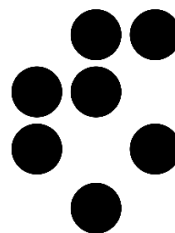




Gimnazija Novo mesto



Institut »Jožef Stefan«

# **UPORABA MIKROTERMOFOREZE ZA DOLOČANJE VEZAVE SLADKORJEV NA IZOLEKTIN rCnSLB2**

(raziskovalna naloga iz interdisciplinarnega področja)

Avtorji:

Jernej Birk

Domen Hočevar

Kaja Rangus

Mentor:

Janja Pust

Somentorici:

dr. Jerica Sabotič

dr. Ana Mitrović

Novo mesto, marec 2021

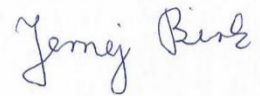
**IZJAVA**

Podpisani Jernej Birk, Domen Hočevar in Kaja Rangus, dijaki Gimnazije Novo mesto, potrjujemo, da je raziskovalna naloga z naslovom

**Uporaba mikrotermoforeze za določanje vezave sladkorjev na izolektin rCnSLB2**

nastala kot rezultat lastnega raziskovalnega dela, da so rezultati korektno navedeni in pri pisanju niso bile kršene avtorske pravice in intelektualne lastnine drugih.

Jernej Birk



Domen Hočevar



Kaja Rangus



dr. Jerica Sabotič, Odsek za biotehnologijo, Institut »Jožef Stefan«; dr. Ana Mitrović, Odsek za biotehnologijo, Institut »Jožef Stefan«; Janja Pust, profesorica na Gimnaziji Novo mesto

## **POVZETEK**

Lektini so proteini, ki se specifično vežejo na ogljikove hidrate. Zaradi visoke specifičnosti vezave lahko delujejo antiproliferativno (delovanje, ki preprečuje razmnoževanje celic) na omejen tip celic in zaradi tega predstavljajo velik potencial pri zdravljenju rakavih obolenj. S preprečitvijo absorpcije hranil v prebavnih sistemih žuželk lektini delujejo tudi insekticidno. Za gobo poprhnjeno livko (*Clitocybe nebularis*) je značilna visoka vsebnost različnih lektinov. Z afinitetno kromatografijo smo iz nje izolirali za glukozo specifičen lektin z oznako CnGlcL in njegovo čistost potrdili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo. V drugem delu naloge smo z mikrotermoforezo analizirali vezavo med pripravljenim rekombinantnim saharozil izolektinom rCnSLB2 in sladkorji saharozo, glukozo, fruktozo, metil  $\alpha$ -D-glukopiranozidom, N-acetilglukozaminom in maltotriozo.

Mikrotermoforeza je nova metoda, ki za določanje biofizikalnih lastnosti molekularnih interakcij uporablja fizikalni pojav termoforeze. Potek termoforeze je odvisen od velikosti, naboja in solvacijskih ovojev udeleženih molekul. Prednosti tega postopka so majhna poraba vzorcev, možnost analize šibkih molekularnih interakcij, enostavna uporaba in možnost analize molekularnih interakcij v pogojih, ki so podobni naravnim.

Vezava med lektini in sladkorji ima pomembno vlogo pri molekularnih interakcijah med celicami v organizmu in s povzročitelji bolezni ter se lahko uporablja pri zaznavi nekaterih bolezni. Mikrotermoforeza še ni bila uporabljena za določanje lastnosti interakcij med lektini in sladkorji, zato naša raziskovalna naloga odpira široka vrata nadaljnjim raziskavam.

**Ključne besede:** lektini, *Clitocybe nebularis*, izolacija, mikrotermoforeza, vezava, afiniteta

## **ABSTRACT**

Lectins are proteins that specifically bind carbohydrates. Due to their high binding specificity some show antiproliferative activity (activity that prevents proliferation of cells) on a specific type of cells and therefore have a potential in cancer treatment. Furthermore, insecticidal activity of lectins has been confirmed in numerous studies. Lectins act as insecticides by disrupting the digestion in insect gut. The mushroom *Clitocybe nebularis* contains a great number of diverse lectins. With affinity chromatography we isolated the glucose specific lectin CnGlcL from the fruiting bodies of clouded agaric (*Clitocybe nebularis*) and analysed it using polyacrylamide gel electrophoresis. In the second part of the study we used microthermophoresis to analyse the binding between the recombinant sucrose-binding isolectin rCnSLB2 from the same mushroom and the carbohydrates sucrose, glucose, fructose, methyl  $\alpha$ -D-glucopyranoside, N- acetylglucosamine and maltotriose.

Microthermophoresis is a new technology that uses the physical phenomenon of thermophoresis to determine the biophysical properties of molecular interactions. The results of thermophoresis depend on size, electric charge and solvation shell, which is why it can be used for analysing molecular interactions. Advantages of microthermophoresis include low sample consumption, the option to analyse weak molecular interactions, the ease of use and the option to analyse molecule interactions in an environment similar to the natural one.

Lectin binding to glycans plays an important role in molecular interactions between cells in an organism or with pathogens and can be useful in disease diagnostics. Microscale thermophoresis has not yet been used to detect interactions between lectins and sugars. Thus, we hope our research opens many possibilities for its new potential application.

**Key words:** lectins, *Clitocybe nebularis*, isolation, microthermophoresis, binding, affinity

## **ZAHVALA**

Pri izvajanju eksperimentalnega dela in pisanju raziskovalne naloge smo bili deležni številnih napotkov in pomoči, česar enostavno ne moremo spregledati.

Raziskovalno delo je bilo pripravljeno za Krkine nagrade in Srečanje mladih raziskovalcev ZOTKS. Res, da smo teoretični in eksperimentalni del opravili sami, vendar nam brez podpore Instituta »Jožef Stefan« in Gimnazije Novo mesto ter pomoči mentorjev in zaposlenih na teh ustanovah ne bi uspelo.

Posebno zahvalo dolgujemo odseku za biotehnologijo B3 Instituta »Jožef Stefan« ter prof. dr. Janku Kosu, da nam je februarja 2020 omogočil opravljanje eksperimentalnega dela v laboratoriju.

Neizmerno smo hvaležni tudi dr. Jerici Sabotič in dr. Ani Mitrović za pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela, iskanju primerne literature, napotke in nasvete pri pisanju ter potrpežljivost pri skupnem delu. Zahvaljujemo se tudi ostalemu osebju IJS za tehnično in moralno podporo.

Zahvaljujemo se tudi mentorici Janji Pust za neomajno podporo pri našem projektu, vsebinski pregled naloge, spodbujanje pri našem pisanju ter ostalim članicam kemijskega laboratorija Gimnazije Novo mesto ter ravnateljici Mojci Lukšič za možnost opravljanja raziskovalne naloge.

Lepo se zahvaljujemo tudi profesoricama Branki Klemenčič in Tanji Gačnik za vsebinsko popravo naloge in spodbujanju k pisanju ter profesorici slovenščine Suzani Krvavica za njeno lektoriranje. Zahvala gre tudi našima razredoma, 4. C in 4. D, ter razredničarkama Maji Hren in Nataliji Petakovič, ki so nam stali ob strani in skrbeli, da nismo zaostajali s šolskim delom.

1.	UVOD.....	11
1.1.	Glive.....	11
1.2.	Prostotrosnice ( <i>Basidiomycetes</i> ).....	11
1.3.	Poprhnjena livka ( <i>Clitocybe nebularis</i> ).....	12
1.4.	Biološko aktivne snovi iz gob.....	12
1.5.	Lektini.....	13
1.5.1.	Vrste lektinov glede na zgradbo.....	14
1.5.2.	Vloga lektinov v bioloških sistemih.....	15
1.5.2.1.	Protimikrobno delovanje.....	15
1.5.2.2.	Mitogena in antiproliferativna aktivnost.....	16
1.5.2.3.	Lektini in žuželke.....	16
1.5.2.4.	Uporabnost lektinov v citokemiji/histokemiji.....	16
1.5.3.	Lektini po izvoru.....	16
1.5.3.1.	Rastlinski lektini.....	16
1.5.3.2.	Bakterijski lektini.....	16
1.5.3.3.	Lektini v višjih glivah.....	17
1.5.3.3.1.	Lektini iz poprhnjene livke ( <i>Clitocybe nebularis</i> ).....	17
1.6.	Ogljikovi hidrati.....	18
1.6.1.	Struktura monosaharidov.....	19
1.6.1.1.	Ciklične strukture monosaharidov.....	19
1.6.2.	Povezovanje monosaharidov.....	20
1.6.3.	Ogljikovi hidrati na celičnih površinah.....	20
1.6.4.	Vezava lektinov s sladkorji.....	20
1.7.	Specifičnost vezave lektinov s sladkorji.....	21
1.7.1.	Specifična vezava rekombinantnega saharozil lektina B s preprostimi sladkorji.....	21
1.8.	Kromatografija.....	21
1.8.1.	Afinitetna kromatografija.....	21
1.9.	Elektroforeza.....	22
1.9.1.	NaDS-PAGE.....	22
1.10.	Spektrofotometrija.....	23
1.10.1.	Beer-Lambertov zakon.....	23
1.11.	Termoforeza.....	23
1.11.1.	Mikrotermoforeza.....	24
2.	NAMEN DELA.....	26

2.1.	Cilji .....	26
2.2.	Hipoteze .....	26
2.3.	Shema dela .....	27
3.	MATERIALI .....	28
3.1.	Laboratorijska oprema .....	28
3.2.	Kemikalije .....	29
3.3.	Goba .....	30
3.4.	Gel .....	30
3.5.	Lektin .....	30
3.5.1.	Sladkorji .....	30
3.6.	Raztopine .....	31
3.7.	Pufri .....	31
4.	METODE DELA .....	32
4.1.	Ekstrakcija soka poprhnjene livke .....	32
4.2.	Centrifugiranje soka .....	32
4.3.	Ultrafiltracija .....	32
4.4.	Afinitetna kromatografija .....	33
4.5.	Uporaba mikrotermoforeze za določanje vezave sladkorjev na izolektin rCnSLB2 .....	33
4.6.	Merjenje absorbance .....	34
4.7.	NaDS-PAGE .....	35
4.8.	Termoforeza .....	37
4.8.1.	Označevanje proteina .....	37
4.8.2.	Postopek termoforeze .....	38
4.8.2.1.	Preliminarni test .....	38
4.8.2.2.	Preverjanje vezave .....	38
4.8.2.3.	Afiniteta vezave .....	38
4.8.2.4.	Analiza podatkov .....	39
5.	REZULTATI Z INTERPRETACIJO .....	41
5.1.	Kromatogram afinitetne kromatografije .....	41
5.2.	NaDS-PAGE .....	43
5.3.	Mikrotermoforeza .....	44
5.3.1.	Saharoza .....	45
5.3.2.	Glukoza .....	48
5.3.3.	Fruktoza .....	50

5.3.4.	Metil $\alpha$ -D-glukopiranozid .....	51
5.3.5.	N-acetilglukozamin .....	52
5.3.6.	Maltotrioza .....	54
6.	RAZPRAVA .....	56
6.1.	Izolacija lektina .....	56
6.2.	Določanje afinitete vezave z mikrotermoforezo .....	56
6.3.	Uporabnost mikrotermoforeze .....	57
7.	ZAKLJUČEK .....	58
8.	VIRI IN BIBLIOGRAFIJA .....	60
8.1.	Viri slik .....	63

## **KAZALO SLIK**

Slika 1:	Poprhnjena livka .....	12
Slika 2:	Aglutinacija eritrocitov .....	13
Slika 3:	Shematske predstave vrst lektinov .....	15
Slika 4:	Bakterija Escherichia coli z vidnimi fimbriji .....	17
Slika 5:	Strukturi dveh stereoizomerov gliceraldehida in struktura dihidroksiacetona .....	19
Slika 6:	Shema poteka afinitetne kromatografije .....	22
Slika 7:	Potek termoforeze .....	24
Slika 8:	Spremljanje fluorescence v kapilarah .....	25
Slika 9:	Aparatura za mikrotermoforezo .....	25
Slika 10:	Shema dela .....	27
Slika 11:	Haworthove formule saharoze, $\beta$ -D-glukoze, fruktoze, metil $\alpha$ -D-glukopiranozida, N-acetilglukozamina in maltotrioze .....	31
Slika 12:	Ultrafiltrator Amicon 8400 .....	32
Slika 13:	Čiščenje saharozil-sefaroze .....	33
Slika 14:	Sistem dovajanja pufru do aparature .....	33
Slika 15:	Pridobljene frakcije z afinitetno kromatografijo .....	34
Slika 16:	Aparatura za spektrofotometrijo, Lambda Bio+ .....	35
Slika 17:	DB100/2/115 Dri-Block grelec med segrevanjem vzorcev .....	35
Slika 18:	Aparatura za gelsko elektroforezo spredaj .....	36
Slika 19:	Shema razporeditve vzorcev prve serije na gelu, na kateri »STD« predstavlja standard (lestvico molske mase), »sok« predstavlja vzorec koncentrata soka po ultrafiltraciji, »nevezano« predstavlja vzorec nevezane (začetne) frakcije afinitetne kromatografije, »fr.« predstavlja vzorec pridobljene frakcije, »prazna« predstavlja prazen žep v gelu, »n. sok« pa sok meglenke po njenem ožemanju. V oglatih oklepajih je na prvem mestu dodana količina vzorca ter na drugem nanašalnega pufru. ....	36
Slika 20:	Shema razporeditve vzorcev druge serije na gelu. Za legendo glej sliko 19 .....	36
Slika 21:	Postopek barvanja gela .....	37

Slika 22: Postopek razbarvanja gela .....	37
Slika 23: Shema kapilar v preliminarnem testu .....	38
Slika 24: Shema razporeditve vsebin v kapilarah 1 do 8 za preverjanje vezave .....	38
Slika 25: Shema zaporednih redčitev sladkorjev .....	39
Slika 26: Dodatek lektina k raztopinam sladkorjev .....	39
Slika 27: Kromatogram prve serije afinitetne kromatografije.....	41
Slika 28: Kromatogram druge serije afinitetne kromatografije .....	41
Slika 29: Povečan kromatogram dela prve serije afinitetne kromatografije .....	42
Slika 30: Povečan kromatogram dela druge serije afinitetne kromatografije .....	42
Slika 31: Slika gela 1. serije NaDS-PAGE z označenimi vzorci in lestvico molske mase. Za legendo glej sliko 19.....	43
Slika 32: Lektini v gobi poprhnjene livke [32].....	43
Slika 33: Slika gela 2. serije NaDS-PAGE z označenimi vzorci in lestvico molske mase. Za legendo glej sliko 19.....	44
Slika 34: Posnetek kapilar pri preliminarnem testu z 10-krat redčenim lektinom pri 5 % jakosti ekscitacije laserja (levo), časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo pri preliminarnem testu z 10-krat redčenim lektinom pri 5% jakosti ekscitacije laserja (desno). .....	44
Slika 35: Posnetek kapilar pri preliminarnem testu z 20-krat redčenim lektinom pri 5 % jakosti ekscitacije laserja (levo), časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo pri preliminarnem testu z 10-krat redčenim lektinom pri 5% jakosti ekscitacije laserja .....	45
Slika 36: Posnetek kapilar preverjanja vezave 100 mM saharoze (levo), MST sledi preverjanja vezave 100 mM saharoze (desno).....	45
Slika 37: Posnetek kapilar preverjanja vezave 100mM saharoze .....	46
Slika 38: Posnetek kapilar preverjanja vezave 100 mM saharoze.....	46
Slika 39: Posnetek kapilar afinitete vezave 100 mM saharoze (levo), MST sledi afinitete vezave 100 mM saharoze (desno).....	47
Slika 40: Krivulja odvisnosti normalizirane fluorescence od koncentracij saharoze, ki smo jo uporabili za izračun Kd. Rezultati so podani kot povprečna vrednost $\pm$ STDEV (n = 2) .....	47
Slika 41: Časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo, ki smo ga uporabili za izračun normalizirane fluorescence pri saharozi .....	48
Slika 42: Posnetek kapilar afinitete vezave 250 mM glukoze (levo), MST sledi afinitete vezave 250 mM glukoze (desno) .....	48
Slika 43: Krivulja odvisnosti normalizirane fluorescence od koncentracij glukoze, ki smo jo uporabili za izračun Kd. Rezultati so podani kot povprečna vrednost $\pm$ STDEV (n = 2) .....	49
Slika 44: Časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo, ki smo ga uporabili za izračun normalizirane fluorescence pri glukozi .....	49
Slika 45: Posnetek kapilar afinitete vezave 250 mM fruktoze (levo), Odziv na odmerek 250 mM fruktoze pri afiniteti vezave (desno) .....	50
Slika 46: Krivulja odvisnosti normalizirane fluorescence od koncentracij fruktoze, ki smo jo uporabili za izračun Kd. Rezultati so podani kot povprečna vrednost $\pm$ STDEV (n = 2) .....	50
Slika 47: Časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo, ki smo ga uporabili za izračun normalizirane fluorescence pri fruktozi .....	51
Slika 48: Posnetek kapilar afinitete vezave 250 mM metil $\alpha$ -D-glukopiranozida (levo), Odziv na odmerek 250 mM metil $\alpha$ -D-glukopiranozida pri afiniteti vezave (desno).....	51



Slika 49: Krivulja odvisnosti normalizirane fluorescence od koncentracij metil $\alpha$ -D-glukopiranozida, ki smo jo uporabili za izračun $K_d$ . Rezultati so podani kot povprečna vrednost $\pm$ STDEV ( $n = 2$ ) .....	52
Slika 50: Časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo, ki smo ga uporabili za izračun normalizirane fluorescence pri metil $\alpha$ -D-glukopiranozidu .....	52
Slika 51: Posnetek kapilar afinitete vezave 240 mM N-acetilglukozamina (levo), Odziv na odmerek 250 mM N-acetilglukozamina (desno) .....	53
Slika 52: Krivulja odvisnosti normalizirane fluorescence od koncentracij N-acetilglukozamina, ki smo jo uporabili za izračun $K_d$ . Rezultati so podani kot povprečna vrednost $\pm$ STDEV ( $n = 2$ ).....	53
Slika 53: Časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo, ki smo ga uporabili za izračun normalizirane fluorescence pri N-acetilglukozaminu.....	54
Slika 54: Posnetek kapilar afinitete vezave 250 mM maltotrioze (levo), odziv na odmerek 250 mM maltotrioze pri afiniteti vezave (desno) .....	54
Slika 55: Krivulja odvisnosti normalizirane fluorescence od koncentracij maltotrioze, ki smo jo uporabili za izračun $K_d$ . Rezultati so podani kot povprečna vrednost $\pm$ STDEV ( $n = 2$ ).....	55
Slika 56: Časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo, ki smo ga uporabili za izračun normalizirane fluorescence pri maltotriozi .....	55

## **KAZALO TABEL**

Tabela 1: Biokemijske lastnosti lektinov iz poprhnjene livke [32] .....	18
Tabela 2: Najmanjše inhibitorne koncentracije in titri inhibicije hemaglutinacije saharozil izolektina rCnSLB2 s sladkorji [40] .....	21
Tabela 3: Sestava NaDS poliakrilamidnega gela .....	30

## **KAZALO ENAČB**

Enačba 1: Izraz za izračun transmitance.....	23
Enačba 2: Beer-Lambertov zakon.....	23
Enačba 3: Enačba lokalnih sprememb v koncentraciji molekul kot funkcija Soretovega koeficienta in temperaturnih razlik v tekočini .....	24
Enačba 4: Normalizirana fluorescenca .....	39
Enačba 5: Kemijska enačba disociacije kompleksa na dve komponenti .....	40
Enačba 6: Konstanta disociacije kompleksa na dve komponenti.....	40

## **SEZNAM OKRAJŠAV**

A – absorbanca

CnGalLs – za galaktozo in sefarozo specifični izolektini iz gobe *Clitocybe nebularis*

CnGlcL – za glukozo specifičen lektin iz gobe *Clitocybe nebularis*

CNL – lektin iz gobe *Clitocybe nebularis*

CnSepL-1 – za sefarozo specifičen lektin iz gobe *Clitocybe nebularis* 1

CnSepL-2 – za sefarozo specifičen lektin iz gobe *Clitocybe nebularis* 2

CnSucL – za saharozo specifičen lektin iz gobe *Clitocybe nebularis*

d – dolžina optične poti

Da – Dalton [g/mol] (enota atomske oz. molske mase)

DNA – deoksiribonukleinska kislina

$\epsilon$  – molarni absorptivni koeficient

fr. – frakcija

I – jakost izstopajoče svetlobe iz snovi

$I_0$  – jakost vpadne svetlobe v snov

IJS – Institut »Jožef Stefan«

IR-svetloba – infrardeča svetloba

kDa –  $10^3$  Da

LD<sub>50</sub> – smrtni odmerek

M – mol/L (množinska koncentracija)

MM – molekulska masa

mM –  $10^{-3}$  mol/L

$\mu$ m –  $10^{-6}$  mol/L

nM –  $10^{-9}$  mol/L

MST – mikrotermoforeza (ang. *MicroScale Thermophoresis*)

NaDS – natrijev dodecilsulfat

NaDS-PAGE – poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS

PBS – fosfatni pufer (ang. *Phosphate-Buffered Saline*)

pI – izoelektrična točka

rCnSLB – rekombinantni izolektin specifičen za saharozo

STD – standard (lestvica molske mase)

STDEV – standardni odklon

T – transmitanca

TAE-pufer – tris acetatni pufer

Tris – tris(hidroksimetil)aminometan

UV-svetloba – ultravijolična svetloba

## **1. UVOD**

### **1.1. Glive**

Glive najdemo v vseh ekosistemih, tako na kopnem, v vodi in v zraku (spore) [1]. Po zgradbi jih delimo na enocelične (kvasovke) in večcelične glive [2]. Telo gliv predstavlja steljka. Celice mnogoceličnih gliv se povezujejo v dolge nitke – hife, ki se na koncu razvejajo na dva dela. Preplet hif tvori micelij (podgobje), nekatere glive pa tvorijo plodišča, posebne razmnoževalne strukture na katerih se razvijejo spore ali trosi [3].

Kot heterotrofni evkarionti za vir energije in ogljika potrebujejo organske spojine drugih organizmov [4]. Glede na način pridobivanja hranilnih snovi jih delimo na gniloživke (saprofite), zajedavce (parazite) in soživke (simbionte). Saprofitske glive se hranijo z odmrlim organskim materialom. Pri tem v okolje sproščajo encime, ki razgradijo polimere, kot so celuloza, škrob, glikogen in proteini, na enostavne komponente, tudi na sladkorje. Parazitske glive hranila sprejemajo iz živih celic gostiteljskih organizmov. Simbionti lahko v naravi preživijo zaradi odnosov z drugimi organizmi, ki so koristni za oba partnerja. Najpogostejši sta dve vrsti sožitja, lišaji in mikorize. Lišaj je primer simbiotskega odnosa med glivo in algo oz. cianobakterijo, mikoriza pa med glivo in višjo rastlino [2].

Glive imajo pomembno vlogo na področju prehranske industrije, za proizvodnjo pekovskih izdelkov in sirov ter alkoholnih pijač [5]. Ključni pomen imajo tudi v medicini in veterini. Proizvajajo snovi, ki jih uporabljamo za izdelavo antibiotikov (penicilini), imunosupresivov in ergot alkaloidov [6]. Uporabljamo jih tudi pri številnih biokemijskih in genetskih raziskavah [5].

S haploidnimi sporami se lahko glive razmnožujejo tako spolno kot nespolno. Vegetativno razmnoževanje lahko poteka še s prenašanjem micelija, s sklerocijem ali gostim prepletom hif in z mitotsko rekombinacijo, tj. paraspolna oblika razmnoževanja, pri kateri nastanejo genetsko različni potomci. Tako jim raznovrstni načini razmnoževanja omogočajo večjo prilagoditev naslednje generacije potomcev okolju [7].

Na Zemlji obstaja po ocenah strokovnjakov vsaj 1,5 milijona različnih vrst gliv, od katerih je znanih več kot 100.000 [8]. Uvrščamo jih v kraljestvo gliv (*Fungi*), saj se od ostalih organizmov razlikujejo v zgradbi, načinu razmnoževanja in celični organizaciji [4]. Poznamo glive sluzavke (*Myxomycota*) in prave glive (*Eumycota*). Slednje tvorijo hife ali podobne izrastke in imajo celične stene skozi večji del ali celotni življenjski cikel. Njihov edini način prehranjevanja je absorpcija. Za razliko od pravih gliv glive sluzavke nimajo hif, celičnih sten v času rasti in prehranjevanja ter so sposobne sprejemanja hranilnih snovi s fagocitozo. Glede na način spolnega razmnoževanja prave glive razdelimo na pet razredov: jarmaste glive (*Zygomycetes*), hitridiomycete (*Chytridiomycetes*), oomicete (*Oomycetes*), prostotrosnice (*Basidiomycetes*) in zaprtotrosnice (*Ascomycetes*). V posebno skupino uvrščamo devteromicete (*Deuteromycetes*), katerih spolne faze ne poznamo [9].

### **1.2. Prostotrosnice (*Basidiomycetes*)**

Med prostotrosnice uvrščamo okoli 30.000 znanih vrst, kar predstavlja 37 % vseh pravih gliv [10]. Zanje je značilno razmnoževanje z bazidiosporami, sredstvi za spolno reprodukcijo, ki nastajajo na betasti strukturi imenovani bazidij [11]. Delimo jih v štiri skupine, od tega dve (*Hymenomycetes* in *Gasteromycetes*) obsegata gobe ali makroglive, ostali dve pa mikroglive rje (*Pucciniomycotina*) in sneti (*Ustilaginomycotina*), ki zajedajo rastline [9].

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

Poprhnjena livka ali meglenska (slika 1) je velika, sivo rjavkasta goba s sploščenim klobukom s premerom do 15 cm. Ta je suh ter belkaste barve. Prožen in na dnu odebeljen bet, dolg 6 do 15 cm, je pri mladi gobi zapolnjen z gobasto snovjo. Poprhnjena livka raste v iglastem in listnatem gozdu, najpogosteje na preperem listju. Polno mesnat bet z zorenjem postane gobast, s podolžno vlaknasto strukturo. Dobro razširjena je v Veliki Britaniji in na Irskem, kjer raste od septembra do začetka decembra. V Sloveniji jih najdemo na Primorskem na apnenčastih tleh [12]. Ima sladek vonj sadja, nekateri zaznajo vonj tulipana, in neizrazit okus. Za uživanje ni nevarna, a pogojno užitna. Še posebej mladi primerki pogosto povzročijo motnje v prebavi [13].



Slika 1: Poprhnjena livka

### **1.4. Biološko aktivne snovi iz gob**

Glive se pogosto uporabljajo v tradicionalni medicini in kot prehranska dopolnila. Najpogosteje delujejo imunomodulatorno in protitumorsko, tudi kot antioksidanti. Delujejo tudi protivnetno, protivirusno in protibakterijsko. Njihovi adaptogeni učinki povečajo odpornost telesa na stres in utrujenost [14].

V zdravnih gobah so prisotni številni polisaharidi, med najpomembnejšimi so  $\beta$ -D-glukani. Nekateri imajo heterosaharidne verige iz manoze, galaktoze, uronske kisline in ksiloze, nekateri pa so vezani na proteoglikane in glikoproteine. Zelo pogosto se uporabljata lentinan,  $\beta$ -D-glukan iz užitnega nazobčanca (*Lentinula edodes*), in shizofilan iz navadne cepilistke (*Schizophyllum commune*) z dokazanimi imunomodulatornimi in protitumorskimi učinki. Rezultati raziskav dokazujejo, da imajo gobe visoko vsebnost vlaknin in malo maščob ter tako ugodno delujejo na našo črevesno floro. Sveže vsebujejo od 3 do 21 % polisaharidov in od 3 do 35 % vlaknin, ki niso prebavljive. Do leta 2001 je bilo odkritih okoli 650 prostotrosnic, ki so vsebovale biološko aktivne ogljikove hidrate. Enake učinke so pokazali tudi heteropolisaharidi. Izvlečke aktivnih heksoz pridobivamo iz gob prostotrosnic, gojenih na rižu. Med polisaharide z aktivnim delovanjem uvrščamo tudi prehranske vlaknine in prebiotike, od katerih disaharid trehaloza pospešuje rast črevesnih bakterij in je njihov pomemben substrat [14]. Prisotni so tudi terpenoidi, ki so sestavljeni iz različnega števila enot izoprena. V gobah so najpogosteje prisotni triterpenoidi, steroli in steroidi z močnim citotoksičnim delovanjem. V kitajskem glavatcu so odkrili spojino kordicepin, ki zavira podvojevanje DNA in deluje kot antimetabolit. Gobe so pomemben vir vitamina D in  $\beta$ -karotena. Slednji je prekurzor vitamina A, vitamin D<sub>2</sub> pa nastane iz ergosterola v celičnih stenah gliv. Gobe vsebujejo večje količine mineralov in elementov v sledovih kot rastline. V

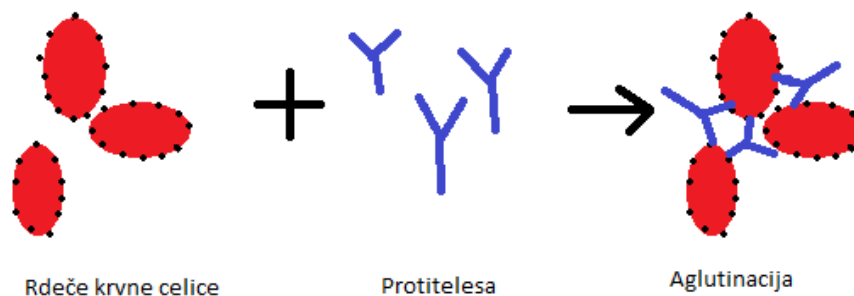
njih najdemo veliko bakra, cinka, selena in železa, med mineralnimi snovmi pa prevladujejo fosfor, kalij in kalcij [14].

Farmakološko aktivni so tudi lektini, imunomodulatorni proteini, manjši polipeptidi, proteini, ki inhibirajo aktivacijo ribosomov, inhibitorji proteaz in nekateri encimi, ki so pokazali protiglivne, protivirusne, protitumorske in imunomodularne lastnosti [14].

### 1.5. Lektini

Lektini so proteini, ki specifično prepoznajo ogljikove hidrate in jih vežejo reverzibilno. Poznamo preko 200 terciarnih oblik živalskih, rastlinskih, bakterijskih in virusnih lektinov [15]. Že v 19. stoletju je bil odkrit obstoj proteinov, ki aglutinirajo eritrocite. Te proteine so poimenovali hemaglutinini [16].

Aglutinacija je pojav, pri katerem se celice ali inertni delci združujejo preko vezave specifičnih protiteles na antigene. Če so ti antigeni komponente površin celic ali inertnih delcev, pojav imenujemo direktna aglutinacija. Pasivna aglutinacija pa poteče, če so antigeni povezani na celice ali inertne delce z adsorpcijo [17]. Vsaka lektinska molekula vsebuje navadno 2 ali več vezavnih mest za povezavo z ogljikovimi hidrati. Zato pri reakciji s celicami, na primer eritrociti, ob vezavi na sladkorje na njihovi površini povzročijo prekrivanje celic in zato izločanje v skupkih (slika 2) [18]. Aglutinacije eritrocitov so sposobni tudi rastlinski proteini, virusi, soli težkih kovin, anorganske koloidne kisline in baze, protamini in histoni [17].



*Slika 2: Aglutinacija eritrocitov*

V 20. stoletju so znanstveniki ugotovili, da ti proteini aglutinirajo tudi druge vrste celic in da so specifični za sladkorje; poimenovali so jih lektini [16, 19].

Glikokonjugati so ogljikovi hidrati, kovalentno povezani s proteini oziroma lipidi. Poznamo tri tipe glikokonjugatov: proteoglikani, glikoproteini in glikolipidi. Čeprav so povezave pri prvih dveh vrstah enake, se kemijsko proteoglikani obnašajo kot polisaharidi, glikoproteini z manjšo vsebnostjo ogljikohidratnega dela pa kot proteini [20].

Lektini sodelujejo pri vezavi med polisaharidi in glikoproteini. Večina lektinov ima vlogo di- ali oligovalenta, vsaka lektinska molekula ima torej vsaj dve mesti za vezavo ogljikovih hidratov. Tako tvorba vezi s sladkorji na njihovi površini omogoča prekrivanje celic (povezovanje med celicami) ali makromolekul z vsebnostjo sladkornih enot (ang. cross-linking) [18]. Vezava med ogljikovimi hidrati in lektini nastane predvsem z vodikovimi vezmi, z znatnim prispevkom van der Waalsovih sil in hidrofobnih interakcij [21]. Lektini in ogljikovi hidrati so v točno določenih parih povezani z mnogimi relativno šibkimi vezmi. Te vezi so dinamične in se lahko pretrgajo, ko je to potrebno [19].

Po specifičnosti vezave na monosaharide delimo lektine na za manozo, galaktozo/N-acetilgalaktozamin, N-acetilglukozamin, L-fukozo ali N-acetilneuraminsko kislino specifične. Za manozo specifični lektini prepoznajo tudi L-fukozo, ostali lektini pa se zaradi visoke specifičnosti vežejo le na eno vrsto monosaharida. Lektini se z visoko specifičnostjo vežejo tudi na di-, tri- in tetrasaharide [22].

Aglutinacija z lektini je podobna tistim s protitelesi. Le-to pa lahko specifično inhibirajo spojine z nizko molekulsko maso, ki so v primeru lektinov sladkorji. Lektini se razlikujejo od protiteles v številnih lastnostih. Veliko lektinov v rastlinah, mikroorganizmih in virusih ni zmožnih imunskega odziva. Protitelesa so si strukturno podobna med seboj, lektini pa se v medsebojni zgradbi razlikujejo. Slednji se namreč razlikujejo v velikosti, aminokislinski zgradbi, zahtevi po železu, organizaciji domene, številu podenot in tudi v terciarni strukturi. Zaradi teh strukturnih raznolikosti so lektini sorodni encimom, vendar niso zmožni katalize. Razvrstimo jih lahko v družine homolognih proteinov, največji in najboljše karakterizirani so rastlinski lektini [23].

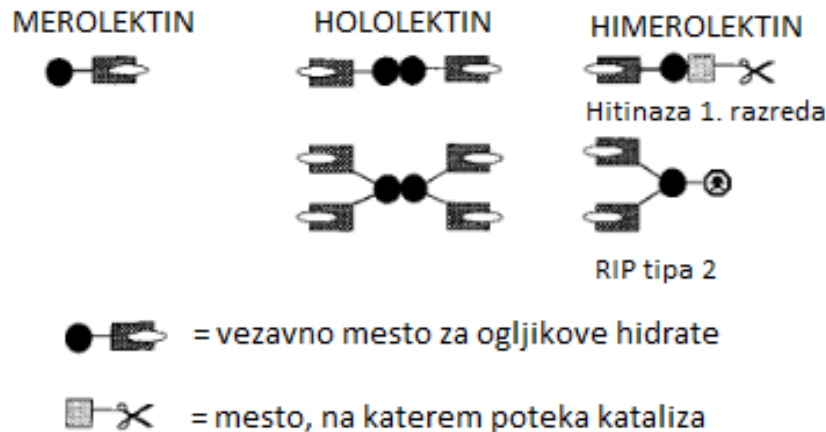
### **1.5.1. Vrste lektinov glede na zgradbo**

Lektini so kot neencimski proteini s svojo reverzibilno vezavo in visoko specifičnostjo vezave na ogljikove hidrate prisotni pri vseh organizmih v naravi. Kljub razlikam v velikostih in oblikah jih lahko razvrstimo v skupine s podobnimi lastnostmi. Vezavna mesta lektinov so raznolika, vendar so podobna znotraj skupine. Specifične lastnosti lektinov so določene s točno obliko vezavnih mest in naravo aminokislinskega ostanka, na katerega se ogljikov hidrat veže. Manjše spremembe v zgradbi teh mest, kot je substitucija le ene ali dveh aminokislin, lahko povzroči opazne spremembe v specifičnosti vezave [21].

Po zgradbi delimo lektine v 3 večje skupine: merolektine, hololektine in himerolektine (slika 3). Merolektini so manjši proteini z enim vezavnim mestom za skupine ogljikovih hidratov. Zaradi svoje monovalentnosti niso sposobni aglutinacije celic ali tvorbe glikokonjugatov [24].

Hololektini lahko vežejo le ogljikove hidrate, a vsebujejo dve ali več med seboj enakih oz. zelo podobnih vezavnih mest. V tej skupini lektinov so vsi z več mesti vezave, sem spada večina znanih rastlinskih lektinov, ki so jih odkrili zaradi sposobnosti hemaglutinacije [24].

Himerolektini so sestavljeni proteini z eno domeno, ki je sposobna vezave ogljikovih hidratov, in z drugo domeno z dobro določenim katalitskim ali drugim biološkim delovanjem, neodvisnim od prve domene. Od števila mest za vezavo ogljikovih hidratov je odvisno, ali se himerolektin obnaša kot merolektin ali kot hololektin. Proteini, ki na primer z dvema vezavnima mestoma na B verigi inaktivirajo ribosome (RIP) tipa 2 (npr. ricin), aglutinirajo celice in delujejo kot hololektini, medtem ko rastlinske hitinaze 1. razreda z enim vezavnim mestom za hitin delujejo kot merolektini [24].



Slika 3: Shematske predstave vrst lektinov

### 1.5.2. Vloga lektinov v bioloških sistemih

Največkrat lektine zasledimo v uporabi v biotehnologiji. Njihove lastnosti, predvsem zmožnost vezave glikokonjugatov, pogosto izkoriščamo v biokemiji, biologiji celice in mikrobiologiji, farmakologiji ter medicini. Na celice delujejo z aglutinacijo, mitogensko stimulacijo, redistribucijo komponent celične membrane, uravnavanjem aktivnosti membrane celičnih encimov, zaviranjem rasti bakterij in gliv, celično agregacijo, toksičnostjo in imunomodulacijo [25].

Nekateri lektini lahko pomagajo pri diagnostiki bolezni. Eden takih je lektin, izoliran iz semen rastline *Cratylia mollis*, ki lahko prepozna glikoproteine virusa denge [25]. Nekateri lektini, sposobni vezave na hitin, imajo protiglivične učinke [24].

Glavna vloga lektinov v bioloških sistemih je spodbujanje stika med celicami, kar omogoča veliko število biokemijskih procesov, vse od tvorbe tkiv iz izoliranih celic do prenosa informacij med njimi. Interakcije med površino ene celice z ogljikovimi hidrati in med površino celice z lektini so podobni delovanju ježka. Pri tem vezavna mesta lektinov na eni celici vzajemno delujejo na skupine ogljikovih hidratov na površini druge celice [19].

#### 1.5.2.1. Protimikrobno delovanje

Mikrobni površinski lektini delujejo kot pritrjevalno sredstvo na celico za viruse (npr. virus influence), bakterije (npr. *Escherichia coli*) in protiste (npr. ameba), zato so nujno potrebni za začetek okužbe. Ob preprečitvi vezave z uporabo ogljikovih hidratov, ki posnemajo tiste, na katere se njihovi lektini vežejo, se lahko prepreči nastanek okužbe, kar omogoča razvoj antiadhezivne terapije proti mikrobnim boleznim [21].

Predvsem lektini, zmožni vezave na manozo in na N-acetilglukozamin, imajo protivirusno delovanje na virus HIV. Ne le preprečujejo okužbo celic, temveč tudi širjenje te virusne okužbe do neokuženih limfocitov T [25].



#### 1.5.2.2. Mitogena in antiproliferativna aktivnost

Lektini delujejo mitogeno v enojedrnih krvnih celicah in antiproliferativno v človeških rakavih celicah, kot so na primer celice levkemije, jetrno celičnega raka in raka na dojkah. Mitogena dejavnost je skupna lastnost mnogih, sploh glivnih lektinov, ki mitogeno delujejo na splenocite [25]. Ti so vrsta levkocitov, ki se nahajajo v vranici [26]. Lektin specifičen za vezavo galaktoze, ki se nahaja v strupu kače *Bothrops leucurus*, deluje protirakavo, tako da povzroči celično smrt celic melanoma [25].

#### 1.5.2.3. Lektini in žuželke

Lektini lahko delujejo kot učinkovit insekticid [19]. Vnos lektinskega gena v nekatere rastline, kot so pšenica, riž, tobak in krompir, se je v zadnjih desetletjih že izkazal za uporabnega pri obrambi rastline pred listnimi ušmi, molji in svetivci [27].

Rastlinski lektini škodljivo učinkujejo na žuželke v različnih fazah življenja. Žuželkam škodujejo s povzročanjem motenj njihovih fizioloških procesov. Čeprav točni mehanizmi insekticidnega delovanja rastlinskih lektinov niso povsem poznani, mnogo raziskav predlaga lastnost prepoznavanja ogljikovih hidratov, ki jo premorejo lektini, kot ključno pri tem učinku. Lektini delujejo toksično v stiku z insektnimi črevesnimi strukturami v peritrofični membrani oziroma v hitinski strukturi srednjega črevesa, s čimer zavirajo prebavo in absorpcijo, kar povzroči pomanjkanje hranilnih snovi in posledično smrt žuželke. Lektini zmanjšajo absorpcijo hranil tudi z vezavo na epitelne celice srednjega dela prebavnega trakta, te so namreč bogate z glikoproteini, ki so sposobni vezave z lektini. Lektini lahko iz srednjega črevesa vstopijo v obtočila žuželke, kjer delujejo toksično s povzročanjem motenj delovanja endogenih lektinov v hemolimfi z vlogo samoobrambe [27].

#### 1.5.2.4. Uporabnost lektinov v citokemiji/histokemiji

S pomočjo lektinov lahko prepoznamo ogljikove hidrate, ki so del glikokonjugatov v celicah. To vezavo zaznamo s tehnikami vizualizacije, z uporabo označenih lektinov, ali pa z neposrednim načinom, kot so imunološke tehnike. Radioaktivno označeni konjugirani lektini so občutljivi in specifični reagenti za prepoznavo glikoproteinov in ostalih glikokonjugatov. Predstavljajo citokemijske in histokemijske pripomočke za prepoznavo glikokonjugatov v najrazličnejših človeških ali živalskih tkivih in doprinašajo k diagnosticiranju različnih bolezni. Uporabni so tudi v forenzični medicini, saj pomagajo pri raziskavah in diagnosticiranju možganskih obolenj umrlih ljudi [25].

### 1.5.3. Lektini po izvoru

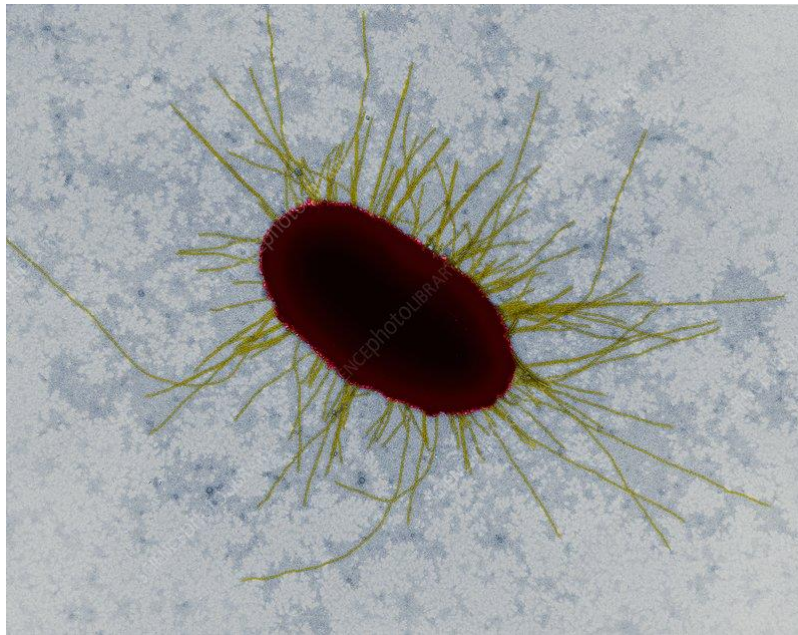
#### 1.5.3.1. Rastlinski lektini

Rastline so bogat vir lektinov. Ti se nahajajo v različnih rastlinskih tkivih, največji vir lektinov so običajno semena [25].

Nekateri rastlinski lektini imajo vlogo založnih proteinov, služijo torej kot vir dušika [28]. Lektini v rastlinah lahko pomagajo pri obrambi rastline pred patogenimi mikroorganizmi, virusi, žuželkami, glistami in rastlinojedci, saj motijo delovanje glikokonjugatov, ki so udeleženi pri razvoju in fiziologiji naštetih organizmov [25].

#### 1.5.3.2. Bakterijski lektini

Lektini so prisotni tudi v bakterijah. Bakterije *Escherichia coli* (slika 4) so se sposobne obdržati na celicah povrhnjice prebavne cevi s prepoznavo skupin oligosaharidov na površini tarčnih celic. Ti lektini so prisotni na tankih izrastkih bakterijske celice, ki se imenujejo fimbriji [19].



Slika 4: Bakterija *Escherichia coli* z vidnimi fimbriji

#### 1.5.3.3. Lektini v višjih glivah

Prvi lektin v gobah je odkril Rudolf Kobert leta 1891 v zeleni mušnici (*Amanita phalloides*), to je bil hemolitični lektin falin. Kasneje je bil v rdeči mušnici (*Amanita muscaria*) odkrit tudi gobji hemaglutinin [29].

Gobji lektini so bili izolirani iz micelija, spor ter drugih delov gob. Večina lektinov iz gob je dimernih proteinov, katerih podenote so povezane z nekovalentnimi vezmi. Izjema so nekateri lektini, ki so povezani z disulfidnimi vezmi. Prisotnih je več različnih skupin lektinov glede na terciarno strukturo in glede na specifičnost za vezavo ogljikovih hidratov. Izoelektrične točke večine gobjih lektinov so v območju od 5 do 8. Glede kinetike vezave lektinov in ogljikohidratnih ligandov je na voljo malo informacij [29].

##### 1.5.3.3.1. Lektini iz poprhnjene livke (*Clitocybe nebularis*)

Raziskovalci so že leta 1978 s pomočjo afinitetne kromatografije izolirali lektin iz poprhnjene livke, ki specifično veže N-acetilgalaktozamin [30]. Tudi na Institutu »Jožef Stefan« že desetletja preučujejo lektine iz gob. Z uporabo sladkornih afinitetnih kromatografij so izolirali lektine, ki se specifično vežejo na galaktozo (CnGalLs), glukozo (CnGlcL), laktozo (CNL), saharozo (CnSucL) ali sefarozo (CnSepLs). Toksikološki testi z vinsko mušico (*Drosophila melanogaster*) so pokazali, da je lektin CnSucL, izoliran iz gobe *Clitocybe nebularis*, zelo močan insekticid ( $LD_{50} 5,5 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$ ) [31, 32].

Na človeške eritrocite krvne skupine A saharozil-specifičen lektin oz. saharozil-lektin (CnSucL) nima izrazite aglutinacijske aktivnosti. Od ostalih lektinov, izoliranih iz poprhnjene livke, se razlikuje v številu podenot in visoki izoelektrični točki (pI nad 9,3) [32].

*Tabela 1: Biokemijske lastnosti lektinov iz poprhnjene livke [32]*

<i>Lektin</i>	<i>velikost določena z analizo NaDS-PAGE [kDa]</i>	<i>velikost določena z masno spektrometrijo (ESI-MS) [Da]</i>	<i>Število podenot</i>	<i>izoelektrična točka</i>
<i>CnSepL-1</i>	17	16.454	2	4,3
<i>CnSepL-2</i>	15	15.602	2	4,3
<i>CNL</i>	19	15.903	2	4,3
<i>CnGalls</i>	19; 17,5; 15,5	/	2	4,8
<i>CnGlCL</i>	31	29.648	2	5
<i>CnSuCL</i>	21	20.293	1	> 9,3

## 1.6. Ogljikovi hidrati

En vzrok za zapleteno zgradbo organskih spojin biološkega izvora je potreba po prepoznavi molekul med seboj za namen opravljanja svojih vlog, to pa omogočajo njihove raznolike strukture [33].

Ogljikovi hidrati so ena izmed najbolj razširjenih vrst organskih spojin, ki sestavljajo žive organizme. Nastanejo kot produkt fotosinteze, endotermne redukcijske kondenzacije ogljikovega dioksida, za katero sta – med drugim – potrebna svetlobna energija in barvilo klorofil [34].

Mnogi ogljikovi hidrati imajo empirično formulo  $C_x(H_2O)_n$  [35]. Njihova topnost v vodi je posledica hidroksilnih skupin v ogljikovih hidratih ter ketonske oziroma aldehidne skupine. Današnja definicija ogljikovih hidratov obsega tudi reducirane in oksidirane molekule ter tiste, ki vsebujejo druge vrste atomov, pogosto dušik [36].

Izraze ogljikov hidrat, saharid in sladkor (s pojmom sladkorji so označeni monosaharidi, disaharidi in trisaharidi [36]) pogosto lahko uporabimo pri poimenovanju iste vrste snovi [33]. Sinonim za ogljikove hidrate so glikani [35].

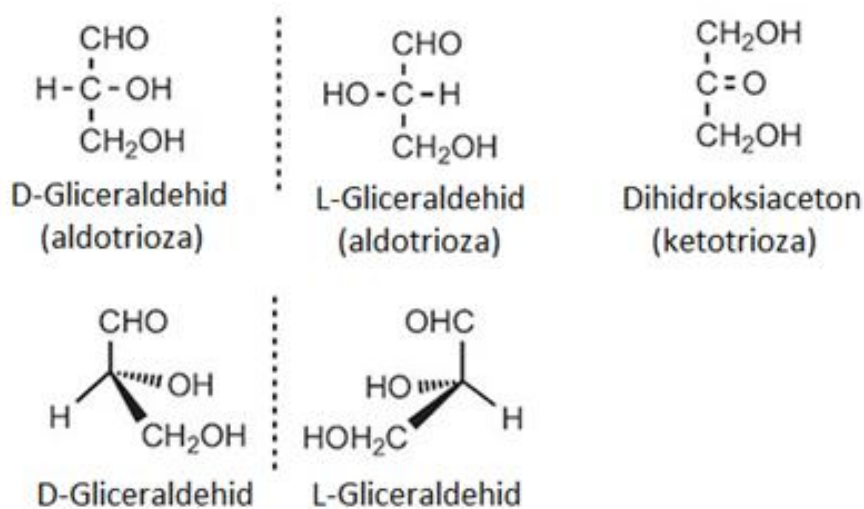
Ogljikove hidrate razdelimo na enostavne in sestavljene. Enostavni so monosaharidi, sestavljeni pa vsebujejo dve ali več monosaharidnih enot, povezanih med seboj. Disaharidi so iz dveh, oligosaharidi iz treh do deset, polisaharidi pa iz več kot deset monosaharidnih enot, navadno več tisoč. Vse sestavljene ogljikove hidrate lahko s hidrolizo razcepimo na monosaharide [33].

Ogljikove hidrate lahko označimo kot kompleksne, če vsebujejo več kot eno vrsto monosaharidnih podenot. Polimer celuloza, zgrajen iz samih monosaharidov glukoze, je primer preprostega ogljikovega hidrata, medtem ko je polisaharid galaktomanan kompleksen polisaharid, ki je zgrajen iz enot galaktoze in manoze. Čeprav so polisaharidi, kot sta celuloza in škrob, preprosti, so njihove strukture kompleksne in trodimenzionalne [35].

### 1.6.1. Struktura monosaharidov

Raziskovanje strukture monosaharidov se je začelo konec devetnajstega stoletja z delom Emila Fischerja. Do sedaj je znano, da so vsi monosaharidi zgrajeni iz kiralnih hidroksimetilnih enot, ki se na enem koncu končajo s hidroksimetilno skupino in na drugem koncu z aldehydno (aldoze) ali  $\alpha$ -hidroksiketonsko skupino (ketoze) [35].

Glicerinaldehid je najpreprostejša aldoza, dihidroksiaceton pa najpreprostejša ketoza (slika 5). Glicerinaldehid vsebuje en kiralen ogljikov atom, medtem ko ga dihidroksiaceton nima. Vsi monosaharidi razen dihidroksiacetona vsebujejo vsaj en kiralen ogljikov atom, število teh je enako številu notranjih CHOH skupin (teh je  $n - 2$  pri aldozah in  $n - 3$  pri ketozah,  $n$  je število ogljikovih atomov v monosaharidu). Število stereoizomerov monosaharida je torej  $2^k$ , kjer je  $k$  število asimetričnih ogljikovih atomov v molekuli [35].



Slika 5: Strukturi dveh stereoizomerov glicerinaldehida in struktura dihidroksiacetona

Ali je konfiguracija sladkorja D ali L, je odvisno od absolutne konfiguracije stereogenega centra, ki je najdlje od karbonilne skupine. Konfiguracijo monosaharida najlažje določimo s predstavitvijo strukture v Fischerjevi projekciji, če je OH skupina (ali druga skupina, ki ni vodikov atom) na desni strani v Fischerjevi projekciji, je konfiguracija D. Če je skupina OH (ali druga skupina, ki ni vodikov atom) na levi strani v Fischerjevi projekciji, je konfiguracija L. Večina vretenčarskih monosaharidov ima D konfiguracijo, izjema sta fukoza in iduronska kislina, ki imata konfiguracijo L [35].

Dva sladkorja, ki se razlikujeta le v konfiguraciji enega kiralnega ogljikovega atoma, se imenujeta epimera [33]. D-glukoza, D-manoza in D-galaktoza so najpogostejše aldoheksoze v bioloških sistemih. D-manoza je C-2 epimer D-glukoze, D-galaktoza pa je C-4 epimer D-glukoze. Epimeri so vrsta diastereomerov [35].

V vretenčarskih glikokonjugatih večinoma najdemo 9 različnih monosaharidov. Te enote monosaharidov so v glikanih lahko še naprej spremenjene za nastanek novih sladkornih struktur. Glukoromična kislina je lahko na primer epimerizirana na C-5 atomu, da nastane iduronska kislina [35].

#### 1.6.1.1. Ciklične strukture monosaharidov

D-glukoza obstaja v treh različnih oblikah. Lahko je v aciklični in v dveh cikličnih oblikah, to sta  $\alpha$ -D-glukoza in  $\beta$ -D-glukoza. Dokaz za obstoj različnih oblik so različne fizikalne lastnosti obeh cikličnih oblik, razlikujeta se v tališču in specifični rotaciji polarizirane svetlobe [33].

Ciklične oblike aldoz nastanejo z intramolekulsko reakcijo med aldehidno in C-5 hidroksilno skupino, pri kateri nastane šestčlenski obroč hemiacetal. Nastaneta dve različni obliki hemiacetala, ker postane ogljikov atom karbonilne skupine monosaharida nov center kiralnosti v hemiacetalu [33].

Ta kiralni center imenujemo anomerni ogljikov atom, dva stereoizomera, ki ju določa ta kiralni center, se imenujeta anomera [35]. Anomeri so, tako kot epimeri, vrsta diastereomerov [33].

V raztopinah monosaharidov obstaja ravnotežje acikličnih in cikličnih oblik monosaharidov. Razmerje med acikličnimi in cikličnimi oblikami monosaharidov je odvisno od zgradbe sladkorja. V raztopinah prevladujejo ciklični hemiacetali s petimi ali šestimi C-atomi, le majhen del molekul obstaja v obliki odprte verige (približno 0,02 %). V ravnotežju je skoraj dvakrat več  $\beta$ -D-glukoze (64 %) kot  $\alpha$ -D-glukoze (36 %). Tvorba petčlenskega ali šestčlenskega obroča, je odvisna od relativne stabilnosti aldoze. Šestčlenski obroči sladkorjev se imenujejo piranoze, petčlenski pa furanoze [33].

### **1.6.2. Povezovanje monosaharidov**

Anomerni ogljikov atom hemiacetala lahko reagira s hidroksilno skupino alkohola, pri čemer nastane acetal. Acetalu sladkorjev pravimo glikozid, vezi med anomernim ogljikovim atomom in kisikovim atomom, ki je bil prej del alkohola, pa glikozidna vez [33]. Podobno kot hemiacetali tudi acetal ali glikozidna vez obstajata v dveh različnih oblikah, v  $\alpha$  in  $\beta$  obliki [35].

Če nastane acetal z reakcijo med hemiacetalno skupino enega monosaharida in hidroksilno skupino drugega monosaharida, se nastali glikozid imenuje disaharid [33]. Na takšen način se povezujejo tudi monosaharidi v oligosaharide [35] in polisaharide. Škrob in celuloza sta polisaharida, zgrajena iz glukoze, ki se razlikujeta v tipu glikozidnih vezi. v škrobu so prisotne  $\alpha$ -glikozidne vezi, v celulozi pa  $\beta$ -glikozidne vezi. Vsi sesalci imajo encim, ki hidrolizira  $\alpha$ -glikozidne vezi, nimajo pa vsi encima za hidrolizo  $\beta$ -glikozidnih vezi, zaradi česar so vsi sposobni prebave škroba, ne pa tudi celuloze [33].

### **1.6.3. Ogljikovi hidrati na celičnih površinah**

Površine mnogih celic vsebujejo kratke polisaharidne verige, ki so s površino povezane zaradi reakcije anomernega ogljikovega atoma cikličnega sladkorja s hidroksilno ali amsko skupino proteina. Polisaharidi na površinah celic delujejo tudi kot mesto vezave za ostale celice, viruse in toksine [33].

Mnogo znanih antibiotikov vsebuje aminosladkorje, kar kaže, da v svojem delovanju prepoznajo ciljne celice. Glikani na površini celic sodelujejo tudi pri nadzoru celične rasti, zato so spremembe teh glikoproteinov opazne pri malignih transformacijah. Glikoproteini na površinah krvnih celic določajo krvno skupino, vsako krvno skupino spremlja različna glikanska struktura. Prisotnost neznane strukture ogljikovih hidratov na površini krvnih celic povzroči sproščanje protiteles, ki tuje delce označijo, da jih celice imunskega sistema potem uničijo. Kri tipa AB ima vse polipeptidne strukture tipa A in tipa B, vsi tipi krvi pa vsebujejo glikanske strukture tipa O, zaradi česar lahko vsi ljudje sprejmejo kri tipa O [33].

### **1.6.4. Vezava lektinov s sladkorji**

Proteine, ki vzajemno delujejo na sladkorje, ločimo v skupine glede na to, kako to sodelovanje poteka. Nekateri prenašajo sladkorje po celični membrani, da zagotovijo hrano celicam, drugi preoblikujejo saharide v metabolnih procesih ali pa se kovalentno vežejo na lipide in druge proteine. Kristalografija visokega spektra dokazuje, da vodikove vezi prispevajo velik delež k vezni energiji. Energija, ki se sprosti pri vezavi proteina oziroma lektina in ogljikovega hidrata, je navadno nižja od tiste, ki nastane pri vezavi

proteina s proteinom. Nizka afiniteta lektinov do ogljikohidratov se do neke mere nadomesti s številčnostjo vezav, kar poveča afiniteto vezave [37].

## 1.7. Specifičnost vezave lektinov s sladkorji

Pri vezavi lektinov na glikane večinoma sodelujejo karboksilne in karboksilaminske kisline, v manjši meri tudi preproste kisline ter aromatske kisline. Galektin 2 iz človeške vranice na primer tvori kompleks z laktozo, pri katerem so stranske verige treh aminokislin (asparagina, arginina in histidina) z vodikovimi vezmi povezane s 4-OH na galaktozi. Tudi vsebovan triptofan [38] (hidrofobna aminokislina [39]) leži ob sladkornem obroču. 6-OH je prav tako z vodikovimi vezmi povezana z galektinom 2, medtem ko 2-OH in 3-OH nista povezana. Ker lahko dajejo različne vrste aminokislin enako možnost vezave z vodikovo vezjo ali enako možnost hidrofobne interakcije, se lahko lektini, zgrajeni iz različnih zaporedij aminokislin, vežejo z istimi ogljikovimi hidrati [38].

### 1.7.1. Specifična vezava rekombinantnega saharozil lektina B s preprostimi sladkorji

Sladkorji saharoza, D-glukoza, D-fruktoza in D-manoza z vezavo na izolektin rCnSLB2 inhibirajo sposobnost le-tega za aglutinacijo krvnih celic. Inhibicija je odvisna od koncentracije sladkorja (Tabela 2) [40].

*Tabela 2: Najmanjše inhibitorne koncentracije in titri inhibicije hemaglutinacije saharozil izolektina rCnSLB2 s sladkorji [40]*

	<i>saharoza</i>	<i>D-glukoza</i>	<i>D-fruktoza</i>	<i>D-manoza</i>
<i>Najmanjša inhibitorna koncentracija sladkorja</i>	<i>0,11 M</i>	<i>0,22 M</i>	<i>0,22 M</i>	<i>0,43 M</i>
<i>Titer inhibicije hemaglutinacije</i>	<i>9,3 M<sup>-1</sup></i>	<i>4,6 M<sup>-1</sup></i>	<i>4,6 M<sup>-1</sup></i>	<i>2,3 M<sup>-1</sup></i>

## 1.8. Kromatografija

Kromatografija se uporablja za ločevanje, določanje in identifikacijo sestavin v različnih zmesih [41]. Je separacijska metoda, pri kateri se sestavine selektivno porazdelijo med mobilno in stacionarno fazo [42]. Preko nje potuje analit, ki je raztopljen v tekoči ali plinasti mobilni fazi [43].

Možnost ločbe različnih sestavin v mešanici organskih spojin temelji na selektivni in preferenčni vezavi posameznih spojin v mobilni fazi na stacionarno fazo. Pri organski kemiji sta najpogosteje uporabljeni plinska (GC) in tekočinska kromatografija (LC) [42]; pri našem delu smo uporabili različico tekočinske kromatografije, in sicer afinitetno kromatografijo.

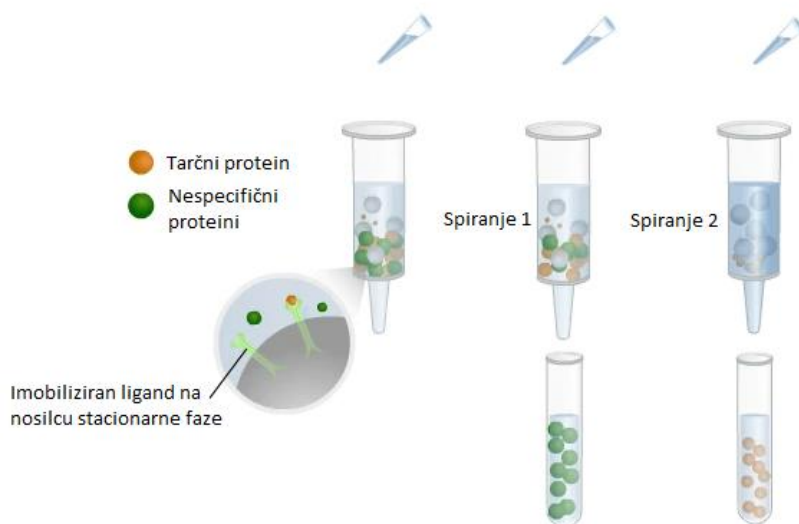
### 1.8.1. Afinitetna kromatografija

Za izolacijo proteinov obstaja več metod. Pri gelski filtraciji s porozno smolo ločimo molekule na podlagi njihove velikosti. Pri ionski izmenjevalni kromatografiji opazujemo moč ionskih interakcij molekul z materialom trdne faze. Vse tradicionalne metode zahtevajo raztopljene molekule, ki so ločene na podlagi fizikalno-kemijskih lastnosti [44]. Afinitetna kromatografija (slika 6) temelji na sposobnosti specifične vezave proteinov in polipeptidov na ligande, ki so kovalentno povezani z nosilcem (t.j. stacionarna faza) [45].



Protein, ki ga želimo izolirati iz kompleksne mešanice proteinov, spustimo skozi navzkrižno povezan polimer ali gel, na katerega je kovalentno vezan specifičen ligand tega proteina. Snov v obliki gela tvori ohlapno, prozorno mrežo, ki omogoča enakomeren in neoviran prehod velikih makromolekul, zato je priporočeno, da so delci gela enake velikosti [46]. Vsi proteini brez afinitete za vezavo tega liganda bodo prešli skozi gel, medtem ko bodo tisti, ki ligand prepoznajo, zadržani v skladu z njeno afiniteto zanj. Uspešna izvedba ločbe zahteva vzajemno delovanje liganda s proteini [45].

Na vezavo tarčnega proteina z ligandom lahko vplivamo z različnimi parametri, kot so koncentracija soli, pH in dodajanje ligandov v raztopino [45].



*Slika 6: Shema poteka afinitetne kromatografije*

## 1.9. Elektroforeza

Elektroforeza je metoda, s katero ločujemo makromolekule v mešanicah z uporabo električnega toka. Makromolekule nanese na koncentracijski gel in se pod vplivom električnega toka pomikajo po ločevalnem gelu z različnimi hitrosti, kar je odvisno od lastnosti gela in makromolekul [47].

### 1.9.1. NaDS-PAGE

NaDS-PAGE (poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS) izvajamo v poliakrilamidnem gelu, ki nastane s polimerizacijo akrilamida in bisakrilamida. Pred zamreženjem gelu dodamo ionski detergent NaDS, ki se veže na proteine in jih negativno nabije. Ena molekula NaDS se veže v enakem razmerju na aminokislinske skupine denaturiranih proteinov. Vsi proteini pridobijo enak naboj na enoto mase, zato se v električnem polju ločujejo le po velikosti [47].

Poliakrilamidne gele navadno poimenujemo glede na vsebnost akrilamida, na splošno se gele z manjšo vsebnostjo uporablja za ločevanje nukleinskih kislin in izoelektrično fokusiranje, gele z večjo od 10 % pa za ločevanje proteinov z NaDS-PAGE. Analizo z NaDS-PAGE pogosto uporabljamo za določitev molekulske mase proteinov, za spremljanje čistosti proteina in za določanje prisotnosti proteinov v kompleksnih mešanicah [47].

Tako proteini večje mase potujejo počasneje, proteini manjše pa hitreje in s tem dlje po gelu. Vizualiziramo jih z barvili (npr. Coomassie modro). Večina gelov NaDS-PAGE vsebuje ozek koncentracijski gel z manjšo vsebnostjo poliakrilamida, po katerem proteini potujejo z višjo hitrostjo in

se ob dosegu ločevalnega gela močno upočasnijo, posledica česar so istočasen prehod na ločevalni gel, povečana ločljivost in ponovljivost elektroforeze [47].

## 1.10. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je metoda, s katero kvantitativno merimo interakcijo UV-svetlobe, IR-svetlobe ter vidne svetlobe s snovjo, kar je uporabno za velik del znanosti in tehnologije. Ta interakcija je odvisna od fizičnih lastnosti snovi, kot so prozornost ali motnost, gladkost ali hrapavost, čistost ali kontaminacija, in ali je snov v tankem ali debelem sloju. Pogosto s to metodo merimo optične lastnosti materiala, kot so odbojnost svetlobe, transmittanca, absorpcija, emitanca, razpršenost svetlobe in fluorescenca [48].

Spektrofotometer sestavljajo trije osnovni deli: vir svetlobe, držalo za vzorec in detektor. Različni spektrofotometri imajo različna območja delovanja, ki so odvisna od vira in detektorjev svetlobe, ki jih je po navadi več vrst v eni napravi [48].

### 1.10.1. Beer-Lambertov zakon

Ko svetloba vpada na medij, se je navadno nekaj odbije od površine, nekaj absorbira in nekaj prodre skozi snov. Transmittanca ( $T$ ) je definirana kot količnik jakosti izhodnega ( $I$ ) in vpadnega ( $I_0$ ) žarka svetlobe (enačba 1). V primeru nizkih koncentracij raztopin velja Beer-Lambertov zakon (enačba 2) [48]. Ta pravi, da je absorbanca ( $A$ ) produkt molarne ekstinkcijskega koeficienta ( $\epsilon$ ), molarne koncentracije ( $c$ ) in dolžine optične poti ( $d$ ) (enačba 2). Hkrati je absorbanca negativni logaritem transmittance. Ekstinkcijski koeficient je lastnost snovi [48].

*Enačba 1: Izraz za izračun transmittance*

$$T = \frac{I}{I_0}$$

*Enačba 2: Beer-Lambertov zakon*

$$A = \epsilon * c * d = -\log T$$

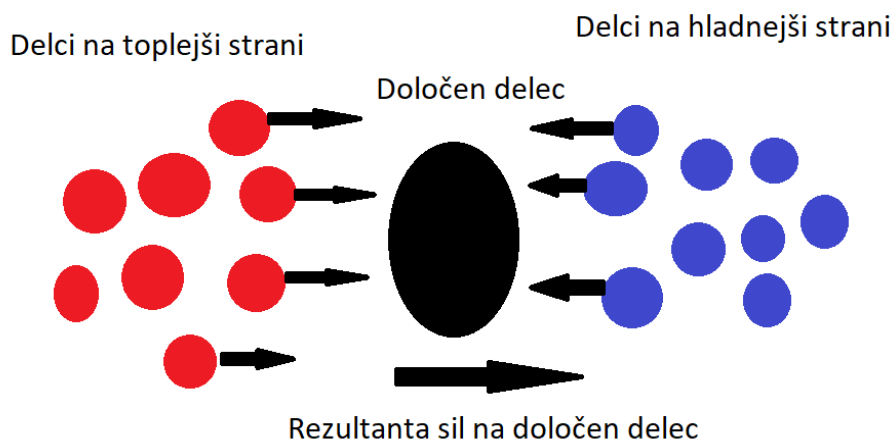
## 1.11. Termoforeza

Termoforeza je pojav, pri katerem zaradi temperaturnega gradienta na suspendiran delec v plinu deluje sila [49, 50]. Termoforezi pravimo tudi Soretov efekt ali termodifuzija [51]. Termoforetična sila navadno pospešuje delce v smeri negativnega temperaturnega gradienta. Silo na določen delec povzročajo trki med delci na toplejši strani in trki med delci na hladnejši strani. Delci na toplejši strani imajo večjo gibalno količino kot delci na hladnejši strani, zaradi česar deluje rezultanta sil na delec v smer negativnega temperaturnega gradienta (slika 7) [50, 51]. Poenostavljeno lahko rečemo, da vroča površina odbija delec, hladna površina pa ga privlači [49].

Termoforetična sila lahko deluje tudi v smeri temperaturnega gradienta, delci se torej začnejo nabirati v predelih z višjo temperaturo. Termoforezi pravimo pozitivna, če deluje sila v smeri negativnega temperaturnega gradienta, ali negativna, če deluje sila v smeri pozitivnega temperaturnega gradienta [51]. Na termoforetsko gibanje delca vpliva njegov Soretov koeficient (enačba 3), ki ga določajo lastnosti delca, kot so masa, površina in sprememba površinskega naboja ali hidratacijskega ovoja [52].



Soretov koeficient kvantitativno opisuje lokalno spremembo koncentracij molekul zaradi temperaturnih razlik v tekočini (enačba 3) [51].



*Slika 7: Potek termoforeze*

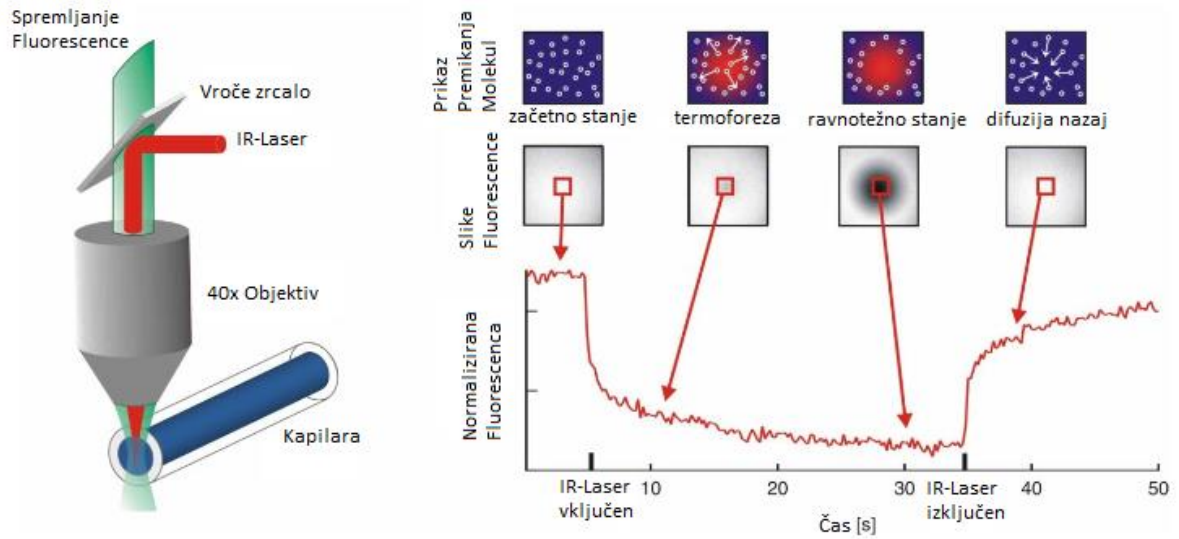
*Enačba 3: Enačba lokalnih sprememb v koncentraciji molekul kot funkcija Soretovega koeficienta in temperaturnih razlik v tekočini*

$$\frac{c}{c_0} = \exp[-S_T * (T - T_0)]$$

### 1.11.1. Mikrotermoforeza

Mikrotermoforeza je natančna metoda določanja biomolekularnih interakcij. Z meritvijo sprememb mobilnosti molekul v temperaturnem gradientu lahko določimo spremembe naboja, velikosti ali hidratacijskega ovoja teh molekul. Pomembne prednosti mikrotermoforeze so zmožnost izvajanja meritev v okolju, ki je podobno naravnemu, ker molekule niso imobilizirane, in nizka poraba vzorcev [53].

Aparatura za mikrotermoforezo (slika 9) določi gibanje fluorescenčnih molekul zaradi termoforeze na podlagi meritev porazdelitve fluorescence v kapilari (slika 8 levo). Temperaturni gradient v kapilari povzroči IR laser, ki del raztopine v kapilari segreje, da je tam temperatura za 2 do 6 stopinj višja kot v nasprotnem delu raztopine. Pred vključitvijo IR laserja je porazdelitev molekul v raztopini kapilare homogena, nato pa sprememba temperature na dva različna načina povzroči spremembo znane fluorescence. Zaradi tega se lahko spremeni fluorescenca barvila, ki je vezana na molekule, in je lahko odvisna od temperature. Drugi odziv spremembe temperature je termoforetski premik molekul s področij z višjo temperaturo na področja z nižjo temperaturo. Sprememba koncentracije je odvisna od splošnih lastnosti molekule, kot so velikost, naboj in konformacija. Poteka do ravnotežnega stanja, nakar učinke termoforeze izniči difuzija v nasprotni smeri (slika 8 desno) [53].



Slika 8: Spremljanje fluorescence v kapilarah



Slika 9: Aparatura za mikrotermoforezo

## **2. NAMEN DELA**

### **2.1. Cilji**

Pred začetkom eksperimentalnega dela smo si zastavili naslednje cilje:

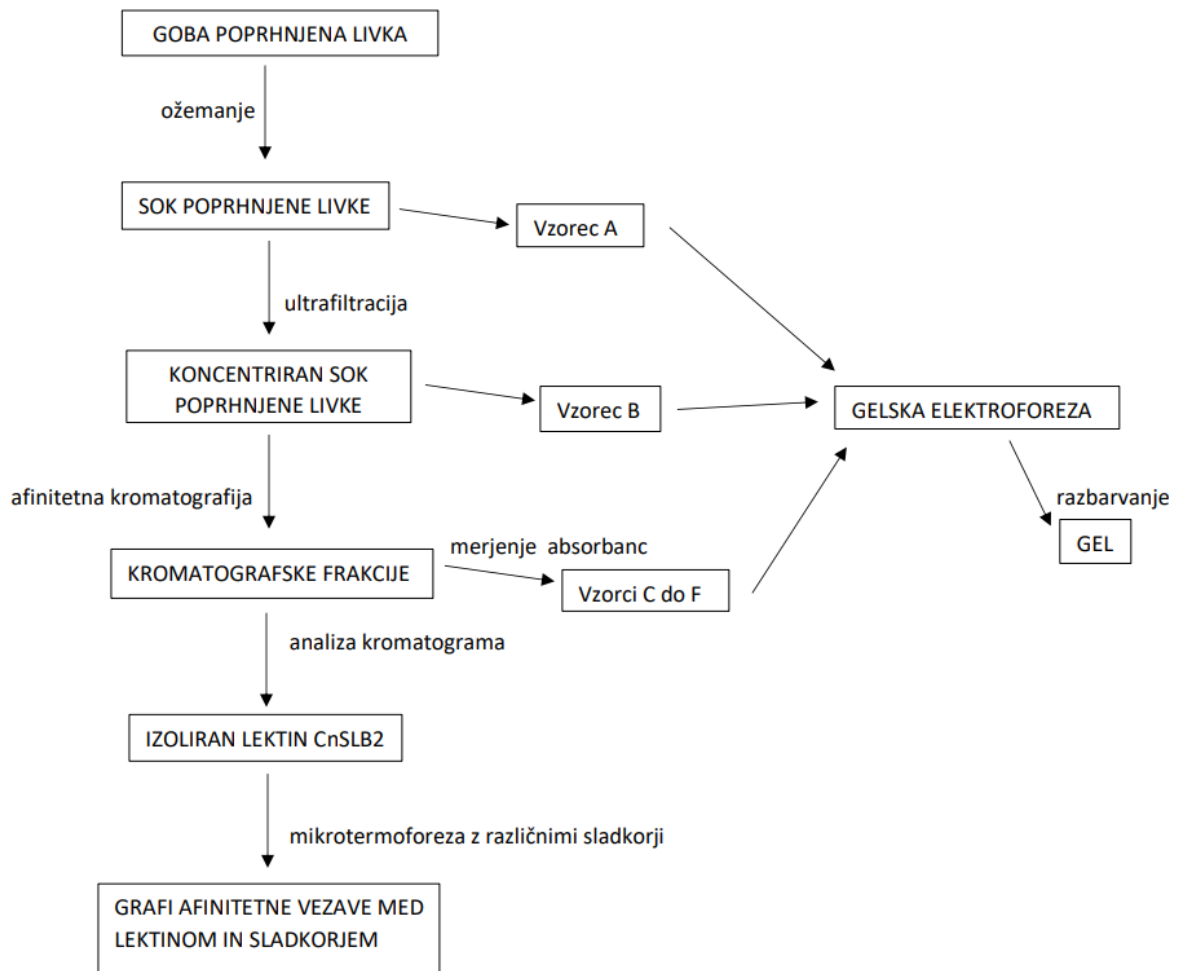
- Izolacija lektina CnSL-B2 iz poprhnjene livke.
- Priprava vzorcev, bogatih s tem lektinom za nadaljnje raziskave.
- S poliakrilamidno gelsko elektroforezo določiti čistost izoliranega lektina.
- Iz poprhnjene livke pripraviti vzorce z visoko koncentracijo proteinov.
- Spremljati vezavo različnih sladkorjev na lektin s pomočjo mikrotermoforeze.
- Ugotoviti, ali je mikrotermoforeza učinkovita metoda za določanje vezave preprostih ogljikovih hidratov (sladkorjev) na lektine.
- Ugotoviti, kateri sladkor se najbolje veže na izolektin rCnSL-B2.

### **2.2. Hipoteze**

Zastavili smo si naslednje hipoteze:

- Goba poprhnjena livka vsebuje lektin, ki se veže na saharozo.
- Mikrotermoforeza je učinkovit postopek za kvantitativno določanje vezave med lektini in preprostimi sladkorji.
- Vezava saharozil izolektina rCnSLB2 na preproste sladkorje je specifična.

### 2.3. Shema dela



Slika 10: Shema dela

### **3. MATERIALI**

#### **3.1. Laboratorijska oprema**

- analitska tehtnica GH-252 Internal Calibration Analytical Balance (A&D Weighing, Avstralija)
- aparatura za mikrotermoforezo Monolith NT. 115 pico (NanoTemper, Nemčija)
- centrifuga Eppendorf Centrifuge 5424 (Eppendorf, Nemčija)
- centrifuga Sorvall LYNX 4000 Superspeed Centrifuge (Thermo Fisher Scientific, ZDA)
- grelec DB100/2/115 Dri-Block Heater (Techne, Združeno Kraljestvo)
- hladilnik Bosch (Bosch, Nemčija)
- kapilare Monolith NT.115 premium coated (NanoTemper, Nemčija)
- kapilare Monolith NT.115 standard (NanoTemper, Nemčija)
- komora za gelsko elektroforezo Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad Laboratories, Inc., ZDA)
- kromatografska kolona s polnilom saharozil safarozo
- krpice Baby soft (Tosama, Slovenija)
- laboratorijska steklovina in osnovna laboratorijska oprema
- pipete Eppendorf Research plus (Eppendorf, Nemčija)
- oprema za označevanje proteinov Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS (NanoTemper, Nemčija)
- pH meter Mettler Toledo FE20-Kit Five-Easy Benchtop (Mettler Toledo, Italija)
- pH papirčki (Macherey-Nagel, Nemčija)
- pipeta Eppendorf RESEARCH z nastavki za pipetiranje (Eppendorf, Nemčija)
- ultrafiltracijska polprepustna membrana, za ločevanje snovi večjih od 3 kDa
- precizna tehtnica ViBRA AJ (SHINKO DENSHI CO., LTD., Japonska)
- ročna stiskalnica – pasirka za krompir
- sistem za dovajanje dušika (ventil nastavljen na 30 bar)
- sistem za elektroforezo Mini-PROTEAN(r) Tetra System (Bio-Rad Laboratories, Inc., ZDA)
- spektrofotometer Lambda 25 UV/VIS Spectrometer (PerkinElmer, ZDA)
- spektrofotometer LAMBDA Bio+ (PerkinElmer, ZDA)
- stresalnik Vibromix 31 (Tehtnica, Slovenija)
- ultrafiltrator Amicon Stirred Cell Model 8400, 350 mL (EMD Millipore, ZDA)
- vorteks Vibromix 10 (Tehtnica, Slovenija)
- zamrzovalnik Bosch (Bosch, Nemčija)

### 3.2. Kemikalije

Pri delu smo uporabili naslednje kemikalije:

- 96 % etanol  $C_2H_6O$  (Carlo Erba Reagents, Italija)
- akrilamid/bis (raztopina) (Sigma-Aldrich, ZDA)
- amin-reaktivno barvilo RED fluorescent dye NT - 647 – NHS za kovalentno označevanje biomolekul (NanoTemper, Nemčija)
- amonijev persulfat (APS)  $(NH_4)_2S_2O_8$  (Sigma-Aldrich, ZDA)
- bromfenol modro  $C_{19}H_9Br_4NaO_5S$  (Canalco, Nizozemska)
- Coomassie Brilliant Blue G  $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$  (Sigma-Aldrich, ZDA)
- D-(+)-Glukoza monohidrat  $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$  (Sigma-Aldrich, ZDA)
- D-fruktoza  $C_6H_{12}O_6$  (Biosynth Carbosynth, ZDA)
- detergent Tween 20  $C_{58}H_{114}O_{26}$  (Sigma Life Science, ZDA)
- EDTA  $C_{18}H_{32}O_{16}$  (Serva, Nemčija)
- etanojska kislina  $CH_3COOH$  (Carlo Erba Reagents, Italija)
- glicerol  $C_3H_8O_3$  (AppliChem, Nemčija)
- glicin  $C_2H_5NO_2$  (Sigma-Aldrich, ZDA)
- kalijev hidrogenfosfat  $KH_2PO_4$  (Fluka Biochemika, Švica)
- kalijev klorid KCl (Sigma-Aldrich, ZDA)
- klorovodikova kislina HCl (Sigma-Aldrich, ZDA)
- magnezijev klorid,  $MgCl_2$  (Sigma-Aldrich, ZDA)
- maltotrioza  $C_{18}H_{32}O_{16}$  (Biosynth Carbosynth, ZDA)
- metil  $\alpha$ -D-glukopiranozid  $C_7H_{14}O_6$  (Sigma Life Science, ZDA)
- n-acetilglukozamin  $C_8H_{15}NO_6$  (Biosynth Carbosynth, ZDA)
- natrijev dodecil sulfat, NaDS  $NaC_{12}H_{25}SO_4$  (Thermo Scientific, ZDA)
- natrijev hidroksid NaOH (Sigma-Aldrich, ZDA)
- natrijev klorid NaCl (Sigma-Aldrich, ZDA)
- natrijev tiosulfat  $Na_2S_2O_3$  (Fluka chemika, Švica)
- saharoza  $C_{12}H_{22}O_{11}$  (Sigma-Aldrich, ZDA)
- standard za NaDS elektroforezo proteinov nizke molekulske mase (Amersham Pharmacia Biotech, Švedska)
- tetrametiletilendiamin (TEMED)  $C_6H_{16}N_2$  (SERVA Electrophoresis, Nemčija)
- tris(hidroksimetil)aminometan (tris)  $C_4H_{11}NO_3$  (Serva, Nemčija)

### 3.3. Goba

- Goba poprhnjena livka (*Clitocybe nebularis*) je bila v Sloveniji nabrana leta 2012, narezana in globoko zamrznjena. Pred uporabo smo jo odtalili na ledu.

### 3.4. Gel

- Predhodno smo dobili dva pripravljena 1,5 mm debela 12 % NaDS poliakrilamidna gela za elektroforezo, vsak z desetimi jamicami za vzorce, po Bio-Radovem protokolu za ročno izdelavo gelov. Volumen raztopine za en gel znaša 8,4 ml [54].

*Tabela 3: Sestava NaDS poliakrilamidnega gela*

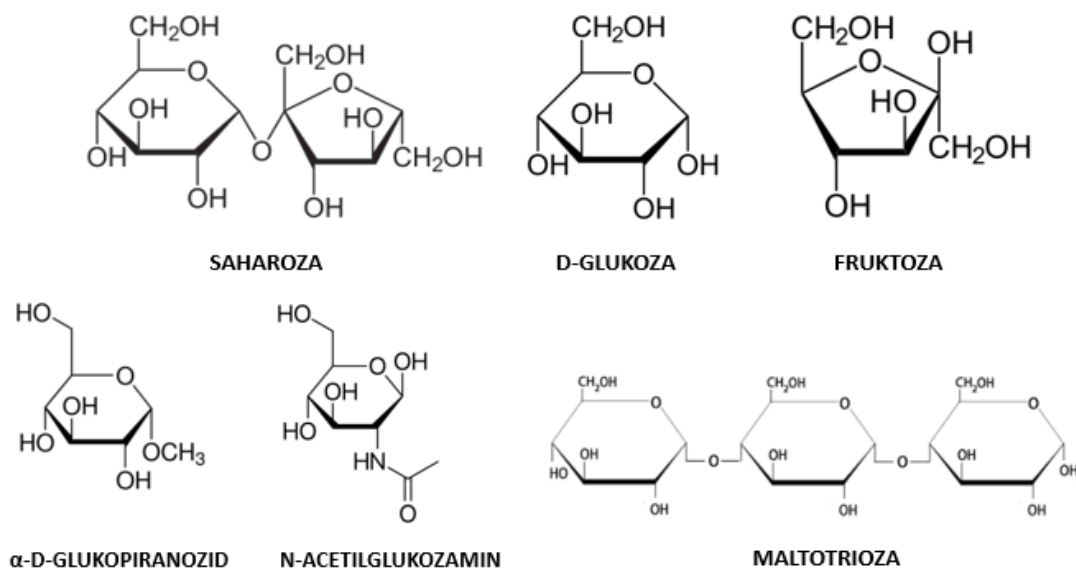
<b>Sestavine</b>	<b>Koncentracijski gel (4 %)</b>	<b>Ločevalni gel (12 %)</b>
30 % Akrilamid/bis	1,98 mL	6,0 mL
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	3,78 ml	/
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	/	3,75 mL
10 % NaDS	150 $\mu$ L	150 $\mu$ L
Deionizirana voda	9 mL	5,93 mL
TEMED	15 $\mu$ L	7,5 $\mu$ L
10 % APS	75 $\mu$ L	75 $\mu$ L
Končni volumen	15 mL	15 mL

### 3.5. Lektin

Raztopina z barvilom RED fluorescent dye NT-647-NHS označenega rekombinantnega izolektina rCnSLB2 iz poprhnjene livke, v mikrocentrifugirkah po 50  $\mu$ L.

#### 3.5.1. Sladkorji

V pufri MST (poglavje Pufri) smo pripravili 500 mM raztopine sladkorjev. Pripravljene raztopine smo shranili v hladilniku do uporabe. Saharozil izolektin rCnSLB2 je specifičen za saharozo, zato smo določili njegovo vezavo na saharozo. Vezavo smo določili tudi za glukozo in fruktozo, ki sta podenoti saharoze. Testirali smo tudi derivata glukoze metil  $\alpha$ -D-glukopiranozid, kjer je 1-C hidroksilna skupina  $\alpha$ -D-glukopiranoze metilirana in zaradi tega kot acetal v skoraj popolnoma ciklični obliki. N-acetilglukozamin je amidni derivat glukoze. Izbrali smo še maltotriozo, ki je trisaharid iz treh enot glukoze.



Slika 11: Haworthove formule saharoze, β-D-glukoze, fruktoze, metil α-D-glukopiranozida, N-acetilglukozamina in maltotrioze

### 3.6. Raztopine

**Raztopina NaOH za izpiranje:** 10 mM natrijev hidroksid, do 2 L destilirane vode

**10-odstotna raztopina za razbarvanje:** 300 mL 96 % etanola, 100 mL očetne kisline, 600 mL deionizirane vode

**30-odstotna raztopina za razbarvanje:** 100 mL 96 % etanola, 300 mL očetne kisline, 600 mL deionizirane vode

**Raztopina Coomassie blue:** 5 tablet Coomassie blue, 600 mL 96 % etanola, 400 mL deionizirane vode

**20-odstotna očetna kislina:** 200 mL očetne kisline, 800 mL deionizirane vode

**Zmes za obarvanje:** 20-odstotna očetna kislina : raztopina Coomassie blue = 1 : 1

### 3.7. Pufri

**10-kratni puffer NaDS-PAGE:** Tris (75 g), glicin (360 g), NaDS (25 g) in do 2,5 L deionizirane vode

**20-kratni puffer PBS:** 10 mM natrijev hidrogensulfat, 140 mM natrijev klorid, 3 mM kalijev klorid, 2 mM kalijev hidrogensulfat, uravnano s klorovodikovo kislino na pH 7,4

**Ekvilibracijski puffer:** 400 mM natrijev klorid, 100 mM tris, destilirana voda, uravnano s klorovodikovo kislino na pH 7,4

**Neutalizacijski puffer:** 1000 mM tris, 1000 mM natrijev klorid, deionizirana voda, uravnano s klorovodikovo kislino na pH 7,0

**MST puffer:** 1000 mM magnezijev klorid, 150 mM natrijev klorid, 50 mM tris, deionizirana voda, uravnano s klorovodikovo kislino na pH 7,4

**Nanašalni puffer:** 4 ml 10 % raztopine NaDS, 2 ml glicerola, 1,5 ml deionizirane vode, 2,5 ml 0,5 M tris-HCl uravnano na pH 6,8, dodatek bromfenol modro (barvilo)



## 4. METODE DELA

### 4.1. Ekstrakcija soka poprhnjene livke

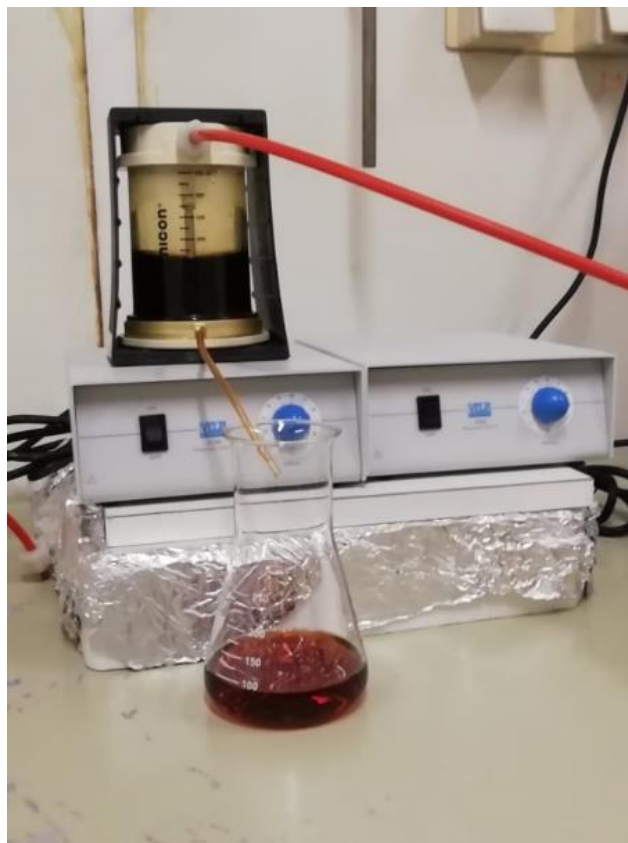
Posodo iz stiropora smo napolnili z ledom in vanjo postavili večjo prazno čašo. Nad njo smo v ročno stiskalnico namestili baby soft krpico in jo napolnili z odtaljeno in narezano gobo poprhnjeno livko. Iz nje smo iztisnili sok, postopek ožemanja pa večkrat ponovili. Sok, ki se je sprostil ob odtajanju, smo precedili skozi krpico in ga prelili v drugo, manjšo čašo. Pri tem postopku smo iz 500 g gob dobili okoli 200 mL soka rdečerjave barve.

### 4.2. Centrifugiranje soka

Pridobljenemu soku poprhnjene livke smo dodali 10 mL 20-kratnega pufra PBS (poglavje Pufri) ter pridobljeno tekočino razdelili v dve centrifugirki. Drugi dve, ki sta služili kot protiuteži, smo napolnili z vodo. Vse štiri centrifugirke smo postavili v centrifugo in ji pred zagonom nastavili naslednje parametre: pospešek 10.000 g, čas 15 minut in temperaturo 4 °C. Po končanem postopku smo sok previdno oddekantirali v čašo.

### 4.3. Ultrafiltracija

Oddekantirano tekočino smo prelili v ultrafiltrator (slika 12) z nameščeno ultrafiltracijsko membrano. Ventil smo nastavili na tlak 5 bar in po večurni inkubaciji s mešanjem pridobili koncentrat soka ter filtrat, ki je vseboval le molekule manjše od 3 kDa.



Slika 12: Ultrafiltrator Amicon 8400

#### **4.4. Afinitetna kromatografija**

Pripravili smo 3 L ekvilibracijskega pufra, 1 dL nevtralizacijskega pufra in 2 L raztopine NaOH za izpiranje (poglavji Pufri, Raztopine).

Približno 150 mL nastalega ultrafiltriranega soka poprhnjene livke smo razdelili na dva enaka dela. Skozi kromatografsko kolono z nosilcem saharozil-sefarozo, smo spustili 1 dL ekvilibracijskega pufra. Dolili smo sok in zmes dobro premešali. Pustili smo jo stati 10 minut, da je potekla vezava lektina na saharozil-sefarozo.



*Slika 13: Čiščenje saharozil-sefaroze*

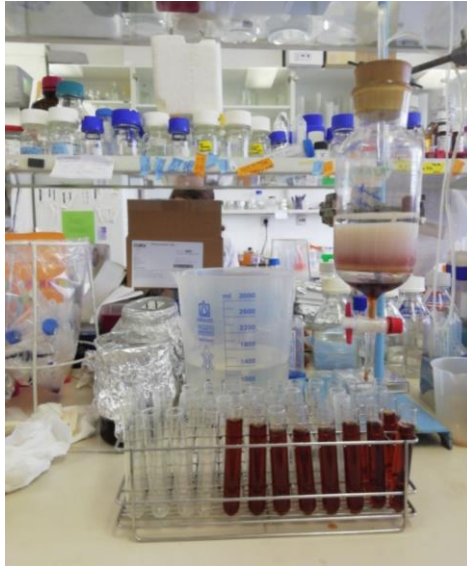
Medtem smo pripravili sistem za dovajanje ekvilibracijskega pufra (slika 14). Z njim napolnjeno čašo smo namestili pol metra nad kromatografsko kolono in vanjo s cevko preusmerili tok pufra.

#### **4.5. Uporaba mikrotermoforeze za določanje vezave sladkorjev na izolektin rCnSLB2**



*Slika 14: Sistem dovajanja pufra do aparature*

Tekočina je iz kolone v epruvete kapljala s hitrostjo 3 do 4 kapljice na sekundo. Ob tem smo raztopini v eprugetah merili absorbanco pri 280 nm. Ko se je absorbanca približala vrednosti nič, smo cevko premestili v čašo z raztopino NaOH za izpiranje, s katero smo izprali vezane proteine. Nadaljevali smo z merjenjem absorbance v eprugetah, hitrost izpiranja pa nastavili na 2 do 3 kapljice na sekundo. V vsako epruveto smo dodali 450  $\mu$ L nevtralizacijskega pufra, da se je pH gibal okoli 8 in ni prišlo do denaturacije lektina. V prvi seriji smo pridobili 115 frakcij. Postopek smo še enkrat ponovili in z drugo serijo pridobili 130 frakcij.



*Slika 15: Pridobljene frakcije z afinitetno kromatografijo*

#### **4.6. Merjenje absorbance**

Vzporedno z afinitetno kromatografijo smo frakcijam s spektrofotometrom Lambda Bio+ (slika 16) merili absorbanco pri 280 nm. Pri tej valovni dolžini namreč absorbirajo aromatske aminokisljine (tirozin, triptofan in v manjši meri fenilalanin), ki sestavljajo proteine, in jo uporabljamo za oceno koncentracije proteinov v vzorcu [55]. Za nastavitev kalibracijske ničle smo uporabili destilirano vodo. Na začetku smo kromatografsko kolono spirali z ekvilibracijskim pufrom. Ko se je s kapljajočo tekočino iz kromatografske kolone napolnila vsaka tretja epruveta, smo tok kapljanja preusmerili v kiveto. Njeni vsebini smo merili absorbanco in na podlagi njihovih vrednosti določali pogostost analiziranja frakcij. Ko so se vrednosti absorbanc ustalile, smo ekvilibracijski puffer nadomestili z raztopino NaOH za izpiranje in analizirali vsako drugo frakcijo. Po vsaki meritvi smo kiveto sprali z destilirano vodo.

Z izmerjenimi vrednostmi absorbanc smo narisali kromatogram in na podlagi vrhov določili, katere frakcije bomo uporabil za analizo z NaDS-PAGE.



*Slika 16: Aparatura za spektrofotometrijo, Lambda Bio+*

#### **4.7. NaDS-PAGE**

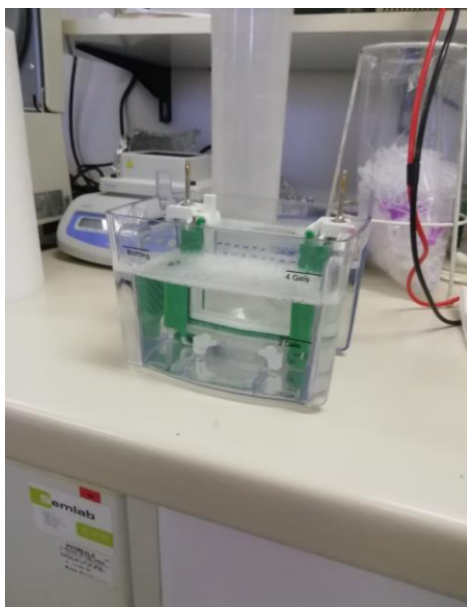
V označene mikrocentrifugirke smo dodali vzorce in nanašalni pufer (poglavje Pufri) skladno s shemami (sliki 19, 20). Po analizi kromatograma smo se odločili za analizo frakcij 49, 66, 80 in 87 prve serije in frakcij 64, 83, 85, 99 in 110 druge serije afinitetne kromatografije.

Mikrocentrifugirke smo z grelcem grelji 10 minut pri 100 °C (slika 17). Po kratki centrifugaciji so bili vzorci pripravljeni za nanos.



*Slika 17: DB100/2/115 Dri-Block grelec med segrevanjem vzorcev*

V sestavljeno aparaturo za gelsko elektroforezo (slika 18) smo vstavili dva gela (poglavje Gel) in jo napolnili s pufrom NaDS (poglavje Pufri). Z mikropipetami smo v žepke v koncentracijskem gelu injicirali vzorce, aparaturo pa zagnali pri električnem toku 70 mA. Ta je med postopkom povzročil nastajanje mehurčkov. Po 50 minutah, ko so vzorci pripotovali do konca gela, se je postopek končal, zato smo aparaturo ugasnili.



*Slika 18: Aparatura za gelsko elektroforezo spredaj*

STD [5+0 µL]	sok [2+2 µL]	nevezano [4+4 µL]	fr. 49 [40+9 µL]	fr. 66 [40+9 µL]	fr. 80 [40+9 µL]	fr. 87 [40+9 µL]	prazna	n. sok [4+4 µL]	sok [4+4 µL]

*Slika 19: Shema razporeditve vzorcev prve serije na gelu, na kateri »STD« predstavlja standard (lestvico molske mase), »sok« predstavlja vzorec koncentrata soka po ultrafiltraciji, »nevezano« predstavlja vzorec nevezane (začetne) frakcije afinitetne kromatografije, »fr.« predstavlja vzorec pridobljene frakcije, »prazna« predstavlja prazen žepek v gelu, »n. sok« pa sok poprhnjene livke po njenem ožemanju. V oglatih oklepajih je na prvem mestu dodana količina vzorca ter na drugem nanašalnega pufra.*

STD [5+0 µL]	sok [2+2 µL]	nevezano [4+4 µL]	fr. 64 [40+9 µL]	fr. 83 [40+9 µL]	fr. 85 [40+9 µL]	fr. 99 [40+9 µL]	fr. 110 [40+9 µL]	STD [5+0 µL]	prazna

*Slika 20: Shema razporeditve vzorcev druge serije na gelu. Za legendo glej sliko 19*

Po končani elektroforezi smo gela položili v petrijevko in jo napolnili z raztopino za obarvanje (poglavje Raztopine). Za enakomerno barvanje in kasnejše razbarvanje smo petrijevko postavili na rotacijsko mešalo (sliki 21, 22). Po eni uri barvanja smo iz nje odlili tekočino in gel prekrili s 30-odstotno raztopino za razbarvanje (poglavje Raztopine). V njej se je namakal 20 minut, nakar smo raztopino odlili in zamenjali z novo. Postopek smo večkrat ponovili.

Gel v petrijevki smo nato čez noč razbarvali z 10-odstotno raztopino za razbarvanje (poglavje Raztopine).



Slika 21: Postopek barvanja gela



Slika 22: Postopek razbarvanja gela

## 4.8. Termoforeza

### 4.8.1. Označevanje proteina

Rekombinantni lektin rCnSLB2 iz poprhnjene livke s koncentracijo 20 nM je bil predhodno že očiščen in označen s fluorescentnim barvilom NT-647-NHS, katerega fluorescenco lahko spremljamo pri valovni dolžini 670 nm z vzbujanjem pri valovni dolžini 650 nm. Barvilo NT-647-NHS se veže na primarne amine, ki se nahajajo na lizinskih ostankih proteina in so lahko dostopni za različna topila ter z njimi tvori stabilne konjugate [56]. Označevanje proteinov za uporabo v mikrotermoforezi je bilo izvedeno po protokolu za označevanje z uporabo kompleta Monolith NT Protein Labeling Kit RED-NHS.



#### 4.8.2. Postopek termoforeze

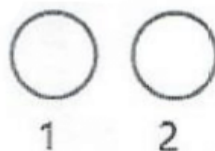
Postopek smo opravljali v treh stopnjah. Opravili smo preliminarni test (ang. Pre-test), preverjanje vezave (ang. Binding Check) in afiniteto vezave (ang. Binding Affinity). Uporabljen tarčni protein je bil lektin rCnSLB2, ligandi pa sladkorji saharoza, D-glukoza, fruktoza, metil  $\alpha$ -D-glukopiranozid, N-acetilglukozamin in maltotriosa.

Lektin smo pred začetkom dela odtajali na ledu, premešali in centrifugirali (pogoji: 10000 g, 4 °C, 5 minut).

##### 4.8.2.1. Preliminarni test

V mikrocentrifugirko smo pripravili ustrezno redčitev raztopine lektina v pufru MST. Da bi preprečili adsorpcijo označenega lektina na stene kapilar smo MST pufru dodali Tween 20. To zmes smo nanесли v dve kapilari (slika 23) in ju vstavili v aparaturo za mikrotermoforezo Monolith NT.115 Pico Red s programom (MO.Control), kjer smo izbrali možnost Pre-test. Meritve smo izvedli pri srednji moči MST laserja.

**Tarča**



*Slika 23: Shema kapilar v preliminarnem testu*

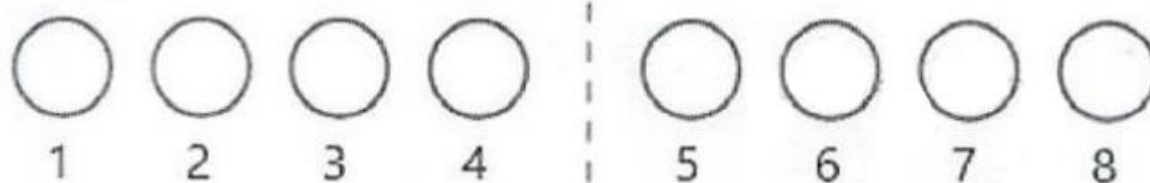
##### 4.8.2.2. Preverjanje vezave

V eni mikrocentrifugirki smo pripravili 20  $\mu$ L MST pufra in v drugi 20  $\mu$ L raztopine sladkorja v MST pufru. V obe smo dodali 20  $\mu$ L raztopine lektina s končno koncentracijo 1,2 nM v pufru MST s Tween 20.

Z vsebino prve mikrocentrifugirke smo napolnili prve štiri kapilare (slika 24), z vsebino druge mikrocentrifugirke pa naslednje štiri. Meritve smo izvedli na Monolith NT.115 Pico Red pri srednji moči MST laserja.

**Tarča**

**Kompleks**

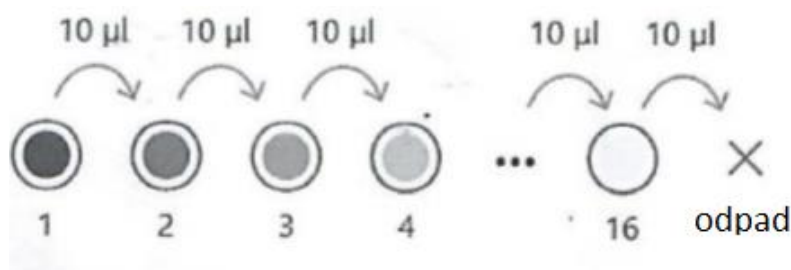


*Slika 24: Shema razporeditve vsebin v kapilarah 1 do 8 za preverjanje vezave*

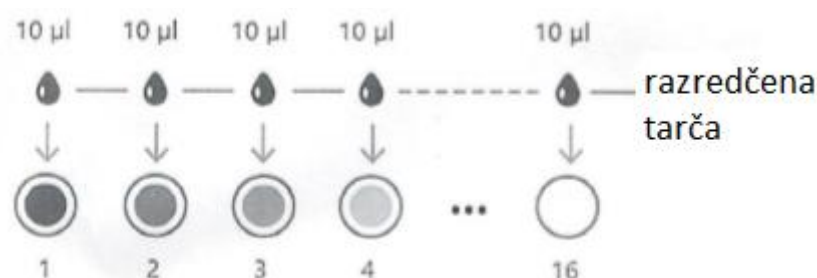
##### 4.8.2.3. Afiniteta vezave

Pripravili smo si 16 mikrocentrifugirk. V prvo smo mikropipetirali 20  $\mu$ L raztopine sladkorja z MST pufrom, v preostale pa po 10  $\mu$ L MST pufra. Za vsako zaporedno raztopino smo izvedli 16 zaporednih

redčitev v razmerju koncentracij sladkorja 2:1 (slika 25). V vsako od 16 mikrocentrifugirk z raztopinami sladkorja smo dodali 10  $\mu\text{L}$  raztopine lektina, ki smo ga 10-krat redčili z MST pufrom z dodatkom Tween 20 (slika 26). Z vsebino iz vsake od mikrocentrifugirke smo napolnili 16 kapilar. Meritve smo izvedli na Monolith NT.115 Pico Red pri srednji moči MST laserja. Posamezne meritve so se razlikovale v koncentracijah sladkorja in Tweena 20. Pri nekaterih meritvah smo namesto navadnih kapilar uporabili premium kapilare. Parametri posameznih meritev so napisani pri rezultatih.



Slika 25: Shema zaporednih redčitev sladkorjev.



Slika 26: Dodatek lektina k raztopinam sladkorjev

#### 4.8.2.4. Analiza podatkov

Izmerjene fluorescenčne vrednosti so prikazane kot normalizirana fluorescenca ( $F_{norm}$ ) (enačba 4 zgoraj), ki predstavlja razmerje intenzitete signala po ( $F$ ) in pred ( $F_0$ ) obsevanjem z IR laserjem [53].

Enačba 4: Normalizirana fluorescenca

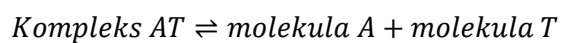
$$F_{norm} = \frac{F}{F_0}$$

$$F_{norm} = (1 - x) F(A)_{norm} + x F(AT)_{norm}$$

Slednja enačba (enačba 4 spodaj) predstavlja prispevek vezanega in nevezanega stanja fluorescenčne tarčne molekule (A) glede na normalizirano fluorescenco.  $F(A)_{norm}$  je prispevek nevezane fluorescenčne molekule A,  $F(AL)_{norm}$  pa prispevek kompleksa fluorescenčne molekule A in liganda. X predstavlja delež fluorescenčnih molekul, ki tvorijo kompleks. Z analizo serije vzorcev s spreminjajočo se koncentracijo liganda in konstantno koncentracijo tarčne molekule, lahko spremembo v MST signalu ( $\Delta F_{norm}$ ) uporabimo za pridobitev podatkov o afiniteti vezave [53]. Afiniteto vezave smo podali kot konstanto disociacije (Kd) (enačba 6). Podatke smo obdelali z uporabo programa MO.Affinity Analysis Software (Nanotemper).



*Enačba 5: Kemijska enačba disociacije kompleksa na dve komponenti*



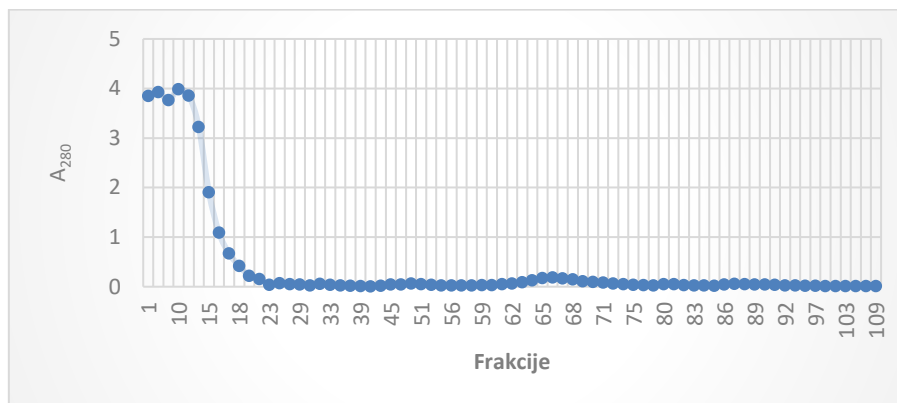
*Enačba 6: Konstanta disociacije kompleksa na dve komponenti*

$$K_d = \frac{[A] * [T]}{[AT]}$$

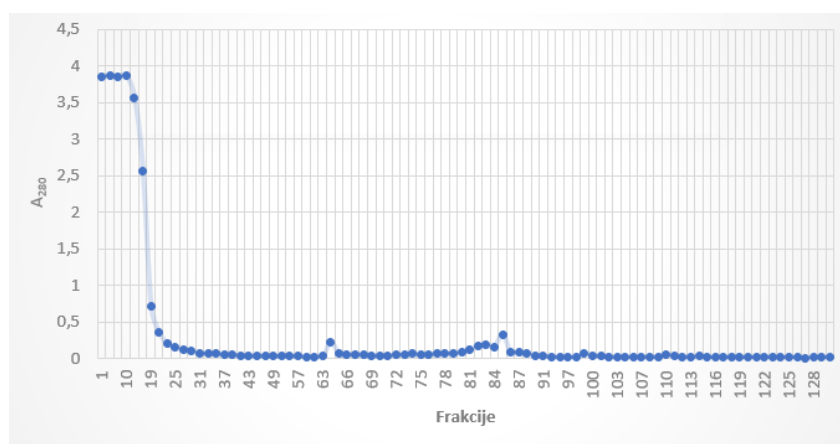
## 5. REZULTATI Z INTERPRETACIJO

### 5.1. Kromatogram afinitetne kromatografije

Iz soka poprhnjene livke smo z afinitetno kromatografijo na nosilcu saharozil-sefaroza izolirali proteine, ki so se vezali na saharozo. Po končani afinitetni kromatografiji smo s spektrofotometrom Lambda 25 izmerili absorbanco pri 280 nm v posameznih frakcijah in narisali kromatogram odvisnosti  $A_{280}$  od frakcije (sliki 27 in 28).



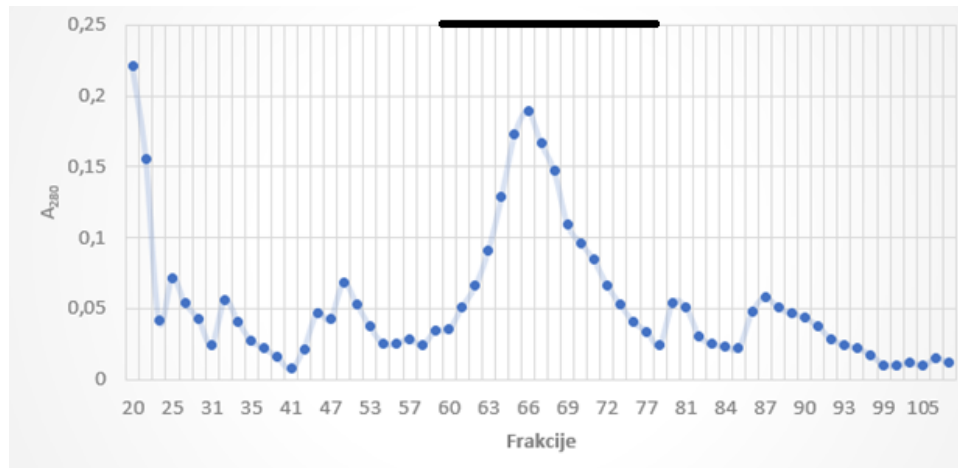
Slika 27: Kromatogram prve serije afinitetne kromatografije



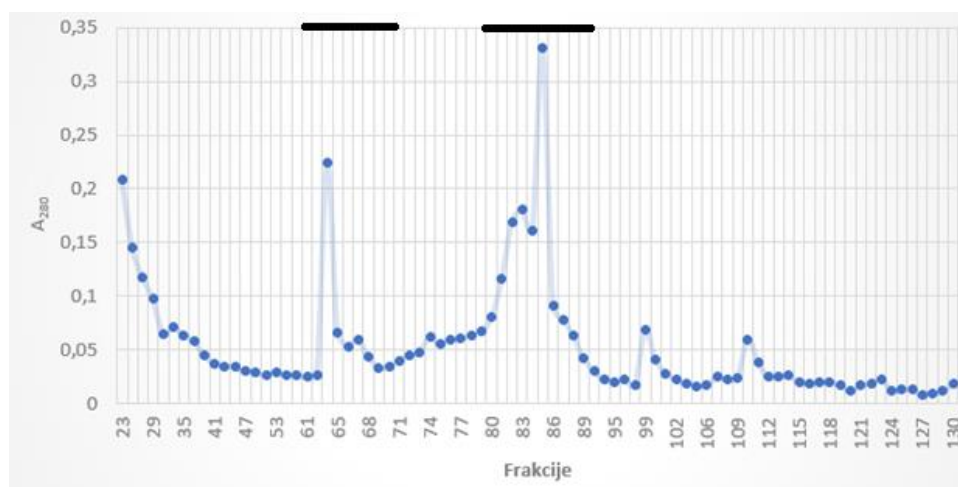
Slika 28: Kromatogram druge serije afinitetne kromatografije

Posamezna točka na kromatogramu predstavlja izmerjeno absorbanco frakcije. Opazimo, da je s tem, ko smo nosilec saharozil-sefaroza po nanosu vzorca spirali z ekvilibracijskim pufrom, pri čemer smo spirali nevezane in slabo vezane proteine, začela upadati tudi absorbanca. Frakcije do frakcije številka 23 v prvi seriji (slika 27) in do frakcije številke 31 v drugi seriji (slika 28), predstavljajo nevezano frakcijo.

Spodnji del kromatograma prve in druge serije smo nato povečali, da so postali vrhovi izpranih proteinov lažje vidni.



Slika 29: Povečan kromatogram dela prve serije afinitetne kromatografije

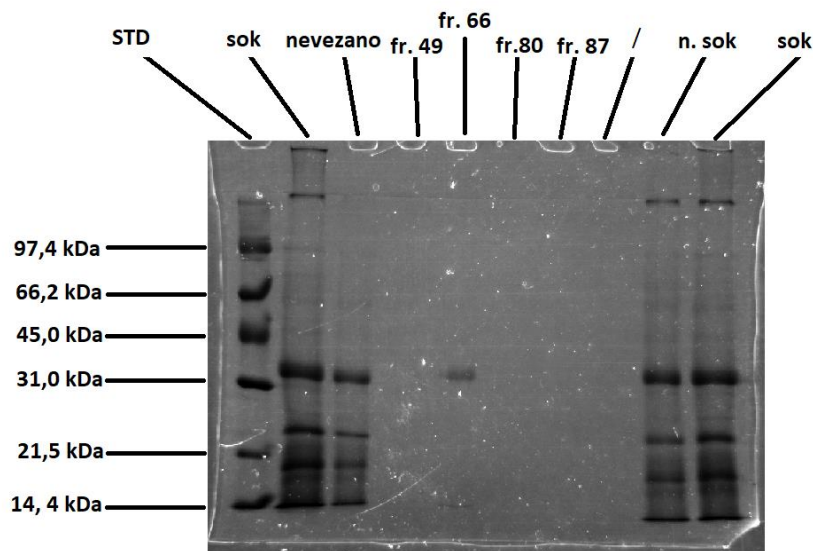


Slika 30: Povečan kromatogram dela druge serije afinitetne kromatografije

Pri prvi seriji (slika 29) ugotovimo, da so se lektini, ki so se vezali na saharozo izprali v enem glavnem vrhu, tj. od 60. do 77. frakcije, pri drugi seriji (slika 30) pa v dveh glavnih vrhovih, od 62. do 70. (vrh 1) in od 80. do 90. frakcije (vrh 2). Na slikah 29 in 30 so območja vrhov označena z vodoravno črno črto. Lahko da gre v drugi seriji za dva izolektina, ki se nekoliko razlikujeta v intenziteti vezave na saharozo. Povišane absorbance pri 280 nm predstavljajo več proteina v frakciji, tako da smo predvidevali, da so se v opisanih vrhovih nahajale tudi največje koncentracije lektinov. Te frakcije smo si zato izbrali za nadaljnjo analizo z NaDS-PAGE.

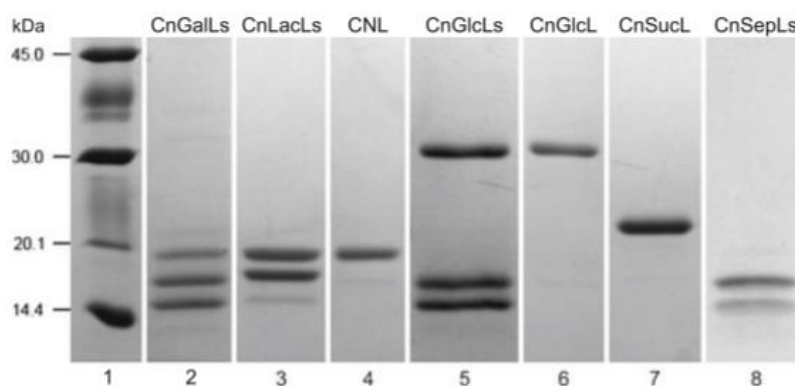
## 5.2. NaDS-PAGE

Izbrane frakcije afinitetnih kromatografij smo analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS, da bi preverili vsebnost proteinov v frakcijah in ocenili čistost izoliranih lektinov ter njihovo molekulsko maso.



Slika 31: Slika gela 1. serije NaDS-PAGE z označenimi vzorci in lestvico molske mase. Za legendo glej sliko 19

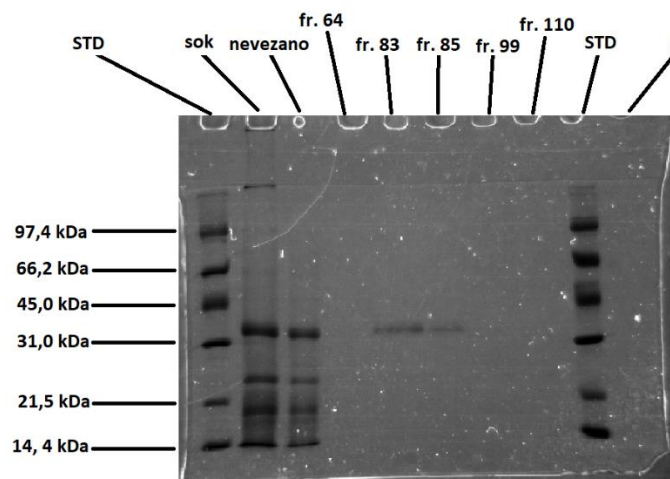
Analiza NaDS-PAGE je pokazala, da smo uspešno očistili protein iz soka poprhnjene livke (slika 31). V stolpcu soka poprhnjene livke in nevezane frakcije opazimo mnogo lis, ki predstavljajo različne proteine, medtem ko je v stolpcu, kjer je prisotna frakcija 66, ki predstavlja vrh 1 prve serije afinitetne kromatografije, prisotna le ena lisa. Le-to je lektin, ki se je specifično vezal na saharozo, ki smo ga uporabili kot ligand pri afinitetni kromatografiji. Ker se pri analizi NaDS-PAGE denaturirani proteini ločujejo le na osnovi velikosti, pri čemer manjši proteini potujejo dlje po gelu, lahko s primerjavo s proteini znanih velikosti (stolpec STD) ocenimo molekulsko maso izbranega proteina. Očiščen lektin ima ocenjeno molekulsko maso 31 kDa.



Slika 32: Lektini v gobi poprhnjene livke [32]

Na podlagi že narejenih raziskav o lastnostih različnih lektinov iz poprhnjene livke (slika 32) predvidevamo, da je izolirani lektin CnGlcL, saj ima podobno molekulsko maso 30 kDa.

Tudi v drugi seriji afinitetne kromatografije smo na podoben način očistili protein z ocenjeno molekulsko maso 31 kDa (slika 33, stolpca fr. 83 in fr. 85), ki je verjetno prav tako lektin CnGlcL.

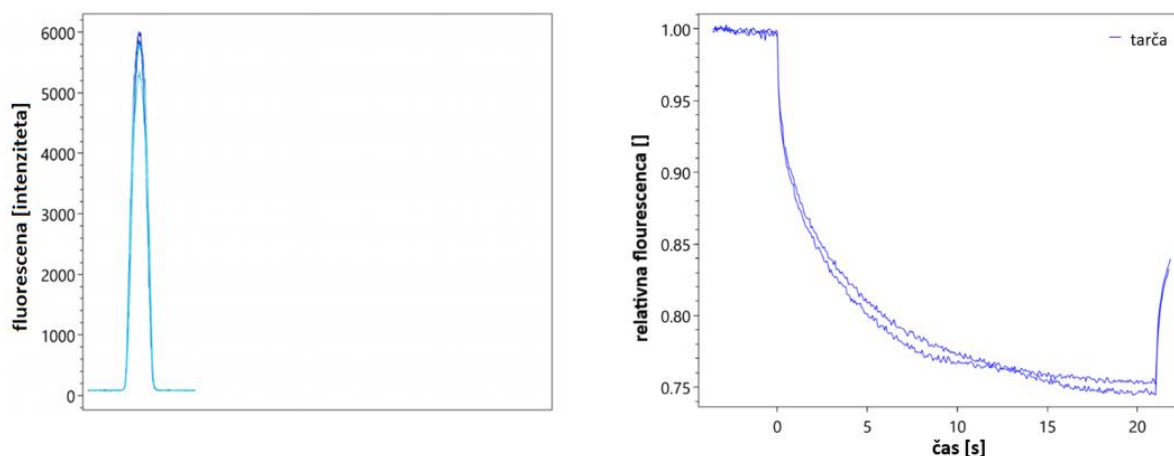


Slika 33: Slika gela 2. serije NaDS-PAGE z označenimi vzorci in lestvico molske mase. Za legendo glej sliko 19

### 5.3. Mikrotermoforeza

Z uporabo mikrotermoforeze (MST) smo spremljali vezavo različnih sladkorjev na lektin rCnSLB2. Kot ligande smo uporabili naslednje sladkorje: saharoza, glukoza, fruktoza, acetilglukozamin, metil  $\alpha$ -D-glukopiranozid in maltotrioza.

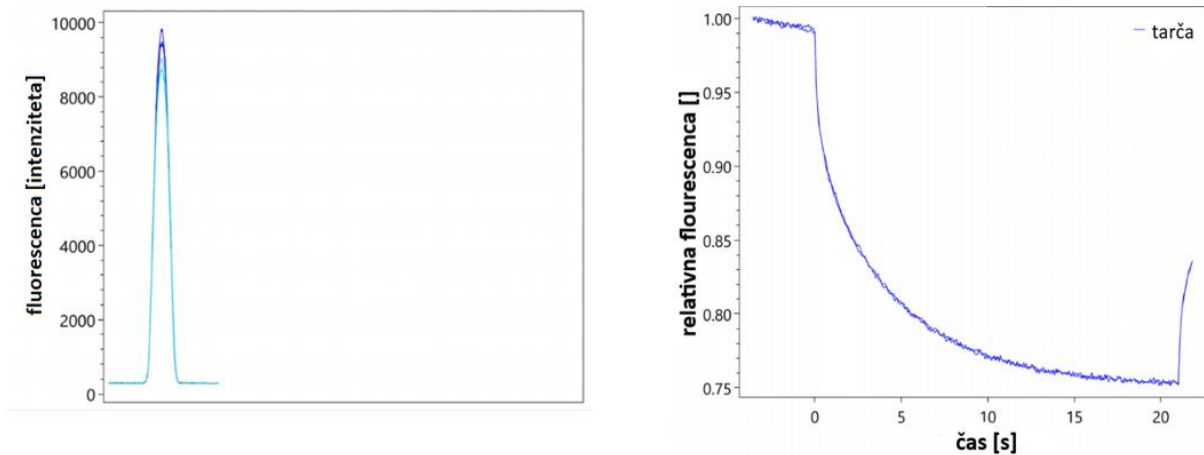
Najprej smo z MST sledmi spremljali le označen protein, da smo določili pogoje meritev za nadaljnje teste. Prvo meritev na mikrotermoforezi smo izvedli z 20-krat redčenim lektinom v pufru MST z dodatkom 0,05% Tween 20 z uporabo standardnih Monolith NT.115 kapilar pri 5 % jakosti ekscitacije laserja.



Slika 34: Posnetek kapilar pri preliminarnem testu z 10-krat redčenim lektinom pri 5 % jakosti ekscitacije laserja (levo), časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo pri preliminarnem testu z 10-krat redčenim lektinom pri 5% jakosti ekscitacije laserja (desno).

Pri tem iz oblike vrhov fluorescence proteina v kapilarah in časovnega poteka spremembe fluorescence med MST analizo (slika 34 desno) opazimo, da je prišlo do manjše adsorpcije proteina na kapilare.

Pri naslednji meritvi smo lektin redčili 10-krat in moč laserja povečali na 20 %.

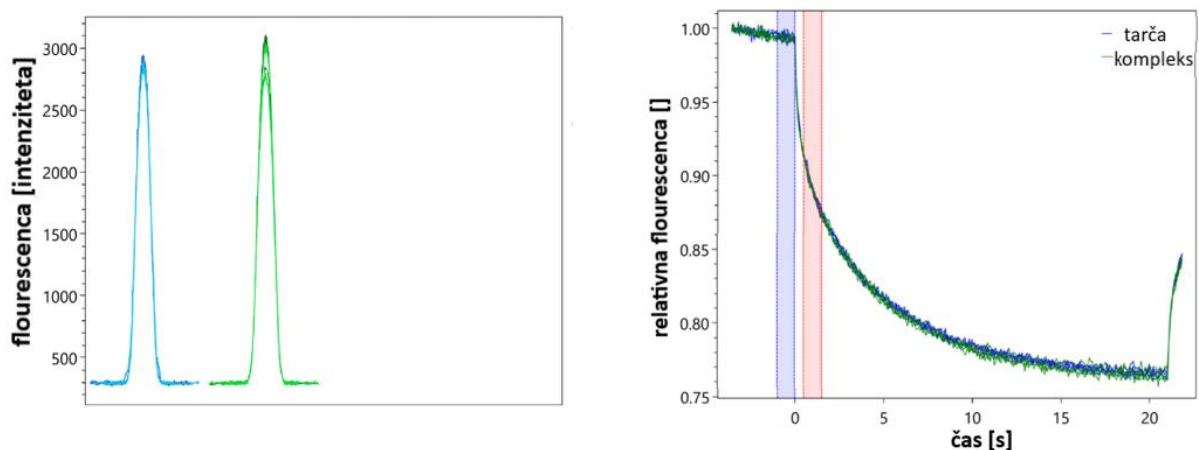


*Slika 35: Posnetek kapilar pri preliminarnem testu z 20-krat redčenim lektinom pri 5 % jakosti ekscitacije laserja (levo), časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo pri preliminarnem testu z 10-krat redčenim lektinom pri 5% jakosti ekscitacije laserja*

Pri tem se je povečala intenziteta signala in iz časovnega poteka spremembe fluorescence med MST analizo (slika 35) ni bilo razvidne adsorpcije. S preliminarnim testom smo določili, da je koncentracija s fluorescenčnim barvilom NT-647-NHS predhodno označenega rCnSLB2 12 nM.

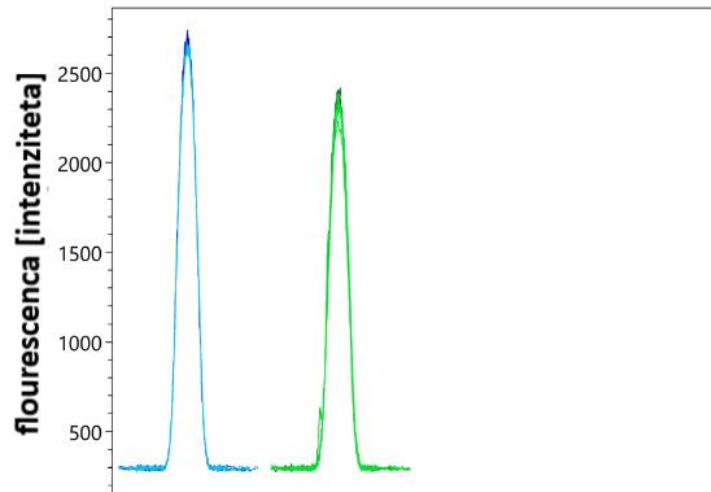
### 5.3.1. Saharoza

Nadaljevali smo s preverjanjem vezave. Pri tem smo kot ligand uporabili 100 mM saharozo, kot tarčo pa 10-krat redčen lektin v pufri MST z 0,05 % Tween 20. Ob tem smo uporabljali standardne Monolith NT.115 kapilare, moč ekscitacijskega laserja pa smo nastavili na 20 %.



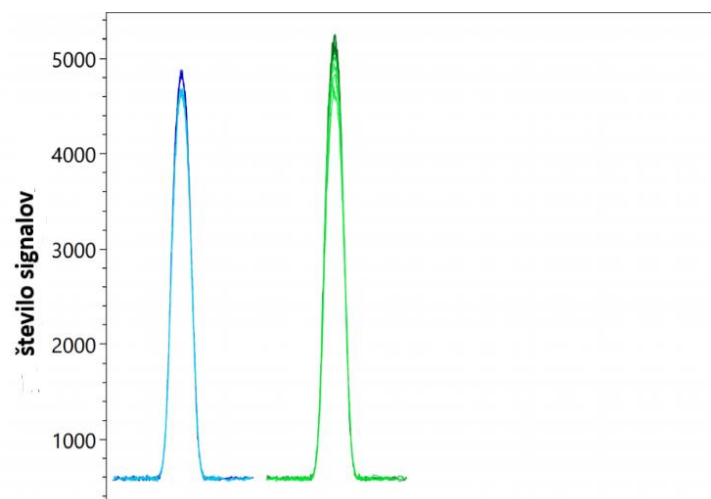
*Slika 36: Posnetek kapilar preverjanja vezave 100 mM saharoze (levo), MST sledi preverjanja vezave 100 mM saharoze (desno)*

Po dodatku sladkorja ni prišlo do pojava adsorpcije na kapilare ali nastanka agregatov, ki bi ovirali meritve. Intenziteta fluorescence tako v kapilarah, kjer smo imeli samo lektin, kot v kapilarah, kjer je bil prisoten še ligand, je bila precej nizka, hkrati pa iz časovnega poteka spremembe fluorescence med MST analizo ni vidnih sprememb v relativni fluorescenci med tarčo in tarčo ob prisotnosti liganda (slika 36).



*Slika 37: Posnetek kapilar preverjanja vezave 100mM saharoze*

Pri ponovitvi poskusa je pri enaki moči eksitacijskega laserja intenziteta fluorescence v kapilarah tako pri sami tarči kot pri tarči z lektinom ostala nizka. Ta je znašala 2690 za lektin in 2348 za kompleks (slika 37).

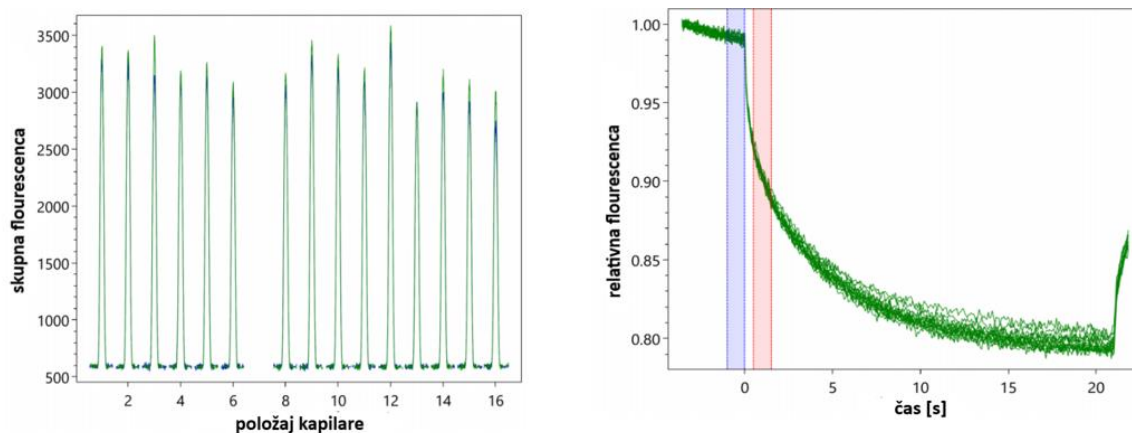


*Slika 38: Posnetek kapilar preverjanja vezave 100 mM saharoze*

V nadaljevanju smo zato moč eksitacijskega laserja povišali na 40 %, s čimer smo izboljšali intenziteto fluorescence. Še vedno pa iz časovnega poteka spremembe fluorescence med MST analizo ni vidnih sprememb v relativni fluorescenci med tarčo in tarčo ob prisotnosti liganda (slika 38). V naslednjem koraku smo ovrednotili afiniteto vezave saharoze na lektin. Najvišja uporabljena koncentracija saharoze pri poskusu je bila 100 mM, sledilo pa ji je 16 zaporednih redčitev. Vrednotenje smo izvedli pri 40-odstotni moči eksitacijskega laserja.

Dodatno smo še povišali koncentracijo Tween 20 na 0,1 %, saj ta zmanjšuje adsorpcijo – vezavo na stene kapilar. Uporabili smo standardne Monolith NT.115 kapilare.

Pri tem smo izvedli dve ponovitvi.

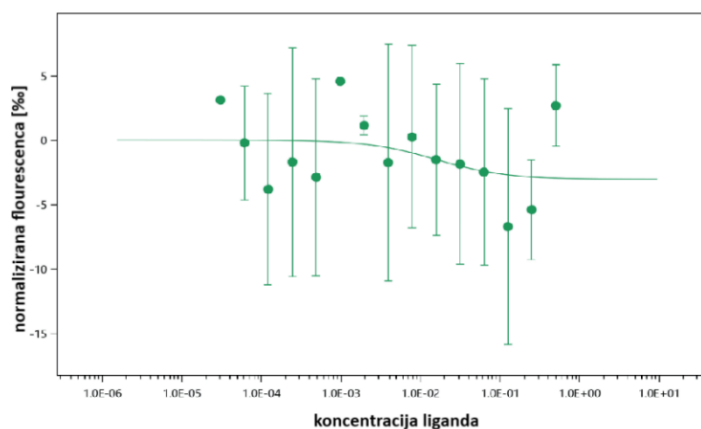


*Slika 39: Posnetek kapilar afinitete vezave 100 mM saharoze (levo), MST sledi afinitete vezave 100 mM saharoze (desno)*

Iz dobljenih rezultatov vidimo precej nizko intenziteto fluorescence. Zato smo pri nadaljnjih meritvah jakost ekstincijskega laserja povečali na 60%. Časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo nakazuje na šibko vezavo med saharozo in lektinom, saj pri MST analizi ni prišlo do večje spremembe fluorescence (slika 39).

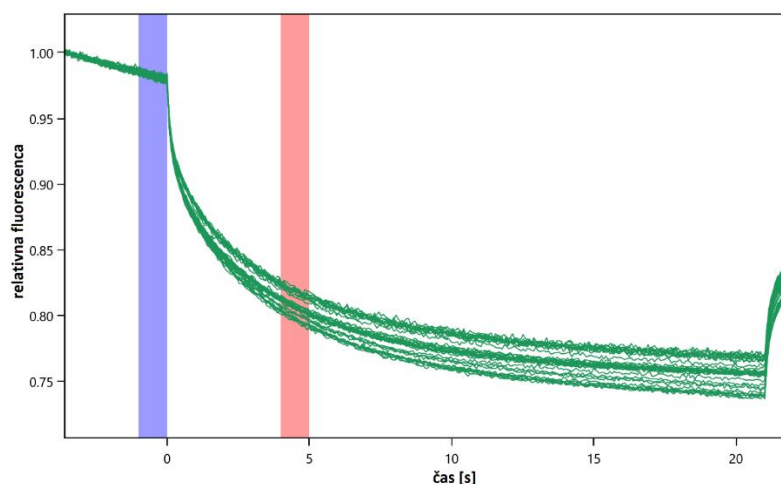
Zaradi šibke afinitete vezave saharoze na lektin smo v nadaljnjih meritvah povečali koncentracijo saharoze na 250 mM oziroma 1000 mM. Uporabili smo MST pufer z 0,1 % Tween 20. Da bi izboljšali intenziteto fluorescentnega signala smo moč ekscitacijskega laserja nastavili na 60 %.

Pri zaporednih redčitvah, ki smo jih pripravili z najvišjo koncentracijo saharoze 250 mM, še vedno nismo opazili večjih sprememb relativne fluorescence ob prisotnosti naraščajočih koncentracij saharoze in posledično iz dobljenih podatkov ni bilo mogoče izračunati konstante disociacije. Začetno koncentracijo saharoze, iz katere smo pripravili nadaljnje redčitve, smo zato povečali na 1000 mM. Pri tem smo izvedli dve neodvisni meritvi in iz njih izračunali konstanto disociacije ( $K_d$ ).



*Slika 40: Krivulja odvisnosti normalizirane fluorescence od koncentracij saharoze, ki smo jo uporabili za izračun  $K_d$ . Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$  STDEV ( $n = 2$ )*





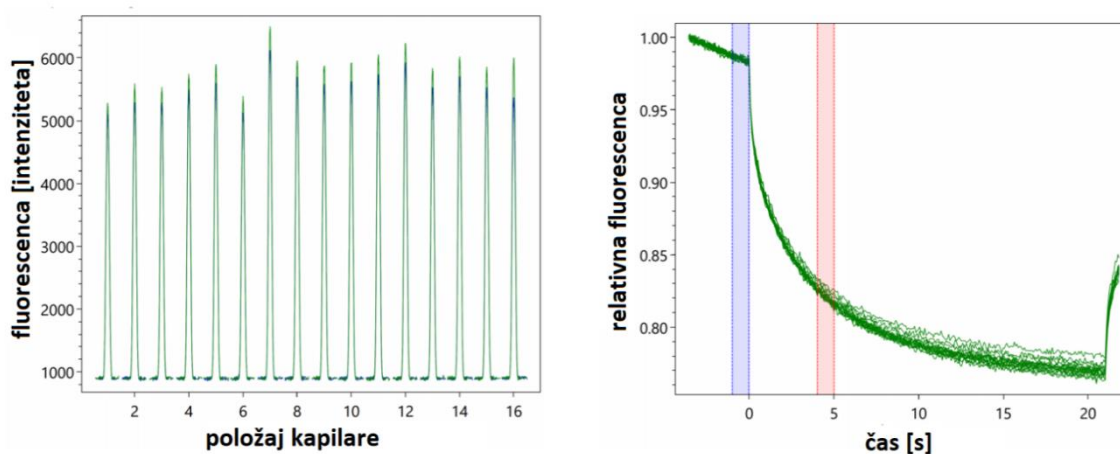
Slika 41: Časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo, ki smo ga uporabili za izračun normalizirane fluorescence pri saharozi

Izračunana konstanta disociacije, ki smo jo pri tem dobili, je znašala 15,9 mM, vendar zaradi majhnih razlik v spremembi fluorescence ta vrednosti ni zanesljiva. Vezava med saharoze na lektin je bila še vedno precej nizka, vendar je iz časovnega poteka spremembe fluorescence med MST analizo razvidno, da pri višjih koncentracijah saharoze pride do interakcije z lektinom (sliki 40 in 41).

### 5.3.2. Glukoza

Pred določanjem afinitete vezave smo najprej s testom vezave preverili, če pride do vezave glukoze na lektin. Pri tem smo uporabili 250 mM glukozo kot ligand in lektin kot tarčo. Poskus smo izvedli v pufru MST z 0,1 % Tween 20 v Monolith NT.115 kapilarah pri 60 % moči ekscitacijskega laserja. Pri izbranih pogojih smo dobili ustrezno intenziteto fluorescence in pri testu nismo zaznali adsorpcije na kapilare. Pri tem je med MST analizo prišlo v prisotnosti glukoze do spremembe fluorescence ob prisotnosti glukoze v primerjavi s samim lektinom, iz česar lahko zaključimo, da se je glukoza vezala na lektin.

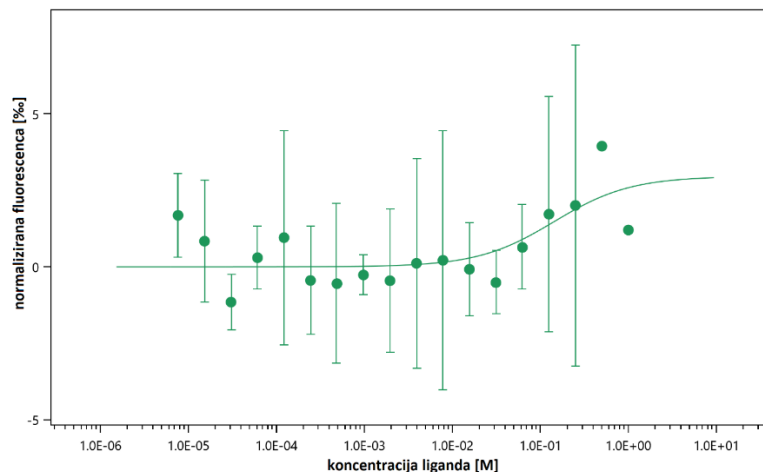
Z določanjem afinitete vezave glukoze smo določili konstanto disociacije. Najvišja uporabljena koncentracija glukoze je bila 250 mM. Uporabili smo pufer MST z 0,1 % Tween 20. Pri vseh meritvah smo uporabili Monolith NT.115 premium kapilare, moč ekscitacijskega laserja smo nastavili na 60 %. Poskus smo izvedli v treh neodvisnih ponovitvah.



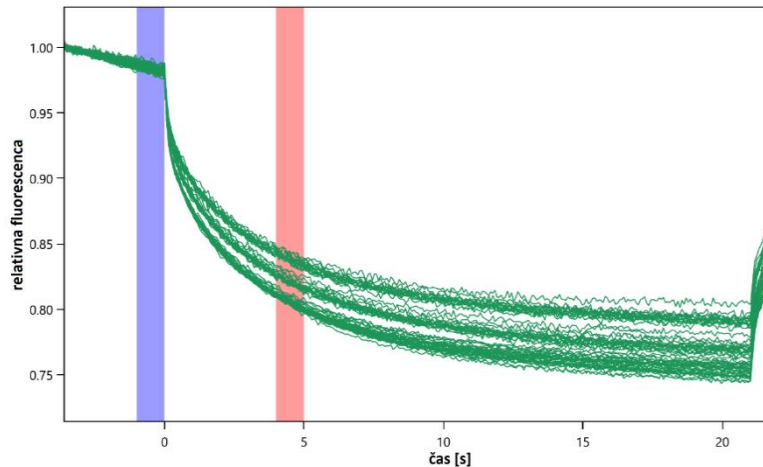
Slika 42: Posnetek kapilar afinitete vezave 250 mM glukoze (levo), MST sledi afinitete vezave 250 mM glukoze (desno)

Pri izbranih pogojih smo pri vseh meritvah dobili ustrezno intenziteto fluorescence v kapilarah in ni bilo adsorpcije na kapilare (slika 42). Pri vseh meritvah je bila relativna sprememba fluorescence v prisotnosti glukoza tudi pri najvišjih uporabljenih koncentracijah precej nizka, zato smo najvišjo uporabljeno koncentracijo povišali na 1000 mM.

Dobljene rezultate smo združili in izračunali Kd.



*Slika 43: Krivulja odvisnosti normalizirane fluorescence od koncentracij glukoze, ki smo jo uporabili za izračun Kd. Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$  STDEV ( $n = 2$ )*

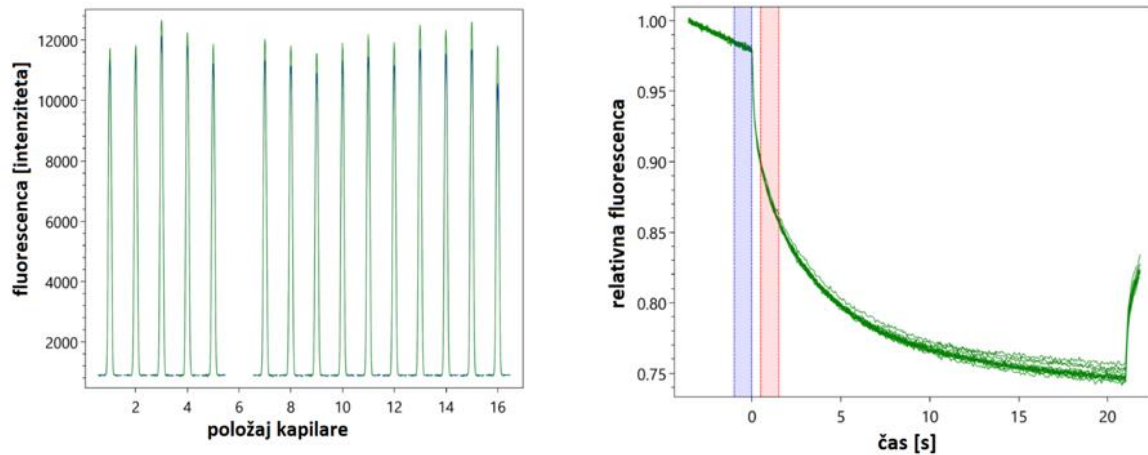


*Slika 44: Časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo, ki smo ga uporabili za izračun normalizirane fluorescence pri glukozi*

Iz časovnega poteka spremembe fluorescence med MST analizo (slika 44) je razvidno, da je pri naraščajočih koncentracijah glukoze prišlo do spremembe fluorescence, kot posledica tvorbe kompleksov med glukozo in lektinom. Določena Kd je bila 143,3 mM (slika 43).

### 5.3.3. Fruktaza

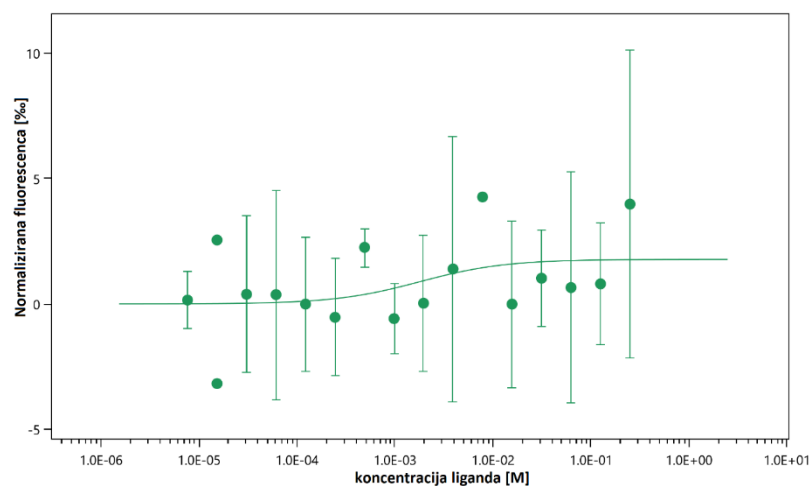
Pred določanjem afinitete vezave smo najprej dvakrat opravili preliminarni test, pri čemer smo uporabili 250 mM fruktozo. Dvakrat smo vrednotili tudi afiniteto vezave 250 mM fruktoze na lektin. Obe meritvi smo opravili z 0,1 % vsebnostjo Tweena 20. Uporabili Monolith NT.115 kapilare. Moč ekscitacijskega laserja smo nastavili na 60 %.



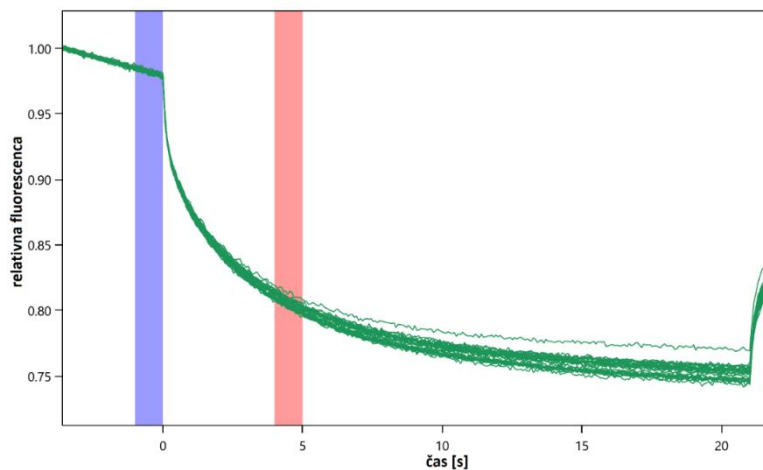
Slika 45: Posnetek kapilar afinitete vezave 250 mM fruktoze (levo), Odziv na odmerek 250 mM fruktoze pri afiniteti vezave (desno)

Število signalov v kapilarah je bilo ustrezno, znašalo je 12015 (slika 45). Adsorpcije ni bilo. Vezni del je znašal 891,5, nevezni pa 890,8.

Po končanih meritvah smo v računalniškem programu narisali skupne grafe vezavnih delov 250 mM fruktoze.



Slika 46: Krivulja odvisnosti normalizirane fluorescence od koncentracij fruktoze, ki smo jo uporabili za izračun  $K_d$ . Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$  STDEV ( $n = 2$ )

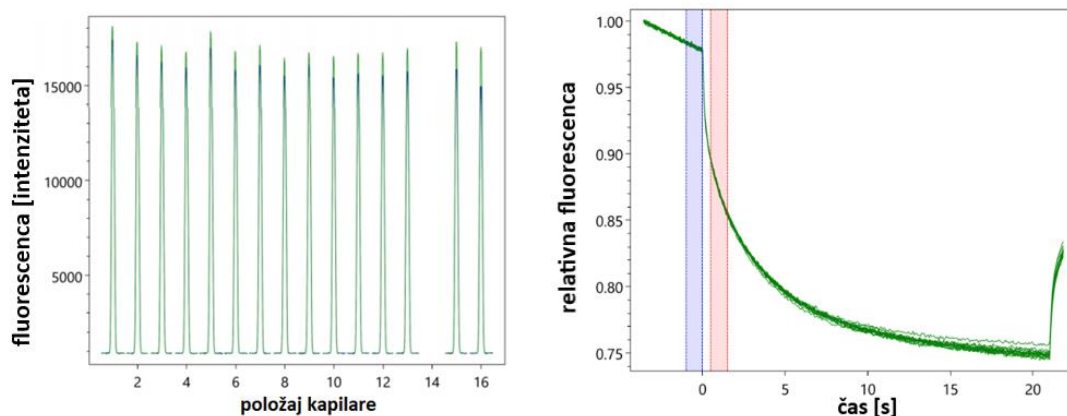


Slika 47: Časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo, ki smo ga uporabili za izračun normalizirane fluorescence pri fruktozi

Razlika med konstantami disociacij je zelo majhna (slika 46), ni prišlo do vezave (slika 47).

### 5.3.4. Metil $\alpha$ -D-glukopiranozid

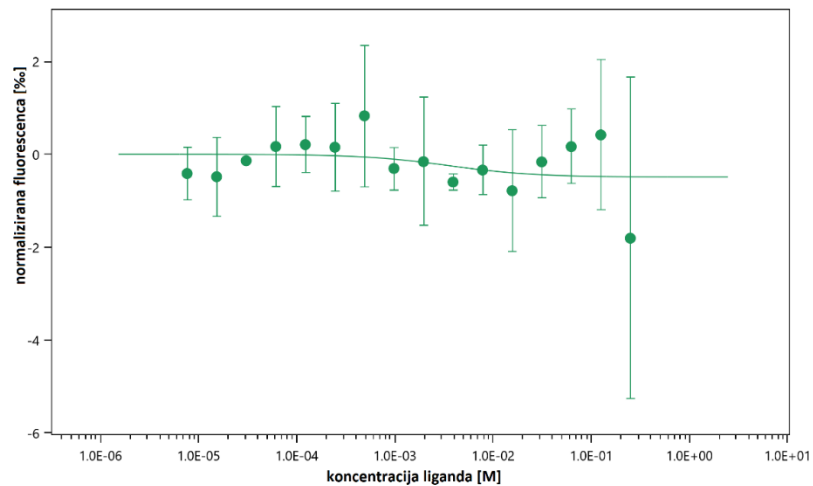
Z 250 mM metil  $\alpha$ -D-glukopiranozidom smo trikrat preverili afinitetno vezavo, pri čemer smo uporabili MST pufer z 0,1 % Tweena 20. Moč ekscitacijskega laserja smo nastavili na 60 % ter uporabili Monolith NT.115 kapilare.



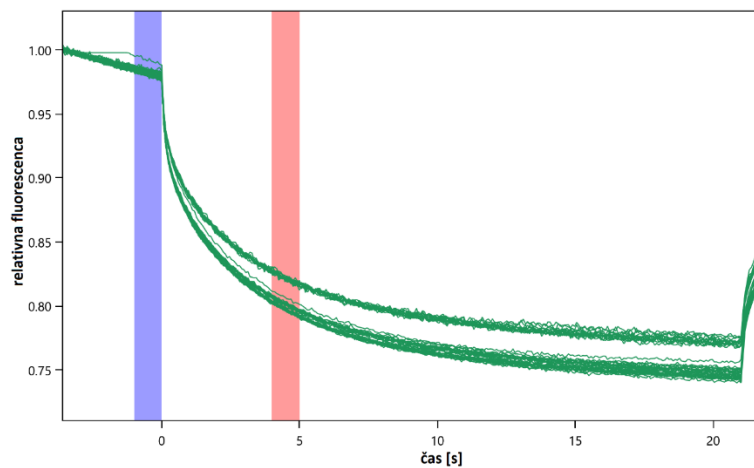
Slika 48: Posnetek kapilar afinitete vezave 250 mM metil  $\alpha$ -D-glukopiranozida (levo), Odziv na odmerek 250 mM metil  $\alpha$ -D-glukopiranozida pri afiniteti vezave (desno)

Iz slike 48 opazimo zadovoljivo število signalov, v povprečju 16996. Nevezni del je znašal 890,2, vezni pa znašal 888,9. Pri naslednjih dveh testih je bilo število signalov nižje.

Po končanih meritvah smo v računalniškem programu narisali skupne grafe za 250 mM metil  $\alpha$ -D-glukopiranozid.



Slika 49: Krivulja odvisnosti normalizirane fluorescence od koncentracij metil  $\alpha$ -D-glukopiranozida, ki smo jo uporabili za izračun  $K_d$ . Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$  STDEV ( $n = 2$ )

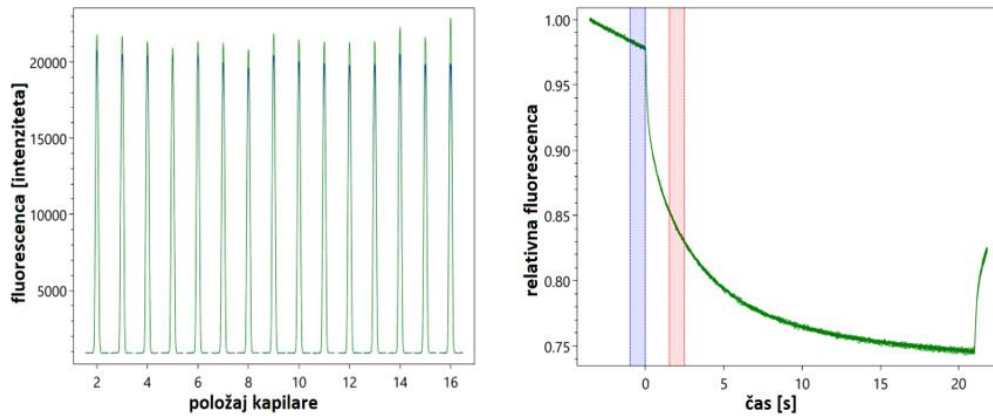


Slika 50: Časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo, ki smo ga uporabili za izračun normalizirane fluorescence pri metil  $\alpha$ -D-glukopiranozidu

Opazimo, da je do neke vezave prišlo, a ta ni bila dovolj izrazita (sliki 49 in 50).

### 5.3.5. N-acetilglukozamin

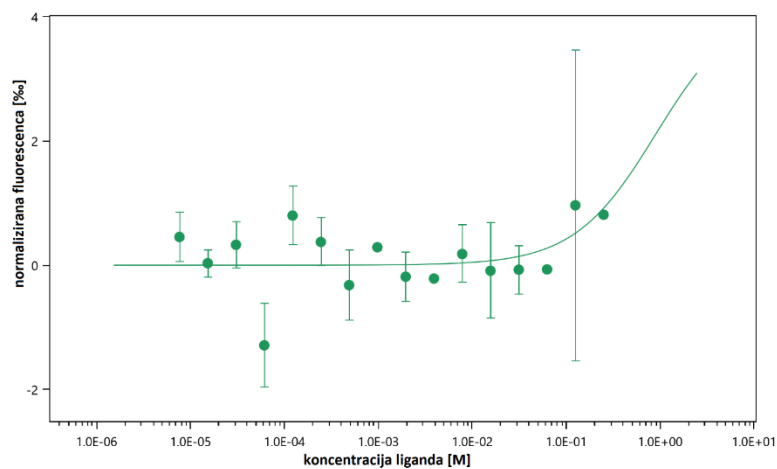
Afiniteto vezave N-acetilglukozamina smo izvedli dvakrat. Pri obeh meritvah smo uporabili 250 mM N-acetilglukozamin. Pri obeh meritvah je bila vsebnost Tweena 20 0,1 %. Pri obeh meritvah smo uporabili Monolith NT.115 kapilare. Pri obeh meritvah smo nastavili moč ekscitacijskega laserja na 60 %.



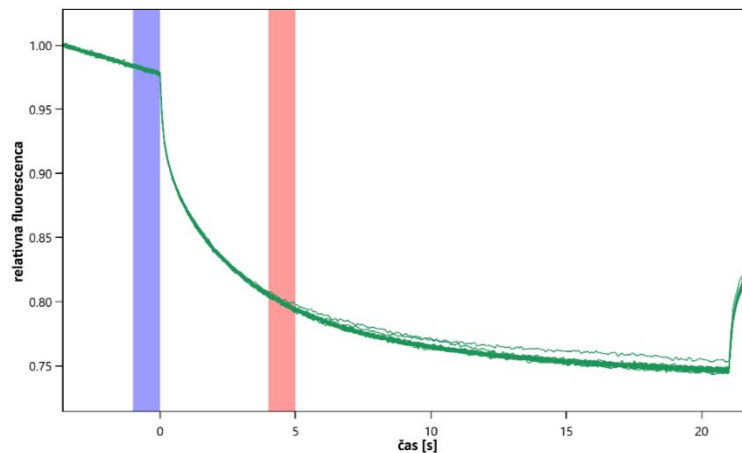
Slika 51: Posnetek kapilar afinitete vezave 240 mM N-acetilglukozamina (levo), Odziv na odmerek 250 mM N-acetilglukozamina (desno)

Pri prvi meritvi afinitete vezave je bilo število signalov v kapilarah visoko, znašalo je 20832 (slika 51). Adsorpcije ni bilo. Vezni del je znašal 889,4, nevezni pa 888,3.

Tudi pri drugi meritvi afinitete vezave je bilo število signalov v kapilarah visoko in ni bilo prisotne adsorpcije. Po končanih meritvah smo v računalniškem programu narisali skupne grafe afinitet vezav N-acetilglukozamina z določeno koncentracijo.



Slika 52: Krivulja odvisnosti normalizane fluorescense od koncentracij N-acetilglukozamina, ki smo jo uporabili za izračun  $K_d$ . Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$  STDEV ( $n = 2$ )

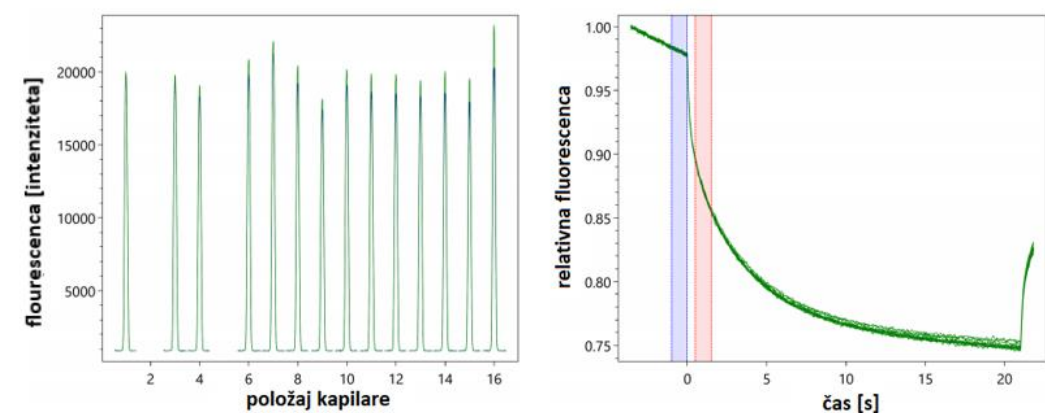


Slika 53: Časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo, ki smo ga uporabili za izračun normalizirane fluorescence pri N-acetilglukozaminu

Iz grafa je razvidno, da do vezave ni prišlo (sliki 52 in 53).

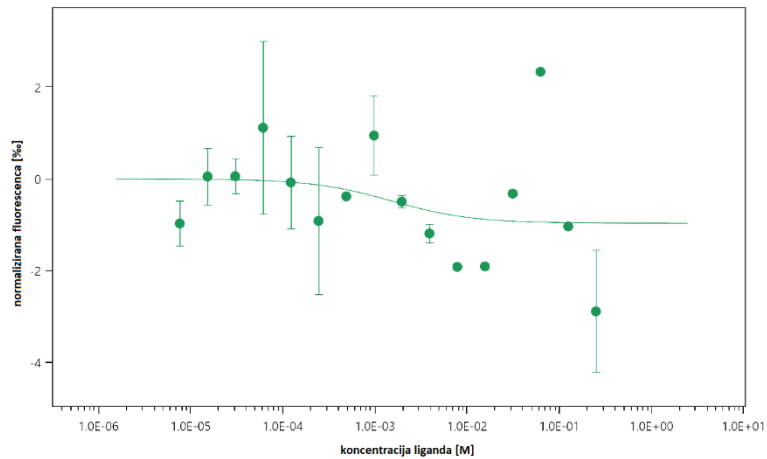
### 5.3.6. Maltotrioza

Z 250 mM maltotrioze smo dvakrat naredili afiniteto vezave. Pri tem smo uporabili MST pufer z 0,1 % Tweena 20 in 60-odstotno moč ekscitacijskega laserja. Vzorce smo v aparaturo za mikrotermoforezo vstavili v Monolith NT.115 kapilarah.

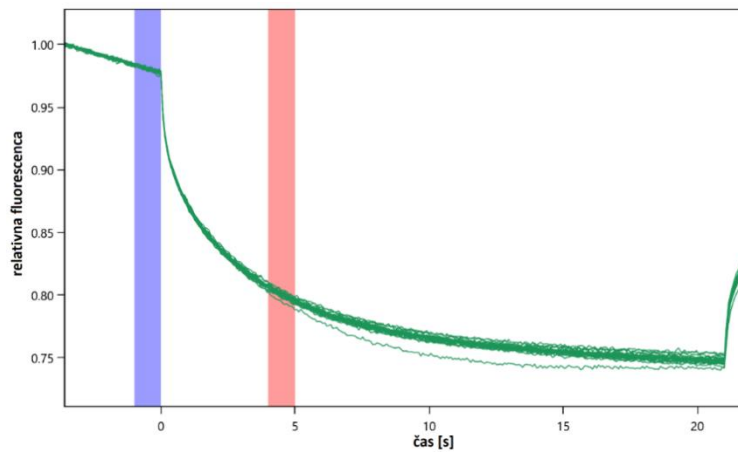


Slika 54: Posnetek kapilar afinitete vezave 250 mM maltotrioze (levo), odziv na odmerek 250 mM maltotrioze pri afiniteti vezave (desno)

Pri obeh meritvah je bilo število signalov visoko (slika 54).



Slika 55: Krivulja odvisnosti normalizirane fluorescence od koncentracij maltotrioze, ki smo jo uporabili za izračun  $K_d$ . Rezultati so podani kot povprečna vrednost  $\pm$  STDEV ( $n = 2$ )



Slika 56: Časovni potek spremembe fluorescence med MST analizo, ki smo ga uporabili za izračun normalizirane fluorescence pri maltotriozi

Opazimo, da do vezave ni prišlo (sliki 55 in 56).



## 6. RAZPRAVA

### 6.1. Izolacija lektina

Pri pripravi soka poprhnjene livke smo vanj dodali natrijev tiosulfat, ki služi kot antioksidant. Kljub temu je sok poprhnjene livke obarvan temno rjavo. Nadaljevali smo z afinitetno kromatografijo, pri kateri smo uporabili kromatografsko kolono, napolnjeno s saharozil-sefarozo. Čeprav so pri prejšnjih poskusih s pomočjo saharozil-sefaroze iz soka poprhnjene livke izolirali za saharozo specifičen lektin CnSucL (molekulska masa 20 kDa) in iz njega pripravili rekombinantno različico rCnSLB2, smo mi z enakim postopkom izolirali lektin z molekulske maso 31 kDa, ki najverjetneje predstavlja za glukozo specifičen lektin CnGlcL [32, 40, 57]. Darovic (2012) in Žigon (2011) sta že pisali o neučinkovitosti vezave rCnSLB na saharozil-sefarozo, saj se ta le delno veže na lektin [40, 57]. Izolacija lektina CnGlcL s pomočjo afinitetne kromatografije na saharozil-sefarozi ni presenetljivo, saj je saharoza disaharid sestavljen iz glukoze in fruktoze. Poleg tega je znano, da je izražanje različnih proteinov v gobah lahko sezonsko odvisno in je lahko povezano tudi z lokacijo rastišča, starostjo gobe, letnim časom in drugimi okoljskimi vplivi [40, 58, 59].

Z uporabo afinitetne kromatografije smo v enem koraku pridobili očiščen protein iz izjemno kompleksnega vzorca. Za nadaljnjo karakterizacijo tega lektina smo izbrali frakcije, ki bodo več kot koristne v prihodnjih raziskavah. V prvem delu naloge smo tako **potrdili hipotezo, da goba poprhnjena livka vsebuje lektin, ki se veže na saharozo.**

### 6.2. Določanje afinitete vezave z mikrotermoforezo

S preliminarnimi testi smo v prvem koraku ovrednotili intenziteto fluorescence označenega lektina in določili pogoje, pri katerih nismo zaznali adsorpcije vzorca na kapilare, tvorbe agregatov v kapilarah in variacij fluorescence [53]. Pri pripravi pufra MST smo magnezijev klorid dodali na koncu, saj bi drugače burno reagiral.

Naše meritve smo pričeli z lektinom z MST pufrom in 0,05 % Tweenom 20. Uporabili smo 20 % moč laserja in navadne kapilare. Zaradi nizke intenzitete fluorescence v raztopini smo povečali moč eksitacijskega laserja na 40 %. Intenziteta signala se je pri tem povečala, v nadaljevanju pa so nastopile nove težave. Opazili smo, da prihaja do adsorpcije raztopine lektina na stene kapilar, zato smo najprej povečali koncentracijo Tween 20 na 0,1 %. Dodatek detergenta zmanjša površinsko napetost in preprečuje adsorpcijo na stene kapilar ter preprečuje nastanek agregatov. Dodatno smo adsorpcijo pri nekaterih meritvah zmanjšali tudi z uporabo premium kapilar, ki imajo posebej obdelano površino. S tem smo želeli izvedeti, ali so kljub nekoliko višji ceni premium kapilare primernejše za naš namen. Pri tem nismo opazili, da je pri premium kapilarah zadostoval manjši dodatek Tween 20 k pufru MST, tip kapilar pa ni značilno vplival na vrednotenje afinitete vezave sladkorja na lektin.

Afiniteto vezave izbranih sladkorjev saharoze, glukoze, fruktoze, metil  $\alpha$ -D-glukopiranozida, N-acetil glukozamina in maltotrioze na saharozil izolektin rCnSLB2 smo ovrednotili z določanjem konstante disociacije s testom afinitete vezave. Pri tem smo spremljali spremembe fluorescence med MST analizo pri 16 različnih koncentracijah, ki smo jih pripravili z zaporednimi redčitvami, pri čemer je bila najvišja uporabljena koncentracija sladkorja 250 mM. Zaradi slabe vezave sladkorjev na lektin smo afiniteto vezave za saharozo in glukozo ovrednotili tudi pri višjih koncentracijah. Pri tem je bila najvišja koncentracija v testu 1000 mM.

Iz dobljenih rezultatov smo ugotovili, da je vezava rCnSLB2 specifična, saj so bile konstante disociacije pri različnih sladkorjih različne, hkrati pa sta se na lektin najbolj vezali saharoza in glukoza. S tem smo **potrdili našo hipotezo, da je vezava saharozil izolektina rCnSLB2 na preproste sladkorje specifična.**

Pri delu so se nam lahko pojavile neidentificirane napake. Raztopine sladkorjev smo pred uporabo res dobro premešali na vorteksu, a se je lahko do časa, ko smo pričeli z mikropipetiranjem, zmes lahko posedla in smo zajeli raztopino z manjšo koncentracijo sladkorja. Tudi pri mikropipetiranju bi lahko nastopila odstopanja, a smo pred začetkom dela vadili tehniko in jo dodobra izpilili. Pri pripravi raztopin smo izračune dvakrat preverili, pred delom pa smo preučili tudi protokole tehtanja. Pri delu smo bili precej pozorni in druge večje napake ne bi smele nastopiti.

### **6.3. Uporabnost mikrotermoforeze**

Najstabilnejši kompleksi lektin-sladkor imajo najnižjo disociacijsko konstanto (enačba 6). Zaradi nizke afinitete vezave izbranih sladkorjev na lektin pri uporabljenih koncentracijah smo  $K_d$  lahko določili le za saharozo in glukozo, medtem ko pri ostalih sladkorjih ni prišlo do vezave. Konstanta disociacije združenih rezultatov za glukozo je znašala 143,3 mM, za saharozo pa 15,9 mM. To pomeni, da se je rCnSLB2, bolje vezal na saharozo kot glukozo, kar se sklada s pričakovanji.

Pridobljeni rezultati kažejo, da mikrotermoforeza ni najprimernejša metoda za določanje vezave sladkorjev na lektine v primeru, da je afiniteta vezave sladkorja nizka, kot smo opazili v našem primeru.

Prednost postopka mikrotermoforeze na Monolith NT.115 za določanje afinitete vezave je, da gre za precej enostavno in hitro metodo. Posamezna metitev je trajala približno 16 minut z upoštevanom pripravo vzorcev. Pred tem je potrebno temeljito pripraviti raztopine in polniti kapilare. V povprečju smo za vsako meritev potrebovali 20 minut. Dodatna prednost te metode je, da za njeno izvedbo potrebujemo relativno majhne količine vzorcev v primerjavi z drugimi metodami, saj je bila končna koncentracija lektina v testu le 1,2 nM. Poleg tega pa nam je, da smo napolnili eno kapilaro, zadostovalo 20  $\mu$ L raztopine sladkorja in lektina.

Metoda mikrotermoforeze je tako izredno uporabna metoda v primerih, ko je prisotna močna afiniteta vezave liganda na tarčo, manj pa je uporabna, kadar je ta afiniteta vezave šibka, kot je bilo v našem primeru. Iz rezultatov našega dela sklepamo, da postopek mikrotermoforeze ni dovolj občutljiv, da bi z njim natančno določili vezavo izbranih sladkorjev na saharozil izolektin rCnSLB2, saj pri večini meritev ni bilo zadostnih sprememb fluorescence ob prisotnosti naraščajočih koncentracij sladkorjev. **Našo hipotezo, da z mikrotermoforezo lahko kvantitativno določimo vezavo med lektini in preprostimi sladkorji, smo ovrgli**, saj to ni najučinkovitejša metoda, če je afiniteta vezave med lektini in preprostimi sladkorji prešibka.

## **7. ZAKLJUČEK**

Poprhnjena livka (*Clitocybe nebularis*) vsebuje veliko lektinov z različnimi biokemijskimi lastnostmi in specifičnostjo za vezavo na različne sladkorje [32]. V uporabi so različne metode za določanje vezave preprostih ogljikovih hidratov na proteine, kot so npr. izotermalna kalorimetrija in analiza inhibicije hemaglutinacije. Prednosti termoforeze za analizo molekulskih interakcij je uporaba zelo majhne količine vzorca brez omejitve glede velikosti molekul [60].

Pred začetkom praktičnega dela naloge smo si postavili več ciljev in jih tekom naloge večinoma dosegli. Iz poprhnjene livke smo izolirali lektin CnGlcL in pripravili vzorce lektina za nadaljnje raziskave. S pomočjo ultrafiltracije smo iz poprhnjene livke pripravili vzorce z visoko koncentracijo proteinov. S poliakrilamidno elektroforezo smo potrdili, da je izolirani lektin dobro očiščen. Za izolacijo smo se poslužili afinitetne kromatografije, ki temelji na reverzibilni interakciji med ligandom in substratom [61], ki se je izkazala za izjemno učinkovito metodo, saj smo lektin iz kompleksnega vzorca izolirali v enem koraku. V našem gobjem soku je najverjetneje prevladoval izoliran lektin CnGlcL, kar nam je pokazala analiza s poliakrilamidno gelsko elektroforezo. Nadalje smo z uporabo označenega rekombinantnega lektina rCnSLB2 z mikrotermoforezo spremljali vezavo saharoze, glukoze, fruktoze, maltotrioze, N-acetilglukozamina in metil  $\alpha$ -D-glukopiranozida na ta izolektin. Najprej smo v preliminarnih testih optimizirali potrebne pogoje pri katerih smo lahko spremljali fluorescenco označenega rekombinantnega lektina ter pri katerih ni prišlo do adsorpcije na kapilare ali tvorbe agregatov. Nato pa smo za posamezne sladkorje preverili vezave na izolektin in določili afiniteto vezave, ki smo jo izrazili s konstanto disociacije. Pri tem smo uporabljali za to namenjene kapilare, ki smo jih napolnili z raztopinami sladkorjev z lektinom, ki smo jih pripravili v pufri MST z dodatkom Tweena 20. Z izbranim naborom preprostih sladkorjev, nismo ugotovili kateri sladkor se na izbrani izolektin veže najbolje, saj pri mikrotermoforezi z naraščanjem koncentracije sladkorjev ni prišlo do spremembe v fluorescenci. Opazili smo tudi, da je pri meritvah občasno prihajalo do adsorpcije, predvsem v vzorcih pri katerih smo uporabili višje koncentracije sladkorjev. Za potrditev uporabnosti mikrotermoforeze kot učinkovite metode za določanje vezave preprostih ogljikovih hidratov na lektine bi morali metodo še dodatno optimirati. Kljub temu pa smo pokazali, da je vezava saharozil izolektina rCnSLB2 na preproste sladkorje je specifična, saj so se konstante disociacije pri različnih sladkorjih razlikovale. Izmed izbranih sladkorjev sta se na lektin najmočneje vezala saharoza in glukoza. Čeprav nismo potrdili vseh postavljenih hipotez, smo se ob delu naučili veliko o biokemiji in se seznanili s številnimi laboratorijskimi tehnikami in metodami, ki se vsakodnevno uporabljajo v biotehnoških laboratorijih. Preučili smo teoretično ozadje termoforeze in vezave ogljikovih hidratov, prvič pa smo se spoznali tudi z lektini, njihovim vplivom ter širokim področjem delovanja.

Z našim raziskovalnim delom smo naredili prvi korak pri uporabi mikrotermoforeze za analizo vezave sladkorjev z izolektinom. Mikrotermoforeza se do sedaj za ta namen namreč še ni uporabljala. Kljub težavam s katerimi smo se srečali pri eksperimentalnem delu mikrotermoforeza predstavlja obetavno metodo s katero bi lahko hitro in enostavno kvantificirali afiniteto vezave med preprostimi ogljikovimi hidrati in lektini, vendar bi bilo pri tem potrebno uporabiti ustrezno koncentracijo sladkorjev, jakost laserja in koncentracijo dodanega detergenta, s katero bi preprečili adsorpcijo na stene kapilar. Mikrotermoforeza tako odpira nove možnosti tudi pri raziskavah interakcij proteinov z enostavnimi ogljikovimi hidrati.

V nadaljnjih raziskavah bi lahko raziskovali še vezavo ostalih lektinov, ki jih vsebuje goba poprhnjena livka. Na podlagi teh raziskav bi dokončno potrdili, ali je postopek mikrotermoforeze premalo občutljiv

za določanje vezave lektinov na sladkorje. Iz kromatografskih frakcij, ki smo jih zbrali med izvajanjem praktičnega dela, bi lahko v prihodnosti izolirali za glukozo specifičen lektin CnGlCL, ga očistili in uporabili za različne namene preučevanja lektinov.

## **8. VIRI IN BIBLIOGRAFIJA**

1. Eaton, & Hale. (1993). *Wood: Decay, pests, and protection*. London: Chapman and Hall.
2. Belušič, G., Koce, J. D., Turk, M., Vittori, M., & Zalar, P. (2018). *Biologija 2: O zgradbi in delovanju organizmov*. Ljubljana: Ljubljana: Miladinska knjiga Založba, d.d.
3. 2016. (n.d.). Osnovne značilnosti gliv. *eucbeniki*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://eucbeniki.sio.si/nar7/1817/index1.html>. [dostopano 16. 12. 2019]
4. Deacon, J. (2006). *Fungal Biology*. Oxford: Blackwell Publisher.
5. Raspor, P. (1996). *Kvasovke. V: Biotehnologija-osnovna znanja*. Ljubljana: BIA d. o. o.
6. Podobnik, A., & Devetak, D. (2000). *Biologija 4 in 5: Raznolikost živih bitij*. Ljubljana: DZS.
7. Šerod, S. (2014). Razmnoževanje gliv. Dostopno na spletnem naslovu: <http://www.gobe.si/Mikologija/RazmnozevanjeGliv>. [dostopano 9. 12. 2019]
8. Campbell, N. A., & Reece, J. B. (2002). *Biology*. San Francisco: Pearson Education Inc.
9. Cimerman, N. (1996). *Nitaste glive. V: Biotehnologija - osnovna znanja*. Ljubljana: BIA d. o. o.
10. Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., & Stalpers, J. A. (2001). *Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi: 9th edition (9.)*. Wallingford: CABI Publishing. Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20013144931>
11. Halbwachs, H., & Bässler, C. (2015). Gone with the wind - A review on basidiospores of lamellate agarics. *Mycosphere*, 6(1), 78–112. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/6/1/10>
12. Arzenšek, B., Tratnik, B., & Malovrh, B. (2002). *Naše gobe*. Ljubljana: Modrijan.
13. O'Reilly, P. (2016). *Fascinated by Fungi*. Penrith, Cumbria: First Nature.
14. Kreft, Glavač, Stojilkovski, Mlinarič, Injac, Novak, Doljak, Štrukelj, Može, S., Umek, Kristl, Janeš, Berlec, Sabotič, & Glavač. (2013). *Sodobna fitoterapija: Z dokazi podprta uporaba zdravilnih rastlin*. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo.
15. Vijayan, M., & Chandra, N. (1999). Lectins. *Current Opinion in Structural Biology*, 9(6), 707–714.
16. Sharon, N., & Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, 14(11), 53R-62R.
17. Stavitsky, A. B. (1998). Agglutination. V poglavju *Encyclopedia of Immunology* (2., pp. 54–56). Cambridge, Massachusetts: Academic Press.
18. Lis, H., & Sharon, N. (1998). Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, 98(2), 637–674. <https://doi.org/10.1021/cr940413g>
19. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). *Biochemistry. 5th edition*. (5.). New York: W. H. Freeman.
20. Brito-Arias, M. (2009). Glycoconjugates. V poglavju *Synthesis and Characterization of Glycosides* (pp. 272–303). Boston: Springer.
21. Sharon, N., & Lis, H. (1995). Lectins--proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition.

- Essays Biochem.*, 30, 59–75.
22. Brito-Arias, M. (2007). *Synthesis and Characterization of Glycosides*. Boston: Springer.
  23. Sharon, N., & Lis, H. (2003). *Lectins*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
  24. Peumans, W. J., & Van Damme, E. J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109(2), 347–352. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.347>
  25. Santos, A. F. S., Da Silva, M. D. C., Napoleão, T. H., Paiva, P. M. G., Correia, M. T. S., & Coelho, L. C. B. B. (2014). Lectins: Function, structure, biological properties and potential applications. *Current Topics in Peptide and Protein Research*, 15(December 2014), 41–62.
  26. Splenocyte. (2016). *Wikipedia*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://en.wikipedia.org/wiki/Splenocyte>. [dostopano 9. 1. 2020]
  27. Mishra, A., Behura, A., Mawatwal, S., Kumar, A., Naik, L., Mohanty, S. S., Manna, D., Dokania, P., Mishra, A., Patra, S. K., & Dhiman, R. (2019). Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. *Food and Chemical Toxicology*, 134(August), 110827. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110827>
  28. Pusztai, A., & Bardocz, S. (2005). *Lectins: Biomedical Perspectives*. Abingdon-on-Thames: Taylor&Francis.
  29. Khan, F., & Islam Khan, M. (2011). Fungal Lectins: Current molecular and biochemical perspectives. *International Journal of Biological Chemistry*, 5(1), 1–20. <https://doi.org/10.3923/ijbc.2011.1.20>
  30. Horejsi, & Kocourek. (1978). Studies of lectins XXXVI. Properties of some lectins prepared by affinity chromatography on O-glycosyl polyacrylamide gels. *Biochimica et Biophysica Acta*, 538(2), 299–315.
  31. Pohleven, J., & Sepčič, K. (2009). *Biokemijske lastnosti lektina iz višje glive meglenske (Clitocybe nebularis) in njegova biološka aktivnost*. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti.
  32. Pohleven, J., Brzin, J., Vrabec, L., Leonardi, A., Čokl, A., Štrukelj, B., Kos, J., & Sabotič, J. (2011). Basidiomycete *Clitocybe nebularis* is rich in lectins with insecticidal activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(4), 1141–1148. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3236-0>
  33. Bruice, P. Y. (1998). *Organic Chemistry* (second edi.). Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall, Inc.
  34. Reusch, W. (2013). Carbohydrates. *ARQUIVO.PT*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://m.arquivo.pt/wayback/20160514043358/https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/carbhyd.htm>. [dostopano 19. 12. 2020]
  35. Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Freeze, H. H., Stanley, P., Bertozzi, C. R., Hart, G. W., & Etzler, M. E. (2017). *Essentials of Glycobiology, Third Edition* (third edit.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
  36. Stick, R. V., & Williams, S. J. (2009). *Carbohydrates: The Essential Molecules of Life*. Oxford: Elsevier.
  37. Nilsson, C. L. (2003). Lectins: proteins that interpret the sugar code. *Analytical Chemistry*,

- 75(15), 348 A-353 A.
38. Sharon, N., & Lis, H. (2002). How Proteins Bind Carbohydrates: Lessons from Legume Lectins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(22), 6586–6591.
  39. Barnes, M. R., & Gray, I. C. (2003). *Bioinformatics for Geneticists*. John Wiley & Sons, Ltd.
  40. Darovic, S. (2012). *Priprava rekombinantnih saharozil izolektinov iz gobe megljenke (Clitocybe nebularis) v E. coli in primerjava njihovih biokemijskih lastnosti*. Univerza v Ljubljani.
  41. Skoog, D. A., West, D. M., Crouch, S. R., & Holler, J. F. (2004). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Boston: Thomson Learning.
  42. Shriner, R. L., Hermann, C. K. F., Morrill, T. C., Curtin, D. Y., & Fuson, R. C. (2004). *The Systematic Identification of Organic Compounds*. Hoboken: John Willey & Sons, INC.
  43. Skoog, D. A., Holler, J. F., & Crouch, S. R. (2007). *Principles of Instrumental Analysis*. Boston: Thomson Brooks.
  44. Overview of Affinity Purification. (n.d.). *ThermoFisher SCIENTIFIC*. Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-affinity-purification.html>. [dostopano 27. 3. 2020]
  45. Cuatrecasas, P., Wilchek, M., & Anfinsen, C. B. (1968). Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 61(2), 636–643. <https://doi.org/10.1073/pnas.61.2.636>
  46. Cuatrecasas, P. (1970). Protein Purification by Affinity Chromatography. *The Journal of Biological Chemistry*, 245(12), 3059–3065.
  47. Corley, R. B. (2005). *A Guide to Methods in the Biomedical Sciences*. New York: Springer.
  48. Germer, T. A., Zwinkels, J. C., & Tsai, B. K. (2014). *Spectrophotometry: Accurate Measurement of Optical Properties of Materials* (1.). Cambridge, Massachusetts: Academic Press.
  49. Reinhardt, K. A., & Kern, W. (2008). *Handbook of Silicon Wafer Cleaning Technology*. Norwich: William Andrew Inc.
  50. Žlebnik, T., & Vidmar, K. (1996). Termoforeza. *Kovine zlitine tehnologije*, 30(1/2).
  51. Duhr, S., & Braun, D. (2006). Why molecules move along a temperature gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(52), 19678–19682. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603873103>
  52. Kruljec, N. (2019). *Načrtovanje in razvoj peptidnih ligandov za afinitetno čiščenje protiteles*. Univerza v Ljubljani.
  53. *User Manual for the Monolith NT.115*. (2013). München. Dostopno na spletnem naslovu: [https://www.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/mst/Manual\\_NT115.pdf](https://www.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/mst/Manual_NT115.pdf) [dostopano 20. 12. 2020]
  54. *A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection*. (n.d.). Hercules, California. Dostopno na spletnem naslovu: [http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6040.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf) [dostopano 23. 5. 2020]



55. Fischer, L., & Stressler, T. (2018). Measurements in the UV Range. V poglavju F. Lottspeich & J. W. Engels (Eds.), *Bioanalytics*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. Dostopno na spletnem naslovu: <https://www.wiley.com/en-us/Bioanalytics%3A+Analytical+Methods+and+Concepts+in+Biochemistry+and+Molecular+Biology-p-9783527339198>
56. *User Manual Monolith NT™ Protein Labeling Kit*. (n.d.). München. Dostopno na spletnem naslovu: [https://manualzilla.com/doc/5634202/monolith-nt-ntm-protein-labeling-kit-red-nhs?fbclid=IwAR1\\_SINA6yOa8YTMSWVBmE7ukR1Sl2mYa0eZLTIPjw31MfD8u7o\\_2ZYIyu0](https://manualzilla.com/doc/5634202/monolith-nt-ntm-protein-labeling-kit-red-nhs?fbclid=IwAR1_SINA6yOa8YTMSWVBmE7ukR1Sl2mYa0eZLTIPjw31MfD8u7o_2ZYIyu0) [dostopano 26. 5. 2020]
57. Žigon, S. (2011). *Karakterizacija za saharozo specifičnega lektina iz gobe meglenske (Clitocybe nebularis)*. Univerza v Ljubljani.
58. Mikiashvili, N. A., Elisashvili, V. I., Wasser, S. P., & Nevo, E. D. (2006). Comparative Study of Lectin Activity of Higher Basidiomycetes. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 8(1), 31–38.
59. Guillot, J., & Konska, G. (1997). Lectins in higher fungi. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25(3), 203–230. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(96\)00110-X](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(96)00110-X)
60. Jerabek-Willemsen, M., André, T., Wanner, R., Roth, H. M., Duhr, S., Baaske, P., & Breitsprecher, D. (2014). MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure*, 1077, 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.009>
61. Urh, M., Simpson, D., & Zhao, K. (2009). *Chapter 26 Affinity Chromatography. General Methods. Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 463). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63026-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63026-3)

## 8.1. Viri slik

Slika 1:

<https://www.first-nature.com/fungi/clitocybe-nebularis.php>  
[citirano: 6. 12. 2020]

Slika 2: Prirejeno po:

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842011000400015](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842011000400015) [dostopano: 13. 12. 2019]

Slika 3: Prirejeno po: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC157596/> [dostopano: 28. 1. 2020]

Slika 4: <https://www.sciencephoto.com/media/799330/view>. [citirano: 4. 7. 2020]

Slika 5: Prirejeno po: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274/> [dostopano: 9. 1. 2020]

Slika 6: Prirejeno po:



<https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/overview-affinity-purification.html> [dostopano 3. 5. 2020]

Slika 8: Prirejeno po: [https://www.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/mst/Manual\\_NT115.pdf](https://www.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/mst/Manual_NT115.pdf) [dostopano 25. 1. 2020]

Slika 11: Prirejeno po:

- <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Beta-D-Glucopyranose.svg> [dostopano 3. 5. 2020]
- <https://en.wikipedia.org/wiki/Sucrose> [dostopano 3. 5. 2020]
- <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/f/fructose.html> [dostopano 3. 5. 2020]
- <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/170445?lang=en&region=SI> [dostopano 3. 5. 2020]
- [https://en.wikipedia.org/wiki/File:Haworth\\_projection\\_of\\_N-Acetylglucosamine.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Haworth_projection_of_N-Acetylglucosamine.svg) [dostopano 3. 5. 2020]
- <http://www.nutrientsreview.com/carbs/oligosaccharides-maltotriose.html> [dostopano 3. 5. 2020]

Slika 32: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21556921> [dostopano 1. 5. 2020]

Ostale slike smo ustvarili sami s pomočjo mentorjev.