

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jerneja MORI

**PRIPRAVA IN IZOLACIJA HIMERNIH
FLAGELINOV ZA AKTIVACIJO IMUNSKEGA
ODZIVA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Jerneja MORI

**PRIPRAVA IN IZOLACIJA HIMERNIH FLAGELINOV ZA
AKTIVACIJO IMUNSKEGA ODZIVA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**PREPARING AND ISOLATION OF CHIMERIC FLAGELLIN FOR
ACTIVATION OF IMMUNE RESPONSE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

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

Za mentorico diplomskega dela je bila, po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije in na osnovi Pravilnika o diplomskem delu, imenovana prof. dr. Darja Žgur Bertok, za somentorja je bil imenovan prof. dr. Roman Jerala in za recenzenta prof. dr. Alojz Ihan.

Mentorica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Somentor: prof. dr. Roman Jerala

Recenzent: prof. dr. Alojz Ihan

Komisija za oceno in zagovor:

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

Član: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Roman JERALA
Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za biotehnologijo

Član: prof. dr. Alojz IHAN
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Jerneja Mori

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 604.4 : 615.371 : 579.61 : 616 – 092(043) = 163.6
KG	<i>Helicobacter pylori</i> /imunski odziv/prirojena imunost/pridobljena imunost/bakterijski proteini/flagelin/himerni flagelin/ <i>Escherichia coli</i> /receptor TLR5/cepiva proti <i>Helicobacter pylori</i>
AV	MORI, Jerneja
SA	ŽGUR-BERTOK, Darja (mentorica)/JERALA, Roman (somentor)/IHAN, Alojz (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2009
IN	PRIPRAVA IN IZOLACIJA HIMERNIH FLAGELINOV ZA AKTIVACIJO IMUNSKEGA ODZIVA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XX, 108 str., 27 pregl., 40 sl., 3 pril., 68 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	<i>Helicobacter pylori</i> je spiralna, po Gramu negativna bakterija, ki okužuje od 25 do 50 % svetovne populacije. Pri večini gostiteljev <i>H. pylori</i> ne povzroča kliničnih simptomov, kljub temu jo pri manjšem deležu bolnikov povezujejo z nastankom gastritisa, peptične razjede in celo raka na želodcu. Ta običkan patogen se uspešno izogiba imunskemu odzivu, tudi z izmikanjem prepoznavanja flagelina preko Toll-u podobnega receptorja 5 (TLR5). Za aktivacijo receptorja TLR5 sta potrebna amino-(N) in karboksi- (C) končna dela flagelina bakterije kot je <i>Escherichia coli</i> , medtem ko notranja, hipervariabilna regija ni ključna pri signaliziranju preko receptorja TLR5, ampak je pomembna za določanje antigenosti flagelina. V diplomskem delu smo pripravili nov himerni flagelin, tako da smo N- in C-končna dela flagelina <i>H. pylori</i> zamenjali z N- in C-končnima deloma flagelina <i>E. coli</i> , ki aktivira receptor TLR5. Predvidevali smo, da bo himerni flagelin sposoben aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5. Da bi zagotovili aktivacijo pridobljenega imunskega odziva, smo na C-končni del himernega flagelina dodatno vezali antigeni multiepitop. Sintetično pripravljen multiepitop je vseboval epitop ureaze B (UreB), epitop vakuolirajočega citotoksina A (VacA) in epitop adhezina A (HpaA). Na C-končni del smo dodali še RGD tripeptid, ki se veže na integrine in poveča internalizacijo proteinov ter histidinski rep za izolacijo proteinov s kelatno kromatografijo. Himerni flagelin smo izražali v <i>E. coli</i> , ga izolirali in očistili. Aktivacijo receptorja TLR5 smo pokazali na celičnih linijah HEK293 z dvojnim luciferaznim testom. Dokazali smo, da sta, tako himerni flagelin kot himerni flagelin z multiepitopom, sposobna aktivacije TLR5 signalne poti. Aktivacijo pridobljenega imunskega odziva smo testirali <i>in vivo</i> na miškah, na katerih smo pokazali odziv serumskih IgG protiteles z ELISA testom. Naši rezultati so pomembni pri razvoju novega in učinkovitega cepiva proti človeškemu patogenu <i>Helicobacter pylori</i> .

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 604.4 : 615.371 : 579.61 : 616 – 092(043) = 163.6
CX *Helicobacter pylori*/immune response/innate immunity/adaptive immunity/bacterial proteins/chimeric flagellin/flagellin/*Escherichia coli*/receptor TLR5/vaccines against *Helicobacter pylori*
AU MORI, Jerneja
AA ŽGUR-BERTOK, Darja (supervisor)/JERALA, Roman (co - advisor)/IHAN, Alojz (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2009
TI PREPARING AND ISOLATION OF CHIMERIC FLAGELLIN FOR ACTIVATION OF IMMUNE RESPONSE
DT Graduation thesis (University studies)
NO XX, 108 p., 27 tab., 40 fig., 3 ann., 68 ref.
LA sl
AL sl/en
AB *Helicobacter pylori* is spiral-shaped, Gram-negative bacterium that chronically infects from 25 to 50% of the world's human population. In most hosts, *H. pylori* does not cause clinical symptoms, however a subset of patients develops gastritis, peptic ulcer, and even gastric cancer. This flagellated pathogen escapes immune clearance, by avoiding detection by the flagellin receptor Toll-like receptor 5 (TLR5). For activation of TLR5 are required amino- (N) and carboxy- (C) terminal segment of flagellin of bacteria such as *Escherichia coli*. In contrast, it is known that the hypervariable region is not mandatory for TLR5 signaling but is involved in flagellin antigenicity. We therefore constructed a chimeric flagellin by replacing the N- and C-terminal segment of *H. pylori* flagellin with segments from TLR5 activating flagellin from *E. coli*. We expected that such an engineered chimeric flagellin would be able to activate innate immune response by TLR5 signaling pathway. To provide activation of adaptive immune response we fused an additional antigenic multiepitope segment of virulence factors of *H. pylori* to the C-terminus of this engineered flagellin. Synthetic multiepitope was comprising the peptide urease B epitope, a vacuolating cytotoxin A (Vac) epitope and an adhesin A (HpaA) epitope. To the C-terminal segment we also added tripeptide sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid) that binds to integrins and could enhance internalization of proteins and His-tag for Ni-NTA purification. Chimeric flagellins were produced in *E. coli*, isolated and purified. The activation of innate immune response by triggering TLR5 signaling pathway with purified proteins was shown on HEK293 cell lines with dual luciferase reporter assay. We demonstrated that both chimeric flagellin and chimeric flagellin with multiepitope were able to activate TLR5. The activation of adaptive immune response was tested *in vivo* on mice, where we have shown increased serum IgG antibody response by ELISA. Our results are important for developing a new and effective vaccine against human pathogen *Helicobacter pylori*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XIV
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XV
SLOVARČEK.....	XX

1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJ RAZISKOVANJA	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NARAVNA IN PRIDOBLEJENA IMUNOST	3
2.1.1 Prirojena imunost	3
2.1.2 Pridobljena imunost	5
2.1.2.1 Humoralna imunost	5
2.1.2.2 Celično posredovana imunost	5
2.1.2.3 Citokini	6
2.1.3 Povezava med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom	7
2.2.1 Receptor TLR5	9
2.2.1.1 Od MyD88 odvisna pot aktivacije	10
2.3.1 Morfologija	12
2.3.2 Epidemiologija	12
2.3.3 Virulentni dejavniki	14
2.3.4 Patogeneza	16
2.3.5 Mehanizmi persistence (vztrajanja)	16
2.3.6 Imunski odziv na bakterijo <i>Helicobacter pylori</i>	17
2.3.6.1 Prirojeni imunski odziv	18
2.3.6.2 Pridobljeni imunski odziv	18
2.3.7 Zdravljenje	19
2.4.1 Cepiva proti <i>H. pylori</i>	20
2.4.1.1 Oslabljen (atenuiran) ali mrtva cepiva	20
2.4.1.2 Proteinska cepiva	21
2.4.1.3 Parenteralno večkomponentno cepivo	21
2.4.1.4 Uporaba bakterijskih vektorjev za prenos antigena	22
2.4.1.5 DNK cepivo	22
2.4.1.6 Cepiva iz mikrosfer (ang. microsphere)	22

2.4.1.7	Cepivo iz bakterijskih duhcev	22
2.4.2	Adjuvansi	23
2.5.1	Zgradba flagelina	24
2.5.2	Flagelin bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	26
2.5.3	Himerni flagelin	27
3	MATERIALI IN METODE	29
3.1	MATERIALI	29
3.1.1	Kemikalije	29
3.1.2	Uporabljene raztopine, pufri in standardi	30
3.1.3	Laboratorijska oprema	33
3.1.4	Uporabljena protitelesa	34
3.1.5	Uporabljeni plazmidi	34
3.1.6	Oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo	37
3.1.7	Organizmi	38
3.1.7.1	Bakterijski sevi	38
3.1.7.2	Celične kulture	39
3.1.7.3	Miši	39
3.1.8	Gojišča	39
3.1.8.1	Gojenje bakterije <i>Escherichia coli</i>	39
3.1.8.2	Gojenje bakterije <i>Helicobacter pylori</i>	40
3.2	METODE	42
3.2.1	Sterilizacija steklovine, gojišč in raztopin	42
3.2.2	Osnovne metode molekularnega kloniranja	42
3.2.2.1	Priprava kompetentnih celic	43
3.2.2.2	Izolacija genomske DNK	44
3.2.2.3	Verižna reakcija s polimerazo (PCR)	44
3.2.2.4	Lepljenje s PCR	46
3.2.2.5	Elektroforeza DNK na agaroznem gelu	47
3.2.2.6	Čiščenje pomnožkov PCR po verižni reakciji s polimerazo	48
3.2.2.7	Izolacija fragmentov DNK iz agaroznih gelov	48
3.2.2.8	Cepitev DNK z restrikcijskimi encimi	48
3.2.2.9	Ligacija	50
3.2.2.10	Transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH5α	51
3.2.2.11	Izolacija plazmidne DNK	51
3.2.2.11.1	Izolacija plazmidne DNK v manjših količinah – mini prep	51
3.2.2.11.2	Izolacija plazmidne DNK s komercialno dostopnim kompletom	52
3.2.2.11.3	Izolacija plazmidne DNK, ki ne vsebuje endotoksina (LPS)	52
3.2.2.12	Določanje koncentracije nukleinskih kislin	52
3.2.3	Izolacija proteinov	53
3.2.3.1	Transformacija in precepljanje v tekoče gojišče LB	53
3.2.3.2	Fermentacija in indukcija izražanja proteina	53
3.2.3.3	Liza celic	54
3.2.3.4	Soniciranje	54
3.2.3.5	Izolacija himernega flagelina (HF-RGD-His) z NI-NTA metodo	54
3.2.3.5.1	Raztapljanje inkluzijskih telesc	54
3.2.3.5.2	Kelatna kromatografija	55
3.2.3.5.3	Zvitje proteina na koloni in spiranje kolone	55

3.2.3.5.4	Elucija proteina	55
3.2.3.5.5	Spiranje kolone in regeneracija	56
3.2.3.6	Izolacija himernega flagelina-multiepitop (HF-multiepitop-RGD-His) na FPLC	56
3.2.3.7	Koncentriranje in dializa vzorcev	57
3.2.3.8	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS (SDS-PAGE)	58
3.2.3.8.1	Vlivanje SDS-PAGE gelov	58
3.2.3.8.2	SDS-PAGE	59
3.2.3.9	Barvanje proteinov z barvilom Coomassie modrim	59
3.2.3.10	Imunski odtis – Western prenos	60
3.2.3.11	Čiščenje izoliranih proteinov z gelsko kromatografijo	61
3.2.3.12	Določanje strukture proteinov s CD spektroskopijo (cirkularni dihiroizem)	61
3.2.4	Delo v celičnem laboratoriju	62
3.2.4.1	Gojenje človeških celičnih kultur HEK293	62
3.2.4.2	Transfekcija človeških celičnih kultur HEK293	63
3.2.4.3	Stimulacija in liza transficiranih celic HEK293	63
3.2.4.4	Merjenje luciferazne aktivnosti	64
3.2.5	In vivo poskusi	64
3.2.5.1	Priprava seruma	65
3.2.5.2	Dokazovanje IgG protiteles v serumu mišk z metodo ELISA	65
4	REZULTATI	67
4.1	PRIPIRAVA EKSPRESIJSKIH VEKTORJEV	67
4.1.1	Teoretična razlaga posameznih segmentov DNK konstruktov	67
4.1.1.1	Himerni flagelin (HF)	67
4.1.1.2	Multiepitop	68
4.1.1.3	RGD-His-stop	69
4.1.2	Postopek kloniranja:	69
4.2	IZOLACIJA HIMERNIH FLAGELINOV	75
4.2.1	Izolacija in dokazovanje proteina HF-RGD-His	76
4.2.2	Izolacija in dokazovanje proteina HF-multiepitop-RGD-His	79
4.2.3	Čiščenje proteina HF-multiepitop-RGD-His stop z gelsko kromatografijo	81
4.2.4	Določanje sekundarne strukture proteina	83
4.3	TEST AKTIVACIJE SIGNALNE POTI PREKO RECEPTORJA TLR5 NA CELIČNIH LINIJAH	84
4.3.1	Vpliv izoliranega proteina himerni flagelin na aktivacijo signalne poti preko receptorja TLR5	85
4.3.2	Vpliv izoliranega proteina himerni flagelin-multiepitop na aktivacijo signalne poti preko receptorja TLR5	86
4.3.3	Vpliv segrevanja izoliranih proteinov na sposobnost aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5	87
4.3.4	Določanje kontaminacije izoliranih proteinov z endotoksinom	88
4.4	IMUNSKI ODZIV NA MIŠKAH	89
4.4.1	ELISA test	89
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	91
5.1	RAZPRAVA	91

5.1.1	Priprava ekspresijskih vektorjev	91
5.1.2	Izolacija himernih flagelinov	93
5.1.3	Test aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5 na celičnih linijah	95
5.1.4	Imunski odziv na miškah	97
5.2	SKLEPI	98
6	POVZETEK	99
7	VIRI	101

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Agonisti receptorjev TLR uporabljeni v kliničnih raziskavah ali cepivih (Wack in Rappuoli, 2005; Akira, 2005) _____	24
Preglednica 2: Kemikalije, encimi in komercialno dostopni kompleti, uporabljeni v diplomskem delu _____	29
Preglednica 3: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri izolaciji in detekciji proteinov _____	30
Preglednica 4: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri izdelavi DNK-konstruktov, pri merjenju luciferazne aktivnosti ter pri delu v celičnem laboratoriju _____	31
Preglednica 5: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri ELISA testih _____	32
Preglednica 6: Uporabljena laboratorijska oprema _____	33
Preglednica 7: Uporabljena protitelesa _____	34
Preglednica 8: Plazmidi uporabljeni v diplomski nalogi _____	34
Preglednica 9: Oligonukleotidi, uporabljeni v diplomskem delu _____	37
Preglednica 10: Uporabljeni sevi bakterije <i>Escherichia coli</i> _____	38
Preglednica 11: Uporabljeni sevi bakterije <i>Helicobacter pylori</i> _____	38
Preglednica 12: Uporabljene celične kulture _____	39
Preglednica 13: Uporabljene celične kulture _____	39
Preglednica 14: Tekoče LB gojišče za bakterije _____	39
Preglednica 15: Trdno LB gojišče za bakterije _____	39
Preglednica 16: Sestava Columbia krvnega agarja za pripravo trdnega gojišča za gojenje <i>H. pylori</i> _____	41
Preglednica 17: Sestava selektivnega DENT-suplementa za pripravo trdnega gojišča za gojenje <i>H. pylori</i> _____	41
Preglednica 18: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNK-polimerazo AccuPrime Pfx _____	45
Preglednica 19: Temperaturni program PCR pri uporabi DNK-polimeraze AccuPrime Pfx _____	45
Preglednica 20: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNK-polimerazo Pfx _____	45
Preglednica 21: Program PCR pri uporabi DNK-polimeraze Pfx _____	46

Preglednica 22: Sestava 10 % ločitvenega SDS gela (za 2 gela) _____	59
Preglednica 23: Sestava 10 % vstopnega SDS gela (za 2 gela) _____	59
Preglednica 24: Teoretične lastnosti posameznega proteina pomembne pri izolaciji _____	75
Preglednica 25: Izračunana koncentracija proteina HF-RGD-His (mg/ml) v vzorcu na podlagi izmerjene absorbance pri 280 nm in ob upoštevanju absorbance pri 330 nm _____	77
Preglednica 26: Izračunana koncentracija proteina HF-multiepitop-RGD-His (mg/ml) v vzorcu na podlagi neto absorbance pri 280 nm _____	80
Preglednica 27: Izračunana koncentracija proteina HF-multiepitop-RGD-His (mg/ml) v nevezani frakciji _____	80

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz povezave med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom (Kaisho, 2007)	7
Slika 2: Shematski prikaz zgradbe receptorja TLR. LRR domena prepozna različne PAMP molekule, medtem ko je TIR domena odgovorna za prenos signala (Akira in Takeda, 2004: 500).	8
Slika 3: Shematski prikaz signalne poti preko receptorja TLR, ki velja tudi za receptor TLR5 (Akira in Takeda, 2004: 500).	11
Slika 4: Bakterija <i>Helicobacter pylori</i> (Middlebury College, 2009)	12
Slika 5: Shematski prikaz imunskega odziva na bakterijo <i>H. pylori</i> . Z zeleno so označene molekule, ki jih posreduje bakterija, s črno pa molekule, ki jih tvori gostitelj (Wilson in Crabtree, 2007: 290).	17
Slika 6: Shematski prikaz zgradbe bička in flagelina, ki je monomerna podenota bička (Ramos in sod., 2004: 510).	25
Slika 7: Tridimenzionalni prikaz flagelina (Honko in Mizel, 2005: 84).	26
Slika 8: Primerjava med tridimenzionalno strukturo bička iz bakterije <i>Salmonella typhimurium</i> (a) z bičkom iz bakterije <i>Campylobacter jejuni</i> (b) (Galkin in sod., 2008: 384).	27
Slika 9: Shematski prikaz psB1AK3 vektorja (Registry of..., 2004).	35
Slika 10: Shematski prikaz pET19b vektorja (BVTech plasmid, 2009).	36
Slika 11: Shematski prikaz pUNO-hTLR5 vektorja (Invivogen, 2009).	36
Slika 12: Shema vektorja pGL2 z vstavljenim NF- κ B-odvisnim promotorjem ter pRL-TK vektorja z vstavljenim zapisom za konstitutivno izraženo Renilla luciferazo (Ebiotrade, 2009; Ciglič, 2007).	37
Slika 13: Shematski prikaz kloniranja.	43
Slika 14: Shematski prikaz metode lepljenja s PCR.	47
Slika 15: Shematski prikaz Biokocke.	49
Slika 16: Prikaz krivulj za različne sekundarne strukture proteinov pridobljenih s CD spektrom.	62

Slika 17: Shematski prikaz poteka dela.	66
Slika 18: Shematski prikaz sestave himernega flagelina (HF).	67
Slika 19: Terciarna struktura himernih flagelinov pridobljena z računalniškim modeliranjem.	68
Slika 20: Shematski prikaz DNK konstrukta za multiepitop.	68
Slika 21: Shematski pregled postopka priprave osnovnih delov himernega flagelina s PCR reakcijami.	70
Slika 22: Shematski pregled postopka priprave himernega flagelina z metodo PCR lepljenja.	71
Slika 23: Shematski prikaz priprave vektorskega konstrukta HF-RGD-His-stop/psB1AK3.	72
Slika 24: Shematski prikaz priprave vektorskega konstrukta HF-multiepitop-RGD-His-stop/psB1AK3.	73
Slika 25: Kontrolna restrikcija konstrukta pET19b-HF- RGD-His-stop, rezanega z NcoI/XhoI.	74
Slika 26: Kontrolna restrikcija konstrukta pET19b-HF- RGD-His-stop rezanega z NcoI/XhoI.	74
Slika 27: SDS-PAGE elektroforeza za ugotavljanje lokacije himernega flagelina.	76
Slika 28: SDS-PAGE elektroforeza za himerni flagelin.	78
Slika 29: Western prenos za himerni flagelin.	78
Slika 30: FPLC kromatogram pridobljen pri izolaciji proteina himerni flagelin-multiepitop.	79
Slika 31: SDS-PAGE elektroforeza za himerni flagelin-multiepitop.	81
Slika 32: Kromatogram pridobljen pri čiščenju proteina z gelsko kromatografijo.	82
Slika 33: Primerjava proteina himerni flagelin-multiepitop-RGD-His pred gelsko kromatografijo (vzorec B) in po gelski kromatografiji (vzorec A).	82
Slika 34: Določanje sekundarne strukture s CD spektroskopijo (cirkularni dihiroizem).	83
Slika 35: Test aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5 s himernim flagelinom (HF-RGD-His).	85
Slika 36: Test aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5 s proteinom himerni flagelin-multiepitop (HF-multiepitop-RGD-His).	86

Slika 37: Test aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5 s segrevanim proteinom himerni flagelin (HF-RGD-His).	87
Slika 38: Test aktivacije signalne poti preko receptorja TLR4, v kompleksu z MD-2, s proteinom himerni flagelin (HF-RGD-His).	88
Slika 39: Določanje IgG protiteles v serumu mišk C57BL/6J, cepljenih s proteinom HF-multiepitop-RGD-His stop z ELISA testom.	90
Slika 40: Določanje IgG protiteles v serumu mišk C57BL/6J cepljenih s proteinom himerni flagelin- multiepitop-RGD-His stop z ELISA testom.	90

KAZALO PRILOG

Priloga A: Nukleotidno in aminokislinsko zaporedje proteina HF-RGD-His.

Priloga B: Nukleotidno in aminokislinsko zaporedje proteina HF-multiepitop-RGD-His.

Priloga C: Načrt transfekcije merjenja luciferazne aktivnosti za poskus ugotavljanja vpliva izoliranega proteina na aktivacijo signalne poti preko receptorja TLR5 in TLR4.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca pri določeni valovni dolžini
Ab	protitelo (ang. antibody)
ABTS	komercialno dostopen substrat za peroksidazo
AK	aminokislina, aminokislinski ostanek
Amp	ampicilin
ang.	Angleško
APC	antigen predstavljajoče celice
APS	amonijev persulfat
ATP	adenozin trifosfat
BabA	adhezin bakterije <i>H. pylori</i>
bp	bazni par
CagA	citotoksični protein
CagA+	sev <i>H. pylori</i> , ki ima zapis za CagA protein
<i>cag</i> PAI	s citotoksinom povezan otok patogenosti
CD	cirkularni dihiroizem
CD4	Celice T pomagalk
CD8	Citotoksične celice T
CFU	enote, ki tvorijo kolonije (ang. Colony forming units)
CLR	C-tipu lektina podobni receptorji
CoA	koencim A
CpG	citozinski in gvaninski nukleozid, povezana s fosfatom
CPI	mešanica proteaznih inhibitorjev (ang. protease inhibitor cocktail)
CT	kolera toksin
Da	dalton, enota za molekulsko maso
DC	dendritične celice
DD	domena smrti (ang. death domain)
DMEM	gojišče za celične kulture (ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DMSO	dimetilsulfoksid

DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	2'-deoksinukleozid-5'-trifosfat
DOC	deoksiholična kislina (5b-holan-24-ojska kislina-3a,12a-diol)
ds	dvovijačen (ang. double-stranded)
DTT	ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina
EGTA	etilen glikol tetraacetna kislina
ELISA	(ang. Enzyme-linked immunosorbent assay)
EtBr	etidijev bromid
FBS	fetalni telečji serum (ang. fetal bovine serum)
FlaA, B	flagelin bakterije <i>Helicobacter pylori</i> , podenota A oziroma B
FliC	flagelin bakterije <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium
Fluc	kresničkina luciferaza
FPLC	proteinska tekočinska kromatografija (Fast Protein Liquid Chromatography)
HEK293	trajna celična kultura iz človeških embrionalnih ledvičnih celic (ang. human embryonic kidney cell line)
HF	himerni flagelin
His	histidinski rep sestavljen iz 6 histidinov
HpaA	<i>H. pylori</i> adhezin A
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
hTLR4	humani oziroma človeški TLR4
hTLR5	humani oziroma človeški TLR5
IARC	mednarodna agencija za raziskave raka (ang. The International Agency for Research on Cancer)
Ig	Imunoglobulin
INF	interferon
IKK	inhibitorna kapa B kinaza (ang. IκB kinase)
IL	interlevkin
IL-1R	receptor za interlevkin-1 (ang. interleukin-1 receptor)

IPTG	izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid (ang. Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)
IRAK	kinaza, povezana z receptorjem IL-1 (ang. IL-1 receptor-associated kinase)
kDa	kilo Da (1000 Da)
KDO	3-deoksi-D-mano-oktulozonska kislina
LB	gojišče Luria-Bertani
LBA	gojišče Luria-Bertani z ampicilinom
LPS	lipopolisaharid, imenovan tudi endotoksin
LRR	z levcinom bogate ponovitve (ang. leucine-rich repeat)
LT	temperaturno labilni toksin bakterije <i>E. coli</i>
MALT	sluznični in podsluznični limfatični folikli (ang. Mucosa associated lymphoid tissue)
MAPK	od mitogena aktivirana proteinska kinaza (ang. Mitogen activated protein kinase)
MD-2	mieloidni diferenciacijski protein 2 (ang. myeloid differentiation protein 2)
MQ	mili Q voda, dodatno očiščena deionizirana voda
MyD88	diferenciacijski mieloidni protein 88 (ang. myeloid differentiation primary-response protein 88)
NAP	nevtrofil aktivirajoči protein
NF- κ B	jedrni faktor κ B
NK	Naravne celice ubijalke
NLR	NOD-u podobni receptorji
nt	nukleotid
PAMP	molekulski motivi patogenih mikroorganizmov (ang. pathogen-associated molecular patterns)
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza (ang. polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	fosfatni pufer s soljo (ang. phosphate buffered saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)

pH	negativni desetiški logaritem koncentracije ionov H_3O^+
PHK	poglavitni histokompatibilnostni kompleks
PLGA	poli(D,L-laktid-ko glikolid)
PRR	receptorji, ki prepoznajo molekulske motive (ang. pattern recognition receptors)
RGD	tripeptid iz aminokislin arginina, glicina in asparaginske kisline
RLE	relativne luciferazne enote
RLR	RIG-u podobni receptorji
Rluc	<i>Renilla</i> luciferaza
RNaza	ribonukleaza
RNK	ribonukleinska kislina
SDS	natrijev dodecil sulfat
stop	stop kodon
TAB	protein, ki veže TAK1 (ang. TAK1-binding protein)
TAK1	s transformirajočim rastnim faktorjem β aktivirana kinaza 1 (ang. transforming growth factor- β -activated kinase 1)
TBK1	vezavna kinaza (ang. TRAF-family-member-associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1)
TCR	T celični receptor
TEMED	N,N,N,N -tetrametil-etilendiamin
Th	Celice T pomagalk (ang. T helper cell)
TICAM-1	adapterski protein, znan tudi kot TRIF (ang. TIR-domain-containing molecule 1)
TICAM-2	adapterski protein, znan tudi kot TRAM (ang. TIR-domain-containing molecule 2)
TIR	domena Toll-interlevkinskega receptorja (ang. Toll-interleukin receptor domain)
TLR	Tollu-podoben receptor (ang. Toll-like receptor)
TNF	dejavnik tumorske nekroze (ang. tumor necrosis factor)
TRAF 6	faktor povezan z receptorjem za TNF (ang. TNF receptor-associated factor 6)

TRAM	adapterski protein soroden TRIF (ang. TRIF-related adaptor molecule)
TRIF	adapterski protein, ki vsebuje domeno TIR (ang. TIR-domain-containing adaptor protein inducing INF- β)
Tween 20	polioksietilensorbitan monolavrat
VacA	vakuolirajoči toksin
VBNC	viabilna oblika bakterije, katere ne moremo gojiti (viable but not culturable)
vrt./min	vrtljaji na minuto
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organization)
% (m/v)	odstotek, delež neke snovi, določen kot razmerje mase te snovi z volumnom celotne raztopine
% (V/V)	odstotek, delež neke snovi, določen kot razmerje prostornine te snovi s prostornino celotne raztopine

SLOVARČEK

Celična linija HEK293	Celična linija HEK293 je nastala s transformacijo normalnih človeških embrionalnih ledvičnih celic z DNK adenovirusa 5. Celice na svoji površini ne izražajo receptorjev TLR, imajo pa ohranjene vse znotrajcelične proteine, ki sodelujejo pri signalizaciji receptorjev TLR.
Flagelin	Flagelin je poglavitni protein v filamentu bakterijskega bička. N- in C-končna predela flagelina sta med različnimi bakterijskimi vrstami ohranjena, medtem ko se variabilna regija lahko razlikuje. Flagelin je ligand receptorja TLR5.
Luciferaza	V molekularni biologiji uporabljamo luciferaze kot poročevalske encime, s katerimi spremljamo izražanje genov. V dvojnem luciferaznem testu hkrati uporabimo dve luciferazi; inducibilno izraženo kresničkino (<i>Photinus pyralis</i>) luciferazo za spremljanje izražanja genov ter konstitutivno izraženo <i>Renilla</i> (<i>Renilla reniformis</i>) luciferazo za normalizacijo odziva.
Ni-NTA	Agarozni nosilec z vezavo nikelj nitrilotriocetne kisline omogoča izolacijo rekombinantnih proteinov z vezanim histidinskim repom (6x His), ki se vežejo na imobilizirane Ni ²⁺ ione.
TLR5	Tollu-podoben receptor 5 je zgrajen iz zunajcelične domene, ki vsebuje z levcini bogate ponovitve, transmembranski segment ter znotrajcelično domeno TIR. Na svoji površini ga izražajo monociti, dendritične celice, epiteljske celice in mastociti.

1 UVOD

Človeški organizem je skozi tisočletja sobivanja z mikroorganizmi razvil številne obrambne mehanizme pred vdorom le-teh. Kljub razvoju prirojenega in pridobljenega imunskega odziva, so nekateri mikroorganizmi sposobni obiti obrambne mehanizme gostitelja in povzročiti bolezen. Med pomembnejše človeške patogene sodi tudi bakterija *Helicobacter pylori*, ki so jo odkrili leta 1982 in jo povezali s številnimi boleznimi.

Pri večini gostiteljev poteka okužba s *H. pylori* asimptomatsko brez bolezenskih znakov, pri nekaterih pa lahko povzroči gastritis, peptično razjedo in celo rak na želodcu, ki je skoraj v vseh primerih smrten. Bakterija je močno razširjena in okužuje od 25 do 50 % svetovnega prebivalstva. Zaradi dolgega sobivanja s človekom je razvila številne mehanizme s katerimi se uspešno izmika imunskemu odzivu in posledično povzroča kronično okužbo.

Zaradi zapletenega zdravljenja s kombinacijo različnih antibiotikov in inhibitorja protonske črpalke, je razvoj cepiva proti bakteriji *H. pylori* vedno bolj zaželen. Zdravljenje je večinoma uspešno, ampak ne ščiti pred ponovno okužbo, je drago in zaradi številnih stranskih učinkov neprijetno za bolnika. Kljub številnim raziskavam in prizadevanjem, raziskovalci še vedno niso odkrili cepiva, ki bi bilo učinkovito pri obrambi pred *H. pylori*.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Zaradi evolucijskih pritiskov in dolgega sobivanja s človekom, se bakterija *H. pylori* uspešno izmika imunskemu odzivu. Med pomembnejšimi dejavniki je sprememba bakterijskega flagelina, ki je pomemben strukturni protein bička. Flagelin večine bakterij je agonist Toll-u podobnega receptorja 5 in aktivira prirojeni imunski odziv. Flagelin bakterije *H. pylori* pa je spremenjen v tolikšni meri, da ne aktivira signalne poti preko receptorja TLR5 (Lee in sod., 2003).

Znano je, da sta za aktivacijo signalne poti preko receptorja TLR5 odgovorna N- in C-končna dela flagelina, ki tvorita α -vijačnico, medtem ko hipervariabilna regija tvori β -

plošče in predstavlja antigenske lastnosti flagelina, ki se med posameznimi bakterijami razlikujejo (Honko in Mizel, 2005).

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V diplomskem delu smo se osredotočili na pripravo rekombinantnih himernih flagelinov, ki bi združevali lastnosti flagelina bakterije *Escherichia coli* in *Helicobacter pylori* in bi bili primerni kot proteinsko cepivo, ki bi nudilo zaščito pred okužbo z bakterijo *H. pylori*.

Znano je, da flagelin bakterije *E. coli* aktivira signalno pot preko receptorja TLR5, zato smo s pomočjo znanega nukleotidnega zaporedja flagelina, pripravili DNK konstrukte, ki so vsebovali zapis za N- in C-končna predela flagelina *E. coli* in vmesno variabilno regijo flagelina *H. pylori*. Poleg priprave himernega flagelina, smo pripravili umetno sintetiziran oligopeptid, imenovan multiepitop, ki združuje epitope treh najpomembnejših virulentnih dejavnikov bakterije *H. pylori*. Združili smo epitope iz proteinov ureaze B, adhezina A in vakuolirajočega citotoksina A. Pripravljene DNK konstrukte smo transformirali v bakterijske celice za izražanje in izolacijo proteinov.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da bomo izolirali, očistili in dokazali himerni flagelin in himerni flagelin z vezanim multiepitopom na C-končnem delu proteina.

Prav tako smo predpostavili, da bosta izolirana proteina (himerni flagelin in himerni flagelin z dodanim multiepitopom) sposobna aktivirati signalno pot preko receptorja TLR5.

Predvideli smo tudi, da bo izoliran himerni flagelin z dodanim multiepitopom sprožil protitelesni odziv v miškah po cepljenju.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NARAVNA IN PRIDOBLJENA IMUNOST

Vsi živi organizmi so izpostavljeni mikroorganizmom kot so bakterije, glive, paraziti in virusi. Zato so razvili obrambne mehanizme, s pomočjo katerih ločijo med lastnimi in tujimi molekulami. Mikroorganizmi so razvili različne načine, kako vdreti v sicer sterilno okolje gostitelja. Najpogostejše poti so preko kože ter dihalnega in gastrointestinalnega trakta (Dempsey in sod., 2003).

Organizem se je pred vdorom tujkov v telo zaščitil na različne načine. Pri ljudeh so se razvili trije različni nivoji zaščite pred vdorom patogenih agensov v telo:

- naravne pregrade,
- prirojena imunost,
- pridobljena imunost (Murray in sod., 2005).

V prvi vrsti so pomembne naravne ovire, kot so koža, sluznice, migetalke na epitelijskih celicah dihal, želodčna kislina in žolč. Epitelijske površine varujejo tudi solze, slina in seč. Če ti mehanizmi odpovedo in mikroorganizmi vdrejo v telo, se aktivira druga stopnja imunskega odziva, to je t. i. prirojena oziroma naravna imunost, pri kateri gre za gensko kodirano imunsko obrambo preko receptorjev, ki prepoznavajo molekule značilne za mikroorganizme in predstavlja prvo linijo zaščite. Sem uvrščamo delovanje interferonov, komplemента, nevtrofilcev, makrofagov, naravnih celic ubijalk in z vnetjem povezano vročino. Vzporedno deluje pridobljeni imunski odziv, ki je specifičen imunski odziv, pri katerem pride do nastanka protiteles in T celic, ki specifično napadejo in uničijo patogeni mikroorganizem (Murray in sod., 2005; Vozelj, 2000). Obe veji imunosti sta se razvijali ločeno, kljub temu pa je aktivacija naravne imunosti potrebna za aktivacijo ustrezne pridobljene imunosti (Akira in Takeda, 2004; Dempsey in sod., 2003).

2.1.1 Prirojena imunost

Prirojeni oziroma naravni imunosti so sprva posvečali manj pozornosti, saj so menili, da gre za nespecifično prepoznavanje mikroorganizmov. Vendar so v zadnjem času raziskave

pokazale, da ima prirojena imunost visoko specifičnost in sodeluje pri ločevanju lastnih od tujih molekul (Akira in Takeda, 2004). Pri tem so ključni receptorji PRR (ang. pattern recognition receptors), ki prepoznavajo prisotnost molekulskih motivov (patogenih) mikroorganizmov oziroma PAMP (ang. Pathogen associated molecular patterns) (Janeway, 1989; Janeway in Medzhitov, 2002; Chaplin, 2006). Najbolj poznane PAMP molekule so bakterijski lipopolisaharidi, peptidoglikan, lipoproteini, lipoteihoična kislina, manani, flagelin, dvoverižna RNK, nemetilirani CpG oligonukleotidi in glukani. Gre za molekule, ki jih sintetizirajo patogeni mikroorganizmi in jih ne najdemo v gostitelju (Medzhitov in Janeway, 1997; de la Barrera in sod., 2006). Pri naravni imunosti so ključni citokini, komplement in druge molekule. Pomembne celice so nevtrofilci, dendritične celice, makrofagi in monociti (Chaplin, 2006).

Makrofagi so fagocitne celice, ki jih najdemo v tkivih in izločajo velike količine citokinov in kemokinov (Gregory in Wing, 2002). Dendritične celice (DC) izražajo veliko število različnih receptorjev PRR, med drugim so pomembni TLR (Toll-u podobni receptorji, ang. Toll-like receptors), NLR (NOD-u podobni receptorji, ang. NOD-like receptors), RLR (RIG-I-u podobni receptorji, ang. RIG-I-like receptors) in CLR receptorji (C-tipu lektina podobni receptorji, ang. C-type lectine-like receptors) (Kapsenberg, 2003). Za razliko od transmembranskih receptorjev TLR, ki so na površini celic in v endosomalnih organelih, so receptorji NLR in RLR topni citosolni proteini, ki prepoznavajo citosolne PAMP molekule (npr. virusna RNK) (Rad in sod., 2009; Akira in Takeda, 2004).

Prepoznavanje patogenov preko receptorjev TLR in drugih PRR sproži sintezo in izločanje vnetnih citokinov, med katerimi so pomembnejši $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-12 , IL-18 ter limfotoksin- α . Poleg vnetnih citokinov, ki imajo tako lokalni kot sistemski učinek, so pomembni tudi kemokini, ki neposredno vplivajo na gibanje celic, zorenje DC, razvoj limfocitov ter stimulacijo Th1 in Th2 pridobljenega imunskega odziva (Dempsey in sod., 2003).

2.1.2 Pridobljena imunost

Pridobljena oziroma specifična imunost je zapleten obrambni sistem gostitelja, ki ima tri pglavitne lastnosti: specifičnost, imunski spomin in ločevanje lastnega od tujega. Razdelimo jo v dve obliki:

- humoralno oziroma protitelesno imunost,
- celično posredovano imunost (Vozelj, 2000).

2.1.2.1 Humoralna imunost

Pri humoralni imunosti so pomembna protitelesa ali imunoglobulini, ki specifično prepoznajo določene antigene. Protitelesa pri ljudeh razdelimo na podlagi njihovih antigenskih lastnosti težkih verig v pet razredov: IgA, IgG, IgM, IgD in IgE. Protitelesa izdelujejo limfociti B, ki nastajajo iz hematopoetskih matičnih celic v kostnem mozgu (Vozelj, 2000).

IgG protitelesa nastajajo pri okužbi ali imunizaciji z virusi, bakterijami ali njihovimi produkti in jih najdemo v krvi in tkivnih tekočinah. Pospešujejo fagocitozo in opsonizacijo. IgA protitelesa izdelujejo plazmatke v podsluznici in večina IgA protiteles nastane lokalno predvsem v črevesju, kjer preprečujejo stik patogenih bakterij in virusov z epitelijskimi celicami. IgA protitelesa ne aktivirajo komplementa in so slabi opsonini. IgM protitelesa imajo veliko molekulsko maso in nastajajo skoraj pri vseh imunskih odzivih. Pri primarnem imunskem odzivu jih odkrijemo prej kot IgG protitelesa (Vozelj, 2000).

2.1.2.2 Celično posredovana imunost

Za učinkovit imunski odziv sta pomembni dve skupini celic:

- limfociti,
- antigen predstavljajoče celice (APC).

Med limfocite uvrščamo dve pglavitni skupini celic, ki so limfociti B, ki dozoriijo v kostnem mozgu in limfociti T, ki dozoriijo v timusu. Ko se naivne celice B prvič srečajo z antigenom, se začnejo hitro razmnoževati. Pri tem nastanejo spominske celice B in

efektorske celice B, ki jih imenujemo plazmatke in so odgovorne za sintezo protiteles, ki jih izločajo v kri in mezgo (Vozelj, 2000).

Limfociti T med zorenjem v timusu pridobijo na svoji površini receptor za antigen, imenovan T celični receptor (TCR), ki lahko prepozna antigen le, če je vezan z membranskimi proteini, imenovanimi molekule poglobitnega histokompatibilnostnega kompleksa (PHK). Molekule PHK razreda I so na vseh celicah z jedri, medtem ko molekule PHK razreda II najdemo le na nekaterih antigen predstavljajočih celicah. Ko naivna celica T prvič sreča antigen povezan s PHK, se začne hitro razmnoževati in diferencirati v spominske celice T in različne efektorske celice, od katerih so pomembnejše celice T pomagalke (T_H – ang. T helper cell) in citotoksične celice (T_C – ang. cytotoxic T cell). Celice T pomagalke na svoji površini izražajo glikoprotein CD4, medtem ko citotoksične celice izražajo glikoprotein CD8. Celice T_H CD4⁺ lahko prepoznajo antigen le, če je vezan na površini antigen predstavljajoče celice v povezavi s PHK razredom II. Med APC spadajo makrofagi, celice B in dendritične celice. Citotoksične celice T (CD8⁺) so pomembne pri uničevanju z virusi okuženih celic in prepoznavajo antigen, le če je vezan z molekulo PHK razreda I (Vozelj, 2000).

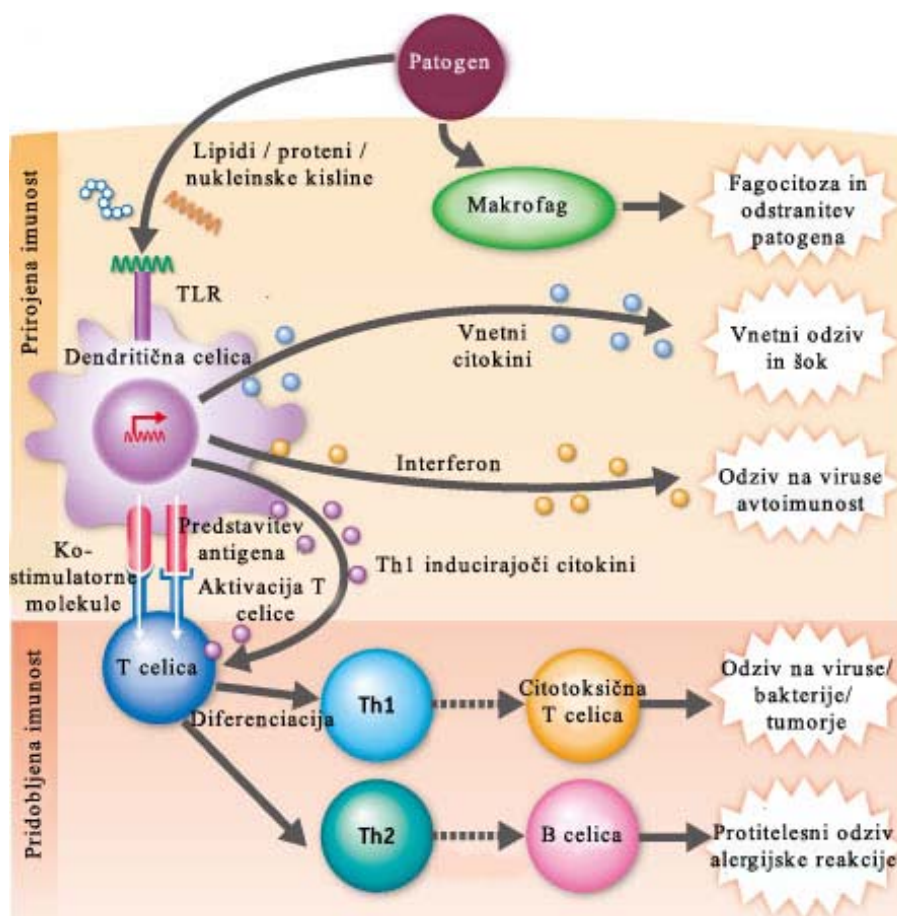
2.1.2.3 Citokini

Citokini so proteinske ali glikoproteinske molekule, ki so komunikacijski dejavniki med celicami imunskega odziva in jih lahko razdelimo v več družin. Interferoni (IFN) nastanejo pri okužbi celic z virusi (IFN- α in IFN- β), medtem ko IFN- γ izdelujejo aktivirane naravne celice ubijalke (NK) (Vozelj, 2000).

Druga velika skupina citokinov so interlevkini (od IL-1 do IL-15), ki jih izločajo limfociti T, makrofagi in nekatere tkivne celice. Interlevkini delujejo specifično na skupino celic, ki izražajo ustrezen receptor za posamezen interlevkin. Pomembna citokina sta tudi dejavnika tumorske nekroze α in β (TNF- α in TNF- β). TNF- α je poglobitni posrednik imunskega odziva na po Gramu negativne bakterije in druge infektivne mikroorganizme (Vozelj, 2000).

2.1.3 Povezava med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom

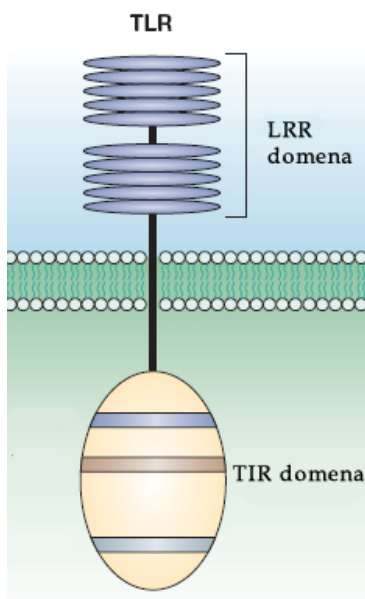
Prirojeni in pridobljeni imunski odziv povezujejo antigen predstavljajoče celice, od katerih so najpomembnejše dendritične celice (Palucka in Banchereau, 1999), ki molekule iz okolja vnesejo v celico z makropinocitozo. Znotraj celice se sprejete molekule razgradijo do peptidov, ki se s pomočjo molekul PHK II predstavijo na svoji površini. Ta proces imenujemo predstavitev antigenov. Aktivacija prirojenega imunskega sistema povzroči zorenje dendritičnih celic in njihovo potovanje v limfne vozle, kjer se stabilnost kompleksa, PHK II – antigeni peptid, poveča. Zorenje DC povzroči tudi sintezo kostimulatornih molekul, kar omogoča aktivacijo naivnih CD4⁺ T celic. To vodi v proliferacijo T celice v smeri razvoja Th1 ali Th2 celice (Dempsey in sod., 2003). Th1 celice, ki izločajo IL-2, IFN- γ in limfotoksin- α , stimulirajo celično posredovano imunost in vnetje. Th2 celice pa izločajo IL-4, IL-5, IL-9 in IL-13 in pomagajo B celicam pri protitelesnem odzivu (Mosmann in Coffman, 1989; Romagnani, 1991).



Slika 1: Shematski prikaz povezave med prirojenim in pridobljenim imunskim odzivom (Kaisho, 2007)

2.2 RECEPTORJI TLR

Leta 1985 so Andersen in sod. odkrili receptor Toll pri vinski mušici *Drosophila melanogaster*, pri kateri je protein nujen za vzpostavitev dorzoventralne osi telesa med embriogenezo (Anderson in sod., 1985). Kasneje so ugotovili, da je receptor Toll pomemben tudi pri obrambi v odraslem osebku pred okužbo z glivo *Aspergillus fumigatus* (Lemaitre in sod., 1996). Nato so pri sesalcih odkrili homologne proteine receptorja Toll in jih poimenovali TLR (Toll-u podobni receptorji, ang. Toll-like receptors). Do danes je pri ljudeh poznanih 11 receptorjev TLR. Ti so integralni membranski glikoproteini tipa I z zunajcelično regijo, ki vsebuje od 19 do 25 tandemskih ponovitev bogatih z levcinom - LRR (ang. Leucine-rich repeat) in citoplazemsko regijo z domeno TIR (ang. Toll/IL-1R domain). Domena TIR je podobna receptorjem interlevkin-1 (Medzhitov, 2001) in je z ekstracelularno regijo povezana s transmembranskim heliksom. Domena LRR tvori konkavno strukturo, ki je vključena v prepoznavanje različnih PAMP molekul, medtem ko je domena TIR ključna pri signaliziranju (Akira in Takeda, 2004; de la Barrera in sod., 2006).



Slika 2: Shematski prikaz zgradbe receptorja TLR. LRR domena prepoznava različne PAMP molekule, medtem ko je TIR domena odgovorna za prenos signala (Akira in Takeda, 2004: 500).

Receptorje TLR1, 2, 4, 5, 6 in 11 najdemo na površini celic. Specializirani so predvsem za prepoznavanje bakterijskih in glivnih komponent, medtem ko se TLR3, 7, 8 in 9 nahajajo

predvsem v znotrajceličnih veziklih kot so endosomi in sodelujejo pri prepoznavanju nukleinskih kislin. Receptor TLR4 s pomočjo proteina MD-2 prepozna lipopolisaharid (LPS) po Gramu negativnih bakterij. Bakterijske lipoproteine, lipoteihoično kislino, zimosan in porine prepozna receptor TLR2 skupaj s TLR1 in TLR6. TLR5 je pomemben pri prepoznavanju bakterijskega flagelina, TLR11 pa prepozna neznano komponento uropatogenih bakterij. Nemetilirano CpG DNK bakterij in virusov prepozna TLR9, dvoverižno virusno RNK (TLR3) in enoverižno virusno RNK (TLR7/8) (Rad in sod., 2009; Akira in Takeda, 2004).

2.2.1 Receptor TLR5

Receptor TLR5 zaznava flagelin, ki je glavni protein v bakterijskem bičku in virulentni dejavnik po Gramu negativnih in pozitivnih bakterij (Hayashi in sod., 2001; Feuillet in sod., 2006). Stimulacija receptorja TLR5 s flagelinom aktivira od MyD88 (diferencijski mieloidni protein 88, ang. myeloid differentiation primary-response protein 88) odvisno signalno pot, kar vodi do premestitve transkripcijskega faktorja NF- κ B (jedrni faktor κ B, ang. Nuclear factor κ B) v jedro. Aktivacija od MyD88 odvisne signalne poti lahko sproži tudi aktivacijo kinaze MAP (od mitogena aktivirana proteinska kinaza, ang. mitogen activated protein kinase), kar inducira zorenje antigen predstavitvenih celic in izločanje kemokinov ter vnetnih citokinov, vključno z IL-6, IL-12 in TNF- α (dejavnik tumorske nekroze, ang. tumour-necrosis factor). Receptorje TLR5 izražajo monociti, dendritične celice, epiteljske celice in mastociti (Feuillet in sod., 2006).

Poleg receptorja TLR5 so v zaznavanje flagelina vključeni tudi proteini Ipaf, ki omogočajo detekcijo citoplazemskega flagelina. To sproži aktivacijo kaspaze 1 in izločanje zrelega IL-1 β (Feuillet in sod., 2006; Miao in sod., 2006; Lightfield in sod., 2008). Ipaf protein spada v družino receptorjev NLR (NACHT- z levcinom bogate ponovitve, ang. NACHT-leucine-rich repeat), ki imajo, tako kot receptorji TLR, domeno bogato z levcinom. Poleg Ipaf proteina v to skupino spadajo še Nalp, Naip, Apaf in Nod (Miao in sod., 2006; Lightfield in sod., 2008).

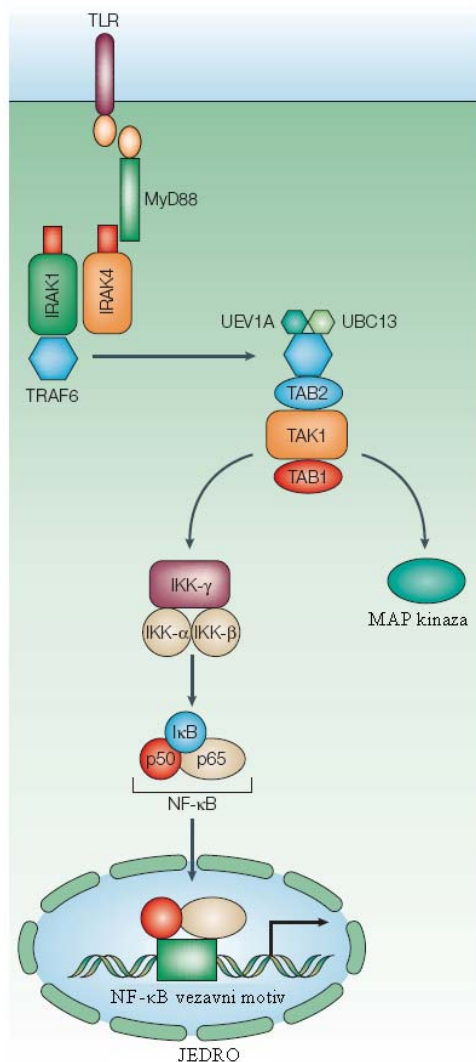
Bičkaste bakterije, ki spadajo v družino α in ϵ *Proteobacterij*, se lahko s spremembo aminokislinskega zaporedja izognejo prepoznavanju preko receptorja TLR5 hkrati pa še

vedno ohranijo gibljivost (Feuillet in sod., 2006; Andersen-Nissen in sod., 2005). V to skupino bakterij spadajo tudi pomembni človeški patogeni kot so *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* in *Bartonella bacilliformis* (Andersen-Nissen in sod., 2005).

Po drugi strani pa se bakterije lahko izognejo prepoznavanju preko receptorja TLR5 z utišanjem genov za izražanje flagelina. Primer je *Listeria monocytogenes*, ki pri 37 °C ne izraža flagelina in *Salmonella typhimurium*, ki prekine sintezo flagelina po vstopu v gostiteljske fagocite (Andersen-Nissen in sod., 2005).

2.2.1.1 Od MyD88 odvisna pot aktivacije

Po vezavi bakterijskega flagelina na receptor TLR5 pride do njegove stimulacije, kar vodi v dimerizacijo receptorja. Na TIR domeno receptorja TLR5 se s svojo TIR domeno veže protein MyD88 (slika 3). MyD88 vsebuje tudi domeno smrti (DD, ang. death domain), ki omogoča vezavo z DD domeno kinaze IRAK4 (ang. IL-1R-associated kinase 4). Sledi vezava IRAK1 kinaze in njena aktivacija preko fosforilacije kinazne domene, ki jo sproži IRAK4. Na aktivirano kinazo IRAK1 se lahko veže TRAF6 (ang. TNF receptor-associated factor 6). Kompleks IRAK1-TRAF6 se sprostí z receptorja in tvori kompleks s TAK1 (ang. transforming growth factor- β -activated kinase 1), TAB1 (ang. TAK1-binding protein), TAB2 in TAB3, kar sproži njihovo fosforilacijo. Aktivirana kinaza TAK1 aktivira kompleks IKK (ang. inhibitor of nuclear factor- κ B (I κ B)-kinase complex), ki je sestavljen iz IKK- α in IKK- β ter regulatorne podenote IKK- γ , imenovane tudi NEMO (ang. NF- κ B essential modulator). Kompleks IKK nato fosforilira I κ B, kar povzroči njegovo poliubikvitinacijo in s tem razgradnjo I κ B. To omogoči sprostitvev transkripcijskega faktorja NF- κ B iz inhibitornega kompleksa in njegov prenos v jedro, kjer sproži prepisovanje od NF- κ B-odvisnih genov (Kawai in Akira, 2006; Akira in Takeda, 2004).



Slika 3: Shematski prikaz signalne poti preko receptorja TLR, ki velja tudi za receptor TLR5 (Akira in Takeda, 2004: 500).

2.3 *Helicobacter pylori*

Leta 1982 sta avstralska raziskovalca Warren in Marshall kot prva izolirala bakterijo *Helicobacter pylori*, sprva poimenovano *Campylobacter pylori*, iz materiala pridobljenega z biopsijo želodca (Warren in Marshall, 1983; Covacci in sod., 1999). Leta 1989 so bakterijo *Campylobacter pylori* preimenovali v *Helicobacter pylori*. (*Campylobacter pylori*, 1989; van Duynhoven in de Jonge, 2001). Za svoje odkritje sta Warren in Marshall leta 2005 prejela Nobelovo nagrado (The Nobel Prize, 2005).

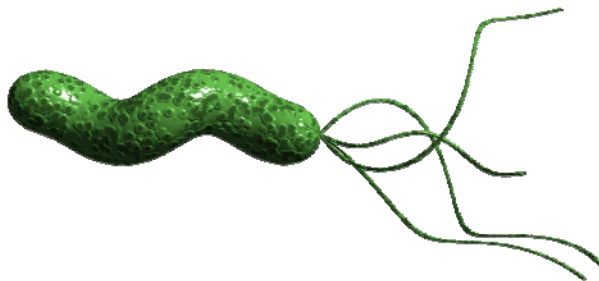
Do danes je bakterija dobro poznan mikroorganizem, ki ponekod okužuje preko 50 % populacije in je povzročitelj gastritisa, peptične razjede in raka na želodcu. 10 let po odkritju je Mednarodna agencija za raziskave raka (IARC) bakterijo uvrstila na seznam

povzročiteljev raka 1. stopnje (van Duynhoven in de Jonge, 2001; IARC, 1994) zaradi dokazane epidemiološke povezave med prisotnostjo bakterije in nastankom raka na želodcu (Amieva in El-Omar, 2008).

2.3.1 Morfologija

Bakterija je po Gramu negativna, mikroaerofilna, gibljiva spiralna palčka, ki pod določenimi pogoji preide v kokoidno obliko in je sposobna preživeti pri zelo nizkem pH v želodcu. Podobno kot druge bakterije, ki so specializirane na eno nišo, ima *H. pylori* majhen genom (1,67 mega bp), ki kodira metabolno pomembne gene (Covacci in sod., 1999; Tomb, 1997).

H. pylori, pridobljena iz različnih izolatov, se med seboj razlikuje v genetskem prstnem odtisu, kljub temu pa so proteini, ki jih DNA kodira, enaki, saj večinoma prihaja do zamenjav na zadnjem mestu kodona, kar zaradi degeneriranosti genskega koda ne povzroči spremembe v aminokislinskem zaporedju proteina (Alm in sod., 1999; Covacci in sod., 1999).



Slika 4: Bakterija *Helicobacter pylori* (Middlebury College, 2009)

2.3.2 Epidemiologija

Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (ang. World Health Organization, WHO) za rakom letno umre 13 % ljudi (podatki za leto 2004). Najpogostejši je pljučni rak, za katerim umre 1,3 milijona ljudi, na drugem mestu je rak želodca, za katerim letno umre 803 000 ljudi (WHO, 2009).

V Sloveniji je, po podatkih Onkološkega inštituta, med letom 2001 in 2006 za rakom želodca zbolelo 468 ljudi. Od tega je bilo 288 moških in 180 žensk. V letu 2006 je bil rak

želodca na sedmem mestu od vseh oblik raka v Sloveniji. Za njim je zbolelo 4,6 % moških ter 3,0 % žensk obolelih za rakom. Od vseh zbolelih za rakom na želodcu je v letu 2006 umrlo 338 ljudi (209 moških in 129 žensk), večinoma po 40. letu starosti (Incidenca raka...,2009).

Prevalenca je višja v deželah v razvoju zaradi slabših higienskih razmer in lahko dosega tudi do 100 % okuženost prebivalstva. V razvitem svetu so okužbe redkejšje in dosegajo od 30 do 50 %. Opažajo, da na okužbo v razvitem svetu vpliva socialno ekonomski status, saj je okuženost višja pri ljudeh iz nižjih socialno ekonomskih slojev (Covacci in sod., 1999).

Epidemiološke raziskave kažejo, da do okužbe z bakterijo pride večinoma znotraj družine v otroštvu. Najverjetnejši prenos okužbe je z matere na otroka ali med brati in sestrami. V nekaterih predelih sveta je lahko okuženih tudi do 90 % otrok starih do 10 let (Covacci in sod., 1999; van Duynhoven in de Jonge, 2001; Amieva in El-Omar, 2008).

Z molekularnimi metodami so dokazali bakterijsko DNK v odpadni vodi in vodnem okolju, vendar je izolacija žive bakterije iz teh virov redka. Raziskovalci predvidevajo, da se bakterija v okolju nahaja v dormantni, sporam podobni obliki, ki je viabilna oblika, vendar je ne moremo gojiti (ang. VBNC – Viable but not culturable) (Amieva in El-Omar, 2008).

Bakterija je izven želodca zelo občutljiva na povečano koncentracijo kisika in tudi na prisotnost svetlobe, zato je najverjetnejša pot okužbe tista, ki omogoča hitri prenos želodčne vsebine iz človeka na človeka (Amieva in El-Omar, 2008). Poti okužbe še niso popolnoma pojasnjene, vendar domnevajo, da se okužba prenaša s človeka na človeka fekalno – oralno, oralno – oralno ali iatrogeno preko okuženih endoskopov (Covacci in sod., 1999; van Duynhoven in de Jonge, 2001; Amieva in El-Omar, 2008). Ko je želodec koloniziran, ostane isti sev več desetletij ali celo doživljenjsko v želodcu, kjer se zaradi horizontalnega prenosa genov ali mutacij lahko spreminja. Ponovna okužba z drugim sevom je redka, prav tako je redka izmenjava oziroma prenos sevov med partnerjema (Covacci in sod., 1999).

2.3.3 Virulentni dejavniki

Med najpomembnejše virulentne dejavnike *H. pylori* spadajo ureaza, citotoksični protein (CagA), vakuolizirajoči toksin (VacA), adhezin, flagelin, nevtrofil aktivirajoči protein (NAP), *cag* PAI (s citotoksinom povezan otok patogenosti, ki kodira bakterijski sekrecijski sistem IV) (Prinz in sod., 2003; Covacci in sod., 1999; Wilson in sod., 2007).

Polarni **biček** je izražen v vseh sevih in omogoča premikanje bakterije v viskoznem želodčnem mukusu ter iskanje bolj pH nevtralnega okolja (Covacci in sod., 1999; Amieva in El-Omar, 2008). Gibanje in kemotaktično zaznavanje pH gradienta in s tem bolj ugodnega okolja je ključno za kolonizacijo želodca (Amieva, 2008). Sevi brez bička niso sposobni kolonizirati želodca, kar nakazuje, da je gibanje pomembno za prečkanje sluznice (Dhar in sod., 2003).

Ko bakterija doseže epiteljske celice, se pritrdi, pri čemer sodelujejo lipidi, gangliozi in sulfatni ogljikovi hidrati (Prinz in sod., 2003; Covacci in sod., 1999). Na površini epiteljskih celic mukusa je pritrjenih okoli 20 % bakterij (Amieva in El-Omar, 2008). Najbolj poznan adhezin je **BabA**, ki se veže na Lewisove b krvne antigene, prisotne na želodčnih epiteljskih celicah (Prinz in sod., 2003; Covacci in sod., 1999). Kot adhezini delujejo tudi SabA, HopZ in HopH ter AlpA in AlpB (Amieva in El-Omar, 2008). Pri vezavi na površino epiteljskih celic sodeluje tudi ***H. pylori* adhezin A** (HpaA), ki je potencialni antigen za uporabo v cepivih, saj je lociran na površini bakterije in je zelo ohranjen lipoprotein, ki ga najdemo pri vseh do danes znanih sevih *H. pylori*. HpaA je imunogen, saj privede pri ljudeh do nastanka protiteles (Carlsohn in sod., 2006).

Obstajajo tri hipoteze o vezavi *H. pylori* na površino celic. Prva hipoteza predpostavlja, da pritrditev povzroči vnetje in celične poškodbe, kar lahko predstavlja vir hranil za bakterijo. Druga hipoteza pojasnjuje, da lahko pritrditev prepreči mehansko odstranitev bakterije, kar omogoča dolgotrajnejšo kolonizacijo želodca. Tretja hipoteza pa zagovarja pritrditev kot mehanizem podvojevanja bakterije (Amieva in El-Omar, 2008).

Ureaza je ključni encim, ki bakteriji omogoča preživetje v sicer zelo neugodnem okolju v želodcu. Gre za citoplazemski encim, ki pretvarja ureo v amonijak (NH₃) in CO₂. Nastali

NH₃ difundira v okolico bakterije, kjer povzroči dvig pH, kar omogoča preživetje bakteriji v zelo kislem okolju, ki vlada v želodcu. Izražanje gena za ureazo je konstitutivno regulirano in lahko predstavlja tudi do 15 % vseh sintetiziranih proteinov (Prinz in sod., 2003; Amieva in El-Omar, 2008). Vnos uree iz okolja poteka preko protonskega kanalčka, odprtega samo pri nizkem pH. Pri nevtralnem pH je kanalček zaprt, s tem se bakterija izogne povečanju bazičnosti (Dhar, 2003).

Citotoksični protein (CagA) in vakuolizirajoči toksin (VacA) sta prisotna le pri nekaterih sevih *H. pylori*, ki so povezani z resnimi boleznimi. Seve, ki izražajo toksina VacA in CagA, pogosteje najdemo pri bolnikih z rakom dvanajsternika in želodca ter antralnim gastritisom (Prinz in sod., 2003).

VacA je sestavljen iz identičnih 87 kDa velikih monomernih podenot, ki se med seboj povežejo v strukturo podobno roži (Prinz in sod., 2003). Nastala struktura je zgrajena iz enega do dveh obročev, sestavljenih iz 6-7 monomernih podenot (Dhar in sod., 2003). VacA se vstavi v membrano poznih endosomalnih veziklov in tvori pore z aktivnostjo klorovih kanalov, kar spremeni koncentracijo kloridnih ionov v endosomalnem veziklu in privede do nastanka vakuol. Vendar še ni popolnoma jasno ali je to pglavitna funkcija tega proteina, saj so *in vitro* pokazali, da protein zmoti predstavitev antigenov in inhibicijo T-celične aktivacije. Prav tako vpliva na uhajanje majhnih molekul kot so železo, nikelj, sladkorji in aminokisline iz celic, kar bi lahko bilo pomembno za pridobivanje hranil za bakterijo iz epitelijskih celic (Amieva in El-Omar, 2008).

CagA je 128 kDa velik imunodominantni antigen, ki sproži močan serološki odziv. Relativno tveganje okužbe s sevom CagA⁺ je različno in v nekaterih raziskavah niso pokazali povezave med proteinom in boleznijo, medtem ko so v drugih pokazali, da sev CagA⁺ poveča možnost nastanka raka, hkrati pa so ga povezali tudi s povečanim vnetjem, celično proliferacijo in metaplazijo (strukturna in funkcijska sprememba celice) želodčne sluznice (Amieva in El-Omar, 2008; Prinz in sod., 2003).

Gen za CagA je del velikega otoka patogenosti (*cag* PAI), ki se je s horizontalnimi prenosi vstavil v genomsko DNK *H. pylori*. Izvor otoka patogenosti ni znan, niti ni poznan drug

protein s podobnimi lastnostmi, kot jih ima CagA. Velik del genov *cag* PAI kaže podobnost s proteini, ki kodirajo sekrecijski transportni sistem tipa IV, ki omogoča prenos bakterijskih produktov iz bakterije v gostiteljsko celico (Amieva in El-Omar, 2008).

2.3.4 Patogeneza

Helicobacter pylori je edini znani organizem, ki je sposoben preživeti in kolonizirati v kislem okolju, kot je želodec. Bakterija povzroča akutna in kronična vnetja želodca, vendar je intenziteta okužbe odvisna od virulentnih dejavnikov seva in dovzetnosti gostitelja. Večina okužb ostane prikritih in asimptomatskih (75 %), zato lahko bakterijo v tem primeru obravnavamo tudi kot komenzal (Amieva, 2008). Kljub temu pa letno za posledicami okužbe s *H. pylori* zboli 7 milijonov ljudi. Z bakterijo so povezani nastanek rane na želodcu in dvanajsterniku (10 %), kronični gastritis (15 %), adenokarcinom (1 %) in MALT limfom (<1 %).

Poznamo tri fenotipe gastritisa, ki je povezan tako s protitelesnim kot s celičnim imunskim odzivom. Prvi je enostavni ali benigni gastritis, ki je lažja oblika gastritisa in ga zaznamo večinoma pri asimptomatskih okužbah in pri ljudeh brez resnih gastrointestinalnih bolezni. Druga oblika, imenovana razjeda dvanajsternika (duodenalni ulkus), se pojavi pri okoli 15 % ljudi, večinoma v zahodni populaciji. Tretji fenotip je rak želodca oziroma dvanajsternika, ki prizadene okoli 1 % bolnikov in prevladuje predvsem v Aziji. Bolniki, ki razvijejo duodenalni ulkus, so večinoma zaščiteni pred nastankom raka (Amieva in El-Omar, 2008).

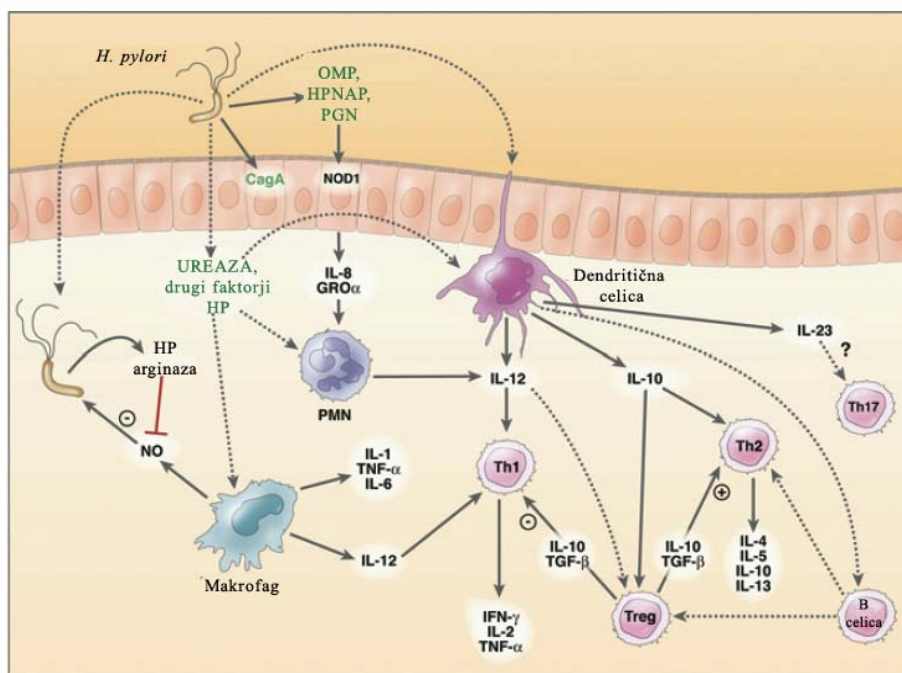
2.3.5 Mehanizmi persistence (vztrajanja)

Da lahko *H. pylori* dlje časa vztraja in kolonizira želodec, mora obiti ne le fizično in celično oviro, ampak tudi pridobljen in prirojen imunski odziv, ki se sproži v želodcu. Ureaza nima le vloge encima, ki naredi okolico bolj bazično, ampak sproži tudi močan vnetni odziv in povzroči poškodbo celic. Hp-NAP, ki deluje kot bakterijski feritin, poleg tega sproži tudi aktivacijo nevtrofilcev in privabljanje polimorfonuklearnih levkocitov na mesto vnetja tako *in vitro* kot *in vivo* (Amieva in El-Omar, 2008).

Nekateri faktorji zmanjšajo vnetje ali prepoznavanje s strani imunskega sistema. Spremenjenega flagelina ne prepozna receptor TLR5, prav tako je spremenjen LPS, ki je 1000-krat manj pirogen in 500-krat manj toksičen kakor LPS po Gramu negativnih enterobakterij. *H. pylori* ima številne glukoziltransferaze, ki modificirajo LPS, tako da le-ta oponaša človeški glikan, s čemer se bakterija izogne prepoznavanju s strani imunskega sistema (Amieva in El-Omar, 2008).

2.3.6 Imunski odziv na bakterijo *Helicobacter pylori*

Bakterija stimulira tako prirojeni kot tudi pridobljeni imunski odziv. Prirojeni imunski odziv se sproži preko receptorjev TLR, ki prepoznajo specifične bakterijske molekule (PAMP). Posledično pride do sinteze vnetnih in protibakterijskih molekul, kar lahko vodi v razvoj gastritisa in celo raka na želodcu. Imunski odziv s sintezo protiteles in celično posredovanim odzivom ni dovolj močan, da bi lahko odstranil bakterijo iz želodca, kar bakteriji omogoča trajno kolonizacijo (Agarwal K in Agarwal S, 2008).



Slika 5: Shematski prikaz imunskega odziva na bakterijo *H. pylori*. Z zeleno so označene molekule, ki jih posreduje bakterija, s črno pa molekule, ki jih tvori gostitelj (Wilson in Crabtree, 2007: 290).

2.3.6.1 Prirojeni imunski odziv

Pri prirojenem imunskem odzivu na *H. pylori* so ključni makrofagi, monociti in dendritične celice, ki producirajo interleukin IL-12, ki stimulira Th1 imunski odziv in citokin IFN- γ (glej sliko 5). Pred kratkim so pokazali, da protein NAP (protein, ki aktivira nevtrofilce) stimulira izločanje IL-12 in IL-23 v nevtrofilcih in monocitih in s tem usmeri imunski odziv v Th1 pot, kar je povezano tudi z nastankom peptične razjede pri bolnikih okuženih s *H. pylori*, predvsem sev CagA+. Makrofagi so vključeni tudi v nastanek vnetnih citokinov kot so IL-1, TNF- α in IL-6. IL-6 so povezali tudi z aktivacijo receptorja TLR4, MAP kinaz in sintezo NF- κ B. *H. pylori*, ki izraža VacA in cag PAI, pa se na drugi strani lahko izogne uničenju z makrofagi, tako da po fagocitozi pride do fuzije fagosomov, kar vodi v nastanek megasomov z velikim številom živih bakterij (Wilson in Crabtree, 2007).

Pri imunskem odzivu na *H. pylori* so zelo pomembne tudi dendritične celice (DC), saj predstavljajo most med pridobljenim in prirojenim imunskim odzivom. Pri aktivaciji DC so verjetno pomembni površinski proteini bakterije *H. pylori* kot sta Omp18 in HpaA. Po aktivaciji receptorjev TLR na dendritičnih celicah lahko le-te usmerijo T celični odziv v smeri Th1 ali Th2 odziva s tvorbo IL-10 ali IL-12. V primeru človeških krvnih mononuklearnih celic so pokazali produkcijo tako IL-10 kot IL-12 po stimulaciji s *H. pylori ex vivo* (Wilson in Crabtree, 2007).

2.3.6.2 Pridobljeni imunski odziv

Helicobacter pylori inducira tako protitelesno kot celično posredovani imunski odziv. Bakterija sproži nastanek protiteles IgG, IgM in IgA, tako lokalno kot sistemsko (Wilson in Crabtree, 2007). Zgodnje raziskave so pokazale, da so pri imunosti pomembna sluznična in v določeni meri tudi serumska IgA protitelesa. Prav tako so pokazali porast IgG protiteles po imunizaciji. Kljub prisotnosti IgA protiteles lahko bakterija še vedno kolonizira želodec in zaščita pred okužbo je lahko dosežena tudi brez povišanega titra protiteles (Agarwal K in Agarwal S, 2008).

Akhiani je s sodelavci pokazal, da protitelesa niso le nepotrebna pri zaščiti pred okužbo, ampak so celo škodljiva, saj so miške, ki niso bile sposobne tvorbe protiteles, lažje

odpravile okužbo, kakor miške, pri katerih so pokazali visoke titre protiteles (Akhiani in sod., 2004).

Pri imunskem odzivu na bakterijo je verjetno bolj kot sinteza IgA protiteles pomembna aktivacija T-celic. Biopsija želodčnega materiala bolnikov je pokazala povečano število T-celic v povezavi z gastritisom in gostoto bakterijskih celic. V nekaterih raziskavah so pokazali, da je pri zaščiti pred okužbo pomembnejši Th1 odziv, v drugih pa Th2 odziv. Pri sistemski imunizaciji miši z uporabo adjuvansov, ki bodisi inducirajo Th1 ali Th2 imunski odziv, so pokazali nižjo kolonizacijo želodca s *H. pylori* (Agarwal K in Agarwal S, 2008).

2.3.7 Zdravljenje

Običajno se okužba zdravi s kombinacijo dveh različnih antibiotikov in zaviralcem protonske črpalke. Kljub temu, da je zdravljenje večinoma učinkovito, je zaskrbljujoče, da se pojavlja vedno več sevov odpornih na zdravila. Kljub uspešnemu zdravljenju je možna ponovna okužba (Ables, 2007). Zapletena shema zdravljenja, nepopolna učinkovitost, razvoj odpornosti na antibiotike, stroški in stranski učinki so dejavniki, ki preprečujejo širšo uporabo zdravil. Zato je pomemben razvoj novih strategij za preprečevanje in iztrebljanje okužbe s *H. pylori* (Dhar in sod., 2003). Kot edina možna trajna rešitev se zdi razvoj primerne cepiva, ki bi bilo ekonomsko učinkovito in bi nudilo ustrezno zaščito pred okužbo (Agarwal K in Agarwal S, 2008; Dhar, 2003).

2.4 CEPIVA

Cepiva so iz ekonomskega in medicinskega stališča najbolj učinkovito orožje v boju proti infekcijskim okužbam. Z uporabo cepiv se je močno zmanjšala obolevnost in smrtnost za različne bolezni, ki jih povzročajo določeni mikroorganizmi. Kljub prizadevanjem še vedno ne poznamo učinkovitega cepiva proti številnim mikroorganizmom, med katerimi je tudi *Helicobacter pylori* (Ruggiero in sod., 2003).

Zdravljenje okužbe s *H. pylori* s hkratno uporabo dveh različnih antibiotikov in inhibitorjem protonske črpalke je sicer učinkovito, ampak predstavlja veliko breme za bolnika, saj se lahko pojavijo številni stranski učinki. Prav tako je skrb vzbujajoča povečana odpornost proti antibiotikom, ki lahko v določenih deželah presega 50 %.

Problem predstavlja tudi visoka stopnja ponovne okužbe predvsem v predelih z visoko stopnjo prenosa okužbe *H. pylori*, saj okužba z bakterijo ne prepreči ponovne infekcije. Pomembno je tudi dejstvo, da so zdravljeni le bolniki s simptomi. Posledično se lahko asimptomatskim bolnikom, ki niso zdravljeni, razvijeta atrofični gastritis ali rak na želodcu, hkrati pa so tudi prenašalci (Ruggiero in sod., 2003).

Zaradi številnih bolezni in močne razširjenosti bi razvoj terapevtskega ali zaščitnega (profilaktičnega) cepiva proti bakteriji *H. pylori* močno zmanjšal obseg bolezni in breme zdravstvene blagajne (Volland in sod., 2006; Ruggiero in sod., 2003).

Pri razvoju cepiva običajno izberemo ustrezne antigene, ki se nahajajo na površini bakterije v večjih količinah, so prisotni in ohranjeni pri različnih bakterijskih sevih ter so pomembni virulentni dejavniki bakterije. Največ pozornosti pri razvoju cepiva proti *H. pylori* so raziskovalci namenili ureazi, ki predstavlja 5 do 10 % vseh sintetiziranih proteinov v celici in je pomemben virulentni dejavnik, ki omogoča preživetje v želodcu, vendar ni močno imunogena. Najbolj imunogen protein je CagA, ki stimulira nastanek IL-8. Pomemben je tudi NAP, ki inducira kemotakso in aktivacijo nevtrofilcev in monocitov ter nastanek IFN- γ in TNF- α . Pri vnetnem odzivu je ključen citotoksin VacA. Zaradi kompleksnih interakcij med bakterijo *H. pylori* in gostiteljem bi bilo najbolj primerno cepivo, sestavljeno iz več različnih komponent (Ruggiero in sod., 2003).

2.4.1 Cepiva proti *H. pylori*

2.4.1.1 Oslabljena (atenuirana) ali mrtva cepiva

Prvi poskusi razvoja cepiva so temeljili na pripravi cepiva iz inaktiviranih bakterijskih celic, ki so jih oslabili z uporabo fizikalnih ali genetskih metod in z uporabo formalina. Tovrstno cepivo je bilo delno učinkovito pri glodavcih, imuniziranih oralno in parenteralno, ne pa tudi pri ljudeh. Cepiva iz oslabljenih oziroma mrtvih bakterij vsebujejo kompleksno mešanico antigenov, kar lahko sproži zaščitno imunost. Na drugi strani pa se lahko zaradi večjega števila antigenov pojavijo različni stranski učinki (Bumann in sod., 2004; Ruggiero in sod., 2003).

2.4.1.2 Proteinska cepiva

Proteinska cepiva, ki jih ločimo na cepiva prve (celični lizati *H. pylori*) in druge generacije (posamezni proteini *H. pylori*), stimulirajo imunski odziv ob uporabi različnih adjuvansov. Številne raziskave so bile izvedene na živalskih modelih, vendar je še vedno premalo raziskav narejenih na ljudeh (Agarwal K in Agarwal S, 2008). Omejeno število kliničnih raziskav je posledica težav pri pripravi izoliranih proteinov, ki bi bili imunogeni v sluznici (Ruggiero in sod., 2003).

Pri izbiri ustreznih antigenov je lahko v pomoč poznavanje DNK zaporedja genoma patogenega mikroorganizma. Ker mora cepivo nuditi zaščito proti širokemu spektru sevov, moramo poiskati antigene, ki so ohranjeni pri vseh sevih, zato se število potencialnih kandidatov za cepivo proti *H. pylori* močno zmanjša (Bumann in sod., 2004).

V predkliničnih raziskavah na živalskih modelih so pokazali zaščitno vlogo cepiva z uporabo ureaze, katalaze, CagA ali VacA proteina. Vendar pa klinične raziskave na ljudeh z uporabo cepiva iz rekombinantne ureaze niso dale željenih rezultatov (Bumann in sod., 2004; Kabir, 2007). Izolirani in očiščeni proteini so v sluznici slabo imunogeni, zato je potrebna uporaba močnih adjuvansov. Najmočnejši adjuvansi so bakterijski toksini kot sta kolera toksin in temperaturno labilni (LT) toksin *Escherichia coli*. Vendar je njuna uporaba zaradi stranskih učinkov močno omejena (Ruggiero, 2003). Pri prostovoljcih, cepljenih oralno z rekombinantno ureazo in LT toksinom, so pokazali porast IgA protiteles proti ureazi, ne pa tudi serumskih IgG protiteles. Prav tako ni prišlo do odstranitve okužbe in spremembe v stopnji gastritisa. Zaradi uporabe LT toksina se je pri prostovoljcih pojavila diareja (Kabir, 2007).

2.4.1.3 Parenteralno večkomponentno cepivo

Znano je, da lahko parenteralno cepivo zaščiti pred okužbo v sluznici. Ruggiero in sodelavci so ugotovili, da so najboljše rezultate dobili ob uporabi parenteralnega cepiva, ki je vsebovalo antigene VacA, CagA ter NAP in ob dodatku aluminijevega hidroksida kot adjuvansa. Da bi ugotovili varnost in imunogenost cepiva, so izvedli testiranja na prostovoljcih. Cepili so jih intramuskularno v treh ponovitvah z 10 µg ali 25 µg CagA, VacA in NAP proteini skupaj z aluminijevim hidroksidom. Cepivo se je izkazalo za zelo

varno, z milimi stranskimi učinki na mestu injiciranja in močno imunogeno, saj so dokazali nastanek protiteles proti vsem trem proteinom pri skoraj vseh prostovoljcih. Hkrati je cepivo induciralo tudi močan celični odziv in nastanek INF- γ (Ruggiero in sod., 2003; Kabir, 2007).

2.4.1.4 Uporaba bakterijskih vektorjev za prenos antigena

Drug pristop k razvoju cepiva je bila priprava oslabiljene bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhi, ki je na svoji površini izražala ureazo. Prostovoljce so cepili oralno s pripravkom, ki je vseboval $5\text{--}8 \cdot 10^7$ CFU, vendar pri njih niso zaznali povišanega titra protiteles proti ureazi. Kljub prizadevanjem bo potrebno rešiti še številna vprašanja, ki zadevajo izražanje plazmidov v vektorski bakteriji in vprašanje varnosti (Ruggiero in sod., 2003; Agarwal K in Agarwal S, 2008).

2.4.1.5 DNK cepivo

V zadnjem času je zanimanje za DNK cepivo proti *H. pylori* močno naraslo, saj je takšno cepivo relativno stabilno, varno in inducira tako protitelesni kot celični odziv. Cepivo lahko omogoča heterologno navzkrižno zaščito in je enostavno za pripravo polivalentnega cepiva. DNK cepivo lahko dostavimo kot golo DNK ali z uporabo bakterijskih vektorjev (npr. *Salmonella spp.*) (Agarwal K in Agarwal S, 2008).

2.4.1.6 Cepiva iz mikrosfer (ang. microsphere)

Kot adjuvanse lahko uporabimo tudi biorazgradljive in biokompatibilne mikrosfere, ki lahko inducirajo tako sistemski kot lokalni imunski odziv po oralni imunizaciji. Največkrat se uporabljata biorazgradljiva polimera poli(D,L-laktid-ko glikolid) (PLGA) ali poli(D,L-laktid)-polietilenglikol. Miške, cepljene oralno, so tvorile IgA in IgG protitelesa proti *H. pylori* (Agarwal K in Agarwal S, 2008).

2.4.1.7 Cepivo iz bakterijskih duhcev

Bakterijski duhci so prazni celični ovoji brez citoplazemske vsebine, vendar z ohranjeno morfologijo in nativnimi antigeni na površini. Pripravimo jih lahko s pomočjo bakteriofagnega PhiX174 proteina E, ki povzroči nastanek por v celični steni po Gramu

negativnih bakterij. Pri miškah, cepljenih oralno z bakterijskimi duhci *Helicobacter pylori*, se je zmanjšalo število bakterij *H. pylori* v želodcu. Ob souporabi adjuvansa kolera toksina pa so dokazali popolno zaščito pred bakterijo (Agarwal K in Agarwal S, 2008).

2.4.2 Adjuvansi

Uporaba adjuvansov pri cepljenju proti bakteriji *H. pylori* je ključna, saj pri ljudeh po oralni aplikaciji samega antigena niso zaznali imunskega odziva (Kabir, 2007).

Različne raziskave so bile narejene z uporabo kolera toksina (CT) in temperaturno labilnega toksina *E. coli* (LT) kot sluzničnih adjuvansov, vendar je njuna uporaba pri ljudeh zaradi številnih stranskih učinkov vprašljiva. Kljub temu, da *H. pylori* okužuje želodec, lahko zaščito dosežemo s parenteralnim cepivom ob uporabi aluminijevega hidroksida kot adjuvansa (Kabir, 2007).

Skene in sodelavci so z uporabo novih adjuvansov ISCOMTM in ISCOMATRIXTM testirali učinkovitost cepiva proti bakteriji *H. pylori*. Adjuvans ISCOMATRIXTM je 40 nm velika struktura v obliki kletke, sestavljena iz holesterola, fosfolipidov in saponinov iz *Quillaja saponaria*, ki ima imunostimulatorne lastnosti. Cepivo, sestavljeno iz proteinov in ISCOMATRIXTM, inducira močan specifičen imunski odziv proti antigenu. ISCOMTM cepivo vsebuje enake materiale, le da je antigen vgrajen v strukture, ki se tvorijo. Miške, katere so cepili z antigenoma HpaA ali katalazo in adjuvansom ISCOMTM oziroma ISCOMATRIXTM, so razvile zaščito pred okužbo s *H. pylori*. Obe tehnologiji sta varni in močno stimulirata Th1 in Th2 imunski odziv ter sprožita močan protitelesni odgovor (Skene in sod., 2008).

Z odkritjem receptorjev TLR se je pogled na imunski odziv močno spremenil. Zdaj vemo, da je močan antigen specifični T- in B-celični odziv odvisen od zaznavanja patogenih mikroorganizmov preko receptorjev TLR, ki aktivirajo prirojeni imunski odziv. Različni agonisti receptorjev TLR sprožijo različne tipe imunskega odziva, zato jih lahko uporabimo kot adjuvanse v cepivih (Wack in Rappuoli, 2005).

Pred kratkim so pokazali, da lahko imunski odziv stimuliramo z nemetiliranimi CpG oligonukleotidi (CpG-ODN), ki so agonisti receptorja TLR9. Pri miškah, cepljenih s sonificiranimi celicami *Helicobacter felis* in adjuvansom CpG-ODN, so pokazali zmanjšano breme okužbe s *H. felis* v primerjavi z necepljenimi miškami (Kabir, 2007).

Preglednica 1: Agonisti receptorjev TLR uporabljeni v kliničnih raziskavah ali cepivih (Wack in Rappuoli, 2005; Akira, 2005)

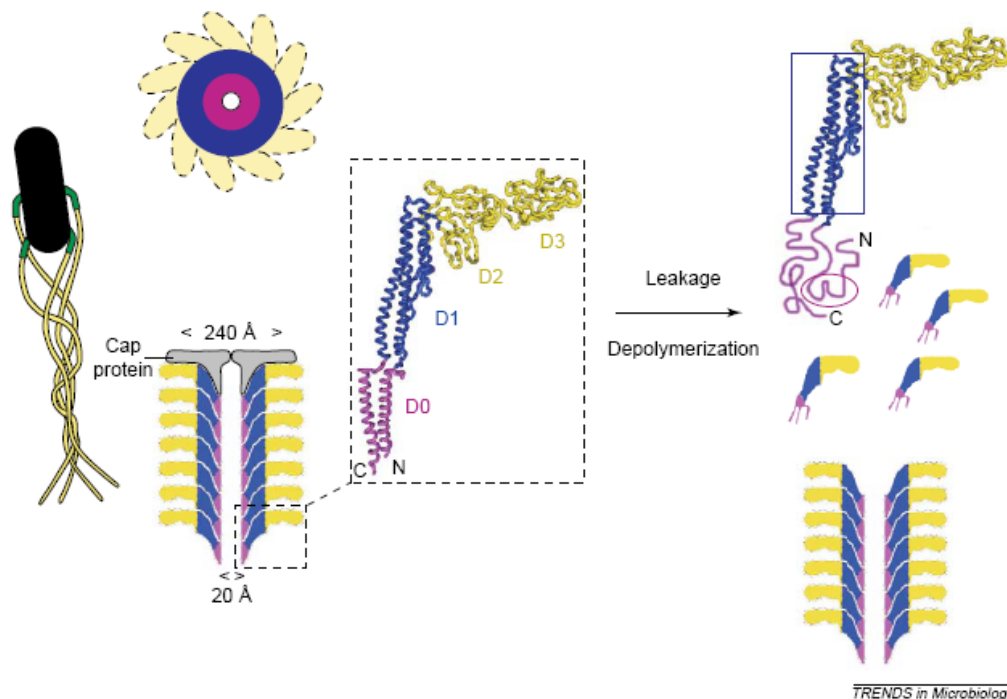
Receptor	Naravni agonist	Oblika uporabljena v cepivu	Tip cepiva
TLR1 (z TLR2)	Triacil lipopeptidi		
TLR2	Lipopeptid		
	Lipoteihoična kislina		
	Porini		
	Zimosan		
	Peptidoglikan		
TLR3	Dvoverižna RNA		
TLR4	Lipopolisaharid	Monofosforil lipid A	melanom
	Heat shock protein	AS02 (MPL + saponin QS-21)	Malarija, HBV, HPV,
	Fibrinogen		HBV
	Fibronektin	AS04 (MPL+ alum) RC-529	HBV
TLR5	Flagelin		
TLR6 (z TLR2)	Lipoprotein		
	Lipoteihojska kislina		
	Zimosan		
TLR7	Enoverižna RNA		
TLR8	Enoverižna RNA		
TLR9	Bakterijska DNA	CpG oligonukleotidi	HBV, gripa
TLR10	Nepoznan		
TLR11	Komponente patogenih bakterij		

2.5 BAKTERIJSKI FLAGELIN KOT ADJUVANS

2.5.1 Zgradba flagelina

Giblјive bakterije izraţajo na svoji površini organel imenovan biček, ki je lahko dolg do 15 µm. Aktivnost bička je kemotaktično regulirana. Filament bička je zgrajen iz pribliţno 20 000 podenot proteina, imenovanega flagelin (Ramos in sod., 2004). Flagelin bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (FliC) je modelni flagelin, na katerem je narejenih največ strukturnih in imunoloških raziskav (Nempont in sod., 2008). Bakterija izloča flagelin skozi centralni kanal rastočega filameta, pri čemer se tvori vijačna struktura. Na koncu flagelina je struktura, ki omogoča polimerizacijo in preprečuje, da bi

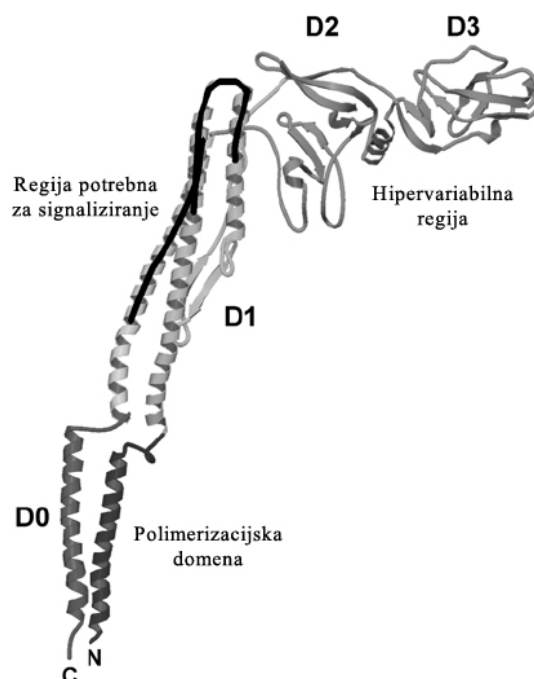
se flagelin sprostil. Molekulska masa flagelina se giblje med 28 in 80 kDa in je odvisna od vrste bakterije (Ramos in sod., 2004).



Slika 6: Shematski prikaz zgradbe bička in flagelina, ki je monomerna podenota bička (Ramos in sod., 2004: 510).

Primerjave sekvenc so pokazale, da sta N- in C-končna predela flagelina med bakterijami ohranjena, medtem ko se centralna hipervariabilna regija razlikuje tako v velikosti kot v aminokislinskem zaporedju. N- in C-končna predela predstavljata domeni D0 in D1 (slika 6) in sta sestavljeni iz α -vijačnic. D1 domena je ključna za prepoznavanje s strani receptorja TLR5. Centralna hipervariabilna regija flagelina (od 170 do 400 AK) je zgrajena v obliki β -plošč (D2 in D3 domeni) in ni vključena v prepoznavanje s strani receptorja TLR5, ampak določa antigene lastnosti flagelina (Ramos in sod., 2004; Nempont in sod., 2008).

Aktivacija signalne poti preko receptorja TLR5 je neodvisna od posttranslacijskih modifikacij flagelina. Sposobnost aktivacije receptorja TLR5 imajo monomerne podenote flagelina, medtem ko filamenti bička ne aktivirajo. Receptor TLR5 prepozna specifično konformacijo D1 domene flagelina, ki je potrebna za nastanek bička in je izpostavljena le v depolimerizirani obliki (Ramos in sod., 2004).



Slika 7: Tridimenzijski prikaz flagelina (Honko in Mizel, 2005: 84).

Agonisti TLR5 so potencialni aktivatorji sistemskega in sluzničnega imunskega odziva. Intravenozno vbrizganje flagelina sproži sistemski odziv, ki se kaže v nastanku vnetnih mediatorjev kot so IL-6 in TNF- α ter v aktivaciji dendritičnih celic. Proti flagelinu se sproži močan protitelesni odziv, ki je usmerjen predvsem proti hipervariabilni regiji (Nempont in sod., 2008).

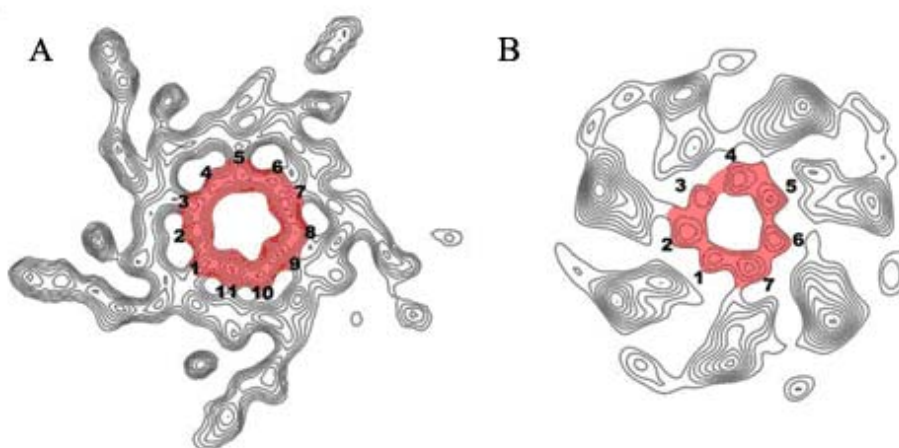
2.5.2 Flagelin bakterije *Helicobacter pylori*

Bakterija *H. pylori* ima od 5 do 6 polarnih bičkov sestavljenih iz dveh strukturnih podenot: 53 kDa velike podenote FlaA in 54 kDa velike podenote FlaB. Zapis za gena, ki kodirata izražanje obeh proteinov, sta locirana ločeno na kromosomski DNK in pod kontrolo različnih promotorjev (Gewirtz in sod., 2004). Flagelin je za *H. pylori* ključni virulenčni dejavnik, ki bakteriji omogoča kolonizacijo v želodcu (Eaton in sod., 1996). Sevi, ki niso izražali oziroma so imeli mutacije v genih za flagelin, niso bili sposobni kolonizacije (Gewirtz in sod., 2004).

Lee in sod. so dokazali, da flagelin *H. pylori* ne aktivira signalne poti preko receptorja TLR5. Prav tako so pokazali, da na aktivacijo preko receptorja TLR5 ne vpliva

posttranslacijska glikozilacija flagelina, ki je značilna za flagelin *H. pylori*. Primerjava aminokislinskega zaporedja N- in C-končna dela flagelina *H. pylori* s flagelini drugih bakterij kaže na podobnost v zaporedju z izjemo nekaj aminokislin (Lee in sod, 2003). To lahko ima vpliv na kvartarno strukturo, ki je bolj občutljiva na spremembe v aminokislinskem zaporedju kakor terciarna struktura (Galkin in sod., 2008).

Dolgo časa je prevladovalo prepričanje, da je zgradba bička enaka pri vseh bakterijah. Vendar je Galkin s sodelavci ugotovil, da je filament bička bakterije *Campylobacter jejuni*, ki spada v isto družino kot *H. pylori* in ne aktivira receptorja TLR5, sestavljen iz 7 protofilamentov in ne 11 kakor so pokazali pri bakteriji *S. typhimurium* (slika 9), kar bi lahko vplivalo na izmikanje aktivacije receptorja TLR5 (Galkin in sod., 2008).



Slika 8: Primerjava med tridimenzionalno strukturo bička iz bakterije *Salmonella typhimurium* (a) z bičkom iz bakterije *Campylobacter jejuni* (b) (Galkin in sod., 2008: 384).

2.5.3 Himerni flagelin

Huleatt in sod. so pokazali, da fuzijski protein, sestavljen iz flagelina fljB bakterije *S. typhimurium* in določenega antigena, poveča imunogenost. Dobro očiščen fuzijski himerni flagelin aktivira signalno pot preko receptorja TLR5 v odsotnosti endotoksina. Z enim samim podkožnim cepljenjem s flagelinom, ki je imel na N-končnem delu vezan piščančji ovalbumin, so pokazali tako celični kot protitelesni odziv proti ovalbuminu. Posledica cepljenja je bil hiter in višji porast IgG protiteles (IgG1 in IgG2) v primerjavi s cepivom, ki je vsebovalo običajne adjuvanse ter aktivacija CD8⁺ T-celičnega odziva (Huleatt in sod.,

2007). Podobno strategijo so uporabili tudi za izdelavo cepiva proti virusu zahodnega Nila. Fuzijski himerni flagelin z antigeni proti virusu je aktiviral nastanek nevtralizirajočih in zaščitnih protiteles, medtem ko sama podenota antigena ni sprožila imunskega odziva (McDonald, 2007). Fuzijski himerni flagelin so pripravili tudi pri razvoju cepiva proti virusu influence A, pri čemer so na C-končni del flagelina *S. typhimurium* vezali štiri tandemске ponovitve antigena M2e (Huleatt in sod., 2008).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Preglednica 2: Kemikalije, encimi in komercialno dostopni kompleti, uporabljeni v diplomskem delu

Proizvajalec	Kemikalije
BioRad	BioRad Protein Assay
BioWhittaker	FBS (Fetal Bovine Serum)
Carlo Erba	Glicerol
Fermentas	DNK-standardi: Gene Ruler DNA Ladder (Low Range), lambda DNK, komercialno dostopni kompleti za čiščenje DNK (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit), PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus, restrikcijski encimi (<i>Xba</i> I, <i>Pst</i> I, <i>Eco</i> RI), T4 DNA ligaza, T4 ligazni pufer
Fluka	Ponceau-S, SDS, DMSO, urea, gvanidini
Ilford	Razvijalec in fiksir
Inalco	IPTG
Invitrogen	DMEM + GlutaMAX™-I, DNK-polimeraza AccuPrime <i>Pfx</i> , DNK-polimeraza Platinum <i>Pfx</i> , 10-kratni <i>Pfx</i> pomnoževalni pufer, raztopina MgSO ₄ za DNK-polimerazo Platinum <i>Pfx</i> , 10-kratni AccuPrime <i>Pfx</i> pomnoževalni pufer, Opti-MEM I medij brez seruma (1-kratni), coelenterazine, restrikcijski pufer REact 2, proteinski standard SeeBlue Plus 2 PreStained Standard, Blast agar in Blast TB gojišča,
Kodak	Film in kaseta za filme(Kodak X-omat AR Film XAR-5, Kodak X-omatic Cassette)
LKB BROMMA	Triton X-100
Merck	Etanol, metanol, izopropanol, NaCl, NaOH, očetna kislina, bakteriološki agar, kloroform, Na-acetat
New England Biolabs	Restrikcijski encimi (<i>Spe</i> I), DNK-ligaza T4, T4 ligazni pufer, restrikcijski pufri
Operon	Začetni oligonukleotidi
Oxoid	DENT-suplement, Columbija krvni agar
Pierce	Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate
Polyplus-transfection	JetPEI transfekcijski reagent
Promega	2-kratni hitri ligacijski pufer, 5-kratni lizni pufer, luciferin, RQ1 DNase Buffer, RQ1 DNase, RNazin, RQ1 DNase STOP
Qiagen	Komercialno dostopni kompleti za čiščenje in izolacijo DNK (QiaQuick PCR Purification Kit, QIAEX II Gel Extraction Kit, QiaQuick Nucleotide Removal Kit, MiniElute Gel Extraction Kit, DNeasy Plant Mini Kit), Ni-NTA polnilo
Serva	TEMED

Se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 2: Kemikalije, encimi in komercialno dostopni kompleti, uporabljeni v diplomskem delu

Proizvajalec	Kemikalije
Sigma	Komercialno dostopni kompleti za izolacijo plazmidne DNK (GenElute Plasmid Miniprep Kit, GeneElute Endotoxin-free Plasmid Midiprep Kit), akrilamid, N,N'-metilen-bis-akrilamid, agaroz, bromfenolmodro, gojišče LB po Millerju, nitrocelulozna membrana (45 µm), EDTA, EGTA, ampicilin, amonijev persulfat, Tris, etidijev bromid, raztopina Tripsin EDTA (1-kratna), dNTP, Tween 20, DOC, Na ₂ HPO ₄ , SDS, Na ₃ VO ₄ , glicin, NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O, glukoza, glicerol, β-merkaptotanol, CPI (mešanica proteaznih inhibitorjev), Coomassie blue barvilo, ABTS (2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina) substrat, BSA (bovine serum albumin)
Tropix	I-BLOCK

3.1.2 Uporabljene raztopine, pufri in standardi

Preglednica 3: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri izolaciji in detekciji proteinov

Raztopina/pufer/standard	Sestavine
Lizni pufer za His Tag proteine	10 mM Tris (pH=8), 0,1 % DOC (deoksiholat)
CPI-His	Mešanica proteaznih inhibitorjev za His tag proteine, brez EDTA
Pufer za raztapljanje inkluzijskih telesc (IT)	10mM Tris, (pH=8,0), 8M urea
Pufri za refolding na koloni (padajoča koncentracija uree)	10mM Tris, (pH=8,0) z 7,2M urea, 6,4M urea, 5,6M urea, 4,8M urea, 4,0M urea, 3,2M urea, 2,4M urea, 1,6M urea, 0,8M urea ali 0M urea
Pufer I za spiranje kolone	50mM Tris, (pH=8,0)
Pufer II za spiranje kolone	50mM Tris, (pH=8,0), 20 mM imidazol
Pufer III za spiranje kolone	50mM Tris, (pH=8,0), 50 mM imidazol
Pufer IV za spiranje kolone	50mM Tris, (pH=8,0), 100 mM imidazol
Pufer za renaturacijo I	6M gvanidinijev HCl, 100 mM Na-acetat, pH=5,9
Pufer za renaturacijo II	6M gvanidinijev HCl, 100 mM Na-acetat, pH=5,9, 500 mM imidazol
Pufer za elucijo I	50mM Tris, (pH=8,0), 250 mM imidazol
Pufer za elucijo II	50mM Tris, (pH=8,0), 500 mM imidazol
Pufer A za FPLC	50mM Tris, (pH=8,0), 100 mM NaCl
Pufer B za FPLC	50mM NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (pH=8,0), 100mM NaCl, 500mM imidazol
4-kratni reducirajoči vzorčni pufer s SDS	320 mg SDS, 2 ml 0,5 M Tris/HCl (pH=6,8), 3,2 ml glicerol, 0,8 ml β--merkaptotanol, 0,8 ml 1-odstotnega bromfenolmodrega, 1,2 ml MQ

Se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 3: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri izolaciji in detekciji proteinov

Raztopina/pufer/standard	Sestavine
10-odstotni ločitveni gel	4,1 ml MQ, 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl (pH=8,8), 100 µl 10-odstotnega SDS, 3,3 ml 30-odstotnega akrilamid/bisakrilamid, , 50 µl 10-odstotnega APS, 5 µl TEMED (navedeno za 2 gela)
4-odstotni vstopni gel	3,05 ml MQ, 1,25 ml 0,5 M Tris/HCl (pH=6,8), 0,665 ml 30-odstotnega akrilamid/bisakrilamid, 50 µl 10-odstotnega SDS, 25 µl 10-odstotnega APS, 5 µl TEMED (navedeno za dva gela)
10-kratni elektroforezni pufer s SDS	30 g Tris, 10 g SDS, 144 g glicina, dopolnimo do 1 l z dH ₂ O. Pred elektroforezo pufer 10-krat redčimo z dH ₂ O.
Pufer za mokri prenos proteinov na membrano	6,057 g Tris, 28,8 g glicina, 400 ml metanola, dopolnimo z dH ₂ O do 2 l.
Raztopina za spiranje (WB)	1 X PBS (0,058 M Na ₂ HPO ₄ , 0,017M NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O, 0,068 M NaCl), 0,01 % Tween 20
Raztopina za blokiranje (WB)	1 X PBS (sestava kot pri raztopini za spiranje), 0,01 % Tween 20, 0,2 % I-BLOCK
10-kratna raztopina Ponceau	2 % (m/v) raztopina Ponceau-S, 30 % (m/v) CCl ₃ COOH, 30 % (m/v) sulfosalicilna kislina
Coomassie modro barvilo	0,2 % (w/v) raztopina Coomassie modrega barvila, 30 % metanol, 10 % očetna kislina
Raztopina za razbarvanje SDS gela	30 % etanol, 10 % očetna kislina
Raztopina za fiksiranje in shranjevanje SDS gela	20 % očetna kislina, 10 % glicerol
PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus	vsebuje proteine velikosti 11 kDa, 17 kDa, 28 kDa, 36 kDa, 55 kDa, 72 kDa, 95 kDa, 130 kDa, 250 kDa

Preglednica 4: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri izdelavi DNK-konstruktov, pri merjenju luciferazne aktivnosti ter pri delu v celičnem laboratoriju

Raztopina/pufer/standard	Sestavine
50-kratni TAE pufer za agarozno elektroforezo	242 g Tris, 57,1 ml ledocetna kislina, 100 ml 0,5 M EDTA, dH ₂ O do 1 l. pH uravnemo na 8.
6-kratni nanašalni pufer za agarozno elektroforezo	0,25 % bromfenolmodro, 0,25 % ksilencianol, 40 % (w/v) glukoze v dH ₂ O.
Pufer 1 Mini Prep	50 mM glukoza, 25 mM Tris/HCl (pH=8,0), 10 mM EDTA (pH=8,0)
Pufer 2 Mini Prep	0,2 M NaOH, 1 % SDS

Se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 4: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri izdelavi DNK-konstruktov, pri merjenju luciferazne aktivnosti ter pri delu v celičnem laboratoriju

Raztopina/pufer/standard	Sestavine
Pufer 3 Mini Prep	5 M kalijev acetat, CH ₃ COOH
Pufer TE	10 mM Tris/HCl (pH=8,0), 1 mM EDTA
Zmes dNTP	1,25 mM ATP, 1,25 mM CTP, 1,25 mM GTP, 1,25 mM TTP
Gene Ruler DNA Ladder Low Range	vsebuje DNK velikosti 25 bp, 50 bp, 75 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 700 bp,
Standard λ EcoRI/HindIII	vsebuje DNK velikosti 125 bp, 564 bp, 831 bp, 947 bp, 1.375 bp, 1.584 bp, 1.907 bp, 2.027 bp, 4.973 bp, 5.148 bp, 21.226 bp,
LUC-pufer (pufer za merjenje luciferazne aktivnosti)	LUC-pufer: 2,38 g HEPES, 0,38 g MgCl ₂ , 0,06 g EGTA-Na raztopiš v 100 ml dH ₂ O, uravnaš pH na 7,8 in dodaš 0,08 g NaF. Poleg 2,6 ml LUC pufru dodamo še DTT, ATP, CoA in MQ do 13 ml. Luciferin raztopimo v DMSO in ga dodamo pufru.
RENILLA-pufer (pufer za merjenje luciferazne aktivnosti)	2,6 ml 5-kratnega Renilla-pufru (3,346 g Na pirofosfat, 6,9 g NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O, 14,5 g NaCl, 1,822 g CDTA, 5 ml metanol, pH uravnemo na 5,0), MQ do 13 ml. Coelenterazin raztopimo v metanolu in ga dodamo pufru.
10-kratni PBS (za celični laboratorij)	100 g NaCl, 2,5 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,5 g KH ₂ PO ₄ , dodamo MQ do 1 l, pH uravnemo na 7,4.
TFB1	40 mM RbCl, 20 mM MnCl ₂ •H ₂ O, 12mM K-acetat, 4 mM CaCl ₂ •2H ₂ O, 15 % glicerol, pH=5,8
TFB1	4 mM MOPS, 4 mM RbCl, 30 mM CaCl ₂ •2H ₂ O, 15 % glicerol, pH=6,8

Preglednica 5: Raztopine, pufri in standardi, ki smo jih uporabljali pri ELISA testih

Raztopina/pufer/standard	Sestavine
Pufer za redčitev antigena	50 mM Na ₂ CO ₃ , pH=9,6
10-kratni PBS-T (za ELISO)	150 mM NaCl, 7,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 2,5 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,05 % Tween-20, pH uravnemo na 7,2
Blokirni pufer	1-kratni PBS-T (za ELISO), 1 % BSA

3.1.3 Laboratorijska oprema

Preglednica 6: Uporabljena laboratorijska oprema

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Agilent Technologies	Aparatura za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HP 1100 Series HPLC system)
Applied Photophysics	Aparatura za merjenje cirkularnega dikroizma (Chirascan)
Beckman	Centrifuga J2-HS
Becton Dickinson	Vrečke za vzdrževanje mikroaerofilne atmosfere
Berthold Technologies	Mithras LB 940 in pripadajoči računalniški program MikroWin 2000
Binder	CO ₂ inkubator za celične kulture
Biometra	Luminometer
BioRad	Aparatura za poliakrilamidno gelsko elektroforezo (Mini Protean II) in moker prenos proteinov na membrano (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell), aparatura za agarozno elektroforezo DNK, Ni-NTA sefaroza za izolacijo proteinov
Brand	Avtomatske pipete
Chemass	Spektrofotometer in pripadajoči računalniški program za obdelavo podatkov
Dispenser	Serološke pipete
Eppendorf	Avtomatska pipeta 0,1–2,5 µl, namizna centrifuga MiniSpin, centrifuga 5415R, termoblok Thermomixer comfort
Euromax	Svetlobni mikroskop
Gilson	5 ml, 1 ml, 200 µl, 100 µl, 20 µl pipete
Hanna instruments	Magnetno mešalo
Hettich	Centrifuga Universal 32R
Hewlett Packard	Spektrofotometer
Horizon	Kadička za elektroforezo
IKA	Magnetno mešalo
Kambič	Parni sterilizator A-500/700
Lauda	Termostatirana vodna kopel
Moulinex	Mikrovalovna pečica SYBIO
Novagen	Dializne epice (3 500 kDa, 6-8 kDa)
Nunc	Mikrotitrne plošče (96-well)

Se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 6: Uporabljena laboratorijska oprema

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Oxoid	Anaerobni lonec
Pharmacia Biotech, GradiFrac System	Aparatura za hitro proteinsko tekočinsko kromatografijo (Fast Protein Liquid Chromatography)
PlastiBrand	Nastavki za avtomatske pipete
Privileg	Aparatura za varjenje vrečk
Sartorius	Koncentrator
Sartoriusstedim biotech	Filter papir (0,45µm)
Savant	Vakuumska centrifuga SpeedVac
SpectraPor	Dializne cevke (MWCO: 3 500)
Tehtnica Železnik	Tehtnica ET-1111
Tekmar	Sonikator (Tekmar Sonic Disruptor)
Thermo Scientific	Centrifuga Sorvall RC5C Plus, NanoDrop 1000 in pripadajoči računalniški program za obdelavo podatkov
TPP	Falkonke

3.1.4 Uporabljena protitelesa

Preglednica 7: Uporabljena protitelesa

Protitelo	Opis
Primarna protitelesa proti histidinskemu repu (za Western blot)	Primarna mišja protitelesa, ki prepoznajo štiri histidinske ostanke, brez BSA (Qiagen)
Poliklonska sekundarna protitelesa, konjugirana s hrenovo peroksidazo	Kozja poliklonska protitelesa proti mišjim protitelesom IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Santa Cruz)
Sekundarna protitelesa proti mišjim IgG1, konjugirana s hrenovo peroksidazo (za ELISO)	Kozja poliklonska protitelesa proti mišjim protitelesom IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Sigma)

3.1.5 Uporabljeni plazmidi

Preglednica 8: Plazmidi uporabljeni v diplomski nalogi

Vir	Plazmid
Novagen	pET19b
BioBrick®, Tom Knight laboratorij	pSB1AK3

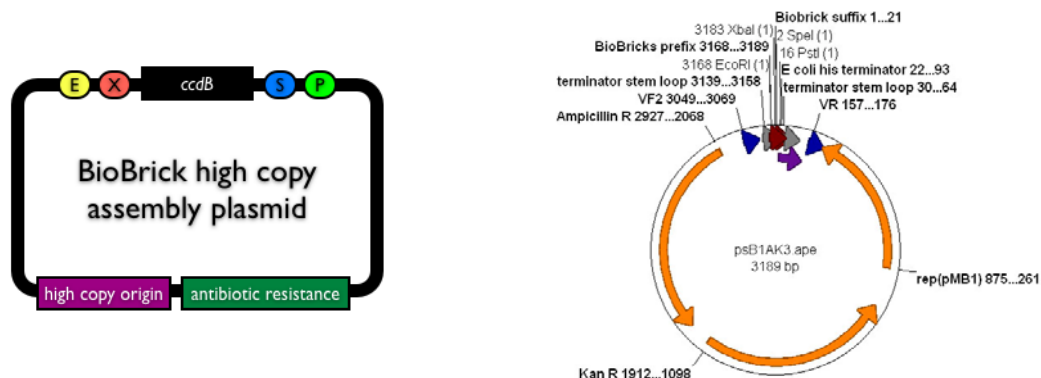
Se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 8: Plazmidi uporabljeni v diplomski nalogi

Vir	Plazmid
Invivogen	pUNO-hTLR5
Promega	pGL2 (luciferazni reporterski vektor), phRL-TK (<i>Renilla</i> luciferazni reporterski vektor)
darilo (Carsten Kirschning, Technische Universität München)	hMD-2 v pEF-BOS, hTLR4 v pFLAG-CMV,

- pSB1AK3

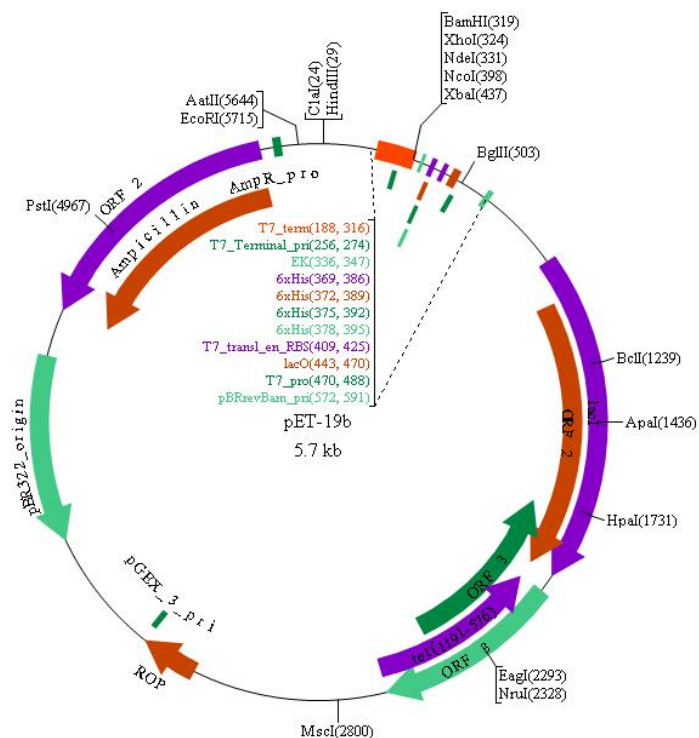
Vektor ima zapis za odpornost proti antibiotikoma kanamicinu in ampicilinu. V vektorju je vstavljena tudi *ccdB* domena, ki kodira toksin, kar omogoča selekcijo ustrezno transformiranih celic s pravilno rezanim vektorjem. Pred samo ligacijo smo morali vektor najprej rezati z ustreznima encimoma (*EcoRI* – *SpeI* / *XbaI* – *PstI*), tako da smo izrezali *ccdB* domeno, ki je toksična za kompetentne celice *E. coli* DH5 α . Produkt restrikcije smo nanesli na agarozno elektroforezo in iz gela izrezali ustrezno rezan vektor ter ga očistili s komercialnimi kompleti za čiščenje DNK. V vektorju smo sestavili t. i. biokocke (sestavljene DNK konstrukti). Vse konstrukte smo pripravili v tem vektorju in jih naknadno prenesli v vektor pET19b.



Slika 9: Shematski prikaz pSB1AK3 vektorja (Registry of..., 2004).

- pET19b

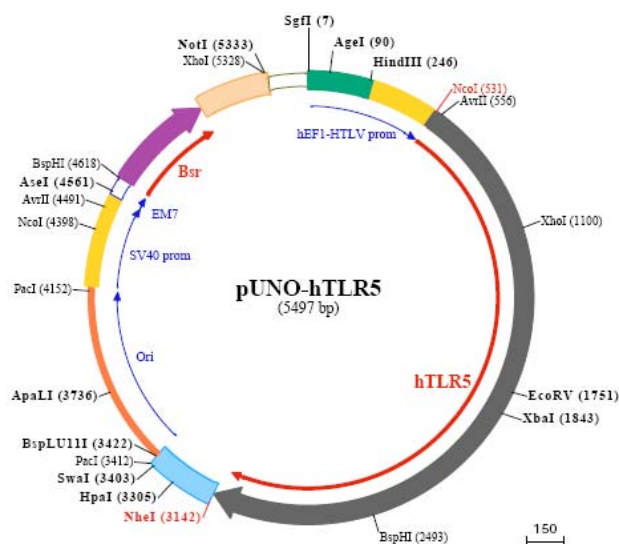
Vektor za izražanje proteinov v bakterijskih sistemih ima zapis za T7 promotor in T7 terminator ter histidinski rep. Vektor vsebuje zapis za odpornost proti antibiotiku ampicilinu, kar omogoča selekcijo bakterij s prejetim plazmidom. V vektor pET19b smo prenesli konstrukte HF-RGD-His stop in HF-multiepitop-RGD-His stop, ki smo jih pripravili v vektorju pSB1AK3.



Slika 10: Shematski prikaz pET19b vektorja (BVTech plasmid, 2009).

- pUNO-hTLR5

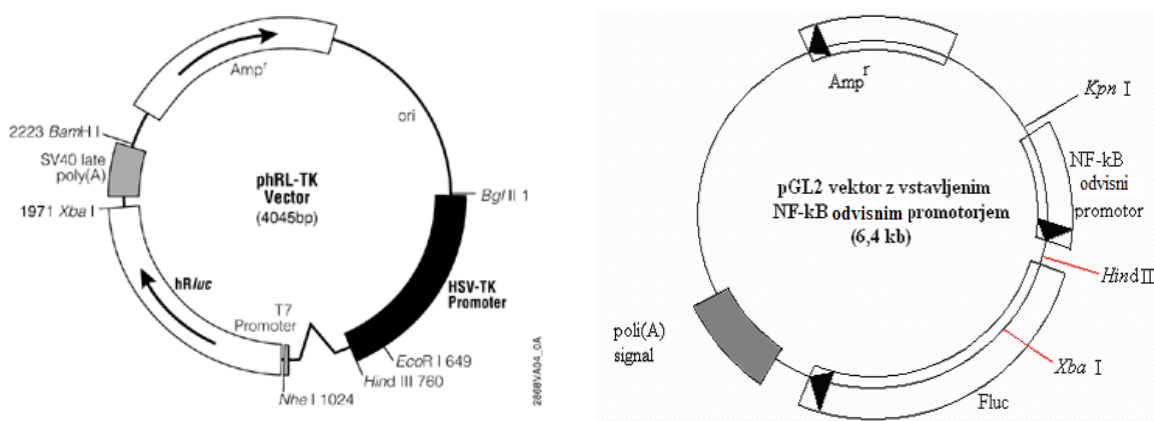
Vektor pUNO z zapisom za humani receptor TLR5 (hTLR5) ima zapis za odpornost proti antibiotiku blasticidinu in je prilagojen za neposredno *in vitro* ali *in vivo* transfekcijo. Izražanje gena je pod kontrolo močnega ubikvitarnega EF1a/HTLV promotorja.



Slika 11: Shematski prikaz pUNO-hTLR5 vektorja (Invivogen, 2009).

- pGL2 in phRL-TK

pGL2 luciferazni poročevalni vektor vsebuje gen za kresničkino luciferazo, ki je pod kontrolo promotorja NF- κ B. *Renilla* luciferazni poročevalni vektor phRL-TK vsebuje gen za *Renilla* luciferazo, ki je pod kontrolo konstitutivnega promotorja TK.



Slika 12: Shema vektorja pGL2 z vstavljenim NF- κ B-odvisnim promotorjem ter phRL-TK vektorja z vstavljenim zapisom za konstitutivno izraženo *Renilla* luciferazo (Ebiotrade, 2009; Ciglič, 2007).

3.1.6 Oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo

Preglednica 9: Oligonukleotidi, uporabljeni v diplomskem delu

Oznaka oligonukleotida	Kratka oznaka oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje
GKLTVTSG-F	Si152	5'CTAGAGGAAAGCTCACAGTAACAAGCGGAAGTGTGCGG CCGCTGCA 3'
GKLTVTSG-R	Si157	5'GCGGCCGCACTAGTTCCGCTTGTTACTGTGAGCTTTCCT 3'
N-HP-F	Si129	5'CCGCCTCGAGATGGCTTTTCAGGTCAATAC 3'
C-HP-R	Si130	5'CCGCGGATCCCTAAGTTAAAAGCCTTAAGATATTTTG 3'
N-EC-F (bb)	Si161	5'CGTCGAATTCGCGGCCGCTCTAGAATGGCACAAGTCATTA ATACC 3'
N-EC-R (bb)	Si162	5'CGTCCTGCAGGCGGCCGCACTAGTTTAAACGCTAAAACCA TCAAGG 3'
C-EC-F (bb)	Si163	5'CCTCGAATTCGCGGCCGCTCTAGAATGGCTGTTGCAAATG GTAAAACC 3'

Se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 9: Oligonukleotidi, uporabljeni v diplomskem delu

Oznaka oligonukleotida	Kratka oznaka oligonukleotida	Nukleotidno zaporedje
C-EC-R (bb)	Si164	5'CCGCCTGCAGGCGGCCGCACTAGTACCCTGTAACAGAGA CAGAAC 3'
213-V-HP-R	Si165	5'CCGCCTGCAGGCGGCCGCACTAGTCCCTGTACCTGCTGAA CTAG 3'
215-V-HP-F	Si166	5'CCTCGAATTCGCGGCCGCTCTAGAATGGGTGTGTTGGCAG AAGTG 3'
V-HP-N-EC-R	Si167	5'GCCGTGATTAACGCTTTAACGCTAAAACCATCAAGG 3'
N-EC-V-HP-F	Si168	5'GGTTTTAGCGTTAAAGCGTTAATCACGGCTTCTG 3'
C-EC-V-HP-R	Si169	5'CCATTTGCAACAGCTCTTAAGGTTGTAACCCCAG 3'
V-HP-C-EC-F	Si160	5'GTTACAACCTTAAGAGCTGTTGCAAATGGTAAAACC 3'
EC-BamHI-F	Si131	5'GGTAAAACCACGGACCCGC 3'
EC-BamHI-R	Si132	5'GCGGGTCCGTGGTTTTACC 3'
RGD-His-stop-f	Si158	5'CTAGACGAGGAGACCACCACCACCACCACCTAGACTA GTGCGGCCGCTGCA 3'
RGD-His-stop-r	Si159	5'GCGGCCGCACTAGTCTAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTC CTCGT 3'
N-EC-F (pET)	Si205	5' GCATCCATGGCGATGGCACAAGTCATTAATACC 3'
Reverseak3 (pET)	Si207	5' GCAT CTCGAG CCTTGCCCGTTTTTTTGGCCGG 3'

3.1.7 Organizmi

3.1.7.1 Bakterijski sevi

Preglednica 10: Uporabljeni sevi bakterije *Escherichia coli*

Sev	Genotip	Vir
DH5 α	F ⁻ / <i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1 endA1 gyrA96, thi-1, relA1</i>	zbirka sevov na Kemijskem inštitutu Ljubljana
BL21[DE3]pLysS	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> DE3) pLysS (Cam ^R)	zbirka sevov na Kemijskem inštitutu Ljubljana

Preglednica 11: Uporabljeni sevi bakterije *Helicobacter pylori*

Sev	Genotip	Vir
SS1S	<i>cagA</i> ⁺ , <i>vacA</i> s2-m2, Str ^r	prof. dr. Rainer Haas (Max von Pettenkofer-Institut, München)
ATTC 43504		Inštitut za imunologijo in mikrobiologijo Ljubljana

3.1.7.2 Celične kulture

Preglednica 12: Uporabljene celične kulture

Celična kultura	Vir
HEK293	Carsten Kirschning (Tehnična Univerza München)

3.1.7.3 Miši

Preglednica 13: Uporabljene celične kulture

Sev	Lastnosti	Vir
C57BL/6	Odrasle samice starejše od 6 tednov	Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patologijo

3.1.8 Gojišča

3.1.8.1 Gojenje bakterije *Escherichia coli*

Bakterijo *E. coli* smo gojili v gojišču Luria-Bertani (LB). Za selekcijo uspešno transformiranih bakterij smo uporabljali antibiotik ampicilin ali blasticidin.

Preglednica 14: Tekoče LB gojišče za bakterije

Kemikalija	Količina
Gojišče LB po Millerju	25 g/l

Preglednica 15: Trdno LB gojišče za bakterije

Kemikalija	Količina
Gojišče LB po Millerju	25 g/l
Agar	15 g/l

- Priprava tekočega gojišča LB za bakterije:

V destilirani vodi smo raztopili sestavine gojišča LB po Millerju v končni koncentraciji 25 g/l in sterilizirali v avtoklavu z vlažno toploto. Gojišče smo shranili do uporabe pri sobni temperaturi. Pred inokulacijo smo gojišču dodali še antibiotik ampicilin v končni koncentraciji 50 µg/ml. Nacepljeno gojišče smo inkubirali 14 do 16 ur na stresalniku pri 37 °C in 150 vrt/min.

- Priprava trdnega gojišča LB za bakterije:

Trdno gojišče za bakterije smo pripravili podobno kot tekoče, le da smo mu dodali še agar v končni koncentraciji 1,5 %. Po sterilizaciji v avtoklavu z vlažno toploto smo delno ohlajenemu gojišču dodali antibiotik ampicilin v končni koncentraciji 50 µg/ml. Gojišče smo rahlo premešali in ga razlili v sterilne plastične petrijevke. Plošče smo shranili do uporabe pri 4 °C.

Trdno gojišče smo nacepili s sterilno cepilno zanko ali tekočo kulturo vcepka, ki smo ga razmazali s sterilno spatulo. Nacepljene plošče smo inkubirali 16 ur pri 37 °C.

- Priprava tekočega gojišča z blasticidinom:

Uporabili smo že pripravljeno gojišče FastMedia Blast (Invivogen), ki vsebuje LB gojišče in antibiotik blasticidin. V borosilikatni steklenici (500 ml) smo najprej sterilizirali 200 ml destilirane vode. V ohlajeno vodo smo stresli vsebino vrečke in dobro premešali, da je postala raztopina homogena. Steklenico smo segreli v mikrovalovni pečici ali nad ognjem, tako da je postalo gojišče bistro. Gojišče smo do uporabe shranili pri sobni temperaturi. Uporaba, inokulacija in inkubacija so enake kot v primeru tekočega LB gojišča.

- Priprava trdnega gojišča z blasticidinom:

Priprava trdnega gojišča poteka podobno kot priprava tekočega, le da uporabimo FastMedia Blast agar (Invivogen) gojišče, ki poleg LB gojišča in antibiotika blasticidin, vsebuje še agar. Po segrevanju gojišča v mikrovalovni pečici smo počakali, da se je gojišče ohladilo in nato razlili v sterilne plastične petrijevke. Plošče smo shranili do uporabe pri 4 °C. Uporaba, inokulacija in inkubacija so enake kot v primeru trdnega LB gojišča.

3.1.8.2 Gojenje bakterije *Helicobacter pylori*

- *Helicobacter pylori* sev SS1S smo shranjevali pri -80 °C v 1-kratnem PBS z 25-odstotnem glicerolu.
- Trdno gojišče za *H. pylori* so pripravili v Službi za pripravo gojišč na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani. Selektivno gojišče za izolacijo *H. pylori*

iz kliničnih izolatov in sprotno gojenje seva SS1S je vsebovalo komercialno dostopen Oxoidov *H. pylori* selektivni medij, ki je osnova za Columbia krvni agar (ang. Columbia blood agar base) (preglednica 15), kateremu so dodali DENT-suplement (preglednica 16) in streptomycin za potrebe reizolacije seva SS1S v obliki streptofatol-sulfata do končne koncentracije 250 mg/liter gojišča. Po toplotni sterilizaciji so v gojišče dodali še hemolizirano konjsko kri (ang. Leaked horse blood), ki jo pripravljajo sami, s ponavljajočimi cikli zamrzovanja in odmrzovanja krvi, pri čemer se eritrociti lizirajo. Kri je pridobljena iz klavnice.

- Nacepljene plošče s *H. pylori* smo inkubirali pri 37 °C v mikroaerofilni atmosferi, ki smo jo vzpostavili z uporabo komercialno dostopnih BBL TM CampyPakTM Plus vrečk s paladijevim katalizatorjem proizvajalca Becton Dickinson. Za vzdrževanje atmosfere smo uporabili dvolitrski anaerobni lonec proizvajalca Oxoid.

Preglednica 16: Sestava *Columbia krvnega agarja* za pripravo trdnega gojišča za gojenje *H. pylori*

Kemikalija	Količina
Poseben pepton	23,0 mg/l
Škrob	1,0 mg/l
NaCl	5,0 mg/l
Agar	10,0 mg/l
pH	7,3 ± 0,2

Preglednica 17: Sestava selektivnega DENT-suplementa za pripravo trdnega gojišča za gojenje *H. pylori*

Kemikalija	Količina
Vankomicin	10 mg/L
Trimetoprim	5.0 mg/L
Cefsulodin	5,0 mg/L
Amfotericin B	5,0 mg/L
Hemolizirana konjska kri	

3.2 METODE

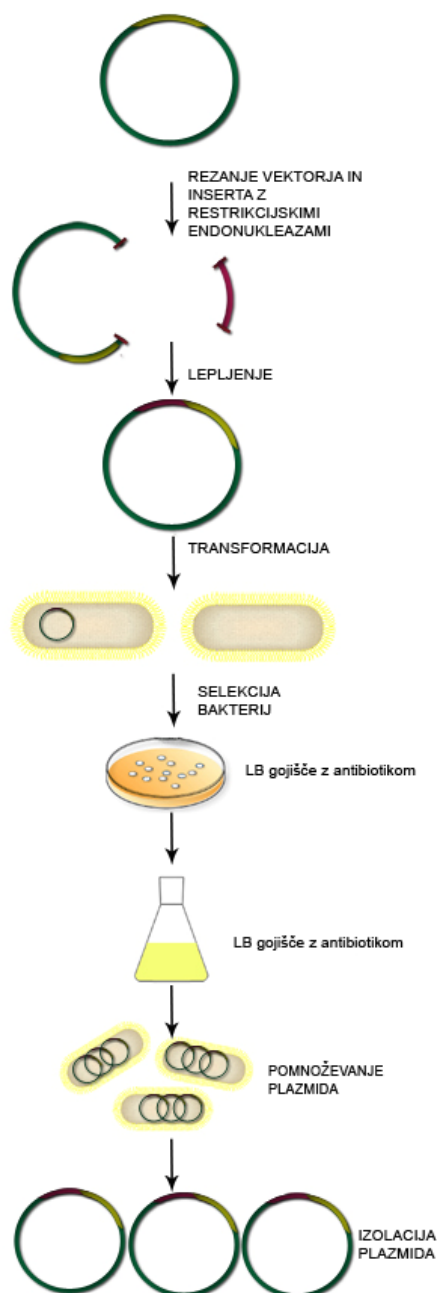
3.2.1 Sterilizacija steklovine, gojišč in raztopin

Ves material, potreben za gojenje celičnih kultur in bakterije *E. coli* ter *H. pylori*, smo predhodno sterilizirali po standardnih postopkih:

- Sterilizacija v avtoklavu z vlažno toploto (20 minut, 121 °C in $1,2 \cdot 10^5$ Pa).
- Snovi, občutljive na povišano temperaturo, smo sterilizirali s filtracijo preko filtra s premerom por 0,2 µm.

3.2.2 Osnovne metode molekularnega kloniranja

Večina metod, ki smo jih uporabili, je opisanih v priročnikih s tega področja (Ausubel in sod., 2002; Sambrook in sod., 1989). Podrobno so v nadaljevanju opisane najpomembnejše.



Slika 13: Shematski prikaz kloniranja.

3.2.2.1 Priprava kompetentnih celic

Na LB ploščo smo nacepili *E. coli* DH5 α . Zrasle so posamezne kolonije, ki smo jih naslednji dan precepili v 10 ml tekočega LB gojišča in inkubirali čez noč pri 37 °C in stresanju 160 vrt./min. Zjutraj smo inokulum precepili v 100 ml predhodno ogretega tekočega LB gojišča, tako da je bil začetni OD_{600nm} v gojišču 0,05. Kulturo smo inkubirali pri 37 °C in stresanju 160 vrt./min dokler, OD_{600nm} ni narasel do 0,5. Kulturo smo nato

ohladili na ledu za 5 minut in celice prenesli v sterilno centrifugirko ter jih centrifugirali 5 minut pri 4 000 vrt./min in 4 °C. Potem smo pazljivo odstranili gojišče in pazili, da so bile celice ves čas na ledu. Celice smo nato resuspendirali v 60 ml hladnega (4 °C) TFB 1 pufra (30 ml pufra/100 ml kulture) in suspenzijo inkubirali na ledu 90 minut. Sledilo je centrifugiranje 5 minut pri 4 000 vrt./min in 4 °C. Zatam smo previdno odstranili supernatant ter celice resuspendirali v 8 ml TFB 2 pufra. V pripravljene sterilne mikrocentrifugirke smo prenesli alikvote po 60 µl kompetentnih celic in jih hitro zamrznili v tekočem dušiku ter shranili do uporabe na -80 °C.

3.2.2.2 Izolacija genomske DNK

Genomsko DNK iz bakterije *Helicobacter pylori* seva ATTC 43504 ali SS1S smo izolirali iz celic, ki smo jih predhodno postrgali iz plošče s sterilnim brisom in jih prenesli v 1 ml Pufra I Mini Prep. Bris smo odrezali, ga dali v mikrocentrifugirko in centrifugirali 1 minuto pri 13 000 obratih/min. Bris smo nato odstranili in mikrocentrifugirko ponovno centrifugirali 1 minuto pri 13 000 obratih/min, da smo zbrali celice. Pufer I Mini Prep smo odsesali in nadaljevali postopek s komercialno dostopnim kompletom za izolacijo genomske DNK (Quiagen DNeasy Plant Mini Kit).

3.2.2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

PCR reakcije smo izvedli z DNK-polimerazo AccuPrime *Pfx* ali pa DNK-polimerazo Platinum *Pfx*. Končni volumen reakcijske mešanice je bil 50 µl. Temperaturni programi pomnoževanja in vsebina reakcijskih mešanic so opisani v preglednicah 18-21.

Preglednica 18: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNK-polimerazo AccuPrime Pfx

Komponenta	Založna koncentracija	Koncentracija v PCR-epici	V
matrična DNK	10 ng/μl	0,2 ng/μl	1 μl
začetni oligonukleotid 1	20 pmol/μl	0,4 pmol/μl	1 μl
začetni oligonukleotid 2	20 pmol/μl	0,4 pmol/μl	1 μl
10-kratni pomnoževalni pufer za polimerazo AccuPrime <i>Pfx</i>	10 X	1 X	5 μl
polimeraza AccuPrime <i>Pfx</i>	2,5 U/μl	0,05 U/μl	1 μl
MQ			41 μl
Končni volumen			50 μl

Preglednica 19: Temperaturni program PCR pri uporabi DNK-polimeraze AccuPrime *Pfx*

Stopnja	Temperatura	Čas
1. začetna denaturacija	95 °C	2 min
2. 30 ciklov	denaturacija 95 °C prileganje 55 °C podaljševanje 68 °C	15 s 30 s 1 min za 1kb
3. zaključno podaljševanje	68 °C	7 min
4. konec	4 °C	neskončno

Preglednica 20: Sestava reakcijske mešanice za verižno reakcijo z DNK-polimerazo *Pfx*

Komponenta	Založna koncentracija	Koncentracija v PCR-epici	V
matrična DNK	10 ng/μl	0,2 ng/μl	1 μl
začetni oligonukleotid 1	20 pmol/μl	0,4 pmol/μl	1 μl
začetni oligonukleotid 2	20 pmol/μl	0,4 pmol/μl	1 μl
10-kratni pomnoževalni pufer za polimerazo <i>Pfx</i>	10 X	1 X	5 μl
dNTP	2,5 mM	0,2 mM	4 μl
MgSO ₄	50 mM	1 mM	1 μl
polimeraza <i>Pfx</i>	2,5 U/μl	0,05 U/μl	1 μl
MQ			35 μl
Končni volumen			50 μl

Preglednica 21: Program PCR pri uporabi DNK-polimeraze *Pfx*

Stopnja		Temperatura	Čas
1.	začetna denaturacija	94 °C	2 min
2.	30 ciklov	denaturacija	94 °C
		prileganje	55 °C
		podaljševanje	68 °C
3.	zaključno podaljševanje	68 °C	7 min
4.	konec	4° C	neskončno

S pomočjo spodnje enačbe smo izračunali temperaturo prileganja (T_m , ang. melting temperature):

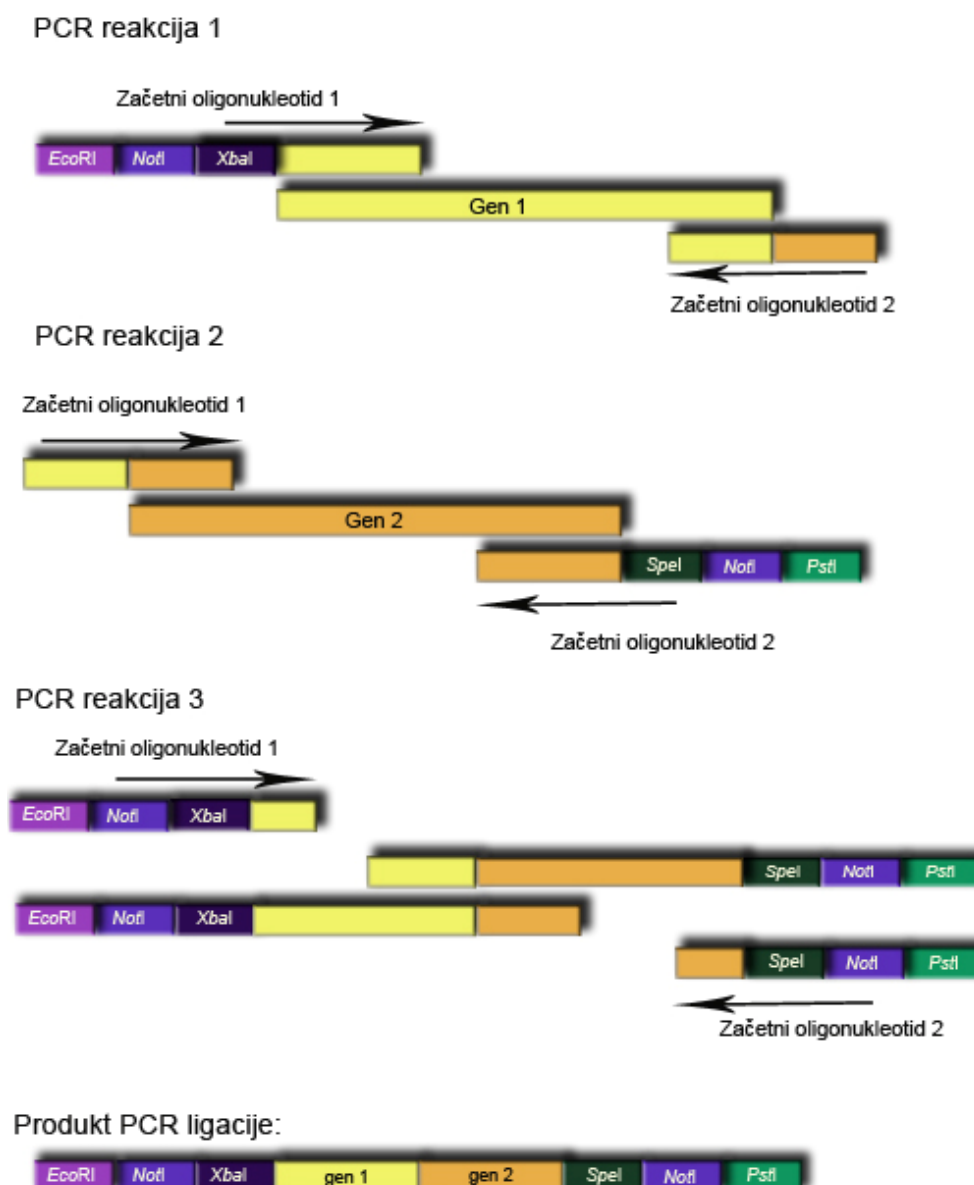
$$T_m = 4(G^* + C^*) + 2(A^* + T^*) \quad \dots (1)$$

* G, C, A, T pomenijo število določene baze v začetnem oligonukletidu.

Uspešnost PCR reakcije smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu.

3.2.2.4 Lepljenje s PCR

Metodo lepljenja s PCR smo uporabili za pripravo nekaterih genskih konstruktov. Pri tej metodi se zaporedno izvedejo tri PCR reakcije. V prvi reakciji pomnožimo gen 1 s parom oligonukleotidov. Smiselni oligonukleotid vsebuje zapis za ustrezna restrikcijska mesta, potrebna za kloniranje v vektor, protismiselni pa del, ki je komplementaren začetku gena 2. Na podoben način pomnožimo v ločeni PCR reakciji gen 2, le da smiselni oligonukleotid v tem primeru vsebuje del, ki je komplementaren koncu gena 1, protismiselni oligonukleotid pa zapis za ustrezna restrikcijska mesta. V tretji PCR reakciji predstavljata produkta prvih dveh PCR reakcij matrično DNK. Ker sta si produkta na določenem delu komplementarna, se zlepi. V tretjo reakcijo dodamo začetna oligonukleotida, ki sta komplementarna začetku in koncu genskega konstrukta. Glej sliko 13 za shematski prikaz metode.



Slika 14: Shematski prikaz metode lepljenja s PCR.

3.2.2.5 Elektroforeza DNK na agaroznem gelu

Elektroforezo DNK na agaroznem gelu smo uporabili za analizo različnih vzorcev DNK. Koncentracija agaroznega gela je bila odvisna od velikosti pričakovanega fragmenta. Običajno smo uporabili 1,2-odstotni (m/v) gel, za velike fragmente pa redkejšega. Ustrezno količino agaroze smo raztopili s segrevanjem v 100 ml 1-kratnega pufra TAE v mikrovalovni pečici, ohladili na 60 °C, dodali 2 µl etidijevega bromida (10 g/l) in vlili v

pripravljeno kadičko za elektroforezo. Ko se je gel strdil, smo nanegli vzorce DNK v žepke. PCR-produktom in restrikcijskim mešanici smo dodali 1/6 končnega volumna 6-kratnega nanašalnega pufru za agarozno elektroforezo. Poleg vzorcev smo dodali na gel še velikostni standard. Elektroforeza je potekala v 1-kratnem pufru TAE pri konstantni napetosti 100 V. Gel smo nato osvetlili z UV-svetlobo in fotografirali.

3.2.2.6 Čiščenje pomnožkov PCR po verižni reakciji s polimerazo

Uspešnost PCR reakcije smo preverili z agarozno elektroforezo tako, da smo del reakcijske mešanice nanegli na gel. Preostanek smo očistili s komercialno dostopnim kompletom QiaQuick PCR Purification Kit, po navodilih proizvajalca. Postopek čiščenja temelji na selektivni adsorpciji pomnožka PCR na kolono, kar omogoča izpiranje nečistoč (polimeraze, začetnih oligonukleotidov itd.). Na koncu sledi še izpiranje vezane DNK z MQ v sterilno mikrocentrifugirko.

3.2.2.7 Izolacija fragmentov DNK iz agaroznih gelov

Pri izolaciji fragmentov DNK iz agaroznih gelov smo uporabili komercialno dostopen komplet QiaEX II Gel Extraction Kit ali MiniElute Gel Extraction Kit (odvisno od velikosti fragmentov), po navodilih proizvajalca. Želeni fragment smo s skalpelom izrezali iz agaroznega gela in ga prenesli v mikrocentrifugirko. Postopek izolacije temelji na selektivni adsorpciji nukleinskih kislin na krogličasti nosilec oziroma kolono. Vezavi DNK sledi spiranje nečistoč in na koncu izpiranje vezane DNK z MQ v sterilno mikrocentrifugirko.

3.2.2.8 Cepitev DNK z restrikcijskimi encimi

Fragmente, ki smo jih pripravili z verižno reakcijo s polimerazo, smo cepili z restrikcijskimi endonukleazami, ki prepoznavajo točno določena DNK zaporedja. Enak postopek smo uporabili za pripravo in linearizacijo plazmidov.

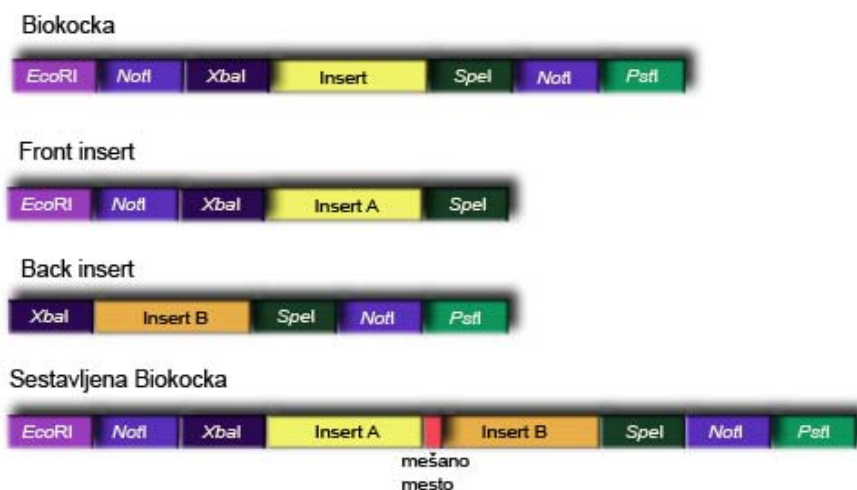
Restrikcijske zmesi so vsebovale:

- 1–3 µg DNK,

- 3 µl 10-kratnega pufru za restrikcijski encim,
- 0,5 µl restrikcijskega encima (10 U/µl) za 1 µg DNK,
- sterilno MQ do končnega volumna 30 µl.

Pri delu smo uporabili encime: *EcoRI* (reže na mestu 5' G/AATTC 3'), *XbaI* (reže na mestu 5' T/CTAGA 3'), *SpeI* (reže na mestu 5' A/CTAGT 3'), *PstI* (reže na mestu 5' CTGCA/G 3'), *XhoI* (reže na mestu 5' C/TCGAG 3') in *NcoI* (reže na mestu 5' C/CATGG 3'). Glede na izbor dveh encimov smo izbrali pufer v katerem je bila encimska aktivnost najboljša.

Sistem Biokocke (ang. BioBrick), ki smo ga uporabili za pripravo konstruktov, omogoča sestavljanje posameznih fragmentov v končni konstrukt (slika 14). Posamezne fragmente je potrebno pripraviti tako, da jih lahko uporabimo ali kot »front« ali kot »back« insert. Za pripravo »front« insertov smo uporabili encima *EcoRI* in *SpeI*, v pufru NEB2. »Back« insert smo dobili z uporabo *XbaI* in *PstI*, v pufru REact 2. *SpeI* in *XbaI* tvorita lepljive konce, ki se po ligaciji zlepijo in nastane mešano mesto (ACTAGA). Za uspešno ligacijo smo morali pravilno rezati vektor pSB1AK3. Za vstavljanje »front« inserta smo vektor rezali z *EcoRI* in *SpeI*, za vstavljanje »back« inserta z *XbaI* in *PstI*, za 3-točkovno ligacijo pa z *EcoRI* in *PstI* v pufru REact 2.



Slika 15: Shematski prikaz Biokocke.

Za vstavljanje konstruktov v vektor pET19b smo fragment in vektor rezali z encimoma *XhoI* in *NcoI* v pufru React 2. Restrikcijsko zmes smo inkubirali 3 ure pri 37 °C. Po

restrikciji smo reakcijo ustavili tako, da smo restriksijsko mešanico zamrznili ali pa jo takoj nanесли na agarozni gel, iz katerega smo potem izrezali in očistili izbrani fragment.

3.2.2.9 Ligacija

Ligacija je ključni korak pri genskem kloniranju, saj omogoča vstavljanje gena v plazmidni vektor. Produkta PCR reakcije s cepitvijo z restriksijskimi encimi pripravimo tako, da tvorijo lepljive konce, ki se med ligacijo združijo s komplementarnimi konci plazmidnega vektorja, ki je bil lineariziran z enakima encimoma. Za uspešno ligacijo je pomembno tudi molarno razmerje med vektorjem in insertom (fragmentom). V primeru standardne ligacije pri kateri v vektor vstavljamo le en fragment, je molarno razmerje fragment : vektor = 3 : 1 (enačba 2).

$$Masa(fragment) = \frac{masa(vektor) \times dolžina(fragment)}{dolžina(vektor)} \times 3 \quad \dots(2)$$

V primeru 3-točkovne ligacije pri kateri v isto ligacijsko zmes damo dva različna fragmenta (»front« in »back«) ter ustrezno rezan vektor, pa je molsko razmerje fragment A: fragment B: vektor = 1 : 1 : 1. Razmerje velja za fragmente večje od 300 bp. V obeh primerih moramo upoštevati tudi dolžino (bp) posameznega fragmenta oziroma vektorja.

Ligacijske mešanice so vsebovale:

- izračunano količino fragmenta,
- izbrano količino vektorske DNK (v našem primeru 100 ng),
- 1 µl T4 DNK-ligaze (400 U/µl),
- 2 µl T4 ligaznega pufra,
- sterilno MQ do končnega volumna 20 µl.

Ligacija je potekala 3 ure pri sobni temperaturi ali preko noči pri 16 °C. Po ligaciji smo ligacijsko mešanico transformirali v bakterijske celice ali jo shranili pri 4 °C.

3.2.2.10 Transformacija kompetentnih celic *E. coli* DH5 α

Z uporabo metode s toplotnim šokom smo vnesli plazmide in rekombinantne plazmide v bakterijske celice *E. coli* DH5 α , v katerih so se namnožili.

Kompetentne bakterijske celice (shranjene pri -80 °C) smo odtalili na ledu, jim dodali 25 μ l ligacijske mešanice oziroma izbrano količino plazmidne DNK ter inkubirali na ledu od 25 do 30 minut. Sledil je toplotni šok s štiriminutno inkubacijo pri 42 °C. Mikrocentrifugirko s transformacijsko zmesjo smo nato takoj vrnili na led za dve minuti in zatem dodali 1 ml gojišča LB in inkubirali eno uro pri 37 °C in stresanju 150 vrt./min. Celice smo zbrali s triminutnim centrifugiranjem pri 7 000 vrt./min, usedlino celic pa nato resuspendirali v preostanku LB gojišča in jo razmazali na trdno gojišče LB z ustreznim antibiotikom in inkubirali pri 37 °C čez noč.

3.2.2.11 Izolacija plazmidne DNK

3.2.2.11.1 Izolacija plazmidne DNK v manjših količinah – mini prep

Posamezne kolonije s plošče LB z dodanim ustreznim antibiotikom smo precepili v stekleničko z 10 ml sterilnega tekočega gojišča LB in dodali ustrezno količino antibiotika. Tekočo kulturo smo inkubirali od 14 do 16 ur pri 37 °C in 150 vrt./min. Nato smo 1,5 ml kulture odpipetirali v sterilne mikrocentrifugirke in centrifugirali 30 sekund pri 10 000 vrt./min, odstranili supernatant ter pelet resuspendirali v 100 μ l pufra 1 Mini Prep. Celice smo lizirali z 200 μ l pufra 2 Mini Prep, nato mikrocentrifugirko 5-krat obrnili in eno minuto inkubirali na ledu. Pufer 2 Mini Prep smo nevtralizirali s 150 μ l pufra 3 Mini Prep, premešali na vibracijskem mešalu z narobe obrnjenimi mikrocentrifugirkami in 5 minut inkubirali na ledu. Mešanico smo centrifugirali 5 minut pri 10 000 vrt./min in supernatant s plazmidno DNK previdno prenesli v sveže mikrocentrifugirke. DNK smo iz supernatanta oborili z dodatkom 2-kratnega volumna absolutnega etanola, ohlajenega na -20 °C. Po dveh minutah inkubacije pri sobni temperaturi smo oborjeno DNK zbrali s petminutnim centrifugiranjem pri 10 000 vrt./min. Supernatant smo odstranili in usedlino sprali z 0,5 ml na -20 °C ohlajenega 70-odstotnega etanola in ponovno centrifugirali 5 minut pri 10 000

vrt./min. Supernatant smo odstranili, oborino pa posušili in jo nato raztopili v 20 µl TE-pufra, ki smo mu dodali RNazo.

3.2.2.11.2 Izolacija plazmidne DNK s komercialno dostopnim kompletom

Za pridobivanje čistejše plazmidne DNK smo uporabili komercialno dostopen komplet (Sigma: GenElute Plasmid Miniprep Kit ali Fermentas: GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit) in izolacijo izvedli po navodilih proizvajalca. Izolacija plazmidne DNK temelji na alkalni lizi celic in vezavi plazmidne DNK na kolono. Sledi spiranje nečistoč, na koncu pa DNK izperemo s kolone s 100 µl MQ. Na ta način smo pridobili čistejšo plazmidno DNK v višjih koncentracijah (približno 150 ng/µl).

3.2.2.11.3 Izolacija plazmidne DNK, ki ne vsebuje endotoksina (LPS)

Zaradi narave naših eksperimentov DNK, ki jo transficiramo v človeško celično kulturo HEK293, ne sme vsebovati endotoksina (lipopolisaharida). V ta namen smo plazmidno DNK izolirali s komercialno dostopnim kompletom GenElute Endotoxin-free Plasmid Midiprep Kit, po navodilih proizvajalca. Izolacija plazmidne DNK temelji na alkalni lizi bakterijskih celic, sledi odstranjevanje endotoksina z ekstrakcijo v poseben puffer, ki ga nato zavržemo. Plazmidno DNK potem vežemo na kolono, sledi še dodatno izpiranje nečistoč, na koncu pa DNK speremo s kolone v sterilno mikrocentrifugirko s priloženo vodo, ki ne vsebuje endotoksina.

3.2.2.12 Določanje koncentracije nukleinskih kislin

Zaradi velike natančnosti pri eksperimentih na celičnih linijah je potrebno poznati točne koncentracije plazmidne DNK, ki smo jo določali spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 260 in 280 nm na NanoDrop napravi. Pri tem smo upoštevali, da raztopina z absorbanco 1 pri 260 nm vsebuje 50 µg/ml dvoverižne DNK. Razmerje $A_{260} : A_{280} = 1,7-1,9$ pove, da so pripravljene vzorci čisti, brez proteinskih primesi, fenola ali RNK.

3.2.3 Izolacija proteinov

3.2.3.1 Transformacija in precepljanje v tekoče gojišče LB

Ustrezne plazmide smo transformirali v celice *E. coli* sev BL21[DE3]pLysS, ki je prilagojen za izražanje rekombinantnih proteinov, katerih zapisi so vstavljeni v vektorje s T7-promotorjem. Bakterijske celice smo gojili na trdnem gojišču LB z dodanim antibiotikom ampicilinom 16 ur pri 37 °C. Nato smo posamezne kolonije precepili v 10 ml sterilnega tekočega gojišča LB in dodali ustrezno količino ampicilina (100 µg/ml), da bi zagotovili obstanek plazmida v bakterijski celici in inkubirali od 15 do 16 ur pri 37 °C, 100 vrt./min.

3.2.3.2 Fermentacija in indukcija izražanja proteina

Na spektrofotometru smo izmerili absorbanco 10-krat redčenega vzorca prekonočne kulture pri 600 nm in preračunali (enačba 3) koliko kulture je potrebno precepiti v 250 ali 500 ml tekočega gojišča LB (odvisno od fermentacije), da bo končni OD₆₀₀ = 0,05–0,1.

$$Volumen (inokulum) = \frac{A(\text{željena}) \cdot V(\text{gojišče})}{A(OD_{600nm})} \quad \dots(3)$$

V tekoče gojišče smo dodali ustrezni volumen antibiotika ampicilina (100 µg/ml) in inkubirali pri 37 °C in 160 vrt./min. Ves čas smo spremljali absorbanco pri 600 nm in ko je ta dosegla vrednost od 0,8 do 0,9, smo inducirali izražanje proteinov z dodatkom IPTG v končni koncentraciji 1 mM. Po indukciji je sledila inkubacija pri različnih pogojih za različne proteine:

- Himerni flagelin (HF-RGD-His):
25 °C, stresanje 110 vrt./min, inkubacija največ 16 ur po indukciji
- Himerni flagelin-multiepitop (HF-multiepitop-RGD-His):
25 °C, stresanje 160 vrt./min, inkubacija največ 8 ur po indukciji

Po končani inkubaciji smo gojišče prelili v centrifugirke, jih uravnotežili na tehtnici in centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 5 000 vrt./min. Supernatant smo previdno odstranili.

3.2.3.3 Liza celic

Zbrane celice smo shranili pri -20 °C ali pa jih lizirali s pufrom za lizo His tag proteinov. Volumen liznega pufru je odvisen od volumna fermentacije. Za dvolitrsko fermentacijo je potrebno dodati 50 ml pufru za lizo, za 250-mililitrsko fermentacijo pa 5 ml. Nato smo dodali CPI-His (mešanico proteaznih inhibitorjev za proteine s histidinskim repom) v razmerju 1:500 (v/v) in inkubirali 30 minut na ledu.

3.2.3.4 Soniciranje

Sledilo je soniciranje celic s sonikatorjem. Lizat smo odpipetirali v stekleno čašo, ki je bila ves čas na ledu. Ob zamenjavi sonde smo najprej naredili tuning, tako da je bila vrednost okoli 9. Soniciranje je potekalo pri nastavitvah pulza 1s ON, 2s OFF, času 3 minute in amplitudi 45 %. Vrednost amplitude je odvisna od sonde. Po soniciranju smo vzorec, ki ne sme biti viskozen, prenesli v čiste centrifugirke in centrifugirali 30 minut pri 12 000 vrt./min in 4 °C. Supernatant smo prenesli v sveže falkonke in ga shranili pri -20 °C. Prav tako smo pri -20 °C shranili pelet v katerem so inkluzijska telesca. Izolacijo proteinov smo nadaljevali bodisi iz inkluzijskih telesc (himerni flagelin) bodisi iz supernatanta (himerni flagelin-multiepitop). Protein v inkluzijskih telescih je nepravilno zviti, medtem ko je protein v supernatantu v nativni konformaciji.

3.2.3.5 Izolacija himernega flagelina (HF-RGD-His) z NI-NTA metodo

3.2.3.5.1 Raztapljanje inkluzijskih telesc

Himerni flagelin smo izolirali iz inkluzijskih telesc (IT), ki smo jih dobili po 250-mililitrski fermentaciji. IT smo raztopili v 4 ml pufru za raztapljanje IT z zelo dobrim vorteksiranjem dokler bela oborina ni popolnoma izginila. Nato smo centrifugirali 15 minut pri 12 000 vrt./min, previdno prenesli supernatant v sveže falkonke in izmerili absorbanco pri 280 nm. 500 µl vzorca smo shranili pri 4 °C, da smo vzorec preverili na SDS-PAGE elektroforezi, ostalo pa smo nanесли na Ni-NTA sefarozo.

3.2.3.5.2 Kelatna kromatografija

Ni-NTA sefaroza je običajno shranjena v 20-odstotnem etanolu, zato smo jo pred nanosom vzorca spirali. Nanesli smo vsaj 3 volumne kolone pufru 50 mM Tris, pH=8,0. Nato smo kolono ekvilibrirali s pufrom za spiranje inkluzijskih telesc, v katerem smo imeli raztopljen tudi naš vzorec. Nanesli smo 2-kratni volumen kolone (= volumen polnila). Nato smo kolono zaprli s stiščkom, nanesli vzorec, kolono zaprli še s pokrovom in nežno premešali, tako da smo dobili homogeno raztopino. Kolono smo inkubirali preko noči pri 4 °C in rahlem stresanju. Po inkubaciji smo lovili nevezano frakcijo v falkonko ter izmerili absorbanco pri 280 nm in shranili vzorec pri 4 °C. Nato smo spirali kolono s pufrom za raztapljanje IT, dokler absorbanca pri 280 nm ni padla pod 0,02 oziroma ni bilo več proteinskega spektra.

3.2.3.5.3 Zvitje proteina na koloni in spiranje kolone

Sledilo je zvijanje proteina na koloni tako, da smo kolono spirali s padajočo koncentracijo uree (7.2 M, 6.4 M, 5.6 M, 4.8 M, 4.0 M, 3.2 M, 2.4 M, 1.6 M, 0.8 M in 0 M) v 50 mM Tris pH=8,0. Na kolono smo nanesli 2-kratni volumen kolone posameznega pufru. Po spiranju s padajočo koncentracijo uree smo spirali kolono še s pufrom I dokler absorbanca pri 280 nm ni padla pod 0.02, oziroma dokler proteinski spekter ni izginil. Postopek smo ponovili za pufer II in III. Sledilo je še spiranje s pufrom IV. Nanesli smo 5-krat po 1-kratni volumen kolone. Frakcije smo v tem primeru zbirali v falkonko. Vmes smo spremljali, če se protein eluira iz kolone tako, da smo merili absorbanco pri 280 nm.

3.2.3.5.4 Elucija proteina

Sledila je elucija proteina s kolone. Na kolono smo nanašali po 2 ml pufru za elucijo I in frakcije lovili v 2 ml mikrocentrifugirke. Vsaki frakciji smo izmerili absorbanco pri 280 nm in ko je padla pod 0,02, smo pričeli elucijo še s pufrom za elucijo II. Ponovno smo na kolono nanašali po 2 ml pufru in frakcije lovili v 2 ml mikrocentrifugirke ter ves čas spremljali absorbanco pri 280 nm za posamezne frakcije. Na podlagi dobljenih vrednosti absorbanc in pripadajočih spektrov smo posebej združili frakcije iz elucije I in posebej

frakcije od elucije II, pri čemer smo pazili, da smo združevali frakcije v obratnem vrstnem redu, kakor so si sledile. S tem smo zmanjšali obarjanje proteina.

3.2.3.5.5 Spiranje kolone in regeneracija

Po eluciji smo na kolono nanesti dvakrat po 1-kratni volumen kolone pufru za regeneracijo I, in enkrat po 1-kratni volumen kolone pufru za regeneracijo II. S tem smo dosegli, da smo iz kolone sprali vse nespecifično vezane proteine. Nato smo na kolono nanesti vsaj 10–15krat po 1-kratni volumen kolone pufru za spiranje I, s tem smo s kolone sprali ves imidazol. V kolikor smo kolono potrebovali v kratkem, smo jo shranili v 50 mM Tris, pH=8,0, sicer smo na kolono nanesti 2–3kratni volumen kolone 20-odstotnega etanola in kolono shranili do naslednje uporabe pri 4 °C.

3.2.3.6 Izolacija himernega flagelina-multiepitop (HF-multiepitop-RGD-His) na FPLC

Izolacija HF-multiepitop-RGD-His je potekala na aparaturi za hitro proteinsko tekočinsko kromatografijo (Fast Protein Liquid Chromatography – FPLC). Ker je bila Ni-NTA sefaroza spravljena v 20-odstotnem etanolu, je bilo najprej potrebno spiranje s 50 % pufru A za FPLC in 50 % pufru B za FPLC. Pri tem je potrebno injektor nastaviti na spiranje (ang. wash), da gre pufer mimo kolone. Spiranje je potekalo 5 minut pri pretoku 5 ml/min. Sledilo je kalibriranje kolone s pufrom A (100 %), ki zagotovi razmere, primerne za nanos vzorca na kolono. Spiranje kolone je potekalo toliko časa, da se bazna linija na kromatogramu, ki ves čas meri absorbanco pri 280 nm, ni ustalila. Sledil je nanos vzorca na kolono, ki je bila kalibrirana s pufrom A.

Vse pufre za FPLC je potrebno filtrirati z membranskimi filtri velikosti por 0,45 µm in degazirati, s čemer iz pufru odstranimo zračne mehurčke, ki bi lahko poškodovali kolono. Na kolono smo z injekcijsko brizgalko nanesti 2 ml supernatanta, ki smo ga dobili po soniciranju in centrifugiranju vzorca, pri pretoku 1 ml/min. Nevezano frakcijo smo lovili v čisto falkonko in ves čas spremljali kromatogram. Ko se je bazna linija ustalila, smo začeli z gradientno elucijo proteina. Pri tem smo vzpostavili gradient pufru B, ki je počasi naraščal od 0 do 12 % v volumnu 150 ml, pri pretoku 2 ml/min. Ves čas smo spremljali kromatogram in lovili frakcije v čiste falkonke. Ko se je kromatogram umiril, smo povečali

gradient od 12 do 50 % pufra B v volumnu 150 ml in ponovno spremljali kromatogram in na podlagi absorbance lovili ustrezne frakcije v falkonke. Po končanem spiranju smo gradient dvignili od 50 do 100 % pufra B v volumnu 10 ml in pretoku 2 ml/min, da so se iz kolone sprali vsi morebiti vezani proteini.

Po končani eluciji je bilo potrebno kolono spirati po protokolu:

- 100 % pufra B, 5 minut pri pretoku 2 ml/min;
- 100 % pufra A, pri pretoku 2 ml/min, dokler se ne sperejo vse nečistoče;
- A, B šoba v MQ, injektor nastavljen na spiranje, pri pretoku 5 ml/min;
- A šoba v 20-odstotnem etanolu, 5 minut pri pretoku 5 ml/min

Sledilo je merjenje absorbance pri 280 nm in določanje spektra za posamezne frakcije. Na podlagi absorbance smo izračunali koncentracijo proteina (mg/ml) v posamezni frakciji s pomočjo Lambert-Beerovega zakona:

$$\text{Koncentracija proteina (mg/ml)} = \frac{\text{Absorbanca}_{280\text{nm}}}{\text{ekstincijski koeficient} \cdot \text{dolžina kivete (1cm)}} \quad \dots (4)$$

Ekstincijski koeficient je vrednost, ki pove, koliko svetlobe snov absorbira pri določeni valovni dolžini. Vrednost za proteine je odvisna predvsem od prisotnosti aromatskih aminokislin, še posebej triptofana in jo lahko, na podlagi znanega aminokislinske zaporedja, vnaprej izračunamo.

Koncentracijo proteinov v nevezani frakciji smo določili z reagentom za določanje koncentracije proteinov (BioRad Protein Assay, BioRad). Reagent je kislo barvilo, ki se veže na proteine in spremeni obarvanost raztopine v odvisnosti od koncentracije proteinov. Na podlagi absorbance pri 595 nm in umiritvene krivulje smo ocenili koncentracijo proteinov.

3.2.3.7 Koncentriranje in dializa vzorcev

Sledilo je zniževanje koncentracije imidazola v proteinskih vzorcih. Vzorce smo najprej koncentrirali in nato dializirali.

1.) Koncentriranje vzorcev

Združene frakcije smo nanegli na membrano koncentradorja, ki smo ga predhodno sprali z MQ. Nato smo vzorce centrifugirali 30 minut pri 3 000 vrt./min.

2.) Dializa

Vzorec smo dali v dializno cevko, ki smo jo predhodno sprali z MQ ali v dializno epico, kar je odvisno od volumna vzorca. V čaše ustreznih velikosti smo pripravili pufer, proti kateremu smo želeli vzorec dializirati. V našem primeru smo pripravili 1-kratni PBS celični z 10-odstotnim glicerolom. Dializa je potekala vsaj 4 ure ali preko noči pri 4 °C, ob rahlem mešanju dializnega pufra na magnetnem mešalu. Po dializi smo izmerili absorbanco pri 280 nm in vzorce zamrznili pri -20 °C.

3.2.3.8 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti SDS (SDS-PAGE)

SDS-PAGE smo izvajali z uporabo vertikalnega sistema Mini-Protean II. Sistem smo sestavili po navodilih proizvajalca (BioRad).

3.2.3.8.1 Vlivanje SDS-PAGE gelov

Med dve stekelci, ločeni 1,0 mm, smo najprej vlili 10-odstotni ločitveni gel (preglednica 22), ga prelili s 100 µl izopropanola in pustili 1 uro, da je polimeriziral. Nato smo s filtrirnim papirjem odstranili izopropanol in na ločitveni gel vlili 4-odstotni vstopni gel (preglednica 23), v katerega smo vstavili glavniček, s katerim naredimo žepke za nanos vzorca. Vstopni gel smo pustili polimerizirati od 30 do 45 minut. Pripravljeni gel smo uporabili takoj ali pa smo ga spravili pri 4 °C tako, da smo v žepke nalili MQ, gel ovili v omočeno papirnato brisačko in vse skupaj zavili v alu folijo.

Preglednica 22: Sestava 10 % ločitvenega SDS gela (za 2 gela)

Komponenta	Volumen
LOČITVENI GEL (10 %)	
MQ	4,1 ml
1,5 M Tris-HCl, pH=8,8	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	100 µl
Akrilamid/bis 30 % stok	3,3 ml
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Preglednica 23: Sestava 10 % vstopnega SDS gela (za 2 gela)

Komponenta	Volumen
VSTOPNI GEL (4%)	
MQ	3,05 ml
1,5 M Tris-HCl, pH=6,8	1,25 ml
10 % (w/v) SDS	50 µl
Akrilamid/bis 30 % stok	0,665 ml
10 % APS	25 µl
TEMED	5 µl

3.2.3.8.2 SDS-PAGE

Vzorcem smo predhodno dodali toliko 4-kratnega reducirajočega SDS nanašalnega pufra, da je bila končna koncentracija SDS v vzorcu enkratna in izvedli denaturacijo proteinov pri 95 °C v 10-ih minutah. Po denaturaciji smo vzorce centrifugirali 5 minut pri 13 200 vrt./min. Medtem smo sestavili aparaturo za SDS-PAGE. V žepke smo nanesti vzorce in standard PageRulerTM Prestained Protein Ladder Plus, s pomočjo katerega lahko določimo velikost proteinov v vzorcu. Elektroforeza je potekala v enkratnem SDS elektroforeznem pufu približno 1 uro, pri konstantni napetosti 200 V. Elektroforezo smo ustavili, ko je barvilo bromfenol-modro, ki je prisotno v nanašalnem pufu, pripotovalo do spodnjega roba ločevalnega gela.

3.2.3.9 Barvanje proteinov z barvilom Coomassie modrim

Po končani elektroforezi smo poliakrilamidni gel 2-3krat sprali z destilirano vodo, nato pa dodali razvijalec Coomassie, ki ga pripravimo z 20-odstotno očetno kislino v razmerju

Coomassie : 20-odstotna očetna kislina = 1 : 1. Gel smo barvali 10 minut ob rahlem stresanju, potem smo ozadje razbarvali z mešanico 30-odstotnega etanola in 10-odstotne očetne kisline, ki smo jo večkrat zamenjali s svežo. Gel smo fiksirali z mešanico 20-odstotne očetne kisline in 10-odstotnega glicerola. Celoten postopek barvanja je potekal ob rahlem stresanju (50 obr./min), pri sobni temperaturi.

3.2.3.10 Imunski odtis – Western prenos

Po končani elektroforezi smo poliakrilamidni gel sprali z MQ, potem pa smo ga skupaj z nitrocelulozno membrano (z 0,45 µm velikimi porami) in filtrirnim papirjem, ki je enake velikosti kot membrana, namakali 30 minut v pufru za mokri prenos. Enoto za prenos smo sestavili po navodilih proizvajalca v zaporedju:

- blazinice,
- filtrirni papir,
- poliakrilamidni gel,
- nitrocelulozna membrana,
- filter papir,
- blazinice.

Nitrocelulozna membrana je bila obrnjena proti anodi. Sestavljeno kaseto smo vstavili v celico za Western prenos, ohlajeno na 4 °C in jo do roba napolnili s hladilnim pufrom za prenos. Prenos je potekal pri konstantnem toku 350 mA 120 minut, ob stalnem mešanju pufra z magnetnim mešalom in menjavanju hladilne enote vsakih 40 minut. Po končanem prenosu smo membrano sprali z MQ in jo obarvali z reverzibilnim barvilom Ponceau, ki omogoča kontrolo prenosa proteinov na membrano. Barvanje je potekalo od 5 do 10 minut, v 10 ml barvila. Odzadje smo razbarvali s spiranjem z MQ, sledilo je popolno razbarvanje proteinov v enkratnem PBS pH=7,4 pufru (2-krat po 10 minut). Nato smo membrano blokirali s 5 ml pufra za blokiranje (WB) preko noči ali 60 minut pri 4 °C in rahlem mešanju. Po blokiranju smo membrano inkubirali s primarnimi mišjimi tetra-His protitelesi (Qiagen), ki se vežejo na štiri histidine v 6-histidinskem repu. Raztopino s primarnimi protitelesi smo pripravili tako, da smo v 5 ml blokirnega pufra dodali primarna protitelesa v razmerju 1 : 2 000. Membrano smo zapakirali v vrečko in 60 minut (lahko tudi več) inkubirali ob rahlem stresanju pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje 4-krat po 5 minut s

pufrom za spiranje. Nato smo membrano inkubirali z raztopino s sekundarnimi kozjimi IgG protitelesi (Santa Cruz), ki se vežejo na primarna mišja protitelesa in so označena s hrenovo peroksidazo. Redčili smo jih v razmerju 1 : 3 000 v 5 ml blokirnega pufru. Inkubacija je potekala ob rahlem stresanju od 30 do 45 minut pri sobni temperaturi. Sledilo je spiranje membrane 3-krat po 5 minut s pufrom za spiranje. Za detekcijo hrenove peroksidaze smo uporabili SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate, ki smo ga pripravili v mikrocentrifugirki v razmerju reagent A : reagent B = 1 : 1. Substrat za detekcijo hrenove peroksidaze vsebuje luminol in vodikov peroksid. Oksidacija luminola z vodikovim peroksidom povzroči prehod oksidiranega luminola v vzbujeno stanje. Pri prehodu v osnovno stanje se sproščajo fotoni svetlobe, ki jih kasneje zaznamo na filmu kot lise. Substrat smo nakapljali na stekleno ploščo in nanjo položili membrano, da je bila stran s proteini obrnjena proti substratu in inkubirali 5 minut. Membrano smo položili v hibridizacijsko folijo, slednjo pa v kaseto za razvijanje filma. V temnici smo na membrano položili film za določen čas. Film smo nato prenesli v razvijalec za 1 do 2 minuti, ga sprali z vodo, nato pa ga od 1 do 2 minuti inkubirali še v fiksirni raztopini. Film smo na koncu sprali z vodo in ga posušili. Na mestih vezave sekundarnih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo, na primarna Anti His-tag protitelesa, smo na filmu zaznali temne lise.

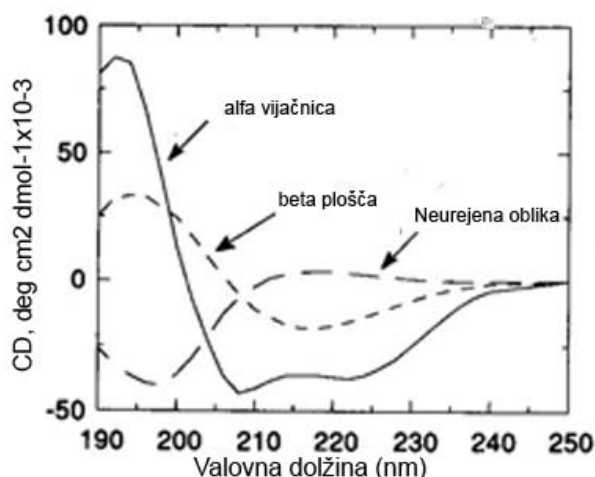
3.2.3.11 Čiščenje izoliranih proteinov z gelsko kromatografijo

Izolirane proteine smo dodatno očistili z gelsko kromatografijo na aparaturi za tekočinsko kromatografijo (HPLC). Gelska ali izključitvena kromatografija ločuje molekule na podlagi njihove velikosti. Kolona vsebuje polnilo z zamreženo strukturo v katero se ujamejo manjše molekule, medtem ko se velike ne. Zato hitreje potujejo večje molekule kakor manjše in se tudi prej eluirajo iz kolone. Proteine raztopljene v pufru 1-kratni PBS celični smo nanесли na kolono (Superdex 75 HR 10/300). Pretok je bil ves čas 0,5 ml/min.

3.2.3.12 Določanje strukture proteinov s CD spektroskopijo (cirkularni dihiroizem)

Izoliranim proteinom smo preverili sekundarno strukturo z uporabo Chirascan CD spektrofotometra (Applied Photophysics) in z ustreznim pripadajočim računalniškim programom. Sekundarna struktura je lahko v obliki α -vijačnice, β -plošče ali v obliki

neurejenih struktur. CD spektre smo merili v območju od 190 do 270 nm in na podlagi že znanih krivulj (slika 14) določili sekundarno strukturo proteinov. Dolžina uporabljene kivete je bila 1 mm, koncentracija proteina 0,5 mg/ml v 2 mM Na-fosfatu.



Slika 16: Prikaz krivulj za različne sekundarne strukture proteinov pridobljenih s CD spektrom.

3.2.4 Delo v celičnem laboratoriju

3.2.4.1 Gojenje človeških celičnih kultur HEK293

Človeške celične kulture HEK293 smo gojili v posebnih posodicah, ki so omogočale pritrditev celic na dno posode in rast v monosloju. Inkubirali smo jih v inkubatorju pri 37 °C in 5-odstotnem CO₂. Hranila in rastne faktorje smo dodali v obliki gojišča DMEM z 10 % FBS, ki smo ga zamenjali vsake tri do štiri dni. Ko so celice dosegle določeno gostoto preraščenosti, smo jih presadili oziroma zredčili. V ta namen smo najprej odstranili gojišče in jih dvakrat sprali s 5 ml sterilnega pufra 1-kratni PBS celični, nato pa prelili z 2 ml tripsina z EDTA, da so se odlepili od podlage. Tripsin smo nevtralizirali z dodatkom 3 ml medija DMEM z 10 % FBS. Suspenzijo celic smo centrifugirali v sterilni plastični centrifugirki 5 minut, pri 1 200 vrt./min, pri sobni temperaturi. Medtem smo gojitveno posodico sprali s pufrom 1-kratni PBS celični. Po centrifugiranju smo odstranili staro gojišče in celice nežno resuspendirali v od 6 do 7 ml svežega gojišča DMEM z 10 % FBS. 10 µl resuspendiranih celic smo prenesli na hemacitometer in prešteli celice v najmanj dveh kvadratih ter preračunali gostoto celic na ml gojišča. Na podlagi števila celic smo odpipetirali ustrezen volumen celic in DMEM z 10 % FBS gojišča za izvedbo poskusa na

mikrotitrsko ploščo s 96-imi luknjicami, primerno za gojenje celičnih kultur. Preostanek celic smo vrnili v sprano posodico za gojenje celičnih kultur in dodali ustrezen volumen gojišča DMEM z 10 % FBS ter celice inkubirali v inkubatorju do naslednjega poskusa oziroma do preraščenosti.

3.2.4.2 Transfekcija človeških celičnih kultur HEK293

Transfekcijo celic HEK293 s plazmidno DNK smo izvedli po navodilih proizvajalca transfekcijskega reagenta (jetPEI™). Celice smo dan pred transfekcijo nacepili na mikrotitrsko ploščo z ustrezno gostoto celic ($4 \cdot 10^4$ celic/ml na luknjico). Celice smo nato 24 ur inkubirali v inkubatorju pri 37 °C in 5-odstotnem CO₂, da so dosegle ustrezno gostoto. Za transfekcijo smo si na podlagi znanih koncentracij plazmidne DNK preračunali količino posameznih plazmidov in količino 150 mM NaCl.

Celice smo transficirali s plazmidi:

- z zapisom za receptor hTLR5 oziroma hTLR4 in MD-2– odvisno od poskusa,
- z zapisom za inducibilno izraženim Fluc genom (gen za kresničkino luciferazo – Fluc, ki je pod inducibilnim NF-κB odvisnim promotorjem) in
- z zapisom za konstitutivno izraženim Rluc genom (gen za *Renilla* luciferazo – Rluc, ki je pod konstitutivnim promotorjem, torej se izraža ves čas).

V dve ločeni mikrocentrifugirki smo odpipetirali ustrezno količino plazmidov in 150 mM NaCl, v drugo pa 150 mM NaCl in transfekcijski reagent jetPEI™, dobro premešali na vorteksu in centrifugirali 15 sekund pri 13 400 vrt./min. Vsebino z jetPEI™ reagentom smo prenesli v mikrocentrifugirko s plazmidi in inkubirali od 15 do 30 minut pri sobni temperaturi. Nato smo transfekcijsko mešanico dodali celicam in inkubirali do stimulacije celic.

3.2.4.3 Stimulacija in liza transficiranih celic HEK293

Celice HEK293 smo stimulirali z različnimi stimulantmi, kar je bilo odvisno od poskusa. V kolikor smo preverjali sposobnost aktivacije TLR5 signalne poti, smo celice, transficirane s plazmidom za hTLR5, stimulirali 24 ur po transfekciji z izoliranimi proteini in kot

kontrolno uporabili komercialno dostopen rekombinantni flagelin FliC, izoliran iz bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, v končni koncentraciji 10 ng/ml. Čez 20 ur smo celicam, pri katerih smo želeli meriti luciferazno aktivnost, odstranili medij in jih lizirali z ustreznim 1-kratnim liznim pufrom (Promega). Lizirane celice smo do merjenja luciferazne aktivnosti zamrznili pri -20 °C.

Prisotnost lipopolisaharida (LPS) v izoliranih proteinih smo preverjali na celicah transficiranih s plazmidom z zapisom za hTLR4 in plazmidom za zapis MD-2, kot kontrolno pa smo uporabili komercialno dostopen LPS v končni koncentraciji 10 ng/ml. Stimulacijo smo izvedli 6 ur po sami transfekciji, lizo celic pa po 16 urah po stimulaciji.

3.2.4.4 Merjenje luciferazne aktivnosti

Tik pred merjenjem luciferazne aktivnosti z dvojnim luciferaznim testom smo pripravili ustrezna pufra. Pufer za merjenje luciferazne aktivnosti je vseboval 1-kratni luciferazni pufer, koencim A, DTT, ATP in D-luciferin. Pufer za merjenje aktivnosti renile pa 1-kratni renilni pufer in coelenterazin. Mikrotitersko ploščo z liziranimi celicami smo vstavili v luminometer Mithras, ustrezna injektorja pa smo potopili v pufr. Pri dvojnem luciferaznem testu luminometer najprej pomeži aktivnost kresničkine luciferaze (Fluc), nato pa še aktivnost *Renilla* luciferaze (Rluc). Ker imata oba encima različna substrata, je mogoče njuno aktivnost ločeno meriti hkrati v istem vzorcu. Aktivnost Rluc nam pove delež transficiranih celic, saj se *Renilla* luciferaza ves čas izraža in nam tako prikazuje delež celic, ki so sprejele plazmid z zapisom za Rluc, medtem ko nam aktivnost Fluc (Fluc pod NF- κ B-promotorjem) kaže aktivacijo TLR5 signalne poti ob stimulaciji z ligandom (HF-RGD-His in HF-multiepitop-RGD-His) oziroma FliC. Razmerje Fluc/Rluc (RLE – relativne luciferazne enote) nam torej pove normalizirano vrednost stimuliranih celic glede na transficirane celice.

3.2.5 *In vivo* poskusi

In vivo poskuse smo izvajali na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani, kjer so bile miši ustrezno nastanjene. Za vse izvedene poskuse *in vivo* na miškah smo pridobili ustrezna dovoljenja s strani Veterinarske Uprave Republike Slovenije (VURS) in Etične

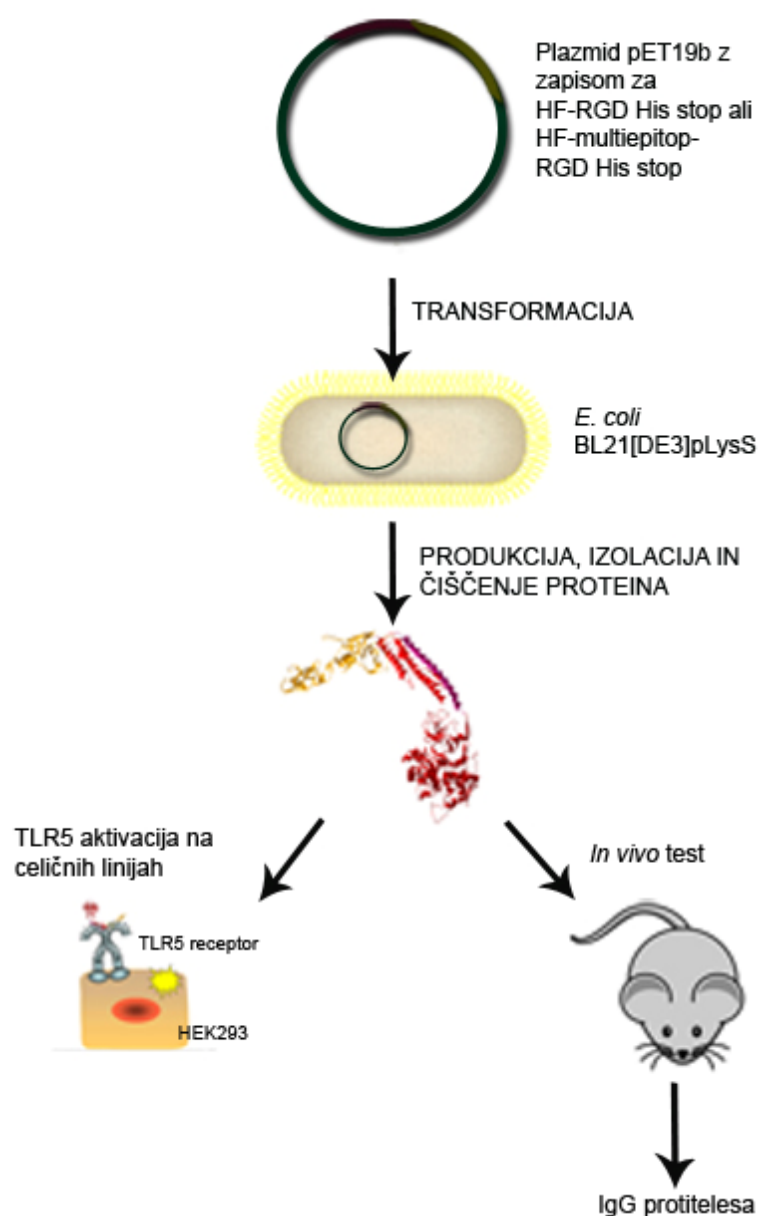
komisije za poskuse na živalih. Vsi poskusi na živalih so bili izvedeni s strani ustrezno usposobljenih oseb.

3.2.5.1 Priprava seruma

Kri, odvzeto miškam, smo na ledu transportirali do laboratorija in takoj pričeli z desetminutnim centrifugiranjem vzorcev pri 13 000 obr./min, pri 4 °C. Po centrifugiranju smo previdno prenesli serum (supernatant), v svežo mikrocentrifugirko in ga shranili do nadaljnjih poskusov pri -80 °C.

3.2.5.2 Dokazovanje IgG protiteles v serumu mišk z metodo ELISA

Na mikrotitersko ploščo za ELISO (enzyme-linked immunosorbent assay) s 96-imi luknjicami smo najprej vezali antigen, ki je bil v našem primeru izolirani himerni protein. Antigen smo razredčili v 50 mM Na₂CO₃ pufru pH=9,6, tako da je bila končna koncentracija antigena 10 µg/ml na luknjico. V posamezno luknjico smo nanесли 50 µl mešanice in inkubirali preko noči pri 4 °C. Sledilo je spiranje nevezanega antigena, tako da smo v posamezno luknjico nanесли 3-krat po 200 µl 1-kratnega PBS-T. Po spiranju smo vezavna mesta blokirali z blokirnim pufrom, tako da smo v posamezno luknjico nanесли 200 µl blokirnega pufru in inkubirali 90 minut pri 37 °C. Blokiranju je sledilo spiranje po postopku, ki je opisan zgoraj. Zatем smo pripravili različne redčitve seruma mišk v blokirnem pufru in v posamezno luknjico nanесли 50 µl ustrezne redčitve seruma in inkubirali 90 minut pri 37 °C. Ponovno je sledilo spiranje in nato vezava s hrenovo peroksidazo označenih sekundarnih IgG protiteles (Goat anti-mouse IgG), ki smo jih redčili v razmerju 1 : 3 000 v blokirnem pufru. V posamezno luknjico smo nanесли 50 µl ustrezno redčenih sekundarnih protiteles in inkubirali 90 minut pri 37 °C. Nevezana protitelesa smo sprali. Sledilo je dokazovanje vezave označenih sekundarnih protiteles z barvno reakcijo, ki smo jo sprožili z dodatkom komercialno dostopnega substrata za peroksidazo ABTS (Sigma). Barvno reakcijo smo ustavili po 20-ih minutah z dodatkom enakega volumna 1-odstotnega SDS (100 µl). Takoj po ustavitvi reakcije smo izmerili absorbanco pri 405 nm na aparaturi Mithras.



Slika 17: Shematski prikaz poteka dela.

4 REZULTATI

4.1 PRIPRAVA EKSPRESIJSKIH VEKTORJEV

Pripravljeni in uporabljeni DNK konstrukti v diplomskem delu:

- pET19b-HF-RGD-His-stop
- pET19b-HF-multiepitop-RGD-His-stop

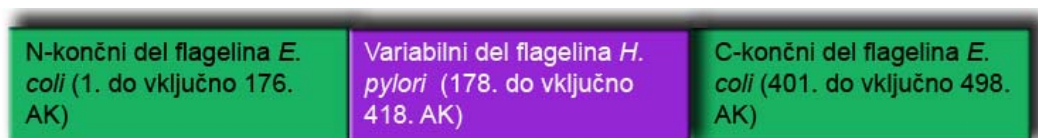
4.1.1 Teoretična razlaga posameznih segmentov DNK konstruktov

4.1.1.1 Himerni flagelin (HF)

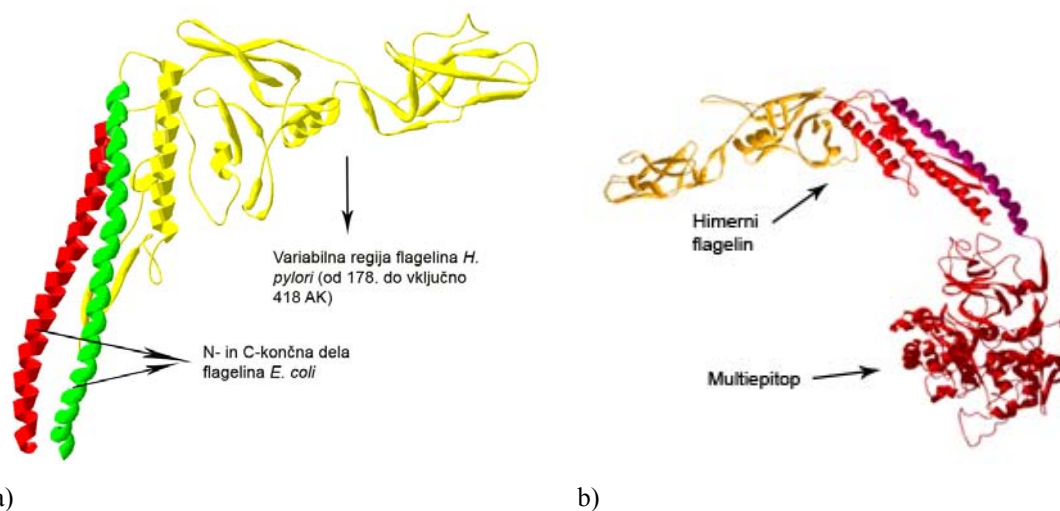
HF je oznaka za himerni flagelin, ki smo ga pridobili iz N- in C-končnega dela flagelina bakterije *E. coli* in variabilnega dela flagelina bakterije *Helicobacter pylori*.

Priprava himernega flagelina je bila zahtevnejša stopnja, saj je bilo najprej potrebno ugotoviti kje je najbolj primerno mesto za vstavev variabilnega dela flagelina *H. pylori* v flagelin bakterije *E. coli* ne da bi se pri tem porušila osnovna struktura flagelina in da bi leta bil še vedno sposoben aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5.

Z računalniškim modeliranjem in s pomočjo znanega nukleotidnega zaporedja flagelina *E. coli*, smo variabilno regijo flagelina *H. pylori* s PCR ligacijo vnesli na mesto med 177. aminokislino in 400. aminokislino flagelina *E. coli*, kjer je meja med dvema koncema flagelina.



Slika 18: Shematski prikaz sestave himernega flagelina (HF).



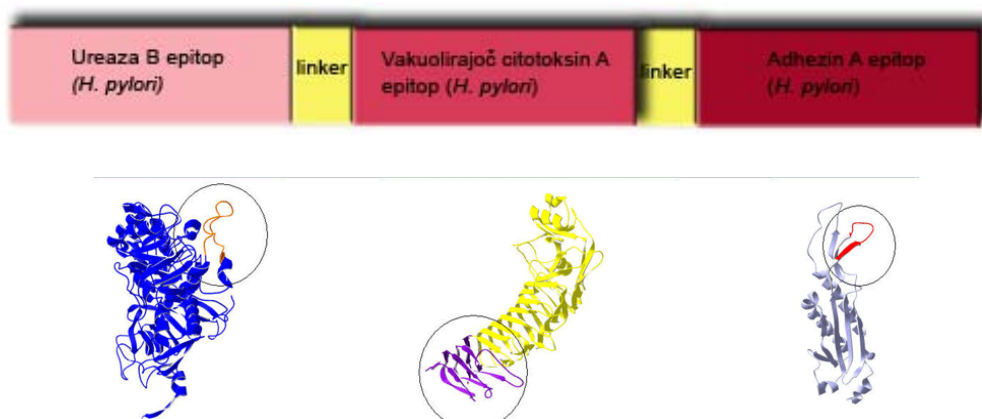
Slika 19: Terciarna struktura himernih flagelinov pridobljena z računalniškim modeliranjem.

a) Zelena in rdeča veriga predstavljata N- in C-končna dela flagelina iz bakterije *E. coli*, ki sta odgovorna za aktivacijo signalne poti preko receptorja TLR5. Rumen del predstavlja variabilno regijo flagelina *H. pylori*, ki je odgovorna za prepoznavanje proteina s strani imunskega sistema. Model je pripravil prof. dr. Roman Jerala (Kemski inštitut Ljubljana).

b) Terciarna struktura himernega flagelina z vezanim multiepitopom na C-koncu himernega flagelina. Model je pripravil prof. dr. Roman Jerala (Kemski inštitut Ljubljana).

4.1.1.2 Multiepitop

Multiepitop je sintetično pripravljen oligonukleotid, ki so ga sintetizirali pri podjetju GeneArt in vsebuje epitope treh najpomembnejših virulenčnih dejavnikov bakterije *H. pylori* kot so epitop ureaze B, epitop vakuolirajočega citotoksina A in epitop adhezina A. Med posameznimi epitopi je linker, ki je sestavljen iz 8 aminokislin (GKLTVTSG).



Slika 20: Shematski prikaz DNK konstrukta za multiepitop.

Modele terciarnih struktur je pripravil prof. dr. Roman Jerala (Kemski inštitut Ljubljana).

4.1.1.3 RGD-His-stop

RGD-His-stop je sestavljen iz treh aminokislin (RGD – arginin, glicin, asparaginska kislina), ki povečajo adhezijo proteina na celično površino, histidinskega repa sestavljenega iz 6 histidinov, ki so pomembni pri izolaciji in vizualizaciji proteina ter stop kodona TAG. Oligonukleotid RGD-His-stop smo naročili kot oligonukleotida (si158 in si159), ki sta komplementarna in se povežeta v dvoverižno DNK molekulo, ki ima na 5' koncu lepljiv rep *Xba*I in na 3' koncu lepljiv rep *Pst*I.

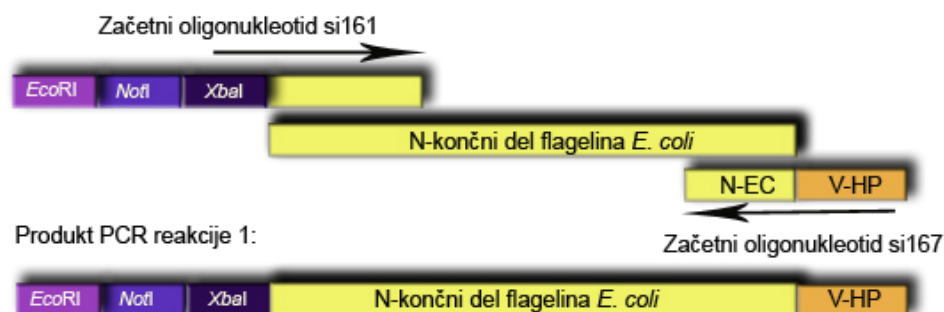
4.1.2 Postopek kloniranja:

Vse stopnje kloniranja in priprave DNK konstruktov smo izvedli v času projekta iGEM 2008. Pri tem so sodelovali vsi člani ekipe, zato sem v diplomskem delu navedla le končne DNK konstrukte, ki sem jih uporabila pri nadaljnjem delu.

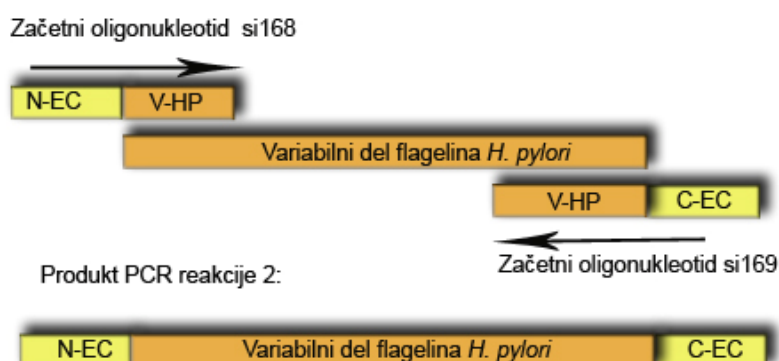
Najprej smo rezali vektor psB1AK3 z restrikcijskima endonuklezama *Xba*I in *Pst*I, da smo izrezali ccdB domeno in produkt restrikcije nanесли na gel ter ustrezno velik fragment očistili iz gela. Oligonukleotid RGD-His-stop je bil pripravljen tako, da se je z lepljivima koncema vstavil v vektor psB1AK3, rezan z *Xba*I in *Pst*I. Ligacijsko zmes smo transformirali v kompetentne celice *E. coli* DH5 α , da se je vektorski konstrukt RGD-His-stop/psB1AK3 pomnožil in ga nato izolirali s komercialnimi kompleti za izolacijo plazmidne DNK (slika 23).

Himerni flagelin smo pripravili tako, da smo najprej izolirali genomsko DNK iz bakterij *E. coli* in *H. pylori* ter potem s PCR reakcijo pomnožili gena za flagelin *E. coli* (začetni oligonukleotidi: si127 in si128) in *H. pylori* (začetni oligonukleotidi: si129 in si130). Nato smo s PCR reakcijo ločeno pomnožili N-končni (začetni oligonukleotidi: si161 in si167) in C-končni del flagelina *E. coli* (začetni oligonukleotidi: si160 in si164) ter variabilno regijo flagelina *H. pylori* (začetni oligonukleotidi: si168 in si169), (slika 21). S PCR ligacijo (slika 22) smo zlepili posamezne fragmente v DNK konstrukt, ki smo ga poimenovali himerni flagelin (HF).

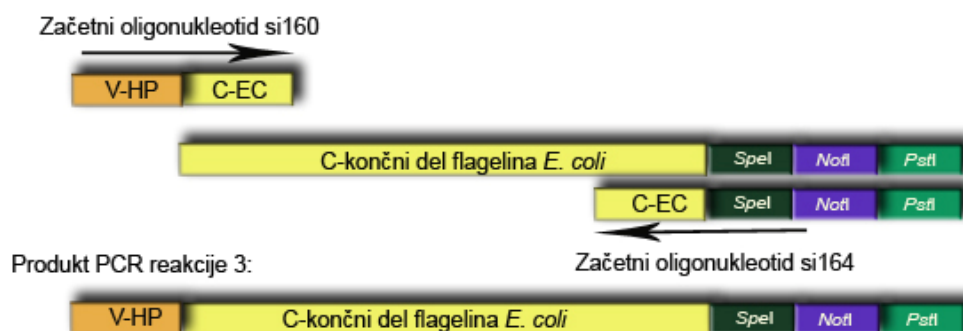
PCR reakcija 1



PCR reakcija 2

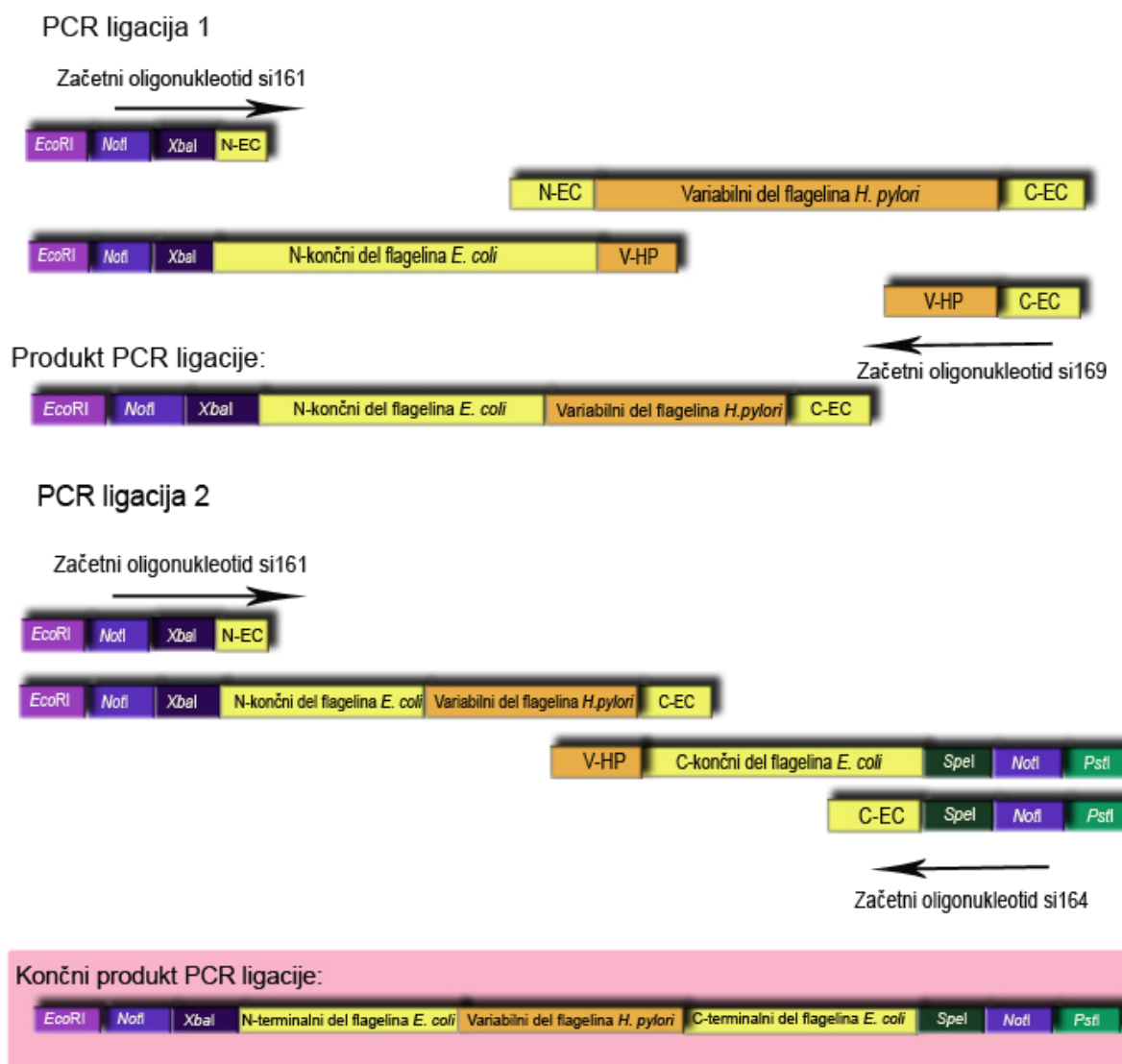


PCR reakcija 3



Slika 21: Shematski pregled postopka priprave osnovnih delov himernega flagelina s PCR reakcijami.

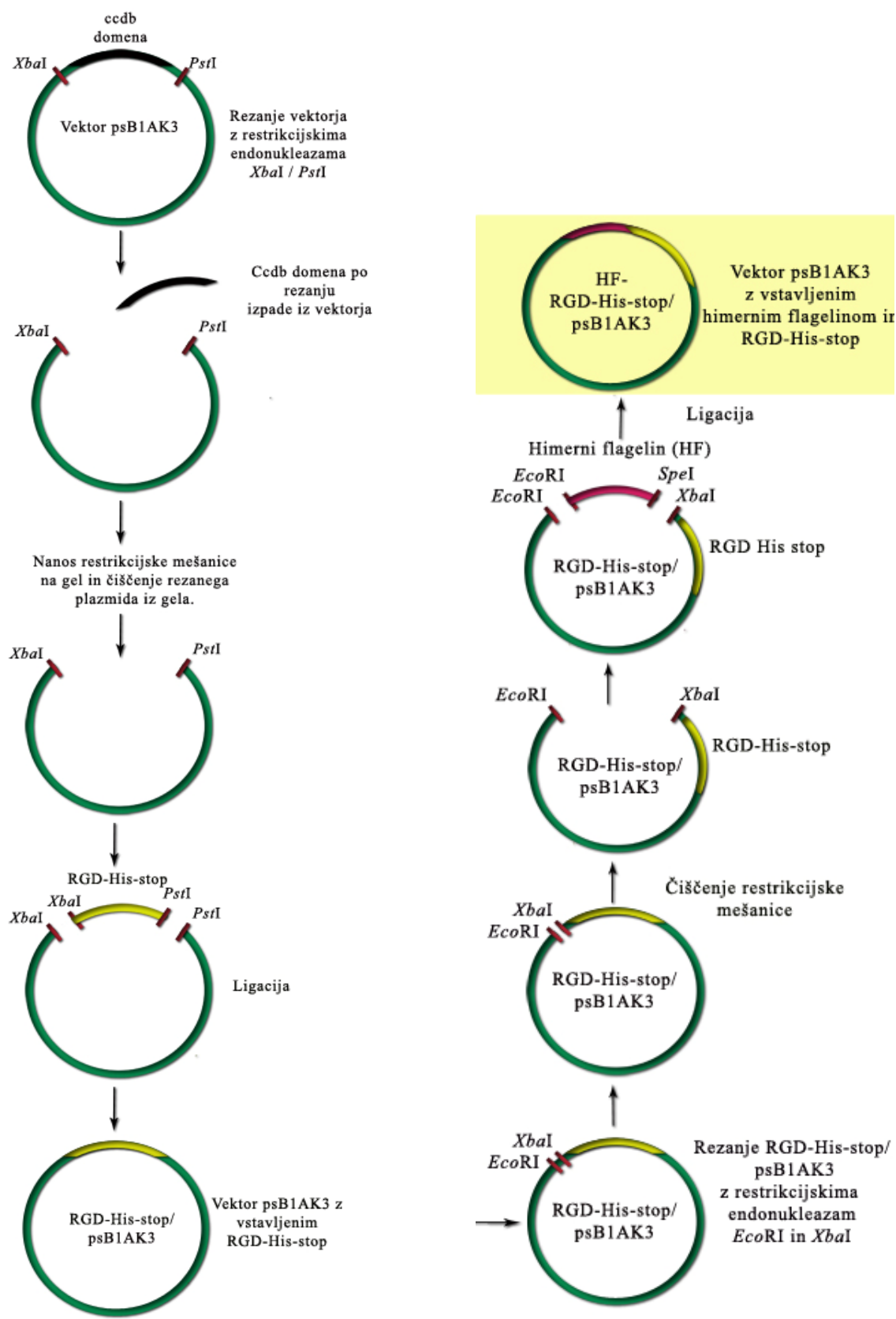
EcoRI, *NotI*, *XbaI*, *SpeI* in *PstI* so restrikcijska mesta, ki smo jih z reakcijo PCR vnesli v DNK konstrukt in so potrebna pri nadaljnjem kloniranju. N-končni del flagelina *E. coli* prikazuje del flagelina bakterije *E. coli* od 1. do vključno 176. aminokislina. Variabilni del flagelina *H. pylori* označuje variabilno regijo flagelina bakterije *H. pylori* od 178. do 418. aminokislina. C-končni del flagelina *E. coli* prikazuje del flagelina bakterije *E. coli* od 401. do 498. aminokislina. Z N-EC je označen del, ki je komplementaren N-končnemu delu flagelina *E. coli*, V-HP označuje del, ki prilega na variabilni del flagelina *H. pylori*, z C-EC pa smo označili del, ki je komplementaren C-končnemu delu flagelina *E. coli*.



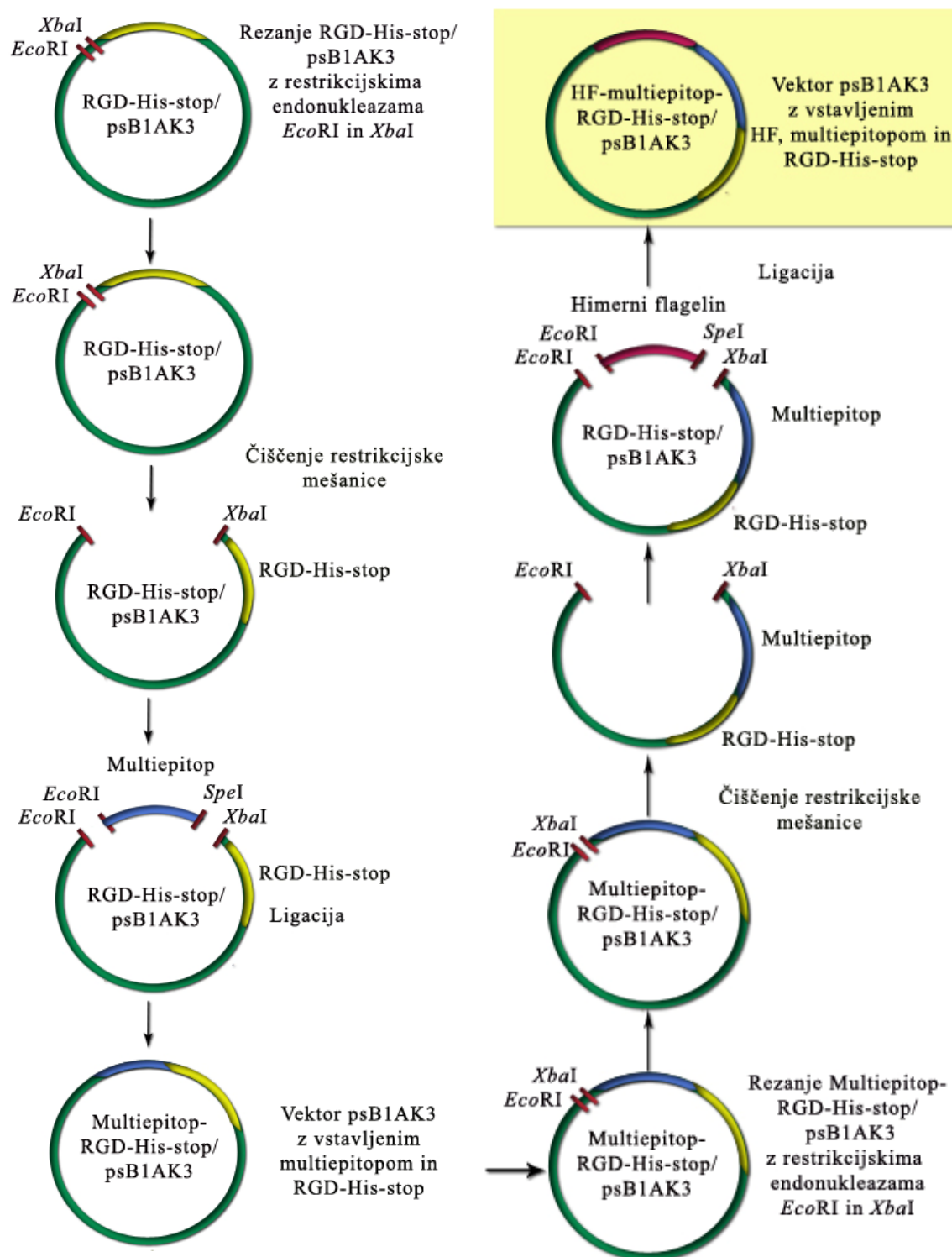
Slika 22: Shematski pregled postopka priprave himernega flagelina z metodo PCR lepljenja.

V prvi PCR reakciji smo zlepili N-končni del flagelina *E. coli* z variabilnim delom flagelina *H. pylori*. V drugi PCR reakciji pa smo produkt PCR ligacije 1 zlepili še s C-končnim delom flagelina bakterije *E. coli* tako, da smo dobili celotni himerni flagelin z ustreznimi restrikcijskimi mesti na obeh koncih.

PCR pomnožek himerni flagelin smo rezali z restrikcijskima endonukleazama *EcoRI/SpeI* in ga ligirali v plazmid psB1AK3 z vstavljenim oligonukleotidom RGD-His-stop, ki smo ga pred tem rezali z *EcoRI/XbaI*. Lepljiva konca, ki ostaneta po rezanju s *SpeI* in *XbaI*, tvorita mešano restrikcijsko mesto, ki se ga ne da več razrezati. Ligacijsko zmes smo transformirali v kompetentne celice *E. coli* DH5 α in nato izolirali pomnoženi vektorski konstrukt HF-RGD-His-stop/psB1AK3 s komercialnimi kompleti za izolacijo plazmidne DNK (slika 23).



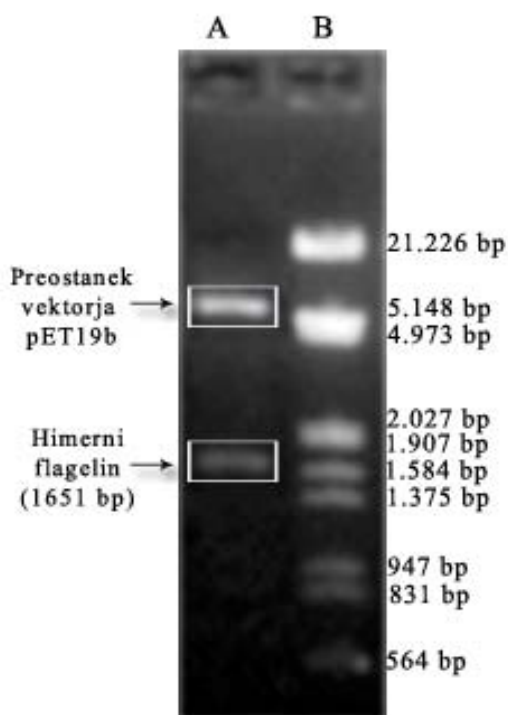
Slika 23: Shematski prikaz priprave vektorskega konstrukta HF-RGD-His-stop/psB1AK3.



Slika 24: Shematski prikaz priprave vektorskega konstrukta HF-multiepitop-RGD-His-stop/psB1AK3.

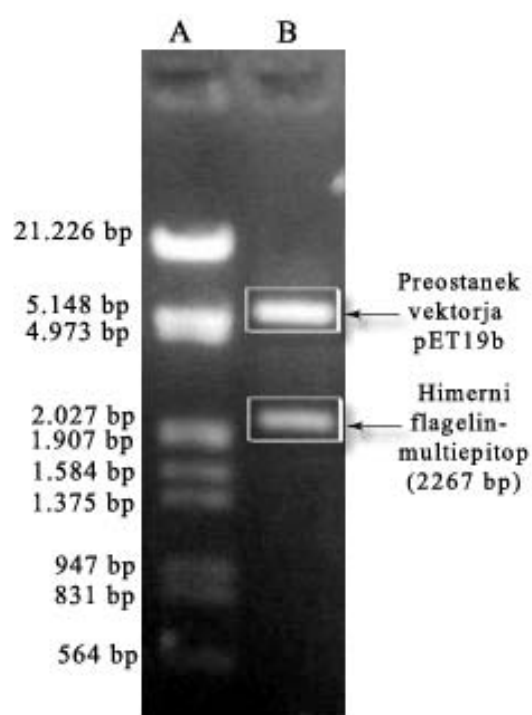
Ker je za izražanje proteinov v bakterijskih celicah bolj primeren vektor pET19b, smo dobljena DNK konstrukta prenesli v ta vektor tako, da smo s PCR reakcijo (začetni oligonukleotidi: si205 in si207) vnesli zapis za ustrezna restrikcijska mesta (na 5' koncu

NcoI in na 3' koncu *XhoI*) v DNK konstrukt in ga po PCR reakciji rezali z *NcoI* in *XhoI*. Nastali so lepljivi konci, ki omogočajo ligacijo z vektorjem pET19b, rezanim z istima encimoma. Ligacijsko zmes smo transformirali v *E. coli* DH5 α in izolirali plazmid ter preverili ustreznost skloniranega konstrukta s kontrolno restrikcijo, ki smo jo nanegli na agarozni gel (slika 25 in slika 26).



Slika 25: Kontrolna restrikcija konstrukta pET19b-HF- RGD-His-stop, rezanega z *NcoI/XhoI*.

Pričakovana velikost fragmenta je 1 651 bp. Na 1,2-odstotni agarozni gel smo nanegli restrikcijsko mešanico (označena z A), ki smo ji dodali ustrezen volumen 6-kratnega nanašalnega pufra LB. Kot standard (označen z B) smo uporabili λ DNK rezano s *HindIII/EcoRI* (5 μ l).



Slika 26: Kontrolna restrikcija konstrukta pET19b-HF- RGD-His-stop rezanega z *NcoI/XhoI*.

Pričakovana velikost fragmenta je 2 267 bp. Na 1,2-odstotni agarozni gel smo nanegli restrikcijsko mešanico (označena z B), ki smo ji dodali ustrezen volumen 6-kratnega nanašalnega pufra LB. Kot standard (označen z A) smo uporabili λ DNK rezano s *HindIII/EcoRI* (5 μ l).

Po kontrolni restrikciji smo ustreznost DNK zaporedja preverili z določitvijo nukleotidnega zaporedja (v prilogi).

4.2 IZOLACIJA HIMERNIH FLAGELINOV

Izolirali smo proteina:

- himerni flagelin (HF-RGD-His)
- himerni flagelin-multiepitop (HF-multiepitop-RGD-His)

Na podlagi znanih nukleotidnih zaporedij DNK konstruktov za proteina HF-RGD-His in HF-multiepitop-RGD-His smo s pomočjo računalniškega programa Gene Runner DNK zaporedje prevedli v aminokislinsko zaporedje. Nato smo s pomočjo bioinformacijskih orodij pridobili podatke pomembne za izolacijo proteina. Pri tem smo uporabili internetni program ProtParam (ExPASy).

Preglednica 24: Teoretične lastnosti posameznega proteina pomembne pri izolaciji

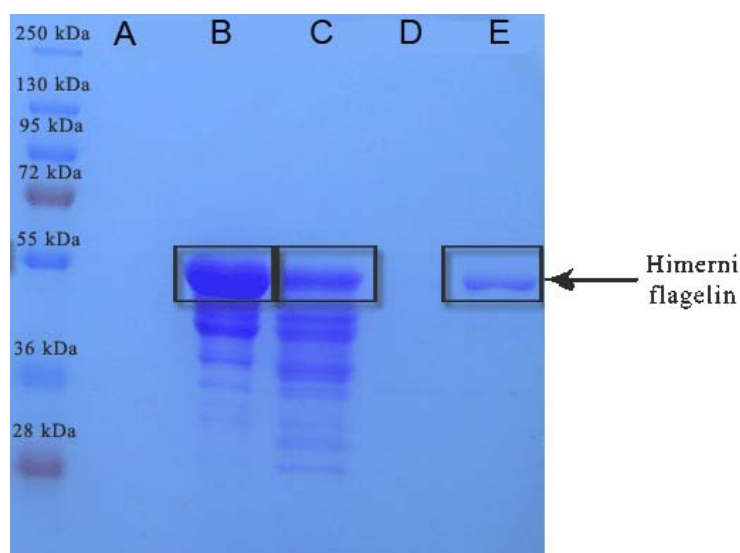
Protein	Število aminokislin	Velikost (kDa)	Teoretična izoelektrična točka	Ekstincijski koeficient	Abs 0.1% (=1 g/l)
HF-RGD-His	526	55,1	6,47	7450	0,135
HF-multiepitop- RGD-His	705	73,9	8,92	8940	0,121

Za izolacijo proteinov smo vektorska konstrukta pET19b-HF-RGD-His-stop in pET19b-HF-multiepitop-RGD-His-stop transformirali v kompetentne bakterijske celice *E. coli* seva BL21[DE3]pLysS.

Po transformaciji smo precepili posamezno kolonijo v tekoče LBA gojišče in kulturo stresali preko noči pri 37 °C. Naslednji dan smo ustrezeni volumen vcepka prenesli v sveže tekoče gojišče LBA ter ob ustrezni celični gostoti, ki smo jo določili z merjenjem absorbance pri 600 nm, inducirali sintezo proteina z dodatkom IPTG. Po indukciji smo bakterijsko kulturo inkubirali pri 25 °C. Čas inkubacije se je razlikoval za posamezen protein (HF-RGD-His –največ 16 ur in HF-multiepitop-RGD-His – največ 8 ur), zato se je protein nahajal na različnih mestih. Posledično se je razlikoval tudi način izolacije proteina.

4.2.1 Izolacija in dokazovanje proteina HF-RGD-His

Najprej smo morali ugotoviti, ali se protein HF-RGD-His nahaja v topni obliki v citosolu ali v inkluzijskih telescih in izkazalo se je, da se je protein kopičil v inkluzijskih telescih v nepravilno zviti obliki (slika 27). Zaradi dodanega histidinskega repa smo za izolacijo proteinov uporabili Ni-NTA kolono. Ker se je protein nahajal v denaturirani obliki, smo izvedli dodaten korak, s katerim smo protein na koloni ponovno zvili. Pri tem smo uporabili pufre s padajočo koncentracijo uree. Podrobnejši opis postopka izolacije proteina je opisan v poglavju Materiali in metode, v podpoglavju Izolacija proteinov.



Slika 27: SDS-PAGE elektroforeza za ugotavljanje lokacije himernega flagelina.

Na SDS-PAGE gel smo nanesti različne vzorce frakcij, da bi ugotovili, kje se protein nahaja. A: Frakcija, pridobljena pri eluciji s pufrom za elucijo II (500 mM imidazol), B: Frakcija, pridobljena pri eluciji s pufrom za elucijo I (250 mM imidazol); protein je dializiran proti pufru Tris-HCl, C: Frakcija, pridobljena pri eluciji s pufrom za elucijo I (250 mM imidazol); protein je dializiran v pufru Na-fosfat, D: Nevezana frakcija, pridobljena po nanosu raztopljenih inkluzijskih telesc na kolono, E: Raztopljena inkluzijska telesa v 8 M urei. Protein je bil eluiran brez predhodnega spiranja s pufrom IV, ki vsebuje 100 mM imidazol.

Po spiranju kolone smo naredili elucijo proteina s pufrom za elucijo I, saj smo ugotovili, da se protein spira pri 250 mM koncentraciji imidazola. Sledilo je koncentriranje proteinov in dializa proti pufru PBS z 10-odstotnim glicerolom, ki je primeren za imunizacijo mišk. Po dializi smo določili koncentracijo proteinov v vzorcu (preglednica 25) tako, da smo izmerili absorbanco pri 280 nm in upoštevali ozadje pri valovni dolžini 330 nm. Neto

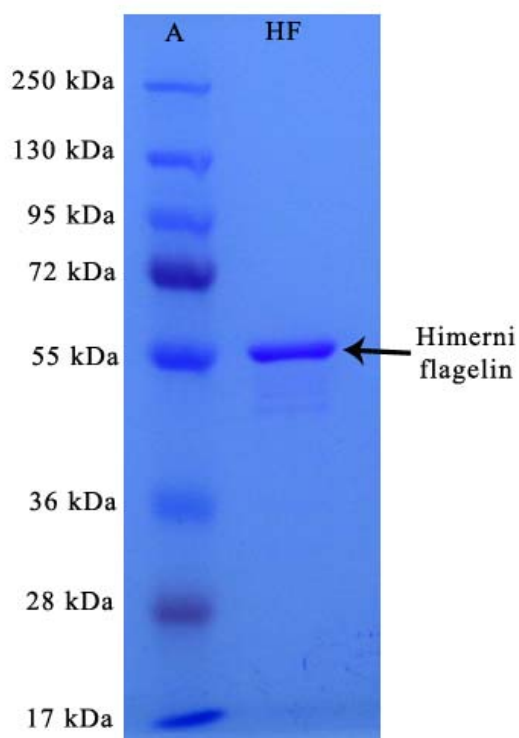
absorbanco pri 280 nm smo dobili tako, da smo od vrednosti absorbance pri 280 nm odšteli vrednost absorbance pri 330 nm. Iz določene neto absorbance pri 280 nm smo izračunali koncentracijo proteina s pomočjo Lambert-Beerovega zakona (enačba 4).

Preglednica 25: Izračunana koncentracija proteina HF-RGD-His (mg/ml) v vzorcu na podlagi izmerjene absorbance pri 280 nm in ob upoštevanju absorbance pri 330 nm

Protein	Absorbanca (280 nm)	Absorbanca (330 nm)	Neto absorbanca (280 nm)	Abs 0.1% (=1 g/l)	Koncentracija proteina (mg/ml)
HF-RGD-His	0,22973	0,092911	0,13646	0,135	1,01

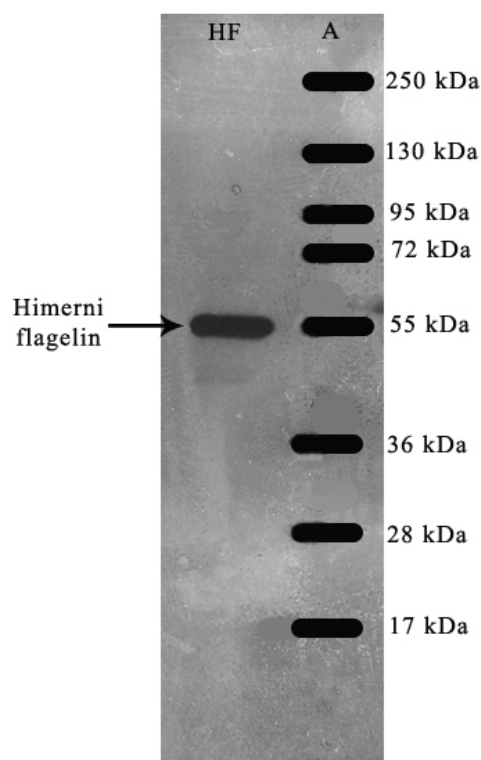
Izolirani protein HF-RGD-His smo dokazali na SDS-PAGE gelu, po barvanju z barvilom Coomassie modrim. Na podlagi potovanja standarda (PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus) smo določili približno velikost proteina. Pričakovana velikost HF-RGD-His je 55 kDa, kar ustreza višini lise na gelu (slika 28).

Uspešnost izolacije smo preverili tudi z Western prenosom. Primarna protitelesa, ki smo jih uporabili, prepoznajo štiri histidinske ostanke v histidinskem repu. Na primarna protitelesa smo vezali sekundarna, ki so označena s hrenovo peroksidazo in omogočajo detekcijo proteinov ob dodatku ustreznega substrata (slika 29).



Slika 28: SDS-PAGE elektroforeza za himerni flagelin.

Izoliran himerni flagelin iz inkluzijskih telesc smo nanesli na 10-odstotni SDS gel. Elektroforeza je potekala pri konstantni napetosti 350 V, 45 minut. Predvidena velikost himernega flagelina (označen kot HF) je 55 kDa. Kot standard (označen z A) smo uporabili PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus. Na gel smo nanesli 7 μ l standarda in 25 μ g proteina, ki smo ga denaturirali v 1-kratnem SDS reducirnem pufri in s segrevanjem pri 95 °C, 10 minut. Protein smo obarvali z barvilom Coomassie modrim.



Slika 29: Western prenos za himerni flagelin.

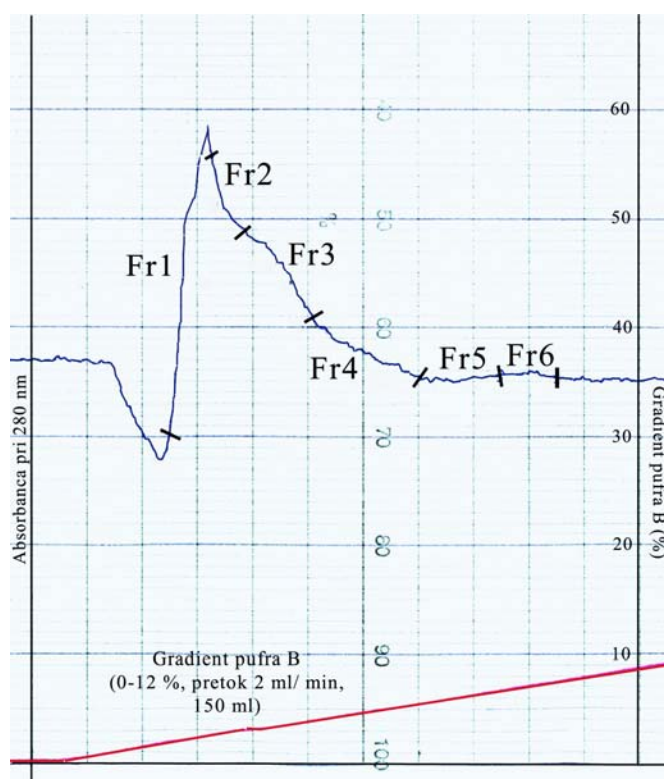
Izoliran himerni flagelin (označen kot HF) iz inkluzijskih telesc smo dokazali s prenosom Western.

Na podlagi potovanja velikostnega standarda PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (označen kot A) smo določili velikost proteina HF-RGD-His, ki ustreza pričakovani velikosti 55 kDa. Čas ekspozicije je bil 3 minute. Za detekcijo smo uporabili kemiluminiscentni substrat Super Signal West Pico.

4.2.2 Izolacija in dokazovanje proteina HF-multiepitop-RGD-His

Za protein HF-multiepitop-RGD-His smo ugotovili, da se nahaja v topni obliki v citosolu (rezultati niso prikazani), zato smo protein izolirali s tekočinsko kromatografijo (ang. Fast Protein Liquid Chromatography ali FPLC) na Ni-NTA koloni.

Protein smo vezali na kolono in spirali nečistoče iz kolone. Nato smo izvedli gradientno elucijo proteina, pri kateri smo povečevali koncentracijo imidazola s postopnim dodajanjem pufra B za FPLC. V prvem koraku smo nastavili gradient pufra B od 0 do 12 %, v končnem volumnu 150 ml. S pomočjo kromatograma smo ves čas (slika 30) spremljali elucijo proteina. Po preteku prvega gradienta smo nastavili drugo stopnjo gradienta pufra B od 12 do 50 %, v končnem volumnu 150 ml. Ko se je končal drugi gradient, smo nastavili še tretjega (od 50 do 100 % pufra B za FPLC v 10 ml). Pretok pufra je bil ves čas 2 ml/min.



Slika 30: FPLC kromatogram pridobljen pri izolaciji proteina himerni flagelin-multiepitop.

Rdeča črta prikazuje dviganje gradienta (postopno povečevanje koncentracije pufra B za FPLC od 0 do 12 %). Modra črta odraža vrednost absorbance pri 280 nm. Višji kot je naklon, več proteina se eluira. Na podlagi spreminjanja vrednosti absorbance smo lovili frakcije, ki so na sliki označene kot Fr1, Fr2, Fr3, Fr4, Fr5 in Fr6. Ker se je protein eluiral iz kolone v območju gradienta od 0 do 12 %, je prikazan le ta odsek kromatograma.

Posamezne frakcije, ki smo jih zbrali, smo skoncentrirali in dializirali proti pufru PBS celični z 10-odstotnim glicerolom. Izmerili smo absorbanco pri 280 nm in določili koncentracijo proteina v vzorcu (preglednica 26 in preglednica 27). Potem smo vzorce nanesli na 10-odstotni SDS-PAGE gel. Po končani elektroforezi smo gel obarvali z barvilom Coomassie modrim (slika 29).

Preglednica 26: Izračunana koncentracija proteina HF-multiepitop-RGD-His (mg/ml) v vzorcu na podlagi neto absorbance pri 280 nm

Frakcija	Absorbanca (280 nm)	Absorbanca (330 nm)	Neto absorbanca (280 nm)	Abs 0.1% (=1 g/l)	Koncentracija proteina (mg/ml)
Frakcija 1	0,490	0,090	0,400	0,121	3,310
Frakcija 2	0,382	0,059	0,323	0,121	2,670
Frakcija 3	0,218	0,034	0,184	0,121	1,520
Frakcija 4	0,116	0,028	0,089	0,121	0,730
Frakcija 5	0,117	0,038	0,079	0,121	0,660
Frakcija 6	0,054	0,020	0,035	0,121	0,290

Koncentracijo nevezane frakcije smo določili s komercialno dostopnim kompletom za določanje koncentracije proteinov (Bio-Rad Protein Assay).

Preglednica 27: Izračunana koncentracija proteina HF-multiepitop-RGD-His (mg/ml) v nevezani frakciji

Frakcija	Absorbanca (595 nm) za 100-krat redčen vzorec	Absorbanca (595 nm) za neredčen vzorec	Koncentracija proteina (mg/ml)
Nevezana frakcija	0,550	55,00	56,78

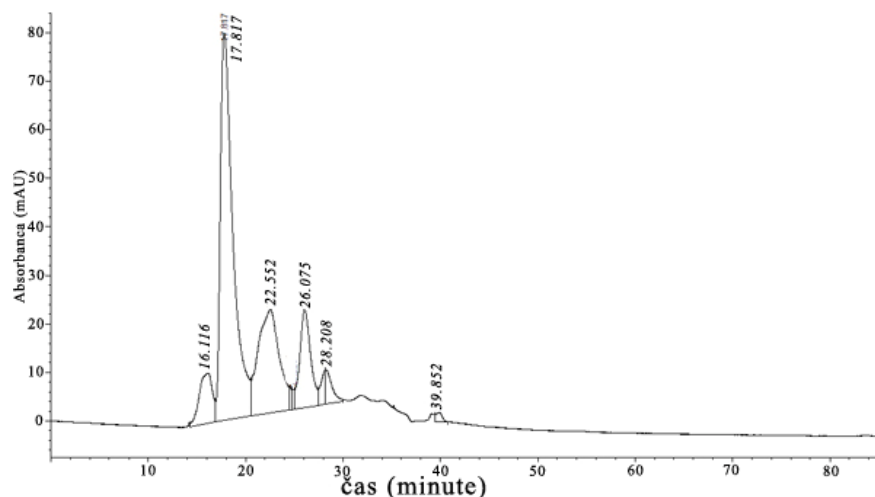


Slika 31: SDS-PAGE elektroforeza za himerni flagelin-multiepitop.

Frakcije proteina HF-multiepitop-RGD-His izolirane iz supernatanta smo nanesli na 10-odstotni SDS gel. Elektroforeza je potekala pri konstantni napetosti 350 V 45 minut. Vzorci: A: standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus; NF: nevezana frakcija, dobljena po nanosu supernatanta na kolono; Fr1: frakcija 1; Fr2: frakcija 2; Fr3: frakcija 3; Fr4: frakcija 4; Fr5: frakcija 5; Fr6: frakcija 6. Predvidena velikost proteina je 73,9 kDa. Na 10-odstotni SDS gel smo nanesli 7 μ l standarda in 10 μ g proteina, ki smo ga denaturirali v 1-krat reduciranem SDS pufru in z desetminutnim segrevanjem pri 95 °C. Gel smo obarvali z barvilom Coomassie modrim.

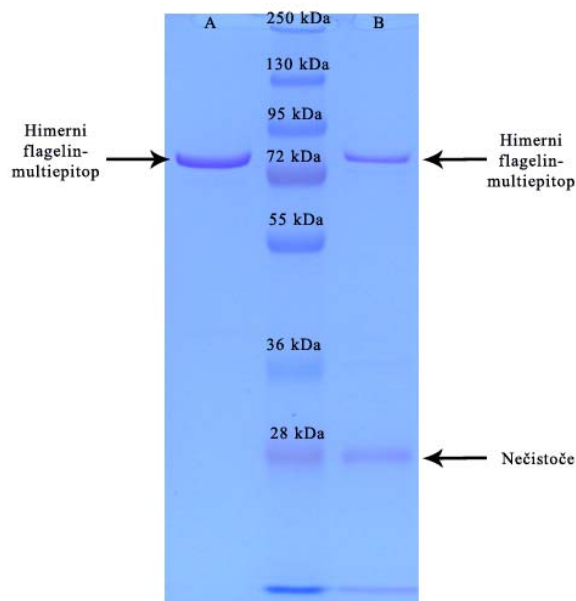
4.2.3 Čiščenje proteina HF-multiepitop-RGD-His stop z gelsko kromatografijo

Zaradi prisotnosti nečistoč smo protein dodatno očistili z gelsko kromatografijo. Princip gelske kromatografije temelji na tem, da se manjši proteini ujamejo v zamreženo strukturo kolone in posledično potujejo počasneje kot večji proteini, ki se v luknjice ne ujamejo. Ker so bile v našem primeru nečistoče na višini 28 kDa, smo pričakovali, da se bo himerni flagelin-multiepitop-RGD-His eluiral prej iz kolone kakor nečistoče, saj je velik 73,9 kDa in se ne ujame v zamreženo strukturo.



Slika 32: Kromatogram pridobljen pri čiščenju proteina z gelsko kromatografijo.

Protein HF-multiepitop-RGD-His smo dodatno očistili nečistoč z gelsko kromatografijo na HPLC aparaturi. Najvišji vrh na kromatogramu predstavlja izoliran protein HF-multiepitop-RGD-His, medtem, ko so manjši vrhovi nečistoče, ki so se ujele v zamreženo strukturo nosilca in posledično počasneje potovale. Protein je bil raztopljen v pufru 1-krat PBS celični. Pretok je bil 0,5 ml/min. Vrednosti pri posameznem vrhu nam povedo koliko časa je protein potreboval, da se je eluiral iz kolone.



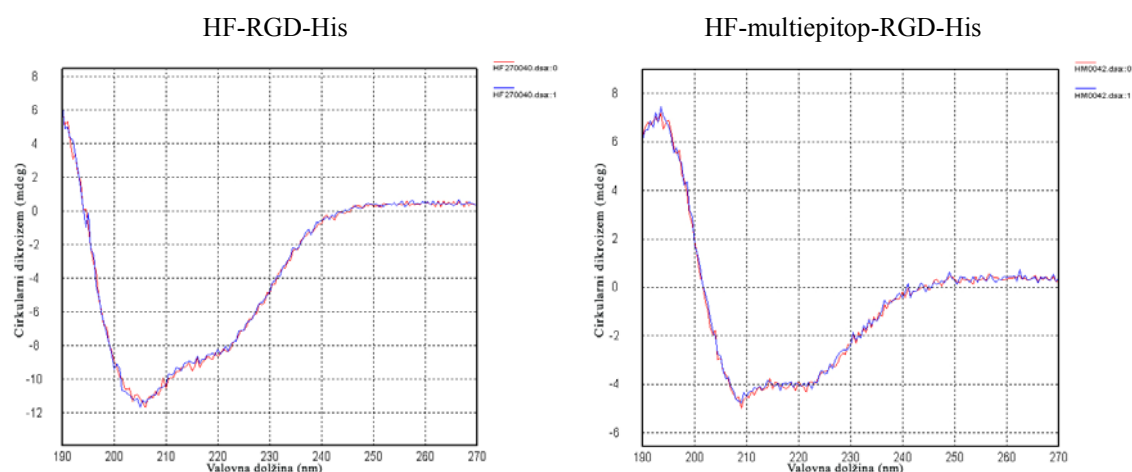
Slika 33: Primerjava proteina himerni flagelin-multiepitop-RGD-His pred gelsko kromatografijo (vzorec B) in po gelski kromatografiji (vzorec A).

V primeru vzorca B so vidne nečistoče na višini 28 kDa, medtem ko teh nečistoč po gelski kromatografiji ni več. Predvidena velikost proteina je 73,9 kDa. Kot standard smo uporabili PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus. Na 10-odstotni SDS gel smo nanegli 7 µl standarda in 15 µg proteina, ki smo ga denaturirali v 1-kratnem reducirajočem SDS pufru in z desetminutnim segrevanjem pri 95 °C. Gel smo obarvali z barvilom Coomassie modrim.

4.2.4 Določanje sekundarne strukture proteina

Izoliranim in dokazanim proteinom smo želeli določiti tudi sekundarno strukturo proteina, ki nam pove, v kakšni konformacijski obliki je protein. Izolirana proteina HF-RGD-His in HF-multiepitop-RGD-His smo dializirali proti 2 mM Na-fosfatu, zato da smo odstranili pufer PBS celični, ki bi zaradi prisotnih ionov lahko motil CD spekter. Nato smo s pomočjo aparature za merjenje cirkularnega dihiroizma (Chirascan CD spektrofotometer) izmerili CD spekter, na podlagi katerega lahko sklepamo o sekundarni strukturi proteina.

Spekter kaže tipičen vzorec za proteine v obliki α -vijačnice ter značilen vzorec večje eliptičnosti pri 208 nm kot pri 220 nm, kar je značilno za ovite vijačnice.



Slika 34: Določanje sekundarne strukture s CD spektroskopijo (cirkularni dihiroizem).

Sekundarno strukturo za proteina HF-RGD-His (leva slika) in HF-multiepitop-RGD-His (desna slika) smo določili s CD spektroskopijo. Proteina sta bila raztopljena v 2 mM Na-fosfatu s pH 7,5. Pri merjenju smo uporabili optično kiveto z 1 mm dolžine poti. Iz krivulje je razvidno, da je protein HF-RGD-His večinoma v obliki α -vijačnic, v manjši meri pa je prisotna tudi β -plošča. Tudi protein HF-multiepitop-RGD-His je v večji meri sestavljen iz α -vijačnic ter v manjši meri β -plošč, opazna pa je tudi prisotnost nedefiniranih struktur, ki so lahko posledica prisotnosti multiepitopa na C-končnem delu himernega flagelina.

4.3 TEST AKTIVACIJE SIGNALNE POTI PREKO RECEPTORJA TLR5 NA CELIČNIH LINIJAH

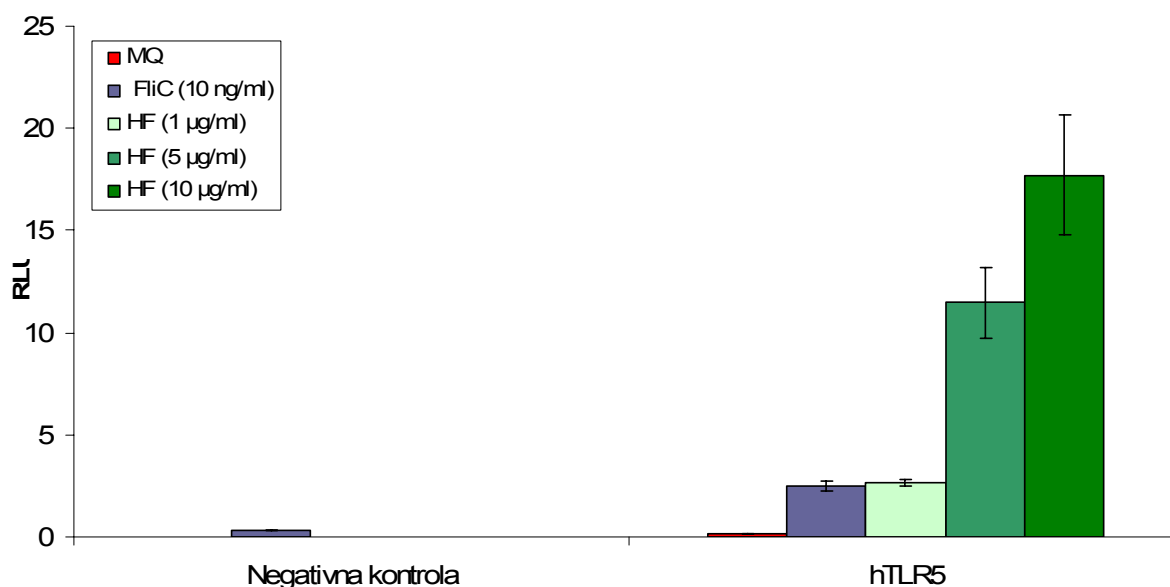
Aktivacijo signalne poti preko receptorja TLR5 smo preverjali na celičnih linijah HEK293, ki izražajo zelo majhne količine receptorjev TLR in imajo vse ostale funkcionalne proteine signalne poti. Aktivacijo smo preverjali z dvojnimi luciferaznimi testi. V celice smo transficirali plazmid z zapisom za humani receptor TLR5 ter plazmid z zapisom za Fluc, ki je pod inducibilnim promotorjem NF- κ B in plazmid z zapisom za Rluc, ki je pod konstitutivnim promotorjem. Vrednosti Fluc odražajo aktivacijo signalne poti TLR, vrednosti Rluc pa delež transficiranih celic. Iz razmerja vrednosti Fluc/Rluc dobimo informacijo o aktivaciji signalne poti. Višja kot je vrednost, močnejša je aktivacija signalne poti preko receptorja TLR5.

Aktivacija signalne poti preko receptorja TLR5 je predpogoj za kasnejšo aplikacijo proteina kot cepiva na testnih živalih. Zato smo pred cepljenjem mišk morali dokazati in potrditi sposobnost aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5 na celicah.

Kot negativno kontrolo smo celice HEK293, ki so izražale zelo majhne količine receptorja TLR5 (niso bile transficirane s plazmidom za zapis hTLR5), stimulirali s komercialno dostopnim flagelinom bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (FliC v končni koncentraciji 10 ng/ml). Dodatno kontrolo smo naredili še na celicah HEK293, ki so izražale receptor TLR5, pri čemer smo jih stimulirali z MQ (negativna kontrola) ali s komercialno dostopnim FliC v končni koncentraciji 10 ng/ml (pozitivna kontrola).

4.3.1 Vpliv izoliranega proteina himerni flagelin na aktivacijo signalne poti preko receptorja TLR5

Zanimalo nas je, ali je izoliran HF-RGD-His sposoben aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5. Za aktivacijo signalne poti sta pomembna N- in C-končna dela flagelina, medtem ko variabilni del nima vpliva. Himerni flagelin je sestavljen iz N- in C-končnega dela flagelina bakterije *E. coli*, ki aktivira signalno pot preko receptorja TLR5 in variabilnega dela flagelina bakterije *H. pylori*.

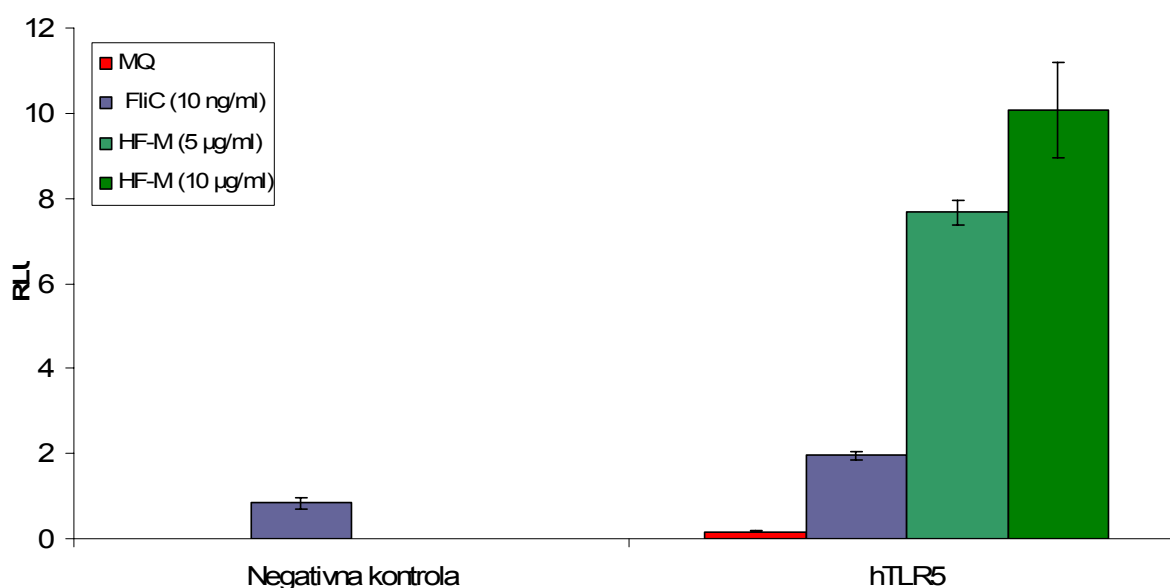


Slika 35: Test aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5 s himernim flagelinom (HF-RGD-His).

Na celičnih linijah HEK293 smo preverili sposobnost aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5 z izoliranim himernim flagelinom (na sliki označen s HF). Naredili smo dve negativni kontroli. V prvem primeru smo celice HEK293 transficirali s praznim plazmidom in jih stimulirali s komercialnim flagelinom bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (FlhC) v končni koncentraciji 10 ng/ml, v drugem primeru pa smo celice transficirali s plazmidom z zapisom za receptor hTLR5 in jih stimulirali z MQ. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili celice HEK293, transficirane s hTLR5 in stimulirane s komercialnim flagelinom FlhC v končni koncentraciji 10 ng/ml. Celice HEK293, ki so izražale receptor TLR5, smo stimulirali z naraščajočo koncentracijo (1, 5 in 10 µg/ml) izoliranega himernega flagelina.

4.3.2 Vpliv izoliranega proteina himerni flagelin-multiepitop na aktivacijo signalne poti preko receptorja TLR5

HF-multiepitop-RGD-His se od himernega flagelina razlikuje v vezanem multiepitopu na C-končnem delu. Preveriti smo želeli ali vezava dodatne funkcionalne skupine vpliva na aktivacijo signalne poti preko receptorja TLR5. Zato smo izvedli eksperiment na celičnih linijah HEK293, po prej opisanem postopku.

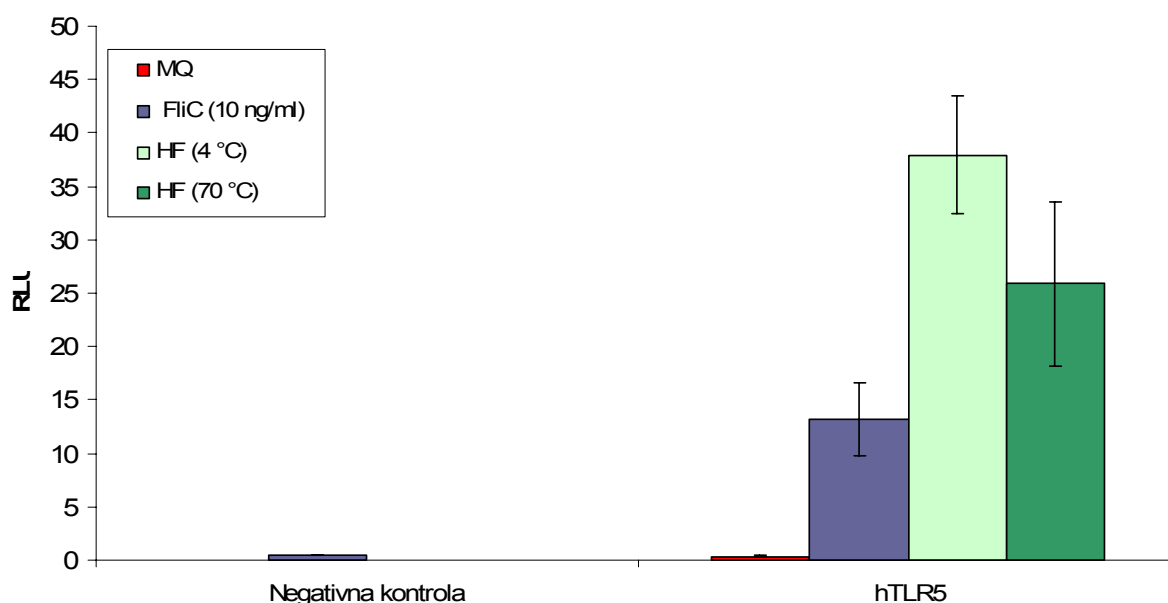


Slika 36: Test aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5 s proteinom himerni flagelin-multiepitop (HF-multiepitop-RGD-His).

Na celičnih linijah HEK293 smo preverili sposobnost aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5 z izoliranim himernim flagelinom z multiepitopom (na sliki označen s HF-M). Naredili smo dve negativni kontroli. V prvem primeru smo celice HEK293 transficirali s praznim plazmidom in jih stimulirali s komercialnim flagelinom bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (FliC), v končni koncentraciji 10 ng/ml. V drugem primeru smo celice transficirali s plazmidom z zapisom za receptor hTLR5 in jih stimulirali z MQ. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili celice HEK293, transficirane s hTLR5 in stimulirane s komercialnim flagelinom FliC v končni koncentraciji 10 ng/ml. Celice HEK293, ki so izražale receptor TLR5, smo stimulirali z naraščajočo koncentracijo (5 in 10 µg/ml) izoliranega himernega flagelina z multiepitopom.

4.3.3 Vpliv segrevanja izoliranih proteinov na sposobnost aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5

Flagelin lahko spontano polimerizira, kar lahko zmanjša aktivacijo signalne poti preko receptorja TLR5. Ker smo želeli preveriti, ali se v primeru izoliranega himernega flagelina pojavi polimerizacija, smo primerjali, kako dvajsetminutno segrevanje proteina pri 70 °C vpliva na sposobnost aktivacije signalne poti.

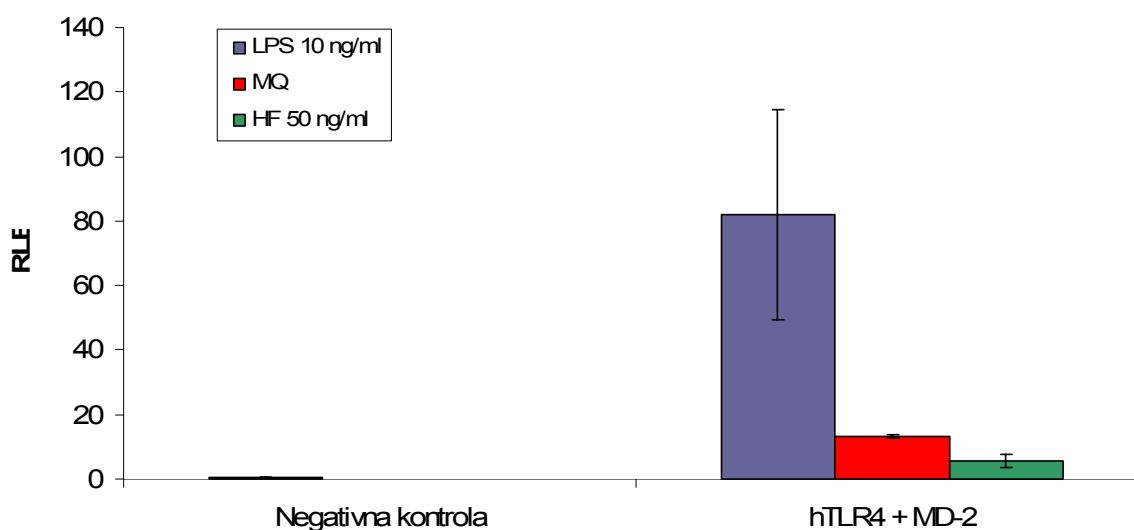


Slika 37: Test aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5 s segrevanim proteinom himerni flagelin (HF-RGD-His).

Testirali smo sposobnost aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5 za himerni flagelin, ki smo ga segrevali 20 minut pri 70 °C, v primerjavi s himernim flagelinom, ki smo ga hranili pri 4 °C. Celice smo stimulirali s himernim flagelinom, v končni koncentraciji 5 µg/ml. Naredili smo dve negativni kontroli. V prvem primeru smo celice HEK293 transficirali s praznim plazmidom in jih stimulirali s komercialnim flagelinom bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (FliC), v končni koncentraciji 10 ng/ml. V drugem primeru pa smo celice transficirali s plazmidom z zapisom za receptor hTLR5 in jih stimulirali z MQ. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili celice HEK293, transficirane s hTLR5 in stimulirane s komercialnim flagelinom FliC, v končni koncentraciji 10 ng/ml.

4.3.4 Določanje kontaminacije izoliranih proteinov z endotoksinom

Ker smo izolirane himerne flageline uporabili *in vivo* na miškah kot cepivo, smo želeli preveriti stopnjo kontaminacije z endotoksinom (LPS). Receptor TLR4 skupaj s proteinom MD-2 prepozna ligand endotoksin, ki aktivira signalno pot. Prisotnost endotoksina v izoliranih proteinih ni zaželjena, saj bi lahko sprožil močan vnetni odziv in sepso pri testnih živalih po aplikaciji.



Slika 38: Test aktivacije signalne poti preko receptorja TLR4, v kompleksu z MD-2, s proteinom himerni flagelin (HF-RGD-His).

Testirali smo sposobnost aktivacije signalne poti preko receptorja TLR4, v kompleksu z MD-2, za izolirani protein HF-RGD-His. Celice smo stimulirali s himernim flagelinom, v končni koncentraciji 50 ng/ml. Naredili smo dve negativni kontroli. V prvem primeru celice HEK293 nismo transficirali s plazmidom z zapisom za humani receptor TLR4 in MD-2, ampak smo jih le stimulirali s komercialnim LPS-om, v končni koncentraciji 10 ng/ml. V drugem primeru smo celice transficirali s plazmidom z zapisom za receptor hTLR4 in MD-2 ter jih stimulirali z MQ. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili celice HEK293, transficirane s hTLR4 in MD-2 ter stimulirane s komercialnim LPS-om, v končni koncentraciji 10 ng/ml.

4.4 IMUNSKI ODZIV NA MIŠKAH

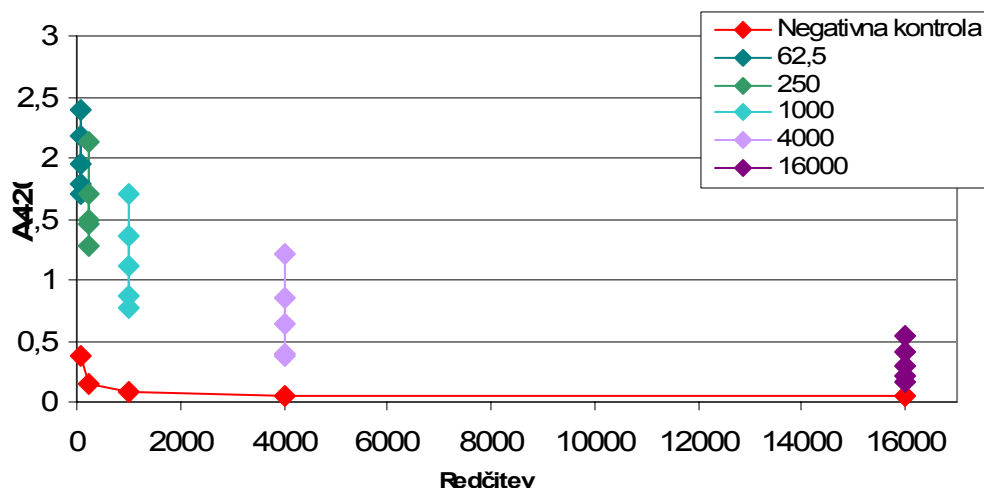
Vsi eksperimenti na poskusnih živalih so bili izvedeni pod strokovnim nadzorom prof. dr. Simona Horvata, ki je večino dela opravil ob pomoči Ane Lasič, študentke medicine. Pred začetkom eksperimenta smo s strani Veterinarske Uprave Republike Slovenije (VURS) in Etične komisije za poskuse na živalih pridobili potrebna ustrezna dovoljenja. Živali so bile nastanjene na Inštitutu za mikrobiologijo in imunologijo v Ljubljani.

Miške C57BL/6J smo intraperitonealno cepili z izoliranim proteinom HF-multiepitop-RGD-His. Protein je bil raztopljen v raztopini PBS celični (pH=7,4) z 10-odstotnim glicerolom ob dodatku aluminijevega hidroksida kot adjuvansa, v razmerju 1 : 2. Miške smo cepili dvakrat v zaporedju. Po treh tednih smo jim prvič vzeli kri, da bi preverili nastanek protiteles IgG v serumu.

4.4.1 ELISA test

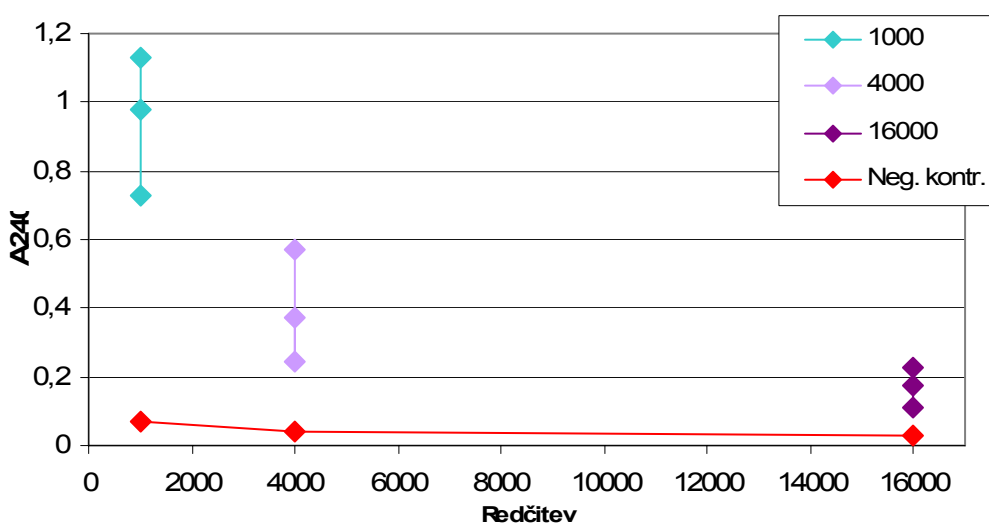
Dva tedna po prvem cepljenju smo miškam odvzeli kri iz repne vene, jo takoj centrifugirali in prenesli serum v svežo mikrocentrifugirko. V serumu smo nato preverjali nastanek IgG protiteles proti proteinu HF-multiepitop-RGD-His s testom ELISA. Na mikrotitrsko ploščo, primerno za ELISA test, smo vezali protein, spirali in blokirali ter v luknjice dodali serum. Če so bila v serumu prisotna IgG protitelesa, so se le-ta vezala na protein. Na vezana IgG protitelesa smo vezali sekundarna protitelesa, ki so bila označena s hrenovo peroksidazo. Ob dodatku substrata ABTS je prišlo do barvne reakcije, ki smo jo ovrednotili z merjenjem absorbance, pri valovni dolžini 405 nm.

Titer IgG protiteles smo preverili po 3 tednih in po 3 mesecih po zadnjem cepljenju.



Slika 39: Določanje IgG protiteles v serumu mišk C57BL/6J, cepljenih s proteinom HF- multiepitop-RGD-His stop z ELISA testom.

IgG protitelesa so nastala 3 tedne po zadnjem cepljenju. Miške so bile cepljene intraperitonealno z 100 µg proteina v končnem volumnu raztopine 300 µl. Kot adjuvans smo uporabili aluminijev hidroksid, v razmerju protein : AlOH = 2 : 1. Kot negativno kontrolo smo uporabili serum necepljene miške (vzorec smo dobili iz laboratorija na Rodici; Oddelek za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo). V skupini je bilo 5 mišk. Serum smo ustrezno redčili 62,5-krat, 250-krat, 1000-krat, 4000-krat in 16000-krat.



Slika 40: Določanje IgG protiteles v serumu mišk C57BL/6J cepljenih s proteinom himerni flagelin-multipitop-RGD-His stop z ELISA testom.

IgG protitelesa so nastala 3 mesece po zadnjem cepljenju. Miške so bile cepljene intraperitonealno z 100 µg proteina v končnem volumnu raztopine 300 µl. Kot adjuvans smo uporabili aluminijev hidroksid, v razmerju protein : AlOH = 2 : 1. Kot negativno kontrolo smo uporabili serum necepljene miške (vzorec smo dobili iz laboratorija na Rodici; Oddelek za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo). V skupini so bile 3 miške. Serum smo ustrezno redčili 1000-krat, 4000-krat in 16000-krat.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Flagelin je pomemben virulentni dejavnik bakterije *Helicobacter pylori* (Covacci in sod., 1999), ki za razliko od flagelinov večine enterobakterij, ne aktivira prirojene imunosti preko receptorja TLR5 (Amieva in sod., 2008). Prav tako je bakterija *H. pylori* razvila številne druge mehanizme, s katerimi se uspešno brani pred imunskim odzivom. Ker je prevalenca okužbe v svetovnem merilu zelo visoka, se raziskovalci trudijo, da bi razvili uspešno in učinkovito cepivo, ki bi zmanjšalo breme bolezni (Volland in sod., 2006; Ruggiero in sod., 2003). Prilagojenost bakterije na sobivanje s človekom otežuje razvoj vakcine, zato je potrebno poiskati nove poti pri razvoju cepiva, ki bi tarčno ciljale tako na aktivacijo prirojene imunosti (preko receptorjev TLR) kot tudi na aktivacijo pridobljene imunosti.

V diplomskem delu smo se osredotočili na modifikacije flagelina in pripravo rekombinantnih himernih flagelinov, ki bi bili sposobni aktivacije imunskega odziva.

5.1.1 Priprava ekspresijskih vektorjev

V diplomskem delu smo pripravili in uporabili dva vektorska konstrukta: pET19b-HF-RGD-His in pET19b-HF-multiepitop-RGD-His, ki se razlikujeta le v dodanem multiepitopu na C-končnem delu himernega flagelina. Oba konstrukta smo uporabili za izražanje in izolacijo proteinov v bakterijskih celicah ter z različnimi eksperimenti dokazali njun vpliv pri aktivaciji imunskega odziva.

Himerni flagelin (HF) je osnovni konstrukt, ki izkazuje tako lastnosti flagelina *E. coli* kot tudi lastnosti flagelina *H. pylori*. Zaradi prisotnosti N- in C-končnega predela flagelina bakterije *E. coli* je himerni flagelin sposoben aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5, kar smo dokazali na celičnih linijah HEK293, transficiranih s plazmidom za zapis humanega receptorja TLR5. Ker sam flagelin *H. pylori* ne aktivira signalne poti preko receptorja TLR5, deluje dodatek N- in C-končnega predela flagelina *E. coli* kot adjuvans, podobno kot kolera toksin ali temperaturno labilni toksin *E. coli* v mnogih cepivih, ki so že bila testirana na živalih. Prav zaradi njune prisotnosti in morebitnih stranskih učinkov

tovrstna cepiva niso primerna za aplikacije na ljudeh (Ruggiero in sod., 2003). Temu smo se izognili z uporabo flagelina kot adjuvansa, ki ne deluje kot toksin in posledično nima stranskih učinkov. Variabilna regija flagelina iz *H. pylori* naj bi predstavljala antigen, proti kateremu naj bi se po naših pričakovanjih tvorila protitelesa in bi imela zaščitno funkcijo pred okužbo z bakterijo *H. pylori*.

Podoben pristop priprave cepiva z uporabo flagelina kot adjuvansa so uporabili pri pripravi vakcine proti virusu zahodnega nila in virusu influence tipa A. V tem primeru so raziskovalci uporabili flagelin bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, ki je modelni flagelin za raziskave (McDonald in sod., 2007; Huleatt in sod., 2008; Nempont in sod., 2008).

V našem raziskovalnem delu smo namesto flagelina bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium uporabili flagelin bakterije *E. coli*, ki smo ga spremenili tako, da smo variabilno regijo zamenjali z variabilno regijo flagelina *H. pylori*. Ker variabilna regija ni vključena v aktivacijo signalizacije preko receptorjev TLR in ker je izpostavljena na površini proteina, se nam je zdela zamenjava variabilne regije dobra rešitev kako izdelati nov, v naravi nepoznan flagelin, ki bi bil sposoben aktivacije signalne poti preko receptorjev TLR5, hkrati pa bi nosil antigenske lastnosti flagelina bakterije *H. pylori*, proti kateri smo želeli izdelati varno in učinkovito cepivo.

Ker smo želeli še dodatno povečati učinkovitost cepiva, smo pripravili umetno sintetiziran gen imenovan multiepitop, ki kodira epitope iz treh različnih proteinov (ureaza B, adhezin A in vakuolirajoč citotoksin A), ki so pomembni virulentni dejavniki bakterije *H. pylori*. Na ta način smo ciljali na štiri različne antigene bakterije *H. pylori*: flagelin, ureazo B, adhezin A in vakuolirajoč citotoksin A. Multiepitop smo vezali na C-končni del himernega flagelina.

Cepivo smo dodatno izboljšali z vezavo tripeptida RGD, sestavljenega iz aminokislin arginina, glicina in asparaginske kisline. Motiv RGD omogoča vezavo proteina na specifične celične receptorje in tako poveča internalizacijo proteinov in imunogenost proteina (Yano in sod., 2003). Motiv RGD imajo tudi nekateri ekstracelularni proteini kot

so vitronektin, fibrinogen in laminin, ki se vežejo na integrine (Plow in sod., 2000). Funkcionalnost RGD motiva nismo posebej preizkušali.

Sestavni del proteinov je bil tudi histidinski rep (označen s His), sestavljen iz 6 histidinov, ki omogočajo izolacijo in čiščenje proteinov na Ni-NTA koloni.

Ustreznost DNK zaporedja pripravljenih konstruktov smo potrdili s kontrolnimi restrikcijami in z določanjem nukleotidnega zaporedja, ki je ustrezalo predpostavljenim.

5.1.2 Izolacija himernih flagelinov

Himerni flagelin je umetno sestavljen protein, ki združuje lastnosti različnih proteinov. Na podlagi znanega aminokislinskega zaporedja smo za posamezni protein določili teoretične lastnosti (velikost proteina, izoelektrično točko, ekstincijski koeficient), ki so nam kasneje pomagale pri izolaciji proteina in pri njegovem dokazovanju. Ker je himerni flagelin sestavljen iz N- in C-končnega dela flagelina *E. coli* in variabilne regije flagelina *H. pylori*, smo sklepali, da bo himerni flagelin imel podobne lastnosti kakor flagelin bakterije *E. coli*.

Rekombinantna proteina HF-RGD-His in HF-multiepitop-RGD-His smo pripravili v bakteriji *E. coli* BL21[DE3]pLysS z uporabo ekspresijskega sistema pET19b. Izolacije proteinov smo se lotili na dva različna načina, saj smo ugotovili, da se je protein HF-RGD-His nahajal pretežno v netopni obliki, v inkluzijskih telescih, medtem ko se je protein HF-multiepitop-RGD-His nahajal v topni obliki, v citosolu.

Protein HF-RGD-His smo izolirali iz raztopljenih inkluzijskih telesc (v 8 M urei), ki smo jih nanесли na Ni-NTA sefarozo, pri čemer smo, zaradi nepravilno zvite oblike proteina, vključili stopnjo, pri kateri smo protein s postopnim zmanjševanjem koncentracije uree ponovno zvili na koloni. Ta stopnja je bila ključna, saj je le pravilno zvit protein sposoben aktivirati signalno pot preko receptorja TLR5.

Za protein HF-RGD-His smo ugotovili, da se iz kolone spira pri 250 mM koncentraciji imidazola (slika 27). Na SDS-PAGE gelu, obarvanem z barvilom Coomassie modro so poleg lise na ustrezni višini 55 kDa, prisotne še nečistoče (slika 27). Zato smo pred elucijo

z 250 mM imidazolom uvedli še dodatno spiranje kolone s pufrom s 100 mM koncentracijo imidazola (pufer IV za spiranje kolone). Z vmesno stopnjo smo tako zmanjšali količino nečistoč (slika 28), ki bi sicer lahko motile nadaljnje eksperimente. Iz slike 28 je razvidno, da smo izolirali protein s čistostjo več kot 90 %. Protein HF-RGD-His smo potrdili tudi s prenosom Western (slika 29), ki je bolj specifična metoda kakor SDS-PAGE. Pri tem smo uporabili tetrahistidinska primarna protitelesa, ki prepoznavajo štiri histidine v histidinskem repu.

Izolacijo proteina HF-multiepitop-RGD-His smo izvedli s tekočinsko kromatografijo, ki omogoča stalen pretok pufov in vzpostavitev gradienta. Dobljene frakcije (slika 30) smo nanegli na SDS-PAGE gel (slika 31) in dokazali, da se protein nahaja večinoma v frakcijah od 3 do vključno 6, pri čemer frakcija 3 vsebuje še nekaj nečistoč. Nečistoče so bile prisotne tudi pri frakciji 5 in 6, na višini 28 kDa. Ker je bilo v primeru frakcije 3 nečistoče težje odstraniti zaradi podobne velikosti z našim proteinom, smo pri nadaljnjem delu uporabili le frakcije 4, 5 in 6, pri čemer smo frakciji 5 in 6 še dodatno očistili z gelsko kromatografijo (slika 32). Za primerjavo učinkovitosti čiščenja smo vzorce nanegli na SDS-PAGE gel in ugotovili, da so bile pred čiščenjem prisotne nečistoče na višini 28 kDa, po čiščenju pa teh nečistoč ni bilo več (slika 33). Na podlagi SDS-PAGE gela lahko sklepamo o več kot 90-odstotni čistosti izoliranega proteina.

Proteina HF-multiepitop-RGD-His nismo uspeli dokazati s prenosom Western, kljub številnim ponovitvam. Ker pa je bila lisa na SDS-PAGE gelu vedno na pravi višini, smo sklepali, da se je histidinski rep med izolacijo verjetno odcepil in posledično tetrahistidinska protitelesa niso več prepoznala vezavnega mesta na proteinu HF-multiepitop-RGD-His.

Ker se himerni flagelin razlikuje od sicer v naravi znanih flagelinov, nas je zanimala sekundarna struktura, ki smo jo določili s pomočjo cirkularnega dihiroizma. Iz slike 34 je razvidno, da sta se sekundarni strukturi za protein HF-RGD-His in HF-multiepitop-RGD-His nekoliko razlikovali, kar lahko pripišemo vezanemu multiepitopu na C-končnem delu himernega flagelina.

V obeh primerih je protein pretežno v obliki α -vijačnic, kar je posledica prisotnosti C- in N-končnega dela flagelina *E. coli*, v manjši meri pa je prisotna tudi β -plošča, ki jo tvori variabilna regija. Multiepitop se zelo verjetno zvije v sferično strukturo, saj ga sestavljajo manjši segmenti različnih proteinov.

5.1.3 Test aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5 na celičnih linijah

Sposobnost aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5 za proteina HF-RGD-His in HF-multiepitop-RGD-His smo preverjali na celičnih linijah HEK293. Izolirane himerne flageline smo pred stimulacijo celic vedno centrifugirali, zato da smo odstranili oborino, ki bi sicer lahko motila meritev. Delež proteinov se je oboril ne glede na to, ali smo proteine shranjevali pri 4 °C ali pri - 20 °C.

Eksperimenti na celičnih linijah so pokazali, da proteina HF-RGD-His in HF-multiepitop-RGD-His aktivirata signalno pot, pri čemer je HF-RGD-His stop aktiviral močnejše kakor HF-multiepitop-RGD-His (slika 35 in slika 36). Boljša aktivacija v primeru proteina HF-RGD-His v primerjavi z HF-multiepitop-RGD-His je verjetno posledica vezave multiepitopa na C-končnem delu himernega flagelina, kar vpliva na strukturo proteina in posledično slabšo aktivacijo.

Za aktivacijo so bile potrebne 100-krat višje koncentracije izoliranega proteina v primerjavi s komercialno dostopnim flagelinom bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (FliC). Aktivacija je bila primerljiva med 10 ng/ml komercialno dostopnega flagelina in 1 μ g/ml izoliranega proteina (slika 35). Na aktivacijo bi lahko vplivalo dejstvo, da je himerni flagelin umetno pripravljen protein, ki ga v naravi ne najdemo in posledično težko primerjamo njegove lastnosti s komercialno dostopnim flagelinom FliC, saj lahko že manjše spremembe v sekundarni strukturi vplivajo na sposobnost aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5. Prav tako smo himerni flagelin pripravili iz C- in N-končnega dela flagelina *E. coli*, ki naj bi aktivirala signalno pot, medtem ko je kontrolni flagelin bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium izoliran iz celičnih linij HEK293. Da bi ugotovili ali je razlika posledica različnih flagelinov, bi bilo potrebno narediti še eksperimente pri katerih bi primerjali aktivacijo izoliranega flagelina iz bakterije *E. coli* z izoliranimi himernimi flagelini.

Na aktivacijo signalne poti lahko vpliva tudi dejstvo, da je komercialno dostopen flagelin v zelo čisti obliki in raztopljen v MQ. Izolirani himerni flagelini pa lahko vsebujejo nečistoče v sledih, kar lahko posledično vpliva na slabšo aktivacijo. Ali so za slabšo aktivacijo krive nečistoče oziroma postopek izolacije proteina, bi lahko preverili tako, da bi v bakterijskih celicah izražali flagelin bakterije *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in ga izolirali po enakem postopku kakor smo izolirali himerni flagelin. Na celičnih linijah bi nato primerjali sposobnost aktivacije signalne poti za komercialno dostopen FliC in izoliran FliC.

Zaslediti je tudi nizko aktivacijo signalne poti preko receptorja TLR5 v primeru, ko celice HEK293 niso bile transficirane s plazmidom z zapisom za hTLR5, so pa bile stimulirane s FliC. To lahko razložimo z dejstvom, da celice HEK293 v majhni meri same izražajo receptor TLR5, kar posledično vodi do aktivacije signalne poti.

Flagelin lahko spontano polimerizira, kar zmanjša njegovo sposobnost aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5. Pot aktivacije TLR5 signalne poti s flagelinom še ni popolnoma pojasnjena, ampak domneva se, da so za aktivacijo potrebne monomerne podenote flagelina, medtem ko celotne flagele niso sposobne aktivacije. Polimerizacijo flagelina lahko preprečimo s segrevanjem. Želeli smo ugotoviti ali segrevanje himernih flagelinov vpliva na aktivacijo signalne poti, zato smo protein HF-RGD-His stop segrevali 20 minut pri 70 °C. Na celičnih linijah HEK293 smo primerjali sposobnost aktivacije signalne poti za protein, ki smo ga segrevali s proteinom, ki smo ga hranili pri 4 °C (slika 37). Ugotovili smo, da segrevanje ni povečalo aktivacije signalne poti, temveč se je aktivacija celo znižala v primerjavi s proteinom, ki smo ga hranili pri 4 °C. Slabša aktivacija v primeru segrevanja proteina bi lahko bila posledica denaturacije monomernih podenot flagelina, ki posledično niso več aktivirale signalne poti. S tem eksperimentom smo ugotovili, da ni nujno segrevanje pred vsakim testiranjem himernih flagelinov na celičnih linijah.

Ker smo želeli preveriti tudi kontaminacijo izoliranih proteinov z endotoksinom (LPS), smo naredili eksperiment na celičnih linijah HEK293, transficiranih s plazmidom z zapisom za humani TLR4 ter plazmidom z zapisom za protein MD-2, ki skupaj s TLR4

prepoznava prisotnost LPS-a (slika 38). Celice smo stimulirali z izoliranim proteinom HF-RGD-His v končni koncentraciji 50 ng/ml in ugotovili, da kljub 5-krat povišani koncentraciji izoliranega flagelina v primerjavi s kontrolo (LPS v končni koncentraciji 10 ng/ml) ni aktiviral signalne poti preko receptorja TLR4, v kompleksu s proteinom MD-2. Odsotnost endotoksina v izoliranih flagelinih je pomembna predvsem zaradi uporabe proteinov kot cepiva na testnih živalih, pri katerih bi lahko, v primeru prevelike količine slednjega, prišlo do nastanka vnetne reakcije ali celo septičnega šoka.

5.1.4 Imunski odziv na miškah

Protein HF-multiepitop-RGD-His stop smo testirali tudi *in vivo* na poskusnih miškah (sev C57BL/6J). Učinkovitost proteinskega cepiva smo testirali z intraperitonealno aplikacijo proteina, pri čemer smo kot adjuvans uporabili aluminijev hidroksid. Kljub uporabi TLR5 liganda (flagelina) smo uporabili tudi aluminijev hidroksid, ki je zelo močan in učinkovit adjuvans v proteinskih cepivih, saj smo želeli vzpodbuditi močan imunski odziv. Da bi ugotovili, kolikšen je prispevek adjuvansa k aktivaciji imunskega odziva na miškah, bi morali testirati še uporabo proteina HF-multiepitop-RGD-His stop brez dodanega aluminijevega hidroksida, kar bo izvedeno v nadaljnjih eksperimentih.

Prve vzorce serumov smo z ELISA testi preverili že po treh tednih po zadnjem cepljenju in dobili vzpodbudne rezultate. Titri IgG protiteles so bili povišani v primerjavi s kontrolno skupino mišk, ki ni bila cepljena, kar kaže na imunski odziv mišk na cepivo. Po treh mesecih smo ponovno preverili titre IgG protiteles v serumu mišk, ki so bili prav tako povišani v primerjavi s kontrolo, vendar so bili titri IgG nižji kot v serumu, odvzetem po treh tednih. Možen vzrok je starost mišk, kar vpliva na imunski odziv in tvorbo protiteles. Za bolj natančne rezultate bi bilo potrebno pogosteje in v določenih intervalih zbirati serume in ugotavljati titre IgG proteiteles.

Izolirani HF-multiepitop-RGD-His je dal na miškah obetavne rezultate, ki kažejo na aktivacijo imunskega odziva, saj smo potrdili porast titra IgG protiteles v miškah, cepljenih s proteinom v primerjavi s kontrolno skupino. Sledi še ponovitev eksperimentov za protein HF-RDG-His in primerjava učinkovitosti v primerjavi s proteinom HF-multiepitop-RGD-His.

Bolj kot porast titra IgG protiteles je pomembna zaščitna vloga cepiva, ki jo bomo ugotavljali tako, da bomo cepljene miške okužili z bakterijo *H. pylori* in spremljali padec oziroma porast kolonizacije želodca z omenjeno bakterijo.

5.2 SKLEPI

- Pripravili smo vektorska konstrukta pET19b-HF-RGD-His-stop in pET19b-HF-multiepitop-RGD-His-stop.
- Po izražanju v bakterijskih celicah smo ugotovili, da se protein HF-RGD-His nahaja v inkluzijskih telescih v netopni obliki.
- Protein HF-multiepitop-RGD-His se je po izražanju v bakterijskih celicah nahajal v topni obliki, zato smo ga izolirali iz citosolne frakcije celic.
- Izolirali smo več miligramov rekombinantnih proteinov HF-RGD-His in HF-multiepitop-RGD-His s čistostjo več kot 90 % in brez kontaminacije z endotoksinom. Taka proteina bosta uporabna kot proteinsko cepivo v predkliničnih raziskavah.
- Oba proteina smo dokazali s SDS-PAGE, medtem ko smo s prenosom Western dokazali le HF-RGD-His.
- Na celičnih linijah HEK293 smo dokazali aktivacijo signalne poti preko receptorja TLR5 za HF-RGD-His in HF-multiepitop-RGD-His.
- Na celicah HEK293 smo pokazali, da dvajsetminutno segrevanje proteina HF-RGD-His pri 70 °C, ni povečalo aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5.
- Na celičnih linijah HEK293, transficiranih s hTLR4 in MD-2, smo pokazali, da izolirani protein HF-RGD-His ni kontaminiran z endotoksini in je posledično primeren za aplikacijo *in vivo* na miškah.
- Pri testiranju *in vivo* smo dokazali povišane titre IgG protiteles v primerjavi s kontrolno skupino v serumu cepljenih mišk, po treh tednih in tudi po treh mesecih.

6 POVZETEK

Bakterija *Helicobacter pylori* je močno razširjena bakterija, ki okužuje preko 50 % svetovnega prebivalstva. Pri večini okuženih poteka okužba asimptomatsko in bakterija ne povzroča težav, v manjši meri pa lahko pride do vnetja želodčne sluznice, rane na želodcu in dvanajsterniku ter celo raka na želodcu. Skozi stotisočletja sobivanja s človekom se je *H. pylori* evolucijsko prilagodila in razvila številne mehanizme s pomočjo katerih se uspešno izmika prepoznavanju imunskega sistema. Med te mehanizme sodi tudi sprememba flagelina v takšni meri, da le-ta ne aktivira signalne poti preko receptorja TLR5.

Imunski sistem se sicer odzove na okužbo s *H. pylori*, vendar je odziv prešibak, zaradi česar lahko bakterija brez zdravljenja trajno kolonizira želodčno sluznico. Zdravljenje okužbe poteka s kombinacijo dveh različnih antibiotikov in inhibitorja protonske črpalke. Vendar zdravljenje ne prepreči nove okužbe, ima številne stranske učinke in predstavlja veliko finančno breme za zdravstveno blagajno. Zato se številni raziskovalci trudijo razviti uspešno in učinkovito cepivo proti bakteriji *H. pylori*, vendar do danes še ne poznamo takšnega cepiva.

V diplomskem delu smo se osredotočili na razvoj in pripravo proteinov, ki bi hkrati aktivirali prirojeni in pridobljeni imunski odziv proti bakteriji *H. pylori*. Aktivacija prirojenega imunskega odziva poteka preko receptorjev TLR. Kot agonist smo izbrali flagelin, ki aktivira signalno pot preko receptorja TLR5. Ker flagelin bakterije *H. pylori* ne aktivira signalne poti preko receptorja TLR5, smo izbrali flagelin bakterije *E. coli*, za katerega je znano, da je sposoben aktivacije signalne poti.

Znano je, da sta pri signalizaciji preko receptorjev TLR pomembna N- in C-končna dela flagelina, medtem ko variabilna regija ni vključena v signaliziranje ampak je pomembna pri določevanju antigenih lastnosti flagelina. Z molekularno biološkimi metodami smo pripravili nov flagelin, ki smo ga poimenovali himerni flagelin in je bil sestavljen iz N- in C-končnih delov flagelina bakterije *E. coli* ter variabilne regije flagelina *H. pylori*. Ker pa smo želeli še dodatno povečati zaščito pred bakterijo *H. pylori*, smo na pripravljen himerni flagelin vezali antigeni multiepitop, ki je umetno pripravljen oligopeptid iz epitopov treh različnih virulenčnih dejavnikov.

Predpostavili smo, da bosta himerni flagelin in himerni flagelin z multiepitopom sposobna aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5, hkrati pa bosta zaradi prisotnosti variabilne regije in vezanega multiepitopa imela antigenske lastnosti bakterije *H. pylori*.

Himerna flagelina smo pripravili in izolirali iz bakterijskih celic vrste *E. coli*. Po dokazovanju in čiščenju izoliranih proteinov, smo le-te testirali na celičnih kulturah HEK293 transficiranih s plazmidom z zapisom za hTLR5. Potrdili smo, da sta izolirana himerna flagelina sposobna aktivacije signalne poti preko receptorja TLR5.

Ker pa smo želeli testirati še imunogene lastnosti proteina, smo eksperimente izvedli *in vivo* na testnih miškah, ki smo jih cepili s himernim flagelinom z multiepitopom. Po odvzemu krvi smo ugotovili povišan titer IgG protiteles v serumu cepljenih mišk v primerjavi z necepljenimi.

Pridobljeni rezultati imajo velik pomen pri razvoju tehnološko naprednega sintetičnega cepiva proti bakteriji *H. pylori*. V kolikor bi se cepivo izkazalo za varno in učinkovito tako na živalih kot tudi v kliničnih testiranjih, bi lahko predstavljalo novo orožje v boju proti zelo razširjeni bakteriji *Helicobacter pylori*. S sistemskim cepljenjem bi lahko okužbo močno omejili ali jo celo iztrebili.

7 VIRI

- Ables A.Z., Simon I., Meltone E.R. 2007. Update on *Helicobacter pylori* treatment. American Academy of Family Physicians, 75: 351-358
- Agarwal K., Agarwal S. 2008. *Helicobacter pylori* vaccine: from fast to future. Mayo Clinic Proceedings, 83, 2: 169-175
- Akhiani A.A., Schön K., Franzén L.E., Pappo J., Lycke N. 2004. *Helicobacter pylori*-Specific antibodies impair the development of gastritis, facilitate bacterial colonization, and counteract resistance against infection. Journal of Immunology, 172: 5024–5033
- Akira S., Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. Nature Reviews. Immunology, 4: 499–511
- Akira S., Uematsu S., Takeuchi O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. Cell, 124, 4: 783–801
- Alm R.A., Ling L-S.L., Moir D.T., King B.L., Brown E.D., Doig P.C., Smith D.R., Noonan B., Guild B.C., de Jonge B.L., Carmel G., Tummino P.J., Caruso A., Uria-Nickelsen M., Mills D.M., Ives C., Gibson R., Merberg D., Mills S.D., Jiang Q., Taylor D.E., Vovis G.F., Trust T.J. 1999. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. Nature, 14, 397: 176-180
- Amieva M.R., El-Omar E.M. 2008. Host-bacterial interactions in *Helicobacter pylori* infection. Reviews in Basic and Clinical Gastroenterology, 134: 306-323
- Andersen L.P. 2007. Colonization and infection by *Helicobacter pylori* in humans. Helicobacter, 12, 2: 12–15
- Andersen-Nissen E., Smith K.D., Strobe K.L., Rassouljian Barrett S.L., Cookson B.T., Logan S.M., Aderem A. 2005. Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102, 26: 9247–9252

- Anderson K.V., Jürgens G., Nüsslein-Volhard C. 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: Genetic studies on the role of the *Toll* gene product. *Cell*, 42, 3: 779–789
- Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. 2002. Short protocols in molecular biology. 5th ed. New York, John Wiley and Sons: 1512 str.
- Baldari C.T., Lanzavecchia A., Telford J.L. 2005. Immune subversion by *Helicobacter pylori*. *Trends in Immunology*, 26, 4: 199-207
- Bumann D., Jungblut P.R., Meyer T.F. 2004. *Helicobacter pylori* vaccine development based on combined subproteome analysis. *Proteomics*, 4: 2843–2848
- BVTech plasmid. 2009. Plasmid map of pET-19b. Seattle, BVTech plasmid <http://www.biovisualtech.com/bvplasmid/pET-19b.htm> (avgust, 2009): 1-1
- Campylobacter pylori* becomes *Helicobacter pylori*. 1989. *Lancet*, 2: 1019-1020
- Carlsohn E., Nyström J., Bölin I., Carol L., Nilsson C.L., Svennerholm A.M. 2006. HpaA is essential for *Helicobacter pylori* colonization in mice. *Infection and Immunity*, 2006, 74, 2: 920–926
- Ciglič M. 2007. Vpliv sprememb proteina MyD88 na signalizacijo Tollu-podobnih receptorjev. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 80 str.
- Chaplin D. 2006. Overview of the human immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 2, Suppl 2: S430-S435
- Covacci A., Telford J.L., Giudice G.D., Parsonnet J., Rappuoli R. 1999. *Helicobacter pylori* virulence and genetic geography. *Science*, 284: 1328- 1333
- de la Barrera S., Alemán M., Sasiain M. del C. 2006. Toll-Like receptors in human infectious diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 12: 4173-4184

- Dempsey P.W., Vaidya S.A., Cheng G. 2003. The Art of War: Innate and adaptive immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60: 2604–2621
- Dhar S.K., Soni R.K., Das B.K., Mukhopadhyay G. 2003. Molecular mechanism of action of major *Helicobacter pylori* virulence factors. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 253: 207–215
- Eaton K.A., Suerbaum S., Josenhans C., Krakowka S. 1996. Colonization of gnotobiotic piglets by *Helicobacter pylori* deficient in two flagellin genes. *Infection and Immunity*, 64: 2445–2448
- Ebiotrade. 2009. pHRL-TK vector, China. EbioTrade
<http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/Promega/2868vaw4.gif> (avgust, 2009): 1-1
- Feuillet V., Medjane S., Mondor I., Demaria O., Pagni P.P., Gala'n J.E., Flavell R.A., Alexopoulou L. 2006. Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 33: 12487–12492
- Galkin V.E., Yu X., Bielnicki J., Heuser J., Ewing C.P., Guerry P., Egelman E.H. 2008. Divergence of quaternary structures among bacterial flagellar filaments. *Science*, 320, 5874: 382-385
- Gewirtz A.T., Yu Y., Krishna U.S., Israel D.A., Lyons S.L., Peek R.M. 2004. *Helicobacter pylori* flagellin evades Toll-like receptor 5-mediated innate immunity. *Journal of Infectious Diseases*, 189: 1914–1920
- Gregory S.H., Wing E.J. 2002. Neutrophil-Kupffer cell interaction: a critical component of host defenses to systemic bacterial infections. *Journal Of Leukocyte Biology*, 72: 239–248

- Hayashi F., Smith K.D., Ozinsky A., Hawn T.R., Yi E.C., Goodlett D.R., Eng J.K., Akirak S., Underhill D.M., Aderem A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410: 1099-1103
- Honko A.N., Mizel S.B. 2005. Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunologic Research*, 33, 1: 83–101
- Huleatt J.W., Jacobs A.R., Tang J., Desai P., Kopp E.B., Huang Y., Song L., Nakaar V., Powell T.J. 2007. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine*, 25: 763–775
- Huleatt J.W., Nakaar V., Desai P., Huang Y., Hewitt D., Jacobs A., Tang J., McDonald W., Song L., Evans R.K., Umlauf S., Tussey L., Powell T.J. 2008. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*, 26: 201-214
- IARC 1994. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, IARC - International Agency for Research on Cancers. World Health Organization, 61: 270 str.
- Incidenca raka v Sloveniji 2006. 2009. Ljubljana, Register raka Republike Slovenije. Onkološki inštitut Ljubljana
http://www.onko-i.si/uploads/LP_2006.pdf (junij, 2009): 76 str.
- Invivogen. 2009. pUNO-hTLR5, San Diego, Invivogen
http://www.invivogen.com/PDF/pUNO-hTLR5_TDS.pdf (avgust, 2009): 4 str.
- Janeway C.A. Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 54, 1:1-13

Janeway C.A. Jr, Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annual Review Of Immunology*, 20: 197–216

Kabir S. 2007. The current status of *Helicobacter pylori* vaccines: A review. *Helicobacter*, 12: 89-102

Kaisho T. 2007. Elucidating the mechanism behind immunity using dendritic cells. Hirose, Riken Research (avgust, 2007)
<http://www.rikenresearch.riken.jp/frontline/303/> (avgust, 2009): 1-1

Kapsenberg M.L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews. Immunology*, 3: 984-993

Lee S.K., Stack A., Katzowitsch E., Aizawa S.I., Suerbaum S., Josenhans C. 2003. *Helicobacter pylori* flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes and Infection*, 5: 1345–1356

Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.M., Hoffmann J.A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86, 6: 973-983

Lightfield K.L., Persson J., Brubaker S.W., Witte C.E., von Moltke J., Dunipace E.A., Henry T., Sun Y-H., Cado D., Dietrich W.F., Monack D.M., Tsolis R.M., Vance R.E. 2008. Critical function for Naip5 in inflammasome activation by a conserved carboxy-terminal domain of flagellin. *Nature Immunology*, 9, 10: 1171-1178

McDonald W.F., Huleatt J.W., Foellmer H.G., Hewitt D., Tang J., Desai P., Price A., Jacobs A., Takahashi V.N., Huang Y., Nakaar V., Alexopoulou L., Fikrig E., Powell T.J. 2007. A West Nile virus recombinant protein vaccine that co-activates innate and adaptive immunity. *Journal Of Infectious Diseases*, 195: 1607-1617

Medzhitov R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews. Immunology*. 1: 135–145

Medzhitov R., Janeway C.A. Jr. 1997. Innate immunity: the virtues of an nonclonal system of recognition. *Cell*, 91: 295-298

Miao E.A., Alpuche-Aranda C.M., Dors M., Clark A.E., Bader M.W., Miller S.I., Aderem A. 2006. Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1b via Ipaf. *Nature Immunology*, 7, 6: 569-575

Middlebury College. 2009. *Helicobacter pylori*. Vermont, Middlebury College.
http://s99.middlebury.edu/BI330A/STUDENTS/KASSIS/kassis/helicobacter_pylori.htm (avgust, 2009): 1-1

Mosmann T.R., Coffman R.L. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Advanced Immunology*; 46: 145-173

Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. 2005. *Medical Microbiology*. 5th ed. Philadelphia, Elsevier MOSBY: 963 str.

Nempont C., Cayet D., Rumbo M., Bompard C., Villeret V., Sirard J-C. 2008. Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *Journal Of Immunology*, 181, 3: 2036–2043

Nobel prize in physiology or medicine 2005. 2005. Stockholm, Nobel prize organization.

http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2005/press.html (junij, 2009): 3 str.

Palucka K., Banchereau J. 1999. Dendritic cells: A link between innate and adaptive immunity. *Journal of Clinical Immunology*, 19, 1: 12-25

- Prinz C., Hafsi N., Volland P. 2003. *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. Trends in Microbiology, 11, 3: 134-138
- Rad R., Ballhorn W., Volland P., Eisenächer K., Mages J., Rad L., Ferstl R., Lang R., Wagner H., Schmid R.M., Bauer S., Prinz C., Kirschning C.J., Krug A. 2009. Extra- and intracellular pattern recognition receptors cooperate in the recognition of *Helicobacter pylori*. Gastroenterology, 136, 7, 2247-2257
- Ramos H.C., Rumbo M., Sirard J.C. 2004. Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. Trends in Microbiology, 12, 11: 509-517
- Registry of standard biological parts. 2004. Part:pSB1AK3. Cambridge, Registry of standard biological parts.
http://www.partsregistry.org/Image:PsB1AK3_map.jpg (avgust, 2009): 1-1
- Romagnani S. 1991. Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more. Immunology Today, 12: 256-257
- Ruggiero P., Peppoloni S., Rappuoli R., Del Giudice G. 2003. The quest for a vaccine against *Helicobacter pylori*: how to move from mouse to man? Microbes and Infection, 5: 749-756
- Skene C.D., Doidge C., Sutton P. 2008. Evaluation of ISCOMATRIX™ and ISCOM™ vaccines for immunisation against *Helicobacter pylori*. Vaccine, 26: 3880-3884
- Tomb J.F., White O., Kerlavage A.R., Clayton R.A., Sutton G.G., Fleischmann R.D., Ketchum K.A., Klenk H.P., Gill S., Dougherty B.A., Nelson K., Quackenbush J., Zhou L., Kirkness E.F., Peterson S., Loftus B., Richardson D., Dodson R., Khalak H.G., Glodek A., McKenney K., Fitzgerald L.M., Lee N., Adams M.D., Hickey E.K., Berg D.E., Gocayne J.D., Utterback T.R., Peterson J.D., Kelley J.M., Cotton M.D., Weidman J.M., Fujii C., Bowman C., Watthey L., Wallin E., Hayes W.S.,

- Borodovsky M., Karp P.D., Smith H.O., Fraser C.M., Venter J.C. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*, 388: 539-547
- van Duynhoven Y.T.H.P, de Jonge R. 2001. Transmission of *Helicobacter pylori* : a role for food? *Bulletin of the World Health Organization*, 79: 455–460
- Voland P., Zeitner M., Hafsi N., Prinz C.. 2006. Human immune response towards recombinant *Helicobacter pylori* urease and cellular fractions. *Vaccine*, 24: 3832-3839
- Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1. izdaja. Ljubljana. DZS: 551 str.
- Wack A., Rappuoli R. 2005. Vaccinology at the beginning of the 21st century. *Current Opinion in Immunology*, 17: 411–418
- Warren, J.R., Marshall B.J. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet*, 1: 1275
- WHO. 2009. Cancer. Geneva, WHO-World Health Organization.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (junij, 2009): 297 str.
- Wilson K.T., Crabtree J.E. 2007. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology*, 133: 288-308

ZAHVALA

Somentorju prof. Romanu Jerali se zahvaljujem, ker mi je omogočil opravljanje diplomskega dela v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu ter za številne nasvete in ideje tekom dela. Hvala tudi za izredno hiter in natančen pregled diplomske naloge.

Karolini Ivičak se zahvaljujem za podporo in pomoč ter za vso potrpežljivost in neprecenljive nasvete pri laboratorijskem delu in pri pisanju diplome. Res si najboljša mentorica in prijateljica.

Zahvaljujem se tudi Robertu Bremšku, ki me je vpeljal v svet proteinov in mi pokazal, da znajo biti zelo zanimivi ter hvala za vso dobro voljo in motivacijo v trenutkih, ko ni šlo vse po načrtih.

Zahvaljujem se tudi prof. Simonu Horvatu, ki je opravil večino dela na miškah ter z dobro voljo vedno poskrbel za prijetno vzdušje.

Mentorici prof. dr. Darji Žgur Bertok se zahvaljujem za hiter, natančen in kritičen pregled diplomske naloge.

Prof. dr. Alojzu Ihanu se zahvaljujem za recenzijo diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi vsem zaposlenim v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu za dobro voljo in prijazne besede ter za prijetno delovno okolje.

Zahvaljujem se tudi Mojci Benčina, Nini Pirher in Moniki Ciglič, ki so kot mentorice sodelovale pri projektu iGEM in svoje izkušnje nesebično predajale naprej.

Zahvala gre tudi celotni iGEM ekipi s katerimi smo preživeli številne lepe trenutke v laboratoriju in še lepše ter nepozabne izven njega.

Zahvaljujem se sošolcem in prijateljem, ki so me spremljali skozi študijska leta, me podpirali in mi polepšali študijsko obdobje, ki je žal prehitro minilo.

Zahvaljujem se tudi mojim staršem. Ves čas študija sta mi stala ob strani in me vodila v pravo smer. Pokazala sta mi, da se delavnost in vztrajnost obrestuje in da je vse mogoče, če je le volja.

PRILOGE

Priloga A: Nukleotidno in aminokislinsko zaporedje proteina HF-RGD-His.

Nukleotidno zaporedje DNK konstrukta HF-RGD-His-stop:

ATGGCACAAAGTCATTAATACCAACAGCCTCTCGCTGATCACTCAAAAATAATATCAACAAGAACCAGTCTGCGCTGTCGAG
TTCTATCGAGCGTCTGTCTTCTGGCTTGCGTATTAAACAGCGCGAAGGATGACGCAGCGGGTCAGGCGATTGCTAACCGTTT
CACCTCTAACATTAAGGCCCTGACTCAGGCGGCCCGTAACGCCAACGACGGTATCTCCGTTGCGCAGACCACCGAAGGCG
CGCTGTCCGAAATCAACAACAACCTACAGCGTGTGCGTGAAGTACGGTACAGGCCACTACCGGTACTAACTCTGAGTCT
GATCTGTCTTCTATCCAGGACGAAATTAATCCCGTCTGGATGAAATTGACCGCGTATCTGGTCAGACCCAGTTCAACGG
CGTGAACGTGCTGGCAAAAAATGGCTCCATGAAAATCCAGGTTGGCGCAAATGATAACCAGACTATCACTATCGATCTGA
AGCAGATTGATGCTAAAACTCTTGGCCTTGATGGTTTTAGCGTTAAAGCGTTAATCACGGCTTCTGGGGATATTAGCTTGA
CTTTTAAACAAGTGGATGGCGTGAATGATGTAACCTTTAGAGAGCGTAAAAAGTTTCTAGTTCAGCAGGCACGGGGATCGGT
GTGTTAGCGGAAGTGATTAACAAAAATTCTAACCGAACAGGGGTTAAAGCTTATGCGAGCGTTATCACCACGAGCGATGT
GGCGGTCCAATCAGGAAGTTTGAGTAATTTAACTTTAAATGGGATCCATTTGGGTAATATCGCAGATATTAAGAAAAATG
ACTCAGACGGAAGGTTAGTCGCAGCGATCAATGCGGTTACTTCAGAAAACCGCGTGGAAGCTTATACGGATCAAAAAAGG
GCGCTTGAATTTGCGCAGTATAGATGGTCGTGGGATTGAAATCAAAACCGATAGCGTCAGTAATGGGCCTAGTGCTTTAA
CGATGGTCAATGGCGGTGAGGATTTAACAAAAGGTTCTACTAAGTATGGGAGGCTTTCTCTCACACGCTTAGACGCTAAA
AGCATCAATGTCGTTTCGGCTTCTGATTCGCAACATTTAGGTTTCACAGCGATTGGTTTTGGGGAATCTCAAGTGGCAGAA
ACCAGGTGAATTTGCGCGATGTTACTGGGAATTTAAACGCTAATGTCAAATCAGCCAGTGGCGCGAACTATAACGCCGT
GATCGCTAGCGGTAACCAAAGCTTGGGATCTGGGGTTACAACCTTAAAGAGCTGTTGCAAATGGTAAAACCGGATCCGC
TGAAAGCGCTGGACGATGCTATCGCATCTGTAGACAAATTCCGTCTTCCCTCGGTGCGGTGCAAAACCGTCTGGATTCC
GCGGTTACCAACCTGAACAACACCACTACCAACCTGTCTGAAGCGCAGTCCCGTATTGAGGACGCCGACTATGCGACCGA
AGTGTCCAATATGTCGAAAGCGCAGATCATCCAGCAGGCCGGTAACTCCGTGTTGGCAAAAGCTAACCCAGGTACCGCAG
CAGGTTCTGTCTGTGTACAGGGTACTAGACGAGGAGACCACCACCACCACCACCTAG

Legenda:

- ATG start kodon
- Variabilni del flagelina *H. pylori*
- N- in C-končni del flagelina *E. coli*
- RGD-His-stop

Aminokislinsko zaporedje proteina HF-RGD-His:

MAQVINTNSLSLITQNNINKNQSALSSSIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISVAQTTEGALSEIN
NNLQVRVELTVQATTGTNSESLSSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQFNGVNVLAKN GSMKIQVGANDNQITIDLKQIDAKTLGL
DGFSVKALITASGDISLTFKQVDGVNDVTLESVKVSSSAGTGIGVLAEVINKNSNRTGVKAYASVITTSADVAVQSGSLSNLT
LNI
GIHLGNIADIKKNDSDGRLVAAINAVTSETGVEAYTDQKGRNLNRSIDGRGIEIKTDSVSNGPSALTMVNGGQDLTKGSTNYGR
LSLTRLDAKSINVVSASDSQHLGFTAIGFGESQVAETTVNLRDVTGNFNANVKSASGANYNAVIASGNQSLGSGVTTLRAVAN
GKTTDPLKALDDAIASVDKFRSSLGAVQNRLDSAVTNLNNTTTNLSEAQSRIQDADYATEVSNMSKAQIIQQAGNSVLAKANQ
VPQQVLSLLQGTRRGDHHHHHHH@

Priloga B: Nukleotidno in aminokislinsko zaporedje proteina HF-multiepitop-RGD-His.

Nukleotidno zaporedje DNK konstrukta HF-multiepitop-RGD-His-stop:

ATGGCACAAAGTCATTAATACCAACAGCCTCTCGCTGATCACTCAAAATAATATCAACAAGAACCAGTCTGCGCTGTGCGAG
TTCTATCGAGCGTCTGTCTTCTGGCTTGCCTATTAAACAGCGCGAAGGATGACGCAGCGGGTCAGGCGATTGCTAACCCTTT
CACCTCTAACATTAAAGGCTGACTCAGGCGGGCCCGTAACGCCAACGACGGTATCTCCGTTGCGCAGACCACCGAAGGCG
CGCTGTCCGAAATCAACAACAACCTACAGCGTGTGCGTGAACGTACGGTACAGGCCACTACCGGTACTAACTCTGAGTCT
GATCTGTCTTCTATCCAGGACGAAATTAATCCCGTCTGGATGAAATTGACCGCGTATCTGGTCAGACCCAGTTCAACGG
CGTGAACGTGCTGGCAAAAAATGGCTCCATGAAAATCCAGTTGGCGCAAAATGATAACCAGACTATCACTATCGATCTGA
AGCAGATTGATGCTAAAACCTCTTGGCCTTGATGGTTTTAGCGTTAAAGCGTTAATCACGGCTTCTGGGGATATTAGCTTGA
CTTTTAAACAAGTGGATGGCGTGAATGATGTAACCTTTAGAGAGCGTAAAAGTTTCTAGTTCAGCAGGCACGGGGATCGGT
GTGTTAGCGGAAGTGATTAACAAAAATTTCTAACCGAACAGGGGTTAAAGCTTATGCGAGCGTTATCACACGAGCGATGT
GGCGGTCCAATCAGGAAGTTTGAGTAATTTAACTTTAAATGGGATCCATTTGGGTAAATATCGCAGATATTAAGAAAAATG
ACTCAGACGGAAGGTTAGTCGCAGCGATCAATGCGGTTACTTCAGAAAACCGCGTGGAAGCTTATACGGATCAAAAAAGG
GCGCTTGAATTTGCGCAGTATAGATGGTCTGTTGATTGAAATCAAAACCGATAGCGTCAGTAATGGGCCTAGTGCTTTAA
CGATGGTCAATGGCGGTGAGGATTTAACAAAAGGTTCTACTAATACTGGGAGGCTTTCTCTCACACGCTTAGACGCTAAA
AGCATCAATGTCGTTTCGGCTTCTGATTCGCAACATTTAGGTTTCACAGCGATTGGTTTTGGGAATCTCAAGTGGCAGAA
ACCACGGTGAATTTGCGCGATGTTACTGGGAATTTTAAACGCTAATGTCAAATCAGCCAGTGGCGCGAACTATAACGCCGT
GATCGCTAGCGGTAACCAAAGCTTGGGATCTGGGGTTACAACCTTAAGAGCTGTTGCAAATGGTAAAACACGGATCCGC
TGAAAGCGCTGGACGATGCTATCGCATCTGTAGACAAATCCGTTCTTCCCTCGGTGCGGTGCAAAACCGTCTGGATTCC
GCGGTTACCAACCTGAACAACACCACTACCAACCTGTCTGAAGCGCAGTCCCGTATTTCAGGACGCCGACTATGCGACCGA
AGTGTCCGAATATGTGCAAGCGCAGATCATCCAGCAGGCCGGTAACCTCGTGTGGCAAAAGCTAACACGGTACCGCAG
CAGGTTCTGTCTCTGTACAGGGTACTAGACACATGGACATGCTTATGGTGTGCCACCACCTTGGATAAAAAGCATTAAAGA
AGATGTTCAAGTTCGCTGATTCAAGGATCGGCAAACTGACCGTGACCAGCGGCCAAAAACAGAAGTTCAACCCACGCAA
GTCATTGATGGGCCTTTTGGCGGTGGCAAGACACGGTTGTCAATATTGATCGCATCAACACTAAAGCCGATGGCAGAT
TAAAGTGGGAGGGTTTAAAGCTTCTTTACCACCAACCGCGGTCATTTGAATATCGGCAAAAGCGGTGTCAATCTGTCCA
ATCAAGCGAGCGGGCGCACCTTTTAGTGGAAAATCTAACCGGGAATATCACCGTTGATGGGCCTTTAAGAGTGAATAAT
CAAGTGGGTGGCTATGCTTTGGCAGGATCAAGCGCAATTTTGAATTTAAGGCTGGTGTGGATACTAAAAACGGCACAGC
CACTTTCAATAACGGCAAACTGACCGTGACCAGCGGCAAAAGGACCATACAGAAAAATCAGAACCCTGGGTTGTTAACT
AGACGAGGAGACCACCACCACCACCACCTAG

Legenda:

- ATG start kodon
- Variabilni del flagelina *H. pylori*
- N- in C- končni del flagelina *E. coli*
- Multiepitop
- RGD-His-stop

Aminokislinsko zaporedje proteina HF-multiepitop-RGD-His:

MAQVINTNSLSLITQNNINKNQALSSSIERLSSGLRINSKDDAAGQAIANRFTSNIKGLTQAARNANDGISVAQTTEGALSEIN
NNLQVRVRELTQATTGTNSESDDLSSIQDEIKSRLDEIDRVSGQTQFNGVNVLAKNKSMKIQVGANDNQITIDLKQIDAKTLGL
DGFSVKALITASGDISLTFKQVDGVNDVTLESVKVSSSAGTGIGVLAEVINKNSNRTGVKAYASVITTSADVAVQSGSLNLTN
GIHLGNIADIKKNDSDGRLVAAINAVTSETGVEAYTDQKGRNLNRSIDGRGIEIKTDSVSNGPSALTMVNGGQDLTKGSTNYGR
LSLTRLDAKSINVSASDSQHLGFTAIGFGESQVAETTVNLRDVTGNFNANVKSASGANYNAVIAAGNSQLSGSVTTLRAVAN
GKTTDPLKALDDAIAVSVDKFRSSLGAVQNRLLDSAVTNLNNTTNLSEAQSRIQDADYATEVSNMSKAQIIQQAGNSVLAKANQ
VPQQVLSLLQGTRHMDMLMVCHHLDKSIKEDVQFADSRIGKLTVTSGQKTEVQPTQVIDGPFAGGKDTVVNIDRINTKADGTI
KVGGFKASLTNAAHLNIGKGGVNLNQAASGRTLLVENLTGNITVDGPLRVNNQVGGYALAGSSANFEFKAGVDTKNGTATF
NNGKLTVTSGKRTIQKKSEPGLLTRRGDHHHHHHH@

Priloga C: Načrt transfekcije merjenja luciferazne aktivnosti za poskus ugotavljanja vpliva izoliranega proteina na aktivacijo signalne poti preko receptorja TLR5 in TLR4. Pri vseh eksperimentih na celičnih linijah HEK293 smo uporabljali količino plazmidov, ki je navedena v preglednici:

Oznaka transfekcijske mešanice	Količina plazmida (ng/luknjico)					
	pSB1AK3-CMV	FluC (pGL2)	RluC (phRL-TK)	pUNO-hTLR5	hTLR4 v pFLAG-CMV	hMD-2 v pEF-BOS
Negativna kontrola	20	50	10	/	/	/
hTLR5	/	50	10	20	/	/
hTLR4	/	80	10	/	10	10