

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kristijan TKALEC

**IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA IN
PRIMERJAVA PROTEINA LISTERIOLIZINA O
IN NJEGOVEGA MUTANTA H311A**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Kristijan TKALEC

**IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA IN PRIMERJAVA PROTEINA
LISTERIOLIZIN O IN NJEGOVEGA MUTANTA H311A**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**ISOLATION, CHARACTERISATION AND COMPARISON OF THE
PROTEIN LISTERIOLYSIN O AND ITS MUTANT H311A**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo na v Laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija biotehnologije je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Gregor Anderluh, za somentorico dr. Marjetka Podobnik, za recenzentko prof. dr. Nataša Poklar Ulrih ter za predsednico komisije prof. dr. Branka Javornik.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka Javornik
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Gregor Anderluh
Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo

Članica: dr. Marjetka Podobnik
Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo

Članica: prof. dr. Nataša Poklar Ulrih
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Diplomsko delo je rezultat lastnega dela. Podpisan se strinjam z objavo svoje diplomske naloge v polnem tisku na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Kristijan Tkalec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.1:579.61:543.2/9(043.2)=163.6
KG	proteomika/izolacija proteinov/listerioloizin O/od holesterola odvisni citolizini/ <i>Listeria monocitogenes</i> / toksin, ki tvori pore/listerioza/karakterizacija/hemolizna aktivnost/termična denaturacija/H311A
AV	TKALEC, Kristijan
SA	ANDERLUH, Gregor (mentor)/PODOBNIK, Marjetka (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikova 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2013
IN	IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA IN PRIMERJAVA PROTEINA LISTERIOLOIZIN O IN NJEGOVEGA MUTANTA H311A
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XVI, 61 str., 8 pregl., 43 sl., 2 pril., 58 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Listerioloizin O (LLO) je protein bakterije <i>Listeria monocitogenes</i> in spada v skupino od holesterola odvisnih citolizinov (CDC), ki tvorijo pore v membrani. Med vsemi CDC-ji je LLO edini, ki je odvisen od pH vrednosti okolice. Najbolj je aktiven pri pH 5,5, kar omogoča bakteriji pobeg iz fagolizosoma. Po uspešnem pobegu bakterije v citosol, prične bakterija z razmnoževanjem in vdiranjem v sosednjo celico. LLO je sestavljen iz štirih domen, od katerih se D2 in D3 konformacijsko najbolj spremenita. V tretji domeni se nahaja histidin na mestu 311, ki je pomemben za aktivacijo celotnega proteina. Na tem mestu smo histidin zamenjali z alaninom. Izdelali smo dva protokola, po katerima smo uspešno izolirali proteine LLO wt z in brez His-repka in LLO H311A z in brez His-repka. Vse proteine smo pripravili v dveh različnih pH vrednostih, pH 5,7 in pH 7,5. Ugotovili smo, da med proteini ni opaznejših razlik v deležih sekundarnih strukturnih elementov ter da so vsi sestavljeni iz α -vijačnic, β -struktur in naključnih zvitij. Dokazali smo, da je protein LLO wt s His-repkom pri pH 7,5, skozi čas stabilen, saj ne pride do proteolitske razgradnje. Pride pa do tvorbe dimerov. LLO denaturira pri višji temperaturi, če je pri nižjem pH (5,5), brez His-repka in v divji obliki. Enako velja za aktivnost LLO. Bolj je aktiven pri nižjem pH, brez His repka in v divji obliki. Ugotovili smo, da je histidin na mestu 311 zelo pomemben za aktivnost proteina, saj je mutant manj aktiven in denaturira pri nižji temperaturi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 577.1:579.61:543.2/9(043.2)=163.6
CX proteomics/protein isolation/listeriolysin O/cholesterol dependent cytolysins/
Listeria monocitogenes/pore-forming toxin/listeriosis/characterization/hemolytic
activity/thermal denaturation/H311A
AU TKALEC, Kristijan
AA ANDERLUH, Gregor (supervisor)/PODOBNIK, Marjetka (co-supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikova 101
PB Univerity of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Biotechnology Studies
PY 2013
TY ISOLATION, CHARACTERISATION AND COMPARISON OF THE PROTEIN
LISTERIOLIZIN O AND ITS MUTANT H311A
DT Graduation thesis (University studies)
NO XVI, 61 p., 8 tab., 43 fig., 2 ann., 58 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Listeriolizin O (LLO) is a protein of *Listeria monocitogenes* and belongs to a class
of cholesterol-dependent cytolysins (CDC), which form pores in the membrane.
Among all the CDC's, the LLO is the only one that depends on pH of the
surrounding area. It is most active at pH 5.5, which allows the bacterium to escape
from phagolysosome. After successful escape of bacterium to cytosol, the
bacterium begins with breeding and intrusion with the adjacent cell. LLO is
composed of four domains, of which D2 and D3 are conformationally the most
changed. In the third domain there is histidine at position 311, which is important
for the activation of the total protein. At this point, we replaced histidine with
alanine. We developed two protocols for which we successfully isolated protein
LLO wt with and without His-tags and LLO H311A with and without His-tags. All
proteins were in two different pH values, pH 5.7 and pH 7.5. We have found that
the proteins have no significant differences in the proportions of secondary
structural elements, and that they are all composed of α - helices, β - structures and
random bendings. We have shown that protein LLO wt with His-tag at pH 7.5 is
stable over time, since there is no proteolytic degradation. But it does get to
formation of dimers. If the LLO is at the lower pH (5.5), is without his His-tag and
is in its wild form, it gets denatured at a higher temperature. The same applies to
activities of the LLO. It is more active with lower pH, without its His-grenadier and
in its wild form. We have found that the histidine at position 311 is very important
for the activity of protein, since the mutant is less active and denatures at lower
temperatures.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	IV
KEY WORDS DOCUMENTATION	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XIII
SLOVARČEK	XVI
1 UVOD	17
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	17
1.2 CILJ RAZISKOVANJA	18
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	18
2 PREGLED OBJAV	18
2.1 ROD <i>Listeria</i>	18
2.2 ŽIVLJENSKI KROG BAKTERIJE <i>L. monocytogenes</i>	19
2.3 OD HOLESTEROLA ODVISNI CITOLIZINI	20
2.4 LISTERIOLIZIN O	25
2.4.1 Intracelularne aktivnosti LLO	25
2.4.2 Ekstracelularne aktivnosti LLO	26
2.4.3 LLO mutant	28
3 MATERIAL IN METODE	28
3.1 MATERIALI	28
3.1.1 Kemikalije	28
3.1.2 Pufri in raztopine	29
3.1.3 Laboratorijska oprema	31
3.1.4 Gojišča za rast bakterijskih celic	33
3.1.5 Bakterijski sevi	33
3.1.5 Plazmidi	34
3.1.6 Encim TEV proteaza	35

3.2 METODE	35
3.2.1 Pripravljalne metode	35
3.2.1.1 Sterilizacija pufrov, raztopin, gojišč in steklovine	35
3.2.1.2 Transformacija kompetentnih celic	35
3.2.1.3 Rast bakterijskih celic v tekočem mediju	36
3.2.1.4 Ekstrakcija topnih proteinov	36
3.2.1.5 Čiščenje, regeneracija in shranjevanje Ni-NTA kolone	37
3.2.1.6 Prva stopnja Ni-NTA kromatografije	37
3.2.1.7 Cepitev s TEV proteazo in dializa	38
3.2.1.7 Dializa brez cepitve His-repkov	38
3.2.1.8 Druga stopnja Ni-NTA kromatografije	39
3.2.1.9 Kationsko-izmenjevalna kromatografija SP-5PW	39
3.2.1.10 Določanje koncentracije očiščenega proteina	39
3.2.1.11 Koncentriranje proteina	40
3.2.2 Analitske metode	40
3.2.2.1 NaDS-PAGE elektroforeza	40
3.2.2.2 Test proteolitske stabilnosti proteina	41
3.2.2.3 CD-spektroskopija	41
3.2.2.4 Kristalizacija	42
3.2.2.5 Hemolitična aktivnost	43
3.2.2.6 DSF test	44
4 REZULTATI	45
4.1 ANALIZA PROTEINA	45
4.2 PRODUKCIJA, IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PROTEINA	47
4.2.1 Preverjanje uspešnosti izražanja proteina v E. coli	47
4.2.2 Ni-NTA kromatografija I	48
4.2.3 Preverjanje vsebnosti frakcij iz Ni-NTA I	50
4.2.4 Dializa in cepljenje His-repkov s TEV proteazo	51
4.2.5 Ni-NTA kromatografija II	52

4.2.6 Kationsko-izmenjevalna kromatografija	54
4.2.7 Koncentriranje proteina	56
4.3 TEST PROTEOLITSKE STABILNOSTI	59
4.4 CIRKULARNI DIKROIZEM	60
4.5 DOLOČEVANJE TERMIČNE STABILNOSTI PROTEINOV Z DIFERENČNO DINAMIČNO FLUORIMETRIJO	63
4.6 HEMOLIZNA AKTIVNOST	65
4.7 KRISTALIZACIJA PROTEINA	67
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	68
5.1 RAZPRAVA	68
5.2 SKLEPI	71
6 POVZETEK	72
7 VIRI	73
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Predstavniki družine CDC in bakterije, ki jih proizvajajo (Rosado in sod., 2008)	22
Preglednica 2:	Seznam uporabljenih kemikalij in kompletov	28
Preglednica 3:	Seznam uporabljenih raztopin in pufrov	29
Preglednica 4:	Seznam uporabljene laboratorijske opreme	31
Preglednica 5:	Seznam uporabljenih gojišč	33
Preglednica 6:	Seznam uporabljenih plazmidov	34
Preglednica 7:	Koraki čiščenja Ni-NTA kolone	37
Preglednica 8:	Aminokislinsko zaporedje LLO ter napoved sekundarne strukture po programu Scratch Protein Prediction	47

KAZALO SLIK

Slika 1:	Prikaz vstopa bakterije <i>L. monocytogenes</i> v gostiteljsko celico in vdor v sosednjo celico (Hamon in sod., 2012)	20
Slika 2:	Tridimenzionalna struktura perfringolizina O (PFO) in intramedilizina (ILY) (Tweten, 2005)	21
Slika 3:	Mehanizem nastanka pore pri od holesterol odvisnih citolizinov (Dunstone in sod., 2012)	23
Slika 4:	Konformacijske spremembe v domeni D3 ob vezavi CDC na tarčno membrano (Bavdek, 2010)	23
Slika 5:	Prikaz ugreznitve transmembranskih β -lasnic D3 v membrano in konformacijske spremembe tako v D2 kot v D3 (Czajkowsky in sod., 2004)	24
Slika 6:	Prikaz dveh načinov nastanka por (Bavdek, 2010)	24
Slika 7:	Model strukture LLO po že znani strukturi PFO (Hamon in sod., 2012)	25
Slika 8:	Intracelularne aktivnosti LLO (Hamon in sod., 2012)	26
Slika 9:	Ekstracelularne aktivnosti LLO (Hamon in sod., 2012)	27
Slika 10:	Tipični CD spektri proteinov (Kelly in sod., 2005)	42
Slika 11:	Prikaz kristalizacije z metodo viseče kapljice (Caffrey in Cherezov 2009)	43
Slika 12:	Mikrotiterna plošča po opravljeni hemolizi	44
Slika 13:	Filogenetsko drevo proteina LLO in njemu podobnim CDC-jem in MACPF-jem	46
Slika 14:	NaDS-PAGE elektroforeza za preverjanje uspešnosti indukcije	48
Slika 15:	Spiranje Ni-NTA kolone s pufrom za nanos (št. 3)	49
Slika 16:	Spiranje Ni-NTA kolone s pufrom za spiranje (št. 4)	49
Slika 17:	Spiranje Ni-NTA kolone s pufrom za elucijo (št. 5)	50
Slika 18:	NaDS-PAGE elektroforeza z vzorci prvih treh frakcij	51
Slika 19:	NaDS-PAGE elektroforeza z pred in po dializi	52
Slika 20:	Ni-NTA kolona 1	53
Slika 21:	Ni-NTA kolona 2	53
Slika 22:	NaDS-PAGE elektroforeza, preverjanje ločbe z drugo Ni-NTA kromatografijo	54
Slika 23:	Potek kationsko-izmenjevalne kromatografije z nosilcem TSKgel®, ki ima za osnovo metakrilni polimer	55

Slika 24: Analiza čistosti LLO po kationsko-izmenjvalni kromatografiji	55
Slika 25: Koncentracijski NaDS-PAGE elektroforezni gel za protein LLO wt pH 5,7 brez His-repka	56
Slika 26: Koncentracijski NaDS-PAGE elektroforezni gel za protein LLO H311A pH 5,7 s His-repkom	56
Slika 27: Koncentracijski NaDS-PAGE elektroforezni gel za protein LLO wt pH 5,7 s His-repkom	57
Slika 28: Koncentracijski NaDS-PAGE elektroforezni gel za protein LLO H311A pH 5,7 brez His-repka	57
Slika 29: Proces pridobivanja proteinov LLO in njegovega mutanta H311A brez His-repkov	58
Slika 30: Proces pridobivanja proteinov LLO in njegovega mutanta H311A s His-repki	59
Slika 31: Test proteolitske stabilnosti proteina LLO wt s His-repkom pri pH 7,5	60
Slika 32: Spekter cirkularnega dikroizma za proteina LLO wt brez His repka in LLO wt s His-repkom	61
Slika 33: Spekter cirkularnega dikroizma za proteina LLO H311A z in brez His-repka	61
Slika 34: Spekter cirkularnega dikroizma za proteina LLO wt brez His-repka in LLO H311A brez His-repkov	62
Slika 35: Spekter cirkularnega dikroizma za proteina LLO wt s His-repkom in LLO H311A s His-repkom	62
Slika 36: Spekter cirkularnega dikroizma pri bližnjem UV-območju za protein LLO wt s His-repkom pri pH 7,5 in pH 5,7	63
Slika 37: Temperatura denaturacije (T_m) za proteine LLO wt z in brez His-repka in LLO H311A z in brez His-repka pri pH 5,5 in pH 7,5	64
Slika 38: Graf primerjave termične stabilnosti LLO wt z in brez His-repka in LLO H311A z in brez His-repka pri pH 5,5 in pH 7,5	64
Slika 39: Prikaz spremembe hemolitske aktivnosti s časom (1)	65
Slika 40: Prikaz spremembe hemolitske aktivnosti s časom (2)	65
Slika 41: Prikaz spremembe hemolitske aktivnosti s časom (3)	66
Slika 42: Prikaz hitrosti hemolize za vse proteine pri treh različnih koncentracijah proteinov	66
Slika 43: Prikaz hitrosti hemolize za LLO wt brez His-repka pri pH 5,7 in LLO wt brez His-repka pri pH 7,4, pri vseh izmerjenih koncentracijah	67

KAZALO PRILOG

Priloga A: Mapa plazmida pPROEX Htb z označenimi pomembnejšimi mesti

Priloga B: Aminokislinsko zaporedje proteina listeriolizin O.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca
ALO	antrolizin O
ALV	alveolizin
AMP	adenozin monofosfat
CD	cirkularni dikroizem
CDC	od holesterola odvisni citolizin (<i>ang.</i> Cholesterol Dependent Cytolysins)
CFTR	cistični fibrozis transmembranski prevodnostni regulator (<i>ang.</i> Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)
DMSO	dimetil sulfoksid
DSF	diferenčna dinamična fluorimetrija (<i>ang.</i> Differential Scanning Fluorimetry)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FPLC	tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov
Gal	galaktin
GILT	z γ -interferonom inducirana lizosomalna tiol reduktaza (<i>ang.</i> γ -interferon-inducible lysosomal thiol reductase)
IL-1 β	interlevkin-1 β
ILO	ivanolizin
ILY	intermedilizin
InlA	internalin A
InlB	internalin B
IPTG	izopropil β -D-tiogalaktozid
kDa	kilo Dalton
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LB	Luria Bertanijevo gojišče
LBA	Luria Bertanijevo gojišče z dodatkom ampicilina
LLO	listeriolizin O
LSO	seeligerilizin
MACPF	membranski litični kompleks-perforin (<i>ang.</i> Membrane Attack

	Complex and Perforin)
MAPK	z mitogenom aktivirane protein kinaze
MnSOD	superoksid dismutaza z manganom
MQ	mili-Q voda, dodatno očiščena destilirana voda
NaDS	natrijev dodecil sulfat
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS
Ni-NTA	nikelj-nitrilotriocetna kislina
NF- κ B	jedrni faktor- κ B transkripcijski faktor
NOX2 NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza, z NOX2 enoto
NTA	nitrilotriocetna kislina
OD	optična gostota
oz.	oziroma
PFO	perfringolizin O
PFT	toksin, ki tvori pore
PKR	protein-kinazni receptor
PLO	piolizin
PLP	perforinu podoben protein
PLY	pnevmolizin
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
RNA	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivna
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
SLO	streptolizin O
SLY	suilizin
SPH	sferikolizin
Sumo	majhni ubikvitinu podobni proteini
TEV	virus jedkanja tobaka (<i>ang.</i> "tobacco etch virus")
TLP	torso-podoben protein
TLY	tetanolizin O
TMH	transmembranska β -lasnica

UV	spekter ultravijolične svetlobe
VIS	spekter vidne svetlobe
VLY	vaginolizin
wt	divji tip (<i>ang.</i> Wild type)
β -ME	β -merkaptetoetanol
ϵ	ekstincijski koeficient

Okrajšave aminokislin:

A	Ala	alanin
C	Cys	cistein
D	Asp	asparaginska kislina
E	Glu	glutaminska kislina
F	Phe	fenilalanin
G	Gly	glicin
H	His	histidin
I	Ile	izolevcin
K	Lys	lizin
L	Leu	levcin
M	Met	metionin
N	Asn	asparagin
P	Pro	prolin
Q	Gln	glutamin
R	Arg	arginin
S	Ser	serin
T	Thr	treonin
V	Val	valin
W	Trp	triptofan
Y	Tyr	tirozin

SLOVARČEK

LLO wt	Divji tip proteina listeriolizina O.
LLO H311A	Mutanta divjega tipa proteina listeriolizina O. Na mestu 311 ima histidin zamenjan z alaninom.
His-repek	6 histidinov, ki se nahajajo na N-koncu proteina LLO wt oz LLO H311A.

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Patogene bakterije imajo sposobnost povzročanja bolezni (Wassenaar, 2012). Večina ljudem nevarnih bakterij izhaja iz Gram negativne skupine, medtem ko ima Gram pozitivna veja le nekaj predstavnikov. Med njih spada tudi rod *Listeria*, ki vsebuje 8 vrst, med katerimi je najnevarnejša *Listera monocytogenes* (Todar, 2012).

L. monocytogenes je Gram pozitivna paličasta in fakultativno intracelularna bakterija, ki povzroča bolezen listeriozo – sepsa, gastroenteritis in meningitis, ki se večkrat sprevrže v meningoencefalitis. Najbolj dovzetni za listeriozo so novorojenčki, nosečnice, starejši pacienti in pacienti z oslabljenim imunskim sistemom. Letalnost je med 20 in 30 procenti vseh obolelih, zdravi pa se jo z antibiotiki (Ramaswamy in sod., 2007).

Glavni virulenčni dejavnik, ki ga uporablja ta bakterija, je od holesterola odvisen citolizin (*ang.* cholesterol dependent cytolysins – CDC) listeriolizin O (LLO), ki sodi med toksine, ki znajo tvoriti pore (*ang.* pore forming toxins – PFT). Njihova glavna prednost je zmožnost vezave na membranski holesterol in tvorba por do 35 nm velikosti, kar omogoča prehajanje ionov in molekul. Izmed teh toksinov najbolj izstopa ravno listeriolizin O, saj je, po do sedaj znanih podatkih, edini od holesterola odvisen citolizin katerega aktivnost regulira pH (Hamon in sod., 2012).

Medtem, ko so mnogi CDCji že dobro raziskani, se pri proteinu LLO še vedno raziskuje katera domena je pomembna za aktivacijo proteina in kako le-ta poteka. Tudi njegova tridimenzionalna struktura še ni znana. Zaradi znane vloge LLO v patogenezi in tudi visokega odstotka letalnosti pri listeriozi, je za zdravljenje okužb pomembno dobrošno poznavanje delovanja tega toksina. Na podlagi temeljitega poznavanja lastnosti proteina, se lahko izdelajo farmacevtske rešitve, ki bi bile bolj učinkovite v borbi proti listeriozi. Poleg zdravljenja pacientov, pa se z razumevanjem delovanja proteina LLO odpirajo tudi druge biotehnološke in zdravstvene rešitve. CDC se lahko uporablja kot sonde za zaznavanje holesterola v celičnih membranah sesalcev (Warnock in sod., 1993). LLO tvori dovolj velike pore, da lahko skozi prehajajo tudi večje molekule. Mandal in sodelavci so prikazali, da je možno uporabiti LLO za vnos bioterapevtskih molekul v gostiteljske celice (Mandal in sod., 2004).

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

Cilj raziskovanja v moji diplomski nalogi je izolirati proteine LLO wt (z in brez His-repkov) in LLO H311A (z in brez His-repkov) pri dveh različnih pH vrednostih (5,7 in 7,5). Protokole za izolacije bomo priredili oziroma optimizirali za pridobitev čim večje količine očiščenih proteinov. S primerjanjem pomejenih CD spektrov proteinov, bomo določili razlike v sekundarni strukturi med proteini. Z diferenčno dinamično fluorimetrijo (*ang.* differential scanning fluorimetry - DSF) bomo merili denaturacijo proteinov ob zviševanju temperature in preučevali vpliv mutacije na termično stabilnost LLO. S to metodo bomo primerjali temperature denaturacij proteinov in določili pri kakšnih pogojih LLO najdlje zdrži v nativni obliki. Aktivnost LLO bomo določili z merjenjem hemolize, in tako preverili kakšna koncentracija, katera oblika LLO ter pri katerem pH je najbolj učinkovita. Poiskali bomo kristalizacijske pogoje in določili najustreznejše za kristalizacijo proteina LLO wt s His-repki pri pH 7,5. Pri pogojih kristalizacije, bomo preverili tudi časovno stabilnost proteina (hidroliza, obarjanje).

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Toksin LLO v naravi najdemo v dveh fiziološko različnih okoljih: v fagolizosomu s pH~5,5 in v citosolu sesalske celice s pH~7,5. Predpostavljali smo, da bo LLO bolj aktiven in dlje stabilen pri pH 5,5 oziroma 5,7, kot pri pH 7,5 oziroma 7,4.

Pri tem smo preverili, kako vpliva prisotnost His-repka na stabilnost in aktivnost, tako divjega tipa LLO, kot mutanta H311A.

Zaradi značilne pKa vrednosti imidazolne stranske verige histidina pa smo tudi predpostavili, da bo mutacija H311A verjetno vplivala na pH regulacijo LLO.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ROD *Listeria*

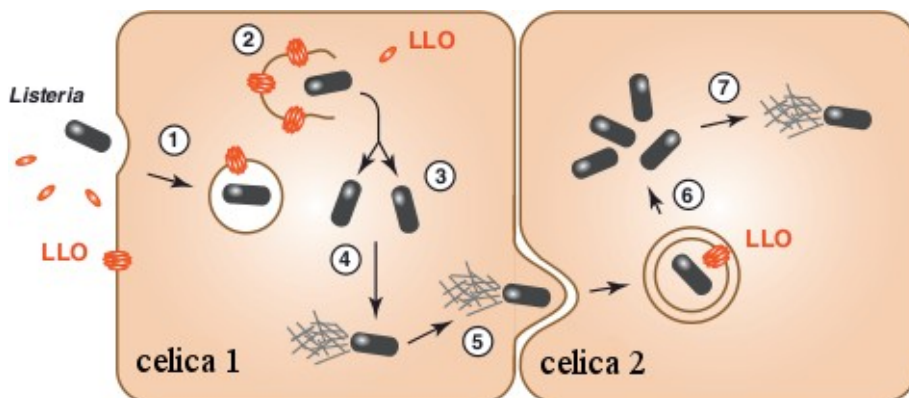
Gram-pozitivne bakterije imajo, za razliko od Gram negativnih, zelo debelo plast peptidoglikana in prisotno teihonično kislino v celični steni. Med gram-pozitivne bakterije sodijo bakterije iz rodov: *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus* in *Streptococcus* (Todar, 2012). Rod *Listeria* predstavlja fakultativno anaeorobne nesporogene bakterije paličaste oblike in šteje 8 vrst: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* in *L. ivanovii*, slednja zajema dve podvrsti *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* in *L. ivanovii* subsp. *londoniensi*. (Graves in sod., 2010). Kljub temu, da so bakterije iz tega rodu splošno prisotne v zemlji, vodi, krmi,

človeški hrani, iztrebkih in tudi na razpadajočih rastlinskih materialih, sta patogeni vrsti in nevarni za živali in ljudi samo dve, *L. ivanovii* in *L. monocytogenes*. Izmed teh dveh predstavlja *L. monocytogenes* večji zdravstveni problem, saj je pogost patogen pri ljudeh in povzroča bolezen listeriozo (Leclercq in sod., 2010).

Bakterija se v telo največkrat prenese s hrano, kot so mlečni izdelki, paštete, solata in dimljena riba. Ker je odporna na visoke koncentracije soli, nižje pH-vrednosti in nizko temperaturo, predstavlja velik problem za živilsko industrijo (Bavdek, 2010). Listerioza se kaže skozi razne bolezenske znake. Pogost je gastroenteritis, kjer pride do vnetja želodca, tankega in debelega črevesja. Zelo nevarno je, če pride do meningoencefalitisa ali sepse. Občutljivi so predvsem starejši pacienti, pacienti z oslabljenim imunskim sistemom in novorojenčki. Pri nosečnicah bakterija prečka placentarno bariero in lahko povzroči splav, neonatalni meningitis ali sepso (Vadia in sod., 2011; Ramaswamy in sod., 2007).

2.2 ŽIVLJENSKI KROG BAKTERIJE *L. monocytogenes*

L. monocytogenes je dobro prilagojena tako na življenje v zemlji, kot na življenje v citosolu evkariontske celice. V okolju je prisotna praktično povsod, je saprofit in se prehranjuje z odmrliimi deli rastlin. Ker ima sposobnost preživetja ekstremnih okoljih, se neredko znajde tudi v hrani in krmi. Sposobna je preživeti tudi visoko slanost, nizko temperaturo in spremembo pH (Freitag in sod., 2009). Primarna pot infekcije je preko kontaminirane hrane, ki se absorbira skozi črevesni epitelij v kri. Bakterija pride do jeter in ledvic, od koder se preko krvnega obtoka lahko širi do možganov oziroma v primeru nosečnosti, do placentе (Lecuit, 2007). Že leta 1962 je raziskovalec Mackaness dokazal, da je *L. monocytogenes* sposobna v makrofagu laboratorijske miši preživeti in se razmnoževati (Mackaness, 1962). Ko pride bakterija v bližino makrofaga, pride do fagocitoze in bakterija pasivno vstopi v makrofag. Pri ostalih celicah, ki niso sposobne fagocitoze, pa vstop bakteriji omogočata dva površinska proteina te bakterije, internalin A (InlA) in internalin B (InlB). Internalina se vežeta na receptorje gostiteljske celice. Protein InlA omogoča vstop v epitelne celice, medtem ko se InlB veže na receptorje večine ostalih sesalskih celic (Seveau in sod., 2007). Ko se bakterija znajde v celici je naslednji korak pobeg iz fagolizosoma v citosol, kjer lahko nadaljuje s svojim razmnoževanjem. Nizek pH v fagolizosomu je ključen za delovanje toksina LLO (Beauregard in sod., 1997). Poleg LLO, *L. monocytogenes* izloča tudi citoplazemsko superoksid-dismutazo (*ang.* manganese superoxide dismutase – MnSOD), peptidoglikan acetilazo (PgdA) in dve fosfolipazi C (*ang.* Phospholipase C – PLC), PI-PLC ter PC-PLC. Fosfolipazi C sta sposobni hidrolizirati dele fagolizosomske membrane, hkrati pa LLO naredi pore velike med 20 in 40 nm, čez katere iz fagolizosoma izhajajo tako ioni, kot proteini (Archambaud in sod., 2006; Portnoy in sod., 2002).



Slika 1: Prikaz vstopa bakterije *L. monocytogenes* v gostiteljsko celico in vdor v sosednjo celico (Hamon in sod., 2012)

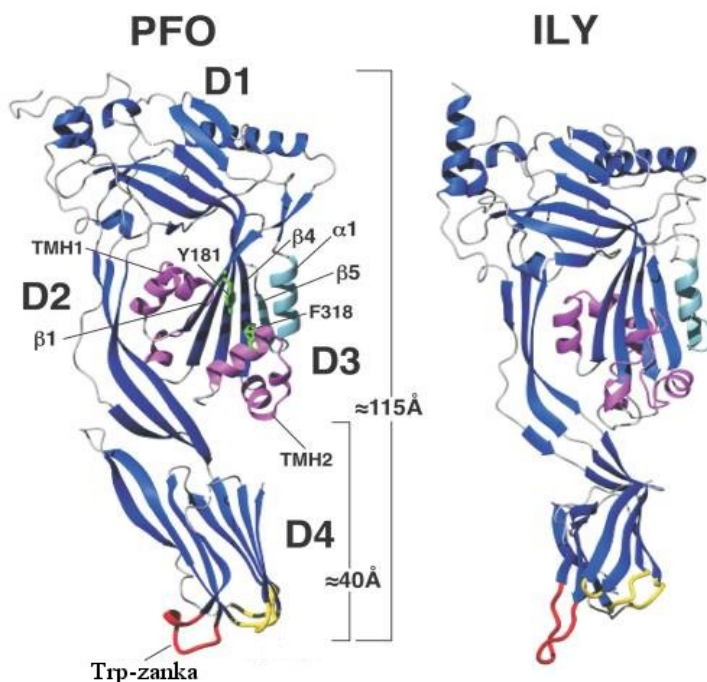
V 1. stopnji bakterija vstopi v fagolizosom gostiteljske celice. Za tem se v 2. stopnji s pomočjo LLO in ostalih izločkov prebije v citosol gostiteljske celice. V 3. fazi se bakterija prične razmnoževati. Nato pride do produkcije aktinskih filamentov (stopnja 4) in preboja v sosednjo celico (stopnja 5). V sosednji celici je bakterija obdana z dvojno membrano iz katere zopet uide in nadaljuje z razmnoževanjem (6. stopnja). Zadnja stopnja, stopnja 7, prikazuje produkcijo aktinskih filamentov in nadaljnji napad na sosednjo celico.

Po prehodu v citosol, prične bakterija z razmnoževanjem in produkcijo aktinskih filamentov, ki jo obdajajo (slika 1). Protein ActA, ki je odgovoren za polimerizacijo aktinskih filamentov, je prisoten samo na enem polu bakterijske stene in se tako posledično tvorijo aktinski filament samo na enem polu bakterije. Obstajata dve obliki aktina: krajši filamenti in daljše fibrile. Skupaj tvorijo repek, ki potiska bakterijo v naključno smer. Ko enkrat pripluje do celične membrane, jo aktinski filament potiskajo v sosednjo celico. Posledično preide v drugo celico, kjer je obdana z dvojno membrano. S pomočjo izločkov, ki smo jih prej omenili, uspe *L. monocytogenes* hitro pobegniti v citosol in tako nadaljuje svoj cikel razmnoževanja in vdiranja v sosednje celice (Portnoy in sod., 2002).

2.3 OD HOLESTEROLA ODVISNI CITOLIZINI

CDC so zelo pomembni eksotoksini, ki tvorijo pore (*ang.* pore-forming proteins, PFT) in jih proizvajajo člani rodov Gram-pozitivnih bakterij (Dunstone in sod., 2012). Do sedaj poznamo 20 predstavnikov, ki so dobro raziskani. Bakterije, ki jih proizvajajo, štejemo med 28 vrst, ki spadajo ali v deblo *Firmicutes* (rodovi *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Streptococcus*, *Listeria* in *Clostridium*) ali pa v deblo *Actinobacteria* (rodova *Arcanobacterium* in *Gardnerella*). Med toksini so opazili določeno raven aminokislinske identičnosti (od 28,1 do 99,6 %) in podobnosti (večja od 45,7 %). Število aminokislinskega zaporedja se giblje med 471 in 665 aminokislin (A. P. Heuck in sod., 2010). Vsem predstavnikom CDC je skupno, da so sestavljeni iz štirih domen, da za

učinkovito aktivacijo potrebujejo holesterol v tarčni membrani, da so sposobni tvoriti pore v celični membrani, ki presegajo 15 nm v premer in da povzročajo beta-hemolizo oziroma popolno hemolizo eritrocitov (Rampersaud in sod., 2011; Tweten, 2005). Nekateri predstavniki CDC družine (npr. intermedilizin) sicer ne potrebujejo holesterola za vezavo na membrano, potrebujejo pa receptor CD59. Holesterol potrebujejo pri kasnejšem delovanju (Rampersaud in sod., 2011). Vsi od holesterola odvisni citolizini, razen pnevmolizina, se sintetizirajo v obliki vodotopnih monomernih proteinov. Na N-terminalnem koncu imajo signalni peptid, kar omogoča proteinu izstop iz bakterijske celice skozi sekrecijski sistem tipa II. Za tem se signalni peptid odcepi in enoverižni protein velikosti med 50 in 80 kDa je pripravljen (Bavdek, 2010; Tweten, 2005). Do sedaj so uspeli določiti kristalno strukturo nekaj od holesterol odvisnih citolizinov (suilizin (Xu in sod., 2010), perfringolizin (Rossjohn in sod., 1997), intermedilizin (Polekhina in sod., 2005), antrolizin (Bourdeau in sod., 2009)). Kristale so pridobili iz monomernih in vodotopnih oblik toksinov.



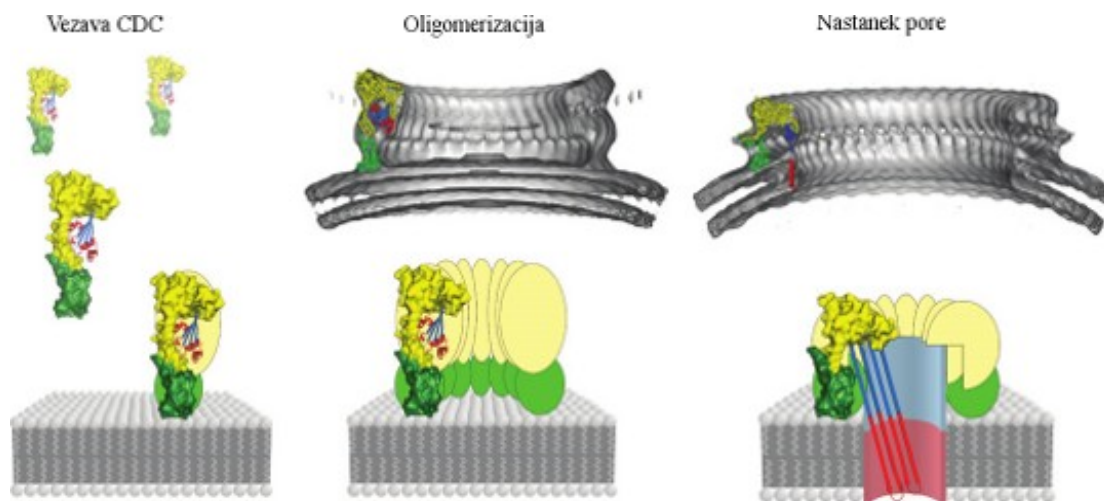
Slika 2: Tridimenzionalna struktura perfringolizina O (PFO) in intramedilizina (ILY) (Tveten, 2005)

Označene so domene (D1, D2, D3 in D4) in rdeče obarvana Trp-zanka. Podrobneje je označena D3 domena, kjer so vidni β -trakovi, α -vijačnice, TMH1 in TMH2.

Preglednica 1: Predstavniki družine CDC in bakterije, ki jih proizvajajo (Rosado in sod., 2008)

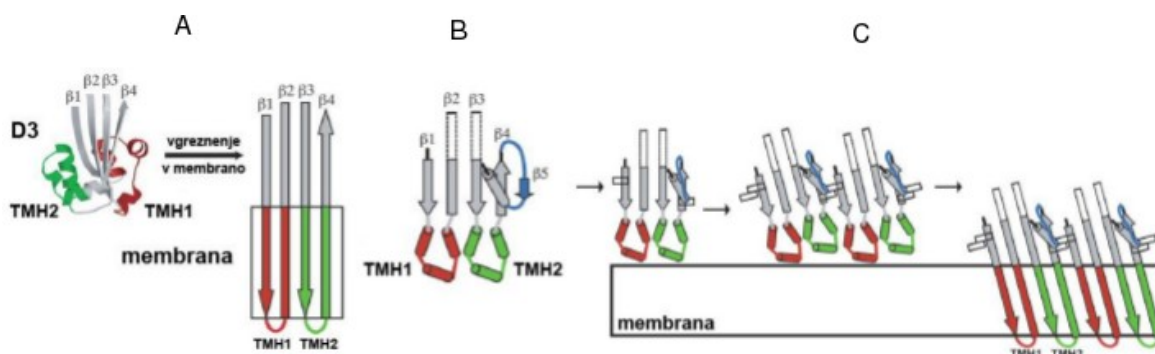
Vrsta	Toksin	Okrajšava	Št. aminokislinskih ostankov	M (kDa)
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	piolizin	PLO	534	57,873
<i>Bacillus anthracis</i>	antrolizin O	ALO	512	56,647
<i>Bacillus cereus</i>	cereolizin O	CLO/CLY	509	56,223
<i>Bacillus sphaericus</i>	sferikolizin	-	478	52,661
<i>Bacillus thuringiensis ser.</i>	turingiolizin O	TLO	512	56,571
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	laterosporolizin	LSL	-	-
<i>Clostridium bifermentans</i>	bifermentolizin	BFL	-	-
<i>Clostridium botulinum</i>	botulinolizin	BLY	-	-
<i>Clostridium chauvoei</i>	chauveolizin	CVL	-	-
<i>Clostridium histolyticum</i>	histolitokolizin	HTL	-	-
<i>Clostridium novyi</i>	novyilizin	NVL	-	-
<i>Clostridium perfringens</i>	perfringolizin O	PFO	500	55.830
<i>Clostridium septicum</i>	septikolizin	SPL	495	53.546
<i>Clostridium sordellii</i>	sordelilizin	SDL	-	-
<i>Clostridium tetani</i>	tetanolizin O	TLY	527	59.077
<i>Gardnerella vaginalis</i>	vaginolizin	VLY	516	56.851
<i>Listeria ivanovii</i>	ivanolizin	ILO	528	58.542
<i>Listeria monocytogenes</i>	listeriolizin O	LLO	529	58.688
<i>Listeria seeligeri</i>	seeligerilizin	LSO	530	59.182
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	sferikolizin	-	506	56.138
<i>Paenibacillus alvei</i>	alveolizin	ALV	501	55.268
<i>Streptococcus canis</i>	streptolizin O	SLO	574	63.911
<i>Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis</i>	streptolizin O	SLO	574	63.992
<i>Streptococcus intermedius</i>	intermedilizin	ILY	532	58.423
<i>Streptococcus mitis</i>	mitilizin	MLY	471	52.983
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	pnevmolizin	PLY	471	52.899
<i>Streptococcus pyogenes</i>	streptolizin O	SLO	571	63.638
<i>Streptococcus suis</i>	suilizin	SLY	497	54.845
<i>Streptococcus SK597</i>	lektinolizin	LLY	665	73,781

CDCji so sestavljeni iz štirih domen (D1, D2, D3 in D4), med katerimi je domena 4 pomembna za vezavo na membrano (Ramachandran in sod., 2002). Mehanizem delovanja je sestavljen iz treh faz (slika 3). Najprej pride do vezave monomernih oblik toksina na membrano, nato do oligomerizacije na membrani in na koncu tvorba oligomernega kompleksa, ki predstavlja poro (Dunstone in sod., 2012).



Slika 3: Mehanizem nastanka pore pri od holesterol odvisnih citolizinov (Dunstone in sod., 2012)

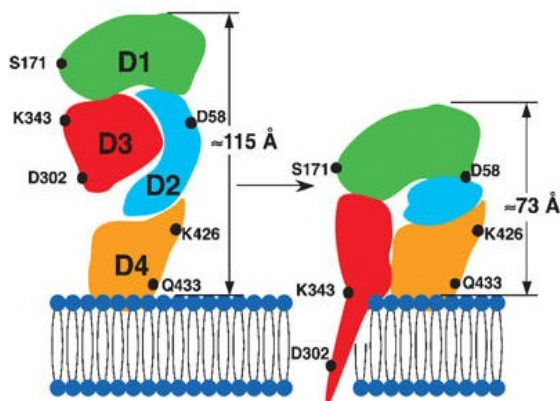
Na dnu domene D4 se nahaja tako imenovana triptofanska zanka in je pomembna za prepoznavanje holesterola (slika 7). Poleg triptofanske zanke so v D4 še tri dodatne zanke (slika 7). S tem protein poskrbi, da zanke pridejo v stik s holesterolom, medtem ko preostanek D4 ostane v vodnem okolju (Heuck in sod., 2007). Vezava D4 na holesterol povzroči konformacijske spremembe v domeni D3, kar privede do oligomerizacije monomerov. D3 je sestavljena iz štirih β -trakov, ene manjše β -zanke in α -vijačnice (slika 2). β 4 je zaščiten z manjšo zanko β 5 in α -vijačnico (slika 4). To je pomembno, saj se s tem prepreči naključna oligomerizacija proteinov (Tweten, 2005; Heuck in sod., 2000). Ko pride D4 v stik z membrano, pride do odmika α -vijačnice, ki ščiti β 4. Ta sprememba omogoči razvitje šestih α -vijačnic (označenih na sliki 4 – tri rdeče in tri zelene) v dve transmembranski β -lasnici (*ang.* transmembrane hairpin, TMH). TMH1 se orientira proti hidrofobnem delu, TMH2 pa se vzpostavi v vodnem okolju (slika 4). Sama oligomerizacija pa poteče med β 1 in β 4-trakom (Bavdek, 2010).



Slika 4: Konformacijske spremembe v domeni D3 ob vezavi CDC na tarčno membrano (Bavdek, 2010)

A – prikaz TMH1, TMH2, ki sta sestavljeni iz šestih α -vijačnic, B – β 4 je zaščiten z manjšo zanko β 5 in α -vijačnico. C – ko pride D4 v stik z membrano, pride do odmika α -vijačnice, nakar poteče oligomerizacija med β 1 in β 4-trakom.

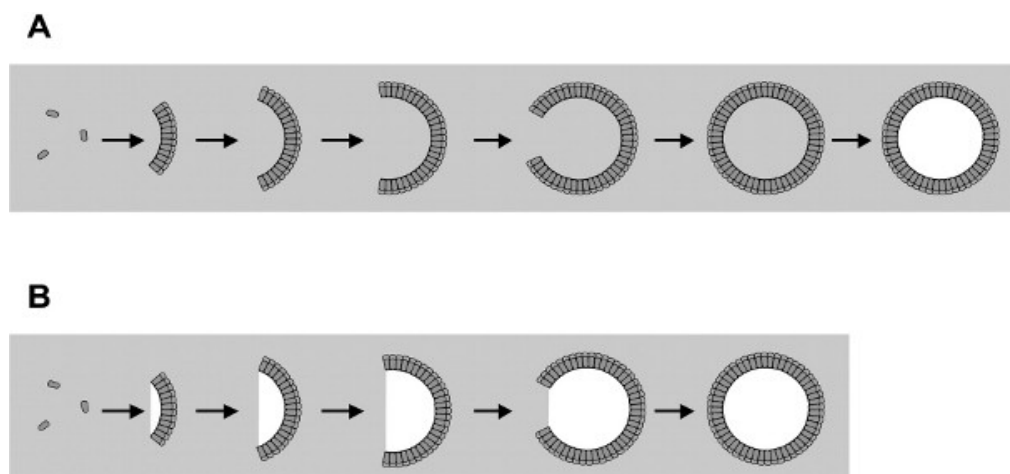
Poleg konformacijskih sprememb v D3 in D4, pride med tvorbo pore tudi do konformacijskih sprememb v domeni 2 (D2). Domena 2 je sestavljena iz dveh dolgih β -trakov, ki sta povezana s tremi α -vijačnicami (TMH1) domene 3. Zaradi te vezave deluje D2 kot napeta vzmet. Ko se tri α -vijačnice konformacijsko spremenijo v transmembransko β -lasnico (ko se protein veže na membrano in prične s tvorjenjem pore), se prekine vez med D3 in D2, kar privede to tega, da se D2 skrči (slika 5) (Czajkowsky in sod., 2004).



Slika 5: Prikaz ugreznitve transmembranskih β -lasnic D3 v membrano in konformacijske spremembe tako v D2 kot v D3 (Czajkowsky in sod., 2004)

A – CDC preden tvori poro, B – CDC po tvorbi pore.

Do sedaj so raziskali, da obstajata dve možni poti za tvorbo membranskih por. Prvi način je, da najprej na površini membrane poteče oligomerizacija proteinov (30-50 monomerov) in se nato tvori pora. (slika 6A) Alternativni način pa je, da je tekom nastajanja pore (ko je še v obliki loka), membrana že prepustna (slika 6B) (Heuck in sod., 2003).

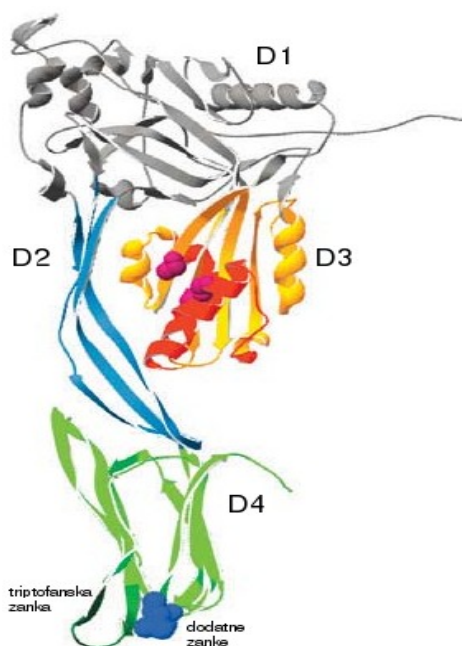


Slika 6: Prikaz dveh načinov nastanka por (Bavdek, 2010)

A – najprej se oblikuje krog, potem postane pora, B – med delanjem kroga je pora funkcionalna.

2.4 LISTERIOLIZIN O

Listeriolizin O je poglaviti dejavnik pri pobegu bakterije *L. monocytogenes* iz fagolizosoma. Do sedaj je edini znani CDC, pri katerem je aktivnost odvisna od pH vrednosti okolice (Bavdek in sod., 2012). LLO je najbolj aktiven pri pH 5,5, kar mu služi najboljše v kislem okolju fagosoma v makrofagu (Geoffroy in sod., 1987). Tudi njegova polipeptidna veriga gradi 4 domene, pri kateri se D4 veže na holesterol iz gostiteljske membrane.



Slika 7: Model strukture LLO po že znani strukturi PFO (Hamon in sod., 2012)

Vključuje štiri strukturne domene, triptofansko zanko in tri dodatne zanke.

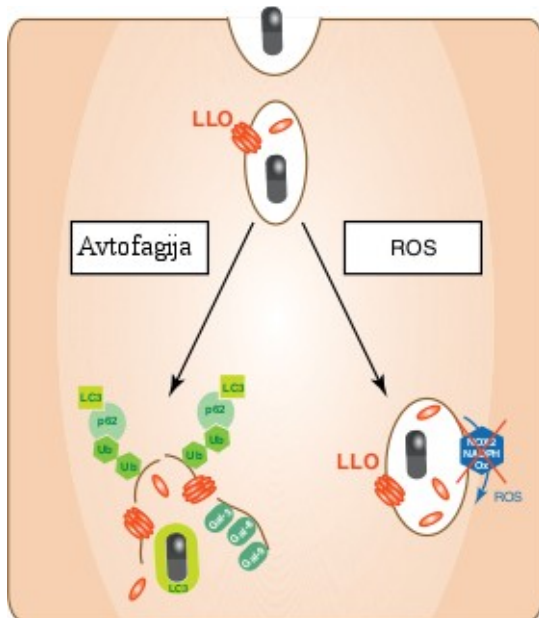
Za učinkovitost LLO je potrebno vključevanje gostiteljskih dejavnikov. Prvi takšen dejavnik je encim GILT (*ang.* γ -interferon-inducible lysosomal thiol reductase), ki ima optimalno delovanje pri nižjih pH in s svojimi cisteinskimi ostanki pomaga pri aktivaciji LLO (Singh in sod., 2008). Druga gostiteljski faktor predstavlja natrijev kanal CFTR (*ang.* cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), zaradi katerega se poveča koncentracija natrija v fagosomu, kar olajša izgradnjo por (Radtke in sod., 2011).

2.4.1 Intracelularne aktivnosti LLO

Predvideva se, da mehanizmi avtofagije prepoznajo poškodovano membrano fagosoma, ki jo je povzročil LLO (slika 8). Posledično se zaradi LLO aktivirajo ubikvitin, avtofagijska markerja p62 in LC3 ter galaktini (Gal) 3, 8 in 9 (Hamon in sod., 2012).

LLO igra pomembno vlogo pri zaviranju produkcije ROS (reaktivne kisikove zvrsti), ki

omejuje razmnoževanje bakterij v makrofagu. Kot je iz slike 8 razvidno, avtorji članka predpostavljajo, da LLO inhibira lokalizacijo NOX2 NADPH oksidaze, ki proizvaja ROS (Hamon in sod., 2012).



Slika 8: Intracelularne aktivnosti LLO (Hamon in sod., 2012)

Na levi strani je prikazana indukcija avtofagije. Membranski ostanki z LLO porami aktivirajo produkcijo markerja LC3, ki se veže na bakterijo ter jo označi za avtofagijo. Na desni strani je prikazano zaviranje produkcije ROS. LLO poskrbi za inhibicijo NOX2 NADPH oksidaze, ki je odgovorna za produkcijo ROS.

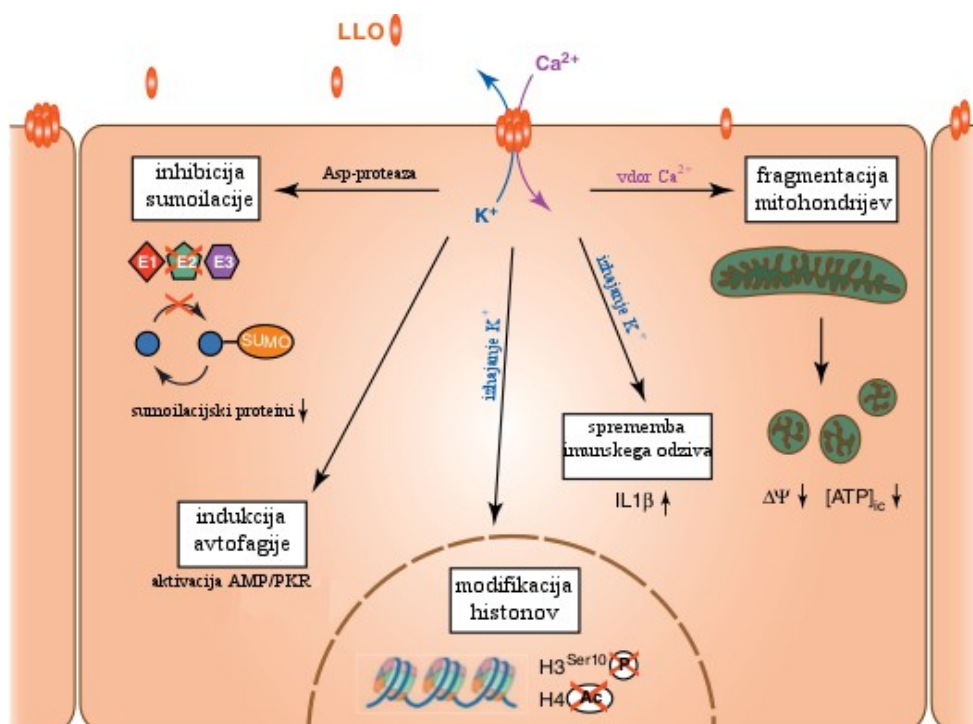
2.4.2 Ekstracelularne aktivnosti LLO

Poleg vloge LLO v celici, lahko njegovo delovanje na celični membrani sproži različne fiziološke odzive. Za razliko od intracelularne aktivnosti LLO, kjer deluje protein v nizkem pH (fagolizosom), se v primeru ekstracelularne aktivnosti LLO nahaja v nevtralnem pH. Znano je, da sproži izražanje transkripcijskega faktorja NF- κ B (Kayal in sod., 1999), z mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK) (Tang in sod., 1996), fosfatidilinositola (Sibeliu in sod., 1996) in vpliva na vdor kalcija v celico (Dramsi in sod., 2003). Vdor kalcija v celico doprinese k učinkovitemu vstopu bakterije v celico (Vadia in sod., 2011).

Indukcija avtofagije je možna tudi iz zunaj celičnega okolja. LLO posredno aktivira z AMP aktivirano protein-kinazo in protein-kinazni receptor (*ang.* protein kinase receptor – PKR) (Hamon in sod., 2012). Med vezavo listeriolizina O na celično membrano, prihaja tudi do poseganja v posttranslacijsko modifikacijo imenovano sumoilacija, ki poteka preko treh encimov: E1, E2 in E3. Sumo (*ang.* small ubiquitin-like modifier) proteini se tekom sumoilacije kovalentno vežejo na proteine, ki so pomembni pri transkripcijski regulaciji,

intracelularnemu transportu, apoptozi in odgovoru na stres (Hay, 2005). LLO povzroči degradacijo encima E2 (pri človeku znan kot Ubc9), kar privede do blokiranja nadaljnje sumoizacije (Hamon in sod., 2012).

Zaradi tvorbe por v celični membrani prične izhajati kalij, kar aktivira kaspazo-1. Ta encim cepi prekurzor proteina IL-1 β (*ang.* interleukin-1 β), ki je pomemben pri regulaciji imunskega in vnetnega odgovora (Hamon in sod., 2012).



Slika 9: Ekstracelularne aktivnosti LLO (Hamon in sod., 2012)

Zaradi LLO por pride do vdora kalcija in izhajanje kalija iz celice. Zaradi vdora kalcija pride do fragmentacije mitohondrijev. Zaradi izhajanja kalija pride do modifikacije histonov in spremembi imunskega odziva. Prav tako pride do indukcije avtofagije in inhibicije sumoilacije.

LLO vpliva tudi na morfološke spremembe endoplazemskega retikuluma in fragmentacijo mitohondrijev (Stavru in sod., 2011). Slednje se zgodi zaradi vdora kalcija v celico. Prav tako LLO prispeva k modifikaciji histonov. Zaradi izhajanja kalija iz celice pride do defosforilacije histona H3 (Hamon in sod., 2012).

2.4.3 LLO mutant

Aktivnost LLO je od odvisna od pH. Na zaporednem mestu 311 v aminokislinskem zaporedju LLO se nahaja histidin, ki je unikaten rodu *Listeria*. Mesto 311 predstavlja mesto na eni od šestih α -vijačnic, ki se nahajajo v domeni 3. Ta del D3 domene se ob vezavi na membrano razvije v TMH1 in TMH2. Ker ima histidin pKa med 6 in 7, in ker leži v proteinu na mestu, kjer so konformacijske spremembe ob tvorbi por največje, lahko mutacija na tem mestu (zamenjava histidina z alaninom) vpliva na aktivnost in strukturo LLO (Bavdek, 2010).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Preglednica 2: Seznam uporabljenih kemikalij in kompletov

Proizvajalec	Kemikalije
Bio-Rad	Akrilamid, bis-akrilamid, barvilo Coomassie Brilliant Blue R-250, standardi znanih molekulskih mas Precision Plus Protein Unstained Standards (161-0363)
Carlo Erba Reagents	Glicerol
Difco	Agar, Bacto tripton, kvasni ekstrakt, tripton
Gold Biotechnology	Ditiotreitol (DTT), izopropil β -D-tiogalaktozid (IPTG)
Hampton Research	Kristalizacijski pufri: Index Screen, Memb Fac, Natrix Screen, Peg Ion, Salt RX
Invitrogen	Poliakrilamidni geli NuPAGE® Novex® Bis-Tris Gel 1,0 mm 10 jamic, SimplyBlueTMSafeStain za vizualizacijo proteinskih lis na poliakrilamidnem gelu, pufer za obtežitev in barvanje vzorcev proteina pri gelski elektroforezi NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X), elektroforezni pufer NuPAGE® MES SDS Running Buffer
Merck	37 % klorovodikova kislina, metanol, očetna kislina, 100 % etilenglikol, EDTA
Quiagen	Polnilo kolon Ni-NTA Superflow, Ni-NTA Superflow Fast Flow
Riegel	96 % etanol

se nadaljuje...

...nadaljevanje

Proizvajalec	Kemikalije
Sasol Wax	Vazelin Vaselinum Album
Sigma Aldrich	α -ketoglutarat dehidrogenaza, β -merkapt-etanol (β -ME), β -nikotinamid adenin dinukleotid hidrat (NAD^+), 2-amino-2-hidroksimetilpropan-1,3-diol (Tris), 2,2-bis(hidroksietil)-imino-tris(hidroksimetil)-metan (Bis-Tris), SYPRO® Orange, 1,3-bis(tris(hidroksimetil)metilamino)propan (Bis-Tris propan), absolutni etanol, agaroz, amonijev acetat, amonijev nitrat, amonijev dibazični citrat, amonijev sulfat, ampicilin, kanamicin, Antifoam 289, bromfenol modro, citronska kislina, dikalijev hidrogen fosfat, etilendiamino tetraacetna kislina (EDTA), fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF), glicin, gvanidinijev hidroklorid, imidazol, kalijev hidrogenfosfat trihidrat, L-glutation reduciran, natrijev citrat, natrijev dihidrogenfosfat, natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, natrijev hidroksid, natrijev klorid, nikljev sulfat, MES (low moisture content), HEPES, NaH_2PO_4

3.1.2 Pufri in raztopine

Preglednica 3: Seznam uporabljenih raztopin in pufrov

Pufer/raztopina in volumen	Sestavina in priprava
1. Fosfatni pufer (500 mL)	11,5 g KH_2PO_4 in 81,8 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$.
2. Pufer za resuspendiranje celic (100 mL)	50 mM BisTris (pH 6,5), 250 mM NaCl in 10 % (V/V) glicerola
3. Ni-NTA pufer za nanos proteina (500 mL)	50 mM BisTris (pH 6,5), 250 mM NaCl, 10 mM imidazol (pH 6,5), 5 % (V/V) glicerola.
4. Ni-NTA pufer za spiranje kolone (250 mL)	50 mM BisTris (pH 6,5), 300 mM NaCl, 25 mM imidazol (pH 6,5), 5 % (V/V) glicerola
5. Ni-NTA pufer za elucijo proteina (250 mL)	50 mM BisTris (pH 6,5), 300 mM NaCl, 300 mM imidazol (pH 6,5), 5 % (V/V) glicerola
6. Dializni pufer (3 L) (pH 7,0)	20 mM Tris (pH 7,0), 200 mM NaCl, 5 % (V/V) glicerola
7. Dializni pufer (3 L) (pH 5,7)	10 mM NaH_2PO_4 (pH 5,7), 200 mM NaCl, 5 % (V/V) glicerola
8. Dializni pufer 1 (3 L) (pH 7,0)	10 mM Tris (pH 7,0), 250 mM NaCl, 5 % (V/V) glicerola
9. Dializni pufer 2 (3 L) (pH 7,0)	10 mM Tris (pH 7,0), 150 mM NaCl, 5 % (V/V) glicerola
10. Dializni pufer 3 (3 L) (pH 7,0)	10 mM Tris (pH 7,0), 10 mM NaCl, 5 % (V/V) glicerola

se nadaljuje...

...nadaljevanje

Pufer/raztopina in volumen	Sestavina in priprava
11. Dializni pufer 1 (3 L) (pH 5,7)	10 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0), 250 mM NaCl, 5 % (V/V) glicerola
12. Dializni pufer 2 (3 L) (pH 5,7)	10 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0), 150 mM NaCl, 5 % (V/V) glicerola
13. Dializni pufer 3 (3 L) (pH 5,7)	10 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,0), 10 mM NaCl, 5 % (V/V) glicerola
14. Ni-NTA II pufer za nanos proteina (500 mL) (pH 7,0)	50 mM Tris (pH 7,0), 250 mM NaCl, 5 mM imidazol pH 7,0, 5 % (V/V) glicerola.
15. Ni-NTA II pufer za nanos proteina (500 mL) (pH 5,7)	50 mM MES (pH 5,7), 250 mM NaCl, 5 mM imidazol pH 5,7, 5 % (V/V) glicerola.
16. Pufer za kationsko kromatografijo A (500 mL) (pH 5,7)	10 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 5,7), 10 mM NaCl, 5 % (V/V) glicerola, 2 mM DTT
17. Pufer za kationsko kromatografijo B (500 mL) (pH 5,7)	10 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 5,7), 1 M NaCl, 5 % (V/V) glicerola, 2 mM DTT
18. Pufer za kationsko kromatografijo Y (100 mL) (pH 5,7)	65 % pufra A (pH 5,7) + 35 % pufra B (pH 5,7)
19. Pufer za kationsko kromatografijo A (pH 7,5)	10 mM BisTris (pH 7,5), 10 mM NaCl, 5 % (V/V) glicerola, 2 mM DTT
20. Pufer za kationsko kromatografijo B (pH 7,5)	10 mM BisTris (pH 7,5), 1 M NaCl, 5 % (V/V) glicerola, 2 mM DTT
21. Pufer za kationsko kromatografijo Y (pH 7,5)	65 % pufra A (pH 7,5) + 35 % pufra B (pH 7,5)
22. Končni pufer (500 mL) (pH 5,7)	20 mM MES (pH 5,7), 150 mM NaCl, 5 % (V/V) glicerola
23. Končni pufer (500 mL) (pH 7,5)	20 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 % (V/V) glicerola
24. Pufer za nativno elektroforezo	25 mM Tris in 192 mM glicin. Pufer smo umerili na (pH 8,8) s 6 M NaOH
25. 5-kratni vzorčni pufer za nativno elektroforezo (10 mL)	312,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 50 % (V/V) glicerola in 0,05 % (V/V) bromfenol modrega
26. Raztopina za vizualizacijo proteinskih lis na gelu za nativno elektroforezo (40 ml)	20 ml 0,1 % (w/V) raztopine Coomassie Blue R-250 barvila, 20 ml 20% (V/V) očetne kisline
27. Raztopina za razbarvanje gela za nativno elektroforezo (40 mL)	20 ml 30 % (V/V) etanola, 20 ml 10 % (V/V) očetne kisline.
28. Pufer za shranjevanje gelov pri nativni elektroforezi (20 mL)	5 % (V/V) glicerola, 2 mL 10 % (V/V) očetne kisline.
29. Raztopina za pripravo nanašalnega gela pri nativni elektroforezi (4 ml za 4 gele)	2,3 ml MQ vode, 0,65 ml 30 % raztopine akrilamida, 1 ml 0,5 M Tris (pH 6,8); 40 µl (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ , 8 µl Temed-a
30. Raztopina za pripravo ločevalnega gela pri nativni elektroforezi (7,5 ml za 4 gele)	2,5 ml MQ vode, 3 ml 30 % raztopine akrilamida/bis-akrilamida, 1,9 ml 1,5 M Tris (pH 8,8); 75 µl APS-a (amonijev persulfat), 7,5 µl Temed-a
31. Eritrocitni pufer (500 mL) (pH 5,7)	20 mM MES (pH 5,7), 150 mM NaCl
32. Eritrocitni pufer (500 mL) (pH 7,5)	20 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl
33. Pufer za DSF (500 mL) (pH 5,5)	10 mM MES (pH 5,5), 10 mM NaCl
34. Pufer za DSF (500 mL) (pH 7,5)	10 mM Hepes (pH 7,5), 10 mM NaCl

3.1.3 Laboratorijska oprema

Preglednica 4: Seznam uporabljene laboratorijske opreme

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Agilent Technologies	UV-VIS spektrofotometer: Agilent 8453 UV-Visible Chemstation software
Applied Photophysics	CD spektrofotometer: Chirascan
BD Bioscience Falcon	Kristalizacijske plošče: 24-well Cell Culture Plate
Beckman	Centrifuga: Beckman J2-HS Centrifuge Rotorja: JA-10 in JA-20
Belimed	Pomivalno dezinfekcijski stroj: LA180
Bio-Rad	Vertikalni elektroforezni sistem Mini Protean III Stekelca za vlivanje gelov za elektroforezo: Mini-Protean 3 Short Plates Mini-Protean 3 Spacer Plates (0,75 mm in 1 mm) Stojalo za vlivanje gelov Držalo za gel, glavniček za žepe
Biosan	Termični blok: CH-100 Namizni stresalnik: MiniShaker PSU 2T
BioTek	Synergy Mx Multi-Mode Reader za izvajanje hemolizne aktivnosti
Brand	Pipeta: Accu-jet pro
Elma	Ultrasonična kopel za degaziranje raztopin: Transsonic 460
Eppendorf	Centrifuga: Eppendorf Centrifuge 5415R Avtomatska pipeta: ResearchPro 0,5–10 µl
GE Healthcare	Kromatografski sistem Äkta FPLC: črpalke P-920, monitor UPC-900, injektorski vijak NV-907, omejevalnik pretoka Flow Restrictor PR-902, zbiratelj frakcij Fraction Collector Frac-920, programsko orodje Unicorn 5.20 Kolona XK16/20 150 mL zanka za FPLC sistem
Gilson	Pipete: 0,2–2 µL, 2–20 µL, 20–100 µL, 20–200 µL 200–100 µL
H+P Labortechnik GmbH	Parni sterilizator: Varioklav
Hampton Research	Silikonizirana stekelca za kristalizacijo s premerom 18 mm Kristalizacijski pladenj
Heat Systems- Ultrasonics inc.	Sonikator: Sonicator 385
Hellma	Kiveta s premerom 10,00 mm, model QS, kiveta s premerom 1 mm

se nadaljuje...

...nadaljevanje

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Hellma	Kiveta s premerom 10,00 mm, model QS, kiveta s premerom 1 mm
Hettich Zentrifugen	Centrifugi: Rotina 35 R in Rotina 28 R
Hewlett Packard	Spektrofotometer: Diode Array Spectrophotometer Peltierjev element: Peltier Temperature Control Accessory 89090A
Invitrogen	Elektroforezni sistem: XCell SureLock Mini-Cell
Kambič	Stresalnik za gojenje kultur: IS-200K Avtoklav Laboratorijski sušilnik-sterilizator SP-250 C Inkubator I-115
Mettler Toledo	pH meter: Seven easy
Milipore	Sistem za pridobivanje demineralizirane vode: RiOs 16 Sistem za pridobivanje visokoprečiščene in demineralizirane vode: MQ R6 Koncentrator Amicon Ultra 15 30K NMWL Sistem za ultrafiltracijo Microcon Ultracel YM-10 Filtri za sterilno filtracijo Millex-GP, 0,22 µm pore Nitrocelulozni membranski filtri s premerom 25 mm in 0,22 ter 0,45 µm porami Vakumska črpalka za filtracijo Vacuum Pump XF54 230 50
Nikon	Stereomikroskop: Nikon SMZ1500
Olympus	Fotoaparat za slikanje gelov: SP-550UZ
Pharmacia	FPLC naprava za regeneracijo kolon s črpalkami P-500 in monitorjem Liquid Chromatography Controller LCC-500 plus 50 mL-zanka za FPLC sistem Vir napetosti pri nativni elektroforezi: Electrophoresis Power Supply EPS 500/400
Roche	LightCycler® 480 RT-PCR
Sartorius	Analitska tehtnica: Sartorius analytic
Spearlab	Penasti krio-posodi: Small Foam Dewar in Tall Foam Dewar
Spectrum Laboratories	Dializna cev: Spectra/Por 1 Dialysis Membrane (6–8 kDa, širina 40 mm, premer 25,5 mm)
Techno Plastic Products	5 -, 10-, 25- in 50-mL serološke pipete
Tehtnica Železniki d.o.o.	Precizna tehtnica: Exacta 300 EB in Exacta 610 EB Magnetno mešalo Rotamix 550MMH
Tosoh Bioscience	Kolona za kationsko izmenjevalno kromatografijo SP-5PW (30) TSKgel®
Volpi AG	Vir dodatne svetlobe pri mikroskopiranju Intralux 4100

3.1.4 Gojišča za rast bakterijskih celic

Preglednica 5: Seznam uporabljenih gojišč

Gojišče	Sestavine in priprava raztopin
Luria Bertanijevo gojišče (LB)	0,5 % (m/V) kvasnega ekstrakta, 1 % (m/V) triptona in 1 % (m/V) NaCl. Za pripravo trdnega gojišča smo dodali 15 g/L agarja in po ohlajanju na 50 °C še antibiotik ampicilin (končne koncentracije 100 µg/ml za LBA gojišče). Gojišče smo razlili v petrijevke
Bogato gojišče (<i>ang.</i> Terrific broth) (TB)	2,4 % (m/V) kvasnega ekstrakta, 1,2 % (m/V) triptona, 0,4 % (V/V) glicerola
Selektivno gojišče za indukcijo rasti (50 mL)	45 mL TB gojišča, 5 mL fosfatnega pufra, 100 µL ampicilina založne koncentracije 50 mg/mL, 50 µL kloramfenikola
Selektivno gojišče za rast (1 L)	900 mL TB gojišča, 100 mL fosfatnega pufra, 2 mL ampicilina založne koncentracije 50 mg/mL, 1 mL kloramfenikola, 3 kapljice protipenilca Antifoam 289

3.1.5 Bakterijski sevi

E. coli BL21(DE3)pLysS $F^- ompT hsdS(r_B^- m_B^-) gal dcm \lambda(DE3) pLysS (Cam^r)$
($\lambda(DE3)$: *lacI*, *lacUV5*-T7 gene 1, *ind1*, *sam7*, *nin5*)

Uporabljen sev je izpeljava *E. coli* seva B, vsebuje gen za RNA-polimerazo faga T7, promotor *lacUV5* in *lacI*. Ob dodatku IPTG se prične prepisovati T7 RNA-polimeraza, ta inducira visok nivo ekspresije tarčnega proteina, ki je zapisan na vektorjih s promotorjem T7. Sev ima okvarjena gena *lon* in *ompT*, ki kodirata proteazi za razgradnjo rekombinantnih proteinov. Prisoten pa je plazmid pLysS z zapisom za lizocim T7 (poveča toleranco na toksine) in odpornost proti kloramfenikolu.

3.1.5 Plazmidi

Preglednica 6: Seznam uporabljenih plazmidov

Plazmid	Opis
pPROEX-HTb LLO	Plazmidni vektor z zapisom za <i>lacI</i> , za ampicilinsko rezistenco, za protein LLO wt s His-repkom na N-koncu
pPROEX-HTb H311A	Plazmidni vektor z zapisom za <i>lacI</i> , za ampicilinsko rezistenco, za protein LLO H311A s His-repkom na N-koncu
pET8c-LLO	Plazmidni vektor z zapisom za ampicilinsko rezistenco, za protein LLO wt s His-repkom na N-koncu (ni možna cepitev repka)
pET8c-LLO H311A	Plazmidni vektor z zapisom za ampicilinsko rezistenco, za protein LLO H311A s His-repkom na N-koncu (ni možna celitev repka)

Plazmid pPROEX-HTb (priloga A) je velik 4779 baznih parov in pri obeh primerih predstavlja osnovo, pri kateri je razlika samo v vstavljeni sekvenci (LLO wt oziroma njegov mutant LLO H311A). Plazmid vsebuje zapis za β -laktamazo, ki je odgovoren za odpornost na ampicilin, in *lacI*, ki zapisuje represorski protein LacR. Ekspresija želenega proteina je regulirana s *trc* promotorjem, prepis pa inducira IPTG. Za vstavitev sekvence proteina, sta bila uporabljena dva restrikcijska encima: BamHI in PstI. Na N-konec gena LLO wt in LLO H311A je bil dodan zapis za histidinski repek s šestimi histidini (His6-repek) in cepitveno mesto za TEV proteazo. His-repki omogočijo izolacijo tarčnega proteina z metodo Ni-NTA kromatografije (<http://www.addgene.org/vector-database/3835>).

Plazmid pET8c-LLO je velik le 2488 baznih parov in prav tako pri obeh primerih predstavlja osnovo, pri kateri je razlika samo v vstavljeni sekvenci LLO wt oziroma LLO H311A. Tudi ta plazmid vsebuje zapis za β -laktamazo. Vsebuje promotor za T7 polimerazo RNA, vendar se gen za T7 polimerazo RNA nahaja na progafu DE3 na bakterijskem kromosomu *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Na N-koncu je bil dodan histidinski repek, ki sicer omogoča izolacija tarčnega proteina na podlagi uporabe nikljeve afinitetne kromatografije, vendar ne vsebuje cepitveno mesto za TEV proteazo (Bavdek, 2010).

3.1.6 Encim TEV proteaza

Encim izvira iz genoma virusa jedkanja tobaka (*ang.* »tobacco etch virus« - TEV) in je pomemben zaradi specifičnosti proteolitske cepitve v proteinu oz. peptidu. Aminokislinska sekvenca, ki jo encim zazna, je ENLYFQ(G/S), cepi jo pa na mestu Q – G oziroma Q – S. To specifično zaporedje se nahaja v podaljšku histidinskih repkov, kar nam omogoča lažjo izolacijo tarčnega proteina, ki ima his-repke. Poleg cepljenega His-repka znotraj proteinskega zaporedja, ima tudi TEV proteaza His-repke (vendar brez vstavljenega specifičnega TEV cepitvenega mesta). To omogoča ločitev TEV proteaze na Ni-NTA koloni od tarčnega proteina, ko smo mu že odstranili His-repek in se le ta tako ne veže več na kolono. (Kapust in sod., 2002).

Uporabljena koncentracija TEV proteaze je bila 0,69 mg/ml, pripravljena pa je bila v Laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo na Kemijskem inštitutu.

3.2 METODE

3.2.1 Pripravljalne metode

3.2.1.1 Sterilizacija pufrov, raztopin, gojišč in steklovine

Material, ki smo ga uporabljali pri gojenju bakterij in izolacijo le-teh, smo predhodno sterilizirali v avtoklavu po standardnih postopkih. V primerni steklovini smo z vlažno toploto izvršili 20-minutno sterilizacijo pri temperaturi 121 °C in pritisku $1,2 \cdot 10^5$ Pa. Temperaturno občutljive pufre in raztopine za kromatografijo smo prefiltrirali skozi filtre velikosti 0,22 µm, medtem ko smo ostale, ki niso bili namenjeni za kromatografijo, prefiltrirali skozi filtre s premerom por 0,45 µm.

3.2.1.2 Transformacija kompetentnih celic

Transformacija se dogajala s privzemom plazmidne DNA, ki kodira tarčni protein, iz okolice v bakterijsko celico (*E. coli*). Najprej smo 100 µL kompetentnih bakterijskih celic BL21DE3pLysS, shranjenih na -70 °C, postavili za 10 minut na led. Nato smo jim ob ognju dodali 1 µL že prej pripravljenega plazmida (s koncentracijo 100 ng/µL), ki se je nahajal na 4 °C. Mešanico smo pustili na ledu 30 minut, nakar smo izvedli temperaturni šok. Za 1 minuto smo postavili celice v termoblok, ki je bil ogret na 42 °C, nato pa za 3 minute na led. Za tem smo ob ognju dodali 200 µL LB tekočega gojišča in vse skupaj inkubirali 1 uro v rotacijskem stresalniku na 150 vrt./min in 37 °C. Po enournem stresanju smo vsebino mikrocentrifugirke ob sterilnih pogojih razmazali po površini LBA gojišča (hranilni agar LB z dodatkom ampicilina s koncentracijo 100 µL/mL), petrijevko pa preko noči postavili v inkubator pri 37 °C.

3.2.1.3 Rast bakterijskih celic v tekočem mediju

Ob ognju smo celične kolonije s sterilno plastično cepilno zanko postrgali s petrijevke in jih prenesli v tekoče gojišče volumna 50 mL. Kulturo smo postavili v rotacijski stresalnik za 2 uri na 37 °C in 180 vrt./min.

Iz te začetne kulture smo vzeli po 10 mL zgoščenih celic in jih aseptično prestavili v produkcijska gojišča volumnov 1 L (4 x 1 L). Spet je sledilo stresanje v stresalniku pri 37 °C in 180 vrt./min. Sproti smo s spektrofotometrom Diode Array Spectrophotometer (Hewlett Packard) preverjali absorbanco oziroma optično gostoto pri 600 nm, dokler ni dosegla vrednosti okoli 1,0. Do te vrednosti so celice prišle v približno 3 do 4 urah. Nato smo erlenmajerice ohladili na ledu in s tem znižali temperaturo gojene kulture na 20 °C. Med tem časom smo ohladili stresalnik na 20 °C, dodali celicam induktor izražanja rekombinantnega proteina (IPTG – izopropil β -D-tiogalaktozid) s končno koncentracijo 0,5 mM, celice pa vrnil v stresalnik in stresali 20 ur pri 20 °C in 180 vrt./min. Pred indukcijo in po končanem gojenju celic smo odvzeli 1 mL vzorca, ki smo ga nato 15 minut centrifugirali pri 5000 vrt./min pri 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf), mu odstranili supernatant, usedlino pa ponovno raztopili v 150 μ L pufru za resuspendiranje (št. 2, preglednica 3) in shranili na -20 °C. Ta vzorca sta nam pomagala pri preverjanju produkcije našega proteina, kar smo storili s pomočjo NaDS-PAGE elektroforezo (nanos po 10 μ L od vsakega shranjenega vzorca).

Po dvajsetih urah rasti, smo celično kulturo centrifugirali 15 minut pri 5000 vrt./min in 4 °C (J2-HS Centrifuge, Beckman), odlili supernatant, usedlino pa zopet raztopili v pufru za resuspendiranje (št. 2, preglednica 3). 80 ml nastale suspenzije smo zamrznili v tekočem dušiku in shranili v zamrzovalniku na -80 °C.

3.2.1.4 Ekstrakcija topnih proteinov

Zamrznjene celice na -80 °C smo odtalili čez noč na ledu v hladni sobi (4 °C). Naslednje jutro smo odtaljenim celicam v digestoriju dodali inhibitor serinskih proteaz PMSF (končna koncentracija 2 mM), reducent disulfidnih vezi β -ME (končna koncentracija 5 mM), inhibitor serinskih proteaz benzamidin (končna koncentracija 1 mM) in katalizator razgradnje bakterijskih sten lizocim (končna koncentracija 0,5 mg/mL). Bakterijske celice smo homogenizirali na ledu z ultrazvočno dezintegracijo (sonikacijo) z veliko potopno sondo (premer 13 mm). Sonikacijo smo izvedli na napravi Sonicator 385 (Heat Systems-Ultrasonics Inc.) pri programu številka 2, ki je trajal 7 minut. Pri tem se je izvajal 1-sekundi pulz in 2-sekundni premor in 38 % amplitudo. Program smo izvedli dvakrat, vmes malo premešali celice in optimalno pozicionirali položaj čaše na ledu.

Po končani sonikaciji smo nastalo celično kašo prelili v centrifugirke, jih uravnotežili in centrifugirali 50 minut pri 17000 vrt./min in 4 °C. Supernatant, kjer se je nahajal naš protein, smo pazljivo odlili v čisto čašo, prefiltrirali skozi 0,45 µm filter in spravili v 150 mL zanko, ki je bila pripravljena za kromatografsko čiščenje vzorca na Ni-NTA koloni na FPLC. Pred nanosom na FPLC smo odvzeli 10 µL vzorca in ga shranili v zamrzovalnik pri -20 °C. Ta vzorec nam bo služil za preverjanje z NaDS-PAGE elektroforezo.

3.2.1.5 Čiščenje, regeneracija in shranjevanje Ni-NTA kolone

Pred vsako uporabo Ni-NTA kolone je bilo potrebno izvesti regeneracijo. S tem smo skušali odstraniti vse nečistoče in proteinske ostanke iz kolone ter na nosilec vezati nove nikljeve ione. Regeneracijo smo izvajali s FPLC sistemom (ÄKTA, GE Healthcare) in po protokolu, ki je naveden v preglednici 7. Na začetku in med vsako stopnjo smo kolono sprali s 5-kratnim volumnom kolone (60 mL) MQ vode pri pretoku 2 mL/min. Ostale raztopine smo spirali s hitrostjo pretoka 1 mL/min.

Preglednica 7: Koraki čiščenja Ni-NTA kolone

Korak	Raztopina	Koncentracija	Volumen (mL)
1	EDTA	0,5 M	10
2	gvanidinijev hidroklorid	6 M	20
3	NaOH	0,1 M	10
4	Etanol	20 % (V/V)	50
5	NiSO ₄	0,2 M	20

Po regeneraciji smo kolono obdržali v raztopini NiSO₄ in shranili v hladni sobi na 4 °C do uporabe. Pred uporabo smo jo sprali s 5-kratnim volumnom kolone MQ vode in 5-kratnim volumnom kolone Ni-NTA pufra za nanos (št. 3, preglednica 3).

3.2.1.6 Prva stopnja Ni-NTA kromatografije

V tem primeru gre za afinitetno kromatografijo in ločevanje molekul, pri čemer je pomembna specifična vezava histidinskih repkov na nikljeve katione, ki so vezani na nosilec. Nosilec je sestavljen iz agaroznih zrn (Sephacrose®), na katere je vezana nitrilotriocetna kislina (NTA), na katerih so vezani nikljevi kationi. Nikelj reagira preko vezi z dušikovimi atomi, ki se nahajajo v imidazolnih skupinah v His-repkih. Imidazol, ki ga dodamo v pufre za spiranje in elucijo proteina iz kolone, nam služi kot kompetenca vezanemu His-repku na nosilcu kolone. Večja kot je koncentracija imidazola v pufru, več vezanih His-repkov, in s tem tudi našega proteina, lahko izpodrine iz vezavnega mesta (Hochuli in sod., 1988).

Regenerirano kolono smo povezali v sistem ÄKTA FPLC in jo najprej sprali s 60 mL (5-kratni volumen kolone) MQ vode, nato pa še s 60 mL (5-kratni volumen kolone) pufru za nanos (št. 3, preglednica 3). Pretok spiranja je bil 2 mL/min, saj smo morali zagotoviti, da pritisk sistema na nobeni točki ne presega 1,0 MPa. Po uspešnem spiranju smo v kromatografski sistem vključili 150 mL zanko, v kateri je bila prefiltrirana proteinska mešanica. Ker je protein moral biti na hladnem, sta bili kolona in zanka ves čas hlajeni. Pri nanosu vzorca je bil pretok 1 mL/min, saj smo s tem časovno omogočili kvalitetno vezavo proteina na nosilec. Nanosu vzorca je sledilo spiranje s pufrom za nanos (št. 3, preglednica 3), dokler preko detektorja nismo več zaznali vsebnost proteinov. Sledilo je spiranje s pufrom za spiranje (št. 4, preglednica 3) šibko oziroma nespecifično vezanih molekul, kjer smo pretok povečali na 2 mL/min, in temu je sledil pufer za elucijo (št. 5, preglednica 3). Ta zadnji pufer je vseboval visoko koncentracijo imidazola (300 mM) in je tako konkuriral His-repku na proteinu pri vezavi na nosilec in spral tarčni protein s kolone. Pri vseh korakih smo zbirali vzorce v posebne čaše. Detektor je z merjenjem absorbance pri 280 nm zaznal prisotnost proteinov. Glede na uporabo pufov smo na koncu imeli tri vzorce, ki smo jih zbrali v tri ločene čaše. Nevezan protein, nespecifično vezan protein ter specifično vezan (tarčni) protein. Vse čaše smo shranili na hladno, po 7 µL od vsakega vzorca pa smo preverili na NaDS-PAGE elektroforezi. Kolono smo po končani uporabi spirali z MQ vodo in kasneje še z 20 % etanolom.

3.2.1.7 Cepitev s TEV proteazo in dializa

Dializa je biokemijski proces ločevanja snovi na podlagi velikosti molekul. Skozi tanko membrano v obliki črevesa prehajajo snovi, ki niso večje od 6-8 kDa in se s tem v membrani znižuje koncentracijski gradient določenih molekul. V našem primeru smo ta korak izvedli z dializnim setom Spectra/Por 1 Dialysis Membrane (Spectrum Laboratories) in smo se s tem odstranili imidazol ter zmanjšali ionsko jakost raztopine.

Vse do sedaj nabrane vzorce smo analizirali z NaDS-PAGE elektroforezo in se na podlagi ustrezne molekulske mase določili, da se v elucijskem vzorcu nahaja naš protein. Tarčni protein volumna 20 mL smo nalili v dializno črevo in dodali 6 mL TEV proteaze. Dializa je čez noč potekala v pufru volumna 3 L (št. 6 oz. št. 7, preglednica 3) in v hladni sobi s temperaturo 4 °C.

3.2.1.7 Dializa brez cepitve His-repkov

His-repka nismo vedno cepili s proteina. V tem primeru je bil namen te dialize samo odstranitev imidazola in znižanje koncentracije soli v raztopini. Pripravili smo 3 dializne pufre (št. 8-13, preglednica 3), ki so se razlikovali v koncentraciji NaCl in jih postopoma (na 12 ur) menjavali. Dializa je potekala v hladni sobi na 4 °C. Razen omenjenih razlik, je potekala dializa, kot je opisano v točki 3.2.1.7.

3.2.1.8 Druga stopnja Ni-NTA kromatografije

Po dializi smo uspešnost cepitve s TEV proteazo preverili z NaDS-PAGE. Nato smo vzorec prefiltrirali skozi filter velikosti 0,45 μm v 50 mL zanko in le-to priključili na sistem ÄKTA FPLC. Postopek je bil enak, kot pri točki 3.2.1.6. Edina razlika je bila v tem, da so se tokrat odcepljeni His-repki, TEV proteaze in necepljeni tarčni protein vezali na nosilec v koloni. Tarčni protein, ki se je uspešno cepil med dializo, pa je prišel iz kolone v fazi nanosa oziroma spiranja. V fazi elucije z imidazolom so se odcepile tudi ostale molekule, ki so se tokrat vezale na kolono.

Zatem smo izvedli analizo dobljenih vzorcev z nikljeve kolone in tako preverili čistost ter količino dobljenega proteina.

3.2.1.9 Kationsko-izmenjevalna kromatografija SP-5PW

Ionsko-izmenjevalna kromatografija je ena izmed najbolj uporabljenih tehnik za izolacijo proteinov, ki deluje po principu vezave nasprotno nabitih molekul na nosilec. Pri kationsko-izmenjevalni kromatografiji prihaja do vezave pozitivno nabitih molekul na negativno nabit nosilec. Sledi linearno gradientno spiranje s posebej pripravljenima pufroma za to metodo, pri katerih ima en pufer visoko koncentracijo soli. Molekule, ki so šibko vezane na nosilec, se hitro sperejo iz kolone, medtem ko se močnejše vezane molekule, sperejo kasneje (Edelmann, 2011).

Ionsko kromatografijo smo uporabili kot stopnjo čiščenja v primeru, ko ni bilo možno odcepiti His-repka s proteina. Kot nosilec v koloni se je uporabil TSKgel® (Tosoh Bioscience LCC), ki ima za osnovo metakrilni polimer. Na sistem ÄKTA FPLC smo najprej priključili kolono za kationsko-izmenjevalno kromatografijo in zanko za nanos vzorca. Pred nanosom vzorca, smo kolono spirali pufrom A (št. 16 oz. št. 19, preglednica 3), ki ima nizko koncentracijo soli. Vzorec smo prefiltrirali skozi filter velikosti 0,45 μm v 50 mL zanko. Sledil je nanos na kolono in začetno spiranje s pufrom A (št. 16 oz. št. 19). Zatem smo pripravili linearno gradientno spiranje s pufrom A in pufrom B (št. 17 oz. št. 20, preglednica 3). Najprej smo zviševali delež pufra B do 50 %, spirali nekaj časa z mešanico pufra A in pufra B (1:1), nakar smo postopoma zvišali delež pufra B na 100 %. Signal je zaznal tri vrhove, katere smo zbirali v frakcije. Kjer smo predvideli, da je tarčni protein, smo zbirali frakcije po 0,5 mL, jih analizirali z NaDS-PAGE elektroforezo in jih združili.

3.2.1.10 Določanje koncentracije očiščenega proteina

Ker se je po drugi stopnji Ni-NTA kromatografije oz. po kationsko-izmenjevalni kromatografiji tarčni protein izjemno očistil, smo lahko koncentracijo proteina določili z merjenjem absorbance pri 280 nm in se izračunala koncentracija proteina v vzorcu. To smo

storili s pomočjo Beer-Lambert-Bouguerjevega zakona oziroma Absorpcijskega zakona, ki pravi da je absorbanca raztopine (A) enaka produktu ekstinkcijskega koeficienta (ϵ), dolžine poti žarka skozi kiveto (l) in koncentracije raztopine (c).

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

Na UV-VIS spektrofotometru Agilent 8453, UV-Visible Chemstation software (Agilent Technologies) smo v kvarčnih kivetah Hellma s širino 1 cm izmerili absorbcijo UV svetlobe pri 280 nm. Meritev smo ponovili trikrat in iz dobljenih rezultatov izračunali povprečno vrednost. Da bi izračunali iskano koncentracijo, smo potrebovali vrednost ekstinkcijskega koeficienta, ki smo jo določili z orodjem ProtParam (Gasteiger in sod., 2005). Za naš protein znaša $75750 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ oz. $1,315 \text{ mg/mL}$ za 0,1 % vodno raztopino.

3.2.1.11 Koncentriranje proteina

Za koncentracijo proteina smo uporabili ultrafiltracijo, ki za svoje delo uporablja centrifugalno silo. Sistem filtrske membrane z določenim premerom por prepušča skozi le tiste molekule, ki so manjše od teh por, ostale pa ostanejo v koncentratu nad membrano. Uporabili smo sistem Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices s filtrsko membrano, ki prepušča molekule manjše od 10 kDa. Vzorec s tarčnim proteinom volumna 50 mL smo nekaj ur postopoma koncentrirali pri 3600 rcf in 4°C v centrifugi Rotina 35 R (Hettich Zentrifugen), da smo na koncu prišli do zelenega volumna 2,65 mL s koncentracijo 20 mg/mL. Ta proces se je izvajal tako, da smo odvečni filtrat shranjevali v posebni ohlajeni čaši in postopoma dodajali vzorec ter hkrati preverjali, da se protein ne obarja. Nato smo koncentrirani protein odpipetirali po alikvotih volumna $100 \mu\text{L}$, ki smo jih shranili v zamrzovalnik na -80°C .

3.2.2 Analitske metode

3.2.2.1 NaDS-PAGE elektroforeza

NaDS-PAGE elektroforeza predstavlja standardno uporabljeno metodo za ločevanje proteinov po njihovi molekularni masi. Zaradi natrijevega dodecil sulfatnega aniona, ki se veže na analizirane proteine, postanejo vsi proteini negativno nabiti in se ob vzpostavitvi električnega kroga pričnejo pomikati proti pozitivno nabiti anodi. Hitrost potovanja proteinov je odvisna od velikosti oz. molekulske mase. Krajši oz. manjši proteini potujejo hitreje, kot večji oz. daljši (Kresge in sod., 2006; Weber in sod., 1969). Glede na velikost vzorcev je tudi pomembno kako zamrežen gel potrebujemo. Če imamo manjše proteine, potrebujemo večjo zamreženost gela, kot če imamo večje proteine.

Najprej smo z MQ vodo razredčili vzorce do zelene koncentracije, jim dodali po $3 \mu\text{L}$ vzorčnega pufra NuPage® LDS Sample Buffer (4X) in jih v toplotnem bloku denaturirali 10 minut pri 90°C . Če smo nanesti bakterijske celice, smo denaturirali 1 uro pri 90°C .

Nato je sledilo 5 minutno centrifugiranje pri 5000 vrt./min, s katerim smo dosegli, da se je vsebina mikrocentrifirke posedla. Vmes smo pripravili elektroforezni pufer na način, da smo koncentrirani NuPage® MES SDS Running Buffer 20-krat razredčili z MQ vodo. Za tem smo vzorce nanesti na gel (NuPage® Novex® 4-12 % Bis-Tris Gel), v en žepček pa dodali 5 µL standarda molekulskih mas Precision Plus Protein unstained standard (Bio-Rad 161-0363). Za izvedbo elektroforeze smo uporabili sistem Xcell SureLock® (Invitrogen). Parametre smo nastavili na konstantno napetost 200 V, začetni tok 125 mA in trajanje 40 minut. Po končanem ciklu elektroforeze smo gel spirali v MQ vodi (3-krat po 5 minut), za tem smo ga potopili za 30 minut v barvilo SimplyBlue™ SafeStain. Po nastanku obarvanih lis, smo odlili barvilo in dodali MQ vodo ter pustili čez noč, da je nastal večji kontrast med pobarvanimi lisami in nepobarvanim gelom.

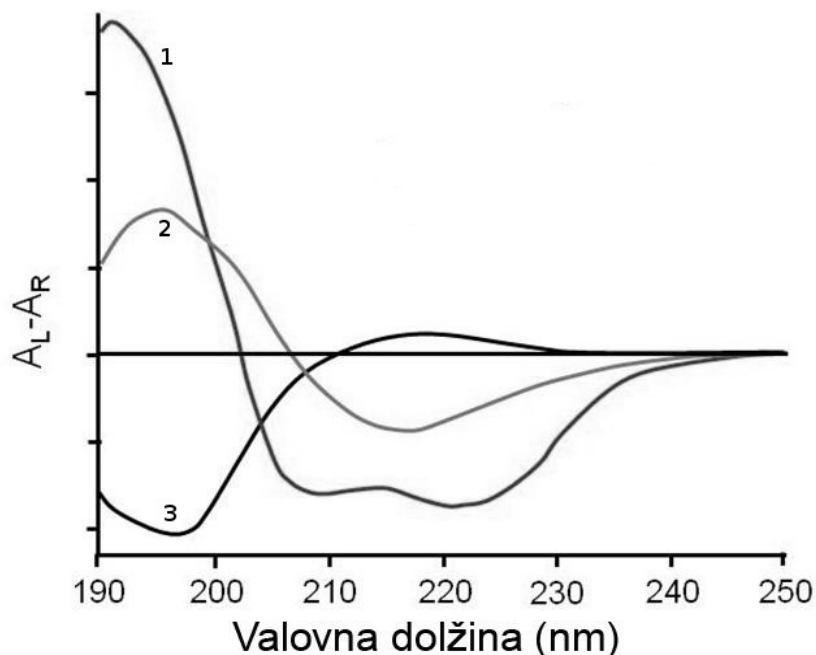
3.2.2.2 Test proteolitske stabilnosti proteina

Protein s koncentracijo 20 mg/mL smo hranili na 20 °C in vsakih nekaj dni odvzeli dva vzorca velikosti 3 µL ter ju shranili v zamrzovalnik na -20 °C. Analizo smo izvršili s pomočjo NaDS-PAGE elektroforeze, kjer smo skušali ugotoviti ali prihaja do denaturacije oz. spremembe v strukturi proteina, če je le-ta dlje časa na izbrani temperaturi. Potek metode je opisan v točki 3.2.2.1.

3.2.2.3 CD-spektroskopija

Cirkularni dikroizme (CD) je tehnika, ki meri razliko v absorpciji levo in desno-sučne polarizirane svetlobe optično aktivnih molekul v raztopini. Pri proteinih iz CD spektrov posnetih v daljnem UV-območju določimo deleže sekundarnih strukturnih elementov (alfa vijačnice, beta strukture in naključna zvitja). Iz spektrov, posnetih v bližnjem UV-območju pa informacije o terciarni strukturi preučevanega proteina. CD-spektroskopske analize lahko izvajamo v dveh valovnih območjih (Kelly in sod., 2005):

- Amidno območje oz. daljne UV-območje (170–250 nm), v katerem prevladuje prispevek peptidnih vezi. S to metodo dobimo informacije o sekundarni strukturi proteina.
- Bližnje UV-območje (250-300 nm), v katerem prevladuje prispevek aromatskih aminokislin in disulfidnih vezi. Na ta način analiziramo terciarno strukturo in nativno stanje proteina.



Slika 10: Tipični CD spektri proteinov (Kelly in sod., 2005)

Oznake: 1 - α vijačnice, 2 - β strukture, 3 - naključno zviti proteini.

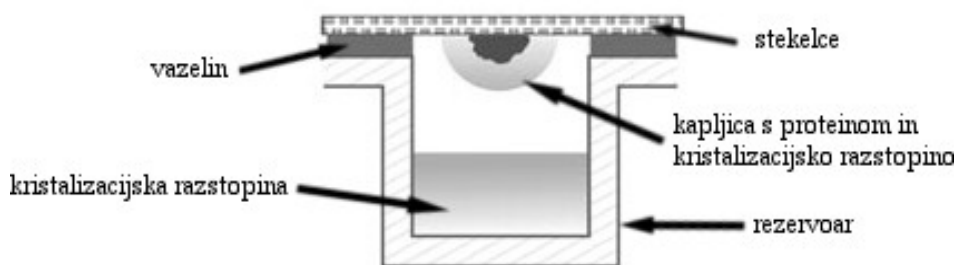
CD-spektre proteinov smo merili s sistemom Chirascan (Applied Photophysics) v kivetah debeline 1 mm in volumna 200 μ L za daljne (190-280 nm) UV-območje. Za analizo pri konstantnih 20 °C, smo uporabili 20 mM MES pufer pH 5,7 oziroma 20 mM Tris pufer pH 7,5. Koncentracija proteina je bila 0,18 mg/mL, koncentracija soli v vzorcu pa 1,35 mM. Izvedli smo 2-krat po 3 meritve in na podlagi povprečja dobili rezultate.

Za analizo bližnjega (250-320 nm) UV-območja, smo uporabili kivete debeline 10 mm in volumna 300 μ L. Meritve smo izvajali pri 20 °C. Uporabljena pufrna sta bila identična, kot pri meritvi pri daljnem UV-območju. Za to metodo je bila potrebna večja koncentracija proteina, ki je znašala 1,8 mg/mL, koncentracija soli pa 13,5 mM. Enako smo tudi v tem primeru izvedli 2-krat po 3 meritve in na podlagi izračunanega povprečja, dobili rezultate.

3.2.2.4 Kristalizacija

Kristalizacija je metoda pri kateri, iz dovolj čistega vzorca proteina in dovolj visoke koncentracije ter ustreznih pogojev, dobimo iz proteina kristale. Optimalna koncentracija proteina je med 5 in 100 mg/mL (odvisno od proteina), zahtevana čistoča pa nad 95 %. Eden izmed ključnih osnov poteka kristalizacije je odvajanje vode (parna difuzija) iz koncentrirane raztopine proteina, ki je v viseči kapljici (slika 11). Kapljica je v razmerju 1:1 (protein:kristalizacijska raztopina). Če so pogoji in proces optimalni, se prične

tvorjenje kristalov, v negativnem primeru pride do precipitacije proteina. Sistem, ki je sestavljen iz rezervoarja, krovnega stekelca, vazelina, kapljice s proteinom in kristalizacijske raztopine, mora biti nepredušno zaprt (McPherson, 2004).



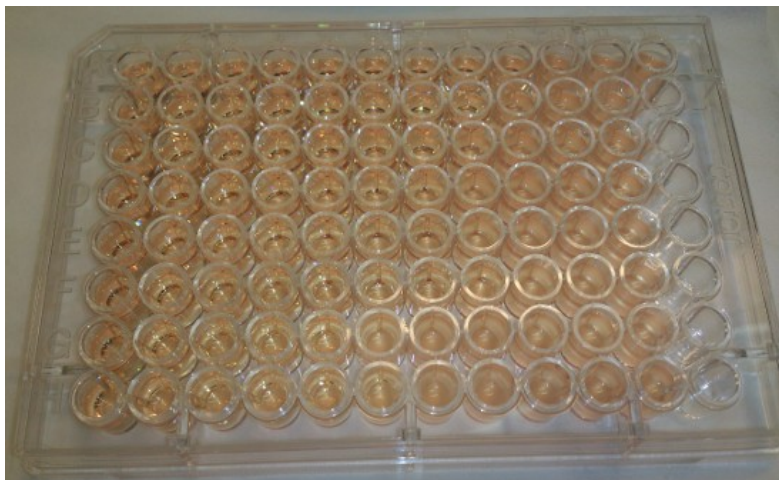
Slika 11: Prikaz kristalizacije z metodo viseče kapljice (Caffrey in Cherezov 2009)

Uporabili smo kristalizacijske plošče 24-well Cell Culture Plate (BD Bioscience Falcon). Najprej smo v notranje robove pokrovčka plošče namestili malo plastelina, robove rezervoarjev pa smo namazali z vazelinom in vse ploščice nedvoumno označili. Nato smo v rezervoarje dodali 0,5 mL kristalizacijske raztopine iz seta raztopin Hampton Research (Index Screen, Memb Fac, Natrix Screen, Peg Ion, Salt RX). Medtem smo iz zamrzovalnika (-80 °C) vzeli vzorce s koncentriranim proteinom (20 mg/mL) in jih odtaljevali 10 minut na ledu, nakar v mikrocentrifugirkah pripravili 3 vzorce: protein s koncentracijo 20 mg/mL, protein s koncentracijo 10 mg/mL in kontrolni vzorec (brez proteina). Za redčitev smo uporabili pufer (št. 22 oz. št. 23, preglednica 3), v katerem je protein shranjen. Vzorce smo 10 minut centrifugirali pri 5000 vrt./min in 4 °C. Nato smo pričeli z nanašanjem kapljic na silikonizirana krovna stekelca (Hampton Research) po principu 1 µL vzorca in 1 µL kristalizacijske raztopine. Tako smo na eno krovno stekelce formulirali 3 kapljice, ki so predstavljale 2 različni koncentraciji proteina ter eno kontrolno kapljico. Krovna stekelca smo obrnili, da so kapljice visele, in jih namestili na posamezni rezervoar. Pri tem smo morali biti zelo natančni, saj so krovna stekelca zelo krhka, hkrati pa smo morali zagotoviti, da je vazelin dobro zapolnil stičišče krovnega stekla in rezervoarja. Zaprt sistem rezervoarjev smo postavili v omaro, kjer je bila stalna temperatura 20 °C. Vsak drugi dan smo s stereomikroskopom Nikon SMZ1500 spremljali in beležili spremembe, nastale v kapljicah.

3.2.2.5 Hemolitična aktivnost

Hemolitična aktivnost je metoda, s katero lahko hitro izmerimo poškodbe membran eritrocitov. Meritve se izvajajo s pomočjo spektrofotometra, ki meri absorbanco pri 630 nm (Simonsen in sod., 2008). Pri nepoškodovanih rdečih krvnih celicah pride do difuzije svetlobe, kar se vidi kot signal. Med potekom hemolize se celična suspenzija zaradi delovanja toksina spremeni iz motne v jasno suspenzijo. Ta sprememba povzroči tudi spremembo v svetlobni absorpciji preiskovanega vzorca. Zaradi poškodbe eritrocitov se

skozi hemolizo zaznani signal zmanjšuje in posledično, ko so vsi eritrociti uničeni, signal izgine (Gallik, 2011).



Slika 12: Mikrotiterna plošča po opravljeni hemolizi

Levo zgoraj je vidna liza eritrocitov (jasna suspenzija) in desno spodaj, nelizirani eritrociti (motna suspenzija).

1 mL eritrocitov, dobljenih na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani in shranjenih v konzervansu, smo dodali fiziološko raztopino, narahlo pomešali in vse skupaj centrifugirali 5 minut pri 2500 vrt./min in sobni temperaturi. Supernatant smo odstranili, zopet dodali fiziološko raztopino in centrifugirali pri enakih pogojih. To smo ponavljali dokler ni supernatant postal povsem bister, kar je pomenilo, da smo se znebili liziranih eritrocitov. Na podoben način smo eritrocite še sprali z ustreznim eritrocitnim pufrom (št. 31 oz. št. 32, preglednica 3). V čisto erjenmajerico smo odlili 20 mL ustreznega eritrocitnega pufra in dodali 40,7 μ L očiščenih eritrocitov. V zadnjo jamico mikrotitrne plošče smo odpipetirali 100 μ L eritrocitne suspenzije in 100 μ L ustreznega eritrocitnega pufra. Tej mešanici smo izmerili absorbanco pri 630 nm in ustrezno redčila, dokler ni bila absorbanca 0,5. V prvi stolpec mikrotitrne plošče smo z avtomatsko pipeto obpipetirali po 180 μ L ustreznega eritrocitnega pufra in 20 μ L proteina, s koncentracijo 2,82 μ L/mL. Nato smo v vsak naslednji stolpec odpipetirali po 100 μ L mešanice iz prejšnjega stolpca in tako smo pripravili ustrezne redčitve. Z avtomatsko multikanalno pipeto smo v vsako jamico dodali 100 μ L eritrocitne suspenzije, vstavili v čitalec mikrotiternih plošč (Sinergy MX) in izvršili meritev, ki je trajala 20 min.

3.2.2.6 DSF test

Diferenčna dinamična fluorimetrija (*ang.* differential scanning fluorimetry - DSF) je enostavna in hitra metoda za analiziranje temperaturno odvisnega razvitja proteinov.

Temperatura, pri kateri poteka razvijanje proteina, je merjena skozi povečanje fluorescence barvila SYPRO® Orange, ki se veže na hidrofobne dele proteina. Zaradi temperaturne spremembe se prične denaturacija proteina, kar pripelje do izpostavljanja hidrofobnih delov proteina, ki so sicer obrnjeni proti notranji strani strukture proteina. Na izpostavljene hidrofobne dele se veže barvilo, kar povzroči večjo fluorescenco. DSF test se največkrat izvaja z RT-PCR sistemom (Niesen, Berglund in Vedadi, 2007; Vedadi in sod., 2006).

Najprej smo pripravili 5000-kratno redčitev barvila SYPRO® Orange v DMSO. Nato smo v luknjice mikrotitrne plošče odpipetirali barvilo, pufer za DSF (št. 33 oz. št. 34, preglednica 3) in vzorec proteina s koncentracijo 2,5 µM. Skupni volumen ni presegal 20 µM. Tako pripravljeno ploščo smo inkubirali 5 min na 20 °C, zatem smo temperaturo zviševali iz 20 °C do 85 °C s hitrostjo 0,02 °C/s (1,2 °C/min). Med segrevanjem smo merili sproščanje fluorescence pri 610 nm. Zadnji korak je bilo ohlajanje na 20 °C.

4 REZULTATI

4.1 ANALIZA PROTEINA

Listeriolizin O je sestavljen iz 529 aminokislin (Uniprot). Z uporabo strežnika SSpro (Pollastri in sod., 2002), ki je eden izmed mnogih rešitev v sklopu Scratch Protein Predictor (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>), smo skušali predvideti sekundarno strukturo proteina (preglednica 8). Dobljeni rezultati prikazujejo, da je listerioloizina O sestavljen iz 21,9 % α -vijačnic, 26,7 % β -plošč in 51,4 % naključnih zvitij. Sodeč po raziskavi iz 2012 leta, se deleži sekundarnih elementov ujemajo z deleži v modelnem LLO, ki so $24,4 \pm 2,4$ % α -vijačnic, $25,1 \pm 1,8$ % β -plošč in $50,5 \pm 0,4$ % naključnih zvitij (Bavdek in sod., 2012).

Preglednica 8: Aminokislinsko zaporedje LLO ter napoved sekundarne strukture po programu Scratch

Protein Prediction

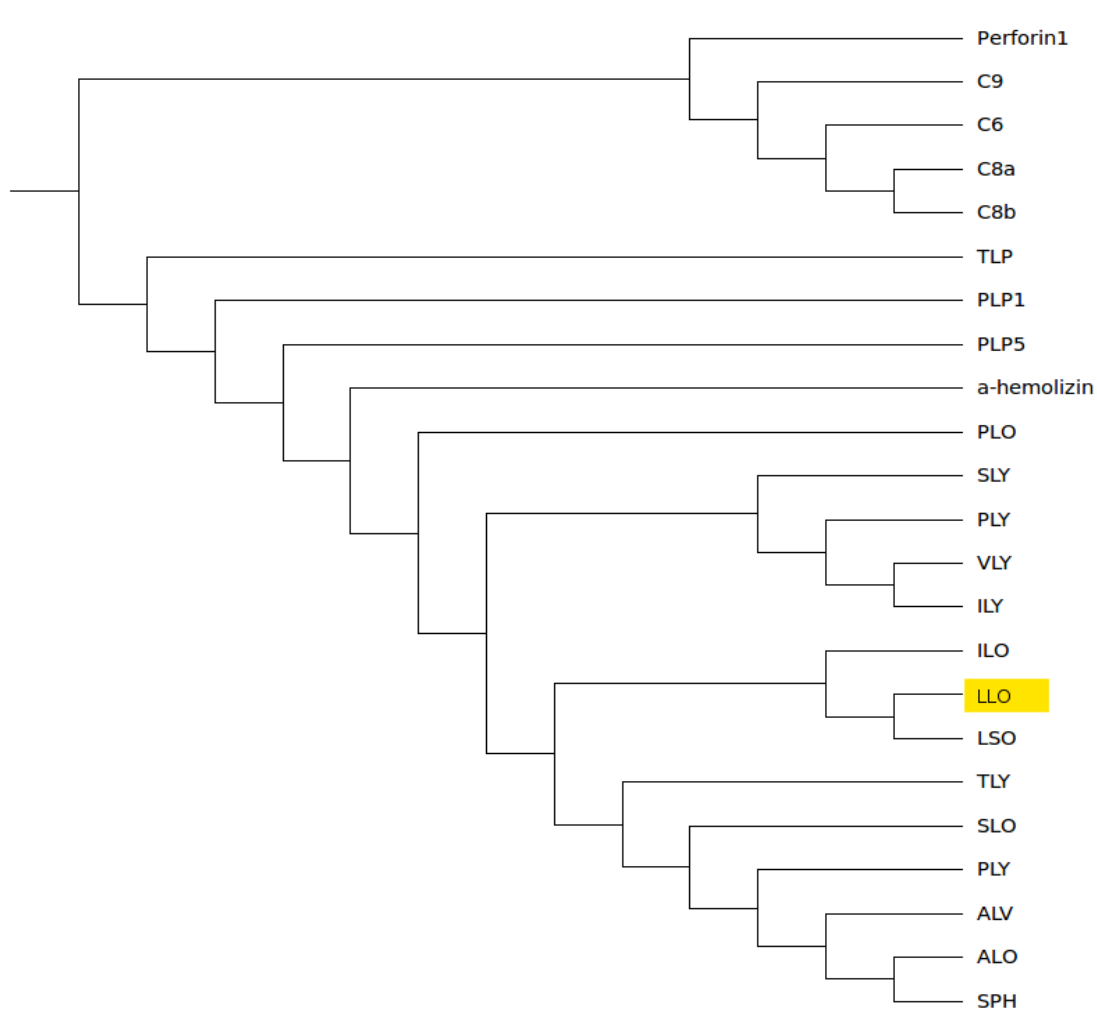
Z rumeno so označene α -vijačnice, z oranžno pa β -plošče.

Predvidene sekundarne strukture:

MKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSSMAPPASPPASPKTPIEKKHAEIDKYIQGLD
YNKNVVLVYHGDATNVPPRKGKDGNEYIVVEKKKKSINQNNADIQVVNAISSLTYPGALVKAN
SELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKIVVKNAATKSNVNNAVNTLVERWNEKYAQAYPN
VSAKIDYDDEMAYESQLIAKFGTAFKAVNNSLVNFGAISEGKMOEEVISFKQIYYNVNVNEPTRP
SRFFGKAVTKEQLQALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYLKLSINSHSTKVKAADFDAVSGKSVSGD
VELTNIKNSSFKAIVYGGSAGDEVDIHDGNLGDRLDILKKGATFNRETPGVPIAYTTNFKDNE LAVI
KNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNYDPEGNEIVQHKNWSENNKSKLAHFTS
SIYLPGNARNINVYAKECTGLAWEWWRTVIDDRNLPLVKNRNISIWGTILYPKYSNKVDNPIE

S pomočjo podatkovne baze UniProt (12.2.2013) (<http://www.uniprot.org/>) in orodjem ClustalO (12.2.2013) (<http://www.clustal.org/omega/>) smo poiskali in primerjali izbrana zaporedja proteinov med seboj. Listeriolizin O smo primerjali z nekaterimi od holesterol odvisnimi citolizini in MACPF (membranski litični kompleks-perforin) družino proteinov. Med seboj smo primerjali listerioloizina O, piolizina, antrolizina O, sferikolizina, perfringolizina O, tetanolizina O, vaginolizina, ivanolizina, seeligerilizina, alveolizina, streptolizina O, intermedilizina O, pnevmolizina, suilizina in TLP (*ang.* Torso-like protein), človeški C6, človeški C8 α , človeški C8 β , perforin, PLP1 (*ang.* Perforin-like protein), PLP5, človeški C9 ter α -hemolizina. Glede na primerjavo proteinov smo s programom TreeviewX (12.2.2013) (<https://code.google.com/p/treeviewx/>) zgradili filogenetsko drevo, ki prikazuje filogenetske odnose med analiziranimi proteini.

Iz slike 13 lahko sklepamo, da sta si LLO in LSO evolucijsko najbolj blizu. Iz drevesa je razvidno, da proteini spadajo v dve skupini, ki sta si evolucijsko oddaljeni.



Slika 13: Filogenetsko drevo proteina LLO in njemu podobnim CDC-jem in MACPF-jem

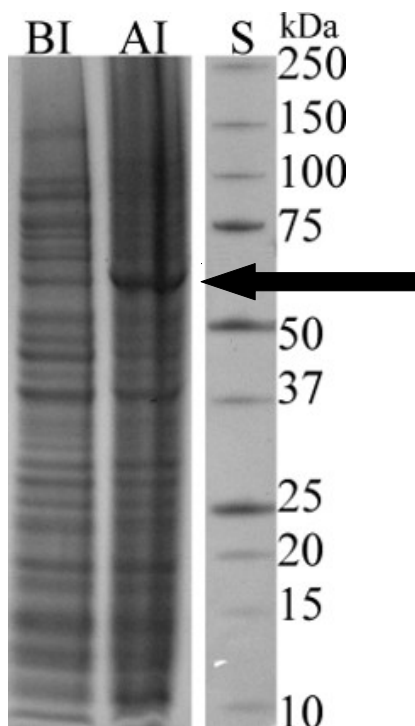
Primerjani proteini so: Perforin1 – perforin 1, C9 – človeški C9 protein, C6 – človeški C6 protein, C8a – človeški C8 α protein, C8b – človeški C8 β protein, TLP – protein podoben proteinu Torso, PLP1 – perforinu podoben protein 1, PLP5 – perforinu podoben protein 5, α -hemolizin – α -hemolizin, PLO – piolizin, SLY – suilizin, PLY – pnevmolizin, VLY – vaginolizin, ILY – intermedilizin, ILO – ivanolizin, LLO – listerioloizin O, LSO – seeligerilizin, TLY – tetanolizin O, SLO – streptolizin O, PLY – pnevmolizin, ALV – alveolizin, ALO – antrolizin O, SPH – sferikolizin. Z rumeno je označen listerioloizin O.

4.2 PRODUKCIJA, IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PROTEINA

V tem poglavju so predstavljeni rezultati produkcije, izolacije in čiščenja proteinov LLO wt in LLO wt brez His-repkov pri dveh pH (5,7 in 7,5). Rezultati za proteina LLO H311A z in brez His-repkov pri pH 5,7 ter 7,5 so bili podobni. Edina razlika je v nižji ekspresiji mutanta z in brez His-repka pri obeh pH in posledično manjši količini produkta. Protein LLO brez His-repka je bil kloniran v vektor pPROEX-Htb LLO, medtem ko je bil LLO s His-repkom kloniran v pET8c-LLO H311A. Posledično pri slednjih ni bila mogoča cepitev repka od proteina.

4.2.1 Preverjanje uspešnosti izražanja proteina v *E. coli*

Najprej smo z NaDS-PAGE elektroforezo analizirali učinkovitost indukcije izražanja LLO z IPTG. Analizirali smo vzorec bakterijskih celic pred in po indukciji z IPTG (slika 14).



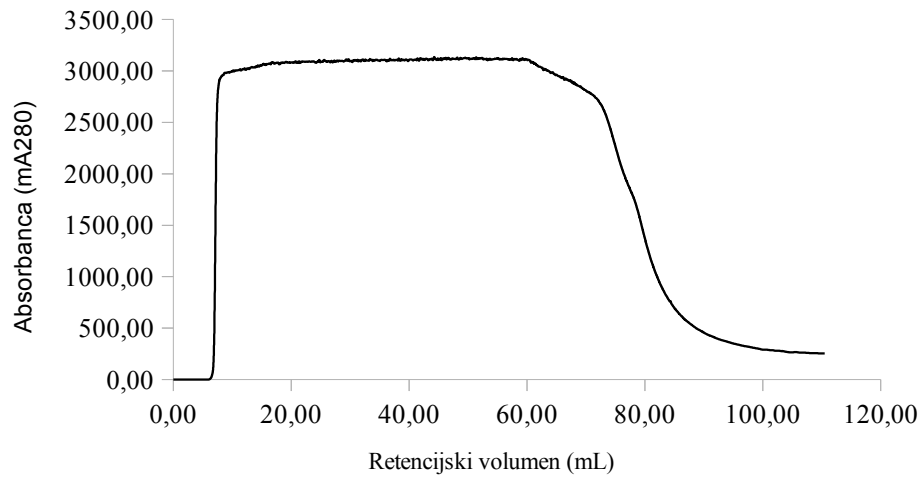
Slika 14: NaDS-PAGE elektroforeza za preverjanje uspešnosti indukcije

BI – pred indukcijo, AI – po indukciji in S – standard molekularnih mas. Puščica nakazuje tarčni protein LLO wt pH 5,7 brez His-repka.

Pri vseh proteinih smo dobili podoben rezultat, zato je prikazan samo LLO wt brez His-repka pri pH 5,7.

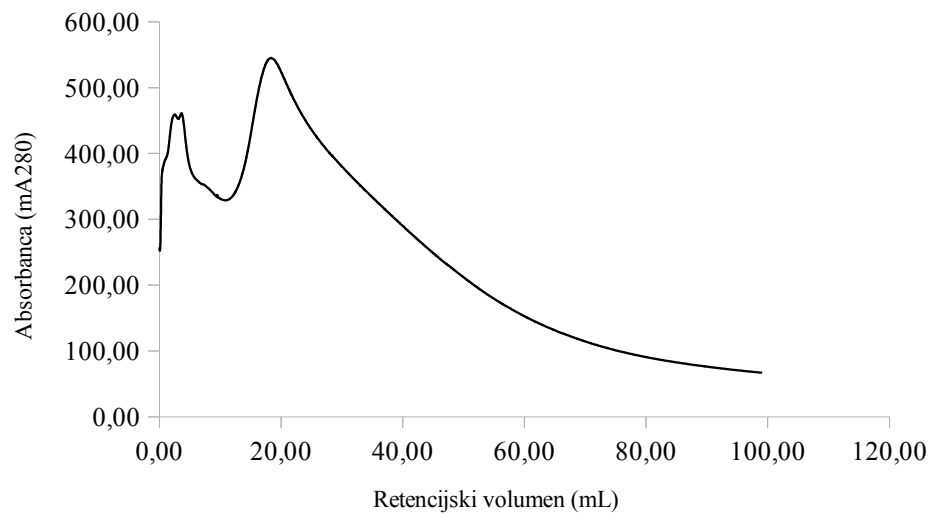
4.2.2 Ni-NTA kromatografija I

Ko smo se prepričali, da se je protein uspešno izrazil, smo pričeli s prvo Ni-NTA kromatografijo. Najprej smo lizirali zamrznjene bakterijske celice, jih lizirali s sonikacijo ter nato nanесли supernatant na Ni-NTA kolono. Zbirali smo tri frakcije (prva nevezana, druga nevezana in vezana frakcija) in jih kasneje preverili z NaDS-PAGE elektroforezo.



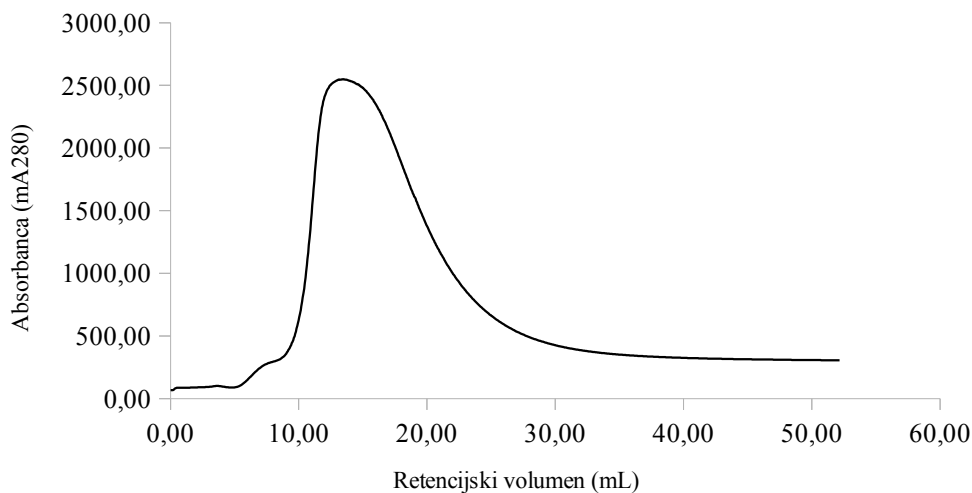
Slika 15: Spiranje Ni-NTA kolone s pufrom za nanos (št. 3)

Zbirali smo prvo nevezano frakcijo od 8 mL do 98 mL.



Slika 16: Spiranje Ni-NTA kolone s pufrom za spiranje (št. 4)

Zbirali smo drugo nevezano frakcijo od 18 mL do 65 mL.



Slika 17: Spiranje Ni-NTA kolone s pufrom za elucijo (št. 5)

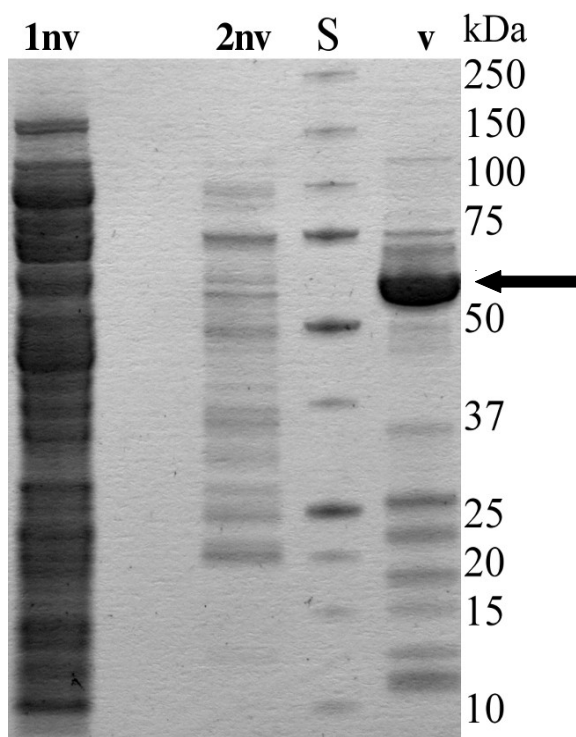
Zbirali smo vezano frakcijo od 9 mL do 38 mL.

Zbrane frakcije smo poimenovali:

- 1nv (prva nevezana frakcija);
- 2nv (druga nevezana frakcija);
- v (vezana frakcija).
-

4.2.3 Preverjanje vsebnosti frakcij iz Ni-NTA I

Nato je sledila analiza zbranih frakcij po prvi nikljevi koloni. To smo storili z uporabo NaDS-PAGE elektroforeze. Prikazani so rezultati proteina LLO wt brez His-repka. Pri ostalih primerih so rezultati elektroforeznih gelčkov enaki.

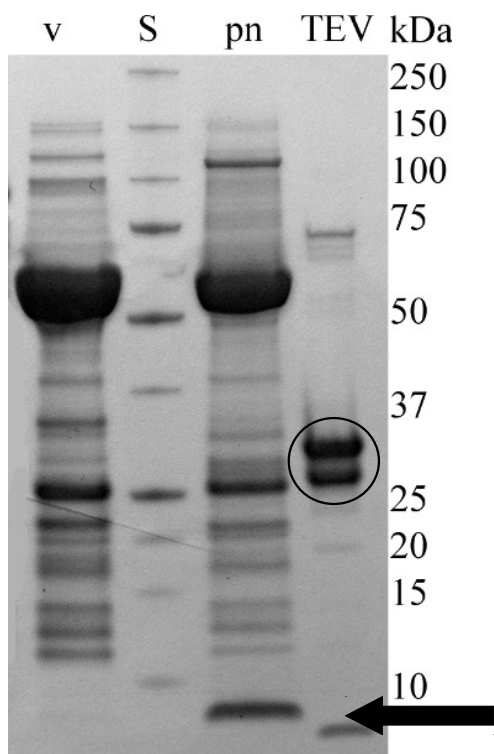


Slika 18: NaDS-PAGE elektroforeza z vzorci prvih treh frakcij

1nv – prva nevezana frakcija, 2nv – druga nevezana frakcija, S (standard molekularnih mas, mase označene na desni strani slike) in v – vezana frakcija. Puščica označuje LLO wt, ki se nahaja v vezani frakciji.

4.2.4 Dializa in cepljenje His-repkov s TEV proteazo

Pri proteinih, ki so vsebovali cepitveno mesto za TEV proteazo, smo His-repke cepili med samo dializo. Po uspešnem analiziranju lokacije tarčnega proteina, smo vezano frakcijo dializirali skozi noč ob prisotnosti TEV proteaze. Naslednji dan smo zopet naredili NaDS-PAGE elektroforezo in se prepričali o uspešnosti cepljenja His-repkov s proteazo.

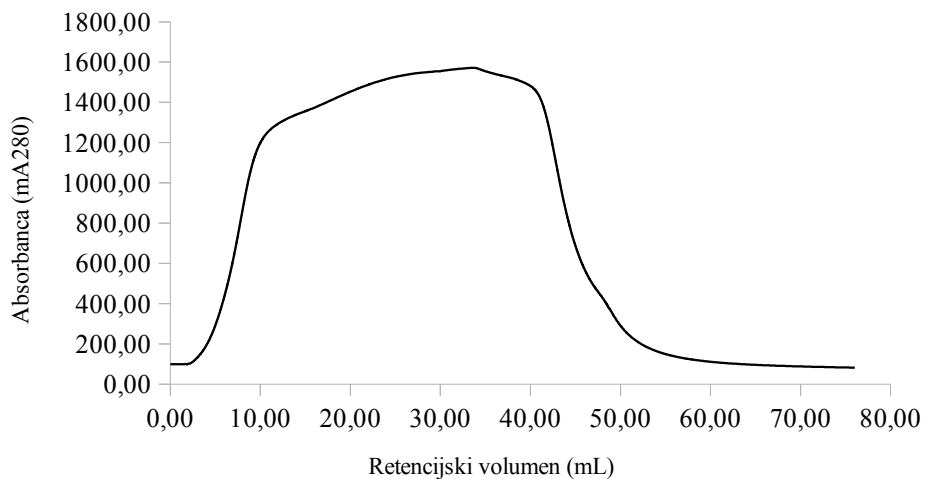


Slika 19: NaDS-PAGE elektroforeza z pred in po dializi

v – vezana frakcija, S – standard molekulskih mas, pn – po dializi oz. pred drugim nanosom na nikljevo kolono, TEV – TEV proteaza. Puščica kaže cepljene His-repke, obkrožena je TEV proteaza.

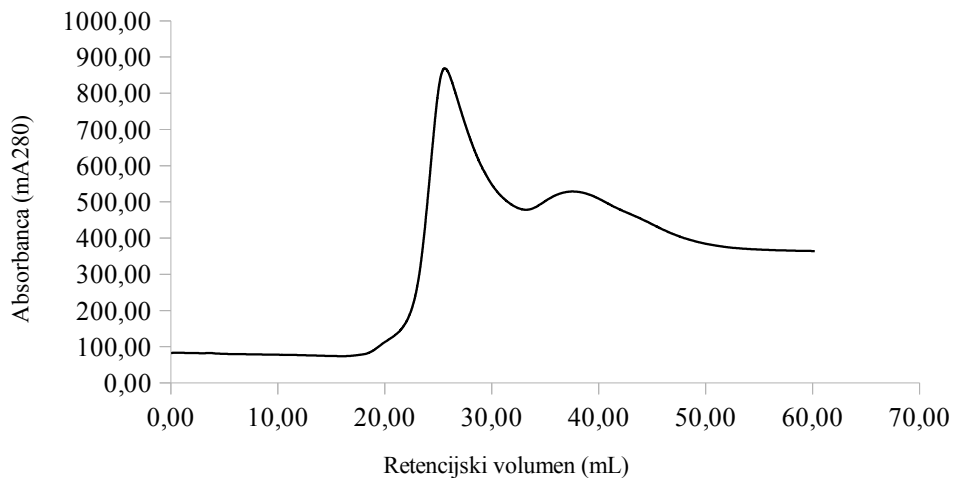
4.2.5 Ni-NTA kromatografija II

Po tem, ko smo s pomočjo dialize odstranili His-repke proteinu, smo pričeli z drugo Ni-NTA kromatografijo. Na nikljevo kolono smo nanegli vzorec in ga najprej spirali s pufrom za nanos (št. 14 oz. št. 15), nato pa s pufrom za elucijo (št. 5), ki je identičen pufu za elucije iz Ni-NTA kromatografije I. Oba vrha smo zbrali v dve frakciji in smo v nadaljnjem procesu analizirali njuno vsebnost. Zaradi cepitve His-repkov, je tarčni protein bil v prvi frakciji, His-repki in TEV proteaza so se pa vezali na kolono.



Slika 20: Ni-NTA kolona 1

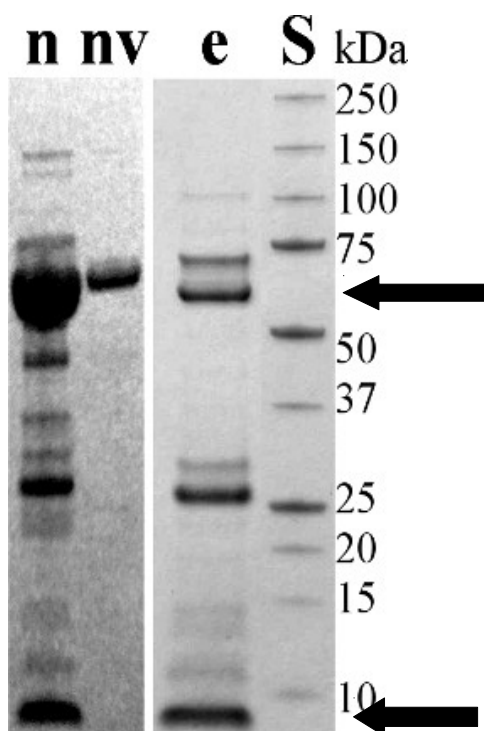
Spiranje s pufrom za nanos (št. 14 oz. št. 15). Zbirali smo frakcijo od 4 mL do 55 mL (nevezana frakcija).



Slika 21: Ni-NTA kolona 2

Spiranje s pufrom za elucijo (št. 5). Zbirali smo frakcije od 20 mL do 48 mL (elucija).

Učinkovitost ločbe smo zopet preverili z NaDS-PAGE elektroforezo.



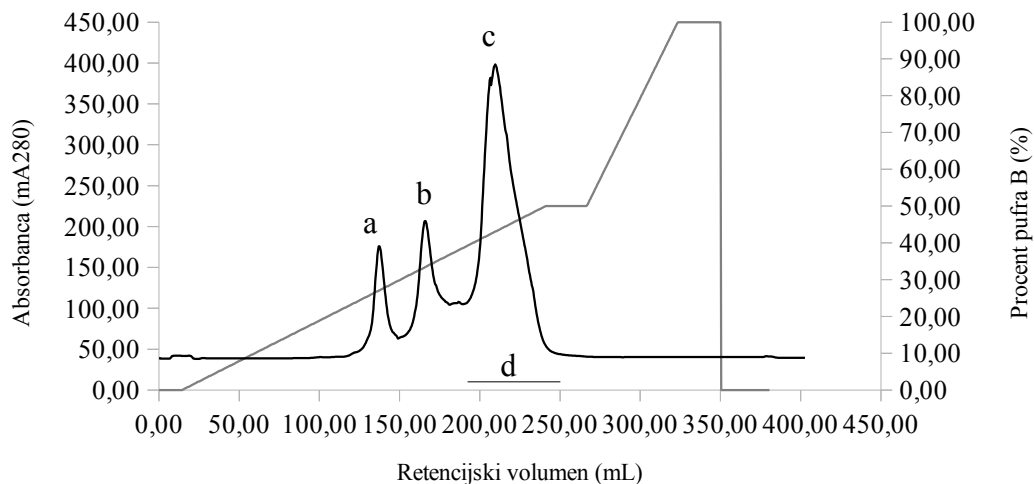
Slika 22: NaDS-PAGE elektroforeza, preverjanje ločbe z drugo Ni-NTA kromatografijo

n – nanos (po dializi z TEV proteazo), nv – nevezana frakcija, e – elucija in S – standard molekularnih mas. Zgornja puščica kaže tarčni protein, spodnja pa His-repke.

4.2.6 Kationsko-izmenjevalna kromatografija

Za tiste proteine, pri katerih His-repkov nismo mogli odcepiti, smo uporabili drugačen protokol po dializi, pri kateri seveda ni bila prisotna TEV proteaza. Namen te dialize je bil, da smo iz vzorca po Ni-NTA koloni odstranili imidazol in zmanjšali vsebnost soli (NaCl) iz 300 mM na 10 mM.

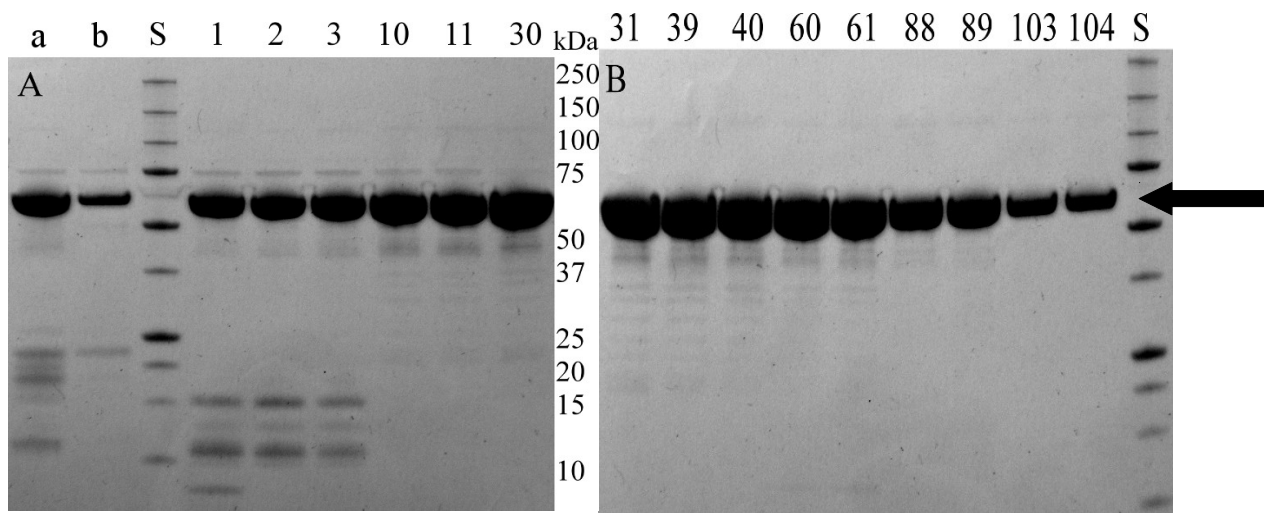
Metoda kationsko-izmenjevalne kromatografije, je potekala po protokolu, pri katerem smo dobili tri vrhe, ki smo jih shranili (slika 23). Analiza z NaDS-PAGE elektroforezo je pokazala (slika 24), da je največ LLO v tretjem vrhu, zato smo posebej shranili frakcije tretjega vrha po 0,5 mL.



Slika 23: Potek kationsko-izmenjevalne kromatografije z nosilcem TSKgel®, ki ima za osnovo metakrilni polimer

Vidni so trije vrhi, prvi (a), drugi (b) in tretji vrh (c) v katerem je očiščen protein LLO wt s His-repkom.

Frakcije smo zbirali pri prvem, drugem in pri tretjem vrhu. Pri slednjem smo zbirali od 195 mL do 250 mL oziroma od 1 do 104 (območje d).



Slika 24: Analiza čistosti LLO po kationsko-izmenjvalni kromatografiji

A – razvidna sta vrh 1 (a) in vrh 2 (b), standard molekulskih mas (S) ter frakcije c (1,2,3,10,11,30). B –

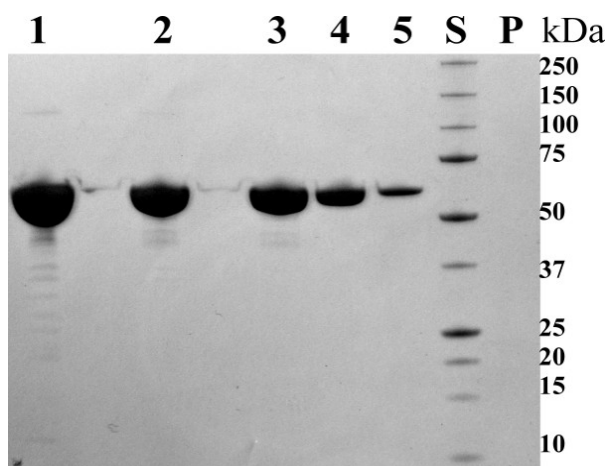
razvidne so frakcije c (31, 39, 40, 60, 61, 88, 89, 103, 104) in standard molekulskih mas (S). S puščico je označen nivo velikosti proteina LLO wt s His-repkom.

4.2.7 Koncentriranje proteina

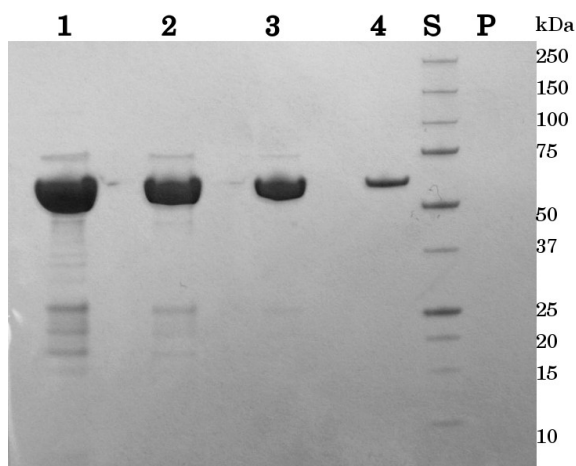
Na podlagi dobljenih rezultatov iz kromatograma in slike elektroforeze, smo se odločili za najbolj optimalne frakcije proteina, ki so predstavljale največjo koncentracijo proteina v najbolj čisti obliki. Izbrali smo 500 μ L frakcije od zaporedne številke 10 do 104 (z retencijskim volumnom od 200 mL do 247 mL). Združili smo 47 mL vzorca s koncentracijo 1,06 mg/mL in pričeli s koncentriranjem. Po ultrafiltraciji smo volumen zmanjšali na 2,6 mL, koncentracijo pa povečali na 20 mg/mL.

Pri alternativnem protokolu, s katerim smo izolirali LLO wt brez His-repka, smo imeli eno skupno frakcijo, ki smo jo dobili z metodo Ni-NTA kromatografije II. Temu vzorcu smo izmerili koncentracijo in ga ustrezno skoncentrirali.

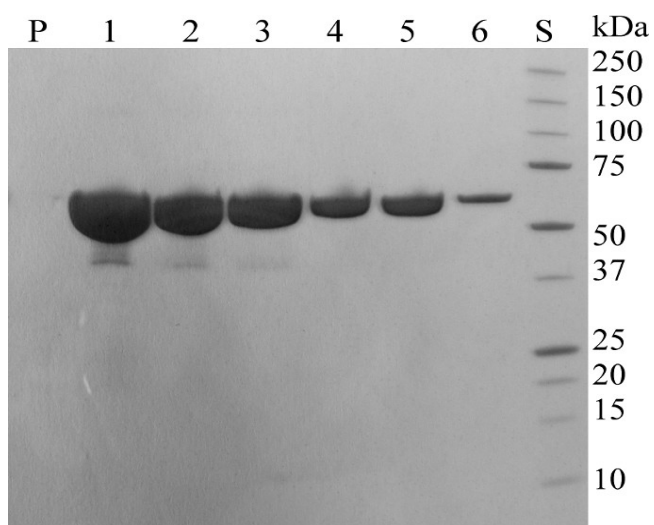
Uspešnost koncentracije vzorca smo preverili z NaDS-PAGE elektroforezo.



Slika 25: Koncentracijski NaDS-PAGE elektroforezni gel za protein LLO wt pH 5,7 brez His-repka
1 – 40 μ g, 2 – 20 μ g, 3 – 14 μ g, 4 – 5 μ g, 5 – 1 μ g, S – standard molekularnih mas in P – permeat.

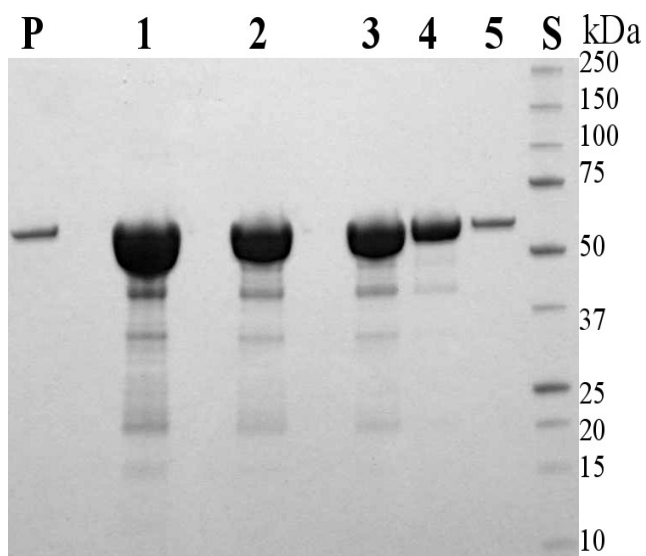


Slika 26: Koncentracijski NaDS-PAGE elektroforezni gel za protein LLO H311A pH 5,7 s His-repkom
1 – 24 μ g, 2 – 15 μ g, 3 – 6 μ g, 4 – 1,5 μ g, S – standard molekularnih mas in P – permeat.



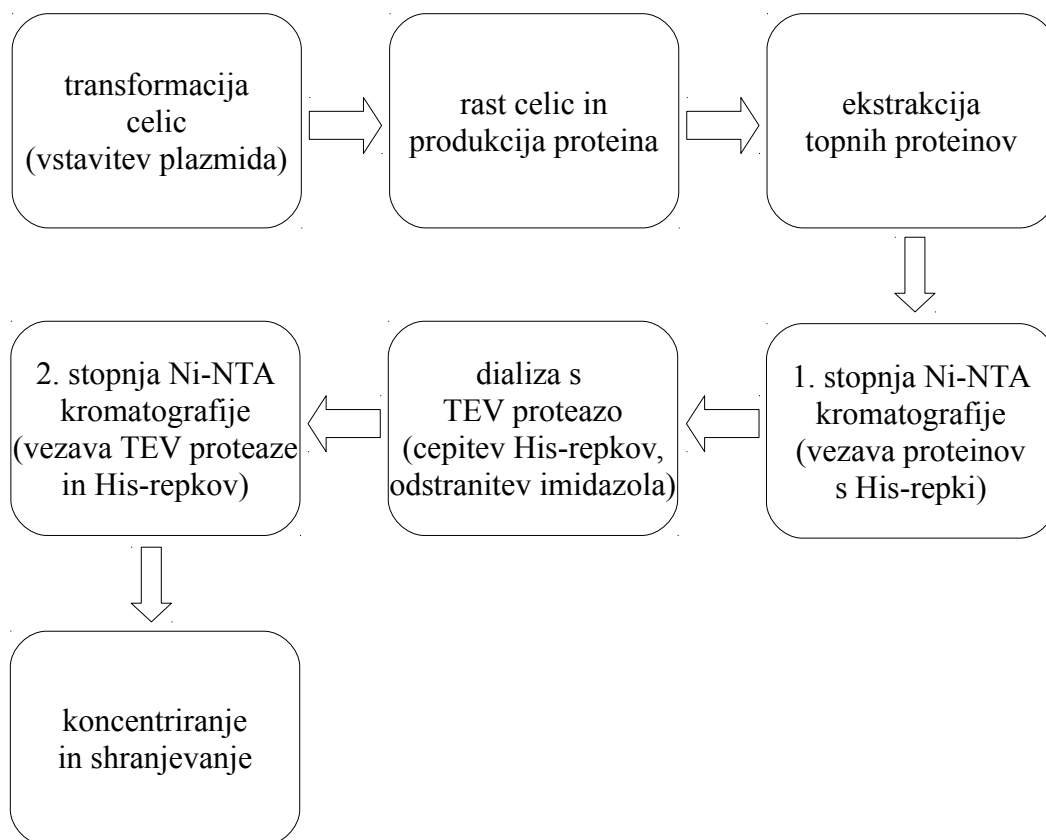
Slika 27: Koncentracijski NaDS-PAGE elektroforezni gel za protein LLO wt pH 5,7 s His-repkom

P – permeat, 1 – 40 μ g, 2 – 20 μ g, 3 – 14 μ g, 4 – 5 μ g, 5 – 5 μ g, 6 – 1 μ g, S – standard molekularnih mas.



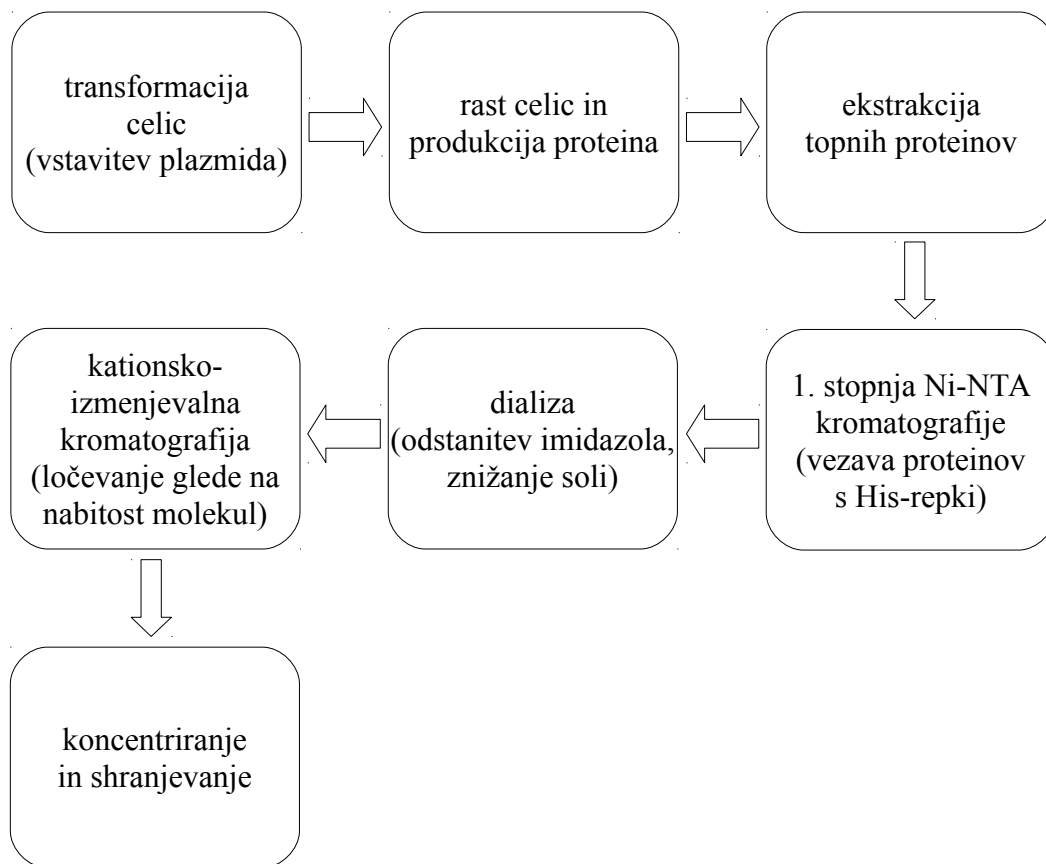
Slika 28: Koncentracijski NaDS-PAGE elektroforezni gel za protein LLO H311A pH 5,7 brez His-repka

P – permeat, 1 – 40 μ g, 2 – 20 μ g, 3 – 14 μ g, 4 – 5 μ g, 5 – 1 μ g, S – standard molekularnih mas.



Slika 29: Proces pridobivanja proteinov LLO in njegovega mutanta H311A brez His-repkov

Uporaba dotičnega vektorja za kloniranje omogoča cepljenje His-repkov iz proteina (dializa s TEV proteazo) in posledično ponovno uporabo Ni-NTA kolone za izolacijo.



Slika 30: Proces pridobivanja proteinov LLO in njegovega mutanta H311A s His-repki

Pri tem protokolu se je uporabil drug vektor za kloniranje, ki ne omogoča cepljenje His-repkov iz proteina.

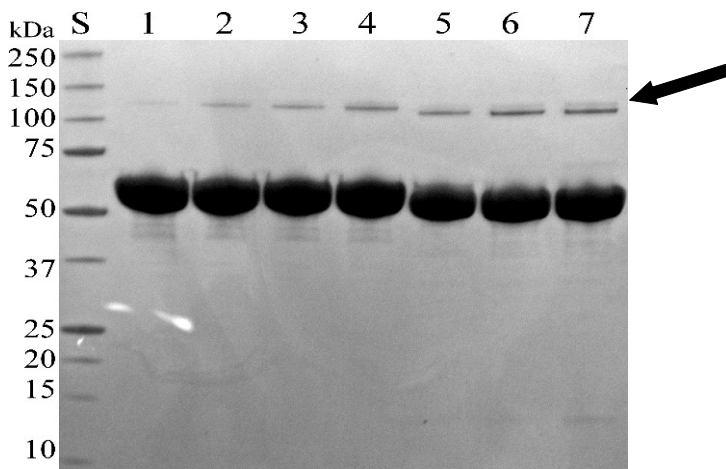
Posledično smo za izolacijo uporabili kationsko-izmenjevalno kromatografijo.

Izolirali smo sledeče proteine:

- LLO wt s His-repkom pri pH 5,7 (20 mg/mL) in pH 7,5 (20 mg/mL);
- LLO H311A s His-repkom pri pH 5,7 (3 mg/mL) in pH 7,5 (3 mg/mL);
- LLO wt brez His-repka pri pH 5,7 (20 mg/mL) in pH 7,5 (20 mg/mL);
- LLO H311A brez His repka pri pH 5,7 (20 mg/mL) in pH 7,5 (20 mg/mL).
-

4.3 TEST PROTEOLITSKE STABILNOSTI

V 35 dneh smo redno jemali vzorce za test stabilnosti proteina. Analizirati smo, ali LLO wt s His-repkom pri pH 7,5, proteolitsko razpada v danem času na stalni temperaturi 20 °C. Vzorce smo nanesti na NaDS-PAGE elektroforezo.



Slika 31: Test proteolitske stabilnosti proteina LLO wt s His-repkom pri pH 7,5

Slika prikazuje NaDS-PAGE elektroforezo (4 - 12 % zamreženost) pod ne-redukcijskimi pogoji, kjer puščica kaže na tvorbo dimerov. 1 – prvi dan, 2 – pet dan, 3 – osmi dan, 4 – trinajsti dan, 5 – dvajseti dan, 6 – sedemindvajseti dan, 7 – petintrideseti dan.

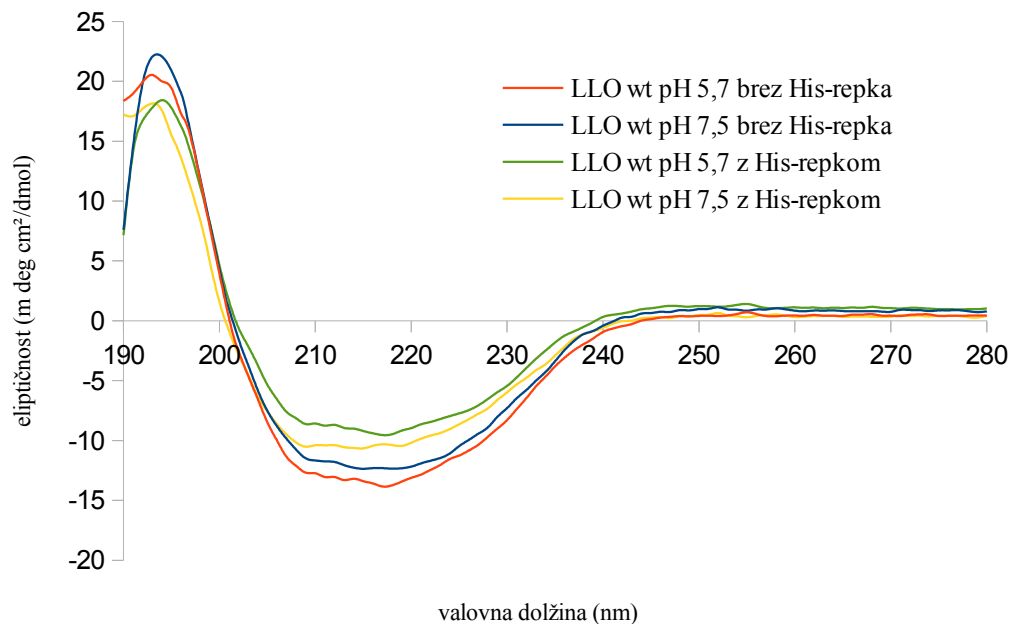
Gel prikazuje, da je pri teh pogojih vzorec proteolitsko zelo stabilen.

4.4 CIRKULARNI DIKROIZEM

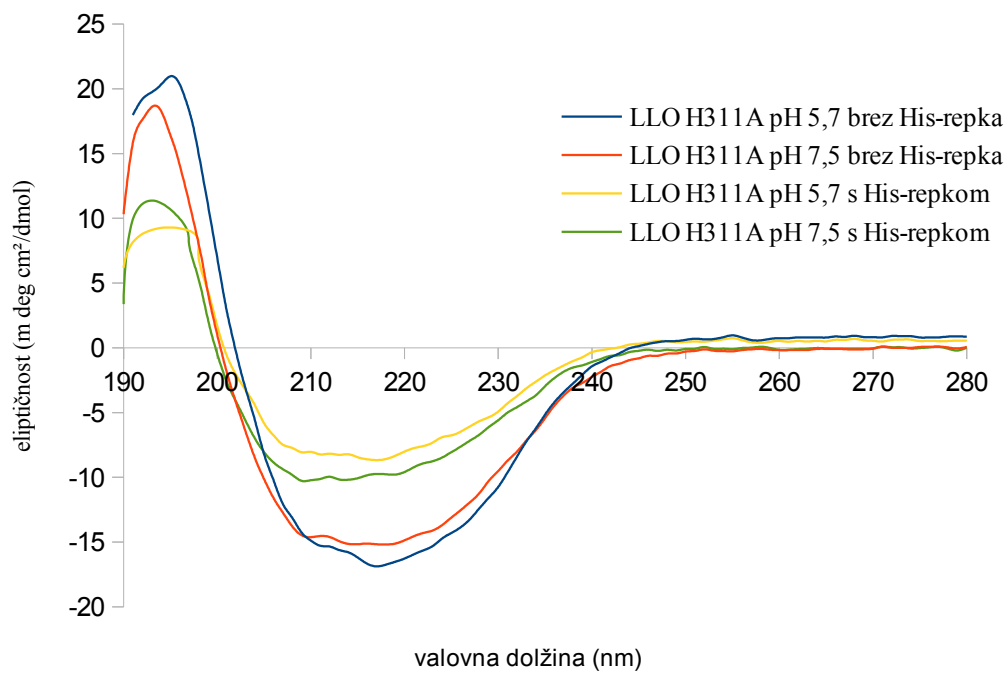
Pri analizi sekundarnih struktur smo s pomočjo cirkularnega dikroizma primerjali očiščene proteine med seboj. V daljnem UV-območju smo merili CD spektre za naslednje vzorce:

- LLO wt z in brez His-repka pri dveh pH vrednostih (5,7 in 7,5);
- LLO H311A z in brez His-repka pri dveh pH vrednostih (5,7 in 7,5).

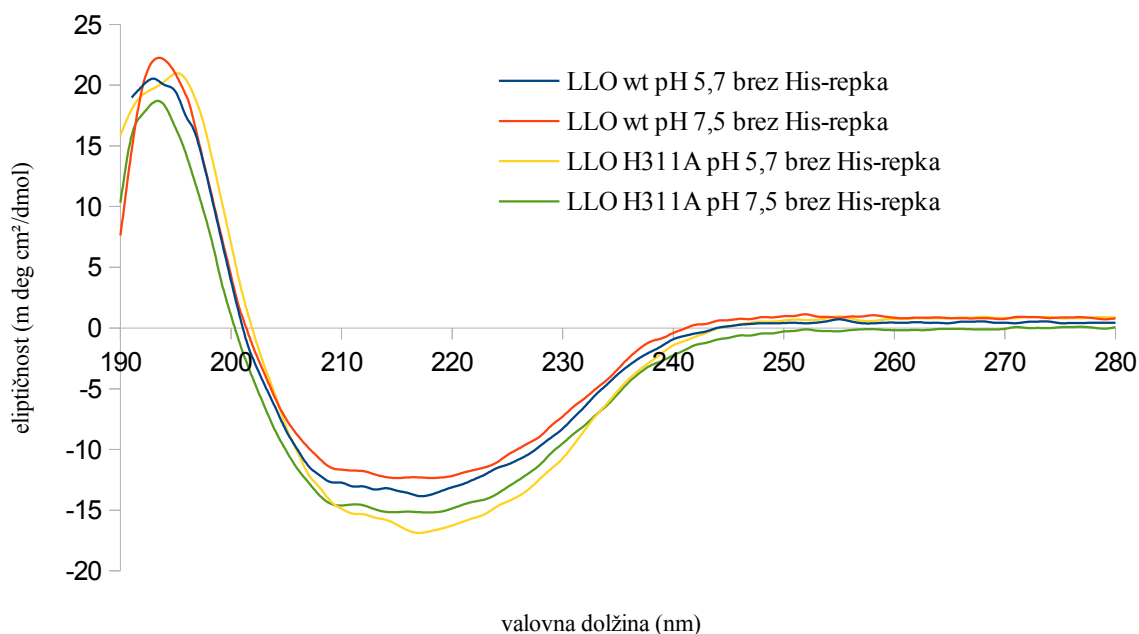
Na naslednjih straneh so predstavljeni rezultati v obliki grafov za CD, merjen pri daljnem UV-območju.



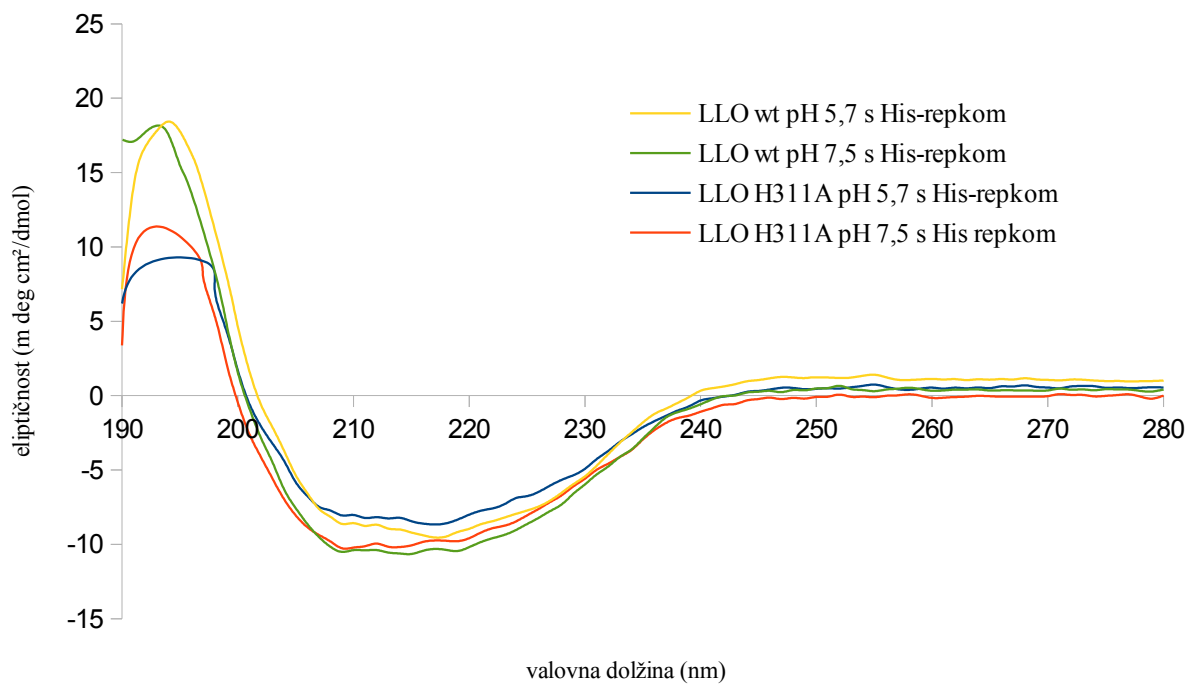
Slika 32: Spekter cirkularnega dikroizma za proteina LLO wt brez His repka in LLO wt s His-repkom



Slika 33: Spekter cirkularnega dikroizma za proteina LLO H311A z in brez His-repka

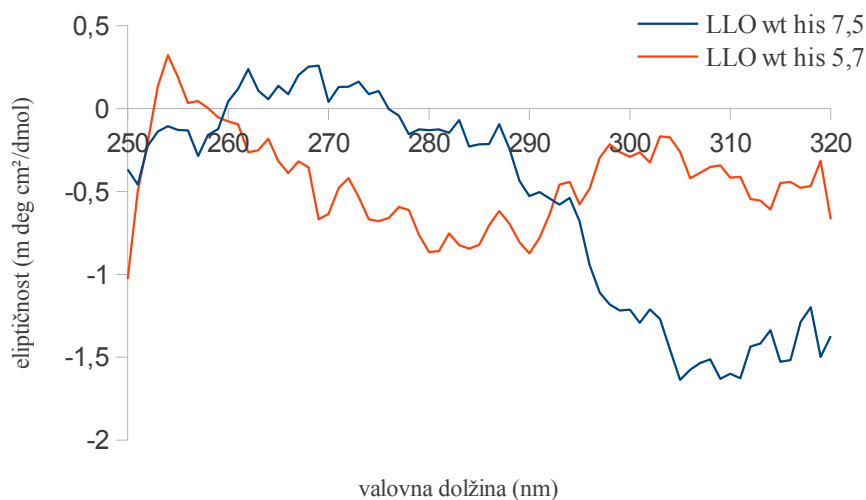


Slika 34: Spekter cirkularnega dikroizma za proteina LLO wt brez His-repka in LLO H311A brez His-repkov



Slika 35: Spekter cirkularnega dikroizma za proteina LLO wt s His-repkom in LLO H311A s His-repkom

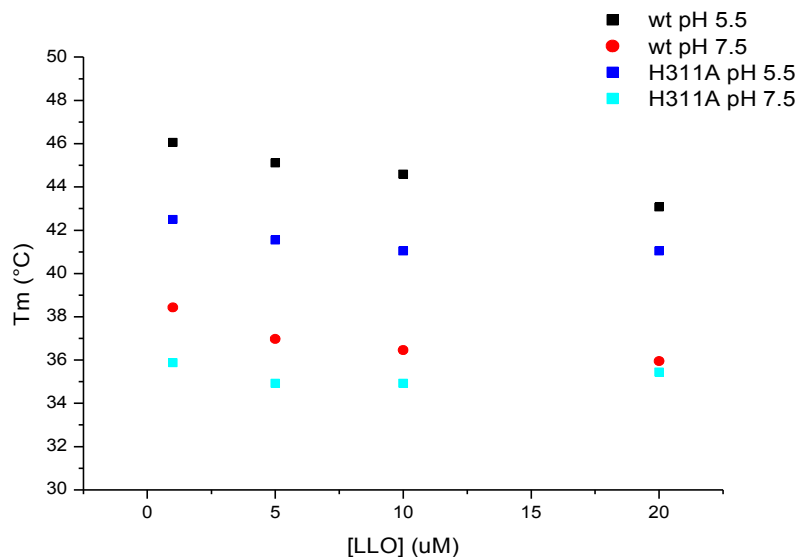
Pri merjenju pri bližnjem UV-območju smo analizirali vzorec LLO wt s His-repkom pri dveh vrednostih pH: 5,7 in 7,5.



Slika 36: Spekter cirkularnega dikroizma pri bližnjem UV-območju za protein LLO wt s His-repkom pri pH 7,5 in pH 5,7

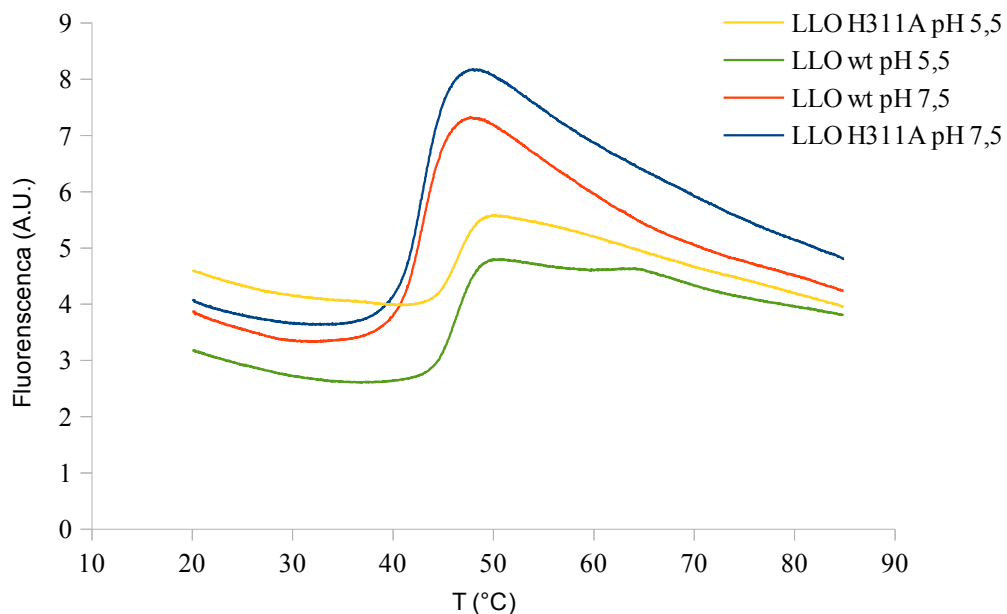
4.5 DOLOČEVANJE TERMIČNE STABILNOSTI PROTEINOV Z DIFERENČNO DINAMIČNO FLUORIMETRIJO

S to metodo smo analizirali kateri protein je stabilnejši pri konstantnemu povišanju temperature. Pri dveh različnih vrednostih pH (5,5 in 7,5) smo primerjali vzorce LLO wt brez His-repka in LLO H311A brez His-repka. Na podlagi rezultatov smo izračunali temperaturo denaturacije proteinov, ki so predstavljeni v grafu številka 34, potek termične stabilnosti proteinov pa je predstavljen v grafu 35.



Slika 37: Temperatura denaturacije (T_m) za proteine LLO wt z in brez His-repka in LLO H311A z in brez His-repka pri pH 5,5 in pH 7,5

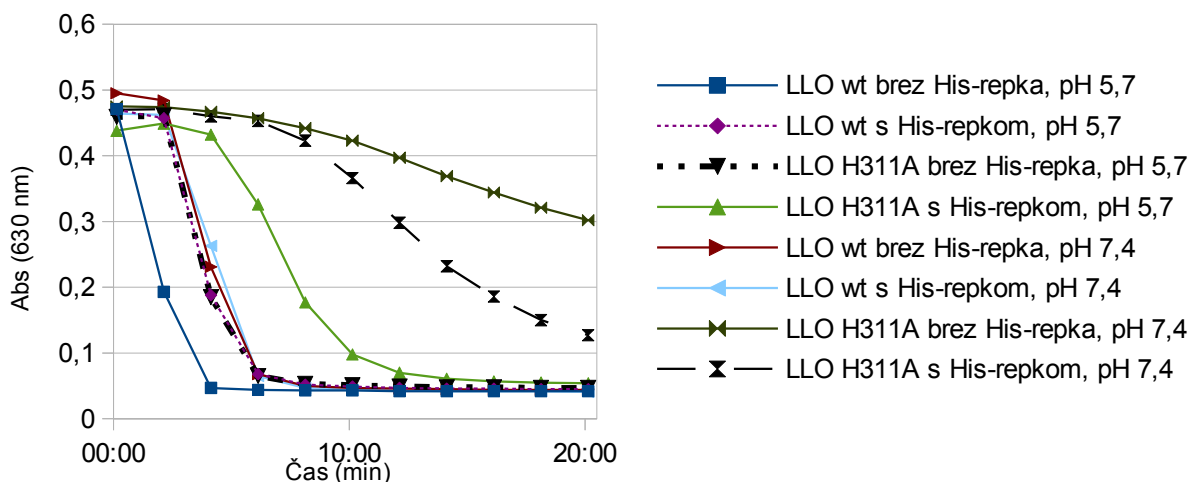
Uporabljene koncentracije proteinov so: 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M in 20 μ M.



Slika 38: Graf primerjave termične stabilnosti LLO wt z in brez His-repka in LLO H311A z in brez His-repka pri pH 5,5 in pH 7,5

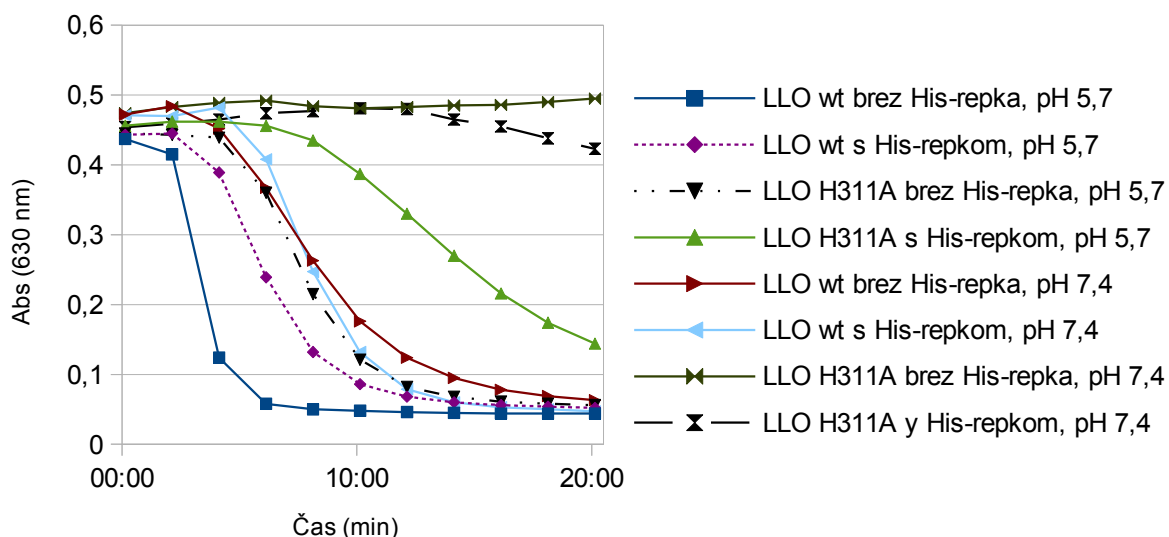
4.6 HEMOLIZNA AKTIVNOST

S to metodo smo merili hemolizno aktivnost vseh izoliranih proteinov. Testirali smo štiri različne toksine: LLO wt s His-repkom, LLO wt brez His-repka, LLO H311A s His-repkom in LLO H311A brez His-repka, pri dveh različnih pH vrednostih (5,7 in 7,4). Poleg velikega spektra proteinov, smo še pri vsakem proteinu izvedli redčitev od 2,82 $\mu\text{g/mL}$ do 0,0027539 $\mu\text{g/mL}$.



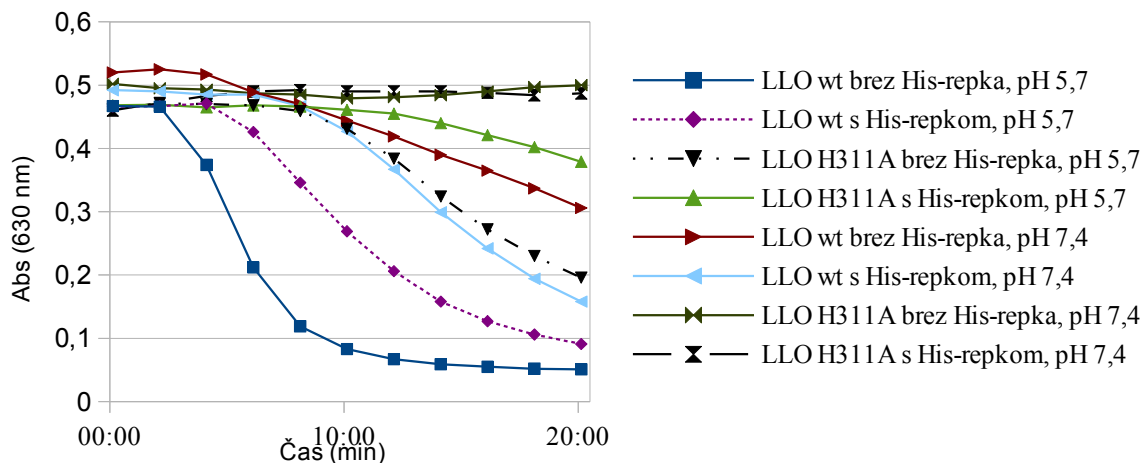
Slika 39: Prikaz spremembe hemolitske aktivnosti s časom (1)

Koncentracija proteinov je 8,8125 ng/mL.



Slika 40: Prikaz spremembe hemolitske aktivnosti s časom (2)

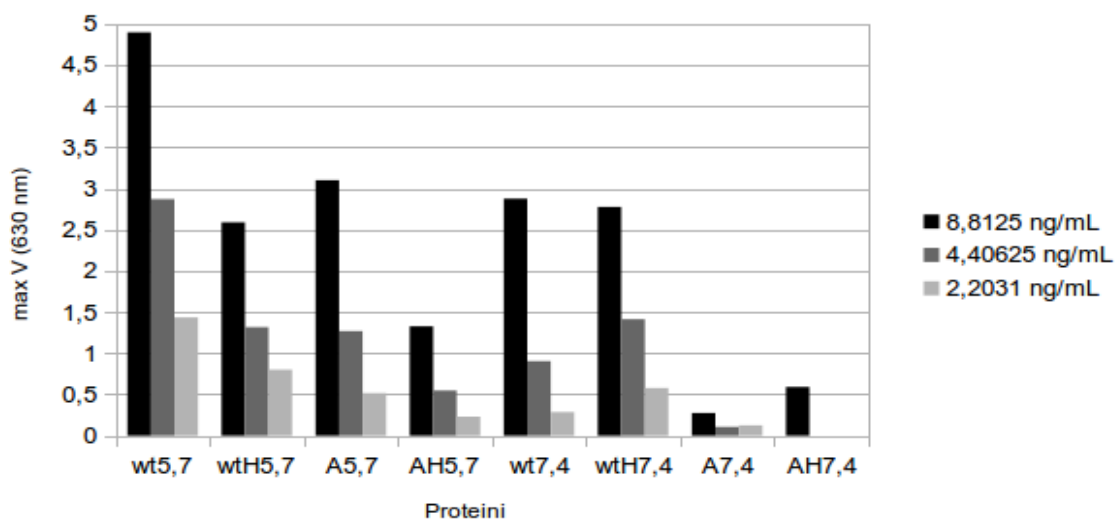
Koncentracija proteinov je 4,40625 ng/mL.



Slika 41: Prikaz spremembe hemolitske aktivnosti s časom (3)

Koncentracija proteinov je 2,2031 ng/mL.

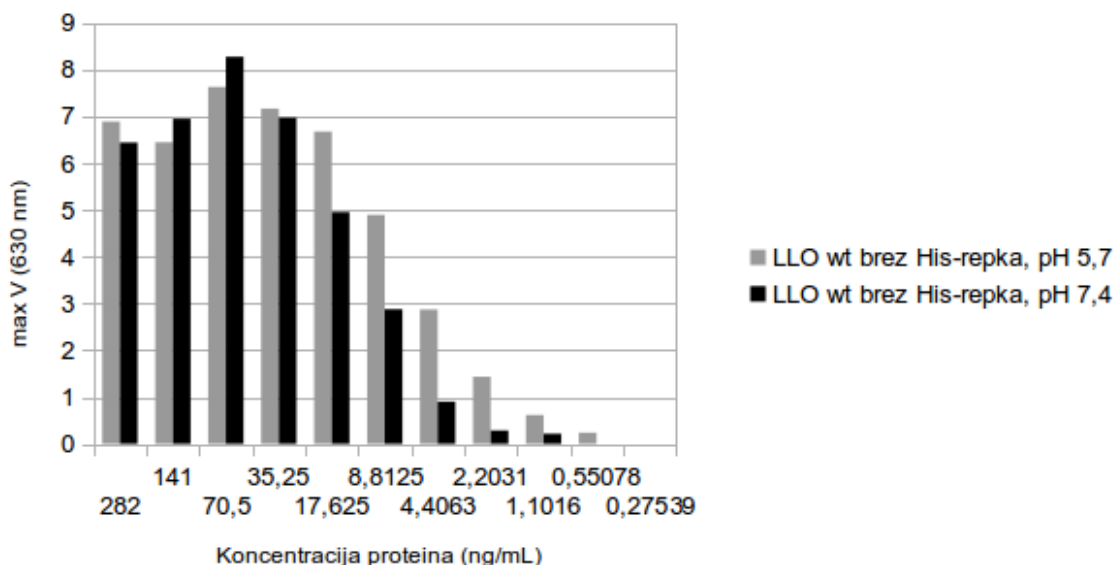
Sprememba koncentracije proteinov vodi k spremembi učinkovitosti hemolize. Najbolj učinkovit je LLO wt brez His-repka pri pH 5,7, najmanj pa LLO H311A s His-repkom pri pH 7,4.



Slika 42: Prikaz hitrosti hemolize za vse proteine pri treh različnih koncentracijah proteinov

wt5,7 – LLO wt brez His-repka pH 5,7; wtH5,7 – LLO wt s His-repkom pH 5,7; A5,7 – LLO H311A brez His-repka pH 5,7; AH5,7 – LLO H311A s His-repkom pH 5,7; wt7,4 – LLO wt brez His-repka pH 7,4; wtH7,4 – LLO wt s His repkom pH 7,4; A7,4 – LLO H311A brez His-repka pH 7,4; AH7,4 – LLO H311A s His-repkom pH 7,4.

Iz grafa je razvidno, da se z zmanjšanjem koncentracije proteina, zmanjšuje tudi hitrost hemolize. LLO wt je bolj aktiven pri pH 5,7, kot pri pH 7,4. Enako velja tudi za LLO H311A. Tako pri LLO wt, kot tudi pri LLO H311A His repek vpliva na aktivnost. Brez His-repka je protein bolj aktiven, kot pa s His-repkom. Divji tip LLO je bolj aktiven, kot njegov mutant.



Slika 43: Prikaz hitrosti hemolize za LLO wt brez His-repka pri pH 5,7 in LLO wt brez His-repka pri pH 7,4, pri vseh izmerjenih koncentracijah

V primerih koncentracije 35 ng/mL ali več ni bistvenih razlik. Razlike v aktivnosti LLO wt brez His-repka so očitne od koncentracije 17,625 ng/mL, do 0,55078 ng/mL. Pri pH 5,7 je LLO wt brez His-repka bolj aktiven, kot pri pH 7,4.

4.7 KRISTALIZACIJA PROTEINA

Kristalizacija je potekala, kot je napisano pod točko 3.2.2.5. Izoliran protein LLO wt s His-repkom pri pH 7,5 smo poizkusili kristalizirati pri vseh standardnih pogojih kristalizacijskega seta raztopin Hampton Research (Index Screen, Memb Fac, Natrix Screen, Peg Ion, Salt RX). Kristalov v času opravljanja mojega diplomskega dela nismo dobili.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

L. monocytogenes je bakterija, ki je prilagojena na življenje v celičnem citosolu, kot tudi v okolju. Uspešno zaobide obrambne mehanizme organizma in se hitro razmnožuje. Zaradi patogenih lastnosti, bakterija nemalokrat povzroči smrt (Farber in sod., 1991). Listeriolizin O (LLO) je glavni razlog, zakaj je *L. monocytogenes* tako uspešna pri pobegu iz fagolizosoma (Mengaud in sod., 1988). LLO, ki spada med od holesterola odvisne citolizine (CDC), ustvari pore, skozi katere lahko prehajajo ioni in proteini. Posledično se fagolizosom razgradi in bakterija preide v citosol, kjer se razmnoži in preide v sosednjo celico (Schnupf in sod., 2007). Medtem, ko je struktura in natančno delovanje proteinov CDC dobro poznana, predstavlja LLO, zaradi specifične pH-odvisnosti in neraziskanosti strukture, do določene mere neznanko. Kljub temu, da ni poznana tridimenzionalna struktura proteina, je podobnost med CDC toksini dovolj velika, da lahko sklepamo o sami strukturi oziroma razporeditvi štirih domen, ki sestavljajo ta protein (Heuck in sod., 2010).

Pri toksinih roda *Listeria*, je histidin na zaporednem mestu 311 edinstven, saj ostali CDC imajo lizin. Ker se nahaja v domeni 3 in je del šestih α -vijačnic (kasneje TMH1 in TMH2), je zelo pomemben pri konformacijskih spremembah tretje domene. Zamenjava te aminokisline z drugo (v našem primeru je to alanin), pripelje do spremembe aktivnosti in strukture LLO (Bavdek, 2010).

Iz podatkovne baze UniProt smo najprej poiskali zaporedja izbranim od holesterola odvisnim citolizinom in MACPF. Nato smo jih primerjali med seboj in ustvarili filogenetsko drevo, ki nam prikazuje sorodnost izbranih proteinov (slika 13). Ugotovimo lahko, da so človeški proteini iz družine MACPF (perforin 1, C9, C6, C8 α in C8 β) sorodno najbolj oddaljeni od raziskovanega LLO. Medtem ko sta proteina LSO in ILO najbolj sorodna listeriolizinu O. Tako seeligerilizin (LSO), kot ivanolizin (ILO) in listeriolizin O (LLO), izvirajo iz istega roda gram pozitivnih bakterij, imenovanega *Listeria*.

Za produkcijo proteinov LLO wt in LLO H311A smo uporabili celice *E. coli* BL21(DE3)pLysS, ki so odporne na kloramfenikol. Celice smo transformirali s štirimi plazmidi, ki so vsebovali sekvence za LLO wt oz. LLO H311A. cDNA za LLO je bila v ta plazmid vstavljena tako, da je divji tip (*ang.* wildtype - wt) listeriolizina O sestavljen iz samega proteina LLO z dodatkom His-repka na N-koncu. Mutant listeriolizina O je imel na mestu 311 histidin zamenjan z alaninom ter dodan His-repek na N-koncu. V plazmidu pET8c je bil dodan necepljiv His-repek, v pPROEXHTb pa cepljiv His-repek. Iz NaDS-PAGE elektroforeznega gelčka (slika 14) je razvidno, da po dodatku IPTG pride do močnega izražanja LLO v *E. coli* celicah. Del rekombinantnega proteina, ki ga je predstavljal His-repek, je zelo pomagal pri čiščenju LLO. Pri Ni-NTA kromatografiji smo

na Ni-NTA kolono najprej nanesti vzorec, ki se je s His-repki specifično vezal na nosilec kolone (slika 15). Šele ob zadostnem povečanju imidazola v pufru za elucijo (št. 5) smo dosegli, da se je iz kolone spral LLO wt oz. LLO H311A (slika 17). Zaradi velikega števila ostalih nečistoč na gelčku (slika 18), ne moremo z zagotovostjo trditi, da se v prvi nevezani frakcijah in v drugi nevezani frakciji tarčni protein ne nahaja. Lahko pa trdimo, da ga je največ v vezani frakciji, saj je lisa pri 57 kDa najmočnejša. V primeru, ko je rekombinantni protein vseboval cepljiv His-repek (s TEV proteaznim mestom) smo vzorec po prvi Ni-NTA ločbi dializirali ob prisotnosti TEV proteaze. Na sliki 19 je pri vzorcu pn (po dializi in pred drugim nanosom na nikljevo kolono) opazna dodatna lisa velikosti pod 10 kDa, ki se v vzorcu pD (pred dializo) ne pojavi. Ta lisa predstavlja odcepljene His-repke. Po uspešni cepitvi His-repkov od tarčnega proteina (LLO wt in LLO H311A) smo nadaljevali s ponovitvijo Ni-NTA kromatografije. Tokrat se iskani protein, zaradi cepitve His-repka, ni vezal na nosilec nikljeve kolone. V nevezani frakciji (slika 20), ki smo jo zbirali, se je nahajal naš protein. V eluciji (slika 21) so se nahajale molekule, ki so se vezale na kolono. To so bili His-repki, TEV proteaza in ostali fragmenti nepravilno zvitega proteina, ki je še vseboval His-repke. Na sliki 22 je jasno vidno, da se v nevezani frakciji nahaja tarčni protein, v eluciji pa nečistoče. Nekoliko durgačen protokol smo uporabili za izolacijo proteina listeriolizina O in njegovega mutanta H311A od katerih se His-repka ni dalo cepiti. Dializa je seveda potekala brez prisotnosti TEV proteaze, saj na proteinu ni bilo cepitvenega mesta. Dializo smo uporabili za odstranitev imidazola in znižanje koncentracije soli natrijevega klorida. S tem smo vzorec pripravili za naslednjo ločitveno metodo, kationsko-izmenjevalno kromatografijo. Ob uporabi metode linearne gradientnega spiranja s pufri A in B smo dobili 3 frakcije, ki smo jih skrbno shranili (slika 23). Slika 24 prikazuje NaDS-PAGE elektroforezni gelček, s katerim smo preverili nečistoče v posameznih frakcijah. Zbrane delne frakcije iz tretjega zaznanega vrha smo glede na čistost združili. Sledilo je koncentriranje proteinov izoliranih tako po prvem kot po drugem protokolu. Iz slik 25, 26, 27 in 28 lahko opazimo visoko raven čistosti proteina. V procesu čiščenja proteina se je konstantno pojavljala in je prevladovala ena močnejša lisa na NaDS-PAGE elektroforeznem gelčku, ki je predstavljala tarčni protein v monomerni obliki. Ostale komaj opazne lise lahko pripišemo nečistočam, ki so vseeno prisotne v raztopini proteina. Ker tekom izolacije nismo opazili drugačnih oblik proteina (dimere, tetramere,...), smo izvedli test proteolitske stabilnosti. Na sliki 31, kjer je predstavljen gelček NaDS-PAGE, lahko opazimo nekaj lis. Razločno je vidna močna lisa, ki predstavlja monomer proteina LLO wt s His-repkom pri vrednosti pH 7,5. Nad pričakovano liso se pojavi tudi dodatna lisa, ki postaja vse močnejša tekom 35-dnevnega testa. Na podlagi standarda molekulskih mas, lahko sklepamo, da se skozi čas monomeri združijo v dimere, saj je dodatna lisa pripotovala do mesta med 100 in 150 kDa, kar predstavlja podvojeno molekulsko maso proteina (približno 115 kDa). Drugače je pa LLO wt s His-repkom pri pH 7,5 pri teh pogojih zelo proteolitsko stabilen.

Listeriolizinu O smo s pomočjo strežnika Scratch Protein Predictor poizkušali izračunati vsebnost posameznih sekundarnih elementov. Iz preglednice 8 je vidna razporeditev sekundarnih struktur: 21,9 % α -vijačnic, 26,7 % β -struktur in 51,4 % naključnih zvitij, kar

se ujema z teoretičnimi vrednostmi iz raziskave iz 2012, kjer so številke sledeče: $24,4 \pm 2,4$ % α -vijačnic, $25,1 \pm 1,8$ % β -struktur in $50,5 \pm 0,4$ % naključnih zvitij (Bavdek in sod., 2012). Z metodo cirkularnega dikroizma smo pri stalni temperaturi 20 °C in pri daljnem UV-območju najprej analizirali vse kombinacije vzorcev pri pH 5,7 in pH 7,5. Bistvenih razlik v spektrih analiziranih vzorcev ni. Na sliki 32, kjer smo primerjali LLO wt z in brez His-repka ter pri dveh vrednostih pH, ni opaznih relevantnih razlik med vzorci. Na drugem grafu (slika 33), kjer smo testirali LLO H311A z in brez His-repka pri dveh pH vrednostih, tudi ni večjih razlik med proteini. Razliko, ki jo lahko opazimo v amplitudah krivulj, lahko pripišemo različni koncentraciji vzorcev. Med primerjavo LLO wt in LLO H311A (z in brez His-repka), ki sta predstavljena na slikah 34 in 35, tudi ni omembe vrednih odstopanj. CD spekter potrjuje dejstvo, da sta LLO in njegov mutant H311A sestavljena iz α -vijačnic, β -struktur in iz naključnih zvitij. Pri bližnjem UV-območju smo analizirali protein LLO wt s His-repkom pri dveh vrednostih pH in stalni temperaturi 20 °C. Slika 36 prikazuje primerjavo med proteinom pri pH 5,7 in pH 7,5. Iz grafa je razvidno, da zaradi prešibkega signala ni možno sklepati o terciarni strukturi proteina.

Vpliv temperature in vrednosti pH na stabilnost dveh proteinov, LLO wt brez His-repka in LLO H311A brez His-repka, smo analizirali z metodo diferenčne dinamične fluorimetrije z RT-PCR. Na grafu (slika 37) vidimo ima LLO wt brez His-repka pri pH 5,5 najvišjo vrednost T_m (46 °C), LLO H311A brez His-repka pri pH 7,5 pa najnižjo (36 °C). V točki ravnovesja med denaturiranim in nativnim proteinom je izmerjena temperatura denaturacije (T_m) proteina. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da je protein pri pH 5,5 dlje stabilen oziroma dlje v nativni obliki, kot pri pH 7,5 ter, da je LLO wt dlje stabilen od njegovega mutanta. Iz slike 37 je tudi razvidno, da T_m pada s povečanjem koncentracije proteina. Na grafu 38 (slika 38) so prikazani vsi proteini in denaturacija skozi konstantega povišanja temperature. Zopet lahko opazimo, da je najbolj stabilen protein LLO wt brez His-repka pri pH 5,5, najmanj pa LLO H311A brez His-repka pri pH 7,5. Sklepamo lahko, da so LLO proteini bolj stabilni pri pH 5,5 kot pri pH 7,5 ter da je LLO wt bolj stabilen od njegovega mutanta.

S hemolizno aktivnostjo smo preverjali sposobnost hemolize listeriolizina O in njegovega mutanta H311A pri različnih pogojih. Iz grafov 39, 40 in 41, kjer so proteini analizirani pri različnih koncentracijah, lahko opazimo, da so proteini praviloma bolj aktivni pri pH 5,7, kot pri pH 7,4. Nedvomno se opazi tudi razlika v aktivnosti med LLO wt in njegovim mutantom. LLO H311A je manj aktiven. Poleg aktivnosti same, smo še izmerili njeno hitrost. Iz rezultatov (slika 42) je razvidno, da je najvišjo maksimalno hitrost (max V) poškodbe eritrocitov, pričakovano imel protein LLO wt brez His-repka pri pH 5,7. Razvidno je tudi, da je max V višja pri proteinih LLO wt, kot pri LLO H311A. Enako velja tudi za proteine brez His-repkov, ki imajo višjo max V, kot pri proteinih s His-repki. Iz slike 43 je opazno, da protein LLO wt brez His-repka pri pH 5,7 hitreje poškoduje eritrocije, kot v primeru proteina LLO wt brez His-repka pri pH 7,4. Najbolj očitne razlike so opazne med koncentracijo 17,625 ng/mL in 0,55078 ng/mL. Iz rezultatov lahko

sklepamo, da je za aktivnost proteina LLO najbolj pomemben pH (bolje 5,7, kot 7,4), da je LLO wt na splošno aktivnejši od njegovega mutanta ter da necepljen His-repek zniža aktivnost proteina LLO. Pri višjih koncentracijah LLO-ja ni velikih razlik, medtem ko je pri nižjih koncentracijah LLO wt pri pH 5,7 najbolj aktiven.

Za določanje tridimenzionalnih struktur proteinov je najbolj razširjena metoda kristaliziranje (Durbin in sod., 1996). Iz nastalih kristalov se posredno, preko metode sipanja X-žarkov, računalniško določi tridimenzionalna struktura tarčnega proteina. Z očiščeno obliko proteina LLO wt s His-repkom pri pH 7,5 smo pripravili kristalizacijske plošče. Pri kristalizaciji s standardnim setom kristalizacijskih raztopin Hampton Research (Index Screen, Memb Fac, Natrix Screen, Peg Ion, Salt RX) smo želeli dobiti kristale. Na žalost nam kljub dodelanemu protokolu in pazljivosti pri samem delu, v tem času ni uspelo kristalizirati proteina.

5.2 SKLEPI

- V diplomski nalogi smo optimizirali dva protokola za produkcijo in izolacijo proteinov LLO wt in LLO H311A, oba z in brez His-repka. Z različnimi protokoli smo dobili zadostno količino čistega proteina, ki smo ga uporabili za izbrane analize.
- Analizirali smo protein listeriolizin O, ga primerjali z nekaterimi sorodnimi proteini, sestavili filogenetsko drevo in ocenili delež sekundarnih strukturnih elementov.
- Pri temperaturi 20 °C smo izvedli test proteolitične stabilnosti proteina, ki je trajal 35 dni. Pokazali smo, da pride pri analiziranem proteinu LLO wt s His-repkom pri pH 7,5 do sprememb v strukturi proteina, saj se pojavijo dimeri, medtem ko do proteolitske razgradnje ni prišlo.
- S CD metodo smo vsem izoliranim proteinom pri dveh pH vrednostih, 5,7 in 7,5, v daljnem UV-območju izmerili optične aktivnosti. Bistvenih razlik v sprektih nismo opazili. Proteini so sestavljeni iz α -vijačnic, β -struktur in iz naključnih zvitij.
- Pri metodi cirkularnega dikroizma smo izvedli tudi analizo v bližnjem UV-območju. Analizirali smo protein LLO wt s His-repkom pri dveh pH vrednostih, 5,7 in 7,5. Zaradi prešibkega izhodnega signala, nismo dobili uporabnih rezultatov.
- S pomočjo metode diferenčne dinamične fluorimetrije z RT-PCR smo pokazali, da se protein LLO denaturira pri višji temperaturi pri pH 5,5, kot pri pH 7,5. LLO H311A brez His-repka se denaturira pri nižji temperaturi, kot protein LLO wt brez His-repka. Dokazali smo tudi, da LLO wt brez His-repka denaturira pri višji temperaturi, kot njegov mutant, LLO H311A brez His repka. Pri pH 7,5 ni velikih razlik med LLO wt brez His-repka in s His-repkom. Enako velja za LLO H311A.

Pri pH 7,5 ni velikih razlik med proteinom s His-repkom ali brez His-repka.

- Merjenje hemolitske aktivnosti je pokazalo, da je aktivnost proteina odvisna od pH, His-repka in mutacije. Proteini so bolj aktivni pri pH 5,7, kot pri 7,4, bolj so aktivni če so brez his-repka in LLO wt je bolj aktiven od LLO H311A.

6 POVZETEK

Ob dejstvu, da *Listeria monocytogenes* povzroča 20 do 30 odstotno umrljivost, je razumevanje delovanja te patogene bakterije zelo pomembno za nadaljnjo zdravljenje in preprečevanje okužb. Bakterija, ki povzroča listeriozo, predstavlja največjo nevarnost pri okužbi nosečnic, novorojenčkov, starejših pacientov in pacientov z oslabljenim imunskim sistemom. Nahaja se tako v zemlji kot v vodi in se v človeški organizem največkrat prenese s hrano. Kar bakteriji omogoča preživetje v celici je nedvomno protein listeriolizin O, ki sodi v družino od holesterol odvisnih citolizinov, ki so sposobni tvoriti pore v membrani. Vendar se za razliko od ostalih PFT proteinov, CDC-ji vežejo na membranski holesterol in tvorijo pore velikosti 35 nm. Posebnost proteina LLO je v tem, da je njegova aktivnost odvisna od pH. Najbolj aktiven je pri pH 5,5, kar ustreza pH vrednosti fagosoma v makrofagu. Po uspešnem prehodu iz fagolizosoma v citosol, prične bakterija z razmnoževanjem in vdiranjem v sosednjo celico.

V diplomski nalogi smo uspešno pripravili več proteinov: LLO wt s His-repkom, LLO wt brez His-repka, LLO H311A s His-repkom in LLO H311A brez His-repka. Teoretično sekundarno strukturo proteina LLO smo določili z bioinformacijskimi orodji in sestavili filogenetsko drevo. Pokazali smo, da LLO s časom tvori dimere. Vse proteine smo pripravili v celicah *E. coli* pri dveh pH vrednostih 5,7 in 7,5. Za doseganje ustrezne čistosti proteinov smo uporabili nikljevo afinitetno kromatografijo, dializo ter kationsko-izmenjevalno kromatografijo. Analiza proteinov je potekala z gelsko elektroforezo, cirkularnim dikroizmom v daljnem in bližnjem UV-območjem, merjenjem hemolitične aktivnosti, merjenjem emisijske fluorescence, kot funkcije temperature z RT-PCR in kristalizacijo. Analize so pokazale, da je LLO bolj aktiven pri nižjem pH, brez His-repka in v divji obliki. Ugotovili smo, da LLO denaturira pri višji temperaturi pri pH 5,5, brez His-repka in v divji obliki. Naši rezultati kažejo na to, da ima histidin na mestu 311, pomembno vlogo pri termični stabilnosti in aktivnosti LLO.

7 VIRI

- Archambaud C., Nahori M. A., Pizarro-Cerda J., Cossart P., Dussurget O. 2006. Control of *Listeria* superoxide dismutase by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 42: 31812–31822
- Bavdek A. 2010. Molekularni mehanizem vezave listeriolizina O na lipidne membrane. Doktorska disertacija, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 129 str.
- Bavdek A., Kostanjšek R., Antonini V., Lakey J. H., Mauro Dalla Serra, Gilbert R. J. C., Anderluh G. 2012. pH dependence of listeriolysin O aggregation and pore-forming ability. *The Federation of European Biochemical Societies Journal*. 279, 1: 126–141
- Beauregard K. E., Lee K. D., Collier J. R., Swanson J. A. 1997. pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Experimental Medicine*, 186, 7: 1159–1163
- Bourdeau W. R., Malito E., Chenal A., Bishop B. L., Musch M. W., Villereal M. L., Chang E. B., Mosser E. M., Rest R. F., Tang W. J. 2009. Cellular functions and X-ray structure of anthrolysin O, a cholesterol-dependent cytolysin secreted by *Bacillus anthracis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 14645–14656
- Caffrey M., Cherezov V. 2009. Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases. *Nature Protocols*, 4, 5: 706–731
- Czajkowsky D.M., Hotze E.M., Shao Z., Tweten R.K. 2004. Vertical collapse of a cytolysin prepore moves its transmembrane beta-hairpins to the membrane. *European Molecular Biology Organization Journal*, 23: 3206–3215
- Dramsi S., Cossart P. 2003. Listeriolysin O-mediated calcium influx potentiates entry of *Listeria monocytogenes* into the human Hep-2 epithelial cell line. *Infection and Immunity*, 71, 6: 3614–3618
- Dunstone M. A., Tweten R. K. 2012. Packing a punch: the mechanism of pore formation by cholesterol dependent cytolysins and membrane attack complex/perforin-like proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 22, 3: 342–349
- Durbin S. D., Feher G. 1996. Protein crystallization. *Annual Review of Physical Chemistry*, 47, 1: 171–204
- Edelmann M. J. 2011. Strong cation exchange chromatography in analysis of posttranslational modifications: innovations and perspectives. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011: 1–7
doi:10.1155/2011/936508
- Farber J. M., Peterkin P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55, 3: 476–511
- Freitag N. E., Port G. C., Miner M. D. 2009. *Listeria monocytogenes* — from saprophyte to intracellular pathogen. *Nature Reviews. Microbiology*, 7, 9: 623

- Gallik S. 2011. Cell Biology OLM
<http://www.cellbiologyolm.stevegallik.org> (julij 2013)
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M. R., Appel R. D., Bairoch A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. The Proteomics Protocols Handbook. Walker J.M (ed.). New York, Humana Press: 571–607
- Geoffroy C., Gaillard J. L., Alouf J. E., Berche P. 1987. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. Infection and Immunity, 55, 7: 1641–1646
- Graves L. M., Helsel L. O., Steigerwalt A. G., Morey R. E., Daneshvar M. I., Roof S. E., Orsi R. H.. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 60, 6: 1280–1288
- Hamon M. A., Ribet D., Stavru F., Cossart P. 2012. Listeriolysin O: the Swiss army knife of *Listeria*. Trends in Microbiology, 20: 1-9
- Hay R. T. 2005. SUMO. Molecular Cell, 18, 1: 1–12
- Heuck A. P., Savva C. G., Holzenburg A., Johnson A. E. 2007. Conformational changes that effect oligomerization and initiate pore formation are triggered throughout perfringolysin O upon binding to cholesterol. Journal of Biological Chemistry, 282, 31: 22629–22637
- Heuck A. P., Tweten R. K., Johnson A. E. 2003. Assembly and topography of the prepore complex in cholesterol-dependent cytolysins. Journal of Biological Chemistry, 278, 33: 31218–31225
- Heuck, A. P., Hotze E. M., Tweten R. K., Johnson A. E. 2000. Mechanism of membrane insertion of a multimeric β -barrel protein: perfringolysin O creates a pore using ordered and coupled conformational changes. Molecular Cell, 6, 5: 1233–1242
- Heuck A. P., Moe P. C., Johnson B. B. 2010. The cholesterol-dependent cytolysin family of gram-positive bacterial toxins. Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins: 551–577
- Hochuli E., Bannwarth W., Döbeli H., Gentz R., Stüber D. 1988. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. Nature Biotechnology, 6, 11: 1321–1325
- Kapust R. B., Tözsér J., Copeland T. D., Waugh D. S. 2002. The P1' specificity of tobacco etch virus protease. Biochemical and Biophysical Research Communications, 294, 5: 949–955
- Kayal S., Lilienbaum A., Poyart C., Memet S., Israel A., Berche P. 1999. Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules

- and chemokines. *Molecular Microbiology*, 31, 6: 1709–1722
- Kelly S. M., Jess T. J., Price N. C.. 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics*, 1751, 2: 119–139
- Kresge N., Simoni R. D., Hill R. L. 2006. SDS-PAGE to determine the molecular weight of proteins: the work of Klaus Weber and Mary Osborn. *Journal of Biological Chemistry*, 281: e19
<http://www.jbc.org/content/281/24/e19> (julij 2013)
- Leclercq A., Clermont D., Bizet C., Grimont P. A. D., Le Flèche-Matéos A., Roche S. M., Buchrieser C. 2010. *Listeria Rocourtiae* Sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 9: 2210–2214
- Lecuit M. 2007. Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection*, 9, 10: 1216–1225
- Mackaness G. B. 1962. Cellular resistance to infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 116, 3: 381–406
- Mandal M., Kawamura K. S., Wherry J. E., Ahmed R., Lee K. D. 2004. Cytosolic delivery of viral nucleoprotein by listeriolysin O-liposome induces enhanced specific cytotoxic T lymphocyte response and protective immunity. *Molecular Pharmaceutics*, 1, 1: 2–8
- McPherson A. 2004. Introduction to protein crystallization. *Methods*, 34, 3: 254–265
- Mengaud J., Vicente M. F., Chenevert J., Pereira J. M., Geoffroy C., Gicquel-Sanzey B., Baquero F., Perez-Diaz J. C., Cossart P. 1988. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 56, 4: 766–772
- Niesen F. H., Berglund H., Vedadi M. 2007. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols*, 2, 9: 2212–2221
- Polekhina G., Giddings K. S., Tweten R. K., Parker M. W. 2005. Insights into the action of the superfamily of cholesterol-dependent cytolysins from studies of intermedilysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 3: 600–605
- Portnoy D. A., Auerbuch V., Glomski I. J. 2002. The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection. *The Journal of Cell Biology*, 158, 3: 409–414
- Radtke A. L., Anderson K. L., Davis M. J., DiMagno M. J., Swanson J. A., O’Riordan M. X. 2011. *Listeria monocytogenes* exploits cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) to escape the phagosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 4: 1633–1638
- Ramachandran R., Heuck A. P., Tweten R. K., Johnson A. E. 2002. Structural insights into

- the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. *Nature Structural & Molecular Biology*, 9, 11: 823–827
- Ramaswamy V., Cresence V. M., Rejitha J. S., Lekshmi M. U., Dharsana K. S., Prasad S. P., Vijila H. M. 2007. *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 40, 1: 4–13
- Rampersaud R., Planet P. J., Randis T. M., Kulkarni R., Aguilar J. L., Lehrer R. I., Ratner A. J. 2011. Inerolysin, a cholesterol-dependent cytolysin produced by *Lactobacillus iners*. *Journal of Bacteriology*, 193, 5: 1034–1041
- Rosado C. J., Kondos S., Bull T. E., Kuiper M. J., Law R. H. P., Buckle A. M., Voskoboinik I. 2008. The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cellular Microbiology*, 10, 9: 1765–1774
- Rossjohn J., Feil S. C., McKinstry W. J., Tweten R. K., Parker M. W. 1997. Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell*, 89, 5: 685–692
- Schnupf P., Portnoy D. A. 2007. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. *Microbes and Infection*, 9, 10: 1176–1187
- Seveau S., Pizarro-Cerda J., Cossart P. 2007. Molecular mechanisms exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion. *Microbes and Infection*, 9, 10: 1167–1175
- Sibeliuss U., Rose F., Chakraborty T., Darji A., Wehland J., Weiss S., Seeger W., Grimminger F. 1996. Listeriolysin is a potent inducer of the phosphatidylinositol response and lipid mediator generation in human endothelial cells. *Infection and Immunity*, 64, 2: 674–676
- Simonsen S. M., Sando L., Rosengren K. J., Wang C. K., Colgrave M. L., Daly N. L., Craik D. J. 2008. Alanine scanning mutagenesis of the prototypic cyclotide reveals a cluster of residues essential for bioactivity. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 15: 9805–9813
- Singh R., Jamieson A., Cresswell P. 2008. GILT is a critical host factor for *Listeria monocytogenes* infection. *Nature*, 455, 7217: 1244–1247
- Stavru F., Bouillaud F., Sartori A., Ricquier D., Cossart P. 2011. *Listeria monocytogenes* transiently alters mitochondrial dynamics during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 9: 3612–3617
- Tang P., Rosenshine I., Cossart P., Finlay B. B. 1996. Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eucaryotic cells. *Infection and Immunity*, 64, 6: 2359–2361
- Todar K. 2012. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Madison, Wisconsin.
<http://textbookofbacteriology.net/index.html> (julij 2012)
- Tweten R. K. 2005. Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infection and Immunity*, 73, 10: 6199–6209

- Vadia S., Arnett E., Haghighat A. C., Wilson-Kubalek E. M., Tweten R. K., Seveau S. 2011. The pore-forming toxin listeriolysin O mediates a novel entry pathway of *L. monocytogenes* into human hepatocytes. PLoS Pathogens, 7, 11: e1002356
doi: 10.1371/journal.ppat.1002356
- Vedadi M., Niesen F. H., Allali-Hassani A., Fedorov O. Y., Finerty Jr. P. J., Wasney G. A., Yeung R., Arrowsmith C., Ball L. J., Berglund H. 2006. Chemical screening methods to identify ligands that promote protein stability, protein crystallization, and structure determination. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103, 43: 15835–15840
- Warnock D.E., Roberts C., Lutz M.S., Blackburn W.A., Young W.W., Baenziger J.U. 1993. Determination of plasma membrane lipid mass and composition in cultured Chinese hamster ovary cells using high gradient magnetic affinity chromatography. The Journal of Biological Chemistry, 268: 10145-10153
- Wassenaar T. M. 2012. Bacteria: the benign, the bad, and the beautiful. New York, John Wiley & Sons: 215 str.
- Weber K., Osborn M. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Journal of Biological Chemistry, 244, 16: 4406-4412
- Xu L., Huang B., Du H., Zhang X.C., Xu J., Li X., Rao Z. 2010. Crystal structure of cytotoxin protein suilysin from *Streptococcus suis*. Protein Cell, 1, 1:96-105

ZAHVALA

Najprej se zahvaljujem mentorju prof. dr. Gregorju Anderluh in somentorici dr. Marjetki Podobnik, da sem lahko opravljal diplomsko delo v laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo na Kemijskem inštitutu. Hvaležen sem vama za spodbujanje pri delu, posredovanje znanja, razpoložljivost in potrpežljivost.

Zahvaljujem se prof. dr. Nataši Poklar Ulrih za hitri, a natančni pregled diplomskega dela.

Naslednja zahvala gre osebju na Kemijskem inštitutu, ki so me toplo sprejeli in me vključili v njihov tim. Hvala Maji Capuder, Omarju Nanehu, dr. Nadi Kraševac, dr. Gorazdu Hribarju, Metki Novak, Jelki Lenarčič, Tei Tomšič, dr. Katji Rebolj, dr. Urški Dermol in še marsikomu, ki mi je v trenutku negotovosti priskočil na pomoč.

Zahvaljujem se sodelavki Marti Marchioretto, s katero se nama je 3 mesece svet vrtel okoli proteina LLO.

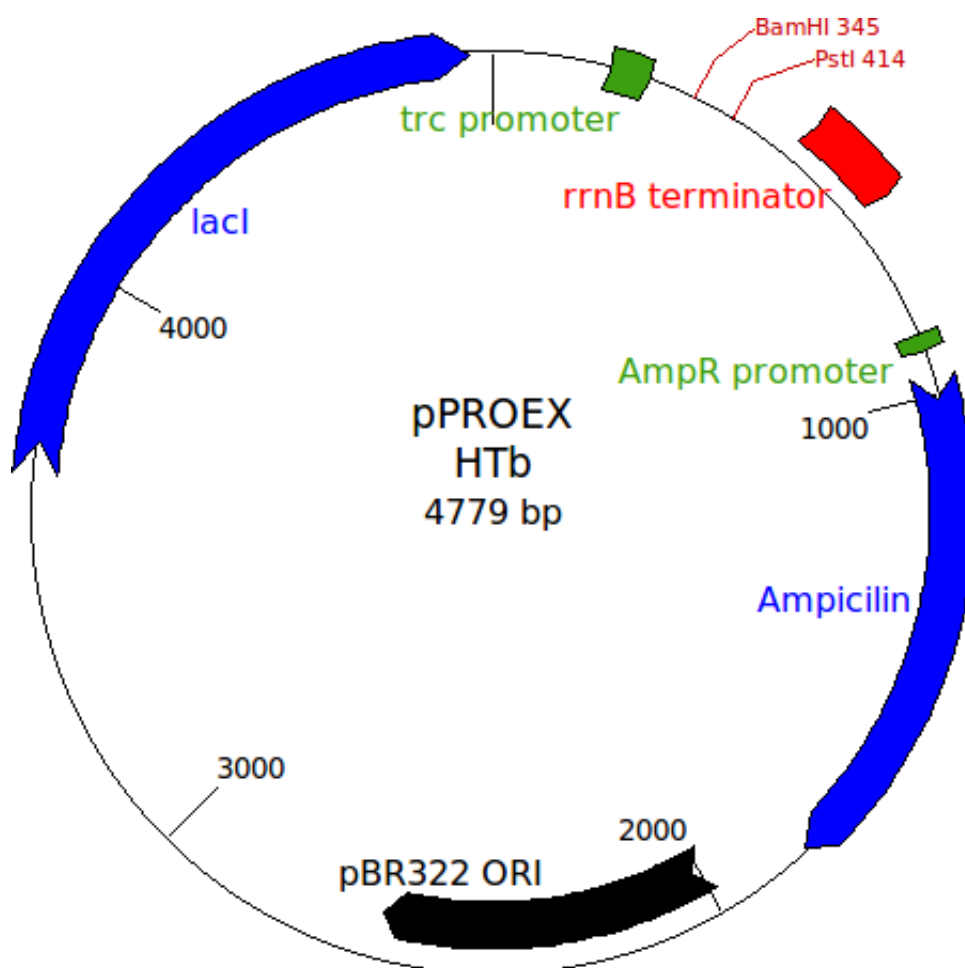
Hvala bližnjim prijateljem Luki, Davorju, Omarju in Blažu za pomoč pri razglabljanju problemov, ki se tičejo znanstvenega in filozofskega sveta.

Zahvaljujem se družini, ki me je preganjala. Hvala mami, očetu, bratu in Deji.

In na koncu, hvala puncu Ini Parkelj, ki me je bodrila in mi stala ob strani v vseh trenutkih te diplome.

PRILOGE

Priloga A: Mapa plazmida pPROEX Htb z označenimi pomembnejšimi mesti (povzeto po strani www.lablife.org). Mapa je obdelana s programom GENTle (Manske M. GENTle V 1.9.4 2003, University of Cologne).



Priloga B: Aminokislinsko zaporedje proteina listeriolizin O.

Aminokislinsko zaporedje:

MKKIMLVFITLILVSLPIAQQTEAKDASAFNKENSISSMAPPASPPASPKTPIEKKHA
DEIDKYIQGLDYNKNNVLVYHGDAVTNVPPRKGKDGNEYIVVEKKKKKSINQNN
ADIQVVNAISSLTYPGALVKANSELVENQPDVLPVKRDSLTLSDLPGMTNQDNKI
VVKNATKSNVNNAVNTLVERWNEKYAQAYPNVSAKIDYDDEMAYSESQLIKFG
TAFKAVNNSLNVNFGAISEGKMQEEVISFKQIYYNVNVNEPTRPSRFFGKAVTKE
QLQALGVNAENPPAYISSVAYGRQVYLKLSTNSHSTKVKAAFDAAVSGKSVSGDV
ELTNIKNSSFKAVIYGGSAKDEVQIIDGNLGDRLDILKKGATFNRETPGVPIAYTTN
FLKDNE LAVIKNNSEYIETTSKAYTDGKINIDHSGGYVAQFNISWDEVNYDPEGNE
IVQHKNWSENNKSKLAHFTSSIYLPGNARNINVYAKECTGLAWEWWRVIDDRN
LPLVKNRNISIWGTTLYPKYSNKVDNPIE
