

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Katarina MUSTAR

**UPORABA MAKROCIPINA IZ GOBE ORJAŠKI
DEŽNIK NA TRDNEM NOSILCU ZA IZOLACIJO
CISTEINSKIH PROTEAZ Z AFINITETNO
KROMATOGRAFIJO**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Katarina MUSTAR

**UPORABA MAKROCIPINA IZ GOBE ORJAŠKI DEŽNIK NA
TRDNEM NOSILCU ZA IZOLACIJO CISTEINSKIH PROTEAZ Z
AFINITETNO KROMATOGRFIJO**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**USING MACROCYPIN FROM PARASOL MUSHROOM AS AN
AFFINITY CHROMATOGRAPHY LIGAND FOR ISOLATION OF
CYSTEINE PROTEASES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Odseku za biotehnologijo Inštituta Jožef Štefan v Ljubljani.

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

Komisija za oceno in zagovor:

- Predsednik: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- Član: prof. dr. Janko KOS
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo
- Član: dr. Jerica SABOTIČ
Inštitut Jožef Štefan, Ljubljana, Odsek za biotehnologijo
- Član: doc. dr. Blaž CIGIĆ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

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.

Katarina MUSTAR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 582.28 : 606 : 577.152.34 (043.2)
KG prostotrosnice/bazidiomicete/*Macrolepiota procera*/*Clitocybe nebularis*/proteazni inhibitorji/makrocipin/cisteinska proteaza/afinitetna kromatografija/*Phaseolus vulgaris*/*Actinidia deliciosa*
AV MUSTAR, Katarina
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 MAKROCIPINA IZ GOBE ORJAŠKI DEŽNIK NA TRDNEM NOSILCU ZA IZOLACIJO CISTEINSKIH PROTEAZ Z AFINITETNO KROMATOGRFIJO
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 69 str., 7 pregl., 32 sl., 53 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI Proteaze imajo pomembno vlogo pri mnogih fizioloških in patoloških procesih. Najpomembnejši mehanizem uravnavanja njihove proteolitične aktivnosti je interakcija s specifičnimi inhibitorji. Inhibitor cisteinskih proteaz makrocipin iz gobe orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*) je nov inhibitor z zanimivimi inhibitorynimi lastnostmi, vendar je njegova biološka vloga nepoznana. Rekombinantni makrocipin, kemično vezan na afinitetni nosilec, predstavlja zelo uporaben afinitetni medij za hitro in enostavno čiščenje cisteinskih proteaz iz različnih virov (izvlečki rastlinskih, glivnih, živalskih tkiv, bakterijskih lizatov in podobno). Optimirali smo izolacijo proteaz iz gobjih izvlečkov, kot najučinkovitejša se je izkazala elucija s spremembo pH, prav tako tudi pri izolaciji legumaina in ostalih cisteinskih proteaz. Z uporabo makrocipina smo v postopku afinitetne kromatografije izolirali proteaze iz prostotrosnic meglenke (*Clitocybe nebularis*) in orjaškega dežnika. Izolirali smo makrocipin in lektin CnL iz meglenke ter lektinom podobne proteine iz orjaškega dežnika. Pokazali smo, da se izolirani proteini na makrocipin najverjetneje vežejo specifično, ter da lektin CnL ne vpliva na inhibitoryno aktivnost makrocipina. Iz tega lahko sklepamo na fiziološko in biološko funkcijo makrocipina, ki je verjetno uravnavanje proteolitične aktivnosti. Morda sodeluje pri uravnavanju aktivnosti gobjih lektinov, in je tako lahko posredno ali neposredno vpleten tudi v obrambo pred škodljivci, vzpostavljanje medvrstnih razmerij in razvoj plodišč. Z makrocipin-afinitetno kromatografijo smo izolirali tudi aktinidin iz kivija, legumain iz kalečih semen fižola ter legumain in druge cisteinske proteaze iz korteksa svinjskih ledvic. Afinitetna kromatografijo, z inhibitorjem cisteinskih proteaz, vezanim na trden nosilec, se je izkazala za uporabno metodo iskanja tarč v gobi in izolacije cisteinskih proteaz iz različnih naravnih virov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
 DC UDC 582.28 : 606 : 577.152.34 (043.2)
 CX basidiomycetes/*Macrolepiota procera*/*Clitocybe nebularis*/protease inhibitors/macrocyprin/cysteine protease/affinity chromatography/*Phaseolus vulgaris*/*Actinidia deliciosa*
 AU MUSTAR, Katarina
 AA KOS, Janko (supervisor)/SABOTIČ, Jerica (co-supervisor)
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
 PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme of Biotechnology
 PY 2009
 TI USING MACROCYPRIN FROM PARASOL MUSHROOM AS AN AFFINITY CHROMATOGRAPHY LIGAND FOR ISOLATION OF CYSTEINE PROTEASES
 DT Graduation thesis (university studies)
 NO XII, 69 p., 7 tab., 32 fig., 53 ref.
 LA sl
 AL sl / en
 AB Proteases play important roles in many physiological and pathophysiological processes. The most important mechanism of regulation of their proteolytic activity is interaction with specific inhibitors. Cysteine protease inhibitor macrocyprin from parasol mushroom (*Macrolepiota procera*) is a new inhibitor with interesting inhibitory properties, although its biological function is unknown. Recombinant macrocyprin, chemically bound to affinity matrix, represents a very useful affinity medium for quick and easy purification of cysteine proteases from various sources (plant extracts, fungal, animal tissues, bacterial lysates and similarly). Isolation of proteases from mushroom extracts was optimised and the most effective isolation was achieved by pH change, which proved most effective also for isolation of legumain and other cysteine proteases. Proteases were isolated from basidiomycetes clouded agaric (*Clitocybe nebularis*) and parasol mushroom (*Macrolepiota procera*) using macrocyprin-affinity chromatography. We have isolated macrocyprin and lectin CnL from clouded agaric and lectin-like proteins from parasol mushroom. The isolated proteins have shown to bind specifically to macrocyprin and the CnL lectin did not affect its inhibitory activity against papain. These results suggest a physiological and biological function of macrocyprin, which is likely to be regulation of proteolytic activity. It may also participate in regulation of mushroom lectins' activities, and therefore may be directly or indirectly involved in the defence against pests, the establishment of interspecific relationships and the development of basidiocarps. By macrocyprin-affinity chromatography we have isolated also actinidin from kiwifruit, legumain from germinated bean seeds and legumain and other cysteine proteases from pig kidney cortex. Affinity chromatography with cysteine protease inhibitor ligated to solid matrix proved to be a useful method for target protein search in mushrooms and isolation of cysteine proteases from different natural sources.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD IN OPREDELITEV PROBLEMA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 PROTEAZE	2
2.1.1 Cisteinske proteaze	3
2.1.1.1 Papainova družina proteaz C1	3
2.1.1.2 Legumainova družina proteaz C13	4
2.1.1.3 Fiziološka vloga cisteinskih proteaz	5
2.2 INHIBITORJI PROTEAZ	6
2.2.1 Glivni inhibitorji družine papainu podobnih cisteinskih proteaz	6
2.2.1.1 Makrocipin	7
2.3 GLIVE	8
2.3.1 Prostotrosnice (<i>Basidiomycetes</i>)	8
2.3.1.1 <i>Macrolepiota procera</i> (orjaški dežnik)	9
2.3.1.2 <i>Clitocybe nebularis</i> (meglenka, poprhnjena livka)	10
2.4 KROMATOGRFSKE METODE	10
2.4.1 Afinitetna kromatografija	11
2.4.1.1 Princip	12
2.4.1.2 Nosilec	13
2.4.1.3 Ligand	14
2.4.1.4 Vezava liganda na nosilec	14
2.4.1.5 Postopek	15
2.4.1.6 Uporaba	15
3 MATERIAL IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.1.1 Naravni materiali	16
3.1.2 Plazmidi	16
3.1.3 Bakterijski sevi	16
3.1.4 Gojišča	16

3.1.5 Kemikalije in drobna oprema	17
3.1.6 Pufri in reagenti	17
3.1.7 Oprema	19
3.2 METODE	20
3.2.1 Priprava rekombinantnega makrocipina	20
3.2.1.1 Transformacija plazmida pET11a::rMcp1a v ekspresijski sev <i>E.coli</i> BL21(DE3)	20
3.2.1.2 Izražanje rMcp v bakterijah <i>E.coli</i> s pomočjo indukcije z IPTG	20
3.2.1.3 Izolacija rMcp	21
3.2.1.4 Gelska filtracija	21
3.2.1.5 Ultrafiltracija	22
3.2.1.6 Določanje inhibitorne aktivnosti rMcp	22
3.2.1.7 Določanje koncentracije rMcp	22
3.2.2 Vezava liganda (rMcp) na nosilec (sefarozo)	23
3.2.3 Priprava izvlečkov iz naravnih vzorcev	24
3.2.3.1 Priprava izvlečka iz gob	24
3.2.3.2 Priprava kivijevega izvlečka	24
3.2.3.3 Priprava izvlečka iz fižolovih semen	24
3.2.3.4 Priprava izvlečka iz svinjskih ledvic	25
3.2.4 Afinitetna kromatografija	25
3.2.5 Karakterizacija proteinov	26
3.2.5.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE)	26
3.2.5.2 Cimografija z želatino	27
3.2.5.3 Nativna elektroforeza (PAGE)	28
3.2.5.4 Prenos Western in določanje N-terminalnega aminokislinskega zaporedja	28
3.2.5.5 Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo	29
3.2.5.6 Določanje encimske aktivnosti	30
3.2.5.6.1 Test encimske aktivnosti s substratom Z-Phe-Arg-AMC	30
3.2.5.6.2 Test encimske aktivnosti s substratom Z-Ala-Ala-Asn-AMC	30
3.2.5.6.3 Test encimske aktivnosti s substratom FITC- hemoglobin	31
3.2.5.6.4 Test encimske aktivnosti s substratom BAPNA	31
3.2.5.7 Določanje vpliva lektina CnL na inhibitorno aktivnost Mcp	32
4 REZULTATI	33
4.1 PRIPRAVA AFINITETNE KROMATOGRFIJE	33
4.1.1 Heterologno izražanje inhibitorja cisteinskih proteaz makrocipina	33
4.1.2 Čiščenje in karakterizacija rekombinantnega makrocipina	34
4.1.3 Priprava afinitetne kromatografije	36
4.2 IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA CISTEINSKIH PROTEAZ	37
4.2.1 Izolacija cisteinskih proteaz iz prostotrošnic	37

4.2.1.1 Optimizacija izolacije cisteinskih proteaz iz prostotrošnic	38
4.2.1.2 Analiza proteinov z elektroforeznimi metodami	38
4.2.1.3 Encimske aktivnosti	40
4.2.1.4 Analiza N-terminalnih aminokislinskih zaporedij	40
4.2.1.5 Vpliv CnL na inhibitorno aktivnost Mcp	43
4.2.1.6 Vezava proteinov iz prostotrošnic na nosilec (sefarozo)	44
4.2.2 Izolacija in karakterizacija cisteinskih proteaz iz kivija	47
4.2.2.1 Izolacija cisteinskih proteaz iz kivija	47
4.2.2.2 Analiza proteinov z elektroforeznimi metodami	47
4.2.2.3 Encimske aktivnosti	48
4.2.2.4 Analiza N-terminalnih aminokislinskih zaporedij	48
4.2.3 Izolacija in karakterizacija cisteinskih proteaz iz semen fižola	49
4.2.3.1 Izolacija cisteinskih proteaz iz semen fižola	49
4.2.3.2 Analiza proteinov z elektroforeznimi metodami	50
4.2.3.3 Encimske aktivnosti	51
4.2.3.4 Analiza N-terminalnih aminokislinskih zaporedij	52
4.2.3.5 Masna spektrometrija	53
4.2.4 Izolacija in karakterizacija cisteinskih proteaz iz svinjskih ledvic	53
4.2.4.1 Izolacija cisteinskih proteaz iz svinjskih ledvic	53
4.2.4.2 Analiza proteinov z elektroforeznimi metodami	54
4.2.4.3 Encimske aktivnosti	56
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	57
5.1 RAZPRAVA	57
5.2 SKLEPI	61
6 POVZETEK	63
7 VIRI	65
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kemikalije in drobna oprema.	17
Preglednica 2: Izračun koncentracije [mg/ml] in mase [mg] proizvedenega in očiščenega rMcp1.	36
Preglednica 3: Inhibitorna aktivnost makrocipina vezanega na sefarozo.	36
Preglednica 4: N-terminalna aminokislinska zaporedja proteinov, izoliranih iz prostotrosnic.	41
Preglednica 5: N-terminalna aminokislinska zaporedja proteinov v kontrolnih proteinskih lisah.	46
Preglednica 6: N-terminalna aminokislinska zaporedja proteinov, izoliranih iz kivija (<i>Actinidia deliciosa</i>).	49
Preglednica 7: N-terminalna aminokislinska zaporedja proteinov, izoliranih iz fižolovih semen (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	53

KAZALO SLIK

Slika 1: Prostotrosnica <i>Macrolepiota procera</i> (orjaški dežnik) (Poler, 1990: 95).	9
Slika 2: Prostotrosnica <i>Clitocybe nebularis</i> (meglenka, poprhnjena livka) (Vrščaj, 1990: 207).	10
Slika 3: Osnova afinitetne kromatografije (Kregar, 1996).	12
Slika 4: Princip afinitetne kromatografije (Constans, 2005).	13
Slika 5: Shematski prikaz priprave afinitetne kromatografije.	33
Slika 6: Izražanje rekombinantnega makrocipina.	34
Slika 7: Čiščenje rekombinantnega makrocipina z gelsko filtracijo.	35
Slika 8: Analiza očiščenega rekombinantnega makrocipina z NaDS-PAGE.	35
Slika 9: Shematski prikaz postopka izolacije in karakterizacije proteinov iz različnih naravnih virov.	37
Slika 10: Elucijski diagram rMcp-afinitetne kromatografije izvlečkov prostotrosnic.	38
Slika 11: Analiza proteinov izoliranih iz meglenke z NaDS-PAGE (A) in želatinsko cimografijo (B).	39
Slika 12: Analiza proteinov izoliranih iz orjaškega dežnika z NaDS-PAGE (A) in želatinsko cimografijo (B).	40
Slika 13: NaDS-PAGE proteinov iz prostotrosnic, ki smo jih izbrali za določanje N-terminalnega zaporedja.	41
Slika 14: Poravnava določenega N-terminalnega aminokislinskega zaporedja Cn1 z zaporedjem makrocipinov Mcp1a in Mcp4a.	42
Slika 15: Poravnava določenega N-terminalnega aminokislinskega zaporedja Cn3 z zaporedjem N-konca ricinu B-podobnega lektina CnL.	42
Slika 16: Poravnava določenega N-terminalnega aminokislinskega zaporedja Mp3 z zaporedjem domnevne mananaze iz <i>A. bisporus</i> in proteina iz <i>L. bicolor</i> .	43
Slika 17: Vpliv lektina CnL na inhibitorno aktivnost makrocipina.	44
Slika 18: Analiza NaDS-PAGE ne-kontrolnih in kontrolnih izolatov iz prostotrosnic.	45
Slika 19: NaDS-PAGE (kontrolnih) proteinov iz prostotrosnic, ki smo jih izbrali za določanje N-terminalnega zaporedja.	45

Slika 20: Poravnava določenega N-terminalnega aminokislinskega zaporedja MpK5 z zaporedjem galektina iz <i>L. bicolor</i> .	47
Slika 21: Elucijski diagram rMcp-afinitetne kromatografije izvlečkov kivija.	47
Slika 22: Analiza proteinov izoliranih iz kivija z NaDS-PAGE (A) in želatinsko cimografijo (B).	48
Slika 23: NaDS-PAGE proteinov iz kivija (<i>Actinidia deliciosa</i>), ki smo jih izbrali za določanje N-terminalnega zaporedja.	48
Slika 24: Elucijski diagram rMcp-afinitetne kromatografije izvlečkov fižola.	50
Slika 25: Analiza proteinov izoliranih iz fižola z NaDS-PAGE.	50
Slika 26: Nativna elektroforeza (PAGE) vzorcev izoliranih iz fižolovih semen.	51
Slika 27: Aktivnosti legumaina in ostalih cisteinskih proteaz iz fižolovih semen.	52
Slika 28: NaDS-PAGE proteinov, izoliranih iz fižolovih semen (<i>Phaseolus vulgaris</i>), ki smo jih izbrali za določanje N-terminalnega zaporedja.	52
Slika 29: Elucijski diagram rMcp-afinitetne kromatografije izvlečkov ledvic.	54
Slika 30: Analiza proteinov izoliranih iz svinjskih ledvic z NaDS-PAGE.	55
Slika 31: Nativna elektroforeza (PAGE) vzorcev izoliranih iz svinjskih ledvic.	55
Slika 32: Aktivnost legumaina in ostalih cisteinskih proteaz iz svinjskih ledvic.	56

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
AMC	7-amino-4-metil kumarin (»7-amino-4-methyl coumarin«)
APS	amonijev persulfat
BANA	N- α -benzoil-D,L-arginil- β -naftilamid
BAPNA	N-benzoil-D,L-arginil- <i>p</i> -nitroanilid
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Brij 35	polioksetilen lauril eter
CNBr	cianogen bromid
CnL	lektin iz prostotrošnice <i>Clitocybe nebularis</i>
Da	dalton, enota za molekulsko maso, ki ustreza 1/12 mase čistega izotopa ^{12}C
dH ₂ O	destilirana voda
DTT	ditiotreitol
E64	trans-epoksi sukcinil-L-levcilamido-(4-gvanidino)-butan
EDTA	etilendiaminotetraacetat
FITC	fluorescein-izotiocianat
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
kDa	kilo dalton
l	dolžina optične poti
LB	Luria-Bertani
LBA	Luria-Bertani z dodatkom ampicilina
LMW	nizkomolekularni proteinski standard (»low molecular weight standard«)
M	molarnost, mol/l
Mcp	makrocipin (»macrocyprin«)
Me ₂ SO	dimetilsulfoksid
MHCII	poglavitni histokompatibilni kompleks razreda II (»major histocompatibility complex class II«)
mRNA	informacijska RNA (»messenger RNA«)
NaAc	natrijev acetat
NaDS	natrijev dodecil sulfat
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
NC-IUBMB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
pI	izoelektrična točka proteinov (»point of isoelectricity«)
<i>p</i> NA	<i>para</i> -nitroanilid

PVDF	poliviniliden difluorid
rMcp	rekombinantni makrocipin
SN	supernatant
TCA	trikloroocetna kislina (»trichloroacetic acid«)
TEMED	tetrametiletilendiamin
Tris	tris-hidroksimetil-aminometan
UV	ultravijolična svetloba
VIS	vidna svetloba
Z-Ala-Ala-Asn-AMC	benzoiloksikarbonil-Ala-Ala-Asn-4-metil-7-kumarilamid
Z-Phe-Arg-AMC	benzoiloksikarbonil-Phe-Arg-4-metil-7-kumarilamid
Z-Phe-Arg- <i>p</i> NA	benzoiloksikarbonil-Phe-Arg- <i>p</i> NA
ϵ	molarni absorpcijski koeficient

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	triptofan
Val	V	valin

1 UVOD IN OPREDELITEV PROBLEMA

Izolacija in čiščenje proteaz iz rastlinskih, glivnih, živalskih tkiv, bakterijskih lizatov in drugih virov običajno predstavljajo večstopenjski postopek z majhnim končnim izkoristkom. Z uporabo trdnih nosilcev, na katerih so vezane substance z afiniteto do iskane proteaze, lahko postopek poenostavimo.

Iz gobe orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*) je bil izoliran inhibitor cisteinskih proteaz makrocipin, ki je v svojem razredu popolnoma nov inhibitor z zanimivimi inhibitornimi lastnostmi. Kemično vezan na trden nosilec bi lahko predstavljal zelo uporaben afinitetni medij za hitro in enostavno čiščenje cisteinskih proteaz iz različnih virov. Glede na to, da je njegova funkcija nepoznana, bi lahko s pomočjo prepoznavanja njegovih tarč v gobi sklepali na njegovo biološko in fiziološko funkcijo. Njegovo uporabnost lahko ovrednotimo tudi z iskanjem tarč v različnih okoljskih vzorcih.

Cilj naloge je preizkusiti možnost uporabe afinitetnega nosilca z vezanim inhibitorjem cisteinskih proteaz makrocipinom za izolacijo nekaterih cisteinskih proteaz iz različnih naravnih virov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PROTEAZE

Proteaze, ki jih imenujemo tudi peptidaze, proteinaze oz. proteolitični encimi (Barrett in McDonald, 1986), so encimi, ki hidrolizirajo peptidne vezi. So nujno potrebne za preživetje živih organizmov, kodirane so s približno 2% genov v vseh vrstah živih organizmov (Rawlings in sod., 2009) in predstavljajo pomemben del fizioloških procesov v organizmih. Proteaze so vključene v različna patološka stanja pri živalih in rastlinah in predstavljajo pomemben virulenčni faktor mnogih patogenov kot so virusi, bakterije, glive in paraziti (Vandeputte-Rutten in Gros, 2002). Proteaze so vključene v številne procese, kot je npr. prebava proteinov iz hrane, recikliranje intracelularnih proteinov, sodelujejo pri koagulaciji krvi, predstavljanju antigenov in aktivaciji številnih proteinov, vključno z encimi, peptidnimi hormoni ter nevrottransmiterji (Rawlings in sod., 2007) in igrajo ključne regulatorne vloge pri spočetju, rojstvu, prebavi, rasti, razvoju, staranju in celo smrti organizmov (Shen in Chou, 2009). V farmacevtski industriji so pomembne tarče za pripravo zdravil proti različnim boleznim. Proteaze so široko uporabne v biotehnologiji, predvsem v živilstvu, usnjarstvu, industriji detergentov in v ekoloških bioremediacijskih procesih. Zaradi njihovega obsežnega potenciala je veliko raziskav usmerjenih v odkrivanje in karakterizacijo novih v naravi prisotnih proteaz iz virov, ki so bili do sedaj spregledani (Sabotič in sod., 2006).

Obstajajo različni kriteriji razvrščanja proteaz. Glede na izvor jih lahko delimo na mikrobnne, rastlinske in živalske, glede na območje delovanja v organizmu na znotrajcelične in zunajcelične, glede na mesto cepitve pa na ekso- in endoproteaze (Barrett, 1977). Delijo se lahko tudi po velikosti na visoko- in nizko- molekularne ter tudi po načinu delovanja, glede na različen katalitski tip. Eksoproteaze cepijo peptidno vez blizu amino ali karboksi konca substrata, endoproteaze pa cepijo peptidne vezi stran od N- ali C-koncev (Grzonka in sod., 2007), torej znotraj proteinske verige. Obstajajo različni sistemi za delitev proteaz v različne skupine. NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) jih uvršča med hidrolaze, ki delujejo na peptidno vez, in jih razdeli na 19 podrazredov. Po tej nomenklaturi so eksoproteaze nadalje razdeljene glede na specifičnost odcepljanja različno velikih fragmentov iz obeh koncev polipeptidne molekule. Endoproteaze, za katere se uporablja sinonim proteinaze, pa so razdeljene na osnovi katalitskih mehanizmov (NC-IUBMB, 2009). Za razvrstitev proteaz se uporablja tudi klasifikacijski sistem MEROPS, ki deli proteaze na osnovi katalitskega mehanizma delovanja in njihove evolucijske sorodnosti-ujemanja v primarni in terciarni strukturi (Rawlings in Barret, 1993). Katalitski tip proteaze se nanaša na kemijsko skupino, ki je odgovorna za katalizo hidrolize peptidne vezi. Poznamo šest specifičnih katalitskih tipov: serinske, treoninske, cisteinske, aspartatne, glutaminske in metalo-proteaze. Pri proteazah serinskega, treoninskega in

cisteinskega tipa je katalitični nukleofil reaktivna skupina stranske verige aminokislina v aktivnem mestu (Ser, Thr, Cys), in to je lahko hidroksilna skupina oz. atom kisika (serinske in treoninske proteaze) ali sulfhidrilna skupina oz. atom žvepla (cisteinske proteaze). Pri aspartatnih in metalo proteazah je nukleofil ponavadi aktivirana molekula vode. Glutaminske proteaze so prepoznali šele leta 2005 in še niso podrobno preučene (Rawlings in sod., 2007). Posamezni katalitski tipi so razvrščeni nadalje v družine, evolucijsko povezane družine pa so združene v naddružine ali klane (Rawlings in Barrett, 1993).

2.1.1 Cisteinske proteaze

Cisteinske proteaze so prisotne v vseh živih organizmih. To so proteini z molekulskimi masami okoli 21-30 kDa. Katalizirajo hidrolizo peptidnih, amidnih, esterskih, tiol esterskih in tiono esterskih vezi (Grzonka in sod., 2007). Po klasifikaciji MEROPS razdelimo cisteinske proteaze v 10 klanov in 72 družin (Rawlings in sod., 2009). Največja in najbolj raziskana je papainova družina C1, ki spada v klan CA (Rawlings in sod., 2006).

2.1.1.1 Papainova družina proteaz C1

V družino proteaz C1 (papainova družina), ki je del klana CA, spadajo številne bakterijske in virusne proteaze, proteaze arhej, praživali, glivne, rastlinske in živalske proteaze, ki so homologne papainu, npr. papain, kimopapain, karikain, glicil-endoproteaza, bromelain, aktinidin in druge. V tej družini je veliko endoproteaz in nekaj eksoproteaz (Rawlings in sod., 2009).

Papain je najbolj poznana cisteinska proteaza. Izolirana je bila 1879 iz papaje (*Carica papaya*) in je tudi prva proteaza, ki ji je bila določena kristalografska struktura. Surov posušen lateks papaje vsebuje mešanico najmanj štirih cisteinskih proteaz (papain, kimopapain, karikain, glicil-endoproteaza) in druge encime. Zelo čist papain lahko dobimo z afinitetno kromatografijo. Papain je sestavljen iz 212 aminokislin z tremi internimi disulfidnimi mostički in ima molekulsko maso 23,4 kDa. Je relativno bazičen protein s pI 8,75 (Rawlings in sod., 2009). Struktura encimov družine C1 je podobna papainu, ki je sestavljen iz dveh domen, in sicer L-domene, katere osrednja struktura je α -vijačnica in D-domene, ki jo sestavlja β -nagubana ravnina, ločenih z režo z aktivnim mestom, ki ga pri papainu formirata Cys25 in His159, vsak na svoji domeni (Salas in sod., 2008). Aktivno mesto družine C1 predstavljata torej Cys in His, ki v pH intervalu od 3,5 do 8,0 oblikujeta katalitično diado. Za razgradnjo peptidne vezi sta pomembni še dve aminokislini. To sta Gln19, ki je pred katalitičnim Cys in Asn175, ki sledi katalitičnemu His. Gln pomaga tvoriti oksanionsko luknjo, Asn pa je pomemben za orientacijo imidazolskega obroča

histidina v katalitični reži (Rawlings in sod., 2009). Za katalitično aktivnost mora biti reaktivna tiolna skupina encima v reducirani obliki. Tako so cisteinske proteaze bolj aktivne v reducirajočem in kislem okolju (Grzonka in sod., 2007). E64 je ireverzibilni inhibitor proteaz družine C1, enako široko, toda reverzibilno inhibicijo pa kaže leupeptin (Rawlings in sod., 2009).

Aktinidin je cisteinska proteaza, ki so jo našli v sadju kivija (*Actinidia chinensis*), sestavlja ga polipeptidna veriga dolga 220 ostankov in ima molekulska masa 23,6 kDa. Podoben je papainu, saj katalizira hidrolizo benzoil-L-arginin etil estera, ima široko substratno specifičnost in široko območje optimalnega pH od 5,0 do 7,0 ter ohrani aktivnost med pH 3,5 in 8,8. Prvih 20 aminokislin aktinidina predstavlja signalno zaporedje, ki skrbi, da protein vstopa v sekretorno pot (Yuwono, 2004). Aktinidin (220 aminokislin) je lahko prisoten v neaktivni obliki s 126 aminokislin dolgim propeptidom in 33 aminokislin dolgim C- terminalnim podaljškem (Podivinsky in sod., 1989).

2.1.1.2 Legumainova družina proteaz C13

V družino proteaz C13 (legumainova družina), ki je del klana CD, spadajo številne bakterijske proteaze, proteaze arhej, praživali, gliv, rastlin in živali. Tipska proteaza je legumain, ki je bil izoliran iz stročnice *Canavalia ensiformis* (Rawlings in sod., 2009). Legumaini so Asn-specifične cisteinske proteaze, ki jih najdemo v rastlinah, kjer imajo izvencitoplazemsko lokalizacijo v vakuolah ali celičnih stenah, trematodih *Schistosoma mansoni* in kasneje so jih odkrili tudi v lizosomalnih sistemih sesalcev (Dando in sod., 1999; Chen in sod., 1997; Salas in sod., 2008). Rastlinski legumaini so klasificirani v tri glavne skupine, in sicer so lahko semenski legumaini, ki se sintetizirajo med razvojem semen, vegetativni legumaini, ki jih najdemo v vegetativnih organih in legumaini iz zgodnje embriogeneze, ki se izražajo v sadnem tkivu in kotiledonih (Salas in sod., 2008). Sesalčki legumain je bil najprej izoliran iz svinjskih ledvic, znano je tudi, da encim obstaja v številnih drugih sesalčkih tkivih, kot so posteljica, vranica, jetra, testisi in timus. Med temi organi je specifična aktivnost legumaina višja v placenti in ledvicah (Chen in sod., 1997; Yamane in sod., 2002).

Družina peptitaz C13 vsebuje asparginil-endoproteaze in glikozilfosfatidilinozitol: protein transamidaze (Rawlings in sod., 2009). Legumaini so endoproteaze s specifičnostjo za cepljenje na karboksi koncu Asn-ostanka proteina (Bah in sod., 2006). Aktivna mesta predstavljata His in Cys. Eden najboljših sintetičnih substratov za sesalčki legumain je Z-Ala-Ala-Asn-AMC. Maksimalna aktivnost je opažena pri pH 4,0 do 6,0, pri višjih pH legumain denaturira. Proteaze v družini C13 lahko inhibiramo z jodoacetamidom in N-etilmaleimidom (Rawlings in sod., 2009), klasični inhibitor cisteinskih proteaz papainove družine, E64, nanje nima vpliva (Bah in sod., 2006). Sesalčki legumain je glikoziliran,

prav tako so glikozilirani tudi rastlinski, z izjemo ricinusovih. Legumaini se sintetizirajo kot neaktivni prekursorji (pre-pro-polipeptidi), ki vključujejo N-terminalni signalni peptid in zreli encim, ki ima na obeh koncih propeptida. Prolegumain je usmerjen v lizosome ali rastlinsko vakuolo, kjer se aktivira vsaj delno z avtolizo (Rawlings in sod., 2009). Zrele rastlinske legumaine sestavlja ena polipeptidna veriga z molekulskimi masami od 33-39 kDa (Senyuk in sod., 1998). Prašičji legumain je glikoprotein z molekulsko maso 34 kDa (Chen in sod., 1997).

2.1.1.3 Fiziološka vloga cisteinskih proteaz

Vloge cisteinskih proteaz v naravi so zelo raznolike. Fiziološke funkcije rastlinskih cisteinskih proteaz vključujejo izgradnjo in razgradnjo skladiščnih proteinov med kalitvijo semen, senescenco organov in programirano celično smrtjo. Zelo pomembna je njihova vpletenost v proteasomsko proteolitično signalno pot, ki vpliva na različne metabolične procese, kot so hormonsko signaliziranje, celični cikel, embriogeneza, morfogeneza, razvoj cvetov, oksidativni stres (Salas in sod., 2008).

Družina proteaz C1 prispeva proteolitično aktivnost prebavnim vakuolam praživali in lizosomalnemu sistemu evkariontskih celic (Rawlings in sod., 2009). Papainu podobne cisteinske proteaze v rastlinah sodelujejo pri razgradnji proteinov in N-mobilizaciji med kalitvijo semen, senescenci listov, programirani celični smrti in delujejo proti rastlinskemu patogenom, pri čemer je pomemben njihov visok nivo pred dozorevanjem sadja (Salas in sod., 2008). Razgradnja skladiščnih proteinov predstavlja vir aminokislin potrebnih za sintezo proteinov pri kalitvi semen (Bah in sod., 2006). Za papain je verjetno, da posreduje pri zaščiti proti rastlinskemu škodljivcu (Konno in sod., 2004). Tudi za aktinidin je bila predlagana vloga pri obrambi, in sicer naj bi bil vpleten v zaščito pred plenilci (Yuwono, 2004). Posredno vlogo pri obrambi so potrdili Tuppo in sod. (2008), ki navajajo, da je funkcija aktinidina proteolitična cepitev kivelina na kissper in KiTH. Kissper je aktiven pri tvorbi por v membranah (Tuppo in sod., 2008).

Biološke funkcije rastlinskega legumaina vključujejo post-translacijsko procesiranje skladiščnih proteinov, lektinov in encimov in mobilizacijo skladiščnih proteinov med kalitvijo semen (Dando in sod., 1999; Rawlings in sod., 2009; Senyuk in sod., 1998). Senyuk in sod. (1998) poročajo, da legumaini razgrajujejo fazeolin, ki je glavni skladiščni globulin pri fižolu (*Phaseolus vulgaris*) in da vzorec razgradnje fazeolina sovpada z vzorcem mRNA nivoja legumaina in tvorbo legumainskih polipeptidov v kotiledonih fižolovih semen. Sesalčji legumain razgrajuje različne biološko aktivne peptide in proteine, kot so nevrotenzin, vazoaktivni intestinalni peptid, goveji serumski albumin, piščančji lizocim C. Legumain igra ključno vlogo pri procesiranju bakterijskih antigenov (fragment C tetanusnega toksina) za predstavitev s sistemom MHC II. Legumain tudi inhibira tvorbo

osteoklastov in resorpcijo kosti (Yamane in sod., 2002; Rawlings in sod. 2009; Dando in sod., 1999).

2.2 INHIBITORJI PROTEAZ

Ker so proteaze vključene v številne pomembne znotrajcelične in zunajcelične procese, je lahko nekontrolirano delovanje proteaz škodljivo, zato je uravnavanje encimske aktivnosti zelo pomembno. Aktivnost proteaz se lahko uravnava z regulacijo encimske aktivnosti z delno proteolizo neaktivnih prekurzorjev, z lokalizacijo proteaz, s posttranslacijskimi modifikacijami, s pH raztopine in z inhibitorji. Proteazne inhibitorje uvrščamo med pomembnejše regulatorje proteolitične aktivnosti encimov v bioloških procesih (Turk in sod., 1997; Rawlings in sod., 2004).

Proteinski inhibitorji proteaz so prisotni v rastlinskih in živalskih tkivih, mikroorganizmih, glivah in praživalih. Lahko se nahajajo zunajcelično ali znotrajcelično. Večina endogenih inhibitorjev je kompetitivnih. Del njihove molekule se prilega aktivnemu mestu encima in se zato specifično in reverzibilno vežejo na encim. V tem so analogni substratom in tudi mehanizem reakcije je podoben, le da ne pride do cepitve, tako kot pri substratu (Bode in Huber, 1991).

Inhibitorje lahko razdelimo glede na izvor, reakcijski mehanizem in strukturno podobnost. Salvesen in Nagase (1989) sta predlagala delitev proteaznih inhibitorjev glede na specifičnost. Razdelila sta jih na 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 (Salvesen in Nagase, 1989).

2.2.1 Glivni inhibitorji družine papainu podobnih cisteinskih proteaz

Inhibitorje družine papainu podobnih cisteinskih proteaz delimo glede na strukturno podobnost na več skupin, kot so naddružina cistatinov, ki jih nadalje razdelimo na družino stefinov, cistatinov in kininogenov, družina čagazinov, družino mikocipinov, tiropinov, družino sojinega Kunitzovega tripsinskega inhibitorja in druge (Otto in Schirmeister, 1997; Dubin, 2005).

V družino mikocipinov spadata proteinska inhibitorja cisteinskih proteaz klitocipin in makrocipin. Klitocipin je specifičen in močan inhibitor cisteinskih proteaz, izoliran iz gobe meglenke (*Clitocybe nebularis*) in je bil do odkritja makrocipina edini predstavnik nove družine inhibitorjev I48 po klasifikaciji MEROPS (Rawlings in sod., 2009). Klitocipin je protein z molekulsko maso 16,8 kDa, ima zaporedje dolgo 150 aminokislin, ki ne vsebuje

cisteinov ali metioninov. V molekuli ni disulfidnih mostičkov, prav tako so odsotni kofaktorji ali vezani kovinski ioni in ni glikoziliran. Klitocipin kaže izjemno temperaturno stabilnost in je odporen na ekstremne pH ter proteolitično razgradnjo, čeprav ni stabiliziran s kovalentnimi interakcijami v terciarni strukturi. Močno inhibira papain in katepsin L, v čemer je podoben družini cistatinov, tiropinov in inhibitorjev cisteinskih peptidaz iz krompirja. Ključna razlika klitocipina od omenjenih inhibitorjev pa je relativno slaba inhibicija katepsina B in neučinkovitost za katepsin H. Klitocipin je dober inhibitor bromelaina, kar je značilno tudi za inhibitorje cisteinskih peptidaz iz krompirja, ne pa za cistatine in tiropine. Mehanizem inhibicije cisteinskih peptidaz s klitocipinom še ni pojasnjen. Fiziološka vloga klitocipina še ni znana. V gobi *Clitocybe nebularis* se izraža v visokih koncentracijah, kar je bolj značilno za proteine s strukturnimi funkcijami in ne za proteine, udeležene v signaliziranju, katalizi ali regulaciji. Ob endogeni fiziološki funkciji je možna tudi zaščitna vloga pred patogenimi infekcijami in insekti ali abiotskimi dejavniki (Sabotič, 2007).

2.2.1.1 Makrocipin

Makrocipin (Mcp) je inhibitor cisteinskih proteaz, ki je bil izoliran iz trosnjakov orjaškega dežnika (*Macrolepiota procera*) in karakteriziran na biokemijskem in genetskem nivoju. Imenovan je bil po rodu prostotrosnic iz katerih izhaja (ang. macrocypin, *Macrolepiota procera* cysteine protease inhibitor). Makrocipin ima iz 167 aminokislin dolgega izpeljanega aminokislinskega zaporedja izračunano molekulsko maso 19 kDa, medtem ko analiza očiščenega proteina na poliakrilamidni gelski elektroforezi kaže liso z molekulsko maso 21 kDa. Izoelektrično točko ima pri pH 4,8. Makrocipin je uvrščen v družino mikocipinov, katere edini predstavnik pred njim je bil klitocipin. Makrocipin ima podobne biokemijske lastnosti in inhibitorni spekter kot klitocipin, čeprav se ujemata le v 21% izpeljanega aminokislinskega zaporedja. Inhibitorja imata podobni molekulski masi in enaki izoelektrični točki. Oba kažeta stabilnost pri visokih temperaturah in ekstremnih pH vrednostih. Makrocipin je močan inhibitor papaina in katepsinov L in K, inhibicija legumaina in katepsina H pa je bistveno šibkejša. V primerjavi s klitocipinom je makrocipin enako močan inhibitor papaina in nekoliko slabši inhibitor katepsinov L in K. Inhibicija legumaina je pri makrocipinu približno desetkrat šibkejša kot pri klitocipinu. Poleg tega pa makrocipin šibko inhibira katepsin H, medtem ko ga klitocipin ne inhibira. Genska analiza makrocipina je pokazala prisotnost genske družine makrocipina, ki kaže večjo heterogenost zaporedij kot pri klitocipinu. Enako kot pri klitocipinu pa je gen sestavljen iz štirih eksonov in treh kratkih intronov. Oba proteina imata visoko vsebnost prolinskih aminokislinskih ostankov, toda makrocipin ima za razliko od klitocipina v zaporedju metioninske, histidinske in en cisteinski ostanek. Na osnovi podobnosti zaporedij so makrocipini razdeljeni v 5 skupin, kjer je identičnost zaporedij znotraj skupin več kot 90% in med skupinami 75-86% (Sabotič, 2007; Sabotič in sod., 2009). Tudi za

makrocipin fiziološka vloga ni poznana. Predvideva se, da ima obrambno vlogo pred plenilskimi žuželkami in parazitskimi mikroorganizmi, ki napadajo gobe (Sabotič, 2007, Sabotič in sod., 2009).

2.3 GLIVE

Glive so heterotrofni organizmi. Njihova hrana so lahko odmrle organske snovi - so torej gniloživke (saprofiti) ali pa živijo kot zajedalci (paraziti) in izkoriščajo snovi celic drugih živih bitij. Lahko živijo tudi simbiotsko, v sožitju z avtotrofnimi organizmi. Večina je pritrjenih. Celice obdajajo celične stene iz hitina, redkeje celuloze. Rezervni polisaharid v celicah je glikogen (Podobnik in Devetak, 2000).

Glive delimo na glive sluzavke (*Myxomycota*) in prave glive (*Eumycota*). Glive sluzavke so organizmi, ki ne tvorijo hif, nimajo celičnih sten v času rasti in prehranjevanja in so sposobne ingestije s fagocitozo. 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 cikel ter se prehranjujejo izključno z absorpcijo. Preplet hif tvori podgobje (micelij). Prave glive nadalje razvrstimo v pet razredov: *Oomycetes* (oomicete), *Chytridiomycetes* (hitridiomicete), *Zygomycetes* (jarmaste glive), *Ascomycetes* (zaprtotrosnice, askomicete) in *Basidiomycetes* (prostotrosnice, bazidiomicete). Med *Deuteromycetes* (devteromicete) uvrščamo glive katerih spolna faza ni poznana, večina izhaja iz askomicet (Gunde-Cimerman, 1996; Podobnik in Devetak, 2000).

2.3.1 Prostotrosnice (*Basidiomycetes*)

Prostotrosnice so glive, pri katerih v spolnem procesu nastanejo haploidne bazidiospore na bazidiju, kjer pride tudi do mejoze diploidnih jeder. So pomembna skupina gliv z okoli 16000 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 (Gunde-Cimerman, 1996).

Poleg zaprtotrosnic in devteromicet spadajo prostotrosnice med višje glive, pri katerih so hife predeljene s prečnimi stenami oz. septi, ki so običajno perforirani in imajo kompleksne pore oz. dolipore. Posamezni predeli lahko vsebujejo eno ali več jeder. Primarni homokarionski micelij vsebuje v predelih (kompartimentih) po eno jedro. Če se srečata dva različna, kompatibilna micelija iste vrste, lahko sledi anastomoza hif in izmenjava jeder. Nastaneta micelija, ki imata jedra obeh paritvenih tipov in postaneta heterokarionska. To je precej pogosto in lahko vodi do nastanka tridimenzionalnega omrežja, ki pri določenih vrstah gliv omogoča nastanek velikih plodišč. Tak sekundarni

micelij namreč raste dalje v obliki zapončnega micelija, iz katerega nastanejo sprva primordiji in nato trosnjaki oz. plodišča. Površino lamel ali por prekrivajo bazidiji, ki so skupna značilnost prostotrosnic, kljub njihovi veliki raznolikosti. Na površini bazidija se navadno na 4 kratkih pecljatih izrastkih (sterigmah) razvijejo in sprostijo haploidne bazidiospore. V nasprotju z askom, pri katerem se spore razvijejo znotraj sporangija in govorimo o endosporangiju je bazidij eksosporangij. Mnoge prostotrosnice poleg spolnih spor producirajo eno ali več oblik nespolnih spor (Gunde-Cimerman, 1996; Podobnik in Devetak, 2000).

Sabotič in sod. (2007) so pokazali, da prostotrosnice vsebujejo nepričakovano število in raznolikost proteaz, kar kaže na to, da so idealen vir novih proteaz s potencialno edinstvenimi lastnostmi. Prvič so pokazali prisotnost pomembnega števila cisteinskih proteaz v prostotrosnicah. O aktivnosti cisteinskih proteaz so pred tem poročali le o domnevni aktivnosti trosnjakov *P. ostreatus*, kar je bilo neznačilno in le delno karakterizirano (Shin in Choi, 1998).

2.3.1.1 *Macrolepiota procera* (orjaški dežnik)

Orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*) spada v rod dežnikov (*Macrolepiota*), družino kukmark (*Agaricaceae*) in red lističark (*Agaricales*). Orjaški dežnik spada med največje gobe naših gozdov, saj njegov senčniku podoben klobuk doseže premer 30 cm. Klobuki mladih gob so jajčasti in kroglasti. Klobukova povrhnjica je raztrgana v razločne svetlo do temnorjave luske. Samo sredina klobuka ostane gladka. Lističi so beli in niso zrasli z betom. Klobuk je na do 40 cm visokem, tudi rjavoluskastem betu na katerem je značilno premično zastiralo. Orjaški dežnik raste v svetlih gozdovih in na obrobjih gozdov od pozne pomladi do pozne jeseni. Nežno meso te užitne gobe je popolnoma belo, ima prijeten duh in okus po orehih (Eisenreich in sod., 1993).



Slika 1: Prostotrosnica *Macrolepiota procera* (orjaški dežnik) (Poler, 1990: 95).

2.3.1.2 *Clitocybe nebularis* (meglenka, poprhnjena livka)

Meglenka ali poprhnjena livka (*Clitocybe nebularis*) spada v rod livk (*Clitocybe*), družino kolobarničark (*Tricholomataceae*) in red lističark (*Agaricales*). Mladi klobuki so močno izbočeni, kasneje se udrejo, v osredju so debelomesnati in krepki. Njihova barva se menja v sivih tonih od pepelnate do belkaste. Povrhnjica klobuka je nagubana, rob zvit, premer je do 18 cm. Lističi so zelo gosti, ozki, bledorumeni, kratko priraščeni na bet in jih je lahko odstraniti. Bel do sivkast bet se v starosti izvotli, njegova površina je podolžno vlaknata, večkrat ima nekoliko kijasto obliko. Ta vrsta je pri nas značilna poznojesenska goba, izjemoma raste tudi maja. Pojavlja se v večjih skupinah, vrstah, lokih, krogih in zlasti na stelnjakih listnatih gozdov. Je zelo pogosta goba, zlasti na submediteranskem območju. Ima poseben duh, pogosto neprijetno sladkoben. Meglenka je le pogojno užitna (Eisenreich in sod., 1993; Vrščaj, 1990).



Slika 2: Prostotrošnica *Clitocybe nebularis* (meglenka, poprhnjena livka) (Vrščaj, 1990: 207).

2.4 KROMATOGRFSKE METODE

Kromatografske tehnike spadajo med zelo učinkovite metode ločevanja substanc. Kromatografski sistem, na katerem poteka ločevanje zmesi snovi, je sestavljen iz dveh faz. Prva je stacionarna faza, ki je lahko trdna ali tekoča, druga pa je mobilna faza, ki je tekočina ali plin in se giblje skozi ali preko stacionarne faze. Kromatografske ločitve lahko izvedemo na dva načina in sicer kot tankoplastno kromatografijo ali pa kolonsko kromatografijo. Pri slednji je stacionarna faza pakirana v stekleno, železno ali plastično cev, imenovano kolona. V kolono dovajamo mobilno fazo (eluent), ki se giblje po koloni in z njo potujejo raztopljene snovi, ki smo jih predhodno nanесли na vrh stacionarne faze. Kadar pa je stacionarna faza nanescena v tanki plasti na stekleno ploščo ali folijo iz inertnega materiala, govorimo o tankoplastni kromatografiji (Wilson in Walker, 2005; Kregar, 1996).

Osnova ločevanja v kromatografskem sistemu je porazdelitev snovi (topljenca) med obema fazama, do katere pride zaradi različno močnih vezi na stacionarno fazo oziroma zaradi različne topnosti v stacionarni in mobilni fazi. Glede na naravo interakcije med stacionarno fazo in snovjo razlikujemo (Kregar, 1996):

1. Adsorpcijska kromatografija. S to tehniko ločujemo snovi, ki se različno močno adsorbirajo na stacionarno fazo in nato desorbirajo z mobilno fazo.
2. Porazdelitvena kromatografija. Z njo ločujemo snovi na osnovi razlik v topnosti – porazdelitvi – med stacionarno fazo, ki je vezana na inertnem nosilcu, in mobilno fazo. Sem spada tudi plinska kromatografija.
3. Ionsko izmenjevalna kromatografija. Z njo ločujemo snovi, ki se razlikujejo v afiniteti do stacionarne faze, ki vsebuje nabite skupine (ione).
4. Izločitvena kromatografija. S to tehniko, ki jo imenujemo tudi gelska kromatografija, ločujemo snovi na osnovi razlik v velikosti molekul.
5. Afinitetna kromatografija. Pri tej tehniki uporabljamo razlike v biološki afiniteti do neke snovi, ki je kot stacionarna faza imobilizirana na inertnem nosilcu, npr. substrat, kadar želimo izolirati encim, ali antigen, kadar čistimo protitelesa.

2.4.1 Afinitetna kromatografija

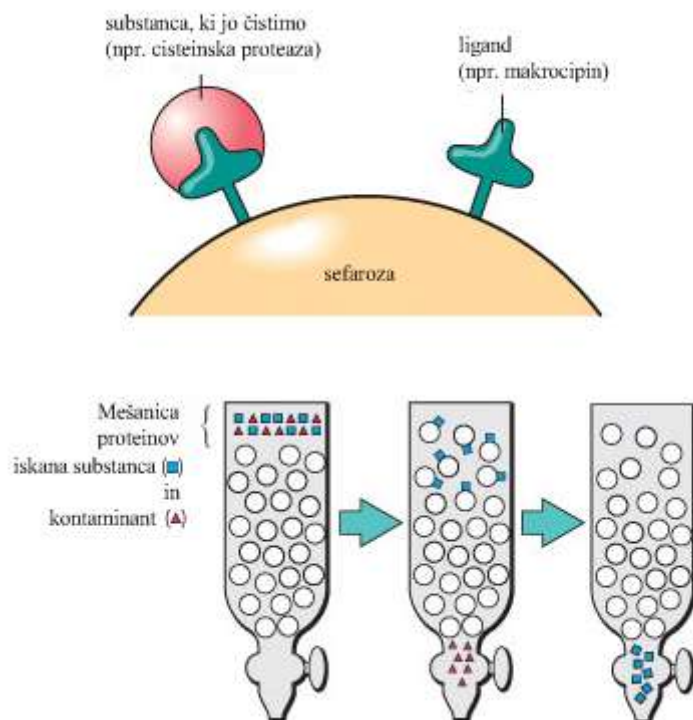
Afinitetna kromatografija spada med adsorpcijske kromatografije, pri kateri se molekula, ki jo želimo očistiti, specifično in reverzibilno adsorbira na komplementarno vezno substanco (ligand), ki je imobilizirana na trdno, porozno in inertno podlago (nosilec). Ta tehnika je hitra, preprosta in zelo učinkovita, saj je očiščenje pogosto nekaj tisoč-kratno. Poleg tega omogoča primerno procesiranje velikih volumnov. Afinitetna kromatografija je uporabna za čiščenje molekul iz kompleksnih bioloških mešanic, ločevanje nativnih od denaturiranih oblik iste substance in odstranjevanje majhnih količin biološkega materiala od velikih količin neuporabnih substanc (Affinity..., 1979; Polanowski in sod., 2003). S to metodo je v enem samem koraku teoretično lahko doseči absolutno očiščenje tudi iz kompleksnih mešanic. Tehnika je bila razvita za čiščenje encimov, razširila pa se je tudi za uporabo pri ločevanju nukleotidov, nukleinskih kislin, imunoglobulinov, membranskih receptorjev in celo celotnih celic in celičnih fragmentov (Wilson in Walker, 2005).



Slika 3: Osnova afinitetne kromatografije (Kregar, 1996).

2.4.1.1 Princip

Substanca, ki jo želimo izolirati s pomočjo afinitetne kromatografije, je sposobna reverzibilne vezave na specifičen ligand, ki je vezan na trdni nosilec. Ob dodatku mešanice proteinov k imobiliziranemu ligandu v kromatografski koloni se na ligand veže le specifična substanca, ki jo želimo očistiti. Vse ostale komponente speremo in substanco pridobimo iz liganda z elucijo pod spremenjenimi pogoji (slika 4). Metoda zahteva predhodno znanje o strukturi in biološki specifičnosti substance, ki jo želimo očistiti, da lahko predvidimo pogoje uspešnega ločevanja, ki so optimalni za vezavo substance na ligand. V primeru encima je ligand lahko substrat, kompetitiven reverzibilni inhibitor ali pa alosterični aktivator (kofaktor) (Wilson in Walker, 2005, Cuatrecasas in sod., 1968).



Slika 4: Princip afinitetne kromatografije (Constans, 2005).

2.4.1.2 Nosilec

Idealen nosilec za afinitetno kromatografijo mora imeti sledeče lastnosti:

- primerne in močne kemijske skupine, na katere se ligand lahko kovalentno veže,
- stabilnost pri pogojih vezave nosilec-ligand,
- stabilnost med vezavo substance in njeno elucijo,
- šibka nespecifična adsorbcija,
- dobre pretočne lastnosti.

V praksi se uporabljajo delci, ki so enotni, sferični in rigidni. Najbolj pogosti so prečno povezani dekstrani, agaroz, poliakrilamid, polimetakrilat, polistiren, celuloza, porozno steklo in kremen (Wilson in Walker, 2005). Sefaroza je agarozni gel, ki ima vse lastnosti primerne nosilca za imobilizacijo biološko aktivnih molekul. Hidroksilne skupine na sladkornih ostankih so preprosto uporabne za kovalentno vezavo liganda. Sefaroza 4B je široko uporabljen nosilec. Ima strukturo odprtih por, zato je notranost nosilca dosegljiva za vezavo in ima dobro vezno kapaciteto celo za velike molekule. Sefaroza 4B kaže ekstremno nizko ne-specifično adsorbcijo. Oblika gela zagotovi odlične tokovne lastnosti (Affinity..., 1979).

2.4.1.3 Ligand

Pomembne lastnosti liganda so specifična in reverzibilna vezalna afiniteta za substance, ki jih želimo očistiti in kemijske skupine, ki dovoljujejo, da se kovalentno veže na nosilec (Affinity..., 1979), kot so npr. $-NH_2$, $-COOH$, $-SH$ in $-OH$ (Wilson in Walker, 2005). Za uspešno ločevanje je imobilizirani ligand dosegljiv in obdrži svojo specifično afiniteto za substanco. Pomembna je tudi dostopnost metod za spiranje nevezanega materiala in selektivno desorbpcijo željenih substanc v aktivni obliki (Affinity..., 1979). Na izbiro kemične narave liganda vpliva tudi biološka specifičnost substance, ki jo želimo očistiti. V praksi je možno izbrati ligand, ki kaže absolutno specifičnost vezave izključno le na eno substanco. Možno je tudi izbrati ligand, ki kaže selektivnost za skupine in se veže na tesno sorodno skupino substanc (Wilson in Walker, 2005).

2.4.1.4 Vezava liganda na nosilec

V nekaterih primerih vezava liganda na nosilec lahko ovira njegovo sposobnost vezave substance, zato se med ligand in nosilec doda distančnik. Uporaba distančnika je najbolj pomembna pri majhnih ligandih in je pogosto ključna za uspešnost ločevanja (Wilson in Walker, 2005).

Sefarozo se lahko za vezavo različnih ligandov obdela z različnimi snovmi. Najbolj pogosta metoda vezave liganda na nosilec vključuje predhodno obdelavo nosilca s cianogen bromidom (CNBr) (Wilson in Walker, 2005). Sefarozna 4B aktivirana s CNBr je aktivirani derivat Sefarozne 4B, pripravljena v reakciji Sefarozne 4B s cianogen bromidom. Vezavna reakcija je spontana, hitra in enostavna. Cianogen bromid reagira z hidroksilnimi skupinami na sefarozi, in jih pretvori v imidokarbonatne skupine. V aktivirani sefarozi so prisotne tudi cianatne esterske skupine. Aktivirane skupine reagirajo s primarnimi amino skupinami liganda. Večtočkovna povezava prepreči hidrolizo proteinov in drugih biopolimerov. Aktivacijski proces prav tako prečno poveže sefarozo, kar zviša njeno kemijsko stabilnost in omogoča večjo izbiro elucijskih pogojev in derivatizacije. Sefarozna 4B aktivirana s CNBr je uporabna za vezavo ligandov, kot so proteini in nukleinske kisline in je namenjena za (Affinity..., 1979):

- hitro imobilizacijo ligandov, ki vsebujejo primarne amino skupine,
- vezavo kontroliranih količin liganda ter
- zmogljivo in multi-točkovno vezavo proteinov.

2.4.1.5 Postopek

Nosilec, na katerega je kovalentno vezan ligand, je pakiran v kolono. Po nanosu vzorca in specifični vezavi željene substance najprej sledi spiranje nespecifično vezanih komponent, nato pa očiščeno substanco speremo z liganda s specifično ali nespecifično elucijo (slika 4). Nespecifično elucijo dosežemo s spremembo pH ali ionske moči. S tem dosežemo elucijo zaradi spremembe v stanju ionizacije skupin liganda in/ali makromolekul, ki so pomembne za vezavo ligand-makromolekula. Eluent zbiramo v epruveh kot frakcije. Pri eluciji s spremembo pH mora biti pH zbranih frakcij popravljen na vrednost, kjer ne pride do izgub lastnosti in/ali denaturacije proteinov. Specifična elucija se lahko doseže z uporabo visoke koncentracije substrata ali reverzibilnega inhibitorja, če gre za encim, oziroma z uporabo dodanih ligandov, za katere ima iskana substanca višjo afiniteto kot jo ima za imobilizirani ligand (Wilson in Walker, 2005).

2.4.1.6 Uporaba

Afinitetna kromatografija velja za eno najbolj učinkovitih načinov za ločevanje in čiščenje proteinov. Metoda je bila zaradi njene selektivnosti v glavnem uporabljena za ločevanje proteinov in peptidov iz naravnih virov in pridobljenih s kemičnim in genskim inženiringom. Izkazala se je kot primerna za ločevanje proteolitičnih encimov in njihovih inhibitorjev. V primeru čiščenja proteaz se uporabljajo imobilizirani substrati ali njihovi analogi, kot tudi različni tipi sintetičnih ali naravnih inhibitorjev (Polanowski in sod., 2003). Uporabna je v industrijskem čiščenju plazemskih proteinov za terapevtske namene in sicer različnih koagulacijskih faktorjev, proteaznih inhibitorjev, antikoagulantov, albumina, imunoglobulinov G in drugih proteinov (Burnouf in Radosevich, 2001). Najbolj pogosta uporaba afinitetne kromatografije v zadnjem desetletju je čiščenje protiteles z uporabo rekombinantnega proteina A ali proteina G. Večina monoklonskih protiteles, ki so uporabni za raziskave in diagnostiko in tudi terapevtska protitelesa, ki so uporabna za zdravljenje pacientov, so očiščena z afinitetno kromatografijo. Afinitetna kromatografija se uporablja tudi za ločevanje mešanic celic. Tehnika temelji na lastnostih celic, kot so antigeni in izpostavljeni sladkorni ostanki na površini celic ali na specifičnih interakcijah membranskih receptorjev z ligandom. Afinitetne tehnike, metodologije in koncepti so postali neprecenljivo orodje v bioznanosti z uporabo za čiščenje proteinov, interakcijsko mapiranje proteinov, razvoj farmacevtikov ter diagnostiko, genomiko in proteomiko (Uhlen, 2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Naravni materiali

- gobe meglenke in orjaški dežniki, nabrane na področju Krasa
- 4 kiviji
- 30 fižolovih semen
- 4 svinjske ledvice

3.1.2 Plazmidi

Uporabljeni plazmidi izvirajo iz zbirke plazmidov na Odseku za biotehnologijo Inštituta Jožef Štefan v Ljubljani.

- plazmid pET11a::rMcp1a

3.1.3 Bakterijski sevi

Uporabljeni laboratorijski sevi izvirajo iz zbirke sevov na Odseku za biotehnologijo Inštituta Jožef Štefan v Ljubljani.

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

3.1.4 Gojišča

- tekoče gojišče Luria-Bertani (LB) (vsebuje 10 g triptona, 5 g kvasnega izvlečka, 10 g NaCl v 1 l destilirane vode)
- trdno gojišče LB in dodanim antibiotikom ampicilinom v koncentraciji 100 µg/ml (LBA) (poleg sestavin, ki jih vsebuje tekoče gojišče LB (v enakih koncentracijah), vsebuje še agar, in sicer 15 g agarja v 1 l destilirane vode)

3.1.5 Kemikalije in drobna oprema

Preglednica 1: Kemikalije in drobna oprema.

Proizvajalec	Kemikalije
Amersham Biosciences	sefaroza 4B aktivirana s CNBr
Apollo Scientific, Velika Britanija	IPTG
Bachem Feinkemikalien, Švica	Z-Phe-Arg- <i>p</i> NA
Bachem, Nemčija	Z-Phe-Arg-AMC; Z-Ala-Ala-Asn-AMC
Calbiochem, ZDA	hemoglobin
Carlo Erba, Italija	NaCl; glicerol; očetna kislina; etanol; metanol; HCl; NaOH; amonijev sulfat
Difco Laboratories, ZDA	želatina
Fermentas, Nemčija	DTT
Fluka Biochemica, Švica	imidazol; ZnCl ₂
Fluka, ZDA	akrilamid, butanol, tripsin
GE Healthcare, ZDA	standard velikosti (Pharmacija LMW standard); Coomassie Brilliant Blue R-250 ; Superdex S200
Kemika, Hrvaška	NaAc; Na ₂ HPO ₄ ; Na ₂ S ₂ O ₃
Merck, Nemčija	TEMED; Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O; urea; NaHCO ₃ ; NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O; Me ₂ SO; TCA
Peptide Institute, Japonska	E64
Riedel-de Haën, Nemčija	citronska kislina; KH ₂ PO ₄
Serva, Nemčija	NaDS; bromfenol modro; APS; Tris; Triton X-100; EDTA; Fast Garnet GBC; NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O; glicin; Serva blue R
Sigma, Nemčija	BANA; BAPNA; FITC; jodoocetna kislina; papain
Sigma, ZDA	ampicilin; Brij 35; CaCl ₂ x2H ₂ O

3.1.6 Pufri in reagenti

Pufri za izolacijo rMcp:

- puffer TET (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2mM EDTA, 0,1% TritonX-100)
- puffer TET z 1 M, 3 M, 6 M in 8 M ureo

Gelska filtracija:

- puffer za gelsko filtracijo (0,1 M NaAc, 0,3 M NaCl, 0,001 M EDTA, pH 6,5)

Določanje aktivnosti inhibitorja:

- fosfatni puffer (0,1 M fosfat (pH 6,5) s 3 mM DTT in 1 mM EDTA)
- prekinjevalni reagent III (10 mM parakloromerkuribenzojska kislina, 50 mM EDTA, pH 6,0)
- barvni reagent (0,3 mg soli Fast Garnet GBC (diazonium-o-aminoazotoluen)/ml 4% Brij 35)

Vezava rMcp na sefarozo:

- vezalni karbonatni pufer (0,5 M NaHCO₃, 0,3 M NaCl, pH 8,5)
- 2 M Tris-HCl (pH 8,5)

Priprava izvlečka iz fižolovih semen:

- pufer 100 mM NaAc, 0,5 M NaCl, 1,5 mM EDTA, pH 6,5
- pufer 100 mM NaAc, 0,1 M NaCl, 1,5 mM EDTA, pH 6,5

Priprava izvlečka iz ledvic:

- pufer za tkivo (0,1 M fosfatni pufer, pH 6,0, 60 mM EDTA, 15 mM DTT, 0,3 M NaCl)

Afinitetna kromatografija:

- vezalni pufer / pufer za afinitetno kromatografijo (0,1 M NaAc, 0,3 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 6,5 in pri izolaciji iz ledvic 0,1 M fosfatni pufer, pH 6,0 z 20 mM EDTA, 5 mM DTT in 0,3 M NaCl)
- elucijski pufri (10 mM NaOH; 20 mM NaOH; 0,7 M NaCl; 10 mM HCl)
- pufer za nevtralizacijo (2M Tris, pH 6,5)

Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS:

- vzorčni pufer (125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 20% glicerol, 4% NaDS z bromfenol modrim)
- pufer za ločevalni gel: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
- pufer za koncentrirni gel: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- 10% NaDS
- 10% APS
- pufer za elektroforezo (2,9 g/l Tris, 14,4 g/l glicina, 1 g/l NaDS, pH 8,3)

Cimografija z želatino:

- 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
- 1% želatina
- 10% APS
- 10% NaDS
- 0,05% želatina v 0,3 M Tris-HCl, pH 8,8
- pufer za elektroforezo 2,9 g/l Tris, 14,4 g/l glicina, 1 g/l NaDS, pH 8,3)
- 2,5 % Triton-X-100, ki smo ga pripravili iz 10 x pufra za renaturacijo (25% Triton X-100)

- razvijalni pufer (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂·2H₂O, 0,02% (m/v) Brij 35)

Nativna elektroforeza, določanje aktivnosti izoliranih proteaz:

- citratni pufer (39,1 mM citronska kislina, 121 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, pH 8,5)
- fosfatni pufer (0,1 M fosfatni pufer, 20 mM EDTA, pH 7,0)
- 0,2 M imidazol v 0,1% (m/v) NaDS

Prenos proteinov iz gela na membrano:

- pufer za prenos (pripravili smo ga 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)

Test encimske aktivnosti s substratom FITC-hemoglobin:

- fosfatni pufer (0,1 M fosfatni pufer, 1,5 mM EDTA, pH 6,0)

Vpliv lektina CnL na inhibitorno aktivnost Mcp:

- pufer BANA (0,1 M fosfatni pufer, 0,2 mM EDTA, pH 6,0)

Test encimske aktivnosti s substratom BAPNA:

- pufer (0,1 M Tris, 20 mM CaCl₂, pH 6,0)

3.1.7 Oprema

Pri delu smo uporabljali naslednjo opremo:

- vodna kopel SW22, Julabo, Nemčija
- inkubator BINDER
- UV/VIS spektrofotometer Lambda 25, Perkin Elmer precisely, ZDA
- centrifugi Sorvall RC5C plus, ZDA in Eppendorf 5424, Nemčija
- sonikator Digital sonifier W450 D, Branson, ZDA
- magnetno mešalo Rotamix S-10, Tehnica, Slovenija
- vibracijski stresalnik Vibromix₃₁, Tehnica, Slovenija
- ultraturaks ULTRA-TURRAX, IKA-Labortechnik, Nemčija
- aparaturna za elektroforezo MiniProtean II, BioRad, ZDA
- aparaturna za fotografiranje gelov UVItec, UVItec, Velika Britanija
- naprava za določanje aminokislinskega zaporedja: sekvenator Procise 492A, Applied Biosystems, ZDA, povezan z analizatorjem 120A, Applied Biosystems, ZDA
- aparaturna za FPLC Äkta prime, Amersham Pharmacia Biotech, Švedska
- fluorimeter Luminiscence Spectrometer LS 30, Perkin Elmer, ZDA
- čitalec mikrotitrskih plošč Tecan, Safire, ZDA
- ultrafilter Amicon, ZDA

- multikanalna pipeta Biohit, Finska
- pH meter Mettler Toledo, ZDA
- masni spektrometer MSD Trap XCT Ultra, Agilent, ZDA.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava rekombinantnega makrocipina

3.2.1.1 Transformacija plazmida pET11a::rMcp1a v ekspresijski sev *E.coli* BL21(DE3)

Za izražanje makrocipina v bakteriji smo uporabili že pripravljene plazmide pET11a::rMcp1a. V te plazmide je bil predhodno vstavljen vključek, in sicer inhibitor proteaz iz užitne gobe orjaškega dežnika (*Macrolepiota procera*). Ekspresijske vektorje smo transformirali v seve *E. coli* BL21(DE3). Kompetentne celice smo odtalili na ledu in jim dodali 2 μ l plazmida, nežno premešali in inkubirali na ledu 30 min. Nato smo celice izpostavili toplotnemu šoku; inkubirali smo jih 45 s pri 42°C v vodni kopeli. Po tem smo jim dodali 800 μ l tekočega gojišča Luria-Bertani (LB) in celice inkubirali 1 h pri 37°C, ob stresanju 180 vrt./min. 100 μ l bakterijske suspenzije smo nato enakomerno razmazali po predhodno pripravljeni plošči LBA (plošči s trdim gojiščem LB in dodanim antibiotikom ampicilinom). Plošče smo inkubirali čez noč pri 37°C. Naslednji dan smo izbrali transformirano kolonijo *E.coli* BL21 (DE3) pET11a::rMcp1a in jo nacepili v 20 ml gojišča LBA ter jo inkubirali preko noči pri 37°C ob stresanju 225 vrt./min.

3.2.1.2 Izražanje rMcp v bakterijah *E.coli* s pomočjo indukcije z IPTG

Tretji dan smo sev nacepili v štiri dvolitrške erlenmajerice. V vsako smo ob gorilniku prelili 300 ml gojišča LB dodali 300 μ l ampicilina (iz založne raztopine s koncentracijo 100 mg/ml) ter v vsako odpipetirali 3 ml prekonočne kulture (kulturo smo redčili 1:100) ter jih inkubirali pri 37°C ob stresanju 220 vrt./min. Med gojenjem smo spremljali optično gostoto pri 600 nm (A_{600}). Ko je optična gostota pri 600 nm dosegla vrednost 1-1,5 (po približno 4 urah) smo kulture *E. coli* inducirali z 1 mM IPTG (300 μ l 1M izopropil- β -D-tiogalaktopiranozida) ter inkubirali še 6 ur pri 37°C (ob stresanju 220 vrt./min). Po 10 urah gojenja smo kulturam ponovno izmerili A_{600} , jih ohladili na ledu, po 250 ml prelili v centrifugirke GS-3 in centrifugirali 15 min pri 6000 x g (pri 4°C) v centrifugi Sorvall RC5C plus z rotorjem GS-3. Supernatante smo zavrgli, usedline celic pa resuspendirali v pufri TET (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA, 0,1% TritonX-100). V vsako centrifugirko smo dodali 25 ml pufra TET (pH 7,5), oborine resuspendirali in jih združili

(100 ml) v centrifugirko GSA. Suspenzijo smo zamrznili preko noči pri -20°C . Vzorec suspenzije smo shranili ločeno za nadaljne analize.

3.2.1.3 Izolacija rMcp

Suspenzijo celic smo počasi odtajali. Celice smo razbili z ultrazvokom (17x15s) s pomočjo sonikatorja Digitall sonifier W450 D (Branson, ZDA). Po sonikaciji smo suspenzijo centrifugirali 15 min pri $8000 \times g$ (pri 4°C) v centrifugi Sorvall RC5C plus z rotorjem GSA. Supernatant smo zavrgli, oborino pa smo raztopili v 50 ml pufra TET in jo resuspendirali s pomočjo magnetnega mešala (2 h, 4°C). Sledilo je ponovno centrifugiranje 15 min pri $10000 \times g$ (pri 4°C , rotor GSA). Supernatant smo ponovno zavrgli, oborino pa smo s pomočjo magnetnega mešala (1,5 h, 4°C) raztopili v 30 ml pufra TET z 1 M ureo. Ponovno smo centrifugirali 15 min pri $10000 \times g$ (pri 4°C , rotor GSA). Supernatant smo zamrznili pri -20°C (SN3), oborino pa s pomočjo magnetnega mešala (4°C) raztopili v 25 ml pufra TET s 3M ureo. Raztopino smo centrifugirali 15 min pri $10000 \times g$ (pri 4°C , rotor GSA). Supernatant smo zamrznili pri -20°C (SN4), oborino pa raztapljali preko noči (4°C) s pomočjo magnetnega mešala v 15 ml pufra TET s 6M ureo. Naslednji dan smo raztopino še enkrat centrifugirali 15 min pri $10000 \times g$ (pri 4°C , rotor GSA). Supernatant smo zamrznili pri -20°C (SN5), oborino pa raztopili (4°C) s pomočjo magnetnega mešala v 10 ml pufra TET z 8 M ureo. Med postopkom smo shranjevali alikvotne (0,2 ml) vseh supernatantov in suspenzij za nadaljne analize.

3.2.1.4 Gelska filtracija

Gelska filtracija je metoda, ki temelji na ločevanju molekul zaradi razlik v njihovi velikosti. Ob tem se predpostavlja, da ni elektrostatskih in drugih interakcij med gelom in sestavinami vzorca in da imajo proteini vzorca enotno, sferično obliko, kar pa vedno ne drži. Stacionarna faza je zamrežen polimer v obliki gela, ki ima točno definirano velikost por. Manjše molekule se v pore ujamejo in zato potujejo počasneje ter imajo daljši elucijski čas. Večje molekule v pore ne proдреjo in zato potujejo hitreje ter imajo krajši elucijski čas. Molekule se tako ločijo po padajoči molekularni masi.

Kolono premera 3,2 cm in višine 142 cm, ki je bila napolnjena z gelom Superdex S200 (GE Healthcare, ZDA), smo sprali s pufrom za gelsko filtracijo (0,1 M NaAc, 0,3 M NaCl, 0,001 M EDTA, pH 6,5). Izvedli smo dve gelski filtraciji in sicer prvo s 25 ml vzorca (raztopljenega rekombinantnega makrocipina v urei) brez dodanega reducenta DTT (ditiotritol) in drugo s 45 ml vzorca s 5 mM DTT. Filtracija je potekala 24 ur pri 4°C s pretokom 52,8 ml/h. Frakcije smo zbirali na kolektorju na 30 min. Prisotnost proteinov smo spremljali z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 280 nm na UV/VIS spektrofotometru (Perkin Elmer precisely, Lambda 25, ZDA) z uporabo kivete iz

kremenovega stekla širine 1 cm in prisotnost rMcp1 s testom inhibicije papaina s substratom BANA. Proteine v frakcijah smo analizirali tudi s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS. Proteinske vrhove smo ločeno združili in jih koncentrirali s pomočjo ultrafiltracije. Skoncentriranim vzorcem smo ponovno izmerili A_{280} in jim določili koncentracijo proteinov.

3.2.1.5 Ultrafiltracija

V 350 ml ultrafilter (Amicon, ZDA) smo vstavili membrano (Amicon, ZDA), ki zadrži molekule večje od 3 kDa, in nalili vzorec. V hladni sobi (pri temperaturi 4°C) smo ga postavili na magnetno mešalo in priklopili na jeklenko z dušikom pri nadtlaku približno 5 barov. Koncentriranemu vzorcu smo izmerili A_{280} , ga označili in ga shranili v zamrzovalniku na -20°C.

3.2.1.6 Določanje inhibitorne aktivnosti rMcp

Inhibitorne aktivnosti vzorcev smo določali z merjenjem znižanja encimske aktivnosti cisteinske proteaze papain (Sigma, Nemčija) glede na sintetični kromogen substrat BANA (N- α -benzoi-D,L-arginil- β -naftilamid, Sigma, Nemčija). Reakcija poteka tako, da papain sprosti 2-naftilamin, ki se raztopljen v neionskem detergentu Brij veže na barvni reagent Fast Garnet. Pri tem nastane rdeče obarvan kompleks, ki absorbira svetlobo valovne dolžine 520 nm.

K 75 μ l koncentriranega papaina v 750 μ l aktivacijske raztopine (0,1 M fosfat, pH 6,5, 1 mM EDTA s 3 mM DTT) smo dodali 25 μ l vzorca in 15 min inkubirali pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 25 μ l 0,1 M substrata BANA v Me₂SO in 10 min inkubirali pri 37°C. Reakcijo smo nato prekinili s prekinjevalnim reagentom: mešanica reagenta III (10 mM parakloromerkuribenzojska kislina, 50 mM EDTA, pH 6,0) z barvnim reagentom (0,3 mg soli Fast Garnet GBC (diazonium-o-aminoazotoluen)/ml 4% Brij 35) v razmerju 1:1. Intenziteto obarvanega kompleksa smo merili pri 520 nm proti slepemu vzorcu, ki smo ga pripravili po enakem postopku brez dodatka encima. Kontrolno vrednost encimske aktivnosti smo izmerili po enakem postopku brez dodatka vzorca.

3.2.1.7 Določanje koncentracije rMcp

Pri določanju vsebnosti proteinov v vzorcu izkoriščamo dejstvo, da aromatske aminokislina (triptofan, tirozin in fenilalanin) absorbirajo svetlobo valovne dolžine 280 nm. Te aminokislina so v veliki večini proteinov zastopane v zelo podobnih deležih, tako da lahko z merjenjem absorbance, ki jo povzročajo, enostavno ocenimo približno

koncentracijo proteinov v bistrih raztopinah vzorca. Ključna prednost metode je enostavnost in hitrost izvajanja, moti pa jo motnost vzorca (koloidni delci, mehurčki, obarvanost).

Vzorcju smo izmerili absorbanco pri 280 nm. Kot slepi vzorec smo uporabili pufer za gelsko filtracijo. Zvezo med absorbanco in koncentracijo snovi v kiveti opisuje Beer-Lambertov zakon, ki pravi, da je velikost absorbance pri 280 nm premosorazmerna koncentraciji snovi (c), dolžini optične poti svetlobnega žarka (širina kvarčne kivete) (l) in molarnemu absorpcijskemu koeficientu (ϵ), ki je značilen za določeno snov: $A = \epsilon \times c \times l$.

Absorbanca je količina brez enote. Dolžino optične poti merimo v cm , koncentracijo v mol/l in molarni absorpcijski koeficient v $l/(mol \cdot cm)$. Če na tak način določamo masno koncentracijo (g/l), se v enačbi uporabi masni absorpcijski koeficient ($l/(g \cdot cm)$), ki za rMcp znaša $2,57 l/(g \cdot cm)$.

3.2.2 Vezava liganda (rMcp) na nosilec (sefarozo)

Uporabili smo 5 g prahu sefaroze 4B aktivirane s CNBr. V navodilih proizvajalca je navedeno da je potreben 1 g liofiliziranega prahu za približno 3,5 ml končnega volumna medija, torej smo pričakovali 17,5 ml končnega volumna sefaroze. Prah smo suspendirali v približno 100 ml 1 mM HCl, da je nabrekli, nato smo gel počasi spirali na nuči z 1 L 1 mM HCl približno 15 min.

Makrocipin smo raztopili v vezalnem karbonatnem puffru (0,5 M NaHCO₃, pH 8,5, 0,3 M NaCl) z dodatkom 5 mM DTT. Uporabili smo približno 5 ml puffra na g liofiliziranega prahu, torej 25 ml puffra. V navodilih proizvajalca je priporočena vezava okoli 5-10 mg proteina na ml medija. Mi smo vezali 2,2 mg rMcp1 na ml medija (39,25 mg/17,5 ml). Volumen liganda je bil 32,5 ml. Ligandu v karbonatnem puffru s 5 mM DTT smo dodali gel iz nuče ter stresali 2 uri na stresalniku. Z dodatkom 50 ml 2 M Tris-HCl (pH 8,5) in inkubacijo čez noč na sobni temperaturi smo blokirali vse skupine, na katere se ligand ni vezal (vsa preostala aktivirana mesta). Raztopino smo odnučirali, izmerili A_{280} nevezanega supernatanta, ter gel v nuči sprali z vezalnim karbonatnim puffrom in spravili z dodatkom 1 M NaCl pri 4°C.

Po vezavi rMcp1 na sefarozo smo preverili inhibitorno aktivnost vezanega inhibitorja. Na kolono z zaprtim stiščkom smo nanegli približno 10 ml vezalnega puffra, vsebino kolone pomešali in odpipetirali 200 μ l suspenzije sefaroze, ter določili aktivnost inhibitorja po postopku opisanem v točki 3.2.1.6.

3.2.3 Priprava izvlečkov iz naravnih vzorcev

3.2.3.1 Priprava izvlečka iz gob

Za izolacijo cisteinskih proteaz smo pripravili več litrov izvlečka iz meglenske (*Clitocybe nebularis*) in orjaškega dežnika (*Macrolepiota procera*). Gobe so bile nabrane v naravnem okolju na področju Krasa in do priprave izvlečka shranjene pri -20°C . Gobe smo odtalili v mikrovalovni pečici in jim dodali 1 g natrijevega bisulfita ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, antioksidant, prepreči nespecifične interakcije) na 1 kg gob, dobro premešali in iztisnili sok ter dodali NaCl do koncentracije 0,3 M. Vodni izvleček smo nato centrifugirali 30 min pri $7000 \times g$ (pri 4°C , rotor GS-3) in supernatant nanesti na afinitetno kromatografijo.

3.2.3.2 Priprava kivijevega izvlečka

Za izolacijo aktinidina smo pripravili kivijev izvleček. Štiri zelene kivije (*Actinidia deliciosa*), ki smo jih kupili v lokalni trgovini, smo narezali na koščke in jih zamrzili pri -20°C . Naslednji dan smo kivi odtajali in mu dodali 1g natrijevega bisulfita ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) na 1 kg kivija (0,38 g/380 g), dobro premešali in iztisnili sok (200 ml), ter dodali NaCl do koncentracije 0,3 M. Med postopkom smo vzdrževali temperaturo od $0 - 4^{\circ}\text{C}$. Vodni izvleček smo nato centrifugirali 15 min pri $16000 \times g$ (4°C , rotor GSA) in supernatant nanesti na afinitetno kromatografijo.

3.2.3.3 Priprava izvlečka iz fižolovih semen

Za izolacijo legumaina smo pripravili 160 ml izvlečka iz 30 kalečih fižolovih semen (*Phaseolus vulgaris*). Pred kalitvijo smo semena fižola 5 minut sterilizirali v varikini, jih dobro sprali s sterilno vodo in pustili 2 uri v sterilni vodi, da so nabrekli. Predhodno smo pripravili petrijevko tako, da smo vanjo po dnu položili plast bombažne vate in na njo filter papir. Vsebino petrijevke smo nato dobro navlažili s sterilno vodo, pokrili s pokrovom, zavili v aluminijasto folijo in avtoklavirali. V tako pripravljeno petrijevko smo postavili namočena fižolova semena s predhodno ožgano pinceto. Petrijevko smo pokrili s pokrovom, zavili v aluminijasto folijo in 3 dni inkubirali pri $28-30^{\circ}\text{C}$. Po tem času smo kalečim fižolom odstranili lupino, jih stekali ($m = 41,92 \text{ g}$) in jim dodali 50 ml pufru (100 mM NaAc, 0,5 M NaCl, 1,5 mM EDTA, pH 6,5, pred uporabo smo mu dodali 2 mM DTT). Fižole smo nato mleli 10 min s pomočjo ultraturaksa (IKA-Labortechnik, Nemčija). Homogenat smo centrifugirali 40 min pri $12000 \times g$ (pri 4°C) v centrifugi Sorvall RC5C plus z rotorjem SS34. V supernatantu smo obarjali proteine z amonijevim sulfatom. 50 ml supernatanta smo postopoma ob mešanju na ledu dodajali amonijev sulfat do 80% nasičenosti. Po 4 urnem mešanju se je vzorec obarjal v hladni sobi preko noči. Naslednji

dan smo vsebino čaše z oborjenimi proteini centrifugirali 20 min pri 16000 x g (pri 4°C, rotor GSA). Supernatant (SN2) smo zavrgli (1 ml smo zamrznili za nadaljnje analize), pelet pa raztopili v 25 ml 0,1 mM NaAc, 0,1 M NaCl, 1,5 mM EDTA, pH 6,5 in ga nato dializirali v hladni sobi v dializnem črevu premera 22 mm, ki zadrži molekule večje od 7 kDa (Serva, Nemčija) v istem pufru, da bi odstranili amonijev sulfat. Po dializi smo vzorec centrifugirali 30 min pri 16000 x g (pri 4°C, rotor GSA) in uporabili supernatant (SN3).

3.2.3.4 Priprava izvlečka iz svinjskih ledvic

Sveže svinjske ledvice (približno 300g), ki smo jih kupili v lokalni klavnici, smo očistili maščobe in ožilja in izrezali srednji del (korteks). Tkivo smo nasekljali na drobne kose in resuspendirali v trikratni količini (900 ml) pufru za tkivo (0,1 M fosfatni pufer, pH 6,0, 60 mM EDTA, 15 mM DTT, 0,3 M NaCl). Tkivo smo homogenizirali s paličnim mešalnikom približno 10 min in pustili 24 ur pri 4°C. Naslednji dan smo centrifugirali 20 min pri 8000 x g (pri 4°C, rotor GS-3) in supernatant nato centrifugirali še 20 min pri 16000 x g (pri 4°C, rotor GSA). Dobljeni supernatant smo do nanosa na kolono shranili. Celoten postopek je potekal pri temperaturi od 0 do 4°C.

3.2.4 Afinitetna kromatografija

Uporabljali smo stekleno kolono, napolnjeno z dobro spranim pripravljenim gelom (sefarozo z vezanim rMcp). Po nanosu vzorca (npr. 100 ml izvlečka meglenke) je sledilo spiranje kolone z vezalnim pufrom, dokler A_{280} v frakcijah ni padla pod vrednost 0,030. Vezane proteine smo nato spirali z elucijskim pufrom (10 mM NaOH). Eluat smo lovili v epruvete (okoli 10 ml na epruveto), v katere smo predhodno pripravili po 1 ml pufru za nevtralizacijo (2M Tris, pH 6,5). Eluiranimi frakcijam smo s pH lističi merili pH in merili A_{280} na UV/VIS spektrofotometru z uporabo kivete iz kremenovega stekla širine 1 cm. Kot slepi vzorec smo uporabljali vezalni pufer. Proteinske vrhove smo ločeno združili in koncentrirali s pomočjo ultrafiltracije. Kot elucijske pufre smo testirali tudi 20% Me₂SO, 4% brij in 6 M ureo. Pred ponovno uporabo kolone smo le-to vedno sprali z vezalnim pufrom.

Postopek afinitetne kromatografije se je glede na nanešeni vzorec nekoliko razlikoval. Afinitetna kromatografija za izolacijo aktinidina iz kivijevega izvlečka je bila identična zgoraj opisani. Za izolacijo legumaina iz fižola smo uporabili tri elucijske pufre in sicer najprej 0,7 M NaCl in nato 10 mM HCl, ki mu je sledil še 10 mM NaOH. V epruvete za lovljenje frakcij smo prav tako predhodno pripravili ustrezno količino pufru za nevtralizacijo frakcij. Pri izolaciji cisteinskih proteaz (legumaina) iz ledvic smo uporabili drug vezalni pufer in sicer 0,1 M fosfatni pufer, pH 6,0 z 20 mM EDTA, 5 mM DTT in 0,3

M NaCl. Tu smo izvedli dve različici afinitetne kromatografije: pri prvi je bil kot eluent uporabljen 20 mM NaOH, pri drugi pa so si sledili trije elucijski pufri in sicer najprej 0,7 M NaCl, nato 10 mM HCl, ki mu je sledil še 10 mM NaOH.

3.2.5 Karakterizacija proteinov

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

Poliakrilamidna gelska elektroforeza (PAGE) v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS) je analitska metoda za ločevanje proteinov in peptidov. Temelji na uporabi anionskega detergenta (NaDS), ki se veže na denaturirane proteinske molekule, ta kompleks pa ima negativen naboj. V zamreženem gelu potujejo ti kompleksi v električnem polju proti pozitivno nabiti anodi, hitrost potovanja pa je obratnosorazmerna z velikostjo proteinov.

Pri delu smo uporabljali elektroforezni sistem MiniProtean II (BioRad, ZDA) in obarvane standarde velikosti (Pharmacija LMW standard, GE Healthcare, ZDA). 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, 1,5 ml dH₂O in malo bromfenol modrega. Vzorce smo pripravili tako, da smo zmešali proteinski vzorec in vzorčni pufer in inkubirali 10 min v vreli vodi (100°C) ter centrifugirali 30 s pri 20000 x g v mikrocentrifugi (Eppendorf 5424, Nemčija).

Elektroforeza je potekala v navpični smeri v dveh različno zamreženih gelih in sicer v koncentracijskem gelu (manjša zamreženost, koncentriranje proteinov na ozko območje) in ločevalnem gelu (ločevanje proteinov po velikosti).

Pred pripravo gelov smo stekelca vpeli v nosilec s steklenim sendvičem in tega vpeli v nosilec za vlivanje. Ločevalni gel (12%) smo pripravili tako, da smo zmešali 3 ml 40% (m/v) raztopine akrilamida (vsebuje akrilamid in N,N'-metilen bisakrilamid), 4,335 ml dH₂O, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 in 100 µl 10% NaDS. Polimerizacijo gela smo sprožili z dodatkom 50 µl 10% (m/v) APS in 15 µl reagenta TEMED. Raztopino smo premešali in vlili med dve pokončni stekleni ploščici, razmaknjeni za 1,5 mm. Na vrh ulitega ločevalnega gela smo nalili butanol, nasičen z dH₂O, da se je izravnala linija gela. Gel je polimeriziral 20 do 45 min. Po tem času smo butanol odlili, linijo gela sprali z dH₂O in popivnali s papirnato brisačko. Na strjeni ločevalni gel smo ulili še koncentrirni gel, v katerega smo namestili glavniček z 10 žepki, širine 1,5 mm. Koncentrirni gel (4%) smo pripravili tako, da smo zmešali 0,5 ml 40% raztopine akrilamida, 3,168 ml dH₂O, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 in 50 µl 10% (m/v) NaDS. Pred vlitjem nad ločevalni gel smo dodali v koncentrirni gel še 25 µl 10% APS in 8 µl reagenta TEMED. Ko se je gel strdil,

smo odstranili glavniček, ploščici vpeli v aparaturo za elektroforezo, vlili pufer za elektroforezo (vsebuje 2,9 g/l Tris, 14,4 g/l glicina, 1 g/l NaDS, pH 8,3), in v žepke previdno odpipetirali (do 60 μ l) pripravljene vzorce. Elektroforeza je potekala pri konstantnem toku 30 mA/gel približno 70 min.

Gel smo nato barvali 30 min v raztopini Coomassie Brilliant Blue R-250 (GE Healthcare, ZDA), ki smo jo pripravili v 80% etanolu (0,2% Coomassie Brilliant Blue) in jo zmešali z 20% očetno kislino (CH_3COOH) v razmerju 1:1. Nato smo ga primerno razbarvali z večkratno zamenjavo razbarvalne raztopine (30% (v/v) EtOH, 10% AcOH), dokler se proteinske lise niso razločno videle. Gele smo slikali s sistemom za slikanje gelov UVItec (UVItec, Velika Britanija), ki je bil povezan z računalniškim programom UVI Photo.

3.2.5.2 Cimografija z želatino

Cimografija je elektroforezna tehnika, pri kateri substrat za detekcijo encimske aktivnosti (npr. želatina) kopolimerizira z poliakrilamidnim gelom. Vzorčki so pripravljani na enak način kot pri NaDS-PAGE, le da se jih tu ne kuha. Na mestih, kjer encimi razgradijo substrat, po barvanju gela opazimo prozorne lise na temno obarvanem ozadju.

Vzorčni pufer smo uporabljali enak kot pri NaDS-PAGE. Vzorce smo pripravili tako, da smo zmešali proteinski vzorec in vzorčni pufer in inkubirali pri sobni temperaturi približno 20 min ter centrifugirali 30 s pri 20000 x g v mikrocentrifugi.

Ločevalni gel (10% NaDS-PAGE z 1 mg/ml želatine) smo pripravili tako, da smo zmešali 2,26 ml 40% (m/v) raztopine akrilamida, 3,56 ml dH_2O , 2,25 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 z 0,4% NaDS in 900 μ l 1% želatine. Polimerizacijo gela smo sprožili z dodatkom 25 μ l 10% APS in 15 μ l reagenta TEMED. Raztopino smo dobro premešali in vlili med pokončni stekleni ploščici, razmaknjeni za 1,5 mm. Na vrh ulitega ločevalnega gela smo nalili 0,05% želatino v 0,3 M Tris-HCl, pH 8,8, da se je izravnala linija gela. Gel se je trdil 20 do 45 min. Po tem času smo želatino odlili in popivnali s papirnato brisačko. Na strjeni ločevalni gel smo ulili še koncentrirni gel, v katerega smo namestili glavniček z 10 žepki, širine 1,5 mm. Koncentrirni gel smo pripravili tako, da smo zmešali 0,625 ml 40% raztopine akrilamida, 3,05 ml dH_2O , 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 in 50 μ l 10% (m/v) NaDS. Pred vlitjem nad ločevalni gel smo dodali v koncentrirni gel še 20 μ l 10% APS in 10 μ l reagenta TEMED. Ko se je gel strdil, smo odstranili glavniček, ploščici vpeli v aparaturo za elektroforezo, vlili pufer za elektroforezo in v žepke dodali do 60 μ l pripravljenih vzorcev. Elektroforeza je potekala pri konstantnem toku 30 mA/gel približno 40 min. Po elektroforezi smo gel inkubirali 1 h v pufru za renaturacijo 2,5 % Triton-X-100 pri sobni temperaturi na rotacijskem mešalniku, na tak način smo odstranili iz gela NaDS. Gel smo potem razvijali 21 h v razvijalnem pufru (100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 200 mM NaCl, 5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02% (w/v) Brij 35 in dodatkom 2 mM DTT), kateremu smo lahko dodali tudi specifične inhibitorje. Pri cimogramu z inhibitorjem E64, ki je specifičen za

cisteinske proteaze, smo E64 dodali v vzorec in v razvijalni pufer do končne koncentracije 33 μM . V vzorec smo dodali ustrezno količino inhibitorja iz založne raztopine in inkubirali pri sobni temperaturi 15-20 min, šele nato dodali vzorčni pufer in inkubirali vzorce še 20 min pri sobni temperaturi.

Gel smo barvali 1 h v raztopini Coomassie Brilliant Blue R-250 in ga nato primerno razbarvali (2-krat 30-40 min). Proteolitična aktivnost po razbarvanju je bila vidna v obliki prozornih lis na temno modrem ozadju obarvane želatine. Gele smo slikali s sistemom za slikanje gelov UVItec, ki je bil povezan z računalniškim programom UVI Photo.

3.2.5.3 Nativna elektroforeza (PAGE)

O nativni elektroforezi govorimo, kadar proteinskim vzorcem ne dodamo denaturanta ali natrijevega dodecilsulfata (NaDS). Molekule se ločujejo na osnovi naboja in velikosti, struktura molekul pa se ohrani. Nativna elektroforeza se uporablja v preparativne namene in kadar želimo ohraniti biološko aktivnost molekul.

Ta tip elektroforeze smo izvedli na enak način, kot je opisano zgoraj, s to razliko, da smo ločevalni gel, koncentrirni gel in vzorčni pufer pripravili brez dodatka 10 % NaDS, namesto tega smo odpipetirali ustrezno količino dH_2O . Tudi pufer za elektroforezo smo pripravili brez NaDS.

Nativno elektroforezo smo uporabili za analizo proteinskih vzorcev, dobljenih s pomočjo afinitetne kromatografije iz fižolovega izvlečka in izvlečka iz svinjskih ledvic. Izvedli smo jo po že opisanem postopku (Budič in sod., 2009). Po končani elektroforezi smo dva paralelna nativna gela obravnavali na dva načina:

1. gel smo spirali 5 min v dH_2O in ga zatem razvijali v 40 ml citratnega pufra (39,1 mM citronska kislina, 121 mM Na_2HPO_4 , 1 mM EDTA, pH 8,5), ki smo mu dodali 2 mM DTT in 100 μM fluorogeni substrat Z-Ala-Ala-Asn-AMC (Bachem, Nemčija), ki je specifičen za legumain;
2. gel smo spirali 5 min v dH_2O in ga zatem razvijali v 40 ml fosfatnega pufra (0,1 M fosfatni pufer, 20 mM EDTA, pH 7,0), ki smo mu dodali 2 mM DTT in 100 μM fluorogeni substrat Z-Phe-Arg-AMC (Bachem, Nemčija).

3.2.5.4 Prenos Western in določanje N-terminalnega aminokislinskega zaporedja

N-terminalno zaporedje proteinov in peptidnih fragmentov smo določili z avtomatizirano Edmanovo degradacijo z uporabo avtomatskega sekvenatorja Procise 492A (Applied Biosystems, ZDA), povezanega z analizatorjem 120A (Applied Biosystems, ZDA).

Proteine v vzorcu smo ločili z NaDS-PAGE in jih prenesli na membrano PVDF. Pri postopku prenosa proteinov iz poliakrilamidnega gela na poliviniliden difluorid (PVDF) membrano (prenos Western) dobimo na membrani enak vzorec ločenih proteinov, kakor je bil na gelu (Towbin in sod., 1979). Pufer za prenos smo pripravili tako, da smo zmešali 100 ml pufera, ki vsebuje 30 g/l Tris in 58 g/l glicina, z 200 ml metanola, 3,75 ml 10% NaDS in mešanico dolili z dH₂O do 1 l. Plastično mrežo iz tanka smo razprli in na anodno stran (črno) najprej položili blazinico in 3 filter papirje enakih dimenzij, kakor gel. Blazinici in filter papirje smo predhodno namočili v pufru za prenos, da so se prepojili. Na filter papirje smo dali membrano PVDF Immobilon-P^{SQ} (Milipore, ZDA), ki ima velikosti por 0,2 μm. Membrano smo predhodno nekaj sekund aktivirali v 100% metanolu, nato sprali v dH₂O ter namočili v pufru za prenos, da se je prepojila. Na membrano smo položili gel, ki smo ga predhodno inkubirali 5 min v pufru za prenos. Tako membrano, kot tudi gel smo na enem koncu označili. Na gel smo dali še 3 filter papirje in blazinico ter priklopili katodno ploščo (prozorno). Pri nalaganju plasti smo pazili, da med njimi ni bilo zračnih mehurčkov in da so se vse plasti dobro in tesno prilegale. Plastično mrežo smo postavili v tank tako, da je bil črni del mreže ob črnem delu tanka. Tank smo skupaj s posodico z ledom vstavili v kadičko za prenos Western (Biorad, ZDA) in to do vrha dolili s pufram za prenos. Prenos je trajal 100 min pri napetosti 200 mA. Po končanem prenosu smo razstavili sendvič, membrano sprali v dH₂O in jo v njej pustili čez noč. Naslednji dan smo membrano barvali približno 1 minuto v raztopini barvila Serva blue R, ki smo jo pripravili tako, da smo 0,05 g barvila Serva blue raztopili v 20 ml metanola in 500 μl očetne kisline in dolili z dH₂O do 50 ml. Na koncu smo membrano razbarvali v 50% metanolu. Proteinske lise smo iz membrane izrezali in sledilo je določanje zaporedja, ki ga je izvedla mag. Adrijana Leonardi z Odseka za molekularne in biomedicinske znanosti na Inštitutu Jožef Stefan.

Aminokislinska zaporedja smo analizirali z uporabo pripomočkov Nacionalnega Centra za Biotehnoško Informacijo (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), na ExpaSy na Švicarskem Inštitutu za Bioinformatiko (<http://www.expasy.org/>) in v bazi podatkov MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>).

3.2.5.5 Identifikacija proteinov z masno spektrometrijo

Masna spektrometrija je način ločevanja ionov glede na njihov količnik m/z (masa na naboj). S pomočjo masne analize proteinskih fragmentov lahko ugotovimo njihovo aminokislinsko zaporedje in jih identificiramo. Masni spektrometer sestoji iz treh delov – iz ionizatorja, analizatorja in detektorja. V ionizatorju delci dobijo naboj, zaradi katerega se potem v analizatorju odklonijo, kar na koncu zazna detektor.

Vzorec, ki smo ga izolirali iz fižolovega izvlečka z 10 mM HCl, smo analizirali z NaDS-PAGE, gel po elektroforezi pobarvali s Coomassie Brilliant Blue R-250. Iz gela smo nato izrezali lise in za identifikacijo proteinov uporabili masno spektrometrijo. Analizo je izvedel dr. Marko Fonovič z Odseka za biokemijo, molekularno in strukturno biologijo na Inštitutu Jožef Stefan z elektrosprej ionizacijo (LC-MS-MS) na masnem spektrometru MSD Trap XCT Ultra (Agilent, ZDA).

3.2.5.6 Določanje encimske aktivnosti

3.2.5.6.1 Test encimske aktivnosti s substratom Z-Phe-Arg-AMC

Princip te metode je fluorimetrično določanje 7-amino-4-metil kumarina (AMC), ki ga odcepljajo encimi iz substrata. Ta fluorogeni substrat se uporablja za določanje aktivnosti cisteinskih proteaz (katepsinov B in L, papaina in plazemskih kalikreinov).

Različnim količinam vzorca (0,5; 2; 5; 25 μ l) v 500 μ l reakcijske raztopine (0,1 M fosfat, 20 mM EDTA, pH 7,0), ki je vsebovala 3 mM DTT, smo primešali 10 μ l 5 mM substrata Z-Phe-Arg-AMC (Bachem, Nemčija) in 10 min inkubirali pri 37°C. Reakcijo smo prekinili z dodatkom prekinjevalnega reagenta in sicer 2 ml 5 mM jodoocetne kisline in spremljali nastanek produkta z merjenjem fluorescence pri valovni dolžini ekscitacije 370 nm in emisije 460 nm na pretočnem fluorimetru Luminiscence Spectrometer LS 30 (Perkin Elmer, ZDA). Slepri vzorec smo pripravili po enakem postopku, brez dodatka vzorca.

3.2.5.6.2 Test encimske aktivnosti s substratom Z-Ala-Ala-Asn-AMC

Princip te metode je fluorimetrično določanje 7-amino-4-metil kumarina (AMC), ki ga odcepljajo encimi iz fluorescenčnega substrata Z-Ala-Ala-Asn-AMC. Substrat se uporablja za določanje aktivnosti legumaina.

Različnim količinam vzorca (0,5; 2; 5; 25 μ l) v 500 μ l reakcijske raztopine (39,1 mM citronske kisline, 121 mM natrijevega fosfata (Na_2HPO_4), 1 mM EDTA, pH 5,8), ki je vsebovala 2 mM DTT, smo primešali 5 μ l 5 mM substrata Z-Ala-Ala-Asn-AMC (Bachem, Nemčija) in 10 min inkubirali pri 37°C. Reakcijo smo prekinili z dodatkom prekinjevalnega reagenta in sicer 2 ml 5 mM jodoocetne kisline in spremljali nastanek produkta z merjenjem fluorescence pri valovni dolžini ekscitacije 370 nm in emisije 460 nm na fluorimetru Luminiscence Spectrometer LS 30 (Perkin Elmer, ZDA). Slepri vzorec smo pripravili po enakem postopku, brez dodatka vzorca.

3.2.5.6.3 Test encimske aktivnosti s substratom FITC- hemoglobin

Pri testu smo uporabili hemoglobin (Calbiochem, ZDA), ki je bil označen z fluorescein-izotiocianatom (FITC) (Sigma, Nemčija). FITC-hemoglobin je bil pripravljen po postopku, ki je opisan za pripravo FITC-kazeina (Twining, 1984).

Najprej smo pripravili mešanico substrata in pufra, tako da smo za vsak vzorec zmešali 200 μ l fosfatnega pufra (0,1 M fosfatni pufer, 1,5 mM EDTA, pH 6,0) z dodatkom 2 mM DTT in 10 μ l substrata FITC-hemoglobin. V mikrocentrifugirke smo zmešali 50 μ l vzorca in 210 μ l mešanice substrata in pufra in inkubirali 15 min pri 37°C. Po tem času smo v mikrocentrifugirke odpipetirali 430 μ l prekinjevalca 5% trikloroocetne kisline (5% TCA) in inkubirali 10 min pri sobni temperaturi. Nato smo centrifugirali 5 min pri 20000 x g. Med tem smo si za vsak vzorec pripravili epruveto z 2,3 ml 0,5 M NaOH in po centrifugiranju iz vsake mikrocentrifugirke vanjo odpipetirali 200 μ l supernatanta. Nastanek produkta smo spremljali z merjenjem fluorescence pri valovni dolžini ekscitacije 490 nm in emisije 525 nm na fluorimetru Luminiscence Spectrometer LS 30 (Perkin Elmer, ZDA).

3.2.5.6.4 Test encimske aktivnosti s substratom BAPNA

Kot substrat pri reakciji smo uporabili sintetični substrat BAPNA, katerega raztopina je brezbarvna in prosojna. Pri njegovi razgradnji se sprošča *p*-nitroanilin, ki je intenzivno rumeno obarvan in ga lahko določimo spektrofotometrično, z merjenjem absorbance pri 405 nm. Intenziteta barve produkta je sorazmerna številu razgrajenih molekul substrata. Substrat BAPNA se uporablja za določanje aktivnosti proteaz, kot so papain, aktinidin in tripsin.

Različnim količinam vzorca (50, 100 μ l) smo primešali 1,5 ml mešanice 0,01 M substrata BAPNA (N-benzoil-D,L-arginil-p-nitroanilid, Sigma, Nemčija) in pufra (0,1 M Tris, 0,02 M CaCl₂, pH 8,0 z dodatkom 3 mM DTT pred uporabo) v razmerju 1: 100 in 30 min inkubirali pri 37°C na stresalniku. Substrat BAPNA smo predhodno pripravili v Me₂SO, tako da smo zatehtali 100 mg BAPNA na 2,3 ml Me₂SO. Reakcijo smo prekinili z dodatkom prekinjevalnega reagenta in sicer 1 ml 0,2 M HCl in spremljali nastali produkt z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 405 nm. Slepri vzorec smo pripravili po enakem postopku, brez dodatka vzorca. Pozitivno kontrolo smo pripravili po enakem postopku, le da smo namesto vzorca dodali 50 μ l tripsina (Fluka, ZDA) s koncentracijo 0,05 mg/ml. Test smo ponovili še s pufrom BAPNA (0,1 M Tris, 0,02 M CaCl₂, pH 6,0 z dodatkom 3 mM DTT pred uporabo).

3.2.5.7 Določanje vpliva lektina CnL na inhibitorno aktivnost Mcp

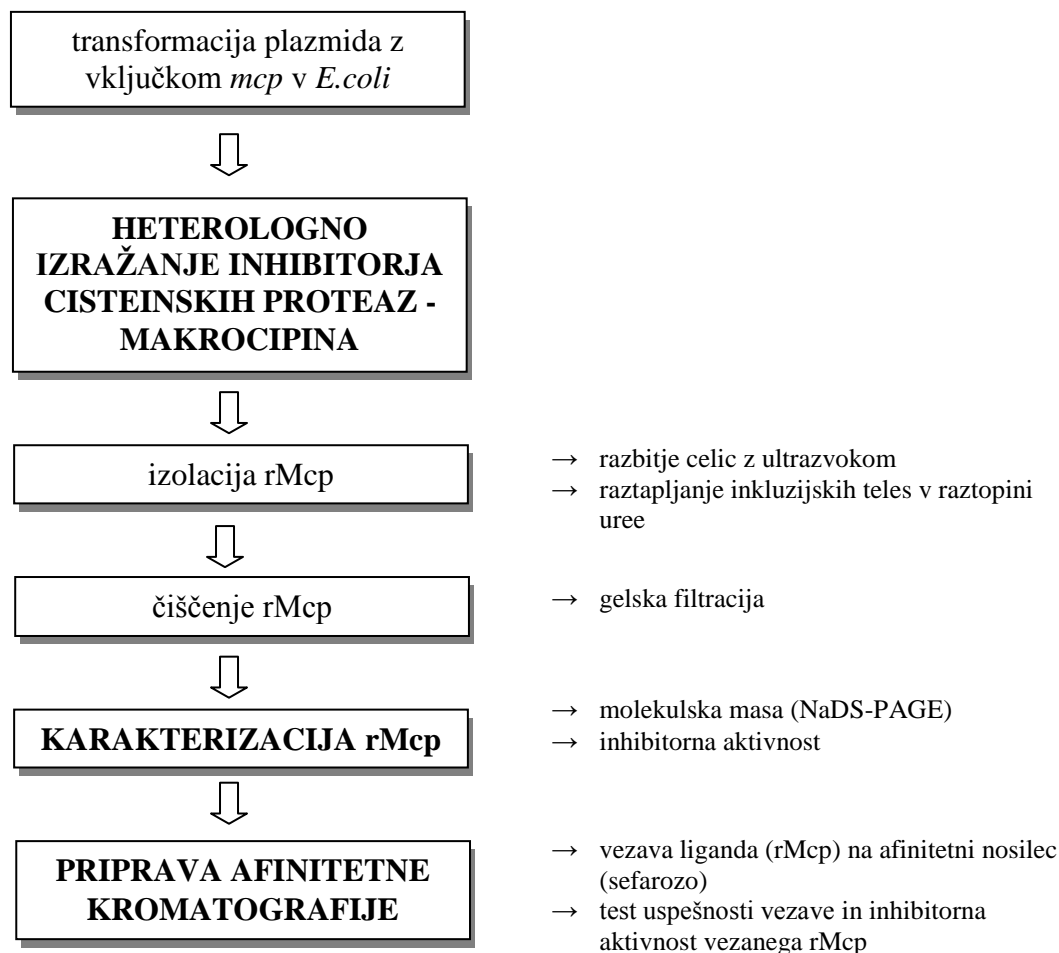
Test temelji na uporabi kromogenega substrata Z-Phe-Arg-*p*NA (Bachem Feinkemikalien, Švica), iz katerega encimi odcepljajo *p*NA (*para*-nitroanilid), njegovo sproščanje pa spremljamo spektrofotometrično pri valovni dolžini okrog 405 nm.

V tri mikrocentrifugirke smo zmešali različna razmerja rekombinantnega Mcp1 in rekombinantnega lektina CnL, ki sta bila pripravljena na Odseku za biotehnologijo Inštituta Jožef Štefan, in sicer CnL:Mcp1=1:1 (15 μ M CnL in 15 μ M Mcp1), CnL:Mcp1=1:3 (3 μ M CnL in 9 μ M Mcp1) in CnL:Mcp1=3:1 (39 μ M CnL in 13 μ M Mcp1) v pufru BANA (100 mM fosfatni pufer, 0,2 mM EDTA, pH 6,0) z dodatkom reducenta 5 mM DTT. Pripravili smo si tudi 10 μ M Mcp1 in 10 μ M CnL v pufru BANA s 5 mM DTT. Papain (Sigma, Nemčija) smo redčili 50 krat v pufru BANA. Kot substrat smo uporabljali 300 μ M Z-Phe-Arg-*p*NA v pufru BANA s 5 mM DTT.

Test smo izvajali v mikrotitrski plošči, v vsako izmed luknjic smo odpipetirali 20 μ l predhodno pripravljene raztopine papaina in 100 μ l pufru BANA z DTT. V luknjice smo odpipetirali različne količine (2,5 μ l; 5 μ l; 10 μ l in 20 μ l) inhibitorja, lektina ter mešanice inhibitor-lektin in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Po tem času smo v luknjice z multikanalno pipeto odpipetirali 100 μ l 300 μ M Z-Phe-Arg-*p*NA in inkubirali 5 min pri 37°C. Po tem času smo s čitalcem mikrotitrskih plošč Tecan (Safire, ZDA) izmerili absorbanco pri 410 nm (A_{410}). Slepí vzorec smo pripravili po enakem postopku, brez dodatka inhibitorja, lektina in encima (papaina). Kontrolni vzorec smo pripravili po enakem postopku, brez dodatka inhibitorja in lektina.

4 REZULTATI

4.1 PRIPRAVA AFINITETNE KROMATOGRAFIJE

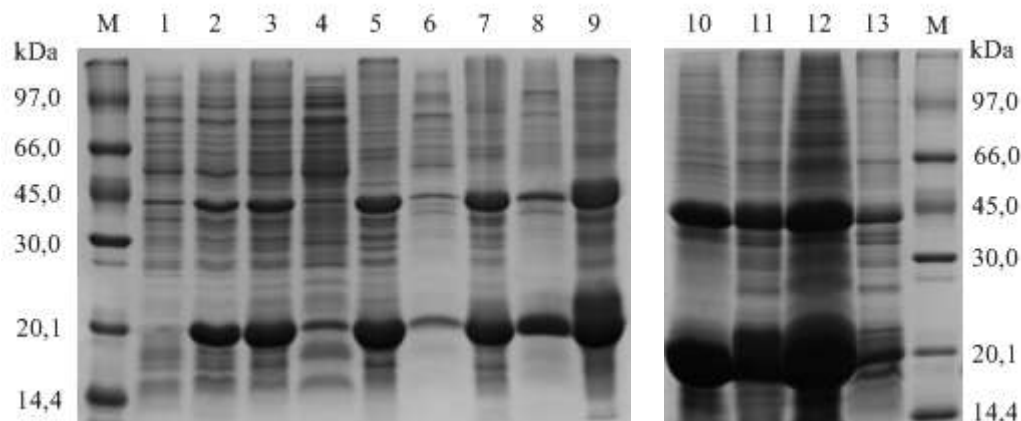


Slika 5: Shematski prikaz priprave afinitetne kromatografije.

4.1.1 Heterologno izražanje inhibitorja cisteinskih proteaz makrocipina

Za pripravo rekombinantnega makrocipina smo uporabili bakterijski ekspresijski sistem. Ekspresijski vektor pET11a::rMcp1a smo transformirali v bakterijski sev *E. coli* BL21(DE3), ki omogoča prekomerno izražanje po indukciji z laktoznim analogom IPTG. Nivo rekombinantnega proteina je bil znatno višji 6 ur po indukciji z IPTG kot pred indukcijo, kar je razvidno iz slike 6 - linija 2 kot močnejša lisa na območju, kjer smo pričakovali naš protein (21 in 42 kDa). Celice smo po gojenju razbili s pomočjo sonikacije. Rekombinantni makrocipin se je izražal v glavnem v obliki netopnih inkluzijskih teles, ki

smo jih raztapljali v pufru z postopnim poviševanjem koncentracije uree (v 1 M, 3 M, 6 M in 8 M urei).

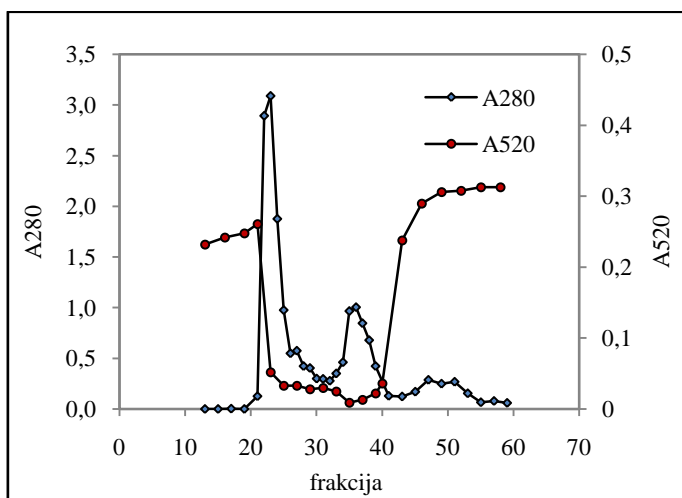


Slika 6: Izražanje rekombinantnega makrocipina.

Analiza izražanja rekombinantnega makrocipina z NaDS-PAGE (12% poliakrilamidni gel, obarvan s Commasie Blue) v ekspresijskem sistemu *E. coli* BL21(DE3) pET11a::rMcp1a. M- označevalec molekulskih mas, 1- celični lizat pred indukcijo izražanja in 2- 6 h po indukciji izražanja z IPTG; 3- vzorec po razbitju celic; 4- supernatant 1; 5- raztopljena oborina v pufru TET, 6- supernatant 2; 7- oborina, raztopljena v pufru TET z 1 M ureo; 8- supernatant 3; 9- oborina, raztopljena v pufru TET s 3 M ureo, 10- supernatant 4, 11- oborina, raztopljena v pufru TET s 6 M ureo; 12- supernatant 5; 13- oborina, raztopljena v pufru TET z 8 M ureo; M- označevalec molekulskih mas.

4.1.2 Čiščenje in karakterizacija rekombinantnega makrocipina

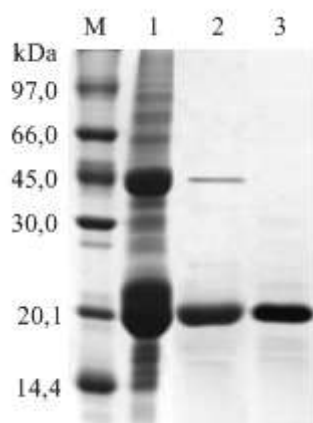
Rekombinantni makrocypin smo čistili s pomočjo gelske filtracije. Frakcijam smo izmerili absorbanco pri 280 nm in v njih določili prisotnost inhibitorja cisteinskih proteaz s testom inhibicije papaina s substratom BANA (slika 7). Prisotni so bili trije proteinski vrhovi, od tega sta prvi in drugi vrh pokazala inhibicijo papaina. Drugi vrh je pokazal večjo specifično aktivnost, frakcijam z višjimi koncentracijami proteinov so tu odgovarjale tudi višje inhibitorne aktivnosti. Frakcije, ki so kazale inhibitorno aktivnost v prvih dveh vrhovih, smo združili, jih koncentrirali ter jih uporabili za pripravo afinitetne kromatografije.



Slika 7: Čiščenje rekombinantnega makrocipina z gelsko filtracijo.

Modro: koncentracija proteinov izmerjena kot absorbanca pri 280 nm. Rdeče: Inhibitorna aktivnost v frakcijah, merjena s testom inhibicije papaina s substratom BANA, podrobnosti so opisane v metodah pod točko 3.2.1.6.

Analiza očiščenega inhibitornega proteina je pod reducirajočimi pogoji na poliakrilamidni elektroforezi v prisotnosti NaDS pokazala liso rMcp1 z molekularno maso 21 kDa. V primeru brez predhodne redukcije je bila prisotna tudi lisa pri 42 kDa, ki ustreza dimerom rMcp1, ki nastanejo s tvorbo disulfidnih vezi med cisteini v molekulah makrocipina (Sabotič in sod., 2009). Potrdili smo tudi uspešnost gelske filtracije, saj so bile na NaDS-PAGE prisotne le željene proteinske lise (slika 8).



Slika 8: Analiza očiščenega rekombinantnega makrocipina z NaDS-PAGE.

M-označevalec molekulskih mas; 1- rMcp1 pred gelsko filtracijo; 2- očiščen rMcp1 brez reducenta; očiščen rMcp1 z dodatkom reducenta.

4.1.3 Priprava afinitetne kromatografije

Pred vezavo liganda (rMcp) na nosilec (sefarozo 4B aktivirano s CNBr) smo ocenili koncentracijo inhibitorja po Beer-Lambertovem zakonu. Skoncentriranim vzorcem smo izmerili A_{280} in izračunali koncentracijo proteinov.

Preglednica 2: Izračun koncentracije [mg/ml] in mase [mg] proizvedenega in očiščenega rMcp1.

A_{280}	V [ml]	c [mg/ml]	m [mg]
3,10	32,5	1,21	39,25

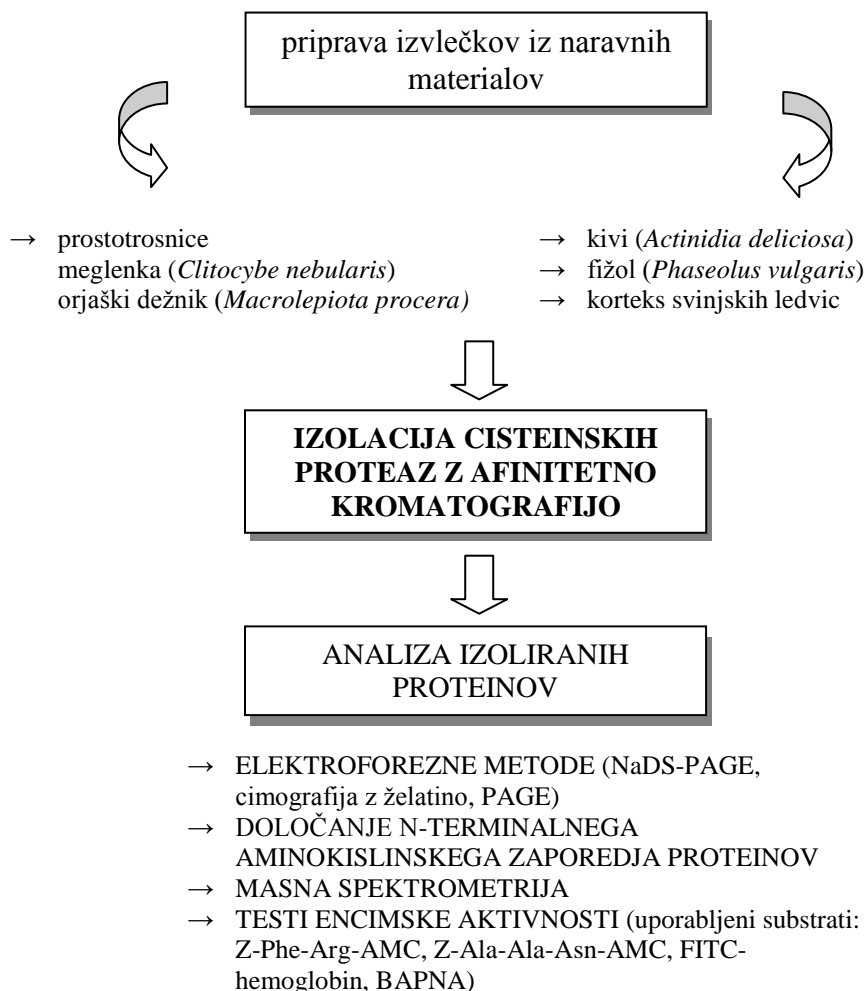
Rekombinantni makrocipin, ki smo ga pripravili s heterolognim izražanjem v bakteriji *E. coli*, smo vezali na sefarozo in z njo napolnili kolono za afinitetno kromatografijo.

S testom inhibicije papaina s substratom BANA, ki je opisan v točki 3.2.1.6, smo testirali uspešnost vezave inhibitorja na sefarozo in njegovo inhibitorno aktivnost. Makrocipin je pri vezavi ohranil svoje inhibitorne lastnosti, saj je sefaroza, na katero smo vezali makrocipin močno inhibirala papain. 50 μ l očiščenega rMcp1 je za 93% inhibiralo testni papain, medtem ko je 200 μ l suspenzije gela testno proteazo inhibiralo za 68%.

Preglednica 3: Inhibitorna aktivnost makrocipina vezanega na sefarozo.

	A_{520}	% aktivnosti	% inhibicije
Pozitivna kontrola	0,3460	100	0
Očiščen rMcp1	0,0243	7	93
Pozitivna kontrola	0,4879	100	0
Sefaroza z vezanim rMcp1	0,1565	32	68

4.2 IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA CISTEINSKIH PROTEAZ

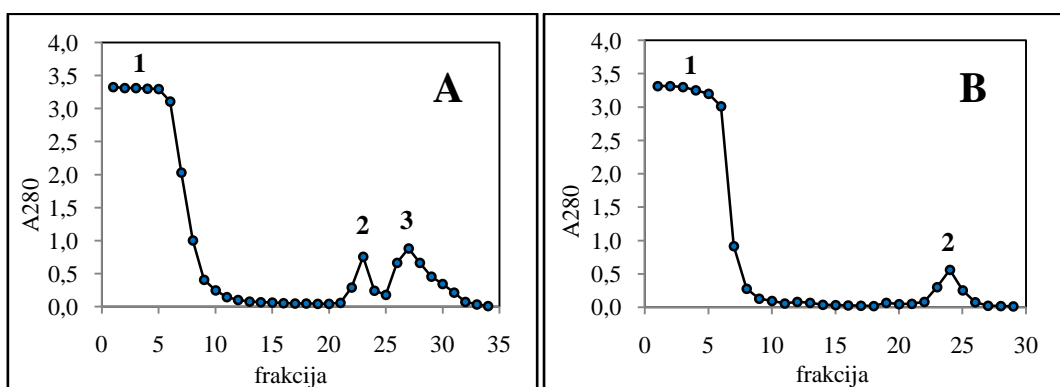


Slika 9: Shematski prikaz postopka izolacije in karakterizacije proteinov iz različnih naravnih virov.

4.2.1 Izolacija cisteinskih proteaz iz prostotrosnic

Iz prostotrosnic, iz katerih so izolirali inhibitorje cisteinskih proteaz, ki spadajo v družino mikocipinov, smo želeli s pomočjo afinitetnega nosilca z vezanim inhibitorjem cisteinskih proteaz - makrocipinom izolirati cisteinske proteaze. V ta namen smo po postopku, opisanem v točki 3.2.3.1, pripravili vodna izvlečka iz meglenke (*Clitocybe nebularis*) in orjaškega dežnika (*Macrolepiota procera*). Ločeno smo ju nanegli na kolono in spirali z vezalnim pufrom, eluirali pa z 10 mM NaOH. Postopek smo večkrat ponovili in dobili ponovljive rezultate.

Vrh 1 na elucijskih diagramih (slika 10) predstavlja nevezane proteine, ki smo jih iz kolone sprali z vezalnim pufrom. Proteine, ki so se v postopku rMcp-afinitetne kromatografije vezali, smo pridobili z elucijo s spremembo pH. V primeru nanosa izvlečka meglenke na afinitetno kromatografijo smo z elucijo dobili dva vrhova, v primeru nanosa izvlečka orjaškega dežnika pa enega (slika 10). Eluirane vrhove smo ločeno koncentrirali. Izmerili smo A_{280} skoncentriranih vzorcev ter jih identificirali s pomočjo NaDS-PAGE in cimografije.



Slika 10: Elucijski diagram rMcp-afinitetne kromatografije izvlečkov prostotrosnic.

Absorbanca pri 280 nm frakcij tekem spiranja nevezanih proteinov (vrh 1) in elucije vezanih proteinov iz A: izvlečka meglenke (vrh 2 in vrh 3) in B: izvlečka orjaškega dežnika (vrh 2).

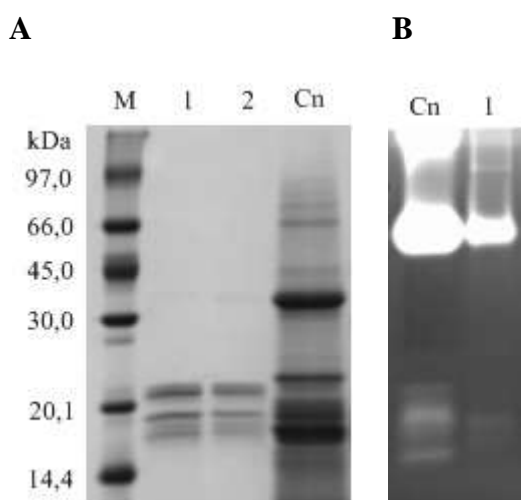
4.2.1.1 Optimizacija izolacije cisteinskih proteaz iz prostotrosnic

Optimizirali smo izolacijo cisteinskih proteaz z uporabo različnih eluentov v postopku afinitetne kromatografije. Kot elucijske pufre smo poleg 10 mM NaOH uporabili tudi 20% Me_2SO , 4% brij ali 6 M ureo. 20% Me_2SO in 4% brij sta se izkazala za neuspešna, saj z merjenjem A_{280} v frakcijah nismo zaznali elucijskega vrha. 6 M urea se je izkazala kot uspešen eluent, vendar je bil vrh nižji kot pri uporabi 10 mM NaOH. Analiza proteinov z elektroforeznimi metodami je pokazala nizko vsebnost proteinov, ki niso kazali želatinolitične aktivnosti. Kot najbolj ustrezen eluent pri izolaciji cisteinskih proteaz iz prostotrosnic se je izkazal 10 mM NaOH.

4.2.1.2 Analiza proteinov z elektroforeznimi metodami

Analiza NaDS-PAGE je pokazala, da so v obeh vrhovih izoliranih iz izvlečka meglenke prisotne enake lise z ocenjenimi velikostmi 17 kDa, 18 kDa, 19 kDa, 21 kDa in 22 kDa in šibko vidna lisa pri 37 kDa (slika 11A), zato smo vrhova po sledečih afinitetnih kromatografijah združevali.

Vzorci smo analizirali tudi na prisotnost želatinolitične aktivnosti oz. nespecifične razgradnje proteinov. V primeru nanosa izvlečka meglenke je prisotnih pet lis s proteolitično aktivnostjo, dve močni in tri šibke. V primeru nanosa izolata pa je lis manj in so šibkejše kot v samem izvlečku. Prisotne so štiri lise, ena močna in tri šibke. Vzorec želatinolitične aktivnosti je bil ponovljiv (slika 11B), razlika se je kazala le v jakosti lis med posameznimi vzorci. Aktivnosti smo karakterizirali z dodatkom inhibitorja E64, ki je specifičen za papainovo družino proteaz, vendar le ta proteaz ni inhibiral (ni prikazano). Močne aktivnosti se nahajajo pri višjih molekulkah, vendar primerjava lis, ki kažejo želatinolitično aktivnost z lisami določenimi z NaDS-PAGE ni mogoča, saj pri NaDS-PAGE z želatino ne moremo pravilno določiti molekulkah mas proteinov. Na potovanje proteinov lahko vpliva afinitetna interakcija med aktivnim mestom encima in želatino (Hummel in sod., 1996). Opazili so tudi, da je navidezna molekulska masa odvisna od nanešene količine proteaze, in ker količin posameznih proteaz v izvlečku in eluatu ni mogoče določiti, vrednosti molekulkah mas niso zanesljive (Sabotič in sod., 2007).

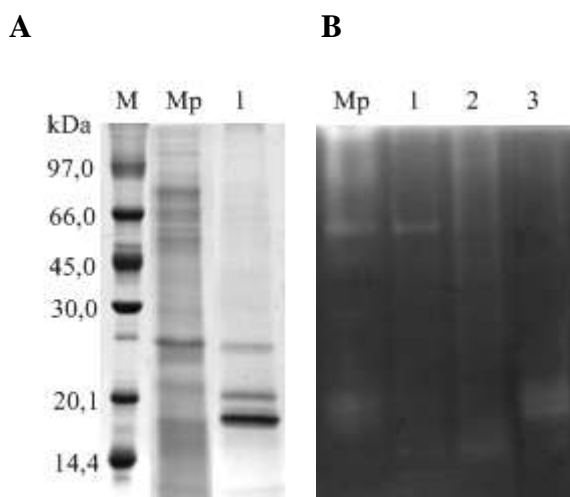


Slika 11: Analiza proteinov izoliranih iz meglenke z NaDS-PAGE (A) in želatinsko cimografijo (B).

M- označevalec molekulkah mas; 1- proteini izolirani iz izvlečka meglenke, vrh 1; 2- proteini izolirani iz izvlečka meglenke, vrh 2; Cn- izvleček meglenke.

Analiza skoncentriranih vzorcev, izoliranih iz izvlečka orjaškega dežnika, je na NaDS-PAGE pokazala lise z ocenjenimi velikostmi 18 kDa, 20 kDa in 26 kDa. Vidna je bila tudi šibka lisa z ocenjeno velikostjo 19 kDa (slika 12A). Vzorci, ki smo jih pridobili pri večkratnih ponovitvah afinitetne kromatografije, so se razlikovali v jakosti proteinskih lis, vsi vzorci tudi niso imeli vseh omenjenih lis, vendar pa niso kazali proteinskih lis drugačnih velikosti.

Vzorci smo, prav tako kot pri megljenki, analizirali tudi s pomočjo želatinske cimografije. Tu so izolati kazali aktivnosti, ki pa so se med seboj precej razlikovale, predvsem v položaju aktivne lise na gelu (slika 12B). Tako v primeru nanosa izvlečka orjaškega dežnika kot v primeru nanosenih izolatov so bile lise šibke. Pri gobjem izvlečku sta prisotni dve lisi, pri izoliranih vzorcih pa ena. Aktivnosti smo karakterizirali s pomočjo dodatka inhibitorja E64, ki je specifičen za papainovo družino proteaz, vendar le ta aktivnosti ni inhibiral (ni prikazano).



Slika 12: Analiza proteinov izoliranih iz orjaškega dežnika z NaDS-PAGE (A) in želatinsko cimografijo (B).

M- označevalec molekulskih mas; Mp- izvleček orjaškega dežnika; 1, 2, 3- proteini izolirani iz izvlečka orjaškega dežnika z afinitetno kromatografijo.

4.2.1.3 Encimske aktivnosti

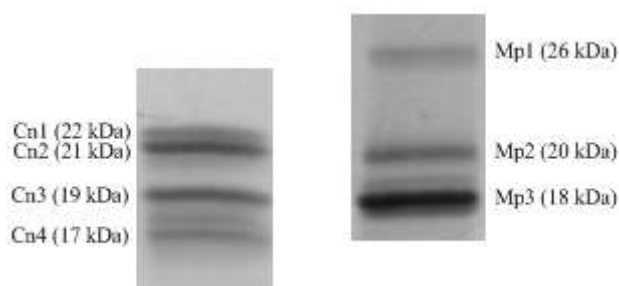
Po eni izmed izolacij cisteinskih proteaz iz megljenke smo ugotavljali aktivnosti frakcij na substrat Z-Phe-Arg-AMC, po postopku, opisanem v točki 3.2.5.6.1. Aktivnosti nismo zaznali, kar je bila verjetno posledica nizke koncentracije proteaz.

Skoncentrirani vzorci, izolirani iz obeh prostotrosnic, prav tako niso kazali aktivnosti pri testu encimske aktivnosti s substratom FITC- hemoglobin.

4.2.1.4 Analiza N-terminalnih aminokislinskih zaporedij

Najmočnejše proteinske lise vzorcev, izoliranih iz obeh prostotrosnic, katerih elektroforegrama sta prikazana na sliki 13, smo uporabili za določanje N- terminalnega aminokislinskega zaporedja. Analiza je pokazala, da je bilo v vzorcu prisotnih več

različnih proteinov. Zaradi različnih intenzitet signalov je bilo v posameznih lisah mogoče razbrati več N-terminalnih aminokislinskih zaporedij (preglednica 4).



Slika 13: NaDS-PAGE proteinov iz prostotrosnic, ki smo jih izbrali za določanje N-terminalnega zaporedja.

Proteinom v označenih lisah smo določili N-terminalno aminokislinsko zaporedje; Cn- proteini izolirani iz izvlečka meglenke (levo); Mp- proteini izolirani iz izvlečka orjaškega dežnika (desno).

Preglednica 4: N-terminalna aminokislinska zaporedja proteinov, izoliranih iz prostotrosnic.

Cn- oznaka za vzorce izolirane iz meglenke; Mp- oznaka za vzorce izolirane iz orjaškega dežnika.

	5				10				15				20							
Cn1	F	Y	T	I	R	H	L	V	E	G	L	H	P	I	N					
			P						T		V			•						
Cn2	A	L	P	R	W	N	Y	•												
		P	•	•																
Cn3	S	I	T	P	G	T	Y	N/V	I	A	N/L	V	A/G	Y	D	P	•			
	N	P	A	F	G	N	S	L												
Cn4	N	V	P	F	G	N	S	V	I	F										
Mp1	M	V	F	L	I															
Mp2	•	V	F	E	•															
		P		L																
Mp3	S	G	Q	T	Y	K	I	T	N	V	K	A	G	T	V	I	D	L	S	G
	N	V	K	A	G	T	V	I	•	L	•	G	E	D	N	S	•	W	•	•

Aminokislinsko zaporedje smo primerjali z že znanimi aminokislinskimi zaporedji proteinov s programom BLAST in ugotovili podobnost z že znanimi proteini.

Pri proteinih iz meglenke smo ugotovili podobnost pri Cn1 (22 kDa), pri katerem smo določili zaporedje dolgo 15 aminokislinskih (FYTIRHLVEGLHPXN), ki je pokazalo 92% identičnost in 92% podobnost z zaporedjem N-konca makrocipina 4 iz prostotrosnice *Macrolepiota procera* (Sabotič in sod., 2009). Možno bi bilo, da bi se makrocipin spiral iz

kolone, vendar izolirani protein kaže manjšo identičnost in podobnost (ti znašata le 76%) z zaporedjem N-konca makrocipina 1a, ki je vezan na kolono.

```

                10      20
                . . . . | . . . . | . . . . | . . . .
Makrocipin 1a  MGFEDGFYTI LHLAEGQHPNSKIP 24
Makrocipin 4a  MALEDGFYTI RHLVEGQHPS--IP 22
Cn1            -----FYTI RHLVEGLHPX--N- 15

```

Slika 14: Poravnava določenega N-terminalnega aminokislinskega zaporedja Cn1 z zaporedjem makrocipinov Mcp1a in Mcp4a.

Identične aminokisliline v zaporedjih so označene temno sivo in podobne svetlo sivo.

V proteinski lisi Cn3 (19 kDa) smo določili N-terminalno zaporedje dolžine 16 aminokislin (SITPGTYNIANVAYDP), ki je pokazalo 92 % identičnost in 92% podobnost z zaporedjem N-konca ricinu B-podobnega lektina CnL, ki so ga že predhodno izolirali iz gobe *Clitocybe nebularis* in karakterizirali (Pohleven in sod., 2009).

```

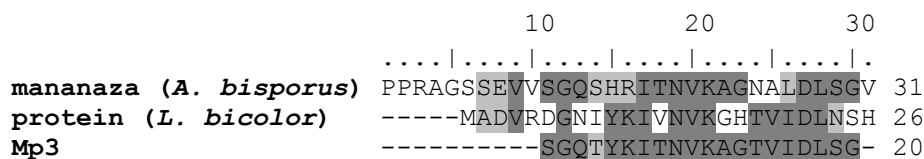
                10
                . . . . | . . . . | . . . . | . . .
CnL  MSITPGTYNI TNVAYTNR 18
Cn3  -SITPGTYNI ANVAYDP- 16

```

Slika 15: Poravnava določenega N-terminalnega aminokislinskega zaporedja Cn3 z zaporedjem N-konca ricinu B-podobnega lektina CnL.

Identične aminokisliline v zaporedjih so označene temno sivo in podobne svetlo sivo.

Pri vzorcu proteinov, izoliranih iz orjaškega dežnika, smo prav tako ugotovili podobnost z že znanimi proteini. Podobnost je bila ugotovljena pri Mp3 (18 kDa), pri katerem smo določili zaporedje N-konca dolgo 20 aminokislin (SGQTYKITNVKAGTVIDLSG), ki je pokazalo 70% identičnost in 90% podobnost z zaporedjem N-konca domnevne mananaze, ki so jo našli v šampinjonih (*Agaricus bisporus*) ter 70% identičnost in 70% podobnost z zaporedjem N-konca proteina iz prostotrosnice *Laccaria bicolor*, ki spada v družino C13 proteinov, ki vežejo ogljikove hidrate.



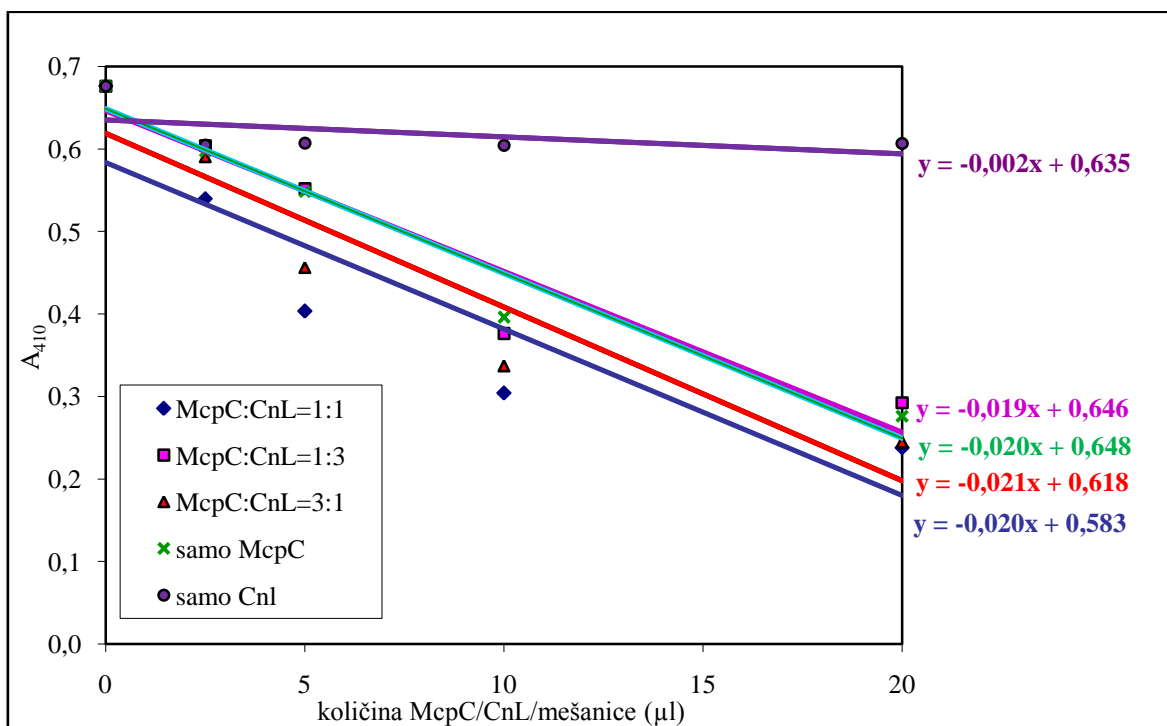
Slika 16: Poravnava določenega N-terminalnega aminokislinskega zaporedja Mp3 z zaporedjem domnevne mananaze iz *A. bisporus* in proteina iz *L. bicolor*.

Identične aminokisliline v zaporedjih so označene temno sivo in podobne svetlo sivo.

V vzorcih Cn2 in Cn4 smo aminokislinsko zaporedje razbrali le do sedme oz. desete aminokisliline, prav tako pri Mp1 in Mp2, kjer smo zaporedje lahko razbrali le do pete oz. tretje aminokisliline. Za zanesljivost primerjalnih analiz bi tu morali določiti daljše zaporedje, zato podobnosti nismo ugotovili.

4.2.1.5 Vpliv CnL na inhibitorno aktivnost Mcp

Analiza N-terminalnih zaporedij je pokazala, da smo iz meglenke s pomočjo rMcp-afinitetne kromatografije izolirali ricinu B-podobne lektine. Da bi ugotovili, ali lektini vplivajo na inhibitorno aktivnost makrocipina, smo testirali inhibicijo papaina s substratom Z-Phe-Arg-pNA v prisotnosti lektina. Pripravili smo mešanice makrocipina in ricinu B-podobnega lektina iz *C. nebularis* v različnih razmerjih, in sicer 1:1, 1:3 in 3:1 in v testu uporabili različne količine teh mešanic. Prav tako smo testirali tudi inhibicijo različnih količin samega makrocipina. Rezultate smo grafično predstavili z linearnimi trendnimi črtami in prikazanimi pripadajočimi enačbami, ki kažejo na to, da lektini ne vplivajo na inhibitorno aktivnost makrocipina. To lahko sklepamo iz naklona premice, ki prikazuje inhibicijo papaina z Mcp1, ki je enak naklonom premic, pri katerih je Mcp1 dodan tudi lektin v različnih razmerjih. Ti nakloni imajo zaokroženo vrednost -0,02 (slika 17). Da bi ugotovili, kakšen je vpliv lektinov na papain, smo testirali tudi različne količine samih lektinov. Tu se je izkazalo, da ima papain enako aktivnost v odsotnosti ali prisotnosti lektinov. Premica je vodoravna, njen naklon je 0 (slika 17).



Slika 17: Vpliv lektina CnL na inhibitorno aktivnost makrocipina.

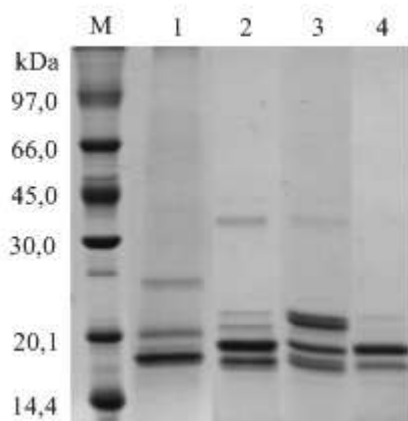
Encimska aktivnost papaina v prisotnosti različnih količin inhibitorja makrocipina (Mcp), lektina CnL in njune mešanice v različnih razmerjih.

4.2.1.6 Vezava proteinov iz prostotrošnic na nosilec (sefarozo)

Zaradi vezave lektinov in lektinu podobnih proteinov na rMcp-afinitetno kromatografijo, se je pojavilo vprašanje, ali je vezava makromolekul specifična na vezani ligand (makrocipin) ali je ta vezava nespecifična adsorbcija na nosilec (sefarozo). V ta namen smo izvedli kontrolne afinitetne kromatografije, tako, da smo izvleček meglenske in orjaškega dežnika nanegli na sefarozo brez vezanega inhibitorja in eluirali z 10 mM NaOH. Potek afinitetne kromatografije je bil enak predhodnim afinitetnim kromatografijam z vezanim makrocipinom.

Analiza tako izoliranih proteinov iz meglenske je na poliakrilamidni gelski elektroforezi v prisotnosti NaDS pokazala lise z ocenjeno velikostjo 17 kDa in 19 kDa ter šibkejšo liso pri 22 kDa. Lise se ujemajo s tistimi, ki smo jih izolirali z vezanim inhibitorjem, le da je kontrolnih manj. Pri izolaciji proteinov iz orjaškega dežnika se je po NaDS-PAGE izkazalo, da so v elucijskem vrhu prisotne lise z ocenjenimi velikostmi 17 kDa, 19 kDa, 21 kDa, 23 kDa in 37 kDa, ki se ne ujemajo z nekontrolnimi izolati.

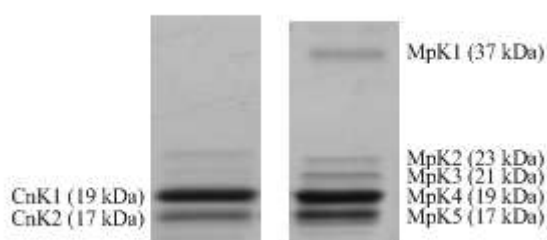
Kontrolni vzorci niso kazali želatinolitične aktivnosti, saj na cimogramu po barvanju ni bilo opaziti prozornih lis na temno obarvanem ozadju, kar pomeni, da izolirani proteini v vzorcu niso proteaze (ni prikazano).



Slika 18: Analiza NaDS-PAGE ne-kontrolnih in kontrolnih izolatov iz prostotrosnic.

M- označevalec molekulskih mas; 1- proteini izolirani iz izvlečka orjaškega dežnika; 2- kontrola (orjaški dežnik); 3- proteini izolirani iz izvlečka meglenke; 4- kontrola (meglenka).

V lisah, ki so bile močne in po prenosu na membrano PVDF in barvanju dobro vidne, smo proteinom določali N-terminalno aminokislinsko zaporedje (slika 19). Analiza je pokazala, da je bilo v vzorcu prisotnih več različnih proteinov. Zaradi različnih intenzitet signalov je bilo v posameznih lisah mogoče razbrati več N-terminalnih aminokislinskih zaporedij (preglednica 5).



Slika 19: NaDS-PAGE (kontrolnih) proteinov iz prostotrosnic, ki smo jih izbrali za določanje N-terminalnega zaporedja.

Proteinom v označenih lisah smo določili N-terminalno aminokislinsko zaporedje; Cn- proteini izolirani iz izvlečka meglenke (levo); Mp- proteini izolirani iz izvlečka orjaškega dežnika (desno).

Preglednica 5: N-terminalna aminokislinska zaporedja proteinov v kontrolnih proteinskih lisah.

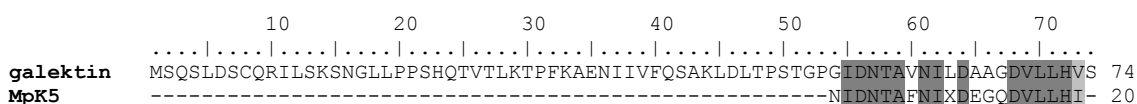
Cn- oznaka za vzorec izoliran iz meglenke; Mp- oznaka za vzorec, izoliran iz orjaškega dežnika.

	5					10					15					20					25				
CnK1	N	S	A	F	G	N	S	V	I	D	L	T	G	N	D	P	A	E	N	T	P	•	I	•	V
CnK2	N	S	A	F	G	N																			
MpK1	/																								
MpK2	/																								
MpK3	K	T	G	L	V	Q	I	L	E	•															
MpK4	N	S	A	F	G	N	S	V	I	D															
MpK5	N	I	D	N	T	A	F	N	I	•	D	E	G	Q	D	V	L	L	H	I					

V proteinski lisi CnK1 (19 kDa) smo določili N-terminalno zaporedje dolžine 25 aminokislin (NSAFGNSVIDLTGNDPAENTPXIXV). Določeno zaporedje kaže 75% identičnost in 88% podobnost z zaporedjem v vzorcu Cn3 (19 kDa, NPAFGNSL), ki je bilo določeno poleg zaporedja ricinu B- podobnega lektina iz *C. nebularis* ter 70% identičnost in podobnost z N-koncem proteina v Cn4 (17 kDa, NVPGNSVIF). Pokazalo je tudi podobnost z ricinu B-podobnim lektinom iz *C. nebularis*, in sicer od 12. aminokislina naprej.

V vzorcu CnK2 (17 kDa) smo aminokislinsko zaporedje razbrali le do šeste aminokislina, ki se ujema z prvimi šestimi določenimi aminokislina določenimi v CnK1. Isti aminokislinski motiv se spet pojavi v vzorcu MpK4 (19 kDa), ki smo mu določili 10 N-terminalnih aminokislin. Podobno, 19 aminokislin dolgo zaporedje N-konca, smo določili tudi v vzorcu MpK5 (17 kDa). V MpK5 smo poleg tega zaporedja določili še 20 aminokislin dolgo zaporedje N-konca proteina (NIDNTAFNIXDEGQDVLLHI), ki kaže 68% identičnost in 73% podobnost z zaporedjem N-konca galektina, ki so ga našli v dvobarvni bledivki (*Laccaria bicolor*).

N-terminalnih zaporedij za proteina v lisah MpK1 in MpK2 ni bilo mogoče določiti, verjetno zaradi tega, ker sta bila na amino koncu blokirana. V vzorcu MpK3 smo zaporedje lahko razbrali do 9 aminokislina, vendar podobnosti z že znanimi proteini nismo ugotovili.



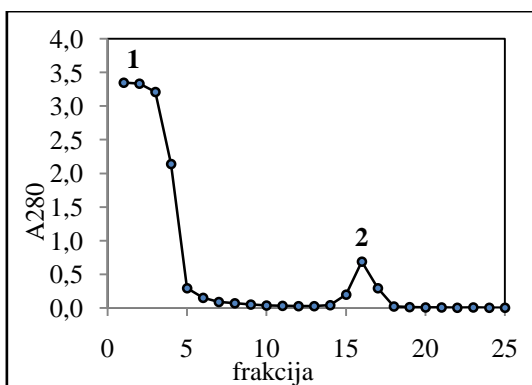
Slika 20: Poravnava določenega N-terminalnega aminokislinskega zaporedja MpK5 z zaporedjem galektina iz *L. bicolor*.

Identične aminokisliline v zaporedjih so označene temno sivo in podobne svetlo sivo.

4.2.2 Izolacija in karakterizacija cisteinskih proteaz iz kivija

4.2.2.1 Izolacija cisteinskih proteaz iz kivija

Z nanosom kivijevega izvlečka na kolono smo želeli izolirati aktinidin. Izvleček proteinov iz zelenega kivija (*Actinidia deliciosa*) smo nanесли na rMcp-afinitetno kromatografijo in ga spirali z vezalnim pufrom. Za elucijo vezanih proteinov smo uporabili 10 mM NaOH. Postopek smo večkrat ponovili in dobili ponovljive rezultate. Vrh 1 na elucijskemu diagramu predstavlja nevezane proteine, ki smo jih iz kolone spirali z vezalnim pufrom. Vrh 2 smo dobili z elucijo s spremembo pH, in predstavlja proteine, ki so se v postopku afinitetne kromatografije vezali na kolono (slika 21).



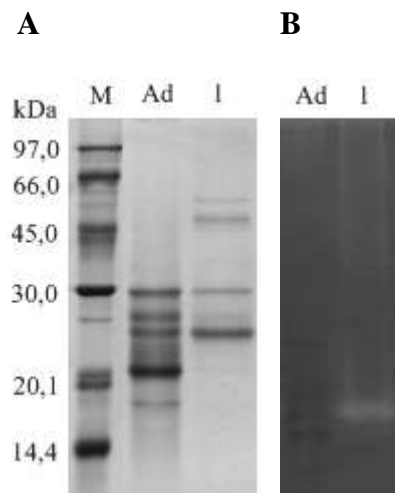
Slika 21: Elucijski diagram rMcp-afinitetne kromatografije izvlečkov kivija.

Absorbanca pri 280 nm v frakcijah tekom spiranje nevezanih proteinov (vrh 1) in elucije vezanih proteinov (vrh 2) iz kivija (*A. deliciosa*).

4.2.2.2 Analiza proteinov z elektroforeznimi metodami

Izolirane proteine smo analizirali s pomočjo poliakrilamidne gelske elektroforeze v prisotnosti NaDS, ki je pokazala tri močnejše lise z ocenjenimi molekulskimi masami 24 kDa, 30 kDa in 48 kDa ter šibkejšima lisama pri 27 kDa in 57 kDa (slika 22A). Vzorce smo analizirali tudi s cimografijo in potrdili prisotnost aktivnosti. Prisotna je bila srednje

močna lisa (slika 22B). Vzorci iz zaporednih afinitetnih kromatografij so kazali enake lise in aktivnost, medtem ko izvleček kivija ni kazal proteolitične aktivnosti.



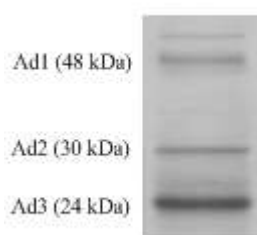
Slika 22: Analiza proteinov izoliranih iz kivija z NaDS-PAGE (A) in želatinsko cimoografijo (B).
M- označevalec molekulskih mas; Ad- izvleček kivija; I- proteini izolirani iz kivija.

4.2.2.3 Encimske aktivnosti

V vzorcih, izoliranih iz kivija, nismo zaznali aktivnosti proteaz s testom BAPNA, čeprav smo v njih določili želatitolitično aktivnost pri pH 8,0. Aktivnosti smo pri testu preverjali tudi pri pH vrednosti 6,0, ki je bližje pH optimumu proteina.

4.2.2.4 Analiza N-terminalnih aminokislinskih zaporedij

Analiza NaDS-PAGE je pokazala, da je bilo v vzorcu prisotnih več različnih proteinov. Poleg tega je bilo v posameznih lisah mogoče razbrati več N-terminalnih aminokislinskih zaporedij.



Slika 23: NaDS-PAGE proteinov iz kivija (*Actinidia deliciosa*), ki smo jih izbrali za določanje N-terminalnega zaporedja.

Preglednica 6: N-terminalna aminokislinska zaporedja proteinov, izoliranih iz kivija (*Actinidia deliciosa*).

	5										10
Ad1	L	P	S	Y	G	D	A	N	P	A	
	•	E	F	N	D	P	V	•	•	•	
		G	•								
Ad2	/										
Ad3	L	P	S	Y	V	D	W	R	S	A	

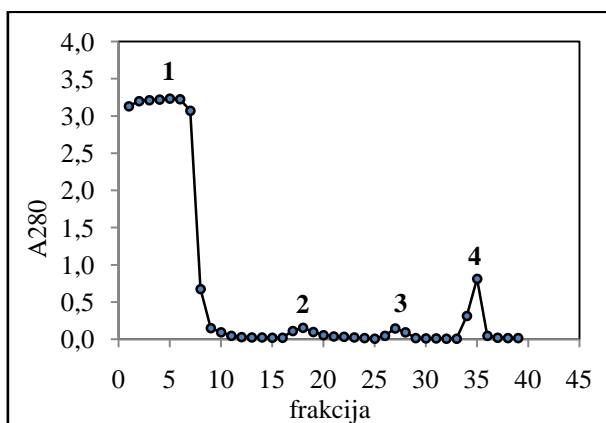
Pri vzorcu proteinov izoliranih iz kivija smo potrdili homologijo z aktinidinom. V proteinski lisi Ad3 smo določili zaporedje N-konca dolgo 10 aminokislin (LPSYVDWRSA), ki je pokazalo 100% identičnost z zaporedjem N-konca zrelega aktinidina, ki je bil izoliran iz *Actinidia deliciosa*. Tudi ocenjena velikost izoliranega proteina Ad3 (24 kDa) se ujema z predhodno opisanimi aktinidini. N-terminalna aminokislinska zaporedja proteina z višjo molekularno maso v lisi Ad2 nismo mogli določiti, verjetno zaradi blokirane N-konca, v lisi Ad1 pa je bilo prisotnih več različnih proteinov, za katere nismo našli podobnosti z že znanimi proteini.

4.2.3 Izolacija in karakterizacija cisteinskih proteaz iz semen fižola

4.2.3.1 Izolacija cisteinskih proteaz iz semen fižola

Želeli smo izolirati cisteinske proteaze iz legumainove družine C13. Ugotovljeno je bilo, da legumaini razgrajujejo skladiščne globuline med kalitvijo in po njej pri fižolu (*Phaseolus vulgaris*) (Senjuk in sod., 1998), zato smo pripravili izvleček proteinov iz kalečih fižolovih semen.

Izvleček proteinov smo nanegli na afinitetno kromatografijo in jih spirali z vezalnim pufrom. Nato smo proteine eluirali s tremi zaporednimi elucijskimi pufri in sicer najprej s spremembo ionske moči (0,7 M NaCl) in nato še s spremembo pH (10 mM HCl, ki mu je sledil še 10 mM NaOH). Vrh 1 na elucijskem diagramu predstavlja nevezane proteine, ki smo jih iz kolone sprali z vezalnim pufrom. Z različnimi eluenti smo iz kolone sprali proteine, ki so se v postopku rMcp-afinitetne kromatografije vezali na kolono. Z elucijo s spremembo ionske moči smo dobili vrh 2, z elucijo s spremembo pH pa vrh 3 (z znižanjem pH) in vrh 4 (s povišanjem pH) (slika 24). Elucijske vrhove smo ločeno koncentrirali in jih identificirali s pomočjo NaDS-PAGE in cimografije.

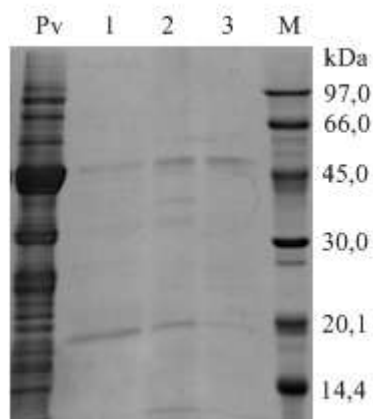


Slika 24: Elucijski diagram rMcp-afinitetne kromatografije izvlečkov fižola.

Absorbanca pri 280 nm v frakcijah tekom spiranja nevezanih proteinov (vrh 1) in elucije vezanih proteinov (vrh 2- eluent 0,7 M NaCl, vrh 3- eluent 10 mM HCl, vrh 4- eluent 10 mM NaOH) iz fižola (*P. vulgaris*).

4.2.3.2 Analiza proteinov z elektroforeznimi metodami

Po analizi NaDS-PAGE se je izkazalo, da so v vrhovih prisotne lise z ocenjenimi velikostmi 20 kDa, 35 kDa, 39 kDa, 47 kDa in 50 kDa (slika 25). Vzorci smo analizirali na prisotnost želatinolitične aktivnosti, ki pa jo izolirani vzorci niso pokazali (ni prikazano).



Slika 25: Analiza proteinov izoliranih iz fižola z NaDS-PAGE.

M-označevalec molekulskih mas; Pv- proteini iz fižolovega izvlečka; 1- proteini izolirani z eluentom 0,7 M NaCl; 2- proteini izolirani z eluentom 10 mM HCl; 3- proteini izolirani z eluentom 10 mM NaOH.

Da bi potrdili prisotnost legumaina oz. ostalih cisteinskih proteaz v izoliranih vzorcih, smo želeli ohraniti biološko aktivnost molekul in jo prikazati na gelu, zato smo izvedli nativno elektroforezo (PAGE brez NaDS). Proteini v izolatih so se po obravnavanju gelov s

fluorescenčnima substratoma za legumain Z-Ala-Ala-Asn-AMC in za ostale cisteinske proteaze Z-Phe-Arg-AMC izkazali za neaktivne, saj na gelih ni bilo prisotnih lis, ki bi fluorescirale. Potrdili smo le prisotnost cisteinskih proteaz v začetnem vzorcu (fižolovem izvlečku) in v vzorcu z nevezanimi proteini, kar prikazujeta aktivni lisi na sliki 26. Prisotnosti legumaina nismo na tak način potrdili v nobenem od vzorcev, saj na gelu ni bilo prisotnih aktivnih lis (ni prikazano).



Slika 26: Nativna elektroforeza (PAGE) vzorcev izoliranih iz fižolovih semen.

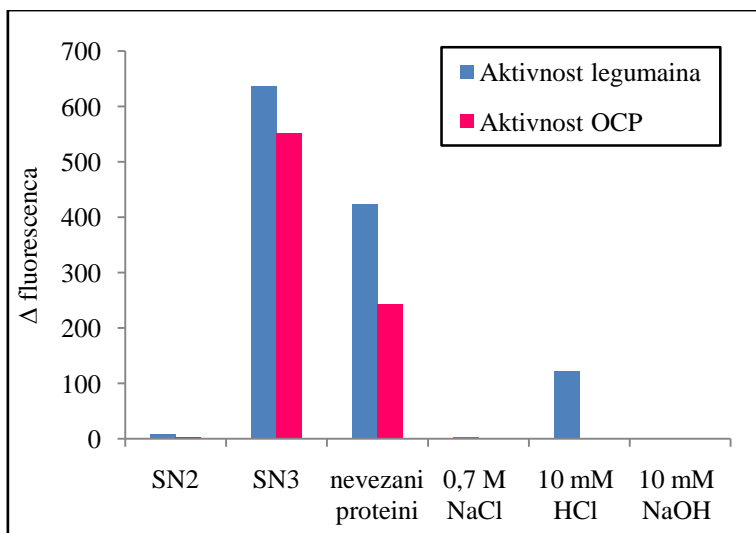
Linija 2 (SN3) in linija 3 (nevezani proteini) kažeta aktivnost na fluorescenčni substrat Z-Phe-Arg-AMC; linija 1 (SN2), linija 4 (eluent 0,7 M NaCl), linija 5 (eluent 10 mM HCl) in linija 6 (eluent 10 mM NaOH) ne kažejo aktivnosti.

4.2.3.3 Encimske aktivnosti

Prisotnost legumaina v vzorcih, izoliranih iz fižolovega izvlečka, smo potrdili z testom aktivnosti na substrat Z-Ala-Ala-Asn-AMC. Test aktivnosti na substrat Z-Phe-Arg-AMC pa je pokazal odsotnost ostalih cisteinskih proteaz v vzorcih izoliranih iz izvlečka fižola.

Potrdili smo uspešnost priprave izvlečka iz fižolovih semen s pomočjo obarjanja z amonijevim sulfatom, saj je bila aktivnost v supernatantu (SN2) po centrifugiranju oborine minimalna. V supernatantu (SN3), ki smo ga nanegli na afinitetno kromatografijo, pa smo potrdili prisotnost legumaina in ostalih cisteinskih peptidaz, aktivnosti so bile tu visoke. Aktivnost je ostala tudi po spiranju nevezanih proteinov, vendar manjša, kar kaže na to, da smo na kolono nanegli preveliko količino izvlečka in so se verjetno vsa vezna mesta inhibitorja zapolnila. Med nevezanimi proteini so bile torej tudi cisteinske proteaze, zato smo afinitetno kromatografijo ponavljali, dokler nevezanim proteinom aktivnosti nismo več določili. Prisotnost legumaina smo potrdili v vzorcih, izoliranih iz fižolovega izvlečka z eluentom 10 mM HCl. V vzorcih, izoliranih iz fižolovega izvlečka z ostalima eluentoma (0,7 M NaCl in 10 mM NaOH), nismo potrdili prisotnosti legumaina. Test aktivnosti na

substrat Z-Phe-Arg-AMC je pokazal odsotnost ostalih cisteinskih proteaz v vezanih vzorcih izoliranih iz fižolovega izvlečka z vsemi tremi eluenti (slika 27).

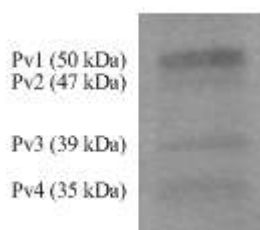


Slika 27: Aktivnosti legumaina in ostalih cisteinskih proteaz iz fižolovih semen.

Aktivnost legumaina je bila določena s substratom Z-Ala-Ala-Asn-AMC in ostalih cisteinskih proteaz (OCP) s substratom Z-Phe-Arg-AMC. Vrednosti so poenotene (vse so preračunane na količino 0,5 μ l testiranega vzorca) in povprečne, ter izražene kot ΔF (razlika v fluorescenci med vzorcem in slepo probo).

4.2.3.4 Analiza N-terminalnih aminokislinskih zaporedij

Najmočnejše lise vzorca, izoliranega iz fižola z eluentom 10 mM HCl, v katerem smo z encimskimi testi potrdili legumain in katerega elektroforegram je prikazan na sliki 25, smo uporabili za določanje N-terminalnega aminokislinskega zaporedja.



Slika 28: NaDS-PAGE proteinov, izoliranih iz fižolovih semen (*Phaseolus vulgaris*), ki smo jih izbrali za določanje N-terminalnega zaporedja.

Preglednica 7: N-terminalna aminokislinska zaporedja proteinov, izoliranih iz fižolovih semen (*Phaseolus vulgaris*).

5					
Pv1	/				
Pv2	/				
Pv3	H	V	Y	A	V
	S	A	D	R	A
	N				
	Q				
Pv4	/				

Zaporedja Pv1, Pv2 in Pv4 so bila na amino koncu verjetno blokirana, zato jih nismo mogli določiti. Pri vzorcu Pv3 smo zaporedje lahko razbrali le do pete aminokislinske. S pomočjo analize N-terminalnih aminokislinskih zaporedij legumaina nismo identificirali. Za zanesljivost primerjalnih analiz bi morali določiti precej daljše zaporedje.

4.2.3.5 Masna spektrometrija

Legumain smo potrdili tudi z masno spektrometrijo in sicer v vzorcu, izoliranem iz izvlečka semen fižola z eluentom 10 mM HCl oz. natančneje v lisi ki je imela v analizi NaDS-PAGE ocenjeno velikost 50 kDa (slika 25, linija 2). Legumain je predstavljal le majhen delež vzorca, medtem ko je bil v vzorcu prisoten predvsem fazeolin.

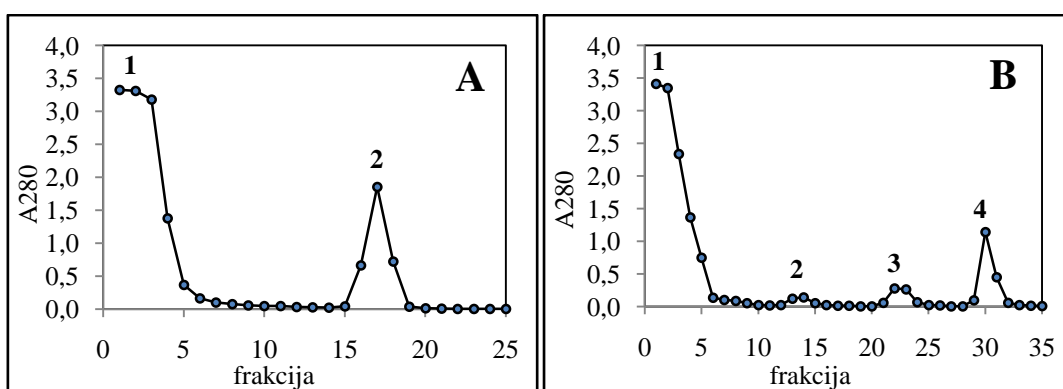
4.2.4 Izolacija in karakterizacija cisteinskih proteaz iz svinjskih ledvic

4.2.4.1 Izolacija cisteinskih proteaz iz svinjskih ledvic

Želeli smo preizkusiti možnosti uporabe našega afinitetnega nosilca z vezanim inhibitorjem cisteinskih proteaz makrocipinom tudi za izolacijo sesalčjega legumaina. Chen in sod. (1997) so testirali prisotnost legumaina v različnih podganjih, zajčjih in svinjskih organih in navajajo, da so najvišjo aktivnost določili v svinjskih ledvicah. Zato smo se odločili za pripravo izvlečka iz svinjskih ledvic.

Izvleček smo nanegli na afinitetno kromatografijo in jih spirali z vezalnim pufrom (0,1 M fosfatni pufer, pH 6,0 z 20 mM EDTA, 5 mM DTT in 0,3 M NaCl). Uporabili smo pufer s pH 6,0, saj je maksimalna aktivnost legumaina pri pH 5,8 (Chen in sod., 1997). Tu smo izvedli dve različici afinitetne kromatografije, in sicer afinitetno kromatografijo z eluentom 20 mM NaOH in afinitetno kromatografijo s tremi zaporednimi elucijskimi pufri, najprej s

spremembo ionske moči (0,7 M NaCl) in nato s spremembo pH (10 mM HCl, ki mu je sledil še 10 mM NaOH). Na elucijskem diagramu rMcp-afinitetne kromatografije vrh 1 predstavlja nevezane proteine, ki smo jih iz kolone sprali z vezalnim pufrom. Z različnimi eluenti smo iz kolone sprali proteine, ki so se v postopku rMcp-afinitetne kromatografije vezali. Z elucijo z močnejšim povišanjem pH smo dobili vrh 2 (slika 29A). Z elucijo s spremembo ionske moči smo dobili vrh 2, z elucijo s spremembo pH pa vrh 3 (s kislim pH) in vrh 4 (z alkalnim pH) (slika 29B). Elucijske vrhove smo ločeno koncentrirali in jih analizirali z NaDS-PAGE in cimografijo.

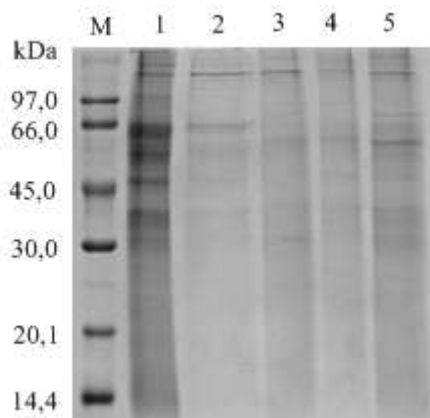


Slika 29: Elucijski diagram rMcp-afinitetne kromatografije izvlečkov ledvic.

Absorbanca pri 280 nm v frakcijah tekom spiranja nevezanih proteinov (vrh 1) in elucije vezanih proteinov (vrh 2, vrh 3, vrh 4). A: elucija z 20 mM NaOH (vrh 2); B: zaporedna elucija z 0,7 M NaCl (vrh 2), z 10 mM HCl (vrh 3) in z 10 mM NaOH (vrh 4).

4.2.4.2 Analiza proteinov z elektroforeznimi metodami

NaDS-PAGE izolatov je pokazala številne lise različnih molekularnih mas, ki so se pojavile v ocenjenem intervalu od 30 kDa do 97 kDa, nekatere pa tudi večjih molekularnih mas (slika 30). Lise so bile šibke in gosto razporejene, zato tu nismo izvedli prenosa Western in določanja N-terminalnega aminokislinskega zaporedja proteinov. Analiza vzorcev na cimogramu z želatino ni pokazala aktivnosti izoliranih proteinov (ni prikazano).



Slika 30: Analiza proteinov izoliranih iz svinjskih ledvic z NaDS-PAGE.

M-označevalec molekulskih mas; 1- proteini iz izvlečka ledvic; 2- proteini izolirani z eluentom 20 mM NaOH; 3- proteini izolirani z eluentom 0,7 M NaCl; 4- proteini izolirani z eluentom 10 mM HCl; 5- proteini izolirani z eluentom 10 mM NaOH

Da bi se aktivnosti čim bolj ohranile, smo izvedli nativno elektroforezo in po ločbi proteinov obravnavli gela s fluorescenčnima substratoma za legumain Z-Ala-Ala-Asn-AMC in za ostale cisteinske proteaze Z-Phe-Arg-AMC. Na ta način smo potrdili prisotnost cisteinskih proteaz v vrhovih, izoliranih z 20 mM NaOH in 10 mM HCl (slika 31), saj sta bili na ustreznih mestih na gelu prisotni lisi, ki sta fluorescirali. Prisotnosti legumaina nismo zaznali v nobenem od vzorcev (ni prikazano).

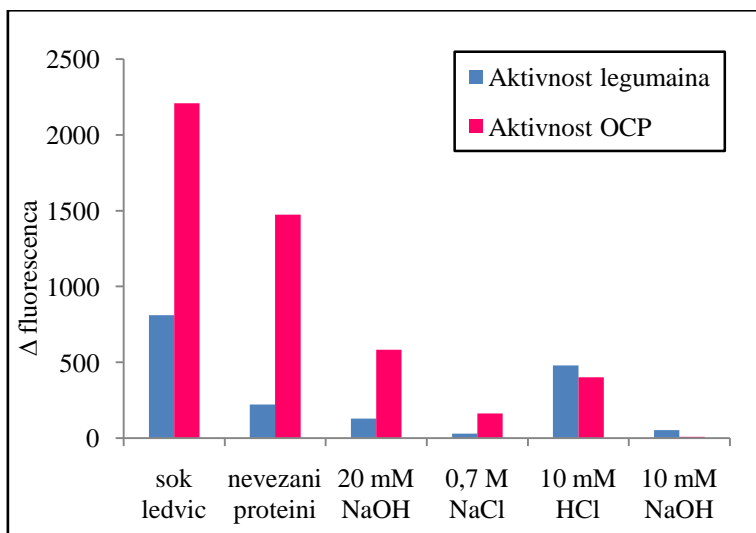


Slika 31: Nativna elektroforeza (PAGE) vzorcev izoliranih iz svinjskih ledvic.

Linija 1 (izvleček ledvic), linija 2 (eluent 20 mM NaOH) in linija 4 (eluent 10 mM HCl) kažejo aktivnost na fluorescenčni substrat Z-Phe-Arg-AMC; linija 3 (eluent 0,7 M NaCl) in linija 5 (eluent 10 mM NaOH) ne kažeta aktivnosti.

4.2.4.3 Encimske aktivnosti

Prisotnost legumaina in ostalih cisteinskih proteaz v vzorcih, izoliranih iz korteksa ledvic, smo potrdili z testom aktivnosti na substrat Z-Ala-Ala-Asn-AMC in na substrat Z-Phe-Arg-AMC. V izvlečku, ki smo ga nanegli na afinitetno kromatografijo, smo potrdili prisotnost legumaina in ostalih cisteinskih proteaz, aktivnosti so bile tu visoke. Med nevezanimi proteini so bile še vedno prisotne cisteinske proteaze, zato smo afinitetno kromatografijo ponavljali, dokler frakcije nevezanih proteinov aktivnosti niso več kazale. Aktivnost legumaina je bila najvišja v vzorcu, izoliranem iz izvlečka ledvic z eluentom 10 mM HCl. V ostalih vzorcih smo potrdili prisotnosti legumaina, vendar so kazali nizke aktivnosti. Zaznali smo cepitev substrata Z-Phe-Arg-AMC, kar kaže tudi na prisotnost ostalih cisteinskih proteaz, predvsem v vzorcih, eluiranih z 20 mM NaOH in 10 mM HCl (slika 32), kar se ujema z aktivnostmi na gelu (slika 31).



Slika 32: Aktivnost legumaina in ostalih cisteinskih proteaz iz svinjskih ledvic.

Aktivnost legumaina je bila določena s substratom Z-Ala-Ala-Asn-AMC in ostalih cisteinskih proteaz (OCP) s substratom Z-Phe-Arg-AMC. Vrednosti so poenotene (vse so preračunane na količino 0,5 μ l testiranega vzorca) in povprečne, ter izražene kot ΔF (razlika v fluorescenci med vzorcem in slepo probo).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Izolacija in čiščenje proteaz iz okoljskih izvlečkov običajno predstavlja večstopenjski postopek z nizkim izkoristkom. Kadar je le možno, si pomagamo z uporabo trdnih nosilcev, na katerih so vezane substance z afiniteto do iskane proteaze. Afinitetna kromatografija velja za enega najbolj učinkovitih načinov za ločevanje in čiščenje proteinov in se je izkazala kot primerna za izolacijo proteolitičnih encimov. Za čiščenje proteaz se poleg imobiliziranih substratov ali njihovih analogov kot ligandi uporabljajo tudi različni tipi sintetičnih ali naravnih inhibitorjev (Polanowski in sod., 2003).

Iz prostotrosnice *Macrolepiota procera* je bil izoliran inhibitor cisteinskih proteaz makrocipin (Sabotič in sod., 2009), ki je v svojem razredu popolnoma nov inhibitor z zanimivimi inhibitornimi lastnostmi. Makrocipini so močni inhibitorji papaina, katepsina L in V in šibkejši inhibitorji katepsinov S, K, B in H ter legumaina, ne inhibirajo pa serinske proteaze tripsina in aspartatne proteaze pepsina (Sabotič in sod., 2009). Gre za kompetitiven reverzibilni inhibitor cisteinskih proteaz, kar pomeni, da je njegova vezava v aktivno mesto reverzibilna ter zmanjša ali prepreči razgradnjo substrata. Inhibitor je specifičen in stabilen (Sabotič in sod., 2009), in je zaradi teh lastnosti primeren kot ligand v postopku afinitetne kromatografije. Makrocipin bi kemično vezan na trden nosilec lahko predstavljal zelo uporaben afinitetni medij za hitro in enostavno čiščenje cisteinskih proteaz iz različnih virov. S tem namenom smo pripravili rekombinantni makrocipin, ga vezali na afinitetni nosilec in preizkusili možnost njegove uporabe.

Preizkusili smo možnost uporabe proteinskega inhibitorja makrocipina za izolacijo cisteinskih proteaz iz prostotrosnic *Clitocybe nebularis* in *Macrolepiota procera*, iz katerih izhajata oba inhibitorja cisteinskih proteaz, ki predstavljata družino mikocipinov (Sabotič, 2007). Poleg tega je funkcija makrocipina nepoznana, zato bi lahko s pomočjo identifikacije njegovih tarč v gobah sklepali na njegovo biološko in fiziološko funkcijo.

Za izolacijo proteinov iz izvlečkov gob smo optimirali uporabo eluentov v postopku rMcp-afinitetne kromatografije. Kot najprimernejša se je izkazala elucija s spremembo pH z uporabo 10 mM NaOH. Iz obeh gob smo uspeli izolirati proteaze, ki so kazale nespecifično razgradnjo proteinov na cimogramih z želatino, vendar nismo uspeli potrditi, da gre za cisteinske proteaze, saj jih inhibitor cisteinskih proteaz papainove družine E64 ni inhibiral. V izolatih iz zaporednih kromatografij so se aktivnosti med seboj razlikovale, kar je bilo opazno predvsem pri proteazah iz orjaškega dežnika. To lahko pripišemo dejstvu, da so bile gobe, iz katerih smo pripravili vodne izvlečke, nabrane v različnem času od pozne pomladi do pozne jeseni in do priprave izvlečkov različno dolgo hranjene. Opazovane

proteolitične aktivnosti se namreč lahko spreminjajo s starostjo gobe ter tudi z razvojnim stanjem, okoljem rasti in drugimi dejavniki, kot so opazili pri gobi *A. bisporus* (Burton in sod., 1993). Izoliranih proteinov, ki so kazali želatinolitično aktivnost, nismo uspeli nadalje karakterizirati, saj je določevanje molekulskih mas pri cimografiji nezanesljivo (Hummel in sod., 1996, Sabotič in sod., 2007) in določena N-terminalna zaporedja niso kazala podobnosti z znanimi proteazami.

Iz obeh prostotrosnic smo z uporabo rMcp-afinitetne kromatografije poleg proteaz izolirali še druge proteine. N-terminalno zaporedje proteina iz meglenke (*Clitocybe nebularis*) z ocenjeno molekulsko maso 22 kDa (Cn1) in z določenimi 15 aminokislinami, je podobno N-terminalnemu zaporedju makrocipina 4 iz gobe *Macrolepiota procera*. Izključili smo možnost, da gre tu za makrocipin 1a, ki je bil uporabljen kot ligand v postopku afinitetne kromatografije, saj je določeno zaporedje izoliranega proteina različno od zaporedja N-konca vezanega liganda. Objav o izolaciji makrocipina iz meglenke do sedaj še ni bilo, torej smo iz te gobe prvi izolirali makrocipin. Način vezave za enkrat ni možno razložiti, opažena pa je bila nagnjenost k dimerizaciji pri nekaterih makrocipinih (Sabotič in sod., 2009).

Iz meglenke smo izolirali tudi protein z ocenjeno molekulsko maso 19 kDa, katerega določeno N-terminalno zaporedje dolžine 16 aminokislin (Cn3) kaže 92 % identičnost in 92% podobnost z zaporedjem N-konca ricinu B-podobnega lektina CnL (Pohleven in sod., 2009). Pohleven in sod. (2009) so lektin CnL izolirali iz gobe *Clitocybe nebularis* in ga tudi karakterizirali. Lektini so proteini, ki specifično vežejo različne tipe ogljikovih hidratov. S pomočjo NaDS-PAGE so ocenili molekulsko maso proteina, ki znaša 19 kDa (Pohleven in sod., 2009) in se ujema z molekulsko maso našega izolata Cn3.

N-terminalno zaporedje proteina iz orjaškega dežnika z ocenjeno molekulsko maso 18 kDa in z določenimi 20 aminokislinami N-konca (Mp3) pa je podobno zaporedju N-konca domnevne mananaze iz šampinjonov (*Agaricus bisporus*) in N-terminalnemu zaporedju proteina iz prostotrosnice *Laccaria bicolor*, ki spada v družino C13 proteinov, ki vežejo ogljikove hidrate. Primerjava celotnega zaporedja domnevne mananaze s podatki v bazi kaže 35% identičnost in 62% podobnost s proteinom iz *L.bicolor*. Tu gre torej ponovno za lektinom podobne proteine. Zaradi vezave lektinov in lektinom podobnih proteinov na sefarozo z vezanim makrocipinom, smo ugotavljali kakšen je vpliv teh proteinov na inhibitor, ter dokazali, da lektin CnL ne vpliva na inhibitorno aktivnost makrocipina.

Nosilec, uporabljen za pripravo afinitetne kromatografije, je polisaharid sefaroza, torej bi se lektini lahko nespecifično vezali na nosilec (sefarozo) in ne na imobilizirani ligand (makrocipin). Zato smo izvedli še kontrolne afinitetne kromatografije, da bi potrdili specifičnost vezave izoliranih lektinov na makrocipin. Po izvedbi kontrolnih afinitetnih kromatografij in analizi N-terminalnih aminokislinskih zaporedij proteinov, ki so se iz

gobjih izvlečkov specifično vezali na sefarozo brez vezanega makrocipina, smo ugotovili, da je praktično v vseh lisah, ki imajo ocenjeno molekulsko maso okoli 20 kDa, enak oz. podoben aminokislinski motiv. V kontrolnih proteinskih lisah iz obeh gob, ki smo jim določili molekulski masi 19 kDa (CnK1 in MpK4) in 17 kDa (CnK2 in MpK5), smo dobili enaka oz. podobna zaporedja. Ti zaporedji sta bili tudi v lisi z molekulsko maso 19 kDa nekontrolnega vzorca iz meglenke (Cn3), poleg lektina CnL, in v lisi z molekulsko maso 17 kDa (Cn4). Ti proteini so se vezali specifično na sefarozo, saj so se vezali tako v postopku rMcp-afinitetne kromatografije kot tudi na sefarozo brez vezanega rMcp. V kontrolni lisi MpK5 z molekulsko maso 17 kDa smo poleg tega zaporedja določili še N-konec proteina, ki je podoben galektinu iz dvobarvne bledivke (*Laccaria bicolor*). Pričakovali smo vezavo lektinov na sefarozo, vendar so bili le-ti večinoma različni od tistih, ki so se specifično vezali na makrocipin. Rezultati kontrolnih afinitetnih kromatografij in analiza kontrolnih proteinov je pokazala, da je bila vezava ricinu B-podobnega lektina CnL iz meglenke verjetno specifična na makrocipin, prav tako tudi vezava lektinom podobnega proteina iz orjaškega dežnika in vezava makrocipina iz meglenke. V prostotrosnicah je prisotnih veliko različnih lektinov in iz meglenke so že bili izolirani različni lektini s specifičnostjo za glukozo, galaktozo, saharozo in laktozo, pri čemer je bila za izolacijo uporabljena afinitetna kromatografija s sladkorji, imobiliziranimi na sefarozo. Lektin CnL se je vezal specifično na laktozo. Lektinom iz meglenke so določili tudi N-terminalna aminokislinska zaporedja (Pohleven, 2009), vendar N-terminalna zaporedja kontrolnih proteinov niso kazala podobnosti z nobenim od njih. Kontrolni vzorci prav tako niso kazali želatinitične aktivnosti, kar potrjuje, da je bila vezava proteaz pri nekontrolnih vzorcih specifična.

Makrocipin, kemično vezan na trden sefarozni nosilec, predstavlja uporaben afinitetni medij za hitro in enostavno čiščenje proteaz iz prostotrosnic. Po afiniteti do endogenih proteaz lahko sklepamo na fiziološko in biološko funkcijo makrocipina, ki je verjetno uravnavanje proteolitične aktivnosti. Poleg tega smo ugotovili tudi vezavo z lektini, ki so se verjetno specifično vezali na rMcp iz obeh gobjih izvlečkov. Ker lektin CnL ni vplival na inhibitorno aktivnost makrocipina, lahko sklepamo, da je morda makrocipin vpleten v uravnavanje aktivnosti gobjih lektinov, ki naj bi imeli obrambno funkcijo pred fungivori, vlogo pri vzpostavljanju simbiotskega ali parazitskega razmerja z drugimi organizmi in vlogo pri povezovanju hif med razvojem plodišč (Guillot in Kanska, 1997; Wang in sod., 1998).

Za ovrednotenje uporabnosti makrocipin-afinitetne kromatografije smo preizkusili možnosti uporabe afinitetnega nosilca z vezanim inhibitorjem cisteinskih proteaz makrocipinom tudi za izolacijo različnih cisteinskih proteaz iz različnih naravnih virov.

Z makrocipin-afinitetno kromatografijo smo iz izvlečka kivija (*Actinidia deliciosa*) izolirali cisteinsko proteazo aktinidin, ki je prisotna v zrelem kiviju (Praekelt in sod., 1988;

Podivinsky in sod., 1989; Snowden in Gardner, 1990). Aktinidin smo identificirali v proteinski lisi, ki je imela na NaDS-PAGE ocenjeno molekulsko maso 24 kDa. Proteinu smo določili 10 aminokislin dolgo zaporedje N-konca, ki je pokazalo 100% identičnost z zaporedjem N-konca zrelega aktinidina. Tudi ocenjena molekulska masa se ujema s predhodno opisanimi aktinidini. Izolati so kazali proteolitično aktivnost na cimogramu z želatino. Glede na to, da kivijev izvleček ni kazal aktivnosti, lahko sklepamo na to, da smo z afinitetno kromatografijo uspeli hitro in enostavno očistiti proteaze od ostalih makromolekul v izvlečku kivija ter, da je njihova koncentracija glede na začetni izvleček v izolatu obogatena.

Iz kalečih fižolovih semen (*Phaseolus vulgaris*) smo izolirali legumain. Legumaini se izražajo v semenih predvsem v času kalitve, kjer so pomembni za razgradnjo in mobilizacijo skladiščnih proteinov, ki so potrebni za rast. Glavni med njimi v fižolu je fazeolin (Senjuk in sod., 1998). Z elektroforeznimi metodami prisotnosti legumaina v vzorcih nismo uspeli potrditi. Vzorci niso kazali niti želatinolitične aktivnosti, niti aktivnih lis na nativnem gelu po dodatku substrata Z-Ala-Ala-Asn-AMC, ki je eden najboljših sintetičnih substratov za sesalčji legumain (Rawlings in sod., 2009). Vzrok odsotnosti aktivnosti je lahko v visoki specifičnosti razgradnje, saj so legumaini Asn-specifične cisteinske proteaze (Dando in sod., 1999) ali pa v pH občutljivosti proteaze. Maksimalna aktivnost legumaina je v pH območju od 4,0 do 6,0 in proteaza pri višjih pH vrednostih (nad pH 6,0) denaturira (Rawlings in sod., 2009). Lahko sklepamo, da je legumain tekom elektroforeze, ki teče pri pH vrednosti okrog 8,3, denaturiral in zato ni pokazal aktivnosti. Prisotnost legumaina smo potrdili z encimskim testom aktivnosti na substrat Z-Ala-Ala-Asn-AMC, in sicer v izolatih z uporabljenim eluentom 10 mM HCl. Ostala eluenta (0,7 M NaCl in 10 mM NaOH) sta se izkazala kot neučinkovita za izolacijo legumaina. Tako smo optimirali postopek izolacije cisteinske proteaze legumaina iz fižolovih semen, pri čemer je najučinkovitejša elucija s spremembo pH z uporabo 10 mM HCl. Nizko vsebnost legumaina in visoko vsebnost fazeolina smo v aktivnem vzorcu (eluent 10 mM HCl) identificirali s pomočjo masne spektrometrije, in sicer v proteinski lisi z ocenjeno velikostjo 50 kDa. Skladiščni protein fazeolin se je verjetno vezal nespecifično. Zaznali smo ga kljub temeljitim spiranju, kar je verjetno posledica velike količine tega proteina v kalečih semenih. Aktivnosti na substrat Z-Phe-Arg-AMC (tako v testu kot tudi z elektroforeznimi metodami) v izolatih ni bilo, kar kaže na odsotnost cisteinskih proteaz v izolatih iz fižola z vsemi uporabljenimi eluenti, čeprav smo njihovo aktivnost določili v izvlečku. Izoliranim proteinom nismo uspeli določiti N-končnih zaporedij in jih primerjati z znanimi proteini, saj so bila zaporedja na amino koncu verjetno blokirana.

Preizkusili smo tudi možnost uporabe afinitetnega nosilca z vezanim makrocipinom za izolacijo sesalčjega legumaina iz svinjskih ledvic. Sesalčji legumain so prvič izolirali iz svinjskih ledvic, znano pa je, da encim obstaja tudi v številnih drugih sesalčjih tkivih, kot so posteljica, vranica, jetra, testisi in timus. Med temi organi je specifična aktivnost

legumaina višja v placenti in ledvicah (Chen in sod., 1997; Yamane in sod., 2002). Prašičji legumain je glikoprotein z molekularno maso 34 kDa (Chen in sod., 1997). Po NaDS-PAGE se je izkazalo, da smo izolirali številne proteine različnih molekularnih mas. Analiza vzorcev na cimoogramu z želatino ni pokazala proteolitične aktivnosti izoliranih vzorcev. Legumain smo, zaradi že prej omenjene pH občutljivosti, potrdili le s testi aktivnosti na specifičen substrat Z-Ala-Ala-Asn-AMC. Kot eluent se je kot najbolj uspešen, tako kot pri izolaciji iz fižola, izkazal 10 mM HCl, sledi pa mu 20 mM NaOH. Na nativnem gelu, ki smo ga obravnavali z Z-Phe-Arg-AMC smo potrdili prisotnost cisteinskih proteaz v vrhovih, izoliranih z 20 mM NaOH in 10 mM HCl, kar se ujema s testi encimske aktivnosti.

Makrocipin torej lahko kemično vezan na trden sefrozni nosilec predstavlja uporaben afinitetni medij za hitro in enostavno čiščenje cisteinskih proteaz iz okolij, v katerih se nahajajo (izvlečki rastlinskih, glivnih, živalskih tkiv, bakterijskih lizatov in podobno). Z njim smo izolirali aktinidin iz kivija, uporaben je za izolacijo rastlinskega legumaina iz kalečih fižolovih semen ter za izolacijo sesalčjega legumaina in ostalih cisteinskih proteaz iz korteksa svinjskih ledvic. Natančnejše poznavanje posebnih lastnosti glivnih proteaz in njihovih inhibitorjev lahko zaradi pomembne vloge v fizioloških in patoloških procesih vodi do njihove uporabe v humani in veterinarski medicini, pri zaščiti in izboljšavi poljščin v kmetijstvu, v biotehnoloških procesih, farmacevtski industriji ter pri procesih bioremediacije.

5.2 SKLEPI

Rekombinantni makrocipin, kemično vezan na afinitetni nosilec, predstavlja zelo uporaben afinitetni medij za hitro in enostavno čiščenje cisteinskih proteaz in drugih proteinov iz različnih virov, pri čemer se je za elucijo specifično vezanih proteinov izkazala kot najprimernejša sprememba pH.

Iz prostotrošnic *Clitocybe nebularis* in *Macrolepiota procera* smo izolirali proteaze in pokazali, da so se vezale specifično na makrocipin. Optimirali smo postopek izolacije proteinov iz gobjih izvlečkov in kot najučinkovitejša se je izkazala elucija s spremembo pH.

Prvi smo izolirali makrocipin iz prostotrošnice *Clitocybe nebularis* z molekularno maso 22 kDa, kar kaže na njegovo splošno razširjenost v prostotrošnicah.

Izolirali smo lektin CnL iz meglenke in lektinom podobne proteine iz orjaškega dežnika. Na makrocipin se verjetno vežejo specifično, toda lektin CnL ne vpliva na inhibitorno aktivnost makrocipina.

Fiziološka in biološka funkcija makrocipina je verjetno uravnavanje proteolitične aktivnosti. Morda sodeluje tudi pri uravnavanju aktivnosti gobjih lektinov, in je zato posredno vpleten v obrambo pred škodljivci, vzpostavljanje medvrstnih razmerij in razvoj plodišč.

Iz kivija (*Actinidia deliciosa*) smo izolirali cisteinsko proteazo aktinidin.

Iz kalečih fižolovih semen (*Phaseolus vulgaris*) smo izolirali cisteinsko proteazo legumain. Optimirali smo postopek izolacije legumaina, za izolacijo je bil učinkovit le eluent 10 mM HCl.

Makrocipin-afinitetna kromatografija se je izkazala uporabna tudi pri izolaciji sesalčjega legumaina in ostalih cisteinskih proteaz iz korteksa svinjskih ledvic, predvsem pri izolaciji z uporabljenima eluentoma 20 mM NaOH in 10 mM HCl.

6 POVZETEK

Proteaze ali peptidaze imajo pomembno vlogo pri mnogih fizioloških in patofizioloških procesih. Izolacija in čiščenje proteaz iz okoljskih izvlečkov običajno predstavlja večstopenjski postopek z nizkim izkoristkom. Kadar je le možno, si pomagamo z uporabo trdnih nosilcev, na katerih so vezane substance z afiniteto do iskane proteaze. Makrocipin, inhibitor cisteinskih proteaz iz prostotrosnice *Macrolepiota procera*, poleg klitocipina predstavlja novo družino inhibitorjev cisteinskih proteaz I48, ki je uvrščena v klasifikacijo inhibitorjev MEROPS in poimenovana mikocipini. Pripravili smo rekombinantni makrocipin, ga vezali na afinitetni nosilec in preizkusili možnost njegove uporabe.

Prostotrosnice ali bazidiomicete so v naravi razširjene, vendar so njihovi proteolitični sistemi zelo slabo poznani. Znano je, da vsebujejo številne in različne proteolitične encime in so lahko idealen vir novih proteaz s potencialno edinstvenimi lastnostmi. Preizkusili smo možnost uporabe makrocipina za izolacijo cisteinskih proteaz iz prostotrosnic *Clitocybe nebularis* (meglenka) in *Macrolepiota procera* (orjaški dežnik). Iz obeh gob smo izolirali proteaze, vendar pa nismo uspeli potrditi, da gre za cisteinske proteaze. Izoliranim proteinom smo določili N-terminalna aminokislinska zaporedja, in jih primerjali z že znanimi zaporedji. Protein iz meglenke z ocenjeno molekulsko maso 22 kDa se je v 92% ujema z N-koncem makrocipina iz orjaškega dežnika, protein z ocenjenomolekulsko maso 19 kDa pa v 92% z N-koncem lektina iz meglenke. N-konec proteina z ocenjeno molekulsko maso 18 kDa, ki smo ga izolirali iz orjaškega dežnika, je pokazal podobnost z N-koncem proteina iz gobe *Laccaria bicolor*, ki veže ogljikove hidrate. Izvedli smo kontrolne afinitetne kromatografije s sefarozo brez vezanega inhibitorja in ugotovili da se lektini in lektinom podobni proteini v postopku afinitetne kromatografije verjetno vežejo specifično na makrocipin ter nasprotno, da se kontrolni protein, ki je podoben galektinu iz *Laccaria bicolor*, veže specifično na sefarozo. Makrocipin iz meglenke se je verjetno vezal specifično na makrocipin. Proteaze se na sam nosilec brez vezanega inhibitorja niso vezale, saj izolirani proteini niso kazali proteolitične aktivnosti.

Makrocipin, kemično vezan na trden sefarozni nosilec, predstavlja uporaben afinitetni medij za hitro in enostavno čiščenje proteaz iz prostotrosnic. Na podlagi karakterizacije izoliranih proteinov lahko sklepamo na funkcijo makrocipina, ki je verjetno uravnavanje proteolitične aktivnosti. Poleg tega smo ugotovili tudi vezavo z lektini iz obeh gob, ki so se nanj verjetno vezali specifično. Ugotovili smo, da lektini in lektinom podobni proteini ne vplivajo na inhibitorno aktivnost makrocipina, zato lahko sklepamo, da morda sodeluje pri uravnavanju lektinskih aktivnosti in je zato posredno vpleten v obrambno funkcijo, vzpostavljanje medvrstnih razmerij in razvoj plodišč.

Preizkusili smo tudi možnosti uporabe afinitetnega nosilca z vezanim makrocipinom za izolacijo različnih cisteinskih proteaz iz različnih naravnih virov. Iz kivija (*Actinidia*

deliciosa) smo izolirali cisteinsko proteazo aktinidin, ki je prisotna v zrelem kiviju. Potrdili smo želatinolitično aktivnost izolatov. Aktinidin smo identificirali v proteinski lisi z ocenjeno molekularno maso 24 kDa, saj je njegovo N-terminalno zaporedje pokazalo 100% identičnost z zaporedjem N-konca zrelega aktinidina.

Iz kalečih fižolovih semen (*Phaseolus vulgaris*) smo izolirali legumain. Prisotnost legumaina smo v izolatih potrdili s testom aktivnosti na substrat Z-Ala-Ala-Asn-AMC pri uporabi eluenta 10 mM HCl. Ostala eluenta (0,7 M NaCl in 10 mM NaOH) sta se izkazala kot neučinkovita za izolacijo legumaina. S tem smo optimirali postopek izolacije cisteinske proteaze legumaina iz fižolovih semen. Legumain smo v proteinski lisi aktivnega vzorca potrdili tudi z masno spektrometrijo, vendar je bila njegova količina med drugimi proteini nizka. S testom aktivnosti na substrat Z-Phe-Arg-AMC nismo potrdili prisotnosti ostalih cisteinskih proteaz v izolatih iz fižola pri vseh uporabljenih eluentih, čeprav so bile aktivne v uporabljenem izvečku.

Afinitetni nosilec z vezanim makrocipinom se je izkazal kot primeren za izolacijo sesalčjega legumaina in ostalih cisteinskih proteaz iz svinjskih ledvic. Izolirali smo številne proteine različnih molekularnih mas. Legumain smo zaradi njegove pH občutljivosti lahko potrdili le s testi aktivnosti na specifičen substrat. Kot eluent za legumain se je kot najbolj uspešen izkazal 10 mM HCl. Tako na nativnem gelu kot s testom encimske aktivnosti smo potrdili prisotnost cisteinskih proteaz v vrhovih, izoliranih z 20 mM NaOH in 10 mM HCl.

Makrocipin torej lahko kemično vezan na trden sefrozni nosilec predstavlja uporaben afinitetni medij za hitro in enostavno čiščenje cisteinskih proteaz iz okolij, v katerih se nahajajo (izvlečki rastlinskih, glivnih, živalskih tkiv, bakterijskih lizatov in podobno).

7 VIRI

- Affinity chromatography. Principles and methods. 1979. Uppsala, Švedska, Ljungföretagen AB: 112 str.
- Bah S., Paulsen B.S., Diallo D., Johansen H.T. 2006. Characterization of cysteine proteases in Malian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 2: 189–198
- Barrett A. J. 1977. Introduction to the history and classification of tissue proteinases. V: *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*. Barrett A.J. (ed). Amsterdam, North-Holland Publishing company: 1-55
- Barrett A.J., McDonald J.K. 1986. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. *Biochemical Journal*, 237, 3: 935
- Bode W., Huber R. 1991. Ligand binding: Proteinase-protein inhibitor interactions. *Current Opinion in Structural Biology*, 1: 45-52
- Budič M., Kidrič M., Meglič V., Cigić B. 2009. A quantitative technique for determining proteases and their substrate specificities and pH optima in crude enzyme extracts. *Analytical Biochemistry*, 388: 56–62
- Burnouf T., Radosevich M. 2001. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 49, 1-3: 575-586
- 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: 1379-1386
- Chen J.M., Dando P.M., Rawlings N.D., Brown M.A., Young N.E., Stevens R.A., Hewitt E., Watts C., Barrett A.J. 1997. Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 12: 8090-8098
- Constans A. 2005. Tag! Purifying Proteins with Affinity Chromatography. *The Scientist*, 19, 4: 30
- Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C.B. 1968. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61: 636-643

- Dando P.M., Fortunato M., Smith L., Knight C.G., Mckendrick J.E., Barrett A.J. 1999. Pig kidney legumain : an asparaginyl endopeptidase with restricted specificity. *Biochemical Journal*, 339, 3: 743-749
- Dubin G. 2005. Review. Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62 :653–669
- Eisenreich W., Eisenreich D., Zimmer U.E., Handel A. 1993. Rastline in živali okrog nas. Ljubljana, DZS: 400 str.
- Guillot J., Kanska G. 1997. Lectins in higher fungi. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25, 3: 203-230
- Gunde-Cimerman N. 1996. Nitaste glive. V: *Biotehnologija - osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA, d.o.o.: 95-111
- Grzonka Z., Kasprzykowski F., Wiczak W. 2007. Cysteine proteases. V: *Industrial enzymes*. Polaina J. in MacCabe A.P. (ur.). Springer: 181-195
- Hummel K.M., Penheiter A.R., Gathman A.C., Lilly W.W. 1996. Anomalous estimation of protease molecular weights using gelatin-containing SDS-PAGE. *Analytical Biochemistry*, 233: 140-142
- Konno K., Hirayama C., Nakamura M., Tateishi K., Tamura Y., Hattori M., Kohno K. 2004. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant Journal*, 37, 3: 370-378
- Kregar I. 1996. Kromatografske metode. V: *Biotehnologija - osnovna znanja*. Raspor P. (ur.). Ljubljana, BIA, d.o.o.: 609-632
- 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)
- Otto H.H., Schirmeister T. 1997. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chemical Reviews*, 97: 133-171
- Podivinsky E., Forster R.L.S., Gardner R.C. 1989. Nucleotide sequence of actinidin, a kiwi fruit protease. *Nucleic acids research*, 17, 20: 8363

- Podobnik A., Devetak D. 2000. Biologija 4. in 5.. Raznolikost živih bitij. Ljubljana, DZS: 273 str.
- Pohleven J. 2009. Biokemijske lastnosti lektina iz višje glive meglenke (*Clitocybe nebularis*) in njegova biološka aktivnost. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 127 str.
- Pohleven J., Obermajer N., Sabotič J., Anžlovar S., Sepčič K., Kos J., Kralj B., Štrukelj B., Brzin J. 2009. Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. *Biochimica et Biophysica acta*, 1790, 3: 173-181
- Polanowski A., Wilimowska-Pelc A., Kowalska J., Grybel J., Żelazko 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. 1. izdaja. Maribor, Založba Obzorja Maribor: 474 str.
- 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. (ur.). 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., Brzin J. 2006. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of biotechnology*, 128: 297-307
- Sabotič J., Popovič T., Puizdar V., Brzin J. 2009. Macrocypins, a family of cysteine protease inhibitors from basidiomycete *Macrolepiota procera*. *FEBS Journal*, doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07138.x
- Salas C.E., Gomes M.T.R., Hernandez M., Lopes M.T.P. 2008. Plant cysteine proteases: Evaluation of the pharmacological activity. *Phytochemistry*, 69: 2263-2269
- Salvesen G., Nagase H. 1989. Inhibition of proteolytic enzymes. V: proteolytic enzymes: A practical approach. Benyou R.J., Bond J.S. (eds.). Oxford, IRL Press: 83-104
- Senyuk V., Rotari V., Becker C., Zakharov A., Horstmann C., Müntz K., Vaintraub I. 1998. Does an asparaginyl-specific cysteine endopeptidase trigger phaseolin degradation in cotyledons of kidney bean seedlings?. *European journal of biochemistry*, 258, 2:546-558
- Shen H.B., Chou K.C. 2009. Identification of proteases and their types. *Analytical Biochemistry*, 385, 1: 153-160
- Shin H.H., Choi H.S. 1998. Purification and characterization of cysteine protease from *Pleurotus ostreatus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62, 7: 1416-1418
- Snowden K.C., Gardner R.C. 1990. Nucleotide sequence of an actinidin genomic clone. *Nucleic Acids Research*, 18, 22: 6684
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 9, 76, 4350-4354
- Tuppo L., Giangrieco I., Palazzo P., Bernardi M.L., Scala E., Carratore V., Tamburrini M., Mari A., Ciardiello M.A. 2008. Kiwellin, a modular protein from green and gold kiwi fruits: evidence of in vivo and in vitro processing and IgE binding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10: 3812-3817
- Twining S.S. 1984. Fluorescein isothiocyanate-labeled casein assay for proteolytic enzymes. *Analytical Biochemistry*, 143: 30-34
- Turk B., Turk V., Turk D. 1997. Structural and functional aspects of papain like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biological Chemistry*, 378, 3-4: 141-150

- Uhlen M. 2008. Affinity as a tool in life science. *BioTechniques*, 44, 5: 649-654
- Vandeputte-Rutten L., Gros P. 2002. Novel proteases: common themes and surprising features. *Current Opinion in Structural Biology*, 12: 704-708
- Vrščaj D. 1990. Glive od Triglava do Jadrana. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 416 str.
- Wang H., Ng T.B., Ooi V.E.C. 1998. Lectins from mushrooms. *Mycological Research*, 102, 8: 897-906
- Wilson K., Walker J. 2005. *Chromatographic techniques. V: Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. 6th edition.* Wilson K., Walker J. (eds.). New York, Cambridge University Press: 485-540
- Yamane T., Takeuchi K., Yamamoto Y., Li Y., Fujiwara M., Nishi K., Takahashi S., Ohkubo I. 2002. Legumain from bovine kidney: its purification, molecular cloning, immunohistochemical localization and degradation of annexin II and vitamin D-binding protein. Elsevier Science, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1596, 1: 108-120
- Yuwono T. 2004. The presence of actinidin (cysteine protease) and recombinant plasmids carrying the actinidin gene influence the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 20: 441-447

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojemu mentorju prof. dr. Janku Kosu, ki mi je dal priložnost sodelovati v področju raziskav vloge proteaz in proteaznih inhibitorjev.

Somentorici in delovni mentorici, dr. Jerici Sabotič, se najlepše zahvaljujem za zaupanje, posredovanje dragocenega znanja, nasvete, spodbudo in neposredno pomoč pri izdelavi naloge.

Za strokovni pregled naloge se zahvaljujem somentorici dr. Jerici Sabotič, mentorju prof. dr. Janku Kosu in recenzentu, doc. dr. Blažu Cigiću.

Zahvaljujem se Inštitutu Jožef Štefan, ki mi je omogočil izvedbo raziskave.

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

Iskreno se zahvaljujem vsem, ki ste mi kakor koli pomagali pri nastajanju tega dela.

Najlepša hvala tudi mojim staršem, ki so me ves čas spodbujali in mi moralno in materialno stali ob strani, ter mi omogočili čas in mir, da sem delo lahko pripeljala do konca.