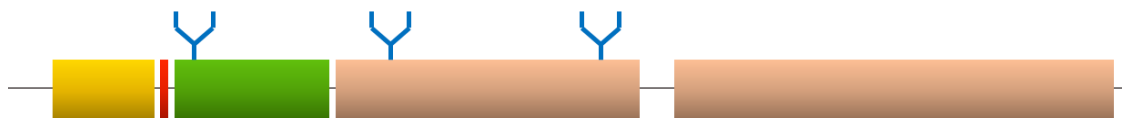


DEGLIKOZILACIJA VITRONEKTINA

UVOD

Glikozilacija je ena najpogostejših kovalentnih modifikacij proteinov, kjer pride do kovalentne vezave oligosaharida na protein. Glede na to, na katero aminokislino se oligosaharid veže, ločimo tri vrste glikozilacije: če pride do vezi s hidroksilno skupino serina oz. treonina (*O*-glikozilacija) ali preko aminske skupine asparagina (*N*-glikozilacija) ali preko triptofanskega aminokislinskega ostanka (*C*-glikozilacija). V primeru *N*-glikozilacije se na asparaginsko enoto oligosaharid lahko pripne le, če je ta del značilnega zaporedja Asp–X–Ser/Thr, kjer je X katerikoli aminokislinski ostanek razen prolina. Slika 1 prikazuje vitronektin s tremi *N*-glikozilacijskimi mesti.



Slika 1: Shematski prikaz vitronektina z označenimi *N*-glikozilacijskimi mesti.

Za razliko od *O*-glikozilacije, kateri so podvrženi tako notrajcelični kot tudi zunajcelični proteini, poteka proces *N*-glikozilacije samo na tistih proteinih, ki so namenjeni za izločanje iz celice. Čeprav je glikozilacija določenih proteinov nujen pogoj za njihovo pravilno zvitje in posledično funkcionalnost, služi glikozilacija proteinov večine proteinov kot zaščita proti degradaciji. V primeru nekaterih proteinov zunajceličnega matriksa ima glikozilacija pomembno vlogo pri procesih celične adhezije in celične komunikacije.

PNGaza F, znana tudi kot glikopeptid *N*-glikozidaza, *N*-glikozidaza F ali glikopeptidaza (Slika 2) je hidrolaza, ki katalizira kemijsko reakcijo cepitve vezi med glukozaminoglikanom in asparaginom in je najpogosteje uporabljen encim za študije deglikozilacij *N*-vezanih oligosaharidov.



Slika 2: Struktura PNGaze F, iz katere je očitna dimerna struktura encima.

NAMEN VAJE

Namen vaje je z vitronektina odcepiti *N*-glikozilirane oligosaharide, ter primerjati elektroforezno mobilnost ter adhezivne lastnosti deglikozilirane oblike in jo primerjati z lastnostmi glikoziliranega proteina. Spoznati metodo barvanja s srebrom.

POSTOPEK DELA

1. Pripravite 10 ml reakcijskega pufru za cepitev: 0,2 % NaDS, 100 μ M β -merkaptoetanol.
2. K 18 μ l izoliranega proteina vitronektina (gre še vedno za isti protein, ki se nahaja v 20 mM pufru HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM cistein, pH 7,5) oz. drugega kontrolnega proteina, dodajte 2 μ l prej pripravljenega reakcijskega pufru za cepitev. Kuhajte vzorec pri 100 °C 10 min, da pride do denaturacije proteina.
3. Ohladite mikrocentrifugirko z vzorcem na sobno temperaturo.
4. Dodajte 5 μ l pripravljenega encima PNGaze F v reakcijsko mešanico.
5. Inkubirajte pri 37 °C 1 h.
6. Ustavite reakcijo s ponovnim kuhanjem reakcijske zmesi pri 100 °C 5 min.
7. 10 μ l reakcijske mešanice prenesite v novo mikrocentrifugirko in dodajte 5 μ l nanašalni pufer z reducentom, k preostalemu proteinu pa dodajte 5 μ l pufru brez reducenta.
8. Aparaturo priključite na napetost in pustite, da elektroforeza poteka pri 35 mA/gel dokler barvilo bromfenolmodro ne pride do spodnjega roba.
9. Proteine v gelu fiksirajte v raztopini 50 % metanola in 5 % očetne kisline 10 min.
10. Gel prenesite v raztopino 50 % metanola za 10 min.
11. Gel spirajte v vodi 5 min, pri tem jo vmes zamenjajte.
12. Gel prenesite v raztopino natrijevega tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) za 1 min (!).
13. Gel prenesite v vodo in ga 2 \times dobro sperite.
14. Proteine v gelu barvajte z inkubacijo v raztopini 0,1 % srebrovega nitrata (AgNO_3) z dodatkom 0,08 % formaldehida (37 %) 20 min.
15. Gel sperite 2 \times z dH_2O .
16. Gel inkubirajte v raztopini 2 % natrijevega karbonata (Na_2CO_3) z dodatkom 0,04 % formaldehida (37 %) do zelene intenzitete lis.
17. Reakcijo zaustavite z dodatkom citronske kisline ali prenosom gela v 5 % očetno kislino. Inkubirajte 10 min.
18. Gel prenesite v dH_2O .

19. V spodnji pravokotnik narišite, kako je zgedal NaDS-PAGE gel po barvanju s srebrom. Ugotovite, ali prihaja do razlik v potovanju glikoziliranega in neglikoziliranega proteina.

