

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMON ŽURGA

IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA LEKTINOV IZ GOBE ORJAŠKI DEŽNIK
(*Macrolepiota procera*)

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF LECTINS FROM PARASOL
MUSHROOM (*Macrolepiota procera*)

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljal na Inštitutu Jožef Stefan, Odsek za biotehnologijo, pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom asis. dr. Jureta Pohlevna. Meritve z masno spektrometrijo je opravil dr. Bogdan Kralj na Odseku za znanosti o okolju, Inštitut Jožef Stefan. Določanje aminokislinskega zaporedja z Edmanovo degradacijo je opravila dr. Adrijana Leonardi z Odseka za molekularne in biomedicinske znanosti na Inštitutu Jožef Stefan.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Janku Kosu, ki mi je omogočil opravljanje dipomske naloge na Inštitutu Jožef Stefan. Posebej se zahvaljujem dr. Juretu Pohlevnu za vodenje in pomoč pri eksperimentalnem delu diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi dr. Jerici Sabotič in ostalim sodelavcem iz Odseka za biotehnologijo za pomoč pri delu v laboratoriju.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo izdelal samostojno pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom dr. Jureta Pohlevna.

Simon Žurga

Sestava diplomske komisije:

- Predsednik: prof. dr. Albin Kristl
- Mentor: prof. dr. Janko Kos
- Somentor: dr. Jure Pohleven
- Članica: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar

Vsebina

| | | |
|-----------|---|----|
| 1 | Uvod | 1 |
| 1.1 | Glive: pomen in lastnosti | 1 |
| 1.1.1 | Prostotrošnice (Basidiomycetes) | 2 |
| 1.1.1.1 | Orjaški dežnik (<i>Macrolepiota procera</i>) | 3 |
| 1.2 | Glikobiologija | 3 |
| 1.3 | Lektini | 4 |
| 2 | Hipoteza in namen dela | 8 |
| 3 | Materiali in metode | 10 |
| 3.1 | Materiali | 10 |
| 3.1.1 | Kemikalije in drobna oprema | 10 |
| 3.1.2 | Oprema | 13 |
| 3.1.3 | Pufri in raztopine | 14 |
| 3.1.4 | Biološki material | 16 |
| 3.1.5 | Plazmidi | 16 |
| 3.1.6 | Začetni oligonukleotidi | 17 |
| 3.1.7 | Gojišča | 17 |
| 3.2 | Metode | 19 |
| 3.2.1 | Izolacija lektinov iz orjaškega dežnika (<i>M. procera</i>) | 19 |
| 3.2.1.1 | Priprava izvlečka iz plodišč glive | 19 |
| 3.2.1.2 | Afinitetna kromatografija | 19 |
| 3.2.1.2.1 | Priprava nosilca in vezava sladkorjev | 19 |
| 3.2.1.2.2 | Afinitetna kromatografija na laktozil- in galaktozil-sefarozi ter sefarozi | 20 |
| 3.2.1.2.3 | Zaporedna afinitetna kromatografija z glukozil- oziroma saharozil-sefarozi in laktozil-sefarozi | 20 |
| 3.2.1.3 | Ultrafiltracija vzorcev | 21 |
| 3.2.1.4 | Preparativna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo | 21 |
| 3.2.2 | Biokemijska karakterizacija lektinov | 21 |
| 3.2.2.1 | Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata | 21 |
| 3.2.2.2 | Izoelektrično fokusiranje | 23 |
| 3.2.2.3 | Masna spektrometrija z ionizacijo z elektrorazprševanjem | 23 |
| 3.2.2.4 | Gelska filtracija z uporabo tekočinske kromatografije za hitro ločevanje proteinov | 23 |
| 3.2.2.5 | Prenos western | 24 |
| 3.2.2.6 | Določanje aminokislinskih zaporedij izoliranih lektinov | 24 |
| 3.2.3 | Molekulska kloniranje ter analiza lektin-kodirajočih genov in cDNA | 25 |
| 3.2.3.1 | Pomnoževanje delnih nukleotidnih zaporedij lektin-kodirajočih genov in cDNA | 25 |
| 3.2.3.2 | Pomnoževanje cDNA z metodo hitrega kloniranja 3' in 5' koncev cDNA | 26 |
| 3.2.3.3 | Pomnoževanje gena z metodo hoje po genomu | 27 |
| 3.2.3.4 | Agarozna gelska elektroforeza | 28 |
| 3.2.3.5 | Čiščenje fragmentov DNA | 29 |
| 3.2.3.6 | Kloniranje fragmentov | 29 |

| | |
|---|----|
| 3.2.3.7 Analiza gena in cDNA, ki kodirata lektin iz <i>M. procera</i> | 30 |
| 3.2.3.8 Analiza iz cDNA izpeljanega aminokislinskega zaporedja lektina iz <i>M. procera</i> | 30 |
| 3.2.4 Biološke aktivnosti lektinov | 31 |
| 3.2.4.1 Hemaglutinacijski testi | 31 |
| 3.2.4.1.1 Test hemaglutinacije z različnimi krvnimi skupinami eritrocitov..... | 31 |
| 3.2.4.1.2 Test inhibicije hemaglutinacije s sladkorji in glikoproteinom | 32 |
| 3.2.4.1.3 Test inhibicije hemaglutinacije s proteinskimi inhibitorji proteaz, makrocipini in klitocipinom | 32 |
| 4 Rezultati..... | 33 |
| 4.1 Izolacija in biokemijska karakterizacija lektinov | 33 |
| 4.1.1 Sefarozil-specifični lektin MpSepL..... | 33 |
| 4.1.2 Galaktozil-specifični lektin MpGalL..... | 36 |
| 4.1.3 Laktozil-specifični lektin MpLacL | 38 |
| 4.2 Karakterizacija gena in cDNA, ki kodirata lektin iz <i>M. procera</i> | 40 |
| 4.3 Analiza iz cDNA izpeljanega aminokislinskega zaporedja lektina iz <i>M. procera</i> | 41 |
| 4.4 Biološki testi in ugotavljanje vezavnih značilnosti lektinov | 43 |
| 4.4.1 Hemaglutinacijska aktivnost lektinov | 43 |
| 4.4.2 Vezavne specifičnosti MpSepL in MpLacL za sladkorje in glikoprotein..... | 44 |
| 4.4.3 Inhibicija hemaglutinacije z makrocipini in klitocipinom..... | 45 |
| 5 Razprava | 46 |
| 5.1 Lektini iz plodišč glive orjaški dežnik..... | 46 |
| 5.2 Analiza gena in cDNA, ki kodirata lektin iz <i>M. procera</i> ter njegovega izpeljanega aminokislinskega zaporedja..... | 48 |
| 5.3 Biološke aktivnosti lektinov in njihove vezavne specifičnosti za ogljikove hidrate. 50 | |
| 6 Sklepi..... | 52 |
| 7 Literatura | 53 |

Povzetek

Glive so znane po uporabi v prehranske namene in po raznovrstnih zdravilnih učinkih, saj vsebujejo številne biološko aktivne substance. Ena izmed takih substanc so tudi lektini, to je raznolika skupina proteinov, ki reverzibilno vežejo ogljikove hidrate. Iz gobe orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*) smo s pomočjo sladkorne afinitetne kromatografije izolirali sefarozil-specifični lektin, galaktozil-specifični lektin in laktozil-specifični lektin, za katere se je po natančni analizi izkazalo, da gre za izooblike proteina, imenovanega *Macrolepiota procera* lektin (MpL). Sefarozil- in laktozil-specifičnemu lektinu smo določili delna aminokislinska zaporedja, na podlagi katerih smo načrtovali degenerirane začetne oligonukleotide in jih uporabili v verižni reakciji s polimerazo. Z njimi smo pridobili delno nukleotidno zaporedje cDNA in na podlagi tega načrtovali specifične oligonukleotidne začetnike, s katerimi smo z metodo hitrega pomnoževanja 3' in 5' koncev cDNA določili celotno nukleotidno zaporedje cDNA, z metodo hoje po genomu pa smo pomnožili celoten gen s promotorsko in terminatorsko regijo. Na nukleotidnem nivoju smo opazili določeno heterogenost, saj se nukleotidni zaporedji gena in cDNA nekoliko razlikujeta v kodirajočem in nekodirajočem delu zaporedja. Poleg tega se izpeljano aminokislinsko zaporedje MpL nekoliko razlikuje od določenih delnih zaporedij sefarozil- in laktozil-specifičnega lektina, torej gre verjetno za eno izmed izooblik lektina. Primerjava nukleotidnih zaporedij gena, cDNA ter izpeljanega aminokislinskega zaporedja lektina z zaporedji v podatkovnih zbirkah je pokazala podobnost s proteini, udeleženi v metabolizmu sladkorjev, med njimi tudi z lektini. Lektin MpL je bil uvrščen v naddružino ricinu B podobnih lektinov. Za izolirana sefarozil- in laktozil-specifična lektina smo s testi hemaglutinacije in inhibicije hemaglutinacije s sladkorji ugotovili, da sta specifična za ogljikove hidrate, ki vsebujejo galaktozo. S testom inhibicije hemaglutinacije z gobjimi inhibitorji cisteinskih proteaz, mikocipini, smo pokazali inhibitorni učinek le-teh na aglutinacijsko aktivnost lektinov.

Abstract

Fungi are well known for their use in nutrition and diverse medicinal properties, as they contain numerous biologically active substances. One of them is a diverse group of proteins called lectins, which reversibly bind carbohydrates. Using carbohydrate affinity chromatography, several lectins were isolated from parasol mushroom (*Macrolepiota procera*), namely sepharose-specific lectin, galactose-specific lectin and lactose-specific lectin. Detailed analysis revealed that all three lectins were isoforms of a protein, designated *Macrolepiota procera* lectin (MpL). On the bases of the partial amino acid sequences determined for sepharose- and lactose-specific lectins, degenerate primers were designed and used in polymerase chain reaction. Partial cDNA sequence was obtained, from which specific primers were designed. Using these specific primers and 3' and 5' rapid amplification of cDNA ends methods, a complete nucleotide sequence of cDNA was obtained. Futhermore, using the genome walking method, a complete gene sequence with its promoter and terminator regions was determined. Heterogeneity of the lectin was observed at the nucleotide level, as the sequences of the gene and cDNA slightly differed in coding and in non-coding regions. In addition, some differences between deduced amino acid sequence of MpL and partial amino acid sequences determined for sepharose- and lactose-specific lectins were also observed, suggesting that MpL is one of the lectin isoforms. A comparison of the gene, cDNA and translated amino acid sequences of MpL with the sequences in the database revealed similarities with proteins involved in metabolism of carbohydrates, including lectins. Moreover, MpL was identified as a member of the ricin B-like lectins superfamily. Hemagglutination and hemagglutination inhibition assays showed that isolated sepharose- and lactose-specific lectins specifically bind galactose-containing carbohydrates. In addition, inhibitory action of mushroom cysteine protease inhibitors, mycocypins, on agglutinating activity of the lectins was also shown by hemagglutination inhibition assays.

Seznam okrajšav

| | |
|-------------------|--|
| 3' RACE | metoda hitrega kloniranja 3' koncev cDNA (ang. rapid amplification of 3' cDNA ends) |
| 5' RACE | metoda hitrega kloniranja 5' koncev cDNA (ang. rapid amplification of 5' cDNA ends) |
| A | absorbanca |
| BLAST | algoritem za iskanje podobnosti in poravnavo nukleotidnih ali aminokislinskih zaporedij (ang. Basic Local Alignment Search Tool) |
| bp | bazni par |
| CBB | modro barvilo za barvanje proteinov (ang. Coomassie Brilliant Blue) |
| cDNA | komplementarna DNA (ang. complementary DNA) |
| Da | dalton – enota za molekulsko maso, ki ustreza 1/12 mase čistega izotopa ^{12}C |
| dH ₂ O | deionizirana voda |
| ESI-MS | masna spektrometrija (ang. mass spectrometry) z ionizacijo z elektrorazprševanjem (ang. electrospray ionization) |
| FPLC | tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov (ang. Fast Protein Liquid Chromatography) |
| Gal | galaktoza |
| GalNAc | <i>N</i> -acetilgalaktozamin |
| Glc | glukoza |
| GlcNAc | <i>N</i> -acetilglukozamin |
| LB | hranljivo gojišče za gojenje bakterij (gojišče Luria Bertani) |
| LBA | gojišče LB z dodanim antibiotikom ampicilin |
| MpGalL | Galaktozil-specifični lektin in gobe <i>Macrolepiota procera</i> |
| MpL | lektin iz <i>Macrolepiota procera</i> |
| <i>mpl</i> | gen, ki kodira lektin iz <i>Macrolepiota procera</i> |
| MpLacL | Laktozil-specifični lektin in gobe <i>Macrolepiota procera</i> |
| MpSepL | Sefarozil-specifični lektin in gobe <i>Macrolepiota procera</i> |
| NAc | <i>N</i> -acetilna skupina |
| NaDS | natrijev dodecil sulfat |

| | |
|-----------|---|
| PAGE | poliakrilamidna gelska elektroforeza |
| PCR | verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase Chain Reaction) |
| PSI-BLAST | pozicijsko specifični (ang. Position-Specific Iterated) BLAST |
| PVDF | poliviniliden difluorid |
| RP-HPLC | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. High Performance Liquid Chromatography) z reverzno fazo (ang. reverse phase) |
| SOC | gojišče za gojenje bakterij (ang. Super optimal broth with catabolite repression) |
| Tris | tris(hidroksimetil)aminometan ali 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol |
| X-gal | 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid |

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 | levcin |
| 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 |

Standardne 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 |

1 Uvod

1.1 Glive: pomen in lastnosti

Glive so velika skupina evkariontskih organizmov s predstavniki, kot so rje, sneti, plesni, kvasovke in gobe z mesnatimi trosnjaki. Glive imajo pomembno vlogo v ekosistemih, saj s sposobnostjo razgrajevanja kompleksnih polimernih molekul skrbijo za kroženje snovi, s pridom pa jih za svoje potrebe izkorišča človek. Gobe, ki so plodišča nekaterih vrst gliv, predstavljajo nizkokalorično hrano z nizko vsebnostjo maščob in so vir vlaknin, vitaminov in mineralov. Gobe imajo veliko zdravilnih učinkov, kot so protitumorsko, imunomodulatorno, protivnetno, antioksidativno, protivirusno, protimikrobno in hipoholesterolemično delovanje. Ljudem so zelo poznane tudi kvasovke, ki jih uporabljamo pri proizvodnji kruha in alkoholnih pijač ter kot ekspresijski sistem v biotehnologiji. Ostale uporabe gliv obsegajo proizvodnjo antibiotikov, zdravil za zniževanje lipidov v krvi, raznih organskih kislin, encimov, vitaminov, hrane, uporablja se jih tudi pri zatiranju škodljivcev, obnavljanju okolja po kontaminacijah s strupenimi snovmi in kot modelni organizem v biologiji (1).

Do danes naj bi bilo odkritih okoli sto tisoč predstavnikov gliv, po predvidevanjih pa naj bi jih obstajalo okoli 1,5 milijona (2). Pred razvojem molekularnih metod za filogenetske analize so zaradi nekaterih podobnosti v načinu življenja glive prištevali h kraljestvu rastlin. Ti organizmi sedaj tvorijo svoje kraljestvo, ločeno od rastlin in živali (3). Z živalmi naj bi bile v bližnjem sorodstvenem razmerju in naj bi se od njih v razvoju ločile pred milijardo let, na kar kažejo raziskave nekaterih visoko ohranjenih proteinov, kot so aktin, α - in β -tubulin in elongacijski faktor 1α (4). Kot ostali evkariontski organizmi, glivne celice vsebujejo z membrano obdano jedro, ki vsebuje kromosome in gene, sestavljene iz intronov in eksonov. Celice gliv vsebujejo tudi mitohondrije in ostale membranske strukture, 80S ribosome in sterole, prisotne v njihovih membranah (1). Ne vsebujejo kloroplastov, so torej skupina heterotrofnih organizmov, ki potrebujejo organske snovi iz okolja za svoje energijske potrebe. Rezervno energijo shranjujejo v obliki glikogena in maščobnih kislin, nikoli v obliki škroba. Glive vsebujejo celično steno in vakuole. Stena glivne celice je sestavljena iz glukanov, ki jih najdemo tudi v rastlinah, in hitina, prisotnega v eksoskeletu nekaterih členonožcev, kombinacijo obeh pa najdemo samo v

glivah (5). Večina gliv je sestavljena iz filamentoznih struktur, ki jim pravimo hife. To so nitaste, apikalno rastoče strukture s premerom 2-10 μm in dolge do nekaj metrov. Med seboj prepletene hife tvorijo micelij (1). Potrebo po energiji glive zadostijo s parazitiranjem rastlin in živali; s simbiozo z algami, višjimi rastlinami ali insekti; ali pa s prebavo propadajočega organskega materiala. Da lahko slednje pridobijo energijo iz kompleksnih polimerov (celuloza, hitin, lignin), tako imenovane gniloživke izločajo celulaze, hitinaze, proteaze in večkomponentne encimske sisteme za razgradnjo lignina (6). Razmnoževanje gliv je glede na potrebe in razmere v okolju lahko spolno ali nespolno. Življenjski cikel glive obsega telomorfni (spolni) in anamorfni (nespolni) stadij. Nespolno razmnoževanje obsega razmnoževanje s konidiji, fragmentacijo, hlamidiosporami in brstenjem pri kvasovkah. Pri spolnem razmnoževanju pride najprej do plazmogamije, torej zlitja dveh celic, kateri sledi zlitje dveh kompatibilnih jeder (kariogamija), šele nato lahko poteče mejoza (1).

Glive razdelimo na prave glive (*Eumycota*) in glive sluzavke (*Myxomycota*). Za sluzavke je značilno, da ne vsebujejo hif, v času vegetativnega stanja nimajo celične stene, celično steno vsebujejo le razmnoževalne tvorbe, ter so sposobne fagocitoze. Prave glive vsebujejo hife, imajo celične stene skozi celotni ali večji del svojega življenjskega ciklusa in so se sposobne hraniti izključno z absorpcijo. Prave glive so glede na način spolnega razmnoževanja oziroma glede na način tvorbe spor razdeljene na pet razredov. Oomicete (*Oomycetes*), hitridomicete (*Chytridiomycetes*), zigomicete (*Zygomycetes*), askomicete (*Ascomycetes*) in bazidomicete (*Basidiomycetes*). V skupino devteromicet (*Deuteromyces*) uvrščamo glive, katerih spolna faza ni poznana in jih večina izhaja iz askomicet (7).

1.1.1 Prostotrosnice (*Basidiomycetes*)

V to skupino spada okoli 23000 znanih vrst gliv, ki jih razdelimo v tri skupine: *Pucciniomycotina* in *Ustilagomycotina*, ki vključujeta rastlinske parazite rje oziroma sneti, ter *Agaricomycotina*. Pri slednji je velika večina makrogliv ali gob (*Agaricomycetes*), ostale pa so še uhljarke, pa tudi kvasovkam podobni enocelični organizmi (8). Za glive prostotrosnice je značilno, da mejospore, imenovane bazidiospore, nastanejo prosto na celici (bazidiju), v kateri pride do zlitja jeder ali kariogamije. Bazidiospore vzklijejo v haploiden micelij, ki pri večini vrst predstavlja manjši del življenjskega kroga

(metageneze). Ta micelij je septiran in se lahko razmnožuje nespolno s konidiosporami. Pri spolnem razmnoževanju mora najprej priti do združitve pozitivno in negativno orientiranih hif. Zlitju hif ne sledi takoj zlitje jeder, ampak nastane najprej dvojedrni micelij, katerega hife so septirane ter vsebujejo dolipore in zaponke; od tod tudi ime zapončni micelij. Zlitju jeder sledi tvorba bazidija ob hkratni redukcijski delitvi. Pri nižjih prostotrosnicah (rje, sneti) je bazidij septiran na štiri zaporedne celice, medtem ko je pri višjih prostotrosnicah (makroglive) bazidij cel. Rje in sneti nikoli ne tvorijo posebnega trosnjaka (goba) in so po načinu življenja predvsem zajedavci, pri makroglivah pa prevladujejo saprofiti in simbionti (8, 9).

1.1.1.1 Orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*)

Orjaški dežnik, latinsko *Macrolepiota procera*, je užitna saprofitska goba prostotrosnica, ki spada v rod dežnikov (*Macrolepiota*), družino kukmark (*Agaricaceae*) in red lističark (*Agaricales*). Je ena največjih gob pri nas, saj lahko njegova plodišča dosežejo višino do 40 cm in širino klobuka 30 cm. Mlade gobe imajo jajčaste in okrogle klobuke. Klobukova povrhnjica je raztrgana, tako da tvori svetlo do temnorjave luske, pri čemer ostane gladka samo sredina klobuka. Lističi niso zrasli z betom, na katerem je značilen premičen obroček. Rastišča obsegajo svetle gozdove ali pašnike na obrobju gozdov. Goba raste od pozne pomladi do pozne jeseni (10).

1.2 Glikobiologija

V biologiji (v živih organizmih) poznamo štiri vrste makromolekul, in sicer nukleinske kisline, proteine, lipide in ogljikove hidrate. Slednji se od ostalih razlikujejo po dveh pomembnih karakteristikah. Ogljikovi hidrati so lahko visoko razvejane molekule, katerih monomerna enota se lahko z drugo enoto poveže z različnimi tipi vezi, medtem ko so proteini in nukleinske kisline skoraj vedno linearni in imajo en sam tip vezi, ki povezuje monomerne enote v celoto. To omogoča ogljikovim hidratom, ki so v celici predvsem vezani na proteine in lipide, skoraj neomejeno število možnih kombinacij (11). S strukturo, biosintezo in njihovo vlogo se ukvarja področje, ki mu pravimo glikobiologija, poleg naštetega pa se glikobiologija ukvarja tudi s proteini, imenovanimi lektini, ki so te ogljikove hidrate sposobni prepoznavati. Glikomika je veja glikobiologije, ki se ukvarja s

proučevanjem glikoma. Glikom je celoten nabor ogljikovih hidratov v človeškem telesu in vključuje proste ogljikove hidrate in glikokonjugate (glikane), ki obsegajo glikoproteine, glikolipide, peptidoglikane in lipopolisaharide (12).

Zaradi svoje raznolikosti imajo ogljikovi hidrati v organizmih številne vloge, na primer energijsko in strukturno vlogo. Poleg tega imajo tudi vlogo v medceličnih interakcijah, interakcijah med celico in ekstracelularnim matriksom oziroma med celico in molekulo (13). Glikozilacija celic je močno odvisna od sprememb v celični funkciji in se neprestano spreminja, recimo v različnih življenjskih obdobjih in pri boleznih. Spremenjena glikozilacija je mnogokrat diagnostični kazalec, na primer pri revmatoidnem artritisu in malignih obolenjih (11, 14). Glikani sodelujejo pri regulaciji procesov v celicah, signalizaciji, adheziji, migraciji, morfogenezi celic in apoptozi, sodelujejo pa tudi pri posredovanju imunskega odgovora in tvorjenju metastaz. V te procese je vključena tudi posebna skupina proteinov, imenovana lektini, ki lahko informacijo glikanov prepoznajo in so jo sposobni prevesti v biološki odgovor (14).

1.3 Lektini

Proteine, ki zlepljajo (aglutinirajo) eritrocite, so odkrili že proti koncu 19. stoletja. Začelo se je z odkritjem toksičnega hemaglutinina ricina, proteina s toksično in netoksično lektinsko domeno, ki so ga izolirali iz semen navadnega kloščevca (*Ricinus communis*). Sledilo mu je odkritje abrina iz rastline perlasti les (*Abrus precatorius*) z enakimi lastnostmi kot ricin. Danes te proteine (hemaglutinine) imenujemo lektini. To je skupina proteinov neimunskega izvora, ki imajo v svoji zgradbi vsaj eno nekatalitično domeno, s katero reverzibilno in specifično vežejo ogljikove hidrate, katerih pri tem ne modificirajo (12, 15, 16). Razširjenost lektinov v vseh organizmih nakazuje njihovo vlogo pri osnovnih življenjskih procesih. Navadno imajo lektini več vezavnih mest za ogljikove hidrate, kar jim omogoča povezavo glikanov na različnih celicah in posledično aglutinacijo celic, od tod tudi njihovo drugo ime (hem)aglutinini (12). Lektini, poleg tega da so sposobni aglutinacije celic, sodelujejo pri adheziji, regulaciji proliferacije, regulaciji celičnega preživetja, vnetju in mnogih drugih procesih v organizmih. Njihova biološka funkcija je lahko posledica vezave in zamreženja glikoziliranih receptorjev na celici, vezave glikanov ekstracelularnega matriksa, lahko pa tudi vezave znotrajceličnih glikanskih enot (16, 17).

Lektine zaradi njihove specifične vezave na glikane lahko uporabljamo za tipizacijo bakterij, določevanje krvnih skupin, separacijo in tipizacijo celic, mapiranje nevronske poti, testiranje encimov, lahko pa jih uporabljamo tudi na področju glikobiologije pri proučevanju strukture in vloge ogljikovih hidratov (11). Bioprepoznavne lastnosti lektinov, ki interagirajo s sladkorji glikoproteinov mukusa in glikokaliksa celic ter vodijo do procesov kot so mukoadhezija, citoadhezija in citoinvazija, predstavljajo možnosti ciljne dostave učinkovin v tkiva in možnosti za razvoj novih farmacevtskih učinkovin ter dostavnih sistemov (18).

Lektini z ogljikovimi hidrati ne tvorijo močnih kovalentnih vezi, ampak le tesne reverzibilne asociate. Za to je odgovorno aminokislinsko zaporedje v zankah vezavnega mesta, vezava pa je posledica vodikovih, ionskih, hidrofobnih in van der Waalsovih interakcij. Vezava monosaharidov na lektine je šibka, z disociacijsko konstanto v milimolarnem ali mikromolarnem področju, medtem ko je pri vezavi kompleksnih ogljikovih hidratov disociacijska konstanta višja (nad μM) in je zato fiziološko pomembna. Afiniteta se poveča tudi na račun multivalentnosti samega lektina ali multivalentnosti, dosežene s tvorbo asociacij lektinov in kompleksnosti ogljikovih hidratov (12).

Lektine lahko na podlagi celotne strukture razdelimo na tri tipe. Proteini *merolektini* so zgrajeni iz ene same polipeptidne domene, vsebujejo eno samo vezavno mesto in zaradi tega ne kažejo aglutinacijske aktivnosti. *Hololektini* so proteini, zgrajeni iz dveh ali več domen, ki so enake ali zelo homologne in lahko vežejo sladkorje. Ti lektini so zato zmožni aglutinacije celic. *Himerolektini* so fuzijski proteini, zgrajeni iz lektinske domene in domene z neko drugo biološko vlogo (19). Lektine glede na homologijo oziroma evolucijsko sorodnost razdelimo na šest skupin: R, L, P, C, I in galektine, vendar ta klasifikacija ne zajame vseh znanih lektinov. *Lektini tipa R* so pripadniki naddružine proteinov, pri kateri vsi proteini vsebujejo domeno za vezavo ogljikovih hidratov, ki je strukturno podobna lektinski domeni ricina B z značilnim β -triperesnim vzorcem zvitja. Ti lektini so prisotni v rastlinah, živalih, glivah in bakterijah. Rastlinski lektini tega tipa navadno poleg lektinske domene vsebujejo še dodatno domeno, ki ima vlogo toksina. *Lektini tipa L* so bili prvotno odkriti v semenih stročnic. Ta skupina lektinov je dobro raziskana in se uporablja v biomedicini in analitiki. Najbolj znana predstavnika te skupine sta mitogena fitohemaglutinin in konkanavalin A, ki stimulirata delitev limfocitov T.

Lektini tipa P prepoznajo manozo-6-fosfat in so sorodni receptorjem M6P. Ti receptorji so pomembni pri živalih, saj prepoznajo glikanske enote kislil hidrolaz, ki vsebujejo manozo-6-fosfat, in jih selektivno prenesejo v lizosome. *Lektini tipa C* potrebujejo za svoje delovanje kalcijeve ione. Ta skupina lektinov je prisotna v vseh živih bitjih in vključuje številne proteine, kot so kolektini, selektini, endocitotski receptorji in proteoglikani. Ti lektini imajo vlogo adhezijskih in signalnih receptorjev, pomembnih pri vnetju in imunskemu odzivu na tumorske in z virusi okužene celice. *Lektini tipa I* spadajo v naddružino imunoglobulinov. Edini dobro raziskani lektini iz te skupine so proteini Siglec, ki vežejo sialično kislino in predstavljajo receptorje na površini makrofagov. *Galektini* vežejo ogljikove hidrate, ki vsebujejo β -galaktozo in si delijo strukturno homologijo v domeni za vezavo sladkorjev. Prvotno so jih imenovali lektini tipa S, ker nekateri od njih za stabilnost potrebujejo proste tiolne skupine. Galektini so danes poznani kot najbolj razširjeni lektini (12).

Ljudje in živali užijejo veliko lektinov, ki so prisotni v rastlinah. Najvišje koncentracije lektinov se v rastlinah v večini primerov nahajajo v semenih. Ena najpomembnejših lastnosti rastlinskih lektinov je, da lahko ohranijo aktivnost tudi v gastrointestinalnem traktu in živalim, ki te lektine zaužijejo, povzročajo težave s prebavo. To kaže na obrambno vlogo lektinov pred plenilci. Parenteralna toksičnost rastlinskih lektinov je znana že od odkritja ricina in abrina, vendar lahko lektini povzročajo tudi sistemske učinke zaradi internalizacije preko enterocitov. To lahko privede do imunskega odgovora in tvorbe protiteles ter alergičnih reakcij, kar lahko vodi do trajne periferne antigenske stimulacije in nastanka imunskih bolezni (20). Vloga lektinov v samih rastlinah naj bi bila skladiščenje proteinov, širjenje celične stene, transport ogljikovih hidratov, skladiščenje in mobilizacija rezervnih snovi in drugo. Lektini predstavljajo v rastlinah tudi način komunikacije s simbiotskimi organizmi, kot so mikorizne glive in dušik-fiksirajoče bakterije (21). V banani (*Musa paradisiac*) so odkrili lektin BanLec, ki se veže na protein gp 120 na površini virusa HIV in tako prepreči vstop virusa v celico. Tako bi lahko ta lektin uporabljali pri zdravljenju oziroma preprečevanju okužbe z virusom HIV (22). Poleg tega nekateri lektini iz rastlin, na primer lektin iz bele omele (*Viscum album*), kažejo imunomodulatorne in protitumorske učinke pri sesalcih (23).

V živalih so od lektinov najpogostejši galektini in lektini tipa C, najdemo pa še tip I, tip L in tip P lektinov. Udeleženi naj bi bili predvsem v procesih imunosti, pri interakcijah med celicami ter med celicami in ekstracelularnim matriksom, pri ciljanju lizosomalnih encimov ter interakciji med spermijem in jajčecem (15, 24). Pri imunskih in rakavih obolenjih pride v organizmu do sprememb glikozilacije celic in tudi do sprememb v ekspresiji določenih lektinov, kar bi lahko uporabili kot prognostični kazalec pri malignih spremembah in avtoimunskih boleznih (17, 25).

Lektini iz višjih gliv, na primer iz prostotrošnic, pa so slabše raziskani. Pri gobah so podobno kot pri rastlinah opazili razlike v količini lektinov v posameznih delih gob, razlike se pojavljajo tudi glede na razvojno stopnjo gobe, letni čas in lokacijo. V gobah imajo lektini vlogo v metabolizmu, simbiotskih in parazitskih odnosih, pri združevanju hif v času rasti plodišča, pri dormanci gob in obrambi pred paraziti (26). Za galektina iz gobe gnojliščna tintnica (*Coprinus cinereus*) so ugotovili, da se njuna koncentracija spreminja tekom razvoja plodišča. V različnih fazah namreč pride do različne ekspresije genov, ki kodirata proteina, kar nakazuje na udeležnost lektina v fiziološko pomembnih procesih omenjene gobe (27).

Pri gobjih lektinih poznamo šest različnih struktur (28). Ena izmed njih je β -triperesni (ang. β -trefoil) vzorec zvitja, ki je tipičen za lektine tipa R. Ti lektini vsebujejo domeno za vezavo ogljikovih hidratov, ki je strukturno podobna lektinski domeni iz ricina. Te domene kažejo notranjo homologijo aminokislinskega zaporedja, ki se izraža v treh ponovitvah (α , β in γ) z bolj ali manj ohranjenimi motivi glutamin – katerakoli aminokislina – triptofan (QxW motiv). Poleg tega imajo ohranjene hidrofobne aminokislinske ostanke, ki so pri β -triperesnem zvitju ricinskih B domen pomembni za tvorbo hidrofobnega jedra (29). Eden izmed takih proteinov je lektin iz gobe meglenke (*Clitocybe nebularis*), ki kaže antiproliferativno delovanje na levkemične limfocite T (30).

2 Hipoteza in namen dela

Glede na to da so lektini prisotni v organizmih in so že bili izolirani iz mnogih vrst gliv, predvidevamo, da tudi goba orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*) vsebuje tovrstne proteine. Prisotnost lektinov v tej glivi so predhodno že nakazali (31).

Namen našega dela je izolirati različne lektine iz gobe *M. procera* s pomočjo afinitetne kromatografije na sami sefarozi ali na sefarozi s pripetimi sladkorji, jih natančneje biokemijsko okarakterizirati in določiti nukleotidna zaporedja gena in mRNA oziroma cDNA, ki te lektine kodirajo. Nadalje je namen našega dela določiti vezavne specifičnosti lektinov za ogljikove hidrate in preveriti njihovo biološko aktivnost ter preveriti aktivnost lektinov v interakciji z drugimi proteini.

V ta namen bomo:

- uporabili metodo afinitetne kromatografije na sami sefarozi ali sefarozi s pripetimi sladkornimi ligandi za izolacijo lektinov;
- uporabili metodo ultrafiltracije in metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPLC) za dodatno čiščenje lektinov ter metode, kot so poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE), izoelektrično fokusiranje, gelsko filtracijo z uporabo tekočinske kromatografije za hitro ločevanje proteinov (FPLC), masno spektrometrijo z ionizacijo z elektrorazprševanjem (ESI-MS), prenos western in določanje aminokislinskega zaporedja z Edmanovo razgradnjo za določitev biokemijskih lastnosti lektinov;
- uporabili molekularno-biološke tehnike, kot so metoda verižne reakcije s polimerazo (PCR), hitro pomnoževanje 5' in 3' koncev cDNA (5' in 3' RACE) in hoja po genomu za določitev nukleotidnih zaporedij genov in mRNA oziroma cDNA, ki kodirajo lektine iz *M. procera*;
- uporabili programska in internetna orodja za analizo nukleotidnih zaporedij genov in cDNA, ki kodirajo lektine ter za analizo iz cDNA izpeljanih aminokislinskih zaporedij lektinov iz *M. procera*;

- uporabili teste hemaglutinacije in inhibicije hemaglutinacije s sladkorji in proteinskimi inhibitorji proteaz makrocipini in klitocipinom za ugotavljanje biološke aktivnosti lektinov in določitev njihovih vezavnih specifičnosti.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

| | |
|---|-----------------------------|
| absolutni etanol | Carlo Erba, Italija |
| acetonitril | Sigma Aldrich, Nemčija |
| Advantage 2 Polymerase mix (komplet) | Clontech, ZDA |
| agar | Sigma Aldrich, Nemčija |
| agaroz | Serva, Nemčija |
| AgNO ₃ | Alkaloid Skopje, Makedonija |
| amonijev persulfat ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈) | Serva, Nemčija |
| ampicilin | Sigma Aldrich, Nemčija |
| asialofetuin | Sigma Aldrich, Nemčija |
| brezvodni EtOH | KEFO, Slovenija |
| CaCl ₂ × 2H ₂ O | Sigma Aldrich, Nemčija |
| citronska kislina | Serva, Nemčija |
| Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250 | Fluka, Nemčija |
| ditiotritol | Fermentas, Kanada |
| divinilsulfon | Fluka, Nemčija |
| DNA barvilo SYBR® Safe | Invitrogen, ZDA |
| DreamTaq™ Polimeraza (komplet) | Fermentas, Kanada |
| etilendiamintetraocetna kislina (EDTA) | Serva, Nemčija |
| FirstChoice® RACE-Ready cDNA Kit | Ambion, ZDA |
| fruktoza | Sigma Aldrich, Nemčija |
| galaktoza | Fluka, Nemčija |
| GeneRuler™ 1 kb Plus (komplet) | Fermentas, Kanada |
| GeneRuler™ 100 bp Plus (komplet) | Fermentas, Kanada |
| glicerol | Carlo Erba, Italija |
| glicin | Serva, Nemčija |
| glukoza monohidrat | Fluka, Nemčija |

| | |
|--|---------------------------|
| goveji serumski albumin | Sigma Aldrich, Nemčija |
| HCHO (37%) | Merck, Nemčija |
| HCl (37%) | Merck, Nemčija |
| izopropanol | Carlo Erba, Italija |
| jajčni albumin | Serva, Nemčija |
| kazeinski hidrolizat | Sigma Aldrich, Nemčija |
| KCl | Fluka, Nemčija |
| KOH | Carlo Erba, Italija |
| komplet za hojo po genomu (GenomeWalker™ Universal Kit) | Clontech, ZDA |
| konjski mioglobin | Serva, Nemčija |
| kvasni ekstrakt | Sigma Aldrich, Nemčija |
| laktoza monohidrat | Fluka, Nemčija |
| membrana za ultrafiltracijo - Omega 3K 12PK | Pall corporation, ZDA |
| manoza | Sigma Aldrich, Nemčija |
| metanol | Sigma Aldrich, Nemčija |
| mikrotitrna plošča (96 jamic z okroglim dnom) | TPP, Švica |
| Minisart filtri za sterilno filtracijo (0.2 µm) | Sartorius, Nemčija |
| MnCl ₂ ×4H ₂ O | Fluka, Nemčija |
| <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etilendiamin (TMED) | Serva, Nemčija |
| <i>N,N'</i> -metilen bisakrilamid | Fluka, Nemčija |
| Na ₂ CO ₃ | Merck, Nemčija |
| NaCl | AppliChem, Nemčija |
| NaOH | Carlo Erba, Italija |
| Natrijev dodecil sulfat (NaDS) | Serva, Nemčija |
| nizkomolekularni proteinski standard – LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis | Amersham Biosciences, ZDA |
| ocetna kislina | Fluka, Nemčija |
| pGEM [®] -T Easy Vector Systems (komplet) | Promega, ZDA |
| PhastGel™ IEF 3–9 (gel za izoelektrično fokusiranje) | Pharmacia, Švedska |

| | |
|---|-----------------------------|
| poliviniliden difluorid (PVDF) Immobilion-P ^{SQ} | Milipore, ZDA |
| saharoza | Fluka, Nemčija |
| Sepharose CL 4B (sefaroza) | GE Healthcare, ZDA |
| široki označevalec izoelektričnih točk (Broad pI Calibration Kit) | Pharmacia, Švedska |
| trifluorocetna kislina | Pierce, ZDA |
| tripsin | Boehinger Mannheim, Nemčija |
| tris(hirdoksimetil)aminometan (Tris) | Serva, Nemčija |
| Univerzalni začetni oligonukleotidi M13 in SP6 | Invitrogen |
| Wizard [®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (komplet) | Promega, ZDA |
| Wizard [®] SV Gel and PCR Clean-Up System (komplet) | Promega, ZDA |

3.1.2 Oprema

| | |
|---|--|
| pipete | avtomatska večkanalna pipeta Proline 50-1200 µl, Biohit, Finska |
| spektrofotometra | Lambda 25, PerkinElmer, ZDA NanoDrop™ 1000, NanoDrop Technologies, ZDA |
| centrifuge | Sorvall RC-5C Plus, Thermo Fisher Scientific, ZDA Centrifuge 5424, 5415R in 5804R, Eppendorf, Nemčija |
| ultrafiltra | Amicon 8200 in 8400, Milipore ZDA |
| naprava za HPLC | HPLC system 1100 series, Hewlett-Packard, Nemčija |
| kolona za HPLC | ChromSpher C8, 100 × 3 mm, Chrompack, Nizozemska |
| naprava za FPLC | ÄKTA™purifier, GE Healthcare Biosciences AB, Švedska |
| kolona za FPLC | Superdex™ 75 10/300 GL, GE Healthcare Biosciences AB, Švedska |
| naprava za poliakrilamidno gelsko elektroforezo | Mini-PROTEAN II®, Bio-Rad, ZDA |
| naprava za izoelektrično fokusiranje | PhastSystem, Pharmacia, Švedska |
| kadička za prenos western | Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad, ZDA |
| naprava za agarozno elektroforezo | Owl EasyCast Mini Gel System (modela: B1A, B2), Thermo Fisher Scientific, ZDA |
| napajalnik za elektroforezo | Power Pack Basic, Bio-Rad, ZDA |
| naprava za fotografiranje gelov | Sistem UVItec, UVItec, Velika Britanija |
| magnetno mešalo | Rotamix S10, Tehnica, Slovenija |
| vibracijski stresalnik | EV-202, Tehnica, Slovenija |

| | |
|---|--|
| orbitalni stresalnik | Vibromix 31, Tehnica, Slovenija Infors, Švica (v kombinaciji s Certomat HK) |
| termo stresalnik | ThermoShaker TS1, Biometra, Nemčija |
| termo inkubator | Certomat HK, B. Braun Biotech International, Nemčija |
| vodna kopel | U3 (grelec), 6A (kadička), Julabo, Nemčija |
| naprava za določanje aminokislinskega zaporedja | Procise Protein Sequencing System 492, PE Applied Biosystems, ZDA |
| tehtnici | 200A, Tehnica, Slovenija Genius ME, Sartorius, Nemčija |
| vakuumski koncentrador | Speedvac, Savant, ZDA |
| masni spektrometer | Q-TOF Premier, Micromass MS Tehnologies/Waters, Velika Britanija |
| pH meter | SevenEasy, Mettler Toledo, Švica |
| naprava za PCR | 2720 Thermal cycler, Applied Biosystems, ZDA |
| komora za sterilno delo | SC-R, Labcaire, Velika Britanija |

3.1.3 Pufri in raztopine

Priprava nosilca za afinitetno kromatografijo:

- puffer 1: 0,5 M Na₂CO₃, pH 11- uravnan z NaOH
- puffer 2: 0,5 M Na₂CO₃, pH 10,5 - uravnan z NaOH
- puffer za shranjevanje: 2 M NaCl, 0,02 M Tris-HCl, pH 7,8

Afinitetna kromatografija:

- afinitetni puffer (uporabljen za ekstrakcijo lektinov iz gob in kot mobilna faza pri afinitetni kromatografiji): 0,02 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl, pH 7,8
- elucijska raztopina: 0,01 M NaOH

- nevtralizacijski pufer: 2 M Tris-HCl, pH 7,6

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPLC)

- topilo A: 0,1% (v/v) trifluoroacetna kislina, dH₂O do 100%
- topilo B: 90% (v/v) acetonitril, 0,1% (v/v) trifluoroacetna kislina, dH₂O do 100%

Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)

- vzorčni pufer: 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 2 ml glicerol (100%), 4 ml 10% NaDS, 1,5 ml dH₂O in 0,01% bromfenol modrega
- pufer za elektroforezo: 3 g/l Tris, 14,4 g/l glicin, 1 g/l NaDS, dH₂O, pH ~ 8,3
- CBB raztopina za barvanje: 1 del 0,2% (m/v) raztopine CBB v 80% (v/v) EtOH in 1 del 20% (v/v) raztopine očetne kisline (AcOH)
- 30% razbarvalna raztopina: 30% (v/v) EtOH, 10% (v/v) AcOH
- raztopina DTT (5 mg/l)
- raztopina AgNO₃ (1,5 g/l)
- 3% (m/v) raztopina Na₂CO₃ z 0,5 ml/l 36% (m/v) HCHO

Gelska filtracija z uporabo tekočinske kromatografije za hitro ločevanje proteinov

- pufri za gelsko filtracijo: 0,05 M Tris-HCl, 0,4 M NaCl, pH 7,58, sladkor (0,3 M ali 0,5 M laktoza ter 0,4 M galaktoza)

Prenos western

- prenašalni pufer: 100 ml 10 × prenašalni pufer (30 g/l Tris, 58 g/l glicin), 200 ml metanol, dH₂O do 1 l, pH ~ 8,3
- raztopina barvila CBB: CBB 0,1% (m/v), metanol (MeOH) 40% (v/v), očetna kislina 1% (v/v)
- 50% (v/v) raztopina MeOH

Določanje aminokislinskega zaporedja

- pufer za cepitev s tripsinom: 50 mM Tris-HCl, 20 mM CaCl₂, pH 8,03

Agarozna elektroforeza

- TAE pufer: 0,04 M Tris-acetat, pH 8,0, 1 mM etilendiamintetraacetat (EDTA)

Hemaglutinacijski testi

- eritrocitni pufer: 0,02 M Tris-HCl, 0,13 M NaCl, pH 7.4

3.1.4 Biološki material

Glivni material

- Plodišča oziroma gobe glive orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*) so bile nabrane v naravnem okolju na področju Krasa leta 2007. Do pričetka raziskav so bile gobe shranjene pri -20 °C. Glivni material je vseboval klobuke in bete.

Bakterijski sevi

- Pri delu smo uporabljali komercialne kompetentne celice *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen, ZDA). Te celice izvirajo iz seva K12, ki omogoča varno delo z molekularno-biološkimi tehnikami. Skupaj s plazmidom pGEM-T Easy je omogočena α -komplementacija gena za β -galaktozidazo, zato lahko izvajamo belomodro selekcijo.

Eritrociti

- Pri testih biološke aktivnosti in vezavne specifičnosti lektinov smo uporabljali človeške eritrocite tipa A, B in O, katere nam je priskrbel dr. Urban Švajger iz Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani. Eritrociti so bili pridobljeni s centrifugiranjem sveže krvi in sprani s fiziološko raztopino. Uporabni so bili, dokler se supernatant ni obarval rdeče, kar je nakazovalo na hemolizo eritrocitov.

3.1.5 Plazmidi

Pri delu smo uporabljali lineariziran plazmid pGEM[®]-T Easy, ki ima na 3' koncu končni timidin, kar izboljša ligacijo in preprečuje recirkularizacijo plazmida.

3.1.6 Začetni oligonukleotidi

Za podvojevanje željenih nukleotidnih zaporedij smo uporabili degenerirane in specifične začetne oligonukleotide (Thermo Fischer Scientific, Nemčija), zbrane v Preglednici I.

Preglednica I: Seznam degeneriranih in specifičnih začetnih oligonukleotidov, uporabljenih v verižnih reakcijah s polimerazo. Pri degeneriranih začetnih oligonukleotidih smo uporabili standardni degeneriran kod, pri čemer **I** pomeni inozin; **H** je A, C, T; **Y** je C, T; **S** je C, G; **V** je A, C, G; **R** je A, G; **K** je G, T. Pod nukleotidnimi zaporedji degeneriranih začetnih oligonukleotidov so napisana aminokislinska zaporedja, na podlagi katerih smo načrtovali oligonukleotidne začetnike.

| Degenerirani | Ime | Smerni | Nukleotidno zaporedje (5' → 3') | Vir AK zaporedja |
|--------------|----------------|-------------|---|------------------------------------|
| | Mp-Kitka-N1 | Smerni | CARCAITAYAARATHACIAAIGT Q T Y K I T N V K | Naše delo + diploma K. Mustar (31) |
| | Mp-Kitka-N2 | Smerni | AARGCIGGIACIGTIATHGAYYT K A G T V I D L | Naše delo + diploma K. Mustar (31) |
| | MpK5-GalL-N1 | Smerni | AAAYATHGAYAAYACIGCITTYAA N I D N T A F N | Diploma K. Mustar (31) |
| | MpK5-GalL-N2 | Smerni | GAYGARGCICARGAYGTIYT D E G Q D V L | Diploma K. Mustar (31) |
| | MpK5-GalL-C1 | Protismerni | KRTCICCITGRTCRSAIAC | Naše delo |
| | Mp-LacL-Ric-N1 | Smerni | ATHTTYGTICCITTYACIAAYT I F V P F T N Y | Naše delo |
| | Mp-LacL-Ric-N2 | Smerni | GGITAYGGIGAYACIACICC G Y G D T T P | Naše delo |
| | Mp-LacL-Ric-C1 | Protismerni | CCRTGRTRAAIGTCCAYTGYTG Q W T F N H G Q | Naše delo |
| Specifični | MpKTK-ter-1F | Smerni | ATCTGGCGGATGAAGTCAACGAAAAT | |
| | MpKTK-ter-2F | Smerni | ATCTTTGTCCCCTTCAACCACTACAACC | |
| | MpKTK-ter-3F | Smerni | AGCTCTGGTGGACTTGGGAAGGTCTCC | |
| | MpKTK-prom-1R | Protismerni | AGGCTTTACCCGTCAGTTGAACGTCCAT | |
| | MpKTK-prom-2R | Protismerni | GGTTCTTGCCGCTATGGTAGGGGTAGC | |
| | MpKTK-prom-3R | Protismerni | GATGATGGACTTGTGTCTTCACCAGA | |
| | Mp-KIT-F-1 | Smerni | CTACGCGCTTCGTGGTTTCTC | |
| | Mp-KIT-F-2 | Smerni | CGTGAATTATCACTACTTCTC | |
| | Mp-KIT-R-1 | Protismerni | TGAGATAGACAACGTGTGGTT | |
| | Mp-KIT-R-1 | Protismerni | GTTGATGAAGGGGTATAACAC | |

3.1.7 Gojišča

Tekoča gojišča:

- gojišče LB (1 liter): 10 g triptona (kazeinski hidrolizat), 5 g kvasnega ekstrakta, 10 g NaCl, pH uravnan na 7,5, avtoklavirano
- gojišče LBA (1 liter): gojišču LB po avtoklaviranju dodamo še ampicilin do koncentracije 100 µg/ml
- SOC gojišče (100 ml): 2 g triptona, 0,5 g kvasnega ekstrakta, 1 ml 1 M NaCl, 0,25 ml 1 M KCl, dodamo do 97 ml dH₂O in avtoklaviramo, nato dodamo 1 ml 2 M

Mg²⁺ (sterilno filtrirano), 1 ml 2 M glukoze (sterilno filtrirano), razredčimo do 100 ml z sterilno dH₂O, končni pH 7,0

Trdna gojišča:

- gojišče LB: gojišču LB pred avoklaviranjem dodamo 15 g agarja
- gojišče LBA: gojišču LB pred avoklaviranjem dodamo 15 g agarja, po avtoklaviranju pa še ampicilin (100 µg/ml)
- gojišče LBA/X-Gal (1 liter): gojišču LB pred avoklaviranjem dodamo še 15 g agarja, avtoklaviramo ter dodamo ampicilin (100 µg/ml in X-Gal (80 µg/ml)

3.2 Metode

3.2.1 Izolacija lektinov iz orjaškega dežnika (*M. procera*)

3.2.1.1 Priprava izvlečka iz plodišč glive

Plodišča (1464 g sveže teže) orjaškega dežnika (*M. procera*) smo narezali na majhne koščke, jim dodali afinitetni pufer z 0,5 g/l reducenta $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ in nato s homogenizacijo pripravili izvleček. Za večji izkoristek smo ekstrakcijo ponovili trikrat, pri čemer smo skupno porabili 1500 ml afinitetnega pufru. Izvleček smo prefiltrirali skozi filtrirni papir, centrifugirali 30 minut pri $9500 \times g$ in 4°C ter supernatant uporabili za izolacijo lektinov ali pa ga shranili pri -20°C .

3.2.1.2 Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija spada med adsorpcijske kromatografije, s katero lahko ločujemo proteine, nukleotide, nukleinske kisline, imunoglobuline, celice in celične komponente. Za ločitev komponente iz zmesi se mora le ta specifično in reverzibilno adsorbirati na nosilec s pripetimi ligandi, katerih struktura se komplementarno prilega delu iskane snovi. Nosilec mora imeti dobre pretočne lastnosti, šibko nespecifično adsorpcijo, mora biti stabilen pri vezavi liganda in pogojih izolacije, poleg tega pa mora imeti tudi primerne skupine za vezavo liganda. Po drugi strani pa mora ligand, od katerega je odvisno, katere komponente bo vezal in ali bo vezava specifična in reverzibilna, vsebovati skupine, primerne za vezavo na nosilec. Ob ustreznem poznavanju postopkov je metoda preprosta, hitra in omogoča uporabo velikih volumnov.

3.2.1.2.1 Priprava nosilca in vezava sladkorjev

Kot nosilec smo izbrali sefarozo (Sephacrose CL 4B). Delčki sefaroze so okrogli in sestavljeni iz agaroze, katere vsebnost je bila v našem primeru 4%. Oznaka CL (ang. Cross-linked) pomeni, da so derivati sefaroze zamreženi, kar omogoča večjo kemično in fizikalno odpornost v primerjavi z nezamreženo sefarozo, poleg tega pa ima tudi boljše

pretočne lastnosti, pri čemer selektivnost ostaja enaka. Zamrežena sefaroza je uporabna tudi za ločevanje v organskih topilih, saj je nanje odporna.

Za pripravo posameznih nosilcev z vezanimi različnimi sladkorji (galaktoza, laktoza, glukoza ali saharoza) smo uporabili 100 ml sefaroze brez topila. Sefarozo smo dodali v nučo in jo sprali s pufrom 1 ter se tako znebili etanola, v katerem je bila shranjena. Po spiranju smo sefarozi, resuspendirani v 100 ml pufra 1, po kapljicah dodali 11 ml divinilsulfona, s katerim smo sefarozo aktivirali. Sledilo je 70-minutno mešanje na rotacijskem mešalniku, zaščiteno pred svetlobo. Po končani aktivaciji sefaroze smo divinilsulfon odstranili s spiranjem s pufrom 2, nato pa je sledila vezava liganda (sladkorja), pri čemer smo dodali 100 ml 15% (m/v) raztopine sladkorja. Sledilo je 15-urno mešanje in končno spiranje s pufrom 2. Po končani pripravi sefaroze z vezanimi sladkorji smo le te uporabili ali shranili v pufru za shranjevanje (32).

3.2.1.2.2 Afinitetna kromatografija na laktozil- in galaktozil-sefarozi ter sefarozi

Za izolacijo lektinov iz orjaškega dežnika smo uporabili laktozil- in galaktozil-sefarozo. Ker je sefaroza sama po sebi polisaharid in bi lahko bili izolirani lektini posledica vezave na nosilec, ne pa na sladkorje, smo izvedli še kontrolno afinitetno kromatografijo, pri kateri smo uporabili z divinilsulfonom aktivirano sefarozo brez vezanega sladkorja. Izvleček orjaškega dežnika smo nanесли na kolone s prej omenjenimi nosilci in rahlo mešali pol ure na rotacijskem mešalniku. Sledilo je spiranje (pretok 50 ml/min) nevezanega materiala iz kolone z afinitetnim pufrom, dokler se pri izhodnem pufru absorbanca pri 280 nm (A_{280}) ni približala vrednosti $A = 0,05$. Vezane proteine smo nato eluirali z elucijsko raztopino. V epruvete, v katere smo predhodno dodali 1 ml nevtralizacijskega pufra (0,01 M NaOH), smo zbirali frakcije po približno 15 ml in jim nato izmerili A_{280} . Frakcije posameznih afinitetnih kromatografij, ki so vsebovale proteine, smo združili in skoncentrirali.

3.2.1.2.3 Zaporedna afinitetna kromatografija z glukozil- oziroma saharozil-sefarozo in laktozil-sefarozo

Za izolacijo glukozil- oziroma saharozil-specifičnih lektinov smo uporabili zaporedno afinitetno kromatografijo, pri čemer smo nevezan material po afinitetni kromatografiji na

laktozil-sefarozi nanesti na glukozil- ali saharozil-sefarozo. Elucija in zbiranje frakcij je potekalo enako kot opisano pod točko 3.2.1.2.2.

3.2.1.3 Ultrafiltracija vzorcev

Po afinitetni kromatografiji smo izolirane lektine (volumnov 120-730 ml) koncentrirali in razsolili v ultrafiltrih s pomočjo membran za ultrafiltracijo, ki zadržijo delce, večje od 3 kDa. Koncentriranje do volumna 5-7 ml je potekalo v prostoru s temperaturo 4-5 °C ob konstantnem mešanju pri nadtlaku. Vzorce smo centrifugirali 15-20 min pri 3000 × g, jih razdelili na enake volumnne v več mikroepreuet in shranili pri -20 °C.

3.2.1.4 Preparativna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z reverzno fazo

Za kasnejše biokemijske analize smo lektine dodatno čistili in razsolili z uporabo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z reverzno fazo (RP-HPLC). Pri tej tehniki ločevanje proteinov poteka na podlagi hidrofobnosti. Vzorce (60-200 µl) smo nanašali v topilu A, pri čemer je bil skupni volumen injiciranja 1 ml. V topilu A je potekala vezava proteinov in peptidov na kolono, spiranje le teh iz kolone pa smo dosegli z gradientom topila B. Program, po katerem je potekala analiza, prikazuje preglednica II. Pretok je bil 1 ml/min. Detekcija eluiranih proteinov je potekala spektrofotometrično pri valovni dolžini 215 nm. Eluirane vzorce smo posušili v vakuumskem koncentradorju in shranili na -20 °C.

Preglednica II: Program za RP-HPLC. Preglednica prikazuje količino topila B v mobilni fazi v času.

| | | | | | |
|------------|-----|------|--------|-------|-------|
| t (min) | 0-5 | 5-35 | 35-38 | 38-40 | 40-42 |
| % topila B | 0 | 0-65 | 65-100 | 100 | 100-0 |

3.2.2 Biokemijska karakterizacija lektinov

3.2.2.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata

Čistost izoliranih lektinov in njihove molekulske mase smo ocenjevali z analizo s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE). Gele za NaDS-PAGE smo pripravili s pomočjo sestavin, navedenih v preglednici III. Pri tem je raztopina akrilamida (vsebuje akrilamid in *N,N'*-metilen bisakrilamid)

odgovorna za tvorbo gela, medtem ko polimerizacijo sprožita amonijev persulfat $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$ in *N,N,N',N'*-tetrametil-etilendiamin (TMED). Pri pripravi smo najprej vlili ločevalni gel, ki je gosto zamrežen in služi ločevanju proteinov. Na vrh smo za izravnavo bazne linije in da bi preprečili izsušitev gela vlili izopropanol (ali butanol), nasičen z vodo. Gel je polimeriziral v 20-45 min, po končanem strjevanju pa smo alkohol odlili in gel sprali z dH_2O , stekelca pa osušili s filter papirjem. Nato smo vlili še manj zamrežen koncentrirni gel, ki proteine koncentrira na majhno območje, in vanj vstavili glavniček z 10 režami. Po strditvi gela smo ga skupaj s stekelci odstranili iz naprave za vlivanje in odstranili glavniček, nakar je bil gel primeren za analizo izoliranih lektinov.

Preglednica III: Sestava gelov za NaDS-PAGE. V preglednici so podane količine sestavin, ki sestavljajo določen gel. Skupni volumni zadoščajo za pripravo enega gela debeline 1.5 mm, ki je sestavljen iz ločevalnega in koncentrirnega gela.

| | Koncentrirni gel | | Ločevalni gel | |
|--|------------------------------|-----------|------------------------------|--|
| | Pufer: 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 | | Pufer: 1,5 m Tris-HCl pH 8,8 | |
| | 4% | 12% | 15% | |
| dH ₂ O | 3,167 ml | 4,335 ml | 3,585 ml | |
| Pufer | 1,250 ml | 2,500 ml | 2,500 ml | |
| NaDS 10% (m/v) | 0,050 ml | 0,100 ml | 0,100 ml | |
| Akrilamid/bis 40% (m/v) | 0,500 ml | 3,000 ml | 3,750 ml | |
| amonijev persulfat $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$ 10% (m/v) | 0,025 ml | 0,050 ml | 0,050 ml | |
| <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etilendiamin (TMED) | 0,008 ml | 0,015 ml | 0,015 ml | |
| Skupaj | 5,000 ml | 10,000 ml | 10,000 ml | |

Vzorcem lektinov (10 μg) smo dodali 10-15 μl vzorčnega pufru z ali brez 1 μl reducenta ditiotraitola s končno koncentracijo 15 mM in kuhali 8 minut na 100 °C. Po kuhanju smo vzorce kratko centrifugirali in odpipetirali v žepke. Poleg tega smo nanegli tudi nizkomolekularne proteinske standarde molekulskih mas od 14,4 do 97 kDa, s pomočjo katerih smo ocenili molekulske mase proteinov. Elektroforezno ločevanje je potekalo v navpični smeri in je trajalo približno 70 min pri konstantnem toku 30 mA/gel v pufru za elektroforezo. Gele smo po končani elektroforezi obarvali z modrim barvilom CBB ali s srebromim barvanjem in jih slikali.

Barvanje gelov s CBB v raztopini za barvanje je trajalo 60 minut. Po barvanju smo gele do primerne vidnosti lis razbarvali z večkratno menjavo 30% oziroma 10% razbarvalne raztopine.

Gele smo barvali tudi s srebrom, ki nudi boljšo detekcijo proteinov. Pred tem smo s CBB obarvane gele razbarvali v 30% razbarvalni raztopini in jih nato nekaj minut rehidrirali v dH₂O. Gele smo za 30 min izpostavili delovanju reducenta, raztopini ditiotreitola (5 mg/l), in jih nato prenesli v raztopino AgNO₃ (1,5 g/l). Gele smo stresali v temi 60 min. Po stresanju smo prenesli gele v 3% (m/v) raztopino Na₂CO₃ z 0,5 ml/l 36% (m/v) HCHO, kar je sprožilo barvno reakcijo, katero smo po primernem obarvanju gela ustavili z nekaj grami citronske kisline (33).

3.2.2.2 Izoelektrično fokusiranje

Izoelektrične točke lektinov smo ugotavljali s pomočjo metode izoelektričnega fokusiranja na sistemu PhastSystem (Pharmacia, Švedska). Na ta način smo preverili tudi njihovo čistost, saj lahko s to metodo učinkovito ločimo izooblike proteinov. Izoelektrično fokusiranje lektinov je potekalo po navodilih proizvajalca na gelu s pH gradientom od 3 do 9. Izoelektrične točke smo ocenili s pomočjo širokega označevalca izoelektričnih točk za pH območje od 3 do 9.

3.2.2.3 Masna spektrometrija z ionizacijo z elektrorazprševanjem

Molekulske mase lektinov MpSepL, MpGalL in MpLacL, očiščenih z RP-HPLC, smo določili z masno spektrometrijo z ionizacijo z elektrorazprševanjem (ESI-MS). Delo je opravil dr. Bogdan Kralj na Odseku za znanosti o okolju, Inštitut Jožef Stefan. Lektine smo raztopili v vodi in metanolu v volumskem razmerju 60:40 z 0,1% mravljično kislino. Vzorce smo z injekcijsko črpalko (pretok 5 µl/min) vnesli v vir ionov z ionsko napetostjo 4 kV. S pretvorbo dobljenih masnih spektrov z različno nabitimi ioni smo določili molekulske mase lektinov.

3.2.2.4 Gelska filtracija z uporabo tekočinske kromatografije za hitro ločevanje proteinov

Gelska filtracija nam je služila za ocenitev velikosti nenedenaturiranih lektinov, s tem pa smo sklepali na njihovo morebitno tvorbo kvartarnih (oligomernih) struktur z nekovalentnimi asociacijami. Kolono Superdex™ 75 10/300 GL smo uravnotežili s pufrom za gelsko

filtracijo, ki je vseboval ustrezen sladkor (enak imobiliziranemu sladkorju pri izolaciji posameznih lektinov z afinitetno kromatografijo). Sladkor smo uporabili z namenom, da bi izničili interakcije lektina s sladkornimi enotami nosilca Superdex 75 (zamrežena agarosa in dekstran), in s tem preprečili podaljšanje elucijskih volumnov. Pri analizi MpSepL smo torej uporabili galaktozo (0,4 M) ali laktozo (0,5 M), pri analizi MpGalL galaktozo (0,4 M), pri MpLacL pa laktozo (0,3 M ali 0,5 M). Posamezne lektine (200 μ l) smo 30 min inkubirali v pufru z ustreznim sladkorjem in jih nato nanesli na kolono. Pretok je bil 0,5 ml/min. Kalibracija kolone je potekala z naslednjimi proteinskimi standardi, nanešenimi v pufru z 0,4 M galaktozo: goveji serumski albumin (66 kDa), jajčni albumin (45 kDa) in konjski mioglobin (17,8 kDa). Iz elucijskih volumnov standardov smo napravili umeritveno krivuljo, na podlagi te pa iz dobljenih elucijskih diagramov posameznih lektinov izračunali njihove molekulske mase.

3.2.2.5 Prenos western

Pred prenosom western smo proteine najprej ločili z NaDS-PAGE na gelih, ki so bili starani vsaj en dan. S staranjem gelov smo se znebili prisotnosti radikalov, ki bi lahko spremenili preiskovane proteine. S prenosom western smo proteine iz gela prenesli na poliviniliden difluoridno (PVDF) membrano, kar je potekalo v prenašalnem pufru. Prenos je trajal 90 min pri konstantnem toku 200 mA. Po končanem prenosu smo membrano sprali z dH₂O in jo v njej pustili čez noč. Naslednji dan smo membrano najprej za nekaj sekund pomočili v 100% metanol in nato za 1 min v raztopino barvila CBB. Po barvanju smo membrano razbarvali v 50% (v/v) raztopini MeOH. Ko so se lise primerno videle, smo membrano sprali še z dH₂O in jo posušili na zraku. Lise smo izrezali in jih shranili pri -20 °C.

3.2.2.6 Določanje aminokislinskih zaporedij izoliranih lektinov

Določanje aminokislinskih zaporedij je potekalo z Edmanovo razgradnjo, in sicer je delo opravila dr. Adrijana Leonardi z Odseka za molekularne in biomedicinske znanosti na Inštitutu Jožef Stefan. N-končna aminokislinska zaporedja lektinov (MpSepL in MpLacL) smo določali iz izrezanih lis na PVDF membrani po prenosu western. Notranja aminokislinska zaporedja pa smo določali peptidnim fragmentom, dobljenim po cepitvi

lektina MpLacL s tripsinom in ločevanju z RP-HPLC. Ker so lektini pogosto odporni na proteolitično razgradnjo s proteazami (35), smo pred dodatkom tripsina lektin denaturirali, pri čemer smo ga v pufru za cepitev kuhali 30 min na 100 °C. Tripsin smo dodali 5-krat po 2 µl (razmerje encima in substrata je bilo 1:100 (w/w)) v polurnih oziroma enournih intervalih. Skupni čas tripsiniziranja je bil 3,5 h ob stalnem stresanju na 37 °C. Dobljene peptidne fragmente smo ločili z RP-HPLC po programu, opisanem v poglavju 3.2.2.3. Analizirali smo tudi sam tripsin in necepljeni MpLacL ter po primerjavi kromatogramov določili, kateri fragmenti so pri tripsiniziranemu vzorcu posledica cepitve lektina. Tem fragmentom smo nato določili aminokislinska zaporedja.

3.2.3 Molekulsko kloniranje ter analiza lektin-kodirajočih genov in cDNA

3.2.3.1 Pomnoževanje delnih nukleotidnih zaporedij lektin-kodirajočih genov in cDNA

Za pomnoževanje genov in cDNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo najprej uporabili smerne in protismerne degenerirane začetne oligonukleotide (zbrani v preglednici I). Te smo načrtovali na podlagi delnih aminokislinskih zaporedij lektinov (MpSepL in MpLacL), katere smo določili s pomočjo Edmanove degradacije ali na podlagi delnih zaporedij, ki so bila opisana v diplomskem delu K. Mustar (31). Pri načrtovanju smo uporabili računalniški program CADEPCO (Computer-Assisted DEgenerate Primer CONstruction) (36), pri čemer smo izbirali degenerirane začetne oligonukleotide z najnižjo degeneriranostjo ter ustrezno dolžino (17-28 bp), vsebnostjo G-C (optimalno 40%) in talilno temperaturo med 55 in 80 °C. Matrice za pomnoževanje zaporedij z metodo PCR so bile 10- oziroma 100-krat redčena genomska DNA in cDNA, pripravljena z obratno transkripcijo RNA. Za izolacijo nukleinskih kislin smo plodišča gobe orjaški dežnik zdrobili v terilnici s tekočim dušikom in tkivo v primernih alikvotih shranili pri – 80 °C. Visoko molekularno genomsko DNA (gDNA) smo izolirali po protokolu za izolacijo genomske DNA iz nitastih gliv, gob in rastlinskih tkiv (34), celokupno RNA pa z uporabo kompleta RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Nemčija) po navodilih proizvajalca za izolacijo RNA iz rastlinskih tkiv in nitastih gliv. Po primarni PCR, pri kateri smo uporabili degenerirane začetne oligonukleotide (MpK5-GalL-N1 in MpK5-GalL-C1 ter Mp-LacL-Ric-N1 in Mp-LacL-Ric-C1; preglednica I), smo 1 µl produkta uporabili kot matrico pri

vgnezdeni PCR (MpK5-GalL-N2 in MpK5-GalL-C1 ter Mp-LacL-Ric-N2 in Mp-LacL-Ric-C1; preglednica I). Pri obeh reakcijah smo uporabili enake pogoje (program 1, preglednica IV). Za pomnoževanje smo uporabili polimerazo DreamTaq™, zmes za reakcijo pa pripravili po navodilih proizvajalca (Fermentas. Kanada). Pri delu smo uporabili metodo vročega začetka (hot start), ki zmanjša nespecifično podvojevanje pri nizkih temperaturah, in metodo PCR s padajočo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov (touchdown).

Preglednica IV: Programi za pomnoževanje delnih nukleotidnih zaporedij genov in cDNA, ki kodirajo lektine. Zvezdica (*) pri temperaturi označuje stopnjo, v kateri smo v zmes dodali polimerazo (PCR metoda vročega začetka). Zaznamek -1 °C pomeni, da se temperatura v vsakem ciklu v tisti stopnji zmanjša za 1 °C. (PCR metoda s padajočo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov).

| Program 1 | Program 2 | Program 3 | Trajanje | Število ciklov |
|------------------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Temperatura (°C) | | | | |
| 95 | 95 | 95 | 5 min | 1 |
| 65* | 65* | 65* | 30 s | |
| 94 | 94 | 94 | 30 s | 10 |
| 65 -1 °C | 60 -1 °C | 55 -1 °C | 30 s | |
| 72 | 72 | 72 | 1 min | |
| 94 | 94 | 94 | 30 s | 25 |
| 55 | 50 | 45 | 30 s | |
| 72 | 72 | 72 | 1 min | |
| 72 | 72 | 72 | 5 min | 1 |
| 4 | 4 | 4 | ∞ | |

Na podlagi dobljenih delnih nukleotidnih zaporedij smo načrtovali začetne oligonukleotide, specifične za gen oziroma cDNA.

3.2.3.2 Pomnoževanje cDNA z metodo hitrega kloniranja 3' in 5' koncev cDNA

Za pomnoževanje navzdol ležečih zaporedij cDNA smo uporabili metodo hitrega kloniranja 3' koncev cDNA (ang.: rapid amplification of 3' cDNA ends; 3' RACE). Uporabili smo degenerirana začetna oligonukleotida Mp-Kitka-N1 oziroma Mp-LacL-Ric-N1 (preglednica I) in zunanji začetni oligonukleotid 3' RACE (3' RACE outer primer) v primarni, v vgnezdeni PCR pa Mp-Kitka-N2 oziroma Mp-LacL-Ric-N2 (Preglednica I) in notranji začetni oligonukleotid 3' RACE (3' RACE inner primer). Reakciji sta potekali v enakih pogojih, po programu 2 (preglednica IV). Uporabili smo tudi degenerirana začetna oligonukleotida MpK5-GalL-N1 oziroma MpK5-GalL-N2 in zunanji začetni oligonukleotid 3' RACE v primarni PCR, ki je potekala po programu 3 (Preglednica IV).

Matrica v primarnih PCR je bila cDNA (1 µl), pripravljena z obratno transkripcijo RNA s pomočjo oligo(dT)-adapterskega začetnega oligonukleotida (dT(17)-3'RACE), ki se prilega na začetek poli-A-repa mRNA. V vgnezenih PCR pa smo kot matrico uporabili produkt primarnih PCR (1 µl).

S pomočjo metode hitrega kloniranja 5' koncev cDNA (ang.: rapid amplification of 5' cDNA ends; 5' RACE) pa smo pomnožili navzgor ležeče zaporedje cDNA za MpL. Pomnoževanje je potekalo podobno kot pri 3' RACE, le da se tu adapterski začetni oligonukleotid prilega na 5' konec cDNA. V primarni PCR smo uporabili specifični začetni oligonukleotid MpKTK-prom-1R (preglednica I) in zunanji začetni oligonukleotid 5' RACE (5' RACE outer primer), medtem ko smo v vgnezeni PCR uporabili MpKTK-prom-2R oziroma MpKTK-prom-3R (preglednica I) in notranji začetni oligonukleotid 5' RACE (5' RACE inner primer). Reakcije so potekale po programu 1 (preglednica IV). Z metodama 3' in 5' RACE smo tako s pomočjo kompleta FirstChoice® RACE-Ready cDNA Kit dobili celotno zaporedje cDNA.

3.2.3.3 Pomnoževanje gena z metodo hoje po genomu

Za pomnoževanje gena, ki kodira lektin iz *M. procera*, ter njegove promotorske in terminatorske regije smo uporabili metodo hoje po genomu (ang.: genome walking), ki omogoča pomnoževanje neznanih fragmentov DNA ležečih navzdol in navzgor od znanega delnega nukleotidnega zaporedja. Za to smo uporabili s kompletom GenomeWalker™ Universal Kit pripravljene genomske knjižnice, pri katerih je bila genomska DNA rezana z restrikcijskima encimoma StuI oziroma PvuII. Nastalim fragmentom smo nato na tope konce ligirali adapterje in knjižnici Mp-StuI in Mp-PvuII uporabili kot matrici pri pomnoževanju celotnega zaporedja gena, ki kodira MpL. Pri tem smo uporabili polimerazo Advantage 2 Polymerase Mix in programa, navedena v preglednici V.

Za pomnoževanje navzdol ležečih regij smo uporabili začetni oligonukleotid MpKTK-ter-1F oziroma MpKTK-ter-2F (preglednica I) in zunanji začetni oligonukleotid AP1 (outer adaptor primer 1), ki se prilega na adapter fragmentov genomskih knjižnic. Produkta primarne PCR smo redčili 50-krat in jih uporabili kot matrice v vgnezeni PCR, pri kateri

smo uporabili MpKTK-ter-2F (primarna PCR: MpKTK-ter-1F) in MpKTK-ter-3F (primarna PCR: MpKTK-ter-1F oziroma MpKTK-ter-2F) (preglednica I) ter notranji začetni oligonukleotid AP2 (nested adaptor primer 2).

Za pomnoževanje navzgor ležečih regij pa smo v primarni PCR uporabili začetni oligonukleotid MpKTK-prom-1R oziroma MpKTK-prom-2R (preglednica I) in AP1, v vgnezdni PCR pa smo uporabili MpKTK-prom-2R (primarna PCR: MpKTK-prom-1R) in MpKTK-prom-3R (primarna PCR: MpKTK-prom-1R oziroma MpKTK-prom-2R) ter AP2.

Preglednica V: Programa za pomnoževanje gena z metodo hoje po genomu. Zaznamek $-0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ pri temperaturi pomeni, da se v vsakem ciklu temperatura zmanjša za $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (PCR metoda s padajočo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov).

| Primarni PCR | | | Vgnezden PCR | | |
|-----------------------------------|----------|------------|-----------------------------------|----------|------------|
| Temp. ($^{\circ}\text{C}$) | Čas | Št. ciklov | Temp. ($^{\circ}\text{C}$) | Čas | Št. ciklov |
| 94 | 15 s | 5 | 95 | 1 min | 1 |
| 72 | 3 min | | | | |
| 94 | 15 s | 10 | 95 | 20 s | 8 |
| 72 $-0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ | 3 min | | 72 $-0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ | 3 min | |
| 94 | 15 s | 25 | 95 | 20 s | 27 |
| 67 | 3 min | | 68 | 3 min | |
| 67 | 4 min | 1 | 68 | 4 min | 1 |
| 4 | ∞ | | 4 | ∞ | |

3.2.3.4 Agarozna gelska elektroforeza

Produkte, dobljene pri PCR ($5\text{ }\mu\text{l}$), smo analizirali z metodo agarozne elektroforeze. Gel smo pripravili s segrevanjem 1% raztopine agaroze v TAE puftru z dodatkom barvila SYBR[®] Safe, nato pa smo raztopino nekoliko ohladili in jo vlili v kadičko za agarozno elektroforezo. Po ločevanju fragmentov z elektroforezo smo njihovo velikost ocenili s pomočjo velikostnih standardov GeneRuler[™] 100 bp Plus ali pa GeneRuler[™] 1kb Plus za fragmente, dobljene z metodo hoje po genomu. Standarda smo redčili po navodilih proizvajalca velikostnih standardov (Fermentas, Kanada).

3.2.3.5 Čiščenje fragmentov DNA

DNA smo po PCR lahko čistili neposredno iz zmesi, če se je pri analizi pokazalo, da je v njej prisoten le en fragment primerne velikosti in v primerni količini (močna intenziteta lise na slikanem gelu). Če pa so bili na agaroznem gelu poleg željenega prisotni še drugi fragmenti, smo želeni fragment iz gela izrezali s skalpelom in ga nato čistili. DNA smo čistili z uporabo kompleta Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, ZDA) po navodilih proizvajalca. Da bi dobili višje koncentracije DNA, smo zmanjšali volumen vode (20 µl namesto 50 µl), s katero smo očiščeni fragment eluirali iz mikrokolone. Filtrat s prisotnim fragmentom smo shranili pri 4 °C, če je sledila ligacija, ali pri -20 °C za dalj časa.

3.2.3.6 Kloniranje fragmentov

Preden smo očiščeni fragment DNA poslali na analizo za določanje nukleotidnega zaporedja, smo ga ligirali v plazmidni vektor pGEM[®]-T Easy s pomočjo kompleta pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega, ZDA) in nato plazmid z insertom namnožili v celicah *E. Coli*. Ligacijska mešanica je bila sestavljena iz 0,15 µl pGEM plazmida, 5 µl ligacijskega pufra (iz kompleta), 1 µl T4 DNA ligaze in 4 µl očiščenega DNA fragmenta. Mešanico smo inkubirali 1-2 uri na sobni temperaturi in čez noč na 4 °C. Po ligaciji smo mešanici dodali 100 µl kompetentnih bakterijskih celic *E. coli* DH5α (Invitrogen, ZDA) in inkubirali 30 min na ledu, nato pa smo celice transformirali s temperaturnim šokom, tako da smo jih za 1 min prenesli v vodno kopel (42 °C) in nato takoj ohladili na ledu. Celicam smo dodali 700 µl SOC medija in jih 1 h inkubirali pri 37 °C na orbitalnem stresalniku. Po tem smo na pripravljena trdna gojišča LBA/X-Gal razmazali 100 µl transformirane kulture celic, ostanek kulture (700 µl) pa smo 2 min centrifugirali pri 6000 × g. Nato smo 600 µl supernatanta odstranili in ostanek dobro premešali, da smo ponovno dobili homogeno suspenzijo koncentriranih celic, katero smo razmazali na trdna gojišča. Gojišča smo inkubirali 16 ur na 37 °C in nato s pomočjo modro-bele selekcije izbrali po 4 kolonije belih celic, ki naj bi vsebovale plazmid z določenim fragmentom. S PCR na osnovi kolonije smo s pomočjo univerzalnih začetnih oligonukleotidov M13 in SP6 preverili, ali izbrane kolonije dejansko vsebujejo fragment. Če se je izkazalo, da so celice vsebovale plazmid z vključenim fragmentom, smo celice namnožili v prekončni kulturi pri 37 °C v tekočem

gojišču LBA (3 ml). Plazmide s fragmentom smo nato izolirali s pomočjo kompleta Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification system (Promega, ZDA) za čiščenje DNA iz celic. Postopek smo opravili po navodilih proizvajalca, zmanjšali smo le volumen vode (90 μ l namesto 100 μ l), s katero smo eluirali očiščen plazmid iz mikrokolone.

Koncentracije (v ng/ μ l) DNA oziroma plazmida smo merili spektrofotometrično, pri čemer je moralo biti razmerje A_{260}/A_{280} čim bližje 1,8. Na podlagi izmerjenih koncentracij smo pripravili po 20 μ l raztopine plazmida s koncentracijo 80 ng/ μ l in vzorce poslali na analizo z avtomatiziranim servisom za določanje nukleotidnega zaporedja pri podjetju MWG Biotech (Nemčija).

3.2.3.7 Analiza gena in cDNA, ki kodirata lektin iz *M. procera*

Za združitev in poravnavo nukleotidnih zaporedij prekrivajočih fragmentov gena in cDNA smo uporabili računalniški program za urejanje poravnave BioEdit (37). Tako smo sestavili celotno nukleotidno zaporedje gena s promotorsko in terminatorsko regijo ter zaporedje cDNA in ju primerjali. Sestavljeni zaporedji smo dodatno potrdili s pomnožitvijo celotnih nukleotidnih zaporedij gena in cDNA z uporabo specifičnih začetnih oligonukleotidov. V primarni PCR smo uporabili specifične začetne oligonukleotide Mp-KIT-F-1 in Mp-KIT-R-1, v vgnezdenu pa Mp-KIT-F-2 in Mp-KIT-R-2 (preglednica I). Reakciji sta potekali pod enakimi pogoji (program 1, preglednica IV).

Iskanje podobnosti nukleotidnih zaporedij gena in cDNA z zaporedji v podatkovni bazi smo izvedli z algoritmom BLASTn (38) na strežniku NCBI (39). Promotorsko regijo gena smo analizirali s pomočjo programskega orodja za iskanje transkripcijskih elementov TESS (40, 41).

3.2.3.8 Analiza iz cDNA izpeljanega aminokislinskega zaporedja lektina iz *M. procera*

Aminokislinsko zaporedje, izpeljano iz cDNA, smo analizirali s pomočjo orodij za proteomiko na strežniku ExPaSy (42). Z orodjem ProtParam smo izračunali molekulsko maso, teoretično izoelektrično točko, aminokislinsko sestavo in ekstincijski koeficient lektina. Orodje TermiNator smo uporabili za napoved posttranslacijskih modifikacij na N-

koncu lektina, algoritme SignalP, SecretomeP, TargetP, WoLF PSORT in NetNES pa za preverjanje morebitne prisotnosti signalnega peptida in napoved subcelične lokalizacije. TMHMM smo uporabili za napoved transmembranskih regij, morebitna mesta glikozilacije in fosforilacije pa smo preverjali z NetNGlyc, YinOYang in NetPhos.

Aminokislinsko zaporedje lektina smo primerjali z zaporedji proteinov v podatkovnih bazah s pomočjo algoritmov BLASTp (38) in PSI-BLAST (38) na strežniku NCBI (39). S programom SMART (43, 44) smo iskali morebitne proteinske domene prisotne v lektinu, s programskim orodjem SUPERFAMILY (45, 46) pa smo lektin uvrstili v proteinsko družino.

3.2.4 Biološke aktivnosti lektinov

3.2.4.1 Hemaglutinacijski testi

Vezavne aktivnosti lektinov smo ugotavljali na podlagi zlepljanja eritrocitov oziroma hemaglutinacije. Delo je potekalo v mikrotitrskih ploščah z zaokroženim dnom z ~ 2% suspenzijo eritrocitov ($\sim 4.8 \times 10^8$ eritrocitov/ml) v eritrocitnem pufri.

3.2.4.1.1 Test hemaglutinacije z različnimi krvnimi skupinami eritrocitov

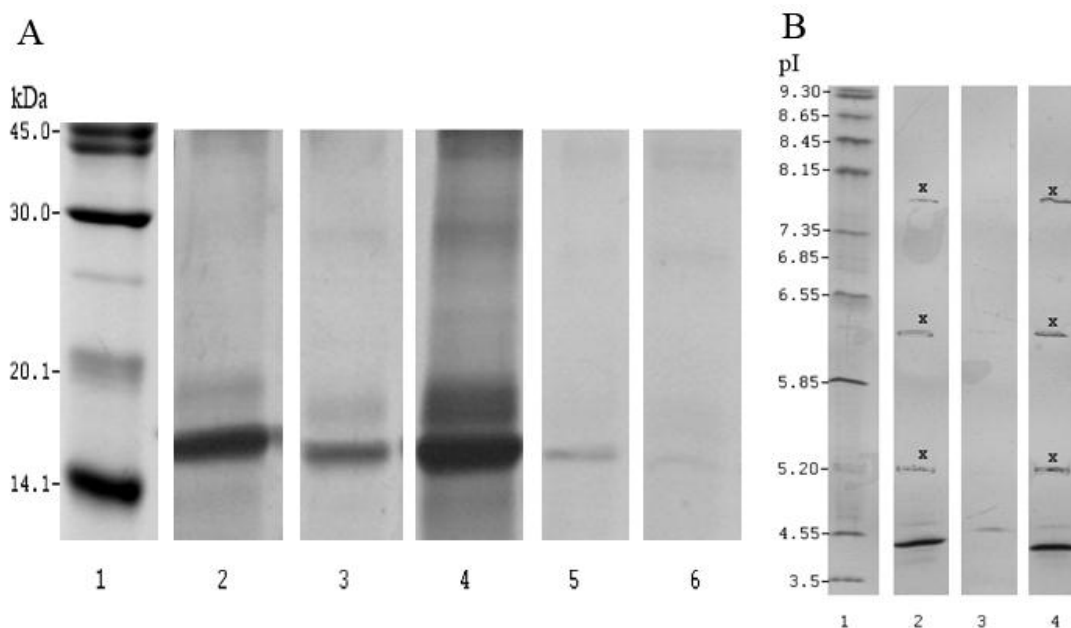
V vsako vdolbinico smo dodali 100 μ l 2% suspenzije eritrocitov, nato pa še 1-30 μ l lektinov MpSepL ($c = 0,67$ mg/ml), MpGalL ($c = 0,21$ mg/ml) in MpLacL ($c = 0,38$ mg/ml). Hemaglutinacijo smo ocenili vizualno po eni uri inkubacije pri sobni temperaturi in določili titer hemaglutinacije, definiran kot obratna vrednost najnižje koncentracije lektina, ki še zleplja eritrocite. Za lažjo primerjavo smo specifičnost lektinov za posamezne eritrocite izrazili v odstotkih kot relativni aglutinacijski titer, katere smo izračunali iz titra hemaglutinacije za določen tip eritrocitov/najvišji titer hemaglutinacije $\times 100$.

3.2.4.1.2 Test inhibicije hemaglutinacije s sladkorji in glikoproteinom

Vezavne specifičnosti lektinov MpSepL in MpLacL smo ocenili s pomočjo testa inhibicije hemaglutinacije z monosaharidi (2 M D-glukoza, 2 M D-galaktoza, 2 M β -fruktoza, 2 M D-manozo), z disaharidoma (1 M D-saharoza, 1 M D-laktoza) in z glikoproteinom asialofetoinom (6 mg/ml oziroma 125 μ M). Lektine smo skupaj z zaporednimi redčitvami sladkorjev (volumen sladkorne raztopine v jamici je bil 50 μ l) 30 min inkubirali v mikrotitrskih ploščah. Po tem smo dodali 50 μ l 4% suspenzije eritrocitov skupine A, inkubirali eno uro pri sobni temperaturi in nato vizualno ocenili aglutinacijo. Določili smo titer hemaglutinacije, ki je definiran kot obratna vrednost najnižje koncentracije sladkorja ali glikoproteina, ki še prepreči aglutinacijo eritrocitov. Specifičnost lektinov za posamezne inhibitorje smo izrazili v odstotkih kot relativni titer inhibicije hemaglutinacije, katere smo izračunali iz titra inhibicije hemaglutinacije določenega sladkorja/titer inhibicije z najmočnejšim inhibitorjem $\times 100$.

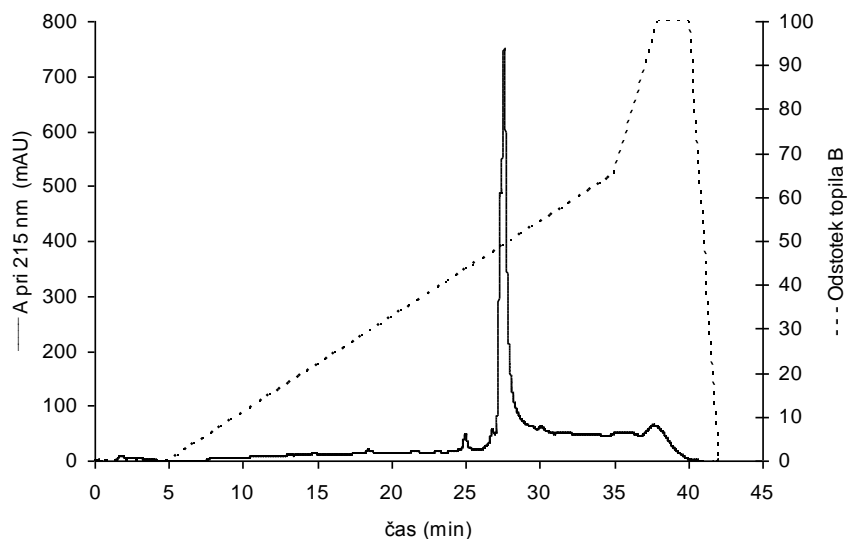
3.2.4.1.3 Test inhibicije hemaglutinacije s proteinskimi inhibitorji proteaz, makrocipini in klitocipinom

Makrocipini in klitocipin so inhibitorji cisteinskih proteaz, izolirani iz orjaškega dežnika (*M. procera*) oziroma meglenke (*Clitocybe nebularis*). Rekombinantne makrocipine in klitocipin smo dobili od dr. Jerice Sabotič iz Odseka za biotehnologijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. S hemaglutinacijskim testom smo preverili morebitni vpliv makrocipinov in klitocipina na aglutinacijsko aktivnost lektinov MpSepL in MpLacL. Aglutinacijske koncentracije lektinov MpSepL in MpLacL smo skupaj z makrocipini (rMcp1, rMcp2 in rMcp3) ali klitocipinom (rClt) 30 min inkubirali v mikrotitrskih ploščah, nato pa smo dodali 100 μ l 2% suspenzije eritrocitov skupine A. Po eni uri inkubacije na sobni temperaturi smo vizualno ocenili hemaglutinacijo in določili najnižje koncentracije makrocipinov in klitocipina, ki inhibirajo aglutinacijo eritrocitov z MpSepL in MpLacL. Rezultate smo podali kot molarno razmerje inhibitorja in lektina pri najmanjši koncentraciji inhibitorja, ki še inhibira hemaglutinacijo.

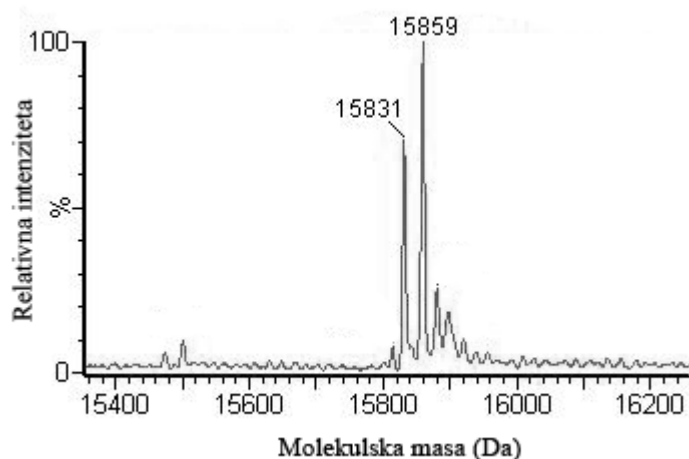


Slika 2: Analiza nereduciranih vzorcev z NaDS-PAGE (A) in izoelektrično fokusiranje (B) lektinov, izoliranih iz gobe orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*). (A) Stolpec 1 – standardni proteini nizkih molekulskih mas, stolpec 2 – sefarozil-specifični lektin, stolpec 3 – galaktozil-specifični lektin, stolpec 4 – laktozil-specifični lektin, stolpec 5 – združene frakcije po glukozil-sefarozni afinitetni kromatografiji, stolpec 6 – združene frakcije po saharozil-sefarozni afinitetni kromatografiji. (B) Stolpec 1 – standardni proteini z različnimi izoelektričnimi točkami, stolpec 2 – MpSepL, stolpec 3 – MpGalL, stolpec 4 – MpLacL. Lise, označene z x, so posledica nanosa vzorca na gel.

Po afinitetni kromatografiji smo MpSepL za nadaljnje analize dodatno očistili z RP-HPLC, pri čemer smo dobili en glavni vrh z retencijskim časom 27,543 min (slika 3). Očiščenemu lektinu smo določili natančno molekulsko maso z ESI-MS, ki je pokazala dva večja vrhova z molekulskima masama 15831 Da in 15859 Da (slika 4).



Slika 3: Čiščenje in analiza MpSepL z RP-HPLC. Polna črta prikazuje elucijski diagram MpSepL, prekinjena črta pa gradient topila B. Glavni vrh pri $t = 27,543$ min predstavlja MpSepL.



Slika 4: Analiza MpSepL z ESI-MS. Prikazan je pretvorjen masni spekter MpSepL z glavnima vrhovoma pri molekulskih masah 15831 Da in 15859 Da.

Velikost nedenaturiranega lektina in morebitno tvorbo kvartarnih (oligomernih) struktur smo ugotavljali s pomočjo gelske filtracije z uporabo FPLC metode. Najprej smo analizirali proteinske standarde različnih molekulskih mas in napravili umeritveno krivuljo (y (log velikosti) = $0,040 \times x$ (čas v min) + $0,586$), ki smo jo uporabili za oceno velikosti eluiranih lektinov. Na podlagi elucijskega diagrama MpSepL z glavnim vrhom pri elucijskem volumnu 17,59 ml, smo lahko ocenili nenavadno nizko molekulsko maso, in sicer $\sim 1,6$ kDa (ni prikazano). Ta je najverjetneje posledica zadrževanja lektina v koloni zaradi interakcij med lektinom in nosilcem.

N-končna aminokislinska zaporedja MpSepL smo določili iz proteinske lise, izrezane iz PVDF membrane po prenosu western. V literaturi smo našli še N-končno zaporedje proteina, prav tako izoliranega s pomočjo afinitetne kromatografije na sefarozi iz ekstraktov plodišč glive *Macrolepiota procera*, imenovanega Mp3, ki je kazalo podobnost z našim dobljenim zaporedjem (31). Iz obeh zaporedij smo sestavili združeno zaporedje in vsa podali v preglednici VI. Primerjava združenega zaporedja s proteini iz podatkovne zbirke z uporabo algoritma PSI-BLAST je pokazala podobnost MpSepL s proteinom iz glive *Schizophyllum commune*, ki spada v družino proteinov s sposobnostjo vezave ogljikovih hidratov.

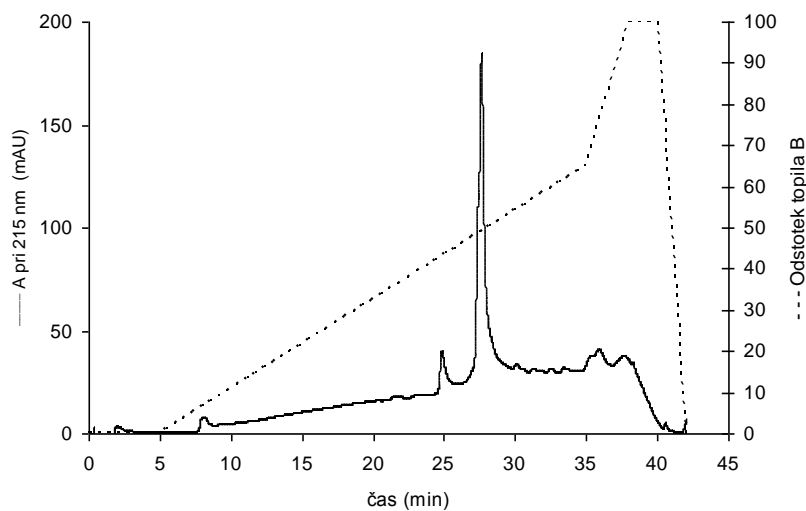
Preglednica VI: N-končna aminokislinska zaporedja MpSepL. V tabeli so predstavljena N-končna aminokislinska zaporedja MpSepL in Mp3 (31) ter združeno aminokislinsko zaporedje.

| | 5 | 10 | 15 | 20 |
|--|---|-------------------------------|-------------------|-------|
| N-končna aminokislinska zaporedja MpSepL | V P E G Q S Y K I T N V K A G | S D Q D L I G T P Y K I I N V | N V A K I Q N E L | Y D A |
| N-končno aminokislinsko zaporedje Mp3 | S G Q T Y K I T N V K A G T V I D L S G | | | |
| Združeno aminokislinsko zaporedje | V P S G Q T Y K I T N V K A G T V I D L S G | | | |

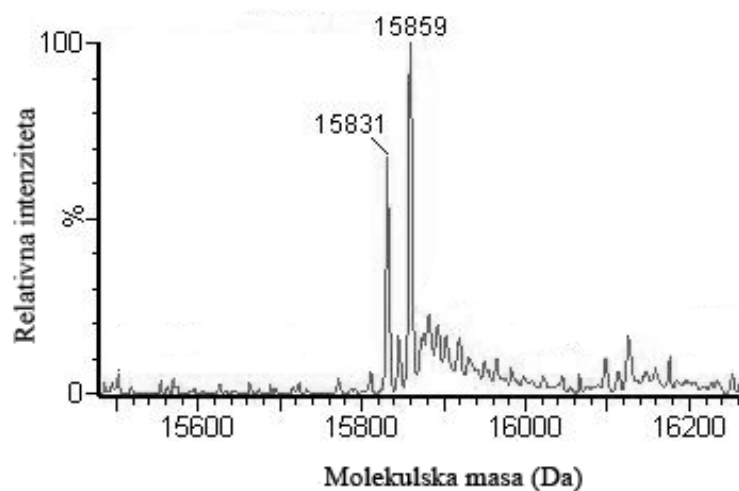
4.1.2 Galaktozil-specifični lektin MpGalL

Galaktozil-specifični lektin smo pridobili z afinitetno kromatografijo na galaktozil-sefarozi. Elucijski diagram je bil podoben elucijskemu diagramu MpSepL (slika 1). Združene proteinske frakcije smo skoncentrirali ($c = 0,21 \text{ mg/ml}$) in vzorec analizirali z NaDS-PAGE. Analiza v reducirajočih ali nereducirajočih (ni prikazano) pogojih je pokazala eno glavno liso pri 16 kDa (Slika 2A, stolpec 3), ki predstavlja MpGalL. Izoelektrična točka lektina je pri pH 4,4 (slika 2B, stolpec 3).

MpGalL smo dodatno očistili z RP-HPLC, pri čemer smo dobili en glavni vrh z retencijskim časom 27,601 min (slika 5). Očiščenemu lektinu smo določili natančno molekulsko maso z ESI-MS, ki je pokazala dva večja vrhova z molekulskima masama 15831 Da in 15859 Da (slika 6). Pri gelski filtraciji z uporabo metode FPLC smo glavni vrh dobili pri elucijskem volumnu 17,79 ml, iz tega pa izračunali nenavadno nizko molekulsko maso, in sicer $\sim 1,5 \text{ kDa}$ (ni prikazano).



Slika 5: Čiščenje in analiza MpGalL z RP-HPLC. Polna črta prikazuje elucijski diagram MpGalL, prekinjena črta pa gradient topila B. Glavni vrh pri $t = 27,601$ min predstavlja MpGalL.

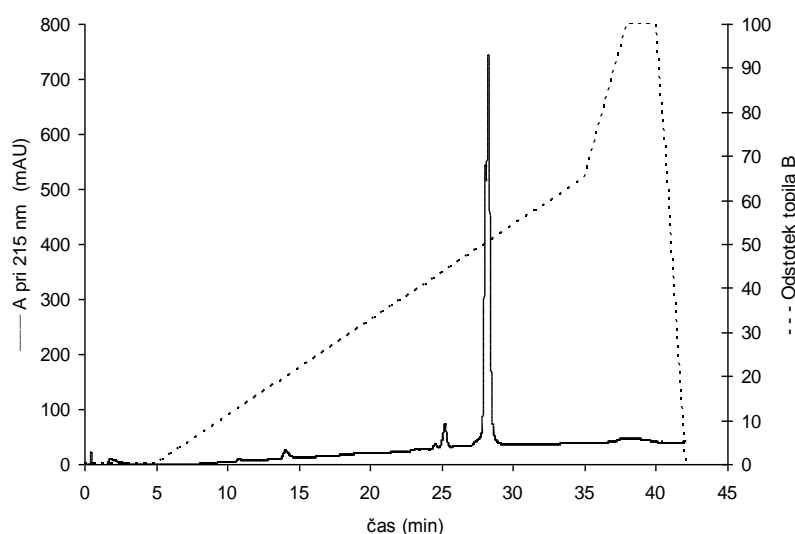


Slika 6: Analiza MpGalL z ESI-MS. Prikazan je pretvorjen masni spekter MpGalL z glavnima vrhovoma pri molekulskih masah 15831 Da in 15859 Da.

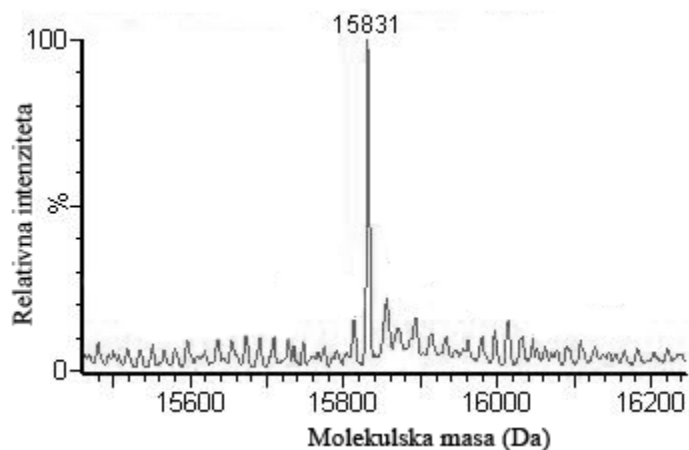
4.1.3 Laktozil-specifični lektin MpLacL

Laktozil-specifični lektin smo pridobili z afinitetno kromatografijo na laktozil-sefarozi. Elucijski diagram je bil podoben elucijskemu diagramu MpSepL (slika 1). Proteinske frakcije smo skoncentrirali ($c = 0,38 \text{ mg/ml}$) in analizirali z NaDS-PAGE. Analiza v reducirajočih ali nereducirajočih (ni prikazano) pogojih je pokazala eno glavno proteinsko liso pri 16 kDa (slika 2A, stolpec 4), ki predstavlja MpLacL. Izoelektrična točka lektina je pri pH 4,4 (Slika 2B, stolpec 4).

Po čiščenju MpLacL z RP-HPLC smo dobili en glavni vrh z retencijskim časom 28,232 min (slika 7). Analiza z ESI-MS je pokazala en večji vrh z molekulsko maso 15831 Da (slika 8). Z gelsko filtracijo z uporabo metode FPLC smo za MpLacL ocenili nenavadno nizko molekulsko maso, in sicer $\sim 1 \text{ kDa}$ (ni prikazano).

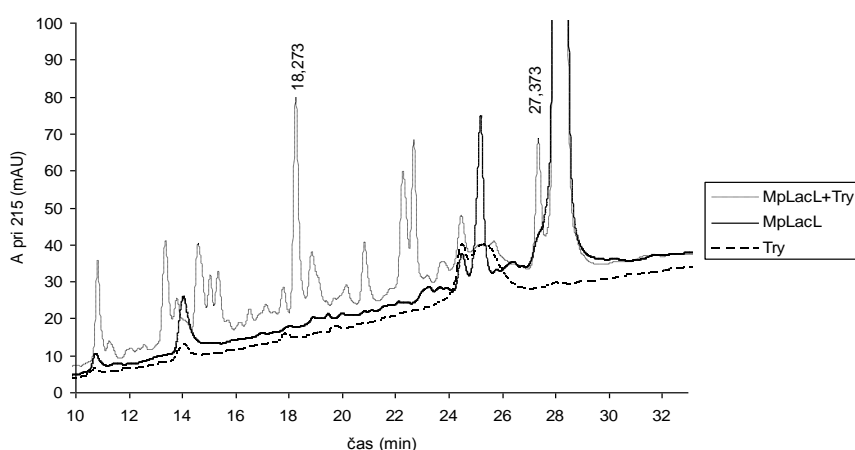


Slika 7: Čiščenje in analiza MpLacL z RP-HPLC. Polna črta prikazuje elucijski diagram MpLacL, prekinjena črta pa gradient topila B. Glavni vrh pri $t = 28,232 \text{ min}$ predstavlja MpLacL.



Slika 8: Analiza MpLacL z ESI-MS. Prikazan je pretvorjen masni spekter MpLacL z enim glavnim vrhom pri molekulske masi 15831 Da.

Določanje N-končnega aminokislinskega zaporedja proteinske lise MpLacL, izrezane iz PVDF membrane, po prenosu western ni uspelo. Zato smo z namenom pridobitve notranjih aminokislinskih zaporedij MpLacL cepili s tripsinom. Po cepitvi smo fragmente ločili z RP-HPLC in s primerjavo elucijskih diagramov cepljenega MpLacL, necepljenega MpLacL in tripsina določili, kateri vrhovi so posledica cepitve MpLacL s tripsinom (slika 9). Vrhovoma z elucijskima časoma 18,273 in 27,373 min smo določili aminokislinska zaporedja (preglednica VII). Primerjava dobljenih aminokislinskih zaporedij s proteini iz podatkovne zbirke z uporabo algoritma PSI-BLAST ni pokazala značilne podobnosti z drugimi proteini.



Slika 9: Elucijski diagrami cepljenega MpLacL, necepljenega MpLacL in tripsina po RP-HPLC. Označena sta dva izmed vrhov z retencijskima časoma 18,273 in 27,373 min, nastalih s cepitvijo MpLacL s tripsinom, katerima smo določili aminokislinska zaporedja.

Preglednica VII: Notranja aminokislinska zaporedja MpLacL. V tabeli so podana aminokislinska zaporedja, določena za fragmenta po cepitvi lektina s tripsinom in čiščenju z RP-HPLC. Z X je označena aminokislina, ki je ni bilo mogoče identificirati.

| | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 |
|----------------------------|--|---------------------|-------|-----|----|
| Vrh po HPLC t = 18.273 min | N Q Q W T F N H T Q | K S D V S D E A G K | G G L | L P | |
| Vrh po HPLC t = 27.373 min | I F V P F T N Y N L D L S G Y Q D T T P <u>X</u> T P V Q | | | | |

4.2 Karakterizacija gena in cDNA, ki kodirata lektin iz *M. procera*

Na podlagi določenih delnih aminokislinskih zaporedij lektinov smo načrtovali več degeneriranih začetnih oligonukleotidov, da bi pomnožili gene in cDNA različnih lektinov. Z metodo hitrega kloniranja 3' koncev in uporabo degeneriranih začetnih oligonukleotidov Mp-Kitka-N1 in Mp-Kitka-N2 (Preglednica I) smo uspeli pomnožiti 492 dolg del cDNA, ki kodira lektin iz *M. procera* (MpL). Nukleotidnih zaporedij drugih lektinov nam z uporabo ostalih degeneriranih začetnih oligonukleotidov ni uspelo pomnožiti. Na podlagi dobljenega delnega cDNA zaporedja MpL smo načrtovali specifične začetne oligonukleotide. S pomočjo metode hitrega kloniranja 5' koncev smo pomnožili še manjkajoči del cDNA, z metodo hoje po genomu pa celoten gen *mpl* s promotorsko in terminatorsko regijo. Prekrivajoče fragmente smo združili s programskim orodjem BioEdit (37). Dobljeni nukleotidni zaporedji smo potrdili s ponovnim pomnoževanjem celotnega gena in cDNA s celotnim odprtim bralnim okvirjem. Poravnava nukleotidnih zaporedij gena in cDNA je pokazala določene razlike med njima v kodirajočem in nekodirajočem delu zaporedja (slika 10).

Gen za MpL (dostopna koda v GenBank/EMBL podatkovni zbirki je HQ449738) je dolg 791 bp in je sestavljen iz štirih eksonov (94, 202, 125 in 5 bp) ter treh intronov (56, 245 in 64 bp). Celotno določeno nukleotidno zaporedje cDNA (HQ449739) s poli-A-repom je dolgo 756 bp, kodirajoče nukleotidno zaporedje cDNA s stop kodonom pa je dolgo 426 bp in se prevede v 141 aminokislinskih dolgih polipeptidnih verig.

Genu MpL, njegovemu kodirajočemu delu in cDNA smo iskali podobnost z nukleotidnimi zaporedji v podatkovnih zbirkah z uporabo algoritma BLASTn (38). Ugotovili smo

podobnost z različnimi zaporedji, ki kodirajo proteine, udeležene v metabolizmu sladkorjev.

| | | | |
|--------------|------|---|------|
| MpL gDNA | -306 | CTGTGCGTGGTGACGCGCGGTTTTCTAGGGCCCTCATCCCTGCCTATTCTGTCTCCGAAATGAGATAAGGGCGGCACAGCAGCTTTTAATGCCACAG | -307 |
| MpL gDNA | -206 | GAATATTGATGCTCTTCTATGACGTACGGAATGGTTCAAGAATGACATAAACACGCTCGTCTGGCCATGAAGTTGATCCCATAAAAGCCTACCGCTCG | -107 |
| MpL gDNA | -106 | TCCAGAAGTTGCTCTAACTCGGTTGTTCTCTCTTTACCTTCACCTACGCGCTTCGTTGTTTCCCTCCAGCCCCACGTGAATTACTACTTTC | -7 |
| MpL cDNA | -92 | CTAACTCGGTTGTTCTCTCTTTACCTTCACCTACGCGCTTCGTTGTTTCCCTCCAGCCCCACGTGAATTACTACTTTC | -7 |
| MpL gDNA | -6 | TCAACCATGTCACCCCAAGTCTCCTCTGGCCAGACTTACAAAGATTACCAATGTCAAAGCCGGTACGGTATCGACCTCTCTGGCGAAGACAACAAGTCCA | 94 |
| MpL cDNA | -6 | TCAACCATGTCACCCCAAGTCTCCTCTGGCCAGACTTACAAAGATTACCAATGTCAAAGCCGGTACGGTATCGACCTCTCTGGCGAAGACAACAAGTCCA | 94 |
| AK izpeljane | 1 | M S T Q V S S G Q T Y K I T N V K A G T V I D L S G E D N K S | 31 |
| MpL gDNA | 95 | GTAGGTACCCCTCCCTTCCCACATGTTCTTAACCCACCTTCCCTTGTAGTATCGGCTACCCCTACCATAGTGGCAAGAACAACAATGGACG | 194 |
| MpL cDNA | 95 | ~~~~~TCATCGGTACCCCTACCATAGTGGCAAGAACAACAATGGACG | 138 |
| AK izpeljane | 32 | I I G Y P Y H S G K N Q Q W T | 46 |
| MpL gDNA | 195 | TTCAACTGGACGGGTAAAGCTTGGACCTCCGCTCTGCCCTCGGGCAGTACCTAGGTATTGAGGGCACCCTCGGGCGGCGGGAACCCCTCTCGTTGCCG | 294 |
| MpL cDNA | 139 | TTCAACTGGACGGGTAAAGCTTGGACCTCCGCTCTGCCCTCGGGCAGTACCTAGGTATTGAGGGCACCCTCGGGCGGCGGGAACCCCTCTCGTTGCCG | 238 |
| AK izpeljane | 47 | F N W T G K A W T L R S A S S G S Y L G I E G T P A D G T R L V A | 79 |
| MpL gDNA | 295 | TCAACGATCCCTTCGAATGGCACACTCTGGCGGATGAAGCCAAAGAAATGCTTTCCGGTGAAGTTCAATTTTTTACTTCTCTCTTTTTCAGGACTTTTG | 394 |
| MpL cDNA | 239 | TCAACGATCCCTTCGAATGGCACACTCTGGCGGATGAAGCCAAAGAAATGCTTTCCG~~~~~ | 296 |
| AK izpeljane | 80 | V N D P F E W H I W R D E A N E N A F R | 99 |
| MpL gDNA | 395 | CCTTCCCGCCCTTGACTCCGATGATGGGATGATCGCGTGGGTGTTGCTGTATCTAACTAGCTTCAAAGTCGTTAGTGTGCTCTTCGCGCCCTTC | 494 |
| MpL cDNA | 296 | ~~~~~ | 296 |
| MpL gDNA | 495 | TGCCCGTTCTACACCTCTGCTTCTATTACTTCCATACATTTCTACTTCTCTCTGTCAAAGCCAGAGCCTGCACCTTCTTTTCTATGTGCTAACCCACCTCG | 594 |
| MpL cDNA | 296 | ~~~~~ | 296 |
| MpL gDNA | 595 | TAGCATCTTTGTCCTTCCCAACTACAACCTCGACCTATCCGGTTACGGTATACACCCCGGAACTCCCGTCCAACTCTGGTGGACTTGGGAAGGT | 694 |
| MpL cDNA | 297 | ~-CATCTTTGTCCTTCCCAACTACAACCTCGACCTATCCGGTTACGGTATACACCCCGGAACTCCCGTCCAACTCTGGTGGACTTGGGAAGGT | 393 |
| AK izpeljane | 100 | I F V P F T N Y N L D L S G Y G D T T P G T P V Q L W W T W E G | 131 |
| MpL gDNA | 695 | CTCCACCAAACTGGACAATCGATCGTCTGACCTCCGCGCGAATCCCTCCCTCGTGGCGCTATTTAACTGACGCATGTTTATCTCGCAGCTTGA*TCG | 794 |
| MpL cDNA | 394 | CTCCACCAAACTGGACAATCGATCGT~~~~~CTTGA*TCG | 429 |
| AK izpeljane | 132 | L H Q T W T I D R P * | 141 |
| MpL gDNA | 795 | GTGTTATACCCCTTCATCAACGCATATGGGCGCCCTGAACACACAGTTGCTATCTCATGTTTCTCTCCGGTGTGTTGTAACCTCGGATCTGAACCTGT | 894 |
| MpL cDNA | 430 | GTGTTATACCCCTTCATCAACGCATATGGGCGCCCTGAACACACAGTTGCTATCTCATGTTTCTCTCCGGTGTGTTGTAACCTCGGATCTGAACCTGT | 529 |
| MpL gDNA | 895 | CATCTCTGAACTCATACCCGTTTTTCGTGTACCACTTATACTTGTGTTGATGTAGTGTCTCATCGCTCGT*GTGTTGTTGTTCTTTATTGTTGATTAT | 994 |
| MpL cDNA | 530 | CATCTCTGAACTCATACCCGTTTTTCGTGTACCACTTATACTTGTGTTGATGTAGTGTCTCATCGCTCGT*GTGTTGTTGTTCTTTATTGTTGATTAT | 629 |
| MpL gDNA | 995 | ACATCATCTCACTCTGGTGGTTTCTTCGCGTGTGCGAAATCGGATCGATACTATGTAATGATGTGCGGATTAACCTGCACAGATGAATTTTTTA | 1094 |
| MpL cDNA | 630 | ACATCATCTCACTCTGGTGGTTTAAAAA | 664 |
| MpL gDNA | 1095 | TCGCACCGCAGACCGAAGCCGCGCAGC | 1119 |

Slika 10: Poravnava nukleotidnih zaporedij gena *mpl* in cDNA z izpeljanim aminokislinskim zaporedjem. Nukleotidno zaporedje gena je označeno z MpL gDNA, zaporedje cDNA z MpL cDNA in izpeljano aminokislinsko zaporedje z AK izpeljane. Nukleotidi in aminokislinske se začnejo šteti pri začetnem kodonu (ATG). Zaključni kodon (TGA) je označen v izpeljanem aminokislinskem zaporedju z *. S sivo barvo so osenčeni bazni pari, kjer smo opazili razlike med zaporedjem gDNA in cDNA.

4.3 Analiza iz cDNA izpeljanega aminokislinskega zaporedja lektina iz *M. procera*

Izpeljano aminokislinsko zaporedje MpL smo primerjali z določenimi delnimi aminokislinskimi zaporedji izoliranih MpSepL in MpLacL, da bi preverili, ali dobljeno nukleotidno zaporedje ustreza izoliranemu lektinu. Ugotovili smo, da se delna aminokislinska zaporedja izoliranih lektinov skoraj popolnoma ujemajo z izpeljanim aminokislinskim zaporedjem. Pri dobljenem delnem aminokislinskem zaporedju MpSepL se prolin (P) razlikuje od serina (S) na mestu 6 na izpeljanem aminokislinskem zaporedju MpL. Pri dobljenem delnem zaporedju MpLacL se histidin (H) razlikuje od triptofana (W)

na mestu 49 in glutamin (Q) od glicina (G) na mestu 51 (slika 11). Preverili smo tudi razlike v nukleotidnih zaporedjih gena in cDNA in ugotovili, da se nekatere razlike odražajo na izpeljanem aminokislinskem zaporedju, in sicer je na mestu 9 poleg glutamina (Q) možen tudi arginin (R), na mestu 17 poleg lizina (K) tudi izolevcin (I) in na mestu 73 poleg asparaginske kisline (D) še glicin (G).

| | | |
|--------------------|---|--------------------|
| MpL AK izpeljane | MSTQVSSGQTYKITNVKAGTVIDLSGEDNKSIIIGYPYHSGKNQQWTFNWT | 50 |
| MpSepL AK določene | <u>V</u> SSGQTYKITNVKAGTVIDLSG | |
| MpLacL AK določene | | NQQWTFN <u>H</u> T |
| MpL AK izpeljane | GKAWTLRSASSGSYLGIEGTPADGTRLVAVNDPFEWHIWRDEANENAFRI | 100 |
| MpLacL AK določene | <u>Q</u> | I |
| MpL AK izpeljane | FVPFTNYNLDLSGYGDTTPGTPVQLWWTWEGLHQWTWTIDRP | 141 |
| MpLacL AK določene | FVPFTNYNLDLSGYQDTTP <u>X</u> TPVQ | |

Slika 11: Primerjava izpeljanega aminokislinskega zaporedja MpL z zaporedji, določenimi za MpSepL in MpLacL. Aminokislina, ki se razlikuje od aminokislina iz izpeljanega aminokislinskega zaporedja, so označene s krepkim podčrtanim tiskom. Aminokislina, ki je nismo uspeli določiti, je zapisana z X.

Z uporabo internetnih orodij za proteomiko (Poglavje 3.2.3.8) smo analizirali izpeljano aminokislinsko zaporedje MpL. Protein je z začetnim metioninom dolg 141 aminokislina in ne vsebuje cisteinov. Obstaja 75% verjetnost posttranslacijskega procesiranja proteina z izrezom začetnega metionina in nadaljnjim aciliranjem naslednjega serina. Izračunana molekulska masa proteina z metioninom je 15920,5 Da, brez začetnega metionina 15789,3 Da, brez metionina in z acilacijo na serinu pa 15831,3 Da.

Teoretična izoelektrična točka je pri pH 5,20 in se ne razlikuje pri proteinu z ali brez metionina. S pomočjo programskega orodja smo določili molarni ekstinkcijski koeficient za lektin, ki znaša $58440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, torej ima lektin pri absorbanci $A = 1$ koncentracijo 0,27 mg/ml.

Internetna orodja so predvidela, da lektin MpL nima signalnega peptida, zato je sintetiziran na prostih ribosomih v citosolu in se ne izloča iz celice po poti endoplazmatski retikulum – Golgijev aparat. Protein naj bi se izločal iz celice po nekласični poti, največja verjetnost subcelične lokalizacije pa je ekstracelularni prostor. Lektin naj ne bi vseboval transmembranskih regij. Z orodji za iskanje možnih N- in O-glikozilacijskih mest proteinov smo za lektin našli tri taka mesta (Asn 29 in 48, Thr 2), vendar zaradi odsotnosti

signalnega peptida protein verjetno ni glikoziliran. MpL vsebuje potencialna mesta za fosforilacijo na Ser (8 mest), Thr (6 mest) in Try (3 mesta).

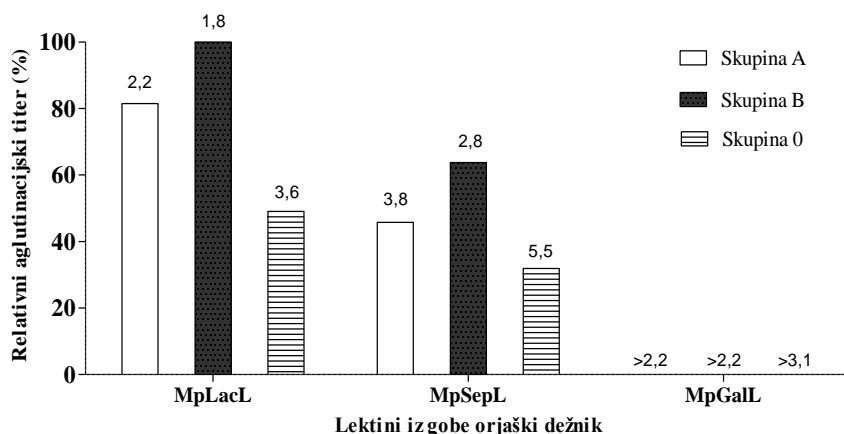
Za primerjavo izpeljanega aminokislinskega zaporedja MpL z zaporedji proteinov v podatkovnih bazah se je najbolje izkazal PSI-BLAST (38). Ugotovili smo, da izpeljano aminokislinsko zaporedje MpL kaže podobnost z nekaterimi glivnimi proteini, vključenimi v metabolizem sladkorjev, med njimi tudi nekaterimi lektini. Za vse te proteine je značilno, da vsebujejo lektinsko domeno ricinskega B tipa in kažejo nizko podobnost aminokislinskega zaporedja z MpL.

Izpeljano aminokislinsko zaporedje MpL smo analizirali še s programskima orodjema SMART in SUPERFAMILY, ki temeljita na modelu za prepoznavanje evolucijsko oddaljenih domen in članov proteinskih družin (44, 46). Ugotovili smo, da MpL vsebuje lektinsko domeno ricinskega B tipa, za katero so značilne tri različno ponavljajoče se homologne poddomene, imenovane α -, β - in γ -ponovitve, na vsaki pa je ohranjen motiv glutamin – katerakoli aminokislina – triptofan (QxW) (29). Pri MpL ni tako, saj v β -ponovitvi nima ohranjenega QxW motiva, vsebuje pa v zadnji, γ -ponovitvi, dva taka motiva (ni prikazano).

4.4 Biološki testi in ugotavljanje vezavnih značilnosti lektinov

4.4.1 Hemaglutinacijska aktivnost lektinov

Aglutinacijsko aktivnost izoliranih lektinov smo ugotavljali s hemaglutinacijskim testom na človeških eritrocitih krvnih skupin A, B in O. Rezultati so podani grafično na sliki 12. Pri MpLacL in MpSepL sta vidna podobna trenda specifičnosti za eritrocite in sicer sta kazala največjo specifičnost za eritrocite skupine B, nato A in O. Lektin MpGalL pri pogojih izvajanja testa ni aglutiniral nobene skupine eritrocitov.



Slika 12: Aglutinacija različnih tipov eritrocitov z lektini iz *M. procera*. Stolpci predstavljajo specifičnosti lektinov za A, B in O skupine človeških eritrocitov. Nad stolpci so podane najnižje koncentracije lektinov v μM , ki so še aglutinirale. Z znakom > so označene najvišje koncentracije lektinov, pri katerih ni prišlo do aglutinacije. Specifičnost lektinov za posamezne eritrocite smo izrazili v odstotkih kot relativni aglutinacijski titer (definiran pod točko 3.2.4.1.1), ki pomeni aglutinacijski titer za posamezne eritrocite, preračunan glede na titer aglutinacije eritrocitov krvne skupine B z MpLacL, ki predstavlja 100%.

4.4.2 Vezavne specifičnosti MpSepL in MpLacL za sladkorje in glikoprotein

Vezavne specifičnosti smo s testi inhibicije hemaglutinacije ugotavljali za MpSepL in MpLacL z aglutinacijskima koncentracijama 5,2 oziroma 2,9 μM , ki sta edina kazala močno hemaglutinacijo. Za inhibicijo smo uporabili sladkorje in glikoprotein asialofetuin po postopku, opisanem v poglavju 3.2.4.1.2. Izkazalo se je, da imata lektina podobni specifičnosti za ogljikove hidrate, in sicer je bila aglutinacija človeških eritrocitov skupine A najbolj inhibirana z glikani asialofetuin, nato z laktozo in galaktozo. Tem so sledili ostali sladkorji, za katere je bila vezavna specifičnost izraziteje nižja (preglednica VIII).

Preglednica VIII: Vezavne specifičnosti MpSepL in MpLacL za ogljikove hidrate, določene s testom inhibicije hemaglutinacije. Koncentracije sladkorjev in glikoproteina, pri katerih so izzvali inhibicijo aglutinacije, so podane v mg/ml oziroma v mM (vrednosti v oklepaju). Specifičnosti lektinov za inhibitorje so izražene kot odstotki titra inhibicije hemaglutinacije posameznega inhibitorja glede na titer inhibicije pri posameznem lektinu z asialofetuinom, ki predstavlja 100%. Relativni titer inhibicije hemaglutinacije je definiran pod točko 3.2.4.1.2.

| Sladkorni/glikoproteinski inhibitor | Najnižja inhibitorna koncentracija | | Relativni titer inhibicije hemaglutinacije (%) | |
|-------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|--|----------|
| | MpLacL | MpSepL | MpLacL | MpSepL |
| Asialofetuin | 0,0012 ($2,7 \times 10^{-3}$) | 0,0006 ($1,25 \times 10^{-5}$) | 100,0000 | 100,0000 |
| Laktoza | 0,0732 (0,214) | 0,0366 (0,107) | 1,7486 | 1,7540 |
| Galaktoza | 0,0771 (0,428) | 0,0386 (0,214) | 1,6602 | 1,6630 |
| Manoza | 39,4400 (219) | 9,8750 (54,8) | 0,0032 | 0,0065 |
| Fruktoza | 79,1000 (439) | 39,440(219) | 0,0016 | 0,0016 |
| Saharoza | 150,300 (439) | 74,960 (219) | 0,0009 | 0,0009 |
| Glukoza | 39,4400 (219) | 79,040 (438,6) | 0,0032 | 0,0008 |

4.4.3 Inhibicija hemaglutinacije z makrocipini in klitocipinom

S testi inhibicije hemaglutinacije smo ugotovili, da makrocipini (rMcp 1, 3 in 4) in klitocipin (rClt) inhibirajo hemaglutinacijski učinek MpLacL in MpSepL. Rezultati so podani v preglednici IX.

Preglednica IX: Inhibicija hemaglutinacije z makrocipini in klitocipinom. Uporabljeni so bili rekombinantni makrocipini 1, 3 in 4 ter klitocipin. V preglednici so predstavljene aglutinacijske koncentracije lektinov in najnižje koncentracije inhibitorjev, ki so inhibirale hemaglutinacijo. Podano je tudi njuno koncentracijsko razmerje.

| Inhibitor: μM (mg/ml) | Lektin: μM (mg/ml) | Koncentracijsko razmerje (inhibitor:lektin) |
|----------------------------------|--------------------------------|---|
| rMcp1 1,078 (0,021) | MpSepL 4,019 (0,064) | 0,268:1 |
| rMcp3 1,395 (0,026) | MpSepL 4,107 (0,065) | 0,340:1 |
| rMcp4 1,539 (0,029) | MpSepL 4,107 (0,065) | 0,375:1 |
| rClt 0,953 (0,016) | MpSepL 4,169 (0,066) | 0,229:1 |
| rMcp1 0,223 (0,004) | MpLacL 4,270 (0,068) | 0,052:1 |
| rMcp3 0,845 (0,016) | MpLacL 4,251 (0,067) | 0,199:1 |
| rMcp4 0,932 (0,017) | MpLacL 4,251 (0,067) | 0,219:1 |
| rClt 0,378 (0,006) | MpLacL 4,233 (0,067) | 0,089:1 |

5 Razprava

Glive so poleg svoje vloge v ekosistemu znane tudi po številnih biološko aktivnih substancah s protimikrobnim, imunomodulatornim, protivnetnim in protitumorskim delovanjem. Mednje spadajo tudi proteini, ki specifično vežejo različne ogljikove hidrate, imenovani lektini. Na Oddelku za biotehnologijo na Inštitutu Jožef Stefan se raziskovalci že nekaj časa ukvarjajo z lektini iz gobe meglenske (*Clitocybe nebularis*). Nedavno so s pomočjo afinitetne kromatografije iz izvlečkov plodišč izolirali nov lektin, imenovan *Clitocybe nebularis* lektin, ki spada v skupino ricinskih B lektinov in za katerega je bilo ugotovljeno imunomodulatorno delovanje (30). Omenjeni rezultati so nas privedli k odkrivanju in raziskovanju novih lektinov iz plodišč glive orjaški dežnik (*M. procera*).

5.1 Lektini iz plodišč glive orjaški dežnik

Iz plodišč glive orjaški dežnik smo s pomočjo afinitetne kromatografije izolirali več lektinov oziroma izolektinov. Po naših podatkih iz te glive še niso bili izolirani lektini. Pri izolaciji smo kot nosilec uporabili samo sefarozo (polisaharid), ki je služila za kontrolno afinitetno kromatografijo, ali sefarozo z vezanimi sladkorji: galaktozo, laktozo, glukozo ali saharozo. Pri slednjih dveh smo uporabili metodo zaporedne kromatografije, pri čemer smo nevezane frakcije po laktozil-sefarozni kromatografiji nanесли na glukozil- oziroma saharozil-sefarožno kolono. Na podlagi nosilca, uporabljenega pri izolaciji posameznega lektina, smo izolirane proteine tudi poimenovali. Metoda afinitetne kromatografije se je izkazala za učinkovit način izolacije lektinov iz kompleksne mešanice snovi po ekstrakciji plodišč. Ker so lektini v splošnem obstojni proteini, smo za elucijo lektinov s kolone namesto kompetitivne elucije s sladkorji uporabili NaOH in se s tem izognili kasnejšemu odstranjevanju na lektine vezanih sladkorjev.

Iz izvlečka plodišč orjaškega dežnika nam je tako uspelo izolirati sefarozil-specifični lektin (MpSepL), galaktozil-specifični lektin (MpGalL) in laktozil-specifični lektin (MpLacL), medtem ko z glukozil- in saharozil-sefarozo nismo uspeli izolirati proteinov. Lektine smo natančno biokemijsko okarakterizirali, s čimer smo želeli tudi ugotoviti, ali gre pri MpSepL, MpGalL in MpLacL za več lektinov ali za enega samega. Analiza z NaDS-PAGE je pokazala, da so proteini podobnih velikosti, z maso okoli 16 kDa, in da ne tvorijo

kovalentnih disulfidnih povezav, kar kaže na odsotnost cisteinov. Z masno spektrometrijo smo po dodatnem čiščenju z RP-HPLC določili natančne molekulske mase lektinov, in sicer smo pri MpSepL in MpGalL dobili dva vrhova z molekulskima masama 15831 in 15859 Da ter pri MpLacL en vrh z molekulsko maso 15831 Da. Dva vrhova v masnem spektru z različnima masama pri MpSepL in MpGalL sta lahko posledica heterogenosti lektinov, ki se kaže v raznolikosti primarne strukture in/ali različnih posttranslacijskih modifikacijah lektinov, zato sklepamo, da smo dobili dve izoobliki lektina. Izoelektrično fokusiranje MpSepL, MpGalL in MpLacL je pokazalo podobne izoelektrične točke glavnih lis lektinov pri pH okoli 4,4, opazimo pa lahko še šibkejše lise, ki tudi kažejo na heterogenost teh lektinov. Z gelsko filtracijo z metodo FPLC smo poskušali ugotoviti velikost lektinov v nedenaturirajočih pogojih in tako sklepati na morebitno tvorbo kvartarnih struktur z nekovalentnimi asociacijami. Tvorba oligomernih struktur je pri lektinih pomembna, saj omogoča multivalentnost oziroma prisotnost več vezavnih mest za sladkorje v primerih, ko ima podenota le eno vezavno mesto (12). Multivalentnost je odločilna pri izražanju določenih fizioloških učinkov, sproženih z zamreženjem glikoziliranih receptorjev na površini celice (47). Iz dobljenih rezultatov z gelsko filtracijo smo izračunali nenavadno nizke molekulske mase lektinov (1-2 kDa), ki so najverjetneje posledica podaljšanih retencijskih časov zaradi interakcij lektinov z nosilcem kolone Superdex, ki je sestavljen iz dekstrana (razvejan polimer glukoze) in agaroze (polimer iz enot galaktoze in anhidrogalaktoze). Teh interakcij kljub dodatku sladkorja v pufer za gelsko filtracijo nismo uspeli preprečiti, smo pa z večanjem koncentracije sladkorja v pufru uspeli nekoliko zmanjšati retencijske čase. Za lektine namreč velja, da imajo v primerjavi z mono- in disaharidi, katere smo uporabili v pufru za gelsko filtracijo, višje afinitete za kompleksne ogljikove hidrate, kot so polimeri pri Superdexu (12). Zaradi tega najverjetneje dodani sladkorji niso mogli uspešno tekmovati z nosilcem za vezavna mesta lektinov in tako niso preprečili interakcij.

Za karakterizacijo lektinov iz orjaškega dežnika in za načrtovanje začetnih oligonukleotidov, uporabljenih v nadaljnji molekularno-biološki analizi, smo lektinom določili delna aminokislinska zaporedja. Za MpSepL nam je uspelo določiti N-končno aminokislinsko zaporedje, ki se glede na iz cDNA izpeljano aminokislinsko zaporedje začne na petem mestu. Pri MpLacL nam to ni uspelo, kar kaže na to, da je N-konec proteina blokirano, in potrjuje njegovo napovedano acetiliranost. Zato smo lektin cepili s

tripsinom in določili dve notranji aminokislinski zaporedji. Pregled lastnosti izoliranih lektinov je prikazan v preglednici X. Na podlagi preglednice lahko hitro ugotovimo, da gre pri izoliranih lektinih za en sam protein, katerega smo poimenovali MpL (*Macrolepiota procera* lektin). V nekaterih primerih (molekulske mase, izoelektrični fokusiranje, aminokislinska zaporedja) pa lektin kaže heterogenost, zaradi česar lahko sklepamo, da je prisotnih več izolektinov.

Preglednica X: Primerjava biokemijskih lastnosti lektinov in njihovih vezavnih specifičnosti. Zvezdica (*) pomeni, da je ujemanje N-končnega aminokislinskega zaporedja MpSepL in notranjih zaporedij MpLacL z izpeljanim aminokislinskim zaporedjem MpL le delno.

| | MpSepL | MpGalL | MpLacL |
|--|--------------|--------------|--------|
| Ocenjene molekulske mase po NaDS-PAGE (kDa) | 16 | 16 | 16 |
| Izoelektrična točka (pH) | 4,4 | 4,4 | 4,4 |
| Retencijski čas po RP-HPLC (min) | 27,543 | 27,601 | 28,232 |
| Molekulske mase po ESI-MS (Da) | 15831, 15859 | 15831, 15859 | 15831 |
| Ujemanje dobljenih aminokislinskih zaporedij z iz cDNA izpeljanim aminokislinskim zaporedjem MpL | Da* | / | Da* |
| Aglutinacija eritrocitov različnih krvnih skupin | B>A>O | B>A>O | / |
| Specifičnost za asialofetuin (AF), laktozo (Lac) in galaktozo (Gal) | AF>Lac>Gal | AF>Lac>Gal | / |

5.2 Analiza gena in cDNA, ki kodirata lektin iz *M. procera* ter njegovega izpeljanega aminokislinskega zaporedja

S pomočjo molekularno-bioloških metod smo uspeli pridobiti gen *mpl* s promotorsko in terminatorsko regijo ter cDNA s celotnim odprtim bralnim okvirjem za kodiranje MpL. Zaporedja so pokazala podobnost z nekaterimi glivnimi proteini, udeleženi v metabolizmu sladkorjev. Nukleotidno zaporedje gena je sestavljeno iz štirih eksonov in treh intronov, pri čemer se nukleotidna zaporedja med introni in eksoni ujemajo z ohranjenimi mesti izrezovanja intronov, napovedanimi za evkariontske gene, to sta GTRNGY za 5'-mesto in YNYAG za 3'-mesto izrezovanja (48). Pri analizi promotorske regije smo ugotovili, da gen ne vsebuje zaporedja TATA, vendar smo z uspešno izolacijo lektinov (MpSepL in MpLacL), katerih določena delna aminokislinska zaporedja se pokrivajo z iz cDNA izpeljanim aminokislinskim zaporedjem MpL, na proteinskem nivoju dokazali, da se gen za lektin izraža. Poleg tega je znano, da samo določeni geni v glivah vsebujejo zaporedje TATA (49). Primerjava omenjenih aminokislinskih zaporedij (N-končnega aminokislinskega zaporedja MpSepL in notranjih zaporedij MpLacL) z iz cDNA

izpeljanim aminokislinskim zaporedjem MpL je pokazala, da se aminokislinska zaporedja pokrivajo, vendar pa se 3 aminokislinski ostanki razlikujejo, kar kaže na heterogenost lektina. Razlike lahko opazimo tudi na nukleotidnem nivoju med zaporedjema gena in cDNA.

Kodirajoče zaporedje cDNA se prepíše v 141 aminokislinsko dolgo polipeptidno verigo. Z uporabo internetnih orodij za proteomiko smo ugotovili, da je primarni translacijski produkt najverjetneje posttranslacijsko modificiran z izrezom metionina in acetilacijo serina na drugem mestu, ki sta v evkariontskih organizmih med najpogostejšimi, še posebej kadar je v aminokislinskem zaporedju serin na drugem mestu, kot je to pri našem proteinu (50). Izpeljano aminokislinsko zaporedje lektina brez metionina in z acetilacijo serina na drugem mestu ima molekulsko maso 15831,3 Da, ki ustreza masi v masnih spektrih MpSepL, MpGalL in MpLacL. Ena izmed alternativ izpeljanega aminokislinskega zaporedja zaradi genske heterogenosti, in sicer alternativa z izrezanim metioninom in acetilacijo na serinu, ima molekulsko maso 15859,4 Da, ki se tudi pojavi v masnih spektrih MpSepL in MpGalL. Genska heterogenost je pogosta pri gobjih lektinih, vključno z ricinu B podobnimi lektinimi (35). Heterogenost je lahko posledica polimorfizma ali pa prisotnosti genskih družin, ki kodirajo izolektine (51). Torej ima zrel MpL izrezan metionin, acetilno skupino na sledečem serinu in ne vsebuje cisteinov, kar se ujema s splošnim dejstvom, da imajo gobe nizko vsebnost aminokislinske žveplom (52). Analiza je pokazala tudi, da lektin ne vsebuje signalnega proteina in naj bi bil zato sintetiziran na prostih ribosomih, tako se izogne sekreciji in glikozilacijskemu mehanizmu preko endoplazemskega retikuluma – Golgijevega aparata. Po napovedih z orodji za proteomiko naj bi bil MpL sekretorni protein, ki se izloča po neklasični poti, kar je znano tudi za druge gobje lektine, recimo galektine (27).

Z algoritmom PSI-BLAST smo izpeljanemu aminokislinskemu zaporedju lektina MpL iskali podobnost z ostalimi proteini v podatkovnih zbirkah. MpL kaže podobnost predvsem z glivnimi proteini, ki vsebujejo lektinsko domeno ricinskega B tipa, ki je znana iz lektinskih domen toksičnih rastlinskih proteinov ricina in abrina (12). MpL kaže notranjo homologijo aminokislinskega zaporedja, ki se izraža v treh ponovitvah (α , β in γ) z bolj ali manj ohranjenimi QxW motivi. Poleg tega ima lektin ohranjene hidrofobne aminokislinske ostanke, ki so pri » β -trefoil« zvitju ricinskih B domen pomembni za tvorbo hidrofobnega

jedra (29). Tudi programsko orodje SUPERFAMILY, ki združuje proteine s skupnim evolucijskim prednikom (46), je lektin uvrstilo v naddružino ricinu B podobnih lektinov.

5.3 Biološke aktivnosti lektinov in njihove vezavne specifičnosti za ogljikove hidrate

Biološko aktivnost lektinov navadno preverjamo z aglutinacijskim testom na eritrocitih, pri čemer lahko lektini z vezavo glikanskih enot na površini celic zlepijo eritrocite. Vezavne specifičnosti lektinov za eritrocite različnih krvnih skupin ter za sladkorje in asialofetuin smo ugotavljali s testom hemaglutinacije oziroma testom inhibicije hemaglutinacije. Ugotovili smo, da MpSepL in MpLacL aglutinirata eritrocite vseh krvnih skupin, in sicer sta kazala največjo specifičnost za eritrocite B, sledijo eritrociti A in O. Lektin MpGalL pa pri koncentracijah, s katerimi smo izvajali test, ni aglutiniral eritrocitov nobene od krvnih skupin. Na podlagi specifičnosti za različne tipe eritrocitov lahko sklepamo na specifičnosti lektinov za glikanske enote, izražene na površini posameznih skupin eritrocitov. Lektina MpSepL in MpLacL torej kažeta največjo afiniteto za galaktozo, ki je končni del sladkorne determinante človeške krvne skupine B, sledi pa GalNAc, ki je končni del determinante skupine A (53). Pri testih inhibicije hemaglutinacije eritrocitov skupine A z MpSepL in MpLacL smo ugotovili, da oba lektina najmočneje inhibira, torej kaže zanju največjo afiniteto, asialofetuin, ki vsebuje razvejane verige ogljikovih hidratov Gal β 1–4GlcNAc in Gal β 1–4GalNAc, sledi laktoza (Gal β 1–4Glc) in nato galaktoza ter ostali. S tem smo tudi pokazali, da imata MpSepL in MpLacL večjo afiniteto do daljših in sestavljenih ogljikovih hidratov, ki vsebujejo enote galaktoze, kar je značilnost lektinov (12). Ugotovljene vezavne specifičnosti lektinov se ujemajo z metodami izolacije, pri katerih smo uporabili sefarozo (polimer iz ponavljajočih enot D-Gal β 1–4 3,6-anhidro-L-Gal) ali laktozo. Iz teh testov lahko ugotovimo, da lektina kažeta enako specifičnost za skupine eritrocitov in sladkorne komponente, iz česar lahko sklepamo, da sta MpSepL in MpLacL enaka lektina oziroma izolektina.

S testi aglutinacije smo ugotavljali tudi biološko aktivnost lektinov v interakciji z gobjimi inhibitorji proteaz, makrocipini in klitocipinom. Inhibitorje družine papainu podobnih cisteinskih proteaz delimo glede na strukturno podobnost na več skupin. Ena izmed teh skupin inhibitorjev so mikocipini, med katere spadajo makrocipini, izolirani iz plodišč glive orjaški dežnik (*M. procera*), z molekulskimi masami ~ 19 kDa, in klitocipin, izoliran

iz plodišč glive meglenke (*Clitocybe nebularis*), z molekulsko maso ~ 17 kDa. Dosedanji poskusi so pokazali, da med mikocipini in lektinom iz meglenke (*Clitocybe nebularis* lektin, CnL) prihaja do določenih interakcij; na primer klitocipin se je pri afinitetni kromatografiji izoliral skupaj s CnL. Biološki pomen teh interakcij so proučevali z ugotavljanjem vpliva lektina CnL na inhibitorno delovanje mikocipinov in izkazalo se je, da CnL ni kazal učinka na makrocipin 1 (31). V našem primeru pa smo iz orjaškega dežnika z afinitetno kromatografijo na sefarozi skupaj z lektini izolirali enega izmed makrocipinov, kar smo pokazali z imunodetekcijo s protitelesi proti makrocipinom (neobjavljeno). Ugotavljanje vpliva mikocipinov na biološko aktivnost lektinov iz orjaškega dežnika smo izvedli s testi inhibicije hemaglutinacije, pri katerih smo MpSepL in MpLacL predhodno inkubirali z mikocipini. Izkazalo se je, da so mikocipini inhibirali aglutinacijsko aktivnost lektinov, pri čemer sta največji učinek kazala Clt in Mcp1, sledita jima Mcp3 in Mcp4. Interakcije med mikocipini in lektini ter inhibitorni učinki mikocipinov na aglutinacijsko aktivnost lektinov bi lahko imeli določeno biološko vlogo v gobi, in sicer bi lahko bile interakcije med lektini in mikocipini pomembne pri sinergističnem delovanju teh proteinov v obrambi gobe pred predatorji in paraziti, saj so bili za te proteine ugotovljeni insekticidni učinki (35, 54). Poleg tega pa bi inhibitorni učinki mikocipinov lahko kazali na njihovo vlogo pri regulaciji aktivnosti lektinov v gobi.

6 Sklepi

V diplomskem delu smo pokazali, da goba orjaški dežnik (*Macrolepiota procera*) vsebuje lektine, ki so se po natančni analizi aminokislinskega in nukleotidnega zaporedja izkazali za izolektine. Lektin smo poimenovali *Macrolepiota procera* lektin (MpL).

Afinitetna kromatografija na sami sefarozi ali z vezano galaktozo in laktozo se je izkazala za hitro in učinkovito metodo izolacije lektina. Pokazali smo, da je uporaba NaOH uspešna tehnika za elucijo lektinov iz afinitetne kolone in da pri tem lektin ohrani aktivnost.

Z molekularno-biološkimi metodami smo pridobili nukleotidno zaporedje gena in mRNA oziroma cDNA, ki kodirata MpL. Analiza izpeljanega aminokislinskega zaporedja je pokazala, da lektin spada med ricinu B podobne lektine.

S testi hemaglutinacije in inhibicije hemaglutinacije s sladkorji smo ugotovili, da MpL kaže največjo specifičnost za ogljikove hidrate, ki vsebujejo galaktozo.

Dokazali smo tudi povezanost med MpL in mikocipini, gobjimi inhibitorji cisteinskih proteaz, in ugotovili, da le-ti inhibirajo aglutinacijsko aktivnost lektinov. To bi lahko kazalo na njihovo vlogo pri sinergističnem delovanju v obrambi gobe pred plenilci in paraziti, poleg tega pa bi inhibitorni učinki mikocipinov lahko kazali na njihovo vlogo pri regulaciji aktivnosti lektinov v gobi.

Predmet nadaljnjih raziskav bi lahko bile ostale biološke aktivnosti MpL in vloge lektinov v gobi.

7 Literatura

1. Deacon J.: Fungal Biology, MA: Blackwell Publishers, Cambridge, 2005.
2. Hawksworth D.L.: The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 2006; 95: 641–55.
3. Bruns T.: Evolutionary biology: a kingdom revised. *Nature* 2006; 443: 758–61.
4. Baldauf; Palmer, JD: Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90: 11558–11562.
5. Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M.: *Introductory Mycology*, 4. izdaja, John Wiley and Sons, New York, 1996: 28-33, 685.
6. Pereira JL, Noronha EF, Miller RN, Franco OL.: Novel insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential, *Letters in Applied Microbiology* 2007; 44: 573–81.
7. Raffaelli M., Thomas-Domenech J.M.: *Botanika*. Mladinska knjiga, Ljubljana, 1990: 96.
8. Raspor P. (ur.): *Biotehnologija – osnovna znanja*. BIA, d.o.o, Ljubljana, 1996: 95-111.
9. <http://web.bf.uni-lj.si/ag/botanika/gradiva/Pregled%20sistema.pdf>, 3.11.2010
10. Eisenreich W., Eisenreich D., Zimmer U.E., Handel A.: *Rastline in živali okrog nas*, DZS, Ljubljana, 1993.
11. Dwek R.A.: *Glcobiology: toward understanding the function of sugars*, *Chemical Reviews*, 1996; 96: 683-720.
12. Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Freeze H.H., Stanley P., Bertozzi C.R., Hart G.W., Etzler M.E. (eds.): *Essentials of glycobiology*, 2. izdaja, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2008.
13. Lee Y.C., Lee R.T.: *Carbohydrate-protein interactions: Basis of Glycobiology*, *Accounts of chemical research*, 1995; 28: 321-327.
14. Varki A.: *Biological roles of oligosaharides: all of the theories are correct*, *Glycobiology*, 1993; 3, 2: 97-130.
15. Sharon N., Lis H.: *History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules*, *Glycobiology*, 2004; 14, 10: 53R-62R.

16. Meyers R.A.: Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine, 2. izdaja, Willey-VCH Verlag, Weinheim, 2004: 953, 3253.
17. Perillo N.L., Marcus M.E., Baum L.G.: Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death, *Journal of Molecular Medicine*, 1998; 76, 6: 402-412.
18. Kocbek P., Kristl J.: Ciljan vnos učinkovin z uporabo lektinov – korak naprej v razvoju bioadhezivnih dostavnih sistemov, *Farmaceutski Vestnik*, 2006; 57: 162-168.
19. Peumans W.J., Van Damme E.J.M.: Lectins as plant defense proteins, *Plant Physiology*, 1995; 109: 347-352.
20. Vasconcelos I.M., Oliveira J.T.A.: Antinutritional properties of plant lectins, *Toxicon*, 2004; 44, 4: 385-403.
21. <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/lectins.html>, 3.11.2010
22. Swanson M.D., Winter H.C., Goldestein I.J., Markovitz D.M.: A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication, *The journal of biological chemistry*, 2010; 285, 12: 8646-8655.
23. Hoessli D.C., Ahmad I.: Mistletoe lectins: carbohydrate-specific apoptosis inducers and immunomodulators. *Current Organic Chemistry*, 2008; 12, 11: 918-925.
24. Gabius H.J.: Animal lectins, *European journal of biochemistry*, 1997; 243: 543-576.
25. Kilpatrick D.C.: Lectin-glycoconjugate interactions in health and disease, *Biochemical society transactions*, 2008; 36, 6: 1453-1456.
26. Guillot J., Kanska G.: Lectins in higher fungi, *Biochem Syst Ecol*, 1997; 25: 203-230.
27. Boulianne R.P., Liu Yi, Aebi M., Lu B.C., Kues U.: Fruiting body development in *Coprinus cinereus*: regulated expression of two galectins secreted by a non-classical pathway, *Microbiology*, 2000; 146: 1841-1853.
28. Imberty A., Mitchell E.P., Wimmerová M.: Structural basis of high-affinity glycan recognition by bacterial and fungal lectins. *Current Opinion in Structural Biology*, 2005; 15, 5: 525-534.
29. Hazes B.: The (QxW)(3) domain: a flexible lectin scaffold. *Protein Science*, 1996; 5, 8: 1490-1501.

30. Pohleven J, Obermajer N., Sabotič J., Anžlovar S., Sepčič 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
31. Mustar K.: Uporaba makrocipina iz gobe orjaški dežnik na trdnem nosilcu za izolacijo cisteinskih proteaz z afinitetno kromatografijo, diplomsko delo, Univerza v Ljubljani: Biotehniška fakulteta, 2009: 83.
32. Levi G., Teichberg V.I.: Isolation and physicochemical characterization of electrolectin, a beta-D-galactoside binding lectin from the electric organ of *Electrophorus electricus*, *Journal of Biological Chemistry*, 1981; 256, 11: 5735-5740.
33. Merrill C.R., Goldman D., Sedman S.A., Ebert M.H.: Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins, *Science*, 1981; 211, 4489: 1437-1438.
34. Möller E.M., Bahnweg G., Sandermann H., Geiger H.H.: A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues, *Nucleic Acids Research*, 1992; 20, 22: 6115-6116.
35. Pohleven J.: Biokemijske lastnosti lektina iz višje glive meglenke (*Clitocybe nebularis*) in njegova biološka aktivnost, Doktorska dizertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2009: 127 strani.
36. <http://sabina.anzlovar.com/calc/cadepco.cgi>, 3.10.2010
37. Hall T.A.: Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999; 41: 95-98.
38. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J.: Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990; 215, 3: 403-410.
39. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 3.10.2010
40. <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess?RQ=WELCOME>, 3.10.2010
41. Schug J. 2003. Using TESS to predict transcription factor binding sites in DNA sequence. V: *Current protocols in bioinformatics*. Baxevanis A. D. (ed.). New York, J. Wiley and Sons, Inc.: 2.6.1-2.6.15.
42. <http://expasy.org>, 3.10.2010

43. <http://smart.embl-heidelberg.de>, 3.10.2010
44. Letunic I., Doerks T., Bork P.: SMART 6: recent updates and new developments, *Nucleic Acids Research*, 2009; 37: D229-232.
45. <http://supfam.cs.bris.ac.uk/SUPERFAMILY>, 3.10.2010
46. Gough J., Karplus K., Hughey R., Chothia C.: Assignment of homology to genome sequences using a library of hidden markov models that represent all proteins of known structure, *Journal of Molecular Biology*, 2001; 313 (4): 903-919.
47. Brewer F.C.: Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002; 1572, 2: 255-262.
48. Kinghorn J. R.: Gene structure in eukaryotic microbes, Oxford, IRL Press, 1987: 93-139.
49. 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.
50. Polevoda B., Sherman F.: N^α-terminal acetylation of eukaryotic proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 2000; 275, 47: 36479-36482.
51. Van Damme E.J.M., Peumans W.J., Pusztai A., Bardocz S.: Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications, New York, John Wiley & Sons, Inc., 1998.
52. Senatore F., Dini A., Marino A., Schettino O.: Chemical constituents of some basidiomycetes, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1988; 45, 4: 337-345.
53. Kamerling J.P.: Comprehensive glycoscience, From chemistry to systems biology, *Biochemistry of Glycoconjugate Glycans; Carbohydrate-Mediated Interactions*, Volume 3, Elsevier, Amsterdam, 2007.
54. Sabotič J.: Karakterizacija mikocipinov izbranih vrst prostotrosnic z genskim in proteinskim inženirstvom, Doktorska dizertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2007: 201 strani.