

Univerza v Ljubljani  
Fakulteta za farmacijo



SARA ŽIGON

**KARAKTERIZACIJA ZA SAHAROZO SPECIFIČNEGA LEKTINA  
IZ GOBE MEGLENKE (*Clitocybe nebularis*)**

**CHARACTERIZATION OF SUCROSE SPECIFIC LECTIN FROM  
THE MUSHROOM CLOUDED AGARIC (*Clitocybe nebularis*)**

Ljubljana, 2011

*Natura in minima maxima.*

Narava je največja v najmanjših stvareh.

Diplomsko naloge sem opravljala na Inštitutu Jožef Stefan, Odseku za biotehnologijo (B3) pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem. in somentorstvom dr. Jerice Sabočič, univ. dipl. mikrobiol. Aminokislinsko zaporedje je z Edmanovo metodo razgradnje določila dr. Adrijana Leonardi z Odseka za molekularne in biomedicinske znanosti (B2) na Inštitutu Jožef Stefan.

### **Zahvala**

*Za pomoč pri izdelavi diplomske naloge se zahvaljujem mentorju prof. dr. Janku Kosu, univ. dipl. kem., ki mi je omogočil opravljanje naloge na Inštitutu Jožef Stefan.*

*Prav tako se zahvaljujem tudi somentorici dr. Jerici Sabočič, univ. dipl. mikrobiol. za vso pomoč in vodenje eksperimentalnega dela naloge.*

*Hvala tudi dr. Juretu Pohlevnu, univ. dipl. biol. za pomoč pri analizah HPLC in biokemijski karakterizaciji rekombinantnega lektina ter vsem laboratorijskim kolegom odseka B3, ki so mi pri delu prijateljsko stali ob strani.*

*Nenazadnje se zahvaljujem tudi svojim staršem, ki so me podpirali v vseh pogledih tako med študijem farmacije kot tudi na dotedanji življenjski poti.*

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko naloge izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem.

Sara Žigon

Ljubljana, april 2011

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag.farm

Člani diplomske komisije: prof. dr. Janko Kos, univ. dipl. kem.

dr. Jerica Sabočič, univ. dipl. mikrobiol.

doc. dr. Lucija Peterlin-Mašič, mag. farm.

## KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
KAZALO PREGLEDNIC.....	III
KAZALO SLIK.....	IV
POVZETEK .....	V
ABSTRACT .....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
1. UVOD .....	1
1.1 GLIVE.....	1
1.1.1 Pomen in lastnosti gliv.....	1
1.1.2 Morfologija in taksonomska razvrstitev gliv .....	1
1.1.2.1 Prostotrošnice ( <i>Basidiomycetes</i> ).....	2
1.1.2.2 Meglenka ali poprhnjena livka ( <i>Clitocybe nebularis</i> ).....	3
1.1.3 Kemijska sestava gliv .....	3
1.1.4 Biološko aktivne snovi iz gob.....	4
1.2. LEKTINI.....	5
1.2.1 Kratek pogled v zgodovino lektinov.....	5
1.2.2 Pomen, lastnosti in uporaba rastlinskih in živalskih lektinov.....	6
1.2.3 Lektini iz gob .....	10
1.2.3.1 Lektini iz megleinke ( <i>Clitocybe nebularis</i> ).....	11
1.3 MOLEKULSKO KLONIRANJE IN IZRAŽANJE PROTEINOV V BAKTERIJSKEM SISTEMU <i>Escherichia coli</i> .....	12
1.3.1 Molekulsko kloniranje .....	12
1.3.2 Bakterijski ekspresijski sistem <i>Escherichia coli</i> .....	14
2. HIPOTEZA IN NAMEN DELA .....	16
3. MATERIALI IN METODE .....	17
3.1 MATERIALI IN LABORATORIJSKA OPREMA.....	17
3.1.1 Reagenti .....	17
3.1.2 Laboratorijska oprema .....	18
3.1.3 Kompleti reagentov .....	19
3.1.4 Biološki material.....	19
3.1.5 Gojišča .....	21
3.1.6 Raztopine in pufri .....	21
3.1.7 Plazmidi .....	22
3.1.8 Encimi.....	25
3.1.9 Začetni oligonukleotidi .....	25
3.2 METODE .....	27
3.2.1 Molekulsko kloniranje .....	27
3.2.1.1 Določitev delnega aminokislinskega zaporedja gobjega lektina CnSL.....	27
3.2.1.2 Izolacija RNA in sinteza cDNA .....	28
3.2.1.3 Pomnoževanje delnih nukleotidnih zaporedij gena CnSL z verižno reakcijo s polimerazo (PCR).....	28
3.2.1.3.1 Pomnoževanje nezanega zaporedja CnSL z degeneriranimi začetniki .....	29
3.2.1.3.2 Pomnoževanje cDNA z metodo hitrega kloniranja 3' koncov cDNA (3'RACE) .....	30
3.2.1.3.3 Pomnoževanje cDNA z metodo hitrega kloniranja 5' koncov cDNA (5'RACE) .....	31
3.2.1.3.4 Pomnoževanje gena z metodo hoje po genomu .....	32
3.2.1.4 Pomnoževanje celotnega nukleotidnega zaporedja CnSL.....	34

3.2.1.5 Agarozna gelska elektroforeza .....	35
3.2.1.6 Čiščenje fragmentov DNA .....	36
3.2.1.7 Vstavitev fragmentov v plazmidni vektor .....	36
3.2.1.8 Priprava kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH5α.....	37
3.2.1.9 Transformacija plazmidov v kompetentne celice in njihovo pomnoževanje .....	38
3.2.1.10 Določitev bakterijskih kolonij z vstavljenim plazmidom in produktom PCR.....	38
3.2.1.11 Izolacija, čiščenje in določitev nukleotidnega zaporedja plazmidne DNA .....	40
3.2.1.12 Analiza zaporedij.....	40
3.2.2 Priprava in pridobivanje rekombinantnega CnSL (rCnSL) .....	40
3.2.2.1 Načrtovanje začetnikov za rCnSL.....	41
3.2.2.2 Piprava sistema za izražanje .....	41
3.2.2.3 Izražanje rCnSL v ekspresijskem sistemu <i>E. coli</i> BL21 (DE3) z indukcijo z IPTG .....	44
3.2.3 Čiščenje in renaturacija rCnSL iz inkluzijskih telesc .....	45
3.2.3.1 Obarjanje z amonijevim sulfatom .....	46
3.2.4 Gelska filtracija.....	47
3.2.5 Določanje koncentracije proteinov .....	47
3.2.6 Koncentriranje vzorcev z ultrafiltracijo .....	48
3.2.7 Poliakrilamidna gelska EF v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE) .....	48
3.2.8 Biokemijska karakterizacija pripravljenega rCnSL .....	50
3.2.8.1 Afinitetna kromatografija .....	50
3.2.8.2 Izoelektrično fokusiranje (IEF) .....	51
3.2.8.3 Aglutinacijska oz. hemolitična aktivnost lektinov .....	52
3.2.8.4 Cirkularni dikroizem (CD) .....	52
4. REZULTATI .....	54
4.1. Določitev N-končnega in dela notranjega aminokislinskega zaporedja CnSL .....	54
4.2 Pomnoževanje delnih nukleotidnih zaporedij gena CnSL z verižno reakcijo s polimerazo .....	54
4.2.1 Izolacija celokupne RNA .....	54
4.2.2 Pomnoževanje nezanega zaporedja CnSL z degeneriranimi začetniki .....	55
4.2.3 Pomnoževanje cDNA z metodo hitrega kloniranja 3' koncov cDNA (3'RACE).....	55
4.2.4 Pomnoževanje cDNA z metodo hitrega kloniranja 5' koncov cDNA (5'RACE).....	58
4.2.5 Pomnoževanje gena z metodo hoje po genomu .....	61
4.3 Pomnoževanje celotnega zaporedja CnSL .....	64
4.4 Priprava in pridobivanje rekombinantnega CnSL (rCnSL).....	71
4.4.1 Priprava sistema za izražanje .....	71
4.4.2 Izražanje rCnSL v ekspresijskem sistemu <i>E. coli</i> BL21 (DE3) z indukcijo z IPTG .....	74
4.4.2.1 Poskusno izražanje rCnSL.....	75
4.4.2.2 Pridobivanje rCnSL .....	77
4.4.3 Čiščenje in renaturacija rCnSL iz inkluzijskih telesc .....	77
4.4.4 Gelska filtracija.....	79
4.5 Biokemijska karakterizacija pripravljenega rCnSL .....	82
4.5.1 Afinitetna kromatografija .....	82
4.5.2 Izoelektrično fokusiranje (IEF) .....	83
4.5.3 Aglutinacijska oz. hemolitična aktivnost rekombinantnega lektina .....	84
4.5.4 Analiza vzorca s cirkularnim dikroizmom (CD) .....	85
5. RAZPRAVA .....	86
5.1 Analiza zaporedij cDNA in gena saharozil-lektina.....	86
5.2 Biokemijske lastnosti rekombinantnega saharozil-lektina .....	88
5.3 Zaključek .....	91
6. SKLEPI .....	92
7. LITERATURA .....	93
8. PRILOGE .....	98

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Oligonukleotidni začetniki iz kompletov FirstChoice® RLM-RACE Kit in GenomeWalker™ Universal Kit.....	25
Preglednica II: Načrtovani oligonukleotidni začetniki .....	26
Preglednica III: Oligonukleotidni začetniki iz kompletov CloneJET™ PCR Cloning Kit in pGEM®-T Easy Vector System.....	26
Preglednica IV: Reagenti, uporabljeni za izvedbo degenerirane reakcije PCR.....	29
Preglednica V: Temperaturni program, uporabljen pri degenerirani reakciji PCR in metodi 3'RACE.....	30
Preglednica VI: Uporabljeni reagenti pri izvedbi metode 3'RACE.....	30
Preglednica VII: Uporabljeni reagenti pri izvedbi metode 5'RACE za 1° in 2°PCR .....	32
Preglednica VIII: Temperaturni program, uporabljen pri izvedbi metode 5'RACE.....	32
Preglednica IX: Temperaturni program, uporabljen pri metodi hoje po genomu .....	33
Preglednica X: Uporabljeni reagenti pri izvedbi metode hoje po genomu.....	34
Preglednica XI: Reagenti, uporabljeni pri pomnoževanju celotnega zaporedja cDNA oz. gDNA .....	34
Preglednica XII: Temperaturni program PCR, uporabljen pri pomnoževanju cDNA oz. gDNA .....	35
Preglednica XIII: Ligacija v vektorja pGEM-T Easy in pJET 1,2 .....	36
Preglednica XIV: Reagenti uporabljeni pri PCR na osnovi kolonije .....	39
Preglednica XV: Temperaturni program PCR na osnovi kolonije .....	39
Preglednica XVI: Uporabljeni reagenti za pripravo vključka DNA z restrikcijskima mestoma .....	41
Preglednica XVII: Temperaturni program, uporabljen za pripravo vključka DNA z restrikcijskima mestoma.....	42
Preglednica XVIII: Reagenti za izvedbo restrikcije z encimoma <i>NdeI</i> in <i>BamHI</i> .....	42
Preglednica XIX: Uporabljeni reagenti za ligacijo vključkov CnSL v vektor pET-11a .....	43
Preglednica XX: Uporabljeni reagenti pri izvedbi kontrolne restrikcije .....	43
Preglednica XXI: Reagenti za pripravo gela za NaDS-PAGE .....	49
Preglednica XXII: Načrtovani degenerirani oligonukleotidni začetniki .....	54
Preglednica XXIII: Uporabljeni začetniki v 1°PCR 5'RACE .....	58
Preglednica XXIV:Uporabljeni začetniki v 2°PCR 5'RACE .....	58
Preglednica XXV: Izvedba 1°PCR z metodo hoje po genomu .....	61
Preglednica XXVI: Izvedba 2°PCR z metodo hoje po genomu .....	62
Preglednica XXVII: Pomnoževanje celotne cDNA (1°PCR).....	64
Preglednica XXVIII: Pomnoževanje celotne cDNA (2°PCR) .....	64
Preglednica XXIX: Pomnoževanje celotnega zaporedja CnSL iz gDNA .....	65
Preglednica XXX: Pomnoževanje celotne cDNA z metodo 3'RACE (1°PCR) .....	65
Preglednica XXXI:Pomnoževanje celotne cDNA z metodo 3'RACE.....	66
Preglednica XXXII: Uvedba restrikcijskih mest v CnSL.....	72
Preglednica XXXIII: Izvedba kontrolne restrikcije.....	74
Preglednica XXXIV:Teoretične vrednosti nekaterih parametrov pripravljenih različic CnSL.....	75
Preglednica XXXV: Optična gostota celic v odvisnosti od časa gojenja .....	76

## KAZALO SLIK

Slika 1: Goba megleinka .....	3
Slika 2: Splošna shema priprave rekombinantne DNA z metodo molekulskega kloniranja .....	13
Slika 3: Shematski prikaz vektorja pGEM-T Easy.....	23
Slika 4: Modro-beli seleksijski test .....	23
Slika 6: Shematski prikaz vektorja pET-11a .....	24
Slika 7: Izolacija RNA .....	54
Slika 8: Pomnoženi fragmenti cDNA z degeneriranim 3'RACE.....	55
Slika 9: Poravnava prvih dveh nukleotidnih zaporedij CnSL, dobljenih z metodo degeneriranega 3'RACE .....	56
Slika 10: Poravnava izpeljanih aminokislinskih zaporedij CnSL, dobljenih z metodo degeneriranega 3'RACE .....	57
Slika 11: Shematski prikaz načrtovanja oligonukleotidnih začetnikov za CnSL .....	58
Slika 12: Pomnoženi produkti v 1°PCR z metodo 5'RACE .....	58
Slika 13: Pomnoženi produkti v 2°PCR z metodo 5'RACE .....	58
Slika 14: Poravnava delnih proteinskih zaporedij dobljenih z metodama degenerirani 3'RACE in 5'RACE .....	60
Slika 15: Pomnoženi produkti v 1°PCR z metodo hoje po genomu.....	61
Slika 16: Pomnoženi produkti v 2°PCR z metodo hoje po genomu.....	61
Slika 17: Pomnoženi produkti cDNA v 1°PCR.....	64
Slika 18: Pomnoženi produkti cDNA v 2°PCR.....	64
Slika 19: Pomnoženi produkti cDNA v 1°PCR s 3'RACE .....	65
Slika 20: Pomnoženi produkti cDNA v 2°PCR s 3'RACE .....	66
Slika 21: Poravnava predvidenih proteinskih zaporedij celotne cDNA in gDNA za izolektin CnSL skupine A .....	67
Slika 22: Poravnava predvidenih proteinskih zaporedij celotne cDNA in gDNA za izolektin CnSL skupine B .....	68
Slika 23: Poravnava predvidenih proteinskih zaporedij celotne cDNA (skupin A in B) s predvidenimi proteini CC1G_06022, CC1G_06042 in CC1G_11118 iz bazidiomicete <i>Coprinopsis cinerea okayama</i> .....	70
Slika 24: Poravnava nukleotidnih zaporedij, ki smo jih izbrali za pripravo različic rCnSL 1-4 .....	71
Slika 25: Uvedba restrikcijskih mest v izbrana zaporedja CnSL .....	72
Slika 26: Restrikcija plazmidov pJET in pET-11a .....	73
Slika 27: Ponovna restrikcija plazmida pET-11a .....	73
Slika 28: Kontrolna restrikcija .....	74
Slika 29: Predvidena aminokislinska zaporedja različic CnSL 1-4.....	75
Slika 30: Grafični prikaz poskusnega izražanja različic rekombinantnega CnSL.....	76
Slika 31: Poskusno izražanje rCnSL-2 .....	76
Slika 32: Poskusno izražanje rCnSL-3 .....	76
Slika 33: Poskusno izražanje rCnSL-4 .....	77
Slika 34: Izražanje različic rCnSL.....	77
Slika 35: Čiščenje rCnSL-2 iz inkluzijskih telesc .....	78
Slika 36: Čiščenje rCnSL-3 iz inkluzijskih telesc .....	78
Slika 37: Čiščenje rCnSL-4 iz inkluzijskih telesc .....	78
Slika 38: Grafični prikaz meritev $A_{280}$ (rCnSL-3) v posameznih frakcijah po izvedbi gelske filtracije .....	80
Slika 39: Grafični prikaz meritev $A_{280}$ (rCnSL-4) v posameznih frakcijah po izvedbi gelske filtracije .....	80
Slika 40: rCnSL-3 v frakcijah po gelski filtraciji.....	80
Slika 41: rCnSL-4 v frakcijah po gelski filtraciji .....	80
Slika 42: Združene frakcije rCnSL-3 in 4 po gelski filtraciji in ultrafiltraciji.....	81
Slika 43: Afinitetna kromatografija rCnSL-3 na saharozil-sefaroznem gelu .....	82
Slika 44: Skoncentrirane frakcije rCnSL-3 po gelski filtraciji in afinitetni kromatografiji.....	83
Slika 45: Izoelektrično fokusiranje.....	83
Slika 46: Izgled vzorcev po 16 urah (poskus A) .....	84
Slika 47: Izgled vzorcev po 16 urah (poskus B).....	84
Slika 48: CD-spektra naravnega in rekombinantnega CnSL v dalnjem UV-območju .....	85

## POVZETEK

Glice so zakladnica raznovrstnih biološko aktivnih snovi, ki imajo ugodne prehranske, zdravilne in številne druge učinke. Pomembno mesto med njimi zavzemajo tudi lektini, skupina raznolikih proteinov, ki vežejo ogljikove hidrate. Pred kratkim izoliran saharozil-lektin (SucL20) iz bazidiomicete megleanke (*Clitocybe nebularis*) ima zanimive lastnosti in izkazuje insekticidno aktivnost na ličinkah vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Saharozil-lektinu smo z Edmanovo metodo razgradnje aminokislín določili N-končno in del notranjega aminokislinskega zaporedja. Na podlagi teh zaporedij smo načrtovali degenerirane oligonukleotidne začetnike, ki smo jih uporabili v verižni reakciji s polimerazo (metodi hitrega pomnoževanja 3' cDNA koncev). Z njihovo pomočjo smo dobili delni nukleotidni zaporedji cDNA, na osnovi katerih smo načrtovali specifične oligonukleotidne začetnike, ki smo jih uporabili pri metodi hitrega pomnoževanja 5' cDNA koncev in pri metodi hoje po genomu. Delna nukleotidna zaporedja cDNA, pridobljena z metodama 3' in 5' RACE, smo združili in dobili celotno zaporedje cDNA. V nadaljevanju smo načrtovali še specifične oligonukleotidne začetnike, ki smo jih uporabili za pomnoževanje celotnega zaporedja cDNA. Primerjava dobljenih zaporedij je pokazala, da so zaporedja heterogena, vendar jih lahko vseeno razvrstimo v dve skupini (A in B), pri čemer je zaporedje A bolj podobno zaporedju naravnega saharozil-lektina v primerjavi z zaporedjem B. Med pomnoženimi zaporedji cDNA smo izbrali štiri, iz katerih smo poskusili pridobiti rekombinantne proteine (rCnSL 1-4). Z uporabo plazmidnega vektorja pET-11a in bakterijskega sistema za izražanje *Escherichia coli* smo uspešno pridobili rekombinantni lektin rCnSL-3, ki je saharozil-lektin skupine B. Lektin smo čistili z obarjanjem z amonijevim sulfatom in gelsko filtracijo. Določili smo mu nekatere biokemijske lastnosti in jih primerjali z lastnostmi naravnega saharozil-lektina. Ugotovili smo, da v nasprotju z naravnim lektinom rCnSL-3 nima vezavne specifičnosti za saharozo, njegova izoelektrična točka pa je za dve pH enoti nižja od izoelektrične točke SucL20. Struktturna analiza proteinov s cirkularnim dikroizmom je pokazala, da sta oba lektina pravilno zvita in se med seboj nekoliko razlikujeta. Naravni lektin šibko aglutinira človeške eritrocite vrste A, medtem ko rekombinantni protein na enakem tipu eritrocitov izkazuje hemolitično aktivnost. Različne lastnosti obeh proteinov so posledica razlik v primarni strukturi naravnega in rekombinantnega lektina.

## ABSTRACT

Fungi contain a wealth of various biologically active substances with beneficial nutritional, medicinal and many other effects. Lectins, a group of diverse carbohydrate-binding proteins, have an important role among them. A recently isolated sucrose lectin (SucL20) from the basidiomycete clouded agaric (*Clitocybe nebularis*) possesses interesting features and exerts insecticidal activity against fruit fly larvae (*Drosophila melanogaster*). With the Edman degradation method we have determined partial amino acid sequence including the N-terminal of the sucrose lectin. Based on these, degenerate primers were designed and used in the polymerase chain reaction (rapid amplification of 3' cDNA ends). Partial cDNA sequences were obtained, from which specific primers were designed and used in the rapid amplification of 5' cDNA ends and genome walking. After combining the partial nucleotide sequences (obtained with the 3' and 5' RACE method) a complete cDNA sequence was obtained. Furthermore, new primers were designed for the amplification of the complete coding cDNA sequence. Comparison of acquired nucleotide sequences showed heterogeneity, nevertheless, sequences could be classified in two groups (A and B). In comparison with the sequence B, sequence A shows greater similarity to the sequence of native sucrose lectin. Of all acquired cDNA sequences we have chosen four from which we tried to prepare recombinant proteins (rCnSL 1-4). A recombinant lectin rCnSL-3 was successfully expressed in bacterial expression system *Escherichia coli* using the pET-11a plasmid vector. The sequence of rCnSL-3 is classified as B. Purification of the lectin was performed using the ammonium sulphate precipitation method and by gel filtration. Some biochemical properties of the recombinant lectin have been determined and compared with the characteristics of the native sucrose lectin. In contrary to the native lectin, rCnSL-3 does not possess the binding specificity for sucrose and its isoelectric point is two pH units lower than the isoelectric point of SucL20. Structural analysis of the two lectins (with circular dichroism method) showed, that both proteins are properly folded and that they slightly differ in structure. Native lectin weakly agglutinates human erythrocytes type A, while the recombinant protein exerts hemolytical activity on the same group of erythrocytes. Different properties of the native and recombinant lectins are attributable to differences in their primary structures.

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>θ</b>	eliptičnost [mdeg]
<b>[θ]<sub>mrw</sub></b>	povprečna molarna eliptičnost aminokislinskega ostanka [deg cm <sup>2</sup> /dmol]
<b>1°PCR</b>	primarna reakcija PCR
<b>2°PCR</b>	sekundarna (vgnezdena) reakcija PCR
<b>3' RACE</b>	metoda hitrega kloniranja 3' koncov cDNA ( <u>rapid amplification of 3' cDNA ends</u> )
<b>5' RACE</b>	metoda hitrega kloniranja 5' koncov cDNA ( <u>rapid amplification of 5' cDNA ends</u> )
<b>A<sub>280</sub></b>	absorbanca (negativni logaritem prepustnosti) pri valovni dolžini 280 nm
<b>AK</b>	<u>aminokislina</u>
<b>Amp</b>	antibiotik <u>ampicilin</u>
<b>APS</b>	<u>amonijev peroksodisulfat</u>
<b>BamHI</b>	restriktijska endonukleaza <u>Bacillus amyloliquefaciens</u> sev <u>H</u> , številka <u>I</u>
<b>BLAST</b>	<u>Basic Local Alignment Search Tool</u> (orodje za iskanje osnovnih logičnih poravnav nukleotidnih in aminokislinskih zaporedij)
<b>bp</b>	<u>bazni par</u>
<b>CD</b>	<u>circularni dikroizem</u>
<b>cDNA</b>	komplementarna DNA ( <u>complementary DNA</u> )
<b>CNBr</b>	ciano bromid
<b>CnSL</b>	<u>saharozil-lektin iz gobe Clitocybe nebularis</u>
<b>ConA</b>	lektin <u>konkanavalin A</u> iz stročnice <u>Canavalia ensiformis</u>
<b>Da</b>	dalton: enota za molekulsko maso, ki ustreza 1/12 mase čistega izotopa <sup>12</sup> C
<b>deg</b>	stopinja ( <u>degree</u> )
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	deionizirana voda
<b>DMF</b>	<u>dimetil formamid</u>
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>dNTP</b>	2'-deoksinukleozid-5'-fosfat(i)
<b>EDTA</b>	<u>etilendiamintetraacetat</u>
<b>EF</b>	<u>elektroforeza</u>
<b>g</b>	gravitacijski pospešek: enota za centrifugiranje (g = 9,807 m/s <sup>2</sup> )

<b>gDNA</b>	genomska DNA
<b>gojišče LB</b>	gojišče <u>Luria</u> - <u>Bertani</u>
<b>gojišče LBA</b>	gojišče <u>Luria</u> - <u>Bertani</u> z dodanim antibiotikom <u>ampicilinom</u>
<b>gojišče LBAX</b>	gojišče <u>Luria</u> - <u>Bertani</u> , ki vsebuje še <u>ampicilin</u> , <u>X-gal</u> in IPTG
<b>HEPES</b>	4-(2- <u>hidroksietil</u> )-1-piperazinetansulfonska kislina
<b>HPLC</b>	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti ( <u>High Performance Liquid Cromatography</u> )
<b>IEF</b>	izoelektrično fokusiranje
<b>IJS</b>	Inštitut Jožef Stefan
<b>IPTG</b>	izopropil-β-D-tiogalaktosid
<b>KpnI</b>	restriktionska endonukleaza <u>Klebsiella pneumoniae</u> številka I
<b>λ</b>	valovna dolžina [nm]
<b>LAF</b>	laminarni pretok zraka ( <u>Laminar Air Flow</u> )
<b>LMW</b>	nizka molekulska masa ( <u>Low Molecular Weight</u> )
<b>M</b>	molarnost [mol/L]
<b>M<sub>mrw</sub></b>	povprečna molekulska masa aminokislinskega ostanka proteina [g/mol]
<b>MBL</b>	lektin, ki v sistemu komplementa veže manozo ( <u>mannose-binding lectin</u> )
<b>mM</b>	mini molarnost [ $10^{-3}$ mol/L]
<b>mRNA</b>	informacijska RNA ( <u>messenger RNA</u> )
<b>NaDS</b>	natrijev <u>dodecil sulfat</u>
<b>NdeI</b>	restriktionska endonukleaza <u>Neisseria denitrificans</u> številka I
<b>NEB</b>	New England Biolabs (biotehnološko podjetje)
<b>OD<sub>600</sub></b>	optična gostota pri valovni dolžini 600 nm ( <u>optical density</u> )
<b>P</b>	tlak ( <u>Pressure</u> )
<b>PAGE</b>	poliakrilamidna gelska elektroforeza
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo ( <u>Polymerase Chain Reaction</u> )
<b>PHA</b>	fitohemaglutinin iz navadnega fižola ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )
<b>pI</b>	izoelektrična točka ( <u>Point of Isoelectricity</u> )
<b>rCnSL</b>	rekombinantni CnSL
<b>RNA</b>	ribonukleinska kislina
<b>RF</b>	reverzna faza

<b>SucL20</b>	naravni saharozil-lektin
<b>TAE</b>	pufer <u>Tris-acetat-EDTA</u>
<b>TEMED</b>	<i>N,N,N',N'</i> – tetrametiletilen diamin
<b>TFA</b>	trifluorocetna kislina
<b>Tris</b>	<u>tris</u> (hidroksimetil)aminometan oz. 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3- propandiol
<b>Triton X-100</b>	polietilen glikol-mono-[ <i>p</i> -(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil] eter
<b>UTR</b>	neprevedljiva regija ( <u>Untranslated Region</u> )
<b>WGA</b>	lektin iz pšeničnih kalčkov ( <i>Triticum vulgaris</i> ) ( <u>Wheat Germ agglutinin</u> )
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β- <i>D</i> -galaktopiranozid

#### Kratice nukleotidov:

A adenin  
C citozin  
G gvanin  
T timin  
U uracil  
B G, T ali C  
D G, A ali T  
H A, C ali T  
K G ali T  
M A ali C  
N A, C, G ali T  
R G ali A  
S C ali G  
V A, C ali G  
W A ali T  
Y C ali T  
i inozin

#### Okrajšave imen aminokislin:

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

## 1. UVOD

### 1.1 GLIVE

#### 1.1.1 Pomen in lastnosti gliv

Glive so posebna skupina živih bitij, ki spremljajo človeka že od pradavnine. To dokazuje vsaj 2.400 let stara gliva črnomekinasta mraznica (*Armillaria ostoyae*), ki se nahaja v ZDA, prekriva površino 15 hektarjev in dosega težo do 10.000 ton ter je tako eden izmed najstarejših in največjih organizmov na Zemlji (1, 2).

Glive imajo tudi v današnjem času pomembno vlogo na področju ekologije, gospodarstva in zdravstva. Razgrajujejo odmrle organske snovi v naravi, jih spreminja v humus in tako pomembno sodelujejo pri kroženju snovi v ekosistemih (3). Sposobne so razgraditi celulozo in lignin, pri čemer povzročajo znatno škodo na lesu, gorivu in hrani. Kot paraziti povzročajo tudi bolezni (mikoze) pri ljudeh in živalih (4, 5). Vendar pa glive proizvajajo tudi mnoge snovi, ki jih že mnogo let s pridom uporabljamo v medicini in veterini. To so antibiotiki (penicilini, cefalosporini), imunosupresivi (ciklosporin), ergot alkaloidi, nekateri encimi, hormoni in vitamini (1, 3). Glive pa seveda uživamo tudi kot hrano. V današnjem času si ne moremo predstavljati proizvodnje alkoholnih pihač, pekovskih izdelkov in sirov brez uporabe kvasovk. Prav tako postajajo nekatere kvasovke (*Saccharomyces*, *Kluveromyces*, *Pichia*) nepogrešljivi organizmi pri biokemijskih in genetskih raziskavah ter kot ekspresijski sistem v molekularni biologiji (6). Tehnološki encimi iz nitastih gliv se uporabljajo v živilski industriji, papirni industriji in kot sestavine detergentov (7). Določene vrste gliv, ki so smrtno nevarni zajedalci raznih škodljivih žuželk, se uporabljajo za njihovo zatiranje v poljedelstvu in so okolju prijazna sredstva. Glive so nenazadnje tudi občutljivi kazalci (bioindikatorji) okoljskih sprememb. Ozko so navezane na življenske razmere, v katerih živijo in se hitro odzivajo na okoljske spremembe. Zaradi vse večje onesnaženosti okolja se njihova pojavnost in število v naravi čedalje bolj zmanjšuje (4).

#### 1.1.2 Morfologija in taksonomska razvrstitev gliv

Glive so evkariontski, heterotrofni absorptivni organizmi. Njihova hrana so odmrle organske snovi, zato jih uvrščamo med gniloživke (saprofile) oz. tudi med zajedalce (parazite), ker izkoriščajo snovi celic drugih živih bitij. Živijo tudi v simbiozi z avtotrofnimi organizmi - z modrozelenimi bakterijami ali zelenimi algami in jih v tem primeru imenujemo lišaji. Lahko pa

živijo tudi v sožitju z določenimi vrstami dreves (mikoriza) in večinoma spodbujajo njihovo rast in razvoj (3, 5). Večina gliv je pritrjenih na podlago in ima celične stene iz hitina, redkeje celuloze. Vse celice so obdane s plazmalemo, ki pri glivah vsebuje kot prevladujoči sterol ergosterol. Rezervni polisaharid v celicah je glikogen (3, 8). Metabolizem gliv je aeroben do fakultativno anaeroben. Telo večine gliv je steljka, ki je lahko enocelična ali pa mnogocelična, sestavljena iz dolgih, prostih različno prepletenih votlih nitastih celic imenovanih hife. Bolj ali manj gost preplet hif imenujemo micelij ali podgobje. Glive se razmnožujejo s spolnimi ali nespolnimi sporami, ki so lahko endogene oz. eksogene in se razlikujejo po obliki, velikosti in barvi (1, 9).

Mikologi menijo, da je na Zemlji vsaj 1.500.000 vrst gliv, od tega je poznanih le nekaj več kot 100.000 vrst (1). Uvrščamo jih v posebno kraljestvo gliv (*Fungi*) - delimo jih na prave glive (*Eumycota*) in glive sluzavke (*Myxomycota*). Prave glive obsegajo tiste vrste, ki imajo hife ali so z njimi v tesnem sorodu, imajo celične stene skozi večji del ali celotni življenjski ciklus ter se prehranjujejo izključno z absorpcijo. Glive sluzavke pa so organizmi, ki ne tvorijo hif, nimajo celičnih sten v času rasti in prehranjevanja ter so sposobne zaužitja snovi s fagocitozo. Prave glive so glede na način tvorbe spor oz. na način spolnega razmnoževanja razvrščene v pet razredov: oomicete (*Oomycetes*), hitridiomicete (*Chytridiomycetes*), zigomicete oz. jarmaste glive (*Zygomycetes*), askomicete oz. zaprtotrosnice (*Ascomycetes*) in bazidiomicete oz. prostotrosnice (*Basidiomycetes*). Posebno skupino predstavljajo devteromicete (*Deuteromycetes*), ki med življenjskim ciklom nimajo spolne faze oz. njihova spolna faza ni poznana (5).

### 1.1.2.1 Prostotrosnice (*Basidiomycetes*)

Za ta razred gliv je značilno razmnoževanje s spolnimi sporami - bazidosporami, ki nastajajo eksogeno na betasti strukturi imenovani bazidij. Nespolne spore so pri tem razredu redke (5). Prostotrosnice so pomembna skupina gliv s približno 25.000 znanimi vrstami (1). Delijo se v štiri skupine, od katerih dve (*Hymenomycetes* in *Gasteromycetes*), obsegata makroglive oz. gobe. Ostali dve skupini obsegata mikroglive, to so rje in sneti, ki so znani rastlinski paraziti (5).

### 1.1.2.2 Meglenka ali poprhnjena livka (*Clitocybe nebularis*)

Meglenko uvrščamo med prostotrošnice (*Basidiomycetes*), natančneje v red lističark (*Agaricales*), družino kolobarničark (*Tricholomataceae*) in rod livk (*Clitocybe*) (9). Goba ima klobuk premera od 5 do 20 cm, ki ima na temenu pogosto široko grbo. Pri starejši gobi je klobuk udrt in nekoliko vegast. Je pepelnato ali sajasto sivkast, na osredju pa temnejši (ob suhem vremenu barve zbledijo). Na začetku je predvsem na obrobju belkasto poprhnjen, gladek in bleščeč, s spodvihanimi krajci in ima tanko kožico, ki se zlahka olupi. Meso je belo in čvrsto, kmalu postane mehko in nekoliko vlaknato. Ima močan, skoraj neprijeten sladkoben vonj po moki in kiselkast okus. Gosti, ozki in različno dolgi lističi poraščajo bet in so svetlo rumene barve; z lahkoto jih odstranimo izpod klobuka. Trosni prah je svetlo rumen. Čvrst, prožen in pri dnu odebelen bet (dolg 6 do 15 cm in premera 1,5 do 3 cm) je pri mladi gobi napolnjen z vlaknato gobasto snovjo, pozneje postaja vse bolj votel. Je sivo-rjav, nekoliko svetlejši od klobuka, podolžno vlaknat, z belim opredkom na dnu (2, 10, 11).



Meglenka je zelo pogosta vrsta gobe, predvsem v severnem zmernem pasu (12). Raste v velikih skupinah ali krogih v listnatih in mešanih gozdovih, na jasah ali ob robu gozda. Najdemo jo tudi na travnikih, v parkih in vrtovih. Raste od zgodnje do pozne jeseni oz. do prve zmrzali. Je pogojno užitna goba, torej je ne smemo uživati presne ali premalo kuhanje, vendar pa lahko tudi po ustreznom prekuhavanju povzroči prebavne motnje (2, 10).

Slika 1: Goba meglenka (12)

### 1.1.3 Kemijska sestava gliv

Glive vsebujejo okoli 90 odstotkov vode, od 2,5 do 5,5 odstotkov beljakovin (aminokislin, višjih in nižjih peptidov), od 1 do 6 odstotkov različnih polisaharidov, do 1,5 odstotka maščob (gliceridov in glikolipidov), do 1 odstotek mikroelementov (najpomembnejši so selen, jod, germanij, kalcij, kalij, natrij, železo, krom, fluor, kobalt, baker, mangan, molibden, silicij, cink in fosfor) in vitamine (predvsem iz skupine B, nekatere v manjših količinah tudi vitamin C in D). Glive vsebujejo tudi različna pigmentna barvila, ki imajo kompleksno organsko strukturo. Poleg

tega so vir mnogih toksinov. Obremenjene so tudi s škodljivimi rudninami, kot so svinec, kadmij, železo, živo srebro, arzen in radioaktivni izotopi (jod<sup>131</sup>, prevladuje cezij<sup>137</sup>). Količina teh snovi se povečuje s staranjem gliv, ker te snovi dalj časa črpajo iz tal (2, 9, 11, 13).

#### 1.1.4 Biološko aktivne snovi iz gob

Največji napredek pri raziskovanju gliv se v zadnjem desetletju kaže na področju zdravilnosti gliv. To področje je še vedno malo raziskano (14). Delno ga omejujejo farmacevtski predpisi, saj so vsi pripravki iz gob trenutno deklarirani kot prehranska dopolnila in je gobam tako priznano le preventivno delovanje in ne tudi zdravilno delovanje (kot podpora zdravljenju s klasičnimi metodami). Poleg tega je zgradba gobjih zdravilnih učinkovin zelo zapletena in jih danes še ni mogoče sintetizirati. Medicinski preparati, ki so na tržišču, lahko tako nastajajo le na osnovi izvlečka iz gob. Zdravilno delovanje gob je različno, saj posamezne gobe vsebujejo različne učinkovine kot so polisaharidi, polisaharido-proteinski kompleksi, triterpeni, fenoli, encimi, antioksidanti, proteini in peptidi (15, 16, 17). Manjši deleži zdravilnih snovi se pojavljajo praktično v vsaki gobi. V splošnem je dokazano, da metaboliti zdravilnih gob stimulirajo različne celice imunskega sistema in pomagajo vzpostaviti ravnotesje v telesu, ki je pogosto porušeno zaradi načina življenja ali bolezni (11, 16).

Za razliko od zdravilnih rastlin, ki pretežno delujejo samo na posamezne organe, pa je pri gobah delovanje celovito, vendar počasnejše in manj opazno. Raziskave so pokazale, da je uživanje celotne gobe oz. njenih ekstraktov učinkovitejše kot uživanje posameznih izoliranih spojin, saj ima več spojin aditivno oz. tudi sinergistično delovanje v različnih stadijih bolezni (13). Glavni terapevtski in preventivni učinki gob se kažejo kot protibakterijsko, protivirusno, protitumorno delovanje (zavirajo tako rast kot razvoj raka), znižujejo in uravnavajo krvni tlak, znižujejo in uravnavajo količino krvnega sladkorja, zmanjšujejo količino celokupnega holesterola v krvi, krepijo imunski sistem (tudi pri okužbi z virusom HIV), imajo pomembno antioksidativno delovanje, zmanjšujejo stres z delovanjem na živčni sistem, povečujejo reprodukcijsko sposobnost in potenco, pomagajo pri dihalnih funkcijah in alergijah, krepijo delovanje organov (ledvic, jeter, srca, ožilja) in pomagajo pri utrujenosti, izčrpanosti in nespečnosti (11, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20). Zato so pomembna podpora klasičnemu zdravniškemu zdravljenju, predvsem ko želimo povečati telesno odpornost po zdravljenju (npr. kemoterapiji). Dosedanje klinične

raziskave (kombinacija konvencionalnega zdravljenja in uporabe izvlečkov iz gob pri zdravljenju alergij, diabetesa, več vrst raka, kroničnega hepatitisa B in okužb z virusom HIV) so se izkazale za uspešne (13, 18), zato lahko pričakujemo, da se bo tak način zdravljenja uveljavil v bodoče. Prav tako naj bi se izvlečke iz gob v bodoče uporabljalo tudi pri zdravljenju vnetij, astme, revmatoidnega artritisa, ateroskleroze, tromboze, tuberkuloze in septičnega šoka (16).

V gobah so odkrili tudi spojine, ki imajo protikomplementno aktivnost in bi jih zato lahko uporabljali pri presaditvi organov. Pozornost so pritegnile snovi, ki zavirajo rast multirezistentne bakterije MRSA (na meticilin odporna bakterija *Staphylococcus aureus*) oz. snovi, ki onemogočajo vezavo lipopolisaharida Gram-negativnih bakterij na imunske celice in s tem nastanek septičnega šoka. Nekateri polisaharidi spodbujajo hematopoezo v kostnem mozgu in bi lahko služili pri zdravljenju levkopenije, nastale po kemoterapiji oz. obsevanju. V zadnjem času so pri nekaterih izoliranih spojinah zasledili tudi spodbujanje sinteze živčnega rastnega faktorja, selektivno agonistično vezavo na opioidni receptor κ oz. vezavo na dopaminske receptorje D<sub>1</sub> (13, 16, 18).

## 1.2. LEKTINI

Lektini so raznolika skupina proteinov ali glikoproteinov, ki imajo vsaj dve vezavni mesti za ogljikove hidrate in po vezavi nanje povzročijo aglutinacijo, obarjanje in druge pojave, podobne učinkom specifičnih protiteles (21, 22). Lektini se lahko z veliko afiniteto (reverzibilno (23)) vežejo na specifične monosaharide v polisaharidih, glikoproteinih oz. glikolipidih, in sicer na posamezne monosaharide ali na več različnih hkrati (8). Pri tem ostanejo lastnosti ogljikovih hidratov nespremenjene (24).

### 1.2.1 Kratek pogled v zgodovino lektinov

Prvi lektin je leta 1888 odkril P.H. Stillmark, ki je opazil, da izvleček iz semen navadnega kloščevca (*Ricinus communis*) - ricin povzroči aglutinacijo eritrocitov. Na podlagi te lastnosti so tovrstne izolirane spojine poimenovali hemaglutinini. Pri nadaljnjih raziskavah so opazili, da nekateri hemaglutinini selektivno aglutinirajo krvne celice glede na krvne skupine AB0 in so jih leta 1954 poimenovali lektini (25). Ta beseda izvira iz latinske besede »*legere*«, ki pomeni izbrati, in sicer lektini selektivno izberejo vezavno mesto na glikoziliranih površinah celic (22). Prav s pomočjo lektinov ricina in abrina je Paul Erlich odkril osnovne principe imunologije, ki jih

je objavil leta 1891 (25). Med njimi je bilo tudi odkritje sistema komplementa. Njegove raziskave so kasneje nadaljevali in ugotovili, da se aktivacija komplementa lahko prične tudi z vezavo lektina MBL (ang. mannose-binding lectin) na ogljikove hidrate v bakterijski celični steni. Zato so ta način aktivacije poimenovali »*lektinska pot aktivacije komplementa*« (26, 27). Leta 1960 je P.C. Nowell odkril, da ima fitohemaglutinin (PHA) iz navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*) mitogene lastnosti, torej sposobnost spodbujanja delitve limfocitov T (25). To lastnost so kasneje odkrili tudi pri konkanavalinu A (ConA) iz stročnice *Canavalia ensiformis* in drugih lektinih, ki so od tedaj postali bolj prepoznavni (28). V 60. letih prejšnjega stoletja so ameriški znanstveniki odkrili da aglutinin WGA iz pšeničnih kalčkov (*Triticum vulgaris*) in ConA prednostno aglutinirata maligno spremenjene celice. To lastnost so odkrili tudi pri nekaterih drugih lektinih (25). Desetletje kasneje se je izkazalo, da površinski bakterijski lektini lahko sodelujejo pri vezavi bakterije na fagocitne celice tudi brez prisotnosti opsoninov. Ta pojav so poimenovali *lektinofagocitoza* in je del prirojene imunosti (27). Do leta 1967 je bilo izolirano le manjše število lektinov, ki pa je hitro porastlo po uvedbi afinitetne kromatografije v laboratorijsko praksu (29). S pojavom rekombinantne DNA tehnologije v 80. letih prejšnjega stoletja so raziskovalci lahko začeli karakterizirati tudi lektine, ki jih do tedaj niso uspeli analizirati. V tem času se je razvilo tudi posebno področje molekularne biologije – *glikobiologija*. Slednja se ukvarja s proučevanjem strukture, biosinteze in biologije ogljikovih hidratov ter njihovo vlogo v bioloških sistemih, prav tako se ukvarja tudi z lektini (30). Ker imajo lektini zelo pomembno vlogo pri fizioloških in patoloških procesih v organizmih (31), so tudi v današnjem času predmet mnogih raziskav.

### **1.2.2 Pomen, lastnosti in uporaba rastlinskih in živalskih lektinov**

Lektini so v naravi zelo razširjeni in imajo mnogo funkcij v različnih organizmih. Do sedaj so izolirali in okarakterizirali na stotine lektinov iz virusov, bakterij, alg, gliv, rastlin, živali, telesnih tekočin nevretenčarjev in vretenčarjev ter celičnih membran sesalcev (15, 27, 32).

Rastlinski lektini so skupina najbolje raziskanih lektinov (33). Nahajajo se v koreninah, listih, lubju, cvetovih, čebulicah in korenikah, v največji meri pa v semenih (34). Rastlinski lektini sodelujejo pri shranjevanju hranilnih snovi, njihova glavna fiziološka vloga je obramba pred fitopatogenimi mikroorganizmi, glivami, rastlinojedimi insekti in živalmi (35, 36, 37, 38). Nekateri lektini omogočajo simbiozo med rastlinami in bakterijami, ki vežejo dušik (32, 38).

Večina rastlinskih lektinov je stabilnih v širokem pH območju, obstojnih pri visokih temperaturah in odpornih proti živalskim oz. insektnim proteazam (36, 38). Posledica tega je veliko število škodljivih lokalnih in sistemskih reakcij, ki uvrščajo te snovi v skupino protiprehranjevalnih oz. toksičnih snovi (36, 37). Kljub temu jih nekateri rastlinojedci vseeno prebavijo. Insekticidno delovanje naj bi bilo posledica vezave lektina na sladkorne receptorje v črevesju insektov oz. naj bi temeljilo na spremembi delovanja nekaterih encimov (24, 36, 39), vendar je o samem mehanizmu delovanja do sedaj znanega bolj malo (35). V zadnjih petnajstih letih so bili nekateri lektini uspešno pridobljeni z rekombinantno tehnologijo DNA (npr. lektina iz rastline *Allium sativum* (40)) kot tudi vgrajeni v transgene rastline (lektina iz rastlin *Galanthus nivalis* in *Pisum sativum* (41)), pri čemer se je zmanjšala uporaba strupenih pesticidov in povečala količina pridelane hrane. Pri načrtovanju transgenih rastlin je ključnega pomena, da vgrajeni lektini ne škodujejo netarčnim organizmom (36).

V gastrointestinalnem traktu lahko lektini poškodujejo epiteljske membrane, vplivajo na izgubo epiteljskih celic, motijo prebavo in absorpcijo hranil, povzročajo spremembe v bakterijski flori in spreminjajo imunsko stanje prebavnega trakta. Prodrejo lahko tudi v sistemski obtok, kjer lahko motijo metabolizem lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov, spodbujajo povečanje in/ali atrofijo notranjih organov in tkiv ter povzročijo spremembe v hormonski oz. imunski homeostazi. Lektini inhibirajo številne črevesne encime in povzročijo tudi čezmerno rast črevesnih bakterij, kar lahko vodi do povečanega sproščanja bakterijskih toksinov. Pri prehajanju lektinov v krvni obtok prihaja do nastanka specifičnih protiteles kot tudi do sproščanja histamina iz bazofilcev ter s tem do povzročitve alergijske reakcije (36). Ker so lektini prisotni v velikem deležu v vsakodnevni prehrani, lahko zaradi naštetega pri človeku in živalih pride do akutne zastrupitve, saj je mnogo lektinov odpornih proti termični obdelavi in prisotnim prebavnim encimom. Znanstveniki so zato prekomerno uživanje nekaterih živil (kot so žita, mlečni izdelki, stročnice) povezali s poslabšanjem vnetnih (alergijskih) in prebavnih bolezni pri občutljivejših ljudeh. Glede na raziskave zadnjih let naj bi bili prav lektini eden izmed možnih dejavnikov za nastanek nekaterih avtoimunih bolezni kot so diabetes tipa I in revmatoidni artritis (38, 42). Eden izmed ciljev na področju lektinologije je zato določitev škodljivih lektinov in umik le-teh z jedilnika.

Lektini imajo tudi mnoge pozitivne učinke, saj so v človeškem telesu prisotni kot elementi prirojenega imunskega odziva (27, 43). Selektini, ki so celični adhezijski proteini na zunanjih površinah belih krvničk, sodelujejo pri vnetnih procesih tako, da levkocitom omogočajo prepoznavanje endotelijskih celic, na katere se nato vežejo (8, 44). Interakcije med ogljikovimi hidrati in lektini na površini celic imajo pomembno vlogo v človeškem organizmu pri procesih kot so medcelična prepoznavna, adhezija in migracija celic, aktivacija in diferenciacija celic, nadzor celične rasti, imunomodulacija, opsonizacija mikrobov, fagocitoza, apoptoza, avtofagija in drugih (28, 33, 34, 45, 46). Lektini se velikokrat bolje vežejo na rakave celice v primerjavi z normalnimi celicami, saj se na prvih pojavlja večje število celičnih receptorjev za lektine oz. so površinski receptorji spremenjeni (46). Zato so lektine začeli uporabljati pri načrtovanju protitumorskih zdravil, bodisi zaradi njihove neposredne toksičnosti oz. kot dostavne sisteme drugih toksičnih snovi (45). Toksični lektini lahko izzovejo apoptozo preko aktivacije kaspaz, receptorja Fas in mitohondrijske poti (24, 34, 47). V to skupino uvrščamo lektina PHA in WGA, ki uspešno zavirata rast malignih celic pri raku debelega črevesja in raku dojke (34). Lektini pa lahko izzovejo tudi nekrozo ali apoptozo v povezavi z dlje trajajočim procesom avtofagije (34, 46). Takšen način zdravljenja pri hepatocelularnem karcinomu preizkušajo z uporabo ConA, ki inducira proces avtofagije. Proces je neodvisen od aktivacije limfocitov in predstavlja nov pristop k zdravljenju raka (46). Lektin ConA je še posebej zanimiv, saj je znan mitogen in bi tako sočasno aktiviral tudi limfocite T in dodatno okreplil imunski sistem (34, 46). Trenutno se pri komplementarnem zdravljenju raka dojke in melanomu uporablja lektini ML I-III iz bele omele (*Viscum album*) (34, 47), v predkliničnih preizkušanjih pa je tudi rekombinantna različica rML-I (aviscumin). V kliničnih raziskavah so še ConA, pegiliran-ConA, PHA in WGA (34). Tudi lektin iz česna (*Allium sativum*) ima protitumorsko delovanje in je v zadnjem času predmet mnogih raziskav, saj ga pogosto uživamo kot prehrano (34).

Lektine od leta 1983 uspešno uporabljajo pri prečiščevanju kostnega mozga pred njegovo presaditvijo otrokom s hudo kombinirano imunsko pomanjkljivostjo (ang. Bubble boys). Postopek omogoča presaditev kostnega mozga haploidentičnih donorjev, pri čemer je uspešnost zdravljenja 75-odstotna (27, 48, 49). Ljudje s pomanjkanjem lektina MBL so pogosto tarče mnogih infekcij, kot tudi drugih bolezni kot so sistemski lupus eritematozus, revmatoidni artritis

in cistična fibroza. Terapija z nadomestnim rekombinantnim lektinom (rhMBL) je v eksperimentalni fazi (27).

Patogeni mikroorganizmi izražajo na svoji površini široko paletto lektinov (adhezinov), ki prepoznajo glikokonjugate na gostiteljski celici in s tem pripomorejo k celični adheziji in invaziji. Zato predstavljajo mikrobni lektini primerno tarčo za pripravo novih cepiv (33). V zadnjih letih so raziskovalci odkrili nekaj lektinov, ki se specifično vežejo na gp120 in zavirajo vezavo in zlitje virusa HIV s celicami CD<sub>4</sub> (50), pri čemer imajo lektini različne vezavne specifičnosti. Aktivnost proti virusu HIV izkazujejo lektin iz zvončka (*Galanthus nivalis*), griffitsin iz rdeče alge *Griffithsia*, cyanovirin-N iz alge *Nostoc ellipsosporum*, syctovirin iz cianobakterije *Syctonema varium*, lektin iz velike koprive (*Urtica dioica*) in lektin BanLec iz plodov banane (*Musa acuminata*). Ti lektini predstavljajo potencialno mikrobicidno sredstvo za preprečevanje primarne virusne infekcije (50, 51, 52). Poleg tega bi te lektine uporabili tudi v boju z virusi, ki imajo glikozilirane ovojnice (npr. hepatitis B in C) (50).

Za interakcije med lektini in ogljikovimi hidrati so značilne predvsem vodikove vezi med hidroksilnimi skupinami ogljikovih hidratov in polarnimi funkcionalnimi skupinami aminokislinskih ostankov (44). Interakcije med lektini in sladkorji so specifične, saj jih lahko primerjamo z interakcijami encim-substrat ali antigen-protitelo (45). Lektini so zato zelo uporabni pri karakterizaciji glikoproteinov, celičnih površin, tkiv kot tudi pri študijah rasti in diferenciacije celic (8, 15, 24, 44). Danes so uveljavljeno orodje v biokemiji, biotehnologiji, imunologiji, celični biologiji, in diagnostiki (15, 46). Še posebej uporabni so pri zgodnjem odkrivanju raka, saj nekaterih glikokonjugatov na maligno spremenjenih celicah ni mogoče zaznati z razpoložljivimi monoklonskimi protitelesi (28).

S tehnikami kot so lektinska afinitetna elektroforeza, lektinska afinitetna kromatografija, GLIA (ang. glyccoprotein-lectin immunosorbent assay), ELIFA (ang. enzyme-linked immunofiltration assay) in lektinskimi mikromrežami, se je določitev, ločitev oz. izolacija glikoproteinov zelo poenostavila (24, 27, 28, 53). Razvoj lektinskih mikromrež bliskovito narašča, saj so le-te sposobne hitre in natančne določitve načina glikozilacije vzorca, pri čemer lahko analizo izvedemo z zelo majhno količino vzorca. Tovrstne mikromreže se rutinsko uporablja za

preverjanje ustreznosti glikozilacije na proizvedenih terapevtskih rekombinantnih proteinih (7) kot tudi pri odkrivanju novih biomarkerjev pri različnih boleznih (53).

### **1.2.3 Lektini iz gob**

Pojavnost in količinska vsebnost lektinov je pri višjih glivah večja v primerjavi z višjimi rastlinami (23, 41, 54). Prvi gobji hemaglutinin je v rdeči mušnici (*Amanita muscaria*) odkril W.W. Ford leta 1910 (23). To raziskavo so izvedli z namenom določanja neznanih toksičnih snovi v nekaterih višjih glivah. Pri tem se je izkazalo, da naj bi bili prav lektini eni izmed glavnih akterjev pri parazitizmu nad rastlinami, insekti in nematodi (15, 55). Glede na to, da so lektine odkrili tudi v užitnih gobah in drugih rastlinah, so kasneje sklepali, da aktivnost in toksičnost lektinov nista nujno povezani (23). Gobje lektine so začeli intenzivneje raziskovati po letu 1948.

Lektini se v veliki meri nahajajo v plodiščih gob, manj v miceliju in betu (15). Količinska vsebnost lektinov v določenem delu gobe je spremenljiva glede na razvojno fazo gobe ter kraj in letni čas nabiranja le-te (23). Zaradi teh razlogov se lahko lektini izolirani iz enake gobe razlikujejo v specifičnosti vezave sladkorjev (15, 54). Lektini naj bi v gobah imeli pomembno vlogo pri fizioloških procesih kot so mirovanje, rast, morfogeneza, morfološke spremembe po okužbi s patogenimi mikroorganizmi in molekulskem prepoznavanju celic med zgodnjimi fazami mikorizacije (15, 23, 56). Čeprav so do danes odkrili že veliko gobjih lektinov, pa njihova vloga *in vivo* ostaja v veliki meri še nepoznana (15).

Gobji lektini so zanimivi, saj se od ostalih znanih lektinov zelo razlikujejo glede vezavne specifičnosti za ogljikove hidrate (15). Uporabljamo jih v taksonomskih, embrioloških in bakterioloških študijah kot tudi v študijah sprememb membranskih glikokonjugatov, razvrščanju celic, ločevanju normalnih in maligno spremenjenih celic ter izolaciji membranskih kot tudi serumskih glikokonjugatov (23). Toksične lastnosti gobjih lektinov lahko izkoriščamo za ločevanje različnih vrst celic, saj se na ta način znebimo celic, ki jih ne potrebujemo (23).

Veliko gobjih lektinov je *panaglutininov*, t.j. aglutinirajo eritrocite vseh tipov človeške krvi (15). Nekateri so obstojni v širokem temperaturnem in pH območju (23) in so v grobih izvlečkih pogosto odporni proti proteolizi zaradi agregacije z drugimi proteini (41). Mehanizem

insekticidnega delovanja gobijih lektinov naj bi temeljil na spremembi delovanja nekaterih encimov (24). Študije o njihovi toksičnosti kažejo na to, da bi jih lahko uporabili pri načrtovanju transgenih rastlin (41). Najizrazitejše toksično delovanje med gobjimi lektini (izoliranimi iz dvesto različnih vrst gob) je izkazoval lektin iz rdečebetne polstenke (*Xerocomus chrysenteron*) na modelu vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) in bombaževe sovke (*Spodoptera littoralis*). Na vinski mušici so močnejše insekticidno delovanje zasledili le še pri rastlinskem lektinu iz malega zvončka (*Galanthus nivalis*) (41). Nekateri gobji lektini zavirajo tudi rast rakavih celic. Takšen primer je lektin iz velike zraščenke (*Grifola frondosa*), ki deluje citotoksično na celice HeLa (32).

#### 1.2.3.1 Lektini iz megleanke (*Clitocybe nebularis*)

A. Tétry je s sodelavci leta 1953 objavil članek v katerem zasledimo, da so v gobi megleanki našli aglutinin, ki specifično veže človeške eritrocite tipa A (23). Leta 1978 sta V. Horejsi in J. Kocourek v svoji obsežni raziskavi izolirala tudi lektin iz megleanke. Za to sta uporabila afinitetni ligand  $\alpha$ -D-GalNAc na O-glikozil poliakrilamidnem gelu. Izolirani lektin je imel molekulsko maso 70 kDa, sestavljen je bil iz dveh podenot, njegova pI pa je znašala približno 4,4 (57).

Raziskovalci IJS že več kot desetletje uspešno raziskujejo snovi iz nekaterih vrst gob. Prvi so natančneje proučili snovi iz gobe megleanke in ugotovili, da vsebuje še nepoznan inhibitor cisteinskih peptidaz, ki so ga poimenovali klitocipin (58). Prav tako so z zaporedno afinitetno kromatografijo izolirali več lektinov z različnimi specifičnostmi vezave sladkorjev, in sicer glukozil-specifičen lektin (GlcL30), galaktozil-specifičen lektin (GalL), saharozil-specifičen lektin (SucL20) in laktozil-specifičen lektin (CNL). Vsem lektinom so določili biokemijske lastnosti, še posebej pa so proučili CNL, ki so ga nato tudi pripravili z rekombinantno DNA tehnologijo (59, 60).

Analiza za saharozo specifičnega lektina SucL20 je pokazala, da je molekulsa masa lektina 20.293 Da, vrednost izoelektrične točke pa nad 9,3. Z RF-HPLC določeno N-končno zaporedje je bilo VNPNLPGPNDVFVGFRGTNN, del notranjega zaporedja (po cepitvi lektina s tripsinom) pa GNTQVQVTGTNLCLD (60). SucL20 je v bioloških testih izkazoval toksične učinke na ličinkah vinske mušice (56, 61), šibko aglutinacijsko aktivnost pri vezavi na človeške eritrocite tipa A, B, 0 in goveje eritrocite ter zaviralno aktivnost na kunčjo proteinsko fosfatazo-1 (60).

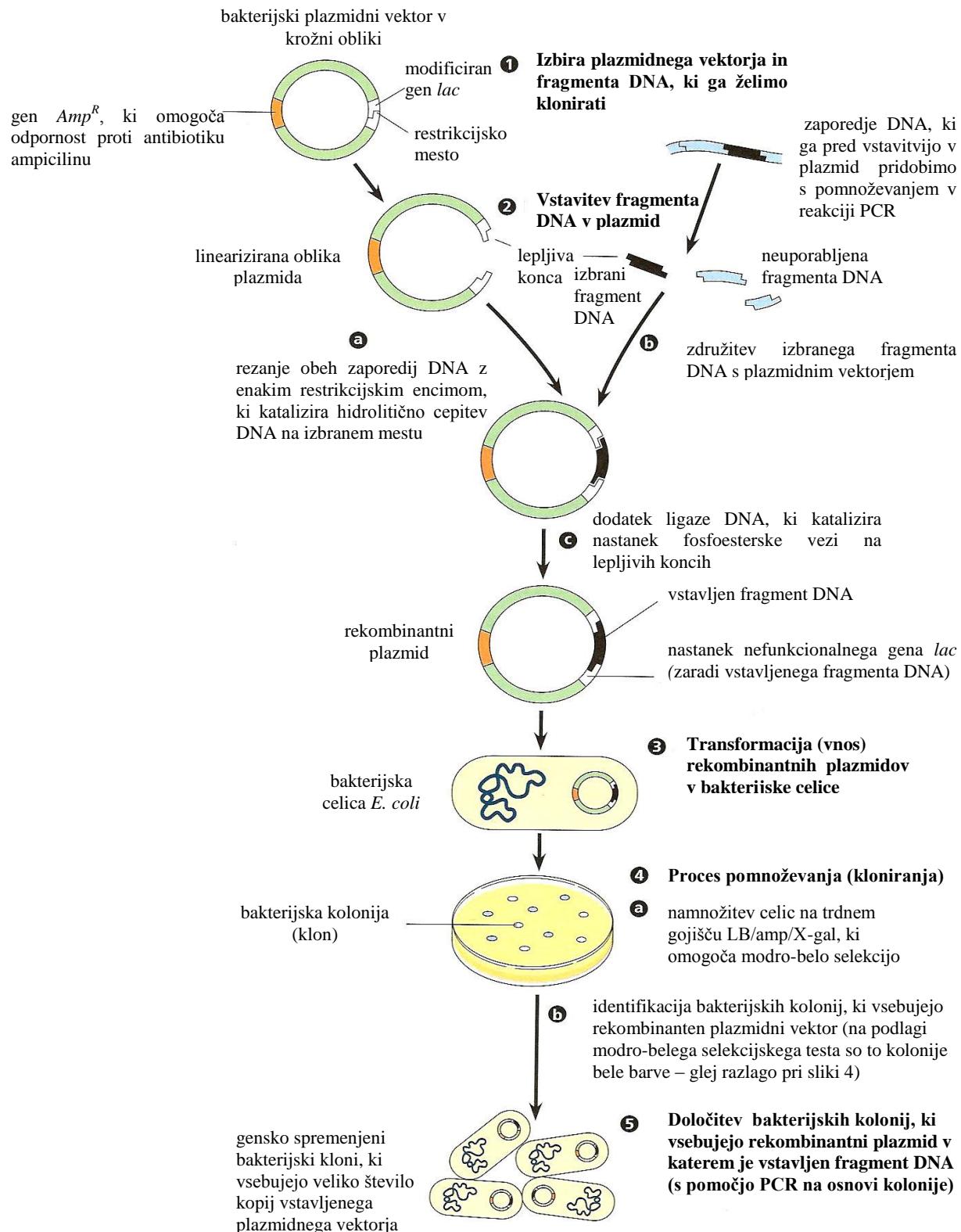
## 1.3 MOLEKULSKO KLONIRANJE IN IZRAŽANJE PROTEINOV V BAKTERIJSKEM SISTEMU *Escherichia coli*

### 1.3.1 Molekulske kloniranje

Rekombinacija DNA ali molekulske kloniranje je kovalentna vključitev fragmenta DNA iz ene vrste celic ali organizma v DNA druge vrste, ki se je sposobna podvojevati. Izberemo lahko praktično katerikoli del DNA in ga pripravimo za kopiranje. Ko se prejemniška celica deli, njene potomke lahko proizvedejo več kopij hibridne DNA; s tem je DNA klonirana. Če fragment z zapisom za nek protein vstavimo navzdol od promotorske regije, gostiteljske celice proizvajajo kopije tega zapisa in proteina. Ta postopek je danes uveljavljen za proizvodnjo večjih količin proteinov, ki so pomembni v medicini, kmetijstvu in temeljnih znanostih in jih je težko oz. dragi pridobiti z drugimi metodami (1, 44).

Osnovne stopnje priprave rekombinantne molekule DNA so sledeče (slika 2):

1. Izbor molekule DNA, ki bo služila kot prenosnik (vektor) za tujo DNA in priprava fragmenta tuje DNA (navadno s pomnoževanjem z reakcijo PCR).
2. Rezanje deoksiribonukleotidnih verig vektorja in fragmenta tuje DNA z enako restriktivno endonukleazo ter vstavitev fragmenta v vektor. Pri tem nastane rekombinantna (hibridna) molekula DNA.
3. Vnos rekombinantne DNA v gostiteljski organizem (pogosto je to bakterijska celica, lahko pa je to tudi kvasovka, nitasta gliva, živalska ali rastlinska celica), kjer se lahko podvojuje. Prizem tuje DNA v celico imenujemo transformacija.
4. Proces pomnoževanja (kloniranja) plazmidnega vektorja z vstavljenim fragmentom DNA v selekcijskem gojišču. Pri tem se pomnožijo le bakterijske celice, ki smo jih uspešno transformirali.
5. Določitev gostiteljskih kolonij (klonov), ki so sprejele in pomnožile rekombinantno DNA. Pri tem si pomagamo z reakcijo PCR na osnovi kolonije, kjer na začetku visoka temperatura povzroči lizo bakterijskih celic, v nadaljevanju reakcije pa pride do prileganja specifičnih oligonukleotidnih začetnikov na zaporedje poznanega plazmidnega vektorja. Rezultate reakcije PCR na osnovi kolonije preverimo z izvedbo agarozne elektroforeze.



Slika 2: Splošna shema priprave rekombinantne DNA z metodo molekulskega kloniranja (1)

Dvojna vijačnica DNA je prikazana v obliki modrega traku; s črno barvo je označen fragment DNA, ki ga želimo klonirati.

### 1.3.2 Bakterijski ekspresijski sistem *Escherichia coli*

*Escherichia coli* je po Gramu negativna, fakultativno anaerobna, paličasta bakterija iz družine enterobakterij (*Enterobacteriaceae*). Pri človeku in toplokrvnih živalih je del normalne črevesne flore. Bakterija *E. coli* je načeloma nepatogen mikroorganizem, vendar pa lahko patogeni sevi povzročajo hude gnojne infekcije in diarejo (8).

Bakterija *E. coli* je bila prvi genetsko in molekularno-bioološko raziskani mikroorganizem in prva, ki je bila spremenjena z genskih inženirstvom ter podvržena proizvodnji rekombinantnih proteinov (62). Iz modela za temeljne znanstvene raziskave se je razvila v industrijski mikroorganizem in trenutno predstavlja najpogosteje uporabljan prokariontski ekspresijski sistem (63). Postala je standardni organizem pri proizvodnji encimov za diagnostične in analizne namene. Uporablja se tudi za sintezo farmacevtsko pomembnih proteinov, ki ne zahtevajo zapletenih posttranslacijskih sprememb in niso sestavljeni iz več različnih podenot (64). To so rekombinantni interferoni, antikoagulanti, inzulin, človeški rastni hormon, paratiroidni hormon in lososov kalcitonin (7).

Široka uporabnost genetsko spremenjenih sistemov bakterije *E. coli* temelji na določenih prednostih pred ostalimi ekspresijskimi sistemi. Te vključujejo kratek generacijski čas (bakterija se v ugodnih pogojih podvoji v dvajsetih minutah (1)), veliko gostoto celic v kulturi (63), visok delež izraženega heterolognega proteina (več kot 20 % vseh celičnih proteinov (64)), pri čemer bakterije rastejo na cenениh in enostavnih gojiščih (65). Poznani so tudi številni naravni bakterijski promotorji in promotorji litičnih bakteriofagov (T3, T5, T7 in SP6), ki jih lahko s pridom izkoriščamo. Bakterija *E. coli* je lahko dostopna in genetsko dobro okarakterizirana, njen genom je v celoti poznan od leta 1997 (7). Zaradi tega dandanes obstaja veliko raznolikih produkcijskih sevov in zanje načrtovanih ekspresijskih vektorjev (63). Predstavlja uveljavljen ekspresijski sistem tudi za regulatorne ustanove, saj le-te dovoljujejo pridobivanje nekaterih zdravilnih učinkovin z njeno uporabo.

Genetsko spremenjeni ekspresijski sistemi bakterije *E. coli* pa imajo tudi pomanjkljivosti. Ena izmed njih je odsotnost posttranslacijskih mehanizmov (glikozilacije, tvorbe disulfidnih vezi (62)), pri čemer lahko posledično pride do nepravilnega zvitja proteina in do njegove

nefukcionalnosti. *E. coli*, ki je po Gramu negativna bakterija, ima v svoji celični steni prisoten lipopolisaharid. Ta se po propadu bakterije sprosti v gojišče in predstavlja nevarno nečistočo predvsem pri sintezi zdravilnih učinkovin, ki jih v telo vnašamo intravensko. Lipopolisaharid pri intravenskem vnosu deluje kot močan pirogen (63). Zato je pri sintezi tovrstnih učinkovin nujno čiščenje produkta s sterilno filtracijo oz. ultrafiltracijo, kar predstavlja dodaten strošek za proizvajalca. Poleg tega ima bakterijski ekspresijski sistem *E. coli* omejitve pri izločanju rekombinantnega proteina v gojišče. Navadno se proteini pod vplivom močnih promotorjev nakopičijo v citoplazmi bakterije v obliki agregatov – inkluzijskih teles (63, 64). Izolacija inkluzijskih teles in naknadno zvijanje proteinov v aktivno konformacijo predstavlja prvi korak čiščenja proteinov, pri čemer so pogoste velike izgube, obstaja pa tudi možnost, da se biološka aktivnost po zvijanju ne vzpostavi. Za proteine z nižjo komercialno vrednostjo (kot so to npr. tehnični encimi), sta čiščenje inkluzijskih teles in ponovno zvijanje časovno in cenovno neugodna. Bakterija lahko izloča rekombinantne proteine tudi v periplazmo, na zunanjji del celične stene oz. jih izloča v gojišče, vendar moramo za to predhodno opraviti obsežnejše genetske spremembe na bakterijah oz. uporabiti kompleksnejše ekspresijske vektorje (62, 63). Proteini, pridobljeni v periplazmi celice, imajo zelo nizke izkoristke, zato se ta način pridobivanja uporablja le za proizvodnjo manjših količin proteinov, po katerih je manj povpraševanja, kot so to npr. zdravila sirote (ang. orphan drugs) (64). Gre za zdravila, ki so namenjena odkritju, preventivi ali samemu zdravljenju redkih bolezni. Rekombinantni proteini (ki se kopičijo v citoplazmi) lahko na N-koncu ohranijo iniciacijski metionin, ki pa pogosto vpliva na imunogenost proizvoda. Nenazadnje lahko predstavlja težavo tudi razgradnja proteinskih produktov z bakterijskimi (endogenimi) proteazami (7).

Velikemu številu omenjenih težav se lahko izognemo z izboljšavami produkcijskih sefov bakterije *E. coli* in izboljšavami plazmidnih vektorjev ter z delnimi spremembami gena za rekombinantni protein (64). Prav tako lahko izboljšamo lastnosti gojišča z dodajanjem različnih snovi, ki pripomorejo k donosnejši sintezi proteina (63). Čeprav se v današnjem času uporablja za proizvodnjo proteinov tudi veliko drugih ekspresijskih sistemov, pa bakterija *E. coli* ostaja pomemben sistem, ki se še naprej razvija in tako ponuja vedno nove možnosti za proizvodnjo rekombinantnih proteinov.

## 2. HIPOTEZA IN NAMEN DELA

Raziskovalci Odseka za biotehnologijo na Inštitutu Jožef Stefan od leta 2004 uspešno proučujejo lektine iz gobe megleinke (*Clitocybe nebularis*). Izoliranim lektinom so določili biokemijske lastnosti in ugotavljali njihove biološke aktivnosti. Ugotovili so, da saharozil-lektin (SucL20) specifično veže sladkor saharozo in se od ostalih lektinov, izoliranih iz gobe megleinke, znatno razlikuje v izoelektrični točki (60). Poleg tega ima dokazano tudi insekticidno aktivnost na ličinkah vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) (56, 61) in je zato zanimiv za nadaljnje raziskave.

Naša hipoteza je, da s poznavanjem delnega aminokislinskega zaporedja lektina SucL20, izoliranega iz gobe megleinke, lahko pripravimo primerne začetnike, ki nam bodo omogočili določitev celotnega genomskega zaporedja lektina, njegovo izražanje v *E. coli* in izolacijo rekombinantnega proteina.

Namen diplomske naloge bo priprava rekombinantnega saharozil-lektina (rCnSL) in njegova karakterizacija. Pripravili ga bomo z uporabo tehnik molekulskega kloniranja, ustrezno čistili in nato še preverili, ali bo tudi rekombinanti lektin izkazoval podobne lastnosti kot jih naravni lektin. Najprej bomo naravnemu saharozil-lektinu z Edmanovo metodo razgradnje aminokislin določili N-končno in del notranjega aminokislinskega zaporedja. Analizirana dela aminokislinskega zaporedja bomo prevedli v nukleotidno zaporedje in načrtovali ustrezne oligonukleotidne začetnike za pomnožitev nukleotidnega zaporedja z uporabo verižne reakcije s polimerazo (PCR). Z več različnimi izvedbami PCR in uporabo rekombinantne DNA tehnologije bomo postopoma dobili delna nukleotidna zaporedja, ki jih bomo s pomočjo računalniških programskega orodij sestavili v celoto in dobili zapis naravnega saharozil-lektina. Celotno zaporedje bomo nato vstavili v izbran ekspresijski plazmid, slednjega pa nato transformirali v bakterijski ekspresijski sistem *Escherichia coli*. Izražen rekombinanti saharozil-lektin (rCnSL) bomo nato očistili z gelsko izključitveno kromatografijo in okarakterizirali njegove biokemijske lastnosti.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI IN LABORATORIJSKA OPREMA

##### 3.1.1 Reagenti

<i>Proizvajalec:</i>	<i>Reagent:</i>
➤ Alkaloid Skopje, Makedonija	AgNO <sub>3</sub>
➤ Amersham Biosciences, ZDA	označevalec velikosti proteinov pri NaDS-PAGE: LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis
➤ Apollo Scientific, Velika Britanija	IPTG
➤ AppliChem, Nemčija	NaCl
➤ Carlo Erba, Italija	amonijev sulfat, absolutni etanol, glicerol, HCl (37%), kloroform, NaOH, ocetna kislina
➤ Invitrogen, ZDA	barvilo DNA: SYBR® Safe, TRIzol®
➤ Fermentas, Litva	označevalec velikosti molekulskih mas 100 bp oz. 1 kb: GeneRuler™ 100 bp oz. 1kb DNA Ladder Plus EF nanašalni pufer: 6x Loading Dye Solution
➤ Fluka, Švica	akrilamid, glukoza, KCl, MnCl <sub>2</sub>
➤ GE Healthcare, Švedska	Coomassie Brilliant Blue (PhastGel Blue R-350)
➤ Merck, Nemčija	HCHO, t-butanol, metanol, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , TEMED, urea
➤ Pharmacia, Švedska	sefaroza (Sepharose CL 4B), široki označevalec izoelektričnih točk: Broad pI Calibration Kit
➤ Pierce, ZDA	CNBr, TFA
➤ Serva, Nemčija	agaroza, APS, β- merkaptoetanol, citronska kislina EDTA, HEPES, NaDS, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O Tris, Triton X-100,
➤ Sigma, ZDA	agar, ampicilin, CaCl <sub>2</sub> , kazeinski hidrolizat-tripton, kvazni ekstrakt, MgCl <sub>2</sub>
➤ Sigma-Aldrich, ZDA	acetonitril

### 3.1.2 Laboratorijska oprema

<i>Laboratorijska oprema:</i>	<i>Proizvajalec:</i>
apertura za agarozno EF	Owl Easy Cast Mini Gel System (modela: B1A, B2), Thermo Fisher Scientific, ZDA
aparatura za fotografiranje gelov	Sistem UVItec, UVItec, Velika Britanija
aparatura za HPLC	Hewlett-Packard series 1100 system, HP, Nemčija
apertura za NaDS-PAGE	Mini-Protean II®, Bio-Rad, ZDA
aparatura za PCR	Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, AB, ZDA
avtomatizirana apartura za EF in IEF	PhastSystem, Pharmacia, Švedska
avtomske pipete (10 - 5000 µL)	Eppendorf, Nemčija
avtoklav	Varioklav, H+P Labortechnick GmbH, Nemčija
avtomski stresalnik	Centromat HK, B.Braun Biotech International, ZDA
centrifuge	Eppendorf 5424, 5415 R in 5804 R, Eppendorf, Nemčija Sorvall RC-5C Plus, Sorvall, ZDA
centrifugirke (GSA, GS-3 in SS-34)	Sarstedt, Nemčija
filtri za sterilno filtracijo (0,2 µm)	Minisart, Sartorius, Nemčija
hladilnik	Gorenje, Slovenija
inkubator	Binder BD 115, Binder, Nemčija
kolona za HPLC	ChromSpher C8 (100 × 3 mm), Chrompack, Nizozemska
komora z laminarnim pretokom zraka	SC-R Labcaire, Velika Britanija
magnetno mešalo	Rotamix SHP-10, Tehnica, Slovenija
mikrotitrskra plošča	Nunclon Delta SI, Nunc, Danska
mikrovalovna pečica	Zanussi ZM 21 MS, Zanussi, Italija
napajalnik za elektroforezo	Power Pack Basic, Bio-Rad, ZDA
naprava za določanje zaporedja AK	Procise Protein Sequencing System 492, PE Applied Biosystems, ZDA
orbitacijski stresalnik	Vibromix 10, Tehnica, Slovenija
pH-meter	Mettler Toledo Seven Easy, ZDA
sonifikator	Digital Sonifier W-450 D, Branson, ZDA

spektrofotometra	Lambda 25, PerkinElmer, ZDA
	NanoDrop ND-2000c, NanoDrop Technologies, ZDA
spektropolarimeter CD	CD Spectrometer model 62A DS, Aviv inc, ZDA
tehnci	AND GH-252-EC, A&D Instruments, Velika Britanija
	Vibra AJH 4200CE, Shinko Denshi Vibra, Japonska
termoblok	TS1 Thermo Shaker, Biometra, Nemčija
ultrafiltracijska celica	Amicon 8200, Amicon div., ZDA
UV transiluminator	Visi-Blue™ VB-26, UVP, ZDA
vakuumski koncentrator	Speedvac, Savant, ZDA
vibracijski stresalnik	EV-202, Tehntica, Slovenija
zamrzovalnik (-20°C)	Gorenje, Slovenija
zamrzovalnik (-80°C)	Sanyo MDF-53V, Sanyo Electric Co., Japonska

### 3.1.3 Kompleti reagentov

- komplet za izolacijo RNA: *TRIzol® Plus RNA Purification Kit* (Invitrogen, ZDA)
- komplet za prepis RNA v cDNA: *RETROScript® Kit*, (AppliedBiosystems, ZDA)
- komplet za izvedbo 3' oz. 5' RACE: *FirstChoice® RLM-RACE Kit* (Applied Biosystems, ZDA)
- kompleta za pomnoževanje gena z metodo hoje po genomu: *GenomeWalker™ Universal Kit* in *Advantage® 2 PCR Kit* (BD Biosciences Clontech, ZDA)
- komplet za izolacijo fragmentov nukleinskih kislin iz agaroznega gela oz. za direktno čiščenje produktov PCR: *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, ZDA)
- kompleta za kloniranje produktov PCR: *CloneJET™ PCR Cloning Kit* (Fermentas, Litva) in *pGEM®-T Easy Vector System* (Promega, ZDA)
- komplet za izolacijo in čiščenje plazmidne DNA: *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, ZDA)

### 3.1.4 Biološki material

#### a) Glivni material

Raziskovalci IJS so oktobra 2004 nabrali plodišča glive meglenke na Krasu (oznaka vzorca CnK3) ter na Vrhu nad Želimljami (oznaka vzorca CnV3). Iz svežih plodišč so izolirali micelij in dokazali, da spada v vrsto *Clitocybe nebularis*. Vzorci svežih plodišč so bili homogenizirani v terilnici s tekočim dušikom in shranjeni v alikvotih pri -80°C (za izolacijo RNA in gDNA).

Visokomolekularno gDNA so izolirali po protokolu za izolacijo genomske DNA iz nitastih gliv, gob in rastlinskih tkiv (58). Shranjeni vzorci so bili izhodni material za naše delo.

b) Naravni saharozil-lektin

Med mnogimi lektini gobe megleanke so raziskovalci IJS s pomočjo sladkorne afinitetne kromatografije z uporabo saharozil-sefarozne kolone izolirali saharozil-lektin (SucL20). Po nanosu ekstrakta plodišča in spiranju kolone, so vezan lektin eluirali z 0,2 M saharozo oz. 0,01 M NaOH. Eluirane frakcije SucL20 so združili, skoncentrirali in vzorce shranili pri -80°C (60). Naravni saharozil-lektin smo uporabili za določitev N-končnega aminokislinskega zaporedja in pri določanju strukture s CD-spektroskopijo.

c) Bakterijski sevi

Pri izvedbi molekularno-bioloških tehnik smo uporabljali bakterijske celice vrste *Escherichia coli*, prilagojene za delo v laboratoriju, in sicer:

- kompetentne celice *E. coli* DH5 $\alpha$ , sev K12 (genotip: F $^-$   $\Phi$ 80(*lacZ*)ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK $^+$ , mK $^+$ ) *phoA supE44 λ thi-1 gyrA96 relA1*), ki smo jih sami vzgojili iz celic proizvajalca Invitrogen, ZDA in jih uporabili pri molekulskega kloniranju;
- kompetentne celice *E. coli* BL21 (DE3) (genotip: F $^-$  *ompT hsdSB(rB $^+$ , mB $^+$ ) gal dcm* ( $\lambda$ DE3)) podjetja Novagen, ZDA, ki smo jih uporabili kot ekspresijski sistem, za pridobivanje rekombinantnega proteina. Prednost teh celic je, da imajo inaktivirano proteazo (*omp T*), kar zmanjša možnost razgradnje izraženih proteinov.

d) Eritrociti

Za ugotavljanje specifičnosti vezave rekombinatnega lektina smo uporabili človeške eritrocite tipa A, ki nam jih je priskrbel dr. Urban Švajger z Zavoda RS za transfuzijsko medicino v Ljubljani. Eritrociti so bili pridobljeni s centrifugiranjem sveže krvi in nato sprani s fiziološko raztopino (0,9 % NaCl). Tako pripravljeni eritrociti (shranjeni pri 4°C) so bili uporabni dokler se supernatant ni obarval rdeče – slednje je nakazovalo hemolizo eritrocitov.

### 3.1.5 Gojišča

Uporabljali smo tekoče oz. trdno gojišče LB (Luria-Bertani), ki je posebej prilagojeno za gojenje bakterijskih celic *E. coli*. Vsa gojišča smo shranjevali pri 4°C. Način priprave gojišč je bil sledeč:

- **tekoče gojišče LB (1L):** 5 g kvasni ekstrakt, 10 g kazeinski hidrolizat (tripton), 10 g NaCl in do 1L dH<sub>2</sub>O. Gojišče steriliziramo z avtoklaviranjem 20 min pri 121°C in P = 2,1 bar.
- **tekoče gojišče LBA:** sterilnemu gojišču LB dodamo v aseptičnih pogojih antibiotik ampicilin v razmerju 100 µg Amp/mL gojišča LB.
- **trdno gojišče LB (1L):** se od zgoraj opisanega tekočega gojišča LB razlikuje le po tem, da v gojišče zatehtamo še 15 g agarja, preden dodamo dH<sub>2</sub>O in gojišče steriliziramo z avtoklaviranjem 20 min pri 121°C in P = 2,1 bar. Ko se gojišče ohladi na 50-55°C, ga vlijemo v sterilne petrijevke. Delamo v aseptični komori, ki ima laminarni pretok zraka.
- **trdno gojišče LBA (1L):** pripravimo na enak način kot trdno gojišče LB, ki pa mu pred vlivanjem v sterilne petrijevke dodamo še 100 µg Amp/mL gojišča LB.
- **trdno gojišče LBAX (1L):** pripravimo na enak način kot trdno gojišče LBA in mu ob ohladitvi na 50-55°C dodamo še 1 mL 1M IPTG in 0,5 mL X-gal (c = 100 mg X-gal/mL DMF). Tako pripravljeno gojišče vlijemo v aseptičnim pogojih v sterilne petrijevke.
- **tekoče gojišče S.O.C. (Super Optimal Broth z dodatki):** 2 % m/v tripton, 0,5 % m/v kvasni ekstrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glukoza. Gojišče filtriramo skozi sterilni filter s porami 0,2 µm in shranimo v hladilniku.

### 3.1.6 Raztopine in pufri

Raztopini za pripravo kompetentnih celic:

- **raztopina TBCa:** 10 mM HEPES, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub> in 250 mM KCl. Raztopino pripravimo tako da najprej zmešamo HEPES, CaCl<sub>2</sub> in KCl, zmes raztopimo v dH<sub>2</sub>O in pH uravnamo na 6,7 z raztopino KOH. V tako pripravljeno raztopino dodamo še MnCl<sub>2</sub> in nadalje filtriramo raztopino skozi sterilni filter s porami 0,2 µm. Raztopino hranimo pri 4°C.
- **raztopina TBCaG** je raztopina TBCa, ki ji dodamo še 15% glicerol. Za pripravo 1 mL take raztopine potrebujemo 185 µL 80 % glicerola in 815 µL raztopine TBCa. Končno raztopino hranimo na ledu do njene uporabe.

Pufri (hranimo jih pri 4°C, razen pufra TAE):

- *eritrocitni pufer*: 20 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl (pH 7,4).
- *pufer za afinitetno kromatografijo*: 20 mM Tris-HCl, 0,4 M NaCl (pH 6,5).
- *pufer za gelsko filtracijo*: 0,02 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl (pH 7,5).
- *pufer TAE (Ix)*: 0,04 M Tris-acetat, 1mM EDTA (pH 8,0).
- *pufer TET*: 50 mM Tris-HCl, 2mM EDTA, 0,1 % Triton X-100 (pH 7,5).

Raztopine za NaDS-PAGE:

- *pufer za koncentracijski gel*: 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8). Pufer avtoklaviramo.
- *pufer za ločevalni gel*: 0,5 M Tris-HCl (pH 8,8). Pufer avtoklaviramo.
- *elektroforezni pufer*: 29 g Tris baze, 144 g glicina, 10 g NaDS, do 1 L dH<sub>2</sub>O (pH 8,3).
- *nanašalni pufer*: 2,5 mL 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 2 mL glicerola, 4 mL 10% NaDS, 0,5 mL 0,1% bromfenol modro, 1 mL dH<sub>2</sub>O. Pufer hranimo pri 4°C.
- *0,1 % raztopina Coomassie brilliant blue*: 5 tablet Coomassie PhastGel blue R-350, 200 mL dH<sub>2</sub>O in 800 mL etanola.
- *10% razbarvalna raztopina*: 10% (v/v) etanola in 5% (v/v) CH<sub>3</sub>COOH.
- *30% razbarvalna raztopina*: 30% (v/v) etanola in 10% (v/v) CH<sub>3</sub>COOH.
- *50% razbarvalna raztopina*: 50% (v/v) etanola in 12% (v/v) CH<sub>3</sub>COOH.
- *razvijalna raztopina* (pri barvanju z AgNO<sub>3</sub>): 28,5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,5 mL HCHO do 1L dH<sub>2</sub>O.

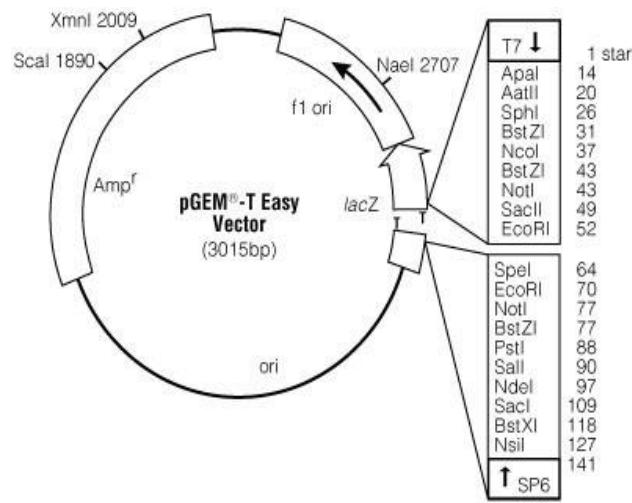
### 3.1.7 Plazmidi

Produkte verižne reakcije s polimerazo smo klonirali s pomočjo dveh različnih lineariziranih plazmidnih vektorjev. To sta bila pGEM-T Easy (Promega, ZDA) in pJET 1.2/blunt cloning vector (Fermentas, Litva). Za pridobivanje rekombinantnega proteina v bakterijskih celicah *E. coli* smo kot ekspresijski vektor uporabili plazmid pET-11a (Novagen, ZDA). Vsi trije plazmidi so z nekaterimi najpomembnejšimi značilnostmi predstavljeni v nadaljevanju.

**pGEM®-T Easy** (slika 3) je sestavljen iz replikacijskih zaporedij (ori in f1 ori), multiplega mesta za kloniranje (MCS), promotorjev za *in vitro* transkripcijo (promotorja za polimerazo RNA T7 in SP6), genom za odpornost proti ampicilinu (*Amp'*) in delom operona *lac*, ki vsebuje gen za β-galaktozidazo. Plazmid je zasnovan tako, da omogoča neposredno ligacijo produktov PCR preko

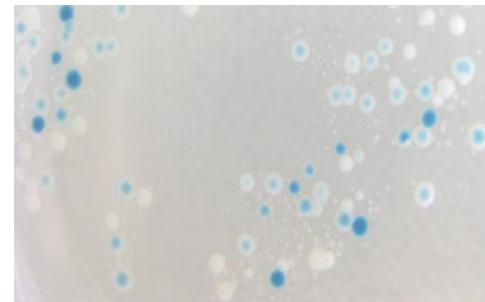
lepljivih concev, pri čemer mora biti produkt PCR adeniliran na 5' koncu. To dosežemo z uporabo polimeraze *Taq*, ki na oba 5' konca produkta doda nukleotid A (66).

S plazmidom pGEM-T Easy in celicami *E. coli* *DH5α* smo lahko izvedli modro-beli selekcijski test (slika 4), saj le-te omogočajo α-komplementacijo gena β-galaktozidaze plazmida. V primeru, da bakterijska celica sprejme plazmid (brez vključka), ostane gen za β-galaktozidazo aktivен in se na selekcijskem gojišču LBA/IPTG/X-gal inducira zaradi prisotnosti IPTG. Encim nato cepi substrat X-gal in nastane modro obarvan produkt (modro obarvane kolonije). Če bakterija

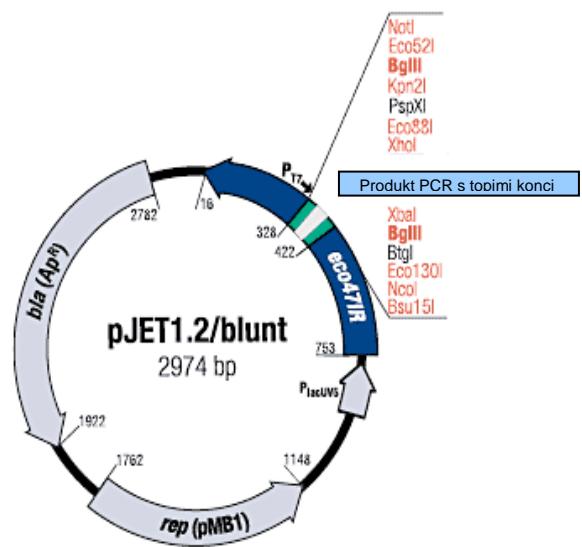


Slika 3: Shematski prikaz vektorja pGEM-T Easy (66)

sprejme plazmid z vključkom, pa slednji povzroči nastanek nefunkcionalnega gena za β-galaktozidazo in encim ni sposoben cepiti substrata, zato ostanejo kolonije bele barve (7).



Slika 4: Modro-beli selekcijski test

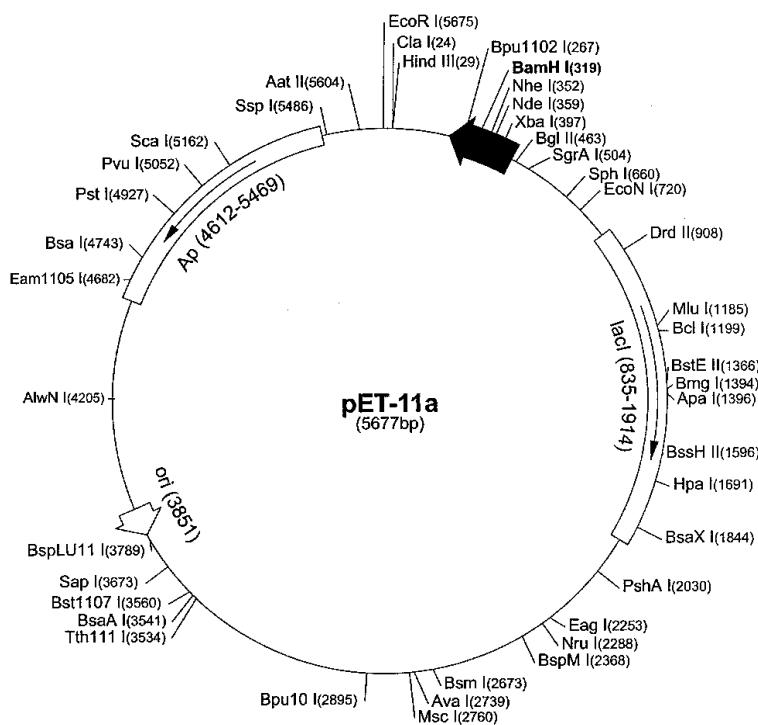


Slika 5: Shematski prikaz vektorja pJET 1,2 (67)

Plazmid omogoča ligacijo produktov PCR preko topih koncev, če smo predhodno uporabili polimerazo *Pfu* oz. *Pfx*. Ob uporabi polimeraze *Taq*, pa produkte PCR z lepljivimi konci preoblikujemo s posebno polimerazo (priloženo kompletu) v produkte s topimi konci, kot je navedeno v navodilih proizvajalca. Prednost uporabe plazmida pJET, v primerjavi s plazmidom pGEM-T, je v njegovi uspešnosti ligacije produkta PCR v zelo kratkem času (67).

**pET-11a** je eden najuspešnejših plazmidov za kloniranje in izražanje rekombinantnih proteinov v bakteriji *E. coli*. Nadzor nad izražanjem proteina omogoča močan bakteriofagni promotor T7. Izražanje rekombinantnega proteina lahko poteka le v bakterijskih sevih s kromosomskim zapisom za polimerazo RNA T7 (npr. *E. coli* BL21 (DE3)). Polimeraza RNA T7 je pod nadzorom promotorja *lac*, ki se aktivira po indukciji z IPTG ali laktozo. Pri tem nastajajo velike količine polimeraze RNA T7, ki se veže na promotor T7 in prepiše vstavljeni gen. Zaradi močne aktivnosti in specifičnosti polimeraze RNA T7 se izražajo velike količine tarčnega proteina. V

vektor je vstavljen še gen *lacI* za represorski protein LacR, ki z vezavo na operator operona *Lac* prepreči konstitutivno prepisovanje genov oz. »puščanje promotorja«. Plazmid vsebuje še replikacijsko zaporedje (ori), gen za odpornost proti ampicilinu (*Ap*) in veliko število restriktionskih mest, med katera lahko (po cepitvi z izbranimi restriktazami) vstavimo zapis za rekombinantni protein (7, 68).



Slika 6: Shematski prikaz vektorja pET-11a (68)

### 3.1.8 Encimi

Pri molekulske kloniranju smo uporabljali sledeče encime:

- termostabilno polimerazo **Taq** (Dream Taq™ DNA Polymerase, Fermentas, Litva);
- polimerazo s kontrolnim branjem **Pfx** (Platinum® Pfx DNA Polymerase, Invitrogen, ZDA);
- ligazo DNA T4 (New England Biolabs, ZDA) oz. kot del kompleta pGEM®-T Easy Vector System (Promega, ZDA) oz. kompleta CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Litva).
- restrikcijske endonukleaze **BamHI**, **KpnI** in **NdeI** (New England Biolabs, ZDA);
- reverzno transkriptazo **MMLV-RT** iz kompleta RETROscript® Kit, (Applied Biosystems, ZDA).

Pri izvedbi reakcij smo uporabljali pripadajoče encimske pufre istega proizvajalca.

### 3.1.9 Začetni oligonukleotidi

Pri pomnoževanju nukleotidnih zaporedij z verižno reakcijo s polimerazo smo uporabili nekatere oligonukleotidne začetnike, ki so bili del kompletov FirstChoice® RLM-RACE Kit in GenomeWalker™ Universal Kit. Prav tako smo pri PCR na osnovi kolonije uporabili plazmidne začetnike iz kompletov CloneJET™ PCR Cloning Kit in pGEM®-T Easy Vector System. Predvsem pa smo sami načrtovali začetne oligonukleotide, ki so jih po našem naročilu proizvedli v podjetju Thermo Fisher Scientific v Nemčiji. Vsi oligonukleotidni začetniki so navedeni v spodnjih preglednicah.

**Preglednica I: Oligonukleotidni začetniki iz kompletov FirstChoice® RLM-RACE Kit in GenomeWalker™ Universal Kit**

Oznaka oligonukleotida	komplet	Nukleotidno zaporedje začetnika v smeri 5' → 3'
dT(17)-3'RACE adapter	RLM-RACE Kit	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTVN
3'RACE outer primer	RLM-RACE Kit	GCGAGCACAGAATTAATACGACT
3' RACE inner primer	RLM-RACE Kit	CGCGGATCCGAATTAATACGACTCACTATAGG
5' RACE adapter	RLM-RACE Kit	GCUGAUGGCGAUGAAUGAACACUGCGUUUGCUGGUUUGAUGAAA
5' RACE outer primer	RLM-RACE Kit	GCTGATGGCGATGAATGAACACTG
5' RACE inner primer	RLM-RACE Kit	CGCGGATCCGAACACTGCGTTGCTGGCTTGATG
AP1 (outer adaptor primer)	Genome Walker™	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2 (nested adaptor primer)	Genome Walker™	ACTATAGGGCACGCGTGGT

**Preglednica II: Načrtovani oligonukleotidni začetniki**

Oznaka začetnika	Vrsta reakcije PCR	Nukleotidno zaporedje začetnika v smeri 5' → 3'
CnSL-deg-N1	degeneriran; deg. 3'RACE	GTTAAAYCCiAAYYTiCC
CnSL-deg-N2	degeneriran; deg. 3'RACE	GGiCCiAAYGAYGTiTTYGT
CnSL-deg-C1	degeneriran; deg. 3'RACE	TCiARRCAiARRTTiGTiCC
CnSL-deg-C2	degeneriran; deg. 3'RACE	ACYTGiACYTGiGTRTTiCC
CnSL-uniA-prom1	5' RACE; hoja po genomu	TATTACCAGCAGATCCTGAGGCAAAGAT
CnSL-uniB-prom1	5' RACE; hoja po genomu	TACCCGAAATAGAGAACAGGAAGATAAC
CnSL-A-prom2	5' RACE; hoja po genomu	CTATATTGTTGTCGGCGAAATCCGAC
CnSL-B-prom2	5' RACE; hoja po genomu	TAGTTCTGCCTCTGCACCGTTGTCATC
CnSL-A-ter2	hoja po genomu	TCTTGTTCCCTCTTATTGTTCCCGTGAT
CnSL-B-ter2	hoja po genomu	CTAATCATGCAGCCCTACCACAGGTCTT
CnSL-uniB-ter1	hoja po genomu	AAGGACCCACTGCACCTCGACAGATGGT
CnSL-A-F1	pomnoževanje celotne cDNA	GGTTTGCTGGCTTGATGAAAAG
CnSL-B-F1	pomnoževanje celotne cDNA	TTATAGGTAGGTCCAAGGTAGAAT
CnSL-A-F2	pomnoževanje celotne cDNA	AATCCTACAAGCTATCCAAC
CnSL-B-F2	pomnoževanje celotne cDNA	AGAGGTCAAATAGGAGCAACTTC
CnSL-uni-F3	pomnoževanje celotne cDNA	TCCTCGCTYTSCTCCCTTYGG
CnSL-A-R1	pomnoževanje celotne cDNA	AGGAACAAGATCAAGAGACATTTC
CnSL-A-R2	pomnoževanje celotne cDNA	CTAAGGAAAGTAGAGGATTAGAGC
CnSL-B-R1	pomnoževanje celotne cDNA	TCCTTACCAAGACCCTAGACCGA
CnSL-B-R2	pomnoževanje celotne cDNA	GAAAGGAATGGAACTCAGTTGTC
CnSL-1-Nde-F	uvedba restrikcijskega mesta	GGCATATGGCAGCATTCTCTCTTG
CnSL-1-BamHI-R	uvedba restrikcijskega mesta	GGGGATCCTCATCATCAGCCAGATCCTGAGGCAAAGAT
CnSL-2-Nde-F	uvedba restrikcijskega mesta	CCCATATGCCAACCTTTCGCCCATTTC
CnSL-2-BamHI-R	uvedba restrikcijskega mesta	AAGGATCCTCATCATCACCTAGTTCTGCCTGCACCGT
CnSL-proC-Nde-F	uvedba restrikcijskega mesta	CCCATATGCCAACCTTTCGCCCATTTC
CnSL-C-Nde-F	uvedba restrikcijskega mesta	AACATATGATAAACCTAACCTGCGGGGCCAA
CnSL-C-BamHI-R	uvedba restrikcijskega mesta	CCGGATCCTCATCATCAGTTGTCAGTTGGAACTC

**Preglednica III: Oligonukleotidni začetniki iz kompletov CloneJET™ PCR Cloning Kit in pGEM®-T Easy Vector System**

Oznaka oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje začetnika v smeri 5' → 3'
smerni plazmidni začetnik pGEM-T	CGCGGGAAATTCGATT
smerni plazmidni začetnik pJET 1,2	GCTCGAGTTTCAGCAAGAT
protismerni plazmidni začetnik pGEM-T	AATCACTAGTGAAT
protismerni plazmidni začetnik pJET 1,2	ATCTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAGC
začetnik T7	TAATACGACTCACTATAGGG

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Molekulska kloniranje

Pri molekulskem kloniraju gre za ustvarjanje velikega števila enakih kopij zaporedja DNA, ki ga s pomočjo prenosnika (vektorja) vnesemo v celico gostiteljskega organizma. Ko taki, transformirani celici omogočimo, da se na trdni hrani podlagi s celično delitvijo razraste v kolonijo popolnoma enakih celic, ustvarimo celični klon, v katerem imajo vse celice enako dedno zasnova.

Molekulska kloniranje smo izvajali v več zaporednih korakih. Ti so vključevali pomnoževanje fragmenta DNA s PCR, ligacijo očiščenega fragmenta DNA v plazmidni vektor (pGEM-T oz. pJET), transformacijo plazmida v bakterijske celice *E. coli* DH5α in inkubacijo celic na ustreznem gojišču. Nato smo s PCR na osnovi kolonije preverili, ali izbrane bakterijske kolonije vsebujejo plazmid z vstavljenim fragmentom DNA. Pozitivne klone smo nacepili v tekoče gojišče, kjer so se namnožili v velikem številu. Bakterijske celice smo lizirali, iz njih izolirali in očistili plazmidno DNA, ki smo jo nato poslali na določitev nukleotidnega zaporedja. Posamezni koraki molekulskega kloniranja so podrobnejše opisani v nadaljevanju.

#### 3.2.1.1 Določitev delnega aminokislinskega zaporedja gobrega lektina CnSL

Raziskovalci IJS so predhodno že določili N-končno zaporedje in del notranjega zaporedja lektina iz gobe meglenke (ki so ga dobili po cepitvi proteina s tripsinom) (60). Ker smo želeli določiti še dodatno notranje zaporedje oz. potrditi že znane rezultate, smo ponovno določili N-končno in del notranjega aminokislinskega zaporedja, ki smo ga kemijsko cepili na krajše peptidne fragmente s CNBr. Protein smo obdelali na sledeč način: najprej smo 35 µL proteina (c = 1,15 g/L dH<sub>2</sub>O) kuhalili 30 min v vodni kopeli pri 100°C, pri čemer se je protein denaturiral. Nato smo mu dodali 200 µL 80 % mravljične kisline, ki je predstavljala kisel medij za delovanje 2,35 µL β-merkaptoetanola. Slednjega smo dodali v nadaljevanju in je preprečil morebitno izločanje bromidnih ionov ob nadalnjem dodaktu CNBr. Lektin smo kemijsko cepili tako, da smo v dotedanjo mešanico dodali 1 kristalček CNBr. Vzorec smo inkubirali 24 ur v temi pri 37°C. Reakcijo cepitve proteina smo prekinili z dodatkom 1175 µL dH<sub>2</sub>O. Vzorec smo posušili do suhe oborine z vakuumskim koncentratorjem Speedvac (Savant, ZDA) in pri tem odstranili mravljično kislino. Dobljene peptidne fragmente smo ločili z RF-HPLC na aparaturi Hewlett-

Packard 1100 series system (HP, Nemčija) z uporabo kolone ChromSpher C8 - 100 × 3 mm, (Chrompack, Nizozemska). Vzorec smo pred nanosom na kolono raztopili v topilu A (0,1% (v/v) TFA v dH<sub>2</sub>O) in ga centrifugirali 10 min pri 16.000 g. Volumen injiciranja vzorca je znašal 1 mL. V topilu A je potekala vezava peptidov na kolono, eluiranje le-teh pa smo dosegli z gradientom topila B (90% (v/v) acetonitril in 0,1% (v/v) TFA v dH<sub>2</sub>O). Analiza vzorca je potekala 42 min pri pretoku 1 mL/min. Topilo B smo začeli dodajati po 5 min trajanja analize; po 35 min je njegov delež znašal 65% MF, po 38 min pa je dosegel 100%. Eluirane fragmente smo zaznali pri  $\lambda = 215$  nm, jih vzorcili ob različnih časih in shranili pri -20°C. Peptidnim fragmentom smo določili aminokislinska zaporedja z avtomatizirano Edmanovo metodo razgradnje aminokislin s pomočjo aparature Procise Protein Sequencing System 492 (PE Applied Biosystems, ZDA).

### **3.2.1.2 Izolacija RNA in sinteza cDNA**

Iz homogeniziranih lističev gobe megljenke vzorcev CnV3 in CnK3 (shranjenih pri -80°C) smo izolirali celokupno RNA s pomočjo kompleta TRIzol® Plus RNA Purification Kit (Invitrogen, ZDA) po navodilih proizvajalca. Za prepis RNA v komplementarno DNA (cDNA) smo uporabili kompletni RETROscript® Kit, (AppliedBiosystems, ZDA) in prav tako sledili navodilom proizvajalca. Pri prepisu smo uporabili sidran oligo(dT)-adapterski začetni oligonukleotid (dT(17)-3'RACE), ki se je prilegal na začetek poli-A-repa mRNA. Tako pripravljene vzorce smo lahko uporabili pri metodi 3'RACE in pomnoževanju celotne cDNA. Izolacijo RNA smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo.

### **3.2.1.3 Pomnoževanje delnih nukleotidnih zaporedij gena CnSL z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)**

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je metoda molekularne biologije, pri kateri lahko pomnožimo željen odsek nukleotidnega zaporedja matrične DNA do velikega števila kopij. V reakciji poleg matrične DNA sodelujeta še začetna oligonukleotidna začetnika (smerni in protismerni), vsi štirje deoksiribonukleotid-trifosfati (dATP, dCTP, dGTP in dTTP), termostabilna polimeraza, magnezijevi ioni in ustrezni pufer. Reakcija poteka ciklično in je sestavljena iz treh glavnih temperturnih sklopov: začetne denaturacije matrične DNA, več deset ciklov pomnoževanja (pri tem je vsak cikel sestavljen iz denaturacije, prileganja začetnih oligonukleotidov in podaljševanja verige DNA) ter končne stopnje podaljševanja še nedokončane

verige DNA. Vsaka na novo sintetizirana veriga DNA lahko služi kot nova matrica, tako da koncentracija tarčne DNA narašča eksponentno.

Na osnovi poznanega delnega aminokislinskega zaporedja izoliranega CnSL smo s pomočjo računalniškega programa CADEPCO (Computer-Assisted Degenerate Primer Construction, dostopnega na <http://sabina.anzlovar.com/calc/cadepco.cgi>) načrtovali degenerirane oligonukleotidne začetnike. Slednje smo nato uporabili za pomnoževanje delnih nukleotidnih zaporedij cDNA preiskovanega CnSL z verižno reakcijo s polimerazo. Pri tem smo uporabili DNA polimerazo *Taq* (Fermentas, Litva) in ciklični termostat Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, ZDA). Reakcijo PCR smo izvajali v sterilnih 200 µL mikrocentrifugirkah podjetja Eppendorf, Nemčija. Komponente reakcijske zmesi posameznega vzorca in pogoji izvedene reakcije PCR so opisani v nadaljevanju.

### **3.2.1.3.1 Pomnoževanje nezanega zaporedja CnSL z degeneriranimi začetniki**

Neznano nukleotidno zaporedje lektina smo najprej pomnoževali s smernima degeneriranimi začetnikoma CnSL-deg-N1 in CnSL-deg-N2 ter protismernima degeneriranimi začetnikoma CnSL-deg-C1 in CnSL-deg-C2. Izvedli smo primarno reakcijo PCR (1°PCR) in vgnezdeno reakcijo PCR (2°PCR) na tak način, da smo v vsakem vzorcu uporabili kombinacijo vseh načrtovanih degeneriranih oligonukleotidnih začetnikov. Kot matrica nam je pri tem služila cDNA oz. različne redčitve gDNA iz izhodnega vzorca CnV3. Za izvedbo reakcije smo uporabili temperaturni program PCR s padajočo temperaturo za 1°C za vsak cikel (ang. touchdown) in reagente, ki so podani v nadaljevanju. Količina reagentov je navedena za posamezen vzorec.

#### **Preglednica IV: Reagenti, uporabljeni za izvedbo degenerirane reakcije PCR**

Komponenta reakcijske zmesi degenerirane reakcije PCR	Količina
10x pufer za polimerazo <i>Taq</i>	5 µL
zmes dNTP-jev (vsak 1,25 mM)	8 µL
smerni začetnik CnSL-deg-N1 oz. N2 (10 µM)	8 µL
protismerni začetnik CnSL-deg-C1 oz. C2 (10 µM)	8 µL
matrična cDNA oz.	1 µL
10 x ali 100 x redčena gDNA	2 µL
DNA polimeraza (0,25 µL polimeraze <i>Taq</i> [5 u/µL] razredčene z 9,75 µL sterilne dH <sub>2</sub> O)	10 µL
sterilna dH <sub>2</sub> O	do 50 µL

#### Preglednica V: Temperaturni program, uporabljen pri degenerirani reakciji PCR in metodi 3'RACE

Stopnja degenerirane reakcije 1° oz. 2° PCR		Temperatura	Trajanje
začetna denaturacija DNA		95°C	5 min
dodatek polimeraze pri visoki temperaturi (ang. hot start)		65°C	30 sek
10 ciklov pomnoževanja	denaturacija DNA	94°C	30 sek
	prileganje začetnih oligonukleotidov s padajočo temperaturo za 1°C za vsak cikel	65-55°C	30 sek
	podaljševanje verige	72°C	1 min
25 ciklov pomnoževanja	denaturacija DNA	94°C	30 sek
	prileganje začetnih oligonukleotidov	55°C	30 sek
	podaljševanje verige	72°C	1 min
končno podaljševanje DNA		72°C	5 min
ustavitev reakcije in shranjevanje produktov		4°C	∞

#### 3.2.1.3.2 Pomnoževanje cDNA z metodo hitrega kloniranja 3' koncov cDNA (3'RACE)

Z metodo hitrega kloniranja 3' koncov smo pomnožili prvi delni zaporedji preiskovanega CnSL. Metoda omogoča začetek pomnoževanja neznanega zaporedja, saj se uporabljen 3'RACE začetnik veže na adapterski začetni oligonukleotid (dT(17)-3'RACE), ki smo ga vezali na zaporedje CnSL pri prepisu mRNA v cDNA. V primarni reakciji 3'RACE smo uporabili degeneriran smerni začetni nukleotid CnSL-deg-N1 in protismerni začetnik 3'RACE outer, kot matrica nam je služila cDNA (pridobljena z obratno transkripcijo iz RNA vzorca CnV3). Nadalje smo 50 x redčene produkte primarne PCR uporabili v sekundarni reakciji PCR – vgnezdeni PCR. Tu smo uporabili začetni oligonukleotid CnSL-deg-N2 in začetnik 3'RACE inner. Oba 3'RACE začetnika sta bila del kompleta FirstChoice® RLM-RACE Kit (AppliedBiosystems, ZDA). Pri obeh reakcijah PCR smo uporabili enako količino reagentov in enak temperaturni program (ki je naveden v preglednici V). V spodnji preglednici so navedeni uporabljeni reagenti.

#### Preglednica VI: Uporabljeni reagenti pri izvedbi metode 3'RACE

Komponenta reakcijske zmesi 3'RACE	Količina
10x pufer za polimerazo <i>Taq</i>	5 µL
zmes dNTP-jev (vsak 1,25 mM)	8 µL
3'RACE inner oz. outer začetnik (10 µM)	2 µL
CnSL-deg-N1 oz. N2 (10 µM)	8 µL
matrična cDNA (v 1°PCR) oz. produkt 1°PCR (v 2°PCR)	1 µL
DNA polimeraza (0,25 µL polimeraze <i>Taq</i> [5 u/µL] razredčene z 9,75 µL sterilne dH <sub>2</sub> O)	10 µL
sterilna dH <sub>2</sub> O	do 50 µL

Glede na dobljeni delni nukleotidni zaporedji CnSL smo načrtovali nove oligonukleotidne začetnike, ki smo jih uporabili za pomnožitev nadaljnje zaporedja lektina z metodo 5'RACE.

### **3.2.1.3.2.1 Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov**

Pri načrtovanju novih začetnikov smo upoštevali osnovna pravila za njihovo načrtovanje (69, 70): oligonukleotidne začetnike smo načrtovali v smeri 5' → 3', dolžina posameznega začetnika je znašala 26 - 30 baz, vsebnost baz G oz. C je bila med 40 in 60 %, v zadnjih šestih bazah načrtovanega začetnika se bazi G oz. C nista pojavili več kot 3-krat, na skrajnem 3' koncu je bil nukleotid C oz. T in temperatura tališča je bila pri vseh začetnikih podobna ( $\pm 10^{\circ}\text{C}$ ). Pazili smo tudi na možnosti nastanka dimerov in lasničnih zank pri samih oligonukleotidih in se temu skušali čim bolj izogniti. Pri načrtovanju smo si pomagali s spletnima programskima orodnjema, in sicer sta bila to programa BCM Search Launcher - Sequence utilities (dostopen na <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>) in program Oligoanalyzer 3.1. (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/Default.aspx>).

### **3.2.1.3.3 Pomnoževanje cDNA z metodo hitrega kloniranja 5' koncov cDNA (5'RACE)**

Pri nadalnjem pomnoževanju zaporedja CnSL smo uporabili metodo hitrega kloniranja 5' koncov cDNA. Metoda omogoča pomnoževanje zaporedja z začetkom na 5' koncu cDNA. Za izvedbo te metode smo uporabili cDNA (CnV1), ki so jo raziskovalci IJS že predhodno pripravili z uporabo kompleta FirstChoice® RLM-RACE Kit (Applied Biosystems, ZDA). Pri tem so mRNA najprej obdelali po navodilih proizvajalca, na 5' konec zaporedja mRNA vezali 45 baz dolg RNA oligonukleotidni adapter (5'RACE adapter) in jo nato prepisali v cDNA. Tako pripravljeno cDNA (označeno kot CnV15'R) smo v nadaljevanju lahko uporabili za pomnoževanje s 5'RACE specifičnima oligonukleotidnima začetnikoma.

Pri pomnoževanju zaporedja cDNA z metodo 5'RACE smo v primarni reakciji PCR uporabili specifični smerni začetni oligonukleotid 5'RACE outer in protismerna začetnika CnSL-uniA-prom1 in CnSL-uniB-prom1. Izvedli smo 2+3 stopenjsko primarno PCR, nato pa še vgnezdeno PCR, kjer smo uporabili kot matrico 50 x redčene produkte 1°PCR, specifični smerni začetnik 5'RACE inner in protismerna začetnika CnSL-A-prom2 in CnSL-B-prom2. Količine uporabljenih reagentov (za posamezni vzorec) in reakcijski pogoji so podani v nadaljevanju.

**Preglednica VII: Uporabljeni reagenti pri izvedbi metode 5'RACE za 1° in 2°PCR**

<b>Komponenta reakcijske zmesi 5'RACE</b>	<b>Količina</b>
10x pufer za polimerazo <i>Taq</i>	5 µL
zmes dNTP-jev (vsak 1,25 mM)	8 µL
5'RACE outer oz. inner začetnik (10 µM)	2 µL
specifičen protismerni (R) začetnik (10 µM)	2 µL
matrična cDNA (v 1°PCR) oz. produkt 1°PCR (v 2°PCR)	1 µL
DNA polimeraza (0,25 µL polimeraze <i>Taq</i> [5 u/µL] razredčene s 4,75 µL sterilne dH <sub>2</sub> O)	5 µL
sterilna dH <sub>2</sub> O	do 50 µL

**Preglednica VIII: Temperaturni program, uporabljen pri izvedbi metode 5'RACE**

<b>Stopnja reakcije</b>	<b>1°PCR</b>		<b>2°PCR</b>	
začetna denaturacija DNA	95°C, 3 min		95°C, 5 min	
dodatek polimeraze pri visoki temperaturi	65°C, 30 sek		65°C, 30 sek	
denaturacija DNA	4 cikli	95°C, 30 sek		
prileganje začetnih oligonukleotidov		72°C, 90 sek		
denaturacija DNA	17 ciklov	95°C, 30 sek	10 ciklov	95°C, 30 sek
prileganje začetnih oligonukleotidov s padajočo temperaturo za 1°C za vsak cikel		71-54°C, 30 sek		65-55°C, 30 sek
podaljševanje verige		72°C, 1 min		72°C, 1 min
denaturacija DNA	20 ciklov	95°C, 30 sek	25 ciklov	95°C, 30 sek
prileganje začetnih oligonukleotidov		55°C, 30 sek		55°C, 30 sek
podaljševanje verige		72°C, 1 min		72°C, 1 min
končno podaljševanje DNA	72°C, 5 min		72°C, 5 min	
ustavitev reakcije in shranjevanje produktov	4°C, ∞		4°C, ∞	

Nukleotidna zaporedja, ki smo jih dobili z metodo 5'RACE, smo s pomočjo programa BioEdit poravnali s predhodno dobljenima zaporednjema 3'RACE in dobili predvideno celotno zaporedje cDNA. Na podlagi celotnega zaporedja smo s pomočjo računalniških programov nadalje načrtovali oligonukleotidne začetnike za pomnožitev celotnega zaporedja lektina CnSL.

### **3.2.1.3.4 Pomnoževanje gena z metodo hoje po genomu**

Metoda hoje po genomu (ang. genome walking) omogoča pomnoževanje neznanih zaporedij DNA, ki ležijo bodisi navzdol oz. navzgor glede na segment poznanega nukleotidnega zaporedja. Zato smo s to metodo lahko pomnožili tudi promotorsko regijo gena CnSL. Pri tem smo uporabili že predhodno pripravljene genomske knjižnice gobe megleinke, ki so jih pripravili raziskovalci

IJS z uporabo kompleta GenomeWalker™ Universal Kit (BD Biosciences Clontech, ZDA) po navodilih proizvajalca. Genomsko DNA so ločeno rezali s štirimi restriktionskimi encimi (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII* in *StuI*) in na podlagi dobljenih fragmentov pripravili štiri genomske knjižnice. Razrezano genomsko DNA so očistili z obarjanjem z etanolom in na tope konce ligirali adapterje iz kompleta GenomeWalker™ (60).

Promotorsko regijo gena CnSL smo pomnožili z uporabo omenjenih genomske knjižnic, ki so služile kot matrice v PCR. Pri tem smo uporabili reagente kompleta Advantage® 2 PCR Kit (Clontech, ZDA). V 1°PCR smo uporabili začetna protismerna oligonukletida CnSL-uniA-prom1 in CnSL-uniB-prom1 ter smerni oligonukleotid CnSL-uniB-ter1, ki so se vsak zase specifično vezali na znano delno nukleotidno zaporedje. V kombinaciji z njimi smo uporabili začetni oligonukleotid AP1 (ang. outer adaptor primer 1) iz kompleta GenomeWalker™, ki se je prilegal na predhodno vezan adapter. V nadaljevanju smo kot matrico v 2°PCR uporabili 50 x redčene produkte 1°PCR in začetne oligonukleotide CnSL-A-prom2, CnSL-B-prom2, CnSL-A-ter2 in CnSL-B-ter2 v kombinaciji z oligonukleotidom AP2 (ang. nested adaptor primer 2) iz kompleta GenomeWalker™. Pri pomnoževanju smo uporabili spodaj navedene reagente in pogoje:

**Preglednica IX: Temperaturni program, uporabljen pri metodi hoje po genomu**

Stopnja reakcije PCR	1°PCR		2°PCR	
začetna denaturacija DNA			95°C, 3 min	
prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje			65°C, 30 sek	
denaturacija DNA	5 ciklov	94°C, 15 sek	4 cikli	95°C, 30 sek
prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje		72°C, 3 min		72°C, 3 min
denaturacija DNA	10 ciklov	94°C, 15 sek	17 ciklov	95°C, 30 sek
prileganje začetnih oligonukleotidov		72-67°C, 3 min		71-54°C, 30 sek
s padajočo temperaturo za X°C za vsak cikel (X = 0,5°C pri 1°PCR oz. X= 1°C pri 2°PCR)				72°C, 3 min
podaljševanje verige				
denaturacija DNA	25 ciklov	94°C, 15 sek	20 ciklov	95°C, 30 sek
prileganje začetnih oligonukleotidov				55°C, 30 sek
podaljševanje verige		67°C, 3 min		72°C, 3 min
končno podaljševanje DNA	67°C, 4 min		72°C, 5 min	
ustavitev reakcije in shranjevanje produktov	4°C, ∞		4°C, ∞	

#### Preglednica X: Uporabljeni reagenti pri izvedbi metode hoje po genomu

Komponenta reakcijske zmesi	1°PCR	2°PCR
10x pufer Advantage 2 PCR	2,5 µL	5 µL
zmes dNTP-jev iz kompleta (vsak 10 mM)	0,5 µL	1 µL
oligonukleotidni začetnik AP 1 oz. 2 (10 µM)	0,5 µL	1 µL
specifičen oligonukleotidni začetnik (10 µM)	0,5 µL	1 µL
matrična gDNA iz genomske knjižnjice (v 1°PCR) oz. 50 x redčen produkt 1°PCR (v 2°PCR)	0,5 µL	1 µL
50x polimerazna mešanica Advantage®	0,5 µL	1 µL
sterilna dH <sub>2</sub> O iz kompleta	do 25 µL	do 50 µL

#### 3.2.1.4 Pomnoževanje celotnega nukleotidnega zaporedja CnSL

Po združitvi in poravnavi zaporedij 3' in 5'RACE smo dobili celotno zaporedje cDNA saharozil-lektina, na katerem smo lahko načrtovali nove oligonukleotidne začetnike za pomnožitev celotnega zaporedja. Celotno zaporedje cDNA (CnV3 in CnK3) oz. gDNA (CnV3) smo v 1°PCR pomnoževali z načrtovanimi smernimi začetnikoma CnSL-A-F1 in CnSL-B-F1 ter protismernimi začetnikoma CnSL-A-R1 in CnSL-B-R1. V 2°PCR smo pa uporabili smerna začetnika CnSL-A-F2 in CnSL-B-F2 ter protismerna začetnika CnSL-A-R2 in CnSL-B-R2. Vsi navedeni začetniki so podani v preglednici II. Pri pomnoževanju smo uporabili pogoje navedene v spodnjih preglednicah.

#### Preglednica XI: Reagenti, uporabljeni pri pomnoževanju celotnega zaporedja cDNA oz. gDNA

Komponenta reakcijske zmesi	1°PCR	2°PCR
10x pufer za polimerazo <i>Taq</i>	5 µL	5 µL
zmes dNTP-jev (vsak 1,25 mM)	8 µL	8 µL
smerni (F) začetnik (10 µM)	1 µL	1 µL
protismerni (R) začetnik (10 µM)	1 µL	1 µL
cDNA oz. 10 x ali 100 x redčena gDNA (v 1°PCR) oz. produkt 1°PCR (v 2°PCR)	1 µL 2 µL	1 µL
DNA polimeraza (0,25 µL polimeraze <i>Taq</i> [5 u/µL] razredčene s 4,75 µL sterilne dH <sub>2</sub> O)	3 µL	5 µL
sterilna dH <sub>2</sub> O	do 53 µL	do 50 µL

**Preglednica XII: Temperaturni program PCR, uporabljen pri pomnoževanju cDNA oz. gDNA**

Stopnja reakcije 1° oz. 2°PCR		Temperatura	Trajanje
	začetna denaturacija DNA	95°C	5 min
	dodatek polimeraze pri visoki temperaturi ( <i>ang. hot start</i> )	65°C	30 sek
20 ciklov pomnoževanja	denaturacija DNA	95°C	30 sek
	prileganje začetnih oligonukleotidov s padajočo temperaturo za 1°C za vsak cikel	65-45°C	30 sek
	podaljševanje verige	72°C	1 min
10 ciklov pomnoževanja	denaturacija DNA	95°C	30 sek
	prileganje začetnih oligonukleotidov	45°C	30 sek
	podaljševanje verige	72°C	1 min
	končno podaljševanje DNA	72°C	5 min
	ustavitev reakcije in shranjevanje produktov	4°C	∞

Za pomnožitev celotnega zaporedja cDNA (CnK3 in CnV3) smo ponovno uporabili tudi metodo 3'RACE. V 1°PCR smo uporabili smerne začetne oligonukleotide CnSL-A-F1, CnSL-B-F1, CnSL-A-F2 in CnSL-B-F2, kot protismerni oligonukleotid smo uporabili 3'RACE outer začetnik. V sledečem 2°PCR smo kot matrico uporabili 50 x redčene produkte primarne PCR, smerne začetne nukleotide CnSL-A-F2, CnSL-B-F2 in CnSL-uni-F3 ter protismerni oligonukleotid 3'RACE inner. Pri tej izvedbi smo uporabili enako količino reagentov in enak PCR temperaturni program kot pri metodi degeneriranega 3'RACE (preglednici IV in V).

### 3.2.1.5 Agarozna gelska elektroforeza

Elektroforeza je separacijska tehnika, pri kateri lahko molekule v električnem polju ločimo na podlagi njihovih molekulskih mas in konformacije. Hitrost potovanja je odvisna od velikosti fragmenta in je obratno sorazmerna molekulski masi.

Za ločevanje produktov PCR smo uporabili horizontalno agarozno gelsko elektroforezo, ki je primera za ločevanje nukleinskih kislin. Gele smo pripravili s segrevanjem 1% (m/v) agarozne raztopine v pufru 1x TAE. Raztopini smo pred segrevanjem primešali še DNA barvilo SYBR® Safe DNA Stain (Invitrogen, ZDA) v razmerju 0,1 µL barvila/mL agarozne raztopine. Za izvedbo elektroforeze smo nanesli po 5 µL vzorcev PCR in 10 µL označevalca molekulskih mas.

Vzorcem PCR in označevalcem velikosti molekulskega mas 100 bp ali 1 kb (GeneRuler™ 100 bp oz. 1 kb DNA Ladder Plus [0,5 µg/µL], Fermentas, Litva) smo pred nanosom na gel dodali 6x nanašalni pufer (6x Loading Dye Solution, Fermentas, Litva) v v/v razmerju 1 : 5. Po končani elektroforezi smo DNA v gelu zaznali in fotografirali pri 300 nm z aparaturom Sistem UVItec (UVItec, Velika Britanija).

### 3.2.1.6 Čiščenje fragmentov DNA

Produkte PCR reakcije (45 µL) smo v celoti nanesli na 1% agrozni gel in izvedli elektroforezo pri 60-100 V. Ločene fragmente DNA smo zaznali s pomočjo UV transiluminatorja Visi-Blue™ VB-26 (UVP, ZDA) in jih izrezali s skalpelom iz agaroznega gela. Nato smo jih očistili z uporabo kompleta za elucijo nukleinskih kislin iz agaroznega gela Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA) po navodilih proizvajalca. V primerih, ko se je pomnožil le en specifičen produkt PCR, smo fragment DNA očistili neposredno iz mešanice PCR z uporabo enakega čistilnega kompleta. Tako očiščene fragmente smo shranili pri -20°C.

### 3.2.1.7 Vstavitev fragmentov v plazmidni vektor

Očiščene produkte PCR (fragmente preiskovane DNA) smo vstavili v plazmidna vektorja pGEM-T Easy oz. pJET 1,2/blunt cloning vector. Pri tem smo uporabili kompleta za kloniranje produktov PCR pGEM®-T Easy Vector System (Promega, ZDA) in CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas, Litva) ter natančno sledili navodilom proizvajalcev.

Preglednica XIII: Ligacija v vektorja pGEM-T Easy in pJET 1,2

Komponenta ligacijske mešanice glede na uporabljen polimerazo	pGEM-T Easy		pJET 1,2
	polimeraza <i>Taq</i>	<i>Taq</i>	<i>Pfx</i>
plazmidni vektor (50 ng/µL)	0,2 µL	0,5 µL	1 µL
2x reakcijski pufer	5 µL	5 µL	10 µL
očiščen PCR produkt	3,8 µL	3,5 µL	2 µL
DNA polimeraza, ki izdeluje tope konce	/	0,5 µL	/
inkubacija	/	5 min pri 70°C	/
T4 DNA ligaza (3 u/µL pri pGEM-T Easy in 5 u/µL pri pJET 1,2)	1 µL	0,5 µL	1 µL
dH <sub>2</sub> O	/	/	6 µL
inkubacija	2 h pri 22°C	30 min pri 22°C	
končni volumen ligacijske mešanice	10 µL	10 µL	20 µL

Plazmid pGEM-T omogoča ligacijo produktov PCR preko lepljivih koncev (ki nastanejo po uporabi polimeraze *Taq*), pJET 1,2 pa preko topih koncev (ki nastanejo po uporabi polimeraze *Pfx*). Ker smo pri reakciji PCR v večini primerov uporabljali polimerazo *Taq*, smo dobili produkte PCR z lepljivimi konci. Slednje smo pri uporabi vektorja pJET 1,2 preoblikovali v tope konce s posebnim encimom – DNA polimerazo, ki izdeluje tope konce (ang. DNA blunting enzyme). Pri tem smo uporabili reagente iz kompleta CloneJET™ PCR Cloning Kit in sledili protokolu, ki ga navaja proizvajalec.

### 3.2.1.8 Priprava kompetentnih celic *E. coli* DH5α

Pri izvedbi molekulskega kloniranja smo uporabljali kompetentne celice *E. coli* DH5α, ki smo jih sami vzgojili iz komercialno dostopnih kompetentnih celic *E. coli* DH5α (Invitrogen, ZDA). Najprej smo iz komercialnih celic *E. coli* DH5α pripravili *trajno kulturo*. Celice proizvajalca smo s sterilno cepilno zanko nacepili v 3 mL tekočega gojišča LB in stresali v avtomatskem stresalniku Centromat HK (B. Braun Biotech International, ZDA) preko noči pri 37°C in 220 obr/min. V naslednjem popoldnevu smo odpipetirali 100 µL gojišča s kompetentnimi celicami in jih ob gorilniku razmazali na trdno gojišče LBA v petrijevki ter preko noči inkubirali pri 37°C. Celice so se namnožile in popolnoma prekrile površino gojišča v petrijevki. S cepilno zanko (ki smo jo predhodno prežarili na plamenu gorilnika in jo ohladili) smo v sledečem popoldnevu nacepili bakterije v več epruvet s 3 mL novega tekočega gojišča LB in nato epruvete stresali preko noči pri 37°C in 220 obr/min. Naslednji dan smo v vsako izmed epruvet odpipetirali 1 mL 80% glicerola in na kratko stresali na vibracijskem stresalniku. 1,5 mL tako pripravljenih celic smo odpipetirali v sterilne plastične epruvete in jih zamrznili pri -80°C. Iz tako pripravljenih trajne kulture celic smo nato vzgojili celice, ki smo jih uporabili pri delu. V komori LAF SC-R (Labcaire, Velika Britanija) smo s cepilno zanko precepili bakterije iz zamrznjene trajne kulture v 3 mL tekočega gojišča LB. Celice smo stresali preko noči pri 37°C in 220 obr/min. Naslednje jutro smo v 1 L sterilno stresalno erlenmajerico ob gorilniku odmerili 100 mL tekočega gojišča LB in vanj precepili 750 µL prekonočne kulture. Erlenmajerico smo stresali pri 37°C in 220 obr/min ter merili optično gostoto pri 600 nm (OD<sub>600</sub>) dokler ni dosegla vrednosti v območju med 0,35 in 0,40. Pri teh vrednostih so celice v zgodnji logaritemski fazi rasti kar je za nadaljnjo obdelavo celic ključnega pomena. Celice smo prelili v sterilne centrifugirke, ki smo jih nato

inkubirali na ledu 10 do 15 min. Sledilo je centrifugiranje celic 10 min pri 3000 x g in 4°C. Centrifugirke smo na ledu prenesli v komoro LAF. Tam smo oddekantirali supernatant in celice resuspendirali v skupno 25 mL ohlajene raztopine TBCa. Vsebino vseh centrifugirk smo združili v eno ter jo inkubirali na ledu 10 do 30 min. Celice smo še enkrat centrifugirali 10 min pri 3000 x g in 4°C. V laminariju smo popolnoma odstranili supernatant in celice resuspendirali s pipetiranjem v 1,5 mL ohlajene raztopine TBCaG. Tako pripravljene celice smo nato alikvotirali po 50 µL v sterilne, ohlajene 1,5 mL centrifugirke in jih zamrznili najprej v etanolu pri -80°C, po nekaj urah pa shranili pri -80°C.

### **3.2.1.9 Transformacija plazmidov v kompetentne celice in njihovo pomnoževanje**

Pojem transformacije obsega proces privzema gole DNA v gostiteljsko celico. Transformacijo smo izvedli na sledeč način: pripravljene alikvote kompetentnih celic *E. coli* DH5α (shranjene v mikrocentrifugirkah pri -80°C) smo odtalili na ledu. V vsak 50 µL alikvot kompetentnih celic smo odpipetirali po 5 µL ligacijske mešanice in vsebino epice rahlo premešali. Nadalje smo celice inkubirali na ledu 20 do 30 min. Sledil je topotni šok celic v vodni kopeli, in sicer 30 s pri 42°C. Celice smo nato takoj odstavili na led za 10 min (71), jim nato ob gorilniku dodali 445 µL gojišča S.O.C. in jih stresali 45 do 60 min v avtomatskem stresalniku pri 37°C in 220 obr/min. 100 µL gojišča s celicami smo ob gorilniku razmazali na trdno gojišče LBA oz. LBAX. Preostalih 400 µL v epici smo centrifugirali 2 min pri 4600 x g in nato odpipetirali 300 µL supernatanta, ki smo ga zavrgli. Preostalih 100 µL smo dobro premešali na vibracijskem stresalniku in nato razmazali na trdno gojišče LBA oz. LBAX v petrijevkah. Slednje smo še označili in inkubirali preko noči pri 37°C.

### **3.2.1.10 Določitev bakterijskih kolonij z vstavljenim plazmidom in produktom PCR**

Plazmidi so se preko noči namnožili v bakterijskih celicah v velikem številu. Pri uporabi plazmida pGEM-T Easy smo s pomočjo belo-modrega selekcijskega testa izbrali bele kolonije, ki naj bi vsebovale vstavljen fragment DNA v plazmidu. Plazmid pJET pa je zasnovan tako, da v velikem deležu preživijo le tiste bakterije, ki imajo vstavljen fragment DNA v plazmidu. Izbrali smo nekaj naključnih kolonij in preverili če vsebujejo plazmid z vključkom še s PCR na osnovi kolonije (ang. colony PCR). Količina reagentov za posamezni vzorec je navedena v nadaljevanju.

#### Preglednica XIV: Reagenti uporabljeni pri PCR na osnovi kolonije

Komponenta reakcijske mešanice PCR na osnovi kolonije	pGEM-T Easy	pJET	pET-11a
10x pufer za polimerazo <i>Taq</i>	3 µL	2 µL	2 µL
zmes dNTP-jev (vsak 1,25 mM)	2,5 µL	3,2 µL	3,2 µL
smerni plazmidni začetnik pGEM-T (20 µM) oz. pJET (10 µM) oz. začetnik specifičen za vključek (10 µM) pri pET-11a	0,5 µL	0,4 µL	0,4 µL
protismerni plazmidni začetnik pGEM-T (20 µM) oz. pJET (10 µM) oz.začetnik T7 (5 µM) pri pET-11a	0,5 µL	0,4 µL	0,8 µL
sterilna dH <sub>2</sub> O	13,5 µL	13,9 µL	13,5 µL
DNA polimeraza <i>Taq</i> [5 u/µL] oz. 0,1 µL polimeraze <i>Taq</i> [5 u/µL] razredčene z 9,9 µL sterilne dH <sub>2</sub> O	10 µL	0,1 µL	0,1 µL
končni volumen mešanice	30 µL	20 µL	20 µL

V vsak vzorec smo s sterilnim nastavkom za pipeto prenesli izbrano kolonijo s trdnega gojišča LBA oz. LBAX. Pri izvedbi PCR na osnovi kolonije smo v primeru vektorja pGEM-T uporabili način dodatka polimeraze pri visoki temperaturi, pri vektorjih pJET in pET-11a pa smo nerazredčeno polimerazo dodali že v začetno reakcijsko mešanico. Po končani reakciji PCR smo vsak vzorec v celoti nanesli na agarozni gel in izvedli agarozno elektroforezo. PCR je potekal po naslednjem temperaturnem programu:

#### Preglednica XV: Temperaturni program PCR na osnovi kolonije

Stopnja PCR na osnovi kolonije	pGEM-T Easy		pJET in pET-11 a*	
razpad bakterij in sproščanje plazmida iz celic	99°C, 10 min		95°C, 3 min	
dodatek polimeraze pri visoki temperaturi	65°C, 30 sek			
denaturacija plazmidne DNA	30 ciklov	94°C, 30 sek	25 ciklov	94°C, 30 sek
prileganje začetnih oligonukleotidov		50°C, 30 sek		60°C, 30 sek
podaljševanje verige		72°C, 1 min		72°C, 1 min
končno podaljševanje plazmidne DNA	72°C, 3 min			
ustavitev reakcije	4°C, ∞		4°C, ∞	

\* pri plazmidu pET –11a je prileganje začetnih oligonukleotidov potekalo 30 sek pri 50°C

Izbrane bakterijske kolonije, ki so vsebovale plazmid z vključkom, smo nacepili v 3 mL tekočega gojišča LBA in stresali prekonočno v avtomatskem stresalniku Centromat HK (B. Braun Biotech International, ZDA) pri 220 obr/min in 37°C. Pri tem so se bakterije namnožile in z njimi tudi plazmidi.

### 3.2.1.11 Izolacija, čiščenje in določitev nukleotidnega zaporedja plazmidne DNA

Plazmidno DNA smo iz bakterijskih celic izolirali in očistili s pomočjo kompleta Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, ZDA) po navodilih proizvajalca. Končna elucija vzorca je bila narejena v 90 µL dH<sub>2</sub>O. Vzorcem očiščene plazmidne DNA smo nato izmerili koncentracijo na spektrofotometru NanoDrop ND-2000c (NanoDrop Technologies, ZDA) in jih z dH<sub>2</sub>O razredčili na koncentracijo 70-80 ng/µL. 20 µL vsakega vzorca smo s hitro pošto poslali na avtomatiziran servis Eurofins MWG Operon v Nemčijo, kjer so določili nukleotidna zaporedja fragmentov DNA.

### 3.2.1.12 Analiza zaporedij

Delna nukleotidna zaporedja (dobljena pri izvedbi degeneriranega 3'RACE in 5'RACE) smo združili in primerjali s pomočjo algoritma ClustalW računalniškega programa BioEdit (<http://bioedit.software.informer.com/>) in dobili celotno nukleotidno zaporedje cDNA saharozil-lektina. Prav tako smo z enakim programom v nadaljevanju primerjali oz. poravnali celotno cDNA z gDNA in določili introne v genomske DNA. Pri prevajanju nukleotidnih zaporedij v proteinska zaporedja smo uporabili program BCM Search Launcher - Sequence utilities (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>). Promotorski del zaporedja smo analizirali s pomočjo algoritma TESS - Transcription Element Search System (<http://www.cbil.uprnn.edu/tess>). S pomočjo algoritmov **blastn** in **blastp** na strežniku NCBI - National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), smo iskali tudi podobnosti med nukleotidnim zaporedjem saharozil-lektina in ostalimi nukleotidnimi zaporedji v podatkovni bazi.

## 3.2.2 Priprava in pridobivanje rekombinantnega CnSL (rCnSL)

Za pridobivanje rCnSL smo izbrali dobro poznan bakterijski ekspresijski sistem *E. coli* BL21 (DE3) in enega izmed najuspešnejših plazmidov za kloniranje in izražanje rekombinantnih proteinov v tem sistemu – vektor pET-11a. Določili smo restriktične endonukleaze, ki so sposobne cepiti izbran plazmidni vektor, hkrati pa ne cepijo zaporedja CnSL. Pri tem smo si pomagali s spletnim računalniškim programom RestrictionMapper (dostopnim na <http://www.restrictionmapper.org/>). Izmed vseh ustreznih restrikta smo izbrali dve, in sicer *NdeI* in *BamHI*.

### 3.2.2.1 Načrtovanje začetnikov za rCnSL

Med vsemi določenimi nukleotidnimi zaporedji celotne cDNA preiskovanega lektina smo izbrali tri različna zaporedja, iz katerih smo izpeljali štiri različice lektina CnSL (CnSL-1, CnSL-2, CnSL-C in CnSL-proC). Zanje smo načrtovali nove oligonukleotidne začetnike, v katere smo uvedli restrikcijski mesti encimov *NdeI* in *BamHI*. Pri načrtovanju začetnikov smo upoštevali nekaj osnovnih pravil: oligonukleotidne začetnike smo načrtovali v smeri 5' → 3', dolžina posameznega začetnika je znašala 18-24 nukleotidov, po restrikcijskem mestu smo dodali še vsaj dva nukleotida, pri protismernih začetnikih smo poleg obstoječega zaključnega kodona dodali še dva zaključna kodona. Nekatere lastnosti načrtovanih začetnikov smo preverili tudi s spletnim programom Oligoanalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyser/applications/oligoanalyzer/>). Načrtovani začetniki so podani v preglednici II, pri čemer so mesta restrikcijskih encimov podprtana, s krepkim tiskom pa so poudarjena zaporedja začetnih oz. zaključnih kodonov.

### 3.2.2.2 Piprava sistema za izražanje

Za pridobitev zaporedja cDNA (ki bi ga lahko vstavili v ekspresijski plazmidni vektor) smo izvedli reakcijo PCR, pri kateri smo uporabili načrtovane oligonukleotidne začetnike (preglednica II), ki so vnesli restrikcijski mesti *NdeI* in *BamHI* na 5' oz. 3' konec zaporedja. Pri pomnoževanju smo uporabili polimerazo DNA Platinum® *Pfx* (Invitrogen, ZDA), pare oligonukleotidnih začetnikov CnSL-1-Nde-F s CnSL-1-BamHI-R, CnSL-2-Nde-F s CnSL-2-BamHI-R in CnSL-C-Nde-F oz. CnSL-proC-Nde-F s CnSL-C-BamHI-R ter kot matrico izbrano nukleotidno zaporedje cDNA saharozil-lektina. Pogoji izvedbe reakcije PCR so navedeni v nadaljevanju.

**Preglednica XVI: Uporabljeni reagenti za pripravo vključka DNA z restrikcijskima mestoma**

Komponenta reakcijske mešanice PCR	Količina
10x ojačevalni pufer za polimerazo Platinum® <i>Pfx</i>	5 µL
zmes dNTP-jev (vsak 1,25 mM)	3,6 µL
MgSO <sub>4</sub> (50 mM)	1 µL
plazmidni vektor pJET z izbranim zaporedjem cDNA (c ≈ 1,7 ng/µL)	1 µL
smiselni začetnik z restrikcijskim mestom <i>NdeI</i> -F (10 µM)	1,5 µL
protismiselni začetnik z restrikcijskim mestom <i>BamHI</i> -R (10 µM)	1,5 µL
polimeraza Platinum® <i>Pfx</i> [2,5 u/µL]	0,4 µL
sterilna dH <sub>2</sub> O	do 50 µL

**Preglednica XVII: Temperaturni program, uporabljen za pripravo vključka DNA z restriktijskima mestoma**

Stopnja reakcije PCR	Pogoji	
začetna denaturacija DNA	94°C, 5 min	
denaturacija DNA prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige	25 ciklov	94°C, 15 sek 68°C, 50 sek
	ustavitev reakcije in shranjevanje produktov	
		4°C, ∞

Poleg vnesenih restriktijskih mest *NdeI* in *BamHI* je vključek po pomnoževanju vseboval kodirajoče nukleotidno zaporedje cDNA, ki je vključno z začetnim in zaključnim kodonom obsegalo 294 nukleotidnih baz pri CnSL-1, 231 baz pri CnSL-2, 585 baz pri CnSL-C in 678 baz pri CnSL-proC. Velikost pomnoženih produktov PCR smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Uspešno pomnožene produkte smo klonirali v plazmidni vektor pJET 1,2 (Fermentas, Litva), transformirali v kompetentne celice *E. coli* DH5α in jim ponovno določili nukleotidna zaporedja. S tem smo preverili, da slučajno ni prišlo do mutacij med pomnoževanjem vključkov oz. potrditi, da je bilo pomnoževanje pravilno.

Vključke CnSL v vektorjih pJET in ekspresijski vektor pET-11a (ki je vseboval drug lektin) smo cepili z restriktijskima encimoma *NdeI* in *BamHI* (New England Biolabs, ZDA). S tem smo pridobili vključke CnSL s preverjenim nukleotidnim zaporedjem in prazen ekspresijski vektor pET-11a, ki smo ga lahko ponovno uporabili. Restrikcija je potekala v inkubatorju Binder BD 115 (Binder, Nemčija) 4 ure pri 37°C v primeru plazmida pJET, pri plazmidu pET-11a pa 3 ure pri 37°C.

**Preglednica XVIII: Reagenti za izvedbo restrikcije z encimoma *NdeI* in *BamHI***

Komponenta	Količina
Plazmidna DNA z vključkom (pJET = 17 ng/µL; pET-11a = 55 ng/µL)	32 µL
10x pufer št.4 (NEB); ustrezen medij za delovanje obeh encimov	4 µL
restriktijski encim <i>NdeI</i> [20 u/µL]	2 µL
restriktijski encim <i>BamHI</i> [20 u/µL]	2 µL

Po izvedbi restrikcije smo vzorce v celoti nanesli na agarozni gel in izvedli elektroforezo. Na UV-transiluminatorju smo zaznali razrezane fragmente: vključke CnSL in vektorja pJET in pET-11a. Vse vključke CnSL in vektor pET-11a smo nato iz gela izrezali in očistili. Preko

restriktivnih mest *NdeI* in *BamHI* smo vključke CnSL ligirali v plazmid pET-11a. Ligacija je potekala preko noči pri 16°C. Količine uporabljenih reagentov so navedene v preglednici XIX.

**Preglednica XIX: Uporabljeni reagenti za ligacijo vključkov CnSL v vektor pET-11a**

Komponenta ligacijske mešanice	Količina
očiščen vključek CnSL	6 µL
očiščen plazmidni vektor pET-11a	2 µL
10x pufer za DNA ligazo T4	1 µL
DNA ligaza T4 [400 u/µL]	1 µL

Ligacijsko mešanico s posameznim vključkom CnSL (5 µL) smo transformirali v kompetentne celice *E. coli* DH5α in s PCR na osnovi kolonije (podpoglavlje 3.2.1.10) določili pozitivne klone (celice s plazmidom in vključkom CnSL). Bakterijske celice smo preko noči namnožili v tekočem gojišču in iz njih izolirali plazmidno DNA. Slednji smo določili koncentracijo z uporabo spektrofotometra NanoDrop ND-2000c (NanoDrop Technologies, ZDA).

Želeli smo potrditi, da so vključki CnSL vstavljeni v plazmidu pET11-a, zato smo izvedli še kontrolno restrikcijo. Ta je obsegala enojno in dvojno restrikcijo plazmidne DNA z vključkom CnSL. Pri enojni restrikciji smo z restriktazo *KpnI* cepili zaporedje vključka CnSL, pri dvojni restrikciji smo pa z restriktazama *NdeI* in *BamHI* ločili vključek CnSL od vektorja pET-11a. Restriktaze oz. ustrezna restrikcijska mesta znotraj zaporedja vključka CnSL in vektorja pET-11a smo izbrali s pomočjo programa RestrictionMapper (<http://www.restrictionmapper.org/>). Restrikcija je potekala v termobloku TS1 Thermo Shaker (Biometra, Nemčija) 4 ure pri 37°C in 600 obr/min.

**Preglednica XX: Uporabljeni reagenti pri izvedbi kontrolne restrikcije**

Komponenta reakcijske zmesi	Enojna restrikcija	Dvojna restrikcija
plazmidna DNA z vključkom (c = 50 ng/µL)	5 µL	5 µL
10x pufer št.1 (NEB); ustrezni medij za delovanje <i>KpnI</i>	1,5 µL	/
10x pufer št.4 (NEB); ustrezni medij za delovanje <i>NdeI</i> in <i>BamHI</i>	/	1,5 µL
restrikcijski encim <i>KpnI</i> [10 u/µL]	1 µL	/
restrikcijska encima <i>NdeI</i> [20 u/µL] in <i>BamHI</i> [20 u/µL]	/	vsak 0,5 µL
dH <sub>2</sub> O	do 15 µL	do 15 µL

Razrezane fragmente po enojni oz. dvojni restrikciji smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo. Po kontrolni restrikciji smo 2 µL plazmidne DNA pET-11a z vključkom CnSL transformirali v ekspresijske kompetentne celice *E. coli* BL21 (DE3). Transformacijo smo izvedli na enak način kot pri celicah *E. coli* DH5α (podpoglavlje 3.2.1.9).

Oznaki vzorcev rCnSL-C in rCnSL-pro C smo v nadaljevanju spremenili v rCnSL-3 in rCnSL-4.

### **3.2.2.3 Izražanje rCnSL v ekspresijskem sistemu *E. coli* BL21 (DE3) z indukcijo z IPTG**

Pred pridobivanjem različic rekombinatnega lektina (rCnSL-2 oz. 3 oz. 4) v večji količinah, smo izvedli manjše poskusno izražanje proteinov in opazovali časovni potek izražanja različic rCnSL. Pri tem smo bakterijske celice *E. coli* BL21 (DE3) gojili v 100 mL tekočega gojišča LBA v 1 L stresalni erlenmajerici v avtomatskem stresalniku Centromat HK (B. Braun Biotech International, ZDA) pri 37°C in 220 obr/min. Ko je optična gostota pri 600 nm ( $OD_{600}$ ) dosegla vrednost 0,9 - 1,2 smo inducirali izražanje z dodatkom 100 µL 1M induktorja izopropil-β-D-thiogalaktoranozida (IPTG) in spremljali  $OD_{600}$  s spektrofotometrom Lambda 25 (PerkinElmer, ZDA). Po indukciji z IPTG smo celice pustili rasti še 6 ur, pri čemer smo vsako uro izmerili  $OD_{600}$  in shranili 1 mL vzorca celic. Preden smo vzorec celic zamrznili pri -20°C, smo ga centrifugirali 2 min pri  $7000 \times g$  v centrifugi Eppendorf 5424 (Eppendorf, Nemčija) in sprijetim celicam v celoti odstranili supernatant. Kasneje smo celice resuspendirali v dH<sub>2</sub>O, pri čemer smo za vsak vzorec preračunali ustrezno količino dH<sub>2</sub>O po enačbi  $V(dH_2O \text{ v } \mu\text{L}) = OD_{600 \text{ vzorca}} \times 75$ . Na ta način smo dobili primerljivo koncentracijo izraženega proteina v vseh vzorcih, ki smo jih nato analizirali z NaDS-PAGE in ugotovili koliko ur po indukciji je izražanje posameznega rCnSL največje.

Različice rekombinatnega lektina (rCnSL-2 oz. 3 oz. 4) smo pridobili z gojenjem bakterijskih celic *E. coli* BL21 (DE3) v 500 mL tekočega gojišča LBA na enak način kot smo to izvedli pri poskusnem izražanju proteinov. Edina razlika je bila ta, da smo 500 mL gojišča s celicami razdelili v 2 x 2 L stresalni erlenmajerici in je bila količina dodanega 1M IPTG 2 x 250 µL. Celice smo po indukciji z IPTG gojili še 4 ure in izmerili  $OD_{600}$ . Vsebino vsake erlenmajerice smo nato prelili v posamezno centrifugirko GS-3 (Sarstedt, Nemčija), centrifugirke uravnotežili med seboj in centrifugirali 15 min pri  $6000 \times g$  in 4°C v centrifugi Sorvall RC-5C Plus (Sorvall,

ZDA). Celicam smo po centrifugiraju odstranili supernatant in jih nato resuspendirali v 25 mL pufra TET (količina, ki smo jo odmerili v vsako centrifugirko). Suspendirane bakterijske celice iste različice rCnSL smo iz dveh centrifugirk GS-3 združili v eno centrifugirko GSA ter zamrznili pri -20°C.

### 3.2.3 Čiščenje in renaturacija rCnSL iz inkluzijskih telesc

Zamrznjene bakterijske celice smo v centrifugirkah GSA počasi odtalili pri sobni temperaturi in jih nato razbili z ultrazvokom s sonifikatorjem Digital Sonifier W-450 D (Branson, ZDA). Postopek smo izvajali 10 min pri 95% amplitudi in nastaviti cikla na 0,9. Pri tem se je razvilo precej topote, ki bi lahko vodila do denaturacije, zato smo centrifugirko hladili z ledom. Netopno frakcijo smo ločili s centrifugiranjem (15 min pri  $10.000 \times g$  in 4°C v centrifugi Sorvall RC-5C Plus, ZDA) in jo raztopili v 40 ml pufra TET. Po ponovnem centrifugiranju (15 min pri  $10.000 \times g$  in 4°C) smo oborino postopoma raztapliali v naraščajočih koncentracijah sečnine, raztopljeni v pufru TET. Oborini smo po vsakem centrifugiranju vedno najprej odstranili supernatant (ki smo ga shranili) in jo nato raztapliali v raztopini sečnine s pomočjo magnetnega mešala pri 4°C. Raztpljanje smo začeli z dodatkom 35 mL 1M sečnine in oborino raztapliali 1 uro. Sledilo je centrifugiranje (15 min pri  $10.000 \times g$ , 4°C) in 36-urno raztpljanje oborine v 25 mL 3M sečnine. Po 20 minutnem centrifugiranju pri  $10.000 \times g$  smo oborino raztapliali 3 ure v 15 mL 6M sečnine. Raztopino smo nato centrifugirali v centrifugirki SS-34 20 min pri  $12.000 \times g$  in 4°C. Nazadnje smo oborino raztapliali 2 uri v 10 mL 8M sečnine in jo preko noči shranili v hladilniku. Naslednji dan smo raztopino še zadnjič centrifugirali 20 min pri  $12.000 \times g$  in 4°C.

V primeru, da se protein ni oboril po centrifugiranju v 3M sečnini (vzorca rCnSL-2 in rCnSL-3), smo vzorec nadalje centrifugirali 20 min v centrifugirki SS-34 pri  $30.600 \times g$  in 4°C. Če se v vzorcu ni pojavila oborina, smo ga centrifugirali še enkrat pri enakih pogojih in če se nato v vzorcu še vedno ni pojavila oborina, smo vzorec sonificirali 10 min pri 95 % amplitudi in nastaviti cikla na 0,9. Nato smo v istih centrifugirkah vzorec centrifugirali 20 min pri  $12.000 \times g$  in 4°C.

Med raztpljanjem različic rekombinantnega lektina smo po vsaki stopnji (raztpljanju ali centrifugiranju) vzorčili 200 μL raztopine. Vzorce smo nato analizirali z NaDS-PAGE in

ugotovili v katerih frakcijah supernatana se je nahajalo največ proteina. Le-te smo nato združili ter shranili v hladilniku.

### 3.2.3.1 Obarjanje z amonijevim sulfatom

Vzorca rCnSL-2 in rCnSL-3 sta bila po čiščenju iz inkluzijskih telesc še vedno precej motna, zato smo se odločili za dodaten korak čiščenja oz. koncentriranja proteinov z obarjanjem. Rekombinantna lektina smo obarjali z amonijevim sulfatom tako, da smo vzorcem (glede na njihov volumen) dodali tolikšno količino amonijevega sulfata, da je prišlo do 100 % nasičenja raztopine. Amonijev sulfat smo dodajali postopoma in ga raztopljal s pomočjo magnetnega mešala več ur, vendar se kljub temu ni v celoti raztopil. Raztopino smo nato shranili preko noči v hladilniku. Naslednji dan smo vzorca rCnSL-2 in rCnSL-3 centrifugirali v centrifugirki GSA 15 min pri  $16.200 \times g$  v hladni centrifuggi ( $4^{\circ}\text{C}$ ) Sorvall RC-5C Plus (Sorvall, ZDA). Ker je bila oborina skoraj neznatna, smo vzorca ponovno centrifugirali 10 min pri  $19.700 \times g$  in  $4^{\circ}\text{C}$ . Raztopino posameznega vzorca smo nato filtrirali skozi filter papir Sartorius (Sartorius AG, Nemčija) z velikostjo por  $0,2 \mu\text{m}$ . Filtrat smo shranili v hladilniku. Oborino, ki je ostala na filter papirju, smo postrgali s papirja in jo raztopili v pufru za gelsko filtracijo (rCnSL-2 v 8 mL pufra, rCnSL-3 v 15 mL pufra). Ponovno smo izvedli postopek centrifugiranja (15 min pri  $20.200 \times g$  in  $4^{\circ}\text{C}$ ) in vzorec filtrirali ter filtrat shranili v hladilniku. Oborino smo ponovno postrgali s papirja in jo raztopili v pufru za gelsko filtracijo (rCnSL-2 v 10 mL pufra, rCnSL-3 v 20 mL pufra). Vzorca smo nato centrifugirali še 15 min pri  $20.200 \times g$  in  $4^{\circ}\text{C}$ . V vzorcu rCnSL-2 do nastanka oborine ni prišlo. Oborini rCnSL-3 smo odlili supernatant in jo raztopljal v 15 mL pufra za gelsko filtracijo na magnetnem mešalu v hladni sobi ( $4^{\circ}\text{C}$ ) preko noči. To raztopino smo nato očistili z gelsko filtracijo. Vsem filtratom oz. raztopinam smo izmerili koncentracijo s spektrofotometrom NanoDrop ND-2000c (NanoDrop Technologies, ZDA).

Vzorca rCnSL-4 nismo obarjali z amonijevim sulfatom, saj je bila njegova motnost majhna. Pred izvedbo gelske filtracije smo vzorec centrifugirali 10 min pri  $20.200 \times g$  in  $4^{\circ}\text{C}$ , oddekantirali supernatant in ga nato nanesli na kolono za gelsko filtracijo.

### 3.2.4 Gelska filtracija

Gelska filtracija (imenovana tudi gelska izključitvena kromatografija) je separacijska metoda, ki ločuje na osnovi velikosti oz. oblike proteinov. Ločevanje poteka na zamreženem polimernem gelu (z določeno velikostjo por), ki predstavlja stacionarno fazo. Ko na gel nanesemo vzorec, začnejo molekule zaradi toka mobilne faze difundirati v pore stacionarne faze. Večje molekule potujejo hitreje, saj se lahko gibljejo le med delci stacionarne faze, ne morejo pa difundirati vanje. Manjše molekule pa na svoji poti vzdolž kolone zahajajo v pore, se v njih nekaj časa zadržujejo in nato oddifundirajo v mobilno fazo – zato je njihov elucijski volumen večji.

Za čiščenje rekombinantnih proteinov smo uporabili kolono z višino 113 cm in premerom 4 cm, napolnjeno z gelom Superdex S200 (GE Healthcare, Švedska). Kolono smo dobro očistili in pred nanosom vzorca gel spirali 24 ur s pufrom za gelsko filtracijo (0,02 M Tris-HCl in 0,3 M NaCl, pH = 7,5). Na kolono smo nanesli 15 mL posameznega vzorca lektina (rCnSL-3 oz. rCnSL-4). Ločevanje je potekalo 24 ur pri 4°C s pretokom 52,8 mL pufra/uro. S pomočjo zbiralca frakcij smo le-te zbirali na vsakih 30 min. Volumen posamezne frakcije je znašal 26 mL. Frakcijam smo določili koncentracijo proteinov z merjenjem A<sub>280</sub>.

### 3.2.5 Določanje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov smo določali z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 280 nm s spektrofotometrom Lambda 25 (PerkinElmer, ZDA). K absorpcijskemu maksimumu proteinov pri 280 nm prispevajo predvsem aromatske aminokisline Tyr in Trp ter v manjši meri tudi Phe in disulfidne vezi. Enaka koncentracija proteina, ki ima v svoji zgradbi večji delež aromatskih aminokislin, bo imela večjo absorbanco. Če poznamo molarni absorpcijski koeficient za protein ( $\epsilon$ ), lahko izračunamo njegovo koncentracijo v raztopini z Beer-Lambertovim zakonom:

$$A = \epsilon \times l \times c \quad (\text{enačba } I)$$

A ... absorbanca

c ... molarna koncentracija snovi v vzorcu [mol/L]

$\epsilon$  ... molarni absorpcijski koeficient [L/(mol × cm)]

l ... dolžina optične poti skozi vzorec [cm]

Vrednost molarnega absorpcijskega koeficiente za rekombinantni lektin smo izračunali s pomočjo spletnega programskega orodja ProtParam (<http://expasy.org/tools/protparam.html>). Preverili smo tudi, ali predhodno obarjanje z amonijevim sulfatom in njegova prisotnost v vzorcu vpliva na absorbanco pri 280 nm. Ugotovili smo, da amonijev sulfat ne vpliva na meritve (72). Vsem frakcijam smo po gelski filtraciji izmerili absorbanco pri 280 nm in ugotovili, v katerih se nahaja največ proteina ter frakcije združili.

### **3.2.6 Koncentriranje vzorcev z ultrafiltracijo**

Po merjenju absorbance vzorcev rCnSL-3 in rCnSL-4 smo ugotovili, da je njihova koncentracija prenizka za izvedbo nadalnjih poskusov. Odločili smo se, da jih bomo skoncentrirali z metodo ultrafiltracije. Metoda temelji na uporabi membran s porami določene velikosti, ki prepuščajo le molekule in ione topila oz. topljencev z nizko molekulsko maso. Uporabili smo 200 mL ultrafiltracijsko celico Amicon 8200 (Amicon div., ZDA), ki smo jo postavili na magnetno mešalo v hladni sobi (4°C). Pretok raztopine skozi membrano smo dosegli z nadtlakom dušika, ki je znašal približno 4 bare. Membrana ultrafiltracijske celice je imela premer 62 mm in je prepuščala proteine manjše od 3 kDa, ostale pa zadržala. Izbrane frakcije po gelski filtraciji z največjo vsebnostjo rekombinantega proteina smo združili v ultrafiltru in vzorec skoncentrirali na volumen 5 mL.

Pred izvedbo cirkularnega dikroizma (CD) smo manjši količini vzorca rCnSL-3 zamenjali pufer s pomočjo centrifugalnega koncentratorja Amicon® Ultra-4 (Millipore, ZDA) z izključitveno molekulsko maso 3 kDa. Pretok skozi membrano smo dosegli s centrifugalno silo, in sicer smo pri tem uporabili hladno centrifugo (4°C) Eppendorf 5804 R (Eppendorf, Nemčija). Vzorca nativnega in rekombinantega CnSL smo pri  $3.000 \times g$  najprej skoncentrirali na 250 μL, nato pa dodali fosfatni pufer (pH 6,5) do 4 mL in vzorce skoncentrirali na volumen, ki je ustrezal približni koncentraciji 0,2 μg proteina/μL.

### **3.2.7 Poliakrilamidna gelska EF v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE)**

Pri tej vrsti elektroforeze komponente vzorca pred analizo denaturiramo z NaDS, dodatkom reducenta (npr. β-merkaptoetanolom) in kuhanjem pri 100°C. Razmerje med nabojem in dolžino verige proteina v kompleksu z NaDS je enako za vse proteine, ki imajo zato tudi enako

elektroforezno mobilnost. Ločitev molekul se tako vrši izključno na osnovi velikosti zaradi zamreženosti separacijskega gela. Velike molekule potujejo počasi, majhne hitro, ne glede na naboje, ki bi ga imele v nativnem stanju. Zato je metoda primerna tudi za določevanje relativne molekulske mase.

NaDS-PAGE smo uporabili za oceno velikosti in preverjanje količine proteina pri vseh različicah rCnSL tekom njihove priprave. Pri tem smo uporabili elektroforezni sistem Mini-PROTEAN II® (Bio-Rad, ZDA). Elektroforezo smo izvedli na gelu, ki je bil sestavljen iz dveh različno zamreženih gelov: manj zamreženega koncentracijskega gela (v katerem se proteini nakopičijo skupaj) in bolj zamreženega ločevalnega gela (kjer se proteini ločijo po velikosti). Gela se poleg zamreženosti razlikujeta tudi v molarnosti pufra (s katerim sta pripravljena) in v vrednosti pH. Reagenti za pripravo 12% oz. 15% gela so v mL podani v spodnji preglednici.

**Preglednica XXI: Reagenti za pripravo gela za NaDS-PAGE.**

Reagenti / konc. gela	Koncentrirni gel (pH pufra 6,8)	Ločevalni gel (pH pufra 8,8)	
	4%	12%	15%
dH <sub>2</sub> O	3,168	4,335	3,585
Pufer Tris-HCl	1,250	2,500	2,500
10% NaDS	0,050	0,100	0,100
40% akrilamid	0,500	3,000	3,750
10% APS	0,025	0,050	0,050
TEMED	0,008	0,015	0,015
končni volumen	5,000	10,000	10,000

Gel smo pripravili tako, da smo med 1,5 mm razmagnjeni stekelci najprej vlili ločevalni gel, nanj pa takoj zatem še butanol, nasičen z dH<sub>2</sub>O, da smo izravnali linijo gela. Ko se je gel strdil (čez 30 do 45 min) smo s filter papirjem v celoti popivnali butanol, sprali vrh gela z dH<sub>2</sub>O in tudi slednjo popivnali s papirjem. Na vrh ločevalnega gela smo vlili še koncentrirni gel ter v gel namestili glavniček z desetimi žepki ter počakali, da se je tudi ta gel strdil. Glavniček smo odstranili in stekelci z gelom vpeli v aparaturo za EF ter v sistem nalili 1x elektroforezni pufer.

Vzorce za nanos na gel smo pripravili tako, da smo v čiste 1,5 mL epice odpipetirali proteinski vzorec in nanašalni pufer v razmerju 1:1. Nato smo jih kuhal 10 min v vodni kopeli pri 100°C.

Vzorce smo nanesli v žepke na gelu, prav tako tudi 5 µL označevalca velikosti, ki je vseboval standardne proteine molekulskih mas od 14,4 do 97 kDa (iz kompleta LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis, Amersham Biosciences, ZDA). Elektroforeza je potekala v navpični smeri pri konstantnem toku 30 mA/gel približno 70 min.

Po končani elektroforezi smo gel barvali vsaj 45 min v 0,1 % raztropini barvila Coomassie brilliant blue (PhastGel Blue R, GE Healthcare, Švedska). Nato smo ga razbarvali z večkratno zamenjavo 30 % razbarvalne raztopine in ga pustili preko noči v 10 % razbarvalni raztopini. Če barvanje z barvilkom Coomassie ni bilo uspešno, smo gel barvali z bolj občutljivimi srebrovimi ioni. Najprej smo gel popolnoma razbarvali v 30 % razbarvalni raztopini, nato smo ga spirali 30 s z dH<sub>2</sub>O, ga inkubirali 15 min v vodni raztopini K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (c = 1 g/L), ga ponovno spirali 30 s z dH<sub>2</sub>O ter ga inkubirali vsaj 20 min v sveže pripravljeni vodni raztopini AgNO<sub>3</sub> (c = 2 g/L). Gel smo razvijali v razvijalni raztopini toliko časa, dokler se niso pojavile obarvane lise na gelu. Reakcijo vezave srebrovih ionov smo ustavili z dodatkom 5 gramov citronske kisline.

Elektroforezo očiščenega rCnSL-3 in 4 smo izvedli tudi na gradientnem poliakrilamidnem gelu PhastGel™ 8 - 25 % (Pharmacia, Švedska) na avtomatizirani aparaturi PhastSystem (Pharmacia, Švedska) po navodilih proizvajalca.

### **3.2.8 Biokemijska karakterizacija pripravljenega rCnSL**

Lastnosti pripravljenega rCnSL-3 smo ugotavljali z uporabo afinitetne kromatografije, izoelektričnega fokusiranja, cirkularnega dikroizma in s hemaglutinacijskim testom. Način izvedbe analiz je podrobneje opisan v nadaljevanju.

#### **3.2.8.1 Afinitetna kromatografija**

Afinitetna kromatografija je metoda ločevanja biokemijskih mešanic na osnovi visoko specifične reverzibilne biološke interakcije. V našem primeru je bila to interakcija med lektinom in sladkorjem. Predvsem smo želeli ugotoviti specifičnost vezave pripravljenega rekombinantnega lektina na saharozo. To smo preizkusili na koloni, ki je vsebovala saharozil-sefarozo (Sepharose CL 4B, Pharmacia, Švedska). Sefaroza CL 4B je trgovsko ime za prečno zamreženo agarozo, ki je v obliki kroglic. Vsebnost sefaroze je glede na dano oznako 4 %. Zamreženost sefaroze omogoča večjo kemično in fizikalno odpornost v primerjavi z nezamreženo obliko. Prav tako ima

tudi boljše pretočne lastnosti in jo lahko uporabimo tudi za ločevanje snovi raztopljenih v organskih topilih, saj je nanje odporna.

Pri izvedbi afinitetne kromatografije smo uporabili naslednje raztopine:

- pufer za afinitetno kromatografijo (20 mM Tris-HCl, 0,4 M NaCl; pH 6,5)
- elucijska raztopina (0,01 M NaOH)
- nevtralizacijski pufer (2M Tris-HCl; pH 6,5)

V stekleno kolono višine 15 cm in premera 4 cm smo nalili 100 mL saharozil-sefaroze, počakali da se je ustrezeno posedla in jo spirali s pufom za afinitetno kromatografijo. Na kolono smo nanesli 3 mg rekombinantega saharozil-lektina (raztopljenega v pufru za gelsko filtracijo) in ga nato spirali s pufom za afinitetno kromatografijo s približnim pretokom 15 mL/min. V epruvete smo lovili 5 mL frakcije nevezanega vzorca. Po spiranju vzorca s 300 mL afinitetnega pufra, smo v celoti sprali nevezan vzorec, zato smo pri 60. frakciji na kolono začeli dodajati elucijsko raztopino. Pri tem je prišlo do spremembe pH (na vrednost 12) in posledično do eluiranja vezanega vzorca, ki smo ga lovili v epruvete, v katere smo predhodno odpipetirali 200  $\mu$ L nevtralizacijskega pufra s pH = 6,5. Vsem frakcijam smo izmerili A<sub>280</sub> in vrednosti prikazali v obliki grafa. Nevezane frakcije vzorca smo nato združili in skoncentrirali z ultrafiltracijsko celico Amicon 8200 (Amicon div., ZDA).

### 3.2.8.2 Izoelektrično fokusiranje (IEF)

Metoda IEF temelji na ločevanju proteinov v električnem polju na osnovi razlik v številu kislih in bazičnih skupin v posameznem proteinu. Izoelektrična točka (pI) je definirana kot pH, pri katerem molekula nima naboja oz. je njen celokupni nabolj enak nič. Zato pri pI molekule nimajo elektroforezne mobilnosti in ne morejo potovati.

S pomočjo IEF smo določili pI rCnSL-3 in ugotovili ali se rekombinanti lektin pojavlja v več izoblikah. IEF smo izvedli s pomočjo avtomatizirane naprave PhastSystem (Pharmacia, Švedska) na poliakrilamidnem gelu z gradientom pH od 3 do 9 (PhastGel™ IEF 3-9, Pharmacia, Švedska). Izoelektrične točke smo določili s pomočjo označevalca izoelektričnih točk za pH območje od 3 do 9 (Broad pI Calibration Kit, Pharmacia, Švedska).

### 3.2.8.3 Aglutinacijska oz. hemolitična aktivnost lektinov

Vezavno specifičnost rekombinantega lektina smo preizkusili tudi s testom zlepljanja eritrocitov (hemaglutinacijo). Izolirane človeške eritrocite krvne skupine A, ki smo jih uporabili pri testih aglutinacije, smo pred izvedbo poskusa nekajkrat sprali s fiziološko raztopino (0,9 % NaCl) in jih nato še dvakrat sprali z eritrocitnim pufrom (20 mM Tris-HCl in 140 mM NaCl pH = 7,4). Na mikrotitrsko ploščo z zaokroženim dnom Nunclon Delta SI (Nunc, Danska) smo v vsako vdolbinico odpipetirali po 100 µL 2 % (m/v) eritrocitne suspenzije. Nato smo v prvem poskusu k eritrocitom dodali 20 µL in 30 µL vzorca rCnSL-3 s koncentracijo 1,405 mg/mL. V drugem poskusu smo v vdolbinice najprej odpipetirali po 1, 2, 4, 6, 8 in 10 µL vzorca rCnSL-3 s koncentracijo 1,405 mg/mL in nato dodali po 100 µL 2 % (m/v) eritrocitne suspenzije. Aglutinacijo oz. hemolizo eritrocitov smo vizualno ocenili po enourni oz. po 24-urni inkubaciji vzorca pri sobni temperaturi.

### 3.2.8.4 Cirkularni dikroizem (CD)

Pri cirkularnem dikroizmu gre za vrsto spektroskopije pri kateri merimo razliko v absorbanci med levosučno in desnosučno krožno polarizirano svetlogo optično aktivnih molekul v raztopini. To razliko imenujemo eliptičnost ( $\theta$ ). Spekter cirkularnega dikroizma (CD-spekter) prikazuje eliptičnost v odvisnosti od valovne dolžine. Če v vzorčni molekuli ni asimetričnih centrov, se obe svetlobi enako absorbirata in je razlika med njima enaka nič. Če pa so v vzorcu asimetrični centri, bo glede na razporeditev le-teh razlika lahko pozitivna ali negativna. Iz CD-spektra lahko ugotovimo, kolikšen delež aminokislín zavzema sekundarno zgradbo vijačnice  $\alpha$ , ravnine  $\beta$  oz. naključnega zvitja (7).

S CD-spektroskopijo smo ugotavljali struktorno podobnost naravnega saharozil-lektina in rekombinantnega lektina rCnSL-3. Meritve obeh lektinov smo izvedli na spektropolarimetru AVIV 62A DS (Aviv inc, ZDA) v daljnem UV območju pri valovnih dolžinah od 185 do 250 nm. Poleg meritve vzorcev smo pri vsaki meritvi izmerili še CD-spekter samega topila in ga odšteli od CD-spektra lektina. Pri meritvah smo uporabili kiveto iz kvarčnega stekla debeline 1 mm. Vzorca naravnega in rekombinantnega lektina smo pripravili po sledečem postopku: najprej smo jima zamenjali pufer s pomočjo centrifugalnega koncentratorja Amicon® Ultra-4 (Millipore, ZDA) kot je to opisano v podpoglavlju o koncentriranju vzorcev (3.2.6). Raztopili smo ju v 0,01

M fosfatnem pufru (pH 6,5), ki ima dovolj nizko absorbanco tudi v dalnjem UV območju in tako ne moti meritev. Vzorca smo centrifugirali 10 min pri 16.100 × g in 4°C v centrifugi Eppendorf 5415 R (Eppendorf, Nemčija). Koncentracijo obeh lektinov smo izmerili s spektrofotometrom NanoDrop ND-2000c (NanoDrop Technologies, ZDA) in je znašala 0,59 µg/µL za naravni CnSL in 0,17 µg/µL za rCnSL-3. Nato smo posneli CD-spektra obeh lektinov.

Rezultate meritev eliptičnosti smo grafično predstavili s povprečno molarno eliptičnostjo aminokislinskega ostanka ( $[\theta]_{mrw}$ ) izračunano po enačbi 2. Pri tem smo upoštevali povprečno molekulsko maso aminokislinskega ostanka proteina ( $M_{mrw}$ ), ki smo jo izračunalni tako, da smo molekulsko maso proteina delili s številom aminokislinskih ostankov proteina.

$$[\theta]_{mrw} = \frac{\theta \times M_{mrw}}{10 \times l \times c} \quad (\text{enačba } 2)$$

$\theta$ .....eliptičnost pri valovni dolžini  $\lambda$  [stopinje oz. mdeg]

$[\theta]_{mrw}$ ....povprečna molarna eliptičnost aminokislinskega ostanka [deg cm<sup>2</sup>/dmol]

$M_{mrw}$ ....povprečna molekulska masa aminokislinskega ostanka proteina [g/mol]

c.....koncentracija proteina [mg/mL]

l.....debelina kivete oz. dolžina optične poti [cm]

## 4. REZULTATI

### 4.1. Določitev N-končnega in dela notranjega aminokislinskega zaporedja CnSL

Po cepitvi lektina s CNBr in ločitvi peptidnih fragmentov z RF-HPLC, smo določili N-končno in del notranjega aminokislinskega zaporedja naravnega CnSL. Zaporedje N-končnega dela lektina je bilo VNPNLPGPNDVFVGFRGTNN, del notranjega zaporedja pa TAIRFGNLNT. Medtem smo na osnovi že predhodno določenega N-končnega in dela notranjega zaporedja (60) načrtovali degenerirane oligonukleotidne začetnike s pomočjo računalniškega programa CADEPCO. Te začetnike smo uporabili v reakciji degenerirane reakcije PCR.

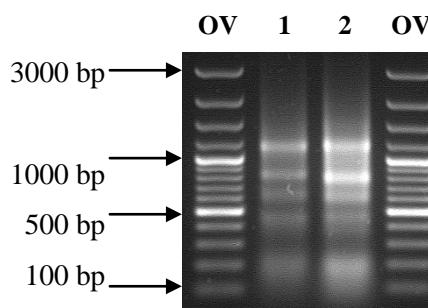
Preglednica XXII: Načrtovani degenerirani oligonukleotidni začetniki

oznaka degeneriranega začetnika	AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE degenerirano nukleotidno zaporedje v smeri 5' → 3'
CnSL-deg-N1	V N P N L P GTi AAY CCi AAY YTi CC
CnSL-deg-N2	G P N D V F V GGi CCi AAY GAY GTi TTY GT
CnSL-deg-C1	D L C L N T G TCi ARR CAi ARR TT iGT iCC
CnSL-deg-C2	V Q V Q T N G AC YTG iAC YTG iGT RTT iCC

### 4.2 Pomnoževanje delnih nukleotidnih zaporedij gena CnSL z verižno reakcijo s polimerazo

#### 4.2.1 Izolacija celokupne RNA

RNA smo izolirali iz homogenata gobe megleanke (*Clitocybe nebularis*), ki so ga predhodno pripravili raziskovalci IJS in ga shranili pri -80°C. Uspešnost izolacije celokupne RNA iz obeh gob smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Kot označevalec velikosti smo uporabili velikostni standard 100 bp. Na gelu vidimo, da smo uspešno izolirali RNA v obeh primerih, pri čemer je bila količina izolirane RNA večja pri vzorcu CnV3 v primerjavi s CnK3. Obe različici RNA smo nato prevedli v cDNA, ki smo jo označili z enakima oznakama – CnK3 oz. CnV3.



OV – označevalec velikosti molekulskih mas

1 – izolirana RNA CnK3

2 – izolirana RNA CnV3

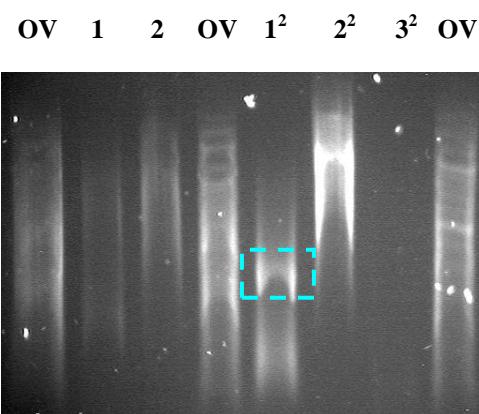
Slika 7: Izolacija RNA

#### 4.2.2 Pomnoževanje nezanega zaporedja CnSL z degeneriranimi začetniki

Pomnoževanje zaporedja cDNA oz. različnih redčitev gDNA (CnV3) s kombinacijo smernih in protismernih degeneriranih oligonukleotidnih začetnikov se je izkazalo za neuspešno, čeprav smo reakcijo izvedli večkrat. Na agaroznem gelu nismo zasledili nobenega pomnoženega produkta 1° ali 2° PCR. Zato smo ta način pomnoževanja opustili in se odločili, da bomo delo nadaljevali z metodo 3'RACE.

#### 4.2.3 Pomnoževanje cDNA z metodo hitrega kloniranja 3' koncov cDNA (3'RACE)

Pri pomnoževanju z metodo 3'RACE sta se degenerirana začetna oligonukleotida CnSL-deg-N1 in CnSL-deg-N2 v 1° PCR in 2° PCR vezala na cDNA (CnV3) lektina in reakcija PCR je v obeh primerih potekla uspešno. To je razvidno iz gela po agarozni elektroforezi, kjer je viden pomnožen odsek nukleotidnega zaporedja v vzorcu **1<sup>2</sup>** (z modro označena lisa na sliki 8). Pri pripravi agaroznega gela smo pomotoma uporabili dH<sub>2</sub>O namesto pufra TAE, zato so lise fragmentov na sliki razpotegnjene in ne moremo oceniti njihove velikosti. Velikost označenega fragmenta smo določili šele po nanosu vzorca **1<sup>2</sup>** na nov gel, kjer je bila njegova velikost 750 bp. Manjši fragment v vzorcu **1<sup>2</sup>** (velikosti 200 bp) pa je predstavljal nespecifično pomnožitev degeneriranih začetnikov. V vzorcu **2<sup>2</sup>** je prišlo do pomnoževanja samih 3'RACE začetnikov, v kontrolnem vzorcu **3<sup>2</sup>** pa po pričakovanjih do pomnoževanja ni prišlo. Uspešno pomnožen fragment vzorca **1<sup>2</sup>** smo nato izrezali iz gela, ga klonirali v vektor pGEM-T Easy in mu po transformaciji (dveh bakterijskih kolonij, ki sta vsebovali plazmid z vključkom) določili nukleotidno zaporedje.



OV - označevalec velikosti molekulskih mas (100 bp)

1 - produkt 1°PCR (cDNA + 3'RACE outer + CnSL-deg-N1)

2 - kontrola 1°PCR (cDNA + 3'RACE inner + dH<sub>2</sub>O)

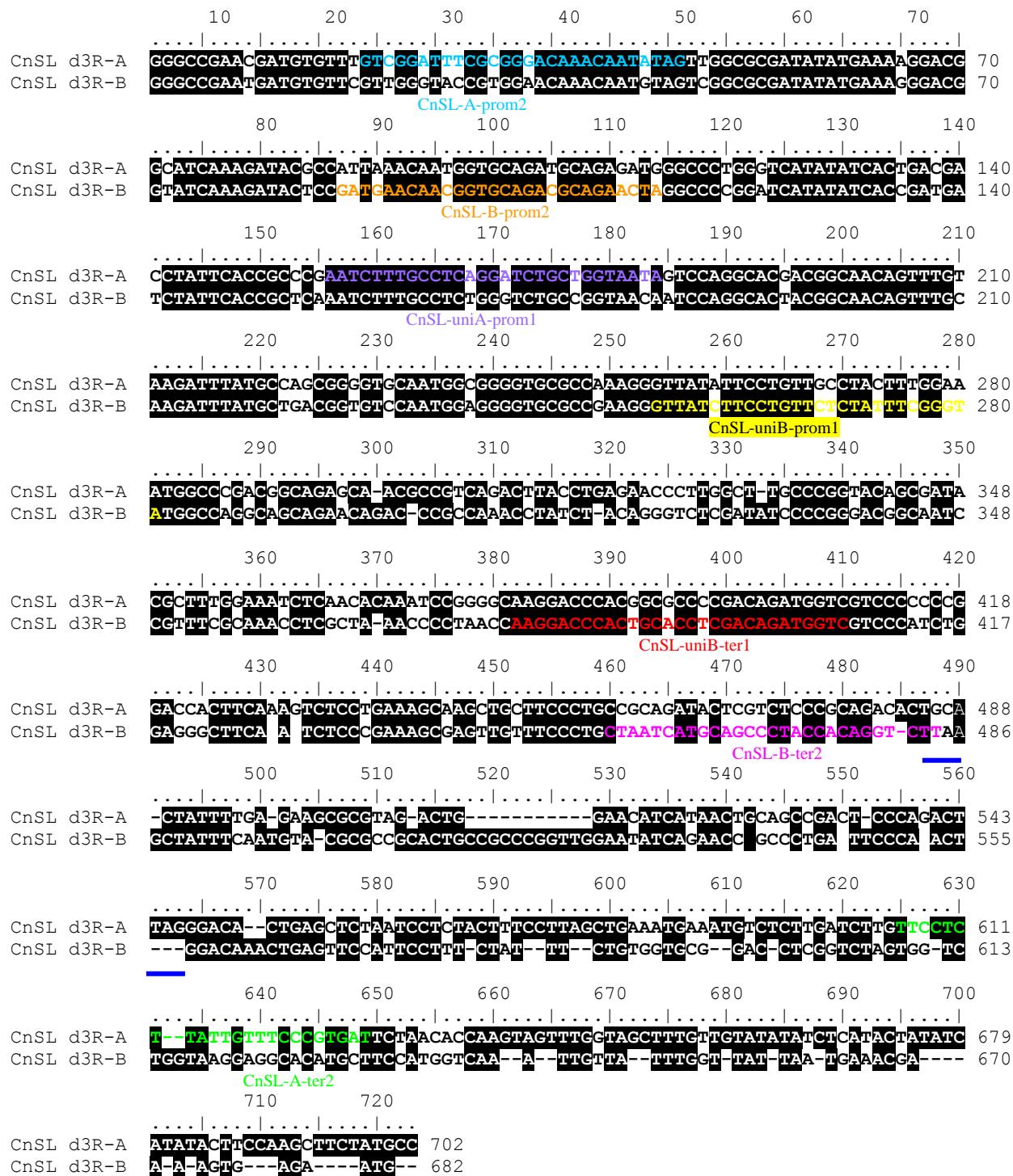
1<sup>2</sup> - produkt 2°PCR (1 + 3'RACE inner + CnSL-deg-N2)

2<sup>2</sup> - produkt 2°PCR (2 + 3'RACE inner + CnSL-deg-N2)

3<sup>2</sup> - kontrola 2°PCR (dH<sub>2</sub>O + 3'RACE inner + CnSL-deg-N2)

fragment, ki smo ga izrezali in mu določili zaporedje

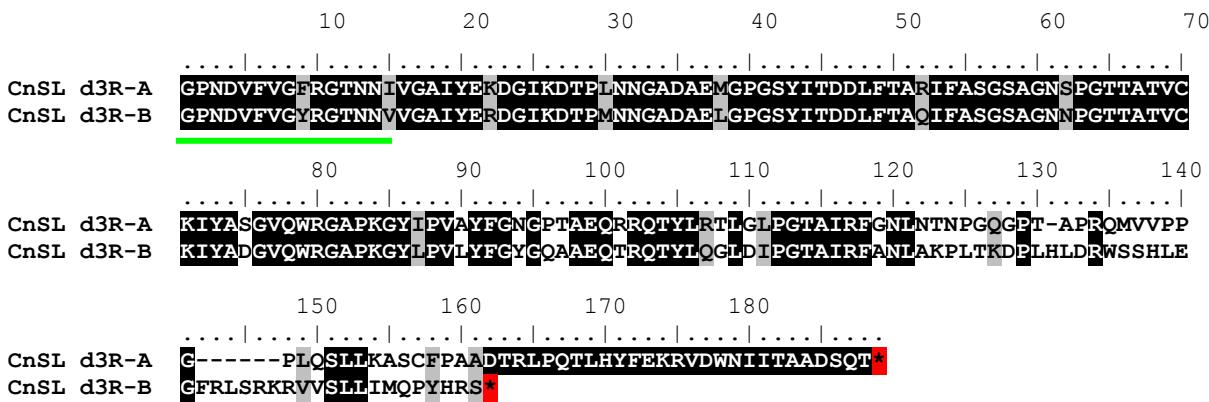
Slika 8: Pomnoženi fragmenti cDNA z degeneriranim 3'RACE



**Slika 9: Poravnava prvih dveh nukleotidnih zaporedij CnSL, dobljenih z metodo degeneriranega 3'RACE**

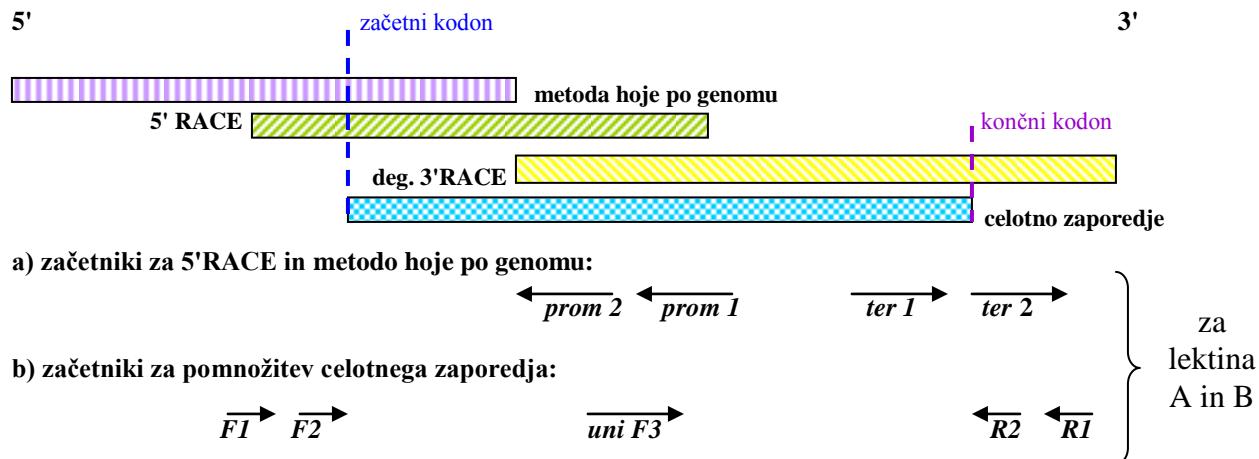
S črno barvo so senčeni nukleotidi, ki so identični v obeh različicah lektina CnSL. Z različnimi barvami so označeni in poimenovani načrtovani oligonukleotidni začetniki za metodo 5'RACE. Končna kodona TAA in TAG sta podprtana s temno modro barvo.

Nukleotidni zaporedji CnSL, dobljeni z metodo 3'RACE, smo računalniško obdelali, ju primerjali in analizirali (slika 9). Ugotovili smo, da se zaporedji razlikujeta tako v dolžini kot tudi v zaporedju nukleotidov. Zato smo se odločili, da ju bomo v nadaljevanju označevali s črkama **A** oz. **B**. Dolžina celotnega zaporedja A je bila 702 bp, zaporedje B pa je bilo dolgo 682 bp, pri čemer je dolžina zaporedja do končnega kodona znašala 560 bp pri zaporedju A in 486 bp pri B. Po prevajanju nukleotidnega zaporedja v proteinsko zaporedje smo v obeh oblikah zasledili del N-končnega aminokislinskega zaporedja preiskovanega lektina, in sicer **GPNDVFVGFRTNN**. Dolžina izpeljanega aminokislinskega zaporedja A je bila 188 AK, zaporedja B pa 161 AK. Iz poravnave obeh aminokislinskih zaporedij (slika 10) je razvidno, da sta zaporedji A in B v začetnem delu podobni, v delu od 121. aminokisline dalje pa zelo različni. Iz tega lahko sklepamo, da gre za zaporedji dveh izolektinov, ki sta sestavljeni iz konstantne in spremenljive regije.



**Slika 10: Poravnava izpeljanih aminokislinskih zaporedij CnSL, dobljenih z metodo degeneriranega 3'RACE**  
 Identične aminokisline so senčene s črno barvo, podobne (80 % podobnost) pa s sivo barvo. S svetlo zeleno je podprt podprt prisoten del N-končnega zaporedja.

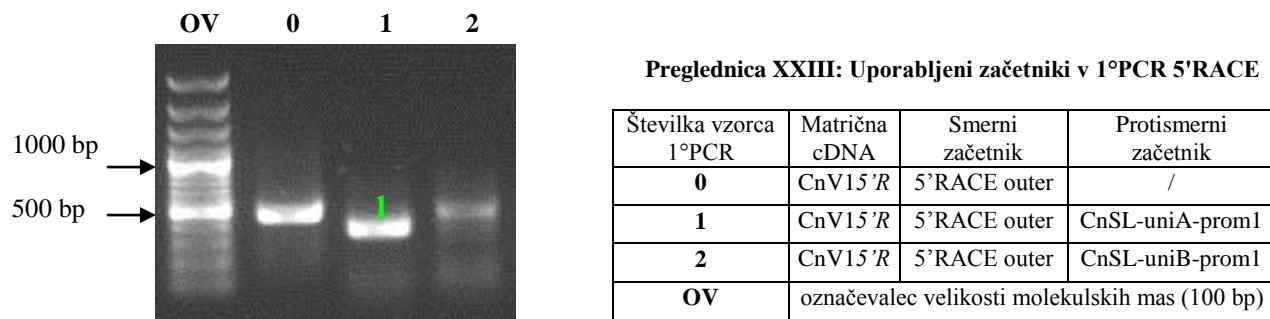
Na osnovi poravnave nukleotidnih zaporedij A in B smo načrtovali nove oligonukleotidne začetnike, ki so nam služili za nadaljnje pomnoževanje neznanega zaporedja CnSL z metodo 5'RACE. Začetnike smo načrtovali za obe različici lektina, in sicer za primarno in sekundarno (vgnezdeno) PCR, s pripadajočima številkama 1 in 2. Pri tem smo poiskali tista mesta v zaporedju, kjer sta se izolektina najbolj razlikovala, ker smo želeli, da bi se začetniki vezali čim bolj specifično. Načrtovali smo tudi dva univerzalna začetnika na delu zaporedja, ki je imel najbolje ohranjen zapis obeh izolektinov. Načrtovani oligonukleotidni začetniki za metodo 5'RACE so prikazani na slikah 9 in 11 ter navedeni v preglednici II.



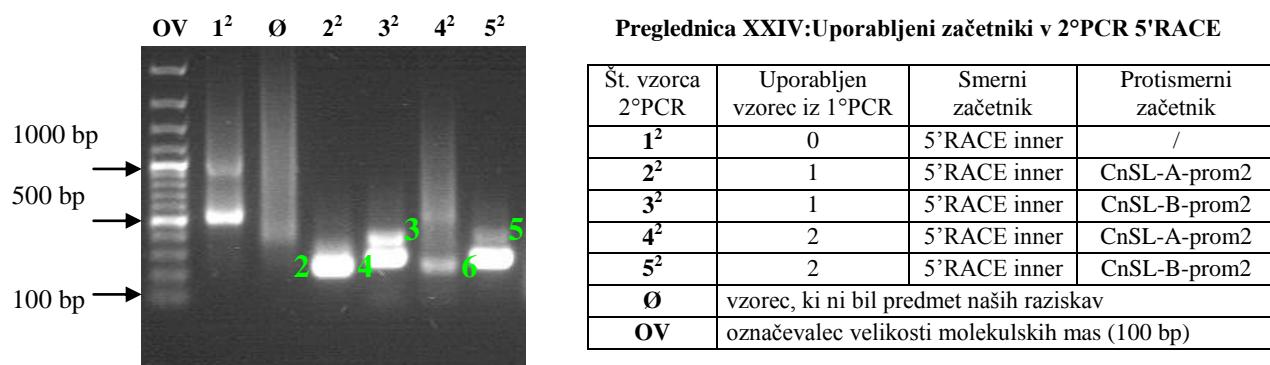
Slika 11: Shematski prikaz načrtovanja oligonukleotidnih začetnikov za CnSL

#### 4.2.4 Pomnoževanje cDNA z metodo hitrega kloniranja 5' koncev cDNA (5'RACE)

Z metodo 5'RACE smo uspešno pomnožili fragment DNA v primarni in sekundarni reakciji PCR (sliki 12 in 13) z uporabo začetnikov CnSL-uniA-prom1, CnSL-uniA-prom2, CnSL-A-prom1, CnSL-A-prom2, CnSL-Bprom1, CnSL-Bprom2.



Slika 12: Pomnoženi produkti v 1°PCR z metodo 5'RACE



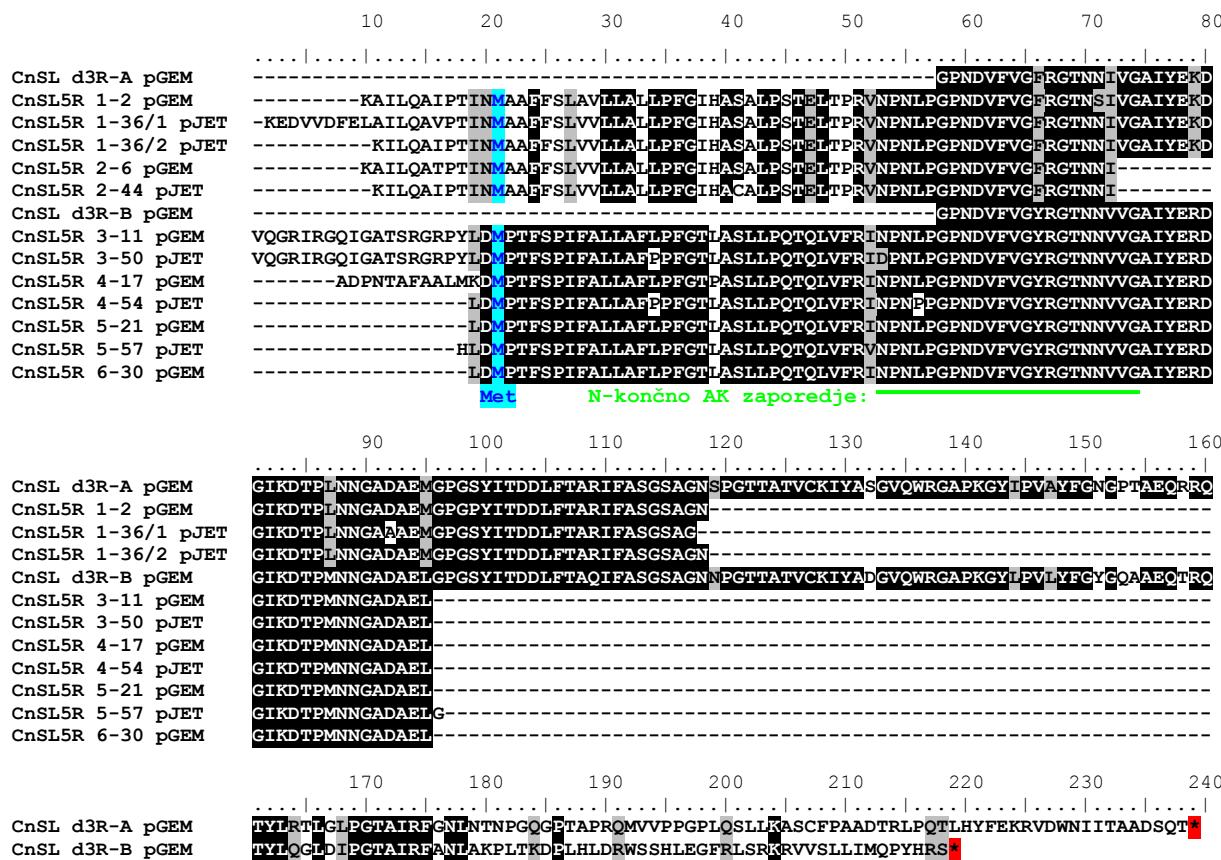
1 – 6: fragmenti, ki smo jih izrezali iz gela in jim določili zaporedje

Slika 13: Pomnoženi produkti v 2°PCR z metodo 5'RACE

V 1°PCR je v kontrolnem vzorcu 0 prišlo do pomnoževanja samega 5'RACE outer začetnika. Glede na velikost lise v vzorcu 0 smo sklepali, da je do enakega pomnoževanja prišlo tudi v vzorcu 2 (lisa enake velikosti), zato pomnoženega produkta PCR nismo uporabili v 2°PCR. Specifično pomnožene fragmente velikosti 200 do 400 bp (oštrevljene z zeleno barvo na slikah 12 in 13) smo izrezali iz gela in klonirali v vektorja pGEM-T Easy in pJET 1,2. Dobljena nukleotidna zaporedja 5'RACE smo poravnali in primerjali med seboj. Ugotovili smo, da so se zaporedja uspešno pomnožila z začetniki A in B, pri čemer se po pričakovanjih nukleotidna zaporedja A (fragmentov 1-2) in zaporedja B (fragmentov 3-6) med seboj razlikujejo. Dolžina nukleotidnih zaporedij je bila (glede na velikost izrezanih fragmentov) pričakovana, in sicer od 188 bp do 379 bp.

Nukleotidna zaporedja 5'RACE smo poravnali z zaporedji 3'RACE in s tem dobili celotno predvideno nukleotidno zaporedje CnSL (z začetnim kodonom ATG in končnim kodonom TAA oz. TAG – priloga 1). Primerjava vseh zaporedij kaže na podobnost zaporedij A, dobljenih z metodama 3' in 5'RACE, enako velja pri primerjavi zaporedij B.

Zaporedja dobljena z metodo 3' in 5'RACE smo s programom BioEdit prevedli tudi v proteinska zaporedja in jih poravnali med seboj (slika 14). Dolžina prevedenih zaporedij 3'RACE je bila 161 oz. 181 AK, proteinska zaporedja 5'RACE so bila dolga od 62 do 118 AK. Vsa predvidena proteinska zaporedja (dobljena z metodama 3' in 5'RACE) smo združili in dobili celotno kodirajoče zaporedje CnSL, ki je od začetnega metionina do končnega kodona znašalo 218 AK v primeru izolektina A in 198 AK v primeru izolektina B. Ugotovili smo, da je N-končno AK zaporedje VNPNLPGPNDVFVGFRGTNN v celoti prisotno v vseh proteinskih zaporedjih A (fragmenta 1 in 2) in B (fragmenti 3-6), pri čemer se pri izolektinu B namesto začetnega Val pojavlja Ile. Prisotnost aminokisline Val oz. Ile se je izkazala kot dober pokazatelj vrste zaporedja A oz. B. Na podlagi sestavljenega celotnega nukleotidnega zaporedja CnSL smo načrtovali nove oligonukleotidne začetnike za pomnožitev celotnega nukleotidnega zaporedja za izolektina A in B (slika 11 in priloga 1).



**Slika 14: Poravnava delnih proteinskih zaporedij dobavljenih z metodama degenerirani 3'RACE in 5'RACE**

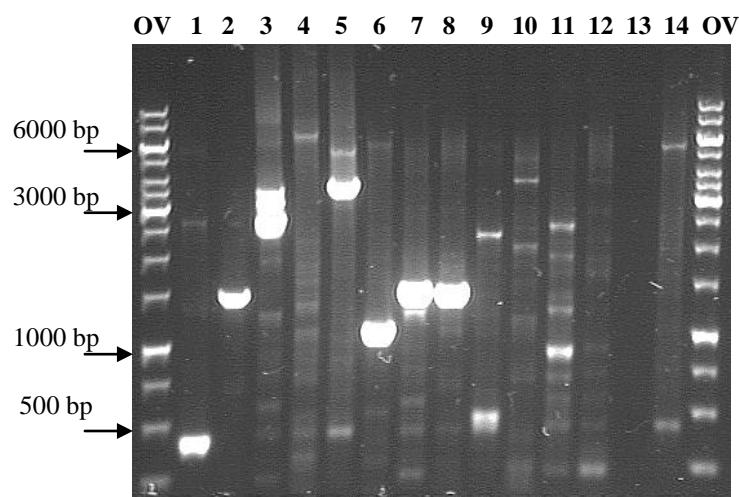
Zaporedji dobljeni z degeneriranim 3'RACE imata oznako CnSL d3R, zaporedja dobljena s 5'RACE pa oznako CnSL5R. Z modro barvo je senčen začetni metionin, z zeleno barvo je podčrtano N-končno aminokislinsko zaporedje, s črno barvo so senčene enake AK, s sivo barvo so označeni predeli, kjer so si AK podobne (50 % podobnost), z rdečo barvo sta označena končna kodona izolektinov A in B.

Analiza nukleotidnega zaporedja CnSL5R 1-36 je pokazala, da se je fragment dvakrat zaporedoma vstavil v plazmidni vektor pJET, ki omogoča vstavljanje fragmentov s topimi konci. Zato smo daljše zaporedje razdelili na dva dela, ki smo ju označili še z dodatnima številkama (1-36/1 oz. 1-36/2). Primerjava obeh zaporedij je pokazala, da se v kodirajočem delu razlikujeta le v enem nukleotidu. Zaporedja 1-2 in 1-36/1 oz. 1-36/2 se razlikujejo v petih nukleotidih. Pri nadaljnji medsebojni primerjavi zaporedij posameznih fragmentov smo ugotovili, da sta zaporedji z oznakama 6-30 in 6-65 identični, zato smo pri poravnavah zaporedij navedli le eno. Zaporedji 2-6 in 2-44 sta nekoliko krašči od ostalih 5'zaporedij in se razlikujeta v kodirajočem delu le v enem nukleotidu. Zaporedji 3-11 in 3-50 ter zaporedji 5-21 in 5-57 se v kodirajočem zaporedju razlikujeta v dveh nukleotidih, zaporedji 4-17 in 4-54 pa v treh nukleotidih.

#### 4.2.5 Pomnoževanje gena z metodo hoje po genomu

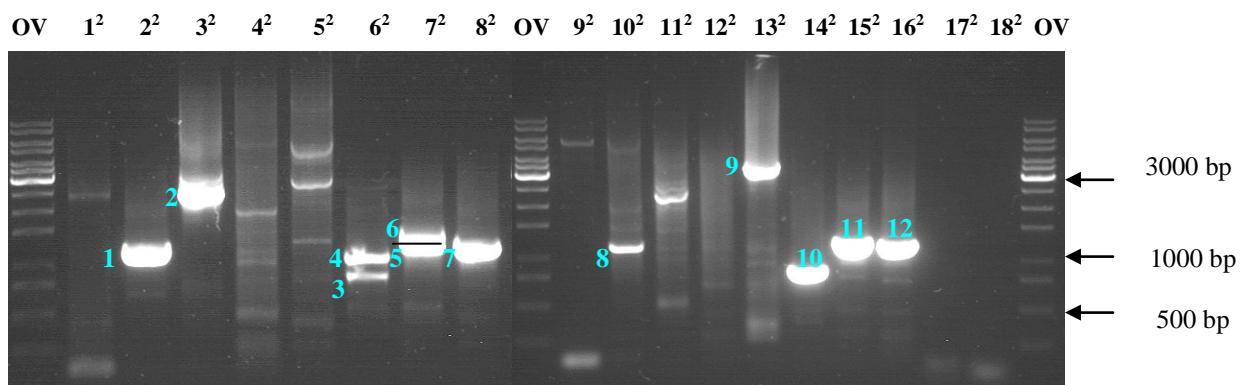
Pri pomnoževanju zaporedja gDNA (CnV3) z metodo hoje po genomu smo dobili informacijo o promotorskem delu zaporedja gena CnSL. Pri pomnoževanju smo uporabili enake začetnike kot smo jih načrtovali za metodo 5'RACE in so navedeni v preglednici II. V 1°PCR smo kot matrico uporabili predhodno pripravljene knjižnice genomske DNA, ki so bile pridobljene z uporabo restriktijskih encimov *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* in *StuI*. Nato smo izvedli še vgnezdeno PCR in specifično pomnoženim produktom (označenim s svetlo modrimi številkami na sliki 16) določili nukleotidna zaporedja.

**Preglednica XXV: Izvedba 1°PCR z metodo hoje po genomu**



**Slika 15:** Pomnoženi produkti v 1°PCR z metodo hoje po genomu

Št. vzorca 1°PCR	Genomska knjižnjica	Uporabljena začetnika
<b>1</b>	<i>DraI</i>	CnSL-uniA-prom1 in AP 1
<b>2</b>	<i>EcoRV</i>	
<b>3</b>	<i>PvuII</i>	
<b>4</b>	<i>StuI</i>	
<b>5</b>	<i>DraI</i>	CnSL-uniB-prom1 in AP 1
<b>6</b>	<i>EcoRV</i>	
<b>7</b>	<i>PvuII</i>	
<b>8</b>	<i>StuI</i>	
<b>9</b>	<i>DraI</i>	CnSL-uniB-ter1 in AP 1
<b>10</b>	<i>EcoRV</i>	
<b>11</b>	<i>PvuII</i>	
<b>12</b>	<i>StuI</i>	
<b>13</b>	/	CnSL-uniB-prom1 in AP1
<b>14</b>	<i>DraI</i>	samo AP1
<b>OV</b> - označevalec velikosti (1 kb)		



**Slika 16:** Pomnoženi produkti v 2°PCR z metodo hoje po genomu.

**OV** - označevalec velikosti molekulskih mas (1 kb)

**1-12** – fragmenti, ki smo jih izrezali iz gela in jim določili zaporedje

Preglednica XXVI: Izvedba 2°PCR z metodo hoje po genomu

Št. vzorca 2°PCR	Uporabljena začetnika	Uporabljen vzorec iz 1°PCR	Št. vzorca 2°PCR	Uporabljena začetnika
1 <sup>2</sup>	CnSL-A-prom2 in AP 2	1	5 <sup>2</sup>	CnSL-B-prom2 in AP 2
2 <sup>2</sup>		2	6 <sup>2</sup>	
3 <sup>2</sup>		3	7 <sup>2</sup>	
4 <sup>2</sup>		4	8 <sup>2</sup>	
9 <sup>2</sup>	CnSL-A-prom2 in AP 2	5	13 <sup>2</sup>	CnSL-B-prom2 in AP 2
10 <sup>2</sup>		6	14 <sup>2</sup>	
11 <sup>2</sup>		7	15 <sup>2</sup>	
12 <sup>2</sup>		8	16 <sup>2</sup>	
		13	17 <sup>2</sup>	CnSL-B-prom2 in AP 2
		/	18 <sup>2</sup>	

V 1° in 2°PCR smo uspešno pomnožili zaporedja promotorjev (sliki 15 in 16). V kontrolnem vzorcu 13 po pričakovanjih ni prišlo do pomnoževanja, saj v vzorec nismo dodali genomske DNA iz nobene knjižnjice. Do nespecifičnega pomnoževanja je prišlo v vzorcu 14, kjer smo dodali le AP2, nismo pa dodali specifičnega oligonukleotidnega začetnika. Ker se je pomnoževanje v 1°PCR izkazalo bolj uspešno z začetnikoma CnSL-uniA-prom1 in CnSL-uniB-prom1 (v primerjavi s CnSL-uniB-ter1) smo kot matrico v 2°PCR uporabili vzorce 1-8. V 2°PCR je prišlo do nastanka produktov v vseh vzorcih, razen 17<sup>2</sup> in 18<sup>2</sup>, ki sta služila kot kontrolna vzorca. Do nespecifičnega pomnoževanja produktov je prišlo v vzorcih 1<sup>2</sup>, 4<sup>2</sup>, 5<sup>2</sup>, 9<sup>2</sup> in 11<sup>2</sup>. Močno izražene PCR produkte (fragmente) ostalih vzorcev smo izrezali in jih očistili.

Pri kloniranju fragmentov 3 in 4 smo naredili napako - fragmenta smo pri čiščenju pomotoma združili na isti čistilni koloni (zato smo ju v nadaljevanju označili kot skupni fragment 3+4 oz. 3\*). Kloniranje fragmenta 5 ni bilo uspešno, prav tako ni bila uspešna določitev nukleotidnega zaporedja fragmenta 10. Ugotovili smo, da fragmentom večjim od 1500 bp (fragmenta 2 in 9), nismo uspeli določiti celotnega nukleotidnega zaporedja v enem koraku. Nukleotidno zaporedje vseh fragmentov smo prevedli v proteinsko zaporedje in s tem preverili prisotnost poznanega N-končnega AK zaporedja lektina. Slednjega so vsebovali fragmenti 1, 3+4, 6, 7, 8, 9, 11 in 12. Fragmentom 1, 2, 8 in 9, ki so v svojem zaporedju imeli prisotno zaporedje uporabljenega vgnezdenega oligonukleotidnega začetnika AP2, smo določili zaporedje še z druge strani (v smeri 3' → 5'). Po dve zaporedji istega fragmenta smo združili in dobili daljše zaporedje. To nam je uspelo le pri dveh fragmentih, in sicer 1 in 8. Fragmentoma 2 in 9 dolžine 3000 bp nismo uspeli

določiti celotnega zaporedja.

Zaporedja fragmentov smo poravnali in jih primerjali med seboj. Pri tem smo ugotovili, da se precej razlikujejo. Podobnost zaporedij smo zasledili pri fragmentih 1, 2 in 8; 7, 11 in 12; 3\* in 6; zaporedje fragmenta 9 pa se je razlikovalo od drugih. Promotorska zaporedja smo primerjali s predhodno dobljenimi zaporedji 5'RACE in ugotovili, da je fragmente 3\*, 6, 7, 11 in 12 možno poravnati z ostalimi zaporedji skupine B, dobljenimi z metodo 5'RACE (priloga 3). Promotorski zaporedji 1 in 8 pa smo uspešno poravnali s 5'zaporedji skupine A (priloga 2). Zaporedje 2 smo opustili, saj v prevedenem proteinskem zaporedju ni vsebovalo poznanega N-končnega dela zaporedja, iz česar sklepamo, da zaporedje ni bilo specifično pomnoženo. Pri nadaljnjih primerjavah zaporedij smo ugotovili, da fragment 9 dejansko vsebuje zaporedje genomske DNA lektina skupine A. Zato smo ga uporabili pri kasnejših poravnavah kjer smo primerjali celotno cDNA skupine A.

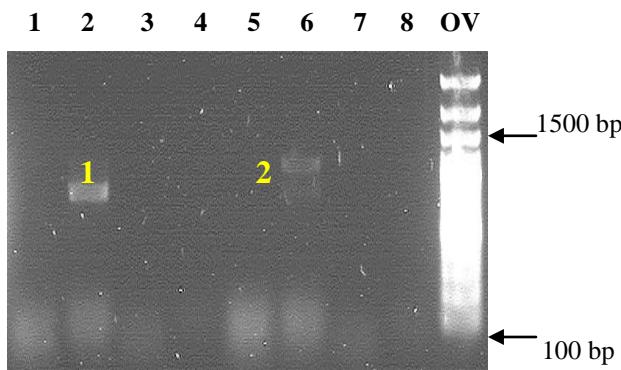
S poravnavo nukleotidnih zaporedij, pridobljenih z metodo hoje po genomu in 5'RACE, smo lahko določili morebitno prisotnost intronov. V zaporedjih skupine A (priloga 2) smo zasledili le en intron dolžine 51 nukleotidov. V zaporedjih skupine B (priloga 3) pa sta prisotna dva intona, in sicer sta njuni dolžini 59 in 56 nukleotidov. Iz poravanave zaporedij B vidimo tudi, da se promotorski zaporedji 3\* in 6 popolnoma razlikujeta glede na promotorska zaporedja 7, 11 in 12 od mesta 209 do 545 (priloga 3). Iz tega lahko sklepamo, da se pri izolektinu B pojavljata dva različna tipa promotorja.

Poleg intronov smo s poravnavo promotorskih in 5'RACE zaporedij določili tudi 5' neprevedljivo regijo - 5'UTR (ang. untranslated region). Gre za področje, kjer začne potekati transkripcija zaporedja in kjer so navadno prisotni elementi, ki nadzirajo izražanje gena. Začetek tega področja predstavlja prvi nukleotid 5'RACE zaporedij, konec področja pa zadnji nukleotid pred začetnim kodonom kodirajočega zaporedja (ATG). Dolžine 5'UTR so bile različne, in sicer so pri zaporedjih vrste A znašale 34, 53 in 71 nukleotidov, pri zaporedjih B pa 7, 11 in 121 nukleotidov.

#### 4.3 Pomnoževanje celotnega zaporedja CnSL

Pri pomnoževanju celotnega zaporedja CnSL smo kot matrico uporabili cDNA (CnK3 in CnV3) oz gDNA (CnV3). Celotno zaporedje CnSL smo najprej pomnoževali s cDNA, z načrtovanimi smernimi in protismernimi začetniki (preglednica II in priloga 1). V reakciji primarne in vgnezdeni PCR so se pomnožili produkti v vzorcih 2, 6, 1<sup>2</sup>, 2<sup>2</sup>, 5<sup>2</sup> in 6<sup>2</sup> (sliki 17 in 18). Po pričakovanjih do pomnoževanja ni prišlo v kontrolnih vzorcih 3, 4, 7, 8, 9<sup>2</sup> in 10<sup>2</sup>. V pripadajočih preglednicah so navedeni posamezni začetniki, ki smo jih uporabili pri pomnoževanju cDNA.

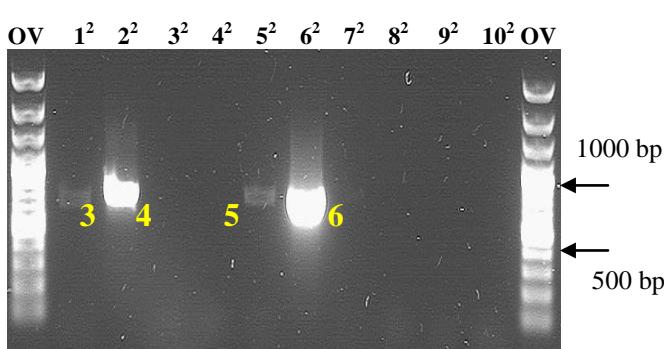
Preglednica XXVII: Pomnoževanje celotne cDNA (1°PCR)



Slika 17: Pomnoženi produkti cDNA v 1°PCR

Številka vzorca 1°PCR	Matrična cDNA	Smerni začetnik	Protismerni začetnik
1	CnK3	CnSL-A-F1	CnSL-A-R1
2	CnK3	CnSL-B-F1	CnSL-B-R1
3	/	CnSL-A-F1	CnSL-A-R1
4	/	CnSL-B-F1	CnSL-B-R1
5	CnV3	CnSL-A-F1	CnSL-A-R1
6	CnV3	CnSL-B-F1	CnSL-B-R1
7	/	CnSL-A-F1	CnSL-A-R1
8	/	CnSL-B-F1	CnSL-B-R1
OV	– označevalec molekulskih mas (100 bp)		
1, 2	– fragmenta, ki ju izrežemo in določimo zaporedje		

Preglednica XXVIII: Pomnoževanje celotne cDNA (2°PCR)



Slika 18: Pomnoženi produkti cDNA v 2°PCR

Št. vzorca 2°PCR	Uporabljen vzorec iz 1°PCR	Smerni začetnik	Protismerni začetnik
1 <sup>2</sup>	1	CnSL-A-F2	CnSL-A-R2
2 <sup>2</sup>	2	CnSL-B-F2	CnSL-B-R2
3 <sup>2</sup>	3	CnSL-A-F2	CnSL-A-R2
4 <sup>2</sup>	4	CnSL-B-F2	CnSL-B-R2
5 <sup>2</sup>	5	CnSL-A-F2	CnSL-A-R2
6 <sup>2</sup>	6	CnSL-B-F2	CnSL-B-R2
7 <sup>2</sup>	7	CnSL-A-F2	CnSL-A-R2
8 <sup>2</sup>	8	CnSL-B-F2	CnSL-B-R2
9 <sup>2</sup>	/	CnSL-A-F2	CnSL-A-R2
10 <sup>2</sup>	/	CnSL-B-F2	CnSL-B-R2
OV	– označevalec molekulskih mas (100 bp)		
3-6	– fragmenti, ki jih izrežemo in jim določimo zaporedje		

Velikost fragmentov pomnožene cDNA je bila 700 do 1000 bp. Vse fragmente smo uspešno klonirali v vektor pJET 1,2, vendar pa transformacija pri fragmentu št. 2 ni uspela. Dolžina

dobljenih zaporedij celotne cDNA je znašala od 348 do 770 nukleotidnih baz. Nukleotidna zaporedja smo poravnali in ugotovili, da sta zaporedji cCnSL 5-27 in 6-32 identični, zato smo v poravnavah zaporedij navedli le eno. Zaporedji fragmentov 1 in 3 sta bili skupine A, ostala zaporedja (fragmenti 4 – 6) pa skupine B (prilogi 4 in 5). Nukleotidna zaporedja smo prevedli tudi v proteinsko obliko in ugotovili, da je predvidena dolžina kodirajočega zaporedja A 221 AK, zaporedja B pa 225 AK (priloga 6). V nasprotju z ostalimi zaporedji skupine B, ki imajo na N-končnem delu aminokislino Ile, smo pri zaporedjih 5-27 in 6-32 zasledili aminokislino Val, ki je prisotna pri zaporedjih skupine A (priloga 6).

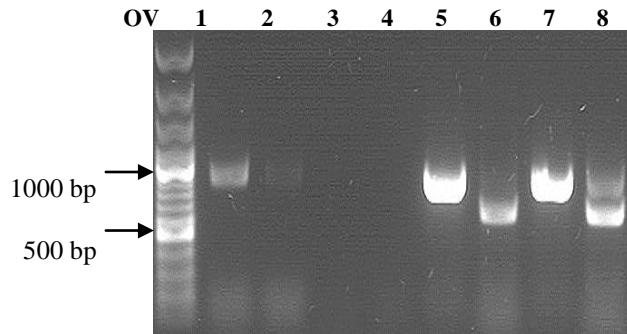
Pri pomnoževanju celotnega zaporedja CnSL smo kot matrico uporabili tudi gDNA. Reakcijo PCR smo izvedli večkrat, z različnimi začetniki in pri tem spremajali tudi temperaturni program PCR, vendar pomnoževanje ni bilo najbolj uspešno. Uspeli smo pomnožili le tri zaporedja (dolžine 930 bp) z uporabo začetnikov tipa B, ki so navedeni v spodnji preglednici. Zaporedje gDNA 2 ni vsebovalo N-končnega aminokislinskega zaporedja lektina, zato ga v poravnavah nismo uporabili.

#### Preglednica XXIX: Pomnoževanje celotnega zaporedja CnSL iz gDNA

Oznaka fragmenta gDNA	Začetnika uporabljenega v 1°PCR	Začetnika uporabljenega v 2°PCR
cCnSL gDNA 2	CnSL-B-F1 + CnSL-B-R1	CnSL-uni-F3 + CnSL-B-R2
cCnSL gDNA 3		CnSL-B-F2 + CnSL-B-R2
cCnSL gDNA 4		CnSL-B-F2 + CnSL-B-R2

Želeli smo pridobiti več informacij o celotnem zaporedju CnSL, zato smo pomnoževanje celotnega zaporedja cDNA izvedli še s preverjeno metodo 3'RACE. Rezultati pomnoževanja v 1° oz. 2°PCR in uporaba oligonukleotidnih začetnikov so prikazani v nadaljevanju.

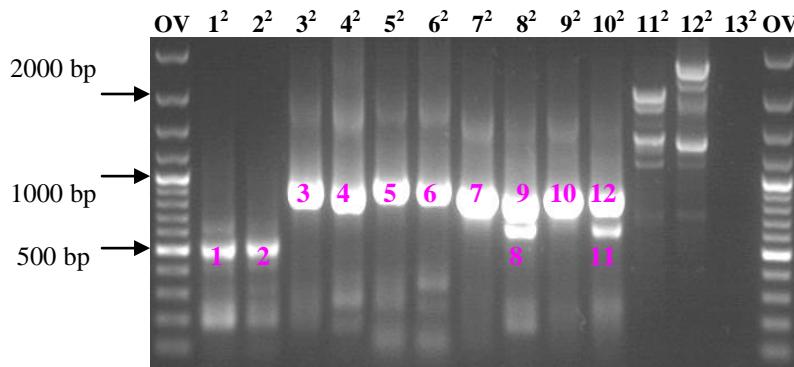
#### Preglednica XXX: Pomnoževanje celotne cDNA z metodo 3'RACE (1°PCR)



Slika 19: Pomnoženi produkti cDNA v 1°PCR s 3'RACE

Št. vzorca 1°PCR	Matrična cDNA	Smerni začetnik	Protismerni začetnik
1	CnK3	CnSL-B-F1	3'RACE outer
2	CnK3	CnSL-B-F1	3'RACE outer
3	CnK3	/	3'RACE outer
4	CnV3	/	3'RACE outer
5	CnV3	CnSL-A-F2	3'RACE outer
6	CnV3	CnSL-B-F2	3'RACE outer
7	CnK3	CnSL-A-F2	3'RACE outer
8	CnK3	CnSL-B-F2	3'RACE outer
OV – označevalec molekulskih mas (100 bp)			

Pomnoževanje produktov je bilo uspešno v obeh reakcijah 3'RACE. Produkte primarnega PCR (vzorce 1, 5, 6 in 7) smo čistili direktno iz PCR mešanice, pri vzorcu 8, pa smo iz gela izrezali nižje ležeči fragment (velikosti 650 bp) in ga nato očistili. V 2°PCR smo oštevilčene fragmente 1-12 prav tako izrezali iz gela in očistili, saj so vzorci poleg pomnoženega fragmenta vsebovali še mnogo nespecifičnih produktov. Velikost večine fragmentov je znašala 850 bp. Kontrolni vzorci 3, 4 in 13<sup>2</sup> so bili ustrezno negativni. V vzorcih 11<sup>2</sup> in 12<sup>2</sup> je prišlo do nespecifičnega pomnoževanja 3'RACE začetnikov, s tem smo dokazali, da v drugih vzorcih ni prišlo do podobnega pomnoževanja.



**Slika 20: Pomnoženi produkti cDNA v 2°PCR s 3'RACE**

#### Preglednica XXXI:Pomnoževanje celotne cDNA z metodo 3'RACE

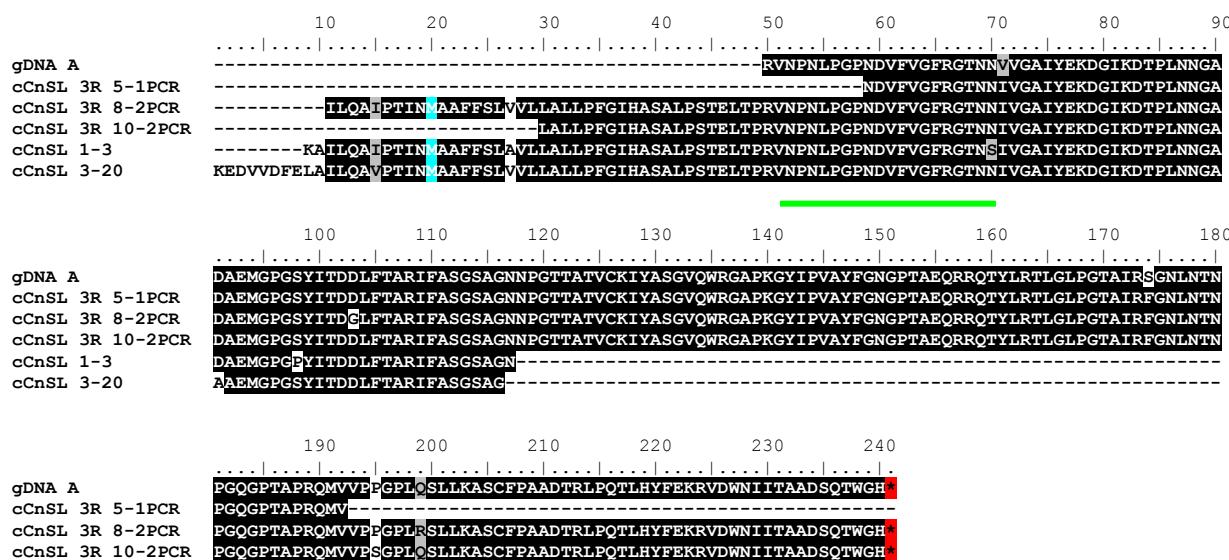
Št. vzorca 2°PCR	Uporabljen vzorec iz 1°PCR	Smerni začetnik	Protismerni začetnik	Št. vzorca 2°PCR	Uporabljen vzorec iz 1°PCR	Smerni začetnik	Protismerni začetnik
1 <sup>2</sup>	1*	CnSL-uni-F3	3'RACE inner	8 <sup>2</sup>	6	CnSL-uni-F3	3'RACE inner
2 <sup>2</sup>	2*	CnSL-uni-F3	3'RACE inner	9 <sup>2</sup>	7	CnSL-uni-F3	3'RACE inner
3 <sup>2</sup>	1	CnSL-uni-F3	3'RACE inner	10 <sup>2</sup>	8	CnSL-uni-F3	3'RACE inner
4 <sup>2</sup>	2	CnSL-uni-F3	3'RACE inner	11 <sup>2</sup>	3	/	3'RACE inner
5 <sup>2</sup>	1	CnSL-B-F2	3'RACE inner	12 <sup>2</sup>	4	/	3'RACE inner
6 <sup>2</sup>	2	CnSL-B-F2	3'RACE inner	13 <sup>2</sup>	/	/	3'RACE inner
7 <sup>2</sup>	5	CnSL-uni-F3	3'RACE inner	OV – označevalec molekulskih mas (100 bp)			

1\* = CnK3 + CnSL-A-F1+3'RACE outer      } produkta 1°PCR,  
2\* = CnV3 + CnSL-A-F1+3'RACE outer      } ki nista prisotna na sliki 19 in smo ju uspešno pomnožili v ločeni reakciji PCR

V nadaljevanju smo uspešno klonirali vse fragmente 2°PCR, razen fragmenta 11. Dolžina nukleotidnih zaporedij celotne cDNA (dobljenih z metodo 3'RACE) je bila od 402 do 897 nukleotidnih baz. Ugotovili smo, da se fragmenti vzorcev 1\*, 2\*, 5, 6, 7, 8 v 1°PCR in 1, 2, 7 v 2°PCR, niso specifično pomnožili. Specifično se je pomnožilo le 10 od 18 zaporedij (56 % vseh zaporedij) pridobljenih z metodo 3'RACE.

Specifično pomnožena zaporedja celotnega zaporedja lektina (pridobljena z metodo 3'RACE) smo najprej primerjali na nukleotidnem nivoju, kjer smo jih poravnali s predhodno pridobljenimi zaporedji celotne cDNA in zaporedji gDNA (prilogi 4 in 5). Ugotovili smo, da lahko fragmenta 8 in 10 (pridobljena v 2°PCR z metodo 3'RACE) uvrstimo k že znanim zaporedjem skupine A, fragmente 3, 4, 5, 6, 9 in 12 (iz 2°PCR) ter fragment 1 (iz 1°PCR) pa k zaporedjem skupine B.

Ob primerjavi celotne cDNA z gDNA smo pridobili podatek o številu intronov in eksonov izolektinov A in B. Izolektin A je sestavljen iz štirih intronov (dolžine 62, 78, 63 in 56 nukleotidov) in petih eksonov (dolžine 153, 107, 227 in 180 nukleotidov). Prvi trije introni se nahajajo v kodirajočem zaporedju, četrti pa po končnem kodonu TAG, kjer se nahaja tudi zadnji ekson (priloga 4). Celotno kodirajoče zaporedje izolektina A (od vključno začetnega kodona ATG do končnega kodona TAG) vsebuje 663 nukleotidov oz. pri zaporedju, pridobljenem z metodo degeneriranega 3'RACE, 654 nukleotidov. Predvideno kodirajoče aminokislinsko zaporedje lektina A (od vključno začetnega Met do končnega kodona) znaša 221 AK (slika 21) oz. pri omenjeni različici zaporedja (pridobljenega z degeneriranim 3'RACE) tri aminokisline manj.

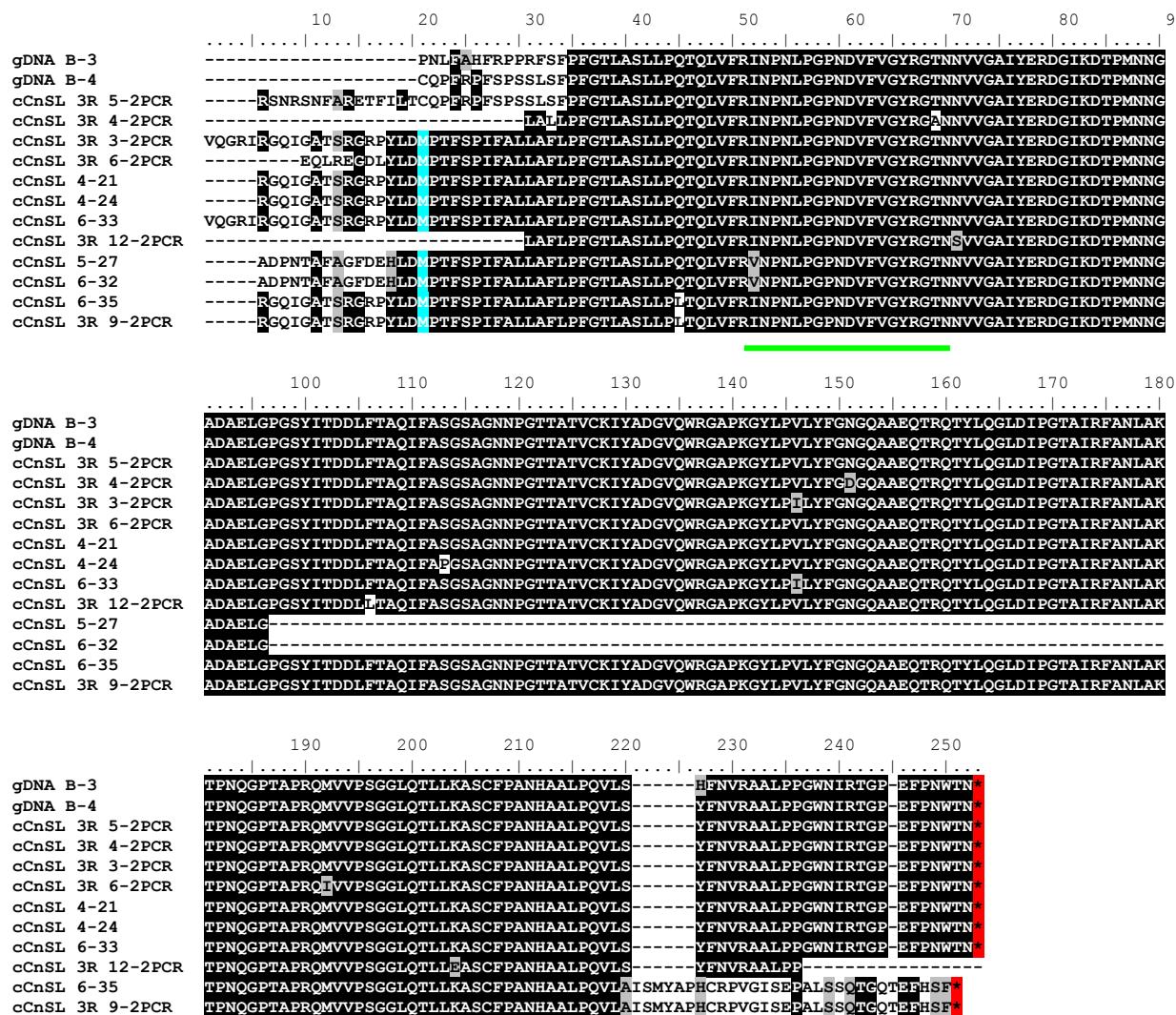


**Slika 21: Poravnava predvidenih proteinskih zaporedij celotne cDNA in gDNA za izolektin CnSL skupine A**

S črno barvo so senčene enake aminokisline, s sivo barvo podobne aminokisline (50 % podobnost), z modro barvo začetni metionin, z rdečo pa končni kodon. Z zeleno barvo je podprt N-končno zaporedje lektina.

Pri prevajanju nukleotidnega zaporedja gDNA skupine A smo opazili, da se že na samem začetku pojavi končni kodon. Zato sklepamo, da je prvih 35 nukleotidov zaporedja gDNA (ki se ne ujemajo z ostalimi poravnanimi zaporedji v prilogi 4) tudi del introna, ki pa ga zaradi prekratke dolžine samega zaporedja gDNA ne moremo določiti.

Izolektin B je prav tako sestavljen iz štirih intronov (dolžine 56, 56, 63 in 65 nukleotidov) in petih eksonov (dolžine 110, 63, 107, 227 in 108 nukleotidov). Vsi introni se nahajajo v kodirajočem delu izolektina. Celotno kodirajoče zaporedje je dolgo 675 oz. 690 nukleotidov, ki se pri prevajanju prevedejo v 225 oz. 230 AK (slika 22).



**Slika 22:** Poravnava predvidenih proteinskih zaporedij celotne cDNA in gDNA za izolektin CnSL skupine B

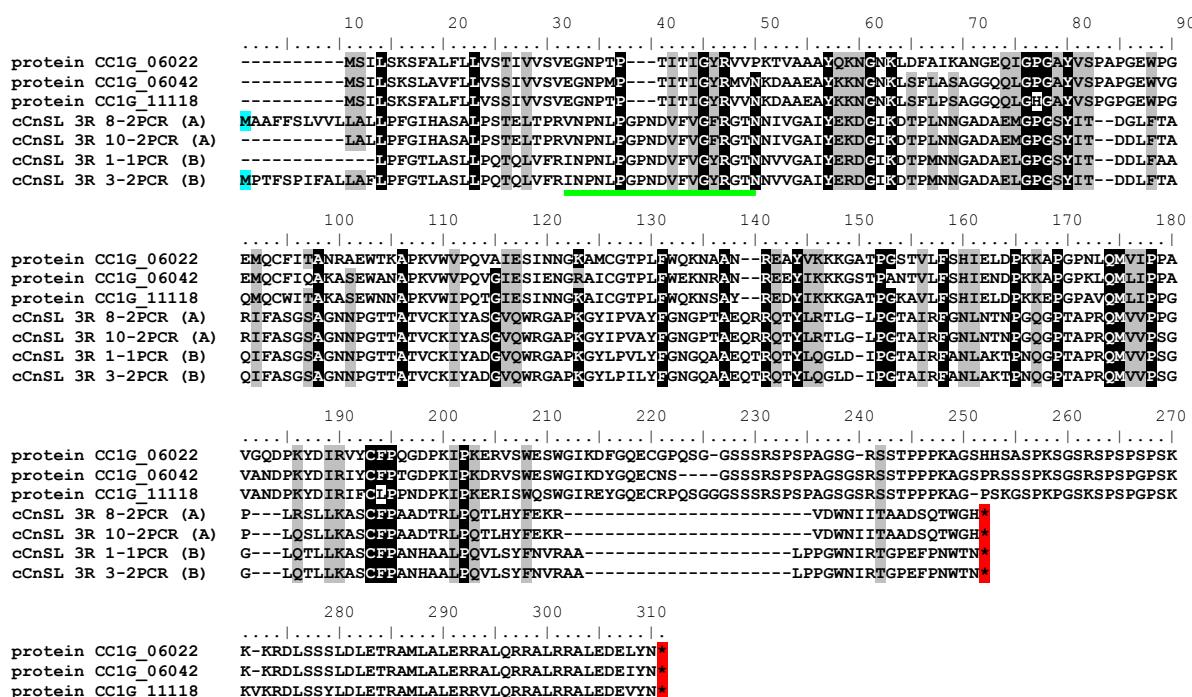
S črno barvo so senčene enake aminokisline, s sivo barvo podobne aminokisline (50 % podobnost), z modro barvo začetni metionin, z rdečo pa končni kodon. Z zeleno barvno je podprt N-končno zaporedje lektina.

S poravnavo 3'RACE zaporedij A in B (prilogi 4 in 5) smo dobili tudi podatek o dolžini regije 3'UTR (ang. 3' Untranslated region). Gre za območje, ki sledi končnemu kodonu (TAA oz. TAG oz. TGA) in se konča z zadnjim nukleotidom pred poli A repom. Regija ima pomembno vlogo pri posttranskripcijskem uravnavanju izražanja proteinov. Ugotovili smo, da se dolžine regije 3'UTR zelo razlikujejo, pri čemer so dolžine pri izolektinu A 134, 156 in 163 nukleotidov, pri izolektinu B pa 116, 123, 172, 174, 176 in 196 nukleotidov.

S pomočjo spletnega programskega orodja BioEdit smo primerjali delež identičnosti nekaterih zaporedij A in B. Izbrali smo zaporedja enakih dolžin, saj program drugače ne zmore pravilno primerjati različnih zaporedij. Pri izolektinu skupine A smo primerjali identičnost zaporedij cCnSL3R 8-2PCR in cCnSL3R 10-2 PCR od N-končnega dela zaporedja do končnega kodona. Na nukleotidnem nivoju sta bili zaporedji 99,3 % identični, na predvidenem proteinskem nivoju pa 98,4 % identični. Kodirajoča zaporedja skupine B (cCnSL3R 3-2 PCR, cCnSL3R 6-2 PCR, cCnSL 4-21, cCnSL 4-24 in cCnSL 6-33) so bila na nukleotidnem nivoju 99,6 – 100 % identična, na predvidenem proteinskem nivoju pa 98,1 – 100 % identična. V obeh primerih sta bili identični zaporedji cCnSL3R 3-2 PCR in cCnSL 6-33. Pet aminokislin daljši zaporedji skupine B (cCnSL3R 9-2 PCR in cCnSL 6-35) sta se na nukleotidnem in proteinskem nivoju prav tako izkazali za identični. Primerjava zaporedij skupine B (gDNA B-3 in B-4, cCnSL3R 3, 4, 5, 6 (2°PCR), cCnSL 4-21, cCnSL 4-24 in cCnSL 6-33) od N-končnega dela do stop kodona je pokazala 99,2 – 100 % identičnost na nukleotidnem nivoju in 98,4 – 100 % identičnost na predvidenem proteinskem nivoju. Identična zaporedja so bila v obeh primerih gDNA B-4, cCnSL3R 5-2 PCR in cCnSL 4-21, kot tudi zaporedji cCnSL3R 3-2 PCR in cCnSL 6-33.

Primerjali smo tudi predvidena proteinska zaporedja CnSL skupine A (cCnSL3R 8-2PCR) in B (gDNA B-3 in B-4, cCnSL3R 3, 5, 6, 9 (2°PCR), cCnSL 4-21, cCnSL 4-24, cCnSL 6-33 in cCnSL 6-35), pri čemer smo najprej primerjali zaporedja od začetnega Met do stop kodona. Analiza je pokazala 64,5 – 66,6 % identičnost. Ob upoštevanju dolžine zaporedij od N-končnega dela do stop kodona pa je bila identičnost 68,3 – 72,6 %. Delež identičnosti je pri tej analizi znatno manjši, saj so zaporedja različno dolga in se tako pri njihovi primerjavi poleg substitucij upoštevajo tudi insercije in delecije.

Nukleotidna oz. predvidena proteinska zaporedja smo vnesli tudi v podatkovni bazi blastn oz. blastp, kjer smo iskali podobnost dobljenih zaporedij z že znanimi zaporedji v bazah podatkov. Na nukleotidnem nivoju (pri e < 1) nismo zasledili nobene podobnosti, medtem ko smo na proteinskem nivoju (pri e < 1) našli podobnost s tremi predvidenimi proteini (CC1G\_06022, CC1G\_06042 in CC1G\_11118) iz bazidiomicete gnojiščne tintnice (*Coprinopsis cinerea okayama*). Primerjava večine zaporedij CnSL (A oz. B) je pri vseh treh predvidenih proteinih CC1G pokazala 23-26 % identičnost in 41-44 % podobnost. Poravnava treh predvidenih proteinov iz gnojiščne tintnice z nekaterimi zaporedji CnSL je podana na spodnji sliki.



**Slika 23:** Poravnava predvidenih proteinskih zaporedij celotne cDNA (skupin A in B) s predvidenimi proteini CC1G\_06022, CC1G\_06042 in CC1G\_11118 iz bazidiomicete *Coprinopsis cinerea okayama*.

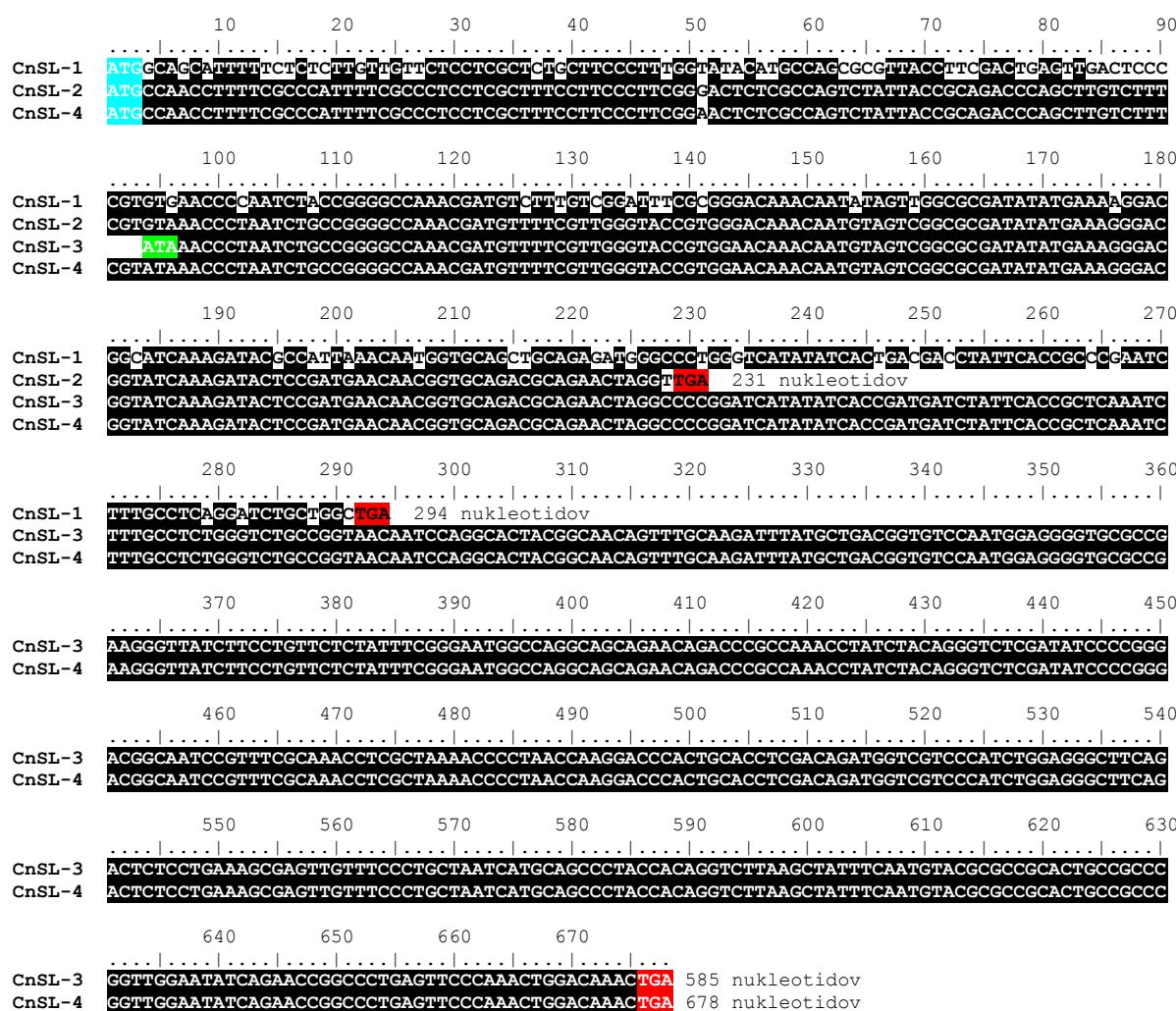
S črno barvo so senčene enake aminokisline, s sivo barvo podobne aminokisline (80 % podobnost), z modro začetni metionin pri različicah CnSL, z rdečo pa končni kodoni. Z zeleno barvo je podčrtano N-končno zaporedje CnSL. Predvidena proteinska zaporedja CnSL imajo podano oznako skupine (A oz. B) v oklepaju.

Pri izpeljanih proteinskih zaporedjih CnSL skupin A in B smo ugotovili, da je N-končni del bolje ohranjen od zadnjega dela zaporedja. Glede na zgornjo poravnavo, pa slednjega ne moremo trditi tudi za primer zaporedij proteinov iz gnojiščne tintnice in zaporedij CnSL.

## 4.4 Priprava in pridobivanje rekombinantnega CnSL (rCnSL)

### 4.4.1 Priprava sistema za izražanje

Med vsemi celotnimi zaporedji cDNA, ki smo jih uspešno pomnožili z načrtovanimi smernimi in protismernimi začetniki (podpoglavlje 4.3), smo izbrali tri zaporedja za pripravo rekombinantnega lektina. In sicer, smo izbrali zaporedja cCnSL 1-3, cCnSL 6-32 in cCnSL 4-21, iz katerih smo načrtovali štiri različice CnSL 1-4 za pripravo rCnSL (slika 24).



**Slika 24: Poravnava nukleotidnih zaporedij, ki smo jih izbrali za pripravo različic rCnSL 1-4**

S črno barvo so senčeni identični nukleotidi, s svetlo modro barvo začetni kodon ATG (Met), z zeleno barvo začetni kodon ATA in z rdečo barvo kočni kodon TGA. Na koncu vsakega zaporedja je zapisano število nukleotidov v danem zaporedju.

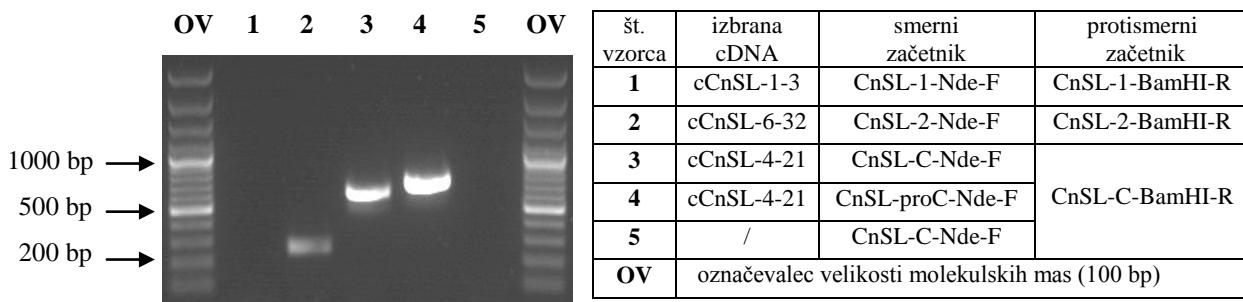
Zaporedja, ki smo jih izbrali za pripravo različic rCnSL, smo poimenovali z novimi oznakami:

- > **CnSL-1** = cCnSL 1-3
- > **CnSL-2** = cCnSL 6-32
- > **CnSL-3** = CnSL-C = cCnSL 4-21 (od začetnega kodona ATA do vključno končnega kodona TGA)
- > **CnSL-4** = CnSL-proC = cCnSL 4-21 (od začetnega kodona ATG do vključno končnega kodona TGA)

CnSL-1 je izolektin skupine A, ostali trije (CnSL 2-4) pa spadajo v skupino B. Zaporedji CnSL-3 in CnSL-4 izhajata iz istega zaporedja, pri čemer se CnSL-3 začne z N-končnim zaporedjem proteina, zaporedje CnSL-4 pa vsebuje še pro regijo istega proteina in tako obsega celotno kodirajoče zaporedje lektina. Za izbrana zaporedja smo načrtovali nove oligonukleotidne začetnike, ki uvajajo restriktijski mesti. Ti so s krepko poudarjenim začetnim oz. končnim kodonom in podčrtanim restriktijskim mestom navedeni v preglednici II.

Izbrana zaporedja smo pomnožili z načrtovanimi začetniki, ki so vsebovali restriktijski mesti 5'-CATATG-3' in 5'-GGGATCC-3', ki ju prepoznata restriktijska encima *NdeI* in *BamHI*. Pri pomnoževanju smo uporabili polimerazo s kontrolnim branjem (DNA Platinum® *Pfx*), ki omogoča pomnoževanje nukleotidnega zaporedja brez napak. Uspešnost pomnoževanja smo preverili na agaroznem gelu in ugotovili, da so se začetniki vezali le na tri zaporedja, in sicer CnSL 2-4. Velikost fragmentov (s plazmidnim vektorjem, ki šteje 120 bp) je bila 250 bp za CnSL-2, 700 bp za CnSL-3 in 800 bp za CnSL-4 (slika 25). V kontrolnem vzorcu 5 po pričakovanjih ni prišlo do pomnoževanja. Zaporedje CnSL-1 smo poskusili še enkrat pomnožiti pod enakimi pogoji, vendar se je pomnoževanje ponovno izkazalo za neuspešno. Zato smo zaporedje CnSL-1 na tem mestu opustili in delo nadaljevali z ostalimi tremi zaporedji.

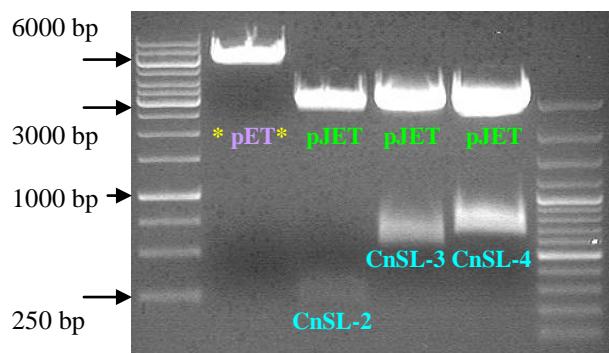
Preglednica XXXII: Uvedba restriktijskih mest v CnSL



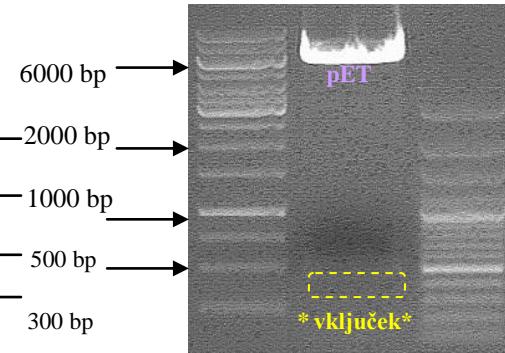
Slika 25: Uvedba restriktijskih mest v izbrana zaporedja CnSL

Želeli smo se prepričati, da pomnožena zaporedja CnSL 2-4 res vsebujejo uvedeni restriktijski mesti in da je njihovo nukleotidno zaporedje identično izpisanimu zaporedju na sliki 24. Zato smo vzorce klonirali v vektor pJET in jim določili nukleotidna zaporedja. Zaporedje vsakega CnSL smo natančno pregledali in ugotovili, da so dobljena zaporedja vseh treh različic CnSL 2-4 identična predhodno določenim zaporedjem.

Posamezne fragmente CnSL 2-4 smo izrezali iz vektorja pJET in jih vstavili v ekspresijski plazmidni vektor pET-11a. Pri tem smo uporabili ekspresijski vektor pET-11a, ki je predhodno vseboval vključek DNA vstavljen preko enakih restriktijskih mest (*NdeI* in *BamHI*), ki smo jih uvedli tudi sami v izbrana zaporedja CnSL. Po restrikciji obeh vektorjev smo z agarozno gelsko elektroforezo preverili, če so se zaporedja CnSL izrezala iz vektorja pJET in če se je iz plazmida pET-11a izrezal vključek, ki ga ne potrebujemo. V prvem poskusu nam je uspelo izrezati zaporedja CnSL iz vektorja pJET, vendar ne iz vektorja pET-11a (slika 26).



Slika 26: Restrikcija plazmidov pJET in pET-11a

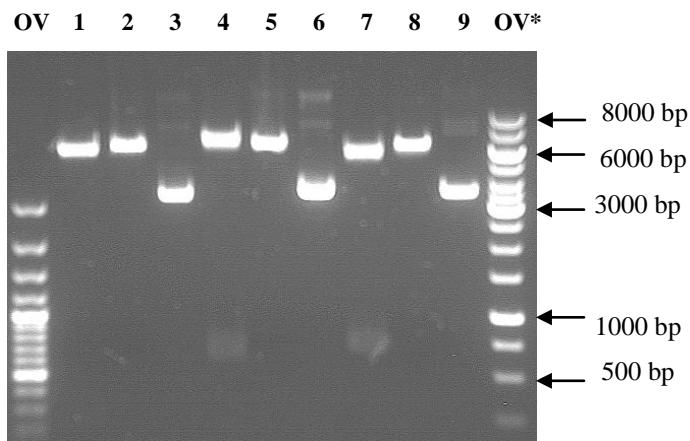


Slika 27: Ponovna restrikcija plazmida pET-11a

Na slikah 26 in 27 sta uporabljena označevalca velikosti 1kb (na levi strani) in 100 bp (na desni strani). Fragmenti CnSL po restrikciji so označeni z modro barvo, plazmidna vektorja pJET oz. pET pa z zeleno oz. vijolično barvo. Označka **\* pET\*** predstavlja plazmidni vektor pET-11a z vključkom DNA (restrikcija ni potekla). Uspešno izrezan vključek DNA je očrtan z rumeno barvo.

Pri ponovni restrikciji plazmida pET-11a z vključkom DNA (slika 27) se je slednji uspešno izrezal iz plazmida. Velikost fragmentov CnSL 2-4 je bila primerljiva z dolžino njihovega nukleotidnega zaporedja (slika 24). Plazmid pET-11a in vse tri fragmente CnSL smo izrezali iz gela in očistili. Fragmente smo nato vstavili v ekspresijski vektor pET-11a. Da bi potrdili uspešnost vstavitve fragmentov CnSL 2, 3 in 4, smo izvedli še enojno in dvojno kontrolno

restrikcijo. Pri tem smo uporabili restriktijski encim *KpnI* oz. encima *NdeI* in *BamHI*. Encim *KpnI* je cepil nukleotidno zaporedje enkrat in to znotraj zaporedja lektinov CnSL 2-4.



Preglednica XXXIII: Izvedba kontrolne restrikcije

Restrikcija	CnSL-2	CnSL-3	CnSL-4
dvojna ( <i>NdeI</i> + <i>BamHI</i> )	1	4	7
enojna ( <i>KpnI</i> )	2	5	8
ni restrikcije	3	6	9

OV - označevalec velikosti molekulskih mas (100 bp)

OV\* - označevalec velikosti molekulskih mas (1 kb)

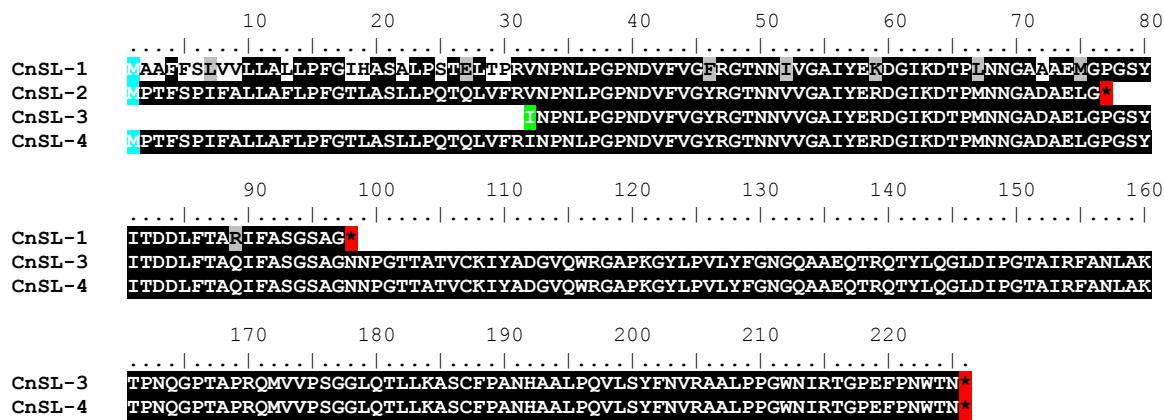
Slika 28: Kontrolna restrikcija

Kontrolna restrikcija je potrdila domnevo, da so bila zaporedja CnSL 2-4 uspešno vstavljeni v vektor pET-11a (slika 28), saj so se fragmenti CnSL 2-4 pri dvojni restrikciji izrezali iz plazmidnega vektorja pET-11a (fragmenta med 500 in 1000 bp). Obrisa fragmenta CnSL-2 (vzorec 1) s prostim očesom ne vidimo, ker je bila njegova koncentracija zelo majhna. Da je tudi v tem primeru prišlo do restrikcije, lahko sklepamo iz velikosti plazmida pET-11a po enojni restrikciji (vzorec 2) oz. dvojni restrikciji (vzorec 1). Na sliki 28 vidimo tudi, da nerezan plazmid z vstavljenim fragmentom CnSL (vzorci 3, 6 in 9) potuje hitreje kot rezan plazmid (vzorci 1, 2, 4, 5, 7 in 8). Razlog je v njegovi konformacijski obliki; lineariziran plazmid potuje počasneje kot krožna oblika, ki lahko zavzame nadzvito obliko (ang. supercoiled) in potuje bistveno hitreje. Nad nadzvito obliko (pri 4000 bp) se pojavljajo tudi druge konformacijske oblike plazmida, ki potujejo počasneje. Te so najbolje vidne pri vzorcu 6.

#### 4.4.2 Izražanje rCnSL v ekspresijskem sistemu *E. coli* BL21 (DE3) z indukcijo z IPTG

Pred poskusnim izražanjem rCnSL v bakterijskem ekspresijskem sistemu *E. coli* BL21 (DE3) pET-11a:: CnSL (oznaka vektorja z vstavljenim fragmentom), smo nukleotidna zaporedja različic CnSL prevedli v aminokislinsko zaporedje (slika 29). Iz slednjega smo s pomočjo programa ProtParam določili teoretične lastnosti pripravljenih treh različic CnSL 2-4 (preglednica XXXIV). Predvsem nas je zanimala predpostavljena molekulska masa proteinov, njihova teoretična

izoelektrična točka in izračunan molarni absorpcijski koeficient ( $\epsilon$ ) oz. specifična absorbanca (A<sub>0,1%</sub>) pri 280 nm. Predvidena molekulska masa nam je v nadaljevanju služila kot orientacijska vrednost pri spremeljanju izražanja posameznega lektina z metodo NaDS-PAGE.



**Slika 29:** Predvidena aminokislinska zaporedja različic CnSL 1-4.

S črno barvo so senčene enake aminokisline, s sivo podobne (50 % podobnost), z modro barvo je senčen začetni Met, z zeleno začetna aminokislina Ile pri CnSL-3 in z rdečo končni kodoni.

#### Preglednica XXXIV: Teoretične vrednosti nekaterih parametrov pripravljenih različic CnSL

	CnSL-2	CnSL-3	CnSL-4
število AK	76	194	225
predvidena molekulska masa (Da)	8 152	20 596	24 016
teoretična pI	4,53	7,95	8,58
$\epsilon_{280}$ (L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	2980	28545	28545
A <sub>0,1%</sub> (g L <sup>-1</sup> )	0,366	1,386	1,189

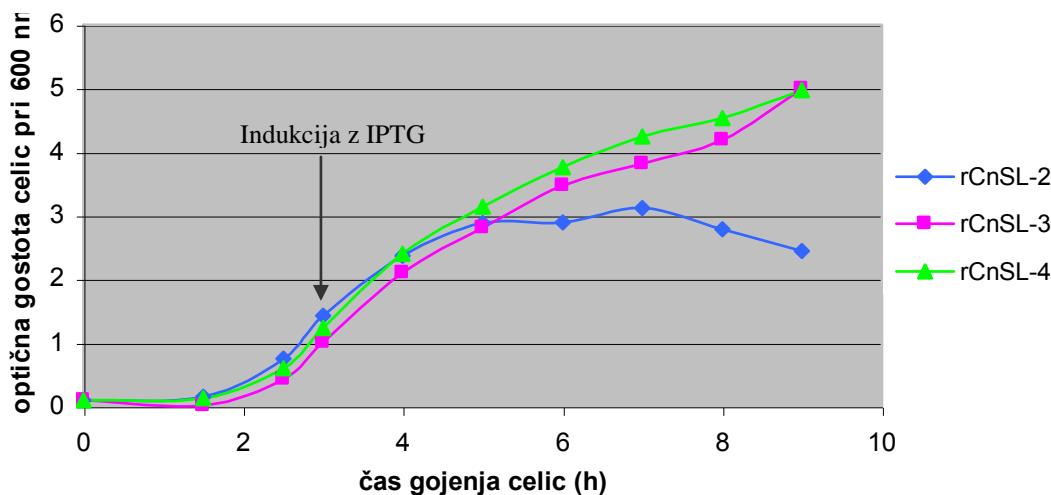
#### 4.4.2.1 Poskusno izražanje rCnSL

Pri poskusnem izražanju smo želeli ugotoviti po kolikšnem času po indukciji z IPTG se izraža največ posameznega rekombinantnega proteina. To smo ugotovili s pomočjo spremeljanja optične gostote pri 600 nm (OD<sub>600</sub>) in ustrezno redčitvijo vzorcev, ki smo jih nato analizirali z metodo NaDS-PAGE. Ugotovili smo, da je pri vseh treh različicah rCnSL izražanje največje po štirih urah ali več (ko se na gelu pojavi najintenzivnejša lisa).

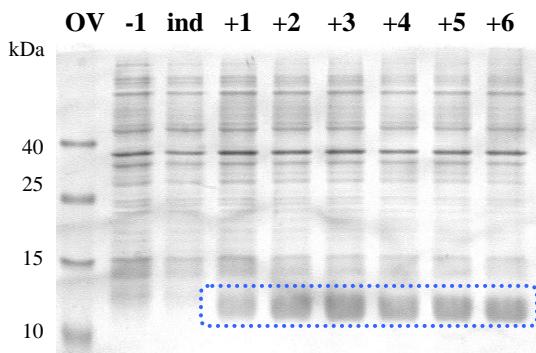
Preglednica XXXV: Optična gostota celic v odvisnosti od časa gojenja

Indukcija z IPTG ←

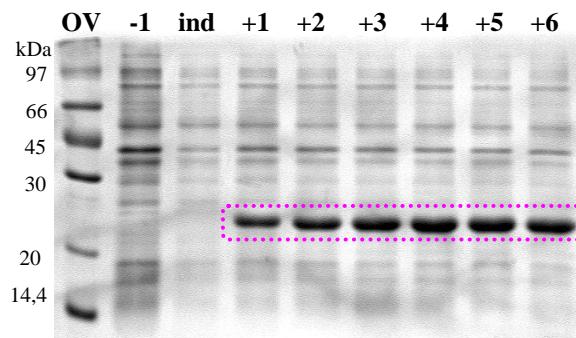
čas gojenja (h)	Optična gostota pri 600 nm		
	rCnSL-2	rCnSL-3	rCnSL-4
1,5	0,147	0,090	0,126
2,5	0,751	0,430	0,605
3	1,427	1,011	1,231
+ 1	2,368	2,101	2,395
+ 2	2,88	2,81	3,14
+ 3	2,89	3,47	3,76
+ 4	3,12	3,81	4,24
+ 5	2,79	4,19	4,53
+ 6	2,44	4,99	4,97



Slika 30: Grafični prikaz poskusnega izražanja različic rekombinantnega CnSL

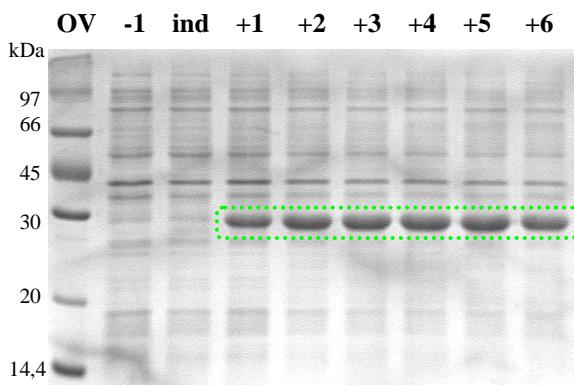


Slika 31: Poskusno izražanje rCnSL-2



Slika 32: Poskusno izražanje rCnSL-3

Na slikah 31, 32 in 33 je prikazano poskusno izražanje različic rCnSL po izvedbi NaDS-PAGE. Oznaka **-1** pomeni izražanje proteina pred indukcijo z IPTG, **ind** je izražanje proteina ob času indukcije z IPTG, naraščajoče vrednosti **+1 do +6** pa označujejo zaporedno uro po indukciji z IPTG in pripadajoče izražanje proteina ob tem času. Frakcije, v katerih se izraža protein, so obkrožene s prekinjeno črto. **OV** je označevalec velikosti molekulskih mas.



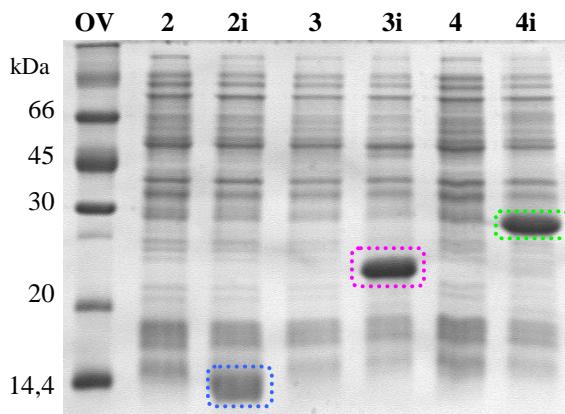
Slika 33: Poskusno izražanje rCnSL-4

Pri preverjanju izražanja različic CnSL (z NaDS-PAGE) smo ugotovili, da se teoretične in ocenjene vrednosti molekulskih mas razlikujejo. Na gelu so rekombinatni lektini imeli večje ocenjene molekulske mase od izračunanih:

rCnSL-2	13 kDa
rCnSL-3	25 kDa
rCnSL-4	29 kDa.

#### 4.4.2.2 Pridobivanje rCnSL

Različice rCnSL smo pridobivali na enak način kot smo to izvedli pri poskusnem izražanju, vendar smo tokrat med potekom izražanja odvzeli le dva vzorca: pred indukcijo in štiri ure po indukciji z IPTG. S tem smo preverili, ali je do izražanja proteina zares prišlo in v kolikšni meri.



Slika 34: Izražanje različic rCnSL

- 
- 2- izražanje rCnSL-2 pred indukcijo z IPTG
  - 2i- izražanje rCnSL-2 4h po indukciji z IPTG
  - 3- izražanje rCnSL-3 pred indukcijo z IPTG
  - 3i- izražanje rCnSL-3 4h po indukciji z IPTG
  - 4- izražanje rCnSL-4 pred indukcijo z IPTG
  - 4i-izražanje rCnSL-4 4h po indukciji z IPTG
- 

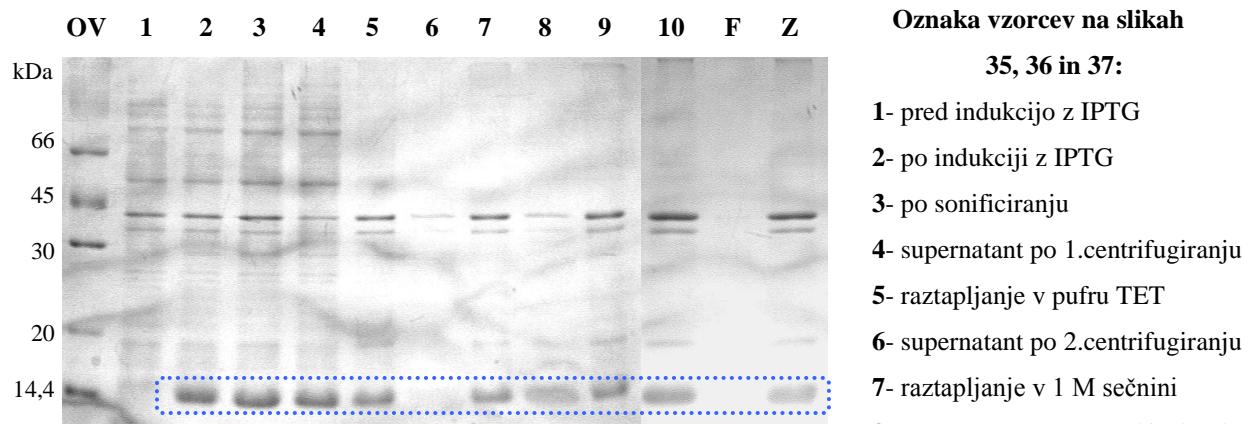
OV - označevalec velikosti molekulskih mas

Pred indukcijo se ni izražala nobena različica rekombinantnega lektina rCnSL, štiri ure po indukciji z IPTG (vzorci 2i, 3i in 4i) pa so se vsi trije lektini izražali v veliki meri (slika 34).

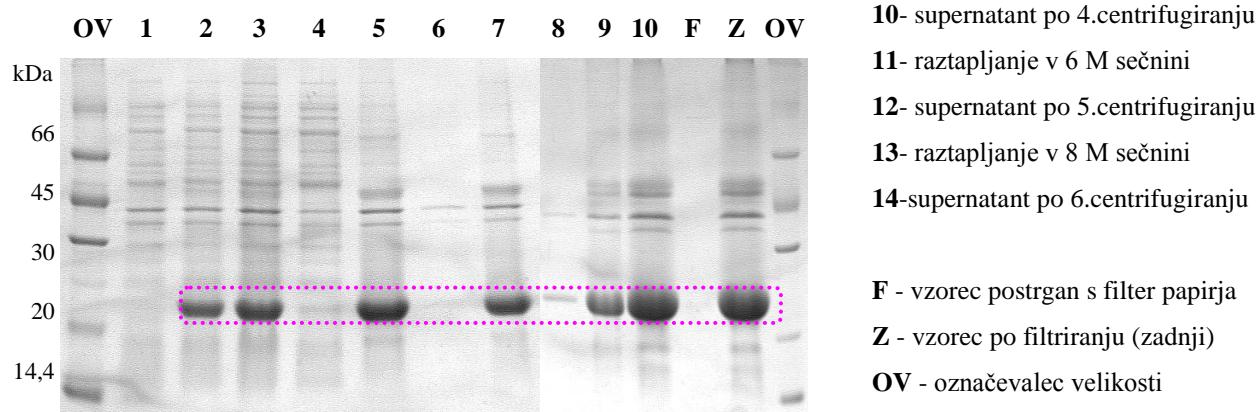
#### 4.4.3 Čiščenje in renaturacija rCnSL iz inkluzijskih teles

Glede na to, da smo za heterologno izražanje rekombinantnih proteinov v ekspresijskem sistemu *E. coli* uporabili močan promotor *lac*, smo sklepali, da so se pripravljeni rekombinantni proteini agregirali predvsem v obliki inkluzijskih teles v citoplazmi bakterij. Bakterijske celice smo zato

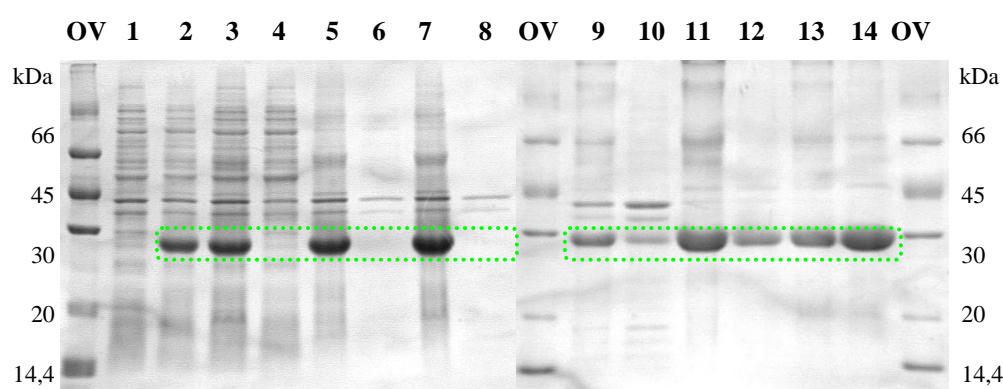
lizirali z ultrazvokom in rekombinantne lektine čistili iz inkluzijskih telesc s centrifugiranjem in raztplavljanjem v pufru TET oz. v naraščajočih koncentracijah sečnine. Sečnina je v koncentracijah do 10 M močan denaturant, ki prekinja nekovalentne vezi in s tem poveča topnost proteinov v raztopini. Raztplavljanje izraženih rekombinantnih lektinov smo spremljali z NaDS-PAGE.



**Slika 35: Čiščenje rCnSL-2 iz inkluzijskih telesc**



**Slika 36: Čiščenje rCnSL-3 iz inkluzijskih telesc**



**Slika 37: Čiščenje rCnSL-4 iz inkluzijskih telesc**

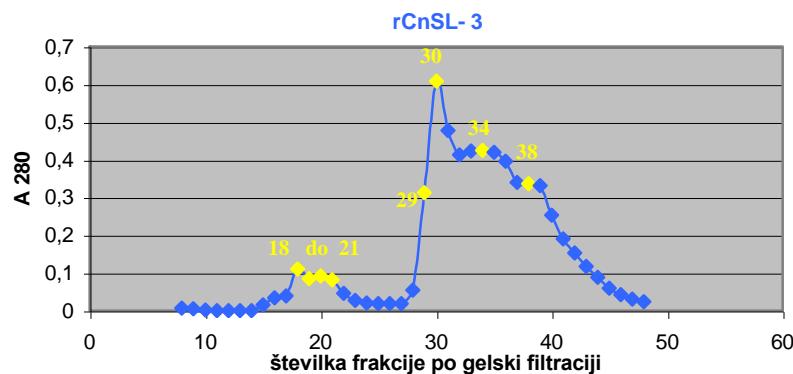
Pri čiščenju iz inkluzijskih telesc sta se rCnSL-2 in rCnSL-3 obnašala na podoben način; popolnoma sta se raztopila v 3 M sečnini in nato se po večkratnem centrifugiraju nista več oborila. Da bi vzorca še nekoliko očistili, smo ju filtrirali skozi filter papir z velikostjo por 0,2 µm. Prisotnost posameznega proteina na filter papirju oz. v filtratu smo preverili tudi z NaDS-PAGE (oznaki F oz. Z). Ugotovili smo, da sta se oba proteina uspešno filtrirala. Vzorec rCnSL-4 pa se je raztapljal tudi v 6 in 8 M sečnini.

Ker sta bila »zadnja« vzorca rCnSL-2 in rCnSL-3 po filtriranju še nekoliko motna, smo ju dodatno čistili oz. koncentrirali z obarjanjem z amonijevim sulfatom. Oborjene proteine smo od raztopine ločili s centrifugiranjem in jih nato renaturirali v pufru za gelsko filtracijo. Količino prisotnih rekombinantnih proteinov po renaturaciji smo preverili z merjenjem absorbance pri 280 nm. Izmerjeni vrednosti smo preračunali v koncentracijo:  $c(rCnSL-2) = 1,6 \text{ mg/mL}$  in  $c(rCnSL-3) = 8,1 \text{ mg/mL}$ . Količina rCnSL-2 v raztopini je bila zelo majhna, zato smo nadaljnje delo z vzorcem opustili. Razlog za tako nizko vsebnost proteina je bilo njegovo šibkejše izražanje (slika 31) glede na izražanje preostalih dveh proteinov (sliki 32 in 33). Prav tako je bil volumen vzorca rCnSL-2 polovičen glede na ostala dva, saj smo ga izgubili pri nanosu na kolono za gelsko filtracijo (podpoglavlje 4.4.4). Tudi renaturacija po obarjanju z amonijevim sulfatom ni bila najbolj uspešna. Vzorec rCnSL-4 (supernatant 14) pa smo pred izvedbo gelske filtracije samo centrifugirali in v nadaljevanju uporabili dobljen supernatant.

#### 4.4.4 Gelska filtracija

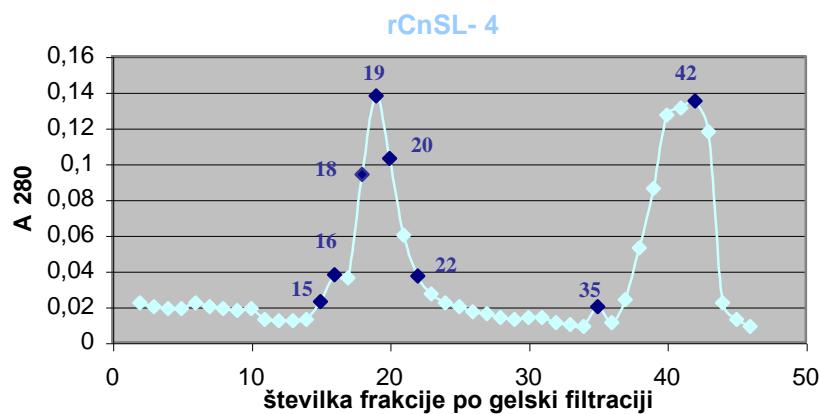
Gelsko filtracijo smo najprej izvedli na vzorcu rCnSL-2, ki še ni bil skoncentriran z amonijevim sulfatom. Ker je bila kolona zamašena (z enim od predhodno čiščenih proteinov) se je v gel absorbirala le polovica vzorca, ki pa skozi kolono ni potovala. Preostali volumen vzorca smo poskušali čim bolj skoncentrirati z obarjanjem z amonijevim sulfatom, vendar je bila količina proteina premajhna, da bi bila ponovna izvedba gelske filtracije smiselna.

V nadaljevanju smo kolono najprej očistili, nato pa nanjo nanesli preostala rekombinantna proteina rCnSL-3 in rCnSL-4. Prisotnost posameznega rCnSL v posamezni frakciji po gelski filtraciji smo analizirali z merjenjem absorbance pri 280 nm (sliki 38 in 39). Frakcije, ki naj bi vsebovale največ rekombinantnega lektina, smo analizirali tudi z NaDS-PAGE (sliki 40 in 41).



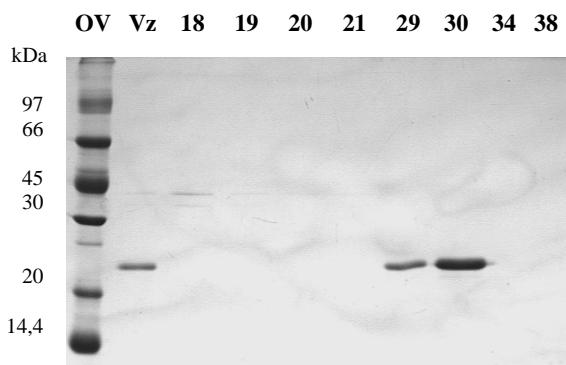
Slika 38: Grafični prikaz meritev A<sub>280</sub>(rCnSL-3) v posameznih frakcijah po izvedbi gelske filtracije

Z rumenimi številkami so označene frakcije, ki smo jih v nadaljevanju analizirali z NaDS-PAGE.

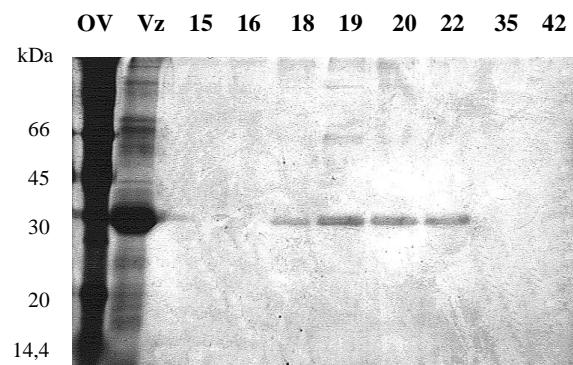


Slika 39: Grafični prikaz meritev A<sub>280</sub>(rCnSL-4) v posameznih frakcijah po izvedbi gelske filtracije

S temno modrimi številkami so označene frakcije, ki smo jih v nadaljevanju analizirali z NaDS-PAGE.



Slika 40: rCnSL-3 v frakcijah po gelski filtraciji



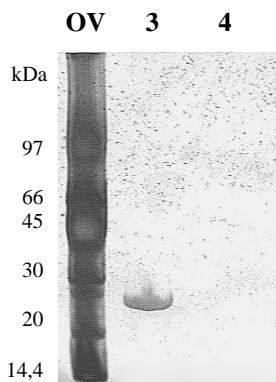
Slika 41: rCnSL-4 v frakcijah po gelski filtraciji

Na slikah 40 in 41 so s številkami označene frakcije po gelski filtraciji, ki smo jih analizirali z NaDS-PAGE; oznaka **Vz** predstavlja vzorec rCnSL-3 oz. 4, ki smo ga nanesli na kolono pred izvedbo gelske filtracije; **OV** je okrajšava za označevalce velikosti molekulskih mas. Gel na sliki 39 smo barvali z barvilm Coomassie, na sliki 40 pa s srebrom.

Glede na krivuljo grafa rCnSL-3 po izvedbi gelske filtracije (slika 38), smo sklepali, da je največ proteina v frakcijah 28-32. Slednje smo preverili s ponovnim merjenjem absorbance pri 280 nm s spektrofotometrom, ki je omogočal izris absorpcijskega spektra proteinov. Glede na obliko krivulje smo določili ali je v frakciji prisoten rekombinantni protein oz. Triton-X (komponenta pufra za gelsko filtracijo, ki absorbira svetlobo tudi v tem območju). Ugotovili smo, da je rCnSL-3 prisoten v frakcijah 29-31, kar je potrdila tudi analiza z NaDS-PAGE (slika 40). Te frakcije smo nato združili in jih z ultrafiltracijsko celico skoncentrirali na volumen 5,5 mL. Končna koncentracija vzorca rCnSL-3 je znašala 1,405 mg/mL.

Iz grafa rCnSL-4 po gelski filtraciji (slika 39) nismo razbrali kateri vrh predstavlja rCnSL-4 oz. Triton-X. Prisotnost proteina v izbranih frakcijah smo preverili z NaDS-PAGE, kjer se je izkazalo, da se rCnSL-4 nahaja v frakcijah 18, 19, 20 in 22 (slika 41). Pri barvanju gela z barvilkom Coomassie smo ugotovili, da je količina proteina v posamezni frakciji zelo majhna, saj jo s prostim očesom nismo uspeli zaznati. Gel smo zato ustrezno obdelali še z občutljivejšimi, srebrovimi ioni.

Frakcije 18-21 smo združili in jih z ultrafiltracijsko celico skoncentrirali na volumen 5 mL. Količino proteina v skoncentriranim vzorcu smo preverili z merjenjem absorbance pri 280 nm na spektrofotometru z izrisom funkcije, vendar rCnSL-4 ni bil zaznaven. Na enak način smo preverili tudi količino proteina v filtratu, ki pa prav tako ni vseboval proteina. Sklepali smo, da je rekombinantnega proteina bilo tako malo, da se je v celoti vezal na membrano ultrafiltracijske celice. Možnost napačnih meritev aparature smo ovrgli, saj smo na njej izmerili tudi količino proteina v kontrolnem vzorcu, ki je bila enaka navedeni.



Morebitno prisotnost rCnSL-4 v vzorcu smo še enkrat preverili z avtomatizirano metodo NaDS-PAGE in barvanjem s srebrom, vendar proteina v vzorcu ni bilo.

**OV** - označevalec velikosti molekulskih mas

**3** - združene frakcije **rCnSL-3** po izvedbi gelske filtracije in ultrafiltraciji

**4** - združene frakcije **rCnSL-4** po izvedbi gelske filtracije in ultrafiltraciji

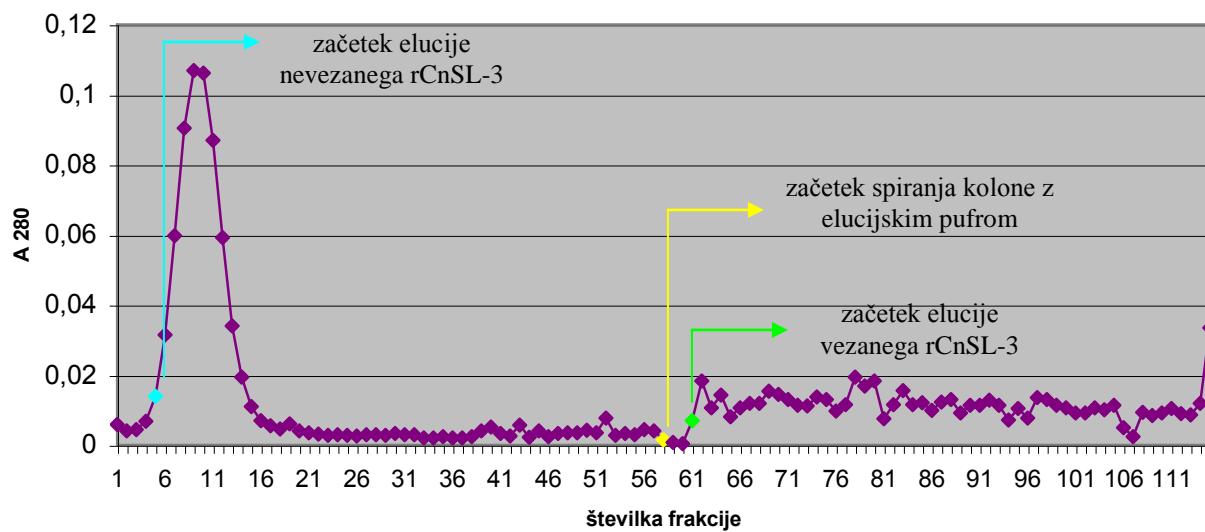
Slika 42: Združene frakcije rCnSL-3 in 4 po gelski filtraciji in ultrafiltraciji

#### 4.5 Biokemijska karakterizacija pripravljenega rCnSL

Biokemijske lastnosti smo lahko določali le na vzorcu rCnSL-3, ki smo ga čistega pridobili v zadostni količini. Količina rCnSL-2 je bila premajhna že pred izvedbo gelske filtracije, v vzorcu rCnSL-4 pa je bila količina proteina tako majhna, da se je protein pri koncentriranju z ultrafiltracijo v celoti vezal na membrano ultrafiltracijske celice.

##### 4.5.1 Afinitetna kromatografija

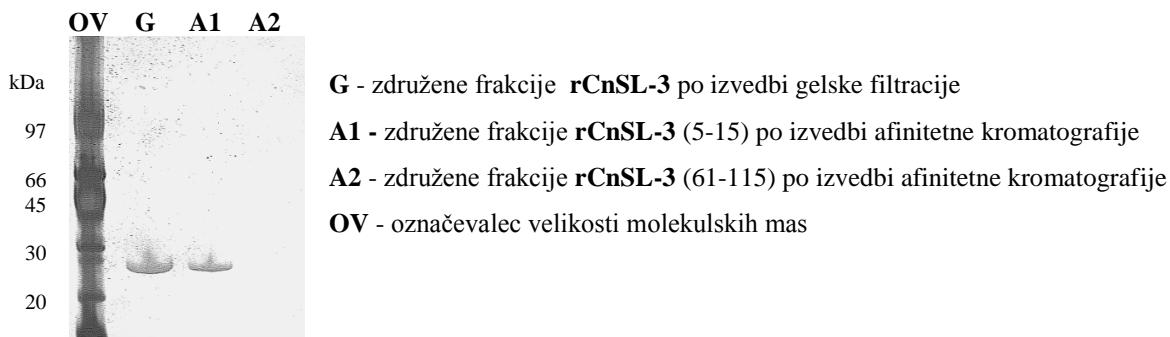
Naravni saharozil-lektin (SucL20) specifično veže sladkor saharoze. Z afinitetno kromatografijo smo preverili, ali se tudi pripravljeni rekombinantni lektin (rCnSL) veže na enak sladkor in v kolikšni meri. Vzorec rCnSL-3 smo nanesli na kolono, ki je vsebovala saharozil-sefarozni gel in po spiranju povzročili eluiranje morebitno vezanega vzorca s saharoze s spremembou pH elucijske raztopine. Prisotnost proteina v vseh frakcijah smo določali spektrofotometrično (slika 43).



Slika 43: Afinitetna kromatografija rCnSL-3 na saharozil-sefaroznem gelu

Iz grafa je razvidno, da se je pripravljeni rCnSL-3 eluiral že v začetnih frakcijah (5-15) in se ga večina ni vezala na saharozil-sefarozni gel. Delež rCnSL-3, ki se je vezal na saharozo, je bil minimalen. To potrjujejo izmerjene vrednosti A<sub>280</sub> od 61.frakcije dalje, ki so nekoliko višje od vrednosti 0, vendar pa kljub temu zelo nizke. Nevezane frakcije vzorca (5-15) smo nato združili in skoncentrirali z ultrafiltracijsko celico. Enako smo postopali pri frakcijah 61-115.

Prisotnost rCnSL-3 v obeh skoncentriranih vzorcih (5-15 in 61-115) smo preverili tudi z avtomatizirano metodo NaDS-PAGE. Gel smo barvali s srebrovimi ioni (slika 44).

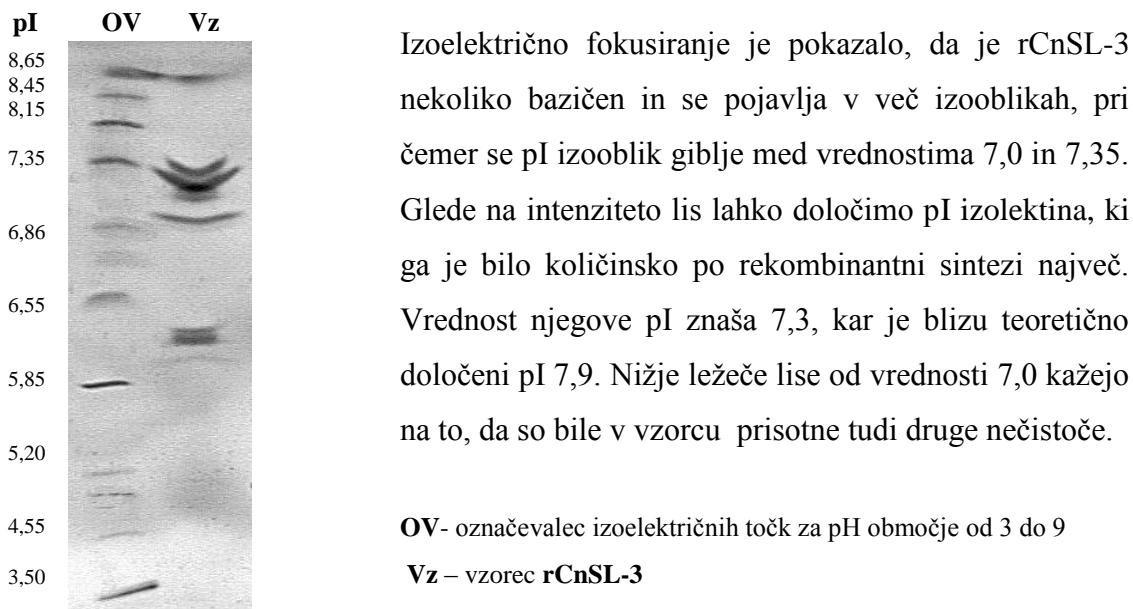


Slika 44: Skoncentrirane frakcije rCnSL-3 po gelski filtraciji in afinitetni kromatografiji

Nevezane frakcije rCnSL-3 (5-15), ki smo jih združili po izvedbi afinitetne kromatografije, so vsebovale rekombinantni protein, ostale ne. Z analizo NaDS-PAGE smo še enkrat potrdili, da se rCnSL-3 ni vezal na saharozil-sefarozo.

#### 4.5.2 Izoelektrično fokusiranje (IEF)

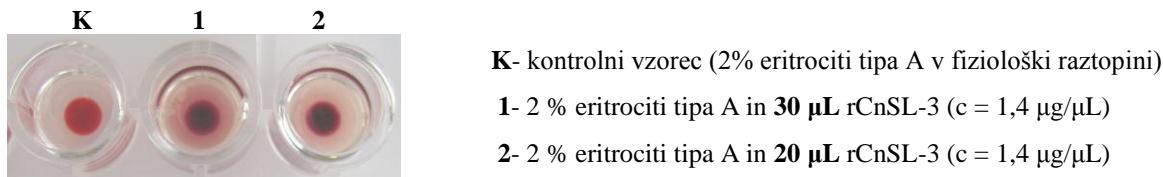
Želeli smo pridobiti podatek o vrednosti izoelektrične točke rCnSL-3, saj le-ta predstavlja eno zanimivejših lastnosti naravnega saharozil-lektina. Prav tako nas je zanimalo ali se rekombinantni lektin pojavlja v več izooblikah.



Slika 45: Izoelektrično fokusiranje

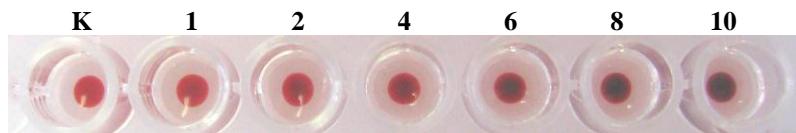
#### 4.5.3 Aglutinacijska oz. hemolitična aktivnost rekombinantnega lektina

Morebitno aglutinacijsko oz. hemolitično aktivnost rCnSL-3 smo s prostim očesom ugotavljali na človeških eritrocitih krvne skupine A, in sicer smo na mikrotitskih ploščah izvedli dva poskusa. V poskusu A smo k eritrocitom dodali večji volumen rCnSL-3. Po preteku ene ure smo vzorce pregledali, pri čemer nismo opazili nikakršne spremembe (ne aglutinacije, ne hemolize) glede na kontrolni vzorec. Vse kar smo opazili pri vseh vzorcih je bilo posedanje eritrocitov na dno vdolbinic mikrotitrskih plošč. Po 16-ih urah smo vzorce ponovno pregledali in ugotovili, da je rekombinantni lektin v tem času povzročil hemolizo eritrocitov (slika 46).



Slika 46: Izgled vzorcev po 16 urah (poskus A)

Pri poskusu B pa smo s prostim očesom določili najmanjši dodan volumen vzorca rCnSL-3, ki je še povzročil hemolizo eritrocitov – ta je znašal 4 µL. S pomočjo pridobljenega podatka smo lahko izračunali končno koncentracijo lektina v vdolbinici, ki je znašala 53,9 µg/mL. Ko smo slednjo vrednost delili s teoretično molsko maso lektina, smo dobili najmanjšo litično koncentracijo rCnSL-3, ki je znašala 2,6 µM. Pri naraščajočih volumnih rekombinantnega lektina (v 2 % eritrocitni suspenziji) je bila hemoliza vse bolj izrazita (sliki 46 in 47). Z gotovostjo lahko trdimo, da je v vzorcih lektinov (4, 6, 8, 10) prišlo do hemolize, saj reakcija ni potekla v kontrolnem vzorcu.



Slika 47: Izgled vzorcev po 16 urah (poskus B)

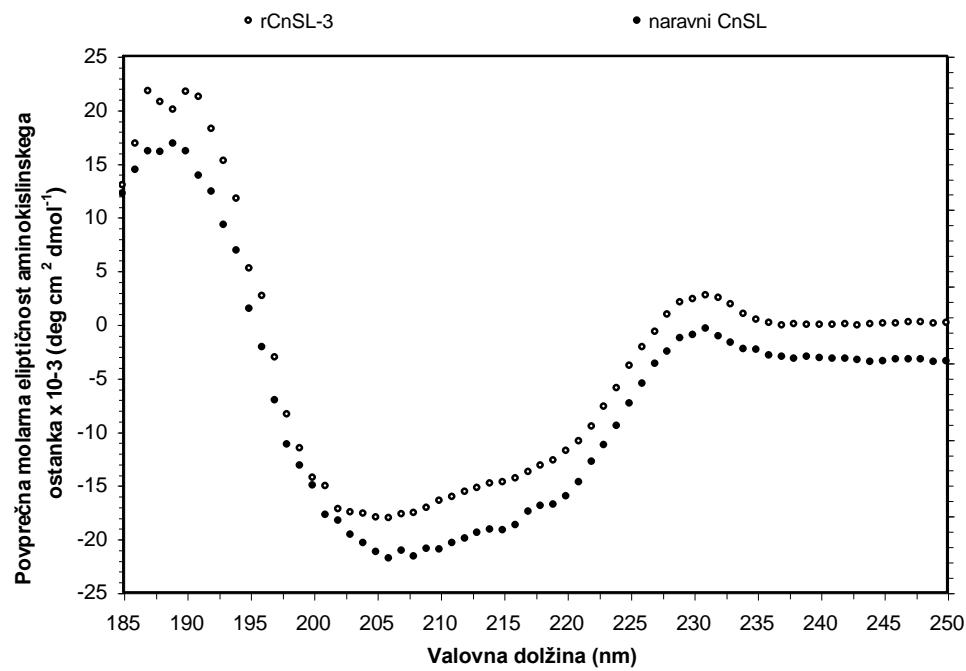
K - kontrolni vzorec (2% eritrociti tipa A v fiziološki raztopini)  
1, 2, 4, 6, 8, 10 - 2 % eritrociti tipa A in navedeno število µL rCnSL-3 (c = 1,4 µg/µL)

#### 4.5.4 Analiza vzorca s cirkularnim dikroizmom (CD)

S CD-spektroskopijo smo ugotavljali podobnost sekundarne strukture naravnega (SucL20) in rekombinantnega lektina (rCnSL-3). Meritve smo izvajali v dalnjem UV območju, pri valovnih dolžinah 185 – 250 nm. Rezultati so grafično prikazani na sliki 48.

CD-spektra obeh lektinov sta si po obliki podobna, vendar se ne prekrivata in zato konformaciji proteinov nista identični, ampak samo podobni. V spektru vidimo prisotnost negativnega vrha pri vrednosti 205 nm in dva pozitivna vrhova - pri vrednostih 188 nm in 230 nm. Vrh pri 230 nm je posledica absorbance triptofanskih stranskih verig proteina (60).

Cilj raziskave s CD-spektroskopijo ni bila analiza deležev posameznih elementov sekundarne strukture ( $\alpha$ -vijačnic in  $\beta$ -ploskev) v proteinu, ampak le primerjava strukture naravnega in rekombinantnega lektina. Glede na podobnost CD-spektrov obeh lektinov lahko trdimo, da se je rekombinantni lektin zvil pravilno in ima podoben vzorec elementov sekundarne strukture kot naravni lektin.



Slika 48: CD-spektra naravnega in rekombinantnega CnSL v dalnjem UV-območju

## 5. RAZPRAVA

Raziskovalci IJS so iz gobe megleinke (*Clitocybe nebularis*) uspešno izolirali več lektinov z različnimi specifičnostmi vezave sladkorjev. Med izoliranimi lektini je za saharozo specifični lektin (SucL20) izkazoval najmočnejše insekticidno delovanje na ličinkah vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) (56, 61). Posebnost saharozil-lektina je tudi njegova visoka izoelektrična točka, kar je redkost med gobjimi lektini, ki so večinoma kisli (60). Na podlagi zanimivih lastnosti naravnega lektina smo v okviru diplomskega dela določili nukleotidno zaporedje naravnega saharozil-lektina, pripravili njegovo rekombinatno različico (rCnSL) in slednjemu določili nekatere biokemijske lastnosti.

### 5.1 Analiza zaporedij cDNA in gena saharozil-lektina

Z molekularno-bioškimi tehnikami smo pridobili informacijo o zaporedju cDNA in promotorskem delu gena naravnega CnSL. Uspešno smo pomnožili in določili 2 zaporedji z metodo degeneriranega 3'RACE, 13 zaporedij z metodo 5'RACE, 8 zaporedij celotne cDNA, 18 zaporedij celotne cDNA (dobljenih z metodo 3'RACE), 3 zaporedja gDNA in 9 zaporedij promotorskega dela gena CnSL. Od vseh 53 zaporedij je bilo specifično pomnoženih 43, torej 81 % vseh zaporedij. Med temi smo zasledili le nekaj v celoti identičnih zaporedij. Opazili smo, da je variabilnost zaporedij večja na proteinском nivoju v primerjavi z nukleotidnim nivojem. Glede na to ugotovitev lahko sklepamo, da so v nukleotidnem zaporedju prisotne substitucije, ki pri prevajanju povzročijo spremembe v aminokislinskem zaporedju.

Primerjava dobljenih zaporedij lektina CnSL je pokazala, da smo uspešno pomnožili dve različici zaporedja proteina, ki smo ju v nadaljevanju označili kot A in B. Obe različici sta sestavljeni iz konstantnega dela (ki se prične z N-končnim delom proteina in je dolg 44 AK) in spremenljivega dela, ki mu sledi. Glede na veliko število deloma različnih zaporedij lektina lahko sklepamo, da je v gobi megleinki prisotna večja družina za saharozo-specifičnih lektinov oz. izolektinov. Za nekatere gobe je splošno znano, da proizvajajo številne izolektine (24).

Nukleotidno zaporedje izolektinov A in B je sestavljeno iz petih eksonov in štirih intronov, pri čemer se pri različici A zadnjitron in ekson nahajata v nekodirajočem delu zaporedja po

končnem kodonu TAG. Zaporedja med introni in eksoni se ujemajo z ohranjenimi mesti izrezovanja intronov, napovedanih za evkariontske gene, in sicer zaporedje GTRNGY za 5'-mesto in YNYAG za 3'-mesto izrezovanja (73). V promotorskem delu zaporedja izolektinov nismo zasledili ohranjenega mesta TATA, vendar pa smo z uspešno izvedbo rekombinantne sinteze lektinov (rCnSL 2-4) dokazali, da se gen za protein CnSL izraža. Iz predhodnih raziskav je tudi znano, da le določeni geni v glivah vsebujejo zaporedje TATA (74). Pri izolektinu B smo opazili, da se med dobljenimi promotorskimi zaporedji pojavljata dva različna tipa promotorja (priloga 3). Iz tega lahko sklepamo, da ima izolektin B tudi dva različna začetka transkripcije, kar bi lahko tudi obrazložilo različne dolžine neprevedljive regije 5'UTR. Terminatorsko zaporedje (neprevedljiva regija 3'UTR) ne vsebuje ohranjenega zaporedja poliadenilacijskega signala za evkarionte (AATAAA) (73). Glede na odsotnost ohranjenih zaporedij v promotorski in terminatorski regiji gena CnSL lahko sklepamo, da se pri izolektinih A oz. B pojavlja bolj kompleksen način uravnavanja izražanja proteina tako na transkripcijskem kot tudi na posttranskripcijskem nivoju. V končnem delu zaporedja smo določili tudi dolžine neprevedljive regije 3'UTR, ki so bile precej različne. Ta pojav so opazili tudi drugi raziskovalci pri proučevanju proteinov iz gliv (58).

Dolžina kodirajočega zaporedja cDNA pri izolektinu A znaša 663 oz. 654 nukleotidov, ki se prevedejo v 221 oz. 218 AK dolgo zaporedje. Zaporedje cDNA je pri izolektinu B dolgo 675 oz. 690 nukleotidov in se prevede v 225 oz. 230 AK zaporedje. Iz tega sledi, da se heterogenost zaporedij pojavlja tudi znotraj istega tipa izolektina. Analiza predvidenih proteinskih zaporedij izolektinov A in B je pokazala, da so zaporedja 64,5 – 66,6 % identična, medtem ko je identičnost znotraj posamezne skupine (A oz. B) večja, in sicer 98 – 100 %.

Morebitno podobnost dobljenih nukleotidnih oz. predvidenih proteinskih zaporedij CnSL z že poznanimi zaporedji smo preverili v podatkovnih bazah blastn in blastp. Podobnost zaporedij (pri e < 1) smo zasledili le na proteinskem nivoju, in sicer s tremi predvidenimi proteini (CC1G\_06022, CC1G\_06042 in CC1G\_11118) iz bazidiomicete gnojiščne tintnice (*Coprinopsis cinerea okayama*). Pri tem smo ugotovili, da so zaporedja CnSL (tako skupine A kot B) pri vseh treh predvidenih proteinih CC1G 23 - 26 % identična oz. 41 - 44 % podobna.

## 5.2 Biokemijske lastnosti rekombinantnega saharozil-lektina

Po določitvi celotnega nukleotidnega zaporedja izolektinov smo izbrali tri različna zaporedja, iz katerih smo načrtovali štiri lektine (CnSL 1-4). Z rekombinantno sintezo smo pridobili različice rCnSL 2-4, vendar smo karakterizacijo izvedli le na vzorcu rCnSL-3, ki smo ga čistega dobili v dovoljšnji količini. Zanimivo je, da se prav rCnSL-3 po izračunani molekulski masi (20 596 Da) najbolj približa dejanski molekulski masi naravnega saharozil-lektina, ki znaša 20 293 Da (60).

Na začetku uporabe rekombinantne DNA tehnologije so bili izkoristki pri pridobivanju lektinov zelo majhni (0,1 - 5 mg proteina na liter tekoče kulture). Danes lahko s pomočjo te tehnologije pridobivamo tudi do 20 mg/L tekoče kulture (24). Izkoristek pridobljenega in očiščenega rekombinantnega proteina rCnSL-3 je znašal 18 mg/L tekočega gojišča, kar lahko ocenimo kot dober rezultat. K takšnemu rezultatu je pripomogla predvsem uporaba ekspresijskega plazmidnega vektorja pET-11a, ki je eden najuspešnejših plazmidov za kloniranje in izražanje rekombinantnih proteinov v bakteriji *Escherichia coli* (68). Pri čiščenju oz. koncentriranju rekombinantnega proteina smo uporabili amonijev sulfat kot tudi čiščenje z gelsko filtracijo, ki sta uveljavljena načina za izolacijo in čiščenje lektinov (23). Dejstvo je, da se pri izvajanjtu več korakov čiščenja izkoristek proteina lahko precej zmanjša (24). Prav velike izgube proteinov tekom njunega čiščenja so onemogočile nadaljnje delo z vzorcema rCnSL-2 in 4.

Ena zanimivejših lastnosti naravnega saharozil-lektina je njegova visoka izoelektrična točka (pI), ki znaša > 9,3 (60). Med glivnimi lektini smo zasledili pI > 9 le še pri lektinah iz bazidiomicet *Rhizoctonia solani* (pI > 10,0) (75), uhljevke *Auricularia polytricha* (pI = 10,65), vijoličaste bledivke (*Laccaria amethystea*) (pI = 9,5) in oranžne latvice (*Aleuria aurantia*) (pI = 9,1) (23). Lektin iz gobe *Auricularia polytricha* specifično veže laktozo, iz vijoličaste bledivke laktozo oz. L-fukozo, slednjo specifično veže tudi lektin iz oranžne latvice (23). Lektin iz bazidiomicete *Rhizoctonia solani* pa specifično veže D-galaktozo oz. N-acetil D-galaktozamin (75). Čeprav imajo vsi omenjeni lektini visoke izoelektrične točke, se glede specifičnosti vezave sladkorjev razlikujejo. Z izjemo saharozil-lektina noben od navedenih lektinov ne veže sladkorja saharoze.

Na podlagi predvidenega aminokislinskega zaporedja je bila izračunana vrednost pI za rCnSL-3 nižja od pI naravnega lektina, in sicer 7,95. Eksperimentalno določena pI izolektinov rCnSL-3 se

je gibala med 7,0 in 7,35. Izooblika lektina, ki je bila v vzorcu prisotna v največji meri, je imela pI 7,3. Razlog, da se rekombinantni lektin pojavlja v več oblikah, je morda v deloma različni rekombinantni sintezi proteina v bakterijah *E. coli*. Pri tem je lahko prišlo do različnega zvitja proteinov in do nekoliko drugačne konformacije proteinov ter posledično različnega potovanja izooblik lektinov v električnem polju. Poleg tega računalniški modeli ne morejo popolnoma predvideti vpliva tridimenzionalne strukture proteina, ki pa ima veliko vlogo pri potovanju proteina v električnem polju. Izračunana pI ( $r\text{CnSL-3}$ ) = 7,95 se je tako izkazala kot približna vrednost v primerjavi z eksperimentalno določeno vrednostjo 7,3. Ker smo se želeli prepričati, da vzrok za nekoliko spremenjeno potovanje rekombinantnega proteina pri izoelektričnem fokusiranju ni bilo nepravilno zvitje proteina, smo izvedli še analizo strukture proteina s cirkularnim dikroizmom (CD).

Analiza CD-spektrov naravnega in rekombinantnega saharozil-lektina je pokazala, da sta si proteina podobna po strukturi, saj imata krivulji obeh proteinov enako obliko, vendar se ne prekrivata. Iz tega lahko sklepamo, da je prišlo pri renaturaciji (po koncentriranju z amonijevim sulfatom) do pravilnega zvitja rekombinantnega proteina, ki pa se po lastnostih nekoliko razlikuje od naravnega.

Z rekombinantnim lektinom CnSL-3 smo izvedli tudi hemaglutinacijski test na eritrocitih skupine A, ki je bil po enakem protokolu predhodno izведен tudi na naravnemu saharozil-lektinu SucL20, in je izkazoval zelo šibko aglutinacijsko aktivnost (60). Ker imajo eritrociti krvne skupine A na svojih membranah vezana  $\alpha$ -N-acetyl-D-galaktozamin in  $\alpha$ -L-fukozo (25, 44) smo že vnaprej predvidevali, da do aglutinacije ne bo prišlo, saj naj bi naš lektin vezal saharozo, ki je disaharid, sestavljen iz glukoze in fruktoze. Kot predvideno do aglutinacije ni prišlo, vendar pa smo po šestnajstih urah opazili, da je  $r\text{CnSL-3}$  povzročil hemolizo eritrocitov, česar pa raziskovalci IJS niso zasledili pri naravnemu lektinu (60). Za lektine je značilno, da so navadno sestavljeni iz lektinske in nelektinske domene (55). Iz rezultatov poskusa zato sklepamo, da bi lahko nelektinska domena  $r\text{CnSL-3}$  imela litično aktivnost. Pri ponovnem vrednotenju hemolitične aktivnosti smo določili tudi najmanjšo litično koncentracijo  $r\text{CnSL-3}$ , ki je znašala 2,6  $\mu\text{M}$ . Hemaglutinacijski poskus smo izvedli le na človeških eritrocitih skupine A (ki smo jih imeli na razpolago), vendar pa se nekateri lektini vežejo le na živalske eritrocite, celice prazivali oz.

kvasovk, saj imajo naštete celice na svoji površini drugačne ogljikove hidrate. Poleg tega je znano, da se nekateri lektini uspešno vežejo le na eritrocite, ki so bili predhodno obdelani s proteolitičnimi encimi, kot je npr. tripsin, ki povečajo reaktivnost aktivnih mest, pri čemer se ne spremeni njihova specifičnost (23, 54). Nekateri lektini imajo tako hemolitično kot tudi hemaglutinacijsko sposobnost, ki se odražata po vezavi enakih sladkorjev. Tovrstno aktivnost so zasledili pri lektinu žveplenega lepoluknjičarja (*Laetiporus sulphureus*). Glede na zanimiv pojav so raziskovalci sklepali, da je v nekaterih primerih hemoliza izrazitejša in prekrije manj izrazito aglutinacijo, zato so za tovrstne lektine uvedli izraz **hemolizini** (23).

Naravni in rekombinantni saharozil-lektin se glede eksperimentalno določenih lastnosti najbolj razhajata v sposobnosti vezave sladkorja saharoze. Naravni lektin SucL20 veže saharozo v veliki meri (po tej lastnosti je dobil tudi ime (60)), vezava rekombinantnega lektina rCnSL-3 na saharozo pa je minimalna in praktično zanemarljiva. Poimenovanje rekombinantnega proteina z izrazom »rekombinantni saharozil-lektin« v nadaljevanju ni najbolj ustrezno, saj lektin ne veže saharoze.

Naravni in rekombinantni saharozil-lektin se po biokemijskih lastnostih precej razlikujeta. Prišli smo do zaključka, da je vzrok temu različna tridimenzionalna ureditev obeh proteinov, na katero pa ima odločajoč vpliv primarna struktura proteina. Z Edmanovo metodo razgradnje aminokislin smo poleg N-končnega določili tudi del notranjega aminokislinskega zaporedja naravnega saharozil-lektina. Določeno N-končno zaporedje lektina (VNPNLPGPNDVFVGFRGTNN) se je popolnoma ujemalo s predhodno določenim N-končnim zaporedjem raziskovalcev IJS (60). Ugotovili smo, da se pri naravnem lektinu pojavljata notranji zaporedji GNTQVQVTGTNLCLD (60) in TAIRFGNLNT. V nobenem od predvidenih aminokislinskih zaporedij (izpeljanih iz pomnoženih nukleotidnih zaporedij naravnega lektina) nismo zasledili dela notranjega zaporedja GNTQVQVTGTNLCLD, zaporedje TAIRFGNLNT pa je prisotno le v proteinskih zaporedjih izolektina A. Iz tega sledi, da smo uspeli pomnožiti zaporedji izolektinov A in B, ki se razlikujeta od prevladujočega zaporedja naravnega lektina SucL20, saj ne vsebujeta dela notranjega zaporedja GNTQVQVTGTNLCLD. Obenem lahko trdimo, da je zaporedje naravnega lektina bolj podobno zaporedju izolektina A, saj vsebuje del notranjega zaporedja TAIRFGNLNT. Uspešno pripravljen rekombinantni lektin rCnSL-3 pa izhaja iz zaporedja, ki smo ga uvrstili k

skupini izolektinov B in se zato po lastnostih razlikuje od izolektina A oz. naravnega saharozilektina.

### 5.3 Zaključek

Gobji lektini so poznani po svojih insekticidnih učinkih. Naravni lektin SucL20 ima dokazane insekticidne učinke na organizmu vinske mušice (56, 61). Pripravljeni rCnSL-3 se v mnogih lastnostih razlikuje od SucL20, med drugim izkazuje litično aktivnost na človeških eritrocitih vrste A, ki jo pri SucL20 ne zasledimo. Litična aktivnost bi lahko nakazovala, da je rCnSL-3 toksične narave oz. bi lahko izkazoval tudi insekticidno aktivnost. Zato je s tega vidika zanimiv tudi za nadaljnje raziskave, saj se uporaba biopesticidov vse bolj povečuje v primerjavi z nizkomolekularnimi sinteznimi pesticidi oz. anorganskimi pesticidi, ki so že obsoletni. Rastlinski lektini se zadnji dve desetletji uspešno uporabljajo kot naravni insekticidi, ki ne onesnažujejo okolja in jih lahko z genskim inženiringom vgradimo v rastline (36, 37).

Transgene rastline so v današnjem času vse bolj zanimive, saj uspešno kljubujejo škodljivcem in omogočajo večjo pridelavo hrane. Glede na toksičnost gobijih lektinov lahko pričakujemo, da bodo v bodoče zelo uporabni na tem področju.

## 6. SKLEPI

V okviru diplomskega dela smo z molekularno-biološkimi metodami določili veliko število nukleotidnih zaporedij saharozil-lektina iz glive megleanke (*Clitocybe nebularis*). Dobljena zaporedja smo analizirali na nukleotidnem in proteinskem nivoju ter ugotovili, da izmed vseh zaporedij lahko izluščimo dve različici zaporedja cDNA, in sicer izolektina A in B. Prevladajočega zaporedja naravnega lektina nismo uspeli pomnožiti, vendar pa je zaporedje A bolj podobno zaporedju naravnega lektina v primerjavi z zaporedjem B. Glede na raznolikost zaporedij znotraj posamezne različice izolektina lahko sklepamo, da je naravni lektin mešanica več različnih izolektinov.

Izmed določenih zaporedij smo izbrali tri nukleotidna zaporedja, iz katerih smo načrtovali štiri različne lektine (CnSL 1-4), ki smo jih poskušali pridobiti z rekombinantno tehnologijo DNA.

S pomočjo bakterijskega ekspresijskega sistema *Escherichia coli* in uporabe prenosnika pET-11a smo uspešno pridobili rekombinantni lektin rCnSL-3, ki je izolektin skupine B. Da bi pridobili tudi dovoljšno količino rekombinantnih lektinov rCnSL-2 in rCnSL-4, bi morali optimizirati postopke čiščenja proteinov.

Rekombinantnemu lektinu rCnSL-3 smo določili nekatere biokemijske lastnosti in jih primerjali z lastnostmi naravnega saharozil-lektina (SucL20). Ugotovili smo, da v nasprotju z naravnim lektinom rCnSL-3 nima vezavne specifičnosti za saharozo in njegova izoelektrična točka je za 2 pH enoti manjša od izoelektrične točke SucL20. Struktturna analiza obeh lektinov s cirkularnim dikroizmom je pokazala, da sta oba proteina pravilno zvita in vsebujeta podobne elemente sekundarne strukture. Naravni lektin šibko aglutinira človeške eritrocite vrste A, medtem ko rekombinantni protein na enakem tipu eritrocitov izkazuje hemolitično aktivnost. Različne lastnosti lektinov so posledica razlik v primarni strukturi proteinov, ki se odražajo tudi na njihovi tridimenzionalni strukturi. Naravni lektin je po strukturi bolj podoben izolektinu A, zaporedje pridobljenega rekombinantnega lektina pa uvrščamo v skupino B.

## 7. LITERATURA

1. Campbell N.A, Reece J.B.: *Biology 6<sup>th</sup> Edition*. Pearson Education Inc., San Francisco, 2002: 340-351, 375-401, 616-632.
2. Pleše J.: *Gobe*. Učila International, Tržič, 2009: 10-11, 176-177.
3. Podobnik A., Devetak D.: *Biologija 4 in 5: Raznolikost živih bitij*. DZS, Ljubljana, 2000: 47-55.
4. Plitaver A.: *Zavarovane gline v Sloveniji*. Ministrstvo za okolje in prostor (Uprava RS za varstvo narave), Ljubljana, 1997: 5-6, 9.
5. Gunde-Cimerman N.: *Nitaste gline*. V: Biotehnologija – osnovna znanja (urednik Raspov P.). BIA d.o.o., Ljubljana, 1996: 96-110.
6. Raspov P.: *Kvasovke*. V: Biotehnologija – osnovna znanja (urednik Raspov P.). BIA d.o.o., Ljubljana, 1996: 69-93.
7. Štrukelj B., Kos J.: *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 68-184.
8. Anderson D.M. (urednik): *Dorland's Illustrated Medical dictionary 30<sup>th</sup> Edition*. Saunders, Philadelphia, 2003: 642, 744, 1010.
9. Vrščaj D.: *Gline: od Triglava do Jadran*. Kmečki glas, Ljubljana, 1990: 5-106, 207.
10. Bielli E.: *Gobe: spoznavanje, prepoznavanje in nabiranje najbolj razširjenih vrst gob*. Mladinska knjiga, Ljubljana, 2002: 13, 17, 28, 85.
11. Arzenšek B., Tratnik B., Malovrh B.: *Slovenski gobarski vodnik*. Modrijan, Ljubljana, 2010: 30, 61-63, 318.
12. Læssøe T., Del Conte A.: *Velika knjiga o gobah: Priročnik za prepoznavanje, nabiranje in pripravo gob*. DZS, Ljubljana, 1997: 6, 87.
13. Borchers A.T., Keen C.L., Gershwin M.E.: *Mushrooms, Tumors, and Immunity: An Update*. Experimental Biology and Medicine, 2004; 229 (5): 393-406.
14. Kreft S.: *Premalo raziskane učinkovine: zdravilne gobe*. Herbika, september 2000: 16-19.
15. Singh R.S., Bhari R., Kaur H.P.: *Mushroom lectins: Current status and future perspectives*. Critical Reviews in Biotechnology, 2010; 30 (2): 99-126.
16. Lull C., Wicher H.J., Savelkoul H.F.J.: *Antiinflammatory and Immunomodulating Properties of Fungal Metabolites*. Mediators of Inflammation, 2005; 2: 63-80.
17. Ooi V.E.C., Liu F.: *Immunomodulation and Anti-Cancer Activity of Polysaccharide-Protein Complexes*. Current Medicinal Chemistry, 2000; 7: 715-729.
18. Lindequist U., Niedermeyer T.H.J., Jülich W-D: *The Pharmacological Potential of Mushrooms*. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2005; 2 (3): 285-299.

19. Vrhovec B.: *Zdravilne gobe Slovenije in 100 okusnih gob*. Narava, Kranj, 2010: 3-43, 83.
20. Lee W.H., Friedrich J.A.: *Zdravilna moč gob: naravna zdravila, ki že 20 stoletij zdravijo raka, sladkorno bolezni, bolezni srca in druge težave*. Aurea Press, Ljubljana, 1999: 37-96.
21. Kališnik M. (urednik): *Slovenski Medicinski e - Slovar*. Medicinska fakulteta in Lek d.d., Ljubljana, 2004.
22. Goldstein I.J., Hughes R.C., Monsigny M., Osawa T., Sharon N.: *What should be called a lectin?* Nature, 1980; 258: 66.
23. Guillot J., Konska G.: *Lectins in Higher Fungi*. Biochemical Systematics and Ecology 1997; 25 (3): 203-230.
24. Lam S.K., Ng T.B.: *Lectins: production and practical applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010; 89 (1): 45-55.
25. Sharon N., Lis H.: *History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules*. Glycobiology 2004; 14: 53-62.
26. Male D., Brostoff J., Roth B.D, Roitt I.: *Immunology* 7<sup>th</sup> Edition. Elsevier Limited, Philadelphia, 2006; 87-103.
27. Sharon N.: *Lectins: past, present and future*. Biochemical Society Transactions, 2008; 36: 1457-1460.
28. Mody R., Joshi S., Chaney W.: *Use of Lectins as Diagnostic and Therapeutic Tools for Cancer*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 1995; 33 (1): 1-10.
29. Sharon N.: *Lectins: from obscurity into the limelight*. Protein Science, 1998; 7: 2042-2048.
30. Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Freeze H.H., Stanley P., Bertozzi C.R., Hart G.W., Etzler M.E. (uredniki): *Essentials of Glycobiology 2<sup>nd</sup> Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York; 784 str.
31. Mavec P.: *Pomen lektinov v imunologiji in onkologiji*. Proteus, 1978; 41 (4): 140-143.
32. Wang H., Ng T.B., Ooi E.C.V.: *Lectins from mushrooms*. Mycological Research 1998; 102 (8): 897-906.
33. Nilsson C.L.: *Lectins: Analytical Tools from Nature*. V: Lectins: Analytical Technologies (urednik Nilsson C.L.), Elsevier, Amsterdam, 2007: 1-13.
34. Liu B., Bian H., Bao J.: Plant lectins: *Potential antineoplastic drugs from bench to clinic*. Cancer Letters, 2010; 287 (1): 1-12.
35. Michiels K., Van Damme E.J.M., Smagghe G: *Plant-insect interactions: What can we learn from plant lectins?* Archives of insect biochemistry and physiology, 2010; 73 (4): 193-212.
36. Vasconcelos I.M., Oliveira J.T.A.: *Antinutritional properties of plant lectins*. Toxicon, 2004; 44: 385-403.

37. Carini C.R., Grossi-de-Sá M.F.: *Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides*. Toxicon, 2002;40: 1515-1539.
38. Peumans W.J., Van Damme E.J.M.: *Lectins as Plant Defense Proteins*. Plant Physiology, 1995; 109: 347-352.
39. Majumder P., Mondal H.A., Das S.: *Insecticidal Activity of Arum maculatum Tuber Lectin and Its Binding to the Glycosylated Insect Gut Receptors*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005; 53: 6725-6729.
40. Fitches E., Wiles D., Douglas A.E., Hincliffe G., Audsley N., Gatehouse J.A.: *The insecticidal activity of recombinant garlic lectins towards aphids*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2008; 38 (10): 905-915.
41. Trigueros V., Lougarre A., Ali-Ahmed D., Rahbé Y., Guillot J., Chavant L., Fournier D., Paquereau L.: *Xerocomus chrysenteron lectin: identification of a new pesticidal protein*. Biochimica et Biophysica Acta, 2003; 1621 (3): 292-298.
42. Hamid R., Masood A.: *Dietary Lectins as Disease Causing Toxicants*. Pakistan Journal of Nutrition, 2009; 8 (3): 293-303.
43. Sahly H., Keisari Y., Crouch E., Sharon N., Ofek I.: *Recognition of Bacterial Surface Polysaccharides by Lectins of the Innate Immune System and Its Contribution to Defense against Infection: the Case of Pulmonary Pathogens*. Infection and Immunity, 2008; 76 (4): 1322-1332.
44. Boyer R.: *Temelji biokemije*. Študentska založba, Ljubljana, 2005: 198-203, 338-359.
45. Kocbek P., Kristl J.: *Ciljan vnos učinkovin z uporabo lektinov – korak naprej v razvoju bioadhezivnih dostavnih sistemov*. Farmacevtski vestnik, 2006; 57 (2): 162-168.
46. Lei H.Y., Chang C.P.: *Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent*. Journal of Biomedical Science, 2009. (objava na medmrežju: [www.jbiomedsci.com/content/16/1/10](http://www.jbiomedsci.com/content/16/1/10))
47. Heinrich E.L., Welty L.A.Y., Banner L.R., Oppenheimer S.B.: *Direct Targeting of Cancer Cells: A Multiparameter Approach*. Acta Histochemica, 2005; 107 (5): 335-344.
48. Reisner Y., Itzcovitch L., Meshorer A., Sharon N.: *Hemopoietic stem cell transplantation using mouse bone marrow and spleen cells fractionated by lectins*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1978; 75 (6): 2933-2936.
49. Reisner Y., Kapoor N., Kirkpatrick D., Pollack M.S., Cunningham-Rundles S., Dupont B., Hodes M.Z., Good R.A., O'Reilly R.J.: *Transplantation for severe combined immunodeficiency with HLA-A,B,D,DR-incompatible parental marrow cells fractionated by soybean agglutinin and sheep red blood cells*. Blood, 1983; 61: 341-348.

50. Balzarini J.: *Targeting the glycans of gp120: a nove approach aimed at the Achilles heel of HIV*. Lancet Infectious Diseases, 2005; 5: 726-731.
51. Hoorelbeke B., Huskens D., Férid G., François K.O., Takahashi A., Van Laethem K., Schols D., Tanaka H., Balzarini J.: *Actinohivin, a Broadly Neutralizing Prokaryotic Lectin, Inhibits HIV-1 Infection by Specifically Targeting High-Mannose-Type Glycans on the gp120 Envelope*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010; 54 (8): 3287-3301.
52. Swanson M.D., Winter H.C., Goldstein I.J., Markovitz D.M.: *A Lectin Isolated from Bananas Is Potent Inhibitor of HIV Replication*. The Journal of Biological Chemistry, 2010; 285 (12): 8646-8655.
53. Haab B.B.: *Antibody-lectin sandwich arrays for biomarker and glycobiology studies*. Expert Review of Proteomics, 2010; 7 (1): 9-11.
54. Yagi F., Sakai T., Shiraishi N., Yotsumoto M., Mukoyoshi R.: *Hemagglutinins (lectins) in fruit bodies of Japanese higher fungi*. Mycoscience 2000; 41: 323-330.
55. Kamerling J.P. (glavni urednik): *Biochemistry of Glycoconjugate Glycans, Carbohydrate-mediated interactions*. Elsevier, Oxford, 2007: 564-620.
56. Mier N., Canete S., Klaebe A., Chavant L., Fournier D.: *Insecticidal properties of Mushroom and Toadstool Carpophores*. Phytochemistry, 1996; 41 (5): 1293-1299.
57. Horejsí V., Kocourek J.: *Studies on lectins. XXXVI. Properties of some lectins prepared by affinity chromatography on O-glycosyl polyacrylamide gels*. Biochimica et Biophysica Acta, 1978; 538 (2): 299-315.
58. Sabotič J.: *Karakterizacija mikocipinov izbranih vrst prostotrošnic z genskim in proteinskim inženirstvom*. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije, Ljubljana, 2007: 201 str.
59. Pohleven J., Obermajer N., Sabotič J., Anžlovar S., Sepčić K., Kos J., Kralj B., Štrukelj B., Brzin J.: *Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom Clitocybe nebularis with antiproliferative activity against human leukemic T cells*. Biochimica et Biophysica Acta 2009; 1790 (3): 173-181.
60. Pohleven J.: *Biokemijske lastnosti lektina iz višje gline Meglenke (Clitocybe nebularis) in njegova biološka aktivnost*. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti, Ljubljana, 2009: 127 str.
61. Kandić, L.: *Insekticidno delovanje proteinov izbranih gob in rastlin na modelu vinske mušice*. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2007; 82 str.
62. Swartz J.R.: *Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins*. Current Opinion in Biotechnology 2001; 12 (2): 195-201.

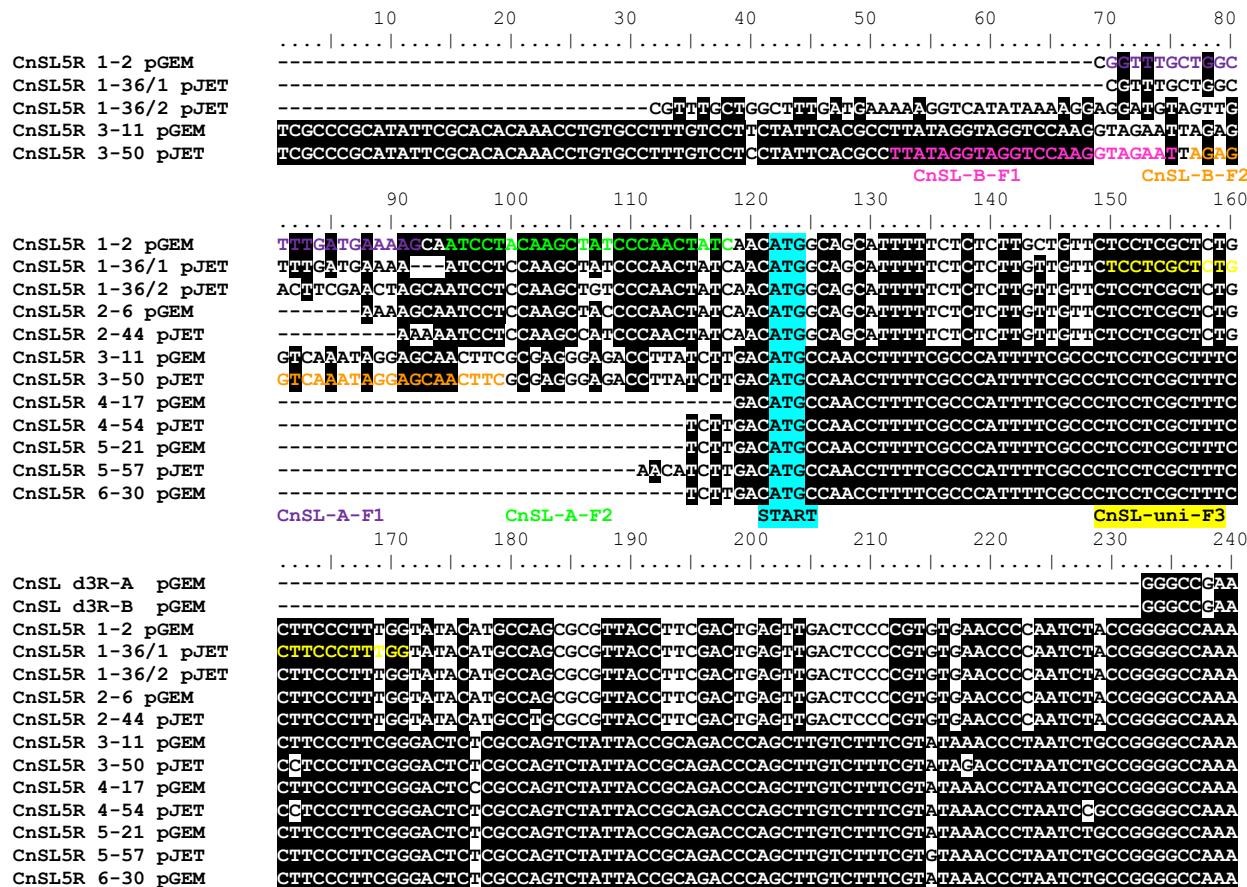
63. Terpe K.: *Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006; 72 (2): 211-222.
64. Schmidt F.R.: *Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004; 65 (4): 363-372.
65. Baneyx F.: *Recombinant protein expression in Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology, 1999; 10 (5): 411-421.
66. Promega: *pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual*. ZDA, 2007.
67. Fermentas: *CloneJET™ PCR Cloning Kit #K1231, #K1232*, Litva, 2009.
68. Novagen: *pET System Manual 11<sup>th</sup> Edition*. ZDA, 2006.
69. Clontech Laboratories: *GenomeWalker™ Universal Kit User Manual*. ZDA, 2007.
70. Clontech Laboratories: *Advantage®2 PCR Enzyme System User Manual*. ZDA, 2009.
71. Singh M., Yadav A., Ma X., Amoah E.: *Plasmid DNA Transformation in Escherichia Coli: Effect of Heat Shock Temperature, Duration, and Cold Incubation of CaCl<sub>2</sub> Treated Cells*. International Journal of Biotechnology and Biochemistry, 2010, 6 (4): 561-568.
72. Aitken A., Learmonth M.: *Protein Determination by UV Absorption*. V: The protein Protocols Handbook (Part 1). Humana Press Inc, Totowa, 2002: 3-6.
73. Sabotič J., Gaser D., Rogelj B., Gruden K., Štrukelj B., Brzin J.: *Heterogeneity in the cysteine protease inhibitor clitocepin gene family*. Biological Chemistry, 2006; 387 (12): 1559-1566.
74. Yang C., Bolotin E., Jiang T., Sladek F.M., Martinez E.: *Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters*. Gene, 2007; 389 (1): 52-65.
75. Candy L., Peumans W.J., Menu-Bouaouiche L., Astoul C.H., Van Damme J., Van Damme E.J.M., Erard M., Rougé P.: *The Gal/GalNAc - Specific Lectin from the Plant Pathogenic Basidiomycete Rhizoctonia solani Is a Member of the Ricin-B Family*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001; 282: 655-661.

## 8. PRILOGE

Legenda uporabljenih oznak v prilogah:

- **ATG** - začetni (start) kodon kodirajočega nukleotidnega zaporedja, ki se prevede v aminokislino metionin **M**
- **TAA, TAG, TGA** - končni (stop) kodoni kodirajočega nukleotidnega zaporedja (po prevajanju so označeni z **\***)
- **—** - s svetlo zeleno barvo je podprtano določeno N-končno zaporedje lektina
- s **črno** barvo so senčeni enaki nukleotidi oz. aminokisline, s **sivo** pa podobne aminokisline (50% podobnost)
- **- - -** - z rdečo prekinjeno črto so označeni prisotni introni v nukleotidnem zaporedju gDNA
- **AAAAAAA** - z rumeno barvo je senčen poliadeniliran rep nukleotidnega zaporedja
- **GAAATGTCTTGTATCTGTTCCCT (CnSL-A-R1)** - primer oznake načrtovanega oligonukleotidnega začetnika za pomnoževanje celotnega zaporedja. Načrtovani začetniki so v zaporedju označeni z različnimi barvami.
- **CnSL5R 3-50 pJET** - primer oznake zaporedja, ki vključuje ime lektina CnSL (*Clitocybe nebularis* saharozil-lektin), vrsto reakcije PCR (5R – 5'RACE), oznako fragmenta (3) iz izbrane bakterijske kolonije (50) in uporabljen klonirni vektor (pJET).
- **Ostale oznake:** **d3R** (degenerirani 3'RACE), **CnSLprom** (metoda hoje po genomu), **cCnSL3R 8-2PCR** (celotno zaporedje cDNA dobljeno z metodo 3'RACE, sledi številka fragmenta in reakcija PCR).

**Priloga 1: Poravnavo vseh delnih nukleotidnih zaporedij CnSL, dobljenih z metodama deg 3'RACE in 5'RACE**

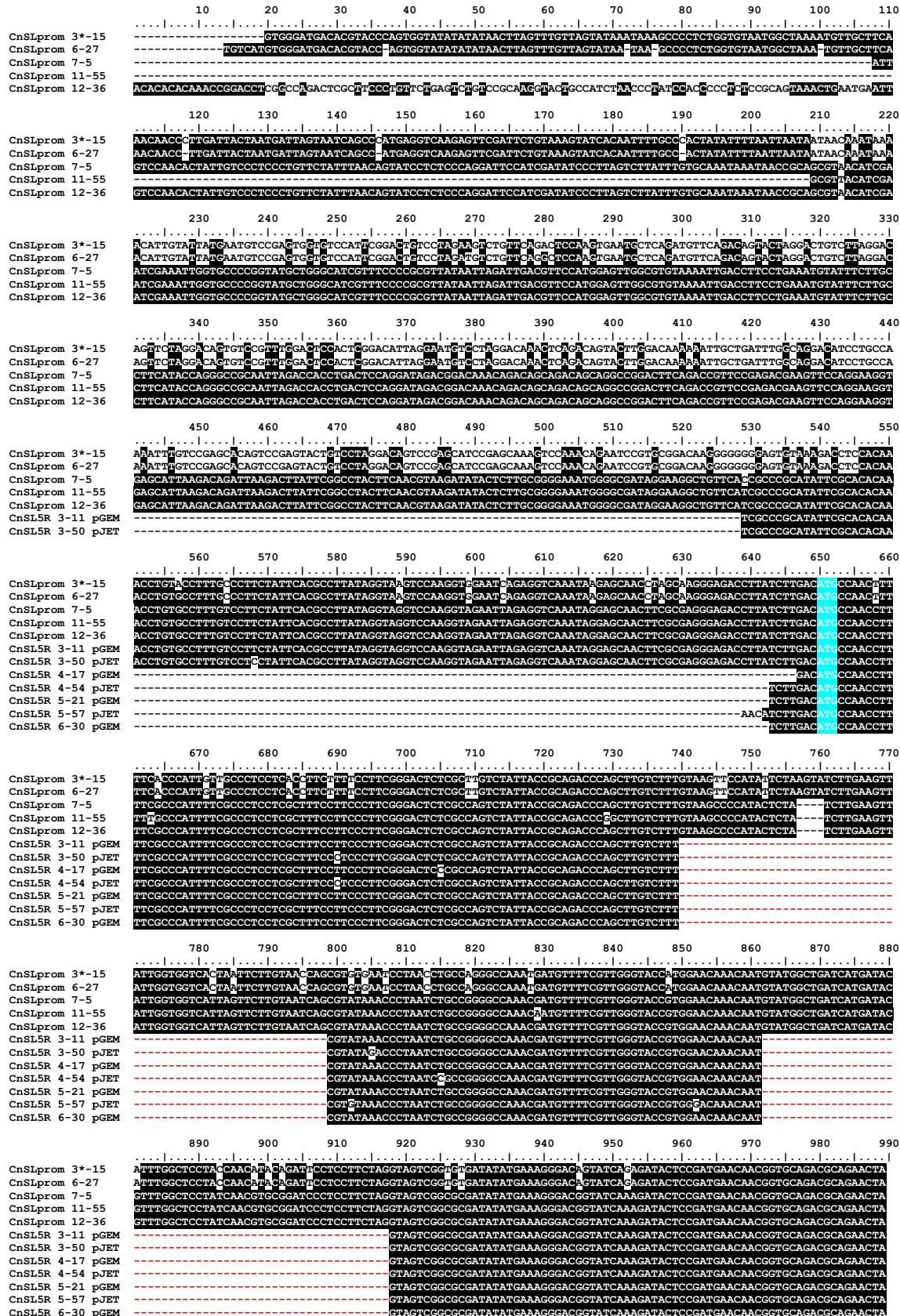


	250	260	270	280	290	300	310	320
CnSL d3R-A pGEM	CGATGTGTTGTCGGATTTCGGCGGACAACAAATATAGT	TGGCGCGATATATGAAAAGGACGGCATCAAAGATA	CGCCAT					
CnSL d3R-B pGEM	TGATGTTCTCGTTGGTACCGTGGACAACAAATGTAGT	CGCGCGATATATGAAAAGGACGGTATCAAAGATA	CTCCGA					
CnSL5R 1-2 pGEM	CGATGCTTGTGTCGGATTTCGGCGGACAACAACTATAGT	TGGCGCGATATATGAAAAGGACGGCATCAAAGATA	CGCCAT					
CnSL5R 1-36/1 pJET	CGATGCTTGTGTCGGATTTCGGCGGACAACAAATATAGT	TGGCGCGATATATGAAAAGGACGGCATCAAAGATA	CGCCAT					
CnSL5R 1-36/2 pJET	CGATGCTTGTGTCGGATTTCGGCGGACAACAAATATAGT	TGGCGCGATATATGAAAAGGACGGCATCAAAGATA	CGCCAT					
CnSL5R 2-6 pGEM	CGATGCTTGTGTCGGATTTCGGCGGACAACAAATATAG							
CnSL5R 2-44 pJET	CGATGCTTGTGTCGGATTTCGGCGGACAACAAATATAG							
CnSL5R 3-11 pGEM	CGATGTTTCGTTGGTACCGTGGACAACAAATGTAGT	CGCGCGATATATGAAAAGGACGGTATCAAAGATA	CTCCGA					
CnSL5R 3-50 pJET	CGATGTTTCGTTGGTACCGTGGACAACAAATGTAGT	CGCGCGATATATGAAAAGGACGGTATCAAAGATA	CTCCGA					
CnSL5R 4-17 pGEM	CGATGTTTCGTTGGTACCGTGGACAACAAATGTAGT	CGCGCGATATATGAAAAGGACGGTATCAAAGATA	CTCCGA					
CnSL5R 4-54 pJET	CGATGTTTCGTTGGTACCGTGGACAACAAATGTAGT	CGCGCGATATATGAAAAGGACGGTATCAAAGATA	CTCCGA					
CnSL5R 5-21 pGEM	CGATGTTTCGTTGGTACCGTGGACAACAAATGTAGT	CGCGCGATATATGAAAAGGACGGTATCAAAGATA	CTCCGA					
CnSL5R 5-57 pJET	CGATGTTTCGTTGGTACCGTGGACAACAAATGTAGT	CGCGCGATATATGAAAAGGACGGTATCAAAGATA	CTCCGA					
CnSL5R 6-30 pGEM	CGATGTTTCGTTGGTACCGTGGACAACAAATGTAGT	CGCGCGATATATGAAAAGGACGGTATCAAAGATA	CTCCGA					
330	340	350	360	370	380	390	400	
CnSL d3R-A pGEM	TAAACAAATGGTCGGAGATGCAGAGATCGGCCCTGGTC	CATATATCAGCGACTTTCACCGCCGAATCTTGCC	TC					
CnSL d3R-B pGEM	TGAAACACGGTCGACAGCAGCAACTA							
CnSL5R 1-2 pGEM	TAAACAAATGGTCGGAGATGCAGAGATCGGCCCTGGTC	CATATATCAGCGACTTTCACCGCCGAATCTTGCC	TC					
CnSL5R 1-36/1 pJET	TAAACAAATGGTCGGAGATGCAGAGATCGGCCCTGGTC	CATATATCAGCGACTTTCACCGCCGAATCTTGCC	TC					
CnSL5R 1-36/2 pJET	TAAACAAATGGTCGGAGATGCAGAGATCGGCCCTGGTC	CATATATCAGCGACTTTCACCGCCGAATCTTGCC	TC					
CnSL5R 3-11 pGEM	TAAACAAATGGTCGGAGATGCAGAGATCGGCCCTGGTC	CATATATCAGCGACTTTCACCGCCGAATCTTGCC	TC					
CnSL5R 3-50 pJET	TAAACAAATGGTCGGAGATGCAGAGATCGGCCCTGGTC	CATATATCAGCGACTTTCACCGCCGAATCTTGCC	TC					
CnSL5R 4-17 pGEM	TAAACAAATGGTCGGAGATGCAGAGATCGGCCCTGGTC	CATATATCAGCGACTTTCACCGCCGAATCTTGCC	TC					
CnSL5R 4-54 pJET	TAAACAAATGGTCGGAGATGCAGAGATCGGCCCTGGTC	CATATATCAGCGACTTTCACCGCCGAATCTTGCC	TC					
CnSL5R 5-21 pGEM	TAAACAAATGGTCGGAGATGCAGAGATCGGCCCTGGTC	CATATATCAGCGACTTTCACCGCCGAATCTTGCC	TC					
CnSL5R 5-57 pJET	TAAACAAATGGTCGGAGATGCAGAGATCGGCCCTGGTC	CATATATCAGCGACTTTCACCGCCGAATCTTGCC	TC					
CnSL5R 6-30 pGEM	TAAACAAATGGTCGGAGATGCAGAGATCGGCCCTGGTC	CATATATCAGCGACTTTCACCGCCGAATCTTGCC	TC					
410	420	430	440	450	460	470	480	
CnSL d3R-A pGEM	GGATCTGCTGGTAATACTCCAGGCACGCGCAACAGTTG	TAAAGATTATGCAAGGGGCTGCAAGATTATGCGACGG	GTC	CAATGGCGGGGTGCGCC				
CnSL d3R-B pGEM	GGATCTGCTGGTAATACTCCAGGCACGCGCAACAGTTG	TAAAGATTATGCAAGGGGCTGCAAGATTATGCGACGG	GTC	CAATGGCGGGGTGCGCC				
CnSL5R 1-2 pGEM	GGATCTGCTGGTAATACTCCAGGCACGCGCAACAGTTG	TAAAGATTATGCAAGGGGCTGCAAGATTATGCGACGG	GTC	CAATGGCGGGGTGCGCC				
CnSL5R 1-36/1 pJET	GGATCTGCTGGTAATACTCCAGGCACGCGCAACAGTTG	TAAAGATTATGCAAGGGGCTGCAAGATTATGCGACGG	GTC	CAATGGCGGGGTGCGCC				
CnSL5R 1-36/2 pJET	GGATCTGCTGGTAATACTCCAGGCACGCGCAACAGTTG	TAAAGATTATGCAAGGGGCTGCAAGATTATGCGACGG	GTC	CAATGGCGGGGTGCGCC				
CnSL5R 5-57 pJET	GGATCTGCTGGTAATACTCCAGGCACGCGCAACAGTTG	TAAAGATTATGCAAGGGGCTGCAAGATTATGCGACGG	GTC	CAATGGCGGGGTGCGCC				
490	500	510	520	530	540	550	560	
CnSL d3R-A pGEM	AAAGGGTTATACTTCCTGTCCTCACTTGGAAATGGCC	CGACGGCAGAGCAACCCGTCAAGACTTAATCTGAGA	CCCTTG					
CnSL d3R-B pGEM	AAAGGGTTATACTTCCTGTCCTCACTTGGAAATGGCC	CGACGGCAGAGCAACCCGTCAAGACTTAATCTGAGA	CCCTTG					
CnSL5R 5-57 pJET	TGA							
570	580	590	600	610	620	630	640	
CnSL d3R-A pGEM	GCTTCCCCGGTACAGCCATACGCTTGGAAATCTCAC	AAATCGGGCGACGACCACGGCC	CGACAGATGGTC					
CnSL d3R-B pGEM	ATATCCCCGGTACAGCCATACGCTTGGAAATCTCAC	AAATCGGGCGACGACCACGGCC	CGACAGATGGTC					
650	660	670	680	690	700	710	720	
CnSL d3R-A pGEM	GTCCCCCGGGACCACTTCAGTCTCTGAAAGCAAG	CTCCCTGCCGCAGACTCTGTCTCCGCAGA	CACTGCA					
CnSL d3R-B pGEM	TCCCCTCTGAGGGCTTCAGACTCTCCGAAAGCGAAG	TTGGTCTAGTGGCTCGGTAAGGA	CCACAGETCTTAAGC					
730	740	750	760	770	780	790	800	
CnSL d3R-A pGEM	CTATTTTGAGAGCGCGTAGACTGGAAACATCAT	ACTGGACACTGA	CTCTCTAACCTCT					
CnSL d3R-B pGEM	TATTTCAATGAGCGCGCCACTCCGCCCGGTTGGA	AATACAGAACGGCCCTGAGTTCCCAAAC	CTGAGCTGAGT					
810	820	830	840	850	860	870	880	
CnSL d3R-A pGEM-T	ACTTTCCTAGCAGAAATGAATGTCTTGATCTG	TCTTCTCTTGTATGTTCCCGTGATCTAA	ACCAAGTAGTTTGG					
CnSL d3R-B pGEM-T	TCCATTTCCTTCTATTTCTGTGGTGGACCTCGGT	CTAGTGGCTCGGTAAGGA	GCACACGCTTCCATGGTC					
890	900	910	920	930				
CnSL d3R-A pGEM	TAGCTTTGTTGTAATACTCATACATATC	ATACACTTCCAAAGCTTCTATGCC						
CnSL d3R-B pGEM	TATTTGGTTATTAATGAAACGAAAGTGAAGATG							

**Priloga 2: Poravnava nukleotidnih zaporedij skupine A dobljenih z metodama hoje po genomu in 5'RACE**

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
CnSLprom 1-3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CnSLprom 8-42	CGACGGCCGGCTGGTATCCCCTACCCCTATCTGTGCAAAATAAAACTGCGGCATAATATCGAGTTGAAATTGGTCTTCGATGCCGAACCTAGCCTC	CGACGGCCGGCTGGTATCCCCTACCCCTATCTGTGCAAAATAAAACTGCGGCATAATATCGAGTTGAAATTGGTCTTCGATGCCGAACCTAGCCTC									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
CnSLprom 1-3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CnSLprom 8-42	CCTAGATTGGAGATGACGTGTTCCCGAACATAATTCTGGCTTCATACCAGGTCGCCAAGTTACACTGGAGAGCCTTCAAAGCTCCATGGTGAT	CCTAGATTGGAGATGACGTGTTCCCGAACATAATTCTGGCTTCATACCAGGTCGCCAAGTTACACTGGAGAGCCTTCAAAGCTCCATGGTGAT									
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	
CnSLprom 1-3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CnSLprom 8-42	TCTGAATCCCCGCCGATGATGGGCCATGACGCCCTTGGAAAATGCCCATGCGAGTTACCCAGTGGCAAATAAAATCCAAGACTAAAGGA	TCTGAATCCCCGCCGATGATGGGCCATGACGCCCTTGGAAAATGCCCATGCGAGTTACCCAGTGGCAAATAAAATCCAAGACTAAAGGA									
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	
CnSLprom 1-3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CnSLprom 8-42	GGCAGTGGCTCGTACACATCTGGAAAGACATTATGAAATGTCGGAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTC	GGCAGTGGCTCGTACACATCTGGAAAGACATTATGAAATGTCGGAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTC									
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	
CnSLprom 1-3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CnSLprom 8-42	ATCTGACGCCACTCGTAACAAATCCCGATGGTTGCTCGGTTCACAGTGTTCACACTCTGACATGAAATTGCCCAAATTCTGACCGAAAATCAAGGTT	ATCTGACGCCACTCGTAACAAATCCCGATGGTTGCTCGGTTCACAGTGTTCACACTCTGACATGAAATTGCCCAAATTCTGACCGAAAATCAAGGTT									
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	
CnSLprom 1-3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CnSLprom 8-42	TGACAGCATTACCGAAAGTACTCTCGACTTCTCTATGCGCTTGCGATCCCCCGAGGATAATTAGGTTCAAAGGACACATCGATTCAAACCCCTCAGT	TGACAGCATTACCGAAAGTACTCTCGACTTCTCTATGCGCTTGCGATCCCCCGAGGATAATTAGGTTCAAAGGACACATCGATTCAAACCCCTCAGT									
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	
CnSLprom 1-3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CnSLprom 8-42	CACTTGACGAATGCCATTACCGGGAGTCCTGGTCTCGTCAATTGATGTTGCCAACCATGTCGAACATCCGGATGCCCTTCATTATGGGAAGGCCCTCGA	CACTTGACGAATGCCATTACCGGGAGTCCTGGTCTCGTCAATTGATGTTGCCAACCATGTCGAACATCCGGATGCCCTTCATTATGGGAAGGCCCTCGA									
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	
CnSLprom 1-3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CnSLprom 8-42	GAAGACCTCACCTATGTAATAAGATAAGTGTATAGCCACGTAACCGCTAGATGTTGCAACCCCTTGCACGGAGAGACTAGAAGTTATAAGAGTCCT	GAAGACCTCACCTATGTAATAAGATAAGTGTATAGCCACGTAACCGCTAGATGTTGCAACCCCTTGCACGGAGAGACTAGAAGTTATAAGAGTCCT									
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	
CnSLprom 1-3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CnSLprom 8-42	TCGATGTTGGCTTCTCGCACACTGCCGTGGCGCACACCTATGCACCTTATTCTGTAAGTGAACCCAGGTATATAAGGAGGATGTAGTT	TCGATGTTGGCTTCTCGCACACTGCCGTGGCGCACACCTATGCACCTTATTCTGTAAGTGAACCCAGGTATATAAGGAGGATGTAGTT									
CnSL5R 1-36/2 pJET	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CnSL5R 1-2 pGEM	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CnSL5R 1-36/1 pJET	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000	
CnSLprom 1-3	GACTTCGA-----ACTGCAATCTTCAAGCTATCCCAACTATCAACATG	GACGCAATTTCCTCTCTTGTGCTCCCTCGCTTGCTTCCCTTGGTATACA									
CnSLprom 8-42	GACTTCGA-----ACTGCAATCTTCAAGCTATCCCAACTATCAACATG	GACGCAATTTCCTCTCTTGTGCTCCCTTGCTTCCCTTGGTATACA									
CnSL5R 1-36/2 pJET	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CnSL5R 1-2 pGEM	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CnSL5R 1-36/1 pJET	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CnSL5R 2-6 pGEM	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CnSL5R 2-44 pJET	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100	
CnSLprom 1-3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	
CnSLprom 8-42	TGCCAGCGGTTACCTTCGACTGAGTTGACTCC	TGAGTCCTTGCTTGTGACTAGCGTGTGAACCCCAAT									
CnSL5R 1-36/2 pJET	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CnSL5R 1-2 pGEM	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CnSL5R 1-36/1 pJET	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CnSL5R 2-6 pGEM	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CnSL5R 2-44 pJET	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200	
CnSLprom 1-3	CTACCGGGCCAAACGATGTCCTTGTGGATTCGCGGGACAAACATAG	-----									
CnSLprom 8-42	CTACCGGGCCAAACGATGTCCTTGTGGATTCGCGGGACAAACATAG	-----									
CnSL5R 1-36/2 pJET	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CnSL5R 1-2 pGEM	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CnSL5R 1-36/1 pJET	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CnSL5R 2-6 pGEM	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
CnSL5R 2-44 pJET	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290		
CnSL5R 1-36/2 pJET	ATGGTGCACTGTCAGAGATGGGCCCTGGTCAATATAC	TGAGTCCTTGCTTGTGACTAGCGTGTGAACCCCAAT									
CnSL5R 1-2 pGEM	ATGGTGCACTGTCAGAGATGGGCCCTGGTCAATATAC	TGAGTCCTTGCTTGTGACTAGCGTGTGAACCCCAAT									
CnSL5R 1-36/1 pJET	ATGGTGCACTGTCAGAGATGGGCCCTGGTCAATATAC	TGAGTCCTTGCTTGTGACTAGCGTGTGAACCCCAAT									

### Priloga 3: Poravnavna nukleotidnih zaporedij skupine B dobljenih z metodama hoje po genomu in 5'RACE



#### **Priloga 4: Poravnavo nukleotidnih zaporedij cDNA in gDNA skupine A (določitev intronov in 3'UTR)**

Genomic sequence alignment showing cCnSL genes across various samples. The alignment spans from position 10 to 1200. cCnSL genes are shown as red dashed lines, while other genes are black solid lines. A green bar highlights a specific region around position 220. A yellow box highlights a region around position 1000.

### **Priloga 5: Poravnava nukleotidnih zaporedij cDNA in gDNA skupine B (določitev intronov in 3'UTR)**

Panel 1 (10-110):

cCnSL gDNA B-3  
cCnSL gDNA B-4  
cCnSL 6-33  
cCnSL 6-35  
cCnSL 4-21  
cCnSL 4-24  
cCnSL 3R 3-2PCR  
cCnSL 3R 9-2PCR  
cCnSL 3R 12-2PCR  
cCnSL 3R 5-2PCR  
cCnSL 3R 6-2PCR  
cCnSL 3R 4-2PCR

Panel 2 (120-220):

cCnSL gDNA B-3  
cCnSL gDNA B-4  
cCnSL 6-33  
cCnSL 6-35  
cCnSL 4-21  
cCnSL 4-24  
cCnSL 3R 3-2PCR  
cCnSL 3R 9-2PCR  
cCnSL 3R 1-1PCR  
cCnSL 3R 12-2PCR  
cCnSL 3R 5-2PCR  
cCnSL 3R 6-2PCR  
cCnSL 3R 4-2PCR

Panel 3 (230-330):

cCnSL gDNA B-3  
cCnSL gDNA B-4  
cCnSL 6-33  
cCnSL 6-35  
cCnSL 4-21  
cCnSL 4-24  
cCnSL 3R 3-2PCR  
cCnSL 3R 9-2PCR  
cCnSL 3R 1-1PCR  
cCnSL 3R 12-2PCR  
cCnSL 3R 5-2PCR  
cCnSL 3R 6-2PCR  
cCnSL 3R 4-2PCR  
CnSL d3R B

Panel 4 (340-440):

cCnSL gDNA B-3  
cCnSL gDNA B-4  
cCnSL 6-33  
cCnSL 6-35  
cCnSL 4-21  
cCnSL 4-24  
cCnSL 3R 3-2PCR  
cCnSL 3R 9-2PCR  
cCnSL 3R 1-1PCR  
cCnSL 3R 12-2PCR  
cCnSL 3R 5-2PCR  
cCnSL 3R 6-2PCR  
cCnSL 3R 4-2PCR  
CnSL d3R-B

## **Žigon S. Karakterizacija za saharozo specifičnega lektina iz gobe meglenke (*Clitocybe nebularis*).**

Dipl. delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo, Univerzitetni študijski program farmacij, 2011.

**Priloga 6: Poravnavna vseh predvidenih proteinskih zaporedij celotne cDNA in gDNA (brez intronov) skupin A in B**

