

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA MEŠKO

**PRIPRAVA REKOMBINANTNEGA KATEPSINA S V *Pichia pastoris* IN
NJEGOVA UPORABA PRI TESTIRANJU ZAVIRALCEV**

MAGISTRSKA NALOGA

**PREPARATION OF RECOMBINANT CATHEPSIN S IN *Pichia pastoris* AND ITS
USE FOR THE TESTING OF INHIBITORS**

MASTER'S THESIS

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo pod mentorstvom prof. dr. Janka Kosa in somentorstvom asist. mag. Urše Pečar Fonović.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Janku Kosu za možnost sodelovanja na področju raziskav katepsinov in za zaupanje pri dodelitvi teme magistrske naloge.

Posebej bi se rada zahvalila somentorici mag. Urši Pečar Fonović za nepogrešljivo in prijazno strokovno pomoč. Hvala za vse nasvete in potrpežljivo posredovanje znanja med delom v laboratoriju in pri pisanju magistrske naloge.

Hvala dr. Ani Lenassi-Zupan s Kemijskega inštituta za pomoč pri elektroporaciji in prof. dr. Michaelu Gütschowu z Univerze v Bonnu za prispevane zaviralce katepsina S.

Lepa hvala vsem sodelavcem Katedre za farmacevtsko biologijo za praktične nasvete in prijetno delovno okolje med raziskovalnim delom.

Hvala staršema in bratu za brezmejno podporo in vzpodbudo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Janka Kosa in somentorice mag. Urše Pečar Fonović.

Maja Meško

Kazalo vsebine

I. POVZETEK.....	iv
II. ABSTRACT	v
III. SEZNAM OKRAJŠAV.....	vi
1. UVOD	1
1.1 PEPTIDAZE	1
1.2 KATEPSINI.....	1
1.3 KATEPSIN S	2
1.3.1 SINTEZA IN DOZOREVANJE KATEPSINA S	3
1.3.2 FIZIOLOŠKA VLOGA KATEPSINA S	3
1.3.3 KATEPSIN S V PATOLOŠKIH PROCESIH	4
1.3 ZAVIRANJE AKTIVNOSTI KATEPSINA S	6
1.3.1 ENDOGENI ZAVIRALCI.....	6
1.3.2 EKSOGENI ZAVIRALCI	7
1.4 IZRAŽANJE REKOMBINANTNEGA KATEPSINA S	8
1.4.1 IZRAŽANJE REKOMBINANTNIH PROTEINOV V KVASOVKI <i>Pichia pastoris</i>	10
2. HIPOTEZA IN NAČRT ZA DELO.....	11
2.1 KLONIRANJE cDNA PROKATEPSINA S	11
2.2 EKSPRESIJA IN DETEKCIJA KATEPSINA S.....	11
2.3 IZOLACIJA IN POTRDITEV AKTIVNOSTI KATEPSINA S.....	12
2.4 TESTIRANJE ZAVIRALCEV	12
2.5 POVZETEK NAČRTA DELA	12
3. MATERIALI IN METODE.....	13
3.1 MATERIALI.....	13
3.1.1 REAGENTI.....	13
3.1.2 KOMPLETI REAGENTOV	14
3.1.3 POMEMBNEJŠA LABORATORIJSKA OPREMA IN NAPRAVE.....	14
3.1.4 ORGANIZMI.....	15
3.1.5 PLAZMIDI.....	15
3.1.6 ENCIMI, PROTITELESA	16
3.1.7 GOJIŠČA	17
3.1.8 OSTALI MATERIALI.....	17
3.2 METODE	20

3.2.1 NAMNOŽITEV ZAPISA ZA PROKATEPSIN S	20
3.2.2 VSTAVITEV ZAPISA ZA PROKATEPSIN S V KLONIRNI VEKTOR pGEM-T Easy ..	23
3.2.3 TRANSFORMACIJA <i>E.coli</i>	23
3.2.4 LIGACIJA V EKSPRESIJSKI VEKTOR pPIC9	25
3.2.5 ELEKTROPORACIJA KVASOVKE <i>P.pastoris</i> GS115	26
3.2.6 EKSPRESIJA PROKATEPSINA S.....	29
3.2.7 IZOLACIJA PROKATEPSINA S IZ GOJIŠČA	31
3.2.8 DOLOČITEV KONCENTRACIJE IN AKTIVNOSTI KATEPSINA S.....	31
3.2.9 TESTIRANJE ZAVIRALCEV	32
4. REZULTATI.....	36
4.1 MOLEKULSKO KLONIRANJE	36
4.1.1 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	36
4.1.2 LIGACIJA V KLONIRNI VEKTOR pGEM-T Easy	36
4.1.3 LIGACIJA V EKSPRESIJSKI VEKTOR pPIC9 IN TRANSFORMACIJA <i>E.coli</i>	37
4.2 ELEKTROPORACIJA <i>P.pastoris</i>	38
4.3 TESTNA EKSPRESIJA.....	39
4.4 EKSPRESIJA V VEČJI KOLIČINI IN IZOLACIJA	40
4.4.1 DOLOČITEV KONCENTRACIJE IN AKTIVNEGA DELEŽA KATEPSINA S.....	42
4.5 TESTIRANJE ZAVIRALCEV	43
4.5.1 TESTIRANJE ZAVIRALCEV KATEPSINA S.....	43
4.5.2 TESTIRANJE ZAVIRALCEV KATEPSINA B	44
5. RAZPRAVA	45
6. SKLEP.....	52
7. LITERATURA.....	53

Kazalo slik

Slika 1: Plazmidna karta vektorja pGEM-T Easy (Promega).....	15
Slika 2: Plazmidna karta vektorja pPIC9 (Invitrogen).....	16
Slika 3: Nukleotidno zaporedje humanega katepsina S (ImaGenes) z označenimi mesti prileganja začetnih nukleotidov na začetku in koncu gena.	21
Slika 4: Produkti verižne reakcije s polimerazo	36
Slika 5: Agarozna gelska elektroforeza – preverjanje ligacije cDNA prokatepsina S v pGEM-T Easy	37
Slika 6: Agarozna gelska elektroforeza – preverjanje prisotnosti zapisa prokatepsina S	37
Slika 7: Agarozna gelska elektroforeza – preverjanje vstavitve cDNA prokatepsina S v pPIC9	38
Slika 8: Pregled fenotipa transformant <i>P.pastoris</i> z verižno reakcijo s polimerazo.....	39
Slika 9: Pregled testne ekspresije z barvanjem s srebrom nitratom (klona S4 in S6), časovne točke od 0 do 93 ur.....	40
Slika 10: Elucijski profil prokatepsina S	41
Slika 11: Pregled različnih frakcij s prenosom western.....	41
Slika 12: Začetna hitrost reakcije v odvisnosti od koncentracije E-64 pri stalni koncentraciji substrata.....	42
Slika 13: Začetna hitrost reakcije v odvisnosti od razmerja med koncentracijo zaviralca in encima ($[Z]/[E]$).....	42
Slika 14: Začetna hitrost reakcije v odvisnosti od dodatka različnih koncentracij zaviralcev – katepsin S	43
Slika 15: Začetna hitrost reakcije v odvisnosti od dodatka različnih koncentracij nitroksolina.	44
Slika 16: Začetna hitrost reakcije v odvisnosti od dodatka različnih koncentracij zaviralcev – katepsin B.....	44
Slika 17: Restriksijska mesta linearnega vektorja pGEM-T Easy.....	47

Kazalo preglednic

Preglednica I: Reakcijska mešanica za reakcijo PCR.....	22
Preglednica II: Reakcijska mešanica za vstavev procatS v pGEM-T Easy	23
Preglednica III: Reakcijska mešanica za restrikcijo procatS/pGEM-T Easy oz. pPIC9	24
Preglednica IV: Reakcijska mešanica za vstavev zapisa za prokatepsin S v pPIC9	25
Preglednica V: Reakcijska mešanica za restrikcijo procatS/pPIC9	25
Preglednica VI: Pogoji za elektroporacijo <i>P.pastoris</i>	27
Preglednica VII: Reakcijska mešanica za reakcijo PCR	28
Preglednica VIII: Priprava vzorcev testne ekspresije za NaDS-PAGE.....	29
Preglednica IX: Koncentracije testiranih zaviralcev katepsina S	33
Preglednica X: Koncentracije testiranih zaviralcev katepsina B	33
Preglednica XI: Strukture testiranih zaviralcev katepsina S in katepsina B.....	34

I. POVZETEK

Katepsin S je cisteinska proteaza, ki ima v organizmu ključno vlogo pri pravilnem delovanju specifičnega imunskega odziva. Poleg razgrajevanja imunogenih proteinov sodeluje tudi pri zorenju molekul histokompatibilnostnega kompleksa tipa II in je tako potreben v procesu predstavitve antigenov limfocitom T CD4+. Povečano aktivnost katepsina S so povezali z mnogimi bolezenskimi stanji, predvsem z avtoimunskimi boleznimi in rakom. Ker je iskanje njegovih zaviralcev v zadnjem času vse večjega pomena tudi v farmacevtski industriji, smo želeli pridobiti zadostno količino aktivnega katepsina S za testiranje zaviralne aktivnosti spojin Gü 2149, Gü 2458 ter nitroksolina.

V okviru magistrskega dela smo uspešno klonirali cDNA človeškega prokatepsina S ter rekombinantni protein izrazili v ekspresijskem sistemu seva *GS115* metilotrofne kvasovke *Pichia pastoris*. Kot ekspresijski vektor smo uporabili pPIC9, ki omogoča izražanje proteinov pod kontrolo močno inducibilnega promotorja za alkoholno oksidazo ob prisotnosti metanola. cDNA prokatepsina S smo v genom kvasovke vnesli z elektroporacijo. Rekombinantni prokatepsin S se je v neaktivni obliki izločal v gojišče, od koder smo ga izolirali s pomočjo ionsko-izmenjevalne kromatografije in ga aktivirali z inkubacijo na 37°C v prisotnosti DTT. Uspešnost izolacije smo preverili s pomočjo NaDS-PAGE ter prenosa western. Koncentracijo aktivnega katepsina S smo določili s spektrofotometrično metodo in s titracijo aktivnega mesta z zaviralcem E-64. Določili smo koncentracijo 13,3 µM, končni izplen pa je znašal 0,55 mg/l kulture.

Analize aktivnosti rekombinantnega katepsina S so pokazale, da smo pridobili zadostno količino aktivnega proteina za testiranje zaviralnega delovanja molekul Gü 2149, Gü 2458 in nitroksolina. Testiranje zaviralcev je pokazalo najvišjo stopnjo zaviranja v primeru Gü 2458, ki je zavrl aktivnost katepsina S že v nizkih nanomolarnih koncentracijah (10 nM). Visoko stopnjo zaviranja smo opazili tudi v primeru Gü 2149, ki je zmanjšal aktivnost katepsina S ob dodatku višjih nanomolarnih koncentracij (50-100 nM). Oba sta se izkazala kot selektivna zaviralca katepsina S v primerjavi s katepsinom B. Rezultati našega dela so pokazali tudi, da nitroksolin v nizkih mikromolarnih koncentracijah ne vpliva bistveno na aktivnost katepsina S.

II. ABSTRACT

Cathepsin S is a cysteine protease, known for its role in the proper function of the adaptive immune system. In addition to degradation of immunogenic proteins it is involved in the MHC class II antigen presentation. Its increased activity has been linked to various diseases, mostly autoimmune disorders and cancer. Recently it has drawn attention as a potential drug target what has led to the searching of its selective inhibitors. Our goal was to obtain active recombinant cathepsin S which would allow us to evaluate the potential inhibitory action of compounds Gü 2149, Gü 2458 and nitroxoline.

We have successfully cloned a cDNA coding for human procathepsin S and the recombinant protein was expressed in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, strain GS115. We used pPIC9 vector for extracellular expression under the control of strong inducible AOX promoter in the presence of methanol. Integration of the gene into yeast chromosome was achieved by electroporation. Recombinant procathepsin S was secreted to the medium in inactive form and purified by ion-exchange chromatography. Since it is capable of autoactivation, it was activated by incubation at 37°C in the presence of DTT. Purified cathepsin S was analyzed by SDS-PAGE and western blotting. The concentration of obtained protein was determined by spectrophotometry ($\epsilon = 78250 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) and by active-site titration with E-64, irreversible inhibitor. The concentration was 13,3 μM and the yield 0,55 mg/l culture.

Activity assays have shown that sufficient amount of active cathepsin S was obtained for testing of selected compounds. The highest degree of inhibition was observed for Gü 2458, which was found to inhibit cathepsin S in the range of low nanomolar concentrations (10 nM). High level of inhibition was observed also in the case of Gü 2149, which reduced the activity of cathepsin S in nanomolar concentrations (50-100 nM). Both compounds were shown to be selective for cathepsin S, showing no effect on the activity of cathepsin B. Our results also show that the activity of cathepsin S remains practically unchanged in the presence of low micromolar concentrations of nitroxoline.

III. SEZNAM OKRAJŠAV

A_{280} – absorbanca pri 280 nm

bp – bazni par

BSA – goveji serumski albumin

catB – katepsin B

catS – katepsin S

cDNA – komplementarna DNA

dH₂O – destilirana voda

DNA – deoksiribonukleinska kislina

DMSO – dimetilsulfoksid

DTT - ditiotreitol

EDTA – etilendiamintetraoetna kislina

HRP – hrenova peroksidaza

IPTG – izopropil β -D-tiogalaktozid

NaDS – natrijev dodecil sulfat

NaDS-PAGE – poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS

OD₆₀₀ – optična gostota pri 600 nm

PCR (polymerase chain reaction) - verižna reakcija s polimerazo

RFU – relativna enota fluorescence

TEMED – N,N,N',N'- tetrametiletildiamin

Tris – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propanol

X-gal – 5-bromo-4-kloroindol-3-il- β -D-galaktopiranozid

[E] – molarna koncentracija encima

[Z] – molarna koncentracija zaviralca

1. UVOD

1.1 PEPTIDAZE

Peptidaze so encimi, ki katalizirajo ireverzibilno razgradnjo peptidne vezi in imajo pomembno vlogo v mnogih fizioloških procesih ter pri zagotavljanju homeostaze. Na podlagi aminokislinskega preostanka v aktivnem mestu encima, ki določa nukleofilno skupino, razdelimo peptidaze v 8 skupin z različnimi mehanizmi katalitskega delovanja. To so serinske, cisteinske, treoninske peptidaze ter glutamatne, aspartatne in metaloproteaze. Prav tako obstajajo peptidaze z mešanim ter neznanim mehanizmom katalize. (1)

Klasifikacijski sistem MEROPS razdeli peptidaze glede na evolucijsko podobnost in stopnjo podobnosti v aminokislinskem zaporedju na družine, skupine sorodnih družin pa so združene v klane glede na podobnosti v strukturi proteinov in mehanizmu katalize. (1)

1.2 KATEPSINI

Večina katepsinov spada med cisteinske peptidaze in so razvrščeni v družino CA1 – papainu podobne peptidaze. V človeškem genomu je zapis za vsaj 11 različnih cisteinskih katepsinov, ki jih označujemo s črkami (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W, X). Katepsin G ima v aktivnem mestu serin, katepsina D in E pa sta aspartatni peptidazi. Večinoma delujejo kot endopeptidaze, kar pomeni, da katalizirajo razgradnjo peptidne vezi znotraj polipeptidnih verig proteinov. Izjemi sta le katepsina C in X, ki imata eksopeptidazno aktivnost ter katepsina B in H, ki izkazujeta tako endo- kot eksopeptidazno aktivnost. (1)

(2)

Katepsini so pomembne regulatorne in signalne molekule v številnih procesih, kot so zagotavljanje ravnotežja med sintezo in razgradnjo proteinov, procesiranje antigenov v imunskem sistemu ter preoblikovanje kostnega tkiva z osteoklasti. Udeleženi so v različnih proteolitskih kaskadah in neravnovesje v njihovem izražanju lahko vodi do različnih bolezenskih stanj, kot so avtoimunske bolezni, kronična vnetja, artritis in diabetes. (3) Za

večino predstavnikov družine katepsinov velja, da so najbolj aktivni v pH območju med 4,5 in 6,5 in v reducirajočem okolju, zato se v aktivni obliki večinoma nahajajo v lizosomih ali endosomih. Velika večina se jih konstitutivno izraža v vseh tkivih, izjema je omejeno tkivno specifično izražanje katepsinov K, S in W. To dejstvo nakazuje, da imajo bolj specifične vloge v posameznih tkivih. (2)

Čeprav natančen mehanizem vpletenosti še ni znan, so številne raziskave potrdile vlogo cisteinskih katepsinov pri rakavih obolenjih. Pogosto so povečano aktivnost zaznali v zgodnjih stopnjah razvoja bolezni. Vpliv posameznih katepsinov so v različnih raziskavah preučevali na mišjih modelih z zmanjšanjem ravni izražanja (izbijanje genov) ali z zmanjševanjem aktivnosti posameznih katepsinov (povečano izražanje endogenih zaviralcev, vnos sintetiziranih zaviralcev) in ugotovili, da vplivajo na rast, migracijo in sposobnost metastaziranja tumorskih celic. Pri tumorskih celicah pogosto pride tudi do translokacije katepsinov na celično membrano ali izločanja v medceličnino. Motnje v fiziološkem ravnovesju med katepsini in njihovimi endogenimi zaviralci lahko vodijo do nenadzorovanega razgrajevanja proteinov v medceličnini (laminin, kolagen tipa IV, proteini, ki so pomembni za celično adhezijo), kar lahko olajša migracijo tumorskih celic. (2) (3)

1.3 KATEPSIN S

Katepsin S (catS, oznaka gena *CTSS*) so najprej odkrili v bezgavkah ter ga prvič izolirali iz vranice. (4) Uvrščamo ga v poddružino katepsinu L-podobnih katepsinov, saj največ podobnosti med ostalimi katepsini izkazuje s katepsinom L, s katerim ga povezuje 49% homolognosti v aminokislinskem zaporedju. Njegov genski zapis se nahaja na kromosomu 1q21. (5)

Izraža se v profesionalnih antigen predstavitvenih celicah, kamor uvrščamo makrofage, limfocite B in dendritične celice. Najdemo ga tudi v neprofesionalnih antigen predstavitvenih celicah, kot so celice črevesnega endotelija. Najvišje stopnje izražanja so zaznali v bezgavkah, vranici in alveolarnih makrofagih, odkrit pa je bil tudi v endoteliju žil in v gladkih mišičnih celicah žil, v celicah glie v možganih, črevesju, ščitnici ter v celicah pigmentnega mrežničnega epitelija. (4) (6)

1.3.1 SINTEZA IN DOZOREVANJE KATEPSINA S

Zrel katepsin S je monomeren neglikozilirani encim velikosti 24 kDa. Sintetizira se kot preproencim. Po odcepitvi pre-regije se transportira v Golgijev aparat, kjer poteče fosforilacija in se vzpostavijo disulfidne vezi med Cys126-Cys224, Cys136-Cys180, Cys170-Cys213 in Cys272-Cys320. Poteče tudi vezava manoze-6-fosfata na edino glikozilacijsko mesto v proteinu, ki se nahaja na proregiji (Asn104), kar usmeri protein v lizosome, kjer se shrani kot neaktiven proencim velikosti 37 kDa. Propeptid namreč substratom ovira dostop do aktivnega mesta in deluje kot intrinzični zaviralec aktivnosti. Do aktivacije pride po avtokatalitski proteolizi N-terminalnega peptida (98 aminokislin med mestoma 16-114), ki je lahko delno katalizirana s strani drugih peptidaz. (3) (4)

Znano je, da se dozorevanje katepsina S razlikuje od ostalih cisteinskih proteaz, pri katerih avtokataliza poteče le pri nizkih pH vrednostih. Vasiljeva in sod. so uspeli dokazati, da je katepsin S sposoben tudi avtokatalitske odcepiteve propeptida pri nevtralnem pH (pH=7,5) ob prisotnosti dekstran sulfata. (7) Že prisotnost signalnega peptida kaže, da nahajanje katepsina S ni omejeno le na znotrajcelično okolje in dejstvo, da do aktivacije lahko pride tudi pri višjih pH vrednostih izven lizosomov, podpira širšo vlogo katepsina S v bioloških procesih.

1.3.2 FIZIOLOŠKA VLOGA KATEPSINA S

V normalnih fizioloških pogojih katepsin S z ostalimi katepsini sodeluje pri razgradnji znotrajceličnih proteinov v lizosomu, ima pa tudi specifične funkcije. Od ostalih katepsinov se loči po tem, da je stabilen tudi pri nevtralnem pH, kar pomeni, da je lahko aktiven tudi izven lizosomov. (8) V medceličnini katalizira razgradnjo zunajceličnih proteinov, kot so elastin, kolagen, fibronektin in laminin ter sodeluje v preoblikovanju medceličnine. (4)

Poleg tega je njegova aktivnost izrednega pomena pri delovanju imunskega sistema. Poleg razgrajevanja endocitiranih proteinov do antigenov sodeluje pri zorenju molekul glavnega histokompatibilnostnega kompleksa tipa II (MHC II) v limfocitih B, dendritičnih celicah in makrofagih. (3) (9) (10) MHC II so heterodimerne molekule, ki jih izražajo antigen

predstavitvene celice in so ključne za sprožitev specifičnega imunskega odziva. Nahajajo se znotraj celice in vežejo antigene, ki izvirajo iz izvenceličnih proteinov, ter jih izpostavijo na membrani. Tam jih lahko prepoznajo limfociti T CD4+, ki se po vezavi aktivirajo in sprožijo imunski odziv. Vezavno mesto za antigene na MHC II pred aktivacijo pokriva invariantna veriga, ki preprečuje nespecifično vezavo antigenov. Znano je, da je katepsin S ključnega pomena pri zadnjem koraku večstopenjske razgradnje invariantne verige do fragmenta CLIP, ki se s pomočjo molekul HLA-DM v vezavnem mestu izmenja z antigenom in sproži potovanje na celično membrano. (10) V miših z izbitim genom za katepsin S so opazili močno zmanjšano hitrost predstavitve antigenov in kljub temu, da so miši imele normalno število limfocitov T in B, niso bile sposobne normalnega imunskega odziva, saj so imele v primerjavi s kontrolno skupino pomembno znižano koncentracijo protiteles IgG. (11) Delovanje katepsina S je torej nujno potrebno za začetek procesa predstavitve antigenov in posledično sprožitev specifičnega imunskega odziva.

1.3.3 KATEPSIN S V PATOLOŠKIH PROCESIH

Raziskave kažejo, da je neravnovesje med izražanjem katepsina S in zaviranjem njegove aktivnosti povezano s številnimi bolezenskimi procesi. Največ pozornosti je v zadnjem času namenjene vlogi katepsina S pri raku. Povečano izražanje katepsina S so namreč odkrili v tumorskih celicah raka pljuč in prostate, v astroцитomih in glioblastomu. (3) (12) Tudi s tumorji povezani makrofagi pogosto izločajo aktiven katepsin S. (2)

Verjetni mehanizmi protumorskega delovanja katepsina S v medceličnini so povezani z razgrajevanjem izvenceličnih proteinov laminina, kolagena, elastina ter proteinov, ki sodelujejo pri celični adheziji. S tem je neposredno olajšana invazija rakavih celic, poleg tega pride do aktivacije proencimov in rastnih faktorjev, ki spodbudijo tumorsko rast. (2) Na mišjem modelu raka trebušne slinavke so Wang in sod. dokazali vpliv katepsina S na sposobnost angiogeneze v tumorjih prek razgradnje laminina, pri čemer se sproščajo faktorji, ki spodbujajo angiogenezo. Po drugi strani pa razgrajuje faktorje, ki se sproščajo pri razgradnji kolagena tipa IV ter zavirajo angiogenezo, kar torej dodatno spodbuja angiogenezo v rakavih celicah in je ključnega pomena za njihovo rast. (13)

Povišano izražanje katepsina S pri glioblastomu je bilo povezano s slabšo prognozo bolnikov. (3) Vendar so Kos in sod. pri raziskovanju vloge katepsina S pri pljučnem raku ugotovili nasprotno, saj je bila prognoza boljša pri bolnikih s povišanimi vrednostmi katepsina S v tumorskem tkivu in celicah pljučnega parenhima. (12) To nakazuje, da bi bila njegova vloga pri raku, bolj kot samo z razgrajevanjem medceličnine, lahko povezana predvsem z modulacijo imunskega odziva. Morebitne okvare mehanizma predstavitve antigenov bi lahko pripomogle k pobegu tumorskih celic izpod kontrole limfocitov T.

Patološko razgrajevanje kolagena in elastina v medceličnini so povezali tudi z začetno fazo razvoja ateroskleroze. V pregledu novejših raziskav Liu in sod. navajajo, da je prisotnost katepsina S nujen faktor pri začetku preoblikovanja arterijskih žilnih sten, saj z razgradnjo elastinskih vlaken poveča prehajanje monocitov v intimo žilne stene in njihovo diferenciacijo v makrofage. (14) Pomembno vlogo predstavlja tudi proteoliza izvenceličnega holesterolskega receptorja pre β -HDL, ki je odgovoren za odstranjevanje holesterola iz makrofagov. Lindstedt in sod. so v študiji potrdili, da inkubacija omenjenega receptorja s katepsinom S močno zmanjša njegovo aktivnost in s tem spodbudi nastanek ti. penastih celic. (15)

Raziskave so osredotočene tudi na vlogo katepsina S v avtoimunskih boleznih, kjer so zaznali povišano izražanje pri bolnikih z revmatoidnim artritisom, multiplo sklerozo in Sjögrenovim sindromom. (4) (16) Schönefuss in sod. so raziskovali vlogo katepsina S v avtoimunskih dermatoloških boleznih in odkrili, da se specifično izraža v keratinocitih bolnikov z luskavico. (17) Te raziskave kažejo na smiselnost razvoja zaviralcev aktivnosti katepsina S v različnih patologijah, ki so povezane z nepravilnim oz. pretiranim odzivom imunskega sistema, kot so avtoimunske bolezni, astma in težave pri transplantacijah. (18)

Povišane koncentracije katepsina S so odkrili tudi v možganih bolnikov z Alzheimerjevo boleznijo. (19) Munger in sod. so v študiji primerjali vplive povečanega izražanja katepsinov B, D, L in S na nastanek amiloida β iz transmembranskega β -amiloid prekursorskega proteina v lizosomih. Ugotovili so, da je samo v primeru katepsina S prišlo do povečanja količine amiloida β , ki je glavna komponenta amiloidnih plakov. (20) Raziskuje se tudi njegova vloga pri nevropatski bolečini, saj naj bi bil vpleten v vzdrževanje vnetja nevronov. Katepsin S cepi fraktalkin, ki je v fizioloških pogojih vezan

na membrane nevronov, po cepitvi pa spodbuja vnetje in aktivira celice mikroglie, kar povzroči kronično nevropatsko bolečino. (21) (22) (23)

Katepsin S naj bi bil vpleten tudi v metabolne bolezni. Pri bolnikih z diabetesom tipa 2 so odkrili povišane vrednosti serumskega katepsina S in raziskovali povezavo s pojavom odpornosti na inzulin. Ugotovljeno je bilo, da katepsin S ni neposredno povezan z odpornostjo, vendar natančen mehanizem povezave še ni znan. (24) (25) Več študij je potrdilo povišan serumski katepsin S tudi v primeru debelosti, kjer se izraža v adipocitih belega maščobnega tkiva. (26) (27)

1.3 ZAVIRANJE AKTIVNOSTI KATEPSINA S

Ker lahko neželjeno delovanje izven lizosomov povzroči organizmu škodo, je aktivnost katepsinov natančno nadzorovana že na nivoju transkripcije in translacije. Tudi po aktivaciji so proteaze nadzorovane prek kombinacije več dejavnikov. Pomemben dejavnik aktivnosti cisteinskih katepsinov predstavlja pH vrednost okolja, saj so večinoma najbolj stabilni in izkazujejo najvišjo stopnjo aktivnosti pri nizkih vrednostih pH, kar omejuje njihovo delovanje na mikrookolje znotrajceličnih veziklov. Prav tako se tiolne skupine cisteina v nereducirajočem okolju izven lizosomov hitro oksidirajo, s čimer se zmanjša sposobnost proteolize. Delovanje proteolitičnih encimov iz družine katepsinov je zato v veliki večini omejeno na okolje znotraj lizosomov. Vendar pa se katepsin S v tem nekoliko razlikuje od ostalih katepsinov, saj izkazuje večjo stabilnost in aktivnost tudi pri nevtralnem pH. (18)

1.3.1 ENDOGENI ZAVIRALCI

Najpomembnejši dejavnik pri omejevanju aktivnosti cisteinskih proteaz je prisotnost endogenih zaviralcev, ki prek vezave na različna mesta encima reverzibilno preprečijo proteolitično funkcijo. Njihov pomen je izražen predvsem, ko se katepsini znajdejo izven omejenih celičnih razdelkov, kot so lizosomi in endosomi. Zaviralci se nahajajo v citoplazmi in v medceličnici v visokih koncentracijah, ki močno presegajo koncentracijo proteaz, ter ščitijo celice in tkiva pred neželenim delovanjem proteaz. Najobsežnejšo skupino endogenih zaviralcev predstavljajo cistatini, ki so prisotni tako znotraj celic kot v

medceličnini in so kompetitivni inhibitorji cisteinskih proteaz. Znotrajcelične cistatine, ki se nahajajo v citosolu (cistatin A in B) imenujemo tudi stefini in jih uvrščamo v tip I. Izven celic pa se nahajajo cistatini tipa II (cistatin C) ter kininogeni (tip III), ki so prisotni v krvnem obtoku. (18) (28)

1.3.2 EKSOGENI ZAVIRALCI

Odkritje, da so cisteinske proteaze povezane z različnimi patološkimi procesi, je privedlo do povečanega zanimanja za iskanje učinkovitih selektivnih zaviralcev posameznih proteaz. Aktivnost katepsina S lahko nadzorujemo na različnih nivojih, posledično so lahko zaviralci katerekoli molekule, ki bodisi zavirajo prepisovanje gena (represorji), vplivajo na prevajanje mRNA (protismerni oligonukleotidi) ali pa vplivajo na aktivnost zrelega encima (peptidni ali nepeptidni zaviralci). (29) Glavne skupine zaviralcev cisteinskih katepsinov predstavljajo spojine z elektrofilnimi skupinami, ki kovalentno interagirajo s cisteinom v aktivnem mestu. (30) Njihova uporabnost sega od orodja za analizo kinetike encimskih reakcij do raziskovanja substratov in uporabe v diagnostiki ter ciljanem zdravljenju.

E-64 (*trans*- epoksi sukcinil-L-levcilamido-(4-gvanidino)-butan), ki so ga iz izolirali iz kulture *Aspergillus japonicus*, je bil prvi odkrit ireverzibilni peptidni zaviralec cisteinskih proteaz. Del molekule, ki omogoča kovalentno vezavo na cisteinske proteaze, je epoksidni obroč, ki tvori tioetersko vez s tiolno skupino v aktivnem mestu proteaz. (31) Struktura E-64 je služila kot spojina vodnica pri razvoju specifičnih epoksidnih zaviralcev, med drugim tudi pri razvoju CA-074 (L-3-*trans*-(propilkarbamoiloksiran-2-karbonil)-L-izolevcin-L-prolin), ki je *in-vitro* uporaben specifični zaviralec katepsina B. (32) Čeprav E-64 učinkovito zavira cisteinske katepsine, pa ne zadosti potrebi po zaviralcih, ki bi specifično prepoznavali ter omogočali razlikovanje med biološkimi funkcijami posameznih katepsinov. Razvoj novih specifičnih zaviralcev je olajšalo razkritje kristalne strukture katepsina S. McGrath in sodelavci so pripravili kompleks katepsina S z vezanim zaviralcem in s pomočjo kristalne strukture kompleksa so odkrili nekoliko večji vezavni žep S2 v primerjavi s podobnimi katepsini, kar je pomembno pri načrtovanju strukture selektivnih zaviralcev. (33)

Iskanje novih zaviralcev proteaz najpogosteje temelji na sintezi spojin, ki posnemajo peptidno zaporedje naravnih substratov, vendar so odporne na proteolitično delovanje encima. S tem pristopom so odkrili vinil sulfonske zaviralce, ki se selektivno kovalentno vežejo na cisteinske proteaze. (34) V to skupino sodi tudi LHVS, ki se uporablja kot selektivni zaviralec katepsina S. (35) Uporabo zaviralcev iz te skupine v terapiji otežuje dejstvo, da gre za ireverzibilno vezavo, kar poveča verjetnost, da bo kompleks encima z vezanim zaviralcem predstavljal neznan antigen za imunski sistem. Pogosto lahko težavo predstavlja tudi prebitek v koncentraciji, ki povzroči vezavo podobnih tarč. To močno zmanjša specifičnost vezave in vpliva na ozko terapevtsko okno. (36)

Pogosta težava sintetiziranih nizkomolekularnih zaviralcev je prenos učinkovitosti iz *in vitro* testiranj, saj obstaja manj dokazov o učinkovitosti v *in vivo* študijah. Pri tem je potrebno upoštevati, da je katepsin S aktiven tako znotraj kot tudi izven celic. (2) Iskanje novih zaviralcev katepsina S v farmacevtski industriji je usmerjeno k molekulam, ki so sposobne selektivne vezave v aktivno mesto katepsina S in učinkujejo že v nizkih koncentracijah. Idealni zaviralec je sposoben reverzibilne vezave pri fizioloških pogojih *in vivo* ter nima neželenih stranskih učinkov, povezanih z neselektivno vezavo. Novejše strategije iskanja zaviralcev vključujejo tudi specifična protitelesa proti katepsinu S, katerih glavna prednost je visoka selektivnost vezave, ki zmanjša obseg neželenega delovanja na podobne proteaze. (37) Trenutno so v različnih fazah predkliničnih in kliničnih študij zaviralci katepsina S za uporabo pri zdravljenju luskavice in revmatoidnega artritisa. (30)

1.4 IZRAŽANJE REKOMBINANTNEGA KATEPSINA S

Priprava rekombinantnih proteinov v gostiteljskih celicah nam omogoča pridobivanje večjih količin pravilno zviti in aktivnih proteinov. Večje količine očiščenih proteinov potrebujemo za raziskovanje strukture, aktivnosti in biološke vloge posameznih proteinov, vedno bolj pa se uveljavljajo tudi kot biološka zdravila v farmaciji. Medtem, ko je za nekatere predstavnike katepsinov (npr. B, L, H) značilno, da se konstitutivno izražajo v tkivih in organih, kar omogoča izolacijo, pa tkivno specifično izražanje katepsina S ne omogoča pridobivanja večjih količin proteina, potrebnega za raziskave (38) Kljub temu v vseh primerih velja, da je pridobivanje rekombinantnih proteinov bolj zaželeno kot

izolacija iz živalskih in človeških tkiv, saj se s tem izognemo etičnim zadržkom in nevarnosti okužbe, ki so povezani z izolacijo živalskih in človeških proteinov. Na tak način se izognemo tudi prisotnosti sorodnih encimov v sledovih, ki pogosto ostanejo po čiščenju in lahko motijo študije. Tehnologija rekombinantne DNA nam omogoča tudi razvoj modificiranih proteinov z izboljšanimi lastnostmi.

Med najpogosteje uporabljene ekspresijske sisteme uvrščamo bakterijske seve *E.coli*, katerih prednosti so predvsem nezahtevno gojenje in hitra rast. Vendar pa prekomerno izražanje proteinov pogosto vodi do tvorbe netopnih agregatov oz. inkluzijskih telesc, kar zahteva dodatne korake, s katerimi protein denaturiramo in mu omogočimo pravilno zvitje. Rekombinantni človeški prokatepsin S so uspešno izrazili v *E.coli* z visokimi izpleni aktivnega proteina, ki znašajo 2-14 mg/l kulture. (38) (39) V primeru katepsina S so, tako kot za številne cisteinske proteaze, ugotovili, da je izplen večji, če protein izrazimo v obliki proencima. (38) (40) Kramer in sod. so dosegli kar dvakrat večji izplen aktivnega katepsina S, če so pred zvitjem v presežku dodali nativni propeptid katepsina S, s čimer so tudi potrdili ključno vlogo propeptida pri pravilnem zvitju. (41)

Tudi celice kvasovk se pogosto uporabljajo za izražanje, saj imajo vse prednosti bakterij (nezahtevno gojenje, poceni gojišča), hkrati pa so kot evkarionti sposobne vseh posttranslacijskih modifikacij višjih organizmov. Katepsin S so uspešno izrazili v kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*, končni izplen je znašal 0,17 mg/l kulture. (42)

Insektne in sesalske celice omogočajo pripravo proteinov z vsemi značilnostmi nativnih proteinov (fosforilacija, glikozilacija, tvorba disulfidnih vezi), vendar je proces priprave bolj zahteven in dražji. Zato najpogosteje služijo za raziskave znotrajceličnih vlog proteinov ter se v manjši meri uporabljajo za pripravo večjih količin rekombinantnih proteinov. Rekombinantni mišji in podganji katepsin S, pripravljen s pomočjo bakulovirusov v insektnih celicah *Sf9*, so uspeli pripraviti z izpleni, višjimi od 1 mg/l kulture (38) V celicah *Sf9* so izrazili tudi človeški rekombinantni katepsin S z visokim izplenom (45-50 mg/l celične kulture) ter pasji in opičji rekombinantni katepsin S. (43) (44) Katepsin S je bil izražen tudi v hrčkovih ledvičnih celicah (*BHK-21*), opičjih ledvičnih celicah ter v človeških embrionalnih ledvičnih celicah (*HEK 293*). (45) (46)

1.4.1 IZRAŽANJE REKOMBINANTNIH PROTEINOV V KVASOVKI *Pichia pastoris*

Kvasovka *P.pastoris* je v zadnjem času zelo pogosto uporabljen organizem za izražanje rekombinantnih proteinov. Uvrščamo jo med metilotrofne kvasovke, kar pomeni, da je sposobna presnove metanola, ki ga lahko uporablja kot edini vir ogljika. Proces presnove je večstopenjski in v njem sodeluje več encimov. V genomu *P.pastoris* najdemo dva gena, ki kodirata encim alkoholno oksigenazo (AOX) - *AOX1* in *AOX2*. *AOX1* je odgovorna za večino presnove metanola v celicah. Čeprav homologni gen *AOX2* izkazuje kar 97% podobnosti, pa ima encim *AOX2* občutno manjšo sposobnost presnove metanola in fenotip kvasovke, ki izraža samo *AOX2*, v gojiščih z metanolom raste vidno počasneje. Ta fenotip označimo kot Mut^S (Methanol ut^li^li^za^ti^on sl^ow), medtem ko fenotip z običajno sposobnostjo uporabe metanola označimo kot Mut⁺. (47) Ker encim izkazuje nizko afiniteto do kisika, mora kvasovka to nadomestiti s sintezo večjih količin AOX. Izražanje je inducirano v prisotnosti metanola, ki je nujno potreben dejavnik za izražanje gena. Ob prisotnosti metanola kot induktorja tako posledično pride do intenzivne sinteze encima, močan promotor AOX pa je zelo uporaben tudi za usmerjanje izražanja rekombinantnih proteinov. (48)

2. HIPOTEZA IN NAČRT ZA DELO

Namen magistrskega dela je pripraviti količino aktivnega katepsina S, ki nam bo omogočala testiranje zaviralcev in bo na voljo raziskovalni skupini fakultete za nadaljnje raziskave. Z izborom optimalnih pogojev za kloniranje, ekspresijo in izolacijo bomo poskušali dobiti čim večjo količino aktivnega proteina. Predpostavljamo, da z uporabo kvasovke *Pichia pastoris* lahko pripravimo zadostno količino aktivnega katepsina S. Nadalje predvidevamo, da sintezni zaviralci, ki so bili razviti za vezavo v aktivno mesto katepsina S, zmanjšajo njegovo aktivnost. Rekombinantni katepsin S bomo pripravili po načrtu, opisanem v naslednjih podpoglavjih.

2.1 KLONIRANJE cDNA PROKATEPSINA S

Na začetku bomo s pomočjo znanega zaporedja zapisa za človeški prokatepsin S načrtovali začetne oligonukleotide za reakcijo PCR. Po pomnoževanju z reakcijo PCR bomo zapis vstavili v klonirni vektor pGEM-T Easy. Z njim bomo transformirali bakterijo *E.coli* in s pomočjo modro-belega testa in restrikcijske analize izbrali ustrezne klone, iz katerih bomo izolirali pripravljen in pomnožen vektor. Iz transformiranih klonov *E.coli* bomo pripravili tudi trajne kulture. Zapis za prokatepsin S bomo nato preklonirali v ekspresijski vektor kvasovke *P.pastoris* pPIC9. Po restrikcijski analizi bomo pregledali tudi pravilnost zaporedja. Z elektroporacijo bomo zapis za prokatepsin S v vektorju pPIC9 (procatS/pPIC9) vnesli v genom *P.pastoris*.

2.2 EKSPRESIJA IN DETEKCIJA KATEPSINA S

Določili bomo fenotip dobljenih klonov *P.pastoris* na ploščah MM/MD in z reakcijo PCR ter izbrali kandidate za testno ekspresijo. Detekcijo prokatepsina S v vzorcih po testni ekspresiji bomo izvedli s pomočjo NaDS-PAGE in barvanjem z barvilom Coomassie brilliant blue ter s srebrovim nitratom, prav tako bomo prokatepsin S določili s pomočjo specifičnih kozjih protiteles proti katepsinu S z metodo prenosa western. Izbrali bomo primerne klone za ekspresijo v večji količini in pripravili tudi trajne kulture.

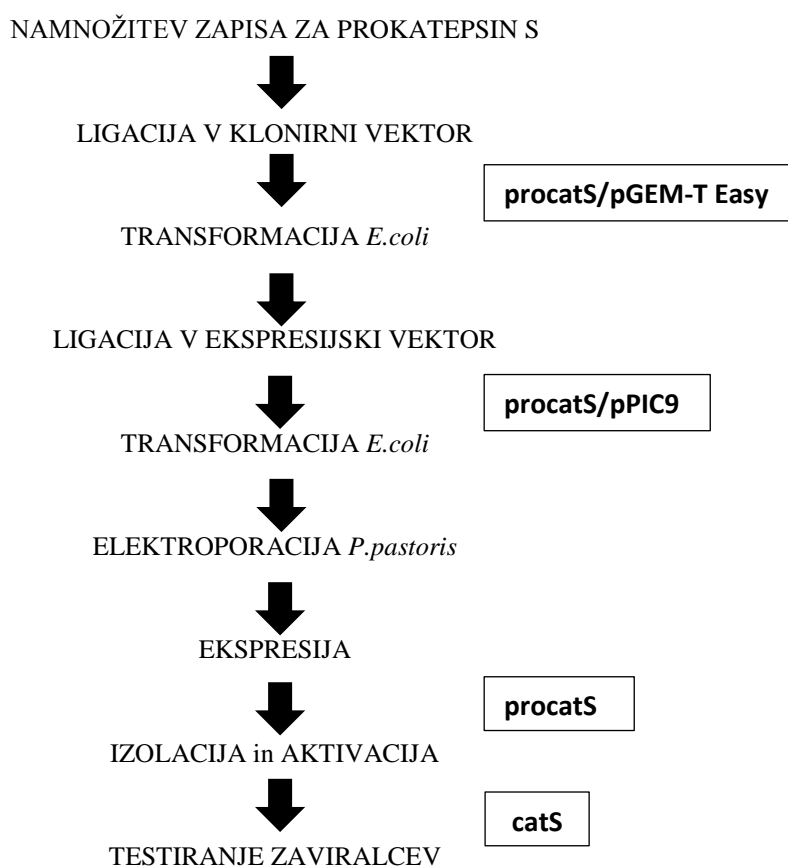
2.3 IZOLACIJA IN POTRDITEV AKTIVNOSTI KATEPSINA S

Optimizirali bomo postopek izolacije prokatepsina S iz gojišča. Izolirani produkt bomo ponovno detektirali z barvilom Coomassie brilliant blue in s prenosom western. Določili bomo koncentracijo dobljenega proteina in delež aktivnega proteina.

2.4 TESTIRANJE ZAVIRALCEV

Dobljeni katepsin S bomo uporabili za testiranje zaviralcev Gü 2149, Gü 2458 in nitroksolina. Za določitev selektivnosti inhibicije katepsina S bomo izvedli tudi preverjanje vpliva Gü 2149 in Gü 2458 na aktivnost katepsina B.

2.5 POVZETEK NAČRTA DELA



3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 REAGENTI

2x PCR Master mix (Fermentas)

2x ligacijski pufer (Promega)

10x ligacijski pufer (Promega)

10x pufer za restrikcijo NEB 3 (New England Biolabs)

agar (Sigma Aldrich)

amonijev persulfat (Fluka)

barvilo Coomassie Brilliant Blue (Fluka)

barvilo SYBR Gold (Life Technologies)

CA-074 (Peptide Institute, Inc.)

dimetilsulfoksid (Sigma Aldrich)

dinatrijev hidrogen fosfat – Na_2HPO_4 (Sigma Aldrich)

DTT (Fluka)

E-64 (Sigma)

EDTA (Sigma Aldrich)

etanol (70%, 96%) (Riedel deHaen)

glicerol, brezvodni (Fluka)

goveji serumski albumin (Sigma Aldrich)

IPTG (Sigma)

LB Broth Base (Life Technologies)

LHVS (darilo Jamesa McKerrowa, UCSF, ZDA)

metanol (Panreac)

mleko v prahu (1,25%, Pomurske mlekarne)

natrijev dihidrogen fosfat dihidrat – $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich)

natrijev dodecil sulfat (Sigma Aldrich)

natrijev hidroksid (Carlo Erba)

natrijev klorid (Carlo Erba)

nitroksolin (Sigma Aldrich)
standard velikosti DNA GeneRuler™ 1kb DNA Ladder #SM0311 (Fermentas)
standard velikosti proteinov SeeBlue® Plus2 (Invitrogen)
substrat za HRP West Dura Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific)
TEMED (Sigma)
X-gal (Calbiochem)
Z-RR-AMC (Calbiochem)
Z-VVR-AMC (Calbiochem)

3.1.2 KOMPLETI REAGENTOV

komplet za izolacijo plazmidne DNA GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma Aldrich)
komplet za izolacijo plazmidne DNA iz agaroznega gela Qiaex II Gel Extraction Kit (Qiagen)
komplet za izolacijo plazmidne DNA iz agaroznega gela Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)
komplet za ligacijo pGEM-T Easy Vector System (Promega)

3.1.3 POMEMBNEJŠA LABORATORIJSKA OPREMA IN NAPRAVE

čitalec mikrotitrskih ploščic, spektrofotometer TECAN Sapphire 2 (Columbus Plus)
naprava za elektroporacijo (BIORAD Gene Pulser)
naprava za NaDS-PAGE (BIO RAD Protean Cell 3)
naprava za prenos western (BIO RAD Laboratories)
naprava za pomnoževanje s polimerazo GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems)
sistem za slikanje gelov G:Box (Syngene)
spektrofotometer NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific)
spektrofotometer Lambda Bio+ (PerkinElmer)
tekočinski kromatografski sistem ÄKTA (GE Healthcare Life Sciences)

3.1.4 ORGANIZMI

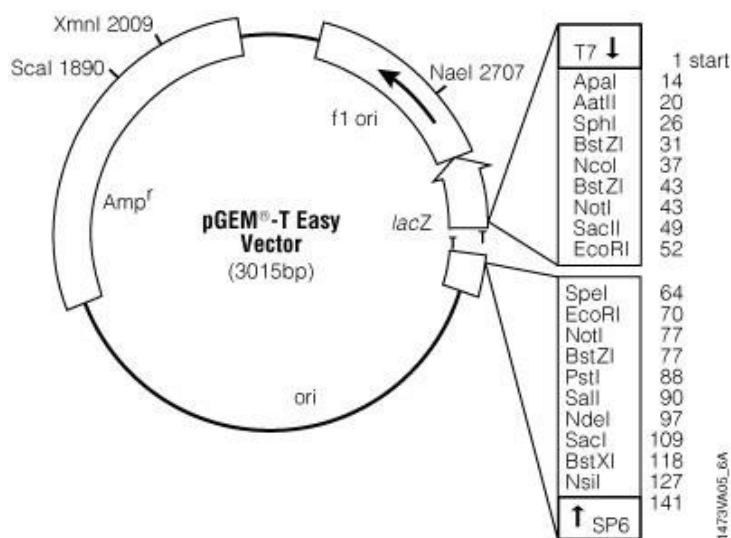
Escherichia coli TOP10 (Invitrogen)

Pichia pastoris GS115 (Invitrogen)

3.1.5 PLAZMIDI

KLONIRNI VEKTOR pGEM-T Easy (Promega)

Vektor pGEM-T Easy se uporablja za hitro vstavljanje produktov verižne reakcije s polimerazo in ne zahteva uporabe restriksijskih encimov. Na voljo je v linearni obliki z dodatkom posameznih timinskih nukleotidov na obeh 3' koncih, ki omogočata vstavitev fragmentov, pomnoženih s polimerazami, ki na 3' konce pripenjajo adeninske nukleotide. Za selekcijo na gojišču vsebuje gen *lacZ*, ki omogoča modro-beli test in gen za odpornost proti ampicilinu.

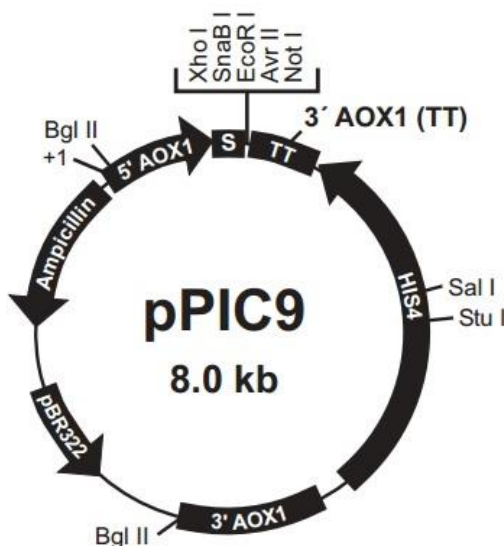


Slika 1: Plazmidna karta vektorja pGEM-T Easy (Promega)

EKSPRESIJSKI VEKTOR pPIC9 (Invitrogen)

Vektor pPIC9 je ekspresijski vektor kvasovke *P.pastoris*, ki se uporablja za izražanje rekombinantnih proteinov direktno v gojišče. Je integracijski vektor, kar pomeni, da ga

pred vnosom lineariziramo, nato pa se preko komplementarnih zaporedij vstavi v kromosom kvasovke. Od izbire restrikcijskih mest je odvisno, ali se bo integriral v lokus *his4* ali *AOX1* ter ali bo do vstavitve prišlo prek insercije ali zamenjave gena. Kot selekcijski gen vsebuje gen *HIS4* za histidinol dehidrogenazo, ki omogoča selekcijo transformiranih klonov na gojišču brez histidina. Pomnoževanje plazmida v *E.coli* in selekcijo na gojišču pa omogočata mesto začetka podvojevanja v *E.coli* pBR322 ter gen za odpornost proti ampicilinu.



Slika 2: Plazmidna karta vektorja pPIC9 (Invitrogen)

3.1.6 ENCIMI, PROTITELESA

NotI - 10000 U/ml (New England Biolabs)

XhoI - 20000 U ml (New England Biolabs)

BglII - 10 U/ml (Fermentas)

SalI - 100 U/μl (Fermentas)

T₄ DNA ligaza - 400000 U/ml (New England Biolabs)

primarna kozja poliklonska protitelesa proti katepsinu S (AF1183, R&D Systems)

sekundarna oslovsko protikozja protitelesa, označena s HRP (SC-2020, Santa Cruz Biotechnology)

3.1.7 GOJIŠČA

GOJIŠČA ZA RAST BAKTERIJSKIH CELIC

gojišče	sestavine in priprava
LB (Luria-Bertani)	1 % (m/V) triptona 0,5 % (m/V) kvasnega ekstrakta, in 1 % (m/V) NaCl. Sterilizirali smo v avtoklavu (121°C, 20 min). Za pripravo trdnih gojišč smo dodali agar (15g/l).
LBA	Gojišču LB smo po avtoklaviranju dodali antibiotik ampicilin (100 mg/ml)
LB + kloramfenikol	Gojišču LB smo po avtoklaviranju dodali antibiotik kloramfenikol (34mg/ml)

GOJIŠČA ZA RAST KVASOVK

Za gojenje kvasovke *P.pastoris* smo uporabljali gojišča YPD, BMGY, BMMY, MD in MM, pripravljena po navodilih proizvajalca (Pichia Expression Kit: For expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*, Invitrogen).

3.1.8 OSTALI MATERIALI

AGAROZNI GEL ZA ELEKTROFOREZO DNA

Za pripravo 0,8 oz. 1% gela smo ustrezno količino agaroze s segrevanjem raztopili v pufru 1x TAE (40 mM Tris, 20 mM etanojska kislina, 1 mM EDTA, pH=8,0).

POLIAKRILAMIDNI GEL ZA ELEKTROFOREZO PROTEINOV

12% LOČEVALNI GEL

sestavina	količina za pripravo 2 gelov
40% akril/bisakrilamid	2,1 ml
1,5 M Tris-HCl (pH=8,8)	1,75 ml
dH ₂ O	2,97 ml
10% NaDS	87,5 µl
10% amonijev persulfat	87,5 µl
TEMED	3 µl

5% KONCENTRACIJSKI GEL

sestavina	količina za pripravo 2 gelov
40% akril/bisakrilamid	0,57 ml
1,5 M Tris-HCl (pH=8,8)	0,59 ml
dH ₂ O	3 ml
10% NaDS	45 µl
10% amonijev persulfat	45 µl
TEMED	4,5 µl

PUFRI

pufer	proizvajalec oz. sestava
100 mM fosfatni pufer, pH= 6,5 (100 ml)	27,8 ml 1 M K ₂ HPO ₄ + 72,2 ml 1 M KH ₂ PO ₄
osnovni pufer za katepsin S	100 mM fosfatni pufer + 0,1% PEG 8000
aktivacijski pufer za katepsin S	osnovni pufer + 5 mM cistein + 1,5 M EDTA
fosfatni pufer PBS (1 l)	KCl (0,2 g) + NaH ₂ PO ₄ (1,44 g) + KH ₂ PO ₄ (0,24 g) + NaCl (8,76 g)
pufer PBST	1x PBS + 0,05% Tween 20

RAZTOPINE ZA BARVANJE S COOMASSIE BRILLIANT BLUE

raztopina za barvanje (500 ml)
5 ml očetne kisline
0,5 g Coomassie Brilliant Blue
20 ml metanola
H ₂ O do 500 ml

raztopina za razbarvanje (200 ml)
60 ml 95% etanola
20 ml očetne kisline
H ₂ O do 200 ml

RAZTOPINE ZA BARVANJE S SREBROM

raztopina za predtretiranje (250 ml)
75 ml 95% etanola
17 g AcONa
H ₂ O do 250 ml
➔ 50 ml te raztopine dodamo 1 ml sveže pripravljenega 10% Na ₂ S ₂ O ₃

raztopina za fiksiranje (250 ml)
100 ml 95% etanola
25 ml očetne kisline
H ₂ O do 200 ml

raztopina za barvanje (50 ml)
625 µl 20% (w/v) AgNO ₃
H ₂ O do 50 ml

raztopina za razvijanje (250 ml)
7,42 g Na ₂ CO ₃
H ₂ O do 250 ml
➔ 50 ml te raztopine dodamo 25 µl 36% formaldehida

3.2 METODE

3.2.1 NAMNOŽITEV ZAPISA ZA PROKATEPSIN S

IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA Z ZAPISOM ZA PROKATEPSIN S

Kupljeni klon z zapisom za prokatepsin S smo na gojišču (LB + kloramfenikol) redčili do posameznih kolonij, ki smo jih nato precepili v 5 ml tekočega gojišča s kloramfenikolom. Iz 3 ml prekonočne kulture smo po navodilih proizvajalca kompleta (GenElute™ Plasmid Miniprep Kit) izolirali plazmidno DNA.

NAČRTOVANJE ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV

Začetna oligonukleotida za pomnoževanje zapisa prokatepsina S z verižno reakcijo s polimerazo smo načrtovali na podlagi nukleotidnega zaporedja prokatepsina S.

```
1 ttagaagaga gccactaat tcaaggactc ttaccgtggg agcaactgct ggttctatca
61 caatgaaacg gctggtttgt gtgctcttgg tgtgctcctc tgcagtggca cagttgcata
121 aagatcctac cctggatcac cactggcatc tctggaagaa aacctatggc aaacaataca
181 aggaaaagaa tgaagaagca gtacgacgtc tcatctggga aaagaatcta aagtttgtga
241 tgcttcacaa cctggagcat tcaatgggaa tgcactcata cgatctgggc atgaaccacc
301 tgggagacat gaccagtgaa gaagtgatgt ctttgatgag ttccctgaga gttcccagcc
361 agtggcagag aaatatcaca tataagtcaa accctaattg gatattgcct gattctgtgg
421 actggagaga gaaaggggtg gttactgaag tgaaatatca aggttcttgt ggtgcttgct
481 gggctttcag tgctgtgggg gccctggaag cacagctgaa gctgaaaaca ggaaagctgg
541 tgtctctcag tgcccagaac ctggtggatt gctcaactga aaaatatgga acaaaggct
601 gcaatgggtg cttcatgaca acggctttcc agtacatcat tgataacaag ggcatcgact
661 cagacgcttc ctatccctac aaagccatgg atcagaaatg tcaatatgac tcaaaatc
721 gtgctgccac atgttcaaag taaactgaac ttccttatgg cagagaagat gtctgaaag
781 aagctgtggc caataaaggc ccagtgtctg ttggtgtaga tgcgcgcat ctttctttct
841 tcctctacag aagtgggtgc tactatgaac catcctgtac tcagaatgtg aatcatgggtg
901 tacttgtggt tggctatggt gatcttaatg ggaagaata ctggcttgtg aaaaacagct
961 ggggccacaa ctttgggtgaa gaaggatata ttcggatggc aagaaataaa ggaaatcatt
```

```

1021 gtgggattgc tagctttccc tcttaccag aaatctagag gatctctcct tttataaca
1081 aatcaagaaa tatgaagcac tttctcttaa ctttaattttt cctgctgtat ccagaagaaa
1141 taattgtgtc atgattaatg tgtatttact gtactaatta gaaaatatag tttgaggccg
1201 ggcacggtgg ctcacgcctg taatcccagt acttgggagg ccaaggcagg catatcaact
1261 tgaggccagg agttaaagag cagcctggct aacatggtga aaccccatct ctactaaaaa
1321 tacaaaaaat tagccgagca cggtggtgca tgctgtaat cccagctact tgggaggctg
1381 aggcacgaga ttccttgaac ccaagagggtt gaggctatgt tgagctgaga tcacaccact
1441 gtactccagc ctggatgaca gagtggagac tctgtttcaa aaaaacagaa aagaaaatat
1501 agtttgattc ttcatttttt taaatttgca aatctcagga taaagtttgc taagtaaatt
1561 agtaatgtac tatagatata actgtacaaa aattgttcaa cctaaaacaa tctgtaattg
1621 cttattgttt tattgtatac tctttgtctt ttaagacccc taatagcctt ttgtaacttg
1681 atggcttaaa aatacttaat aaatctgcca tttcaaattt caaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1741 aaa

```

Slika 3: Nukleotidno zaporedje humanega katepsina S (ImaGenes) z označenimi mesti prileganja začetnih nukleotidov na začetku in koncu gena.

Začetnima oligonukleotidoma smo na 5'-koncu dodali še krajši del nukleotidnega zaporedja, ki ga prepoznavata restriksijska encima XhoI (na 5'-konec zapisa) in NotI (na 3'-konec zapisa), kar nam omogoči ligacijo v ekspresijski vektor. Za prepoznavno mesto za encim XhoI smo dodali tudi zaporedje za signalni peptid *P.pastoris* (α -faktor). To zaporedje je sicer prisotno že v vektorju pPIC9, vendar ga restrikcija z XhoI delno odstrani in v nasprotnem primeru pri ekspresiji ne bi prišlo do izločanja proteina v gojišče. Pred uporabo smo začetne nukleotide raztopili v dH₂O in pripravili raztopine z 10 μ M koncentracijo. Začetna nukleotida:

5'-XhoI-catS: 5'-CCGCTCGAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT AAA CGG CTG GTT TGT GTG C-3'

XhoI signalni peptid *P.pastoris* preprocatS (brez ATG)

3'-NotI-catS: 5'-CAC TGC GGC CGC CTA GAT TTC TGG GTA AGA GGG-3'

NotI STOP preprocatS

POMNOŽEVANJE DNA Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR)

Za reakcijo PCR smo pripravili reakcijsko mešanico s končnim volumnom 25 μ l.

Preglednica I: Reakcijska mešanica za reakcijo PCR

začetni nukleotid 5'Xho-catS	2 μ l
začetni nukleotid 3'Not-catS	2 μ l
plazmidna DNA	0,5 μ l
dH ₂ O	20,5 μ l
<i>skupaj</i>	<i>25 μl</i>

Po 5 min segrevanja na 94°C smo reakcijski mešanici dodali še 25 μ l 2x PCR Master mix, ki vsebuje Taq polimerazo in deoksinukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) v ustreznem pufru z dodatkom MgCl₂. Reakcijo smo izvedli pri standardnih pogojih pomnoževanja:

- vroči začetek (5 min, 94°C)
 - 94°C, 30 s
 - 62°C, 30 s
 - 72°C, 45 s
- } 30 ponovitev
-
- 72°C, 10 min
 - 4°C, ∞

AGARozNA GELSKA ELEKTROFOREZA

Po končani reakciji smo pomnožen zapis za prokatepsin S ločili od preostalih neporabljenih deoksinukleotidov s pomočjo agarozne gelske elektroforeze. Pripravili smo 1% agarozni gel v pufru 1x TAE, na katerega smo nanegli 24 μ l produkta PCR z dodanim barvilom (20 μ l PCR produkta smo zmešali s 4 μ l 6x nanašalnega barvila). Za primerjavo velikosti dobljenega produkta smo na gel nanegli tudi standard velikosti. Po 45 min elektroforeze pri napetosti 100 V smo gel barvali z barvilom SYBR Gold. Pomnoženi fragment smo izrezali iz gela in ga izolirali s kompletom za izolacijo plazmidne DNA iz agaroznega gela po navodilih proizvajalca (Sigma Aldrich).

3.2.2 VSTAVITEV ZAPISA ZA PROKATEPSIN S V KLONIRNI VEKTOR pGEM-T Easy

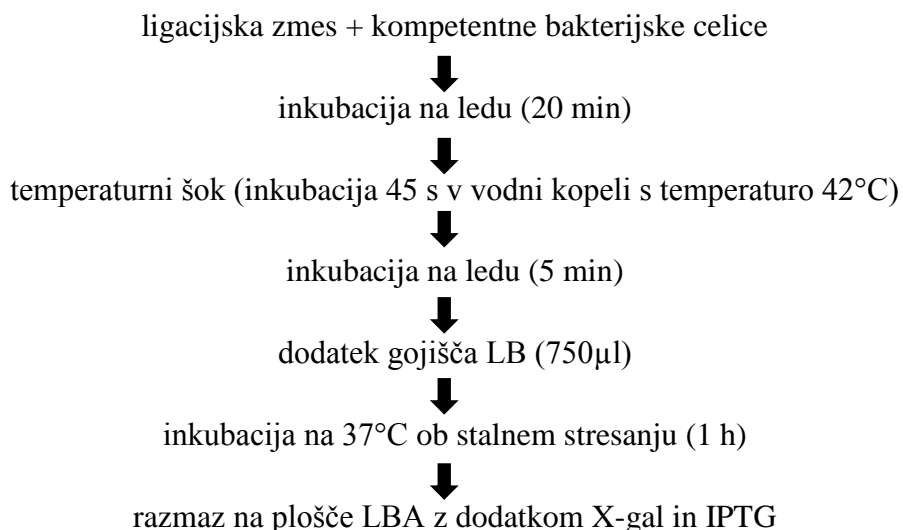
Ligacijo očiščenega fragmenta v klonirni vektor pGEM-T Easy smo izvedli v razmerju 3:1 s pomočjo T₄ DNA ligaze v ustreznem ligacijskem pufru (2h, sobna temperatura).

Preglednica II: Reakcijska mešanica za vstavitev procatS v pGEM-T Easy

plazmid pGEM-T Easy	1 μ l
očiščen fragment procatS	3 μ l
2x ligacijski pufer	5 μ l
T ₄ DNA ligaza (400000 U/ml)	1 μ l
<i>skupaj</i>	<i>10 μl</i>

3.2.3 TRANSFORMACIJA *E.coli*

Za nadaljnje pomnoževanje zapisa za prokatepsin S smo uporabili kompetentne celice *E.coli* sev *TOP10*. Vanje smo vnesli pripravljeni vektor z metodo transformacije s temperaturnim šokom. Uporabili smo 200 μ l zamrznjenih bakterijskih celic, ki smo jih odvajali na ledu in 30 μ l ligacijske zmesi. Transformacijo smo izvedli po naslednjih korakih:



MODRO-BELI TEST

Ustrezne kolonije, ki vsebujejo vektor z zapisom za prokatepsin S, smo izbrali s pomočjo modro-belega testa. Transformirane bakterijske celice smo razmazali na plošče LBA, na katere smo 1 uro pred tem razmazali 100 μ l mešanice za modro-beli test. Za pripravo mešanice smo gojišču LB (638 μ l) dodali 2% raztopino X-gal (191 μ l) in 1M IPTG (20,4 μ l). X-gal je substrat za β -galaktozidazo in po hidrolizi tvori produkt, ki je obarvan modro, IPTG pa se uporablja kot induktor izražanja β -galaktozidaze v *E.coli*. V primerih, kjer je prišlo do vstavitve zapisa v poliklonsko mesto vektorja pGEM-T Easy, je zapis prekinil zaporedje gena *lacZ*, ki kodira α -regijo encima β -galaktozidaze. Tako je nastal nefunkcionalen encim, ki ni cepil X-gal in kolonije, ki so vsebovale zapis za prokatepsin S, so ostale bele barve.

RESTRIKCIJSKA ANALIZA

Prisotnost zapisa za prokatepsin S v klonirnem vektorju smo preverili tudi z restrikcijsko analizo z encimoma XhoI in NotI. Restrikcija je potekala 2 uri na 37°C, produkte smo nato ločili z elektroforezo na 1% agaroznem gelu (45 min, 100 V) in jih izolirali iz gela. Poleg preverjanja uspešnosti ligacije, smo z restrikcijo na enak način pripravili fragment za vstavev v ekspresijski vektor pPIC9 ter pPIC9, katerega pa smo inkubirali 4 ure.

Preglednica III: Reakcijska mešanica za restrikcijo procatS/pGEM-T Easy oz. pPIC9

izolirana DNA procatS/pGEM-T Easy oz. vektor pPIC 9	10 μ l
XhoI (20000 U/ml)	1 μ l
NotI (10000 U/ml)	1 μ l
10x ligacijski pufer NEB 3	2 μ l
100x BSA	0,2 μ l
dH ₂ O	5,8 μ l
<i>skupaj</i>	<i>20 μl</i>

PRIPRAVA TRAJNIH KULTUR *E.coli*

Za pripravo trajnih kultur smo zmešali 750 μl transformiranih bakterijskih celic in 250 μl glicerola, jih zamrznili v tekočem N_2 ter shranili na -80°C .

3.2.4 LIGACIJA V EKSPRESIJSKI VEKTOR pPIC9

Za ligacijo v ekspresijski vektor pPIC9 smo z restrikcijskima encimoma XhoI in NotI predhodno pripravili lepljive konce zapisa in vektorja, ki omogočajo združitve zapisa z lineariziranim vektorjem. Uporabili smo zapisa za prokatepsin S, pomnožena na dva različna načina – z reakcijo PCR in v klonirnem vektorju. Ligacija je potekala 16 ur na 16°C .

Preglednica IV: Reakcijska mešanica za vstavitve zapisa za prokatepsin S v pPIC9

pPIC9, rezan z XhoI in NotI	10 μl
procatS, rezan z XhoI in NotI	10 μl
10x ligacijski pufer	2,5 μl
T ₄ DNA ligaza (400000 U/ml)	1 μl
dH ₂ O	1,5 μl
<i>skupaj</i>	<i>25 μl</i>

Bakterijo *E.coli* TOP10 smo transformirali po enakem postopku, kot je opisan pod 5.2.3. Izolirali smo plazmidno DNA ter uspešnost ligacije pregledali na 1% agaroznem gelu z elektroforezo (45 min, 100 V), za kar smo plazmid predhodno linearizirali z restrikcijskima encimoma BglII in SalI. Uspešnost ligacije smo preverili tudi z reakcijo PCR, ki smo jo izvedli enako kot v 5.2.1.

Preglednica V: Reakcijska mešanica za restrikcijo procatS/pPIC9

procatS/pPIC9	22 μl
restrikcijski encim (BglIII oz. SalI)	5 μl
pufer O	3 μl
<i>skupaj</i>	<i>30 μl</i>

Pred ekspresijo je potrebno preveriti pravilnost nukleotidnega zaporedja, zato smo naročili analizo zaporedja (MWG Operon). Pripravili smo trajne kulture procatS/pPIC9 v *E.coli* TOP10 po enakem postopku, kot je opisan v 5.2.3. Določili smo tudi koncentracijo vektorja z vstavljenim zapisom procatS/pPIC9 na UV-spektrofotometru NanoDrop.

3.2.5 ELEKTROPORACIJA KVASOVKE *P.pastoris* GS115

Zmrznjene celice kvasovke *P.pastoris* GS115 smo odtajali in nacepili v 5 ml tekočega gojišča YPD ter stresali 48 ur na 30°C.

Za pripravo novih trajnih kultur smo gojili kvasovke v 5 ml gojišča ter jih med stresanjem inkubirali čez noč na 30°C. Nato smo izmerili OD₆₀₀ in kulture ustrezno redčili z gojiščem YPD, ki je vseboval 15% glicerola do OD₆₀₀=75 ter jih zamrznili v tekočem N₂.

Vektorja procatS/pPIC9 in pPIC9 smo skoncentrirali z metodo obarjanja DNA. V obeh primerih smo DNA dodali 1/10 volumna 3 M Na-acetata (pH=5,2) in 2,5-kraten volumen ledenega absolutnega etanola. Mešanico smo pustili čez noč na -20°C in naslednji dan centrifugirali 20 min na 4°C in maksimalnem številu obratov. Oborjeno DNA, ki je ostala na dnu mikrocentrifugirke, smo sprali z 1 ml 70% etanola in ponovno centrifugirali 10 min pri enakih pogojih. Nato smo DNA posušili na zraku in resuspendirali v 22 µl dH₂O brez prisotnosti nukleaz (Invitrogen).

LINEARIZACIJA EKSPRESIJSKEGA VEKTORJA procatS/pPIC9 s SalI in BglII

Pred elektroporacijo je potrebno ekspresijski vektor linearizirati. Za linearizacijo smo izbrali restrikcijska encima BglII in SalI in restrikcijo izvedli na enak način, kot je navedeno v Preglednici V. Poleg procatS/pPIC9 smo linearizirali tudi prazen pPIC9 kot negativno kontrolo pri kasnejši ekspresiji. Uspešnost restrikcije smo pregledali z agarozno gelsko elektroforezo (1% gel, 100 V, 1h), iz gela izolirali linearizirane plazmide in jih raztopili v 20 µl dH₂O. Od tega smo za elektroporacijo shranili 10 µl linearizirane DNA.

PRIPRAVA ELEKTROKOMPETENTNIH CELIC *P.pastoris* IN ELEKTROPORACIJA

Kolonijo s trdnega gojišča YPD smo precepili v 10 ml tekočega gojišča YPD in čez noč stresali na 30°C. Naslednji dan smo 100 µl kulture precepili v 500 ml tekočega YPD in

ponovno inkubirali čez noč na 30°C do ustrezne OD₆₀₀ (1,3 do 1,5). Kulturo z ustrežno OD₆₀₀ smo centrifugirali (2x250 ml), sprali z vodo in ledenim sorbitolom po navodilih proizvajalca (Invitrogen) ter na koncu suspendirali v 600 µl 1M sorbitola. Celice smo do elektroporacije hranili na ledu.

Elektroporacijo smo izvedli na Kemijskem inštitutu na elektroporatorju Gene Pulser (Bio-Rad). Z električnim pulzom smo začasno porušili strukturo lipidnega dvosloja celičnih membran, kar je omogočilo prehod pripravljenega plazmida v celico. Elektrokompetentnim celicam (80 µl) smo dodali lineariziran vektor (10 µl). Po 5 min inkubacije na ledu smo celice izpostavili električnemu pulzu. Za vse vzorce smo uporabili enake pogoje.

Preglednica VI: Pogoji za elektroporacijo P.pastoris

čas elektroporacije	8,3- 8,5 ms
napetost	150 kV
upor	200 Ω
kapaciteta	25 µF

Takoj po elektroporaciji smo dodali 1 ml 1M sorbitola in razmazali kolonije na trdna gojišča MD v alikvotih 300 µl, 200 µl in 100 µl. V 2-3 dneh inkubacije na 30°C so zrasle kolonije uspešno transformiranih kvasovk.

DOLOČANJE FENOTIPA TRANSFORMANT

Fenotip smo določali z opazovanjem različne hitrosti rasti transformant na gojiščih z različnimi viri ogljika. Za določitev smo uporabili trdni gojišči MM (vsebuje metanol kot vir ogljika) in MD (vsebuje glukozo kot vir ogljika). S konico nastavka za pipeto smo zajeli manjšo količino kolonije in se najprej dotaknili MM in nato še MD plošče ter primerjali hitrost rasti kolonij.

Za določanje fenotipa kolonij smo uporabili tudi reakcijo PCR, kot je opisana v priložniku za izražanje proteinov v *P.pastoris* (Pichia Expression Kit). Metoda temelji na dokazovanju prisotnosti gena *AOX1* v kolonijah z uporabo začetnih oligonukleotidov 5'-*AOX1* in 3'-*AOX1*. V primeru fenotipa Mut⁺ transformante vsebujejo omenjeni gen, kar

omogoča njegovo pomnožitev. To lahko po elektroforezi zaznamo na gelu kot lisa velikosti približno 2200 bp, poleg tega se v primeru transformant z uspešno vključenim fragmentom zelenega proteina na gelu pojavi tudi lisa, ki ustreza velikosti rekombinantnega proteina, podaljšana za približno 492 bp. Pri transformantah fenotipa Mut^S se pojavi samo lisa, ki predstavlja rekombinantni protein. (49)

Za pripravo vzorcev smo se dotaknili kolonije z nastavkom za pipeto in jo prenesli v 20 µl 0,02 M NaOH ter inkubirali 20 min na sobni temperaturi. Po 2 min centrifugiranja pri maksimalnem številu obratov smo 10 µl supernatanta prenesli v čisto mikrocentrifugirko in kuhali v vreli vodi 7 min.

Za reakcijo PCR smo pripravili 12,5 µl reakcijske mešanice z naslednjo sestavo:

Preglednica VII: Reakcijska mešanica za reakcijo PCR

začetni nukleotid 5' AOX1	1 µl
začetni nukleotid 3' AOX1	1 µl
pripravljeni vzorec DNA iz kolonij	5 µl
dH ₂ O	5,5 µl
<i>skupaj</i>	<i>12,5 µl</i>

Po 5 min segrevanja na 94°C smo reakcijski mešanici dodali še 12,5 µl 2x PCR Master mix. Reakcijo smo izvedli pri naslednjih pogojih pomnoževanja:

- vroči začetek (5 min, 98°C)
 - 94°C, 1 min
 - 55°C, 1 min
 - 72°C, 1 min
- } 30 ponovitev
-
- 72°C, 10 min
- 4°C, ∞

Produkte reakcije PCR smo pregledali z elektroforezo na 1% agaroznem gelu (1h, 100 V).

3.2.6 EKSPRESIJA PROKATEPSINA S

TESTNA EKSPRESIJA

Izbrane klone smo pred indukcijo izražanja precepili v 25 ml gojišča BMGY in inkubirali med stresanjem čez noč na 30°C, dokler niso dosegle optične gostote $OD_{600}= 2-6$ ter jih centrifugirali (3000×g, 5 min). Celice smo resuspendirali v gojišču BMMY do končne $OD_{600}=1$, s čimer smo sprožili izražanje prokatepsina S, ki je prav tako nadzorovano prek promotorka gena *AOX*.

Določili smo časovne točke, v katerih smo jemali vzorce (start, 19h, 28h, 44h, 51h, 68h, 75h in 93h). Vsakih 24 ur smo dodali metanol do 0,5 % volumna gojišča. Za vzorčenje smo vzeli 1 ml posameznega klona in centrifugirali 3 min pri maksimalnem številu obratov. Supernatant (gojišče) in usedlino (celice) smo ločeno zamrznili v tekočem N₂ in shranili na -80°C.

PREGLED TESTNE EKSPRESIJE

Produkte testne ekspresije smo pregledali s pomočjo NaDS-PAGE, ki nam omogoča ločitev predhodno denaturiranih proteinov po velikosti. Uporabili smo 12% ločevalni gel in 5% koncentracijski gel. Vzorce smo pred nanosom pripravili po naslednji shemi ter jih 5 min kuhali v vreli vodi.

Preglednica VIII: Priprava vzorcev testne ekspresije za NaDS-PAGE

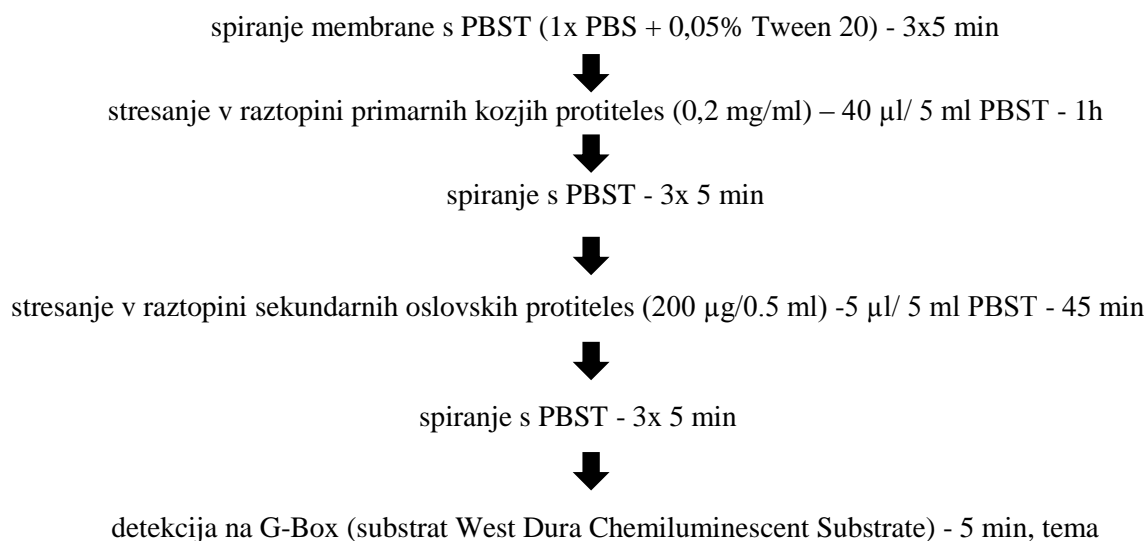
vzorec	20 µl
nanašalni pufer	10,6 µl
DTT	5,4 µl

Elektroforeza je potekala 1 uro pri 100 V, kot standard velikosti smo uporabili SeeBlue[®] Plus2. Po razvijanju smo gel barvali z barvilom Coomassie brilliant blue. Po 1 uri barvanja med rahlim stresanjem smo večkrat dodali tekočino za razbarvanje, dokler se ni gel razbarval in so ostale vidne le lise, ki označujejo proteine.

Zaradi slabega obarvanja smo vzorce pregledali tudi s pomočjo barvanja s srebrom, ki omogoča zaznavanje nižjih koncentracij proteinov. Na gelu smo najprej izvedli fiksiranje proteinov (30 min) in predtretiranje (30 min). Po trikratnem spiranju z dH₂O (3x5 min), smo gel v temi barvali z raztopino srebrovega nitrata (20 min) in nato razvijali (5 min) ter ponovili trikratno spiranje z dH₂O.

DETEKCIJA PROKATEPSINA S

Detekcijo prokatepsina S smo izvedli z metodo prenosa western s kozjimi poliklonskimi IgG protitelesi proti katepsinu S. Po končani elektroforezi smo izvedli prenos na nitrocelulozno membrano, ki je potekal 2 uri na sobni temperaturi ter stalnem toku 60 mA v pufru za prenos. Po prenosu smo membrano najprej inkubirali 1 uro v 5% raztopini posnetega mleka v PBS ob rahlem stresanju, nato pa sledili naslednjemu postopku:



EKSPRESIJA V VEČJI KOLIČINI

Ekspresijo smo izvedli enako kot testno. Potekala je 75 ur v treh erlenmajericah v skupnem volumnu gojišča 1200 ml. Uporabili smo klon S6.

3.2.7 IZOLACIJA PROKATEPSINA S IZ GOJIŠČA

Po končani ekspresiji smo kulturo dvakrat odcentrifugirali (3000×g, 10 min) in supernatant desetkrat skoncentrirali (ultrafilter Amicon, membrana 10 kDa). Sledila je dializa v pufru 100 mM Na acetat (pH= 4,5) + 5 mM EDTA, ki smo jo izvedli trikrat. Za izolacijo smo uporabili tekočinski kromatografski sistem ÄKTA in kolono s kationskim izmenjevalcem Hi Prep SP XL 16/10. Pred nanosom smo vzorec ponovno centrifugirali (10000×g, 10 min).

Zbirali smo frakcije po 10 ml in shranili nevezano frakcijo proteinov, ki se je iz kolone sprala z vezalnim pufrom ter vezano frakcijo proteinov, ki smo jo eluirali po uvedbi gradienta ionske moči (0 – 100%, 10 CV). Shranjene frakcije smo združili in skoncentrirali z ultrafiltrom. Prokatepsin S smo aktivirali ob dodatku DTT do končne koncentracije 5 mM s 40 min inkubacijo na 37°C.

Detekcijo encima smo izvedli enako kot pri testni ekspresiji z NaDS-PAGE ter prenosom western.

3.2.8 DOLOČITEV KONCENTRACIJE IN AKTIVNOSTI KATEPSINA S

Koncentracijo dobljenega katepsina S smo najprej določili z merjenjem absorbance pri 280 nm na UV-spektrofotometru NanoDrop v treh paralelkah, upoštevali smo ekstinkcijski koeficient katepsina S ($\epsilon = 78250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

METODA TITRACIJE AKTIVNEGA MESTA Z ZAVIRALCEM

Delež aktivnosti katepsina S smo določili z metodo titracije aktivnega mesta z zaviralcem E-64 na mikrotitrskih ploščah. Pripravili smo 100 nM encim, pri čemer smo izhajali iz koncentracije, ki smo jo določili spektrofotometrično. Uporabili smo različne koncentracije zaviralca od 10 do 200 nM, tako da je bilo razmerje med [Z]/ [E] med 0 in 2. Osnovne raztopine E-64, ki smo jih uporabljali za redčenje, so vsebovale DMSO. Ta lahko vpliva na rezultat meritev, zato smo vzorcem, ki smo jih redčili v aktivacijskem pufru, dodali DMSO, da so vse raztopine vsebovale enako končno količino DMSO. Kot

negativno kontrolo smo uporabili aktivacijski pufer brez encima, kot pozitivno pa encim brez dodanega zaviralca.

Katepsin S smo najprej aktivirali v aktivacijskem pufru (5 min, 37°C) in mu nato dodali 80 µl zaviralca E-64 različnih koncentracij. Preostalo aktivnost encima smo merili s pomočjo dodatka 5 µl substrata Z-VVR-AMC (200 µM), ki smo ga dodali po 20 min inhibicije in takoj začeli z merjenjem fluorescence vzorcev na čitalcu Tecan pri valovni dolžini ekscitacije 365 nm ter emisije 440 nm.

S pomočjo merjenja fluorescence smo spremljali razliko v hitrosti reakcije v prisotnosti različnih koncentracij zaviralca in brez dodatka zaviralca, količnik obeh vrednosti pa nam je podal podatek o aktivnosti encima. Z metodo linearne regresije smo dobili graf odvisnosti aktivnosti od razmerja $[Z]/[E]$. Presečišče te premice z abscisno osjo nam poda razmerje med $[Z]/[E]$, ko je hitrost reakcije enaka 0, kar pomeni, da je takrat ves aktiven encim inhibiran in je torej koncentracija aktivnega encima točno enaka poznani koncentraciji zaviralca. Glede na rezultate prvega merjenja smo izbrali 5 koncentracij zaviralca v linearnem območju in ponovili meritve.

3.2.9 TESTIRANJE ZAVIRALCEV

ZAVIRANJE AKTIVNOSTI KATEPSINA S

Testirali smo zaviralno aktivnost petih spojin. Zaviralca Gü 2149 ter Gü 2458 sta bila razvita v laboratoriju prof. dr. Michaela Gütschowa (Univeza v Bonnu). Nitroksolin je sicer uveljavljena učinkovina za zdravljenje bakterijskih okužb, prepoznan pa je bil tudi kot zaviralec katepsina B, zato smo želeli preveriti njegov vpliv na aktivnost katepsina S. Spojini E-64 ter LHVS smo uporabili kot kontrolna zaviralca, saj E-64 zavira cisteinske proteaze, LHVS pa je selektivni zaviralec katepsina S.

Vsa testiranja zaviralcev katepsina S smo izvedli s 70 nM encimom v aktivacijskem pufru, z izjemo nitroksolina, kjer smo uporabili 30 nM encim. Encim smo najprej inkubirali 5 min v aktivacijskem pufru ter nato dodali zaviralec. Encim in zaviralec smo inkubirali 60 min na sobni temperaturi in nato dodali substrat Z-VVR-AMC (končna koncentracija v reakciji

10 μM) ter takoj merili fluorescenco vzorcev na čitalcu Tecan. Meritve smo izvajali pri valovni dolžini ekscitacije 365 nm ter emisije 440 nm.

Na mikrotitrsko ploščo smo pri vseh meritvah nanесли kot slepo kontrolo aktivacijski pufer brez encima, kot pozitivno pa katepsin S brez zaviralca. Negativno kontrolo za primerjavo stopnje inhibicije je predstavljal vzorec katepsina S z dodanim E-64. Uporabili smo koncentracije zaviralcev, ki so predstavljene v preglednici.

Preglednica IX: Koncentracije testiranih zaviralcev katepsina S

<i>zaviralec</i>	<i>uporabljena koncentracija</i>
LHVS	3 nM in 10 nM
Gü 2149	50 nM in 100 nM
Gü 2458	10 nM in 50 nM
nitroksolin	10 μM , 50 μM in 100 μM
E-64	10 μM

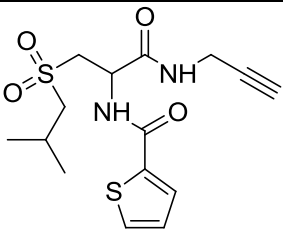
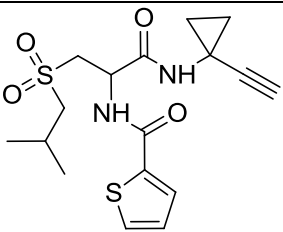
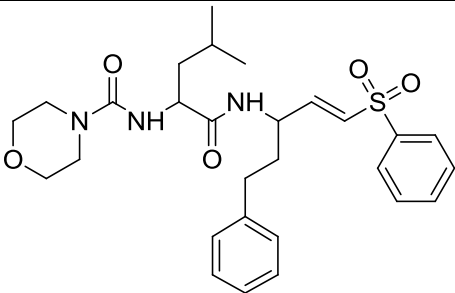
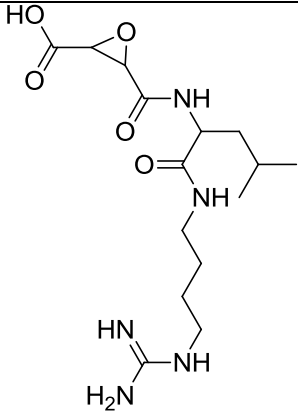
ZAVIRANJE AKTIVNOSTI KATEPSINA B

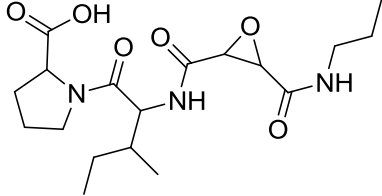
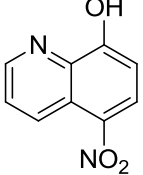
Da bi preverili specifičnost zaviranja katepsina S, smo testirali zaviralno delovanje LHVS, Gü 2149 in Gü 2458 na aktivnost katepsina B. Testiranje smo izvedli po enakem postopku kot pri katepsinu S, le da smo uporabili 10 nM encim. Kot substrat smo uporabili Z-RR-AMC, kot kontrolni zaviralec z znano specifično aktivnostjo pa CA-074. Meritve fluorescences smo izvedli pri valovni dolžini ekscitacije 380 nm ter emisije 460 nm.

Preglednica X: Koncentracije testiranih zaviralcev katepsina B

<i>zaviralec</i>	<i>uporabljena koncentracija</i>
LHVS	3 nM
Gü 2149	50 nM in 100 nM
Gü 2458	10 nM, 50 nM in 100 nM
CA-074	10 μM

Preglednica XI: Strukture testiranih zaviralcev katepsina S in katepsina B

zaviralec	struktura	M [g/mol]
Gü 2149		357,45
Gü 2458		383,49
LHVS		527,68
E-64		357,41

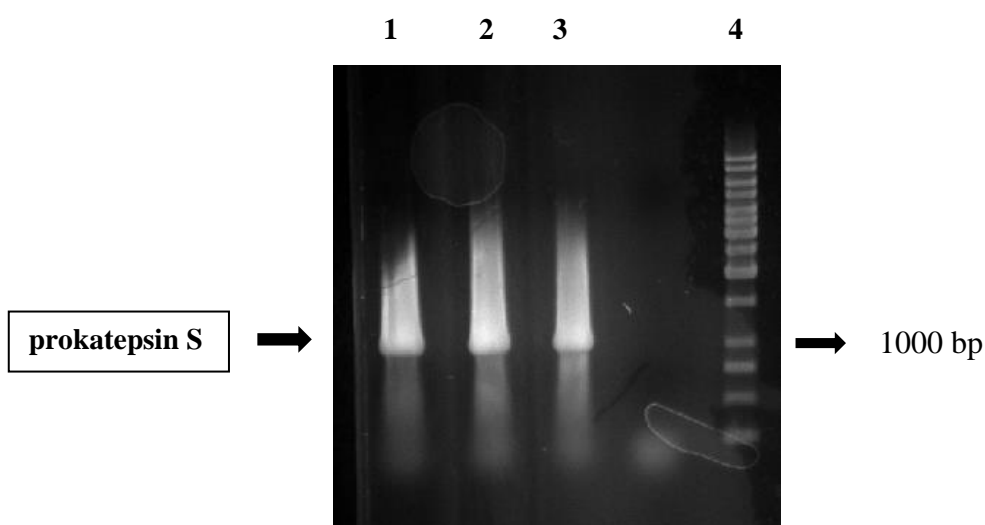
CA-074	 <p>The structure of CA-074 is a complex molecule. It features a central carbon atom bonded to a propyl group, a nitrogen atom of a pyrrolidine ring, an amide group (-NH-), and a carbon atom that is part of a cyclic acetal system. The acetal ring is fused to a five-membered ring containing a carbonyl group and a propylamino group (-NH-CH2-CH2-CH3). A carboxylic acid group (-COOH) is also attached to the pyrrolidine ring.</p>	383,44
nitroksolin	 <p>The structure of nitroksolin is a quinoline derivative. It consists of a fused bicyclic system with a nitrogen atom in the six-membered ring. The quinoline ring has a hydroxyl group (-OH) at the 8-position and a nitro group (-NO2) at the 6-position.</p>	190,16

4. REZULTATI

4.1 MOLEKULSKO KLONIRANJE

4.1.1 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

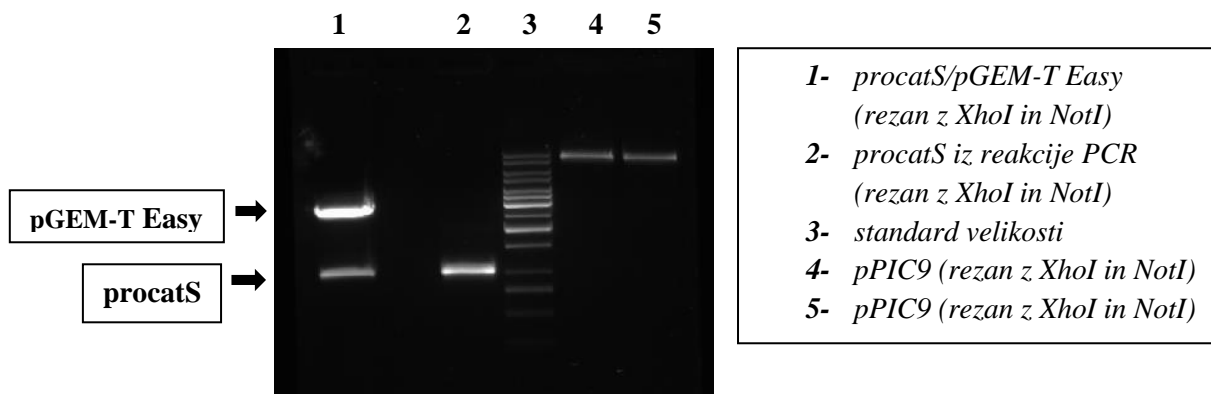
Uspešnost pomnoževanja z verižno reakcijo s polimerazo smo potrdili z agarozno gelsko elektroforezo, kjer je velikost produktov ustrezala pričakovani velikosti prokatepsina S (993 baznih parov). Dobro vidne lise (na sliki označeno z 1, 2 in 3) kažejo na visoko koncentracijo dobljenega produkta. Na mesto 4 smo nanegli standard velikosti.



Slika 4: Produkti verižne reakcije s polimerazo

4.1.2 LIGACIJA V KLONIRNI VEKTOR pGEM-T Easy

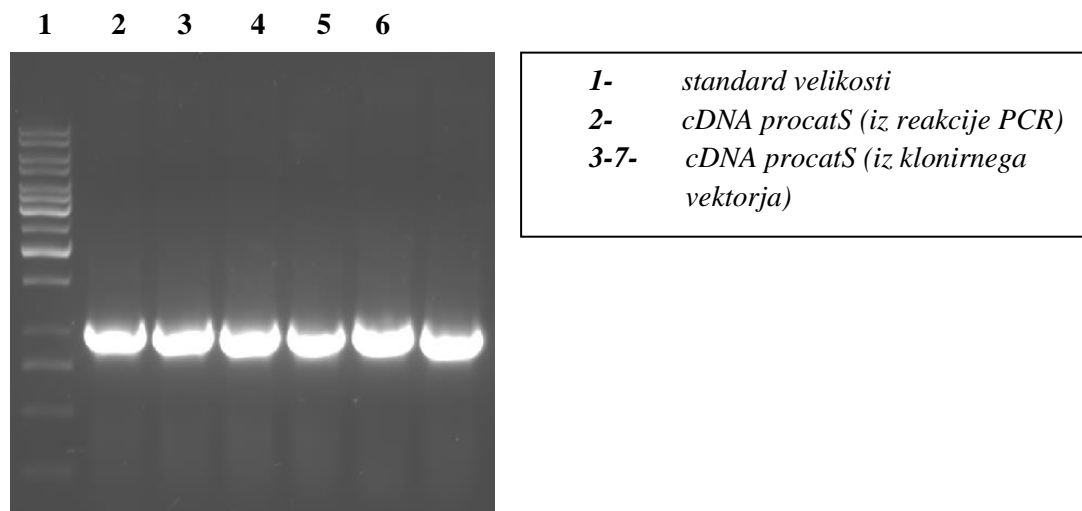
Za preverjanje uspešnosti ligacije cDNA prokatepsina S v klonirni vektor smo produkt izpostavili izbranimi restrikcijskima encimoma XhoI in NotI, ki zapis izrežeta iz vektorja. Rezultati agarozne gelske elektroforeze kažejo, da se je zapis uspešno vključil v klonirni vektor (Slika 5). Lisi na mestu 1 ustrežata velikosti lineariziranega vektorja (3015 bp) in prokatepsina S (993 bp). Poleg cDNA prokatepsina S, ki smo jo pomnožili v klonirnem vektorju, smo imeli na voljo tudi zapis, pomnožen z reakcijo PCR, ki smo ga prav tako izpostavili izbranimi restrikcijskima encimoma (mesto 2). Obenem smo linearizirali tudi ekspresijski vektor pPIC9 (8023 bp) za uporabo v naslednjem koraku (mesti 4 in 5).



Slika 5: Agarozna gelska elektroforeza – preverjanje ligacije cDNA prokatepsina S v *pGEM-T Easy*

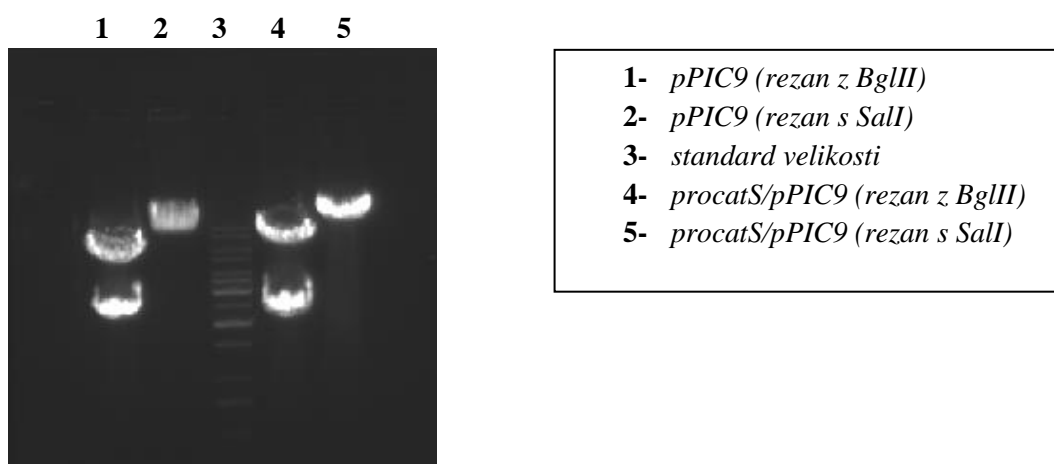
4.1.3 LIGACIJA V EKSPRESIJSKI VEKTOR *pPIC9* IN TRANSFORMACIJA *E.coli*

S produkti ligacije cDNA prokatepsina S v *pPIC9* smo transformirali *E.coli*. V primeru cDNA, ki smo jo pomnožili v klonirnem vektorju, smo dobili 5 kolonij, v primeru cDNA, pomnožene z reakcijo PCR pa je zrasla 1 kolonija. Prisotnost zapisa za prokatepsin S smo z reakcijo PCR potrdili v primeru vseh šestih kolonij. Za nadaljnje delo smo uporabili klon št. 3, ki je nosil zapis za prokatepsin S, pomnožen v klonirnem vektorju,



Slika 6: Agarozna gelska elektroforeza – preverjanje prisotnosti zapisa prokatepsina S

Iz izbranega klona št. 3 smo izolirali procatS/pPIC9 in uspešnost ligacije potrdili z enakim pristopom kot v primeru klonirnega vektorja pGEM-T Easy, le da smo uporabili ustrezna restriksijska encima – BglII in SalI. Pri restrikciji pPIC9 z BglII dobimo na gelu dva fragmenta velikosti 2401 baznih parov in 5620 baznih parov, saj encim prepozna in reže dve mesti v pPIC9, pri restrikciji s SalI pa vektor lineariziramo, saj ga reže le na enem mestu. V primeru, ko je v pPIC9 vključen še zapis za prokatepsin S, dobimo enako razporeditev lis, le da opazimo povečanje za približno 1000 baznih parov, kar ustreza prokatepsinu S.



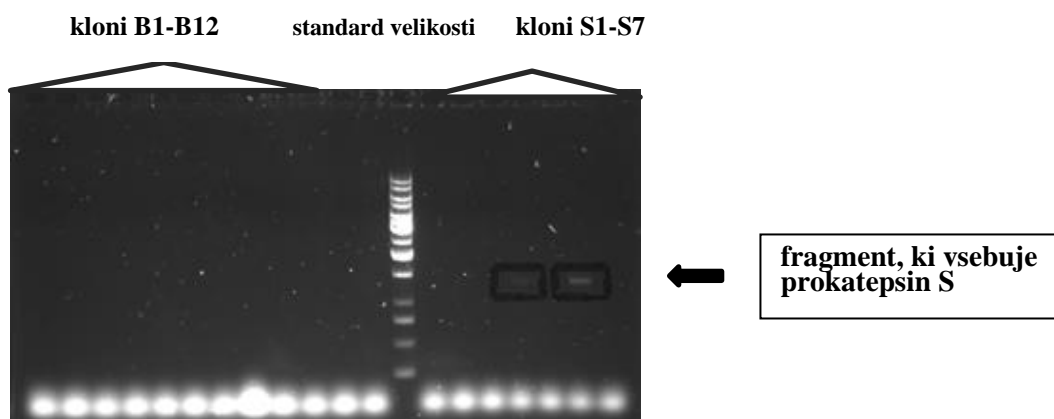
Slika 7: Agarozna gelska elektroforeza – preverjanje vstavitve cDNA prokatepsina S v *pPIC9*

4.2 ELEKTROPORACIJA *P.pastoris*

Po dveh dneh inkubacije so zrasle komaj opazne kolonije, zato smo inkubacijo podaljšali za en dan. Na plošči, kjer smo ekspresijski vektor cepili z BglII, je zraslo 12 kolonij (kolonije B1-B12), na plošči SalI pa 7 kolonij (kolonije S1-S7). Zaradi precej nizkega števila dobljenih transformiranih kolonij, smo se odločili, da bomo pregledali vse. Določanje fenotipa transformiranih kolonij je pomembno tudi za določitev pogojev ekspresije, saj lahko rast fenotipa Mut^S vzdržujemo z manjšimi količinami metanola.

Pri določanju tipa transformant na ploščah MM in MD so rezultati pokazali, da vse transformante ustrezajo pričakovanemu fenotipu. V primeru klonov z vektorjem, ki smo ga linearizirali s Sall, smo na ploščah opazili hitro rast kolonij, kar ustreza fenotipu Mut⁺, nasprotno pa smo primeru cepitve z BglII opazili počasnejšo rast, kar ustreza fenotipu Mut^S.

Za preverjanje fenotipa transformant s pomočjo PCR smo izbrali vseh 19 kolonij z vstavljenim procatS/pPIC9 ter za kontrolo po 3 kolonije vsakega fenotipa transformant brez zapisa za prokatepsin S. Preverjanje smo izvedli z verižno reakcijo s polimerazo in potrdili prisotnost našega zapisa v primeru dveh klonov, ki smo jih dobili z elektroporacijo plazmida, rezanega s Sall (klona S4 in S6). Pri nobenem od klonov nismo dokazali prisotnosti *AOX1* (pribl. 2200 bp), s čimer bi potrdili fenotip Mut⁺ (Slika 8). Izbrana klona smo na novo precepili za testno ekspresijo, naključno pa smo izbrali še 3 klone (B2, B8 in B12). Kot negativno kontrolo smo izbrali 3 klone s praznim vektorjem pPIC9.

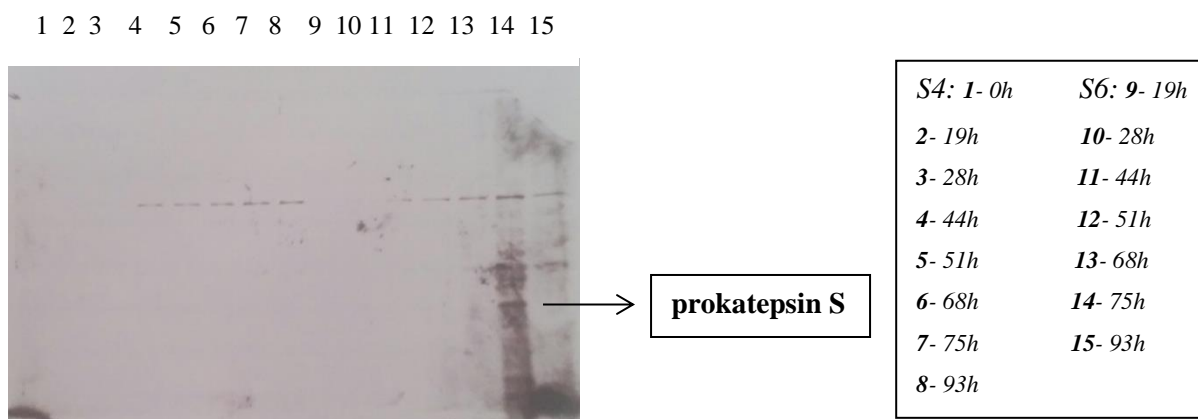


Slika 8: Pregled fenotipa transformant *P.pastoris* z verižno reakcijo s polimerazo

4.3 TESTNA EKSPRESIJA

Vzorce iz izbranih časovnih točk smo pregledali s pomočjo NaDS-PAGE. Po barvanju z barvilom Coomassie brilliant blue nismo zaznali nobene lise pri velikosti, ki bi ustrezala našemu proteinu. Barvanje smo ponovili s srebrovim nitratom, ki omogoča zaznavanje nižjih koncentracij proteinov v vzorcu. Liso pri velikosti 37 kDa, ki ustreza pričakovani

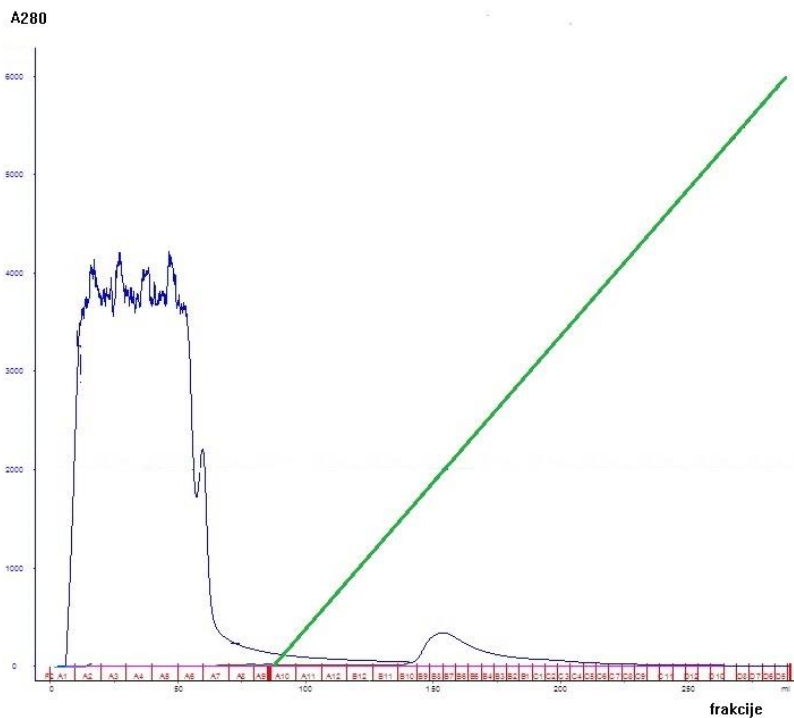
velikosti prokatepsina S, smo zaznali le pri klonu S6, pri čemer je bil optimalni čas ekspresije 75 ur (*Slika 9*).



Slika 9: Pregled testne ekspresije z barvanjem s srebrovim nitratom (klona S4 in S6), časovne točke od 0 do 93 ur

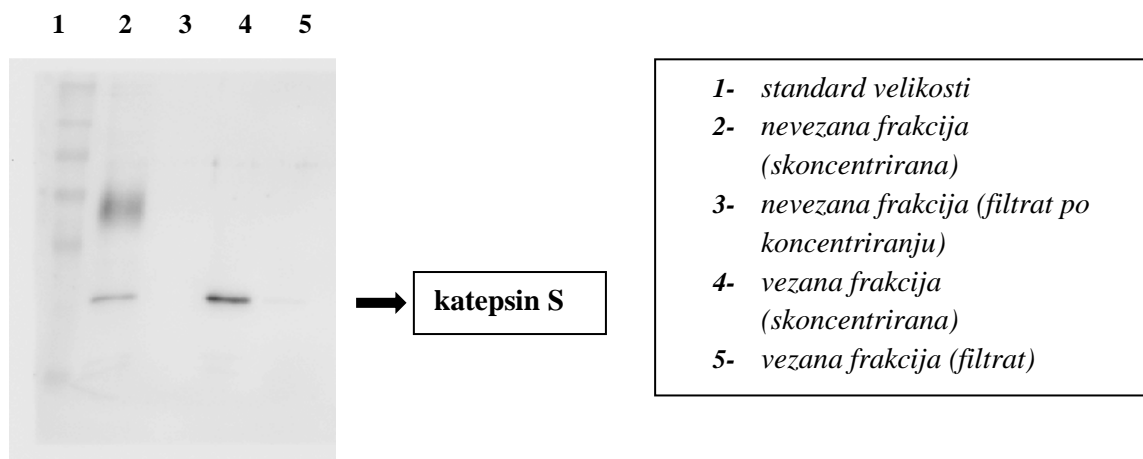
4.4 EKSPRESIJA V VEČJI KOLIČINI IN IZOLACIJA

Sistem za tekočinsko kromatografijo ÄKTA nam je omogočal sprotno detekcijo eluiranih frakcij z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 280 nm (A_{280}). Na *Sliki 10* predstavlja modra barva A_{280} in zelena barva gradient ionske moči. Prvi vrh smo opazili pri spiranju z vezalnim pufrom (nevezane frakcije), drugi vrh pa se je eluiral z elucijskim pufrom (vezane frakcije) pri približno 30% gradienta ionske moči.



Slika 10: Elucijski profil prokatepsina S

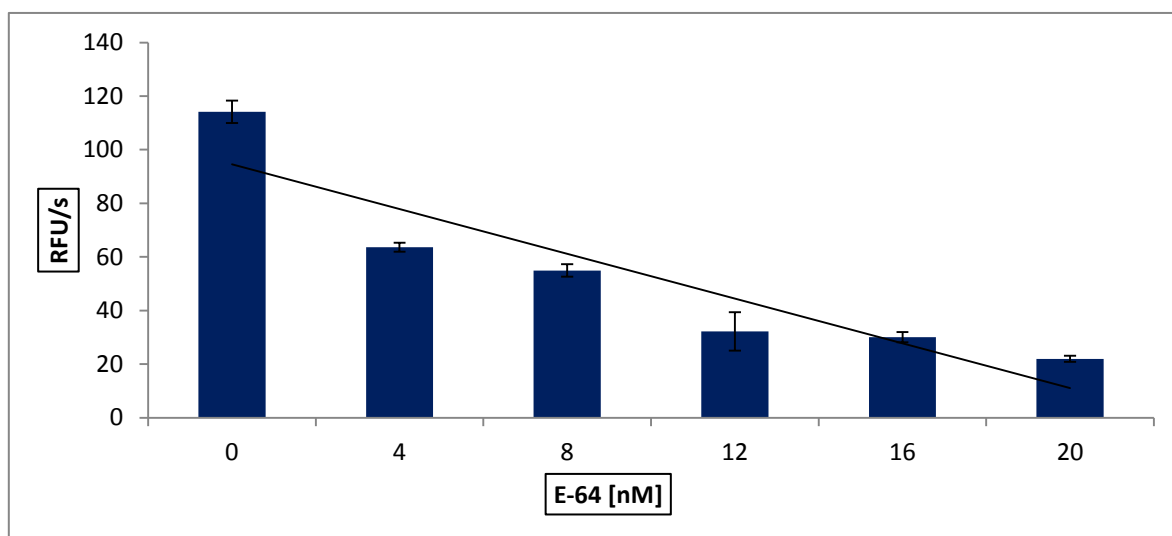
Vzorec S6, ki smo ga skoncentrirali z ultrafiltracijo, očistili z ionsko-izmenjevalno kromatografijo in aktivirali, smo pregledali s pomočjo prenosa western. Rezultati so pokazali prisotnost katepsina S v vezani frakciji, razen v primeru filtrata.



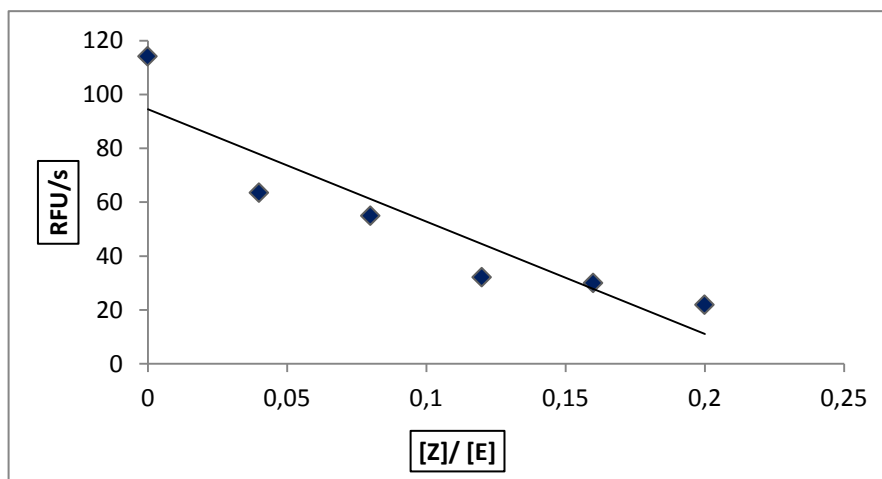
Slika 11: Pregled različnih frakcij s prenosom western.

4.4.1 DOLOČITEV KONCENTRACIJE IN AKTIVNEGA DELEŽA KATEPSINA S

Spektrofotometrično smo določili koncentracijo pridobljenega katepsina S, ki je znašala 13,3 μM oz. 0,33 mg/ml. S pomočjo titracije aktivnega mesta z E-64 in upoštevanjem redčenja smo določili koncentracijo encima 2,7 μM , iz česar smo sklepali, da je aktivnega 20% encima.



Slika 12: Začetna hitrost reakcije v odvisnosti od koncentracije E-64 pri stalni koncentraciji substrata

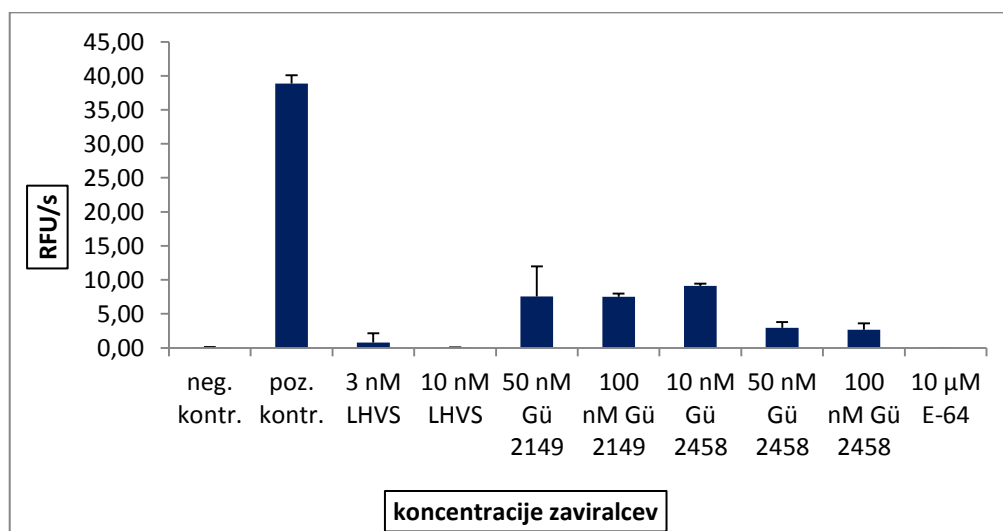


Slika 13: Začetna hitrost reakcije v odvisnosti od razmerja med koncentracijo zaviralca in encima ($[Z]/[E]$)

4.5 TESTIRANJE ZAVIRALCEV

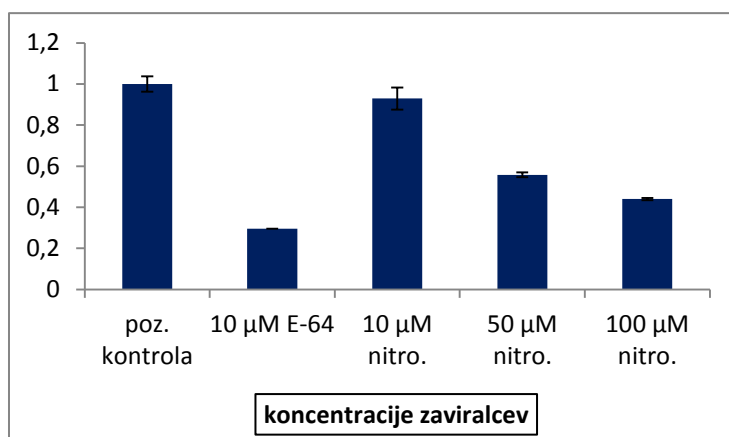
4.5.1 TESTIRANJE ZAVIRALCEV KATEPSINA S

Testirali smo zaviralno aktivnost spojin Gü 2149 ter Gü 2458 in jo primerjali z znanima zaviralcema E-64 in LHVS. Na grafu predstavljeni rezultati kažejo, da je že dodatek 50 nM Gü 2149 močno zmanjšal aktivnost katepsina S. V primeru Gü 2458 je do primerljivega zmanjšanja aktivnosti prišlo že ob dodatku 10 nM zaviralca, ob povečanju koncentracije na 50 nM pa je bila aktivnost skoraj povsem zavrta.



Slika 14: Začetna hitrost reakcije v odvisnosti od dodatka različnih koncentracij zaviralcev – katepsin S

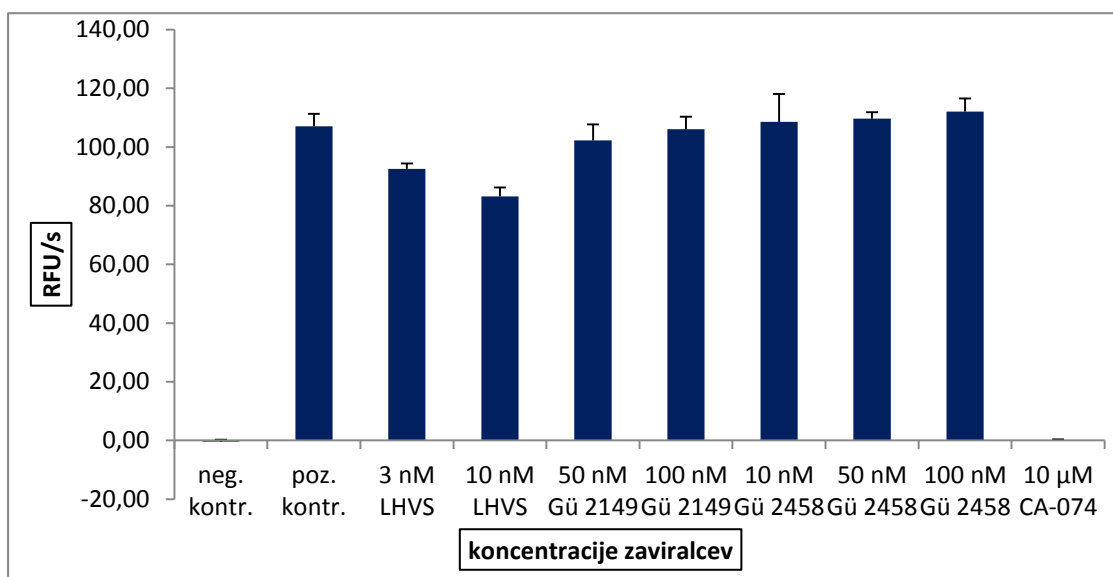
Preverjali smo tudi vpliv nitroksolina na aktivnost katepsina S (Slika 15). Do zmanjšane aktivnosti je prišlo v primeru dodatka višjih koncentracij zaviralca (50 µM, 100 µM).



Slika 15: Začetna hitrost reakcije v odvisnosti od dodatka različnih koncentracij nitroksolina.

4.5.2 TESTIRANJE ZAVIRALCEV KATEPSINA B

Ker smo želeli preveriti tudi selektivnost testiranih zaviralcev za katepsin S, smo testiranje ponovili s katepsinom B. Ob dodatku 100 nM Gü 2149 in Gü 2458 ni bilo opazne razlike v aktivnosti katepsina B. Kot kontrolo smo uporabili tudi selektivni zaviralec katepsina B, CA-074, ki smo ga dodali v mikromolarnem območju.



Slika 16: Začetna hitrost reakcije v odvisnosti od dodatka različnih koncentracij zaviralcev – katepsin B

5. RAZPRAVA

V okviru magistrske naloge smo sledili splošnemu postopku za pripravo rekombinantnih proteinov. Poznan genski zapis za katepsin S smo najprej namnožili s pomočjo klonirnega vektorja in nato preklonirali v ustrezen ekspresijski vektor. Tega nato vstavimo v gostiteljski organizem, ki nam proizvaja želen protein. Za izražanje rekombinantnih proteinov imamo na voljo številne prokariontske in evkariontske sisteme, ki se med seboj razlikujejo po kompleksnosti procesa priprave, ceni ter stopnji posttranslacijskih sprememb na proteinu. Dejstvo je, da ne obstaja popoln sistem, zato je potrebno pri izboru upoštevati lastnosti proteina (stabilnost, lokalizacija, prisotnost pomembnih posttranslacijskih sprememb), želeno količino in način izolacije produkta. (50)

Glede na objavljene rezultate izražanja katepsina S v celicah kvasovk, kjer so uspeli pridobiti aktivni protein, smo se v našem primeru odločili za izražanje katepsina S v kvasovki *P.pastoris*. (38) Ta velja za enega izmed najbolj pogosto uporabljenih evkariontskih ekspresijskih sistemov, ki omogoča pridobivanje pravilno zvitih in aktivnih rekombinantnih proteinov. Močni promotorji izražanja omogočajo pridobivanje večjih količin proteinov, pri čemer je gojenje enostavnejše kot v primeru ostalih evkariontskih sistemov. (47)

Zapis prokatepsina S smo pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo, kar nam je omogočilo *in vitro* pridobitev velikega števila kopij DNA v kratkem času. Z ustreznim načrtovanjem začetnih oligonukleotidov nam reakcija omogoča tudi dodajanje novih zaporedij (pripajanje dodatnih nukleotidov na 5'-konec). V prvem koraku smo v začetna oligonukleotida (*Slika 1*) uvedli krajši zaporedji (6-8 nukleotidov), ki ju prepoznavata restrikcijska encima XhoI in NotI, ki smo ju v nadaljevanju potrebovali za vstavitve zapisa v vektor pPIC9. Gre za ekspresijski vektor kvasovke *P.pastoris*, ki je namenjen izražanju rekombinantnih proteinov in njihovemu izločanju v gojišče, kar poenostavi izolacijo. Vsebuje namreč zaporedje, ki kodira signalni peptid α -faktor (949-1215 bp), ki vodi nastali protein iz celice. Ker pa smo se v našem primeru odločili za uporabo encima XhoI, ki ima restrikcijsko mesto znotraj signalnega zaporedja (1192), smo izgubili del zaporedja KEX2, ki je potrebno za kasnejšo odcepitev signalnega peptida. Zato smo že med začetnim

pomnoževanjem zapisa z reakcijo PCR na enak način kot restrikcijska mesta nadomestili tudi dodatno signalno zaporedje *P.pastoris* (α -faktor).

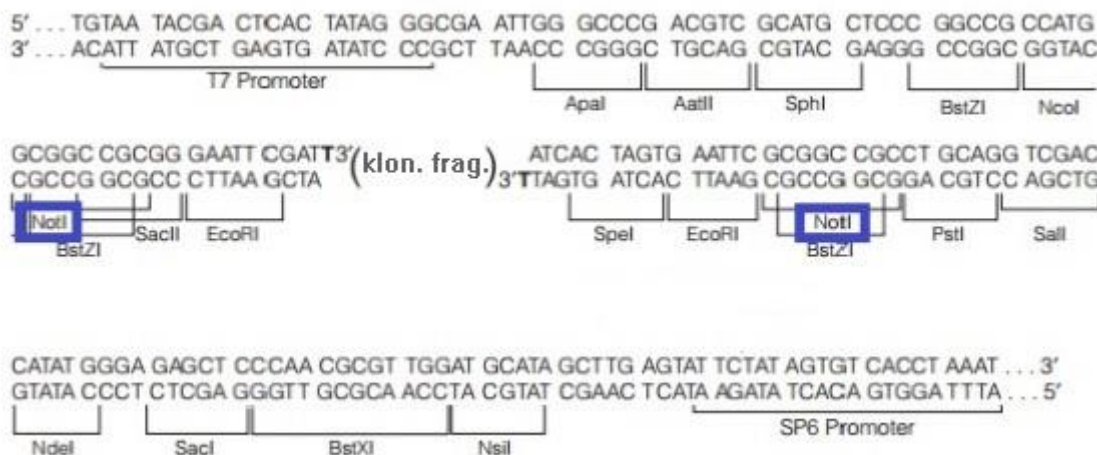
Za pomnoževanje smo izbrali klonirni vektor pGEM-T Easy, ki omogoča vnos v gostiteljske celice bakterij. Klonirni vektor se v celici razmnožuje in tako ustvarja kopije lastne ter vključene DNA. Prednost pomnoževanja s pomočjo bakterijskih celic v primerjavi z reakcijo PCR s Taq polimerazo je predvsem prisotnost popravljalnih mehanizmov, ki so sposobni s kontrolnim branjem novo sintetiziranih zaporedij zaznati in popraviti napake, ki nastanejo pri prepisovanju. (51) (52) Preprosto vstavitvev fragmenta v vektor brez uporabe restrikcijskih encimov nam je omogočila lastnost Taq polimeraze, ki ima tudi aktivnost terminalne transferaze in zelo pogosto na 3'-koncu produkta reakcije PCR pripne dodatni dA. (52) Ta je kompatibilen z dT previsnim koncem v klonirnem vektorju pGEM-T Easy. DNA ligaza nato prepozna linearna konca DNA molekul ter ju med seboj kovalentno poveže. Kljub temu ligacija v pGEM-T Easy ni uspela v vseh poskusih, kar bi lahko bila posledica dejstva, da se insert z dA lepljivimi konci lahko v plazmid z dT lepljivimi konci vključi na dva načina, pri čemer lahko pride do napačne orientacije inserta. Prav tako lahko ligaza izjemoma namesto povezave med zapisom in vektorjem poveže oba konca lineariziranega vektorja in ga s tem »zapre« oz. poveže med seboj več fragmentov, kar prav tako ni zaželeno. (53) Pravilno orientacijo in zaporedje našega fragmenta smo zato na tej točki preverili s sekveniranjem.

Za razliko od izbranega klonirnega vektorja je ekspresijski vektor pPIC9 omogočal usmerjeno vstavitvev zapisa za prokatepsin S. Ponovljivo in usmerjeno vstavljanje tuje DNA lahko dosežemo z uporabo različnih restrikcijskih endonukleaz. (53) Posamezni restrikcijski encimi namreč prepoznavajo točno določena zaporedja (4-8 bp), ki jih vedno cepijo na enak način. Iz tega sledi, da v primeru uporabe enakega restrikcijskega encima na zapisu in vektorju kot rezultat dobimo fragmente obeh zaporedij, ki so med seboj navzkrižno kompatibilni. (54) Z izborom dveh različnih restrikcijskih encimov (XhoI in NotI), ki cepita vsak na enem koncu našega zapisa, torej lahko zagotovimo pravilno usmerjeno vstavitvev zapisa v skladu z bralnim okvirjem. Izhajali smo iz zapisa za prokatepsin S, pomnoženega v klonirnem vektorju, od koder smo ga izrezali z uporabo

restriksijskih encimov in tako dobili lepljive konce, ki so bili kompatibilni z lepljivimi konci ekspresijskega vektorja, ki smo ga predhodno linearizirali z enakima restriksijskima encimoma.

Pri tem koraku molekulskega kloniranja smo imeli največ težav, saj nam v začetnih poskusih ni uspelo vstaviti cDNA prokatepsina S v pPIC9. V prvih poskusih smo tako procatS/pGEM-T Easy kot pPIC9 poskusili cepiti z obema restriksijskima encimoma v enem koraku. Aktivnost restriksijskih encimov je precej odvisna od temperature in pufru, vendar sta oba naša encima v izbranem pufru po podatkih proizvajalca izkazovala 100% aktivnost (55) (56). Ker nismo uspeli dobiti ustreznega rezultata smo se kljub navedbam proizvajalca odločili za dve posamezni reakciji, v katerih smo procatS/pGEM-T Easy in pPIC9 najprej izpostavili encimu XhoI v priporočenem pufru, ju očistili z agarozno gelsko elektroforezo ter izolirali iz gela in nato ponovili enak postopek z encimom NotI. Način je sicer bolj zamuden, vendar nam je po nekaj poskusih uspelo vstaviti zapis za procatS v vektor pPIC9.

Za nastale težave nismo našli jasne razlage, razlog pa bi lahko tičal v prisotnosti dveh prepoznavnih mest za encim NotI znotraj klonirnega vektorja pGEM-T Easy, ki ležita v neposredni bližini vstavljenega zapisa (Slika 17).



Slika 17: Restriksijska mesta linearnega vektorja pGEM-T Easy

Ker encimi bolj učinkovito prepoznavajo restrikcijska mesta, ki ne ležijo v bližini konca verige DNA, bi v našem primeru lahko prišlo do tega, da bi NotI cepil na treh mestih (obe mesti na vektorju ter eno znotraj vstavljenega fragmenta). V primeru sočasne restrikcije bi tako lahko prišlo do zmanjšane učinkovitosti prepoznavne mesta cepitve XhoI, ki bi v takem primeru ostal v neposredni bližini konca verige DNA. V tem primeru bi bilo bolj verjetno, da ne bi prišlo do prepoznavne in cepitve, kar bi lahko razložilo neuspeh pri vstavljanju v pPIC9. Da smo se temu izognili, smo pri ločenih reakcijah najprej izvedli cepitev z XhoI ter v naslednjem koraku še cepitev z NotI.

Vektor pPIC9 z vključenim zapisom za prokatepsin S smo v genom kvasovke vnesli z elektroporacijo, ki je ena izmed bolj učinkovitih metod za vnos tuje DNA (57). Naš cilj je bil pridobiti oba fenotipa transformant po elektroporaciji kvasovke *P.pastoris*, kar smo želeli doseči z izbiro dveh restrikcijskih encimov, ki omogočata integracijo v genom kvasovke na različna načina. Dobljeni fenotip je namreč odvisen od tega, ali se v genomu kvasovke zamenja ali ohrani gen *AOX1*, ki določa sposobnost presnavljanja metanola in hitrost rasti na gojišču z metanolom. Vključitev v genom se pri uporabi encima SalI zgodi z insercijo, ki je posledica enojnega prekrižanja med lokusom *his4* na kromosomu kvasovke in genom *HIS4* ekspresijskega vektorja. Pri tem se ohrani lokus za *AOX1* in transformante torej izražajo normalno *AOX1* (fenotip Mut⁺). Pri linearizaciji plazmida z BglII pa pride do vključitve v genom prek dvojnega prekrižanja in zamenjave gena na lokusu za *AOX1*, s čimer kvasovka izgubi zapis za *AOX1* oksidazo (fenotip Mut^S). (49) Kljub jasni teoriji pa nekateri primeri v literaturi navajajo, da pri cepitvi z encimom BglII transformante fenotipa Mut^S predstavljajo le 5-25 % vseh transformant. (57) Prisotnost obeh fenotipov transformant je zaželjena, saj vnaprej ne moremo predvidevati, kateri fenotip bo predstavljal boljši ekspresijski sistem za nek rekombinantni protein.

V našem primeru smo po elektroporaciji dobili precej nizko število transformiranih kolonij (19), kar bi lahko bila posledica pogojev elektroporacije, kjer z električnim pulzom porušimo strukturo membrane, da omogočimo prehod plazmidne DNA v notranjost celice, pri tem pa lahko na celicah nastane nepopravljiva škoda. Transformante smo za prisotnost zapisa za prokatepsin S pregledali z reakcijo PCR in dokazali prisotnost le v primeru klonov S4 in S6. Dobili smo torej visoko število lažno pozitivnih transformant, za katere je precej verjetno, da sploh ne vsebujejo vektorja, temveč je prišlo le do zamenjave znotraj

lokusa *his4* in vstavitve selekcijskega gena *HIS4* iz vektorja, ki je omogočal rast na gojišču brez histidina. (57)

Pri pregledu fenotipa transformiranih kolonij z opazovanjem različno hitre rasti na ploščah MM in MD smo sicer določili prisotnost obeh tipov transformant, vendar pri nadaljnjem preverjanju prisotnosti zapisa za *AOX1* v genomu *P.pastoris* z reakcijo PCR rezultata nismo uspeli potrditi. Pri nobenem izmed testiranih klonov na gelu nismo zaznali lise pri velikosti, ki ustreza *AOX1* (pribl. 2200 bp). (58) Iz tega sicer sledi, da v nobenem primeru nismo dobili fenotipa Mut^+ , vendar je potrebno upoštevati dejstvo, da je lisa *AOX1* na gelu pogosto zelo slabo vidna. (49) Ob upoštevanju tega smo v vseh primerih kot bolj zanesljivo določitev upoštevali metodo opazovanja hitrosti rasti na gojiščih MM in MD.

Testna ekspresija je pokazala, da smo dobili le en uspešno transformiran klon *P.pastoris*, ki je proizvajal prokatepsin S. Temu smo na testu z ploščami MM in MD določili fenotip Mut^+ , z reakcijo PCR pa Mut^S . Zaradi predhodno omenjene problematike pri določanju z reakcijo PCR, smo se odločili, da gre za fenotip Mut^+ . Tako žal nismo imeli možnosti primerjave izražanja prokatepsina S v obeh fenotipih, kar bi bilo smiselno preveriti v nadaljnjih raziskavah. Fenotip Mut^+ sicer predstavlja manj zaželeno možnost z vidika stroškov gojenja, saj zahteva dodatek večjih količin metanola v gojišču. Ta vidik je bolj izpostavljen pri gojenju večjih količin kvasovke kot v našem primeru, vendar pa ga je smiselno upoštevati v vsakem primeru. Prav tako je večja hitrost presnove metanola povezana z večjo porabo kisika, kar pomeni tveganje za pomanjkljiv dostop kisika, ki lahko postane omejitveni dejavnik pri stopnji ekspresije. Po drugi strani pa je pri fenotipu Mut^+ prisotno manjše tveganje za toksični vpliv metanola, saj je sposoben njegovega hitrejšega presnavljanja. (57)

Pri pregledu rezultatov ekspresije se je žal pokazalo, da vključitev zapisa v genom kvasovke ne pomeni nujno tudi njegovega dobrega izražanja, saj pri pregledu vzorcev z NaDS PAGE in barvanjem z barvilom Coomassie blue nismo zaznali lise, ki bi ustrezala prokatepsinu S. Ker je meja detekcije z omenjenim barvilom okrog 100 ng proteina, smo postopek ponovili z metodo barvanja s srebrovim nitratom, ki je bolj primerna za zaznavanje nižjih količin proteinov. S to metodo, ki obarva že približno 1 ng proteina, smo

uspeli zaznati liso primerne velikosti. (59) Izkazalo se je tudi, da *P.pastoris* res predstavlja ugoden ekspresijski sistem z vidika nizkega izločanja nativnih proteinov, saj na gelu nismo zaznali velikega števila proteinov.

Prokatepsin S smo iz gojišča izolirali s pomočjo ionsko-izmenjevalne kromatografije, ki temelji na ločevanju molekul glede na naboj. Uporabili smo močan kationski izmenjevalec SP XL 16/10, ki veže katione prek skupine SO_3^- . Glede na izoelektrično točko rekombinantnega človeškega katepsina S ($\text{pI} = 8,3 - 8,6$), smo sklepali, da se bo naš produkt v vezalnem pufri s $\text{pH} = 4,5$ nahajal v kationski obliki in se bo vezal na izmenjevalec. (60) Ob uporabi gradienta ionske moči smo produkt uspešno eluirali, kasnejši pregled frakcij s protitelesi proti katepsinu S pa je pokazal, da se je manjši del prokatepsina S izločil s kolone že med spiranjem z vezalnim pufrom. Ta izguba predstavlja tudi eno od razlag za ne prav visok izplen produkta, ki je znašal 0,55 mg/l kulture. Prav tako proizvajalec kvasovke v navodilih za ekspresijo priporoča izbor vsaj 6-8 transformant posameznega fenotipa, ki ima lahko velik vpliv na uspešnost izražanja, vendar v našem primeru te možnosti zaradi nizkega števila transformant nismo imeli. Tako obstaja verjetnost, da bi bil izplen višji v primeru klona Mut^S.

Če pa upoštevamo objavljene izkoristke iz različnih ekspresijskih sistemov, so se kot najbolj donosni izkazali poskusi izražanja katepsina S v *E.coli*, kjer so poročali tudi o izplenu, ki so presegali 10 mg/l kulture. V tem primeru je postopek časovno daljši, saj se izločeni protein v gojišču združuje v netopna inkluzijska telesca, ki zahtevajo dodatne korake raztapljanja in ponovnega zvitja, vendar pa je očitno bolj primeren za pridobivanje večjih količin produkta. (38)

V drugem delu magistrske naloge smo preverjali zaviralno aktivnost molekul Gü 2149, Gü 2458 in nitroksolina ter njihovo selektivnost za katepsin S. Selektivne zaviralce potrebujemo za raziskovanje naravnih substratov katepsina S v organizmu in dokončno razumevanje njegovega delovanja v fizioloških in patoloških procesih. V primeru terapije uporaba selektivnih zaviralcev omogoča delovanje le na posamezen encim, s čimer se izognemo neželenim učinkom, povezanih s splošnim vplivom na aktivnost podobnih katepsinov. (61)

Spojini Gü 2149 ter Gü 2458 sta bili razviti z namenom zaviranja aktivnosti katepsina S in rezultati so potrdili, da obe izkazujeta zaviralni učinek na katepsin S že v območju nanomolarnih koncentracij. Glede na dobljene rezultate je močnejši zaviralec Gü 2458, saj je že ob dodatku 10 nM zaviralca prišlo do 77% zmanjšanja aktivnosti katepsina S v primerjavi s pozitivno kontrolo. V primeru spojine Gü 2149 smo primerljivo stopnjo zaviranja opazili ob dodatku 50 nM zaviralca, ki je aktivnost katepsina S zmanjšala za 81% v primerjavi s pozitivno kontrolo. Že o povišanju koncentracije zaviralca Gü 2458 na 50 nM pa smo opazili skoraj povsem zavrto aktivnost katepsina S, kar je primerljivo z učinkom 3 nM LHVS, ki je znan selektivni zaviralec katepsina S. V primeru spojine Gü 2149 ob nadaljnjem višanju koncentracije na 100 nM nismo opazili razlike v aktivnosti katepsina S glede na 50 nM koncentracijo zaviralca.

Ker nas je zanimalo, ali sta zaviralca selektivna za katepsin S, smo testiranje z enakimi koncentracijami obeh zaviralcev ponovili s katepsinom B. Rezultati niso pokazali razlike v aktivnosti katepsina B, s čimer smo dokazali, da sta zaviralca selektivna za katepsin S. Za dodatno potrditev selektivnosti pa bi bilo potrebno izvesti primerjave tudi z ostalimi cisteinskimi katepsini, predvsem s poddružino katepsinu L-podobnih katepsinov, ki izkazujejo višjo stopnjo strukturne podobnosti s katepsinom S.

Nitroksolin je sicer uveljavljena učinkovina za zdravljenje bakterijskih okužb sečil, prepoznan pa je bil tudi kot zaviralec aktivnosti katepsina B, katerega zavira v območju nizkih mikromolarnih koncentracij. (62) Preverili smo njegov vpliv na katepsin S in ugotovili, da dodatek 10 μ M nitroksolina ni imel vpliva na aktivnost katepsina S. Delno zmanjšano aktivnost smo opazili šele, ko smo povišali koncentracijo dodanega zaviralca na 50 μ M in 100 μ M, pri čemer je katepsin S ohranil približno 50% aktivnost v primerjavi s pozitivno kontrolo.

6. SKLEP

Uspešno smo izrazili prokatepsin S v metilotrofni kvasovki *P.pastoris*. Za pridobitev večjih količin aktivnega katepsina S bi bila potrebna nadaljnja optimizacija izražanja in izolacije iz gojišča. Vsekakor bi bilo v nadaljnjih raziskavah priporočljivo pridobiti oba fenotipa transformiranih kolonij *P.pastoris*, saj obstaja verjetnost, da bi fenotip Mut^S predstavljal bolj ugoden ekspresijski sistem.

Pri testiranju aktivnosti katepsina S ob dodatku različnih zaviralcev smo ugotovili učinkovito zaviralno delovanje spojin Gü 2149 in Gü 2458. Že dodatek nanomolarnih koncentracij obeh spojin je za 80% zmanjšal normalno aktivnost katepsina S, pri čemer se je kot močnejši zaviralec izkazala spojina Gü 2458. Preverili smo še vpliv obeh zaviralcev na katepsin B in potrdili, da testirana zaviralca ne vplivata na njegovo aktivnost. Nitroksolin je vplival na aktivnost katepsina S šele v območju mikromolarnih koncentracij.

7. LITERATURA

1. Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., Bateman, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* 42. 2014, str. 503-509.
2. Mohamed, M.M., Sloane, B.F. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 6 (10), 2006, str. 764-775.
3. Chang, W.S.W., Wu, H.R., Yeh, C.T., Wu, C.W., Chang, J.Y. Lysosomal cysteine proteinase cathepsin S as a potential target for anti-cancer therapy. *Journal of Cancer Molecules*. 3 (1), 2007, str. 5-14.
4. Barrett J.A., Rawlings D.N., Woessner J.F. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 3. 2012. poglavje 413.
5. Shi, G.P., Webb, A.C., Foster, K.E., Knoll, J.H., Lemere, C.A., Munger, J.S. Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution. *Journal of Biological Chemistry*. 269 (15), 1994, str. 11530-11536.
6. Rudensky A., Beers C. *Cytokines as Potential Therapeutic Targets for Inflammatory Skin Diseases*. [ured.] R., Dinarello, Charles A., Asadullah, Khusru Numerof. Springer, 2006. str. 81-95. 978-3-540-37673-6.
7. Vasiljeva O., Dolinar M., Rozman P.J., Turk V., Turk B. Recombinant human procathepsin S is capable of autocatalytic processing at neutral pH in the presence of glycosaminoglycans. *FEBS Letters*. 2005, str. 1285–1290.
8. Kirschke, H., Wiederanders, B., Bromme, D., Rinne, A. Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochemical Journal*. 264, 1989, str. 467-473.
9. Driessen, C., Bryant, R.A., Lennon-Duménil, A.M., Villadangos, J.A., Bryant, P.W., Shi, G.P. Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *The Journal of Cell Biology*. 174 (4), 1999, str. 775-790.
10. Riese, R.J., Wolf, P.R., Brömme, D., Natkin, L.R., Villadangos, J.A., Ploegh, H.L., Chapman, H.A. Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity*. 4 (4), 1996, str. 357-366.
11. Shi G.P., Villadangos A.J., Dranoff G., Small C., Gu L., Haley J.K., Riese R., Ploegh H.L., Chapman A.H. Cathepsin S Required for Normal MHC Class II Peptide Loading and Germinal Center Development. *Immunity*. 1999, str. 197–206.

12. Kos, J., Sekirnik, A., Kopitar, G., Cimerman, N., Kayser, K., Stremmer, A., Werle, B. Cathepsin S in tumours, regional lymph nodes and sera of patients with lung cancer: relation to prognosis. *British Journal of Cancer*. 85 (8), 2001, str. 1193-1200.
13. Wang, B., Sun, J., Kitamoto, S., Yang, M., Grubb, A., Chapman, H.A. Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *Journal of Biological Chemistry*. 281 (9), 2006, str. 6020-6029.
14. Liu, J., Sukhova, G.K., Sun, J.S., Xu, W.H., Libby, P., Shi, G.P. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 24 (8), 2004, str. 1359-1366.
15. Lindstedt, L., Lee, M., Öörni, K., Brömme, D., Kovanen, P.T. Cathepsins F and S block HDL3-induced cholesterol efflux from macrophage foam cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 312, 2003, str. 1019–1024.
16. Saegusa, K., Ishimaru, N., Yanagi, K., Arakaki, R., Ogawa, K., Saito, I. Cathepsin S inhibitor prevents autoantigen presentation and autoimmunity. *The Journal of Clinical Investigation*. 110 (3), 2002, str. 361-369.
17. Schönefuß, A., Wendt, W., Schattling, B., Schulten, R., Hoffmann, K., Stuecker, M. Upregulation of cathepsin S in psoriatic keratinocytes. *Experimental Dermatology*. 19 (8), 2010, str. 80-88.
18. Chapman, H.A., Riese, R.J., Shi, Guo-Ping. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annual review of physiology*. 59 (1), 1997, str. 63-88.
19. Lemere, C.A., Munger, J.S., Shi, G.P., Natkin, L., Haass, C., Chapman, H.A., Selkoe, D.J. The lysosomal cysteine protease, cathepsin S, is increased in Alzheimer's disease and Down syndrome brain. An immunocytochemical study. *The American Journal of Pathology*. 146 (4), 1995, str. 848.
20. Munger, J.S., Haass, C., Lemere, C.A., Shi, G.P., Wong, W.S., Teplow, D.B. Lysosomal processing of amyloid precursor protein to A beta peptides: a distinct role for cathepsin S. *Biochemical Journal*. 311, 1995, str. 299-305.
21. Clark, A.K., Malcangio, M. Microglial signalling mechanisms: Cathepsin S and Fractalkine. *Experimental neurology*. 234 (2), 2012, str. 283-292.
22. Barclay, J., Clark, A.K., Ganju, P., Gentry, C., Patel, S., Wotherspoon, G., Malcangio, M. Role of the cysteine protease cathepsin S in neuropathic hyperalgesia. *Pain*. 130 (3), 2007, str. 225-234.

23. Clark, A.K., Yip, P.K., Grist, J., Gentry, C., Staniland, A.A., Marchand, F. Inhibition of spinal microglial cathepsin S for the reversal of neuropathic pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 104 (25), 2007, str. 10655-10660.
24. Chen, R.P., Ren, A., Ye, S.D. Correlation between serum cathepsin S and insulin resistance in type 2 diabetes. *Experimental and therapeutic medicine*. 6 (5), 2013, str. 1237-1242.
25. Liu, J., Ma, L., Yang, J., Ren, A., Sun, Z., Yan, G. Increased serum cathepsin S in patients with atherosclerosis and diabetes. *Atherosclerosis*. 186 (2), 2006, str. 411-419.
26. Taleb, S., Lacasa, D., Bastard, J. P., Poitou, C., Canello, R., Pelloux, V. Cathepsin S, a novel biomarker of adiposity: relevance to atherogenesis. *The FASEB Journal*. 19 (11), 2005, str. 1540-1542.
27. Taleb, S., Canello, R., Poitou, C., Rouault, C., Sellam, P., Levy, P. Weight loss reduces adipose tissue cathepsin S and its circulating levels in morbidly obese women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 91 (3), 2006, str. 1042-1047.
28. Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., Turk, D. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 1824 (1), 2012, str. 68-88.
29. Hidde L.P., Chapman H.A., Riese J.R., Bryant R.P., Bogyo S.M. *Inhibitor of cathepsin S based upon peptide sequence which comprises at least about 2-20 consecutive residues from preferred invariant chain cleavage site of cathepsin S, spanning from residue 68 to residue 90 of specified sequence*. US 6608030 B1 ZDA, 19. avgust 2003.
30. Palermo, C., Joyce, J.A. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*. 29 (1), 2008, str. 22-28.
31. Hanada, K. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry*. 42, 1978, str. 523-528.
32. Murata, M., Miyashita, S., Yokoo, C., Tamai, M., Hanada, K., Hatayama, K. Novel epoxysuccinyl peptides A selective inhibitor of cathepsin B, in vivo. *FEBS letters*. 280 (2), 1991, str. 311-315.
33. McGrath, M.E., Palmer, J.T., Brömme, D., Somoza, J.R. Crystal structure of human cathepsin S. *Protein Science*. 7 (6), 1998, str. 1294-1302.
34. Palmer, J.T., Rasnick, D., Klaus, J.L., Brömme, D. Vinyl sulfones as mechanism-based cysteine protease inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 38 (17), 1995, str. 3193-3196.

35. Lützner, N., Kalbacher, H. Quantifying cathepsin S activity in antigen presenting cells using a novel specific substrate. *Journal of Biological Chemistry*. 283 (52), 2008, str. 36185-36194.
36. Scott, C.J., Taggart, C.C. Biologic protease inhibitors as novel therapeutic agents. *Biochimie*. 92 (11), 2010, str. 1681-1688.
37. Burden, R.E., Gormley, J.A., Jaquin, T.J., Small, D.M., Quinn, D.J., Hegarty, S.M. Antibody-mediated inhibition of cathepsin S blocks colorectal tumor invasion and angiogenesis. *Clinical Cancer Research*. 15 (19), 2009, str. 6042-6051.
38. Brömme, D., Nallaseth, F.S., Turk, B. Production and activation of recombinant papain-like cysteine proteases. *Methods*. 32 (2), 2004, str. 199-206.
39. Kopitar, G., Dolinar, M., Štrukelj, B., Pungerčar, J., Turk, V. Folding and activation of human procathepsin S from inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry*. 236 (2), 1996, str. 558-562.
40. Tobbell, D.A., Middleton, B.J., Raines, S., Needham, M.R., Taylor, I.W., Beveridge, J.Y., Abbott, W.M. Identification of in vitro folding conditions for procathepsin S and cathepsin S using fractional factorial screens. *Protein Expression and Purification*. 24 (2), 2002, str. 242-254.
41. Kramer, G., Paul, A., Kreuzsch, A., Schüler, S., Wiederanders, B., Schilling, K. Optimized folding and activation of recombinant procathepsin L and S produced in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification*. 54 (1), 2007, str. 147-156.
42. Brömme, D., Bonneau, P.R., Lachance, P., Wiederanders, B., Kirschke, H., Peters, C. Functional expression of human cathepsin S in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of the recombinant enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 268 (7), 1993, str. 4832-4838.
43. Brömme, D., McGrath, M.E. High level expression and crystallization of recombinant human cathepsin S. *Protein Science*. 5 (4), 1996, str. 789-791.
44. Baker, S.M., Karlsson, L., Thurmond, R.L. Cloning, expression, purification, and activity of dog (*Canis familiaris*) and monkey (*Saimiri boliviensis*) cathepsin S. *Protein expression and purification*. 28 (1), 2003, str. 93-101.
45. Barrett J.A., Rawlings D. N., Woessner J. F. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. 3. 2012. poglavje 413.
46. Wiederanders, B., Brömme, D., Kirschke, H., Von Figura, K., Schmidt, B., Peters, C. Phylogenetic conservation of cysteine proteinases. Cloning and expression of a cDNA

coding for human cathepsin S. *Journal of Biological Chemistry*. 267 (19), 1992, str. 13708-13713.

47. Daly, R., Hearn, M. TW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*. 18 (2), 2005, str. 119-138.

48. Potvin, G., Ahmad, A., Zhang, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review. *Biochemical Engineering Journal*. 64, 2012, str. 91-105.

49. Invitrogen. *Pichia Expression Kit For Expression of Recombinant Proteins in Pichia Pastoris*.

50. Palomares, L.A., Estrada-Moncada S., Ramírez T.O. *Production of recombinant proteins. Recombinant Gene Expression*. Humana Press. str. 15-51.

51. Tindall, K.R., Kunkel, T.A. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry*. 27 (16), 1988, str. 6008-6013.

52. Strachan T., Read A. P. *Human Molecular Genetics*. 2. s.l. : New York: Wiley-Liss, 1999. PCR, DNA sequencing and in vitro mutagenesis (2. poglavje). Dostopno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7571/>.

53. Allison, A.L. *Fundamental Molecular Biology*. Wiley, 2007. str. 180-231 (Recombinant DNA technology and molecular cloning).

54. Lodish H., Berk A., Zipursky L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 4. W. H. Freeman, 2000. poglavje 7.1 : DNA Cloning with Plasmid Vectors . dostopno na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21498/> (povzeto septembra 2014).

55. [Elektronski] <https://www.neb.com/products/r0146-xhoi>.

56. New England Biolabs. [Elektronski] <https://www.neb.com/products/r0189-noti> .

57. Romanos, M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*. 6 (5), 1995, str. 527-533.

58. Ayra- Pardo, C., Martínez, C.G., De la Riva, G. A. A single-step screening procedure for *Pichia pastoris* clones, by PCR. *Biotechnologia Aplicada*. 15 (3), 1998, str. 173-175.

59. Weiss, W., Weiland, F., Görg, A. Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis. *Proteomics*. 2009, str. 59-82.

60. Brömme, D., Bonneau, P. R., Lachance, P., Wiederanders, B., Kirschke, H., Peters, C. in Vernet, T. Functional expression of human cathepsin S in *Saccharomyces cerevisiae*.

Purification and characterization of the recombinant enzyme. *Journal of Biological Chemistry*. 268 (7), 1993, str. 4832-4838.

61. Katunuma, N. Structure-based development of specific inhibitors for individual cathepsins and their medical applications. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*. 87 (2), 2011.

62. Mirković, B., Renko, M., Turk, S., Sosič, I., Jevnikar, Z., Obermajer, N. Novel mechanism of cathepsin B inhibition by antibiotic nitroxoline and related compounds. *ChemMedChem*. 6 (8), 2011, str. 1351-1356.

63. Burden, R.E., Snoddy, P., Buick, R.J., Johnston, J.A., Walker, B., Scott, C.J. Recombinant cathepsin S propeptide attenuates cell invasion by inhibition of cathepsin L-like proteases in tumor microenvironment. *Molecular cancer therapeutics*. 7 (3), 2008, str. 538-547.

64. McInerey, P., Adams, P., Hadi, M.Z. Error rate comparison during polymerase chain reaction by DNA polymerase. *Molecular Biology International*. 2014.

65. Mülhardt C., Bees E.W. *Molecular Biology and Genomics*. Elsevier, 2007. str. 65-94.