10 in 12). Iz 1 kg krvavega mlečnika smo pridobili 0,07 mg čistega Cm ICP 16,5 in 0,41 mg Cm ICP 10. Iz podatkov o koncentracijah proteinov in njihovih inhibitornih aktivnostih smo sestavili tabelo kvantitativnega poteka izolacije

(Preglednica 4). Po tej zadnji fazi smo dobili zelo majhne količine inhibitorjev zato smo postopek večkrat ponovili in skupaj predelali 6 kg zelenih delov krvavega mlečnika. Vzorca iz vrha 1 in vrha 2 smo združevali, posušili in ju pozneje detajlno okarakterizirali.



Slika 8: Gelska filtracija inhibitornega vzorca po afinitetni kromatografiji. Pogoji so opisani v metodah po točko 3.2.3.

- ◆— - označuje meritve A_{280}
- - označuje določen % inhibicije



Slika 9: HPLC ločba inhibitornih proteinov dobljenih z afinitetno kromatografijo in gelsko filtracijo. Elucija v 0,1 % trifluoroacetni kislini z 0 – 80 % gradientom acetonitrila.

Preglednica 4: Kvantitativni potek izolacije

stopnja izolacije	protein (mg/ml)	celokupni protein (mg)	inhibitorna akt. (IE)	specifična inh.akt.(IE/mg)	Izkoristek (%)
supernat homogenata	9,4	29760	17000	0,57	100
afinitetna kromatografija	0,25	80	1900	23,7	11,2
vrh po gelski filtraciji	0,02	0,8	900	1125	5,3
HPLC vrh1	ND*	0,07	120	1714	0,7
HPLC vrh2	ND	0,41	480	1171	2,8

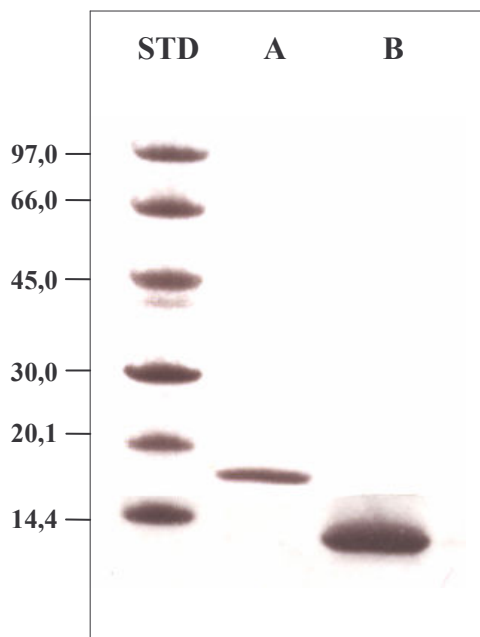
Inhibitorna aktivnost (IE) je podana kot množina inhibitorja, ki inhibira 1 μ g papaina pri predpostavljeni 100 % inhibitorni aktivnosti.

ND* koncentracija ni bila določena

4.2 KARAKTERIZACIJA INHIBITORJEV

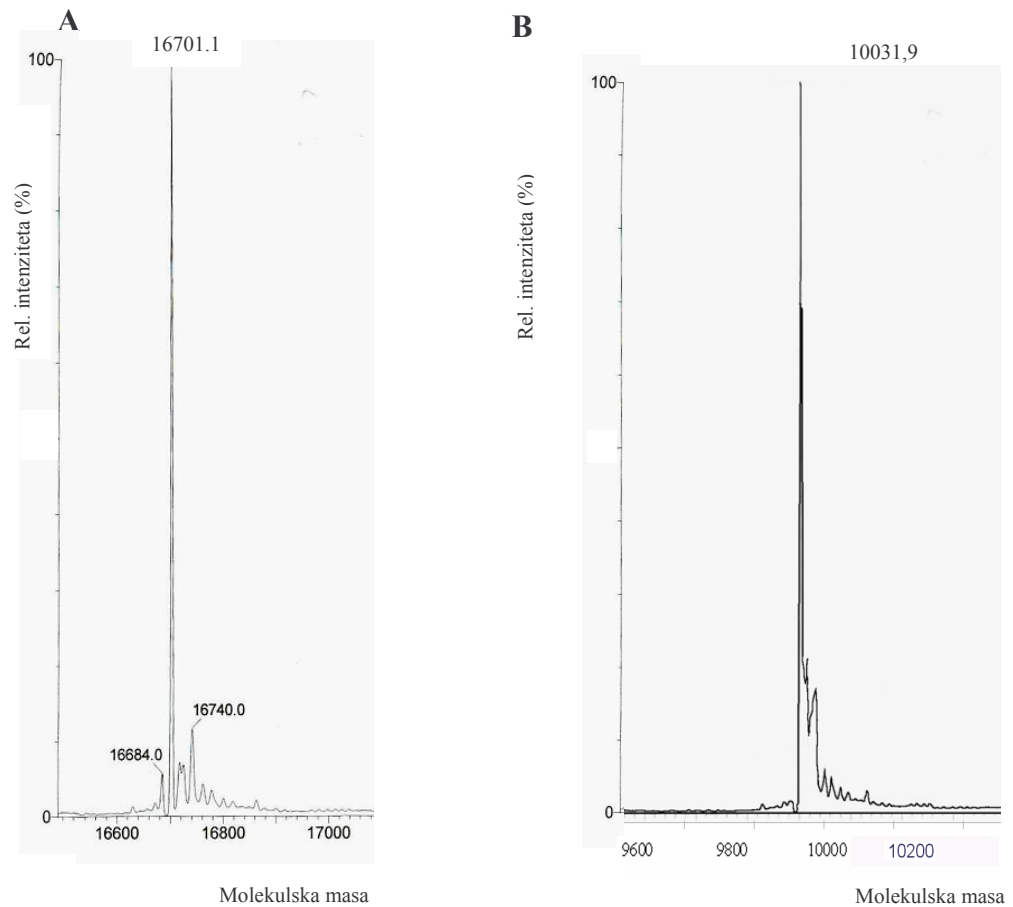
4.2.1 Molekulske mase

PAGE ločenih inhibitorjev iz HPLC v prisotnosti NaDS kaže na prisotnost proteinov dveh molških mas in sicer 16,5 kDa (vrh 1) in 10 kDa (vrh 2) (slika 10). Ista vzorca, ki smo ju dodatno še reducirali, sta se na PAGE v prisotnosti NaDS ločila enako, kot brez predhodne redukcije. To kaže v obeh primerih na ohranjenost peptidnih vezi in odsotnost fragmentov, ki bi jih disulfidnih vezi povezovale (ni prikazano).



Slika 10: Očiščena Cm ICP 16,5 (vrh 1), nanos A in Cm ICP 10 (vrh 2), nanos B na SDS – PAGE. STD so standardi za molekulsko maso.

Masno spektrometrična analiza inhibitorjev iz vrha 1 in vrha 2 po HPLC je potrdila čistost in homogenost izoliranih proteinov in oceno njihovih relativnih molekulskih mas z metodo SDS PAGE. Iz spektra porazdelitve nabitih stanj molekul, smo izračunali natančno molekulsko maso 16701,1 Da za vrh 1 in 10031,9 Da za vrh 2 (slika 11).

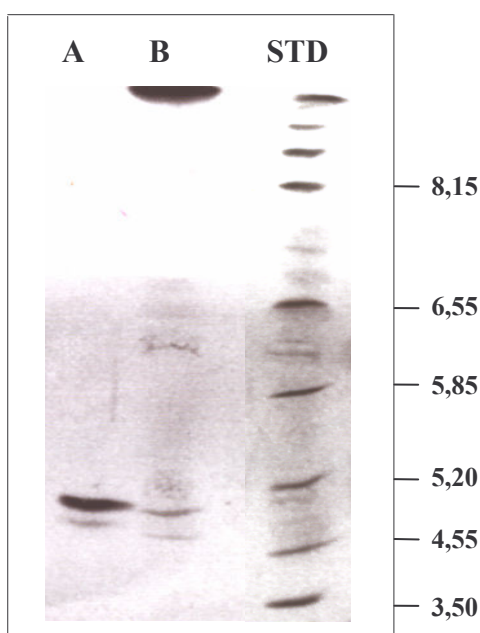


Slika 11: Masna spektroskopija. Določanje molskih mas vrha 1 (A) in vrha 2 (B) po ločbi na HPLC. ES masni spektri so posneti pod nativnimi pogoji.

Na osnovi uporabljenih metod za preverjanje čistosti in določevanje molekulske mase, lahko zaključimo, da sta oba izolirana inhibitorja praktično homogena, monomerna in nerazcepljena proteina, zato smo ju imenovali Cm ICP 16,5 (vrh 1) in Cm ICP 10 (vrh 2).

4.2.2 Izoelektrične točke

Izoelektrične točke vrhov 1 in 2 smo določili z izoelektričnim fokusiranjem (slika 12). Cm ICP iz vrha 1 je pretežno homogen z glavno proteinsko liso pri pH 5,0 in mnogo šibkejšo pri pH 4,8. Cm ICP iz vrha 2 vsebuje protein z alkalno izoelektrično točko določeno pri pH 9,3. Ta vrednost je lahko le ocenjena, saj je že izven linearnosti pH območja uporabljenega gela. Opazna je tudi prisotnost sledov proteina iz vrha 1.



Slika 12: Izoelektrično fokusiranje v pH gradientu 3 – 9: Primerjava Cm ICP 16,5 (nanos A) in Cm ICP 10 (nanos B). STD so proteinski standardi za IEF.

4.2.3 N-terminalno amonokislinsko zaporedje

Določili smo N-terminalno aminokislinsko zaporedje za oba inhibitorna proteina. Zanesljivo določenih aminokislin za Cm ICP 16,5 je 15 in za Cm ICP 10, 20. Vse nadaljnje so težko določljive, zato jih ne navajamo. Razen levcina na prvem mestu, obe zaporedji ne kažeta nobenega ujemanja ali podobnosti (slika 13). Cm ICP 10 kaže popolno identičnost s Cm (helidocistatin), pred časom v našem laboratoriju izoliranim cistatinom iz krvavega mlečnika (slika 13).

Da bi preverili možnost, da je Cm ICP 16,5 zaradi svoje, za cistatin, nadpovprečno visoke molekulske mase, podaljšan na N-terminalnem koncu, smo ga primerjali s

cistatinom iz korenja s podobno molekulsko maso. Obe zaporedji se ujemata le v dveh aminokislinah, kar je statistično nepomembna podobnost. Slika 14.

	1			5				10				15			20	
Cm ICP 16,5	L	D	E	K	Q	M	L	L	I	G	N	L	P	T	K	...
Cm ICP 10	L	G	G	R	T	E	I	T	D	V	K	T	N	K	E	V
Cm (helidocistatin)	L	G	G	R	T	E	I	T	D	V	K	T	N	K	E	V

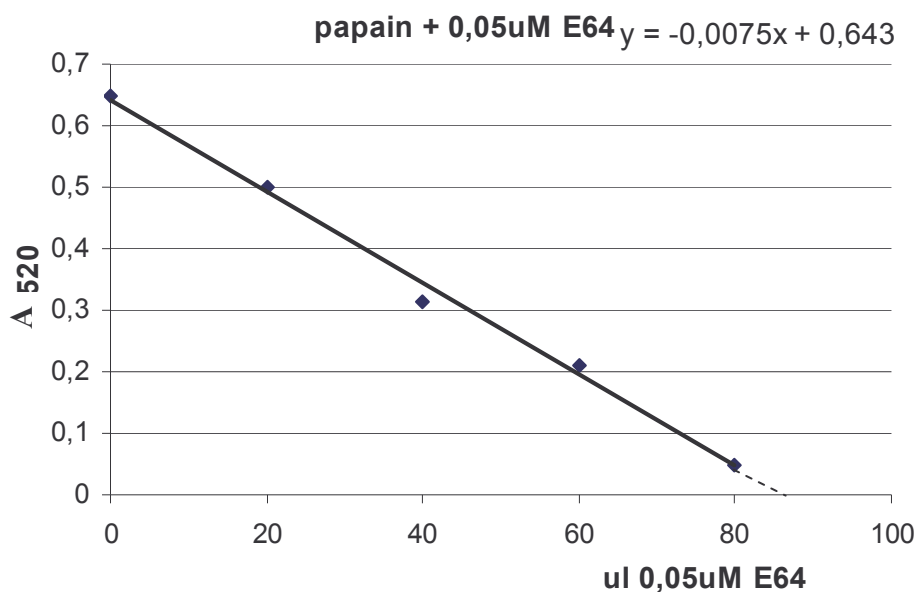
Slika 13: Medsebojno ujemanje N-terminalnih aminokislinskih zaporedij Cm ICP 16,5, Cm ICP 10 in Cm (helidocistatin) (Rogelj s sod., 1998). Identične aminokisline so uokvirjene.

	1			5				10			15			20
Dc	M	A	A	K	T	Q	A	I	L	I	L	L	L	I
Cm ICP 16,5	L	D	E	K	Q	M	L	L	I	G	N	L	P	T

Slika 14: Ujemanje N-terminalnih aminokislinskih zaporedij Dc (cistatin iz korenja) (Rogelj s sod., 1998) in Cm ICP 16,5. Identične aminokisline so uokvirjene.

4.2.4 Določanje aktivnih koncentracij

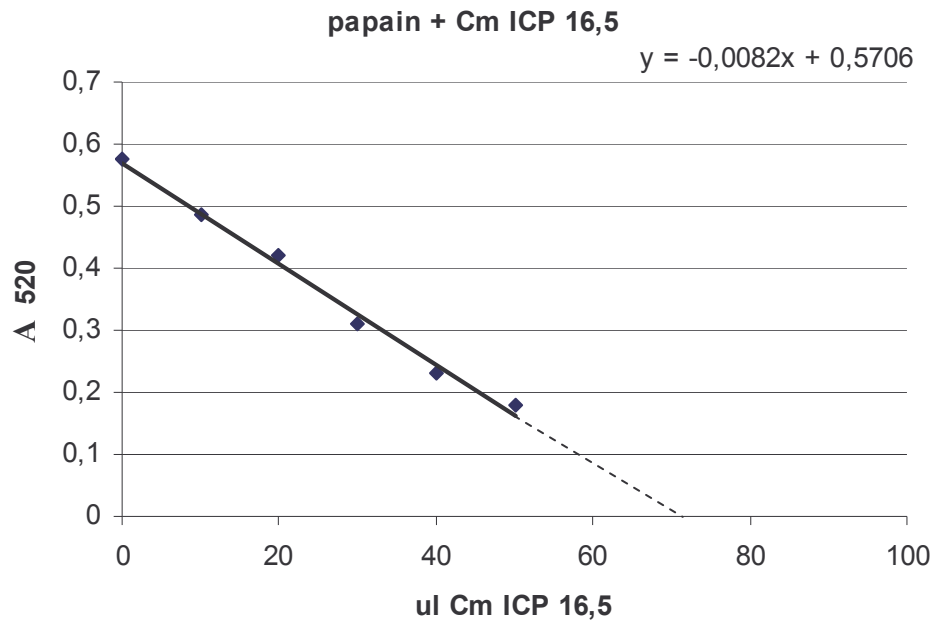
Aktivna koncentracija papaina v testu je bila 0,17 µM (slika 15). Vrh 1, Cm ICP 16,5 je imel aktivno koncentracijo 0,064 µM (slika 16), vrh 2, Cm ICP 10 pa 0,9 µM (slika 17).



A_{520} - označuje meritve A_{520}

Slika 15: Titracijska krivulja inhibicije papaina z E-64

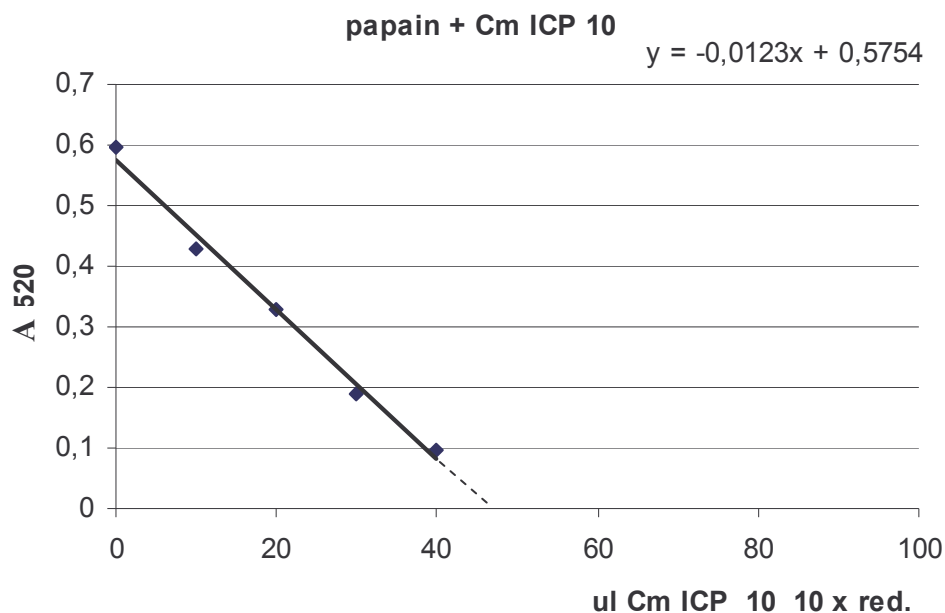
85 μl 0,05 μM E-64 100% inhibira 25 μl papaina. Koncentracija aktivnega papaina je 0,17 μM .



A_{520} - označuje meritve A_{520}

Slika 16: Titracijska krivulja inhibicije papaina s Cm ICP 16,5.

66 μl vrha 1 100 % inhibira 25 μl 0,17 μM papaina. Koncentracija aktivnega Cm ICP 16,5 je 0,0164 μM .



A₅₂₀ - označuje meritve A₅₂₀

Slika 17: Titracijska krivulja inhibicije papaina z Cm ICP 10.

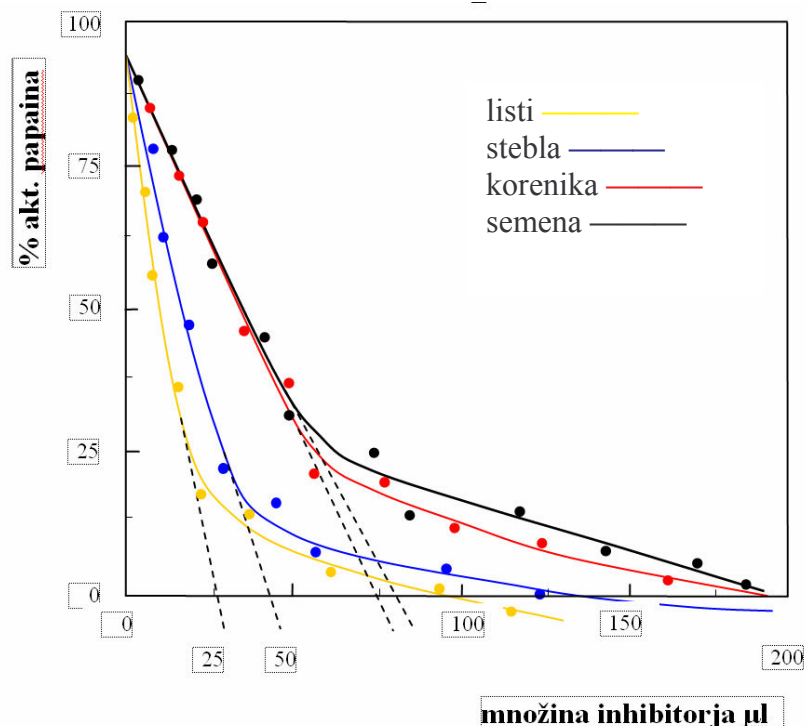
47 µl 10- redčenega vrha 2 100 % inhibira 25 µl 0,17 µM papaina. Koncentracija aktivnega Cm ICP 10 je tako 0,90 µM.

4.3 OCENA VSEBNOSTI INHIBITORJEV V RAZLIČNIH DELIH RASTLIN

Po postopku opisanem v 3.2.1 smo pridobili ekstrakt ločeno samo iz listov, stebel in korenike rastline. Iz zatehtanih 10 g smo pridobili naslednje količine ekstrakta: listi 7,2 ml, stebila 5,4 ml, korenike 3,1 ml.

10 g suhega semena smo v tekočem dušiku strli v prah, ga suspendirali v 10 ml pufra za gelsko kromatografijo na magnetnem mešalu čez noč v hladni sobi. Suspenzijo smo močno centrifugirali in pridobili 9,3 ml bistrega supernatanta.

Z ekstrapolacijo krivulje smo določili količine ekstraktov potrebne za popolno inhibicijo 2 µg papaina. Ti volumni odražajo koncentracijo inhibitorjev v ekstraktih. Največ inhibitorne aktivnosti se nahaja v listih, sledijo steblo, korenika in semena.

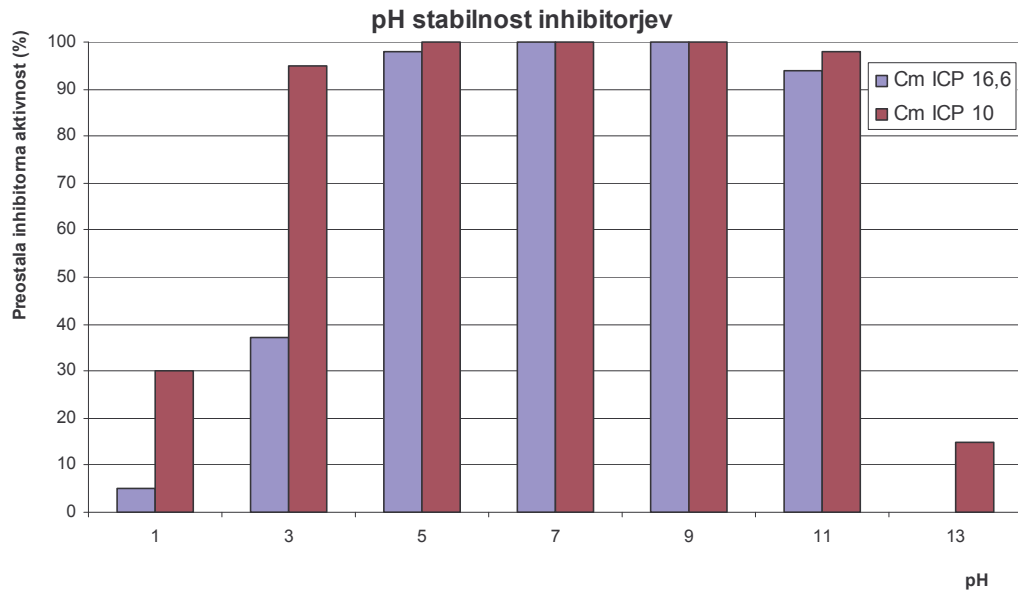


Slika 18: Določanje inhibitorne ekstrakta listov, stebel, korenin in semen s titracijo 2 µg papaina v BANA testu.

4.4 ŠTUDIJA STABILNOSTI

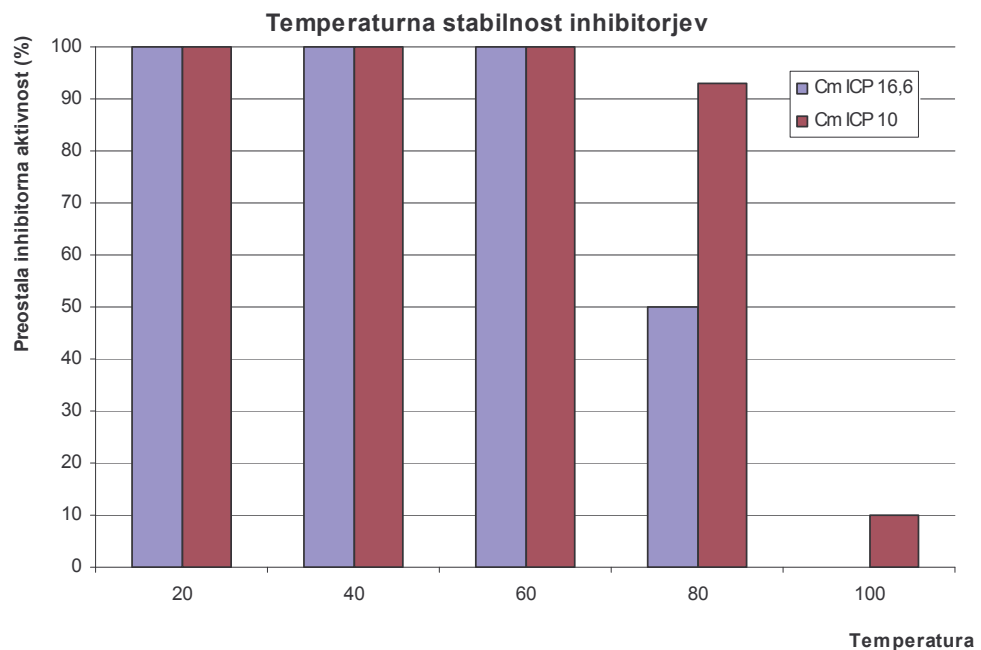
Posledice inkubacije Cm ICP 16,5 in Cm ICP 10 pri različnih pH vrednostih in njuna občutljivost na segrevanje so podani na sliki 19 in 20.

Oba inhibitorja sta se izkazala za zelo obstojna. Cm ICP 16,5 je ohranil približno 40 % svoje aktivnosti pri pH 3.0 in skoraj 95 % pri pH 11.0. (slika 19.) Cm ICP 10 je še obstojnejši. Pri pH 1.0 je ohranil 30 % svoje aktivnosti in pri pH 13.0 15 % svoje aktivnosti.



Slika 19: pH stabilnost inhibitorjev

Da je Cm ICP 16,5 manj obstojen kot Cm ICP 10 je pokazal tudi 15 min preizkus segrevanja. Cm ICP 16,5 ireverzibilno izgubi polovico svoje aktivnosti pri inkubaciji pri 80°C in celotno aktivnost pri 100°C, medtem ko je Cm ICP 10 ohranil 10 % svoje aktivnosti še pri 100°C (slika 20).



Slika 20 Temperaturna stabilnost inhibitorjev

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V laboratoriju odseka za biotehnologijo IJS so pred leti izolirali in okarakterizirali inhibitor cisteinskih proteinaz iz krvavega mlečnika in ga poimenovali helidocistatin zaradi homologije s cistatini (Rogelj s sod., 1998). Na SDS-PAGE so mu določili molekulsko maso 10.000 in izoelektrično točko 9,3. Močno inhibira katepsin L ($K_i = 5,6 \times 10^{-11}$), papain ($K_i = 1,1 \times 10^{-10}$) in katepsin H ($K_i = 7,5 \times 10^{-09}$). Že takrat se je pokazalo, da je prisoten vsaj še en inhibitorski protein, ki pa ga zaradi zelo nizke vsebnosti ni bilo možno izolirati. Kot cilj diplomske naloge smo si zastavili ponovno preučitev v krvavem mlečniku prisotnih inhibitorjev cisteinskih proteinaz, po možnostih še nepoznanih.

V začetni fazi je bilo smiselno ugotoviti ali so posamezni deli rastline bogatejši z inhibitorji kot drugi. Z normirano ekstrapolacijo določene množine ekstraktov, potrebnih za popolno inhibicijo papaina, se je pokazalo, da je največ celotne inhibitorne aktivnosti v listih, sledijo steblo, korenine in semena. Izkazalo se je, da je bila odločitev za izbor zelenih delov rastline v prvi izolaciji pravilna in je zato nismo spreminjali. Uporabili smo mlade rastline v fazi pred razvojem cvetov. Pri tem pa se je potrebno zavedati, da niso bile vse na enotni razvojni stopnji. Torej vzorec predstavlja neko povprečno fiziološko stanje.

Uporabljali smo delno modificirano metodo izolacije, kjer je ionsko kromatografijo nadomestila hidrofobna HPLC. Pri tem je bila najbolj problematična prva stopnja specifične afinitetne kromatografije, s katero ni bilo možno v celoti vezati inhibitorjev, tako da ima ta stopnja najnižji odstotek izkoristka in odločilno prispeva k zelo nizki končni množini očiščenih inhibitorjev. Obstaja pa seveda možnost, da je ocenjena znatna množina inhibitorja, izražena v inhibitornih enotah, v začetnem ekstraktu le navidezna, zaradi prisotnosti sestavin, ki interferirajo s kolorimetričnim merjenjem encimske aktivnosti. Lastnosti na koncu izoliranih inhibitorjev namreč kažejo, da se izjemno tesno vežeta na papain in pomanjkanje afinitete na papain ne more biti razlog za slabo vezavo na afinitetno kolono. Nespecifično vezane nizkomolekularne substance, so v naslednji stopnji, gelski filtraciji, predstavljale večino eluiranih proteinov. Komaj opazen proteinski vrh pa je predstavljal dva med sabo neločena inhibitorja z različno molsko maso in nabojem. Zaradi zelo majhnih količin se nismo odločili za ionsko kromatografijo kot nasledno stopnjo, saj bi se inhibitorja v gradientu preveč razredčila in ju bi ne bilo več možno detektirati.

Uporabljena hidrofobna kolona na HPLC je uspešno ločila dva proteinska vrhova, ki sta se razlikovala po molski masi, izoelektrični točki in N-terminalnem aminokislinskem zaporedju. Na začetku smo ju poimenovali Cm ICP 16.5 in Cm ICP 10, upoštevajoč njuno velikost in inhibitorsko aktivnost.

V celoti smo predelali 6 kg mlečnika v alikvotih po en kilogram, pri čemer smo vsakič v povprečju pridobili 0.07mg Cm ICP 16.5 in 0.41mg helidocistatina. PAGE SDS in ES-

MS kažeta visoko homogenost očiščenih inhibitornih proteinov. Tudi N-terminalno določanje N-terminalnega zaporedja ne kaže opaznih heterogenosti, kar pa ne velja za izoelektrično fokusiranje, kjer se v vzorcu ICP 10 še minimalno kaže primes Cm ICP 16.5.

Za Cm ICP10 se je pokazalo, da je helidocistatin. Molska masa, ki smo jo določili z ES-MS in iz aminokislinskega zaporedja izračunana masa, sta skoraj enaki. Prav tako sta identični izoelektrična točka ter določeno N-terminalno zaporedje.

Zanimivo je, da se je novoizolirani helidocistatin izkazal kot boljši inhibitor od izvirnega, kar je mogoče posledica različnih preparacij encimov, ki smo jih uporabljali v obeh primerih. Ni pa mogoče izključiti obstoja zelo podobnih izooblik helidocistatinov.

Inhibitorni Cm ICP 16.5 se po masi, naboju in dobljenem N-terminalnem koncu, popolnom razlikuje od helidocistatina, podobna sta si le v neobičajni obstojnosti. Razpoložljivo N-terminalno zaporedje Cm ICP 16.5 smo primerjali z zaporedji proteinov v bazi podatkov SwissProt, vendar nismo zasledili nobene podobnosti z drugimi tipi inhibitorjev cisteinskih proteinaz, poleg fitocistatinov torej z inhibitorji CP iz krompirja (Kunitz) (Brzin J. s sod. 1988), kakor tudi ne s katerimkoli drugim proteinom. Ob tem se je potrebno zavedati, da je sekvenciran relativno kratek segment 15 aminokislin in da bi dodatno sekvenciranje mogoče le pokrilo katerega od tipičnih cistatinskih strukturnih elementov. Možnost, da Cm ICP 16.5 ne predstavlja N-terminalno podaljšanega cistatina, smo preverili s primerjavo s fitocistatinom iz korenja s podobno molsko maso 18 kDa. Možnost, da gre za prekursorsko zaporedje je malo verjetna, saj cistatini v prekursorski obliki ne obstajajo.

Prikazani rezultati kažejo, da inhibitorne lastnosti raznolikih inhibitorjev iz krvavega mlečnika omogočajo opravljanje različnih biokemičnih funkcij, ki se pripisujejo fitocistatinom (Laskovski in Kato 1980):

- 1.) Regulacija presnove beljakovin z endogenimi cisteinskimi proteinazami v zelenih delih rastline, med zorenjem semen in tudi pri njihovem kaljenju.
- 2.) Prispevek pri obrambi ob napadu žuželke in glist, ki v večini primerov uporabljajo cisteinske prebavne proteinaze.

Rastlinski inhibitorji, vključno s fitocistatini, so le del zakladnice naravnih spojin, ki predstavljajo množico potencialnih zdravil in fitofarmaceutskih zaščitnih sredstev. Po prikazanih lastnostih, npr. neobičajni obstojnosti proti kemični in pH denaturaciji, se tudi na tem področju Cm ICP 16.5 in helidocistatin uvrščata med zanimivejše kandidate.

5.2 SKLEPI

Zeleni deli rastline krvavi mlečnik (*Chelidonium majus L.*) vsebujejo dva različna inhibitorja cisteinskih proteinaz z molskima masama 16.5 kDa (Cm ICP 16.5) in 10 kDa (Cm ICP 10).

Cm ICP 10 smo okarakterizirali za že poznani helidocistatin.

Cm ICP 16.5 na osnovi pridobljenih podatkov, ne moremo uvrstiti v katerikoli znani razred inhibitorjev cisteinskih proteinaz, prav tako ne moremo izključiti možnosti, da spada med cistatine.

Cm ICP 16.5, še zlasti pa Cm ICP 10 sta izjemno odporna proti denaturaciji.

Iz tega sledi, da sta inhibitorja iz krvavega mlečnika potencialno uporabna v biotehnologiji.

6 POVZETEK

Iz ekstrakta krvavega mlečnika smo očistili in biokemično okarakterizirali dva proteinska inhibitorja cisteinskih proteinaz. Uporabljali smo klasične metode čiščenja proteinov, specifično afinitetno kromatografijo in gelsko filtracijo, inhibitorna proteina pa smo dokončno ločili na HPLC. Večjemu smo določili molsko maso 16,5 kDa (Cm ICP 16,5), izoelektrično točko pri pH 5.0 in N-terminalno aminokislinsko zaporedje, brez signifikantne podobnosti z drugim izoliranim inhibitorjem, z nobenim znanim fitocistatinom in tudi ne z nobenim drugim proteinom iz baze podatkov, torej gre za doslej še neopisan inhibitor. Drugemu inhibitorju (Cm ICP 10) smo določili molsko maso 10 kDa, izoelektrično točko v alkalnem pri pH 9,3 in začetno aminokislinsko zaporedje, ki je v tem delu popolnoma identično zaporedju helidocistatina, ki smo ga pred časom že izolirali v našem laboratoriju. Oba sta, za proteine, neobičajno odporna proti skrajnim pH vrednostim in visoki temperaturi, saj Cm ICP 10 prenese celo kratkotrajno vrenje. Inhibitorna aktivnost je prisotna v vseh delih rastline krvavega mlečnika, pri čemer smo najvišjo aktivnost našli v listih in steblih, sledita korenika in seme.

6 SUMMARY

We have isolated and biochemically characterised 2 inhibitors of cysteine proteinase from *Chelidonium majus* L. leaf extract. Classical biochemical methods were used for protein isolation- specific affinity chromatography and gel filtration. Final separation of inhibitory proteins was achieved by HPLC. Larger inhibitor (Cm ICP 16.5) has molecular weight of 16.5 kDa and isoelectrical point at pH 5.0. Its N-terminal sequence showed no significant similarity with the other characterised inhibitor in this study or any other known phytocystatin or any other protein sequence available in public databases, thus we have isolated so far nonidentified inhibitor. Second inhibitor (Cm ICP 10) has MW of 10 kDa and isoelectric point at pH 9.3. Its N-terminal amino acid sequence is 100% identical to the sequence of chelidocystatin, previously isolated in our laboratory. Both inhibitors are unusually stable in extreme pH and high temperatures, CmI CP10 remains active also after short incubation at boiling temperature. Inhibitory activity is present in all plant parts. The highest activity was however detected in leaves and stems, followed by seeds and rhizom.

7 LITERATURA

- Abe, K., Hiroto, K., Arai, S., 1987. Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. *Agric Biol Chem* 51: 2763-2765
- Barrett AJ (1981) Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinase *Trends Biochem Sci* 12:193-196
- Barrett, A.J., 1986. An introduction to the proteinases. V *Proteinase Inhibitors*, ur. Barrett, A.J., Salvesen, G., 3-22. Elsevier, Amsterdam
- Barrett, A.J., 1986. An introduction to the proteins. V: *proteinase inhibitors* (Barrett A.J. and Salvens G., eds.). Elsevier science Publishers, Amsterdam, New York, 3-22
- Barrett, A.J., 1994. Classification of Peptidases. *Methods in Enzymology*, 244, 3-15
- Barrett, A.J., Kembhavi, A.A., Brown, M.A., Kirsche, H., Knight, C.G., Tamai, M., Hanada, K., 1982. L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* 201, 189-198
- Berdowska I, Siewinski M., 2000. Katedra i Zakład Biochemii Lekarskiej, Akademia Medyczna we Wrocławiu, ul. Chalubinskiego 10, 50-368 Wrocław.
- Berti, P.J., Storer, A.C., 1995. Alignment/Phylogeny of the Papain Superfamily of Cysteine Proteases. *Journal of Molecular Biology* 246, 273-283
- Bevec, T., Stoka, V., Pungercic, G., Dolenc, I., Turk, V., 1996. Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *IJS*: 1331-1338
- Bode, W., Huber, R., 1991. Ligand Binding: Proteinase-protein inhibitor interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 1, 45-52
- Bode, W., Huber, R., 2000. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta* 1477, 241-252
- Bradford MM., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-54
- Brzin, J., Popovič, T., Drobnič – Košorok, M. Kotnik, M., Turk, V., 1988. Inhibitors of cysteine proteinases from potato. *Biological Chemistry*

Hoppe-Seyler, 369 (suppl) 233-238

Brzin, J., Popovič, T., Kidrič, M., Ritonja, A. and Puizdar, V., 1998. Plant Cell Physiol.

Brzin, J., Popovič, T., Turk, V., Borchart, U., Machleidt, W., 1984. Human cystain, a new protein inhibitor of cysteine proteinases. Biochemical and Biophysical Research Communication 118, 103-109

Callis, J., 1995. Regulation of protein degradation. The Plant Cell 7, 845-857

Colombo, M.L., Bosiso, E., 1996. Pharmacol. Res. 33, 127

Green, T.R., Ryan, C.A., 1972. Wound-induced proteinase inhibitors in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. Science 175, 776-777

Gruden, K., 1999. Cisteinske proteinaze iz prebavila koloradskega hrošča (*Leptinotarsa decemlineata* Say): iskanje načina za biotično zatiranja žuželke. Doktorska disertacija

Hanada, K., Tamai, M., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., Tanaka, I., 1978. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. Agric. Chem. 42, 523-528

<http://www.bic-lj.si>

<http://www.pomurske-lekarne.si>

<http://www.visia.si/>

<http://www.zaplana.net>

Kondo, H., Abe, K., Emori, Y., Arai, S., 1991. Gene organisation of oryzacystatin-II, a new cystatin superfamily member of plant origin, is closely related to that of oryzacystatin-I but different from those of animal cystatins. FEBS Lett., 278, 87-90

Kondo, H., Iriji, S., Abe, K., Maeda, H. and Arai, S., 1992. FEBS Lett., 299,48

Križaj, I., Drobnič-Košorok, M., Brzin, J., Jerala, R., Turk, V. 1993. The primary structure of inhibitor of cysteine proteinases from potato. FEBS Lett., 333, 15-20

Laskowski, M.Jr., Kato, I., 1980. Protein inhibitors of proteinases. Annual Review of Biochemistry 49, 593-626

Lenarčič, B., Bevec, T., 1998. Thyropins- New Structurally related Proteinase Inhibitors. Biol. Chem., Vol. 379, 105-111

Lenarčič, B., Galeša, K., Moczydłowski, E., Turk, V., 2000a. Thyropins, a

group of new structually related Inhibitors. *Acta Biologica Slovenica*, Vol. 43, Št. 1-2, 7-10

Lenarčič, B., Krishnan, G., Borukhovich, R., Ruck, B., Turk, V., Moczydlowski, E., 2000b. Saxiphilin, a Saxitoxin-binding Protein with Two Thyroglobulin Type-1 Domains, Is an Inhibitor of Papain-like Cysteine Proteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, No. 20, 15572-15577

Lenarčič, B., Ritonja, A., Štrukelj, B., Turk, B., Turk, V., 1997. Equistatin, A New Inhibitor of Cysteine Proteinases from *Actinia equina*, is Structually Related to Thyroglobulin Type-1 Domains. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, No. 21, 13899-13903

Lenarčič, B., Turk, V., 1999. Thyroglobulin Type-1 Domains in Equistatin Inhibit Both Papain-like Cysteine Proteinases and Cathepsin D. *Journal of Biological Chemistry* 274, 563-566

Orr, G.L., Strickland, J.A., Walsc, T.A., 1994. Inhibition of Diabrotica larval growth by multicystatin from tomato tuber. *Journal of insect Physiology* 40, 893-900

Otto, H.-H., Schirmeister, T., 1997. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem. Rev.*, 97, 133-171

Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1990. Evolution of proteins of the cystain superfamily. *Journal of Molecular Evolution* 30, 60-71

Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal* 290, 205-218

Rawlings, N.D., Barrett, A.J., 1994. Families of Cysteine Peptidases. *Methods in Enzymology* 244, 461-486

Rawlings, N.D., Morton, F.R. & Barrett, A.J. 2006. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 34, D270-D272.

Rogelj, B., Popovič T., Ritonja A., Štrukelj, B., Brzin, J. *Phytochem.* 1998, 1645-1649, 5

Rowan, A.D., Brzin, J., Buttle, D.J., Barrett, A.J., 1990. Inhibition of cysteine proteinases by a protein inhibitor from potato. *FEBS Lett* 269: 328-330

Schwabe C, Anastasi A, Crow H, McDonald JK, Barrett AJ., 1984.

Schwabe C., Anastasi A., Crow H., McDonald J.K., Barrett A.J.; 1984. "Cystatin. Amino acid sequence and possible secondary structure."; *Biochem. J.* 217:813-817

Storer, A.C., Menard, R., 1994. Catalytic mechanism in papain family of

cysteine pepetidases. *Methods in Enzymology* 244, 486-500

Stubbs, M.T., Laber, B., Bode, W., Huber, R., Jerala, R., Lenarčič, B., Turk, V., 1990. The refined 2,4Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with cysteine proteinase papain: A novel type of proteinase inhibitor interaction. *EMBO Journal* 9, 1939-1947

Surjyo, J. B., Anisur, R.K., 2002. Effect of a homeopathic drug, Chelidonium, in amelioration of p-DAB induced hepatocarcinogenesis in mice. *BMC Complement Altern Med*, 2-4.

Štrukelj, B., Lenarčič, B., Gruden, K., Pungerčar, J., Rogelj, V., Turk, V., Bosch, D., Jongsma M.A., 2000. Equistatin, a Protease Inhibitor from the Sea Anemone *Actinia equina*, Is Composed of Three Structural and Functional Domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269, 732-736

Turk, B., Turk, D., Salvesen, G.S., 2002. Regulating Cysteine Protease Activity: Essential Role of Protease Inhibitors As Guardians and Regulators. *Current Pharmaceutical Design*, 1623-1637

Turk, V., Bode, W., 1991. The Cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS*, Vol. 285, No. 2, 213-219

Vierstra, R.D., 1996. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology* 32, 275-302

ZAHVALA

Svoji mentorici prof.dr. Marini Dermastia in somentorju dr. Jožetu Brzinu se zahvaljujem za strokovno vodenje, pomoč, koristne napotke in vzpodbudne besede pri izdelavi in oblikovanju tega diplomskega dela.

Doc.dr. Kristini Gruden se iskreno zahvaljujem za nesebično pomoč, strokovno vodenje in celostno podporo pri nastajanju diplomskega dela. Njeno strokovno znanje in pripravljenost pomagati sta mi olajšali in pomagali zaključiti zastavljeno nalogo.

Zahvala tudi prof.dr.Maji Kovač in doc.dr. Marijani Regvar za pregled in koristne nasvete.

Hvala dr. Borisu Turku, vodiji odseka za Biokemijo in molekularno biologijo IJS za dovoljenje za opravljanje dela.

Dr. Tatjani Popovič iz IJS se zahvaljujem za pomoč pri določanju aktivnih koncentracij. Njeno strokovno znanje in nasveti so mi bili v veliko pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

Mag. Adrijani Leonardi iz IJS se zahvaljujem za izvedbo določanja aminokislinskega zaporedja.

Dr. Borisu Kralju iz IJS gre zahvala za meritve na masni spektroskopiji.

Najlepše se zahvaljujem tudi dr. Boštjanu Novak za nesebično tehnično pomoč pri oblikovanju in izdelavi naloge.

Soprogu Radu se iskreno zahvaljujem, ker mi je stran ob strani.

Globoko in iskreno se na koncu zahvaljujem moji noni, Štefaniji Golčer, ker me je vedno vzpodbujala in neomajno verjela vame. Brez nje danes ne bi bila tukaj. Nona – hvala ti za vse.

Iskrena hvala vsem!