

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BERNARDA PETELINŠEK

VPLIV DOLŽINE MAŠČOBNOKISLINSKE VERIGE NA
ACILIRANEM CISTATINU NA NJEGOVO PREHAJANJE V
CELICO

INFLUENCE OF THE FATTY ACYL CHAIN LENGHT ON
ACYLATED CYSTATIN ON ITS INTERNALIZATION INTO
THE CELL

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom Nine Kočever, mag. farm.

ZAHVALA

Za strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem mentorju izr. prof. dr. Samu Kreftu, mag. farm. in somentorici Nini Kočever, mag. farm.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim na Katedri za farmacevtsko biologijo.

Hvala moji družini in fantu, ker ste mi stali ob strani in me vzpodbujali.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Sama Krefta, mag. farm. in somentorstvom Nine Kočever, mag. farm.

Ljubljana, februar 2008

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE	III
KAZALO SLIK	V
KAZALO PREGLEDNICE	VI
POVZETEK	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1. PROTEINI IN NJHOVA ZGRADBA	1
1.2. PROTEINI KOT UČINKOVINE	2
1.2.1. PROBLEMATIKA TERAPEVTSKIH PROTEINOV	2
1.2.1.1. HITRA ENCIMSKA RAZGRADNJA PROTEINOV	2
1.2.1.2. (NE)STABILNOST PROTEINOV	3
1.2.1.4. KRATEK RAZPOLOVNI ČAS	4
1.2.1.5. MULTIPOTENTNOST PROTEINOV	5
1.2.1.6. ANTIGENSKÉ LASTNOSTI PROTEINOV	5
1.2.2. PRISTOPI ZA POVEČANJE BIOLOŠKE UPORABNOSTI PROTEINOV	5
1.3. ACILIRANJE PROTEINOV	7
1.3.1. GLAVNI MEHANIZMI VEZAVE PROTEINOV Z VEZANIMI MAŠČOBNIMI KISLINAMI NA CELIČNO MEMBRANO	8
1.3.2. PRIMERI ACILIRANJA	9
1.4. PROTEINAZE	10
1.4.1. CISTEINSKE PROTEINAZE	10
1.5. CISTATINI – PROTEINSKI INHIBITORJI CISTEINSKIH PROTEINAZ	11
1.5.1. KOKOŠJI CISTATIN	12
1.5.2. MEHANIZEM INTERAKCIJE CISTEINSKIH PROTEINAZ IN KOKOŠJEGA CISTATINA	13
1.6. METODE UPORABLJENE PRI ANALIZI VZORCEV	15
1.6.1. KAPILARNA ELEKTROFOREZA	15
1.6.2. POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA LAVRILSULFATA (SDS-PAGE)	15
1.6.3. IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE (IEF)	16
2. NAMEN DELA	17
3. MATERIALI IN METODE DELA	18
3.1. REAGENTI IN PUFRI	18

3.2. OPREMA IN APARATURE	24
3.3. METODE DELA	25
3.3.1. ACILIRANJE KOKOŠJEGA CISTATINA	25
3.3.2. KAPILARNA ELEKTROFOREZA	26
3.3.3 SDS-PAGE	27
3.3.4 IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE	28
3.3.5. BARVANJE POLIAKRILAMIDNIH GELOV	28
3.3.6. ENCIMSKI PREIZKUS BANA	29
3.3.7. POSKUS NA CELIČNIH KULTURAH	30
4. REZULTATI IN DISKUSIJA	32
4.1. REAKCIJE ACILIRANJA CISTATINA IN KAPILARNA ELEKTROFOREZA	32
4.1. SDS-PAGE	40
4.3. IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE	42
4.4. ENCIMSKI PREIZKUS BANA	44
4.5. POSKUS NA CELIČNIH KULTURAH	45
5. ZAKLJUČEK	50
6. LITERATURA	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Tridimenzionalna zgradba kokošjega cistatina (29).	12
Slika 2: Model interakcije med kokošjim cistatinom in papainom (28); Q=Gln, G=Gly, P=Pro, W=Trp, A=Ala, C=Cys, L=Leu, V=Val.	14
Slika 3: Elektroferogram vzorcev C0 (črna krivulja) in C6 (rdeča krivulja). Acilirani cistatin je dodatni vrh pri 6. minuti (označen s puščico); nezreagirani cistatin (C0) predstavlja vrh pri 5,75 minuti. Pogoji analize: 50 mM boratni pufer (pH=9,3), injiciranje 40 mbar x 40 sekund, napetost 25 kV, temperatura 30 °C in valovna dolžina detekcije 200 nm; Ccistatina = 167 µg/mL.	33
Slika 4: Elektroferogram vzorcev C0 (črna krivulja) in C8 (rdeča krivulja). Acilirani cistatin predstavlja razširjen vrh pri 7,5 minuti (označen s puščico).	33
Slika 5: Elektroferogram vzorcev C0 (črna krivulja) in C10 (rdeča krivulja). Acilirani cistatin predstavlja vrh pri 6,75 minuti in 8,5 minuti (označena s puščico).	34
Slika 6: Elektroferogram vzorcev C0 (črna krivulja) in C12 (rdeča krivulja). Acilirani cistatin predstavlja vrh pri 9,5 minut (označen s puščico).	34
Slika 7: Elektroferogram vzorcev C0 (črna krivulja) in C14 (rdeča krivulja). Acilirani cistatin predstavlja položnejši vrh pri 9. minuti in 12. minuti (označena s puščico).	35
Slika 8: Elektroferogram vzorcev C0 (črna krivulja) in C16 (rdeča krivulja). Acilirani cistatin predstavlja položnejši vrh pri 7. minuti, 9. minuti, 11. minuti in 13,5 minuti (označeni s puščico).	35
Slika 9: Elektroferogram vzorcev C0 (črna krivulja) in C18 (rdeča krivulja). Acilirani cistatin predstavlja ozki vrh pri 6,25 minut, širši in položnejši pri 7. minuti ter višji vrh pri 8. minuti (označeni s puščico).	36
Slika 10: Elektroferogram vzorcev C8 (rdeča krivulja) in slepe 8 (modra krivulja). Karboksilna kislina je oster vrh pri 8,5 minuti (označen s puščico).	37
Slika 11: Elektroferogram vzorcev C0 (modra krivulja) in slepe 0 (rdeča krivulja).	37
Slika 12: Elektroferogrami aciliranega cistatina; črna krivulja C0, rdeča C12, modra C14 in zelena C16.	38
Slika 13: Elektroferogrami slepih vzorcev z različnimi maščobnokislinskimi kloridi (brez cistatina); modra krivulja slepa 6, rdeča slepa 8, zelena slepa 10, vijolična slepa 12, svetlo zelena slepa 14, temno vijolična slepa 16 in temno zelena slepa 18.	39
Slika 14: SDS-PAGE: 15-odstotni ločitveni gel, volumen nanosa 16 µL; koncentracija cistatina 38 µg/mL; volumen označevalca velikosti proteinov (M) 16 µL; barvanje s srebrovim nitratom; napetost 100 V.	40
Slika 15: SDS-PAGE: 10-odstotni ločitveni gel; volumen nanosa 16 µL; koncentracija cistatina 38 µg/mL; volumen označevalca velikosti proteinov (M) 16 µL; barvanje s srebrovim nitratom; napetost 100 V.	41
Slika 16: IEF: volumen nanosa 20 µL; koncentracija cistatina 83,5 µg/mL; volumen označevalca 10 µL; napetost: 1. uro 100 V, 2. uro 200 V in 30 minut 500 V; barvanje s srebrovim nitratom.	42
Slika 17: In vitro inhibitorno delovanje neaciliranega cistatina (C0) in aciliranih cistatinov (C6, C8, C10, C12, C14, C16 in C18) na papain.	44
Slika 18, 19: Posnetki celic MCF-10A neo T v 1. in 5. minuti po dodatku barvila Z-Arg-Arg-krezilvijoličnega; primerjava C0 s C6 in C8.	46
Slika 20, 21: Posnetki celic MCF-10A neo T v 1. in 5. minuti po dodatku barvila Z-Arg-Arg-krezilvijoličnega; primerjava C0 s C10 in C12.	46
Slika 22, 23: Posnetki celic MCF-10A neo T v 1. in 5. minuti po dodatku barvila Z-Arg-Arg-krezilvijoličnega; primerjava C0 s C14 in C16.	46
Slika 24: Posnetki celic MCF-10A neo T v 1. in 5. minuti po dodatku barvila Z-Arg-Arg-krezilvijoličnega; primerjava C0 s C18.	47
Slika 25: Posnetki celic MCF-10A neo T v 1., 10. in 20. minuti po dodatku barvila Z-Arg-Arg-krezilvijoličnega; primerjava intenzitet rdeče fluorescence pri aciliranih vzorcih (C6, C8, C10,	

C12, C14, C16, C18) in kontroli (C0); volumen vzorca cistatina, dodanega celicam, 200 μ L; koncentracija cistatina 0,2 μ M;	47
Slika 26: Posnetki celic MCF-10A neo T v 25. in 30. minuti po dodatku barvila Z-Arg-Arg-krezilvijoličnega. Intenziteta obarvanja celic pri aciliranih oblikah cistatina, ki je primerljiva z intenziteto pri C0; za C6 do C10 pri petindvajseti minuti, za C12 do C18 pa po trideseti minuti; volumen vzorca cistatina, dodanega celicam, 200 μ L; koncentracija cistatina 0,2 μ M;	48
Slika 27: Aktivnost katepsina B znotraj celice, ki pada z daljšanjem dolžine maščobne verige na cistatinu.	49

KAZALO PREGLEDNICE

<i>Preglednica 1: Vrednosti izmerjenih intenzitet za posamezne vzorce med deseto in dvajseto minuto in izmerjene vrednosti, preračunane v deleže aktivnosti katepsina B.</i>	48
---	----

POVZETEK

Proteini kot zdravilne učinkovine predstavljajo velik potencial, predvsem zaradi svoje specifičnosti kot tudi učinkovitosti. Njihova terapevtska uporaba je omejena zaradi nestabilnosti v fizioloških pogojih. Glavna dejavnika nestabilnosti v fiziološkem okolju sta hitra encimska razgradnja in različen pH. Vprašljiva je tudi absorpcija, saj gre za velike hidrofilne molekule. Posledica vsega tega je kratek razpolovni čas in majhna biološka uporabnost.

Za rešitev teh težav so znani že številni tehnološki pristopi. V naši diplomski nalogi smo preverili učinkovitost kemične modifikacije proteina, kokošjega cistatina, na katerega smo v reakciji aciliranja vezali maščobne verige različnih dolžin (šest, osem, deset, dvanajst, štirinajst, šestnajst in osemnajst ogljikovih atomov dolgo maščobno kislino). Uporabili smo metodo aciliranja v vodni raztopini acetonitrila. Uspešnost reakcije smo potrdili na kapilarni elektroforezi, SDS-PAGE in izoelektričnem fokusiranju.

S primerjanjem *in vitro* BANA preizkusa, kjer modificirani proteini niso imeli inhibitorne aktivnosti, ter poskusa na celičnih kulturah, kjer so modificirani proteini inhibirali endogene encime, smo prišli do zaključka, da je za aktivnost aciliranega proteina potrebna razgradnja z encimi, ki so prisotni v celici. Na ta način se odcepijo vezane verige oziroma razbijejo nastali agregati.

Na celičnih kulturah smo spremljali, kako se prehod cistatina v celico spreminja glede na dolžino vezane maščobne verige. Aktivnost znotrajceličnega katepsina B je padala v odvisnosti od dolžine maščobne verige, vezane na cistatin. Z daljšanjem verige se je povečala lipofilnost proteina, kar je izboljšalo prehod in povečalo koncentracijo cistatina znotraj celice. Več je bilo cistatina, dlje časa je bil katepsin B inhibiran. Najboljša in najdaljša inhibicija se je tako pokazala v primeru osemnajst ogljikovih atomov dolge verige maščobne kisline.

SEZNAM OKRAJŠAV

Aminokislina:

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

APS	amonijev persulfat
BANA	natrijev benzoil-D,L-arginin- β -naftilamid
CX	kokošji cistatin, neaciliran (X=0) in aciliran z različno dolgo maščobno kislino (X= 6, 8, 10, 12, 14, 16 in 18)
Da	Dalton
DTT	ditiotreitrol
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
IEF	izoelektrično fokusiranje
M	označevalec velikosti proteinov
pI	izoelektrična točka
rpm	obrat na minuto
SDS	natrijev lavrilsulfat
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
Slepa X	vzorec brez cistatina; število X pove število C atomov maščobne kisline; (X=0, 6, 8, 10, 12, 14, 16 in 18)
TEMED	N,N,N,N - tetrametil-etilendiamin
TFA	trifluoroetanojska kislina
Tris	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol

1. UVOD

1.1. PROTEINI IN NJIHOVA ZGRADBA

V telesu so proteini prisotni v različnih oblikah, od česar je odvisna tudi njihova funkcija. Tako jih v grobem delimo na globularne, fibrilarne in konjugirane proteine. Najpomembnejši terapevtski proteini so iz skupine globularnih proteinov.

Proteine opišemo glede na štiri hierarhične ravni:

- **Primarna zgradba** je zaporedje aminokislin. Med temi so kovalentne vezi (peptidne vezi in disulfidni mostovi).
- **Sekundarna zgradba** je dvodimenzionalna ureditev struktur, kot so α -vijačnica, β -plošča in zavoj. Takšno organizacijo pogojujejo posamezne aminokisliline, ki določajo različne kote polipeptidne verige. Vzpostavijo se elektrostatske interakcije in vodikove vezi.
- **Terciarna zgradba** je tridimenzionalna zgradba proteina. Na tej stopnji se tvorijo stabilne konformacijske enote, ki jim pravimo domene. Ugotovili so, da se proteinsko aktivno mesto ponavadi nahaja med dvema domenama. Za tvorbo stabilne terciarne konformacije so odgovorne nekovalentne vezi: elektrostatske, vodikove in hidrofobne interakcije.
- **Kvartarna zgradba** je oligomerna zgradba, v katero se združijo podenote polipeptidnih verig. Do končne oblike proteina vodijo le podenote s pravilno terciarno konformacijo, zato je slednja bistvena za aktivnost proteina (1).

1.2. PROTEINI KOT UČINKOVINE

Peptidi in proteini imajo pomembno vlogo v delovanju človeškega organizma, zato lahko nekatere spremembe v njihovem ravnovesju vodijo v nastanek bolezenskega stanja. Posledica hitrega razvoja na področju biotehnologije, še posebno tehnologije rekombinantne DNA, je pojav velikega števila biološko aktivnih peptidov in proteinov, ki jih uspešno uporabljamo za preventivo, diagnostiko in zdravljenje. Terapevtski peptidi in proteini so postali nova skupina učinkovin, ki se odlikujejo po svoji specifičnosti in učinkovitosti. Uporabni so pri zdravljenju številnih bolezni, kot so diabetes, hipertenzija, avtoimunske bolezni, oslabitev spomina, duševne motnje, nekatere kardiovaskularne in metabolične bolezni (2).

1.2.1. PROBLEMATIKA TERAPEVTSKIH PROTEINOV

Vnos terapevtskih proteinov otežuje njihov proteinski značaj, zato jih dajemo v večini primerov parenteralno in v visokih odmerkih. Tak način je izredno neekonomičen ter obremenjujoč za bolnika glede na sam način vnosa kot tudi možnosti neželenih učinkov.

Drugi načini vnosa za sistemsko zdravljenje so še nazalni, pulmonalni, rektalni, vaginalni, sublingvalni in transdermalni. V teh primerih se izognemo metabolizmu prvega prehoda, vendar sta vprašljiva ponovljivost zdravljenja v patoloških razmerah kot tudi doseganje dovolj visoke koncentracije za sistemsko delovanje proteinskih učinkovin (3).

Veliko pozornost namenjajo oblikovanju neinvazivnih peroralnih farmacevtskih oblik, pri katerih morajo upoštevati vse slabosti učinkovine, to je proteina.

1.2.1.1. HITRA ENCIMSKA RAZGRADNJA PROTEINOV

Absorpcija proteinov je vprašljiva, saj se vzdolž prebavnega trakta zvrstijo različni proteolitični encimi, ki predstavljajo proteinskim učinkovinam veliko oviro. Ekso- in

endopeptidaze najdemo v želodcu (pepsin), črevesni svetlini in enterocitih črevesnih resic (di- in tripeptidilpeptidaze v citosolu celic). Proteine razgradijo s hidrolizo. V tankem črevesu poteka prebava proteinov pod vplivom proteolitičnih encimov pankreasa: kimotripsina, tripsina in karboksipeptidaze. Pomembna je tudi encimska razgradnja v krvnem obtoku in jetrih (2, 4).

1.2.1.2. (NE)STABILNOST PROTEINOV

Terapevtska uporaba proteinov je še precej omejena, saj je njihova biološka aktivnost tesno povezana s tridimenzionalno zgradbo. Le-to lahko hitro porušijo različni kemijski kot tudi fizikalni dejavniki okolja.

FIZIKALNO STABILNOST (jakost nekovalentnih interakcij) lahko zmanjšajo že majhne spremembe temperature in pH, prisotnost denaturantov, različnih površin in fizikalnih obremenitev (npr. stresanja). Fizikalna nestabilnost se kaže v obliki nepravilne konformacije, adsorpcije, agregacije, disociacije oligomerov v monomere ter drugih oblik denaturacije (1, 4).

- Pri povišani temperaturi lahko pride do spremembe nativne konformacije proteina. Pri tem se lahko disulfidni most približa prej oddaljeni tiolni skupini. Prekine se obstoječa vez in tvori druga. Denaturiran protein izgubi biološko aktivnost (4).
- Pomemben je tudi pH okolja. Ponavadi je protein najbolj stabilen pri svoji izoelektrični točki, kjer je celokupni naboj proteina enak nič. S spremembo pH se aminokislina v proteinu različno nabijejo, vzpostavijo se različne inter- in intramolekulske interakcije, kar posledično vpliva na spremembo konformacije proteina.
- Denaturanti proteinskih molekul so lahko različne soli, kelatne spojine in organska topila. Od koncentracije in narave soli je odvisno, ali sol zmanjšuje (stabilizacija) ali povečuje topnost (denaturacija) hidrofobnih območij v proteinu. Kelatne spojine (npr. EDTA) denaturirajo predvsem proteine, ki v svoji strukturi vsebujejo kovinske ione. Organska topila različno vplivajo na stabilnost proteina, kar je odvisno od njihove sposobnosti mešanja z vodo. Nekatera organska topila lahko

povečajo hidratiranje proteina in ga s tem stabilizirajo, medtem ko se druga lahko vežejo neposredno nanj in povzročijo denaturacijo.

- Do fizikalne nestabilnosti pride tudi, če je protein v stiku z zrakom ali s hidrofobno površino. V vodni raztopini je protein zvit tako, da ima hidrofobne dele skrite v sredici. Če so prisotne hidrofobne površine, se polipeptidne verige razklenijo in protein izpostavi svoja hidrofobna področja, da lahko vstopa v interakcije (1).

KEMIJSKO NESTABILNOST omogočajo posamezne reaktivne skupine, ki jih imajo določene aminokislino. Glavne reakcije, ki lahko potečejo, so deaminacija, hidroliza, β -eliminacija (disulfidna izmenjava), racemizacija in oksidacija (1, 2).

- Hidroliza amidne vezi je neencimska hidroliza v vodnem mediju, kjer se predvsem asparagin in glutamin pretvorita v ustrezni kislini.
- Hidroliza peptidne vezi poteče v raztopinah z mejnimi vrednostmi pH. Pogosto poteka na C- ali N-koncih polipeptidnih verig, medtem ko so notranje peptidne vezi manj dovzetne za hidrolizo.
- V procesu racemizacije prehajajo *L*-aminokislino v ustrezne *D*-aminokislino.
- Pri kemijski nestabilnosti so pomembni še oksidativni procesi, ki potekajo, kadar je raztopina proteina izpostavljena atmosferskemu kisiku, svetlobi, kovinskim ionom ali različnim reaktivnim kisikovim spojinam (vodikovemu peroksidu, hidroksilnim ali superoksidnim radikalom, hipokloridnim ionom) ter drugim energijskim procesom, ki lahko povzročijo verižne oksidacijske reakcije. Aminokislino, ki so dovzetne za oksidacijske procese, so metionin, triptofan, cistein, histidin in tirozin (1).

1.2.1.4. KRATEK RAZPOLOVNI ČAS

Kratek razpolovni čas je predvsem posledica hidrofilne narave proteinov in hitre encimske razgradnje. Pri proteinskih učinkovinah je ta čas v krvi različen, od nekaj minut za tkivni aktivator plazminogena (tPA) do nekaj dni za monoklonska protitelesa. Podaljšamo ga lahko z modificiranjem proteina ali s spreminjanjem načina vnosa, vendar lahko pri tem izgubimo terapevtsko učinkovitost (3, 4).

1.2.1.5. MULTIPOTENTNOST PROTEINOV

Problem terapevtskih proteinov je tudi širok spekter bioloških učinkov. Če želimo, da je zdravljenje uspešno, mora učinkovina doseči mesto delovanja. V večini primerov se učinkovina porazdeli po telesu in je le malo doseže tarčno mesto. Preostali del učinkovine se lahko veže na nespecifična vezavna mesta in povzroča neželene učinke (3).

1.2.1.6. ANTIGENSKE LASTNOSTI PROTEINOV

Z vnosom terapevtskih proteinov lahko sprožimo imunski odgovor, ki še dodatno prispeva k odstranitvi učinkovine iz telesa. Na imunogenost terapevtskih proteinov lahko vpliva veliko dejavnikov, kot so genetska predispozicija, vrsta bolezni in vrsta proteina (človeški, živalski itd.), prisotnost konjugatov ali fragmentov, način vnosa, pogostost odmerjanja in trajanje zdravljenja. Proizvodnja, rokovanje in shranjevanje lahko v pripravku povzročijo nastanek nečistot ali pa se z oksidacijo in agregacijo spremeni tridimenzionalna zgradba proteina (5).

1.2.2. PRISTOPI ZA POVEČANJE BIOLOŠKE UPORABNOSTI PROTEINOV

Za odpravo naštetih pomanjkljivosti in povečanje biološke uporabnosti proteinov si pomagamo z naslednjimi pristopi:

- Zmanjšamo aktivnost encimov na mestu absorpcije in absorpcijski poti. Pri tem moramo vedeti, kateri encim najbolj prispeva k razgradnji proteina. Uporabimo lahko več inhibitorjev hkrati (aprotinin, bacitracin, sojin tirozinski inhibitor idr.) v kombinaciji s spodbujevalci absorpcije.
- Podaljšamo zadrževanje na mestu absorpcije s pomočjo mukoadhezivnih farmacevtskih oblik (mikrodelcev, liposomov, gelov).
- Povečamo prepustnost absorpcijske bariere s pospeševalci absorpcije, kot so površinsko aktivne snovi (saponini, soli žolčnih kislin), maščobne kisline,

kompleksirajoče snovi (salicilati, citronska kislina) in metilirani β -ciklodekstrini. Prepustnost povečamo tudi z iontoforezo ali liposomi. Lahko pa dodamo snovi, ki odpirajo tesne stike za pospešitev paracelularnega transporta.

- Ciljano dostavimo proteine v kolon. Kolon je primerno mesto za absorpcijo proteinov zaradi manjše količine peptidaz in večje dovzetnosti za pospeševalce absorpcije.
- Povečamo obstojnost proteina pred njegovo razgradnjo s:

a) Fizikalnimi pristopi:

Pri tem terapevtske proteine vgrajujemo v različne farmacevtske oblike. V zadnjem času najbolj raziskan način je vgradnja v nanodelce (6) ali liposome za doseganje transcelularnega transporta z endocitozo. Ostale možnosti so še emulzije, injektibilni implantati, mikrosfere, črpalke in ogrodne oblike (1, 2, 3).

b) Kemijskimi pristopi:

- o Pegiliranje proteinov oziroma pripenjanje verig polietilenglikola na protein, s čimer protein zaščitimo pred encimsko razgradnjo in zmanjšamo prepoznavnost s strani imunskega sistema.
- o Bioizosterne spremembe ali zamenjave določenih aminokislin (vključitev *D*-aminokislin v zgradbo proteinov), kar zmanjša afiniteto do različnih proteolitičnih encimov in upočasni encimsko razgradnjo (1, 2).
- o Modifikacija proteina, s katero povečamo lipofilnost: **aciliranje proteinov z derivati maščobnih kislin**. Acilirane proteine lahko nato še vežemo na lipidni dvosloj liposomov ter na ta način podaljšamo njihov razpolovni čas (7).

1.3. ACILIRANJE PROTEINOV

Aciliranje z derivati maščobnih kislin je ena od osnovnih metod za povečanje lipofilnosti in s tem prepustnosti proteinov skozi celične membrane. Glede na reakcijske razmere se maščobne verige vežejo kovalentno na proste aminske skupine (najpogosteje lizina) in tvorijo stabilne amidne vezi (7, 8, 9). Reakcija aciliranja lahko poteče tudi na tiolnih (pri cisteinu) in hidroksilnih skupinah (pri serinu), pri čemer dobimo tioestre in estre maščobnih kislin (10).

Za uspešno aciliranje moramo zagotoviti ustrezne pogoje. Največjo težavo predstavlja topnost reagenta za aciliranje ter proteina v istem mediju (organskem ali vodnem). Poleg tega je problematična uporaba organskih topil zaradi možne denaturacije proteina in s tem izgube njegove biološke aktivnosti (11).

Možna sta dva pristopa, in sicer aciliranje v vodnem ter aciliranje v organskem topilu. V organskem topilu lahko izvedemo reakcijo neposredno (10) ali pa uporabimo sistem reverzних micelov (V/O) (12). V vodnem mediju uporabimo micide O/V (7) ali vodotopne reagente (9, 13).

- **Sistem reverzних micelov:**

Prednost te metode je nizka in nadzorovana stopnja modifikacije proteinov z nevodotopnimi reagenti. Pri tem se na proteinsko molekulo veže 1 ali 2 verigi maščobnih kislin (12). Proteini na ta način ohranijo vodotopnost, dodane hidrofobne verige pa jim omogočijo vezavo na površino celice.

Sama priprava poteka tako, da molekule proteinov solubilizirajo v koloidnem sistemu, ki je pripravljen iz površinsko aktivne snovi in organskega topila. V tem sistemu je vsebnost vode izredno majhna, predstavlja notranjo fazo sistema in je obdana s površinsko aktivno snovjo. Protein se ujame v to, notranjo fazo. Reagent za aciliranje je prisoten tako v zunanji fazi kot tudi med molekulami površinsko aktivne snovi, ki je v stiku s proteinom. Modificirane proteine nato oborijo z dodatkom acetona (12, 14).

- **Najprimernejše metode za hidrofилne proteine so aciliranja v vodnih raztopinah:**

Novejša metoda je aciliranje v vodni raztopini acetonitrila. Z mešanjem raztopine klorida maščobne kisline v acetonitrilu in vodne raztopine proteina *in situ* pripravimo disperzijo klorida maščobne kisline v vodni raztopini acetonitrila. Na ta način protein modificiramo pri zelo milih pogojih in ni izpostavljen močnemu organskemu topilu ali površinsko aktivni snovi, ki bi lahko povzročila njegovo denaturacijo. Dokazano je tudi, da 50-odstotni acetonitril še ohrani nativno obliko in aktivnost proteina (8).

1.3.1. GLAVNI MEHANIZMI VEZAVE PROTEINOV Z VEZANIMI MAŠČOBNIMI KISLINAMI NA CELIČNO MEMBRANO

V splošnem lahko mehanizme vezave razdelimo na tri načine:

- Vezava proteina na membrano zaradi dodanih hidrofobnih verig maščobnih kislin.
- Vezava proteina na membrano zaradi prisotnega receptorja za maščobne kisline na površini celice (primer hepatocita).
- Vezava proteina na membrano zaradi prisotnih verig maščobnih kislin in receptorja, ki specifično veže ta protein.

Zaradi vezave modificiranih proteinov na površino celice se poveča njihov prehod skozi membrano v citoplazmo (14). V nekaterih primerih se je izkazalo, da z maščobnimi kislinami acilirani proteini ostanejo znotraj celice ujeti v endosomskih veziklih in se ne sprostijo v citoplazmo (15). V primeru, ko je bil učinek aciliranega proteina pogojen z vezavo na receptor, je bila aktivnost tega proteina večja kot pri nemodificirani obliki proteina. To so ugotovili pri enterotoksinu A (iz *Staphylococcus aureus*) in rekombinantnem interferonu α , ki se jima je antiproliferativna aktivnost povečala kar za 100- in 1000-krat (14, 16).

Natančen mehanizem povečanega transporta z maščobnimi kislinami aciliranih proteinov v celice je za zdaj še neznan. Predvidevajo, da se acilirani proteini vežejo na membrano preko hidrofobnih interakcij, nato pa poteče transcitoza (11).

1.3.2. PRIMERI ACILIRANJA

Do sedaj se je pojavilo že ogromno raziskav na temo aciliranja proteinov z maščobnimi kislinami. Večina teh študij je potrdila, da umetno acilirani proteini obdržijo biološko aktivnost, izkazujejo boljše distribucijske lastnosti ter hitreje prehajajo v celico (7, 8, 9, 11, 17, 18, 19). Zavedati pa se moramo, da so *in vivo* pogoji precej bolj kompleksni od *in vitro* pogojev, uporabljenih v teh raziskavah. V enem primeru so primerjali razliko v privzemu aciliranega proteina v celico, če so dodali mediju serum ali ne. Brez serumskih proteinov se je privzem povečal kar za 140-krat v primerjavi z neacilirano obliko. V prisotnosti seruma pa se je privzem aciliranega proteina zmanjšal za 85 odstotkov (pri 1 odstotku seruma) in 98 odstotkov (pri 10 odstotkih seruma) (13). V serumu so proteini, ki imajo visokoafinitetna vezavna mesta za višje maščobne kisline (npr. albumin) (19, 20).

Neposreden dokaz, da modificirani proteini prehajajo celično membrano, podpira tudi dejstvo, da je posttranslacijska sprememba proteinov z maščobnimi kislinami in s fosfolipidi naravni pojav pri transportu proteinov *in vivo* (16). Veliko z maščobnimi kislinami aciliranih proteinov ima v organizmu različne funkcije poleg vezave na membrane: signalizirajo znotrajcelične poti, sodelujejo pri izločanju ter v nekaterih primerih stabilizirajo tridimenzionalno obliko (predvsem miristoilirani proteini). Dve najpogostejši obliki modificiranih proteinov v organizmu sta miristoilirani (kotranslacijska vezava miristinske kisline na aminsko skupino glicina na N-koncu polipeptidne verige – amidna vez) in palmitoilirani (posttranslacijska sprememba s palmitinsko kislino na cisteinu – tioestrška vez) (10, 17, 21).

Prednost aciliranja proteinov z višjimi maščobnimi kislinami je poleg povečanega transporta v celice tudi malo neželenih učinkov, saj so maščobne kisline naravno prisotne v telesu in pri dodatnem vnosu ni težav s toksičnostjo. Vezavni proteini za maščobne kisline (FABP), odgovorni za vezavo, transport in privzem maščobnih kislin, so prisotni v različnih tkivih v telesu. Ugotovili so tudi, da protein, aciliran z maščobnimi kislinami, izzove manjšo imunogenost ter nižjo proizvodnjo protiteles (14).

1.4. PROTEINAZE

Proteolitične encime (proteinaze) najdemo v vseh tkivih in skoraj v vseh delih celice živih organizmov. Sodelujejo pri mnogih procesih, npr. pri razgradnji proteinov v prebavnem traktu in tkivih, pri razgradnji strukturnih proteinov, regulaciji znotrajceličnega proteinskega metabolizma, aktiviranju proencimov in polipeptidov, ki so biološko aktivni, aktiviranju komplementa itd. Glede na zaporedje aminokislin v aktivnem mestu, optimalno pH-območje delovanja in strukturne podobnosti z inhibitorji jih delimo na serinske, cisteinske, aspartatne in metaloproteinaze (22).

1.4.1. CISTEINSKE PROTEINAZE

Najobširnejša in najbolj raziskana je družina papaina. V to družino spadajo tudi lizosomske cisteinske proteinaze (katepsini B, C, F, H, K, L, O, S, V, X/Z in W) (23). Imajo specifične funkcije, ki so pomembne za normalno delovanje organizma. Sodelujejo pri procesih znotrajcelične razgradnje proteinov, imunskega odziva (katepsini S, F in L), proteolitičnem aktiviranju prohormonov in proencimov, razgradnji kolagena, resorpciji kosti in pri drugih procesih. Delovanje katepsinov je uravnovešeno z endogenimi inhibitorji, cistatini. Porušenje tega ravnovesja vodi do različnih bolezenskih stanj, kot so revmatoidni artritis, osteoartritis, rak, nevrološka obolenja, osteoporoza, povišana temperatura (24) in druga (25).

Lizosomske cisteinske proteinaze (katepsina B in L), aspartatne proteinaze (katepsin D) in metaloproteinaze sodelujejo pri procesih razvoja in napredovanja raka. Proteolitična aktivnost katepsina B je udeležena pri razgradnji zunajceličnega matriksa, kar omogoča invazijo in metastaziranje tumorskih celic ter ožiljenje tumorjev (26).

Katepsin B sodeluje pri razgradnji zunajceličnega matriksa bodisi direktno, s tem da katalizira proteolizo matriksnih proteinov (kolagena IV, laminina, fibronektina), bodisi posredno, s tem da aktivira encime proteolitične kaskade razgradnje zunajceličnega matriksa, kot so metaloproteinaze (23, 26).

Cisteinski katepsini so se izkazali kot odlični prognostični in diagnostični tumorski označevalci, saj jih najdemo v različnih tumorjih (dojk, pljuč (27), možganov, kolona, glave in vratu) različno izražene in lokalizirane (23).

1.5. CISTATINI – PROTEINSKI INHIBITORJI CISTEINSKIH PROTEINAZ

Cistatini so po svoji naravi reverzibilni kompetitivni inhibitorji z visoko afiniteto do cisteinskih proteinaz. Kot inhibitorji cisteinskih proteinaz lahko celico zaščitijo pred neprimerno notranjo ali zunanjo proteolizo, kot tudi sodelujejo v kontrolnem mehanizmu, ki je odgovoren za znotraj- oziroma zunajcelično razgradnjo proteinov.

Na osnovi homologije določenih aminokislinskih zaporedij tvorijo naddružino cistatinov. Sestavljajo jih tri glavne družine:

1. Stefini

So enoverižni proteinski inhibitorji z molekulsko maso okoli 11 kDa, brez sladkornih enot ter disulfidnih vezi. Stefini so učinkoviti reverzibilni in kompetitivni inhibitorji cisteinskih proteinaz, predvsem papaina ter katepsinov H in L, medtem ko je inhibicija katepsina B nekoliko slabša.

2. Cistatini

Glavna lastnost predstavnikov te družine je prisotnost dveh disulfidnih vezi, ki se nahajata nasproti C-končnega dela. Sestavlja jih okoli 115 aminokislinskih z molekulsko maso približno 13–24 kDa.

3. Kininogeni

Kininogeni predstavljajo najbolj kompleksne molekule iz naddružine cistatinov (60–120 kDa). Poznani so kot prekurzorji kinina. Pri proteolitični cepitvi kininogena s kalikreinom se sprošča vazoaktiven kinin (peptid z 9–11 aminokislinskimi ostanki), ki v kinin-

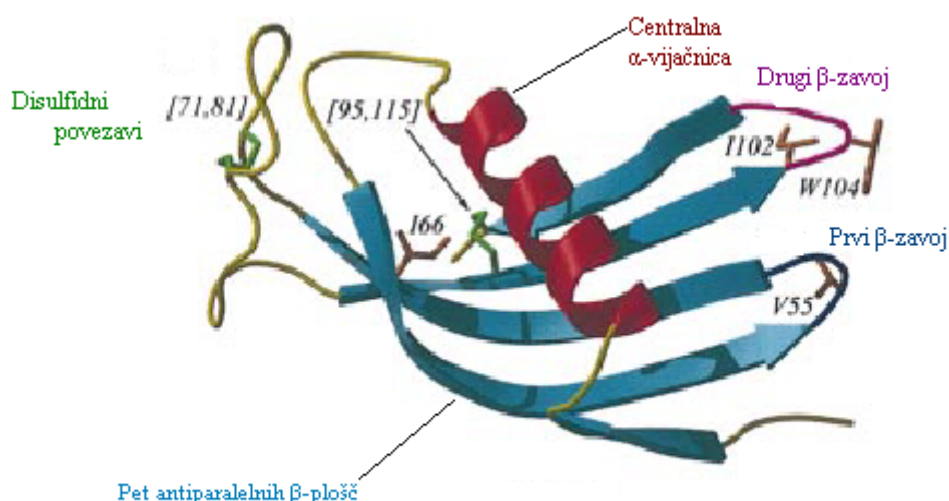
kalikreinskem sistemu sodeluje pri krčenju gladkih mišic in pri procesu vnetja. Pomembni so tudi pri strjevanju krvi.

Nekatere nove inhibitorje je težko uvrstiti v omenjene družine. Zato so predstavnike, izolirane iz riža, uvrstili v svojo družino, družino *fitocistatinov*. Posebno družino naj bi sestavljali tudi cistatini nematod in cistatini insektov (22, 28).

1.5.1. KOKOŠJI CISTATIN

Kokošji cistatin je poleg človeškega cistatina C do sedaj najbolj raziskan. Oba zaradi odsotnosti polisaharidnih enot, homologije v zaporedju določenih aminokislin in strukture disulfidnih vezi uvrščamo v drugo družino cistatinov.

Prva znana tridimenzionalna zgradba inhibitorja cisteinskih proteinaz je bila zgradba molekule kokošjega cistatina, določena s pomočjo rentgenske difrakcijske analize. Zgrajena je iz petih antiparalelnih β -plošč, ki so ovite okoli osrednje, N-končne α -vijačnice. Ima dve disulfidni vezi: vez med cisteinoma Cys-71 in Cys-81 povezuje segment z delno obliko α -vijačnice z osrednjim delom, β -ploščo, medtem ko vez med cisteinoma Cys-95 in Cys-115 povezuje dve antiparalelni verigi znotraj β -plošče (28, 29).



Slika 1: Tridimenzionalna zgradba kokošjega cistatina (29).

Kokošji cistatin izoliramo iz jajčnega beljaka v dveh izoelektričnih oblikah. Aminokislinski zaporedji sta identični, razlikujeta se le v serinski aminokislini, na katero je pri drugi obliki vezana fosfatna skupina (fosfoserin). Glede na to se odražata tudi vrednosti pI: 6,5 (oblika A) in 5,6 (oblika B). Razlika med obema oblikama je le v zgradbi, inhibitorni konstanti za papain imata enaki (30).

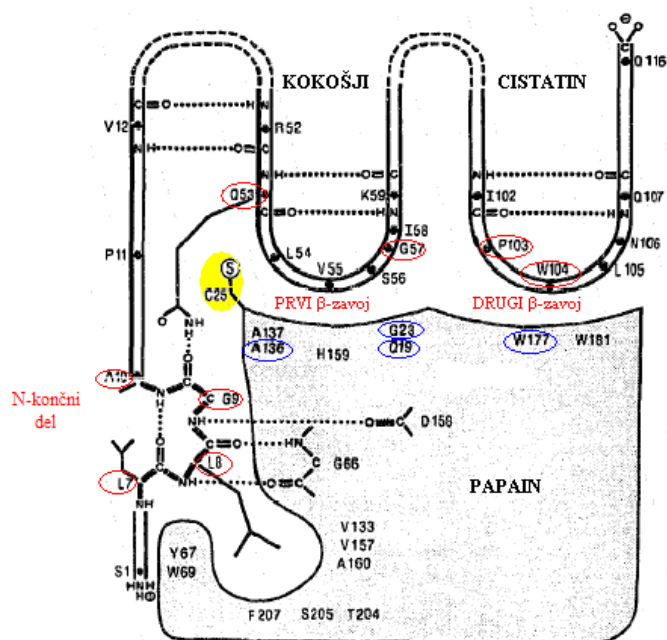
1.5.2. MEHANIZEM INTERAKCIJE CISTEINSKIH PROTEINAZ IN KOKOŠJEGA CISTATINA

Cistatini tvorijo s cisteinskimi proteinazami kompleks, pri čemer pride do minimalnih konformacijskih sprememb obeh proteinov (31). Mehanizem inhibicije se razlikuje od standardnega mehanizma delovanja inhibitorjev serinskih proteinaz, kar so dokazali s kristalnima strukturama prostega in vezanega inhibitorja (32).

Na začetku so predvidevali, da je prosta tiolna skupina bistvena za inhibitorno aktivnost cistatinov tako kot pri nekaterih drugih proteinazah. Ker pa cistatini nimajo prostih tiolnih skupin (le vezane v dve disulfidni vezi), ne more priti do disulfidnega izmenjalnega mehanizma (33).

Pri interakciji sodelujejo tri kontaktna mesta na cistatinu:

- 1) N-končni del,
- 2) prvi β -zavoj z osrednjim območjem Gln-53-X-X-x-Gly-57 (X = hidrofobna aminokislina, kot je Val ali Leu, x = majhna aminokislina, kot je Gly, Ala ali Ser) ter
- 3) drugi β -zavoj, ki vključuje Pro-103 in Trp-104 (29).



Slika 2: Model interakcije med kokošjim cistatinom in papainom (28); Q=Gln, G=Gly, P=Pro, W=Trp, A=Ala, C=Cys, L=Leu, V=Val.

Ta model interakcije podpira dejstvo, da so določena zaporedja aminokislin ohranjena pri vseh inhibitorno aktivnih predstavnikih naddružine cistatinov. V prvem β -zavoju je ohranjeno zaporedje Gln-Val-Val-Ala-Gly (pri kokošjem cistatinu **Gln**-Leu-Val-Ser-**Gly**), ki je odgovorno za inhibicijo cisteinskih proteinaz, kot kofaktor pa naj bi bila Pro-103 in Trp-104 (31, 34). Leu-7 in Leu-8, vezana na Gly-9, prispevata k večji afiniteti, Gly-9-Ala-10 pa tvorita zelo rigidno konformacijo, ki usmerja Leu-8 proti drugemu segmentu papaina (Val-133, Val-157, Ala-160, Ser-205, Phe-207). Dokaz, da gre za togo strukturo, je nezreagirana tiolna skupina na Cys-25 papaina, ki je v neposredni bližini Gly-9-Ala-10 vezi. Gly-9 je ohranjen pri vseh inhibitorno aktivnih predstavnikih naddružine in je odgovoren za večjo moč povezave med cistatini in papainom. Mesta interakcije na papainu so Gly-23, Gln-19, Trp-177 in Ala-136 (32, 34).

1.6. METODE UPORABLJENE PRI ANALIZI VZORCEV

1.6.1. KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Ločitev analita poteka v stekleni kapilari, katere dolžina je ponavadi od 30 do 100 cm, premer pa meri od 25 do 100 μm . Volumen kapilare je večinoma 0,5 do 4 μL , volumen vzorca, ki ga injiciramo, pa nekaj nanolitrov. Razlika v napetosti med anodo in katodo povzroči potovanje nabitih delcev. Hitrost molekul je odvisna od naboja, velikosti molekule, električnega polja, viskoznosti pufra in zamreženosti eventualno prisotnega gela.

Na način potovanja delcev vpliva tudi elektroosmozni tok, ki nastane zaradi negativno nabitih silanolnih skupin, prisotnih na notranji površini steklene kapilare. Slednje privlačijo pozitivno nabite katione (predvsem oksonijeve ione), ki po priključitvi napetosti začnejo potovati proti katodi in s seboj potegnejo celotno raztopino.

Elektroosmozni tok je ponavadi močnejši od elektroforezne mobilnosti molekul, zato proti elektrodi z negativnim nabojem potujejo tako pozitivne kot tudi negativno nabite ter nevtralne molekule. Najmanjši migracijski čas imajo tako majhne molekule s pozitivnim nabojem, sledijo jim velike molekule s pozitivnim nabojem, nato pa po vrsti nevtralne, ki potujejo s hitrostjo elektroosmoznega toka, ter velike molekule z negativnim nabojem. Nazadnje pridejo do detektorja majhne molekule z negativnim nabojem (35, 36).

1.6.2. POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA LAVRILSULFATA (SDS-PAGE)

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo navadno izvajamo v diskontinuirnem sistemu, ki ga sestavljajo različno zamrežena koncentracijski in ločitveni gel ter pufri z različnimi vrednostmi pH in ionske moči. Zgornji, koncentracijski gel je manj zamrežen kot spodnji, ločitveni gel. V koncentracijskem gelu se molekule skoncentrirajo, tako da imajo vse enak začetni položaj pred vstopom v ločitveni gel. V ločitvenem gelu poteka ločitev molekul na

osnovi naboja in velikosti pri nativni PAGE. Pri poliakrilamidni gelski elektroforezi v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (**SDS-PAGE**) pa poteka ločitev molekul samo na osnovi njihove velikosti.

Natrijev lavrilsulfat je anionska površinsko aktivna molekula, ki se nespecifično veže na proteine in jih denaturira. Molekula natrijevega lavrilsulfata se veže na amino kisline denaturiranega proteina v razmerju 1:2 (ena molekula SDS na dve aminokislinski skupini) in daje nastalemu kompleksu močan negativen naboj. Ker imajo vse molekule enak negativen naboj se ločujejo samo zaradi razlik v velikosti (35, 37).

1.6.3. IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE (IEF)

IEF je elektroforezna metoda, ki jo uporabljamo za analizo amfoternih snovi (aminokislin, peptidov, proteinov). Metoda temelji na potovanju amfoternih snovi v poliakrilamidnem gelu pod vplivom napetosti vzdolž gradienta pH. Ločitev poteka na osnovi razlik v številu bazičnih in kislih skupin. Proteini zaradi napetosti potujejo do točke, kjer je pH enak njihovi pI. Pri pI molekule nimajo naboja oziroma je njihov celokupni naboj nič (so elektronevtralne), zato nimajo elektroforezne mobilnosti in ne morejo potovati (35).

Proteine, ločene na poliakrilamidnem gelu, lahko detektiramo z barvanjem s *coomasie brilliant blue* ali s **srebrovimi solmi**. Najpomembnejša razlika med obema načinoma barvanja je v občutljivosti detekcije, ki je pri barvanju s srebrovimi ioni sto- do tisočkrat višja (37).

2. NAMEN DELA

Na kokošji cistatin bomo z reakcijo aciliranja v vodni raztopini acetonitrila uvedli maščobne kisline različnih dolžin (šest, osem, deset, dvanajst, štirinajst, šestnajst in osemnajst ogljikovih atomov).

Produkte reakcije bomo preverili s tremi analiznimi metodami. S kapilarno elektroforezo bomo preverili, ali je reakcija uspešno potekla. Z vezavo maščobne kisline na protein se migracijski čas podaljša v primerjavi z neacilirano obliko proteina.

S SDS-PAGE bomo potrdili prisotnost proteinov v reakcijski zmesi in preverili homogenost reakcijske zmesi. Če bodo proteini med reakcijo razpadli, se bo to odražalo v manjši velikosti in bo pozicija traku pod 13 kDa. Po drugi strani pa lahko nastanejo skupki molekul proteinov, ki imajo skupno velikost večjo kot 13 kDa. Trak na gelu se bo torej pojavil nad to vrednostjo.

Izoelektrično fokusiranje nam bo pokazalo, ali so se maščobne kisline vezale na aminske skupine molekule cistatina. Negativni celokupni naboj molekule se bo povečal, zato bo pI vrednost nižja. Pri neaciliranem cistatinu bi morali dobiti dva trakova, saj kokošji cistatin izoliramo v dveh izoelektričnih oblikah (5,6 in 6,5).

Glavni namen diplomske naloge je ugotoviti, kako aciliranje z maščobnimi kislinami vpliva na inhibitorno aktivnost cistatina ter kako se njegov učinek oziroma prehod v celico spreminja v odvisnosti od dolžine verige uporabljene maščobne kisline za aciliranje. V ta namen bomo napravili *in vitro* encimski preizkus BANA in *in vivo* poskus na celicah MCF-10A neo T s substratom za katepsin B, Z-Arg-Arg-krezilvijoličnim.

3. MATERIALI IN METODE DE LA

3.1. REAGENTI IN PUFRI

REAGENTI IN PUFRI ZA REAKCIJO ACILIRANJA

- Kislinski kloridi:
 - Kaproilklorid (vsebnost 98 %), Sigma, Japonska;
 - Oktanoilklorid (vsebnost 99 %), Sigma, Nemčija;
 - Dekanoilklorid (vsebnost 98 %), Sigma, Nemčija;
 - Lavroilklorid (vsebnost 98 %), Sigma, Italija;
 - Miristoilklorid (vsebnost 97 %), Sigma, ZDA;
 - Palmitoilklorid (vsebnost 98 %), Sigma, St. Louis, ZDA;
 - Streatoilklorid (vsebnost 98,5 %), Sigma, Švica;
- Natrijev hidrogenkarbonat (NaHCO_3), analizne čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška;
- Natrijev karbonat (Na_2CO_3), analizne čistote, Carlo Erba reagenti, Limito, Italija;
- Acetonitril E Chromasolv[®] za HPLC, Sigma, St. Louis, ZDA;
- Raztopina kokošjega cistatina (1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Nina Kočever, mag. farm, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, Slovenija.

Karbonatni pufer, 100 mM, pH= 9,4:

Raztopina 100 mM natrijevega hidrogenkarbonata (NaHCO_3) 250 mL
Raztopina 100 mM natrijevega karbonata (Na_2CO_3) za uravnavo pH do 9,4

REAGENTI IN PUFRI ZA KAPILARNO ELEKTROFOREZO

- Vzorec aciliranega cistatina (1 mg/mL);
- Boratni pufer, 50 mM, pH=9,3, elektroforezne čistote, Agilent Technologies, Waldbronn, Nemčija.

REAGENTI IN PUFRI ZA SDS-PAGE

- 40 % akrilamid/bisakrilamid, analizne čistote, Sigma, St. Louis, ZDA;
- Amonijev persulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), elektroforezne čistote, Sigma, St. Louis, ZDA;

- Bromofenolmodro (tetrabromofenol sulfoftalein), Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija;
- 1-Butanol, analizne čistote, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija;
- Ditiotreitol (2*S*,3*S*)-1,4-bis-sulfanilbutan-2,3-diol), čistote za molekulsko biologijo, Fermentas, St. Leon-Rot, Nemčija;
- Etanol 95 % (CH₃CH₂OH), analizne čistote, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija;
- Glicin (NH₂CH₂COOH), analizne čistote, Serva, Heidelberg, Nemčija;
- Glicerol (C₃H₅(OH)₃), analizne čistote, Carlo Erba reagenti, Limito, Italija;
- Natrijev lavrilsulfat (CH₃(CH₂)₁₀CH₂OSO₃Na), analizne čistote, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija;
- Nizkomolekulski označevalec velikosti proteinov (LMW), Bio-Rad, Hercules, ZDA;
- Klorovodikova kislina 37 % (HCl), analizne čistote, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija;
- TEMED ((CH₃)₂NCH₂CH₂N(CH₃)₂), analizne čistote, Sigma, St. Louis, ZDA;
- Tris (2-amino-2-hidroksimetil-1, 3-propandiol), analizne čistote, Promega, Madison, ZDA.

Elektroforezni pufer, 10X, pH=8,3:

Tris baza	29,0 g
Glicin	144,0 g
SDS	10,0 g
H ₂ O	do 1 L

Nanašalni pufer:

0,5 M Tris-HCl, pH=6,8	2,5 mL
Glicerol	2,0 mL
10 % (m/v) SDS	4,0 mL
0,1 % (m/v) bromofenolmodro	0,5 mL
H ₂ O	1,0 mL

15 % ločitveni gel (4 mL):

40 % akrilamid	1,5 mL
----------------	--------

1,5 M Tris-HCl (pH=8,8)	900 μ L
H ₂ O	1,555 mL
10 % SDS	41 μ L
10 % APS	41 μ L
TEMED	1,7 μ L

10 % ločitveni gel (4 mL):

40 % akrilamid	1,0 mL
1,5 M Tris-HCl (pH=8,8)	1 mL
H ₂ O	1,9 mL
10 % SDS	40 μ L
10 % APS	40 μ L
TEMED	1,6 μ L

5 % koncentracijski gel (1,5 mL):

40 % akrilamid	250 μ L
1,5 M Tris-HCl (pH=6,8)	190 μ L
H ₂ O	1 mL
10 % SDS	15 μ L
10 % APS	15 μ L
TEMED	1,5 μ L

Z vodo nasičen butanol (v/v, 1:1) 25 mL

Priprava vzorcev (nanos po 16 μ L)

Nanašalni pufer	5,8 μ L
1 M DTT	2,9 μ L
Vzorec (c=0,0835 mg/mL)	7,2 μ L

Označevalec velikosti proteinov (LMW) 0,25 μ L
 Nanašalni pufer 15,75 μ L

REAGENTI IN PUFRI ZA IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE:

- IEF-označevalec (pH 3-10), Serva, Heidelberg, Nemčija;
- Anodni pufer Novex[®] (50x), Invitrogen, Carlsbad, ZDA;
- Katodni pufer Novex[®] (10x), Invitrogen, Carlsbad, ZDA;
- Nanašalni pufer Novex[®] (2x), Invitrogen, Carlsbad, ZDA.

Priprava vzorcev:

Vzorec (c=0,167 mg/mL)	10 µL
------------------------	-------

Nanašalni pufer Novex [®] (2x)	10 µL
---	-------

IEF-označevalec (pH 3-10)	2,5 µL
---------------------------	--------

H ₂ O	2,5 µL
------------------	--------

Nanašalni pufer Novex [®] (2x)	5 µL
---	------

REAGENTI IN RAZTOPINE ZA BARVANJE ELEKTROFOREZNIH GELOV**Barvanje s srebrom**

- Etanol 95 % (CH₃CH₂OH), analizne čistote, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija;
- Ocetna kislina 99,8 % (CH₃COOH), analizne čistote, Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija;
- Formaldehid 36 % (HCHO), analizne čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška;
- Natrijev acetat (CH₃COONa), analizne čistote, E. Merck, Darmstadt, Nemčija;
- Natrijev tiosulfat (Na₂S₂O₃), analizne čistote, Kemika, Zagreb, Hrvaška;
- Natrijev karbonat (Na₂CO₃), analizne čistote, Carlo Erba reagenti, Limite, Italija;
- Srebrov nitrat (AgNO₃), analizne čistote, Sigma, St. Louis, ZDA.

1. Fiksiranje (30 min)

95 % etanol	100 mL
ocetna kislina	25 mL
H ₂ O	do 250 mL

2. Predtretiranje (30 min)

95 % etanol	75 mL
natrijev acetat	17 g

H ₂ O	do 250 mL
------------------	-----------

Priprava: 50 mL te raztopine dodamo 1 mL 10 % natrijevega tiosulfata (vedno pripravljamo sproti);

3. Barvanje (20 min)

20 % srebrov nitrat (m/v)	625 µL
H ₂ O	do 50 mL

4. Razvijanje (2–5 min)

natrijev karbonat	7,42 g
H ₂ O	do 250 mL

Priprava: 50 ml te raztopine dodamo 25 µL 36 % formaldehida (vedno pripravljamo sproti);

5. Ustavljanje

1 % očetna kislina	50 mL
--------------------	-------

REAGENTI IN PUFRI ZA PREIZKUS BANA: vsi reagenti so bili stopnje čistote »p.a.«

- 100 mM fosfatni pufer BANA, pH=5,96;

kalijev dihidrogenfosfat (KH ₂ PO ₄)	3 g
dinatrijev hidrogenfosfat (Na ₂ HPO ₄)	0,427 g
dinatrijeva EDTA, c=0,5 M	744 µL
H ₂ O	do 250 mL

- aktivacijski pufer BANA (5 mM raztopina cisteina v pufru BANA);

cistein	24,2 mg
pufer BANA	40 mL

- raztopina papaina v pufru BANA, c=20 µg/mL;

- raztopina substrata BANA;

BANA	0,2 g
DMSO	10 mL

- barvni reagent;

Fast Garnet	0,0063 g
Brij	1 g
H ₂ O	25 mL
- reagent III, pH=6,0;

p-kloromerkuribenzoat	0,0893 g
natrijev hidroksid (NaOH), c=0,5 M	3 mL
dinatrijeva EDTA, c=0,5 M	2,768 mL
H ₂ O	15 mL
klorovodikova kislina (HCl), c=0,1 M	uravnava pH-ja do 6,0
H ₂ O	do 25 mL
- prekinitveni reagent (reagent III in barvni reagent, 1:1, v/v).

REAGENTI IN RAZTOPINE ZA POSKUS NA CELIČNIH KULTURAH

- Celice MCF-10A neo T, prof. Bonie F. Sloane, Državna Univerza Wayne, Detroit, MI;
- Substrat *Arg-Arg-krezilvijolično*, prof. Cornelious van Noorden, Univerza v Amsterdamu, Nizozemska);
- Nigrozin, epidermalni rastni faktor, inzulin, hidrokortizon, antibiotika streptomycin in penicilin, Sigma, St. Lois, MO, ZDA;
- Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS reagent), Promega, Madison, WI, ZDA;
- Zarodni goveji serum, HyClone, Logan, UT, ZDA;
- Medij za celične kulture, F12 in DMEM, Gibco, Carlsbad, CA, ZDA;
- Vsi ostali reagenti so bili »p.a.«.

3.2. OPREMA IN APARATURE

OPREMA IN APARATURE ZA REAKCIJE ACILIRANJA

Stresalnik Vibromix 314 EVT, Tehnica, Slovenija;

Centrifuga Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg, Nemčija;

Centrifuga Centric 150, Tehnica, Slovenija.

OPREMA IN APARATURE ZA KAPILARNO ELEKTROFOREZO

Kapilarna elektroforeza HP^{3D} Capillary Electrophoresis System, Agilent Technologies, Waldbronn, Nemčija;

Računalniški program 3D-CE ChemStation;

Steklena kapilara z mehurčno detekcijsko celico, 56cm x 50 μ m (50 cm do detektorja).

OPREMA IN APARATURE ZA SDS-PAGE

Vertikalni elektroforezni sistem Protean[®] 3 Cell, Bio-Rad, Hercules, ZDA;

Električni napajalnik PowerEase[®] 500, Invitrogen, Carlsbad, ZDA.

OPREMA IN APARATURE ZA IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE

Geli NuPAGE[™] (12 % Bis-Tris gel, 1 mm, 10 žepkov), Invitrogen, Carlsbad, ZDA;

Vertikalni elektroforezni sistem XCell Sure Lock[™], Invitrogen, Carlsbad, ZDA;

Električni napajalnik PowerEase[®] 500, Invitrogen, Carlsbad, ZDA.

OPREMA IN APARATURE ZA ENCIMSKI PREIZKUS BANA

Spektrofotometer Lambda 3 UV-VIS Spectrophotometer, Perkin-Elmer, Nemčija;

Mikrotitrski spektrofotometer Genios, Tecan, Avstrija;

Računalniški program Magellan, verzija 4.1.

OPREMA IN APARATURE ZA POSKUS NA CELIČNIH KULTURAH

Ploščice za mikroskopiranje celičnih kultur, Nalge Nunc International, Rochester, NY, ZDA;

Mikroskop Olympus IX81 Motorized Inverted Microscope;

Računalniški program Cell[®] imaging software.

OSTALO

Tehtnica, KERN ALS 120-4, KERN & Sohn GmbH, Balingen, Nemčija;

PH meter, Metrohm, Švica;

Pipete Biohit, Helsinki, Finska;

Centrifugirke za ultrafiltracijo Centricon® Ultracel YM-10, Millipore, Bedford, ZDA.

3.3. METODE DE LA

3.3.1. ACILIRANJE KOKOŠJEGA CISTATINA

Kokošji cistatin (v nadaljevanju cistatin) smo acilirali z metodo aciliranja v vodni raztopini acetonitrila. Najprej smo pripravili raztopine kislinskih kloridov (0,016 M kaproilklorida, 0,016 M oktanoilklorida, 0,016 M dekanoilklorida, 0,016 M lavroilklorida, 0,016 M miristoilklorida, 0,016 M palmitoilklorida in 0,011 M stearoilklorida) v acetonitrilu.

Kislinski klorid, ki ga v vodi solubiliziramo s pomočjo acetonitrila, prihaja v stik s cistatinom, na katerem poteče reakcija aciliranja. Pri tem nastane kovalentna vez med reaktivno aminokislinsko skupino na cistatinu (Lys) in karbonilno skupino kislinskega klorida maščobne kisline (kaprinske, oktanojske, dekanoske, lavrinske, miristinske, palmitinske ter stearinske). Zaradi bazičnega medija reakcija poteče v smeri nastanka najstabilnejše, amidne vezi.

Potencialna mesta na cistatinu za nastanek N-aciliranega proteina so predvsem na aminskih skupinah lizina (Lys) ter v manjši meri arginina (Arg). Cistatin ima 14 potencialnih mest za nastanek amidne vezi. Ob predpostavki, da se med reakcijo terciarna zgradba cistatina ne spreminja, je pet aminskih skupin za reakcijo nedostopnih (Arg-23, Arg-43, Arg-52, Arg-68 ter Lys-73), dve sta deloma sterično zakriti (Lys-59 in Lys-109), **sedem** preostalih aminskih skupin pa z veliko verjetnostjo sodeluje v reakciji (Lys-39, Lys-51, Lys-91, Lys-114, Arg-34, Arg-46 ter N-konec) (38).

POSTOPEK

K 95 μL karbonatnega puфра (pH 9,4) smo dodali 25 μL delovne raztopine cistatina (1 mg/mL, 0,08 mM) in 30 μL acetonitrila. V acetonitrilu smo predhodno pripravili raztopine kislinskih kloridov v takšni koncentraciji, da smo v končni reakcijski zmesi dobili 50-kratni molski prebitek glede na cistatin. Koncentracija cistatina v reakcijskih zmesih je bila 167 $\mu\text{g/mL}$. Nastale reakcijske zmesi smo nato 30 minut mešali s stresalnikom Vibromix 314 EVT, naslednjih 30 minut pa smo jih pustili mirovati. Po pretečeni uri smo jih 30 minut centrifugirali pri 7 °C in 11.000 rpm. Na koncu smo jih shranili v zamrzovalniku za nadaljnjo uporabo.

V primeru aciliranja cistatina s stearoilkloridom je bila koncentracija acetonitrila 30 odstotkov: k 80 μL karbonatnega puфра (pH 9,4) smo dodali 25 μL delovne raztopine cistatina (1 mg/mL) in 45 μL acetonitrila z raztopljenim stearoilkloridom.

3.3.2. KAPILARNA ELEKTROFOREZA

Proteini so polielektroliti in se kot taki radi adsorbirajo na negativno nabito površino steklene kapilare. Ena od rešitev, da se izognemo tej težavi in posledično raztegnjenim vrhovom, je analiza pri ekstremnih pH. Če je pH medija nad pI proteina (kot tudi v našem primeru), je celokupni naboj proteina negativen in ga zato negativna površina kapilare odbija (39).

Pogoji analize so bili: injiciranje 40 mbar x 40 sekund, napetost 25 kV, temperatura 30 °C in valovna dolžina detekcije 200 nm (mehurčna detekcijska celica). Pred analizo smo kapilaro spirali 2 minuti s 50 mM boratnim pufrom (pH=9,3), po analizi pa 1 min z 0,1 M NaOH in 1 min s 50 mM boratnim pufrom (pH=9,3).

PRIPRAVA VZORCEV in POSTOPEK ANALIZE

Pripravljene vzorce cistatina ($c = 167 \mu\text{g/mL}$), aciliranega z različnimi maščobnimi kisljinami, smo 5-krat razredčili (iz 4 μL na 20 μL) in jih s pipeto vnesli v plastične vialе.

Čas analize za en vzorec je znašal 20 minut. Na vsakih 10 analiz smo zamenjali elektroforezni pufer.

3.3.3 SDS-PAGE

PRIPRAVA GELOV

Najprej smo pripravili raztopino za ločitveni poliakrilamidni gel, pri čemer smo 10-odstotni amonijev persulfat in TEMED dodali tik pred vlivanjem raztopine med obe stekleni plošči. Površino akrilamidne zmesi, ki je segala do treh četrtin višine plošč, smo takoj prekrili z butanolom, nasičenim z vodo (približno 1 mL), ki prepreči oksidacijo vrhnje plasti gela ob stiku z zrakom. Gel smo pustili polimerizirati 30 minut na sobni temperaturi. Nato smo odlili z vodo nasičen butanol, gel dobro sprali z destilirano vodo in ga temeljito osušili s filter papirjem. Nad ločitveni gel smo odpipetirali približno 1 mL 5-odstotnega koncentracijskega gela, ki smo ga pripravili in dobro premešali tik pred vlivanjem. V koncentracijski gel smo vstavili glavniček z desetimi žepki in pustili polimerizirati približno 30 minut na sobni temperaturi. Ko smo glavniček odstranili, smo gel postavili v celico za vertikalno elektroforezo Protean[®] 3 Cell, vanjo vlili elektroforezni pufer ter z njim dobro sprali žepke.

PRIPRAVA PUFROV IN VZORCEV

Glicinski elektroforezni pufer smo razredčili z destilirano vodo v razmerju 1 : 10 do 1 L.

Vzorci za nanos smo pripravili tako, da smo k 5,8 µL nanašalnega pufera in 2,9 µL 1 M DTT-ja dodali 7,3 µL dvakrat razredčenega vzorca (3,65 µL vzorca + 3,65 µL destilirane vode). Nizkomolekulski označevalec velikosti proteinov (LMW-označevalec) pa smo pripravili tako, da smo k 15,75 µL nanašalnega pufera dodali 0,25 µL LMW-označevalca. Tako pripravljene vzorce za nanos smo nato 10 minut izpostavili 90 °C. V sprane žepke smo s pipeto nanašali po 16 µL ohlajenih vzorcev.

POSTOPEK

Elektroforeza je potekala pri konstantni napetosti 100 V, dokler elektroforezna fronta ni pripotovala do spodnjega roba gela (približno 2 uri). Gele smo barvali s srebrovim nitratom.

3.3.4 IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE

PRIPRAVA GELOV

Gelu NuPAGE™ smo odstranili glavniček in ga postavili v celico za vertikalno elektroforezo XCell Sure Lock™. Spodnji prostor elektroforezne celice smo napolnili z anodnim pufrom, zgornjega pa s katodnim pufrom. S katodnim pufrom smo dobro sprali žepke gela.

PRIPRAVA PUFROV IN VZORCEV

Z destilirano vodo smo 20 mL anodnega pufra razredčili do 1 L, 20 mL katodnega pa do 200 mL. 10 µL vzorca smo dodali 10 µL nanašalnega pufra. 2,5 µL z destilirano vodo razredčenega (1 : 1, v/v) IEF-označevalca smo z nanašalnim pufrom dopolnili do 10 µL. Vzorce smo s pipeto nanegli v žepke gela.

POSTOPEK

IEF je prvo uro potekal pri konstantni napetosti 100 V, naslednjo uro pri 200 V, na koncu pa 30 minut pri 500 V. Gele smo barvali s srebrovim nitratom.

3.3.5. BARVANJE POLIAKRILAMIDNIH GELOV

Vsi koraki so potekali ob stresanju pri 50 rpm na sobni temperaturi. Najprej smo gel s steklenih ploščic prenesli v petrijevko z raztopino za fiksiranje in stresali 30 minut, nato

smo ga sprali z destilirano vodo in izpostavili predtretiranju z raztopino natrijevega tiosulfata. Po 30 minutah je sledilo temeljito spiranje z destilirano vodo (trikrat po pet minut). Gel smo barvali 20 minut v raztopini srebrovega nitrata in ga po spiranju z vodo razvijali v raztopini za razvijanje, dokler se niso pojavile lise, približno 15 minut.

3.3.6. ENCIMSKI PREIZKUS BANA

Inhibitorno aktivnost cistatina po aciliranju z maščobnimi kislinami smo določali z encimskim preizkusom BANA. Metoda temelji na hidrolizi BANA (natrijev benzoil-*D,L*-arginin- β -naftilamid), ki je substrat za encim papain. Pri tem se sprosti β -naftilamin in z diazonijevo soljo Fast Garnet tvori obarvano azo spojino.

Absorbanca raztopine, ki jo merimo pri 520 nm, je merilo za aktivnost papaina; večja je absorbanca, bolj je encim aktiven. Ob prisotnosti cistatina, inhibitorja papaina, je hidroliza substrata preprečena, zato je absorbanca raztopine manjša.

POSTOPEK

20 μ L vzorca z določeno koncentracijo aciliranega oziroma neaciliranega cistatina (2,5, 5, 10 in 20 μ g/mL) ali 20 μ L slepega kontrolnega vzorca smo dodali 10 μ L raztopine papaina in 75 μ L raztopine njegovega aktivatorja cisteina (aktivacijskega pufra) ter inkubirali 5 minut pri 37 °C. Nato smo dodali 5 μ L raztopine substrata BANA in inkubirali pri 37 °C 10 minut. Reakcijo smo prekinili z dodatkom prekinitvenega reagenta (100 μ L) in izmerili absorbanco raztopine.

Uporabljali smo tudi dva kontrolna vzorca. V prvem primeru smo reakcijski vzorec nadomestili s pufrom BANA – izmerjene absorbance so pokazale, kakšna je maksimalna aktivnost papaina (vzorec K₁). Z drugo kontrolo, ki ni vsebovala niti cistatina niti papaina (dodali smo le ustrezno količino pufra BANA), smo preverili vpliv reakcijskega ozadja (vzorec K₂).

3.3.7. POSKUS NA CELIČNIH KULTURAH

Celice MCF-10A neo T, ki smo jih uporabili, izvirajo iz celične linije človeških epiteljskih prsnih celic. Vstavili so jim gen za rezistenco na neomicin in onkogen c-Ha-ras. Celične kulture smo gojili v monosloju v mediju DMEM/F12 (1 : 1, v/v) z dodatki: 2 mM glutamin, 10 µg/mL inzulina, 0,5 µg/mL hidrokortizona, 20 ng/mL epidermalnega rastnega faktorja, 12,5 mM HEPES, antibiotiki in 5-odstotni zarodni goveji serum pri 37 °C, v vlažni atmosferi in s 5 % CO₂. Pred uporabo smo jih odcepili od podlage z 0,05-odstotnim tripsinom in 0,02-odstotno EDTA v PBS (pH=7,4). Vitalna sposobnost celic je bila okoli 90 %, kar smo preverili z barvilom nigrozin.

S tem poskusom smo preverili učinek aciliranega cistatina na aktivnost znotrajceličnega katepsina B. Pri tem smo uporabili specifični substrat *Z-Arg-Arg-krezilvijolično*. Katepsin B odcepi enega ali oba arginina od te molekule, kar se pokaže v obliki rdeče fluorescence. Intenziteta te fluorescence je sorazmerna aktivnosti katepsina B. Z dodatkom inhibitorja tega proteolitičnega encima, cistatina, se njegova aktivnost zmanjša in s tem tudi intenziteta fluorescence.

POSTOPEK

Najprej smo izračunali volumen vzorca, ki smo ga nato nanegli na celice:

$c_K(\text{cist}) = 0,2 \mu\text{M}$	$c_K = \frac{n}{V_K} = \frac{m}{M \times V_K}$ $m = c_K \times M \times V_K = 0,2 \mu\text{mol} / L \times 13000 \text{g} / \text{mol} \times 200 \mu\text{L} = 0,52 \mu\text{g}$ $V = \frac{0,52 \mu\text{g} \times 1000 \mu\text{L}}{167 \mu\text{g}} = 3,1 \mu\text{L}$
$V_K = 200 \mu\text{L}$	
$c(\text{cist}) = 167 \mu\text{g/mL}$	

c_K ... končna koncentracija

V_K ... končni volumen

V ploščice za mikroskopiranje celičnih kultur Lab-Tek smo vnesli celične kulture in jih inkubirali v mediju. Po dveh dneh smo odstranili medij in jih sprali s PBS ter dodali medij brez seruma. V prisotnosti inhibitorja (neaciliranega in aciliranega s posameznimi maščobnimi kislinami) smo celice inkubirali 15 minut. Nato smo zamenjali medij

(odstranili inhibitor) in dodali 200 μL substrata (10 μM ; razredčevanje: 1 μL na 26 μL in nato 10 μL na 1000 μL ; od teh 1000 μL odvzamemo 200 μL). Na mikroskopu smo po ekscitaciji (516–555 nm) spremljali rdečo fluorescenco (547–648 nm).

4. REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1. REAKCIJE ACILIRANJA CISTATINA IN KAPILARNA ELEKTROFOREZA

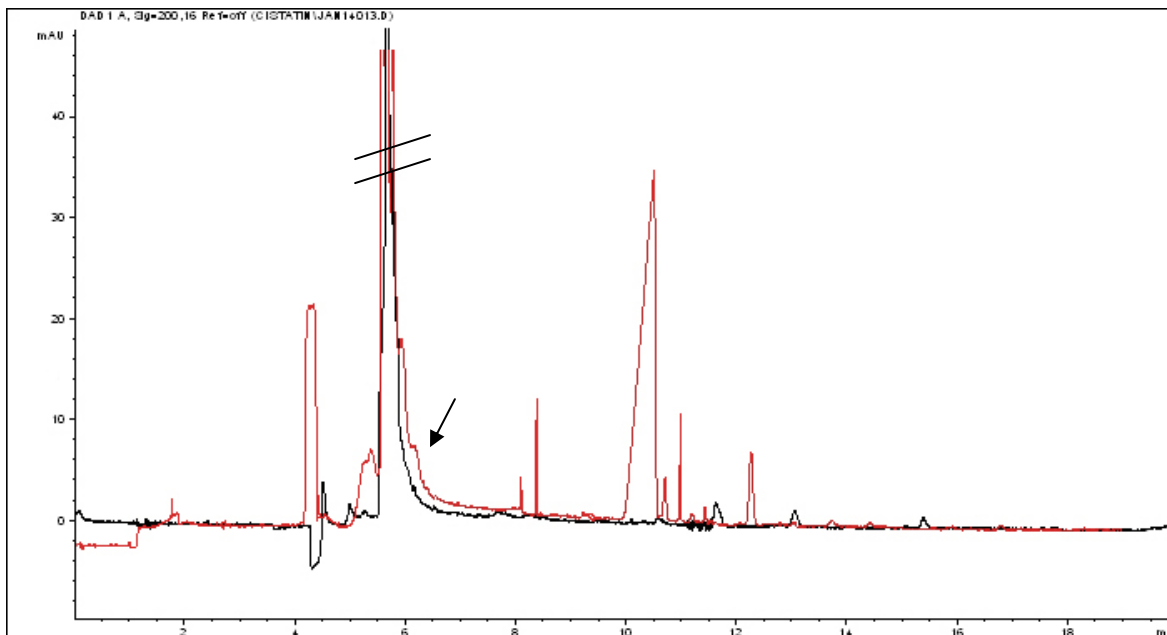
Po reakciji aciliranja cistatina s kislinskimi kloridi maščobnih kislin smo rezultate naše reakcije preverili s kapilarno elektroforezo. Ta metoda je izredno uporabna za veliko različnih analitov, od majhnih anorganskih ionov do velikih biopolimerov (39). Izkazala se je tudi v našem primeru, ko smo morali analizirati velike molekule proteina, na voljo pa smo imeli le majhen volumen reakcijske zmesi (120 μ L).

V nadaljevanju smo uporabili oznake: **C0** za cistatin **brez** dodanega reagenta (kislinskega klorida); **C6** za cistatin, aciliran s **šest** ogljikovih atomov dolgo kaprinsko kislino; **C8** za cistatin, aciliran z **osem** ogljikovih atomov dolgo oktanojsko kislino; **C10** za cistatin, aciliran z **deset** ogljikovih atomov dolgo dekanosko kislino; **C12** za cistatin, aciliran z **dvanajst** ogljikovih atomov dolgo lavrinsko kislino; **C14** za cistatin, aciliran s **štirinajst** ogljikovih atomov dolgo miristinsko kislino; **C16** za cistatin, aciliran s **šestnajst** ogljikovih atomov dolgo palmitinsko kislino; **C18** za cistatin, aciliran z **osemnajst** ogljikovih atomov dolgo stearinsko kislino.

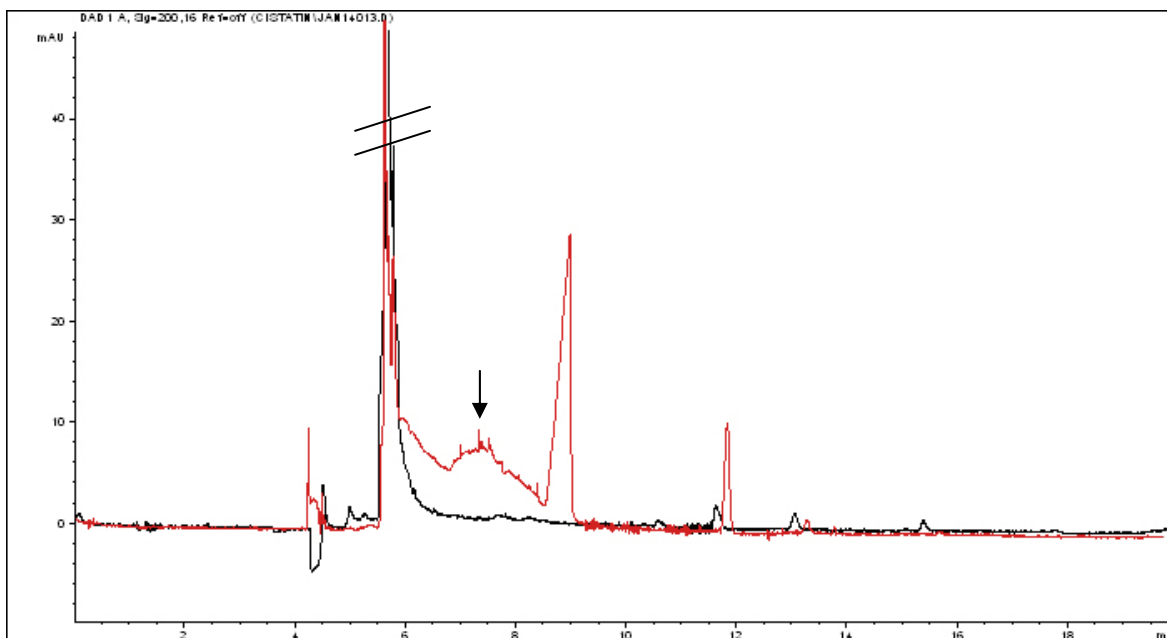
Slepa X je vzorec brez cistatina; število pove število C atomov maščobne kisline; (X=0, 6, 8, 10, 12, 14, 16 in 18)

Na elektroferogramih, ki smo jih dobili po analizi vzorcev aciliranega cistatina, je razvidno, da je v reakcijski zmesi poleg aciliranega cistatina prisoten še majhen del nezreagiranega cistatina. Acilirani cistatin se pojavi v obliki razširjenega vrha z daljšim migracijskim časom. Nezreagirani cistatin predstavlja nekoliko ožji vrh takoj na začetku, pri 5,75 minuti in se časovno ujema s kontrolo (C0) (slike 3 do 9).

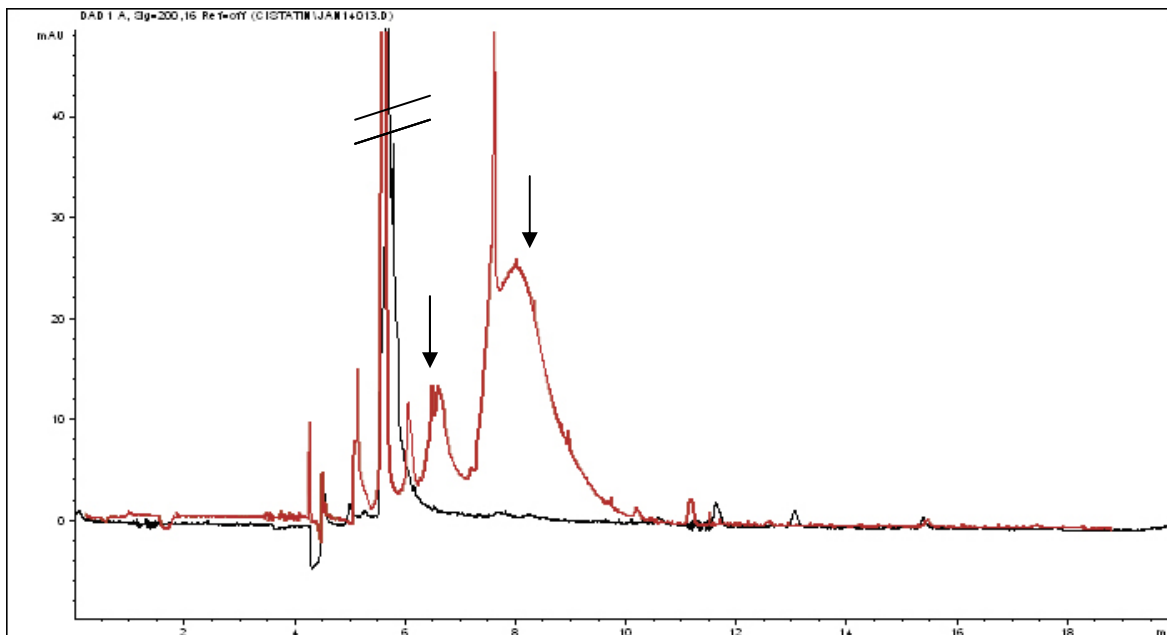
Cistatin obstaja v dveh izoelektričnih oblikah (5,6 in 6,5), ki se na kapilarni elektroforezi ločita. Ker je razlika med obema oblikama minimalna (ena dodatna negativna skupina) se ta ločitev kaže le v razcepljenosti vrha pri 5,75 minuti.



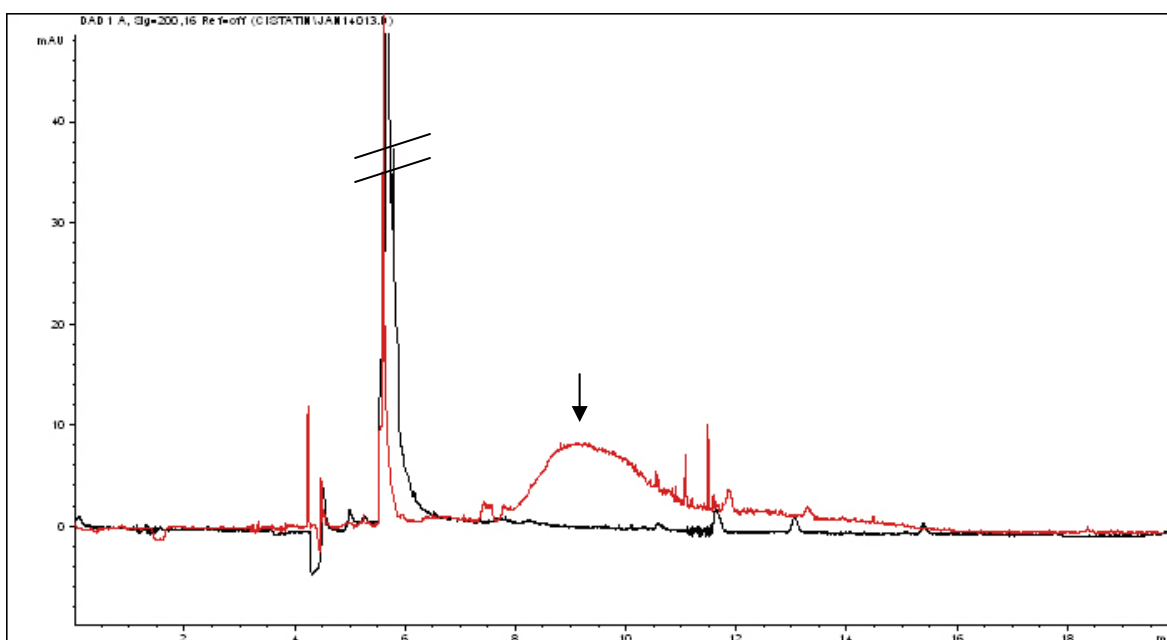
Slika 3: Elektroferogram vzorcev C0 (črna krivulja) in C6 (rdeča krivulja). Acilirani cistatin je dodatni vrh pri 6. minuti (označen s puščico); nezreagirani cistatin (C0) predstavlja vrh pri 5,75 minuti. Pogoji analize: 50 mM boratni pufer (pH=9,3), injiciranje 40 mbar x 40 sekund, napetost 25 kV, temperatura 30 °C in valovna dolžina detekcije 200 nm; Ccistatina = 167 µg/mL.



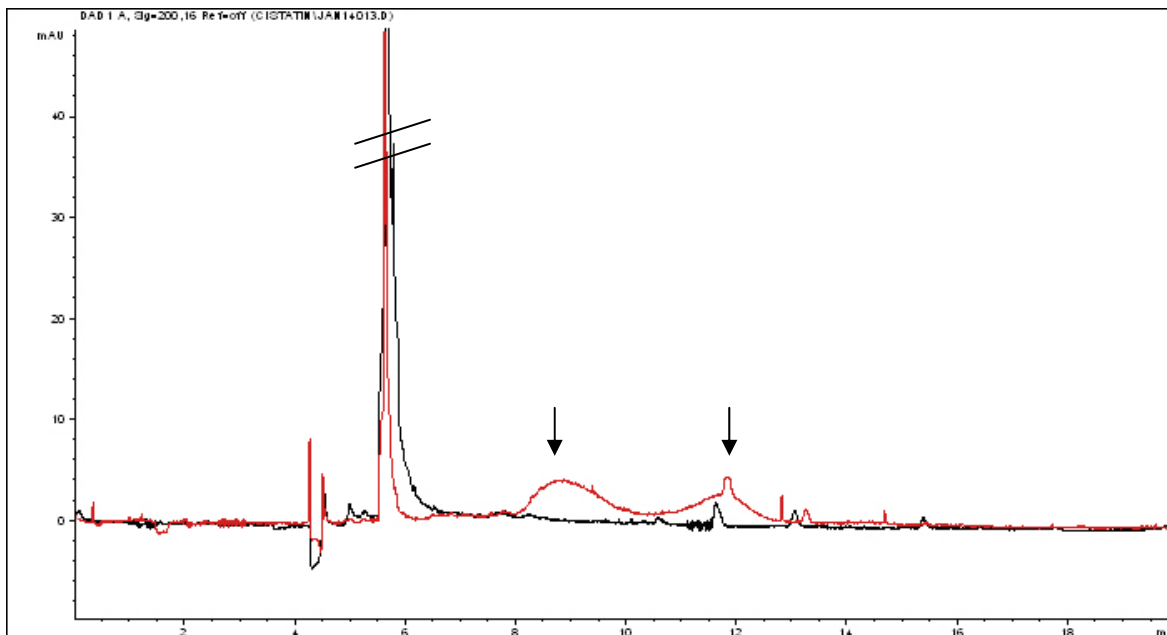
Slika 4: Elektroferogram vzorcev C0 (črna krivulja) in C8 (rdeča krivulja). Acilirani cistatin predstavlja razširjen vrh pri 7,5 minuti (označen s puščico).



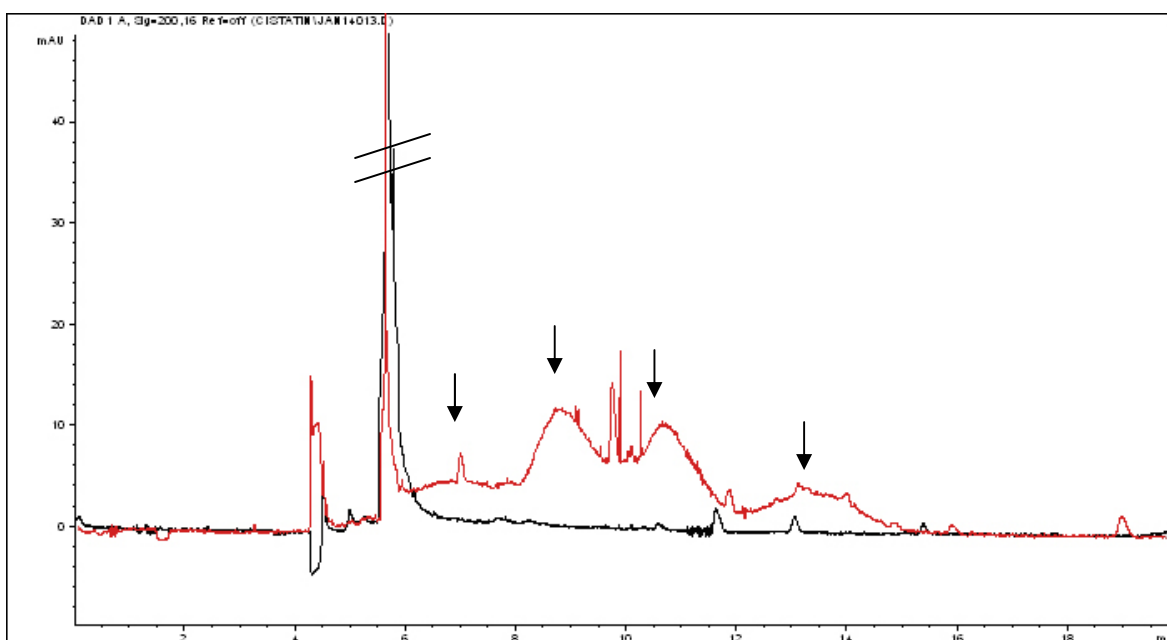
Slika 5: Elektroferogram vzorcev C0 (črna krivulja) in C10 (rdeča krivulja). Acilirani cistatin predstavlja vrh pri 6,75 minuti in 8,5 minuti (označena s puščico).



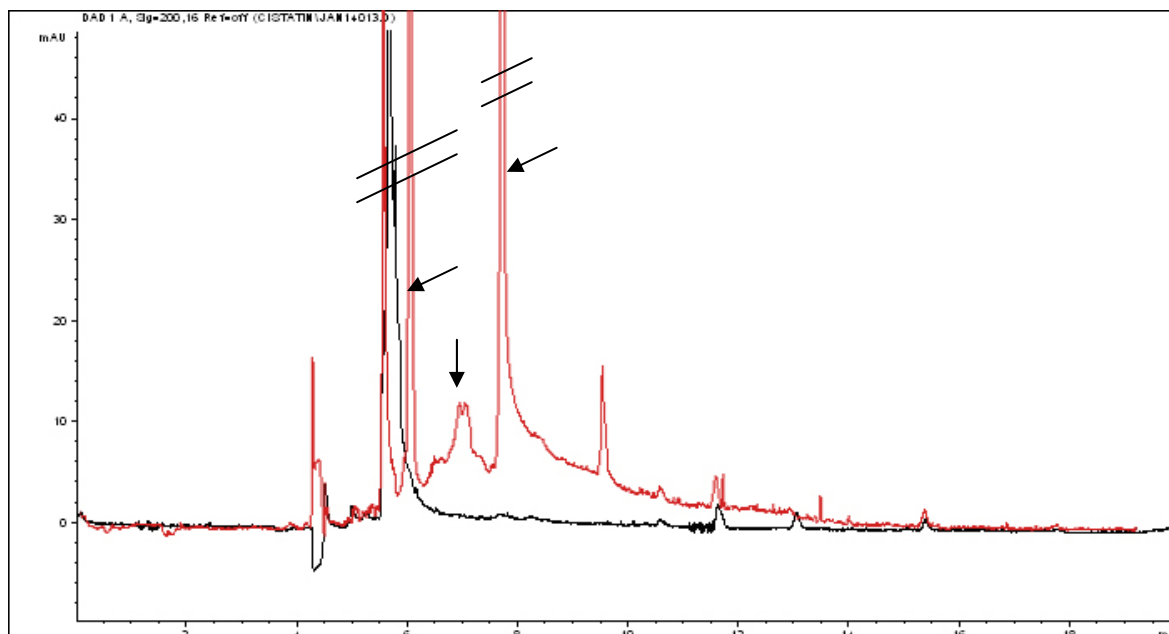
Slika 6: Elektroferogram vzorcev C0 (črna krivulja) in C12 (rdeča krivulja). Acilirani cistatin predstavlja vrh pri 9,5 minut (označen s puščico).



Slika 7: Elektroferogram vzorcev C0 (črna krivulja) in C14 (rdeča krivulja). Acilirani cistatin predstavlja položnejši vrh pri 9. minuti in 12. minuti (označena s puščico).



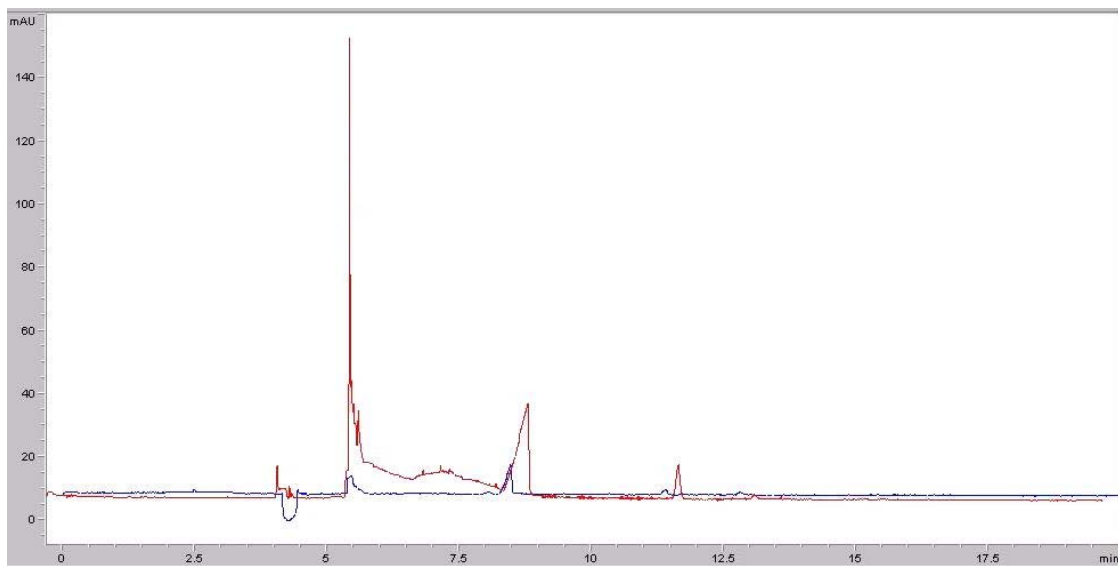
Slika 8: Elektroferogram vzorcev C0 (črna krivulja) in C16 (rdeča krivulja). Acilirani cistatin predstavlja položnejši vrh pri 7. minuti, 9. minuti, 11. minuti in 13,5 minuti (označeni s puščico).



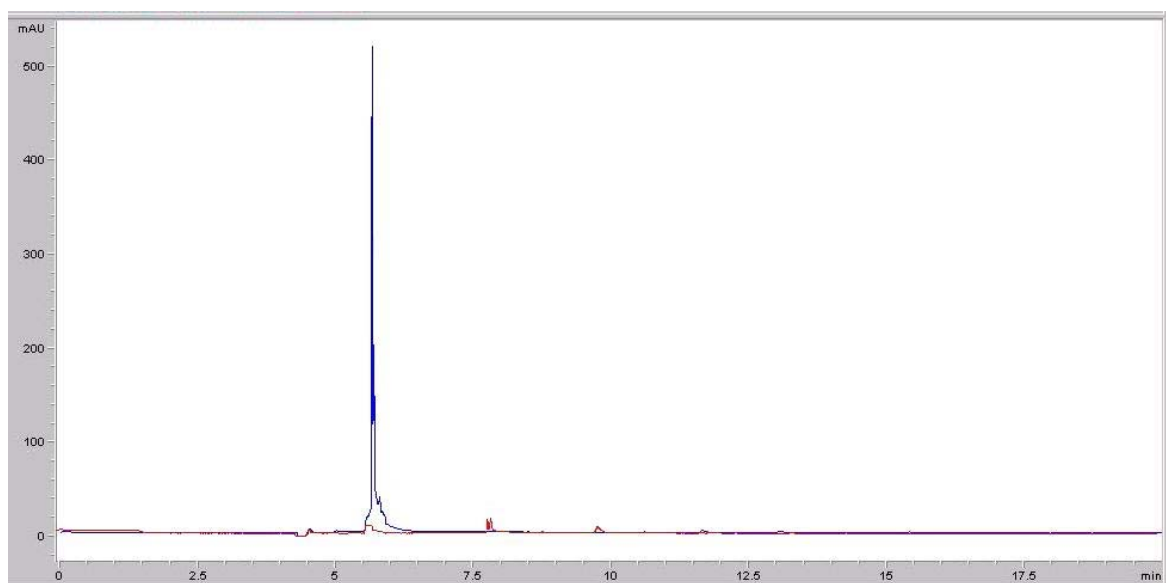
Slika 9: Elektroferogram vzorcev C0 (črna krivulja) in C18 (rdeča krivulja). Acilirani cistatin predstavlja ozki vrh pri 6,25 minuti, širši in položnejši pri 7. minuti ter višji vrh pri 8. minuti (označeni s puščico).

Migracijski čas aciliranega proteina se spremeni (podaljša), ker z uvedbo maščobnih verig na proste aminske skupine zmanjšamo pozitiven naboj na molekuli, število negativnih (karboksilnih) skupin pa ostane enako. Zato je celokupni naboj proteina negativen. Negativno nabite molekule pa počasneje potujejo proti negativni katodi.

V primeru elektroferogramov za vzorce C6, C8, C10 in C12 so poleg razširjenih vrhov tudi ostri vrhovi (v obliki zoba), ki najverjetneje pripadajo solem maščobnih kislin (slike 3 do 5). Te so nastale ob hidrolizi kislinskega klorida. To sklepamo glede na primerjavo vzorcev aciliranega cistatina s slepimi vzorci, ki ne vsebujejo proteinov, pač pa vse ostale komponente reakcijske zmesi (slika 10). Da ne gre za katero izmed ostalih komponent reakcijske zmesi, pa dokazuje še primerjava z elektroferogramoma C0 in slepo 0 (v teh dveh primerih nismo dodali klorida maščobnih kislin), ki ne kažeta vrha v takšni obliki (slika 11).

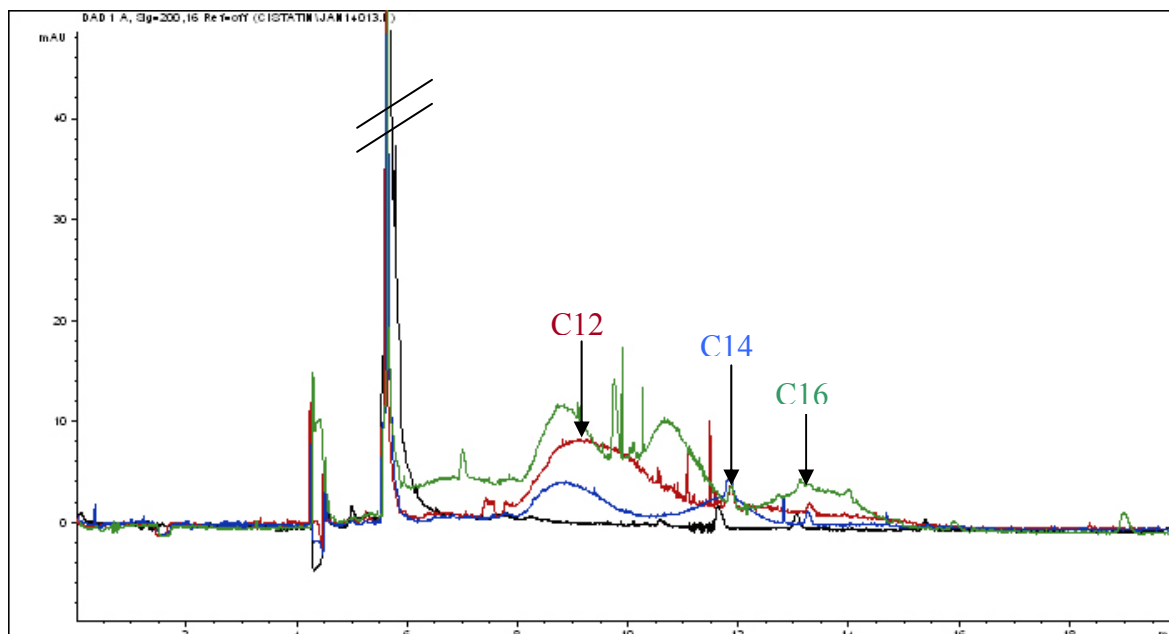


Slika 10: Elektroferogram vzorcev C8 (rdeča krivulja) in slepe 8 (modra krivulja). Karboksilna kislina je oster vrh pri 8,5 minuti (označen s puščico).



Slika 11: Elektroferogram vzorcev C0 (modra krivulja) in slepe 0 (rdeča krivulja).

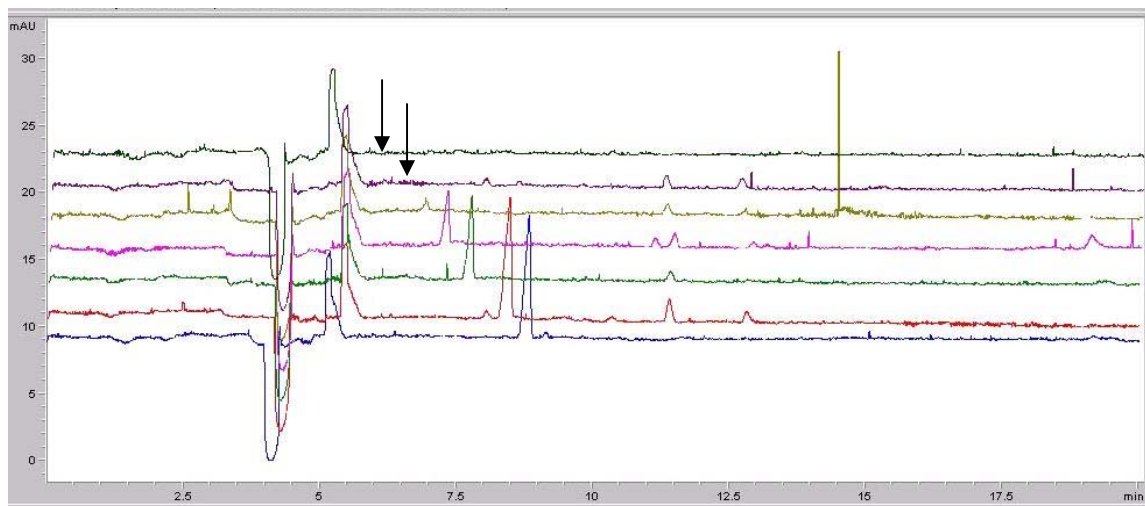
Če primerjamo migracijski čas cistatinov z različno dolžino pripetih verig, vidimo, da so različni. Opazimo lahko časovno zaporedje. C6 ima razširjen vrh z najkrajšim migracijskim časom, sledita C8 in C10. Ostali, od C12 do C16 imajo vrhove s približno podobnim časom. Vendar pa lahko opazimo, da se zadnji vrhovi končujejo še vedno v časovno logičnem zaporedju. Torej C12 ima krajši migracijski čas kot zadnji vrh pri C14, C14 pa krajši od zadnjega vrha pri C16.



Slika 12: Elektroferogrami aciliranega cistatina; črna krivulja C0, rdeča C12, modra C14 in zelena C16.

Daljša je maščobna kislina, dlje časa acilirani protein potuje do detektorja. Izjema je primer C18, kjer smo zaradi premalo topnega reagenta (stearoilklorida) vzorcu dodali 30 odstotkov acetonitrila. Rezultat, ki smo ga dobili, so ozki in visoki vrhovi (slika 9). Ti so verjetno posledica boljše topnega aciliranega proteina, ki se ne poveže v agregate, zato vrhovi niso razširjeni kot v primeru ostalih vzorcev (z 20-odstotnim acetonitrilom). Posledično je tudi migracijski čas vrhov pri C18 krajši, kot bi pričakovali.

Drugo možno pojasnilo, zakaj so v primeru C18 ozki vrhovi, je, da je stearoilklorid še vedno premalo topen v reakcijski zmesi (kljub povečanemu volumnu acetonitrila). Tako pride do nižje stopnje zasedenosti aaminskih skupin na cistatinu. Dokaz za to je primerjava slepih vzorcev. Zobati vrhovi si po velikosti sledijo od najmanjšega (pri slepi 14) do največjega (pri slepi 6). V primeru slepe 16 in slepe 18 vrhov sploh ni videti, saj sta maščobni kislini preveč lipofilni in se po reakciji oborita, nato pa ju popolnoma odstranimo s centrifugiranjem (slika 13).



Slika 13: Elektroferogrami slepih vzorcev z različnimi maščobnokislinskimi kloridi (brez cistatina); modra krivulja slepa 6, rdeča slepa 8, zelena slepa 10, vijolična slepa 12, svetlo zelena slepa 14, temno vijolična slepa 16 in temno zelena slepa 18.

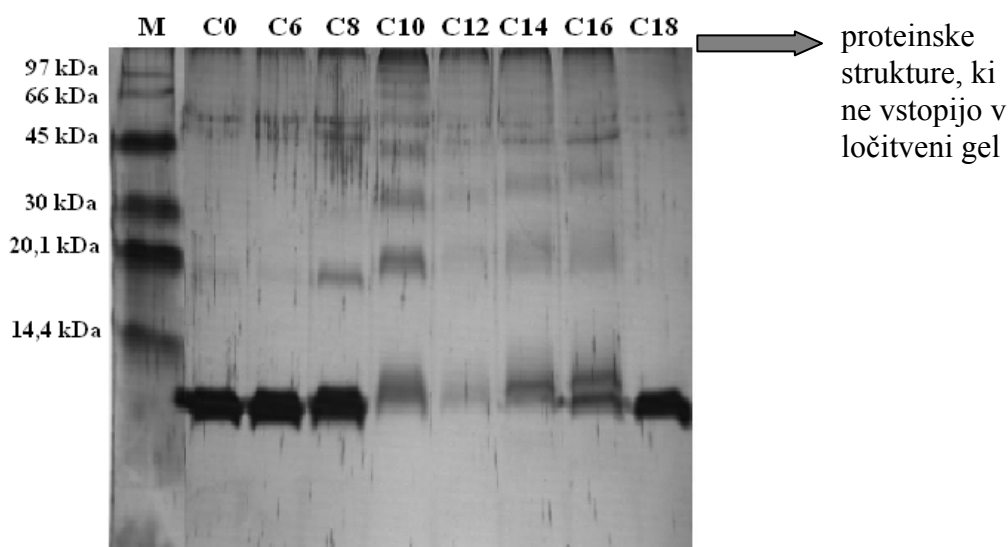
Pojasnilo za več različno velikih vrhov ter z različnim migracijskim časom pri istem vzorcu (npr. C16) bi lahko bilo, da imamo že samo v eni reakcijski zmesi zmes z različno stopnjo modificiranih proteinov (npr. na eni molekuli so zasedene tri aminske skupine, na drugi 5 ...). Izključiti pa ne moremo niti možnosti, da so vsi ti različni vrhovi zmes tako različne stopnje modifikacije kot tudi različno velikih agregatov, v katere so povezane acilirane molekule cistatina.

Metoda, ki smo jo uporabili, torej aciliranje v vodni raztopini acetonitrila, je sicer ugodna za ohranjanje naravnih lastnosti proteina, vendar po drugi strani omogoča nekontrolirano in nespecifično vezavo maščobnih kislin. Produkti, ki jih dobimo, so proteini z visoko in različno stopnjo substitucije. Več kot je vezanih maščobnih skupin, bolj je protein lipofilen in s tem netopen v vodi. To lahko pripelje do intermolekulskih interakcij in posledično nastanka agregatov (8, 12).

4.1. SDS-PAGE

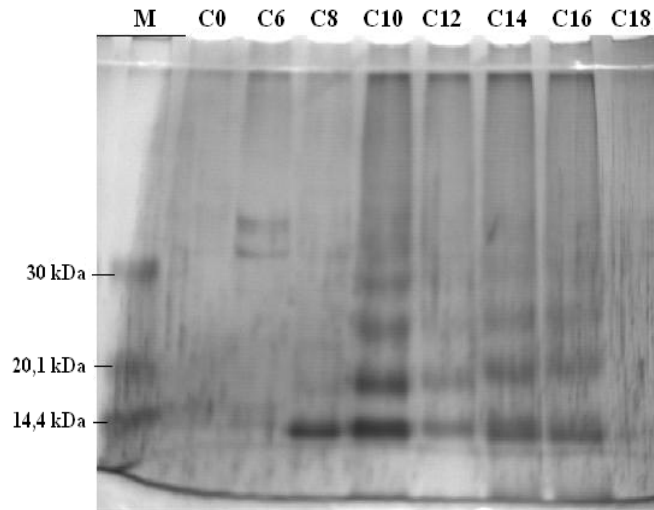
Analiza s SDS-PAGE je potrdila, da so v reakcijskih zmesih prisotne molekule proteinov. Velikost cistatina je 13 kDa, zato so trakovi neaciliranih in aciliranih molekul pod najnižjim trakom LMW-označevalca. Prisotnost dodatnih maščobnih verig, pripetih na proteinsko molekulo, ne vpliva na potovanje proteinov skozi gel, saj je njihova velikost v primerjavi s proteinom zanemarljiva.

Dobili smo tudi dokaz, ki kaže na prisotnost agregatov v vzorcih. Vsi vzorci, razen neaciliranega cistatina (C0), imajo še dodatne trakove, ki kažejo na večje strukture, kot je sam cistatin. Določene strukture so bile tako velike, da niso vstopale iz 5-odstotnega koncentracijskega v 15-odstotni ločitveni gel. To je vidno na vrhu gela v obliki tankih temnejših lis (slika 14).



Slika 14: SDS-PAGE: 15-odstotni ločitveni gel, volumen nanosa 16 μ L; koncentracija cistatina 38 μ g/mL; volumen označevalca velikosti proteinov (M) 16 μ L; barvanje s srebrovim nitratom; napetost 100 V.

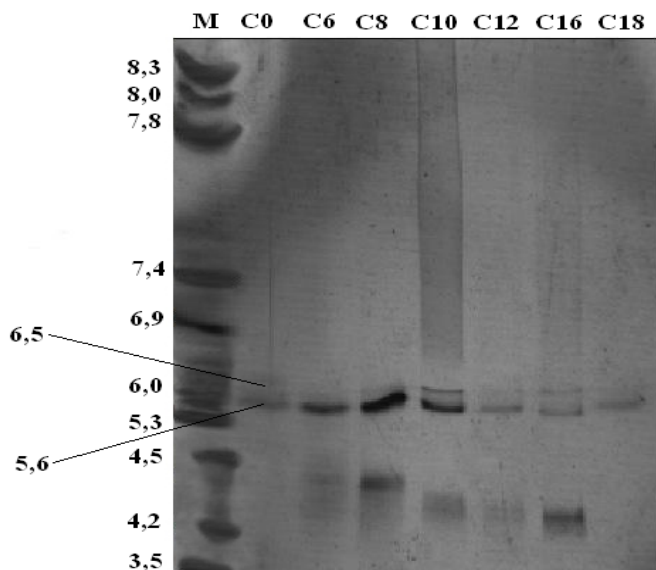
V manj zamreženem poliakrilamidu (na 10-odstotnem ločitvenem gelu) so si trakovi bližje in bolj enakomerno razporejeni, saj so večje strukture lažje potovale (slika 15).



Slika 15: SDS-PAGE: 10-odstotni ločitveni gel; volumen nanosa 16 μL ; koncentracija cistatina 38 $\mu\text{g}/\text{mL}$; volumen označevalca velikosti proteinov (M) 16 μL ; barvanje s srebrovim nitratom; napetost 100 V.

4.3. IZOELEKTRIČNO FOKUSIRANJE

Cistatin lahko, kot smo omenili že v uvodu, izoliramo v dveh izoelektričnih oblikah, in sicer ima oblika A vrednost pI 6,5, oblika B pa zaradi fosfoserina 5,6. To lahko vidimo na sliki 14 pri cistatinu, ki ga nismo acilirali (C0). Prav tako so pri istih vrednostih dvojni trakovi pri aciliranih proteinih. To je razumljivo, saj smo že na elektroferogramih opazili, da v reakcijo aciliranja ne vstopa celotna količina cistatina, pač pa del ostane nezreagirani.



Slika 16: IEF: volumen nanosa 20 μL ; koncentracija cistatina 83,5 $\mu\text{g/mL}$; volumen označevalca 10 μL ; napetost: 1. uro 100 V, 2. uro 200 V in 30 minut 500 V; barvanje s srebrovim nitratom.

Pri izoelektričnem fokusiranju proteini zaradi napetosti potujejo do točke, kjer je pH enak njihovi pI. Z uvedbo maščobnih verig na aminske skupine cistatina smo zmanjšali pozitivni ter na ta račun povečali negativni celokupni naboj. S tem se je vrednost pI zmanjšala in proteini so potovali dlje po gelu, bližje pozitivni anodi. To lahko opazimo pri vseh aciliranih oblikah cistatina, razen pri C18, kjer gre očitno za precej velike agregate, ki težko potujejo po zamreženem poliakrilamidnem gelu.

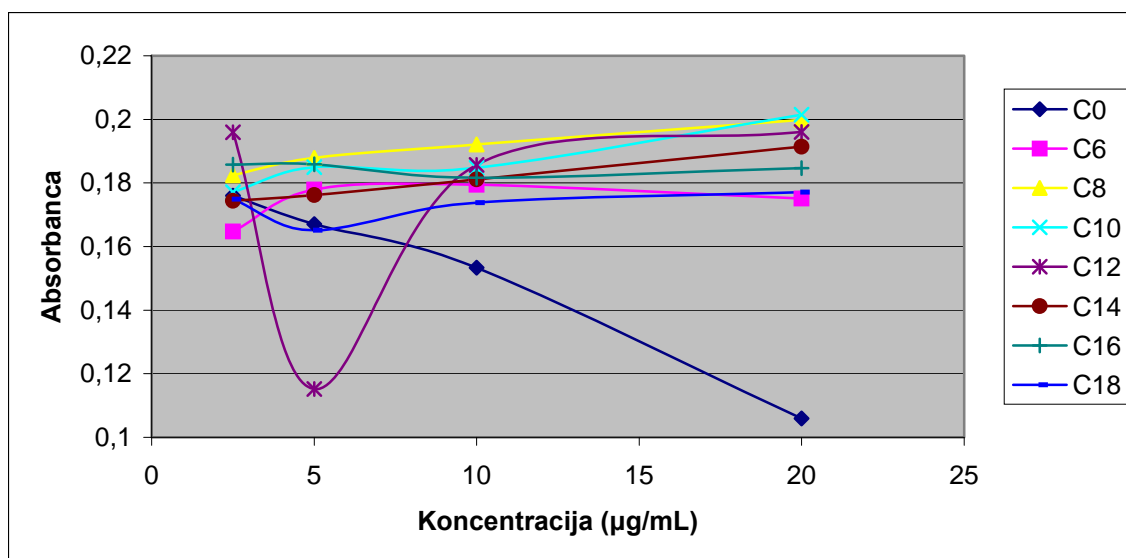
Potrdimo lahko tudi domnevo, da pride do različne zasedenosti aaminskih skupin na cistatinu. Kot vidimo na zgornji sliki, imajo trakovi različno aciliranega cistatina pod vrednostjo 5,6 različne vrednosti pI. Torej je v primeru cistatina, aciliranega s palmitinsko kislino, najverjetneje zasedenih največ pozitivnih skupin (glede na sliko 16).

Poleg tega lahko opazimo, da so spodnji trakovi raztegnjeni oziroma niso ostro zarisani, zaradi česar lahko sklepamo, da gre za različno stopnjo vezave maščobnih verig tudi znotraj posameznega vzorca.

4.4. ENCIMSKI PREIZKUS BANA

S tem preizkusom smo preverili aktivnost aciliranih cistatinov *in vitro*. Rezultati so pokazali, da se inhibitorna aktivnost cistatina po aciliranju izgubi. V primeru kontrole (neaciliranega cistatina; temno modra krivulja na sliki 17) je z večanjem koncentracije cistatina papain vedno bolj inhibiran. Zmanjšana je hidroliza substrata BANA, v manjši meri nastaja obarvan produkt in posledično so manjše absorbance. Preizkus smo napravili tudi s slepimi vzorci, ki so pokazali, da sama reakcijska zmes brez cistatina ne vpliva na aktivnost papaina.

Na sliki 17 krivulja za vzorec C12 močno odstopa od ostalih. Sklepamo, da je prišlo do napake pri delu.



Slika 17: In vitro inhibitorno delovanje neaciliranega cistatina (C0) in aciliranih cistatinov (C6, C8, C10, C12, C14, C16 in C18) na papain.

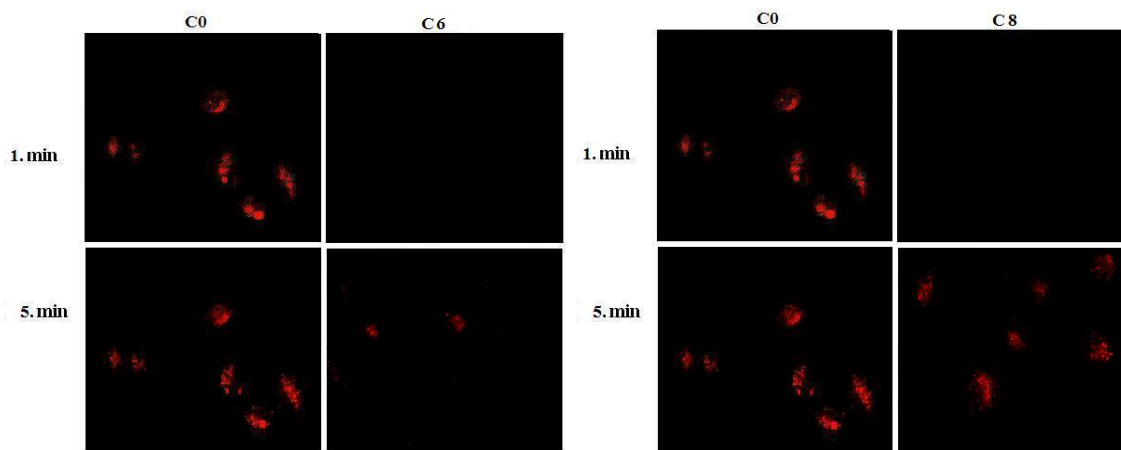
Izgubo biološke aktivnosti cistatina lahko pripišemo kemijski reakciji aciliranja s kislinskimi kloridi ali agregatom, ki jih tvorijo modificirane molekule proteinov. S slednjim se ujemajo ugotovitve iz prejšnjih dveh analiz, torej kapilarne elektroforeze in SDS-PAGE.

4.5. POSKUS NA CELIČNIH KULTURAH

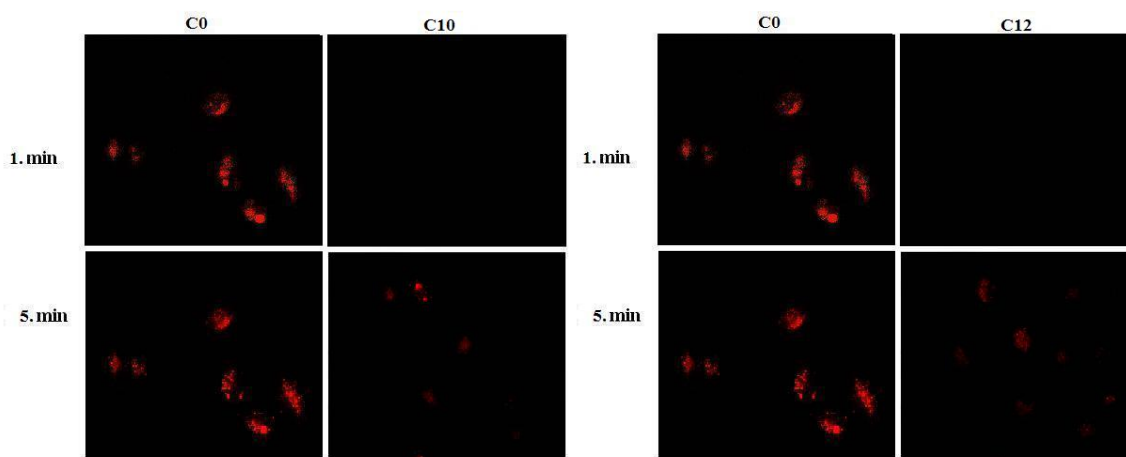
Zanimal nas je tudi *in vivo* učinek aciliranega cistatina ter vpliv dolžine maščobne verige na prehod cistatina v celico.

Pri poskusih na celičnih kulturah smo uporabili barvilo Z-Arg-Arg-krezilvijolično, za katero je znano, da neovirano prehaja skozi celično membrano v celico, kjer ga proteolitični encimi (katepsin B) cepijo v rdeče fluorescirajoči produkt (8). Kot kontrolo smo uporabili neacilirani cistatin (C0), ki rdeče fluorescence ni zmanjšal v tolikšni meri kot acilirani cistatini. S tem poskusom smo dobili rezultat, ki je v nasprotju z ugotovitvami *in vitro* preizkusa BANA. Acilirani cistatin torej ohrani biološko aktivnost in znotraj celice inhibira katepsin B (ni rdeče fluorescence oziroma nastane kasneje). Razlaga za to bi lahko bila, da so encimi, prisotni v celici, razgradili acilirani protein oziroma agregat. Tako pride do odcepitev maščobnih verig oziroma razbitja agregatov na posamezne molekule, ki so inhibitorno aktivne.

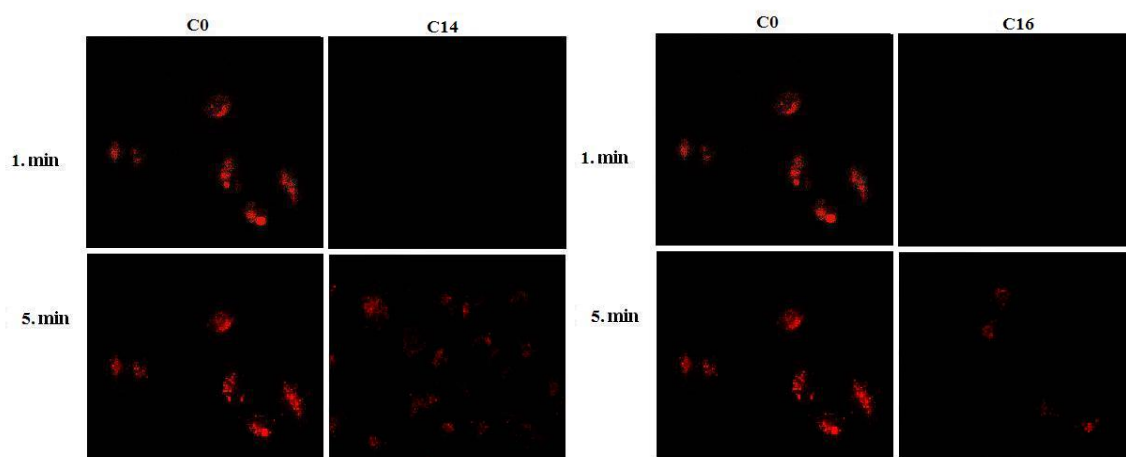
Cistatin brez vezanih maščobnih verig torej ne vstopa v celico, medtem ko acilirani proteini inhibirajo proteolizo barvila (Z-Arg-Arg-krezilvijoličnega) znotraj celice. Primerjali smo intenzitete rdečega obarvanja pri aciliranih vzorcih z neacilirano kontrolo (C0) v prvi in peti minuti. Rezultate prikazujejo slike 18 do 24, ki predstavljajo posnetke celic MCF-10A neo T ob različnih časih po dodatku barvila (volumen vzorca cistatina, dodanega celicam, 200 μ L; koncentracija cistatina 0,2 μ M). Kot vidimo, se rdeče lise pri aciliranih oblikah cistatina pojavijo šele pri peti minuti, in to manj intenzivno v primerjavi s kontrolo. Ta pojav, da v celicah, ki smo jim dodali acilirani cistatin, v začetku ni obarvanja, po določenem času pa se vendarle pojavi, lahko razložimo tako, da tudi v teh celicah inhibicija katepsina B ni popolna. Preostali aktivni katepsin počasneje hidrolizira fluorescentno barvilo, zato fluorescenco zaznamo šele po daljšem času.



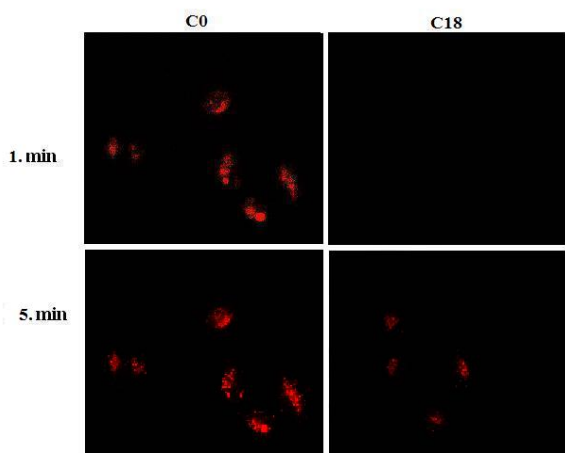
Slika 18, 19: Posnetki celic MCF-10A neo T v 1. in 5. minuti po dodatku barvila Z-Arg-Arg-krezilvijoličnega; primerjava C0 s C6 in C8.



Slika 20, 21: Posnetki celic MCF-10A neo T v 1. in 5. minuti po dodatku barvila Z-Arg-Arg-krezilvijoličnega; primerjava C0 s C10 in C12.

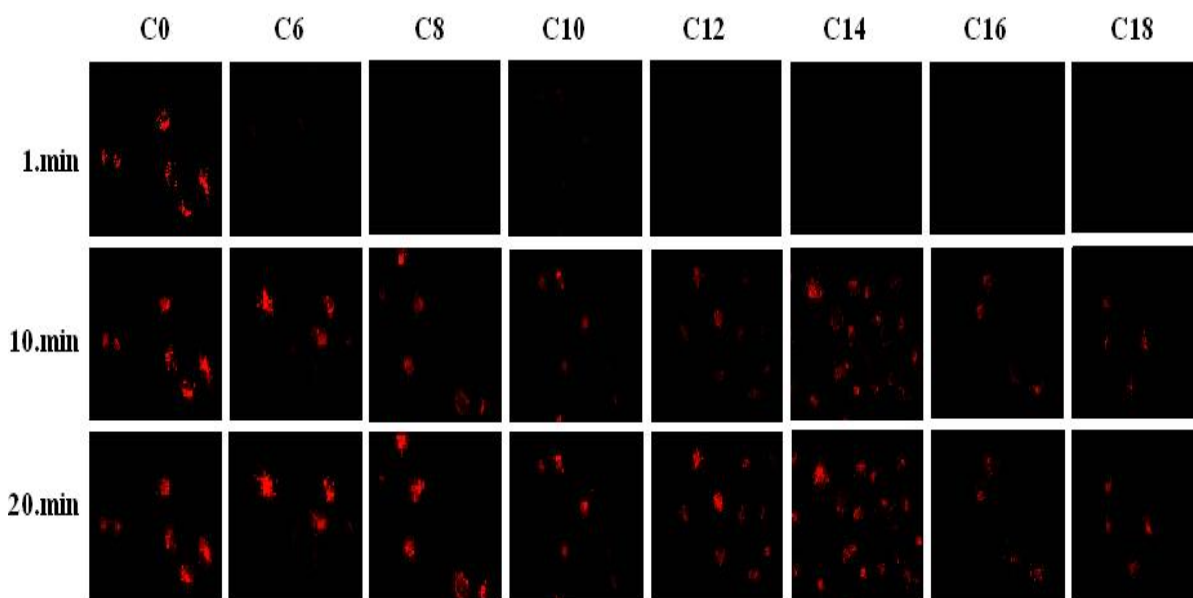


Slika 22, 23: Posnetki celic MCF-10A neo T v 1. in 5. minuti po dodatku barvila Z-Arg-Arg-krezilvijoličnega; primerjava C0 s C14 in C16.



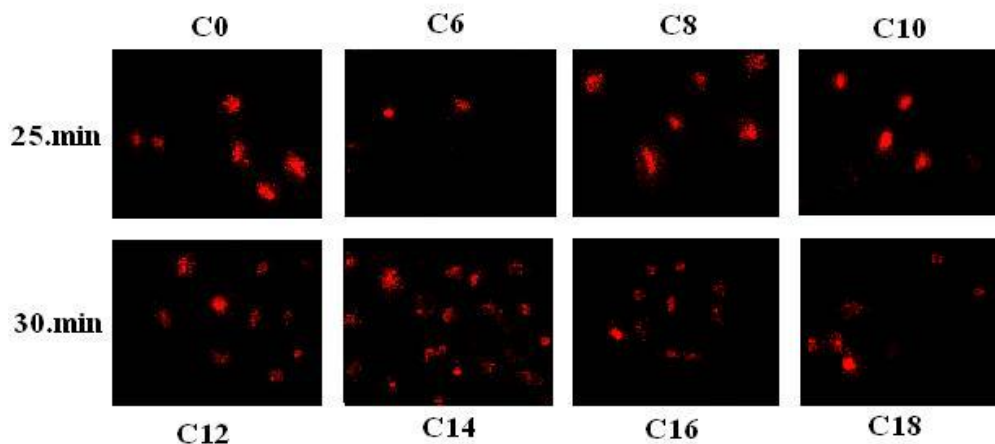
Slika 24: Posnetki celic MCF-10A neo T v 1. in 5. minuti po dodatku barvila Z-Arg-Arg-krezilvijoličnega; primerjava C0 s C18.

Ugotovili smo, da se z daljšanjem maščobne verige, vezane na cistatin, niža aktivnost katepsina B. Poleg tega je podaljšan tudi čas inhibicije. Torej, daljša je veriga, večja je lipofilnost proteina in boljši je prehod, posledično pa več cistatina v celici. Več je cistatina, dlje časa je katepsin B inhibiran. Če pogledamo spodnjo sliko (slika 25), vidimo, da intenziteta barve od C6 do C18 pada. V smeri od prve do dvajsete minute pa intenziteta barve raste, saj katepsin B razgrajuje vse več barvila. Najboljša in najdaljša je inhibicija v primeru osemnajst ogljikovih atomov dolge verige maščobne kisline.



Slika 25: Posnetki celic MCF-10A neo T v 1., 10. in 20. minuti po dodatku barvila Z-Arg-Arg-krezilvijoličnega; primerjava intenzitet rdeče fluorescence pri aciliranih vzorcih (C6, C8, C10, C12, C14, C16, C18) in kontroli (C0); volumen vzorca cistatina, dodanega celicam, 200 μ L; koncentracija cistatina 0,2 μ M;

Primerljivo obarvanje smo opazili šele po petindvajseti (pri C6, C8, C10) oziroma trideseti minuti (pri C12, C14, C16, C18) (slika 26).



Slika 26: Posnetki celic MCF-10A neo T v 25. in 30. minuti po dodatku barvila Z-Arg-Arg-krezilvijoličnega. Intenziteta obarvanja celic pri aciliranih oblikah cistatina, ki je primerljiva z intenziteto pri C0; za C6 do C10 pri petindvajseti minuti, za C12 do C18 pa po trideseti minuti; volumen vzorca cistatina, dodanega celicam, 200 μ L; koncentracija cistatina 0,2 μ M;

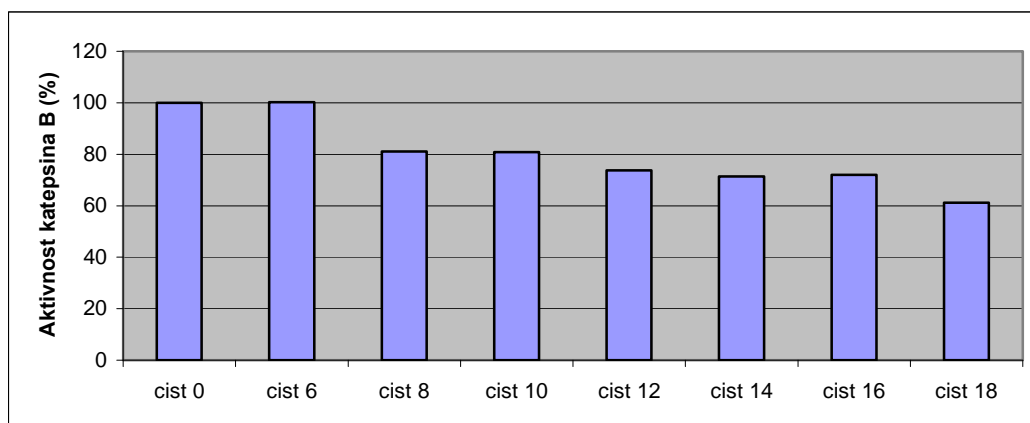
Vizualne rezultate smo želeli prikazati tudi v številkah. Izmerili smo intenziteto rdeče fluorescence v celicah, ki smo jim dodali posamezne vzorce aciliranega oziroma neaciliranega cistatina. Za vsako vrsto vzorca smo izmerili intenzitete pri povprečno 28 celicah. Dobljenim vrednostim smo nato izračunali povprečje za časovni interval med deseto in dvajseto minuto. Nato smo izračunali odstotek aktivnosti katepsina B, pri čemer smo za 100-odstotno aktivnost vzeli vrednost intenzitete pri neaciliranem cistatinu (C0) (preglednica 1).

Preglednica 1: Vrednosti izmerjenih intenzitet za posamezne vzorce med deseto in dvajseto minuto in izmerjene vrednosti, preračunane v deleže aktivnosti katepsina B.

	cist 0	cist 6	cist 8	cist 10	cist 12	cist 14	cist 16	cist 18
10-20 min	41,83207	41,91167	33,91875	33,8334	30,8541	29,85158	30,11162	25,58115
Akt. kat B	100	100,1903	81,0831	80,8791	73,757	71,3605	71,9821	61,152

Grafični prikaz padanja aktivnosti katepsina B (slika 27) sovпада s sliko 25, ki prikazuje naraščanje intenzitete rdeče barve od C6 do C18. Manjše odstopanje opazimo pri vzorcih

C6 in C14, in sicer vidimo, da je aktivnost katepsina B pri C6 nekoliko večja kot pri C0 in pri C16 nekoliko večja kot pri C14. To lahko pripišemo samim celicam, ki so živ sistem in opravljajo vsaka zase svoje življenjske procese, zato se nekoliko razlikujejo tudi njihove metabolične sposobnosti (več endosomov s proteolitičnimi encimi, bolj intenzivno se barvilo cepi). Ker so na grafu prikazane povprečne vrednosti, so v to vključene vse celice, tudi tiste z bolj intenzivnim metabolizmom.



Slika 27: Aktivnost katepsina B znotraj celice, ki pada z daljšanjem dolžine maščobne verige na cistatinu.

Dokazali smo, da acilirani cistatin pride v celico ter ohrani biološko aktivnost. Zaenkrat pa ne poznamo še samega mehanizma prehoda. Pri tem lahko le ugibamo, ali maščobne verige omogočijo prehod proteinske molekule skozi lipidni dvosloj ali pa le poskrbijo za vezavo proteina na celično membrano, čemur nato sledi endocitoza. V literaturi lahko o tem najdemo različne teorije. V nekaterih primerih se je izkazalo, da acilirani proteini ostanejo znotraj celice ujeti v endosomskih veziklih in se ne sprostijo v citoplazmo (15). V našem primeru, ko smo cistatin uporabili kot potencialno terapevtsko učinkovito molekulo za inhibicijo katepsinov, bi bil ta mehanizem celo zaželen, saj je tudi katepsin B znotraj celice lociran v endosomih (8).

5. ZAKLJUČEK

V diplomski nalogi smo na molekulo cistatina kovalentno vezali maščobne kisline in na ta način povečali njegovo lipofilnost. Uporabili smo različne dolžine maščobnih verig (od šest do osemnajst ogljikovih atomov) ter spremljali razlike v prehodu aciliranega cistatina v celico.

Uporabili smo metodo aciliranja v vodni raztopini acetonitrila. Ta je omogočila nekontrolirano in nespecifično vezavo maščobnih kislin. Proteini, ki smo jih dobili, so imeli visoko in različno stopnjo substitucije. Zaradi večje lipofilnosti in s tem netopnosti v reakcijski zmesi, so se verjetno združili v agregate.

Uspešnost reakcije aciliranja smo potrdili s kapilarno elektroforezo. Del proteinskih molekul je ostal nezreagiran. Dodatni razširjeni vrhovi na elektroferogramih vzorcev C10, C14 in C16 so verjetno zmes tako molekul z različno stopnjo substitucije kot tudi različno velikih agregatov.

Različno stopnjo substitucije med posameznimi aciliranimi vzorci kot tudi znotraj istega vzorca je potrdilo izoelektrično fokusiranje, SDS-PAGE pa pojav agregatov. Ti so na gelu presegli velikost samega cistatina, to je 13 kDa.

S preizkusom BANA smo preverili aktivnost aciliranih cistatinov *in vitro*. Rezultati so pokazali, da se inhibitorna aktivnost cistatina po aciliranju izgubi. Izgubo biološke aktivnosti smo pripisali sami kemijski reakciji aciliranja s kislinskimi kloridi ali agregatom, ki so jih tvorile modificirane molekule proteinov.

V nasprotju z rezultati *in vitro* preizkusa smo v poskusu na celičnih kulturah ugotovili, da je acilirani cistatin ohranil biološko aktivnost in znotraj celice inhibiral katepsin B. Sklepamo, da acilirane proteine ali agregate razgradijo proteolitični encimi, ki so prisotni v celici. Tako pride do odcepitve maščobnih verig oziroma razbitja agregatov na posamezne molekule, ki so nato inhibitorno aktivne.

Ugotovili smo tudi, da je med deseto in dvajseto minuto po dodatku substrata aktivnost katepsina B padala v odvisnosti od dolžine maščobne verige, vezane na cistatin. Na podlagi tega, lahko sklepamo naslednje: daljša kot je bila veriga, večja je bila lipofilnost proteina, kar je izboljšalo prehod in povečalo koncentracijo cistatina znotraj celice. Več kot je bilo cistatina, dlje časa je trajalo, da smo opazili aktivnost katepsina B. Najboljša in najdaljša inhibicija se je tako pokazala v primeru osemnajst ogljikovih atomov dolge verige maščobne kisline.

Dokazali smo torej, da cistatin, aciliran z maščobnimi kislinami, uspešno prehaja lipidni dvosloj ter opravlja svojo nalogo znotraj celice. Česar pa ne vemo in lahko le ugibamo, pa je sam mehanizem prehoda, kaj se zgodi z aciliranim proteinom znotraj celice, kako vplivajo maščobne verige na porazdelitev in encimsko razgradnjo proteina znotraj celice ...⁽¹⁵⁾. Na vsa ta vprašanja in še več bo potrebno odgovoriti, da bo lahko takšen terapevtski protein varen, kakovosten in učinkovit.

6. LITERATURA

- 1) Cegnar, M., Kristl, J., Kos, J. Oblikovanje nanodelcev s proteini (Designing of protein-loaded nanoparticles). *Farm Vestn*, 2003, let. 54, str. 37-46.
- 2) Šegula, M., Vrečer, F. Nove farmacevtske oblike za peroralno dostavo peptidov in proteinov (Novel dosage forms for oral delivery of peptides and proteins). *Farm Vestn*, 2003, let. 54, str. 25-35.
- 3) Gantar, M., Štrukelj, B. Mehanizmi delovanja in oblikovanje biotehnoloških produktov (Mechanisms of action and formulation of biotech products). *Farm Vestn*, 2000, let. 51, str. 491-498.
- 4) Planinšek, O., Srčič, S. Kritične fizikalno-kemijske lastnosti peptidov in proteinov za načrtovanje farmacevtskih oblik (Critical physicochemical properties of peptides and proteins for drugs formulation). *Farmacevtska tehnologija na prelomu tisočletja*, 10. posvetovanje, str. 33-44.
- 5) Štrukelj, B. Razvoj, delitev in vloga bioloških zdravil. V *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Uredila B. Štrukelj, B., J. Kos, Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo, 2007, 1. izd., str. 4-24.
- 6) Cegnar, M., Kos, J., Kristl, J. Cystatin incorporated in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: development and fundamental studies on preservation of its activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, let. 22, str. 357-364.
- 7) Martins, M. B. F., Jorge, J. C. S., Cruz, M. E. M. Acylation of L-asparaginase with total retention of enzymatic activity. *Biochimie*, 1990, let. 72, str. 671-675.
- 8) Kočever, N., Obermajer, N., Štrukelj, B., Kos, J., Kreft, S. Improved acylation method enables delivery of functional palmitoylated cystatin into epithelial cells. *Chemical Biology & Drug Design*, 2007, let. 69, št. 2, str. 124-131.
- 9) Foldvari, M., Attah-Poku, S., Hu, J., Li, Q., Hughes, H., Babiuk, L. A., Kruger, S. Palmitoyl derivatives of Interferon- α : potential for cutaneous delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1998, let. 87, št.10, str. 1203-1208.
- 10) Yousefi-Salakdeh, E., Johansson, J., Strömberg, R. A method of S- and O-palmitoylation of peptides: synthesis of pulmonary surfactant protein-C models. *Biochem J*, 1999, let. 343, str. 557-562.
- 11) Chopineau, J., Robert, S., Fenart, L., Cecchelli, R., Lagoutte, B., Paitier, S., Dehouck, M. P., Domurado, D. Monoacylation of ribonuclease A enables its

- transport across an *in vitro* model of the blood-brain barrier. *Journal of Controlled Release*, 1998, let. 56, str. 231-237.
- 12) Robert, S., Domurado, D., Thomas, D., Chopineau, J. Fatty acid acylation of RNase A using reversed micelles as microreactors. *Biochemical and biophysical research communications*, 1993, let. 196, št. 1, str. 447-454.
 - 13) Ekrami, H. M., Kennedy, A. R., Shen, W. C. Water-soluble fatty acid derivatives as acylating agents for reversible lipidization of polypeptides. *FEBS Letters*, 1995, let. 371, str. 283-286.
 - 14) Kabanov, A. V., Batrakova, E. V. New technologies for drug delivery across the blood brain barrier. *Current Pharmaceutical Design*, 2004, let.10, št.12, str. 1355-1363.
 - 15) Slepnev, V. I., Phalante, L., Labrousse, H., Melik-Nubarov, N. S., Mayau, V., Goud, B., Buttin, G., Kabanov, A. V. Fatty acid acylated peroxidase as a model for the study of interaction of hydrophobically-modified proteins with mammalian cells. *Bioconjugate Chem*, 1995, let. 6, št. 5, str. 608-615.
 - 16) Kabanov, A. V., Levashov, A. V., Yu Alakhov, V., Martinek, K., Severin, E. S. Fatty acylation of protein for translocation across cell membranes. *Biomedical Science*, 1990, let. 1, str. 33-36.
 - 17) Chopineau, J., Robert, S., Fenart, L., Cecchelli, R., Lagoutte, B., Paitier, S., Dehouck, M. P., Domurado, D. Physicochemical characterization and *in vitro* interaction with brain capillary endothelial cells of artificially monoacylated ribonucleases A. *Letters in Peptide Science*, 1997, let. 4, str. 313-321.
 - 18) Kamyshny, A., Trofimova, D., Magdassi, S., Levashov, A. Native and modified glucose oxidase in reversed micelles. *Colloids and Surfaces B:Biointerfaces*, 2002, let. 24, str. 177-183.
 - 19) Wan, L., Chang, T. W. Site-Specific Lipophilic Modification of Interferon- α . *Journal of Protein Chemistry*, 2002, let. 21, št. 6, str. 371-381.
 - 20) Kurtzhals, P., Havelund, S., Jonassen I., Markussen, J. Effect of fatty acids and selected drugs on the albumin binding of a long acting, acylated insulin analogue. *Journal of Pharmaceutical Science*, 1997, let. 86, št. 12, str. 1365-1368.
 - 21) Resh, M. D. Fatty acylation of proteins: new insight into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, let. 1451, str. 1-16.

- 22) Oliviera, A. S., Xavier-Filho, J., Sales, M. P. Cysteine proteinases and cystatins. *Brazilian archives of biology and technology*, 2003, let. 46, št. 1, str. 91-104
- 23) Turk, V., Kos, J., Turk, B. Cysteine cathepsins (proteases) – On the main stage of cancer? *Previews (Cancer cell)*, 2004, str. 409-410.
- 24) Reddy, V. Y., Zhang, Q. Y., Weiss, S. J. pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, let. 92, str. 3849-3853.
- 25) Turk, V., Turk, B., Turk, D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO Journal*, 2001, let. 20, št. 17, str. 4629-4633.
- 26) Premzl, A., Turk, V., Kos, J. Intracellular proteolytic activity of cathepsin B in associated with capillary-like tube formation by endothelial cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2006, let. 97, str. 1230-1240.
- 27) Werle, B., Schanzenbächer, U., Turenšek Lah, T., Ebert, E., Jülke, B., Ebert, W., Fiehn, W., Kayser, K., Spiess, E., Abrahamson, M., Kos, J. Cystatin in non-small lung cancer: Tissue levels, localization and relation to prognosis. *Oncology Reports*, 2006, let.16, str. 647-655.
- 28) Turk, V., Bode, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS*, 1991, let. 285, št. 2, str. 213-219.
- 29) Staniforth, R. A., Giannini, S., Higgins, L. D., Conroy, M. J., Hounslow, A. M., Jerala, R., Craven C. J., Waltho, J. P. Three-dimensional domain swapping in the folded and molten-globule states of cystatins, an amyloid-forming structural superfamily. *The EMBO Journal*, 2001, let. 20, št. 17, str. 4774-4781.
- 30) Laber, B., Krieglstein, K., Henschen, A., Kos, J., Turk, V., Huber, R., Bode, W. The cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin is a phosphoprotein. *FEB*, 1989; 248 (1,2): 162-168.
- 31) Nycander, M., Björk, I. Evidence by chemical modification that tryptophan-104 of the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin is located in or near the proteinase-binding site. *Biochem. J.*, 1990, let. 271, str. 281-284.
- 32) Bode, W., Engh, R., Musil D., Thiele, U., Huber, R., Karshikovi, A., Brzin, J., Kos, J., Turk, V. The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *The EMBO Journal*, 1988, let.7, št.8, str. 2593 – 2599.

-
- 33) Anastasi, A., Brown, M. A., Kembhavi, A. A., Nicklin, M. J. H., Sayers, C. A., Sunter, D. C., Barrett, A. J. Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. *Biochem J*, 1983, let. 211, str. 129-138.
- 34) Machleidt, W., Thiele, U., Laber, B., Assfalg-Machleidt, I., Esterl, A., Wiegand, G., Kos, J., Turk, V., Bode, W. Mechanism of inhibition of papain by chicken egg white cystatin (Inhibition constants of N-terminally truncated forms and cyanogen bromide fragments of the inhibitor). *FEB*, 1989, let. 243, št. 2, str. 234-238.
- 35) Kočevar, N., Kreft, S., Obermajer, N. Identifikacija in karakterizacija bioloških zdravil ter analiza bioloških vzorcev. V *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Uredila B. Štrukelj, B., J. Kos, Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo, 2007, 1. izd., str. 136-183.
- 36) Kreft, S. Razvoj kapilarno elektroforeznih metod za uporabo v farmacevtski biologiji (Development of the capillary electrophoretic methods for application in pharmaceutical biology). Doktorska dizertacija, 1999, str. 6-11.
- 37) Sambrook, J., Russell, D. W. *Molecular Cloning*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory press, 2001, 3. izd., let.3, A8.40-A8.51.
- 38) Kočevar, N. Palmitoiliranje cistatina (Palmitoylation of cystatin). Diplomski naloga, 2004, str. 1-20.
- 39) Camilleri, P. *Capillary electrophoresis: theory and practice* 2nd ed. CRC Press LLC, 1998, str. 363-396.