

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SIMONA DAROVIC

**PRIPRAVA REKOMBINANTNIH SAHAROZIL IZOLEKTINOV IZ GOBE  
MEGLENKE (*CLITOCYBE NEBULARIS*) V *E. COLI* IN PRIMERJAVA  
NJIHOVIH BIOKEMIJSKIH LASTNOSTI**

**PREPARATION OF RECOMBINANT SUCROSE ISOLECTINS FROM  
CLOUDED AGARIC (*CLITOCYBE NEBULARIS*) IN *E. COLI* AND COMPARISON  
OF THEIR BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS**

Ljubljana, 2012

Diplomsko naložilo sem opravljala na Institutu »Jožef Stefan«, Odsek za biotehnologijo (B3), pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa, univ. dipl. kem. in somentorstvom dr. Jerice Sabotič, univ. dipl. mikrobiol. Določitve aminokislinskih zaporedij z Edmanovo metodo razgradnje je opravila dr. Adrijana Leonardi iz Odseka za molekularne in biomedicinske znanosti (B2) na Institutu »Jožef Stefan«.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se prof. dr. Janko Kosu, univ. dipl. kem., ki mi je omogočil opravljanje diplomske naloge na Institutu »Jožef Stefan«. Posebej se zahvaljujem dr. Jerici Sabotič, univ. dipl. mikrobiol., za vso pomoč in vodenje eksperimentalnega dela diplome. Za pomoč in spodbudo pri delu se zahvaljujem tudi dr. Juretu Pohlevnu, univ. dipl. biol., in vsem ostalim kolegom odseka B3.

### **Izjava**

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

Simona Darovic

Sestava diplomske komisije

Predsednik: prof. dr. Albin Kristl

Mentor: prof. dr. Janko Kos

Somentorica: dr. Jerica Sabotič

Članica: doc. dr. Alenka Zvonar

## VSEBINA

<b>VSEBINA .....</b>	<b>I</b>
<b>POVZETEK .....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>VI</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. GLIVE .....	1
1.1.1. Biološko aktivni proteini iz gob .....	2
1.1.2. Prostotrošnice ( <i>Basidiomycetes</i> ).....	3
1.1.3. Poprhnjena livka ( <i>Clitocybe nebularis</i> ) .....	3
1.2. GLIKOBIOLOGIJA .....	3
1.2.1. Lektini.....	4
1.2.1.1. Uporaba lektinov .....	7
1.2.2. Lektini iz gob.....	9
1.2.3. Lektini iz gobe megleinke ( <i>Clitocybe nebularis</i> ) .....	11
1.3. EKSPRESIJSKI SISTEM BAKTERIJE <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	12
<b>2. NAMEN DELA IN HIPOTEZA .....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>15</b>
3.1. MATERIALI IN OPREMA.....	15
3.1.1. Reagenti .....	15
3.1.2. Laboratorijska oprema .....	16
3.1.3. Biološki material .....	17
3.1.4. Gojišča .....	19
3.1.5. Pufri in raztopine .....	19
3.2. METODE .....	22
3.2.1. Priprava sistema za izražanje rekombinantnih saharozil izolektinov .....	22
3.2.1.1. Vstavitev restrikcijskih mest v kodirajoče zaporedje cDNA .....	22
3.2.1.2. Agarozna gelska elektroforeza .....	23
3.2.1.3. Čiščenje fragmentov cDNA iz zmesi PCR in restrikcija fragmentov cDNA ter plazmida pET-11a.....	24
3.2.1.4. Čiščenje kodirajočih fragmentov cDNA in lineariziranega plazmida pET-11a iz restrikcijskih zmesi .....	25

3.2.1.5. Priprava in pomnožitev ekspresijskih vektorjev .....	25
3.2.1.6. Priprava trajnih kultur <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ z vstavljenim vektorjem pET-11a z zapisom za posamezne saharozil izolektine .....	27
3.2.2. Priprava rekombinantnih saharozil izolektinov .....	28
3.2.2.1. Analiza aminokislinskih zaporedij izpeljanih iz cDNA .....	28
3.2.2.2. Priprava kompetentnih celic <i>E. coli</i> BL21(DE3) in njihova transformacija .....	28
3.2.2.3. Poskusno izražanje izolektinov rCnSL-ProA in rCnSL-A.....	29
3.2.2.4. Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata.....	30
3.2.2.5. Priprava saharozil izolektinov in raztpljanje inkluzijskih telesc .....	31
3.2.2.6. Preverjanje izločanja izolektinov rCnSL-ProA in rCnSL-ProB .....	32
3.2.2.7. Gelska filtracija .....	33
3.2.2.8. Ultrafiltracija .....	34
3.2.2.9. Dializa .....	34
3.2.2.10. Ionsko izmenjevalna kromatografija.....	35
3.2.2.11. Določanje koncentracije rekombinantnih saharozil izolektinov .....	37
3.2.3. Določanje biokemijskih lastnosti saharozil izolektinov .....	37
3.2.3.1. Prenos western in določitev N-končnih zaporedij rekombinantnih saharozil izolektinov.....	37
3.2.3.2. Primerjava saharozil izolektinov z metodama NaDS PAGE in BN PAGE .....	38
3.2.3.3. Izoelektrično fokusiranje.....	39
3.2.3.4. Cirkularni dikroizem .....	40
3.2.3.5. Afinitetna kromatografija .....	41
3.2.3.6. Hemaglutinacija in inhibicija hemaglutinacije.....	42
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>44</b>
4.1. Priprava sistema za izražanje rekombinantnih saharozil izolektinov.....	44
4.1.1. Vstavitev restrikcijskih mest v kodirajoče zaporedje cDNA .....	44
4.1.2. Restrikcija fragmentov cDNA ter plazmida pET-11a .....	45
4.1.3. Priprava in pomnožitev ekspresijskih vektorjev .....	46
4.2. Priprava rekombinantnih saharozil izolektinov.....	47
4.2.1. Analiza aminokislinskih zaporedij izpeljanih iz cDNA .....	47
4.2.2. Priprava in čiščenje rekombinantnega izolektina rCnSL-A.....	48

4.2.3.	Priprava in čiščenje rekombinantnega izolektina rCnSL-ProA .....	51
4.2.4.	Priprava in čiščenje rekombinantnega izolektina rCnSL-B .....	58
4.2.5.	Priprava in čiščenje rekombinantnega izolektina rCnSL-ProB .....	60
4.3.	Določanje biokemijskih lastnosti saharozil izolektinov .....	63
4.3.1.	Analiza N-končnih zaporedij rekombinantnih saharozil izolektinov .....	63
4.3.2.	Primerjava saharozil izolektinov z metodama NaDS PAGE in BN PAGE	64
4.3.3.	Izoelektrično fokusiranje .....	65
4.3.4.	Cirkularni dikroizem .....	66
4.3.5.	Afinitetna kromatografija .....	67
4.3.6.	Hemaglutinacija in inhibicija hemaglutinacije .....	68
<b>5.</b>	<b>RAZPRAVA .....</b>	<b>70</b>
<b>6.</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>78</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>79</b>
<b>8.</b>	<b>PRILOGE .....</b>	<b>86</b>

## POVZETEK

Gobe imajo ugodne prehranske in zdravilne lastnosti. Vsebujejo raznovrstne biološko aktivne substance s številnimi farmakološkimi in drugimi učinki. Ena izmed teh snovi so lektini, ki so raznolika skupina proteinov s sposobnostjo vezave ogljikovih hidratov. Goba megleinka (*Clitocybe nebularis*) vsebuje številne lektine, med katerimi je tudi za saharozo specifičen lektin. Slednji je na modelu vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) izkazoval visoko insekticidno aktivnost. S pridobitvijo različnih cDNA, ki kodirajo saharozil lektin, se je izkazalo, da genski zapis za saharozil lektin vsebuje zapis za 31 aminokislin dolg N-končni propeptid. S pomočjo bakterije *Escherichia coli* in vektorja pET-11a smo pridobili štiri rekombinantne saharozil izolektine, in sicer lektina rCnSL-A in rCnSL-B ter njuni oblici z N-končnim propeptidom rCnSL-ProA in rCnSL-ProB. Izolektine smo raztopili iz inkluzijskih telesc in jih očistili z gelsko filtracijo. Izolektin rCnSL-ProA smo čistili še s kationsko izmenjevalno kromatografijo. Istovetnost pripravljenih izolektinov smo preverili z določitvijo N-končnega zaporedja z Edmanovo metodo razgradnje. Pri tem se je izkazalo, da se je izolektin rCnSL-ProA med izražanjem v bakteriji *E. coli* procesiral, in sicer se mu je odstranilo 20 aminokislin dolgo N-končno zaporedje. Očiščenim rekombinantnim izolektinom smo določili biokemijske lastnosti in jih primerjali z naravnim saharozil lektinom. Naravni saharozil lektin in izolektini rCnSL-A, rCnSL-ProA ter rCnSL-ProB so monomeri, medtem ko izolektin rCnSL-B tvori višje strukture, najverjetneje dimere. Izoelektrična točka izolektina rCnSL-A je enaka naravnemu lektinu, izolektin rCnSL-B pa ima nižjo izoelektrično točko. Z analizo s cirkularnim dikroizmom smo pokazali, da je vsaj določen delež izolektinov po zvijanju iz inkluzijskih telesc dosegel aktivno konformacijo. Slednje smo potrdili z afinitetno kromatografijo. Vsi rekombinantni izolektini so se vezali na saharozil-sefarozo, kar pomeni, da N-končni propeptid ne vpliva na biološko funkcijo vezave saharoze. Naravni lektin je aglutiniral človeške eritrocite krve skupine B in kunčje eritrocite, medtem ko so izolektini rCnSL-ProA, rCnSL-B in rCnSL-ProB aglutinirali le kunčje eritrocite. Izolektin rCnSL-A ni izkazoval aglutinacijske aktivnosti. S testi inhibicije hemaglutinacije smo dokazali, da izolektini rCnSL-ProA, rCnSL-B in rCnSL-ProB vežejo saharozo, glukozo, fruktozo in manozo. Iz primerjave rekombinantnih izolektinov z naravnim saharozil lektinom sklepamo, da je naravni saharozil lektin heterogen. Sestavljen je iz več izolektinov, pri čemer verjetno prevladujejo izolektini skupine A.

## ABSTRACT

Mushrooms have good nutritional and medicinal properties. They contain various biologically active substances with numerous pharmacological and other effects. One of such substances is lectins, which are a diverse group of proteins that specifically bind carbohydrates. Mushroom clouded agaric (*Clitocybe nebularis*) contains a number of lectins, among which is also sucrose lectin, which shows high insecticidal activity on the model of fruit fly (*Drosophila melanogaster*). Different sucrose lectin encoding cDNA sequences were obtained, which revealed that genes of sucrose lectins encode for 31 amino acids long N-terminal propeptide. Using bacterial expression system with *Escherichia coli* and vector pET-11a we obtained four recombinant sucrose isolectins, namely lectins rCnSL-A and rCnSL-B and their forms with N-terminal propeptide rCnSL-ProA and rCnSL-ProB. Isolectins were dissolved from inclusion bodies and purified by gel filtration. Isolectin rCnSL-ProA was further purified by cation exchange chromatography. The identity of prepared isolectins was examined by determination of N-terminal sequences with Edman degradation method. This has proven that isolectin rCnSL-ProA was processed in bacteria *E. coli* by cleavage of 20 amino acids long N-terminal propeptide sequence. Biochemical properties of purified isolectins were determined and compared with the natural sucrose lectin. Natural sucrose lectin and isolectins rCnSL-A, rCnSL-ProA and rCnSL-ProB are monomers, while the rCnSL-B forms higher structures, probably dimers. Isoelectric point of rCnSL-A is the same as in the case of natural lectin, while rCnSL-B has a lower isoelectric point. Structural analysis with circular dichroism showed, that isolectins achieved active conformation after folding from inclusion bodies. This was confirmed by affinity chromatography. All recombinant isolectins bind to sucrose-sepharose, which means that N-terminal propeptide does not affect biological function of sucrose binding. Natural lectin agglutinated human erythrocytes type B and rabbit erythrocytes, while isolectins rCnSL-ProA, rCnSL-B and rCnSL-ProB agglutinated rabbit erythrocytes only. Isolectin rCnSL-A did not exhibit agglutinating activity. With the haemagglutination inhibition assay we have shown that isolectins rCnSL-ProA, rCnSL-B and rCnSL-ProB bind sucrose, glucose, fructose and mannose. From the comparison of recombinant isolectins with the natural one we conclude that the natural sucrose lectin is heterogeneous. It consists of several isolectins among which isolectins of group A are probably in majority.

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>[<math>\Theta</math>]<sub>mrw</sub></b>	eliptičnost aminokislinskega ostanka
<b>A</b>	absorbanca
<b>A<sub>0,1 %</sub></b>	absorbanca 0,1 % raztopine
<b>A<sub>280</sub></b>	absorbanca pri valovni dolžini 280 nm
<b>AK</b>	aminokislina
<b>APS</b>	amonijev persulfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )
<b>ASL</b>	lektin iz česna ( <i>Allium sativum</i> )
<b>BamHI-HF</b>	restriksijska endonukleaza bakterije <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> sev H, št. I
<b>BanLec</b>	lektin iz banane ( <i>Musa acuminata</i> )
<b>BisTris</b>	bis(2-hidroksietil)amino-tris(hidroksimetil)metan
<b>BLASTp</b>	orodje za iskanje logičnih poravnav aminokislinskih zaporedij
<b>BN PAGE</b>	modra nativna poliakrilamidna gelska elektroforeza
<b>bp</b>	bazni par
<b>c</b>	molarna koncentracija
<b>c<sub>i</sub></b>	najnižja inhibitorna koncentracija
<b>CD</b>	cirkularni dikroizem
<b>cDNA</b>	komplementarna DNA
<b>Clt</b>	klitocipin iz gobe megleinke ( <i>Clitocybe nebularis</i> )
<b>CnGallS</b>	galaktozil-specifični lektini iz gobe megleinke ( <i>Clitocybe nebularis</i> )
<b>CnGlcL</b>	glukozil-specifičen lektin iz gobe megleinke ( <i>Clitocybe nebularis</i> )
<b>CNL</b>	laktozil-specifičen lektin iz gobe megleinke ( <i>Clitocybe nebularis</i> )
<b>CnSepL</b>	sefarozil-specifčen lektin iz gobe megleinke ( <i>Clitocybe nebularis</i> )
<b>CnSucL</b>	naravni saharozil lektin iz gobe megleinke ( <i>Clitocybe nebularis</i> )
<b>dATP</b>	2'-deoksiadenozintrifosfat
<b>dCTP</b>	2'-deoksicitidintrifosfat
<b>dGTP</b>	2'-deoksigvanozintrifosfat
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>dNTP</b>	2'-deoksinukleozidtrifosfat(i)
<b>dTTP</b>	2'-deoxsitimidintrifosfat
<b>ɛ</b>	molarni absorpcijski koeficient

<b>EDTA</b>	etilendiamintetraacetat
<b>g</b>	gravitacijski pospešek (9,807 m/s <sup>2</sup> )
<b>GFRT</b>	lektin iz alg rodu <i>Griffithsia</i>
<b>GNA</b>	lektin iz malega zvončka ( <i>Galanthus nivalis</i> )
<b>gojišče LB</b>	gojišče Luria-Bertani
<b>gojišče LBA</b>	gojišče Luria-Bertani z dodanim ampicilinom
<b>gojišče S.O.C.</b>	obogateno gojišče »Super optimal broth with catabolite repression«
<b>HEPES</b>	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
<b>IEF</b>	izoelektrično fokusiranje
<b>IJS</b>	Institut »Jožef Stefan«
<b>IPTG</b>	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
<b>K<sub>d</sub></b>	disociacijska konstanta
<b>l</b>	dolžina kivete
<b>LMW</b>	nizka molekulska masa
<b>MLI</b>	lektin iz bele omele ( <i>Viscum album</i> )
<b>MM</b>	molekulska masa
<b>NaDS</b>	natrijev dodecil sulfat
<b>NaDS PAGE</b>	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS
<b>NCBI</b>	nacionalni center za biotehnološke informacije
<b>NdeI</b>	restriktijska endonukleaza bakterije <i>Neisseria denitrificans</i> št. I
<b>NEB</b>	biotehnološko podjetje »New England Biolabs«
<b>OD<sub>600</sub></b>	optična gostota pri valovni dolžini 600 nm
<b>PCR</b>	verižna reakcija s polimerazo
<b>pDNA</b>	plazmidna DNA
<b>PHA</b>	lektin iz navadnega fižola ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )
<b>pI</b>	izoelektrična točka
<b>PNA</b>	lektin iz arašida ( <i>Arachis hypogaea</i> )
<b>polimeraza Pfx</b>	polimeraza DNA s kontrolnim branjem
<b>PVDF</b>	poliviniliden difluorid
<b>rCnSL</b>	rekombinantni saharozil lektin iz gobe <i>Clitocybe nebularis</i>
<b>RNA</b>	ribonukleinska kislina
<b>sefariza SP</b>	sulfopropil sefariza
<b>TAE</b>	pufer Tris-acetat-EDTA

<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletilen diamin
<b>TET</b>	pufer Tris-EDTA-Triton X-100
<b>tricin</b>	N-(2-hidroksi-1,1-bis(hidroksimetil)etyl)glicin
<b>Tris</b>	2-amino-2-(hidroksimetil)propan-1,3-diol
<b>Triton X-100</b>	polietilen glikol-mono-[p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-fenil]eter
<b>UV</b>	ultravijolična svetloba
<b>WGA</b>	lektin iz pšeničnih kalčkov ( <i>Triticum vulgaris</i> )
<b><math>\Theta</math></b>	eliptičnost

### Okrajšave aminokislin

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

### Okrajšave nukleotidov

<b>A</b>	adenin
<b>C</b>	citozin
<b>G</b>	gvanin
<b>T</b>	timin
<b>U</b>	uracil

## 1. UVOD

### 1.1. GLIVE

Glive so evkariontski organizmi, ki se delijo na plesni, kvasovke in gobe. Telo pravih gliv je, z izjemo kvasovk, ki so enocelične glive, mnogocelična steljka. Ta je zgrajena iz nitastih filamentov, imenovanih hife, ki predstavljajo osnovno celično enoto gliv [1, 2]. Celice so obdane s plazemsko membrano, ki vsebuje ergosterol kot prevladujoči sterol, leto pa obdaja iz hitina zgrajena celična stena [3]. Posamezne hife se med seboj povezujejo in tvorijo preplet imenovan micelij ali podgobje [1]. Glive so heterotrofni organizmi, ki potrebujejo organske spojine drugih organizmov kot vir energije in ogljika za celično sintezo. Hrano pridobijo z absorpcijo majhnih, topnih organskih molekul [1, 2, 4]. Glede na način prehranjevanja so gniloživke ali saprofiti, zajedavke ali paraziti in simbionti [4, 5]. Saprofiti so organizmi, ki se hranijo z odmrlim organskim materialom. Pri tem v okolje izločajo številne encime, ki razgradijo kompleksne polimere, kot so škrob, celuloza, proteini, keratin in lignin [4]. Paraziti so rastlinski ali živalski patogeni, ki zajedajo druga živa bitja in izkoriščajo njihove snovi [5]. Simbionti tudi absorbirajo hranila iz živega gostitelja, vendar pa je takšen odnos koristen za oba partnerja. Lišaji in mikorize predstavljajo najpomembnejše primere simbiontskih gliv. Lišaj je simbiontska povezava glivnih hif s fotosintetskim partnerjem, ki je po navadi zelena alga ali cianobakterija [6], mikoriza pa je sožitje glive s koreninami rastlin [1, 7]. Glive imajo običajno haploidno jedro, kar jih razlikuje od ostalih evkariontov. Razmnožujejo se spolno in nespolno s sporami. Spore imajo dve glavni nalogi, in sicer širitev vrste in preživetje, dokler ne nastopijo ugodnejši pogoji za rast [4, 8].

Poznamo več kot 100 000 vrst gliv, mikologi pa ocenjujejo, da jih je na svetu približno 1,5 milijona [1]. Glive predstavljajo samostojno kraljestvo (*Fungi*), saj se od ostalih organizmov bistveno razlikujejo tako v celični organizaciji, kot v načinu prehranjevanja in razmnoževanja [4]. Kraljestvo gliv sestavlja dve skupini, in sicer glive sluzavke (*Myxomycota*) in prave glive (*Eumycota*). Prave glive obsegajo tiste vrste, ki imajo hife ali pa so z njimi v tesnem sorodu, imajo celične stene večji del življenskega ciklusa ali skozi celoten življenski ciklus ter se prehranjujejo izključno z absorpcijo. Glede na način spolnega razmnoževanja so prave glive razdeljene v razrede *Oomycetes*, *Chytridiomycetes*,

*Zygomycetes*, *Ascomycetes* in *Basidiomycetes*. Prave glive, ki nimajo spolne faze, uvrščamo v poseben razred *Deuteromycetes* oziroma med nepopolne glive [3].

### 1.1.1. Biološko aktivni proteini iz gob

Po definiciji Chang-a in Miles-a so gobe makroglive z značilnimi plodišči, ki so bodisi nadzemna ali podzemna in so vidna s prostim očesom [9]. Med gobe sodijo predvsem vrste iz razreda *Basidiomycetes* in tudi nekatere vrste iz razreda *Ascomycetes* [10]. Gobe so pomemben sestavni del človekove prehrane. Imajo ugodne hranilne lastnosti, ki so posledica visoke vsebnosti proteinov in vlaknin ter nizke vsebnosti maščob [11]. Vsebujejo številne farmakološko aktivne spojine, zaradi česar so se že od nekdaj uporabljale v tradicionalni orientalski medicini, v zadnjih desetletjih pa narašča tudi njihova uporaba v zahodnem svetu [12, 13]. Najbolj znane biološko aktivne spojine iz gob so polisaharidi, ki izkazujejo protitumorno in imunomodulatorno delovanje [14]. Poleg slednjih vsebujejo gobe številne sekundarne metabolite, kot so laktoni, triterpenoidi, seskviterpeni, alkaloidi, steroli, polifenoli in drugi metaboliti gob s farmakološkim delovanjem [12, 15]. Tretja skupina biološko aktivnih snovi iz gob so proteini [16].

Gobe vsebujejo številne proteine z raznoliko biološko aktivnostjo, kot so encimi, ki razgrajujejo lignin in celulozo, lektini, proteaze, inhibitorji proteaz, hidrofobini in proteini, ki inaktivirajo ribosome. Številni med njimi izkazujejo protibakterijsko, protivirusno, antioksidativno, protitumorno in imunomodulatorno delovanje, zaradi česar predstavljajo vir potencialnih zdravilnih učinkovin [16, 17]. Kemični insekticidi škodujejo okolju in človeškemu zdravju. Gobji proteini, ki delujejo toksično na žuželke in ogorčice, omogočajo okolju prijaznejšo zaščito rastlin. Uporabni so tudi v papirni, tekstilni, prehrambeni, kozmetični in farmacevtski industriji, pri proizvodnji energije iz obnovljivih virov, v kmetijstvu ter v bazičnih raziskavah [16]. Pomembna prednost gobjih proteinov je njihova stabilnost v širokem temperaturnem in pH območju, kar olajša njihovo uporabo na najrazličnejših področjih, in njihova edinstvenost, saj se pogosto razlikujejo od bakterijskih, rastlinskih in živalskih proteinov. Zaradi dolgoletne uporabe gob v prehrani veljajo proteini izolirani iz užitnih gob za varne [16, 17]. Kljub raznolikosti in uporabnosti gobjih proteinov jih je bilo izoliranih in ovrednotenih relativno malo, zaradi česar predstavljajo gobe neizkorisčen zaklad biološko aktivnih proteinov [16].

### 1.1.2. Prostotrosnice (*Basidiomycetes*)

Prostotrosnice so skupina gliv, ki vključuje okoli 16 000 znanih vrst in se delijo v štiri skupine. Dve skupini (*Hymenomycetes* in *Gasteromycetes*) obsegata makroglive oz. gobe, ostali dve pa obsegata rje (*Pucciniomycotina*) in sneti (*Ustilaginomycotina*), ki so znani rastlinski paraziti [3].

### 1.1.3. Poprhnjena livka (*Clitocybe nebularis*)

Poprhnjena livka ali meglenika (slika 1) je gniloživka, ki raste v velikih skupinah v listnatih in mešanih gozdovih, na jasah ali ob robu gozda. Pepelnato ali sajasto sivkast klobuk je na osredju temnejši. Ima tanko kožico, ki jo sprva pokriva droben belkast poprh, ki kmalu odpade. Klobuk je najprej izbočen, pozneje se splošči in ugrezne. Meso je belo, čvrsto in vlaknato, z močnim sladkobnim vonjem in kiselkastim okusom. Gosti in ozki lističi so svetlo rumene barve in poraščajo bet. Ta je čvrst, prožen, pri dnu odebelen in svetlejši od klobuka. Bet je pri mladi gobi poln, pozneje pa votel. Meglenka je pogojno užitna goba. Pri posameznikih lahko povzroči prebavne težave. Vsebovala naj bi toplotno neobstojne snovi, ki škodijo človeškim prebavilom in se pri višjih temperaturah popolnoma razkrojijo [5, 18, 19].



Slika 1: Goba meglenika (*Clitocybe nebularis*)

## 1.2. GLIKOBIOLOGIJA

Osrednja tema molekularne biologije je prenos biološke informacije DNA preko RNA na proteine. Organizmi, poleg nukleinskih kislin in proteinov, vsebujejo še dve skupini makromolekul, in sicer lipide in ogljikove hidrate [20, 21]. Biokemiki so sprva sklepali, da so ogljikovi hidrati pomembni zgolj zaradi vloge v energijskem metabolizmu in strukturne vloge, vendar so nadaljnje raziskave pokazale, da so nepogrešljivi tudi v razvoju, rasti, normalnem delovanju in preživetju organizmov [20, 22, 23]. Posledično se je razvila nova veja molekularne biologije, imenovana glikobiologija. Glikobiologija se ukvarja s kemijo ogljikovih hidratov oz. sladkorjev, njihovo biosintezo, razgradnjo in vlogo v bioloških procesih ter s proteinimi, ki prepoznavajo in vežejo ogljikove hidrate. Ogljikovi hidrati so v organizmih najpogosteje kovalentno vezani na proteine in lipide, ter kot taki tvorijo

glikoproteine in glikolipide, prisotni pa so tudi v prosti obliki [20, 23]. Vsi sladkorji, ki so prisotni v določenem tipu celic ali organizmu, tvorijo glikom. Slednjega proučuje glikomika. Glikom je veliko bolj kompleksen kot genom ali proteom [20]. Nukleinske kisline in proteini so namreč linearni polimeri, saj se lahko aminokisline in nukleotidi povezujejo zgolj na en način. Nasprotno so ogljikovi hidrati polimeri zgrajeni iz monosaharidov, ki nosijo številne funkcionalne skupine in se lahko med seboj povezujejo s številnimi glikozidnimi vezmi ter tvorijo razvejane polimere [20, 21]. Medtem ko lahko tri aminokisline tvorijo 27 različnih tripeptidov, lahko tri heksoze tvorijo kar 38 016 različnih trisaharidov [24].

Ogljikovi hidrati imajo širok spekter delovanja. Potrebni so za pravilno zvitje mnogih na novo sintetiziranih proteinov. Zagotavlja topnost glikoproteinov in njihov transport na mesto delovanja. Imajo zaščitno vlogo, saj lahko sladkorni del glikoproteina ščiti polipeptidno verigo pred proteazami. Glikozilacija lahko modulira interakcije glikoproteinov z ligandi. Tako na primer nekateri receptorji rastnih faktorjev pridobijo vezavne lastnosti šele po glikozilaciji. Ogljikovi hidrati imajo ključno vlogo v interakcijah in adheziji med celicami ter v interakcijah celic z zunajceličnim matriksom. Predstavlja tudi vezavno mesto za številne mikroorganizme [20, 22]. Njihov pomen v organizmu dokazuje tudi dejstvo, da se glikozilacija in struktura ogljikovih hidratov bistveno spreminja med embriogenezo in diferenciacijo celic, glikozilacija pa je spremenjena tudi pri patoloških procesih, kot je na primer maligna transformacija in revmatoidni artritis [21].

### 1.2.1. Lektini

Leta 1888 je Peter Hermann Stillmark v svoji doktorski disertaciji prvič opisal protein ricin iz semen ricinusa (*Ricinus communis*), ki aglutinira eritrocite. S tem je postavil temelje raziskovanja lektinov. V naslednjih letih so bili iz rastlin izolirani številni proteini s sposobnostjo aglutinacije eritrocitov. Zaradi svoje biološke aktivnosti so bili poimenovani hemaglutinini [25]. Izraz lektin je šele leta 1954 vpeljal William C. Boyd, in sicer za tiste hemaglutinine, ki razlikujejo med eritrociti različnih krvnih skupin. Ime izhaja iz latinskega izraza *legere*, ki pomeni izbrati ali pobrati [26]. Danes se poimenovanje lektin uporablja za proteine in glikoproteine z vsaj eno vezavno domeno brez katalitične aktivnosti, ki prepozna ter specifično in reverzibilno veže monosaharide ali oligosaharide

[27-29]. Lektini lahko vežejo proste sladkorje ali sladkorne enote polisaharidov, glikoproteinov ali glikolipidov, ki so bodisi prosti ali vezani v celični membrani [30]. V naravi so zelo razširjeni, prisotni so v virusih, arhejah, bakterijah, glivah, rastlinah in živalih [25, 29, 30].

Lektine lahko, na osnovi njihove strukture, razdelimo v štiri skupine, in sicer so to merolektini, hololektini, superlektini in himerolektini. Merolektini vsebujejo le eno domeno, ki veže sladkorje. Zaradi monovaletne narave niso sposobni aglutinirati celic. Hololektini so zgrajeni iz dveh ali več identičnih ali homolognih vezavnih domen za sladkorje, kar jim omogoča aglutinacijo celic in precipitacijo glikokonjugatov. Aglutinacija celic je namreč premreženje celic preko vezave multivalentnih lektinov s sladkorji na površini celic. Večina izoliranih lektinov spada med hololektine. Superlektini, enako kot hololektini, vsebujejo vsaj dve vezavni domeni, vendar pa te prepoznajo in vežejo strukturno različne sladkorje. Zadnja skupina so himerolektini, ki vsebujejo eno ali več vezavnih domen za sladkorje in domeno, ki izkazuje biološko aktivnost, ki je neodvisna od vezave ogljikovih hidratov. Himerolektini so glede na število sladkornih vezavnih mest lahko merolektini ali hololektini [27, 28, 30].

Interakcije med lektini in sladkorji so zelo specifične in jih lahko primerjamo z interakcijami med encimi in njihovimi substrati ali med protitelesi in antigeni [30, 31]. V vezavi lektina z ustreznim sladkorjem so udeležene zlasti številne vodikove vezi, ki jih omogočajo hidroksilne skupine ogljikovih hidratov. Med ogljikovim ogrodjem sladkorjev in nepolarnimi aminokislinsimi lektina se vzpostavijo hidrofobne interakcije. V vezavi lektina s sladkorji sodelujejo še elektrostatske interakcije in van der Waalsove vezi [20, 32]. Lektini lahko vežejo monosaharide in disaharide, vendar pa je njihova afiniteta do preprostih sladkorjev ( $K_d = 10^{-3}$ – $10^{-4}$  M;  $K_d = ([\text{lektin}] \cdot [\text{ogljikov hidrat}]) / [\text{kompleks}]$ ) mnogo manjša kot do kompleksnih oligosaharidov ( $K_d = 10^{-6}$ – $10^{-8}$  M). Slednji so prisotni v organizmih in predstavljajo naravne ligande letinov [28]. Dejstvo, da številni lektini vsebujejo več vezavnih mest za sladkorje, še dodatno okrepi interakcijo z njihovimi ligandi [20]. Specifičnost lektinov za različne ogljikove hidrate se lahko določa na več načinov. Najenostavnejši so inhibicijski testi, kot je inhibicija aglutinacije. Lektin veže določen sladkor, če ta prepreči z lektinom povzročeno aglutinacijo celic. Sladkor se namreč veže na lektin in mu tako onemogoči vezavo sladkorjev na površini celic ter s tem aglutinacijo. V

zadnjem času se bolj uporabljajo sladkorne mikromreže. Te omogočajo določanje specifičnosti lektinov za kompleksne oligosaharide, ki so prisotni v naravi [33]. Običajno so lektini specifični za skupino sladkorjev z neko strukturo in ne za en sam sladkor [28].

Biološka vloga lektinov je od nekdaj privlačila raziskovalce, ki se ukvarjajo z lektini v mikroorganizmih, rastlinah ali živalih [25]. Mikroorganizmi uporabljajo lektine na svoji površini za adhezijo na gostiteljeve celice in kolonizacijo tkiv [20, 26, 34]. Te interakcije so lahko patogene in vodijo v infekcijo ali pa gre za simbiotski odnos med mikroorganizmom in gostiteljem [20]. Mehanizem adhezije mikroorganizmov s pomočjo lektinov je lahko uporaben za razvoj antiadhezivne terapije infekcijskih bolezni [26]. Primer je lektin PNA iz arašida (*Arachis hypogaea*), ki inhibira vezavo bakterij rodu *Salmonella* na celice Caco-2. Bakterije rodu *Salmonella* in lektin PNA namreč prepoznaajo in vežejo isti sladkor na površini celic [35].

Lektini so bili prvič odkriti v rastlinah, kar je verjetno tudi razlog, da je večina izoliranih lektinov rastlinskih. Lektini so prisotni v vseh delih rastlin, pri čemer jih je največ v semenih, kar kaže na njihovo vlogo v shranjevanju hrani [33]. Služijo kot zaloga dušika, pomembni so pri pravilnem zvijanju glikoproteinov v endoplazemskem retikulumu in njihovemu transportu v Golgijev aparat. Lektini na koreninah rastlin omogočajo vzpostavitev simbiontskega odnosa z mikoriznimi glivami in bakterijami, ki vežejo dušik [27, 28]. Zelo pomembna je njihova vloga pri obrambi rastlin pred fitopatogenimi bakterijami, glivami, ogorčicami in žuželkami. Rastline nimajo razvitega imunskega odziva, zato služijo lektini kot obrambni mehanizem [27, 28, 30, 33]. Rastlinski lektini so eni najmočnejših naravnih insekticidnih proteinov [35]. Imajo izrazite negativne učinke na plodnost, rast, razvoj in preživetje žuželk [33]. Njihova toksičnost temelji na vezavi glikokonjugatov v prebavilih žuželk, vendar pa točen mehanizem delovanja še ni znan [27]. Vežejo se na glikozilirane površine epiteljskih celic ali glikozilirane encime v prebavnem traktu žuželk, nekateri lektini pa se iz prebavnega trakta absorbirajo in povzročajo sistemske učinke [27, 33]. Kemični insekticidi predstavljajo neposredno grožnjo okolju in človeškemu zdravju. Uporaba transgenih rastlin, ki izražajo insekticidne lektine in so zato odporne proti žuželkam, lahko zmanjša uporabo pesticidov [36]. Pripravljeni so bile že številne takšne transgene rastline, kot so pšenica, tobak, riž in krompir [29].

V živalih so bili lektini odkriti mnogo kasneje kot v rastlinah. Prisotni so v celotnem živalskem kraljestvu, tako pri nevretenčarjih, kot pri sesalcih [20]. Udeleženi so v interakcijah med celicami ter v interakcijah celic z zunajceličnim matriksom. Pomembno vlogo imajo v pravilnem zvijanju glikoproteinov in njihovemu transportu na mesto delovanja, v diferenciaciji celic in rasti večceličnih organizmov. Inducirajo lahko proliferacijo celic ali apoptozo, vključeni so v morfogenezo organov, metastaziranje tumorjev, sodelujejo v prirojenem imunskejem odzivu, cirkulaciji levkocitov in vnetju [20, 25, 30, 37].

#### **1.2.1.1. *Uporaba lektinov***

Lektini imajo zelo širok spekter aplikacij v glikobiologiji, biotehnologiji, biokemiji, farmaciji ter na številnih drugih področjih [30]. Zaradi sposobnosti specifične vezave sladkorjev so nepogrešljivo orodje za detekcijo, izolacijo in čiščenje glikokonjugatov ter za proučevanje njihove sinteze [25, 29]. Ker specifično vežejo sladkorje na površini celic, se lahko uporabljam za frakcioniranje celic, določanje njihovih površinskih lastnosti in ugotavljanje sprememb na celični površini tekom fizioloških in patoloških procesov [26, 30]. Eritrociti različnih krvnih skupin na površini izražajo različne sladkorje, zato lahko z lektini določamo krvne skupine [26]. Uporabni so tudi v klinični mikrobiologiji, kot diagnostični reagenti za identifikacijo in taksonomsko razvrščanje bakterij in virusov [34, 38].

Interakcije lektin-oligosaharid lahko izkoriščamo za ciljano dostavo učinkovin. Ciljanje dosežemo tako, da pripravimo konjugate učinkovin z lektini ali pa na površino nanodelcev, mikrodelcev ali liposomov pripnemo molekule lektina [30, 39]. Različne vrste celic imajo na površini različne sladkorje, vzorec glikozilacije pa je spremenjen tudi na obolenih celicah. Z uporabo lektinov tako dosežemo ciljano dostavo učinkovin v specifične celice in tkiva. Prednost uporabe z lektini konjugiranih učinkovin ali lektiniziranih dostavnih sistemov je tudi podaljšan čas zadrževanja na mestu absorpcije. Lektini lahko po vezavi na površino celice sprožijo citoinvazijo oz. endocitozo ali transcitozo, zato je uporaba takšnih dostavnih sistemov obetajoč pristop za povečanje absorpcije učinkovin z nizko biološko uporabnostjo [37, 39].

V zadnjem desetletju se veliko truda vлага v razvoj protitumornih učinkovin, ki delujejo specifično le na maligne celice. Med transformacijo normalnih celic v maligne pride med drugim tudi do spremembe vzorca glikozilacije na njihovi površini. Številni lektini vežejo in aglutinirajo zgolj maligne celice in se zato lahko uporablja v detekciji, diagnostiki, prognozi in terapiji rakavih obolenj [30, 37]. Pri terapiji raka lahko uporabimo netoksičen lektin, konjugiran s protitumorno učinkovino ali toksičen lektin, ki sam deluje na maligne celice [40]. Lektini imajo dva načina protitumornega delovanja, in sicer lahko stimulirajo protitumorni imunski odziv ali izzovejo apoptozo v malignih celicah [29, 37]. Ekstrakt iz bele omele (*Viscum album*), ki vsebuje lektin MLI, se uporablja za komplementarno terapijo raka dojke zlasti v Nemčiji in tudi druge v Evropi [40]. Lektin MLI aktivira naravne celice ubijalke, monocite in makrofage, poveča produkcijo citokinov in povzroči apoptozo določenih transformiranih celičnih linij [35, 37]. Kemoterapija in radioterapija rakavih obolenj povzročata poškodbe gastrointestinalnega trakta, diarejo in zmanjšano absorpcijo hrani. Nekateri lektini, kot je lektin PHA iz navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*), po peroralni aplikaciji spodbudijo rast epitelija v prebavnem traktu preko vezave slatkornih enot receptorjev za rastne faktorje. Ti lektini lahko zmanjšajo negativne stranske učinke konvencionalne terapije na prebavni trakt bolnikov [35].

Lektini se lahko izkoriščajo tudi v antivirusni terapiji okužb z živalskimi in človeškimi virusi, ki v ovojnici vsebujejo glikoproteine. Takšni virusi so na primer hepatitis B in C ter virus HIV-1 [41]. Pri infekciji z virusom HIV-1 se glikoprotein gp120, ki se nahaja v ovojnici virusa, veže na receptorske molekule na celicah CD<sub>4</sub>, čemur sledi fuzija virusa s celico. Številni lektini, kot je cianovirin-N iz alge *Nostoc ellipsosporum*, GNA iz malega zvončka (*Galanthus nivalis*), lektin BanLec iz banane (*Musa acuminata*), lektin GFRT iz alg rodu *Griffithsia* in actinohivin iz bakterije *Longispora albida*, vežejo sladkorne enote glikoproteina gp120 in preprečijo vstop virusa v celice. Lektini so tako potencialne učinkovine za razvoj vaginalnih in rektalnih mikrobicidov, ki preprečijo spolni prenos virusa [42, 43].

Lektini so prisotni v naši vsakodnevni prehrani. Zlasti rastlinski lektini so odporni proti razgradnji s prebavnimi encimi. Nekateri lektini so toksični in se lahko vežejo na glikozilirane celične membrane in proste glikokonjugate v prebavnem traktu ter tako spremenijo celično morfologijo in metabolizem. Spremenjena je lahko prebavna,

absorptivna in sekretorna funkcija prebavil ter delovanje prebavnih encimov [44, 45]. Najbolj so raziskani toksični učinki lektina PHA, zaradi številnih zastrupitev s premalo kuhanim fižolom. Lektin PHA povzroča diarejo, bruhanje in slabost [28]. Lektini se lahko iz prebavnega trakta tudi absorbirajo ter imajo sistemske učinke, kot so alergije, hipertrofija pankreasa in jeter, vpliv na sistemski metabolizem, itd. Zato je pri uporabi lektinov v najrazličnejše namene potrebno upoštevati njihovo potencialno toksičnost za ljudi [44, 45].

### 1.2.2. Lektini iz gob

Lektini se v gobah pojavljajo pogosteje in v večjih količinah kot v rastlinah [46, 47]. Prvi gobji lektin je leta 1910 odkril Ford v rdeči mušnici (*Amanita muscaria*) med raziskovanjem vzrokov za njeno toksičnost [46, 48]. Do danes so bili izolirani številni lektini iz gob razreda *Basidiomycetes* in *Ascomycetes*, vendar so kljub temu še vedno bistveno manj raziskani kot njihovi rastlinski in živalski analogi [46-50].

Pojavnost lektinov v gobah ni odvisna od sistematske razvrstitev, ampak je verjetno povezana s fiziologijo in načinom življenja posamezne vrste. Večina lektinov je bila izolirana iz plodišč, čeprav so prisotni tudi v podgobju. Izražanje lektinov se spreminja med razvojem plodišč, hkrati pa je pogosta različna vsebnost v posameznih strukturah plodišča, kot so klobuk, bet in lističi. Vsebnost lektinov v gobi je odvisna tudi od starosti plodišča ter časa in mesta nabiranja [47].

Gobji lektini so skupina proteinov oz. glikoproteinov z raznolikimi biokemijskimi lastnostmi. Nekateri so sposobni vezave mono- in disaharidov, medtem ko drugi vežejo le kompleksne oligosaharide [46, 48]. Specifični so predvsem za galaktozo, laktozo, fukozo in N-acetylgalaktozamin [50]. Gobji lektini imajo, tako kot njihovi rastlinski in živalski analogi, nizko afiniteto do vezave sladkorjev, ki se lahko poveča v primeru njihove multivalentnosti. Multivalentnost je lahko posledica več vezavnih mest na lektinu ali povezovanja lektinov v višje strukture. Običajno so zgrajeni iz dveh do štirih podenot, povezanih z nekovalentnimi vezmi, izolirani pa so bili tudi monomerni lektini. Molekulska masa gobjih lektinov znaša med 15 in 90 kDa, delež vezanih ogljikovih hidratov sega do 30 %, izoelektrična točka pa se običajno nahaja med pH 5 in 8. Stabilni so v širokem pH in

temperaturnem območju ter za svoje delovanje običajno ne potrebujejo kovinskih ionov [47, 48].

Gobji lektini so bili sprva razvrščeni na osnovi njihove specifičnosti, vendar pa specifičnost pogosto ni povezana z njihovo terciarno strukturo oz. s strukturo vezavnega mesta. Zaradi tega so danes glede na njihovo strukturo razvrščeni v šest družin. To so ricinu-B podobni lektini, galektini, lektini s strukturo  $\beta$ -propelerja, aktinoporinu podobni lektini, homologi cianovirina-N in glivni imunomodulatorni proteini [51].

Družina ricinu-B podobnih lektinov je najobsežnejša skupina gobjih proteinov, v katero sodi tudi lektin CNL iz gobe megleinke (*Clitocybe nebularis*) [52]. Vanjo so vključeni lektini z značilnim  $\beta$ -triperesnim vzorcem zvitja, ki je bil prvič opisan v podenoti B ricina iz semen ricinusa (*Ricinus communis*) [51]. Za galektine je značilno 130 aminokislin dolgo ohranjeno zaporedje, znotraj katerega je vezavno mesto za  $\beta$ -galaktozide. Galektini so najbolj razširjena skupina lektinov, saj so prisotni pri človeku, živalih, rastlinah, glivah in virusih [53]. Lektini s strukturo  $\beta$ -propelerja imajo simetrično strukturo iz 4 do 8 ponovitev štirih antipararelnih  $\beta$ -struktur, ki tvorijo obliko  $\beta$ -propelerja [54]. Družina aktinoporinu podobnih lektinov se imenuje tudi družina XCL, po predstavniku lektinu XCL iz rdečebetne polstenke (*Xerocomus chrysenteron*) [51]. Gre za lektine, ki vežejo N-acetylgalaktozamin in imajo podobno strukturo kot aktinoporini iz morskih vetrnic [55]. Homologi cianovirina-N so prisotni v bakterijah, rastlinah in glivah. Cianovirin-N je 11 kDa velik lektin s protivirusnim delovanjem, izoliran iz cianobakterije *Nostoc elipsosporum*. Za razliko od cianovirina-N, so njegovi gobji homologi brez disulfidnih vezi in imajo eno samo vezavno mesto, zaradi česar ne izkazujejo protivirusnega delovanja [56]. Glivni imunomodulatorni proteini so poznani tudi kot imunoglobulinom podobni lektini. Izolirani so bili iz gob razreda *Basidiomycetes*. Zanje je značilna nizka molekulska masa (13-15 kDa), človeškemu fibronektinu podobna terciarna struktura in imunomodulatorno delovanje [57]. Iz gob so bili izolirani tudi številni lektini, ki jih glede na njihovo strukturo ne moremo uvrstiti v nobeno od opisanih družin [51].

Raziskave gobjih lektinov so v veliki meri usmerjene v njihovo potencialno uporabnost v biotehnologiji in biomedicini, medtem ko je njihovi *in vivo* vlogi posvečene manj pozornosti [48]. Za gobje lektine so predlagali številne biološke vloge, vendar pa ni

neposrednih dokazov, ki bi podprtli katero izmed njih. Posledično biološka vloga lektinov v gobah še ni povsem razjasnjena, verjetno pa podobno kot pri rastlinah in živalih tudi v gobah lektini prevzemajo različne vloge. Ker so lektini v gobah prisotni v velikih količinah, verjetno predstavljajo zalogo hrani [46]. Poleg tega so vključeni v rast in morfogenezo gob, saj omogočajo kohezijo med hifami med razvojem plodišča. Sodelujejo tudi pri tvorbi struktur, s katerimi parazitske glive vdrejo v gostiteljeve celice [47, 48]. Številni gobji lektini so specifični za sladkorje, ki niso prisotni v gobah, kar nakazuje na njihovo vlogo pri interakcijah z drugimi organizmi [58]. Udeleženi so pri vzpostavitvi simbiontskih odnosov. Gobji lektini namreč prepoznačajo sladkorje v celični steni bakterij in tako tvorijo specifične interakcije v lišajih [46]. Odgovorni so tudi za specifično prepoznavo med glivami in rastlinami v zgodnjih stopnjah vzpostavitve mikorizne povezave [46-48, 50]. Gobji lektini, tako kot rastlinski, sodelujejo v obrambi gob pred objedanjem z žuželkami, ogorčicami in drugimi živalmi. Njihovo vlogo v obrambi dokazuje, poleg že omenjene specifičnosti za sladkorje, ki niso prisotni v gobah, tudi njihova celična lokalizacija. Večina iz plodišč izoliranih gobjih lektinov se nahaja v citoplazmi, kjer ne pridejo v stik z endogenimi sladkorji, ki so locirani v organelih in na površini celic. Na drugi strani pa je po zaužitju vsebina citoplazme v neposrednem stiku s prebavili fungivorov [58]. Gobji lektini so pogosto stabilni v širokem temperaturnem in pH območju ter v prisotnosti proteolitičnih encimov, kar jim omogoča ohranitev aktivnosti v prebavilih žuželk in ogorčic [48]. V prid obrambni vlogi gobjih lektinov govori tudi visoka vsebnost številnih lektinov v plodiščih, ki so najpogosteje napadene strukture s strani fungivorov, indukcija sinteze določenih lektinov po napadu fungivora in seveda njihovo toksično delovanje na žuželke in ogorčice. Njihova toksičnost se kaže kot upočasnjena rast in razvoj, zmanjšana plodnost in zmanjšano preživetje žuželk in ogorčic [58].

### 1.2.3. Lektini iz gobe meglenke (*Clitocybe nebularis*)

Vsako leto žuželke povzročijo velike izgube pridelka. Znano je, da žuželke hitro razvijejo odpornost na rutinsko uporabljane kemične insekticide, le-ti pa imajo škodljiv vpliv na okolje, zato je razvoj novih alternativnih insekticidov nujen [59]. V iskanju novih naravnih insekticidnih spojin so raziskovalci preverjali insekticidno delovanje ekstraktov plodišč gob na vinsko mušico (*Drosophila melanogaster*), pri čemer je meglenka (*Clitocybe nebularis*) izkazovala visoko aktivnost [60, 61]. Iz tega razloga so se raziskovalci Odseka

za biotehnologijo na IJS odločili iz megleinke izolirati lektine, ki so odgovorni za njen insekticidno delovanje [59].

Izkazalo se je, da vsebuje megleinka številne lektine z različno specifičnostjo za sladkorje. Z uporabo slatkornih afinitetnih kromatografij so iz nje izolirali glukozil-specifičen lektin CnGlcL, galaktozil-specifične lektine CnGalLs, sefarozil-specifična lektina CnSepL-1 in CnSepL-2, laktozil-specifičen lektin CNL ter saharozil-specifičen lektin CnSucL. V preglednici I so povzete njihove biokemijske lastnosti [52, 59].

**Preglednica I: Biokemijske lastnosti lektinov iz gobe megleinke [59]**

Lektin	MM iz SDS-PAGE	MM	Število podenot	pI
CnSepL-1	17	16,454	2	4,3
CnSepL-2	15	15,602	2	4,3
CnGlcL	31	29,648	2	5
CnGalLs	19; 17,5; 15,5	/	2	4,8
CNL	19	15,903	2	4,3
CnSucL	21	20,293	1	>9,3

Saharozil-specifičen lektin oz. saharozil lektin se od ostalih lektinov, izoliranih iz gobe megleinke, razlikuje v visoki izoelektrični točki in številu podenot. Izkazuje šibko aglutinacijsko aktivnost za človeške eritrocite krvne skupine A [52]. Na modelu vinske mušice je imel med vsemi izoliranimi lektini najbolj izraženo insekticidno delovanje z  $LC_{50}$   $5,5 \pm 0,6 \text{ } \mu\text{g/mL}$ . Raziskovalci so tudi ugotovili, da omenjeni lektin ni toksičen za številne človeške celične linije. Lektin CnSucL bi zaradi njegove aktivnosti lahko uporabljal kot naravno insekticidno sredstvo [59]. Z molekularno-biološkimi metodami so pridobili več zaporedij cDNA za saharozil-specifičen lektin, iz katerih so izluščili dve različici, in sicer A in B [62].

### **1.3. EKSPRESIJSKI SISTEM BAKTERIJE *ESCHERICHIA COLI***

V zadnjih desetletjih je gensko inženirstvo odrlo pot do uporabe rekombinantnih proteinov v terapevtske in komercialne namene, s tem pa se je povečala potreba po učinkovitih ekspresijskih sistemih [63]. O izbiri ekspresijskega sistema odločajo številni dejavniki, kot so nivo izražanja, biološka aktivnost in posttranslacijske spremembe rekombinantnega proteina, zahteve regulatornih organov in nenazadnje cena [64].

Bakterija *E. coli* je po Gramu negativna, fakultativno anaerobna bakterija, ki ne tvori spor [65]. Bila je prvi genetsko in molekularno biološko raziskan mikroorganizem, prva je bila spremenjena z genskim inženirstvom in podvržena proizvodnji rekombinantnih proteinov [63]. Danes je bakterija *E. coli* najpogosteje uporabljen prokariontski ekspresijski sistem. Njena priljubljenost je posledica kratkega generacijskega časa, hitre rasti do visokih celičnih gostot na preprostih, cenovno nezahtevnih gojiščih in visokega izkoristka pri proizvodnji rekombinantnih proteinov. Slednje je sposobna akumulirati do več kot 20 % mase vseh celičnih proteinov [66-71]. Zaradi dolgoletne prisotnosti v biotehnologiji je njena uporaba v proizvodnji terapevtskih proteinov sprejeta s strani regulatornih organov [70]. Rekombinantne proteine lahko pridobivamo v citoplazmi, v periplazmi, na celični površini ali v gojišču bakterije *E. coli*. Transport proteina v periplazmo, ki je prostor med notranjo in zunanjim membrano pri po Gramu negativnih bakterijah, usmerja N-končno signalno zaporedje, ki je med translokacijo odcepljeno. Pridobivanje proteinov v gojišču ali izražanje na površini bakterijske celice je zahtevno in težko dosegljivo [63, 64].

Uporaba bakterije *E. coli* v proizvodnji heterolognih proteinov ima tudi številne pomankljivosti. Visoko izražanje proteinov v citoplazmi bakterije *E. coli* pogosto vodi v nepravilno zvijanje in agregacijo proteinov v obliki inkluzijskih teles. Inkluzijska telesa sicer ščitijo proteine pred proteazami [68], vendar so pri zvijanju proteinov v aktivno konformacijo prisotne velike izgube, obstaja pa tudi možnost, da biološka aktivnost po zvijanju ne bo vzpostavljena [63, 66]. Mnogi evkariontski proteni imajo kompleksno terciarno in kvartarno strukturo ter zahtevajo številne posttranslacijske spremembe za oblikovanje nativne, biološko aktivne konformacije. Producija takšnih proteinov v bakteriji *E. coli* je zaradi odsotnosti posttranslacijskih sprememb problematična [69]. Rekombinantni proteini, pripravljeni v citoplazmi bakterije *E. coli* lahko ohranijo iniciacijski metionin, kar pogosto vpliva na imunogenost proizvoda. Ne-nazadnje predstavlja težavo tudi pomanjkanje mehanizmov za izločanje proteinov v gojišče in razgradnja rekombinantnih proteinov z bakterijskimi proteazami [64]. Danes se bakterija *E. coli* uporablja zlasti pri proizvodnji encimov za diagnostične in analitske namene ter pri proizvodnji terapevtskih proteinov, ki naravno niso glikozilirani ali pa glikozilacija ni potrebna za njihovo biološko aktivnost [63, 70]. Na tržišču so prisotni rekombinantni interferoni, antikoagulanti, inzulin, človeški rastni hormon in drugi hormoni pripravljeni v bakteriji *E. coli* [63].

## 2. NAMEN DELA IN HIPOTEZA

Raziskovaci Odseka za biotehnologijo na IJS so iz gobe megleinke (*Clitocybe nebularis*) izolirali za saharozo specifičen lektin, ki je zanimiv zaradi svoje insekticidne aktivnosti na ličinke vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) [59]. Z molekularno biološkimi metodami so pridobili veliko število cDNA za saharozil lektin, iz katerih so izluščili dve različici, in sicer A in B. Prevladajočega zaporedja naravnega lektina niso uspeli pomnožiti, vendar pa je zaporedje A bolj podobno naravnemu lektinu kot zaporedje B [62]. S pridobitvijo kodirajoče cDNA se je izkazalo, da gen za saharozil lektin vsebuje zapis za prolektin z N-končnim propeptidom.

Namen diplomske naloge je pripraviti štiri rekombinantne saharozil izolektine, in sicer rCnSL-A, rCnSL-ProA, rCnSL-B in rCnSL-ProB. Izolektin rCnSL-A sodi v skupino A, izolektin rCnSL-B sodi v skupino B, izolektina rCnSL-ProA in rCnSL-ProB pa sta njuna neprocesirana analoga z ustreznim N-končnim propeptidom. Rekombinantne saharozil izolektine bomo pripravili v ekspresijskem sistemu bakterije *E. coli* BL21(DE3) z uporabo vektorja pET-11a. Očistili jih bomo s tehnikami, kot je gelska filtracija in ionsko izmenjevalna kromatografija. Tako pripravljene saharozil izolektine bomo biokemijsko ovrednotili. Določili bomo njihovo velikost, izoelektrično točko, tvorbo kvartarnih struktur, zvitje v aktivno konformacijo, vezavo saharoze, hemaglutinacijsko aktivnost in njihovo specifičnost za preproste sladkorje. Rekombinantne izolektine bomo primerjali med seboj in z naravnim saharozil lektinom. Pri tem nas zanima tudi ali je saharozil lektin aktiven že v neprocesirani obliki oz. ali je za aktivnost potrebna odstranitev N-končnega propeptida.

Naša hipoteza je, da je saharozil lektin skupine A po svojih lastnostih bolj podoben naravnemu saharozil lektinu kot saharozil lektin skupine B.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. MATERIALI IN OPREMA

##### 3.1.1. Reagenti

<i>Proizvajalec</i>	<i>Reagenti</i>
Alkaloid Skopje, Makedonija	AgNO <sub>3</sub>
Amersham Biosciences, ZDA	označevalec velikosti »LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis«, sefariza SP
AppliChem, Nemčija	NaCl
Appolo Scientific, VB	IPTG
Carlo Erba, Italija	absolutni etanol, aceton, glicerol, HCl, KOH, NaOH, acetna kislina
Fermentas, Litva	nanašalni pufer »6× Loading Dye Solution«, označevalec velikosti »GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder«, označevalec velikosti »GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder«, označevalec velikosti »PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder«
Fluka, Nemčija	barvilo Ponceau S, 1-butanol, CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O, divinilsulfon, D-glukoza monohidrat, KCl, MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O, MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O, N,N'-metilen bisakrilamid, sahariza
GE Healthcare Švedska	Coomassie Brilliant Blue PhastGel Blue R-35, geli za izoelektrično fokusiranje »PhastGel IEF 3-9«, karboksimetil celuloza, nosilec »Sephacryl® S-200 High Resolution«, označevalec »IEF Broad pI Calibration Kit«
Invitrogen, ZDA	barvilo SYBR® Safe, nativni poliakrilamidni geli »Native PAGE™ Novex 4-16 % BisTris Gels«, označevalec velikosti »NativeMark™ unstained protein standard«
Kemika Zagreb, Hrvatska	bromfenol modro
Merck, Nemčija	HCHO, metanol, Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , sečnina, TEMED, Cl <sub>3</sub> CCOOH

Millipore, ZDA	membrana PVDF »Immobilon® Transfer membrane«
Pharmacia Fine Chemicals, Švedska sefaroha 4B	
Promega, ZDA	komplet »Wizard® Plus SV Minipreps Purification System«, komplet »Wizard® Plus SV Gel and PCR Clean-Up System«
Serva, Nemčija	agarosa, APS, citronska kislina, EDTA, glicin, HEPES, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , natrijev dodecil sulfat, tricin, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Tris, Triton X-100
Sigma Aldrich, ZDA	agar, ampicilin, BisTris, $\text{CaCl}_2$ , D-fruktoza, kazeinski hidrolizat (tripton), $\text{K}_2\text{CO}_3\text{O}_7$ , kvasni ekstrakt, D-manoza, $\text{MgCl}_2$ ,
Thermo Scientific, ZDA	Coomassie Brilliant Blue G-250

---

### 3.1.2. Laboratorijska oprema

- aparatura za agarozno elektroforezo: »Owl Easy Cast Mini Gel System« (modela B1A, B2), Termo Fisher Scientific, ZDA
- aparatura za fotografiranje gelov: Sistem UVItec, UVItec, Velika Britanija
- aparatura za NaDS PAGE : »Mini-Protean II®«, Bio-Rad, ZDA
- aparatura za nativno elektroforezo: »XCell SureLock™ Mini-Cell Electophoresis System«, Invitrogen, ZDA
- aparatura za PCR: »Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler«, Applied Biosystems, ZDA
- aparatura za prenos western: »Mini Trans-Blot System«, Bio-Rad, ZDA
- avtomatizirana aparatura za IEF: »PhastSystem«, Pharmacia, Švedska
- avtomsatske pipete (10 – 5000  $\mu\text{L}$ ): Eppendorf, Nemčija
- centrifuga: Eppendorf 5424, Eppendorf, Nemčija
- hlajene centrifuge: Eppendorf 5415 R, Eppendorf, Nemčija; Sorvall RC-5C Plus, Sorvall, ZDA; Rotina 380R, Andreas Hettich GmbH & Co., Nemčija
- centrifugalni filter: Amicon® Ultra-4, Millipore, ZDA
- centrifugirke (GSA, GS-3 in SS-34): Sarstedt, Nemčija
- dializna membrana: »MEMBRA-CEL® MWCO3500«, Serva, Nemčija
- hladilnik: Gorenje, Slovenija

- inkubator: Binder BD 115, Binder, Nemčija
- komora z laminarnim pretokom zraka: SC-R Labcaire, Velika Britanija
- magnetno mešalo: Rotamix SHP-10, Tehnica, Slovenija
- membrana za ultrafiltracijo: Omega 3K 12PK, Pall Corporation, ZDA
- mikrotitrská plošča: Nunclon Delta SI, Nunc, Danska
- mikrovalovna pečica: Zanussi ZM 21 MS, Zanussi, Italija
- napajalnik za elektroforezo: PowerEase 500, Invitrogen, ZDA
- naprava za določanje N-končnega aminokislinskega zaporedja: »Precise Protein Sequencing System 492«, PE Applied Biosystem, ZDA
- orbitacijski stresalnik: Vibromix 10, Tehnica, Slovenija
- pH-meter: Mettler Toledo Seven Easy, ZDA
- sonifikator: »Digital Sonifer W-450 D«, Branson, ZDA
- spektrofotometri: Lambda 25, PerkinElmer, ZDA; Lambda Bio, PerkinElmer, ZDA; NanoDrop ND-2000c, NanoDrop Technologies, ZDA
- spektropolarimeter CD: »CD Spectrometer AVIV 62A DS«, Aviv, ZDA
- sterilni filter (0,2 µm): Minisart, Sartorius, Nemčija
- stresalnik: Certomat, HK, B. Braun Biotech International, ZDA
- tehtnici: AND GH-252-EC, A&D Instruments, VB; Vibra AJH 4200CE, Shinko Denshi Vibra, Japonska
- termoblok: »TS1 Thermo Shaker«, Biometra, Nemčija
- transiluminator UV: »Visi-Blue™ VB-26«, UVP, ZDA
- ultrafiltracijska celica: Amicon 8400, Amicon, ZDA
- vibracijski stresalnik: Vibromix 10, Tehnica, Slovenija
- vodna kopel: WiseBath WB-11, Witeg, Nemčija
- zamrzovalnik (-20 °C): Gorenje, Slovenija
- zamrzovalnik (-80 °C): Sanyo MDF-53 V, Sanyo Electric Co., Japonska

### 3.1.3. Biološki material

#### a) cDNA z zapisom za izolektine rCnSL-ProA, rCnSL-B in rCnSL-ProB

Raziskovalci IJS so z metodami molekulskega kloniranja pridobili kodirajoče zaporedje za saharozil lektin. Pri tem so dobili več različic cDNA, ki so jih razdelili v skupini A in B. cDNA z zapisom za izolektin rCnSL-ProA je bila vstavljen v vektor pJET, medtem ko sta

bili cDNA z zapisom za izolektina rCnSL-B in rCnSL-ProB vstavljeni v ekspresijski vektor pET-11a [62]. Plazmidi z vključki so bili shranjeni pri -20 °C.

**b) Naravni saharozil lektin**

Naravni saharozil lektin z oznako CnSucL so raziskovalci IJS izolirali iz gobe meglenke (*Clitocybe nebularis*) z uporabo saharozne afinitetne kromatografije [52]. Vzorci s koncentracijo 3,1 mg/mL so bili shranjeni pri -20 °C.

**c) Encimi**

- polimeraza DNA s kontrolnim branjem Platinum® *Pfx* (Invitrogen, ZDA)
- restriktijski endonukleazi *NdeI* in *BamHI-HF* ter pufer 10× NEB4 (New England Biolabs, ZDA)
- ligaza DNA T4 in 10× pufer za ligazo DNA T4 (New England Biolabs, ZDA)

**d) Deoksinukleozid-trifosfati**

dATP, dCTP, dGTP in dTTP [100 mM] (New England Biolabs, ZDA)

**e) Ekspresijski plazmid pET-11a**

pET-11a je eden najuspešnejših plazmidov za izražanje rekombinantnih proteinov v bakteriji *E. coli*. Vsebuje replikacijsko zaporedje (ori), gen za odpornost proti ampicilinu, številna restriktijska mesta in pozni bakteriofagni promotor T7. Izražanje proteinov poteka le v bakterijskih sevih s kromosomskim zapisom za polimerazo RNA T7 pod nadzorom IPTG inducibilnega promotorja *lacUV5*. V vektor je vstavljen tudi gen *lacI* za represorski protein LacR, ki z vezavo na operator operona *lacUV5* prepreči konstitutivno prepisovanje polimeraze RNA T7 in s tem proteina [63, 66].

**f) Bakterijski sevi**

- *E. coli* DH5α sev K12 (Invitrogen, ZDA)
- *E. coli* BL21(DE3) (Novagen ZDA), ki smo ga uporabili za izražanje izolektinov, saj ima v kromosому zapis za polimerazo RNA T7

**g) Začetni oligonukleotidi**

Začetne oligonukleotide (preglednica II) so proizvedli v podjetju Thermo v Nemčiji.

**Preglednica II: Nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov**

V preglednici so podprtana restriktijska mesta za restriktijski endonukleazi *NdeI* in *BamHI-HF*.

Oznaka	Nukleotidno zaporedje 5'→3'
rProCnSL-A-NdeI-F	GGGC <u>CATATGGCAGCATTTCTCTTGTGTTTC</u>
rCnSL-A-NdeI-F	AAAC <u>CATATGGTGAACCCAATCTACCGGGGCCA</u>
rCnSL-A-BamHI-R	ATT <u>GGATCCTCATCATCAGTGTCCCCAAGTCTGGGAGTC</u>

**h) Eritrociti**

Človeško kri krvnih skupin A, B in O nam je priskrbela doc. dr. Nataša Obermajer iz Odseka za biotehnologijo na IJS, kunčjo kri pa smo pridobili iz Biotehniške fakultete, Oddelka za zoologijo na Rodici.

**3.1.4. Gojišča**

- tekoče gojišče LB: 1 L gojišča vsebuje 5 g kvasnega ekstrakta, 10 g kazeinskega hidrolizata in 10 g NaCl. Gojišče avtoklaviramo 20 min pri 121 °C in tlaku 2,1 bar.
- tekoče gojišče LBA: Pripravimo ga iz sterilnega tekočega gojišča LB, ki mu aseptično dodamo 100 µg ampicilina na mL gojišča.
- trdno gojišče LBA: 1 L gojišča vsebuje 5 g kvasnega ekstrakta, 10 g kazeinskega hidrolizata, 10 g NaCl in 15 g agarja. Gojišče avtoklaviramo 20 min pri 121 °C in tlaku 2,1 bar. Ko se gojišče ohladi na 50 °C – 55 °C mu dodamo 100 µg ampicilina na mL gojišča in ga vlijemo v sterilne petrijevke.
- tekoče gojišče S.O.C.: 2 % (m/v) kazeinski hidrolizat, 0,5 % (m/v) kvasni ekstrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glukoza. Gojišče filtriramo skozi sterilni filter s porami velikosti 0,2 µm.

**3.1.5. Pufri in raztopine**

**a) Pufri in raztopine za pripravo kompetentnih celic**

- raztopina TBCa: 10 mM HEPES, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, pH 6,7. Raztopino pripravimo tako, da v ustreznom volumnu sterilne dH<sub>2</sub>O raztopimo HEPES, CaCl<sub>2</sub> in KCl ter uravnamo pH z raztopino KOH. Nato dodamo še MnCl<sub>2</sub> in sterilno filtriramo.
- raztopina TBCaG: TBCaG je raztopina TBCa s 15 % glicerola.

**b) Pufri in raztopine pri NaDS PAGE**

- pufer za koncentracijski gel: 1,5 M Tris-HCl, pH 6,8. Pufer avtoklaviramo in shranimo v hladilniku.
- pufer za ločevalni gel: 0,5 M Tris-HCl, pH 8,8. Pufer avtoklaviramo in shranimo v hladilniku.
- elektroforezni pufer: 29 g Tris, 144 g glicin, 10 g NaDS, do 1L dH<sub>2</sub>O, pH 8,3
- nanašalni pufer za NaDS PAGE: 2,5 mL pufer za koncentracijski gel, 2,0 mL glicerol, 4,0 mL 10 % raztopina NaDS, bromfenol modro, 1,5 mL dH<sub>2</sub>O.

- 10 % (m/v) raztopina NaDS
- 10 % (m/v) raztopina APS
- 0,1 % raztopina Coomassie Brilliant Blue: 5 uprašenih tablet Coomassie Brilliant Blue PhastGel Blue R-350, 200 mL dH<sub>2</sub>O, 800 mL etanol. Raztopino filtriramo.
- 10 % razbarvalna raztopina: 10 % (v/v) etanol, 5 % (v/v) ocetna kislina
- 30 % razbarvalna raztopina: 30 % (v/v) etanol, 10 % (v/v) ocetna kislina
- razvijalna raztopina: 28,5 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,5 mL HCHO, do 1 L dH<sub>2</sub>O
- vodna raztopina K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> s koncentracijo 1 g/L
- vodna raztopina AgNO<sub>3</sub> s koncentracijo 2 g/L

**c) Pufri in raztopine pri prenosu western**

- pufer za prenos western: 3 g Tris, 5,8 g glicin, 200 mL metanol, do 1 L dH<sub>2</sub>O
- raztopina za barvanje pri prenosu western: 500 µL ocetna kislina, 0,05 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 20 mL metanol, 30 mL dH<sub>2</sub>O
- razbarvalna raztopina: 50 % (v/v) metanol

**d) Dializni pufri**

- dializni pufer 1: 0,05 M Tris-HCl, 1,5 M sečnina, 0,15 M NaCl, pH 7,5
- dializni pufer 2: 0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,5
- dializni pufer 3: 0,05 M Tris-HCl, 1,5 M sečnina, 0,15 M NaCl, pH 6,5
- dializni pufer 4: 0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 6,5
- dializni pufer 5: 0,02 M Tris-HCl, 1,5 M sečnina, 0,3 M NaCl, pH 7,5
- dializni pufer 6: 0,02 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl, pH 7,5

**e) Pufri pri ionsko izmenjevalni kromatografiji**

Fosfatni pufer smo pripravili iz NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O in Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O

- začetni pufer 1: 50 mM fosfatni pufer, pH 7,0
- gradientni pufer 1: 50 mM fosfatni pufer, 0,3 M NaCl, pH 7,0
- končni pufer 1: 50 mM fosfatni pufer, 1 M NaCl, pH 7,0
- začetni pufer 2: 50 mM fosfatni pufer, 3 M sečnina, pH 7,0
- gradientni pufer 2: 50 mM fosfatni pufer, 3 M sečnina, 0,3 M NaCl, pH 7,0
- končni pufer 2: 50 mM fosfatni pufer, 3 M sečnina, 1 M NaCl, pH 7,0

**f) Pufri in raztopine pri BN PAGE**

- 20× katodni dodatek: 0,2 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL dH<sub>2</sub>O
- nanašalni pufer BN PAGE: 0,418 g BisTris, 53,5 µL 12 M HCl, 4 g glicerol, 0,117 g NaCl, 0,4 mg Ponceau S, do 10 mL dH<sub>2</sub>O

- 20× osnovni pufer: 10,46 g BisTris, 8,96 g tricin, do 50 mL dH<sub>2</sub>O
- anodni pufer: 35 mL 20× osnovni pufer, do 700 mL dH<sub>2</sub>O
- katodni pufer: 10 mL 20× osnovni pufer, 10 mL 20× katodni dodatek, do 200 mL dH<sub>2</sub>O
- dodatek G-250: 5 % (m/v) Coomassie Brilliant Blue G-250
- fiksirna raztopina: 40 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) acetna kislina

**g) Raztopine pri IEF**

- razbarvalna raztopina IEF: 30 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) acetna kislina
- 20 % (v/v) triklorocetna kislina
- raztopina za barvanje pri IEF: 4 mL 0,1 % raztopina Coomassie Brilliant Blue in 36 mL raztopina, ki vsebuje 0,1 % (m/v) CuSO<sub>4</sub>, 30 % (v/v) metanol in 10 % (v/v) acetna kislina

**f) Pufri in raztopine pri afinitetni kromatografiji**

- 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 20 % (m/v) saharoza v 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- 200 mM fosfatni pufer, pH 5,7
- vezavni pufer A: 20 mM Tris-HCl, 0,4 M NaCl, pH 7,0
- vezavni pufer B: 20 mM BisTris-HCl, 0,4 M NaCl, pH 6,0
- nevtralizacijski pufer: 2 M Tris-HCl, pH 6,5
- shranjevalna raztopina: 2 M NaCl

**g) Pufri in raztopine pri hemaglutinacijskih testih**

- eritrocitni pufer: 0,02 M Tris-HCl, 0,13 M NaCl, pH 7,4
- pufer za shranjevanje eritrocitov: 110 mM glukoza, 72 mM NaCl, 27 mM trinatrijev citrat, 2,6 mM citronska kislina, pH 6,1
- različne koncentracije raztopin glukoze, fruktoze, manoze in saharoze v dH<sub>2</sub>O (1 M, 0,5 M, 0,25 M, 0,13 M, 63 mM, 31 mM)

**h) Ostali pufri**

- pufer TAE: 0,04 M Tris-acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0
- pufer TET: 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, pH 7,5
- pufer za gelsko filtracijo: 0,02 M Tris-HCl, 3 M sečnina, 0,3 M NaCl, pH 7,5
- pufer za cirkularni dikroizem: 10 mM fosfatni pufer, pH 6,5

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Priprava sistema za izražanje rekombinantnih saharozil izolektinov

##### 3.2.1.1. Vstavitev restrikcijskih mest v kodirajoče zaporedje cDNA

Verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction, PCR) je metoda molekularne biologije, s katero pomnožimo željen fragment DNA. V plazmidu pJET je bilo vstavljeni zaporedje, ki kodira izolektin rCnSL-ProA [62]. Z uporabo PCR smo s pomočjo začetnih oligonukleotidov vključek pomnožili in vanj vnesli restrikcijska mesta za restriktazi *NdeI* in *BamHI-HF*. Za vnos restrikcijskih mest za restriktazi *NdeI* in *BamHI-HF* smo se odločili, ker restriktazi ne cepita kodirajoče cDNA, vendar pa na pravih mestih cepita ekspresijski vektor pET-11a, v katerega smo želeli vstaviti cDNA. Pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov smo upoštevali, da se načrtujejo v smeri 5'→3', in da morajo na 5' koncu pred restrikcijskim mestom vsebovati še tri bazne pare, ki omogočajo učinkovito vezavo restrikcijske endonukleaze. Pri protismiselni začetniku rCnSL-A-BamHI-R smo na koncu kodirajočega zaporedja vključili tri stop kodone (preglednica II, priloga 1). Smiseln začetnik rProCnSL-A-NdeI-F vnese restrikcijsko mesto za restriktazo *NdeI* pred zapis za propeptid, medtem ko smiseln začetnik rCnSL-A-NdeI-F vnese restrikcijsko mesto za restriktazo *NdeI* za zapis za propeptid. Izvedli smo tri reakcije PCR (preglednica III) in tako pomnožili kodirajoči cDNA z zapisom za izolektina rCnSL-A in rCnSL-ProA. V preglednicah IV in V so navedeni reagenti in pogoji pri reakcijah PCR. Uporabili smo polimerazo DNA s kontrolnim branjem Platinum® *Pfx*, ki poleg polimerazne aktivnosti vsebuje še 3'→5' eksonukleazno aktivnost in s tem zagotavlja večjo natančnost pomnoževanja. Reakcije smo izvedli v aparaturi za PCR (»Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler« Applied Biosystems, ZDA).

Oba vključka, tako z zapisom za izolektin rCnSL-ProA kot za izolektin rCnSL-A, sta po pomnoževanju vsebovala restrikcijska mesta za restriktazi *NdeI* in *BamHI-HF* ter kodirajoče nukleotidno zaporedje cDNA.

Preglednica III: Reakcije PCR

Reakcija PCR	Smiseln začetnik	Protismiselni začetnik	Produkt
PCR1	rProCnSL-A-NdeI-F	rCnSL-A-BamHI-R	cDNA za rCnSL-ProA
PCR2	rCnSL-A-NdeI-F	rCnSL-A-BamHI-R	cDNA za rCnSL-A
PCR3	rCnSL-A-NdeI-F	/	/

Preglednica IV: Reagenti v reakcijah PCR

Reagent	Volumen [ $\mu$ L]
10× ojačevalni pufer za polimerazo DNA Platinum <i>Pfx</i>	5
zmes dNTP-jev [vsak 1,25 mM]	3,6
MgSO <sub>4</sub> [50 mM]	1
pJET z vstavljeni kodirajoči cDNA	1
smiseln začetnik (rProCnSL-A-NdeI-F ali rCnSL-A-NdeI-F)	1,5
protismiseln začetnik (rCnSL-A-BamHI-R)	1,5
polimeraza DNA Platinum® <i>Pfx</i> [2,5 U/ $\mu$ L]	0,4
sterilna dH <sub>2</sub> O	36

Preglednica V: Pogoji reakcij PCR

Stopnja reakcije PCR	Pogoji	
začetna denaturacija DNA	94 °C, 5 min	
denaturacija DNA	94 °C, 15 s	25 ciklov
podaljševanje verige DNA	68 °C, 45 s	
zaključek reakcije	4 °C, $\infty$	

### 3.2.1.2. Agarozna gelska elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza se uporablja v biokemiji in molekularni biologiji za ločevanje molekul DNA in RNA. Razmerje med nabojem in dolžino je pri vseh nukleinskih kislinah enako, zato se molekule ločujejo zgolj glede na velikost, pri čemer manjše molekule potujejo skozi pore agaroznega gela hitreje kot večje.

S pomočjo agarozne gelske elektroforeze smo analizirali produkte verižne reakcije s polimerazo. Pripravili smo 1 % (m/v) agarozni gel tako, da smo agarozo s segrevanjem raztopili v pufru TAE. Raztopini smo primešali barvilo SYBR® Safe (Invitrogen, ZDA) v končni koncentraciji 0,01 % (v/v) in jo vlili v aparaturo za agarozno elektroforezo. Nato smo na gel nanesli po 4  $\mu$ L posamezne reakcijske zmesi PCR, ki smo ji dodali 4  $\mu$ L 1× nanašalnega pufra. Na gel smo nanesli tudi 10  $\mu$ L označevalca velikosti »GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder [0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L]« (Fermentas, Litva), ki smo ga pred nanosom redčili z 0,3× nanašalnim pufrom v razmerju 1:12. 1× in 0,3× nanašalni pufer smo predhodno pripravili iz 6× nanašalnega pufra (»6× Loading Dye Solution« Fermentas, Litva) z redčenjem s sterilnim 10 % glicerolom. Elektroforezo smo izvajali 30 min pri 120 V. Ločeno DNA smo optično zaznali ter gel fotografirali pri 300 nm z aparaturo za fotografiranje gelov (Sistem UVItc, Velika Britanija).

### 3.2.1.3. Čiščenje fragmentov cDNA iz zmesi PCR in restrikcija fragmentov cDNA ter plazmida pET-11a

V vsaki reakciji PCR, z izjemo negativne kontrole, se je specifično pomnožil samo en produkt, zato smo ga očistili po navodilih proizvajalca neposredno iz reakcijske zmesi z uporabo kompleta »Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System« (Promega, ZDA).

Očiščena fragmenta cDNA z zapisom za izolektina rCnSL-ProA in rCnSL-A ter plazmid pET-11a, ki ima vstavljeni cDNA z zapisom za proteazni inhibitor klitocipin, smo cepili z restrikcijskima endonukleazama *NdeI* in *BamHI-HF* (New England Biolabs, ZDA). Restrikcijske endonukleaze so bakterijski encimi, ki cepijo DNA na specifičnem mestu oz. točno določenemu nukleotidnemu zaporedju. Pri izvedbi restrikcijske reakcije smo uporabili pufer 10× NEB4 (New England Biolabs, ZDA), ki je kompatibilen tako z restriktazo *NdeI*, kot z restriktazo *BamHI-HF*. Upoštevali smo pravilo, da restrikcijski endonukleazi ne smeta presegati 10 % volumna reakcijske zmesi. Izvedli smo tri restrikcijske reakcije, in sicer za kodirajoča fragmenta cDNA ter za plazmid pET-11a (preglednici VI in VII). Restrikcijske reakcije so potekale 3 ure v inkubatorju (Binder BD 115, Binder, Nemčija) pri 37 °C. S tem smo dobili lineariziran prazen vektor pET-11a in kodirajoči cDNA, ki ju lahko preko restrikcijskih mest vstavimo v ekspresijski vektor.

**Preglednica VI: Reagenti v restrikcijski reakciji s kodirajočima fragmentoma cDNA**

Reagent	Volumen [µL]
fragmet cDNA z zapisom za izolektin rCnSL-ProA ali rCnSL-A	18
pufer 10× NEB4	4
<i>NdeI</i> (20 U/µL)	2
<i>BamHI-HF</i> (20 U/µL)	2
sterilna dH <sub>2</sub> O	14

**Preglednica VII: Reagenti v restrikcijski reakciji s pDNA**

Reagent	Volumen [µL]
pDNA pET11-a [58,7 ng/µL]	32
pufer 10× NEB4	4
<i>NdeI</i> (20 U/µL)	2
<i>BamHI-HF</i> (20 U/µL)	2

### 3.2.1.4. Čiščenje kodirajočih fragmentov cDNA in lineariziranega plazmida pET-11a iz restrikcijskih zmesi

Pri čiščenju kodirajočih fragmentov cDNA in lineariziranega plazmida pET-11a smo uporabili agarozno gelsko elektroforezo. Po že opisanem postopku smo pripravili 1 % (m/v) agarozni gel (glej 3.2.1.2.) in nanj nanesli celotne restrikcijske zmesi (40 µL), ki smo jim predhodno dodali po 7 µL 6× nanašalnega pufra (»6× Loading Dye Solution« Fermentas, Litva). Na gel smo nanesli tudi 10 µL označevalca velikosti »GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder [0,5 µg/µL]« (Fermentas, Litva), ki smo ga pred nanosom redčili po že opisanem postopku (glej 3.2.1.2.). Elektroforezo smo izvajali 45 min pri 70 V ter ob koncu optično zaznali ločeno DNA in fotografirali gel pri 300 nm. Fragmenta cDNA z zapisom za izolektina rCnSL-ProA in rCnSL-A ter lineariziran plazmid pET-11a smo pod transiluminatorjem UV (»Visi-Blue™ VB-26« UVP, ZDA) s skalpelom izrezali iz agaroznega gela. Izrezano DNA smo očistili po navodilih proizvajalca z uporabo kompleta »Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System« (Promega, ZDA).

### 3.2.1.5. Priprava in pomnožitev ekspresijskih vektorjev

Fragmenta cDNA z zapisom za izolektina rCnSL-ProA in rCnSL-A smo preko restrikcijskih mest za *NdeI* in *BamHI-HF* subklonirali v plazmid pET-11a (preglednica VIII).

**Preglednica VIII: Reagenti uporabljeni pri ligaciji cDNA v vektor pET-11a**

Reagent	Volumen [µL]
cDNA z zapisom za rCnSL-ProA oz. rCnSL-A	6
lineariziran vektor pET-11a	2
10× pufer za ligazo DNA T4	1
ligaza DNA T4 [400 U/µL]	1

Ligacija je potekala 3 dni pri 4 °C. S tem smo dobili kodirajoč cDNA z zapisom za izolektin rCnSL-ProA oz. rCnSL-A vstavljen v ekspresijski vektor pET-11a. Tako pripravljena ekspresijska vektorja smo pomnožili v bakteriji *E. coli* DH5α.

Kompetentne celice *E. coli* DH5α smo transformirali s plazmidom pET-11a::rCnSL-ProA oz. pET-11a::rCnSL-A. Pojem transformacije zajema proces privzema gole DNA v gostiteljsko celico. Kompetentne celice, ki so bile alikvotirane po 50 µL in shranjene pri -80 °C, smo odtalili na ledu ter jim ob gorilniku dodali 5 µL ligacijske zmesi, ki je

vsebovala plazmid pET-11a::rCnSL-ProA oz. pET-11a::rCnSL-A. Celice smo rahlo premešali in jih 25 min inkubirali na ledu. Nato smo jih podvrgli temperaturnemu šoku, tako da smo jih 30 s inkubirali v vodni kopeli s temperaturo 42 °C in nato 10 min hladili na ledu. Ob gorilniku smo jim dodali 450 µL gojišča S.O.C. in jih stresali 45 min pri 37 °C in 250 obratih/min v stresalniku (Certomat HK, B.Braun Biotech International, ZDA). Nato smo ob gorilniku razmazali 100 µL gojišča s celicami na trdno gojišče LBA. Preostalih 405 µL gojišča s celicami smo centrifugirali 2 min pri 4600× g v centrifugi Eppendorf 5424 (Eppendorf, Nemčija) in odstranili 305 µL supernatanta. Celice smo resuspendirali s stresanjem in jih ob gorilniku razmazali na trdno gojišče LBA. Plošče smo inkubirali preko noči pri 37 °C.

Naslednji dan so bile na trdnem gojišču LBA vidne številne kolonije bakterij *E. coli* DH5α. Naključno smo si izbrali 5 kolonij *E. coli* DH5α pET-11a::rCnSL-ProA in 5 kolonij *E. coli* DH5α pET-11a::rCnSL-A, ki smo jih s sterilnim nastavkom ob gorilniku nacepili v po 3 mL tekočega gojišča LBA. Gojišče, v katerega nismo nacepili bakterij, je služilo kot negativna kontrola. Nacepljene kulture smo stresali 16 ur pri 37 °C in 250 obratih/min. Po 16 urah smo po navodilih proizvajalca iz kultur izolirali pDNA z uporabo kompleta »Wizard® plus SV Minipreps DNA Purification System« (Promega, ZDA) in izmerili njeno koncentracijo s spektrofotometrom NanoDrop® ND-2000c (NanoDrop Technologies, ZDA).

Želeli smo preveriti ali izolirana pDNA vsebuje fragment cDNA z zapisom za izolektin rCnSL-ProA oz. rCnSL-A. V ta namen smo izvedli dvojno restrikcijo z restrikcijskima endonukleazama *NdeI* in *BamHI-HF* v pufru 10× NEB4 (preglednica IX). Hkrati smo rezali tudi plazmid pET-11a z vstavljenim zapisom za klitocipin (preglednica X), kar nam je omogočalo primerjavo velikosti. Restrikcija je potekala 3 ure pri 37 °C v inkubatorju (Binder BD 115, Binder, Nemčija). Uspešnost restrikcije smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo, pri čemer smo na 1 % (m/v) agarozni gel nanesli celotno restrikcijsko zmes (15 µL), ki smo ji dodali 2 µL 6× nanašalnega pufra (»6× Loading Dye Solution« Fermentas, Litva). Na gel smo nanesli tudi 10 µL označevalca velikosti »GeneRuler™ 1kb DNA Ladder [0,5 µg/µL]« (Fermentas, Litva), ki smo ga redčili po že opisanem postopku (glej 3.2.1.2.). Elektroforeza je potekala 30 min pri 120 V.

**Preglednica IX: Kontrolna dvojna restrikcija plazmidov pET-11a::rCnSL-ProA in pET-11a::rCnSL-A**

Reagent	Volumen [μL]
pET-11a::rCnSL-ProA oz. pET-11a::rCnSL-A [cca 200 ng/μL]	1
pufer 10× NEB4	1,5
<i>NdeI</i> (20 U/μL)	0,5
<i>BamHI-HF</i> (20 U/μL)	0,5
sterilna dH <sub>2</sub> O	11,5

**Preglednica X: Kontrolna dvojna restrikcija plazmida pET-11a::Clt**

Reagent	Volumen [μL]
pET-11a::Clt [58,7 ng/μL]	5
pufer 10× NEB4	1,5
<i>NdeI</i> (20 U/μL)	0,5
<i>BamHI-HF</i> (20 U/μL)	0,5
sterilna dH <sub>2</sub> O	7,5

Izmed izoliranih plazmidov smo za nadaljnjo delo izbrali tiste, ki smo jih izolirali v najvišji koncentraciji. Plazmidne vektorje pET-11a::rCnSL-ProA, izolirane iz kolonij, označenih 4 in 5 ter vektorje pET-11a::rCnSL-A, izolirane iz kolonij, označenih 6 in 9, smo redčili s sterilno dH<sub>2</sub>O tako, da smo dobili 20 μL posameznega vektorja s koncentracijo 80 ng/μL. Poslali smo jih na avtomatiziran servis Eurofins MWG Operon v Nemčijo, kjer so jim določili nukleotidna zaporedja. Dobljena nukleotidna zaporedja smo s programom BioEdit, verzija 7.1.3, primerjali s pravilnim zaporedjem cDNA z zapisom za izolektin rCnSL-ProA oz. rCnSL-A in s tem preverili ali je prišlo pri pomnoževanju z reakcijo PCR do napak.

**3.2.1.6. Priprava trajnih kultur *E. coli* DH5α z vstavljenim vektorjem pET-11a z zapisom za posamezne saharozil izolektine**

Kompetentne celice *E. coli* DH5α smo po opisanem postopku transformirali (glej 3.2.1.5.) z 1 μL plazmida pET11-a::rCnSL-ProA, pET-11a::rCnSL-A, pET-11a::rCnSL-ProB oz. pET-11a::rCnSL-B. Naslednji dan smo ob gorilniku s sterilnim nastavkom nacepili po eno kolonijo v 3 mL tekočega gojišča LBA in stresali 16 ur v stresalniku (Certomat HK, B.Braun Biotech International, ZDA) pri 37 °C in 250 obratih/min. K posamezni kulturi smo dodali 1 mL sterilnega 80 % glicerola, premešali z vorteksiranjem in alikvotirali po 1,8 mL v sterilne plastične epruvete. Te smo ustrezno označili, zamrznili v etanolu ohlajenem na -80 °C in shranili pri -80 °C.

### **3.2.2. Priprava rekombinantnih saharozil izolektinov**

#### **3.2.2.1. Analiza aminokislinskih zaporedij izpeljanih iz cDNA**

Strežnik za proteomiko ExpaSY (<http://www.expasy.org/tools>) nudi orodja, ki napovejo lastnosti proteinov na osnovi njihovega aminokislinskega zaporedja. Z orodjem Translate smo prevedli nukleotidno zaporedje kodirajoče cDNA z zapisom za ustrezni izolektin v aminokislinsko zaporedje. Slednjega smo analizirali z orodjem ProtParam, ki napove število aminokislin, molekulsko maso, izoelektrično točko, molarni absorpcijski koeficient in  $A_{0,1\%}$  proteina. Aminokislinska zaporedja smo analizirali tudi z orodjem SIG-Pred na strežniku Univerze v Leedsu (<http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/>), ki predvidi prisotnost signalnega zaporedja v proteinu in njegovo procesiranje v evkariontskih in prokariontskih organizmih. Aminokislinska zaporedja saharozil izolektinov smo primerjali med seboj, z uporabo progama BioEdit, verzija 7.1.3, in z zaporedji proteinov v podatkovnih bazah, z uporabo algoritma BLASTp, na strežniku NCBI (»National Center for Biotechnology Information« <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### **3.2.2.2. Priprava kompetentnih celic *E. coli* BL21(DE3) in njihova transformacija**

Kompetentne celice *E. coli* BL21(DE3) smo pripravili v komori z laminarnim pretokom zraka (SC-R Labcaire, Velika Britanija) iz 50  $\mu$ L alikvota kompetentnih celic *E. coli* BL21(DE3). Slednje smo s sterilnim nastavkom nacepili v 3 mL tekočega gojišča LB in kulturo stresali 16 ur pri 37 °C in 250 obratih/min v stresalniku (Certomat HK, B.Braun Biotech International, ZDA). Nato smo 1 mL prekonočne kulture precepili v 100 mL tekočega gojišča LB in stresali pri 37 °C in 250 obratih/min. Vsakih dvajset minut smo preverili optično gostoto pri 600 nm ( $OD_{600}$ ) s spektrofotometrom Lambda Bio, (PerkinElmer, ZDA). Ko je ta dosegla vrednost 0,35-0,40, so bile celice v zgodnji logaritemski fazi. Takrat smo jih aseptično prelili v tri sterilne centrifugirke, in sicer v vsako po 33 mL kulture ter inkubirali na ledu 10-15 min. Celice smo nato 10 min centrifugirali v hlajeni centrifugi Rotina 380R (Andreas Hettich GmbH & Co., Nemčija) pri 3000× g in 4 °C. Supernatant smo aseptično odstranili in celice resuspendirali tako, da smo jih združili v 25 mL ohlajene raztopine TBCa. Nato smo jih 20 min inkubirali na ledu in ponovno 10 min centrifugirali v hlajeni centrifugi pri 3000× g in 4 °C ter aseptično odstranili supernatant. Celice smo resuspendirali v 1,5 mL ohlajene raztopine TBCaG in jih alikvotirali po 50  $\mu$ L v ohlajene sterilne mikrocentrifugirke. Zamrznili smo jih v etanolu ohlajenem na -80 °C in shranili pri -80°C.

Odločili smo se, da bomo pripravili rekombinantna saharozil izolektina rCnSL-A in rCnSL-B ter njuna neprocesirana analoga z N-končnim propeptidom rCnSL-ProA in rCnSL-ProB [62]. V ta namen smo transformirali kompetentne celice *E. coli* BL21(DE3) z 1 µL vektorjev pET-11a::rCnSL-ProA, pET-11a::rCnSL-A, pET-11a::rCnSL-ProB oz. pET-11a::rCnSL-B. Delali smo po enakem postopku kot pri transformaciji celic *E. coli* DH5 $\alpha$  (glej 3.2.1.5.) le, da smo na trdno gojišče LBA nanesli le 100 µL gojišča s celicami, preostalih 405 µL pa smo zavrgli. Naslednji dan smo po eno kolonijo precepili v 20 mL tekočega gojišča LBA in stresali 16 ur pri 37 °C in 250 obratih/min. Tako pripravljene prekonočne kulture smo uporabili kot vcepek za izražanje posameznih izolektinov.

### **3.2.2.3. Poskusno izražanje izolektinov rCnSL-ProA in rCnSL-A**

S poskusnim izražanjem smo želeli ugotoviti jakost in časovni potek izražanja izolektinov rCnSL-ProA in rCnSL-A. K 100 mL tekočega gojišča LBA smo dodali 1 mL prekonočne kulture bakterij *E. coli* BL21(DE3) pET-11a::rCnSL-ProA oz. *E. coli* BL21(DE3) pET-11a::rCnSL-A in stresali v stresalniku (Certomat HK, B.Braun Biotech International, ZDA) pri 37 °C in 250 obratih/min. Vsakih 30 min smo izmerili OD<sub>600</sub> s spektrofotometrom Lambda Bio (PerkinElmer, ZDA). Ko je vrednost OD<sub>600</sub> dosegla 0,9-1,1, smo inducirali izražanje lektina z dodatkom 1 M izopropil-β-D-tiogalaktosida (IPTG) v končni koncentraciji 1 mM. Celice smo inkubirali s stresanjem nadaljnjih 8 ur, pri čemer smo vsako uro odvzeli 1 mL vzorca in izmerili OD<sub>600</sub>. Ko je vrednost OD<sub>600</sub> presegla 2,5, smo pred merjenjem vzorce 10× redčili s tekočim gojiščem LBA in izmerjeno OD<sub>600</sub> množili z 10. Po 1 mL vzorca smo nato centrifugirali 2 min pri 7000× g v centrifugi Eppendorf 5424 (Eppendorf, Nemčija). Supernatant smo odstranili, celice pa resuspendirali v ustrezni količini dH<sub>2</sub>O ( $V[\mu\text{L}] = \text{OD}_{600} \times 75$ ). K 10 µL posameznega vzorca smo dodali 10 µL nanašalnega pufra za NaDS PAGE in izražanje preverili z metodo NaDS PAGE.

Izražanje izolektina rCnSL-ProA se je izkazalo za zelo šibko, zato smo poskusili izražanje izboljšati z optimiranjem časa indukcije. Pripravili smo tri kulture tako, da smo k 100 mL tekočega gojišča LBA dodali 1 mL prekonočne kulture *E. coli* BL21(DE3) pET-11a::rCnSL-ProA. Vse tri kulture smo stresali pri 37°C in 250 obratih/min. Spremljali smo OD<sub>600</sub> in prvo kulturo inducirali pri OD<sub>600</sub> 0,4-0,6, drugo pri OD<sub>600</sub> 0,9-1,1, tretjo pa pri OD<sub>600</sub> 1,4-1,6 s 100 µL 1M IPTG. Celice smo nato inkubirali s stresanjem nadaljnjih 6 ur in vsako uro odvzeli vzorec, kot je opisano zgoraj.

### 3.2.2.4. Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata

Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS PAGE) je metoda za ločevanje in vizualizacijo proteinov, pri kateri ločujemo denaturirane proteine. Popolno denaturacijo dosežemo z nekaj minutnim inkubiranjem vzorca v prisotnosti NaDS, morebitne disulfidne vezi pa lahko prekinemo z dodatkom reducenta. Razmerje med nabojem in dolžino polipeptidne verige je v kompleksu z NaDS identično za vse proteine, zato se ti ločujejo samo na osnovi razlike v velikosti. Metodo NaDS PAGE smo uporabljali za preverjanje prisotnosti in količine posameznega izolektina po izražanju v bakteriji *E. coli* BL21(DE3), med posameznimi koraki čiščenja ter za ugotavljanje njihove čistosti in velikosti.

Pri NaDS PAGE smo uporabljali aparaturo za NaDS PAGE (»Mini-Protean II<sup>®</sup>, BioRad, ZDA). Proteini so potovali na gelu debeline 1,5 mm, ki je bil zgrajen iz 4 % (m/V) koncentracijskega in 12 % (m/V) ločevalnega gela. Gel smo pred elektroforezo vlili med dve stekli (preglednica XI). Najprej smo vlili ločevalni gel in njegovo gladino izravnali z butanolom, nasičenim z dH<sub>2</sub>O. Ko se je ločevalni gel strdil, smo butanol odstranili, vlili koncentracijski gel in vanj vstavili glavniček.

**Preglednica XI: Reagenti za pripravo koncentracijskega in ločevalnega gela pri NaDS PAGE**

Reagent	4 % (m/v) koncentracijski gel [mL]	12 % (m/v) ločevalni gel [mL]
dH <sub>2</sub> O	3,168	4,335
puffer za koncentracijski gel	1,250	/
puffer za ločevalni gel	/	2,500
10 % raztopina NaDS	0,050	0,100
N,N'-metilen-bis-akrilamid	0,500	3,000
10 % raztopina APS	0,025	0,050
TEMED	0,008	0,015

Vzorce smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirki združili ustrezno količino vzorca in nanašalnega pufra za NaDS PAGE. Pri tem smo upoštevali, da je maksimalen volumen, ki ga lahko nanesemo v posamezen žepek, 60 µL. Vzorce smo nato inkubirali 10 min pri 100 °C in nanesli na gel. Na gel smo nanesli tudi 5 µL označevalca velikosti »Amersham Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis« (Amersham Biosciences, ZDA). Elektroforeza je potekala pri 30 mA/gel, dokler ni elektroforezna fronta oz. bromfenol modro zapustil gela.

Po končani elektroforezi smo gel barvali 1 uro v 0,1 % raztopini Coomassie Brilliant Blue in ga nato primerno razbarvali. Pri tem smo ga 1 uro inkubirali v 30 % razbarvalni raztopini in nato preko noči v 10 % razbarvalni raztopini. Med barvanjem in razbarvanjem smo gel stresali na orbitacijskem stresalniku (Vibromix 10, Tehnica, Slovenija) pri 50 obratih/min. Če barvanje z barvilo Coomassie Brilliant Blue ni bilo uspešno, smo gel popolnoma razbarvali v 30 % razbarvalni raztopini in ga nato barvali z občutljivejšimi srebrovimi ioni. Gel smo najprej 30 s spirali z dH<sub>2</sub>O, ga 15 min inkubirali v vodni raztopini K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> s koncentracijo 1 g/L, ga ponovno spirali 30 s z dH<sub>2</sub>O ter ga nato vsaj 20 min inkubirali v vodni raztopini AgNO<sub>3</sub> s koncentracijo 2 g/L. Gel smo nato barvali v razvijalni raztopini toliko časa, da so se pojavile obarvane lise. Reakcijo barvanja s srebrovimi ioni smo zaustavili z dodatkom 5 g citronske kisline. Gel smo po barvanju fotografirali z aparaturom za fotografiranje gelov (Sistem UVItc, Velika Britanija).

### **3.2.2.5. Priprava saharozil izolektinov in razapljanje inkluzijskih teles**

Posamezne izolektine (rCnSL-A, rCnSL-ProA, rCnSL-B in rCnSL-ProB) smo pridobili z izražanjem v 1200 mL tekočega gojišča LBA, ki smo ga alikvotirali po 300 mL v štiri sterilne erlenmajerice z volumnom 2 L. V vsako erlenmajerico smo dodali 3 mL ustrezne prekonočne kulture in stresali v stresalniku (Certomat HK, B. Braun Biotech International, ZDA) pri 37 °C in 250 obratih/min. Spremljali smo OD<sub>600</sub> in ob ustreznih vrednostih inducirali izražanje posameznega izolektina z 1 M IPTG v končni koncentraciji 1 mM. Izražanje izolektinov rCnSL-A, rCnSL-ProB in rCnSL-B smo inducirali pri OD<sub>600</sub> 0,9-1,1, medtem ko smo izražanje izolektina rCnSL-ProA inducirali pri OD<sub>600</sub> 1,4-1,6. Štiri ure po indukciji smo s hlajenjem na ledu zaustavili izražanje izolektinov rCnSL-ProA, rCnSL-ProB in rCnSL-B ter pet ur po indukciji izražanje izolektina rCnSL-A. Vsebino vsake erlenmajerice smo prelili v centrifugirko GS-3 (Sarstedt, Nemčija) in 15 min centrifugirali pri 6000× g in 4 °C v hlajeni centrifugiji Sorvall RC-5C Plus (Sorvall, ZDA). Supernatant oz. gojišče smo odlili in shranili pri 4 °C. V vsako centrifugirko GS-3 smo dodali 25 mL pufra TET in resuspendirali celice. Vsebino štirih centrifugirk GS-3 z ustreznim lektinom smo združili v centrifugirki GSA (Sarstedt, Nemčija), jo zamrznili pri -80 °C in shranili pri -20 °C.

Postopek pridobivanja izolektina rCnSL-ProA smo morali, zaradi težav pri čiščenju, ponoviti in pri tem optimirali potek čiščenja. V nadalnjem besedilu je pri tistih stopnjah, ki

se razlikujejo med izolektinoma rCnSL-ProA, pridobljenima v dveh časovno ločenih ponovitvah izražanja, za lektin očiščen po optimiranem postopku uporabljeni oznaka rCnSL-ProA2.

Celice, ki so bile zamrznjenje v centrifugirkah GSA, smo počasi odtalili v ledeni kopeli in jih razbili s sonificiranjem. Sonificirali smo 10 min s sonifikatorjem (Digital Sonifer W-450 D, Branson, ZDA). Uporabili smo sondno premera 3 mm in nastavitev cikla 0,9 ter amplitude 95 %. Med sonificiranjem smo vsebino centrifugirke hladili z ledom, da ne bi prišlo do denaturacije proteinov zaradi segrevanja. Po sonificirjanju smo vsebino 15 min centrifugirali v hlajeni centrifugi Sorvall RC-5C Plus (Sorvall, ZDA) pri  $10000\times g$  in 4 °C. Supernatant smo odstranili in ga shranili pri 4 °C. Netopno frakcijo smo z magnetnim mešalom raztapljali 90 min v 50 mL pufra TET in hkrati hladili z ledom. Vsebino smo ponovno centrifugirali (15 min pri  $10000\times g$  in 4 °C) ter odlili in shranili supernatant. Oborino smo nato postopoma raztapljali v naraščajočih koncentracijah sečnine, raztopljeni v pufru TET, kot je opisano v nadaljevanju. Po raztapljanju smo ločili netopno frakcijo s centrifugiranjem (15 min pri  $10000\times g$  in 4 °C) ter odstranili supernatant. Izolektina rCnSL-ProA in rCnSL-A smo postopoma raztapljali 90 min v 30 mL 1 M sečnine v pufru TET, 90 min v 30 mL 3 M sečnine v pufru TET, čez noč v 20 mL 6 M sečnine v pufru TET in 90 min v 10 mL 8 M sečnine v pufru TET. Izolektin rCnSL-ProB smo raztapljali 90 min v 30 mL 3M sečnine v pufru TET in 90 min v 20 mL 8 M sečnine v pufru TET ter izolektin rCnSL-B 90 min v 25 mL 3 M sečnine v pufru TET in 90 min v 5 mL 6 M sečnine v pufru TET. Po vsakem raztapljanju smo odvzeli po 200 µL vzorca, ki smo ga shranili pri -20°C. Supernatante, ki smo jih pridobili s centrifugiranjem, smo shranili pri 4 °C. Vsebnost izolektinov v posamezni suspenziji in supernatantu smo preverili z NaDS PAGE, pri tem smo na gel nanesli po 8 µL vzorev po raztapljanju in po 20 µL vzorcev supernatantov. Vzorcem smo dodali nanašalni pufer za NaDS PAGE v razmerju 1:1.

### **3.2.2.6. Preverjanje izločanja izolektinov rCnSL-ProA in rCnSL-ProB**

Izolektina rCnSL-ProA in rCnSL-ProB vsebujeta N-končni propeptid, ki v naravnem saharozil lektinu ni prisoten. Preverili smo, če propeptid med izražanjem v bakteriji *E. coli* BL21(DE3) usmerja izločanje izolektinov rCnSL-ProA in rCnSL-ProB v gojišče. V ta namen smo proteine v gojišču po izražanju izolektinov rCnSL-ProA, rCnSL-ProB oz. rCnSL-A obarjali z acetonom, kot je opisano v nadaljevanju. Vzorec oborjenih proteinov v

gojišču, po izražanju izolektina rCnSL-A, nam je služil kot primerjava za vsebnost proteinov, ki so prisotni v gojišču. Izolektin rCnSL-A namreč ne vsebuje N-končnega propeptida in ga zato v gojišču nismo pričakovali.

Kot je že opisano (glej 3.2.2.5.), smo gojišča pridobili s 15 min centrifugiranjem kulture pri  $6000\times g$  in  $4^{\circ}\text{C}$  v hlajeni centrifugigi Sorvall RC-5C Plus (Sorvall, ZDA). V centrifugirko GS-3 smo odmerili 200 mL acetona ohlajenega na  $-20^{\circ}\text{C}$ , dodali 50 mL ustreznega gojišča, vsebino premešali z vorteksiranjem in shranili preko noči pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Naslednji dan smo vsebino centrifugirali 20 min pri  $8300\times g$  in  $4^{\circ}\text{C}$ , odlili supernatant in oborino prenesli v mikrocentrifugirko. To smo centrifugirali 10 min pri  $16,1\times g$  v hlajeni centrifugigi Eppendorf 5415 R (Eppendorf, Nemčija) ter zopet odstranili supernatant. Mikrocentrifugirko smo pustili odprto pri sobni tempreaturi preko noči, da je izhlapel preostali aceton. Naslednji dan smo oborino raztopili v 500  $\mu\text{L}$  nanašalnega pufra za NaDS PAGE z 10 min inkubiranjem pri  $100^{\circ}\text{C}$ . Vsebnost proteinov v gojišču smo preverili z NaDS PAGE, pri čemer smo na gel nanesli 40  $\mu\text{L}$  v nanašalnem pufru raztopljene oborine. Za primerjavo smo na gel nanesli še 10  $\mu\text{L}$  vzorcev bakterijskih lizatov po indukciji izražanja in 15  $\mu\text{L}$  vzorcev netopne frakcije bakterijskih lizatov z inkluzijskimi telesci. Vzorcem smo dodali nanašalni pufer za NaDS PAGE v razmerju 1:1.

### 3.2.2.7. Gelska filtracija

Gelska filtracija je separacijska metoda, pri kateri ločitev proteinov temelji na razlikah v njihovi velikosti in obliki. Po nanosu zmesi proteinov na nosilec, večji proteini potujejo hitreje in prej zapustijo kolono, kot manjši. Z gelsko filtracijo smo čistili izolektine po raztavljanju iz inkluzijskih teles.

Pri gelski filtraciji smo uporabili kolono dolžine 95 cm in premera 4,5 cm, napolnjeno s stacionarno fazo »Sephacryl® S-200 High resolution« (GE Healthcare, Švedska). Pred nanosom vzorca smo stacionarno fazo 24 ur spirali s pufrom za gelsko filtracijo (20 mM Tris-HCl, 3 M sečnina, 0,3 M NaCl, pH 7,5). Vzorec, katerega volumen ni presegal 30 mL, smo centrifugirali 20 min pri  $11953\times g$  in  $4^{\circ}\text{C}$  v centrifugirkah SS-34 v hlajeni centrifugigi Sorvall RC-5C Plus (Sorvall, ZDA) in s tem odstranili morebitne delce, ki bi lahko zamašili nosilec. Po nanosu vzorcev izolektinov rCnSL-ProA (30mL) in rCnSL-B (30 mL) smo nastavili pretok pufra za gelsko filtracijo na 42,6 mL/h in zbirali frakcije v epruvete po

23 minut, tako da je volumen posamezne frakcije znašal 16,3 mL. Po nanosu vzorcev izolektinov rCnSL-A (30 mL) in rCnSL-ProB (20 mL), smo nastavili pretok na koloni na 63,6 mL/h, tako da je volumen posamezne frakcije znašal 24,4 mL. Frakcije smo zbirali 24 ur in nato spirali nosilec s pufom za gelsko filtracijo še nadaljnjih 24 ur. S spektrofotometrom Lambda 25 (PerkinElmer, ZDA) smo izmerili absorbanco posamezne frakcije pri 280 nm ( $A_{280}$ ). Ločbo smo ocenili z NaDS PAGE, pri čemer smo na gel nanesli po 35 µL izbranih frakcij, ki smo jim dodali 15 µL nanašalnega pufra za NaDS PAGE.

### **3.2.2.8. Ultrafiltracija**

Ultrafiltracija je metoda za koncentriranje proteinov z različnimi molekulskimi masami, medtem ko manjše molekule, kot so soli, sladkorji in manjši peptidi, prehajajo v filtrat. Uporabljali smo jo za koncentriranje rekombinantnih izolektinov po gelski filtraciji, dializi in ionsko izmenjevalni kromatografiji. Izolektina rCnSL-ProB in rCnSL-B smo pred ultrafiltracijo nakisali z razredčeno HCl do pH 6,5 in s tem preprečili obarjanje izolektinov zaradi bližine izoelektrične točke. Uporabili smo ultrafiltracijsko celico (Amicon 8400, Amicon, ZDA) in membrano, ki prepušča molekule manjše od 3 kDa, večje pa zadrži v celici. Celico smo v hladni sobi (4 °C) priklopili na nadtlak dušika in njen vsebino mešali na magnetnem mešalu. Če se je izolektin pri koncentriranju obarjal, smo ultrafiltracijo prekinili in ločili oborino z 20 minutnim centrifugiranjem v centrifugirki SS-34 pri 11953×g in 4 °C v hlajeni centrifugi Sorvall RC-5C Plus (Sorvall, ZDA). Po zaključeni ultrafiltraciji smo koncentratu in filtratu izmerili  $A_{280}$  s spektrofotometrom Lambda 25 (PerkinElmer, ZDA).

Vzorec izolektina rCnSL-ProA smo po ionsko izmenjevalni kromatografiji na karboksimetil celulozi skoncentrirali s centrifugalnim filtrom (Amicon® Ultra-4, Millipore, ZDA), ki prepušča molekule, manjše od 3 kDa. Uporabili smo hlajeno centrifugo Rotina 380R (Andreas Hettich GmbH & Co., Nemčija) pri 3900×g in 4 °C.

### **3.2.2.9. Dializa**

Dializa je metoda, s katero zamenjamo pufer, v katerem se nahaja protein, z želenim pufom. Pri dializi smo uporabili dializno membrano (»MEMBRA-CEL® dialysis tubing«, Serva, Nemčija) premera 22 mm in z velikostjo por 3,5 kDa. Dializo smo izvajali v hladni sobi (4 °C) ob mešanju z magnetnim mešalom.

Izolektinom rCnSL-A, rCnSL-B in rCnSL-ProB smo po gelski filtraciji z dializo postopno odstranili sečnino kot je opisano v nadaljevanju, da bi dosegli pravilno zvijanje v aktivno konformacijo. Izolektin rCnSL-A (50 mL) smo dializirali 16 ur v 3 L dializnega pufra 1 (0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 1,5 M sečnina, pH 7,5) in nato še 8 ur in 16 ur v po 2 L dializnega pufra 2 (0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,5). Izolektina rCnSL-ProB (15 mL) in rCnSL-B (30 mL) smo dializirali v pufer z nižjo vrednostjo pH, da ne bi prišlo do obarjanja proteinov zaradi bližine izoelektrične točke. Dializirali smo ju 16 ur v 3 L dializnega pufra 3 (0,05 Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 1,5 M sečnina, pH 6,5) in nato še 8 ur in 16 ur v po 2 L dializnega pufra 4 (0,05 Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 6,5).

Izolektin rCnSL-ProA smo dializirali pred ionsko izmenjevalno kromatografijo. Pri dializi izolektina rCnSL-ProA (9,5 mL) smo odstranili NaCl in sečnino ter s tem pripravili vzorec za ionsko izmenjevalno kromatografijo na karboksimetil celulozi in dosegli pravilno zvitje izolektina. Dializirali smo 16 ur, 8 ur in nato še 16 ur v po 1 L začetnega pufra 1 (50 mM fosfatni pufer pH 7,0). Izolektin rCnSL-ProA2 (60 mL) smo dializirali za pripravo vzorca za ionsko izmenjevalno kromatografijo na sefarazi SP 16 ur, 8 ur in nato še 16 ur v po 1 L začetnega pufra 2 (50 mM fosfatni pufer, 3 M sečnina, pH 7,0). Po ionski izmenjevalni kromatografiji na sefarazi SP smo izolektinu rCnSL-ProA2 (80 mL) postopno odstranili sečnino, da bi dosegli pravilno zvitje. Dializirali smo ga 16 ur v 3 L dializnega pufra 5 (0,02 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl, 1,5 M sečnina, pH 7,5) in nato še 8 ur in 16 ur v po 2 L dializnega pufra 6 (0,02 M Tris-HCl, 0,3 M NaCl, pH 7,5).

Če je med dializo prišlo do obarjanja proteinov, smo dializo prekinili in ločili oborino z 20 minutnim centrifugiranjem v centrifugirki SS-34 pri  $11953\times g$  in  $4^{\circ}\text{C}$ . Z NaDS PAGE smo preverili vsebino supernatanta in oborine tako, da smo pred centrifugiranjem odvezeli dva vzorca po 35  $\mu\text{L}$ . Enega smo centrifugirali 10 min pri  $20200\times g$  v centrifugi Eppendorf 5424 (Eppendorf, Nemčija) in supernatant prenesli v svežo mikrocentrifugirko. Vsem trem vzorcem (celotnemu vzorcu, supernatantu in oborini) smo dodali 15  $\mu\text{L}$  nanašalnega pufra za NaDS PAGE in jih analizirali.

### 3.2.2.10. Ionsko izmenjevalna kromatografija

Pri ionsko izmenjevalni kromatografiji je ločba proteinov posledica različnih elektrostatskih interakcij med molekulami v mobilni fazi in nabitimi skupinami stacionarne

faze. Ločimo anionsko izmenjevalno kromatografijo, pri kateri se na stacionarno fazo vežejo negativno nabite molekule, in kationsko izmenjevalno kromatografijo, pri kateri se na stacionarno fazo vežejo pozitivno nabite molekule. Izolektin rCnSL-ProA smo očistili s kationsko izmenjevalno kromatografijo. Za stacionarno fazo smo uporabili 80 mL karboksimetil celuloze (GE Healthcare, Švedska), ki ima na površini karboksimetilne skupine (-CH<sub>2</sub>-COO<sup>-</sup>). Stacionarno fazo smo sprali z 2 L začetnega pufra 1 (50 mM fosfatni pufer, pH 7,0). Pri tem smo pH začetnega pufra izbrali med izoelektrično točko rCnSL-ProA in β-laktamaze, pri katerem je izolektin rCnSL-ProA pozitivno nabit in naj bi se vezal na kationski izmenjevalec, medtem ko je β-laktamaza negativno nabita in se naj ne bi vezala. Vzorec rCnSL-ProA, ki smo ga dializirali v začetni pufer 1, smo pred nanosom centrifugirali 20 min pri 11953× g in 4° C v centrifugirkah SS-34 v hlajeni centrifugi Sorvall RC-5C Plus (Sorvall, ZDA) in s tem odstranili morebitne delce, ki bi lahko zamašili stacionarno fazo. Po nanosu vzorca (9,5 mL) smo nastavili pretok na 13,8 mL/h in spirali stacionarno fazo s 320 mL začetnega pufra 1. Nato smo izvedli gradientno elucijo, pri kateri smo tekom spiranja z 950 mL pufra linearno povečevali ionsko moč začetnega pufra, in sicer do gradientnega pufra 1 (50 mM fosfatni pufer, 0,3 M NaCl, pH 7,0). Stacionarno fazo smo sprali še s 120 mL končnega pufra 1 (50 mM fosfatni pufer, 1M NaCl, pH 7,0) in s tem zagotovo sprostili vse vezane molekule. Med nanosom vzorca in spiranjem smo zbirali frakcije volumna 5,3 mL.

Pri čiščenju izolektina rCnSL-ProA2 smo uporabili kolono, napolnjeno s 50 mL sefaroze SP (»SP Sepharose High Performance«, Amersham Biosciences, ZDA), ki ima na površini sulfopropilne skupine (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Stacionarno fazo smo najprej sprali z 1 L začetnega pufra 2 (50 mM fosfatni pufer, 3 M sečnina, pH 7,0). Vzorec rCnSL-ProA2, ki smo ga dializirali v začetni pufer 2, smo pred nanosom centrifugirali 20 min pri 11953× g in 4 °C. Po nanosu vzorca (60 mL) smo stacionarno fazo sprali z 200 mL začetnega pufra 2. Nato smo izvedli gradientno elucijo, pri kateri smo tekom spiranja s 300 mL pufra, linearno povečevali ionsko moč začetnega pufra do gradientnega pufra 2 (50 mM fosfatni pufer, 3 M sečnina, 0,3 M NaCl, pH 7,0). Stacionarno fazo smo sprali še z 200 mL končnega pufra 2 (50 mM fosfatni pufer, 3 M sečnina, 1 M NaCl, pH 7,0). Med nanosom vzorca in spiranjem smo zbirali frakcije po 10 mL.

Po izvedbi obeh ionsko izmenjevalnih kromatografijah smo izmerili  $A_{280}$  posamezne frakcije s spektrofotometrom Lambda 25 (PerkinElmer, ZDA). Ločbo smo analizirali z metodo NaDS PAGE, pri čemer smo na gel nanesli po 35  $\mu\text{L}$  izbranih frakcij, ki smo jim dodali 15  $\mu\text{L}$  nanašalnega pufera za NaDS PAGE.

### 3.2.2.11. Določanje koncentracije rekombinantnih saharozil izolektinov

Očiščenim in skoncentriranim rekombinantnim izolektinom smo izmerili  $A_{280}$  s spektrofotometrom Lambda 25 (PerkinElmer, ZDA). Kot slepi vzorec smo uporabili pufer v katerem se je nahajal posamezni lektin. Pri valovni dolžini 280 nm absorbirajo aromatske aminokisline, in sicer triptofan, tirozin, v manjši meri pa tudi fenilalanin. Iz  $A_{280}$  smo izračunali koncentracijo posameznega izolektina z uporabo Beer-Lambertovega zakona, pri čemer je  $A$  absorbanca,  $\varepsilon$  molarni absorpcijski koeficient predviden z orodjem ProtParam [ $\text{l/mol}\cdot\text{cm}$ ],  $l$  dolžina optične poti oz. kivete [cm] in  $c$  koncentracija [mol/L].

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (\text{enačba } I)$$

### 3.2.3. Določanje biokemijskih lastnosti saharozil izolektinov

Pri določanju biokemijskih značilnosti smo primerjali naravni saharozil lektin in očiščene rekombinantne saharozil izolektine. Koncentracije saharozil izolektinov, ki smo jih uporabili v biokemijskih analizah so zapisane v preglednici XII.

**Preglednica XII: Koncentracije saharozil izolektinov, ki smo jih uporabili v biokemijskih analizah**

Izolektin	Koncentracija [mg/mL]
naravni saharozil lektin	3,10
rCnSL-A	0,935
rCnSL-B	1,40
rCnSL-ProA	0,271
rCnSL-ProB	0,519

### 3.2.3.1. Prenos western in določitev N-končnih zaporedij rekombinantnih saharozil izolektinov

Pri prenosu westrn proteine najprej ločimo z NaDS PAGE, nato pa jih iz poliakrilamidnega gela prenesemo na membrano. Na 12 % (m/v) poliakrilamidni gel smo, na osnovi izmerjene  $A_{280}$ , nanesli 20  $\mu\text{L}$  izolektina rCnSL-A, 20  $\mu\text{L}$  izolektina rCnSL-ProA, 15  $\mu\text{L}$  izolektina rCnSL-B in 30  $\mu\text{L}$  izolektina rCnSL-ProB, ki smo jim dodali nanašalni pufer za NaDS PAGE v razmerju 1:1. Nanesli smo tudi po 5  $\mu\text{L}$  označevalcev velikosti »Amersham

Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis« (Amersham Biosciences, ZDA) in »PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder« (Fermentas, Litva). Slednji vsebuje obarvane velikostne označevalce in omogoča vizualizacijo prenosa proteinov na membrano. Ker manjši tok zagotavlja boljšo ločbo, smo elektroforezo izvajali pri 20 mA/gel. Po končani elektroforezi smo sestavili aparaturo za prenos western (»Mini Trans-Blot System«, BioRad, ZDA), v katero smo v naslednjem zaporedju vstavili: tri filter papirje (Whatman), 12 % (m/v) poliakrilamidni gel, membrano PVDF in tri filter papirje (Whatman). Vse smo predhodno omočili v pufru za prenos western. V aparatu smo natočili pufer za prenos western. Prenos smo izvajali 2 uri pri konstantnem toku 200 mA. Po končanem prenosu smo membrano preko noči stresali v sterilni dH<sub>2</sub>O na orbitacijskem stresalniku (Vibromix 10, Tehnica, Slovenija) pri 50 obratih/min. Naslednji dan smo membrano barvali 5 do 10 min v raztopini za barvanje pri prenosu western, ki smo jo predhodno prefiltirirali skozi filter paptir (Whatman, Cat. No 1004 125). Membrano smo nato razbarvali v 50 % (v/v) metanolu. S skalpelom smo izrezali lise posameznih proteinov in jim določili N-končna aminokislinska zaporedja z avtomatizirano Edmanovo razgradnjo z uporabo aparature »Procise Protein Sequencing System 492« (PE Applied Biosystems, ZDA). Z določitvijo N-končnih zaporedij smo želeli preveriti istovetnost pripravljenih rekombinantnih saharozil izolektinov in ugotoviti identiteto 30 kDa velike nečistoče pri izolektinu rCnSL-ProA.

### **3.2.3.2. Primerjava saharozil izolektinov z metodama NaDS PAGE in BN PAGE**

Po že opisanem postopku smo izvedli metodo NaDS PAGE (glej 3.2.2.4.), in sicer smo na poliakrilamidni gel nanesli 4 µL naravnega saharozil lektina, 10 µL izolektina rCnSL-A, 5 µL izolektina rCnSL-B, 30 µL izolektina rCnSL-ProA in 20 µL izolektina rCnSL-ProB. Vzorcem smo dodali nanašalni pufer za NaDS PAGE v razmerju 1:1, z izjemo izolektina rCnSL-ProA, ki smo mu dodali nanašalni pufer v razmerju 2:1. Po končani elektroforezi smo gel barvali v 0,1 % raztopini Coomassie Brilliant Blue in ga nato primerno razbarvali.

Pri nativni poliakrilamidni gelski elektroforezi ostane struktura proteinov nespremenjena in se ločujejo glede na velikost in celokupni naboј. Pri običajni nativni poliakrilamidni elektroforezi potujejo negativno nabiti proteini proti anodi, medtem ko se pozitivno nabiti proteini porazgubijo v elektrolitu nad gelom. Pri modri nativni poliakrilamidni gelski elektroforezi (BN PAGE) dodamo k proteinom Coomassie Brilliant Blue G-250, ki se veže

nanje in jih negativno nabije, s čimer dosežemo, da se proteini ločujejo samo po velikosti. Proteini, ki imajo sicer bazično izoelektrično točko in s tem pozitiven naboј, pridobijo negativen naboј in potujejo proti anodi. Z BN PAGE smo preverili ali izolektini tvorijo kvartarne strukture.

Pri BN PAGE smo uporabili gel »NativePAGE™ Novex 4-16 % Bis-Tris Gel« (Invitrogen, ZDA), ki smo ga vstavili v aparaturo za nativno elektroforezo (»XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System«, Invitrogen, ZDA). Na gel smo nanesli 4 µL naravnega saharozil lektina, 10 µL izolektina rCnSL-A, 5 µL izolektina rCnSL-B ter po 17 µL izolektinov rCnSL-ProA in rCnSL-ProB. Vzorce smo pred nanosom pripravili, kot je navedeno v preglednici XIII. Poleg vzorcev smo nanesli 5 µL označevalca velikosti »NativeMark™ unstained protein standard« (Invitrogen ZDA).

**Preglednica XIII: Priprava vzorcev pri BN PAGE**

Reagent	Volumen [µL]
vzorec	x
nanašalni pufer BN PAGE	6,25
dodatek G-250	2,5
sterilna dH <sub>2</sub> O	do 25,75

Elektroforezo smo izvajali 1 uro pri 150 V in 10 mA ter nato pri 250 V in 4 mA, dokler ni elektroforezna fronta prišla do dna gela. Med elektroforezo se razvija toplota, ki lahko denaturira proteine, zato smo aparaturo hladili z ledom. Po končani elektroforezi smo gel inkubirali dvakrat po 30 min v raztopini 40 % (v/v) metanola in 10 % (v/v) ocetne kisline na orbitacijskem stresalniku, nato pa ga barvali z 0,1 % raztopino Coomassie Brilliant Blue po postopku, ki je opisan pri metodi NaDS PAGE (glej 3.2.2.4.).

### **3.2.3.3. Izoelektrično fokusiranje**

Izoelektrično fokusiranje (IEF) je horizontalna elektroforezna metoda pri kateri se proteini ločujejo na osnovi razlik v celokupnem naboju. Poteka v poliakrilamidnem gelu z gradientom pH, v katerem proteini v električnem polju potujejo do točke, kjer je pH enak njihovi izoelektrični točki (pI). Izoelektrična točka je pH, pri katerem protein nima naboja oz. je njegov celokupen naboј enak nič.

Z izoelektričnim fokusiranjem smo primerjali izoelektrične točke naravnega saharozil lektina, izolektina rCnSL-A in izolektina rCnSL-B. Izolektinov rCnSL-ProA in rCnSL-ProB zaradi prenizke koncentracije na gelu ne bi videli, zato jih nismo nanesli. Pri IEF smo uporabili avtomatizirano aparaturo za IEF (»PhastSystem«, Pharmacia, Švedska) in gel z gradientom pH od 3 do 9 »PhastGel™ IEF 3-9« (GE Healthcare, Švedska). Na gel smo s pomočjo glavničkov nanesli dvakrat po 3 µL označevalca izoelektričnih točk za pH območje od 3 do 9 »Broad pI Calibration Kit« (GE Healthcare, Švedska), dvakrat po 3 µL naravnega saharozil lektina in izolektina rCnSL-A ter 3 µL izolektina rCnSL-B. Fokusiranje je potekalo pri 15 °C do 410 Vh. Po zaključenem IEF smo gel inkubirali 5 min v 40 mL 20 % (v/v) triklorocetne kisline, ki obori proteine in nato 5 min v 40 mL razbarvalne raztopine IEF. Gel smo barvali eno uro v raztopini za barvanje pri IEF, ga nato razbarvali v razbarvalni raztopini IEF in ga fotografirali.

### 3.2.3.4. Cirkularni dikroizem

Cirkularni dikroizem je vrsta spektroskopije, pri kateri merimo razliko med absorpcijo levosučno in desnosučno polarizirane svetlobe. Ta razlika se imenuje eliptičnost in jo označujemo z  $\Theta$ . Eliptičnost merimo v dalnjem UV območju, ki sega od valovne dolžine 180 do 240 nm. S spektrom cirkularnega dikroizma, ki prikazuje eliptičnost v odvisnosti od valovne dolžine, lahko ugotovimo, kolikšen delež aminokislin zavzema sekundarno zgradbo vijačnice  $\alpha$ , ravnine  $\beta$  oz. naključnega zvitja. Z določitvijo spektra CD lahko tudi ugotovimo ali so proteini zviti v pravilno konformacijo.

Za meritev eliptičnosti smo potrebovali 300 µL posameznega izolektina s koncentracijo približno 0,2 mg/mL v 10 mM fosfatnem pufru s pH 6,5, ki ima v dalnjem UV območju dovolj nizko absorbanco. Manjši količini vzorcev naravnega saharozil lektina (20 µL) in rekombinantnih izolektinov rCnSL-A (70 µL), rCnSL-B (45 µL) in rCnSL-ProB (120 µL) smo zamenjali pufer s pomočjo centrifugalnega filtra (Amicon® Ultra-4, Millipore, ZDA), ki prepušča molekule manjše od 3 kDa. Vzorce smo redčili z 10 mM fosfatnim pufrom pH 6,5 do 4 mL, jih skoncentrirali na 300 µL s centrifugiranjem v hlajeni centrifugi Rotina 380R (Andreas Hettich GmbH & Co., Nemčija) pri 3900×g in 4 °C, ponovno redčili s fosfatnim pufrom do 4 mL in skoncentrirali na 300 µL. Izolektin rCnSL-ProA (210 µL) smo samo redčili z 10 mM fosfatnim pufrom, pH 6,5 do ustrezne koncentracije in tako dobili izolektin v 35 mM fosfatnem pufru, ki vsebuje 14 mM NaCl. Pred meritvijo smo

vzorce 10 min centrifugirali v hlajeni centrifugi Eppendorf 5415 (Eppendorf, Nemčija) pri  $16,1 \times g$  in  $4^{\circ}\text{C}$  in s tem odstranili morebitne delce, ki bi motili meritev ter jim izmerili koncentracijo s spektrofotometrom NanoDrop<sup>®</sup> ND-2000c (NanoDrop Technologies, ZDA).

Meritve spektrov CD smo opravili na spektropolarimetru (AVIV 62A DS, Aviv, ZDA), pri tem smo uporabili kiveto dolžine 0,1 cm. Merili smo v dalnjem UV območju od 185 nm do 250 nm, s korakom 1 nm. Hkrati z meritvami vzorcev smo izmerili tudi spektre CD pufrov, v katerih so vzorci in vrednosti odsteli od spektrov izolektinov. Z merjenjem napetosti na diodi smo zagotovili zanesljivost meritev, saj če napetost na diodi preseže 350 V, meritve niso več zanesljive. Spektre smo preračunali na eliptičnost aminokislinskega ostanka z naslednjo enačbo:

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

$M_{mrw}$  je povprečna molska masa aminokislinskega ostanka [g/mol], ki jo izračunamo:

$$M_{mrw} = \frac{M_{protein}}{\text{št. aminokislín v proteinu}} \quad (\text{enačba } 3)$$

$[\theta]_{mrw}$  označuje eliptičnost aminokislinskega ostanka [deg  $\text{cm}^2/\text{dmol}$ ],  $\Theta$  eliptičnost [deg],  $c$  koncentracijo proteina [mg/mL],  $l$  dolžino kivete [cm] in  $M_{protein}$  molsko maso proteina [g/mol]

### 3.2.3.5. Afinitetna kromatografija

Afinitetna kromatografija temelji na specifičnih reverzibilnih bioloških interakcijah med imobiliziranim ligandom in proteinom. Disociacijo kompleksa in s tem elucijo proteina lahko dosežemo z dodatkom liganda, ki tekmuje s stacionarno fazo za protein, ali pa s spremembo sestave mobilne faze. Pri našem delu smo afinitetno kromatografijo uporabili za analizo vezavne sposobnosti izolektinov.

Pri afinitetni kromatografiji smo uporabili sefarozo 4B (Pharmacija Fine Chemicals, Švedska), na katero smo vezali saharozo. Sefarozo 4B (10 mL) smo sprali na nuči s 300 mL 0,5 M raztopine  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , jo prenesli v centrifugirko in ji dodali 10 mL 0,5 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Ob mešanju smo po kapljicah dodali 1,2 mL divinilsulfona, ki je aktiviral hidroksilne skupine sefaroze 4B. Po dodatku smo zmes mešali na orbitacijskem stresalniku 70 min pri 50 obratih/min in sobni temperaturi. Aktivirano sefarozo 4B smo nato na nuči sprali s 300

mL 0,5 M raztopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, jo prenesli nazaj v centrifugirko in dodali 10 mL 20 % (m/v) saharoze v 0,5 M raztopini Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Reakcijsko zmes smo mešali 16 ur na orbitacijskem stresalniku pri sobni temperaturi. Sefarozo smo nato sprali na nuči s 400 mL 0,5 M raztopine Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 400 mL destilirane vode, 400 mL 200 mM fosfatnega pufra s pH 5,7 in s 400 mL 2 M raztopine NaCl. Tako pripravljeno saharozil-sefarozo smo do uporabe shranili v 2 M raztopini NaCl pri 4 °C.

Saharozil-sefarozo (10 mL) smo prelili v kolono in jo sprali s 30 mL 10 mM NaOH in s 30 mL vezavnega pufra. Pri naravnem saharozil lektinu in rekombinantnih izolektinih rCnSL-A in rCnSL-ProA smo uporabili vezavni pufer A (20 mM Tris-HCl, 0,4 M NaCl, pH 7,0), medtem ko smo pri izolektinih rCnSL-B in rCnSL-ProB uporabili vezavni pufer B (20 mM BisTris-HCl, 0,4 M NaCl, pH 6,0), ki ima nižji pH. Na stacionarno fazo smo nanesli približno 1 mg posameznega vzorca in inkubirali 15 min pri sobni temperaturi ob mešanju na orbitacijskem stresalniku. Stacionarno fazo smo spirali s 60 mL vezavnega pufra A ali B in nato eluirali vezano frakcijo s 70 mL 10 mM NaOH. Zbirali smo frakcije po 5 mL, pri čemer smo frakcije z 10 mM NaOH takoj nevtralizirali z dodatkom 500 µL nevtralizacijskega pufra (2 M Tris-HCl, pH 6,5). Frakcijam smo izmerili A<sub>280</sub> s spektrofotometrom Lambda 25 (PerkinElmer, ZDA).

Pri izolektinu rCnSL-A smo na stacionarno fazo, po prvi afinitetni kromatografiji, še enkrat nanesli nevezano frakcijo in s tem preverili ali je delna vezava izolektinov posledica nizke vezavne kapacitete saharozil-sefaroze.

### **3.2.3.6. Hemaglutinacija in inhibicija hemaglutinacije**

Aktivnost naravnega lektina CnSucL in rekombinantnih saharozil izolektinov smo ugotavljal s hemaglutinacijskimi testi. Lektini z več vezavnimi mesti za ogljikove hidrate imajo sposobnost hemaglutinacije tistih eritrocitov, ki imajo na površini sladkorje, ki jih prepozna in veže lektin. Hemaglutinacijsko aktivnost smo ugotavljal s človeškimi eritrociti krvnih skupin A, B in 0 ter s kunčjimi eritrociti. Eritrocite smo izolirali s 5 min centrifugiranjem sveže krvi v hlajeni centrifuggi Rotina 380R (Andreas Hettich GmbH & Co., Nemčija) pri 1000× g in 4 °C. Nato smo jih z zaporednim centrifugiranjem (5 min pri 1000× g in 4 °C) večkrat sprali z eritrocitnim pufrom (20 mM Tris-HCl, 130 mM NaCl, pH 7,4) ter shranili v pufru za shranjevanje eritrocitov. Pri hemaglutinacijskih testih smo

uporabljali mikrotitrskne plošče z zaokroženim dnom (Nunclon Delta SI, Nunc, Danska). V vdolbinico smo odpipetirali po 20 µL posameznega lektina in dodali po 100 µL 2 % (v/v) suspenzije eritrocitov v eritrocitnem pufru. Po eni uri inkubacije pri sobni temperaturi smo aglutinacijo vizualno ocenili. Nadaljnje hemaglutinacijske teste smo izvajali le s kunčjimi eritrociti. Pri izolektinu rCnSL-A smo preverili, če izkazuje hemaglutinacijsko aktivnost pri višji koncentraciji, in sicer smo k 60 µL izolektina rCnSL-A dodali 60 µL 4 % (v/v) suspenzije kunčjih eritrocitov v eritrocitnem pufru. Za ostale lektine (naravni saharozil lektin, rCnSL-ProA, rCnSL-B in rCnSL-ProB) smo določili najnižjo koncentracijo pri kateri še aglutinirajo kunčje eritrocite in iz nje določili titer hemaglutinacije, definiran kot obratna vrednost najnižje koncentracije lektina, ki še aglutinira eritrocite. Najnižjo koncentracijo, ki še aglutinira eritrocite, smo določili tako, da smo v mikrotitrsko ploščo odpipetirali 18 µL neredčenih izolektinov, 18 µL 10× redčenih izolektinov, 18 µL 100× redčenih izolektinov in 18 µL 1000× redčenih izolektinov ter dodali 100 µL 2 % (v/v) suspenzije kunčjih eritrocitov v eritrocitnem pufru. Izolektinom rCnSL-ProA, rCnSL-B in rCnSL-ProB smo nadalje natančneje določili titer, in sicer smo v mikrotitrsko ploščo odpipetirali po 20, 16, 12, 8 in 4 µL posameznega izolektina, jim dodali eritrocitni pufer do volumna 20 µL ter 100 µL 2 % (v/v) suspenzije kunčjih eritrocitov v eritrocitnem pufru.

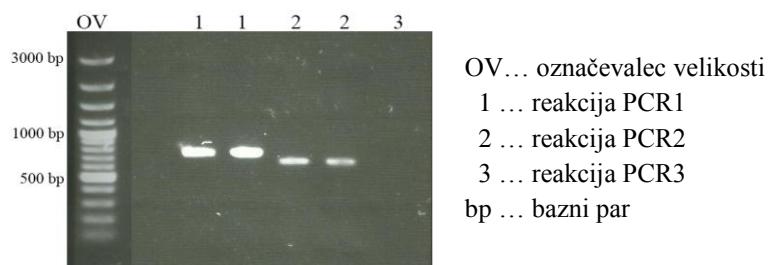
Vezavno specifičnost izolektinov rCnSL-ProA, rCnSL-B in rCnSL-ProB smo ugotavljali s testi inhibicije hemaglutinacije, in sicer smo uporabili kunčje eritrocite ter monosaharide D-glukozo, D-fruktozo in D-manozo ter disaharid saharozo (glukozil- $\alpha,\beta(1\rightarrow2)$ - fruktoza). K 25 µL izolektina rCnSL-ProA oz. rCnSL-ProB in 16 µL izolektina rCnSL-B smo dodali 50 µL 1 M raztopine posameznega sladkorja ter inkubirali pri sobni temperaturi 20 min. Nato smo dodali 50 µL 4 % (v/v) suspenzije kunčjih eritrocitov v eritrocitnem pufru in po eni uri vizualno ocenili inhibicijo hemaglutinacije. Določili smo tudi titer inhibicije hemaglutinacije, definiran kot obratna vrednost najnižje inhibitorne koncentracije sladkorja, ki še popolnoma prepreči aglutinacijo eritrocitov. Izolektinu rCnSL-B smo določili titer inhibicije hemaglutinacije za D-glukozo, D-fruktozo, D-manozo in saharozo, medtem ko smo izolektinoma rCnSL-ProA in rCnSL-ProB določili titer le za saharozo. K 25 µL izolektina rCnSL-ProA oz. rCnSL-ProB in 16 µL izolektina rCnSL-B smo dodali 50 µL posameznega sladkorja v koncentracijah 0,5 M, 0,25 M, 0,13 M, 63 mM in 31 mM, inkubirali 20 min ter nato dodali 50 µL 4 % suspenzije eritrocitov. Po eni uri smo ocenili najnižjo koncentracijo sladkorja, ki povzroči popolno inhibicijo hemaglutinacije.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Priprava sistema za izražanje rekombinantnih saharozil izolektinov

#### 4.1.1. Vstavitev restriktičnih mest v kodirajoče zaporedje cDNA

S PCR smo pomnožili kodirajočo cDNA z zapisom za izolektin rCnSL-ProA in vanjo vstavili restriktični mesti za restriktaži *NdeI* in *BamHI-HF*. Restriktaža *NdeI* cepi zaporedje 5'CA ] TATG3' in s tem omogoča vnos start kodona ATG z zapisom za Met, restriktaža *BamHI-HF* pa cepi zaporedje 5'G ] GATCC3'. Uporabili smo dva smiselna oligonukleotidna začetnika. Smiselni začetnik rProCnSL-A-NdeI-F se prilega zaporedju na začetku kodirajoče cDNA in vnese restriktično mesto tik pred zapis za N-končni propeptid. Smiselni začetnik rCnSL-A-NdeI-F se prilega zaporedju znotraj cDNA in vnese restriktično mesto in start kodon tako, da dobimo nukleotidno zaporedje, ki kodira lektin rCnSL-A. S protismiselnim oligonukleotidnim začetnikom rCnSL-A-Bam-HI-R smo v zaporedje vnesli tri stop kodone TAG (priloga 1). Uspešnost in specifičnost reakcij PCR smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (slika 2).



Slika 2: Analiza produktov reakcij PCR z agarozno gelsko elektroforezo

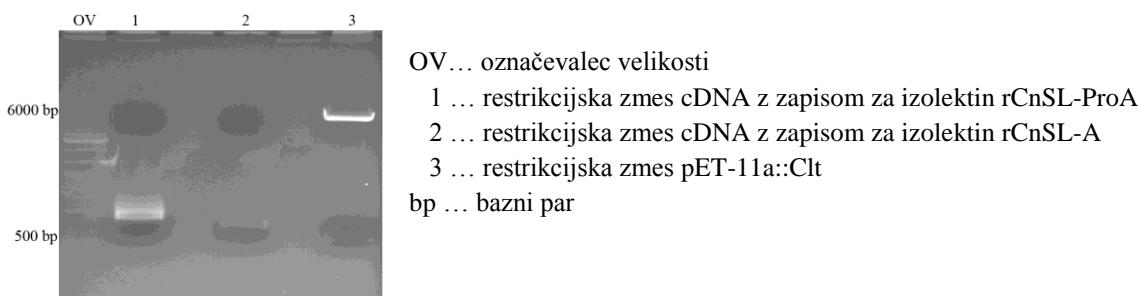
Agarozni gel (1 % (m/v)) fotografiran pri 300 nm.

Pri reakciji PCR1, kjer smo uporabili začetnika rProCnSL-A-NdeI-F in rCnSL-A-BamHI-R se je specifično pomnožila cDNA z zapisom za izolektin rCnSL-ProA. Slednja je bila, vključno z začetnim in enim končnim kodonom, dolga 666 baznih parov in se prevede v 221 aminokislin dolgo polipeptidno verigo. Z agarozno gelsko elektroforezo ocenjena velikost produkta je znašala okrog 700 bp. Pri reakciji PCR2, kjer smo uporabili začetnika rCnSL-A-NdeI-F in rCnSL-A-BamHI-R, se je specifično pomnožila cDNA z zapisom za izolektin rCnSL-A. Pri cDNA z zapisom za izolektin rCnSL-A je bilo kodirajoče zaporedje dolgo 576 baznih parov in se prevede v 191 aminokislin dolgo polipeptidno verigo. Z agarozno gelsko elektroforezo ocenjena velikost produkta je bila okrog 600 bp. cDNA z zapisom za izolektin rCnSL-A je manjša kot cDNA z zapisom za izolektin rCnSL-ProA, saj ne vsebuje nukleotidnega zaporedja, ki kodira N-končni propeptid. Reakcija PCR3 je

služila kot kontrola specifičnosti pomnoževanja. Pri njej smo uporabili samo smiseln začetnik rCnSL-A-NdeI-F in po pričakovanjih se pri reakciji PCR3 ni pomnožil noben fragment.

#### 4.1.2. Restrikcija fragmentov cDNA ter plazmida pET-11a

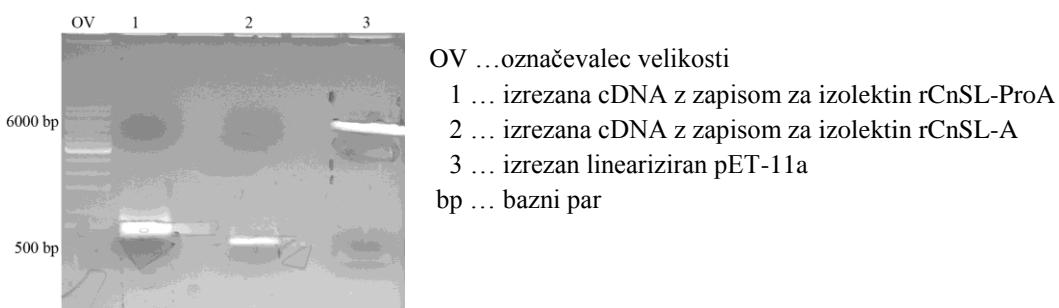
Produkte reakcije PCR smo očistili neposredno iz reakcijske zmesi. Izolirana fragmenta cDNA z zapisom za izolektina rCnSL-ProA in rCnSL-A ter vektor pET-11a smo cepili z restrikcijskima endonukleazama *NdeI* in *BamHI-HF*. S tem smo dobili lineariziran vektor pET-11a in kodirajoči cDNA, ki smo ju lahko preko restrikcijskih mest vstavili v ekspresijski vektor. Produkte restrikcije smo ločili z agarozno gelsko elektroforezo (slika 3) in očistili iz agaroznega gela (slika 4).



Slika 3: Ločba restrikcijskih zmesi fragmentov cDNA in vektorja pET-11a z agarozno gelsko elektroforezo

Agarozni gel (1 % (m/v)) fotografiran pri 300 nm.

Na agaroznem gelu (slika 3) smo videli, da se je iz vektorja pET-11a uspešno izrezala cDNA z zapisom za klitocipin. Na gelu sta bili nameč vidni dve lisici. Večja (6000 bp) je pripadala lineariziranemu vektorju pET-11a, manjša (500 bp) pa je predstavljala cDNA z zapisom za klitocipin.



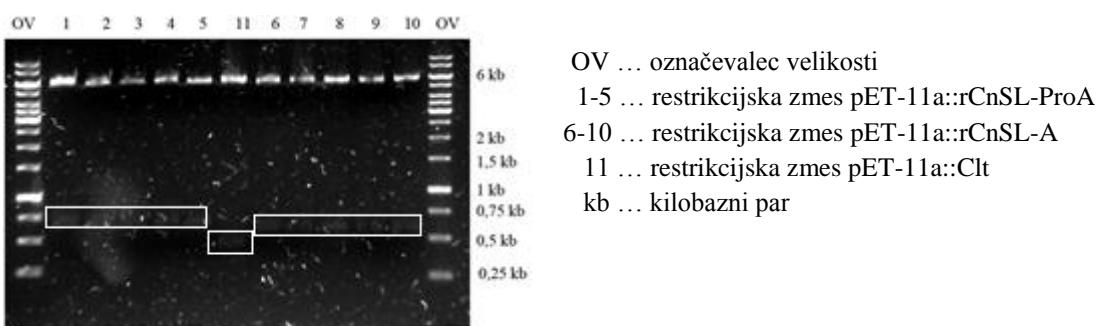
Slika 4: Izrezana fragmenta cDNA in vektor pET-11a iz agaroznega gela

Agarozni gel (1 % (m/v)) z izrezanimi fragmentoma cDNA in vektorjem pET-11a fotografiran pri 300 nm.

#### 4.1.3. Priprava in pomnožitev ekspresijskih vektorjev

Fragmenta cDNA z zapisom za izolektina rCnSL-ProA in rCnSL-A smo s pomočjo ligaze DNA T4 preko restriktijskih mest subklonirali v plazmid pET-11a. Dobljene ekspresijske vektorje smo pomnožili v celicah *E. coli* DH5α. Izbrali smo po 5 kolonij, iz katerih smo izolirali pDNA.

S kontrolno dvojno restrikcijo smo preverili, če so izolirani vektorji pET-11a vsebovali cDNA z zapisom za izolektin rCnSL-ProA oz. rCnSL-A. Hkrati smo za primerjavo naredili dvojno restrikcijo vektorja pET-11a, ki je vseboval cDNA z zapisom za klitocipin. Restriktijske reakcije smo analizirali z agarozno gelsko elektroforezo (slika 5). Kontrolna dvojna restrikcija je potrdila vsebnost cDNA z zapisom za izolektin rCnSL-ProA oz. rCnSL-A v ustremnem plazmidu. Po restrikciji pET-11a::rCnSL-ProA, pET-11a::rCnSL-A in pET-11a::Clt sta bili na agaroznem gelu vidni po dve lisi. Zgornja je bila pri vseh enako velika in je predstavljala lineariziran vektor pET-11a. Manjša lisa je bila fragment kodirajoče cDNA. Ta je največji pri rCnSL-ProA (687 bp), manjši pri rCnSL-A (588 bp) in najmanjši pri Clt, kar je bilo v skladu z rezultati agarozne gelske elektroforeze.



Slika 5: Analiza produktov kontrolne dvojne restrikcije z agarozno gelsko elektroforezo

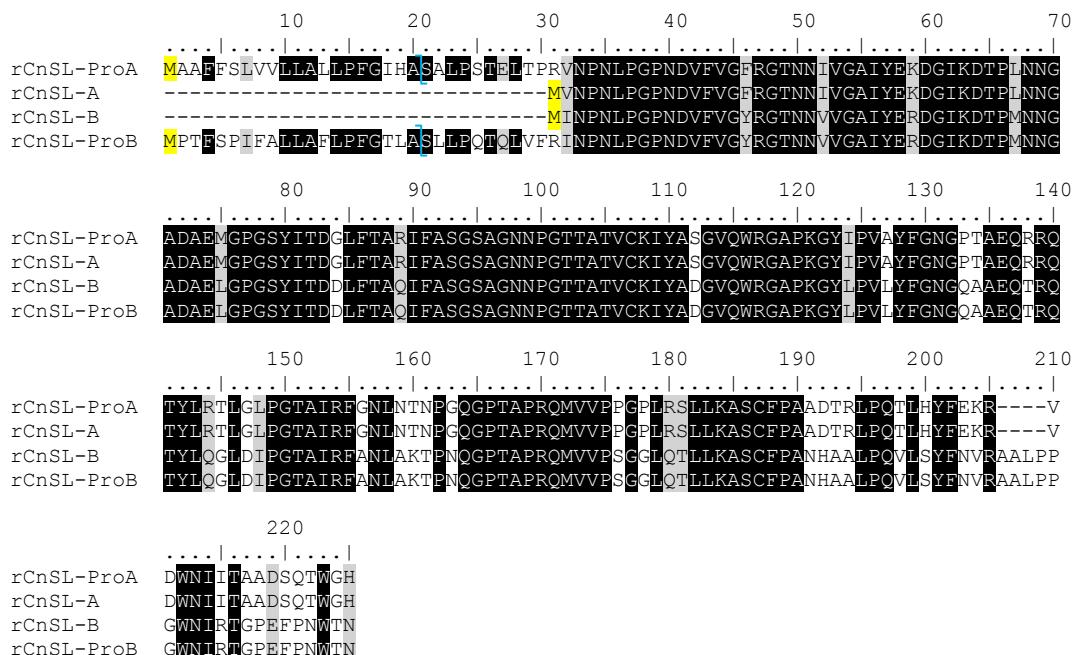
Agarozni gel (1 % (m/v)) fotografiran pri 300 nm. Na sliki so z belo obkrožene kodirajoče cDNA.

Za nadaljnjo delo smo izbrali plazmid pET-11a::rCnSL-ProA, izoliran iz kolonij 4 in 5 ter plazmid pET-11a::rCnSL-A, izoliran iz kolonij 6 in 9. Plazmid pET11a::rCnSL-ProA smo izolirali v koncentraciji 218 ng/µL iz kolonije 4 in v koncentraciji 236,0 ng/µL iz kolonije 5. Plazmid pET-11a::rCnSL-A smo izolirali v koncentraciji 234,0 ng/µL iz kolonije 6 in v koncentraciji 267,8 ng/µL iz kolonije 9. Izbranim plazmidnim vektorjem pET-11a::rCnSL-ProA in pET-11a::rCnSL-A smo določili nukleotidno zaporedje. Med pomnoževanjem ni prišlo do napak, saj so bila dobljena zaporedja identična predhodno določenim zaporedjem.

## 4.2. Priprava rekombinantnih saharozil izolektinov

### 4.2.1. Analiza aminokislinskih zaporedij izpeljanih iz cDNA

Iz zaporedij cDNA smo izpeljali aminokislinska zaporedja rekombinantnih saharozil izolektinov in jih primerjali med seboj s programom BioEdit, verzija 7.1.3. (slika 6).



Slika 6: Poravnavna izpeljanih aminokislinskih zaporedij rekombinantnih saharozil izolektinov

S črno barvo so senčene enake aminokisline, s sivo podobne aminokisline in z rumeno začetni metionin. Z znakom » l « je označeno z orodjem SIG-Pred predvideno mesto cepitve izolektinov rCnSL-ProA in rCnSL-ProB.

Naravni saharozil lektin iz gobe meglenke (*Clitocybe nebularis*) ima N-končno zaporedje VNPN [59], kar se ujema z N-končnim zaporedjem izolektina rCnSL-A. Identičnost zaporedij rekombinantnih izolektinov rCnSL-A in rCnSL-B znaša 74,2 %, pri čemer sta si izolektina bolj podobna na N-končni polovici. Zaporedji izolektinov imata na N-končni polovici (od 32. do 123. AK) namreč 90,2 % identičnost, medtem ko je identičnost C-končne polovice zaporedij (od 124. do 225. AK) 59,5 %. Zaporedji propeptidov (od 1. do 31. AK) izolektinov rCnSL-ProA in rCnSL-ProB imata 51,6 % identičnost.

Z orodjem SIG-Pred smo preverili, če je v izolektinih rCnSL-ProA in rCnSL-ProB, ki vsebujeta N-končni propeptid, prisotno signalno zaporedje. Orodje je predvidevalo prisotnost N-končnega signalnega zaporedja, ki je značilno tako za evkarionte kot za bakterijo *E. coli* in bi se pri obeh izolektinih cepilo med aminokislinsama A20 in S21. Orodje ni predvidelo cepitve med 31. in 32. aminokislino, ki bi vodila v nastanek

izolektinov rCnSL-A oz. rCnSL-B. Z orodjem ProtParam smo izolektinom, na podlagi izpeljanih aminokislinskih zaporedij, izračunali predvidene biokemijske lastnosti (preglednica XIV). Izolektinoma rCnSL-ProA in rCnSL-ProB smo določili lastnosti z intaktnim in s procesiranim aminokislinskim zaporedjem, kot predvideva orodje SIG-Pred.

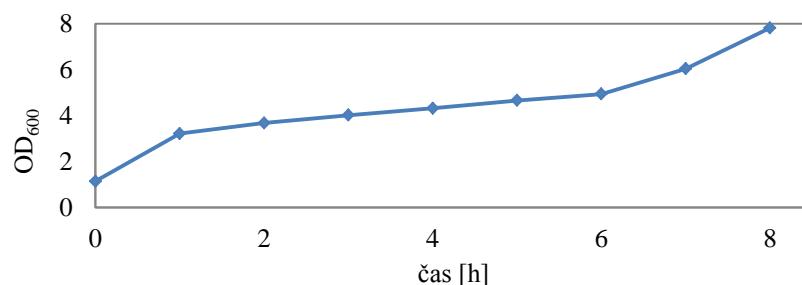
Preglednica XIV: Predvidene lastnosti rekombinantnih saharozil izolektinov

	rCnSL-A	rCnSL-B	rCnSL-ProA	procesiran rCnSL-ProA	rCnSL-ProB	procesiran rCnSL-ProB
število AK	191	195	221	201	225	205
prvi AK	MV	MI	MA	SA	MP	SL
MM [kDa]	20,395	20,727	23,530	21,417	24,016	21,880
pI	9,39	7,74	9,39	9,39	8,58	8,58
$\epsilon$ [l/mol·cm]	26993	28483	26993	26993	28483	28483
A <sub>0,1 %</sub>	1,32	1,37	1,15	1,26	1,19	1,30

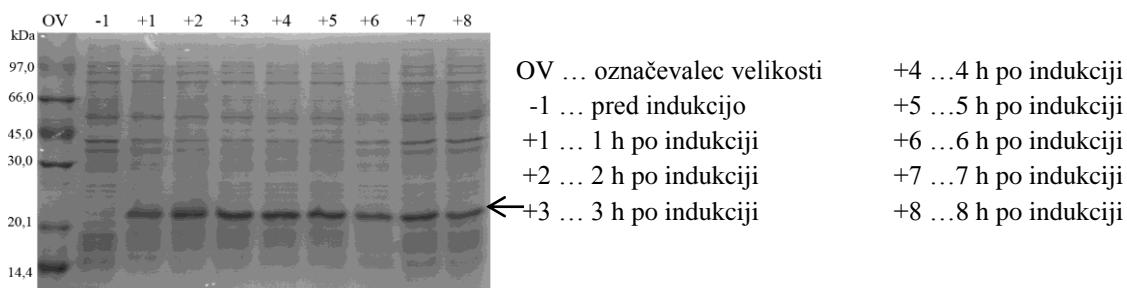
Z uporabo orodja BLASTp smo primerjali aminokislinska zaporedja rekombinantnih saharozil izolektinov z zaporedji proteinov v podatkovnih bazah in ugotovili, da so vsi štirje izolektini podobni hipotetičnim proteinom CC16\_06022, CC16\_11118 in CC1G\_06042 iz gobe gnojiščne tintnice (*Coprinopsis cinerea* Okayama 7). Identičnost zaporedij izolektina rCnSL-A in proteina CC16\_06022 znaša 20,9 % (priloga 2).

#### 4.2.2. Priprava in čiščenje rekombinantnega izolektina rCnSL-A

Pri izolektinu rCnSL-A smo s poskusnim izražanjem analizirali, koliko časa po indukciji izražanja je prisotno največ rekombinantnega proteina. Izražanje smo inducirali ob času 0, ko je OD<sub>600</sub> dosegla vrednost 1,140. Analiza vzorcev, ki smo jih zbirali vsako uro osem ur po indukciji izražanja (sliki 7 in 8), je pokazala, da je najmočnejše izražanje štiri oz. pet ur po indukciji. Ker glede na izmerjene vrednosti OD<sub>600</sub>, v navedenem času število bakterij narašča, je optimalen čas izražanja 5 ur po indukciji, saj je takrat izkoristek večji.



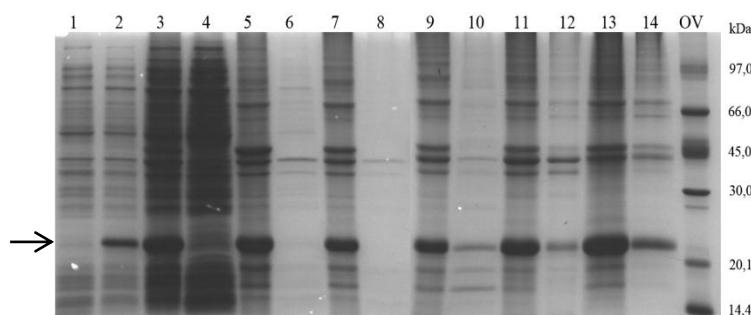
Slika 7: Odvisnost OD<sub>600</sub> od časa po indukciji izražanja izolektina rCnSL-A v kulturi *E. coli* BL21(DE3) pET-11a::rCnSL-A



**Slika 8: Analiza poskusnega izražanja izolektina rCnSL-A z NaDS PAGE**

Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue. Puščica označuje liso, ki predstavlja izolektin rCnSL-A.

Izolektin rCnSL-A smo pripravili z izražanjem v 1200 mL tekočega gojišča LBA. Izražanje smo inducirali pri  $OD_{600}$  1,052 in ga zaustavili 5 ur kasneje. Po izražanju smo bakterijske celice razbili in rekombinantni lektin rCnSL-A postopno raztapljal iz inkluzijskih teles. Postopek izolacije iz inkluzijskih teles smo analizirali z NaDS PAGE (slika 9).



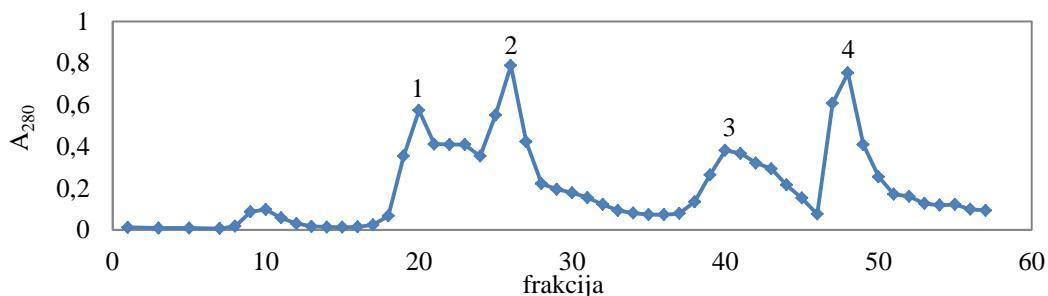
**Slika 9: Analiza raztpljanja izolektina rCnSL-A iz inkluzijskih teles z NaDS PAGE**

Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue. Puščica označuje liso, ki predstavlja izolektin rCnSL-A.

OV...označevalec velikosti	8... frakcija topna v 1 M sečnini
1... bakterijski lizat pred indukcijo	9... oborina resuspendirana v 3 M sečnini
2... bakterijski lizat 5 ur po indukciji	10... frakcija topna v 3 M sečnini
3... bakterijski lizat po sonificiranju	11... oborina resuspendirana v 6 M sečnini
4... topna frakcija bakterijskega lizata	12... frakcija topna v 6 M sečnini
5... netopna frakcija resuspendirana v pufru TET	13... oborina resuspendirana v 8 M sečnini
6... frakcija topna v pufru TET	14... frakcija topna v 8 M sečnini
7... oborina resuspendirana v 1 M sečnini	

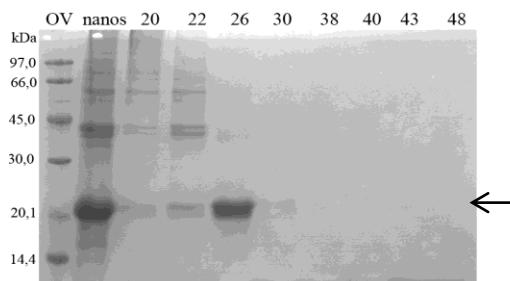
Rekombinantni izolektin rCnSL-A se je začel raztapljal iz inkluzijskih teles v 3 M sečnini v pufru TET, dokončno pa se je raztopil v 6 M in 8 M sečnini v pufru TET. V inkluzijskih telesih so bile prisotne tudi nečistoče z molekulskimi masami nad 45 kDa (slika 9), zato smo rekombinantni izolektin rCnSL-A čistili z gelsko filtracijo v prisotnosti 3 M sečnine. Ker je bila večina izolektina raztopljen v 6 M in 8 M sečnini v pufru TET, smo vzorca združili in nanesli na nosilec za gelsko filtracijo. Izolektin rCnSL-A, ki se je raztopil že v 3 M sečnini, zaradi omejene kapacitete nismo nanesli na nosilec. V frakcijah,

ki smo jih zbirali med gelsko filtracijo, smo izmerili A<sub>280</sub> (slika 10) in preverili vsebnost proteinov v izbranih frakcijah z NaDS PAGE (slika 11).



Slika 10: Odvisnost A<sub>280</sub> od frakcije pri čiščenju izolektina rCnSL-A z gelsko filtracijo

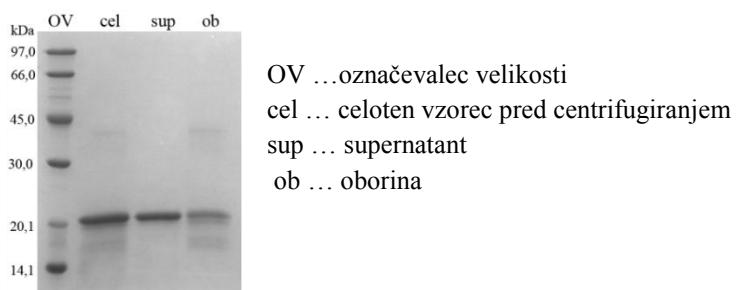
Gelska filtracija izolektina rCnSL-A na nosilcu »Sephadryl® S-200 High resolution« z uporabo pufera, 20 mM Tris-HCl, 3 M sečnina, 0,3 M NaCl, pH 7,5 pri pretoku 63,6 mL/h. Volumen posamezne frakcije je znašal 24,4 mL.



Slika 11: Analiza vsebnosti izbranih frakcij po gelski filtraciji izolektina rCnSL-A z NaDS PAGE

Poliakrilamidni gel barvan s Coomassie Brilliant Blue (12 % (m/v)). S številkami so označene frakcije, ki smo jih analizirali. Puščica označuje liso, ki predstavlja izolektin rCnSL-A.

Rekombinantni lektin rCnSL-A se je nahajal v vrhovih 1 in 2. V vrhu 1 je bilo relativno malo lektina, prisotni pa so bili tudi večji proteini. V vrhu 2 se je nahajal relativno čist lektin rCnSL-A. V pufru vzorca, ki smo ga čistili z gelsko filtracijo, je bil prisoten Triton X-100, ki absorbira svetlobo pri valovni dolžini 280 nm in je verjetno predstavljal zadnja dva vrhova, saj v njiju analiza z NaDS PAGE ni pokazala prisotnosti proteinov. Združili smo frakcije 24 - 33, ki sestavljajo vrh 2, in jih z ultrafiltracijo skoncentrirali na 50 mL. Da bi dosegli pravilno zvitje rekombinantnega lektina rCnSL-A smo z dializo postopoma iz pufera oz. vzorca odstranili sečnino. Med dializo je prišlo do obarjanja, zato smo vsebnost lektina rCnSL-A v celotnem vzorcu, oborini in supernatantu analizirali z NaDS PAGE (slika 12). Analiza z NaDS PAGE je pokazala, da so bile v oborini prisotne nečistoče in lektin rCnSL-A. Večina lektina je bila prisotna v supernatantu. Med dializo smo sicer z obarjanjem izgubili del rekombinantnega izolektina rCnSL-A, vendar so se oborile predvsem nečistoče, zaradi česar smo pridobili bolje očiščen rekombinantni lektin.



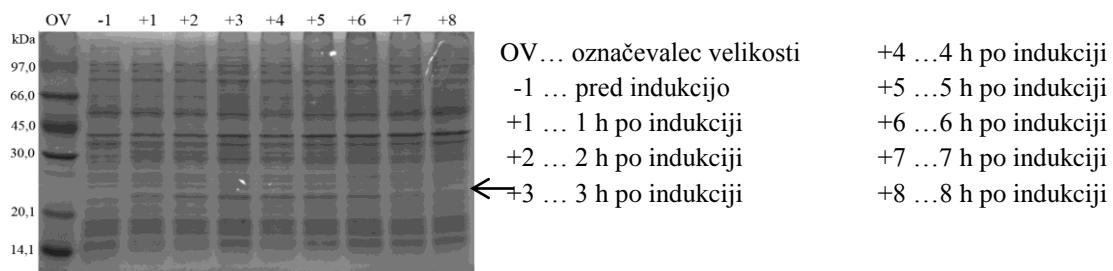
Slika 12: Analiza obarjanja izolektina rCnSL-A med dializo z NaDS PAGE

Analiza prisotnosti lektina rCnSL-A v celotnem vzorcu, supernatantu in oborini pri obarjanju med dializo z NaDS PAGE. Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue.

Supernatant smo z ultrafiltracijo skoncentrirali do 18,0 mL in izmerili  $A_{280}$ , ki je znašala 1,238. Z uporabo Beer-Lambertovega zakona, smo izračunali koncentracijo lektina rCnSL-A, ki je znašala 0,935 mg/mL. Z izražanjem v 1200 mL tekočega gojišča LBA, pri čemer smo izražanje inducirali pri  $OD_{600}$  približno 1 in ga zaustavili 5 ur po indukciji, raztapljanjem inkluzijskih teles v 6 in 8 M sečnini in čiščenjem z gelsko filtracijo v prisotnosti 3 M sečnine ter zvijanjem proteina s postopnim odstranjevanjem sečnine smo pripravili 16,8 mg očiščenega rekombinantnega izolektina rCnSL-A. Izkoristek pridobivanja lektina rCnSL-A je znašal 14,0 mg/L bakterijske kulture.

#### 4.2.3. Priprava in čiščenje rekombinantnega izolektina rCnSL-ProA

S poskusnim izražanjem izolektina rCnSL-ProA smo želeli ugotoviti jakost izražanja in čas po indukciji, ko je prisotnega največ izolektina. Izražanje smo inducirali z IPTG pri  $OD_{600}$  0,958. Analiza vzorcev, ki smo jih zbirali vsako uro osem ur po indukciji (slika 13), je pokazala, da je izražanje lektina rCnSL-ProA v izbranih pogojih zelo šibko.

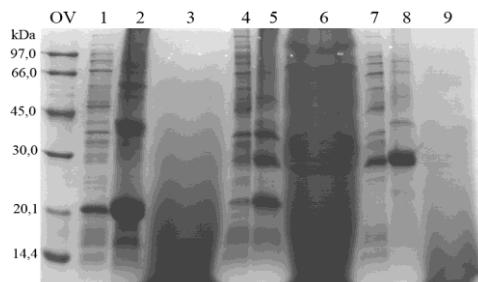


Slika 13: Analiza poskusnega izražanja izolektina rCnSL-ProA (indukcija izražanja pri  $OD_{600} \sim 1$ ) z NaDS PAGE

Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue. Puščica označuje liso, ki predstavlja izolektin rCnSL-ProA.

Preverili smo, ali je bila nizka količina izolektina rCnSL-ProA v bakterijskem lizatu posledica izločanja v gojišče, saj omenjeni izolektin vsebuje na N-končnem delu propeptid,

ki bi lahko usmerjal izločanje v gojišče. Proteine v gojišču smo obarjali z acetonom ter nato z NaDS PAGE analizirali prisotnost izolektina (slika 14). Hkrati smo preverili tudi izločanje lektina rCnSL-ProB v gojišče, vzorec oborjenih proteinov v gojišču po izražanju lektina rCnSL-A pa nam je služil kot primerjava za običajno vsebnost proteinov v gojišču.



Slika 14: Analiza izločanja izolektinov rCnSL-ProA in rCnSL-ProB v gojišče z NaDS PAGE

Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue.

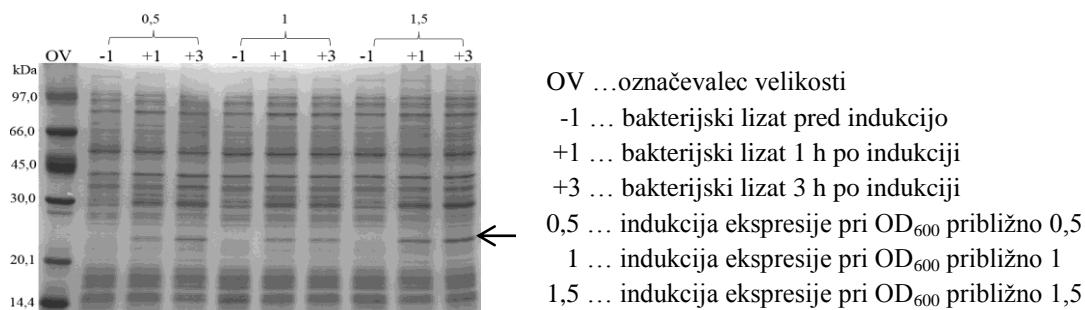
OV ... označevalec velikosti

- 1 ... bakterijski lizat *E. coli* BL21(DE3) pET-11a::rCnSL-A po indukciji izražanja
- 2 ... netopna frakcija bakterijskega lizata, ki vsebuje inkluzijska telesca z izolektinom rCnSL-A
- 3 ... oborjeni proteini v gojišču po izražanju izolektina rCnSL-A
- 4 ... bakterijski lizat *E. coli* BL21(DE3) pET-11a::rCnSL-ProA po indukciji izražanja
- 5 ... netopna frakcija bakterijskega lizata, ki vsebuje inkluzijska telesca z izolektinom rCnSL-ProA
- 6 ... oborjeni proteini v gojišču po izražanju izolektina rCnSL-ProA
- 7 ... bakterijski lizat *E. coli* BL21(DE3) pET-11a::rCnSL-ProB po indukciji izražanja
- 8 ... netopna frakcija bakterijskega lizata, ki vsebuje inkluzijska telesca z izolektinom rCnSL-ProB
- 9 ... oborjeni proteini v gojišču po izražanju izolektina rCnSL-ProB

Analiza z NaDS PAGE je pokazala, da se izolektina rCnSL-ProA in rCnSL-ProB nista izločala v gojišče, saj na gelu ni bilo ustrezne proteinske lise. Hkrati je bila vsebnost proteinov v gojiščih po izražanju lektinov rCnSL-A, rCnSL-ProA in rCnSL-ProB podobna.

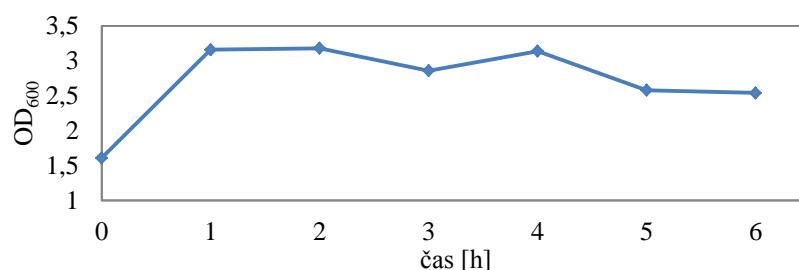
Zaradi šibkega izražanja lektina rCnSL-ProA v izbranih pogojih, bi bil izkoristek priprave in čiščenja slab. Iz tega razloga smo izražanje optimirali tako, da smo spremajali čas indukcije izražanja, in sicer smo v dodatnem poskusu izražanje inducirali pri vrednostih OD<sub>600</sub> 0,460, 1,072 in 1,561 ter nato jakost izražanja analizirali z NaDS PAGE (slika 15). Izražanje lektina rCnSL-ProA je bilo najbolj intenzivno v kulturi, kjer smo inducirali izražanje pri OD<sub>600</sub> približno 1,5. Za ta primer smo z NaDS PAGE analizirali, kdaj po indukciji je izražanje najmočnejše (sliki 16 in 17). Po indukciji izražanja se je rast bakterij ustavila. Sklepali smo, da ima izražanje izolektina rCnSL-ProA verjetno celo toksičen učinek na bakterije, saj se je vrednost OD<sub>600</sub> znižala. Največ rekombinantnega proteina je bilo v vzorcih 4, 5 in 6 ur po indukciji. Ker se je 4 ure po indukciji vrednost OD<sub>600</sub> nižala,

optimalno izražanje izolektina rCnSL-ProA zagotovimo z indukcijo izražanja pri vrednosti  $OD_{600}$  približno 1,5 ter z zaustavitvijo izražanja 4 ure po indukciji.

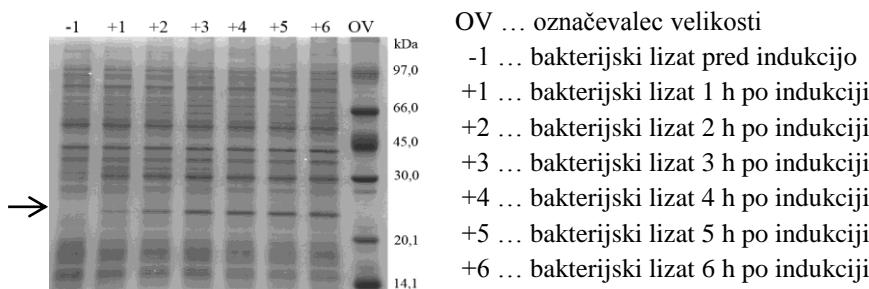


Slika 15: Analiza poskusnega izražanja izolektina rCnSL-ProA pri različnih časih indukcije z NaDS PAGE

Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue. Puščica označuje liso, ki predstavlja izolektin rCnSL-ProA.



Slika 16: Odvisnost  $OD_{600}$  od časa po indukciji izražanja izolektina rCnSL-ProA pri  $OD_{600} \sim 1,5$  v kulturi *E. coli* BL21(DE3) pET- 11a::rCnSL-ProA

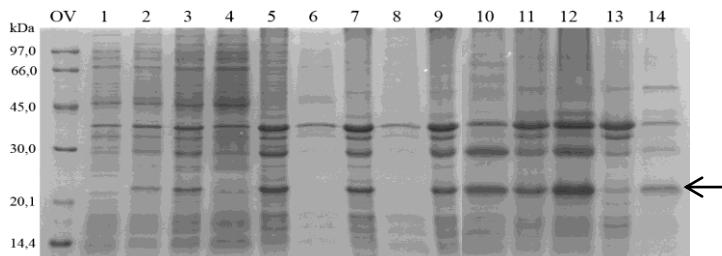


Slika 17: Analiza poskusnega izražanja izolektina rCnSL-ProA (indukcija izražanja pri  $OD_{600} \sim 1,5$ ) z NaDS PAGE

Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue. Puščica označuje liso, ki predstavlja izolektin rCnSL-ProA.

Izolektin rCnSL-ProA smo pripravili z izražanjem v 1200 mL tekočega gojišča LBA, pri čemer smo izražanje inducirali pri vrednosti  $OD_{600}$  1,490 in ga zaustavili 4 ure kasneje. Po izražanju smo razbili bakterijske celice in izolektin rCnSL-ProA postopno raztapljal iz inkluzijskih teles. Postopek izolacije iz inkluzijskih teles smo analizirali z NaDS PAGE (slika 18). Rekombinantni izolektin rCnSL-ProA se je iz inkluzijskih teles raztopil v 3 M, 6 M in 8 M sečnini v pufru TET. V inkluzijskih telesih so bile prisotne tudi nečistoče z molekulskimi masami nad 30 kDa (slika 18), zato smo lektin rCnSL-ProA čistili z gelsko

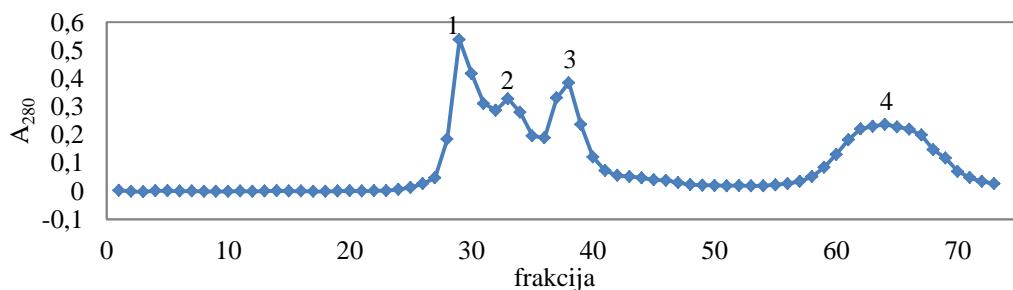
filtracijo. Glede na ostale proteine je bilo relativno največ izolektina raztopljenega v 6 M in 8 M sečnini v pufru TET, zato smo ta dva vzorca združili in nanesli na nosilec za gelsko filtracijo. Vzorci izolektina, ki se je raztopil v 3 M sečnini v pufru TET, zaradi omejene kapacitete nismo nanesli na kolono. Med gelsko filtracijo smo zbirali frakcije, jim izmerili  $A_{280}$  in preverili vsebnost proteinov v izbranih frakcijah z NaDS PAGE (sliki 19 in 20).



**Slika 18: Analiza razapljanja izolektina rCnSL-ProA iz inkluzijskih teles z NaDS PAGE**

Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue. Puščica označuje liso, ki predstavlja izolektin rCnSL-ProA.

- |  |  |
|--|--|
| OV...označevalec velikosti                       | 8... frakcija topna v 1 M sečnini          |
| 1... bakterijski lizat pred indukcijo            | 9... oborina resuspendirana v 3 M sečnini  |
| 2... bakterijski lizat 4 ure po indukciji        | 10... frakcija topna v 3 M sečnini         |
| 3... bakterijski lizat po sonificiranju          | 11... oborina resuspendirana v 6 M sečnini |
| 4... topna frakcija bakterijskega lizata         | 12... frakcija topna v 6 M sečnini         |
| 5... netopna frakcija resuspendirana v pufru TET | 13... oborina resuspendirana v 8 M sečnini |
| 6... frakcija topna v pufru TET                  | 14... frakcija topna v 8 M sečnini         |
| 7...oborina resuspendirana v 1 M sečnini         |  |



**Slika 19: Odvisnost  $A_{280}$  od frakcije pri čiščenju izolektina rCnSL-ProA z gelsko filtracijo**

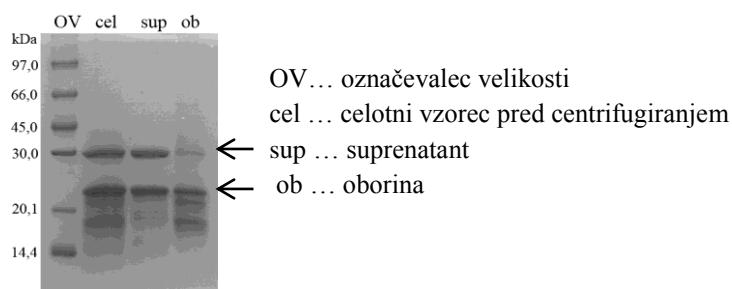
Gelska filtracija izolektina rCnSL-ProA na nosilcu »Sephadryl® S-200 High resolution« z uporabo pufra 20 mM Tris-HCl, 3 M sečnina, 0,3 M NaCl, pH 7,5 pri pretoku 42,6 mL/h. Volumen posamezne frakcije je znašal 16,3 mL.



**Slika 20: Analiza vsebnosti izbranih frakcij po gelski filtraciji izolektina rCnSL-ProA z NaDS PAGE**

Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue. S številkami so označene frakcije, ki smo jih analizirali.

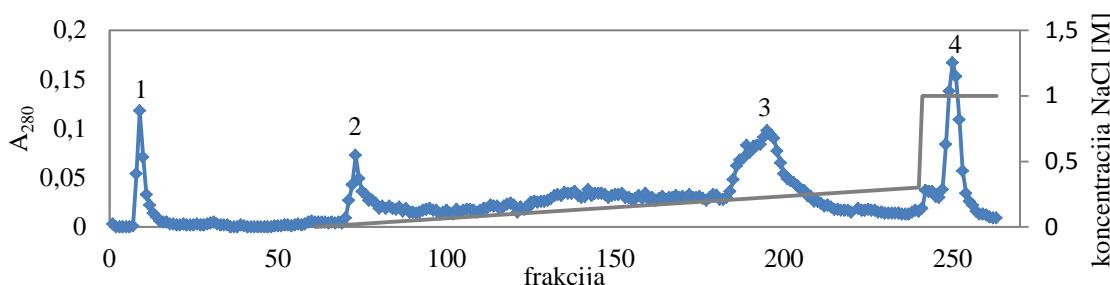
Izolektin rCnSL-ProA se z gelsko filtracijo ni povsem očistil. V vrhu 1 in 2 so bili prisotni proteini z višjo molekulsko maso, s tem da je bil v vrhu 2 prisoten še majhen del izolektina rCnSL-ProA. Največ izolektina se je nahajalo v vrhu 3, kjer je bila prisotna tudi nečistoča velikosti 30 kDa. Vrh 4 je verjetno vseboval Triton X-100, saj v njem analiza z NaDS PAGE ni pokazala prisotnosti proteinov. Frakcije 36-41, ki so sestavljale vrh 3, smo združili in z ultrafiltracijo skoncentrirali na 9,5 mL. Identiteto 30 kDa velike nečistoče smo preverili z določitvijo N-končnega zaporedja (slika 35), in sicer smo lisi PROA30, ki ustreza nečistoči velikosti 30 kDa, določili N-končno zaporedje HPETLVKV. Z orodjem BLASTp na strežniku NCBI smo primerjali dobljeno zaporedje s proteini iz podatkovnih baz. Izkazalo se je, da je šlo za  $\beta$ -laktamazo, encim, ki omogoča bakterijam odpornost proti  $\beta$ -laktamskim antibiotikom, kakršen je tudi ampicilin. Vektor pET-11a nosi zapis za  $\beta$ -laktamazo in s tem omogoča rast bakterij, ki vsebujejo plazmid, na selekcijskem gojišču LBA. Nukleotidno zaporedje  $\beta$ -laktamaze, zapisane v vektorju pET-11a, smo z orodjem Translate prevedli v aminokislinsko zaporedje in mu nato z orodjem ProtParam predvideli izoelektrično točko, ki je znašala 5,46. Predvideni izoelektrični točki izolektina rCnSL-ProA (9,36) in  $\beta$ -laktamaze (5,46) sta se razlikovali za več kot dve enoti, kar je omogočilo čiščenje izolektina rCnSL-ProA z ionsko izmenjevalno kromatografijo. Odločili smo se izolektin rCnSL-ProA čistiti s kationsko izmenjevalno kromatografijo pri pH 7,0, pri katerem je izolektin pozitivno nabit in naj bi se vezal na kationski izmenjevalec, medtem ko je  $\beta$ -laktamaza negativno nabita in naj se ne bi vezala. Med dializo (50 mM fosfatni pufer, pH 7,0), pri pripravi vzorca za ionsko izmenjevalno kromatografijo, je prišlo do obarjanja. Z dializo smo kljub temu nadaljevali, saj mora biti vzorec za uspešno ionsko izmenjevalno kromatografijo brez soli. Po dializi smo s centrifugiranjem odstranili oborino in z NaDS PAGE analizirali prisotnost izolektina v oborini in supernatantu (slika 21).



Slika 21: Analiza obarjanja izolektina rCnSL-ProA med dializo z NaDS PAGE

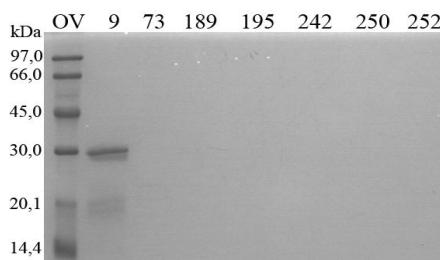
Analiza prisotnosti lektina rCnSL-ProA v celotnem vzorcu, supernatantu in oborini pri obarjanju med dializo pri pripravi vzorca za ionsko izmenjevalno kromatografijo z NaDS PAGE. Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue. Zgornja pučica označuje liso, ki predstavlja nečistočo velikosti 30 kDa, spodnja puščica pa označuje liso, ki predstavlja izolektin rCnSL-ProA.

Tako v oborini kot v supernatantu, so bili prisotni izolektin rCnSL-ProA,  $\beta$ -laktamaza in druge nečistoče, vendar je večina izolektina rCnSL-ProA ostala raztopljena v supernatantu. Slednjega smo nanesli na kolono za ionsko izmenjevalno kromatografijo z nosilcem karboksimetil celulozo. Za elucijo smo izbrali povečanje ionske moči in uporabili gradientno elucijo z naraščanjem vsebnosti NaCl. V frakcijah, ki smo jih zbirali med ionsko izmenjevalno kromatografijo, smo izmerili  $A_{280}$  (slika 22) in preverili vsebnost proteinov v izbranih frakcijah z NaDS PAGE (slika 23).



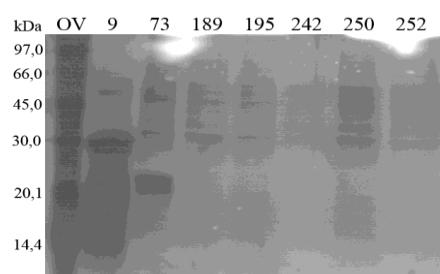
Slika 22: Odvisnost  $A_{280}$  od frakcije pri čiščenju rekombinantnega izolektina rCnSL-ProA z ionsko izmenjevalno kromatografijo na karboksimetil celulozi

Ionsko izmenjevalna kromatografija izolektina rCnSL-ProA na karboksimetil celulozi z gradientno elucijo z naraščanjem koncentracije NaCl v 50 mM fosfatnem pufru, pH 7,0. Pretok pufra je znašal 13,8 mL/h, volumen posamezne frakcije pa 5,3 mL. Modra linija prikazuje absorbanco posamezne frakcije pri 280 nm, siva pa naraščanje koncentracije NaCl v pufru.



Slika 23: Analiza vsebnosti izbranih frakcij po ionsko izmenjevalni kromatografiji izolektina rCnSL-ProA na karboksimetil celulozi z NaDS PAGE

Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue. S številkami so označene frakcije, ki smo jih analizirali.

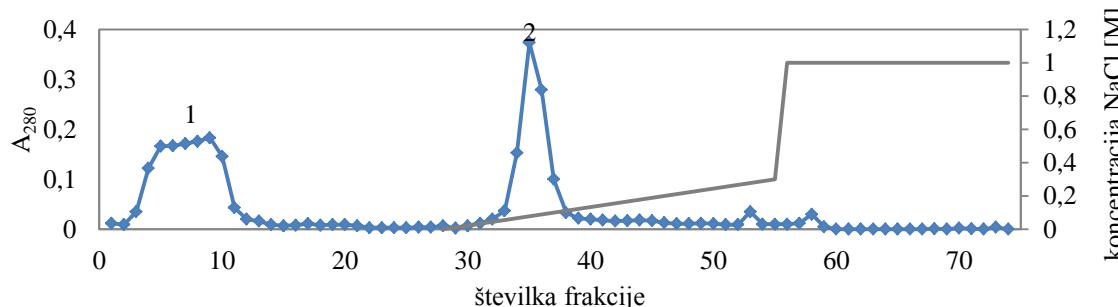


Slika 24: Analiza vsebnosti izbranih frakcij po ionsko izmenjevalni kromatografiji izolektina rCnSL-ProA na karboksimetil celulozi z NaDS PAGE - barvanje s srebrom

Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s srebrom. S številkami so označene frakcije, ki smo jih analizirali.

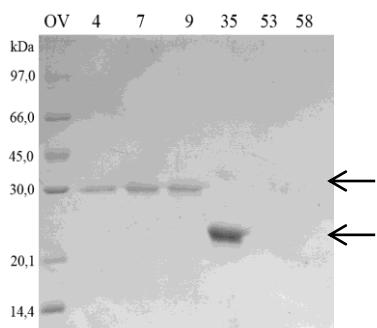
Analiza izbranih frakcij z NaDS PAGE je pokazala, da sta se v vrhu 1, ki je predstavljal nevezano frakcijo, nahajala  $\beta$ -laktamaza in del izolektina rCnSL-ProA. Vsebnosti proteinov v ostalih vrhovih, po barvanju poliakrilamidnega gela z barvilkom Coomassie Brilliant Blue, nismo zaznali, zato smo gel barvali s srebrovimi ioni (slika 24). Izkazalo se je, da se je relativno čist izolektin rCnSL-ProA nahajal v vrhu 2, medtem ko so bile v vrhovih 3 in 4 prisotne le nečistoče. Frakcije vrha 2 (70-80) smo združili in z ultrafiltracijo ter centrifugalnim filtriranjem skoncentrirali na 850  $\mu$ L ter določili  $A_{280}$  0,341. Koncentracija izolektina rCnSL-ProA, ki smo jo izračunali po Beer-Lambertovem zakonu, je znašala 0,271 mg/mL. Po opisanem postopku smo pridobili 0,230 mg očiščenega izolektina rCnSL-ProA. Ker smo večino lektina izgubili v koraku ionsko izmenjevalne kromatografije in pri koncentriranju v centrifugalnem filtru, smo ponovili pridobivanje in optimirali postopek ionsko izmenjevalne kromatografije, in sicer smo ionsko izmenjevalno kromatografijo izvajali v prisotnosti 3 M sečnine na nosilcu sefarozu SP.

Postopek pridobivanja izolektina rCnSL-ProA z izražanjem, raztapljanje iz inkluzijskih teles in gelsko filtracijo smo ponovili po enakem postopku, kot je opisano. Po gelski filtraciji smo frakcije, ki so vsebovale lektin rCnSL-ProA združili, jih z ultrafiltracijo skoncentrirali na 60 mL in dializirali v začetni pufer 2 (50 mM fosfatni pufer, 3 M sečnina, pH 7,0), pri čemer tokrat ni prišlo doobarjanja lektina. Za čiščenje z ionsko izmenjevalno kromatografijo smo uporabili sefarozo SP. Po spiranju z začetnim pufrom 2 smo lektin rCnSL-ProA eluirali z gradientno elucijo s povečano ionsko močjo. Frakcijam smo izmerili  $A_{280}$  (slika 25) in z NaDS PAGE analizirali prisotnost izolektina v izbranih frakcijah (slika 26).



Slika 25: Odvisnost  $A_{280}$  od frakcije pri čiščenju rekombinantnega izolektina rCnSL-ProA z ionsko izmenjevalno kromatografijo na sefarazi SP

Ionsko izmenjevalna kromatografija izolektina rCnSL-ProA na sefarazi SP z gradientno elucijo z naraščanjem koncentracije NaCl v 50 mM fosfatnem pufru s 3 M sečnino, pH 7,0. Volumen posamezne frakcije je znašal 10 mL. Modra linija prikazuje absorbenco posamezne frakcije pri 280 nm, siva pa naraščanje koncentracije NaCl v pufru.



Slika 26: Analiza vsebnosti izbranih frakcij po ionsko izmenjevalni kromatografiji izolektina rCnSL-ProA na sefarazi SP z NaDS PAGE

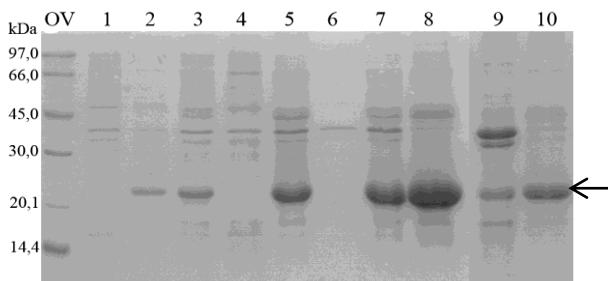
Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue. S številkami so označene frakcije, ki smo jih analizirali. Zgornja pučica označuje liso, ki predstavlja nečistočo velikosti 30 kDa, spodnja pučica pa označuje liso, ki predstavlja izolektin rCnSL-ProA

Nosilec sefaroze SP se je izkazal za boljšega kot karboksimetil celuloza, saj se je izolektin rCnSL-ProA v celoti vezal na nosilec. Po pričakovanjih se  $\beta$ -laktamaza v izbranih pogojih ni vezala na nosilec (vrh 1), vezani izolektin rCnSL-ProA pa se je eluiral pri približno 78 mM NaCl. Frakcije iz vrha 2 (32-39) smo združili in z dializo odstranili sečnino, da bi dosegli pravilno zvitje izolektina. Vzorec izolektina rCnSL-ProA smo z ultrafiltracijo skoncentrirali na 8 mL. Pri tem je prišlo do obarjanja, zato smo oborino odstranili s centrifugiranjem. V supernatantu smo izmerili  $A_{280}$ , ki je znašala 0,835. Po Beer-Lambertovem zakonu izračunana koncentracija je znašala 0,66 mg/mL. Z izražanjem v 1200 mL tekočega gojišča LBA, pri čemer smo izražanje inducirali pri  $OD_{600}$  približno 1,5 in ga zaustavili 4 ure kasneje, raztopljanjem inkluzijskih teles v 6 in 8 M sečnini, čiščenjem z gelsko filtracijo v prisotnosti 3 M sečnine in ionsko izmenjevalno kromatografijo na sefarazi SP ter zvijanjem proteina s postopnim odstranjevanjem sečnine smo pripravili 5,3 mg očiščenega izolektina rCnSL-ProA. Izkoristek pridobivanja izolektina rCnSL-ProA je znašal 4,42 mg/L bakterijske kulture.

#### 4.2.4. Priprava in čiščenje rekombinantnega izolektina rCnSL-B

Lektin rCnSL-B smo pridobili po predhodno optimiranem postopku izražanja in čiščenja [62], in sicer smo ga pridobili z izražanjem v 1200 mL tekočega gojišča LBA, pri čemer smo izražanje inducirali, ko je vrednost  $OD_{600}$  dosegla 1,014 in ga zaustavili 4 ure kasneje. Po izražanju smo bakterijske celice razbili, lektin rCnSL-B raztopljal iz inkluzijskih teles v raztopljanju analizirali z NaDS PAGE (slika 27). V skladu s pričakovanji se je izolektin rCnSL-B raztopil v 3 M in 6 M sečnini v pufru TET. Ker so bile v inkluzijskih telesih prisotne nečistoče, smo vzorca združili in čistili z gelsko filtracijo v prisotnosti 3 M

sečnine. V frakcijah, ki smo jih zbirali med gelsko filtracijo, smo izmerili A<sub>280</sub> (slika 28) in z NaDS PAGE analizirali prisotnost izolektina v izbranih frakcijah (slika 29).



Slika 27: Analiza raztplavljanja izolektina rCnSL-B iz inkluzijskih teles z NaDS PAGE

Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue. Puščica označuje liso, ki predstavlja izolektin rCnSL-B.

OV...označevalec velikosti

1... bakterijski lizat pred indukcijo

2... bakterijski lizat 4 ure po indukciji

3... bakterijski lizat po sonificiranju

4... topna frakcija bakterijskega lizata

5... netopna frakcija resuspendirana v pufru TET

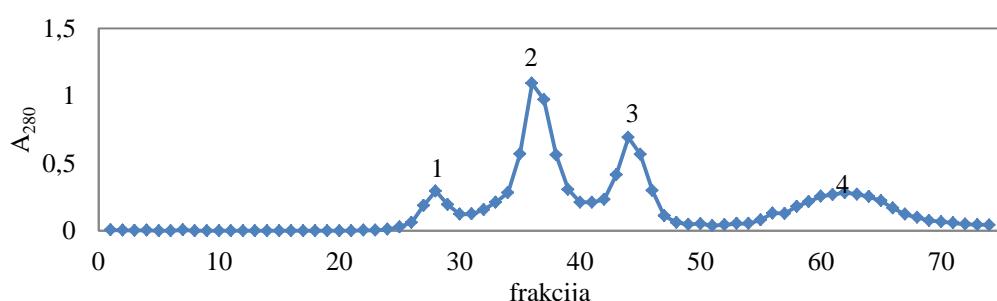
6... frakcija topna v pufru TET

7... oborina resuspendirana v 3 M sečnini

8... frakcija topna v 3 M sečnini

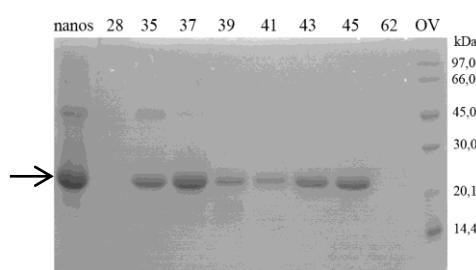
9... oborina resuspendirana v 6 M sečnini

10... frakcija topna v 6 M sečnini



Slika 28: Odvisnost A<sub>280</sub> od frakcije pri čiščenju izolektina rCnSL-B z gelsko filtracijo

Gelska filtracija izolektina rCnSL-B na nosilcu »Sephadryl® S-200 High resolution« z uporabo pufra 20 mM Tris-HCl, 3 M sečnina, 0,3 M NaCl, pH 7,5 pri pretoku 42,6 mL/h. Volumen posamezne frakcije je znašal 16,3 mL.



Slika 29: Analiza vsebnosti izbranih frakcij po gelski filtraciji izolektina rCnSL-B z NaDS PAGE

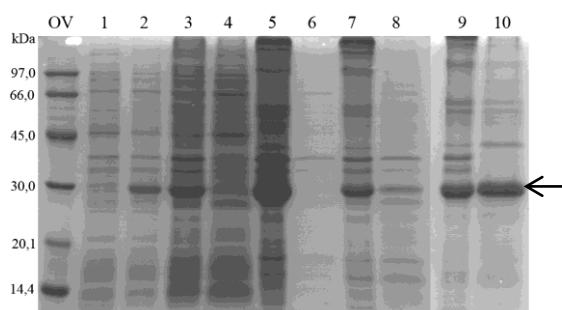
Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue. S številkami so označene frakcije, ki smo jih analizirali. Puščica označuje liso, ki predstavlja izolektin rCnSL-B.

Analiza z NaDS PAGE (slika 29) je pokazala, da izolektin rCnSL-B verjetno tvori višje strukture, saj se je eluiral v dveh vrhovih. Prisoten je bil v vrhovih 2 in 3. V vrhu 1 so bili

prisotni proteini z višjimi molekulskimi masami, medtem ko je vrh 4 najverjetneje predstavljal Triton X-100, saj v njem ni bilo prisotnih proteinov. Združili smo frakcije iz vrhov 2 in 3 (33-47) in jih nakisali do pH 6,5 z razredčeno HCl, da ne bi prišlo do obarjanja, saj je bila predvidena izoelektrična točka lektina rCnSL-B pri pH 7,74. Protein smo z ultrafiltracijo skoncentrirali na 30 mL in nato z dializo odstranili sečnino, da bi dosegli pravilno zvitje izolektina. Po dializi smo vzorcu izmerili A<sub>280</sub>, ki je znašala 1,932. Koncentracija, izračunana po Beer-Labertovem zakonu, je bila 1,40 mg/mL. Z izražanjem v 1200 mL tekočega gojišča LBA, pri čemer smo izražanje inducirali pri OD<sub>600</sub> približno 1 in ga zaustavili 4 ure kasneje, raztpljaljem inkluzijskih teles v 3 M in 6 M sečnini in čiščenjem z gelsko filtracijo v prisotnosti 3 M sečnine ter zvijanjem proteina s postopnim odstranjevanjem sečnine smo pripravili 42,0 mg očiščenega rekombinantnega izolektina rCnSL-B. Izkoristek pridobivanja lektina rCnSL-B je znašal 35,0 mg/L bakterijske kulture.

#### 4.2.5. Priprava in čiščenje rekombinantnega izolektina rCnSL-ProB

Tudi izolektin rCnSL-ProB smo pripravili po že opisanem optimiranem postopku izražanja in čiščenja [62]. Rekombinantni lektin rCnSL-ProB smo pridobili z izražanjem v 1200 mL tekočega gojišča LBA, pri čemer smo izražanje inducirali pri vrednosti OD<sub>600</sub> 0,998 in ga zaustavili 4 ure kasneje. Po izražanju smo bakterijske celice razbili in inkluzijska telesa raztpljali v pufru TET in 3 M sečnini v pufru TET, da bi odstranili nečistoče in v 8 M sečnini v pufru TET, da bi raztopili izolektin rCnSL-ProB. Postopek izolacije iz inkluzijskih teles smo analizirali z NaDS PAGE (slika 30).

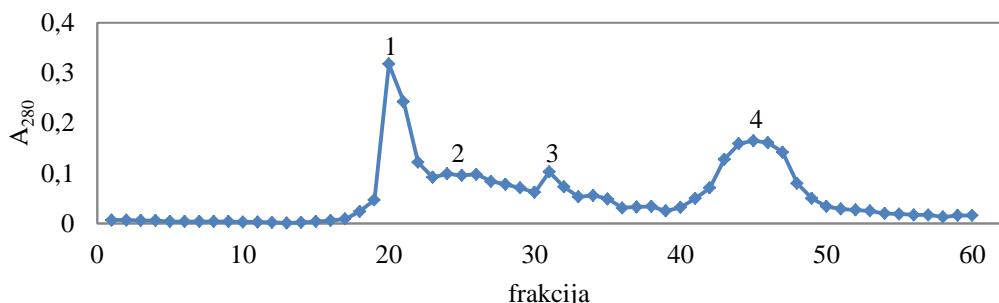


Slika 30: Analiza raztpljanja izolektina rCnSL-ProB iz inkluzijskih teles z NaDS PAGE

Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue Puščica označuje liso, ki predstavlja izolektin rCnSL-ProB.

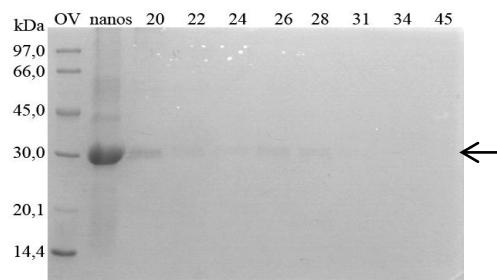
- |  |  |
|--|--|
| OV... označevalec velikosti                      | 6 ... frakcija topna v pufru TET           |
| 1... bakterijski lizat pred indukcijo            | 7 ... oborina resuspendirana v 3 M sečnini |
| 2... bakterijski lizat 4 ure po indukciji        | 8 ... frakcija topna v 3 M sečnini         |
| 3... bakterijski lizat po sonificiranju          | 9 ... oborina resuspendirana v 8 M sečnini |
| 4... topna frakcija bakterijskega lizata         | 10... frakcija topna v 8 M sečnini         |
| 5... netopna frakcija resuspendirana v pufru TET |  |

V skladu z našimi pričakovanji se je izolektin rCnSL-ProB raztopil v 8 M sečnini v pufru TET. Ker so bile v vzorcu prisotne nečistoče, smo ga čistili z gelsko filtracijo v prisotnosti 3 M sečnine. V frakcijah, ki smo jih zbirali tekom gelske filtracije, smo izmerili A<sub>280</sub> (slika 31) in z NaDS PAGE analizirali vsebnost izolektina v izbranih frakcijah (slika 32).



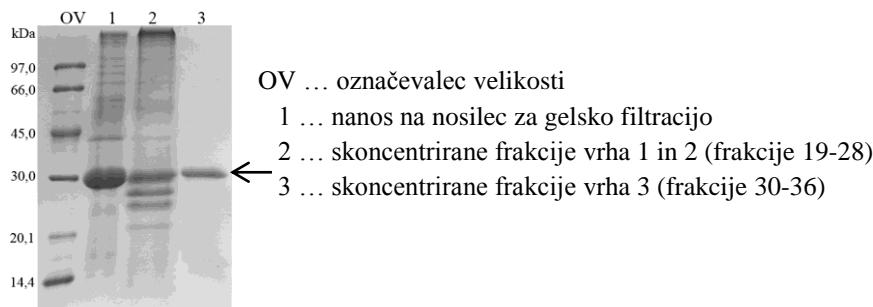
Slika 31: Odvisnost A<sub>280</sub> od frakcije pri čiščenju izolektina rCnSL-ProB z gelsko filtracijo

Gelska filtracija izolektina rCnSL-ProB na nosilcu »Sephadryl® S-200 High resolution« z uporabo pufra 20 mM Tris-HCl, 3 M sečnina, 0,3 M NaCl, pH 7,5 pri pretoku 63,6 mL/h. Volumen posamezne frakcije je znašal 24,4 mL.



Slika 32: Analiza vsebnosti izbranih frakcij po gelski filtraciji izolektina rCnSL-ProB z NaDS PAGE  
Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue. S številkami so označene frakcije, ki smo jih analizirali. Puščica označuje liso, ki predstavlja izolektin rCnSL-ProB.

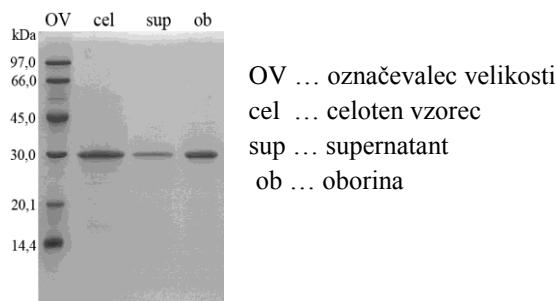
Analiza z NaDS PAGE je pokazala, da gelska filtracija v prisotnosti 3 M sečnine ni primerna za čiščenje izolektina rCnSL-ProB, saj se je le-ta nahajal v vseh frakcijah, razen v vrhu 4, ki je verjetno vseboval Triton X-100. Kljub temu smo združili frakcije vrha 1 in 2 (frakcije 19-28) ter vrha 3 (frakcije 30-36), jih nakisali z razredčeno HCl do pH 6,5, da ne bi prišlo doobarjanja zaradi bližine pI ter jih skoncentrirali z ultrafiltracijo. Frakcije vrha 1 in 2 (frakcije 19-28) smo skoncentrirali na 11 mL, frakcije vrha 3 (frakcije 30-36) pa na 15 mL. Vsebnost koncentratov smo analizirali z NaDS PAGE (slika 33). Analiza skoncentriranih frakcij je pokazala prisotnost izolektina rCnSL-ProB, pri čemer so bile v vrhu 1 in 2 (frakcije 19-28) prisotne številne nečistoče, v vrhu 3 (frakcije 30-36) pa očiščen izolektin rCnSL-ProB. Iz tega razloga smo le slednjega izbrali za nadaljnjo delo.



**Slika 33:** Analiza vsebnosti izolektina rCnSL-ProB v skoncentriranih frakcijah po gelski filtraciji z NaDS PAGE

Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue. Puščica označuje liso, ki predstavlja izolektin rCnSL-ProB.

Z dializo smo nato postopno odstranili sečnino, da bi dosegli pravilno zvitje izolektina. Tudi pri izolektinu rCnSL-ProB je med dializo prišlo do obarjanja, zato smo oborino odstranili s centrifugiranjem in vsebino supernatanta ter oborine analizirali z NaDS PAGE (slika 34).



**Slika 34:** Analiza obarjanja izolektina rCnSL-ProB med dializo z NaDS PAGE

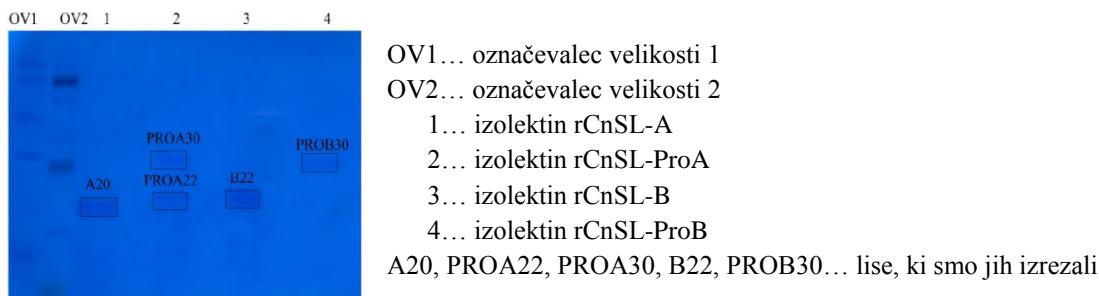
Analiza prisotnosti lektina rCnSL-ProB v celotnem vzorcu, supernatantu in oborini pri obarjanju med dializo z NaDS PAGE. Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue.

Tako v supernatantu, kot v oborini, se je nahajal čist izolektin rCnSL-ProB. Delo smo nadaljevali s topno frakcijo izolektina rCnSL-ProB, to je s supernatantom, ki smo ga z ultrafiltracijo skoncentrirali na 12 mL. Tudi pri ultrafiltraciji je prišlo do obarjanja, zato smo oborino odstranili s centrifugiranjem in izmerili  $A_{280}$  supernatanta, ki je znašala 0,618. Koncentracija izolektina rCnSL-ProB, izračunana po Beer-Lambertovem zakonu, je znašala 0,519 mg/mL. Z izražanjem v 1200 mL tekočega gojišča LBA, pri čemer smo izražanje inducirali pri  $OD_{600}$  približno 1 in ga zaustavili 4 ure kasneje, raztapljanjem inkluzijskih teles v 8 M sečnini in čiščenjem z gelsko filtracijo v prisotnosti 3 M sečnine ter zvijanjem proteina s postopnim odstranjevanjem sečnine, smo pripravili 6,23 mg očiščenega rekombinantnega izolektina rCnSL-ProB. Izkoristek pridobivanja lektina rCnSL-ProB je znašal 5,19 mg/L bakterijske kulture.

#### 4.3. Določanje biokemijskih lastnosti saharozil izolektinov

##### 4.3.1. Analiza N-končnih zaporedij rekombinantnih saharozil izolektinov

Z določitvijo N-končnih aminokislinskih zaporedij smo analizirali istovetnost in procesiranje pripravljenih saharozil izolektinov. Lektine smo prenesli na membrano PVDF (slika 35) in jim določili N-končna zaporedja (preglednica XV).



Slika 35:Prenos western rekombinantnih saharozil izolektinov

Poliviniliden difluoridna membrana z rekombinantnimi saharozil izolektini po prenosu western (barvana s Coomassie Brilliant Blue).

##### Preglednica XV: N-končna aminokislinska zaporedja rekombinantnih saharozil izolektinov

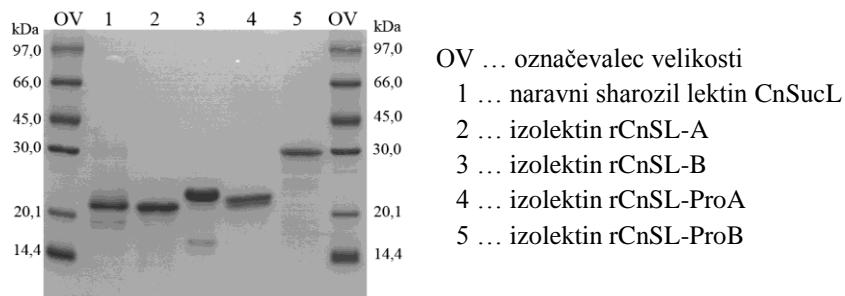
Zaporedje 1 predstavlja prevladajoče zaporedje, v manjšem delu pa je prisotno tudi zaporedje 2.

Izolektin	Zaporedje 1	Zaporedje 2
rCnSL-A (A20)	MVNP	VNPN
rCnSL-B (B22)	MINP	INPN
rCnSL-ProA (PROA22)	SALP	/
rCnSL-ProB (PROB30)	MPTF	PTFS

Z določitvijo N-končnih zaporedij smo potrdili istovetnost pripravljenih rekombinantnih saharozil izolektinov, saj so se N-končna zaporedja, ki smo jih zaznali, ujemala z izpeljanimi aminokislinskimi zaporedji (slika 6). Pri izolektinu rCnSL-A, rCnSL-B in rCnSL-ProB smo zaznali po dve N-končni zaporedji, in sicer je prevladajoče zaporedje imelo ohranjen začetni metionin, medtem ko je bil ta pri majhnem delu molekul izolektinov odstranjen. Lisi PROA22, ki ustreza izolektinu rCnSL-ProA, smo določili N-končno zaporedje SALP in s tem smo pokazali, da se je izolektin rCnSL-ProA med izražanjem v bakteriji *E. coli* BL21(DE3) procesiral, saj se mu je odcepilo N-končno zaporedje na mestu med aminokislinama A20 in S21, kot je predvidevalo orodje SIG-Pred. Za razliko od izolektina rCnSL-ProA, se izolektin rCnSL-ProB v bakteriji *E. coli* BL21(DE3) ni cepil, čeprav je orodje SIG-Pred predvidevalo tudi njegovo procesiranje.

#### 4.3.2. Primerjava saharozil izolektinov z metodama NaDS PAGE in BN PAGE

Z metodo NaDS PAGE (slika 36) smo ocenili čistost rekombinantnih saharozil izolektinov in njihovo velikost v primerjavi z naravnim saharozil lektinom CnSucL in molekulske masami, predvidenimi z orodjem ProtParam (preglednica XIV).

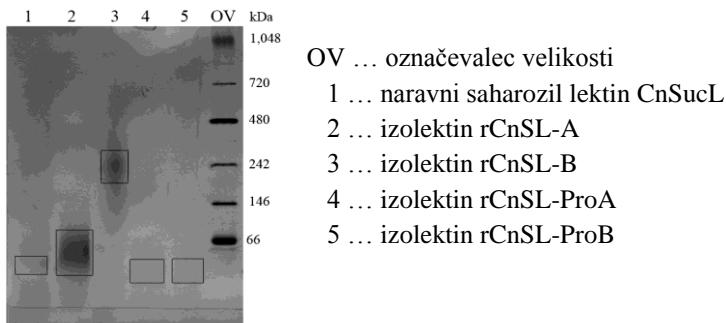


Slika 36: Primerjava saharozil izolektinov z NaDS PAGE

Poliakrilamidni gel (12 % (m/v)) barvan s Coomassie Brilliant Blue.

Naravni saharozil izolektin CnSucL je na 12 % (m/v) poliakrilamidnem gelu potoval pri velikosti 22 kDa, kar je približno 1,7 kDa večje od molekulske mase, določene z masno spektrometrijo (20,293 kDa) [52]. Pri naravnem saharozil lektinu je bila prisotna tudi šibka lisa velikost 19 kDa, ki je, bodisi nečistoča, ali pa izoblika saharozil lektina. Rekombinantni lektin rCnSL-A je potoval kot ena lisa z velikostjo 22 kDa, kar je približno 1,6 kDa večje od molekulske mase predvidene z orodjem ProtParam (20,395 kDa). Iz gela smo ocenili 98 % čistost izolektina rCnSL-A. Med pripravljenimi rekombinantnimi izolektini je bil izolektin rCnSL-A po velikosti najbolj podoben naravnemu saharozil lektinu CnSucL, kar je v skladu s pričakovanji, saj se primarna struktura izolektina rCnSL-A najbolj ujema z določenimi delnimi zaporedji naravnega saharozil lektina [62]. Izolektin rCnSL-B je potoval pri velikosti 24 kDa, kar je približno 3,4 kDa večje od predvidene molekulske mase (20,727 kDa). Poleg tega je bila v vzorcu prisotna nečistoča velikosti 16 kDa tako, da je bila čistost izolektina rCnSL-B približno 90 %. Izolektin rCnSL-ProA je potoval na poliakrilamidnem gelu kot dve lisni podobne jakosti in velikosti. Iz gela ocenjena velikost je znašala 23 kDa, kar je 1,6 kDa večje od predvidene molekulske mase procesiranega izolektina (21,417 kDa). Najverjetnejše nobena izmed dveh lis ni predstavljala nečistoče, saj smo z Edmanovo razgradnjo določili le eno N-končno zaporedje. Dve lisni sta bili lahko posledica nepopolne denaturacije izolektina. V tem primeru je bila čistost rekombinantnega lektina rCnSL-ProA 98 %. Izolektin rCnSL-ProB je potoval pri velikosti 30 kDa, kar je kar 6,0 kDa večje od predvidene molekulske mase (24,016 kDa). Prisotna je bila ena sama lisa, iz gela ocenjena čistost izolektina rCnSL-ProB pa je znašala 96 %.

Z nativno elektroforezo BN PAGE (slika 37) smo preverili velikost izolektinov in možno tvorbo dimerov ali oligomerov



OV ... označevalec velikosti  
1 ... naravni saharozil lektin CnSucL  
2 ... izolektin rCnSL-A  
3 ... izolektin rCnSL-B  
4 ... izolektin rCnSL-ProA  
5 ... izolektin rCnSL-ProB

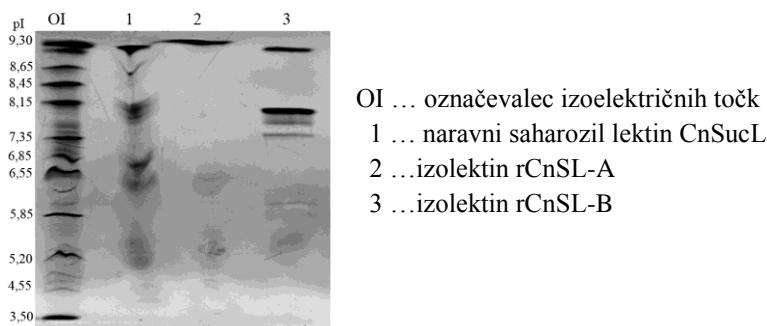
Slika 37: Primerjava saharozil izolektinov z nativno elektroforezo BN PAGE

Gel »NativePAGE™ Novex 4-16 % Bis-Tris Gel« (Invitrogen, ZDA) barvan s Coomassie Brilliant Blue.

Naravni saharozil lektin CnSucL ter izolektini rCnSL-A, rCnSL-ProA in rCnSL-ProB so potovali pri velikosti približno 40 kDa, medtem ko je izolektin rCnSL-B potoval pri velikosti približno 240 kDa. Glede na ocenjene molekulske mase tvorijo naravni saharozil lektin ter izolektini rCnSL-A, rCnSL-ProA in rCnSL-ProB dimere, medtem ko izolektin rCnSL-B tvori višje strukture. Obstaja tudi možnost, da so izolektini zgolj potovali pri navidezno višjih masah in da izolektin rCnSL-B tvori dimere, ostali izolektini pa so monomeri. Analiza izolektinov z nativno elektroforezo BN PAGE je pokazala, da izolektin rCnSL-B tvori višje strukture kot ostali izolektini.

#### 4.3.3. Izoelektrično fokusiranje

Z izoelektričnim fokusiranjem (slika 38) smo želeli pridobiti informacijo o izoelektrični točki saharozil izolektinov. Visoka pH naravnega saharozil lektina iz gobe meglenke je namreč zanimiva, ker ima večina gobijih lektinov izoelektrično točko v območju pH 5-8 [48].



OI ... označevalec izoelektričnih točk  
1 ... naravni saharozil lektin CnSucL  
2 ...izolektin rCnSL-A  
3 ...izolektin rCnSL-B

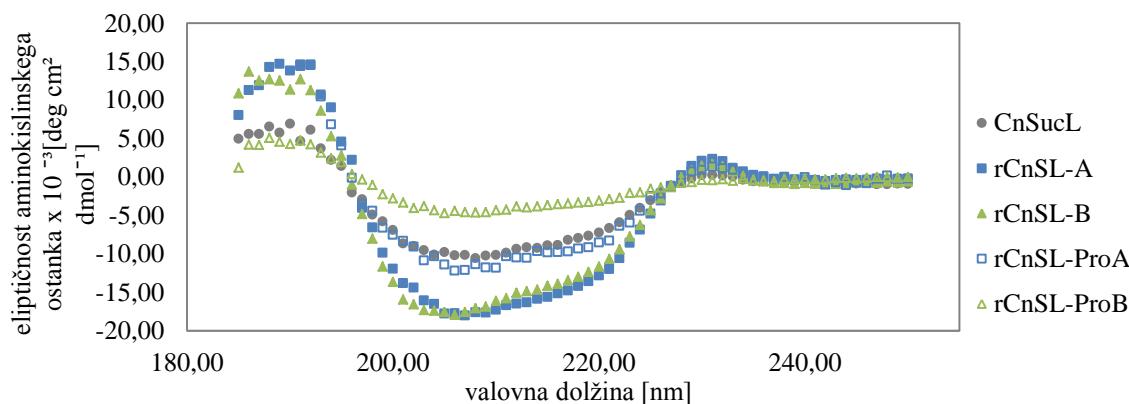
Slika 38: Izoelektrično fokusiranje naravnega saharozil lektina CnSucL ter rekombinantnih saharozil izolektinov rCnSL-A in rCnSL-B

Gel »PhastGel IEF 3-9« (GE Healthcare, Švedska) barvan s Coomassie Brilliant Blue.

Naravni saharozil lektin CnSucL se je pojavljal v več izoblikah. Pri izoelektričnem fokusiranju se je ločilo več lisi, najbolj intenzivna pa je bila lisa s pI 9,3. Poleg nje so bile prisotne še lise s pI 8,6, 8,0, 6,8, 6,5 in druge. Izolektin rCnSL-A je bil čist izolektin z eno samo liso s pI 9,3. Predvidena pI vrednost za izolektin rCnSL-A je znašala 9,39 in se je ujemala z določeno pI vrednostjo. Izolektin rCnSL-B se je pojavljal v dveh intenzivnih lisah, in sicer s pI 9,3 in s pI 8,1. Lisa s pI 8,1 je ustrezala predvideni izoelektrični točki 7,95, ostale lise pa so lahko predstavljale nečistoče ali različno nabite oblike izolektina.

#### 4.3.4. Cirkularni dikroizem

S CD smo primerjali sekundarne strukture rekombinantnih izolektinov z naravnim saharozil lektinom. S tem smo želeli potrditi, da so rekombinantni izolektini zviti v pravilno konformacijo. Meritve smo izvajali v dalnjem UV območju, pri tem pa smo hkrati merili tudi napetost na diodi. Pri vseh izolektinih je bila napetost na diodi ustrezna, razen pri izolektinu rCnSL-ProA je zaradi prisotnosti NaCl v pufru v območju med 185 nm in 190 nm narasla nad 350 V, zato pri izolektinu rCnSL-ProA nismo upoštevali meritev pri valovnih dolžinah nižjih od 190 nm.



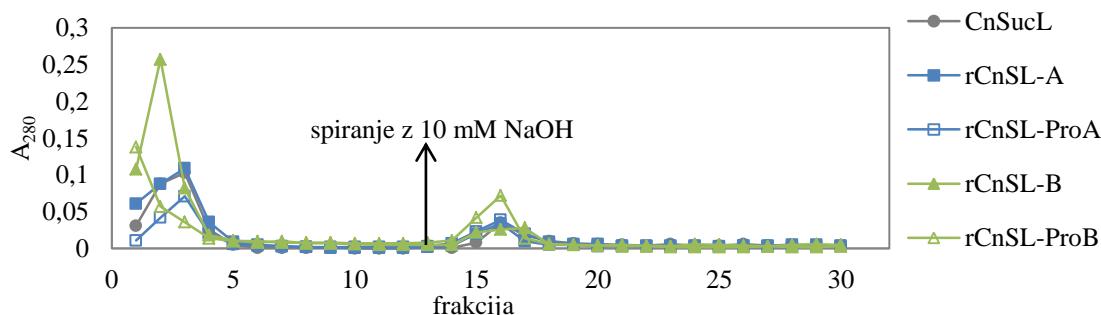
Slika 39: Spektri CD naravnega saharozil lektina CnSucL in rekombinantnih saharozil izolektinov

Spektri CD izolektinov (slika 39) niso bili povsem identični, imeli pa so skupne značilnosti. Pri vseh spektrih so se pojavljali trije vrhovi, in sicer negativni vrh pri valovni dolžini okoli 205 nm in dva pozitivna vrhova pri valovni dolžini okoli 230 nm in 188 nm. Glede na podobnost spektrov rekombinantnih izolektinov s spektrom naravnega lektina smo sklepali, da imajo rekombinantni lektini podobne sekundarne strukture, kot naravni saharozil lektin. Spekter CD izolektina rCnSL-ProA je bil najbolj podoben spektru naravnega saharozil lektina, kar pomeni, da ima izolektin rCnSL-ProA zelo podobno strukturo kot naravni lektin. Izolektina rCnSL-A in rCnSL-B sta imela med seboj zelo

podobna spektra, medtem ko spekter izolektina rCnSL-ProB ni bil izrazito podoben nobenemu izmerjenemu spektru.

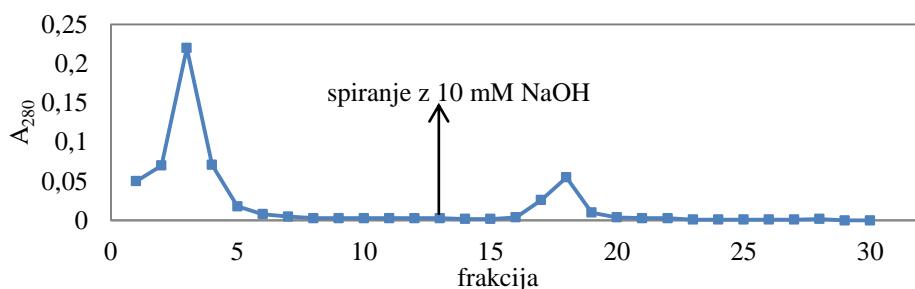
#### 4.3.5. Afinitetna kromatografija

Primerjava spektrov CD ni nedvoumno pokazala, da so vsi rekombinantni izolektini dosegli pravilno zvitje, ki omogoča vezavo sladkorjev. Z afinitetno kromatografijo smo želeli preveriti, če imajo pripravljeni rekombinantni izolektini biološko funkcijo vezave saharoze. Na sefarozo smo kovalentno vezali saharozo in na tako pripravljenem nosilcu analizirali po 1 mg posameznega izolektina (slika 40). Za kontrolo učinkovitosti priprave nosilca smo uporabili naravni saharozil lektin, ki se je deloma vezal na saharozil-sefarozo, kar pomeni, da je reakcija vezave saharoze na inertni nosilec potekla in je tako pripravljen nosilec za afinitetno kromatografijo primeren za analizo biološke aktivnosti rekombinantnih izolektinov. Vsi pripravljeni rekombinantni saharozil izolektini so se deloma vezali na saharozil-sefarozo. Delež vezanih rekombinantnih izolektinov rCnSL-ProA in rCnSL-ProB, ki vsebujeta N-končni propeptid, je znašal približno 40 %, medtem ko se je pri izolektinu rCnSL-A in rCnSL-B vezalo približno 20 % oz. 17 % nanešenega proteina. Delež vezanega naravnega saharozil lektina CnSucL je znašal približno 25 %.



Slika 40: Odvisnost  $A_{280}$  od frakcije pri analizi vezave saharozil izolektinov na saharozil-sefarozo  
Nanos posameznega izolektina je znašal 1 mg, volumen posamezne frakcije pa je bil 5 mL.

Delna vezava bi bila lahko posledica prenizke vezavne kapacitete saharozil-sefaroze ali pa nezmožnosti vezave večjega deleža izolektina na saharozo. To smo preverili tako, da smo nevezano frakcijo izolektina rCnSL-A ponovno nanesli na kolono za afinitetno kromatografijo (slika 41). Pri drugem nanosu se je nevezan izolektin rCnSL-A iz prejšnje ponovitve vezal na saharozil-sefarozo v približno enakem deležu kot pri prvi ponovitvi, in sicer je delež vezanega izolektina znašal približno 19 %. S tem smo potrdili, da je delna vezava izolektinov le posledica nizke vezavne kapacitete saharozil-sefaroze. Vsi pripravljeni rekombinantni izolektini imajo torej biološko aktivnost vezave saharoze.



Slika 41: Odvisnost A<sub>280</sub> od frakcije pri analizi sposobnosti vezave nevezane frakcije izolektina rCnSL-A na saharozil-sefarazi

Afinitetna kromatografija nevezane frakcije izolektina rCnSL-A na saharozil-sefarazi. Volumen posamezne frakcije je znašal 5 mL.

#### 4.3.6. Hemaglutinacija in inhibicija hemaglutinacije

Ker naravni saharozil lektin šibko aglutinira človeške eritrocite krvne skupine A [59], smo želeli preveriti, če tudi rekombinantni izolektini izkazujejo aglutinacijsko aktivnost. Uporabili smo človeške eritrocite krvnih skupin A, B in 0 ter kunčje eritrocite. Pri človeških eritrocitih krvne skupine 0 in A nismo opazili aglutinacije. Človeške eritrocite krvne skupine B je aglutiniral samo naravni saharozil lektin CnSucL, kunčje eritrocite pa so aglutinirali naravni saharozil lektin in rekombinantni izolektini rCnSL-ProA, rCnSL-B in rCnSL-ProB. Presenetljivo le izolektin rCnSL-A (0,16 mg/mL oz. 7,6 µM) ni aglutiniral kunčjih eritrocitov, zato smo preverili, če ni to posledica prenizke koncentracije izolektina. Izolektin rCnSL-A ni aglutiniral kunčjih eritrocitov niti pri koncentraciji 0,47 mg/mL oz. 23 µM. V drugem poskusu smo želeli ugotoviti najnižje aglutinacijske koncentracije in titre hemaglutinacije naravnega lektina in izolektinov rCnSL-ProA, rCnSL-B in rCnSL-ProB (preglednici XVI in XVII).

#### Preglednica XVI: Določanje najnižjih aglutinacijskih koncentracij saharozil izolektinov s kunčjimi eritrociti

V preglednici so navede molarne koncentracije saharozil izolektinov, ki smo jih uporabili v aglutinacijskih testih. Znak √ pomeni, da je izolektin v navedeni koncentraciji povzročil aglutinacijo eritrocitov, znak × pa, da aglutinacije ni bilo.

Izolektin	Koncentracija [µM]								
CnSucL	25	23	2,3	0,23	0,023				
	√	√	√	×	×				
rCnSL-ProA	2,1	1,9	1,7	1,3	0,84	0,42	0,19	0,019	0,0019
	√	√	×	×	×	×	×	×	×
rCnSL-B	11	10	9,0	6,8	4,5	2,3	1,0	0,10	0,010
	√	√	√	√	×	×	×	×	×
rCnSL-ProB	3,6	3,3	2,9	2,2	1,4	0,72	0,33	0,033	0,0033
	√	√	×	×	×	×	×	×	×

**Preglednica XVII: Najnižje aglutinacijske koncentracije in titri hemaglutinacije saharozil izolektinov**

	CnSucL	rCnSL-ProA	rCnSL-B	rCnSL-ProB
Najnižja aglutinacijska konc. [ $\mu\text{g/mL}$ ]	47	41	140	79
Najnižja aglutinacijska konc. [ $\mu\text{M}$ ]	2,3	1,9	6,8	3,3
Titer [ $\mu\text{M}^{-1}$ ]	0,43	0,53	0,15	0,30

Izolektin rCnSL-ProA ima podobno aglutinacijsko aktivnost kot naravni saharozil lektin. Najnižjo aglutinacijsko aktivnost oz. najmanjši titer ima izolektin rCnSL-B, medtem ko izolektin rCnSL-A sploh ne izkazuje aglutinacijske aktivnosti.

S testi inhibicije hemaglutinacije smo ugotavljali vezavno specifičnost izolektinov rCnSL-ProA, rCnSL-B in rCnSL-ProB. Pri tem smo uporabili kunče eritrocite ter sladkorje D-glukozo, D-fruktozo, D-manozo in saharozo. Pri vseh treh izolektinih je dodatek 50  $\mu\text{L}$  1 M (0,42 M) D-glukoze, D-fruktoze, D-manoze in saharoze povsem inhibiral hemaglutinacijo. Določili smo tudi najmanjše inhibitorne koncentracije sladkorjev ( $c_i$ ) in titre inhibicije hemaglutinacije (preglednica XVIII).

**Preglednica XVIII: Najmanjše inhibitorne koncentracije in titri inhibicije hemaglutinacije sladkorjev**  
V posamezni celici predstavlja zgornja številka najmanjšo inhibitorno koncentracijo ustreznega sladkorja, spodnja pa titer inhibicije hemaglutinacije.

Izolektin	saharoza	D-glukoza	D-fruktoza	D-manoza	
rCnSL-ProA	0,40 M $2,5 \text{ M}^{-1}$	ni določeno	ni določeno	ni določeno	$c_i$ titer
rCnSL-B	0,11 M $9,3 \text{ M}^{-1}$	0,22 M $4,6 \text{ M}^{-1}$	0,22 M $4,6 \text{ M}^{-1}$	0,43 M $2,3 \text{ M}^{-1}$	$c_i$ titer
rCnSL-ProB	0,40 M $2,5 \text{ M}^{-1}$	ni določeno	ni določeno	ni določeno	$c_i$ titer

Pri izolektinu rCnSL-B je sahariza inhibirala aglutinacijo kunčjih eritrocitov pri najnižji koncentraciji. Sledila sta D-glukoza in D-fruktoza, ki sta gradnika saharoze, medtem ko je pri D-manozi prišlo do inhibicije pri višji koncentraciji. Pri izolektinih rCnSL-ProA in rCnSL-ProB je sahariza inhibirala hemaglutinacijo pri enaki koncentraciji, ki pa je višja, kot pri izolektinu rCnSL-B. Inhibicije hemaglutinacije izolektinov rCnSL-ProA in rCnSL-ProB z D-glukozo, D-fruktozo in D-manozo nismo določili.

## 5. RAZPRAVA

Lektini iz gob so raznolika skupina proteinov, ki se med seboj razlikujejo v aminokislinskem zaporedju in strukturi, vezavni specifičnosti, biološki vlogi in potencialni uporabnosti [47, 48, 51]. Raziskovalci Odseka za biotehnologijo na IJS so iz gobe meglenke izolirali številne lektine, med katerimi je tudi za saharozo specifičen lektin oz. saharozil lektin [52]. Lektine, ki vežejo saharozo, so našli tudi v plesnih *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium thomii* [72], *Aspergillus niger*, *Aspergillus vesicolor*, *Aspergillus rugulosus*, *Aspergillus nidulans* [73], *Aspergillus terricola* [74] in askomiceti grbičasti gomoljki (*Tuber borchii*) [75]. Saharozil lektin iz gobe meglenke je izkazoval visoko insekticidno aktivnost [59], zaradi česar je zanimiv za nadaljnjo karakterizacijo. V diplomskem delu smo zato pripravili rekombinantne saharozil izolektine in jih biokemijsko okarakterizirali.

Raziskovalci Odseka za biotehnologijo na IJS so pridobili zaporedje cDNA z zapisom za saharozil lektin [62]. Le-to je pokazalo, da genski zapis za saharozil lektin vsebuje zapis za propeptid oz. 31 aminokislina dolgo N-končno zaporedje. Številni lektini so sintetizirani kot prekurzorji, ki so bodisi že aktivni, ali pa aktivnost pridobijo po procesiranju v zrelo obliko. Takšni so lektin iz ječmena (*H. vulgare*) [76], lektin GNA iz navadnega malega zvončka (*Galanthus nivalis*) [77] in lektin WGA iz pšeničnih kalčkov (*Triticum vulgare*) [78]. Vsi trije se sintetizirajo kot aktivni preprolektini z N-končnim signalnim zaporedjem, ki usmerja translokacijo proteina v endoplazemski retikulum in se pri tem kotranslacijsko odstrani. Poleg tega vsebujejo tudi C-končno zaporedje, ki usmerja njihov transport v vakuolo, kjer se procesirajo v zrelo obliko [76, 78, 79]. N- in C-končno zaporedje omenjenih lektinov je namenjeno pravilnemu usmerjanju lektinov v organele in ne vpliva na biološko aktivnost. Kot prekurzor se sintetizira tudi ricin iz semen ricinusa (*Ricinus communis*). Slednji je heterodimer, zgrajen iz polipeptidne verige A z ribosom inaktivirajočo aktivnostjo in verige B, ki veže galaktozo. Prekurzor lektina vsebuje N-končno signalno zaporedje, ki usmerja translokacijo v endoplazemski retikulum. Temu sledi 9 aminokislina dolg propeptid, ki omogoča uspešen vstop proteina v endoplazemski retikulum in vpliva na nivo glikozilacije. Za propeptidom je zaporedje verige A in verige B, ki ju povezuje 12 aminokislina dolg peptid. Slednji usmerja transport ricina v vakuolo,

kjer poteče postranslacijsko procesiranje. Za razliko od prej omenjenih lektinov, pridobi ricin aktivnost šele po procesiranju v zrelo obliko [80].

V diplomskem delu smo pripravili štiri rekombinantne saharozil izolektine, in sicer izolektina rCnSL-A in rCnSL-B ter njuni oblici z N-končnim propeptidom dožine 11 aminokislin za izolektin rCnSL-ProA in dolžine 31 aminokislin za izolektin rCnSL-ProB. Uporabili smo ekspresijski vektor pET-11a, ki je eden najbolj učinkovitih do sedaj razvitih vektorjev za kloniranje in pripravo rekombinantnih proteinov v bakteriji *E. coli* [81]. Ekspresijski sistem bakterije *E. coli* omogoča pridobivanje rekombinantnih lektinov z izkoristki nad 20 mg/L bakterijske kulture [29]. V preteklosti so v njej pripravili rekombinantni tripsinski inhibitor knispin iz gobe meglenke z izkoristkom 70 mg/L [82] in rekombinantni lektin CNL z izkoristkom kar 200 mg/L bakterijske kulture [52]. Izkoristki priprave in čiščenja saharozil izolektinov so znašali 14,0 mg/L za izolektin rCnSL-A, 4,4 mg/L za izolektin rCnSL-ProA, 42,0 mg/L za izolektin rCnSL-B in 5,2 mg/L bakterijske kulture za izolektin rCnSL-ProB. Poleg različnega nivoja izražanja v bakterijskem ekspresijskem sistemu (slike 10, 19, 29 in 32) so bili nizki izkoristki predvsem posledica izgub na račun obarjanja proteinov med čiščenjem. Izolektin rCnSL-B je bil edini, ki se med dializo ali ultrafiltracijo ni obarjal in je izkazoval tudi najvišji izkoristek. Izolektini so se v bakteriji *E. coli* akumulirali v obliki inkluzijskih teles. Pri zvijanju proteinov iz inkluzijskih teles v pravilno konformacijo so pogoste velike izgube, obstaja pa tudi možnost, da biološka aktivnost po zvijanju ni vzpostavljena [63]. Čeprav je pri izolektinih rCnSL-A, rCnSL-ProA in rCnSL-ProB prišlo med postopki čiščenja in ponovnega zvijanja do obsežnega obarjanja, smo pri vseh uspeli pripraviti biološko aktivne oblike. Pri čiščenju saharozil izolektinov smo uporabili nespecifične metode, ki so primerne za vse proteine. Metode čiščenja lektinov se namreč delijo na nespecifične, kot je gelska filtracija in ionsko izmenjevalna kromatografija, in specifične, ki temelijo na interakcijah lektinov s sladkorji (npr. slatkorna afinitetna kromatografija) [47, 48]. Večje število zaporednih korakov čiščenja zmanjša izkoristek [29], kar je, poleg nizkega nivoja izražanja, razlog za najnižji izkoristek pridobivanja izolektina rCnSL-ProA. Slednji je po čiščenju z gelsko filtracijo vseboval še β-laktamazo, ki smo jo odstranili s kationsko izmenjevalno kromatografijo. Kationske izmenjevalce delimo glede na vrednosti pK<sub>a</sub> na šibke in močne. Močni kationski izmenjevalci so ionizirani skoraj pri vseh vrednostih pH, šibki pa le v bolj bazičnem območju [83]. Karboksimetil celuloza, ki je šibki kationski izmenjevalec, je le delno vezala

izolektin rCnSL-ProA, zato smo jo nadomestili z močnim izmenjevalcem sulfopropil sefarozo. Slednja je bila učinkovitejša, saj se je povečal izkoristek priprave čistega biološko aktivnega rekombinantnega izolektina rCnSL-ProA iz 0,2 mg/L na 4,4 mg/L bakterijske kulture.

Pridobljenim rekombinantnim saharozil izolektinom smo določili N-končno aminokislinsko zaporedje. Izolektini rCnSL-A, rCnSL-B in rCnSL-ProB so v veliki večini ohranili začetni metionin. Cepitev začetnega metionina je odvisna od aminokislinskega ostanka za njim, in sicer je metionin zagotovo odstranjen, če je prva aminokislina za metioninom alanin, glicin, prolin ali serin [63]. Zaradi navedenega smo pričakovali, da bo vsaj pri izolektinu rCnSL-ProB začetni metionin povsem odstranjen, toda tudi pri tem izolektinu je pri večini molekul ostal prisoten začetni metionin. Pri izolektinu rCnSL-ProA smo z določitvijo N-končnega zaporedja dokazali, da se je izolektin med izražanjem v bakteriji *E. coli* procesiral. Odcepilo se je N-končno zaporedje med aminokislinama A20 in S21, tako da ima, glede na zrelo obliko rCnSL-A, 11 aminokisl dolg propeptid, medtem ko ima izolektin rCnSL-ProB, glede na zrelo obliko rCnSL-B, na N-koncu 31 dodatnih aminokisl. Izolektin rCnSL-ProA se je po sintezi v citoplazmi najverjetneje izločal v periplazmo preko Sec sekretorne poti. Za izločanje v periplazmo morajo proteini vsebovati 18 do 30 aminokisl dolgo, hidrofobno N-končno signalno zaporedje, ki ga med translokacijo odstranijo membranske signalne peptidaze [69]. Z izločanjem izolektina rCnSL-ProA v periplazmo lahko razložimo cepitev 20 aminokisl dolgega, hidrofobnega zaporedja. Izolektin je verjetno v periplazmi agregiral v inkluzijska telesa, v katera se je ujela tudi β-laktamaza. Slednja se po sintezi izloča v periplazmo [66] in je bila verjetno iz tega razloga prisotna v inkluzijskih telescih.

Pridobivanje izolektina rCnSL-ProA bi lahko izboljšali z izločanjem v gojišče bakterije *E. coli*. Izolektina rCnSL-ProA in rCnSL-ProB se kljub temu, da vsebujeta N-končni propeptid, ne izločata v gojišče. Laboratorijski sevi *E. coli* izločajo v gojišče po naravni poti le malo proteinov. Pridobivanje rekombinantnih proteinov v gojišču ima številne prednosti, kot je manjša verjetnost proteolize, enostavnejše čiščenje in verjetnejše zvijanje v pravilno konformacijo [64]. Izločanje proteinov v gojišče lahko dosežemo na dva načina. Prvi pristop vključuje aktivni transport preko zunanje membrane, pri čemer uporabimo transportne sisteme iz patogenih sevov ali drugih bakterij. Drugi pristop pa vključuje

metode, ki usmerjajo proteine v periplazmo, od kjer se s pasivnim transportom izločajo v okolje. Pasivni transport omogoča povečana prepustnost zunanje membrane, ki jo dosežemo npr. z osmotskim šokom ali lizocimi [63]. Pasivni transport bi lahko uporabili za pridobivanje izolektina rCnSL-ProA v gojišče, v kolikor predpostavka o njegovem izločanju v periplazmo drži.

Pri določanju molekulskih mas naravnega saharozil lektina in rekombinantnih izolektinov z NaDS PAGE smo opazili, da so bile molekulske mase ocenjene iz gela približno 1 do 6 kDa večje od molekulskih mas, določenih z masno spektrometrijo oz. predvidenih z orodjem ProtParam. Podobne razlike v molekulskih masah so se pojavile tudi pri ostalih lektinih iz gobe meglenke [59]. Do navidezno višjih molekulskih mas izolektinov pri analizi s poliakrilamidnimi geli je lahko prišlo zaradi delne ohranitve konformacije izolektinov, zaradi česar so počasneje potovali v gelu in kazali navidezno večje molekulske mase.

Za biološko aktivnost lektinov je tvorba višjih struktur, kot so dimeri in oligomeri, pogosto zelo pomembna, saj lahko s tvorbo le teh monovalentni lektini postanejo multivalentni. Multivalentnost okrepi interakcije z ligandi ter omogoča aglutinacijo celic in premreženje receptorjev na celični površini. Posamezen lektin pa lahko vsebuje v polipeptidni verigi tudi več vezavnih mest za sladkorje in je že sam po sebi multivalenten, brez tvorbe višjih struktur [20]. Z analizo z nativno elektroforezo BN PAGE smo pokazali, da izolektin rCnSL-B tvori više strukture kot ostali rekombinantni saharozil izolektini. Raziskovalci Odseka za biotehnologijo na IJS so z gelsko filtracijo čistega naravnega saharozil lektina CnSucL dokazali, da ta ne tvori višjih struktur [52]. Iz tega lahko sklepamo, da so tudi izolektini rCnSL-A, rCnSL-ProA in rCnSL-ProB monomeri, saj so pri analizi z nativno elektroforezo potovali enako, kot naravni saharozil lektin. Višje strukture potemtakem verjetno tvori samo izolektin rCnSL-B. Tvorbo višjih struktur oz. dimerov pri izolektinu rCnSL-B smo opazili tudi pri čiščenju z gelsko filtracijo, kjer je potoval v dveh vrhovih. Da bi potrdili zgoraj navedeno, bi morali z gelsko filtracijo analizirati očiščene rekombinantne izolektine.

Gobji lektini imajo izoelektrično točko običajno v območju 5 – 8 [48]. Naravni saharozil lektin je pri tem posebnost, saj ima nenavadno visoko izoelektrično točko pri 9,3 [52]. Iz

tega razloga smo z izoelektričnim fokusiranjem primerjali naravni saharozil lektin ter izolektina rCnSL-A in rCnSL-B. Pri naravnem lektinu se je ločilo več lis, kar kaže na heterogenost lektina. Heterogenost je pri gobjih lektinih pogosta [84] in je značilna tudi za lektin CNL iz gobe megleinke [52]. Ločba naravnega lektina v več lis z različnimi pI vrednostmi je lahko posledica razlik v primarni strukturi ali v glikozilaciji. Genski zapis za saharozil lektin vsebuje zapis za N-končni propeptid, ki morda usmerja translokacijo v endoplazemski retikulum, kjer je lahko lektin podvržen glikozilacijskemu mehanizmu. Kljub ločbi lektina v več lis, je bila lisa s pI 9,3 izrazito intenzivnejša od ostalih. Visoko izoelektrično točko imajo tudi lektini iz bazidiomicete vijoličaste bledivke (*Laccaria amethystea*, pI = 9,5), uhljevke (*Auricularia polytricha*, pI = 10,6), kosmate črnivke (*Psathyrella lacrymabunda*, pI = 9-10) in oranžne latvice (*Aurelia aurantia*, pI = 9,1). Nobeden od naštetih lektinov ni specifičen za saharozo [46-48].

Izolektin rCnSL-A ima enako izoelektrično točko kot najizrazitejša lisa naravnega lektina, kar je v skladu z našimi pričakovanji, saj se primarna struktura izolektina rCnSL-A najbolj ujema z določenimi delnimi zaporedji naravnega saharozil lektina. Pri izolektinu rCnSL-B smo z izoelektričnim fokusiranjem ugotovili prisotnost dveh intenzivnih lis s pI 8,1 in 9,3. Lisa s pI 8,1 je bila intenzivnejša, ujemala se je s predvideno izoelektrično točko in je verjetno predstavljala izolektin rCnSL-B. Pri izolektinu rCnSL-B smo pri analizi z NaDS PAGE opazili nečistočo veliko 16 kDa, ki morda predstavlja dodatno liso pri izoelektričnem fokusiranju. Poleg teh dveh lis so bile pri izolektinu rCnSL-B vidne tudi šibkejše lise s pI med 8,1 in 7,5. Te so lahko nečistoče ali pa različno nabite oblike izolektina, ki zato različno potujejo v električnem polju.

Pripravljeni rekombinantni izolektini so se med izražanjem v bakteriji *E. coli* akumulirali v inkluzijskih telescih. Zvijanje proteinov iz inkluzijskih telesc v aktivno konformacijo ni vedno uspešno, zato smo pravilnost zvitja izolektinov preverili s cirkularnim dikroizmom. Spektri CD naravnega saharozil lektina CnSucL in rekombinantnih izolektinov niso bili identični, kar je verjetno posledica različne primarne strukture, imeli pa so enake značilnosti. Iz tega sklepamo, da imajo rekombinantni izolektini podobne sekundarne strukture in so se zvili v pravilno konformacijo. Razlike v spektrih CD so lahko tudi posledica tega, da se je zgolj del posameznega rekombinantnega saharozil izolektina zvil v pravilno konformacijo. Spekter CD lektina CNL ima tri vrhove pri enakih valovnih

dolžinah kot spektri saharozil lektinov. Pri ugotavljanju toplotne obstojnosti lektina CNL se je pokazalo, da se spekter CD nezvitega lektina razlikuje od spektra CD zvitega lektina predvsem v odsotnosti značilnega vrha pri valovni dolžini 230 nm [52]. Iz tega vidika je problematičen zlasti spekter CD izolektina rCnSL-ProB, ki ima pri valovni dolžini 230 nm zelo nizek vrh. Lahko da je pravilno konformacijo dosegel le del izolektina rCnSL-ProB, zaradi česar je bil spekter manj izrazit. Vsaj del izolektina rCnSL-ProB se je zagotovo pravilno zvil, saj je izolektin izkazoval aglutinacijsko aktivnost in se vezal na saharozil-sefarozo. Najbolj izrazit spekter CD sta imela izolektina rCnSL-A in rCnSL-B. Naravni lektin je imel nižji vrh pri 230 nm, kot izolektina rCnSL-A in rCnSL-B, kar je lahko posledica nekoliko različne strukture izolektinov ali delnega razvitja naravnega lektina med izolacijo. Podobnost spektrov CD naravnega in rekombinantnih saharozil lektinov s spektrom CD lektina CNL nakazuje, da imajo lahko podobno terciarno strukturo, to je  $\beta$ -triperesno zvitje [52].

Aktivnost rekombinantnih saharozil izolektinov smo potrdili z afinitetno kromatografijo in aglutinacijskimi testi. Sladkorna afinitetna kromatografija je pomembna metoda za čiščenje lektinov. Pričetek njene uporabe pri izolaciji lektinov je pomenil velik napredek v glikobiologiji [25]. Z afinitetno kromatografijo na saharozil-sefarazi smo potrdili aktivnost pripravljenih rekombinantnih izolektinov in njihovo zmožnost vezave saharoze. Saharozil izolektini so bili aktivni že v obliki prolektinov, saj sta se vezala tudi izolektina rCnSL-ProA in rCnSL-ProB, in sicer v večjem deležu, kot njuni zreli oblici rCnSL-A in rCnSL-B.

Natančnejše podatke o vezavni sposobnosti izolektinov smo pridobili s testi hemaglutinacije in inhibicije hemaglutinacije. Naravni lektin je aglutiniral človeške eritrocite krvne skupine B in kunčje eritrocite, kar se ni ujemalo s predhodno izvedenimi aglutinacijskimi testi na človeških eritrocitih. V predhodnih testih je naravni saharozil lektin CnSucL aglutiniral človeške eritrocite krvne skupine A z najnižjo aglutinacijsko koncentracijo 47  $\mu\text{M}$ , medtem ko eritrocitov krvne skupine B ni aglutiniral [52]. Najvišja koncentracija naravnega saharozil lektina, ki smo jo uporabili v testih aglutinacije, je bila 23  $\mu\text{M}$ , kar je lahko vzrok za odsotnost aglutinacije človeških eritrocitov krvne skupine A. Izolektini rCnSL-ProA, rCnSL-B in rCnSL-ProB so hemaglutinirali samo kunčje eritrocite, izolektin rCnSL-A pa ni izkazoval aglutinacijske aktivnosti. Naravni saharozil lektin in rekombinantni lektin rCnSL-ProA imata podobni najnižji aglutinacijski koncentraciji, in

sicer je naravni saharozil aglutiniral kunčje eritrocite do koncentracije 2,3  $\mu\text{M}$ , izolektin rCnSL-ProA pa do koncentracije 1,9  $\mu\text{M}$ . Izolektina rCnSL-B in rCnSL-ProB sta izkazovala aglutinacijsko aktivnost pri nekoliko višjih koncentracijah, pri čemer je izolektin rCnSL-ProB (3,3  $\mu\text{M}$ ) aglutiniral kunčje eritrocite v nižji koncentraciji, kot izolektin rCnSL-B (6,8  $\mu\text{M}$ ). Izolektin rCnSL-A ni izkazoval aglutinacijske aktivnosti, pri čemer je bila najvišja koncentracija, v kateri smo ga testirali, 23  $\mu\text{M}$ . Izolektina rCnSL-ProA in rCnSL-A se razlikujeta le v dodatnih enajstih N-končnih aminokislina pri izolektinu rCnSL-ProA. Ker multivalentni lektini povzročajo hemaglutinacijo s premreženjem eritrocitov preko vezave sladkorjev na njihovi površini [20], verjetno teh enajst aminokislin ustvari dodatno vezavno mesto, ki izolektinu rCnSL-ProA omogoča aglutinacijo, ki je pri izolektinu rCnSL-A ni. Na drugi strani pa bi lahko propeptid omogočal izolektinu rCnSL-ProA tvorbo dimerov, vendar jih analiza z nativno elektroforezo BN PAGE ni potrdila, saj sta izolektina rCnSL-A in rCnSL-ProA potovala podobno. Izkazalo se je, da vsaj v primeru izolektinov rCnSL-A in rCnSL-ProA N-končni propeptid pomembno vpliva na biološko aktivnost. Vpliv N-končnega propeptida na biološko aktivnost smo opazili tudi pri afinitetni kromatografiji, kjer sta se izolektina rCnSL-ProA in rCnSL-ProB vezala na saharozil-sefarozo v večjem deležu, kot obliki brez N-končnega propeptida.

Vsi saharozil izolektini, z izjemo izolektina rCnSL-A, so aglutinirali kunčje eritrocite in s tem pokazali specifičnost za sladkorje na njihovi površini. V literaturi nismo zasledili podatka, kateri so ti sladkorji, vendar pa obstajajo številni članki o lektinah, ki aglutinirajo kunčje eritrocite, ne pa človeških. Takšni lektini so ASLI in ASLIII iz česna (*Allium sativum*) [85], BanLec iz banane (*Musa acuminata*) [86], lektini iz pegatega kačnika (*Arum maculatum*) [87], jajčastolistnega muhovnika (*Listera ovata*), širokolistne močvirnice (*Epipactis helleborine*) in lektini iz orhidej rodu *Cymbidium* [88]. Vsi našteti lektini so specifični za D-manozo. S testi inhibicije hemaglutinacije smo pokazali, da je tudi pri rekombinantnih saharozil izolektinih D-manoza inhibirala hemaglutinacijo. Poleg D-manoze pa so hemaglutinacijo inhibirali še saharoza, D-glukoza in D-fruktoza, in sicer vsaj pri izolektinu rCnSL-B v nižjih koncentracijah, kot D-manoza. Natančnejšo specifičnost vezave rekombinantnih saharozil izolektinov za posamezne sladkorje bi lahko določili s sladkornimi mikromrežami.

Naravni saharozil lektin iz gobe megleinke je verjetno mešanica več izolektinov, ki spadajo tako v skupino A, kot v skupino B. Poleg teh verjetno vsebuje še druge izolektine, ki mu omogočajo aglutinacijo človeških eritrocitov krvne skupine B. Izolektini v naravnem saharozil lektinu lahko delujejo sinergistično in s tem okrepijo njegovo delovanje.

Saharozil-lektina skupine A (rCnSL-A in rCnSL-ProA) sta po svojih lastnostih bolj podobna naravnemu saharozil lektinu CnSucL iz gobe megleinke (*Clitocybe nebularis*), kot saharozil-lektina skupine B (rCnSL-B in rCnSL-ProB). Biokemijske lastnosti naravnega saharozil lektina so med vsemi pripravljenimi rekombinantnimi saharozil izolektini najbolj podobne biokemijskim lastnostim izolektina rCnSL-A. Določena delna aminokislinska zaporedja naravnega saharozil lektina se najbolj ujemajo z aminokislinskim zaporedjem izpeljanim iz cDNA in N-končnim zaporedjem izolektina rCnSL-A. Poleg tega potuje rekombinantni izolektin rCnSL-A pri analizi z NaDS PAGE in z nativno elektroforezo BN PAGE pri podobni velikosti, kot naravni saharozil lektin, izoelektrična točka izolektina rCnSL-A pa je enaka izoelektrični točki najizrazitejše lise naravnega lektina. Oba lektina imata sposobnost vezave saharoze, razlikujeta pa se v aglutinacijski aktivnosti. Aglutinacijska aktivnost naravnega saharozil lektina je najbolj podobna aglutinacijski aktivnosti rekombinantnega izolektina rCnSL-ProA. Slednji sicer ni aglutiniral človeških eritrocitov krvne skupine B, je pa imel podoben titer aglutinacije kunčjih eritrocitov, kot naravni saharozil lektin. Rekombinantni izolektin rCnSL-ProA in naravni saharozil lektin sta imela tudi zelo podobna spektra CD in s tem strukturo.

V nadalnjih raziskavah bi bilo potrebno preveriti biološko aktivnost posameznih rekombinantnih izolektinov in njihovih kombinacij. Zlasti nas zanima njihovo insekticidno delovanje, zaradi katerega je naravni saharozil lektin zanimiv. Kemični insekticidi škodujejo okolju in človeškemu zdravju, zato predstavlja uporaba novih bioloških insekticidov prihodnost na tem področju.

## 6. SKLEPI

V diplomskem delu smo s pomočjo bakterije *Escherichia coli* in vektorja pET-11a uspešno pridobili štiri rekombinantne saharozil izolektine iz gobe meglenke (*Clitocybe nebularis*). To sta izolektina rCnSL-A in rCnSL-B ter njuni oblici z N-končnim propeptidom rCnSL-ProA in rCnSL-ProB. Izolektinu rCnSL-ProA se je med izražanjem v bakteriji *E. coli* odcepilo dvajset aminokislin dolgo N-končno zaporedje tako, da je bil propeptid izolektina rCnSL-ProA dolg 11 aminokislin. Propeptid izolektina rCnSL-ProB je bil dolg 31 aminokislin.

Rekombinantnim izolektinom smo določili biokemijske značilnosti in jih primerjali z naravnim saharozil lektinom. Naravni saharozil lektin ter izolektini rCnSL-A, rCnSL-ProA in rCnSL-ProB so monomeri, medtem ko izolektin rCnSL-B tvori višje strukture, najverjetneje dimere. Izoelektrična točka izolektina rCnSL-A je enaka najizrazitejši lisi naravnega lektina, izolektin rCnSL-B pa ima nižjo izoelektrično točko. Z analizo s CD smo pokazali, da je vsaj del pripravljenih izolektinov, po zvijanju iz inkluzijskih teles, dosegel aktivno konformacijo. Slednje smo potrdili z afinitetno kromatografijo. Vsi rekombinantni izolektini so se vezali na saharozil-sefarozo, kar pomeni, da propeptid ne vpliva na vezavo saharoze. Naravni saharozil lektin iz gobe meglenke je aglutiniral človeške eritrocite krvne skupine B in kunče eritrocite, medtem ko so izolektini rCnSL-ProA, rCnSL-B in rCnSL-ProB aglutinirali samo kunče eritrocite. Izolektin rCnSL-A ni izkazoval aglutinacijske aktivnosti. Vsaj v primeru izolektinov rCnSL-A in rCnSL-ProA lahko sklepamo, da N-končni propeptid pomembno vpliva na biološko aktivnost. Aglutinacijo rekombinantnih izolektinov rCnSL-ProA, rCnSL-B in rCnSL-ProB so inhibirale sahariza, glukoza, fruktoza in manoza.

Naravni saharozil lektin je heterogen. Sestavljen je iz več izolektinov med katerimi so najverjetneje tudi pripravljeni rekombinantni izolektini, pri čemer pa prevladujejo izolektini skupine A.

## 7. LITERATURA

1. Campbell N.A., Reece J.B.: *Biology*. 6<sup>th</sup> Edition. Pearson Education Inc., San Francisco, 2002: 616-632.
2. Raffaelli M., Thomas-Domenech J.M.: *Botanika*. Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 1990: 36-43.
3. Gunde-Cimerman N.: *Nitaste glive*. V: Biotehnologija - osnovna znanja (urednik Raspor P.). BIA d.o.o., Ljubljana, 1996: 96-110.
4. Deacon J.W.: *Fungal biology*. 4<sup>th</sup> Edition. Blackwell Publisher, Oxford, 2006: 1-16.
5. Arzenšek B., Tratnik B., Malovrh B.: *Slovenski gobarski vodnik*. 1. izdaja. Modrijan, Ljubljana, 2010: 17-18, 318.
6. Podobnik A., Devetak D.: *Biologija 4 in 5: Raznolikost živih bitij*. 1. izdaja. DZS, Ljubljana, 1997: 47-56.
7. Gogala N.: *Simbiotske glive*. V: Biotehnologija - osnovna znanja (urednik Raspor P.). BIA d.o.o., Ljubljana, 1996: 113-128.
8. Raspor P.: *Kvasovke*. V: Biotehnologija - osnovna znanja (urednik Raspor P.). BIA d.o.o., Ljubljana, 1996: 69-93.
9. Chang S.T., Miles P.G.: *Musrooms biology-a new discipline*. Mycologist, 1992; 6: 64-65.
10. Kreft S.: *Premalo raziskane učinkovine: Zdravilne gobe*. Herbika, september 2000: 16-19.
11. Guillamon E., Garcia-Lafuente A., Lozano M., D'Arrigo M., Rostango M.A., Villares A., Martinez J.A.: *Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases*. Fitoterapia, 2010; 81(7): 715-723.
12. Lindequist U., Niedermeyer T.H., Julich W.D.: *The pharmacological potential of mushrooms*. Evidence-based Complement Alternative Medicine, 2005; 2(3): 285-299.
13. Sullivan R., Smith J.E., Rowan N.J.: *Medicinal mushrooms and cancer therapy - translating a traditional practice in Western medicine*. Perspectives in Biology and Medicine, 2006; 49: 159-170.
14. Lull C., Wicher H.J., Salvekul H.F.J.: *Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites*. Mediators of Inflammation, 2005; 2: 63-80.

15. Wasser S.P.: *Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011; 89(5): 1323-1332.
16. Erjavec J., Kos J., Ravnikar M., Dreš T., Sabotič J.: *Proteins of higher fungi - from forest to application*. Trends in Biotechnology, 2012; 30(5): 259-273.
17. Xu X., Yan H., Chen J., Zhang X.: *Bioactive proteins from mushrooms*. Biotechnology Advances, 2011; 29(6): 667-674.
18. Laessone T.: *Gobe*. Prešernova družba d.d., Ljubljana, 2006: 40.
19. Bielli E.: *Gobe - spoznavanje, prepoznavanje in nabiranje najbolj razširjenih vrst gob*. Založba Mladinska knjiga, Ljubljana, 2002: 85.
20. Varki A., Cummings R.D., Esko J.D., Freeze H.H., Stanley P., Bertozzi C.R., Hart G.W., Etzler M.E.: *Essentials of Glycobiology*. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2009: 784.
21. Dwek R.A.: *Glycobiology: Toward understanding the function of sugars*. Chemical Reviews, 1996; 96(2): 683-720.
22. Varki A.: *Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct*. Glycobiology, 1993; 3(2): 97-130.
23. Taylor E.T., Drickamer K.: *Introduction to glycobiology*. 3<sup>rd</sup> edition. Oxford University Press Inc., New York, 2011: 1-16.
24. Laine R.A.: *Information capacity of carbohydrate code*. Pure and Applied Chemistry, 1997; 69(9): 1867-1873.
25. Sharon N., Lis H.: *History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules*. Glycobiology, 2004; 14(11): 53R-62R.
26. Sharon N.: *Lectins: from obscurity into the limelight*. Protein Science, 1998, 7(9): 2042-2048.
27. Peumans W.J., Van Damme E.J.: *Lectins as plant defense proteins*. Plant Physiology, 1995; 109: 347-352.
28. Vandeborre G., Smagghe G., Van Damme E.J.: *Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects*. Phytochemistry, 2011; 72(13): 1538-15350.
29. Lam S.K., Ng T.B.: *Lectins: production and practical applications*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011; 89(1): 45-55.

30. Naeem A., Saleemuddin M., Khan R.H.: *Glycoprotein targeting and other applications of lectins in biotechnology*. Current Protein and Peptide Science, 2007; 8(3): 261-271.
31. Danguy A., Decaestecker C., Genten F., Salmon I., Kiss R.: *Applications of lectins and neoglycoconjugates in histology and pathology*. Acta Anatomica (Basel), 1998; 161(1-4): 206-218.
32. Gabius H.J., Andre S., Jimenez-Barbero J., Romero A., Solis D.: *From lectin structure to functional glycomics: principles of the sugar code*. Trends in Biochemical Sciences, 2011; 36(6): 298-313.
33. Michiels K., Van Damme E.J., Smagghe G.: *Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins?*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 2010; 73(4): 193-212.
34. Slifkin M., Doyle R.J.: *Lectins and their application to clinical microbiology*. Clinical Microbiology Reviews, 1990; 3(3): 197-218.
35. Pusztai A., Bardocz S., Ewen S.W.: *Uses of plant lectins in bioscience and biomedicine*. Frontiers in Bioscience, 2008; 13: 1130-1140.
36. Inbar J., Chet I.: *Lectins and biocontrol*. Critical Reviews in Biotechnology, 1997; 17(1): 1-20.
37. Jordinson M., Calam J., Pignatelli M.: *Lectins: from basic science to clinical application in cancer prevention*. Expert Opinion on Investigational Drugs, 1998; 7(9): 1389-1403.
38. Aksoy U., Uner A.: *Lectins and their application to parasitology*. Turkish Journal of Infection, 2003; 17(4): 513-516.
39. Kocbek P., Kristl J.: *Ciljan vnos učinkovin z uporabo lektinov - korak naprej v razvoju bioadhezivnih dostavnih sistemov*. Farmacevtski vestnik, 2006; 57: 162-168.
40. Heinrich E.L., Welty L.A., Banner L.R., Oppenheimer S.B.: *Direct targeting of cancer cells: a multiparameter approach*. Acta Histochemica, 2005; 107(5): 335-344.
41. Balzarini J.: *Targeting the glycans of gp120: a novel approach aimed at the Achilles heel of HIV*. The Lancet Infectious Diseases, 2005; 5(11): 726-731.
42. Swanson M.D., Winter H.C., Goldstein 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.

43. Hoorelbeke B., Huskens D., Ferir G., Francois K.O., Takahashi A., Van Laethem K., Schols D., Tanaka H., Balzarini J.: *Actinohivin, a broadly neutralizing prokaryotic lectin, inhibits HIV-1 infection by specifically targeting high-mannose-type glycans on the gp120 envelope.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010; 54(8): 3287-3301.
44. Vasconcelos I.M., Olivera J.T.: *Antinutritional properties of plant lectins.* Toxicon, 2004; 44(4): 385-403.
45. Hamid R., Masood A.: *Dietary lectins as disease causing toxicants.* Pakistan Journal of Nutrition, 2009; 8(3): 293-303.
46. Singh R.S., Bhari R., Kaur H.P.: *Mushroom lectins: current status and future perspectives.* Critical Reviews in Biotechnology, 2010; 30(2): 99-126.
47. Guillot J., Konska G.: *Lectins in higher fungi.* Biochemical Systematics and Ecology, 1997; 25(3): 203-230.
48. Khan F., Khan M.I.: *Fungal lectins: Current molecular and biochemical perspectives.* International Journal of Biological Chemistry, 2011; 5: 1-20.
49. Yagi F., Sakai T., Shiraishi N., Yotsumoto M., Mokoyoshi R.: *Hemagglutinins (lectins) in fruit bodies of Japanese higher fungi.* Mycoscience, 2000; 41: 323-330.
50. Wang H., Ng T.B., Ooi V.E.: *Lectins from mushrooms.* Mycological Research, 1998; 102(8): 897-906.
51. Goldstein I.J., Winter H.C.: *Mushroom lectins.* V: Comprehensive Glycoscience Volume 3 (urednik: Kamerling J.P.). Elsevier, Oxford, 2007: 601-620.
52. Pohleven J.: *Biokemijske lastnosti lektina iz višje gline meglenke (*Clitocybe nebularis*) in njegova biološka aktivnost.* Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana, 2009: 127.
53. Cooper D.N., Barondes S.H.: *God must love galectins; he made so many of them.* Glycobiology, 1999; 9(10): 979-984.
54. Fulop V., Jones D.T.: *Beta propellers: structural rigidity and functional diversity.* Current Opinion in Structural Biology, 1999; 9(6): 715-721.
55. Birck C., Damian L., Marty-Detraves C., Lougarre A., Schulze-Briese C., Koehl P., Fournier D., Paquereau L., Samama J.P.: *A new lectin family with structure similarity to actinoporins revealed by the crystal structure of Xerocomus chrysenteron lectin XCL.* Journal of Molecular Biology, 2004; 344(5): 1409-1420.

56. Percudani R., Montanini B., Ottonello S.: *The anti-HIV cyanovirin-N domain is evolutionarily conserved and occurs as a protein module in eukaryotes*. Proteins: Structure, Function, Bioinformatics, 2005; 60(4): 670-678.
57. Ko J.L., Hsu C.I., Lin R.H., Kao C.L., Lin J.Y.: *A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from the edible mushroom, Flammulina velutipes and its complete amino acid sequence*. European Journal of Biochemistry, 1995; 228(2): 244-249.
58. Bleuler-Martinez S., Butschi A., Garbani M., Walti M.A., Wohlschlager T., Potthoff E., Sabotič J., Pohleven J., Luthy P. Hengartner M.O., Aebi M., Kunzler M.: *A lectin-mediated resistance of higher fungi against predators and parasites*. Molecular Ecology, 2011; 20(14): 3056-3070.
59. Pohleven J., Brzin J., Vrabec L., Leonardi A., Cokl A., Štrukelj B., Kos J., Sabotič J.: *Basidiomycete Clitocybe nebularis is rich in lectins with insecticidal activities*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011; 91(4): 1141-1148.
60. Mier N., Canete S., Klaebe A., Chavant L., Fournier D.: *Insecticidal properties of mushroom and toadstool carpophores*. Phytochemistry, 1996; 41(5): 1293-1293.
61. Kandić L.: *Insekticidno delovanje proteinov izbranih gob in rastlin na modelu vinske mušice*. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2007: 82.
62. Žigon S.: *Karakterizacija za saharozo specifičnega lektina iz gobe megleinke (Clitocybe nebularis)*. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011: 105.
63. Štrukelj B., Kos J.: *Biološka zdravila: Od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 68-111.
64. Makrides S.C.: *Strategies for achieving high-level expression of genes in Escherichia coli*. Microbiological Reviews, 1996; 60(3): 512-538.
65. Anderson D.M.: *Dorland's illustrated medicinal dictionary*. 30<sup>th</sup> Edition. Saunders, Philadelphia, 2003: 642.
66. Swartz J.R.: *Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins*. Current Opinion in Biotechnology, 2001; 12(2): 195-201.
67. Sorensen H.P., Mortensen K.K.: *Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in Escherichia coli*. Journal of Biotechnology, 2005; 115(2): 113-128.

68. Baneyx F.: *Recombinant protein expression in Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology, 1999; 10(5): 411-421.
69. Baneyx F., Mujacic M.: *Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli*. Nature Biotechnology, 2004; 22(11): 1399-1408.
70. Schmidt F.R.: *Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004; 65(4): 363-372.
71. Terpe K.: *Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006; 72(2): 211-222.
72. Singh R.S., Sharma S., Kaur G., Bhari R.: *Screening of Penicillium species for occurrence of lectins and their characterization*. Journal of Basic Microbiology, 2009; 49(5): 471-476.
73. Singh R.S., Tiwary A.K., Bhari R.: *Screening of Aspergillus species for occurrence of lectins and their characterization*. Journal of Basic Microbiology, 2008; 48(2): 112-117.
74. Singh R.S., Bhari R., Kaur H.P., Vig M.: *Purification and characterization of a novel thermostable mycelial lectin from Aspergillus terricola*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010; 162(5): 1339-1349.
75. Koharudin L.M., Visconti A.R., Jee J.G., Ottonello S., Gorineborn A.M.: *The evolutionarily conserved family of Cyanovirin-N homologs: Structures and carbohydrate Specificity*. Structure, 2008; 16(4): 570-584.
76. Schroeder M.R., Raikhel N.V.: *Isolation and characterization of pro-barley lectin expressed in Escherichia coli*. Protein Expression and Purification, 1992; 3(6): 508-511.
77. Van Damme E.J., Kaku H., Perini F., Goldstein I.J., Peeters B., Yagi F., Decock B., Peumans W.J.: *Biosynthesis, primary structure and molecular cloning of snowdrop (*Galanthus nivalis* L.) lectin*. European Journal of Biochemistry, 1991; 202(1): 23-30.
78. Mansfield M.A., Pemans W.J., Raikhel N.V.: *Wheat-germ agglutinin is synthesized as a glycosilated precursor*. Planta, 1988; 173: 482-489.
79. Fouquaert E., Hanton S.L., Brandizzi F., Peumans W.J., Van Damme E.J.: *Localization and topogenesis studies of cytoplasmic and vacuolar homologs of the Galanthus nivalis agglutinin*. Plant Cell Physiology, 2007; 48(7): 1010-1021.

80. Jolliffe N.A., Di Cola A., Marsden C.J., Lord J.M., Ceriotti A., Frigerio L., Roberts L.M.: *The N-terminal ricin propeptide influences the fate of ricin A-chain in tobacco protoplasts*. The Journal of Biological Chemistry, 2006; 281(33): 23377-23385.
81. Novagen, *pET System Manual*. 11<sup>th</sup> Edition, ZDA, 2006.
82. Avanzo P., Sabotič J., Anzlovar S., Popovič T., Leonardi A., Pain R.H., Kos J., Brzin J.: *Trypsin-specific inhibitors from the basidiomycete Clitocybe nebularis with regulatory and defensive functions*. Microbiology, 2009; 155(12): 3971-3981.
83. Kuhelj R.: *Biokemija v praksi: načela in tehnike*. 3. izdaja. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, 2003: 44-49.
84. Cooper D.N., Boulianne R.P., Charlton S., Farrell E.M., Sucher A., Lu B.C.: *Fungal galectins, sequence and specificity of two isolectins from Coprinus cinereus*. The Journal of Biological Chemistry, 1997; 272(3): 1514-1521.
85. Dam T.K., Bachhawat K., Rani P.G., Surolia A.: *Garlic (*Allium sativum*) lectins bind to high mannose oligosaccharide chains*. The Journal of Biological Chemistry, 1998; 273(10): 5528-5535.
86. Koshte V.L., Van Dijk W., Van Der Stelt M.E., Aalberse R.C.: *Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from Musa paradisiac (banana)*. Biochemical Journal, 1990; 272(3): 721-726.
87. Van Damme E.J., Goossens K., Smeets K., Van Leuven F., Verhaert P., Peumans W.J.: *The major tuber storage protein of Araceae species is a lectin. Characterization and molecular cloning of the lectin from Arum maculatum L.* Plant Physiology, 1995; 107(4): 1147-1158.
88. Van Damme J.M., Smeets K., Torrekens S., Van Leuven F., Pneumans W.J.: *Characterization and molecular cloning of mannose-binding lectins from the Orchidaceae species Listera ovata, Epipactis helleborine and Cymbidium hybrid*. European Journal of Biochemistry, 1994; 221(2): 769-777.

## 8. PRILOGE

### Priloga 1: Prileganje začetnih oligonukleotidov kodirajoči cDNA izolektina rCnSL-ProA

Priloga prikazuje prileganje oligonukleotidnih začetnikov kodirajoči cDNA v vektorju pJET in aminokislinsko zaporedje izpeljano iz cDNA. Protismiseln začetnik rCnSL-A-BamHI-R je zapisan v narekovajih, ker je prikazano njemu reverzno komplementarno zaporedje. Z rumeno so senčeni začetni kodoni ATG (Met), z rdečo pa STOP kodoni TGA. V aminokislinskem zaporedju je predviden N-končni propeptid zapisan poševno.

rProCnSL-A-NdeI-F zaporedje cDNA AK zaporedje	GGGCATATGGCACGATTTCCTCTTGTGTTTC ACTATCAACATGGCACGATTTCCTCTTGTGTTCTCCGCTCTGCTCCCTTGATACATGCCA M A A F F S L V V L L A L L P F G I H A
zaporedje cDNA rCnSL-A-NdeI-F AK zaporedje	GCGCGTACCTCGACTGAGTTGACTCCCCGTGTGAACCCCAATCTACCGGGGCCAACGATGTCTTGT AAACATATGGTAACCCCAATCTACCGGGGCCA S A L P S T E L T P R V N P N L P G P N D V F V
zaporedje cDNA AK zaporedje	CGGATTCGCGGGACAAACAATATAAGTTGGCGCATATATGAAAAGGACGGCATCAAAGATAACGCCATTA G F R G T N N I V G A I Y E K D G I K D T P L
zaporedje cDNA AK zaporedje	AACATGGTGCAGATCGAGAGATGGGCCCTGGGTCAATATACACTGACGGCTATTACCGGCCGAATCT N N G A D A E M G P G S Y I T D G L F T A R I
zaporedje cDNA AK zaporedje	TTGCCTCAGGATCTGCTGTAATAATCCAGGCACGACGGAACAGTTGTAAGATTATGCCAGCGGGT F A S G S A G N N P G T T A T V C K I Y A S G V
zaporedje cDNA AK zaporedje	GCAATGGCGGGGTGCCAAAGGGTTATATTCTGTTGCCTACTTGGAAATGGCCGACGGCAGAGCAA Q W R G A P K G Y I P V A Y F G N G P T A E Q
zaporedje cDNA AK zaporedje	CGCCGTCAGACTTACCTGAGAACCTTGGCTGCCCGTACAGCGATACGCTTGGAAATCTCAACACAA R R Q T Y L R T L G L P G T A I R F G N L N T
zaporedje cDNA AK zaporedje	ATCGGGGCAAGGACCCACGGCGCCCCGACAGATGGTCGTCCCCCGGACCACCTCGAAGTCTCTGAA N P G Q G P T A P R Q M V V P P G P L R S L L K
zaporedje cDNA AK zaporedje	AGCAAGCTGCTCCCTGCCGAGATACTCGTCTCCCGCAGACACTGCACTATTGAGAAGCGCGTAGAC A S C F P A A D T R L P Q T L H Y F E K R V D
zaporedje cDNA »rCnSL-A-BamHI-R« AK zaporedje	TGGAACATCATAACTGCAGCCGACTCCCAGACTGGGGACACTGAGCTCTAAATCCTCTAC ACTGGGGACACTGATGATGAGGTTCCAAT W N I I T A A D S Q T W G H

## **Priloga 2: Poravnava aminokislinskih zaporedij izolektina rCnSL-A in proteina CC16\_06022**

Primerjava zaporedij izolektina rCnSL-A s hipotetičnim proteinom CC16\_06022 iz genoma gobe gnojiščne tintnice. S črno so senčene enake aminokisline in s sivo podobne aminokisline.