

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BOŽENA KESIĆ

ISOLATION AND CHARACTERISATION OF CYSTATIN F MUTANTS

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogu sem opravljala na Inštitutu Jožef Stefan pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom dr. Milice Perišić Nanut. Mutante cistatina F je pripravila dr. Milica Perišić Nanut, legumain Katarina Koruza, mag. biotehnol., katepsin H dr. Tomaž Langerholc, inhibitor legumaina MCP1 pa Jerica Sabotič na Inštitutu Jožef Stefan.

ZAHVALA

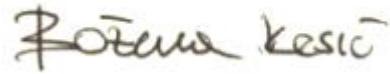
Zahvaljujem se prof. dr. Janku Kosu za mentorstvo in sprotno preverjanje napredka eksperimentalnega dela. Še posebej se zahvaljujem, da mi je bil vedno na voljo za nasvete.

Dr. Milici Perišić Nanut se zahvaljujem za strokovne in tehnične nasvete med izvajanjem eksperimentalnega dela ter pri pisanju magistrske naloge.

Očetu, mami in sestri se zahvaljujem za nasvete, motivacijo in podporo tekom celotnega študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogu samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom dr. Milice Perišić Nanut.



KAZALO VSEBINE

KAZALO SLIK.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	V
POVZETEK	VI
KLJUČNE BESEDE	VI
ABSTRACT	VII
KEY WORDS	VII
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VIII
1 UVOD.....	2
1.1 IZRAŽANJE IN SINTEZA	2
1.2 STRUKTURA IN INHIBITORNA AKTIVNOST	3
1.3 AKTIVACIJA.....	4
1.4 GLIKOZILACIJA	4
1.5 ZNOTRAJCELIČNO/ZUNAJCELIČNO NAHAJANJE	6
1.6 FIZIOLOŠKA VLOGA	7
1.6.1 Cistatini.....	7
1.6.2 C1 in C13 cisteinske proteaze – tarče cistatinov	7
1.6.3 Cistatin F in njegove tarče v imunskem sistemu	8
1.7 IZRAŽANJE REKOMBINANTNIH PROTEINOV.....	10

2	NAMEN DELA	12
3	MATERIALI IN METODE	13
3.1	MATERIALI IN NAPRAVE	13
3.1.1	Reagenti	13
3.1.2	Naprave in druga oprema	19
3.2	METODE	20
3.2.1	Priprava mutantov cistatina F	20
3.2.2	Priprava celičnih lizatov s sonifikacijo	22
3.2.3	Izolacija mutantov cistatina F s Co^{2+} afinitetno kromatografijo	22
3.2.4	Koncentriranje vzorcev	25
3.2.5	Merjenje koncentracije proteinov	25
3.2.6	SDS-PAGE	26
3.2.7	Barvanje s srebrovim nitratom	27
3.2.8	Prenos western	27
3.2.9	Barvanje z barvilkom R-250 Coomassie modro	28
3.2.10	Encimski testi inhibicije legumain in katepsina H	29
4	REZULTATI	32
4.1	Izolacija mutantov s Co^{2+} afinitetno kromatografijo	32
4.1.1	Izolacija trojno deglikoziliranega cistatina F	33
4.1.2	Izolacija N-končno skrajšanega cistatina F	34

4.1.3	Izolacija trojno deglikoziliranega N-končno skrajšanega cistatina F	35
4.1.4	Izolacija dvojno deglikoziliranega N-končno skrajšanega cistatina F	36
4.2	Karakterizacija mutantov	38
4.2.1	Testi inhibicije legumaina z izoliranimi mutanti cistatina F	38
4.2.2	Testi inhibicije katepsina H z izoliranimi mutanti cistatina F	39
5	RAZPRAVA.....	40
6	SKLEPI.....	43
7	LITERATURA	44

KAZALO SLIK

Slika 1: Terciarna struktura cistatina F (2)	3
Slika 2: Možni mehanizmi monomerizacije cistatina F (13).....	4
Slika 3: Lizosomska pot (19).....	5
Slika 4: Primerjava količine znotrajceličnega in zunajceličnega cistatina F in cistatina C v humanih U937 celicah (7)	6
Slika 5: Shema interakcij med cistatinom F, legumainom, katepsini C, H, L, V, perforinom in prograncimom B	9
Slika 6: Aminokislinsko zaporedje mutantov cistatina F	21
Slika 7: Kemoluminiscenčna reakcija encima HRP z luminolom (45).....	28
Slika 8: Frakcije po izolaciji mutanta 3dg s Co^{2+} afinitetno kromatografijo.....	33
Slika 9: Frakcije po izolaciji mutanta ΔN s Co^{2+} afinitetno kromatografijo.	34
Slika 10: Frakcije po izolaciji mutanta 3dg ΔN s Co^{2+} afinitetno kromatografijo.	36
Slika 11: Frakcije po izolaciji mutanta 2dg ΔN s Co^{2+} afinitetno kromatografijo.	37
Slika 12: Grafi inhibicije legumaina.....	38
Slika 13: Grafi inhibicije katepsina H.	39

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Posebnosti v protokolu za izolacijo posameznih mutantov	24
--	----

POVZETEK

Cistatin F je inhibitor C1 cisteinskih proteaz in legumaina iz skupine C13 cisteinskih proteaz. Njegova fiziološka vloga naj bi bila uravnavanje delovanja imunskih celic, kot so dendritične celice, monociti, limfociti T, naravne celice ubijalke, eozinofilci in nevtrofilci. Po sintezi tvori dimere in se glikozilira. Zunaj celice se nahaja večinsko v dimerni obliki z različnimi glikozilacijskimi statusi, znotraj celice pa ga najdemo v dimerni obliki, ki prevladuje v Golgijevem aparatu in endoplazmatskem retikulumu ter v monomerni obliki znotraj endosomov in lizosomov, kjer je lahko v intaktni ali N-končno skrajšani obliki, glikozilirani na asparaginih 61 in 62. V magistrskem delu smo iz celičnega gojišča z metodo Co^{2+} afinitetne kromatografije izolirali mutante trojno deglikoziliranega in do lizina 35 N-končno skrajšanega cistatina F. Dvojno (na asparaginih 61 in 62) deglikoziliran in do lizina 35 N-končno skrajšan mutant ter trojno (na asparaginih 61, 62 in 115) deglikoziliran in do lizina 35 N-končno skrajšan mutant cistatina F pa smo izolirali iz celic Freestyle HEK293F. Ugotovili smo, da mutacija glikozilacijskega mesta 61 in 62 na asparaginu s serinom lahko povzroči znotrajcelično zadrževanje proteina. Poleg tega smo ugotovili tudi, da mutacija glikozilacijskih mest na asparaginih 61 in 62 ali 61, 62 in 115, povzroči nastanek dimera. Izolirane mutante smo okarakterizirali na legumain in katepsin H. Legumain je inhibiral N-končno skrajšana oblika, dvojno deglikozilirana N-končno skrajšana oblika in trojno deglikozilirana N-končno skrajšana oblika. KATEPSIN H pa dvojno deglikozilirana N-končno skrajšana oblika in trojno deglikozilirana N-končno skrajšana oblika.

KLJUČNE BESEDE

cistatin F, glikozilacija, N-končno skrajšanje, Co^{2+} afinitetna kromatografija, katepsin H, legumain

ABSTRACT

Cystatin F inhibits C1 cysteine proteases and legumain, a member of C13 cysteine proteases. Its physiological role is a regulation of immune cells, such as dendritic cells, monocytes, T lymphocytes, natural killer cells, eosinophils and neutrophils. After synthesis it forms dimer and is glycosylated. Extracellularly it is present mostly as a dimer with different glycosylation profiles while intracellularly it exists in dimeric and monomeric form, first being more common in Golgi apparatus and endoplasmic reticulum, and the second in endosomes/lysosomes, where it can be in intact or N-terminally truncated form, glycosylated on asparagine 61 and/or 62 residues. In master thesis we describe the isolation of triple deglycosylated and to lysine 35 N-terminally truncated forms of cystatin F from cell medium using Co^{2+} affinity chromatography. With the same method we have isolated also double (on asparagine 61 and 62) deglycosylated until lysine 35 N-terminally truncated form and triple (on asparagine 61, 62 and 115) deglycosylated until lysine 35 N-terminally truncated cystatin F mutant from Freestyle HEK293F cells. We found that mutation of glycosylation sites on asparagine 61 and 62 with serine can result in intracellular localization of protein. Additionally we have found that mutation of glycosylation sites on asparagine 61 and 62 or 61, 62 and 115 can lead to dimer formation. After the isolation, we have tested the mutant inhibitory activity for legumain and cathepsin H. We showed, that N-terminally truncated form, double deglycosylated N-terminally truncated form and triple deglycosylated N-terminally truncated form inhibit legumain and that double deglycosylated N-terminally truncated form and triple deglycosylated N-terminally truncated form inhibit cathepsin H.

KEY WORDS

cystatin F, glycosylation, N-terminal truncation, Co^{2+} affinity chromatography, cathepsin H, legumain

SEZNAM OKRAJŠAV

2dgΔN	dvojno deglikozilirana N-končno skrajšana oblika cistatina F
3dg	trojno deglikozilirana oblika cistatina F
3dgΔN	trojno deglikozilirana N-končno skrajšana oblika cistatina F
ΔN	N-končno skrajšana oblika cistatina F
AK	aminokislinski ostanek
Asn	asparagin
CLM	cistatinom podobna molekula, izvirajoča iz kostnega mozga (bone marrow-derived cystatin-like molecule)
CLIP	peptid invariantne verige povezane s poglavitnim histokompatibilnostnim kompleksom razreda II (class II-associated invariant chain peptide)
CTL	citotoksični T limfocit
Cys	cistein
DC	dendritične celice
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ER	endoplazmatski retikulum
GA	Golgijev aparat
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
Gln	glutamin
Gly	glicin
HEK293	celice ledvice človeškega embrija 293 (human embryonic kidney 293)
His	histidin
HRP	hrenova peroksidaza
IL-2	interlevkin 2
LPS	lipopolisaharid
MAC-1	adhezijska molekula makrofagov (macrophage adhesion molecule 1)
MCA	metilkumarin hidroklorid
MCP	makrocipin
MES	4-morfolinoetansulfonska kislina

MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (major histocompatibility complex)
MPR	manoza 6-fosfatni receptor (mannose 6-phosphate receptor)
M6P	manoza 6-fosfat (mannose 6-phosphate)
NK	naravna celica ubijalka (natural killer cell)
NP40	nonil fenoksipolietoksiletanol
PBS	fosfatni pufer z NaCl
Pro	prolin
PVDF	poliviniliden difluorid
RIPA	radioimunoprecipitacijski test (radioimmunoprecipitation assay)
SDS	natrijev dodecil sulfat
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom
Ser	serin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletilendiamin
Thr	treonin
Trp	triptofan
Val	valin

1 UVOD

Cistatini so endogeni inhibitorji cisteinskih proteaz – encimov, zadolženih za katalizo hidrolize peptidnih vezi. Po predlogu Rawlingsa in Barretta cistatine delimo v skupine glede na njihovo strukturno podobnost, število domen in prisotnost disulfidnih vezi. Tako poznamo stefine (A in B), cistatine (C, D, E/M, F, S, SA, SN), cistatine, ki niso sposobni inhibicije cisteinskih proteaz (G, H, T, CLM), kininogene, lateksine in fetuine. Stefini so znotrajcelični proteini brez cisteinskih vezi in nezmožni glikozilacije. Cistatini so zunajcelični proteini, ki so zmožni fosforilacije in imajo vsaj dve disulfidni vezi. Lateksini in fetuini so sestavljeni iz dveh cistatinskih domen. Kininogeni pa so intravaskularni proteini z več cistatinskimi domenami (1).

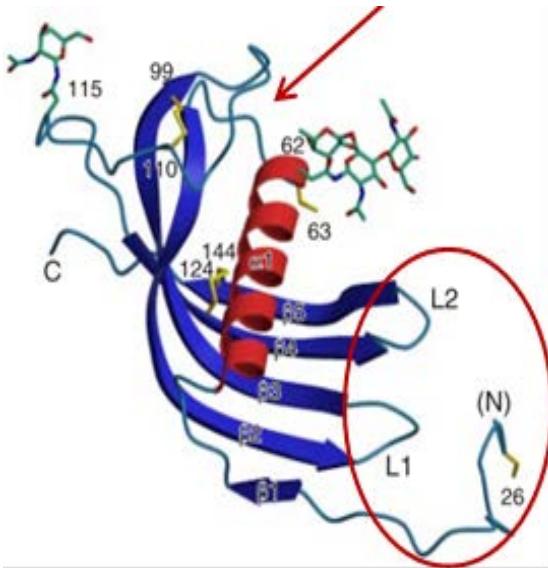
Cistatin F uvrščamo med cistatine, čeprav ima z drugimi pripadniki te skupine zelo malo podobnosti v aminokislinskem zaporedju (< 35 %). Od njih se razlikuje tudi v nekaterih drugih lastnostih – je glikoziliran, tvori dimer (2), poleg tega pa je njegovo glavno mesto delovanja znotraj celice (3).

1.1 IZRAŽANJE IN SINTEZA

Gen za cistatin F se nahaja na kromosomu 20 (4), kjer je zapis za 145 AK (aminokislinskih ostankov) dolg pre-cistatin F z 19 AK dolgim signalnim peptidom (5). Sintetiziran protein je neaktivен in sestavljen iz dveh domen. Masa proteina izračunana iz aminokislinskega zaporedja znaša 29086 Da. Po glikozilaciji, ki poteče na treh mestih, k masi prispevajo še oligosaharidi. Masa enega polisaharida je 1500–2000 Da (6). Primarno se izraža v imunskeih celicah, kjer je nivo izražanja odvisen od aktivnosti in stopnje diferenciacije celic. Najdemo ga v monocitih (7), naravnih celicah ubijalkah (NK celicah) (8), dendritičnih celicah (DC celicah) (9, 10), citotoksičnih limfocitih T (CTL) (9), nevtrofilcih in eozinofilcih (11).

1.2 STRUKTURA IN INHIBITORNA AKTIVNOST

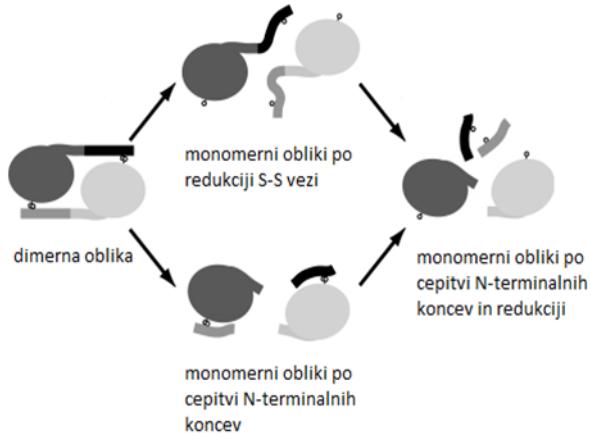
Cistatini s tvorbo reverzibilnih kompleksov kompetitivno inhibirajo cisteinske proteaze, pri čemer zadostujejo že nanomolarne do pikomolarne koncentracije inhibitorja (12). Najbolj tesna vezava cistatina F s pripadniki družine cisteinskih proteaz C1 je s katepsini F, K, L, in V (6, 12) s Ki vrednostmi med 0,17–0,35 nM, manj tesna vezava je s katepsinoma S in H z vrednostmi Ki okrog 35 nM in legumainom iz C13 družine cisteinskih proteaz (Ki = 10 nM), medtem ko katepsinov B (Ki > 1000) in X (Ki > 100) ne inhibira (3, 13). Poseben je katepsin C, pri katerem je za inhibicijo potrebna predhodna proteoliza N-končnega dela cistatina F (14). Poleg cisteinskih proteaz C1 cistatini C, E/M in F z manjšo afiniteto inhibirajo tudi cisteinske proteaze C13 (13). To skupno lastnost imajo zaradi ohranjene strukture (slika 1). Sestavljeni so iz sredinske α -vijačnice in petih nasprotno usmerjenih β -trakov. Za vezavo v aktivno mesto cisteinskih proteaz C1 sta predvsem pomembni zanki med β -trakovi (L1 in L2) in gibljivi N-končni segment. Centralna zanka L1 ima zaporedje Gln-Xaa-Val-Xaa-Gly, medtem ko zanka L2 vsebuje AK Pro-Trp (12). Za inhibicijo cisteinskih proteaz C13 pa je pomembno drugo vezavno mesto, ki se nahaja med koncem α -vijačnice in začetkom β 2-traka (13).



Slika 1: Tertiarna struktura cistatina F (2). Na sliki je z rdečo elipso označeno mesto, s katerim se cistatin F veže v aktivno mesto C1 cisteinskih proteaz, z rdečo puščico pa mesto, s katerim se veže na legumain iz družine C13 cisteinskih proteaz.

Na ravni primarne strukture ima cistatin F za razliko od ostalih cistatinov na N-koncu 6 AK več, poleg tega pa se razlikuje tudi v številu cisteinov, in sicer 6 namesto 4. Med Cys124-Cys144 in Cys99-Cys110 se tvorita intramolekularni disulfidni vezi, dodatna cisteinska ostanka – Cys26 in Cys63 – pa omogočata vzpostavitev intermolekularne disulfidne vezi. K tvorbi dimera dodatno prispevajo še polarne skupine na površju proteina, ki ustvarjajo hidrofilno okolje (2).

1.3 AKTIVACIJA



Slika 2: Možni mehanizmi monomerizacije cistatina F (13).

Monomerizacija in s tem aktivacija cistatina F lahko poteče po dveh mehanizmih (slika 2). Prvi je redukcija S-S vezi med Cys26 na eni domeni cistatina F in Cys63 na drugi domeni. Drugi mehanizem monomerizacije pa je proteolitična cepitev N-končnih AK do Lys35 (14), domnevno s katepsinom V (15). Monomerizacija cistatina F po enem ali drugem mehanizmu ima zelo velik pomen

pri inhibiciji cisteinskih proteaz. Katepsin C namreč inhibira le N-končno skrajšana

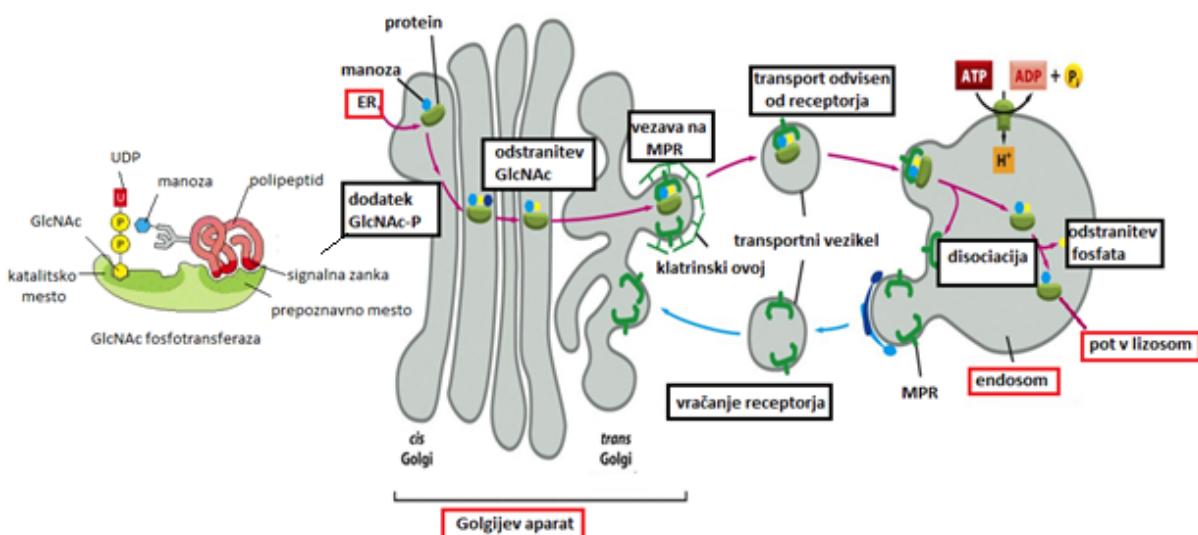
oblika (14). Intaktna oblika cistatina F znatno bolje inhibira katepsin S kakor N-končno skrajšana oblika, medtem ko katepsin H lahko inhibirata obe obliki, pri čemer ima rahlo večjo inhibitorno sposobnost N-končno skrajšana oblika (16).

1.4 GLIKOZILACIJA

Glikozilacija polipeptidne verige ima za protein zelo velik pomen. Vpliva na njegovo znotraj ali zunajcelično nahajanje, interakcijo z encimom ali receptorjem ter stabilnost. Že majhne spremembe v glikozilacijskem statusu pa lahko njegovo funkcijo spremenijo (17). Glede na mesto v polipeptidni verigi, kjer poteče glikozilacija, sta najbolj pogosti O-glikozilacija in N-glikozilacija. O-glikozilacija poteče v Golgijevem aparatu (GA) na hidroksilni skupini Ser ali Thr, medtem ko N-glikozilacija poteče že v endoplazmatskem retikulumu (ER) na aminski skupini Asn v aminokislinskem zaporedju Asn-X-Ser/Thr/Cys, kjer X predstavlja katerokoli AK. Vendar pa ni nujno, da so na proteinu zasedena vsa glikozilacijska mesta, ali pa da bo glikozilacija na vseh mestih potekla v enakem obsegu. To je odvisno od polipeptidnega zaporedja poleg glikozilacijskih mest, ki po zvitju proteina tvorijo signalno zanko. Signalna zanka se veže na regulatorna mesta encimov, udeleženih v glikozilaciji, in tako vpliva na

njihovo aktivnost in posledično obseg glikozilacije. Naslednji dejavnik, ki vpliva na glikozilacijo, je faza razvoja in diferenciacije celice, njeno fiziološko stanje in okolje (18).

Za glikoproteine, ki so usmerjeni v lizosomske pot, je značilna manzoza 6-fosfat (M6P). Ta se veže na manzoza 6-fosfatni receptor (MPR) na membrani *trans* GA. Od tod se kompleks prenese do poznega endosoma, kjer se zaradi znižanja pH glikoprotein odstrani z MPR. Dodatno zorenje poznega endosoma povzroči še odstranitev fosfata z manzoze, receptor pa se z veziklom zopet vrne na membrano *trans* GA (slika 3) (19).



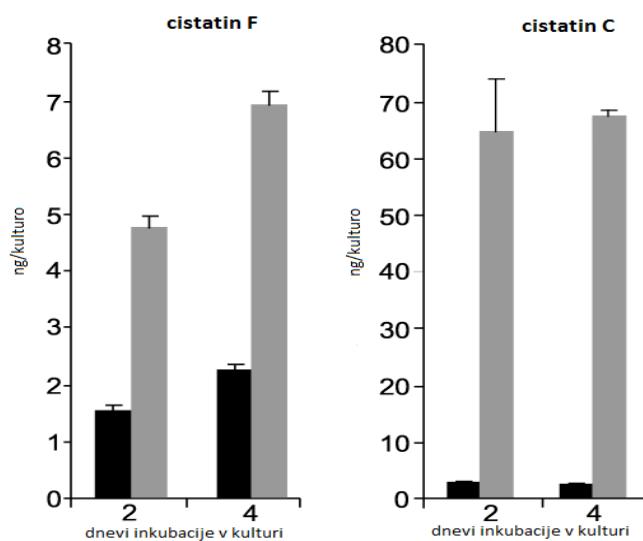
Slika 3: Lizosomska pot (19).

Poleg cistatina E/M je cistatin F edini cistatin, ki je glikoziliran. Ima dve običajni glikozilacijski mesti, Asn62 in Asn115 (številčenje pre-cistatina F), poleg tega pa še eno dodatno glikozilacijsko mesto na Asn61 (2). Pri tem je potrebno poudariti, da glikozilacija na Asn62 ne poteče na vseh molekulah cistatina F (7), kar nakazuje na različne funkcije glikozilirane in neglikozilirane oblike (2). Zelo pomembna funkcija glikozilacije cistatina F je znotrajcelično zadrževanje proteina. Protein po sintezi in N-glikozilaciji v ER in GA preide v endosome in lizosome, kjer se lahko aktivira. Ključni pogoj za prehod v lizosome je glikozilacija Asn61 in/ali 62. Medtem ko glikozilacija Asn115 mesta ne omogoča lizosomske poti. Druga funkcija glikozilacije je varovanje proteina pred redukcijo disulfidne vezi v dimeru. Oligosaharid na mestu Asn62 je s proteinom še dodatno povezan z vodikovimi vezmi

in skoraj popolnoma pokriva površino disulfidne vezi dimera, kar preprečuje njegovo redukcijo (20). To pojasni tudi zelo visoke koncentracije reducenta, ki so potrebne za tvorbo monomera *in vitro* (3). Naslednja posledica glikozilacije na Asn62 ali Asn61 je sposobnost endocitoze. Cistatin F, glikoziliran le na Asn115, izgubi to sposobnost (3, 20). Dimerni cistatin F lahko prehaja v druge celice preko vezave M6P na MPR. Glede na to, da določen delež cistatina F lahko prehaja v celice, ki nimajo MPR, mora obstajati tudi alternativni način prehoda (20).

1.5 ZNOTRAJCELIČNO/ZUNAJCELIČNO NAHAJANJE

Cistatin F se lahko nahaja tako znotraj kot zunaj celice. Znotraj celice se protein v ER in GA nahaja v obliki dimera, v pozinem endosому in lizosому pa v aktivni monomerni obliki. Zunaj celice se cistatin F nahaja v večinsko dimerni, neaktivni obliki, ter z različnimi glikozilacijskimi statusi (20). Za cistatine s signalnim peptidom, kot je tudi cistatin F, je značilno, da je količina zunajceličnega proteina v primerjavi z znotrajceličnim večja. Cistatin F pa se od ostalih cistatinov razlikuje v deležu znotrajceličnega proteina. Za primer je na sliki 4 prikazan delež znotrajceličnega cistatina F, ki je večji od deleža zunajceličnega cistatina C.



Slika 4: Primerjava količine znotrajceličnega in zunajceličnega cistatina F in cistatina C v humanih U937 celicah (7). Črni stolpci prikazujejo količino znotrajceličnega, sivi pa zunajceličnega proteina. Zunajcelično je cistatina C 24–30 krat več kot znotrajcelično, medtem ko je cistatina F zunajcelično le 3-krat več.

1.6 FIZIOLOŠKA VLOGA

1.6.1 Cistatini

Nekoč so cistatinom pripisovali nalogu inhibicije katepsinov, ki so zaradi različnih vzrokov ubežali iz celičnih razdelkov v celični citosol ali izven celice. Vendar poleg inhibicije nekontrolirano izločenih katepsinov cistatini lahko delujejo tudi regulatorno znotraj celice, pri tem pa morajo biti kolokalizirani s svojimi tarčami (3). Cistatini imajo pomembno vlogo v imunskem sistemu, pri strjevanju krvi, razvoju kože in reproduktivnega sistema, uravnavanju celičnega cikla in pri vnetjih. Neustrezno uravnavanje izražanja cistatinov pa se kaže v razvoju patoloških stanj, kot so nevrodgenerativne bolezni, vnetna stanja, kožne bolezni in neustrezna reproduktivna funkcija. Njihova prisotnost pa lahko deluje pozitivno ali negativno na nastanek ali napredovanje raka (5).

1.6.2 C1 in C13 cisteinske proteaze – tarče cistatinov

Proteaze so encimi, ki cepijo peptidne vezi. Glede na njihov katalitski mehanizem jih delimo na serinske, cisteinske, aspartatne, glutamatne, treoninske proteaze, metaloproteaze, proteaze mešanega tipa ter tiste z neznanim mehanizmom delovanja. Glede na mesto cepitve proteina, pa v grobem na endopeptidaze, ki cepijo znotraj aminokislinske verige proteina ali eksopeptidaze, ki cepijo C ali N-končne dele proteina (21). Nekoč so katepsine iz družine cisteinskih proteaz C1 večinoma povezovali s katabolizmom proteinov v lizosomih, zdaj pa so poznane tudi številne druge funkcije izven endosomov in lizosomov – v jedru, citoplazmi, celični membrani in v zunajceličnem prostoru (22). Povezujejo jih z antigensko predstavljivijo, uravnavanjem celične citotoksičnosti, apoptozo, kostno remodelacijo, uravnavanjem hormonske aktivacije in odpornostjo na virusne, bakterijske ter parazitske okužbe. Aktivnost teh encimov mora biti ustrezno uravnana, saj lahko v nasprotnem primeru povzročijo stanja, kot so vnetje, tumorska invazija, nevrodgeneracija (5). Delovanje katepsinov je uravnano na več nivojih. Začne se že na transkripcijskem in translacijskem nivoju, kasneje so lahko uravnavani s kofaktorji, ali pa je njihova aktivnost omejena z nahajanjem ločeno od substrata v celičnih razdelkih. Ne nazadnje pa so lahko regulirani tudi z inhibitorji (23). Ena izmed skupin takih inhibitorjev so prav cistatini.

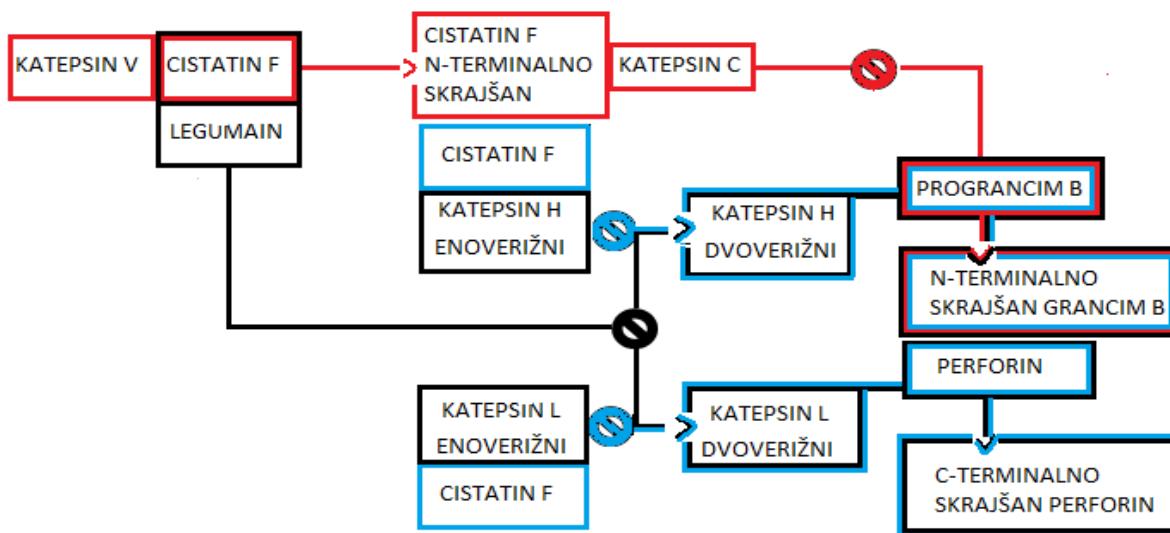
Predstavnik cisteinskih proteaz C13 je legumain, ki ga poznamo tudi pod imenom asparaginska endopeptidaza. Pri človeku se nahaja v endosomu/lizosomu. Sprva je sintetiziran v neaktivni pre-pro obliki, nakar se v bolj kislem okolju avtokatalitično aktivira z odcepitvijo C-končnega dela (24). Udeležen je v razgradnji proteinov v endolizosому (25) in antigenski predstavitvi (26). Poleg tega pa tudi pri aktivaciji katepsinov B, H in L (25).

Pripadnik skupine cisteinskih proteaz C1 je katepsin H in ima aminopeptidazno ali endopeptidazno aktivnost (27). Sintetizira se v neaktivni prepro-peptidni obliki. Nahaja se večinoma znotrajcelično, vendar pa ga najdemo tudi v zunajceličnem prostoru (28, 29). Njegova znotrajcelična funkcija je proteinska razgradnja v lizosomih, tako kot za večino ostalih katepsinov (29). Ima pa tudi funkcijo aktivacije grancic B v celicah imunskega sistema – NK in CTL, nevtrofilcih in mastocitih (30). Povišane vrednosti povezujejo s kolorektalnim rakom, rakom dojk in prostate, melanomi in gliomi, znižane pa s ploščatoceličnim rakom kože. Ima namreč zmožnost razgradnje zunajceličnega matriksa, kar vpliva na napredovanje raka (proliferacija, migracija in metastaze) (28).

1.6.3 Cistatin F in njegove tarče v imunskemu sistemu

Ker se cistatin F primarno izraža v celicah imunskega sistema, lahko sklepamo, da je uravnavanje njihovega delovanja tudi njegova osnovna funkcija. Nivo izražanja v človeških imunskih celicah se spreminja glede na njihovo aktivnost in stopnjo diferenciacije. Za monocite velja, da je njegovo izražanje v neaktiviranih monocitih večje kot v aktiviranih. V celicah NK ga je največ v mirujočem klonu celic NK s citotoksičnim fenotipom (anergične NK celice) in manj v celicah NK, stimuliranih z IL-2, v katerih se aktivirajo perforin ter grancica A in B (9). V DC se gen izraža le v celicah, ki izvirajo iz zarodnih celic in ne iz monocitov. Izražanja ne zaznamo pri neaktiviranih celicah, zaznamo pa ga pri DC aktiviranih z vezavo lipopolisaharidov (LPS) (9,10). Gen se izraža v počivajočih CTL (9) in nevtrofilcih ter eozinofilcih (11). Selektivno izražanje kaže na različne funkcije v posameznih imunskih celicah in tako velik pomen v imunskemu odzivu.

Cistatin F ima kot inhibitor katepsinov C, H in L pomembno vlogo pri uravnavanju aktivacije perforinov in grancima B. Ti se nahajajo v NK (27) in CTL (31), nevtrofilcih (32) in mastocitih (33). Perforini in grancimi so zadolženi za citotoksično delovanje teh celic. Delujejo tako, da se na celično membrano tarčne celice najprej veže aktiviran perforin, ki povzroči lizo membrane. Pore v membrani nato omogočijo vstop grancimov, ki so sposobni razgradnje proteinov v tarčni celici (23). Za aktivacijo perforina s cepitvijo njegovega C-končnega dela naj bi bil zadolžen katepsin L (34), za aktivacijo grancima in odcepitev njegovega N-končnega dela pa katepsin C oziroma alternativno katepsin H (30,35). Cistatin F sodeluje v inhibiciji aktivacije grancimov B in perforinov preko dveh mehanizmov. Direktno preko vezave na aktivno obliko katepsina C, H ali L ali indirektno z inhibicijo legumaina (36), ki je odgovoren za aktivacijo katepsinov H in L (37) (slika 5).



Slika 5: Shema interakcij med cistatinom F, legumainom, katepsini C, H, L, V, perforinom in prograncimom B. Rdeča pot prikazuje, kako cistatin F inhibira aktivacijo prograncima B. KATEPSIN V proteolitično cepi N-končni del cistatina F. N-končno skrajšan cistatin F je tako aktiviran in lahko inhibira katepsin C, zato cepitev prograncima B v N-končno skrajšan grancim B ne poteče. Črna pot prikazuje, kako vezava cistatina F na legumain povzroči inhibicijo aktivacije grancima B in perforina. Legumain namreč normalno aktivira katepsina L in H s pretvorbo njihovih neaktivnih enoverižnih oblik v aktivne dvoverižne oblike. Aktivna oblika katepsina H je zadolžena za proteolitično cepitev N-končnega dela prograncima B in tako njegovo aktivacijo. Aktivna oblika katepsina B pa je zadolžena za proteolitično cepitev C-končnega dela perforina in njegovo aktivacijo. Modra pot prikazuje direktno pot inhibicije aktivacije perforina in prograncima B. Cistatin F se veže na enoverižni katepsin L, kar zavre njegovo pretvorbo v aktivno dvoverižno obliko, ki je sposobna aktivacije perforina. Možna je tudi direktna inhibicija aktivacije prograncima B z direktno vezavo na enoverižni katepsin H.

V imunskih celicah monomerna oblika cistatina F uravnava tudi antigensko predstavitev. Eden od mehanizmov uravnavanja je preko inhibicije katepsina S v antigen predstavitev celicah, kot je DC. Katepsin S je udeležen pri zorenju invariantne verige kompleksa MHCII. Po sintezi in zvitju se na kompleks MHCII v ER veže invariantna veriga, ki prekriva vezavno mesto za molekule antigena. Z veziklom se nato tak kompleks odcepi in potuje proti endosomu/lizosomu. Z zniževanjem pH postane katepsin S v endosomu/lizosomu aktivен in lahko invariantno verigo cepi do peptida CLIP, ki je še vedno v vezavnem mestu za antigen. Cistatin F inhibira zorenje molekule MHCII in cepitev invariantne verige do peptida CLIP z inhibicijo katepsina S v nezrelih DC. Drugi možen mehanizem uravnave antigenske predstavitev DC je preko uravnavanja adhezije in možnosti antigenske predstavitev limfocitom T. V DC po signalu za zorenje s katepsinom L poteče cepitev prokatepsina X in tako njegova aktivacija. Katepsin X sproži povečano število MAC-1 adhezijskih molekul na površini DC. Tako je DC sposobna vezave na tujek in aktivacije z molekulami LPS. Cistatin F po aktivaciji DC z LPS inhibira katepsin L, ki inhibira pretvorbo katepsina X v njegovo aktivno obliko, kar povzroči deadhezijo DC in antigensko predstavitev (16). Poleg tega ima cistatin F vlogo pri inhibiciji encimov v endolizosomih, ki so udeleženi pri procesiranju antigena v peptide, primerne za predstavitev na molekuli MHCII. Primer takega encima je legumain (26).

1.7 IZRAŽANJE REKOMBINANTNIH PROTEINOV

Priprava rekombinantnih proteinov za namen študij strukture in funkcije proteinov zahteva sistem za izražanje, ki z možnostjo relativno enostavne izolacije omogoča pridobitev biološko aktivnega rekombinantnega proteina. Poznamo več sistemov za izražanje: bakterijske celice (*E. coli*), kvasovke (*P. pastoris*), insektne celice in sesalske celice. Vsak od njih ima prednosti in slabosti in se med seboj razlikujejo z vidika izkoristka, cene, možnosti posttranslacijskih modifikacij, kofaktorjev, zahtevnosti dela in porabljenega časa (38).

Eden najbolj uporabljenih sistemov za izražanje so bakterijske kulture. Tak sistem je poceni, nudi visoke izkoristke, čas, ki ga porabimo, pa je kratek. Vendar pa prokariotske celice niso sposobne posttranslacijskih modifikacij, nimajo šaperonov in ustreznih kofaktorjev, ki so

potrebni za izražanje pravilno zvitega in biološko aktivnega proteina. V primerjavi z bakterijskimi kulturami so bolj napreden sistem kvasovke. Izražanje rekombinantnih proteinov v kvasovkah omogoča nekatere posttranslacijske modifikacije, vendar pa niso sposobne izražanja čisto vseh proteinov. Naslednji sistem za izražanje so insektne celice transducirane z bakulovirusi. Bakuloviorusi so za človeka nenevarni, saj so njihovi naravnii gostitelji insekti. Slabost njihove uporabe je časovna zamudnost pri pripravi. Insektne celice so sposobne vseh posttranslacijskih modifikacij, vendar pa jim še vedno lahko manjkajo nekateri pomembni kofaktorji. Najbolj primeren sistem za ekspresijo z vidika zahtevnih posttranslacijskih modifikacij in zvijanja proteina so sesalske celice. Sposobne so vseh posttranslacijskih modifikacij in vsebujejo vse kofaktorje in šaperone za pravilno zvitje proteina. Optimizacija takih sistemov pa je včasih lahko zamudna in draga (38).

Eden od sesalskih sistemov so HEK293 (Human embryonic kidney cells) celice ledvice človeškega embrija (39). Obstajajo dve različici takih celic. Prvotne HEK293 rastejo pritrjene na površino, druge Freestyle HEK293F celice pa so prilagojene na rast v suspenziji. Poleg klasičnih prednosti gojenja rekombinantnih proteinov v sesalskih celicah je prednost suspenzijskih celic izražanje rekombinantnih proteinov v malem (ml) ali velikem (l) obsegu. Gojenje proteinov v velikem obsegu omogoča manj razlik med šaržami in velik izkoristek (39). Suspenzijske celice lahko gojimo v inkubatorjih s stresalnikom v prisotnosti 8 % CO₂ namesto v bioreaktorjih.

2 NAMEN DELA

Cistatin F obstaja v različnih celičnih razdelkih v različnih oblikah – dimerni, monomerni, monomerni N-končno skrajšani oblici ter z različnimi glikozilacijskimi profili. Vsaka od oblik bi lahko imela različne funkcije in tarče. Namen magistrske naloge je bil z encimskimi testi inhibicije preveriti inhibitorno sposobnost posameznih oblik na potencialni tarči cistatina F v imunskem sistemu, to je na legumain in katepsin H. V celicah Freestyle HEK293F so bili pripravljeni mutanti cistatina F. Te mutante smo iz celic in celičnega gojišča izolirali ter določili čistost in prisotnost proteina z barvanjem s srebrovim nitratom in prenosom western. Nadalje smo izolirane proteine okarakterizirati z encimskimi testi inhibicije.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI IN NAPRAVE

3.1.1 Reagenti

METODA	
Priprava celičnih lizatov s sonifikacijo	<p><u>Lizirni pufer:</u></p> <ul style="list-style-type: none">– 50 mM fosfatni pufer pH = 8,6– 0,5 M NaCl,– 0,1-odstotni TWEEN 20,– ena tableta proteaznega inhibitorja complete™ ULTRA Tablets, Mini, EDTA-free, - EASYpack, Sigma-Aldrich Co. LLC, REF: 05892970001
Co ²⁺ afinitetna kromatografija	<p><u>Nosilec:</u></p> <ul style="list-style-type: none">– TALON® Metal Affinity Resin, Clontech Laboratories, inc. Takara Biotechnology, CAT: 635502 <p><u>Dodatki vzorcu pred nanosom na kolono:</u></p> <ul style="list-style-type: none">– NaCl– Imidazol (čistost \geq 99,5-odstotna) <p><u>Vezavni pufer:</u></p> <ul style="list-style-type: none">– 50 mM TRIS HCl (analitska čistost), pH = 7,4– 500 mM NaCl <p><u>Elucijski pufer:</u></p> <ul style="list-style-type: none">– 50 mM TRIS HCl (analitska čistost), pH = 7,4– 120 mM NaCl,– 400 mM Imidazol (čistost $>$ 99,5-odstotna)

	<p><u>Regeneracijski pufer:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 20 mM MES, (čistost \geq 99,0-odstotna) – 0,3 M NaCl, – pH = 5,0 <p><u>Shranjevanje kolone:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 20-odstotni EtOH
Merjenje koncentracije proteinov	<p><u>Reagenčni set:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – DC Protein Assay Reagents Package, Bio-Rad Laboratories, Inc., CAT: 500-0116 <p><u>Priprava umeritvene krivulje:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – goveji serumski albumin, (čistost: 99-odstotna), Sigma-Aldrich Co. LLC., REF: A-3059
SDS-PAGE	<p><u>4-odstotni koncentrirni gel (debelina 1,5 mm):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 6,335 ml destilirane H₂O, – 2,500 ml pufra (0,5 M TRIS HCl; pH = 6,8), – 0,100 ml 10-odstotnega SDS-a, – 1,000 ml 40-odstotnega akrilamida/bisakrilamida (37,5 : 1), Sigma-Aldrich Co. LLC., CAT: 01709, – 0,050 ml 10-odstotnega amonijevega persulfata, – 0,015 ml TEMED <p><u>12-odstotni ločevalni gel (debelina 1,5 mm):</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 8,670 ml destilirane H₂O, – 5,000 ml pufra (1,5 M TRIS HCl; pH = 8,8), – 0,200 ml 10-odstotnega SDS-a, – 6,000 ml 40-odstotnega akrilamida/bisakrilamida (37,5:1), Sigma-Aldrich

	<p>Co. LLC., CAT: 01709,</p> <ul style="list-style-type: none"> – 0,100 ml 10-odstotnega amonijevega persulfata, – 0,030 ml TEMED <p><u>Pufer za elektroforezo:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 24,7 mM TRIS (analitska čistost) – 191,8 mM glicin (analitska čistost) – 1 % SDS (analitska čistost) – pH = 8,3 <p><u>5X nanašalni pufer:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 1 g SDS (analitska čistost) – 5 ml glicerola (analitska čistost) – 150 mg TRIS, analitska čistost – 25 mg bromfenolno modrega – do 10 ml dodati H₂O – pH = 6,8 <p><u>Lestvica velikosti:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa CAT: 26619
Barvanje s srebrovim nitratom	<p><u>Raztopina za fiksacijo gela:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 50-odstotni EtOH – 12-odstotna ocetna kislina – 50 µl 37-odstotnega formaldehida na 100 ml raztopine <p><u>Raztopina za izpiranje:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 50-odstotni EtOH

	<p><u>Raztopina za senzitizacijo:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 0,02-odstotni natrijev tiosulfat <p><u>Raztopina za impregnacijo:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 0,2-odstotni AgNO₃ (čistost \geq 99,8-odstotna) – 50 µl 37-odstotnega formaldehida na 100 ml raztopine <p><u>Raztopina za razvijanje slike:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 6-odstotni Na₂CO₃ – 50 µl 37-odstotnega formaldehida na 100 ml raztopine – 2 ml 0,02-odstotnega natrijevega tiosulfata na 100 ml raztopine <p><u>Raztopina za zaustavitev reakcije:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 50-odstotni EtOH – 12-odstotna ocetna kislina
Prenos western	<p><u>Puffer za prenos:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 24,7 mM TRIS (analitska čistost) – 77,3 mM Glicin (analitska čistost) – 6,24 M metanol – 13 mM 10-odstotni SDS <p><u>Protitelesa:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – primarna protitelesa: kunčja protitelesa proti cistatinu F, Sigma-Aldrich Co. LLC. REF: HPA040442-100UL

	<ul style="list-style-type: none"> – sekundarna protitelesa: kozja protitelesa proti kunčjemu IgG, Jackson Imuno research laboratories. REF: 111-035-144 <p><u>Substrat za HRP:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – Lumi Light Plus Western Blotting Substrate, Roche Applied Science. REF: 12015196001 <p><u>Gojišče za obdelavo membrane: PBS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 137 mM NaCl, – 2,7 mM KCl, – 10 mM Na₂HPO₄ × 2H₂O, – 1,8 mM KH₂PO₄ – pH = 7,4
Barvanje z barvilm Coomassie modro	<p><u>Barvilo Coomassie modro:</u></p> <p>20 ml založne raztopine dodamo 20 ml 20-odstotne ocetne kisline</p> <p>Založna raztopina:</p> <ul style="list-style-type: none"> – 5 tablet PhastGel™ Blue R, GE Healthcare, REF: 17-0518-01 – 400 ml dH₂O – 600 ml EtOH <p><u>Razbarvanje gelov:</u></p> <p>30-odstotna razbarvalna raztopina:</p> <ul style="list-style-type: none"> – 100 ml EtOH – 50 ml CH₃COOH – 850 ml dH₂O

	<p>10-odstotna razbarvalna raztopina:</p> <ul style="list-style-type: none"> – 300 ml EtOH – 100 ml CH₃COOH – 600 ml dH₂O
Test z legumainom	<p><u>Pufer za pripravo razredčitev vzorca:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – fosfatni pufer pH = 6,8 <p><u>Redčenje legumaina in substrata:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 5 mM DTT v pufru za legumain <p><u>Pufer za legumain in substrat:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 39,1 mM citronska kislina (čistost \geq 99,0 %) – 121 mM dinatrijev fosfat (analitska čistost) – 1 mM EDTA (analitska čistost) – pH = 5,8 <p><u>Encim:</u></p> <p>Legumain (Katarina Koruza, mag. biotehnol., Inštitut Jožef Stefan) (40)</p> <p><u>Pozitivna kontrola:</u></p> <p>Inhibitor legumaina MCP1 (Jerica Sabotič, Inštitut Jožef Stefan)</p> <p><u>Substrat:</u></p> <p>12,5 µM Z-Ala-Ala-Asn-AMC, Bachem, REF: I-1865</p>
Test s katepsinom H	<p><u>Obdelava vzorca:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 100 mM DTT

	<p><u>Pufer za pripravo razredčitev vzorca:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – fosfatni pufer pH = 6,8 – 100 mM DTT; dodamo pred poskusom <p><u>Testni pufer:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 2 mM EDTA (analitska čistost), – 100 mM MES, (čistost \geq 99,0 %) – 0,1 % PEG 8000 – 5 mM DTT; dodamo pred poskusom – pH = 6,5 <p><u>Encim:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 1 nM katepsin H, pripravljen iz 500 nM založnega katepsina H (dr. Tomaž Langerholc, Inštitut Jožef Stefan) <p><u>Substrat:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – 20 μM Z-Arg-MCA, Bachem, REF: I-1130
--	--

3.1.2 Naprave in druga oprema

Co ²⁺ afinitetna kromatografija	<p><u>Kolona:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – Disposable Columns 5 ml, Qiagen GmbH, REF: 1018597
Koncentriranje	<p><u>Centrifugirke:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> – Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with Ultracel®-3 membrane, Merck Millipore, REF: UFC900324 – Amicon®Ultra-4 Centrifugal Filter Unit with Ultracel®-3 membrane, REF: UFC800324

Merjenje koncentracije proteinov	<u>Aparatura:</u> – Infinite® M1000 PRO, Tecan Group Ltd.
Prenos western	<u>Nitrocelulozna membrana:</u> – Amersham Protran 0.2 NC, GE Healthcre Life Sciences CAT: 10600006 <u>Aparatura:</u> – ChemiDoc™ MP System, Bio-Rad Laboratories, Inc.
Test z legumainom in katepsinom H	<u>Aparatura:</u> – Infinite® M1000 PRO, Tecan Group Ltd.

3.2 METODE

3.2.1 Priprava mutantov cistatina F

Na inštitutu Jožef Stefan so pripravili mutante 3dg, ΔN , 3dg ΔN in 2dg ΔN . Postopek je bil sestavljen iz priprave mutantov z metodo verižne reakcije s polimerazo in uvedbo prekrivajočih se oligonukleotidnih podaljškov v to reakcijo. Pri tej metodi so poleg klasičnih 5'-končnega smerneg oligonukleotida in 3'-končnega protismernega oligonukleotida v reakcijo uvedli še 5' smerni mutirani oligonukleotid in 3' protismerni mutirani oligonukleotid. Z mutiranimi oligonukleotidoma so povzročili mutacije N61S, N62S in N115S ki se kažejo na proteinu po translaciji. Na mestu cDNA kjer je zapis za končni histidin, so pripeli še označevalec z zaporedjem za 5 histidinov. Na 5' in 3' konec cDNA so bila uvedena tudi prepoznavna mesta za restriktijske endonukleaze zaradi vstavitve zaporedja v plazmid. Izvedena je bila transfekcija celic Freestyle HEK293F s plazmidno DNA po navodilih proizvajalca. Po gojenju celic so zbrali celično gojišče in tako zbrali rekombinantne proteine 3dg in ΔN ter same celice, v katerih sta se nahajala proteina 3dg ΔN in 2dg ΔN .

10	20	30	40	50	
MRAAGTLLAF	CCLVLSTTGG	PSPDTCSQDL	NSRVKPGFPK	TIKTNDPGVL	
60	70	80	90	100	
QAARYSVEKF	NNCT <u>N</u> DMFLF	KESRITRALV	QIVKG L KYML	EVEIGRTTCK	
110	120	130	140		
KNQHLRLDDC	DFQTNHTLQ	TLSCYSEVWW	V P WLQHFEVP	VLRCH	
20	30	40	50		
	G	PSPDTCSQDL	NSRVKPGFPK	TIKTNDPGVL	
60	70	80	90	100	
QAARYSVEKF	SS CT <u>N</u> DMFLF	KESRITRALV	QIVKG L KYML	EVEIGRTTCK	
110	120	130	140		
KNQHLRLDDC	DFQT <u>S</u> HTLQ	TLSCYSEVWW	V P WLQHFEVP	VLRCHHHHHH	3dg
60	70	80	90	100	
QAARYSVEKF	NNCT <u>N</u> DMFLF	KESRITRALV	QIVKG L KYML	EVEIGRTTCK	
110	120	130	140		
KNQHLRLDDC	DFQTNHTLQ	TLSCYSEVWW	V P WLQHFEVP	VLRCHHHHHH	ΔN
60	70	80	90	100	
QAARYSVEKF	SS CT <u>N</u> DMFLF	KESRITRALV	QIVKG L KYML	EVEIGRTTCK	
110	120	130	140		
KNQHLRLDDC	DFQT <u>S</u> HTLQ	TLSCYSEVWW	V P WLQHFEVP	VLRCHHHHHH	3dgΔN
60	70	80	90	100	
QAARYSVEKF	SS CT <u>N</u> DMFLF	KESRITRALV	QIVKG L KYML	EVEIGRTTCK	
110	120	130	140		
KNQHLRLDDC	DFQTNHTLQ	TLSCYSEVWW	V P WLQHFEVP	VLRCHHHHHH	2dgΔN

Slika 6: Aminokislinsko zaporedje mutantov cistatina F. Prvo aminokislinsko zaporedje predstavlja nativni cistatin F, sledijo mu zaporedja mutantov 3dg, ΔN, 3dgΔN in 2dgΔN. Z rdečo označeni AK predstavljajo mesta mutageneze. Z modro so označena mesta, s katerimi se cistatin F veže v aktivacijsko mesto C1 cisteinskih proteaz. Podčrtani AK predstavljajo mesto vezave na legumain z asparaginom, označenim z vijoličasto barvo, ki je najbolj pomemben za vezavo. Zeleno označeni histidinski AK predstavljajo označevalec His.

3.2.2 Priprava celičnih lizatov s sonifikacijo

Mutanta 3dgΔN in 2dgΔN se nahajata znotrajcelično, zato smo morali pred izolacijo izvesti še lizo celic. Za uspešnost izolacije je ta korak zelo pomemben, saj moramo zagotoviti, da protein v kar največji meri sprostimo iz celice in tako povečamo izkoristek končne izolacije. Z lizirnim pufrom zagotovimo primeren pH in ionsko jakost ter tako stabiliziramo vzorec. Dodamo pa tudi mešanico proteaznih inhibitorjev za inhibicijo proteolitičnih encimov.

Izvedba

Celice smo 48 ur po transfekciji centrifugirali 5 min pri 900 obr./min, odstranili gojišče in posedene celice sprali s PBS ter jih zmrznili na -80 °C. Pred izolacijo proteina smo celice odmrznili in resuspendirali pelet v 10 ml ledeno mrzlega lizirnega pufra, kateremu smo dodali eno tabletko mešanice proteaznih inhibitorjev. Lizo celic smo pospešili s sonifikacijo. Vzorec smo sonificirali 5-krat po 30 s, sonifikator pa nastavili na intenziteto 80 % in 0,75 ciklov. Pri tem smo pazili, da se vzorec ni segrel, zato smo sonifikacijo izvajali na ledu z vmesnimi približno eno minutnimi prekinitvami. Celični lizat smo nato razdelili v alikvote po 1,5 ml in centrifugirali 20 min pri 4 °C in 20.000 obr./min. Supernatant smo shranili za nanos na kolono za izolacijo.

3.2.3 Izolacija mutantov cistatina F s Co²⁺ afinitetno kromatografijo

Co²⁺ afinitetna kromatografija je ena izmed različic afinitetne kromatografije z imobiliziranim kovinskim ionom, ki jo uporabljamo za čiščenje rekombinantnih proteinov z vezanimi histidini. Poleg Co²⁺ lahko kot alternativna vezova iona uporabimo tudi Zn²⁺, Ni²⁺ ali Cu²⁺. Izolacija temelji na reverzibilni vezavi Co²⁺ iona na nosilcu s histidini rekombinantnega proteina. Rekombinantne proteine lahko pripravimo tako, da jim dodamo 6–10 histidinov, zaradi česar imajo večjo afiniteto do nosilca kot drugi proteini, ki nimajo zaporedno dodanih histidinov. Z dodatkom kompetitivnih molekul, kot je imidazol, povzročimo odcepitev vezanih proteinov z nosilca. Odcepitev je možna tudi s povišanjem ionske jakosti ali z

znižanjem pH elucijskega pufra. Izbira je odvisna od proteina, ki ga želimo izolirati. Metoda omogoča visoko selektivnost in velik izkoristek izolacije (41).

Izvedba

Proteine 3dg, ΔN , 2dg ΔN in 3dg ΔN smo izolirali z uporabo Co^{2+} afinitetne kromatografije po splošnem protokolu, posebnosti v izolaciji posameznih mutantov pa so zbrane v preglednici II. Najprej smo pripravili vezavni in elucijski pufer. Sledila je priprava kolone. Skozi plastično kolono smo spustili vezavni pufer, da se je filter dobro omočil. Nato smo napipetirali 6 ml že pripravljenega sefaroznega nosilca in ga predinkubirali s 60 ml (20 volumnov nosilca) vezavnega pufra. Ko je pufer odtekel, smo plastično kolono zamašili ter nanesli predhodno ustrezno obdelan vzorec (preglednica I). Sledila je inkubacija na stresalniku in ledu. S tem omogočimo boljšo vezavo označenih proteinov na nosilec in preprečimo proteolizo. Po inkubaciji smo zbrali prvo frakcijo – nevezane proteine. Nato smo zopet nanesli 10 ml vzorca na kolono ter ponovili inkubacijo. Sledilo je novo zbiranje nevezane frakcije. Ko je bila frakcija zbrana, smo skozi kolono spustili 45 ml vezavnega pufra (15 volumnov nosilca) ter kolono spirali, da so se sprali vsi nevezani proteini. Zbrali smo dve frakciji in ju poimenovali Spiranje 1 in Spiranje 2. Sledila je elucija. Nanesli smo 6–12 ml elucijskega pufra (2–4 volumna nosilca) in zbrali frakcijo Elucija 1. Zopet smo nanesli elucijski pufer, (2 volumna nosilca) nosilec v koloni rahlo premešali ter inkubirali 30–40 min na ledu v pokončnem položaju. Po inkubaciji smo zbrali frakcijo Elucija 2. Eluciji 1 in Eluciji 2 smo dodali vezavni pufer v razmerju 1 : 3. Na ta način smo zmanjšali učinek imidazola, saj ta vpliva na stabilnost proteina. Ti dve frakciji smo nato še skoncentrirali. Sledilo je spiranje s 60 ml vezavnega pufra – frakciji Spiranje po eluciji 1 in 2. Kolono smo še dodatno spirali z vezavnim pufrom, vsaj z 20 volumni nosilca. Skozi kolono smo spustili 5 volumnov regeneracijskega pufra, nato 5 volumnov MiliQ vode, ter kolono shranili v 20-odstotnem etanolu na 4 °C.

Preglednica I: Posebnosti v protokolu za izolacijo posameznih mutantov

	3dg	ΔN	2dg ΔN	3dg ΔN
Priprava vzorca	Centrifugiranje 4000 obr./min, 5 min, 4 °C + 400 mM NaCl v vzorec	Centrifugiranje 4000 obr./min, 5 min, 4 °C + 400 mM NaCl v vzorec	Lizirni pufer Sonifikacija 5-krat po 30 s na ledu Centrifugiranje 20000 obr./min, 20 min, 4 °C + 5 mM imidazol	Lizirni pufer Sonifikacija 5-krat po 30 s na ledu Centrifugiranje 20000 obr./min, 20 min, 4°C + 5 mM imidazol
Predinkubacija kolone	Vezavni pufer	Vezavni pufer	Vezavni pufer Lizirni pufer + 5 mM Imidazol	Vezavni pufer Lizirni pufer + 5 mM Imidazol
Nanos 1	Inkubacija 30 min na stresalniku na ledu	Inkubacija 30 min	Inkubacija 40 min	Inkubacija 40 min
Nanos 2	Inkubacija 30 min	Inkubacija 30 min	Inkubacija 40 min	Inkubacija 40 min
Spiranje 1	Vezavni pufer	Vezavni pufer	Vezavni pufer + 5 mM Imidazol	Vezavni pufer + 20 mM Imidazol
Spiranje 2	Vezavni pufer	Vezavni pufer	Vezalni pufer+ 5 mM Imidazol	Vezavni pufer
Elucija 1	Elucijski pufer Po zbrani frakciji dodatek vezavnega pufra v razmerju 1 : 3 Koncentriranje	Elucijski pufer Po zbrani frakciji dodatek vezavnega pufra v razmerju 1 : 3 Koncentriranje	Elucijski pufer Po zbrani frakciji dodatek vezavnega pufra v razmerju 1 : 3 Koncentriranje	Elucijski pufer Po zbrani frakciji dodatek vezavnega pufra v razmerju 1 : 3 Koncentriranje
Elucija 2	Po 1 h inkubaciji v elucijskem pufru v pokončnem položaju na ledu	Po 1 h inkubaciji v elucijskem pufru v pokončnem položaju na ledu	Po 1 h inkubaciji v elucijskem pufru v pokončnem položaju na ledu	Po 1 h inkubaciji v elucijskem pufru v pokončnem položaju na ledu
Spiranje po eluciji 1	Vezavni pufer	Vezavni pufer	Vezavni pufer	Vezavni pufer
Spiranje po eluciji 2	Vezavni pufer	Vezavni pufer	Vezavni pufer	Vezavni pufer

3.2.4 Koncentriranje vzorcev

Po Co^{2+} afinitetni kromatografiji je bilo potrebno vzorce pred elektroforezno ločbo in encimskimi testi skoncentrirati. Pred elektroforezno ločbo smo Elucije 1 in 2 redčili v vezavnem pufru v razmerju 1 : 3. Pred encimskimi testi pa smo vzorcem dodali 10-kratni volumen fosfatnega pufra s $\text{pH} = 6,8$ in vse vzorce skoncentrirali do volumna 0,5 ml. Uporabili smo centrifugirke s filtrom, ki zadrži proteine $> 3 \text{ kDa}$. Centrifugirali smo pri 4000 G, dokler nismo dobili želenega volumna.

3.2.5 Merjenje koncentracije proteinov

Merjenje celokupne koncentracije proteinov smo izvedli z metodo, ki temelji na Lowrijevem principu. Pri tej metodi Cu^{2+} ioni bakrovega tartrata v alkalnem tvorijo kompleks z dušikom peptidnih vezi. Novonastali Cu^+ ioni katalizirajo oksidacijo aromatskih skupin tirozina in triptofana in v manjši meri reagirajo tudi cistein in histidin. Sledi redukcija Folinovega reagenta s kompleksom proteina in bakrovih ionov. Pri tem Folinov reagent izgubi kisikove atome fosfovolframove in fosfomolibdenske kisline, kar vidimo kot spremembo barve v modro. Reakcijo lahko izmerimo spektrofotometrično pri 750 nm (42).

Izvedba

Najprej smo pripravili standardne raztopine za izris umeritvene krivulje. Kot standard smo uporabili goveji serumski albumin ter pripravili 6 standardov v koncentracijskem območju 0,0125–0,4 mg/ml v vezavnem pufru za frakcije Nevezano 1 in 2, Spiranje 1 in 2, Spiranje po eluciji 1 in 2 ter v elucijskem in vezavnem pufru v razmerju 1 : 3 za vzorce koncentrirana Elucija 1 in 2 ter filtrate koncentriranih Elucij 1 in 2. Pripravili smo tudi 4 standarde v koncentracijskem območju 0,2–1,6 mg/ml v lizirnem pufru z dodanim 5 mM imidazolom za vzorce nanos in frakcije Nevezano 1 in 2 za mutanta 3dgΔN in 2dgΔN. Test smo izvajali na brezbarvni mikrotitrski ploščici s 96 vdolbinami. Meritve za vsak vzorec, kontrole in standarde smo izvedli v triplikatih. Na ploščico smo napipetirali 5 μl vzorca ali standarda. Dodali smo 25 μl reagenta A (bakrov tartrat v alkalnem gojišču). Za meritve koncentracij

vzorcev, ki so vsebovali detergent, smo morali reagentu A dodati še reagent S (SDS) v razmerju 20 µl na 1 ml reagenta A. Na koncu smo dodali še 200 µl reagenta B (Folinov reagent). Pripravili smo tudi slepo kontrolo za standarde in za vzorce. Mikrotitrsko ploščico smo stresali 5 sekund, da so se reagenti premešali. Po 15 minutah inkubacije smo merili absorbanco pri 750 nm. Reakcija je stabilna 1 uro, potem pa se vrednosti spremenijo za 5 %.

3.2.6 SDS-PAGE

Z metodo poliakrilamidne gelske elektroforeze (PAGE) lahko v prisotnosti električnega polja ločujemo proteine glede na njihovo velikost, obliko in naboj. Molekule potujejo po nosilcu iz poliakrilamida od negativne katode k pozitivni anodi. Ob dodatku natrijevega dodecil sulfata (SDS) vzorcu, poliakrilamidnemu gelu in pufru za elektroforezo se ločijo le glede na njihovo velikost, saj SDS povzroči linearizacijo proteina in mu da negativni naboj. S pomočjo standardov lahko določimo velikosti ločenih proteinov. Poleg denaturacije z SDS lahko uporabimo tudi predobdelavo vzorca pod visoko temperaturo. Elektroforeza lahko poteče pod reducijajočimi ali nereducirajočimi pogoji. Ob dodatku reducenta podremo disulfidne vezi in tako terciarno strukturo proteina (44).

Izvedba

Z metodo SDS-PAGE smo ločili proteine iz zbranih frakcij po Co^{2+} afinitetni kromatografiji. Vzorcem smo pred izvedbo elektroforeze izmerili celokupno koncentracijo proteinov z metodo po Lowriju. Pripravili smo gele, nato smo mešanico vzorca in 5-kratnega nanašalnega pufra 10 sekund stresali in kratko centrifugirali, segrevali 10 min na 100 °C, ter zopet 10 s stresali in kratko centrifugirali. Na gele smo nanesli standarde in vzorce. Elektroforeza je potekala brez reducenta, razen pri vzorcu 2dgΔN, kjer smo dodali 50 mM DTT, da bi preverjali prisotnost dimerov. Elektroforeza je potekala pri stalnem toku 30 mA/gel v pufru za elektroforezo.

3.2.7 Barvanje s srebrovim nitratom

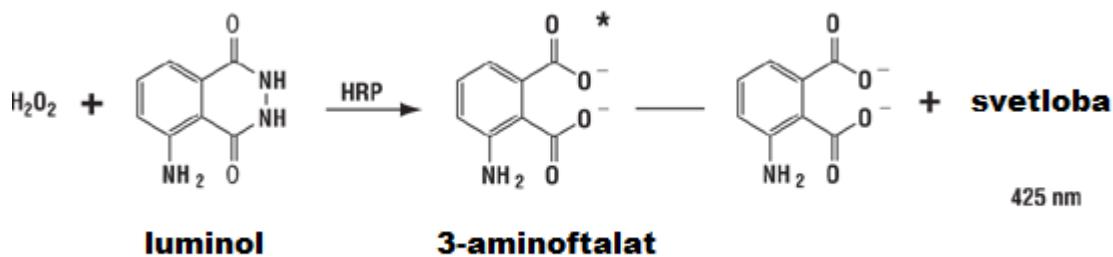
Barvanje poliakrilamidnih gelov s srebrovim nitratom po elektroforezni ločbi proteinov nam omogoča detekcijo nanogramskeih vrednosti proteinov. Ta metoda je sestavljena iz več stopenj, ki si sledijo v vrstnem redu – fiksacija, spiranje, senzitizacija, spiranje, impregnacija, spiranje, razvijanje slike, zaustavitev reakcije in končno spiranje (43).

Izvedba

Poliakrilamidni gel smo po elektroforezni ločbi prenesli v stekleno petrijevko. V digestoriju smo dodali raztopino za fiksacijo ter gele čez noč stresali na orbitalnem stresalniku. Drugi dan smo raztopino v petrijevki odlili in spirali s 50-odstotnim etanolom 3-krat po 20 min. Nato smo gel stresali 1 min v raztopini za senzitizacijo in spirali z MiliQ vodo 3-krat po 20 sekund. Sledila je 20-minutna impregnacija z raztopino srebrovega nitrata v temi – petrijevko smo postavili na orbitalni stresalnik in jo pokrili z aluminijasto folijo, nakar smo zopet spirali z MiliQ vodo 2-krat po 30 s. Sledilo je razvijanje slike pod UV-svetlobo. Slike smo posneli v intervalih po 1 min. Odlili smo raztopino in zaustavili reakcijo z reagentom za zaustavljanje reakcije. Po 10 min smo gel sprali s 50-odstotnim etanolom in ga shranili.

3.2.8 Prenos western

Presnos western je imunski test, s katerim določimo proteine po elektroforezni ločbi. V ta namen jih prenesemo na nosilec, ki je lahko nitrocelulozna, najlonska ali PVDF-membrana. Proteine nato detektiramo s pomočjo specifičnih protiteles. Prisotnost imunskega kompleksa pa določimo s pomočjo encimske reakcije, kemoluminiscenčno (slika 7) ali fluorescenčno (44, 45). V našem primeru smo uporabili določanje s kemoluminiscenco.



Slika 7: Kemoluminiscenčna reakcija encima HRP z luminolom (45). Po cepitvi vodikovega peroksida s HRP poteče oksidacija luminola. Tvorí se 3-aminoftalat, ki je v vzbujenem stanju. Ko se vrača v osnovno stanje, oddaja svetlobo, ki jo lahko merimo pri 425 nm.

Izvedba

Gele smo po elektroforezni ločbi za 10 min postavili v ledeno mrzli pufer za prenos, nato pa v kadički z ledeno mrzlim pufrom sestavili tesen kompleks, sestavljen iz mrežice, filter papirja, gela, nitrocelulozne membrane ter zopet filter papirja in mrežice. Z valjarjem smo zagotovili, da v kompleksu ni bilo zračnih mehurčkov. Prenos je potekal na ledu 90 min pri konstantnem toku 200 mA. Pripravili smo 5-odstotno mleko v prahu v PBS, s katerim smo 45–60 min blokirali mesta na membrani, kjer ni bilo prenesenih proteinov. Primarna protitelesa (kunčja poliklonska protitelesa proti cistatinu F) smo redčili 1 : 375 v PBS in membrano inkubirali čez noč na stresalniku v hladni sobi. Nevezana primarna telesa smo spirali 3-krat po 10 min v PBS. S HRP označena sekundarna protitelesa proti kunčjim protitelesom smo s PBS redčili v razmerju 1 : 5000 in inkubirali membrano 120 min na stresalniku na sobni temperaturi. Po končani inkubaciji smo membrano spirali 3-krat po 10 min v PBS. Na membrano smo nanesli substrat za HRP (peroksidni reagent) in luminol z ojačevalcem reakcije, inkubirali 5 min in merili kemoluminiscenco.

3.2.9 Barvanje z barvilm R-250 Coomassie modro

Barvilo Coomassie modro omogoča nespecifično barvanje proteinov. Negativno nabite SO^{3-} -skupine barvila se vežejo s pozitivno nabitimi aminskimi skupinami proteina z ionskimi vezmi. Trp in Phe AK pa se z barvilm vežejo z interakcijami $\pi-\pi$. Z barvanjem lahko zaznamo 1 μ g proteina (46).

Izvedba

Uspešnost prenosa proteinov s poliakrilamidnega gela na nitrocelulozno membrano smo preverjali z barvanjem z R-250 Coomassie modrim. Gel smo barvali z enakim razmerjem barvila in 20-odstotne ocetne kisline 1 uro na stresalniku. Gele smo nato postopoma razbarvali v 30-odstotni razbarvalni raztopini 1 uro in 10-odstotni razbarvalni raztopini čez noč.

3.2.10 Encimski testi inhibicije legumaina in katepsina H

Cistatin F je inhibitor legumaina in katepsina H. Encima ob dodatku substrata tvorita produkt, ki ga spektrofotometrično zaznamo kot povišanje absorbance. Če pa je encim zavrt z inhibitorjem, se produkt ne tvori in je absorbanca zmanjšana sorazmerno s količino inhibitorja. Rezultate vzorcev vrednotimo glede na vrednosti pozitivne in negativne kontrole. Vrednosti, ki so nižje od vrednosti pozitivne kontrole, veljajo za pozitivne in nakazujejo na prisotnost inhibitorja.

Izvedba testa inhibicije legumaina z mutanti 3dg, 2dgΔN in 3dgΔN

Pripravili smo pufer za legumain. Pred poskusom smo pripravili še pufer z DTT za redčenje legumaina in substrata. Aparaturo smo nastavili na $\lambda_{eks} = 370 \pm 2,5$ nm in $\lambda_{em} = 460 \pm 2,5$ nm ter temperaturo 30 °C, čas meritve 30 min in opredelili tip plošče (Greiner 96 Flat Bottom Black Polystyrol). Na mikrotitrsko ploščo smo napipetirali 20, 16 in 4 µl vzorca s posameznim mutantom cistatina F ter dodali fosfatni pufer do končnega volumna 20 µl. Tako smo pripravili tri različne koncentracije za posamezni mutant. Vsako koncentracijo smo merili v triplikatih. 4 µl legumaina smo razredčili s 16 µl pufra za legumain z dodanim DTT. V vdolbinice smo napipetirali 20 µl raztopine legumaina in premešali z rahlim tresenjem. Sledila je 15-minutna inkubacija v plošči s pokrovom. Pred meritvijo smo pripravili 12,5 µM substrat z redčenjem založne raztopine v pufru z dodanim DTT. V vsako vdolbino smo po inkubaciji dodali 40 µl substrata, premešali s tresenjem in začeli meritev. Pozitivno kontrolo smo pripravili s pipetiranjem 20 µl fosfatnega pufra pH = 6,8 + 20 µl legumaina + 40 µl substrata +

1 μ l inhibitorja MCP. Negativna kontrola je bila sestavljena iz 20 μ l fosfatnega pufra pH = 6,8 + 20 μ l legumaina + 40 μ l substrata, slepa kontrola pa iz 20 μ l pufra brez DTT + 40 μ l substrata. Vrednostim dobljenih absorbanc vzorca pozitivne in negativne kontrole smo odšteli vrednost slepe kontrole. Nato smo dobljenim vrednostim izračunali povprečno vrednost. Izrisali smo grafe povprečnih absorbanc v odvisnosti od časa.

Izvedba testa inhibicije legumaina z mutantom Δ N

Test je potekal po enakem protokolu kakor za mutante 3dg, 2dg Δ N in 3dg Δ N vendar z določenimi spremembami v količinah. Na mikrotitrsko ploščo smo napipetirali 25 μ l vzorca z mutantom. 5 μ l legumaina smo razredčili z 20 μ l pufra za legumain z dodanim DTT. V vdolbinice smo napipetirali 25 μ l raztopine legumaina in premešali z rahlim tresenjem. V vsako vdolbino smo po inkubaciji dodali 50 μ l substrata. Pozitivno kontrolo smo pripravili s pipetiranjem 25 μ l pufra za legumain + 25 μ l legumaina + 50 μ l substrata + 1 μ l inhibitorja MCP. Negativna kontrola je bila sestavljena iz 25 μ l pufra za legumain + 25 μ l legumaina + 50 μ l substrata, slepa kontrola pa iz 25 μ l pufra za legumain brez DTT + 50 μ l substrata.

Izvedba testa inhibicije katepsina H

Pripravili smo testni pufer za katepsin H. Pred poskusom smo aparaturo za spektrofotometrično kinetično meritve nastavili na T = 30 °C, $\lambda_{eks} = 370 \pm 5\text{nm}$ in $\lambda_{em} = 460 \pm 5$ in čas meritve 30 min. Opredelili smo tudi tip uporabljene plošče (Greiner 96 Flat Bottom Black Polystyrol). Fosfatnemu pufru za razredčitev vzorca in testnemu pufru za razredčitve katepsina H in substrata smo pred poskusom dodali DTT. Na mikrotitrsko ploščico smo najprej napipetirali 30 μ l vzorca, razredčenega v fosfatnem pufru do koncentracij 0 (negativna kontrola), 60, 180 in 240 nM nato smo dodali 50 μ l 1 nM katepsina H. Na koncu smo razredčili še substrat in napipetirali 20 μ l 5 mM substrata. Slepko kontrolo smo pripravili iz 30 μ l fosfatnega pufra s 100 mM DTT, 50 μ l testnega pufra za katepsin in 20 μ l, 5 mM substrata. Vse meritve smo izvajali v triplikatih. Dobljene vrednosti absorbanc vzorcev in negativne

kontrole smo odšteli od povprečne vrednosti slepe kontrole, nato pa dobljenim vrednostim posameznih mutantov in negativne kontrole izračunali povprečno vrednost. Izrisali smo grafe povprečnih absorbanc v odvisnosti od časa za vsak mutant.

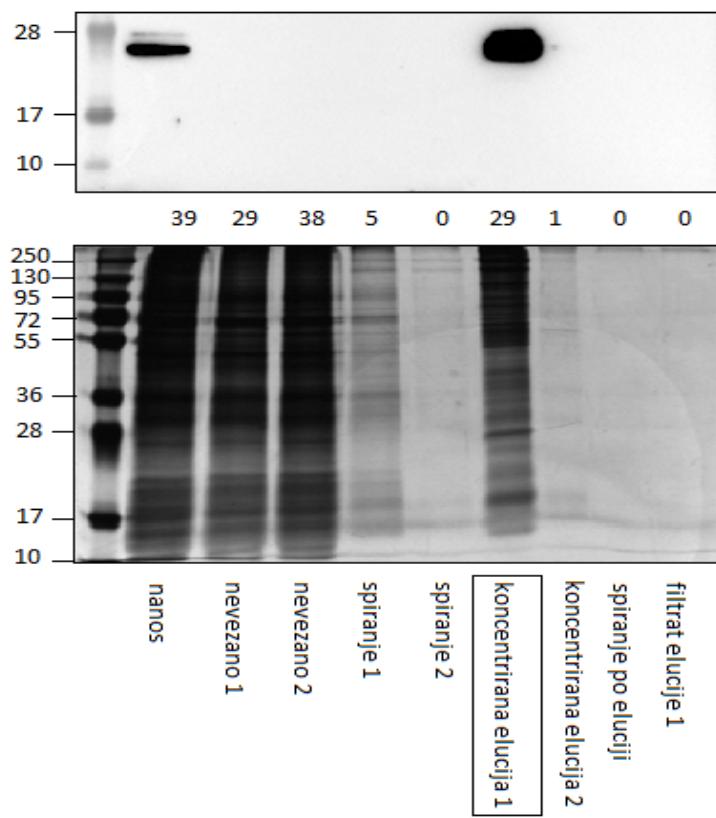
4 REZULTATI

4.1 Izolacija mutantov s Co^{2+} afinitetno kromatografijo

Mutanta 3dg in ΔN smo izolirali iz celičnega gojišča, 3dg ΔN in 2dg ΔN pa iz celic Freestyle HEK293F. Prisotnost mutantov v izhodiščnih vzorcih smo dokazali s prenosom western, čistost frakcij pa z barvanjem elektroforeznih gelov s srebrovim nitratom. Mase celokupnih proteinov v frakcijah, v katerih smo izolirali mutante, so bile 359 μg proteina 3dg, 204 μg proteina ΔN , 758 μg 2dg ΔN in 3493 μg 3dg ΔN . Molarne koncentracije končnih vzorcev, ki smo jih uporabili tudi za karakterizacijo, so bile 19,7 μM , 10,2 μM , 89 μM in 45 μM . Vrednosti so izračunane glede na predpostavke, da so proteini naslednjih velikosti: 3dg dimer 26 kDa, ΔN monomer 20 kDa, 3dg ΔN monomer 15,5 kDa in 2dg ΔN monomer 17 kDa. Velikosti mutantov so ocenjene glede na podatke, pridobljene s prenosom western.

4.1.1 Izolacija trojno deglikoziliranega cistatina F

Prvi izoliran protein je bil 3dg. Rezultati te metode izolacije so predstavljeni na sliki 8. Dokazali smo, da kapaciteta kolone po nanosu ni bila presežena, saj v frakcijah Nevezano 1 in Nevezano 2 ni bilo opaziti lis. S spiranjem smo sprali vse nevezane proteine, kar se vidi na sliki barvanja s srebrom. Sledila je Elucija 1, v kateri smo v celoti izolirali protein. Po enourni inkubaciji proteina v elucijskem pufru (Elucija 2) pa proteina ni bilo, zato ta stopnja ni potrebna. Preverili smo tudi frakcijo Spiranje po eluciji, ki tudi ni vsebovala proteina.

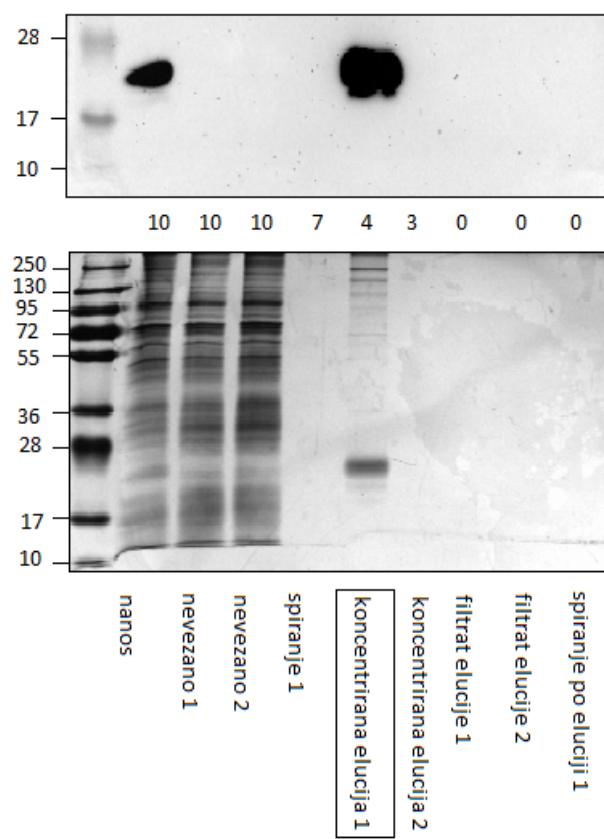


Slika 8: Frakcije po izolaciji mutanta 3dg s Co^{2+} afinitetno kromatografijo.

Zgoraj so prikazane slike, pridobljene s prenosom western, spodaj pa z barvanjem elektroforeznih gelov s srebrovim nitratom. Obkrožena je frakcija, ki smo jo v nadaljevanju uporabili za karakterizacijo z legumainom in katepsinom H.

4.1.2 Izolacija N-končno skrajšanega cistatina F

Drugi protein, ki smo ga izolirali, je bil ΔN . Uporabili smo enak protokol in pogoje kot pri izolaciji 3dg. Rezultati so prav tako kot pri 3dg pokazali, da nismo presegli kapacitete kolone, saj v frakcijah Nevezano 1 in Nevezano 2 nismo zaznali proteina ΔN . Tudi frakciji Spiranje in Spiranje po eluciji nista vsebovali proteina. V celoti smo ga namreč izolirali v frakciji Elucija 1. Tudi tokrat smo preverjali prisotnost proteina v frakciji Elucija 2, vendar ga tako kot pri 3dg v tej frakciji nismo dobili in smo ta korak v naslednjih nanosih na kolono izpustili. Čistost frakcije je bila zelo dobra, saj je vzorec vseboval le nekaj visokomolekularnih nečistoč.

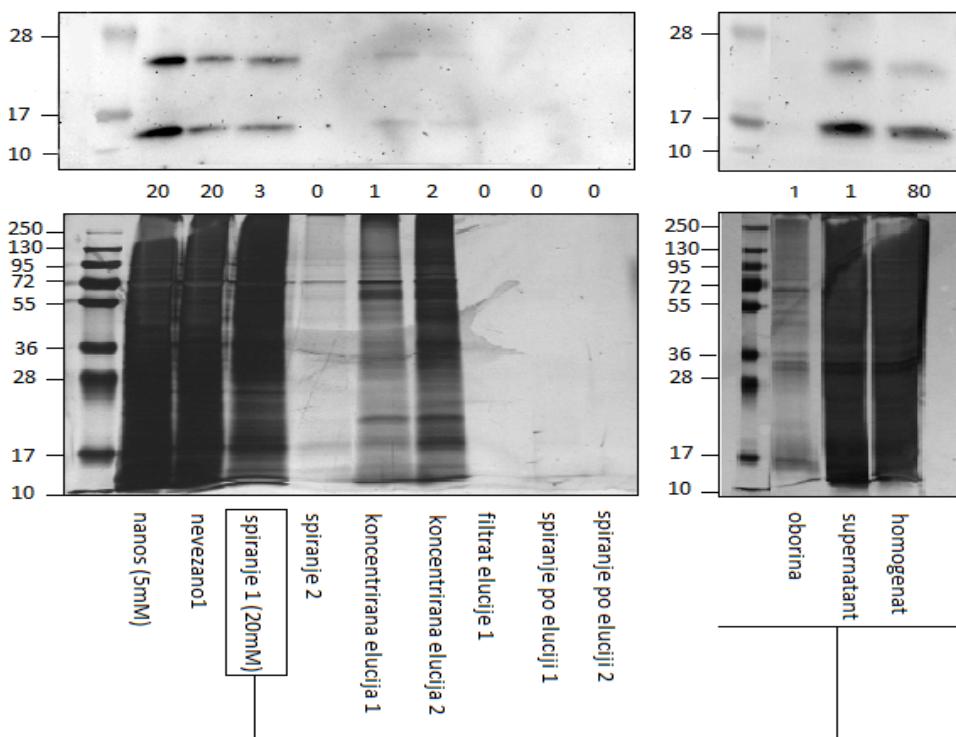


Slika 9: Frakcije po izolaciji mutanta ΔN s Co^{2+} afinitetno kromatografijsko. Zgoraj so prikazane slike, pridobljene s prenosom western, spodaj pa z barvanjem elektroforeznih gelov s srebrovim nitratom. Obkrožena je frakcija, ki smo jo v nadaljevanju uporabili za karakterizacijo z legumainom in katepsinom H.

4.1.3 Izolacija trojno deglikoziliranega N-končno skrajšanega cistatina F

3dgΔN smo izolirali iz celic, zato smo pričakovali, da se bo na kolono nespecifično vezalo več proteinov, ki na površini kažejo histidinske AK. Da bi vezavo preprečili, smo se odločili za spremembo protokola Co²⁺ afinitetne kromatografije. Po postopku lize celic smo v vzorec in pufer za predinkubacijo kolone pred nanosom vzorca dodali 5 mM imidazola. Prav tako smo protokol spremenili v koraku spiranja. V vezavni pufer smo namreč dodali 20 mM imidazol. Rezultati so pokazali, da je dodatek 5 mM imidazola v vzorcu in lizirnem pufru za predinkubacijo kolone povzročil, da se je poleg nečistoč, ki smo jih poskušali izločiti, izločil tudi protein 3dgΔN. Tudi izpiranje kolone z vezavnim pufrom z dodatkom 20 mM imidazola je bilo neustrezno, saj so se poleg nečistoč sprali tudi želeni proteini. V frakciji Elucija smo zaradi izgub v predhodnih frakcijah dobili zelo malo 3dgΔN, kar se vidi tudi na sliki po barvanju s srebrom. V frakciji Elucija 2 je bilo zelo malo proteina, s kolone pa so se sprale tudi ostale vezane nečistoče. V spiranju po eluciji pa specifičnega proteina nismo zasledili.

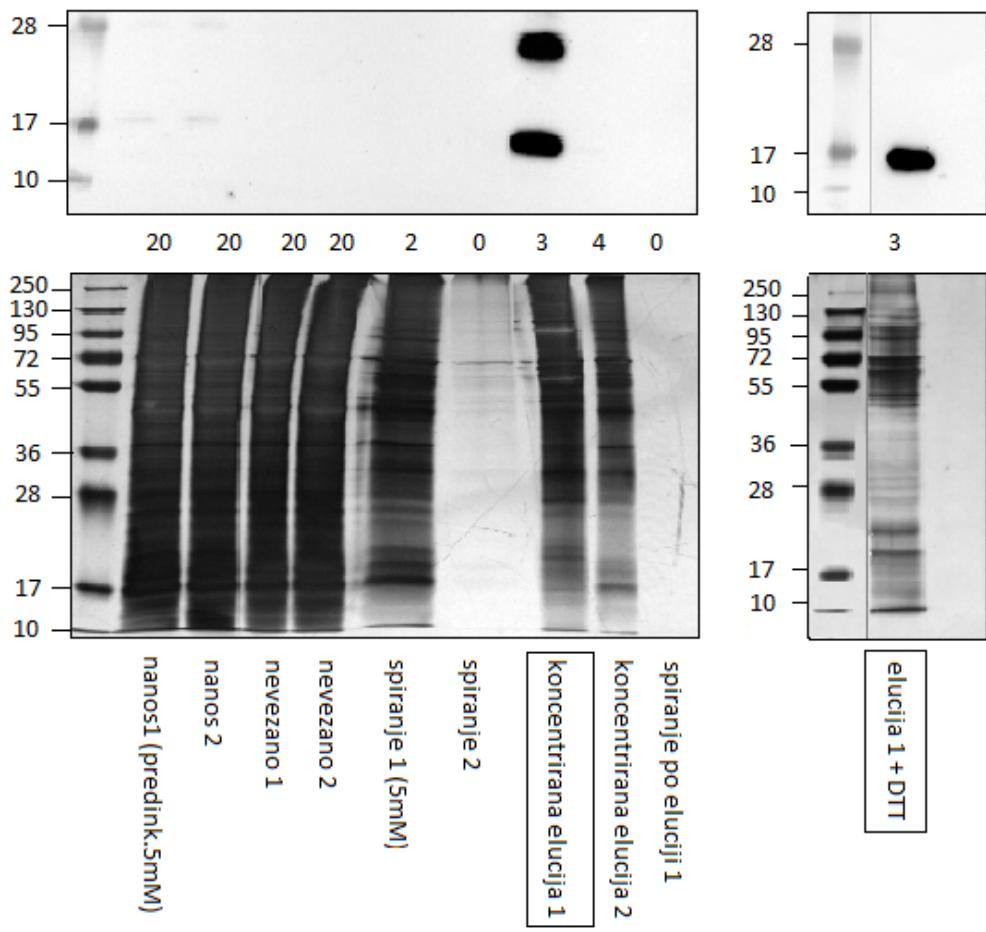
V primeru tega mutanta smo največ proteina izolirali v frakcijah Nevezano in Spiranje 1. Zato smo se odločili frakcijo Nevezano 1 zopet nanesti na kolono in poskušati protein izolirati po klasičnem protokolu – brez dodanega imidazola vzorcu. Vzorec smo redčili z vezavnim pufrom (10 volumnov frakcije), da bi odstranili imidazol iz vzorca. Vendar pa izolacija ni bila uspešna. Za karakterizacijo smo se zato odločili uporabiti frakcijo Spiranje1. Ker je ta frakcija vsebovala imidazol, smo vzorec redčili z vezavnim pufrom (10 volumnov vzorca) in vzorec koncentrirali. Ker se je v procesu koncentriranja ta frakcija oborila, smo se odločili preveriti, če se je oboril mutant ali kak drug protein. Ugotovili smo, da oborina ni vsebovala proteina.



Slika 10: Frakcije po izolaciji mutanta $3dg\Delta N$ s Co^{2+} afinitetno kromatografijo. Zgoraj so prikazane slike, pridobljene s prenosom western, spodaj pa z barvanjem elektroforeznih gelov s srebrovim nitratom. Desno je prikazana frakcija Spiranje 1 po centrifugiranju. Obkrožena je frakcija, ki smo jo v nadaljevanju uporabili za karakterizacijo z legumainom in katepsinom H.

4.1.4 Izolacija dvojno deglikoziliranega N-končno skrajšanega cistatina F

Protokol smo zaradi neustreznih pogojev pri izolaciji proteina $3dg\Delta N$ spremenili. Tokrat smo pri izolaciji $2dg\Delta N$ imidazol dodali le v pufer za predinkubacijo kolone in kolono po nanosu vzorca spirali z vezavnim pufrom, ki smo mu dodali 5 mM imidazol. Specifičnih lis v frakciji Nevezano ali Spiranje ni bilo videti, zato je pristop z dodatkom 5 mM imidazola ustrezен. Protein smo v celoti izolirali v frakciji Elucija 1. Tam sta se pokazali dve lis, kar bi lahko kazalo na prisotnost monomerne in dimerne oblike. Da bi potrdili kovalentno vezavo, smo vzorcu dodali 50 mM DTT in znova izvedli elektroforezno ločbo, prenos western in barvanje elektroforeznih gelov s srebrovim nitratom. Po redukciji smo po prenosu western dobili le eno liso.

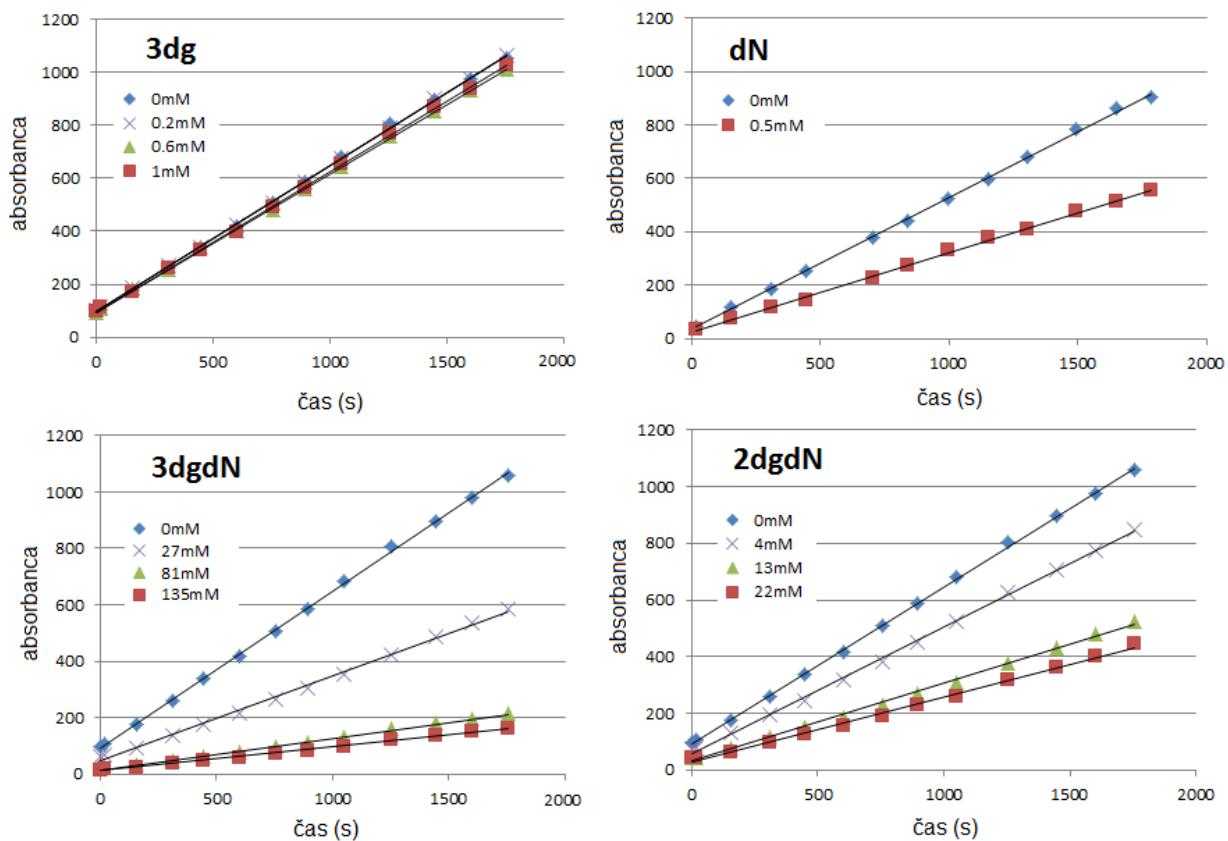


Slika 11: Frakcije po izolaciji mutanta $2dg\Delta N$ s Co^{2+} afinitetno kromatografijo. Zgoraj so prikazane slike, pridobljene s prenosom western, spodaj pa z barvanjem elektroforeznih gelov s srebrovim nitratom. Levo je prikazan prenos western pod nereducirajočimi pogoji, desno pa z dodatkom 50 mM DTT. Obkrožena je frakcija, ki smo jo v nadaljevanju uporabili za karakterizacijo z legumainom in katepsinom H.

4.2 Karakterizacija mutantov

4.2.1 Testi inhibicije legumaina z izoliranimi mutanti cistatina F

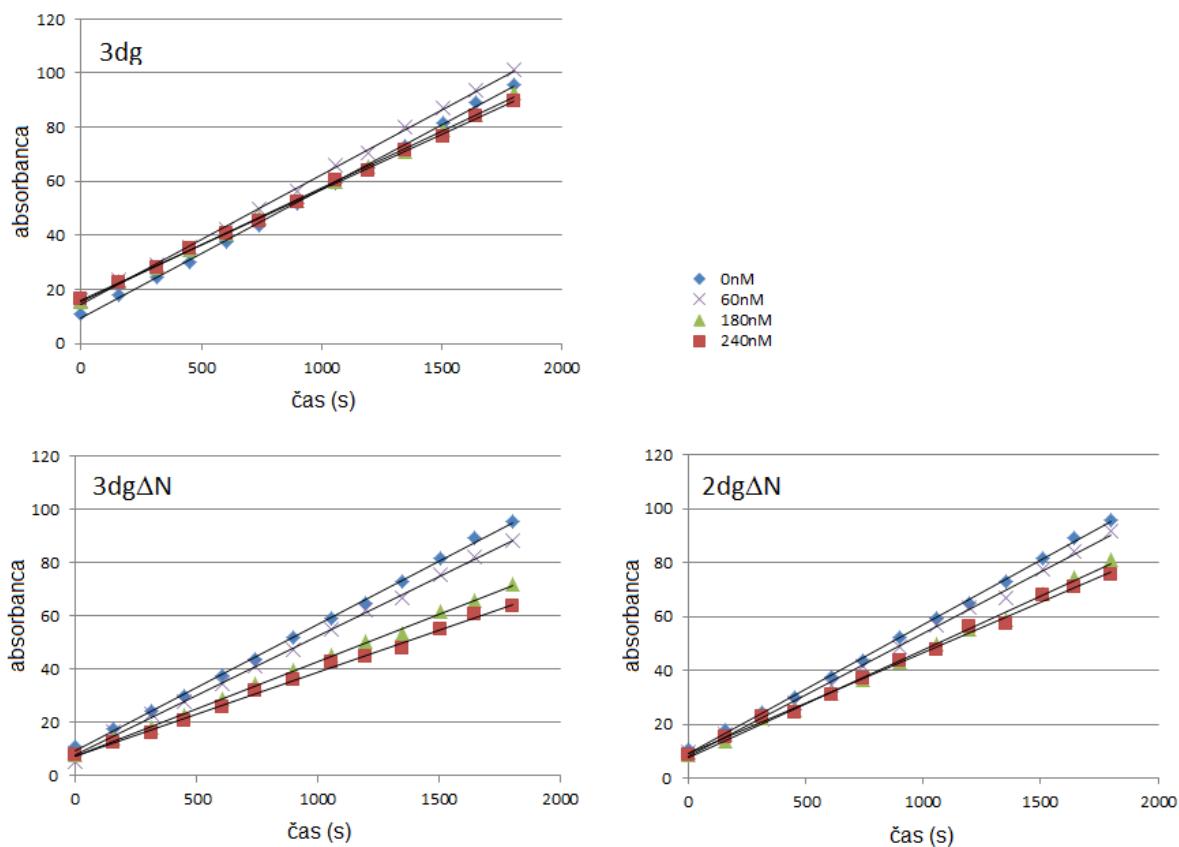
Mutanti ΔN , $3dg\Delta N$ in $2dg\Delta N$ so inhibirali legumain, medtem ko inhibicije z mutantom $3dg$ nismo zaznali. Vse vrednosti absorbanc negativne kontrole so bile višje kakor vrednosti vzorcev. Največjo inhibicijo je pokazal mutant ΔN , sledila sta mutanta $2dg\Delta N$ in $3dg\Delta N$.



Slika 12: Grafi inhibicije legumaina.

4.2.2 Testi inhibicije katepsina H z izoliranimi mutanti cistatina F

Mutanta 3dg Δ N in 2dg Δ N sta inhibirala katepsin H, medtem ko inhibicije z mutantoma 3dg in Δ N nismo zaznali. Graf inhibicije ob dodatku Δ N ni prikazan. Vse vrednosti absorbanc negativne kontrole so bile višje kakor vrednosti vzorcev. Inhibicija je bila največja pri dodatku 240 nM mutanta, manjša pri 180 nM in najmanjša pri 60 nM.



Slika 13: Grafi inhibicije katepsina H.

5 RAZPRAVA

Fiziološka vloga cistatina F je povezana z uravnavanjem delovanja celic imunskega sistema. Strukturni in glikozilacijski profil proteina neposredno vplivata na njegovo nahajanje in funkcijo. Potrebno je torej raziskati, kako različne oblike proteina vplivajo na njegovo funkcijo preko interakcije z njegovimi tarčami. V ta namen smo pripravljene mutante cistatina F 3dg, ΔN , 3dg ΔN in 2dg ΔN , označene s his-označevalcem, izolirali iz celičnega gojišča ali celičnega lizata celic Freestyle HEK293F z metodo Co^{2+} afinitetne kromatografije, uspešnost izolacije preverjali s prenosom western in barvanjem elektroforeznih gelov s srebrovim nitratom, nato pa preverili njihovo inhibitorno aktivnost na katepsin H in legumain.

Mutanta 3dg in ΔN sta se po izražanju v celicah Freestyle HEK293F nahajala v celičnem gojišču, 3dg ΔN in 2dg ΔN pa v celici. Po dosedanjih odkritijih bi pričakovali, da se bodo vsi mutanti, ki so bili deglikozilirani na mestih Asn 61 in 62 (3dg, 3dg ΔN in 2dg ΔN), zaradi nezmožnosti prehoda v lizosome izločili v celično gojišče (20). Vendar pa se to ni zgodilo. Vzrok za to je lahko več. Eden je lahko ta, da je bila preprečitev vezave sladkorjev povzročena z mutacijo Asn61Ser in Asn62Ser, serini pa se lahko fosforilirajo in omogočijo zadrževanje v celici. Potrebno bi bilo preveriti nahajališče mutantov v celici in izvesti mutacijo, ki ne omogoča fosforilacije.

Izolacija mutantov 3dg in ΔN z metodo Co^{2+} afinitetne kromatografije (3.2.3) iz celičnega gojišča je pričakovano dala dobre rezultate. Proteina smo namreč izolirali v relativno čisti obliki. Najbolj čist je bil vzorec ΔN , sledil je 3dg. Izolacija 2dg ΔN in 3dg ΔN pa je bila s tega vidika bolj problematična. Ta dva proteina smo izolirali iz celic, ob lizi celic pa so se poleg mutantov iz njih sprostili še ostali proteini, ki so se na nosilec vezali z normalno prisotnimi histidini. Problema smo se zavedali že pred izolacijo, zato smo poskušali ta pojav preprečiti z dodajanjem nizke koncentracije imidazola v stopnjah izolacije pred zbiranjem frakcije Elucija 1 (preglednica I). Imidazol namreč kompetitivno tekmuje s histidinom za vezavo na Co^{2+} kovinske ione nosilca, ker histidin v stranski verigi vsebuje imidazolno skupino in sta si strukturi podobni. Co^{2+} kovinski ioni, vezani na nosilec, vežejo histidin z majhno afinifeto,

vendar z veliko specifičnostjo. Za namen preprečitve vezave nespecifičnih proteinov na nosilec smo testirali dodatek 5 mM imidazola v vzorec pred nanosom na kolono, v pufer za predinkubacijo nosilca in v vezavni pufer v koraku spiranja nevezanih proteinov. Tak pristop se je izkazal za napačnega, saj smo poleg nečistoč s kolone sprali tudi naš protein. Odločili smo se za spremembo protokola in dodali 5 mM imidazol v pufer za predinkubacijo kolone in v koraku spiranja nevezanih proteinov. Ta se je izkazal za ustrezna. Nadalje smo problem vezanih nečistoč poskušali odpraviti s stopenjsko elucijo. Najprej smo poskušali eluirati nespecifično vezane proteine z 20 mM elucijskim pufrom, nato pa še rekombinantni protein s 400 mM elucijskim pufom. Vendar pa se je ob dodatku 20 mM imidazola eluiral tudi rekombinantni protein, zato je uporaba 20 mM imidazola neustrezna. Nespecifične vezave se lahko zgodijo tudi zaradi nespecifičnih ionskih ali hidrofobnih interakcij z nosilcem. Ionske interakcije preprečimo z dodatkom 500 mM NaCl v vezavnem pufu in 400 mM NaCl v vzorcu. V nadalnjih raziskavah bi lahko preizkusili še druge pristope, na primer uporabo etilen glikola ali glicerola za preprečitev hidrofobnih interakcij. Smiselno bi bilo tudi optimizirati volumne nanosa in nosilca. Po izolaciji mutantov 2dg Δ N in 3dg Δ N iz celičnih lizatov je lahko problematično tudi premreženje DNA z nosilcem. To lahko rešimo z ustrezno sonifikacijo pri lizi celic in dodatkom 500 mM NaCl in DNaze I (47).

Po izolaciji je sledilo preverjanje posameznih frakcij glede na prisotnost in čistost mutantov. 3dg smo izolirali v dimerni obliki, Δ N v monomerni obliki, 2dg Δ N in 3dg Δ N pa v monomerni in dimerni obliki. Slednje nas je presenetilo, saj je pogoj za tvorbo dimerov tvorba dveh disulfidnih vezi med Cys26 ene in Cys63 druge molekule (2). 2dg Δ N in 3dg Δ N obliki sta skrajšani in nimata Cys26, ki bi lahko tvoril disulfidno vez in s tem dimer. Proteina sta se lahko povezala preko obeh Cys63, vezava pa v tem primeru ni bila ovirana, saj mutanta nimata glikoziliranih Asn61 in Asn62.

Izolirane mutante smo okarakterizirali glede sposobnosti inhibicije legumaina in katepsina H. Znano je, da tako intaktna kot tudi N-končno skrajšana oblika cistatina F inhibirata katepsin H, ne inhibira ga dimerna oblika, ni pa znano, kako na to vplivajo razlike v glikozilaciji (16). Legumain inhibirajo vse oblike cistatina F, tudi dimer, saj se vezavno mesto nahaja na drugem

delu molekule kot vezavno mesto za proteaze C1. Pričakovali smo, da bodo vsi štirje mutantni inhibirali legumain, vendar pa je inhibicija potekla le pri mutantih ΔN , $2dg\Delta N$ in $3dg\Delta N$. Možno je, da je mutant $3dg$ nepravilno zvit, ali pa je prišlo do njegove inaktivacije med njegovo izolacijo. Rezultati inhibicije katepsina H v nasprotju s pričakovanji niso pokazali inhibitorne aktivnosti za mutanta ΔN in $3dg$, mutanta $2dg\Delta N$ in $3dg\Delta N$ pa sta inhibirala katepsin H. Vzrok za to, da ΔN in $3dg$ nista inhibirala katepsina H, je lahko podoben kot pri legumainu, le da je v tem primeru tudi vezavno mesto za katepsin H na mutantu ΔN nefunkcionalno.

6 SKLEPI

Izolirali in okarakterizirali smo $3dg$, ΔN , $3dg\Delta N$ in $2dg\Delta N$ mutante cistatina F, pri tem pa ugotovili značilnosti mutantov, ki so zanimive za dodatne raziskave.

Deglikozilacija mutantov lahko vpliva na tvorbo dimera. Mutanta $2dg\Delta N$ in $3dg\Delta N$ smo izolirali v monomerni in dimerni obliki. Presenetljivo je, da mutanta $2dg\Delta N$ in $3dg\Delta N$ kljub N-končnemu skrajšanju lahko tvorita dimer, pri čemer predvidevamo, da je dimerizacija posledica deglikozilacije mutantov.

Mutacija glikozilacijskih mest 61 in 62 na asparaginu s serinom lahko povzroči znotrajcelično zadrževanje proteina. Mutanta $2dg\Delta N$ in $3dg\Delta N$ se kljub deglikozilaciji na Asn61 in 62 nahajata znotrajcelično. Serin se lahko fosforilira in omogoči zadrževanje v celici.

Z inhibicijo legumaina in katepsina H smo okarakterizirali mutante. Največjo inhibicijo legumaina je pokazal mutant ΔN , sledila sta mutanta $2dg\Delta N$ in $3dg\Delta N$. Največjo inhibicijo katepsina H je pokazal mutant $2dg\Delta N$, sledil mu je $3dg\Delta N$. $3dg$ ni inhibiral niti legumaina niti katepsina H. Možno je, da je bil protein nepravilno zvit, ali pa je prišlo do deaktivacije v procesu izolacije.

Izolacijo mutantov bi lahko dodatno optimizirali in s tem prispevali k večjemu izkoristku in čistosti. Potrebno bi bilo preveriti nahajališče $2dg\Delta N$ in $3dg\Delta N$ mutantov v celici ter izvesti mutacijo, ki ne omogoča fosforilacije, da bi potrdili, da je zamenjava Asn s Ser vzrok za znotrajcelično zadrževanje mutantov.

Cistatin F ima veliko vlogo pri uravnavanju celic imunskega sistema. Poznavanje njegove strukture, funkcije posameznih strukturnih elementov in tarčnih proteinov, prispeva k boljšemu razumevanju mehanizmov uravnavanja delovanja imunskih celic.

7 LITERATURA

1. Rawlings N D, Barrett A J: Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *Journal of molecular evolution* 1990; 30: 60-71.
2. Halfon S, Ford J, Foster J, Dowling L, Lucian L, Sterling M, Xu Y, Weiss M, Ikeda M, Liggett D, Helms A, Caux C, Lebecque S, Hannum C, Menon S, McClanahan T, Gorman D, Helms, G Z A: Leukocystatin, a new class II cystatin expressed selectively by hematopoietic cells. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 16400-16408.
3. Langerholc T, Zavašnik B V, Turk B, Turk V, Abrahamson M, Kos J: Inhibitory properties of cystatin F and its localization in U937 promonocyte cells. *FEBS Journal* 2005; 272: 1535-1545.
4. Deloukas P, Matthews L H, Ashurst J, Burton J, Gilbert J G R, Jones M, ... Bailey J: The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20. *Nature* 2001 414: 865-871.
5. Magister S, Kos J: Cystatins in immune system. *J Cancer* 2013; 4: 45-56.
6. Ni J, Fernandez M A, Danielsson L, Chillakuru R A, Zhang J, Grubb A, Su J, Gentz R, Abrahamson M: Cystatin F is a glycosylated human low molecular weight cysteine proteinase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 24797-24804.
7. Nathanson C M, Wasselius J, Wallin H, Abrahamson M: Regulated expression and intracellular localization of cystatin F in human U937 cells. *European Journal of Biochemistry* 2002; 269: 5502-5511.
8. Obata O A, Hashimoto S I, Onai N, Kurachi M, Nagai S, Shizuno K I, Nagahata T, Matsushima K: Comprehensive gene expression analysis of human NK cells and CD8+ T lymphocytes. *International immunology* 2002; 14: 1085-1098.
9. Halfon S, Ford J, Foster J, Dowling L, Lucian L, Sterling M, Xu Y, Weiss M, Ikeda M, Liggett D, Helms A, Caux C, Lebecque S, Hannum C, Menon S, McClanahan T, Gorman D, Helms, G Z A: Leukocystatin, a new class II cystatin expressed selectively by hematopoietic cells. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273: 16400-16408.
10. Hashimoto S I, Suzuki T, Nagai S, Yamashita T, Toyoda N, Matsushima K: Identification of genes specifically expressed in human activated and mature dendritic cells through serial analysis of gene expression. *Blood* 2000; 96: 2206-2214.

11. Matthews S P, McMillan S J, Colbert J D, Lawrence R A, Watts C. Cystatin F Ensures Eosinophil Survival by Regulating Granule Biogenesis. *Immunity* 2016; 44: 795–806.
12. Abrahamson M, Fernandez A M, Nathanson C M: Cystatins. Biochemical Society Symposia Portland Press Limited 2003; 70: 179-199.
13. Alvarez F M, Barrett A J, Gerhartz B, Dando P M, Ni J, Abrahamson M: Inhibition of mammalian legumain by some cystatins is due to a novel second reactive site. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 19195-19203.
14. Hamilton G, Colbert J D, Schuetelkopf A W, Watts C: Cystatin F is a cathepsin C-directed protease inhibitor regulated by proteolysis. *The EMBO journal* 2008; 27: 499-508.
15. Maher K, Konjar S, Watts C, Turk B, Jerala R: Cystatin F regulates proteinase activity in IL-2-activated natural killer cells. *Protein and peptide letters* 2014; 21: 957-965.
16. Magister Š, Obermajer N, Mirković B, Švajger U, Renko M, Softić A, Romih R, Colbert J D, Watts C, Kos J: Regulation of cathepsins S and L by cystatin F during maturation of dendritic cells. *European journal of cell biology* 2012; 91: 391-401.
17. Rasmussen J R: Effect of glycosylation on protein function. *Current opinion in structural biology* 1992; 2: 682-686.
18. Warren C E: Glycosylation. *Current opinion in biotechnology* 1993; 4: 596-602.
19. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Molecular Biology of the Cell. 4th edition, Garland Science, New York 2002. Transport from the Trans Golgi Network to Lysosomes.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26844/> dostopno marec, 2016
20. Colbert J D, Plechanovová A, Watts C: Glycosylation directs targeting and activation of cystatin f from intracellular and extracellular sources. *Traffic* 2009; 10: 425-437.
21. Rawlings N D, Waller M, Barrett A J, Bateman A: MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: 503-509.
<https://merops.sanger.ac.uk/> dostopno: februar 2016

22. Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, Turk D: Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Proteins and Proteomics* 2012; 1824: 68-88.
23. Nanut P M, Sabotić J, Jewett A, Kos J, Murakami M, Vasiljeva O: Cysteine cathepsins as regulators of the cytotoxicity of NK and T cells. *Frontiers in immunology* 2014; 5.
24. May J C H E N, Fortunato M, Barrett A J: Activation of human prolegumain by cleavage at a C-terminal asparagine residue. *Biochemical Journal* 2000; 352: 327-334.
25. Noda S K, Yamamoto A, Sugihara K, Hashimoto N, Asano M, Nishimura M, Nishimura H I: Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 33194-33199.
26. Manoury B, Hewitt E W, Morrice N, Dando P M, Barrett A J, Watts C: An asparaginyl endopeptidase processes a microbial antigen for class II MHC presentation. *Nature* 1998; 396: 695-699.
27. Magister Š, Tseng H C, Bui V T, Kos J, Jewett A: Regulation of split anergy in natural killer cells by inhibition of cathepsins C and H and cystatin F. *Oncotarget* 2015; 6.
28. Schweiger A, Stabuc B, Popovic T, Turk V, Kos J: Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of total cathepsin H in human tissue cytosols and sera. *Journal of immunological methods* 1997; 201: 165-172.
29. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology
http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_CTSH.html#LINKS dostopno: maj 2016
30. D'Angelo M E, Bird P I, Peters C, Reinheckel T, Trapani J A, Sutton V R: Cathepsin H is an additional convertase of pro-granzyme B. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285: 20514-20519.
31. Hayashida M, Kawano H, Nakano T, Shiraki K, Suzuki A.: Cell death induction by CTL: perforin/granzyme B system dominantly acts for cell death induction in human hepatocellular carcinoma cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 2000; 225: 143-150.
32. Wagner C, Stegmaier S, Hänsch G M: Expression of granzyme B in peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (PMN), myeloid cell lines and in PMN derived from haemopoietic stem cells in vitro. *Molecular immunology* 2008; 45: 1761-1766.

33. Strik M C, de Koning P J, Kleijmeer M J, Bladergroen B A, Wolbink A M, Griffith J M, Wouters D, Fukuoka Y, Schwartz L B, Hack C E, van Ham S M, Kummer J A, van Ham S M: Human mast cells produce and release the cytotoxic lymphocyte associated protease granzyme B upon activation. *Molecular immunology* 2007; 44: 3462-3472.
34. Konjar Š, Sutton V R, Hoves S, Repnik U, Yagita H, Reinheckel T, Peters C, Turk V, Turk B, Trapani J A, Jerala R: Human and mouse perforin are processed in part through cleavage by the lysosomal cysteine proteinase cathepsin L. *Immunology* 2010; 131: 257-267.
35. Smyth M J, McGuire M J, Thia K Y: Expression of recombinant human granzyme B. A processing and activation role for dipeptidyl peptidase I. *The Journal of Immunology* 1995; 154: 6299-6305.
36. Colbert J D, Matthews S P, Kos J, Watts C: Internalization of exogenous cystatin F suppresses cysteine proteases and induces the accumulation of single-chain cathepsin L by multiple mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 2011; 286: 42082-42090.
37. Noda S K, Yamamoto A, Sugihara K, Hashimoto N, Asano M, Nishimura M, & Nishimura H I: Biosynthetic processing of cathepsins and lysosomal degradation are abolished in asparaginyl endopeptidase-deficient mice. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 33194-33199.
38. Cazalla D, Sanford J R, Cáceres J F: A rapid and efficient protocol to purify biologically active recombinant proteins from mammalian cells. *Protein expression and purification* 2005; 42: 54-58.
39. Portolano N, Watson P J, Fairall L, Millard C J, Milano C P, Song Y, Cowley S M, Schwabe J W: Recombinant protein expression for structural biology in HEK 293F suspension cells: a novel and accessible approach. *Journal of visualized experiments: JoVE* 2014; 92.
40. Sabotič J, Koruza K, Gabor B, Peterka M, Barut M, Kos J and Brzin J: The Value of Fungal Protease Inhibitors in Affinity Chromatography, *Affinity Chromatography*, Dr. Sameh Magdeldin (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/35354. <http://www.intechopen.com/books/affinity-chromatography/the-value-of-fungal-protease-inhibitors-in-affinity-chromatography>, dostopno maj 2016
41. Priročnik Affinity Chromatography handbook Principles and Methods:

http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/Affinity_chromatography_handbook.pdf,
dostopno april, 2016

42. DC Protein Assay navodila za uporabo:

http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9005.pdf, dostopno: april 2016

43. Chevallet M, Luche S, Rabilloud T: Silver staining of proteins in polyacrylamide gels.
Nature protocols 2006; 1: 1852-1858.

44. Priročnik Western bloting. Principles and Methods:

http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/13346133/litdoc28999897_20150330003035.pdf, dostopno: maj 2016

45. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemiluminescent-western-blotting.html>, dostopno: april 2016

46. <https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/staining-protein-gels-coomassie-blue>, dostopno maj: 2016

47. TALON Metal Affinity Resins navodila za uporabo:

https://www.google.si/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjV18LTqZDMAhWHaRQKHW3BtEQFggqMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.clontech.com%2Fxxclt_ibcGetAttachment.jsp%3FcItemId%3D17512&usg=AFQjCNFwiHCJKL0i4X3GmcJndTdSNvfZzQ&bvm=bv.119408272,d.bGg,
dostopno: april 2016