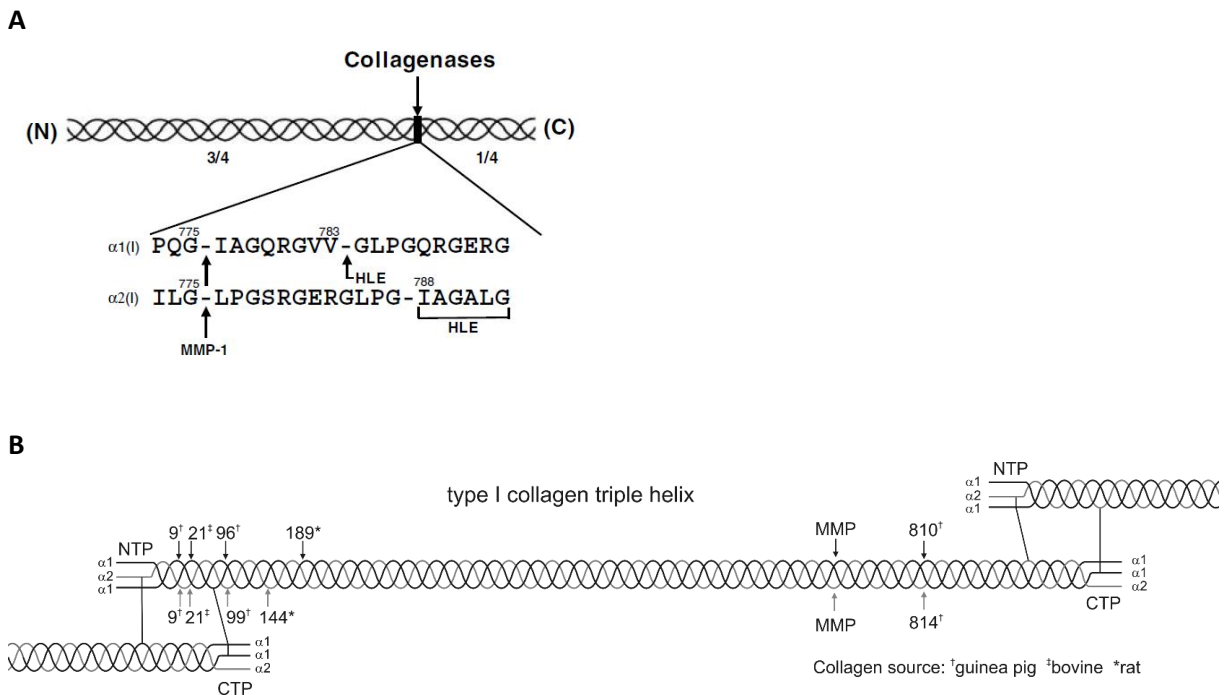


Vaja 6: Cepitev kolagena tipa I s kolagenazami

Trojna vijačnica kolagena je izjemno odporna na hidrolitično razgradnjo. Peptidaze, ki so sposobne to strukturo cepiti, imenujemo kolagenaze. Pri človeku med kolagenaze spadajo nekatere metalopeptidaze, levkocitna elastaza ter cisteinski katepsin K. Metalopeptidaze in elastaza cepijo trojno vijačnico kolagena tipa I na točno določenem mestu, kjer je struktura trojne vijačnice nekoliko razrahljana (slika 1A), katepsin K pa cepi na več mestih blizu obeh koncev verig (slika 1B). Poleg regije trojne vijačnice vsebujejo kolagenski trimeri še kratka N- in C-končne telopeptide, ki ne tvorijo strukture trojnice vijačnice, temveč tvorijo kovalentne prečne povezave med dvema verigama enega trimera ter eno verigo sosednjega trimera. Te regije so bistveno manj odporne na proteolizo kot sama trojna vijačnica.

Poleg endogenih človeških peptidaz lahko v človeškem telesu delujejo tudi bakterijske kolagenaze. Med njimi so najbolj poznane in najpogostejše kolagenaze iz priložnostnega patogena *Clostridium difficile*, ki je sicer del normalne črevesne flore. Ti encimi so bistveno manj specifični od endogenih peptidaz.



Slika 1: (A) cepitvo mesto metalopeptidaz in levkocitne elastaze v kolagenu tipa I. (B) cepitvena mesta katepsina K v kolagenu tipa I. N-in C-končni telopeptidi so označeni kot NTP oz. CTP.

Namen vaje je primerjati delovanje nekaterih kolagenolitičnih (katepsin K, klostridijska kolagenaza) in nekolagenolitičnih peptidaz (papain, tripsin) na nativen in denaturiran kolagen iz telečje kože, ki je sestavljen pretežno iz kolagena tipa I.

Materiali:

- topen nativen kolagen iz telečje kože – založna raztopina s koncentracijo 8 mg/ml,
- denaturiran kolagen (pripravite iz nativnega s segravanjem po navodilih asistenta)
- encimi – rekombinanten človeški katepsin K, papain, tripsin iz goveje vranice, klostridijska kolagenaza (koncentracije založnih raztopin vam bo povedal asistent na vajah),
- 1 M DTT,
- Reakcijski pufer 1: 100 mM Na-acetat pH 5,5, 1 mM EDTA
- Reakcijski pufer 2: 50 mM TES pH 7,4, 0,36 mM CaCl₂
- 8 % poliakrilamidni gel za NaDS-PAGE

Izvedba:

Za vsako reakcijo pripravimo reakcijsko mešanico, ki bo v končnem volumnu 20 µl vsebovala 10 µg substrata (nativen ali denaturiran kolagen) in encim (končne koncentracije za posamezen encim boste določili po posvetu z asistentom). Reakcije s cisteinskima peptidazama (katepsin K in papain) izvajate v reakcijskem pufru 1, ki dodatno vsebuje še 5 mM DTT, s preostalima dvema pa v reakcijskem pufru 2.

Vse reakcijske zmesi inkubirate 1 uro pri 28 °C, nato pa reakcije prekinete z dodatkom vzorčnega pufra za NaDS-PAGE in takojšnjim segretjem vzorcev na vsaj 85 °C. Vzorce nato ločite na 8% poliakrilamidnem gelu v prisotnosti NaDS in proteinske lise obarvate s Coomassie Brilliant Blue R-250.