

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Petra DIMIC

**PRIPRAVA IN ANALIZA MONOKLONSKIH
PROTITELES PROTI EGEROLIZINU RahU IZ
BAKTERIJE *Pseudomonas aeruginosa* PA01**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologije

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Petra DIMIC

**PRIPRAVA IN ANALIZA MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI
EGEROLIZINU RahU IZ BAKTERIJE *Pseudomonas aeruginosa* PA01**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologije

**PREPARATION AND ANALYSIS OF MONOCLONAL
ANTIBODIES AGAINST AEGEROLYSIN RahU FROM THE
BACTERIUM *Pseudomonas aeruginosa* PA01**

M. SC. THESIS

Master Study Programmes - Biotechnology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija – 2. stopnja Biotehnologije. Delo je bilo opravljeno na Biotehniški fakulteti na Oddelku za zootehniko (Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo) ter na Oddelku za biologijo (Katedra za biokemijo).

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje je bila za mentorico predlagana prof. dr. Mojca Narat, za somentorja magistrskega dela prof. dr. Peter Maček, za recenzentko pa prof. dr. Kristina Sepčić.

Komisija za oceno in zagovor:

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

Članica: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter MAČEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIĆ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisani/podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Petra Dimic

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2
DK 577.27(043.2)
KG biotehnologija/molekularna imunologija/monoklonska protitelesa/egerolizin
RahU/*Pseudomonas aeruginosa*/ELISA/DIBA/prenos western/poliakrilamidna
gelska elektroforeza
AV DIMIC, Petra
SA NARAT, Mojca (mentorica)/MAČEK, Peter (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI 2015
IN PRIPRAVA IN ANALIZA MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI
EGEROLIZINU RahU IZ BAKTERIJE *Pseudomonas aeruginosa* PA01
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Biotehnologije)
OP IX, 36 str., 5 pregl., 13 sl., 22 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI *Pseudomonas aeruginosa* je aerobna, nesporogena, Gram negativna paličasta bakterija, ki je prisotna povsod v naravi in je eden izmed glavnih oportunističnih človeških patogenov v zadnjem stoletju. Omenjena bakterija proizvaja protein egerolizinske družine, ki je produkt gena PA0122 in je poimenovan RahU. Rao in sodelavci so dokazali, da RahU v *P. aeruginosa* zaznava in razlikuje med različnimi oblikami oksidiranih fosfolipidov. Za podrobne raziskave sinteze in funkcije tega proteina bi lahko uporabili protitelesa. Zato je bil naš cilj proizvesti in okarakterizirati monoklonska protitelesa proti RahU. Z rekombinantnim RahU smo imunizirali miš Balb/c in s klasičnim postopkom hibridomske tehnologije pridobili hibridome. S presejalnima testoma ELISA in DIBA smo odbrali hibridome, ki so proizvajali specifična protitelesa proti antigenu RahU in jih klonirali. Pridobili smo dva klena (5G2/B3 in 5G2/E3), ki sta proizvajala monoklonska protitelesa. Protitelesa smo očistili s precipitacijo z amonijevim sulfatom. Z metodama SDS-PAGE in prenos western smo dokazali, da monoklonska protitelesa specifično prepoznavajo tako rekombinantni RahU, kot tudi nativni RahU, ki se nahaja v celičnem lizatu bakterije *P. aeruginosa* PA01.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

ND Du2
DC 577.27(043.2)
CX biotechnology/molecular immunology/monoclonal antibodies/aegerolysin
RahU/*Pseudomonas aeruginosa*/ELISA/DIBA/Western blot/polyacrylamide gel
electrophoresis
AU DIMIC, Petra
AA NARAT, Mojca (supervisor)/ MAČEK, Peter (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study in Biotechnology
PY 2015
TI PREPARATION AND ANALYSIS OF MONOCLONAL
ANTIBODIES AGAINST AEGEROLYSIN RahU FROM THE
BACTERIUM *Pseudomonas aeruginosa* PA01
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes - Biotechnology)
NO IX, 36 p., 5 tab., 13 fig., 22 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Pseudomonas aeruginosa* is an anaerobic, non-sporogenic, Gram negative rod shaped bacteria which is present everywhere in nature and is one of the main opportunistic human pathogens in the last century. It produces an aegerolysin-like protein, which is encoded by the gene *PA0122* and is named RahU. Rao and co-workers have demonstrated that the protein RahU in *P. aeruginosa* acts as a device to detect and distinguish between different forms of oxidised phospholipids. Antibodies could be used for detailed research into the synthesis and function of this protein. Therefore it was our goal to produce a monoclonal antibody against RahU. We inoculated Balb/c mice with the recombinant protein and produced hybridomas with the use of classic hybridoma technology. With the use of two screening methods ELISA and DIBA, we picked out the hybridomas that were producing antibodies specific for the antigen and cloned them. We obtained two clones (5G2/B3 and 5G2/E3), both producing monoclonal antibodies. We used the method of precipitation with ammonium sulfate to purify the antibodies. With the use of SDS-PAGE and Western blot we demonstrated that the mAbs specifically recognize recombinant RahU, as well as native RahU in the cellular lysate of *P. aeruginosa* PA01.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	2
2.2 EGEROLIZINSKA DRUŽINA PROTEINOV	3
2.2.1 Vloga egerolizinov.....	5
2.2.2 Perspektive	5
2.3 PRIDOBIVANJE PROTITELES	6
2.3.1 Prirojena in pridobljena imunost.....	6
2.3.2 Nastanek protiteles	7
2.3.3 Zgradba protiteles	7
2.3.4 Monoklonska protitelesa	9
2.3.5 Uporaba monoklonskih protiteles	9
2.3.6 Metodologija priprave mAb	10
3 MATERIALI IN METODE.....	14
3.1 PRIPRAVA REKOMBINANTNEGA EGEROLIZINA RAHU	14
3.2 IMUNIZACIJA	14
3.4 PRIPRAVA MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI EGEROLIZINU RAHU.	15
3.4.1 Izolacija vranice, priprava vraničnih in mielomskih celic za fuzijo	15
3.4.2 Fuzija	15
3.4.3 Kloniranje hibridomov in gojenje klonov	15
3.5 DETEKCIJA IN IZOLACIJA SPECIFIČNIH PROTITELES.....	16
3.5.1 Encimski imunski test – ELISA (angl. »enzyme-linked immunosorbent assay«).....	16

3.5.2	Precipitacija protiteles z amonijevim sulfatom in ultrafiltracija	17
3.5.3	Točkovna imunoencimska reakcija na membrani – DIBA (angl. »dot immunobinding assay«).....	18
3.5.5	Priprava celičnega lizata bakterije <i>P. aeruginosa</i> PA01	19
3.5.6	SDS-poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE)	20
3.5.8	Prenos western	21
3.5.9	Imunoencimska reakcija	21
4	REZULTATI.....	23
4.1	PRESEJALNI TESTI PO FUZIJI.....	23
4.1.1	Testiranje hibridomov s testom ELISA	23
4.1.3	Testiranje prisotnosti in aktivnosti protiteles s testom DIBA	24
4.2	TESTIRANJE PROTITELES PO OBARJANJU.....	25
4.3	SDS-POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA (SDS-PAGE) IN PRENOS WESTERN	26
4.4	IMUNOENCIMSKA REAKCIJA	28
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	31
5.1	RAZPRAVA	31
5.2	SKLEPI	33
6	POVZETEK	34
7	VIRI	35

ZAHVALA

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Genom <i>P. aeruginosa</i>	3
Slika 2: Položaj gena PA0122 oz. RahU (<i>Pseudomonas</i> genome database).....	4
Slika 3: Zgradba imunoglobulina (Vozelj, 2000).....	8
Slika 4: Shema proizvodnje monoklonskih protiteles (prir. po Wilson in Walker, 2010).....	11
Slika 5: Standardni postopek za pridobitev monoklonskih protiteles (prir. po Elgert, 2009). 13	
Slika 6: Shema poteka koncentriranja protiteles iz izhodnega vzorca do 40× skoncentriranega vzorca protiteles	17
Slika 7: Testiranje supernatantov hibridomov s testom DIBA	24
Slika 8: Testiranje supernatantov klena 5G2 s testom DIBA	25
Slika 9: Prikaz rezultatov testa DIBA v postopku čiščenja monoklonskih protiteles iz gojišča in končna aktivnost čistih monoklonskih protiteles	26
Slika 10: Membrana barvana s Coomassie modro po prenosu western. Nanešena sta dva vzorca rekombinantnega proteina egerolizin RahU. Fr. 22 – frakcija 22 (c = 1,52 µg/mL), Fr. 24 – frakcija 24 (c = 1,54 µg/mL), M – molekularni označevalec, Mw – molekulska masa	27
Slika 11: Membrana barvana s Coomassie modro po prenosu western. Nanešen celični lizat PA01, rekombinantni egerolizin RahU (Pa-tro) in gojišče LB. M – molekularni označevalec, Mw – molekulska masa, L – celični lizat PA01 po 8-ih urah gojenja, Pa-tro – rekombinantni RahU (pozitivna kontrola), Goj. – gojišče LB (negativna kontrola)	28
Slika 12: Imunoencimska reakcija z očiščenima monoklonskima protitelesoma 5G2/B3 (levo) ter 5G2/E3 (desno). Fr. 22 – frakcija 22 (c = 1,52 µg/mL), Fr. 24 – frakcija 24 (c = 1,54 µg/mL), M – molekularni označevalec, Mw – molekulska masa.....	29
Slika 13: Imunoencimska reakcija z monoklonskima protitelesoma 5G2/B3 in 5G2/E3 ter supernatanti hibridomov (poliklonska protitelesa). L – celični lizat PA01 po 8-ih urah gojenja, R – rekombinantni RahU, G – gojišče LB, M – molekularni označevalec, Mw – molekulska masa, 5G2/B3 in 5G2/E3 – monoklonski protitelesi, 5G3, 1B10, 2F2, 3A4 – supernatanti nekloniranih hibridomov, SFM – gojišče brez seruma	30

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Potek koncentriranja protiteles v centrifugirkah Macrosep	17
Preglednica 2: Podatki o izmerjeni optični gostoti (OD) po 8-ih urah gojenja in preračunan potrebovani volumen vzorca.....	19
Preglednica 3: Sestava PBS z dodatki.....	19
Preglednica 4: Sestava nanašalnega pufra.....	20
Preglednica 5: Testiranje hibridomov s presejalnim testom ELISA	23

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ab	protitelo
Ag	antigen
APC	antigen predstavljene celice
CDR	hipervariabilne ali komplementarnost-določajoče regije (angl. "complementarity determining region")
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. "deoxyribonucleic acid")
DIBA	točkovni encimskoimunski test (angl. "dot-immunobinding assay")
ELISA	encimskoimunski test (angl. "enzyme-linked immunosorbent assay")
Fab	podenota IgG (ali IgY) sestavljena iz dela težke in celotne lahke verige
Fc	podenota IgG (ali IgY) sestavljena iz konstantnih delov obeh težkih verig
FCA	kompletnejši Freundov adjuvans
FIA	nekompletnejši Freundov adjuvans
HAT	medij, ki vsebuje hipoksantin, aminopterin in timidin
HGPRT	hipoksantin gvanin fosforibozil transferaza
LPS	lipopolisahard
mAb	monoklonsko protitelo
MALT	mukozno limfoidno tkivo (angl. "mucosa-associated lymphoid tissue")
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (angl. "major histocompatibility complex")
mRNA	informacijska RNA (angl. "messenger RNA")
Mw	molekulska masa (angl. "molecular weight")
ORF	odprt bralni okvir (angl. "open reading frame")
PEG	polietilen glikol
SDS-PAGE	elektroforeza v poliakrilamidnem gelu z natrijevim dodecil sulfatom
SEM	vrstični elektronski mikroskop
TCR	T-celični receptor
w.t.	divji tip (angl. "wild type")

1 UVOD

Pseudomonas aeruginosa je Gram negativna oportunistična patogena bakterija, ki je navzoča povsod v naravi. Bakterija se je sposobna fenotipsko prilagoditi glede na okolje v katerem se nahaja. Je eden izmed glavnih človeških patogenov, ki lahko povzroča različne infekcije predvsem pri ljudeh z oslabljenim imunskim sistemom (Samadpour, 2001). Eden izmed proteinov, ki ga proizvaja *P. aeruginosa* je tudi egerolizin RahU (Rao in sod., 2008; Rao in sod., 2011).

Poznamo več različnih vrst egerolizinov, ki jih lahko najdemo v glivah, bakterijah in rastlinah. Funkcionalna vloga mikrobnih egerolizinov je še vedno neznana (Rao in sod., 2011), domnevna pa se, da igrajo pomembno vlogo pri rastnem ciklu organizma, ki jih proizvaja. Izolirani proteini in njihove rekombinantne oblike imajo molekulsko maso od 14 do 17 kDa, kisel pH ter zelo nizko izoelektrično točko (Berne in sod., 2009).

Čeprav fiziološka vloga egerolizinov v organizmih, ki jih proizvajajo, še ni dovolj dobro poznana jih njihove biološke lastnosti delajo zanimive zaradi več različnih lastnosti (toksičnost, uporabni so kot označevalci za detekcijo in označevanje specifičnih lipidov v membrani ter kot biološki označevalci za določanje izpostavljenosti glivičnim okužbam, protitelesa proti egerolizinom so uporabna kot orodja za imunodiagnostiko, močne promotorje, ki uravnavajo izražanje egerolizinskih genov, lahko uporabljammo pri tehnikah hkratnega izražanja več genov, itd.) (Berne in sod., 2009, Novak in sod., 2015).

1.1 NAMEN DELA

Cilj naloge je bil proizvesti in okarakterizirati monoklonska protitelesa proti proteinu RahU (*PA0122*), ki ga sintetizira bakterija *P. aeruginosa* PA01. Pridobljena protitelesa bodo uporabili za ovrednotenje ravni sinteze egerolizina RahU v različnih fazah bakterijske rasti.

Predpostavljalji smo, da je molekula RahU imunogena in da bomo uspeli aktivirati imunski odziv miš na ravni limfocitov B. Predpostavljalji smo, da bomo s klasično metodo pridobili monoklonska protitelesa, ki bodo specifično reagirala z RahU in bomo tako lahko dokazali zvezo med njegovo celično sintezo in številom bakterijskih celic.

2 PREGLED OBJAV

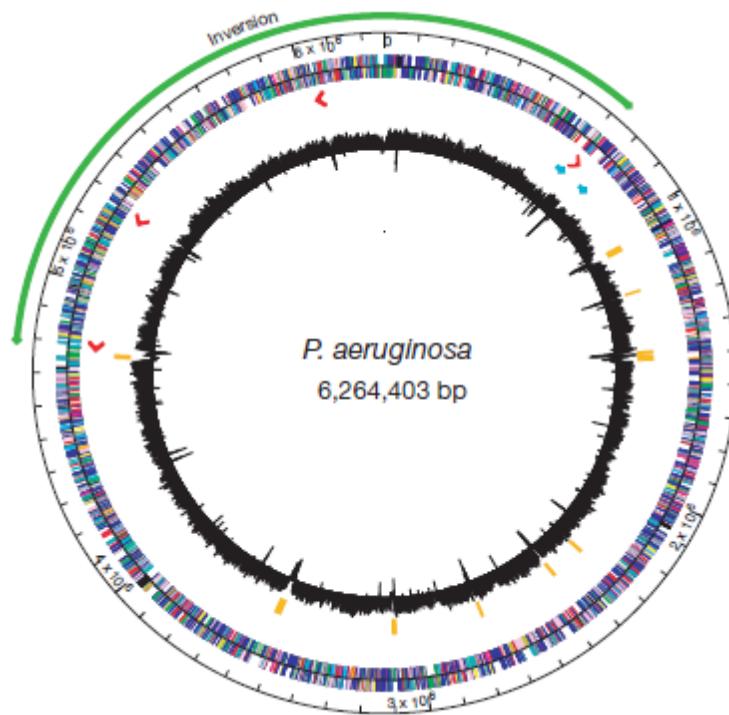
2.1 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonas aeruginosa je aerobna, nesporogena, Gram negativna paličasta bakterija, ki pripada družini *Pseudomonadaceae*. Člani te vrste v povprečju merijo $0,5 \times 2,5 \mu\text{m}$, za premikanje uporablajo polarne flagele in nekateri sevi so prekriti s plastjo sluzi (Samadpour, 2001).

P. aeruginosa je navzoča povsod v naravi. Najdemo jo v vlažnih okoljih, vključno v zemlji, kmetijskih pridelkih, površinskih vodah, pitni vodi, destilirani vodi, bazenih in zdraviliščih. Tolerira visoke koncentracije soli in dobro raste v širokem temperaturnem razponu (20° – 40°C) (Samadpour, 2001). Ena izmed osupljivih lastnosti več vrst pseudomonad je ta, da lahko kot vir ogljika in energije uporablajo veliko različnih organskih spojin. Nekatere vrste izrabljajo preko 100 različnih spojin, le nekaj vrst izrablja manj kot 20 različnih spojin. Na drugi strani pa pseudomonadam primanjkuje hidrolitičnih encimov, ki so potrebni za razgradnjo polimerov v monomerne enote. Pseudomonade tipično vsebujejo več inducibilnih operonov, ker je za katabolizem neobičajnih substratov po navadi potrebna aktivnost več različnih encimov (Madigan in sod., 2003). Ta vrsta se je zmožna tudi fenotipsko prilagoditi glede na to v katerem okolju se nahaja in lahko reverzibilno preklaplja med sluzasto in ne-sluzasto obliko. Proizvajanje večjih količin eksopolisaharida (alginat) pomaga pri adheziji na trdne površine, pri tvorbi biofilmov in pri lovljenju hranilnih snovi v vodnih okoljih (Samadpour, 2001).

Pojav *P. aeruginosa* kot enega izmed glavnih oportunističnih človeških patogenov v zadnjem stoletju bi lahko bila posledica njene odpornosti na antibiotike in dezinfekcijska sredstva, ki uničijo ostale bakterije v okolju (Stover in sod., 2000).

Genom *P. aeruginosa* je s 6,3 milijoni baznih parov (Mbp) izrazito večji od večine 25 do sedaj sekvenciranih bakterijskih genomov. S 5.570 napovedanimi odprtimi bralnimi okvirji (angl. »ORFs«) se genetska kompleksnost *P. aeruginosa* približuje tistim od preprostih evkariontov, kot je *Saccharomyces cerevisiae*, katere genom kodira okoli 6.200 proteinov. Sekvenciranje celotnega 6,3-Mbp velikega genoma *P. aeruginosa* so dosegli z enostavno implementacijo vzorčenja celotnega genoma po hitri metodi (angl. »whole-genome-shotgun sampling«) (Stover in sod., 2000).



Slika 1: Genom *P. aeruginosa*

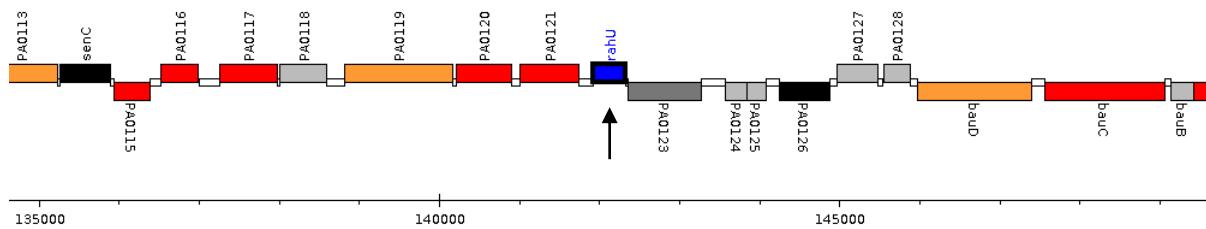
Zunanji krog (Slika 1) prikazuje lokacije kromosomov v baznih parih (vsaka črtica predstavlja 100 kb). Razporeditev genov je prikazana z barvnimi območji glede na funkcionalno kategorijo in smer prepisa (zunanji obroč je plus veriga; notranji obroč je minus veriga). Rdeče puščice predstavljajo lokacije in smer prepisa genov ribosomske RNA; zelena puščica predstavlja obrnjeno regijo, ki je nastala med homologno rekombinacijo med *rrnA* in *rrnB*; modre puščice predstavljajo lokaciji dveh regij, ki lahko vsebujeta bakteriofage (Stover in sod., 2000).

2.2 EGEROLIZINSKA DRUŽINA PROTEINOV

Leta 2002 je bila definirana nova proteinska družina egerolizinov (PF06355; IPR 009413), ki jo sestavlja nekaj izoliranih in sekvenciranih proteinov ter več genomskeih prepisov in sekvenc napovedanih iz oznak izraženih zaporedij (Berne in sod., 2009, Novak in sod., 2015).

Egerolizini (PF06355), ki so bili do sedaj odkriti v glivah, bakterijah in rastlinah, predstavljajo skupino med seboj zelo podobnih proteinov z različnimi biološkimi lastnostmi. Znani primeri so ostreolizin (*Pleurotus ostreatus*), Asp-hemolizin (*Aspergillus fumigatus*), egerolizini iz bazidiomicete *Moniliophthora perniciosa* in terelizin iz plesni *Aspergillus terreus*. Čeprav domnevamo, da je biološka vloga glivnih egerolizinov podobna vlogi bakterijskih egerolizinov, pa funkcionalna vloga mikrobnih egerolizinu podobnih proteinov še vedno ni znana (Rao in sod., 2011).

Gen (*PA0122*) *P. aeruginosa* določa RahU (Slika 2), ki pripada protinski družini egerloizinov. Rao in sod. (2011) so preučevali vlogo rekombinantnega proteina (r)-RahU, da bi razumeli interakcije med gostiteljem in bakterijo na funkcionalnem genomskem in celičnem nivoju. Pokazali so, da protein RahU v *P. aeruginosa* deluje kot naprava za zaznavanje in razlikovanje med različnimi oblikami oksidiranih fosfolipidov, ki lahko v mikrookolju prav tako interagirajo z gostiteljskimi celicami med interakcijami gostitelj-bakterija (Rao in sod., 2011).



Slika 2: Položaj gena PA0122 oz. RahU (*Pseudomonas* genome database)

Prvi egerolizin, ki je bil izoliran in sekvenciran je Asp-hemolizin, smrtonosen in kardiotoksičen protein iz patogene glive *Aspergillus fumigatus*. Ta naj bi tvoril pore v membranah eritrocitov in tako induciral hemolizo preko koloidno-osmotskega mehanizma. Ena izmed prvih študij pleurotolizina A in pleurotolizina B z uporabo vrstičnega elektronskega mikroskopa (SEM) je pokazala, da ta dvokomponentni hemolizin tvori obročke in pore na površini membrane eritrocitov. Agregacija proteina na površini membrane in inhibicija hemolizina je bila dosežena z osmotskimi protektanti različnih molekulskih mas. Na ta način so inhibirali tudi ostreolizin A in pleurotolizin B (Ota in sod., 2013). Hidrodinamični premer nastalih por je bil ocenjen na okoli 4 nm (Berne in sod., 2009; Ota in sod., 2013).

Optimalni pH za vezavo egerolizinov na membrano eritrocitov in permeabilizacijo le-te ni enak. Optimalen pH za vezavo je ponavadi pri pH 5 - 7 pri Asp-hemoliznu in ostreoliznu, do maksimalne hemolize pa pride pri pH 7 – 8. Vendar pa egerolizini ohranijo membransko aktivnost v razponu pH od 3,5 do 10,5 (Berne in sod., 2009).

Proteini, ki spadajo v družino egerolizinov, imajo podobne lastnosti. Vsi imajo nizko izoelektrično točko, podobno molekulsko maso (14 – 17 kDa) in so občutljivi na temperaturne spremembe. Prav tako so stabilni pri različnih vrednostih pH (Berne in sod., 2009).

V tej nalogi smo preizkusili imunogenost egerolizina RahU iz bakterije *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Ta protein je sestavljen iz 136 aminokislin, ima molekulsko maso 14.579 kDa in izoelektrično točko pri vrednosti 4,65.

2.2.1 Vloga egerolizinov

Eksperimentalni rezultati nakazujejo, da igrajo egerolizini pomembno vlogo pri rastnem ciklu organizma, ki jih producira. Fernandez Espinar in Labarere (1997) sta dokazala, da ekspresija *Aa-Pri1* mRNA sovpada z razvojnim stadijem primordijev bazidiomicete *Agrocybe aegerita* (topolovka), kar nakazuje na udeležbo proteina pri nastanku hif in primordijev. Ta protein so kasneje očistili in poimenovali egerolizin. S pomočjo imunohistokemičnih metod so opazovali pojavljanja ostreolizina in egerolizina v miceliju in trosnjaku bazidiomicet (*P. ostreatus* in *A. aegerita*) ter to vzporejali z razvojnim stadijem gliv. Oba proteina so zasledili v hitro rastočih primordijih, v bazidijih in bazidiosporah v trosnjaku, kar lahko nakazuje njihovo funkcijo pri začetku fruktifikacije in/ali sporulacije. Njuno pojavljanje v perifernih delih trosnjaka in v lamelah nakazuje, da lahko sodelujeta pri diferenciaciji hif in oblikovanju bazidijev in bazidiospor. To hipotezo podpira tudi odkritje, da nekatere bakterije izražajo egerolizinom podobne proteine med sporulacijo. Zanimivo je tudi to, da lahko ostreolizin izrazito inducira fruktifikacijo pri *P. ostreatus* tudi, ko je dodan miceliju (Berne in sod., 2009). Nadalje, nekateri izmed egerolizinov interagirajo s specifičnimi membranskimi lipidi, se vežejo na umetne lipidne membrane in celične membrane ter so citotoksični in toksični za eksperimentalne živali. Sprožijo lahko tudi imunski odziv pri ljudeh z induciranjem proizvodnje histamina in citokinov (npr. dejavnik tumorske nekroze α ter interlevkina 6 in 8). Novak in sodelavci so v genomu nitaste gline *Aspergillus niger* identificirali dva gena, ki kodirata egerolizinska proteina, vendar pa še ni znano ali imata ta dva proteina podobne lastnosti kot ostali egerolizini. (Berne in sod., 2009, Novak in sod., 2015).

2.2.2 Perspektive

Čeprav fiziološke vloge egerolizinom-podobnih proteinov v organizmih, ki jih proizvajajo, še ne poznamo dovolj dobro, pa so njihove biološke lastnosti zanimive zaradi več razlogov. Asphemolizin, na primer, je smrtonosni toksin, ki ima domnevno pomembno vlogo pri infekciji z *Aspergillus fumigatus*. Ta plesen povzroča veliko različnih bolezni, še posebno zelo smrtonosno in invazivno bolezen imenovano aspergiloza, ki pogosto prizadene osebe z oslabljenim imunskim sistemom, kot na primer pri levkemiji, raku ali osebam z AIDS-em, ter po presaditvi kostnega mozga ali organov. Specifična vezava na posebne lipidne domene v celični membrani je še ena izmed karakteristik egerolizinom-podobnih proteinov. To so še posebej preučevali za ostreolizin. Ostreolizin in verjetno tudi nekateri drugi egerolizini se specifično vežejo na raftom-podobne s holesterolom-bogate domene v membrani, zato bi lahko te proteine uporabili za raziskovanja membranskih domen. Fluorescenčno ali spinsko označene mutante ostreolizina, ki niso litično aktivni bi lahko uporabljali za preučevanje strukturne in funkcionalne vloge bioloških membran. Kot označevalce so do sedaj uporabljali že več citolitičnih proteinov, ki specifično prepoznajo določene komponente v lipidnih raftih. V primerjavi s temi citolizini pa ostreolizin specifično zaznava kombinacijo dveh glavnih lipidnih komponent v membranskih raftih, to sta holesterol in sfingomielin. Tako bi lahko bil ta protein uporaben kot zunanjji označevalci lipidnih raftov, ki lahko zazna domene, ki pripadajo holesterol-sfingomielinskim raftom. Egerolizine lahko kot biološke označevalce uporabljamo

za določanje izpostavljenosti glivičnim okužbam, protitelesa proti egerolizinom pa so uporabna kot orodja za imunodiagnostiko. Egerolizinski geni imajo močne promotorje, ki uravnavajo njihovo izražanje zato so uporabni pri tehnikah hkratnega izražanja več genov (Berne in sod., 2009, Novak in sod., 2015).

2.3 PRIDOBIVANJE PROTITELES

2.3.1 Prirojena in pridobljena imunost

Vsi večcelični organizmi posedujejo notranje mehanizme za obrambo pred okužbami. Ker so ti obrambni mehanizmi stalno prisotni in pripravljeni prepoznati in odstraniti mikrobe, pravimo, da predstavljajo prirojeno oz. naravno imunost. Skupna lastnost mehanizmov prirojene imunosti je, da prepoznavajo in se odzivajo na mikrobne motive, na ne-mikrobne pa ne. Prirojena imunost se razlikuje od pridobljene imunosti v tem, da je slednjo potrebno najprej spodbuditi, da je specifična in da se razvije imunski spomin. Prirojena imunost ne predstavlja le prve obrambe pred okužbami ampak tudi vpliva na potek pridobljenega imunskega sistema (Abbas in Lichtman, 2004).

Komponente prirojene imunosti prepoznavajo strukture, ki so skupne različnim tipom mikrobov in niso prisotni pri gostiteljskih celicah. Vsaka komponenta prirojene imunosti lahko prepozna različne bakterije, viruse ali glice. Na primer, fagociti izražajo receptorje za bakterijske lipopolisaharide (LPS ali endotoksini), ki so prisotni pri veliko bakterijskih vrstah, ne pa pri celicah sesalcev. Drugi receptorji fagocitov prepoznavajo terminalne manozne ostanke na glikoproteinih; veliko bakterijskih glikoproteinov ima terminalni manozni ostanek za razliko od sesalskih glikoproteinov, ki se končajo s salicilno kislino ali N-acetilgalaktozaminom. Fagociti prepoznavajo in se odzovejo na dvovijačno RNA, ki jo najdemo v virusih, ne pa tudi v sesalskih celicah, in na ne-metilirane CpG nukleotide, ki so pogosti v bakterijski DNA, ne najdemo pa jih v sesalski DNA. Za razliko od prirojene imunosti je pridobljen imunski sistem specifičen za strukture imenovane antigeni, ki so lahko mikrobnega ali ne-mikrobnega izvora in se lahko razlikujejo med mikrobi istega tipa (Abbas in Lichtman, 2004).

Pridobljeni imunski odziv je specifičen za antigen, ki spodbudi ta odziv preko prepoznavne tega antiga in sproži aktivacijo limfocitov. Nalogu specifičnega prepoznavanja antiga imata dva strukturno podobna tipa celičnih površinskih proteinov na limfocitih:

- membransko vezana protitelesa IgM na celicah B tvorijo B-celični receptor (BCR) in
- T-celični receptorji (TCRs) na celicah T (Abbas in Lichtman, 2004).

Celični receptorji imunskega sistema imajo dve funkciji: prepoznavajo zunanje dražljaje (antigene) in sprožijo odzive celic, na katerih so ti receptorji izraženi. Produkt aktivacije limfocitov B preko BCR so protitelesa, ki so enako specifična kot IgM v BCR.

2.3.2 Nastanek protiteles

Antigeni se razširjajo preko limfatičnega in krvnega obtočilnega sistema na sosednje sekundarne limfatične organe kot so limfne žleze, vranica ali mukozno limfoidno tkivo (MALT). Intravenozno injiciran antigen potuje po krvi do vranice, kjer nastajajo protitelesi. Če je antigen vnesen podkožno, intradermalno, lokalno ali intraperitonealno, potem antigen potuje po limfatičnemu sistemu do najbližjih bezgavk (Madigan in sod., 2003).

Po prvi predstavitvi antiga se začne vsaka celica B, ki je bila stimulirana (če se je antigen vezal na ustrezni BCR), deliti in se diferencirati v plazmatske celice, ki izločajo protitelesa, nato pa še v spominske celice. Plazmatske celice imajo relativno kratko življenjsko dobo (manj kot 1 teden), vendar pri primarnem odzivu protiteles proizvajajo in izločajo velike količine protiteles IgM. Preden se specifično protitelo začne sproščati v kri obstaja latentna faza kateri sledi postopno povečanje titra (tj. količine) protiteles in nato pride do počasnega padca v primarnem imunskejem odzivu (Madigan in sod., 2003).

Spominske celice, ki so nastale pri prvem srečanju z antigenom lahko živijo več let. Če kasneje pride do ponovne izpostavitve antigenu, ni potrebna ponovna aktivacija preko celic T pomagalk, saj se spominske celice hitro preobrazijo v plazmatske celice in pričnejo proizvajati protitelesa IgG. Titer protiteles hitro naraste na nivo, ki je 10 – 100-krat večji od titra po prvi izpostavitvi antigenu. Temu pravimo sekundarni protitelesni odziv. Sekundarni odziv je posledica imunskega spomina, ki zagotovi hitrejši in močnejši odziv protiteles (Madigan in sod., 2003).

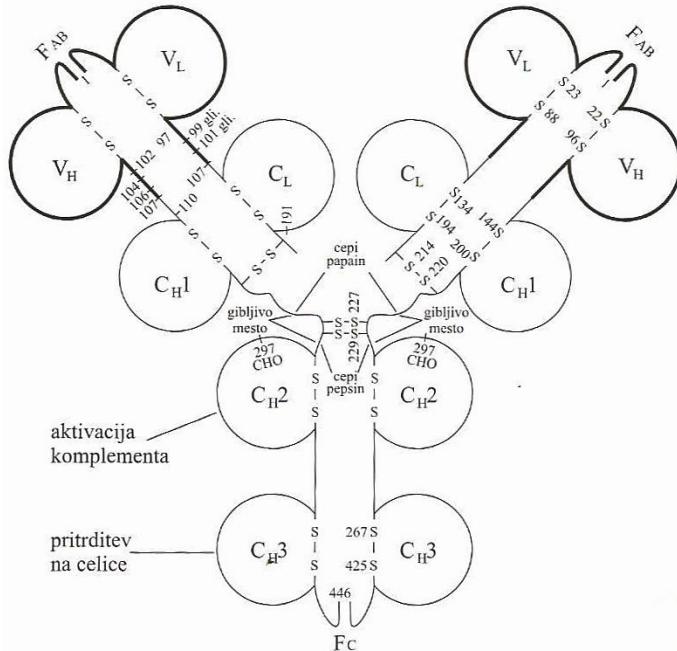
S časom se titer protiteles zmanjšuje, vendar pa pri vsaki naslednji izpostavitvi antigenu ponovno pride do hitrega sekundarnega odziva. Sekundarni odziv je osnova za imunizacijski protokol poznan kot »booster shot« (Madigan in sod., 2003).

2.3.3 Zgradba protiteles

Funkcija protiteles je vezava molekul, ki so bile tekom prirojene in pridobljene imunske aktivacije prepoznane kot tuje. Gostitelj lahko proizvaja veliko različnih protiteles, ki so strukturno podobna a vendar edinstvena. Protitelesa so najbolj raznoliki proteini, saj imajo lahko milijon različnih aminokislinskih zaporedij, večina drugih proteinskih molekul, ki jih proizvaja posamezni gostitelj pa je identičnih, torej imajo enako aminokislinsko zaporedje (Elgert, 2009).

Prototip razredov protiteles je IgG, ki je tudi najbolj zastopana oblika v serumu (Slika 3). Zgrajena je iz simetrične strukture dveh lahkih in dveh težkih verig (H_2L_2) povezujejo pa ju močne nekovalentne sile in disulfidne vezi (Goding, 1996). Vsaka variabilna regija težke ali lahke verige vsebuje tri hipervariabilne regije imenovane CDR regije. Izmed teh treh ima največjo variabilnost CDR3 regija, ki je locirana na stičišču V in C regije. Kot pričakovano je CDR3 tudi del molekule, ki največ prispeva k vezavi antiga (Abbas in Lichtman, 2004).

Vezava antiga je močna, specifična in reverzibilna z disociacijsko konstanto med 10^{-6} do 10^{-10} M ali manj. Protitelesa z disociacijsko konstanto večjo od 10^{-6} M je težko zaznati in verjetno nimajo velikega biološkega pomena. Lahki verigi protitelesa lahko razdelimo na dva glavna tipa κ in λ . (Goding, 1996).



Slika 3: Zgradba imunoglobulina (Vozelj, 2000).

Protitelesa so sposobna vezave veliko različnih antigenov, vključno z makromolekulami in majhnimi kemikalijami. Razlog za to je, da antigen-vezavna regija protitelesa tvori ravno površino, ki je sposobna prilagajanja veliko različnim oblikam. Protitelesa se vežejo na antogene preko reverzibilnih, nekovalentnih interakcij, vključno z vodikovimi vezmi in nabitimi interakcijami (Abbas in Lichtman, 2004).

Poliklonska protitelesa izvirajo iz več različnih klonov celic B, ki so se diferencirale v protitelo-proizvajajoče plazmatske celice kot odziv na imunogen. Monoklonska protitelesa izvirajo iz enega samega klena celice B, ki proizvajajo protitelesa proti specifičnemu antigenu (Howard in Kaser, 2006). Za pridobitev poliklonskih protiteles v gostitelja namenoma inokuliramo imunogen, podobno kot pri cepljenju. Ko vnesemo imunogen v gostitelja pod kontroliranimi pogoji, ga imunski sistem procesira, kar vodi v namnoževanje in diferenciacijo celic B, ki proizvajajo protitelesa, ki se izločajo v kri. Nato zberemo krvni serum in izoliramo protitelesa za nadaljnjo uporabo (Howard in Kaser, 2006). Poliklonska protitelesa, ki nastanejo proti določenemu proteinu so po navadi usmerjena proti več različnim epitopom. Prednost specifičnosti za več epitopov (angl. »polyepitopic specificity«) je, da tudi kadar so proteini razgrajeni, v naboru poliklonskih protiteles kakšna prepoznajo določene epitope. Tak primer se zgodi npr. pri denaturaciji proteinov z SDS ali s fiksacijo z aldehidi, kjer pride do uničenja nekaterih, vendar ne vseh epitopov (Wilson in sod., 1993). Poliklonska protitelesa so

pomembna za gostitelja, vendar imajo omejeno uporabo v terapevtskih, analitičnih in preparativnih aplikacijah (Verma in Singh, 2013).

2.3.4 Monoklonska protitelesa

Monoklonska protitelesa (mAb) so protitelesa, ki jih proizvaja klon, torej potomke ene same celice (specifična celica B). Protitelesa z različno specifičnostjo so prisotna v imunskejem serumu, saj jih proizvajajo različne celice B ali kloni (Verma in Singh, 2013), mAb pa v supernatantu celične kulture.

Limfocitov B ni mogoče uporabiti *in vitro* kot neomejen vir protiteles, ker imajo celice B omejeno življenjsko dobo. Zato je potrebno celice B narediti nesmrtnе, da jih lahko uporabljamо kot neomejen vir specifičnih protiteles. Odgovor na ta problem je prinesla tehnologija hibridomov, po principu katere se dandanes proizvajajo monoklonska protitelesa. Prva monoklonska protitelesa sta v zadnji četrtni 20. stoletja proizvedla Köhler in Milstein, ki sta zasnovała poskus kako imortalizirati protitelo-proizvajajoče celice B s fuzijo s tumorskimi celicami (tj. mielomske celice) (Köhler in Milsten, 1975). Mielomska celična linija vsebuje mutacijo in ne proizvaja encima, ki bi omogočal rast v selekcijskem mediju, vendar pa ta encim prispevajo normalne celice B (Abbas in Lichtman, 2004). Köhler in Milstein sta izvedla fuzijo primarne celice B (ki proizvaja protitelesa) z mielomsko celico (tumorsko celico) in tako proizvedla hibridno celico, ki je zadržala lastnosti obeh posameznih celic. Metoda, ki sta jo uporabila je izkoristila dobre lastnosti obeh tipov celic. Hibridne celice ozioroma hibridomske celice so bile sposobne produkcije protiteles, kar je lastnost celic B in so bile nesmrtnе, kar je lastnost mileomskih celic. Beseda hibridom je nastala z združitvijo dveh angleških besed in pomeni združitev dveh celic (tj. celice B in mielomske celice). Hibridomske celice so postale stalen vir protiteles z enako specifičnostjo (Verma in Singh, 2013).

2.3.5 Uporaba monoklonskih protiteles

Monoklonska protitelesa so izredno koristna kot diagnostični in terapevtski reagenti ter za istovetenje številnih celičnih tipov in celičnih površinskih antigenov. V začetku so uporabljali monoklonska protitelesa predvsem kot diagnostične reagente *in vitro* (Vozelj, 2000).

Pri uporabi monoklonskih protiteles lahko pride tudi do določenih problemov kot je npr. nizka afiniteta vezave antigena, posamezne vrste monoklonskih protiteles težje aktivirajo komplement ali povzročijo aglutinacijo antigenov *in vitro*. Monoklonska protitelesa je pri ljudeh težko uporabljati *in vivo*, ker je težko proizvesti človeške hibridome, za razliko od mišjih (Elgert, 2009).

Monoklonska protitelesa so zelo uporabna v diagnostiki, zdravljenju ter na področju tarčne dostave zdravil, ne samo proti nalezljivim boleznim, ki jih povzročajo bakterije, virusi ter praživali, ampak tudi za zdravljenje raka ter metabolnih in hormonskih bolezni. Uporabljajo

se tudi v diagnostiki limfoidnih in mieloidnih malignosti, tipizaciji tkiv, pri testih ELISA, radioimunskeih testih, serotipizaciji mikroorganizmov itd. (Siddiqui, 2010).

2.3.6 Metodologija priprave mAb

2.3.6.1 Imunizacija

Imunizacija je pomembna z vidika dobre aktivacije celic B in z vidika zorenja afinitete. Z dodajanjem adjuvansov stimuliramo naravno imunost kar je še posebej pomembno, kadar imuniziramo s čistim proteinom. V našem primeru je to rekombinantni protein RahU. Ko za antigen specifični limfociti B prepozna antigen, preko membransko vezanih imunoglobulinskih receptorjev, se vzpodbudi specifični imunski odziv. Prepoznavanje antiga sproži signalne poti, ki sprožijo aktivacijo celic B. Ponavlajoča se izpostavljenost proteinskemu antigenu se odrazi v proizvodnji protiteles s povečano afiniteto za ta antigen. (Abbas in Lichtman, 2004).

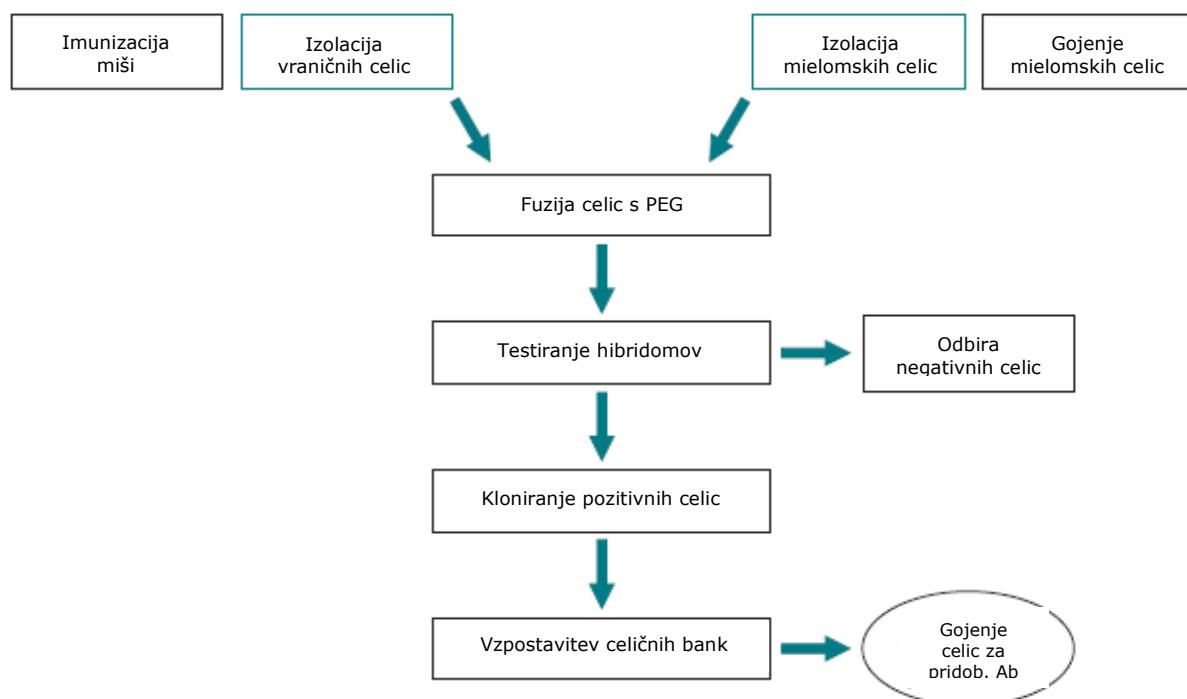
Miš je odličen kandidat za imunizacijo, ker je dostopnih več sevov po sprejemljivih cenah, z mišmi je lahko manipulirati, obstaja veliko reagentov za detekcijo mišjih IgG in miši se dobro odzivajo na tuje proteine (Howard in Kaser, 2007). Balb/C je sev miši, ki se običajno uporablja za proizvodnjo monoklonskih protiteles in večina tumorskih celičnih linij, ki se uporablja za fuzijo izhaja iz te miši (Wilson in Walker, 2010).

Običajno antigen pred imunizacijo živali zmešamo s primernim adjuvansom. Adjuvansi so substance, ki povečajo imunogenost antiga in se uporabljajo za stimulacijo specifične imunosti (Wilson in Walker, 2010). Emulzije so najpogosteje uporabljeni adjuvansi za proizvodnjo poliklonskih protiteles. »Zlati standard« predstavlja kompletni Freund-ov adjuvans (FCA), ki je emulzija olja v vodi in vsebuje manid monooleat (angl. »mannide monooleate«), ki je surfaktant in topotropno obdelano bakterijo *Mycobacterium tuberculosis*. Nekompletan Freund-ov adjuvans (FIA) je identičen FCA, le da ne vsebuje delcev bakterije *Mycobacterium*. Tako FCA kot FIA ohranjata antigen v vodni fazni emulziji, kar omogoča počasno izločanje antiga in izpostavitev imunskemu sistemu. Glavna slabost uporabe FCA je z njim povezana toksičnost. Mineralno olje ni prebavljivo ter komponente mikrobakterij lahko povzročijo vnetno reakcijo. Stranske učinke FCA lahko zmanjšamo tako, da injiciramo manjšo koncentracijo adjuvansa (Howard in Kaser, 2007).

Magic™ Mouse Adjuvant (Creative Diagnostics, ZDA) je nov adjuvans, ki se uporablja posebej za imunizacijo miši in omogoči hitro produkcijo visokih titrov protiteles. Adjuvans vsebuje CpG DNA (tj. kratki oligonukleotidi, ki vsebujejo nemetylirane citozin-gvanin dinukleotide znotraj določenega baznega okvira), ki stimulira imunski odziv. Imunski sistem sesalcev se je razvil tako, da prepozna te sekvene, ki jih v naravi najdemo v bakterijski DNA, kot znak za okužbo. Izpostavitev CpG DNA povzroči hitro in močno aktivacijo imunskega sistema, ob hkratni aplikaciji antiga pa pride do produkcije visokih titrov za antigen.

specifičnih protiteles. Pri uporabi adjuvansa Magic™ Mouse Adjuvant se izognemo postopkom, ki bi pri pripravi antiga spremenili njegovo nativno konformacijo, zato omogoča pridobitev protiteles proti konformacijskim epitopom nativnega antiga (Creative Diagnostics, ZDA).

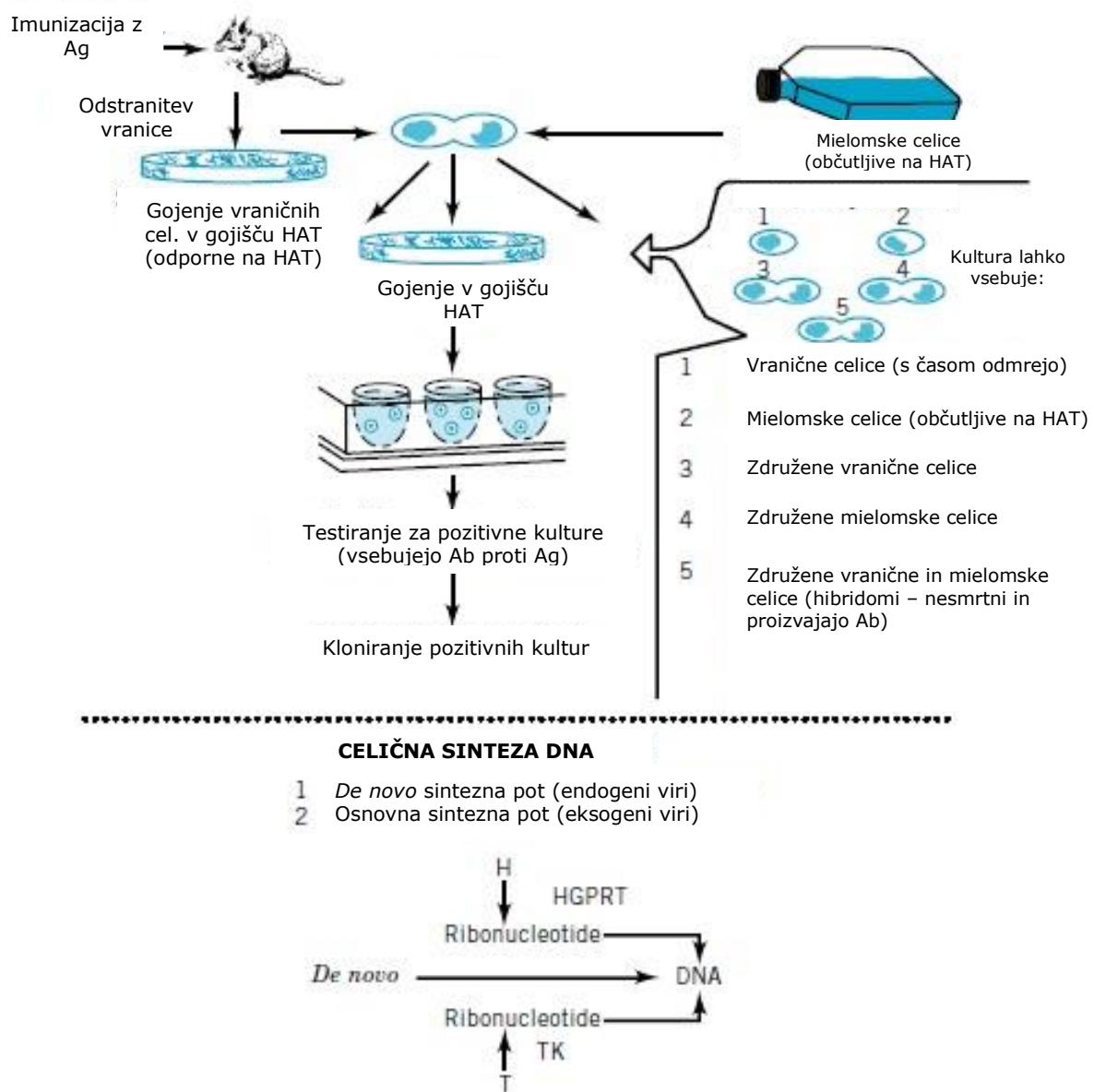
Miši imuniziramo, po navadi trikrat ali štirikrat v obdobju 3-4 mesecev po intraperitonealni poti (Wilson in Walker, 2010). Za prvo imunizacijo uporabimo antigen (10-100 µg proteina ali 10^7 celic) v emulziji s FCA. V 10-14 dneh bo prišlo do šibkega odziva protiteles (predvsem nizko-afinitetni IgM). Naslednjo imunizacijo, ki jo imenujemo pozitivna imunizacija (druga izpostavitev antigenu), izvedemo z nekompletnim Freund-ovim adjuvansom. Tekom sekundarnega odziva na proteinski antigen se bo povečal delež IgG izotipov v primerjavi z IgM. Čeprav lahko pride do dovolj velikega odziva, je priporočljivo izvesti še drugo pozitivno imunizacijo, da odziv dozori in se poveča nabor reaktivnih celic B ter se poveča titer protiteles v serumu. Osem do deset dni po drugi pozitivni imunizaciji je potrebno odvzeti serum imunizirane živali in primerjati reaktivnost s serumom, ki je bil odvzet pred imunizacijo in po vsaki imunizaciji. Ko določimo dovolj velik titer protiteles v serumu ($>1:1000$ redčitev), pustimo žival »počivati« 3-6 tednov. V tem času pride do upada povečanega sekundarnega odziva, tako da bo pri zadnji izpostavitvi antigenu lahko prišlo do ponovne aktivacije celic B in namnoževanja (Howard in Kaser, 1996). Zadnjo imunizacijo izvedemo intravenozno (če je glede na naravo Ag mogoče), uporabimo antigen v fiziološki raztopini (ali PBS) in izvedemo fuzijo 3-4 dni za tem. Za fuzijo lahko uporabimo tako vranico kot limfne žleze. Le-te ne vsebujejo toliko makrofagov, zato jih je potrebno gojiti skupaj s celicami podlage (»feeder« celice) (Goding, 1996).



Slika 4: Shema proizvodnje monoklonskih protiteles (prir. po Wilson in Walker, 2010).

2.3.6.2 Priprava hibridomov

Po imunizaciji izoliramo vranice miši (Slika 4 in Slika 5), ki so proizvedle najvišje titre protiteles. Mišje vranične celice zmešamo z mielomskimi celicami, ki same ne proizvajajo imunoglobulinov, v razmerju približno 10:1. V prisotnosti 50% polietilen glikola (PEG), ki spremeni prepustnost membrane pride do zlitja membran. Ker je fuzija celic naključen proces, vsebuje celična kultura mešanico različnih fuzijskih parov. Da se znebimo mielomskih celic uporabimo seleksijski medij, ki vsebuje hipoksantin-aminopterin-timidin (HAT). Aminopterin je analog folne kisline, ki prekine *de novo* biosintezo purinov in pirimidionov, ki so ključni za sintezo DNA. Mielomske celice, ki smo uporabljene za proizvodnjo hibridomov, ne vsebujejo encima hipoksantin-gvanin fosforibozil transferaze (HPGRT⁻), zato ne morejo izrabljati eksogenega hipoksantina za sintezo purinov po drugi poti. Aminopterin prav tako blokira endogeno sintezo purinov in pirimidinov. Mielomske celice (HPGRT⁻), ki so se uspešno združile z vraničnimi celicami (HPGRT⁺), imajo encim in tako lahko rastejo na HAT mediju (Elgert, 2009).



Slika 5: Standardni postopek za pridobitev monoklonskih protiteles (prir. po Elgert, 2009).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRIPRAVA REKOMBINANTNEGA EGEROLIZINA RahU

Z namenom pridobitve čistega rekombinantnega RahU smo kodirajočo regijo gena *rahU* (*PA0122*) (smiseln začetni oligonukleotid: CCCCCATATGGCATACGCAGAATGGATCGC, protismiseln začetni oligonukleotid: CCCCTCGAGAGAACCAACGCGAACCAAGGGAGAACGGCCGAGGGTCA) najprej vstavili v ekspresijski vektor pET-21c(+) na enak način, kot je bil pripravljen ekspresijski sistem za izražanje rekombinantnega OlyA6-H6 (Ota in sod., 2013), s to razliko, da pred trombinsko mesto nismo vstavili linkerja.

Rekombinantni RahU smo nato v ekspresijskem sevu *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Novagen, ZDA) najprej izrazili po protokolu, ki so ga za izolacijo LLO uporabili Bavdek in sodelavci, 2012, nato pa očistili in s trombinom rezali po protokolu, ki so ga Ota in sodelavci, 2013 uporabili za pripravo rekombinantnega OlyA6.

3.2 IMUNIZACIJA

Miško Balb/c smo imunizirali dvakrat po protokolu, ki je prilagojen adjuvansu Magic™ Mouse Adjuvant (Creative Diagnostics, ZDA). Pri prvi imunizaciji smo v stegensko mišico vbrizgali mešanico antiga (rekombinantni protein egerolizin RahU) in adjuvansa (70 µL). Drugo imunizacijo smo izvedli 21 dni kasneje, vbrizgali smo 90 µL mešanice.

Imunizirani miški smo 10 dni po drugi imunizaciji odvzeli kri, da smo preverili imunski odziv miške. Rep smo dezinficirali z alkoholom in odrezali konico repa s sterilnimi škarjami. V heparinizirano kapilaro smo »posesali« kapljice krvi in nato zaustavili krvavitev. Kri smo izpihali v sterilno centrifugirko in vzorec (60 µL) centrifugirali (10 min, 4000 obr./min). S pipeto smo odstranili zgornjo plast, ki predstavlja serum in ga shranili v zamrzovalniku pri -20°C v označeni Eppendorf epruveti.

Zadnjo tako imenovano pozitivno imunizacijo smo izvedli 20 dni po drugi imunizaciji in v stegensko mišico vbrizgali 90 µL mešanice antiga in adjuvansa. Miška je kmalu po imunizaciji začela pešati, zato smo jo 1 uro po imunizaciji žrtvovali. Pred žrtvovanjem smo miški odvzeli kri, da smo pridobili imunski serum, ki smo ga v nadalnjih testih uporabili kot pozitivno kontrolo za ugotavljanje specifičnih protiteles v medijih hibridnih klonov.

3.4 PRIPRAVA MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI EGEROLIZINU RahU

3.4.1 Izolacija vranice, priprava vraničnih in mielomskeh celic za fuzijo

Žrtvovanje miške in odvzem vranice smo izvedli po standardnem postopku (Goding, 1996). Prešteli smo število vraničnih celic ($3,48 \times 10^8$ celic) in število mielomskeh celic ($1,6 \times 10^8$ celic). Glede na število vraničnih celic smo izračunali, koliko mL mielomskeh celic bomo uporabili za fuzijo, da bo razmerje med vraničnimi in mielomskimi celicami 7:1.

Mielomske celice NS1 smo imeli shranjene v tekočem dušiku zato jih je bilo potrebno teden dni pred načrtovano fuzijo odtajati. Da smo zagotovili sterilno okolje, smo delali v laminariju. Pripravili smo si staničevino, alkohol, končno gojišče za celice NS1 (DMEM, 20% FCS, 0,01% gentamicin) ter 10-mililitrsko centrifugirko, v katero smo odpipetirali 8 mL gojišča DMEM. Pripravili smo vodno kopel s temperaturo 37°C, v katero smo prenesli ampulo s celicami. Celice smo s pipeto prenesli v centrifugirko z gojiščem DMEM in centrifugirali (900 obr./min, 10 min). Supernatant smo zavrgli in celice resuspendirali v gojitvenem mediju. Preverili smo viabilnost celic in jih prenesli v stekleničko ter inkubirali pri 37°C, dokler niso celice prišle v eksponentno fazo rasti.

3.4.2 Fuzija

V epruveti smo zmešali pripravljene vranične celice z izračunanim volumnom mielomskeh celic in centrifugirali 10 min, 900 obr./min. Fuzijo smo izvedli po standardnem postopku (Howard in Kaser, 2007). Po fuziji smo celice 10 minut inkubirali pri 37°C in jih nato centrifugirali (10 min, 900 obr./min). Supernatant smo zavrgli celice pa smo resuspendirali v selekcijskem gojišču, ki je vsebovalo DMEM, 20% FCS, 2 mL/100mL HAT in 0,01% gentamicin. Kulturo smo prestavili v plošče z 96 luknjicami in jih inkubirali v CO₂ inkubatorju pri 37°C.

3.4.3 Kloniranje hibridomov in gojenje klonov

Po desetih dnevih rasti v selekcijskem gojišču smo izvedli kloniranje, s katerim smo osamili klone hibridomov, ki so izločali protitelesa specifična za rekombinantni RahU. Za kloniranje smo izbrali metodo mejne redčitve (angl. »limiting dilution«), ki temelji na razredčevanju suspenzije celic (s titracijo ali z uravnavanjem končne koncentracije) tako, da v končnem koraku teoretično dosežemo 1 celico v eni luknjici. Pod mikroskopom smo prešteli celice v vzorcu (100 µL suspenzije celic smo redčili v 900 µL gojišča) in preverili njihovo viabilnost. Nato smo izračunali faktor razredčitve po formuli:

$$\text{Faktor razredčitve} = \frac{\text{št. celic/mL}}{\text{željeno št. celic na luknjico/mL}}$$

Kot gojišče smo uporabili DMEM (Sigma-Aldrich, ZDA), 20% FBS (HyClone, ZDA) in gentamicin. Celice smo nanesli na ploščo za gojenje z 96 luknjicami (200 µL / luknjico) in jih inkubirali v CO₂-inkubatorju (5% CO₂, 37°C).

Pod mikroskopom smo spremljali rast celic v luknjicah. Odbrali smo luknjice, v katerih je bila ena sama kolonija celic (te celice so bile potomke enega hibridoma) in jih prenesli v novo mikrotitrsko ploščo. S testom DIBA opisanim pod točko 3.4.3 smo določili najbolj obetavne klone in jih prenesli v gojitvene posodice (gojišče DMEM, 15% FBS in gentamicin).

Ker lahko proteini v FBS motijo nadaljnje analize pri pripravi monoklonskih protiteles, smo klone iz gojišča s serumom prenesli v gojišče brez seruma (SFM, HyClone, ZDA). Po prenosu v gojišče brez seruma smo supernatante klonov večkrat testirali s testom DIBA, da smo preverili, če še uspešno rastejo. Ko so celice prerastle dno gojitvene posodice, smo zamenjali gojišče. Pri tem smo celice resuspendirali in jih odpipetirali v označene centrifugirke. Centrifugirali smo jih 10 minut pri 9000 obr./min, da so se celice posedle. Supernatante smo prenesli v označene stekleničke in jih shranili v hladilniku pri 4°C za poznejšo uporabo.

3.5 DETEKCIJA IN IZOLACIJA SPECIFIČNIH PROTITELES

3.5.1 Encimski imunski test – ELISA (angl. »enzyme-linked immunosorbent assay«)

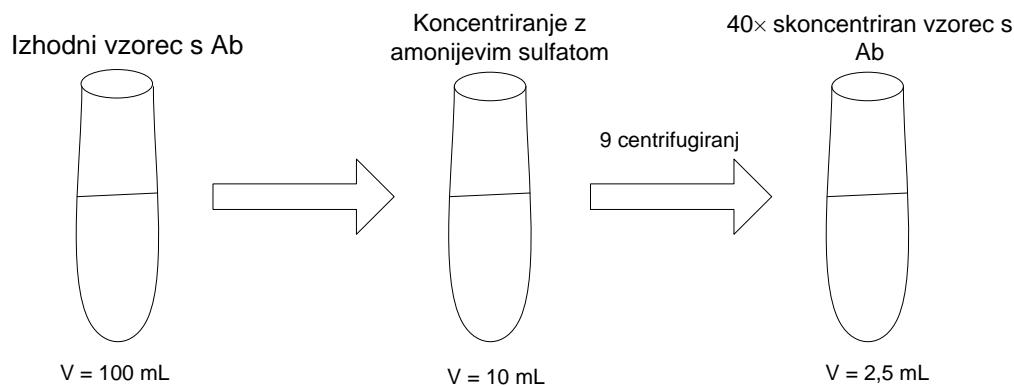
Na pet plošč z 96 luknjicami smo najprej nanesli antigen (rekombinantni RahU) v razredčitvi 1:2000 (50 µL na luknjico). Plošče smo čez noč shranili v hladilnik (4°C), da je potekla vezava antiga na plastiko. Naslednji dan smo iz plošč stresli razredčino antiga, sledilo je spiranje plošč na avtomatskem spiralniku (Biotek, ELx-50, ZDA). Vsako ploščo smo spirali 5-krat z raztopino 0,05% Tween-20 PBS. Po spiranju smo v luknjice z avtomatsko multikanalno pipeto nanesli raztopino za blokado (0.5% (w/v) BSA v 0.05% Tween-20 PBS, 300 µL na luknjico) in plošče inkubirali 1 uro pri 37°C. Sledilo je spiranje plošč z raztopino 0,05% Tween-20 v PBS (5-krat) in nanos supernatantov klonov (100 µL na luknjico). Za pozitivno kontrolo smo v eno luknjico nanesli imunski serum (1:2000), za negativno kontrolo pa PBS. Plošče smo inkubirali 2 uri pri 37°C. Zopet je sledilo spiranje plošč, nato pa smo v vsako luknjico nanesli 50 µL konjugata (zajčji proti-mišji IgG konjugiran s hrenovo peroksidazo, Sigma A9044, ZDA) v redčitvi 1:5000 in inkubirali 45 minut pri 37°C. Po končani inkubaciji je zopet sledilo spiranje, nato pa smo nanesli substrat ABTS (75 µL na luknjico). ABTS je bil v tabletki, ki smo jo raztopili v 10 mL pufra, pripravljenem po navodilih proizvajalca Thermo Scientific, ZDA (2,75 mL 0,2M natrijevega fosfata, 2,43 mL 0,1M citronske kisline, 5 mL 1xPBS in 10 µL peroksid). Plošče smo inkubirali v temi 30 minut in nato izmerili absorbanco pri valovni dolžini 405 nm na avtomatskem spektrofotometru (Biotek, EL808, ZDA).

3.5.2 Precipitacija protiteles z amonijevim sulfatom in ultrafiltracija

Supernatanta celičnih kultur (klona 5G2/B3 in 5G2/E3), ki smo jih pridobili, kot je opisano pod točko 3.3.3, smo prenesli v falkonke in ju centrifugirali (30 min, 3000 obr./min). Nato smo supernatanta prenesli v čaši, ki sta imeli vsaj dvakratni volumen supernatanta. V čaši smo dali magnetni mešali in med mešanjem po kapljicah dodajali nasičeno raztopino hladnega amonijevega sulfata z nevtralno pH vrednostjo. Amonijev sulfat smo dodajali počasi, da ni prišlo do lokalnega povišanja zasičenosti, kar bi povzročilo obarjanje drugih proteinov. Končni volumen dodanega amonijevega sulfata je približno enak volumnu supernatanta (mišji imunoglobulini se namreč obarjajo pri 45% – 50% zasičenosti vzorca z amonijevim sulfatom). Za oboritev klona 5G2/B3 ($V = 100 \text{ mL}$) je bilo potrebno dodati 103,8 mL 100% amonijevega sulfata, za oboritev klona 5G2/E3 ($V = 100 \text{ mL}$) pa 100 mL 100% amonijevega sulfata. Čaši z oborjenima supernatantoma smo čez noč shranili pri 4°C , da so se proteini do konca oborili. Naslednji dan smo vzorca prenesli v centrifugirki in ju centrifugirali 15 min na 10000 obr./min v centrifugiji Sorvall RC-5C (Thermo Scientific, ZDA). Po centrifugiranju smo supernatant shranili za primer, če nismo vseh oborili protiteles. Usedlino smo resuspendirali v 10 mL PBS in vzorec prenesli v centrifugirke Macrosep (Pall Corporation, ZDA). Potek koncentriranja protiteles je opisan v Preglednici 1.

Preglednica 1: Potek koncentriranja protiteles v centrifugirkah Macrosep

	Št. obratov na minuto	Čas
1. centrifugiranje	5800 obr./min	20 min
2. centrifugiranje	5800 obr./min	30 min
3.- 8. centrifugiranje	6300 obr./min	35 min
9. centrifugiranje	6300 obr./min	50 min (koncentriranje)



Slika 6: Shema poteka koncentriranja protiteles iz izhodnega vzorca do 40× skoncentriranega vzorca protiteles

Po vsakem končanem centrifugiranju smo zavrgli filtrat, ki je med centrifugiranjem pronical skozi membrano na dno centrifugirke in spet dodali 5 mL svežega PBS, razen pri zadnjem centrifugiranju. Volumna vzorcev 5G2/B3 in 5G2/E3, ki smo jih dobili po ultrafiltraciji je znašal 2,5 mL.

Supernatant, ki smo ga dobili in shranili centrifugiraju po prvemobarjanju smo testirali s testom DIBA in ugotovili, da je prisotnih še nekaj protiteles. Ponovno smo dodali amonijev sulfat, in sicer 100 mL k supernatantu klena 5G2/B3 ($V_2 = 203,8$ mL) in 110 mL k supernatantu klena 5G2/E3 ($V_2 = 200$ mL). Zasičenost z amonijevim sulfatom je bila tako 75%. Ponovili smo postopek ultrafiltracije, kot je opisano zgoraj. Izolat ($V=2,5$ mL) smo shranili v označenih stekleničkah v hladilniku pri 4°C za kasnejšo uporabo.

3.5.3 Točkovna imunoencimska reakcija na membrani – DIBA (angl. »dot immunobinding assay«)

DIBA je priročen test za kvalitativno in semikvantitativno oceno prisotnosti in aktivnosti protiteles, ki v principu poteka enako kot test ELISA, le da se izvaja na membrani, ki veže proteine. Test DIBA smo izvedli po standardnem postopku, kot je opisano v literaturi (Goding, 1996).

Uporabili smo membrano Immobilon-P PVDF (Milipore, ZDA), na katero smo najprej s svinčnikom narisali mrežo s kvadratki v velikosti 0,5 cm × 0,5 cm. Membrano smo za 30 sekund pomočili v metanol, da smo jo aktivirali, nato pa smo jo spirali v destilirani vodi (5 min). Glede na načrt poskusa smo membrano razrezali na različno dolge trakce (z različnim številom kvadratkov). Membrano smo nato malo osušili in nato s pipeto v vsak kvadratek nanesli kapljice (2 µL) ustreznih razredčitev antiga (rekombinantni RahU). Počakali smo, da so se kapljice vpile v membrano in jo nato 1 uro pri sobni temperaturi inkubirali v posodicah z raztopino 0,5% Tween-PBS, da smo blokirali prosta vezna mesta. Med tem smo pripravili ustrezne razredčitve vzorcev s protitelesi (supernatanta klonov 5G2/B3 in 5G2/E3 (po ultrafiltraciji)), ki naj bi proizvajala specifična protitelesa proti rekombinantnemu RahU, kot negativno kontrolo pa smo uporabili gojišče s serumom. Trakce smo čez noč inkubirali pri 4°C v razredčitvah vzorcev s protitelesi. Po končani inkubaciji smo trakce spirali pri sobni temperaturi 3-krat po 10 minut v 0,05% Tween-20 PBS. Med tem smo pripravili razredčino sekundarnih označenih protiteles (zajčji proti-mišji IgG, konjugiranih s hrenovo peroksidazo Sigma A9044, Sigma-Aldrich, ZDA), ki smo jih redčili 1:2000. Trakce smo v sekundarnih označenih protitelesih inkubirali 45 minut pri sobni temperaturi. Temu je sledilo spiranje 2-krat v raztopini 0,05% Tween-20 PBS (10 min) in nato še v 1×PBS (10 min). Po spiranju smo trakce prenesli v prazno posodico in jih prenili s kromogenim substratom za hrenovo peroksidazo TrueBlue (TMB Stabilised Substrate for Horseradish Peroxidase, Promega Corporation, ZDA). Ko se je pojavila modra barva, smo jih hitro prenesli v dH₂O, da smo ustavili reakcijo. Trakce smo nato posušili in jih fotografirali.

3.5.5 Priprava celičnega lizata bakterije *P. aeruginosa* PA01

Celični lizat bakterije *P. aeruginosa* PA01 smo pripravili z namenom, da dokažemo, da mAb, ki smo jih pripravili, prepozna nativni protein egerolizin RahU tudi v samem lizatu in ne samo v obliki očiščenega proteina.

Že pripravljeno prekonočno kulturo bakterije *Pseudomonas aeruginosa* z oznako PA01 w.t. (V=250 µL) smo inokulirali v 50 mL gojišča LB in dali na stresalnik (200 obr./min., T=37°C). Po 8-ih urah gojenja smo odvzeli 200 µL vzorca iz erlenmajerice in mu dodali 800 µL svežega gojišča LB. Izmerili smo absorbanco pri 600 nm. Dobljeni rezultat smo pomnožili s 5, ker smo vzorec 5-krat redčili, nato pa smo preračunali, kolikšen volumen vzorca moramo odvzeti iz erlenmajerice za nadaljnjo analizo (Preglednica 2).

Preglednica 2: Podatki o izmerjeni optični gostoti (OD) po 8-ih urah gojenja in preračunan potrebovani volumen vzorca

PA01	
<i>OD</i>	0,337
<i>OD</i> × 5	1,69
<i>V</i> (µL)	592

$$V = \frac{1 \times 1000}{OD}$$

Vzorec smo centrifugirali 1 minuto na 13000 obr./min, odstranili supernatant, dodali 200 µL PBS in še enkrat centrifugirali. Po centrifugiranju smo odstranili PBS in celice zamrznili čez noč. Naslednji dan smo usedlini celic dodali 50 µL PBS z dodatki (Preglednica 3) in inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. Nato smo celice sonicirali. Po soniciranju smo vzorec centrifugirali 10 minut na 14000 obr./min pri 4°C, da smo se znebili ostankov celic. Supernatant smo prenesli v novo epico in ga zamrznili do naslednje uporabe.

Preglednica 3: Sestava PBS z dodatki

PBS z dodatki	2.5 mL PBS
<i>Lizocim</i>	25 µL
<i>DNaza</i>	2.5 µL
<i>RNaza</i>	5 µL
<i>AEBSF</i>	1.75 µL
<i>PMSF</i>	1.75 µL
<i>benzamidin</i>	2.5 µL

3.5.6 SDS-poliakrilamidna gelska elektroforeza (SDS-PAGE)

Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE) je metoda, ki se pogosto uporablja za kvantitativno analizo mešanice proteinov. Ker metoda temelji na ločevanju proteinov glede na njihovo velikost, jo lahko uporabljamo pri določanju relativne molekulske mase proteinov (Wilson in Walker, 2010). SDS-poliakrilamidno gelsko elektroforezo smo izvedli po standardnem postopku (Harlow in Lane, 1988).

Najprej smo izvedli SDS-PAGE na 15% poliakrilamidnem ločevalnem gelu, ker smo po velikosti ločevali rekombinantni RahU, katerega molekulska masa je okrog 14 kDa. Nanesli smo dve frakciji, ki smo ju pridobili po ločevanju proteinov iz bakterijskega lizata z metodo FPLC (angl. »fast protein liquid chromatography«). Frakciji vsebujeta različni koncentraciji rekombinantnega proteina; frakcija 22: 1,52 µg/mL in frakcija 24: 1,54 µg/mL. Frakcija 22 vsebuje tudi trombin, frakcija 24 pa ne. Vzorca smo najprej redčili v PBS, da smo dobili redčitev 1:20, nato pa smo dodali še nanašalni pufer (Preglednica 4) v razmerju 1:1. Končna redčitev obeh frakcij rekombinantnega proteina je bila tako 1:40. V vsak žepek pa smo nanesli 20 µL vzorca. Kot molekularni označevalec smo uporabili BlueStar Prestained Protein Ladder proizvajalca Nippon Genetics, Japonska. Elektroforeza je tekla 30 minut pri toku 80 V do ločevalnega gela, nato pa smo spremenili tok na 100 V in ločevanje nadaljevali še 2 uri in pol.

Preglednica 4: Sestava nanašalnega pufra

10% w/v	SDS
10 mM	β-merkaptoetanol
20% v/v	Glicerol
0,2 M	Tris-HCl, pH 6,8
0,05% w/v	Bromfenol modro

V drugem primeru smo na ločevalni gel nanesli vzorec lizata celic *P. aeruginosa* (PA01), po 8-ih urah gojenja. Kot kontrolo smo uporabili tudi rekombinantni RahU. Za izvedbo SDS-PAGE smo uporabili 12% poliakrilamidni ločevalni gel in 4% nalagalni gel. SDS-PAGE smo izvedli po standardnem postopku (Harlow in Lane, 1988).

Pripravili smo dva gela in vsak gel je imel 15 luknjic. Na gel smo nanesli molekularni označevalec (BlueStar Prestained Protein Ladder, Nippon Genetics, Japonska), rekombinantni protein RahU (oznaka Pa-tro, Mw=14,9133 kDa, c=0,320 mg/mL), celični lizat (PA01) ter gojišče LB (negativna kontrola). Vzorcem smo dodali nanašalni pufer (dodan β-merkaptoetanol) v razmerju 1:1. Končni volumen vzorcev na luknjico je bil 30 µL, končni volumen molekularnega označevalca na luknjico pa 5 µL.

3.5.8 Prenos western

Po končani SDS-PAGE elektroforezi smo proteine iz gela prenesli na membrano z metodo prenosa western. Uporabili smo membrano Immobilon-P PVDF (Milipore, ZDA). Prenos smo izvedli po standardnem postopku (Burnette, 1981).

Membrano smo najprej aktivirali v 100% metanolu nato pa smo jo skupaj s filter papirji in gelom namočili v pufer za prenos (10 mM CAPS pH 11 + 10% metanol (v/v)). Po standardnem postopku smo iz gela, membrane in filter papirjev sestavili »sendvič« in ga namestili med anodno in katodno ploščo naprave (Multiphor II, Pharmacia LKB, Švedska). Od velikost sendviča je bila odvisna jakost električnega toka, ki smo ga fiksirali. Izračunali smo jo po formuli:

$$Tok (mA) = površina sendviča (cm^2) \times 0,8$$

Tok, ki smo ga fiksirali je znašal 29,9 mA, prenos iz gela na membrano pa je trajal 35 minut.

Postopek prenosa vzorcev celičnega lizata (PA01) in rekombinantnega RahU iz gela na membrano je potekal enako, kot je opisano prej. Ker smo imeli 2 gela, smo izrezali 2 membrani ter 16 filter papirjev. Tok, ki smo ga fiksirali, je znašal 27,2 mA, prenos iz gela na membrano pa je trajal 35 minut.

3.5.9 Imunoencimska reakcija

Po končanem prvem prenosu western smo membrano razrezali na tri enake dele. Prvi trak smo pobarvali z barvilom Coommassie modro. Najprej smo PVDF membrano omočili v metanolu (10 s) in jo nato sprali z dH₂O (2-krat po 2 minuti). Membrano smo 2 minuti inkubirali v raztopini za barvanje (na stresalniku), nato pa smo jo razbarvali v raztopini za razbarvanje (2-krat po 5 minut). Membrano smo sprali z dH₂O (3-krat po 5 minut) in jo posušili na zraku.

Druga dva trakova membrane smo uporabili za izvedbo imunoencimske reakcije. Membrano smo po končanem prenosu western inkubirali v pufru za blokado prostih veznih mest (0,5% Tween-PBS), nato pa smo izvedli reakcijo po enakem protokolu kot velja za DIBA test. Drugi trakec smo inkubirali v očiščenih monoklonskih protitelesih 5G2/B3, tretji trakec pa v očiščenih monoklonskih protitelesih 5G2/E3.

Po drugem prenosu western (vzorca celičnega lizata (PA01) in rekombinantnega proteina egerolizin RahU) smo obe membrani razrezali na 4 enake dele. Zadnji del druge membrane smo pobarvali z barvilom Coomassie modro po enakem postopku, kot je opisano prej.

Preostale trakce smo uporabili za izvedbo imunoencimske reakcije enako, kot je opisano prej. Trakec št. 2 smo inkubirali v monoklonskih protitelesih 5G2/E3, trakec št. 4 pa v monoklonskih

protitelesih 5G2/B3. Ostale trakce smo inkubirali v supernatantih hibridomov 5G3, 1B10, 2F2 ter 3A4. En trakec je služil kot negativna kontrola. Inkubirali smo ga v gojišču brez serumata (SFM). Z negativno kontrolo smo preverili ali monoklonska protitelesa reagirajo z molekulami, ki so prisotne v SFM.

4 REZULTATI

4.1 PRESEJALNI TESTI PO FUZIJI

4.1.1 Testiranje hibridomov s testom ELISA

Za presejalni test, kjer je v testiranje vključenih veliko vzorcev, v našem primeru jih je bilo približno 500, običajno uporabljamo test ELISA. Po fuziji smo v supernatantih celic preverjali prisotnost specifičnih protiteles. Prvi presejalni test ELISA smo izvedli 12 dni po fuziji. Testirali smo hibridome, da bi lahko odbrali tiste, ki proizvajajo največ protiteles in jih nato klonirali. Nanešeni volumen supernatanta na posamezno luknjico mikrotitrske plošče je bil 100 μL . Antigen smo redčili 1:2000, serum 1:2000 ter konjugat 1:5000. Po 45 minutah inkubacije v substratu (v temi) smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 405 nm na avtomatskem spektrofotometru.

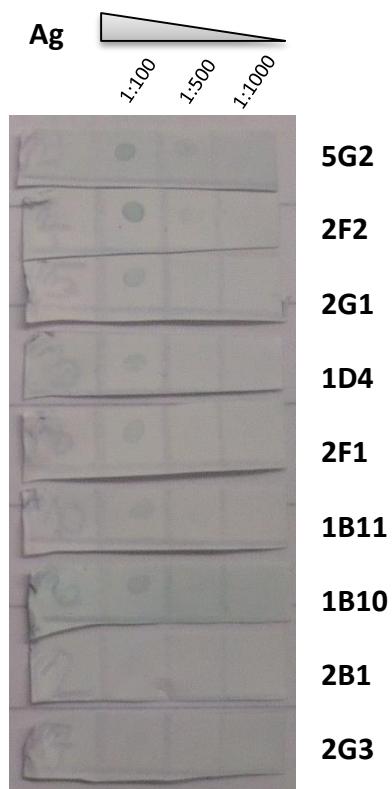
Preglednica 5: Testiranje hibridomov s presejalnim testom ELISA

Oznaka hibridomov	Absorbanca 12 dni po fuziji	Absorbanca 21 dni po fuziji
1D4	0,145	0,346
1B10	0,225	1,463
2F1	0,135	0,707
2G1	0,314	1,902
2F2	0,219	1,786
2G2	0,255	0,085
3F7	0,173	0,073
3A11	0,207	0,077
5G2	0,310	1,423
5G3	0,146	0,447
1B11	0,104	0,387
2B1	0,119	0,210
2G3	0,119	/
3C3	0,101	/
serum (+)	0,462	2,302
PBS (-)	0,03	0,071

Iz rezultatov v preglednici (Preglednica 5) je razvidno, da najvišji titer specifičnih protiteles (najvišja izmerjena absorbanca) proizvajajo hibridomi v luknjicah z oznakami 1B10, 2G1, 2F2 in 5G2. Odločili smo se za kloniranje hibridomov z oznakami 2G1, 5G2 in 1B10.

4.1.3 Testiranje prisotnosti in aktivnosti protiteles s testom DIBA

Za testiranje prisotnosti protiteles v primerih, ko imamo majhno število vzorcev in potrebujemo le kvalitativno oceno ne pa kvantitativne, se poslužujemo testa DIBA. Po izvedbi presejalnega testa ELISA smo s testom DIBA preverili še, v katerih supernatantih hibridomov je največ specifičnih protiteles, ki se vežejo na naš antigen na membrani (Slika 7). Antigen smo redčili 1:100, 1:500 in 1:1000 konjugat pa 1:1000.



Slika 7: Testiranje supernatantov hibridomov s testom DIBA

Kot najboljši hibridom se je izkazal 5G2 zato smo ga naprej klonirali. Nanešeni redčitvi antiga sta 1:100 in 1:500, ker smo pri prejšnjem DIBA testiranju ugotovili, da je reakcija pri redčitvi antiga 1:1000 zelo slaba. Konjugat je redčen 1:1000. Kot negativno kontrolo smo uporabili gojišče s serumom.

Po kloniranju smo s testom DIBA testirali supernatante klena 5G2 (Slika 8), ki smo jih označili glede na njihovo pozicijo na mikrotitrski plošči (B3, D3, D4, E3, E10, F10). Nanesli smo enake redčitve antiga in konjugata kot prejšnjič. Kot negativno kontrolo smo uporabili gojišče s serumom.



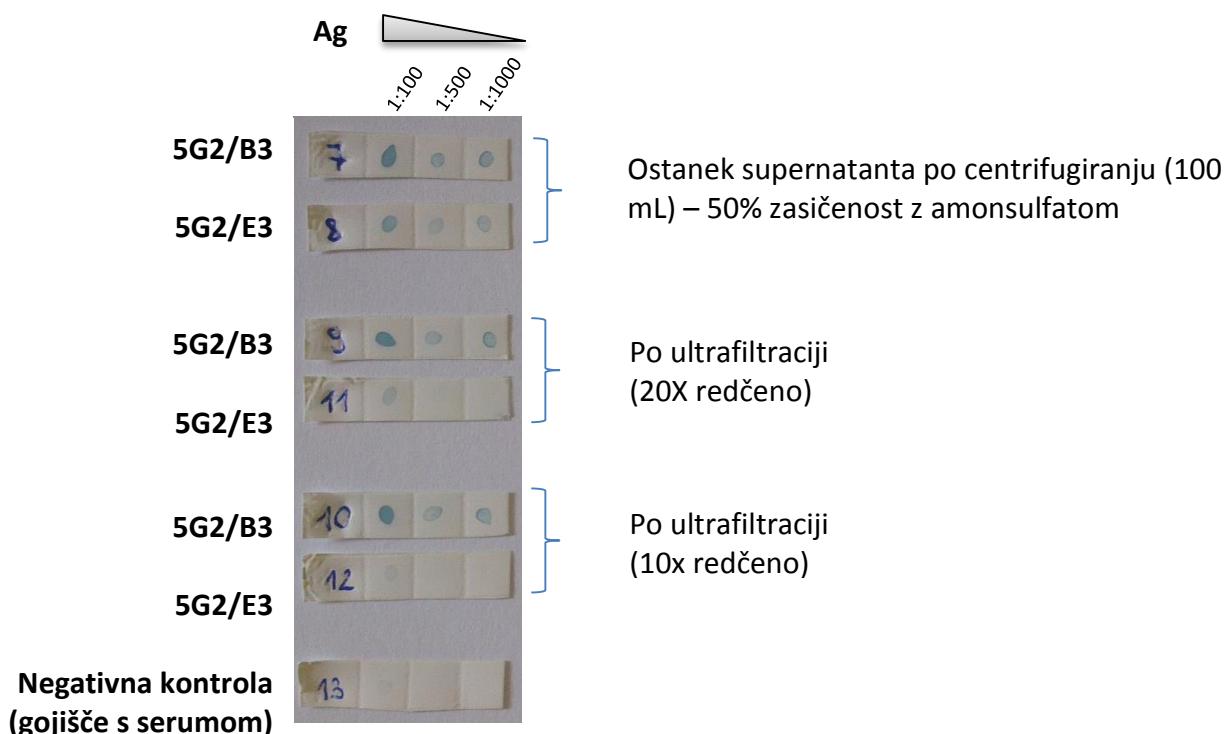
Slika 8: Testiranje supernatantov klena 5G2 s testom DIBA

Za nadaljnjo produkcijo smo izbrali klena 5G2/B3 in 5G2/E3, ostale klone pa smo zamrznili. Klone smo nato prestavili v gojišče brez seruma (SFM) in jih še nekajkrat testirali s testom DIBA, da smo dokazali nespremenjeno aktivnost protiteles.

4.2 TESTIRANJE PROTITELES PO OBARJANJU

Po obarjanju z amonijevim sulfatom smo pridobili monoklonska protitelesa 5G2/B3 in 5G2/E3 v čisti obliki (Slika 9). Nanešene so redčitve antigena 1:100, 1:500 in 1:1000. Konjugat smo redčili 1:2000. Kot negativno kontrolo smo uporabili gojišče s serumom.

Volumen vzorcev 5G2/B3 in 5G2/E3 po ultrafiltraciji je bil 2,5 mL (40× skoncentrirano). Koncentracija protiteles 5G2/B3 je bila 1029 µg/mL, to je okoli 1 mg/mL. Količina protiteles 5G2/B3 v 100 mL je torej 2,5 mg. Koncentracija protiteles 5G2/E3 je bila 562 µg/mL, to je okoli 0,56 mg/mL. Količina protiteles 5G2/E3 v 100 mL je torej 1,4 mg.

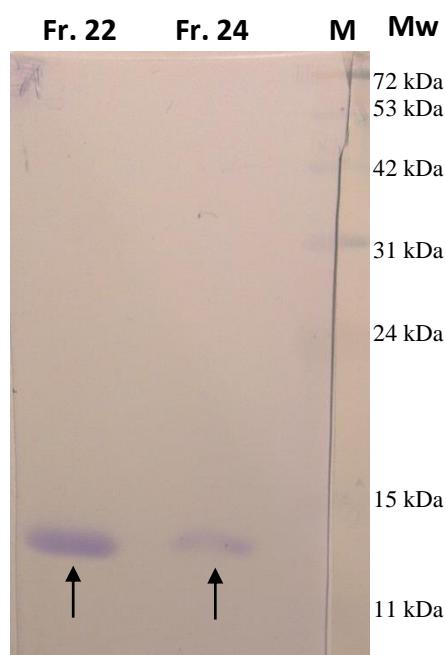


Slika 9: Prikaz rezultatov testa DIBA v postopku čiščenja monoklonskih protiteles iz gojišča in končna aktivnost čistih monoklonskih protiteles

4.3 SDS-POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA (SDS-PAGE) IN PRENOS WESTERN

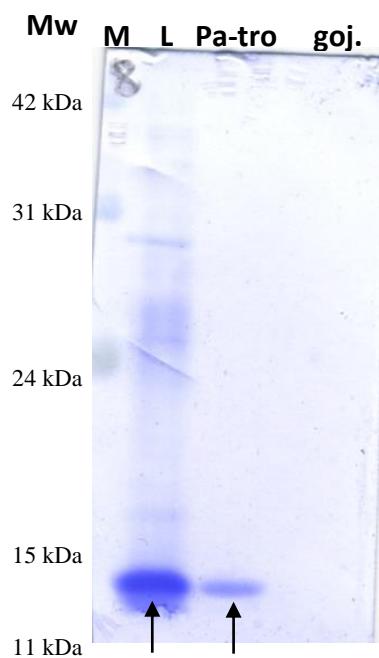
Na SDS-PAGE elektroforezo smo nanesli vzorca rekombinantnega RahU (frakcija 22 in frakcija 24), da smo določili njegovo molekulsko maso ter preverili, ali rekombinantni protein reagira z monoklonskim protitelesom. Na elektroforezni gel smo nanesli 20 µL Ag/žepek redčenega 1:40. Vzorce smo zmešali z nanašalnim pufrom (dodan β-merkaptoetanol) v razmerju 1:1. Končni volumen na luknjico je bil 30 µL.

Membrano smo po prenosu western razrezali na 3 enake dele. Prvi del smo pobarvali z barvilom Coomassie modro, s katerim smo potrdili, da so se proteini iz gela prenesli na membrano. Dokazali smo, da ima rekombinantni protein v obeh vzorcih molekulsko maso okrog 14 kDa (Slika 10). Frakcija 22 ima močnejšo liso, ker ima rekombinantni protein zraven pripet trombin. Frakcija 24 nima pripetega trombina, zato je lisa nekoliko šibkejša.



Slika 10: Membrana barvana s Coomassie modro po prenosu western. Nanešena sta dva vzorca rekombinantnega proteina egerolizin RahU. Fr. 22 – frakcija 22 ($c = 1,52 \mu\text{g/mL}$), Fr. 24 – frakcija 24 ($c = 1,54 \mu\text{g/mL}$), M – molekularni označevalec, Mw – molekulska masa

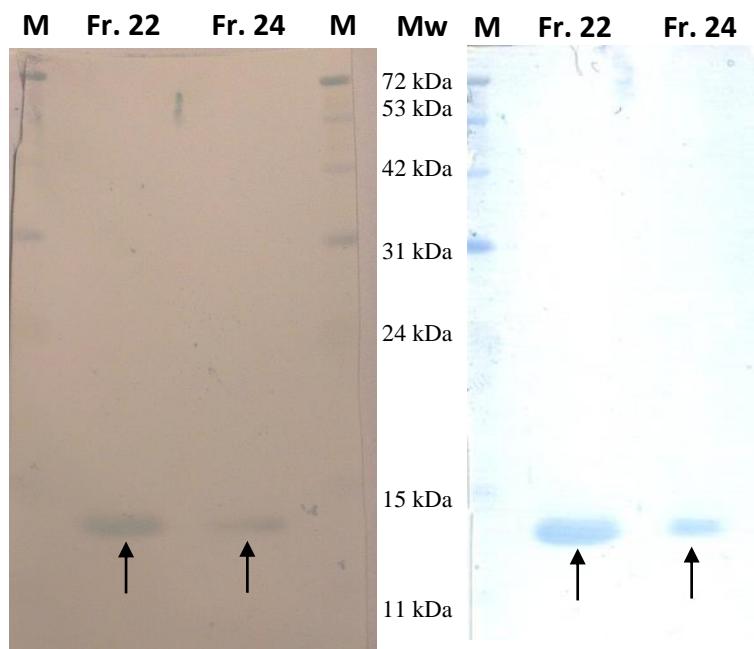
Dokazali smo tudi, da monoklonski protitelesi 5G2/B3 in 5G2/E3 prepoznavata nativni protein egerolizin RahU tudi v celičnem lizatu bakterije *Pseudomonas aeruginosa* PA01 (Slika 11). Celični lizat smo pripravili tako, kot je opisano pod točko 3.4.4. Na SDS-PAGE elektroforezo smo nanesli celični lizat PA01 po 8-ih urah gojenja, rekombinantni RahU (oznaka Pa-tro), ki je služil kot pozitivna kontrola in gojišče LB (negativna kontrola). Zadnji del druge membrane smo odrezali in ga pobarvali z barvilkom Coomassie modro s katerim smo zaznali vse proteine, ki so bili prisotni v celičnemu lizatu. Najmočnejša lisa pripada rekombinantnemu egerolizinu, kar nakazuje, da je proteina v celičnemu lizatu po 8-ih urah gojenja veliko.



Slika 11: Membrana barvana s Coomassie modro po prenosu western. Nanešen celični lizat PA01, rekombinantni egerolizin RahU (Pa-tro) in gojišče LB. M – molekularni označevalec, Mw – molekulska masa, L – celični lizat PA01 po 8-ih urah gojenja, Pa-tro – rekombinantni RahU (pozitivna kontrola), Goj. – gojišče LB (negativna kontrola)

4.4 IMUNOENCIMSKA REAKCIJA

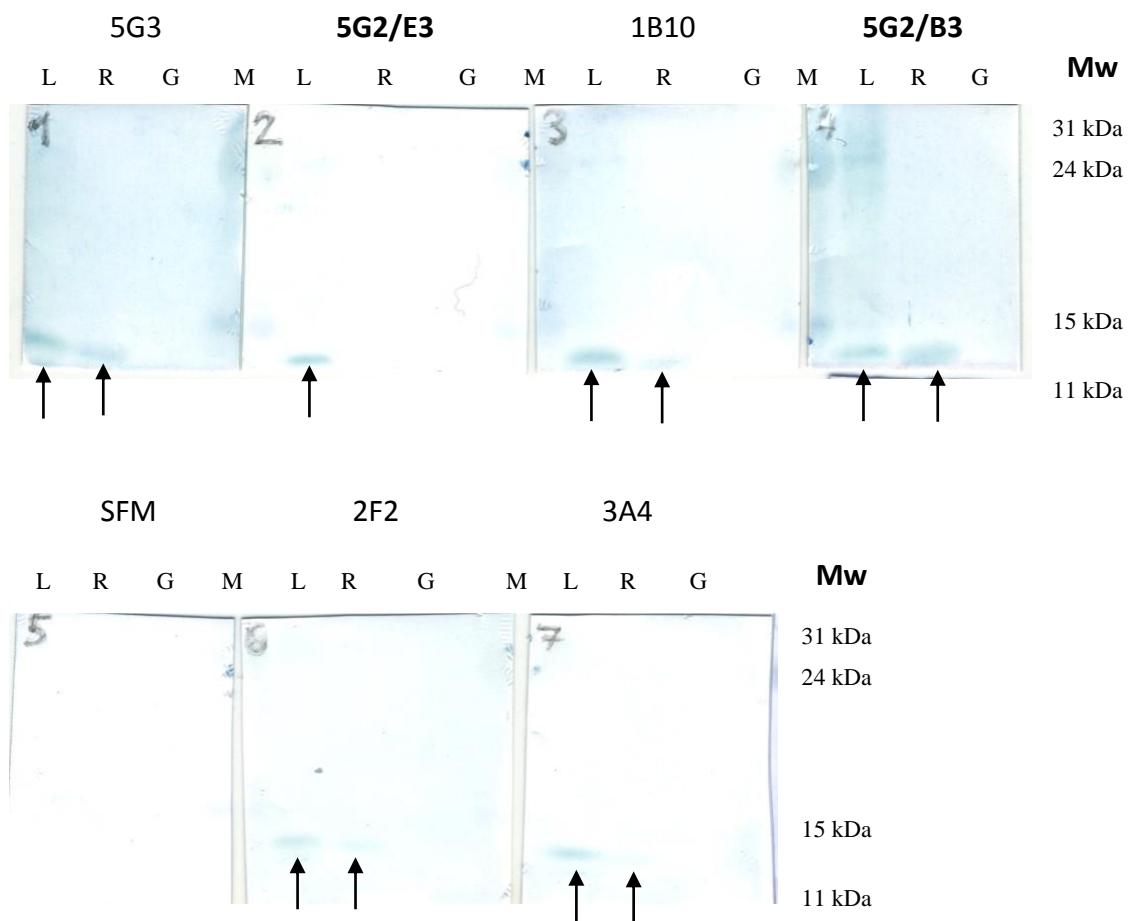
Po prenosu western smo izvedli tudi imunoencimski test z dvema frakcijama rekombinantnega proteina (Slika 12), pri čemer smo drugi del membrane inkubirali v monoklonskih protitelesih 5G2/B3 ($V_{mAb} = 4 \text{ mL}$, redčitev 1:20), tretji del pa v monoklonskih protitelesih 5G2/E3 ($V_{mAb} = 4 \text{ mL}$, redčitev 1:20).



Slika 12: Imunoencimska reakcija z očiščenima monoklonskima protitelesoma 5G2/B3 (levo) ter 5G2/E3 (desno). Fr. 22 – frakcija 22 ($c = 1,52 \mu\text{g/mL}$), Fr. 24 – frakcija 24 ($c = 1,54 \mu\text{g/mL}$), M – molekularni označevalec, Mw – molekulska masa

Ker smo želeli detektirati protein (rekombinantni RahU), ki reagira z določenim monoklonskim protitelesom, ki smo ga pripravili, smo po prenosu western izvedli imunoencimsko reakcijo, pri kateri smo membrano inkubirali v izbranih monoklonskih protitelesih (5G2/B3 in 5G2/E3). Hkrati smo prepoznavanje rekombinantnega proteina izvedli tudi z nekaterimi hibridomi, ki jih v procesu pridobivanja specifičnih protiteles nismo klonirali. Torej smo uporabili tudi poliklonska protitelesa.

Membrane smo inkubirali v monoklonskih Ab (5G2/B3 in 5G2/E3 – redčena 1:40 v PBS) ter v supernatantih nekloniranih hibridomov (5G3, 1B10, 2F2, 3A4). Kot negativno kontrolo smo uporabili gojišče brez seruma (SFM) (Slika 13).



Slika 13: Imunoencimska reakcija z monoklonskima protitelesoma 5G2/B3 in 5G2/E3 ter supernatanti hibridomov (poliklonska protitelesa). L – celični izdat PA01 po 8-ih urah gojenja, R – rekombinantni RahU, G – gojišče LB, M – molekularni označevalec, Mw – molekulska masa, 5G2/B3 in 5G2/E3 – monoklonski protitelesi, 5G3, 1B10, 2F2, 3A4 – supernatanti nekloniranih hibridomov, SFM – gojišče brez seruma

S tem smo dokazali, da proizvedeni monoklonski protitelesi 5G2/B3 in 5G2/E3 specifično prepoznavata nativni protein egerolizin RahU tudi v celičnemu izdatu *P. aeruginosa* (PA01) po 8-ih urah gojenja.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Pseudomonas aeruginosa je patogena bakterija, ki v veliki večini okužuje osebe z oslabljenim imunskim sistemom. Ker je prisotna skoraj povsod v naravi, so potrebne dobre diagnostične metode, ki omogočajo hitro in specifično zaznavanje povzročitelja okužbe. Zanesljive in hitre diagnostične metode so pomembne tudi za določanje proteina egerolizina, katerega vloga zaenkrat še ni natančno določena, vendar pa na podlagi dosedanjih ugotovitev lahko sklepamo, da imajo nekateri egerolizini potencial za uporabo v medicinskih aplikacijah. V tej nalogi smo se osredotočili na proizvodnjo monoklonskih protiteles specifičnih za egerolizin RahU, ki ga proizvaja bakterija *P. aeruginosa* PA01.

Ker je egerolizin imunogena molekula, smo skleiali, da bomo z imunizacijo miške z rekombinantnim proteinom egerolizin RahU uspeli aktivirati močan imunski odziv na nivoju limfocitov B. Miško Balb/c smo štirikrat imunizirali z rekombinantnim egerolizinom RahU, ki ga je pripravila Špela Miklavič. Po odvzemu krvi 10 dni po drugi imunizaciji smo v imunskem serumu uspeli dokazati protitelesa proti uporabljenemu antigenu in s tem dokazali, da je bila naša domneva pravilna. Pri zadnji poživitveni imunizaciji, ki smo jo izvedli 20 dni po drugi imunizaciji je miška začela hitro pešati, zato smo jo morali 1 uro po imunizaciji žrtvovati. Vzrok, zakaj je miška po poživitveni imunizaciji tako hitro začela pešati, ni znan.

Po žrtvovanju miške in odvzemu vranice smo naredili fuzijo vraničnih celic z mielomskimi celicami NS1. Po desetih dnevih rasti v selekcijskemu gojišču smo izvedli kloniranje s katerim smo osamili klone hibridomov, ki so izločali protitelesa specifična za rekombinantni RahU. Z razredčevanjem suspenzije celic smo teoretično dosegli, da je v vsaki luknjici mikrotitrsko plošče po 1 celica. Za selekcijo hibridomskih celic, ki so izmed približno 500 vzorcev proizvajala največ protiteles proti našemu antigenu (rekombinantni egerolizin RahU), smo uporabili presejalni test ELISA. Prvi presejalni test smo izvedli 12 dni po fuziji. V preglednici (Preglednica 5) je zbranih 14 najbolj obetavnih hibridomov (1D4, 1B10, 2F1, 2G1, 2F2, 2G2, 3F7, 3A11, 5G2, 5G3, 1B11, 2B1, 2G3 in 3C3). Drugi presejalni test smo naredili 21 dni po fuziji. Izmed prej testiranih 14-ih hibridomov smo najboljše rezultate dobili (najvišja absorbanca) pri hibridomih z oznakami 1B10, 2G1, 2F2 in 5G2.

Po presejalnem testu ELISA smo še s testom DIBA preverili, v katerih supernatantih hibridomov je največ protiteles, ki se vežejo na antigen egerolizin RahU na membrani. Testirali smo 11 supernatantov hibridomov (5G2, 2F2, 2G1, 1D4, 2F1, 1B11, 1B10, 2B1 in 2G3). Izmed vseh testiranih hibridomov sta se kot najboljša izkazala 5G2 in 2F2. Odločili smo se za kloniranje treh hibridomov: 5G2, 2F2 in 1B10.

Po kloniranju smo s testom DIBA testirali supernatante klena 5G2. Na membrano smo nanesli dve redčitvi egerolizina RahU, in sicer 1:100 in 1:500. Pri prejšnjih testiranjih smo namreč ugotovili, da je reakcija pri redčitvi antiga 1:1000 zelo slaba. Kot negativno kontrolo smo

uporabili gojišče s serumom. Kot najboljši smo izbrali klon z oznako 5G2/B3, pri katerem sta bili reakciji pri obeh redčitvah antigena izmed vseh najmočnejši. Za nadaljnjo produkcijo smo izbrali klena 5G2/B3 in 5G2/E3, ostale pa smo zamrznili v tekočem dušiku.

Da smo pridobili mAb 5G2/B3 in 5G2/E3 v čisti obliki, smo jih morali iz supernatanta oboriti z amonijevim sulfatom. Poobarjanju in ultrafiltraciji je volumen vzorcev 5G2/B3 in 5G2/E3 znašal 2,5 ml. Nato smo želeli preveriti ali očiščena mAb reagirajo z rekombinantnim egeroliziom RahU in dokazati, da je protein egeolizin RahU edini, ki se obarva. Na SDS-PAGE elektroforezo smo nanesli dva vzorca rekombinantnega proteina (po čiščenju z metodo FPLC; označena z imenoma frakcija 22 in frakcija 24), ki ga je pripravila Špela Miklavič. Po elektroforezi smo naredili prenos na membrano western. Po prenosu smo jo razrezali na tri enake dele. Prvi trak smo pobarvali z barvilm Coomassie modro. Dobili smo po eno liso pri vsakem vzorcu (Slika 11), s čemer smo dokazali, da je protein egerolizin RahU monomeren, ter da ima molekulsko maso okrog 14 kDa. Drugi in tretji trak pa smo uporabili za imunoencimski test v očiščenih mAb. Drugi trak smo inkubirali v mAb 5G2/B3 (Slika 12 - levo), tretji trak pa v mAb 5G2/E3 (Slika 12 - desno). Na obeh trakovih smo dobili lise na mestih kjer se je nahajal protein in s tem dokazali, da obe očiščeni mAb reagirata z rekombinantnim RahU.

Naš cilj je bil, da bi s pripravljenimi mAb lahko dokazali zvezo med sintezo egerolizina RahU v celicah *P. aeruginosa* ter številom bakterijskih celic. Tega nismo uspeli dokazati, zato smo se odločili, da dokažemo, da lahko z mAb zaznamo egerolizin RahU v celičnemu izatu *P. aeruginosa* PA01 w.t.. Po 8-ih urah gojenja bakterije *P. aeruginosa* PA01 w.t. smo odvzeli vzorec iz erlenmajerice. Vzorec smo dvakrat centrifugirali. Po prvem centrifugiranju smo odstranili supernatant in dodali PBS zato, da smo čim bolj odstranili gojišče. Celice smo zamrznili čez noč. Naslednji dan smo usedlini celic dodali PBS z dodatki (Preglednica 3) in celice sonicirali. S soniciranjem smo razbili celične stene. Ker so celice *P. aeruginosa* sluzaste, smo ugotovili, da soniciranje pripomore tudi k odstranjevanju sluzi. Po soniciranju smo celice ponovno centrifugirali, da smo se znebili ostankov celic, supernatant pa smo prenesli v novo plastično epruvetko. Pripravljen celični izat smo nanesli na SDS-PAGE poleg vzorca rekombinantnega RahU (oznaka Pa-tro; negativna kontrola), gojišča LB (negativna kontrola) in lestvico (proteinski standardi). Naredili smo dva 12% poliakrilamidna gela in na vsak gel nanesli po 4 ponovitve vzorcev. Po končani elektroforezi smo naredili prenos western. Obe membrani smo razrezali na 4 enake dele in dobili 8 trakcev. En trakec smo pobarvali z barvilm Coomassie modro (Slika 11). Na sliki je viden celoten nabor proteinov iz celičnega izata *P. aeruginosa* PA01. Pri molekulski masi približno 14 kDa smo dobili zelo močno liso, kar dokazuje, da je po 8-ih urah gojenja celice bakterije proizvedejo veliko proteina egerolizina RahU. Ostalih 7 trakov smo uporabili za imunoencimsko reakcijo s štirimi supernatanti hibridomov (5G3, 1B10, 2F2, 3A4), katerih nismo klonirali in z dvema očiščenima mAb (5G2/B3 in 5G2/E3) ter gojiščem brez seruma (SFM), ki smo ga uporabili kot negativno kontrolo. Iz Slike 13 je razvidno, da smo z mAb 5G2/B3 in 5G2/E3 uspeli zaznati egerolizin RahU v celičnemu izatu *P. aeruginosa* PA01. Prav tako smo protein zaznali s supernatanti hibridomov, torej s poliklonskimi protitelesi.

5.2 SKLEPI

- Pridobili smo več hibridomov, ki proizvajajo specifična protitelesa proti rekombinantnemu RahU
- Uspeli smo pridobiti dva klena iste družine, ki sta stabilna in proizvajata monoklonska protitelesa proti rekombinantnemu RahU
- Pridobljeni monoklonski protitelesi imata visoko afiniteto do RahU
- Pridobljeni monoklonski protitelesi prepoznavata RahU tudi v celičnemu lizatu bakterije *P. aeruginosa* PA01

6 POVZETEK

Pseudomonas aeruginosa je aerobna, nesporogena, Gram negativna paličasta bakterija, ki pripada družini *Pseudomonadaceae*. Pojav *P. aeruginosa* kot enega izmed glavnih oportunističnih človeških patogenov v zadnjem stoletju bi lahko bila posledica njene odpornosti na antibiotike in dezinfekcijska sredstva, ki uničijo ostale bakterije v okolju.

Egerolizini (PF06355), ki so bili do sedaj odkriti v glivah, bakterijah in rastlinah, predstavljajo družino med seboj zelo podobnih proteinov z različnimi biološkimi lastnostmi. Egerolizinski protein RahU je produkt gena *PA0122* in ga proizvaja bakterija *P. aeruginosa*.

Namen magistrske naloge je bil proizvesti in okarakterizirati monoklonska protitelesa (mAb) proti egerolizinu RahU, ki ga sintetizira bakterija *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Za pridobitev mAb smo uporabili klasično hibridomsko tehnologijo. Z mešanico antigena (rekombinantni RahU) in adjuvansa (Magic™ Mouse Adjuvant, Creative Diagnostics, ZDA) smo miš Balb/c večkrat zapored imunizirali in s tem vzbudili njen imunski odziv. Nato smo miš žrtvovali ter izvedli fuzijo vraničnih in mielomskih celic. S tem smo pridobili hibridome. Le-te smo selekcionirali s presejalnima testoma ELISA in DIBA. Glede na najboljše rezultate na presejalnih testih smo določili hibridome, katere smo klonirali (5G2, 2G1 in 1B10). Po nadaljnjih testiranjih s testom DIBA smo izmed teh izbrali dva klena (5G2/B3 in 5G2/E3), ostale pa smo zamrznili. Z obarjanjem z amonijevim sulfatom smo pridobili čista mAb 5G2/B3 in čista mAb 5G2/E3. Nato smo na SDS-PAGE ločili dva vzorca rekombinantnega RahU (frakcija 22 in frakcija 24). Iz gela smo proteine prenesli na membrano z metodo prenosa western. Membrano smo razrezali na tri enake dele in prvi del pobarvali z barvilom Coomassie modro, da smo določili velikost proteina egerolizin RahU (okrog 14 kDa) in dokazali, da je monomeren. Druga dva trakova smo uporabili za imunske encimsko reakcijo z očiščenima mAb 5G2/B3 in 5G2/E3. Dokazali smo, da mAb specifično prepoznavata protein egerolizin RahU. Da bi dokazali, da mAb prepoznavata protein egerolizin RahU tudi v celičnemu lizatu bakterije *P. aeruginosa* PA01 smo pripravili lizat bakterije po 8-ih urah gojenja. Nanesli smo ga na SDS-PAGE poleg rekombintnega egerolizina RahU (pozitivna kontrola) ter gojišča LB (negativna kontrola). Po končani elektroforezi smo proteine prenesli na membrano s prenosom western in membrano razrezali na 8 enakih delov. Sledil je enak postopek kot prej – en del membrane smo pobarvali z barvilom Coomassie modro s čimer smo zaznali vse proteine, ki so v celičnemu lizatu. Ostalih 7 trakov smo uporabili za imunoencimsko reakcijo z mAb (5G2/B3 in 5G2/E3), širimi supernatanti hibridomov, ki jih nismo klonirali (poliklonska protitelesa) ter gojiščem brez seruma (negativna kontrola). Dokazali smo, da pripravljena mAb prepoznavajo RahU tudi v celičnemu lizatu bakterije *P. aeruginosa* PA01.

7 VIRI

Abbas A.K., Lichtman A.H. 2004. Basic immunology: Functions and disorders of the immune system. 2nd ed. Philadelphia, Saunders: 322 str.

Bavdek A., Kostanjšek R., Antonini V., Lakey J.H., Dalla Serra M., Gilbert R.J.C. & Anderluh G. 2012. pH dependence of listeriolysin O aggregation and pore-forming ability. FEBS Journal 279: 126–141

Berne S., Lah L., Sepčić K. 2009. Aegerolysins: structure, function, and putative biological role. Protein science, 18: 694-706

Burnette, W.N. 1981. “Western blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Analytical biochemistry, 112, 2: 195-203

Elgert K.D. 2009. Immunology: Understanding the immune system. 2nd ed. New Jersey, John Wiley & Sons, Inc: 726 str.

Fernandez Espinar M., Labarere J. 1997. Cloning and sequencing of the *Aa-Pri1* gene specifically expressed during fruiting initiation in the edible mushroom *Agrocybe aegerita*, and analysis of the predicted amino-acid sequence. Current Genetics, 32: 420-424

Goding J. 1996. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. 3rd ed. London, Academic Press: 492 str.

Harlow E., Lane D. 1988. Antibodies: A laboratory manual. 1st ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory: 726 str.

Howard G.C., Kaser M.R. 2007. Making and using antibodies: a practical handbook. Boca Raton, Taylor & Francis Group: 394 str.

Köhler G., Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 256: 495-497

Madigan M.T., Martinko J.M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10th ed. Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall, Pearson Education: 1019 str.

Novak M., Kraševec N., Skočaj M., Maček P., Anderluh G., Sepčić K. 2015. Fungal aegerolysin-like proteins: distribution, activities, and applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 99, 2: 601-610

- Ota K., Leonardi A., Mikelj M., Skočaj M., Wohlschlager T., Künzler M., Aebi M., Narat M., Križaj I., Anderluh G., Sepčić K., Maček P. 2013. Membrane cholesterol and sphingomyelin, and ostreolysin A are obligatory for pore-formation by a MACPF/CDC-like pore-forming protein, pleurotolysin B. *Biochimie* 95: 1855-1864
- Rao J., DiGiandomenico A., Unger J., Bao Y., Polanowska-Grabowska R.K., Goldberg J.B. 2008. A novel oxidized low-density lipoprotein-binding protein from *Pseudomonas a. aeruginosa*. *Microbiology*, 154: 654-665
- Rao J., Elliot M.R., Leitinger N., Jensen R.V., Goldberg J.B., Amin A.R. 2011. RahU: An inducible and functionallz pleiotropic protein in *Pseudomonas aeruginosa* modulates innate immunity and inflammation in host cells. *Cellular immunology*, 270: 103-113
- Samadpour M. 2001. Molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa* in distribution systems. Denver, American Water Works Association: 94 str.
- Siddiqui M.Z. 2010. Monoclonal antibodies as diagnostics; an appraisal. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72, 1: 12-17
- Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrener P., Hickey M.J., Brinkman F.S., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K.-S., Wu Z., Paulsen I.T., Reizer J., Saier M.H., Hancock R.E.W., Lory S., Olson M.V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959-964
- Verma A.S., Singh A. 2013. Animal biotechnology: Models in discovery and translation. San Diego, Academic press: 668 str.
- Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1. izd. Ljubljana, Založba DZS: 552 str.
- Wilson L., Matsudaira P.T., Asai D.J. 1993. Antibodies in cell biology. San Diego, Academic press: 452 str.
- Wilson K., Walker J. 2010. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. 7th ed. New York, Cambridge university press: 744 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mojci Narat za napotke pri delu v celičnem laboratoriju ter pri izdelavi magistrske naloge.

Hvala somentorju prof. dr. Petru Mačku za napotke pri izdelavi magistrske naloge.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Kristini Sepčić za hiter in temeljit pregled magistrske naloge.

Posebej se zahvaljujem dr. Ivanki Cizelj za vso pomoč pri delu v celičnem laboratoriju na Oddelku za zootehniko (Katedra za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo) ter Špeli Miklavič za pomoč pri delu v laboratoriju na Oddelku za biologijo (Katedra za biokemijo).

Hvala mami za vso podporo!