

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

Blanka Premrov Bajuk

IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA
PROTEINSKIH IN NEPROTEINSKIH INHIBITORJEV
CISTEINSKIH PEPTIDAZ DERMATOFITA
Trichophyton mentagrophytes
TER NJIHOV VPLIV NA GOSTITELJA

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
VETERINARSKA FAKULTETA

UDK 577.152.34:577.112.386:582.282(043.3)

Blanka Premrov Bajuk, univ. dipl. biol.

IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA
PROTEINSKIH IN NEPROTEINSKIH INHIBITORJEV
CISTEINSKIH PEPTIDAZ DERMATOFITA
Trichophyton mentagrophytes
TER NJIHOV VPLIV NA GOSTITELJA

Doktorska disertacija

Ljubljana, 2011

Blanka Premrov Bajuk

**IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA
PROTEINSKIH IN NEPROTEINSKIH INHIBITORJEV
CISTEINSKIH PEPTIDAZ DERMATOFITA
Trichophyton mentagrophytes
TER NJIHOV VPLIV NA GOSTITELJA**

Delo je bilo opravljeno na Inštitutu za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani v okviru raziskovalnih projektov *Vpliv citosolnih dermatofitnih proteinov na imunski odziv pri sesalcih* s šifro J4-2092-04060 in *Struktura in funkcija proteinaz in njihovih proteinskih inhibitorjev pri dermatofitih* s šifro L4-4423-04060.

Predstojnica inštituta:

prof. dr. Silvestra Kobal

Javni zagovor je bil opravljen v Ljubljani, dne: _____

Mentorica:

prof. dr. Marinka Drobnič Košorok

Somentor:

doc. dr. Tadej Malovrh

Člani strokovne komisije za oceno in zagovor:

- doc. dr. Irena Zdovc, **predsednica**
- prof. dr. Marinka Drobnič Košorok, **mentorica in članica**
- doc. dr. Tadej Malovrh, **somentor in član**
- prof. dr. Ljiljana Pinter (VF Zagreb), **članica**

Izjava o delu

Izjavljam, da je doktorska disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Blanka Premrov Bajuk

KAZALO VSEBINE

Kazalo vsebine	4
Kazalo slik	8
Kazalo razpredelnic	10
Seznam kratic in okrajšav	11
Okrajšave aminokislin	13
IZVLEČEK	14
ABSTRACT	15
1 UVOD	16
2 PODATKI IZ LITERATURE	18
2.1 Dermatofiti.....	18
2.1.1 Taksonomija dermatofitov.....	20
2.1.1.1 <i>Trichophyton spp.</i>	20
2.1.2 Patogeneza dermatofitnih okužb.....	20
2.1.3 Imunski odziv na dermatofite	22
2.2 Cisteinske peptidaze	23
2.2.1 Razdelitev cisteinskih peptidaz.....	24
2.2.1.1 Papainu podobne cisteinske peptidaze (klan CA).....	25
2.2.1.2 Kaspaze (klan CD)	27
2.2.2 Regulacija aktivnosti cisteinskih peptidaz.....	28
2.3 Inhibitorji peptidaz.....	29
2.3.1 Nespecifični peptidazni inhibitorji	32
2.3.2 Proteinski inhibitorji cisteinskih peptidaz.....	32
2.3.2.1 Klan IC, Družini I48 (Klitocipinska družina) in I85 (Makrocipinska družina)	33
2.3.2.2 Klan ID, Družina I4 (Serpinska družina)	33
2.3.2.3 Klan IF, Družina I67 (Bromeinska družina).....	34
2.3.2.4 Klan IH, Družina I25 (Cistatinska družina).....	34
2.3.2.5 Klan II, Družina I27 (Kalpastatinska družina).....	35
2.3.2.6 Klan IK, Družini I57 (Družina stafostatin B) in I58 (Družina stafostatin A)	35
2.3.2.7 Klan IL, Družina I39 (Družina α 2M)	36
2.3.2.8 Klan IQ, Družina I50 (Družina P35)	36

2.3.2.9	Klan IV, Družina I32 (Družina IAP)	36
2.3.2.10	Klan IX, Družina I31 (Družina tiropinov).....	37
2.3.2.11	Klan JF, Družina I29 (Družina CTLA)	37
2.3.3	Majhni inhibitorji cisteinskih peptidaz	38
2.3.3.1	E-64	39
2.4	Glivne peptidaze in inhibitorji.....	39
2.4.1	Peptidaze gliv	39
2.4.1.1	Peptidaze dermatofitov.....	40
2.4.2	Glivni inhibitorji cisteinskih peptidaz.....	41
2.4.2.1	Proteinski inhibitorji cisteinskih peptidaz	41
2.4.2.2	Majhni inhibitorji cisteinskih peptidaz.....	42
2.5	Peptidaze in inhibitorji pri imunskem odzivu	43
2.5.1	Apoptoza	43
2.5.2	Predstavljanje antigenov	44
2.5.3	Interakcije gostitelj-patogen.....	45
2.5.4	Dermatofitne peptidaze in inhibitorji pri imunskem odzivu.....	46
3	UTEMELJITEV DELA	48
3.1	Hipoteze	48
3.2	Namen dela	49
4	MATERIAL IN METODE	50
4.1	Gojišča in gojenje glive <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	50
4.1.1	Ločevanje proteinskega in neproteinskega inhibitorja cisteinskih peptidaz iz gojišča glive	50
4.2	Izolacija proteinskega inhibitorja	51
4.2.1	Priprava citosolnega ekstrakta glive <i>T. mentagrophytes</i>	51
4.2.2	Določanje koncentracije proteinov	51
4.2.3	Afinitetna kromatografija na koloni CM-papain Sepharose 4B	52
4.2.3.1	Priprava kolone CM-papain Sepharose 4B	52
4.2.3.2	Afinitetna kromatografija	52
4.2.4	Ionsko izmenjevalna kromatografija na CIM-disku.....	52
4.2.5	RP-HPLC.....	53
4.3	Karakterizacija proteinskega inhibitorja.....	53
4.3.1	NaDS-PAGE	53
4.3.2	Imunokemijske raziskave	55
4.3.2.1	Zbiranje in priprava vzorcev serumov kuncev	55
4.3.2.2	Imunski odtis	55
4.3.3	Določanje aminokislinskega zaporedja.....	56
4.3.3.1	Odstranjevanje N-terminalne blokade.....	56

4.3.3.1.1	Razgradnja z β -tripsinom	56
4.3.3.1.2	Razgradnja s himotripsinom	56
4.3.3.1.3	Razgradnja z V-8.....	57
4.3.3.1.4	Razgradnja s TFA.....	57
4.3.3.2	RP-HPLC	57
4.3.3.3	Sekveniranje	57
4.3.3.4	Iskanje homologije	57
4.4	Izolacija neproteinskega inhibitorja	57
4.4.1	Priprava citosolnega ekstrakta glive <i>T. mentagrophytes</i>	58
4.4.2	Anionsko izmenjevalna kromatografija na SPE-koloni.....	58
4.4.3	RP-HPLC.....	58
4.5	Karakterizacija neproteinskega inhibitorja	58
4.5.1	HPLC-DAD	58
4.5.2	Temperaturna stabilnost	59
4.5.3	pH-stabilnost	59
4.5.4	Masna analiza	59
4.6	Določanje inhibicije encimske aktivnosti.....	59
4.6.1	Merjenje inhibicije papaina.....	60
4.6.2	Merjenje inhibicije katepsina B	60
4.6.3	Merjenje inhibicije katepsina L.....	61
4.6.4	Merjenje inhibicije katepsina H	61
4.6.5	Merjenje inhibicije tripsina.....	61
4.7	Interakcija neproteinskega inhibitorja z imunskim odzivom gostitelja.....	61
4.7.1	Poskusne živali.....	62
4.7.2	Imunizacija	62
4.7.3	Vzorci krvi.....	62
4.7.4	Priprava mononuklearnih celic	62
4.7.4.1	Merjenje celične proliferacije.....	63
4.7.4.2	Merjenje apoptoze	64
4.7.4.3	Statistična analiza podatkov.....	64
4.7.5	Imunokemijske raziskave	65
4.7.5.1	Razgradnja ovalbumina	65
4.7.5.2	NaDS – PAGE	65
4.7.5.3	Imunski odtis	66
5	REZULTATI	67
5.1	Proteinski in neproteinski inhibitor v gojišču glive <i>T. mentagrophytes</i>	67
5.2	Proteinski inhibitor iz glive <i>T. mentagrophytes</i>	69
5.2.1	Izolacija proteinskega inhibitorja.....	69

5.2.1.1	Afinitetna kromatografija na CM-papain Sepharose 4B	69
5.2.1.2	Ionska kromatografija na CIM-disku	70
5.2.1.3	RP-HPLC	71
5.2.2	Lastnosti proteinskega inhibitorja.....	72
5.2.2.1	NaDS-PAGE.....	72
5.2.2.2	Imunski odtis	73
5.2.2.3	Določanje aminokislinskega zaporedja	74
5.2.2.3.1	RP-HPLC.....	74
5.2.2.3.2	Aminokislinska zaporedja	76
5.3	Neproteinski inhibitor iz glive <i>T. mentagrophytes</i>	77
5.3.1	Izolacija neproteinskega inhibitorja	77
5.3.1.1	RP-HPLC	77
5.3.2	Lastnosti neproteinskega inhibitorja	79
5.3.2.1	RP-HPLC-DAD.....	79
5.3.2.2	Temperaturna stabilnost.....	81
5.3.2.3	pH-stabilnost.....	82
5.3.2.4	Masna analiza.....	83
5.4	Inhibicija encimske aktivnosti	85
5.4.1	Inhibitorne lastnosti proteinskega in neproteinskega inhibitorja iz glive <i>T. mentagrophytes</i>	85
5.5	Vpliv neproteinskega inhibitorja na imunski odziv gostitelja	86
5.5.1	Celična proliferacija	86
5.5.2	Apoptoza.....	88
5.5.3	Imunokemijske raziskave	90
5.5.3.1	Razgradnja ovalbumina	90
5.5.3.2	Imunski odtis	91
6	RAZPRAVA.....	93
7	ZAKLJUČKI	104
8	POVZETEK	105
9	SUMMARY.....	107
10	LITERATURA	109
	ZAHVALA	119
	Priloga.....	121

KAZALO SLIK

Slika 1: Katalitični mehanizem cisteinskih peptidaz.	24
Slika 2: Struktura aktivnega mesta papaina.	26
Slika 3: Vsebnost proteinskih in neproteinskih inhibitorjev cisteinskih peptidaz iz glive <i>T. mentagrophytes</i> v retentatih in filtratih tekočega Sabouradovega gojišča po 10-kratni zamenjavi pufra.....	67
Slika 4: Elucijski profil proteinov dermatofita <i>T. mentagrophytes</i> po nanosu glivnega homogenata na afinitetno kolono karboksi-metil-papain sefaroze 4B.	69
Slika 5: Kromatogram anionsko izmenjevalne kromatografije inhibitorja iz glive <i>T. mentagrophytes</i> (PI).	70
Slika 6: Elucijski profil komponent inhibitorja iz glive <i>T. mentagrophytes</i> na HPLC-koloni z obrnjeno fazo.	71
Slika 7: Poliakrilamidni elektroforezni gel posameznih stopenj izolacije proteinskega inhibitorja iz glive <i>T. mentagrophytes</i>	72
Slika 8: Imunski odtis izoliranega proteinskega inhibitorja iz glive <i>T. mentagrophytes</i>	73
Slika 9: RP-HPLC-kromatogram peptidov, pridobljenih z razgradnjo nizkomolekularne (zgornja krivulja) in visokomolekularne oblike (spodnja krivulja) proteinskega inhibitorja iz glive <i>T. mentagrophytes</i> z β -tripsinom.	74
Slika 10: RP-HPLC-kromatogram peptidov, pridobljenih z razgradnjo proteinskega inhibitorja iz glive <i>T. mentagrophytes</i> s himotripsinom.	75
Slika 11: RP-HPLC kromatogram peptidov, pridobljenih z razgradnjo izoliranega proteinskega inhibitorja iz glive <i>T. mentagrophytes</i> s proteazo V-8.....	75
Slika 12: Elucijski profil komponent filtrata citosolnega ekstrakta glive <i>T. mentagrophytes</i> na koloni RP-HPLC.....	77
Slika 13: Elucijski profil komponent SPE-eluata glive <i>T. mentagrophytes</i> na koloni RP-HPLC.	78
Slika 14: Kromatografski profil komponente T.m.I 1 po HPLC-DAD.	79
Slika 15: Kromatografski profil komponente T.m.I 2 po HPLC – DAD.	80
Slika 16: Vpliv temperature na aktivnost neproteinskega inhibitorja iz glive <i>T. mentagrophytes</i>	81
Slika 17: Vpliv pH na aktivnost neproteinskega inhibitorja iz glive <i>T. mentagrophytes</i>	82
Slika 18: Spekter LC-ESI MS neproteinskega inhibitorja T.m.I 1.	83
Slika 19: Spekter LC-ESI MS neproteinskega inhibitorja T.m.I 2.	84
Slika 20: Primerjava meritev proliferacije vraničnih celic iz poskusnih skupin miši.....	86
Slika 21: Primerjava meritev apoptoze vraničnih celic iz poskusnih skupin miši.	88
Slika 22: Poliakrilamidni elektroforezni gel ovalbumina, razgrajenega z različnimi peptidazami.....	90

Slika 23: Imunski odtis razgrajenega ovalbumina s sekundarnimi protitelesi anti-IgG.	91
Slika 24: Imunski odtis razgrajenega ovalbumina s sekundarnimi protitelesi anti-IgM.	92

KAZALO RAZPREDELNIC

Razpredelnica 1: Klani in družine cisteinskih peptidaz.	25
Razpredelnica 2: Aminokislinska zaporedja peptidov, pridobljenih z encimsko ali s kislom hidrolizo proteinskega inhibitorja cisteinskih peptidaz iz dermatofita <i>T. mentagrophytes</i>	76
Razpredelnica 3: Inhibicijski profil proteinskega in neproteinskega inhibitorja iz dermatofita <i>T. mentagrophytes</i>	85

SEZNAM KRATIC IN OKRAJŠAV

ACK-pufer.....	pufer za lizo eritrocitov
AIF.....	inducirajoči faktor apoptoze (angl. <u>A</u> poptosis- <u>I</u> nducing <u>F</u> actor)
APC.....	antigen predstavitvena celica (angl. <u>A</u> ntigen <u>P</u> resenting <u>C</u> ell)
APS.....	amonijev persulfat
BANA.....	N- α -benzoyl-D,L-arginine- β -naphthylamide
BAPNA.....	Na-benzoil-DL-arginin p-nitroanilid
BID.....	angl. <u>B</u> H3- <u>I</u> nteracting <u>D</u> omain death agonist
BIR.....	bakulovirusna ponovitev IAP
BSA.....	goveji serumski albumin (angl. <u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin)
CLIP.....	z razredom II povezan peptid invariantne verige (angl. <u>C</u> lass II <u>I</u> nvariant <u>C</u> hain <u>P</u> eptide)
DISC.....	angl. <u>D</u> eath- <u>I</u> nducing <u>S</u> ignalling <u>C</u> omplex
DR.....	receptor smrti (angl. <u>D</u> eath <u>R</u> eceptor)
DTH.....	pozna preobčutljivost tipa IV (angl. <u>D</u> elayed <u>T</u> ype of <u>H</u> ipersensitivity)
DTT.....	ditiotreitol
EDTA.....	etilendiamin tetraacetna kislina
Fc.....	angl. <u>F</u> ragment <u>C</u> rystallizable <u>R</u> egion
FCS.....	fetalni goveji serum (angl. <u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum)
H-Arg-PNA.....	H-Arg p-nitroanilid
IAP.....	angl. <u>I</u> nhibitor of <u>A</u> poptosis <u>P</u> roteins
IFN γ	interferon γ
Ig.....	imunoglobulin
Ii.....	invariantna veriga (angl. <u>I</u> nvariant <u>C</u> hain)
IL.....	interlevkin
LCM-medij.....	medij za limfocitne kulture (angl. <u>L</u> imfocyte <u>C</u> ulture <u>M</u> edium)
LHVS.....	inhibitor vinil-sulfon
MEM-medij.....	angl. <u>M</u> inimum <u>E</u> ssential <u>M</u> edium
MHC.....	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (angl. <u>M</u> ajor <u>H</u> istocompatibility <u>C</u> omplex)
MOMP.....	permeabilizacija zunanje mitohondrijske membrane (angl. <u>M</u> itochondrion <u>O</u> uter <u>M</u> embrane <u>P</u> ermeabilization)
NaDS.....	natrijev dodecil sulfat
NK-celica.....	celica naravna ubijalka (angl. <u>N</u> atural <u>K</u> iller <u>C</u> ell)
OVA.....	ovalbumin

PAGE.....	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS.....	fosfatni pufer (angl. <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline)
PHA.....	fitohemaglutinin
PVDF.....	poliviniliden difluorid
RP-HPLC.....	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo
SPE.....	angl. <u>S</u> olid <u>P</u> hase <u>E</u> xtraction
TCA.....	trikloroacetna kislina
TEMED.....	tetrametilendiamin
TFA.....	trifluoroacetna kislina
<i>T. mentagrophytes.</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
TNF α	faktor tumorske nekroze alfa (<u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor <u>a</u> lpha)
vrt./min.....	vrtljajev na minuto
Z-Phe-Arg-PNA.....	Z-Phe-Arg p-nitroanilid

OKRAJŠAVE AMINOKISLIN

Aminokislina	tričrkovni zapis	enočrkovni zapis
alanin	ala	A
arginin	arg	R
asparagin	asn	N
asparaginska kislina	asp	D
cistein	cys	C
glutaminska kislina	glu	E
glutamin	gln	Q
glicin	gly	G
histidin	his	H
izolevcin	ile	I
levcin	leu	L
lizin	lys	K
metionin	met	M
fenilalanin	phe	F
prolin	pro	P
serin	ser	S
treonin	thr	T
triptofan	trp	W
tirozin	tyr	Y
valin	val	V

IZOLACIJA IN KARAKTERIZACIJA PROTEINSKIH IN NEPROTEINSKIH INHIBITORJEV CISTEINSKIH PEPTIDAZ DERMATOFITA *Trichophyton mentagrophytes* TER NJIHOV VPLIV NA GOSTITELJA

IZVLEČEK

Ključne besede: Biokemija, glivične beljakovine – kemija; *Trichophyton* – metabolizem, cisteinske proteinaze, inhibitorji – izolacija in čiščenje; aminokislinsko zaporedje; kromatografija – metode; miši - imunologija

V doktorskem delu opisujemo izolacijo proteinskega in neproteinskega (peptidnega) inhibitorja cisteinskih peptidaz. Izolirali smo ju iz dermatofitne glive *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes*), ki smo jo gojili najprej na trdnem, nato še v tekočem gojišču. Citosolni glivni ekstrakt smo pridobili z mehansko in ultrazvočno dezintegracijo glivnega micelija.

Za izolacijo proteinskega inhibitorja smo uporabili afinitetno kromatografijo, ki ji je sledila ionsko izmenjevalna, nazadnje pa še kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo. Z uporabo poliakrilamidne gelske elektroforeze z natrijevim dodecil sulfatom smo ugotovili, da se inhibitor pojavlja v nizko- in visokomolekularni obliki. Obema smo določili molekulsko maso. Proteinskemu inhibitorju smo z avtomatskim sekveniranjem določili nekaj delnih aminokislinskih zaporedij. Iz primerjave teh z do sedaj znanimi oz. opisanimi inhibitorji cisteinskih peptidaz sklepamo, da ima proteinski inhibitor iz glive *T. mentagrophytes* določene strukturne posebnosti. Z metodo prenosa proteinov na membrano z imunodetekcijo, smo dokazali, da serumi kuncev, naravno okuženih z dermatofitom, vsebujejo protitelesa proti visokomolekularnim oblikam proteinskega inhibitorja.

Izolacijo neproteinskega (peptidnega) inhibitorja cisteinskih peptidaz smo dosegli z uporabo ultrafiltracije, šibke anionsko izmenjevalne kromatografije in nazadnje še kromatografije visoke ločljivosti z obrnjeno fazo. Izolirani neproteinski inhibitor je najverjetneje tripeptid, na kar nakazuje masna analiza. S poskusi *in vivo* in *in vitro* smo dokazali, da peptidni inhibitor zavira apoptozo imunskih celic miši, nima pa vpliva na proliferacijo limfocitov. Metoda prenosa proteinov na membrano z imunodetekcijo je pokazala, da neproteinski inhibitor vpliva na procesiranje ovalbumina.

Tako proteinski kot tudi peptidni inhibitor glive vrste *T. mentagrophytes* pri svoji rasti izločajo v medij (gojišče). Oba inhibitorja dokazano inhibirata delovanje papaina, katepsinov B in L, ne pa tudi katepsina H.

ISOLATION AND CHARACTERISATION OF PROTEIN AND NON-PROTEIN INHIBITORS OF CYSTEINE PEPTIDASES FROM THE DERMATOPHYTE *Trichophyton mentagrophytes* AND THEIR INFLUENCE ON HOSTS

ABSTRACT

Key words: Biochemistry; fungal proteins – chemistry; *Trichophyton* – metabolism; cysteine proteinase inhibitors – isolation and purification; amino acid sequence; chromatography – methods; mice - immunology

Isolation and characterisation of a protein and a non-protein (peptide) inhibitor of cysteine peptidases are reported. Both inhibitors were isolated from a dermatophyte species *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes*) after its cultivation on solid and in liquid medium. The cytosolic extract was prepared by mechanic and ultrasonic disintegration of fungal mycelia.

The isolation process of a protein inhibitor involved affinity chromatography, followed by ion exchange chromatography and reverse phase high performance liquid chromatography. Results of SDS-PAGE indicate that the fungal inhibitor exists in a high (24 kDa) and low (12 kDa) molecular mass forms. Partial amino acid sequences of the inhibitor protein were obtained by automated sequencing. Since no sequence homology has so far been found between partial protein sequences of *T. mentagrophytes* inhibitor and other known cysteine protease inhibitors, we can speculate that this inhibitor has some structurally unique characteristics. Results of immunoblotting procedures indicate that sera of *T. mentagrophytes* infected rabbits contain antibodies against the higher molecular mass forms of the inhibitor.

The isolation process of the peptide inhibitor involved ultrafiltration followed by weak anion-exchange chromatography and finally, reverse phase high performance liquid chromatography. The small fungal inhibitor is most likely a tripeptide as concluded from molecular mass analysis. Experiments *in vivo* and *in vitro* showed that the inhibitor decreases apoptosis of mouse immune cells but has no effect on the proliferation of lymphocytes. From the immunoblotting results it was concluded that the peptide dermatophyte inhibitor affects the processing of ovalbumin.

The fungus *T. mentagrophytes* secretes both the protein and the peptide inhibitors during its growth in medium. Both inhibitors impair the proteolytic activity of papain and cathepsins B and L, but not of cathepsin H or trypsin.

1 UVOD

Proteolitični encimi (peptidaze, proteaze) so obsežna skupina proteinov – približno dva odstotka vseh genov nosi zapise za peptidaze in njihove homologe pri najrazličnejših vrstah organizmov. V človeškem genomu najdemo zapis za več kot 550 aktivnih in domnevnih peptidaz (Rawlings s sod., 2006). Peptidaze katalizirajo cepitev peptidnih (amidnih, -CO-NH-) vezi. Glede na mesto cepitve jih naprej delimo v eksopeptidaze, ki odstranjujejo aminokislinske ostanke z aminskega ali karboksilnega konca peptidov oz. proteinov, ter endopeptidaze (proteinaze), ki cepijo vezi znotraj polipeptidnih verig. Proteolitične encime lahko na podlagi njihovega katalitičnega mehanizma uvrstimo v enega izmed osmih razredov: aspartatne, cisteinske in glutaminske peptidaze, metalopeptidaze, asparaginske, serinske in treoninske peptidaze ter peptidaze z neznanim katalitičnim mehanizmom delovanja (Phillips in Fletterick, 1992; Rawlings in Barrett, 1999; Monod s sod. 2002; podatkovna baza MEROPS).

Cisteinske peptidaze so v naravi zelo razširjene. Vpletene so v številne biološke procese, kot so razgradnja proteinov, cepitev proencimov in prohormonov, predstavljanje antigenov, oploditev, celična proliferacija, diferenciacija in apoptoza. Neuravnoteženo delovanje endogenih encimov lahko vodi v nastanek najrazličnejših bolezni kot so revmatoidni artritis, multipla skleroza, osteoporoza, rak (Rzychon s sod., 2004).

Celice in organizmi imajo na voljo različne strategije za zaščito pred neželjeno proteolizo. Ena izmed njih je kontrola aktivnosti proteolitičnih encimov s pomočjo inhibicije. Inhibitorji pa niso pomembni le za regulacijo endogenih peptidaz. Nekateri virusi, bakterije in paraziti izločajo cisteinske peptidaze, da bi se izognili obrambnim mehanizmom gostiteljev (Dubin, 2005).

Interakcije med cisteinskimi peptidazami in njihovimi inhibitorji so predmet številnih raziskav. Specifični inhibitorji so potrebni za preprečevanje neželene ali celo usodne proteolize. Uporabni so kot terapevtska sredstva, služijo pa tudi kot orodje za raziskave mehanizma delovanja. Večje razumevanje interakcij med peptidazami in inhibitorji je osnova za boljše nadzorovanje proteolitične aktivnosti. Podatki o strukturi peptidaz in inhibitorjev omogočajo razumevanje tudi evlucijskega razvoja tako organizmov kot proteaz in njihovih inhibitorjev.

V doktorskem delu opisujemo izolacijo in delno karakterizacijo proteinskega in peptidnega inhibitorja iz dermatofita *T. mentagrophytes*, s čimer prispevamo majhen delež v kompleksen mozaik encimov in njihovih inhibitorjev.

2 PODATKI IZ LITERATURE

2.1 Dermatofiti

Dermatofiti so skupina sorodnih patogenih gliv, ki se hranijo s keratinom poroženelih tkiv kot so koža, lasje oz. dlaka ter nohti in s tem pri ljudeh ali živalih povzročijo okužbo, imenovano dermatofitoza. Glivična okužba je navadno zgolj kožna in omejena na neživo roženo plast omenjenih tkiv, saj glive navadno ne morejo prodreti globje v tkivo oz. organe gostitelja. Značilne obročaste kožne spremembe nastanejo zaradi delovanja gliv ter imunskega odziva gostitelja, da bi odstranil glivne celice. Pri ljudeh lahko glede na telesni predel, kjer se okužba pojavi, bolezen različno poimenujemo, npr. *tinea pedis* na podplatih, *tinea manum* na rokah, *tinea capitis* na glavi ipd.

Dermatofite lahko poimenujemo glede na njihov habitat:

- antropofilni (humanofilni) dermatofiti so praviloma omejeni na človeka in redko povzročijo okužbe živali, med ljudmi se prenašajo z neposrednim stikom ali posredno prek kožnih lusk (npr. med družinskimi člani, v športnih objektih, kopališčih in zdraviliščih);
- zoofilni dermatofiti navadno povzročajo okužbe pri živalih, redko tudi pri ljudeh. Do okužbe pri ljudeh pride prek stika z bolno živaljo;
- rezervoar za geofilne dermatofite je zemlja. Preživijo namreč na poroženelem tkivu dlak, las, perja in rogov, ko ti niso več del živali oz. ljudi, temveč so podvrženi procesom razkrajanja. Geofilne vrste dermatofitov lahko povzročijo okužbe pri ljudeh in živalih (Weitzman in Sumerbell, 1995; Chermette s sod., 2008).

Pri okužbah z zoofilnimi in geofilnimi dermatofiti se na koži pogosto pojavi močna vnetna reakcija, pri antropofilnih dermatofitih pa so okužbe praviloma subakutne ali kronične (Weitzman in Summerbell, 1995; Mendez-Tovar, 2010).

Kljub uspešnim postopkom zatiranja in zdravljenja se dermatofitne okužbe kože, las oz. dlak ter nohtov pri ljudeh še vedno pojavljajo, oz. celo naraščajo. Prizadenejo namreč od 20–25 odstotkov svetovne populacije. Vrste dermatofitnih povzročiteljev se razlikujejo glede na geografsko območje in klimatske značilnosti, določene vrste so razširjene po vsem svetu, nekatere pa imajo le omejeno geografsko porazdelitev.

Epidemiologija dermatofitnih okužb se spreminja zaradi migracij, načina življenja, uporabe protiglivičnih pripravkov ter socialno-ekonomskih dejavnikov (Havlickova s sod., 2008; Ameen, 2010). Pogostnost pojavljanja posameznih vrst dermatofitov pri ljudeh, izoliranih iz kožnih sprememb ali nohtov, se je v zadnjih 70 letih zelo spremenila. Za osrednjo in severno Evropo je od 50 let prejšnjega stoletja značilen porast okužb z glivo *Trichophyton rubrum*. Ta predstavlja kar 80–90 odstotkov sevov, sledi ji *T. mentagrophytes*. Omenjeno dejstvo pripisujejo povečani incidenci dermatofitoz na podplatih (*tinea pedis*). V južni Evropi in arabskih deželah sta najpogosteje izolirana zoofilna dermatofita *Microsporum canis* (*M. canis*) in *Trichophyton verrucosum* (*T. verrucosum*). V predvsem sredozemskih evropskih deželah se v zadnjih letih povečuje delež okužb z *M. canis*. Omenjeni dermatofit se pojavlja pri dermatofitozah na glavi (*tinea capitis*) pri otrocih. V Sloveniji je prav tako najpogosteje izoliran dermatofit *M. canis*, sledijo mu *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* in *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. Za trenutno razporeditev dermatofitov v Evropi naj bi bili najbolj odgovorni trije dejavniki:

- slabši ekonomski standard v številnih vzhodnih in južnih evropskih državah je povezan s porastom predvsem zoofilnih infekcij zaradi tesnejšega stika med ljudmi in živalmi;
- urbana območja z gosto poselitvijo in s številnimi socialnimi aktivnostmi, kot so potovanja in šport, omogočajo razširjanje okužb s *T. rubrum*;
- povečano preseljevanje ljudi omogoča pojavljanje različnih antropofilnih dermatofitnih vrst.

Širjenje dermatofitoz v večini razvitih držav sveta je velik ekonomski problem, ki je povezan z uporabo najrazličnejših protiglivičnih sredstev (Seebacher s sod., 2008; Havlickova s sod., 2008).

Dermatofitoze pa so tudi ene najpogostejših kožnih boleznih pri hišnih ljubljenceh in domačih živalih, lahko se pojavijo celo pri divjih živalih in živalih v ujetništvu. Zaradi možnega prenosa med različnimi skupinami živali, visokih stroškov zdravljenja, težkega nadzora in zdravstvenih posledic za ljudi so tovrstne okužbe izredno problematične. Dodatne zaplete predstavlja tudi dejstvo, da je za uporabo v veterinarski medicini na voljo le nekaj registriranih protiglivičnih pripravkov, poleg tega je uporaba sistemskih zdravil pri ekonomskih živalih omejena zaradi ostankov teh zdravil v izdelkih, namenjenih prehrani ljudi. Dermatofitoze pri živalih povzročajo več različnih vrst dermatofitov, kljub temu pa je za večino okužb odgovornih le nekaj zoofilnih vrst: *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. equinum* in *T. verrucosum*, ter geofilna vrsta *M. gypseum* (Chermette s sod., 2008).

2.1.1 Taksonomija dermatofitov

Dermatofiti so razvrščeni v rodove *Microsporum*, *Trichophyton* in *Epidermophyton*. Če pri njih še ni bila najdena oblika spolnega razmnoževanja, jih uvrščamo med nepopolne glive (*Fungi imperfecti*; deblo *Deuteromycota*). Te imajo dobro razvit, razrasel in septiran micelij. Če pa je znan tudi spolni način razmnoževanja, jih štejemo med popolne glive (*Fungi perfecti*) v razred *Ascomycetes*. Isto vrsto glive lahko zato glede na način razmnoževanja različno razvrščamo. Anamorf je ime za nespolni, teleomorf pa za spolni način razvrščanja.

Dermatofiti spadajo v skupino plesni (*Hyphomycetes*), ki rastejo kot dolga, vozlasta vlakna celic in oblikujejo makroskopsko vidni micelij. Morfologija dermatofitov je odvisna od tega, ali rastejo v parazitskem stadiju (na živalih ali ljudeh) ali v saprofitskem stadiju (na gojiščih). V parazitskem stadiju s segmentacijo hife nastanejo artrokonidiji, ki odpadejo v obliki prostih artrospor in lahko okužijo novo dlako oz. drugo keratinizirano tkivo. V saprofitskem stadiju pa se na miceliju tvorijo mikro- in makrokonidiji, ki so vrstno specifični (Alexopoulos s sod., 1996). Razdelitev v posamezne rodove temelji na morfologiji in tvorbi konidijev (Weitzman in Summerbell, 1995).

2.1.1.1 *Trichophyton spp.*

Za rod *Trichophyton* je pri rasti na gojišču značilen pojav gladkostenih makro- in mikrokonidijev ter spiralasto zavrtih hif. Makrokonidiji nastanejo lateralno bodisi neposredno na hifah bodisi na krajših pecljih. Lahko imajo tanko ali debelo steno in so cigaraste ali hruškaste oblike. Velikost makrokonidijev je od 4–8 x 8–50 µm. Mikrokonidiji pa so okrogle, hruškaste, cigaraste ali nepravilne oblike, veliki od 2–3 x 2–4 µm.

2.1.2 Patogeneza dermatofitnih okužb

Koža predstavlja zaščito telesa pred izgubo vode in proti mehanskim poškodbam. Predstavlja fizično in kemijsko bariero, h kateri znatno prispevajo antimikrobni peptidi in proteini ter tako zagotavljajo učinkovito zaščito pred mikrofloro iz okolja. Na površini je epidermis – samoobnavljajoči se skvamozni epitel, sestavljen iz več plasti keratinocitov. Ti se v najbolj zunanji plasti *stratum corneum* luščijo, nadomestijo pa jih novo diferencirane celice, ki izhajajo iz epidermalnih zarodnih celic v bazalni plasti. Pri funkciji epidermalne bariere igrajo pomembno vlogo različne proteaze, njihove tarče in inhibitorji (Meyer-Hoffert, 2009).

Čeprav je okužba z dermatofiti omejena na površino kože, so interakcije med glivo in gostiteljem kompleksne in slabo raziskane. Večina raziskav je omejenih na preučevanje

keratinolitičnih proteaz, ki jih glive izločajo za pridobivanje hranil iz netopnega poroženelega substrata. Kljub temu še ni razjasnjeno, kako dermatofiti regulirajo uporabo najrazličnejših encimov ter kakšna je njihova alternativna vloga pri procesih, kot sta aderenza gliv in imunomodulacija. Prav tako ni veliko znanega o virulenčnih dejavnikih, ki niso peptidaze.

Klinični znaki dermatofitoze so odvisni tako od gostitelja kot od vrste glivnega povzročitelja. Čeprav je lahko dermatofitna okužba akutna in se odpravi z učinkovitimi prirojenimi in pridobljenimi imunskimi mehanizmi, so se nekatere vrste, kot sta *T. rubrum* in *M. canis*, tako prilagodile gostitelju, da povzročijo kronično okužbo s slabo izraženimi simptomi.

Po prvem stiku dermatofita z gostiteljem je naslednja faza dermatofitne okužbe proces, imenovan aderenza. Sposobnost glive *T. rubrum*, da se pritrudi na epitelne celice, povezujejo s t. i. adhezini, ki so specifični za ogljikove hidrate in se izrazijo na površini mikrokonidijev. Pri okužbi z glivo *T. mentagrophytes* so na površini kože opazili dolge fibrilarne izrastke, ki so povezali glivne artrokonidije s keratinociti ter artrokonidije med seboj. Izločene aspartatne proteaze dokazano igrajo pomembno vlogo pri adherenci glive *Candida albicans* na epitelij (Vermout s sod., 2008).

Začetnemu stiku glive sledi invazija poroženelih plasti. Iz pritrjenih artrokonidijev poženejo mlade hife, ki rastejo tako vzdolžno med posameznimi plastmi kot prečno skozi celoten sloj *stratum corneum*. Razvijejo se mikrokolonije, nove hife se spremenijo v artrokonidije in življenjski krog glive se sklene. Zorenje (germinacija) artrokonidijev in prodiranje hif v globlje plasti mora biti hitro, saj nenehno luščenje epitelija povzroči odstranitev gliv s površine kože (Ogawa s sod., 1998; Martinez-Rossi s sod., 2008).

Da lahko razgradijo keratin v oligopeptide in aminokisljine, imajo dermatofiti na voljo številne peptidaze, ki so jih v preteklosti imenovali s skupnim imenom keratinaze. Med njimi so različne serinske in metaloendoproteaze, imenovane subtilizini oz. fungalizini, malo pa je znanega o drugih hidrolazah, npr. lipazah in ceramidazah. Dokazana je neposredna povezava med sposobnostjo izločanja keratinaz in patogenostjo glive. Sevi *M. canis* z veliko keratinolitično aktivnostjo in vitro običajno povzročijo okužbe z bolj izraženimi kliničnimi znaki.

Izražanje peptidaz, ki jih glive izločajo, je povečano, kadar so kot edini vir ogljika in dušika prisotni kompleksni proteini. Mehanizmi, ki zagotavljajo povečano ali zmanjšano izražanje genov, še niso povsem razjasnjeni. Pri nekaterih glivah izražanje najrazličnejših genov kot odgovor na spremembe v viru dušika povzročijo transkripcijski dejavniki s cinkovimi prsti iz družine GATA. Da bi preživel in rasli na gostitelju, morajo dermatofiti koordinirati izražanje različnih peptidaz. Profil izražanja različnih proteinov in proteaz je odvisen od vrste dermatofita, čeprav je med ortolognimi geni opazna visoka stopnja podobnosti. Tako je morda različna regulacija izražanja proteinov

povezana s specializacijo posamezne vrste dermatofita na določenega gostitelja in s tem z resnostjo povzročene okužbe.

Poškodbe na površini kože gostitelja pa niso rezultat le neposrednega delovanja dermatofitnih litičnih encimov. Ti namreč delujejo tudi kot antigeni, zaradi česar je v celoten proces vključen tudi gostiteljev imunski sistem s proteazami in nekaterimi vnetnimi dejavniki (Vermout s sod., 2008; Mendez-Tovar, 2010).

2.1.3 Imunski odziv na dermatofite

Okužbe z dermatofiti sprožijo specifični imunski odziv – tako protitelesni (razvijejo se protitelesa IgM, IgG, IgA in IgE) kot tudi celično posredovan. Najbolj učinkovit odgovor in zaščito pred dermatofitozo predstavlja celični imunski odziv, predvsem reakcija pozne preobčutljivosti tipa IV (DTH). Zanj so značilni makrofagi, ki delujejo kot nespecifične efektorske celice in kot antigen predstavitvene celice (APC), v tesnem sodelovanju s T-celicami pomagalkami. Aktivacijo makrofagov povzroči sproščanje nekaterih pomembnih citokinov, kot je interferon γ (IFN- γ) iz T-celic pomagalk Th1 (limfociti CD3⁺ CD4⁺). Te celice prepoznajo antigen, ki je predstavljen v obliki peptida (epitopa za celice T), v sklopu molekul poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa razreda II (MHC II) na površini APC (predvsem makrofagov in drugih APC kože). Akutna dermatofitoza je torej povezana z DTH, perzistentna (kronična) bolezen pa s takojšnjo preobčutljivostjo (preobčutljivostna reakcija tipa I), za katero so značilne velike koncentracije protiteles tipa IgE in IgG4. T-celice pomagalke Th2 izločajo citokine, predvsem interleukin 4 (IL-4), kar povzroči izotipsko spremembo protiteles v omenjena razreda (Woodfolk, 2005; Vermout s sod., 2008). Imunski odziv in stopnja vnetja pa nista odvisna le od vrste dermatofita, temveč tudi od vrste gostitelja in njegovega patofiziološkega stanja (nepoškodovane poroženele plasti, prisotnost normalne mikroflore in fungistatičnih maščobnih kislin) ter od okoljskih dejavnikov (UV-svetloba, temperatura, vlaga, pH) (Ogawa s sod., 1998). Kot je bilo že omenjeno, je vzorec izločenih dermatofitnih peptidaz najverjetneje povezan s stopnjo imunskega odziva in vnetja pri gostitelju. Obseg kožnih poškodb je odvisen od učinkovitosti delovanja izločenih dermatofitnih peptidaz ter od imunskega sistema gostitelja. Izločene peptidaze in drugi metaboliti pa lahko vplivajo na imunski odziv tudi prek specifičnih imunogenih lastnosti. Bolj ko je antigen tuj – večja ko je njegova molekulska masa oz. kompleksna struktura, intenzivnejša sta imunski in vnetni odziv (Mendez-Tovar, 2010).

Nekateri dermatofiti, npr. *T. rubrum* in *T. tonsurans*, so visoko specializirani za okužbo človeka kot primarnega gostitelja. Gostiteljevemu imunskemu odzivu se lahko izognejo ali ga zmanjšajo (suprimirajo), to pa vodi v nastanek kroničnih okužb. V supresijo imunskega odziva so najverjetneje vpleteni manani celične stene gliv. Manani iz

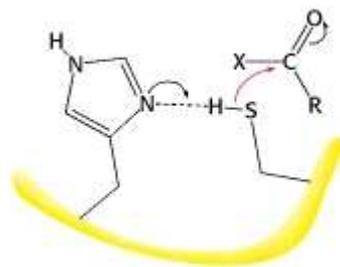
T. rubrum namreč *in vitro* zavrejo proliferacijo limfocitov po stimulaciji z nekaterimi antigeni (tudi dermatofitnimi) ter mitogeni.

Bolje je razjasnjena vloga keratinocitov in monocitov/makrofagov pri modulaciji odziva proti dermatofitom. Keratinociti, izpostavljeni *T. rubrum*, izločajo manj IL-1 α kot tisti, izpostavljeni *T. mentagrophytes*. Omenjeno dejstvo je najbrž povezano z različno klinično sliko obeh okužb. Pomemben del imunskega odziva proti dermatofitom predstavljajo makrofagi. Raziskave *in vitro* so pokazale, da se pri znotrajcelični diferenciaciji konidijev *T. rubrum* v hife poškodujejo celične membrane, posledica je smrt makrofagov. Poleg tega se zmanjša izražanje molekul MHC II, kostimulacijskih molekul CD54 in CD80, zmanjša se izločanje dušikovega oksida in IL-12, izražanje protivnetnega citokina IL-10 pa se poveča. Poveča se tudi izločanje faktorja tumorske nekroze alfa (TNF α) iz makrofagov. Tega se sicer ne povezuje z imunosupresijo, vendar lahko omogoča znotrajcelično rast patogenov. *T. rubrum* se z zmanjševanjem določenih elementov, potrebnih za potek imunskega odziva, izogiba nastanku gostiteljeve imunosti s tem, da povzroči smrt makrofagov ali vpliva na njihovo efektorsko učinkovitost (Vermout s sod., 2008).

2.2 Cisteinske peptidaze

Peptidaze oz. proteaze so encimi, ki katalizirajo hidrolizo peptidne vezi. Splošni mehanizem hidrolize zahteva prisotnost treh skupin: (1) nukleofilno skupino, ki napade karbonilno skupino in tvori tetraedrični intermediat; (2) pozitivno nabito skupino oz. predel, ki stabilizira negativen naboj kisikovega atoma in tetraedrični intermediat ter (3) donorja protonov, ki olajša odstranitev odcepljene aminokislina. Glede na specifičen mehanizem cepitve vezi oz. glede na naravo nukleofilnih skupin, odgovornih za katalizo, peptidaze razdelimo v več razredov (Phillips in Fletterrick, 1992).

Med cisteinske peptidaze uvrščamo encime, pri katerih je nukleofil tiolna skupina cisteinskega ostanka iz katalitične triade (slika 1). Prvi korak katalize je deprotonacija tiola v aktivnem mestu encima z najbližjo aminokislino, ki ima bazično stransko verigo; najpogosteje je to histidin. Naslednji korak je nukleofilni napad deprotoniranega cisteinskega anionskega žvepla na karbonilni ogljik substrata. Nastane tetraedrični intermediat, ki je stabiliziran z oksanionsko luknjo. V tej stopnji se sprosti odsek substrata z aminskim (N-) koncem, histidinski ostanek v encimu pa se ponovno deprotonira. Nastane tioesterski intermediat, ki povezuje novi karboksilni konec substrata s cisteinskim tiolom. Tioesterska vez se nato hidrolizira, pri čemer nastane karboksilno-kislinski ostanek na preostalem substratu, prosti encim pa se regenerira.



Slika 1: Katalitični mehanizem cisteinskih peptidaz.
Povzeto in prirejeno po <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>.

Cisteinske peptidaze so izšle iz vsaj sedmih različnih evolucijskih izvorov, vsak izmed njih pa je vodil v nastanek skupine z določeno zgradbo in lastnostmi. Na podlagi podobnosti v aminokislinskem zaporedju jih hierarhično razdelimo v družine, skupino sorodnih družin pa imenujemo klan. Družina vsebuje proteine, ki so si sorodni s primerjavo zaporedij, klan pa vsebuje proteine, kjer je podobnost opazna le s primerjavo struktur. Analiza zaporedja je omejena na del proteina, ki je neposredno odgovoren za peptidazno aktivnost in ga imenujemo peptidazna enota. Po terminologiji podatkovne baze MEROPS proteaze označujemo s črkami in številkami. Prva črka označuje katalitični tip ('C' za cisteinske peptidaze), sledi črka, ki označuje klan, vsaka družina v enem klanu pa je označena s številko (Barrett in Rawlings, 2001; Rawlings s sod, 2010). Naddružina cisteinskih peptidaz je sestavljena iz približno 50 družin encimov, ki so uvrščene v naslednje klane: CA, CD, CE, CF, CH, CL, CM, CN in CO (MEROPS, razpredelnica 1).

2.2.1 Razdelitev cisteinskih peptidaz

Cisteinske peptidaze so v naravi zelo razširjene, izolirane pa so bile iz virusov, bakterij, gliv, rastlin, parazitov in sesalcev – tudi ljudi (Leung-Toung s sod., 2002). Večino cisteinskih peptidaz predstavljajo katepsini, kalpaini in kaspaze (van Eijk s sod., 2003). Poleg sodelovanja v lizosomih in metabolnih pretvorbah beljakovin imajo cisteinske peptidaze vlogo tudi pri remodeliranju tkiv, pretvorbah zunajceličnega matriksa, delovanju imunskega sistema in modulaciji in spremembah v delovanju celic. Delovanje cisteinskih peptidaz je lahko znotraj- ali zunajcelično (Dickinson, 2002).

Razpredelnica 1: Klani in družine cisteinskih peptidaz.

Klan:	Družine :
CA	C1, C2, C10, C12, C16, C19, C28, C39, C47, C51, C54, C58, C64, C65, C66, C67, C71, C76, C78, C83, C85, C86, C87, C88
CD	C11, C13, C14, C25, C50, C80
CE	C5, C48, C55, C57, C63, C79
CF	C15
CL	C60, C82
CM	C18
CN	C9
CO	C40

2.2.1.1 Papainu podobne cisteinske peptidaze (klan CA)

V to skupino uvrščamo papain in njemu sorodne rastlinske peptidaze, kot so kimopapain, karikain, bromelain in aktinidin; cisteinske peptidaze parazitov *Tripanosomatida*, *Leishmania*, *Schistosoma*, *Giardia*, *Fasciola* in drugih; hidrolazo bleomicina ter lizosomalne cisteinske peptidaze – katepsine B, H, F, L, K, S, O, P, V, W, X, Q, M, R.

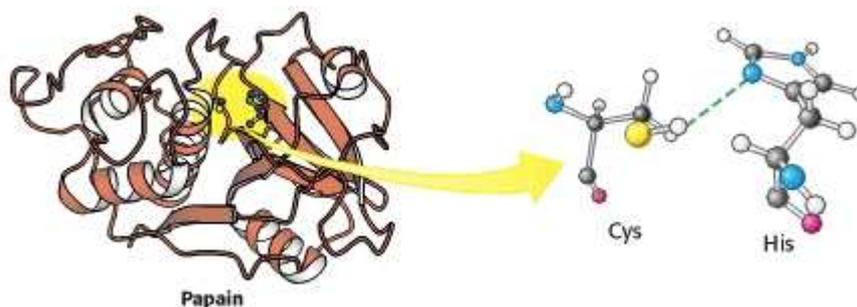
V klanu je več družin cisteinskih peptidaz, njihova struktura pa je podobna papainu. Poleg ostankov Cys158 in His293 v katalitični diadi sta pogosto prisotna še dva ostanka. Eden je Gln152, ki pomaga pri nastanku oksanionske luknje – elektrofilnega centra, ki stabilizira tetraedrični intermediat, ter Asn308 (včasih tudi Asp), ki orientira imidazolni obroč katalitičnega histidina. Za papain je značilno zaporedje Gln19, Cys25, His159 in Asn175. Večina peptidaz v klanu CA je endopeptidaz, nekaj v družini C1 pa jih ima predvsem eksopeptidazno aktivnost. Prevladujoče mesto za specifičnost peptidaz podružine C1A je mesto S2. Le-to pogosto izraža težnjo za zasedenost s hidrofobno in nenabito stransko verigo.

Papain uvrščamo v družino C1, ki vsebuje številne endopeptidaze in nekaj eksopeptidaz. Eksopeptidaza je dipeptidil-peptidaza I, močno eksopeptidazno aktivnost imata tudi katepsina B in H. Katepsin B se obnaša tudi kot dipeptidil peptidaza, katepsin H je aminopeptidaza, katepsin X pa izključno karboksipeptidaza. Proteaze družine C1 prispevajo k proteolitični aktivnosti prebavnih vakuol protozojev in lizosomalnemu sistemu evkariontskih celic. Zreli katepsini so fiziološko prisotni v rahlo kislem okolju lizosomov in endosomov, kjer razgrajujejo proteine in sodelujejo pri predelavi drugih beljakovinskih molekul – npr. pri aktivaciji prohormonov v hormone.

Pomembni so tudi za razgradnjo antigenih polipeptidov ter za njihovo predstavljanje v sklopu molekul MHC II. Odkrite so bile tudi zunajcelične vloge katepsinov ter delovanje na drugih lokacijah znotraj celic, npr. v sekretornih veziklih, citosolu in jedru (Turk s sod., 2000; Turk s sod., 2001; Conus in Simon, 2008; Turk in Turk, 2009; Reiser s sod., 2010).

Papain in številne druge proteaze poddružine C1A se sintetizirajo v zrnatem endoplazemskem retikulumu kot neaktivni proencimi s propeptidi na N-koncu. Vsebujejo N-glikozilacijska mesta, ki so potrebna za prenos v lizosome prek manozna-6-fosfat receptorske poti. Kljub temu omenjene proteaze niso zgolj v lizosomih, temveč potujejo med fagosomi, endosomi in lizosomi, posamezne proteaze pa se v različnih organelih tudi kopičijo (Lecaille s sod., 2002). Pri katepsinu B propeptid onemogoča vezavo substrata v aktivno mesto. Da nastanejo aktivne peptidaze, se propeptidi odcepijo, pogosto z avtolizo. Prosti propeptidi katepsinov B, L in drugih so učinkoviti inhibitorji peptidaz.

Papain vsebuje tri disulfidne vezi. Njegova polipeptidna veriga je zvita v globularni protein z dvema nasprotnima domenama, med katerima leži žleb, v katerega se lahko veže substrat. Ena domena je sestavljena iz skupka vijačnic, na koncu ene izmed vijačnic je cistein v aktivnem mestu. Druga domena je β -sodček, kjer sta v aktivnem mestu His in Asn (ali Asp) (slika 2).



Slika 2: Struktura aktivnega mesta papaina.
Povzeto in prirejeno po <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books>.

Večina članov poddružine C1A je monomernih, dipeptidil peptidaza I pa je homotetramer, pri čemer je vsak monomer sestavljen iz treh verig, ki so rezultat proteolitične razgradnje. Encimi, podobni aminopeptidazi C poddružine C1B, so oligomerni. Tipični predstavnik je hidrolaza bleomicina kvasovk, ki je homoheksamer, aktivna mesta pa so razporejena na notranji strani osrednjega kanala. To omogoča vezavo le majhnim molekulam v katalitično mesto.

Veliko članov družine C1 je tarč farmaceutskih pripravkov, za številne so bili razviti učinkoviti inhibitorji. Primer so učinki le-teh na katepsin B pri rakavih obolenjih, na

katapsin S pri kontroli predstavljanja antigenov, na katapsin K pri nadzoru osteoporoze, na katapsin L pri njegovi vlogi pri procesiranju antigenov in metabolizmu tumorskih celic.

V družino C2 spadajo kalpaini – od kalcija odvisne, papainu podobne cisteinske peptidaze. Kalpaini so pomembni za znotrajcelično razgradnjo proteinov, organizacijo citoskeleta in celične membrane, sodelujejo pa tudi z membranskimi receptorji in proteini, ki vežejo kalmodulin (17 kDa-protein s štirimi mesti, ki lahko vežejo kalcijeve ione).

Inhibitor E-64 je ireverzibilni inhibitor peptidaz v družini C1 in C2, podobno široko, vendar reverzibilno inhibicijo povzroča leupeptin. Proteini cistatinske družine reverzibilno zavirajo delovanje papaina in večine njegovih homologov (MEROPS).

2.2.1.2 Kaspaze (klan CD)

Klan CD vsebuje pet družin endopeptidaz, pri vseh se pojavljata His in Cys kot del katalitične diade. Katalitični His se pojavlja v motivu His-Gly, pred tem pa je prisotnih več hidrofobnih ostankov. Katalitični Cys se pojavlja v motivu Ala-Cys, pred katerim je spet niz hidrofobnih ostankov. Katalitična diada His, Cys deluje z drugačnim mehanizmom kot diada Cys, His v klanu CA.

Specifičnost peptidazne aktivnosti je povezana z mestom P1 substrata, ki je navadno Asn pri članih družine C13 in C14 ter Arg ali včasih Lys pri članih družine C11, C25 in C50.

Za člane družin C14 in C25 so znane terciarne proteinske strukture. Zanje so značilni proteini α/β s strukturo, ki je sestavljena iz sendviča $\alpha/\beta/\alpha$. β -ploskev vsebuje šest verig, zadnja je antiparalelna z vsemi drugimi. Druge družine uvrščamo v isti klan zaradi ohranjenosti motivov okrog katalitičnih ostankov.

Člani klana CD se morajo pred začetkom delovanja aktivirati. Peptidaze družine C11 se sintetizirajo kot proencimi in za aktivacijo potrebujejo odstranitev propeptida na N-koncu. Peptidaze družine C14 se aktivirajo z dimerizacijo brez proteolize ali z notranjo delno proteolizo. Prolegumain se aktivira sam s cepitvijo asparaginske vezi v kislem okolju lizosomov. Gingipaina R in K se izločata in delujeta skupaj pri avtolitični odstranitvi svojih hemaglutininskih domen na C-koncu.

Peptidaze v družini C14 so endopeptidaze, ki jih z enim imenom imenujemo kaspaze (od cisteina odvisne, za aspartat specifične proteaze). Zanje je značilna stroga specifičnost za aspartat na mestu P1. Različne kaspaze pa se razlikujejo po zahtevah glede ostankov v žepih P2, P3 in P4. Evolucijsko so ohranjene, opisane so bile tako pri človeku kot pri insektih, nematodih in hidri (Hengartner, 2000). Pri sesalcih ločimo dve biološko različni kaspazni poddružini: ena sodeluje pri predelavi proinflammatoryh

citokinov (t. i. vnetne kaspaze), druga pa je potrebna za sprožitev in izvršitev odgovora v procesu programirane celične smrti – apoptoze (t. i. apoptotične kaspaze). Predlagana je bila tudi vloga kaspaz pri procesih, kot so regulacija celičnega ciklusa, hematopoeza in prenos signalov v imunskem sistemu (Cassens s sod., 2003; Chowdhury s sod., 2008).

Kristalne strukture kaspaz -1, -3, -7, -8 in -9 so pokazale, da je njihova katalitična domena sestavljena iz dveh verig, zvitih v unikatno strukturo α/β s katalitično diado His, Cys. Kaspaze se sintetizirajo kot enoveržni prekursorji, zimogenska oblika se v citosolu aktivira z dimerizacijo ali omejeno proteolizo (Turk s sod., 2002). Zimogen je sestavljen iz proteazne domene, pred katero je različno dolga (2–25 kDa) N-terminalna prodomena. Prodomena se med aktivacijo odcepi, temu pa sledi notranja cepitev proteazne domene na dve podenoti, veliki približno 20 in 10 kDa. Nekatere kaspaze vsebujejo tudi kratko povezovalno regijo med veliko in majhno podenoto, ki se med aktivacijo prav tako odcepi. Osnovna strukturna enota kaspaz je torej heterodimer, sestavljen iz ene velike in ene majhne podenote. Aktivni encimi pa vsebujejo dva antiparalelna heterodimera, vsakega s svojim neodvisnim aktivnim centrom. Encim prepozna substrat z žlebom, ki ga tvorita zanki manjše in večje podenote (Cassens s sod., 2003). Kaspaze z dolgimi prodomenami so verjetno odgovorne za začetek apoptotičnega odziva, tiste s kratkimi prodomenami pa so efektorske kaspaze. Te so neposredno odgovorne za smrt celice.

Za vzdrževanje homeostaze je regulacija delovanja kaspaz zelo pomembna, poteka pa na dva načina. Kaspaze se lahko pod vplivom ustreznih vnetnih ali apoptotičnih dražljajev aktivirajo, pri čemer pride do njihove pretvorbe iz proencimske v aktivno obliko. Po drugi strani pa lahko aktivnim kaspazam delovanje preprečijo številni naravni inhibitorji (Stennicke s sod., 2002). Delovanje kaspaze-1 zavira CrmA – naravni inhibitor iz virusa osepnic goveda. Člane klana CD inhibirajo peptidni aldehidni in peptidilklorometanski inhibitorji. Kaspazni inhibitorji so farmakološko pomembni za preprečevanje pretirane apoptoze, ki je opazna pri ishemičnih poškodbah in neurodegenerativnih boleznih (MEROPS).

2.2.2 Regulacija aktivnosti cisteinskih peptidaz

Aktivnost peptidaz je v celici skrbno nadzorovana z različnimi mehanizmi, nenadzorovana proteoliza je namreč škodljiva ali celo usodna, saj vodi v poškodbe celic oz. tkiv. Poleg nadzora nad endogenimi proteazami mora organizem nadzorovati tudi proteaze, ki jih izločajo različni mikroorganizmi in vnetne celice (Bode in Huber, 2000; Turk s sod., 1997; Turk s sod., 2002).

Aktivnost cisteinskih peptidaz sesalcev uravnava ustrezno razmerje med sintezo in razgradnjo peptidaz (Leung-Toung s sod., 2002). Na proteolitično delovanje cisteinskih peptidaz vplivajo tudi drugi dejavniki:

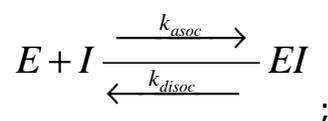
- pH; številne cisteinske peptidaze so prilagojene delovanju v kislih znotrajceličnih veziklih, zato so praviloma nestabilne in šibko aktivne pri nevtralnem in bazičnem pH;
- redoks potencial; cistein v aktivnem mestu se hitro oksidira, zaradi česar so encimi najbolj aktivni v reducirajočem okolju. Endosomi k vzdrževanju takega okolja pripomorejo s kopičenjem cisteina (Chapman s sod., 1997);
- zimogenska aktivacija; večina peptidaz se sintetizira v obliki neaktivnih prekursorjev, ki se aktivirajo s proteolitičnim odcepom N-terminalnega propeptida (Laskowski Jr. in Qasim, 2000; Turk s sod., 2001). Ta navadno zahteva nizek pH, s čimer je preprečena aktivacija encimov pri izločanju;
- usmerjen transport v endosome in lizosome; vse do zdaj znane cisteinske peptidaze so glikoproteini, njihova N-glikozilirana mesta pa so pogosto manozilirana. Na podlagi fosfomanozilnih ostankov, ki pospešujejo vezavo z manoza-6-fosfatnimi receptorji, se pri sekreciji encimi usmerijo v lizosome (Chapman s sod., 1997). Tako se doseže ločitev oz. kompartmentalizacija encimov od njihovih substratov (Bird s sod., 2009);
- modulacija prepoznavne substrata oz. katalize z vezavo proteaze s kofaktorjem – ionom, proteinom, nukleinsko kislino ali sladkorjem (Bird s sod., 2009);
- prisotnost reverzibilnih ali ireverzibilnih inhibitorjev cisteinskih peptidaz; vloga teh je predvsem inhibicija encimov, ki 'uidejo' iz endosomov in lizosomov. Zato sta citoplazma in zunajcelični prostor bogata z inhibitorji, ki so v velikem stehiometrijskem prebitku glede na encime (Chapman s sod., 1997; Laskowski Jr. in Qasim, 2000).

2.3 Inhibitorji peptidaz

Za delovanje encimov je potrebno, da peptidna veriga substrata leži prek žleba peptidaze, ki veže substrat. Peptidazni inhibitorji delujejo tako, da encimu preprečijo hidrolizo substrata. Pri proteinskih inhibitorjih, poznamo namreč tudi majhne, neproteinske inhibitorje, lahko reakcijo inhibitorja s peptidazo obravnavamo kot posebno vrsto interakcije protein-protein. Mehanizem inhibicije je lahko soroden katalitičnemu mehanizmu delovanja peptidaze ali pa vključuje sterično oviranje aktivnega mesta ali njegove okolice (Otlewski s sod., 2005). Tako lahko inhibitorji, ki so podobni substratu, neposredno blokirajo aktivno mesto encima; lahko se vežejo ob aktivno mesto oz. mesto vezave substrata ali imajo alosteričen vpliv na proteolitično

aktivnost oz. interakcijo s substratom prek vezave inhibitorja na oddaljeno mesto na encimu (Bode in Huber, 2000). Strukturni elementi, ki so odgovorni za inhibicijo, so največkrat N- ali C-konci ter izpostavljene zanke – posamezno ali pa gre za več omenjenih elementov hkrati. Med nastankom kompleksa se navadno ne pojavijo konformacijske spremembe, včasih pa obstajajo strukturne tranzicije inhibitorjev in encimov. Inhibicija s proteinskimi inhibitorji je pogosto povezana s cepitvijo peptidnih vezi (Otlewski s sod., 2005).

Večina endogenih peptidaznih inhibitorjev je kompetitivnih, saj se vežejo v aktivno mesto proteaz, s čimer preprečijo vezavo substrata na to mesto. Najbolj preprosto (dvomolekularno) interakcijo med encimom (E) in inhibitorjem (I) lahko zapišemo z enačbo:



pri čemer k_{asoc} pomeni konstanto hitrosti asociacije, k_{disoc} pa konstanto hitrosti disociacije. Razmerje med hitrostnima konstantama k_{disoc}/k_{asoc} imenujemo konstanta inhibicije (K_i); ta je enaka ravnotežni konstanti za disociacijo kompleksa encim-inhibitor. Interakcije encim-inhibitor so lahko reverzibilne ali ireverzibilne, nekateri inhibitorji pa se po interakciji z encimom razcepijo. Takim inhibitorjem pravimo 'samomorilski inhibitorji'.

Za razumevanje fiziološke vloge in pomena proteaznih inhibitorjev sta pomembna dva pojma, in sicer zakasneni čas inhibicije – $d(t)$, in čas stabilnosti – $s(t)$. Zakasneni čas inhibicije je definiran kot čas, ki je potreben za približno 99-odstotno končanje reakcije, to pa ustreza sedmim razpolovnim časom reakcije ($t_{1/2} = \ln 2/k_{asoc}[I^0]$):

$$d(t) \approx 5/k_{asoc}[I^0];$$

pri čemer $[I^0]$ pomeni fiziološko koncentracijo nekega inhibitorja. Omenjeni odnos velja za ireverzibilne ali psevdoreverzibilne inhibitorje, ki so v velikem molarnem prebitku glede na ciljne proteaze. Čas stabilnosti reverzibilnih inhibitorjev pa je definiran kot minimalni čas, med katerim kompleks EI ostane nedisociiran. Čas stabilnosti je ocenjen kot 1/10 razpolovnega časa disociacijske reakcije ($t_{1/2} = \ln 2/k_{disoc}$):

$$s(t) \approx 0,07/k_{disoc}.$$

Inhibitorji naj bi tako imeli fiziološki pomen, če je njihov zakasneni čas krajši od 1 sekunde, reverzibilni inhibitorji pa naj bi imeli čas stabilnosti daljši od 10 minut.

Na podlagi omenjenega lahko inhibitorje razdelimo na dva fiziološka tipa: inhibitorje, ki delujejo v sili, in regulatorne inhibitorje. Inhibitorji, ki delujejo v sili, hitro vežejo peptidaze in z njimi ostanejo v stabilnem kompleksu, kar preprečuje nadaljnjo proteolizo. Fiziološke koncentracije teh inhibitorjev so zato veliko večje od koncentracij ciljnih proteaz, inhibitorji in encimi pa so v fizično ločenih delih celic. Omenjeni inhibitorji delujejo predvsem na peptidaze mikroorganizmov in peptidaze, ki so se sprostile iz lizosomov. K drugemu tipu inhibitorjev prištevamo inhibitorje, ki aktivnosti peptidaze ne zaustavijo, temveč jo modulirajo. Ti inhibitorji so navadno na istem mestu kot ciljne proteaze, na podlagi funkcije pa jih lahko razdelimo na pražni, pufski in zakasnjeni tip inhibitorjev. Pražni inhibitorji služijo predvsem kot podporni sistem, ki nevtralizira naključno aktivirane peptidaze. Ker je fiziološka koncentracija pražnih inhibitorjev navadno nižja od koncentracije proencimov, je v primeru intenzivne aktivacije le-teh njihova koncentracija premajhna, da bi zaustavila proteolizo. K pufskemu tipu inhibitorjev prištevamo reverzibilne inhibitorje, ki se hitro vežejo na peptidaze, vendar je kompleks peptidaze in inhibitorja nestabilen in hitro razpade. V prisotnosti substrata omenjeni inhibitorji tako ostanejo nevezani, v odsotnosti substrata pa proteazam preprečujejo nespecifično razgradnjo. Zadnja skupina inhibitorjev so zakasnjeni tip inhibitorjev. Gre za ireverzibilne ali psevdoreverzibilne inhibitorje, ki se počasi vežejo na aktivirane ciljne peptidaze, s čimer omogočajo proteolizo le določen čas. S pomočjo kofaktorja se tak inhibitor lahko hitro spremeni v tip inhibitorja, ki deluje v sili, s tem pa prepreči nadaljnjo hidrolizo (Turk s sod., 2002).

Podobno kot peptidaze tudi njihove proteinske inhibitorje na podlagi homologije uvrščamo v družine. Homologija je izražena bodisi s podobnostjo v aminokislinskem zaporedju tipičnemu inhibitorju neke družine bodisi drugemu proteinu, ki je dokazano že podoben tipičnemu inhibitorju družine. Podobnost mora obstajati vsaj v delu, ki je odgovoren za inhibicijo. Družina lahko vsebuje le en inhibitor, po drugi strani pa lahko produkt nekega gena vsebuje več inhibitornih domen, zaradi česar jih uvrščamo v različne družine. Vsaka družina inhibitorjev je označena s črko I, ki ji sledi številka. Če obstajajo podatki o divergenci znotraj družine, so inhibitorji razvrščeni še v poddružine. Družine so uvrščene v klane, ki jih označujemo z dvema črkama, prva je I. Posamezen klan vsebuje inhibitorje, ki imajo isto evlucijsko poreklo. Sestavljeni inhibitorji (angl. compound inhibitors) so proteini, ki vsebujejo več kot eno inhibitorno enoto. Poleg proteinskih inhibitorjev je v podatkovni bazi MEROPS še skupina majhnih inhibitorjev peptidaz, ki so pomembni kot orodje raziskav ali imajo terapevtski pomen (Rawlings s sod., 2004; Rawlings s sod., 2010; MEROPS).

Proteinski inhibitorji peptidaz tvorijo za albumini in globulini tretjo največjo funkcionalno skupino plazemskih proteinov v organizmu (Hibbets s sod., 1999). Endogeni inhibitorji so praviloma proteinski, majhni neproteinski inhibitorji, ki vplivajo na proteolitično aktivnost gostiteljskih peptidaz, pa so produkt mikroorganizmov (Bode in Huber, 1992; Schirmeister in Kaeppler, 2003). Proteazne inhibitorje lahko na podlagi

njihove aktivnosti razdelimo v dve splošni kategoriji. V eno uvrščamo nespecifične proteazne inhibitorje, ki inhibirajo delovanje več razredov peptidaz, v drugo skupino pa uvrščamo za razred specifične peptidazne inhibitorje, ki inhibirajo le peptidaze enega razreda. Slednji imajo manjšo molekularno maso in večjo specifičnost za ciljni encim. Ta je posledica specifičnih vezavnih mest, ki so znotraj aktivnega mesta inhibitorja. Delovanje peptidaznih inhibitorjev se lahko prepreči z zasičenjem razpoložljivih inhibitorjev, oksidativno inaktivacijo aktivnega mesta inhibitorja ali proteolitično inaktivacijo s proteazami, ki niso vezane v kompleks z inhibitorjem (Hibbets s sod., 1999).

2.3.1 Nespecifični peptidazni inhibitorji

Med nespecifične inhibitorje peptidaz spadajo makroglobulini alfa – proteini z veliko molekularno maso, ki predstavljajo tudi od 8 do 10 odstotkov celokupnih serumskih beljakovin. Uvrščamo jih v klan IL, družino I39, kamor uvrščamo tudi druge velike homologne proteine, ki inhibirajo različne peptidaze, ne glede na njihov katalitični tip. Najbolj znan je človeški makroglobulin $\alpha 2$, našli pa so jih tudi pri podganah, miših, psih, prašičih, govedu, konjih in drugih. Pri psih odkrita makroglobulina $\alpha 1$ in $\alpha 2$ sta po zgradbi in vlogi podobna človeškemu makroglobulinu $\alpha 2$. Ta je glikoprotein, sestavljen iz štirih enakih podenot, vsaka izmed njih ima molekularno maso približno 185 kDa. Makroglobulini lahko učinkujejo na različne peptidaze zaradi mehanizma delovanja, ki mu pravimo mehanizem pasti. Ko peptidaza cepi peptidno vez v posebnem območju na molekuli makroglobulina alfa, ki ga imenujemo 'past', to izzove konformacijsko spremembo, ki povzroči, da se peptidaza ujame v makroglobulin. V kompleksu je dostop substrata do peptidaze omejen, vendar le, če ta ni premajhen. Makroglobulini tudi ne inhibirajo peptidaz, ki so tako specifične, da ne cepijo vezi v območju pasti, ali če so prevelike, da bi se z makroglobulinom internalizirale. Pri sesalcih makroglobulini $\alpha 2$ delujejo kot molekule, ki vežejo najrazličnejše endopeptidaze, s čimer povzročijo hitro odstranjevanje kompleksa makroglobulina alfa s peptidazo iz obtoka z receptorjem posredovano endocitozo. Ena molekula makroglobulina lahko veže in odstrani eno ali dve molekuli peptidaze. Glavna vloga makroglobulinov alfa je najverjetneje hitra inhibicija presežka proteolitične aktivnosti endogenih proteaz, poleg tega pa so del obrambnega mehanizma proti patogenom oz. parazitom (Hibbets s sod., 1999; MEROPS).

2.3.2 Proteinski inhibitorji cisteinskih peptidaz

Inhibitorji cisteinskih peptidaz delujejo znotraj- in zunajcelično. Za ustrezno delovanje vseh živih sistemov je namreč nujno vzdrževanje pravilnega ravnovesja med prostimi in vezanimi encimi. Porušeno ravnovesje vodi v nastanek patološkega stanja oz. bolezni.

To se zgodi, kadar je cisteinskih peptidaz preveč ali premalo, bodisi zaradi spremenjenega metabolizma proteinov ali pa zaradi prisotnosti peptidaz virusnega, bakterijskega, parazitskega ali glivnega izvora (Leung-Toung s sod., 2002).

2.3.2.1 Klan IC, Družini I48 (Klitocipinska družina) in I85 (Makrocipinska družina)

V družini I48 je klitocipin, izoliran iz bazidiomicetne glive *Lepista nebularis*. Inhibira predstavnike cisteinskih endopeptidaz iz družine C1: papain ($K_i = 0,59$ nM), katepsin L ($K_i = 0,41$ nM), katepsin B ($K_i = 0,48$ μ M), in stebelni bromelain ($K_i = 0,16$ μ M), ne pa tudi katepsina H.

Na podlagi strukture kompleksa med klitocipinom in katepsinom V je predlagan naslednji mehanizem inhibicije: inhibitor tvori klin, ki blokira aktivno mesto peptidaze. Klin se tvori z dvema zankama. Prva je stabilizirana z vodikovo vezjo (Arg12-Gly22) na sekundarnem mestu vezave substrata, druga zanka pa vsebuje kratko vijačnico, ki se veže na primarno mesto vezave substrata. Omenjeni mehanizem inhibicije je podoben delovanju cistatinov.

Klitocipin je monomerni protein z molekulsko maso 16,8 kDa. V njegovem aminokislinskem zaporedju ni cisteinov in metioninov, zato ne vsebuje disulfidnih vezi.

Družina I85 vsebuje inhibitorje cisteinskih in serinskih peptidaz. Makrocipini so bili izolirani iz bazidiomicetne glive *Macrolepiota procera*, inhibirajo pa cisteinske peptidaze iz družine C1. Makrocipina 1 in 3 poleg tega inhibirata še legumain, makrocipin 4 pa serinsko proteazo tripsin.

Mehanizem inhibicije je najverjetneje podoben tistemu pri klitocipinu, čeprav modelne študije nakazujejo, da se zanki makrocipinov ne prilegata aktivnemu mestu peptidaze. Za inhibicijo legumaina in tripsina pa naj bi bila odgovorna tretja zanka.

Terciarna struktura makrocipinov je podobna klitocipinovi (MEROPS).

2.3.2.2 Klan ID, Družina I4 (Serpinska družina)

V to družino uvrščamo inhibitorje cisteinskih ter serinskih endopeptidaz. Znan predstavnik družine je proteinazni inhibitor α_1 , ki inhibira delovanje tripsina. Inhibitorji te družine zavirajo predvsem peptidaze družine S1, pa tudi S8, C1 in C14. Za interakcijo serpinov je pomemben nastanek acilnega encima, zato je inhibitor specifičen za razrede peptidaz, v katalizi katerih sodelujejo acilni encimski intermediati. Inhibicija z inhibitorji družine I4 je dosežena z ireverzibilno, kovalentno reakcijo.

Pri mehanizmu inhibicije je potrebno, da se peptidna vez, ki je v zanki reaktivnega mesta, razcepi. To sproži hitro konformacijsko spremembo, zaradi katere kataliza

poteka le do nastanka acilnega encima in sprostitve C-končnega dela zanke reaktivnega mesta. N-končni del zanke se umesti v β -strukturo in s tem prenese encimsko molekulo na nasprotni del inhibitorja. To povzroči porušenje strukture encima in njegovega katalitičnega mesta, zaradi česar se hidroliza acilnega encima ne nadaljuje in kovalentni kompleks obstane.

Virusni serpin crmA inhibira apoptotične peptidaze kaspazne družine ter grancim B. Njegova biološka vloga je najverjetneje podaljšanje obdobja, v katerem z virusom okužene celice sintetizirajo novi virus (MEROPS).

2.3.2.3 Klan IF, Družina I67 (Bromeinska družina)

V omenjeni družini so inhibitorji cisteinskih endopeptidaz. Bromein je inhibitor stebelnega bromelaina in je bil izoliran iz istega vira – stebela ananasa. Obstaja več njegovih izooblik, prekuzorski protein pa vsebuje tri homologne inhibitorne domene. Stebelni bromelain razgradi povezovalni propeptid med lahko in težko verigo ene od teh inhibitornih domen.

Glavna tarča bromeina je stebelni bromelain, šibko pa zavira tudi delovanje tripsina in himotripsina.

Bromein je heterodimer iz lahke verige z 11 aminokislinskimi ostanki in težke verige z 41 ostanki, povezanimi z disulfidnimi vezmi. Spektroskopija z magnetno resonanco je pokazala, da je protein sestavljen iz dveh domen, vsaka pa vsebuje antiparalelno β -ploskev iz treh verig (MEROPS).

2.3.2.4 Klan IH, Družina I25 (Cistatinska družina)

V omenjeno družino uvrščamo inhibitorje peptidaz iz družine C1. Najbolj znani so cistatini, ki so znotrajcelični proteini, izločajo pa se tudi zunajcelično. Ločimo štiri poddružine: poddružina A vsebuje citoplazemska cistatina A in B, poddružini B in D vsebujeta homologe, podobne cistatinu C in sarkocistatinu, ki sta sekretorna proteina. Izločajo pa se tudi večje molekule homologov v poddružini C, katerih tipičen predstavnik je kininogen.

Cistatini v poddružini I25A zavirajo delovanje peptidaz družine C1. Inhibitorji v poddružini I25B tudi delujejo večinoma na peptidaze družine C1, nekateri pa prek drugega reaktivnega mesta inhibirajo še legumain iz družine C13, klana CD. Ena izmed cistatinskih domen v kininogenu inhibira kalpain. Inhibitorji v poddružini I25C zavirajo delovanje peptidaz družine S8 in M12, ne pa tudi C1.

Na podlagi kristalografije ovocistatina velja, da inhibitor vstavi klinasto strukturo v žleb reaktivnega mesta papainu podobnega encima. Klin se naredi iz treh ločenih delov olipeptidne verige: dveh lasničnih zank (Gln53-Gly57 in Pro103-Trp104) ter N-konca

Gly9-Ala10. Vpletenost N-končnega dela inhibitorja je razlog za hiter upad inhibitorne aktivnosti, ki se pojavi, če cistatinu odstranimo aminokislinske ostanke z N-konca. Cistatin C inhibira legumain prek drugega neodvisnega reaktivnega mesta, kjer je najverjetneje Asn39.

Proteinska struktura, značilna za cistatinsko družino, je nastala na osnovi kristalnih struktur ovocistatina ter cistatinov A, B, C in D. Inhibitorna enota poddružine I25A je brez disulfidnih mostičkov, inhibitorne enote drugih poddružin pa navadno vsebujejo dve disulfidni zanki. Poleg enostavnih inhibitorjev v to družino uvrščamo sestavljene inhibitorje z dvema, tremi ali osmimi inhibitornimi enotami.

Predstavnike družine I25 najdemo pri protozojih, glivah, rastlinah, živalih in virusih. Biološka vloga rastlinskih fitocistatinov je sodelovanje pri obrambi rastline pred predatorskimi žuželkami, saj inhibitorji zavirajo razgradnjo rastlinskih proteinov v prebavilih žuželk. Pri živalih najverjetneje sodelujejo pri regulaciji endogenih lizosomalnih cisteinskih peptidaz, tako znotraj kot zunaj celic. Potencialni transgeni fitocistatini bi bili lahko uporabni pri zaščiti rastlin pred škodljivci (MEROPS).

2.3.2.5 Klan II, Družina I27 (Kalpastatinska družina)

Družina I27 vsebuje inhibitorje kalpainov iz peptidazne družine C2. Kalpastatini zavirajo delovanje kalpaina 1 in 2, kalpain 3 je manj občutljiv.

Vsaka od štirih inhibitornih enot v molekuli kalpastatina vsebuje tri zelo ohranjene podomene, imenovane A, B in C. Poddomena B je najbolj neposredno vpletena v mehanizem inhibicije in vsebuje esencialno zelo ohranjeno zaporedje. V inhibitorni enoti 1 je to Gly-Xaa-Lys (Arg)-Asp (Glu)-Xaa-Thr-Ile-Pro-Pro-Xaa-Tyr-Arg, pri čemer je Xaa lahko katerakoli aminokislina. Inhibitorne enote kalpastatinov so ločene z odseki približno 140 aminokislin. Poleg inhibitornih domen je na N-koncu regija, imenovana domena L.

Biološka vloga kalpastatinov je regulacija delovanja glavnih kalpainov. Ti sodelujejo pri rasti nevronov, mišični homeostazi, prenosu signalov in apoptozi (MEROPS).

2.3.2.6 Klan IK, Družini I57 (Družina stafostatin B) in I58 (Družina stafostatin A)

Družini inhibitorjev I57 in I58 vsebujeta inhibitorje stafopainov – cisteinskih endopeptidaz v družini C47. Stafostatin B uvrščamo v družino I57, stafostatin A pa v družino I58. Oba sta bila izolirana iz bakterije *Staphylococcus aureus*, drugje jih niso odkrili. Stafostatin B deluje tako, da se z ostanki Ile-Gly-Thr-Ser na mestih P2 in P2' razteza prek žleba aktivnega mesta v enaki orientaciji kot substrat. Stafostatin A inhibira le delovanje stafopaina A. Vsebuje eno disulfidno zanko, čeprav ta očitno ne sodeluje pri mehanizmu inhibicije (MEROPS).

2.3.2.7 Klan IL, Družina I39 (Družina a 2M)

Predstavniki omenjene družine so opisani pod točko 2.3.1 – nespecifični peptidazni inhibitorji.

2.3.2.8 Klan IQ, Družina I50 (Družina P35)

V to družino uvrščamo bakulovirusni P35 inhibitor kaspaz – peptidaz iz družine C14. Čisti rekombinantni P35 inhibira človeške kaspaze -1, -3, -6, -7, -8 in -10 z vrednostmi K_{asoc} od $1,2 \times 10^3$ do $7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ter z zgornjimi mejnimi vrednostmi K_i od 0,1 do 9,0 nM.

Inhibicija, podobna delovanju serpinov in makroglobulinov, temelji na mehanizmu pasti, ki ga povzroči konformacijska sprememba inhibitorja po cepitvi vezi v reaktivnem mestu. Pri P35 cepitev vezi reaktivnega mesta peptida vodi v nastanek tioesterskega intermediata, s čimer je katalitični mehanizem onemogočen, zato ne pride do hidrolize tioestra. Inhibitor potem zavzame novo, stabilnejšo konformacijo, pri kateri se njegov N-terminalni konec vsadi v žleb aktivnega mesta encima. Ker se P35 med tvorbo inhibitornega kompleksa razcepi, ga lahko uvrščamo med 'samomorilske inhibitorje' kaspaz (Cassens s sod., 2003).

Biološka vloga inhibitorjev družine I50 in I30, prek zaustavitve apoptoze okuženih celic, omogoča razmnoževanje bakulovirusov v njihovih gostiteljih – žuželkah. Ugotovitev, da prenos genov P35 s pomočjo vektorja adenovirusov ščiti človeške nevrone pred apoptozo, je napeljala na možnost, da bi lahko P35 uporabljali pri zdravljenju neurodegenerativnih bolezni (MEROPS).

2.3.2.9 Klan IV, Družina I32 (Družina IAP)

Predstavniki omenjene družine so tudi inhibitorji kaspaz – tako iniciatorskih kot izvrševalnih (eksekutorskih). Najprej so bili odkriti pri virusih, homologne proteine pa so odkrili tudi pri sesalcih. Vsi inhibitorji družine I32 vsebujejo vsaj eno, ~ 80 ostankov dolgo ponovitev, imenovano BIR (bakulovirusna ponovitev IAP). Ta oblikuje tri kratke β -verige in štiri α -vijačnice, ki se zvijejo v kompaktno strukturo s koordiniranim cinkovim ionom (Mace s sod., 2010).

Proteini IAP so razvili več različnih mehanizmov inhibicije kaspaz ter nekaj drugih mehanizmov inhibicije apoptoze. Tako npr. domena BIR3 inhibitorja XIAP inhibira delovanje kaspaze-9, saj preprečuje dimerizacijo katalitično neaktivnih monomernih podenot, ki je predpogoj za aktivnost. Naprotno se povezovalno zaporedje, ki leži na N-koncu domene BIR2, pri inhibiciji kaspaze-3 ali -7 z inhibitorjem XIAP veže v žleb aktivnega mesta v orientaciji, ki je ravno nasprotna vezavi substrata. Domena BIR2 vsebuje tudi površinski žleb, ki se veže s kaspazo-7 na posebnem mestu, ki se izpostavi

še ob cepitvi pri zorenju encima. Lahko, da je vezavno mesto domen BIR enotna, evolucijsko ohranjena struktura, ki omogoča tako različne mehanizme zaviranja apoptoze. IAP, ki delujejo kot inhibitorji kaspaz, lahko opredelimo kot prazne inhibitorje, saj morajo kaspaze za sproženje apoptoze preseči njihovo raven. Ker so našli predstavnike IAP tudi pri kvasovkah, ki nimajo kaspaz niti apoptoze, obstaja možnost, da imajo IAP poleg inhibicije kaspaz še druge vloge (Turk s sod., 2002; Dubrez-Daloz s sod., 2008; Gyrd-Hansen in Meier, 2010; MEROPS).

2.3.2.10 Klan IX, Družina I31 (Družina tiropinov)

Družina inhibitorjev I31 vsebuje predvsem inhibitorje papainu podobnih cisteinskih peptidaz iz družine C1, ki jih s skupnim imenom imenujemo tiropini. Vsi vsebujejo ohranjeno zaporedje Cys-Trp-Cys-Val. Družina vsebuje inhibitorje z eno, dvema ali tremi inhibitornimi enotami.

Znana je terciarna struktura kompleksa med katepsinom L in fragmentom invariantne verige p41 MHC II. Ta je klinaste oblike in ga sestavljata dve poddomeni, ki sta stabilizirani z disulfidnimi vezmi. Prva poddomena vsebuje kratko strukturo α -vijačnice in β -verige, druga poddomena pa kratko antiparalelno β -ploskev. V ozkem delu klina so tri zanke. Do inhibicije pride, ko se ožji del klinaste strukture fragmenta p41 prek treh zank zasidra v žleb aktivnega mesta encima (MEROPS).

2.3.2.11 Klan JF, Družina I29 (Družina CTLA)

Družina I29 vsebuje inhibitorje cisteinskih peptidaz iz družine C1. Večina predstavnikov omenjene družine ima le eno, nekateri pa celo več inhibitornih domen.

Kot je bilo že omenjeno, se papainu podobne cisteinske proteaze sintetizirajo kot neaktivni proencimi z N-terminalnimi propeptidnimi regijami. Aktivacija teh encimov vključuje odcepitev omenjenih propeptidnih delov, ki pa *in vivo* in *in vitro* opravljajo najrazličnejše funkcije (Yamamoto s sod., 2002). Med drugim delujejo kot močni reverzibilni inhibitorji zrelih encimov. Njihova osrednja vloga je preprečevanje prezgodnje aktivacije encimov, zaradi česar omenjeni inhibitorji predstavljajo puferski tip inhibitorjev, s čimer vzdržujejo zalogo proteaz. Poleg tega delujejo kot šaperoni, ki pomagajo pri pravilnem zvijanju in usmerjanju peptidaze na tarčno mesto.

Propeptidi so kovalentno povezani z N-terminalnim delom zrelega encima in v iztegnjeni obliki ležijo v aktivnem mestu peptidaze v obratni smeri kot substrat. Na vrhu žleba z aktivnim mestom je propeptid na zreli del encima vezan prek vijačne domene. Znotraj lizosomov se s pomočjo kofaktorjev (npr. glikozaminoglikanov) oz. zaradi pH ravnotežje med odprto in zaprto obliko premakne v prid odprte oblike encima, kar povzroči aktivacijo peptidaz. Ko inhibitorni propeptidi odslužijo svojemu namenu, se verjetno razgradijo s pomočjo okoliških proteaz. Poleg propeptidov, ki inhibirajo le

starševske encime, sta predstavnika omenjene skupine inhibitorjev še antigen-2 α in 2 β citotoksičnih limfocitov T (CTLA-2 α in CTLA-2 β). Genomske analize so pokazale ekspresijo sorodnih, propeptidu podobnih proteinov pri drozofili in podganah, kar nakazuje na prisotnost omenjenih inhibitorjev tudi pri drugih organizmih (Turk s sod, 2002; MEROPS).

Znana je terciarna struktura prokatepsina L. N-terminalni del propeptida tvori globularno domeno s tremi vijačnicami in z majhno hidrofobno sredico, C-terminalni del pa vsebuje iztegnjeno strukturo, ki zasede vezavni žleb, vendar v nasprotni smeri kot substrat. CTLA-2 α in CTLA-2 β inhibirata z enakim mehanizmom, kot je opisan za propeptid katepsina L (MEROPS).

2.3.3 Majhni inhibitorji cisteinskih peptidaz

Med proteinskimi inhibitorji in majhnimi, sintetičnimi inhibitorji je glavna razlika ta, da se proteinski inhibitorji pogosto ne vežejo na tarčne peptidaze kot substrat. Navadno se približajo aktivnemu mestu peptidaze z nekaj aminokislinskimi ostanki, ki v aminokislinskem zaporedju ne ležijo skupaj. Nastala izvihana struktura preprečuje proteolitično cepitev inhibitorja. Proteinski inhibitorji so navadno tudi zelo selektivni in učinkoviti. S stališča razvoja terapevtskih učinkovin pa so zaradi lažjega prenosa do tarčnih encimov primernejši majhni inhibitorji. Vendar pa številni majhni inhibitorji oz. tipi inhibitorjev pogosto ne morejo selektivno razlikovati med različnimi encimskimi razredi (Turk s sod., 2002).

Nespecifični inhibitorji so peptidni aldehidi (leupeptin in antipain), ki delujejo kot reverzibilni analogi prehodnega stanja, ter peptidni klometil ketoni, ki inaktivirajo peptidaze z alkilacijo aktivnega mesta. Peptidni diazometani in epoksidi alkilirajo cistein v aktivnem mestu, zato inhibirajo predvsem cisteinske peptidaze. Obstajajo pa tudi najrazličnejši sintetični inhibitorji peptidaz, ki bi lahko bili uporabni za zdravljenje različnih bolezni (Leung-Toung s sod., 2002).

Največji problem sintetičnih inhibitorjev cisteinskih peptidaz je njihova podobnost s serinskimi peptidazami glede afinitete do substrata ter proteolitičnega mehanizma. Skupna je predvsem zahteva po elektrofilnem izosteru, ki reagira selektivno in po možnosti tudi reverzibilno, s katalitičnim nukleofilom, ki je pri cisteinskih peptidazah cisteinski tiolat, pri serinskih pa serinski hidroksil. Čeprav sta prostorski organiziranosti katalitičnih triad serinskih in cisteinskih peptidaz podobni, sta oksanionska luknja in negativno nabit tetraedrični intermediat glavni značilnosti katalitičnega mehanizma serinskih peptidaz, cisteinske peptidaze pa stabilizira poznejši, bolj nevtralen acilni intermediat. Omenjeno mehanistično razliko je treba pri razvoju sintetičnih inhibitorjev upoštevati. Tako kot serinske imajo tudi cisteinske peptidaze razmeroma plitko, topilo izpostavljeno aktivno mesto, v katero se prilegajo kratki odseki proteinskih zank ali

verig substratov/inhibitorjev. Večina sintetičnih inhibitorjev je tako dolgih le 2–4 aminokislina. Vežejo se na sekundarna mesta encimov, končajo pa v obliki različnih elektrofilnih izoster (Leung s sod., 2000).

2.3.3.1 E-64

E-64 je bil izoliran leta 1978, in sicer iz glive *Aspergillus japonicus*. Inhibira večino peptidaz v družini C1, vendar z različnimi hitrostmi. Razpolovni časi inhibicije v sekundah pri 10 μ M koncentraciji inhibitorja so: 0,1 za papain; 0,8 za katepsin B; 17 za katepsin H; 0,7 za katepsin L in 9,2 za kalpain. Ima molsko maso 357, je topen v vodi in izredno stabilen. Vsebuje trans-epoksisukcinilno kislino, vezano na modificiran dipeptid (leucilamino-4-gvanidinobutan). Uvrščamo ga v epoksisukcinatni razred inhibitorjev.

E-64 ni splošni inhibitor cisteinskih peptidaz. Skupina družin v klanu CA vsebuje peptidaze s preferenco do glicilnih vezi, ki jih E-64 ne inhibira. Podobne značilnosti imajo tudi peptidaze v klanu CE. E-64 prav tako ireverzibilno ne inaktivira peptidaz v klanu CD, kot so kaspaze. Po drugi strani pa reverzibilno inhibira peptidaze, kot so klostripain, tripsin in gingipain R, ki so specifični za arginin. Pri tem je pomemben 4-gvanidino butanski ostanek inhibitorja.

Inhibicija je ireverzibilna, saj pride do S-alkilacije cisteina v aktivnem mestu prek odprtja epoksidnega obroča. Tioesterska vez nastane med nukleofilnim napadom na mesto C2 ali C3 epoksidnega obroča. Kristalne strukture so pokazale, da inhibitor raje zaseda mesta S, ne pa S' (MEROPS; Matsumoto s sod., 1999).

2.4 Glivne peptidaze in inhibitorji

2.4.1 Peptidaze gliv

Pri glivah so našli številne proteolitične encime, ki jih na podlagi njihovih lastnosti uvrščamo med aspartatne, metalo-, serinske ali cisteinske peptidaze. Prevladujejo aspartatne in serinske peptidaze (North, 1982). Peptidaze igrajo pomembno vlogo pri fiziologiji, morfogenezi in metabolizmu gliv (Sabotič s sod., 2007).

Od endoproteaz so pri patogenih glivah odkrili sekretorne aspartatne peptidaze pepsinske družine (A1), serinske peptidaze subtilizinske poddružine (S8A) ter metalopeptidaze družin M35 in M36. Pri vrsti *Aspergillus niger* je bil dokazan obstoj proteinaze A iz družine A4, pri vrsti *Coccidioides immitis* pa himotripsinu podobna peptidaza. Sekretorne proteaze tripsinske družine (S1) so dokumentirane pri vrsti *Fusarium* ter patogenih glivah žuželk.

Od eksoproteaz so pri supernatantih kultur različnih vrst *Aspergillus* izolirali aminopeptidaze (družina M28), karboksipeptidaze (družina S10) in dipeptidil-peptidaze (poddružini S9B in S9C) (Monod s sod., 2002).

Pri bazidiokarpnih 43 bazidiomicetnih vrst gliv, iz 7 rodov in 18 družin, so odkrili peptidaze štirih katalitičnih razredov: 4 % vseh so predstavljale aspartatne peptidaze, 5 % cisteinske, 6 % metalopeptidaze in 22 % serinske peptidaze. Drugih ni bilo mogoče nedvoumno določiti (Sabotič s sod., 2007a).

2.4.1.1 Peptidaze dermatofitov

Kot pri številnih drugih glivah tudi pri dermatofitih lahko zaznamo zunajcelično proteolitično aktivnost *in vitro* pri rasti v gojišču, kjer so proteini edini vir dušika (Monod, 2008). Peptidaze, ki jih izločajo dermatofiti, pogosto imenujejo s skupnim izrazom keratinaze, čeprav keratinizirana tkiva, kot so povrhnjica, nohti in dlaka, poleg keratinov vsebujejo tudi različne druge, med seboj povezane proteine (Monod s sod., 2002; Monod, 2008).

Pri dveh vrstah dermatofitov, *M. canis* in *M. cookei*, so pri metodi stresanja kultur, ki posnema psevdoparazitsko rast gliv, ter pri stacionarni kulturi, ki posnema saprofitsko rast gliv, odkrili več različnih peptidaz, ki so jih opisali kot gelatinaze in elastinolitični encimi (Simpanya in Baxter, 1996). Pri *M. canis* sta bili kasneje opisani 31,5 kDa serinska peptidaza (Mignon s sod., 1998) in 43,5 kDa metaloproteaza (Brouta s sod., 2001).

Ker je rast dermatofitov počasna in ker je težko pridobiti dovolj materiala za izolacijo nativnih proteinov in njihovo karakterizacijo, so za raziskave proteolitične aktivnosti različnih dermatofitnih vrst uporabili obratni genetski pristop – od genov k proteinom. Izkazalo se je, da imajo dermatofiti v genomu zapis za številne sekretorne endoproteaze, podobne tistim iz gliv rodu *Aspergillus*. Našli so 20 genov, ki kodirajo sekretorne endo- in eksopeptidaze, za 15 proteaz so dokazali izločanje med rastjo v gojišču s proteini. Čeprav so proteinska zaporedja ortologov pri vrstah izredno ohranjena, pa je količina izločenih proteaz odvisna od vrste.

Dermatofitne serinske peptidaze imenovane subtilizini, imajo molekulsko maso od 30 do 37 kDa in niso glikozilirani. Sintetizirajo se kot preproteini s predzaporedjem, dolgim približno 100 aminokislinskih ostankov, ki se med procesom zorenja odstrani z avtoproteolitično aktivnostjo. So alkalne peptidaze, ki najbolj delujejo pri pH od 7 do 9. Metalopeptidaze, imenovane fungalizini, so glikoproteini z molekulsko maso od 40 do 48 kDa. Sintetizirajo se prav tako kot preproteini s predzaporedjem, dolgim približno 240 aminokislinskih ostankov. So cinkove metalopeptidaze, njihovo optimalno območje pH je med 7 in 8.

Pri vrsti *T. rubrum* je bil dokazan obstoj endoproteaz iz družin S8 in M36, od eksopeptidaz pa dve sekretorni levcin aminopeptidazi (Lap1 in Lap2) in dve dipeptidil-peptidazi (DppIV in DppV). Lap1 in Lap2 sta metalopeptidazi, aktivni pri pH med 6,5 in 10,5. DppIV in DppV sta serinski peptidazi s katalitično triado Ser, Asp, His in sta glikoproteina, velika približno 90 kDa, s približno 10 kDa N-vezanih ogljikovih hidratov (Monod s sod., 2005, Monod, 2008).

2.4.2 Glivni inhibitorji cisteinskih peptidaz

Glede na vlogo peptidaz v živih celicah je pričakovati, da so poleg encimov prisotni tudi endogeni inhibitorji. Nekateri od njih zavirajo delovanje različnih endogenih peptidaz, nekateri pa so zelo specifični in inhibirajo samo en tip peptidaz (North, 1982).

2.4.2.1 Proteinski inhibitorji cisteinskih peptidaz

Cistatinom podoben inhibitor cisteinskih peptidaz je bil izoliran iz ene izmed najbolj razširjenih patogenih gliv, *Candida albicans*. Cistatinom je soroden po molekularni masi, kemijskih lastnostih in zaporedju na N-koncu (Tsushima s sod., 1992).

Prvi proteinski inhibitor cisteinskih peptidaz, opisan pri višjih glivah (*Basydiomyceta*), je klitocipin iz glive *Lepista nebularis* (prej imenovane *Clitocybe nebularis*) (Brzin s sod., 2000; Kidrič s sod., 2002; Galeša s sod., 2004; Galeša s sod., 2006; Sabotič s sod., 2007b). Klitocipin ne vsebuje zaporedij, ki bi bila podobna drugim inhibitorjem cisteinskih peptidaz, zato ga po MEROPS-ovi klasifikaciji uvrščamo v svojo družino, imenovano I48, klana IC (MEROPS). Ima 150 aminokislin dolgo zaporedje, ki ne vsebuje cisteinov, metioninov in histidinov. Protein ni glikoziliran. Inhibira papain, bromelain ter katepsina B in L z K_i v nanomolarnem območju. Je monomerni protein z molekularno maso 16,8 kDa. Infrardeča spektroskopija je pokazala, da vsebuje veliko antiparalelnih β -ploskev in zelo malo vijačnic. Sprva so mislili, da je klitocipin homodimer, kasneje pa se je izkazalo, da gre za monomerni protein, ki se lahko zvije v dve kinetični stanji: visokokooperativno prehodno stanje in termalno nezvito stanje. Njegova stabilnost je odvisna le od nekovalentnih interakcij znotraj polipeptidne verige (Brzin s sod., 2000; Kidrič s sod., 2002; Galeša s sod., 2004; Galeša s sod., 2006; Sabotič s sod., 2007b). Opis družine I48 je pod točko 2.3.2.1.

Iz druge bazidiomicetne glive *Makrolepiota procera* je bila izolirana družina novih inhibitorjev cisteinskih peptidaz, imenovanih makrocipini. Zapis zanje nosi družina genov, razdeljena v pet skupin, znotraj katerih je več kot 90-odstotna podobnost v aminokislinskem zaporedju, med skupinami pa je ta podobnost 75–86-odstotna. Makrocipini so učinkoviti inhibitorji papaina, cisteinskih katepsinskih endopeptidaz ter katepsinov B in H, ki imata tako endo- kot eksopeptidazno aktivnost. Imajo podobne osnovne biokemijske lastnosti kot klitocipin, prav tako so stabilni pri visokih

temperaturah in ekstremnih vrednostih pH. Nativni makrocipin je protein z molekulsko maso 19 kDa. Njegovo aminokislinsko zaporedje je bogato s prolinom in tirozinom, ne vsebuje pa veliko levcina. Klasifikacija MEROPS jih uvršča v družino I85, klana IC (Sabotič s sod., 2009; MEROPS). Opis družine I85 je pod točko 2.3.2.1.

2.4.2.2 Majhni inhibitorji cisteinskih peptidaz

Pri aktinomicetah so bili odkriti leupeptini (Aoyagi s sod., 1969) in antipain (Suda s sod., 1972). Leupeptin inhibira številne serinske peptidaze in treoninske peptidaze, od cisteinskih pa predstavnike družin C1 in C11. Je analog tranzicijskega stanja katepsina B s počasno, vendar močno vezavo. Antipain je bil izoliran iz kultur vrst *Streptomyces*. Ima širok spekter inhibitorne aktivnosti, zavira delovanje papaina, tripsina, trombina, katepsina B in drugih. Deluje kot reverzibilni inhibitor. Tako leupeptine kot antipain uvrščamo v aldehydni razred inhibitorjev. Zanje je značilno, da tvorijo hemiacetalne ali tiohemiacetalne konjugate s hidroksilnimi ali tiolnimi skupinami encimov (MEROPS).

Zelo pomemben majhen glivni inhibitor je E-64 (Hanada s sod., 1978), katerega lastnosti in mehanizem delovanja so opisani pod točko 2.3.3.1. Trans-epoksisukcinilni tipi inhibitorjev cisteinskih peptidaz so bili opisani pri več sevih gliv iz družine hifomicet. Bazična, vodotopna inhibitorja, imenovana estatini A in B, sta bila izolirana iz gojišča glive *Myceliophthora thermophila* (Yaginuma s sod., 1989). Gliva *Penicillium citrinum* kot metabolit izloča dva inhibitorja cisteinskih peptidaz, imenovana katestatin A in B, ki sta dekarbamidolna analoga estatinov (Woo s sod., 1995). Katestatini A, B in C so bili izolirani tudi iz ene vrste morske glive *Microascus longirostris* (Yu s sod., 1996). Iz gojišča glive *Gliocladium sp.* so izolirali in karakterizirali štiri inhibitorje, imenovane TMC-52 A, B, C in D. Vsi štirje močno inhibirajo zlasti katepsin L (Isshiki s sod., 1998). WF14861 je inhibitor katepsina B in L, izoliran iz rastlinske patogene glive *Colletotrichum sp.*, ki jo uvrščamo med *Coelomycetes*, rod *Melanconiales*. Sestavljajo ga trans-epoksisukcinilna kislina, L-tirozin in spermidin (Otsuka s sod., 1999a in 1999b). Sorodna inhibitorja, imenovana WF14865A in B, sta bila izolirana tudi iz glive *Aphanoascus fulvescens* (Otsuka s sod., 2000).

Dva močna inhibitorja človeškega katepsina L sta bila izolirana iz glive *Streptomyces sp.* Oba, YM-51084 in YM-51085, sta acil-tripeptida (Teramura s sod., 1996).

Iz gojišča kserofilne glive *Aspergillus penicilloides* je bil izoliran aurantiamid acetat, selektivni inhibitor katepsinov L in B (Isshiki s sod., 2001).

Pri številnih vrstah skupine gliv *Basidiomycotina* so dokazali inhibitorno aktivnost majhnih inhibitorjev cisteinskih peptidaz proti papainu ter človeškemu katepsinu B in H (Mlinarič s sod., 2000).

2.5 Peptidaze in inhibitorji pri imunskem odzivu

Največja sistema za razgradnjo proteinov v celicah sta endosomni in lizosomni sistem ter citosolni proteasomi. Peptidaze, ki so v endosomih ali lizosomih, igrajo pomembno vlogo pri procesiranju in predstavljanju antigenov, regulaciji citokinov, razvoju celic naravnih ubijalk (NK-celice), aktivaciji integrinov, indukciji apoptoze in pri signaliziranju s Toll-like receptorji (Colbert s sod., 2009). V endosomih in lizosomih so v glavnem cisteinske in aspartatne peptidaze. Večina lizosomalnih cisteinskih peptidaz je sorodna papainu, zaradi česar jih uvrščamo v družino C1 (opis pod točko 2.2.1.1) (MEROPS). Med njimi so katepsini L, S, C, F, H, B, X, K, V in W. Katepsina D in E sta aspartatni peptidazi, sorodni pepsinu. V lizosomu je tudi asparaginilna endopeptidaza – legumain, ki jo uvrščamo v družino C13. Nekateri od omenjenih encimov so endopeptidaze (katepsini S, L, K, F, V, D, E in legumain), nekateri pa amino- (katepsina C in H) ali karboksi-eksopeptidaze (katepsina B in X). Katepsin B se lahko v odvisnosti od pH obnaša kot karboksipeptidaza ali endopeptidaza (Honey in Rudensky, 2003; Berdowska, 2004; Colbert s sod., 2009). Pri ljudeh katepsine B, L, H, F, O, X in C najdemo v večini tkiv, katepsini S, K, W in V pa so omejeni le na specifična tkiva (Berdowska, 2004).

Kot že omenjeno, so cisteinske in deloma serinske ter aspartatne peptidaze ter njihovi inhibitorji pomembni pri dveh procesih delovanja imunskega sistema, kjer je vpletena proteoliza. To sta apoptoza in od molekul MHC II odvisno predstavljanje antigenov. Omenjene proteaze namreč sodelujejo pri regulaciji apoptoze nevtrofilnih granulocitov, monocitov in dendritičnih celic, pri selekciji v primarnih limfatičnih organih oz. razvoju limfocitov B in T ter pri ubijanju tarčnih celic s citotoksičnimi celicami T (limfociti CD3⁺ CD8⁺) in s celicami NK. Pri predstavljanju antigenov cisteinske in aspartatne peptidaze povzročijo cepitev vezi v antigenih, kar sproži razvijanje polipeptidnih verig in vezavo t. i. procesiranih antigenov (dolgih od 13 do 26 aminokislinskih ostankov) v žleb novonastalih molekul MHC II. Poleg tega so isti encimi vpleteni v razgradnjo invariantne verige Ii, ki zaseda vezavno mesto za peptide na molekulah MHC II (Chapman s sod., 1997; van Eijk s sod., 2003; Berdowska, 2004; Colbert s sod., 2009).

2.5.1 Apoptoza

Programirana celična smrt se pojavlja pri telesnih celicah vrst v vseh taksonomskih kraljestvih organizmov in pri vseh organskih sistemih. Je ključni del razvoja večceličnih organizmov in je pomemben del imunskih efektorskih mehanizmov odziva na tujke. Pri sesalcih v imunskem sistemu ločimo dva tipa programirane celične smrti: apoptozo in nekrozo.

Apoptotična smrt celice je pomemben del imunskega odziva gostiteljev, zato so številni patogeni organizmi razvili dejavnike za njeno regulacijo. V intrinzično pot apoptoze je

vpletena permeabilizacija zunanje membrane mitohondrijev (MOMP). To omogoči nepovratno sproščanje dejavnikov, kot so citokrom c, inducirajoči faktor apoptoze (AIF), endonukleaza G in drugi, ki vodijo v smrt celice. Vsak izmed njih ima svojo vlogo, citokrom c pa povzroči aktivacijo kaspaze-9. S tem se začne proteolitična kaskada efektorskih kaspaz (-3, -6 in -7), kar vodi v razkroj celice prek fragmentacije DNA in izražanja markerjev za fagocitozo na površini celic. Značilnost apoptotične smrti je, da ne povzroči vnetnega odziva. Obstaja pa še ekstrinzična pot apoptoze, v katero so vpleteni receptorji smrti (DR). Pri tem nastane kompleks DISC za sproženje smrti. Vanj sta vključeni iniciatorski kaspazi-8 in -10. Kaspaza-8 nato aktivira efektorske kaspaze (Hedrick s sod., 2010; Wyllie, 2010).

V apoptozo so vpletene cisteinske in aspartatne peptidaze. Katepsin B lahko aktivira številne kaspaze in povzroči fragmentacijo celičnih jeder. Lizosomalne peptidaze cepijo BID, kar povzroči ojačenje signala po mitohondrijski poti. Ne nazadnje, lizosomalni encimi makrofagov sodelujejo pri razgradnji nukleosomov apoptotičnih celic (van Eijk s sod., 2003).

2.5.2 Predstavljanje antigenov

Limfociti T prepoznajo antigene v obliki peptidov, vezanih v žleb molekul MHC, ki so na površini antigen predstavitevni celic. Peptidni odseki se tvorijo v kislih oddelkih celic APC z nizom reakcij, kot so denaturacija, redukcija in proteoliza. Vse naštetu s skupnim izrazom imenujemo procesiranje antigenov (Rodríguez in Diment, 1995). Viruse, znotrajcelične bakterije in parazite, ki vstopijo v citosol, prepoznajo predvsem limfociti T CD8 prek kompleksa peptidni antigen-MHC I. Nasprotno pa topne proteine ali proteine, nastale iz fagocitiranih organizmov, prepoznajo limfociti T CD4 prek kompleksa peptid-MHC II (Unanue, 2005).

Eksogeni antigeni, ki jih ujamejo antigen predstavitvene celice, se razgradijo v endosomalnem oddelku skupaj z endogenimi antigeni (antigeni, ki jih sintetizirajo celice APC, npr. membranske beljakovine, endosomalne komponente ali avtofagocitirane citosolne beljakovine). Vloga molekul MHC II je priti v stik z endosomalno mrežo, vezati čim več najrazličnejših peptidov, nastalih iz antigenov, ter jih na površini celic APC predstaviti T-celicam pomagalkam. Vezava omenjenih peptidov zahteva tudi delovanje endosomalnih proteaz, ki odstranijo šaperon invariantne verige (Ii), ki je povezan z molekulami MHC II v endoplazemskem retikulumu in zagotavlja njihovo pravilno sestavljanje v heterodimere. Regija CLIP (z razredom II povezan peptid invariantne verige) Ii se vstavi v vezavno mesto peptidov novo-nastalih molekul MHC II, da prepreči vezavo drugih peptidov, preden te pridejo do endosomalnega sistema. Razgradnja Ii poteka v natančno določenem zaporedju: protein s celotno dolžino (33–35 kDa) se najprej cepi na luminalni strani, pri čemer nastane vmesni peptid (Iip22), ki se nato cepi na mestu, ki je blizu distalne strani CLIP. Pri tem nastane

Iip10, ki se cepi na proksimalnem koncu CLIP. Kompleks CLIP-MHC II prepoznajo podtipi molekul MHC II. Te so šaperoni za zamenjavo CLIP s peptidi antigenov. Peptidaze, ki spremenijo Iip10 v CLIP, so katepsin L v timusnih epitelnih celicah in katepsin S v limfocitih B, makrofagih in dendritičnih celicah. Protein s celotno dolžino Ii in Iip22 lahko cepi več različnih peptidaz. Za razliko od cepitve Ii pa razgradnja endocitiranih antigenov ni tako natančno določena – cepitvena mesta so določena predvsem z dostopnostjo aktivnemu mestu peptidaze. Razgradnji pomagata tudi nizek pH v endolizosomih ter redukcija disulfidnih vezi, kar omogoči razvijanje antigena in s tem izpostavitve mest za cepitev. Procesiranje antigenov povzroči nastanek naključnih peptidov, ki se lahko neposredno vežejo v žleb molekul ali pa se po vezavi še 'obrežejo'. Endosomalne proteaze imajo najverjetneje redundantno in, v splošnem, sekundarno vlogo pri izbiri peptidov, ki se bodo pojavili na površini APC. Opisani pa so tudi primeri antigenov, ki za uspešno predstavljanje potrebujejo delovanje točno določenih peptidaz (Lennon-Duménil s sod., 2002; Honey in Rudensky, 2003; Hsing in Rudensky, 2005; Bird s sod., 2009; Burster s sod., 2010).

V nekaterih APC, predvsem dendritičnih celicah, se lahko eksogeni antigeni razgradijo v endosomalnih oddelkih in se predstavijo tudi s pomočjo molekul MHC I, v procesu, ki ga imenujemo endosomalna pot navzkrižnega predstavljanja. Pomembno vlogo pri tej aktivnosti naj bi imel katepsin S (Bird s sod., 2009).

2.5.3 Interakcije gostitelj-patogen

V literaturi najdemo veliko podatkov o zlasti parazitskih organizmih, ki izločajo peptidaze različnih razredov in ki so po svoji strukturi in funkciji podobne gostiteljevim endosomalnim proteazam. Parazitski helmintni črvi tako izločajo peptidaze, s katerimi razgradijo zunajcelični matriks, znotrajcelični protozoji, npr. *Leishmania spp.*, *Plasmodium spp.* in *Toxoplasma spp.*, potrebujejo peptidaze za invazijo in prehranjevanje. Poleg vloge v življenjskem ciklusu patogenih organizmov omenjene proteaze delujejo kot virulenčni dejavniki, s katerimi se lahko paraziti bodisi izognejo gostiteljevemu imunskemu odzivu bodisi ga zavrejo ali preusmerijo, da je manj učinkovit. Tako npr. nekateri helminti izločajo proteaze, ki aktivirajo imunski odziv Th2, po drugi strani pa nekateri endogeni paraziti in bakterije sprožijo imunski odziv Th1. Pogoste tarče peptidaz patogenih organizmov so protitelesa IgA, IgG in/ali IgE, komponente komplementnega sistema, IL-18 ter receptorji za IL-2 in Fc-del IgG (Lecaille s sod., 2002; Bird s sod., 2009; Atkinson s sod., 2009).

Aktivnost tako gostiteljevih kot parazitovih peptidaz je pogosto omejena ali zaustavljena z inhibitorji, ki so v citoplazmi celic, v njihovem endosomalnem sistemu ali v zunajceličnem (medceličnem) okolju. Inhibitorje peptidaz pa lahko izločajo tudi patogeni sami. Od teh so najbolj proučevani inhibitorji filiarnih nematodov, s katerimi lahko bodisi zaustavijo različne efektorske mehanizme ali vplivajo na citokinsko mrežo.

Med imunoregulatorne lastnosti omenjenih inhibitorjev spadajo zaviranje delovanja proteaz, vpletenih v procesiranje in predstavljanje antigenov, kar vodi v zmanjšanje imunske odzivnosti, odvisne od molekul MHC, sproženje izražanja IL-10 in stimulacijo makrofagov (Hartmann in Lucius, 2003; Bird s sod., 2009; Ochieng in Chaudhuri, 2010). Tako se npr. črevesni nematod *Nippostrongylus brasiliensis* izogne gostiteljevemu imunskemu sistemu z izločanjem inhibitorja cisteinskih peptidaz, imenovanega nipocistatin, ki spremeni procesiranje antigenov v antigen predstavitvenih celicah gostitelja (Dainichi s sod., 2001; Vray s sod., 2002).

2.5.4 Dermatofitne peptidaze in inhibitorji pri imunskem odzivu

Pri dermatofitih je bilo ugotovljeno, da izločajo snovi, ki lahko zmanjšajo imunski odziv gostitelja. To so večinoma manani – glikoproteinske komponente celične stene, ki predstavljajo do 20 odstotkov celotne mase gliv. Sestavljeni so iz proteinov, na katere so vezani polisaharidi in oligosaharidi s ponavljajočimi se manoznimi sladkorji. Manani se vežejo na površino mononuklearnih fagocitov in lahko zavrejo celično posredovan imunski odziv ter proliferacijo keratinocitov. S tem se gliva dalj časa ohrani na površini kože. Ker se manani pri posameznih dermatofitnih vrstah razlikujejo po svoji kemijski zgradbi, je lahko to razlog za razlike v stopnji vnetja, povzročene z različnimi vrstami gliv (Dahl, 1993 in 1994).

Poleg vloge pri razgradnji strukturnih proteinov poroženele plasti gostitelja imajo dermatofitne peptidaze škodljiv vpliv tudi na imunski sistem – lahko aktivirajo druge gostiteljske proteaze ali inaktivirajo njihove inhibitorje in druge biološke peptide (Monod s sod., 2002).

Prva stopnja pri okužbi z dermatofiti je aderenza gliv na površino gostitelja. Zelo malo je znanega o dejavnikih, ki omogočajo ta proces. Poleg že omenjenih adhezinov (poglavje 2.1.2) lahko pri tem procesu sodelujejo tudi različne vrste dermatofitnih peptidaz. Najrazličnejše proteaze služijo dermatofitom tudi za razgradnjo keratina v oligopeptide in aminokislino za asimilacijo. Mehanizmi, s katerimi glive bodisi sprožijo ali zavrejo ekspresijo določenih proteaz, še niso povsem razjasnjeni. Stikalo, s katerim glive sprožijo aktivacijo genov na podlagi hranil, ki so na razpolago, je najverjetneje pod nadzorom transkripcijskega dejavnika iz družine GATA. Tako npr. produkti genov *areA* in *nit-2* iz vrst *Aspergillus nidulans* in *Neurospora crassa* sprožijo sintezo različnih encimov in permeaz, med njimi tudi zunajceličnih peptidaz. Pri nekaj patogenih glivah ljudi in rastlin so bili produkti genov *areA* in *nit-2* dokazano vpleteni v patogenost.

Po okužbi z dermatofiti so poškodbe na koži lahko tudi posledica drugih dejavnikov, ne le neposrednega delovanja glivnih litičnih encimov. Lahko se namreč aktivirajo tudi gostiteljske peptidaze, poleg tega pa ob dermatofitni okužbi pojavijo strukturne in funkcionalne spremembe same epidermalne bariere.

Različni mehanizmi, ki jih imajo dermatofiti na voljo pri soočanju z imunskim sistemom gostitelja ali povzročitvi poškodb prek vnetnih procesov, so bili že predstavljeni v poglavjih 2.1.2 in 2.1.3. Podrobneje bi predstavili le različno izražanje peptidaz. Vzorec peptidaz, ki jih dermatofiti izločajo, je najbrž pomemben pri procesih nastanka imunosti in vnetja. Intenzivnost vnetne reakcije je namreč odvisna od globine poškodb, nastalih zaradi delovanja dermatofitnih proteaz ob okužbi. Peptidaze pa imajo tudi specifične imunogene lastnosti; za nekatere od njih (npr. subtilizin 3 in metaloproteaza 3 iz *M. canis*) je bilo dokazano, da lahko sprožijo specifičen imunski odziv. Dve drugi proteazi, subtilizin Tri r 2 iz *T. rubrum* in dipeptidil-peptidaza Tri t 4 iz *T. tonsurans*, lahko sprožita dvojni imunski odgovor – pozno ali takojšnjo preobčutljivost. Nekatere izločene dermatofitne peptidaze pa lahko neposredno delujejo na imunske mediatorje, kot je bilo dokazano za DppIV (Vermout s sod., 2008).

O dokazanem izločanju inhibitorjev proteaz iz dermatofitne glive poroča Mihelčič (2003). V delu opisuje delno karakterizacijo proteinskega in neproteinskega inhibitorja cisteinskih proteaz, izoliranih iz citosolnega ekstrakta glive *Microsporum canis*. Molekulska masa proteinskega inhibitorja je 28 kDa, inhibira pa delovanje papaina in katepsina B, ne pa tudi katepsinov H in L. Nizkomolekularni inhibitor zavira delovanje papaina, katepsinov B in L, ne pa tudi katepsina H.

3 UTEMELJITEV DELA

Obstoj peptidaznih inhibitorjev je bil dokazan že pri več vrstah tako patogenih kot nepatogenih gliv. Iz celičnega ekstrakta, pridobljenega z dezintegracijo micelija *Microsporum canis*, sta bila izolirana in delno okarakterizirana proteinski in peptidni inhibitor cisteinskih proteaz (Mihelčič, 2003). Ker v literaturi nismo zasledili podatkov o lastnostih in vlogi peptidaznih inhibitorjev pri sorodnem dermatofitu *T. mentagrophytes*, je bil cilj pričujočega raziskovalnega dela boljše preučiti omenjeno glivo in njene inhibitorje cisteinskih peptidaz.

Apoptoza lahko modulira delovanje obrambnega sistema proti patogenim organizmom. Ti lahko bodisi sprožijo apoptozo imunskih celic in se tako izognejo prepoznavi z njimi bodisi zavrejo apoptozo, npr. makrofagov, in se tako izognejo uničenju (Allen in Deepe Jr., 2005). Ker je neproteinski (peptidni) inhibitor iz glive *T. mentagrophytes* zavrl delovanje katepsinov, ki so dokazano vpleteni v delovanje imunskega sistema, smo želeli preveriti predvsem njegov učinek na predstavljanje antigenov ter celično proliferacijo in apoptozo.

3.1 Hipoteze

V okviru našega raziskovalnega programa smo želeli preveriti naslednje hipoteze:

- **1. hipoteza:** gliva *T. mentagrophytes* proizvaja in v gojišče izloča proteinske in neproteinske (peptidne) inhibitorje cisteinskih peptidaz. Inhibitorji imajo določene lastnosti, ki jih pogojuje njihova primarna struktura. Ta izkazuje različno stopnjo homologije v aminokislinskem zaporedju z inhibitorji sorodnih predstavnikov debla gliv.
- **2. hipoteza:** glivni proteinski inhibitor zaradi svoje imunogene narave pri gostitelju izzove nastanek specifičnih protiteles.
- **3. hipoteza:** neproteinski inhibitorji cisteinskih peptidaz iz glive *T. mentagrophytes* prek inhibicije katepsinov B, H in L prizadenejo procesiranje in od molekul MHC II odvisno predstavljanje antigenov ter vplivajo na proliferativne in apoptotične procese imunskih celic.

3.2 Namen dela

Raziskovalno delo je pripomoglo k izolaciji, identifikaciji in karakterizaciji proteinskih in neproteinskih inhibitorjev cisteinskih peptidaz glive *T. mentagrophytes*. Razjasnjena struktura izoliranih glivnih inhibitorjev cisteinskih peptidaz bi lahko služila kot osnova za izdelavo sintetičnega inhibitorja, uporabnega v terapevtske namene za preprečevanje bolezni, povezanih z okvarami ali s spremenjenim izražanjem peptidaz.

Z rezultati našega raziskovalnega dela smo poskušali razjasniti vpliv inhibitorjev cisteinskih peptidaz na procesiranje in predstavljanje antigenov ter apoptozo imunskih celic gostitelja. Dobljena spoznanja bodo v pomoč pri nadaljnjih raziskavah o mehanizmih imunskega odziva pri okužbi z dermatofiti in vlogi identificiranih vrstno specifičnih proteinov in metabolitov v tem procesu.

4 MATERIAL IN METODE

4.1 Gojišča in gojenje glive *Trichophyton mentagrophytes*

Izolat glive *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes*) smo gojili na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Gliva je bila izolirana s klasičnimi mikološkimi metodami med rutinskimi diagnostičnimi preiskavami z dlak kuncev, okuženih s *T. mentagrophytes*. Identifikacija dermatofita je temeljila na makroskopskih in mikroskopskih morfoloških lastnostih kulture.

Glivo smo 14 do 21 dni gojili pri 26 °C na trdnem gojišču (Dermasel agar, Oxoid LTD, Basingstoke). Gojišče s pH 5,6 je vsebovalo pepton (10 g/L), glukozo (40 g/L) in agar (15 g/L). Nato smo 1 cm² kolonij na trdnem gojišču prenesli v liter tekočega Sabouraudejevega gojišča (Oxoid LTD, Basingstoke). To je imelo pH 5,7 in je vsebovalo kazein (5 g/L), razgrajeno sveže meso (5 g/L) in glukozo (20 g/L). Kulturo smo z rahlim stresanjem inkubirali še 10 dni pri isti temperaturi. Med rastjo glive smo spremljali čistost kulture ter morebitno bakterijsko kontaminacijo.

4.1.1 Ločevanje proteinskega in neproteinskega inhibitorja cisteinskih peptidaz iz gojišča glive

Za ločevanje proteinskega od neproteinskega inhibitorja cisteinskih peptidaz smo gojišče glive *T. mentagrophytes* ultrafiltrirali v koncentradorju, katerega membrana prepušča molekule z molekulsko maso, ki je manjša od 3.000 Da.

Po 10 dneh rasti glive smo gojišče ultrafiltrirali pri 3000 vrt./min in 4 °C v koncentradorju Centriprep YM-3 (Amicon). Po eni uri centrifugiranja smo odvzeli vzorec retenta (R0) in filtrata (F0). Omenjeni postopek smo ponovili 10-krat, s tem da smo retentatu vsakič dodali 50 mM pufer Tris/HCl s pH 7,4, ki je vseboval 0,5 M NaCl. Tako smo iz retentata izrinili neproteinske inhibitorje, saj so ti med ultrafiltracijo prehajali skozi pore membrane v filtrat. Inhibitorno aktivnost retentatov in filtratov proti papainu smo izmerili, kot je opisano pod točko 4.6.1.

4.2 Izolacija proteinskega inhibitorja

Izolacija proteinskega inhibitorja iz citosola glive *T. mentagrophytes* je vključevala afinitetno in ionsko izmenjevalno kromatografijo, ki ji je sledila še tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (RP-HPLC).

4.2.1 Priprava citosolnega ekstrakta glive *T. mentagrophytes*

Micelij glive *T. mentagrophytes*, pridobljen v tekočem gojišču, smo sprali s 50 mM pufrom Tris/HCl s pH 7,4 in dodatkom 0,5 M NaCl ter ga s tekočim dušikom večkrat zamrznili in nato odmrznili. Sledilo je mehansko razbijanje micelija z drobljenjem zamrznjenega micelija v terilnici, nato še z uporabo ultrazvoka – 10-krat po 30 sekund pri 20 kHz in 220 W z vmesnim hlajenjem na ledu (Sonicator XL2020, Misonix). Da bi odstranili ostanke celic in njihovih sten, smo dobljeni glivni homogenat 20 minut centrifugirali pri $1.000 \times g$ in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (centrifuga Universal 32-R, Hettich), nato še 1 uro pri $25.000 \times g$ (ultracentrifuga Beckmann, Avanti J-301; rotor JM-30-50). Dobljeni supernatant smo filtrirali skozi filter $0,2\text{ }\mu\text{m}$ (Minisart, Sartorius) in ga do uporabe zamrznili pri -20 ali $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.2 Določanje koncentracije proteinov

Koncentracijo proteinov v celičnem ekstraktu dermatofita *T. mentagrophytes* smo določali z metodo po Bradfordu (Bradford, 1976). Uporabili smo komercialni test za določanje koncentracije proteinov (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad). V $50\text{ }\mu\text{L}$ glivnega citosolnega ekstrakta smo dodali $2,5\text{ mL}$ barvnega reagenta, ki smo ga pripravili z redčenjem komercialnega reagenta (Dye Reagent Concentrat, Bio-Rad) z 2-krat destilirano vodo v razmerju 1 : 5 (v : v). Po 10-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo izmerili absorbanco vzorcev pri 595 nm s spektrofotometrom (UV-/VIS-spektrofotometer Lambda 12, Perkin Elmer). Koncentracijo proteinov smo odčitali iz umeritvene krivulje, ki smo si jo predhodno pripravili s standardno raztopino govejega serumskega albumina (Bio-Rad Protein Assay Standard II, Bio-Rad). Koncentracije standardnih raztopin so bile od $0,1$ do $1,4\text{ mg/mL}$. Aparaturo smo pred začetkom merjenja umerili z $0,01\text{ M}$ pufrom PBS, pH 7,2, ki smo ga uporabili tudi za redčenje osnovne raztopine standarda.

4.2.3 Afinitetna kromatografija na koloni CM-papain Sepharose 4B

4.2.3.1 Priprava kolone CM-papain Sepharose 4B

Afinitetno kolono smo pripravili po navodilih proizvajalca (Amersham Pharmacia Biotech). 2,5 g sefaroze 4B, aktivirane s cianogen bromidom (CNBr), smo 15 minut namakali v 1 mM HCl s pH 3, da je nabreknila. Dobljeno suspenzijo smo prelili v nučo in jo sprali z 1 mM HCl, nato pa še z 0,2 M karbonatnim pufrom s pH 8,7, ki je vseboval 0,5 M NaCl. Gel smo prenesli v plastično centrifugirko, v kateri smo predhodno v istem pufru raztopili 60 mg papaina (Sigma). Mešanico smo pri sobni temperaturi na stresalniku stresali 2 uri, nato pa jo prenesli v nučo, kjer smo jo nekajkrat sprali z 0,2 M glicinskim pufrom s pH 8,0. Suspenzijo smo prenesli v centrifugirko in jo v istem pufru zopet 2 uri stresali na stresalniku. Vsebino centrifugirke smo prenesli v nučo in gel 6-krat izmenično sprali z 0,1 M acetatnim pufrom s pH 4,0, ki je vseboval 0,5 M NaCl, ter z 0,2 M karbonatnim pufrom s pH 8,7, ki je vseboval 0,5 M NaCl. Gel smo nato sprali z 0,1 M fosfatnim pufrom s pH 6,0, ki je vseboval 1,5 mM EDTA in ga prenesli v centrifugirko ter dodali aktivator – 2 mM cistein v fosfatnem pufru. Centrifugirko smo za 10 minut namestili na stresalnik, nato pa mu dodali inaktivator – jodocetno kislino v fosfatnem pufru s končno koncentracijo 10 mM. Tako pripravljen gel smo prenesli v kolono mer 3 × 21 cm in ga sprali s 50 mM pufrom Tris/HCl s pH 7,4, ki je vseboval 0,5 M NaCl. Kolono smo shranjevali v hladilniku pri 4 °C, v istem pufru z dodanim natrijevim azidom (NaN₃) v končni koncentraciji 20 milimol/L.

4.2.3.2 Afinitetna kromatografija

Pred začetkom kromatografije smo kolono uravnotežili s 50 mM pufrom Tris/HCl s pH 7,4, ki je vseboval 0,5 M NaCl. Na kolono smo zatem previdno nanesti približno 500 mL citosolnega ekstrakta glive *T. mentagrophytes*, ki smo mu predhodno uravnali pH na 7,4. Vezane proteine smo eluirali z 10 mM NaOH s pH 12, in jih lovili v epruvete po 3 mL. Eluatom v epruveti smo z dodatkom HCl uravnali pH na 7,4 ter izmerili absorbanco pri 280 nm. Eluiranje smo končali, ko se je vrednost absorbance približala ničli. Frakcijam smo izmerili inhibitorno aktivnost proti papainu. Frakcije z vsaj 75-odstotno inhibicijo smo združili in skoncentrirali v vakuumu (Speed Vac, Savant).

4.2.4 Ionsko izmenjevalna kromatografija na CIM-disku

Skoncentrirane frakcije, dobljene po afinitetni kromatografiji, smo nanesti na monolitiski anionsko izmenjevalni kromatografski nosilec CIM QA s premerom 12 mm in z debelino 3 mm (Bia Separations), ki smo ga uravnotežili z 20 mM pufrom Tris/HCl s pH 8,0. Vezane proteine smo eluirali z NaCl v pufru Tris/HCl s pH 8,0 z linearnim gradientom od 0 do 1 M, pri pretoku 1,0 mLmin⁻¹. Elucijo proteinov smo spremljali z merjenjem

absorbance pri 280 nm. Ulovljene proteine z inhibitorno aktivnostjo smo koncentrirali v vakuumu (Speed Vac, Savant) in dokončno očistili s pomočjo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (RP-HPLC).

4.2.5 RP-HPLC

Vzorci proteinov, pridobljenih s pomočjo afinitetne in ionsko izmenjevalne kromatografije z vsaj 75-odstotno inhibitorno aktivnostjo proti papainu, smo nanesti na kolono Brownlee Aquapore Bu-300 mer $30 \times 4,6$ mm, ki smo jo uravnovežili z 0,1-odstotno (v : v) trifluoroacetno kislino (TFA). Kolono smo eluirali s 30-minutnim linearnim gradientom od 0 do 80 % (v : v) acetonitrila in 0,1-odstotno TFA, pri pretoku $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$. Elucijo proteinov smo spremljali z merjenjem absorbance pri 215 nm.

4.3 Karakterizacija proteinskega inhibitorja

4.3.1 NaDS-PAGE

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo z natrijevim dodecilsulfatom (NaDS-PAGE) smo izvedli po Laemmlijevi metodi. Uporabili smo jo za spremljanje čistosti inhibitorja med postopki izolacije ter za določanje molekulske mase izoliranega glavnega inhibitorja. Izvedli smo jo na vertikalnem elektroforeznem aparatu mini-Protean (Bio-Rad).

Najprej smo pripravili ločitveni poliakrilamidni gel z 12-odstotno zamreženostjo:

4,35 mL 2-krat destilirane vode
2,5 mL 1,5 M pufra Tris-HCl s pH 8,8
100 μL 10-odstotnega (w : v) NaDs
3,0 mL 40-odstotnega akrilamida (Bio-Rad)

Po 5-minutnem degaziranju v ultrazvočni kopeli (Iskra) smo mešanici dodali 50 μL 10-odstotnega (w : v) sveže pripravljene amonijevega persulfata (APS, Bio-Rad) in 5 μL TEMED-a (tetrametilendiamin, Bio-Rad). Raztopino smo vlili v model za pripravo gelov, nadplastili z 2-krat destilirano vodo in pustili polimerizirati vsaj 45 minut na sobni temperaturi. Po končani polimerizaciji smo 2-krat destilirano vodo odstranili in pripravili koncentracijski gel s 4-odstotno zamreženostjo:

3,18 mL 2-krat destilirane vode
1,26 mL 0,5 M pufra Tris-HCl s pH 6,8

50 μ L 10-odstotnega (w:v) NaDS
0,5 mL 40-odstotnega akrilamida (Bio-Rad)

Po 5-minutnem degaziranju v ultrazvočni kopeli (Iskra) smo mešanici dodali 25 μ L 10-odstotnega (w : v) APS in 5 μ L TEMED-a. Ob vlivanju pripravljene raztopine v model smo vstavili glavniček, s katerim smo naredili žepke za nanos vzorcev. Gel je na sobni temperaturi polimeriziral 30 minut.

Vzorce (celični ekstrakt glive *T. mentagrophytes*, inhibitorne frakcije na posameznih stopnjah izolacije) smo pred nanosom na elektroforetski gel zmešali v razmerju 1 : 1 (v : v) z Laemmlijevim pufrom z NaDS (50 mM Tris/HCl, pH 6,8 s 4 % (w : v) NaDS, 20 % (v : v) glicerola, 10 % (v : v) 2-merkaptetanola in 0,04 % (w : v) barvila bromofenol modro) ter jih 5 minut inkubirali v vreli vodni kopeli. Na gel smo nanесли po 5 μ L vzorca ali standarda. Kot standard za določanje molekulskih mas proteinov smo uporabili PageRuler (Prestained Protein Ladder, Fermentas). Ta je vseboval mešanico desetih rekombinantnih obarvanih proteinov z molekulskimi masami od 11 do 170 kDa. Ploščo z gelom smo vstavili v elektroforezno celico in jo napolnili s pufrom Tris/HCl s pH 8,3, ki je vseboval NaDS in glicin. Elektroforeza je potekala 45 minut pri stalni napetosti 200 V. Po končani elektroforezi smo odstranili koncentracijski gel, ločene proteine pa smo obarvali s srebrom po metodi Nesterenko (Nesterenko s sod., 1994).

Korak^a:	Raztopina:	Čas:
Fiksacija	60 mL 50-odstotnega acetona v 2-krat destilirani vodi, 1,5 mL 50-odstotne TCA v 2-krat destilirani vodi, 25 μ L 37-odstotne HCHO	5 min
Splakovanje	2-krat destilirana voda	3 \times 5 s
Spiranje	2-krat destilirana voda	5 min
Splakovanje	2-krat destilirana voda	3 \times 5 s
Predtretiranje	60 mL 50-odstotnega acetona v 2-krat destilirani vodi	5 min
Predtretiranje	100 μ L 10-odstotnega Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O v 2-krat destilirani vodi, 60 mL 2-krat destilirane vode	1 min
Splakovanje	2-krat destilirana voda	3 \times 5 s
Impregnacija	0,8 mL 20-odstotnega AgNO ₃ v 2-krat destilirani vodi (shranjeno v temi), 0,6 mL 37-odstotne HCHO, 60 mL 2-krat destilirane vode	8 min
Splakovanje	2-krat destilirana voda	3 \times 5 s
Razvijanje	1,2 g Na ₂ CO ₃ , 25 μ L 37-odstotne HCHO, 25 μ L 10-odstotnega Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O v 2-krat destilirani vodi, 60 mL 2-krat destilirane vode	10 – 20 s
Prekinitiv	1-odstotna ledocetna kislina v 2-krat destilirani vodi	30 s
Splakovanje	2-krat destilirana voda	10 s

^aVsi koraki se izvajajo na stresalniku pri sobni temperaturi.

Za barvanje gelov z briljantnim modrilom smo gel 20 do 30 minut inkubirali v raztopini 2-destilirane vode, ki je vsebovala 40 % (v : v) metanola, 10 % (v : v) očetne kisline in 0,1 % (w : v) barvila Comassie Blue R-250 (Bio-Rad). Gel smo nato prenesli v raztopino za razbarvanje – 2-krat destilirano vodo s 40 % (v : v) metanola in 10 % (v : v) očetne kisline. Raztopino smo večkrat zamenjali, dokler se ni ozadje gelov razbarvalo, proteinske lise pa postale lepo vidne.

Gele z obarvanimi proteini smo vrstično preslikali (skenirali) z navadnim računalniškim skenerjem pri visoki ločljivosti.

4.3.2 Imunokemijske raziskave

Metodo imunskega odtisa (angl. Immunoblot) smo uporabili, da bi ugotovili, ali serumi kuncev, obolelih za trihofitozo, vsebujejo protitelesa proti inhibitorju cisteinskih peptidaz, ki ga sintetizira dermatofit *T. mentagrophytes*.

4.3.2.1 Zbiranje in priprava vzorcev serumov kuncev

Pozitivni serum je bil pridobljen iz kuncev, naravno okuženih z glivo *T. mentagrophytes*. Pri živalih iz farmske reje je bila klinična diagnoza potrjena z mikroskopsko preiskavo dlak in izolacijo glive na plošči agarja (Dermasel, Oxoid) po 14-dnevni inkubaciji. Preiskavo so opravili na Inštitutu za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Za negativno kontrolo smo uporabili serume kuncev iz nadzorovane reje brez klinično zaznavnih sprememb.

Živalim smo iz ušesne vene odvzeli 1 do 2 mL krvi, jo pustili koagulirati na sobni temperaturi in jo nato centrifugirali 15 minut pri 3.500 vrt./min. Dobljene serume smo alikvotirali in shranili pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3.2.2 Imunski odtis

Po končani elektroforezi NaDS-PAGE smo izolirani proteinski inhibitor z elektroelucijo iz poliakrilamidnega gela prenesli na polivinilidendifluoridno membrano (PVDF, Immobilon-P, Millipore). Prenos v elektroelucijski celici (Bio-Rad) je potekal 45 minut pri stalni napetosti 100 V. Pri tem smo uporabili z ledom hlajen pufer, ki je vseboval 3,03 g Trisa, 14,4 g glicina in 200 mL metanola na 1 L raztopine. Po prenosu proteinov smo nezasedena mesta na membrani, kamor bi se lahko nespecifično vezala protitelesa, blokirali z inkubacijo membrane čez noč, pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 2-odstotni (w : v) raztopini Tween₂₀ v pufru PBS. Membrano smo nato trikrat po 5 minut spirali z 0,05-odstotnim (w : v) Tween₂₀ v pufru PBS. Sledila je inkubacija membran v raztopini pozitivnih ali negativnih serumov kuncev, redčenih 1 : 200 (v : v) s pufrom PBS s 3 % govejega serumskega albumina (BSA) in 0,05 % Tween₂₀. Inkubacija membran je

potekala na sobni temperaturi 1,5 ure, ob rahlem stresanju. Nevezana protitelesa smo sprali z 0,05-odstotnim (w:v) Tween₂₀ v puftru PBS 3-krat po 5 minut. Membrane smo nato 1 uro pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju inkubirali z raztopino sekundarnih protiteles. Kozja protitelesa proti kunčjim protitelesom IgG, konjugirana z hrenovo peroksidazo (Jackson Immunoresearch) so bila redčena 1 : 750 (v : v) s pufrom PBS s 3 % govejega serumskega albumina (BSA) in 0,05 % Tween₂₀. Da bi postali kompleksi antigenov s protitelesi vidni, smo uporabili substrat 3-amino-9-etil-karbazol (Sigma). 1,34 mL koncentrirane raztopine aminoetilkarbazola smo dodali 20 mL 0,1 M acetatnega pufrs s pH 5,2 in 20 µL 30-odstotnega (v : v) H₂O₂. Membrane smo v tako pripravljeno raztopino razvijali do obarvanja, nato pa jih prenesli v 2-krat destilirano vodo. Membrane smo posušili na zraku in jih vrstično preslikali (GS-700 Imaging Densitometer, Bio-Rad).

4.3.3 Določanje aminokislinskega zaporedja

Za določanje aminokislinskega zaporedja izolirane nizkomolekularne in visokomolekularne oblike inhibitorja cisteinskih peptidaz, izoliranega iz glive *T. mentagrophytes*, smo uporabili metodo določanja zaporedja (sekvenciranja) z razgradnjo po Edmanu (Edman, 1949).

4.3.3.1 Odstranjevanje N-terminalne blokade

Da bi pred sekveniranjem odstranili blokado na N-koncu inhibitorja, smo tega encimsko razgradili z β-tripsinom, himotripsinom ter s proteazo V-8 iz bakterije *Staphylococcus aureus*. Vzorce inhibitorja smo pred začetkom razgradnje 5 minut segrevali v mikrovalovni pečici. Vse tri razgradnje so potekale v reakcijski mešanici s končnim volumnom 100 µL. Razgradnjo smo prekinili z dodatkom 500 µL 0,1-odstotne (v : v) TFA. Na koncu smo poskusili še z razgradnjo v raztopini TFA in metanola.

4.3.3.1.1 Razgradnja z β-tripsinom

Hidroliza z β-tripsinom je potekala 2 uri pri 37 °C v 0,1 M puftru z N-metilmorfolinom s pH 8,2. 1 µL raztopine β-tripsina s koncentracijo 0,1 µg/µL smo dodajali vsakih 30 minut.

4.3.3.1.2 Razgradnja s himotripsinom

Proteolitična razgradnja s himotripsinom je potekala 1,5 ure v 75 mM puftru HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetsulfonska kislina) s pH 8,2 in z dodatkom 1,5 M NaCl, pri 37 °C. 1 µL raztopine himotripsina s koncentracijo 0,1 µg/µL smo dodajali vsakih 30 minut.

4.3.3.1.3 Razgradnja z V-8

Proteinski inhibitor smo razgrajevali s proteazo V-8 v 0,1 M natrijevem fosfatnem pufru s 4 M ureo, pH 7,8. Dodali smo 1 μL raztopine V-8 s koncentracijo 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Razgradnja pri 37 °C je potekala 24 ur.

4.3.3.1.4 Razgradnja s TFA

Deblokada ostanka na N-koncu v raztopini TFA in metanola v razmerju 1 : 1 (v : v) je potekala, kot je opisano (Gheorghe s sod., 1997). Vzorce smo na sobni temperaturi inkubirali tri dni.

4.3.3.2 RP-HPLC

Hidrolizate inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes*, pridobljene po zgoraj opisanih postopkih, smo najprej ločili s pomočjo RP-HPLC. Uporabili smo kolono C(18) Chrompack (100 \times 3 mm), ki smo jo najprej uravnotežili z 0,1-odstotno (v : v) TFA v 2-krat destilirani vodi. Peptide smo pri pretoku 1 mLmin⁻¹ eluirali 40 minut z linearnim gradientom od 0 do 60 % (v : v) acetonitrila in 0,1 % (v : v) TFA v 2-krat destilirani vodi. Posamezne vrhove smo ločeno zbirali.

4.3.3.3 Sekveniranje

N-končna zaporedja peptidov, ki smo jih pridobili po zgoraj opisanih postopkih razgradnje in jih ločili z RP-HPLC, smo določili z avtomatskim sekvenatorjem (Procise 492A Automated Sequencing System, Applied Biosystems).

4.3.3.4 Iskanje homologije

Za iskanje podobnosti v aminokislinskem zaporedju med izoliranim glivnim inhibitorjem in drugimi znanimi inhibitorji oz. proteini, smo dobljena zaporedja primerjali znotraj baze neredundantnih proteinskih zaporedij, pri čemer smo uporabili algoritem blastp (protein-protein) pri NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

4.4 Izolacija neproteinskega inhibitorja

Za izolacijo peptidnega inhibitorja iz citosola dermatofita *T. mentagrophytes* smo uporabili ionsko izmenjevalno kromatografijo, ki ji je sledila tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (RP-HPLC).

4.4.1 Priprava citosolnega ekstrakta glive *T. mentagrophytes*

Priprava celičnega homogenata je bila enaka tisti, ki je opisana pod točko 4.2.1, s to razliko, da smo glivni micelij pred zamrzovanjem sprali z ultra čisto vodo (ELGA Water Systems). Po ultracentrifugiranju (1 ura pri $25.000 \times g$) smo dobljeni supernatant ultrafiltrirali skozi koncentrador Centriprep YM-3, z velikostjo por 3.000 Da (Amicon, Millipore). S tem smo odstranili proteine in druge visokomolekularne snovi.

4.4.2 Anionsko izmenjevalna kromatografija na SPE-koloni

Po ultrafiltraciji smo pH dobljenega filtrata popravili na 8 in ga približno 10 mL nanesli na šibko anionsko izmenjevalno kolono SPE (Strata X-AW, $33 \mu\text{m}$, $200 \text{ mg}/3 \text{ mL}$, Phenomenex). Kolono smo pred tem kondicionirali s 3 mL metanola in jo nato uravnotežili s 3 mL ultra čiste vode. Po spiranju z ultra čisto vodo in nato še z metanolom smo inhibitor eluirali z 0,4-odstotno (v : v) TFA v metanolu. Frakcijo smo posušili do suhega s prepihanjem z dušikom, ter jo raztopili v v ultra čisti vodi z 10 % (v : v) metanola in 0,1 % (v : v) TFA.

4.4.3 RP-HPLC

Vzorec po anionsko izmenjevalni kromatografiji smo nanesli na kolono Luna (C(18), $5 \mu\text{m}$, $250 \times 4,6 \text{ mm}$, Phenomenex). Kot mobilno fazo smo uporabili ultra čisto vodo z 10 % (v : v) metanola in 0,1 % (v : v) TFA. Na kolono smo nanašali po $100 \mu\text{L}$ vzorca. Elucijo kolone pri pretoku $1,1 \text{ mLmin}^{-1}$ in sobni temperaturi smo spremljali z merjenjem absorpcije ločenih komponent pri 205 nm. Posamezne vrhove smo zbirali v ependorfke. Frakcije z inhibitorno aktivnostjo proti papainu smo združili in jih posušili v vakuumu (Speed Vac, Savant). Shranili smo jih pri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

4.5 Karakterizacija neproteinskega inhibitorja

4.5.1 HPLC-DAD

Za frakcije z največjo inhibitorno aktivnostjo proti papainu, zbrane po ločbi RP-HPLC, smo uporabili detekcijo z diodnim nizom (Varian). Kolona, mobilna faza in pogoji elucije so bili enaki opisanim pod točko 4.4.3. Elucijo smo spremljali z merjenjem absorbance od 200 do 400 ali 800 nm.

4.5.2 Temperaturna stabilnost

Vpliv temperature na obstojnost glivnega inhibitorja smo določali z inkubiranjem konstantne količine inhibitorja v 0,1 M fosfatnem pufru s pH 6,0, z dodatkom 1,5 mM EDTA pri temperaturi 30, 50, 70 ali 90 °C. Čas inkubacije pri posamezni temperaturi je bil 30 ali 60 minut. Inkubacijo smo prekinili s hlajenjem vzorcev na ledu. Preostalo inhibitorno aktivnost proti papainu smo pomerili, kot je opisano pod točko 4.6.1.

4.5.3 pH-stabilnost

Za določanje pH-stabilnosti smo konstantno količino inhibitorja 30 ali 60 minut inkubirali v pufrih s pH 2, 4, 6, 8, 10 ali 12 pri temperaturi 37 °C. Reakcijo smo prekinili s hlajenjem vzorcev na ledu. pH raztopine smo uravnali na 6,0, preostalo inhibitorno aktivnost proti papainu pa pomerili, kot je opisano pod točko 4.6.1.

4.5.4 Masna analiza

Molekulska masa glivnih peptidnih inhibitorjev smo določili s kombinacijo tekočinske kromatografije in masne spektrometrije z ionizacijo z elektrorazprševanjem (LC/ESI, Micromass quattro micro TMAPI, Walters).

4.6 Določanje inhibicije encimske aktivnosti

Za določanje inhibitorne aktivnosti frakcij med posameznimi postopki izolacije ter čistih izoliranih inhibitorjev smo uporabili papain. Inhibitorno aktivnost čistih tako proteinskih kot peptidnih inhibitorjev pa smo ugotavljali še s katepsinom B, L in H ter s serinsko peptidazo tripsinom.

Encimsko aktivnost smo določali z uporabo specifičnih sintetičnih kromogenih substratov; spektrofotometrično smo izmerili absorbanco produktov, nastalih pri reakciji. Inhibitorno aktivnost smo izražali z odstotkom inhibicije, pri čemer smo aktivnost inhibiranega encima (inkubiranega z inhibitorno frakcijo ali s čistim inhibitorjem) primerjali z aktivnostjo neinhibiranega encima. Za 100-odstotno encimsko aktivnost smo torej vzeli absorbanco produktov, nastalih pri reakciji brez dodanih inhibitorjev.

4.6.1 Merjenje inhibicije papaina

Inhibicijo papaina smo merili z modificirano metodo po Baretu (Barett, 1972). Uporabili smo encim papain iz lateksa papaje (E.C.3.4.22.2, Sigma) ter sintetični substrat BANA (Sigma). Pri hidrolizi le-tega se sprošča 2-naftilamin, ki se veže na barvni reagent 4-diazo-2,3 dimetilazobenzen, s čimer nastane rdeče obarvan produkt, katerega absorbanco lahko izmerimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 520 nm.

Pri merjenju inhibicije v kivetah smo 100 μ L inhibitorja dodali 250 μ L mešanice papaina (20 μ g/mL) in L-cisteina (5 mM, Sigma) v 0,1 M fosfatnem pufru s pH 6,0, ki je vseboval 1,5 mM EDTA. Mešanico papaina in cisteina smo predinkubirali 5 minut pri sobni temperaturi, celotno mešanico (z dodanim inhibitorjem) pa še 5 minut pri sobni temperaturi ter nato 5 minut pri 37 °C. Slepemu vzorcu in negativni kontroli smo dodali le cistein. Vsem vzorcem smo nato dodali 25 μ L 0,03 M BANA (66,0 mg BANA/5 mL DMSO, Merck). Po 10-minutni inkubaciji pri 37 °C smo reakcijo prekinili z dodatkom 500 μ L reagenta za pripajanje, ki je bil sestavljen iz mešanice (1 : 1, v : v) 10 mM 4-klormerkurijbenzojeve kisline z dodatkom 50 mM EDTA, pH 6,0, in barvnega reagenta (6,0 mg Fast Garnet GBC soli v 20 mL 4-odstotnega Brija 35 (vse kemikalije Sigma)). Absorbanco pri 520 nm smo pomerili v zožanih plastičnih kivetah s spektrofotometrom (Lambda 12, Perkin Elmer).

Za merjenje inhibicije v mikrotitrskih ploščah s 96 vdolbinicami (Costar) smo zgoraj omenjeni protokol prilagodili. V vdolbinico smo odpipetirali 20 μ L inhibitorja, ki smo mu dodali 60 μ L mešanice papaina (s končno maso 0,2 μ g) in cisteina (končna koncentracija 1,0 mM) v 0,1 M fosfatnem pufru s pH 6,0, ki je vseboval 1,5 mM EDTA. Po 10-minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo dodali 20 μ L 6,0 mM BANA v DMSO in mešanico inkubirali še 10 minut pri 37 °C. Dodali smo 100 μ L reagenta za pripajanje in pomerili absorbanco pri 492 nm s čitalnikom za mikrotitrne plošče (Rosys Anthos reader 2010, Anthos Labtec Instruments Ges. M. b. H.).

4.6.2 Merjenje inhibicije katepsina B

Pri testiranju inhibicije katepsina B smo uporabili encim katepsin B iz goveje vranice (E.C.3.4.22.1, Sigma) in substrat Z-Phe-Arg-PNA·HCl (Bachem). Pri razgradnji substrata se sprošča p-nitrofenol, ki je obarvan rumeno. Za izvedbo testa smo 350 μ L frakcije inhibitorja 5 minut predinkubirali pri 37 °C z encimom (100 μ g/mL v 0,05 M fosfatnem pufru z dodatkom 1,0 mM EDTA, pH 5,5) in 5 mM L-cisteinom (Sigma). Nato smo dodali 100 μ L Z-Phe-Arg-PNA·HCl (2 mg/mL) in mešanico inkubirali 10 minut pri 37 °C. Po tem času smo reakcijo prekinili z dodatkom 2,0 mL 1,2 mM jodocetne kisline (Sigma) in s spektrofotometrom (Lambda 12, Perkin Elmer) pomerili absorbanco pri 410 nm.

4.6.3 Merjenje inhibicije katepsina L

Za merjenje inhibicije katepsina L smo uporabili humani katepsin L iz jeter (E.C. 3.4.22.15, Sigma) in substrat Z-Phe-Arg-PNA·HCl (Bachem). 20 µL frakcije inhibitorja smo inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi z 12 µL encima (0,07 µg/ µL) v 0,1 M acetatnem pufru, pH 5,5 z dodatkom 1,0 mM EDTA. V mešanici je bilo tudi 8,0 µL 17,5 mM L-cisteina. Po dodatku 10 µL 217 µM Z-Phe-Arg-PNA·HCl in 10-minutni inkubaciji pri 37 °C smo reakcijo prekinili z dodatkom 100 µL jodocetne kisline. Absorbanco pri 405 nm smo pomerili s čitalnikom za mikrotitrne plošče (Rosys Anthos reader 2010, Anthos Labtec Instruments Ges. M. b. H.).

4.6.4 Merjenje inhibicije katepsina H

Pri merjenju smo uporabili humani katepsin H iz jeter (E.C. 3.4.22.16, Sigma) in substrat H-Arg-PNA (Bachem). 20 µL frakcije inhibitorja smo inkubirali 10 minut pri 37 °C s 3 µL encima (0,46 mg/mL) v 0,1 M fosfatnem pufru, pH 6,8 z dodatkom 1,0 mM EDTA in 10 mM L-cisteinom. Dodali smo 10 µL 27 mM H-Arg-PNA v metanolu (Merck). Po 20-minutni inkubaciji pri 37 °C smo reakcijo prekinili z 1,2 mM jodocetnokislino. Absorbanco pri 405 nm smo pomerili s čitalnikom za mikrotitrne plošče (Rosys Anthos reader 2010, Anthos Labtec Instruments Ges. M. b. H.).

4.6.5 Merjenje inhibicije tripsina

Za merjenje inhibitorne aktivnosti proti serinski peptidazi smo uporabili goveji tripsin (E.C.3.4.21.4) in sintetični substrat BAPNA (oboje Sigma). Inhibicijo smo ugotavljali z modificirano metodo po Erlangerju (Erlanger, 1961). 200 µL frakcije inhibitorja smo dodali 50 µL encima s koncentracijo 143 µg/mL v 0,1 M očetni kislini. Mešanico smo inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Po dodatku 750 µL 1,0 mM BAPNA v DMSO in 10-minutni inkubaciji pri 37 °C smo reakcijo prekinili z 250 µL 0,2 M HCl. Absorbanco pri 410 nm v zožanih plastičnih kivetah smo pomerili s spektrofotometrom (Lambda 12, Perkin Elmer).

4.7 Interakcija neproteinskega inhibitorja z imunskim odzivom gostitelja

Pri raziskavah smo se omejili na proučevanje treh procesov: celične proliferacije, apoptoze ter predstavljanja antigenov v sklopu molekul MHC II. V te namene smo uporabili živalski model na miših BALB/c.

4.7.1 Poskusne živali

Čeprav je dermatofit *Trichophyton mentagrophytes* glavni povzročitelj dermatofitoz pri kuncih, smo se zaradi enostavnejše oskrbe in dostopnosti živali odločili za miši. Za delo s poskusnimi živalmi smo od Ministrstva za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano – Veterinarska uprava Republike Slovenije pridobili ustrezno dovoljenje (št. 34401-38/2007/3). 12 miši vrste BALB/c smo dobili v Centru za genomiko Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Živali so bile nastanjene v standardnih kletkah na Inštitutu za fiziologijo, farmakologijo in toksikologijo Veterinarske fakultete. Podvržene so bile dnevno nočnemu ritmu 12-ih ur svetlobe in 12-ih ur teme. Mišim smo omogočili prost dostop do hrane in vode. Miši so bile ženskega spola, odrasle, stare od 92 do 98 dni, in težke od 21,1 do 25,1 g.

4.7.2 Imunizacija

Živali smo razdelili v štiri skupine. Mišim iz kontrolne skupine (skupina Kontrola) smo začetni, peti in petnajsti dan poskusa intraperitonealno (i. p.) injicirali po 300 µL fiziološke raztopine, mišim iz skupine, imenovane Inhibitor (skupina I), pa po 300 µL raztopine inhibitorja. Inhibitor smo iz citosola glive *T. mentagrophytes* izolirali z ultrafiltracijo in RP-HPLC kot je opisano v točki 4.4.3. Mišim iz skupine, imenovane Ovalbumin (skupina OVA), smo na omenjene dneve podkožno (s. c.) injicirali 300 µL ovalbumina s koncentracijo 15 µg/L (Chicken egg white, Grade V, Sigma). Mišim iz skupine, imenovane Inhibitor + Ovalbumin (skupina I+OVA) smo injicirali 300 µL glivnega inhibitorja intraperitonealno (i. p.) ter 300 µL ovalbumina s koncentracijo 15 µg/L (Sigma) podkožno (s. c.).

4.7.3 Vzorci krvi

Vzorci krvi smo odvzeli vsaki živali v skupini 29. dan poskusa. S pomočjo steklene Pasteurjeve pipete (Brand, Wertheim) smo mišim v splošni anesteziji, inducirani z mešanico ketamina (Veyx-Pharma, 1,25 mg/žival), ksilazina (Chanelle, 0,125 mg/žival) in acepromazina (Fort Dodge, 0,025 mg/žival), iz retroorbitalnega pleteža odvzeli med 200 in 500 µL krvi v epruvete z gelom za vakuumski odvzem krvi (Microtainer tubes, Becton, Dickinson and Company). Pridobljene serume smo po ločitvi od krvnega strdka s centrifugiranjem do uporabe shranili pri –20 °C.

4.7.4 Priprava mononuklearnih celic

29. dan poskusa smo živali žrtvovali v skladu s Pravilnikom o načinih usmrtitve poskusnih živalih, objavljenem v Uradnem listu Republike Slovenije, št. 140/06. Živalim

smo v aseptičnih pogojih odstranili vranico in jo shranili v mediju LCM. Pripravili smo ga tako, da smo v medij RPMI 1640 (Gibco) dodali natrijev bikarbonat s končno koncentracijo 2 g/L (NaHCO_3 , Sigma), natrijev piruvat s končno koncentracijo 0,1 g/L ($\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3\text{Na}$, Sigma), β -merkaptoetanol s končno koncentracijo 200 milimol/L (BioRad) ter fetalni goveji serum (FCS) s končno koncentracijo 10 % (v : v, Svanoclon). pH raztopine smo pred uporabo uravnali na 7,2. Vranične mononuklearne celice (limfociti B in T, makrofagi, monociti) smo pridobili s pomočjo maceracije vranice med dvema sterilnima predmetnima stekelcema. Suspenzijo celic iz vranične pulpe smo centrifugirali in usedlino za 5 minut resuspendirali v pufru ACK za lizo eritrocitov. Omenjeni pufer je vseboval 0,15 M amonijev klorid (NH_4Cl), 10 mM kalijev bikarbonat (KHCO_3) in 0,1 mM Na_2EDTA (vse kemikalije Sigma). Pufru smo pH uravnali na 7,4. Celice smo 2-krat sprali z osnovnim gojiščem za celice MEM (Gibco) in jih nato resuspendirali v mediju LCM. Celice smo prešteli v hemocitometru po Neubauerju ter jih za nadaljnje delo ustrezno razredčili.

4.7.4.1 Merjenje celične proliferacije

Za določanje proliferacije limfocitov po različni stimulaciji smo uporabili komercialni komplet (BrdU Cell Proliferation Assay, Calbiochem). To je encimskoimunski test, s katerim lahko merimo vključevanje bromodeoksiuridina (BrdU) v novo nastalo DNA aktivno delečih se celic.

Za preverjanje proliferacijske sposobnosti limfocitov smo 50 μL suspenzije vraničnih celic v koncentraciji 2×10^6 celic/mL odpipetirali v mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami (TPP). V vsako vdolbinico smo dodali še 100 μL :

- medija (RPMI 1640 in MEM, 1 : 1 (v : v)) ali
- ovalbumina s končno koncentracijo 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ali
- glivnega inhibitorja ali
- mešanice inhibitorja in ovalbumina (1 : 1 (v : v)) ali
- fitohemaglutinina s končno koncentracijo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma).

Celice stimulirane s fitohemaglutininom smo inkubirali 5, druge pa 7 dni v inkubatorju za gojenje celic, pri 37 °C, 100 % vlažnosti in v atmosferi s 5 % CO_2 . Zadnjih 24 ur inkubacije smo v vse vdolbinice dodali 20 μL BrdU (redčen 1 : 1.200 (v : v)). Po končani inkubaciji smo vsebino vdolbinic odstranili in plošče nežno popivnali s papirnatimi brisačami. Nato smo v vdolbinice dodali 200 μL raztopine za fiksiranje in denaturacijo ter plošče inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Vsebino vdolbinic smo spet odstranili in odvečno tekočino popivnali s papirnatimi brisačami. Dodali smo 100 μL raztopine primarnih mišjih protiteles proti BrdU, redčene 1 : 100 (v : v) z raztopino za razredčevanje. Po 1-urni inkubaciji pri sobni temperaturi smo vdolbinice 3-

krat sprali s pufrom za spiranje. Celicam smo dodali 100 μ L kozjih sekundarnih protiteles proti primarnim protitelesom, konjugiranih s hrenovo peroksidazo. Protitelesa so bila redčena 1 : 1.000 (v : v) z raztopino za razredčevanje konjugata in filtrirana skozi 0,2-mikronski filter. Celice smo nato inkubirali še 30 minut pri sobni temperaturi. Plošče smo po inkubaciji 3-krat sprali s pufrom za spiranje in nato še z 2-krat destilirano vodo. Plošče smo posušili in v vsako vdolbinico odpipetirali 100 μ L raztopine substrata. Celice smo inkubirali 15 minut v temi, pri sobni temperaturi. Po dodatku 100 μ L raztopine za ustavljanje reakcije smo absorbanco pri dvojni valovni dolžini 450 in 540 nm pomerili s čitalnikom za mikrotitrne plošče (Tecan, Sunrise). Meritve celične proliferacije smo izvajali v treh vzporednih ponovitvah.

4.7.4.2 Merjenje apoptoze

Za preučevanje vpliva neproteinskega inhibitorja dermatofita *T. mentagrophytes* na apoptozo v kulturi imunskih celic smo uporabili komercialni komplet (Cell Death Detection ELISA, Roche). Komplet je encimskoimunski test za kvalitativno in kvantitativno *in vitro* določanje citoplazemskih fragmentov DNA, povezanih s histoni. Temelji na vezavi protiteles proti histonom H1, H2A, H2B, H3 in H4.

Gojenje celic v mikrotitrski plošči je bilo enako zgoraj opisanemu.

Pri izvedbi testa smo se držali navodil proizvajalca. Po končani inkubaciji različno stimuliranih celic smo kulturo centrifugirali pri 200 \times g 5 minut. Supernatant smo zavrgli, usedlino pa resuspendirali v 1 mL medija MEM (Gibco). Celice smo ponovno centrifugirali 5 minut pri 1.500 \times g, usedlino pa resuspendirali v 500 μ L pufru za inkubacijo. Za dokončanje lize smo celice 30 minut inkubirali pri sobni temperaturi. Lizat celic smo centrifugirali 10 minut pri 20.000 \times g. Supernatant smo previdno odstranili in ga razredčili 1 : 1 (v : v) s pufrom za inkubacijo. V vdolbinice predpripravljene mikrotitrne plošče smo odpipetirali po 100 μ L vzorcev celičnega lizata ter plošče inkubirali 90 minut pri temperaturi 15–25 $^{\circ}$ C. Vsebino smo odstranili in luknjice 3-krat sprali s po 300 μ L raztopine za spiranje. V vdolbinice smo nato dodali 100 μ L konjugata ter plošče inkubirali 90 minut pri temperaturi 15–25 $^{\circ}$ C. Vsebino smo odstranili in luknjice ponovno 3-krat sprali s po 300 μ L raztopine za spiranje. Po dodatku 100 μ L substrata smo plošče inkubirali 25 minut na stresalniku pri sobni temperaturi. Fotometrično analizo smo izvedli s čitalnikom za mikrotitrne plošče (Tecan, Sunrise) pri valovni dolžini 405 nm. Apoptozo v vseh vzorcih lizatov stimuliranih celičnih kultur smo vedno merili v dveh vzporednih ponovitvah.

4.7.4.3 Statistična analiza podatkov

Rezultate meritev celične proliferacije in apoptoze smo statistično analizirali z računalniškim programom (GraphPad Prism). Uporabili smo metodo enosmerne testa

ANOVA, ki ji je sledil Turkeyjev primerjalni test. Rezultati so predstavljeni s povprečno vrednostjo \pm standardni odklon (SD). Statistično značilne vrednosti so bile vrednosti P, ki so bile manjše ali enake 0,05.

4.7.5 Imunokemijske raziskave

Za preučevanje vpliva neproteinskega dermatofitnega inhibitorja na predstavljanje antigenov smo uporabili metodo imunskega odtisa. Najprej smo ovalbumin razgradili z različnimi peptidazami, razgradne produkte ločili z elektroforezo NaDS-PAGE, ter jih prenesli na membrano. Kot primarna protitelesa smo uporabili serume miši iz vseh štirih zgoraj opisanih skupin (Kontrola, I, I+OVA, OVA). Kot detektorska sekundarna protitelesa smo uporabili protitelesa proti mišjim protitelesom, konjugirana s hrenovo peroksidazo.

4.7.5.1 Razgradnja ovalbumina

Ovalbumin (Chicken egg white, Grade V, Sigma) smo razgradili s papainom ter katepsinoma B in L.

6 mg ovalbumina smo razgrajevali s papainom (s končno koncentracijo 0,2 mg/mL) v 0,1 M fosfatnem puftru s pH 6,0, in z dodatkom 1,5 mM EDTA. Papain smo aktivirali z dodatkom 1,4 mg cisteina. Razgradnja pri 37 °C je potekala 2 uri.

1,86 mg ovalbumina smo razgrajevali s katepsinom B (0,1 mg/250 μ L) v 0,1 M acetatnem puftru s pH 5,0, in z dodatkom 1,0 mM EDTA. Razgradnja pri 30 °C je potekala 23 ur.

30 μ L katepsina L (1,0 IU) smo dodali 0,65 mg ovalbumina v 0,1 M acetatnem puftru s pH 5,5, z dodatkom 2,0 mM EDTA in 20 mM DTT (Sigma). Razgradnja pri 30 °C je potekala 20 ur.

4.7.5.2 NaDS – PAGE

Pripravo vzorcev in elektroforezo smo izvedli, kot je opisano pod točko 4.3.1, s to razliko, da smo pripravili ločitveni poliakrilamidni gel z 10-odstotno zamreženostjo. Kot standard za določanje molekulskih mas proteinov smo uporabili PageRuler (Prestained Protein Ladder, Fermentas). Ločene proteine smo obarvali z barvilom Coomassie brilliant blue R-350 (Bio-Rad). Gele z obarvanimi proteini smo vrstično preslikali (skenirali) z navadnim računalniškim skenerjem pri visoki ločljivosti.

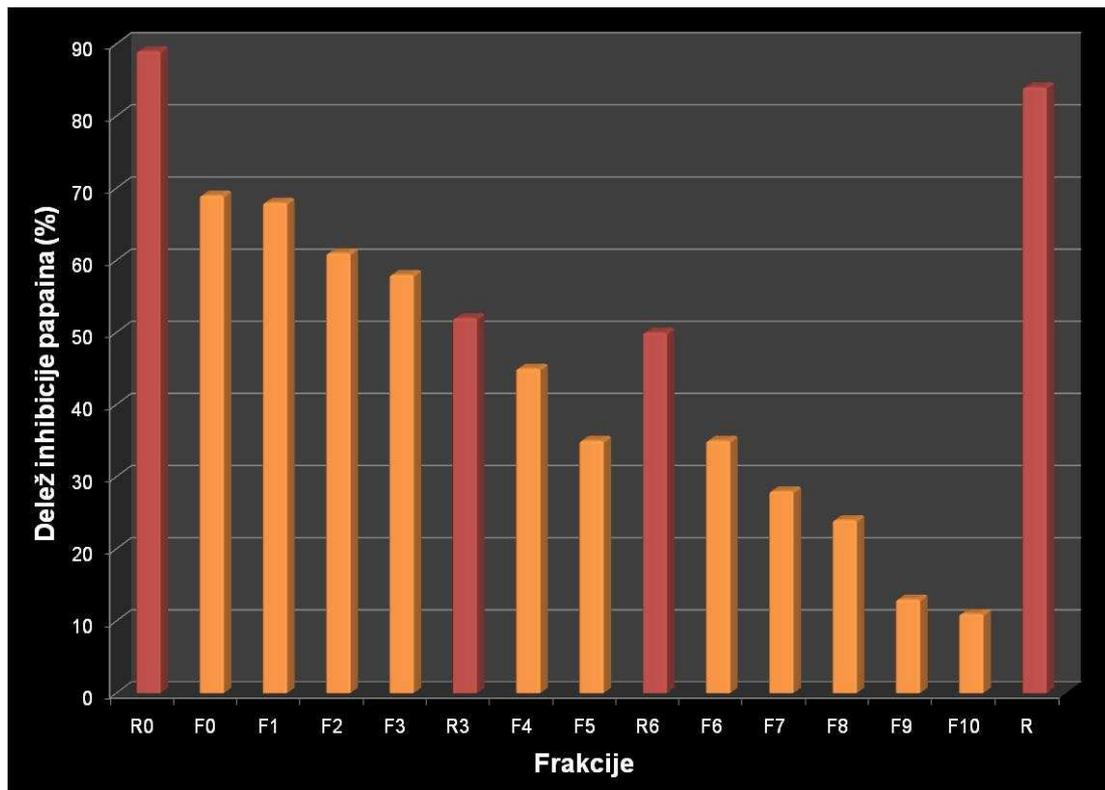
4.7.5.3 Imunski odtis

Po končani elektroforezi NaDS-PAGE smo razgrajeni ovalbumin z elektroelucijo iz poliakrilamidnega gela prenesli na membrano PVDF, kot je opisano pod točko 4.3.2.2. Po blokiranju in spiranju smo membrane pri sobni temperaturi in ob rahlem stresanju inkubirali 1,5 ure v raztopini serumov mišk iz skupine Kontrola, Inhibitor, Ovalbumin in Inhibitor + Ovalbumin, redčenih 1 : 200 (v : v) s pufrom PBS s 3 % BSA in 0,05 % Tween₂₀. Po spiranju nevezanih protiteles iz vzorcev mišjih serumov smo dodali sekundarna protitelesa – kozja protitelesa proti mišjim protitelesom IgG ali IgM, redčena 1 : 1.000 s prej omenjenim pufrom PBS, ki so bila konjugirana s hrenovo peroksidazo (oboje Sigma). Komplekse antigen-protitelo smo naredili vidne s pomočjo aminoetilkarbazola. Membrane smo posušili na zraku in jih vrstično preslikali (GS-700 Imaging Densitometer, Bio-Rad).

5 REZULTATI

5.1 Proteinski in neproteinski inhibitor v gojišču glive *T. mentagrophytes*

Vsebnost proteinskih in neproteinskih inhibitorjev cisteinskih peptidaz v gojišču glive *T. mentagrophytes* smo ugotavljali z določanjem preostale encimske aktivnosti papaina, ki smo ga inkubirali z retentati, oz. filtrati, dobljenimi z ultracentrifugiranjem gojišča glive s koncentradorjem Centriprep YM-3 (slika 3).



Slika 3: Vsebnost proteinskih in neproteinskih inhibitorjev cisteinskih peptidaz iz glive *T. mentagrophytes* v retentatih in filtratih tekočega Sabouradovega gojišča po 10-kratni zamenjavi pufra.

Z rdečo barvo so označeni vzorci retentatov (R), z rumeno pa filtratov (F).

Iz slike 3 je razvidno, da smo inhibitorno aktivnost v gojišču glive izmerili tako v začetnem retentatu (R0) kot v filtratu (F0). Po 10-kratni zamenjavi pufra je inhibitorna aktivnost v retentatu ostala skoraj nespremenjena, v filtratu pa je z zaporednimi zamenjavami pufra počasi upadala. Iz omenjenega lahko sklepamo, da gliva *T. mentagrophytes* v gojišče izloča tako proteinski kot tudi neproteinski inhibitor cisteinskih peptidaz.

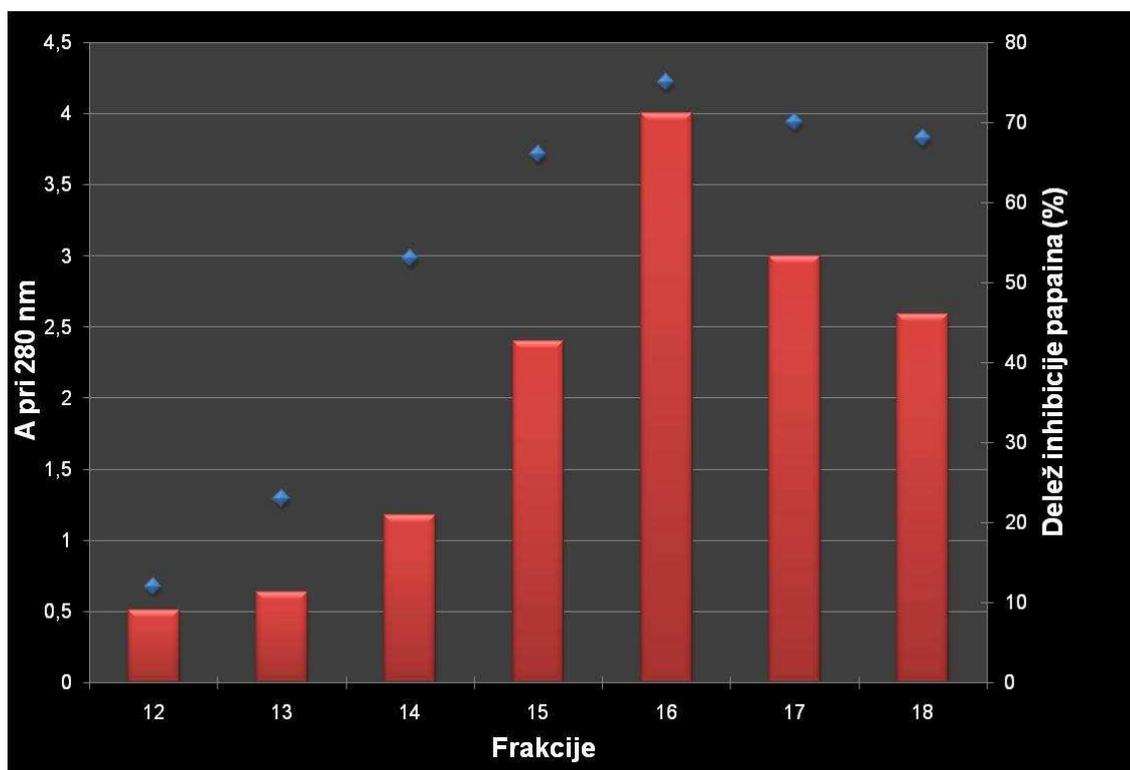
5.2 Proteinski inhibitor iz glive *T. mentagrophytes*

5.2.1 Izolacija proteinskega inhibitorja

Proteinski inhibitor cisteinskih peptidaz iz dermatofita *T. mentagrophytes* smo izolirali z uporabo treh kromatografskih metod: afinitetne kromatografije, ki ji je sledila ionsko izmenjevalna in na koncu še tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo.

5.2.1.1 Afinitetna kromatografija na CM-papain Sepharose 4B

Citosolni ekstrakt dermatofita *T. mentagrophytes* smo nanašali na afinitetno kolono karboksi-metil-papain sefaroze 4B. Pri tem se je proteinski inhibitor nekovalentno vezal na karboksimetilirani papain, ki smo ga predhodno vezali na sefarozo. Vezavo smo prekinili z raztopino NaOH z visokim pH. Elucijo proteinov smo spremljali z merjenjem absorpcije pri 280 nm, za določanje njihove inhibitorne aktivnosti pa smo uporabili papain (slika 4).

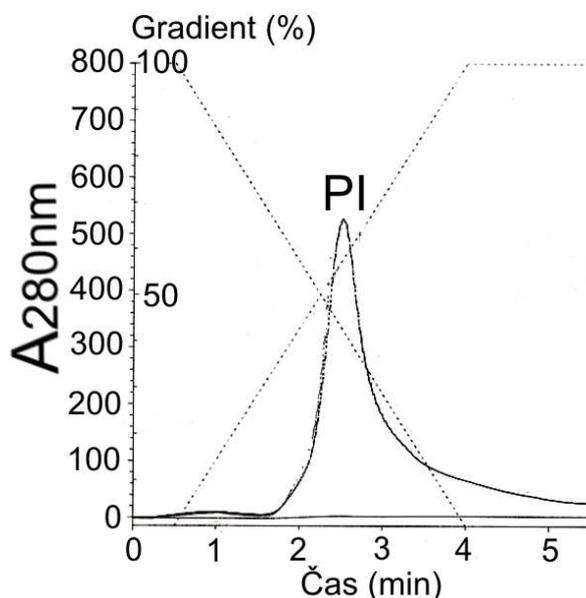


Slika 4: Elucijski profil proteinov dermatofita *T. mentagrophytes* po nanosu glivnega homogenata na afinitetno kolono karboksi-metil-papain sefaroze 4B. Stolpci rdeče barve ponazarjajo koncentracijo proteinov s skalo na levi osi, modri rombi pa prikazujejo delež inhibicije papaina, katerega skala je na desni osi.

Frakcije, pridobljene z afinitetno kromatografijo, ki so imele največ proteinov z veliko inhibitorno aktivnostjo, smo v nadaljevanju očistili z ionsko izmenjevalno kromatografijo (slika 4: frakcije št. 15, 16, 17).

5.2.1.2 Ionska kromatografija na CIM-disku

Inhibitorno frakcijo dermatofita, pridobljeno po afinitetni kromatografiji na CM-papain Sepharose 4B, smo nanесли na monolitsko kolono diska CIM QA v pufru Tris/HCl s pH 8,0 (slika 5). Po spiranju smo vezane proteine sprali s pomočjo linearnega gradienta od 0 do 1,0 M NaCl pri pretoku 1,0 mLmin⁻¹.

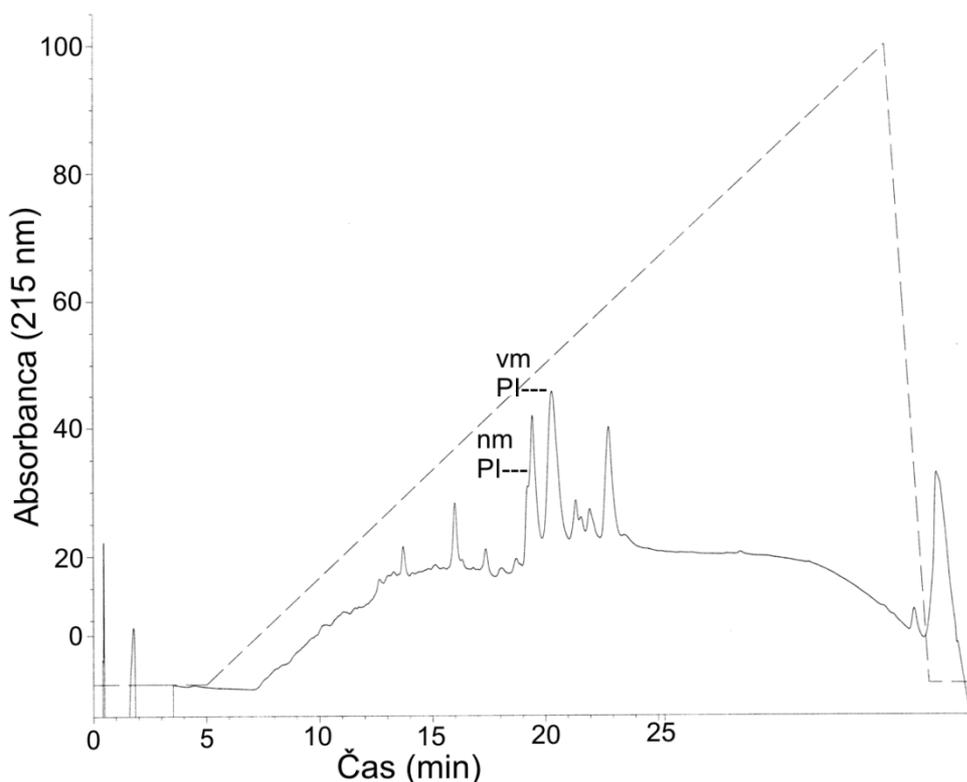


Slika 5: Kromatogram anionsko izmenjevalne kromatografije inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes* (PI).

Komponente vrha PI smo zbrali in jih očistili s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (RP-HPLC).

5.2.1.3 RP-HPLC

Frakcijo dermatofitnega inhibitorja pridobljeno z anionsko izmenjevalno kromatografijo, smo nanesti na HPLC-kolono Brownlee Aquapore Bu-300 z obrnjeno fazo. Elucijo proteinov smo dosegli z linearnim gradientom od 0 do 80 % (v : v) acetonitrila v vodi in 0,1-odstotno TFA (v : v). Elucija pri pretoku $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$ je potekala 30 minut (slika 6).



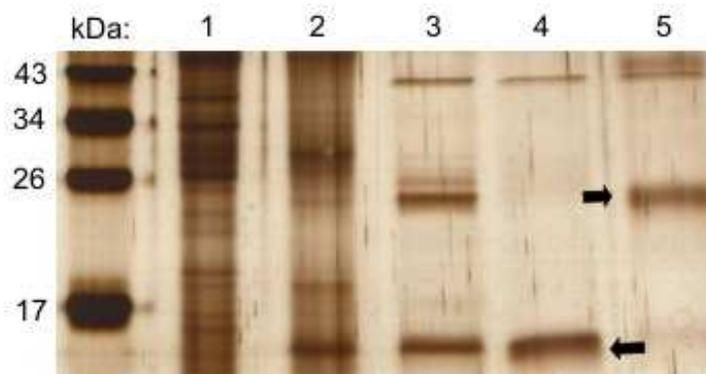
Slika 6: Elucijski profil komponent inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes* na HPLC-koloni z obrnjeno fazo. *nmPI* in *vmPI* sta nizkomolekularna in visokomolekularna oblika proteinskega inhibitorja.

Iz slike 6 je razvidno, da smo pri eluciji na HPLC-koloni z obrnjeno fazo med seboj ločili dve obliki glivnega inhibitorja cisteinskih peptidaz.

5.2.2 Lastnosti proteinskega inhibitorja

5.2.2.1 NaDS-PAGE

Za spremljanje uspešnosti izolacije proteinskega inhibitorja cisteinskih peptidaz na posameznih stopnjah čiščenja smo uporabili poliakrilamidno gelsko elektroforezo z NaDS. Pripravili smo ločitveni gel z 12-odstotno zamreženostjo (slika 7).



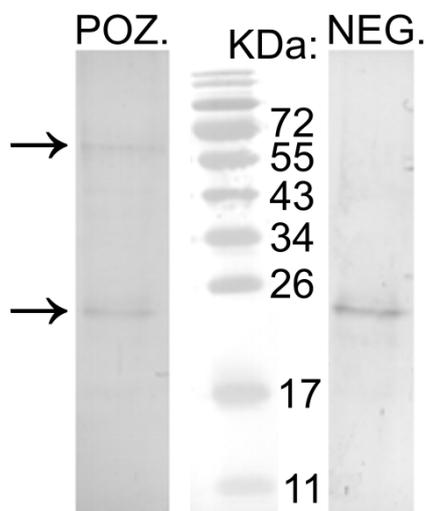
Slika 7: Poliakrilamidni elektroforezni gel posameznih stopenj izolacije proteinskega inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes*.

Na gel smo nanegli: citosolni ekstrakt glive *T. mentagrophytes* (1), inhibitorno frakcijo po afinitetni kromatografiji na CM-papain sefarozi (2), frakcijo inhibitorja po anionsko izmenjevalni kromatografiji na CIM-disku (3) ter nizkomolekularno (4) in viskomolekularno (5) obliko inhibitorja po RP-HPLC. V skrajno levi žepek smo nanegli standard za določanje molekulskih mas proteinov. Gel je obarvan s srebrovim barvilom.

Iz razdalje, ki so jo pripotovali proteini glede na proteinski standard, lahko sklepamo, da je nizkomolekularna oblika inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes* velika 12, viskomolekularna pa 24 kDa.

5.2.2.2 Imunski odtis

Metodo imunskega odtisa smo uporabili, da bi preverili, ali serumi kuncev, naravno okuženih z dermatofitom *T. mentagrophytes*, vsebujejo protitelesa proti glivnemu inhibitorju cisteinskih peptidaz (slika 8).



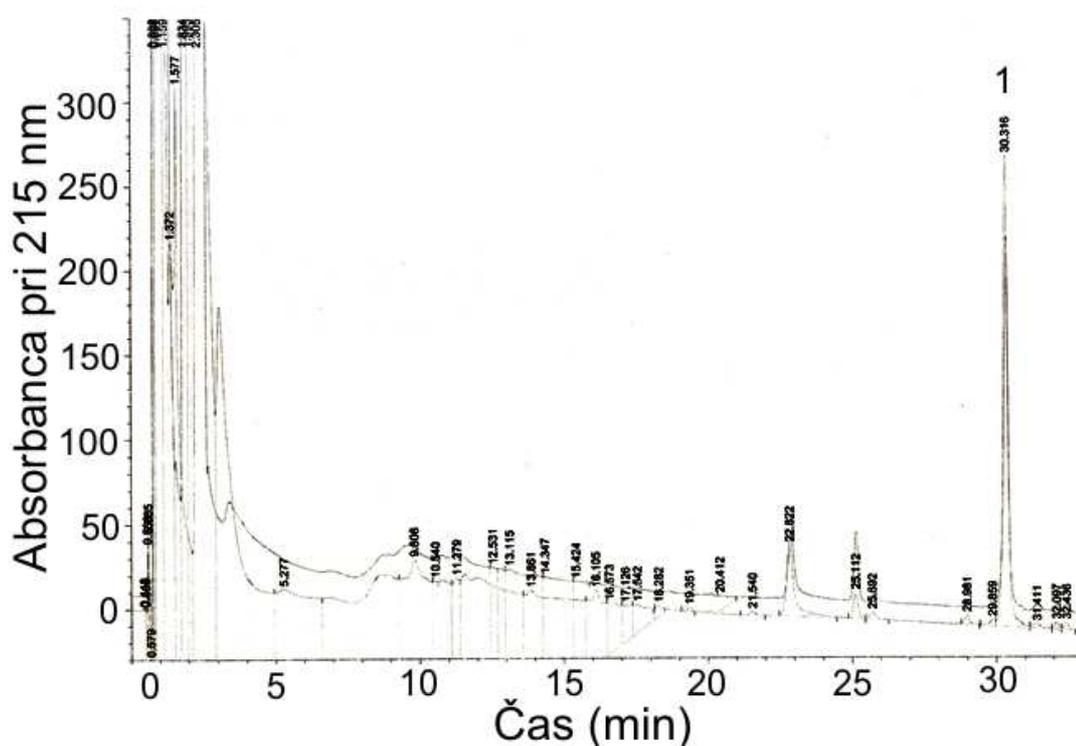
Slika 8: Imunski odtis izoliranega proteinskega inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes*. Namesto primarnih protiteles smo uporabili serume kuncev s potrjeno okužbo z dermatofitom *T. mentagrophytes* (POZ. – pozitivni serum). Kot negativne serume (NEG.) smo uporabili serume kuncev iz nadzorovane reje.

Iz slike 8 je razvidno, da v območju, kjer je nizkomolekularna oblika dermatofitnega proteinskega inhibitorja (12 kDa), nismo zaznali imunске reakcije. V območju molekulske mase visokomolekularne oblike inhibitorja (24 kDa) sta opazni lisi tako pri pozitivnem kot negativnem serumu. Specifična imunogena lisa (prisotna le pri uporabljenem pozitivnem serumu) se pojavi v območju molekulske mase med 55 in 72 kDa.

5.2.2.3 Določanje aminokislinskega zaporedja

Za določanje aminokislinskega zaporedja proteinskega inhibitorja smo morali najprej odstraniti blokado na N-koncu. To smo poskušali doseči z encimsko razgradnjo s pomočjo β -tripsina (slika 9), himotripsina (slika 10), proteaze V-8 (slika 11) ter s kislno hidrolizo v metanolu in TFA. Dobljene peptide smo pred sekveniranjem ločili z RP-HPLC. Ločevanje na koloni Chrompack C18 je potekalo z linearnim gradientom od 0 do 80 % (v : v) acetonitrila v vodi in 0,1-odstotno (v : v) TFA pri pretoku $1,0 \text{ mLmin}^{-1}$ 40 minut.

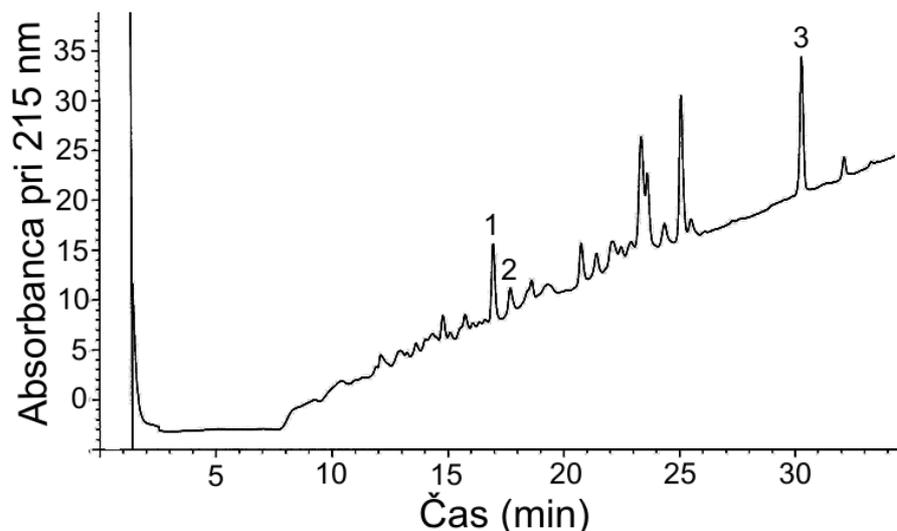
5.2.2.3.1 RP-HPLC



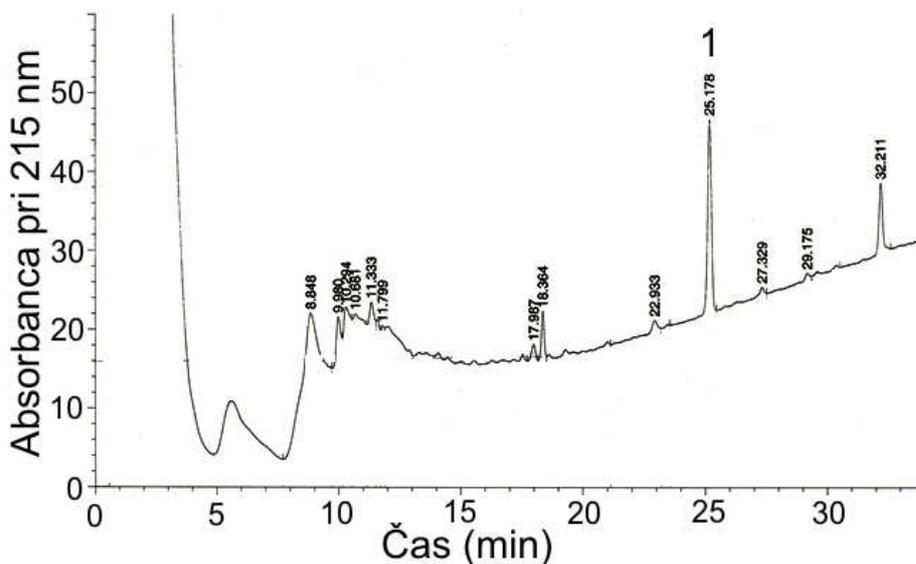
Slika 9: RP-HPLC-kromatogram peptidov, pridobljenih z razgradnjo nizkomolekularne (zgornja krivulja) in visokomolekularne oblike (spodnja krivulja) proteinskega inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes* z β -tripsinom.

Vrh 1 ustreza inhibitorjema z neodstranjeno blokado na N-koncu.

Iz slike 9 je razvidno, da se vrhovi peptidov, dobljenih po razgradnji obeh oblik inhibitorja, popolnoma prekrivajo.



Slika 10: RP-HPLC-kromatogram peptidov, pridobljenih z razgradnjo proteinskega inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes* s himotripsinom. Iz ulovljenega vrha št. 1 smo pridobili aminokislinsko zaporedje, dolgo 13 aminokislin, iz vrha 2 pa aminokislinsko zaporedje, dolgo 8 aminokislin. Vrh 3 ustreza inhibitorju z blokado na N-koncu.



Slika 11: RP-HPLC kromatogram peptidov, pridobljenih z razgradnjo izoliranega proteinskega inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes* s proteazo V-8. Iz ulovljenega vrha št. 1 smo pridobili aminokislinsko zaporedje, dolgo 11 aminokislin.

5.2.2.3.2 Aminokislinska zaporedja

Aminokislinska zaporedja proteinskega inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes* smo določili z uporabo sekveniranja z razgradnjo po Edmanu (razpredelnica 2). Uporabili smo avtomatski sekvenator.

Razpredelnica 2: Aminokislinska zaporedja peptidov, pridobljenih z encimsko ali s kislom hidrolizo proteinskega inhibitorja cisteinskih peptidaz iz dermatofita *T. mentagrophytes*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Razgradnja:													
himotripsin	V	N	E	N	A	P	T	V	Q	P	G	V	R
himotripsin	V	V	T	H	F	Q	L	V					
V8	P	I	R	A	R	G	X	I	E	G	R		
MeOH/TFA	S	V	A	V	K	T	Y	L	V				

X= nedoločen aminokislinski ostanek

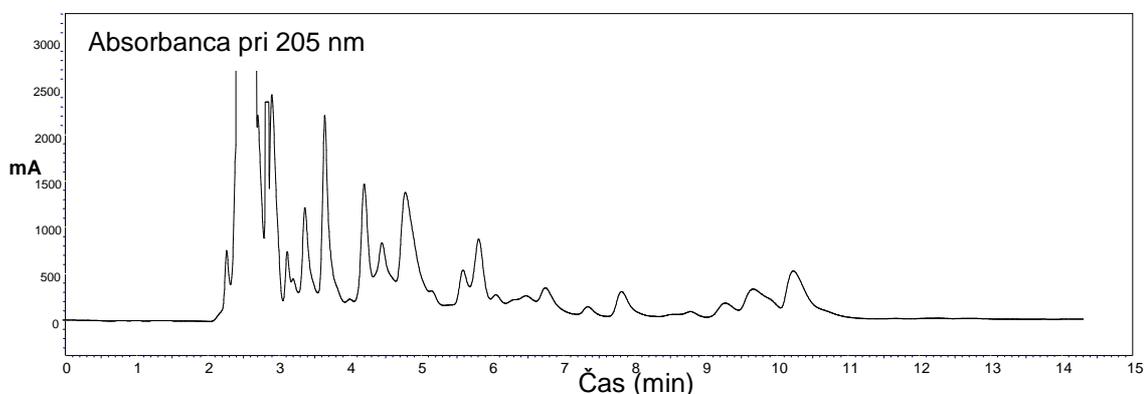
5.3 Nепroteinski inhibitor iz glive *T. mentagrophytes*

5.3.1 Izolacija neproteinskega inhibitorja

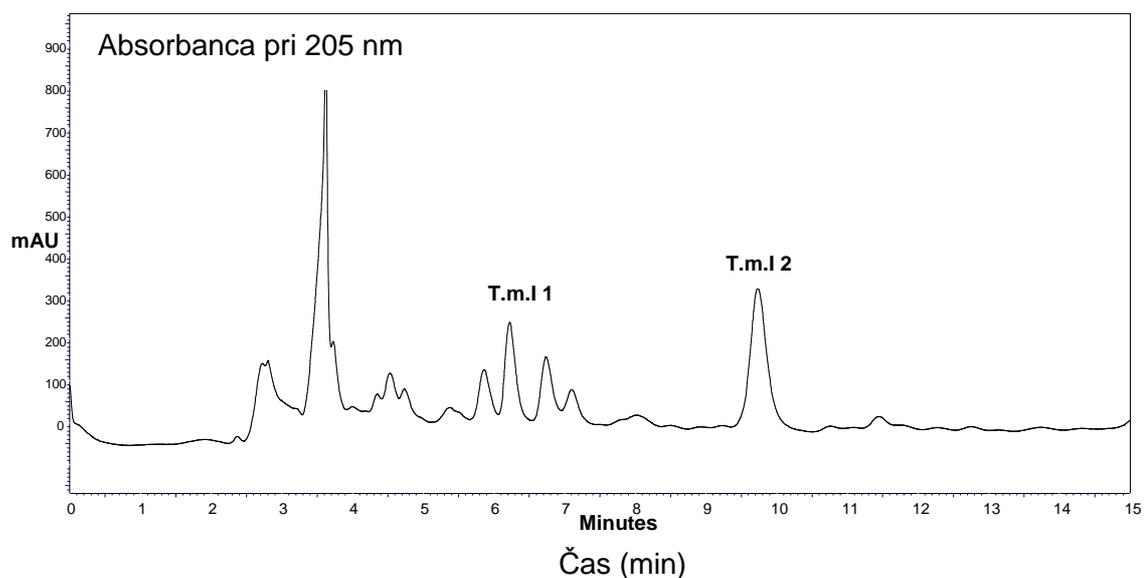
Neproteinski inhibitor cisteinskih peptidaz iz dermatofita *T. mentagrophytes* smo izolirali z uporabo dveh kromatografskih metod: ionsko izmenjevalne in tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z obrnjeno fazo.

5.3.1.1 RP-HPLC

Peptidni inhibitor cisteinskih peptidaz iz dermatofita *T. mentagrophytes* smo najprej poskušali izolirati neposredno iz glivnega citosolnega ekstrakta z uporabo RP-HPLC. Uporabili smo kolono Luna C(18), kot mobilno fazo pa raztopino 10-odstotnega (v : v) metanola v ultra čisti vodi in 0,1-odstotno (v : v) TFA. 15-minutno elucijo kolone pri pretoku $1,1 \text{ mLmin}^{-1}$ in sobni temperaturi smo spremljali z merjenjem absorpcije ločenih komponent pri 205 nm (slika 12). Zaradi prevelikega števila ločenih komponent smo vzorec citosolnega ekstrakta glive *T. mentagrophytes* najprej nanesti na anionsko izmenjevalno kolono SPE (slika 13).



Slika 12: Elucijski profil komponent filtrata citosolnega ekstrakta glive *T. mentagrophytes* na koloni RP-HPLC.



Slika 13: Elucijski profil komponent SPE-eluata glive *T. mentagrophytes* na koloni RP-HPLC.

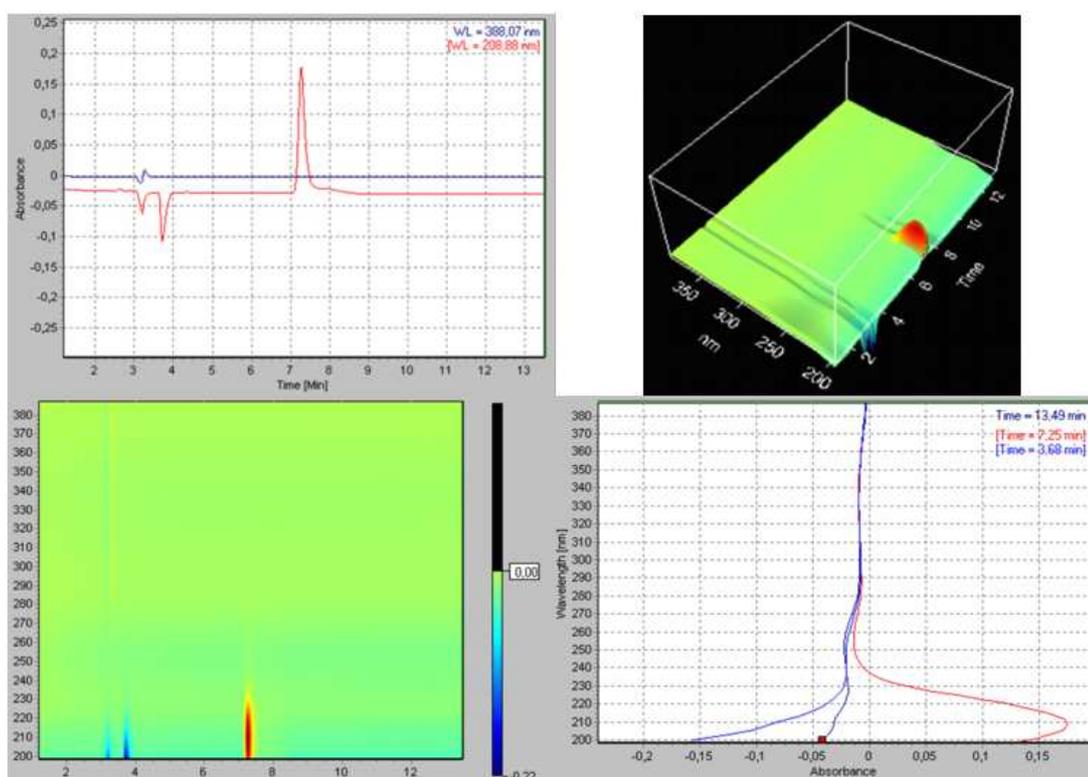
Pri komponentah T.m.I 1 in T.m.I 2 smo zasledili najmočnejšo inhibitorno aktivnost.

Če primerjamo sliki 12 in 13, vidimo, da smo z uporabo ionsko izmenjevalne kromatografije delno očistili citsolni ekstrakt dermatofita. Komponenti, označeni s T.m.I 1 in T.m.I 2, smo ulovili v ependorfke in ju uporabili za nadaljnje analize.

5.3.2 Lastnosti neproteinskega inhibitorja

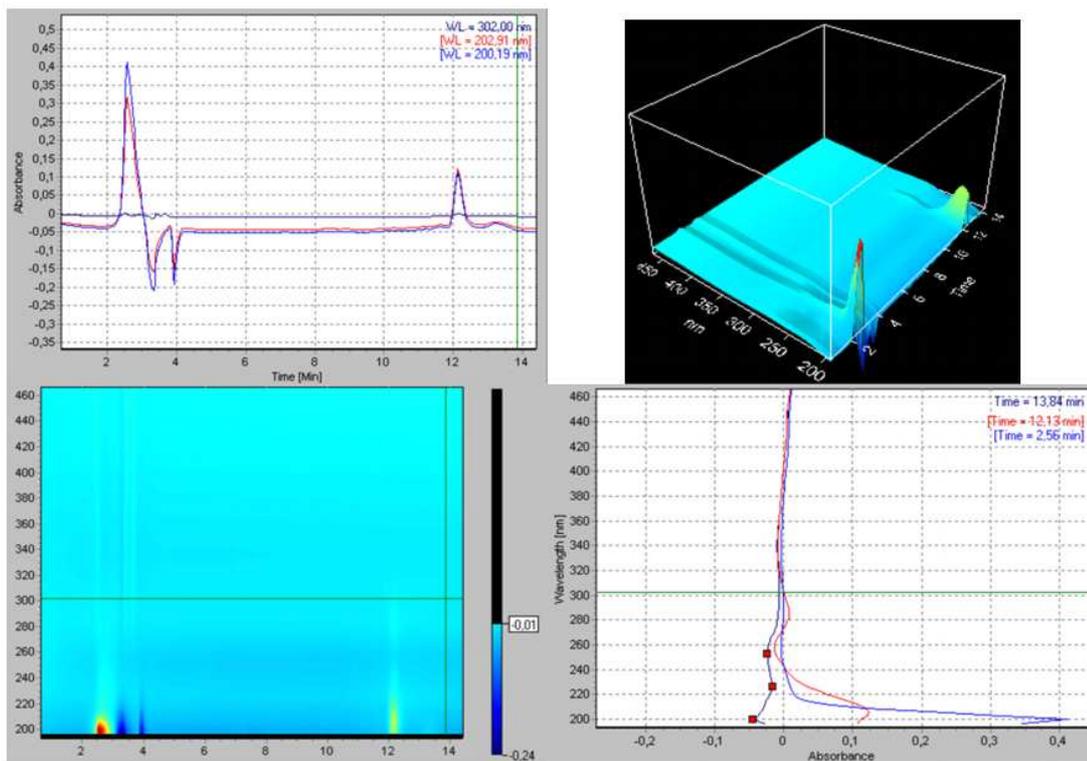
5.3.2.1 RP-HPLC-DAD

Za komponenti T.m.I 1 in T.m.I 2, ločeni z RP-HPLC, smo uporabili še detekcijo z diodnim nizom. Kolona, mobilna faza in pogoji elucije so bili enaki zgoraj opisanim. Elucijo smo spremljali z merjenjem absorbance od 200 do 400 nm (sliki 14 in 15).



Slika 14: Kromatografski profil komponente T.m.I 1 po HPLC-DAD.

Iz slike 14 je razvidno, da se je pri ponovnem nanosu komponente T.m.I 1 na kolono Luna z obrnjeno fazo komponenta eluirala po približno 7 minutah. Iz absorpcijskega spektra lahko razberemo, da ima komponenta največjo absorbanco pri valovni dolžini 210 nm. To nakazuje na peptidno naravo inhibitorja.

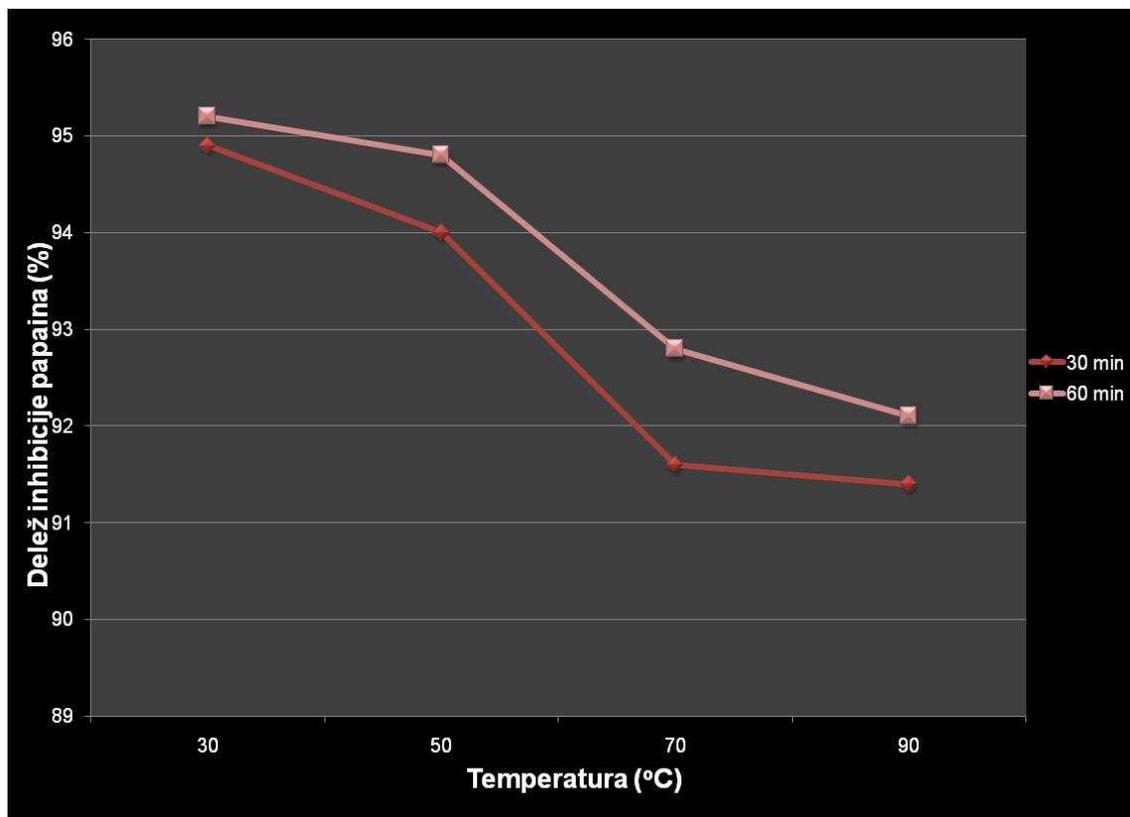


Slika 15: Kromatografski profil komponente T.m.I 2 po HPLC – DAD.

Iz slike 15 je razvidno, da se je pri ponovnem nanosu komponente T.m.I 2 na kolono Luna z obrnjeno fazo večji del komponente eluiral že po približno 3 minutah, manjši del pa šele po 12 minutah. Iz absorpcijskega spektra lahko razberemo, da imata obe komponenti največjo absorbanco pri valovni dolžini 200 nm. To prav tako nakazuje na peptidno naravo komponent.

5.3.2.2 Temperaturna stabilnost

Temperaturno stabilnost izoliranega neproteinskega inhibitorja iz dermatofita *T. mentagrophytes* smo preučevali pri temperaturah 30, 50, 70 ali 90 °C, s 30- ali 60-minutnim časom inkubacije pri določeni temperaturi (slika 16).

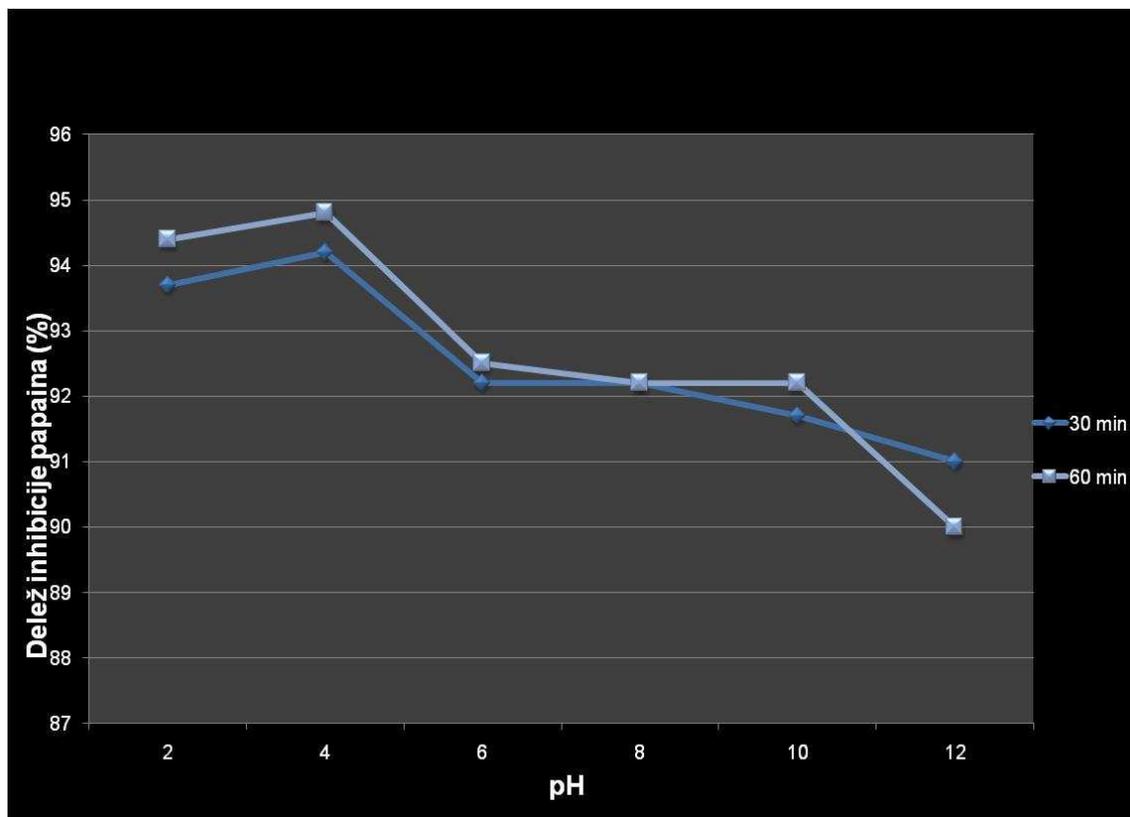


Slika 16: Vpliv temperature na aktivnost neproteinskega inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes*.

Iz slike 16 je razvidno, da tudi 1-urna inkubacija neproteinskega inhibitorja iz dermatofita *T. mentagrophytes* pri temperaturi 90 °C nima večjega vpliva na njegovo inhibitorno aktivnost. Po 30- in 60-minutni inkubaciji pri 50 °C se je aktivnost inhibitorja zmanjšala za približno 1 %. Pri temperaturi 70 °C se je aktivnost zmanjšala za dobre 3 % pri 30-minutni inkubaciji in za 2,4 % pri 60-minutni inkubaciji. Pri 1-urni inkubaciji pri 90 °C se je aktivnost inhibitorja zmanjšala za 3,1 % začetne vrednosti.

5.3.2.3 pH-stabilnost

pH-stabilnost izoliranega nizkomolekularnega inhibitorja iz *T. mentagrophytes* smo preučevali pri pH 2, 4, 6, 8, 10 in 12, s 30- ali 60-minutnim časom inkubacije pri določeni vrednosti pH (slika 17).

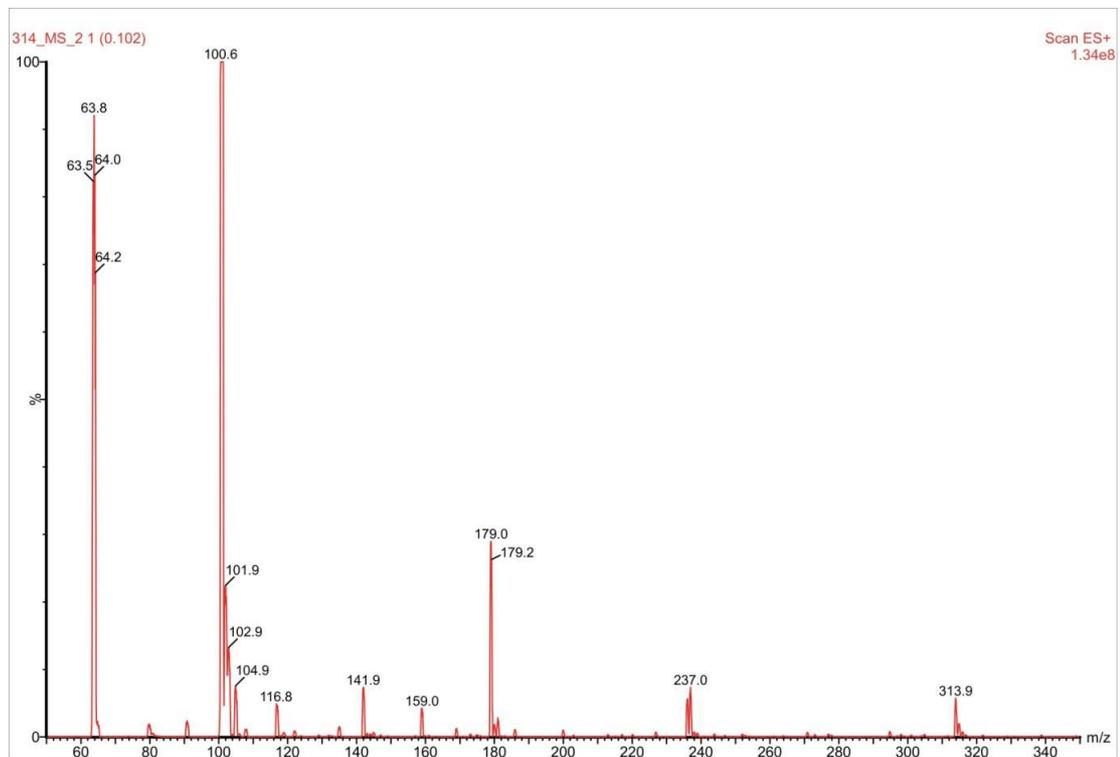


Slika 17: Vpliv pH na aktivnost neproteinskega inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes*.

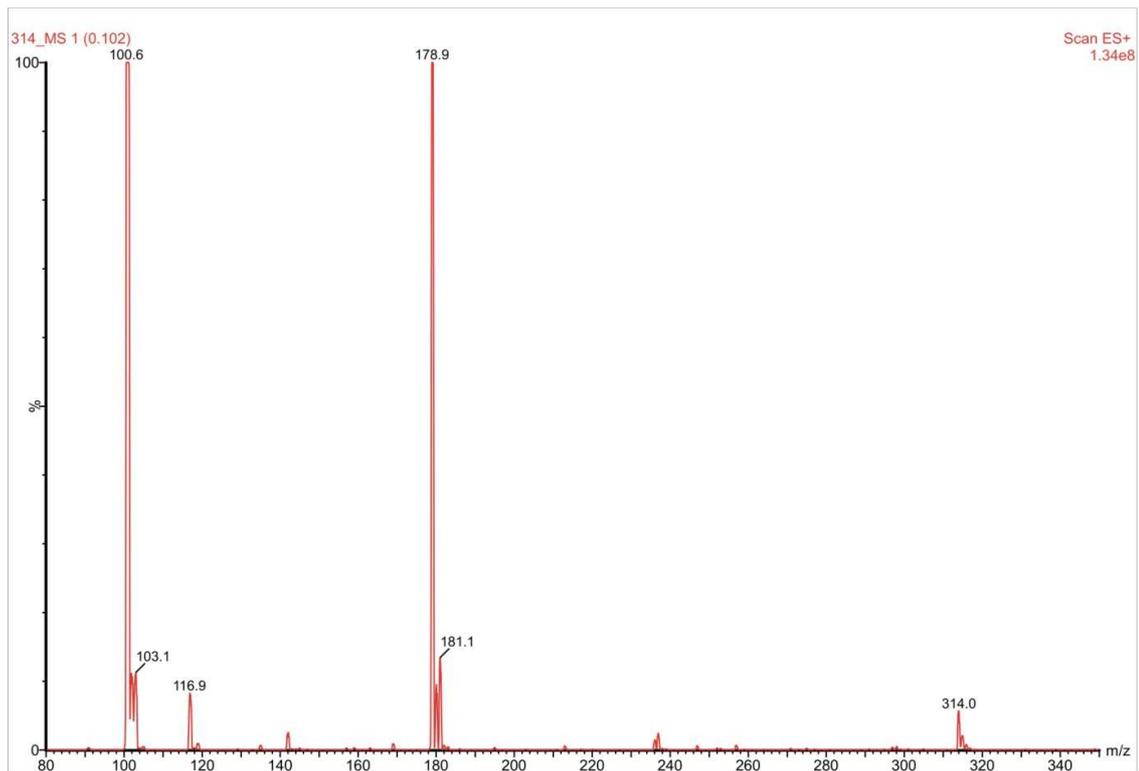
Iz slike 17 je razvidno, da se je aktivnost neproteinskega inhibitorja iz dermatofita *T. mentagrophytes* pri vrednosti pH 4 v primerjavi z aktivnostjo pri pH 2 tako pri 30- kot 60-minutni inkubaciji rahlo povečala (približno za 0,5 %). Aktivnost inhibitorja pri vrednosti pH od 6 do 10 je ostala skoraj nespremenjena. Šele po 60-minutni inkubaciji pri vrednosti pH 12 se je aktivnost inhibitorja zmanjšala za dobre 4 % začetne vrednosti.

5.3.2.4 Masna analiza

Masno analizo neproteinskih inhibitorjev smo izvedli s kombinacijo tekočinske kromatografije in masne spektrometrije z ionizacijo z elektrorazprševanjem (sliki 18 in 19).



Slika 18: Spekter LC-ESI MS neproteinskega inhibitorja *T.m.I 1*.



Slika 19: Spekter LC-ESI MS neproteinskega inhibitorja *T.m.I 2*.

Kot je razvidno iz slik 18 in 19, imata obe obliki dermatofitnega peptidnega inhibitorja (*T.m.I 1* in *T.m.I 2*) enako razmerje masa/naboj, in sicer 314.

5.4 Inhibicija encimske aktivnosti

Proteinskemu in peptidnemu inhibitorju cisteinskih peptidaz iz dermatofita *T. mentagrophytes* smo določali sposobnost inhibicije cisteinskih in ene serinske peptidaze. Za merjenje aktivnosti posamezne peptidaze smo uporabili ustrezni kromogeni substrat (razpredelnica 3) in spektrofotometrično detekcijo.

5.4.1 Inhibitorne lastnosti proteinskega in neproteinskega inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes*

Razpredelnica 3: Inhibicijski profil proteinskega in neproteinskega inhibitorja iz dermatofita *T. mentagrophytes*.

		Proteinski inhibitor	Neproteinski inhibitor
ENCIM:	SUBSTRAT:	INHIBICIJA:	INHIBICIJA:
papain	BANA	+	+
katepsin B	Z-Phe-Arg-PNA	+	+
katepsin L	Z-Phe-Arg-PNA	+	+
katepsin H	H-Arg-PNA	-	-
tripsin	BAPNA	-	-

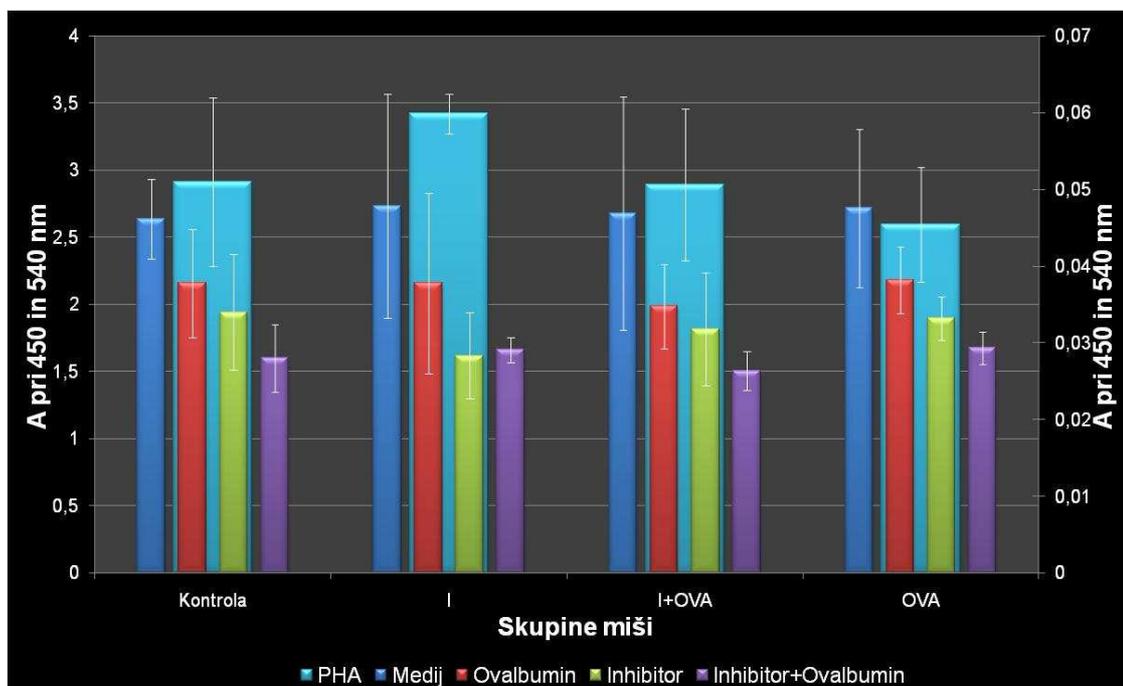
Iz razpredelnice 3 je razvidno, da tako proteinski kot peptidni dermatofitni inhibitor zavirata delovanje papaina, katepsina B in L, ne pa katepsina H. Prav tako oba inhibitorja ne inaktivirata delovanja serinske peptidaze tripsina.

5.5 Vpliv neproteinskega inhibitorja na imunski odziv gostitelja

Pri raziskavah vpliva peptidnega inhibitorja cisteinskih peptidaz dermatofitne glive *T. mentagrophytes* na imunski odziv gostitelja smo se omejili na preučevanje vpliva na celično proliferacijo, programirano celično smrt (apoptozo) ter predstavljanje antigenov. V mišjem modelu so bile živali razdeljene v štiri skupine: Kontrola, skupina Inhibitor (I), skupina Inhibitor + Ovalbumin (I+OVA) ter skupina Ovalbumin (OVA).

5.5.1 Celična proliferacija

Celično proliferacijo smo merili s komercialnim kompletom BrdU Cell Proliferation Assay (slika 20).



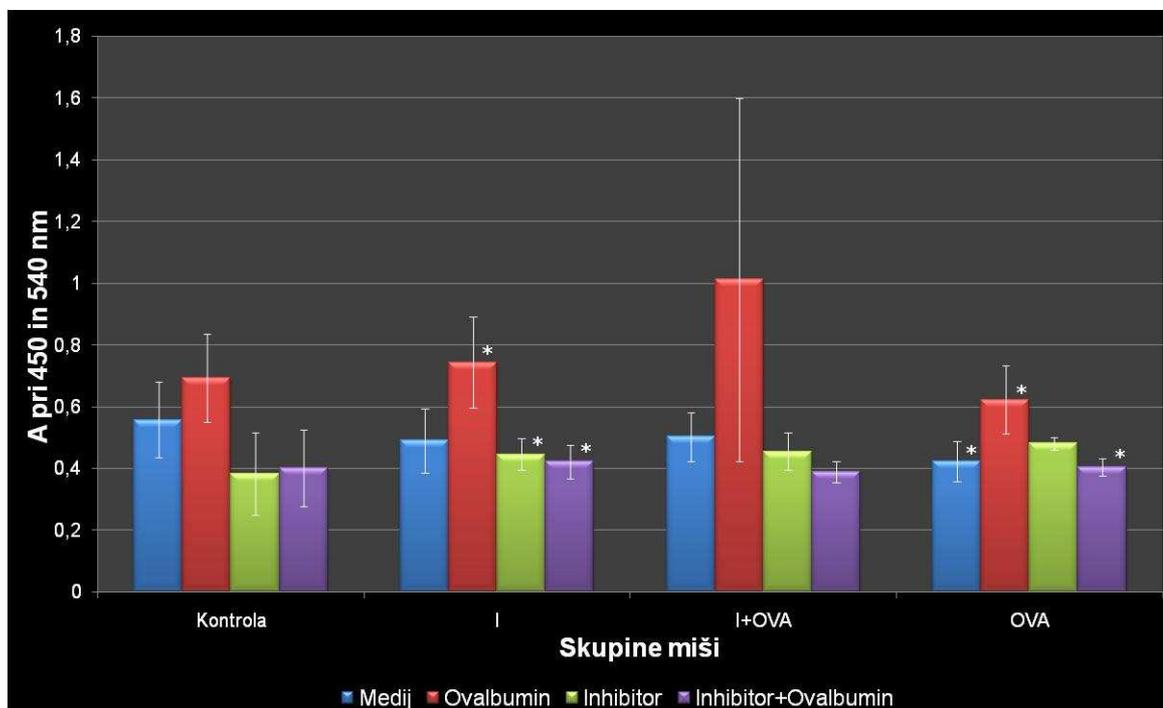
Slika 20: Primerjava meritev proliferacije vraničnih celic iz poskusnih skupin miši. Rezultati so predstavljeni s povprečno vrednostjo izmerjene absorbance treh paralelk \pm standardni odklon (SD). Stolpci ponazarjajo nivo proliferacije celic, ki smo jih v mikrotitrskih ploščah gojili le v mediju (temno modra), ali pa smo jim dodali ovalbumin (rdeča), inhibitor (zelena) ali mešanico inhibitorja in ovalbumina (vijoličasta). Svetlo modri stolpci v ozadju predstavljajo raven proliferacije s PHA s skalo absorbance na levi strani, medtem ko je skala absorbance za ostale predstavitve na pomožni desni osi.

Iz rezultatov meritev celične proliferacije je razvidno, da je bila izmerjena proliferacija največja pri celicah, ki smo jih nespecifično stimulirali s fitohemaglutininom. Povprečne izmerjene vrednosti absorbanc pri vseh skupinah so se gibale med 2,596 (skupina

OVA) in 3,421 (skupina I). Pri tretiranju celic z drugimi snovmi so bile izmerjene vrednosti absorbanca evidentno majhne – med 0,028 in 0,048. Pri nobeni skupini nismo zaznali statistično značilnih razlik. Pri rezultatih dobljenih meritev nismo opazili vpliva neproteinskega inhibitorja cisteinskih peptidaz iz glive *T. mentagrophytes* na celično proliferacijo.

5.5.2 Apoptoza

Apoptozo smo merili s komercialnim kompletom Cell Death Detection ELISA (slika 21).



Slika 21: Primerjava meritev apoptoze vraničnih celic iz poskusnih skupin miši. Rezultati so predstavljeni s povprečno vrednostjo izmerjene absorbance dveh paralelk \pm standardni odklon (SD). Stolpci ponazarjajo nivo izmerjene apoptoze pri celicah, ki smo jim v kulturi dodali medij (modra), ovalbumin (rdeča), inhibitor (zelena) ali mešanico inhibitorja in ovalbumina (vijoličasta). Z zvezdico (*) so označene statistično značilne vrednosti. To so vrednosti P, ki so bile manjše ali enake 0,05.

Iz rezultatov je razvidno, da je bila izmerjena apoptoza največja pri vseh 4 skupinah miši po stimulaciji celic z ovalbuminom. Povprečne izmerjene vrednosti absorbanc so se gibale med 0,622 (skupina OVA) in 1,013 (skupina I+OVA). Pri skupini I+OVA smo zaznali največjo standardno deviacijo (0.588). Izmerjena apoptoza je bila najmanjša pri vseh 4 skupinah miši po tretiranju celic z inhibitorjem ali mešanico inhibitorja in ovalbumina. Izmerjene povprečne vrednosti absorbanc so bile manjše od 0,482. Vrednost 0,482 je bila izmerjena v skupini OVA po tretiranju celic z inhibitorjem. Statistično značilne razlike so se pojavile v skupini I med celicami, ki jim je bil v kulturi dodan ovalbumin, in tistimi, ki jim je bil dodan bodisi inhibitor bodisi mešanica ovalbumina in inhibitorja. Prav tako so se statistično značilne razlike pojavile v skupini OVA, in sicer spet med celicami, ki jim je bil dodan ovalbumin, in tistimi, ki sta jim bila dodana bodisi medij bodisi mešanica inhibitorja in ovalbumina. Najmanjša izmerjena povprečna vrednost absorbance je bila 0,384, in sicer v skupini Kontrola pri celicah, ki so bile gojene v prisotnosti inhibitorja. Iz rezultatov meritev je razvidno, da peptidni

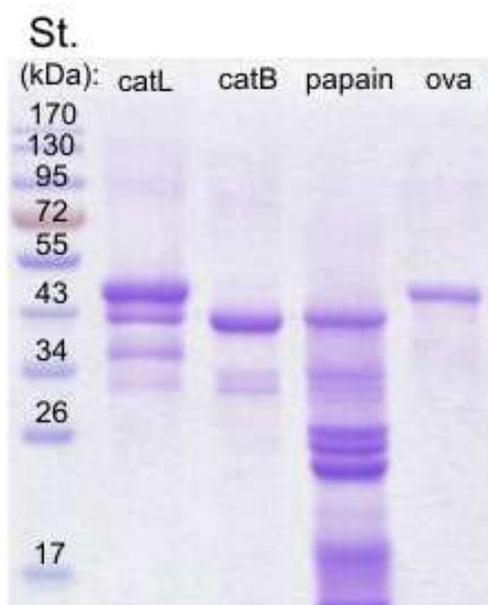
inhibitor cisteinskih peptidaz iz dermatofita *T. mentagrophytes* zavira programirano celično smrt – apoptozo.

5.5.3 Imunokemijske raziskave

Z imunokemijskimi raziskavami smo želeli preveriti vpliv glivnega neproteinskega inhibitorja na predstavljanje antigenov. Najprej smo s pomočjo različnih peptidaz razgradili ovalbumin, produkte razgradnje pa uporabili za imunski odtis. Želeli smo preveriti, ali se protitelesa, pridobljena po različni imunizaciji miši (skupine Kontrola, OVA, I, I+OVA), razlikujejo po svoji specifičnosti.

5.5.3.1 Razgradnja ovalbumina

Ovalbumin smo razgradili s papainom ter katepsinoma B in L. Dobljene razgradne produkte smo analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo z NaDS (slika 22). Pripravili smo ločitveni gel z 10-odstotno zamreženostjo.



Slika 22: Poliakrilamidni elektroforezni gel ovalbumina, razgrajenega z različnimi peptidazami.

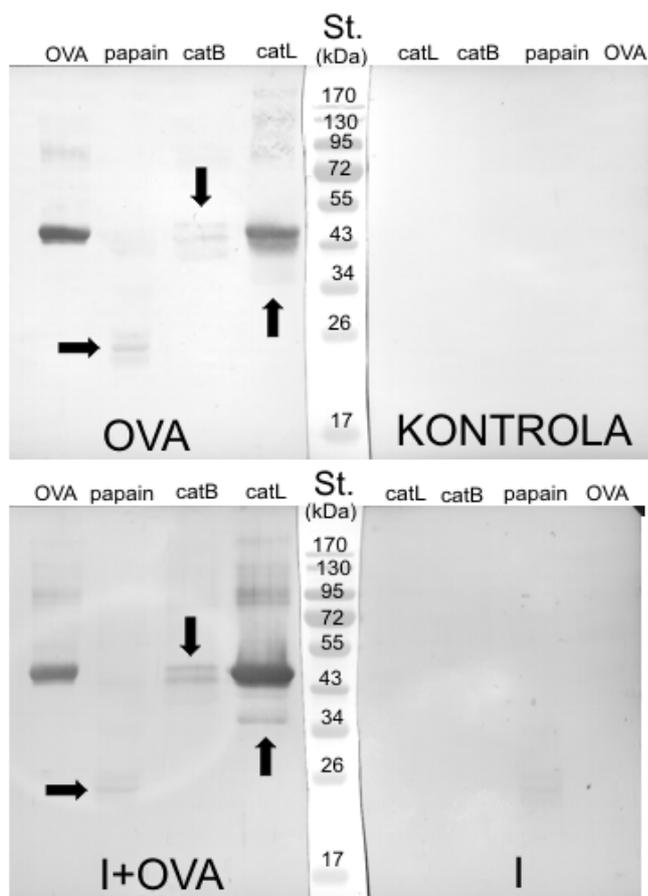
Na gel smo od leve proti desni nanesti: standard za določanje molekulskih mas proteinov (St.), ovalbumin, razgrajen s katepsinom L (catL), ovalbumin, razgrajen s katepsinom B (catB), ovalbumin, razgrajen s papainom (papain), ter nerazgrajeni ovalbumin (ova). Gel je obarvan z barvilom Coomassie brilliant blue.

Iz slike 22 je razvidno, da je bila razgradnja ovalbumina najboljšežnejša pri uporabi papaina, saj je na gelu opaznih največ proteinskih lis. Dobljeni razgradni produkti imajo molekulske mase od približno 11 do 43 kDa (4. stolpec). Pri razgradnji s katepsinom L smo opazili manj razgradnih produktov z molekulskimi masami od 30 do 43 kDa, nekaj ovalbumina pa je ostalo nerazgrajenega (2. stolpec). Nerazgrajeni ovalbumin ima

molekulsko maso 45 kDa (5. stolpec). Pri razgradnji s katepsinom B smo opazili le 3 proteinske lise z molekulskimi masami od 30 do 40 kDa (3. stolpec).

5.5.3.2 Imunski odtis

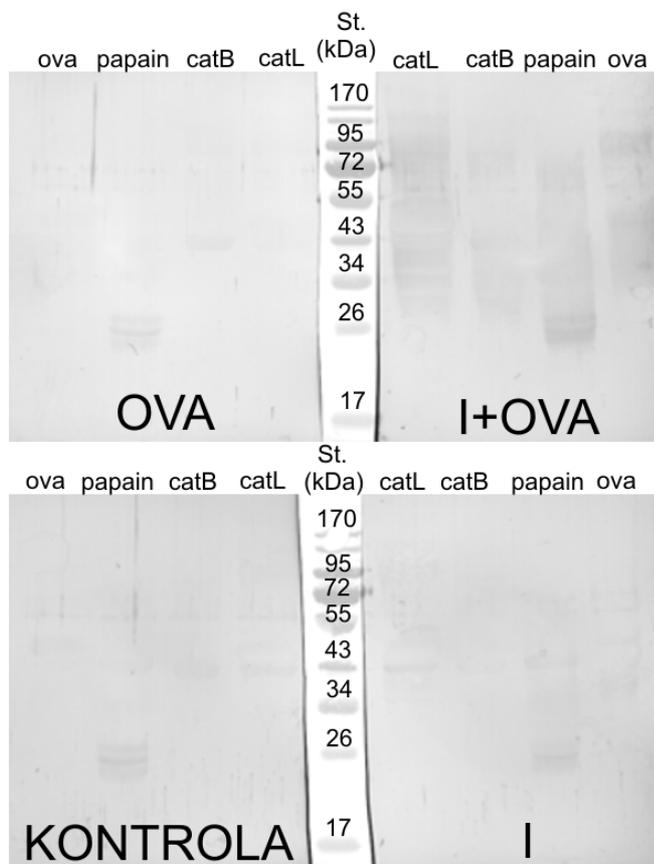
Po končani elektroforezi NaDS-PAGE smo razgrajeni ovalbumin s pomočjo elektroelucije iz poliakrilamidnega gela prenesli na membrano PVDF in ga detektirali s protitelesi (sliki 23 in 24).



Slika 23: Imunski odtis razgrajenega ovalbumina s sekundarnimi protitelesi anti-IgG. Namesto primarnih protiteles smo uporabili serume vseh štirih skupin miši (Kontrola, OVA, I ter I+OVA). Kot sekundarna protitelesa smo uporabili kozja protitelesa proti mišjim protitelesom IgG, ki so bila konjugirana s hrenovo peroksidazo. S puščicami so označene razlike v izraženosti lis.

Kot je razvidno iz slike 23 je izraženost lis, dobljenih po proteolitični razgradnji ovalbumina drugačna na membrani, pri kateri smo kot primarna protitelesa uporabili serum miši, imuniziranih z ovalbuminom (skupina OVA), ter pri membrani, pri kateri

smo uporabili serum miši, ki so bile imunizirane z ovalbuminom in hkrati tretirane z dermatofitnim inhibitorjem (skupina I+OVA).



Slika 24: Imunski odtis razgrajenega ovalbumina s sekundarnimi protitelesi anti-IgM. Namesto primarnih protiteles smo uporabili serume vseh štirih skupin miši (Kontrola, OVA, I ter I+OVA). Kot sekundarna protitelesa smo uporabili kozja protitelesa proti mišjim protitelesom IgM, ki so bila konjugirana s hrenovo peroksidazo.

Pri rezultatih imunskega odtisa z uporabljenimi protitelesi proti mišjim protitelesom IgM, pri različnih skupinah miši nismo opazili večjih razlik v izraženosti lis, dobljenih po proteolitični razgradnji ovalbumina.

6 RAZPRAVA

Inhibitorje cisteinskih peptidaz so odkrili v različnih tkivih in telesnih tekočinah sesalcev ter tudi pri drugih živalih (ribah, insektih), parazitskih protozojih, rastlinah, virusih in bakterijah (Hibbets s sod., 1999; Laskowski in Ikunoshin, 1980; Joshi s sod., 1998; Irvine s sod., 1992; Rzychon s sod., 2003; Espagne s sod., 2005). Pri glivah poročajo večinoma o majhnih inhibitorjih (North, 1982; Hanada s sod., 1978; Mlinarič s sod., 2000; Yaginuma s sod., 1989; Isshiki s sod., 1998; Otsuka s sod., 1999a in 199b). Glivne proteinske inhibitorje so odkrili pri zelo razširjeni patogeni glivi *Candida albicans* ter dveh užitnih gobah *Lepista nebularis* in *Macrolepiota procera* (Tsushima s sod., 1992; Brzin s sod., 2000; Sabotič s sod., 2009). Za zdaj so bili tako proteinski kot peptidni inhibitorji cisteinskih peptidaz podrobneje raziskani pri eni dermatofitni glivi, in sicer pri vrsti *Microsporum canis* (Mihelčič, 2003).

V delu opisujemo izolacijo in delno karakterizacijo proteinskega in peptidnega inhibitorja cisteinskih peptidaz, izoliranega iz dermatofita *Trichophyton mentagrophytes*. Inhibitorje smo izolirali iz celičnega ekstrakta, ki smo ga dobili z dezintegracijo glivnega micelija. Glivo *T. mentagrophytes* smo po izolaciji na trdnem gojišču gojili v tekočem Sabouraudjevem gojišču. Dermatofitne glive tudi v tekočem gojišču namreč tvorijo hife. Zaradi velike odpornosti glivnih celičnih sten smo pred mehansko in ultrazvočno homogenizacijo glivni micelij večkrat izpostavili procesu zamrzovanja v tekočem dušiku in odmrzovanja.

Da bi preverili, ali gliva pri svoji rasti v gojišče izloča tako proteinski kot neproteinski oz. peptidni inhibitor, smo gojišče ultrafiltrirali v koncentradorju, katerega membrana prepušča molekule z molekulsko maso pod 3.000 Da (slika 3). Ker znaša molekulska masa proteinov več tisoč Da, proteini niso prehajali skozi membrano in so ostali v retentatu. Pri ultrafiltraciji smo retentatu dodajali pufer, s čimer smo iz retentatov postopno izrinili vse molekule z relativno molekulsko maso pod 3 kDa. Dokazana inhibitorna aktivnost v filtratih se je zato postopno zmanjševala, v retentatu pa se je ohranila. Iz tega smo sklepali, da gliva *T. mentagrophytes* v gojišče izloča tako proteinski kot peptidni inhibitor cisteinskih peptidaz.

Proteinski inhibitor

Prvi korak pri izolaciji proteinskega inhibitorja je bil nanos glivnega citosolnega ekstrakta na kolono afinitetne kromatografije, z vezanim papainom kot ligandom. Z

uporabo omenjene kromatografije smo želeli v enem koraku odstraniti vse neinhibitorne proteine, ki so prisotni v ekstraktu glivnega micelija. Vezane proteine smo eluirali s spremembo pH in jih ločeno zbirali v epruvete. Frakcije z vsaj 75-odstotno inhibicijo proti papainu smo združili in skoncentrirali (slika 4). Eluirane frakcije z inhibitorno aktivnostjo proti papainu smo analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo z natrijevim dodecilsulfatom (NaDS-PAGE). Ker frakcije na elektroforeznem gelu niso bile homogene – opaznih je bilo več proteinskih lis (slika 7, stolpec 2), smo kot drugo stopnjo izolacije inhibitorja uporabili ionsko izmenjevalno kromatografijo. Za to obliko kromatografije smo se odločili, da bi lahko med seboj ločili čisti glivni inhibitor od papaina ter inhibitorja, ki se je z afinitetne kolone eluiral v kompleksu s papainom. Frakcije z inhibitorno aktivnostjo po afinitetni kromatografiji smo zato nanegli na monolitni kromatografski nosilec disk CIM QA. V primerjavi s tradicionalnimi tehnikami ločevanja in čiščenja biomolekul omogočajo monoliti CIM zelo hitre procese in s tem večjo produktivnost. Nosilec CIM QA je močan anionski izmenjevalec, uporaben predvsem za čiščenje virusov, DNA in velikih proteinov. Kot mobilno fazo smo uporabili pufer Tris/HCl s pH 8,0, vezane proteine pa smo sprali z linearnim gradientom od 0 do 1 M NaCl. Elucijski diagram frakcije na omenjenem nosilcu je pokazal prisotnost le enega vrha z inhibitorno aktivnostjo (slika 5). Analiza vrha po NaDS-PAGE pa je pokazala prisotnost dveh proteinskih lis – manjše pri 12 kDa in večje pri 24 kDa (slika 7, stolpec 3). Za nadaljnje čiščenje oz. da bi oba proteina ločili med seboj, smo inhibitor, dobljen po ionsko izmenjevalni kromatografiji, nanegli na kolono tekočinske kromatografije visoke ločljivosti z obrnjeno fazo (RP-HPLC). Pri tej kromatografiji je tekoča nepolarna stacionarna faza imobilizirana na nosilec, mobilna faza pa je polarna. Elucijo proteinov smo dosegli z linearnim gradientom od 0 do 80 % (v : v) acetonitrila v vodi z dodatkom 0,1-odstotne (v : v) TFA. Na elucijskem diagramu smo opazili tri visoke in več majhnih vrhov, inhibitorno aktivnost proti papainu pa smo zaznali le pri dveh (slika 6). Oba vrhova smo ločeno zbrali. Analiza SDS-PAGE je pokazala, da je v enem vrhu protein z molekularno maso 12, v drugem pa protein z molekularno maso 24 kDa (slika 7, stolpca 4 in 5).

Da bi preverili, ali sta izolirana proteina različna inhibitorja ali različni obliki istega inhibitorja, smo poskušali pridobiti njuno aminokislinsko zaporedje z avtomatskim sekveniranjem z razgradnjo po Edmanu. Pri tej metodi se končni aminokislinski ostanek označi in odcepi s polipeptidne verige, pri čemer se ne porušijo druge peptidne vezi. Prvi korak je t. i. reakcija vezave. Pri tej fenilzotiocianat reagira z nenabito končno aminokislino v rahlo alkalnih pogojih, da nastane ciklični feniltiokarbamoilni derivat. Naslednja stopnja je cepitvena reakcija, pri kateri se v rahlo kislih pogojih derivat končne aminokislinske odcepi kot tiazolinonski derivat. Polipeptidna veriga se tako skrajša za en aminokislinski ostanek. Tiazolinonska aminokislina se selektivno ekstrahira v organsko topilo. Zadnja stopnja je reakcija pretvorbe, pri kateri se aminokislina toplotno obdela s kislino, da nastane obstojnejši feniltiohidantoinjski aminokislinski derivat, ki se ga lahko določi s kromatografijo ali z elektroforezo. Celoten postopek se

nato ponovi za določanje naslednjega aminokislinskega ostanka. Ker po sekveniranju nismo dobili nobenih rezultatov, smo sklepali, da sta inhibitorna proteina bodisi N-terminalno blokirana bodisi je njuna N-terminalna aminokislina skrita v notranjosti proteina. Zato smo oba proteina poskušali razcepiti v krajše peptide, ki bi jih lahko sekvenirali. Najprej smo poskusili z encimsko razgradnjo z β -tripsinom. To je serinska peptidaza, ki cepi C-terminalno stran argininskih in lizinskih ostankov, če jim ne sledi prolin. Ko smo primerjali kromatograma, dobljena po cepitvi manjšega (12 kDa) in večjega (24 kDa) proteina, smo opazili popolno ujemanje vrhov (slika 9). Iz tega dejstva smo sklepali, da imata oba proteina enako aminokislinsko zaporedje oz. sestavo. Nadaljnje raziskave pa so potrebne, da bi dokazali, ali gre pri glivi *T. mentagrophytes* za obstoj dimernega inhibitorja, sestavljenega iz dveh monomernih enot, ali za inhibitor z različnima molekulskima masama, ki sta posledica različnega zvijanja polipeptidne verige, kot je opisano za klitocipin (Galeša s sod., 2004).

Ker iz peptidov, dobljenih po cepitvi inhibitorjev z β -tripsinom nismo dobili aminokislinskega zaporedja, smo poskusili oba proteina razgraditi s himotripsinom – serinsko peptidazo, ki cepi peptidne vezi, pri katerih je na karboksilni strani vezi na mestu P1 tirozinski, triptofanski ali fenilalaninski ostanek. Cepitev, sicer v manjši meri, poteče tudi če je na omenjenem mestu aminokislina lizin. Iz vrhov, nastalih s cepitvijo inhibitornih proteinov s himotripsinom, smo dobili dve aminokislinski zaporedji (slika 10, razpredelnica 2). Razgradnjo obeh proteinov smo nadaljevali s proteazo V-8. To je zunajcelična peptidaza bakterije *Staphylococcus aureus*, znana tudi pod imenom endoproteinaza Glu-C, ki specifično cepi vezi na karboksilnem koncu glutaminske in aspartatne kisline. Iz vrha, dobljenega po cepitvi dermatofitnega inhibitorja z V-8, smo pridobili aminokislinsko zaporedje, dolgo 11 aminokislin (slika 11, razpredelnica 2). Ker smo pri večini kromatogramov opazili razmeroma visoke vrhove nerazgrajenega dermatofitnega proteina (sliki 10 in 11), smo na koncu poskusili glivni inhibitor razgraditi še s tridnevno inkubacijo v raztopini TFA in metanola, v razmerju 1 : 1. Po taki razgradnji nam je uspelo pridobiti še zadnje, 9 aminokislin dolgo zaporedje (razpredelnica 2). Da bi poiskali podobnosti v aminokislinskem zaporedju med izoliranim dermatofitnim inhibitorjem in drugimi znanimi inhibitorji oz. proteini, smo dobljena delna zaporedja primerjali znotraj baze neredundantnih proteinskih zaporedij, pri čemer smo uporabili algoritem blastp (protein-protein) pri NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ker s primerjavo nismo odkrili nobene značilne podobnosti med delnimi zaporedji dermatofitnega inhibitorja in katerikoli znanimi cisteinskimi peptidaznimi inhibitorji, lahko trdimo, da gre za nov inhibitor z določenimi strukturnimi posebnostmi. Omenjeno dejstvo ni presenetljivo, saj je primerjava celotnih aminokislinskih zaporedij inhibitorja klitocipina iz glive *Lepiota nebularis* in makrocipinov iz glive *Macrolepiota procera* pokazala le 17–21-odstotno ujemanje v aminokislinskem zaporedju (Sabotič s sod., 2009). Obe glivi uvrščamo v skupino užitnih bazidiomicetnih gliv.

Kolonizacija z dermatofiti je navadno omejena na keratinizirano tkivo plasti *stratum corneum*, izzove pa lahko šibko ali močno vnetno reakcijo. Čeprav so poroženele plasti kože brez specifičnega obrambnega sistema, se pri okužbi z dermatofiti sproži protitelesna in celična imunost, pri čemer pri odstranitvi glive sodelujejo specifični in nespecifični obrambni efektorski mehanizmi gostitelja (Gupta s sod., 1998). Z encimskoimunskim testom (ELISA) so že raziskovali protitelesni imunski odziv pri kuncih, okuženih z dermatofitom *T. mentagrophytes*, prav tako je bil s prenosom proteinov na membrano (Western blot) dokazan obstoj nekaterih glivnih imunogenih proteinov (Drobnič-Košorok s sod., 1998; Zrimšek s sod., 1999; Zrimšek s sod., 2003a; Zrimšek s sod., 2003b). V naši raziskavi smo tako želeli preveriti, ali so v serumih kuncev, okuženih z glivo *T. mentagrophytes*, tudi protitelesa proti inhibitorju cisteinskih peptidaz. Zato smo obe obliki inhibitorja iz poliakrilamidnega gela prenesli na PVDF membrano s pomočjo elektroelucije. Sledila je imunokemijska detekcija, ki temelji na interakciji med iskanimi proteini in specifičnimi protitelesi, ki te proteine prepoznajo. Kot izvor primarnih protiteles smo uporabili serume kuncev, naravno okuženih z glivo *T. mentagrophytes* (pozitivni serum), oz. serume kuncev iz nadzorovane reje brez klinično zaznavnih sprememb (negativni serum). Iz rezultatov (slika 8) je razvidno, da v območju molekulske mase 12 kDa, kjer naj bi bila nizkomolekularna oblika inhibitorja, nismo opazili imunske reakcije – vezave specifičnih protiteles, v območju visokomolekularne oblike inhibitorja (pri 24 kDa) pa smo vezavo protiteles opazili. Razlog zanjo je lahko navzkrižna reaktivnost s proteini, podobnimi inhibitorju dermatofita *T. mentagrophytes*, saj sta se lisi pojavili pri membranah z dodanimi tako pozitivnimi kot negativnimi serumi. Podobne rezultate sta opisali Drobnič-Košorok s sodelavci (1998), pri proučevanju imunogenih proteinov v micelijskih ekstraktih različnih dermatofitnih in nedermatofitnih gliv ter Mihelčičeva (2003) pri preučevanju inhibitorja cisteinskih proteaz iz glive *Microsporium canis*. Specifično reaktivnost – pojav lis le pri uporabi pozitivnih, ne pa tudi negativnih serumov, smo ugotovili v območju molekulskih mas med 55 in 72 kDa. Sklepamo, da je pri naravni okužbi z dermatofitom *T. mentagrophytes* inhibitor cisteinskih peptidaz prisoten predvsem v visokomolekularni obliki. S tem bi lahko razložili, zakaj pri metodi imunskega odtisa nismo zaznali protiteles proti nizkomolekularni obliki inhibitorja. Da bi podrobneje raziskali imunogene značilnosti izoliranega dermatofitnega inhibitorja, bi bilo treba živali imunizirati s čistima oblikama inhibitorja ter metodo imunskega prenosa ponoviti. To pa bi seveda zahtevalo poskuse na živalih, čemur smo se v pričujočem delu želeli čim bolj izogniti.

Med uporabljenimi postopki izolacije smo prisotnost dermatofitnega proteinskega inhibitorja ugotavljali prek njegove sposobnosti inhibicije papaina. Očiščenim oblikam inhibitorja smo inhibitorno sposobnost določali še proti cisteinskim katepsinom B, L in H ter proti serinski peptidazi tripsinu. Ločenima visokomolekularni in nizkomolekularni obliki proteinskega inhibitorja nismo določili inhibicije, saj je pri metodi RP-HPLC uporabljena mobilna faza (gradient acetonitrila z dodatkom TFA) povzročila denaturacijo in s tem biološko neaktivnost proteinov. Za kvantitativno določanje

inhibitorne sposobnosti posamezne oblike dermatofitnega inhibitorja bi bilo treba pridobiti rekombinantna proteina, saj so v glivah prisotne majhne koncentracije inhibitorjev in je za pridobitev zadostne količine proteinov po naravni poti potrebna velika masa glivnega micelija. Profil inhibicije proteinskega inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes* je podoben inhibitorju klitocipinu, izoliranemu iz užitne gobe *Lepiota nebularis* (razpredelnica 3). Oba inhibirata papain, katepsin B in L, ne inhibirata pa katepsina H. Povprečne vrednosti ravnotežnih konstant K_i pri formiranju kompleksa med naravnim in rekombinantnim klitocipinom ter katepsinom L so bile 30 pM, kar nakazuje na hitro delovanje in močno vezavo omenjenih inhibitorjev. Oba inhibitorja izkazujeta šibkejšo afiniteto do papaina – vrednosti K_i so v območju 10 nM (Brzin s sod., 2000; Sabotič s sod., 2007). Makrocipini, izolirani iz še ene užitne baziomicetne gobe *Macrolepiota procera*, imajo podoben, ne pa identičen profil inhibicije. Rekombinantna makrocipina 1 in 3 sta učinkovita inhibitorja papaina in katepsina L. Rekombinantni makrocipin 4 prav tako dobro inhibira papain, katepsin L pa le šibko. Makrocipini, z izjemo rekombinantnega makrocipina 3, inhibirajo katepsin B v mikromolarnih koncentracijah. Naravni makrocipini in rekombinantni makrocipin 1 inhibirajo katepsin H v prav tako mikromolarnih koncentracijah, pri rekombinantnih makrocipinih 3 in 4 pa so bile izmerjene vrednosti inhibicije 10-krat manjše (Sabotič s sod., 2009). Pri inhibitorju iz dermatofita *T. mentagrophytes* smo preverili tudi njegovo sposobnost inhibicije peptidaz iz drugega katalitičnega razreda. Ugotovili smo, da omenjeni proteinski inhibitor ne zavira aktivnosti serinske peptidaze – tripsina. Enako velja tudi za klitocipin in vse razen enega od rekombinantnih makrocipinov (Brzin s sod., 2000; Sabotič s sod., 2009).

Neproteinski inhibitor

Za izolacijo neproteinskega inhibitorja cisteinskih peptidaz je bila priprava celičnega homogenata glive *T. mentagrophytes* enaka kot za izolacijo proteinskega inhibitorja, le da smo glivni micelij pred razbijanjem sprali z ultra čisto vodo. Poleg tega smo pri ultracentrifugiranju dobljeni supernatant ultrafiltrirali skozi koncentrador z velikostjo por 3.000 Da, da smo odstranili proteine in druge molekule z veliko molekulsko maso. Sprva smo želeli neproteinski inhibitor neposredno izolirati z RP-HPLC, vendar smo na kromatogramu opazili preveliko število vrhov (slika 12). Zato smo kot prvi korak pri izolaciji neproteinskega inhibitorja glivni ultrafiltrat nanegli na šibko anionsko izmenjevalno kolono SPE. Uporaba omenjene kolone nam je omogočila delno očiščenje in koncentriranje neproteinske frakcije. Ko smo to nanegli na kolono RP-HPLC, pri čemer smo kot mobilno fazo uporabili raztopino 10-odstotnega (v : v) metanola v ultra čisti vodi in 0,1-odstotno (v : v) TFA, smo na kromatogramu opazili manjše število vrhov. Vrhove smo ločeno zbirali, inhibitorno aktivnost pa smo zaznali le pri dveh (slika 13). Obe komponenti – T.m.I 1 in T.m.I 2 smo nanegli na enako kolono RP-HPLC, pod enakimi pogoji elucije, le da smo uporabili detekcijo z diodnim nizom. Elucijo smo spremljali z merjenjem absorbance od 200 do 400 nm (sliki 14 in 15). Pri detekciji z

diodnim nizom so številne diode, občutljive za svetlobo, ločeno izolirane ter nanizane druga zraven druge. Z uporabo te vrste detekcije smo želeli ugotoviti, ali se absorpcijska spektra ločenih komponent inhibitorja med seboj razlikujeta. Ugotovili smo, da ima komponenta T.m.I 1 največjo absorbanco pri valovni dolžini 210 nm, komponenta T.m.I 2 pa pri 200 nm. Rezultata potrjujeta peptidno naravo neproteinskega inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes*. Da bi bolje okarakterizirali izolirani neproteinski inhibitor dermatofita *T. mentagrophytes*, smo opravili še masno analizo, ki smo jo izvedli s kombinacijo tekočinske kromatografije in masne spektrometrije z ionizacijo z elektrorazprševanjem (LC-ESI MS; sliki 18 in 19). Pri metodi ESI se raztopina analita razprši v električnem polju, pri čemer nastanejo ioni. Elektrorazprševanje povzroči nastanek drobnih kapljic topila z analitom. Ko te pridejo do masnega spektrometra, se topilo, ki je navadno mešanica vode in organskega topila, odstrani. ESI je rezultat močnega električnega polja, ki deluje na površino raztopine vzorca. Ko topilo odpari v območju visokega vakuuma, se velikost kapljic postopoma zmanjšuje, dokler ne ostane le nabiti analit. Z uporabo omenjene metode smo ugotovili, da imata obe komponenti enako razmerje masa/naboj – 314. Iz omenjenega dejstva lahko sklepamo, da gre za peptid, sestavljen iz nekaj aminokislinskih ostankov, pri čemer se lahko obe obliki peptida med seboj razlikujeta v enem aminokislinskem ostanku, zaradi česar se iz kolone RP-HPLC eluirata ob različnih časih.

Med uporabljenimi postopki izolacije smo prisotnost dermatofitnega peptidnega inhibitorja ugotavljali prek njegove sposobnosti inhibicije papaina. Očiščenim oblikam inhibitorja smo inhibitorno sposobnost določili še proti katepsinom B, L in H ter proti serinski peptidazi tripsinu. Profil inhibicije peptidnega inhibitorja cisteinskih peptidaz, izoliranega iz dermatofita *T. mentagrophytes*, je enak prej opisanemu inhibicijskemu profilu proteinskega inhibitorja. Peptidni glivni inhibitor prav tako zavira delovanje papaina, katepsinov B in L, ne pa tudi katepsina H in serinske peptidaze tripsina. Podobne lastnosti opisuje tudi Mihelčičeva (2003) pri proteinskih ter neproteinskih inhibitorjih, izoliranih iz druge dermatofitne vrste, *Microsporum canis*.

Pri neproteinskem inhibitorju iz glive *T. mentagrophytes* smo raziskali še vpliv temperature in pH na njegovo aktivnost. Iz rezultatov temperaturne stabilnosti je razvidno, da 30- oz. 60-minutna inkubacija pri 30 °C nima nobenega vpliva na aktivnost inhibitorja (slika 16). Po 30- in 60-minutni inkubaciji pri 50 °C se je aktivnost inhibitorja zmanjšala za približno en odstotek. Pri temperaturi 70 °C se je aktivnost zmanjšala za dobre 3 % pri 30-minutni inkubaciji in za 2,4 % pri 60-minutni inkubaciji. Pri 0,5- in 1-urni inkubaciji pri 90 °C se je aktivnost inhibitorja zmanjšala za približno 3 % začetne vrednosti. Iz rezultatov določanja pH-stabilnosti je razvidno, da je bila aktivnost neproteinskega inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes* pri vrednosti pH 4 tako pri 30- kot tudi 60-minutni inkubaciji največja (slika 17). Aktivnost inhibitorja pri vrednosti pH od 6 do 10 je ostala skoraj nespremenjena. Šele pri 60-minutni inkubaciji pri vrednosti

pH 12 se je aktivnost inhibitorja zmanjšala za 4 % prvotne vrednosti. Iz omenjenih rezultatov lahko sklepamo, da je peptidni glivni inhibitor biološko aktiven v širokem temperaturnem (30 do 90 °C) in pH (2 do 12) območju. Omenjene lastnosti prav tako potrjujejo peptidno naravo neproteinskega inhibitorja.

Kolonizacija z dermatofiti je navadno omejena na poroženelo tkivo kožne plasti *stratum corneum*. Preden se razvije okužba mora dermatofit najprej priti v stik z kožo, se nanjo prilepiti ter nazadnje vdreti v keratinske plasti. Od številnih dejavnikov, predvsem pa od vrste dermatofita, okoljskih dejavnikov ter imunskega odziva gostitelja je odvisno, kako intenzivna bo klinična slika okužbe. Čeprav v vrhnjih plasteh kože ni aktivnosti imunskega sistema, se v gostitelju sproži tako protitelesni kot celični imunski odziv ter drugi nespecifični obrambni mehanizmi, ki poskušajo odstraniti glivo (Weitzman in Summerbell., 1995; Mendez-Tovar, 2010). V literaturi je opisanih več peptidaz različnih razredov, ki jih izločajo predvsem parazitski organizmi in ki so po strukturi in svoji vlogi podobne gostiteljevim endosomalnim peptidazam. Poleg sodelovanja v življenjskem ciklu patogenov te proteaze delujejo kot virulenčni dejavniki, ki proteolitično razgrajujejo komponente gostiteljevega imunskega sistema – imunoglobuline in komponente komplementnega sistema. Tako npr. nematodi izločajo proteaze, ki usmerijo in aktivirajo imunski odziv Th2, intracelularni paraziti in bakterije pa imunski odziv Th1 (Lecaille s sod., 2002; Bird s sod., 2009). Patogeni organizmi pa lahko izločajo tudi inhibitorje peptidaz. Imunoregulacijske lastnosti, npr. zaviranje predstavljanja antigenov, indukcija izražanja IL-10, ki zavira vnetje in stimulira odziv Th2, in stimulacija makrofagov, so najbolj raziskane pri filiarnih nematodih (Bird s sod., 2009). Črevesni nematod *Nippostrongylus brasiliensis* se tako imunskemu odzivu gostitelja izogne z izločanjem nipocistatina – inhibitorja cisteinskih proteaz, ki modulira procesiranje antigenov v gostiteljevih antigen predstavitvenih celicah (Dainichi s sod., 2001). Kako pa je pri dermatofitih? Za nekatere dermatofite je znano, da lahko sproščajo snovi, ki zavirajo imunski odziv. Mednje uvrščajo predvsem manane – glikoproteinske dele celične stene, ki se lahko vežejo na površino makrofagov ter zavrejo celični imunski odziv in proliferacijo keratinocitov (Dahl, 1993; Dahl, 1994). Ker smo ugotovili, da gliva *T. mentagrophytes* sintetizira in v medij izloča peptidni inhibitor cisteinskih peptidaz, ki zavira delovanje papaina, katepsina B in L, smo uporabili miši kot laboratorijske živali. Želeli smo namreč raziskati učinek inhibitorjev iz dermatofita *T. mentagrophytes* na imunski odziv miši, saj so različne cisteinske, serinske in aspartatne peptidaze ter njihovi inhibitorji dokazano vpleteni v različne imunske procese. Ker inhibitor ni imel citotoksičnega vpliva na linijo jetrnih celic hrčka (celice BHL; rezultati niso prikazani), smo želeli proučiti njegov vpliv tudi na apoptozo imunskih celic ter celično proliferacijo limfocitov, pridobljenih iz vranic miši, ki smo jih prej imunizirali z ovalbuminom kot specifičnim antigenom.

Celično proliferacijo smo merili s komercialnim encimskim imunskim testom BrdU Cell Proliferation Assay. Za izvedbo testa je treba celice gojiti v vdolbinicah mikrotitrskih

plošč. Dve do 24 ur pred koncem inkubacije se jim doda BrdU. Da se omogoči vezava protiteles na BrdU, je treba pri izvedbi testa po končani inkubaciji celice fiksirati, permeabilizirati in denaturirati DNA. Nato se v vdolbinice doda monoklonska protitelesa anti-BrdU. Nevezana protitelesa se spere ter doda sekundarna protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo. Omenjeni encim po dodatku kromogenega substrata tetrametilbenzidina (TMB) katalizira pretvorbo iz brezbarvne v modro obarvano raztopino. Po dodatku reagenta za ustavitev reakcije se raztopina obarva rumeno. Nastali barvni produkt reakcije lahko izmerimo spektrofotometrično. Intenziteta obarvanosti raztopine je proporcionalna količini v celice vgrajenega BrdU. Iz rezultatov meritev celične proliferacije je očitno, da je bila proliferacija največja pri celicah, ki smo jih nespecifično stimulirali s fitohemaglutininom (slika 20). Rezultat ni presenetljiv, saj je ta lecitin poznan kot mitogen, ki nespecifično stimulira proliferacijo limfocitov T. Izmerjene vrednosti proliferacije celic, pri vseh skupinah miši – tako kontrolni kot tistih, ki smo jim v kulturo dodali bodisi ovalbumin, bodisi inhibitor ali mešanico inhibitorja in ovalbumina, so bile na spodnji meji detekcije. Prav tako so bile razlike v izmerjenih vrednostih absorbance minimalne in nikjer statistično značilne. Da bi lahko z gotovostjo trdili, da izolirani glivni peptidni inhibitor ne vpliva na proliferacijo celic, bi bilo potrebno natančneje proučiti, v kakšni meri je inhibitor sploh imunogen. Miši bi bilo potrebno imunizirati z različnimi koncentracijami inhibitorja ter dokazati prisotnost specifičnih protiteles proti inhibitorju. To bi predstavljalo osnovo za dokaz imunskega odziva, na katerem bi temeljila raziskava proliferacije limfocitov. Ne smemo pa tudi zanemariti dejstva, da pri specifični stimulaciji limfocitov zaznamo manjše vrednosti proliferacije v primerjavi z mitogeni, saj se aktivirajo le za antigen specifični limfociti, ki jih je zelo malo in se morajo v organizmu v procesu imunizacije namnožiti. Tako smo lahko tudi že v našem primeru podobno specifično proliferacijo morda zaznali, vendar jo zaradi meje detekcije metode nismo uspeli statistično ovrednotiti.

Za merjenje apoptoze smo uporabili komercialni encimski imunski komplet Cell Death Detection ELISA. Z njim lahko *in vitro* kvalitativno in kvantitativno določamo citoplazemske fragmente DNA, povezane s histoni. Test temelji na vezavi protiteles proti histonom H1, H2A, H2B, H3 in H4. Za apoptozo so namreč značilni napihovanje membrane, kondenzacija citoplazme in aktivacija endogene endonukleaze, katere delovanje je odvisno od ionov Ca^{2+} in Mg^{2+} . Endonukleaza cepi dvojno vijačnico DNA na najbolj dostopnem mestu – v internukleosomalnem povezovalnem območju, kar vodi v nastanek mono- in oligonukleosomov. DNA v nukleosomih pa je tesno povezana s histoni H2A, H2B, H3 in H4 in zato zaščiten pred razgradnjo. Iz slike št. 21 je razvidno, da je bila apoptoza najbolj intenzivna pri celicah vseh skupin miši (Kontrola, I, I+OVA, OVA) takrat, ko smo celice v kulturi stimulirali z ovalbuminom. Nasprotno pa smo pri tistih celicah, ki smo jim v kulturi dodali samo inhibitor iz glive *T. mentagrophytes* ali mešanico ovalbumina in glivnega inhibitorja, zaznali manj intenzivno apoptozo. Razlike med celicami, ki smo jim dodali ovalbumin, in tistimi, ki smo jim dodali bodisi inhibitor bodisi mešanico inhibitorja in ovalbumina, so bile

ponekod statistično značilne. Iz omenjenih rezultatov bi lahko sklepali, da je dodatek peptidnega glivnega inhibitorja celicam vplival na zmanjšanje njihove apoptoze. Lahko da je vloga glivnega inhibitorja zmanjšati apoptozo in s tem vplivati na izid okužbe in/ali modulirati imunski odziv pri okužbi. Da bi omenjeni fenomen bolje raziskali, bi bilo potrebno preveriti, ali inhibitor iz glive *T. mentagrophytes* poleg katepsinov zavira tudi delovanje kaspaz. Allen s sodelavci (2005) namreč opisuje, da je vsakodnevno tretiranje miši s kaspaznim inhibitorjem benzilokarbonil-Asp(OMe)-fluorometil ketonom zmanjšalo apoptozo pljučnih levkocitov in s tem zavrlo imunski odziv proti patogeni glivi *Histoplasma capsulatum*. Opisan je tudi vpliv inhibitorja E-64d, ki prepreči z aktivacijo sproženo apoptozo limfocitov T pri ljudeh, okuženih s HIV (Yang s sod., 1997).

Celice prepoznajo antigene v obliki kratkih peptidov, ki so vezani v žlebu molekul MHC II, na površini APC. Peptidni fragmenti nastanejo v kislem okolju omenjenih celic z različnimi procesi, ki jih z enim izrazom označujemo procesiranje antigenov. Riese s sodelavci (1998) opisuje, da inhibicija katepsina S z majhnim inhibitorjem LHSV *in vitro* v B-celični hibridomski liniji miši blokira predstavljanje imunodominantnega peptida ovalbumina prek vpliva na vezavo peptida z molekulami MHC II, ne pa z inhibicijo nastanka antigenskega peptida. Selektivno inhibicijo katepsina S *in vivo* pa so dosegli z intraperitonealnim injiciranjem 100 mg/kg LHSV vsakih 48 ur. Pri omenjenem tretiranju miši z inhibitorjem so z NaDS-PAGE pri celicah vranice opazili spremembe v procesiranju MHC II-Ii, nalaganju peptidov in predstavljanju antigenov. Dodajanje inhibitorja je prav tako vplivalo na nastanek specifičnih protiteles. Podolinova s sodelavci (2008) poroča, da dodajanje majhnega inhibitorja cisteinskih peptidaz SB-331750 *in vitro* inhibira procesiranje Ii v vraničnih celicah različnih sevov miši. Splenocite so 4,5 ure tretirali z različnimi koncentracijami inhibitorja ter prek NaDS-PAGE z imunodetekcijo merili akumulacijo p10 Ii. S pretočno citometrijo so dokazali, da je dodajanje inhibitorja *in vitro* povzročilo tudi zmanjšano ekspresijo molekul MHC II s CLIP na celicah Raji. Dodajanje inhibitorja *in vivo* v obliki s.c. administracije dvakrat dnevno je prav tako povzročilo akumulacijo p10 Ii. Zhang s sodelavci (2000) opisuje specifični inhibitor katepsina B, imenovan CA047, ki je v BALB/c miših usmeril z OVA inducirani imunski odziv miši Th2 v odziv Th1, ki so ga določili z merjenjem specifičnih citokinov in protiteles. Inhibitor so mišim dodali dve uri pred in po imunizaciji z OVA, ter vsakih 12 ur v nadaljnjih 10 dnevih. Specifično proliferacijo celic vranice miši so merili s tritijem označenim timidinom. Njihovi rezultati kažejo, da uporaba inhibitorja ni imela vpliva na proliferacijo celic vranice miši, stimuliranih z ovalbuminom. Dodatek inhibitorja frakciji mitohondrijev/lizosomov je zavrlo razgradnjo OVA z lizosomalnimi peptidazami. S podobno zastavljenim poskusom smo želeli preveriti, ali peptidni inhibitor iz glive *T. mentagrophytes* vpliva na procese predstavljanja ovalbumina kot antigena in s tem posledično tudi na specifičnost protiteles. Uporabili smo metodo prenosa proteinov na membrano z imunodetekcijo. Ovalbumin smo najprej razgradili z različnimi peptidazami (katepsinoma B in L ter papainom) ter ga s pomočjo

elektroelucije prenesli na membrano. Po en razrezan kos membrane smo nato inkubirali v prisotnosti serumov ene od 4 skupin mišk: Kontrole, skupine OVA, skupine Inhibitor in skupine Ovalbumin + Inhibitor. Ko smo kot sekundarna detektorska protitelesa uporabili protitelesa proti mišjim protitelesom IgG, pri membranah, ki smo jim dodali serum miši iz kontrolne skupine, nismo opazili nobenih lis (slika 23). To je razumljivo, saj omenjena skupina miši ni prišla v stik z antigenom (ovalbuminom), zato se proti njemu oz. njegovim razgrajenim produktom ni razvil protitelesni imunski odziv. Prav tako nismo opazili skoraj nobene lise pri membranah, ki smo jih inkubirali s serumom miši, ki smo jih tretirali z inhibitorjem. Razlog za tak rezultat je najverjetneje podoben kot pri kontrolni skupini miši – protitelesni imunski odziv proti ovalbuminu se ni razvil. Opazna je le šibka lisa na mestu, kjer smo na membrano nanесли ovalbumin, razgrajen s papainom. Vzrok za to bi lahko bila navzkrižna reaktivnost na antigene, podobne ovalbuminu. Vendar bi morali v tem primeru enak rezultat opaziti na membrani, kjer smo preizkušali serum kontrolne skupine miši. Verjetnejši razlog za pojavljanje lis na membrani, inkubirani s serumom miši skupine I je morebiten vpliv dermatofitnega inhibitorja na predstavljanje antigenov. Takšen vpliv bi lahko spremenil specifičnost protiteles proti neznanim antigenom iz okolja, v katerem so živele miši. Med njimi bi se lahko pojavila protitelesa takšne specifičnosti, ki bi lahko reagirala z OVA, ki smo ga razgradili s papainom. Bolj očitne razlike v razporeditvi lis pa smo opazili med skupinama miši OVA in I+OVA. Obe skupini miši sta bili namreč imunizirani z ovalbuminom, zaradi česar so se proti njemu oz. njegovim antigenskim determinantam razvila protitelesa. Razlika med obema skupinama miši pa je bila v tem, da je bila skupina I+OVA sočasno z ovalbuminom tretirana tudi z glivnim inhibitorjem, ki je lahko zavrl delovanje peptidaz, ki sodelujejo pri procesih predstavljanja ovalbumina kot antigena. Razlike v razporeditvi in intenziteti lis so bile opazne pri vseh treh vzorcih razgrajenega ovalbumina z uporabljenimi peptidazami. Ko smo na membrano nanесли nerazgrajen ovalbumin, razlik nismo opazili. Pri razgradnji ovalbumina s papainom smo pri membrani, inkubirani v prisotnosti seruma miši skupine OVA, opazili 3 lise v območju molekulske mase približno 20 kDa, pri uporabljenem serumu miši I+OVA pa le eno. Pri membrani, inkubirani s serumom miši skupine OVA, smo pri ovalbuminu, razgrajenemu s katepsinom B, opazili 3 jasno izražene lise v območju molekulske mase okrog 43 kDa, nasprotno smo na tem mestu pri membrani, inkubirani s serumom miši skupine I+OVA, opazili le dve lisi. Največje razlike pa smo opazili na mestu, kjer smo ovalbumin razgradili s katepsinom L. Pri membrani, inkubirani s serumom miši skupine OVA, smo na omenjenem mestu opazili dve jasno izraženi lisi v območju molekulske mase 43 kDa, pri membrani, inkubirani s serumom miši skupine I+OVA, pa je bila ta lisa le ena. Poleg tega smo pri tej membrani opazili še eno liso v območju molekulske mase 34 kDa in eno v območju molekulske mase 95 kDa. Iz omenjenih rezultatov razporeditve lis na membranah z veliko verjetnostjo sklepamo, da je bil ovalbumin pri skupini miši OVA, v primerjavi s skupino I+OVA, kot antigen predstavljen drugače. Razlik v razporeditvi lis pa nismo

opazili pri detekciji protiteles razreda M (slika 24). Razloga za to sta najverjetneje vsaj dva. Zaradi preklopa Ig M iz primarnega imunskega odziva v sekundarni imunski odziv z IgG je prišlo do večje specifičnosti in afinitete protiteles. Poleg tega je dobljeni rezultat odvisen tudi od količine posameznega razreda specifičnih protiteles. Po večkratni imunizaciji, v sekundarnem imunskem odzivu torej, so imunoglobulini G daleč najbolj prevladujoč razred imunoglobulinov v serumu, saj predstavljajo 70–75 % vseh protiteles. Nasprotno pa imunoglobulini M predstavljajo le približno 10 % vseh protiteles, pa še ta so rezultat večinoma primarnega imunskega odziva. Protitelesa razreda M so v primerjavi z IgG torej manj specifična, v testih pogosto navzkrižno reagirajo in so, kot že rečeno, v serumu prisotna v manjših količinah. Na podlagi rezultatov naše raziskave ne moremo z gotovostjo trditi na katere procese predstavljanja antigenov vpliva peptidni inhibitor iz dermatofita *T. mentagrophytes*. Možno je namreč, da inhibitor preko selektivne inhibicije različnih peptidaz vpliva na proteolitično razgradnjo OVA in s tem na nastanek antigenskih peptidov, ki lahko, ali pa ne izzovejo stimulacije limfocitov T. Na drugi strani lahko glivni inhibitor vpliva na procese zorenja molekul MHC II – odcepljanje Ii ali nalaganje antigenskih peptidov v žleb MHC II. Za podrobnejše raziskave bi bilo potrebno hkrati z učinkom glivnega inhibitorja preučiti tudi učinke specifičnih inhibitorjev, ki zaustavijo delovanje zgolj ene peptidaze. Procesiranje točno določenega antigena včasih namreč zahteva prisotnost točno določene peptidaze. Poleg tega bi morali s peptidi, nastalimi pri procesiranju ovalbumina z različnimi peptidazami, v prisotnosti inhibitorja ali brez njega, izvesti test stimulacije celic T, kot ga opisujeta Gradehandt in Ruede (1991).

7 ZAKLJUČKI

V doktorski disertaciji so na podlagi zastavljenih hipotez naši zaključki naslednji:

1. hipoteza: gliva *T. mentagrophytes* proizvaja in v gojišče izloča proteinske in neproteinske (peptidne) inhibitorje cisteinskih peptidaz. Inhibitorji imajo določene lastnosti, ki jih pogojuje njihova primarna struktura. Ta izkazuje različno stopnjo homologije v aminokislinskem zaporedju z inhibitorji sorodnih predstavnikov debela gliv.

1. zaključek: iz citosola celic glive *T. mentagrophytes* smo izolirali in delno okarakterizirali tako proteinski kot neproteinski (peptidni) inhibitor cisteinskih peptidaz. Pojavljanje obeh vrst inhibitorjev smo dokazali tudi v gojišču glive. Med določenimi delnimi aminokislinskimi zaporedji proteinskega inhibitorja in zaporedji do zdaj znanih cisteinskih peptidaznih inhibitorjev nismo odkrili nikakršnih podobnosti.

2. hipoteza: glivni proteinski inhibitor zaradi svoje imunogene narave pri gostitelju izzove nastanek specifičnih protiteles.

2. zaključek: rezultati prenosa proteinov na membrano z imunodetekcijo nakazujejo, da serumi kuncev, naravno okuženih z dermatofitom *T. mentagrophytes*, vsebujejo protitelesa le proti visokomolekularni (potencialni dimerni in tetramerni) obliki inhibitorja.

3. hipoteza: neproteinski inhibitorji cisteinskih peptidaz glive *T. mentagrophytes* prek inhibicije katepsinov B, H in L prizadenejo procesiranje in od molekul MHC II odvisno predstavljanje antigenov ter vplivajo na proliferativne in apoptotične procese imunskih celic.

3. zaključek: z imunokemijskimi raziskavami smo dokazali, da peptidni dermatofitni inhibitor zavira apoptozo imunskih celic in vpliva na procesiranje antigena (ovalbumina), nismo pa opazili njegovega vpliva na proliferacijo limfocitov.

8 POVZETEK

V doktorskem delu smo razvili protokol izolacije proteinskega in neproteinskega (peptidnega) inhibitorja cisteinskih peptidaz iz celic pomembne zoofilne vrste dermatofitnih gliv *Trichophyton mentagrophytes*. Glivo smo najprej gojili na trdnem, nato pa še v tekočem gojišču. Glivni micelij smo razbili z uporabo mehanske in ultrazvočne homogenizacije.

Proteinski inhibitor

Proteinski inhibitor smo izolirali z uporabo treh zaporednih kromatografskih metod. Prva je bila afinitetna kromatografija na koloni CM-papain Sepharose 4B, sledila ji je ionsko izmenjevalna kromatografija na CIM-disku ter nazadnje še tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo. Izolirani inhibitor smo tudi delno okarakterizirali. Glivni inhibitor se pojavlja v nizkomolekularni obliki z velikostjo 12 kDa in visokomolekularni obliki z velikostjo 24 kDa. Inhibira proteolitično aktivnost cisteinskih peptidaz papaina, katepsina B in L, ne pa tudi katepsina H ali serinske peptidaze tripsina. Inhibitor iz dermatofita *T. mentagrophytes* je v omenjenih biokemijskih značilnostih (molekulska masa, nizko- in visokomolekularna oblika, profil inhibicije) podoben klitocipinu iz glive *Lepista nebularis* in macrocipinom iz glive *Macrolepiota procera*. Z avtomatskim sekveniranjem smo po odstranjevanju N-končne blokade z encimskim in kislim razgrajevanjem določili nekaj delnih aminokislinskih zaporedij inhibitorja. Ker nismo našli podobnosti v aminokislinskem zaporedju med proteinskimi zaporedji inhibitorja iz glive *T. mentagrophytes* in zaporedji drugih inhibitorjev cisteinskih peptidaz, sklepamo, da ima izolirani glivni inhibitor določene strukturne posebnosti. Za uvrstitev inhibitorja iz dermatofita *T. mentagrophytes* v MEROPS-ovo družino glivnih inhibitorjev I48, kamor uvrščamo tudi klitocipin in makrocipine, je potrebnih še več strukturnih raziskav na najverjetneje rekombinantnem proteinu. Iz rezultatov prenosa proteinov na membrano z imunodetekcijo je razvidno, da serumi kuncev, naravno okuženih z glivo *T. mentagrophytes*, vsebujejo protitelesa le proti visokomolekularnim oblikam inhibitorja.

Neproteinski inhibitor

Neproteinski (peptidni) inhibitor cisteinskih peptidaz smo prav tako izolirali z uporabo več metod. Glivni citosol smo najprej ultrafiltrirali, da smo ločili visokomolekularne komponente od nizkomolekularnih. Sledila je ekstrakcija na šibko anionsko izmenjevalni

koloni SPE, ter nazadnje še kromatografija visoke ločljivosti z obrnjeno fazo. Izolirani glivni peptidni inhibitor je najverjetneje tripeptid, ki smo mu z masno analizo določili razmerje masa/naboj 314. Peptidni inhibitor je dokazano stabilen v širokem temperaturnem (30–90 °C) in pH območju (2–12). Podobno kot proteinski inhibitor zavira proteolitično aktivnost cisteinskih peptidaz papaina, katepsinov B in L, ne pa tudi katepsina H ali serinske peptidaze tripsina. Z imunokemijskimi raziskavami smo dokazali, da peptidni dermatofitni inhibitor zavira apoptozo imunskih celic in vpliva na procesiranje antigena (ovalbumina).

Za zdaj še poznamo bioloških vlog proteinskega in peptidnega inhibitorja dermatofita *T. mentagrophytes*. Poleg nadzora endogene proteolize najverjetneje sodelujeta pri zaščiti pred gostiteljevimi obrambnimi mehanizmi, ki so odgovorni za odstranjevanje dermatofitnih celic s površine kože. Glive namreč med svojo rastjo v medij (gojišče) dokazano izločajo oba inhibitorja. Nadaljnje raziskave so potrebne, da bi lahko osvetlili mehanizme, ki so med okužbo vpleteni v kompleksne interakcije med dermatofitom in njegovim gostiteljem. Selektivna inhibicija cisteinskih peptidaz z glivnim peptidnim inhibitorjem predstavlja terapevtski potencial za modulacijo imunskih procesov, povezanih z molekulami MHC II.

9 SUMMARY

The protocol of isolation of a protein and a non-protein (peptide) inhibitor of cysteine peptidases from cells of an important zoophille dermatophyte species *Trichophyton mentagrophytes* is reported. The fungus was grown on solid and in liquid medium. Fungal mycelia were mechanically and ultrasonically disintegrated.

Protein inhibitor

A three-step procedure was developed for the purification of *T. mentagrophytes* inhibitor: affinity chromatography on CM-papain Sepharose 4B column, followed by ion exchange chromatography on CIM discs and reverse phase high performance liquid chromatography. The isolated protein inhibitor was partially characterized. It exists in a high (24 kDa) and low (12 kDa) molecular mass form. It inhibits the proteolytic activity of cysteine peptidases papain, cathepsins B and L, but not of cathepsin H or serine peptidase trypsin. The protein inhibitor exhibits some similarities in basic biochemical characteristics (molecular mass, low and high molecular mass form and inhibitory profiles) with clitocypin from *Lepista nebularis* and macrocypins from *Macrolepiota procera*. Both forms of the *T. mentagrophytes* inhibitor were hydrolyzed enzymatically and with mild acid hydrolysis. The obtained peptides were separated and N-terminally sequenced. Since no significant sequence homologies have so far been found between the obtained peptides and any known cysteine protease inhibitors, we can speculate that the *T. mentagrophytes* inhibitor has some structurally unique characteristics.

However, for its classification into the same MEROPS family of fungal inhibitors (e.g. I48) as clitocypin and macrocypins, additional structural analyses on recombinant protein are needed. Results of Western blotting procedures with immunodetection indicate that sera of rabbits naturally infected with *T. mentagrophytes* contain antibodies against higher molecular mass forms of the inhibitor.

Peptide inhibitor

Isolation of a non-protein (peptide) inhibitor of cysteine peptidases again involved the use of different methods. Fungal cytosol was ultrafiltrated to remove high molecular mass components. It was then loaded onto a weak anion exchange SPE column and the obtained extract was subjected to reverse phase high performance liquid chromatography.

The isolated fungal small inhibitor is most likely a tripeptide, its ratio mass/z 314 was deducted from mass analyses. The peptide inhibitor is stable in a wide temperature (30–90 °C) and pH range (2–12). It inhibits the proteolytic activity of cysteine peptidases papain, cathepsins B and L, but not that of cathepsin H and serine peptidase trypsin. Results of immunochemical analyses indicate that the peptide dermatophyte inhibitor diminishes apoptosis of immune cells and affects the processing of the antigen (ovalbumin).

A biological target of the *T. mentagrophytes* protein and peptide inhibitors has not yet been found. Besides the regulatory role in the fungal endogenous proteolysis, their roles may be expected in protection against the host's immune cells that are responsible for elimination of the fungus from colonized skin. This is supported by the observation that during their growth, the fungi secrete both inhibitors in the culturing medium. Additional analyses are needed to illuminate the mechanisms responsible for the complex interaction between the dermatophyte and its host during the infection. Selective inhibition of cysteine peptidases with peptide fungal inhibitor may have an important therapeutic potential in modulating class II-restricted immune processes.

10 LITERATURA

Alexopoulos CJ, Mims CW, Blackwell M (1996). Introductory mycology. 4th ed. New York: Wiley, 214–57.

Allen HL, Deepe Jr. GS (2005). Apoptosis modulates protective immunity to the pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum*. J Clin Invest 115 (10): 2875–85.

Ameen M (2010). Epidemiology of superficial fungal infections. Clin Dermatol 28: 197–201.

Aoyagi T, Takeuchi T, Matsuzaki A et al. (1969). Leupeptins, new protease inhibitors from actinomycetes. J Antibiot 22(6): 283–7.

Atkinson HJ, Babbitt PC, Sajid M (2009). The global cysteine peptidase landscape in parasites. Trends Parasitol 25(12): 573–81.

Barrett AJ (1972). A new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases. Anal Biochem 47: 280–93.

Barrett AJ, Rawlings ND (2001). Evolutionary lines of cysteine peptidases. Biol Chem 382: 727–33.

Berdowska I (2004). Cysteine proteases as disease markers. Clin Chim Acta 342: 41–69.

Bird PI, Trapani JA, Villadangos JA (2009). Endolysosomal proteases and their inhibitors in immunity. Nat Rev Immunol 9(12): 871–82.

Bode W, Huber R (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. Eur J Biochem 204: 433–51.

Bode W, Huber R (2000). Structural basis of the endoproteinase – protein inhibitor interaction. Biochim Biophys Acta 1477: 241–52.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–54.

Brouha F, Descamps F, Fett T, Losson B, Gerday C, Mignon B (2001). Purification and characterization of a 43,5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. *Med Mycol* 39: 269–75.

Brzin J, Rogelj B, Popovič T, Štrukelj B, Ritonja A (2000). Clitocypin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*. *J Biol Chem* 275(26): 20104–9.

Burster T, Macmillian H, Hou T, Boehm BO, Mellins ED (2010). Cathepsin G: roles in antigen presentation and beyond. *Mol Immunol* 47: 658–65.

Cassens U, Lewinski G, Samraj AK et al. (2003). Viral modulation of cell death by inhibition of caspases. *Arch Immunol Ther Exp* 51: 19–27.

Chapman HA, Riese RJ, Shi GP (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 59: 63–88.

Chermette R, Ferreira L, Guillot J (2008). Dermatophytoses in animals. *Mycopathologia* 166: 385–405.

Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK (2008). Caspases – an update. *Comp Biochem Physiol Part B* 151: 10–27.

Colbert JD, Matthews SP, Miller G, Watts C (2009). Diverse regulatory roles for lysosomal proteases in the immune response. *Eur J Immunol* 39: 2955–65.

Conus S, Simon HU (2008). Cathepsins: key modulators of cell death and inflammatory responses. *Biochem Pharmacol* 76: 1374–82.

Dahl MV (1993). Suppression of immunity and inflammation by products produced by dermatophytes. *J Am Acad Dermatol* 28: S19–23.

Dahl MV (1994). Dermatophytosis and the immune response. *J Am Acad Dermatol* 31(3): S34–41.

Dainichi T, Maekawa Y, Ishii K et al. (2001). Nippocystatin, a cysteine protease inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, inhibits antigen processing and modulates antigen-specific immune response. *Infect Immun* 69: 7380–6.

Dickinson DP (2002). Cysteine peptidases of mammals: their biological roles and potential effects in the oral cavity and other tissues in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 13(3): 238–75.

Drobnič-Košorok M, Zrimšek P, Zdovc I (1998). Immunogenic proteins in dermatophyte mycelial extracts. *Acta Dermatovenerolog Alp Panon Adriat* 7: 129–33.

Dubin G (2005). Proteinaceous cysteine protease inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 62: 653–69.

Dubreux-Daloz L, Dupoux A, Cartier J (2008). IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle* 7(8): 1036–46.

Edman P (1949). A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch Biochem* 22(3): 475.

Erlanger BF, Kokowski N, Collen W (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch Biochem Biophys* 95: 271–6.

Espagne E, Douris V, Lalmanach G et al. (2005). A virus essential for insect host-parasite interactions encodes cystatins. *J Virol* 79(15): 9765–76.

Galeša K, Thomas RM, Kidrič M, Pain RH (2004). Clitocypin, a new cysteine proteinase inhibitor, is monomeric: impact on the mechanism of folding. *Biochem Biophys Res Commun* 324: 576–8.

Galeša K, Brzin J, Sabotič J, Turk D (2006). Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of the cysteine protease inhibitor clitocypin. *Acta Cryst F* 62: 10–2.

Gheorghe MT, Jörnvall H, Bergman T (1997). Optimized alcoholic deacetylation of N-acetyl-blocked polypeptides for subsequent Edman degradation. *Anal Biochem* 254: 119–25.

Gradehandt G, Ruede E (1991). The endo/lysosomal protease cathepsin B is able to process conalbumin fragments for presentation to T cells. *Immunology* 74: 393–8.

Gupta AK, Einarson TR, Summerbell RC, Shear NH (1998). An overview of topical antifungal therapy in dermatomycoses: a North American perspective. *Drugs* 55: 645–74.

Gyrd-Hansen M, Meier P (2010). IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- κ B, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 10: 561–74.

Hanada K, Tamai M, Yamagishi M, Ohmura S, Sawada J, Tanaka I (1978). Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric Biol Chem* 42(3): 523–8.

Hartmann S, Lucius R (2003). Modulation of host immune response by nematode cystatins. *Int J Parasitol* 33: 1291–302.

Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 51(4): 2–15.

Hedrick SM, Chen IL, Alves BN (2010). Intertwined pathways of programmed cell death in immunity. *Immunol Rev* 236: 41–53.

Hengartner MO (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805): 770–6.

Hibbets K, Hines B, Williams D (1999). An overview of proteinase inhibitors. *J Vet Intern Med* 13: 302–8.

Honey K, Rudensky AY (2003). Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3(6): 472–82.

Hsing LC, Rudensky AY (2005). The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* 207: 229–41.

Irvine JW, Coombs GH, North MJ (1992). Cystatin-like cysteine proteinase inhibitors of parasitic protozoa. *FEMS Microbiol Lett* 96: 67–72.

Isshiki K, Nishio M, Sakurai N, Uchida T, Okuda T, Komatsubara S (1998). TMC-52A to D, novel cysteine proteinase inhibitors, produced by *Gliocladium sp.* *J Antibiot* 51(7): 629–33.

Isshiki K, Asai Y, Tanaka S et al. (2001). Aurantiamide acetate, a selective cathepsin inhibitor, produced by *Aspergillus penicilloides*. *Biosci Biotechnol Biochem* 65(5): 1195–7.

Joshi BN, Sainani MN, Bastawade KB, Gupta VS, Ranjekar PK (1998). Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. *Biochem Biophys Res Commun* 246(2): 382–7.

Kidrič M, Fabian H, Brzin J, Popovič T, Pain RH (2002). Folding, stability, and secondary structure of a new dimeric cysteine proteinase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 297(4): 962–7.

Laskowski M Jr, Ikunoshin K (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Ann Rev Biochem* 49: 593–626.

Laskowski M Jr, Quasim MA (2000). What can the structures of enzyme – inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? *Biochim Biophys Acta* 1477: 324–37.

Lecaille F, Kaleta J, Brömme D (2002). Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev* 102: 4459–88.

Lennon-Duménil AM, Bakker AH, Wolf-Bryant P, Ploegh HL, Lagaudriére-Gesbert C (2002). A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 14: 15–21.

Leung D, Abbenante G, Fairlie DP (2000). Protease inhibitors: current status and future prospects. *J Med Chem* 43(3): 305–41.

Leung-Toung R, Li W, Tam TF, Karimian K (2002). Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a review. *Curr Med Chem* 9(9): 979–1002.

Mace PD, Shirley S, Day CL (2010). Assembling the building blocks: structure and function of inhibitor of apoptosis proteins. *Cell Death Differ* 17: 46–53.

Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A (2008). Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia* 166: 369–83.

Matsumoto K, Mizoue K, Kitamura K, Tse WC, Huber CP, Ishida T (1999). Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives. *Biopolymers* 51: 99–107.

Mendez-Tovar LJ (2010). Pathogenesis of dermatophytosis and tinea versicolor. *Clin Dermatol* 28: 185–9.

MEROPS. Cambridge: Trust Sanger Institute (17. 9. 2009).

<http://merops.sanger.ac.uk/index.shtml> (2.2. 2011).

Meyer-Hoffert U (2009). Reddish, scaly, and itchy: how proteases and their inhibitors contribute to inflammatory skin diseases. *Arch Immunol Ther Exp* 57(5): 345–54.

Mignon B, Swinnen M, Bouchara J et al. (1998). Purification and characterization of a 31,5 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. *Med Mycol* 36: 395–404.

Mihelčič D (2003). Znotrajcelični inhibitorji cisteinskih proteaz dermatofita *Microsporum canis*. Ljubljana: Veterinarska fakulteta. Magistrsko delo.

Mlinarič A, Kreft S, Umek A, Štrukelj B, Popovič T (2000). Cysteine proteinase inhibitors screening of fungal species growing in Slovenia. *Acta Pharm* 50: 39–48.

Monod M, Capoccia S, Léchenne B, Zaugg C, Holdom M, Jousson O (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int J Med Microbiol* 292(5-6): 405–19.

Monod M, Léchenne B, Jousson O et al. (2005). Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Microbiology* 151: 145–55.

Monod M (2008). Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia* 166: 285–94.

Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ (1994). A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods* 28(3): 239–42.

North MJ (1982). Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. *Microbiol Rev* 46(3): 308–40.

Ochieng J, Chaudhuri G (2010). Cystatin superfamily. *J Health Care Poor Underserved* 21: 51–70.

Ogawa H, Summerbell RC, Clemons KV et al. (1998). Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. *Med Mycol* 36: 166–73.

Otlewski J, Jelen F, Zakrzewska M, Oleksy A (2005). The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *EMBO J* 24: 1303–10.

Otsuka T, Muramatsu Y, Higaki T et al. (1999a). WF14861, a new cathepsin B and L inhibitor produced by *Colletotrichum sp.* I. Taxonomy, production, purification and structure elucidation. *J Antibiot* 52(6): 536–41.

Otsuka T, Muramatsu Y, Niikura K, Okamoto M, Hino M, Hashimoto S (1999b). WF14861, a new cathepsin B and L inhibitor produced by *Colletotrichum sp.* II. Biological properties. *J Antibiot* 52(6): 542–7

Otsuka T, Muramatsu Y, Nakanishi T et al. (2000). WF14865A and B, new cathepsin B and L inhibitors produced by *Aphanoascus fulvescens*. I. Taxonomy, production, purification and biological properties. *J Antibiot* 53(5): 449–58.

Phillips MA, Fletterick RJ (1992). Proteases. *Curr Opin Struct Biol* 2: 713–20.

Podolin PL, Bolognese BJ, Carpenter DC et al. (2008). Inhibition of invariant chain processing, antigen-induced proliferative responses, and the development of collagen-induced arthritis and experimental autoimmune encephalomyelitis by a small molecule cysteine protease inhibitor. *J Immunol* 180: 7989-8003.

Rawlings ND, Barrett AJ (1999). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 27(1): 325–31.

Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ (2004). Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J* 378: 705–16.

Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ (2006). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 34: D270–2.

Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 38: D227–33.

Reiser J, Adair B, Reinheckel T (2010). Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest* 120(10): 3421–31.

Riese RJ, Mitchell RN, Villadangos J et al. (1998). Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin Invest* 101(11): 2351–63.

Rodriguez GM, Diment S (1995). Destructive proteolysis by cysteine proteases in antigen presentation of ovalbumin. *Eur J Immunol* 25: 1823–7.

Rzychon M, Sabat A, Kosowska K, Potempa J, Dubin A (2003). Staphostatins: an expanding new group of proteinase inhibitors with unique specificity for the regulation of staphopains, *Staphylococcus spp.* cysteine proteinases. *Mol Microbiol* 49(4): 1051–66.

Rzychon M, Chimel D, Stec-Niemczyk J (2004). Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochim Pol* 51(4): 861–73.

Sabotič J, Trček T, Popovič T, Brzin J (2007a). Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. *J Biotechnol* 128: 297–307.

Sabotič J, Galeša K, Popovič T, Leonardi A, Brzin J (2007b). Comparison of natural and recombinant cliticypins, the fungal cysteine protease inhibitors. *Protein Expr Purif* 53: 104–11.

Sabotič J, Popovič T, Puizdar V, Brzin J (2009). Macrocybins, a family of cysteine protease inhibitors from basidiomycete *Macrolepiota procera*. *FEBS J* 276: 4334–45.

Schirmeister T, Kaeppler U (2003). Non-peptidic inhibitors of cysteine proteases. *Mini Rev Med Chem* 3(4): 361–73.

Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B (2008). Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia* 166: 335–52.

Stennicke HR, Ryan CA, Salvesen GS (2002). Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition. *Trends Biochem Sci* 27(2): 94–101.

Suda H, Aoyagi T, Hamada M, Takeuchi T, Umezawa H (1972). Antipain, a new protease inhibitor isolated from actinomycetes. *J Antibiot* 25(4): 263–6.

Simpanya MF, Baxter M (1996). Multiple proteinases from two *Microsporium* species. *J Med Vet Mycol* 34: 31–6.

Teramura K, Orita M, Matsumoto H, Yasumuro K, Abe K (1996). Effects of YM-51084 and YM-51085, new inhibitors produced by *Streptomyces sp.* Q21705, on cathepsin L. *J Enzyme Inhib* 11(2): 115–21.

Tsushima H, Mine H, Hoshika K, Kawakami Y, Hyodoh F, Ueki A (1992). *Candida albicans* produces a cystatin-type cysteine proteinase inhibitor. *J Bacteriol* 174(14): 4807–10.

Turk B, Turk V, Turk D (1997). Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem* 378: 141–50.

Turk B, Turk D, Turk V (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 1477: 98–111.

Turk V, Turk B, Turk D (2001). Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J* 20 (17): 4629–33.

Turk B, Turk D, Salvesen GS (2002). Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr Pharm Des* 8: 1623–37.

Turk B, Turk V (2009). Lysosomes as "suicide" bags in cell death: myth or reality? *J Biol Chem* 284(33): 21783–7.

van Eijk M, van Noorden CJF, de Groot C (2003). Proteinases and their inhibitors in the immune system. *Int Rev Cytol* 222: 197–236.

Unanue ER (2005). Processing and presentation of antigen by the class II histocompatibility system. In: Kaufmann SHE, Steward MW, eds. *Topley & Wilson's microbiology and microbial infections*. 10th ed. Vol. 7. Immunology. London: Edward Arnold, 375-85.

Vermout S, Tabart J, Baldo A, Mathy A, Losson B, Mignon B (2008). Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia* 166: 267–75.

Vray B, Hartmann S, Hoebeke J (2002). Immunomodulatory properties of cystatins. *Cell Mol Life Sci* 59(9): 1503–12.

Weitzman I, Summerbell RC (1995). The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 8(2): 240–59.

Woo JT, Ono H, Tsuji T (1995). Cathestatins, new cysteine protease inhibitors produced by *Penicillium citrinum*. *Biosci Biotech Biochem* 59(2): 350–2.

Woodfolk JA (2005). Allergy and dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 18: 30–43.

Wyllie AH (2010). "Where, o death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol* 42: 4–9

Yaginuma S, Asahi A, Morishita A, Hayashi M, Tsujino M, Takada M (1989). Isolation and characterization of new thiol protease inhibitors estatins A and B. *J Antibiot* 42(9): 1362–9.

Yamamoto Y, Kurata M, Watabe S, Murakami R, Takahashi SY (2002). Novel cysteine proteinase inhibitors homologous to the proregions of cysteine proteinases. *Curr Protein Pept Sci* 3(2): 231–8.

Yang Y, Liu ZH, Ware CF, Ashwell JD (1997). A cysteine protease inhibitor prevents activation-induced T-cell apoptosis and death of peripheral blood cells from human immunodeficiency virus-infected individuals by inhibiting upregulation of Fas ligand. *Blood* 89(2): 550–7.

Yu CM, Curtis JM, Walter JA et al. (1996). Potent inhibitors of cysteine proteases from the marine fungus *Microascus longirostris*. *J Antibiot* 49(4): 395–7.

Zhang T, Maekawa Y, Handba J et al. (2000). Lysosomal cathepsin B plays an important role in antigen processing, while cathepsin D is involved in degradation of the invariant chain in ovalbumin-immunized mice. *Immunology* 100: 13-20.

Zrimšek P, Kos J, Pinter L, Drobnič-Košorok M (1999). Detection by ELISA of the humoral immune response in rabbits naturally infected with *Trichophyton mentagrophytes*. *Vet Microbiol* 70: 77–86.

Zrimšek P, Drobnič-Košorok M (2003a). Diagnostic potential of immunoblot analysis for rabbits infected with *Trichophyton mentagrophytes*. *Food Technol Biotechnol* 41: 367–70.

Zrimšek P, Kos J, Pinter L, Drobnič-Košorok M (2003b). Serum specific antibodies in rabbits naturally infected with *Trichophyton mentagrophytes*. *Med Mycol* 41: 321–9.

By three methods we may learn wisdom: First, by reflection, which is noblest; second, by imitation, which is easiest; and third by experience, which is the bitterest.

Confucius

ZAHVALA

Vsaka stvar ima svoj začetek, svoj potek in svoj konec.

Za *začetek* tega dela je najbolj zaslužna mentorica, prof. dr. Marinka Drobnič Košorok. Hvala za ponujeno priložnost.

Pri *nastajanju* dela je sodelovalo več ljudi. Na prvem mestu bi se rada zahvalila Katarini Babnik za njene 'zlate roke' v laboratoriju ter za njeno dolgoletno pomoč tako pri raziskovalnem kot pedagoškem delu. Marsičesa ne bi bilo brez tebe!

Doc. dr. Ireni Zdovc se zahvaljujem za delo z glivami in njeno 'nalezljivo' navdušenje nad njimi. Hvala za vse prijazne besede!

Zahvala gre tudi doc. dr. Tadeju Malovrhu. Boljšega somentorja si človek ne bi mogel želeli. Ravno prav karanja na eni in pohvale na drugi strani. Vedno si mi znal prisluhniti in si zaupal vame!

Hvaležna sem dr. Alešu Podgorniku, ki je premaknil izolacijo proteinskega inhibitorja z mrtve točke. Hvala dr. Vidi Smrekar za pomoč pri delu s CIM-diski.

Velika hvala dr. Adrijani Leonardi za HPLC-analize in sekveniranje ter vse pogovore, ki sva jih ob tem opravili. Hvala tudi dr. Igorju Križaju za vse kritične pripombe in pomoč pri nastanku članka.

Hvala Borutu Založniku in Janu Antoniću za masne analize. Hvala mag. Brigiti Grecc-Smole za skrben pregled literature.

Najlepša hvala tudi prof. dr. Ljiljani Pinter za članstvo v strokovni komisiji in hitro branje naloge.

Rada bi se zahvalila vsem nekdanjim in sedanjim sodelavcem. Tina, hvala za vso pomoč pri HPLC-izolaciji 'malih' inhibitorjev in tvoje prijateljstvo, hvala Jerneju, Luciji, Marjani, Tomažu, Moniki, Nini, Robiju, Boštjanu – zaradi vas je bilo in je vzdušje na inštitutu nekaj posebnega. Darja, od tebe sem se veliko naučila, hvala ker me ves čas spremljaš, bodriš in sočustvuješ! Suzana, hvala za tvoje angleške prevode in vedno nasmejan obraz! Valentina, hvala za vse spodbudne pogovore in malice! Hvala nekdanjemu predstojniku prof. dr. Vojtehu Cestniku in sedanji predstojnici prof. dr. Silvestri Kobal za vso podporo.

Najlepša hvala vsem mojim prijateljem, še posebej Tini za dolgoletno prijateljstvo in seveda za skrbno lektoriranje naloge. Hvala Robiju za njeno stilsko oblikovanje.

Hvala tudi vsem tistim, ki jih nisem omenila, pa so se kakorkoli dotaknili mojega življenja in omogočili, da sem, kar sem.

Na *koncu* bi se rada zahvalila še moji družini – staršem za podporo in pomoč, sestrici Jasni za vso organizacijo in 'styling' pri zagovoru.

Povsem na koncu pride najpomembnejše. Največja zahvala gre seveda mojim trem najdražjim. Valči, hvala za dolgoletno ljubezen in podporo! Lari in Leonček, naučila sta me, kaj je v življenju res pomembno. Oba sta že pred svojima rojstvoma 'okusila' raziskovalno delo. Vsi trije ste se veselili mojih uspehov in me tolažili, ko kaj ni šlo. Rada vas imam!

PRILOGA

Izvirni znanstveni članek:

Premrov Bajuk B, Zdovc I, Smrekar V, Križaj I, Leonardi A, Drobnič Košorok M (2011).
Dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* produces cysteine protease inhibitor. *Acta
Chim Slov* 58: 33–40.