

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maruša HAFNER

**ŽIVOST BAKTERIJSKE KULTURE *Escherichia coli*  
MED PROIZVODNJO IZBRANIH BELJAKOVIN**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Maruša HAFNER

**ŽIVOST BAKTERIJSKE KULTURE *Escherichia coli* MED  
PROIZVODNJO IZBRANIH BELJAKOVIN**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**VIABILITY OF BACTERIAL CULTURE *Escherichia coli* DURING  
THE PRODUCTION OF SELECTED PROTEINS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2008

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za biosintezo in biotransformacijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bila za mentorico diplomskega dela imenovana prof. dr. Romana Marinšek Logar in za recenzenta prof. dr. Gorazd Avguštin.

Mentorica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Recenzent: prof. dr. Gorazd Avguštin

## Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIĆ MULEC  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za  
živilstvo

Članica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Gorazd AVGUŠTIN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Maruša Hafner

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.222:547.96 (043) = 163.6
KG	bakterije/ <i>Escherichia coli</i> /beljakovina TNF-α/beljakovina TNF-β/citokin LK-KI-001/živost bakterij/segregacijska stabilnost plazmidov
AV	HAFNER, Maruša
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/AVGUŠTIN, Gorazd (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2008
IN	ŽIVOST BAKTERIJSKE KULTURE <i>Escherichia coli</i> MED PROIZVODNJO IZBRANIH BELJAKOVIN
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 65 str., 5 pregl., 28 sl., 1 pril., 51 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Med biotehnološkim procesom je pomembno spremljanje bioloških parametrov, kot so celična rast in živost, saj količina proizvedene heterologne beljakovine temelji na številu ter fiziološkem stanju bakterij. V diplomskem delu smo vzpostavili metodo za ugotavljanje živosti bakterij s fluorimetrom. Spremljali smo vpliv proizvodnje beljakovin TNF-α, TNF-β in citokina LK-KI-001 na živost bakterijske kulture <i>Escherichia coli</i> . Živost smo poleg merjenja s fluorimetrom preverili tudi z gojitveno metodo na agarskih ploščah LBPG. Preverili smo tudi segregacijsko stabilnost plazmidov ter delež preučevanih beljakovin v celotnih celičnih beljakovinah. Ugotovili smo, da se rezultati meritev optične gostote ( $OD_{600}$ ) proizvodnega seva za citokin LK-KI-001 ne ujemajo z rezultati meritev CFU/ml, ampak se ujemajo rezultati meritev živosti bakterijskih celic s fluorimetrom in rezultati CFU/ml. Pri proizvodnjem seva za beljakovino TNF-α in proizvodnjem sevu za beljakovino TNF-β pa je ravno obratno, rezultati meritev CFU/ml se ujemajo z rezultati meritev $OD_{600}$ . Pri proizvodnjem sevu za citokin LK-KI-001 celice zelo verjetno preidejo v negoljivo (VBNC) stanje. Možno je, da imajo take bakterije poškodovane membrane in jih propidijev jodid v kitu za spremljanje živostiobarva kot mrtve. Ugotovili smo, da najdlje plazmide zadržijo bakterije z beljakovino TNF-α, ki je večinoma topna v citoplazmi celice, v nasprotju s TNF-β in citokinom LK-KI-001, ki sta v obliki inkluzijskih teles. Zanimivo je, da padcu segregacijske stabilnosti plazmidov proizvodnega seva za citokin LK-KI-001 ne sledi padec deleža citokina v celotnih celičnih beljakovinah, kar je vidno pri proizvodnjem sevu za beljakovino TNF-β. Poleg tega pa rezultati kažejo, da je za visoko raven akumulacije preučenih beljakovin dovolj le 20 % bakterij, ki nosijo zapis za beljakovino, za ohranjanje nivoja beljakovine pa še manj.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579.222:547.96 (043) = 163.6
CX	bacteria/ <i>Escherichia coli</i> /protein TNF-α/protein TNF-β/citokin LK-KI-001/viability of bacteria/segregational plasmid stability
AU	HAFNER, Maruša
AA	MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/ AVGUŠTIN, Gorazd (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY	2008
TI	VIABILITY OF BACTERIAL CULTURE <i>Escherichia coli</i> DURING THE PRODUCTION OF SELECTED PROTEINS
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	XIII, 65 p., 5 tab., 28 fig., 1 ann., 51 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	During fermentation process it is essential to monitor different physiological conditions like cell growth and viability because the amount of recombinant protein depends on physiological state of bacteria. In the graduation thesis a method for monitoring viability of bacteria with fluorescence spectroscopy was developed. We studied the effect of TNF-α, TNF-β and cytokine LK-KI-001 production on viability of <i>E. coli</i> . Besides the fluorescence measurement the viability of <i>E. coli</i> with different proteins was also monitored by viable cell counting on LBPG plates (CFU/ml). In addition, segregational plasmid stability and the accumulation level of recombinant protein as the portion of the total cellular proteins were followed. The results of optical density ( $OD_{600}$ ) of cytokine LK-KI-001 production strain does not match the results of viable cell counting but the results of viability match the results of viable cell counting. The opposite situation was observed in cases of strains for production of TNF-α and TNF-β where the correlation between the results of viable cell counting and the results of $OD_{600}$ is confirmed. In bacterial culture for production of cytokine LK-KI-001 cells are likely to reach VBNC state. It is possible that nonculturable (VBNC) bacteria have damaged membranes, therefore the kit detects them as dead because propidium iodide penetrates only bacteria with damaged membranes. Experimental data show that plasmids are at the farthest retained by protein TNF-α production strain because of TNF-α solubility in cytoplasm whilst TNF-β and cytokine LK-KI-001 are present in inclusion bodies. It is interesting that the drop in segregational plasmid stability does not result in a drop in percentage of the cytokine LK-KI-001 in total cellular proteins which is seen with TNF-β. In addition, the data show that only 20 % of bacteria with the recombinant gene is enough for high accumulation level of recombinant protein and even less to keep the accumulation level of protein.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XII</b>
<b>SLOVARČEK .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA .....	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA .....	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK .....	3
2.1.1 PROIZVODNJA REKOMBINANTNIH BELJAKOVIN .....	3
2.1.1.1 Gostitelj .....	3
2.1.1.2 Plazmidi .....	4
2.1.1.2.1 Regulacija izražanja.....	4
2.1.1.2.2 Stabilnost plazmidov .....	5
2.1.2 PROIZVODNJA REKOMBINANTNIH BELJAKOVIN V BAKTERIJI <i>E. coli</i> .....	6
2.2 CITOKINI.....	9
2.2.1 INTERLEVKINI .....	10
2.2.1.1 Dejavnik tumorske nekroze – TNF .....	10
2.2.1.1.1 TNF- $\alpha$ .....	10

2.2.1.1.2 TNF- $\beta$ .....	11
2.2.2 HEMATOPOETSKI RASTNI DEJAVNIKI .....	12
<b>2.2.2.1 Humani granulocitne kolonije stimulirajoči faktor – hG-CSF .....</b>	<b>12</b>
2.2.3 INTERFERONI - IFN .....	13
<b>2.2.3.1 Interferon alfa 2a - IFN-<math>\alpha</math>2a .....</b>	<b>14</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 MATERIALI.....</b>	<b>15</b>
3.1.1 BAKTERIJSKI SEVI IN PLAZMIDI.....	15
3.1.2 GOJIŠČA ZA <i>E. coli</i> .....	17
<b>3.1.2.1 Gojišče LBP.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.2.2 Gojišče LBPG.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.2.3 Gojišče LBPG/amp100.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1.2.4 Gojišče GYSP.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1.2.5 Agarski gojišči LBPG ter LBPG/amp100 .....</b>	<b>18</b>
3.1.3 RAZTOPINE IN PUFRI .....	19
<b>3.1.3.1 Raztopine za dodatek gojišču .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.3.2 Za NaDS-PAGE smo uporabili sledeče raztopine in pufre .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.3.3 Raztopine in pufri za merjenje živosti s fluorimetrom .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.3.4 Oprema .....</b>	<b>22</b>
<b>3.2 METODE .....</b>	<b>23</b>
3.2.1 SHEMA POSKUSOV .....	23
3.2.2 STERILIZACIJA RAZTOPIN, GOJIŠČ IN STEKLOVINE .....	24
3.2.3 MERJENJE OPTIČNE GOSTOTE BAKTERIJSKE KULTURE .....	24
3.2.4 PRIPRAVA ZALOŽNIH BAKTERIJSKIH SEVOV.....	24
<b>3.2.4.1 Priprava založnih bakterijskih kultur <i>E. coli</i> BL21(DE3), <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET19-b/TNF-<math>\alpha</math>, <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET19-b/dN19TNF-<math>\beta</math> in <i>E. coli</i> BL21(DE3) pET3-a/P-Fopt5 .....</b>	<b>24</b>
3.2.5 PRIPRAVA VCEPKOV TER GOJITEV V GOJIŠČU GYSP ZA PROIZVODNJO BELJAKOVIN.....	25
<b>3.2.5.1 Priprava vcepkov za gojišče GYSP za proizvodnjo želenih beljakovin .....</b>	<b>25</b>

<b>3.2.5.2 Gojitev v gojišču GYSP za proizvodnjo beljakovin .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.6 UGOTAVLJANJE ŽIVOSTI BAKTERIJSKIH CELIC .....</b>	<b>25</b>
<b>    3.2.6.1 Ugotavljanje živosti bakterijskih celic s fluorimetrom .....</b>	<b>25</b>
3.2.6.1.1 Priprava umeritvene krivulje za ugotavljanje živosti celic s fluorimetrom.....	25
3.2.6.1.2 Vzorčenje bakterijske kulture za ugotavljanje živosti celic s fluorimetrom.....	26
3.2.6.1.3 Priprava vzorcev za ugotavljanje živosti celic s fluorimetrom.....	27
3.2.6.1.4 Barvanje bakterijskih celic .....	27
3.2.6.1.5 Meritve s fluorimetrom in analiza pridobljenih podatkov.....	27
<b>    3.2.6.2 Ugotavljanje živosti bakterijskih celic z gojenjem na agarskih ploščah LBPG .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2.7 UGOTAVLJANJE SEGREGACIJSKE STABILNOSTI PLAZMIDOV.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.8 ANALIZA BELJAKOVIN .....</b>	<b>29</b>
<b>    3.2.8.1 Analiza beljakovin z natrijev dodecil sulfat – poliakrilamidno gelsko elektroforezo (NaDS-PAGE) in barvanje z barvilom Colloidal Blue .....</b>	<b>29</b>
3.2.8.1.1 Priprava vzorcev za analizo beljakovin z NaDS-PAGE.....	29
<b>    3.2.8.2 Denzitometrično ugotavljanje deleža posamezne beljakovine v celotnih celičnih beljakovinah .....</b>	<b>30</b>
<b>    3.2.8.3 Ugotavljane topnosti preučevanih beljakovin.....</b>	<b>31</b>
3.2.8.3.1 Razbijanje bakterijskih celic z ultrazvokom - soniciranje.....	31
<b>    3.2.8.4 Analiza beljakovin z NaDS-PAGE in barvanje z barvilom Simply Blue .....</b>	<b>31</b>
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>32</b>
<b>    4.1 USTREZNOST METODE ZA UGOTAVLJANJE ŽIVOSTI CELIC S FLUORIMETROM.....</b>	<b>32</b>
<b>    4.2 ŽIVOST BAKTERIJSKIH CELIC, SEGREGACIJSKA STABILNOST PLAZMIDOV IN DELEŽ CILJNE BELJAKOVINE MED SINTEZO TNF-A .....</b>	<b>35</b>
4.2.1 NaDS-PAGE ANALIZA SEVA Z BELJAKOVINO TNF- α .....	38
4.2.2 DELEŽ BELJAKOVINE TNF-α V CELOTNIH CELIČNIH BELJAKOVINAH .....	39

<b>4.3 ŽIVOST BAKTERIJSKIH CELIC, SEGREGACIJSKA STABILNOST PLAZMIDOV IN DELEŽ CILJNE BELJAKOVINE MED SINTEZO TNF-B .....</b>	<b>40</b>
4.3.1 SEGREGACIJSKA STABILNOST PLAZMIDOV .....	43
4.3.2 NaDS-PAGE ANALIZA SEVA Z BELJAKOVINO TNF- β .....	44
4.3.3 DELEŽ BELJAKOVINE TNF-β V CELOTNIH CELIČNIH BELJAKOVINAH .....	45
<b>4.4 ŽIVOST BAKTERIJSKIH CELIC, SEGREGACIJSKA STABILNOST PLAZMIDOV IN DELEŽ CILJNE BELJAKOVINE MED SINTEZO CITOKINA LK-KI-001 .....</b>	<b>46</b>
4.4.1 NaDS-PAGE ANALIZA SEVA S CITOKINOM LK-KI-001 .....	49
4.4.2 DELEŽ CITOKINA LK-KI-001 V CELOTNIH CELIČNIH BELJAKOVINAH .....	50
<b>4.5 TOPNOST PREUČEVANIH BELJAKOVIN .....</b>	<b>51</b>
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI .....</b>	<b>52</b>
5.1 RAZPRAVA.....	52
5.2 SKLEPI .....	57
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>58</b>
<b>VIRI .....</b>	<b>60</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	
<b>PRILOGA A</b> Vzorec 100-odstotno mrtvih bakterij <i>E. coli</i> BL21(DE3), ubitih z 2-propanolom in pobarvanih z LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit-om.	
<b>PRILOGA B</b> Vzorec 50-odstotno mrtvih bakterij <i>E. coli</i> BL21(DE3), ubitih z 70-odstotnim 2-propanolom in pobarvanih z LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit-om.	
<b>PRILOGA C</b> Vzorec 100-odstotno živih bakterij <i>E. coli</i> BL21(DE3), pobarvanih z LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit-om.	

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica 1: Barvanje beljakovin z barvilom Colloidal Blue .....	30
Preglednica 2: Barvanje beljakovin z barvilom SimplyBlue SafeStain.....	31
Preglednica 3: Spreminjanje deleža beljakovine TNF- $\alpha$ v celotnih celičnih beljakovinah v odvisnosti od časa.....	39
Preglednica 4: Spreminjanje deleža beljakovine TNF- $\beta$ v celotnih celičnih beljakovinah v odvisnosti od časa.....	45
Preglednica 5: Spreminjanje deleža citokina LK-KI-001 v celotnih celičnih beljakovinah v odvisnosti od časa.....	50

## KAZALO SLIK

Slika 1: Inkluzijska telesa v celicah <i>E. coli</i> .....	8
Slika 2: 3d-struktura TNF- $\alpha$ . ....	11
Slika 3: Struktura molekule $\Delta N19$ TNF- $\beta$ .....	12
Slika 4: Plazmid pET-19b (Novagen, 1998a).....	15
Slika 5: Plazmid pET-3a (Novagen, 1998b).....	16
Slika 6: Novex® Sharp Protein Standard (Invitrogen) .....	21
Slika 7: Shema poskusov.....	23
Slika 8: Emisijski spektri in umeritvena krivulja (Invitrogen) .....	28
Slika 9: Primer umeritvene krivulje, pripravljene s sevom brez plazmida, $OD_{600} \sim 5,0$ ....	32
Slika 10: Primer umeritvene krivulje, pripravljena s sevom brez plazmida, $OD_{600} \sim 2,5$ ...	33
Slika 11: Primer umeritvene krivulje, pripravljena s sevom brez plazmida, $OD_{600} \sim 1$ .....	33
Slika 12: Primer spektra oddane svetlobe vzorca, ki je vseboval 100-odstotno žive bakterije ( $OD_{600} \sim 1$ ).....	34
Slika 13: Primer spektra oddane svetlobe vzorca, ki je vseboval 100-odstotno mrtve bakterije, ubite s 70-odstotnim 2-propanolom ( $OD_{600} \sim 1$ ). ....	34
Slika 14: Rast in živost bakterijske kulture <i>E. coli</i> pri proizvodnji beljakovine TNF- $\alpha$ ...	36
Slika 15: Rast bakterijske kulture <i>E. coli</i> , segregacijska stabilnost plazmidov in delež beljakovine TNF- $\alpha$ .....	37
Slika 16: NaDS-PAGE analiza seva z beljakovino TNF- $\alpha$ , 1. del (vzorci A in B od 2 do 8 ur rasti).....	38
Slika 17: NaDS-PAGE analiza seva z beljakovino TNF- $\alpha$ , 2. del (vzorci A in B od 10 do 16 ur rasti).....	39
Slika 18: Rast bakterijske kulture <i>E. coli</i> , živost celic, segregacijska stabilnost plazmidov ter delež beljakovine TNF- $\beta$ .....	41
Slika 19: Rast in živost bakterijske kulture <i>E. coli</i> pri proizvodnji beljakovine TNF- $\beta$ ....	42
Slika 20: Segregacijska stabilnost plazmidov po 4 urah rasti seva z beljakovino TNF- $\beta$ ... .	43
Slika 21: Segregacijska stabilnost plazmidov po 10 urah rasti seva z beljakovino TNF- $\beta$ . .	43
Slika 22: NaDS-PAGE analiza seva z beljakovino TNF- $\beta$ , vzorci A (od 2 do 17 ur rasti). .	44
Slika 23: NaDS-PAGE analiza seva z beljakovino TNF- $\beta$ , vzorci B (od 2 do 17 ur rasti). .	45
Slika 24: Rast in živost bakterijske kulture <i>E. coli</i> pri proizvodnji citokina LK-KI-001....	47

Slika 25: Rast bakterijske kulture <i>E. coli</i> , segregacijska stabilnost plazmidov in delež citokina LK-KI-001.....	48
Slika 26: NaDS-PAGE analiza seva s citokinom LK-KI-001, 1. del (vzorci A in B od 3 do 12 ur rasti).....	49
Slika 27: NaDS-PAGE analiza seva s citokinom LK-KI-001, 2. del (vzorci A in B od 15 do 24 ur rasti).....	50
Slika 28: NaDS-PAGE analiza vzorcev sevov z različnimi beljakovinami po soniciranju.	51

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Amp	ampicilin
ang.	angleško
BL21(DE3)	bakterijski sev <i>E. coli</i>
<i>bla</i>	gen za $\beta$ -laktamazo
bp	bazni par
CFU	število kolonijskih enot (ang. colony forming units)
Da	dalton, enota za molekulsko maso
dN19TNF- $\beta$	TNF- $\beta$ na N-terminalnem koncu skrajšan za 19 AK
DNK	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
hG-CSF	humanji granulocitne kolonije stimulirajoči faktor
IFN- $\alpha$ 2a	interferon alfa 2a
IPTG	izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozid
kDa	kilo Da (1000 Da)
LT- $\alpha$	limfotoksin alfa
mRNK	sporočilna ribonukleinska kislina (ang. messenger ribonucleic acid)
NaDS-PAGE	natrijev dodecil sulfat poliakrilamidna gelska elektroforeza
OD <sub>600</sub>	optična gostota, merjena pri valovni dolžini 600 nm (ang. optical density)
<i>P-Fopt5</i>	optimiran gen za citokin LK-KI-001
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije ionov H <sub>3</sub> O <sup>+</sup>
ppGpp	gvanozin tetrafosfat
RNK	ribonukleinska kislina
TNF- $\alpha$	dejavnik tumorske nekroze $\alpha$ (ang. tumor necrosis factor $\alpha$ )
TNF- $\beta$	dejavnik tumorske nekroze $\beta$ (ang. tumor necrosis factor $\beta$ )
<i>traT</i>	gen, ki kodira lipoprotein v zunanjih membrani
VBNC	žive, vendar negojljive (ang. viable but non-culturable)

## SLOVARČEK

- TNF- $\alpha$**  TNF- $\alpha$  je glavni posrednik akutnega vnetnega odziva na gram negativne bakterije in druge infektivne mikrobe. Najpomembnejši fiziološki učinek TNF- $\alpha$  pri nizki koncentraciji je lokalno delovanje na endoteljske celice in na levkocite, tako da se levkociti nakopičijo v vnetišču. V večjih količinah učinkuje sistemsko kot endokrini hormon in inducira povišano telesno temperaturo ter poveča izločanje nekaterih beljakovin akutne faze. Pri zelo velikih koncentracijah pa povzroči septični šok (Abbas in sod., 2000).
- TNF- $\beta$**  TNF- $\beta$  je v primerjavi s TNF- $\alpha$  veliko manj raziskan. Pomemben je pri razvoju limfoidnih organov, sodeluje v vnetnem procesu, saj so dokazali mRNK molekule TNF- $\beta$  na mestu vnetja ter njegovo izločanje ob prisotnosti patogenih organizmov.
- hG-CSF** Humani granulocitne kolonije stimulirajoči faktor je citokin, ki sodi med hematopoetske rastne faktorje in je nujno potreben za zorenje krvnih celic. Vzpodbuja proliferacijo kolonij nevtrofilcev, diferenciacijo prekurzorskih celic v nevtrofilce in stimulira aktivacijo zrelih nevtrofilcev, ki imajo pomembno vlogo pri zaščiti telesa pred infekcijami (Anderlini in sod., 1996).
- Segregacijska stabilnost** Segregacijska stabilnost plazmidov je pojem, ki opisuje razporejanje plazmidov med bakterijske hčerinske celice. Kultura je segregacijsko stabilna, ko vse hčerinske celice dobijo vsaj en plazmid med celično delitvijo (Jana in Deb, 2005).

## 1 UVOD

Tehnologija rekombinantne DNK ponuja številne možnosti izražanja heterolognih beljakovin v mikroorganizmih. Kljub temu pa v praksi naletimo na številne ovire, kot so zmanjšana celična rast oziroma živost, izguba plazmidov, majhna proizvodnja beljakovin ter slaba kvaliteta produkta (Özkan in sod., 2005). Med biotehnološkim procesom je zato pomembno spremljanje bioloških parametrov, kot so celična rast, živost ter tvorba produkta, saj količina heterologne beljakovine temelji na številu ter fiziološkem stanju bakterij.

### 1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Pri proizvodnji rekombinantnih beljakovin sta poleg celične rasti in živosti pomembni tudi visoko izražanje heterologne beljakovine ter segregacijska stabilnost plazmidov (Baneyx, 1999). Poleg tega, da je velika segregacijska stabilnosti plazmidov pomembna za čim večjo proizvodnjo heterologne beljakovine, pa je pomembna tudi zaradi čim manjše uporabe antibiotikov pri proizvodnji rekombinantnih farmacevtskih učinkovin, zaradi možnosti prenosov rezistenc, onesnaževanja okolja in potrebe po popolnem odstranjevanju antibiotika iz končnih proizvodov. Tako je za proizvodnjo rekombinantnih beljakovin za farmacevtsko rabo potrebna visoka segregacijska stabilnost plazmidov, da na koncu procesa fermentacije čim več bakterij vsebuje plazmid z zapisom za heterologno beljakovino.

### 1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V diplomskem delu smo poskušali vzpostavili metodo za ugotavljanje živosti bakterij z uporabo LIVE/DEAD BacLight Viability Kit-a (Invitrogen) z meritvami na fluorimetru. Po vzpostavitvi metode pa smo z meritvami vzorcev bakterijske kulture na fluorimetru ter gojenjem vzorcev bakterijske kulture na agarskih ploščah LBPG poskušali ugotoviti, ali bi lahko bila visoka raven izražene rekombinantne beljakovine tudi posledica negojljivih bakterij. Na podlagi rezultatov predhodnih raziskav je znano, da se citokin LK-KI-001

izloča v obliki inkluzijskih teles v citoplazmi bakterije, kar predstavlja stres za bakterijo. Tako smo z ugotavljanjem živosti bakterij med bioprocесом žeeli dobiti podatke o dejanski segregacijski stabilnosti, saj izguba plazmidov pomeni izgubo zapisa za rekombinantno beljakovino, ne pa tudi izgubo živosti. Poleg tega smo v raziskave vključili tudi sev z beljakovino TNF- $\alpha$  in sev z beljakovino TNF- $\beta$ , saj smo poskušali ugotoviti tudi razlike v živosti sevov ter segregacijski stabilnosti plazmidov na podlagi tega, ali se beljakovina izraža v topni obliku ali v obliku inkluzijskih teles.

### 1.3 DELOVNE HIPOTEZE

V diplomskem delu smo žeeli preveriti sledeče hipoteze:

- Vpliv na rekombinantni sev je različen glede na to, ali se beljakovina izraža v topni obliku ali pa v obliku inkluzijskih teles.
- Beljakovine, ki se izražajo v obliki inkluzijskih teles, imajo večji vpliv na živost bakterij kot beljakovine, ki se izražajo v topni obliku.
- Visoka raven izražene rekombinantne beljakovine je tudi posledica prisotnosti negojljivih bakterij.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 TEHNOLOGIJA REKOMBINANTNE DNK

Tehnologija rekombinantne DNK je v zadnjem času ena od najhitreje razvijajočih se znanstvenih smeri. Omogoča prenos genetskih elementov med sorodnimi in manj sorodnimi organizmi. Razvoj te tehnologije je pomemben tudi za proizvodnjo rekombinantnih farmacevtskih učinkovin (farmacevtska biotehnologija oz. biofarmacevtika), saj metoda omogoča proizvodnjo človeških beljakovin, ki imajo pomembno vlogo pri zdravljenju različnih bolezni, za katere ni drugih učinkovitih zdravil. Take rekombinantne beljakovine so citokini, hormoni, encimi, faktorji strjevanja krvi, monoklonska protitelesa ter beljakovine, uporabljene v različnih cepivih (Vozelj, 2000; Kristl, 2007).

#### 2.1.1 PROIZVODNJA REKOMBINANTNIH BELJAKOVIN

Večina dela pri pripravi rekombinantnih beljakovin temelji na molekularnem kloniraju, kjer lahko katerikoli genetski element vnesemo v vektor, le-tega pa v ustrezenega gostitelja (bakterije, kvasovke, celične linije, rastline, živali), kjer se nato vstavljeni gen izraža. Najpogosteje uporabljeni vektorji za prenos manjših molekul genetskega materiala so plazmidi, ki so izvenkromosomske molekule DNK in se podvajajo neodvisno od kromosoma. Poleg plazmidov se uporablja tudi infekcija celic z virusi. Za prenos večjih molekul ter pri vnosu DNK v celice drugih organizmov pa se uporablja elektroporacija, mikroinjiciranje, mikrobombardiranje ter lipofekcija (Capecchi, 1980; Dower in sod., 1988; Felgner in sod., 1987; Klein in sod., 1987).

##### 2.1.1.1 Gostitelj

Visoka produkcija beljakovine je v veliki meri odvisna od izbranega organizma, v katerem pride do izražanja. Izberemo lahko prokariontske organizme (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, ...) ali pa evkariontske sisteme, od katerih so v uporabi kvasovke (*Pichia pastoris*,

*Saccharomyces cerevisiae*, ...), filamentozne glive, celice insektov, tkivne kulture sesalcev ali pa transgene živali in rastline (Cereghino in Cregg, 2000; Yin in sod., 2007).

Pomembni dejavniki pri izboru gostiteljskega organizma so celična rast, nivo izražanja beljakovine, mesto izražanja (znotrajcelično oz. zunajcelično), posttranslacijske modifikacije, način izolacije beljakovine ter ekomska dostopnost (Makrides, 1996).

### 2.1.1.2 Plazmidi

#### 2.1.1.2.1 Regulacija izražanja

Organizmi imajo zapletene regulacijske sisteme, zato se veliko kloniranih genov v nesorodnem gostitelju ne izraža dobro. Naravni promotor kloniranega gena lahko deluje slabo ali pa v nesorodnem gostitelju sploh ne deluje. Zato so oblikovali vektorje izražanja (ang. expression vector), ki poleg želenega gena vsebujejo tudi vse regulacijske mehanizme za potrebno izražanje (Madigan in sod., 2003). Ti vektorji vsebujejo močne promotorje, tako da rekombinantna beljakovina lahko predstavlja od 10 do 30 % ali celo več vseh celičnih beljakovin.

Pri produkciji rekombinantnih beljakovin je pomembna dobra regulacija promotorja tarčnega gena, saj so nekatere izražene beljakovine lahko usodne za gostiteljsko celico. Dobri promotorji imajo zato nizek nivo osnovnega izražanja, v nekaterih primerih pa je ostra regulacija promotorja nepomembna, kajti že majhne količine produkta drastično zmanjšajo preživetje bakterij. Take so na primer molekule, ki inaktivirajo ribosome ali vplivajo na membranski potencial (Makrides, 1996). Toksičnosti za gostiteljski organizem pa ne predstavljajo vedno tuji geni, ampak je za celico lahko usodno tudi preveliko izražanje lastnih genov. Tak je na primer *traT*, ki kodira lipoprotein v zunanji membrani (Makrides, 1996). Visok nivo osnovnega izražanja promotorja lahko povzroči tudi nestabilnost plazmidov, zmanjšano hitrost celične rasti ter posledično izgubo produkcije rekombinantne beljakovine.

Uporaba izopropil- $\beta$ -D-tiogalaktopiranozida (IPTG) kot induktorja je razširjena za raziskave v laboratorijskem merilu, za produkcijo večjih količin človeških terapevtskih

beljakovin pa je nezaželen zaradi svoje toksičnosti in previsoke cene (Makrides, 1996). Namesto IPTG lahko kot induktor uporabimo laktozo ali pa oblike *LacI* represorja, ki dovolijo toplotno indukcijo (Baneyx, 1999). Za razliko od IPTG, ki ga celice privzamejo simultano, pa je pri lakozi problem transport v celico. Potrebno je omejiti vir ogljika, da sploh pride do privzema, poleg tega pa je potrebna ravno prava količina lakoze, da zagotovimo visoko produkcijo rekombinantne beljakovine (Cserjan-Puschmann in sod., 2002).

V zadnjem času so za kloniranje in izražanje rekombinantnih beljakovin v *E. coli* vse bolj v uporabi pET plazmidi. Tarčni gen v pET plazmidu je pod kontrolo močnega transkripcijskega in translacijskega signala bakteriofaga T7. Njegovo izražanje sprožimo z virom T7 RNK polimeraze, zapisane na kromosomu gostiteljske celice, ki je običajno kontrolirana z IPTG inducibilnim promotorjem *lacUV5*. T7 RNK polimeraza je tako selektivna in aktivna, da celica skoraj popolnoma preusmeri sintezo lastnih beljakovin v sintezo tarčne beljakovine, ki lahko doseže tudi do 50 % vseh celičnih beljakovin le nekaj ur po indukciji (Novagen, 2006).

Tako visoka produkcija pa ima tudi slabosti, saj veliko število mRNK lahko povzroči uničenje ribosomov ter celično smrt. Promotor *lacUV5* je tako močan, da lahko prihaja do osnovnega izražanja heterologne beljakovine celo v odsotnosti IPTG, kar pa se lahko izrazi v segregacijski nestabilnosti plazmidov in posledično manjši produkciji tarčne beljakovine. Poleg tega so lahko v prisotnosti IPTG celo pET plazmidi brez zapisa za heterologno beljakovino toksični za celico (Baneyx, 1999; Novagen, 2006).

#### 2.1.1.2.2 Stabilnost plazmidov

Za dobro produktivnost tarčne beljakovine moramo zagotoviti struktурно in segregacijsko stabilnost plazmidov. Strukturna nestabilnost plazmidov je posledica sprememb v zaporedju baz zaradi insercij, delecij ter točkovnih mutacij. Če pride do mutacij v strukturnih ali regulatornih genih rekombinantne beljakovine, je posledično zmanjšana produkcija, lahko pa se izrazijo le fragmenti beljakovine (Friehs, 2004). Segregacijska stabilnost plazmidov je pojem, ki opisuje razporejanje plazmidov med bakterijske

hčerinske celice. Kultura je segregacijsko stabilna, ko vse hčerinske celice dobijo vsaj en plazmid med celično delitvijo (Jana in Deb, 2005).

Plazmidi predstavljajo metabolno breme za celico, zato imajo celice brez plazmida večjo hitrost rasti ter laže preživijo v primerjavi s celicami s plazmidom. Na manjšo hitrost rasti celic s plazmidom vpliva represija določenih genov za biosintezo ter spremenjeno izražanje genov za transport hrani, poveča pa se izražanje genov, povezanih s topotnim šokom (Siak-Wei Ow in sod., 2006). Če v začetku gojenja naraste populacija celic brez plazmida, lahko na koncu dobimo veliko biomase, vendar nič rekombinantne beljakovine, saj celice brez plazmida popolnoma prerastejo tiste s plazmidom.

Najugodnejša metoda povečanja segregacijske stabilnosti plazmidov je dodatek antibiotika oz. toksične snovi v rastni medij, na katerega so celice odporne zaradi genov, lociranih na plazmidu. Celice brez plazmida tako odmrejo. Vendar pa veliko plazmidov, tudi komercialno dostopnih vektorjev, nosi gen *bla* za encim  $\beta$ -laktamazo, ki razgrajuje laktamazni obroč beta-laktamskih antibiotikov (ampicilin, cefalosporin, penicilin ipd.). Izražanje gena vodi do izločanja encima v medij, zato ima ampicilin stabilizirajoč učinek le v lag fazì ter v začetku eksponentne faze, nato pa ga encim razgradi (Baneyx, 1999; Friehs, 2004). Poleg tega uporaba antibiotikov v rastnem mediju, kljub temu da je v laboratorijskih pogojih široko razširjena, ni zaželena v industrijskem merilu zaradi možnosti prenosov rezistenc in onesnaževanja okolja.

### 2.1.2 PROIZVODNJA REKOMBINANTNIH BELJAKOVIN V BAKTERIJI *E. coli*

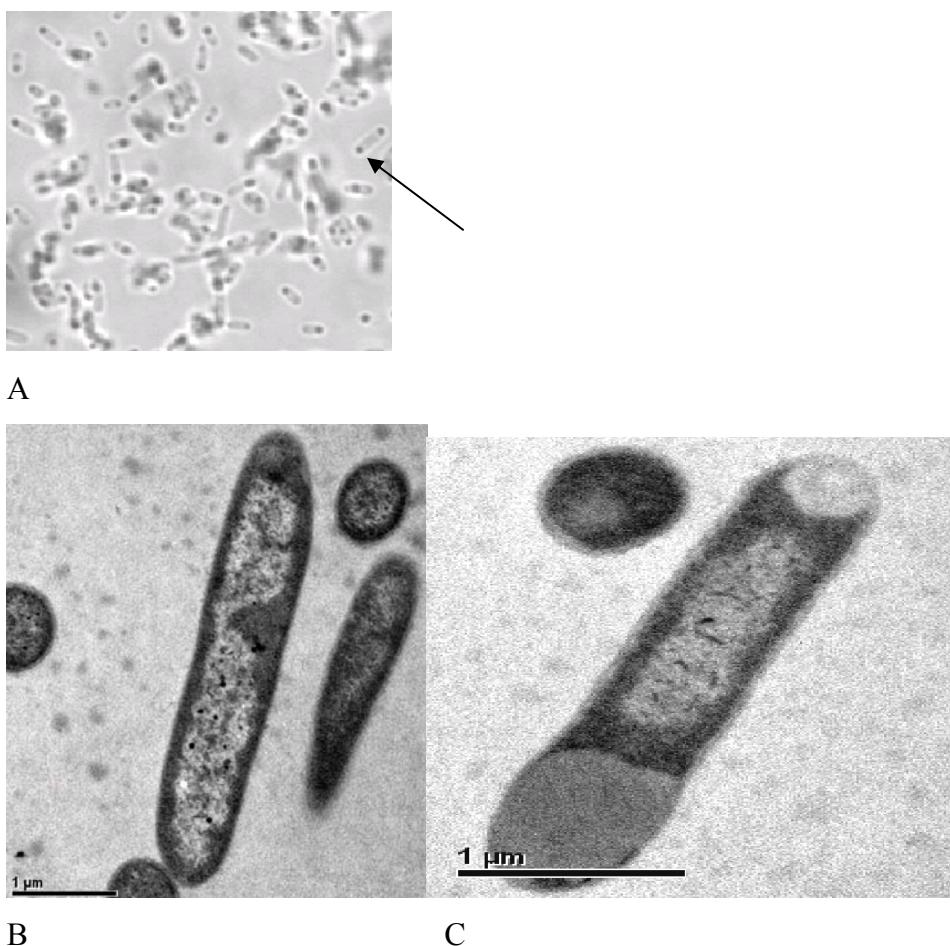
Med številnimi sistemi za izražanje heterolognih beljakovin je bakterija *E. coli* primerna zaradi hitre rasti, enostavnega gojenja na poceni substratih, dobro poznane genetike ter enostavne genetske manipulacije in dostopnosti vedno večjega števila primernih vektorjev ter mutantov (Baneyx, 1999).

Kljub dobro poznani genetiki ter molekularni biologiji *E. coli* pa ta ni primerna za izražanje kateregakoli gena. To pa zaradi edinstvenih strukturnih lastnosti zaporedja genov, stabilnosti ter translacijske učinkovitosti mRNK, enostavnosti zvijanja beljakovin,

razgradnje beljakovin s celičnimi proteazami, velikih razlik v genetskem kodu med tujim genom in *E. coli* ter potencialno toksičnostjo heterologne beljakovine za celico (Jana in Deb, 2005).

Največje slabosti *E. coli* kot sistema za izražanje heterolognih beljakovin pa vključujejo nezmožnost posttranslacijskih modifikacij, ki jih najdemo pri beljakovinah evkariontov, pomanjkanje mehanizmov izločanja beljakovine v medij ter omejene možnosti tvorbe disulfidnih vezi. V gostih kulturah pa je pomemben tudi nastanek velikih količin acetata, kar omeji celično rast (Jana in Deb, 2005).

Beljakovino lahko pridobivamo v citoplazmi, periplazmi, na celični površini ali v gojišču izven celice (Jevnikar, 2007). Beljakovina se v citoplazmi lahko kopiči v topni obliki ali pa kot inkluzijska telesa. Inkluzijska telesa so agregati pravilno in nepravilno zvitih beljakovin, ki se v rekombinantnih bakterijah pojavijo kot posledica izražanja kloniranih genov. V inkluzijskih telesih so beljakovine sicer zaščitene pred razgradnjo z gostiteljevimi proteazami, vendar je do nedavnega veljalo, da inkluzijska telesa predstavljajo oviro za pridobivanje rekombinantnih beljakovin v topni ter funkcionalni obliki (Carrió in Villaverde, 2002). Novejši podatki pa kažejo, da lahko tudi v inkluzijskih telesih pridobimo funkcionalne in biološko aktivne beljakovine (Jevševar in sod., 2005; Tsumoto in sod., 2003; Villaverde in sod., 2000; Tokatlidis in sod., 1991; Worral in Goss, 1989).



Slika 1: Inkluzijska telesa v celicah *E. coli*. Na sliki A so inkluzijska telesa, ki jih označuje puščica (svetlobna mikroskopija). Na sliki B je celica *E. coli*, posneta z elektronskim mikroskopom in nima prisotnih inkluzijskih teles. Na sliki C (elektronska mikroskopija) so inkluzijska telesa, vidna v celici *E. coli* kot odebeline in drugačna gostota celice. Slike so bile posnete na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, Oddelek za biosintezo in biotransformacijo.

Molekularni šaperoni so nujni za pravilno zvijanje celičnih beljakovin, tako pri fizioloških kot pri stresnih pogojih. Producija rekombinantnih beljakovin v inkluzijskih telesih *E. coli* sproži kar nekaj stresnih odzivov, ki se vmešavajo v primarni metabolizem ter sintezo beljakovin. Največkrat se sproži odziv toplotnega šoka (LeThanh in sod., 2005). Beljakovine toplotnega šoka (šaperoni in proteaze) vplivajo na proteolizo ter agregacijo, kajti aktivno odstranjujejo agregirane polipeptide iz beljakovinskih depozitov za novo zvijanje oziroma razgradnjo. Dokazali so, da je prisotnost inkluzijskih teles v odsotnosti

glavnih funkcionalnih šaperonov DnaK ter GroEL pogubna za bakterijske celice (González-Mantálban in sod., 2005).

Kot odziv na povečano izražanje rekombinantnih beljakovin se lahko pojavijo tudi razlike v donosu biomase ter razlike v porabi kisika, sekreciji stranskih produktov, tvorbi gvanozin tetrafosfata (ppGpp) ter beljakovin, ki so posledica stresa, spremeni se lahko tudi število encimov, potrebnih pri metabolnih poteh in nastopijo spremembe v energetskem stanju celice (Özkan in sod., 2004).

## 2.2 CITOKINI

Citokini so polipeptidne efektorske molekule, ki jih izločajo skoraj vse celice, predvsem pa limfociti in makrofagi. Uravnavajo razmnoževanje, diferenciacijo, efektorske funkcije in preživetje celic. Vežejo se s specifičnimi receptorji na membrani tarčne celice in sprožijo signal, ki se prenese v notranjost celice in spremeni izražanje genov v njej. Najpomembnejša lastnost citokinov je pleiotropnost, kar pomeni, da v različnih tarčnih celicah sproščajo različne biološke učinke (Vozelj, 2000). Njihova vloga je pomembna v procesu naravne imunosti, pri uravnovanju aktivacije, rasti in diferenciacije limfocitov, pri vnetnih procesih, ki izzovejo imunski sistem, ter pri hematopoezi. V skupino citokinov spadajo interlevkini in interferoni, zraven pa še hematopoetski dejavniki, rastni dejavniki ter kemokini (Kristl, 2007).

V nasprotju s hormoni, ki delujejo na celico v oddaljenem kraju telesa (endokrino), večina citokinov deluje lokalno. Nekateri citokini se lahko vežejo z receptorji na membrani iste celice, ki jih izloča, in delujejo avtokrino. Ponavadi pa se vežejo na receptorje tarčnih celic, ki so v neposredni bližini celice, ki jih izloča, in delujejo parakrino (Vozelj, 2000).

Producija beljakovin v *E. coli*, ki inaktivirajo ribosome ali pa uničijo membranski potencial pa tudi nekaterih drugih, je lahko usodna za celico, če njihovo izražanje ni strogo regulirano (Makrides, 1996). Za razliko od teh beljakovin pa producija različnih citokinov za bakterijo ne predstavlja neposredne toksičnosti.

## 2.2.1 INTERLEVKINI

### 2.2.1.1 Dejavnik tumorske nekroze – TNF

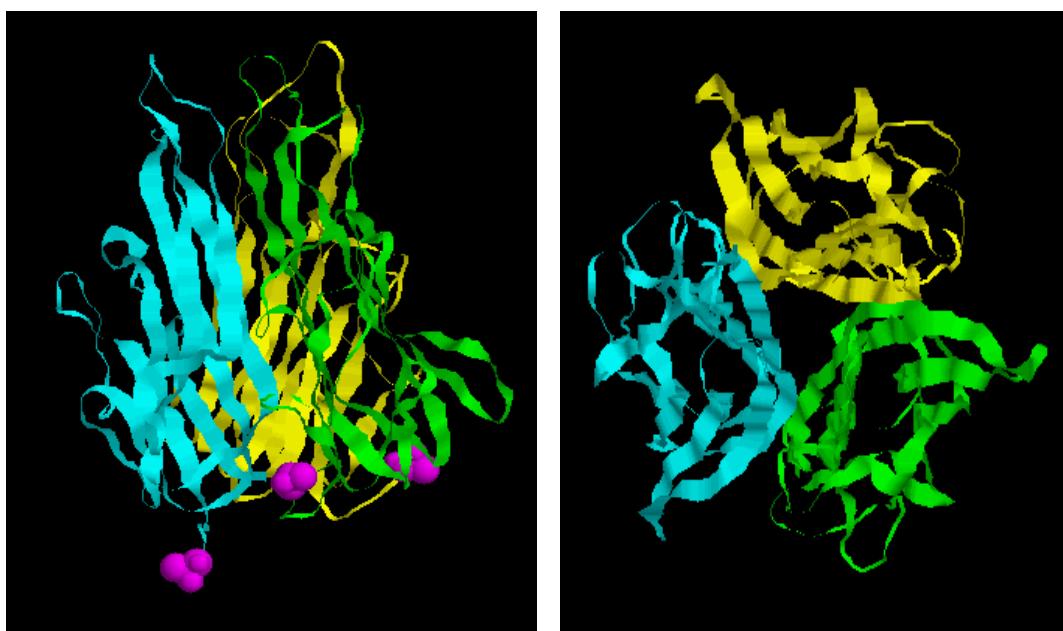
Dejavnik tumorske nekroze ali TNF (ang., tumor necrosis factor) obstaja v dveh oblikah; TNF- $\alpha$  in TNF- $\beta$ . TNF- $\alpha$  večinoma izdelujejo aktivirani makrofagi, medtem ko sorodni citokin TNF- $\beta$  izločajo aktivirani limfociti. TNF- $\beta$  imenujemo tudi limfotoksin alfa (LT- $\alpha$ ). Oba delujeta preko istih receptorjev in imata podobne učinke, toda pri tem sprožita različne učinke glede na vrsto celic, na katere delujeta (Kristl, 2007).

#### 2.2.1.1.1 TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  je glavni posrednik akutnega vnetnega odziva na gram negativne bakterije in druge infektivne mikrobe in je odgovoren za večino sistemskih komplikacij pri resnih infekcijah.

Pri nizki koncentraciji ( $<10^{-9}$  M) TNF- $\alpha$  deluje lokalno na endotelijalne celice in na levkocite, tako da se levkociti nakopičijo v vnetišču, kar je verjetno najpomembnejši fiziološki učinek. V večjih količinah učinkuje sistemsko kot endokrini hormon in inducira povišano telesno temperaturo ter poveča izločanje nekaterih beljakovin akutne faze. Pri zelo velikih koncentracijah ( $\geq 10^{-7}$  M) pa povzroči septični šok (Abbas in sod., 2000).

V makrofagih se TNF- $\alpha$  sintetizira kot neglikozilirana homotrimerna membranska beljakovina, ki je v membrano vključen z dolgim N-koncem. To membransko obliko cepi na membrano vezana metaloproteinaza, tako da je v krvnem obtoku TNF- $\alpha$  v obliki homotrimera, ki je tudi aktivna oblika (Abbas in sod., 2000).

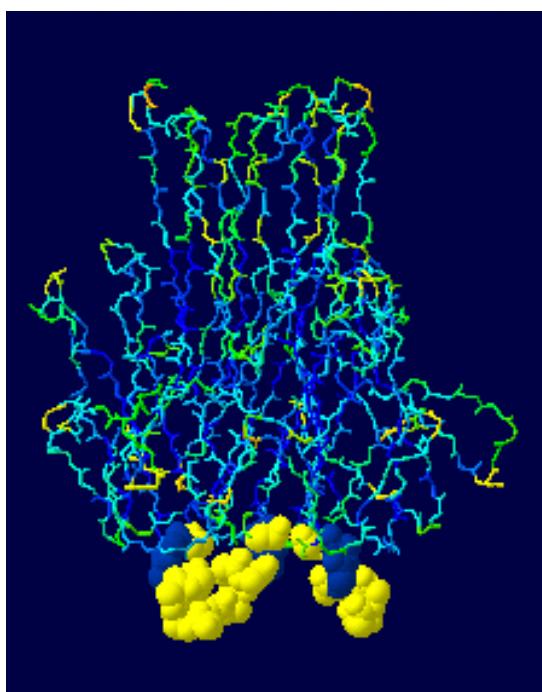


Slika 2: 3d-struktura TNF- $\alpha$ . Podenote so obarvane modro, zeleno in rumeno. Levo: pogled na molekulo od strani, vijolično so označeni N-konci posameznih podenot. Desno: pogled na molekulo od zgoraj. Slike so bile posnete na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, Oddelek za biosintezo in biotransformacijo.

Za farmacevtsko industrijo je TNF- $\alpha$  zanimiv predvsem zaradi protitumorskega delovanja, saj ima neposreden učinek na tumorske celice. Vezava na TNF-receptor (ti so na vseh celicah, razen na eritrocitih) povzroči apoptozo ali pa nekrozo (Kenig, 2006). Od leta 1999 je TNF- $\alpha$  (tasonermin, Beromun®) registriran za zdravljenje sarkoma mehkega tkiva okončin (EMEA, 2000).

#### 2.2.1.1.2 TNF- $\beta$

Aktivna oblika TNF- $\beta$  je tako kot pri TNF- $\alpha$  homotrimer. Podenote se zlepijo okrog trištevnne osi simetrije in tvorijo trimer zvonaste oblike (Ruddle in Ware, 2000).



Slika 3: Struktura molekule  $\Delta N19$  TNF- $\beta$ . Z rumeno so označeni histidinski ter hidrofobni konci, z modro pa hidrofilni konci (nabiti in polarni). Slika je bila posneta na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, Oddelek za biosintezo in biotransformacijo.

TNF- $\beta$  je v primerjavi s TNF- $\alpha$  veliko manj raziskan. O njegovi fiziološki vlogi sklepajo iz poskusov na živalih. Pomemben je pri razvoju limfoidnih organov, sodeluje v vnetnem procesu, saj so dokazali mRNA molekule TNF- $\beta$  na mestu vnetja ter njegovo izločanje ob prisotnosti patogenih organizmov. Vendarle pa ima TNF- $\beta$  manjšo vlogo pri vnetnem odzivu kot TNF- $\alpha$ . Neposredno deluje tudi na tumorske celice, saj z vezavo na receptor tarčne celice sproži proces apoptoze (Ruddle in Ware, 2000).

## 2.2.2 HEMATOPOETSKI RASTNI DEJAVNIKI

### 2.2.2.1 Humani granulocitne kolonije stimulirajoči faktor – hG-CSF

Humani granulocitne kolonije stimulirajoči faktor je citokin, ki sodi med hematopoetske rastne faktorje in je nujno potreben za zorenje krvnih celic. Deluje v mieloidni liniji hematopoeze, kjer vzpodbuja proliferacijo kolonij nevtrofilcev, diferenciacijo

prekurzorskih celic v nevtrofilce in stimulira aktivacijo zrelih nevtrofilcev, ki imajo pomembno vlogo pri zaščiti telesa pred infekcijami (Anderlini in sod., 1996).

Filgrastim je rekombinantna oblika granulocitne kolonije stimulirajočega dejavnika (rG-CSF) (Doljak, 2007). Razvoj filgrastima za terapevtsko uporabo se je pričel leta 1986 z njegovim kloniranjem. Dovoljenje za klinično uporabo pri rakastih pacientih, ki so bili zdravljeni s kemoterapijo, je bilo podeljeno v ZDA v februarju 1991 (Welte in sod., 1996).

Filgrastim so sprva uporabljali kot dodatek kemoterapiji za izboljšanje stanja nevtropenije, ki je eden glavnih stranskih učinkov kemoterapije raka. Kemoterapije, ki so široko v rabi za zdravljenje rastočih tumorjev, ne inhibirajo le rasti tumorjev, ampak tudi produkcijo nevtrofilcev, kar povzroča mnoge stranske učinke zaradi zmanjšane zaščitne funkcije nevtrofilcev. Uporaba rekombinantnega hG-CSF pri pacientih, ki so podvrženi takšni kemoterapiji, je zelo učinkovit način preprečevanja infekcijskih bolezni, ker omogoča naraščanje števila nevtrofilcev na raven, ki je nujna za zaščitno delovanje (Welte in sod., 1996).

### 2.2.3 INTERFERONI - IFN

Interferoni, ki ostanejo aktivni v kislem, sodijo k tipu I interferonov, tisti, ki v kislem zgubijo aktivnost, pa sodijo k tipu II interferonov. Tip I so razdelili v dve podskupini na osnovi celic, ki interferone proizvajajo: levkocitni interferoni (IFN- $\alpha$ ) in fibroblastni interferoni (IFN- $\beta$ ). Interferon tipa II so nekateri imenovali imunski interferon (IFN- $\gamma$ ). Vendar je nastala težava ob odkritju, da je IFN- $\alpha$  heterogen in sestavljen iz veliko različnih, vendar sorodnih vrst, ki jim danes pravimo podtipi. Nekatere skupine raziskovalcev označujejo te skupine kot  $\alpha A$ ,  $\alpha B$ ,  $\alpha C$ ,  $\alpha D$  itd.; drugi uporabljajo numerični sistem:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  itd. Danes prevladuje slednja nomenklatura (Smilović, 2006).

Inducirane celice izločajo interferone lokalno, da preko celičnih receptorjev stimulirajo obrambne mehanizme v bližnjih tkivih. Taki mehanizmi se kažejo kot protivirusni, protimikrobeni, protitumorski in imunomodulacijski učinki. To je osnova za prepričanje, da bi se interferoni lahko uporabljali pri zdravljenju velikega števila infekcijskih in malignih

bolezni. Dostopno je veliko število različno formuliranih, naravnih in rekombinantnih interferonov (Smilović, 2006).

### 2.2.3.1      **Interferon alfa 2a - IFN- $\alpha$ 2a**

IFN- $\alpha$ 2a je le eden izmed 14 podtipov IFN- $\alpha$  pri ljudeh. Podobno kot drugi interferoni ima tudi IFN- $\alpha$ 2a protivirusne, protimikrobne, protitumorske in imunomodulatorne lastnosti.

Roferon A je vodni pripravek rekombinantnega interferona alfa 2a, ki ga proizvede *E. coli*. Zaradi take izbire sistema izražanja rekombinantna beljakovina ni glikozilirana. Sodi med interferone tipa I (Kristl, 2007). Roferon A predpisujejo pri zdravljenju kroničnega hepatitisa C, dlakastocelične levkemije, Kaposijevega sarkoma, ki nastane kot posledica okužbe z virusom HIV, in kronične mieloične levkemije pri bolnikih, ki so jim dokazali kromosom Philadelphia (nastane z recipročno translokacijo dolgih krakov kromosomov 9 in 22) (Kristl, 2007).

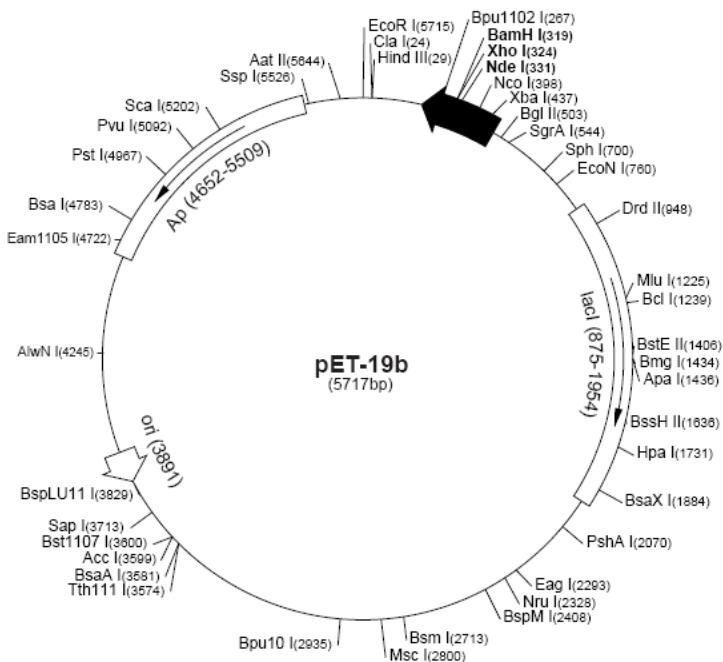
### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 BAKTERIJSKI SEVI IN PLAZMIDI

Umeritveno krivuljo za ugotavljanje živosti bakterijske kulture z meritvami s fluorimetrom smo pripravili s komercialno dostopnim sevom *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) brez plazmida.

Za produkcijo beljakovine TNF- $\alpha$  smo uporabili sev *E. coli* BL21(DE3) pET-19b/TNF- $\alpha$ . V komercialno dostopen plazmid pET-19b (Novagen) je bil vstavljen gen za beljakovino TNF- $\alpha$ , plazmid pa je bil nato transformiran v komercialno dostopen sev *E. coli* BL21(DE3). Oboje je bilo opravljeno v predhodnih raziskavah na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, Oddelek za biosintezo in biotransformacijo.

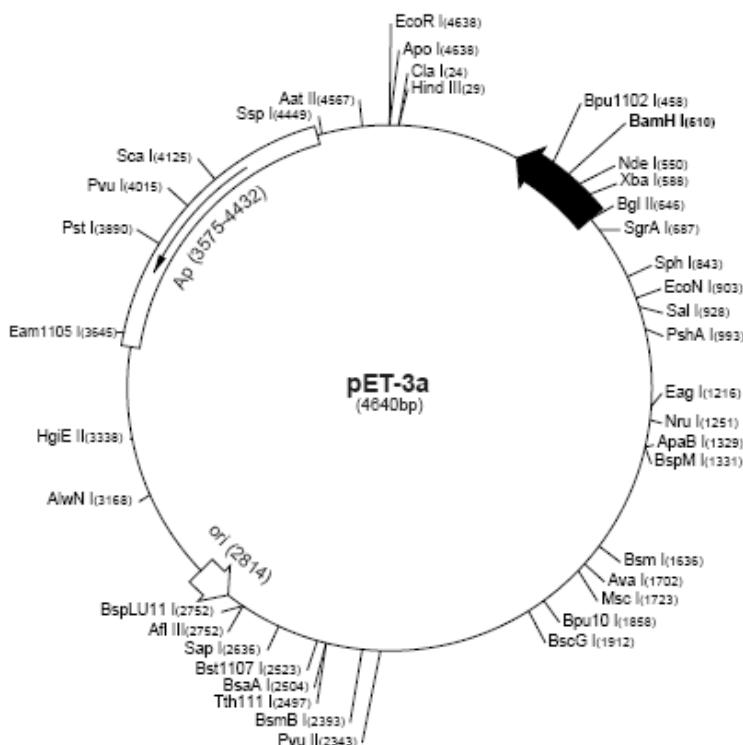


Slika 4: Plazmid pET-19b. Promotor T7: 472-488bp; začetek transkripcije T7: 471bp; mesta za kloniranje-*Nde*I do *Bam*H-I: 319-335bp; terminator T7: 213-259bp (Novagen, 1998a).

Za produkcijo skrajšane oblike beljakovine TNF- $\beta$  (v nadaljevanju TNF- $\beta$ ) smo uporabili enak sev z enakim plazmidom, le da je bil v plazmid vstavljen gen za beljakovino TNF- $\beta$ , na N-terminalnem koncu skrajšano za 19 aminokislin (*E. coli* BL21(DE3) pET19-b/dN19TNF- $\beta$ ). Taka oblika TNF- $\beta$  tvori inkluzijska telesa v bakteriji *E. coli*. Vstavljanje gena za beljakovino TNF- $\beta$  v plazmid ter transformacija plazmida sta bila opravljena v predhodnih raziskavah na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, Oddelek za biosintezo in biotransformacijo.

Enak bakterijski sev smo uporabili tudi za produkcijo citokina LK-KI-001, le da je imel sev transformiran komercialno dostopen plazmid pET3a (Novagen). Vstavljanje optimiranega gena (*Fopt5*) za citokin LK-KI-001 v plazmid ter transformacija plazmida v komercialno dostopen sev *E. coli* BL21(DE3) sta bila opravljena v predhodnih raziskavah na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, Oddelek za biosintezo in biotransformacijo.

Vsi trije plazmidi nosijo rezistenco proti antibiotiku ampicilinu.



Slika 5: Plazmid pET-3a. Promotor T7: 615-631bp; začetek transkripcije T7: 614bp; mesta za kloniranje NdeI do BamHI: 510-550bp; terminator T7: 404-450bp (Novagen, 1998b).

### 3.1.2 GOJIŠČA ZA *E. coli*

Vsa gojišča smo pripravili z demineralizirano vodo (v nadaljevanju demi voda), ki smo jo pridobili z napravo za pripravo demineralizirane vode RiOs16 (Millipore). Prav tako smo vsa gojišča avtoklavirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku  $1,2 \cdot 10^5$  Pa.

#### 3.1.2.1 Gojišče LBP

Gojišče LBP sestavlja:

10 g BBL<sup>TM</sup> Phytone<sup>TM</sup> Peptone (Becton Dickinson) – fiton,  
5 g Bacto<sup>TM</sup> Yeast Extract (Becton Dickinson) – kvasni ekstrakt  
in 10 g NaCl (Sigma).

Z demi vodo ga dopolnimo do 1 l.

#### 3.1.2.2 Gojišče LBPG

Gojišče LBPG sestavlja:

10 g BBL<sup>TM</sup> Phytone<sup>TM</sup> Peptone (Becton Dickinson) – fiton,  
5 g Bacto<sup>TM</sup> Yeast Extract (Becton Dickinson) – kvasni ekstrakt  
in 10 g NaCl (Sigma).

Z demi vodo ga dopolnimo do 995 ml. Po avtoklaviranju ohlajenemu gojišču za plošče LBPG aseptično dodamo 5 ml sterilne 50-odstotne glukoze (Sigma).

#### 3.1.2.3 Gojišče LBPG/amp100

Gojišče LBPG/amp100 sestavlja:

10 g BBL<sup>TM</sup> Phytone<sup>TM</sup> Peptone (Becton Dickinson) – fiton,  
5 g Bacto<sup>TM</sup> Yeast Extract (Becton Dickinson) – kvasni ekstrakt  
in 10 g NaCl (Sigma).

Z demi vodo ga dopolnimo do 993 ml. Po avtoklaviranju ohlajenemu gojišču LBPG aseptično dodamo 5 ml sterilne 50-odstotne glukoze (Sigma) in 2 ml sterilnega ampicilina s koncentracijo 50 mg/ml (Sigma).

### **3.1.2.4 Gojišče GYSP**

Gojišče GYSP sestavlja:

20 g BBL<sup>TM</sup> Phytone<sup>TM</sup> Peptone (Becton Dickinson) – fiton,  
5 g Bacto<sup>TM</sup> Yeast Extract (Becton Dickinson) – kvasni ekstrakt  
in 10 g NaCl (Sigma).

Z demi vodo ga dopolnimo do 970 ml. Po avtoklaviranju aseptično dodamo 20 ml sterilne 50-odstotne glukoze in 10 ml raztopine elementov v sledovih.

### **3.1.2.5 Agarski gojišči LBPG ter LBPG/amp100**

Agarski gojišči LBPG ter LBPG/amp100 sestavlja:

10 g BBL<sup>TM</sup> Phytone<sup>TM</sup> Peptone (Becton Dickinson) – fiton,  
5 g Bacto<sup>TM</sup> Yeast Extract (Becton Dickinson) – kvasni ekstrakt,  
10 g NaCl (Sigma),  
in 15 g agar (Calbiochem).

Z demi vodo ju dopolnimo do 994 ml. Po avtoklaviranju ohlajenemu agarskemu gojišču LBPG aseptično dodamo 5 ml sterilne 50-odstotne glukoze (Sigma) ter gojišče aseptično razlijemo v petrijevke. Za pripravo agarskega gojišča LBPG/amp100 pa mu poleg 5 ml 50-odstotne glukoze aseptično dodamo še 1 ml sterilnega ampicilina s koncentracijo 50 mg/ml (Sigma). Gojišče nato aseptično razlijemo v petrijevke ter jih hranimo na 4 °C.

### 3.1.3 RAZTOPINE IN PUFRI

#### 3.1.3.1 Raztopine za dodatek gojišču

- Glukoza koncentracije 500 g/l:

Zatehtamo 500 g glukoze (Sigma) ter jo po žlicah raztopljam v približno 700 ml deme vode. Za boljše raztopljanje raztopino ogrevamo. Ko dodamo vso glukozo in je ta raztopljena, dopolnimo z deme vodo do 1 l in avtoklaviramo 20 minut pri temperaturi 121 °C ali pa sterilno prefiltriramo preko filtra s premerom por 0,22 µm (Nalgene). Shranjujemo na 4 °C.

- Ampicilin koncentracije 50 mg/ml:

Zatehtamo 0,5 g ampicilina (Sigma) ter ga raztopimo v približno 7 ml posebno čiste vode, ki jo dobimo z napravo MilliQ RG (Millipore) (v nadaljevanju miliQ voda). Dopolnimo z miliQ vodo do 10 ml. Raztopimo sterilno prefiltriramo preko filtra s premerom por 0,22 µm (Nalgene). Shranjujemo pri temperaturi -20 °C.

- 0,4 M IPTG:

Zatehtamo 2,383 g IPTG in raztopimo v približno 20 ml miliQ vode, nato dopolnimo z miliQ vodo do 25 ml. Sterilno prefiltriramo preko filtra s premerom por 0,22 µm (Nalgene). Shranjujemo pri temperaturi -20 °C.

- Raztopina elementov v sledovih:

FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (Sigma)	4 g
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Sigma)	4 g
MnSO <sub>4</sub> x nH <sub>2</sub> O (Sigma)	1 g
AlCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O (Sigma)	1 g

CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O (Sigma)	0,4 g
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (Sigma)	0,2 g
NaMoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O (Sigma)	0,2 g
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O (Sigma)	0,1 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (Sigma)	0,05 g

Navedene kemikalije zatehtamo ter jih raztopimo v približno 700 ml demi vode. Dopolnimo z demi vodo do 1 l in avtoklaviramo 20 minut na temperaturi 121 °C. Shranjujemo na 4 °C.

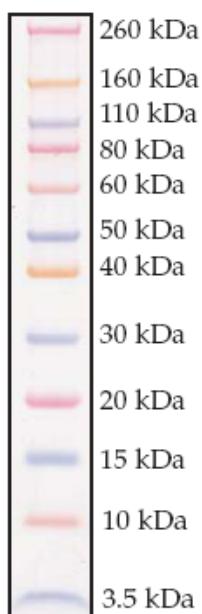
- 50-odstotni glicerol:

Glicerol (Merck) smo zmešali v razmerju 1:1 z demi vodo ter avtoklavirali pri 121 °C 20 minut. Shanjujemo na 4 °C.

### 3.1.3.2 Za NaDS-PAGE smo uporabili sledeče raztopine in pufre

- 1x NaDS pufer za elektroforezo (NuPAGE MES Running Buffer, Invitrogen),
- 4x nanašalni pufer za elektroforezo (NuPAGE LDS Sample Buffer, Invitrogen); izhodna raztopina,
- 2x nanašalni pufer za elektroforezo,
- reducent (NuPAGE Reducing Agent, Invitrogen),
- antioksidant (NuPAGE Antioxidant, Invitrogen),
- barvilo SimplyBlue SafeStain (Invitrogen),
- Colloidal Blue Staining Kit; Stainer A in Stainer B (Invitrogen),

- Sharp Protein Standard (Invitrogen); standard molekulskega mas, za ugotavljanje velikosti beljakovin z NaDS-PAGE,



Slika 6: Novex® Sharp Protein Standard (Invitrogen)

- metanol (Merck),
- ocetna kislina (Fluka),
- 1 M TRIS/HCl, pH=8,0; izhodna raztopina in
- 10 mM TRIS/HCl, pH=8,0.

### 3.1.3.3 Raztopine in pufri za merjenje živosti s fluorimetrom

- 0,85-odstotni NaCl
- 70-odstotni 2-propanol

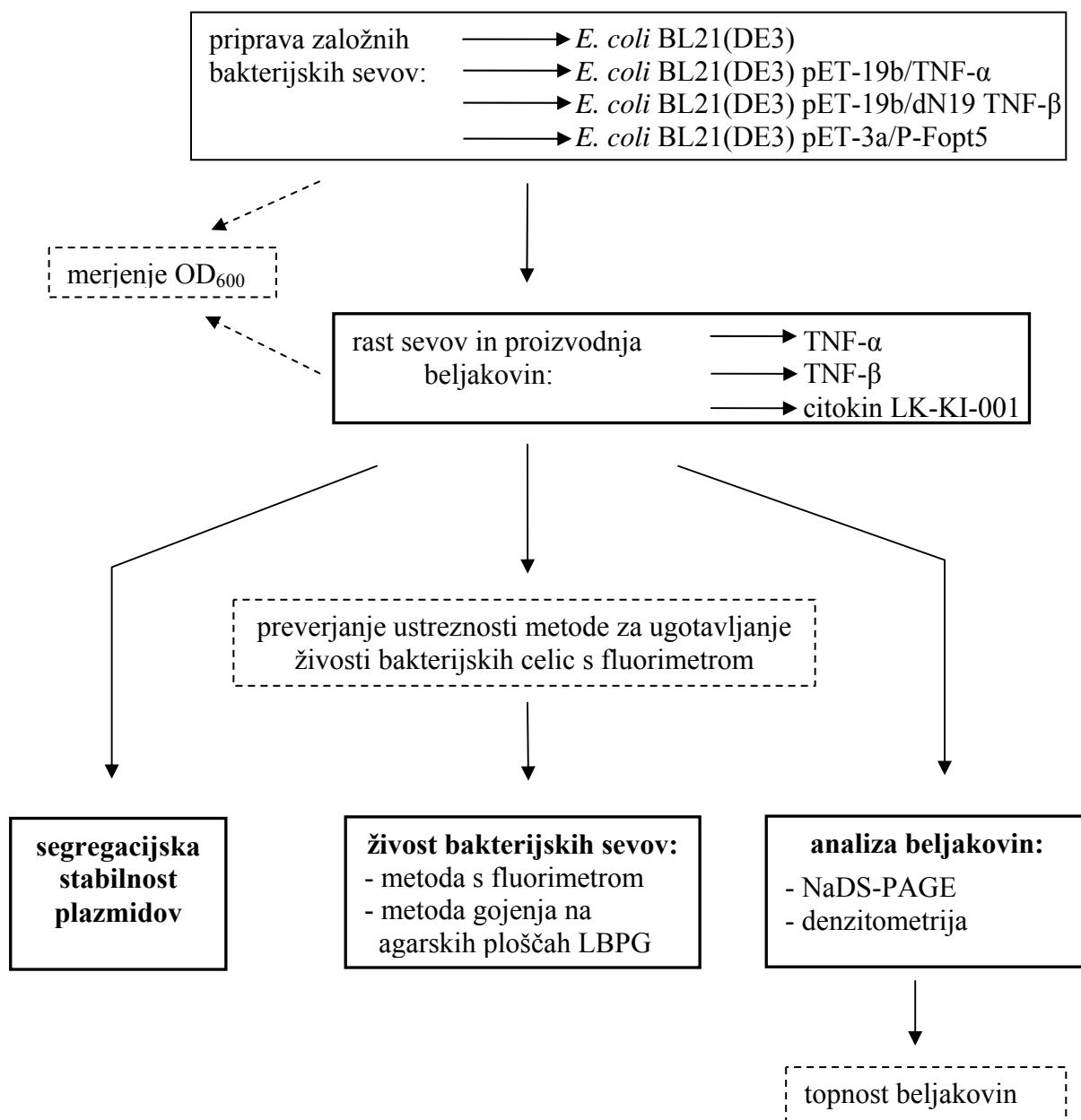
- L7012 LIVE/DEAD® BacLightTM Bacterial Viability Kit (Invitrogen)

### 3.1.3.4 Oprema

- naprava za produkcijo demi vode: RiOs16 (Millipore)
- naprava za produkcijo posebno čiste vode : MilliQRG (Millipore)
- stresalnik Kambič IS-200K (Kambič)
- stresalnik ISF-1-V (Adolf Kuhner AG)
- laminarij Iskra PIO LFVP12
- spektrofotometer Hewlet Packard 8452A Diode Array Spectrophptometer (Hewlet Packard)
- denzitometer Perkin Elmer ProXPRESS2D (Perkin Elmer)
- analitska tehnica (Sartorius)
- NuPAGE sistem za elektroforezo Power Ease500 (Invitrogen)
- avtoklav (Kambič)
- termoblok BIOSAN CH-100 (Biosan)
- inkubator (Kambič)
- digitalni fotoaparat Olympus za slikanje poliakrilamidnih gelov
- centrifuga Rotina 35R (Hettich)
- centrifuga Beckman J2-HS (Beckman)
- centrifuga Eppendorf 5415R (Eppendorf)
- svetlobni mikroskop Axiostar plus (Zeiss)
- vibro-mix mešalo (Tehnica)
- magnetno mešalo MS3000(Biosan)
- vodna kopel tip 1013 (GFL)
- fluorimeter Felix32 PTI (Photon Technology International)
- sonikator (Cole Parmer)

### 3.2 METODE

#### 3.2.1 SHEMA POSKUSOV



Slika 7: Shema poskusov

### 3.2.2 STERILIZACIJA RAZTOPIN, GOJIŠČ IN STEKLOVINE

Ves potrebeni material za gojenje bakterije *E. coli* smo predhodno sterilizirali v avtoklavu z vlažno toplovo. Sterilizacija je potekala 20 minut pri 121 °C in  $1,2 \cdot 10^5$  Pa. Temperaturno občutljive snovi smo sterilizirali s filtriranjem. Uporabili smo filter s premerom por 0,22 µm (Nalgene).

### 3.2.3 MERJENJE OPTIČNE GOSTOTE BAKTERIJSKE KULTURE

Bakterijsko rast smo spremljali z merjenjem optične gostote (ang. optical density – OD) s spektrofotometrom pri valovni dolžini ( $\lambda$ ) 600 nm (v nadaljevanju  $OD_{600}$ ). Vzorec smo redčili z ustreznim gojiščem, tako da smo lahko merili  $OD_{600}$  v področju, kjer je zveza med  $OD_{600}$  in koncentracijo linearna. Linearno področje za spektrofotometer je od  $OD_{600}$  0,2 do 0,5. Za odštevanje ozadja (slepi vzorec) smo uporabili ustrezno gojišče.

### 3.2.4 PRIPRAVA ZALOŽNIH BAKTERIJSKIH SEVOV

#### 3.2.4.1 **Priprava založnih bakterijskih kultur *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3) pET19-b/TNF-α, *E. coli* BL21(DE3) pET19-b/dN19TNF-β in *E. coli* BL21(DE3) pET3-a/P-Fopt5**

V 20 ml gojišča LBPG smo dodali eno kolonijo posameznega seva. Sevom s plazmidi smo dodali 40 µl antibiotika ampicilina. Inkubacija je potekala preko dneva na stresalniku pri 30 °C in 160 obratih v minuto, razen pri sevu *E. coli* BL21(DE3)pET3-a/P-Fopt5, katerega smo inkubirali preko noči pri 25 °C in 160 obratih v minuti. Ko je  $OD_{600}$  posamezne kulture dosegla vrednost 2, smo kulturo vzeli iz stresalnika ter redčili v razmerju 1:1 s sterilnim 50-odstotnim glicerolom. Nato smo po 1 ml te suspenzije odpipetirali v zamrzovalne posodice, jih dobro zaprli, označili ter prenesli na temperaturo -80 °C. Delo smo opravili aseptično.

### 3.2.5 PRIPRAVA VCEPKOV TER GOJITEV V GOJIŠČU GYSP ZA PROIZVODNJO BELJAKOVIN

#### 3.2.5.1 Priprava vcepkov za gojišče GYSP za proizvodnjo želenih beljakovin

V 20 ml gojišča LBPG/amp100 smo dodali 80 µl ustrezne predpripravljene bakterijske kulture. Inkubacija bakterijske kulture za proizvodnjo TNF- $\alpha$  ter dN19TNF- $\beta$  je potekala pri temperaturi 30 °C in 160 obratih v minutih, medtem ko je inkubacija bakterijske kulture za proizvodnjo citokina LK-KI-001 potekala prekonočno pri 25 °C in 160 obratih v minutih. Ko je OD<sub>600</sub> dosegla vrednost nekje med 3 in 5, smo kulture precepili v gojišče GYSP za proizvodnjo beljakovin.

#### 3.2.5.2 Gojitev v gojišču GYSP za proizvodnjo beljakovin

V 20 ml gojišča GYSP smo dodali 20 µl 0,4 M IPTG ter 1 ml vcepka za proizvodnjo dN19TNF- $\beta$ . Za proizvodnjo TNF- $\alpha$  ter citokina LK-KI-001 smo omenjenim sestavinam dodali še 20 µl ampicilina s koncentracijo 50 mg/ml. Inkubacija bakterijskih kultur za proizvodnjo TNF- $\alpha$  ter dN19TNF- $\beta$  je potekala pri temperaturi 30 °C in 160 obratih v minutih, medtem ko je inkubacija bakterijske kulture za proizvodnjo citokina LK-KI-001 potekala pri 25 °C in 160 obratih v minutih.

### 3.2.6 UGOTAVLJANJE ŽIVOSTI BAKTERIJSKIH CELIC

#### 3.2.6.1 Ugotavljanje živosti bakterijskih celic s fluorimetrom

##### 3.2.6.1.1 Priprava umeritvene krivulje za ugotavljanje živosti celic s fluorimetrom

Za pripravo umeritvene krivulje smo uporabili sev brez plazmida (*E. coli* BL21(DE3)). 80 µl založne kulture smo dodali v 20 ml gojišča LBPG in inkubirali na stresalniku pri temperaturi 30 °C do OD<sub>600</sub> = 0,5-5,0. Pripravili smo dvakrat po 20 ml kulture.

Nato smo 25 ml bakterijske kulture centrifugirali 10 do 15 minut pri 10000 obratih v minutih. Odstranili smo supernatant ter pelet resuspendirali v 2 ml 0,85-odstotnega NaCl.

Po 1 ml te suspenzije smo prenesli v centrifugirke in dodali 20 ml 0,85-odstotnega NaCl za žive bakterije ter 20 ml 70-odstotnega 2-propanola za mrtve bakterije. Vzorce smo inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi in premešali vsakih 15 minut.

Po inkubaciji smo vzorce centrifugirali 10 do 15 minut pri 10000 obratih v minuti, pelet resuspendirali v 20 ml 0,85-odstotnega NaCl ter ponovno centrifugirali. Pelet smo resuspendirali v 10 ml 0,85-odstotnega NaCl (Molecular Probes, Invitrogen, 2004).

Najprej je bilo potrebno ugotoviti, kolikokrat moramo redčiti kulturo, da po meritvah s fluorimetrom ter izračunih dobimo linearno krivuljo.

Pripravili smo različna razmerja živih in mrtvih bakterij (Invitrogen, 2004):

- 2 ml suspenzije mrtvih bakterij + 0 ml suspenzije živih bakterij (0 % žive);
- 1,8 ml suspenzije mrtvih bakterij + 0,2 ml suspenzije živih bakterij (10 % žive);
- 1 ml suspenzije mrtvih bakterij + 1 ml suspenzije živih bakterij (50 % žive);
- 0,2 ml suspenzije mrtvih bakterij + 1,8 ml suspenzije živih bakterij (90 % žive);
- 0 ml suspenzije mrtvih bakterij + 2 ml suspenzije živih bakterij (100 % žive).

Vsakič, ko smo pripravili nov vcepek za gojišče GYSP, smo pripravili tudi novo umeritveno krivuljo.

### 3.2.6.1.2 Vzorčenje bakterijske kulture za ugotavljanje živosti celic s fluorimetrom

Rast seva z beljakovino TNF- $\alpha$  smo spremkljali 16 ur, rast seva z beljakovino TNF- $\beta$  pa 17 ur, razen pri preverjanju na agarskih ploščah LBPG, kjer smo rast spremkljali 16 ur. Vzorčenje kulture za proizvodnjo TNF- $\alpha$  in TNF- $\beta$  iz gojišča GYSP je potekalo vsaki dve uri. Vzorce smo analizirali v dveh delih, dvakrat po 8 ur.

Rast seva s citokinom LK-KI-001 pa smo spremkljali 24 ur, dvakrat po 12 ur. Vzorčenje kulture za proizvodnjo citokina LK-KI-001 pa je potekalo vsake tri ure. Ob odvzemenu vsakega vzorca smo izmerili OD<sub>600</sub>. Vsako beljakovino posebej smo spremkljali v dveh neodvisnih vzorcih (vzorec A in vzorec B), poleg tega pa smo vsak vzorec merili v treh ponovitvah.

### 3.2.6.1.3 Priprava vzorcev za ugotavljanje živosti celic s fluorimetrom

25 ml bakterijske kulture smo centrifugirali 10 do 15 minut pri 10000 obratih v minuti, supernatant smo odstranili. Pelet smo resuspendirali v 20 ml 0,85-odstotnega NaCl ter ponovno centrifugirali. Pelet smo resuspendirali v 10 ml 0,85-odstotnega NaCl. Vsak vzorec smo z 0,85-odstotnim NaCl redčili tako, da je bil OD<sub>600</sub> približno 1.

### 3.2.6.1.4 Barvanje bakterijskih celic

V razmerju 1:1 smo zmešali komponento A (barvilo SYTO® 9) in komponento B (propidijev jodid) iz kita L7012 LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit. Na 1 ml vzorca smo dodali 3 µl mešanice barvil (Invitrogen, 2004). Po 15 minutah stresanja v temi je bil vzorec pripravljen za meritve.

Kit vsebuje barvili SYTO® 9 ter propidijev jodid. Obe barvili se vežeta na nukleinske kisline, s tem da SYTO® 9 oddaja zeleno fluorescenco, propidijev jodid pa rdečo fluorescenco. Barvili se razlikujeta tudi v spektralnih lastnostih ter po zmožnostih vdora v zdrave bakterijske celice. Pri uporabi samega barvila SYTO® 9 se obarvajo vse bakterije v populaciji, tako tiste z nepoškodovanimi kot tiste s poškodovanimi membranami. V nasprotju z barvilm SYTO® 9 pa propidijev jodid prodre le v celice, ki imajo poškodovano celično membrano, in povzroči zmanjšanje fluorescence barvila SYTO® 9 v primeru, ko barvamo z obema barviloma.

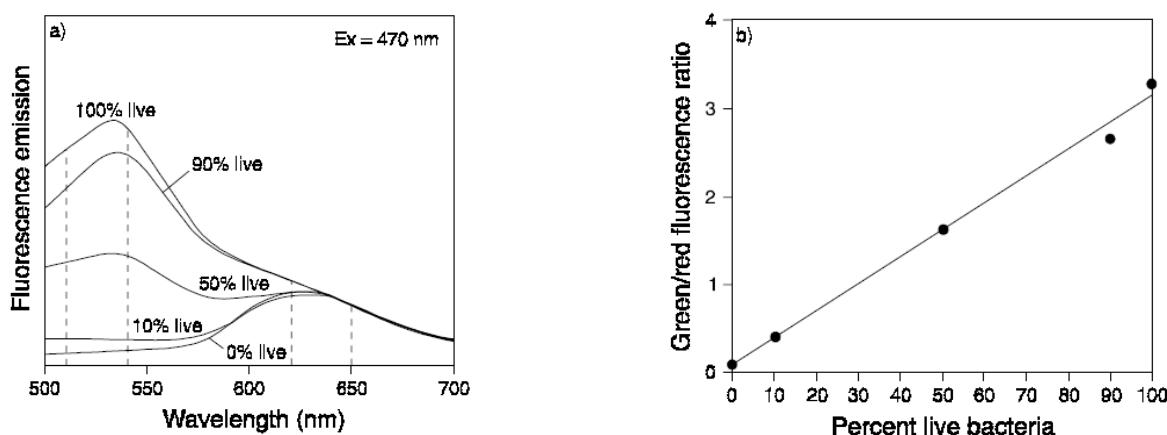
Tako pri primerni mešanici obeh barvil nepoškodovane bakterije (žive bakterije) oddajajo zeleno fluorescenco, celice s poškodovano celično membrano (mrtev bakterije) pa oddajajo rdečo fluorescenco (Invitrogen, 2004).

### 3.2.6.1.5 Meritve s fluorimetrom in analiza pridobljenih podatkov

Vzbujanje fluorokromov (ekscitacija) je potekalo pri valovni dolžini ( $\lambda$ ) 470 nm, oddano svetlobo (emisija) pa smo spremljali pri  $\lambda = 490\text{-}700$  nm (Invitrogen, 2004). Vsak vzorec smo pripravili v treh ponovitvah. Tako smo za vsak vzorec dobili svoj emisijski spekter. Podatke vseh vzorcev smo ovrednotili tako, da smo določili razmerje intenzitete oddane

svetlobe pri 500 nm (zelena svetloba) in 600 nm (rdeča svetloba) (1) ter izračunali povprečje in standardni odklon med ponovitvami. Nato smo narisali umeritveno krivuljo in živost bakterij v vzorcu ugotovili z odčitavanjem z umeritvene krivulje.

$$\text{Delež živih bakterij} = \frac{\text{Emisija pri } 500 \text{ nm}}{\text{Emisija pri } 600 \text{ nm}} \quad \dots (1)$$



Slika 8: Emisijski spektri in umeritvena krivulja. a) Emisijski spektri suspenzij z različnimi deleži živih in mrtvih bakterij. Os y: fluorescentna emisija; os x: valovna dolžina v nm. b) Vsak vzorec z različnim deležem živih in mrtvih bakterij ima svoje razmerje zelena/rdeča fluorescencija, zaradi česar lahko narišemo umeritveno krivuljo. Os y: razmerje zelena/rdeča fluorescencija; os x: odstotek živih bakterij (Invitrogen, 2004).

### 3.2.6.2 Ugotavljanje živosti bakterijskih celic z gojenjem na agarskih ploščah LBPG

Poleg ugotavljanja živosti celic s fluorimetrom smo živost bakterij vzporedno spremljali tudi z gojenjem na agarskih ploščah LBPG.

Sterilno odvzete vzorce v različnih časovnih intervalih smo v laminariju ustreznno redčili z LBPG gojiščem ter nato s steklenim trikotnikom razmazali na agarske plošče LBPG, tako da smo dobili števne plošče. Vsak vzorec smo nacepili na agarske plošče LBPG v treh ponovitvah. Števne plošče smo dobili z redčitvami od  $10^{-5}$  za vzorce, odvzete v začetku eksponentne faze rasti, pa tja do  $10^{-8}$  za vzorce, odvzete v stacionarni fazi rasti. Agarske

plošče smo inkubirali preko noči na 37 °C, naslednji dan pa smo prešteli število kolonijskih enot oziroma CFU (ang., colony forming units).

### 3.2.7 UGOTAVLJANJE SEGREGACIJSKE STABILNOSTI PLAZMIDOV

100 kolonij iz števnih agarskih plošč LBPG, ki smo jih nacepili za ugotavljanje živosti celic z gojenjem na agarskih ploščah, smo po tem, ko smo prešteli kolonije, prepikirali s sterilnimi zobotrebci v laminariju. Po eno kolonijo smo najprej nacepili na agarsko ploščo LBPG/amp100 in z istim zobotrebcem nato še na ploščo LBPG. Inkubirali smo preko noči na 37 °C in naslednji dan prešteli zrasle kolonije na obeh ploščah. Delež kolonij, odpornih na antibiotik ampicilin, smo izračunali po enačbi (2).

$$\text{Ohranjanje plazmidov (\%)} = \frac{\text{Število kolonij na LBPG/amp100}}{\text{Število kolonij na LBPG}} * 100 \quad \dots (2)$$

### 3.2.8 ANALIZA BELJAKOVIN

#### 3.2.8.1 Analiza beljakovin z natrijev dodecil sulfat – poliakrilamidno gelsko elektroforezo (NaDS-PAGE) in barvanje z barvilom Colloidal Blue

Z elektroforezo beljakovinskih vzorcev v poliakrilamidnih gelih smo ločevali in primerjali beljakovinske zmesi celic, ugotavljali čistočo beljakovin in ocenili nekatere fizikalne lastnosti, kot je npr. molekulska masa molekul. S to metodo smo hkrati lahko primerjali več različnih vzorcev.

##### 3.2.8.1.1 Priprava vzorcev za analizo beljakovin z NaDS-PAGE

Vse vzorce, odvzete v različnih časovnih intervalih, smo centrifugirali 15 minut na 5000 obratih v minuti. Pelete smo resuspendirali v 10-kratnem volumnu 10 mM TRIS/HCl, pH = 8,0. Vzorce, ki so bili odvzeti po osmih urah gojenja ali več, smo 5x redčili v 10 mM TRIS/HCl, pH = 8,0. Nato smo 20 µl vzorca dodali 25 µl 2x nanašalnega pufra za

elektroforezo (NuPAGE LDS Sample Buffer, Invitrogen) ter 5 µl reducenta (NuPAGE Reducing Agent, Invitrogen). Vzorce smo denaturirali 10 minut na 70 °C.

Uporabljali smo sistem NuPAGE Novex Bis-Tris NaDS-PAGE (Invitrogen) s 4-12 % gradientnim gelom. Elektroforezo smo izvedli v vertikalnem sistemu Invitrogen. Ločevanje beljakovin je potekalo 40 minut pri napetosti 200 V. Po elektroforetski ločitvi smo beljakovineobarvali z barvilo Colloidal Blue (Invitrogen, Version F, 2002a). Postopek barvanja prikazuje preglednica 1.

Preglednica 1: Barvanje beljakovin z barvilo Colloidal Blue

<b>Stopnja</b>	<b>Raztopina za en gel</b>	<b>Čas</b>	<b>Temperatura</b>
1	Fiksir (40 ml miliQ vode, 50 ml metanola, 10 ml ocetne kisline)	10 min	sobna
2	Barvanje (55 ml miliQ vodo, 20 ml metanola, 20 ml Stainer A (Invitrogen))	10 min	sobna
3	Dodamo 5 ml Stainer B (Invitrogen)	3-12h	sobna
4	Razbarvanje z 200 ml miliQ vode	7h, največ 3 dni	sobna

### **3.2.8.2 Denzitometrično ugotavljanje deleža posamezne beljakovine v celotnih celičnih beljakovinah**

Delež beljakovin v vzorcu lahko ugotavljamo s profilno (enodimensionalno) analizo NaDS-PAGE gela, s čimer dobimo relativni delež beljakovine v celotnem vzorcu. Absolutno koncentracijo beljakovine v vzorcu pa ugotavljamo z volumsko (dvodimensionalno) denzitometrično analizo NaDS-PAGE gela, kjer izmerimo koncentracijo beljakovine v vzorcu glede na standard, nanešen na isti gel. Za kvantifikacijo so primerni NaDS-PAGE-geli, barvani z barvilo Colloidal Blue.

Za ugotavljanje relativnega deleža beljakovin TNF-α, TNF-β ter citokina LK-KI-001 smo uporabili profilno denzitometrično analizo. Za denzitometrijo smo uporabljali denzitometer Perkin Elmer ProXPRESS2D.

### **3.2.8.3 Ugotavljanje topnosti preučevanih beljakovin**

#### **3.2.8.3.1 Razbijanje bakterijskih celic z ultrazvokom - soniciranje**

Za analizo smo uporabili kulture z začetka stacionarne faze rasti, tako da je bilo dovolj sintetiziranih rekombinantnih beljakovin. Pelete smo resuspendirali v 10-kratnem volumnu 10 mM TRIS/HCl, pH = 8,0. Vsako kulturo smo sonicirali 5 minut ter uspešnost preverili s svetlobnim mikroskopom. Če so bila vidna le inkluzijska telesa in ne celotne bakterije, je bilo soniciranje uspešno. V vseh primerih je zadostovalo petminutno soniciranje. Nato smo suspenzije centrifugirali 30 minut na 5000 obratih v minutu in ločili supernatant od peleta.

#### **3.2.8.4 Analiza beljakovin z NaDS-PAGE in barvanje z barvilom Simply Blue**

Tako pelete kot supernatante smo analizirali z NaDS-PAGE po zgoraj opisanem postopku (glej poglavje 3.2.8.1.1). Vzorcev nismo redčili. Na gel smo nanesli 12,5 µl peleta in 6 µl supernatanta.

Po elektroforetski ločitvi smo beljakovine barvali z barvilom SimplyBlue SafeStain (Invitrogen, Version E, 2002b). Postopek barvanja je prikazan v preglednici 2.

Preglednica 2: Barvanje beljakovin z barvilom SimplyBlue SafeStain.

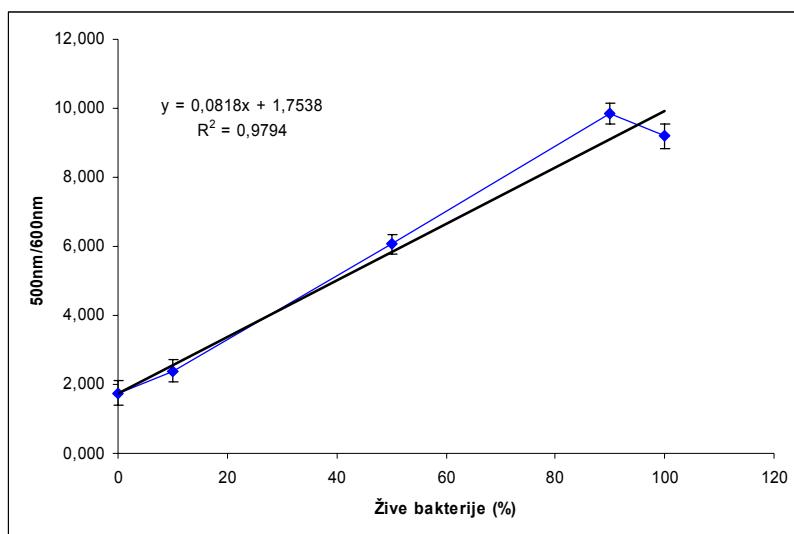
<b>Stopnja</b>	<b>Raztopina</b>	<b>Čas</b>	<b>Temperatura</b>
1	Spiranje z miliQ vodo	3x5 min	sobna
2	Barvanje s Simply Blue barvilm, ogretim na 50 °C	30 min	sobna
3	Razbarvanje z miliQ vodo	30 min	sobna

## 4 REZULTATI

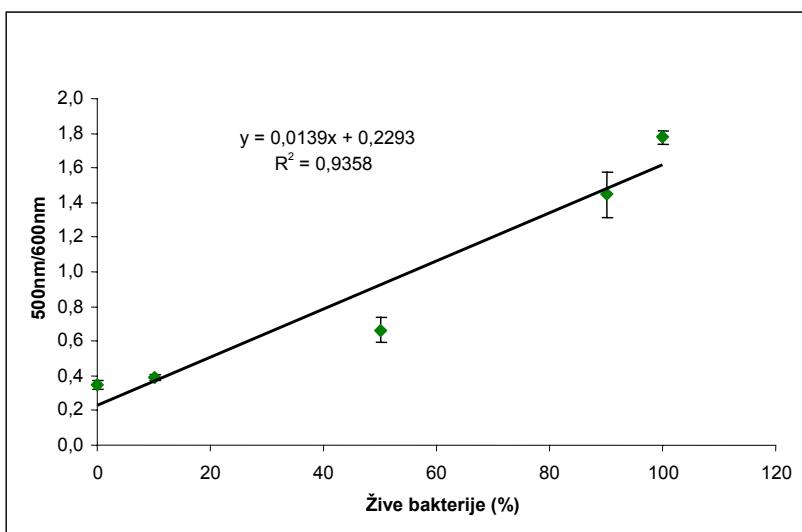
### 4.1 USTREZNOST METODE ZA UGOTAVLJANJE ŽIVOSTI CELIC S FLUORIMETROM

Umeritvene krivulje smo pripravili pri različnih vrednostih OD<sub>600</sub> in različno redčenih bakterijskih kulturah. S slike 9 lahko razberemo, da bakterijska kultura pri vrednosti OD<sub>600</sub> ~ 5 ni več 100-odstotno živa, saj zadnja točka (100-odstotno žive bakterije) ne sledi linearnosti krivulje. Bakterijsko kulturo smo redčili 4-krat. Slika 10 prikazuje primer neredčene bakterijske kulture, kjer vzorci niso v linearinem območju fluorimetra. Vrednost OD<sub>600</sub> bakterijske kulture je bil 2,5. Majhen r<sup>2</sup> dokazuje slabo linearnost.

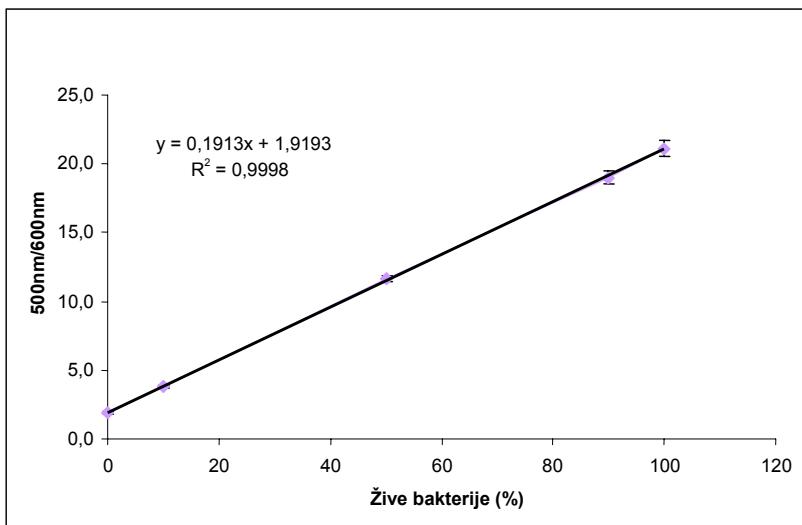
Pri vrednosti OD<sub>600</sub> ~ 1 so bakterije še 100-odstotno žive (slika 11). Bakterijske kulture pri vrednosti OD<sub>600</sub> ~ 1 ni potrebno redčiti. Linearnost je bila ustrezna, kar dokazujejo vrednosti r<sup>2</sup> med 0,979 in 0,999. Bakterijska kultura pri vrednosti OD<sub>600</sub> ~ 1 je najbolj ustrezna za pripravo umeritvene krivulje za ugotavljanje živosti bakterijskih celic s fluorimetrom.



Slika 9: Primer umeritvene krivulje, pripravljene s sevom brez plazmida, OD<sub>600</sub> ~ 5,0. Izhodno kulturo smo redčili 4-krat.

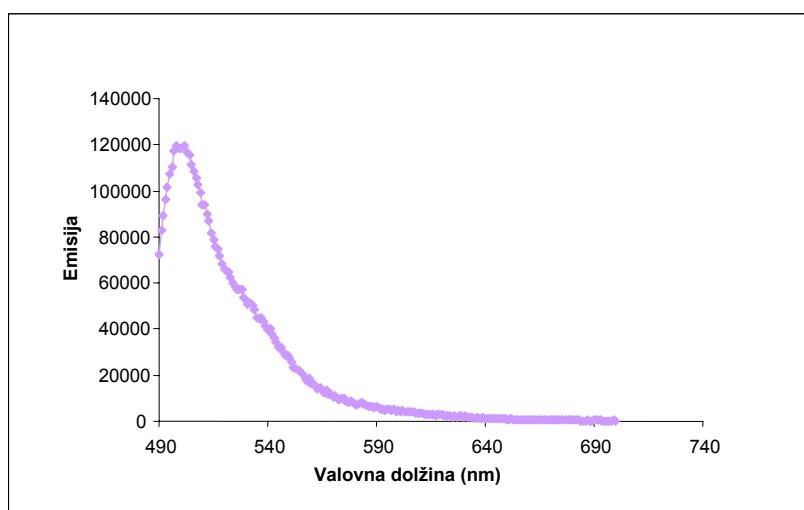


Slika 10: Primer umeritvene krivulje, pripravljena s sevom brez plazmida,  $OD_{600} \sim 2,5$ . Izhodne kulture nismo redčili.

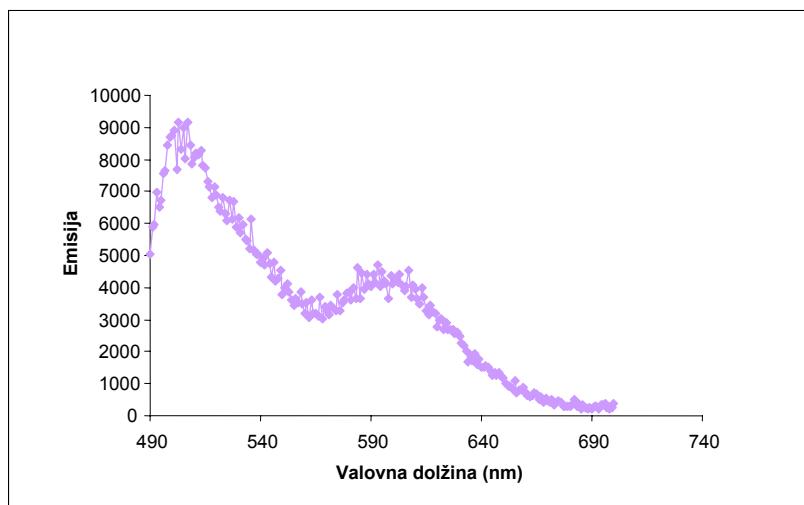


Slika 11: Primer umeritvene krivulje, pripravljena s sevom brez plazmida,  $OD_{600} \sim 1$ . Izhodne kulture nismo redčili. Umeritvena krivulja je bila pripravljena za spremljanje živosti bakterijske kulture med proizvodnjo beljakovine TNF-β, in sicer za vzorce od dveh do osmih ur rasti.

Spekter vzorca 100-odstotno živih bakterij ima dobro viden, velik vrh oddane svetlobe pri 500 nm (slika 12), medtem ko ima spekter vzorca 100-odstotno mrtvih bakterij bistveno manjši vrh pri 500 nm (slika 13). V velikosti vrhov pri 600 nm v primeru 100-odstotno živih in v primeru 100-odstotno mrtvih bakterij ne opazimo tako velike razlike. Razmerje (500nm/600nm) je v primeru 100-odstotno živih bakterij bistveno večje, kot v primeru 100-odstotno mrtvih bakterij.



Slika 12: Primer spektra oddane svetlobe vzorca, ki je vseboval 100-odstotno žive bakterije ( $OD_{600} \sim 1$ ).



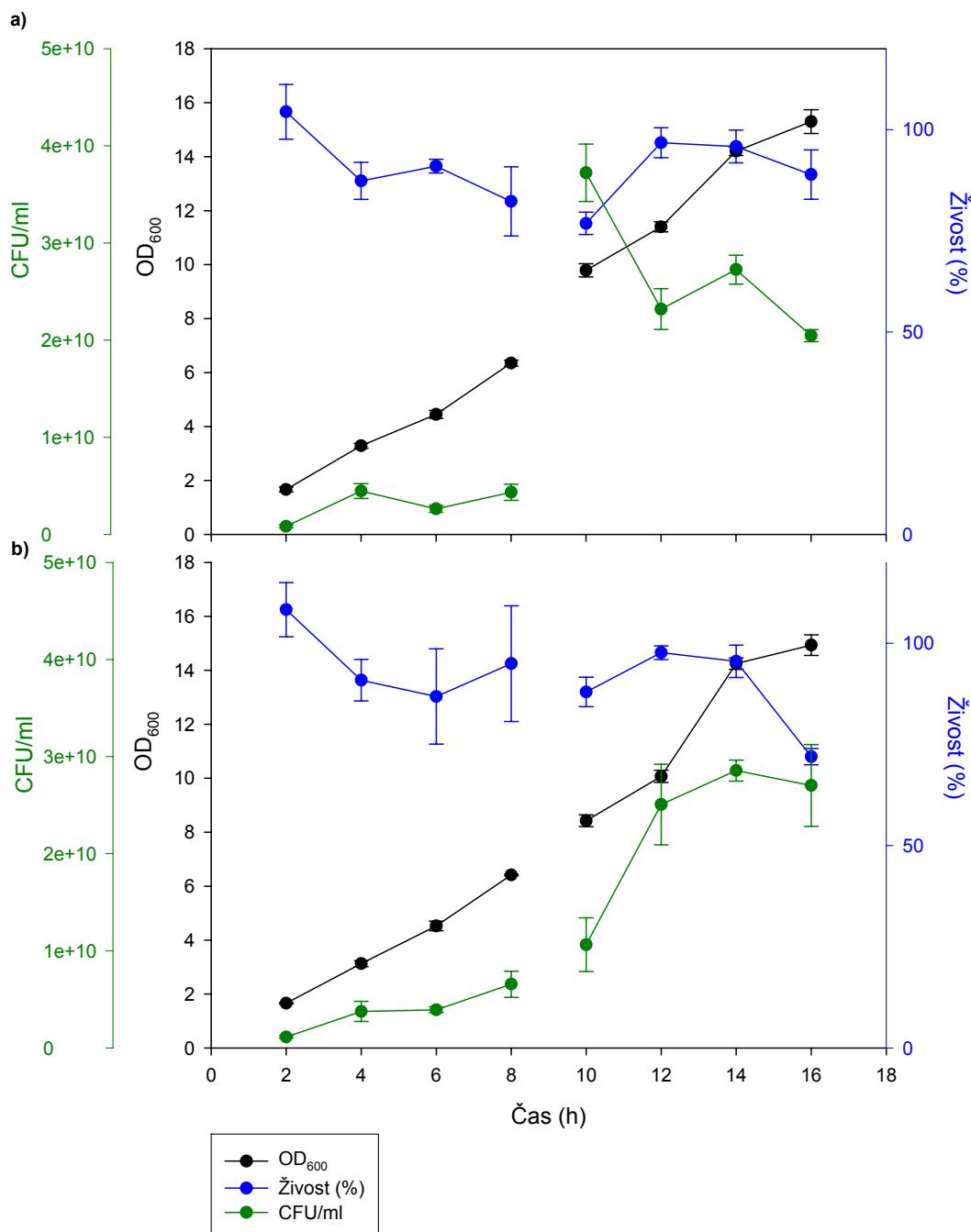
Slika 13: Primer spektra oddane svetlobe vzorca, ki je vseboval 100-odstotno mrtve bakterije, ubite s 70-odstotnim 2-propanolom ( $OD_{600} \sim 1$ ).

#### **4.2 ŽIVOST BAKTERIJSKIH CELIC, SEGREGACIJSKA STABILNOST PLAZMIDOV IN DELEŽ CILJNE BELJAKOVINE MED SINTEZO TNF- $\alpha$**

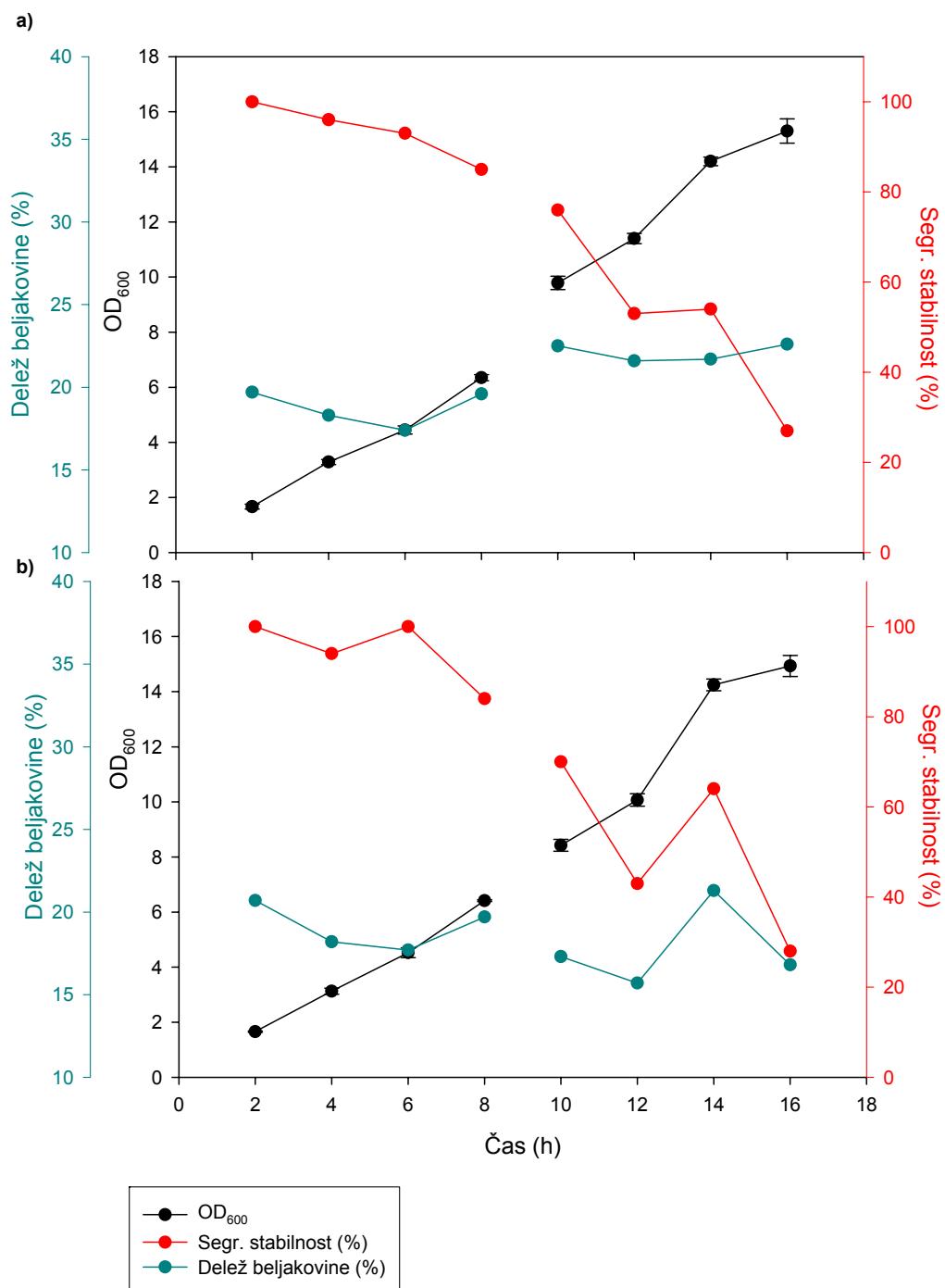
Pri proizvodnji beljakovine TNF- $\alpha$  smo ugotovili, da se rezultati meritev optične gostote ( $OD_{600}$ ) in rezultati meritev CFU/ml ujemajo (slika 14). Krivulja CFU/ml lepo sledi krivulji  $OD_{600}$ , odstopa le vzorec A, odvzet po desetih urah gojenja. Eksponentno fazo rasti kulture potruje eksponentno večanje vrednosti CFU/ml, ko pa kultura preide v stacionarno fazo rasti, se ustali tudi CFU/ml.

V začetku lag faze so bakterije pretežno žive, nato pa se živost nekoliko zmanjša, vendar vse do stacionarne faze rasti ostane bolj ali manj enaka, odstotek živosti se giblje okoli 80 % (slika 14).

Dobljeni eksperimentalni podatki kažejo, da najdlje med preučevanimi kulturami (slike 15, 18 in 25) plazmide zadržijo bakterije z beljakovino TNF- $\alpha$  (slika 15). Segregacijska stabilnost plazmidov v šestnajstih urah rasti sicer pada s 100 na približno 25 %, vendar ima po dvanajstih urah ob vrednosti  $OD_{600} \sim 11$  še vedno približno 50 % bakterij plazmide (slika 15). Delež beljakovine ostaja tekom rasti približno enak, naraščanja deleža beljakovine statistično ne moremo potrditi.



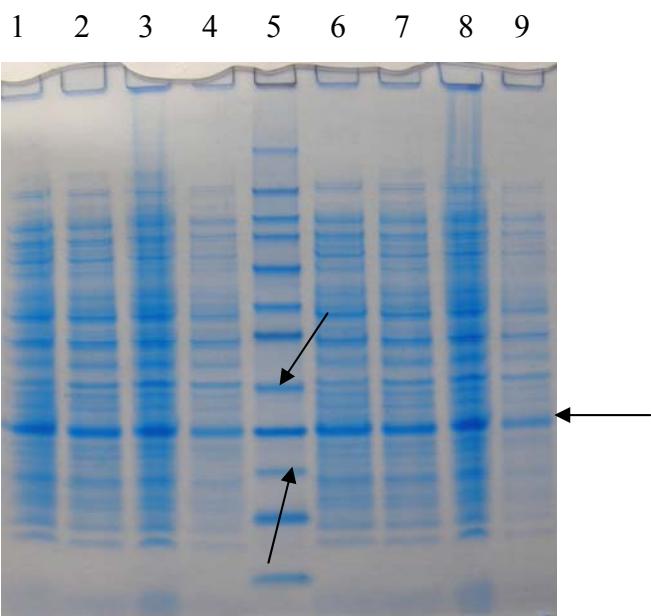
Slika 14: Rast in živost bakterijske kulture *E. coli* pri proizvodnji beljakovine TNF- α. a) Vzorec A. b) Vzorec B. Rast bakterij smo spremajali z merjenjem OD<sub>600</sub>. Živost celic smo spremajali z meritvami s fluorimetrom ter z gojitveno metodo na agarskih ploščah LBPG.



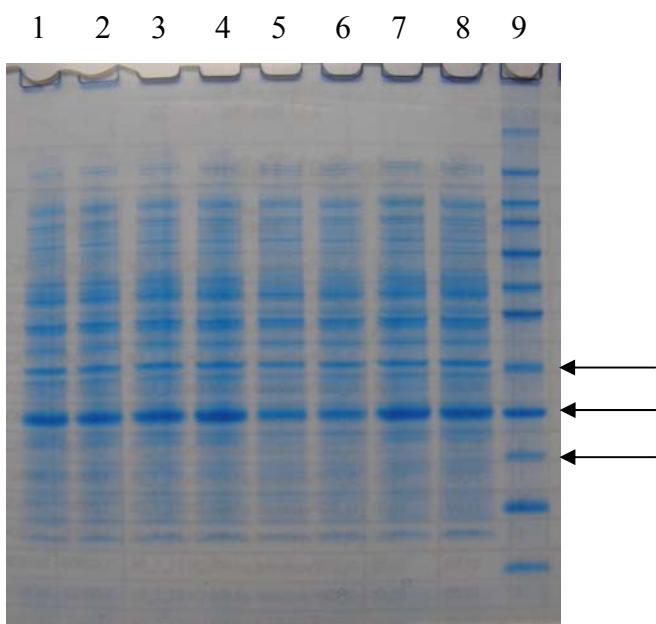
Slika 15: Rast bakterijske kulture *E. coli*, segregacijska stabilnost plazmidov in delež beljakovine TNF- $\alpha$ . a) Vzorec A. b) Vzorec B.

#### 4.2.1 NaDS-PAGE ANALIZA SEVA Z BELJAKOVINO TNF- $\alpha$

Proizvodnja beljakovine TNF- $\alpha$  je bila uspešna, kar dokazujejo dobljene lise, ki jih označuje srednja puščica (slika 16 in 17). Zgornja puščica na obeh slikah označuje beljakovinski standard velikosti 30 kDa, spodnja puščica pa beljakovinski standard velikosti 15 kDa.



Slika 16: NaDS-PAGE analiza seva z beljakovino TNF- $\alpha$ , 1. del (vzorci A in B od 2 do 8 ur rasti). 1: 2 uri rasti; vzorec A. 2: 4 ure rasti; vzorec A. 3: 6 ur rasti; vzorec A. 4: 8 ur rasti; vzorec A. 5: Beljakovinski markerji. 6: 2 uri rasti; vzorec B. 7: 4 ure rasti; vzorec B. 8: 6 ur rasti; vzorec B. 9: 8 ur rasti; vzorec B.



Slika 17: NaDS-PAGE analiza seva z beljakovino TNF- $\alpha$ , 2. del (vzorci A in B od 10 do 16 ur rasti). 1: 10 ur rasti; vzorec A. 2: 12 ur rasti; vzorec A. 3: 14 ur rasti; vzorec A. 4: 16 ur rasti; vzorec A. 5: 10 ur rasti; vzorec B. 6: 12 ur rasti; vzorec B. 7: 14 ur rasti; vzorec B. 8: 16 ur rasti; vzorec B. 9: Beljakovinski markerji.

#### 4.2.2 DELEŽ BELJAKOVINE TNF- $\alpha$ V CELOTNIH CELIČNIH BELJAKOVINAH

Delež beljakovine TNF- $\alpha$  v odvisnosti od časa je predstavljen v spodnji preglednici. Delež beljakovine ostaja tekom rasti približno enak, naraščanja deleža beljakovine statistično ne moremo potrditi.

Preglednica 3: Spreminjanje deleža beljakovine TNF- $\alpha$  v celotnih celičnih beljakovinah v odvisnosti od časa.

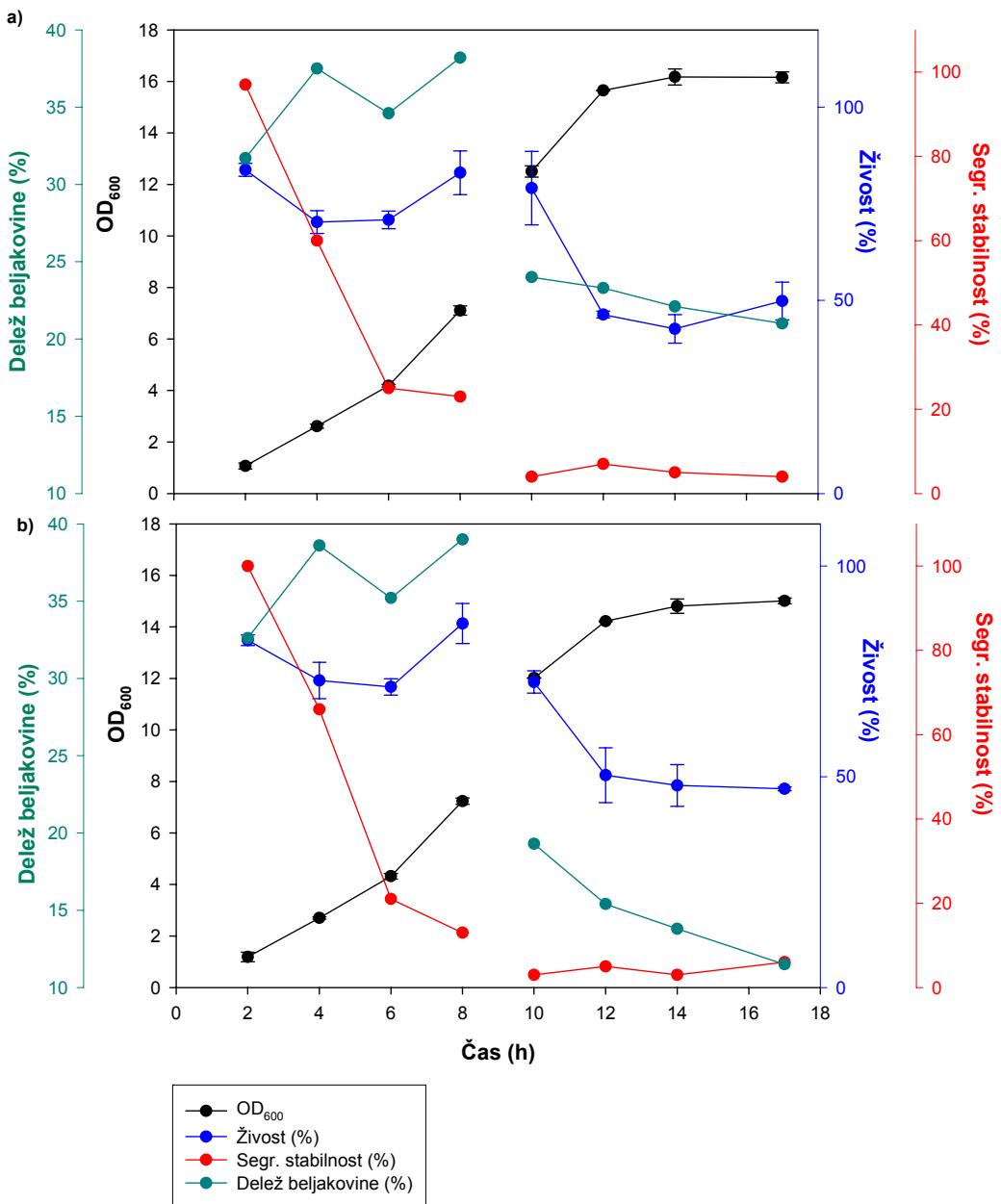
VZOREC A		VZOREC B	
Čas (h)	Delež beljakovine (%)	Čas (h)	Delež beljakovine (%)
2	20	2	21
4	18	4	18
6	17	6	18
8	20	8	20
10	23	10	17
12	22	12	16
14	22	14	21
16	23	16	17

#### **4.3 ŽIVOST BAKTERIJSKIH CELIC, SEGREGACIJSKA STABILNOST PLAZMIDOV IN DELEŽ CILJNE BELJAKOVINE MED SINTEZO TNF- $\beta$**

Pri proizvodnji beljakovine TNF- $\alpha$  kot tudi pri proizvodnji beljakovine TNF- $\beta$  smo ugotovili, da se rezultati meritev OD<sub>600</sub> in rezultati meritev CFU/ml ujemajo (slika 19). Eksponentno rast bakterijske kulture potrjuje eksponentno večanje vrednosti CFU/ml. Število se ustali, ko kultura preide v stacionarno fazo rasti.

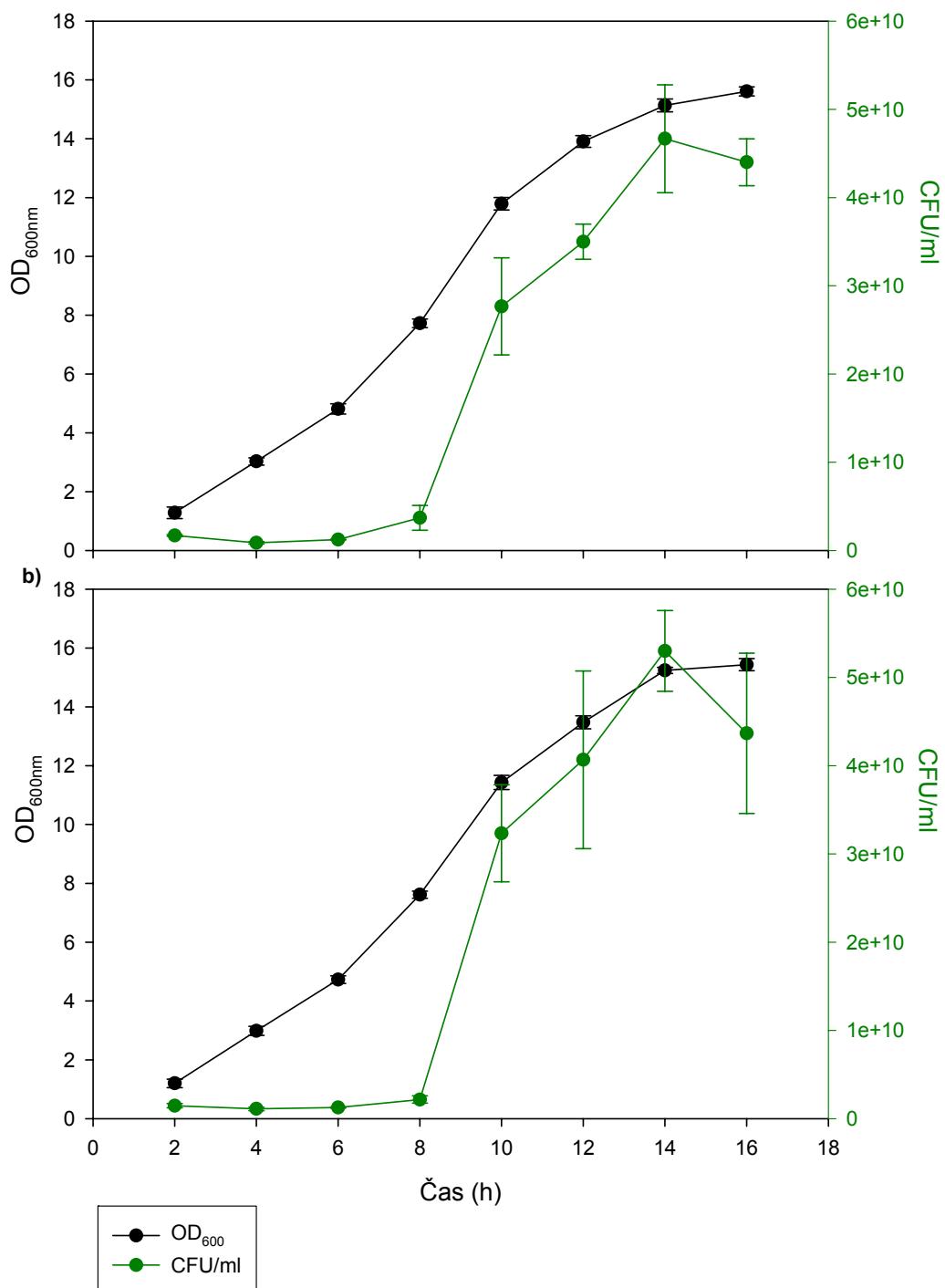
Odstotek živih bakterij je visok (približno 80 %) do pozne eksponentne oz. zgodnje stacionarne faze rasti (pri OD<sub>600</sub> = 12), nato pa zaznamo znaten padec živosti (na 50 % in manj) (slika 18).

Od začetka proizvodnje beljakovine pa do osmih ur rasti se je delež beljakovine TNF- $\beta$  povečeval, istočasno je segregacijska stabilnost plazmidov hitro padala (slika 18, preglednica 2, sliki 20 in 21). Po osmih urah je segregacijska stabilnost plazmidov padla pod 10 %. Padel je tudi delež izražene beljakovine. Poleg tega pa po 8 urah rasti začne padati tudi živost bakterij (slika 18).



Slika 18: Rast bakterijske kulture *E. coli*, živost celic, segregacijska stabilnost plazmidov ter delež beljakovine TNF-β. a) Vzorec A. b) Vzorec B. Rast bakterij smo spremljali z merjenjem OD<sub>600</sub>. Živost celic smo spremljali z meritvami s fluorimetrom.

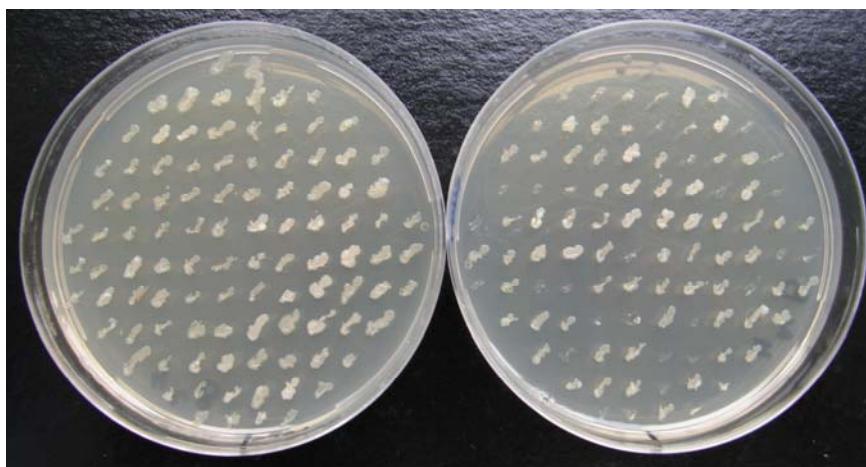
a)



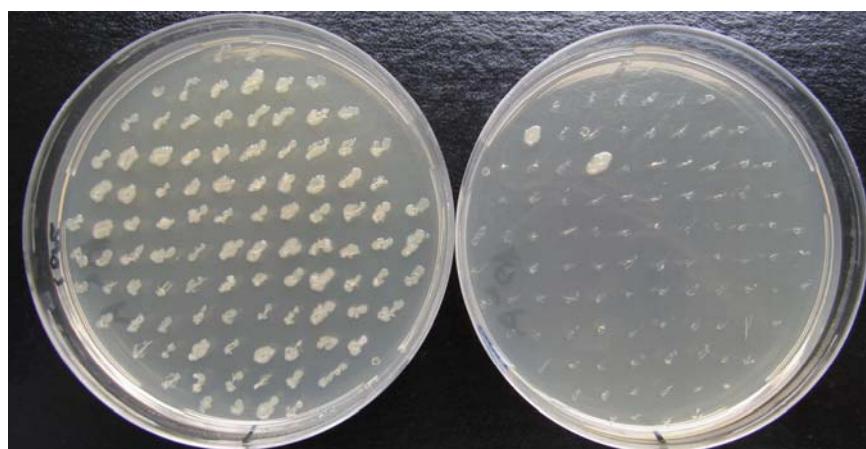
Slika 19: Rast in živost bakterijske kulture *E. coli* pri proizvodnji beljakovine TNF-β. a) Vzorec A. b) Vzorec B. Rast bakterij smo spremljali z merjenjem OD<sub>600</sub>. Živost celic smo spremljali z gojitveno metodo na agarskih ploščah LBPG.

#### 4.3.1 SEGREGACIJSKA STABILNOST PLAZMIDOV

Iz slikovnega prikaza segregacijske stabilnosti plazmidov je opazen znaten padec segregacijske stabilnosti plazmidov od 4 ur (slika 20) do 10 ur (slika 21) rasti proizvodnega seva za beljakovino TNF- $\beta$ .



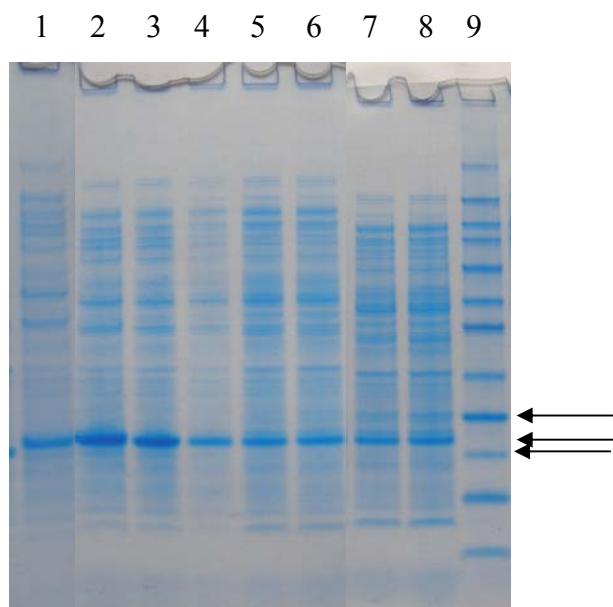
Slika 20: Segregacijska stabilnost plazmidov po 4 urah rasti seva z beljakovino TNF- $\beta$ . Levo: agarska plošča LBPG. Desno: agarska plošča LBPG/amp100.



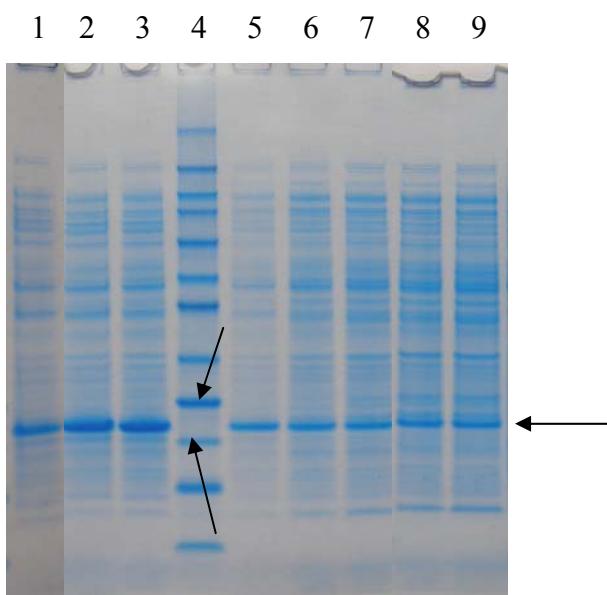
Slika 21: Segregacijska stabilnost plazmidov po 10 urah rasti seva z beljakovino TNF- $\beta$ . Levo: agarska plošča LBPG. Desno: agarska plošča LBPG/amp100.

#### 4.3.2 NaDS-PAGE ANALIZA SEVA Z BELJAKOVINO TNF- $\beta$

Proizvodnja beljakovine TNF- $\beta$  je bila uspešna, kar dokazujejo dobljene lise, ki jih označuje srednja puščica (slika 22 in 23). Zgornja puščica na obeh slikah označuje beljakovinski standard velikosti 20 kDa, spodnja puščica pa beljakovinski standard velikosti 15 kDa.



Slika 22: NaDS-PAGE analiza seva z beljakovino TNF- $\beta$ , vzorci A (od 2 do 17 ur rasti). 1: 2 uri rasti; vzorec A. 2: 4 ure rasti; vzorec A. 3: 6 ur rasti; vzorec A. 4: 8 ur rasti; vzorec A. 5: 10 ur rasti; vzorec A. 6: 12 ur rasti; vzorec A. 7: 14 ur rasti; vzorec A. 8: 17 ur rasti; vzorec A. 9: Beljakovinski markerji.



Slika 23: NaDS-PAGE analiza seva z beljakovino TNF- $\beta$ , vzorci B (od 2 do 17 ur rasti). 1: 2 uri rasti; vzorec B. 2: 4 ure rasti; vzorec B. 3: 6 ur rasti; vzorec B. 4: Beljakovinski markerji. 5: 8 ur rasti; vzorec B. 6: 10 ur rasti; vzorec B. 7: 12 ur rasti; vzorec B. 8: 14 ur rasti; vzorec B. 9: 17 ur rasti; vzorec B.

#### 4.3.3 DELEŽ BELJAKOVINE TNF- $\beta$ V CELOTNIH CELIČNIH BELJAKOVINAH

Delež beljakovine TNF- $\beta$  v odvisnosti od časa je predstavljen v spodnji preglednici. Delež beljakovine po desetih urah gojenja močno pade, istočasno se zmanjša tudi segregacijska stabilnost plazmidov, kar prikazuje slika 18.

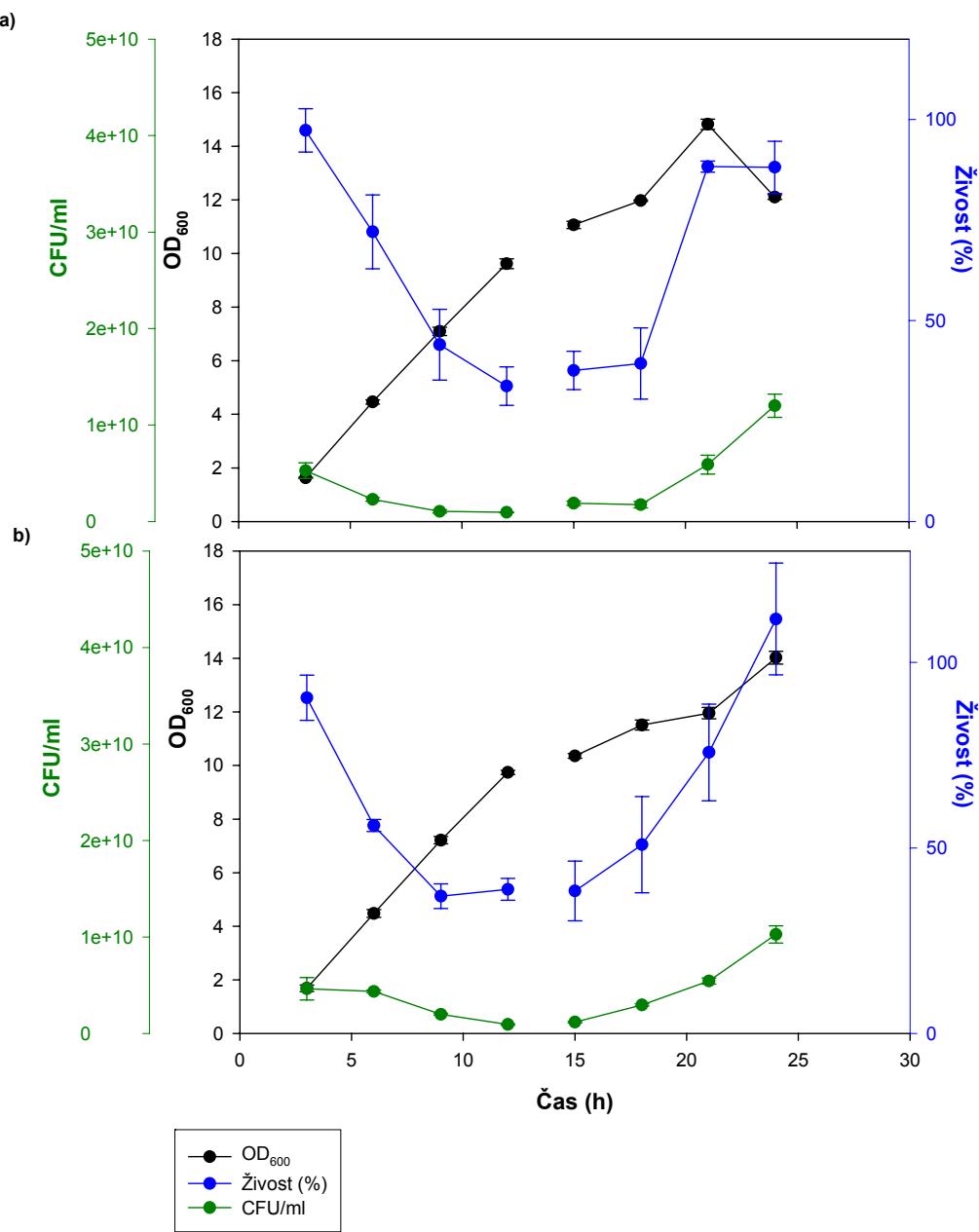
Preglednica 4: Spreminjanje deleža beljakovine TNF- $\beta$  v celotnih celičnih beljakovinah v odvisnosti od časa.

VZOREC A		VZOREC B	
Čas (h)	Delež beljakovine (%)	Čas (h)	Delež beljakovine (%)
2	32	2	33
4	38	4	39
6	35	6	35
8	38	8	39
10	22	10	25
12	24	12	23
14	22	14	14
17	21	17	12

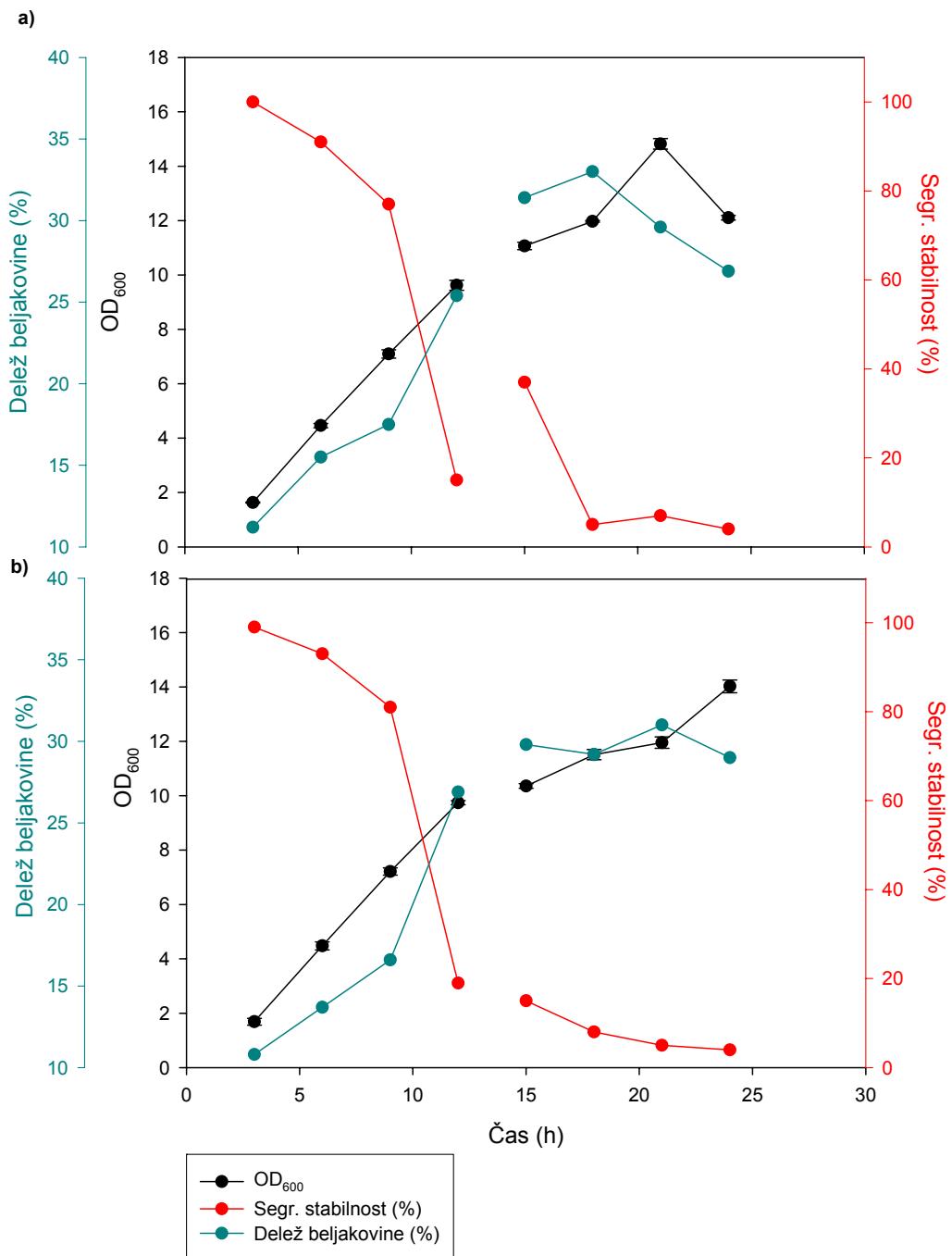
#### **4.4 ŽIVOST BAKTERIJSKIH CELIC, SEGREGACIJSKA STABILNOST PLAZMIDOV IN DELEŽ CILJNE BELJAKOVINE MED SINTEZO CITOKINA LK-KI-001**

Pri proizvodnji citokina LK-KI-001 smo ugotovili, da se rezultati meritev CFU/ml ne ujemajo z rezultati meritev OD<sub>600</sub>, ampak se ujemajo rezultati meritev živosti celic s fluorimetrom ter rezultati meritev CFU/ml (slika 24). V začetku eksponentne faze živost pade s skoraj 100 na manj kot 50 %, nato pa v stacionarni fazi naraste nazaj na 100 %. Enak trend smo ugotovili tudi pri CFU/ml, le-ta najprej pade, v stacionarni fazi rasti pa se začne povečevati.

Zanimivo je, da v dvanajstih urah gojenja segregacijska stabilnost plazmidov pade s 100 na 20 % (slika 25), medtem ko je po treh urah gojenja delež citokina LK-KI-001 približno 11 % vseh celičnih beljakovin, nato pa naraste na približno 30 % citokina LK-KI-001 po 15 urah gojenja (preglednica 3, slika 25).



Slika 24: Rast in živost bakterijske kulture *E. coli* pri proizvodnji citokina LK-KI-001. a) Vzorec A. b) Vzorec B. Rast bakterij smo spremljali z merjenjem OD<sub>600</sub>. Živost celic smo spremljali z gojitveno metodo na agarskih ploščah LBPG in merjenjem s fluorimetrom.

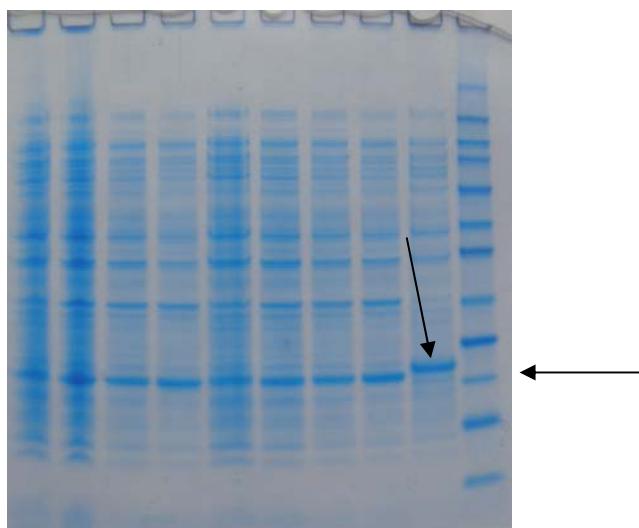


Slika 25: Rast bakterijske kulture *E. coli*, segregacijska stabilnost plazmidov in delež citokina LK-KI-001. a) Vzorec A. b) Vzorec B.

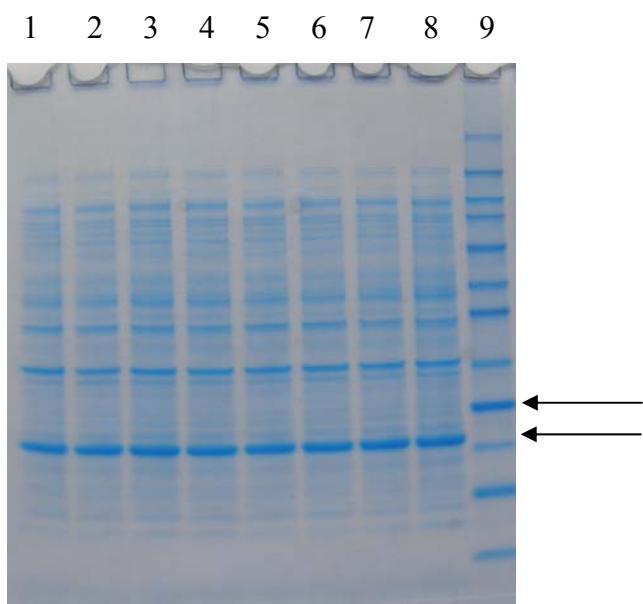
#### 4.4.1 NaDS-PAGE ANALIZA SEVA S CITOKINOM LK-KI-001

Proizvodnja citokina LK-KI-001 je bila uspešna, kar dokazujejo lise, ki jih označuje desna puščica na sliki 26 in spodnja puščica na sliki 27. Leva puščica na sliki 26 označuje beljakovino TNF- $\beta$ , ki smo jo analizirali na istem gelu. Na sliki 27 pa zgornja puščica označuje beljakovinski standard velikosti 20 kDa.

1    2    3    4    5    6    7    8    9    10



Slika 26: NaDS-PAGE analiza seva s citokinom LK-KI-001, 1. del (vzorci A in B od 3 do 12 ur rasti). 1: 3 ure rasti; vzorec A. 2: 6 ur rasti; vzorec A. 3: 9 ur rasti; vzorec A. 4: 12 ur rasti; vzorec A. 5: 3 ure rasti; vzorec B. 6: 6 ur rasti; vzorec B. 7: 9 ur rasti; vzorec B. 8: 12 ur rasti; vzorec B. 9: 2 uri rasti - TNF- $\beta$ ; vzorec A. 10: Beljakovinski markerji.



Slika 27: NaDS-PAGE analiza seva s citokinom LK-KI-001, 2. del (vzorci A in B od 15 do 24 ur rasti). 1: 15 ur rasti; vzorec A. 2: 18 ur rasti; vzorec A. 3: 21 ur rasti; vzorec A. 4: 24 ur rasti; vzorec A. 5: 15 ur rasti; vzorec B. 6: 18 ur rasti; vzorec B. 7: 21 ur rasti; vzorec B. 8: 24 ur rasti; vzorec B. 9: Beljakovinski markerji.

#### 4.4.2 DELEŽ CITOKINA LK-KI-001 V CELOTNIH CELIČNIH BELJAKOVINAH

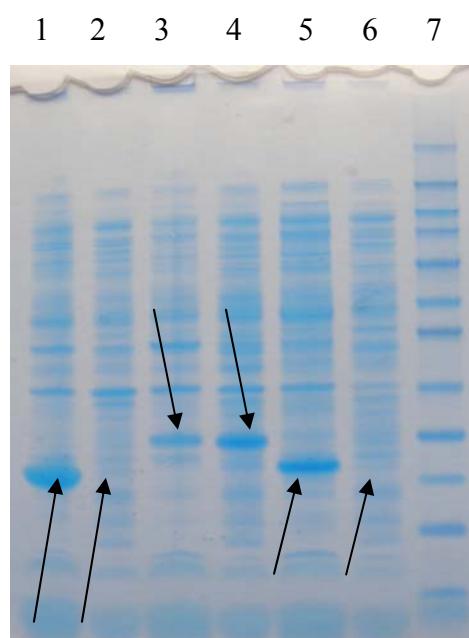
Preglednica prikazuje spremjanje deleža citokina LK-KI-001 v odvisnosti od časa. Delež citokina LK-KI-001 se povečuje do 21. ure rasti bakterijske kulture, istočasno segregacijska stabilnost plazmidov močno pada že po desetih urah rasti kulture (slika 25).

Preglednica 5: Spreminjanje deleža citokina LK-KI-001 v celotnih celičnih beljakovinah v odvisnosti od časa.

VZOREC A		VZOREC B	
Čas (h)	Delež beljakovine (%)	Čas (h)	Delež beljakovine (%)
3	11	3	11
6	16	6	14
9	18	9	17
12	25	12	27
15	31	15	30
18	33	18	29
21	30	21	31
24	27	24	29

#### 4.5 TOPNOST PREUČEVANIH BELJAKOVIN

Predvidevamo, da je živost posameznega preučevanega seva odvisna od tega, ali se preučevana rekombinantna beljakovina izraža v topni obliku ali pa v obliku inkluzijskih teles. Beljakovina, ki se po soniciranju in centrifugiraju nahaja v peletu, je netopna, medtem ko je beljakovina, ki se po soniciranju in centrifugiraju nahaja v supernatantu, topna. Iz slike 28 je možno ugotoviti, da se citokin LK-KI-001 nahaja skoraj popolnoma v netopni obliku (prvi dve puščici na sliki 28), prav tako beljakovina TNF- $\beta$  (zadnji dve puščici na sliki 28), medtem ko se manjši del beljakovine TNF- $\alpha$  nahaja v netopni frakciji, večji del pa je topen (srednji dve puščici na sliki 28).



Slika 28: NaDS-PAGE analiza vzorcev sevov z različnimi beljakovinami po soniciranju. 1: Citokin LK-KI-001; pelet. 2: Citokin LK-KI-001; supernatant. 3: TNF- $\alpha$ ; pelet. 4: TNF- $\alpha$ ; supernatant. 5: TNF- $\beta$ ; pelet. 6: TNF- $\beta$ ; supernatant. 7: Beljakovinski standardi.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Pri ugotavljanju ustreznosti metode za ugotavljanje živosti celic s fluorimetrom smo eksperimentalno ugotovili, pri katerih pogojih dobimo najboljšo umeritveno krivuljo za ugotavljanje živosti celic s fluorimetrom. Za umeritveno krivuljo je pomembno, da točke čim manj odstopajo od linearnosti. To smo zagotovili s primerno vrednostjo  $OD_{600}$  ter primernim redčenjem bakterijske kulture. Ugotovili smo, da je od preizkušenih vrednosti  $OD_{600}$  (0,5-5,0) najprimernejši  $OD_{600} \sim 1$  (slika 11), saj smo dobili velike vrednosti  $r^2$ , ki dokazujejo dobro linearnost. Pri vrednostih  $OD_{600}$ , nižjih od 1, so vrednosti  $r^2$  manjše, pri vrednostih  $OD_{600}$ , višjih od 1 pa smo poleg manjših vrednosti  $r^2$  (slika 9 in 10), s konfokalnim laserskim mikroskopom (Leica TCS SP5) potrdili, da celice, ki naj bi bile 100-odstotno žive, niso 100-odstotno žive, saj niso vse svetile zeleno, in jih tako ne moremo obravnavati kot 100-odstotno žive. Pri vrednosti  $OD_{600} \sim 1$  pa so vse celice, ki naj bi bile 100-odstotno žive, v resnici bile žive (svetile so zeleno) (priloga A, slika A), celice, ki pa smo jih pred opazovanjem pod mikroskopom ubili z 2-propanolom, pa so dejansko bile mrtve (svetile so rdeče) (priloga A, slika A).

Pomemben kriterij za živost bakterij je rast in razmnoževanje v/na ustremnem rastnem mediju. Iz literature (Invitrogen, 2004) je znano, da če primerjamo živost bakterij, ki so v eksponentni fazi rasti, z uporabo LIVE/DEAD BacLight kita ter gojenje v tekočem oziroma na trdnem gojišču, dobimo soodvisne rezultate, kar pa se ni izkazalo v vseh primerih naše raziskave.

Pri primerni mešanici obeh barvil (SYTO 9 in propidijev jodid) bakterije z nepoškodovano celično membrano oddajajo zeleno fluorescenco (so žive), celice s poškodovano celično membrano pa oddajajo rdečo fluorescenco (so mrtve) (Invitrogen, 2004). Možno pa je, da so nekatere bakterije s poškodovano membrano pri določenih pogojih zmožne regeneracije in razmnoževanja, vendar barvilo propidijev jodid prodre vanje, in zato oddajajo rdečo fluorescenco, torej svetijo enako kot mrtve. Prav tako so lahko nekatere bakterije z

nepoškodovano membrano nezmožne razmnoževanja in rasti v rastnem mediju (so t. i. »žive, vendar negoljive«, ang. »viable but not culturable«; v nadaljevanju VBNC), zaradi barvila SYTO 9 pa oddajajo zeleno fluorescenco (Invitrogen, 2004). Bakterije se ponovno začnejo deliti, ko pride do izboljšanja pogojev za rast (Boaretti in sod., 2003). Kljub temu pa je citoplazemska membrana nujna za selektivno komunikacijo celice z okoljem, zato je nepoškodovana citoplazemska membrana nujna za zdravo, živo celico. Bakterije, ki jih obarva propidijev jodid, bi v tem primeru lahko obravnavali kot dejansko mrtve (Sundström in sod., 2004).

Pri proizvodnji TNF- $\alpha$  (slika 14) in TNF- $\beta$  (slika 19) smo ugotovili, da se rezultati meritev OD<sub>600</sub> in rezultati meritev CFU/ml ujemajo, kar nakazuje na to, da celice niso prešle v stanje VBNC. Odstopa le vzorec A, odvzet po desetih urah gojenja seva z beljakovino TNF- $\alpha$ , vendar menimo, da gre za napako pri delu (slika 14, vzorec A).

Prav tako lahko pojasnimo odstotek živih bakterij pri proizvodnji TNF- $\alpha$  in TNF- $\beta$ . V začetku lag faze so bakterije pretežno žive, nato pa lahko opazimo rahlo zmanjšanje živosti, saj zaradi izražanja rekombinantne beljakovine nastane veliko mRNK, kar lahko povzroči uničenje ribosomov in posledično smrt celice (Baneyx, 1999). Tako pri sevu z beljakovino TNF- $\alpha$  (slika 14) kot pri sevu z beljakovino TNF- $\beta$  (slika 19) v eksponentni fazì rasti opazimo tudi eksponentno povečanje števila bakterij. V idelanem primeru bi pričakovali konstanten, visok odstotek živih bakterij. To drži za sev, ki producira TNF- $\alpha$ , saj se odstotek živosti do stacionarne faze rasti giblje okoli 80 % (slika 14). V primeru proizvodnje TNF- $\beta$  je podobno odstotek živih bakterij visok do pozne eksponentne oz. zgodnje stacionarne faze rasti (pri OD<sub>600</sub> = 12), nato pa zaznamo znaten padec živosti (slika 18). Padec živosti lahko pojasnijo velike količine rekombinantne beljakovine, ki povzročijo uničenje ribosomov (Baneyx, 1999), verjetno pa tudi posledica prehoda v novo stresno situacijo, tj. stacionarna faza.. Celice počasi prehajajo v fazo odmiranja, kjer v nekaterih primerih tudi lizirajo (Madigan in sod., 2003).

Za razliko od prejšnjih dveh sevov pa smo za sev s citokinom LK-KI-001 ugotovili precej drugačne lastnosti. Zanimivo je, da se rezultati meritev CFU/ml ne ujemajo z rezultati meritev OD<sub>600</sub>, tako kot pri sevu z beljakovino TNF- $\alpha$  in pri sevu z beljakovino TNF- $\beta$ ,

ampak se ujemajo z rezultati meritev živosti celic s fluotrimetrom (slika 24). Prav tako rezultati meritev živosti celic s fluorimetrom za proizvodni sev za citokin LK-KI-001 niso podobni rezultatom meritev živosti celic s fluorimetrom zgoraj omenjenih sevov. V začetku eksponentne faze živost pade s skoraj 100 na manj kot 50 %, nato pa v stacionarni fazi naraste nazaj na 100 %. Podobno sledijo rezultati meritev CFU/ml. Znano je (Braux in sod., 1997; Maukonen in sod., 2006; Baena-Ruano in sod., 2006; Boulos in sod., 1999; Quéric in sod., 2004), da je uporaba LIVE/DEAD BacLight kita zelo občutljiva in hitra metoda za preučevanje živosti, zato se ne moremo sklicevati na napake pri delu.

Ker smo v primeru proizvodnega seva za citokin LK-KI-001 ugotovili, da se rezultati meritev živosti celic s fluorimetrom ujemajo z rezultati meritev CFU/ml in da se rezultati meritev OD<sub>600</sub> in rezultati meritev CFU/ml ne ujemajo (slika 24), predvidevamo, da je del bakterij v VBNC-stanju. Ugotavljamo tudi, da je možno, da imajo negoljive (VBNC) bakterije poškodovane membrane in jih kit LIVE/DEAD BacLight (Invitrogen) zazna kot mrtve, saj propidijev jodid prodre skozi poškodovane membrane. Tako verjetno zaradi VBNC-stanja celic s kitom ne moremo ugotoviti pravega stanja celic in bi bilo potrebno uporabiti komercialno dostopne metode za ugotavljanje drugih fizioloških aktivnosti (npr. redukcijo INT (2-(4-jodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-fenil-2H-tetrazolijev klorid) in redukcijo XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolijev-5-carboksanilid) v INT-formazan, kar vidimo v spremembi barve).

V fermentacijskih procesih z bakterjo *E. coli* so večkrat opazili padec v CFU/ml. V primeru rekombinantne fuzijske beljakovine promegapoitin (PMP) so takoj po indukciji zaznali padec CFU/ml na 10 %, medtem ko se je koncentracija biomase še vedno večala. Vendar so s pretočno citometrijo potrdili, da so skoraj vse celice žive, kar se razlikuje od primera citokina LK-KI-001, kjer skupaj z vrednostmi CFU/ml pade tudi živost celic. Padec CFU/ml pa pojasnjuje izguba zmožnosti celic za delitev, ne pa smrt (Sundström in sod., 2004).

Poleg živosti smo spremljali tudi segregacijsko stabilnost plazmidov. Proizvodnja beljakovine TNF-β je potekala brez prisotnega antibiotika, medtem ko je proizvodnja TNF-α ter citokina LK-KI-001 potekala od dodanem antibiotiku. Kljub dodatku antibiotika

pa ima pri beta-laktamskih antibiotikih ta vpliv le v lag fazi ter na začetku eksponentne faze, kasneje pa se razgradi, saj se encim  $\beta$ -laktamaza izloča v gojišče (Baneyx, 1999; Friehs, 2004).

Eksperimentalni podatki kažejo, da med preučevanimi bakterijskimi kulturami (slike 15, 18 in 25) plazmide najdlje zadržijo bakterije z beljakovino TNF- $\alpha$  (slika 15). Segregacijska stabilnost v šestnajstih urah rasti sicer pada s 100 na približno 25 %, vendar ima po dvanajstih urah ob  $OD_{600} \sim 11$  še vedno približno 50 % bakterij plazmide (slika 15). Delež TNF- $\alpha$  ostaja tekom rasti približno enak (približno 20 %), kljub temu da začne segregacijska stabilnost padati. Ti podatki kažejo na to, da je za ohranjanje nivoja beljakovine (in ne dodatnega kopiranja) dovolj 25 % bakterij s plazmidom. O večanju deleža beljakovine med osmo in deseto uro rasti ne moremo govoriti, ker so vzorci analizirani na različnih gelih, česar ne moremo primerjati.

Proizvodnja beljakovine TNF- $\beta$  je potekala brez prisotnega antibiotika, zato le-ta ni izvajal selekcijskega pritiska na bakterije. Rezultati deleža beljakovine TNF- $\beta$  v celotnih celičnih beljakovinah kažejo pričakovano povezano deleža beljakovine v celotnih celičnih beljakovinah ter segregacijske stabilnosti. Od začetka proizvodnje beljakovine pa do osmih ur rasti se je delež beljakovine TNF- $\beta$  povečeval, kljub temu da je segregacijska stabilnost padala, kar nakazuje na to, da je že 20-odstotna segregacijska stabilnost plazmidov dovolj za dobro izražanje beljakovine (slika 18). Po osmih urah pa segregacijska stabilnost pada pod 10 %, zato začne padati tudi delež izražene beljakovine. Poleg tega pa po 8 urah rasti začne padati živost bakterij, kar verjetno še dodatno vpliva na količino izražene beljakovine, podobno kot pri proizvodnji TNF- $\alpha$ .

Zaradi različnih pogojev gojenja ne moremo neposredno primerjati rezultatov seva za proizvodnjo TNF- $\alpha$  in TNF- $\beta$  s sevom za proizvodnjo citokina LK-KI-001. Vsekakor pa so rezultati seva za proizvodnjo citokina LK-KI-001 več kot zanimivi.

V dvanajstih urah gojenja segregacijska stabilnost plazmidov pada s 100 na 20 % (slika 25). V stacionarni fazi pa pada celo pod 10 %. V tem primeru bi, kar se tiče deleža rekombinantne beljakovine, pričakovali podobne rezultate kot v primeru beljakovine TNF- $\beta$ . V začetku, ko je segregacijska stabilnost še precej visoka ter so celice v eksponentni fazi rasti, bi se delež citokina LK-KI-001 povečeval, nato pa bi vrednosti

začele upadati zaradi velikega padca v segregacijski stabilnosti plazmidov ter stacionarne faze rasti. Rezultati pa kažejo ravno nasprotno (slika 25, preglednica 3). Po treh urah gojenja je delež citokina LK-KI-001 približno 11 % vseh celičnih beljakovin, nato pa se delež ustali na okoli 30 % citokina LK-KI-001 po 15 urah gojenja (stacionarna faza rasti). Ti podatki sicer kažejo na to, da je za dobro izražanje beljakovin dovolj le 20 % bakterij, ki nosijo zapis za beljakovino, za ohranjanje nivoja beljakovine (in ne dodatnega kopiranja) pa še manj. Zaradi pojava VBNC-celic pa je pri citokinu LK-KI-001 vprašljiva tudi dejanska segregacijska stabilnost. Obstaja verjetnost, da ima večji del populacije, ki je prešel v VBNC-stanje, plazmide in producira želeno beljakovino.

Pred pričetkom dela smo pričakovali razlike v obnašanju sevov na podlagi tega, ali se beljakovina izraža v topni obliku ali obliku inkluzijskih teles. Ugotovili smo nekatere razlike, čeprav se seva za proizvodnjo citokina LK-KI-001 in TNF- $\beta$ , ki sta večinoma v obliku inkluzijskih teles, ne obnašata podobno, vendar je iz prejšnjih raziskav (Jalen, 2008) znano, da so inkluzijska telesa teh citokinov po topnosti različna. Pri TNF- $\alpha$  pa se kaže možnost, da bi se lahko z dohranjevanjem kulture pridobilo relativno več beljakovine TNF- $\alpha$ .

## 5.2 SKLEPI

- Proizvodnja rekombinantnih beljakovin ima vpliv na živost kulture *E. coli*. Poleg tega pa vsaka od preučevanih beljakovin, verjetno zaradi različnih oblik izražanja (topna oblika, inkluzijska telesa), različno vpliva na živost bakterijske kulture, kar potrjuje prvo zastavljeno delovno hipotezo. Ne moremo pa trditi, da imajo beljakovine, ki se izražajo v obliki inkluzijskih teles, večji vpliv na živost bakterij kot beljakovine, ki se izražajo v topni obliki, zato ovržemo drugo delovno hipotezo.
- Rezultati meritev OD<sub>600</sub> produkcijskega seva za citokin LK-KI-001 se ne ujemajo z rezultati meritev CFU/ml, ujemajo pa se rezultati meritev živosti celic s fluorimetrom z rezultati meritev CFU/ml. Pri beljakovinah TNF-α in TNF-β je ravno obratno, kar kaže, da se v tem primeru bakterije ne pojavljajo v VBNC-stanju.
- Rezultat padca segregacijske stabilnosti plazmidov preučevane kulture ni vedno padec deleža preučevane beljakovine v celotnih celičnih beljakovinah. Visoka raven izražene rekombinantne beljakovine kljub padcu segregacijske stabilnosti pa je verjetno posledica prisotnosti negoljivih bakterij, kar potrjuje tretjo zastavljeno delovno hipotezo.
- Pri bakterijski kulturi, kjer celice zelo verjetno ne preidejo v VBNC-stanje (pri beljakovinah TNF-α in TNF-β), je živost dober indikator stanja celic, vidna je tudi povezava med količino beljakovine in živostjo ter segregacijsko stabilnostjo. Pri bakterijski kulturi, kjer celice zelo verjetno preidejo v VBNC-stanje (pri beljakovini LK-KI-001), pa živost, ugotovljena s kitom LIVE/DEAD BacLight (Invitrogen), ni dober indikator stanja kulture.
- Pri proizvodnji beljakovin v bakterijski kulturi so pomembni parametri poleg standardnih OD<sub>600</sub>, segregacijska stabilnost in delež beljakovin tudi živost bakterijske kulture med proizvodnjo in CFU/ml (ugotavljanje stanja VBNC).

## 6 POVZETEK

Spremljanje živosti bakterij med proizvodnjo rekombinantnih beljakovin je pomembno zaradi izboljšanja pogojev procesa fermentacije ter tako večje proizvodnje rekombinantnih beljakovin. Pri tem pa ima proizvodnja rekombinantne beljakovine velik vpliv na metabolizem bakterije, saj predstavlja metabolno breme in stres. Proizvodnja rekombinantne beljakovine sproži različne stresne signale, povezane s topotnim šokom, nepravilnim zvijanjem beljakovin, ter odziv na težavne razmere (ang., stringent response). To lahko vodi v zmanjšanje proizvodnje beljakovine med procesom fermentacije, saj bakterija za preživetje raje uporabi alternativne metabolne poti kot proizvodnjo beljakovine ter razmnoževanje. Med različnimi fiziološkimi pogoji pa je najpomembnejše ugotavljanje živosti bakterij, saj je živost direktno povezana s proizvodnjo procesa fermentacije.

V diplomskem delu smo vzpostavili metodo za ugotavljanje živosti bakterij s fluorimetrom z uporabo LIVE/DEAD BacLight Viability Kit-a (Invitrogen), ki je zmožen ločevanja med živimi in mrtvimi bakterijami. Spremljali smo vpliv proizvodnje beljakovin TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  in citokina LK-KI-001 na živost kulture *E. coli*. Živost smo ugotavljali z merjenjem s fluorimetrom in z gojitveno metodo na agarskih ploščah LBPG. Zanimala nas je segregacijska stabilnost plazmidov in delež preučevanih beljakovin v celotnih celičnih beljakovinah. Ugotavljali smo tudi topnost preučevanih beljakovin, ker smo pričakovali razlike v obnašanju sevov na podlagi tega, ali se beljakovina izraža v topni oblikih ali oblikih inkluzijskih teles.

Ugotovili smo, da se rezultati meritev OD<sub>600</sub> proizvodnega seva za citokin LK-KI-001 ne ujemajo z rezultati meritev CFU/ml, ujemajo pa se rezultati meritev živosti celic s fluorimetrom in rezultati CFU/ml. Pri beljakovinah TNF- $\alpha$  in TNF- $\beta$  je ravno obratno, kar kaže, da se bakterije ne pojavljajo v VBNC-stanju. Opazna je povezava med količino beljakovine in živostjo ter segregacijsko stabilnostjo. Pri bakterijski kulturi, kjer celice preidejo v VBNC-stanje (pri citokinu LK-KI-001), pa živost, ugotovljena s kitom LIVE/DEAD BacLight (Invitrogen), ni dober indikator stanja kulture.

Eksperimentalni podatki kažejo, da najdlje plazmide zadržijo bakterije, ki proizvajajo beljakovino TNF- $\alpha$ . Rezultat padca segregacijske stabilnosti plazmidov pri proizvodnji citokina LK-KI-001 ni padec deleža citokina v celotnih celičnih beljakovinah. Poleg tega

pa rezultati kažejo, da je za dobro izražanje beljakovin dovolj le 20 % bakterij, ki nosijo zapis za beljakovino, za ohranjanje nivoja beljakovine (in ne dodatnega kopiranja) pa še manj.

## VIRI

Abbas A. K., Lichtman A. H., Pober J. S. 2000. Cytokines. V: Cellular and molecular immunology. 4<sup>th</sup> ed. Schmitt W. (ed.). Philadelphia, W. B. Saunders Company: 235-247.

Anderlini P., Przepiorka D., Champlin R., Körbling M. 1996. Biologic and clinical effects of granulocyte colony-stimulating factor in normal individuals. *Blood*, 88, 8: 2819-2825.

Baena-Ruano S., Jiménez-Ot C., Santos-Dueñas I. M., Cantero-Moreno D., Barja F., García-García I. 2006. Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochemistry*, 41: 1160-1164.

Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 411-421.

Boaretti M., del Mar Lleò M., Bonato B., Signoretto C., Canepari P. 2003. Involvement of *rpoS* in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state. *Environmental Microbiology*, 5,10: 986-996.

Boulos L., Prévost M., Barbeau B., Coallier J., Desjardins R. 1999. LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 77-86.

Braux A., Minet J., Tamanai-Shacoori Z., Riou G., Cormier M. 1997. Direct enumeration of injured *Escherichia coli* cells harvested onto membrane filters. *Journal of Microbiological Methods*, 31: 1-8.

Capecchi M. R. 1980. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, 22: 479-488.

Carneiro S., Veloso A. C. A., Amaral A. L., Rocha I., Ferreira E. C. 2005. Image analysis as a tool for viability and recombinant protein production assessment during *E. coli* fermentations. V: International chemical engineering conference: Chempor, 9, Coimbra, 2005 - 9th International chemical engineering conference. Coimbra, Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra.

<http://hdl.handle.net/1822/3508> (28. apr. 2008): 6 str.

Carrió M. M., Villaverde A. 2002. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. Journal of Biotechnology, 96: 3-12.

Cereghino J. L., Cregg J. M. 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiology Reviews, 24: 45-66.

Cserjan-Puschmann M., Grabherr R., Striedner G., Clementschitsch F., Bayer K. 2002. Optimizing recombinant microbial fermentation processes: an integrated approach. BioPharm, 15: 26-34.

Doljak B. 2007. Rastni in drugi hematopoezni dejavniki. V: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). 1. izd. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 316-317.

Dower W. J., Miller J. F., Ragsdale C. W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Research, 16: 6127-6145.

Felgner P. L., Gadek T. R., Holm M., Roman R., Chan H. W., Wenz M., Northop J. P., Rigold G. M., Danielson M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA transfection procedure. Proceedings of the National Academy Science, 83: 7413-7417.

Friehs K. 2004. Plasmid copy number and plasmid stability. Advances Biochemical Engineering/Biotechnology, 86: 47-82.

Hafner M. Živost bakterijske kulture *Escherichia coli* med proizvodnjo izbranih beljakovin.  
Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medodd. štud. mikrobiologije, 2008

---

González-Montalbán N., Carrió M. M., Cuatrecasas S., Arís A., Villaverde A. 2005. Bacterial inclusion bodies are cytotoxic in vivo in absence of functional chaperones DnaK or GroEL. *Journal of Biotechnology*, 118: 406-412.

Invitrogen. 2002a. Colloidal Blue Staining kit. Version F. Instruction manual: life technologies. Carlsbad, Invitrogen.

[http://www.biozentrum.unibas.ch/mass\\_spec/Files/ColloidalBlue.pdf](http://www.biozentrum.unibas.ch/mass_spec/Files/ColloidalBlue.pdf) (apr. 2008): 16 str.

Invitrogen. 2002b. SimplyBlue SafeStain. Version E. Instruction manual: life Technologies. Carlsbad, Invitrogen.

<http://gibcobrl.net/etc/medialib/en/filelibrary/pdf/expressions.Par.80843.File.dat/Expressions%207.4.pdf> (apr. 2008): 20 str.

Invitrogen. 2004. LIVE/DEAD BacLight Bacterial Vialbility Kits. Carlsbad, Invitrogen. Molecular Probes, 8 str.

Invitrogen. 2007. Novex sharp protein standard. Carlsbad, Invitrogen.

[http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/novex\\_sharp\\_prestained\\_man.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/novex_sharp_prestained_man.pdf) (21. apr. 2008): 4 str.

Jalen Š. 2005. Vpliv pH gojišča na funkcionalnost proteina hG-CSF iz inkluzijskih teles bakterije *Escherichia coli*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 78 str.

Jalen Š. 2008. Topnost beljakovin: osebna komunikacija. Ljubljana, Kemijski inštitut v Ljubljani.

Jana S., Deb J. K. 2005. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67: 289-298.

Jevnikar Z. 2007. Ekspresijski sistemi. V: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). 1. izd. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 75-90.

Jevševal S. 2006. Biosinteza rekombinantnih proteinov v bakteriji *Escherichia coli* pri nizki temperaturi. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 118 str.

Jevševal S., Gaberc-Porekar V., Fonda I., Podobnik B., Grdadolnik J., Menart V. 2005. Production of nonclassical inclusion bodies from which correctly folded protein can be extracted. *Biotechnology Progress*, 21: 632-639.

Kenig M. 2006. Razvoj metod afinitetne kromatografije za izolacijo rekombinantnih proteinov iz bakterije *Escherichia coli*. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 136 str.

Klein T. M., Wolf E. D., Wu R., Sanford J. C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327: 70-73.

Kristl J. 2007. Interlevkini in interferoni. V: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Štrukelj B., Kos J. (ur.). 1. izd. Ljubljana, Slovensko farmacevtsko društvo: 370-399.

LeThanh H., Neubauer P., Hoffmann F. 2005. The small heat-shock proteins IbpA and IbpB reduce the stress load of recombinant *Escherichia coli* and delay degradation of inclusion bodies. *Microbial Cell Factories*, 4:6-18.

Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J. 2003. Brock biology of microorganisms. 10<sup>th</sup> ed. Carlson G. (ed.). Upper Saddle River, Pearson Education, Inc., 144-145; 1001-1002.

Makrides S. C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews*, 60, 3: 512-538.

Maukonen J., Alakomi H., Nohynek L., Hallamaa K., Leppämäki S., Mättö J., Saarela M. 2006. Suitability of the fluorescent techniques for the enumeration of probiotic bacteria in

commercial non-dairy drinks and in pharmaceutical products. Food Research International, 39:22-32.

Novagen. 1998a. pET-19b Vector. Darmstadt, Novagen.

<http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/docs/PROT/TB049.pdf> (21. apr. 2008): 2 str.

Novagen. 1998b. pET-3a Vector. Darmstadt, Novagen.

<http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB026.pdf> (21. apr. 2008): 2 str.

Novagen. 2006. pET System Manual. 11<sup>th</sup> ed. Darmstadt, Novagen. 45-49.

Özkan P., Sariyar B., Ütkür F. Ö., Akman U., Hortaçsu A. 2005. Metabolic flux analysis of recombinant protein overproduction in *Escherichia coli*. Biochemical Engineering Journal, 22: 167-195.

Quéric N., Soltwedel T., Arntz W. E. 2004. Application of a rapid direct viable count method to deep-sea sediment bacteria. Journal of Microbiological Methods, 57: 351-367.

Ruddle N., Ware C. F. 2000. Lymphotoxin  $\alpha$  and  $\beta$ . V: Cytokine reference: a compendium of cytokines and other mediators of host defense. Oppenheim J. J., Feldman M. (ed.). Maryland, Elsevier.

<http://books.elsevier.com/companions> (19. apr. 2008): 95-98

Siak-Wei Ow D., Nissom P. M., Philp R., Kan-Weng Oh S., Gek-Sim Yap M. 2006. Global transcriptional analysis of metabolic burden due to plasmid maintenance in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  during batch fermentation. Enzyme and Microbial Technology, 39: 391-398.

Smilović V. 2006. Razvoj celične linije za določanje biološke aktivnosti interferonov. Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 2-19.

Sundström H., Wållberg F., Ledung E., Norrman B., Hewitt C. J., Enfors S. 2004. Segregation to non-dividing cells in recombinant *Escherichia coli* fed-batch fermentation processes. *Biotechnology Letters*, 26: 1533-1539.

EMEA. 2000. Report CPMP/2/99. London, EMEA-The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. (feb. 1999).

[http://www.emea.europa.eu/search.php?entqr=0&output=xml\\_no\\_dtd&sort=date%3AD%3AL%3Ad1&entsp=0&client=emea\\_frontend&ud=1&oe=UTF-8&ie=UTF-8&proxystylesheet=emea\\_frontend&site=emea\\_collection&q=report+CPMP%2F2%2F99&site=emea\\_collection&btnG=Search](http://www.emea.europa.eu/search.php?entqr=0&output=xml_no_dtd&sort=date%3AD%3AL%3Ad1&entsp=0&client=emea_frontend&ud=1&oe=UTF-8&ie=UTF-8&proxystylesheet=emea_frontend&site=emea_collection&q=report+CPMP%2F2%2F99&site=emea_collection&btnG=Search) (apr. 2008): 23 str.

Tokatlidis K., Dhurjati P., Millet J., Beguin P., Aubert J. P. 1991. High activity of inclusion bodies formed in *Escherichia coli* overproducing *Clostridium thermocellum* endoglucanase D. *FEBS Letters*, 282, 1: 205-208.

Tsumoto K., Umetsu M., Kumagai I., Ejima D., Arakawa T. 2003. Solubilization of active green fluorescent protein from insoluble particles by guanidine and arginine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312, 4: 1383-1386.

Villaverde A., Carrió M. M., Cubarsi R. 2000. Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS Letters*, 471: 7-11.

Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1. izd. Ljubljana, Državna založba Slovenije: 23-32

Welte K., Gabrilove J., Bronchud M. H., Platzer E., Morstyn G. 1996. Filgrastim (r.metHuG-GSF): The first 10 years. *Blood*, 88, 6: 1907- 1929.

Worall D. M., Goss N. H. 1989. The formation of biologically active beta-galactosidase inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Australian Journal of Biotechnology*, 3, 1: 28-32.

Yin J., Li G., Ren X., Herrler G. 2007. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. Journal of Biotechnology, 127: 335.347.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se dr. Simoni Jevševal, ki mi je omogočila izvedbo diplomske naloge in mi pomagala s strokovnimi nasveti.

Hvala Špeli Jalen za uvedbo v laboratorijsko delo, za pomoč pri izvedbi eksperimentalnega dela ter za vse nasvete pri pisanju diplomskega dela.

Iskrena hvala vsem iz Laboratorija za biosintezo in biotransformacijo na Kemijskem inštitutu za pomoč pri delu v laboratoriju ter moralno podporo.

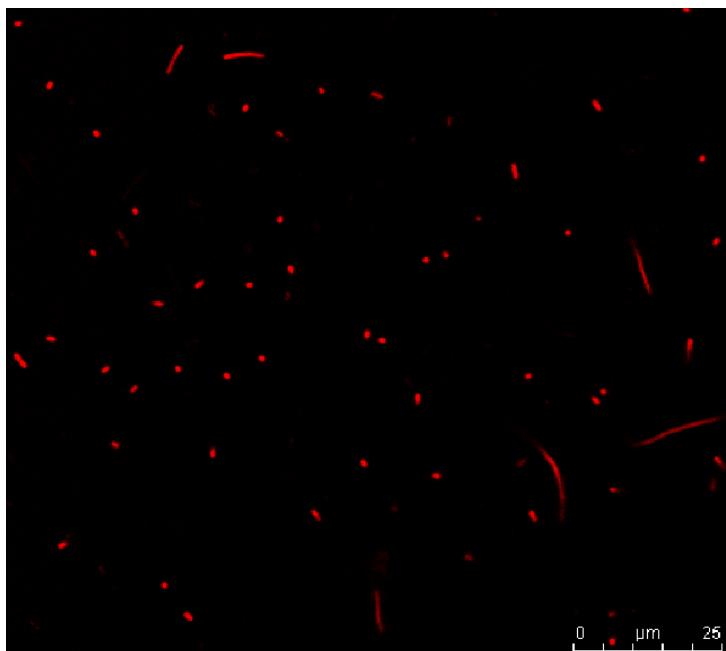
Posebna zahvala je namenjena mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar za strokovne nasvete in kritike pri pisanju diplomskega dela ter čas, ki si ga je vzela zame.

Za recenzijo diplomske naloge se zahvaljujem prof. dr. Gorazdu Avguštinu.

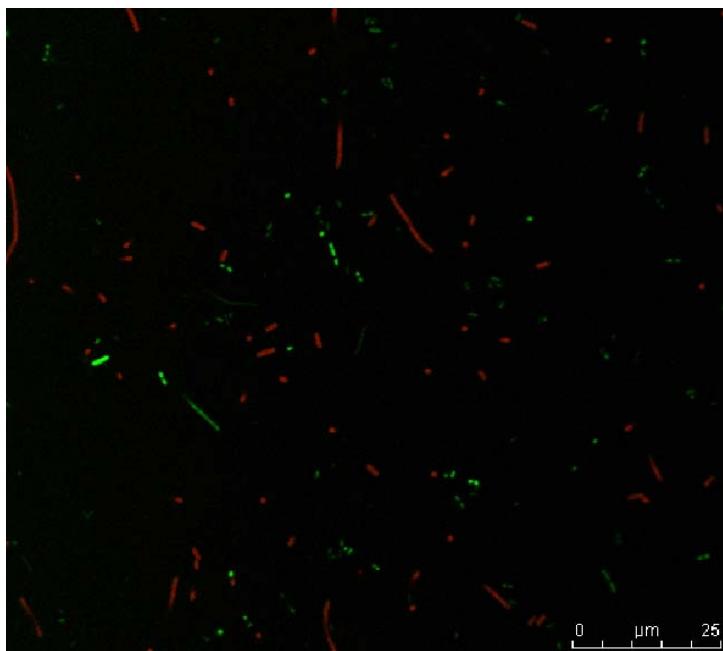
Nenazadnje gre velika zahvala mojim najbližnjim, ki so me podpirali pri doseganju zastavljenih ciljev.

## PRILOGE

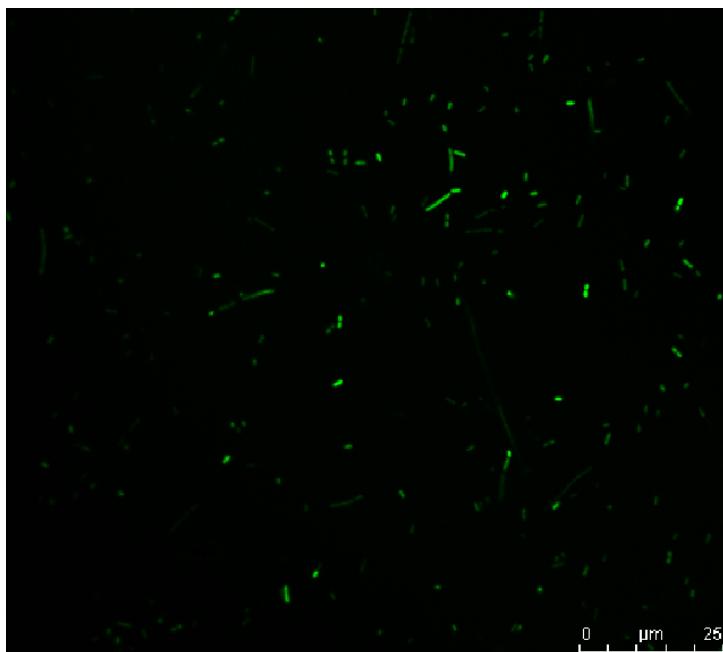
OPAZOVANJE VZORCEV POD KONFOKALNIM LASERSKIM MIKROSKOPOM  
(Leica TCS SP5)



Priloga A: Vzorec 100-odstotno mrtvih bakterij *E. coli* BL21(DE3), ubitih z 2-propanolom in pobarvanih z LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit-om (Invitrogen). Na sliki so vidne bakterijske celice, obarvano rdeče.



Priloga B: Vzorec 50-odstotno mrtvih bakterij *E. coli* BL21(DE3), ubitih z 70-odstotnim 2-propanolom in pobarvanih z LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit-om (Invitrogen). Na sliki so vidne tako mrtve, redeče obarvane bakterijske celice, kot žive, zeleno obarvane bakterijske celice v približnem razmerju 1:1.



Priloga C: Vzorec 100-odstotno živih bakterij *E. coli* BL21(DE3), pobarvanih z LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit-om (Invitrogen). Na sliki so vidne samo zeleno obarvane, torej žive bakterijske celice.