

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA POŽEK

**KARAKTERIZACIJA SAHAROPEPSINU PODOBNE ASPARTATNE
PROTEAZE IZ GOBE *Clitocybe nebularis***

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA POŽEK

**KARAKTERIZACIJA SAHAROPEPSINU PODOBNE ASPARTATNE
PROTEAZE IZ GOBE *Clitocybe nebularis***

**CHARACTERISATION OF SACCHAROPEPSIN RELATED
ASPARTATE PROTEASE FROM MUSHROOM *Clitocybe nebularis***

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

Diplomsko nalogo sem opravljala na Odseku za biotehnologijo Inštituta Jožef Štefan v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem. in somentorstvom dr. Jerice Sabotič, univ. dipl. mikrobiol.

Izjava:

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem. in somentorstvom dr. Jerice Sabotič, univ. dipl. mikrobiol.

Tina Požek

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Janku Kosu za priložnost izdelave diplomske naloge in strokovne nasvete, s čimer sem si pridobila nova znanja.

Zahvala gre tudi somentorici in delovni mentorici dr. Jerici Sabotič za številne nasvete in pomoč in trud pri izdelavi diplomske naloge.

Za strokovni pregled se zahvaljujem somentorici dr. Jerici Sabotič, mentorju prof. dr. Janku Kosu in članoma komisije prof. dr. Danijelu Kiklju in doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar, ki so mi v zelo kratkem času pregledali diplomsko nalogo.

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

Ob tej priložnosti se bi rada zahvalila svojim staršem, ki so mi vedno stali ob strani ter me moralno in materialno spodbujali.

Še posebej lepo pa se bi rada zahvalila svojim prijateljem in soplesalcem, ki mi znajo v vsakem trenutku pričarati nasmeh na obraz in mi dajejo novo moč za naprej.

KAZALO VSEBINE

ZAHVALA	4
KAZALO VSEBINE	5
KAZALO PREGLEDNIC	10
KAZALO SLIK	11
POVZETEK	13
OZNAKE AMINOKISLIN	14
STANDARDNI GENETSKI KOD	15
OKRAJŠAVE	16
1 UVOD	18
1.1 ZNAČILNOSTI IN POMEN GLIV	18
1.2 RAZVRSTITEV GLIV	18
1.2.1 Prostotrosnice (<i>Basidiomycetes</i>)	19
1.2.1.1 <i>Clitocybe nebularis</i> (poprhnjena livka, meglenka)	19
1.3 PEPTIDAZE ALI PROTEAZE	20
1.3.1 Aspartatne proteaze	21
1.3.1.1 Saharopepsin	22
1.3.1.2 Aspartatne proteaze iz gob	23
1.3.1.2.1 Aspartatne proteaze iz meglenke	23
1.4 EKSPRESIJSKI SISTEMI	24
1.4.1 Bakterijski ekspresijski sistem <i>Escherichia coli</i>	24
1.4.2 Kvasni ekspresijski sistem <i>Pichia pastoris</i>	25

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA	27
3 MATERIAL IN METODE.....	28
3.1 MATERIAL	28
3.1.1 Reagenti.....	28
3.1.2 Laboratorijska oprema	29
3.1.3 Gojišča	29
3.1.4 Pufri in raztopine	32
3.1.5 Plazmidi	35
3.1.6 Začetni oligonukleotidi.....	37
3.2 METODE	38
3.2.1 Določitev celotnega zaporedja DNA saharopepsinu podobne aspartatne proteaze iz gobe <i>Clitocybe nebularis</i> (CnAP).....	38
3.2.1.1 Verižna reakcija s polimerazo z uporabo kompleta reagentov Genome Walker.....	38
3.2.1.2 Določanje zaporedja cDNA z metodo hitrega kloniranja 3` in 5` koncov cDNA.....	40
3.2.1.3 Določanje celotnih zaporedij gena in cDNA	42
3.2.1.4 Čiščenje fragmentov DNA s kompletom reagentov Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.....	42
3.2.1.5 Adenilacija fragmentov DNA	43
3.2.1.6 Ligacija s kompletom reagentov pGEM-T Easy Vector Systems	44
3.2.1.7 Priprava kompetentnih bakterij <i>E. coli</i> DH5α	44
3.2.1.8 Transformacija ligacijskih mešanic v kompetentne celice <i>E. coli</i> DH5α	44
3.2.1.9 Verižna reakcija s polimerazo na osnovi kolonije (CPCR)	45
3.2.1.10 Analiza plazmidne DNA na agarozni gelski elektroforezi.....	46
3.2.1.11 Priprava prekonočnih kultur.....	46

3.2.1.12 Izolacija plazmidne DNA s kompletom reagentov »Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System«	47
3.2.1.13 Določanje čistote in koncentracije DNA.....	47
3.2.1.14 Analiza nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij.....	48
3.2.2 Izražanje rekombinantne aspartatne proteaze v kvasovki <i>Pichia pastoris</i>	48
3.2.2.1 Priprava rekombinantnega fragmenta DNA.....	48
3.2.2.2 Priprava plazmidne DNA in vektorjev.....	49
3.2.2.3 Priprava kompetentnih celic <i>Pichia pastoris</i> GS 115	49
3.2.2.4 Transformacija plazmida pPIC9K::rCnAP v ekspresijski sev kvasovke <i>Pichia pastoris</i> GS115.....	50
3.2.2.5 Izražanje rCnAP v kvasovki <i>P. pastoris</i> s pomočjo indukcije z metanolom	50
3.2.3 Izražanje rekombinantne aspartatne proteaze v bakteriji <i>Escherichia coli</i> s pomočjo indukcije z IPTG.....	51
3.2.3.1 Priprava rekombinantnega fragmenta DNA.....	51
3.2.3.2 Priprava vektorjev	51
3.2.3.3 Izražanje v bakterijskih ekspresijskih sevih	52
3.2.4 Karakterizacija proteaze	53
3.2.4.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE)	53
3.2.4.2 Cimografija z želatino	54
3.2.4.2.1 Cimografija z želatino v prisotnosti inhibitorjev proteaz	56
3.2.4.3 Obarjanje proteinov s trikloroocetno kislino.....	56
3.2.4.4 Test encimske aktivnosti s substratom azokazein	56
3.2.4.5 Merjenje encimske aktivnosti s substratom FITC-hemoglobin	57
3.2.4.6 Imunokemijsko določanje CnAP s prenosom proteinov na membrano.....	57
4 REZULTATI	59

4.1 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA ASPARTATNE PROTEAZE IZ GOBE <i>Clitocybe nebularis</i> (CnAP)	59
4.1.1 Hoja po genomu	60
4.1.2 Metoda hitrega kloniranja 3` in 5` koncov cDNA	63
4.1.3 Pomnoževanje celotnega zaporedja gena in cDNA aspartatne proteaze iz gobe <i>Clitocybe nebularis</i> (CnAP)	68
4.1.4 Primerjava aspartatne proteaze iz gobe <i>Clitocybe nebularis</i> (CnAP) s saharopepsinu podobnimi proteazami iz gliv	72
4.2 PRIPRAVA REKOMBINANTNE ASPARTATNE PROTEAZE V BAKTERIJI <i>Escherichia coli</i>	74
4.2.1 Priprava ekspresijskega sistema	74
4.2.2 Heterologno izražanje CnAP	77
4.2.3 Analiza izražanja rCnAP v bakteriji <i>E. coli</i>	78
4.2.3.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza z dodatkom natrijevega dodecil sulfata (NaDS – PAGE)	78
4.2.3.2 Cimografija z želatino	79
4.2.3.3 Prenos proteinov na membrano (prenos Western)	80
4.3 Priprava rekombinantne aspartatne proteaze v metilotrofni kvasovki <i>Pichia pastoris</i>	81
4.3.1 Priprava ekspresijskega sistema	81
4.3.2 Heterologno izražanje	82
4.3.3 Analiza izražanja rCnAP v metilotrofni kvasovki <i>Pichia pastoris</i>	83
4.3.3.1 Test aktivnosti z azokazeinom za rCnAP pridobljene v kvasovki <i>Pichia pastoris</i>	83
4.3.3.2 Test aktivnosti s fluoresceinizotiocianat-hemoglobinom (FITC-Hb)	85
4.3.3.3 Cimografija z želatino	86
4.3.3.4 Prenos proteinov rCnAP iz kvasovke <i>Pichia pastoris</i> na PVDF membrano (prenos Western)	88

5	RAZPRAVA.....	89
6	SKLEPI.....	94
7	LITERATURA	95

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Seznam uporabljenih reagentov in topil.	28
Preglednica 3: Seznam smiselnih in protismiselnih začetnih oligonukleotidov.	37
Preglednica 4: Pri PCR reakciji smo za PCR uporabili naslednje pogoje pomnoževanja	40
Preglednica 5: Seznam inhibitorjev in njihove koncentracije.	56
Preglednica 6: V primarni in sekundarni reakciji PCR uporabljeni gensko specifični začetni oligonukleotidi.	60
Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi uporabljeni v primarni in sekundarni reakciji PCR z metodo hitrega kloniranja koncov cDNA.	63
Preglednica 8: V primarni in sekundarni reakciji PCR uporabljeni začetni oligonukleotidi in matrice za primarno reakcijo PCR.	68
Preglednica 9: Optična gostota pri valovni dolžini 600 nm v odvisnosti od časa indukcije za različne seve.	77
Preglednica 11: Test aktivnosti z azokazeinom za rekombinatno CnAP pridobljeno v kvasovki <i>Pichia Pastoris</i>.	85
Preglednica 12: Merjenje aktivnosti rCnAP s FITC hemoglobinom	86

KAZALO SLIK

Slika 1: Clitocybe nebularis, meglenka (6)	20
Slika 2: Mehanizem delovanja aspartatnih proteaz.....	22
Slika 3: Mapa plazmida pGEM-T Easy.	35
Slika 4: Mapa plazmida pET11a.....	35
Slika 5: Mapa plazmida pPIC9k.	36
Slika 6: Mapa plazmida pET14b.....	36
Slika 7: Postopek določanja neznanega genomskega zaporedja s kompletom reagentov GenomeWalker.....	39
Slika 8: Postopek določanja zaporedja cDNA z metodo hitrega kloniranja 3`in 5` koncev cDNA.....	41
Slika 19: Agarozna gelska elektroforeza produktov sekundarne PCR reakcije.	70
Slika 20: poravnava celotnih nukleotidnih zaporedij cDNA in gDNA CnAP, dobljenih z metodo PCR.	71
Slika 21: poravnava celotnih aminokislinskih zaporedij cDNA in gDNA CnAP dobljenih z metodo PCR.	72
Slika 22: Primerjava AK zaporedja CnAP s saharopepsinom iz različnih gliv	74
Slika 23: Agarozna gelska elektroforeza CnAP fragmenta za izražanje v vektorju pET pridobljenega s polimerazo KOD.....	75
Slika 24: Poravnava nukleotidnih zaporedij cDNA CnAP pridobljenih s polimerazo KOD in Pfx.	76
Slika 25: Optična gostota pri valovni dolžini 600 nm v odvisnosti od časa indukcije za različne seve.	78
Slika 26: Analiza NaDS – PAGE bakterijskega lizata ekspresijskih sistemov <i>E. coli</i>	79
Slika 27a: Cimogram za bakterijske lizate seva BL21(DE3)pT-Trx pET11a::CnAP in BL21(DE3)pT-Trx pET14b::CnAP bakterije <i>E. coli</i>	80

Slika 27b: Cimogram za bakterijske lizate seva BL21(DE3) pET11a::CnAP in BL21(DE3) pET14b::CnAP bakterije <i>E. coli</i>.	80
Slika 28: Določanje aktivnosti rCnAP s prenosom proteinov na PVDF membrano za bakterijski lizat izražen v ekspresijskem sevu BL21(DE3)pET14b::rCnAP in BL21(DE3)pT-Trx pET14b::rCnAP bakterije <i>Escherichia coli</i>.	81
Slika 29: Agarozna gelska elektroforeza rCnAP fragmenta za izražanje v vektorju pPIC9K pridobljenega s polimerazo Pfx.....	82
Slika 30a: Cimografija z želatino za vzorce rekombinantne CnAP z izražanjem v kvasovki <i>Pichia pastoris</i> brez dodatka inhibitorja.	87
Slika 30b: Cimografija z želatino za vzorce rekombinantne CnAP iz z izražanjem v kvasovki <i>Pichia pastoris</i> ob dodatku inhibitorja pepstatin A	87
Slika 31: Določanje aktivnosti nekoncentrirane in koncentrirane AP s histidinskim označevalcem, izražene v kvasovki <i>Pichia pastoris</i> z imunokemijsko metodo prenosa proteinov na PVDF membrano.	88

POVZETEK

Proteaze ali peptidaze so hidrolitični encimi, ki cepijo peptidno vez in imajo pomembno vlogo pri mnogih fizioloških in patofizioloških procesih. Predhodne študije so pokazale, da gobe vsebujejo nepričakovano raznolikost in število proteaz.

Pri eksperimentalnem delu smo z uporabo molekularno bioloških metod hoje po kromosomu in pomnoževanja koncev cDNA določili zaporedje saharopepsinu podobne aspartatne proteaze iz gobe *Clitocybe nebularis*. Celotno zaporedje CnAP kaže 82 % identičnost z aspartatno peptidazo A1 iz gobe *Laccaria bicolor* in 81 % identičnost z endopeptidazo iz gobe *Coprinopsis cinerea*. Na osnovi pridobljenega nukleotidnega zaporedja smo pripravili konstrukt za pripravo rekombinantne proteaze v bakterijskem ekspresijskem sistemu *Escherichia coli* in kvasnem ekspresijskem sistemu *Pichia pastoris* in nato z encimskimi testi analizirali njeno aktivnost.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da je ekspresijski sistem kvasovke *P. pastoris* bolj primeren za pripravo rekombinantne CnAP kot ekspresijski sistem bakterije *E. coli*. Namreč pri bakterijskem ekspresijskem sevu se je aktivnost kazala le pri analizi z metodo NaDS-PAGE za sev BL21 (DE3) pT-Trx pET11a::CnAP, medtem ko pri ostalih sevih in ostalih metodah (test cimografije z želatino in prenos Western) ni bilo nobene aktivnosti. Po drugi strani pa smo pri testu cimografije z želatino za gojišča kvasovke *P. pastoris* po izražanju CnAP opazili močne lise, ki so ob dodatku inhibitorja pepstatina A izginile. Prav tako je bila pri testih aktivnosti z substratom azokazeinom in FITC-hemoglobinom aktivnost primerljiva aktivnosti pepsina, toda dodatek inhibitorja ni inhibiral CnAP, medtem ko je isti inhibitor inhibiral pepsin. Rekombinantna CnAP iz kvasovke torej kaže aktivnost, značilno za aspartatne proteaze, vendar bi bilo potrebno metodo izražanja optimirati.

OZNAKE AMINOKISLIN

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

STANDARDNI GENETSKI KOD

	T			C			A			G		
T	TTT	Phe	F	TCT	Ser	S	TAT	Tyr	Y	TGT	Cys	C
	TTC			TCC			TAC			TGC		
	TTA	Leu	L	TCA			TAA	STOP		TGA	STOP	
	TTG			TCG			TAG			TGG	Trp	W
C	CTT	Leu	L	CCT	Pro	P	CAT	His	H	CGT	Arg	R
	CTC			CCC			CAC			CGC		
	CTA			CCA			CAA	Gln	Q	CGA		
	CTG			CCG			CAG			CGG		
A	ATT	Ile	I	ACT	Thr	T	AAT	Asn	N	AGT	Ser	S
	ATC			ACC			AAC			AGC		
	ATA			ACA			AAA	Lys	K	AGA	Arg	R
	ATG	Met	M	ACG			AAG			AGG		
G	GTT	Val	V	GCT	Ala	A	GAT	Asp	D	GGT	Gly	G
	GTC			GCC			GAC			GGC		
	GTA			GCA			GAA	Glu	E	GGA		
	GTG			GCG			GAG			GGG		

OKRAJŠAVE

AK	aminokislina
AP	aspartatna proteaza
BMGY	gojišče z dodatkom glicerola (buffered glycerol-complex medium)
BMMY	gojišče z dodatkom metanola (buffered methanol-complex medium)
bp	bazni par
BSA	bovine serum albumin, goveji serumski albumin
cDNA	komplementarna DNA
CnAP	aspartatna proteaza iz gobe <i>Clitocybe nebularis</i>
dH ₂ O	destilirana voda
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksi nukleinska kislina
dNTP	deoksi-nukleotid
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
FITC-Hb	hemoglobin označen s fluorescein izotiocianatom
gDNA	genomska DNA
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
kbp	kilobazni par
kDa	kilo Dalton
LB	gojišče Luria Bertani
LBA	gojišče Luria Bertani z dodatkom ampicilina
LBAC	gojišče Luria Bertani z dodatkom ampicilina in kloramfenikola
LMW	nizkomolekularni proteinski standard (low molecular weight standard)
NaDS	natrijev dodecil sulfat
Obr/min	obrat na minuto
OD ₆₀₀	optična gostota pri valovni dolžini 600 nm
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)

RACE	hitro kloniranje cDNA koncev (rapid amplification of cDNA ends)
rCnAP	rekombinantna aspartatna proteaza iz gobe <i>Clitocybe nebularis</i>
TAE	pufer s trisom, EDTA in ocetno kislino
TBS	Tris-HCl, NaCl (Tris buffered saline)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
WB	Western blotting (prenos Western)
x-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid
YNB	gojišče za kvasovke na osnovi dušika (yeast nitrogen base)

1 UVOD

1.1 ZNAČILNOSTI IN POMEN GLIV

Glive predstavljajo eno izmed štirih kraljestev. Gre za heterotrofne organizme, nesposobne fotosinteze, ki sami ne morejo proizvajati hrane (1). V odnosu z drugimi organizmi lahko živijo kot saprotiti (prehranjujejo se z ostanki odmrlih organizmov), zajedalci (od svojega gostitelja dobivajo hrano, gostitelj pa nima nobene koristi od njih) ali simbionti (korist je obojestranska, saj gliva v zameno za hrano daje gostitelju mineralne snovi). Imajo celično steno iz hitina, rezervni polisaharid pa je glikogen (2).

Glive imajo velik pomen za človeka. Uporabljamo jih v medicini, saj iz njih pridobivamo antibiotike, v kulinariki za pripravo različnih jedi, izdelavo posebnih vrst sirov s plemenito plesnijo (npr. gorgonzola), vzhajanje testa in proizvodnjo alkohola. Prav tako jih uporabljamo za pridobivanje encimov za izdelavo pralnih praškov (1). Zelo uporabne so tudi v biotehnologiji, kjer iz njih pridobivamo rekombinantne proteine. Njihova prednost pred bakterijskimi ekspresijskimi sistemi je, da so kljub svoji preprostosti sposobne posttranslacijskih modifikacij (3). Po drugi strani pa glive povzročajo tudi ogromno škodo. Kot gniloživke povzročajo razpad lesa, hrane in izdelkov ali pa kot zajedavke škodujejo rastlinam. Nekatere povzročajo glivična obolenja na ljudeh in živalih (1).

1.2 RAZVRSTITEV GLIV

Glede na morfološke lastnosti in razlike v razmnoževanju jih delimo na glive sluzavke (*Myxomycota*) in prave glive (*Eumycota*). Med prave glive spadajo tiste vrste, ki imajo hife ali pa so z njimi v tesnem sorodu, imajo celično steno skozi večji del ali celotni življenski ciklus in se prehranjujejo zgolj z absorpcijo. Za razliko od njih, pa imajo pri glivah sluzavkah celično steno le razmnoževalne tvorbe (plodišča), vegetativne oblike pa ne. Telo tvorijo celice, ki se sčasoma zlijejo v eno mnogojeadrno sluzasto steljko katero imenujemo plazmodij (4).

Prave glice delimo na pet razredov: *Oomycetes* (oomicete), *Chytridiomycetes* (hitridiomicete), *Zygomycetes* (jarmaste glice), *Ascomycetes* (askomicete, zaprtotrosnice) in *Basidiomycetes* (bazidiomicete, prostotrosnice). V skupino *Deuteromycetes* (devteromicete) uvrščamo glice katerih spolna faza ni poznana (1).

1.2.1 Prostotrosnice (*Basidiomycetes*)

Prostotrosnice so glice, pri katerih obsega spolni proces nastanek haploidnih bazidiospor na bazidiju, kjer pride tudi do mejoze diploidnih jeder. So pomembna skupina glic z okoli 25 000 znanimi vrstami. Delijo se v štiri skupine, od katerih dve – *Hymenomycetes* in *Gasteromycetes* obsegata makroglice oz. gobe. Ostali dve skupini obsegata rje in sneti oz. mikroglive, ki so znani rastlinski paraziti. Najbolj značilni lastnosti prostotrosnic sta zapončni micelij in balistospore, iz katerih se razvije septirani micelij z doliporami (22).

1.2.1.1 *Clitocybe nebularis* (poprhnjena livka, megleška)

Meglenka ali poprhnjena livka (*Clitocybe nebularis*), ki jo vidimo na sliki 1, spada v rod livk (*Clitocybe*), družino kolobarničark (*Tricholomataceae*), red lističark (*Agaricales*), deblo bazidiomicet (*Basidiomycota*) in kraljestvo glic (*Fungi*) (5). Gre za pogojno užitno gobo neprijetnega vonja, ki lahko kljub posebnemu načinu priprave še vedno povzroči prebavne motnje. V Sloveniji jo najdemo predvsem jeseni v submediteranskem območju. Raste v večjih skupinah v listnatih gozdovih in gozdnih obmejkih. Mladi klobuki so močno izbočeni in se sčasoma udrejo, da dobijo obliko lija. Premer klobuka je do 18 cm in je na robovih podvit. Kožica menja barvo vse od bele v suhem do temno sive v vlažnem okolju. Zrela dobi belkast poprh, ki je viden kot meglena prevleka. Pod klobukom se nahajajo značilni gosti in ozki rumeni lističi, na kratko priraščeni na bet (2).



Slika 1: *Clitocybe nebularis*, meglenka (6).

1.3 PEPTIDAZE ALI PROTEAZE

Peptidaze ali proteaze so hidrolitični encimi, ki cepijo peptidno vez. (23). Za peptidaze uporabljamo tudi izraze proteaze in proteinaze oz. proteolitični encimi (25). So nujno potrebne za preživetje vseh organizmov in so pri višjih živalih kodirane s približno 2 % genov (24).

Za klasifikacijo in razdelitev peptidaz obstaja več kriterijev. Glede na izvor jih delimo na mikrobne, rastlinske in živalske. Primeri proteaz iz rastlin so papain, bromelain in keratinaze, medtem ko spadajo med najbolj znane proteaze iz živali trypsin, kimotrypsin, pepsin in renin. Zaradi etičnih razlogov se vedno bolj uporablja mikrobne proteaze iz bakterij, gliv in virusov (8).

Klasifikacijski sistem NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) jih uvršča med hidrolaze in uporablja izraz peptidaze v širšem pomenu. Glede na mesto hidrolize peptidne vezi jih nadalje deli na eksopeptidaze in endopeptidaze. Eksopeptidaze z C- ali N- konca odcepljajo aminokisline ali krajše peptide in jih delimo na aminopeptidaze in karboksipeptidaze (7). Endopeptidaze cepijo znotraj peptidne verige in jih glede na funkcionalno skupino v aktivnem mestu delimo na serinske, cisteinske, aspartatne, treoninske, glutaminske in metalo endoproteaze ter endoproteaze z neznanim katalitskim mehanizmom (9).

Najnovejšo delitev predstavlja klasifikacijski sistem MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>), ki upošteva evolucijsko podobnost in mehanizem delovanja ter deli proteaze na klane in družine. Klani združujejo encime s podobno terciarno strukturo, medtem ko družina predstavlja skupino proteaz, ki kažejo evolucijsko podobnost in visoko stopnjo ujemanja v aminokislinskem zaporedju (10).

Proteaze imajo širok spekter uporabe. Uporabljajo se v detergentih za boljše odstranjevanje madežev, v industriji usnja za odstranjevanje dlak in izboljšanje elastičnosti, prehrambeni industriji za izdelavo sira, razgradnjo glutena pri peki, pripravo sojine omake, odpravljanju grenkega okusa in sintezi umetnega sladila aspartama (8). Proteaze imajo pomembno vlogo v človeku, saj omogočajo znotraj- in zunajcelično razgradnjo proteinov, regulirajo aktivacijo pro-encimov in pro-hormonov, hkrati pa sodelujejo pri procesu razvoja embria, ovulaciji, zdravljenju ran, celični migraciji, kaskadi strjevanja krvi, imunskega odziva in procesu apotoze. Zanimive so tudi za farmacevtsko industrijo, saj igrajo pomembno vlogo pri različnih boleznih kot so: rak, vnetje, revmatoidni artritis, periodontitis, kardiovaskularne bolezni, nevrološke bolezni, ulkus, emfizem, motnje strjevanja krvi, malarija, ... (11). Pomembne fiziološke vloge pa nimajo le pri človeku, temveč tudi v drugih organizmih. Tako so odgovorne za kalitev rastlin, tvorbo spor v bakterijah in askospor v kvasovkah, aktivacijo do aktivnega proteina oziroma razgradnjo do neaktivnega encima (7). Kot pomembni virulenčni faktorji so odgovorni za patogenost številnih virusov in gliv (12).

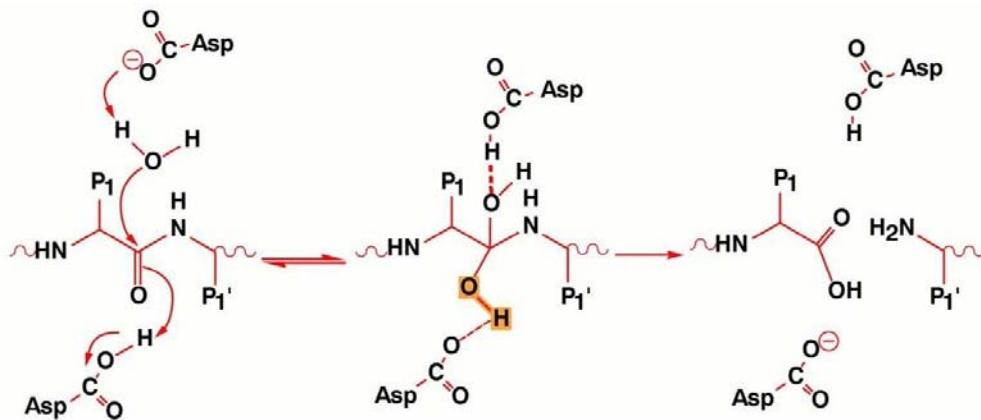
1.3.1 Aspartatne proteaze

Aspartatne proteaze so močno razširjene med vretenčarji, rastlinami, ogorčicami, virusi, paraziti, glivami, nekaterimi bakterijami in arhejami (12). Svoje ime so dobile po aspartatnih ostankih v katalitični diadi. Ti so ligandi za aktivirano molekulo vode (slika 2). Ena izmed značilnosti je, da gre izključno za endopeptidaze (13). Največjo učinkovitost dosežejo pri kislem pH. Klasifikacijski sistem MEROPS jih glede na podobnost v AK zaporedju deli na 14 različnih družin, ki so glede na evolucijsko razmerje in terciarno strukturo združene v 6

klanov. Aspartatne proteaze iz gliv najdemo v družinah A1, A2 in A11 klana AA in družini A22 klana AD (13).

Okoli aspartata v katalitičnem mestu najdemo ohranjeno zaporedje: Xaa-Xaa-Asp-Xbb-Gly-Xbb, kjer predstavlja Xaa hidrofobno aminokislino, Xbb pa serin ali treonin.

Aspartatne proteaze so pomembni virulenčni faktorji (12), najdemo jih pri patoloških stanjih kot so hipertenzija (renin), rak (katepsin D), Alzheimerjeva bolezen (β sekretaza), malarija (plazemski pepsin), AIDS (HIV-1 peptidaza) in pri zdravljenju uporabljamo njihove inhibitorje (11). Uporabljam se tudi kot encimi za koagulacijo mleka pri proizvodnji sira (8).



Slika 2: Mehanizem delovanja aspartatnih proteaz. V katalizi sta udeležena 2 aspartatna ostanka, ki si delita 1 vodikov proton. Za proteolizo je potrebna molekula vode. P1 in P1' predstavlja stranske verige aminokislin (14).

Primera aspartatnih proteaz pomembnih v farmacevtski industriji sta renin in pepsin. Prvi je udeležen pri uravnavanju krvnega tlaka in tako odgovoren za nastanek hipertenzije, medtem ko je pepsin aspartatna proteaza iz želodčnega soka in sodeluje pri prebavi proteinov (15).

1.3.1.1 Saharopepsin

Saharopepsin je aspartatna proteaza, katero klasifikacijski sistem MEROPS uvršča v skupino peptidaz A01.018. Najdemo ga predvsem v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*, od koder

izvira tudi njegovo ime. Njegova inhibitorja sta pepstatin A in majhen protein iz kvasa IA₃. Produkt primarne translacije je prekurzor, imenovan presaharopepsinogen. Vsebuje 22 AK dolgo N-končno pre zaporedje, ki usmerja translokacijo v endoplazemski retikulum in 54 AK dolg N-končni propeptid. Pri nizkem pH-ju in/ali visoki ionski moči pride do avtoaktivacije. Za nastanek zrele oblike saharopepsina je potreben cerevisin (proteinaza B).

Le pravilno zvita oblika lahko zapusti endoplazemski retikulum in gre v Golgijev aparat. Tu pride do dodatnih sprememb ogljikovih hidratov, zaradi česa molekulska masa proteina naraste. Za razliko od katepsina D, ogljikovi hidrati ne igrajo pomembne vloge pri intracelularnem usmerjanju saharopepsina. Aktivacija saharopepsina poteka v vakuoli. Poleg avtoaktivacije ima saharopepsin pomembno vlogo pri aktivaciji ostalih vakuolarnih prekurzorjev hidrolaz in za preživetje pri prehrani s premajhnim vnosom proteinov (13).

1.3.1.2 Aspartatne proteaze iz gob

Veliko raziskav je bilo usmerjenih v aspartatne proteaze iz askomicet, toda le nekaj za tiste iz bazidiomicet. Aspartatne proteaze iz gliv najdemo predvsem v družini A1 klasifikacijskega sistema MEROPS, prisotne pa so tudi v družinah A2 in A11 klana AA ter družini A22 klana AD. Večina aspartatnih proteaz iz prostotrošnic spada v družino A1 (8).

1.3.1.2.1 Aspartatne proteaze iz megleanke

V enem izmed poskusov je bila na osnovi izolacijskega postopka, aktivnosti, inhibicijske specifičnosti in podobnosti v N-končnem zaporedju določena proteolitična aktivnost aspartatnih proteaz iz bazidiomicete *Clitocybe nebularis*. Proteolitična aktivnost se je kazala s štirimi glavnimi lisami pri NaDS-PAGE in dvema proteolitično aktivnima lisama pri kazeinski cimografiji med velikostima 32 in 55 kDa. Določeno je bilo nekaj N – končnih zaporedij, ki kažejo podobnost z aspartatnimi proteazami skupine aspartatnih proteaz A01.018 (12).

1.4 EKSPRESIJSKI SISTEMI

Ekspresijski sistem je sestavljen iz ekspresijskega vektorja, vanj vstavljene DNA in gostitelja. Poznamo več vrst ekspresijskih sistemov, in sicer: bakterije, kvasovke, nitaste glive, rastlinske kulture, transgene rastline, insektne celice (bakulovirusni ekspresijski sistem), sesalske celične kulture (CHO, BHK, mišje mielomske celice), transgene živali ali brezcelične ekspresijske sisteme. Uporabljamo učinkovite organizme, katerih gojenje je nezahtevno, poceni in so varni. Izbira organizma pa je odvisna tudi od tega, če je sposoben glikozilacije in ostalih posttranslacijskih modifikacij. Izbira ekspresijskega sistema je specifična za posamezen protein, želimo si, da je ekspresijski sistem donosnejši od tradicionalne tehnologije pridobivanja. Tako pri industrijskih encimih in prehranskih dodatkih igra glavno vlogo hitrost in ekonomičnost, medtem ko je pri bioloških zdravilih na prvem mestu avtentičnost in varnost. Osnovni postopek priprave tarčnega proteina je sestavljen iz štirih faz: vključitev genskega zapisa oz. kodirajočega genskega zapisa v vektor, vnos vektorja v gostitelja, biosinteza heterolognega proteina pri nadzorovanih pogojih in na koncu še izolacija ter čiščenje produkta. Za ekspresijski vektor ponavadi uporabimo plazmid. Ta vsebuje mesto podvojevanja (ORI), gen za selekcijo (pogosto odpornost proti antibiotiku), promotor, označevalec in pa območje z več mesti za kloniranje (MCS) (3).

1.4.1 Bakterijski ekspresijski sistem *Escherichia coli*

Escherichia coli spada med po Gramu negativne bakterije in predstavlja najpogosteje uporabljen prokariontski ekspresijski sistem. Postala je standardni organizem pri proizvodnji encimov za diagnostične in analizne namene ter sintezo farmacevtsko pomembnih proteinov, ki ne zahtevajo zahtevnih posttranslacijskih sprememb. Njene glavne prednosti pred ostalimi organizmi so v dobi raziskanosti, enostavnem genskem spreminjanju, nezahtevnih, uveljavljenih fermentacijskih postopkih in poznanih številnih promotorjih. Vendar pa ima tudi pomanjkljivost, saj ni sposobna posttranslacijskih sprememb in ima številne probleme pri izločanju rekombinantnih proteinov. Te pridobivamo v citoplazmi, periplazmi, na celični

površini ali pa se izločajo v gojišče. Slabost močnih promotorjev za izražanje v citoplazmi je nepravilno zvijanje in agregacija do inkluzijskih teles. To lahko zmanjšamo z optimizacijo aminokislinskega zaporedja, znižanjem rastne temperature, uporabo dodatnih plazmidov, ki omogočajo sočasno izražanje šaperonov ali z uporabo fuzijskih proteinov (npr. vezavni protein maltoze, glutation-S-transferaza, kloramfenikol acetiltransferaza in drugi). V citoplazmi je omejeno tudi nastajanje disulfidnih vezi, zato moramo uporabiti sev *E. coli* z dvojno mutacijo. Mutirana sta gena za tioredoksin-reduktazo in glutation-oksidoreduktazo, ki sta potrebna za redukcijo tioredoksinov in glutationov, ki reducirajo disulfidne vezi.

Številna farmacevtska podjetja uporabljajo ekspresijski sistem *E. coli* za sintezo rekombinantih interferonov, antikoagulantov, inzulinov ter človeškega rastnega hormona (3).

1.4.2 Kvasni ekspresijski sistem *Pichia pastoris*

Kvasovke so ugodne za ekspresijo rekombinantnih proteinov, saj gre za preproste enocelične organizme za katere je značilna hitra rast, enostavno gojenje in gensko spreminjanje, obenem pa so sposobne posttranslacijskih sprememb (proteolitsko procesiranje, zvijanje, tvorba disulfidnih vezi, glikozilacija). Modelno kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* vedno bolj nadomešča metilotrofna kvasovka *Pichia pastoris*, saj ima slednja večjo zmogljivost sinteze in izločanja heterolognih proteinov. Njene glavne prednosti so prisotnost ekspresijskih vektorjev z močnim strogo reguliranim promotorjem gena za alkohol-oksidazo I, respiratorni metabolizem, enostavne tehnike za gensko spreminjanje, prisotnost posttranslacijskih sprememb in splošno dostopni ekspresijski sistemi (3).

Kot metilotrofna kvasovka *P. pastoris* uporablja metanol kot edini vir ogljika. V prvi stopnji se le-ta s pomočjo encima alkoholna oksidaza oksidira do formaldehida, pri čemer nastaja vodikov peroksid. Da se izognemo njegovi toksičnosti, poteka ta proces v posebnem organelu, imenovanem peroksisom, ki loči vodikov peroksid od ostalih celičnih struktur. Za alkoholno oksidazo v kvasovki *Pichia pastoris* kodirata 2 gena, AOX 1 in AOX 2, vendar predstavlja gen AOX 1 večino oksidazne aktivnosti v celici. Njegovo ekspresijo induciramo z metanolom.

Heterologni protein lahko pridobivamo intracelularno ali pa se izloča v medij. Ker se v medij izločajo le majhne količine kvasovkinih proteinov in predstavlja naš heterologni protein večino, ga je ugodno pridobivati na ta način. Poleg tega pa predstavlja prvi korak v čiščenju, saj je naš protein ločen od ostalih celičnih proteinov. Za izločanje v medij je potrebna prisotnost signalnega zaporedja za izločanje. Najbolj uspešno uporabljeno je pre-pro vodilno zaporedje paritvenega dejavnika α kvasovke *S. cerevisiae* (16).

2 NAMEN DELA IN HIPOTEZA

Naša hipoteza je bila, da goba *Clitocybe nebularis* izraža aspartatno proteazo. Hipotezo smo potrdili.

Proteaze so hidrolitični encimi, ki katalizirajo cepitev peptidnih vezi v proteinih. Pomembne so tako v uravnavanju fizioloških kot patofizioloških procesov, zaradi česar so tudi zanimive za farmacevtsko industrijo kot tarče za razvoj novih zdravil. Predhodne študije so pokazale, da gobe vsebujejo nepričakovano raznolikost in število proteaz, katerih večina je neobčutljiva na standardne razredno specifične proteazne inhibitorje. Namen diplomskega dela je določiti nukleotidno zaporedje saharopepsinu podobne proteaze iz gobe *Clitocybe nebularis* z uporabo molekularno bioloških metod hoje po kromosomu in pomnoževanja koncev cDNA. Na osnovi pridobljenega nukleotidnega zaporedja bomo pripravili konstrukt za pripravo rekombinantne proteaze v bakterijskem ekspresijskem sistemu *Escherichia coli* in kvasnem ekspresijskem sistemu *Pichia pastoris*. Za pripravo rekombinantne saharopepsinu podobne proteaze iz gobe *C. nebularis* bomo izbrali učinkovitejši sistem in nato bomo z encimskimi testi analizirali njeno aktivnost.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Reagenti

Preglednica 1: Seznam uporabljenih reagentov in topil.

proizvajalec	reagenti
Ambion	Kompleta reagentov »FirstChoice RLM RACE« in »Retroscript«, RNase Zap
BD Becton	Tripton
BioLabs	Restriktijski encimi EcoRI-HF, NotI, NdeI, BamHI-HF
Boehringer-Manheim	X-gal
Carlo Erba	NaCl, glicerol, KOH, etanol, HCl, sorbitol
Clontech	Kompleta reagentov »Genome Walker« in »Advantage 2 PCR«
Difco laboratories	želatina
Fluka	KCl, MnCl ₂ ·4H ₂ O, MgSO ₄ , Glukoza, MnCl ₂
GE Healthcare	standard LMW
Invitrogen	SYBR Safe, polimeraza Platinum pfx
MBI Fermentas	MgCl ₂ , 6x nanašalna raztopina za agarozno elektroforezo (sestava: 0,2 % bromfenol modro, 0,2 % ksilen cianol FF, 60 % glicerol, 60mM EDTA), Gene Ruler 1kb DNA Ladder, Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder
Merck	metanol, DMSO, NaHCO ₃ , Trikloroocetna kislina
Millipore	membrana Immobilon transfer membranes
Novagen	polimeraza KOD Hot start DNA,
Promega	Kompleti reagentov »pGEM-T Easy Vector«, »Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System« in »Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System«, Nukleotidi: dATP, dCTP, dGTP, dTTP
Riedel de Haën	KH ₂ PO ₄
Roche	Clone BMG-His-1, Mouse IgG ₁
Serva	NaDS, TEMED, Bromfenol modro, Trihidroksimetilaminometan (Tris), Triton X-100, dializno črevo Servapor
Sigma	Kvasni ekstrakt, HEPES, CaCl ₂ ·2H ₂ O, Agar, Kazeinski hidrozilat, Ampicilin, IPTG,

	MgCl ₂ ,
--	---------------------

3.1.2 Laboratorijska oprema

Preglednica 2: Seznam uporabljene opreme.

Oprema	Proizvajalec
Aparatura PCR Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems
Aparatura za fotografiranje gelov UVItec	UVItec
Centrifuga Eppendorf 5424	Eppendorf
Centrifuga Sorvall RC5C plus	Sorvall
Fluorimeter Luminescence Spectrometer LS 30	Perkin Elmer
Hladilnik	Electrolux, Gorenje
Inkubator BINDER	Binder
Magnetno mešalo S-10	tehntica

pH meter Seven Easy	Mettler Toledo
Sistem za elektroforezo mini Protean II	BioRad
Spektrofotometer Lambda bio plus	PerkinElmer
Spektrofotometer UVI/VIS Lambda 25	Perkin Elmer
Tehntica Vibra AJH 4200CE,	Shinko Denshi Vibra Weighing Instruments
Termoblok ThermoShaker	Biometra
Vibracijski mešalnik Vibromix	Tehntica
Vodna kopel SW22	Julabo
Zamrzovalnik	Indesit

3.1.3 Gojišča

Gojišče SOC

- 20 g tripton
- 5 g kvasni ekstrakt
- 0,59 g NaCl
- 0,24 g MgCl₂
- 1,20 g MgSO₄
- 3,6 g glukoza
- Do 1 l dH₂O

Tekoče gojišče LB:

- 5 g kvasnega ekstrakta
- 10 g triptona
- 5 g NaCl
- 1 l dH₂O

Trdno gojišče LB:

- 3 g agar
- 2 g NaCl
- 2 g Bacto tripton
- 1 g kvasni ekstrakt
- 200 ml dH₂O

Mešanico smo sterilizirali z avtoklaviranjem (121 °C, 20 min, 2,0 bar), pustili da se je ohladila na 50 °C in vlili v sterilne petrijevke.

Trdno gojišče LBA:

Pripravili smo ga na enak način kot trdno gojišče LB, le da smo pred vlivanjem dodali ampicilin do končne koncentracije 1 µg/ml.

Trdno gojišče LBAX:

- 10 g tripton
- 10 g NaCl
- 5 g kvasni ekstrakt
- 15 g agar
- 1 l dH₂O

Pred vlivanjem plošč smo dodali še 1ml 1M IPTG, 0,5ml X-gal in 1ml ampicilina.

Gojišči BMGY in BMMY

- 10 g kvasni ekstrakt
- 20 g pepton
- 100 ml 1 M pufer kalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4 / KH_2PO_4), pH = 6,0
- 100 ml 10x YNB
- 2 ml 500x biotin
- 100 ml 10x glicerol ali 100 ml 10x metanol
- Do 1 l dH₂O

10 g kvasnega ekstrakta in 20 g peptona smo raztopili v 700 ml vode in sterilizirali z avtoklaviranjem. Ko se je ohladilo na temperaturo 25°C, smo dodali še 100 ml 1 M pufra kalijevega hidrogenfosfata s pH = 6,0, 100 ml 10x gojišča YNB, 2 ml 500x biotina in 100 ml 10x glicerola, katere smo predhodno sterilizirali z membranskim filtriranjem. Za gojišče BMMY smo namesto glicerola dodali 100 ml 10x metanol. Gojišče smo hranili pri temperaturi 4 °C.

Gojišče YPD

- 10 g kvasni ekstrakt
- 20 g pepton
- 20 g glukoza
- Do 1 l dH₂O

V 900 ml vode smo raztopili 10 g kvasnega ekstrakta in 20 g peptona (za pripravo plošč YPD smo dodali še 20 g agarja) in sterilizirali z avtoklaviranjem. Na koncu smo dodali še 100 ml 10x glukoze, predhodno sterilizirane z membranskim filtriranjem. Gojišče YPD smo hranili pri sobni temperaturi, plošče pa pri temperaturi 4 °C.

10X gojišče YNB (yeast nitrogen base)

V 1000 ml vode smo raztopili 134 g YNB z amonijevim sulfatom in brez aminokislin in segrevali, da se je YNB popolnoma raztopil v vodi. Gojišče YNB smo sterilizirali z membransko filtracijo in shranili pri temperaturi 4 °C.

500x biotin

V 100 ml vode smo raztopili 20 mg biotina in sterilizirali z membransko filtracijo. Shranili smo ga pri temperaturi 4 °C.

100x histidin

V 100 ml vode smo raztoplili 400 mg L-histidina. Segrevali smo do 50 °C in shranili pri temperaturi 4 °C.

10x glukoza

V 1000 ml vode smo raztopili 200 g D-glukoze in sterilizirali z avtoklaviranjem.

10x metanol

5 ml metanola smo zmešali s 95 ml vode in sterilizirali z membransko filtracijo. Shranili smo ga pri temperaturi 4 °C.

10x glicerol

Zmešali smo 100 ml glicerola in 900 ml vode ter sterilizirali z avtoklaviranjem.

1 M kalij hidrogenfosfatni pufer, pH = 6,0

Zmešali smo 132 ml 1 M K₂HPO₄, 868 ml 1 M KH₂PO₄ in preverili, da je pH = 6,0. Sterilizirali smo z avtoklaviranjem in shranili pri sobni temperaturi.

3.1.4 Pufri in raztopine

Raztopina TBCa:

- 10 mM HEPES
- 55 mM MnCl₂·4H₂O
- 75 mM CaCl₂·2H₂O

- 250 mM KCl

Zmešali smo HEPES, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ in KCl ter z raztopino KOH uravnali pH na 6,7. Nato smo dodali še $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ in sterilizirali z membranskim filtriranjem.

Raztopina TBCaG:

Raztopini TBCa smo dodali glicerol do končne koncentracije 15 %.

pufer McIlvaine

- 43,55 ml 0,1 M citratni pufer
- 56,45 ml 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

pH smo uravnali na 5,5.

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 z 0,4 % NaDS

Za 100 ml pufra smo raztopili 18,2 g tris baze v dH₂O, umerili pH na 8,8 in popravili volumen. Po sterilizaciji z avtoklaviranjem smo dodali še 4 ml 10 % NaDS.

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

Za 100 ml pufra smo raztopili 6,1 g tris baze v dH₂O, umerili pH na 6,8, popravili volumen in sterilizirali z avtoklaviranjem.

1 % želatina

V mikrovalovni pečici smo raztopili 0,5 g želatine v 50 ml sterilne dH₂O (označimo volumen na steklenički). Po segrevanju smo do oznake dopolnili z dH₂O.

10 % amonijev persulfat

Pripravili smo približno 5 ml raztopine, tako da smo 500 mg amonijevega persulfata raztopili v 5 ml dH₂O.

0,05 % želatina v 0,3 M tris-HCl, pH 8,8

Za 100 ml pufra smo raztopili 3,633 g Tris baze v dH₂O, umerili pH na 8,8 in sterilizirali z avtoklaviranjem. Nato smo dodali 0,05 g želatine in raztopili v mikrovalovni pečici.

1x razvijalni pufer pH 3,5

- 100 mM Na-acetat
- 200 mM NaCl
- 0,02 % (w/v) Brij 35

pH smo uravnali s koncentrirano ocetno kislino na 3,5.

Prenašalni pufer

- 100 ml 10x WB (30 g Tris-HCl, 58 g glicina, do 1 l dH₂O)
- 200 ml metanol
- 3,75 ml 10 % NaDS

Dopolnili smo z dH₂O do 1 l in dobro premešali.

Blokirna raztopina

- 10 ml 10x pufer TBS (500 mM Tris-HCl pH = 7,4, 1500 mM NaCl)
- 90 ml dH₂O
- 5 g mleko v prahu

Raztopina TBST

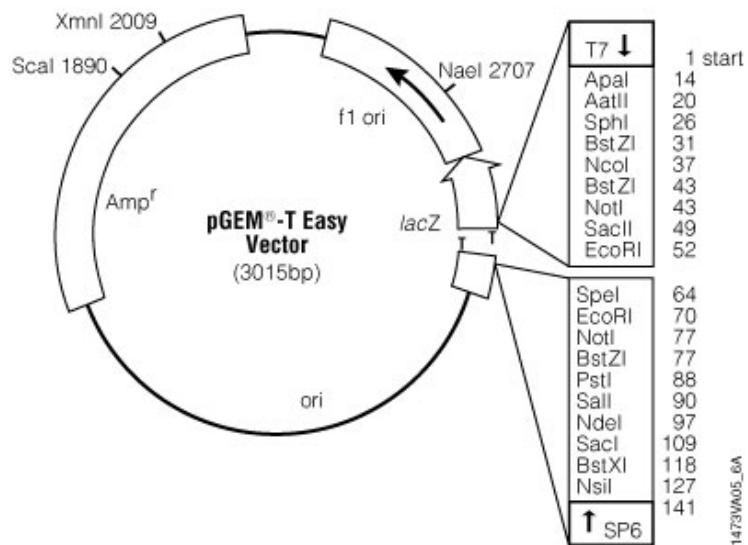
- 100 ml 10x pufer TBS (500 mM Tris-HCl pH = 7,4, 1500 mM NaCl)
- 0,05 % Tween 20

Dopolnili smo z dH₂O do 1 l.

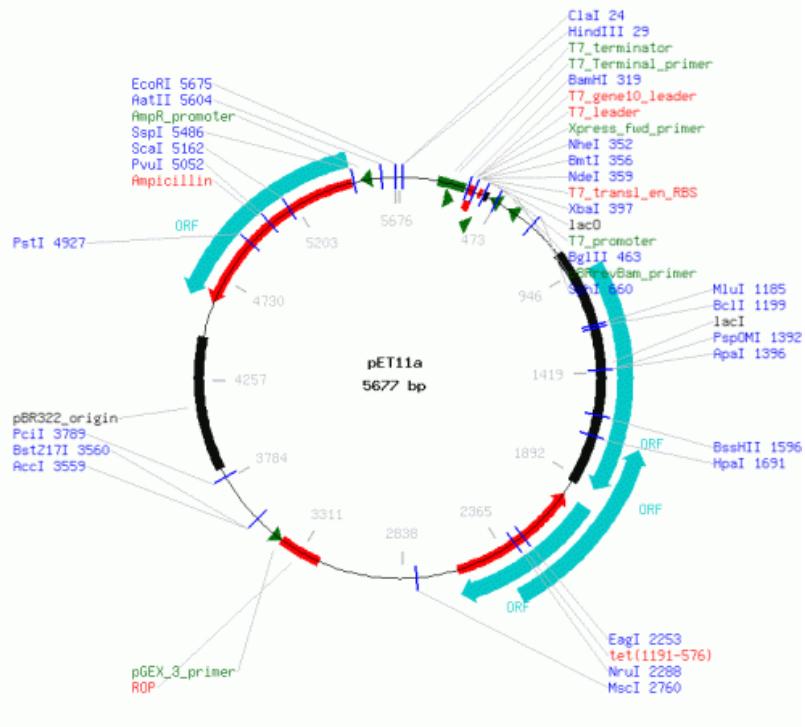
10 % NaDS

V 70 ml dH₂O smo raztopili 10 g NaDS in popravili volumen do 100 ml.

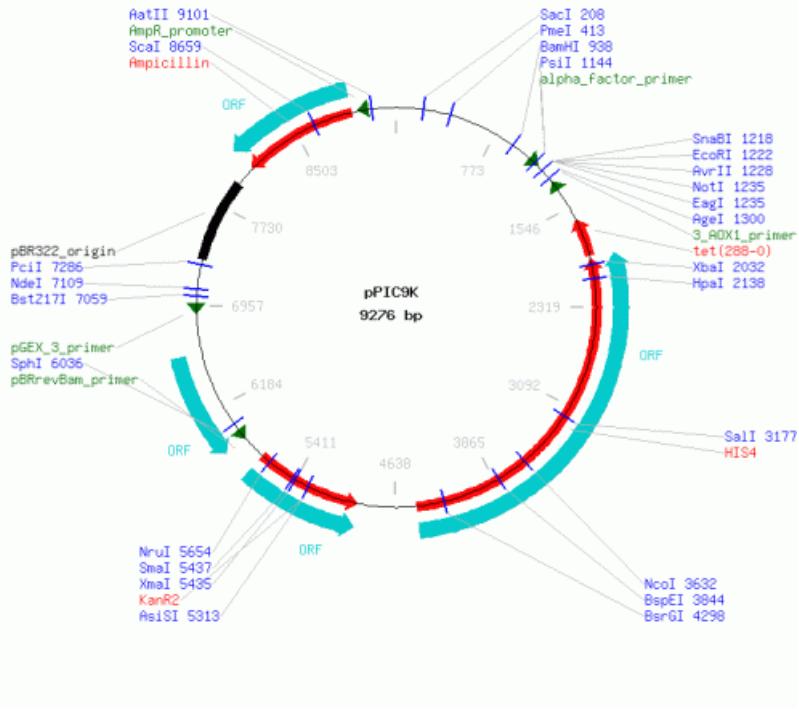
3.1.5 Plazmidi



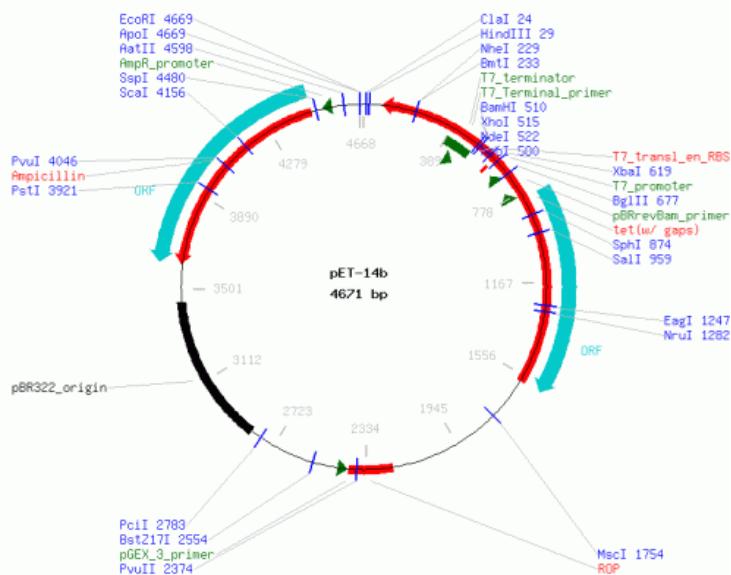
Slika 3: Mapa plazmida pGEM-T Easy.



Slika 4: Mapa plazmida pET11a.



Slika 5: Mapa plazmida pPIC9k.



Slika 6: Mapa plazmida pET14b.

3.1.6 Začetni oligonukleotidi

Preglednica 3: Seznam smiselnih in protismiselnih začetnih oligonukleotidov.

kratica	Nukleotidno zaporedje
M13 uni (for)	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
SP6 (rev)	5'-CTATTTAGGTGACACTATAG-3'
CnAP_ter_1F	5'-ACT CTC GTA AGC CTA AGC TAA TCG TCA CT-3'
CnAP_ter_2F	5'-ACA GCA CCG CAT ACA CAG GCA AAA TCG CAT-3'
CnAP_ter_3F	5'-GTT TCC TTT GGT GAT GAA GAA CTT GAG C-3'
CnAP_pro_1R	5'-TCC AAA GAC CGC TTC ACC TCC ATC TTG TTC-3'
CnAP_pro_2R	5'-CCG AGA TGG TGT CAT ATC CAA GAC CAA GAA T-3'
CnAP_pro_3R	5'-GTG ACG ATT AGC TTA GGC TTA CGA GAG TAG T-3'
CnAP_ter_F1	5'-ACC AGA CTG CAA CCA ACC AT-3'
CnAP_ter_F2	5'-CCT TGG TCC TCA GTC TCC TT-3'
CnAP_pro_R1	5'-GGT GGG CAG TGT ATC GTA GT-3'
CnAP_pro_R2	5'-CAT CCT TCG TTG TCT GTG GTT-3'
rCnAP_NdeI-Flong	5'-CCC ATA TGC GCG TTC ACA AAT TCA AGC TCC AT-3'
rCnAP_BamHI_Rlong	5'- GGG GAT CCT TAT TAT TAC TTT GAA TTA GCA AAA CCA AC-3'
rCnAP_EcoHis6-Flong	5'- GGG AAT TCA CCA CCA CCA CCA CCG CGT TCA CAA ATT CAA GCT CCA TAA GAT -3'
rCnAP_EcoRI-F	5'-GGG AAT TCC GCG TTC ACA AAT TCA AG-3'
rCnAP_NotI-R	5'-CCG CGG CCG CTT ATT ACT TTG AAT TAG CAA A-3'
rCnAP_NdeI-F	5'-CCC ATA TGC GCG TTC ACA AAT TCA AG-3'
rCnAP_BamHI_R	5'-GGG GAT CCT TAT TAT TAC TTT GAA TTA GCA AA-3'
rCnAP_EcoHis6-F	5'-GGG AAT TCC ACC ACC ACC ACC ACC GCG TTC ACA AAT TCA AG-3'
AP1	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'
AP2	5'-ACT ATA GGG CAC GCG TGG T-3'

3.2 METODE

3.2.1 Določitev celotnega zaporedja DNA saharopepsinu podobne aspartatne proteaze iz gobe *Clitocybe nebularis* (CnAP)

3.2.1.1 Verižna reakcija s polimerazo z uporabo kompleta reagentov Genome Walker

Verižna reakcija s polimerazo je način sinteze nukleinskih kislin, s katerim lahko pomnožimo tarčni odsek DNA. Gre za ciklično reakcijo, kjer je vsak cikel sestavljen iz treh stopenj: denaturacija DNA, prileganje začetnih oligonukleotidov in izgrajevanje komplementarne verige. Produkte verižne reakcije s polimerazo analiziramo na koncu na agaroznem gelu, kateremu predhodno dodamo barvilo (3).

Komplet reagentov Genome Walker omogoča pripravo knjižnic genomske DNA, razrezane z restriktionskimi encimi EcoRV, DraI, PvuII in StuI, ki puščajo tope konce in se nanje ligira adaptorje Genome Walker. S pomočjo začetnih oligonukleotidov, specifičnih za gen in za adaptorje, je mogoče pomnožiti neznane fragmente DNA in tako določiti zaporedje promotorskih in terminatorskih zaporedij genov (slika 7).

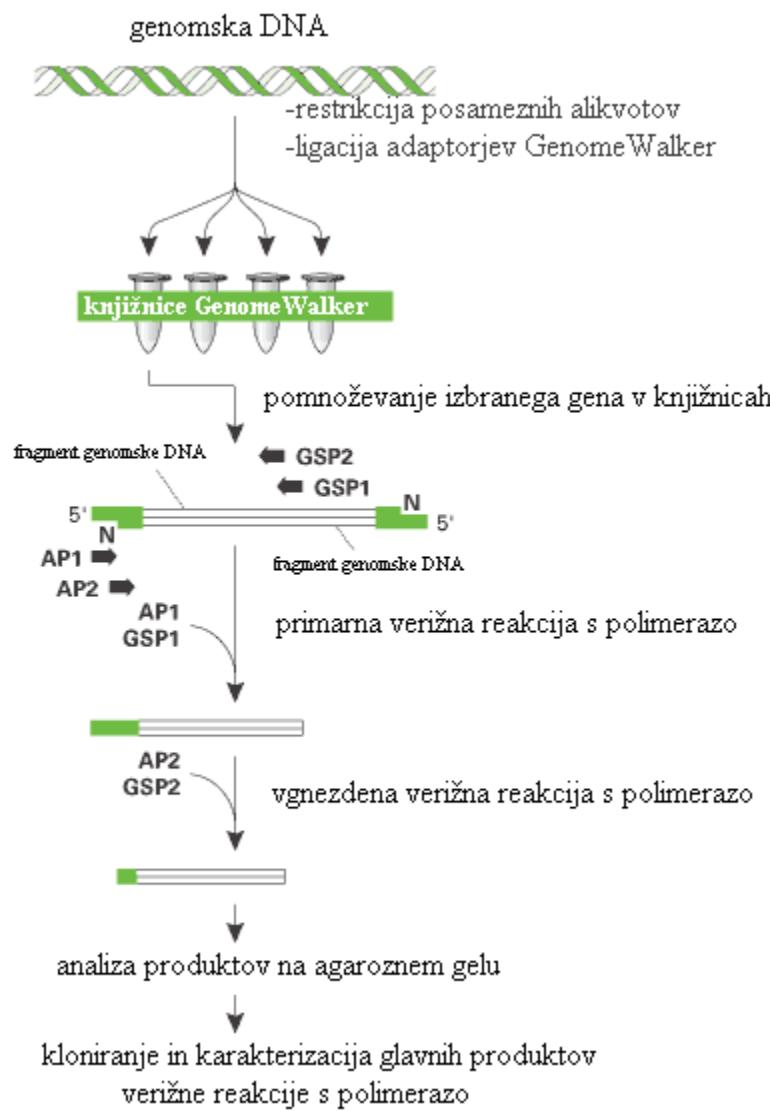
Po navodilih proizvajalca smo za izbrani gen načrtovali specifične začetne oligonukleotide, in sicer za primarno in vgnezdeno verižno reakcijo s polimerazo (preglednica 3)

Že pripravljene knjižnice genomske DNA gobe *C. nebularis* smo uporabili kot matrice v verižni reakciji s polimerazo Advantage SA. V primarni verižni reakciji s polimerazo smo uporabili začetne oligonukleotide CnAP_pro_1R, CnAP_pro_2R, CnAP_ter_1F, CnAP_ter_2F in AP1 (preglednica 3) v pogojih pomnoževanja (preglednica 4).

Produkte primarne verižne reakcije s polimerazo smo redčili 50-krat in jih uporabili kot matrico za vgnezdeno verižno reakcijo s polimerazo z začetnimi oligonukleotidi CnAP_pro_2R, CnAP_pro_3R, CnAP_ter_2F, CnAP_ter_3F in AP2 (preglednica 3) v naslednjih pogojih pomnoževanja (preglednica 4).

Po analizi produktov vgnezdeno verižne reakcije s polimerazo smo močne lise očistili iz 1 % agaroznega gela s kompletom reagentov »Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System« in jih

ligirali v vektor pGEM-T Easy, s katerim smo transformirali kompetentne celice bakterije *E. coli* DH5 α s topotnim šokom pri 42 °C. Vektorje z vključenimi fragmenti smo izolirali s kompletom reagentov »Wizard Plus Minipreps DNA Purification System« in fragmentom določili nukleotidno zaporedje.



Slika 7: Postopek določanja neznanega genomskega zaporedja s kompletom reagentov GenomeWalker.

Preglednica 4: Pri PCR reakciji smo za PCR uporabili naslednje pogoje pomnoževanja:

Primarni PCR

94 °C	20 s	
72 °C	4 min	5x

94 °C	20 s	
72 – 0,5 °C	4 min	10x

94 °C	20 s	
67 °C	3 min	25x

67 °C	4 min	
4 °C	∞	

Sekundarni PCR

94 °C	20 s	5x
72 °C	3 min	

94 °C	20 s	10x
72 – 0,5 °C	3 min	

94 °C	20 s	20x
67 °C	3 min	

70 °C	10 min	
4 °C	∞	

3.2.1.2 Določanje zaporedja cDNA z metodo hitrega kloniranja 3` in 5` koncov cDNA

Metoda hitrega kloniranja koncov cDNA (RACE) je tehnika, ki temelji na verižni reakciji s polimerazo in omogoča kloniranje celotne cDNA, ko imamo na voljo le delna zaporedja cDNA. Glavno izboljšanje metode RACE predstavlja z ligazo RNA povzročeno hitro kloniranje koncov cDNA (RLM-RACE). Pri metodi RLM-RACE pride do pomnožitve cDNA koncov le iz celotne mRNA, kar opazimo pri detekciji kot eno samo liso.

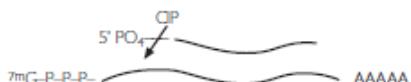
Za sintezo prve verige cDNA z reverzno transkripcijo smo uporabili komplet reagentov »Ambion Retroscrip kit« po navodilih proizvajalca. Kot matrico smo uporabili totalno RNA in začetni oligonukleotid dT₍₁₇₎3'RACE adaptor. V primarni verižni reakciji s polimerazo smo nato uporabili začetne oligonukleotide CnAP_ter_1F, CnAP_ter_2F in 3` RACE zunanjii začetni oligonukleotid (preglednica 3) ter naslednji program: 5 min pri temperaturi 95 °C, 30 s pri temperaturi 65 °C, nato smo v naslednjih desetih ciklih zniževali temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov po 1 °C od 65 °C do 55 °C, katerim je sledilo 25 standardnih ciklov temperatur 94 °C, 30 s, 55 °C, 30 s in 72 °C, 1,5 min ter zadnje podaljševanje verige pri temperaturi 72 °C, 5 min. Produkte primarne verižne reakcije s polimerazo smo uporabili za

vgnezdeno verižno reakcijo s polimerazo, kjer smo uporabili začetne oligonukleotide CnAP_ter_2F, CnAP_ter_3F in 3` RACE notranji začetni oligonukleotid (preglednica 3). Uporabili smo enak program pomnoževanja kot pri primarni verižni rekaciji s polimerazo. V primarni in sekundarni verižni reakciji s polimerazo smo uporabili polimerazo DreamTaq. Metoda 5` RACE je potekala na podoben način kot 3`RACE, le da smo tukaj uporabili v primarni rekaciji s polimerazo začetne oligonukleotide CnAP_pro_1R, CnAP_pro_2R in 5`RACE zunanji začetni oligonukleotid (preglednica 3) ter v vgnezdeni verižni reakciji s polimerazo začetne oligonukleotide CnAP_pro_2R, CnAP_pro_3R in 5`RACE notranji začetni oligonukleotid (preglednica 3).

Produkte vgnezdenih verižnih reakcij s polimerazo smo po postopku, ki ga priporoča proizvajalec, očistili iz agaroznega gela z uporabo kompleta reagentov »Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System« in ligirali v vektor pGEM-T Easy. Z ligacijsko mešanicijo smo transformirali kompetentne bakterije *E. coli* DH5 α s topotnim šokom pri 42°C. Vektorje z vključenimi fragmenti smo izolirali s kompletom »Wizard Plus Minipreps DNA Purification System« in fragmentom določili nukleotidno zaporedje.

5' RLM-RACE

uporaba teleče alkalne fosfataze, da odstranimo 5'PO₄
iz degradirane mRNA, tRNA in DNA



z uporabo kisele tobačne pirofosfataze (TAP), da odstranimo
kapo iz mRNA



ligacija 5' RACE adapterja na mRNA brez kape



reverzna transkripcija

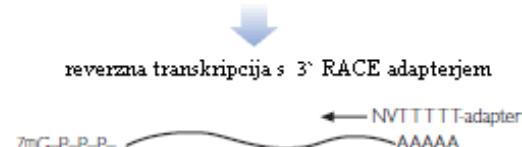


PCR



3' RACE

reverzna transkripcija s 3' RACE adapterjem



PCR



Slika 8: Postopek določanja zaporedja cDNA z metodo hitrega kloniranja 3` in 5` koncov cDNA.

3.2.1.3 Določanje celotnih zaporedij gena in cDNA

Na osnovi zaporedja cDNA smo načrtovali nove začetne oligonukleotide CnAP-F1, CnAP-F2, CnAP-R1 in CnAP-R2 za pomnoževanje celotnega zaporedja gena (preglednica 3). Za določanje celotnega zaporedja gena smo v verižni reakciji s polimerzo za matrico uporabili desetkrat oz. stokrat razredčeno genomsko DNA (gDNA CnV3 EZNA kit 19.01.05). Za določanje celotnih zaporedij cDNA smo v verižni reakciji s polimerazo uporabili za matrico cDNA pripravljeno z reverzno transkripcijo mRNA z uporabo kompleta reagentov »Ambion RetroScript Kit« in začetnega oligonukleotida dT₍₁₇₎3'-RACE.

V primarni verižni reakciji s polimerazo smo uporabili začetna oligonukleotida CnAP-R1 in CnAP-F1 (preglednica 3) in naslednji program: 95 °C, 5 min, 65 °C, 30 s, sledilo je deset ciklov, kjer smo zniževali temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov po 1 °C od 65 °C do 55 °C, katerim je sledilo 20 standardnih ciklov – 94 °C, 30 s, 55 °C, 30 s, 72 °C, 1,5 min ter zadnje podaljševanje verige 5 min pri 72 °C. Produkte primarne reakcije smo uporabili za vgnezdeno verižno reakcijo s polimerazo, kjer smo uporabili začetna oligonukleotida CnAP-R2 in CnAP-F2 in enak program pomnoževanja kot pri primarni verižni reakciji s polimerazo. Produkte vgnezdeno verižne reakcije s polimerazo smo po postopku, ki ga priporoča proizvajalec, očistili iz agaroznega gela z uporabo kompleta reagentov »Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System« in ligirali v vektor pGEM-T Easy. Z ligacijsko mešanico smo transformirali kompetentne bakterije *E. coli* DH5α s toplotnim šokom pri 42 °C. Vektorje z vključenimi fragmenti smo izolirali s kompletom reagentov »Wizard Plus Minipreps DNA Purification System« in fragmentom določili nukleotidno zaporedje.

3.2.1.4 Čiščenje fragmentov DNA s kompletom reagentov Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System

Čiščenje iz 1 % agaroznega gela:

1,5 ml mikrocentrifugirke smo stehtali in zapisali maso. Pod UV svetilko smo poslikali DNA in v temnici iz agaroznega gela izrezali ustrezne DNA fragmente. Ponovno smo stehtali 1,5 ml mikrocentrifugirke in izračunali razliko. V 1,5 ml mikrocentrifugirke smo dodali Membrane

Bind Solution v razmerju 10 µl raztopine na 10 mg agaroznega gela. Nato smo dali za 10 min stresat pri 63 °C, da se je gel popolnoma raztalil. Vsebino smo popolnoma premešali na vibracijskem mešalniku pri sobni temperaturi.

Direktno čiščenje PCR produktov:

Mešanici PCR produktov smo dodali enako količino Membrane Binding Solution in dobro premešali.

Oba postopka smo nadaljevali s čiščenjem DNA s centrifugiranjem:

Raztopino gela oziroma pripravljen PCR produkt smo odpipetirali v kolono, predhodno vstavljeno v vsebnik in 1 min inkubirali pri sobni temperaturi. Centrifugirali smo 1 min pri 20000 x g pri sobni temperaturi. Nato smo kolono sprali s 700 µl Membrane Wash Solution. Centrifugirali smo 1 min pri 20000 x g . Supernatant smo zavrgli in ponovili postopek s 500 µl Membrane Wash Solution ter centrifugirali 5 min pri 20000 x g . Supernatant smo zavrgli, kolono postavili nazaj v vsebnik in ponovno centrifugirali 1 min pri 20000 x g , da je izhlapel še preostali etanol. Kolono smo nato prestavili v čisto 1,5 ml mikrocentrifugirko, sprali z 20 µl dH₂O in centrifugirali 1 min pri 20000 x g . Kolono smo zavrgli, očiščene DNA fragmente pa shranili pri -20 °C.

3.2.1.5 Adenilacija fragmentov DNA

Ob uporabi polimeraze Pfx moramo pred ligacijo izvesti še adenilacijo, ker fragment kasneje ligiramo v vektor pGEM-T Easy, polimeraza Pfx pa sama po sebi ne dela adeniliranih koncov.

7 µl očiščenega PCR produkta smo dodali 1 µl 10x pufra z (NH₄)₂SO₄, 1 µl 25 mM MgCl₂, 0,5 µl 10 mM dATP in 1 µl polimeraze. To smo dali za 30 min stresat v stresalni inkubator ThermoShaker pri 70 °C in 400 obratih na minuto.

3.2.1.6 Ligacija s kompletom reagentov pGEM-T Easy Vector Systems

Pripravili smo izhodiščno zmes, tako da smo za vsako reakcijo zmešali 0,15 µl vektorja pGEM-T Easy, 5 µl 2x ligacijskega pufra, 1 µl T4 ligaze in alikvotirali po 6 µl v nove 1,5 ml mikrocentrifugirke. V vsako mikrocentrifugirko smo dodali še 4 µl očiščenih fragmentov in dobro premešali. Mešanico smo inkubirali 1 h pri sobni temperaturi in nato še čez noč na 16 °C.

3.2.1.7 Priprava kompetentnih bakterij *E. coli* DH5 α

V 3 ml tekočega gojišča LB smo pripravili prekonočno kulturo bakterijskega seva *E. coli* DH5 α in dali stresat pri 37 °C. Naslednji dan smo precepili 1 ml prekonočne kulture v 100 ml tekočega gojišča LB in inkubirali v stresalniku (≥ 250 rpm) pri 37 °C, da je OD₆₀₀ dosegla 0,35 - 0,40. OD₆₀₀ smo prvič preverili po eni uri inkubacije in ga nato spremajali vsake pol ure oz. 15 min. Celice smo nato aseptično prelimi v sterilne centrifugirke, jih inkubirali na ledu 10 – 15 min ter centrifugirali v hladni namizni centrifugi pri 3000 x g, 10 min, 4 °C. Pri delu smo pazili, da so bile celice ves čas na ledu. Pri aseptičnem delu v laminariju smo popolnoma odstranili supernatant in celice resuspendirali s pipetiranjem tako, da so bile združene v 25 ml ohlajene raztopine TBCa. Celice smo nato inkubirali 10 – 30 min na ledu in ponovno centrifugirali v hladni namizni centrifugi pri 3000 x g, 10 min, 4 °C. Supernatant smo v aseptičnih pogojih popolnoma odstranili in celice resuspendirali s pipetiranjem v 1,5 ml ohlajene raztopine TBCaG. Na koncu smo celice alikvotirali po 100 µl v ohlajene mikrocentrifugirke, jih najprej zamrznili v etanolu pri -80 °C ter shranili v zamrzovalniku pri -80 °C.

3.2.1.8 Transformacija ligacijskih mešanic v kompetentne celice *E. coli* DH5 α

Bakterijska transformacija je sprejem fragmentov proste DNA iz okolja v bakterijske celice. Proces poteka v treh stopnjah: vezava DNA na površino celic, prehod DNA v celico in

ustalitev DNA v celici. Za vnos plazmida v bakterijske celice *E. coli* DH5 α smo uporabili metodo s topotnim šokom.

Na ledu smo odtalili kompetentne celice *E. coli* DH5 α , jih po 50 μ l dodali v celotno ligacijsko mešanico in inkubirali 20 min na ledu. Nato smo jih 60 s inkubirali v vroči kopeli pri temperaturi 42 °C in tako izvedli topotni šok. Celice smo ponovno inkubirali na ledu za nekaj minut. Ob ognju (sterilni pogoji) smo dodali 450 μ l gojišča SOC in stresali 45 min pri 37 °C. Po 100 μ l smo razmazali na plošče LBAX, preostanek pa centrifugirali na 10000 x g za 2 min pri sobni temperaturi. Odvzeli smo 300 μ l, supernatanta, preostanek resuspendirali na rotacijskem mešalniku in razmazali na plošče LBAX. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C.

3.2.1.9 Verižna reakcija s polimerazo na osnovi kolonije (CPCR)

Z verižno reakcijo s polimerazo na osnovi kolonije (CPCR) preverimo, če je bila ligacija uspešna in kolonija vsebuje plazmid z vstavljenim fragmentom DNA.

Pripravili smo izhodiščno zmes, tako da smo zmešali 3 μ l 10x pufra Dream Green Taq, 2,5 μ l 1,25 mM mešanice nukleotidov, 0,5 μ l smiselnega začetnega oligonukleotida M13, 0,5 μ l protismiselnega začetnega oligonukleotida SP6 (preglednica 3), 13,5 μ l dH₂O ter alikvotirali v 0,2 ml mikrocentrifugirke. V vsako mikrocentrifugirko smo z nastavkom dodali še ustrezno kolonijo. Polimerazo smo razredčili tako, da smo 0,1 μ l polimeraze Dream Taq Hot Start dodali 9,9 μ l dH₂O.

Uporabili smo naslednji program:

99 °C	10 min	
65 °C	30 s	→ pavza za Hot Start

94 °C	30 s	30x
50 °C	30 s	
72 °C	2 min	

72 °C	2 min	
4 °C		∞

3.2.1.10 Analiza plazmidne DNA na agarozni gelski elektroforezi

Agaroza je iz morske trave izoliran linearni polimer, ki se pogosto uporablja za elektroforezno ločbo nukleinskih kislin. Njena temperatura tališča je 87 – 89 °C in se pri 36 – 39 °C ponovno strdi.

Priprava 1 % agaroznega gela:

Uporabili smo 1 % agarozni gel. V 150 ml 1-kratnega pufra TAE smo suspendirali 1,5 g agaroze, dodali 15 µl barvila SYBR Safe in segreli v mikrovalovki, da se je agarosa popolnoma raztopila. Ko se je gel ohladil na približno 50 °C, smo ga vlili v kadičko in dodali glavniček. Po strditvi smo dodali 1-kratni pufer TAE, da je prekril površino gela in nanesli vzorce.

Priprava in nanos vzorcev:

Po 10 µl plazmidne DNA (produkti CPCR) smo direktno nanašali na gel. V eno izmed jamic smo nanesli še 1 µl DNA označevalca velikosti, kateremu smo predhodno dodali 10 µl 1-kratnega nanašalnega pufra. Le-ta vsebuje glicerol, ki vzorcem poveča gostoto ter barvili bromfenol modro in ksilencianol zeleno, ki omogočata vizualno spremljanje potovanja DNA v gelu.

3.2.1.11 Priprava prekonočnih kultur

V sterilno epruveto z zamaškom smo odpipetirali 3 ml tekočega gojišča LBA. Z nastavkom smo zajeli ustrezno kolonijo in jo navpično spustili v epruveto. V negativni kontroli smo dali v LBA gojišče samo nastavek, brez kolonije. Preko noči smo inkubirali v stresniku pri 250 obratih/min in 37 °C.

3.2.1.12 Izolacija plazmidne DNA s kompletom reagentov »Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System«

1,5 ml prekonočne bakterijske kulture smo prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko in centrifugirali 2 min pri 10000 x g in sobni temperaturi. Supernatant smo odlili, dodali še preostalih 1,5 ml bakterijske kulture, celice resuspendirali z mešanjem na vibracijskem mešalu ter ponovili postopek. Dodali smo 250 µl raztopine za celično resuspendiranje in celice popolnoma resuspendirali z mešanjem na vibracijskem mešalu. Nato smo dodali 250 µl lizirne raztopine, vsebino dobro premešali in inkubirali 2 min pri sobni temperaturi. Dodali smo 10 µl raztopine alkalne proteaze, ponovno dobro premešali in inkubirali 5 min pri sobni temperaturi. Dodali smo še 350 µl nevtralizacijske raztopine in dobro premešali. Bakterijski lizat smo centrifugirali 10 min pri maksimalni hitrosti (20000 x g) pri sobni temperaturi. Lizat smo s pipeto prenesli v kolono in jo centrifugirali 1 min pri 20000 x g pri sobni temperaturi. Filtrat smo zavrgli in dodali 750 µl raztopine za spiranje (predhodno razredčene s 95 % etanolom). Centrifugirali smo 1 min pri 20000 x g pri sobni temperaturi, zavrgli filtrat in postopek ponovili z dodatkom 250 µl raztopine za spiranje. Centrifugirali smo 2 min pri 20000 x g pri sobni temperaturi in kolono prenesli v novo 1,5 ml epruveto. Dodali smo 90 µl dH₂O, centrifugirali 1 min pri 20000 x g pri sobni temperaturi in zavrgli kolono. Očiščeno plazmidno DNA smo shranili pri -20 °C.

3.2.1.13 Določanje čistote in koncentracije DNA

Koncenrtracijo in čistoto DNA smo določili spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 260 in 280 nm. A₂₆₀=1 ustreza koncentraciji 50µg/ml dvoverižne DNA. Pri čistih vzorcih je razmerje A_{260/280} okoli 1,8. Znižana vrednost A_{260/280} kaže na kontaminacijo raztopine s proteini, fenolom ali RNA, zvišana pa na prisotnost barvil.

3.2.1.14 Analiza nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij

Za analizo nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij smo uporabili orodje Sequence Utilities na strežniku BCM Search Launcher (<http://searchlauncherbcm.tmc.edu>). Za iskanje podobnih nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij v bazah podatkov smo uporabili orodja BLAST na strežniku NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Poravnave nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij smo naredili z algoritmom ClustalW v programu BioEdit (<http://mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

3.2.2 Izražanje rekombinantne aspartatne proteaze v kvasovki *Pichia pastoris*

3.2.2.1 Priprava rekombinantnega fragmenta DNA

V izhodiščno zmes smo za vsako reakcijo dali 5 µl 10x pufra, 4 µl 25 mM MgSO₄, 5 µl mešanice nukleotidov, 1 µl polimeraze KOD Taq in 32 µl dH₂O. Alikvotirali smo v 0,2 ml mikrocentrifugirke po 47 µl in v vsako dodali še po 1 µl ustreznega smiselnega in protismiselnega začetnega oligonukleotida rCnAP_EcoRI-F in rCnAP_NotI-R za fragment DNA brez histidinskega označevalca ter rCnAP_EcoHis6-Flong in rCnAP_NotI-R za fragment DNA s histidinskim označevalcem (preglednica 3). Kot matrica je v obeh primerih, za fragment z in brez histidinskega označevalca, služila 100x redčena plazmidna DNA (pGEM::CnAP1-1 19.5.10). Za pomnoževanje fragmenta DNA smo uporabili naslednji program:

95 °C	2 min

95 °C	20 s
68 °C	30 s

4 °C	∞

25x

3.2.2.2 Priprava plazmidne DNA in vektorjev

Iz očiščenih fragmentov DNA in plazmida pPIC9K (slika 5) smo nastavili restrikcijsko mešanico, tako da smo celotni mešanici fragmenta DNA (17 µl) oz. plazmidne DNA (22 µl) dodali po 1 µl ustreznih encimov (NotI-HF in EcoRI-HF), po 3 µl 10x NEB 4 pufra in 10x BSA (oba smo predhodno premešali na vibracijskem mešalu) in dopolnili z dH₂O do končnega volumna 30 µl. Restrikcijsko mešanico smo inkubirali 2 – 4 h v termobloku pri 37 °C. Razrezane plazmide smo analizirali na 1 % agaroznem gelu in nato smo pripravili ligacijsko mešanico.

V mikrocentrifugirko smo dali 10 µl rezanega fragmenta DNA CnAP, 2,5 µl rezanega vektorja pPIC9K (slika 5), 1,5 µl 10x ligaznega pufra T4 DNA in 1 µl ligaze T4. To smo inkubirali preko noči pri 16 °C. Naslednji dan smo naredili transformacijo ligacijske mešanice v kompetentne celice *E. coli* DH5α (metoda 3.2.1.8). Naslednji dan smo iz transformacijskih plošč izbrali 4 kolonije, vsako dvakrat nacepili v 3 ml gojišča LBA in prekonočno stresali pri 37 °C in 220 obr/min. Naslednji dan smo s kompletom reagentov »Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system« očistili plazmidno DNA iz prekonočne kulture (metoda 3.2.1.12) in nastavili restrikcijsko mešanico.

V novo mikrocentrifugirko smo dali 5 µl plazmidne DNA, po 1 µl encimov NotI-HF in EcoRI-HF, 3 µl 10x pufra NEB 4 in 10x BSA (oba smo predhodno premešali na vibracijskem mešalu) in dopolnili z dH₂O do končnega volumna 20 µl. Restrikcijsko mešanico smo inkubirali 3 h pri 37 °C in analizirali na 1 % agaroznem gelu. Plazmidno DNA smo nato linearizirali z encimom SallI, tako da smo dali v restrikcijsko mešanico 8 µl encima SallI, 1,2 µl 10x BSA, 12 µl 10x pufra NEB 3 ter 100 µl vzorca pPIC9K::cCnAP1. Mešanico smo prekonočno inkubirali pri 37 °C. Naslednji dan smo plazmidno DNA na vakuumskem sušilniku skoncentrirali do končnega volumna 10 µl.

3.2.2.3 Priprava kompetentnih celic *Pichia pastoris* GS 115

Na plošče YPD smo nacepili sev kvasovke *Pichia pastoris* GS 115 in 2 – 3 dni inkubirali pri 30 °C. Ko so zrasle kolonije, smo jih precepili v 250 ml gojišča YPD v 2 l erlenmajerico in

prekonočno stresali pri 30 °C, dokler ni bila optična gostota pri 600 nm 1,3 - 1,5. Nato smo celice centrifugirali 5 min pri 1500 x g in 4 °C, odlili supernatant in resuspendirali usedlino v 250 ml ledeno mrzle sterilne vode. Ponovno smo centrifugirali 5 min pri 1500 x g in 4 °C, odlili supernatant in resuspendirali usedlino v 125 ml ledeno mrzle sterilne vode. Postopek smo nato ponovili z 10 ml in na koncu še 5 ml ledeno mrzlega 1 M sorbitola.

3.2.2.4 Transformacija plazmida pPIC9K::rCnAP v ekspresijski sev kvasovke *Pichia pastoris* GS115

V ledeno mrzli elektroporacijski kiveti smo zmešali 300 µl kompetentnih celic *Pichia pastoris* GS115 in celotno linearizirano plazmidno DNA ter inkubirali 5 min na ledu. Z ustreznimi pogoji (nastavitevni volti 1,5 kV, upornost 200 Ω, kapacitanca 25 µF) smo dali celicam pulz in sprožili elektroporacijo. Nato smo hitro dodali 1 ml 1 M sorbitola in nanesli po 200 µl mešanice na selekcijske plošče MD. Te smo inkubirali pri 30 °C dokler se niso pojavile kolonije.

3.2.2.5 Izražanje rCnAP v kvasovki *P. pastoris* s pomočjo indukcije z metanolom

Kolonije iz selekcijskih plošč MD smo nacepili v gojišče BMGY in prekonočno inkubirali pri 30 °C. Naslednji dan smo ga zamenjali z gojiščem BMMY, ki vsebuje metanol, in tako inducirali ekspresijo. Naslednje 3 dni smo vsakodnevno dodajali metanol in s tem vzdrževali nivo izražanja rekombinantnega proteina. Na koncu smo shranili gojišče, saj se je vanj izločala rekombinantna CnAP.

3.2.3 Izražanje rekombinantne aspartatne proteaze v bakteriji *Escherichia coli* s pomočjo indukcije z IPTG

3.2.3.1 Priprava rekombinantnega fragmenta DNA

V izhodiščno zmes smo za vsako reakcijo dali 5 µl 10x pufra, 4 µl 25 mM MgSO₄, 5 µl mešanice nukleotidov, 1 µl polimeraze KOD Taq in 32 µl dH₂O. Alikvotirali smo v 0,2 ml mikrocentrifugirke po 47 µl in v vsako dodali še po 1 µl ustreznega smiselnega in protismiselnega začetnega oligonukleotida rCnAP_NdeI-Flong in rCnAP_BamHI-Rlong (preglednica 3). Kot matrica je služila 100x redčena plazmidna DNA (pGEM::CnAP1-1 19.5.10). Za pomnoževanje fragmenta DNA smo uporabili naslednji program:

95 °C	2 min

95 °C	20 s
68 °C	30 s
}	
25x	

4 °C	∞

3.2.3.2 Priprava vektorjev

Za pripravo rekombinantne CnAP v bakteriji *E. coli* smo uporabili dva različna vektorja, pET11a (slika 4) in pET14b (slika 6). Vektor pET11a nam je služil za izražanje neoznačene CnAP, vektor pET14b pa za izražanje CnAP označene s histidinskim označevalcem.

Iz očiščenih fragmentov DNA in plazmidov (pET11a in pET14b) smo nastavili restriktijsko mešanico, tako da smo celotni mešanici fragmenta DNA (17 µl) oz. plazmidne DNA (22 µl) dodali po 1 µl ustreznih encimov (NdeI in BamHI-HF), po 3 µl 10x NEB 4 pufra (predhodno premešan na vibracijskem mešalu) in dopolnili z dH₂O do končnega volumna 30 µl. Restriktijsko mešanico smo inkubirali 2 – 4 h v termobloku pri 37 °C. Razrezane plazmide smo analizirali na 1 % agaroznem gelu in pripravili ligacijsko mešanico.

V mikrocentrifugirko smo dali 10 µl rezanega fragmenta DNA CnAP, 2,5 µl rezanega vektorja pET11a oz. pET14b, 1,5 µl 10x ligaznega pufra T4 DNA in 1 µl ligaze T4. To smo inkubirali preko noči pri 16 °C. Naslednji dan smo naredili transformacijo ligacijske mešanice v kompetentne celice *E. coli* DH5α (metoda 3.2.1.8). Iz transformacijskih plošč smo izbrali 4 kolonije, vsako dvakrat nacepili v 3 ml gojišča LBA in prekonočno stresali pri 37 °C in 220 obr/min. Naslednji dan smo s kompletom reagentov »Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system« očistili plazmidno DNA iz prekonočne kulture (metoda 3.2.1.12) in transformirali v ekspresijski sev.

Za izražanje aspartatne proteaze v bakteriji smo uporabili dva različna seva kompetentnih celic *E. coli* BL21(DE3) in BL21(DE3)pT-Trx. Zaradi prisotnosti tioredoksina pričakujemo pri sevu BL21(DE3)pT-Trx, da bo prišlo do pravilnega zvitja CnAP.

3.2.3.3 Izražanje v bakterijskih ekspresijskih sevih

Iz trajne kulture seva *E. coli* BL21(DE3) z ekspresijskim vektorjem pET11a ::CnAP oz. pET14b::CnAP smo pripravili prekonočno kulturo. Trem epruvetam z 10 ml gojišča LB smo dodali ampicilin do končne koncentracije 100µg/ml (gojišče LBA). V eno epruveto smo nacepili trajno kulturo BL21(DE3) pET11a::CnAP, v drugo trajno kulturo BL21(DE3) pET14b::CnAP, tretja nam je služila kot negativna kontrola. Vzporedno smo pripravili še prekonočno kulturo iz seva *E. coli* BL21(DE3) pT-Trx z ekspresijskim vektorjem pET11a::CnAP oz. pET14b::CnAP. Epruvetam z 10 ml gojišča LB smo dodali ampicilin do končne koncentracije 100 µg/ml in kloramfenikol do končne koncentracije 34µg/ml (gojišče LBAC). V prvo epruveto smo nacepili trajno kulturo BL21(DE3) pT-Trx pET11a::CnAP, v drugo trajno kulturo BL21(DE3) pT-trx pET14b::CnAP, tretja nam je služila kot negativna kontrola. Epruvete smo prekonočno stresali pri 220 obr./min in 37 °C. Naslednji dan smo precepili prekonočne kulture v večji volumen. V štiri erlenmajerice za ekspresijo z volumnom 1 l smo ob gorilniku sterilno prelim po 100 ml gojišča LBA za sev BL21(DE3) oz. gojišča LBAC za sev BL21(DE3) pT-Trx, odpipetirali ustrezno količino prekonočne kulture in jih inkubirali pri 37 °C in 220 obr./min. Volumen prekonočne kulture smo izračunali po slednji formuli: $V=(100 \text{ ml} * 0,1) / (\text{OD}_{600} * R)$, kjer je V končni volumen prekonočne kulture, ki jo

nacepimo, OD₆₀₀ optična gostota pri 600 nm in R redčitev. Po približno dveh urah smo izmerili optično gostoto pri valovni dolžini 600 nm (OD₆₀₀). S tem smo preverili, če so celice dosegle želeno gostoto 0,5-1,0 in jih nato inducirali z IPTG s končno koncentracijo 1 mM za vektor pET11a (slika 4) oz. 0,4 mM za vektor pET14b (slika 6). Z IPTG smo inducirali izražanje proteina in celice inkubirali še 6 ur pri 37 °C in 220 obr./min. Ob vsaki uri smo izmerili OD₆₀₀ in tako določili gostoto celic. Po vsaki uri po in pred indukcijo smo vsebino centrifugirali 10 min pri 10000 x g, supernatant zavrgli, usedlini pa dodali toliko µl dH₂O kot je bila 75-kratna vrednost OD₆₀₀, dobro resuspendirali na vibracijskem mešalu in lizat zamrznili.

3.2.4 Karakterizacija proteaze

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

Poliakrilamidna gelska elektroforeza je metoda ločevanja proteinov na osnovi potovanja nabitih delcev v električnem polju v zamreženem gelu. Proteine med nanosom na gel denaturiramo z dodatkom anionskega detergenta NaDS. Le-ta poruši konformacijo proteina in se nespecifično veže na povprečno dve aminokislini in tvori negativno nabit kompleks. Hitrost potovanja nativnega proteina je odvisna od njegovega celokupnega naboja, velikosti in oblike. Ob dodatku NaDS je hitrost potovanja odvisna samo od velikosti proteina.

Elektroforeza je potekala v dveh različnih zamreženih gelih: koncentrirni gel (koncentriranje proteinov) in ločevalni gel (ločitev proteinov po velikosti).

Ločevalni gel smo pripravili tako, da smo za en 12 % gel debeline 1,5 mm pripravili 10 ml mešanice. Zmešali smo 4,3 ml dH₂O, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 100 µl 10 % NaDS in 3 ml 40 % raztopine akrilamida. Zamreženje gela smo sprožili z dodatkom 50 µl 10 % APS (amonijev persulfat) in 15 µl reagenta TEMED. To mešanico smo dobro premešali na vibracijskem mešalu in vlili med dve stekelci razmaknjeni za 1,5 mm. Na vrh ulitega ločevalnega gela smo dodali butanol, nasičen z dH₂O in s tem izrvnali linijo gela. Gel se je

nato trdil 30 do 45 min. Butanol smo odlili in nato ulili še 4 % koncentrirni (3,2 ml dH₂O, 1,3 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 50 µl 10 % NaDS, 500 µl 40 % raztopine akrilamida). Tik pred ulitjem smo dodali še 25 µl 10 % APS in 8 µl reagenta TEMED ter v gel namestili glavniček z desetimi žepki.

Vzorce smo pripravili tako, da smo zmešali 30 µl proteinskega vzorca in 20 µl vzorčnega pufra in jih inkubirali 10 min v vreli vodi. Vzorčni pufer smo pripravili tako, da smo zmešali 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 2 ml glicerola, 4 ml 10 % NaDS, dodali za noževo konico bromfenol modrega in 1,5 ml dH₂O.

Ploščici s strjenim gelom smo odstranili glavniček ter jo vpeli v aparaturo za elektroforezo in ulili elektroforezni pufer. Slednjega smo pripravili z mešanjem 29 g Tris, 144 g glicina in 10 g NaDS, dopolnjenim z dH₂O do pH 8,3. V žepke smo nanesli pripravljene vzorce in neobarvan standard velikosti 14,4 – 97 kDa (Pharmacia LMW Standard, GE Healthcare).

Elektroforeza je potekala v navpični smeri pri konstantnem toku 30 mA/gel približno 70 min. Po končani elektroforezi smo barvali gel z raztopino barvila Coomassie brilliant blue 30 min in nato razbarvali z večkratno zamenjavo razbarvalnih raztopin (vsakih 15 min zamenjamo razbarvalno raztopino 30 % etanol in 10 % ocetna kislina, čez noč pa damo v razbarvalno raztopino 10 % etanol in 5 % ocetna kislina).

3.2.4.2 Cimografija z želatino

Cimografija je elektroforezna metoda za detekcijo encimov in njihove aktivnosti. Osnovana je na principu NaDS-PAGE, ki vključuje substrat, kopolimeriziran s poliakrilamidnim gelom. Po elektroforezi se NaDS odstrani iz gela oz. cimograma z inkubacijo 1 h v raztopini Tritona X-100, kateri sledi inkubacija za 21 h v ustremnem razvijальнem pufru. Slednji omogoča aktivnost encimov, prisotnih v vzorcu, ki razgradijo substrat (npr. želatina) kopolimeriziran v gelu. Cimogram barvamo 1 h z raztopino Coomassie brilliant blue in nato razbarvamo v ustremnem pufru. Področja z encimsko aktivnostjo se pokažejo kot prozorne lise na temno obarvanem ozadju.

Pripravili smo 10 % poliakrilamidni gel z NaDS in 1 mg/ml želatine. Ločevalni gel smo pripravili tako, da smo za 1 gel debeline 1,5 mm pripravili 9 ml mešanice. Zmešali smo 2,26 ml 40 % raztopine akrilamida, 2,25 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 z 0,4 % NaDS, 3,56 ml dH₂O in 900 µl 1 % želatine. Zamreženje gela smo sprožili z dodatkom 25 µl 10 % APS (amonijev persulfat) in 15 µl reagenta TEMED. Mešanico smo premešali na vibracijskem mešalu in ulili med stekelca debeline 1,5 mm. Na vrh ultega ločevalnega gela smo dodali 0,05 % želatino v 0,3 M Tris-HCl, pH 8,8, da smo izravnali linijo gela. Ko se je gel po 30 - 45 min strdil, smo želatino odlili, popivnali s filter papirjem in nato vlili še 4 % koncentrirni gel: 0,625 ml 40 % raztopine akrilamida, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 3,050 ml dH₂O in 50 µl 10 % NaDS. Tik pred ulitjem smo dodali še 20 µl 10 % APS in 10 µl reagenta TEMED ter v gel namestili glavniček z desetimi žepki.

Priprava vzorcev:

Proteinske vzorce smo zmešali z vzorčnim puferom v razmerju 1:1 in jih 20 - 30 min inkubirali pri sobni temperaturi.

Vzorčni pufer smo pripravili tako, da smo zmešali 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 2 ml glicerola, 4 ml 10 % NaDS, dodali za noževo konico bromfenol modrega in 1,5 ml dH₂O, alikvotirali po 1ml in shranili v hladilniku.

Ploščici s strjenim gelom smo odstranili glavniček, jo vpeli v aparaturo za elektroforezo in ulili 1x elektroforezni pufer. Pripravili smo 10x elektroforezni pufer s pH 8,3, tako da smo zmešali 29 g Tris, 144 g glicina, 10 g NaDS in dopolnili z dH₂O do 1 l. Pred uporabo smo ga 10x redčili. V žepke smo nanesli pripravljenе vzorce in standard LMW. Elektroforeza je potekala v navpični smeri pri konstantnem toku 30 mA/gel približno 70 min. Po končani elektroforezi smo gel inkubirali v raztopini 2,5 % Triton X-100 na rotacijskem mešalu 1 h. Gel smo nato inkubirali 21 h v razvijalnem pufru (100 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ x 2H₂O, 0,02 % (w/v) Brij 35, pH 8,0).

Gel smo 1 h barvali z 0,1 % raztopino Coomassie brilliant blue in nato razbarvali z večkratno zamenjavo razbarvalnih raztopin: 30 % etanol, dokler ni prišlo do razbarvanja koncentracijskega gela. Nato smo gel dali v 10 % etanol in stresali preko noči. Proteolitična aktivnost je bila vidna kot pojav prozornih lis na temnem ozadju. Gele smo slikali s sistemom za slikanje gelov UVItec, ki je bil povezan z računalniškim programom UVI Photo.

3.2.4.2.1 Cimografija z želatino v prisotnosti inhibitorjev proteaz

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

Preglednica 5: Seznam inhibitorjev in njihove koncentracije.

Inhibitor	Specifičnost	Založna raztopina	Končna koncentracija
E-64	Cisteinske proteaze	20 mM	33 µM
EDTA-Na ₂	Metalo proteaze	0,2 M	2 mM
Pefabloc	Serinske proteaze	0,2 M	4 mM
Kimostatin	Serinske proteaze	30 mM	100 µM
Pepstatin A	Aspartatne proteaze	1,5 mM	6 µM

3.2.4.3 Obarjanje proteinov s triklorooacetno kislino

Vzorce z nizkimi koncentracijami proteinov smo skoncentrirali z obarjanjem s triklorooacetno kislino (TCA) tako, da smo 1 ml vzorca dodali 150 µl 100 % TCA. Obarjali smo 1 h pri temperaturi 4 °C, oborino centrifugirali 15 min pri 9000 x g, supernatant odstranili, oborino pa resuspendirali v ledeno hladnem etanolu. Na koncu smo jo raztopili v 20 µl nanašavnega pufra in 30 µl dH₂O.

3.2.4.4 Test encimske aktivnosti s substratom azokazein

Azokazein je spremenjen protein s kromogeno azo skupino in kot protein predstavlja simulacijo naravnih pogojev. Zaradi uporabnosti pri širokem pH območju in velike nespecifičnosti je primeren za določanje različnih razredov proteaz. Metoda temelji na

topnosti kromogenih nizkomolekularnih peptidov, ki nastanejo pri hidrolizi azokazeina z endopeptidazami. Nerazgrajene molekule azokazeina in njihove večje fragmente po končani inkubaciji vzorca s substratom oborimo s trikloroacetno kislino (TCA), količino razgrajenega substrata pa merimo kot spremembo absorbance pri 350 nm glede na slepi vzorec.

300 µl ekstrakta oziroma manjši volumen smo dali v epico in dopolnili s pufom do 300 µl. Dodali smo 300 µl pufra določene vrednosti in 300 µl 0,4 % azokazeina ter inkubirali v vodni kopeli 40 min do 3 h pri temperaturi 37 °C. Reakcijo smo prekinili z dodatkom 200 µl 50 % TCA in 30 min inkubirali na ledu. Na koncu smo vzorce centrifugirali 15 min pri 20000 g in supernatantu izmerili absorbanci pri 350 nm glede na slepi vzorec ter izrazili aktivnost kot spremembo absorbance pri 350 nm.

3.2.4.5 Merjenje encimske aktivnosti s substratom FITC-hemoglobin

Najprej smo pripravili mešanico substrata in pufra, tako da smo za vsak vzorec zmešali 200 µl acetatnega pufra (0,1 M Na-acetat, pH 3,5) in 5 µl substrata FITC-hemoglobina. Dodali smo 100 µl vzorca ter inkubirali 15 min pri 37 °C. Po tem času smo v mikrocentrifugirke odpipetirali 430 µl prekinjevalca trikloroacetne kisline (5 % TCA) in inkubirali 10 min pri sobni temperaturi. Nato smo centrifugirali 5 min pri 20000 x g. Medtem smo si za vsak vzorec pripravili epruveto z 2,4 ml 0,5M NaOH in po centrifugiranju iz vsake mikrocentrifugirke vanjo odpipetirali 200 µl supernatanta. Nastanek produkta smo spremljali z merjenjem fluorescence pri valovni dolžini eksitacije 490 nm in emisije pri 525 nm s pretočnim fluorimetrom Luminescence Spectrometer LS 30, katerega smo predhodno kalibrirali z dH₂O.

3.2.4.6 Imunokemijsko določanje CnAP s prenosom proteinov na membrano

Prenos Western je imunokemijska tehnika za določitev specifičnih proteinov v vzorcu. Najprej z gelsko elektroforezo ločimo proteine po velikosti, nato jih prenesemo na membrano, kjer jih detektiramo s specifičnimi protitelesi.

Za izvedbo imunokemijskega testa Western blot smo po končani NaDS-PAGE proteine prenesli na poliviniliden difluorid (PVDF) membrano IMMOBILON-P^{SQ} (Millipore) velikosti 6,5 x 8,5 cm in velikostjo por 0,2 µm.

Predhodno smo membrano namočili v 100 % metanol, nato v dH₂O in na koncu v pufer za prenos. Filter papir in gel smo inkubirali v pufru za prenos približno 5 min. Pufer za prenos smo pripravili tako, da smo zmešali 100 ml pufra, ki vsebuje 30 g/l Tris in 58 g/l glicina z 200 ml metanola in 3,75 ml 10 % NaDS ter mešanico dopolnili z dH₂O do 1 l.

Sistem smo sestavili tako, da smo na črno stran (anoda) plastične mreže položili krpico, na njo 3 plasti tankega filter papirja v dimenziji gela in nanje položili gel. Na gel smo položili PVDF membrano Immobilon-P^{SQ} (Millipore) in nanjo 3 plasti tankega filter papirja ter krpico. Membrano kot tudi gel smo označili, tako da smo odstrigli desni spodnji kot. Pri nalaganju plasti smo pazili, da med njimi ni bilo zračnih mehurčkov. Vse smo stisnili skupaj s belo stranjo mreže (katoda) in jo vpeli v plastično ogrodje, tako da je bil črni del mreže ob črnem delu ogrodja. Ogrodje smo skupaj s posodico z ledom vstavili v kadičko za prenos Western (Biorad) in do vrha nalili pufer za prenos. Prenos je potekal 2 h pri konstantnem toku 200 mA. Po končanem prenosu smo razstavili sistem za prenos in inkubirali membrano v blokirni raztopini TBST, gel pa smo dali obarvati v Coomassie brilliant blue. Po 1h inkubacije v primarnih protitelesih (protitelesa proti histidinskem označevalcu, konjugirana s hrenovo peroksidazo) v razmerju primarna protitelesa : blokirna raztopina = 1 : 3333, smo spirali z blokirno raztopino TBST (zamenjali smo jo štirikrat vsakih 15 min). Po inkubaciji smo spirali sekundarna protitelesa 4 krat po 15 min z raztopino 1x TBST. Sledilo je razvijanje filma v temnici.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA ASPARTATNE PROTEAZE IZ GOBE *CLITOCYBE NEBULARIS* (CnAP)

S pomočjo metod hoje po kromosomu ter hitrega pomnoževanja koncev cDNA (3`RACE in 5`RACE) smo določili celotno zaporedje cDNA in celotno zaporedje gena vključno z regulatorno regijo.

Predhodno je bilo na osnovi poznanega N– končnega zaporedja CnAP KGGHSVPLTNFXNAIYXXXI (17) pridobljeno delno nukleotidno zaporedje gena CnAP (slika 9). Na osnovi tega zaporedja smo načrtovali začetne oligonukleotide, ki smo jih uporabili za pomnoževanje delnega zaporedja CnAP z metodama hoje po kromosomu in hitrega pomnoževanja koncev cDNA.

GAGCCGGGCTGGCGTTGGTGGAAAGTATGTACAGATAACTACTCTCGTAAGCCTAAGCTAATCG
TCACTCAAG GTTGACGGCATTCTGGTCTGGATATGACACCATCTCGTTAACATATAACCCCTCC
CnAP_pro_3R CnAP_pro_2R
TTCTATAGCATGATCAATCAGGGTCTCATTGACGAGCCTGTTTCTTCCGTCTGGATCATCTGA

ACAAGATGGAGGTGAAGCGGTCTTGGAGGTATTGACAGCACCGCATAACAGGAAATCGCATAACGT
CnAP_pro_1 R CnAP_ter_2F
ACCTGTCCGCCGCAAGGCCTACTGGGAAGTTGAGCTTACGAAAGTTTCTTGGTATGAAGAACCTGA
GCTCGAGAACACCGCGCTGCCATCGACACCGGCACTTCTTAATCG CnAP_ter_3F

Slika 9: Izhodiščno nukleotidno zaporedje z označenimi začetnimi oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri hoji po kromosomu za določitev terminatorske in promotorske regije. Intron je senčen črno. Začetni oligonukleotidi so podprtani

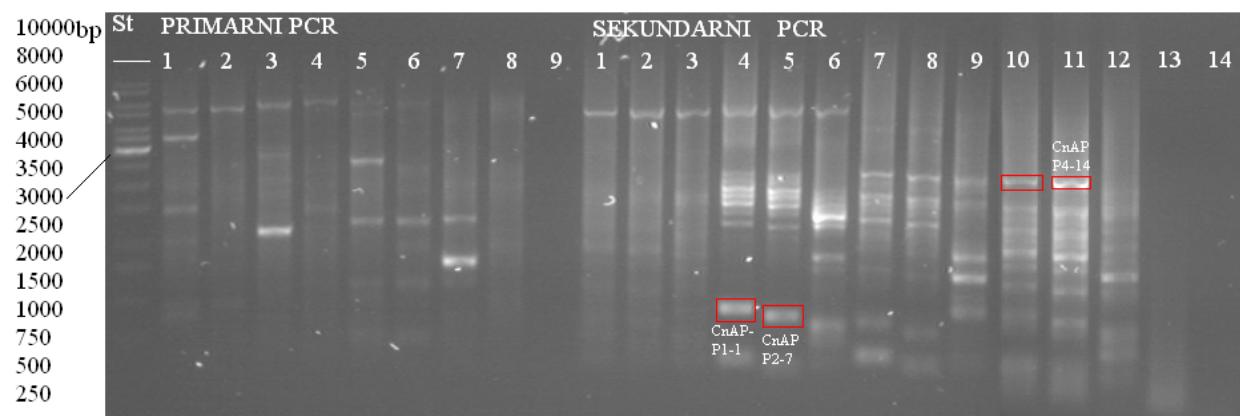
4.1.1 Hoja po genomu

S pomočjo metode hoje po genomu smo iz štirih različnih knjižnic Genome Walker (DraI, EcoRV, PvuII in StuI) določili delno zaporedje gena, vključno z regulatorno regijo. Ta metoda je sestavljena iz primarne in sekundarne reakcije PCR, pri čemer vsakič uporabimo ustrezni začetni oligonukleotid iz kompleta reagentov in gensko specifične začetne oligonukleotide, katere smo predhodno načrtovali. Kot matrica nam v primarni reakciji PCR služi DNA iz ustrezne knjižnice, v sekundarni reakciji PCR pa razredčen produkt primarne reakcije PCR. V preglednici 6 je seznam uporabljenih gensko specifičnih začetnih oligonukleotidov in knjižnic ki so služile kot matrica v primarni PCR reakciji oziroma produktov primarne PCR reakcije, ki so služili kot matrica v sekundarni PCR reakciji.

Preglednica 6: V primarni in sekundarni reakciji PCR uporabljeni gensko specifični začetni oligonukleotidi in matrice za katere smo uporabili ustrezno knjižnico v primarni reakciji PCR oziroma razredčen produkt primarne PCR reakcije v sekundarni PCR reakciji.

Št. Mikrocentrifugirke	PRIMARNA REAKCIJA PCR		SEKUNDARNA REAKCIJA PCR	
	Začetni oligonukleotidi	Knjižnica, ki služi kot matrica	Začetni oligonukleotidi	Št. Mikrocentrifugirke iz primarnega PCR
1	CnAP_pro_1R	DraI	CnAP_pro_2R	1
2	CnAP_pro_2R	DraI	CnAP_pro_3R	1
3	CnAP_pro_1R	EcoRV	CnAP_pro_3R	2
4	CnAP_pro_2R	EcoRV	CnAP_pro_2R	3
5	CnAP_pro_1R	PvuII	CnAP_pro_3R	3
6	CnAP_pro_2R	PvuII	CnAP_pro_3R	4
7	CnAP_pro_1R	StuI	CnAP_pro_2R	5
8	CnAP_pro_2R	StuI	CnAP_pro_3R	5
9	CnAP_pro_1R	dH ₂ O	CnAP_pro_3R	6
10	/	/	CnAP_pro_2R	7
11	/	/	CnAP_pro_3R	7
12	/	/	CnAP_pro_3R	8
13	/	/	CnAP_pro_2R	9
14	/	/	CnAP_pro_2R	dH ₂ O

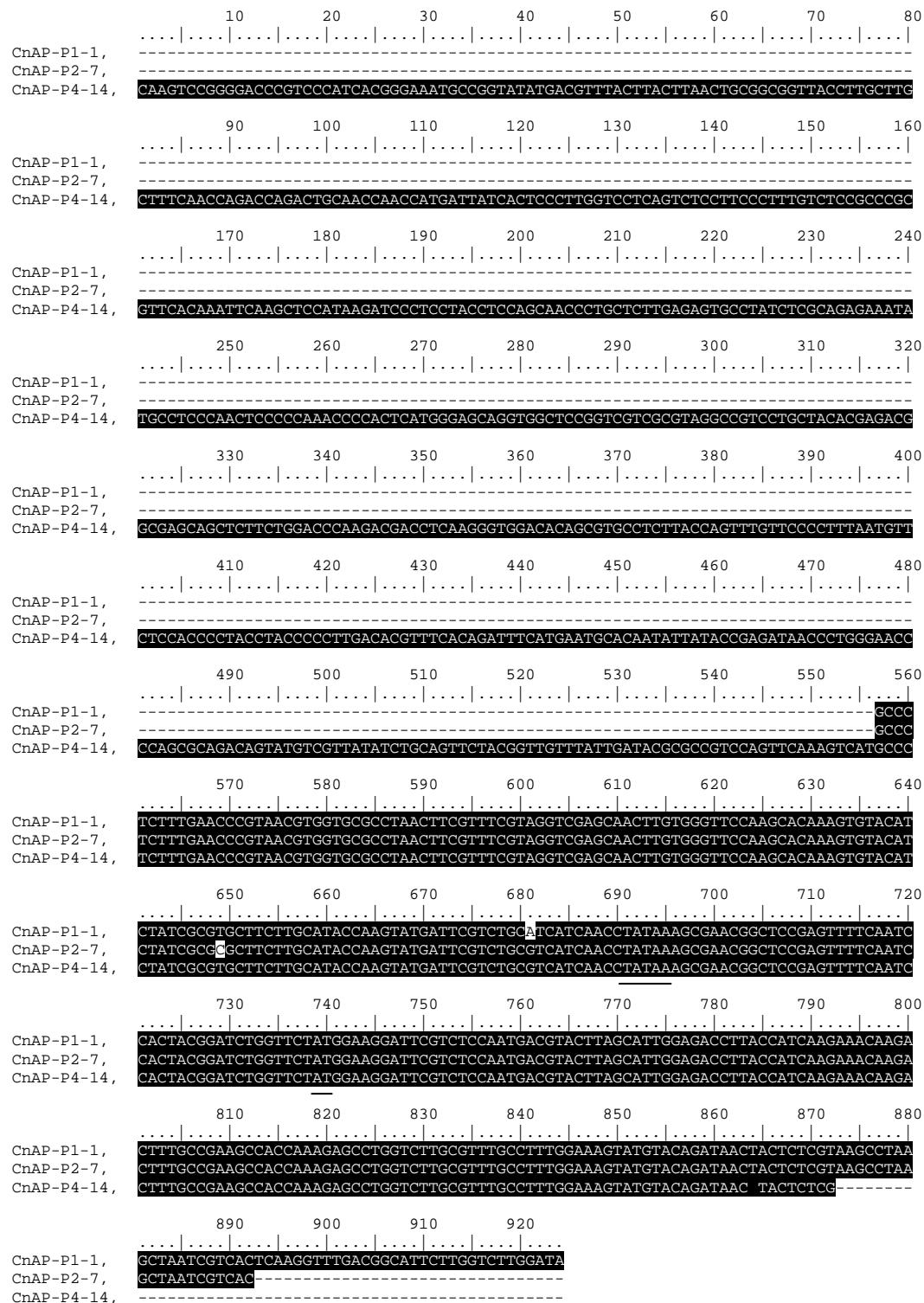
Na sliki 10 vidimo produkte hoje po genomu primarne in sekundarne reakcije PCR. V primarni reakciji PCR so nastali nespecifični produkti, zato jih nismo uporabili pri nadalnjem delu. Pri vzorcih št. 1, 2, 3 sekundarne reakcije PCR opazimo značilno liso, toda ker se enaka lisa pojavi tudi pri vzorcih št. 4, 5, 6, ki so iz druge knjižnice, je po vsej verjetnosti prišlo do nespecifičnega pomnoževanja. Pri vzorcih 4, 5, 6 je sicer vidna lisa, toda ni prisotnega specifičnega produkta, zato jih ne izberemo. Za nadaljnje delo izberemo liso velikosti 400 bp iz vzorcev št. 4 in 5 ter liso velikosti 2400 bp vzorcev št. 10 in 11 in jih z uporabo kompleta reagentov Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System čistimo iz 1 % agaroznega gela.



Slika 10: Agarozna gelska elektroforeza produktov hoje po genomu primarne in sekundarne PCR reakcije. Lise ki smo jih uporabili pri nadalnjem delu so obkrožene z rdečo.

Očiščene vzorce smo nato ligirali v vektor pGEM Easy-T in transformirali v bakterijski sev *Escherichia coli* DH5α. Z reakcijo PCR na osnovi kolonij smo preverili uspešnost ligacije in izbrane kolonije iz vzorcev št. 1, 7, 11 in 14 prekonočno nacepili v tekoče gojišče LBA. Plazmidno DNA smo očistili s kompletom reagentov Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System in ji določili zaporedje.

Delna nukleotidna zaporedja smo poravnali s programom BioEdit in določili celotno zaporedje. DNA iz produkta št. 4 smo pri poravnavi označili kot CnAP-P1-1, zaporedje DNA iz produkta št. 5 kot CnAP-P2-7 in zaporedje DNA iz produkta št. 11 kot CnAP-P4-14 (slika 11).



Slika 11: Poravnava promotorskih zaporedij CnAP. Identični nukleotidi so senčeni črno, različni so senčeni belo. Ohranjeno mesto TATA in začetni kodon ATG sta podčrtana.

Po eno spremembo v nukleotidnem zaporedje najdemo pri vzorcema CnAP-P1-1 in CnAP-P2-7, vendar so vse spremembe pred ohranjenim mestom TATAAA.

Dolžina regulatorne regije 5'UTR pri CnAP-P1-1 in CnAP-P2-7 je 182 nukleotidov, pri CnAP-P4-14 pa 738 nukleotidov (slika 11).

4.1.2 Metoda hitrega kloniranja 3` in 5` koncov cDNA

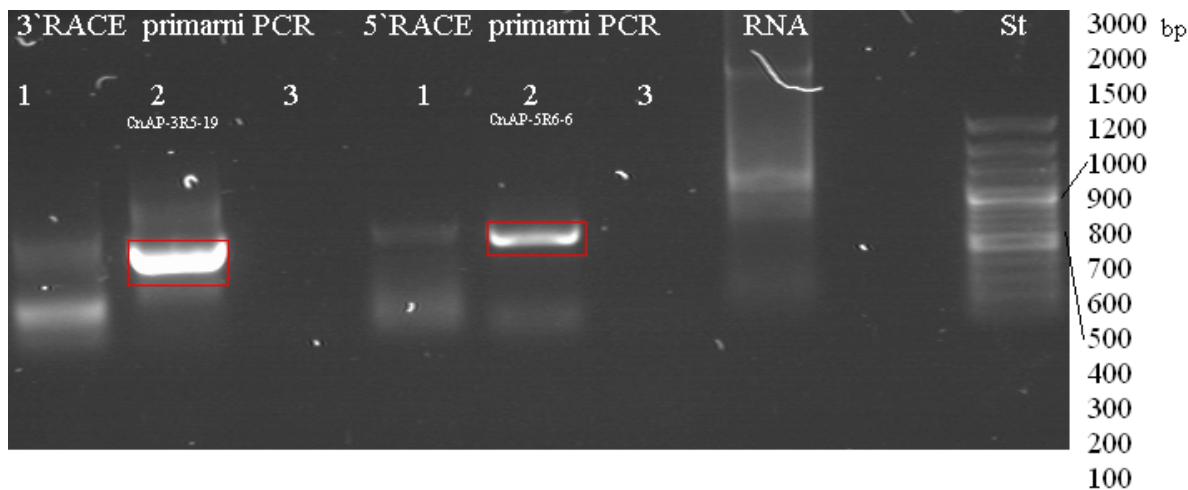
S specifičnimi oligonukleotidi smo s pomočjo hitrega kloniranja 3` in 5` koncov pomnožili 3` in 5` del cDNA ter regijo 3` in 5` UTR (preglednica 7).

Preglednica 7: Začetni oligonukleotidi uporabljeni v primarni in sekundarni reakciji PCR z metodo hitrega kloniranja koncov cDNA. V primarni reakciji PCR smo za 3'RACE v prvih dveh vzorcih kot matrico uporabili produkt reverzne transkripcije iz CnV3 RNA, medtem ko je tretji vzorec negativna kontrola. Pri 5'RACE pa smo kot matrico uporabili produkt reverzne transkripcije CnV5. V sekundarni PCR reakciji smo pri 3'RACE v prvih treh vzorcih uporabili produkt primarne reakcije PCR, medtem ko sta bila vzorca št. 4 in 5 negativni kontroli. Pri 5'RACE pa smo uporabili produkt primarne reakcije 5'RACE.

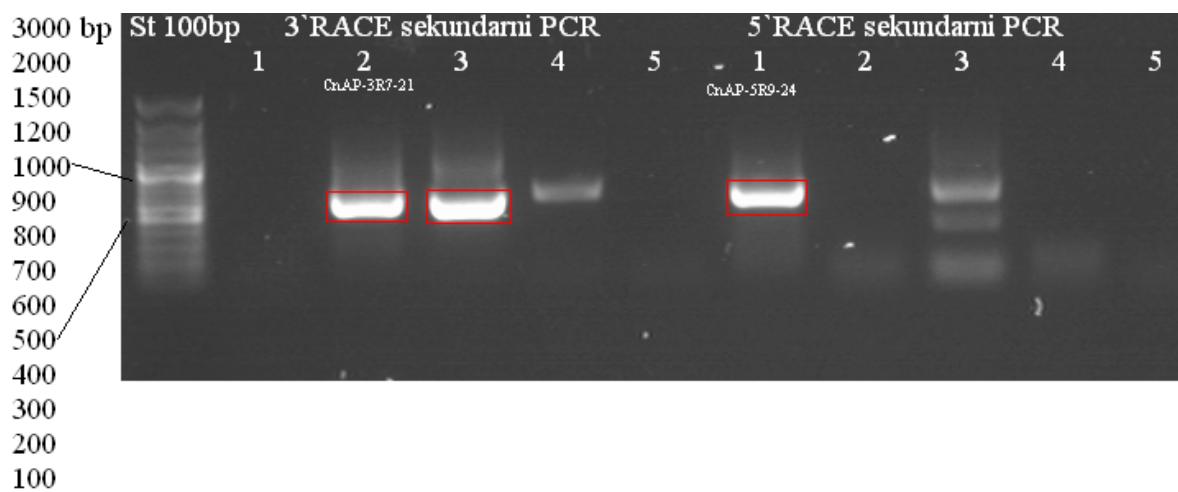
Št. vzorca	PRIMARNA REAKCIJA PCR		SEKUNDARNA REAKCIJA PCR			
	3'RACE	5'RACE	3'RACE	Št. Vzorca iz 1°PCR	5'RACE	Št. Vzorca iz 1°PCR
Začetni oligonukleotid					Začetni oligonukleotid	
1	CnAP_ter_1F	CnAP_pro_1R	CnAP_ter_2F	1	CnAP_pro_2R	1
2	CnAP_ter_2F	CnAP_pro_2R	CnAP_ter_3F	1	CnAP_pro_3R	1
3	CnAP_ter_1F	CnAP_pro_1R	CnAP_ter_3F	2	CnAP_pro_3R	2
4	/	/	CnAP_ter_2F	3	CnAP_pro_2R	3
5	/	/	CnAP_ter_2F	dH ₂ O	CnAP_pro_2R	dH ₂ O

Na slikah 12 in 13 vidimo produkt reakcije PCR v velikosti okoli 800 bp. Ker ni prisotnih nečistoč, smo jih čistili direktno z uporabo kompleta reagentov Wizard SV Gel and PCR

Clean-Up System. Očiščene produkte smo ligirali v vektor pGEM-T Easy (slika 3) in transformirali v bakterijski sev *Escherichia coli* DH5 α .



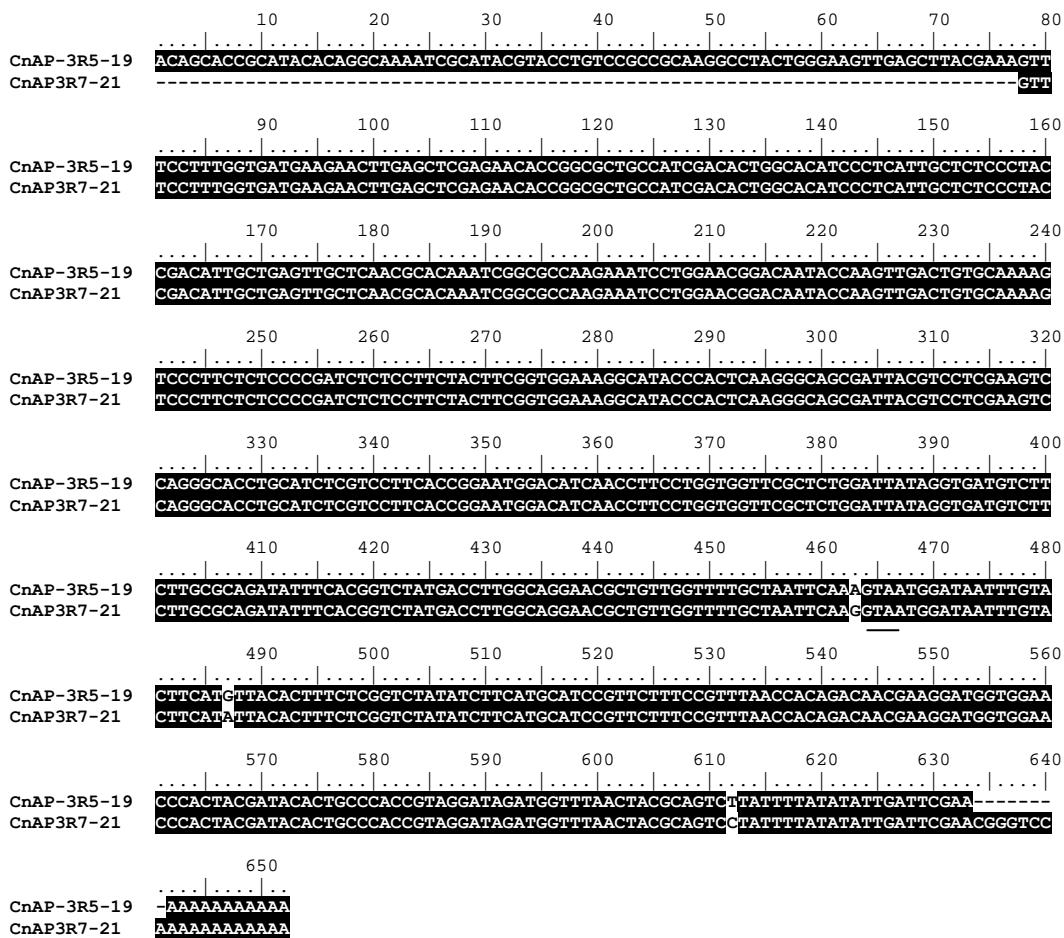
Slika 12: Agarozna gelska elektroforeza primarne reakcije PCR hitrega kloniranja 3` in 5` koncov cDNA.
Produkti katere smo uporabili pri nadalnjem delu so obkrožene z rdečo.



Slika 13: Agarozna gelska elektroforeza sekundarne reakcije PCR hitrega kloniranja 3` in 5` koncov cDNA. Produkti katere smo uporabili pri nadalnjem delu so obkroženi z rdečo.

Z reakcijo PCR na osnovi kolonije smo preverili uspešnost ligacije in izbranim kolonijam št. 19, 21 in 24 določili zaporedje DNA. Kolonija št. 19 vsebuje zaporedje DNA produkta št. 2 iz 3'RACE primarne reakcije PCR, kolonija št. 21 vsebuje zaporedje DNA produkta št. 2 iz 3'RACE sekundarne reakcije PCR, kolonija št. 24 vsebuje zaporedje DNA produkta št. 1 iz 5'RACE sekundarne reakcije PCR.

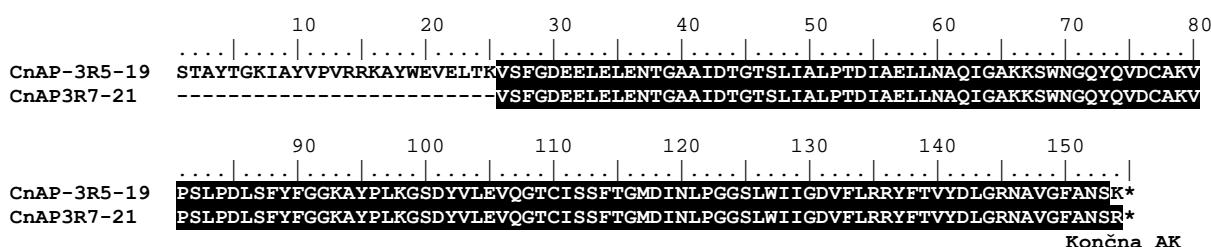
Spodnja slika 10 predstavlja poravnavo delnih zaporedij CnAP s programom BioEdit. Zaporedje CnAP-3R5-19 predstavlja kolonijo št. 19 in vsebuje zaporedje DNA produkta št. 2 iz 3'RACE primarne reakcije PCR, Zaporedje CnAP3R7-21 predstavlja kolonijo št. 21 in vsebuje zaporedje DNA produkta št. 2 iz 3'RACE sekundarne reakcije PCR.



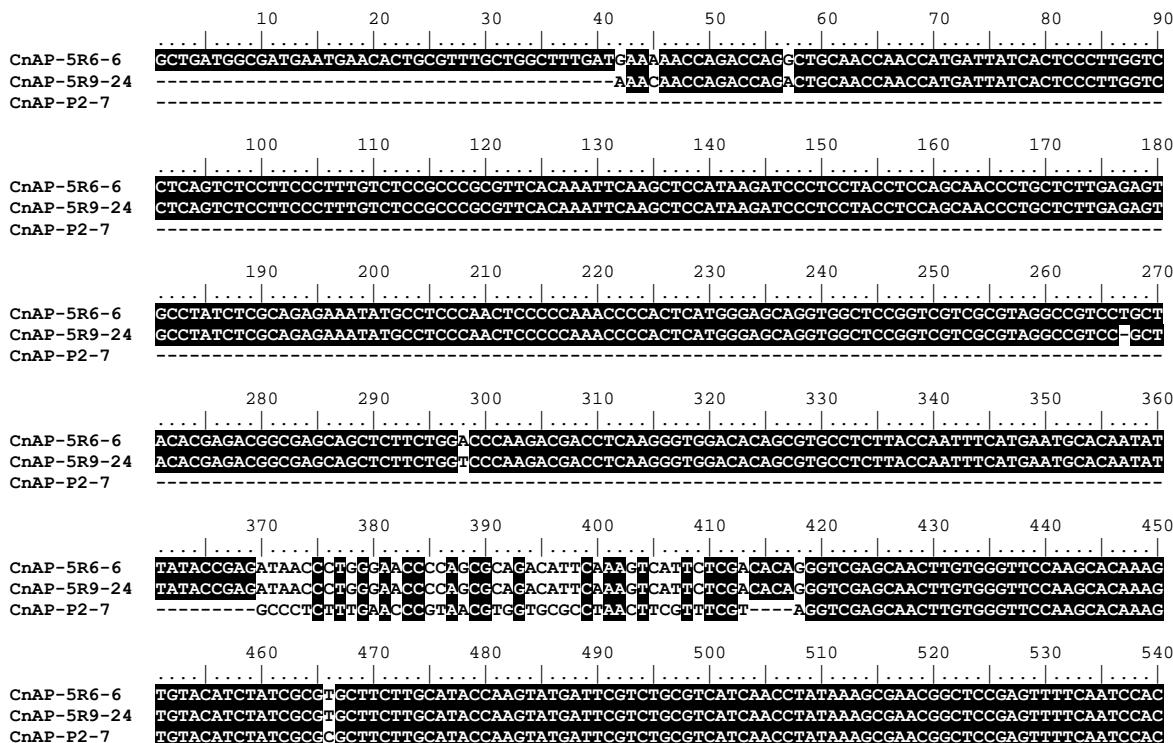
Slika 14: Poravnava delnih nukleotidnih zaporedij CnAP, dobljenih z metodo hitrega kloniranja 3' koncov cDNA. Identični nukleotidi so senčeni črno. Stop kodon TAA je podprt. CnAP-3R5-19 –zaporedje DNA iz vzorca št. 19 (slika 12), CnAP3R7-21 –zaporedje DNA iz vzorca št. 21 (slika 13).

Dolžina regulatorne regije 3`UTR pri CnAP-3R5-19 je 163 nukleotidov, pri CnAP3R7-21 pa 172 nukleotidov (slika 14).

Nukleotidno zaporedje CnAP smo prevedli v aminokislinsko zaporedje in ju primerjali s programom BioEdit. Zaporedji CnAP-3R5-19 in CnAP-3R7-21 se popolnoma ujemata. Razlika je le v zadnji aminokislini (slika 15).



Slika 15: Poravnava delnih aminokislinskih zaporedij cDNA CnAP, dobljenih z metodo hitrega kloniranja 3` koncov cDNA. Idenične AK so senčene črno, različne AK pa so senčene belo.



	550	560	570	580	590	600	610	620	630
CnAP-5R6-6	TACGGATCTGGTTCTATGGAAAGGATTTCGTCCTCCAAATGACGTACTTAGCATTGGAGACCTTACCATCAAGAAAACAAGACTTTGCCGAAGCC								
CnAP-5R9-24	TACGGATCTGGTTCTATGGAAAGGATTTCGTCCTCCAAATGACGTACTTAGCATTGGAGACCTTACCATCAAGAAAACAAGACTTTGCCGAAGCC								
CnAP-P2-7	TACGGATCTGGTTCTATGGAAAGGATTTCGTCCTCCAAATGACGTACTTAGCATTGGAGACCTTACCATCAAGAAAACAAGACTTTGCCGAAGCC								
	640	650	660	670	680	690	700	710	720
CnAP-5R6-6	ACCAAAGAGCCTGGTCTTCGCCTTGCAAAGTTGACGGCATCTTGGCTTCATATGACACCATCTCGG-----								
CnAP-5R9-24	ACCAAAGAGCCTGGTCTTCGCCTTGCAAAGTTGACGGC-----								
CnAP-P2-7	ACCAAAGAGCCTGGTCTTCGCCTTGCAAAGTTGACAGATAACTACTCTCTAACAGCTAACTCGTCAC-----								

Slika 16: Poravnava delnih nukleotidnih zaporedij cDNA CnAP, dobljenih z metodo hitrega kloniranja 5` koncov cDNA in metodo hoje po kromosomu. Idenični nukleotidi so senčeni črno. CnAP-5R6-6 – DNA zaporedje iz produkta št. 6, CnAP-5R9-24 – DNA zaporedje iz vzorca št. 24 Colony PCR.

Pri primerjavi nukleotidnih zaporedij dveh različnih vzorcev CnAP opazimo štiri razlike v zaporedjih, in sicer dve deleciji, eno tranzicijo (sprememba purinske baze v pirimidinsko) in eno translacijo (spremembna purinske baze v purinsko).

Nukleotidno zaporedje smo nato prevedli v aminokislinsko in zaporedji ponovno primerjali v BioEditu (slika 17).

	10	20	30	40	50	60	70	80
CnAP-5R6-6	NOTRLQPTMIIITPLVLSLLPFVSVARVHKFKLHKIIPPTSSNPAL...SAYLAEKYASQLPQTPLMGAG							
gDNA	-----LVLSLLPFVSVARVHKFKLHKIIPPTSSNPAL...SAYLAEKYASQLPQTPLMGADG							
CnAP-5R9-24	EHCVCWLNNOTRLQPTMIIITPLVLSLLPFVSVARVHKFKLHKIIPPTSSNPAL...SAYLAEKYASQLPQTPLMGAG							
	90	100	110	120	130	140	150	160
CnAP-5R6-6	SGRRVGRPATRDGEQLFWIQQDLKGHHSVPLTNFMAQYYTEITLGLPAQTFKVIILDGTGSNLWVPSTKCTSIACLFLHTK							
gDNA	SGRRVGRPATRDGEQLFWIQQDLKGHHSVPLTNFMAQYYTEITLGLPAQTFKVIILDGTGSNLWVPSTKCTSIACLFLHTK							
CnAP-5R9-24	SGRRVGRPATRDGEQLFWIQQDLKGHHSVPLTNFMAQYYTEITLGLPAQTFKVIILDGTGSNLWVPSTKCTSIACLFLHTK							
	170	180	190	200	210	220	230	240
CnAP-5R6-6	YDSSASSTYKANGSEFSIHYGGSMSMEGVFSNDVLSIGDLTIKKQDFEAATKEPGLAFAFGKFDCILGLGYDTIS-----							
gDNA	YDSSASSTYKANGSEFSIHYGGSMSMEGVFSNDVLSIGDLTIKKQDFEAATKEPGLAFAFGKFDCILGLGYDTISVNHITP							
CnAP-5R9-24	YDSSASSTYKANGSEFSIHYGGSMSMEGVFSNDVLSIGDLTIKKQDFEAATKEPGLAFAFGKFDC-----							
	250	260	270	280	290	300	310	320
CnAP-5R6-6	-----							
gDNA	PFYSMINQGLIDEPVFSFRLLGSSEQDGGEAVFGGIDSTAYTGKIAVVPVRKAYWEVETLKVSFGDEELELENTGAIDT							
CnAP-5R9-24	-----							
	330	340	350	360	370	380	390	400
CnAP-5R6-6	-----							
gDNA	GTSLLIALPTDIAELLNAQIGAKKSWNGQYQVDCAKVPSLPDSL...FYFGKAYPLKGS...YLEVQGTCISSFTGMDINLPGG							
CnAP-5R9-24	-----							
	410	420	430	440	450	460		
CnAP-5R6-6	-----							
gDNA	SIWIIGDVFLRRTFTVYDLGRNAVGFANSKWIICTSCYTFSVYIFMHPFFPFNHRQRMM							
CnAP-5R9-24	-----							

Slika 17: Poravnava delnih aminokislinskih zaporedij cDNA CnAP, dobljenih z metodo hitrega kloniranja 5` koncov cDNA in gDNA. Idenične AK so senčene črno. N-končno zaporedje CnAP in začetni kodon sta podprtana.

4.1.3 Pomnoževanje celotnega zaporedja gena in cDNA aspartatne proteaze iz gobe *Clitocybe nebularis* (CnAP)

Na osnovi dobljenih delnih nukleotidnih zaporedij in izhodnega nukleotidnega zaporedja CnAP smo načrtovali nove začetne oligonukleotide (preglednica 8), s katerimi smo pomnožili celotno zaporedje CnAP na nivoju cDNA in gena.

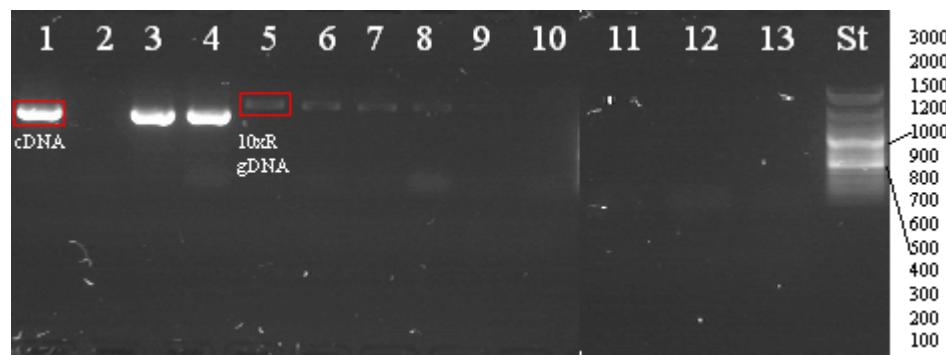
Preglednica 8: V primarni in sekundarni reakciji PCR uporabljeni začetni oligonukleotidi in matrice za primarno reakcijo PCR. V sekundarni reakciji PCR smo kot matrico uporabili produkte primarnih reakcij. PCR Vzorca št. 13 in 14 sta negativna kontrola. V vzorcu št. 13 smo namesto matrice uporabili dH₂O, v vzorcu št. 14 pa produkt primarne PCR reakcije iz vzorca št. 13.

Št. vzorca	PRIMARNA PCR REAKCIJA			SEKUNDARNA PCR REAKCIJA	
	Začetni oligonukleotid	Matrica	Začetni oligonukleotid	CnAP-F2	CnAP-R2
1	CnAP-F1	CnAP-R1	cDNA	/	/
2	CnAP-F2	CnAP-R2	cDNA	/	/
3	CnAP-F2	CnAP-R2	cDNA	/	/
4	CnAP-F1	CnAP-R1	cDNA	/	/
5	CnAP-F1	CnAP-R1	10x redčena genomska DNA (gDNA)	CnAP-F2	CnAP-R2
6	CnAP-F2	CnAP-R2	10x redčena gDNA	/	/
7	CnAP-F2	CnAP-R2	10x redčena gDNA	/	/
8	CnAP-F1	CnAP-R1	10x redčena gDNA	/	/
9	CnAP-F1	CnAP-R1	100x redčena gDNA	CnAP-F2	CnAP-R2
10	CnAP-F2	CnAP-R2	100x redčena gDNA	/	/
11	CnAP-F2	CnAP-R2	100x redčena gDNA	/	/
12	CnAP-F1	CnAP-R1	100x redčena gDNA	/	/
13	CnAP-F1	CnAP-R1	/	CnAP-F2	CnAP-R2
14	/	/	/	CnAP-F2	CnAP-R2

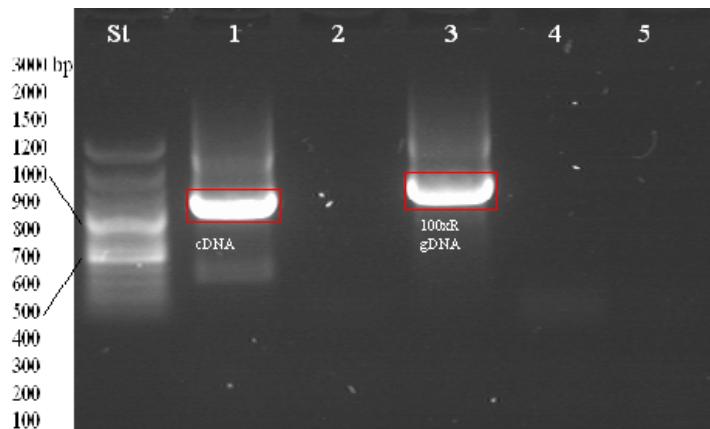
Produkte verižne reakcije s polimerazo smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo.

Na slikah 18 in 19 vidimo izrazite lise v velikosti okoli 1500 bp (produkt št. 1 iz primarne in sekundarne reakcije PCR, kjer je bila kot matrica uporabljena cDNA) in v velikosti okoli 2000 bp (produkt št. 5 iz primarne in št. 3 iz sekundarne reakcije PCR), kjer je bila kot matrica uporabljena genomska DNA. Lise 10x razredčene gDNA so bolj šibke od tistih, kjer je bila matrica nerazredčena cDNA. Produktov primarne reakcije PCR, kjer smo izhajali iz 100x razredčene gDNA z agarozno gelsko elektroforezo ni bilo vidne lise, medtem ko je pri istem produktu sekundarne reakcije nastala samo ena lisa.

Ker ni bilo prisotnih nečistoč, smo jih čistili direktno z uporabo kompleta reagentov Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System. Očiščene produkte smo ligirali v vektor pGEM-T Easy (slika 3) in transformirali v bakterijski sev *Escherichia coli* DH5α. Z reakcijo PCR na osnovi kolonije smo preverili uspešnost ligacije ter izbrane kolonije pod št. 19, 21 in 24 prekonočno nacepili v tekoče gojišče LBA in jim določili zaporedje DNA.



Slika 18: Agarozna gelska elektroforeza produktov primarne PCR reakcije. Vzorci s katerimi smo nadaljevali delo so označeni z rdečo. St – označevalec velikosti 100 bp plus

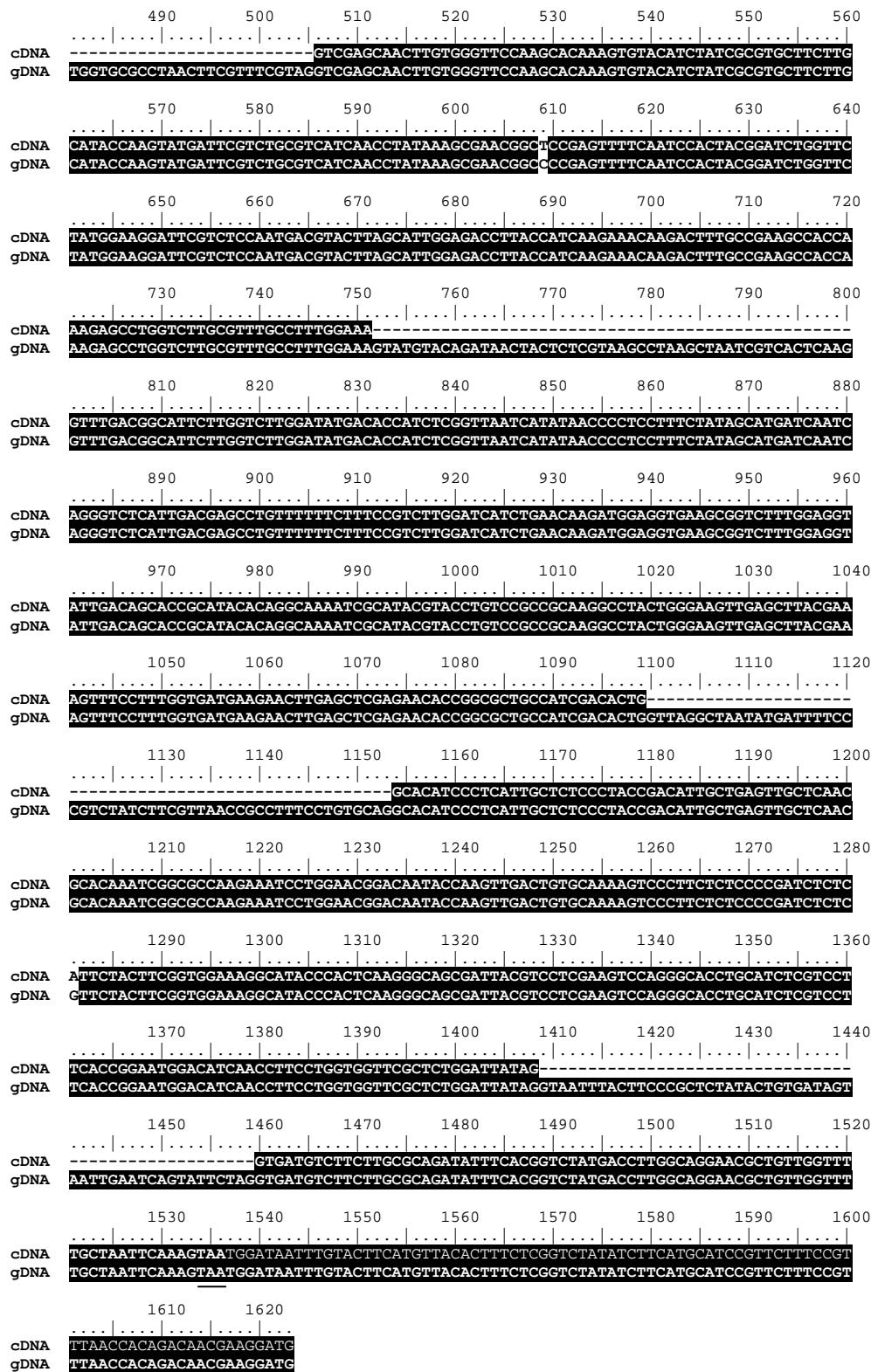


Slika 19: Agarozna gelska elektroforeza produktov sekundarne PCR reakcije. Vzorci s katerimi smo nadaljevali delo so označeni z rdečo. St – označevalec velikosti 100 bp plus

Zaporedje, ki smo ga določili na osnovi genomske DNA (gDNA), je dolgo 1610 bp in na osnovi cDNA 1361 bp. Zaporedji cDNA in gDNA se razlikujeta v 4 nukleotidih (slika 20), katerih posledica je razlika v dveh aminokislinah (slika 21). V genomski DNA najdemo 7 eksonov in 6 intronov. Eksoni so dolgi 258, 56, 23, 245, 299, 254 in 76 bp, introni pa 52, 53, 50, 49, 54 in 51 bp.

10	20	30	40	50	60	70	80
cDNA	ATGATTATCACTC	CCTGGTCCTCAGTCTCCTT	CCCTTTGTCTCCGCCCGCGTT	ACAAAATTCAAGCTCCATAAGATCCC			
gDNA	-----	-----	-----	-----			
90	100	110	120	130	140	150	160
cDNA	TCC	TACCTCCAGCAACCC	TGCTCTTGAGAGTGCC	TATCTCGCAGAGAAATATGCCT	CCAACTCCCCAACCCACTCA		
gDNA	TCCT	ACCTCCAGCAACCC	TGCTCTTGAGAGTGCC	TATCTCGCAGAGAAATATGCCT	CCAACTCCCCAACCCACTCA		
170	180	190	200	210	220	230	240
cDNA	TGGGAGCAGC	TGGCTCCGGTCGTC	CGTAGGCCGCTCGTACACG	GAGACGGCGAGCAGCTCT	TGGACCCAAGACGAC		
gDNA	TGGGAGCAGA	TGGCTCCGGTCGTC	CGTAGGCCGCTCGTACACG	GAGACGGCGAGCAGCTCT	TGGACCCAAGACGAC		
250	260	270	280	290	300	310	320
cDNA	CTCAAGGGTGG	CACAGCGTGCC	CTTACCA	-----	-----	-----	-----
gDNA	CTCAAGGGTGG	CACAGCGTGCC	CTTACCA	AGTTGTTCCACCC	TTAACCCCTGACACGTTCA		
330	340	350	360	370	380	390	400
cDNA	-----	ATTTCATGAATG	CACAATATTATACCG	GAGATAACCTGG	GAACCCAGCGCAGACAG	-----	-----
gDNA	-----	CAGATTTCATGAATG	CACAATATTATACCG	GAGATAACCTGG	GAACCCAGCGCAGACAG	TATGTCGTCA	ATCTGCCAGT
410	420	430	440	450	460	470	480
cDNA	-----	-----	-----	TTCAAAGTCATTCTCGACACAGG	-----	-----	-----
gDNA	-----	-----	-----	TCTACGGTTGTTATTG	AACGGGTGCGCC	CTTTGAACCCGTAACG	

Požek T. Karakterizacija saharopepsinu podobne aspartatne proteaze iz gobe *Clitocybe nebularis*. Diplomska naloga.
Ljubljana, 2010.

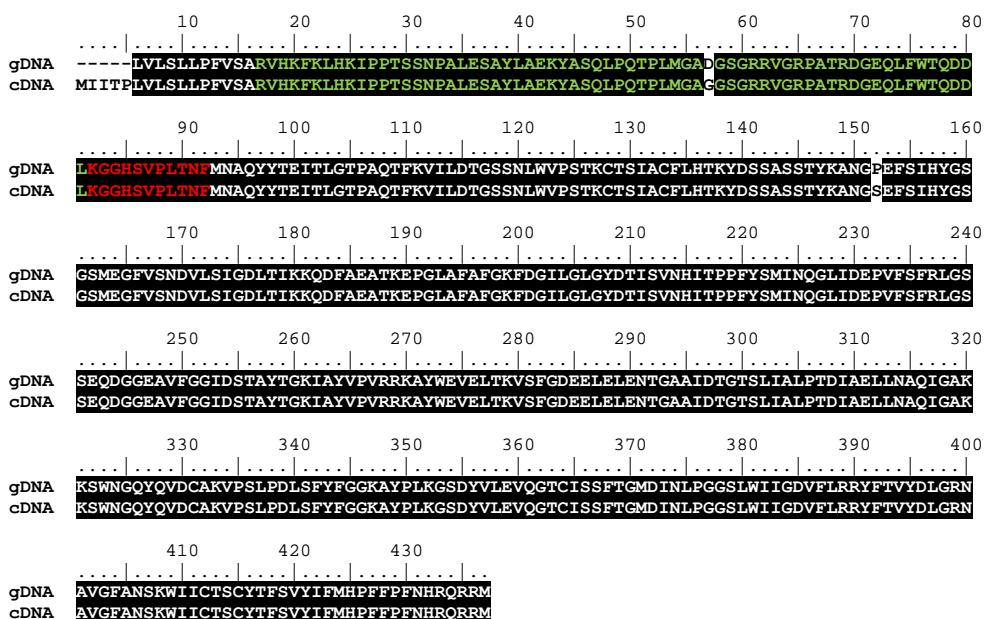


Slika 20: poravnavo celotnih nukleotidnih zaporedij cDNA in gDNA CnAP, dobljenih z metodo PCR.

Identični nukleotidi so senčeni črno, presledki v cDNA prikazujejo introne. Začetni kodon ATG je senčen modro,

končni kodon TAA je podčrtan. Z rumeno je označen začetni oligonukleotid CnAP-F2, začetni oligonukleotid CnAP-R2 pa je podčrtan.

Nukleotidno zaporedje smo prevedli v aminokislinsko in ju primerjali v programu BioEdit. Na aminokislinskem nivoju sta prisotni 2 razliki, torej je prišlo le v dveh začetni oligonukleotidih do tihih mutacij (slika 21).



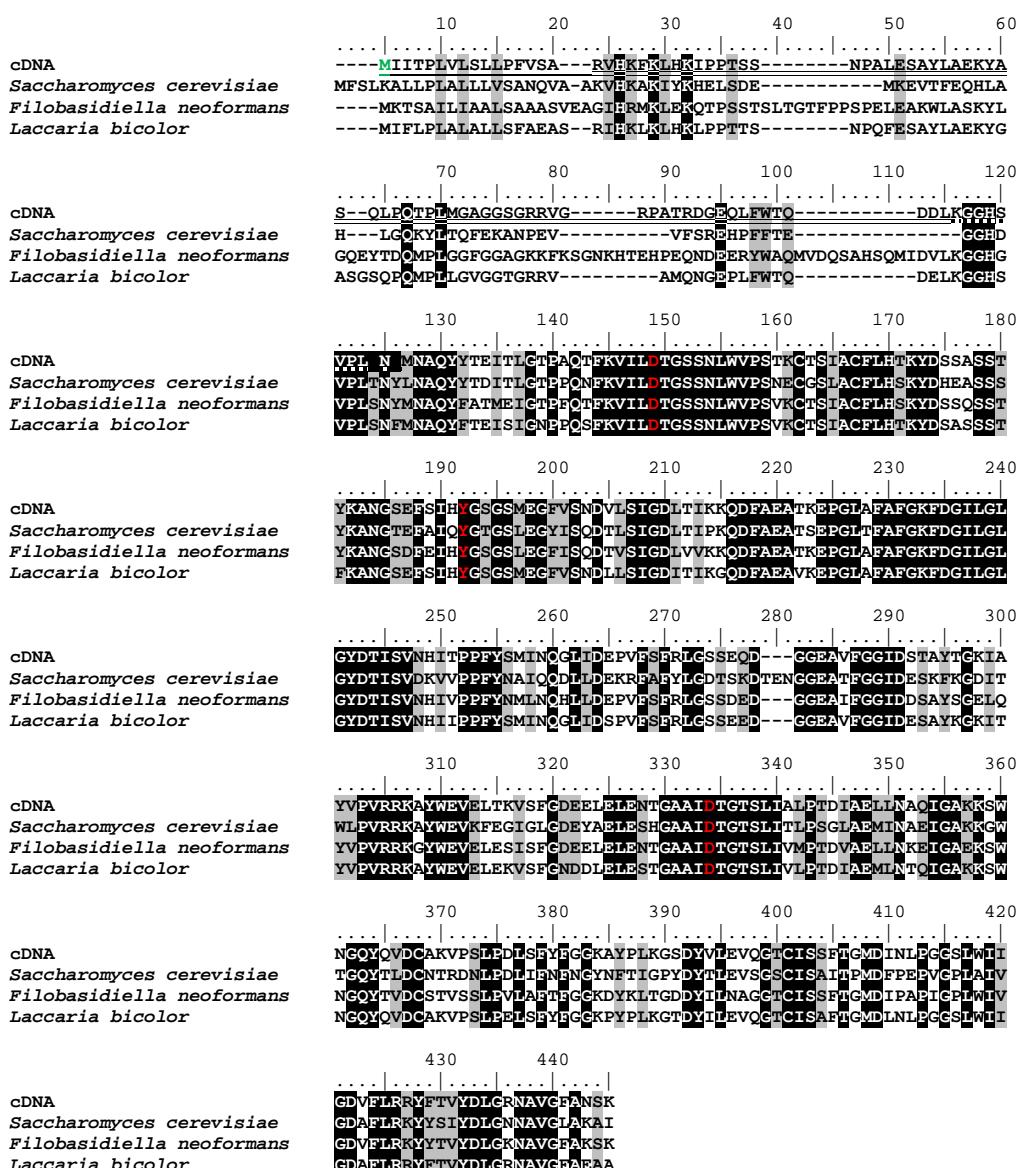
Slika 21: poravnava celotnih aminokislinskih zaporedij cDNA in gDNA CnAP dobljenih z metodo PCR. Identični nukleotidi so senčeni črno, presledki v cDNA prikazujejo introne. Propeptid je označen zeleno, N-končno zaporedje zrele CnAP pa rdeče. Primerjava s poznamenim zaporedjem je omogočila določitev propeptida.

4.1.4 Primerjava aspartatne proteaze iz gobe *Clitocybe nebularis* (CnAP) s saharopepsinu podobnimi proteazami iz gliv

S programom Expasy Protparam smo določili predvidene lastnosti CnAP. Gre za protein, katerega pre-pro oblika je dolga 408 AK z molekulsko maso 44,2 kDa in izoelektrično točko pri pH = 5,35, pro oblika je dolga 392 AK, z molekulsko maso 42,5 kDa in izoelektrično točko pri pH = 5,35, zrela oblika pa je dolga 327 AK, z molekulsko maso 35,3 kDa in izolektrično točko pri pH = 4,84.

Z algoritmom blast smo določili 82 % identičnost CnAP z aspartatno peptidazo A1 iz glive *Laccaria bicolor*, 81 % identičnost z endopeptidazo iz glive *Coprinopsis cinerea* (imenovana tudi *Filobasidiella neoformans*) in 67 % z endopeptidazo iz glive *Cryptococcus neoformans* (slika 22).

Aminokislinske sekvence cDNA CnAP in gliv *Saccharomyces cerevisiae*, *Filobasidiella neoformans* in *Laccaria bicolor* smo nato poravnali s programom BioEdit. Aminokisline iz aktivnega mesta sahsaropepsina (dva aspartata in tirozin) so obarvane rdeče. Ker se CnAP v teh AK popolnoma ujema lahko sklepamo, da gre za aktiven protein.



Slika 22: Primerjava AK zaporedja CnAP s saharopepsinom iz različnih gliv (*Saccharomyces cerevisiae*, *Filobasidiella neoformans* in *Laccaria bicolor*). Identične AK so osenčene črno, podobne sivo, različne pa belo. Začetna AK je označena zeleno, pre regija je podčrtana z enojno črto, pro-peptid z dvojno črto, N- končno zaporedje pa je podčrtano s prekinjeno črto. AK iz aktivnega mesta so označene rdeče.

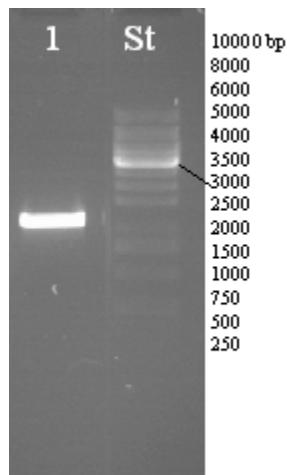
4.2 PRIPRAVA REKOMBINANTNE ASPARTATNE PROTEAZE V BAKTERIJI *ESCHERICHIA COLI*

4.2.1 Priprava ekspresijskega sistema

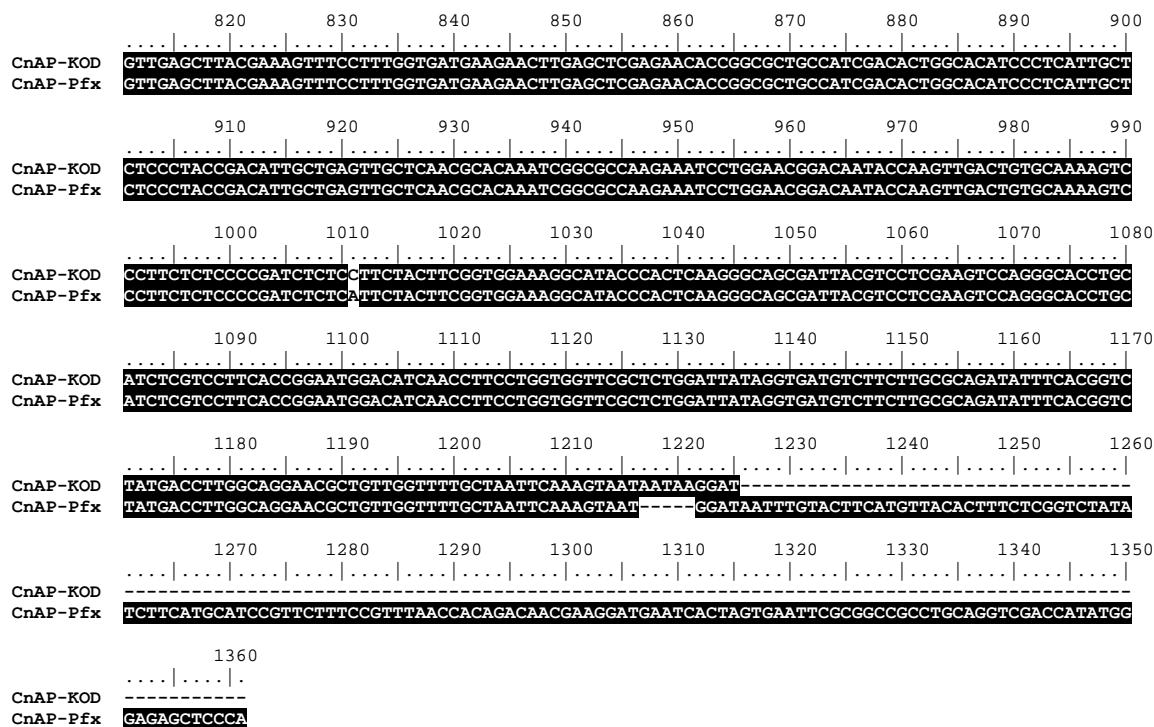
Ekspresijski sistem je sestavljen iz ekspresijskega vektorja z vključenim genom za rekombinantni protein, katerega izražamo v gostitelju. Osnovni postopek priprave tarčnega proteina je sestavljen iz štirih faz: vključitev kodirajočega zaporedja cDNA v vektor, vnos vektorja v gostitelja, biosinteza heterolognega proteina pri nadzorovanih pogojih in na koncu še izolacija ter čiščenje produkta.

Fragment DNA smo pripravili z metodo reakcije PCR in uporabo začetnih oligonukleotidov rCnAP-NdeI-F in rCnAP-BamHI-R (preglednica 3). Uporabili smo polimerazo Pfx, kot matrica pa nam je služila 100x razredčena cDNA CnAP vstavljena v vektor pGEM-T Easy (slika 3). Pri analizi z 1 % agarozno gelsko elektroforezo ni bilo nobenih lis. S spreminjanjem parametrov (različen program PCR reakcije, različno razmerje reagentov za PCR reakcijo, uporaba drugega pufra) smo ponovili PCR reakcijo, vendar brez uspeha. Zato smo predvidevali, da je problem v prekratkih začetnih oligonukleotidih in smo načrtovali nove, daljše začetne oligonukleotide (preglednica 3).

Z uporabo novih začetnih oligonukleotidov rCnAP-NdeI-Flong in rCnAP-BamHI-Rlong (preglednica 3) smo ponovno pomnožili fragment DNA z metodo reakcije PCR. Uporabili smo polimerazo Pfx, kot matrica pa nam je služila 100x razredčena cDNA CnAP vstavljena v vektor pGEM-T Easy (slika 19). Ker je pri uporabi polimeraze Pfx še vedno prišlo do mutacij, smo rekombinantni fragment DNA pomnožili še s polimerazo KOD (slika 23), ki je bolj natančna in dela manj napak kot polimeraza Pfx. Na sliki 24 vidimo primerjavo zaporedij cDNA pridobljenih s polimerazo Pfx in KOD.



Slika 23: Agarozna gelska elektroforeza CnAP fragmenta za izražanje v vektorju pET pridobljenega s polimerazo KOD.



Slika 24: Poravnava nukleotidnih zaporedij cDNA CnAP pridobljenih s polimerazo KOD in Pfx. Idenični nukleotidi so senčeni črno, podobni pa sivo.

Za pripravo rekombinantne CnAP smo uporabili vektorja pET11a (slika 4) in pET14b (slika 6). Prvi ne vsebuje histidinskega označevalca, medtem ko je pri vektorju pET14b prisoten histidinski označevalci. Namreč ob uporabi histidinskega označevalca lahko s pomočjo metode prenos Western preverimo, če je prišlo do izražanja rekombinantne CnAP ali ne.

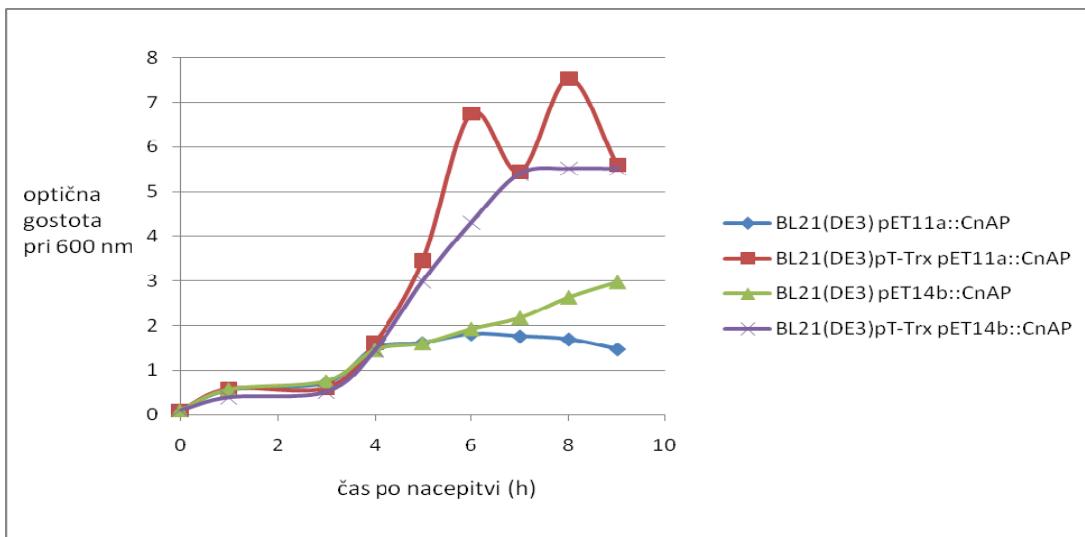
Očiščen fragment DNA rCnAP (slika 23) smo ligirali v ekspresijska vektorja pET11a in pET14b ter transformirali v bakterijski sev *Escherichia coli* DH5α. Z reakcijo PCR na osnovi kolonije smo preverili uspešnost ligacije in izbrane kolonije prekonočno nacepili v tekoče gojišče LBA ter jih čistili s kompletom reagentov Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System.

4.2.2 Heterologno izražanje CnAP

Za izražanje rekombinantne aspartatne proteaze iz gobe *Clitocybe nebularis* (rCnAP) v bakterijah smo uporabili bakterijske seve *Escherichia coli* BL21(DE3) pET11a::CnAP, BL21(DE3) pT-Trx pET11a::CnAP, BL21(DE3) pET14b::CnAP in BL21(DE3) pT-Trx pET14b::CnAP. Bakterijski sev BL21(DE3) ne vsebuje plazmida za tioredoksin, medtem ko je pri bakterijskem sevu BL21(DE3)pT-Trx prisoten plazmid za tioredoksin, ki omogoča pravilno zvitje proteina. Inkubacija kulture je v celoti potekala 8 h v tekočem gojišču LBA (za seve brez plazmida pT-Trx) oz. LBAC (za seve s plazmidom pT-Trx) na stresalniku pri 220 obr/min in 37 °C. Rast smo spremljali spektrofotometrično z merjenjem OD₆₀₀ (preglednica 9) in inducirali izražanje, ko je bila OD₆₀₀ okoli 0,5. Ob vsaki uri smo pobirali vzorce za analizo z NaDS-PAGE, da bi določili čas, ko je bilo izražanje proteina največje (preglednica 9). Največje izražanje rekombinantne CnAP je razvidno iz grafa (slika 25).

Preglednica 9: Optična gostota pri valovni dolžini 600 nm v odvisnosti od časa indukcije za različne seve.

Čas po nacepitvi (h)	OD ₆₀₀			
	BL21(DE3) pET11a::CnAP	BL21(DE3)pT-Trx pET11a::CnAP	BL21(DE3) pET14b::CnAP	BL21(DE3)pT-Trx pET14b::CnAP
0	0,10	0,10	0,10	0,10
1	0,55	0,58	0,56	0,39
3	0,71	0,60	0,75	0,51
4	1,49	1,61	1,45	1,44
5	1,61	3,45	1,60	2,99
6	1,81	6,75	1,92	4,30
7	1,76	5,44	2,17	5,40
8	1,69	7,53	2,63	5,51
9	1,47	5,60	2,97	5,51



Slika 25: Optična gostota pri valovni dolžini 600 nm v odvisnosti od časa indukcije za različne seve.

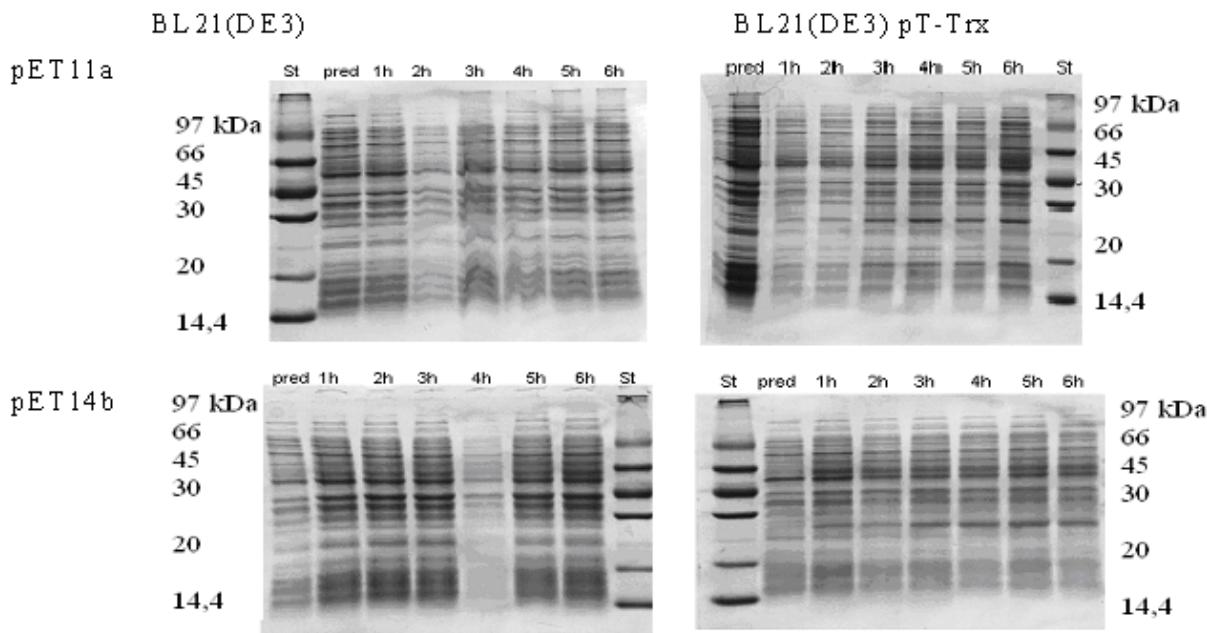
4.2.3 Analiza izražanja rCnAP v bakteriji *E. coli*

Za analizo izražanja CnAP v bakteriji *E. coli* smo uporabili NaDS – PAGE (temelji na potovanju proteinov glede na velikost), cimografijo z želatino in imunokemijsko metodo prenos Western (temelji na določanju aktivnosti s protitelesi).

4.2.3.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza z dodatkom natrijevega dodecil sulfata (NaDS – PAGE)

Za časovno analizo izražanja CnAP v bakteriji *E. coli* smo uporabili NaDS-PAGE in barvanje s Comassie brilliant blue (slika 26). Iz slike 26 seva BL21 (DE3) pET11a::CnAP lahko razberemo, da v tem primeru zagotovo ni prišlo do ekspresije, saj so lise okoli 44 kDa, kolikor naj bi bila velika CnAP, enako močne pred in po indukciji. Na sliki 26 seva BL21 (DE3) pT – Trx pET11a::CnAP je pri velikosti 44 kDa vidna lisa, ki postaja vse močnejša glede na pretečen čas od indukcije. Na sliki 26 seva BL21 (DE3) pET14b::CnAP je lisa v velikosti 44 kDa enako močna pred in po indukciji, torej do ekspresije ni prišlo. Prav tako ni prišlo do ekspresije na sliki 26 seva BL21 (DE3) pT – Trx pET14b::CnAP, saj v tem primeru ni nobene

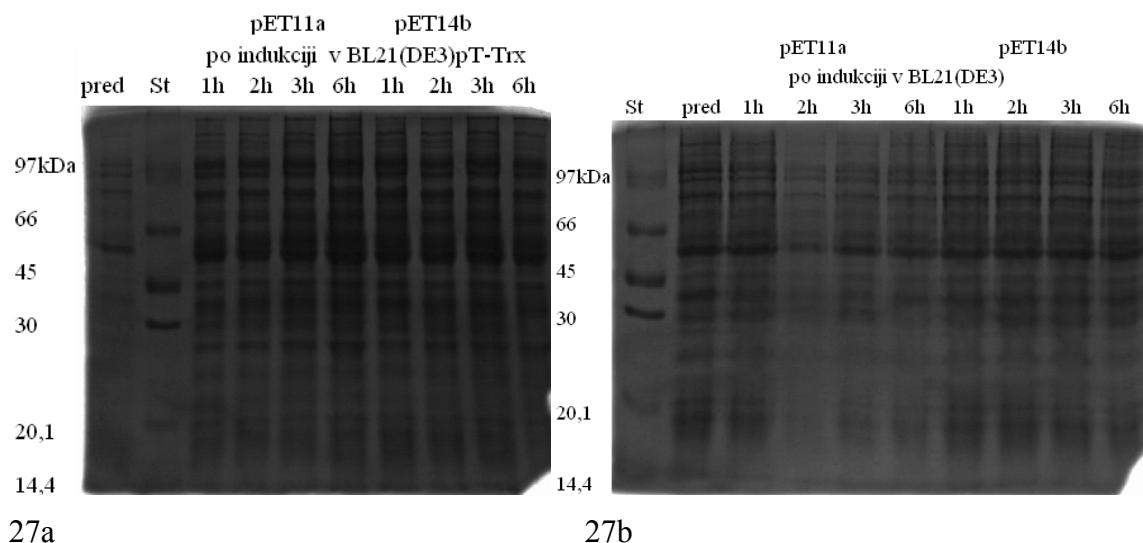
razlike v jakosti lise pred in po indukciji z IPTG. S časom je močnejša le lisa pri 28 kDa, ki predstavlja enega izmed proteinov bakterije *E. coli*.



Slika 26: Analiza NaDS – PAGE bakterijskega lizata ekspresijskih sistemov *E. coli* BL21 (DE3) pET11a::CnAP, BL21 (DE3) pT – Trx pET11a::CnAP, BL21 (DE3) pET14b::CnAP in BL21 (DE3) pT – Trx pET14b::CnAP v odvisnosti od časa. St – označevalec velikosti

4.2.3.2 Cimografija z želatino

Z metodo cimografije z želatino smo analizirali lizate bakterijskega ekspresijskega seva BL21(DE3)pT-Trx pET11a::CnAP oz. BL21(DE3)pT-Trx pET14b::CnAP bakterije *E. coli* pred in po indukciji z IPTG, da bi preverili, če je prišlo do izražanja pravilno zvite aktivne CnAP. V nobenem primeru nismo opazili želatinolitične aktivnosti, iz česar sklepamo, da ni prišlo do izražanja aktivne proteaze niti pri uporabi sočasnega izražanja tioredoksina (slika 27a in b).

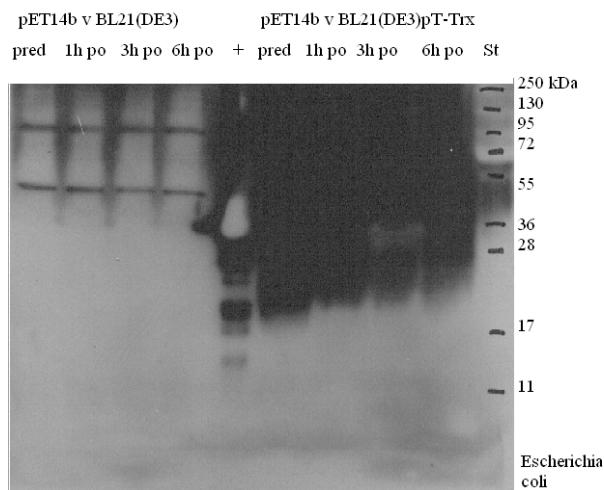


Slika 27a: Cimogram za bakterijske lizate seva BL21(DE3)pT-Trx pET11a::CnAP in BL21(DE3)pT-Trx pET14b::CnAP bakterije *E. coli*.

Slika 27b: Cimogram za bakterijske lizate seva BL21(DE3) pET11a::CnAP in BL21(DE3) pET14b::CnAP bakterije *E. coli*.

4.2.3.3 Prenos proteinov na membrano (prenos Western)

Ekspresijski plazmid pET14b (slika 6) omogoča izražanje rekombinantnih proteinov s histidinskim označevalcem na N-koncu. S prenosom Western in detekcijo s protitelesi, ki specifično prepoznajo histidinski označevalec, smo analizirali lizate bakterije *E. coli* BL21(DE3) pET14b::rCnAP in BL21(DE3) pT-Trx pET14b::rCnAP (slika 28). Za pozitivno kontrolo smo uporabili protein velikosti 36 kDa. Pri pozitivni kontroli opazimo liso pri 36 kDa, vendar pa pri rekombinantni CnAP ni razlike med vzorci pred in po indukciji, iz česar sklepamo, da do izražanja ni prišlo. Odsotnost signala bi lahko pomenila tudi prisotnost zrele oblike CnAP, vendar ker nismo opazili aktivnosti pri analizi s cimogramom z želatino (slika 27 a in b), je to malo verjetno. Lise, ki jih opazimo so posledica nespecifične vezave protiteles.



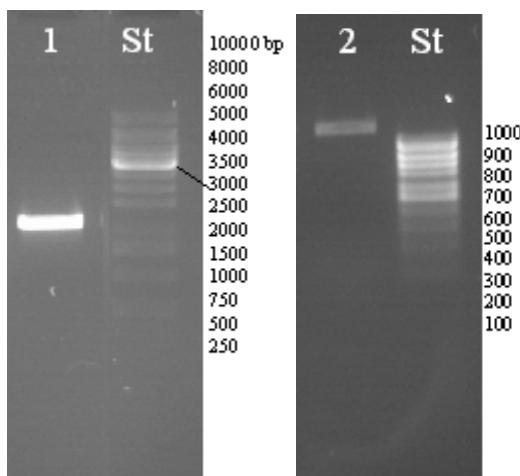
Slika 28: Določanje aktivnosti rCnAP s prenosom proteinov na PVDF membrano za bakterijski lizat izražen v ekspresijskem sevu BL21(DE3)pET14b::rCnAP in BL21(DE3)pT-Trx pET14b::rCnAP bakterije *Escherichia coli*.

4.3 PRIPRAVA REKOMBINANTNE ASPARTATNE PROTEAZE V METILOTROFNI KVASOVKI *PICHIA PASTORIS*

4.3.1 Priprava ekspresijskega sistema

Z metodo reakcije PCR in uporabo začetnih oligonukleotidov rCnAP-EcoRIHis6-F oziroma rCnAP-EcoRI-F in rCnAP-NotI-R (preglednica 3) smo pripravili fragment DNA z in brez histidinskega označevalca. Uporabili smo polimerazo Pfx, kot matrica pa nam je služila 100x razredčena cDNA CnAP vstavljenega v vektor pGEM Easy-T (slika 3). Reakcija je uspela le za produkt brez histidinskega označevalca, za slednjega pa smo morali reakcijo ponoviti z daljšimi začetnimi oligonukleotidi rCnAP-EcoHis6-Flong in rCnAP-NotI-R (preglednica 3). Uporabili smo polimerazo Pfx, kot matrica pa nam je služila 100x razredčena cDNA CnAP, vstavljenega v vektor pGEM Easy-T (slika 3). Na sliki 29 lahko vidimo liso, ki predstavlja fragment cDNA za izražanje v ekspresijskem sevu *E. coli*.

Za plazmidno DNA smo naredili restrikcijo z encimi EcoRI - HF in NotI-HF. Ker polimeraza Pfx pušča na DNA tope konce, smo pred ligacijo v pGEM naredili adenilacijo in nato ligacijske mešanice transformirali v sev kompetentnih celic *Escherichia coli* DH5 α . Z reakcijo PCR na osnovi kolonije smo preverili uspešnost ligacije ter kolonije, ki vsebujejo fragment, prekonočno nacepili v tekoče gojišče LBA. Plazmidno DNA smo izolirali s kompletom reagentov Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System. Očiščeno plazmidno DNA smo rezali z encimoma EcoRI in NotI in ponovno čistili s kompleтом reagentov Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System in fragment ligirali v ekspresijski vektor pPIC9K (slika 5).



Slika 29: Agarozna gelska elektroforeza rCnAP fragmenta za izražanje v vektorju pPIC9K pridobljenega s polimerazo Pfx. St – označevalec velikosti, 1 – rekombinantni PCR fragment s histidinskim označevalcem, 2 – rekombinantni fragment PCR brez histidinskega označevalca.

4.3.2 Heterologno izražanje

Ekspresijski vektor pPIC9K::rCnAP smo z elektroporacijo transformirali v kompetentne celice *Pichia pastoris* GS115. Te smo nacepili na selekcijske plošče MD in inkubirali pri 30 °C nekaj dni. Kolonije označene 1 – 18 smo nacepili v tekoče gojišče BMGY in inkubirali preko noči pri 30 °C in 220 obr/min. Naslednji dan smo gojišče zamenjali z gojiščem BMMY, ki vsebuje metanol in tako smo induciriali ekspresijo. Naslednje 3 dni smo vsakodnevno dodajali

metanol in tako vzdrževali nivo izražanja rekombinantnega proteina. S centrifugiranjem smo odstranili kvasovke in shranili samo gojišče v katerem naj bi se izločal protein. Na enak način smo naredili za ekspresijski vektor pPIC9K::rCnAPHis.

4.3.3 Analiza izražanja rCnAP v metilotrofni kvasovki *Pichia pastoris*

Aktivnost rekombinantnega produkta smo preverjali z različnimi encimskimi testi kot so test aktivnosti z azokazeinom, test aktivnosti s substratom FITC-Hb, cimografija z želatino in prenos proteinov na membrano.

4.3.3.1 Test aktivnosti z azokazeinom za rCnAP pridobljene v kvasovki *Pichia pastoris*

S testom aktivnosti z azokazeinom smo analizirali gojišča kvasovke *P. Pastoris* po izražanju CnAP, da bi preverili, če je prišlo do izražanja CnAP in njenega pravilnega zvitja.

Vzorce gojišč, katere smo shranili po končanem izražanju in niso vsebovali histidinskega označevalca, smo označili z zaporednimi številkami 1 – 18 (preglednica 10). Kot negativno kontrolo smo uporabili sev kvasovke *Pichia pastoris* GS115, ki ni vseboval fragmenta DNA rCnAP. Za pozitivno kontrolo smo uporabili pepsin v koncentraciji 0,6 mg/ml, ki je označen kot pepsin 1 in pepsin 2 ter s tem potrdili, da je bil uporabljen azokazein ustrezne kvalitete. Izmerili smo tudi slepo vrednost glede na dH₂O. Z upoštevanjem slepe vrednosti smo določili samodejni prispevek razpada substrata k absorbciiji in tako dobili dejansko vrednost absorbkcije rCnAP. Za test aktivnosti smo uporabili 2 različna pufra. In sicer Na-acetatni pufer s pH = 3,5 in pufer McIlvaine s pH = 5,5. Kot je bilo pričakovati, je bila aktivnost naših vzorcev večja pri nižjem pH, saj je večina aspartatnih proteaz aktivnih v kislem. Absorbanca rCnAP pri 350 nm je bila podobna absorbanci pepsina pri isti valovni dolžini. Vendar pa rezultati niso taki kot bi pričakovali, saj je aktivnost negativne kontrole enaka kot aktivnost sevov s fragmentom rCnAP (preglednica 10).

Preglednica 10: Test aktivnosti z azokazeinom v gojiščih kvasovke *P. pastoris* po izražanju CnAP.

Št. vzorca	Absorbanca pri 350 nm	
	Na-acetat pufer pH 3,5	McIlvaine pufer pH 5,5
1	0,194	0,178
2	0,197	0,177
3	0,202	0,186
4	0,210	0,185
5	0,202	0,159
6	0,203	0,188
7	0,202	0,183
8	0,203	0,180
11	0,206	0,185

Št. vzorca	Absorbanca pri 350 nm	
	Na-acetat pufer pH 3,5	McIlvaine pufer pH 5,5
14	0,164	0,176
16	0,210	0,194
17	0,205	0,182
18	0,190	0,178
Neg. kontrola	0,201	0,195
pepsin1	0,217	0,151
Pepsin 2	0,258	0,159

Test z azokazeinom smo naredili tudi za vzorce s histidinskim označevalcem, pridobljenimi v kvasovki *Pichia pastoris* (preglednica 11) in shranjenimi v hladilniku. Te vzorce smo pobrali po 4 dneh izražanja in so označeni s črko H za številko vzorca. Hkrati smo ponovili izražanje za rCnAP brez histidinskega označevalca in jo označili kot vzorec številka 3. Gojišče smo prvič pobrali po 2 dneh izražanja in te vzorce označili s črko P pred številko vzorca. Test smo delali tudi za negativno kontrolo, ki je v vseh primerih kazala primerljivo aktivnost kot vzorci z vstavljenim fragmentom. Izmerili smo tudi slepo vrednost glede na dH₂O. Z upoštevanjem slepe vrednosti smo določili samodejni prispevek razpada substrata k absorbciji in tako dobili dejansko vrednost absorbcije rCnAP.

Pri uporabi inhibitorja smo kot pozitivno kontrolo uporabili pepsin s koncentracijo 0,6 mg/ml različnih volumnov (15 µl in 30 µl) ter ju označili kot pepsin 15 oz. pepsin 30. Vrednosti pepsina, inhibiranega s pepstatinom A, so primerljive s lepim vrednostim, torej je bil inhibitor pepstatin A ustrezne kakovosti. Vrednosti izraženih CnAP, katerim smo dodali inhibitor, niso značilno manjše od tistih brez dodatka inhibitorja.

Preglednica 11: Test aktivnosti z azokazeinom za rekombinatno CnAP pridobljeno v kvasovki *Pichia Pastoris*. Vzorci s histidinskim označevalcem so označeni s črko H za številko, vzorci iz poskusne ekspresije pa so označeni s črko P pred številko.

Št. Vzorca	Absorbanca pri 350 nm	
	Brez inh.	Dodan inh. Pepstatin A
3	0,178	0,186
2H	0,205	0,206
3H	0,198	0,192
4H	0,192	0,168
Neg. kontrola	0,186	0,205
Pepsin 15	0,132	0,022
Pepsin 30	0,153	0,028
P3	0,167	/
P2H	0,174	/
P3H	0,179	/
P4H	0,168	/

4.3.3.2 Test aktivnosti s fluoresceinizotiocianat-hemoglobinom (FITC-Hb)

S substratom FITC-Hb smo analizirali gojišča kvasovke *P. Pastoris* po izražanju CnAP, da bi preverili, če je prišlo do izražanja CnAP in njenega pravilnega zvitja. Vzorce s histidinskim označevalcem smo označili s črko H za številko, vzorec brez histidinskega označevalca pa samo s številko (preglednica 12). Vsi vzorce so bili pobrani po 4 dneh izražanja CnAP v gojišče.

Vzporedno smo merili aktivnost rCnAP preko noči s 150 µl 10 mM HCl zakisanim vzorcem in brez dodatka HCl. Te vzorce smo označili s črko K pred številko. Hkrati smo delali tudi z in brez dodatka inhibitorja pepstatina A. Hkrati smo naredili še pozitivno kontrolo, tako da smo uporabili različna volumna pepsina s koncentracijo 0,6 mg/ml in ju označili kot pepsin 15 in pepsin 30. Enkrat smo jima dodali inhibitor pepstatin A, drugič pa ne. V primeru brez dodatka inhibitorja je bila pri večjem volumnu pepsina izražena večja aktivnost kot pri manjšem volumnu. Aktivnosti pepsina ob dodatku inhibitorja sta bili med seboj enaki in hkrati podobni

slepi vrednosti. Dodatek inhibitorja ni znižal aktivnosti rCnAP, prav tako zakisanje ni povečalo aktivnosti rCnAP. Vendar pa rezultati niso taki kot bi pričakovali, saj je aktivnost negativne kontrole enaka kot aktivnost sevov s fragmentom rCnAP. Vse vrednosti rCnAP so bile podobne in primerljive s slepo vrednostjo, torej rCnAP ni bila aktivna.

Preglednica 12: Merjenje aktivnosti rCnAP s FITC hemoglobinom. Vzorci s histidinskim označevalcem so označeni s črko H za številko, vzorci zakisani preko noči pa s črko K pred številko.

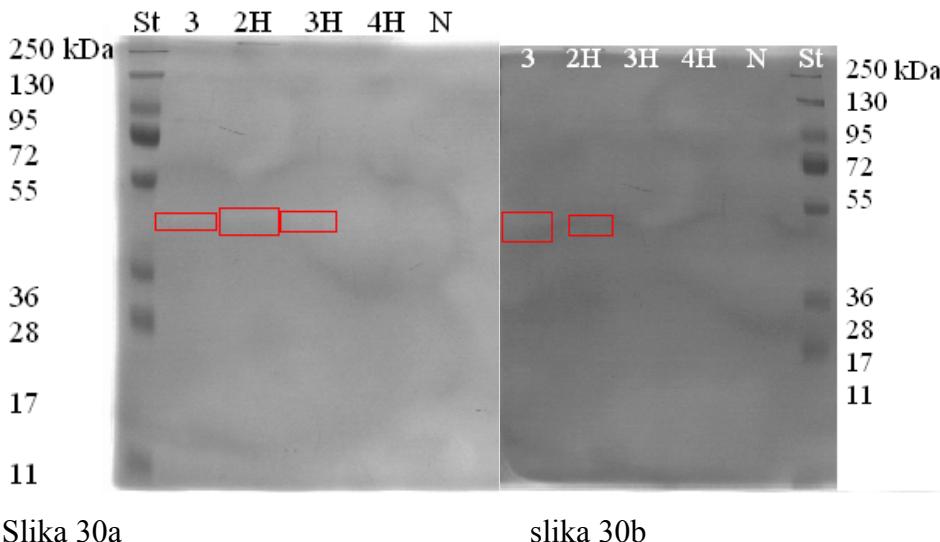
Št. vzorca	Fluorescenza 490/525	
	Brez inhibitorja	Z inhibitorjem pepstatinom A
3	84	108
2H	114	93
3H	114	110
4H	111	119
Neg. kontrola	117	97
Slepa 1	89	108
Slepa 2	110	106
Pepsin 15	170	106
Pepsin 30	223	103
Vzorci, čez noč zakisani z 10 mM HCl		
K3	104	104
K2H	104	101
K3H	119	101
K4H	117	100
Neg. kontrola	114	98

4.3.3.3 Cimografija z želatino

S cimografijo z želatino smo analizirali gojišča kvasovke *P. pastoris* po izražanju CnAP, da bi preverili, če je prišlo do izražanja CnAP in njenega pravilnega zvitja. Vzorce s histidinskim

označevalcem smo označili s črko H za številko, vzorec brez histidinskega označevalca pa samo s številko. Vsi vzorce so bili pobrani po 4 dneh izražanja CnAP v gojišče.

Na cimogramu z želatino brez dodatka inhibitorja (slika 30a) opazimo pri vzorcih 3, 2H in 3H močne lise pri velikosti okoli 44 kDa, medtem ko pri ostalih vzorcih rCnAP ni vidnih lis. Ob dodatku inhibitorja pepstatina A opazimo na cimogramu z želatino pri vzorcih št. 3 in 2H liso pri velikosti 44 kDa, vendar so lise šibkejše kot brez dodatka inhibitorja. Pri ostalih vzorcih ne vidimo ničesar. Opomba: Na sliki se lise vidijo zelo slabo zaradi slabe ločljivosti.



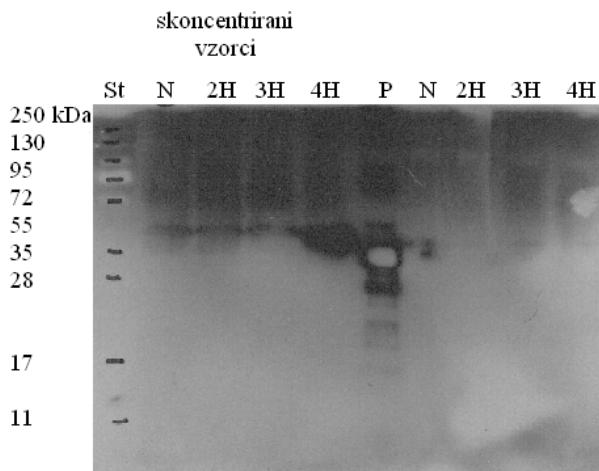
Slika 30a: Cimografija z želatino za vzorce rekombinantne CnAP z izražanjem v kvasovki *Pichia pastoris* brez dodatka inhibitorja. 3 – vzorec brez histidinskega označevalca, 2H, 3H, 4H – vzorci s histidinskim označevalcem, N – negativna kontrola, St – označevalec velikosti PageRuler Prestained

Slika 30b: Cimografija z želatino za vzorce rekombinantne CnAP iz z izražanjem v kvasovki *Pichia pastoris* ob dodatku inhibitorja pepstatin A. 3 – vzorec brez histidinskega označevalca, 2H, 3H, 4H – vzorci s histidinskim označevalcem, N – negativna kontrola, St – označevalec velikosti PageRuler Prestained

4.3.3.4 Prenos proteinov rCnAP iz kvasovke *Pichia pastoris* na PVDF membrano (prenos Western)

S prenosom proteinov na PVDF membrano (slika 31) smo analizirali gojišča kvasovke *P. Pastoris* po izražanju CnAP, da bi preverili, če je prišlo do izražanja CnAP in njenega pravilnega zvitja. Vzorce s histidinskim označevalcem smo označili s črko H za številko. Vsi vzorci so bili pobrani po 4 dneh izražanja CnAP v gojišče.

Na gel smo nanašali koncentrirane in nekoncentrirane vzorce z rCnAP s histidinskim označevalcem izražene v kvasovki *Pichia pastoris* ter pozitivno kontrolo. Pri pozitivni kontroli opazimo liso pri velikosti 36 kDa, kar pomeni da je test zanesljiv in so bila protitelesa ustrezne kakovosti. Vendar pa smo pozitivne kontrole preveč nanesli, ves substrat se je porabil in zato je nastala bela lisa. Pri naših vzorcih vidimo liso, ki je sicer ustrezne velikosti, vendar je prisotna tudi v negativni kontroli, torej ne gre za produkt ekspresije. Obobarjanju s TCA smo dobili bolj koncentrirane vzorce, toda ponovno je šlo le za nespecifično vezavo in izražanjane moremo potrditi.



Slika 31: Določanje aktivnosti nekoncentrirane in koncentrirane AP s histidinskim označevalcem, izražene v kvasovki *Pichia pastoris* z imunokemijsko metodo prenosa proteinov na PVDF membrano.

5 RAZPRAVA

Prostotrosnice kažejo nepričakovano število in raznolikost proteaz, kar kaže na to, da so idealen vir novih proteaz s potencialno edinstvenimi lastnostmi (12). Zaradi širokega spektra delovanja so zanimive v številnih industrijah (prehrambena, farmacija, biotehnologija, insekticidna sredstva) (18). V diplomski nalogi smo raziskovali saharopepsinu podobno aspartatno proteazo iz gobe *Clitocybe nebularis* (CnAP).

V prvem delu diplomske naloge smo določili nukleotidno in aminokislinsko zaporedje cDNA in gena CnAP. Na osnovi že poznanega N-končnega zaporedja je bilo pridobljeno nukleotidno zaporedje CnAP. Iz njega smo z metodama hoje po genomu in hitrega kloniranja koncev cDNA določili delno zaporedje cDNA in gena CnAP. Z novimi začetnimi oligonukleotidi (preglednica 3) in reakcijo PCR smo določili celotno cDNA in gensko zaporedje CnAP. CnAP je v predvidenih lastnostih, kot so dolžina zaporedja, predvidena molekulska masa in izoelektrična točka podobna saharopepsinu iz *S. cerevisiae*. Saharopepsin je 405 AK dolg protein z molekulsko maso 44,5 kDa in izoelektrično točko pri pH = 4,54 (26), medtem ko je CnAP 408 AK dolg protein s predvideno molekulsko maso 44,2 kDa in predvideno izoelektrično točko pri pH = 5,35.

CnAP kaže 82 % identičnost z aspartatno peptidazo A1 iz glive *Laccaria bicolor*, 81 % identičnost z endopeptidazo iz glive *Coprinopsis cinerea* in 67 % z endopeptidazo iz glive *Cryptococcus neoformans* (slika 22). Ob primerjavi zaporedja DNA CnAP in saharopepsina iz kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* opazimo, da se CnAP ujema v vseh treh aminokislinah, potrebnih za aktivnost saharopepsina, iz česar lahko sklepamo, da gre tudi v primeru CnAP za aktiven protein – CnAP vsebuje pro regijo (slika 22), ki se verjetno na enak način kot pri saharopepsinu v kislem okolju odcepi in dobimo aktivno obliko.

Iz slike 20 opazimo razlike v nukleotidih med cDNA in gDNA. Gre za spremembo 4 nukleotidov in 2 AK. V dveh primerih gre za tiho mutacijo (slika 21), torej zaradi spremembe

nukleotida ne pride do spremembe AK, v dveh primerih pa dobimo tudi spremembo aminokislinskega zaporedja.

V drugem delu diplomske naloge je bil naš cilj na osnovi dobljenega zaporedja CnAP pridobiti rekombinantno CnAP v ekspresijskem sistemu *Escherichia coli* in *Pichia pastoris* ter preveriti njeno aktivnost.

Bakterijski ekspresijski sistem *Escherichia coli* je najpogosteje uporabljen, saj gre za preprost organizem, gojenje je enostavno in hkrati poceni. Njegova slabost je tvorba inkluzijskih teles, zaradi katerih je protein neaktivен. Temu se lahko izognemo z uporabo plazmida s pT-Trx, ki poskrbi za pravilno zvitje proteina (18) ali pa uporabimo ekspresijski sistem metilotrofne kvasovke *Pichia pastoris*. Glavna prednost slednje je v posttranslacijskih spremembah kot so proteolitično procesiranje, pravilno zvitje, tvorba disulfidnih vezi in glikozilacija, ki omogočajo pridobivanje aktivnega proteina. Prav tako je ugodno izločanje heterolognega proteina v gojišče, saj kvasovka izloča le nizko količino svojih proteinov in tako dobimo aktiven heterologni protein (3). Aspartatne proteaze iz gliv so slabo raziskane, vendar pa najdemo v literaturi številne raziskave za živalske aspartatne proteaze. Tako so Yoshimasu in sodelavci uspešno pridobili rekombinantni prašičji pepsin v ekspresijskem sistemu *P. pastoris*, katerega homogenost s komercialnim pepsinom so potrdili z metodami NaDS-PAGE, prenosom Western in določanjem N-končnega zaporedja. Prav tako je imel rekombinantni pepsin podobne kinetične lastnosti, pH in temperaturno stabilnost ter sekundarno in terciarno strukturo kot pepsin, ki ga dobimo v prodaji (27). Prav tako so uspešno proizvedli rekombinantni prašičji pepsin v ekspresijskem sistemu *E. coli*. Pridobili so ga z združitvijo gena za pepsinogen in tioredoksin in izražanjem kot združen produkt v *E. coli*. S tem so se izognili tvorbi inkluzijskih teles. Namreč, ponovno zvijanje proteina ne zagotavlja, da bodo vse molekule pravilno zvite (28).

Na sliki 26, katero smo pridobili z metodo NaDS-PAGE lahko razberemo, da je do izražanja v bakterijskem ekspresijskem sistemu *E. coli* verjetno prišlo le pri sevu BL21 (DE3) pT – Trx pET11a::CnAP, saj le tu vidimo liso v velikosti 44 kDa, ki postaja s časom po indukciji vse močnejša. Dokazano je bilo, da sočasna produkcija tioredoksina poveča topnost proteina, saj

tioredoksin reducira disulfidno vez in tako dobimo topen protein, ki je v svoji nativni konformaciji (18). Da bi izražanje lahko z zagotovostjo potrdili, bi morali ponoviti izražanje v večji količini in obenem preverti tudi druge možnosti kot je npr. ponovno zvijanje verige. Iz preglednice 9 je razvidno, kako prisotnost tioredoksina vpliva na rast bakterij. V primerih kjer je prišlo do hkratnega izražanja tioredoksina, je OD₆₀₀ vsaj dvakrat večja kot če tioredoksina ni bilo prisotnega. Liso, ki postaja s časom vse močnejša, najdemo tudi pri sevu BL21 (DE3) pT – Trx pET14b::CnAP, vendar je le-ta v velikosti 28 kDa, torej gre za nek drugi protein iz *E. coli* in ne CnAP. Pri sevih *E. coli* BL21 (DE3) pET11a::CnAP in BL21 (DE3) pET14b::CnAP ne vidimo lise v velikosti 44 kDa, zato tu po vsej verjetnosti ni prišlo do izražanja.

Za bakterijske lizate smo opravili tudi test cimografije z želatino, kjer smo gledali aktivnost CnAP. Tu ni bilo opazne nobene razlike v aktivnosti pred in po indukciji z IPTG. Lahko da ni prišlo do izražanja, ali pa je protein še vedno ostal v neaktivni obliki. Vzrok za neaktivnost proteaze je lahko v nepravilnem zvitju ali pa je prišlo do inaktivacije tekom elektroforeze, ali pa sploh ni prišlo do avtoaktivacije. Pri tem testu ni bilo opazne nobene razlike med bakterijskimi lizati, pri katerih je prišlo do hkratnega izražanja tioredoksina in tistih brez.

Kakršnokoli izražanje pri bakterijskih lizatih smo ponovno ovrgli s testom prenosa proteinov na PVDF membrano. Pri njih sicer vidimo liso ustrezne velikosti pri 44 kDa, vendar je šlo tu za nespecifično vezavo. Tudi ob prisotnosti tioredoksina je prišlo le do nespecifične vezave, sto razliko, da so tukaj zaradi prisotnosti tioredoksina lise močnejše. Ena izmed možnosti pa je tudi, da je prišlo do odcepitve pro-regije, s čimer se je izgubil histidinski označevalec.

Pri testu cimografije z želatino so gojišča kvasovke *P. pastoris* po izražanju CnAP kazala aktivnost (slika 30 a in b), saj vidimo na sliki 30a močne lise, ki pa so bile ob dodatku inhibitorja pepstatina A šibkejše oziroma so v enem primeru celo izginile. Tako bi v kvasovki *Pichia pastoris* lahko prišlo do izražanja aktivnega proteina CnAP.

Toda če pogledamo test prenosa proteinov na membrano (slika 31), ne moremo več s tako zagotovostjo trditi, da je zares prišlo do izražanja aktivnega proteina. Vidimo liso, ki je

ustrezne velikosti, vendar je prisotna tudi v negativni kontroli, torej ni šlo za produkt izražanja ali pa protein ni bil pravilno zvit. Ob obarjanju s TCA smo dobili bolj koncentrirane vzorce, toda ponovno je šlo le za nespecifično vezavo in izražanja ne moremo potrditi. Test je bil zanesljiv, saj pri pozitivni kontroli opazimo ustrezeno liso v velikosti 36 kDa, torej so bila protitelesa ustrezne kakovosti. Ker smo nanesli preveč pozitivne kontrole, se je ves substrat porabil in zato je nastala bela lisa. Prav tako pa je lahko odsotnost signala lahko posledica prisotnosti aktivne CnAP, saj je histidinski označevalcev, ki je na N-koncu, prisoten le v primeru pro-oblike encima.

Za CnAP, proizvedeno v kvasovki *Pichia pastoris*, smo naredili še test aktivnosti z azokazeinom in FITC hemoglobinom. V prvem primeru (preglednica 10) smo uporabili dva različna pufra, in sicer natrij – acetatni pufer s pH = 3,5 in McIlvaine pufer s pH = 5,5. Kot je bilo pričakovati, je bila aktivnost naših vzorcev večja pri nižjem pH, saj je večina aspartatnih proteaz aktivnih v kislem. Rezultati so bili primerljivi s pozitivno kontrolo, toda niso takšni kot smo pričakovali, saj je aktivnost negativne kontrole enaka kot aktivnost sevov s fragmentom rCnAP.

Test z azokazeinom smo naredili tudi za gojišča s histidinskim označevalcem po izražanju CnAP pridobljenimi v kvasovki *Pichia pastoris* in shranjenimi v hladilniku. Vrednosti produktov rekombinantne CnAP, pobranih po dveh dneh izražanja, so bile malo nižje kot vrednosti produktov pobranih po štirih dneh izražanja. Vse vrednosti pa so bile primerljive s pepsinom oz. so kazale celo malo višjo aktivnost od slednjega. Ob dodatku inhibitorja pepstatina A ni prišlo do spremembe v aktivnosti CnAP, medtem ko je pepstatin A inhibiral pepsin, torej so rezultati zanesljivi.

Podobne rezultate smo dobili tudi pri testu aktivnosti s FITC hemoglobinom. Te vrednosti sicer niso bile značilno manjše od aktivnosti pepsina, tudi z zakisanjem nismo povečali njihove aktivnosti in dodatek inhibitorja pepstatina A ni zmanjšal aktivnosti, medtem ko je isti inhibitor dobro inhibiral pepsin. Tudi negativna kontrola je bila v vseh primerih enaka kot vrednosti rCnAP. Tako v tem primeru ne moremo potrditi aktivnosti.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da je ekspresijski sistem kvasovke *P. pastoris* bolj primeren za pripravo rekombinantne CnAP kot ekspresijski sistem bakterije *E. coli*. Namreč pri bakterijskem ekspresijskem sevu smo opazili CnAP le pri analizi z metodo NaDS-PAGE za sev BL21 (DE3) pT-Trx pET11a::CnAP, medtem ko pri ostalih sevih in ostalih metodah (test cimografije z želatino in prenos Western) nismo potrdili prisotnosti heterologno izražene CnAP. Po drugi strani smo pri testu cimografije z želatino za gojišča kvasovke *P. pastoris* po izražanju CnAP opazili močne lise, ki so ob dodatku inhibitorja pepstatina A celo izginile. Prav tako je bila pri testih aktivnosti z substratom azokazeinom in FITC-hemoglobinom aktivnost primerljiva aktivnosti pepsina, toda dodatek inhibitorja ni inhibiral CnAP, medtem ko je isti inhibitor inhibiral pepsin. Slednje kaže na specifične lastnosti CnAP.

6 SKLEPI

- Določili smo cDNA in gensko zaporedje CnAP, aspartatne proteaze iz *C. nebularis*.
- Celotno zaporedje CnAP kaže 82 % identičnost z aspartatno peptidazo A1 iz glive *Laccaria bicolor* in 81 % identičnost z endopeptidazo iz glive *Coprinopsis cinerea*.
- Za pripravo rekombinantne CnAP smo uporabili bakterijski in kvasni ekspresijski sistem.
- V bakterijskem sevu *Escherichia coli* ni prišlo do ekspresije.
- Rekombinantna CnAP iz kvasovke kaže aktivnost, vendar bi bilo potrebno metodo izražanja optimirati.
- Kvasni ekspresijski sistem *P. pastoris* se je izkazal kot boljši za izražanje CnAP kot ekspresijski sistem *Escherichiae coli*.

7 LITERATURA

1. Læssøe T, Del Conte A: *Velika knjiga o gobah*, DZS, 1997, 6-7.
2. Vrščaj D: *Glive od Triglava do Jadrana*, Kmečki glas, 1990, 136-137, 207.
3. Štrukelj B, Kos J: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*, 1.izdaja, Slovensko farmacevtsko društvo, 2007, 55.
4. Podobnik A, Devetak D: *Biologija 4 in 5, Raznolikost živih bitij 1 in 2*, DZS, 1997, 47-56.
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (povzeto oktober 2010)
6. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/87/Clitocybe_Nebularis.JPG
(povzeto maj 2010)
7. Beynon R, Bond J: *Proteolytic enzymes*, Oxford university press, 2001.
8. Rao M in sodelavci: Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiology and molecular biology reviews*, 1998, 597-635.
9. Rawlings N, Barrett A: Evolutionary families of peptidases, *Biochem. J.*, 1993, 290, 205-218.
10. Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A., *MEROPS: the peptidase database*. *Nucleic Acids Res* 38, 2010, D227-D233.
11. Vozelj S, Obermajer N, Kos J: Proteaze in njihovi inhibitorji v telesnih tekočinah kot diagnostični in prognostični tumorski kazalci, *Farmacevtski Vestnik*, 2007; 133–138.
12. Sabotič J, Popovič T, Brzin J: Aspartic proteases from Basidiomycete *Clitocybe nebularis*, *Croatica chemical acta*, 739-745.
13. Barrett A, Rawlings N: *Handbook of proteolytic enzymes*, San Diego : Elsevier Academic Press, 2004.
14. <http://molinterv.aspetjournals.org/content/1/4/198/F5.large.jpg> (povzeto marec 2010)
15. <http://www.cs.stedwards.edu/chem/Chemistry/CHEM43/CHEM43/AspProtease/FUNCTION.HTML> (povzeto maj 2010)
16. Higgins D, Cregg J: *Methods in molecular biology*, vol. 103: *Pichia* protocols, Humana press, Totowa.

17. Kocjančič M: Uporaba inhibitorja serinskih proteaz iz gobe *Clitocybe nebularis* za izolacijo serinskih proteaz z afinitetno kromatografijo, diplomsko delo, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, 2009, 44.
18. Takashi Yasukawa in sod.: Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin, J. Biol. Chem., 1995, 25328-25331.
19. <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu> (povzeto avgust 2010)
20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> (povzeto avgust 2010)
21. <http://mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html> (povzeto avgust 2010)
22. Gunde–Cimerman N: Nitaste glive, Biotehnologija – osnovna znanja, Ljubljana 1996, 95-111.
23. Rawlings N D, Morton F R, Barrett A J: An introduction to peptidases and the MEROPS database. V: Industrial enzymes. Structure, function and applications. 2007, 161-179.
24. Rawlings N D, Morton F R, Barrett A J, MEROPS: the peptide database. Nucleic acids research, 2006, 34, D270-D272.
25. Barrett A J, McDonald J K, Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. Biochem. J., 1986, 237.
26. <http://www.yeastgenome.org/> (povzeto November 2010)
27. Yoshimasu M in sod: Soluble expression and purification of porcine pepsinogen from *Pichia pastoris*, Protein expression and purification 25, 2002, 229-236.
28. Tanaka T, Yada R: Expression of soluble cloned porcine pepsinogen A in *Escherichia coli*, Biochem. J., 315, 1996, 443-446.