

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA ZGONC

DIPLOMSKA NALOGA

VPLIV ZAVIRALCEV KLITOCIPINA IN MAKROCIPINA NA AKTIVNOST
KATEPSINA X, IZRAŽENEGA V KVASOVKI *Pichia pastoris*

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA ZGONC

**VPLIV ZAVIRALCEV KLITOCIPINA IN MAKROCIPINA NA AKTIVNOST
KATEPSINA X, IZRAŽENEGA V KVASOVKI *Pichia pastoris***

**INFLUENCE OF INHIBITORS CLITOCYPIN AND MACROCYPIN ON THE
ACTIVITY OF CATHEPSIN X, EXPRESSED IN YEAST *Pichia pastoris***

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo v biotehnološkem in celičnem laboratoriju katedre za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom asist. mag. Urše Pečar Fonovič.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Janku Kosu, ki mi je omogočil sodelovanje na področju raziskav katepsina X in njegovih inhibitorjev.

Posebna zahvala gre somentorici mag. Urši Pečar Fonovič za usmerjanje, spodbudo, številne nasvete, potrpežljivost ter pomoč pri izdelavi diplomske naloge. Zahvaljujem se ji tudi za čas, ki mi ga je posvetila.

Hvala tudi dr. Jerici Sabotič za inhibitorje iz gob.

Za lepo vzdušje in pomoč pri raziskovalnem delu se zahvaljujem tudi vsem na Katedri za farmacevtsko biologijo.

Hvala tudi Ani Mitrovič za pomoč pri obdelavi podatkov.

Navsezadnje pa gre največja zahvala mojim dragim staršem, bratu, babi in fantu Arminu za vso pomoč, ljubezen in vzpodbudo. Njim dolgujem največ, ker vem, da se na njih lahko vedno zanesem.

Hvala tudi vsem, ki so mi kakorkoli pomagali v času študija in pri izdelavi diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Janka Kosa in somentorice asist. mag. Urše Pečar Fonovič.

Ana Zgonc

Kazalo vsebine

I POVZETEK.....	iv
II SUMMARY.....	v
III OKRAJŠAVE.....	vi
IV OZNAKE AMINOKISLIN.....	viii
1. UVOD.....	1
1.1 Peptidaze.....	1
1.2 Katepsin X.....	3
1.3 Inhibitorji.....	7
1.3.1 Inhibitorji iz gob.....	8
1.4 Izražanje rekombinantnega proteina katepsina X v kvasovki <i>Pichia pastoris</i>	12
2. HIPOTEZA IN NAMEN DELA.....	14
3. MATERIALI IN METODE.....	15
3.1 Materiali in aparature.....	15
3.2 Metode.....	18
3.2.1 ORGANIZEM.....	18
3.2.2 PRIPRAVA GOJIŠČ ZA KVASOVKO <i>Pichia pastoris</i>	18
3.2.3 PRIPRAVA TRAJNE KULTURE.....	19
3.2.4 IZRAŽANJE PROKATEPSINA X V <i>P. PASTORIS</i>	20
3.2.5 ULTRAFILTRACIJA.....	20
3.2.6 DIALIZA.....	21
3.2.7 ČIŠČENJE PROKATEPSINA X Z IONSKO-IZMENJEVALNO KROMATOGRAFIJO IN PONOVDNA ULTRAFILTRACIJA.....	21
3.2.8 AKTIVACIJA PROKATEPSINA X S KATEPSINOM L IN ODSTRANITEV KATEPSINA L Z IMUNOPRECIPITACIJO.....	22
3.2.9 DOLOČITEV KONCENTRACIJE KATEPSINA X.....	22
3.2.10 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECIL SULFATA (SDS-PAGE).....	23
3.2.11 DETEKCIJA PROTEINOV PRI POLIAKRILAMIDNI GELSKI ELEKTROFOREZI.....	26
2.2.11.1 Barvanje z barvilom Coomassie brilliant blue:.....	26
2.2.11.2. Prenos western:.....	27
3.2.12 TITRACIJA KATEPSINA X Z INHIBITORJEM E-64.....	29
3.2.13 TESTIRANJE INHIBITORJEV IZ GOB.....	31
3.2.14 DOLOČANJE KONSTANTE INHIBICIJE Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI SUBSTRATA.....	32
4. REZULTATI.....	34
4.1 Izražanje in izolacija katepsina X.....	34
4.2 Preverjanje izraženega katepsina X.....	37
4.3 Titracija aktivnega mesta katepsina X z inhibitorjem E-64.....	40
4.4 Testiranje inhibitorjev na specifičen substrat za katepsin X.....	41
4.5 Določanje konstante inhibicije z različnimi koncentracijami substrata.....	46
5. RAZPRAVA.....	50
6. SKLEP.....	57
7. VIRI.....	58
8. PRILOGE:.....	64
8.1 Testiranje inhibitorjev na specifičen substrat za katepsin X:.....	64
8.2 Določanje konstante inhibicije z različnimi koncentracijami substrata.....	65

Kazalo ilustracij

Slika 1: Terciarna struktura katepsina X; elementi sekundarnih struktur so v modri barvi, stranske verige His23 Tyr27 mini zanke v zeleni barvi ter Cys31 katalitični aminokislinski ostanek v rumeni barvi; disulfidne vezi so vidne kot oranžni mostovi.(22).....	5
Slika 2: Karboksipeptidazna aktivnost katepsina X; a) površina aktivnega mesta katepsina X, obarvana glede na elektrostatski potencial, površina katalitičnega Cys31 je obarvana rumeno; b) shematski prikaz vezave substrata;(22).....	5
Slika 3: Test z luminolom, ki ima sposobnost oddajanja svetlobe; pri reakciji nastane vzbujen produkt, ki pri prehodu v osnovno stanje odda foton določene valovne dolžine (energijo v obliki svetlobe);.....	28
Slika 4: E-64, inhibitor cisteinskih proteaz.....	29
Slika 5: Tvorba tioeterske povezave med E-64 in Cys ostankom aktivnega mesta.....	29
Slika 6: Elucijski profil prokatepsina X;.....	35
Slika 7: Ekspresija in čiščenje rekombinantnega prokatepsina X, barvanje z barvilom Coomassie Brilliant Blue; OV- označevalci velikosti; lisa 1.- vzorec pred ionsko-izmenjevalno kolono; lisa 2.-zbrane frakcije iz ionsko-izmenjevalne kolone; lisa 3.- skoncentriran vzorec v ultrafiltrirni posodi; lisa 4.- ultrafiltrat; lisa 5.- naš izoliran katepsin X, po aktivaciji; lisa 6.- stari kat X, pripravljen na FFA;.....	37
Slika 8: Ekspresija in čiščenje rekombinantnega prokatepsina X, detekcija katepsina X s prenosom western; lisa 1- vzorec pred ionsko-izmenjevalno kolono, nanos 10 µl; lisa 2- zbrane frakcije iz ionsko-izmenjevalne kolone, nanos 10 µl ; lisa 3- skoncentriran vzorec v ultrafiltrirni posodi, nanos 10 µl; lisa 4- ultrafiltrat, nanos 10 µl; lisa 5- katepsin X po imunoprecipitaciji katepsina L oz. po aktivaciji pro oblike katepsina X, nanos 10 µl; lisa 6- stari katepsin X, pripravljen na FFA, nanos 1µl;.....	38
Slika 9: Elektroforeza in detekcija katepsina L s prenosom western; lisa 1-katepsin L, nanos 0,5 µl; lisa 2-stari katepsin X (0,94 mg/ml), nanos 1µl (0,94 µg); lisa 3- naš katepsin X (0,63 mg/ml), nanos 1,5µl (0,94µg);.....	39
Slika 10: Začetna hitrost reakcije (RFU/sec) v odvisnosti od koncentracije splošnega cisteinskega inhibitorja, E-64, pri stalni koncentraciji substrata Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH;.....	40
Slika 11: Diagram odvisnosti začetne hitrosti (RFU/sec) od razmerja med molarno koncentracijo inhibitorja in molarno koncentracijo encima [I]/[E];.....	40
Slika 12: Povprečne vrednosti RFU/sec pri vsakem inhibitorju in standardna napaka;.....	41
Slika 13: Primerjava aktivnosti inhibitorjev pri dveh testiranjih (sivi in svetlo modri stolpci) in povprečje aktivnosti s standardno napako (temno modri stolpci);.....	42
Slika 14: Koncentracijska odvisnost inhibicije katepsina X; povprečne vrednosti RFU/sec s pripadajočo standardno napako; prvo testiranje; koncentracija inhibitorja klitocipina od 1 nM do 1 µM;.....	43
Slika 15: Primerjava aktivnosti klitocipina v odvisnosti od njegove koncentracije (prvo testiranje); aktivnost negativne kontrole (encim brez inhibitorja) je 1;.....	44
Slika 16: Primerjava aktivnosti klitocipina v odvisnosti od njegove koncentracije (0,1µM, 0,5µM in 1µM) pri dveh testiranjih (sivi in svetlo modri stolpci) in povprečje aktivnosti s standardno napako (temno modri stolpci);.....	44
Slika 17: Določanje K_i z grafično metodo po Dixonu: predstavitev encimsko kinetičnih podatkov, s katerimi lahko določimo K_i ; $1/v$ (recipročna vrednost hitrosti) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja ($M_{cp} 1$) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke- $c(sub.)=1780 \mu M$, rdeče točke- $c(sub.)=590 \mu M$, svetlo modre točke- $c(sub.)=404 \mu M$,	

zelene točke-c(sub.)=300 μ M.....	46
Slika 18: Grafična metoda po Cornish-Bowdnu za določanje K_i in tipa encimske inhibicije; S/v (koncentracija substrata/hitrost) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja (Mcp1) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke-c(sub.)=1780 μ M, rdeče točke-c(sub.)=590 μ M, svetlo modre točke-c(sub.)=404 μ M, zelene točke-c(sub.)=300 μ M.....	47
Slika 19: Določanje K_i z grafično metodo po Dixonu: predstavitev encimsko kinetičnih podatkov, s katerimi lahko določimo K_i ; $1/v$ (recipročna vrednost hitrosti) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja (Clt) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke-c(sub.)=1780 μ M, rdeče točke-c(sub.)=590 μ M, svetlo modre točke-c(sub.)=404 μ M, zelene točke-c(sub.)=300 μ M.....	48
Slika 20: Grafična metoda po Cornish-Bowdnu za določanje K_i in tipa encimske inhibicije; S/v (koncentracija substrata/hitrost) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja (Clt) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke- c(sub.)=1780 μ M, rdeče točke- c(sub.)=590 μ M, svetlo modre točke- c(sub.)=404 μ M, zelene točke- c(sub.)=300 μ M.....	49
Slika 21: Povprečne vrednosti RFU/sec pri vsakem inhibitorju in standardna napaka, drugo testiranje;.....	64
Slika 22: Koncentracijska odvisnost inhibicije katepsina X; povprečne vrednosti RFU/sec s pripadajočo standardno napako; drugo testiranje; koncentracija inhibitorja klitocipina od 50 nM do 1 μ M;.....	64
Slika 23: Določanje K_i z grafično metodo po Dixonu: predstavitev encimsko kinetičnih podatkov, s katerimi lahko določimo K_i ; $1/v$ (recipročna vrednost hitrosti) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja (Mcp 1) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke-c(sub.)=1780 μ M, rdeče točke-c(sub.)=590 μ M, svetlo modre točke-c(sub.)=404 μ M, zelene točke-c(sub.)=300 μ M, drugo testiranje;.....	65
Slika 24: Grafična metoda po Cornish-Bowdnu za določanje K_i in tipa encimske inhibicije; S/v (koncentracija substrata/hitrost) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja (Mcp1) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke-c(sub.)=1780 μ M, rdeče točke-c(sub.)=590 μ M, svetlo modre točke-c(sub.)=404 μ M, zelene točke-c(sub.)=300 μ M, drugo testiranje;.....	66
Slika 25: Določanje K_i z grafično metodo po Dixonu: predstavitev encimsko kinetičnih podatkov, s katerimi lahko določimo K_i ; $1/v$ (recipročna vrednost hitrosti) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja (Clt) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke-c(sub.)=1780 μ M, rdeče točke-c(sub.)=590 μ M, zelene točke-c(sub.)=300 μ M, drugo testiranje;.....	67
Slika 26: Grafična metoda po Cornish-Bowdnu za določanje K_i in tipa encimske inhibicije; S/v (koncentracija substrata/hitrost) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja (Clt) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke- c(sub.)=1780 μ M, rdeče točke- c(sub.)=590 μ M, zelene točke- c(sub.)=300 μ M, drugo testiranje;.....	68

I POVZETEK

Peptidaze so prisotne v vseh živih organizmih. Udeležene so tako pri fizioloških kot patoloških procesih. Izražanje lizosomske cisteinske peptidaze katepsina X je povezano predvsem z boleznimi imunskega sistema in z nevrodegenerativnimi obolenji. Povečano izločanje prokatepsina X so odkrili v imunskih celicah, nevronskih celicah in glii ter tumorskih celicah nekaterih tipov raka. Peptidazni inhibitorji predstavljajo pomemben člen pri regulaciji proteolitične aktivnosti. Ugotovili so, da so višje glive vir peptidaznih inhibitorjev z edinstvenimi lastnostmi. Z namenom iskanja ustreznega inhibitorja karboksipeptidaze katepsina X, smo v diplomski nalogi testirali osem inhibitorjev iz gob z značilnim β triperesnim zvitjem (klitocipin, makrocipini (1,3,4), knispin, kospin, 1C in 2N).

Da bi lahko testirali inhibitorje in da bi rekombinantni katepsin X lahko okarakterizirali, smo potrebovali čist in aktiven encim brez vsebnosti sorodnih proteaz. Rekombinantni katepsin X smo izrazili v metilotropni kvasovki *Pichia pastoris*. Katepsin X se je v gojišče izločil v obliki topnega proteina. Po končani ekspresiji je sledila izolacija proteina iz gojišča. Glavno metodo čiščenja je predstavljala ionsko-izmenjevalna kromatografija. Ker smo katepsin X izrazili v obliki neaktivnega proencima, ga je bilo potrebno aktivirati. Uporabili smo rekombinantno cisteinsko peptidazo katepsin L. Z metodo imunoprecipitacije smo katepsin L nato ločili od aktivnega katepsina X. Prisotnost rekombinantnega katepsina X, uspešnost čiščenja in uspešnost njegove aktivacije smo preverili z analizo SDS-PAGE in s prenosom western.

Očiščenemu in aktiviranemu katepsinu X smo določili koncentracijo s pomočjo spektrofotometrične (preko absorbance pri 280nm in z uporabo ekstinkcijskega koeficienta $E_{1\%,1\text{cm}}$) in kolorimetrične (DC) metode ter delež aktivnega encima z metodo titracije aktivnega mesta. Ob upoštevanju povprečja koncentracij (0,63 mg/ml) smo pridobili 85% aktiven encim.

Drugi del diplomske naloge je predstavljal testiranje inhibitorjev. Od vseh inhibitorjev sta dva (klitocipin in makrocipin 1) pokazala določeno inhibitorno aktivnost do karboksipeptidaze. Njima smo s programom SigmaPlot določili tudi konstanti inhibicije, ki znašata: $K_i=23,0 \pm 4,1 \mu\text{M}$ za Clt in $11,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$ za Mcp 1.

II SUMMARY

Peptidases are present in all living organisms. They are involved in both physiological and pathological processes. Expression of lysosomal cysteine peptidase cathepsin X is related to the immune and neurodegenerative disorders. Increased expression of procathepsin X has been discovered in immune, neurons and glia cells and tumour cells of certain types of cancer. Due to the role of peptidases in biological processes, inhibitors represent an important part in the regulation of their proteolytic activity. It was found that higher fungi are a source of peptidase inhibitors with unique properties. To find the appropriate inhibitors of the cathepsin X carboxypeptidase activity, eight inhibitors from fungi with a distinctive β trefoil fold were tested in this study (clitocypin, macrocypins (1, 3, 4), cnispin, cospin, 1C and 2N).

A pure and active enzyme without the content of other peptidases was needed to test the inhibitors and to characterise the recombinant cahtepsin X. Recombinant cathepsin X was expressed in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. Cathepsin X was secreted into the culture medium as a soluble protein. The main purification method was ion-exchange chromatography. Cathepsin X is expressed as an inactive proenzyme, and needs to be activated. A recombinant cysteine peptidase cathepsin L was used for the activation. Cathepsin L was then removed from the active cathepsin X by the immunoprecipitation method. The efficacy of the expression, purification and activation was tested with the SDS-PAGE analysis and Western blot technique.

The concentration of the purified cathepsin X was determined by the spectrophotometric (absorbance at 280nm, extinction coefficient $E_{1\%,1\text{cm}}$) and colorimetric (DC) method, while the content of active enzyme was determined with the active site titration method. When considering average concentration (0.63 mg/ml), the active enzyme was 85 %.

The second part of the thesis deals with the inhibitor testing. Of all inhibitors, two (clitocypin and macrocypin 1) indicated inhibitory activity towards carboxypeptidase activity. Their inhibition constants were determined to be: $K_i=23,0 \pm 4,1 \mu\text{M}$ for Clt and $11,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$ for Mcp 1).

III OKRAJŠAVE

AICc	informacijski kriterij Akaike
AK	aminokislina
BSA	"Bovine serum albumine"-goveji serimski albumin
BMGY/BMMY:"buffered glycerol (methanol)-complex medium"-	medij za kvasovke
CBB	barvilo Coomassie brilliant blue
Clt	klitocipin
Cnp	knispin
CP	cisteinske proteaze
Da	dalton
DC	"Detergent Compatible", metoda
dH ₂ O	deionizirana voda
DMSO	dimetilsulfoksid
DTT	ditiotritol
E1%, 1cm	ekstinkcijski koeficient
EDTA	etilendiaminotetraoetna kislina
HRP	hrenova peroksidaza
Ki	konstanta inhibicije
MCP (1,3,4)	makrocipini
mg	miligram
ml	mililiter
MW	molekulska masa
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PIC 1	kospin
PBS(T)	fosfatni pufer
pt	protitelo

SDS	natrijev dodecilsulfat
TEMED	N, N, N', N'-tetramediletilendiamin
Tris	tris(hidroksimetil)aminometan
μg	mikrogram
μl	mikroliter
YNB	"Yeast Nitrogen Base"- medij za kvasovke z amonijevim sulfatom in brez AK
YPD	"Yeast Extract Peptone Dextrose" medij za kvasovke

IV OZNAKE AMINOKISLIN

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

1.UVOD

1.1 Peptidaze:

Peptidaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi. Po encimski klasifikaciji spadajo v podrazred hidrolaz, saj za delovanje uporabijo molekulo vode, ki deluje kot nukleofil za napad na karbonilno skupino v amidni vezi. (1)

Glede na kemično naravo katalitičnega mesta oz. kemijsko skupino (glavni, funkcionalni aminokislinski ostanek v aktivnem mestu), odgovorno za katalizo hidrolize peptidne vezi, delimo peptidaze v več specifičnih razredov na cisteinske, aspartatne, serinske, treoninske, glutaminske, mešane peptidaze, peptidaze neznanega katalitičnega tipa ter metalopeptidaze, ki pa za svoje katalitično delovanje potrebujejo še prisotnost dvovalentnega kovinskega iona, vezanega znotraj aktivnega mesta.

Podatkovna baza MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) deli peptidaze v družine glede na podobnost aminokislinskega zaporedja (226 peptidaznih družin), v poddružine glede na zgodovinsko divergenco z družino in v klane glede na strukturne podobnosti (57 klanov). Klan predstavlja eno ali več družin, sestavljenih iz peptidaz, ki kažejo neko evolucijsko sorodnost (imajo skupnega prednika), vendar so se med razvojem tako spremenile, da se ne ujemajo več v celotnem ali delnem aminokislinskem zaporedju, ki je odgovorno za katalitsko aktivnost. Družine v klanu so si podobne predvsem v terciarni strukturi. Kadar struktura ni znana, lahko klan predstavlja eno ali več družin s podobnostjo v položaju aminokislin (AK), ki so pomembne za katalitsko aktivnost, v polipeptidni verigi ter v omejenem ujemanju AK zaporedja v bližini teh AK. (2,3)

Informacije o peptidazah lahko dobimo tudi v drugih dostopnih podatkovnih bazah, kot so podatkovna baza Degradome (<http://degradome.uniovi.es/>) in baza Proteolysis Map (PMAP) (<http://www.proteolysis.org>), ki jo sestavlja več različnih podatkovnih baz: CutDB (data base- podatkovne baze), PathwayDB, ProteaseDB, SubstrateDB in ProfileDB (4).

Glede na mesto hidrolize peptidne vezi v polipeptidni verigi delimo peptidaze na endopeptidaze in eksopeptidaze. Endopeptidaze cepijo peptidno vez znotraj polipeptidne verige, eksopeptidaze pa na koncu. Eksopeptidaze se glede na velikost odcepljenih fragmentov nadalje delijo na mono-peptidaze (cepijo eno aminokislino), di-, tri- ali n-peptidaze (cepijo dve, tri ali več aminokislin), glede na mesto delovanja pa so lahko karboksipeptidaze (cepijo na C- koncu polipeptidne verige) ali aminopeptidaze (cepijo na N- koncu polipeptidne verige). (1,3)

Peptidaze so prisotne v vseh živih organizmih, kar kaže na njihovo pomembno vlogo v bioloških procesih. Kodirane so s približno 2% genov v vseh vrstah živih organizmov.

Imajo pomembne regulatorne in metabolne funkcije: regulirajo znotraj- in zunajcelično razgradnjo in aktivnost več proteinov (aktivacija pro-encimov in pro-hormonov), udeležene so pri tvorbi, prenosu in procesiranju molekulskih signalov, regulirajo izražanje genov, podvojevanje DNA, celično rast in diferenciacijo, celični cikel, sodelujejo pri odgovoru na oksidativni stres ter pri napačnem zvitju proteinov, pri apoptozi oz. celični smrti in tudi pri transportu proteinov. Pomembno vlogo pa imajo zunajcelične peptidaze tudi pri metabolizmu dušika. (5,6) Peptidaze sodelujejo še pri kaskadni reakciji strjevanja krvi, pri imunskem odzivu oz. pri predstavitvi antigena limfocitnim celicam, pri migraciji monocitov, pri uravnavanju krvnega tlaka, pri zdravljenju ran, pri procesu razvoja embrija, pri ovulaciji in pri drugih procesih (5,7).

Aktivnost peptidaz je strogo regulirana na različnih nivojih: z gensko ekspresijo na transkripcijskem in posttranskripcijskem nivoju, s sintezo cimogenov, z blokado peptidaz z endogenimi inhibitornimi proteini, s posttranslacijskimi modifikacijami (glikozilacija, vezava kofaktorja, fosforilacija), s proteolizo in degradacijo (5).

Ker je hidroliza peptidne vezi ireverzibilna in ker imajo peptidaze pomembne funkcije v bioloških procesih pri vseh živih organizmih, lahko nepravilnosti v njihovi aktivnosti oz. neregulirana aktivnost (največkrat prevelika proteoliza) privedejo do patoloških stanj, kot so nevrodegenerativna obolenja, rak, kardiovaskularne bolezni, vnetna stanja (revmatoidni artritis), osteoporoza, sladkorna bolezen, mišična distrofija, multipla skleroza in številne

druge (8,9,10).

S stališča spremenjenega izražanja peptidaz v patoloških stanjih, predstavljajo peptidaze velik potencial kot prognostični in diagnostični dejavnik pri naštetih boleznih, še zlasti pri rakavih obolenjih. Regulacija proteolitične aktivnosti pa s terapevtskega stališča predstavlja ključni mehanizem za zdravljenje le teh stanj. (11)

1.2 Katepsin X

Katepsin X spada med lizosomske cisteinske peptidaze, katerim na splošno pravimo katepsini (12). Katepsine sestavljajo peptidaze iz treh različnih razredov. Največ znanih katepsinov je cisteinskih peptidaz, dva predstavnika sta serinski peptidazi in dva sta aspartatni peptidazi. Odkrili so jih v prvi polovici 20. stoletja. Na začetku so mislili, da sodelujejo katepsini zgolj pri neselektivni razgradnji proteinov, danes pa vemo, da sodelujejo pri številnih pomembnih celičnih procesih (13).

Cisteinski katepsini spadajo v družino papainu podobnih peptidaz, po klasifikaciji MEROPS v družino C1, poddružino C1A in v klan CA. Ta peptidazna družina vsebuje tako endopeptidaze kot tudi eksopeptidaze, čeprav je le teh malo. V človeškem genomu je izraženih 11 človeških katepsinov (katepsini B, C, L, K, S, V, F, H, X (znan tudi pod oznako Z (14) ali P (15)), O in W) (13). Katepsini B, C in H imajo hkrati lahko endo- in eksopeptidazno aktivnost. Katepsin X pa ima zgolj karboksipeptidazno aktivnost (16).

Katepsini se lahko izražajo povsod ali pa so celično oz. tkivno specifični (13,17).

Stabilni so v kislem okolju lizosomov in endosomov. Tu so sposobni razgradnje velikega števila substratov. Znano je, da imajo specifične funkcije tudi izven celice, lahko so vezani na membranske površinske receptorje (plazemska membrana), nahajajo se znotraj sekretornih veziklov, v citosolu ter v mitohondriju in celo v jedru evkariontskih celic. (18)

Po končani sintezi sestojijo katepsini iz treh delov: iz N- terminalnega signalnega peptida, propeptida in iz katalitične domene, ki kasneje predstavlja zrel encim. Signalni peptid je pri katepsinih dolg od 10 do 20 aminokislin (AK) in vodi premestitev prooblike katepsina v endoplazemski retikulum. Ob tem pride do odcepa signalnega peptida. Dolžina propeptida se med katepsini močno razlikuje. Katepsin X ima najkrajšo verigo, sestavljeno

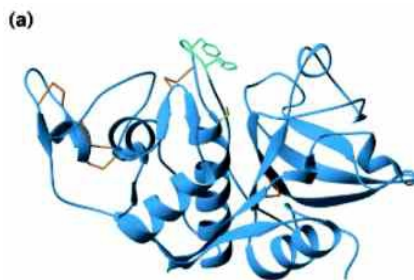
iz 38 aminokislin, katepsin F pa najdaljšo, sestavljeno iz kar 251 AK (19). Proregija deluje kot šaperon za transport proencima v lizosom ali endosom in tudi kot visokoafinitetni reverzibilni inhibitor, ki prepreči prehitro aktivacijo katalitične domene oz. preprečuje dostop substrata do aktivnega mesta. Kot peptid pa omogoča tudi pravilno zvitje zrelega encima. (20)

Cisteinski katepsini se sintetizirajo kot neaktivni proencimi in za aktivacijo potrebujejo proteolitično procesiranje. Ta poteka v kislem okolju endosomov ali lizosomov.

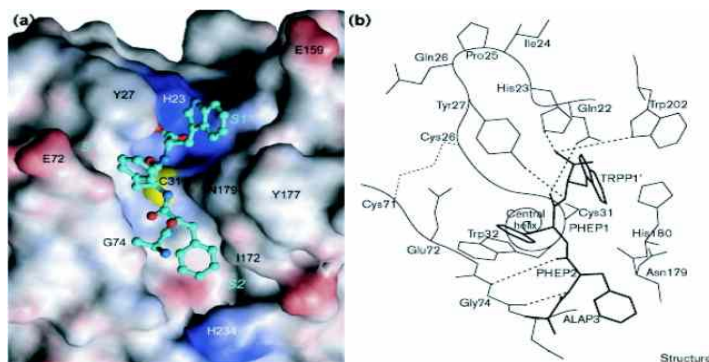
Zaporedje katepsina X je sorodno zaporedju drugih predstavnikov papainu podobnih cisteinskih peptidaz, podobnost je vidna tudi v aktivnem mestu. Struktura zrelega encima ima tudi nekaj posebnosti. Najbolj zanimiva je proregija, ki je najmanjša med vsemi katepsini. Dolga je 38 AK ostankov. Med cisteinskim ostankom proregije (Cys 10p) in cisteinskim ostankom aktivnega mesta (Cys31) se tvori kovalentna povezava. Preko te kovalentne modifikacije proregija prepreči proteolitično aktivnost encima.

Tako kot ostale papainu podobne cisteinske peptidaze, ima tudi katepsin X strukturo dveh domen. Prevladujoča sekundarna struktura N-terminalne domene na levi strani (domena L) je alfa heliks, C-terminalne domene na desni strani (domena D) pa beta nagubana ravnina. Domeni tvorita razpoko z aktivnim mestom v obliki črke V. V aktivnem mestu sta reaktivna AK ostanka, Cys31 in His180, vsak na svojem delu domene (Cys je na levi domeni, His pa na desni).

Strukturno pomemben del je 3 AK dolg peptidni vstavek (Ile24, Pro25, Glu26), ki je del mini zanke (His23-Tyr27). Ta vstavek prisili His23 in Tyr27 v razširjeno konformacijo z njunimi stranskimi verigami, ki molijo v aktivno mesto. Na ta način mini zanka katepsinu X onemogoča endopeptidazno funkcijo. (12,21,22)



Slika 1: Terciarna struktura katepsina X; elementi sekundarnih struktur so v modri barvi, stranske verige His23 Tyr27 mini zanke v zeleni barvi ter Cys31 katalitični aminokislinski ostanek v rumeni barvi; disulfidne vezi so vidne kot oranžni mostovi. (22)



Slika 2: Karboksipeptidazna aktivnost katepsina X; a) površina aktivnega mesta katepsina X, obarvana glede na elektrostatski potencial, površina katalitičnega Cys31 je obarvana rumeno; b) shematski prikaz vezave substrata; (22)

Prokatepsin X se od ostalih cisteinskih katepsinov razlikuje tudi po tem, da v *in vitro* pogojih ni zmožen avtoaktivacije. Aktivira ga katepsin L v nizkih koncentracijah in v reducirajočih pogojih (23).

Izražanje katepsina X je omejeno predvsem na celice imunskega sistema, kot so

dendritične celice, monociti in makrofagi (24). Katepsin X naj bi bil udeležen pri regulaciji imunskega odziva, to je pri prenosu signala, pri rasti, zorenju, adheziji, proliferaciji, celični komunikaciji in migraciji imunskih celic (25). S proteolitično cepitvijo C-terminalnega dela $\beta 2$ podenote integrinskih receptorjev (Mac-1 in LFA-1) katepsin X aktivira ta dva receptorja in s tem modulira imunski odziv oz. regulira kemotakso in druge funkcije $\beta 2$ integrina: celično adhezijo, proliferacijo in migracijo (26).

Katepsin X cepi tudi C-terminalni dipeptid pri alfa enolazi ($\alpha\alpha$, nenevronska enolaza) in gama enolazi ($\gamma\gamma$, NSE- nevronska specifična enolaza) in posledično regulira nevrogenezo in preživetje nevronskih celic. C-terminalni deli gama in alfa enolaze imajo pomembno oz. funkcionalno vlogo na plazemski membrani nevronskih celic. S prisotnostjo katepsina X se zmanjša nevrotrofna aktivnost obeh izoencimov. NSE se tudi uporablja kot tumorski kazalec za prognozo in odziv na terapijo pri raku na pljučih in nevroblastomu. Necepljena NSE regulira proliferacijo in preživetje živčnih celic, prisotnost katepsina X pa značilno zmanjša njeno trofično funkcijo. (27)

Ugotovili so tudi, da katepsin X zmanjša vlogo kemokinskega liganda CXCL-12 pri adheziji hematopoetičnih matičnih celic ter progenitornih celic na osteoblaste (28).

Povečano izražanje tega encima je prisotno tudi pri vnetnih procesih, pri bolnikih, okuženih z bakterijo *H. pylori* (29), pri ljudeh z nevrodegenerativnimi obolenji, povezanimi z vnetjem (27), pri tuberkulozi (30), Huntingtonovi bolezni (31) ter pri ljudeh z večimi hkratnimi poškodbami (32). Povečano izražanje so opazili tudi v možganih bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo (33).

Znano je, da so nekateri cisteinski katepsini (katepsina B, L) udeleženi pri razvoju in napredovanju raka, in lahko predstavljajo diagnostično oz. prognostično informacijo za rakave bolnike. Vloga katepsina X v malignih procesih še ni tako poznana, čeprav so bile narejene številne študije o udeleženiosti katepsina X pri raku. Zapis katepsina X se namreč nahaja na 20. kromosomu v regiji q13, za katero je značilno močno pomnoževanje pri številnih tipih raka. (34,35)

Povečano izražanje katepsina X je prisotno v imunskih in tumorskih celicah raka želodca (36), raka prostate (37), jeter in pri agresivnih oblikah človeškega malignega melanoma

(38).

Narejene so bile pilotne študije na bolnikih s kolorektalnim rakom (CRC). S testom ELISA so določali celokupne vrednosti katepsina X in ugotovili, da nivoji serumskega katepsina X niso pokazali značilnih razlik med bolniki s CRC in kontrolno skupino. Naredili so tudi analizo preživetja in dokazali povezavo med celokupno serumsko koncentracijo katepsina X in preživetjem bolnikov s CRC. Statistika Log RANK je pokazala, da imajo bolniki z višjim nivojem serumskega katepsina X, krajšo preživetveno dobo kot bolniki z nižjim celokupnim nivojem katepsina X ($p=0,028$). Ugotovili so še, da je prooblika bolj značilna za maligni proces, zato samo celokupna serumsko koncentracija odraža status tumorja. Odprto pa ostaja vprašanje ali k povečanem nivoju zunajceličnega katepsina X prispevajo tumorske celice ali aktivirane imunske celice. (39)

1.3 Inhibitorji

Zaradi že omenjene vloge peptidaz v bioloških procesih predstavljajo inhibitorji pomemben člen pri regulaciji njihove proteolitične aktivnosti. Peptidaze in njihovi inhibitorji so prisotni v vseh živih organizmih (40). Ker so lahko peptidaze tudi potencialno škodljive oz. ker sodelujejo tudi v določenih patoloških stanjih, je kontrola njihove aktivnosti s strani specifičnih inhibitorjev zelo pomembna. Pri višjih organizmih nekontrolirana peptidazna aktivnost vodi v številna bolezenska stanja. (8,9,10)

Podatkovna baza MEROPS peptidazne inhibitorje razvrsti v 77 družin glede na homologijo v aminokislinskem zaporedju in nato še v 39 klanov glede na njihovo terciarno strukturo. Inhibitorji so različnega izvora. Prisotni so v glivah, mikroorganizmih, rastlinskih in živalskih tkivih. Podatkovna baza MEROPS vključuje tudi listo inhibitorjev z majhno molekularno maso. Večina teh inhibitorjev je bila sintetizirana v laboratoriju, tisti inhibitorji, ki pa so prisotni v naravi, so bili izolirani iz gliv in bakterij. (40)

Glede na mehanizem delovanja inhibitorje razdelimo v tri skupine:

- Kanonični inhibitorji (standardni mehanizem),
- ne-kanonični inhibitorji,

- serpini.

Mehanizem delovanja prve skupine inhibitorjev je podoben delovanju substrata. Kanonični inhibitorji se vežejo na encim preko izpostavljene konveksne vezavne zanke, ki je komplementarna aktivnemu mestu encima.

Ne-kanonični inhibitorji interagirajo z aktivnim mestom preko N-terminalnega segmenta. Pomembne so tudi sekundarne interakcije zunaj aktivnega mesta, ki dodatno prispevajo k moči in hitrosti vezave ter k specifični prepoznavi inhibitorja.

Serpini so podobni kanoničnim inhibitorjem, ker interagirajo s tarčnimi proteazami kot substrati, vendar pa se od njih razlikujejo po tem, da pri cepitvi ene peptidne vezi v vezavni zanki inhibitorja pride do dramatične spremembe njihove strukture. (40,41,42)

S preučevanjem delovanja specifičnih inhibitorjev lahko spoznamo mehanizem delovanja encimov in vlogo posameznih aminokislin pri tem.

Cilj iskanja novih inhibitorjev je najti visoko selektivne inhibitorje proti peptidazam v določenih stopnjah bolezni, brez da bi s tem prizadeli netarčne proteine (11).

1.3.1 Inhibitorji iz gob

Višje glive predstavljajo bogat vir encimov in sekundarnih metabolitov, zaradi edinstvene metabolične aktivnosti pa so zanimive tudi iz biotehnološkega in medicinskega vidika. Pri gobah so opazili nepričakovano raznolikost in številnost peptidaz s posebnimi lastnostmi. Pomemben mehanizem uravnavanja njihove proteolitične aktivnosti je interakcija s specifičnimi peptidaznimi inhibitorji. Nekatere glivne peptidaze so pokazale inhibicijo le z endogenimi glivnimi inhibitorji. (11)

Tovrstne peptidaze in peptidazni inhibitorji tako predstavljajo pomembne tarče in orodja pri iskanju novih učinkovin za potencialno uporabo v medicini, farmaciji in kmetijstvu (11).

Inhibitorji peptidaz z značilnim β -triperesnim zvitjem

Inhibitorji peptidaz, ki imajo β -triperesno zvitje, so rastlinskega (prve odkril Kunitz) in glivnega izvora (43-47). Glede na podobnost v strukturi jih podatkovna baza MEROPS razvršča v klan IC. Glede na podobnosti v zaporedju so ti peptidazni inhibitorji dalje

razvrščeni v štiri družine: I3 (rastlinskega izvora), I48, I66 in I85 (glivnega izvora) (48). Strukturna analiza je pokazala lastnosti tipičnega β -triperesnega zvitja: deblo v obliki beta sodčka in krona iz šestih β niti (49).

Inhibitorji z β -triperesnim zvitjem inhibirajo različne katalitične razrede peptidaz. Razlog za tako raznoliko inhibicijo je v plastičnosti zank, ki prihajajo iz stabilne β zvite osnove. Posledično imajo tudi različne mehanizme inhibicije. (44-46)

Nekateri inhibitorji in druge molekule s tako strukturo (makrocipini, klitocipini, številni lektini) so odporni na visoke T, ekstremne vrednosti pH in na proteolizo (50-53).

Raziskave so pokazale, da se lahko peptidazni inhibitorji iz gob uporabljajo kot biološki insekticidi pri zaščiti poljščin (54). Vse več se vključujejo tudi v raziskave na področju rakavih obolenj ter imunskega odziva. Zaradi njihovih posebnih lastnosti, specifičnosti in selektivnosti predstavljajo orodje za razumevanje vključenosti posameznih peptidaz v različnih stopnjah tumorjev.

a) KLITOCIPIN (Clt):

Klitocipin je novejši in tudi prvi cisteinski peptidazni inhibitor, izoliran iz trosnjaka gobe *Clitocybe nebularis* (poprhnjene livke), ki spada v razred *Basidiomycetes* (bazidiomicete, prostotrosnice). Clt je 16,8 kDa velik protein, brez metioninskih in cisteinskih aminokislinskih ostankov (43). Ne tvori dimerov (51). Infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo (FTIR) je pokazala, da ima struktura klitocipina veliko vsebnost β struktur (50). Zaradi lastnosti in profila inhibicije, ga je MEROPS uvrstila v novo družino cisteinskih peptidaznih inhibitorjev, družino I48 (56). Znano je, da klitocipin inhibira papain, katepsine L, K, S in V, legumain in bromelain, ni pa aktiven proti katepsinu H, tripsinu in pepsinu. Zelo šibka je inhibicija katepsina B, ki ima izraženo endo- in eksopeptidazno aktivnost ($K_i > 1\mu\text{M}$) (43, 44, 45, 55). Klitocipin kodira majhna družina genov, posledična heterogenost v zaporedju pa ne vpliva na njegovo inhibitorno aktivnost (50, 55).

b) MAKROCIPINI (Mcp):

Makrocipin, izoliran iz gobe *Macrolepiota procera* (orjaški dežnik), je prav tako novejši

cisteinski proteazni inhibitor, za katerega je bila ustanovljena nova družina po klasifikaciji MEROPS, družina I85. Zaradi biokemijskih in genetskih podobnosti so nato klitocipin in makrocipin uvrstili v mikocipinsko družino glivnih cisteinskih proteaznih inhibitorjev.

Makrocipine kodira družina genov, ki je razdeljena v pet skupin. Znotraj vsake skupine velja 90% podobnost v zaporedju in od 75 do 86% podobnost v zaporedju med posameznimi skupinami. Zaradi visoke raznolikosti v genskem zaporedju v naravi obstaja 5 izooblik Mcp [Mcp1 (MM:19,2 kDa, pI=4,8), Mcp3 (MM: 18,9 kDa, pI=4,8), Mcp4 (MM: 18,6 kDa, pI=5,1)]. Ta raznolikost v zaporedju vpliva na inhibitorno aktivnost makrocipinov. Inhibicijski profili makrocipinov in klitocipina so podobni za številne cisteinske peptidaze, niso pa enaki. Razlike so vidne tudi med izooblikami Mcp. (45)

Mcp je močan inhibitor papaina ter katepsinov K, L, S in V (K_i v nM območju) (45). Razlika med Mcp in Clt je vidna tudi v inhibicijskem profilu katepsinov B in H. Mcp je šibek inhibitor obeh, medtem ko pri Clt ni vidne inhibicije (44).

Po pripravi rekombinantnih Mcp-jev, so ugotovili, da rMcp1 in rMcp3 dobro inhibirata legumain in druge papainu podobne cisteinske proteaze (K_i v nanomolarnem območju), medtem ko rMcp4 zelo slabo inhibira legumain ($K_i > 1\mu\text{M}$), ostale papainu podobne cisteinske proteaze (CP) pa dobro (K_i v nanomolarnem območju). To verjetno kaže na različna vezavna mesta za inhibicijo dveh družin cisteinskih proteaz: C1-papainu podobne cisteinske proteaze in C13, legumain. (45)

Študije so pokazale, da Mcp in Clt (43) ne inhibirata aspartaz (pepsin). Zanimivo pa je, da naj bi rMcp4 inhibiral serinsko proteazo tripsin.

Makrocipini imajo tendenco tudi po tvorbi dimerov v nereducirajočih pogojih preko enega cisteina v vsaki molekuli.

Kljub temu, da spadata Mcp in Clt v isto družino, pa je njuna celostna, splošna podobnost v zaporedju nizka (od 17 do 21 %). Kljub tej nizki podobnosti imata oba veliko vsebnost prolina in tirozina ter nizko vsebnost levcina. Mcp vsebuje tudi žveplo-vsebujoče aminokisliline, ki jih pa pri Clt ne najdemo. (45)

Ugotovili so, da se klitocipin in makrocipini ujemajo predvsem v aminokislinskih ostankih na N-terminalnem delu zaporedja. Ta del naj bi bil pomemben za inhibitorno aktivnost in

strukturo. Od teh aminokislinskih ostankov pa je največ prolinskih ostankov.

Mcp in Clt imata podobne tudi biokemijske lastnosti. Oba sta stabilna pri visokih temperaturah (razen Mcp4, ki pri T nad 65 °C izgubi del aktivnosti, ter pri 100 °C postane neaktiven) in ekstremnih pH, imata podobno izoelektrično točko pI (4,8), ter se tudi po molekularni masi dosti ne razlikujeta (19 kDa za Mcp in 16,8 kDa za Clt (43)). UV spekter obeh inhibitorjev je pokazal tudi visoko vsebnost aminokisliline triptofana, kar kaže tudi na strukturno podobnost med Mcp in Clt. (45, 50)

c) KNISPIN (Cnp):

Iz gobe *Clitocybe nebularis* so izolirali tudi serinske proteazne inhibitorje in jih poimenovali CnSPI (*C.nebularis* serine protease inhibitors) (57). Po SDS-PAGE analizi z afinitetno kromatografijo prečiščenih proteinskih ekstraktov iz *C. nebularis* so ugotovili, da vsi CnSPI kažejo v N-terminalnem delu zaporedja podobnost s serinskim proteaznim inhibitorjem iz gobe *Lentinus edodes* (LeSPI) (58). CnSPI1, ki je kazal največjo podobnost v zaporedju z LeSPI, so poimenovali knispin (Cnp) in določili njegovo zaporedje cDNA (58). Oba spadata v družino I66 po klasifikaciji MEROPS. (57)

Molekularna masa knispina, določena z ESI- MS, je 16,5 kDa. Izoelektrična točka naj bi bila 5,2. Nativni CnSPI so stabilni v širokem pH območju, saj ohranijo inhibitorno aktivnost pri pH 2 in pri pH 11. Svojo inhibitorno aktivnost pa izgubijo po 10 minutnem segrevanju na 100 °C (pri 40 °C imajo še popolno inhibitorno aktivnost, z večanjem temperature pa jo popolnoma izgubijo).

Knispin je močan in visoko specifičen inhibitor tripsina (družina S1) s K_i v nanomolarnem območju. Znano je tudi, da slabše inhibira kimotripsin in zelo slabo subtilisin (S8) in kalikrein. Ne inhibira elastaz (S1), trombina, papaina in pepsina. Avanzo in sod., menijo, da naj bi CnSPI imeli regulatorno vlogo v endogenem proteolitičnem sistemu pri gobi *C. nebularis*. (57)

d) KOSPIN (PIC1):

Kospin, izoliran iz gobe *Coprinopsis cinerea* (gnojiščna tintnica), iz družine prostotrošnic, je inhibitor serinskih proteaz (46). Po klasifikaciji MEROPS spada v družino I66 skupaj s

knispinom (57) in LeSPI (58). Ima podobne biokemijske lastnosti in tudi podobnosti v zaporedju s preostalimi predstavniki družine I66. Knispin (57), kospin in LeSPI (58) so vsi majhni proteini (kospin, 16,7kDa) z izoelektričnimi točkami v kislem (pI za kospin=4,9) in s podobnimi inhibitorskimi profili. Inhibitorsko aktivnost obdržijo tudi pri ekstremnih vrednostih pH. Kospin je inhibitor tripsina s K_i v pikomolarnem območju, inhibira tudi kimotripsin (družina S1) s K_i v μM območju, kaže pa šibko inhibicijo do kalikreina, elastaze (S1) in subtilisina (S8). (46)

Kospin naj bi bil klasičen kanonični inhibitor, ki se veže v aktivno mesto in tvori trden in stabilen kompleks s tripsinom. 3D struktura je pokazala, da gre tudi tu za protein s prevladujočimi beta strukturami (46). Torej lahko družino I66 po MEROPS uvrstimo v klan IC skupaj s Kunitzovim tipom serinskih proteaznih inhibitorjev (družina I3) in z mikocipini (družini I48 in I85) (40,47).

e) INHIBITORJA 1 C in 2 N:

Inhibitorja 1 C in 2 N so našli v genomu gobe *Coprinopsis cinerea*. Oznaki C in N pomenita, da imata inhibitorja na C oz. na N koncu zaporedja aminokislinski motiv, sestavljen iz večih histidinskih ostankov (histidinski označevalec). Oba proteina imata značilno beta triperesno zvitje. Molska masa prvega je 16,23 kDa, molska masa drugega pa 14,04 kDa. Izelektrična točka proteina 1C je 4,78 (pI) in 5,04 (pI) pri 2N. Za inhibitor 1C je znano tudi to, da tvori oligomere cys-cys če ni prisotnega reducenta.

1.4 Izražanje rekombinantnega proteina katepsina X v kvasovki Pichia pastoris

Danes se v terapevtske, industrijske in raziskovalne namene vse več uporabljajo rekombinantni proteini, zato se je povečala tudi potreba po učinkovitih ekspresijskih sistemih. Vsak protein potrebuje primeren ekspresijski sistem za optimalno izražanje. Ponavadi obstaja povezava med kompleksnostjo proteina in sistemom za izražanje. (59) Za naš rekombinantni protein prokatepsin X smo za izražanje izbrali metilotrofno kvasovko *Pichia pastoris*. Ta kvasovka združuje prednosti višjih evkariontskih ekspresijskih sistemov kot tudi prednosti po Gramu negativnih bakterij kot sistemov za

izražanje. Možne so posttranslacijske modifikacije (glikozilacija, tvorba disulfidnih vezi, proteolitično procesiranje) ter pravo zvitje proteina (prednosti evkariontskega sistema), ima večjo preferenco za respiratorni metabolizem kot za fermentativno rast, po drugi strani pa je ta kvasovka privlačna tudi zaradi hitre in enostavne rasti, raste v veliki gostoti in na cenovno ugodnih gojiščih ter omogoča visok nivo izražanja. *Pichia* je kot ekspresijski sistem zelo uporabna, saj omogoča enostavno gensko manipulacijo z 10-100 krat večjim nivojem izražanja heteroloških proteinov v primerjavi s kvasovko *Sacharomyces cerevisiae*. (59,60)

P. pastoris je metilotrofna kvasovka, sposobna rasti na metanolu kot edinem viru ogljika in energije. V nekaj stopnjah metanol metabolizira do ogljika. Encimi, potrebni za metanolni metabolizem, so med rastjo kvasovke na metanolu prisotni v velikih količinah, med rastjo kvasovke na drugih virih ogljika pa njihova koncentracija močno upade. Še posebej to velja za encim alkoholna oksidaza, AOX1. Promotor gena AOX1, ki regulira produkcijo tega encima, se uporablja pri ekspresiji želenega gena, ki kodira naš heterološki protein v *P. pastoris*. V gojišču je za indukcijo visokega nivoja prepisovanja AOX1 oz. gena, ki kodira naš protein, potreben metanol.

Ekspresija gena AOX1 je kontrolirana na nivoju prepisovanja. Rast kvasovke na glukozi lahko zavre prepisovanje kljub prisotnosti induktorja. Zato se priporoča rast na glicerolu ob hkratni prisotnosti metanola. (60)

Plazmidi za izražanje v kvasovkah so večinoma prenosni vektorji. Ekspresijska kasetna je sestavljena iz promotorskega in terminalnega zaporedja gena AOX1. Vmes je poliklonsko mesto za vstavev zapisa za tarčni protein. Na tržišču je veliko vektorjev z različnimi lastnostmi. V diplomski nalogi smo uporabili vektor pPIC9, ki lahko vodi nastali produkt v gojišče. Slednje dosežemo s fuzijo signalnega zaporedja, imenovanega faktor α , z zaporedjem tarčnega proteina. *Pichia* tudi ne izloča svojih, nativnih proteinov v gojišče oz. je izločanje zelo majhno, kar olajša izolacijo nastalega proteina iz gojišča. Za selekcijske označevalce se uporabljajo geni za histidiol-dehidrogenazo (HIS4), argininosukcinat-laktazo (ARG4) in drugi. Ti encimi, kodirani na plazmidu torej omogočajo rast mutiranim gostiteljskim sevom. (60)

2.HIPOTEZA IN NAMEN DELA

Zaradi pomembne vloge peptidaz v bioloških procesih predstavljajo inhibitorji pomemben člen pri regulaciji njihove proteolitične aktivnosti.

Naša hipoteza je, da je kvasovka *Pichia pastoris* ustrezen ekspresijski sistem za hitro pripravo katepsina X in da so inhibitorji s strukturo β triperesnega zvitja učinkoviti inhibitorji karboksipeptidazne aktivnosti katepsina X.

Namen diplomskega dela je priprava katepsina X v kvasovki *Pichia pastoris* in testiranje inhibitorjev, ki imajo strukturo tipičnega β triperesnega zvitja ter določitev inhibitornih konstant, K_i .

3.MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali in aparature

Tabela I: Rekombinantni katepsin X, protitelesa proti rekombinantnemu (pro)katepsinu X, rekombinantni katepsin L, protitelesa proti rekombinantnemu katepsinu L.

IME:	konc. [mg/ml]
katepsin X:	
katepsin X, FFA, 2010	0,94
katepsin X, izoliran iz gojišča kvasovke <i>Pichia pastoris</i>	0,63
protitelesa proti katepsinu X in prokatepsinu X:	
3B10 mišja monoklonska protitelesa proti prokatepsinu X in katepsinu X, IJS, 2007	0,95
katepsin L:	
katepsin L, IJS	0,28
protitelesa proti katepsinu L:	
ovčja poliklonska protitelesa proti katepsinu L, Kos J et al., 1995	0,73

Zgona A: Vpliv zaviralcev klitocipina in makrocipina na aktivnost katepsina X, izraženega v kvasovki *Pichia pastoris*. Diplomsko delo.

Tabela II: Standard, ki smo ga uporabili pri eksperimentalnem delu diplome.

standard:	proizvajalec
SeeBlue Plus2 Prestrained, označevalec velikosti proteinov	Invitrogen

Reagenti in topila

Tabela III: Reagenti in topila, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu diplome ter njihovi proizvajalci.

reagenti, topila:	proizvajalec:
Agar (LB)	Sigma
Albumin (BSA)	Sigma
40% akrilamid/ bis-akrilamid	Sigma Aldrich
amonijev persulfat	Sigma, FFA
biotin	Sigma
CM Sephadex C-25	GE Healthcare
D-glukoza	Sigma
DTT	Fluka
EDTA	Sigma
Etanol, 70%, 96%	Riedel deHaen
glicin za elektroforezo	Sigma
glicerol, brezvodni	Fluka
HCl, 37%	Carlo Erba reagents
izopropanol	FFA
kvasni ekstrakt	Fluka
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	J.T.Baker
K ₂ HPO ₄	J.T.Baker
L-cistein	Sigma Aldrich
metanol	Panreac
mleko v prahu	Pomurske lekarnice
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Carlo Erba reagents
natrijev acetat, brezvodni	Merck
NaCl	Carlo Erba reagents
natrijev citrat dihidrat	Riedel deHaen
NaOH	Carlo Erba reagents
ocetna kislina	Merck
pepton	BD(Becton Dickinson and co.
protein A sefaroza	GE Healthcare
SP Sephadex C-25	GE Healthcare
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific
TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamin)	Sigma
Tris HCl	Riedel deHaen
Tween 20	Sigma

Laboratorijska oprema in aparature

Tabela IV: Laboratorijska oprema in aparature, ki smo jih uporabili pri eksperimentalnem delu diplome ter njihov proizvajalec in tip posamezne opreme/aparature.

analizna tehnica	Tehnica EXACTA 610 EB
aparatura za SDS-PAGE	BIO RAD Mini Protean 3 Cell
aparatura za prenos Western	BIO RAD Laboratories Inc.
avtoklav	Systec 2540 EL; Kambič laboratorijska oprema
avtomatske pipete	Biohit
avtomatska večkanalna pipeta	Biohit
centrifuga	Sorvall 5415 R RC 5C Plus
centrifugirka 0,5l	NALGENE
čitalec mikrotitrskih ploščic, spektrofotometer;	TECAN Sapphire 2, Columbus Plus
dializno črevo	SERVA, Visking dialysis tubing 26/32, 12000-14000 Da
G-box	Syngene
hladilnik (+4°C)	Gorenje; LTH
inkubator	UNIHOOD 650 UNIEQUIP
komora z laminarnim pretokom zraka	Iskra PIO LFVP12
konično mešalo (vorteks)	Tehnica, Vibromix 104 EV
magnetno mešalo	Tehnica, Rotamix 550 MM
membrana (nitrocelulozna) za prenos Western	GE Healthcare Amersham Hybond ECL
membranski filter za ultrafiltracijo	Amicon YM10 (76mm) in YM10 (63,5mm)
namizna centrifuga	Eppendorf
pH meter	HANNA HI9321 microprocessor pH meter
polavtomatske pipete	Eppendorf (0,2-2,5ul, 0,5-10ul, 2-20ul, 10-100ul, 20-200ul, 100-1000ul)
sušilec	wtb BINDER
spektrofotometer	PerkinElmer Lambda Bio+; NanoDrop, ND 1000
stresalnik	Tehnica, Vibromix 314 EVT
ultrafiltracijska posoda	Amicon 8200 in 8400
zmrzovalnik	Gorenje; Vip series, SANYO

3.2 Metode

3.2.1 ORGANIZEM

Ekspresijski sev: kvasovka *Pichia pastoris*, sev GS115, klon S41: vsebuje plazmid pPIC9 z vstavljenjo cDNA človeškega prokatepsina X (61).

3.2.2 PRIPRAVA GOJIŠČ ZA KVASOVKO *Pichia pastoris*

Optimalni pogoji ekspresije zavisijo od lastnosti izraženega proteina. Ekspresija rekombinantnega proteina zahteva pripravo različnih gojišč. (62)

BMGY/BMMY:
1% kvasnega ekstrakta
2% peptona
100 mM kalijevega fosfata s pH 6,0
1,34 % YNB
4*10 ⁻⁵ biotin
1% glicerol ali 0,5% metanol

Kvasni ekstrakt in pepton smo raztopili v 700 ml vode, avtoklavirali, ohladili in dodali ostale sestavine. V primeru BMMY smo dodali 10X metanol, v primeru BMGY pa 10X glicerol.

Gojišče smo shranili pri 4 °C.

YPD:
1% kvasnega ekstrakta
2% peptona
2% dekstroze

Kvasni ekstrakt in pepton smo raztopili v 180 ml vode, avtoklavirali, ohladili in dodali 20 ml 10X dekstroze. Tekoče gojišče smo shranili pri sobni temperaturi. V primeru trdnega gojišča YPD (plošče YPD) smo dodali še 2% agar (2 g). Plošče smo shranili pri 4 °C.

10X dekstroza (20% dekstroza):

20g D- glukoze smo raztopili v 100 ml vode in avtoklavirali.

10X metanol (5% metanol):

Zmešali smo 11 ml MeOH z 209 ml vode, sterilno filtrirali ter shranili pri 4 °C.

10X glicerol (10% glicerol):

22ml glicerola smo zmešali z 198 ml vode, sterilno filtrirali in shranili pri sobni temperaturi.

500X biotin (0,02% biotin):

5,5 mg biotina smo raztopili v 27,5 ml vode, sterilno filtrirali in shranili pri 4 °C.

10X YNB (13,4% Yeast Nitrogen Base with Ammonium sulfate without amino acids):

46,9 g YNB smo raztopili v 350 ml vode, sterilno filtrirali in shranili pri 4 °C.

1M fosfatni pufer, pH 6,0:

Zmešali smo 100 ml 1M K₂HPO₄ in 650 ml 1M KH₂PO₄, raztopino avtoklavirali in shranili pri sobni T.

3.2.3 PRIPRAVA TRAJNE KULTURE

Na gojišču YPD smo čez noč pri 30 °C kultivirali kolonijo klona S41. Rast je potekala v inkubatorju in na stresalniku pri 250 rpm. Sledilo je centrifugiranje celic (3000 x g, 5 min, sobna T) in resuspendiranje le teh v gojišču YPD s 15% glicerolom do OD 600 med 50 in 100. Kulturo smo nato zamrznili v tekočem dušiku in shranili pri -80 °C.

3.2.4 IZRAŽANJE PROKATEPSINA X V *P. PASTORIS*

Ekspresija prokatepsina X je potekala pri 30 °C ob stalnem stresanju (250 rpm).

S kolonijo klona S41 smo inokulirali 20 ml gojišča BMGY. 8 ml te kulture smo nacepili v 500 ml gojišča BMGY in inkubirali pri enakih pogojih. Ko je optična gostota pri 600 nm (OD600) dosegla vrednost med 2-6 (OD 600= 2,7), je sledilo 5 minutno centrifugiranje celic pri 3000x g in sobni temperaturi. S tem smo ločili celice od gojišča. Supernatant smo odlili in celice resuspendirali v gojišču BMMY (1,2 l), v katerem je potekla indukcija izražanja prokatepsina X. Samo izražanje je potekalo 72 ur, vsakih 24h pa smo v gojišče dodali 100% metanol do 0,5% končne koncentracije. Po končani ekspresiji je ponovno sledilo centrifugiranje (5 min, 3000 x g, sobna T). Supernatant oz. gojišče z izraženim proteinom smo skoncentrirali, celice pa zavrgli (63).

3.2.5 ULTRAFILTRACIJA

Za koncentriranje gojišča smo uporabili metodo ultrafiltracije. Ultrafiltracija je vrsta membranske filtracije, pri kateri sila hidrostatskega tlaka potiska tekočino in nizkomolekularne snovi skozi membrano, topljence z večjo molekulsko maso pa zadržijo na membrani (64). Uporabili smo membrano Amicon, YM10 (premer 76mm), z mejno vrednostjo 10 000, kar pomeni, da globularni proteini, z molekulskimi masami večjimi od 10 000 Da ne gredo skozi pore. Na ta način smo skoncentrirali in delno očistili naš protein prokatepsin X z molekulsko maso 36 000 Da. Ultrafiltracija je potekala v ultrafiltratorju Amicon 8400 pri nadtlaku dušika (3 bar) in pri stalnem mešanju s hitrostjo 50 rpm na mešalniku ter v hladilniku pri 4 °C.

Po koncentriranju gojišča, v katerem je bil tudi naš protein, smo koncentrat zamrznili pri -80 °C. Ko smo koncentrat potrebovali za nadaljno čiščenje našega proteina, smo ga počasi odtajali na ledu.

3.2.6 DIALIZA

Dializa je biokemijski proces ločevanja majhnih delcev od makromolekul (v naše primeru proteinov) na osnovi selektivne in pasivne difuzije preko semipermeabilne membrane. Pri dializi uporabimo celulozno membrano v obliki črevesa. Gonilna sila za prehod molekul skozi pore je koncentracijska razlika topljenca na obeh straneh membrane (65).

Dializno črevo ustreznih razsežnosti in s primernimi porami (velikost por 12000-14000 Da) smo za 30 min namočili v dializni pufer (50 mM Na-acetat s pH 5,0). Nato smo ga napolnili s koncentratom, ga speli na obeh straneh ter potopili v večji volumen dializnega pufera (4,8l). Izvedli smo tri zaporedne dialize, vsakič v svežem pufru, od katerih sta dve trajali tri ure, ena pa je potekala preko noči.

3.2.7 ČIŠČENJE PROKATEPSINA X Z IONSKO-IZMENJEVALNO KROMATOGRAFIJO IN PONOVA ULTRAFILTRACIJA

Po dializi smo imeli prokatepsin X v pufru (50mM Na acetatu s pH 5,0), primernem za ionsko-izmenjevalno kromatografijo.

Uporabili smo šibek kationski izmenjevalec CM Sephadex C-25. Matriks predstavlja premrežen dekstran z vezano karboksimetilno skupino (CM) (66).

Kolono smo uravnotežili z istim pufrom, kot je v našem vzorcu, to je s 50mM Na- acetat s pH 5,0. Sledil je dvakratni nanos vzorca in spiranje kolone z Na- acetatnim pufrom, vse dokler ni absorbanca pri 280nm (A280) padla pod vrednost 0,3.

Naš protein oz. prokatepsin X je ostal vezan na koloni. Elucija prokatepsina X je potekala z 0,6M NaCl v Na- acetatnem pufru. Zbirali smo frakcije po približno 10ml. Zbrali smo 12 frakcij in potem vsaki izmerili absorbanco pri 280nm ter s tem določili vsebnost proteinov v vsaki frakciji. Frakcije, kjer je bila A280 največja oz. kjer je bila prisotnost proteinov največja, smo združili in jih trikrat dializirali v Na- citratnem pufru s pH 5,5 (50mM Na-citrat z 0,2M NaCl, 1mM EDTA in 2mM DTT). Sledilo je koncentriranje vzorca z ultrafiltracijo (N2, Pmax 75 psi; 5,3 kg/ cm²) z uporabo ultrafiltra YM10 s premerom 63,5 mm. Postopek je enak prejšnji ultrafiltraciji.

3.2.8 AKTIVACIJA PROKATEPSINA X S KATEPSINOM L IN ODSTRANITEV KATEPSINA L Z IMUNOPRECIPITACIJO

Katepsin X smo izrazili v obliki neaktivnega proencima, zato ga je bilo potrebno aktivirati. Za aktivacijo smo uporabili rekombinantni katepsin L (25nM), saj je znano, da se prokatepsin X ne aktivira sam. Inkubacija je potekala 3 ure pri 22-23 °C. Po aktivaciji smo pufri z 10M NaOH zvišali pH na vrednost med 7,5 in 8. Zvišanje pH je pomembno za vezavo protiteles na katepsin L. Dodali smo poliklonska ovčja protitelesa proti katepsinu L s koncentracijo 0,73 mg/ml (razmerje protiteles : katepsin L= 3:1) in inkubirali pri sobni temperaturi dve uri ob stalnem stresanju (61).

Nato smo pripravili sefarozo A, to je agarozo z vezanim proteinom A, ki veže kompleks katepsina L in njegovega protitelesa. 400µL sefaroze A v začetnem pufri smo 1 min centrifugirali pri 10000 x g in nato odstranili supernatant. Sefarozo A smo nadalje sprali dvakrat s 500 µl citratnega pufra s pH 7,75 in z dodanim 0,2 mM NaCl, 1 mM EDTA in 2 mM DTT, jo resuspendirali v 50 µL pufra in odpipetirali 125 µL vsebine v novo epico. Ponovno je sledilo dvakratno spiranje sefaroze A s 50 µL pufra. Nato smo supernatant odlili, vsebino resuspendirali v 50 µL pufra in 50 µL le tega dodali k zmesi katepsina X in katepsina L z vezanimi protitelesi. Inkubacija suspenzije je potekala čez noč pri 4°C ob stalnem stresanju. Naslednji dan je sledilo 5 min centrifugiranje vzorca pri 10000x g. Supernatant smo potem razdelili na alikvote in jih zmrznili na -80 °C.

3.2.9 DOLOČITEV KONCENTRACIJE KATEPSINA X

a) Spektrofotometrična določitev:

Koncentracijo prokatepsina X in aktivnega katepsina X smo določili spektrofotometrično, z meritvijo absorbance pri 280 nm (A_{280}) in z uporabo specifičnega ekstinkcijskega koeficienta za prokatepsin X oz. aktiven katepsin X, $E_{1\%,1\text{cm}} = 27,4 / [M \cdot \text{cm}]$.

Uporabili smo spektrofotometer NanoDrop ND 1000.

b) Metoda DC (BioRad: set kemikalij »DC Protein Assay«):

Koncentracijo proteina smo določili tudi s kolorimetrično metodo, ki temelji na reakciji proteinov z alkalno raztopino bakrovega tartrata in s Folinovim reagentom. Različni proteini izvajajo večjo ali manjšo tvorbo barve. (67)

REAGENT A: bazična raztopina bakrovega tartrata

REAGENT B: razredčen Follinov reagent

REAGENT S; ni podatka

Kot standard smo pripravili raztopino albumina (BSA) v vodi s koncentracijo 10 mg/ml. V citratnem pufru smo pripravili naslednje redčitve:

c st (mg/ml)	V pufru (µl)	V BSA, c=10mg/ml
0,2	24,5	0,5
0,5	23,8	1,3
0,8	23,0	2,0
1,0	22,5	2,5
1,5	21,3	3,8

Na mikrotitrsko ploščico smo odpipetirali standarde in vzorec v duplikatih.

Raztopino A` smo pripravili z mešanjem reagentov A in S. Na 500 µl reagenta A smo dodali 10 µl reagenta S. Na mikrotitrsko ploščico smo najprej odpipetirali po 5 µl vzorca oz. standarda, nato smo dodali raztopino A` (po 25 µl) in potem B (200 µl). Sledila je inkubacija (15 min) in merjenje absorbance na spektrofotometru Tecan pri 750 nm.

3.2.10 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NARIJEVEGA DODECIL SULFATA (SDS-PAGE)

Za detekcijo katepsina X smo uporabili poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti

Na-dodecil sulfata. SDS je anionska površinsko aktivna snov, ki se nespecifično veže na proteine, jih negativno nabije in pri tem denaturira. Zaradi identičnega razmerja med nabojem kompleksa SDS/protein in dolžino polipeptidne verige poteka ločitev molekul na osnovi njihove velikosti oz. relativne molekulske mase. (68) Za izvedbo elektroforeze smo uporabili BIO RAD Mini Protean 3, ki smo jo sestavili po navodilih proizvajalca.

Elektroforezni gel je sestavljen iz zgornjega koncentracijskega in spodnjega ločevalnega gela. Oba gela smo vlili med dve stekleni plošči, med seboj ločeni z ustreznima stranskima vmesnikoma (0,75mm).

Sestava 12% ločevalnega gela:

40% amid/bis-akrilamid	1,2 ml
1,5M Tris- HCl (pH 8,8)	1,0 ml
destilirana voda	1,7 ml
10% SDS	50 μ L
10% amonijev persulfat	50 μ L
TEMED	1,7 μ L

Sestava 5% koncentracijskega gela:

40% amid/bis-akrilamid	188 μ L
1,5M Tris- HCl (pH 6,8)	195 μ L
destilirana voda	1 mL
10% SDS	15 μ L
10% amonijev persulfat	15 μ L
TEMED	1,5 μ L

Ločevalni gel ustrezne zamreženosti smo pripravili po zgornji recepturi, ga dobro premešali ter hitro vlili v pripravljeno celico. Zamreženje gela smo sprožili šele z dodatkom amonijevega persulfata in TEMED-a.

Monomeri akrilamida polimerizirajo v dolge verige, ki jih prečno povezuje N,N'-metilenbisakrilamid. Reakcijo polimerizacije sprožijo sulfatni radikali, ki nastanejo iz persulfatnih ionov.

Nad vlti gel smo dodali še izopropanol za nemoteno polimerizacijo ob stiku z zrakom. Gel je polimeriziral dobre pol ure. Po odlitju izopropanola smo nad ločevalni gel vlili 5% koncentracijski gel, pripravljen podobno kot koncentracijski ter vstavili še glavniček primerne debeline in s primernim številom žepkov (10) za nanos vzorcev.

Med polimerizacijo gela smo pripravili vzorce za analizo.

V vsak žepk smo nanесли 18 μ l pripravljenjega vzorca.

Sestava vzorca: - 10 μ l vzorca iz izolacije/rekombinantnega proteina
- 5,3 μ l nanašalnega pufra
- 2,7 μ l 1M DTT

Pripravljene vzorce smo 8 min denaturirali v vodni kopeli pri 100 °C, jih centrifugirali in nanесли na gel.

Na gel smo vzporedno nanесли tudi označevalec velikosti (SeeBlue Plus2 Prestained, Invitrogen).

Sestava nanašalnega pufra:

0,5M Tris- HCl (pH 6,8)	2,5 ml
20% glicerol	2,0 ml
10% SDS (m/V)	4,0 ml
0,1% bromfenol modrega (m/V)	0,5 ml
destilirana voda	1,0 ml

SDS PAGE poteka vertikalno. Gel je s spodnjim in zgornjim delom v stiku z elektroforeznim pufrom.

Uporabili smo pufer za SDS-PAGE s sestavo:

10X elektroforezni pufer:	
250 mM TRIS baze	29,0 g
1,92 M glicin	144,0 g
1% SDS (m/V)	10,0 g
dH ₂ O	do 1L

Elektroforezo smo izvajali pri stalni napetosti 100 V, 1,5 do 2h.

3.2.11 DETEKCIJA PROTEINOV PRI POLIAKRILAMIDNI GELSKI ELEKTROFOREZI

2.2.11.1 Barvanje z barvilom Coomassie brilliant blue:

Metoda barvanja gela z barvilom Coomassie brilliant blue (CBB) se uporablja za detekcijo proteinov po ločitvi na poliakrilamidnem gelu. Barvilo CBB je aminotrifenilmetansko barvilo, ki v kislih pogojih tvori stabilen kompleks s pozitivno nabitimi aaminskimi skupinami (z bazičnimi aminokislinami- arginin, lizin, histidin). (69)

Po končani elektroforezi vzorcev smo gel prestavili v kadičko in ga potopili v metanolno-očetno raztopino barvila CBB. S tem smo fiksirali in pobarvali proteine.

Sestava raztopine z barvilom CBB:

očetna kislina 100%	5 ml
Coomassie Brilliant Blue	0,5 g
MeOH	200 ml
dH ₂ O	do 500 ml

Gel smo čez noč inkubirali v barvilu ob rahlem stresanju. Naslednji dan je sledilo razbarvanje gela v raztopini etanola in očetne kisline. Presežna, nevezana količina barvila

je pri tem difundirala iz gela.

Raztopina za razbarvanje:

EtOH, 95%	60 ml
očetna kislina, 100 %	20 ml
dH ₂ O	do 200 ml

Razbarvanje je potekalo uro in pol ob rahlem stresanju, dokler lise niso bile jasno vidne.

2.2.11.2. Prenos western:

Po elektroforezni ločbi smo proteine s pomočjo električnega toka prenesli na nitrocelulozno membrano. V takšni obliki so bili proteini primerni za prenos western.

Membrano ustrezne velikosti (8,3 cm * 5,3 cm) smo omočili v pufru za prenos in jo po navodilih proizvajalca vstavili v celico za prenos.

Sestava pufru za prenos western:

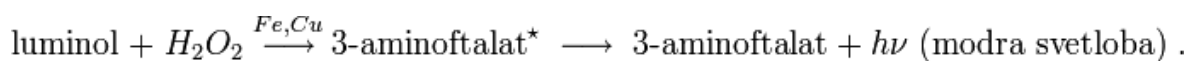
TRIS	2,93 g
Glicin	5,81 g
10% SDS (m/V)	3,75 ml
MeOH	200 ml
dH ₂ O	do 1L

Prenos je potekal 1,5-2h pri stalni napetosti 100 V.

Imunokemijsko analizo proteinov na membrani smo izvedli po sledečem postopku (SISTEM ECL (Enhanced Chemiluminescence) - detekcija kemiluminiscence na membrani):

- blokada nezasedenih mest na membrani (5% mleko v pufru PBS 1X pri sobni T in ob rahlem stresanju)

- spiranje membrane 3 X 5 min v 0,05% TWEEN v pufru PBS (PBST) pri sobni T in ob rahlem stresanju
- inkubacija membrane s primarnimi protitelesi v PBST, 1h, pri sobni T in ob rahlem stresanju
- spiranje membrane s pufrom PBST, 3X 10 min pri sobni T in ob rahlem stresanju
- inkubacija membrane s sekundarnimi protitelesi (konjugat s hrenovo peroksidazo-HRP) v PBST, 1h, pri sobni T in ob rahlem stresanju
- spiranje membrane v pufru PBS, 3 X 10 min, pri sobni T in ob rahlem stresanju
- ECL imunodetekcija- 5 minutna inkubacija membrane z luminolom v ustreznem pufru za peroksidazno reakcijo: hrenova peroksidaza v prisotnosti vodikovega peroksida oksidira kemiluminiscentni substrat luminol;



Slika 3: Test z luminolom, ki ima sposobnost oddajanja svetlobe; pri reakciji nastane vzbujen produkt, ki pri prehodu v osnovno stanje odda foton določene valovne dolžine (energijo v obliki svetlobe);

- detekcija sproščene svetlobe s sistemom za detekcijo fluorescence in kemiluminiscence, G-box

Sestava 5% mleka v 1X PBS:

Posneto mleko v prahu	2,5 g
1X PBS	do 50 ml

Sestava 10X PBS puфра:

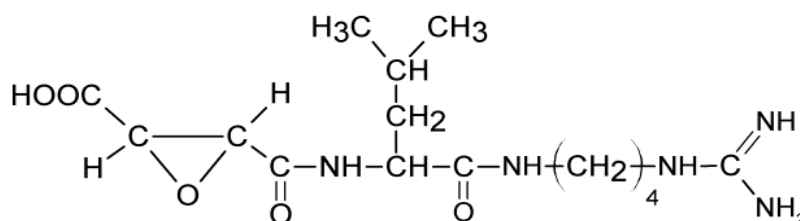
NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄	14,4 g
KH ₂ PO ₄	2,4 g

Sestavine smo raztopili v 800 ml destilirane vode, pH uravnali na 7,4 in dodali dH₂O do 1L. Za pripravo 1X PBS smo 100 ml 10X PBS redčili z dH₂O do 1l. V primeru 0,05%

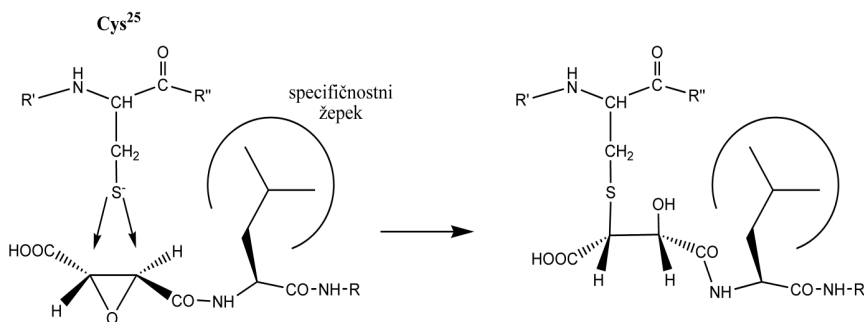
TWEEN v 1X PBS pa smo litrski raztopini dodali še 500 μ l Tween 20.

3.2.12 TITRACIJA KATEPSINA X Z INHIBITORJEM E-64

Inhibitor E-64 (trans-epoksisukcinil- L- levcilamido-(4-gvanidino) butan) je splošni inhibitor cisteinskih proteaz. S tiolno skupino cisteinskega ostanka v aktivnem mestu proteaz tvori tioetersko vez. Ker se pretežno veže le v aktivno mesto, je dober titrant cisteinskih proteaz. (70)



Slika 4: E-64, inhibitor cisteinskih proteaz



Slika 5: Tvorba tioeterske povezave med E-64 in Cys ostankom aktivnega mesta

Za titracijo aktivnega mesta smo uporabili črno mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbnicami. Pripravili smo izoliran katepsin X v aktivacijskem pufru do končne koncentracije 50nM. Kot začetno koncentracijo za redčitev smo upoštevali spektrofotometrično določeno koncentracijo.

Katepsin X smo najprej inkubirali 5min pri sobni T v aktivacijskem pufru, nato pa smo mu dodali inhibitor E64 v naraščajočih koncentracijah od 10 do 100 nM. Osnovna raztopina inhibitorja je bila pripravljena v DMSO, redčitve pa v osnovnem pufru. Po dvajsetminutni

inkubaciji encima in inhibitorja smo najprej v vse vdolbinice dodali po 5 μ l specifičnega substrata Abz-Phe-Glu-Lys (Dnp)-OH (petkrat redčenega z osnovnim pufrom) (16), nato pa smo z multikanalno pipeto odmerili v vsako še po 95 μ L zmesi encima in inhibitorja. Takoj smo začeli kontinuirano meriti sproščanje produkta oz. fluorescenco s spektrofluorimetrom (čitalec Tecan). Merjenje fluorescence je potekalo pri 420 nm in pri 37 °C.

S pridobljenimi podatki smo izrisali diagram odvisnosti začetne hitrosti (RFU/sec) od razmerja med molarno koncentracijo inhibitorja in molarno koncentracijo encima $[I]/[E]$. Z ekstrapolacijo premice smo določili sečišče z abscisno osjo ($[I]/[E]$). Kjer je reakcijska hitrost enaka 0 pri tem razmerju ($[I]=[E]$), je ves encim inhibiran z dodanim inhibitorjem. Koncentracija aktivnega mesta je torej enaka koncentraciji inhibitorja, katerega koncentracijo točno poznamo. Presečišče z abscisno osjo nam poda delež aktivnega encima.

PUFRI ZA MERJENJE ENCIMSKE KINETIKE KATEPSINA X

Osnovni pufer za testiranje inhibicije in za titracijo katepsina X:

Na-acetat s pH 5,5 100 mM
0,1 % PEG 8000

Aktivacijski pufer smo pripravili vsakič sproti.

Sestava aktivacijskega pufra:

cistein	30,29 mg
EDTA	27,9 mg
osnovni pufer za katepsin X	50 ml

3.2.13 TESTIRANJE INHIBITORJEV IZ GOB

Testirali smo 8 inhibitorjev, da bi ugotovili morebitno inhibicijo karboksipeptidazne aktivnosti katepsina X. Za vsak inhibitor smo testiranje opravili dvakrat v dveh ponovitvah. Ena ponovitev pomeni ena vdolbinica na mikrotitrski plošči. Inhibitorji so bili shranjeni v 20 mM Tris-HCl pufru s pH 7,5 in z 0,1-0,3 M NaCl.

Zopet smo uporabili črno mikrotitrsko ploščico s 96 vdolbinicami za merjenje fluorescence. V vsaki vdolbinici smo imeli po 5 μ l substrata Abz-Phe-Glu-Lys (Dnp)-OH, 5 μ l posameznega inhibitorja s končno koncentracijo 1 μ M in 90 μ l katepsina X s končno koncentracijo 30nM, redčenega z aktivacijskim pufrom. Katepsin X smo predhodno inkubirali pet minut v aktivacijskem pufru pri sobni T in nato še 60 minut skupaj z inhibitorjem. Najprej smo v vdolbinice dodali substrat in tik pred merjenjem še v vsako po 95 μ l zmesi inhibitorja in encima. Vsakič smo naredili tudi dve ponovitvi brez encima in inhibitorja, ter dve ponovitvi z encimom in substratom, vendar brez inhibitorja .

SLEPA KONTROLA: aktivacijski pufer (brez encima) in substrat,
NEGATIVNA KONTROLA: aktivacijski pufer z encimom ter substrat;
INHIBITORJI: aktivacijski pufer z encimom, posamezen inhibitor ter substrat;

Po dodatku encima in inhibitorja v vdolbinice smo takoj začeli s kontinuiranim merjenjem fluorescence na spektrofluorimetričnem čitalcu Tecan. Meritve smo izvajali pri 37 °C, pri 320 nm ekscitacije in 420 nm emisije. Od posameznih meritev je program odštel slepe vrednosti. V linearnem območju naraščanja RFU smo določili spremembo RFU na enoto časa (naklon) oz. začetno hitrost za vsako ponovitev. Izbrane podatke smo primerjali z začetno hitrostjo negativne kontrole.

Zanimala nas je tudi koncentracijska odvisnost inhibicije katepsina X. Za klitocipin smo naredili dvakrat po dve ponovitvi. Prvič smo testirali koncentracije inhibitorja od 1 nM do

1 μM , drugič pa od 50 nM do 1 μM . V vsako vdolbinico smo najprej dali 5 μl substrata, nato pa po 95 μl zmesi inhibitorja (različne koncentracije) in encima. Encim, s koncentracijo 30 nM smo predhodno inkubirali v aktivacijskem pufru. Za pripravo redčitev inhibitorjev smo uporabili osnovni pufer. Naredili smo tudi slepo in negativno kontrolo (sestava v tabeli zgoraj). Po dodatku zmesi encima in inhibitorja smo kontinuirano merili fluorescenco na spektrofluorimetru pri enakih pogojih, opisanih že zgoraj.

3.2.14 DOLOČANJE KONSTANTE INHIBICIJE Z RAZLIČNIMI KONCENTRACIJAMI SUBSTRATA

Želeli smo določiti konstanto inhibicije oz. inhibitorno aktivnost dveh inhibitorjev, klitocipina in makrocipina 1, ob prisotnosti različnih koncentracij substrata. Pripravili smo štiri različne koncentracije substrata. Koncentracija osnovne raztopine substrata je bila 8,9 mM.

	1	2	3	4	5	6	7	8	
A									SLEPA KONT.
B									NEGATIVNA KONT.
C									300 nM Clt/ Mcp1
D									600 nM Clt/ Mcp1
E									1,5 μM Clt/ Mcp1
F									3,0 μM Clt/ Mcp1

5X redčen substrat, c= 1780 μM
15X redčen substrat, c= 590 μM
22X redčen substrat, c= 404 μM
30X redčen substrat, c= 300 μM

Ki... konstanta inhibicije = ravnotežna konstanta disociacije kompleksa EI



+ I

$$\text{Ki} = \frac{[\text{E}] * [\text{I}]}{[\text{EI}]}$$

↑ Ki

EI

Na črno mikrotitrsko ploščo smo odpipetirali po 5 μ l pripravljene substrata. Encim smo pripravili v aktivacijskem pufru, mu dodali ustrezen volumen inhibitorja in pufra Tris.

Tik pred merjenjem smo substratu v vdolbinice dodali po 95 μ l zmesi encima in inhibitorja. Merili smo fluorescenco pri 37 °C na spektrofluorimetru Tecan.

Kinetične rezultate za encimsko katalizirane reakcije smo analizirali v programu SigmaPlot, ki s pomočjo informacijskega kriterija Akaike (AICc) določi kateri tip encimske inhibicije relativno najbolj ustreza našim podatkom (71). Za določanje inhibicijske konstante in tipa encimske inhibicije smo poleg programa SigmaPlot uporabili tudi dve grafični metodi in sicer po Dixonu in Cornish- Bowdnu.

4.REZULTATI

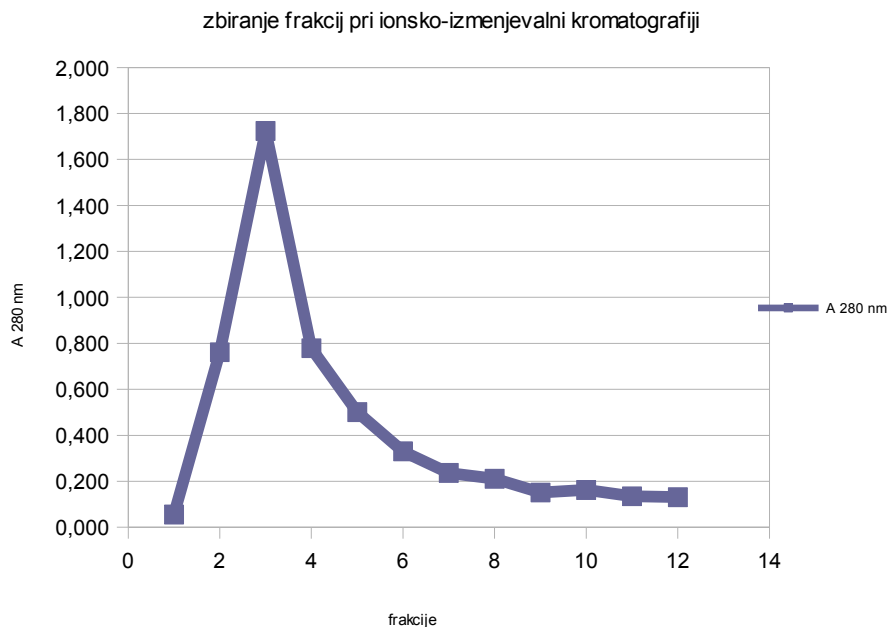
4.1 Izražanje in izolacija katepsina X

Cisteinsko proteazo katepsin X smo izrazili v kvasovki *Pichia pastoris*. Po končani 72-urni ekspresiji, smo skoncentrirano in dializirano gojišče dvakrat nanegli na ionsko-izmenjevalno kolono CM-Sephadex. Sledilo je spiranje kolone z Na-acetatnim pufrom s pH 5,0, dokler ni absorbanca (A 280) padla pod vrednost 0,03.

meritve:	A 280 nm
A1, ozadje (pufer)	0,000
A2	0,307
A3	0,053
A4	0,042
A5	0,036

Elucijo smo izvedli s pufrom s povišano ionsko močjo in zbrali 12 frakcij, katerim smo izmerili A280.

frakcije	A 280 nm
1	0,055
2	0,761
3	1,724
4	0,779
5	0,501
6	0,330
7	0,236
8	0,211
9	0,151
10	0,162
11	0,135
12	0,131



Slika 6: Elucijski profil prokatepsina X;

Prokatepsin X se je eluiral z enim vrhom.

Po končani kromatografiji smo združili 2., 3., 4., 5. in 6. frakcijo. Volumen frakcij je znašal približno 50ml. Združene frakcije smo dializirali v Na- citratnem pufru s pH 5,5 in določili koncentracijo izoliranega prokatepsina X s spektrofotometrično metodo na Nanodropu. Pri merjenju smo upoštevali ekstinkcijski koeficient, značilen za prokatepsin X. $E_{1\%,1\text{cm}}$ znaša 27,4 $/[M \cdot \text{cm}]$. Meritve:

meritev	koncentracija (mg/ml)
1	0,48
2	0,49
3	0,46

Po aktivaciji prooblike s katepsinom L smo ponovno spektrofotometrično določali koncentracijo našega proteina (tokrat aktivne oblike) na NanoDropu. Pri meritvi smo upoštevali ekstinkcijski koeficient.

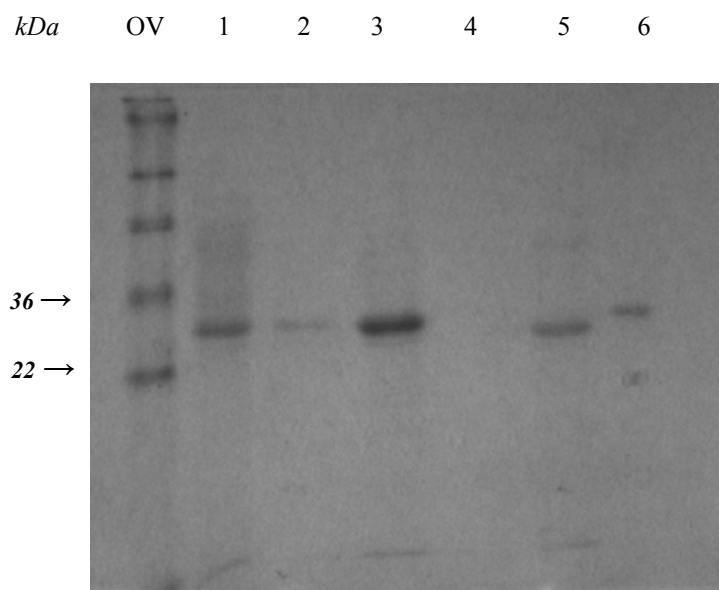
meritev	koncentracija (mg/ml)
1	0,35
2	0,37

Koncentracijo katepsina X smo določili tudi z metodo DC in določili nekoliko višjo koncentracijo kot s spektrofotometrično metodo.

meritev	koncentracija (mg/ml)
1	0,46
2	0,51

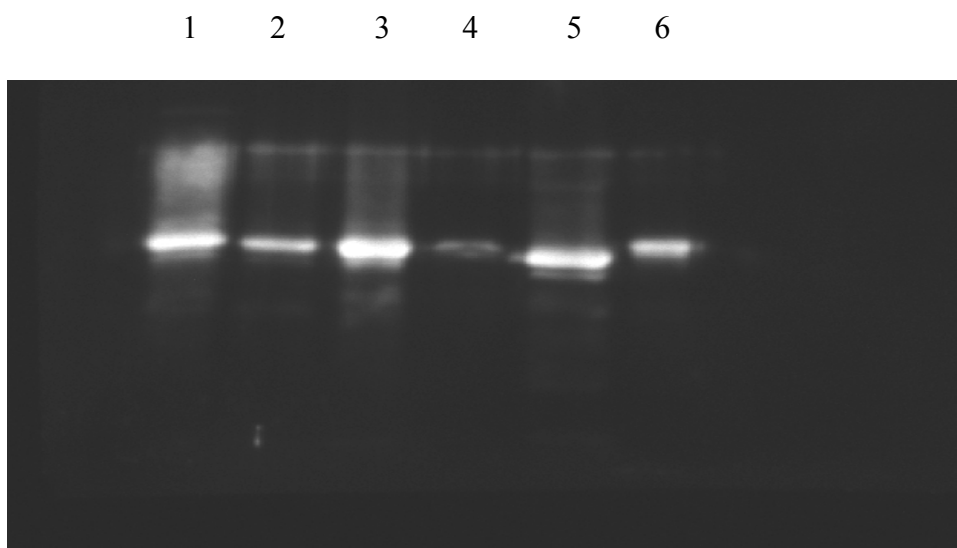
4.2 Preverjanje izraženega katepsina X

3.2.1 Za detekcijo vseh proteinov smo elektroforezni gel barvali z barvilom Coomassie brilliant blue.



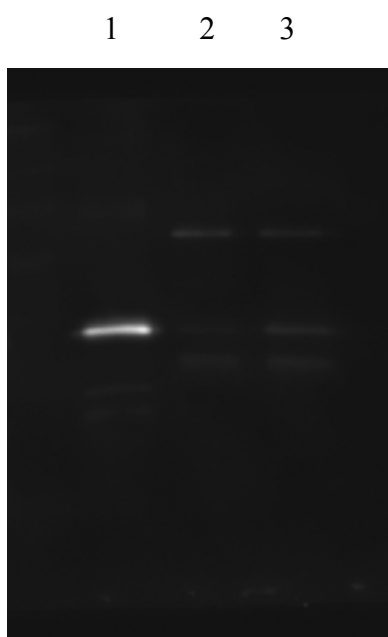
Slika 7: Ekspresija in čiščenje rekombinantnega prokatepsina X, barvanje z barvilom Coomassie Brilliant Blue; OV- označevalci velikosti; lisa 1.- vzorec pred ionsko-izmenjevalno kolono; lisa 2.-zbrane frakcije iz ionsko-izmenjevalne kolone; lisa 3.-skoncentriran vzorec v ultrafiltrirni posodi; lisa 4.- ultrafiltrat; lisa 5.- naš izoliran katepsin X, po aktivaciji; lisa 6.- stari kat X, pripravljen na FFA;

3.2.2 Po SDS poliakrilamidni gelski elektroforezi je sledil prenos proteinov po metodi western na nitrocelulozno membrano in inkubacija le te s primarnimi protitelesi (pt) proti katepsinu X (mišja monoklonska pt, 3B10, s koncentracijo 0,5 µg/ml) in s sekundarnimi protitelesi (kozja proti mišja pt, konjugirana s hrenovo peroksidazo, redčena s pufrom PBST v razmerju 1:10 000), razvitje lis in detekcija s sistemom G-box.



Slika 8: Ekspresija in čiščenje rekombinantnega prokatepsina X, detekcija katepsina X s prenosom western; lisa 1- vzorec pred ionsko-izmenjevalno kolono, nanos 10 µl; lisa 2- zbrane frakcije iz ionsko-izmenjevalne kolone, nanos 10 µl ; lisa 3- skoncentriran vzorec v ultrafiltrirni posodi, nanos 10 µl; lisa 4- ultrafiltrat, nanos 10 µl; lisa 5- katepsin X po imunoprecipitaciji katepsina L oz. po aktivaciji pro oblike katepsina X, nanos 10 µl; lisa 6- stari katepsin X, pripravljen na FFA, nanos 1 µl;

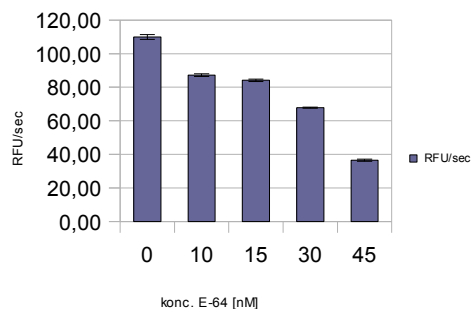
3.2.3 Ker smo za aktivacijo prooblike katepsina X uporabili katepsin L, nas je zanimala morebitna prisotnost katepsina L v vzorcu. Membrano smo inkubirali s primarnimi protitelesi proti katepsinu L (ovčja poliklonska pt, redčena s pufrom PBST v razmerju 1: 1460) ter s sekundarnimi protitelesi (proti ovčja poliklonska pt, konjugirana s HRP in pripravljena v zajcu ter rečena s pufrom PBST v razmerju 1: 2000). Sledilo je razvitje lis in detekcija s sistemom G-box.



Slika 9: Elektroforeza in detekcija katepsina L s prenosom western; lisa 1- katepsin L, nanos 0,5 μ l; lisa 2-stari katepsin X (0,94 mg/ml), nanos 1 μ l (0,94 μ g); lisa 3- naš katepsin X (0,63 mg/ml), nanos 1,5 μ l (0,94 μ g);

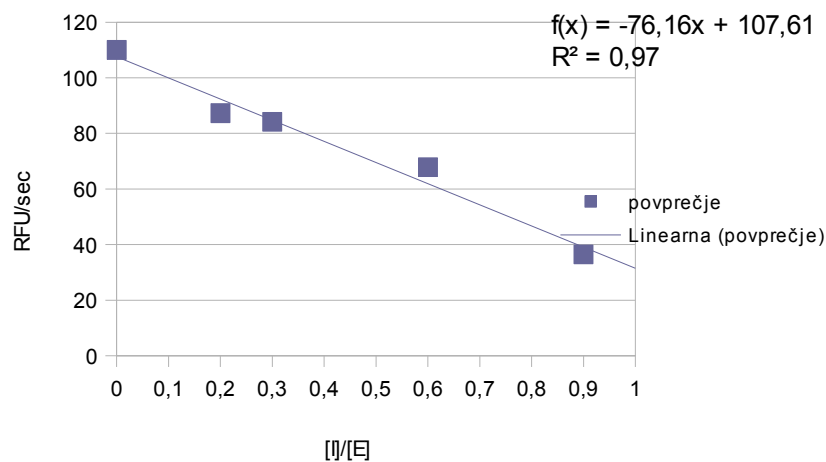
4.3 Titracija aktivnega mesta katepsina X z inhibitorjem E-64

Delež aktivnega katepsina X smo določili z metodo titracije aktivnega mesta, z uporabo splošnega ireverzibilnega inhibitorja E-64 (naraščajoče koncentracije) in substrata, specifičnega za katepsin X.



Slika 10: Začetna hitrost reakcije (RFU/sec) v odvisnosti od koncentracije splošnega cisteinskega inhibitorja, E-64, pri stalni koncentraciji substrata Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH;

Razmerje vezave med encimom in inhibitorjem smo določili iz razmerja med molarno koncentracijo inhibitorja in molarno koncentracijo encima.

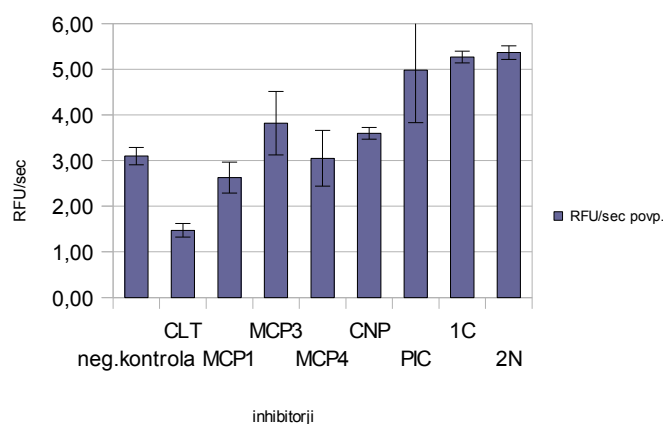


Slika 11: Diagram odvisnosti začetne hitrosti (RFU/sec) od razmerja med molarno koncentracijo inhibitorja in molarno koncentracijo encima $[I]/[E]$;

Premica seka x os pri vrednosti 1'41, kjer je reakcijska hitrost enaka 0 in kjer je koncentracija aktivnega mesta enaka koncentraciji inhibitorja. Koncentracija inhibitorja je 70,5 nM. Če upoštevamo še začetno redčitev encima in povprečno koncentracijo celotnega proteina, imamo aktivnega 85% encima.

4.4 Testiranje inhibitorjev na specifičen substrat za katepsin X

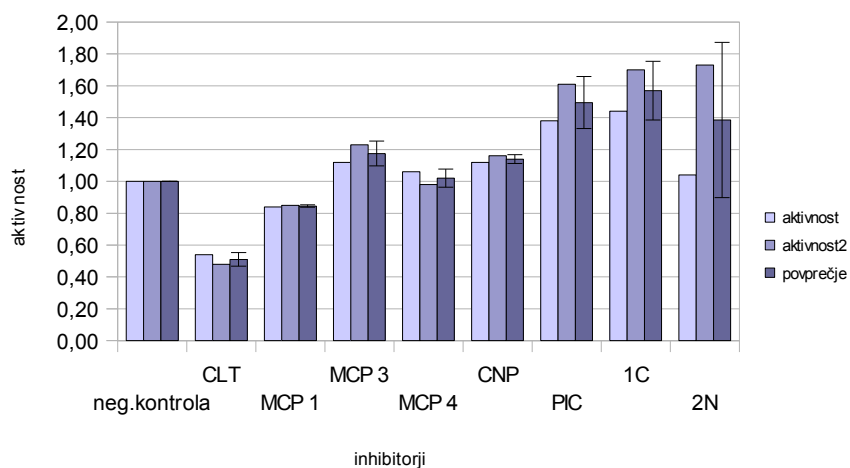
Testirali smo aktivnost osmih inhibitorjev ob prisotnosti substrata Abz-Phe-Glu-Lys(Dnp)-OH, specifičnega za katepsin X.



Slika 12: Povprečne vrednosti RFU/sec pri vsakem inhibitorju in standardna napaka;

Za vsak inhibitor smo testiranje opravili dvakrat v dveh ponovitvah. Pri drugem testiranju smo dobili podobne rezultate (glej prilogo).

Povprečne vrednosti RFU/sec posameznih inhibitorjev smo nato primerjali s povprečno vrednostjo RFU/sec kontrole. Tako smo dobili aktivnost.



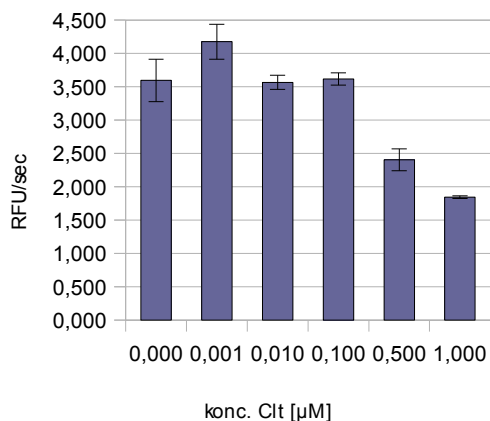
Slika 13: Primerjava aktivnosti inhibitorjev pri dveh testiranjih (sveti in svetlo modri stolpci) in povprečje aktivnosti s standardno napako (temno modri stolpci);

S statistično metodo „t-test“ smo preverili, ali obstajajo statistično značilne razlike med vrednostmi RFU/sec kontrole in vrednostmi RFU/sec vzorca (Clt in Mcp1). Naredili smo enostranski t-test.

inhibitor	P-vrednost
Clt	0,000
Mcp1	0,002

S 5% stopnjo značilnosti ($\alpha=0,05$) lahko trdimo, da obstajajo statistično značilne razlike v inhibiciji katepsina X. Pri dveh inhibitorjih, pri klitocipinu in makrocipinu 1, opazimo znižanje aktivnosti, medtem ko pri ostalih znižanja praktično ni.

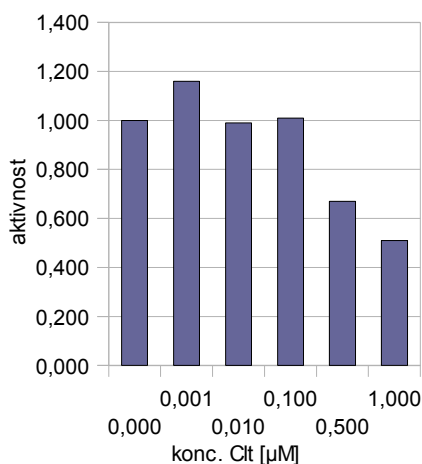
Zanimala nas je koncentracijska odvisnost inhibicije katepsina X. Za klitocipin smo naredili dvakrat po dve ponovitvi.



Slika 14: Koncentracijska odvisnost inhibicije katepsina X; povprečne vrednosti RFU/sec s pripadajočo standardno napako; prvo testiranje; koncentracija inhibitorja klitocipina od 1 nM do 1 μ M;

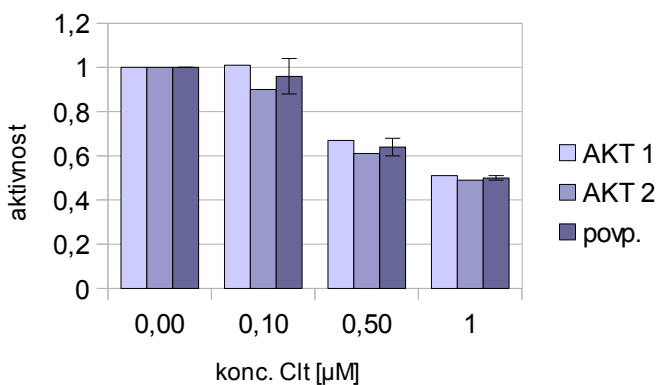
Podobne rezultate smo dobili tudi pri drugem testiranju (glej prilogo).

Vrednosti RFU/sec posameznih koncentracij klitocipina smo primerjali z vrednostjo RFU/sec negativne kontrole (encim brez inhibitorja) in dobili aktivnost.



Slika 15: Primerjava aktivnosti klitocipina v odvisnosti od njegove koncentracije (prvo testiranje); aktivnost negativne kontrole (encim brez inhibitorja) je 1;

Primerjali smo tudi aktivnosti klitocipina v odvisnosti od njegove koncentracije pri dveh testiranjih.



Slika 16: Primerjava aktivnosti klitocipina v odvisnosti od njegove koncentracije (0,1 µM, 0,5 µM in 1 µM) pri dveh testiranjih (sivi in svetlo modri stolpci) in povprečje aktivnosti s standardno napako (temno modri stolpci);

Zgona A: Vpliv zaviralcev klitocipina in makrocipina na aktivnost katepsina X, izraženega v kvasovki *Pichia pastoris*. Diplomsko delo.

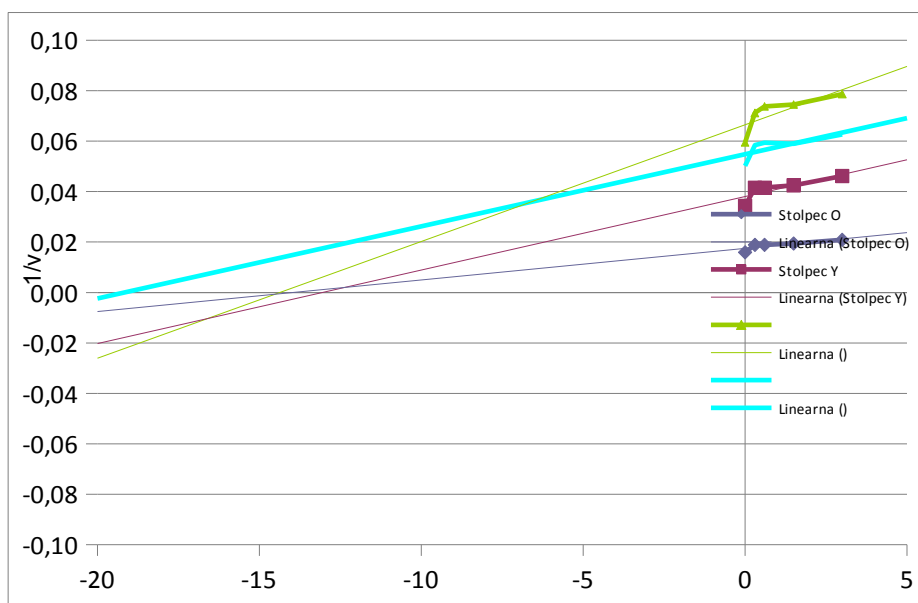
Naredili smo tudi t-test in ugotovili, da lahko s 5% stopnjo značilnosti trdimo, da obstajajo značilne razlike med vrednostjo kontrole in vrednostjo inhibicije pri 0,5 μM in 1 μM koncentraciji klitocipina.

konc. Clt [μM]	p- vrednost
1,000	0,000
0,500	0,000

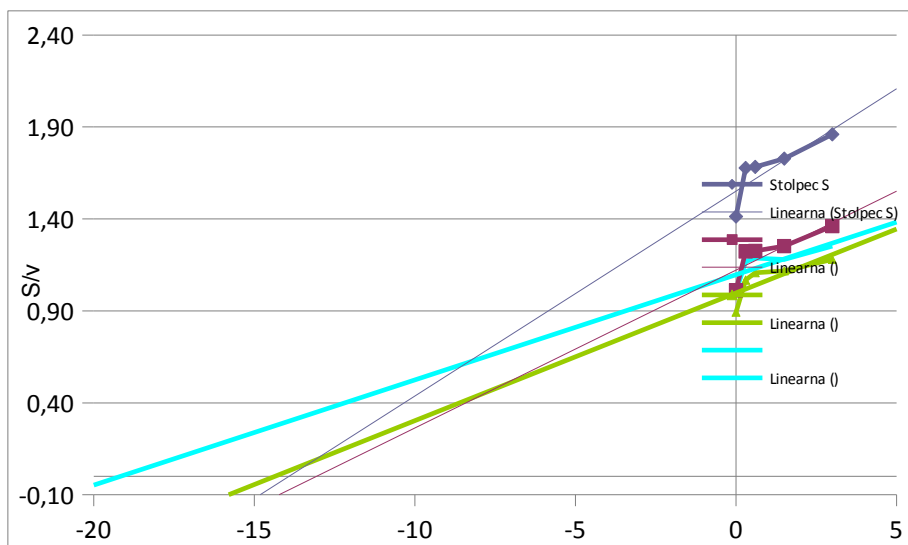
4.5 Določanje konstante inhibicije z različnimi koncentracijami substrata

Za makrocipin 1 in klitocipin smo določili konstanto inhibicije s pomočjo grafičnih metod po Dixonu in po Cornish-Bowdnu ter s pomočjo programa SigmaPlot.

Primer določanja K_i za Mcp1 po dveh grafičnih metodah, po Dixonu in Cornish-Bowdnu.



Slika 17: Določanje K_i z grafično metodo po Dixonu: predstavitev encimsko kinetičnih podatkov, s katerimi lahko določimo K_i ; $1/v$ (recipročna vrednost hitrosti) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja (Mcp 1) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke- $c(\text{sub.})=1780 \mu\text{M}$, rdeče točke- $c(\text{sub.})=590 \mu\text{M}$, svetlo modre točke- $c(\text{sub.})=404 \mu\text{M}$, zelene točke- $c(\text{sub.})=300 \mu\text{M}$

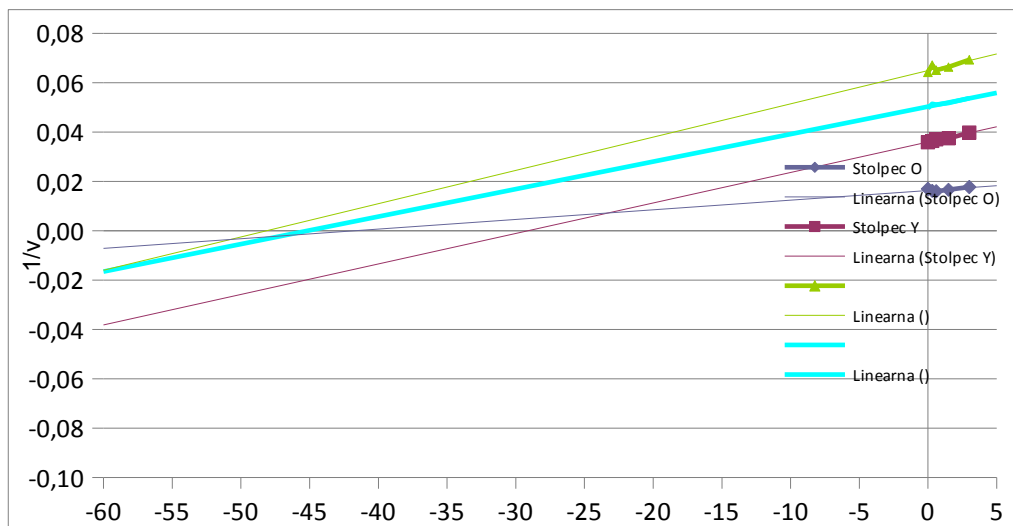


Slika 18: Grafična metoda po Cornish-Bowdnu za določanje K_i in tipa encimske inhibicije; S/v (koncentracija substrata/hitrost) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja ($Mcp1$) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke- $c(sub.)=1780 \mu M$, rdeče točke- $c(sub.)=590 \mu M$, svetlo modre točke- $c(sub.)=404 \mu M$, zelene točke- $c(sub.)=300 \mu M$

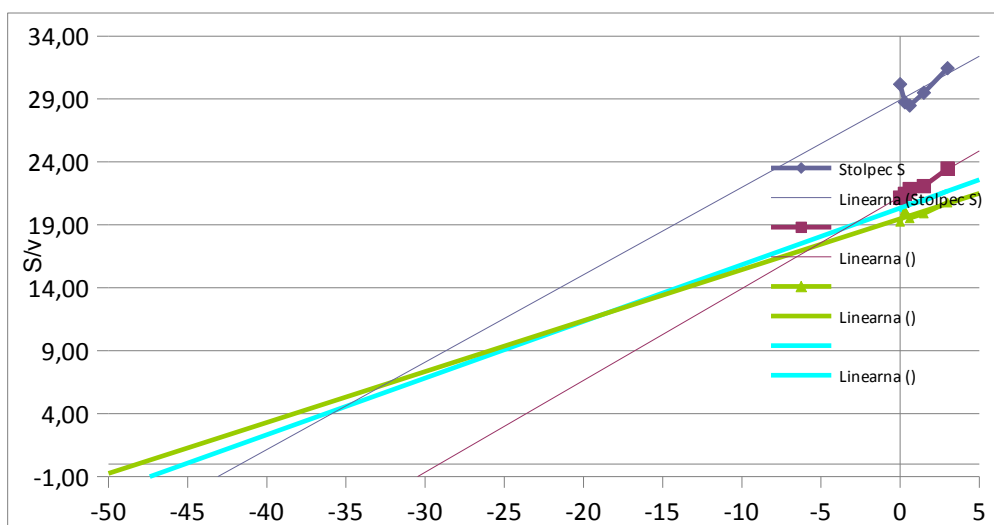
Kinetične rezultate smo analizirali tudi v programu SigmaPlot. Relativno najbolj ustrezen model oz. tip encimske inhibicije smo izbrali na podlagi AICc.

Ki za Mcp 1(prva ponovitev)	$12,23 \pm 1,82 \mu M$ (nekompetitivni inhibitor)
Ki za Mcp 1(druga ponovitev)	$10,37 \pm 0,96 \mu M$ (nekompetitivni inhibitor)

Primer grafičnega določanja K_i za klitocipin:



Slika 19: Določanje K_i z grafično metodo po Dixonu: predstavitev encimsko kinetičnih podatkov, s katerimi lahko določimo K_i ; $1/v$ (recipročna vrednost hitrosti) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja (Cl_t) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke- $c(sub.)=1780 \mu M$, rdeče točke- $c(sub.)=590 \mu M$, svetlo modre točke- $c(sub.)=404 \mu M$, zelene točke- $c(sub.)=300 \mu M$



Slika 20: Grafična metoda po Cornish-Bowdnu za določanje K_i in tipa encimske inhibicije; S/v (koncentracija substrata/hitrost) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja (Cl_t) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke- $c(sub.)=1780 \mu M$, rdeče točke- $c(sub.)=590 \mu M$, svetlo modre točke- $c(sub.)=404 \mu M$, zelene točke- $c(sub.)=300 \mu M$.

Tudi za klitocipin smo dvakrat določili K_i s pomočjo programa SigmaPlot:

Ki (Cl_t) prva ponovitev	$27,70 \pm 5,46 \mu M$ (kompetitivni inhibitor)
Ki (Cl_t) druga ponovitev	$18,29 \pm 2,64 \mu M$ (nekompetitivni inhibitor)

5. RAZPRAVA

Biotehnologija je ena izmed najhitreje razvijajočih se tehnologij. Poleg rastlinske, mikrobne in okoljevarstvene biotehnologije ter živalske pridelave, je največji razcvet doživela farmacevtska biotehnologija z rekombinantnimi zdravilnimi učinkovinami in z genskim zdravljenjem. Z razvojem genskega inženirstva je farmacevtska biotehnologija razvila nove metode za proizvodnjo spojin proteinskega izvora, ki jih zaradi omejene količine naravnih virov ni mogoče dobiti v zadostni količini ali pa je izkoriščanje naravnih virov (celice, tkiva, organi) etično sporno.

Ker se danes rekombinantni proteini vse več uporabljajo v raziskovalne, industrijske in terapevtske namene, se je povečala tudi potreba po učinkovitih ekspresijskih sistemih. Vsak protein je edinstven in zato ni nekega pravila, katere proteine izrazimo s katerimi ekspresijskimi sistemi. Pri proizvodnji encimov in proteinov za raziskovalne in industrijske namene želimo, da je izbran sistem za izražanje donosnejši od tradicionalne tehnologije pridobivanja. Tu je pomembno, da je gojenje proizvodnega organizma nezahtevno in ekonomično. V primeru rekombinantnih zdravilnih učinkovin, namenjenih ljudem, pa je v prvi vrsti pomembna varnost in odsotnost patogenih organizmov. Zaradi potencialne imunogenosti je izbira ekspresijskega sistema zelo pomembna, prav tako je pomemben tudi sam proces izolacije in čiščenja.

Rekombinantne proteine lahko pripravimo v različnih ekspresijskih sistemih. Poznamo po Gramu negativne bakterije (*Echerichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*), po Gramu pozitivne bakterije (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus carnosus*), kvasovke (*Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*), nitaste glive (*Aspergillus sojae*, *A. oryzae*, *Penicillium roqueforti*), rastlinske kulture (celične kulture (kulture suspenzijskih celic, kalusne kulture na agarnem gojišču), tkivne kulture (kulture koreninskih laskov)), transgene rastline, insektne celice z bakulovirusnim ekspresijskim sistemom, sesalske celične kulture (sesalske gostiteljske celice (CHO- ovarijske celice kitajskega hrčka, BHK- ledvične celice mladiča hrčka, mišje mielomske celice NSO)) in transgene živali.

Enostavne proteine pridobivamo v bakterijah, kompleksnejše proteine, ki so sestavljeni iz več podenot pa lahko pridobivamo le s pomočjo višjih evkariontov, saj zahtevajo

posttranslacijske spremembe in imajo več disulfidnih vezi.

Po Gramu negativna bakterija *E. coli* je bila prvi organizem, ki je bil uporabljen za proizvodnjo rekombinantnih proteinov. Proteini se pogosto zberejo v inkluzijskih telesih kot netopni in biološko neaktivni agregati. Sama izolacija je enostavna, renaturacija proteina v aktivno obliko pa je zahteven in drag proces. Bakterija se je zaradi enostavnega genskega spreminjanja, dobre raziskanosti in nezahtevnih fermentacijskih postopkov razvila iz modela za znanstvene raziskave v industrijski mikroorganizem.

Svojevrsne ekspresijske sisteme predstavljajo tudi po Gramu pozitivne bakterije, ki imajo to možnost, da proteine izločijo neposredno v gojišče. Tako se pogosto pridobivajo tehnični homologni encimi, kot so lipaze, proteaze, amilaze in drugi hidrolitični encimi.

Glivni ekspresijski sistemi združujejo prednosti evkariontov in bakterij, ter so primerni za proizvodnjo kompleksnih heterolognih proteinov. Kvasovke so evkariontske celice, ki so sposobne rasti pri velikih celičnih gostotah. Omogočajo tudi posttranslacijske spremembe rekombinantnih proteinov. Kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* se že vrsto let uporablja v prehrambene namene in je zaradi varnosti pridobila status GRAS (Generally Recognized as Safe). Zaradi splošne priznane varnosti se uporablja tudi za proizvodnjo rekombinantnega inzulina in nekaterih rekombinantnih cepiv. Težavi, ki omejujeta njeno uporabo sta hiperglikozilacija in nepravilna glikozilacija. Pri metilitrofni kvasovkah (*Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*) je hiperglikozilacija manjša, do nepravilne glikozilacije sicer lahko pride, vendar ta ni imunogena kot v primeru *Saccharomyces cerevisiae*. (72)

Človeški prokatepsin X smo izrazili v kvasovki *P. pastoris* po že objavljeni metodi (61). V gojišče se je izločil v obliki topnega proteina. Da bi ga lahko okarakterizirali, smo ga morali izolirati iz gojišča, mu odstraniti vse nečistoče in ga na koncu tudi aktivirati.

Kot ekspresijski sev smo uporabili sev GS115, klon S41, ki je vseboval plazmid pPIC9 z vstavljenjo cDNA človeškega prokatepsina X (fuzijski konstrukt signalnega zaporedja prepro-faktorja α z zaporedjem tarčnega proteina). Za optimalno izražanje smo upoštevali smernice Invitrogena. Izražanje v gojišču BMMY je potekalo 72h, vsakih 24h pa smo v

gojišče dodali metanol do koncentracije 0,5%, saj je za indukcijo visokega nivoja prepisovanja AOX1 oz. gena, ki kodira naš protein, le-ta potreben. Po končani ekspresiji smo gojišče 5 min centrifugirali, supernatant s topnim prokatepsinom X pa skoncentrirali na ultrafiltru. Koncentrat smo nato dializirali z Na-acetatnim pufrom s pH 5,0. Glavno metodo čiščenja je predstavljala ionsko-izmenjevalna kromatografija. Prokatepsin X smo iz kolone eluirali z dodatkom 0,6M NaCl. Glede na vrednost absorbance (A) pri 280 nm smo združenim frakcijam izmerili vsebnost prokatepsina X z uporabo ekstinkcijskega koeficienta (E 1%, 1cm), značilnega za (pro)katepsin X.

Prisotnost proteina, uspešnost čiščenja in uspešnost njegove aktivacije smo preverili z analizo SDS PAGE in s prenosom proteinov na membrano. Prisotnost proteinov (*slika 7*, lisa 1) smo pokazali z barvanjem elektroforeznega gela z barvilom Coomassie brilliant blue, ki v kislem z bazičnimi aminokislinami tvori kompleks. Na *sliki 7*. vidimo, da je vzorec pred kromatografijo vseboval še nekatere druge proteine, katerih v končnem vzorcu (*slika 7*, lisa 5) ne zasledimo več. Teh proteinov ni veliko, kar potrjuje prednost izbranega ekspresijskega sistema. Identiteto lise smo s prenosom western potrdili s specifičnimi protitelesi proti katepsinu X.

Iz *slik 7. in 8.* je razvidno, da je bilo čiščenje prooblike uspešno oz. da je bila ionsko izmenjevalna kromatografija učinkovita izbira za čiščenje prooblike našega proteina. V procesu do aktivacije smo zasledili tudi manjšo izgubo prokatepsina X (lisa pri št. 4 (*slika 7.*)).

Za detekcijo katepsina X na membrani smo uporabili monoklonska protitelesa 3B10, ki prepoznajo tako prokatepsin X kot aktiven katepsin X. Kje se nahaja epitop za vezavo protitelesa, še ni znano.

Prokatepsin X v *in vitro* pogojih ni zmožen avtoaktivacije, kaže pa, da je poleg encimske aktivacije možna tudi neencimska aktivacija prokatepsina X ob prisotnosti DTT (73). Ob dodatku DTT naj bi prišlo do cepitve disulfidne vezi med cisteinom aktivnega mesta in cisteinom proregije. Na ta način naj bi se proregija umaknila iz aktivnega mesta in tako omogočila dostop substratom/protitelesom do katalitičnega mesta. Uspešnost neencimske aktivacije prooblike je slabša v primerjavi z encimsko aktivacijo. (73) Mi smo za aktivacijo uporabili rekombinantni katepsin L v pufru z dodanim DTT. Encimska aktivacija je

zahtevala nadaljnje čiščenje. Puzer in sodelavci so sprva za odstranitev katepsina L uporabili kromatografsko metodo (SP Sepharose Fast Flow) pri pH 4,4, vendar se ta proces ni izkazal za učinkovitega (61). Zato smo uporabili metodo imunoprecipitacije in katepsin L odstranili s pomočjo ovčjih protiteles, ki so tvorila imunski kompleks s katepsinom L v nanomolarnem koncentracijskem območju in protein A sefarozo, ki je ta kompleks oborila. V našem primeru se je metoda imunoprecipitacije izkazala za uspešno, saj je učinkovito odstranila rekombinantni katepsin L. To smo pokazali z SDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo in z metodo prenosa western. Po inkubaciji membrane s primarnimi protitelesi proti rekombinantnemu katepsinu L in po uporabi ustreznih sekundarnih protiteles, konjugiranih s peroksidazo, smo namreč potrdili, da smo učinkovito odstranili katepsin L (*slika 7*, lisa 3).

Uspešna je bila tudi sama aktivacija katepsina X, saj je lisa št. 5 (*sliki 7. in 8.*) nižje od ostalih lis. Molekulska masa aktivne oblike katepsina X je ~ 33000 Da, molekulska masa njegove prooblike pa ~ 36000 Da. Iz slik *7. in 8.* vidimo, da molekulska masa starejšega katepsina X ustreza velikosti prooblike. Ena možna razlaga je nepopolna aktivacija pri prejšnjem postopku aktivacije, druga možna razlaga pa ponovna vezava proregije preko disulfidnih vezi z aktivnim mestom. Znano je, da aktiviran encim za svojo katalitično aktivnost vedno potrebuje prisotnost reducenta (v našem primeru cisteina) v aktivacijskem pufu, ki sprosti aktivno mesto. Res pa je tudi, da molekulske mase rekombinantnih proteinov, izraženih v kvasovki *P. pastoris* lahko tudi variirajo, kar je posledica raznolikosti v glikozilaciji.

Po aktivaciji smo ponovno spektrofotometrično z merjenjem A pri 280 nm in z uporabo ekstinkcijskega koeficienta ($27,4 \text{ } /[\text{M} \cdot \text{cm}]$) določili koncentracijo katepsina X na NanoDropu. Tokrat je bila koncentracija nižja od koncentracije prooblike, kar verjetno kaže na izgube v procesu čiščenja katepsina X od katepsina L oz. na izgube pri ultracentrifugiranju vzorca pred samo aktivacijo.

Spektrofotometrično smo določili tudi koncentracijo pred (zbrane frakcije iz kolone) in po aktivaciji z merjenjem A pri 280 nm. Koncentracija je bila veliko višja (pred: 1,3 mg/ml; po aktivaciji: 0,9 mg/ml).

Koncentracijo smo določili še s kolorimetrično metodo DC. Tu smo določili koncentracijo

katepsina X s pomočjo standardne krivulje. Za standard smo uporabili različne redčitve albumina, pripravljenega v enakem pufru, v katerem se je nahajal katepsin X. Testiranje smo izvedli dvakrat. Koncentraciji sta bili sicer nekoliko višji od koncentracij, dobljenih spektrofotometrično z uporabo E1%,1cm, vendar vseeno primerljivi. Kaj je razlog za večjo koncentracijo ob upoštevanju samo A pri 280 nm, ni jasno.

Ker se tekom izolacije del proteina ireverzibilno denaturira, je potrebno določiti delež aktivnega encima. Molarno koncentracijo aktivne oblike katepsina X smo določili z metodo titracije aktivnega mesta. Pri določanju deleža aktivnega encima smo imeli težave, katere gre zelo verjetno pripisati prej omenjenim težavam določitve koncentracije katepsina X. Ob upoštevanju povprečja koncentracij imamo aktivnega 85% encima.

Peptidaze in njihovi inhibitorji so prisotni v vseh živih organizmih. Ker so peptidaze udeležene tako pri fizioloških kot pri patoloških procesih, je kontrola njihove aktivnosti s strani inhibitorjev zelo pomembna. Izražanje lizosomske cisteinske peptidaze katepsina X je povezano z boleznimi imunskega sistema in z nevrodegenerativnimi obolenji. Odkrili so tudi povečano izločanje prokatepsina X pri napredovanju določenih tipov raka. Z namenom iskanja inhibitorjev katepsina X, smo v diplomski nalogi testirali osem inhibitorjev iz gob: klitocipin, makrocipini (1,3,4), knispin, kospin in inhibitorja 1C in 2N. Gre za proteinske inhibitorje z značilnim β -triperesnim zvitjem, ki po klasifikaciji MEROPS pripadajo različnim družinam. Znano je, da so mikocipini v večini cisteinski peptidazni inhibitorji, kospin in knispin sta inhibitorja serinskih peptidaz, inhibitorja 1C in 2N pa smo testirali zaradi značilne strukture β -triperesnega zvitja. Zvitje je sestavljeno iz zank (potencialno reaktivnih), ki se razlikujejo po obliki in sestavi in lahko inhibirajo več razredov peptidaz (katepsine, asparaginil endopeptidaze (AEP), kruzipain, tripsin, kimotripsin, elastaze, subtilisin, amilaze). (74) Ker spada katepsin X med cisteinske peptidaze, bi lahko pričakovali, da bodo mikocipini zmanjšali katalitično aktivnost encima.

Kljub temu, da imajo vsi predstavniki v strukturi značilno β zvitje, smo s testiranjem potrdili, da zgolj prisotnost tega elementa (npr. pri 1C in 2N) ni bil zadosten pogoj za inhibicijo katepsina X. Pomembno je tudi ujemanje v aminokislinskem zaporedju.

Od vseh inhibitorjev sta samo dva (Clt in Mcp1) pokazala inhibitorno aktivnost do

karboksipeptidaze. Verjetno je razlog v njuni podobni strukturi. Makrocipini in klitocipini (mikocipini) imajo namreč strukturno gledano enako zvitje. Struktura spominja na drevo, sestavljeno iz debla, krošnje in korenin.

Ugotovili so, da je za raznoliko vezavo mikocipinov na različne peptidazne tipe odločilen centralni del β -triperesnega zvitja, ki ga sestavlja 6 β -antiparalelnih niti v obliki sodčka. Kot že omenjeno, si s predstavniki družine I3 po klasifikaciji MEROPS (inhibitorji serinskih proteaz Kunitzovega tipa) delijo strukturo β -triperesnega zvitja. Ker je podobnost v zaporedju med družinami nizka tudi znotraj tega zvitja, to potrди dejstvo, da so mikocipini drugačni od družine I3.

Pri inhibiciji so lahko udeležene različne zanke β -triperesnega zvitja. Pri mikocipinih naj bi bili pri inhibiciji papainu podobnih cisteinskih peptidaz udeleženi zanki β 1- β 2 in β 3- β 4.

Kljub temu imajo mikocipini različne inhibitorne posebnosti (47).

Največja podobnost med makrocipini in klitocipini v strukturi in v aminokislinskem zaporedju je v delu, ki je sestavljen iz β -niti (deblo). Ker to predstavlja le kratek del vsega zaporedja nam to razloži dejstvo, zakaj je njuna podobnost v aminokislinskem zaporedju nizka (17-21%). (45) Verjetno razlike v zaporedju prispevajo tudi k razlikam v inhibitorni aktivnosti do katepsina X.

Visoka raznolikost v genskem zaporedju pri makrocipinih vpliva na njihovo inhibitorno aktivnost, kar se je izkazalo tudi v našem primeru, saj je Mcp 1 pokazal določeno inhibitorno aktivnost do katepsina X, medtem ko Mcp 3 in Mcp 4 encima nista inhibirala.

Vemo, da mikocipini inhibirajo endopeptidaze iz papinske družine (papain, katepsine L, K, V, S) v nanomolarnem območju, eksopeptidaze pa z višjimi konstantami inhibicije (43, 45).

Ker sta Mcp1 in Clt pokazala določeno inhibitorno aktivnost do katepsina X, smo jima določili tudi inhibicijsko konstanto. S programom SigmaPlot smo določili K_i in tip oz. način encimske inhibicije za oba inhibitorja.

K_i je pri obeh inhibitorjih v mikromolarnem območju in sicer $K_i = 23,0 \pm 4,1 \mu\text{M}$ za Clt in

$K_i = 11,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$ za Mcp1. Za makrocipin 1 je program obakrat relativno med vsemi modeli izbral nekompetitivni način inhibicije encima, pri klitocipinu pa je program najprej izbral kompetitivni način, ob drugi ponovitvi pa nekompetitivni način inhibicije.

Če bi želeli natančno določiti konstanto inhibicije, bi morali poseči po kaki drugi metodi (npr. metoda Scatchard), kar pa tu ni bilo smiselno, saj sta oba inhibitorja šibka in ne bosta uporabna kot inhibitorja katepsina X.

Kinetične rezultate smo prikazali tudi z dvema grafičnima metodama, po Dixonu in Cornish-Bowdnu. Metodi predstavljata enostavno oceno inhibicijske konstante in načina inhibicije.

V primeru, da bi analizirali podatke grafično samo po eni metodi, ne bi mogli nedvoumno določiti načina inhibicije. Dolgo časa se je K_i kompetitivnih inhibitorjev določal po metodi Dixon, vendar pa metoda ne razlikuje nedvoumno med kompetitivnim in mešanim načinom inhibicije (76). Zaradi tega so uvedli novo metodo po Cornish Bowdnu (CB), ki je podobna prvi, ne loči pa vedno med akompetitivnim in mešanim tipom inhibicije. V določenih primerih sta si metodi tudi komplementarni, ker omogočata določitev K_i in K_i' (disociacijska konstanta ESI- encim, substrat, inhibitor). (76)

V našem primeru, ko sta inhibitorja šibka, grafično težko ocenimo način inhibicije, K_i pa ne moremo določiti, saj naši grafi odstopajo od idealnih modelov. Za makrocipin 1 lahko ocenimo, da gre za nekompetitivni tip inhibitorja, saj se vsaj tri premice pri obeh grafih (in obeh testiranjih) sekajo na osi x. Poleg tega smo tudi s programom SigmaPlot obakrat določili, da je Mcp1 verjetno nekompetitivni inhibitor, zato lažje s pomočjo grafov sklepamo na ta tip. Pri klitocipinu je drugače. Že s programom SigmaPlot smo imeli težave pri določanju K_i in načina inhibicije. Obakrat smo dobili drugačne rezultate. Prav tako tudi grafično ne moremo nedvoumno določili načina inhibicije.

6.SKLEP

Za izražanje rekombinantnega proteina prokatepsina X smo izbrali metilotrofno kvasovko *Pichia pastoris*. V gojišče se je izločil v obliki topnega proteina. Prokatepsin X smo iz gojišča izolirali, ga očistili in aktivirali z rekombinantnim katepsinom L. Prisotnost proteina, uspešnost aktivacije in uspešnost čiščenja smo potrdili z SDS-PAGE analizo in s prenosom proteinov na membrano. Katepsinu X smo določili masno koncentracijo (po dveh metodah- spektrofotometrično in kolorimetrično) in aktivnost. Pri določanju deleža aktivnega encima smo imeli težave. Te so verjetno posledica težav pri določanju koncentracije. Ob upoštevanju povprečne koncentracije (0,63 mg/ml), imamo aktivnega 85% encima.

Drugi del diplome je predstavljal testiranje osmih inhibitorjev, izoliranih iz gob, da bi ugotovili morebitno inhibicijo katepsina X. Od vseh sta dva, klitocipin in makrocipin 1, pokazala določeno inhibitorno aktivnost. S programom SigmaPlot smo jima določili konstanti inhibicije, ki znašata $23,0 \pm 4,1 \mu\text{M}$ za klitocipin in $11,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$ za makrocipin 1.

7.VIRI

1. Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF: The Handbook of Proteolytic Enzymes: second ed. Amsterdam, Elsevier 2004.
2. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A: MEROPS the peptidase database. *Nucleic Acid Res* 2010; 38: D227-33.
3. Barrett AJ: Proteolytic enzymes: nomenclature and classification In: Beynon RJ, Bond JS (eds) *Proteolytic enzymes: a practical approach*, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, 2001; 1-21.
4. Igarashi Y, Heures E, Doctor KS, Talwar P, Gramatikova S, Gramatikoff K, Zhang Y, Blinov M, et al. PMAP: database for analyzing proteolytic events and pathways. *Nucleic Acids Res* 37 (Database issue) 2009; D611-D618.
5. Lopez-Otin C and Bond JS. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem* 2008; 283: 30433-37.
6. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV: Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 597-635.
7. Jedinak A, Maliar T: Inhibitors of proteases as anticancer drugs. *Neoplasma* 2005; 52: 185-92.
8. Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 785-99.
9. Drag M, Salvesen GS: Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9: 690-01.
10. Haq SK, Rabbani G, Ahmad E, Atif SM, Khan RH: Protease inhibitors: a panacea? *J Biochem Mol Toxicol* 2010; 24: 270-77.
11. Sabotič J, Kos J: Microbial and fungal protease inhibitors- current and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012; 93: 1351-75.
12. Nägler DK and Menard R. Human cathepsin X: a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Lett* 1998; 434: 135-39.
13. Turk B, Turk D and Turk V: Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 98-111.
14. Santamaria I, Velasco G, Pendas AM, Fueyo A and Lopez-Otin C: Cathepsin Z, a

- novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J Biol Chem* 1998; 273: 16816-23.
15. Pungerčar J, Ivanovski G: identification and molecular cloning of cathepsin P, a novel human putative cysteine protease of papain family. *Pflugers Arch* 2000; 439: R116-R118.
 16. Puzer L, Cotrin SS, Cezari MH, Hirata IY, Juliano MA, Stefe I, et al.: Recombinant human cathepsin X is a carboxymonopeptidase only: a comparison with cathepsins B and L. *biol Chem* 2005; 386:1191-5.
 17. Lecaille F, Kaleta J, Bromme D: Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design. *Chem Rev* 2002; 102: 4459-88.
 18. Turk V, Turk B, Turk D: Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J*, 2001; 20: 4629-33.
 19. Wiederanders B et al: Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 691-713.
 20. Bromme D and Wilson S: Role of Cysteine Cathepsins In Extracellular proteolysis In Parks WC and Mecham RP: *Extracellular Matix Degradation, Biology of Extracellular Matrix 2*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011: 23-27.
 21. Sivaraman J, Nägler DK, Zhang R, Menard R, Cygler M: Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *J Mol Biol* 2000; 295:939-51.
 22. Gunčar G, Klemenčič I, Turk B, Turk V, Karaoglanovic-Carmona A, Juliano L, et al: Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Structure* 2000; 8: 305-13.
 23. Nägler DK, Zhang R, Tam W, Sulea T, Purisima EO, Menard R: Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochem* 1999; 38: 12648-54.
 24. Kos J, Sekirnik A, Premzl A, Zavašnik Bergant V, Langerholc T, Turk B, et al: Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp Cell Res* 2005; 306:103-13.
 25. Kos J, Jevnikar Z, Obermajer N: The role of cathepsin X in cell signalling. *Cell Adh Migr* 2009; 3:164-6.
 26. Obermajer N, Repnik U, Jevnikar Z, Turk B, Kreft M, Kos J: Cysteine protease

- cathepsin X modulates immune response via activation of β 2-integrins. Immunology 2008; 124:76-88.
27. Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, Fonovič UP, Kos J: Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neurogenesis of neuronal cells. Int J Biochem cell Biol 2009; 41:1685-96./ Hafner A, Obermajer N, Kos J: γ -1-syntrophin mediates trafficking of γ -enolase towards the plasmamembrane and enhances its neurotrophic activity. Neurosignals 2010; 18; 246-58.
 28. Staudt DN, Aicher KW, Kalbacher H, Stevanovic S, Carmona KA, Bogoyo M, et al: Cathepsin X is secreted by human osteoblasts, digests CXCL-12 and impairs adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells to osteoblasts. Haematol 2010; 95: 1452-60.
 29. Krueger S, Kalinski T, Hundertmark T, Wex T, Küster D, Peitz U, et al: Upregulation of cathepsin X in Helicobacter Pylori gastritis and gastric cancer. J Pathol 2005; 207: 32-42.
 30. Baker AR, Zalwango S, Malone LL, Igo RP Jr, Qiu F, Nsereko M, et al: Genetic susceptibility to tuberculosis associated with cathepsin Z haplotype in a Ugandan household contact study. Hum Immunol 2011; 72: 426-30.
 31. Ratovitski T, Chiqhladze E, Waldron E, Hirschhorn RR, Ross CA: Cysteine proteases bleomycin hydrolase and cathepsin Z mediate N-terminal proteolysis and toxicity of mutant huntingtin. J Biol Chem 2011; 286:12578-89.
 32. Nägler DK, Lechner AM, Oettl A, Kozaczynska K, Scheuber HP, Gippner-Steppert C, et al: An enzyme-linked immunosorbent assay for human cathepsin X, a potential new inflammatory marker. J Immunol methods 2006; 308: 241-50.
 33. Wendt W, Zhu XR, Lubbert H, and Stichel CC: Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice. Exp Neurol 2007; 204: 525-40.
 34. Hidaka S, Yasutake T, Takeshita H, Kondo M, Tsuji T, Nanashima A, et al: Differences in 20q13.2 Copy Number between Colorectal Cancers with and without liver metastasis. Clin Cancer Res 2000; 6: 2712-7.
 35. Bar-Shira A, Pinthus HJ, Rozovsky U, Goldstein M, Sellers RW, Yaron Y, et al: Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in a advanced prostate cancer xenograft. Cancer Res 2002; 62: 6803-7.
 36. Buhling F, Peitz U, Krueger S, Kuster D, Vieth M, Gebert I, Roessner A, Weber E, Malfertheiner P, Wex T: Cathepsins K, L, B, X and W are differentially expressed in normal and chronically inflamed gastric mucosa. Biol Chem 2004; 385: 439-45.

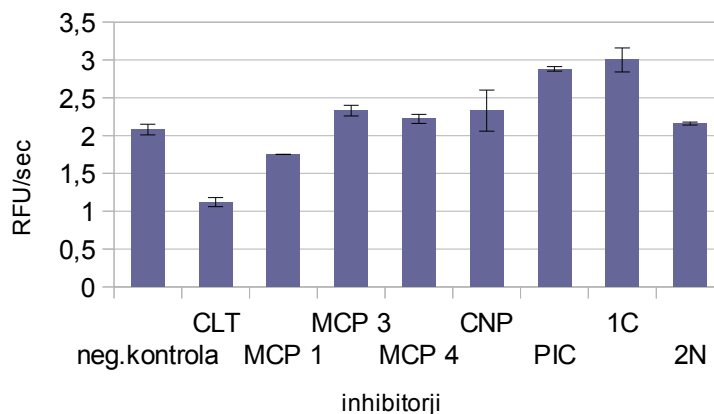
37. Nägler DK, Krueger S, Kellner A, Ziomek E, Menard R, Buhtz P, et al: Upregulation of Cathepsin X in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate* 2004; 60: 109-19.
38. Wang J, Chen L, Li Y, Guan XY: Overexpression of Cathepsin Z contributes to tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE* 2011; 6: e24967.
39. Vizin T, Christensen IJ, Nielsen HJ, Kos J: Cathepsin X in serum from patients with colorectal cancer: relation to prognosis. *Radiol Oncol* 2012; 46: 207-12.
40. Rawlings ND: Peptidase inhibitors in the MEROPS database. *Biochimie* 2010; 92:1463-83.
And <http://merops.sanger.ac.uk/>, povzeto junija 2013
41. Christeller JT: Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS J* 2005; 272: 5710-22.
42. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ: Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J* 2004; 378: 705-16.
43. Brzin J, Rogelj B, Popovič T, Štrukelj B and Ritonja A: Clitocypin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*. *J Biol Chem* 2000; 275: 20104-09.
44. Sabotič J, Galeša K, Popovič T, Leonardi A and Brzin J: Comparison of natural and recombinant clitocypins, the fungal cysteine protease inhibitors. *Protein Expr Purif* 2007; 53: 104-11.
45. Sabotič J, Popovič T, Puizdar V and Brzin J: Macrocypins, a family of cysteine protease inhibitors from the basidiomycete *Macrolepiota procera*. *FEBS J* 2009; 276: 4334-45.
46. Sabotič J, Bleuler-Martinez S, Renko M, Avanzo Caglič P, Kallert S, Štrukelj B, Turk D, Aebi M, Kos J and Kunzler M: Structural basis of trypsin inhibition and entomotoxicity of cospin, a serine protease inhibitor involved in defence of *Coprinopsis cinerea* fruiting bodies. *J Biol Chem* 2012; 287: 3898-07.
47. Renko M, Sabotič J, Mihelič M, Brzin J, Kos J and Turk D: Versatile loops in mycocypins inhibit three protease families. *J Biol Chem* 2010; 285: 308-16.
48. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A: MEROPS the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 2011; 40: D343-50.
49. Oliva ML, Silva MC, Sallai RC, Brito MV, and Sampaio MU: A novel

- subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. *Biochimie* 2010; 92: 1667-73.
50. Kidrič M, Fabian H, Brzin J, Popovič T, Pain RH: Folding, stability, and secondary structure of a new dimeric cysteine proteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 962-67.
51. Galeša K, Thomas RM, Kidrič M, Pain RH: Clitocypin, a new cysteine protease inhibitor, is monomeric: impact on the mechanism of folding. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324: 576-78.
52. Azarkan M, Martinez-Rodriguez S, Buts L, Baeyens-Volant D and Garcia-Pino A. The plasticity of the β -trefoil fold constitutes an evolutionary platform for protease inhibitor. *J Biol Chem* 2010; 286: 43726-34.
53. Sun Y, peng X, Zhang Y, Lv S, Wu W and Wang S: Stability and biological activity of human intestinal trefoil factor produced by *Pichia pastoris*. *Protein Pept Lett* 2008; 15: 255-59.
54. Istinič I, Buh Gašparič M, Sabotič J, Gruden K, Brzin J, Žel J: Uporaba makrocipinov kot pesticidnih učinkovin. SI P-201100304, 2011.
55. Sabotič J, Gaser D, Rogelj B, Gruden K, Štrukelj B and Brzin J: Heterogeneity in the cysteine protease inhibitor clitocypin gene family. *Biol chem* 2006; 387: 1559-66.
56. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ: MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: D160-64.
57. Avanzo P, Sabotič J, Anžlovar S, Popovič T, Leonardi A, Pain RH, Kos J and Brzin J: Trypsin-specific inhibitors from the basidiomycete *Clitocybe nebularis* with regulatory and defensive functions. *Microbiology* 2009; 155: 3971-81.
58. Odani S, Tominaga K, Kondou S, Hori H, Koide T, Hara S, Isemura M, Tsunasawa S: The inhibitory properties and primary structure of a novel serine proteinase inhibitor from the fruiting body of the basidiomycete, *Lentinus edodes*. *Eur J Biochem* 1999; 262: 915-23.
59. Štukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, Slovensko Farmacevtsko Društvo, Ljubljana 2007: 68-90.
60. Invitrogen: *Pichia* Expression Kit: For Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Catalog no. K1710-01 2010: 1-3.
61. Fonović PU, Kos J: Efficient removal of Cathepsin L from active Cathepsin X using immunoprecipitation technique. *Acta Chim* 2009; 56: 985-8

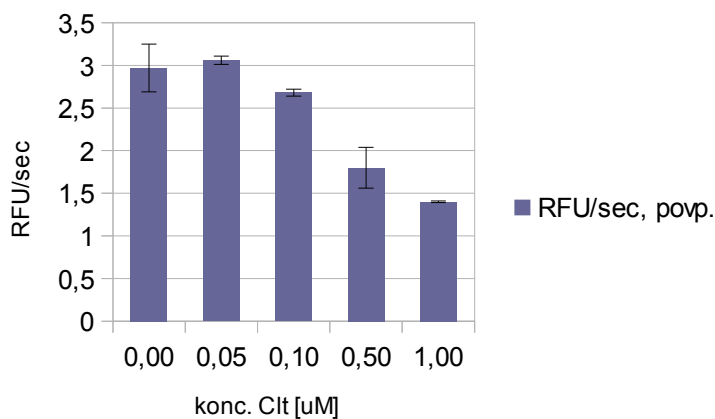
62. Invitrogen: Pichia Expression Kit: For Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Catalog no. K1710-01 2010: 60-65.
63. Invitrogen: Pichia Expression Kit: For Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris*. Catalog no. K1710-01 2010: 54-55.
64. <http://en.wikipedia.org/wiki/Ultrafiltration>, povzeto junija 2013.
65. <http://www.piercenet.com/previews/2013-articles/separation-characteristics-dialysis-membranes/>, povzeto junija 2013.
66. https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314750913712/litdoc71710400AD_20110831025329.pdf, povzeto junija 2013.
67. http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Protein_Quantification/BIORAD_DC_Inst Protein_Assay.pdf, povzeto junija 2013.
68. http://www.fkkt.uni-lj.si/attachments/dsk5644/molekularna_imunologija_-_navodila_za_vaji_3_in_4.pdf, povzeto junija 2013.
69. http://www.carlroth.com/website/de-ch/pdf/Coomassie_E.pdf, povzeto junija 2013.
70. http://bio.ijs.si/~brigita/encimatika/2012_13/Skripta_Encimatika_vaje.pdf, povzeto junija 2013.
71. http://en.wikipedia.org/wiki/Akaike_information_criterion#AICc, povzeto junija 2013.
72. Štukelj B, Kos J: Biološka zdravila: od gena do učinkovine, Slovensko Farmacevtsko Društvo, Ljubljana 2007: 68-106.
73. Dremelj A. Proučevanje vloge katepsina X v celicah raka prostate. Diplomsko delo; FFA, 2011.
74. Renko M, Sabotič J, Turk D: β -Trefoil inhibitors- from the work of Kunitz onward. Biol Chem, 2012; 393: 1043-54.
75. Schlamowitz M, Shaw A, Jackson WT: Limitations of the Dixon plot for ascertaining nature of enzyme inhibition. Tex Rep Biol Med, 1969; 27: 483-8.
76. Cornish-Bowden Athel. A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors. Biochem J 1974; 137: 143-44.

8.PRILOGE:

8.1 Testiranje inhibitorjev na specifičen substrat za katepsin X:



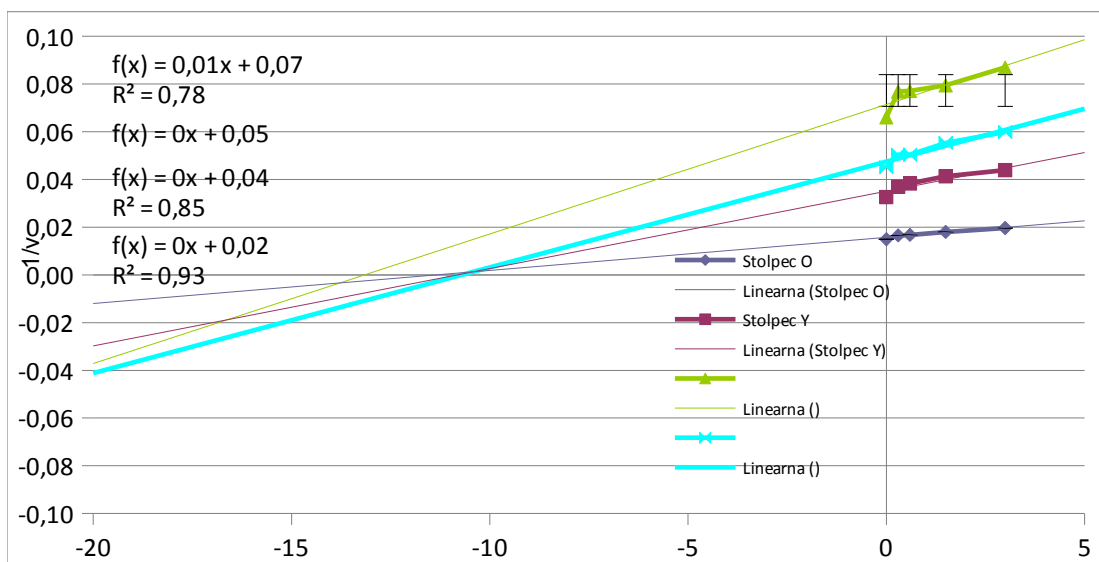
Slika 21: Povprečne vrednosti RFU/sec pri vsakem inhibitorju in standardna napaka, drugo testiranje;



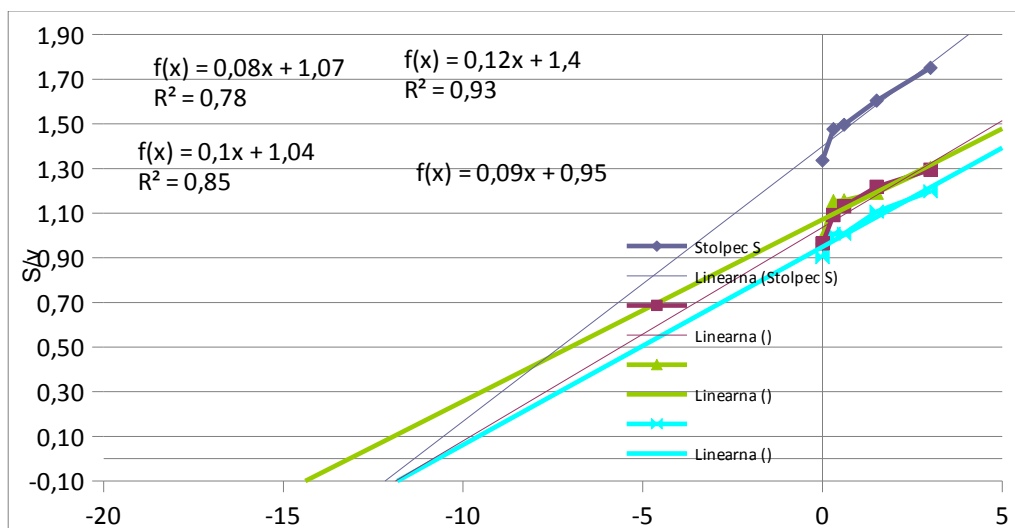
Slika 22: Koncentracijska odvisnost inhibicije katepsina X; povprečne vrednosti RFU/sec s pripadajočo standardno napako; drugo testiranje; koncentracija inhibitorja klitocipina od 50 nM do 1 µM;

8.2 Določanje konstante inhibicije z različnimi koncentracijami substrata

Določanje K_i za Mcp 1, drugo testiranje:

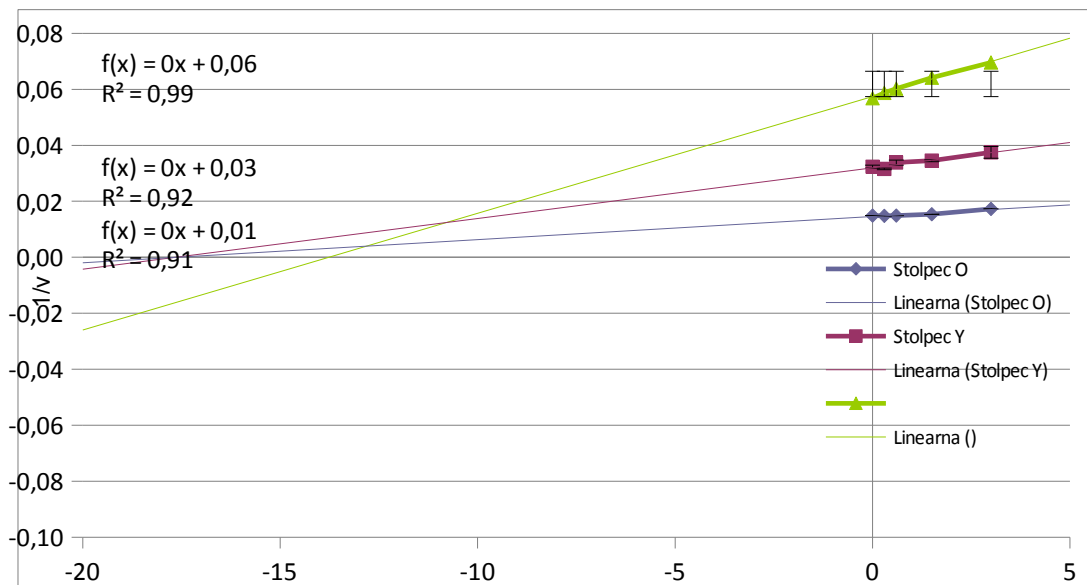


Slika 23: Določanje K_i z grafično metodo po Dixonu: predstavitev encimsko kinetičnih podatkov, s katerimi lahko določimo K_i ; $1/v$ (recipročna vrednost hitrosti) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja (Mcp 1) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke- $c(\text{sub.})=1780 \mu\text{M}$, rdeče točke- $c(\text{sub.})=590 \mu\text{M}$, svetlo modre točke- $c(\text{sub.})=404 \mu\text{M}$, zelene točke- $c(\text{sub.})=300 \mu\text{M}$, drugo testiranje;

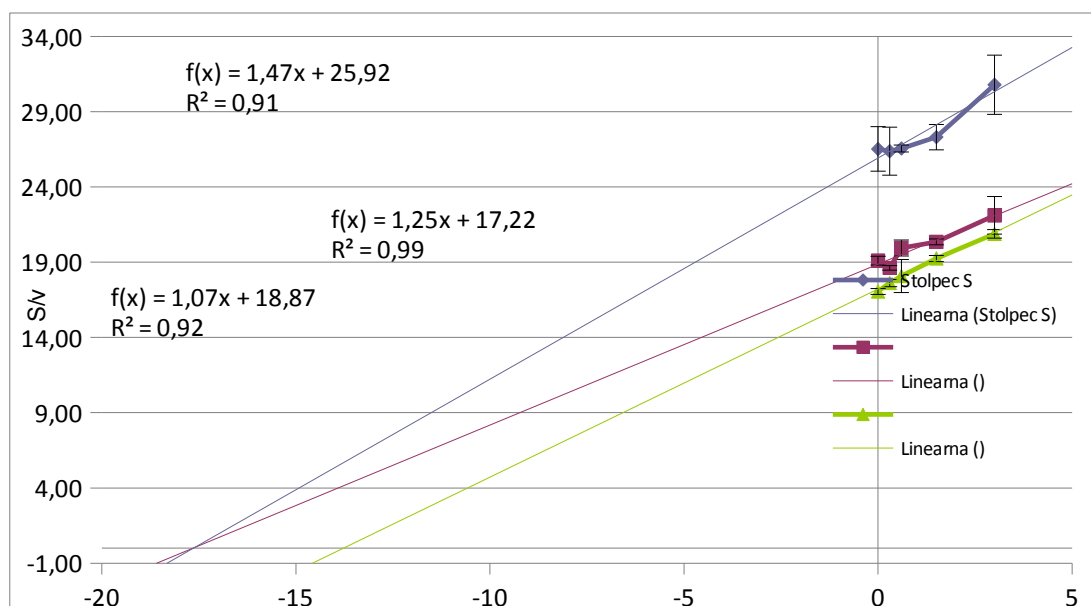


Slika 24: Grafična metoda po Cornish-Bowdnu za določanje K_i in tipa encimske inhibicije; S/v (koncentracija substrata/hitrost) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja ($McpI$) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke- $c(sub.)=1780 \mu M$, rdeče točke- $c(sub.)=590 \mu M$, svetlo modre točke- $c(sub.)=404 \mu M$, zelene točke- $c(sub.)=300 \mu M$, drugo testiranje;

Določanje K_i za Clt, drugo testiranje:



Slika 25: Določanje K_i z grafično metodo po Dixonu: predstavitev encimsko kinetičnih podatkov, s katerimi lahko določimo K_i ; $1/v$ (recipročna vrednost hitrosti) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja (Cl_t) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke- $c(sub.)=1780 \mu M$, rdeče točke- $c(sub.)=590 \mu M$, zelene točke- $c(sub.)=300 \mu M$, drugo testiranje;



Slika 26: Grafična metoda po Cornish-Bowdnu za določanje K_i in tipa encimske inhibicije; S/v (koncentracija substrata/hitrost) v odvisnosti od koncentracije inhibitorja (Cl) pri stalnih koncentracijah substrata: modre točke- $c(sub.)=1780 \mu M$, rdeče točke- $c(sub.)=590 \mu M$, zelene točke- $c(sub.)=300 \mu M$, drugo testiranje;