

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Manca KOCJANČIČ

**UPORABA INHIBITORJA SERINSKIH PROTEAZ IZ  
GOBE *Clitocybe nebularis* ZA IZOLACIJO SERINSKIH  
PROTEAZ Z AFINITETNO KROMATOGRAFIJO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Manca KOCJANČIČ

**UPORABA INHIBITORJA SERINSKIH PROTEAZ IZ GOBE *Clitocybe nebularis* ZA IZOLACIJO SERINSKIH PROTEAZ Z AFINITETNO KROMATOGRAFIJO**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**USING SERINE PROTEASE INHIBITOR FROM *Clitocybe nebularis* AS AN AFFINITY CHROMATOGRAPHY LIGAND FOR ISOLATION OF SERINE PROTEASES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo predstavlja zaključek dodiplomskega Univerzitetnega študija bietechnologije. Opravljeno je bilo na Odseku za biotehnologijo Instituta Jožef Stefan, v Ljubljani.

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

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

Članica:                         dr. Jerica Sabotič  
                                       Institut Jožef Stefan, Ljubljana

Članica:                         prof. dr. Kristina Sepčić  
                                       Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana 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.

Manca Kocjančič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK UDK 606 : 561.28 : 577.152.34 (043.2)  
KG prostotrosnice / *Clitocybe nebularis* / *Macrolepiota procera* / proteazni inhibitorji / CnSPI / knispin/ heterologno izražanje/ serinske proteaze / aspartatne proteaze / afinitetna kromatografija / *Bacillus subtilis* / subtilizin / tripsin  
AV KOCJANČIČ, Manca  
SA KOS, Janko (mentor)/SABOTIČ, Jerica (somentorica)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije  
LI 2009  
IN UPORABA INHIBITORJA SERINSKIH PROTEAZ IZ GOBE *Clitocybe nebularis* ZA IZOLACIJO SERINSKIH PROTEAZ Z AFINITETNO KROMATOGRAFIJO  
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)  
OP XII, 68 str., 13 pregl., 37 sl., 1 pril., 65 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Namen naloge je bil preizkusiti uporabnost afinitetnega nosilca z vezanimi inhibitorji serinskih proteaz iz gobe meglenke (*Clitocybe nebularis*) in rekombinantnega knispina (rCnp) za iskanje tarčnih proteaz v prostotrosnicah in za izolacijo nekaterih serinskih proteaz iz drugih naravnih virov. Iz gobe *C. nebularis* smo izolirali tarčne proteaze in jih delno karakterizirali. Z metodo cimografije z želatino smo dokazali aktivnosti izoliranih proteaz, ki so bile najmočnejše v alkalnem pH in popolnoma inhibirane v prisotnosti inhibitorja serinskih proteaz pefabloc. N-terminalno aminokislinsko zaporedje ene izmed izoliranih proteaz je pokazalo 75% podobnost z N-terminalnim zaporedjem aspartatne proteaze (saharopepsin). Cepitev inzulina je pokazala podobno specifičnost cepitve s saharopepsinom in kimotripsinom. Rezultati afinitetnih kromatografij z vezanim CnSPI oziroma rCnp so bili podobni. Optimirali smo postopek izolacije zunajceličnih subtilizinov bakterije *Bacillus subtilis*, ki vključuje obarjanje proteinov z amonijevim sulfatom in afinitetno kromatografijo z vezanim rCnp. Pokazali smo uporabnost vezanega rCnp za čiščenje mešanice tripsinov. Afinitetna kromatografija z inhibitorji CnSPI in rCnp vezanimi na trden nosilec, se je izkazala za uporabno metodo za izolacijo serinskih proteaz iz različnih naravnih virov.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC 606 : 561.28 : 577.152.34 (043.2)  
CX basidiomycete/ *Clitocybe nebularis* / *Macrolepiota procera* / protease inhibitors / CnSPI /cnispin/ heterologous expression/ serine protease / aspartic protease /affinity chromatography / *Bacillus subtilis* / subtilisin / trypsin  
AU KOCJANČIČ, Manca  
AA KOS, Janko (supervisor)/ SABOTIČ, Jerica (co-supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty , Academic Study Programme in Biotechnology  
PY 2009  
TI USING SERINE PROTEASE INHIBITOR FROM *Clitocybe nebularis* AS AN AFFINITY CHROMATOGRAPHY LIGAND FOR ISOLATION OF SERINE PROTEASES  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XII, 68 p., 13 tab., 37 fig., 1 ann., 65 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The aim of our research was to investigate the applicability of serine protease inhibitors from clouded agaric (*Clitocybe nebularis*) CnSPI and recombinant cnispin (rCnp) as affinity ligands bound to solid matrix for target search in basidiomycetes and for isolation of some serine proteases from other natural sources. We have isolated and partially characterised target proteases from basidiomycete *C. nebularis*. Proteolytic activities were determined using gelatine zymography, and were optimal at alkaline pH and fully inhibited by the serine protease inhibitor pefabloc. N-terminal amino acid sequence determined for one of the isolated proteases showed 75% sequence similarity to the sequence of an aspartatic protease (saccharopepsin). Cleavage specificity of insulin B chain showed similarity with cleavage sites of saccharopepsin and chymotrypsin. Results of affinity chromatography with ligands CnSPI or rCnp were very similar. We have optimized isolation of extracellular subtilisins from *Bacillus subtilis* comprising precipitation of proteins from the medium by ammonium sulphate followed by rCnp affinity chromatography. Applicability of rCnp ligand was also shown for isolation of trypsin from mixture of partially purified trypsins. Affinity chromatography with CnSPI and rCnp bound to solid matrix proved to be a useful method for isolation of serine proteases from different natural sources.

## KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Kazalo vsebine	V
Kazalo slik	VIII
Kazalo preglednic	X
Seznam okrajšav in simbolov	XI
<b>1 UVOD IN OPREDELITEV PROBLEMA</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 GLIVE	2
<b>2.1.1 Značilnosti in pomen gliv</b>	2
<b>2.1.2 Razvrstitev gliv</b>	3
2.1.2.1 Prostotrosnice ( <i>Basidiomycetes</i> )	3
2.1.2.1.1 <i>Clitocybe nebularis</i> (meglenka, poprhnjena livka)	3
2.1.2.1.2 <i>Macrolepiota procera</i> (orjaški dežnik)	4
2.2 PEPTIDAZE ALI PROTEAZE	5
<b>2.2.1 Delitev proteaz</b>	5
2.2.1.1 Serinske proteaze	6
2.2.1.1.1 Serinske proteaze iz prostotrosnic	8
2.3 INHIBITORJI PROTEAZ	8
<b>2.3.1 Inhibitorji serinskih proteaz</b>	9
<b>2.3.2 Inhibitorji serinskih proteaz iz prostotrosnic</b>	11
2.3.2.1 Inhibitorji serinskih proteaz iz gobe <i>Clitocybe nebularis</i> (CnSPI)	11
2.4 AFINITETNA KROMATOGRAFIJA	12
<b>2.4.1 Princip in uporaba afinitetne kromatografije</b>	12
<b>2.4.2 Nosilec</b>	13
<b>2.4.3 Ligand</b>	13
<b>2.4.4 Vezava liganda na nosilec</b>	13
<b>2.4.5 Postopek afinitetne kromatografije</b>	14
<b>3 MATERIAL IN METODE</b>	<b>15</b>
3.1 MATERIAL	15
<b>3.1.1 Bakterijski sevi</b>	15
<b>3.1.2 Gobe</b>	15
<b>3.1.3 Pripravek tripsina</b>	15
<b>3.1.4 Gojišča</b>	15
<b>3.1.5 Inhibitorji proteaz</b>	15
<b>3.1.6 Kemikalije (reagenti in barvila)</b>	16
<b>3.1.7 Pufri in raztopine</b>	17
<b>3.1.8 Aparature in pripomočki</b>	19

<b>3.2</b>	<b>METODE</b>	20
<b>3.2.1</b>	<b>Priprava afinitetne kromatografije</b>	20
3.2.1.1	Priprava rekombinantnega inhibitorja	20
3.2.1.1.1	Izražanje knispina v bakterijah <i>E.coli</i> s pomočjo indukcije z IPTG	20
3.2.1.1.2	Čiščenje knispina	20
3.2.1.1.2.1	Gelska filtracija	21
3.2.1.1.3	Določanje koncentracije proteinov	21
3.2.1.1.4	Določanje inhibitorne aktivnosti na tripsin- test BAPNA	22
3.2.1.2	Vezava na nosilec (Sefarozna aktivirana s CNBr)	22
<b>3.2.2</b>	<b>Izolacija proteaz iz prostotrosnic</b>	23
3.2.2.1	Priprava izvlečka iz gob	23
3.2.2.2	Gojenje micelija meglenze	23
3.2.2.3	Izvedba afinitetne kromatografije	23
3.2.2.4	Ultrafiltracija	24
3.2.2.5	Tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov – FPLC	24
<b>3.2.3</b>	<b>Karakterizacija proteaz</b>	24
3.2.3.1	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE)	24
3.2.3.2	Določanje N-terminalnega aminokislinskega zaporedja	26
3.2.3.3	Cimografija z želatino	26
3.2.3.3.1	Cimografija z želatino v prisotnosti inhibitorjev proteaz	27
3.2.3.4	Test encimske aktivnosti s substratom FITC – hemoglobin	28
3.2.3.5	Test encimske aktivnosti s substratom Z-Phe-Arg-AMC	28
3.2.3.6	Določanje specifičnosti cepitve z inzulinom	29
3.2.3.7	Določanje pH-optimuma	29
3.2.3.8	Vpliv kofaktorjev na aktivnost	29
<b>3.2.4</b>	<b>Izolacija in karakterizacija proteaz iz drugih virov</b>	30
3.2.4.1	Izolacija subtilizina	30
3.2.4.1.1	Gojenje bakterije <i>Bacillus subtilis</i> za izolacijo subtilizina	30
3.2.4.1.2	Izolacija proteaz bakterije <i>B.subtilis</i>	31
3.2.4.1.3	Test encimske aktivnosti s substratom Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC	31
3.2.4.2	Izolacija tripsina iz delno očiščene mešanice tripsinov iz goveda	31
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	32
4.1	<b>PRIPRAVA AFINITETNE KROMATOGRAFIJE</b>	32
<b>4.1.1</b>	<b>Priprava rekombinantnega knispina- rCnp</b>	32
4.1.1.1	Heterologno izražanje knispina	32
4.1.1.2	Čiščenje knispina	33
4.1.1.3	Določitev koncentracije knispina	35
<b>4.1.2</b>	<b>Vezava knispina na Sefarozu, aktivirano s CNBr</b>	35
4.2	<b>IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA SERINSKIH PROTEAZ IZ PROSTOTROSNIC</b>	36
<b>4.2.1</b>	<b>Izolacija serinskih proteaz iz prostotrosnic</b>	36
4.2.1.1	Optimizacija izolacije serinskih proteaz iz prostotrosnic	38

<b>4.2.2</b>	<b>Karakterizacija izoliranih proteaz</b>	38
4.2.2.1	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE) in cimografija z želatino	38
4.2.2.2	Testi encimske aktivnosti	41
4.2.2.2.1	Test encimske aktivnosti s substratom Z-Phe-Arg-AMC	41
4.2.2.2.2	Določanje encimske aktivnosti s cimografijo z želatino	42
4.2.2.2.3	Določanje encimske aktivnosti s testom FITC-hemoglobin	42
4.2.2.3	Določanje N-terminalnega aminokislinskega zaporedja	43
<b>4.2.3</b>	<b>Karakterizacija izbranih proteaz po dodatnem čiščenju vzorcev</b>	45
4.2.3.1	Specifičnost cepitve	47
4.2.3.2	pH-optimum	48
4.2.3.3	Vpliv kofaktorjev	49
4.2.3.4	Vpliv različnih inhibitorjev	49
4.3	<b>IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA SERINSKIH PROTEAZ IZ DRUGIH NARAVNIH VIROV</b>	50
<b>4.3.1</b>	<b>Izolacija subtilizina iz tekočega gojišča bakterije <i>Bacillus subtilis</i></b>	50
4.3.1.1	Optimizacija gojenja bakterije <i>B. subtilis</i>	50
4.3.1.2	Izolacija proteaz z afinitetno kromatografijo rCnp	52
4.3.1.3	Karakterizacija izoliranih proteaz	53
<b>4.3.2</b>	<b>Čiščenje mešanice tripsinov</b>	55
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	56
5.1	<b>RAZPRAVA</b>	56
5.2	<b>SKLEPI</b>	61
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	62
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	64
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO SLIK

Slika 1: Prostotrosnica <i>Clitocybe nebularis</i> (meglenka) (Poler, 2004: 30; Pace, 1981:162)	4
Slika 2: Prostotrosnica <i>Macrolepiota procera</i> (orjaški dežnik) (Poler, 2004:12; Pace, 1981:56)	4
Slika 3: Mehanizem delovanja kanonskih inhibitorjev serinskih proteaz	10
Slika 4: Postopek afinitetne kromatografije in elucijski diagram (prirejeno po Mohr in Pommering, 1985:108)	14
Slika 5: Izražanje rCnp – analiza NaDS-PAGE celičnega lizata <i>E.coli</i> BL21(DE3) pET11a::CnSPI	32
Slika 6: Čiščenje rCnp – analiza NaDS-PAGE celičnega lizata <i>E.coli</i> BL21(DE3) pET11a::CnSPI	33
Slika 7: Gelska filtracija rCnp na koloni Superdex S-200 in inhibitorna aktivnost frakcij na tripsin	34
Slika 8: Čiščenje rCnp – analiza NaDS-PAGE očiščenega rCnp iz celičnega lizata raztopljenega v pufru TET z 8M ureo	34
Slika 9: Afinitetna kromatografija izvlečka meglenke ( <i>Clitocybe nebularis</i> ) na CnSPI – Sefarozi (A) in rCnp – Sefarozi (B)	36
Slika 10: Afinitetna kromatografija izvlečka orjaškega dežnika ( <i>Macrolepiota procera</i> ) na CnSPI – Sefarozi (A) in rCnp – Sefarozi (B)	37
Slika 11: Afinitetna kromatografija izvlečka micelija meglenke na rCnp Sefarozi	37
Slika 12: Analiza vzorca vrh Cn-n z NaDS-PAGE (A) in cimogram z želatino (B)	38
Slika 13: Analiza vzorca vrh Cn-r z NaDS-PAGE (A) in cimogram z želatino(B)	39
Slika 14: Analiza vzorca vrh micelij meglenke z NaDS-PAGE	40
Slika 15: Analiza vzorca vrh Mp-n z NaDS-PAGE (A) in cimogram z želatino (B)	40
Slika 16: Analiza vzorca vrh Mp-r z NaDS-PAGE	41
Slika 17: Cimogram z želatino- prikaz aktivnosti izoliranih proteaz pri pH 3,5 in pH 8,0 (1,2) ter aktivnosti ob prisotnosti razredno specifičnih inhibitorjev pefabloc (1a, 2a) in pepstatin (1b, 2b)	42
Slika 18: Analiza NaDS-PAGE proteinov, ki smo jim določili N-terminalno zaporedje	43
Slika 19: Primerjava N-terminalnih zaporedij Cn-nB1 in aspartatne proteaze ApA1	44
Slika 20: Primerjava N-terminalnih zaporedij Cn-nB2 in saharopepsin SacP ( <i>Laccaria bicolor</i> )	44
Slika 21: Kromatogram FPLC vzorca vrh Cn-r	45

Slika 22: Cimogram z želatino – prikaz proteinskih vrhov po ločitvi s FPLC	45
Slika 23: Cimogram z želatino – aktivnost vrhov po FPLC v prisotnosti inhibitorjev pefabloc (A) in pepstatin (B)	46
Slika 24: Analiza NaDS-PAGE po FPLC. M- označevalec molekulskih mas	46
Slika 25: Mesta cepitve inzulina B s proteaznima vzorcema vrh 2 in vrh 4	47
Slika 26: Analiza NaDS-PAGE – pH-optimum vzorca vrh 2	48
Slika 27: NaDS-PAGE – pH-optimum vzorca vrh 4. M - označevalec molekulskih mas	48
Slika 28: Cimogram z želatino – vpliv optimalnih kofaktorjev na aktivnost vzorca vrh 4	49
Slika 29: Cimogram z želatino – aktivnost vzorca vrh 4 v prisotnosti različnih specifičnih inhibitorjev	49
Slika 30: Rast bakterij <i>B. subtilis</i> na gojišču A (levo) in gojišču YT (desno)	50
Slika 31: Rastna krivulja bakterije <i>B. subtilis</i> , pridobljena s spremljanjem optične gostote ( $OD_{550}$ ) tekom rasti pri $37^{\circ}\text{C}$ v tekočem gojišču (0,5% kvasni ekstrakt, 1% mleko z dodatkom 0,1% glukoze in brez dodatka glukoze (Glc))	51
Slika 32: Cimogram z želatino vzorcev pri gojenju <i>B. subtilis</i> v tekočem gojišču (0,5 % kvasni ekstrakt, 1 % mleko brez dodatka glukoze (A) in z dodatkom 0,1 % glukoze (B))	51
Slika 33: Afinitetna kromatografija filtriranega gojišča <i>B. subtilis</i> na rCnp-Sefarozi (A) in gojišča <i>B. subtilis</i> po koncentriranju proteinov zobarjanjem, na rCnp- Sefarozi (B)	52
Slika 34: Cimogram z želatino – aktivnosti vzorcev iz tekočega gojišča <i>B. subtilis</i> (A) ter aktivnosti v prisotnosti inhibitorja kimostatina (B)	53
Slika 35: NaDS-PAGE po afinitetni kromatografiji gojišča <i>B. subtilis</i> in gojišča <i>B. subtilis</i> po obarjanju (A) in cimogram proteinov, ki so se vezali na kolono (B)	54
Slika 36: Afinitetna kromatografija pripravka tripsina na rCnp - Sefarozi	55
Slika 37: NaDS-PAGE analiza (A) in cimografija z želatino (B) po čiščenju mešanice tripsinov	55

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kemikalije (reagenti in barvila)	16
Preglednica 2: Pufri in raztopine	17
Preglednica 3: Aparature in pripomočki	19
Preglednica 4: Inhibitorji in njihove končne koncentracije	28
Preglednica 5: Optimizacija gojišč za gojenje bakterije <i>B. subtilis</i>	30
Preglednica 6: Optična gostota celic v odvisnosti od časa gojenja	32
Preglednica 7: Uspešnost vezave inhibitorja na Sefarozo	35
Preglednica 8: Aktivnosti izoliranih proteaz in njihove aktivnosti v prisotnosti inhibitorja pefabloc	42
Preglednica 9: Določena N-terminalna aminokislinska zaporedja	43
Preglednica 10: Mesta cepitve na oksidirani B verigi inzulina za vrh 2 in vrh 4 ter primerjava s proteazami s podobnimi mesti cepitve	47
Preglednica 11: Optimizacija trdnih gojišč za gojenje bakterije <i>B. subtilis</i>	50
Preglednica 12: Test aktivnosti s substratom Suc-Ala-Ala-ProPheAMC – supernatant gojišča	54
Preglednica 13: Test aktivnosti s substratom Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC – supernatant gojišča po koncentriranju zobarjanjem	54

## SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

A <sub>280</sub>	absorbanca pri valovni dolžini 280 nm
APS	amonijev persulfat
BAPNA	N-benzoil-DL-arginin-p-nitroanilid hidroklorid
BLAST	» <u>Basic Local Alignment Search Tool</u> «
Brij 35	polioksietilen lauril eter
CNBr	cianogen bromid
rCnp	rekombinantni inhibitor knispin
Cnp	knbspin
CnSPI	inhibitor serinskih proteaz iz gobe <u>Clitocybe nebularis</u> ( <u>Clitocybe nebularis</u> serine protease inhibitor)
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
DMSO	dimetilsulfoksid (Me <sub>2</sub> SO)
DTT	ditiotreitol
E-64	<i>trans</i> -epoksi sukcinil-L-levcilamido-(4-gvanizino)-butan
EC	encimska klasifikacijska številka (» <u>enzyme classification</u> «)
EDTA	etilen-diamin-tetraacetna kislina
FITC-hemoglobin	hemoglobin označen s fluorescein izotiocianatom
FPLC	tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov (fast protein liquid chromatography)
Glc	glukoza
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktosid
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
kDa	kilo dalton
LB	Luria Bertani
LMW	nizkomolekularni proteinski standard (» <u>low molecular weight standard</u> «)
MES	2-(N-morfolino)etansulfonska kislina
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaDS- PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata
NCBI	National Centre for Biotechnology Information

obr/min	obrati/minuto
OD <sub>600</sub>	optična gostota pri valovni dolžini 600 nm
pH	naravni logaritem koncentracije vodikovih ionov
PMSF	fenilmetansulfonilfluorid
<i>p</i> -NA	<i>para</i> -nitroanilid
PVDF	poliviniliden difluorid
TCA	triklorocetna kislina (»trichloroacetic acid«)
TEMED	tetrametiletilendiamin
TET	Tris-HCl, EDTA, Triton-X
Tris	tris-hidroksimetil-aminometan
Z-Phe-Arg-AMC	benzoiloksikarbonil-Phe-Arg-4-metil-7-kumarilamid

### Okrajšave imen aminokislin

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

## 1 UVOD IN OPREDELITEV PROBLEMA

Izolacija in čiščenje proteaz iz okolij, kjer se nahajajo (ekstrakti rastlinskih, glivnih, živalskih tkiv, bakterijskih lizatov in podobno) običajno predstavljajo večstopenjski postopek z nizkim končnim izkoristkom. Kadar je le možno si pomagamo z uporabo trdnih nosilcev, na katerih so vezane substance z afiniteto do iskane proteaze.

Iz gobe *Clitocybe nebularis* je bil izoliran inhibitor serinskih proteaz CnSPI, ki je v svojem razredu popolnoma nov inhibitor z zanimivimi inhibitornimi lastnostmi. Kemično vezan na trden nosilec bi lahko predstavljal afinitetni medij za hitro in enostavno čiščenje serinskih proteaz iz različnih virov. Funkcije inhibitorja so slabo poznane, zato bi lahko s pomočjo prepoznavnih tarč v gobi sklepali na njegovo biološko in fiziološko funkcijo.

Cilj naloge je preizkusiti možnost uporabe afinitetnega nosilca z vezanimi inhibitorji serinskih proteaz (CnSPI in knispin) za izolacijo nekaterih serinskih proteaz iz različnih naravnih virov.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 GLIVE

#### 2.1.1 Značilnosti in pomen gliv

V kraljestvo gliv uvrščamo veliko število različnih organizmov, ki živijo v najrazličnejših bivališčih po vsem svetu. Po velikosti segajo od mikroskopsko majhnih kvasovk do velikih gob z mesnatim trosnjakom. Tudi po načinu življenja so glice zelo raznovrstna skupina - nekatere živijo v sožitju z rastlinami in jim koristijo, druge se naselijo kot zajedavke na gostitelju in lahko celo povzročijo njegovo smrt (Læssoe, 2006).

Glice so posebna skupina steljčnic, za katere je značilno, da so brez fotosintetskih barvil. Vsi predstavniki te skupine so zato heterotrofni organizmi, ki se prehranjujejo na saprotitski (gniloživke), parazitski (zajedalke), ali simbiontski način (v sožitju z avtotrofnim organizmom). Steljka (vegetativna oblika) večine glic je zgrajena iz nitastih celičnih struktur - glivnih hif, katerih preplet tvori podgobje - micelij. Celice obdajajo celične stene iz hitina, redkeje celuloze. Rezervni polisaharid v celicah je glikogen. Razmnoževanje glic je izredno raznoliko, spolno s tvorbo spolnih spor znotraj posebnih tvorb - bazidijev ali askusov, in nespolno z vegetativno rastjo hif ter sporulacijo (Podobnik in Devetak, 1997; Raffaelli in Thomas-Domenech, 1990).

Glice kot razkrojevalke odmrlih organskih snovi omogočajo kroženje snovi v naravi in so pomembne za ohranjanje ekološkega ravnotesja v okolju. Z izločanjem hidrolitičnih encimov so sposobne razgraditi celulozo in lignin. V naravi imajo pomembno vlogo simbiontske glice. Mikoriza, dolgoživa mutualistična asociacija med koreninami rastlin in glivnim micelijem, omogoča intenzivnejši sprejem hranljivih snovi iz tal, ščiti rastline pred patogeni ter navadno povzroča pospešeno rast in razvoj (Læssoe, 2006; Gogala, 1996).

Glice so nepogrešljiv del živega sveta, na številnih področjih so pomembne tudi za človeka. Uporabljam jih kot živilo in začimbo, pri procesiranju hrane ter izdelavi alkoholnih pijač. Z njihovo pomočjo se proizvajajo številni pomembni produkti, npr. antibiotiki, vitamini, encimi, hormoni in beljakovine. Poleg tega se makroglice, kvasne celice in micelij plesni gojijo za hrano. Razvili so tudi metode genskega inženirstva, ki so omogočile produkcijo heterolognih proteinov z uporabo kvasovk in glic. To je pomembno, saj so bakterije nezmožne nekaterih posttranslačijskih modifikacij proteinov. Mnoge filamentozne glice kot npr. rod *Aspergillus*, zelo učinkovito izločajo proteine, kar močno olajša njihovo čiščenje. Glice povzročajo tudi ogromne ekonomske izgube. Kot saprofici povzročajo poškodbe lesa, goriva, hrane in izdelkov. Povzročajo tudi bolezni ljudi in živali (Gunde-Cimerman, 1996; Læssoe, 2006).

## 2.1.2 Razvrstitev gliv

Glede na zgradbo steljke in na nekatere razlike v razmnoževanju delimo glive na: glive sluzavke (Myxomycota) in prave glive (Eumycota). Prave glive obsegajo tiste vrste, ki imajo hife ali pa so z njimi v tesnem sorodu, imajo celične stene skozi večji del ali celotni življenjski ciklus ter se prehranjujejo izključno z absorpcijo. Glive sluzavke se od pravih gliv razlikujejo po tem, da imajo celično steno le razmnoževalne tvorbe (plodišča), celice vegetativnega stadija pa ne. Telo je razvito kot mnogo jedrna ali mnogocelična amebooidna steljka (plazmodij) (Podobnik in Devetak, 1997; Raffaelli in Thomas-Domenech, 1990; Gunde-Cimerman, 1996).

Prave glive so nadalje razvrščene v pet razredov: *Oomycetes* (oomicete), *Chytridiomycetes* (hitridiomicete), *Zygomycetes* (jarmaste glive), *Ascomycetes* (zaprtotrosnice, askomicete) in *Basidiomycetes* (prostotrosnice, bazidiomicete). V skupino *Deuteromycetes* (devteromicete) uvrščamo glive katerih spolna faza ni poznana; večina jih izhaja iz askomicet (Grunde-Cimerman, 1996; Raffaelli in Thomas-Domenech, 1990).

### 2.1.2.1 Prostotrosnice (*Basidiomycetes*)

Prostotrosnice so glive, pri katerih obsega spolni proces nastanek haploidnih bazidiospor na bazidiju, kjer pride tudi do mejoze diploidnih jeder. So pomembna skupina gliv z okoli 25.000 znanimi vrstami. Delijo se v 4 skupine, od katerih dve – *Hymenomycetes* in *Gasteromycetes*, obsegata makroglive oz. gobe. Ostali dve skupini obsegata mikroglive - rje in sneti, ki so znani rastlinski paraziti. Najbolj značilni lastnosti prostotrosnic sta zapončni micelij in balistospore, iz katerih se razvije razvezjani septirani micelij z doliporami (Gunde-Cimerman, 1996).

#### 2.1.2.1.1 *Clitocybe nebularis* (meglenka, poprhnjena livka)

Meglenko (*Clitocybe nebularis*), imenovano tudi poprhnjena livka, uvrščamo v rod livk (*Clitocybe*), družino kolobarničark (*Tricholomataceae*) in red lističark (*Agaricales*). Ima mesnat klobuk, ki je izbočen do sploščen, pogosto ugreznen v obliki ljeta. Je temno sivkasto rjave do sive barve, videti je sivo poprhnjen, sicer je gladek in ima lupljivo kožico. Pod klobukom ima tanke lističe in je brez ovojnice in obročka. Bet je svetlejši od klobuka, čvrst, prožen, kasneje deloma votel in proti dnu rahlo odebelen. Meso je belkasto, debelo in čvrsto, kmalu postane mehko, nekoliko vlaknato. Je kiselkastega okusa in ima močan, malce neprijeten vonj.



**Slika 1: Prostotrosnica *Clitocybe nebularis* (muglenka)** (Poler, 2004: 30; Pace, 1981:162)

Raste od poznega poletja do pozne jeseni, v listnatih in mešanih gozdovih, veliko pod črnim borom na apnenčastih tleh, pri nas predvsem na Krasu in v Istri. Pojavlja se v skupinah, v velikih množinah, razporejena v kolobarje. Meglenka je pogojno užitna (Læssoe, 2006; Pace, 1981; Poler, 1990).

#### 2.1.2.1.2 *Macrolepiota procera* (orjaški dežnik)

Orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*) spada v rod dežnikov (*Macrolepiota*), družino kukmark (Agaricaceae) in red lističark (Agaricales). Klobuk je jajčast ali zvonast, nato polkrožen ali raven, s široko gladko grbo na temenu. Prekriva ga debela, rjavkasta koža, razpadajoča na krpe in luske, ki se proti robu manjšajo. Bet je dolg in votel, neločljiv od klobuka, proti dnu gomoljasto odebelen. Lističe pri mladih gobah pokriva obroček, ki je pri starih premakljiv po betu. Meso je v klobuku mehko, v kocenu trdno in vlaknato. Ima prijeten vonj ter okus po orehih.



**Slika 2: Prostotrosnica *Macrolepiota procera* (orjaški dežnik)** (Poler, 2004:12; Pace, 1981:56)

Rastejo od pozne pomladi do pozne jeseni. Najdemo ga tudi na kamnitem svetu, na prisojnih jasah v listnatih in mešanih gozdovih, pogosto na travnikih in strniščih žitaric. Orjaški dežnik je užiten (Pace, 1981).

## 2.2 PEPTIDAZE ALI PROTEAZE

Peptidaza je (v nomenklaturi encimov Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)) priporočen izraz za vsak protein, ki povzroči hidrolizo peptidnih vezi (Rawlings in sod., 2007). Peptidaze lahko poimenujemo tudi proteaze, poteinaze oz. proteolitični encimi (Barrett in McDonald, 1986). So nujno potrebne za preživetje vseh živih organizmov in so kodirane s približno 2% genov v vseh vrstah živih organizmov (Rawlings in sod., 2006).

Proteaze igrajo ključno vlogo v mnogih fizioloških procesih. Omogočajo znotrajcelično in zunajcelično razgradnjo proteinov, regulirajo aktivacijo pro-encimov in pro-hormonov, sodelujejo pri predstavljavi antigenov, sodelujejo pri procesu razvoja embrija, pri ovulaciji, zdravljenju ran, migraciji monocitov, kaskadi strjevanja krvi ter imunskemu odzivu.

Prav tako pa so proteaze prisotne v patofizioloških stanjih kot so npr. rast tumorjev in metastaza, vnetne bolezni, kardiovaskularne bolezni, nevrološke bolezni, motnje v strjevanju krvi, ipd. V medicini tako zaradi svoje regulatorne vloge ter udeleženosti pri patoloških procesih predstavljajo potencialne tarče za terapijo (Rao in sod., 1998; Vozelj in sod., 2007).

Proteaze so vpletene tudi v mnogih patoloških stanjih pri živalih in rastlinah in so pomemben virulenčni faktor mnogih patogenov kot so bakterije, glive in paraziti.

Proteaze imajo velik obseg aplikacij v biotehnologiji, predvsem v živilstvu (izdelava sirov, mehčanje mesa), industriji usnja (odstranjevanje dlak in izboljšanje elastičnosti) in detergentov ter v ekoloških bioremediacijskih procesih. Zaradi njihovega obširnega potenciala je veliko raziskav osredotočenih na odkrivanje in karakterizacijo novih v naravi prisotnih proteaz iz virov, ki so bili do sedaj spregledani (Rao in sod., 1998; Sabotič in sod., 2006).

### 2.2.1 Delitev proteaz

Proteaze predstavljajo veliko skupino encimov z raznolikostjo v delovanju in strukturi.

Poznamo več kriterijev razvrščanja proteaz:

- izvor: mikrobne, rastlinske in živalske
- mesto delovanja: zunajcelične in znotrajcelične
- mesto cepitve peptidne vezi: eksoproteaze (cepijo peptidno vez blizu N ali C terminalnega konca polipeptidne verige substrata) in endoproteaze (cepijo notranje peptidne vezi v polipeptidni verigi s tendenco delovanja stran od N in C koncev)
- kemična narava katalitičnega mesta: katalitski tip proteaze se nanaša na kemijsko skupino odgovorno za katalizo hidrolize peptidne vezi. Poznamo 6 specifičnih katalitičnih tipov: serinske, treoninske, cisteinske, aspartatne, glutaminske in metalo-proteaze. Pri proteazah serinskega, treoninskega in cisteinskega tipa ima vlogo nukleofila reaktivna skupina stranske verige aminokisline v aktivnem mestu (Ser, Thr, Cys), ki je lahko hidroksilna skupina (serinske in treoninske proteaze) ali

sulfhidrilna skupina (cisteinske proteaze). Pri aspartatnih in metalo-proteazah je nukleofil ponavadi aktivirana molekula vode. Glutaminske proteaze so prepoznali šele leta 2005 in še niso podrobno proučene.

- molekularna struktura in homologija: odvisna od dostopnosti aminokislinskih zaporedij in 3-D struktur; podlaga za določanje evolucijske sorodnosti (Rao in sod., 1998; Rawlings in sod., 2009).

Za razvrščanje proteaz v različne skupine obstajajo različni sistemi. NC-IUBMB jih uvršča med hidrolaze (EC.3.4). Po tej nomenklaturi so eksoproteaze nadalje razdeljene glede na specifičnost odcepljanja različno velikih fragmentov s karboksilnega ali amino-konca polipeptidne molekule. Endoproteaze so nadalje razdeljene na osnovi katalitskih mehanizmov na serinske (EC 3.4.21), cisteinske (EC 3.4.22), aspartatne (3.4.23), metalo- (EC 3.4.24) in treoninske endoproteaze (EC 3.4.25) ter endoproteaze z neznanim katalitskim mehanizmom (3.4.99) (NC-IUBMB, 2009).

Najnovejšo razvrstitev proteaz predstavlja klasifikacijski sistem MEROPS (dostopen na: <http://merops.sanger.ac.uk/>), ki sta ga leta 1993 opisala Rawlings in Barret. Ta razvršča proteaze v **klane** na osnovi katalitskega mehanizma in **družine** na osnovi njihove evolucijske sorodnosti (Rawlings in Barrett, 1993).

#### 2.2.1.1 Serinske proteaze

Serinske proteaze predstavljajo preko tretjine vseh znanih proteolitičnih encimov. Ime družine izhaja iz nukleofilnega serinskega ostanka v aktivnem mestu encima. Serinske proteaze so široko zastopane v naravi, razširjene med virusi, bakterijami in evkarionti, kar kaže na njihovo pomembnost za organizme. Po klasifikaciji MEROPS je preko 26.000 serinskih proteaz razporejenih v 13 klanov in 40 družin. Večina serinskih proteaz je endoproteaz, kjer se hidroliza vezi zgodi na sredini polipeptidne verige. Prav tako jih nekaj spada v družino eksoproteaz, ki odstranijo eno ali več aminoksilin s konca polipeptida (Page in Cera, 2008).

Serinske proteaze so na splošno aktivne pri nevtralnem in alkalnem pH z optimumom med pH 7 in 11. Imajo široko substratno specifičnost. Njihove molekulske mase so med 18 in 35 kDa. Izoelektrične točke serinskih proteaz so navadno med pH 4 in 6. Prepoznamo jih preko irreverzibilne inhibicije z inhibitorji 3,4-DCI, gvanidin, E-64, DFP, PMSF in TLCK. Mehanizem delovanja serinskih proteaz je dvostopenjska reakcija hidrolize, v kateri kovalentno vezan intermediat encim-peptid nastane z izgubo aminokislinskega ali peptidnega fragmenta. Temu koraku acilacije sledi deacilacijski proces, ki nastane z nukleofilnim napadom na intermediat z vodo, čemur sledi hidroliza peptida (Rao in sod., 1998).

Primarne strukture članov štirih klanov – kimotirpsina (PA), subtilizina (SB), karboksiproteaz (SC) in d-Ala-d-Ala proteaze A bakterije *E. coli* (SE) so popolnoma nesorodne, kar kaže na najmanj 4 ločene evolucijske izvore serinskih proteaz. Klani PA, SB in SC imajo skupen reakcijski mehanizem, sestavljen iz skupne katalitične triade treh aminokislin Ser (nukleofil), Asp (elektrofil) in His (baza). Kljub temu da je geometrična orientacija teh ostankov enaka, se zvitje proteinov precej razlikuje. Katalitičen mehanizem klanov SE in SF je različen od tistega pri klanih SA,SB in SE, saj jim primankuje klasična triada Ser-His-Asp (Rao in sod., 1998).

Od 699 proteaz pri človeku, jih je 178 serinskih in od tega jih 138 spada v proteazno družino S1. Družina S1 (kimotripsinska družina) je tako po številu proteinov z določenim zaporedjem in po številu različnih proteaznih aktivnosti največja družina proteaz. Proteaze iz družine S1 so zastopane pri bakterijah, arhejah, praživalih, glivah, virusih, rastlinah in živalih. Vse karakterizirane proteaze kimotripsinske družine so endoproteaze. Poznani so trije glavni tipi aktivnosti: tripsinska, kjer pride do cepitve amidnega substrata za Arg ali Lys na P1, kimotripsinska, kjer pride do cepitve na eni izmed hidrofobnih aminokislin na P1 in elastazna z cepitvijo za Ala na P1. Proteaze iz družine S1 so vključene pri prebavi (tripsin in kimotripsin), imunskem odgovoru posredovanem z IgA in imajo velik potencial za terapevtske tarče (Page in Cera, 2008; Rawlings in sod., 2009). Tripsin je serinska proteaza, najdena v prebavnem sistemu mnogih vretenčarjev. V žlezi slinavki nastaja kot neaktivni proencim tripsinogen. Prisotnost kalcijevih ionov poveča aktivacijo tripsinogena in zavira avtolizo tripsina (Sipos in Merkel, 1970). Velikost tripsina iz pankreasa goveda je 23,8kDa. Optimalen pH delovanja tripsina je okoli pH 8, izoelektrična točka je 10,5 (Cunningham, 1954). Uporaben je v številnih biotehnoloških procesih.

Družina S8, znana tudi kot subtilizinska družina, je druga največja skupina serinskih proteaz. Družino S8 predstavljajo serinska endoproteaza subtilizin in njeni homologi. Proteaze iz družine S8 so zastopane predvsem pri bakterijah, prisotne so tudi v arhejah, praživalih, glivah, virusih, rastlinah in živalih. Večina predstavnikov je endoproteaz in so aktivni v nevtralnih do nekoliko alkalnih pH. Mnogo jih je termostabilnih. Pomembna aplikacija subtilaz je v industriji detergentov in pralnih praškov ter živilsko predelovalni industriji. Subtilizin je serinska endoproteaza, najdena v bakteriji *Bacillus subtilis*. Molekulske mase subtilizinov so okoli 27-36 kDa (Chang in sod., 2009). S kristalografijo je bila določena struktura subtilizina. 275 ostankov gradi globularni protein z večimi alfa vijačnicami in veliko beta ravnino. Vsebujejo eno ali več vezavnih mest za  $\text{Ca}^{2+}$ , ki pripomore k večji termalni stabilnosti (Rawlings in sod., 2009, Priest, 1977).

### 2.2.1.1.1 Serinske proteaze iz prostotrosnic

Proteaze prostotrosnic so slabo poznane. Medtem ko so študije o proteazah pri živalih, rastlinah in bakterijah številne, je poznavanje proteolitične aktivnosti pri prostotrosnicah omejeno na proteaze, vpletene v izkoriščanje hraničnih snovi pri saprofitnih in mikoriznih prostotrosnicah ter virulenčne faktorje pri patogenih vrstah (Sabotič in sod., 2007).

Proteaze igrajo ključno vlogo v fiziologiji, morfogenezi in metabolizmu gob, zato lahko gobe predstavljajo alternativen vir proteaz z novimi karakteristikami. Sabotič in sod. (2007) navajajo, da prostotrosnice kažejo nepričakovano število in raznolikost proteaz, kar kaže na to, da so prostotrosnice idealen vir novih proteaz s potencialno edinstvenimi lastnostmi. Glede na proteolitične aktivnosti, dokazane z metodo želatinske cimografije, so se serinske proteaze izkazale kot prevladujoč katalitski tip proteolitičnih encimov v prostotrosnicah (Sabotič in sod., 2007).

Opisane so bile proteaze, ki se izločajo iz micelija in so vpletene v pridobivanje hraničnih iz okolja. Tako so opisali serinske proteaze večinoma uvrščene med subtilaze, ki so jih izolirali iz prostotrosnic bukovega ostrigarja *Pleurotus ostreatus* (Faraco in sod., 2005), glive bele trohnobe *Phanerochaete chrysosporium* (Dass in sod., 1995), hišnega lesomora *Serpula lacrymans* (Watkinson in sod., 2001), navadne cepilstke *Schizophyllum commune* (Johnston in sod., 2000) in tintnic *Coprinus* sp. (Shaginian in sod., 1990).

Redkejše so raziskave endogene proteolitične aktivnosti iz gob oziroma trosnjakov prostotrosnic. Pri dvotrosnem kukmaku *Agaricus bisporus* so opisali serinsko proteazo, ki se tekom skladiščenja gob izraža v različnih delih trosnjaka in je vpletena v znotrajcelično mobilizacijo proteinov in proces senescence (Burton in sod., 1993). Iz gobe maitake (velika zraščenka, *Grifola frondosa*) so izolirali grifolisin, serinsko proteazo, ki spada v družino sedolizinov (Suzuki in sod., 2005).

## 2.3 INHIBITORJI PROTEAZ

Proteaze so vključene v številnih pomembnih znotrajceličnih in zunajceličnih procesih. Encimi, ki razgrajujejo proteine, so lahko potencialno škodljivi, zato mora biti njihovo delovanje uravnavano. Obstaja več različnih mehanizmov za uravnavanje prekomerne proteolitične aktivnosti. Med pomembnejše regulatorje proteolitične aktivnosti encimov uvrščamo interakcije encimov s proteini, ki jih inhibirajo. Proteazni inhibitorji tvorijo komplekse s tarčnimi proteazami in jih tako inaktivirajo (Rawlings in Barrett, 1993). Med pomembnimi mehanizmi uravnavanja encimske aktivnosti so še: regulacija encimske aktivnosti z delno proteolizo neaktivnih prekurzorjev, z lokalizacijo proteaz, s posttranslacijskimi modifikacijami in s spremembami pH (Turk in sod., 1997).

Inhibitorji proteaz so prisotni v rastlinskih in živalskih tkivih, mikroorganizmih, glivah in praživalih. Lahko se nahajajo zunajcelično ali znotrajcelično. Večina endogenih inhibitorjev je kompetitivnih, kar pomeni, da se v aktivno mesto vežejo reverzibilno ter zmanjšajo ali preprečijo razgradnjo substrata. Del molekule inhibitorja, ki predstavlja reaktivno mesto in se poveže z encimom, se prilega aktivnemu mestu encima in se zato specifično in reverzibilno veže na encim. Kompleks encim-inhibitor je dodatno stabiliziran s številnimi vodikovimi, ionskimi in hidrofobnimi interakcijami in le počasi disociira (Barret, 1986; Bode in Huber, 1991).

Inhibitorje lahko razdelimo po reakcijskem mehanizmu, izvoru in strukturni podobnosti. Leta 1980 sta Laskowski in Kato delila inhibitorje glede na tip proteinaz, ki jih inhibirajo na: inhibitorje serinskih proteaz, inhibitorje cisteinskih proteaz, inhibitorje aspartatnih proteaz in inhibitorje metalo-proteaz (Laskowski in Kato, 1980). Vendar nekateri inhibitorji interagirajo tudi z različnimi tipi proteaz.

Salvesen in Nagase sta leta 1989 predlagala delitev proteaznih inhibitorjev glede na specifičnost. Razdelila sta jih na tri razrede: inhibitorje, ki reagirajo z več kot enim tipom proteaz, inhibitorje specifične le za en tip proteaz in inhibitorje, ki so visokoselektivni le za en encim (Laskowski in Kato, 1980; Salvesen in Nagase, 1989).

S povečevanjem števila odkritij na področju inhibitorjev proteaz so v bazi podatkov MEROPS, ki je v začetku vsebovala samo proteaze dodali novo bazo, ki temelji na enotni klasifikaciji proteaznih inhibitorjev. V sistemu MEROPS so inhibitorne enote proteaznih inhibitorjev dodeljene v družine na osnovi podobnosti aminokislinskih zaporedij in nato na osnovi 3D struktur v 26 klanov (Rawlings in sod., 2009).

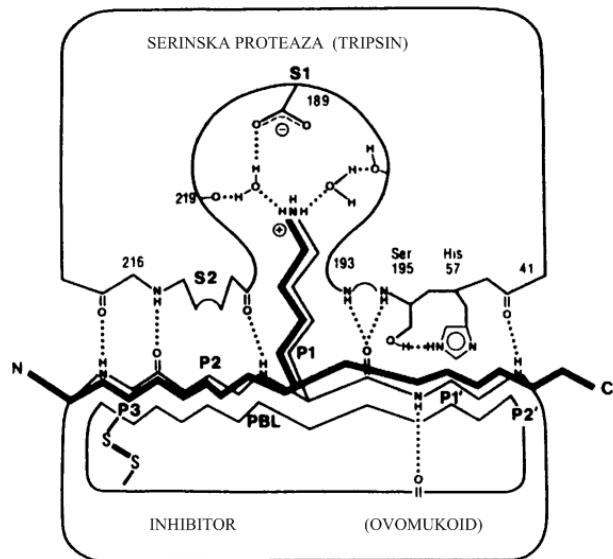
### **2.3.1 Inhibitorji serinskih proteaz**

Serinske proteaze in njihovi naravni proteinski inhibitorji sodijo med najbolj proučene modele interakcij med proteini in tvorjenja proteinskih kompleksov. Inhibitorji serinskih proteaz se po zgradbi in velikosti močno razlikujejo, segajo od majhnih proteinov do velikih makromolekularnih struktur, ki so veliko večje od tarčnih encimov (Otlewski, 1999).

Inhibitorji serinskih proteaz so kompetitivni inhibitorji, ki tvorijo komplekse z encimi v molarinem razmerju 1:1. Proteinski inhibitorji proteaz preprečijo dostop substratov do proteinaznih katalitičnih mest preko steričnih ovir in tako oneomogočijo proteolitične aktivnosti (Bode in Huber, 1992).

Inhibitorji serinskih proteaz so razdeljeni v 20 družin glede na homologijo v aminokislinskem zaporedju in mehanizmu interakcije. Poznamo tri osnovne mehanizme inhibicije (Otlewski in sod, 1999) :

**Kanonski inhibitorji** (standardni mehanizem): vežejo se na encim preko izpostavljene konveksne vezavne zanke, ki se prilega aktivnemu mestu encima in tako inhibira dostop substratu. Mehanizem inhibicije v tej skupini je vedno podoben in spominja na standardni mehanizem vezave substrata (Slika 3). Toda v primerjavi z normalnimi substrati, kjer kompleksa encim-substrat in encim-produkt reverzibilno disocirata, so ti kompleksi zelo stabilni, pri čemer do cepitve običajno ne pride (Laskowski, 1986). Kanonski inhibitorji so relativno majhni proteini okoli 27 do 200 aminokislinskih ostankov in imajo enako tridimensionalno strukturo v predelu, ki obdaja reaktivno mesto (Otlewski in sod., 1999; Bode in Huber, 1991).



Slika 3: Mehanizem delovanja kanonskih inhibitorjev serinskih proteaz

(prirejeno po Bode in Huber, 1992:11). Kanonska vezavna zanka inhibitorja PBL je povezana preko disulfidnega mostička in drugih elementov. Inhibitor se v aktivno mesto proteaze veže podobno kot substrat preko večih vodikovih vezi.

**Ne-kanonski inhibitorji** (npr. hirudin): vežejo se na aktivno mesto proteaze preko N-konca inhibitorja in tvorijo vzporedno  $\beta$ -ravnino. Ti inhibitorji tvorijo tudi sekundarne interakcije s tarčnimi proteazami zunaj aktivnega mesta, kar pripomore k moči in specifičnosti prepoznavanja (Bode in Huber, 1992; Krowarsch in sod., 2003).

**Serpini:** podobno kot kanonski inhibitorji z vrinjanjem peptidne zanke inhibirajo tarčne proteaze. Za razliko od kanonskih inhibitorjev je zanka serpinov fleksibilna in zavzema številne različne konformacije. Za njihov mehanizem inhibicije je pomembna konformacijska sprememba inhibitorja. Predstavlja jih plazemski proteini, sestavljeni iz približno 400 aminokislinskih ostankov (Otlewski in sod., 1999; Laskowski in sod., 2000).

### **2.3.2 Inhibitorji serinskih proteaz iz prostotrosnic**

Veliko različnih tipov proteaznih inhibitorjev je bilo izoliranih iz evkariontskih organizmov, vendar je malo znanega o proteaznih inhibitorjih iz prostotrosnic. Gobe predstavljajo nov vir proteaznih inhibitorjev z edinstvenimi lastnostmi, pomembno medicinsko vrednostjo in potencialnimi insekticidnimi substancami (Avanzo in sod., 2009). V trosnjakih prostotrosnic so zasledili inhibitory aktivnost na tripsin (Vetter, 2000; Gzogyan in sod., 2005). Le nekaj inhibitorjev serinskih proteaz je bilo izoliranih in karakteriziranih. Te vključujejo inhibitorje serinskih proteaz iz gobe *Pleurotus ostreatus* (Dohmae in sod., 1995), ki spada v družino 19 v klasifikaciji MEROPS. Inhibitor serinskih proteinaz iz gobe *Lentinus edodes* (Odani in sod., 1999) in inhibitor serinskih proteaz iz gobe *Clitocybe nebularis* (Avanzo in sod., 2009), močno inhibira tripsin, šibkeje kimotripsin in predstavlja družino I66. Iz micelija pisane ploskocevke (*Trametes versicolor*) so izolirali temperaturno stabilne inhibitorje proteinaze K (Zuchowski in Grzywnowicz, 2006).

Fiziološka vloga inhibitorjev proteaz iz prostotrosnic je slabo poznana. Nekateri imajo verjetno regulatorno vlogo v znotrajceličnih proteolitičnih procesih, kot so pokazali za inhibitor serinskih proteaz iz bukovega ostrigarja (Dohmae in sod., 1995), drugi imajo lahko tudi vlogo pri obrambi pred patogeni ali plenilskimi žuželkami (Avanzo in sod., 2009).

#### **2.3.2.1 Inhibitorji serinskih proteaz iz gobe *Clitocybe nebularis* (CnSPI)**

Pod izraz CnSPI prištevamo več inhibitorjev serinskih proteaz, ki so bili izolirani iz gobe meglenke (*Clitocybe nebularis*) (Avanzo in sod., 2009). Vsi kažejo podobnost N-terminalnega zaporedja z inhibitorjem serinskih proteaz iz gobe *Lentinus edodes* (Odani in sod., 1999), do sedaj edinega člana družine I66 po klasifikaciji MEROPS. En od njih, imenovan knispin (Cnp), je natančno karakteriziran na genetskem in proteinskem nivoju. Molekulska masa knispina je 16,4 kDa. Njegova izoelektrična točka je 5,3. Inhibitor je stabilen v širokem pH-območju, saj obdrži inhibitory aktivnost pri pH 2 in pH 11. Pri višjih temperaturah ni stabilen, saj pri segrevanju nad 40°C izgubi aktivnost (Avanzo in sod., 2009).

Inhibitorni spekter CnSPI in knispina je zanimiv, saj med serinskimi proteinazami družine S1 inhibirajo močno tripsin, slabše kimotripsin. Prav tako dobro inhibirajo meglenkine endogene serinske proteaze, medtem ko proteaze drugih katalitskih tipov ne.

Inhibitorna aktivnost CnSPI na endogene proteaze in insekticidna aktivnost kažeta na dvojno biološko vlogo. Regulatorna vloga v endogenem proteolitičnem sistemu v gobi *Clitocybe nebularis* je bila pokazana na osnovi specifične inhibicije serinskega tipa proteolitične aktivnosti v ekstraktih različnih prostotrosnic, vključujuč *Clitocybe nebularis*. Na primeru insekticidnega delovanja na ličinke vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) lahko predpostavimo zaščitno vlogo CnSPI proti plenilskim žuželkam (Sabotič in sod., 2007; Avanzo in sod., 2009).

## 2.4 AFINITETNA KROMATOGRAFIJA

Afinitetna kromatografija je kromatografska metoda za ločevanje biokemičnih mešanic. Je tip adsorbcjske kromatografije, pri kateri se molekula, ki jo želimo očistiti, specifično in reverzibilno adsorbira na komplementarno vezalno substanco (ligand), ki je kovalentno imobilizirana na netopen podporen nosilec-matriks. Afinitetna kromatografija velja za eno najbolj učinkovitih načinov za ločevanje in čiščenje proteinov. V veliko primerih predstavlja hitro, enostavno in zelo učinkovito tehniko (Affinity..., 1979; Polanowski in sod., 2003).

Osnovni princip vezave biološko aktivne substance z uporabo specifične in reverzibilne interakcije na ustrezni nosilec sega v leto 1910, ko je Starkenstein uporabil netopen škrob za selektivno adsorbcojo  $\alpha$ -amilaze. Hiter razvoj afinitetne kromatografije se je začel po uvedbi novih agaroznih nosilcev (Porath in Flodin 1959). Odkritje, da se lahko molekule, ki vsebujejo primarne aminoskupine vežejo na poliasaharidne matrice aktivirane s CNBr (Axen in sod., 1967), je pomenilo začetek afinitetne kromatografije kot rutinske ločevalne tehnike in njeno vpeljavo v laboratorijsko prakso (Mohr in Pommering, 1985).

### 2.4.1 Princip in uporaba afinitetne kromatografije

Afinitetna kromatografija omogoča ločevanje in čiščenje na osnovi specifičnih bioloških interakcij. Metoda zahteva predhodno znanje o strukturi in biološki specifičnosti sestavine, ki jo želimo očistiti, da lahko predvidimo pogoje uspešne ločitve. Biološki sistemi katerih interakcije se uporablja pri afinitetni kromatografiji so npr. encim – substrat, encim – inhibitor, protitelo – antigen, protitelo – virus (Affinity..., 1979; Wilson in Walker, 2005).

Molekule, ki interagirajo, so po naravi specifične kar omogoča visoko selektivnost ločevanja in uporabo afinitetne kromatografije za čiščenje molekul iz kompleksnih bioloških mešanic, ločevanje nativnih od denaturiranih oblik iste substance in odstranjevanje majhnih količin biološkega materiala od velikih količin neželenih substanc (Affinity..., 1979; Polanowski in sod., 2003). Tehnika je bila sprva razvita za čiščenje encimov, vendar se je kasneje razširila tudi na nukleotide, nukleinske kisline, imunoglobuline, membranske receptorje in celo na celotne celice in celične fragmente (Wilson in Walker, 2005).

V primeru čiščenja proteaz se uporabljo imobilizirani substrati ali njihovi analogi, kot tudi različni tipi sintetičnih ali naravnih inhibitorjev. Za čiščenje serinskih proteaz so uporabili že veliko število specifičnih inhibitorjev. Najpogosteje uporabljeni ligandi za izolacijo serinskih proteaz so tripsinski inhibitor BPTI in serinski inhibitorji iz semen stročnic SBTI (Polanowski in sod., 2003). V zadnjem desetletju prevladuje uporaba afinitetne kromatografije za čiščenje protiteles z uporabo rekombinantnega proteina A ali

proteina G. Večino monoklonskih protiteles, ki se uporablajo za raziskave in diagnostiko, in vsa terapevtska protitelesa čistijo z uporabo afinitetne kromatografije (Uhlen, 2008).

#### **2.4.2 Nosilec**

Idealen nosilec za afinitetno kromatografijo mora vsebovati ustrezne kemijske skupine, na katere se ligand lahko kovalentno veže. Med vezavo makromolekule in njenou elucijo mora biti stabilen. Z ostalimi makromolekulami lahko le šibko interagira, da se minimizira nespecifična adsorbcija. Imeti mora tudi dobre pretočne lastnosti, zato se v praksi uporablajo delci, ki so enotne velikosti, okrogli in rigidni. Najbolj pogosti so prečno povezani dekstrani, agarosa, poliakrilamid, polimetakrilat, polistiren, celuloza, porozno steklo in kremen (Wilson in Walker, 2005).

Sefarosa je agarozni gel v krogličasti obliki, ki ima vse lastnosti, ki so pomembne za dober nosilec, za imobilizacijo biološko aktivnih molekul. Hidroksilne skupine sladkornih ostankov so lahko preprosto uporabne za kovalentno vezavo liganda. Sefarosa 4B je učinkovit in v veliki meri uporabljen nosilec. Ima strukturo odprtih por, tako da je notranjost nosilca dosegljiva za vezavo liganda in zagotavlja dobro vezavno kapaciteto celo za velike molekule. Kaže zelo nizko nespecifično adsorbcijo in krogličasta oblika gela omogoča odlične pretočne lastnosti (Affinity..., 1979).

#### **2.4.3 Ligand**

Na izbiro liganda za afinitetno kromatografijo vpliva več dejavnikov. Ligand mora imeti specifično in reverzibilno vezalno afiniteto do substance, ki jo želimo očistiti. Idealna afiniteta liganda za vezne substance naj bi bila v območju  $10^{-4}$ - $10^{-8}$  M v prosti raztopini. Imeti mora primerne kemijske skupine, ki dovoljujejo, da ga kovalentno vežemo na nosilec. Najpogosteje takšne skupine so -NH<sub>2</sub>, -COOH, -SH in -OH. Če vezava liganda na nosilec ovira njegovo sposobnost vezave makromolekule, se med ligand in matriks vrine distančnik. Optimalna dolžina distančnika je 6-10 ogljikovih atomov. Na kemično naravo liganda vpliva biološka specifičnost sestavine, ki jo želimo očistiti. V praksi je včasih možno izbrati ligand, ki kaže popolno specifičnost s tem, da se bo vezal izključno na eno posebno sestavino. Pogosteje je možna izbira liganda, ki kaže širšo selektivnost in se veže na sorodno skupino sestavin, ki imajo podobno kemijsko specifičnost (Affinity..., 1979; Wilson in Walker, 2005).

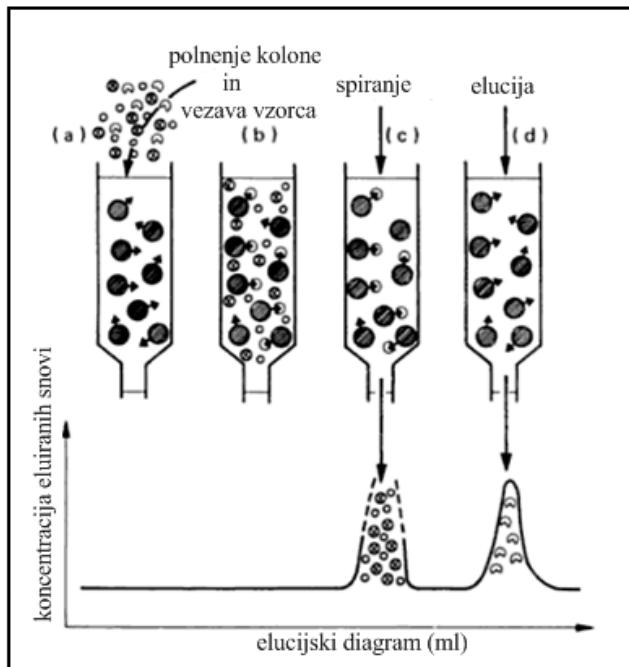
#### **2.4.4 Vezava liganda na nosilec**

Najbolj pogosta metoda vezave liganda, ki vsebuje primarne amino skupine, na nosilec vključuje predhodno obdelavo nosilca s cianogen bromidom (CNBr). Reakcijski pogoji in relativno razmerje reagentov določajo število molekul liganda, ki se lahko veže na vsak delec nosilca (Wilson in Walker, 2005). Reakcija cianogen bromida s Sefarozo 4B vodi v reaktivni produkt, na katerega se lahko vežejo proteini, nukleinske kisline ali drugi

biopolimeri, pod milimi pogoji, preko primarnih amino skupin ali podobnih nukleofilnih skupin. Postopek aktivacije prav tako prečno poveže Sefarozo kar zviša njeno kemijsko stabilnost in omogoča fleksibilnost pri izbiri elucijskih pogojev in derivatizacije. (Affinity..., 1979).

#### 2.4.5 Postopek afinitetne kromatografije

Eno od dveh molekul, ki med seboj interagirata t.j. ligand, immobiliziramo na stacionarno fazo (nosilec), s katero napolnimo kolono (slika 4a). Druga molekula, z afiniteto do komponente vezane na nosilec, pa se adsorbira iz vzorca, ki ga spustimo skozi kolono (slika 4 a,b). S spiranjem (slika 4 c) se najprej odstranijo nespecifično vezane neželjene snovi, ki predstavljajo prvi vrh elucijskega diagrama. Sestavino, ki smo jo tako očistili/izolirali nato ločimo od liganda s specifično ali nespecifično elucijo (slika 4d). Nespecifična elucija je lahko dosežena s spremembou pH ali ionske moči, kar povzroči spremembo v ionizacijskem stanju skupin liganda in/ali makromolekul, ki je pomembna za vezavo ligand-makromolekula. V primeru elucije s spremembou pH, mora biti pH zbranih frakcij popravljen na optimalno vrednost, da ne pride do denaturacije proteinov. Specifična elucija pa vključuje dodajanje visokih koncentracij substrata ali ligandov, za katere ima očiščena komponenta višjo afiniteto, kot jo ima za immobiliziran ligand (Wilson in Walker, 2005).



Slika 4: Postopek afinitetne kromatografije in elucijski diagram (Mohr in Pommering, 1985:108)

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Bakterijski sevi

- sev *Escherichia coli* BL21(DE3); F- *omp T gal [dcm][lon]* hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-), λ (DE3)
- sev *Bacillus subtilis* (divji tip)

##### 3.1.2 Gobe

- gobe meglenke (*Clitocybe nebularis*) in orjaški dežniki (*Macrolepiota procera*), nabранe na področju Krasa
- micelij meglenke CnV (iz zbirke sevov Odseka za biotehnologijo, IJS)

##### 3.1.3 Pripravek tripsina

- delno očiščen tripsin iz goveda (Fluka)

##### 3.1.4 Gojišča

- tekoče gojišče LB (Luria-Bertani) (1% tripton, 0,5% kvasni ekstrakt, 1% NaCl)
- gojišče za *B. subtilis* (0,5% kvasni ekstrakt, 1% mleko)
- gojišče za gojenje micelija meglenke (1,5% sladni ekstrakt)

##### 3.1.5 Inhibitorji proteaz

- Pefabloc (Fluka)
- Kimostatin (Sigma)
- Pepstatin (Peptide Institute)
- E-64 (Peptide Institute)
- Aprotinin (Roche)
- Antipain (Boehringer)
- CnSpi (IJS)

### 3.1.6 Kemikalije (reagenti in barvila)

**Preglednica 1: Kemikalije (reagenti in barvila)**

Kemikalija	kratica/formula	Proizvajalec
izopropil-β-D-tiogalaktoperanozid	IPTG	Apollo Scientific, Velika Britanija
N-benzoil-DL-arginin- <i>p</i> -nitroanilid	BAPNA	Sigma, Nemčija
hidroklorid		
etilen-diamin-tetraacetna kislina	EDTA	Serva, Nemčija
agaroha	/	Sigma, ZDA
akrilamid	/	Fluka, ZDA
amonijev persulfat	APS	Serva, Nemčija
amonijev sulfat	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Carlo Erba, Italija
ampicilin	/	Sigma, ZDA
bakrov sulfat pentahidrat	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Fluka, Švica
polioksetilen lauril eter	Brij 35	Sigma, ZDA
bromfenol modro	/	Serva, Nemčija
butanol	/	Fluka, Švica
cinkov klorid	ZnCl <sub>2</sub>	Fluka, Švica
citronska kislina	/	Riedel-de Haen, Nemčija
Sefarova aktivirana s CNBr 4B	/	Amersham Biosciences, ZDA
coomassie Brilliant Blue R-250	/	GE Healthcare, ZDA
D-glukoza	/	Fluka, Francija
di natrij-hidrogenfosfat-2-hidrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Kemika, Hrvatska
dimetil sulfoksid	DMSO ,Me <sub>2</sub> SO	Merck, Nemčija
dithiotreitol	DTT	Fermentas, Nemčija
etanol	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	Carlo Erba, Italija
glicerol	HOCH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>2</sub> OH	Carlo Erba, Italija
glicin	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Serva, Nemčija
imidazol	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	Fluka,
inzulin B	/	Serva, Nemčija
kalcijev klorid- dihidrat	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Sigma, ZDA
kazeinski hidrolizat	/	Sigma, ZDA
kalijev dihidrogen fosfat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Riedel-de Haen, Nemčija
klorovodikova kislina	HCl	Carlo Erba, Italija
kobaltov klorid	ClCo	Fluka
kvasni ekstrakt	/	Sigma, ZDA
LMW standard	/	GE Healthcare, ZDA
magnezijev klorid	MgCl <sub>2</sub>	Sigma, Nemčija
manganov klorid	MnCl <sub>2</sub>	Fluka, Švica
metanol	CH <sub>3</sub> OH	Carlo Erba, Italija
mleko v prahu	/	Delisse, Francija
natrijev dodecilsulfat	NaDS	Serva, Nemčija

se nadaljuje

nadaljevanje

Kemikalija	kratica/formula	Proizvajalec
natrijev bisulfit	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Kemika, Hrvaška
natrijev hidrogen karbonat	NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Nemčija
natrijev hidrogenfosfat dihidrat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	Merck, Nemčija
natrijev hidroksid	NaOH	Carlo Erba, Italija
natrijev klorid	NaCl	Carlo Erba, Italija
ocetna kislina	CH <sub>3</sub> COOH	Carlo Erba, Italija
Serva blue G	/	Serva, Nemčija
sladni ekstrakt	/	Fluka, Švica
Superdex S200	/	GE Healthcare, ZDA
škrob	/	BDH Chemicals Ltd, Anglija
tetrametiletilendiamin	TEMED	Merck, Nemčija
trihidroksimetilaminometan	Tris	Serva, Nemčija
triklorocetna kislina	CCl <sub>3</sub> COOH	Merck, Nemčija
tripton	/	BD Becton
Triton X-100		Serva, Nemčija
urea	CO(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	Merck, Nemčija
Z-Ala-Ala-Asn-AMC	/	Bachem, Nemčija
Z-Phe-Arg-AMC	/	Bachem, Nemčija
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC	/	Bachem, Nemčija
želatina	/	Difco laboratories, ZDA

### 3.1.7 Pufri in raztopine

#### Preglednica 2: Pufri in raztopine

Pufer	Sestava
<i>pufri za izolacijo knispina</i>	50 mM Tris-HCl 2mM EDTA 0,1% TritonX-100
- pufer TET (pH 7,5)	
- pufer TET z	1 M, 2 M in 8 M ureo
<i>gelska filtracija</i>	0,1 M NaAc 0,3 M NaCl 0,001 M EDTA
- pufer za gelsko filtracijo (pH 6,5)	
<i>določanje aktivnosti inhibitorja</i>	0,1 M Tris 0,02 M CaCl <sub>2</sub>
- pufer za test BAPNA (pH 8)	
<i>vezava CnSPI na Sefarozo</i>	0,5 M NaHCO <sub>3</sub> 0,3 M NaCl
- vezalni karbonatni pufer (pH 8,5)	
- pufer za blokiranje ostalih skupin (pH 8,5)	2 M Tris-HCl

se nadaljuje

nadaljevanje

Pufer	Sestava
<b>afinitetna kromatografija</b>	
- vezalni pufer (pH 6,5)	0,1 M NaAc 0,3 M NaCl 0,001 M EDTA
- elucijski pufri	- 20 mM HCl - 6M urea v vezalnem pufru - 20% DMSO v vezalnem pufru - 4% Brij v vezalnem pufru
- pufer za nevtralizacijo (pH 6,5)	2M Tris
<b>NaDS-PAGE</b>	
- vzorčni pufer	0,125 M Tris-HCl (pH 6,8) 20% glicerol 4% NaDS z bromfenol modrim
- pufer za ločevalni gel (pH 8,8)	1,5 M Tris-HCl
- pufer za koncentrirni gel (pH 6,8)	0,5 M Tris-HCl,
- 10% NaDS	10 g NaDS v 100 ml d H <sub>2</sub> O
- 10% APS	500 mg APS v 5 ml d H <sub>2</sub> O
- pufer za elektroforezo (pH 8,3)	2,9 g/l Tris 14,4 g/l glicina 1 g/l NaDS
- raztopina za barvanje gela	C <sub>45</sub> H <sub>44</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>7</sub> S <sub>2</sub> (Coomassie Brilliant Blue)
- raztopini za razbarvanje gela	30 % etanol, 10 % ocetna kislina 10 % etanol, 5 % ocetna kislina
- raztopina za negativno barvanje	200mM imidazol v 0,1 % raztopini NaDS, 100mM ZnCl <sub>2</sub>
- raztopina za razbarvanje gela	50mM EDTA
<b>cimografija z želatino</b>	
- vzorčni pufer	0,125 M Tris-HCl (pH 6,8) 20% glicerol 4% NaDS z bromfenol modrim
- pufer za ločevalni gel	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 z 0,4% NaDS
- pufer za koncentrirni gel	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- pufer za elektroforezo (pH 8,3)	2,9 g/l Tris, 14,4 g/l glicina, 1 g/l NaDS
- 2,5% Triton X-100	pripravljen iz 10 x pufra za renaturacijo (25% Triton X-100)
- razvijalni pufer	100 mM Tris-HCl (pH 8,0) 200 mM NaCl 5 mM CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O, 0,02% (m/v) Brij 35)
<b>prenos proteinov iz gela na membrano</b>	
- pufer za prenos	100 ml pufra, ki vsebuje 30 g/l Tris in 58 g/l glicina smo zmešali z 200 ml metanola in 3,75 ml 10% NaDS
<b>pufer za test s substratom Z-Phe-Ar-AMC</b>	0,1 M fosfat, 20 mM EDTA, pH 7
<b>pufer za test s substratom Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC</b>	100 ml 0,1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O 4 ml 0,1M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>pufer za test specifičnosti cepitve</b>	50 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
<b>pufri za določanje pH-optimuma</b>	0,25 M NaAc (pH 3, pH 4) 0,25 M MES (pH 5, pH 6) 0,25 M Tris (pH 7, pH 8, pH 9) 0,25M glicin (pH 10, pH 11)

### 3.1.8 Aparature in pripomočki

**Preglednica 3: Aparature in pripomočki**

aparatura oz. pripomoček	Proizvajalec
centrifuga Eppendorf 5424	Eppendorf, Nemčija
centrifuga Sorvall RC5C plus	Sorvall, ZDA
črpalka za gelsko elektroforezo	Technica AutoAnalyser Proportioning Pump
dializno črevo Servapor	Serva, Nemčija
fluorimeter Luminiscence Spectrometer LS 30	Perkin Elmer, ZDA
aparatura FPLC Äkta prime	Amersham Pharmacia Biotech, Švedska
inkubator BINDER	Binder, Nemčija
magnetno mešalo Rotamix S-10	Tehtnica, Slovenija
naprava za določanje aminokislinskega zaporedja	
sekvenator Procise 492A, povezan z analizatorjem 120A	Applied Biosystems, ZDA
pH-meter Seven Easy	Mettler Toledo, ZDA
sistem za elektroforezo MiniProtean II	BioRad, ZDA
aparatura za fotografiranje gelov UVItec	UVItec, Velika Britanija
sonikator Digitall sonifier W450 D	Branson, ZDA
ultrafiltrri (in membrane)	Amicon 8400 oz. 8200 (Amicon 3,5 kDa), ZDA
ultraturaks ULTRA-TURRAX	IKA-Labortechnik, Nemčija
spektrofotometer UV/VIS Lambda 25	Perkin Elmer precisely, ZDA
vibracijski stresalnik Vibromix <sub>31</sub>	Tehtnica, Slovenija
vodna kopel SW22	Julabo, Nemčija

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Priprava afinitetne kromatografije

#### 3.2.1.1 Priprava rekombinantnega inhibitorja

##### 3.2.1.1.1 Izražanje knispina v bakterijah *E.coli* s pomočjo indukcije z IPTG

Za izražanje knispina v bakteriji smo uporabili že pripravljene trajne kulture *E.coli* BL21(DE3) pET11a::CnSPI. Ekspresijski sistem predstavlja sev *E.coli* BL21(DE3) v katerega je bil vključen ekspresijski vektor pET11a s predhodno vstavljenim vkjučkom, ki kodira inhibitor serinskih proteaz knispin (Cnp) iz gobe *Clitocybe nebularis*.

Začeli smo s pripravo prekonočne kulture iz trajne kulture seva *E.coli* BL21(DE3) z ekspresijskim vektorjem pET11a::CnSPI. Dvema epruvetama s 5ml gojišča LB smo dodali ampicilin do koncentracije 100 $\mu$ g/ml (gojišče LBA). V eno epruveto smo nacepili trajno kulturo BL21(DE3) pET11a::CnSPI, druga nam je služila kot kontrola. Epruveti smo inkubirali v stresalniku pri 37°C, 220 obr./min preko noči.

Naslednji dan smo precepili prekonočno kulturo v večji volumen. V dve erlenmajerici za ekspresijo z volumnom 2 l smo ob gorilniku sterilno prelili po 250 ml gojišča LBA, odpipetirali po 2,5 ml prekonočne kulture (kulturo smo redčili 1:100) ter jih inkubirali pri 37°C, ob stresanju 220 obr./min. Po približno dveh urah smo izmerili optično gostoto pri valovni dolžini 550nm (OD<sub>550</sub>), da smo preverili ali so celice dosegle željeno gostoto in jih nato inducirali z 1 mM IPTG (250  $\mu$ l 1M izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktosida), da se je začelo prekomerno izražanje proteina ter jih inkubirali še 5 ur pri 37°C (ob stresanju 220 obr/min). Ob vsaki uri smo izmerili OD<sub>550</sub> in ocenili gostoto celic s pomočjo tabele za ocenitev gostote *E.coli*. Po 5 urah smo vsebino erlenmajeric prelili v dve centrifugirki in centrifugirali 20 min pri 4°C, 6000 x g v centrifugri Sorvall RC5C plus z rotorjem GS-3. Odlili smo supernatant (shranili 30 $\mu$ l za analizo z NaDS-PAGE), usedlini celic pa smo dodali 25 ml pufra TET (50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, pH 8), dobro resuspendirali ter zamrznili pri -20°C.

##### 3.2.1.1.2 Čiščenje knispina

Naslednji dan smo suspenzijo celic počasi odtalili in zamrznili ter postopek ponovili še dvakrat, da bi povzročili lizo celic. Vsebini obeh centrifugirk smo združili v eno ter sprali s 5-10 mL pufra TET. Nato smo za razbitje celic uporabili sonikator (Sonifier W- 450D) 3 krat po 1 min s 30% amplitudo. Po sonikaciji smo suspenzijo centrifugirali 15 min pri 4°C in 6000 x g (Sorvall RC5C plus). Supernatant smo zavrgli, usedlino pa smo s pomočjo magnetnega mešala raztopili v 50 ml pufra TET. Sledilo je centrifugiranje 20 min pri 6000 x g. Supernatant smo ponovno zavrgli (SN3), pelet pa smo s pomočjo magnetnega mešala ratopili v 50 ml pufra TET z 1M ureo. V naslednji stopnji izolacije smo ponovno 20 min centrifugirali pri 6000 x g supernatant odlili (SN4) in pelet raztopili v 70 ml pufra

TET z 2M ureo. Raztopino smo centrifugirali 20 min pri 4°C in 6000 x g. SN smo odlili (SN5), usedlino pa raztapljali s pomočjo magnetnega mešala v 28 ml pufra TET z 8M ureo in dodatkom 2mM DTT, kar predstavlja vzorec, ki smo ga kasneje čistili z gelsko filtracijo. Med postopkom smo shranjevali vzorce (200 µl) supernatantov in suspenzij za kasnejšo analizo z NaDS-PAGE.

### 3.2.1.1.2.1 Gelska filtracija

Gelska filtracija, imenovana tudi gelska izključitvena kromatografija, je ločevalna metoda, ki temelji na ločevanju komponent vzorca zaradi razlik v njihovi velikosti. Ločevanje poteka na zamreženem polimerinem gelu z definirano velikostjo por. Večje molekule se ne ujamejo v pore gela, potujejo skozi gel hitreje in imajo krajsi elucijski čas. Nasprotno, manjše molekule vstopajo v tekočino ujeto v porah v gelu in se tako dalj časa zadržijo na koloni. Tako se molekule ločijo po padajočem velikostnem redu.

Uporabili smo kolono s premerom 4 cm in višino 114 cm, napolnjeno z gelom Superdex S200 (GE Healthcare). Kolono smo sprali s pufom za gelsko kromatografijo (0,1 M NaAc, 0,3 M NaCl, 1mM EDTA, pH 6,5). Nanesli smo 28 ml vzorca. Ločevanje je potekalo 24 ur pri 4°C s pretokom 52,8 ml/uro. S pomočjo kolektorja smo na 30 min zbirali frakcije (25ml). Prisotnost inhibitorja serinskih proteaz smo spremljali s testom inhibicije tripsina s substratom BAPNA. Frakcijam smo izmerili absorbanco pri 280 nm, jih skoncentrirali z ultrafiltracijo ter proteine analizirali z elektroforezo v prisotnosti NaDS.

### 3.2.1.1.3 Določanje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov smo določali z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 280nm. K absorpcijskemu maksimumu proteinov pri 280 nm prispevajo aromatske aminokisline Tyr in Trp ter v manjši meri Phe in disulfidne vezi. Te aminokisline so v veliki večini proteinov zastopane v zelo podobnih deležih, zato lahko z merjenjem njihove absorbance enostavno ocenimo približno koncentracijo proteinov v neobarvanih raztopinah. Koncentracijo proteina lahko izračunamo iz Beer-Lambertovega zakona, če poznamo molarni absorpcijski koeficient za protein.

$$\text{Beer-Lambertov zakon: } A = \epsilon \times l \times c \quad \dots (1)$$

A je absorbanca

$\epsilon$  je molarni absorpcijski koeficient (l/mol x cm)

l je dolžina optične poti- širina kivete

c je molarna koncentracija (mol/l)

Metodo smo uporabili za določanje koncentracije dobljenega rekombinantnega inhibitorja, knispina, za katerega je vrednost  $\epsilon = 1,886$ .

Pri vzorcih po končani afinitetni kromatografiji, ki so bili delno obarvani, je metoda omogočala le grobo oceno koncentracije proteinov. Absorbanco smo merili na spektrofotometru Lambda 25 UV/VIS (PerkinElmer) v steklenih kivetah pri valovni dolžini 280 nm ( $A_{280}$ ).

### 3.2.1.1.4 Določanje inhibitorne aktivnosti na tripsin- test BAPNA

Za določanje inhibitorne aktivnosti inhibitorja serinskih proteaz (CnSPI in Cnp) smo kot testni encim uporabili tripsin. Po dodatku inhibitorja smo določali znižanje encimske aktivnosti tripsina glede na sintetični substrat BAPNA. Reakcija poteka tako, da tripsin hidrolizira substrat BAPNA, pri tem nastane rumeno obarvan *p*-nitroanilin (*p*-NA), ki absorbira svetlobo valovne dolžine 405 nm. Koločino sproščenega *p*-NA smo določili z merjenjem absorbkcije pri 405 nm v plastičnih kivetah.

Najprej smo določili encimsko aktivnost tripsina pri različnih koncentracijah ter tako določili optimalno koncentracijo in volumen, ki smo jo uporabili za test.

Za preverjanje inhibitorne aktivnosti rekombinantnega knispina smo uporabili po 100 µl vzorca posameznih frakcij gelske kromatografije. K 100 µl vzorca smo dodali 50 µl raztopine tripsina (0,05 mg/ml). Substrat (100 mg BAPNA v 2,3 ml DMSO) in pufer (0,1 M Tris, 0,02 M CaCl<sub>2</sub>, pH 8) smo zmešali v razmerju 1:100 in v test dodali 1,5 ml tako pripravljenega substrata. Reakcijsko mešanico smo nato inkubirali 30 min pri 37°C. Reakcijo smo prekinili z 1 ml 0,2 M HCl in nato merili absorbcojo pri valovni dolžini 405 nm proti vodi s spektrofotometrom Lambda 25 UV/VIS (PerkinElmer). Vrednost za slepi vzorec smo pridobili tako, da smo namesto tripsina dodali enako količino pufra. Vsem izmerjenim vrednostim smo odsteli vrednost slepega vzorca. Vrednost pozitivne kontrole smo dobili tako, da smo namesto vzorca v reakcijsko mešanico dodali 100 µl dH<sub>2</sub>O.

### 3.2.1.2 Vezava na nosilec (Sefarozna aktivirana s CNBr)

Rekombinantni inhibitor serinskih proteaz knispin (rCnp) smo vezali na aktivirano Sefarozo 4B s CNBr (Amersham Biosciences). V navodilih proizvajalca je podano, da je potreben 1 g liofiliziranega prahu za približno 3,5 ml končnega volumena gela. 6 g prahu Sefaroze 4B aktivirane s CNBr smo dali v čašo z 100 ml 1mM HCl, da je nabreknil in nato počasi spirali na nuči s 5L 1mM HCl.

Knispin smo raztopili v vezalnem karbonatnem pufu (0,5 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,3 M NaCl, pH 8,5). Priporočena vezava v navodilih proizvajalca je okoli 5-10 mg proteina na ml medija. Vezali smo 1,47 mg rCnp/ml gela. Knispinu v vezalnem pufu (25ml) smo dodali pelet iz nuče in pri sobni temperaturi počasi stresali 2 uri. Nato smo nevezan inhibitor sprali z vezalnim pufom. Preostale aktivirane skupine na nosilcu smo blokirali z dodatkom 50 ml 2 M Tris pufra (pH 8,5) in inkubirali preko noči pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo gel odnucirali in izmerili A<sub>280</sub> supernatanta za določitev učinkovitosti vezave. Vsebino v nuči smo sprali z vezalnim karbonatnim pufom in spravili z dodatkom 1 M NaCl.

### **3.2.2 Izolacija proteaz iz prostotrosnic**

#### **3.2.2.1 Priprava izvlečka iz gob**

Za izolacijo serinskih proteaz smo pripravili več litrov soka iz meglenke (*Clitocybe nebularis*) in orjaškega dežnika (*Macrolepiota procera*). Gobe so bile nabrane na območju Krasa v različnih sezонаh (oktober 2005, december 2006, oktober 2008) in do priprave soka shranjene pri -20°C. Zmrznjene gobe smo odtajali s pomočjo mikrovalovne pećice, dodali 1g/kg natrijevega bisulfita ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), dobro premešali in pregnetli. Sledilo je stiskanje soka skozi plenično podlago. Tako dobljenemu soku smo dodali 0,3 M NaCl in centrifugirali v centrifugi RC5C plus (Sorvall) 30 minut pri 7000 x g in 4°C ter supernatant nanašali na afinitetno kromatografsko kolono.

#### **3.2.2.2 Gojenje micelija meglenke**

Agarozno gojišče preraščeno z micelijem CnV smo razrezali na kvadratke velikosti približno 0,5 cm x 0,5 cm. Po 5 kvadratkov smo prenesli v eno ploščo s tekočim gojiščem (1,5% sladni ekstrakt). Inkubacija je potekala 14 dni pri 37°C. Micelije smo pobrali iz tekočega gojišča jih zamrznili in odmrznili in nato homogenizirali. Centrifugirali smo 20 min pri 10000 x g in tako dobili 90 ml soka, ki smo ga nanesli na afinitetno kromatografsko kolono.

#### **3.2.2.3 Izvedba afinitetne kromatografije**

Steklene kolone smo napolnili s približno 50 ml Sefaroz z vezanim inhibitorjem. Uporabljali smo Sefarozo z imobiliziranim rekombinantnim knispinom (rCnp), ki smo jo pripravili kot je opisano v točki 3.2.1.2 in Sefarozo z imobiliziranim naravnim inhibitorjem CnSPI, ki je bila predhodno pripravljena na enak način. Kolono smo najprej sprali s 100 ml 20 mM HCl in nato s 100 ml vezalnega pufrja (0,1 M NaAc, 0,3 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 6,5). Na kolono smo nanašali vzorce z volumenom 200-400 ml. Po nanosu vzorca smo spirali nespecifično vezane proteine z vezalnim pufrom do absorbcijske vrednosti pri 280 nm ( $A_{280}$ ) nižje od 0,03. Frakcije smo zbirali v epruvete z volumenom 10 ml. Vezane proteine smo eluirali s spremembom pH z elucijskim pufrom (20 mM HCl). Ob spremembah pH, ki smo jo zaznali z indikatorskim papirjem, smo v epruvete dodali 2 ml pufra za nevtralizacijo (2 M Tris pH 6,5), da smo preprečili možno inaktivacijo proteaz. Frakcijam smo nato izmerili absorbancijo pri 280 nm na UV/VIS spektrofotometru (Lambda 25, Perkin Elmer, ZDA) z uporabo kivete iz kremenovega stekla širine 1 cm in vrednosti prikazali v grafu. Frakcije iz vrha smo združili in skoncentrirali s pomočjo ultrafiltracije. Koncentrirane proteine smo analizirali z NaDS-PAGE. Pred ponovno uporabo kolone smo jo vedno sprali z vezalnim pufrom. Kot elucijske pufre smo uporabili tudi: 20 % DMSO v vezальнem pufru, 4 % Brij v vezальнem pufru, in 6M ureo v vezальнem pufru.

### 3.2.2.4 Ultrafiltracija

Vzorce smo koncentrirali v ultrafiltru Amicon 8400 (Amicon). Uporabili smo membrano (Amicon millipore) z velikostjo por, ki zadrži molekule večje od 3kDa. V hladni sobi ( $4^{\circ}\text{C}$ ) smo ultrafilter postavili na magnetno mešalo in priklopili na jeklenko z dušikom pri nadtlaku približno 4 bare. Skoncentriranemu vzorcu smo izmerili absorbanco pri 280 nm in ga shranili v zmrzovalniku pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2.5 Tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov – FPLC

Proteinske vzorce, ki smo jih izolirali iz vodnega izvlečka meglenke z afinitetno kromatografijo, smo dodatno očistili s FPLC. Ta metoda se uporablja za hitro ločevanje proteinov in drugih makromolekul. Uporabili smo sistem FPLC Äkta prime (Amersham Pharmacia Biotech), ki je bil povezan z računalniškim programom Unicorn v5.11., in kolono Superdex S75 HR10/30 (GE Healthcare, ZDA) z notranjim premerom 10 mm in višino 30 cm. V koloni je zamrežen gel iz dekstranov in prečno-povezane agaroze, ki ima sposobnost ločevanja proteinov, katerih molekulska masa je v rangu 3-70 kDa.

Sistem smo najprej sprali z vodo MiliQ in namestili kolono Superdex 75 HR10/30 za gelsko izključitveno kromatografijo. Kolono je računalniški sistem pred nanosom vzorca spral z vezalnim pufrom 50 mM Tris, 0,3M NaCl pH 6,5. Nanesli smo po 200  $\mu\text{l}$  vzorca in kolono sprali z vezalnim pufrom, pri pretoku 1 ml/min. Frakcije smo zbirali ročno glede na izrisane vrhove v programu UNICORN. Kolono smo ob koncu uporabe sprali z 20% etanolom.

## 3.2.3 Karakterizacija proteaz

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

Poliakrilamidna gelska elektroforeza je 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. Le-ta poruši konformacijo proteina in se nespecifično veže na povprečno dve aminokislini in tvori negativno nabit kompleks. Hitrost potovanja nativnega proteina je odvisna od njihovega celokupnega naboja, velikosti in oblike. Ob dodatku NaDS je hitrost potovanja odvisna samo od velikosti (mase) proteina.

Pri delu smo uporabljali elektroforezni sistem MINI PROTEAN II (BioRad). Elektroforeza je potekala v dveh različno zamreženih gelih: koncentrirni gel (koncentriranje proteinov) in ločevalni gel (kjer se proteini ločijo po velikosti).

Ločevalni gel smo pripravili tako, da smo za en gel (12%) debeline 1,5 mm pripravili 10 ml mešanice. Zmešali smo 4,3 ml dH<sub>2</sub>O, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 100 µl 10% NaDS in 3 ml 40 % raztopine akrilamida. Zamreženje gela smo sprožili z dodatkom 50 µl 10 % APS (amonijev persulfat) in 15 µl reagenta TEMED. To mešanico smo premešali in vlili med dva stekelca razmagnjena za 1,5 mm. Na vrh ulitega ločevalnega gela smo nalili butanol nasičen z dH<sub>2</sub>O, da smo izravnali linijo gela. Gel se je nato trdil 30 do 45 min. Butanol smo popivnali s filter papirjem ter nato vlili še 4% koncentrirni gel (3,2 ml dH<sub>2</sub>O, 1,3 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 50 µl 10 % NaDS, 500 µl 40 % raztopine akrilamida). Tik pred vlitjem smo dodali še 25 µl 10 % APS in 8 µl reagenta TEMED ter v gel namestili glavniček z desetimi žepki.

Vzorce smo pripravili tako, da smo zmešali proteinski vzorec in vzročni pufer v razmerju 3:2. Vzorce smo inkubirali 10 min v vreli vodi. Vzorčni pufer smo pripravili tako, da smo zmešali 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 2 ml glicerola, 4 ml 10 % NaDS, dodali malo bromfenol modrega in 1,5 ml dH<sub>2</sub>O.

Ploščici s strjenim gelom smo odstranili glavniček ter jo vpeli v aparaturo za elektroforezo in vlili elektroforezni pufer: pripravljen z mešanjem 29 g Tris, 144 g glicina, 10 g NaDS dopolnjenim z dH<sub>2</sub>O do 1 l, pH 8,3. V žepke smo nanesli pripravljene vzorce in neobarvan standard velikosti 14.4-97 kDa (Pharmacia LMW Standard, GE Healthcare).

Elektroforeza je potekala v navpični smeri pri konstantnem toku 30 mA/gel približno 70 min. Po končani elektroforezi smo barvali gel z 0,1% raztopino barvila Coomassie brilliant blue (PhastGel Blue R, GE Healthcare) 30 min in nato razbarvali z večkratno zamenjavo razbarvalnih raztopin: 30 minut v 30% etanolu in 10 % ocetni kislini in v 10 % etanolu in 5 % ocetni kislini preko noči. Če barvanje z Comassie brilliant blue ni bilo uspešno, smo gel barvali s cinkom v prisotnosti imidazola (negativno barvanje). Gel smo spirali 5 min z dH<sub>2</sub>O, nato smo ga 15 do 30 minut inkubirali v 50 ml 200 mM raztopine imidazola z dodatkom 0,1% NaDS. Pri tem so se topne sestavine iz elektroforeznega pufra (glicin, Tris) odstranile iz gela in zamenjale z imidazolom. Sledilo je spiranje z dH<sub>2</sub>O 1 min in razvijanje gela v 50 ml 100 mM ZnCl<sub>2</sub> 45 do 60 sekund ob stalnem stresanju, dokler se niso pojavile prozorne lise na belem motnem ozadju. Cink namreč tvori topne komplekse z NaDS-proteinskim kompleksom in nastanejo prozorne proteinske lise, medtem ko je ozadje motno zaradi nastajanja netopnega kompleksa med imidazolom, NaDS in cinkom. Razvijanje smo prekinili tako da smo gel 3 x 5 min spirali z dH<sub>2</sub>O in razbarvali s 50 mM EDTA.

### 3.2.3.2 Določanje N-terminalnega aminokislinskega zaporedja

Za določitev N-terminalnega zaporedja smo po končani NaDS-PAGE, proteine prenesli na poliviniliden difluorid (PVDF) membrano **IMMOBILON-P<sup>SQ</sup>** (Millipore) velikosti 6,5 x 8,5 cm z velikostjo por 0,2 µm.

Predhodno smo membrano namočili v 100% metanol, nato v dH<sub>2</sub>O in na koncu v pufer za prenos. Filter papir in gel smo inkubirali v pufru za prenos približno 5 min. Pufer za prenos smo pripravili tako, da smo zmešali 100 ml pufra, ki vsebuje 30 g/l Tris in 58 g/l glicina, z 200 ml metanola in 3,75 ml 10 % NaDS in mešanico dopolnili z dH<sub>2</sub>O do 1 l.

Sistem smo sestavili tako, da smo na anodno stran (črno) plastične mreže položili krpico, na njo 3 plasti tankega filter papirja v dimenziji gela ter nanje položili gel. Na gel smo položili PVDF membrano Immobilon-P<sup>SQ</sup> (Millipore, ZDA) in nanjo 3 plasti tankega filter papirja ter krpico. Tako membrano, kot tudi gel smo na enem koncu označili. Pri nalaganju plasti smo pazili, da med njimi ni bilo zračnih mehurčkov. Vse smo stisnili skupaj s katodno stranjo mreže (prozorno) ter jo vpeli v plastično ogrodje tako da je bil črni del mreže ob črnem delu ogrodja. Ogrdje smo skupaj s posodico z ledom vstavili v kadičko za prenos Western (Biorad, ZDA) in do vrha nalili pufer za prenos. Prenos je potekal 100 min pri konstantnem toku 200 mA. Po končanem prenosu smo razstavili sistem za prenos in membrano inkubirali v dH<sub>2</sub>O preko noči.

Naslednji dan smo membrano barvali približno 1 min z raztopino 500 µl ocetne kisline, 0,05 g barvila Serva blue, 20 ml metanola in dH<sub>2</sub>O do 50 ml. Membrano smo razbarvali z 50% metanolom. Ko se je membrana posušila smo iz nje izrezali proteinske lise.

N-terminalno aminokislinsko zaporedje smo določili z avtomatizirano Edmandovo degradacijo z uporabo avtomatskega sekvenatorja Procise Protein Sequencing System 492A (Applied Biosystems, ZDA) povezanega z analizatorjem 120A (Applied Biosystems, ZDA). Za iskanje podobnih aminokislinskih zaporedij v bazah podatkov smo uporabili orodja BLAST (Altschul in sod., 1997) na strežniku NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) in na strežniku MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>).

### 3.2.3.3 Cimografija z želatino

Cimografija je elektroforezna metoda osnovana na principu NaDS-PAGE, ki vključuje substrat, kopolimeriziran s poliakrilamidnim gelom, za detekcijo encimov in njihove aktivnosti. Vzorci so pripravljeni v standardnem vzorčnem pufru NaDS-PAGE brez kuhanja, kar pomeni da so vzorci pripravljeni brez denaturiranja aktivnih encimov prisotnih v vzorcu. Po elektroforezi se NaDS odstrani iz gela oz. cimograma z inkubacijo v raztopini Tritona X-100, kateri sledi inkubacija v ustrezrem razvijальнem pufru. Ta omogoča aktivnost encimom prisotnim v vzorcu, ki razgradijo substrat (npr. želatina) kopolimeriziran v gelu. Cimogram se nato barva s Coomassie brilliant blue in področja z encimsko aktivnostjo se pokažejo kot prozorne lise na temno obarvanem ozadju.

Pripravili smo 10% poliakrilamidni gel z NaDS in 1mg/ml želatine. Ločevalni gel smo pripravili tako, da smo za en gel (10%) debeline 1,5 mm pripravili 9 ml mešanice. Zmešali smo 2,26 ml 40 % raztopine akrilamida, 2,25 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 z 0,4% NaDS, 3,56 ml dH<sub>2</sub>O in 900 µl 1% želatine. Zamreženje gela smo sprožili z dodatkom 25 µl 10 % APS (amonijev persulfat) in 15 µl reagenta TEMED. To mešanico smo premešali in vlili med dva stekelca razmaknjena za 1,5 mm. Na vrh ulitega ločevalnega gela smo nalili 0,05% želatino v 0,3 M Tris-HCl, pH 8,8, da smo izravnali linijo gela. Gel se je nato trdil 30 do 45 minut. Želatino smo odlili in popivnali s filter papirjem ter nato vlili še 4% koncentrirni gel: 0,625 ml 40 % raztopine akrilamida, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 3,050 ml dH<sub>2</sub>O, 50 µl 10 % NaDS. Tik pred vlitjem smo dodali še 20 µl 10 % APS in 10 µl reagenta TEMED ter v gel namestili glavniček z desetimi žepki.

Vzorce smo pripravili tako, da smo zmešali proteinski vzorec in vzročni pufer v razmerju 1:1 in jih inkubirali na sobni temperaturi približno 20 do 30 minut.

Vzročni pufer smo pripravili tako, da smo zmešali 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 2 ml glicerola, 4 ml 10 % NaDS, dodali malo bromfenol modrega in 1,5 ml dH<sub>2</sub>O, alikvotirali po 1 ml in hranili v hladilniku.

Ploščici s strjenim gelom smo odstranili glavniček ter jo vpeli v aparaturo za elektroforezo in vlili elektroforezni pufer: pripravljen z mešanjem 29 g Tris , 144 g glicina, 10 g NaDS dopolnjenim z dH<sub>2</sub>O do 1L, pH 8,3. V žepke smo nanesli pripravljene vzorce in neobarvan standard velikosti (Pharmacia LMW Standard). Elektroforeza je potekala v navpični smeri pri konstantnem toku 30 mA/gel približno 70 min. Po končani elektroforezi smo gel inkubirali v raztopini 2,5% Triton X-100 na rotacijskem mešalniku 1 uro. Gel smo nato inkubirali 21h v razvijальнem pufru (100 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0,02% (w/v) Brij 35, pH 8,0).

Gel smo barvali z 0,1% raztopino barvila Coomassie brilliant blue ( PhastGel Blue R, GE Healthcare) 30 min in nato razbarvali z večkratno zamenjavo razbarvalnih raztopin: 30 minut v 30% etanolu in 10 % ocetni kislini in v 10 % etanolu in 5 % ocetni kislini preko noči.

Proteolitična aktivnost po razbarvanju je bila vidna kot pojav prozornih lis na temnem ozadju. Gele smo slikali s sistemom za slikanje gelov UVItec, ki je bil povezan z računalniškim programom UVI Photo.

### 3.2.3.3.1 Cimografija z želatino v prisotnosti inhibitorjev proteaz

Postopek je enak opisanemu zgoraj pri cimografiji, le da smo tu v vzorec in razvijalni pufer dodali ustrezno količino inhibitorja (preglednica 4). V vzorec smo dodali ustrezni inhibitor in inkubirali pri sobni temperaturi 15 do 20 minut ter nato dodali vzročni pufer in inkubirali vzorce še 20 minut pri sobni temperaturi.

#### Preglednica 4: Inhibitorji in njihove končne koncentracije

Inhibitor	Končna koncentracija inhibitorja dodanega v vzorec in v razvijalni pufer
Pefabloc	1 mg/ml (4 mM)
Kimostatin	60 µg/ml (100 µM)
Pepstatin	0,7 µg/ml (1µM)
E-64	10 µg/ml (28µM)
EDTA	0,5 mg/ml (1,3mM)
Aprotinin	2 µg/ml (0,3µM)
Antipain	50 µg/ml (74µM)
CnSPI	0,7mg/ml

#### 3.2.3.4 Test encimske aktivnosti s substratom FITC – hemoglobin

Pri testu smo za merjenje proteolitične aktivnosti kot substrat uporabili hemoglobin (Calbiochem, ZDA), ki je bil označen s fluorescein-izotiocianatom (FITC) (Sigma, Nemčija). Označeni proteini so bili pripravljeni po postopku, ki je opisan za pripravo FITC-kazeina (Twining in sod., 1984).

Najprej smo pripravili mešanico substrata in pufra tako da smo za vsak vzorec zmešali 200 µl pufra (0,1M Tris-HCl) in 10µl substrata FITC-hemoglobin. V mikrocentrifugirke smo zmešali 50 µl vzorca in 210 µl mešanice pufra in substrata in inkubirali 15 min pri 37°C. Po inkubaciji smo v mikrocentrifugirke odpipetirali 430 µl 5% TCA (prekinjevalec) in inkubirali 10 min pri sobni temperaturi. Mikrocentrifugirke smo nato centrifugirali 5 min pri 20 000 x g. Med tem smo si za vsak vzorec pripravili epruveto z 2,3 ml 0,5 M NaOH in po centrifugiranju iz vsake epice vanjo odpipetirali 200 µl supernatanta. Nastalemu produktu smo merili fluorescenco na pretočnem fluorimetru (Luminiscence Spectrometer LS 30, Perkin Elmer) pri ekscitaciji 490 nm in emisiji 525 nm.

V primeru meritve z uporabo inhibitorjev smo vzorcu ter mešanici s substratom dodali ustrezne količine inhibitorjev in pred dodatkom substrata inkubirali pri sobni temperaturi 10 do 15 min.

#### 3.2.3.5 Test encimske aktivnosti s substratom Z-Phe-Arg-AMC

Princip te metode je fluorimetrično določanje 7-aminometilkumarina, ki ga encimi odcepijo iz substrata Z-Phe-Arg-AMC. 50µl vzorca smo dopolnili do 500 µl z reakcijsko raztopino (0,1 M fosfat, 20 mM EDTA, pH 7), ki je vsebovala 10 mM cistein ter dodali 10 µl 5 mM substrata Z-Phe-Arg-AMC (Bachem, Nemčija). Inkubirali smo 10 min pri 37°C in nato reakcijo prekinili z dodatkom prekinjevalnega reagenta (2 ml 5 mM jodoacetne kisline). Nastanek produkta smo spremljali z merjenjem fluorescence na pretočnem fluorimetru Luminiscence Spectrometer LS 30 (Perkin Elmer, ZDA), pri ekscitaciji 370 nm in emisiji 460 nm. Spleti vzorec smo pripravili po enakem postopku, brez dodatka vzorca.

### 3.2.3.6 Določanje specifičnosti cepitve z inzulinom

Specifičnost cepitve proteaze, ki smo jo dobili z afinitetno kromatografijo, smo določili z analizo peptidov, ki so nastali pri razgradnji oksidirane verige govejega inzulina B. Inzulin B ima v svojem zaporedju dostopnih veliko različnih prosto dostopnih peptidnih vezi za cepitev. Peptidne verige inzulina B smo izpostavili hidrolizi s proteaznima vzorcema vrh 2 in vrh 4 pri sobni temperaturi 21 ur. Substrat inzulin B (Feinbiochemica Serva, Heidelberg) smo raztopili v 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pufru in pripravili dve različni koncentraciji: 1 mg/ml in 0,1 mg/ml. Substratu smo dodali 50  $\mu\text{l}$  vzorca (vrh 4 ali vrh 2) in inkubirali 21 ur pri sobni temperaturi. Kontrolo smo pripravili enako, le da smo namesto vzorca dodali 50  $\mu\text{l}$  pufra. Peptidnim frakcijam smo določili molekulske masne z uporabo masne spektrometrije. Masno analizo je izvedel dr. Marko Fonovič z Odseka za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo na Institutu Jožef Stefan z elektrosprej ionizacijo (LC-MS-MS) na masnem spektrometru MSD Trap XCT Ultra (Agilent, ZDA). Mesta cepitve smo določili s primerjavo mas posameznega peptida z masami peptidov z znanim zaporedjem.

### 3.2.3.7 Določanje pH-optimuma

Za določanje pH-optimuma smo spremljali spremembe aktivnosti vzorcev (vrh 2 in vrh 4) na cimogramih z želatino (po čiščenju s FPLC) v odvisnosti od pH razvijalnega pufra v katerem so bili cimogrami po elektroforezi inkubirani. Pripravili smo pufre z razponom pH od pH 3 do pH 11. Za razvijalni pufer s pH 3 in 4 smo pripravili 0,25 M NaAc in umerili pH z ocetno kislino, za pH 5 in 6 smo pripravili 0,25 M MES in umerili pH s HCl, za pufer s pH 7, 8 in 9 smo uporabili 0,25 M Tris-HCl in za pH 10 in 11 0,25 M glicin umerjen z NaOH.

### 3.2.3.8 Vpliv kofaktorjev na aktivnost

Pri vzorcu vrh 4 smo ugotavljali tudi vpliv različnih kofaktorjev na proteolitično aktivnost s pomočjo cimogramov z želatino. V predhodnem poskusu smo ugotovili da je aktivnost najmočnejša pri pH 9, zato smo v pufru 0,25 M Tris-HCl, pH 9, pripravili kofaktorje s 5 mM koncentracijo. Testirali smo vpliv nasednjih kofaktorjev: DTT,  $\text{Fe Cl}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  in  $\text{MnCl}_2$ .

### 3.2.4 Izolacija in karakterizacija proteaz iz drugih virov

#### 3.2.4.1 Izolacija subtilizina

##### 3.2.4.1.1 Gojenje bakterije *Bacillus subtilis* za izolacijo subtilizina

- Gojenje na trdnem gojišču - optimizacija gojišč

Pripravili smo po 100 ml trdnih gojišč (preglednica 5) in nanje nacepili bakterije *B. subtilis*. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37°C in nato ocenili rast in prisotnost zunajceličnih proteolitičnih encimov:

**Preglednica 5: Optimizacija gojišč za gojenje bakterije *B. subtilis***  
**sestava gojišča (100ml)**

YT	tripton ..... 16g kvasni ekstrakt..... 10g NaCl..... 5g	
A	kvasni ekstrakt .....0,5g mleko v prahu ..... 1g	
B	100ml 1x SS* kvasni ekstrakt ..... 5g mleko v prahu ..... 2g	
C	100ml 1xSS* kvasni ekstrakt ..... 5g kazein hidrolizat ..... 2g	
D	100ml 1xSS kvasni ekstrakt ..... 5g škrab ..... 2g	

\* 1xSS (0,6g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,4g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1g Na-citrat x 2H<sub>2</sub>O, 0,02g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O v 100 ml dH<sub>2</sub>O)

- Gojenje v tekočem gojišču

Pripravili smo 200 ml tekočega gojišča (0,5% kvasni ekstrakt, 1% mleko) in ga avtoklavirali. Prekonočno kulturo smo pripravili v epruveti s tekočim gojiščem LB. S cepilno zanko smo ob gorilniku nacepili bakterije *B. subtilis* v 2 epruveti, pri čemer je ena služila za kontrolo. Naslednji dan smo ob gorilniku sterilno prelili po 100 ml gojišča v vsako od dveh erlenmajeric (1 L), ter inokulirali po 1 ml prekonočne kulture. V eno izmed erlenmajeric smo dodali še 1 ml 10 % glukoze. Inkubirali smo pri 37°C, 220 obr./min in rast bakterij spremljali spektrofotometrično z merjenjem OD<sub>600</sub> vsako uro naslednjih 9 ur in še 4 ure naslednji dan. Naslednji dan smo izmerili OD<sub>600</sub> še 4x. Nato smo vsebini erlenmajeric centrifugirali 2 min pri 16000xg. Ob vsaki uri smo vzorec supernatanta

zamrznili za analizo s cimografijo. Pelet smo raztopili z 1 ml fiziološke raztopine (1% NaCl) in dobro resuspendirali ter izmerili OD<sub>600</sub>.

Naslednji dan smo gojili *B.subtilis*, da bi pridobili zadostno količino vzorca za nanašanje na afinitetno kromatografijo. Pripravili smo 1 L gojišča (0,5% kvasni ekstrakt, 1% mleko) in ga avtoklavirali. V 4 1 L erlenmajerice smo dodali po 250 ml gojišča in 2,5 ml prekonočne kulture *B.subtilis*. Inkubirali smo pri 37°C, 220 obr./min, 24 ur.

### 3.2.4.1.2 Izolacija proteaz bakterije *B.subtilis*

Vsebino erlenmajeric smo centrifugirali 20 min pri 7000 x g, da smo ločili bakterije od gojišča. Del supernatanta (250 ml) smo filtrirali (0,2 µm) za direkten nanos na afinitetno kromatografijo, v drugem delu supernatanta (750ml) pa smo proteine oborili z amonijevim sulfatom. Postopoma smo dodajali 400 g amonijevega sulfata (80%), mešali z magnetnim mešalom 2 uri in pustili stati čez noč. Naslednji dan smo oborino dializirali proti vezальнemu pufru in odstranili netopne snovi s centrifugiranjem 10 minut pri 16000 x g. Tako pripravljeno raztopino proteinov iz gojišča smo nanesli na afinitetno kromatografsko kolono.

### 3.2.4.1.3 Test encimske aktivnosti s substratom Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC

Različne količine vzorca (5, 10, 25, 50 in 100 µl) smo dopolnili do 500 µl s fosfatnim pufrom pH 7,8 (100 ml 0,1M NaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O in 4ml 0,1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ter dodali 15 µl 1 mM substrata Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC (Bachem, Nemčija). Inkubirali smo 15 min pri 37°C in nato reakcijo prekinili z dodatkom 2 ml 0,2 M HCl. Nastanek produkta smo spremljali z merjenjem fluorescence na pretočnem fluorimetru Luminiscence Spectrometer LS 30 (Perkin Elmer, ZDA), pri ekscitaciji 370 nm in emisiji 460 nm. Spleti vzorec smo pripravili po enakem postopku, brez dodatka vzorca.

Aktivnosti smo merili tudi v prisotnosti inhibitorja kimostatina. V tem primeru smo vzorcu s pufrom dodali inhibitor v 100µM končni koncentraciji in inkubirali 10 min ter nato nadaljevali po zgoraj opisanem postopku.

### 3.2.4.2 Izolacija tripsina iz delno očiščene mešanice tripsinov iz goveda

Pripravili smo raztopino delno očiščene mešanice tripsinov iz goveda (Fluka) s koncentracijo 1 mg/ml. Na kolono smo nanesli 50 ml te raztopine in nespecifično vezane proteine spirali z vezальнim pufrom do absorbcijske pri 280 nm (A<sub>280</sub>) nižje od 0,03. Vezane proteine smo eluirali s spremembom pH z elucijskim pufrom (20 mM HCl).

## 4 REZULTATI

### 4.1 PRIPRAVA AFINITETNE KROMATOGRAFIJE

#### 4.1.1 Priprava rekombinantnega knispina- rCnp

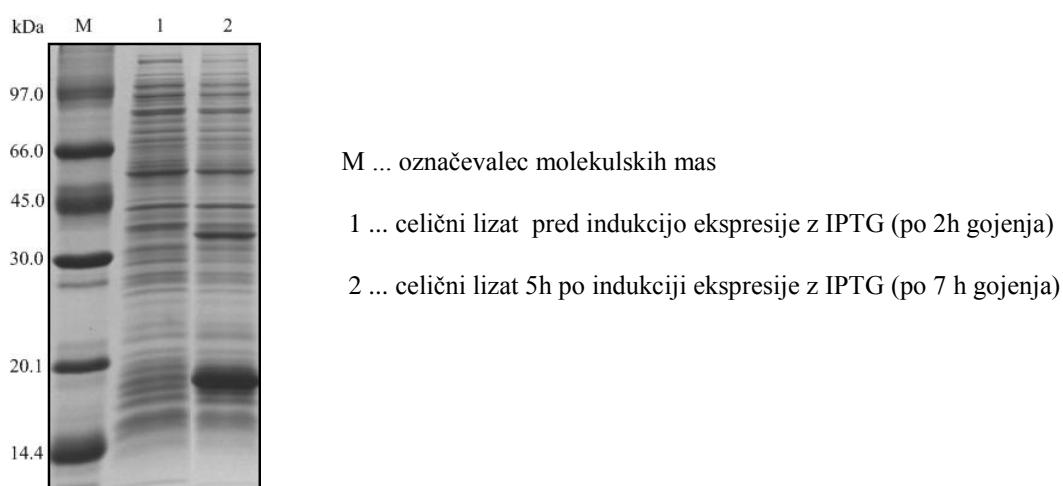
##### 4.1.1.1 Heterologno izražanje knispina

Za izražanje rekombinantnega knispina (rCnp) smo uporabili bakterijski ekspresijski sistem *E.coli* BL21(DE3) pET11a::CnSPI. Inkubacija trajne kulture je v celoti potekala 7 h, v tekočem gojišču LBA na stresalniku pri 220 obr/min in 37°C. Rast smo spremljali spektrofotometrično z merjenjem OD<sub>550</sub> (preglednica 6) in izražanje spodbudili, ko je OD<sub>550</sub> dosegla vrednost približno 0,5.

**Preglednica 6: Optična gostota celic v odvisnosti od časa gojenja**

	čas gojenja (h)	OD <sub>550</sub>	ocenitev gostote celic ( $10^8$ cel/ml)
indukcija z IPTG →	2	0,44	3,37
	3	1,36	10,30
	4	1,67	13,02
	5	1,84	14,50
	6	1,97	15,85
	7	2,11	17,35

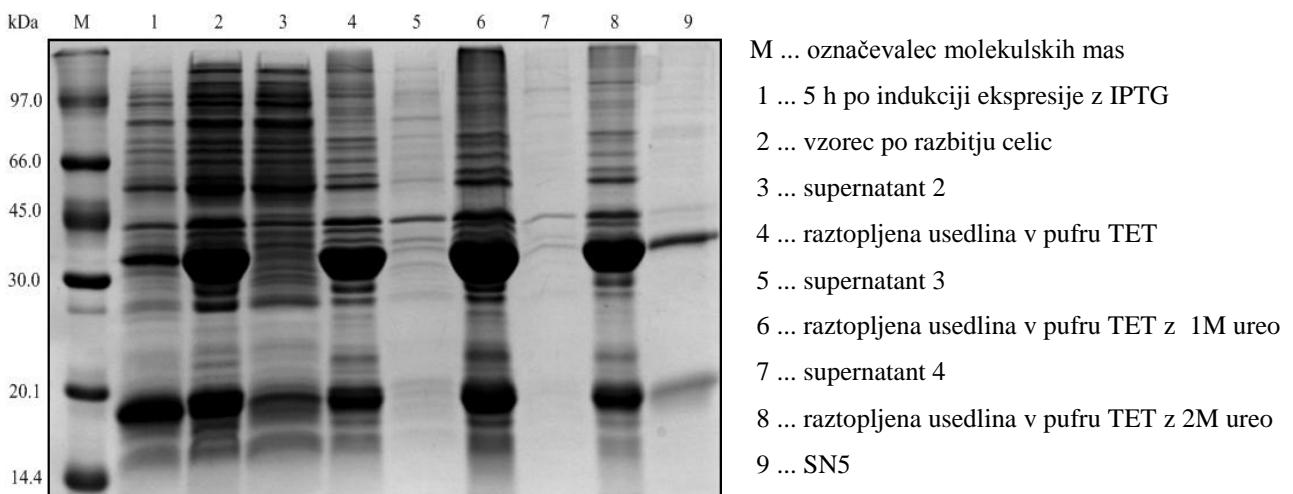
Z NaDS-PAGE smo analizirali po 20µl suspenzije, ki smo jo sterilno odvzeli pred in po indukciji z IPTG. Povečana sinteza želenega rekombinantnega proteina 5 ur po spodbuditvi izražanja z dodatkom IPTG, je razvidna iz slike 5 (linija 2) kot močnejša lisa v območju 18 kDa.



**Slika 5: Izražanje rCnp – analiza NaDS-PAGE celičnega lizata *E.coli* BL21(DE3) pET11a::CnSPI.**

#### 4.1.1.2 Čiščenje knispina

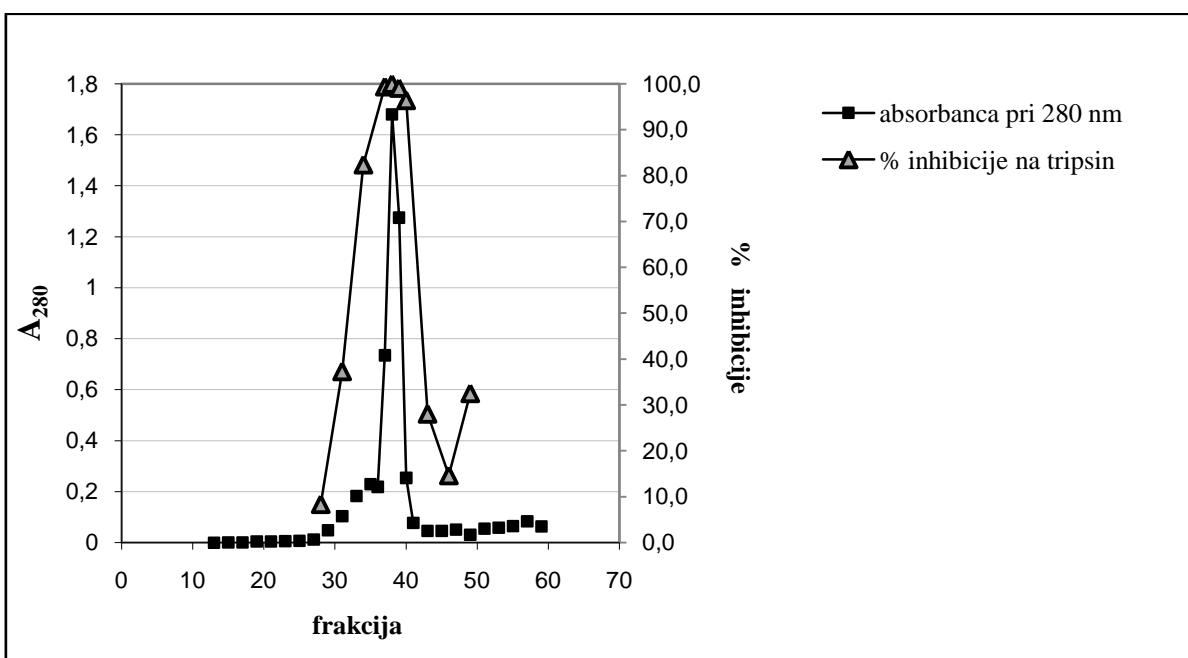
Po 7 urah gojenja smo vsebini erlenmajeric centrifugirali 10 min pri 4000 x g in usedlino raztopili v pufru TET. Bakterijske celice smo lizirali v treh korakih zamrzovanja in odmrzovanja in nato še sonicirali. Netopno frakcijo smo ločili s centrifugiranjem (15 min, 4000xg) in raztopljanjem v pufru TET in nato postopoma v istem pufru z 1 M, 2 M ureo ter pred nanosom na gelsko filtracijo še z 8 M ureo.



Slika 6: Čiščenje rCnp – analiza NaDS-PAGE celičnega lizata *E.coli* BL21(DE3) pET11a::CnSPI

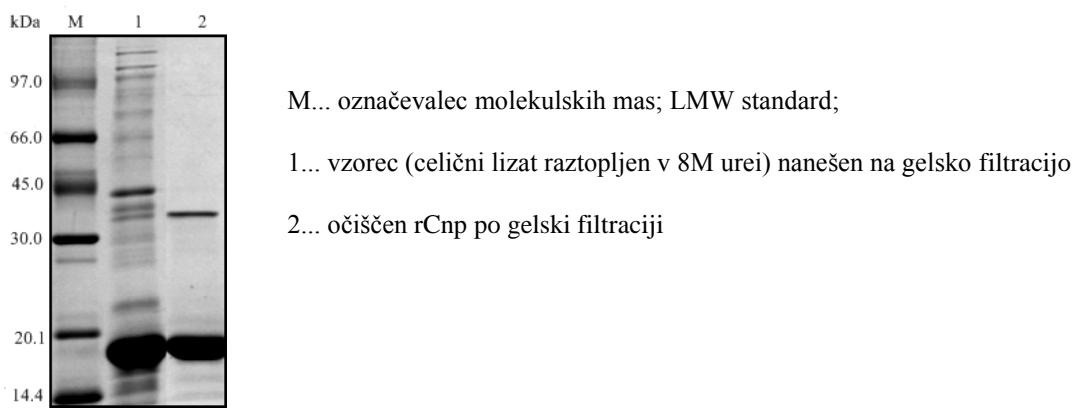
Izražanje rCnp je znotrajcelično, zato je bilo potrebno celice najprej lizirati oz. razbiti (slika 6, stolpec 2). Knispin se izraža v glavnem v obliki netopnih inkluzijskih teles, zato smo jih raztopljalji v pufru TET z poviševanjem koncentracije uree (1M in 2M), da smo delno očistili protein. Topne frakcije celičnega lizata predstavljajo na sliki 6 stolpci 3, 5, 7 in 9. Netopne frakcije celičnega lizata pa stolpcji 2, 4, 5 in 8.

Zadnji korak čiščenja je predstavljala gelska filtracija. Po raztopljanju v pufru TET z 8 M ureo (preko noči) smo rekombinantni knispin čistili z gelsko filtracijo. V frakcijah smo izmerili absorbanco pri 280 nm ter spremljali prisotnost inhibitorja z merjenjem inhibitorne aktivnosti na tripsin s testom BAPNA (slika 7).



**Slika 7: Gelska filtracija rCnp na koloni Superdex S-200 in inhibitorna aktivnost frakcij na tripsin**  
 Inhibitorna aktivnost v frakcijah je bila merjena s testom inhibicije tripsina s substratom BAPNA.

Inhibitor serinskih proteaz knispin se je po gelski filtraciji eluiral v simetričnem proteinskem vrhu. Inhibitorna aktivnost na tripsin je lepo sovpadala z elucijskim vrhom. Frakcije, ki so kazale inhibitorno aktivost, smo skoncentrirali z ultrafiltracijo in jih analizirali z NaDS-PAGE. Le-ta je pokazala da je bila gelska filtracija uspešna. Dobili smo očiščen rekombinantni knispin, na NaDS-PAGE viden kot proteinska lisa z molekulsko maso 18kDa (slika 8, linija 2). Prisotna je še lisa pri 36 kDa, ki ustreza dimeru knispina.



**Slika 8: Čiščenje rCnp – analiza NaDS-PAGE očiščenega rCnp iz celičnega lizata raztopljenega v pufru TET z 8M ureo**

#### 4.1.1.3 Določitev koncentracije knispina

Knispinu, ki smo ga pripravili s heterolognim izražanjem v *E.coli*, smo pred vezavo na nosilec določili še koncentracijo s pomočjo Beer-Lambertovega zakona. Vzorcem skoncentriranim z ultrafiltracijo smo izmerili  $A_{280} = 2,774$ , širina kivete (1 cm) pri tem predstavlja dolžino optične poti, molarni absorpcijski koeficient ( $\epsilon$ ) inhibitorja pa znaša 1,886. Podane smo imeli vse spremenljivke, da smo lahko iz enačbe  $A = \epsilon \times l \times c$  izračunali koncentracijo, ki znaša 1,47 mg/ml proteina.

#### 4.1.2 Vezava knispina na sefarozo, aktivirano s CNBr

Na Sefarozo, ki je bila predhodno že aktivirana s CNBr, smo vezali rekombinantni inhibitor serinskih proteaz iz gobe *Clitocybe nebularis* knispin (rCnp).

Uspešnost vezave rCnp na Sefarozo smo ugotavljali tako, da smo vzorec Sefaroze z vezanim knispinom testirali za inhibicijo aktivnosti na tripsin s substratom BAPNA (opis v točki 3.2.1.1.4). Uspešnost vezave smo določili tudi z merjenjem  $A_{280}$  v odnučiranem supernatantu.

**Preglednica 7: Uspešnost vezave inhibitorja na Sefarozo**

	$A_{280}$
rCnp	2,774
supernatant po vezavi	0,961
<hr/>	
	$A_{405}$
pozitivna kontrola(brez inhibitorja)	0,2908
Sefarzo z vezanim rCnp	0,1600

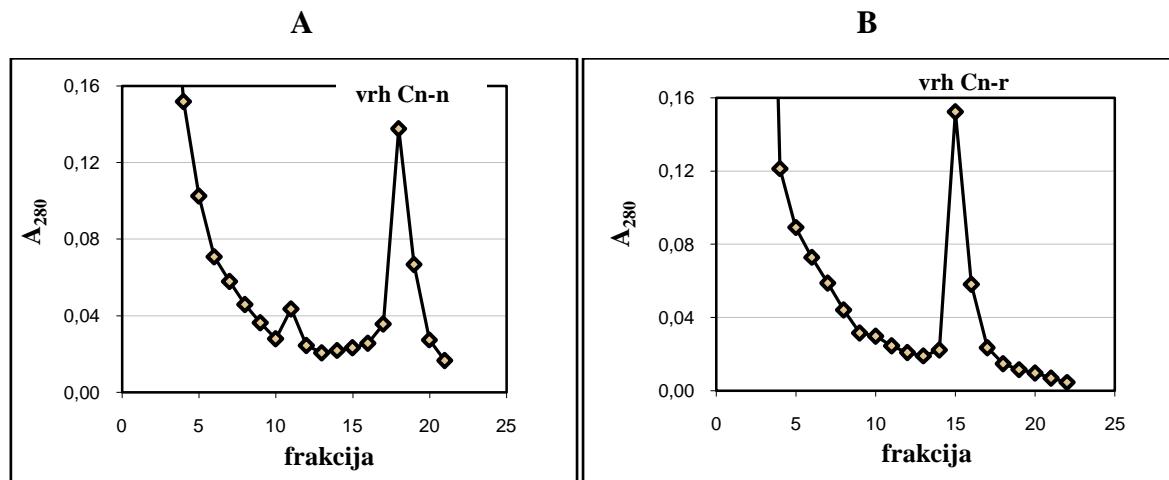
Z merjenjem  $A_{280}$  v supernatantu po vezavi smo potrdili vezavo inhibitorja na Sefarozo. S testom inhibicije tripsina s substratom BAPNA smo potrdili uspešnost vezave inhibitorja na Sefarozo in ohranitev inhibitorne aktivnosti po vezavi na Sefarozo.

## 4.2 IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA SERINSKIH PROTEAZ IZ PROSTOTROSNIC

### 4.2.1 Izolacija serinskih proteaz iz prostotrosnic

Afinitetno kromatografijo smo izvedli z vezanim inhibitorjem, ki je bil izoliran iz trosnjakov (CnSPI) in z rekombinantnim inhibitorjem (rCnp), ki smo ga pripravili z izražanjem v bakterijskem ekspresijskem sistemu (poglavlje 4.1). Prvotno smo želeli izolirati serinske proteaze iz naravnih virov, iz katerih so izolirali inhibitorje serinskih proteaz. V ta namen smo uporabili vodne izvlečke iz prostotrosnice meglenke (*Clitocybe nebularis*), iz katere je bil izoliran CnSPI. Izolacijo smo poizkusili še iz prostotrosnice orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*) ter iz micelija meglenke.

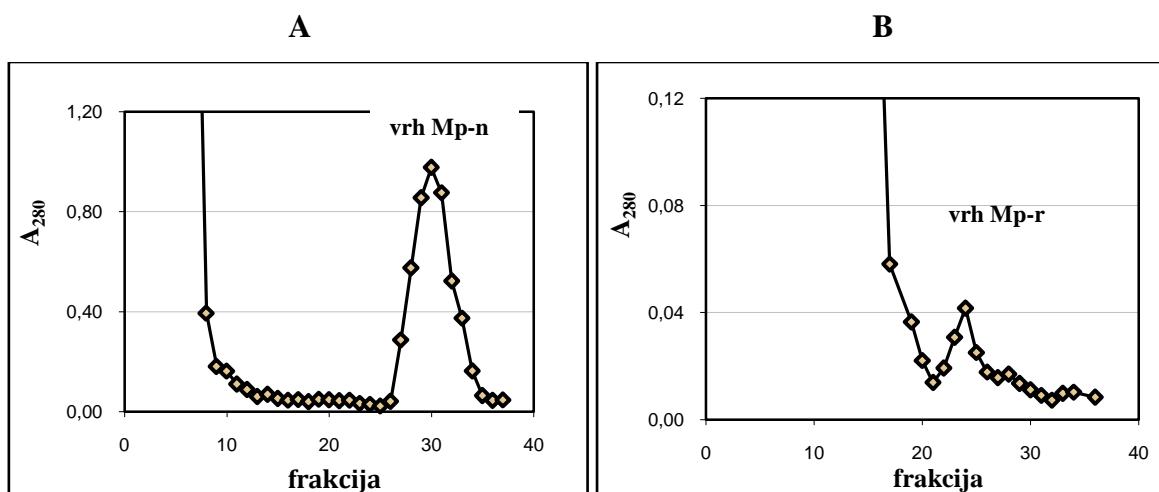
Za izolacijo smo pripravili vodne izvlečke meglenke (*Clitocybe nebularis*) in orjaškega dežnika (*Macrolepiota procera*), ki smo jih ločeno nanašali na kolono po približno 400 ml. Vezane proteine smo eluirali s spremembom pH. Postopek smo večkrat ponovili in dobili ponovljive rezultate. Med potekom afinitetne kromatografije smo spremljali A<sub>280</sub> frakcij in vrednosti prikazali v grafu (slike 9, 10, 11). Eluirane vrhove smo ločeno skoncentrirali z ultrafiltracijo in jih analizirali z NaDS-PAGE.



Slika 9: Afinitetna kromatografija izvlečka meglenke (*Clitocybe nebularis*) na CnSPI – Sefarozi (A) in rCnp – Sefarozi (B)

Vrh Cn-n predstavlja proteine iz izvlečka meglenke, vezane na naravni inhibitor CnSPI, vrh Cn-r pa proteine iz izvlečka meglenke, vezane na rekombinantni inhibitor knispin (rCnp).

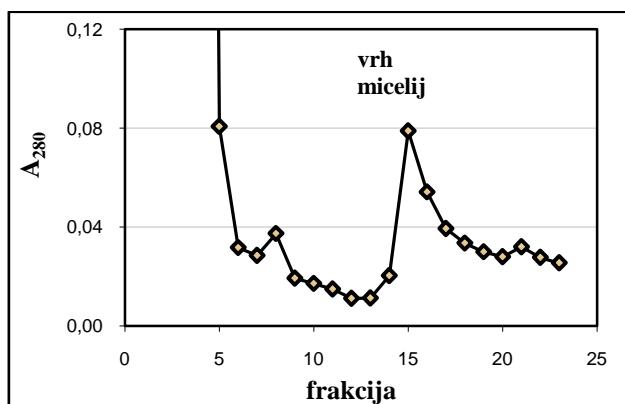
Rezultati afinitetnih kromatografij izvlečkov meglenke z vezanim naravnim inhibitorjem in z vezanim rekombinantnim inhibitorjem so si bili med seboj precej podobni. Po spiranju nevezanih proteinov, smo po spremembami pH dobili lepo ločena elucijska vrha (slika 9).



**Slika 10:** Afinitetna kromatografija izvlečka orjaškega dežnika (*Macrolepiota procera*) na CnSPI – Sefarozi (A) in rCnp – Sefarozi (B)  
 Vrh Mp-n predstavlja proteine iz izvlečka orjaškega dežnika, vezane na naravni inhibitor CnSPI, vrh Mp-r pa proteine iz izvlečka orjaškega dežnika, vezane na rekombinantni inhibitor knispin (rCnp).

Afinitetni kromatografski izvlečki orjaškega dežnika sta se glede na vezan naravni oz. rekombinantni inhibitor nekoliko bolj razlikovali (slika 10). V primeru rekombinantnega inhibitorja je bil vrh eluiranih proteinov dosti manjši.

Z afinitetno kromatografijo z vezanim knispinom smo poizkusili izolirati tudi proteaze iz micelija meglenke (slika 11). Elucijski vrh je bil v primerjavi z vzorcem iz izvlečka meglenke (vrhom Cn-r, Slika 9B) nekoliko manjši.



**Slika 11:** Afinitetna kromatografija izvlečka micelija meglenke na rCnp Sefarozi

#### 4.2.1.1 Optimizacija izolacije serinskih proteaz iz prostotrosnic

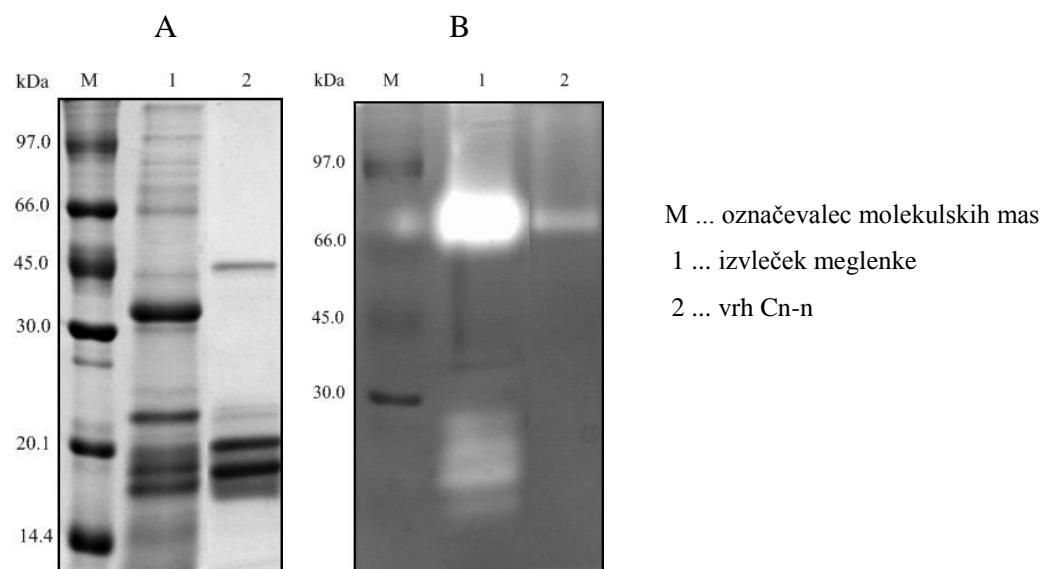
Optimizirali smo način elucije proteaz iz prostotrosnic v postopku afinitetne kromatografije. Kot elucijske pufre smo poleg 20 mM HCl preizkusili še 20% DMSO, 4% Brij in 6 M ureo. 20% DMSO in 4% Brij sta se izkazala za neustrezna eluenta, saj po eluciji frakcij in merjenju  $A_{280}$  ter izrisu elucijskega diagrama nismo dobili elucijskega vrha. 6 M urea se je izkazala kot ustrezni eluent, vendar je bil elucijski vrh nižji kot pri uporabi 20 mM HCl. Kot najbolj ustrezni eluent za izolacijo serinskih proteaz iz prostotrosnic se je izkazala sprememba pH z uporabo 20 mM HCl.

#### 4.2.2 Karakterizacija izoliranih proteaz

Proteine, ki smo jih dobili pri afinitetni kromatografiji z vezavo na inhibitorja CnSPI in rCnp, smo analizirali z elektroforeznimi metodami (poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS in cimografijo z želatino), N-terminalno analizo, testi encimske aktivnosti in testi specifične inhibicije. Izbrane vzorce smo nadalje očistili s tekočinsko kromatografijo za hitro ločevanje proteinov (FPLC). S pomočjo teh analiz smo žeeli kar se da dobro karakterizirati proteaze, ki smo jih izolirali.

##### 4.2.2.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE) in cimografija z želatino

Z analizo NaDS-PAGE smo ocenili molekulske mase proteinov, ki smo jih izolirali z vezavo na CnSPI oz. rCnp. NaDS-PAGE analiza vrha Cn-n (slika 12A, stolpec 2) je pokazala več proteinskih lis, katerih ocenjene molekulske mase so približno 17, 18, 20, in 45kDa, in šibkeje vidni lisovi okoli 22 in 23 kDa.



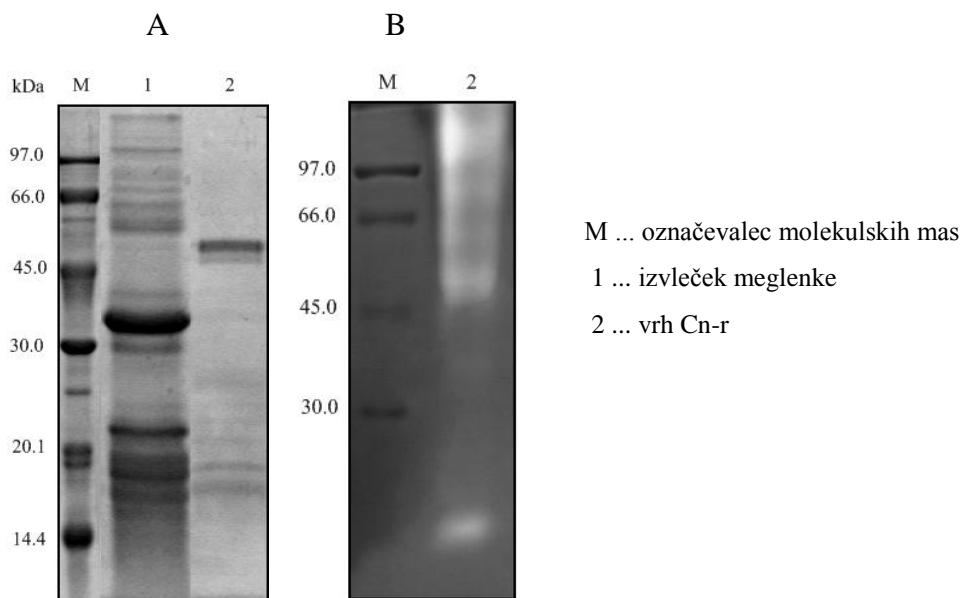
Slika 12: Analiza vzorca vrh Cn-n z NaDS-PAGE (A) in cimogram z želatino (B)

Prisotnost proteaz v izoliranih vzorcih smo preverili preko prisotne encimske aktivnosti oz. encimske razgradnje substrata na cimogramu z želatino. Le-ta po barvanju prikazuje področja s proteolitično aktivnostjo, kjer encimi razgradijo želatino, kot prozorne lise brez želatine na temno obarvanem ozadju.

Iz slike 12 B je razvidno, da so proteaze prisotne v izvlečku, prav tako pa smo jih iz njega tudi izolirali. V izvlečku so prisotne proteaze različnih velikosti; proteaze z nižjo molekulsko maso so nekoliko manj aktivne kot tiste z višjo. Najzanimivejša proteinska lisa na NaDS-PAGE je lisa z ocenjeno molsko maso 45 kDa (slika 12A, stolpec 2), saj smo tudi na cimogramu v tem območju dokazali encimsko aktivnost.

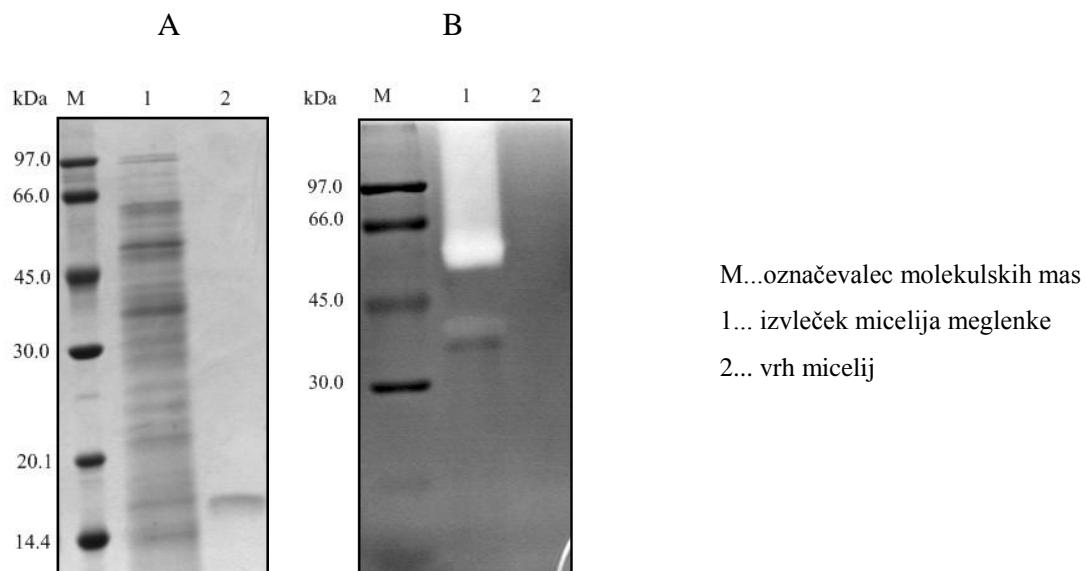
Analiza NaDS-PAGE vrha Cn-r (slika 13A, stolpec 2) je pokazala več proteinskih lis, katerih ocenjene molekulske mase so približno 17, 18, 20, 22 in 23 kDa in najmočneje vidna lisa pri 47 kDa.

Slika 13B prikazuje cimogram z želatino, ki kaže na močno aktivnost proteaz v območju proteinske lise z molsko maso 46-47 kDa ter manjšo aktivnost v spodnjem delu. Za nadaljnjo karakterizacijo proteaz, smo vzorec dodatno očistili s FPLC (poglavje 4.2.2).



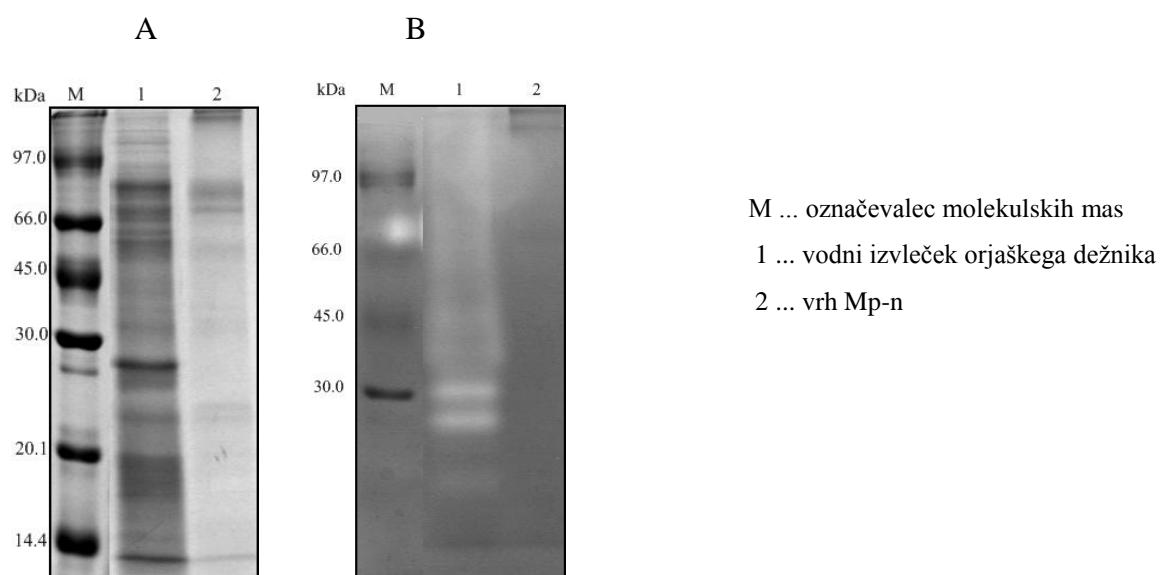
Slika 13: Analiza vzorca vrh Cn-r z NaDS-PAGE (A) in cimogram z želatino(B)

Analiza NaDS-PAGE vzorca vrh micelij (slika 14A) je pokazala proteinsko liso v velikosti 16 kDa, vendar z analizo cimografije z želatino (slika 14B) nismo potrdili proteolitične aktivnosti.



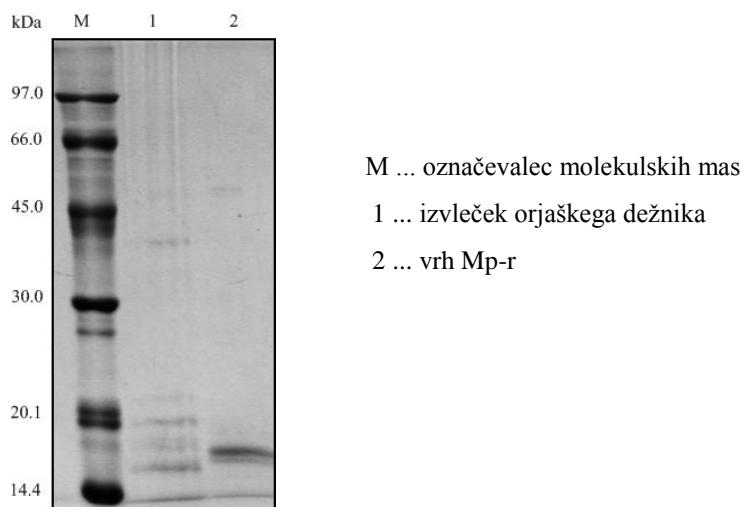
Slika 14: Analiza vzorca vrh micelij megleanke z NaDS-PAGE

Analiza vzorca vrh Mp-n izoliranih proteinov iz izvlečka orjaškega dežnika z vezavo na naravni inhibitor CnSPI z NaDS-PAGE je pokazala več proteinskih lis z ocenjenimi molekulskimi masami 25, 26, 48, 68 in 70 kDa (slika 15A). Cimogram z želatino (slika 15B) je pokazal aktivnost proteaz v izvlečku, medtem ko v izoliranem vzorcu vrh Mp-n aktivnosti ni bilo.



Slika 15: Analiza vzorca vrh Mp-n z NaDS-PAGE (A) in cimogram z želatino (B)

Pri vezavi na rekombinantni inhibitor knispin je vzorec (vrh Mp-r) na gelu precej drugačen. V nasprotju z vrhom Mp-n pri katerem so bile prisotne lise z visokimi molekulskimi masami, so tu ocenjene molekulske mase lis manjše, 16, 17 in 47 kDa (slika 16). Proteolitične aktivnosti vzorca vrh Mp-r prav tako kot za vrh Mp-n na cimogramu z želatino ni bilo.



**Slika 16: Analiza vzorca vrh Mp-r z NaDS-PAGE**

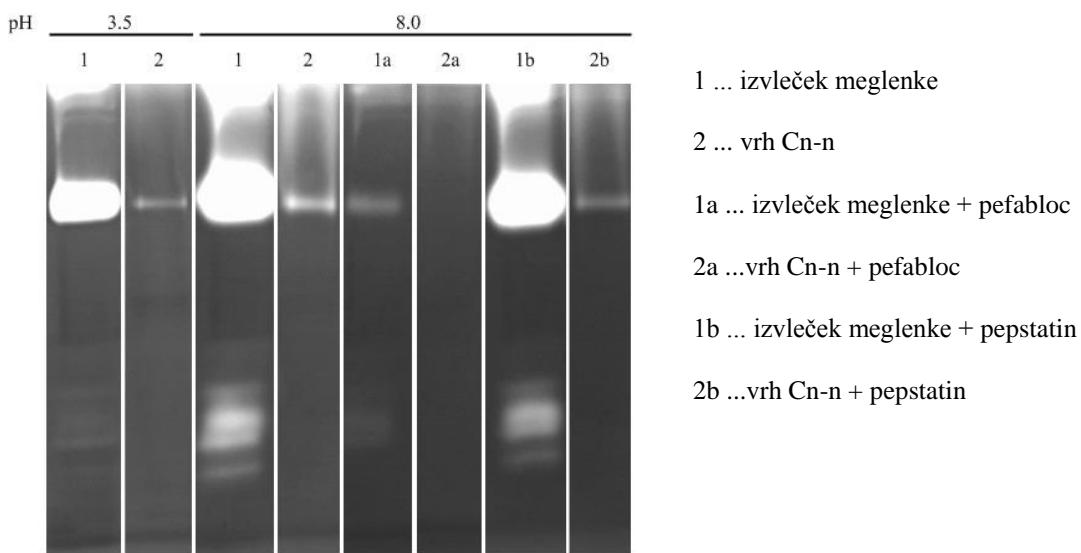
#### 4.2.2.2 Testi encimske aktivnosti

Proteaze lahko delno karakteriziramo s pomočjo specifičnih inhibitorjev, ki ireverzibilno inhibirajo le razred proteaz za katere je specifičen. Tako smo za ugotavljanje tipa proteolitične aktivnosti uporabili inhibitorje pefabloc (inhibitor serinskih proteaz), pepstatin (inhibitor aspartatnih proteaz) in E-64 (inhibitor cisteinskih proteaz). Inhibicijo smo ugotavljali z metodo cimografije z želatino in testom FITC-hemoglobin. Aktivnosti izoliranih proteaz smo primerjali z aktivnostmi po dodatku različnih specifičnih inhibitorjev.

##### 4.2.2.2.1 Test encimske aktivnosti s substratom Z-Phe-Arg-AMC

Med postopkom izolacije proteinov iz izvlečka megleanke z uporabo afinitetne kromatografije z vezanim CnSPI, smo spremljali encimsko aktivnost frakcij na substrat Z-Phe-Arg-AMC. Aktivnosti v vzorcih s tem testom nismo zasledili, verjetno je bil razlog premajhna količina izoliranih encimov.

#### 4.2.2.2.2 Določanje encimske aktivnosti s cimografijo z želatino



**Slika 17:** Cimogram z želatino- prikaz aktivnosti izoliranih proteaz pri pH 3,5 in pH 8,0 (1,2) ter aktivnosti ob prisotnosti razredno specifičnih inhibitorjev pefabloc (1a, 2a) in pepstatin (1b, 2b)

Iz slike 17 je razvidno, da je aktivnost izoliranih proteaz večja pri alkalnem pH. Aktivnost proteaz v soku skoraj popolnoma inhibira inhibitor serinskih proteaz pefabloc (1a), medtem ko inhibitor aspartatnih proteaz pepstatin le delno (1b). Lisa aktivnosti izoliranih proteaz popolnoma izgine v primeru inhibicije aktivnosti z inhibitorjem pefabloc (2a). Inhibitor pepstatin le delno inhibira izolirane proteaze (2b).

#### 4.2.2.2.3 Določanje encimske aktivnosti s testom FITC-hemoglobin

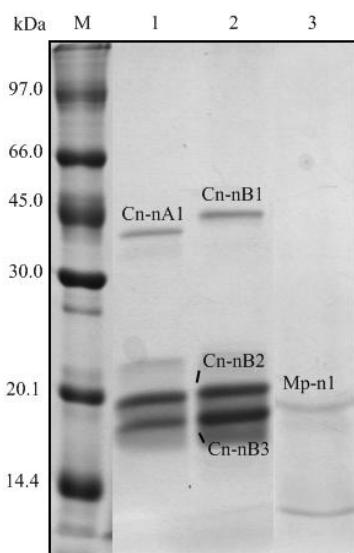
##### Preglednica 8: Aktivnosti izoliranih proteaz in njihove aktivnosti v prisotnosti inhibitorja pefabloc

Vzorec	aktivnost	inhibicija s pefabloc-om	Odstotek inhibicije %
sok megleanke	4027,4	2178,9	45,9
vrh Cn-n ponovitev 1 (A=0,6553)	554,0	174,1	68,6
vrh Cn-n ponovitev 2 (A=0,1096)	182,4	20,35	88,8

Z aktivnostjo vzorca na substrat FITC-hemoglobin smo dokazali prisotnost proteaz v vzorcih Cn-n in Cn-r. Z inhibicijo s specifičnim inhibitorjem pefabloc, ki ireverzibilno inhibira serinske proteaze, smo lahko izolirane proteaze karakterizirali kot serinske. Inhibicijo smo izvedli tudi z uporabo inhibitorja E-64, ki specifično inhibira cisteinske proteaze. Le-ta vzorcev ni inhibiral, kar kaže na to da proteaze niso cisteinske. Vzorci vrh Mp-n in Mp-r ter vrh micelij s testom FITC-Hb niso kazali aktivnosti.

#### 4.2.2.3 Določanje N-terminalnega aminokislinskega zaporedja

Vzorce smo ločili z NaDS-PAGE in po prenosu proteinov iz vzorcev na membrano PVDF najmočneje vidnim lisam določili N-terminalno aminokislinsko zaporedje proteinov (slika 18). Analiza je pokazala, da je bilo v posameznih vzorcih prisotnih več različnih proteinov z različnimi N-terminalnimi aminokislinskimi zaporedji (preglednica 9).



Cn-n ... proteini izolirani iz izvlečka meglenke

Mp-n ... proteini izolirani iz izvlečka orjaškega dežnika

Slika 18: Analiza NaDS-PAGE proteinov, ki smo jim določili N-terminalno zaporedje

Preglednica 9: Določena N-terminalna aminokislinska zaporedja

	kDa	vir	1	5	10	15	20
Cn-nA1	44	meglenka (A=0,4240)	V T G X N A X L P A				
Cn-nB1	45	meglenka (A=0,6553)	K G G H S V P L T N F X N A I Y X X X I	A			
Cn-nB2	20	meglenka (A=0,6553)	N V P F G N Y V I D Q I G Y T	S A A S L T S T X F X X A F G			
Cn-nB3	18	meglenka (A=0,6553)	N V P S G	S P D Y T	P A E F D		
micelij	16	micelij melenke	N E K T S X T R P	X	G X		
Mp-n1	19	orjaški dežnik (A=0,4540)	S V Q T Y X I X N L	N G X X G X V X X V			

Za iskanje podobnih aminokislinskih zaporedij v bazah podatkov smo uporabili orodja BLAST na strežniku NCBI in BLAST MEROPS.

Za vzorec Cn-nB1 smo ugotovili homologijo z že znanimi proteini. Za izolirane proteine iz megleinke Cn-nB1, smo določili zaporedje N- konca dolgo 20 aminokislin KGGHSVPLTNFXNAIYXXXI. NCBI BLAST pokaže 75 % podobnosti in 70% identičnosti z zaporedjem KGGHSVPLSNFMNAQYFTEI (slika 19), ki ustreza aspartatni proteazi iz družine A1 najdeni v genomu prostotrosnice *Laccaria bicolor*.

Cn-nB1	1	KGGHSVPLTNFXNAIYXXXI	20
ApA1	82	KGGHSVPLSNFMNAQYFTEI	101

**Slika 19:** Primerjava N-terminalnih zaporedij Cn-nB1 in aspartatne proteaze ApA1

Blast MEROPS je za 14 AK dolgo zaporedje GHSVPLTNFXNAIY vzorca Cn-nB1 pokazal 79 % identičnosti z aspartatno proteazo saharopepsin iz genoma prostotrosnice *Laccaria bicolor* (slika 20).

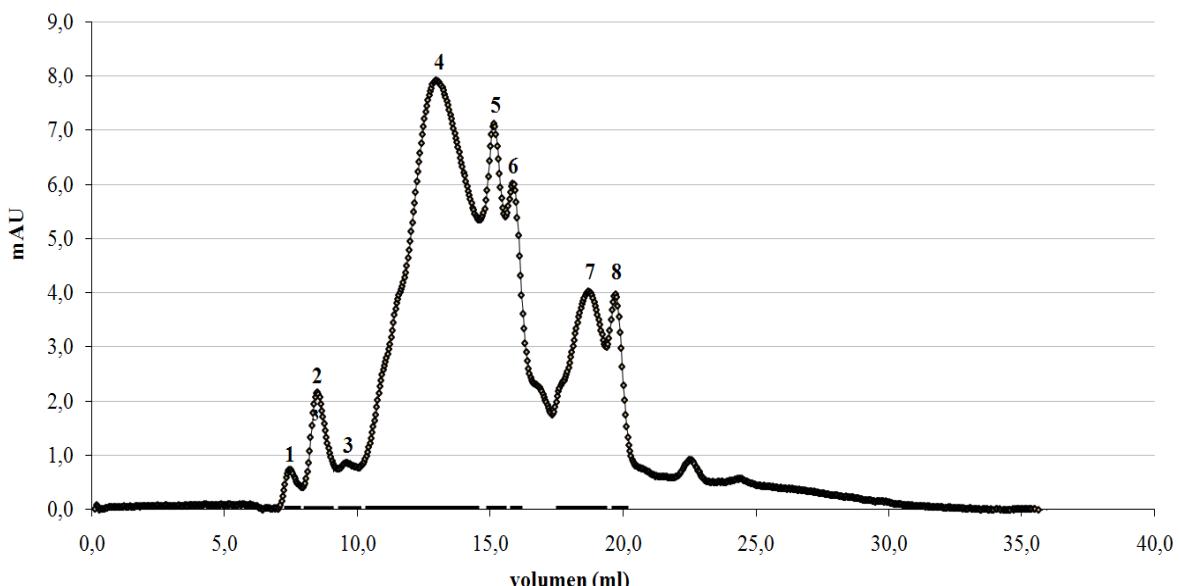
CnB1	GHSVPLTNFXNAIY
SacP	GHSVPLSNFMNAQY

**Slika 20:** Primerjava N-terminalnih zaporedij Cn-nB2 in saharopepsin SacP (*Laccaria bicolor*)

Ostala določena aminokislinska zaporedja ne kažejo podobnosti z aminokislinskimi zaporedji iz baz podatkov.

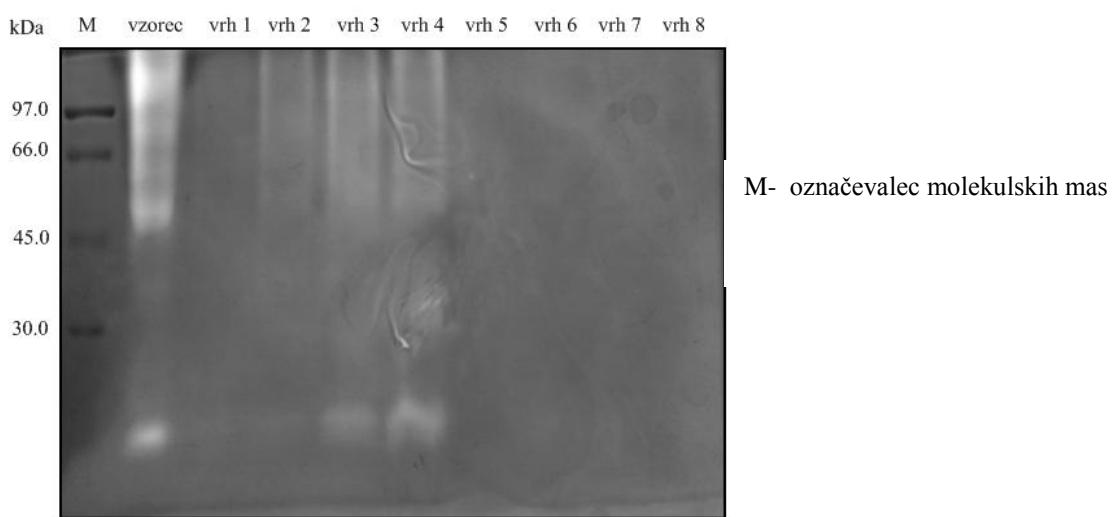
#### 4.2.3 Karakterizacija izbranih proteaz po dodatnem čiščenju vzorcev

Proteinske vzorce (vrh Cn-r), ki smo jih dobili iz izvlečka meglenke z afinitetno kromatografijo (z vezanim rekombinantnim Cnp) smo dodatno ločili s FPLC. Uporabili smo metodo gelske filtracije in ročno zbirali posamezne proteinske vrhove.



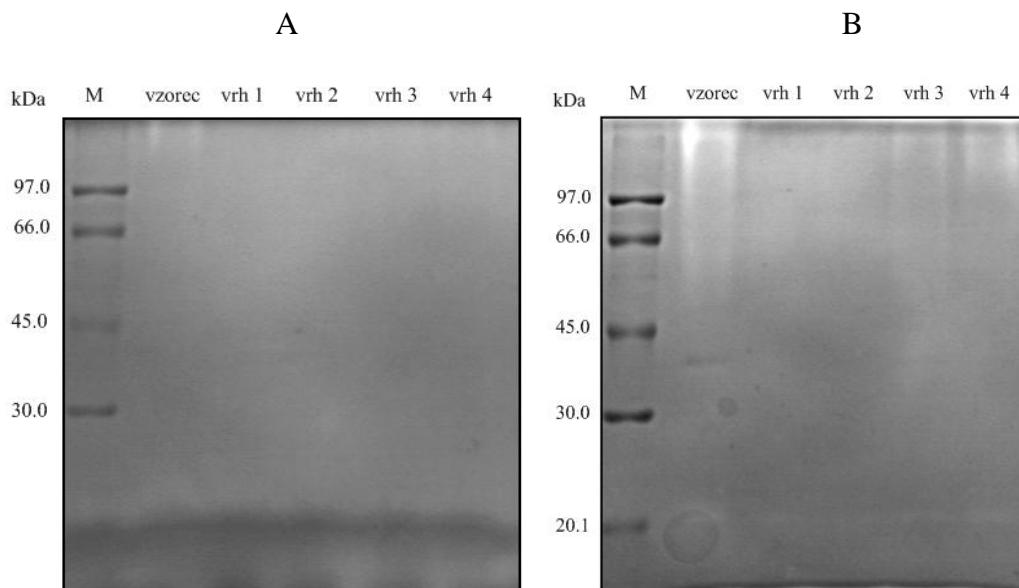
Slika 21: Kromatogram FPLC vzorca vrh Cn-r

Aktivnost frakcij smo preverili z nanosom frakcij v posameznem vrhu na cimogramu z želatino (slika 22). Iz slike 22 je razvidno da so aktivne frakcije v vrhu 2, 3 in 4. Za nadaljnjo analizo smo uporavili vrh 2 in vrh 4.



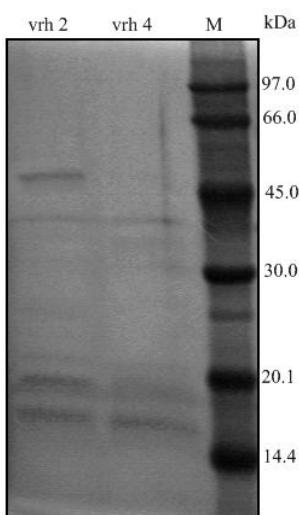
Slika 22: Cimogram z želatino – prikaz proteinskih vrhov po ločitvi s FPLC

Posamezne aktivne vrhove smo karakterizirali še z uporabo specifičnih inhibitorev pefabloc in pepstatin. Kot je razvidno iz slike 23 je proteolitična aktivnost inhibirana v prisotnosti inhibitorja pefabloc, medtem ko v prisotnosti pepstatina le delno. Pepstatin dobro inhibira le proteaze z manjšimi molekulskimi masami.



Slika 23: Cimogram z želatino – aktivnost vrhov po FPLC v prisotnosti inhibitorjev pefabloc (A) in pepstatin (B)

Čistost frakcij smo preverili z NaDS-PAGE. Ker barvanje s Commasie brilliant blue ni bilo dovolj občutljivo smo uporabili negativno barvanje s cinkom v prisotnosti imidazola.



Slika 24: Analiza NaDS-PAGE po FPLC M- označevalec molekulskih mas.

Ločitev s FPLC ni bila povsem uspešna, še vedno je prisotnih več proteinskih lis v posameznem vrhu. Vrh 4 vsebuje proteine v velikosti približno 17, 19 in 40 kDa, vrh 2 pa še dodatno liso v velikosti 47 kDa.

#### 4.2.3.1 Specifičnost cepitve

Specifična mesta cepitve izolirane proteaze smo določili z analizo peptidov v hidrolizirani verigi inzulina B. Kot substrat smo uporabili inzulin B (Serva, Heidelberg), ki smo ga izpostavili hidrolizi s proteaznim vzorcem vrh 2 in vrh 4 pri sobni temperaturi za 21 ur. Z uporabo masne spektrometrije smo analizirali nastale peptide.

Vrh 4

1	5	10	15	20	25	30																												
F	V	N	Q	H	L	C	G	S	H	L	V	E	A	L	Y	L	V	C	G	E	R	G	F	F	Y	T	P	K	A					



Vrh 2

1	5	10	15	20	25	30																												
F	V	N	Q	H	L	C	G	S	H	L	V	E	A	L	Y		L	V	C	G	E	R	G	F	F	Y	T	P	K	A				



Slika 25: Mesta cepitve inzulina B s proteaznima vzorcema vrh 2 in vrh 4

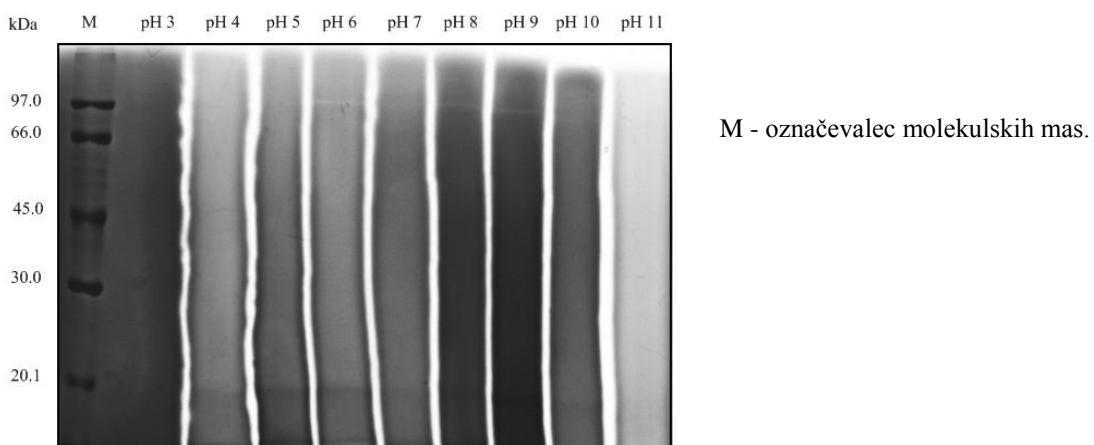
Proteaze, ki smo jih izolirali so zelo specifične. Proteaze v vrhu 4 so cepile le eno mesto (VEAL-YLVC) v oksidiarni verigi inzulina B, proteaze v vrhu 2 pa 3 mesta. V bazi podatkov MEROPS smo specifična mesta cepitve, ki smo jih dobili pri testu primerjali s specifičnimi mesti cepitve proteaz vpisanih v bazi (preglednica 10).

**Preglednica 10: Mesta cepitve na oksidirani B verigi inzulina za vrh 2 in vrh 4 ter primerjava s proteazami s podobnimi mesti cepitve**

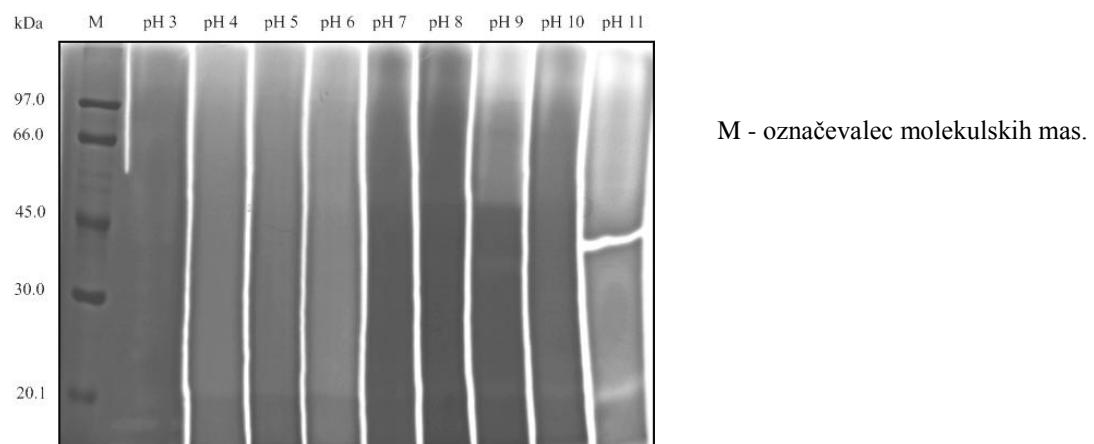
proteaza	družina proteaze	1	5	10	15	20	25	30
		<b>F V N Q H L C G S H L V E A L Y L V C G E R G F F Y T P K A</b>						
vrh 2					↑↑		↑	
vrh 4				↑				
<b>kimotripsin A</b>	S1			↑↑			↑	
kimotripsin C	S1	↑		↑↑↑		↑↑↑		
termomikolin	S8		↑	↑				
subtilizin BPN	S8	↑	↑	↑	↑↑↑		↑↑	
grifolzin	S53	↑	↑	↑	↑↑	↑↑	↑↑	
katepsin E	A1	↑		↑	↑↑↑			
<b>saharopepsin</b>	A1			↑↑		↑↑		
pepsin B	A1			↑	↑↑↑		↑↑	
akrocilindropepsin	A9G	↑	↑		↑↑		↑↑	

#### 4.2.3.2 pH-optimum

Vzorcema vrh 2 in vrh 4 po FPLC smo določali pH-optimum v različnih razvijalnih pufrih z rabičnimi pH-vrednostmi. V vzorcu vrh 2 je aktivnost proteaz z navidezno višjimi molekulskimi masami optimalna v pH-območju od pH 7 do pH 10, medtem ko so aktivnosti proteaz v spodnjem delu z navidezno nižjimi molekulskimi masami optimalne v pH-območju od pH 4 do pH 7 (slika 26). V vzrocu vrh 4 je aktivnost navidezno nizkomolekularnih proteaz optimalna pri pH 4 do pH 6, proteaz v srednjem delu med pH 6 in pH 11 ter navidezno visokomolekularnih proteaz pri pH večjih od 8 (slika 27).



Slika 26: Analiza NaDS-PAGE – pH-optimum vzorca vrh 2

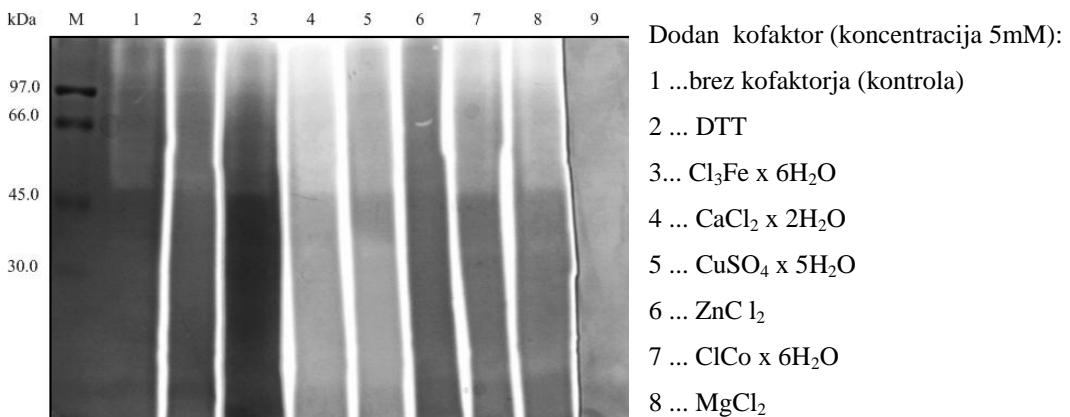


Slika 27: NaDS-PAGE – pH-optimum vzorca vrh 4

Oba vzorca imata proteolitično aktivnost v širokem pH-območju, vendar je aktivnost večja pri alkalnih pH-vrednostih. Največja aktivnost je bila pri obeh v zelo alkalnem pH 11. Optimalni pH za vrh 4 smo določili pH 9.

#### 4.2.3.3 Vpliv kofaktorjev

Za vzorec vrh 4 po čiščenju s FPLC smo pri optimalnem pH (pH 9) opazovali še vpliv različnih kofaktorjev na proteolitično aktivnost.

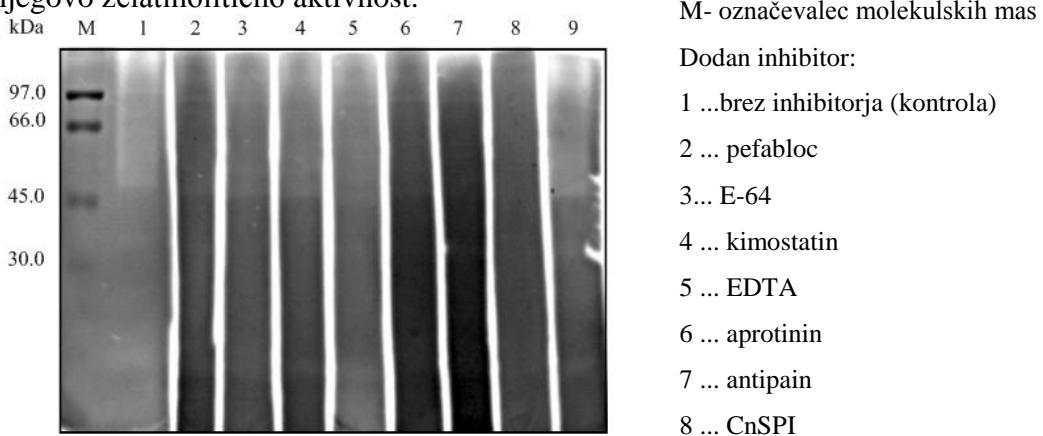


**Slika 28: Cimogram z želatino – vpliv optimalnih kofaktorjev na aktivnost vzorca vrh 4**

Iz slike 28 je razvidno, da je proteolitična aktivnost intenzivnejša pri dodatku kofaktorjev CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O ter CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O in MgCl<sub>2</sub>. Dodatek ZnCl<sub>2</sub> pa aktivnost celo inhibira. Dodatek ostalih kofaktorjev ne vpliva bistveno na encimsko aktivost proteaz v vzorcu. Ob dodatku CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O ter CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O in MgCl<sub>2</sub> se je aktivnost povečala predvsem proteazam z navidezno manjšimi molekulskimi masami.

#### 4.2.3.4 Vpliv različnih inhibitorjev

Za vzorec vrh 4 smo pri optimalnem pH (9) opazovali še vpliv različnih inhibitorjev na njegovo želatinolitično aktivnost.



**Slika 29: Cimogram z želatino – aktivnost vzorca vrh 4 v prisotnosti različnih specifičnih inhibitorjev**

Najbolj je bila aktivnost inhibirana v prisotnosti inhibitorja pefabloc in CnSPI. Aprotinin in antipain sta inhibirala vse razen zgornje lise. Ostali inhibitorji so različne lise proteolitične aktivnosti inhibirali le delno, vse lise so bile še vedno prisotne vendar v manjši jakosti v primerjavi s kontrolo.

### 4.3 IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA SERINSKIH PROTEAZ IZ DRUGIH NARAVNIH VIROV

Želeli smo preizkusiti možnosti uporabe afinitetnega nosilca z vezanim rekombinantnim knispinom (rCnp) za izolacijo serinskih proteaz iz različnih naravnih virov.

#### 4.3.1 Izolacija subtilizina iz tekočega gojišča bakterije *Bacillus subtilis*

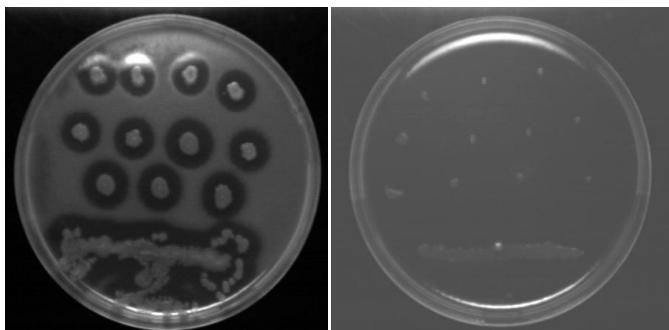
##### 4.3.1.1 Optimizacija gojenja bakterije *B. subtilis*

###### Optimizacija gojišč

Testirali smo gojišča, različna po sestavi:

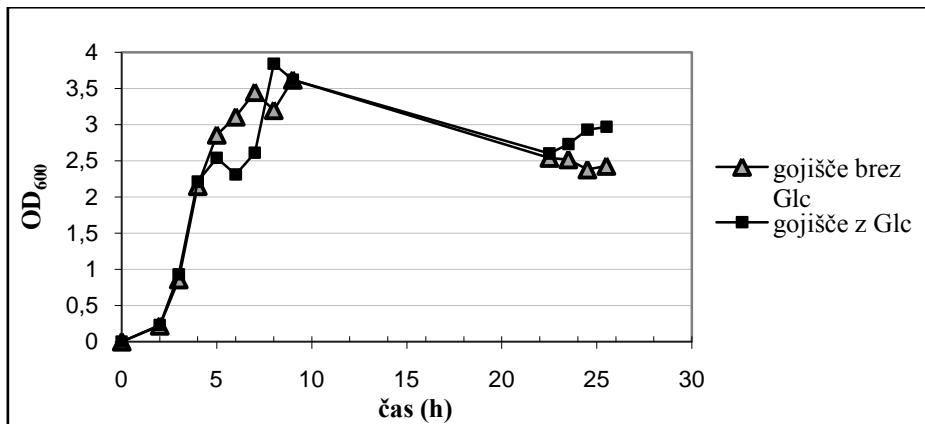
**Preglednica 11: Optimizacija trdnih gojišč za gojenje bakterije *B. subtilis***

	sestava gojišča	Rast
YT	tripton kvasni ekstrakt NaCl	slabša rast gladke kolonije
A	kvasni ekstrakt mleko v prahu	najboljša rast velika cona razgradnje substrata
B	1x SS kvasni ekstrakt mleko v prahu	+ agar slaba rast ni cone razgradnje po 16h srednje velika cona po 24h
C	1xSS kvasni ekstrakt	dobra rast kolonije izbočene, nagubane ni cone razgradnje substrata
D	1xSS kvasni ekstrakt škrob	dobra rast slaba razgradnja substrata vidna cona po 32 h



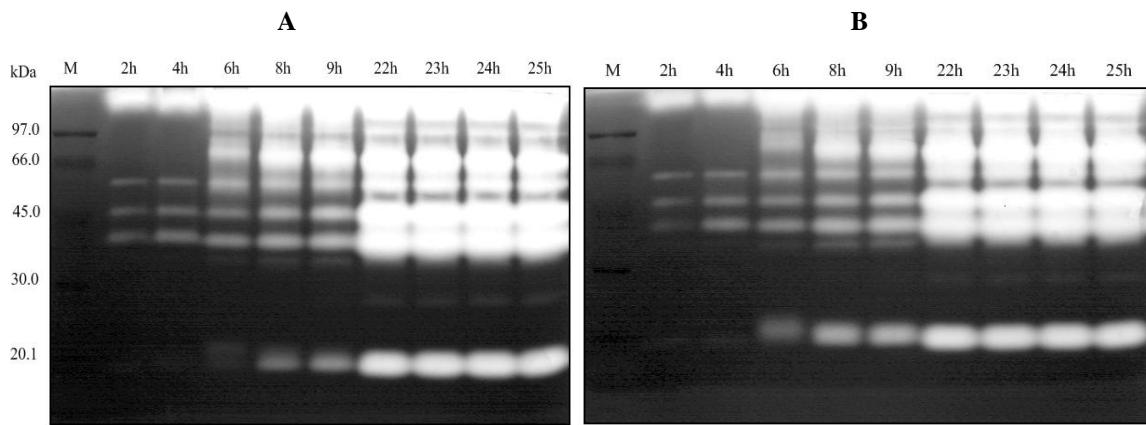
Slika 30: Rast bakterij *B. subtilis* na gojišču A (levo) in gojišču YT (desno)

## Optimizacija inkubacije



Slika 31: Rastna krivulja bakterije *B. subtilis*, pridobljena s spremeljanjem optične gostote ( $OD_{550}$ ) tekom rasti pri  $37^{\circ}\text{C}$  v tekočem gojišču (0,5% kvasni ekstrakt, 1% mleko z dodatkom 0,1% glukoze in brez dodatka glukoze (Glc))

Da bi ugotovili koliko časa je potrebno, da celice namnožimo do čimvečje gostote in v kateri fazi rasti pride do izločanja zunajceličnih proteaz smo spremljali rast bakterij *B. subtilis*. Ugotovili smo, da je dosežena gostota celic največja po 9 urah gojenja (slika 31). Rast smo opazovali tudi pri dodatku 0,1 % glukoze in ugotovili, da ni večjih razlik. Vzorce, ki smo jih sterilno odvzemali med gojenjem, smo analizirali z metodo cimografije z želatino. Iz slike 32A je vidno povečevanje encimske aktivnosti z ozirom na čas gojenja do 22h gojenja, po kateri se aktivnost bistveno več ne povečuje. Če primerjamo s sliko 32B kjer je enakem gojišču dodana še 0,1 % glukoza, opazimo da je aktivnost nekoliko močnejša v gojišču brez dodatka glukoze.



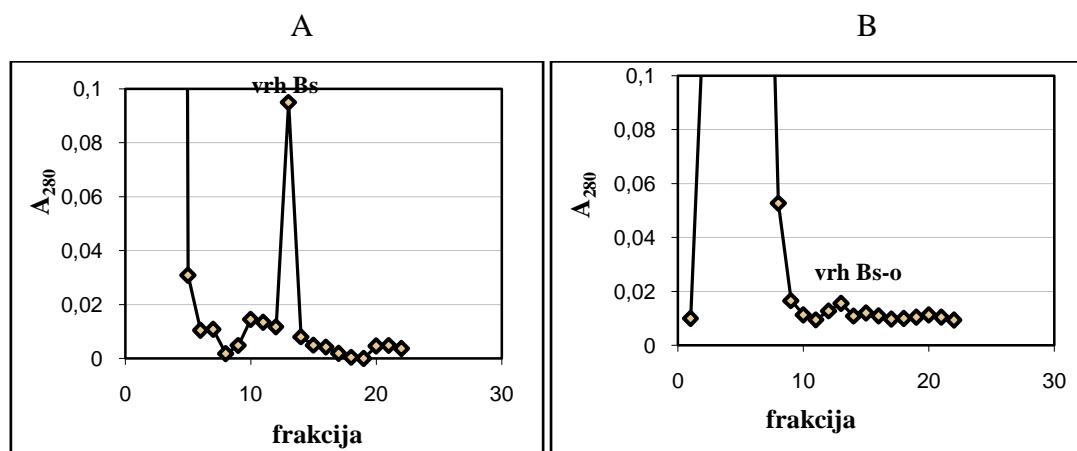
Slika 32: Cimogram z želatino vzorcev pri gojenju *B. subtilis* v tekočem gojišču (0,5 % kvasni ekstrakt, 1 % mleko brez dodatka glukoze (A) in z dodatkom 0,1 % glukoze (B))

Za izolacijo subtilizina iz tekočega gojišča bakterije *B. subtilis* smo izbrali gojišče A (0,5% kvasni ekstrakt in 1% mleko) brez dodatka glukoze in čas inkubacije 24 ur.

#### 4.3.1.2 Izolacija proteaz z afinitetno kromatografijo rCnp

Gojišče v katerem so rasle baktrije *B. subtilis* 24h, smo centrifugirali 20 min pri 7000xg. Tretjino supernatanta gojišča smo filtritali ( $0,2\mu\text{m}$ ), dve tretjini pa smo obarjali z amonijevim sulfatom.

Vzorca smo ločeno nanesli na kolono. Vezane proteine smo eluirali s spremembom pH. Med potekom afinitetne kromatografije smo spremljali  $A_{280}$  frakcij in vrednosti prikazali v grafu (sliki 34 A in B). Eluirana vrhova smo ločeno skoncentrirali z ultrafiltracijo in jih analizirali z NaDS-PAGE.

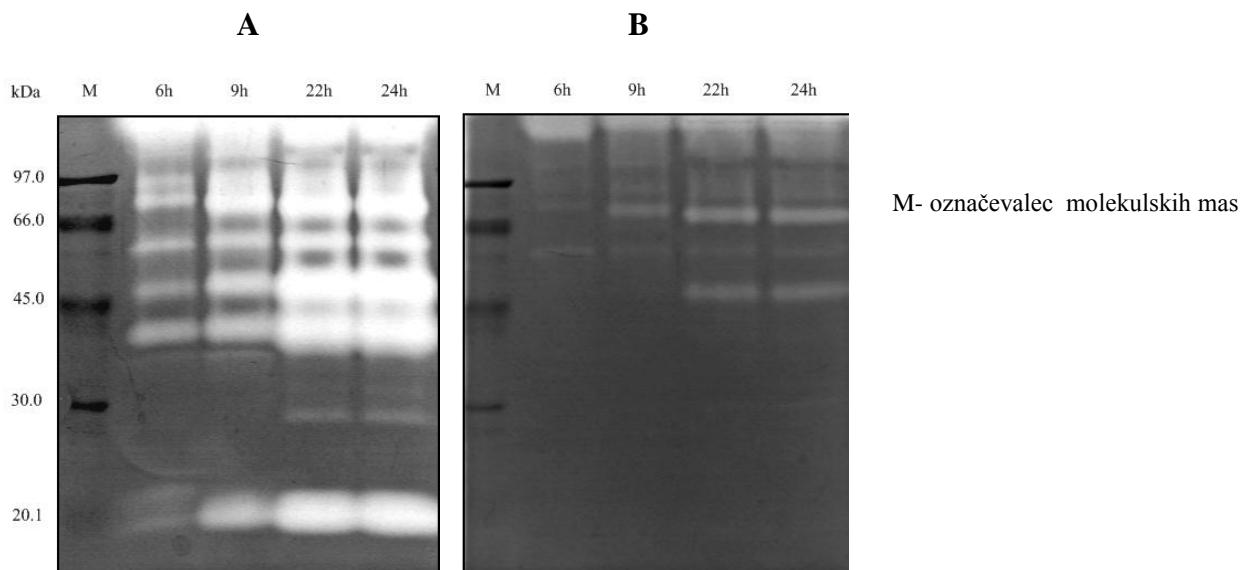


**Slika 33:** Afinitetna kromatografija filtriranega gojišča *B. subtilis* na rCnp-Sefarozi (A) in gojišča *B. subtilis* po koncentriranju proteinov z obarjanjem, na rCnp- Sefarozi (B)  
 Vrh Bs predstavlja proteine izolirane iz filtriranega gojišča, vrh Bs-o pa proteine izolirane iz gojišča po obarjanju.

Po spiranju nevezanih proteinov, smo po spremembi pH dobili ločena elucijska vrha. Vrh vezanih proteinov iz filtriranega gojišča je večji od vrha vezanih proteinov iz gojišča po koncentriranju proteinov z obarjanjem.

#### 4.3.1.3 Karakterizacija izoliranih proteaz

##### Aktivnost brez in v prisotnosti inhibitorja kimostatina

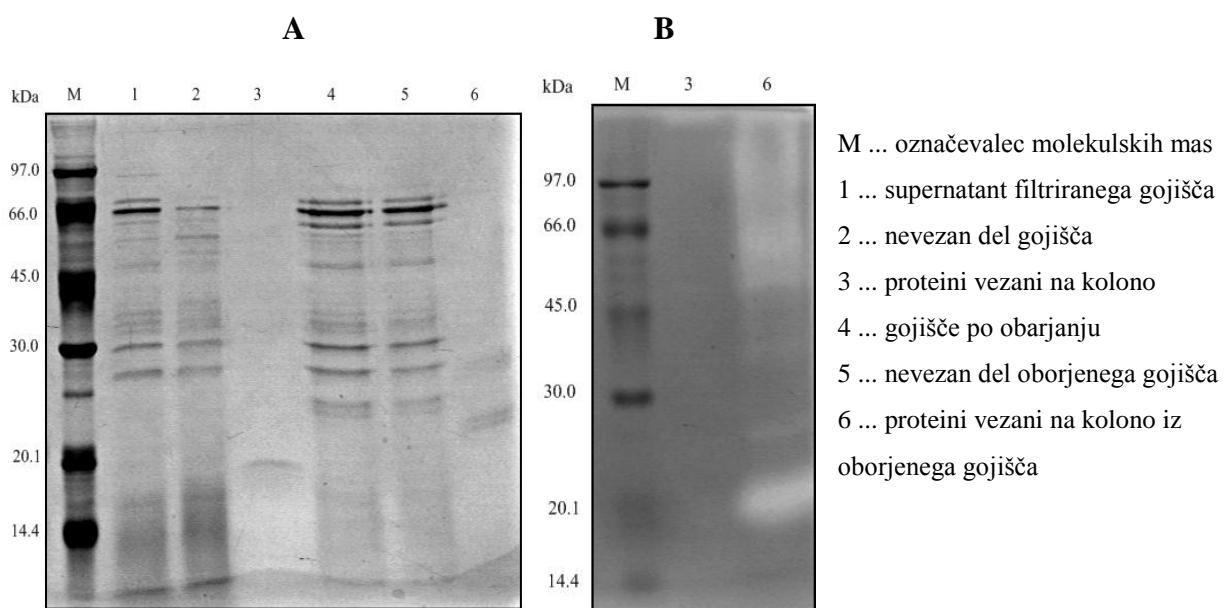


Slika 34: Cimogram z želatino – aktivnosti vzorcev iz tekočega gojišča *B. subtilis* (A) ter aktivnosti v prisotnosti inhibitorja kimostatina (B)

Vzorci gojišč bakterije *B. subtilis* kažejo močno encimsko aktivnost na cimogramu z želatino (sliki 32 in 34A). Prisotnih je več svetlejših lise, ki predstavljajo razgradnjo substrata, iz česar vidimo da je prisotnih več različnih proteolitičnih encimov. V prisotnosti inhibitorja kimostatina, ki inhibira proteaze družine S1 in S8 so lise v spodnjem delu cimograma popolnoma izginile, kar pomeni da je kimostatin inhibiral aktivnost teh proteaz (slika 34). V zgornjem delu so lise še vidne, vendar občutno manj. Sklepamo lahko da so v gojišču prisotne tudi nekatere proteaze, za katere inhibitor kimostatin ni specifičen.

##### Karakterizacija proteinskih vzorcev izoliranih iz tekočega gojišča *B. subtilis*

Analiza NaDS-PAGE je pokazala v supernatantu filtriranega gojišča in v gojišču poobarjanju proteinov številne proteinske lise. Gojišči se po različnem tretiranju med sabo razlikujeta v prisotnosti nekaterih različnih proteinskih lis (slika 35A). Gojišče poobarjanju ima prisotni lisi v velikosti približno 27 in 28 kDa, ki jih ni v gojišču, ki smo ga samo filtrirali. Z analizo vezanih proteinov iz teh gojišč - vrhov Bs in Bs-o smo prav tako dobili različne proteinske lise. Analiza vrha Bs kaže proteinsko liso v velikosti 19 kDa, vrha Bs-o pa lise v velikosti 23, 24 in 27 kDa (slika 35A). Analiza cimografije z želatino je pokazala, da je encimska aktivnost prisotna le v vzorcu vrh Bs-o (slika 35B).



Slika 35: NaDS-PAGE po afinitetni kromatografiji gojišča *B. subtilis* in gojišča *B. subtilis* po obarjanju (A) in cimogram proteinov, ki so se vezali na kolono (B)

### Test aktivnosti s substratom Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC

Encimsko aktivnost vzorcev vrh Bs in vrh Bs-o smo preverili še s substratom Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC. Aktivnost smo dokazali le za vzorec vrh Bs-o, kar se ujema z analizo aktivnosti na cimogramu. Za vzorec vrh Bs-o smo preverili še njegovo aktivnost v prisotnosti inhibitorja kimostatin. Le-ta je popolnoma inhibiral aktivnosti proteaz tako v gojišču kot tudi v vzorcu vrh Bs-o.

Preglednica 12: Test aktivnosti s substratom Suc-Ala-Ala-ProPheAMC - supernatant gojišča

vzorci	Fluorescencija (ekscitacija - 370 nm, emisija - 460nm)			
	5µl	10µl	25µl	100µl
supernatant gojišča	22,4	26,8	50,7	297,6
nevezan del gojišča	23,4	27,5	52,3	296,4
vezani proteini (vrh Bs)	2,0	2,9	3,1	5,8

Preglednica 13: Test aktivnosti s substratom Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC - supernatant gojišča po koncentriranju z obarjanjem

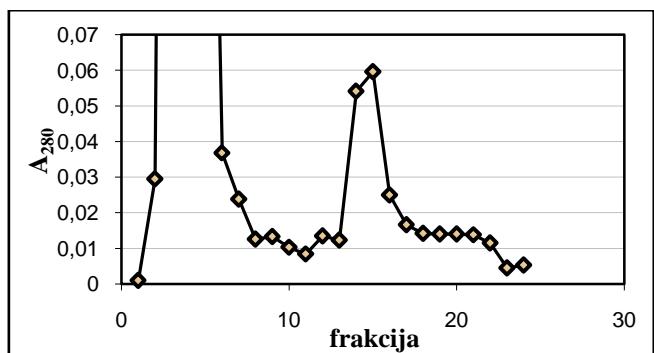
vzorci	Fluorescencija (ekscitacija - 370 nm, emisija - 460nm)				
	5µl	10µl	25µl	50µl	100µl
supernatant gojišča	5,5	6,9	15,3	29,3	51,7
nevezan del gojišča	4	7,1	8,8	26,1	54,9
vezani proteini (vrh Bs-o)	4,7	23,5	96,6	144,2	435,8

### 4.3.2 Čiščenje mešanice tripsinov

Želeli smo preizkusiti možnost uporabe afinitetnega nosilca z vezanim rCnp za čiščenje pripravka delno očištene mešanice tripsinov iz goveda. Pripravili smo raztopino s koncentracijo 1mg/ml, jo nanesli na kolono in eluirali vezane proteine po enakem postopku kot pri prejšnjih afinitetnih kromatografijah.

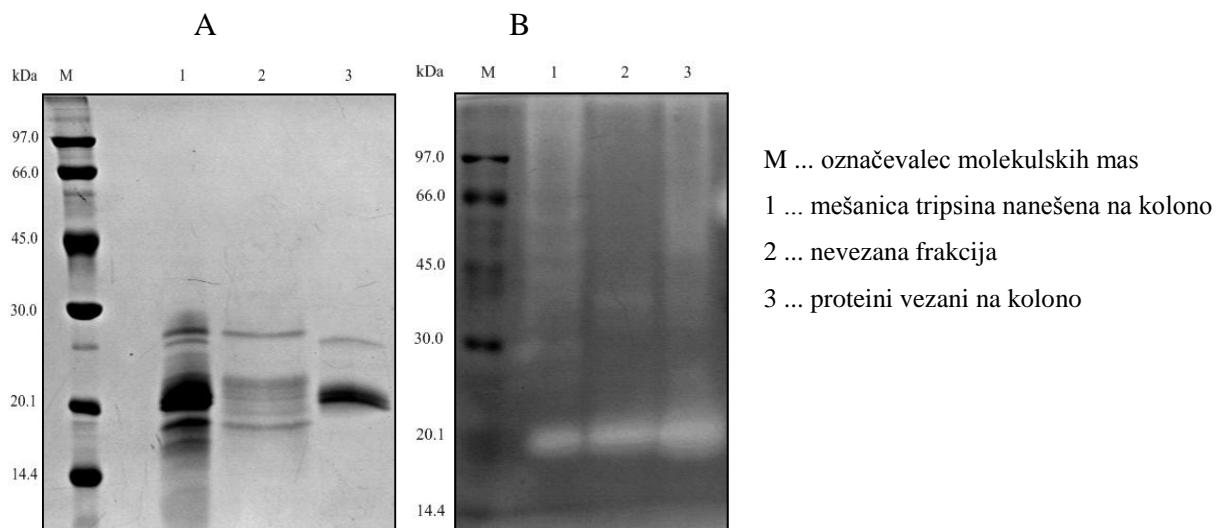
- **Afinitetna kromatografija**

Med potekom afinitetne kromatografije smo spremljali  $A_{280}$  frakcij in vrednosti prikazali v grafu (slika 36). Dobili smo lepo ločen elucijski vrh proteinov, ki smo jih skoncentrirali z ultrafiltracijo in analizirali z NaDS-PAGE (slika 37A).



Slika 36: Afinitetna kromatografija pripravka tripsina na rCnp - Sefarozi

Analiza NaDS-PAGE je pokazala, da smo mešanico tripsinov (slika 37A) očistili in dobili le eno močnejšo proteinsko liso v velikosti 22 kDa, in eno šibkejšo v velikosti 27 kDa. Prav tako je iz cimograma z želatino razvidna močnejša aktivnost v vzorcu očiščenem z afinitetno kromatografijo (slika 37B).



Slika 37: NaDS-PAGE analiza (A) in cimografija z želatino (B) po čiščenju mešanice tripsinov.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Preizkusili smo možnost uporabe afinitetnega nosilca z vezanimi inhibitorji serinskih proteaz CnSPI in rCnp iz gobe *C. nebularis* za izolacijo nekaterih serinskih proteaz iz različnih naravnih virov. V prvem delu smo se osredotočili na iskanje tarčnih proteaz iz prostotrosnic, s pomočjo katerih bi lahko posredno sklepali na biološko in fiziološko funkcijo inhibitorja. V drugem delu pa smo preizkusili uporabnost pripravljene afinitetne kromatografije za izolacijo proteaz iz gojišča bakterije *B. subtilis*, ki izloča serinske proteaze subtilizine, ter za čiščenje pripravka mešanice tripsinov.

Delo smo pričeli s pripravo afinitetnega nosilca, na katerega smo vezali rekombinantno pripravljeni inhibitor knispin (rCnp).

V prvem delu smo želeli izolirati proteaze iz prostotrosnic. Prostotrosnice kažejo nepričakovano število in raznolikost proteaz, kar kaže na to, da so idealen vir novih proteaz s potencialno edinstvenimi lastnostmi. CnSPI je poleg inhibicije gobjih serinskih proteaz inhibiral tudi druge proteazne aktivnosti, ki so bile drugače neobčutljive na druge inhibitorje (jih z uporabo specifičnih inhibitorjev ni bilo možno uvrstiti v znane razrede proteaz). Te proteaze predstavljajo edinstvene proteaze, ki so še posebej zanimive (Sabotič in sod., 2007). V ta namen smo uporabili izvlečke prostotrosnic *Clitocybe nebularis* (meglenka) in *Macrolepiota procera* (orjaški dežnik). Iz obeh gob smo z uporabo afinitetne kromatografije uspeli izolirati proteine, vendar smo prisotnost proteaz potrdili le za vzorce izolirane iz izvlečkov gobe meglenke. Prisotnost proteaz smo potrdili z metodo cimografije z želatino, tako kot so že dokazovali proteolitične aktivnosti v izvlečkih različnih prostotrosnic (Sabotič in sod., 2007). Molekulskih mas iz lis aktivnosti cimograma ne moremo pravilno določiti, saj so opazili, da je molekulska masa odvisna od nanešene količine proteaze. Ker količin posameznih proteaz v izvlečku in eluatu ni bilo mogoče določiti, vrednosti molekulskih mas niso zanesljive (Sabotič in sod., 2007).

Postopek izolacije je ponovljiv, saj so vzorci, ki smo jih izolirali iz meglenke in orjaškega dežnika tekom večih afinitetnih kromatografij na CnSPI-Sefarozi in rCnp-Sefarozi, kazali podobne vzorce proteinskih lis na NaDS-PAGE, ter aktivnosti na cimogramih z želatino.

Z afinitetno kromatografijo, ki je imela na nosilec vezan naravni inhibitor CnSPI, smo iz izvlečka meglenke izolirali proteine, na grafikonu (slika 9A) označene kot vrh Cn-n. Analiza NaDS-PAGE je pokazala več proteinskih lis, v spodnjem delu lise v velikostih okoli 20 kDa in zgornjem delu liso v velikosti 45 kDa (slika 12A). Na cimogramu (slika 12B) je aktivnost v izvlečku meglenke vidna predvsem v zgornjem delu, prav tako nekoliko v spodnjem. Aktivnost vzorca vrh Cn-n pa je vidna le v zgornjem delu. Iz tega lahko sklepamo, da so proteaze z višjimi molekulskimi masami specifične za CnSPI. Proteinske lise, vidne na NaDS-PAGE v velikosti okoli 20 kDa, na cimogramu z želatino

niso pokazale aktivnosti. Možno je, da le-te niso proteaze ali pa so zaradi občutljivosti izgubile aktivnost pri eluciji pri nizkem pH ali med potekom cimografije.

Prisotnost proteaz v vzorcu smo dokazali z nespecifično razgradnjo proteinov na gelu z želatino. Da bi ugotovili katalitični tip proteaze, smo aktivnost vrha Cn-n z metodo cimografije z želatino opazovali tudi v prisotnosti specifičnih inhibitorjev pefabloc in pepstatin (slika 17). Prvi je popolnoma inhibiral vidne aktivnosti, medtem ko jih je pepstatin le deloma. Iz tega sklepamo da so v vzorcu vrh Cn-n prisotne serinske proteaze, ki jih specifično inhibira pefabloc in delno tudi aspartatne proteaze, ki jih inhibira pepstatin.

Znižanje aktivnost v prisotnosti inhibitorja pefabloc smo dokazali tudi z določanjem encimske aktivnosti s testom FITC-hemoglobin. Odstotek inhibicije v vzorcu Cn-n je bil 68,6. Aktivnost vzorcev v prisotnosti inhibitorjev E-64 ni bila zmanjšana, iz česar sklepamo da med izoliranimi proteini ni proteaz cisteinskega tipa.

Proteinski lisi z velikostjo 45 kDa iz vzorca Cn-n smo določili tudi N-terminalno aminokislinsko zaporedje, za katerega smo ugotovili 75% podobnost in 70% identičnost z N-terminalnim zaporedjem aspartatne proteaze saharopepsin iz družine A1 določene v genomu prostotrošnice *Laccaria bicolor*. Proteazo s podobnim N-terminalnim zaporedjem so izolirali iz meglenke že z uporabo afinitetne kromatografije z vezanim lektinom konkanavalin A (Sabotič in sod., neobjavljeno). Predstavniki skupine A01.018 družine A1 aspartatnih proteaz po klasifikaciji MEROPS so pepstatin A občutljive proteaze z dvema do petimi N-glikozilacijskimi mesti ter z molekulskimi masami od 39 kDa do 45 kDa (Rawlings in sod., 2009).

Z afinitetno kromatografijo, ki je imela na nosilec vezan heterologno izražen knispin, smo iz izvlečka meglenke izolirali proteine, na grafikonu (slika 9B) označene kot vrh Cn-r.

Z analizo NaDS-PAGE (slika 13A) smo ugotovili prisotnost različno velikih proteinov. Prisotnost proteaz v izoliranem vzorcu pa smo potrdili z metodo cimografije z želatino, ki je kazala močno aktivnost v območju proteinov z višjimi molekulskimi masami.

Vrh Cn-r smo dodatno očistili s FPLC in aktivne vrhove nadalje karakterizirali. Vrh 4 vsebuje proteine v velikosti 17, 19 in 40 kDa, vrh 2 pa še dodatno liso v velikosti 47 kDa. Z analizo peptidov v hidrolizirani verigi inzulina B smo določili specifična mesta cepitve proteazam v vrhu 4 in vrhu 2 in jih primerjali s specifičnimi mesti cepitve oksidirane verige B inzulina drugih proteaz v bazi podatkov MEROPS (preglednica 10). Mesta cepitve proteaz vrha 2 popolnoma Sovpadajo z mesti cepitve serinske proteaze iz družine S1 kimotripsin A. Podobna mesta cepitve ima tudi aspartatna proteaza saharopepsin (Dreyer, 1989), za katero smo pri vzorcu Cn-n dokazali podobnost v N-aminokislinskem zaporedju.

Vrh 4 vsebuje zelo specifično proteazo, saj je substrat kljub 24-urnem delovanju cepila le na enem mestu. V vzorcih gre verjetno za mešanico serinskih in aspartatnih proteaz, pri čemer je verjetno proteaza v vrhu 2 z molekulsko maso 47 kDa aspartatna proteaza podobna saharopepsinu, medtem ko nizkomolekularni proteini verjetno predstavljajo serinske proteaze podobne kimotripsinu.

Proteazam v vzorcih vrh 2 in vrh 4 smo določili še pH-optimum, ki je znašal 9,0. Nasprosto je bila aktivnost proteaz boljša v alkalnem kot kislem pH-območju (sliki 23 in 24). K stabilnosti in aktivnosti nekaterih proteaz pripomore prisotnost določenih ionov (Berg in sod., 2002). Dodatek kofaktorjev  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  in  $\text{MgCl}_2$  je pozitivno vplival na aktivnost proteaz, medtem ko je dodatek kofaktora  $\text{ZnCl}_2$  aktivnost celo inhibiral.  $\text{CaCl}_2$  ter  $\text{MgCl}_2$  povečata aktivnost tudi pepsinu A in B (Klomkla in sod., 2007). Kalcijevi ioni so pri subtilizinih pomembni za zaščito pred avtolizo in toplotno denaturacijo (Smith in sod., 1999), pri tripsinu pa za stabilizacijo in aktivacijo tripsinogena (Sipos in Merkel, 1970). Bakrovi ioni povečajo aktivnost serinskih proteaz pri bakteriji *Bacillus clausii* (Kazan, 2005).  $\text{ZnCl}_2$  inhibira serinske proteaze vinske mušice *D. melanogaster* (Chihara in sod., 2005). Dodatek ostalih kofaktorjev, ki smo jih testirali, ni bistveno vplival na encimsko aktivost proteaz v vzorcu.

Aktivnosti v prisotnosti inhibitorjev so potrdile prisotnost serinskih proteaz, saj se je aktivnost najbolj zmanjšala v prisotnosti inhibitorjev pefabloc in CnSPI. Pefabloc inhibira mnogo serinskih proteaz iz družine S1 (Rawlings in sod., 2009). Inhibitorja aprotinin in antipain sta inhibirala vse razen zgornje lise. Antipain ima široko inhibitorno specifičnost, saj inhibira papain, tripsin, trombin, katepsin B; medtem ko je aprotinin tripsinski inhibitor iz goveje žleze slinavke imenovan tudi BPTI (ang.: »bovine pancreatic trypsin inhibitor«) (Rawlings in sod., 2009). Ostali inhibitorji so pokazali le delno inhibicijo, vse lise so bile še vedno prisotne, vendar v manjši jakosti v primerjavi s kontrolo. To velja tudi za kimostatin, ki večinoma inhibira serinske proteaze družin S1 in S8 in cisteinske proteaze iz družine C1 (Rawlings in sod., 2009). CnSPI, ki je sicer zelo specifičen inhibitor za tripsin inhibira tudi proteaze iz gob, ki kažejo drugačne lastnosti celo podobne aspartatnim proteazam, čeprav pepsina (A1) ne inhibira (Avanzo in sod., 2009). E-64, ki inhibira cisteinske proteaze iz klana CA, ni pokazal inhibicije. Vzorec inhibicije je potrdil, da so proteaze z aktivnostjo pri pH 9 serinskega tipa.

Primerjava rezultatov afinitetnih kromatografij z vezanim CnSPI oz. rCnp je pokazala zelo podobne rezultate. Grafikona (slika 9 A,B) prikazuje lepo ločena elucijska vrha, vrh Cn-n in vrh Cn-r, ki sta si zelo podobna. Analiza NaDS-PAGE vrhov Cn-n in Cn-r je pokazala nekoliko različen vzorec, ki pa se v določenih proteinskih lisah tudi ujema, 17, 18, 20 in 46 kDa (sliki 12A in 13A). V naravnem izolatu CnSPI je prisotnih več podobnih inhibitorjev (Avanzo in sod., 2009), Cnp pa je samo eden izmed njih in je to lahko razlog za nekoliko različen vzorec. Ujemanje v večini lis kaže na to, da so si inhibitorji CnSPI med seboj zelo podobni. Cimografija z želatino potrjuje prisotnost proteaz v obeh vrhovih z vidno liso razgradnje v podobnem območju (sliki 12B in 13B).

Pri izolaciji proteaz iz micelija smo uporabili afinitetni nosilec z vezanim rekombinantnim knispinom. Analiza NaDS-PAGE (slika 16) je pokazala proteinsko liso v velikosti 16 kDa, vendar aktivnosti na cimogramu z želatino nismo potrdili. Določili smo N-terminalno zaporedje, ki pa se ni ujemalo z nobeno izmed zaporedij v bazah podatkov, niti z zaporedji proteinov izoliranih iz izvlečka gob.

Razlike pri uporabi CnSPI in rCnp so bile večje v primeru izolacije iz izvlečkov orjaškega dežnika. Analiza NaDS-PAGE vrhov Mp-n in Mp-r (sliki 14A in 15A) kaže popolnoma drugačen vzorec proteinskih lis. Razliko bi lahko pripisali razlici v gobjem materialu, saj je vzorec proteinskih lis izvlečkov gob po analizi NaDS-PAGE različen. Gobe, iz katerih smo pripravili vodne izvlečke, so bile nabранe v različnem času od pozne pomladi do pozne jeseni in različno dolgo hranjene pri -20°C (v letih 2004-2008). Aktivnosti na cimogramu z želatino ni bilo v nobenem izmed vzorcev Mp-n in Mp-r, čeprav je bila aktivnost v izvlečku prisotna. Možno je, da ni prišlo do vezave na CnSPI oziroma rCnp, ali pa so med postopkom elucije proteaze izgubile aktivnost zaradi občutljivosti na spremembo pH.

V drugem delu smo preizkusili možnost uporabe afinitetnega nosilca z vezanim inhibitorjem serinskih proteaz rCnp za izolacijo serinskih proteaz iz gojišča bakterije *B. subtilis* in za čiščenje mešanice tripsinov.

Najprej smo optimirali gojenje bakterije *B. subtilis*. Po pričakovanjih smo ugotovili, da *B. subtilis* izloča več proteaz v stacionarni fazi (Priest, 1992), saj je bila želatinolitična aktivnost nekoliko povečana v pozni eksponentni fazi rasti in zelo povečana v stacionarni fazi, po 22h (sliki 31 in 32). Gojišče, v katerem so bakterije *B. subtilis* rasle 24 h, smo pred nanosom na rCnp-afinitetno kromatografijo tretirali na dva načina. Nekaj smo ga le filtrirali (vrh Bs), v drugem delu pa smo obarjali proteine z amonijevim sulfatom (vrh Bs-o). S karakterizacijo izoliranih proteinskih vzorcev vrhov Bs in Bs-o smo prišli do različnih rezultatov. Analiza vrha Bs kaže proteinsko liso v velikosti 19kDa, vrha Bs-o pa lise v velikosti 23, 24 in 27 kDa (slika 33). Molekulske mase subtilizinov bakterij iz rodu *Bacillus* so med 27 in 36 kDa (Chang in sod., 2009). Analiza cimografije z želatino je pokazala, da je encimska aktivnosti prisotna le v vzorcu vrh Bs-o (slika 33B). Encimsko aktivnost vzorcev vrh Bs in vrh Bs-o smo preverili še s substratom Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, in aktivnost dokazali le za vzorec vrh Bs-o, ki jo je prisotnost kimostatina popolnoma inhibirala. Optimirali smo postopek izolacije subtilizinov iz tekočega gojišča bakterij *B. subtilis* z uporabo rCnp-afinitetne kromatografije, in sicer je za uspešno izolacijo potreben korak obarjanja proteinov z amonijevim sulfatom. Čiščenje subtilizinov z afinitetno kromatografijo direktno iz gojišča v enem koraku ni bilo uspešno.

Pipravek tripsina, ki je vseboval mešanico tripsinov, smo uspeli dobro očistiti. Slika 37A analize NaDS-PAGE prikazuje kako smo mešanico tripsinov (stolpec 1) očistili in dobili le eno močnejšo proteinsko liso v velikosti 22 kDa, ki približno odgovarja molekulski masi tripsina iz goveda, ki je 23,8 kDa (Cunningham, 1954) in eno šibkejšo v velikosti 27 kDa.

Prav tako je iz cimograma z želatino razvidna močnejša aktivnost vzorca očiščenega z afinitetno kromatografijo.

CnSPI in knispin, vezana na trden nosilec, sta se izkazala za uporabno metodo za iskanje tarč v gobi in za izolacijo serinskih proteaz iz drugih virov. Količine proteaz, ki smo jih izolirali iz različnih virov, so relativno majhne, kar kaže na nizko kapaciteto vezave proteinov na imobiliziran inhibitor, za kar so morda odgovorne sterične ovire pri vezavi proteaz. Zaradi nizke kapacitete vezave iskanih proteinov na CnSPI in knispin, vezana na trden nosilec, je opisana metoda uporabna predvsem v laboratorijskem in analitskem merilu.

## 5.2 SKLEPI

- \* Pripravili smo rekombinantni inhibitor knispin (rCnp).
- \* Pripravili smo afinitetni koloni: na trdni Sefarozni nosilec smo vezali naravni CnSPI in rCnp.
- \* Za elucijo proteinov na afinitetni kromatografski koloni z vezanim CnSPI oz. rCnp se je izkazala najboljša sprememba pH.
- \* Rezultati afinitetnih kromatografij z vezanim CnSPI oz. rCnp so si podobni.
- \* Iz meglenke smo izolirali tarčne proteaze, katerih aktivnost je najvišja v alkalnem pH in jih popolnoma inhibira inhibitor serinskih proteaz pefabloc.
- \* N-terminalno aminokislinsko zaporedje ene izmed izoliranih proteaz kaže 75% podobnost z N-terminalnim zaporedjem aspartatne proteaze (saharopepsin) iz družine A1, določene v genomu prostotrošnice *Laccaria bicolor*.
- \* Specifičnost cepitve inzulina B kaže na podobnost z mesti cepitve saharopepsina in kimotripsina.
- \* Optimirali smo izolacijo nekaterih zunajceličnih proteaz iz gojišča *B. subtilis* (obarjanje z amonijevim sulfatom + rCnp-afinitetna kromatografija).
- \* Pokazali smo uporabnost vezanega knispina za čiščenje mešanice tripsinov.
- \* CnSPI in knispin vezana na trden nosilec, sta se izkazala za uporabno metodo za iskanje tarč v gobi in za izolacijo serinskih proteaz iz drugih virov v laboratorijskem merilu.

## 6      POVZETEK

Proteaze imajo pomembno vlogo pri mnogih fizioloških procesih, ki so pomembni za normalno delovanje in razvoj organizmov. Izolacija in čiščenje proteaz je običajno večstopenjski postopek z nizkim končnim izkoristkom. Afinitetna kromatografija omogoča učinkovito ločevanje in čiščenje na osnovi izjemno specifičnih bioloških interakcij, kot so interakcije med encimom in substratom, encimom in inhibitorjem in podobno. Iz gobe meglenke (*C. nebularis*) je bil izoliran inhibitor serinskih proteaz CnSPI, ki je v svojem razredu popolnoma nov inhibitor z zanimivimi inhibitornimi lastnostmi. Pod izraz CnSPI prištevamo več inhibitorjev serinskih proteaz. En od njih, imenovan knispin (Cnp), je natančno karakteriziran na genetskem in biokemijskem nivoju.

Preizkusili smo možnost uporabe afinitetnega nosilca z vezanim naravnim inhibitorjem serinskih proteaz CnSPI oz.z rekombinantno pripravljenim knispinom (rCnp) za izolacijo nekaterih serinskih proteaz iz različnih naravnih virov. V prvem delu smo se osredotočili na iskanje tarč CnSPI in knispina- proteaz iz prostotrošnic *Clitocybe nebularis* in *Macrolepiota procera*. Iz obeh gob smo z uporabo afinitetne kromatografije uspeli izolirati proteine, vendar smo prisotnost proteaz z metodo cimografije z želatino potrdili le za vzorce, izolirane iz izvlečkov gobe meglenke. Z afinitetno kromatografijo z vezanim CnSPI smo iz izvlečka meglenke izolirali več proteinov, katerim smo dokazali proteazno aktivnost z metodo cimografije z želatino. Da so proteaze v vzorcu serinskega in aspartatnega tipa, smo ugotovili s popolno inhibicijo aktivnosti v prisotnosti specifičnega inhibitorja serinskih proteaz pefabloc in delne inhibicije aktivnosti v prisotnosti inhibitorja aspartatnih proteaz pepstatina. Proteinski lisi z velikostjo 45 kDa iz vzorca Cn-n smo določili N-terminalno aminokislinsko zaporedje, za katerega smo ugotovili 75% podobnost z N-terminalnim zaporedjem aspartatne proteaze iz družine A1.

Primerjava rezultatov afinitetnih kromatografij z vezanim CnSPI oz. rCnp je pokazala zelo podobne rezultate. Z afinitetno kromatografijo z vezanim knispinom smo iz izvlečka meglenke prav tako izolirali več proteinov s kasneje dokazano proteolitično aktivnostjo. Vzorec vrh Cn-r smo dodatno očistili s FPLC in aktivne vrhove nadalje karakterizirali. Z analizo peptidov v hidrolizirani verigi inzulina B smo določili specifična mesta cepitve proteazam v vrhu 4 in vrhu 2 in jih primerjali s specifičnimi mesti cepitve oksidirane verige B inzulina drugih proteaz v bazi podatkov MEROPS. Vrh 4 vsebuje zelo specifično proteazo, saj je substrat kljub 24-urnem delovanju cepila le na enem mestu. V vzorcih gre verjetno za mešanico serinskih in aspartatnih proteaz.

pH-optimum izoliranih proteaz je bil pri vrednosti 9. Dodatek kofaktorjev  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  in  $\text{MgCl}_2$  je pozitivno vplival na aktivnost proteaz , medtem ko je dodatek kofaktorja  $\text{ZnCl}_2$  aktivnost celo inhibiral.

Pri izolaciji proteaz iz micelija smo uporabili afinitetni nosilec z vezanim rekombinantnim knispinom in očistili protein z molekulske maso 16 kDa, ki pa ni kazal želatinolitične aktivnosti.

Primerjava vzorcev proteinov, izoliranih iz megleinke s CnSPI in rCnp-afinitetno kromatografijo, je pokazala enakovredne rezultate. Po drugi strani so se pri izolaciji iz izvlečkov orjaškega dežnika (*M. procera*) pokazale razlike v rezultatih afinitetnih kromatografij z vezanim naravnim oziroma rekombinantnim inhibitorjem. Analiza NaDS-PAGE vrhov Mp-n in Mp-r je pokazala popolnoma drugačne vzorce proteinskih lis. Prisotnosti proteaz v izoliranih vzorcih nismo dokazali.

V drugem delu smo preizkusili uporabnost afinitetnega nosilca z vezanim rCnp za izolacijo serinskih proteaz iz gojišča bakterije *B. subtilis* in za čiščenje pripravka delno očiščenih tripsinov. Z optimizacijo gojenja bakterije *B. subtilis* smo ugotovili, da *B. subtilis* izloča več subtilizinov v stacionarni fazi ter v gojišču brez dodane glukoze. Uspeli smo izolirati subtilizine, vendar je bil potreben korak obarjanja proteinov z amonijevim sulfatom.

Pripravek tripsina, ki je vseboval mešanico tripsinov, smo uspeli dobro očistiti. Dobili smo močnejšo proteinsko liso v velikosti 22 kDa, ki približno odgovarja molekulski masi tripsina iz goveda. Poleg tega je iz cimograma z želatino razvidna močnejša aktivnost v vzorcu očiščenem z afinitetno kromatografijo.

CnSPI in rCnp, kemično vezana na trden Sefarozni nosilec, sta se izkazala uporabna za iskanje tarč v gobi ter hitro in enostavno čiščenje serinskih proteaz iz drugih virov v laboratorijskem merilu.

## 7 VIRI

Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. Nucleic acids research, 25, 17: 3389-3402

Avanzo P., Sabotič J., Anžlovar S., Popovič T., Leonardi A., Pain R., Kos J., Brzin J. 2009 Trypsin specific serine protease inhibitor from basidiomycete *Clitocybe nebularis*. Microbiology (v tisku)

Axen R., Porath J., Ernback S. 1967. Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Nature, 214, 5095: 1302-1304

Barrett A.J. in Rawlings N.D. 1995. Perspectives in biochemistry and biophysics, Families and Clans of Serine Peptidases. Archives of Biochemistry and Biophysics, 318, 2: 247-250

Barrett A.J., McDonald J.K. 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. Biochemical Journal, 237, 3: 935

Barrett A.J., 1986. An introduction to the proteinases. V: Proteinase Inhibitors, Barrett, A.J., Salvesen, G. (ed.), Amsterdam, Elsevier: 3-22

Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., Clarke N.D. 2002. Biochemistry, New York, ZDA. W.H. Freeman and Company: 1134 str.

Bode W., Huber R. 1991. Ligand binding: Proteinase-protein inhibitor interactions. Current Opinion in Structural Biology, 1: 45-52

Bode W., Huber R. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interactions with proteinases. European Journal of Biochemistry, 204: 433-451

Burton K.S., Wood D.A., Thurston C.F., Barker P.J. 1993. Purification and characterization of a serine proteinase from senescent sporophores of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. Journal of General Microbiology, 139, 6: 1379-1386

Chang A., Scheer M., Grote A., Schomburg I., Schomburg D. 2009. BRENDA, AMENDA and FRENDNA the enzyme information system: new content and tools in 2009. Nucleic Acids Research, 37: D588-D592

Chihara C.J., Song C., LaMonte G., Fetalvero K., Hinchman K., Phan H., Pineda M., Robinson K., Schneider G.P. 2005. Identification and partial characterization of the enzyme of omega: one of five putative DPP IV genes in *Drosophila melanogaster*. Journal of Insect Science, 5: 26

Cunningham L.W. jr. 1954. Molecular-kinetic properties of crystalline diisopropyl phosphoryl trypsin. Journal of Biological Chemistry, 211: 13-19

- Dass S.B., Dosoretz C.G., Reddy C.A., Grethlein H.E. 1995. Extracellular proteases produced by the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic and non-lignolytic conditions. Archives in Microbiology, 163, 4: 254-258
- Dohmae N., Takio K., Tsumuraya Y., Hashimoto Y. 1995 The complete amino acid sequences of two serine proteinase inhibitors from the fruiting bodies of a basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. Archivec of Biochemistry and Biophysics, 316, 1: 498-506
- Dreyer T. 1989. Substrate specificity of proteinase *yscA* from *Saccharomyces cerevisiae*. Carlsberg Research Communications, 54: 85-97
- Faraco V., Palmieri G., Monti M., Sannia G., Giardina P. 2005. A new subfamily of fungal subtilases: structural and functional analysis of a *Pleurotus ostreatus* member. Microbiology, 151, 2: 457-466
- Gogala N. 1996. Simbiotske glive. V: Biotehnologija – osnovna znanja. Raspored P. (ur.). Ljubljana, BIA: 113-128
- Gunde-Cimerman N. 1996. Nitaste glive. V: Biotehnologija - osnovna znanja. Raspored P. (ur.). Ljubljana, BIA: 95-111
- Gzogyan L.A., Proskuryakov M.T., Ievleva E.V., Valueva T.A. 2005. Trypsin-Like Proteinases and Trypsin Inhibitors in Fruiting Bodies of Higher Fungi. Applied Biochemistry and Microbiology, 41, 6: 538–541
- Johnston J.M., Ramos E.R., Bilbrey R.E., Gathman A.C., Lilly W.W. 2000. Characterization od ScPrI, a samll serine protease, from mycelia od *Schizophyllum commune*. Mycological Research, 104, 6: 726-731
- Kawamura T., Oda T., Muramatsu T. 2000. Purification and characterization of a dipeptidyl carboxypeptidase from the polychaete *Neanthes virens* resembling angiotensin I converting enzyme. Comparative Biochemistry and Physiology, 126: 29-37
- Kazan D., Denizci A.A., Oner M.N., Erarslan A. 2005. Purification and characterization of a serine alkaline protease from *Bacillus clausii* GMBAE 42. Journal of Industrial Microbioogy and Biotechnology, 32: 335-344
- Klomklao S., Kishimura H., Yabe M., Benjakul S. 2007. Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*).Comparative Biochemistry and Physiology, 147B: 682-689
- Krowarsch D., Cierpicki T., Jelen F., Otlewski J. 2003. Canonical protein inhibitors of serine proteases. Cellular and Molecular Life Sciences, 60: 2427-2444
- Laskowski M. Jr in Kato I., 1980. Protein inhibitors of proteinases. Annual Review Biochemistry, 49: 593–626
- Laskowski M. Jr, 1986. Protein inhibitors of serine proteinases - mechanism and classification. Advances in experimental medicine and biology, 199: 1-17

- Laskowski M., Qasim M.A., Stephen K. Lu. 2000. Interaction of standard mechanism, canonical preotein inhibitors with serine preoteinases. V: Protein-protein recognition, Kleanthous C. (ed.), Norwich, Oxford University Press: 228-279
- Liu, X.; Broshears, W.C.; Reilly, J.P. 2007. Probing the structure and activity of trypsin with amidination. Anaytical Biochemistry, 367: 13-19
- Meussendoerffer F., Tortora P., Holzer H. 1980. Purification and properties of proteinase A from yeast. Journal of Biological Chemistry, 255: 12087-12093
- Mohr P., Pommerening K. 1985. Affinity chromatography: practical and theoretical aspects. (33 edition), New York, CRC Press: 301 str.
- NC-IUBMB. 2009. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse. London, UK, Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, NC-IUBMB  
<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> (april 2009)
- Odani S., Tominaga K., Kondou S., Hori H., Koide T., Hara S., Isemura M., Tsunasawa S. 1999. The inhibitory properties and primary structure of a novel serine proteinase inhibitor from the fruiting body of the basidiomycete, *Lentinus edodes*. European Journal of Biochemistry, 262, 3: 915-923
- Otlewski J, 1999. Protein inhibitors of serine proteinases. Acta Biochimica Polonica, 46, 3: 531-565
- Pace G. 1981. Vse o gobah. Ljubljana, Mladinska knjiga: 362 str.
- Page M.J. in Di Cera E. 2008. Serine peptidases: Classification, structure and function. Cellular and Molecular Life Sciences, 65: 1220-1236
- Affinity chromatography. Principles and methods. Uppsala, Švedska, Ljungföretagen AB: 112 str.
- Podobnik A., Devetak D. 1997. Biologija 4 in 5. Raznolikost živih bitij 1 in 2. 1. izd. Ljubljana, DZS: 256 str.
- Polanowski A., Wilimowska-Pelc A., Kowalska J., Grybel J., Želazko M., Wilusz T. 2003. Non- conventional affinity chromatography of serine proteinases and their inhibitors. Acta biochimica polonica, 50, 3:765-773
- Poler A. 1990. Gremo po gobe! Maribor, Obzorja: 474 str.
- Poler A. 2004. Nabirajmo užitne gobe. Ljubljana, Kmečki glas: 128 str.
- Porath J., Flodin P. 1959. Gel filtration: method for desalting and group separation. Nature, 183: 1657-1659
- Priest F.G. Extracellular Enzyme Synthesis in the Genus Bacillus. 1977. Bacteriological Reviews, 41, 3:711-753

- Raffaelli M., Thomas-Domenech J.M. 1990. Botanika. 1. Izdaja. Ljubljana, Mladinska knjiga: 96 str.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Dehpande V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 3: 597-635
- Rawlings N.D., Barrett A.J. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 290: 205-218
- Rawlings N.D., Morton F.R., Barrett A.J. 2006. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 34: D270-D272
- Rawlings N.D., Morton F.R., Barrett A.J. 2007. An Introduction to Peptidases and the Merops Database. V: Industrial enzymes. Structure, function and applications. Polaina J., MacCabe A.P. (ed.). Netherlands, Springer: 161-179
- Rawlings N.D., Morton F.R., Kok C.Y., Kong J., Barrett A.J. 2009. MEROPS: the peptidase database. Cambridge, UK, Wellcome Trust Sanger Institute (6. April 2009) <http://merops.sanger.ac.uk/index.htm> (april 2009)
- Rawlings N.D., Tolle D.P., Barrett A.J. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*, 378, 3: 705-716
- Sabotič J. 2007. Karakterizacija mikocipinov izbranih vrst prostotrošnic z genskim in proteinskim inženirstvom. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 201 str.
- Sabotič J., Trček T., Popovič T., Brizin J. 2006. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of Biotechnology*, 128, 2: 297-307
- Salvesen G., Nagase H. 1989. Inhibition of proteolytic enzymes. V: Proteolytic enzymes: A practical approach. Benyou R.J., Bond J.S. (ed). Oxford, IRL Press: 83-104
- Shaginian K.A., Alekhina I.A., Denisova N.P. 1990. Serine proteinase from higher basidiomycetes of Coprinus genus. *Biokhimija*, 55, 8: 1387-1395
- Sipos T., Merkel J.R. 1970. Effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry*, 9, 14: 2766-2775
- Smith C.A., Toogood H.S., Baker H.M., Daniel R.M., Baker E.N. 1999. Calcium-mediated thermostability in the subtilisin superfamily: the crystal structure of *Bacillus Ak.1* protease at 1.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 294: 1027-1040
- Suzuki N., Nishibori K., Oodaira Y., Kitamura S., Michigami K., Nagata K., Tatara Y., Lee B.R., Ichishima E. 2005. Grifolisin, a member od the sedolisin family produced by the fungus *Grifola frondosa*. *Phytochemistry*, 66, 9: 983-990
- T.Læssoe.2006. Gobe. 1.izdaja. Ljubljana, Prešernova družba: 304 str.

- Turk B., Turk V., Turk D. 1997. Structural and functional aspects of papain like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biological Chemistry*, 378: 141-150
- Twining S.S. 1984. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Analytical Biochemistry*, 143: 30-34
- Uhlen M. 2008. Affinity as a tool in life science. *Biotechniques*, 44, 5: 649-654.
- Vetter J. 2000. Trypsin inhibitor activity of basidiomycete mushrooms. *European Food Research and Technology*, 211: 346-348
- Vozelj S., Obermajer N., Kos J. 2007. Proteaze in njihovi inhibitorji v telesnih tekočinah kot diagnostični in prognostični tumorski kazalci. *Farmacevtski vestnik*, 58, 4: 133-138
- Watkinson S.C., Burton K.S., Wood D.A. 2001. Characteristics of intracellular peptidase and proteinase activities from the mycelium of a cord-forming wood decay fungus, *Serpula lacrymans*. *Mycological Research*, 105, 6: 698-704
- Zuchowski J., Grzywnowicz K. 2006. Partial Purification of Proteinase K Inhibitors from Liquid-Cultured Mycelia of the White Rot Basidiomycete *Trametes versicolor*. *Current Microbiology*, 53, 4: 259-264

## ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju prof. dr. Janku Kosu, ki mi je omogočil sodelovanje na področju raziskav proteaz in proteaznih inhibitorjev.

Posebna zahvala gre somentorici in delovni mentorici dr. Jerici Sabotič, za usmerjanje in spodbudo, številne nasvete ter pomoč pri izdelavi naloge.

Za strokovni pregled dela se zahvaljujem somentorici dr. Jerici Sabotič, mentorju prof. dr. Janku Kosu in recenzentki prof. dr. Kristini Sepčić.

Zahvaljujem se Institutu Jožef Stefan, ki mi je omogočil izvedbo raziskave.

Posebno hvaležna sem tudi Jožetu Brzinu, Tatjani Popovič, Juretu Pohlevnu in Maruški Budič za nasvete in pomoč pri raziskovalnem delu. Zahvaljujem se tudi ostalim zaposlenim na Inštitutu Jožef Štefan, saj so mi bili vsi vedno pripravljeni priskočiti na pomoč.

Najlepša hvala mojim staršem, bratu ter fantu, ki so me ves čas spodbujali in mi stali ob strani.

## PRILOGA

### Shematski prikaz poteka dela

