

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Helena ISTINIČ

**DOLOČITEV EPITOPOV MONOKLONSKIH
PROTITELES PROTI ČLOVEŠKEMU PERFORINU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Helena ISTINIČ

**DOLOČITEV EPITOPOV MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI
ČLOVEŠKEMU PERFORINU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EPITOPES MAPPING AGAINST HUMAN PERFORIN USING
MONOCLONAL ANTIBODIES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Gregorja ANDERLUHA.

Komisija za oceno in zagovor diplomskega dela imenovana na seji dne 10.04.2009:

Predsednica: prof.dr. Kristina SEPČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH, mentor
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 12.11.2010

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje diplomske naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Helena ISTINIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK 577.27:576.8(043.2)=163.6
KG perforin/mapiranje/monoklonska protitelesa/epitopi
AV ISTINIČ, Helena
SA ANDERLUH, Gregor
KZ SI 1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2010
IN DOLOČITEV EPITOPOV MONOKLONSKIH PROTITELES PROTI ČLOVEŠKEMU PERFORINU
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP X, 33 [1] str., 1 pregl., 13 sl., 43 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Perforin je pomembna efektorska molekula, ki sodeluje pri odstranjevanju virusno okuženih in tumorigenih celic. Sintetizirajo ga citotoksični T limfociti in naravne celice ubijalke. Nahaja se v citotoksičnih granulah in se po stiku efektorske celice s tarčno celico sprosti v ekstracelularni prostor. Loči se od proteoglikanov sekretorne granule in vključuje v membrano tarčne celice. Pri pH nižjem od 6,2 izgubi litično aktivnost.
Perforin je sestavljen iz signalnega peptida, ki se odcepi v lumnu ER. Sledi mu N-terminalni del z membranolitičnimi lastnostmi in konformacijo amfipatičnega heliksa. Sredino molekule predstavlja MACPF domena, ki tvori poro v membrani tarčne celice. Sledita še EGF domena ter C2 domena na C-terminalnem delu, ki je pomembna za vezavo na lipidno membrano. Proti C-terminalnem delu sledi mesto proteolitične cepitve. Protein vsebuje dve možni mesti za N-glikozilacijo (205 in 249).
V diplomskem delu smo želeli opredeliti epitope nekaterih komercialno dostopnih monoklonskih protiteles proti človeškemu perforinu (Pf-80, Pf-164 in Pf-344) s prenosom proteinov po Westernu. Uporabili smo dele perforina izražene v heterolognem ekspresijskem sistemu *E.coli*.
Ugotovili smo, da monoklonska protitelesa Pf-80 ne prepoznajo linearnih epitopov. Monoklonska protitelesa Pf-164 prepoznajo linearne epitope znotraj regije 200-264, monoklonska protitelesa Pf-344 pa prepoznajo linearne epitope v regiji 373-388, kar odgovarja delu regije EGF. Vezava protiteles Pf-344 na perforin je neodvisna od pH. Vezava perforina na membrano je odvisna od Ca²⁺.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC 577.27:576.8(043.2)=163.6
CX perforin/mapping/monoclonal antibodies/epitop
AU ISTINIČ, Helena
AA ANDERLUH, Gregor
PP SI 1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY 2010
TI EPI TOPE MAPPING AGAINST HUMAN PERFORIN USING MONOCLONAL ANTIBODIES
DT Graduation thesis (University studies)
NO X, 33 [1] p., 1 tab., 13 fig., 43 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Perforin is an important effector molecule involved in removing virus-infected and tumorigenic cells. It is synthesized by cytotoxic T lymphocytes and by natural killer cells. It is located in the secretory cytotoxic granules and released upon contact of the effector cells with the target cells in the extracellular space. It splits up from the proteoglycans secretory granules and it incorporates into the membrane of the target cell. At pH below 6,2 it loses its lytic activity.
Perforin is composed of signal peptide, which is cleaved off in the lumen ER. It is followed by the N-terminal region with the properties and the conformation of the membranolytic amphipathic helix. The MACPF domain represents the molecule's center, forming a pore in the membrane of the target cell. It is followed by the EGF domain and the C2 domain in the C-terminal part, which is important for the binding to the lipid membrane. In the proximity of the C-terminal part, the proteolytic cleavage site is located. The protein contains two potential sites for N-glycosylation (205 and 249).
In this thesis we wanted to define epitopes of some commercially available monoclonal antibodies against human perforin (Pf-80, Pf-164 and Pf-344) with Western blotting. We used parts of perforin expressed in the *E. coli* heterologous expression system.
We found that monoclonal antibodies Pf-80 do not recognize linear epitopes. Monoclonal antibodies Pf-164 recognize the segments of the linear epitopes in the region 200-264, monoclonal antibodies Pf-344 recognize the linear epitopes in the region 373-388, which corresponds to part of the region EGF. Binding of antibodies Pf-344 to perforin is not affected by pH. Binding of perforin to the membrane is calcium dependent.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJ NALOGE.....	1
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 PERFORIN.....	2
2.1.1 Zgradba	2
2.1.2 Delovanje	3
2.2 PROTITELESA.....	5
2.2.1 Zgradba in delovanje	5
2.2.2 Uporaba protiteles	7
2.2.3 Študij monoklonskih protiteles proti človeškemu perforinu.....	9
3 MATERIAL IN METODE	11
3.1 MATERIAL	11
3.1.1 Kemikalije in drobna oprema	11
3.1.2 Geli	11
3.1.3 Raztopine za SDS-PAGE elektroforezo in imunobarvanje	12
3.1.4 Raztopine za spiranje eritrocitov	13
3.1.5 Protitelesa	13
3.1.6 Laboratorijska oprema	14

3.2 METODE	15
3.2.1 Izražanje delov perforina v <i>E. coli</i>	15
3.2.2 SDS polikrilamidna gelska elektroforeza	15
3.2.3 Prenos proteinov po Westrenu in imunodetekcija	15
3.2.4 Spiranje eritrocitov	16
4 REZULTATI	17
4.1 VEZAVA MONOKLONSKIH PROTITELES	17
4.1.1 Monoklonska protitelesa Pf-80	18
4.1.2 Monoklonska protitelesa Pf-164	19
4.1.3 Monoklonska protitelesa Pf-344	21
4.2 VPLIV pH NA VEZAVO MONOKLONSKIH PROTITELES Pf-344 NA PERFORIN	23
4.3 VPLIV Ca ²⁺ NA VEZAVO PERFORINA NA MEMBRANO	24
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	25
5.1 RAZPRAVA	25
5.1.1 Vezava monoklonskih protiteles	26
5.1.2 Vpliv pH na vezavo monoklonskih protiteles Pf-344 na perforin	26
5.1.3 Vpliv Ca ²⁺ na vezavo perforina na membrano	27
5.2 SKLEPI	28
6 POVZETEK	29
7 VIRI IN LITERATURA	30

ZAHVALA

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Potek spiranja eritrocitov pri vezavi PFN na eritrocite.	16
---	-----------

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz človeškega PFN.	2
Slika 2: Mehanizmi GrB, ki povzročijo smrt tarčne celice.....	4
Slika 3: Shematski prikaz protitelesa.	5
Slika 4: Shematski prikaz človeškega PFN in deli PFN uporabljeni v diplomski nalogi za vezavo monoklonskih protiteles.....	17
Slika 5: Primarna monoklonska protitelesa proti človeškemu perforinu Pf-80.....	18
Slika 6: Shematski prikaz človeškega PFN in uporabljeni deli PFN za vezavo z monoklonskimi protitelesi Pf-80.....	18
Slika 7: Primarna monoklonska protitelesa proti človeškemu perforinu Pf-164.....	19
Slika 8: Shematski prikaz človeškega PFN in uporabljeni deli PFN za vezavo z monoklonskimi protitelesi Pf-164.....	20
Slika 9: Primarna monoklonska protitelesa proti človeškemu perforinu Pf-344.....	21
Slika 10: Shematski prikaz človeškega PFN in uporabljeni deli PFN za vezavo z monoklonskimi protitelesi Pf-344.....	22
Slika 11: Vezava primarnih monoklonskih protiteles proti človeškemu perforinu Pf-344 pri različnih pH.....	23
Slika 12: Izotipna kontrola s primarnimi protitelesi anti-Golgin 97 pri različnih pH.	23
Slika 13: Spiranje eritrocitov.....	24

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

% (m/v)	delež snovi, določen kot razmerje mase te snovi z volumnom celotne raztopine
% (v/v)	delež snovi, določen kot razmerje volumna te snovi z volumnom celotne raztopine
° C	stopinja Celzija (enota za temperaturo)
A ₆₃₀	absorbanca pri 630 nm
AK	aminokislina
angl.	angleško
APS	amonijev persulfat
BSA	goveji serumski albumin (angl. bovine serum albumin)
C2	domena na C-terminalnem delu perforina
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kislina
CDR	komplementarnost določujoča regija (angl. complementary determining region)
CTL	citotoksični limfociti T
dH ₂ O	destilirana voda
DTT	ditiotreitrol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamino tetraacetat
EGF	domena podobna epidermalnemu rastnemu dejavniku (angl. epidermal growth factor) v osrednjem delu perforina
ELISA	encimsko imunski test (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
ER	endoplazemski retikulum
Fab	lahka veriga na protitelesu z veziščem za antigen (angl. fragment antigen binding)
Fc	težka veriga na protitelesu, ki se da kristalizirati (angl. fragment crystallizable)
g	gram (enota za maso)
GA	Golgijev aparat
Gr	grancim
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
HIV	virus človeške imunske pomanjkljivosti (angl. human immunodeficiency virus)
Ig	imunoglobulin
IHC	imunohistokemija (angl. immunohistochemistry)
kDa	kilodalton (enota za molsko maso)
LMW	proteinski standard (angl. low molecular weight)

M	molarna koncentracija
mA	miliamper (enota za električni tok)
MACPF	perforinska domena, ki napade membrane (angl. membrane attack complex components)
min	minuta (enota za čas)
μl	mikroliter (enota za tekočine)
ml	mililiter (enota za tekočine)
mm	milimeter (enota za dolžino)
mM	milimolarna koncentracija
NK celice	naravne celice ubijalke (angl. natural killer)
nm	nanometer (enota za dolžino)
PAGE	polikrilamidna gelska elektroforeza
PFN	perforin
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije ionov H ₃ O ⁺
PHK	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
PVDF	polivinil-difluorid
RIA	radioimunska analiza
rpm	vrtljaji na minuto (angl. revolutions per minute)
SIV	virus opičje imunske pomanjkljivosti (angl. simian immunodeficiency virus)
SDS	natrijev dodecil sulfat
TEMED	N,N,N,N-tetrametil-etilendiamin
Tol	protein ToIA
V	volt (enota za električno napetost)

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Perforin je 555 aminokislin dolg citolitični protein, ki ga proizvajajo celice ubijalke imunskega sistema (citotoksični T limfociti in naravne celice ubijalke). Je pomembna efektorska molekula pri odstranjevanju virusno okuženih in tumorskih celic. Njegovo delovanje je odvisno od koncentracije Ca^{2+} in pH. Sintetizira se v endoplazemskem retiklu, kjer se iz N-terminalnega dela odcepi signalni peptid, dolg 21 aminokislin. Nato se zrel perforin prenese v citotoksične granule. Po stiku tarčne in efektorske celice se sprosti v ekstracelularni prostor. V lipidni membrani tarčnih celic tvori perforin transmembranske pore, ki v končni fazi privedejo do propada celice. Za tvorbo pore je odgovorna MACPF domena, ki predstavlja sredino molekule. Tej domeni sledi EGF domena z neznano funkcijo. Na lipidno membrano se perforin veže s C-terminalno C2 domeno. Vezava je odvisna od Ca^{2+} .

Študij perforina je zahteven zaradi občutljivosti proteina in pomanjkanja občutljivih metod. Zato so znanstveniki razvili reaktivna monoklonska protitelesa in uporabili tehniki ELISA in sendvič ELISA.

V diplomskem delu smo opredelili epitope nekaterih komercialno dostopnih monoklonskih protiteles proti človeškemu perforinu (Pf-80, Pf-164 in Pf-344). Uporabili smo dele perforina izražene v heterolognem ekspresijskem sistemu *E.coli*. Uporabljena protitelesa so koristno orodje pri študiju delovanja človeškega perforina, kjer je poznavanje epitopov ključno za interpretacije rezultatov.

1.2 CILJ NALOGE

S prenosom proteinov po Westernu smo opredelili epitope monoklonskih protiteles proti človeškemu perforinu.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Monoklonska protitelesa (Pf-80, Pf-164, Pf-344) prepoznajo linearne epitope.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PERFORIN

2.1.1 Zgradba

Perforin (PFN) je protein, ki tvori pore, velik cca 67 kDa (Bolitho et al., 2007). Je sekretorni protein, ki ga sintetizirajo citotoksični T-limfociti (CTL) in naravne celice ubijalke (NK celice) (Uelner et al., 1997). Celice CTL in NK imajo ključno vlogo v imunskem sistemu pri prepoznavanju in neposrednem uničenju virusno okuženih in tumorskih celic (Vozelj, 2000).

PFN se začne s signalnim peptidom dolgim 21 aminokislin (Slika 1), ki se odcepi v lumnu ER. Protein iz 534 aminokislin vsebuje po predvidevanjih iz cDNA dve možni mesti (205 in 249) za N-glikozilacijo (Lichtenheld et al., 1988). Sredina proteina vsebuje okoli 300 aminokislin dolg odsek, ki je podoben C9-komponenti komplekta in naj bi bil vključen v tvorbo pore v membrani tarčne celice (Uelner et al., 1997) - MACPF (perforinska domena, ki napade membrane). Tej domeni sledita EGF domena, z neznano funkcijo, in C2 domena (Bolitho et al., 2007). C2-domena se nahaja na C-terminalnem delu in naj bi bila pomembna za vezavo na lipidne membrane (Lichtenheld et al., 1988). C- in N-terminalni del sta edinstvena za PFN (Uelner et al., 1997). Na N-terminalnem delu je signalni peptid (Letunic et al., 2006). Ta del zrelega proteina ima membranolitične lastnosti in zavzema konformacijo amfipatičnega heliksa (Natarajan in Cowan, 1998). Proti C-terminalnem delu sledi mesto proteolitične cepitve (Uelner et al., 1997). Cepitev poteče v kislem razdelku, na poti iz ER in GA, preden pride do citotoksičnih granul (Uelner et al., 1997).



Slika 1: Shematski prikaz človeškega PFN.

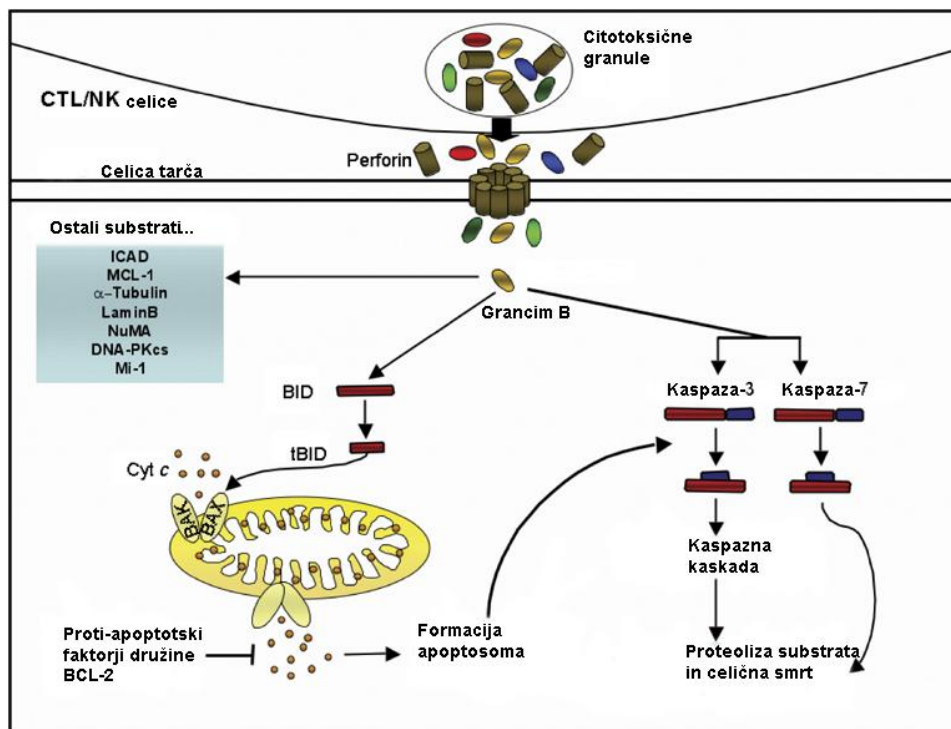
2.1.2 Delovanje

Človeški perforin se najprej sintetizira kot dolg prekurzor, ki ni aktiven. To je predhodnik zrele in aktivne oblike shranjene v litičnih granulah CTL in NK-celic. Neaktivna oblika preprečuje poškodbo membrane ER in Golgijevega aparata (GA) (Uelner et al., 1997). Po nastanku imunološke sinapse se granule v citosolu efektorske celice usmerijo proti mestu kontakta s tarčo, nato se zlijejo z membrano efektorske celice in izločijo svojo vsebino v imunološko sinapso (Stinchcombe in Griffiths, 2003).

Perforin uničuje tarčne celice učinkovito in ni škodljiv za celice, v katerih se sintetizira. K temu pripomore več mehanizmov. Litične granule, v katerih je shranjen perforin, so kisli razdelki, ki vsebujejo proteoglikane (Griffiths in Argon, 1995). Njihov nizki pH naj bi ojačal interakcije med perforinom in proteoglikani (Masson et al., 1990). Vezava perforina na fosfolipidni dvosloj in homopolimerizacija znotraj membran sta od kalcija odvisna procesa (Masson et al., 1990). Ob sekreciji se zvišata pH in koncentracija kalcijevih ionov. To naj bi omogočilo ločitev PFN od proteoglikanov in njegovo vključitev v membrano tarčne celice (Masson et al., 1990).

PFN polimerizira v transmembranske kanale ter povzroči osmotski stres in tako olajša ciljnim celicam privzem proapoptotskih grancimov (Gr) (Baran et al., 2009). PFN je ključna komponenta citolitične mašinerije: po izločanju se veže in vstavi v fosfolipidni dvosloj tarčnih celic ter tvori poro veliko ~ 16 nm v premeru (Lowin et al., 1995). Te pore inducirajo smrt tarčnih celic po dveh poteh: z osmotsko lizo in s sproščanjem drugih komponent litičnih granul (Darmon et al., 1996). PFN z Gr v tarčni celici na imunski sinapsi je glavna pot za indukcijo apoptoze z virusom okuženih celic in tumorjev (Shi et al., 2005), je glavna efektorska molekula citotoksičnih granul in skupaj s proapoptotskimi Gr inducira smrt tarčne celice (Slika 2). Gr vstopijo v celice po od-PFN-neodvisni poti s pomočjo endocitoze po elektrostatski vezavi na membrane (Bird et al., 2005).

Gr B pride v celico v procesu popravljanih mehanizmov, ki ga inducira PFN (Keefe et al., 2005). PFN v sublitičnih koncentracijah tvori prehodne male pore v plazmatski membrani celice, kar povzroči prehajanje Ca^{2+} ionov v celico vzdolž koncentracijskega gradienta. Tako se aktivirajo popravljalni mehanizmi v celici, ki inducirajo homo- in heterotipično zlivanje znotrajceličnih membranskih veziklov, da nastanejo »membranske krpice«, ki popravijo poškodovano membrano (Keefe et al., 2005). Zaradi velikega zlivanja znotrajceličnih veziklov se na površini membrane pojavijo mehurčki, omejeni z membrano, ki vsebujejo lumenski protein lizosomov (Keefe et al., 2005). S popravljanjem membrane telo prepreči nastanek nekrotične smrti poškodovanih celic, ki bi izzvale močan vnetni imunski odziv (Keefe et al., 2005). Namesto tega se take celice popravijo in tako omogočijo apoptotično smrt. Fagociti prepoznajo apoptotične celice in jih fagocitirajo, kar predstavlja manj škode za sosednje celice in omogoči imunskim celicam, da ohranijo specifičnost za tarčne celice (Keefe et al., 2005).



Slika 2: Mehanizmi GrB, ki povzročijo smrt tarčne celice.
Prirejeno po (Cullen in Martin, 2008).

Povečana pH in koncentracija Ca^{2+} pospešita sprostitvev PFN iz proteoglikanov ter njegovo vezavo in insercijo v plazmatske membrane tarčnih celic (Masson et al., 1990). To razloži, kako je PFN hranjen neaktiven pred sekrecijo v litičnih granulah, ne pa, kako je PFN hranjen neaktiven med njegovo biosintezo, ko gre skozi membrano, kot je npr. ER, z bolj nevtralnimi pH in višjo koncentracijo Ca^{2+} (Uellner et al., 1997). Ko se odcepi del PFN na C-terminalnem delu, nastane 60 kDa velika aktivna oblika PFN. Propeptid sestavlja 21 aminokislin z vezanim glikanom, ki sterično ovira C2-terminalno domeno, da bi se vezala na fosfolipidni dvosloj. Ko se odcepi, se C2-domena izpostavi in PFN se lahko veže na celično membrano. Ta cepitev poteče v kislem okolju (Uellner et al., 1997). PFN brez končnega C-terminalnega dela se ne transportira v citotoksične granule, ampak ostane v ER, kjer se razgradi. To nakazuje na dejstvo, da PFN ni pravilno zvit brez tega dela in ne more preko mehanizmov ER, ki odstranjujejo napačno zvite proteine (Uellner et al., 1997).

Ca^{2+} je potreben za vezavo C2 domene (Ishiura et al., 1990). Ta domena je odgovorna za vezavo na membrano in za od- Ca^{2+} -odvisno polimerizacijo (Uellner et al., 1997). PFN pri pH nižjem od 6,2 popolnoma izgubi litično aktivnost (Voskoboinik et al., 2005).

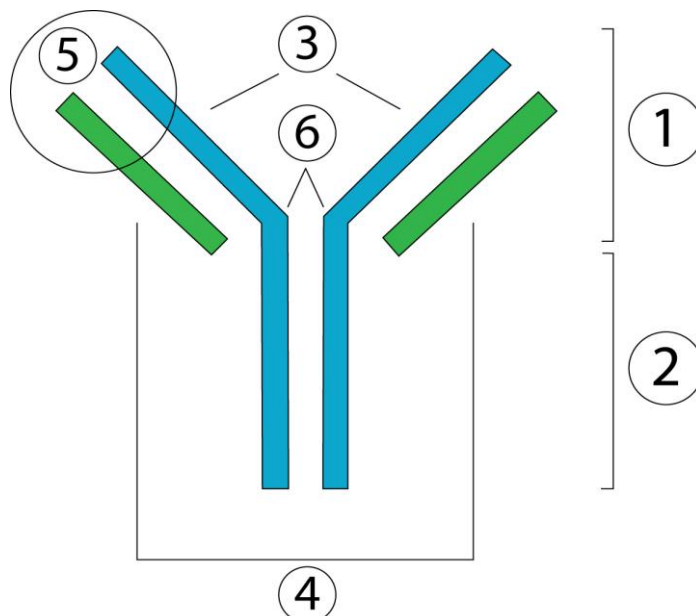
Mutacije v zapisu za PFN lahko vodijo do hude bolezni družinske hemofagocitne limfocitocitoze (FHL, angl. familial hemophagocytic lymphohistiocytosis) (Voskoboinik et al., 2004). To je dedna oblika hemofagocitnih sindromov, ki je smrtna, če se je ne zdravi (Ménasché et al., 2005). Sindrom je posledica nezmožnosti CTL, da odstranijo Ag-predstavitvene celice, kar vodi do prekomerne nekontrolirane aktivacije in ekspanzije celic T ter makrofagov in močno povišanega nivoja citokinov v plazmi (Ménasché et al., 2005).

2.2 PROTITELESA

2.2.1 Zgradba in delovanje

Protitelesa so glikoproteini, ki imajo obliko črke Y in so sestavljena iz dveh enakih lahkih verig in dveh enakih težkih verig, ki so povezane z disulfidnimi vezmi. Protitelo se deli v približno tri enake fragmente: približno na sredini težke verige sta oba fragmenta z veziščem za antigen (Fab) vezana na fragment, ki nima zmožnosti vezanja z antigenom (Fc), ima pa druge efektorske funkcije. Mesto vezišča (tečaj) je gibljivo in omogoča, da se kot med fragmentoma Fab spreminja od 0 do 180° (Slika 3).

Vsaka veriga je sestavljena iz linearno ponavljajočih se podobnih globularnih kompaktnih segmentov iz približno 110 aminokislin. V vsakem segmentu napravi ena vez S-S pentljo iz približno 60 AK. Lahke verige imajo dva taka segmenta, težke pa od štiri do pet. V aminoterminalnem variabilnem segmentu zaporedja vsake težke in lahke verige so tri hipervariabilne regije, CDR, ki določajo komplementarnost in pri lahkih verigah sestavljajo vezišče za antigen ter določajo njegovo specifičnost.



Slika 3: Shematski prikaz protitelesa.

1-regija za vezavo antigena-Fab, 2-regija za vezavo na druge elemente imunskega sistema-Fc,
3-težka veriga, 4-lahka veriga, 5-mesto vezave antigena, 6-tečaj.

Protitelesa so monoklonska in poliklonska. Prva so produkti enega klona limfocitov B. Vse protitelesne molekule, ki jih celice določenega klona izločajo, imajo enako vezišče za antigen in so torej usmerjene proti istemu epitopu. Poliklonska protitelesa izhajajo iz več različnih klonov protitelesa izdelujočih celic, vsa pa reagirajo z istim antigenom.

Antigen je vsaka snov (proteini, polisaharidi, lipidi), ki se specifično veže z molekulo protitelesa. Vezišče za antigen se nahaja v fragmentu Fab. Del molekule antigena, ki se specifično veže z veziščem za antigen na protitelesu, imenujemo epitop (antigenska determinanta). Epitope delimo v dve skupini. Linearne determinante so kovalentno vezana zaporedja približno šestih aminokislin. Konformacijske determinante so sestavljene iz aminokislin, ki so na ločenih delih linearnega aminokislinskega zaporedja in se po zvitju znajdejo skupaj.

Proučevanja z majhnimi antigenskimi molekulami so odkrila, da celice B in celice T spoznajo različne epitope na isti antigenski molekuli. Celice B spoznajo topne antigene, če se vežejo na njihove membrane. Ker celice B vežejo antigen, ki je prost v raztopini, morajo biti epitopi dostopna mesta na izpostavljeni površini imunogena. Velikost epitopa je določena z velikostjo, obliko in aminokislinami v protitelesnem vezišču. Ogljikovi hidrati, nukleinske kisline, peptidi in hapteni, se navadno vežejo na protitelo v globok konkaven žep. Monoklonska protitelesa pa so vezana na globularne proteinske antigene po veliki ploski površini. Te stične površine so lahko ravne ali valovite z izboklinami na eni molekuli, ki so usklajene z vdolbinami na drugi molekuli.

Epitopi, ki jih spoznajo T-celice, so navadno sestavljeni iz aminokislin, ki so znotraj molekule. Ti epitopi so dostopni imunskemu sistemu šele po predelavi antigena, pri čemer nastanejo majhni peptidi, ki se vežejo z molekulo PHK (poglavitni histokompatibilnostni kompleks) razreda I ali II. Te molekule imajo vdolbino, v katero se selektivno vežejo številni antigeni peptidi. Epitopi, ki jih spoznajo celice T, so deloma opredeljeni tudi z določeno molekulo PHK, ki jo izraža posameznik.

Pri vezanju antigena s protitelesi sodelujejo nekovalentne sile (vodikove vezi, ionske vezi, hidrofobne interakcije in van der Waalove sile). Te interakcije so šibke, zato je potrebno veliko interakcij, da nastane močna vez med protitelesom in antigenom.

V vsaki določeni molekuli protitelesa je ena od petih težkih verig (μ , γ , α , δ in ϵ) in ena od dveh lahkih (κ ali λ). Te verige imenujemo izotipe. Izotipi težke verige določajo pet razredov protiteles (IgM, IgG, IgA, IgD in IgE) in efektorske funkcije molekule, kot so npr. vezanje na celice, vezanje komplementa ipd., nimajo pa nobene zveze z vezanjem antigena, torej s specifičnostjo. IgG in IgA se delita še na podrazrede (IgG1-4 in IgA1-2). Izotipi se razlikujejo po efektorskih funkcijah, po povprečni koncentraciji v serumu in po razpolovnem času.

Določeni tipi protiteles enega človeka se lahko razlikujejo od istega tipa protiteles drugega človeka po determinantah, imenovanih alotipi. Določajo jih alelni geni in se dedujejo po Mendlovih pravilih. Ti označevalci niso povezani niti z veziščem za antigen niti z drugimi biološkimi funkcijami.

Z izrazom idiotip pa označujemo antigenske značilnosti variabilne regije na molekulah protitelesa. Vsako vezišče za antigen je določeno z drugačnim aminokislinskim zaporedjem. Del tega zaporedja imenujemo idiotopi. Idiotopi lahko spodbujajo nastajanje protiteles v lastnem telesu (Vozelj, 2000).

Jerne je predpostavil, da lahko idiotope, ki jih izraža posamezno protitelo, prepoznajo druga protitelesa, imenovana antiidiotipska protitelesa, ki nastajajo v lastnem organizmu. Na isto mesto na protitelesu se tako lahko vežeta antigen in antiidiotipsko protitelo, saj sta si strukturno podobna, zato bi lahko antiidiotipsko protitelo posnemalo delovanje antigena v bioloških reakcijah, čemur pravimo molekularna mimikrija (Jerne, 1974).

Antiidiotipska protitelesa se lahko uporabi v raziskavah delovanja encimov, kjer prevzemajo njihovo katalitično aktivnost (Izadyar et al., 1993). Lahko se jih uporabi tudi v raziskovanju površinskih celičnih receptorjev, ki jih je težko izolirati v zadostnih količinah za imunizacijo. Z omenjenimi protitelesi, ki kot imunogeni posnemajo vezišče receptorja, lahko pridobimo monoklonska protitelesa proti receptorju, ki ga želimo izolirati. Zaradi notranje podobe so antiidiotipska protitelesa uporabna tudi v terapevtske namene za razvoj cepiv (Greenspan in Bona, 1993).

2.2.2 Uporaba protiteles

S protitelesi lahko lociramo njihove tarčne molekule v posamezni celici ali tkivu z različnimi tehnikami označevanja. Vezana protitelesa lahko napravimo vidna z različnimi občutljivimi tehnikami. Z vezanimi protitelesi na antigen lahko dobimo pomembne podatke o zgradbi celice.

Z imunoprecipitacijo lahko vse aktivno sintetizirane celične proteine zaznamujemo presnovno z inkubiranjem celic v mediju z radioaktivnimi aminokislinami. Zaznamovane celice speremo in jih nato liziramo z detergentom. Posamezne celične proteine precipitiramo z monoklonskimi protitelesi, pritrjenimi na trdno podlago. Ostale proteine speremo. Ko označene proteine osamimo s protitelesi, jih lahko opredelimo na več načinov. Najpogosteje se uporablja polikrilamidno gelsko elektroforezo. Nevezane proteine odstranimo, vezane pa izperemo v detergentu v SDS, ki jih disociira od protiteles ter obda proteine z močnim negativnim nabojem, kar jim omogoči, da potujejo po njihovi velikosti v polikrilamidni gelski elektroforezi. Lahko nadaljujemo s prenosom proteinov po Westernu in imunodetekcijo.

Imunofluorescenca je občutljiva tehnika za opredeljevanje s protitelesi vezanih molekul v celici ali tkivu. Pri tej tehniki vežemo na protitelesa fluorescentna barvila, ki absorbirajo eno, emitirajo pa drugo barvo svetlobe. Emitirano svetlobo opazujemo s fluorescenčnim mikroskopom, ki ima svetilko z UV svetlobo ter vzbujevalne in zaporne filtre. Obarvanje pripravkov je lahko neposredno, ko se protitelo direktno veže z barvilom, ali posredno, ko neoznačeno protitelo odkrijemo z dodatnim označenim reagentom. Slednje ima dve prednosti: primarnih protiteles ni potrebno označiti, tako se izognemo izgubi protiteles, ki bi nastala ob označevanju in posredna metoda je veliko bolj občutljiva, zaradi vezanih številnih označenih molekul, kar omogoča visoko ločljivost.

Westernov prenos (blotting) je tehnika za analizo proteinskih antigenov. Z SDS elektroforezo najprej ločimo proteine med seboj, tako da ustrezajo položaji različnih proteinov v gelu velikosti njihovih molekul. Ločene proteine nato prenesemo z gela na membrano s pivnanjem na podlagi kapilarnosti ali z elektroforezo, tako da so na membrani makromolekule v natančno taki razvrstitvi kot v gelu. SDS se odstrani s proteinov med prenašanjem in nativne antigenske determinante se navadno spet oblikujejo, ko se proteini vnovič zvižejo. Položaj antigena na membrani lahko določimo z vezanjem zaznamovanih protiteles in dobimo podatek o velikosti antigena (Vozelj, 2000).

Imunohistokemija (IHC) je tehnika, ki se jo uporablja za identifikacijo in lokalizacijo antigenov v celicah tkiv. Vzorce se fiksira in obarva. Glavni namen fiksacije tkiv je ohranjanje morfologije celic ter tkiv in antigenskih molekul, ki jih je treba opredeliti in narediti dostopne za primarna protitelesa (Muzi in Bologna, 1999).

Pri radioimunskem poskusu (RIA) uporabljamo radioaktivno zaznamovan antigen ali protitelo in je zato izredno občutljiva tehnika. RIA v tekoči fazi temelji na načelu tekmovanja med zaznamovanim in nezaznamovanim antigenom za omejeno količino protiteles. Pri RIA na trdni fazi se antigen ali protitelo imobilizira na trdnem matriksu. Obe tehniki uporabljamo za kvantitativno določevanje antigena ali protiteles (Vozelj, 2000).

Načelo encimsko imunskega testa, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), je podobno načelu RIA z razliko, da uporabljamo namesto radioaktivne oznake encim, konjugiran s protitelesom, ki reagira z brezbarvnim substratom, pri čemer nastane obarvan produkt. Test uporabljamo indirektno za kvantitativno določevanje protiteles (Vozelj, 2000). Preizkus se uporablja za določitev titra seruma imuniziranih mišk in za presejalni test supernatanta (Zuber et al., 2005; Zuber et al., 2006). Serum s primarnim protitelesom damo v mikrotitersko jamico prekrito z antigenom, in pustimo, da interagirata. Nevezana protitelesa speremo in določimo vezana protitelesa z dodajanjem z encimom konjugiranega sekundarnega antiizotopskega protitelesa, ki se veže s primarnim protitelesom. Prosta sekundarna protitelesa speremo in dodamo substrat za encim. Obarvani produkt reakcije merimo s spektrofotometrom za merjenje v mikrotiterskih ploščicah. To metodo lahko uporabljamo za ugotavljanje virusa HIV v telesu (Vozelj, 2000). Kompetitivna ELISA se uporablja za oceno specifičnosti epitopov različnih monoklonskih protiteles proti PFN. ELISA se uporablja tudi za primerjavo funkcionalnosti kombinacije para monoklonskih protiteles in za kvantifikacijo vrednosti PFN v celicah supernatanta (Zuber et al., 2005; Zuber et al., 2006).

Kvantitativno pa uporabljamo metodo sendvič ELISA za določevanje antigenov z več epitopi. Pri tej tehniki imobiliziramo v mikrotiterski jamici protitelo, dodamo vzorec z antigeni in pustimo, da reagira s protitelesi. Ko jamico speremo, dodamo drugo z encimom vezano protitelo, specifično za drug epitop na antigenu, in pustimo, da reagira z vezanim antigenom. Druga prosta protitelesa odstranimo, dodamo substrat in izmerimo obarvan produkt reakcije (Vozelj, 2000).

Pretočna citometrija je metoda za merjenje markerjev na ali v celicah oz. delcih v tekočih vzorcih. Pri tem je pomembno, da nam metoda omogoča merjenje na vsaki posamezni celici v vzorcu, ki tečejo ena za drugo skozi pretočni citometer. Merimo lahko sipanje svetlobe na celicah, pri čemer dobimo informacijo o velikosti in granularnosti posamezne celice. Poleg tega lahko merimo s celic oddano fluorescenco, ki je posledica vezave specifičnih, s fluorokromom označenih protiteles na opazovane celične markerje. S kombiniranjem dobljenih podatkov lahko v vzorcu ločimo posamezne populacije celic, določimo njihov delež, opazujemo specifični marker le na posamezni populaciji itd. Zaradi navedenih lastnosti je pretočna citometrija posebej uporabna za analizo heterogenih vzorcev, npr. krvi (Valtriani et al., 1997).

Pri imunodifuziji dodamo v bližnje jamice agaroznega gela antigen in protitelesa, ki difundirajo eden proti drugemu in napravijo na stiku difuzijskih front dobro vidne precipitacijske pasove, ki jih napravimo vidne s spiranjem gela, da odstranimo topne proteine, in z obarvanjem precipitacijskih pasov.

Aglutinacija je zlepljenje delcev, ki imajo na svoji površini antigenske determinante, ki jih pomešamo s specifičnimi protitelesi. Pri mikroorganizmih in celicah so antigenske determinante naravna sestavina njihove površine. Lahko pa so inertni delci, umetno prekrti z antigeni. Protitelesa, ki povzročajo take reakcije, imenujemo aglutinine. Prebitek protiteles preprečuje aglutinacijo (učinek procone) (Vozelj, 2000).

2.2.3 Študije monoklonskih protiteles proti človeškemu perforinu

Eliminacija okuženih ali defektnih celic je pomemben imunološki proces, ki ga vodijo CTL in NK celice. Proces uničenja zavzema degranulacijo različnih proteinov, vključno s perforinom in grancimi, ki skupaj povzročijo apoptozo tarčne celice (Russell in Ley, 2002).

Samo eno komercialno dostopno monoklonsko protitelo obstaja proti celotni dolžini človeškega perforina ($\delta G9$), ki so ga ustvarili pri imunizaciji miši z granulami iz človeških limfnih celic linije YT (Hameed et al., 1992). Monoklonsko protitelo $\delta G9$ se pogosto uporablja za detekcijo intracelularnega PFN pri pretočni citometriji (Rukavina et al., 1998) in imunohistokemiji (Hameed et al., 1992, Anderson et al., 1999) ter tudi za detekcijo topnega PFN pri imunoprecipitaciji (Metkar et al., 2002).

Pomanjkanje občutljivih metod za detekcijo in kvantifikacijo PFN ovira študije tega ključnega proteina (Fraser et al., 2000, Metkar et al., 2002). Razvoj občutljivega zasledovanja pri merjenju PFN pri imunskih testih bo olajšalo načrtovanje študij pri razjasnjevanju regulatornih mehanizmov PFN in osvetlitev vloge PFN pri grancimih.

Merjenje PFN pri imunskih testih zahteva protitelesa, ki prepoznajo vsaj dve različni determinanti PFN. Take kombinacije protiteles se lahko uporablja za merjenje ravni PFN v celicah supernatanta z ELISA, ali za določitev števila celic, ki vsebujejo PFN, s sendvič ELISA (Czerkinsky et al., 1988).

Zuber in sodelavci so v študijah proizvedeli in ocenili mišja monoklonska protitelesa specifična za človeški perforin. Kombinacija monoklonskih protiteles pokaže različne sposobnosti epitopov, ki so bile opredeljene in uporabljene za kvantifikacijo PFN v celicah supernatanta z ELISA, ali za določitev števila celic s PFN s sendvič ELISA. Z uporabo teh novih orodij je bila ekipa sposobna preučiti PFN iz CTL klona in zmeriti PFN stimuliran z virusnimi CTL epitopi (Zuber et al., 2005).

Zuber s sodelavci je tudi opazoval makake okužene s SIV (simian immunodeficiency virus) (Zuber et al., 2006). Makaki predstavljajo pomemben živalski model za infekcije s HIV-1 in predstavlja orodje v razvoju cepiva proti HIV-1 (Haigwood, 2004).

Funkcionalna ustreznost PFN s SIV/HIV1 okužbami je področje aktivnih raziskav. HIV-1 CD8⁺ T celice predstavljajo pri večini pacientov vir majhnih količin PFN, kar lahko oslabi njegovo citolitično funkcijo (Appay et al., 2000). Celice CD8⁺ T v limfnih tkivih (Andersson et al., 1999), vključno z bezgavkami in prebavno sluznico, kažejo omejeno ekspresijo PFN (Shacklett et al., 2004). Nasprotno HIV-1 CD8⁺ T celice iz HIV-1 pozitivnih bolje uravnavajo nivo PFN, če se jih stimulira s HIV-1 okuženimi avtolognimi CD4⁺ T celicami (Migueles et al., 2002).

Ta odkritja so pomembna za PFN pri imunski kontroli HIV-1. Kljub temu pa je vloga PFN pri SIV okužbah težavna za preučevanje zaradi pomanjkanja reagentov in metod za detekcijo PFN. Zuber s sodelavci je ocenil človeški PFN in specifična monoklonska protitelesa za navzkrižno reaktivnost s PFN makaka in njihovo sposobnost detekcije PFN makaka pri citometriji in IHC (Zuber et al., 2005). Uporabil je kombinacijo monoklonskih protiteles z različnimi epitopi za kvantifikacijo PFN makaka z ELISA in določitev števila celic s PFN s sendvič ELISA. S temi novimi orodji so lahko izmerili imunski odgovor inducirani s himernim cepivom S-HIV (virus opičje-človeške imunske pomanjkljivosti) (Zuber et al., 2006).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Kemikalije in drobna oprema

- 4-kloro-1-naftol Sigma, ZDA
- akrilamid Bio-Rad, ZDA
- APS Serva, Nemčija
- BSA Merck, Nemčija
- Coomassie Brilliant Blue Bio-Rad, ZDA
- DTT Merck, Nemčija
- EDTA Merck, Nemčija
- glicerol Kemika, Hrvaška
- glicin Merck, Nemčija
- HEPES Merck, Nemčija
- metanol Merck, Nemčija
- Na₂HPO₄ Merck, Nemčija
- NaCl Merck, Nemčija
- očetna kislina Merck, Nemčija
- proteinski standard Fermentas, Kanada
- PVDF membrana Merck, Nemčija
- SDS Merck, Nemčija
- TEMED Sigma, ZDA
- Tris Merck, Nemčija
- Tris-HCl Merck, Nemčija
- vodikov peroksid Merck, Nemčija

3.1.2 Geli

- 12% ločitveni gel:
 - 0,9 ml akrilamida
 - 1,552 ml dH₂O
 - 0,375 ml 3M Tris pufer (pH 8)
 - 20 µl 10% SDS
 - 150 µl 1,5% APS
 - 3 µl TEMED
- nanašalni gel:
 - 0,25 ml akrilamida
 - 1,4725 ml dH₂O
 - 0,625 ml 0,5 M Tris pufer (pH 7,6)
 - 25 µl 10% SDS
 - 125 µl 1,5% APS
 - 2,5 µl TEMED

3.1.3 Raztopine za SDS-PAGE elektroforezo in imunobarvanje

Raztopine so pripravljene v destilirani vodi (dH₂O).

- 10 × pufer za SDS-PAGE:
 - 35 mM SDS
 - 25 mM Tris
 - 1,92 M glicin
- 2 × nanašalni pufer za SDS-PAGE:
 - 120 mM Tris-HCl
 - 0,2% Comassie Brilliant Blue (m/v)
 - 10% glicerol (v/v)
 - 4% SDS (m/v)
 - pH 8
- raztopina za barvanje SDS-PAGE gelov:
 - 10% očetne kisline (v/v)
 - 40% metanola (v/v)
 - 0,5% Comassie Brilliant Blue (m/v)
- pufer za mokri prenos PVDF membrane po Westernu:
 - 100 ml pufera za SDS-PAGE
 - 200 ml metanola
 - 700 ml dH₂O
- pufera za spiranje PVDF membrane:
 1. 20 mM Tris (pH 7,5)
 - 150 mM NaCl
 2. 20 mM HEPES (pH 5,5)
 - 150 mM NaCl
- pufer za razvijanje PVDF membrane (developing solution):
 - 3g Tris
 - 8g NaCl
 - 0,1g Na₂ HPO₄
- peroksidazni substrat:
 - 50 ml developing solution
 - 30 mg 4-kloro-1-naftol v 10 ml metanola
 - 60 µl H₂O₂
- pufer za blokiranje PVDF membrane:
 - 4% BSA (m/v) v pufru za spiranje PVDF membrane

3.1.4 Raztopine za spiranje eritrocitov

- eritrocitni pufri:
 1. 130 mM NaCl
20 mM Tris
pH 7,4
 2. 20 mM HEPES
150 mM NaCl
1 mM CaCl₂
pH 5,5
 3. 20 mM HEPES
150 mM NaCl
1 mM EDTA
pH 5,5
 4. 20 mM HEPES
150 mM NaCl
1 mM CaCl₂
pH 7,4
 5. 20 mM HEPES
150 mM NaCl
pH 7,4

3.1.5 Protitelesa

- primarna protitelesa proti človeškemu perforinu Pf-344 (Mabtech, Švedska)
- primarna protitelesa proti človeškemu perforinu Pf-164 (Mabtech, Švedska)
- primarna protitelesa proti človeškemu perforinu Pf-80 (Mabtech, Švedska)
- primarna protitelesa anti-Golgin 97 (Abcam, Velika Britanija)
- primarna mišja protitelesa proti pentahistidinskemu repku (Qia Gen, ZDA)
- sekundarna kozja proti-mišja protitelesa konjugirana s hrenovo peroksidazo (Santa Cruz Biotechnology, ZDA)

3.1.6 Laboratorijska oprema

- aparatura za elektroforezo PowerPac HC Bio-Rad, ZDA
- aparatura za prenos proteinov iz gela na PVDF membrano PowerPac 1000 Bio-Rad, ZDA
- centrifuga Centric 322A Tehtnica, Slovenija
- centrifuga Centrifuge 5415D Eppendorf, Nemčija
- centrifuga Sigma 3K30 Sigma, ZDA
- magnetno mešalo Ika RCT Basic, ZDA
- čitalec mikrotiterskih plošč MRX Dynex Technologies, ZDA
- pH-meter Seven Multi Metlar-Toledo, ZDA
- sonikator Vibra cell Sonics & Materials, ZDA
- stresalnik Stovall Life Science, ZDA
- tehtnica Sartorius, Nemčija
- vibracijski stresalnik Vibromix 10 Tehtnica, Slovenija

3.2 METODE

3.2.1 Izražanje delov perforina v *E. coli*

Netopne usedline določenih fragmentov človeškega perforina izraženih v heterolognem bakterijskem okolju (*E. coli*) so bile že pripravljene in shranjene na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (oznake: 22, 181, 8, 101, 13, 2+, M, EGF). Pripravila sta jih Gregor Anderluh in Zdravko Podlesek na Oddelku za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Tem smo dodali po 10 μl destilirane H_2O , 10 μl 1M DTT in 20 μl $2 \times$ nanašalnega pufra. Nato smo jih 5 min kuhali pri $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ in centrifugirali 5 min pri 13,200 rpm. Ostalim usedlinam (oznake: 1, 2, 3, 4, 5) pa smo dodali različne volumne 1M DTT in destilirane H_2O v razmerju 1:1. Vzorce smo nato sonicirali, dodali toliko $2 \times$ nanašalnega pufra, kolikor je bil skupni volumen 1M DTT in destilirane H_2O , kuhali pri $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min in centrifugirali 10 min pri 13,200 rpm. Vzorce smo alikvotirali po 10 μl in jih shranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Proteine smo nato prenesli po Westernu in preverili s protitelesi Anti-5-His, če so se izrazili v *E. coli*.

3.2.2 SDS polikrilamidna gelska elektroforeza

Elektroforezo smo izvedli na PowerPac HC sistemu, na SDS-PAGE gelih debelih 0,75 mm z desetimi žepki. Najprej smo na stojalcu naredili ločitveni 12% gel, ga pokrili z dH_2O do vrha in počakali, da polimerizira. Po 30 min smo dH_2O odstranili in nad ločitvenim gelom vtili nanašalnega, v katerega smo dali glavniček, s katerim smo naredili žepke, v katere smo kasneje vnesli vzorce, in počakali spet 30 min, da še nanašalni gel polimerizira. Gel smo nato prenesli v banjico z $1 \times$ elektroforeznim pufrom za SDS-PAGE, odstranili glavniček ter v žepke vnesli marker in vzorce. Elektroforeza je potekala približno 45 min pri konstantni napetosti 200 V.

Po končani elektroforezi smo proteine v gelu prenesli na PVDF membrano po Westernu ali pa obarvali s Coomassie modrim barvilom. Najprej smo gel $3 \times$ po 10 min spirali na stresalniku z dH_2O , nato smo ga čez noč pustili v barvilu na stresalniku in ga naslednjega dne zopet spirali $3 \times$ po 10 min z dH_2O na stresalniku.

3.2.3 Prenos proteinov po Westernu in imunodetekcija

Proteine smo z mokrim prenosom iz SDS polikrilamidnega gela prenesli na PVDF membrano na PowerPac 1000 sistemu. Membrano smo pred prenosom 30 min namakali v metanolu, peno in papirčke za prenos pa v pufru za mokri prenos PVDF membrane po Westernu. Na nastavek smo dali peno, tri papirčke, gel, membrano, tri papirčke in peno. V aparaturo smo tako sestavljen sklop dali na tak način, da je bil gel na strani katode, membrana pa na strani anode. Prenos je potekal pri 150 mA 90 min.

Po končanem prenosu smo membrano blokirali z 20 ml pufra za blokiranje PVDF membrane in jo tako pustili na stresalniku čez noč. Naslednjega dne smo pufer odlili ter dodali 10 ml novega in 5 μ l ali 2,5 μ l (Pf-344) oz. 10 μ l (Pf-164, Pf-80, anti Golgin 97 ali anti 5 His) primarnih protiteles. Membrano smo inkubirali na stresalniku dve uri, nato pa jo 5 \times po 5 min spirali z enim od dveh pufrov za spiranje PVDF membrane. Zopet smo jo dve uri inkubirali v 10 ml pufra za blokiranje PVDF membrane z 10 μ l sekundarnih kozjih proti-mišjih protiteles. Po končani inkubaciji je sledilo spiranje 5 \times po 5 min s pufrom za spiranje PVDF membrane, pH 7,5.

Na koncu smo PVDF membrano razvili v peroksidaznem substratu za detekcijo sekundarnih protiteles. Po potrebi smo dodali 30 mg 4-kloro-1-naftol v 10 ml metanola in 60 μ l H₂O₂.

3.2.4 Spiranje eritrocitov

Sveže človeške eritrocite smo najprej 2 \times spirali s pufrom za spiranje eritrocitov 1 in 2 \times centrifugirali po 5 min pri 2500 obratih. Nato smo v tri epruvete dali 200-500 μ l eritrocitov in vsako epruveto spirali 2 \times z ustreznim pufrom (2, 3 ali 4) ter centrifugirali 2 \times po 5 min. Pri 630 nm smo zmerili absorbanco (0,5) posamezne eritrocitne suspenzije 200 μ l in jo dali 5 min na led. Po spodnji tabeli smo dali v 6 (Preglednica 1) epruvet eritrocitno suspenzijo sprano z odgovarjajočim pufrom in centrifugirali 10 min pri obratih 15 000 g pri 4 °C. Nato smo odstranili supernatant in spirali z 200 μ l pufra po Preglednici 1. Dodali smo po 2 μ l perforina v puftru 5, v razmerju 1:1. Centrifugirali smo 10 min pri obratih 15 000 g pri 4 °C. Odstranili smo supernatant in usedline resuspendirali v 10 μ l nanašalnega pufra (1 \times) z DTT. Vse vzorce smo nanegli na gel. Elektroforeza je trajala 80 min pri konstantni napetosti 150 V.

Preglednica 1: Potek spiranja eritrocitov pri vezavi PFN na eritrocite.

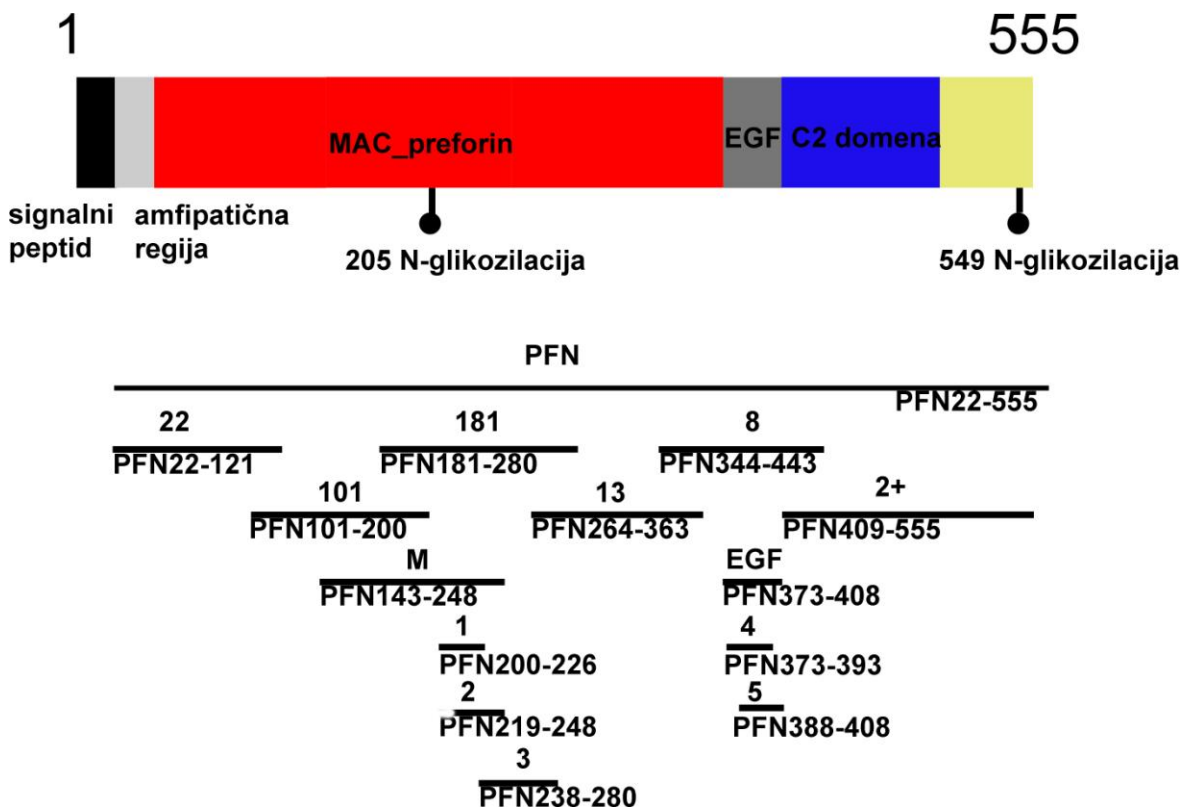
	1	2	3	4 (kontrola)	5	6
Pufer pH	5,5	5,5	5,5	7,5	7,4	7,4
Ca²⁺, EDTA	EDTA	Ca ²⁺	Ca ²⁺	-	Ca ²⁺	Ca ²⁺
Spiranje z	EDTA	Ca ²⁺	EDTA	-	Ca ²⁺	EDTA
Eritrocitna suspenzija	100 μ l	100 μ l	100 μ l	-	100 μ l	100 μ l
PFN	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
2 \times nanašalni pufer	-	-	-	5 μ l	-	-
DTT	-	-	-	3 μ l	-	-

Po končani elektroforezi smo opravili prenos na PVDF membrano po Westernu.

4 REZULTATI

4.1 VEZAVA MONOKLONSKIH PROTITELES

V heterolognem ekspresijskem sistemu *E.coli* smo izrazili različne fragmente PFN (Slika 4). S prenosom proteinov po Westernu smo nato opredelili epitope monoklonskih protiteles proti človeškemu perforinu.

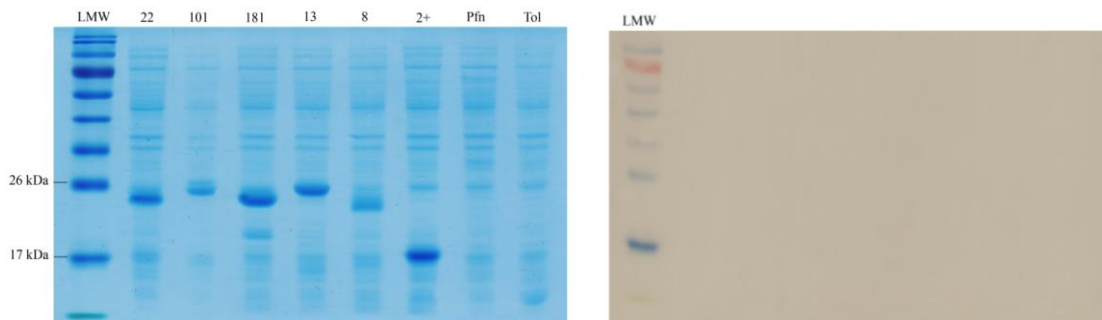


Slika 4: Shematski prikaz človeškega PFN in deli PFN uporabljeni v diplomski nalogi za vezavo z monoklonskimi protitelesi.

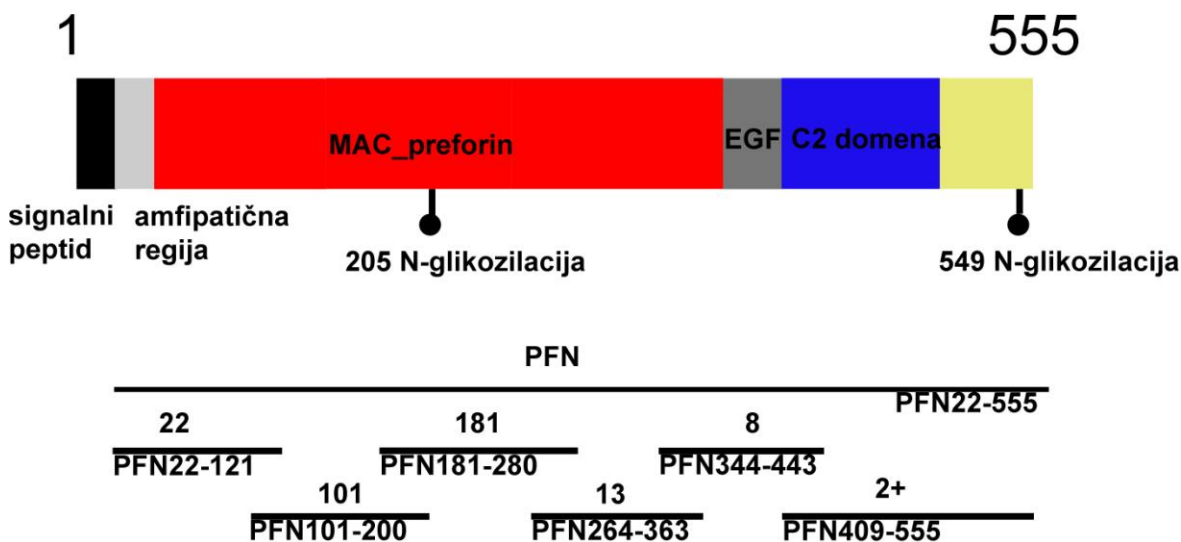
Dolžina črnih črt spodaj predstavlja dolžino uporabljenih fragmentov PFN, ki se na sliki nahajajo glede na odgovarjajoči zgornji prikaz celotnega PFN. Oznake pod črto označujejo začetek in konec zaporedja AK, ki sestavljajo fragment PFN, oznake nad črto pa so oznake, s katerimi smo ločevali fragmente med seboj.

4.1.1 Monoklonska protitelesa Pf-80

Po 3 μ l vsakega vzorca fragmentov PFN smo nanesti na gel. Uporabili smo 10 μ l primarnih monoklonskih protiteles. Membrano smo razvijali v peroksidaznem substratu 30 min. Noben fragment na PVDF membrani se ni obarval (Slika 5, Slika 6). Poskus smo naredili 1 \times .



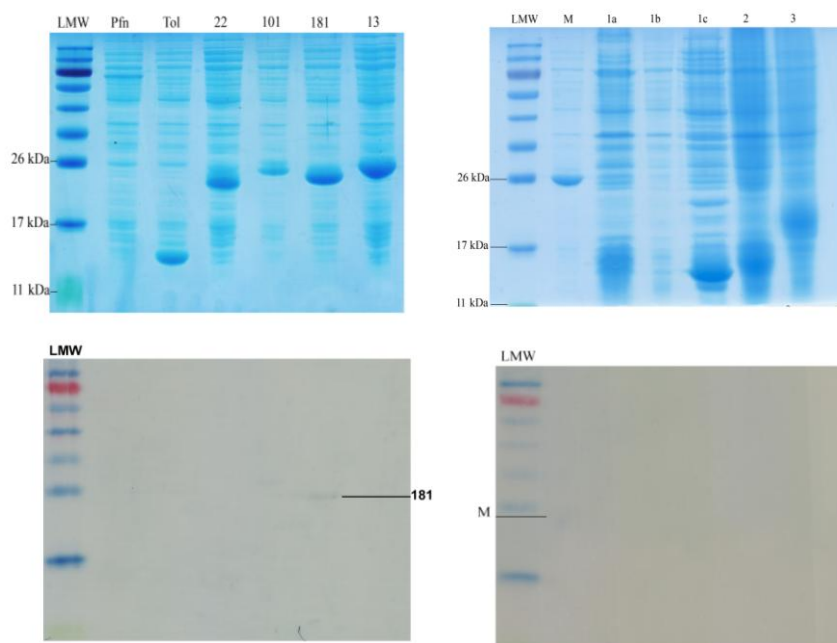
Slika 5: Primarna monoklonska protitelesa proti človeškemu perforinu Pf-80.



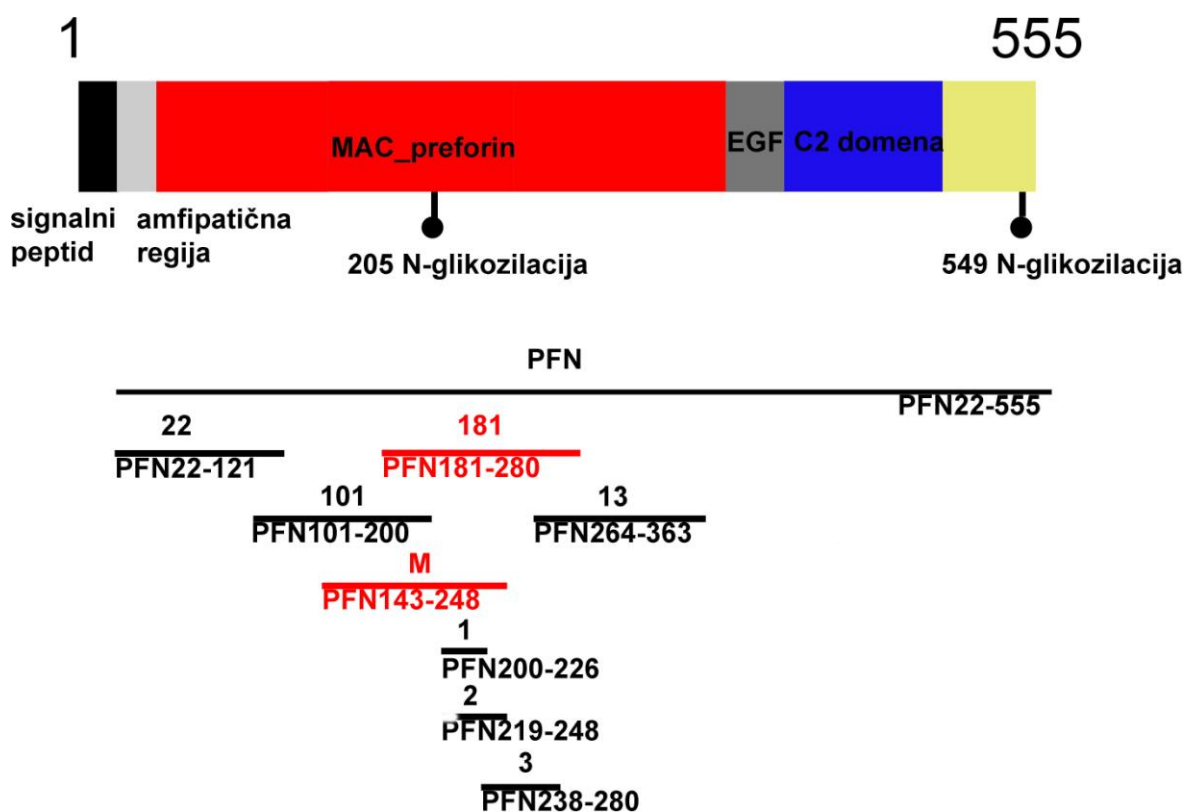
Slika 6: Shematski prikaz človeškega PFN in uporabljeni deli PFN za vezavo z monoklonskimi protitelesi Pf-80.

4.1.2 Monoklonska protitelesa Pf-164

Na gel smo nanесли po 10 μ l vzorca fragmentov PFN. Uporabili smo 10 μ l primarnih monoklonskih protiteles. Membrano smo razvijali v peroksidaznem substratu skoraj eno uro. Peroksidazni substrat smo dodali dvakrat. Obarvala sta se fragmenta M in 181 (Slika 7, Slika 8). Poskus smo izvedli 6 \times . Zaradi težav pri izražanju smo za fragmenta 1 (PFN200-226) uporabili tri različne bakterijske seve in fragment 1 tako označil z 1a, 1b in 1c.



Slika 7: Primarna monoklonska protitelesa proti človeškemu perforinu Pf-164.
1a-fragment izražen v *E. coli* BL21(DE3) pLysE, 1b-fragment izražen v *E. coli* BL21(DE3),
1c-fragment izražen v *E. coli* ORIGAMI(DE3) pLysS.

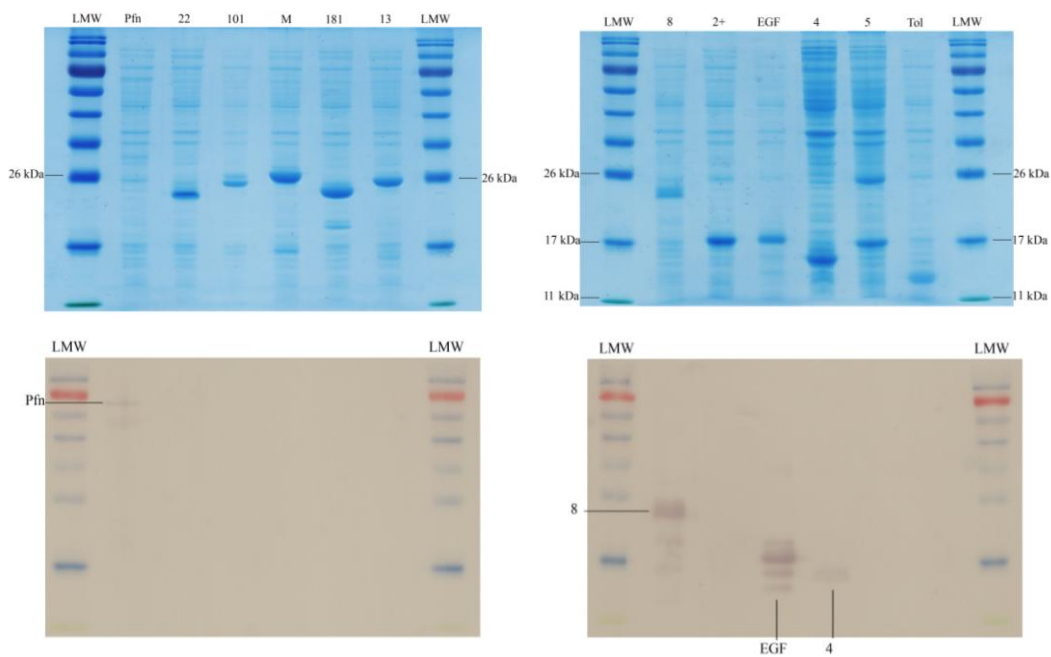


Slika 8: Shematski prikaz človeškega PFN in uporabljeni deli PFN za vezavo z monoklonskimi protitelesi Pf-164.

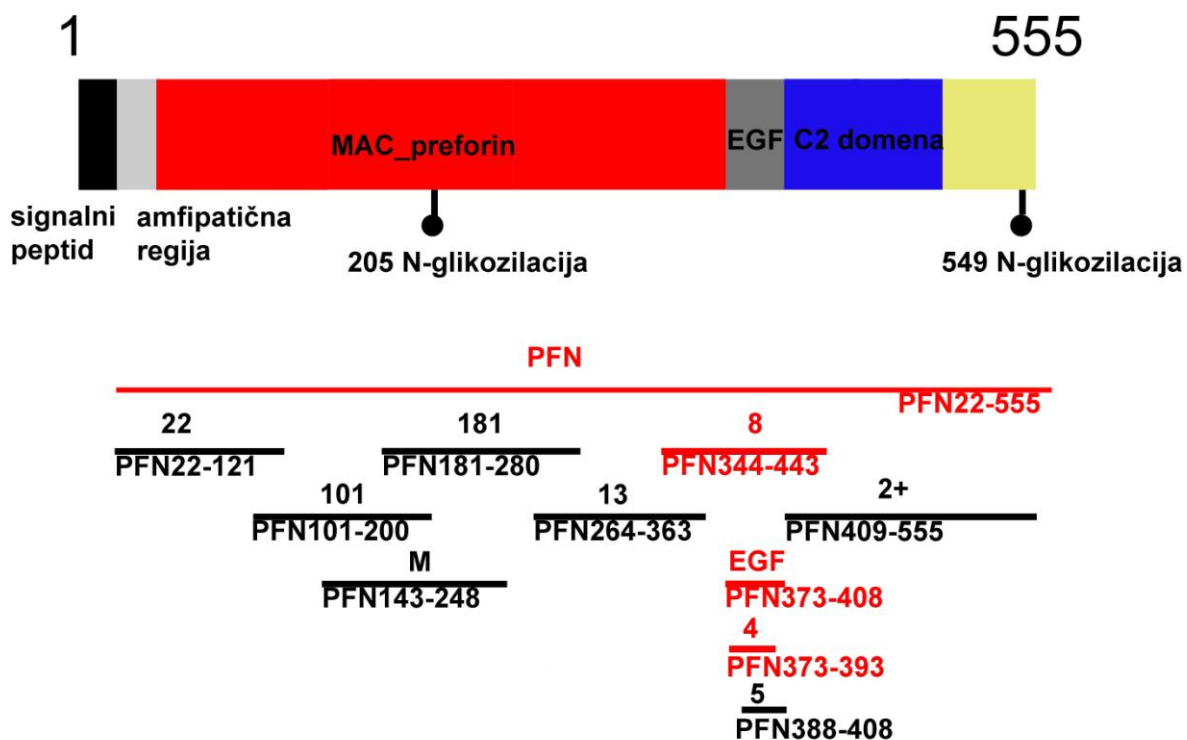
Z rdečo sta označena fragmenta, na katera so se vezala monoklonska protitelesa Pf-164.

4.1.3 Monoklonska protitelesa Pf-344

Po 3 μ l vsakega vzorca fragmentov PFN smo nanegli na gel. Uporabili smo 2,5 ali 5 μ l primarnih monoklonskih protiteles. Membrano smo razvili v nekaj minutah, saj so se fragmenti (8, EGF in 4 in PFN) hitro obarvali (Slika 9, Slika 10). Poskus smo izvedli 3 \times .



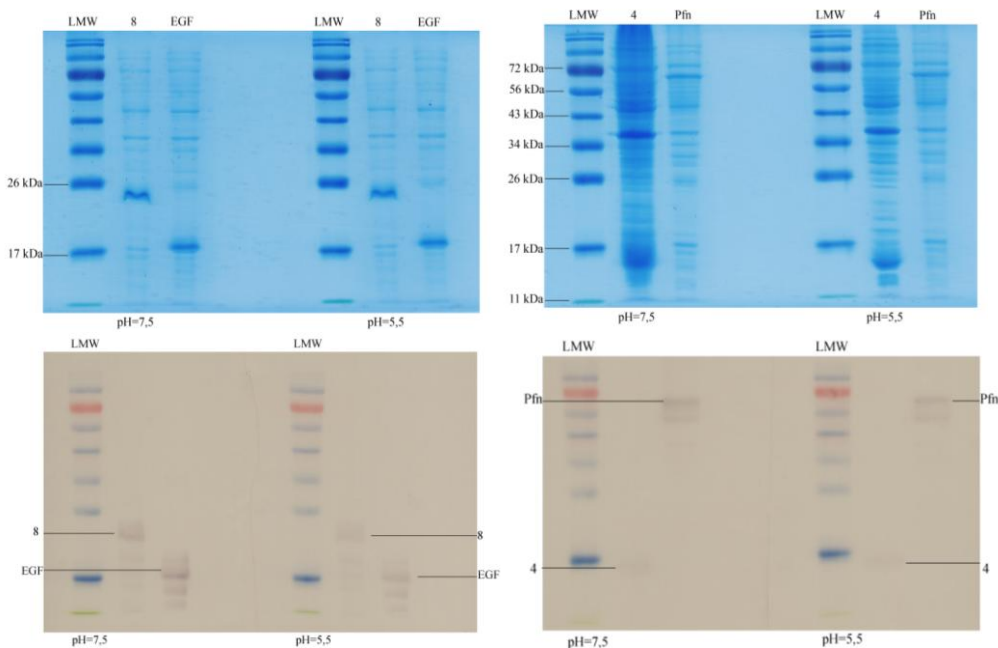
Slika 9: Primarna monoklonska protitelesa proti človeškemu perforinu Pf-344.



Slika 10: Shematski prikaz človeškega PFN in uporabljeni deli PFN za vezavo z monoklonskimi protitelesi Pf-344. Z rdečo so označeni fragmenti, na katere so se vezala monoklonska protitelesa Pf-344.

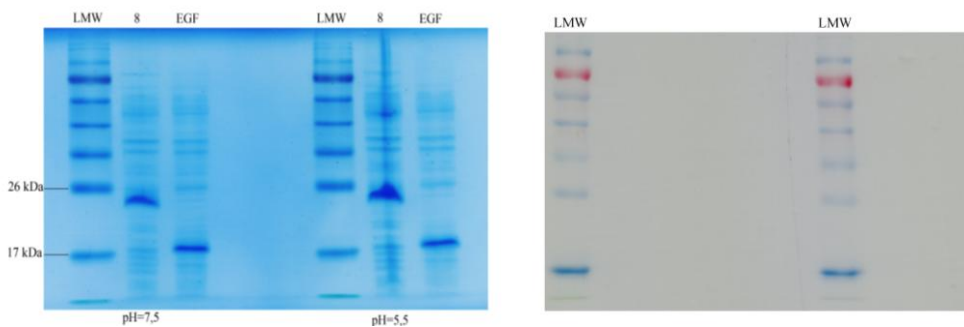
4.2 VPLIV pH NA VEZAVO MONOKLONSKIH PROTITELES Pf-344 NA PERFORIN

Pri protitelesih Pf-344 smo preverili, če pH vpliva na vezavo na PFN. Uporabili smo 2,5 μ l primarnih monoklonskih protiteles. Na gel smo nanesti po 3 μ l vzorca. Med rezultati ne opazimo bistvene razlike (Slika 11). Poskusa smo izvedli 1 \times .



Slika 11: Vezava primarnih monoklonskih protiteles proti človeškemu perforinu Pf-344 pri različnih pH.

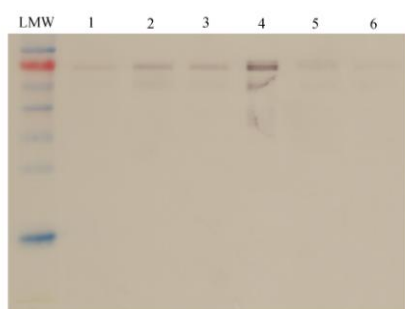
Pri različnih pH smo preverili vezavo fragmentov PFN s protitelesi z istimi izotipi, kot ga imajo protitelesa za človeški perforin. To je IgG1. Uporabili smo 10 μ l primarnih protiteles. Kot smo pričakovali, do vezave ni prišlo (Slika 12). Po 3 μ l vsakega vzorca smo nanesti na gel in membrano razvijali v peroksidaznem substratu 30 min. Poskus smo izvedli 1 \times .



Slika 12: Izotipna kontrola s primarnimi protitelesi anti-Golgin 97 pri različnih pH.

4.3 VPLIV Ca^{2+} NA VEZAVO PERFORINA NA MEMBRANO

Preverili smo vpliv kalcijevih ionov pri vezavi perforina na eritrocitno membrano (Slika 13). Uporabili smo 10 μl primarnih monoklonskih protiteles Pf-344. Na gel smo nanесли celotno vsebino vzorcev, po tabeli. Poskus smo izvedli 2 \times .



	1	2	3	4	5	6
				kontrola		
puffer pH	5,5	5,5	5,5	7,5	7,4	7,4
Ca^{2+}, EDTA	EDTA	Ca^{2+}	Ca^{2+}	-	Ca^{2+}	Ca^{2+}
spiranje z	EDTA	Ca^{2+}	EDTA	-	Ca^{2+}	EDTA
eritrocitna suspenzija (100 μl)	+	+	+	-	+	+

Slika 13: Spiranje eritrocitov.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen diplomske naloge je bil določiti linearne epitope monoklonskih protiteles proti človeškemu perforinu (Pf-80, Pf-164 in Pf-344). Linearne epitopi so kovalentno vezana zaporedja približno šestih aminokislin, monoklonska protitelesa pa so produkti enega klona limfocitov B.

Z določitvijo linearnih epitopov lahko bolje razumemo delovanje PFN. Rezultate vezave protiteles lahko uporabimo za preučevanje delovanja PFN v imunskih odzivih. V naših raziskavah smo protitelesa uporabili pri študiju epitopov, ki jih PFN prepozna, v vodotopne in membransko vezane oblike (Praper et al., v tisku).

PFN, ki ga vsebujejo citolitične granule, se sprosti iz CD8⁺ T celic ter NK celic in predstavlja pomembno vlogo pri obrambi gostitelja. Miške, ki imajo okvarjen zapis za PFN, imajo močno oslajeno citotoksičnost *in vivo*, ki se kaže kot zmanjšana sposobnost prepoznavanja mnogih virusov in intracelularnih patogenov ter kot povečana pojavnost tumorjev (Kagi et al., 1994).

Kljub njegovi pomembnosti, je naše razumevanje molekularnih in celičnih funkcij PFN zelo omejeno, deloma zaradi pomanjkanja primernih metod za študij iz celic sproščenega PFN. Zuber s sodelavci je pripravil monoklonska protitelesa proti različnim epitopom človeškega perforina. Prvi so dokazali, da se izločeni človeški PFN lahko zazna v koncentracijah pg/ml s tehniko ELISA in da se lahko posamezne celice sproščenega PFN določi z uporabo tehnike sendvič ELISA. Proizvedena monoklonska protitelesa proti perforinu prepoznajo različne epitope, ki lahko pojasnijo funkcionalne razlike med njimi (Zuber et al., 2005).

V nadaljnjih študijah je Zuber s sodelavci uporabil monoklonska protitelesa proti človeškemu PFN za navzkrižno reaktivnost s perforinom pri makakih, pogosto v uporabi za študij cepiva za AIDS. Makake se lahko eksperimentalno okuži z virusom SIV ali SHIV. Znanstveniki verjamejo, da je indukcija virusno-specifičnih celic CD8⁺ T preko cepiva pomembna za doseg učinkovitosti in imunosti proti HIV-1 pri ljudeh (Zuber et al., 2006).

Študij perforina je zahteven zaradi njegove majhne razpoložljivosti in pomanjkanja občutljivih metod (Zuber et al., 2005). Težko ga je izolirati, po izolaciji pa se pripravki lahko obnašajo kvantitativno drugače (Metkar et al., 2005). Da je malo časa obstojen, je npr. razvidno tudi pri naših rezultatih na gelih (Slika 5, Slika 7 in Slika 9), kjer pri velikosti 67 kDa ne opazimo madeža po barvanju s Coomassie modrim, se pa nato na PVDF membrani obarva tam, kjer je prišlo do vezave s protitelesi.

Dodatna ovira pri študiju perforina je tudi ta, da ga limfociti proizvajajo v nizkih količinah (Liu et al., 1994) in da se ob izolaciji za več kot 90% zmanjša njegova litična aktivnost (Fraser et al., 2000).

5.1.1 Vezava monoklonskih protiteles

Najprej smo opazovali vezavo posameznega monoklonskega protitelesa na določene fragmente PFN izražene v heterolognem ekspresijskem sistemu *E.coli*.

Zuber s sodelavci je poročal, da prepoznajo monoklonska protitelesa Pf-80 konformacijski epitop na PFN, ki navzkrižno konkurira z monoklonskimi protitelesi $\delta G9$ (Zuber et al., 2005). Iz naših rezultatov je razvidno, da monoklonska protitelesa Pf-80 (Slika 5 in Slika 6) ne prepoznajo linearnih epitopov.

Monoklonska protitelesa Pf-344 (Slika 7 in Slika 8) pa prepoznajo linearne epitope v regiji 373-388. Ta regija odgovarja začetnemu delu EGF (373-408), domeni z neznano funkcijo in se nahaja pred C2 domeno, ki je odgovorna za vezavo PFN na lipidne membrane.

Monoklonska protitelesa Pf-164 (Slika 9 in Slika 10) tudi prepoznajo linearne epitope, ki se nahajajo znotraj regije 200-264. Ta del se nahaja na MACPF domeni, ki je vključena v tvorbo pore v membrani tarčne celice (Uelner et al., 1997). Žal nam ni uspelo določiti točnega obsega, saj se fragmenti 1, 2 in 3 delno prekrivajo z odsekom 200-264, vendar se noben ni obarval pri imunodetekciji, čeprav smo poskus večkrat ponovili. Problem je nastajal pri izražanju fragmenta 1 (200-226) v heterolognem ekspresijskem sistemu. Ko pa nam je slednje le uspelo, nam kljub nekajkratnim poskusom, ni uspelo določiti točnega zaporedja aminokislin. Po naših predpostavkah bi se tako monoklonska protitelesa Pf-164 natančneje najverjetneje vezala v regiji, ki se začne z AK na mestu 200 in konča z eno izmed aminokislin v odseku 219-226.

Monoklonska protitelesa Pf-164 se šibkeje vežejo na linearne epitope kot monoklonska protitelesa Pf-344, saj smo jih morali uporabiti dvakrat več, pri detekciji pa smo morali dvakrat dodati peroksidazni substrat, da so se fragmenti po skoraj eni uri obarvali. Pri monoklonskih protitelesih Pf-344 so se fragmenti obarvali v nekaj minutah.

Iz rezultatov lahko še povzamemo, da se linearni epitopi monoklonskih protiteles, uporabljenih v diplomskem delu, prostorsko ne prekrivajo.

5.1.2 Vpliv pH na vezavo monoklonskih protiteles Pf-344 na perforin

Pri monoklonskih protitelesih Pf-344 smo opazovali vpliv pH na vezavo protiteles na PFN. Voskoboinik in sodelavci so postavili hipotezo, da je PFN neaktiven pri pH vrednostih nižjih od 6,2 zaradi protonacije aspartatnih ostankov odgovornih za vezavo Ca^{2+} (Voskoboinik et al., 2005). Ker bi le-ti bili nezmožni vezave Ca^{2+} , bi posledično bila onemogočena vezava na membrane. Naši rezultati kažejo na to, da pH ne vpliva na vezavo protiteles na membrano, saj so se isti fragmenti perforina pri pH 5,5 in pH 7,4 z imunodetekcijo obarvali in sicer približno enako (Slika 11).

Z izotipno kontrolo (Slika 12) smo potrdili, da se protitelesa istega razreda (IgG1) in z istimi efektorskimi funkcijami, kot zgoraj navedena monoklonska protitelesa, na molekulo perforina ne vežejo. Razrede protiteles določajo težke verige, ki pa nimajo nobene zveze z vezanjem antigena (s specifičnostjo). Potrdili smo tudi, da pH ne vpliva na vezavo.

5.1.3 Vpliv Ca^{2+} na vezavo perforina na membrano

Na vezavo perforina vpliva Ca^{2+} . Opazovali smo vezavo perforina v eritrocitni suspenziji.

Slika 13 kaže, da se je Pfn vezal na membrano pri pH 5,5, ob prisotnosti Ca^{2+} in ob spiranju z njim. Enaka količina perforina se je vezala tudi pri istih pogojih pri spiranju z EDTA, manj pa pri višjem pH oz. pri istem pH in ob prisotnosti ter spiranju z EDTA. Malo pa pri pH 7,4 ob prisotnosti Ca^{2+} in spiranju z EDTA. To potrjuje domnevo, da poteče vezava ob prisotnosti Ca^{2+} . Pri nižjem pH in ob prisotnosti Ca^{2+} se je vezalo več PFN kot pri višjem pH oz. istem pH, a ob prisotnosti EDTA.

Po mnenju Voskoboinika s sodelavci bi se moral pri višjem pH vezati PFN fiksno, pri nižjem pa naj bi ga bilo mogoče odstraniti iz membrane s kelatorjem EDTA (Voskoboinik et al., 2005). Pri pH 5,5, PFN ni trdno zasidran v membrani, medtem ko pri pH 7,4 je ireverzibilno povezan z membrano in ga ni mogoče odstraniti iz membrane s kelacijo (Beseničar, 2008).

To je opazoval tudi Ishiura s sodelavci. Dokazal je, da je večina membrane perforina pri nevtralnem pH bila trdno povezana z membranami rdečih krvnih celic in da ga ni bilo mogoče sprati z EDTA (Ishiura et al., 1990). Naši rezultati tega ne potrjujejo. Mogoče so se med centrifugiranjem membrane eritrocitov poškodovale.

5.2 SKLEPI

- monoklonska protitelesa Pf-80 ne prepoznajo linearnih epitopov
- monoklonska protitelesa Pf-164 prepoznajo linearne epitope in se šibko vežejo v regiji znotraj odseka 200-264
- monoklonska protitelesa Pf-344 prepoznajo linearne epitope in se močno vežejo v regiji 373-388
- vezava monoklonskih protiteles Pf-344 na PFN ni odvisna od pH

6 POVZETEK

Perforin je protein iz 555 AK, ki tvori pore. Nahaja se v citotoksičnih granulah citotoksičnih T limfocitov in naravnih celic ubijalk. Perforin je pomembna efektorska molekula pri odstranjevanju virusno okuženih in tumorogenih celic. Njegovo delovanje je odvisno od koncentracije Ca^{2+} in pH. V odsotnosti Ca^{2+} in pri pH nižjem od 6,2 izgubi litično aktivnost.

Perforin je sestavljen iz signalnega peptida, dolgega 21 AK, ki se odcepi v lumnu ER. Sledi mu N-terminalni del z membranolitičnimi lastnostmi in konformacijo amfipatičnega heliksa. Sredino molekule predstavlja MACPF domena, ki tvori poro v membrani tarčne celice. Sledita še EGF domena ter C2 domena na C-terminalnem delu, ki je pomembna za od- Ca^{2+} -odvisno vezavo na lipidno membrano. Proti C-terminalnem delu sledi mesto proteolitične cepitve. Protein vsebuje dve možni mesti za N-glikozilacijo (205 in 249).

V diplomskem delu smo ugotovili da monoklonska protitelesa Pf-80 ne prepoznajo linearnih epitopov. Monoklonska protitelesa Pf-164 prepoznajo linearne epitope v regiji znotraj odseka 200-264. Kljub večkratnim ponovitvam nam ni uspelo definirati točne regije. Monoklonska protitelesa Pf-344 pa hitreje prepoznajo linerne epitope v regiji 373-388, kar odgovarja delu regije EGF. Naši rezultati z monoklonskimi protitelesi Pf-344 kažejo, da pH na vezavo protiteles na PFN ne vpliva.

7 VIRI IN LITERATURA

Andersson, J., Behbahani, H., Lieberman, J., Connick, E., Landay, A., Patterson, B., Sönnnerborg, A., Lore, K., Uccini, S., Fehniger, T. E. (1999). Perforin is not co-expressed with granzyme A within cytotoxic granules in CD8 T lymphocytes present in lymphoid tissue during chronic HIV infection. *Aids*, 13(11):1295-1303.

Appay, V., Nixon, D. F., Donahoe, S. M., Gillespie, G. M., Dong, T., King, A., Ogg, G. S., Spiegel, H. M., Conlon, C., Spina, C. A., Havlir, D. V., Richman, D. D., Waters, A., Easterbrook, P., McMichael, A. J., Rowland-Jones, S. L. (2000). HIV-specific CD8(+)T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(1):53-75.

Baran, K., Dunstone, M., Chia, J., Ciccone, A., Browne, K. A., Clarke, C. J. P., Lukoyanova, N., Saibil, H., Whisstock J. C., Voskoboinik, I., Trapani, J. A. (2009). The molecular basis for perforin oligomerization and transmembrane pore assembly. *Immunity*, 30(5):685-695.

Bird C. H., Sun J., Ung K., Karambalis D., Whisstock J. C., Trapani J. A. Bird P. I. (2005). Cationic sites of granzyme B contribute to cytotoxicity by promoting its uptake into target cells. *Molecular Cell Biology*, 25(17):7854-7867.

Bolitho, P., Voskoboinik, I., Trapani, J. A., Smyth, M. J. (2007). Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. *Current Opinion in Immunology*, 19:339-347.

Cullen, S. P., Martin, S. J. (2008). Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death and Differentiation*, 15:151-262.

Czerkinsky, C., Andersson, G., Ekre, H. P., Nilsson, L. A., Klareskog, L., Ouchterlony, O. (1988). Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production: I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *Journal of Immunological Methods*, 150(1-2):199-206.

Darmon, A. J., Ley, T. J., Nicholson, D. W., Bleackley, R. C. (1996). Cleavage of CPP32 by Granzyme B Represents a Critical Role for Granzyme B in the Induction of Target Cell DNA Fragmentation*. *The Journal of Biological Chemistry*, 271:21709-21712.

Fraser, S. A., Karimi, R., Michalak, M., Hudig, D.(2000). Perforin lytic activity is controlled by calreticulin. *The Journal of Immunology*, 164:4150-4155.

Greenspan, N. S., Bona, C. A. (1993). Idiotypes: structure and immunogenicity. *FASEB Journal*, 7(5):437-444.

Griffiths, G. M., Argon, Y. (1995). Structure and biogenesis of lytic granules. *Current Topics Microbiology and Immunology*, 198:39-58.

- Haigwood, N. L. (2004). Predictive value of primate models for AIDS. *AIDS Rev.*, 6(4):187-198.
- Hameed, A., Olsen, K. J., Cheng, L., Fox III, W. M., Hruban, R. H., Podack, E. R. (1992). Immunohistochemical identification of cytotoxic lymphocytes using human perforin monoclonal antibody. *American Journal of Pathology*, 140(5):1025-1030.
- Ishiura, S., Matsuda, K., Koizumi, H., Tsukahara, T., Arahata, K., Sugita, H. (1990). Calcium is essential for both the membrane binding and lytic activity of pore-forming protein (perforin) from cytotoxic T-lymphocyte. *Molecular Immunology*, 27(8):803-807.
- Izadyar, L., Friboulet, A., Remy, R. H., Roseto, A., Thomas, D. (1993). Monoclonal antiidiotypic antibodies as functional internal images of enzyme active sites: production of catalytic antibodies with a cholinesterase activity. *Proceedings of a National Academy of sciences of United State of America*, 90(19):8876-8880.
- Jerne, N. K. (1974). Towards a network theory of immune system. *Annals of Immunology*, 125C(1-2):373-389.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H. (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*, 369(6475):31-37.
- Keefe, D., Shi, L., Feske, S., Massol, R., Navarro, F., Kirchhausen, T., Liberman, J. (2005). Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity*, 23:1-14.
- Letunic, I., Copley, R. R., Pils, B., Pinkert, S., Schultz, J., Bork, P. (2006). SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Research*, 34:D275-D260.
- Lichtenheld, M. G., Olsen, K. J., Lu, P., Lowrey, D. M., Hameed, A., Hengartner, H., Podack, E. R. (1988). Structure and function of human perforin. *Nature*, 335:448-451.
- Liu, C. C., Persechini, P. M., Yound, J. D. E. (1994). Characterization of recombinant mouse perforin expressed in insect cells using the baculovirus system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 201:318-325.
- Lowin, B., Peitsch, M. C., Tschopp, J. (1995). Perforin and granzymes: crucial effector molecules in cytolytic T lymphocyte and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Current Topics Microbiology and Immunology*, 198:1-24.
- Masson, D., Peters, P.S., Geuze, H.J., Borst, J., and Tschopp, J. (1990). Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzymes of cytolytic T-cells is dependent of pH. *Biochemistry*, 29:11229-11235.

Ménasché, G., Feldman, J., Fischer, A., De Saint Basile, G. (2005). Primary hemophagocytic syndromes point to a direct link between lymphocytosis and homeostasis. *Immunological Reviews*, 203:165-179.

Metkar, S. S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S. M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J. A., Froelich, C. J. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity*, 16(3):417-428.

Metkar, S. S., Wang, B., Froelich, C. J. (2005). Detection of functional cell surface perforin by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 299:117-127.

Migueles, S. A., Laborico, A. C., Shupert, W. L., Sabbaghian, M. S., Rabin, R., Hallahan, C. W., Van Baarle, D., Kostense, S., Miedema, F., McLaughlin, M., Ehler, L., Metcalf, J., Liu, S., Connors, M. (2009). HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nature Immunology*, 3:1061-1068.

Muzi, P., Bologna, M. (1999). Caleidoscopio italiano. Tecniche di immunoistochimica. Un manuale operativo essenziale. Tipolitografia ATA, Genova, s. 89.

Natarajan, K., Cowan, J. A. (1998). Solution structure of a synthetic lytic peptide: the perforin amino terminus. *Chemistry & Biology*, 5(3):147-154.

Podlesnik, B. M., (2008). Človeški perforin in njegove interakcije z lipidnimi membranami in proteini. Doktorsko delo, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, s. 109.

Praper, T., Beseničar, M. P., Istinič, H., Podlesnik, Z., Metkar, S. S., Froelich, C. J., Anderluh, G. (2010). Human perforin permeabilizing activity, but not binding to lipid membranes, is affected by pH. *Molecular Immunology*, v tisku.

Rukavina, D., Laskarin, G., Rubesa, G., Strbo, N., Bedenicki, I., Manestar, D., Glavas, M., Christmas, S. E., Podack, E. R. (1998). Age-related decline of perforin expression in human cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Blood*, 92(7):2410-2420.

Russell, J. H., Ley, T. J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Immunology*, 20:323-70.

Shacklett, B. L., Cox, C. A., Quigley, M. F., Kreis, C., Stollman, N. H., Jacobson, M. A., Andersson, J., Sandberg, J. K., Nixon, D. F. (2004). Abundant expression of granzyme A, but not perforin, in granules of CD8+ T cells in GALT: implications for immune control of HIV-1 infection. *The Journal of Immunology*, 173(1):641-648.

Shi, L., Keefe, D., Durand, E., Feng, H., Zhang, D., Lieberman, J. (2005). Granzyme B binds to target cells mostly by charge and must be added at the same time as perforin to trigger apoptosis. *The Journal of Immunology*, 174:5455-5461.

Stinchcombe J. C., Griffiths G. M. (2003). The role of the secretory immunological synapse in killing by CD8⁺ CTL. *Seminars in Immunology*, 15: 301-305.

Uellner, R., Zvelebil, M. J., Hopkins, J., Jones, J., MacDougall, L. K., Morgan, B. P., Podack, E., Waterfield, M. D., Griffiths, G. M. (1997). Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. *The EMBO Journal*, 16(24):7287-96.

Valtriani, C., Hurle, C., Balagi, S., Manzini, A. (1997). Caleidoscopio italiano. Citofluorimetria a flusso: aspetti generali con riferimento particolare allo studio di alcune malattie ematologiche. Algraphy, S.n.c., S.p.A., Genova, s. 64.

Voskoboinik, I., Thia, M.- C., De Bono, A., Browne, K., Cretney, E., Jackson, J.T., Darcy, P.K., Jane, S. M., Smyth, M. J., Trapani, J. A. (2004). The functional basis for hemophagocytic lymphohistiocytosis in a patient with co-inherited missense mutations in the perforin (PFN1) gene. *The Journal of Experimental Medicine*, 200:811-816.

Voskoboinik, I., Thia, M.-C., Fletcher, J., Ciccone, A., Browne, K., Smyth, M. J., Trapani, J.A. (2005). Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain. A critical role for aspartate residues 429, 435, 483 and 485, but not 491. *Journal of Biological Chemistry*, 280:8426-8434.

Vozelj, M. (2000). Temelji imunologije. DZS, Ljubljana, s. 551.

Zuber, B., Levitsky, V., Jönsson, G., Paulie, S., Samarina, A., Grundström, S., Metkar, S., Norell, H., Callender, G. G., Froelich, C., Ahlborg, N. (2005). Detection of human perforin by ELISpot and ELISA: ex vivo identification of virus-specific cells. *Journal of Immunological Methods*, 302(1-2):13-25.

Zuber, B., Quigley, M. F., Critchfield, J. W., Shackett, B. L., Abel, K., Miller, C. J., Mörner, A., Paulie, S., Ahlorg N., Sandberg, J. K. (2006). Detection of macaque perforin expression and release by flow cytometry, immunohistochemistry, ELISA and ELISpot. *Journal of Immunological Methods*, 312(1-2):45-53.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Gregorju ANDERLUHU
za izkazano zaupanje in uspešno vodenje pri nastajanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se recenzentu prof. dr. Petru MAČKU za res izredno hitro recenzijo.

Prof. dr. Kristini SEPČIĆ hvala za spodbudo, nasvete in vse lepe želje tekom študija.

Biserki BAKRAČ hvala, da me je naučila metod potrebnih za moje laboratorijsko delo,
za nasvete in vso pomoč. Za razpoložljivost in pomoč se zahvaljujem tudi
Andreju BAVDEKU, Vesni HODNIK, Tilnu PRAPORU in Andreju RAZPOTNIKU.

Tehnični sodelavki Ireni PAVEŠIĆ
se zahvaljujem za potrpežljivost in pomoč v laboratoriju.

Sodiplomantoma Živi RAMŠAK in Mateju SKOČAJU se zahvaljujem za pomoč
v laboratoriju in prijetna druženja pri pogostem čakanju laboratorijskih rezultatov.

Prof. dr. Gregorju ANDERLUHU in dr. Zdravkoti PODLESKU
hvala za izdelavo fragmentov perforina, ki sem jih uporabila v svojem diplomskem delu.

Prijateljicam in sošolkam Alenki ARBEITER, Petri CESAREC, Alenki DI BATTISTA,
Ivani DRAGIĆ, Karmen GOLOB, Alenki GORJAN, Andreji KADIŠ, Špeli KOREN,
Tini MIRT, Ashi PAST, Slavici RADINIA, Nadji REJEC
se zahvaljujem za podporo in vso pomoč tekom študija,
še posebej za vse ure preživete s hčerko, da sem lahko opravljala študijske obveznosti.

Eriki BUZIN, Aljoši DORNI, Vasji KRIŽMANČIČU in Ashi PAST
hvala za tehnično pomoč pri nastajanju diplome.

Fantu Mitji hvala za podporo v zadnjem letu študija, za pomoč pri iskanju zaposlitve
in za vse lepe trenutke, s katerimi mi je polepšal zadnji del naporene študijske poti.
Iskrena zahvala Mitji in celi njegovi družini, da so sprejeli in vzljubili mojo hčerko
ter da se vsi trije skupaj odlično razumemo.

Očetu Lojzetu se zahvaljujem za vso pomoč, spodbudo, nasvete in podporo med študijem,
za požrtvovalnost, potrpljenje, odrekanja in pomoč pri vzgoji hčerke,
za tolažbo in sočustvovanje ob težkih trenutkih, ki sem jih preživljala kot samska mamica,
ter za vse mesece dopusta najprej porabljenega, da sem se uvajala v materinstvo,
nato pa za varstvo hčerke, da sem lahko študirala in se udeleževala terenskih vaj.

Bratu Gregorju in hčerki Veroniki hvala za veselje, ki ga prinašata v naš dom.