UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Matej SKOČAJ

IZRAŽANJE DELOV ČLOVEŠKEGA PERFORINA V BAKTERIJI *Escherichia coli*

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Matej SKOČAJ

IZRAŽANJE DELOV ČLOVEŠKEGA PERFORINA V BAKTERIJI *Escherichia coli*

DIPLOMSKO DELO Univerzitetni študij

EXPRESSION OF HUMAN PERFORIN IN BACTERIA Escherichia coli

GRADUATION THESIS University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za biokemijo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Gregor Anderluh, in za recenzenta prof. dr. Toma Turka.

Mentor: prof. dr. Gregor Anderluh

Recenzent: prof. dr. Tom Turk

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:	doc. dr. Polona JAMNIK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
Član:	prof. dr. Tom TURK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Član:	prof. dr. Gregor ANDERLUH Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

~	
ŠD	Dn
~ ~	

- DK UDK 577.27+612.017:577.112(043)=163.6
- KG imunski sistem/prirojena imunost/citotoksični T limfociti/NK-celice/človeški perforin/MACPF-CDC domena/TolA/*Escherichia coli*
- AV SKOČAJ, Matej
- SA ANDERLUH, Gregor (mentor)/TURK, Tom (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2009
- IN IZRAŽANJE DELOV ČLOVEŠKEGA PERFORINA V BAKTERIJI Escherichia coli
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XV, 67 str., 25 pregl., 54 sl., 78 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Perforin je najpomembnejša efektorska molekula v citotoksičnih limfocitih T (CTL), NK-celicah (ang. Natural Killer) in nekaterih drugih populacijah limfocitov. Perforin je nepogrešljiv pri odstranjevanju okuženih in tumorskih celic. Nahaja se v citotoksičnih granulah v efektorskih celicah. Ob pravem signalu se granule orientiraju proti imunološki sinapsi in sprostijo v ekstracelularni prostor, kjer je pH nevtralen in več kot 1 mM koncentracija Ca^{2+} , ki omogočata njegovo delovanje. Monomeri perforina se povežejo v poliperforin, ki tako preči membrano, kar rezultira v tvorbi transmembranske pore in posledično apoptoze tarčne celice. Perforin je sestavljen iz domene MACPF/CDC in domen EGF ter C2. Še do predkratkim je veljalo, da domeno MACPF/CDC sestavljata dva amfipatična α -heliksa med 187. in 239. AK ostankom. Sedaj pa je jasno, da je domena MACPF/CDC dolga kar 350 AK, zvitje proteina pa je podobno kot pri proteinih CDC, ki jih proizvajajo bakterije. V diplomskem delu smo želeli izraziti različne fragmente človeškega perforina v bakterijskem ekspresijskem sistemu Escerichia coli, ki bi bili primerni za nadlajne strukturne študije. Izražali smo jih kot fuzijske proteine s TolAIII fuzijskim partnerjem. Fuzijski proteini Nterminalnega dela perforina so tekom časa razpadali. Tega procesa tekom študije nismo mogli zaustaviti. Kljub vsem pa smo prišli do spoznanja, da bi bil za nadaljne študije najprimernejša različica fuzijskih proteinov TolA-Pfn-TolA ter da perforin ohranja biološko aktivnost. Perforin v takšni fuziji je namreč pred proteazami zaščiten z 3' in 5' strani. V obliki inkluzijskih telesc smo izražali C-terminalni del perforina. Konstrukte smo uspeli renaturirat, a so tekom časa agregirali v topne multimere.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 577.27+612.017:577.112(043)=163.6
- CX immune system/innate immunity/ cytotoxic T lymphocites/NK-cells/human
- perforin/MACPF-CDC domain/TolA/Escherichia coli
- AU SKOČAJ, Matej
- AA ANDERLUH, Gregor (supervisor)/TURK, Tom (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotehnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2009
- TI EXPRESSION OF HUMAN PERFORIN IN BACTERIA Escherichia coli
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XV, 67 p., 25 tab., 54 fig., 78 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- Perforin is the most most important effector molecule of Cytotoxic T AB Lymphocites (CTL), NK-cells (Natural Killer Cells) and some other subpopulations of lymphocites. It is indinspensable for destroying infected and tumor cells. We can find it in secretory cytotoxic granule in effector cells. After the formation of an immune synapse exocitosis of granule is achived. Granule release their luminal content into the synapse where the pH is neutral and more then 1 mM Ca^{2+} is present. That enables the function of perform. Perforin polymerizes into transmembrane channels and triggers apoptosis. The molecule is composed of MACPF/CDC, EGF and C2 domene. Soon after it's discovery it was proposed that the perforin is inserted into membrane via two closely adjacent amphiphatic α -helix in the region 187-239 amino acid residues (AAR). It is clear now, that MACPF/CDC domene is much more longer (350 AAR) that previously thought and the mehanisme of insertion is identical to another group of pore-forming toxins - bacterial CDC family of proteins. The goal of the presented graduation thesis was to express different fragments of human perforin in bacteria Escerichia coli. They were expressed as a fusion proteins with TolAIII protein as a fusion partner. We were trying to express stable fragment of perforin molecule that would be suitable for further structural studies. Fusion proteins that were composed of N-terminal parts of perforin were sensitive to degradation by proteases. We weren't capable to stop the process of degradation during the experimants. Despite that we can conclude that the best candidates fot further experiments are TolA-Pfn-TolA fusion proteins and that we can preserve its biological activity. Perforin in such fusions are less sensitive to degradation by proteases. We were also expressing C-terminal part of the perforin but in form inclusion bodies. We were able to renaturate the denaturated proteins, but we couldn't keep them in soluble form.

KAZALO VSEBINE

Stran

K	UČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	Ш
K	WORDS DOCUMENTATION	IV
K	LALO VSEBINE	. V
K	LALO PREGLEDNIC	IX
K	ZALO SLIK	. X
0	RAJŠĄVEX	III
SI	VARČEK	KV
1	UVOD	1
	1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
	2 CILJ RAZISKOVANJA	1
	3 DELOVNA HIPOTEZA	1
2	PREGLED OBJAV	2
	1 IMUNSKI SISTEM	2
	2 POPULACIJE IMUNSKIH CELIC, KI KOT EFEKTORSKE MOLEKULE	
	SEBUJEJO PERFORIN	3
	2.1 Citotoksični limfociti T	3
	2.2 NK celice ubijalke	4
	2.3 Ostale populacije imunskih celic, ki kot efektorske molekule vsebujejo	
	erforin	5
	2.3.1 Regulatorne celice T (Treg)	5
	2.3.2 NK celice T	5
	2.3.3 $\gamma \delta^+$ celice T	6
	2.3.4 CD4 ⁺ CTL	6
	3 CITOTOKSIČNE GRANULE	6
	3.1 Grancim B	6
	3.2 Perforin	7
	4 PROTEIN TolA	12
	5 ZAKLJUCEK PREGEDA OBJAV, HIPOTEZA IN NAMEN DELA	12
3	MATERIALI IN METODE	13
	1 MATERIALI	13
	1.1 Kemikalije	13
	1.2 Uporabljeni kompleti	13
	1.3 Uporabljene raztopine, pufri in standardi	13
	1.3.1 Raztopine za agarozno elektroforezo	13
	1.3.2 Raztopine za pripravo kompetentnih celic	13
	1.3.3 Raztopine za NaDS-PAGE in imunodetekcijo	14
	1.3.4 Raztopine za dializo	14
	1.3.5 Raztopine za hemolizni test	14
	1.3.6 Raztopine za ionsko izmenjevalno kromatografijo	14
	1.3./ Putri za gelsko filtracijo	15
	1.3.8 Putri za hidrotobno kromatografijo	15
	1.3.9 Putri za Ni-atinitetno izolacijo pod nativnimi pogoji	15

3.1.3.10	Pufri za Ni-afinitetno izolacijo fuzije pod denaturajočimi pogoji	15
3.1.4	Encimi	15
3.1.5	Laboratorijska oprema	16
3.1.6	Gojišča za E. coli	16
3.1.7	Uporabljena protitelesa	16
3.1.8	Polnilci kromatografskih kolon in pripravljene kolone	16
3.1.9	Bakterijski sevi	17
3.1.10	Oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo	18
3.1.10.1	Začetni oligonukleotidi za konstrukte, pri katerih TolA predstavlja N-	
terminalı	ni del fuzije	18
3.1.10.2	Začetni oligonukleotidi za konstrukta PFN ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA in TolA-PFN ₍₂₂₋₁₂	1)-
TolA	18	<i>,</i>
3.1.10.3	pTolT	18
3.2 M	ETODE	19
3.2.1.1	Izdelava različnih konstruktov Pfn v obliki fuzijskega proteina s TolA	19
3.2.1.2	Priprava konstruktov Pfn, ki predstavljajo C-terminalni del fuzijskega	
proteina	19	
3.2.1.1	Priprava fragmenta Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ za vektor pTolT tako, da predstavlja Pfn de	1
fuzije N-	terminalni (Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA) ali sredinski del (TolA- Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA)	
fuzijskeg	a proteina	20
3.2.1.1.1	TolA- Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA	20
3.2.1.1.2	Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA	20
3.2.2	Izražanje in izolacija rekombinantnih proteinov	23
3.2.2.1	Priprava kompetentnih celic	23
3.2.2.2	Kemijska transformacija kompetentih celic	23
3.2.3	Izražanje in izolacija rekombinantnih proteinov	23
3.2.3.1	Izražanje rekombinantnih proteinov	23
3.2.3.2	Izolacija rekombinantih proteinov	23
3.2.3.2.1	Izolacija rekombinantnih proteinov pri nativnih pogojih	23
3.2.3.2.1	Izolacija rekombinantnih proteinov (TolA-Pfn ₍₁₉₆₋₅₄₀₎) pri denaturajoč	ih
pogojih	24	
3.2.3.3	Dializa N-terminalnih konstruktov Pfn, ki so bili izolirani pri nativnih	
pogojih	24	
3.2.3.4	Zvijanje C-terminalnega dela perforina, ki smo ga izolirali pri	
denatura	jočih pogojih	25
3.2.4	Karakterizacija konstruktov	26
3.2.4.1	Obarjanje proteinov s triklorocetno kislino (TCA)	26
3.2.4.2	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)	26
3.2.4.3	Zasledovanje izražanja konstruktov	26
3.2.4.4	Zasledovanje poteka izolacije konstruktov	26
3.2.4.5	Zasledovanje topnosti proteinov po končani dializi	26
3.2.4.6	Prenos proteinov po westernu in imunodetekcija	27
3.2.5	Rezanje fuzije s trombinom	27
3.2.6	Kromatografske metode	27
3.2.6.1	Gelska kromatografija	27
3.2.6.2	Hidrofobna kromatografija	27
3.2.6.3	Ionsko-izmenjevalna kromatografija	28

	3.2.7	Hemolizni test	28
4	REZ	ZULTATI	29
	4.1	SHEMA POTEKA RAZISKAV V DIPLOMSKEM DELU	29
	4.2	LASTNOSTI AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ KONSTRUKTOV, KI SMO)
	JIH Ľ	ZRAŽALI	29
	4.3	IZRAŽANJE KONSTRUKTOV	31
	4.4	KONSTRUKTI N-TERMINALNEGA DELA PFN	31
	4.4.1	Konstrukt TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎	32
	4.4.1	.1 Izražanje konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ v BL21 (DE3) pLysE	32
	4.4.1.	.1.1 Izražanje in izolacija konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLys 33	E
	4.4.1.	.1.2 Dializa konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLysE	33
	4.4.1	.1.3 Ionsko-izmenjevalna kromatografija vzorca TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21	
	(DE3	b) pLysE 33	
	4.4.1	.1.4 Cepitev konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLysE s trombino	m
	in izo	olacija Pfn fragmenta z Ni-afinitetno kolono	35
	4.4.1	.2 Izražanje konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ v Rosetta (DE3) pLysS	35
	4.4.1	.2.1 Izražanje in izolacija konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta (DE3)	
	pLys	S 36	
	4.4.1	.2.2 Dializa konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta (DE3) pLysS	36
	4.4.1.	.2.3 Optimizacija rezanja konstrukta $TolA-Pfn_{(22-121)}$ iz Rosetta (DE3)	
	pLys	S, prenos proteinov po westernu in imunodetekcija z mišjimi protitelesi proti His	-
	repku	1 36	
	4.4.1	.2.4 Rezanje konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta (DE3) pLysS s	~ -
	trom	binom in izolacija Pfn fragmenta z Ni-afinitetno kromatografijo	37
	4.4.1	$\begin{array}{llllllllllllllllllllllllllllllllllll$	37
	4.4.1.	$\begin{array}{ccc} \text{Hidrofobna kromatografija vzorca IoIA-Pfn}_{(22-121)} \text{ iz Rosetta (DE3)} \\ \text{Scalar} \end{array}$	
	pLys	$\frac{3}{2} = \frac{3}{2}$	20
	4.4.1.	13 Izrazanje konstrukta IoIA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ v Origami (DE3) pLys8	38
	4.4.1.	.4 Izrazanje in izolacija konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Origami (DE3) pLyss	>
	1 1 1	5 Izračanja konstrukta Tal A Dfn v Rasatta gami B (DE2) nI vaS	20
	4.4.1.	5.1 I_{22}	39
	4.4.1	121 azalije ili izolacija kolisti ukta 101A-rin(22-121) iz Kosetta galili-D	
	(DES A A 1	5 2 Dializa konstrukta Tol A-Pfn as tay iz Rosetta gami-B (DE3) nI vsS	10
	<u>4</u> <u>4</u> <u>1</u>	5.3 Obstoinost konstrukta TolA-Pfn/22-121) iz Rosetta gami-B (DE3) pLyso	SS
	nri ra	zličnih T shranjevanja	40
	441	5.4 Cepitev konstrukta TolA-Pfn(22 121) iz Rosetta gami-B (DE3) pLvsS	10
	prend	os proteinov po westernu in imunodetekcija z mišijimi protitelesi proti His-repku.	40
	4.4.1	.5.5 Preverjanje hemolitične aktivnosti konstrukta TolA-Pfn $_{(22-121)}$ in Pfn $_{(22-121)}$	·2-
	121) iz	z Rosetta gami-B (DE3) pLysS ob prisotnosti in odsotnosti Ca ²⁺ ionov na človešk	ih
	in go	vejih eritrocitih	41
	4.4.2	Konstrukti TolA-Pfn(22-136), TolA-Pfn(22-162) in TolA-Pfn(22-196)	42
	4.4.2	.1 Konstrukt TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₉₆₎	42
	4.4.2	.2 Konstrukt TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₆₂₎	43
	4.4.2	.3 Konstrukt TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₃₆₎	43
	Origa	ami (DE3) pLsyS	43

	Rosetta-g	ami B (DE3) pLsyS	43
	4.4.3 k	Konstrukti Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA in TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA	44
	4.4.3.1	Konstrukt Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA	44
	4.4.3.2	Konstrukt TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA	45
	4.4.3.3	Izražanje in izolacija konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA iz celic BL21 (I	DE3)
	pLysS	45	
	4.4.3.3.1	Izražanje in izolacija konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA iz celic Rose	etta
	(DE3) pL	ysS 46	
	4.4.3.3.2	Izražanje konstrukta TolA-Pfn(22-121)-TolA v celicah Origami (DE3	5)
	pLysS	48	
	4.5 KO	NSTRUKT C-TERMINALNEGA DELA PERFORINA, TOLA-PFN(196-3	540)
	49		
	4.5.1 I	zražanje in izolacija	49
	4.5.1.1	Izolacija in raztapljanje IT	49
	4.5.1.2	Izolacija konstrukta TolA-Pfn ₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3) pLysS z Ni-	
	afinitetno	kromatografijo	50
	4.5.1.3	Gelska filtracija z vzorcem konstrukta TolA-Pfn ₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (Dl	E3)
	pLysS	50	
	4.5.1.4	Zvijanje konstrukta TolA-Pfn(196-540) iz Origami (DE3) pLysS	50
	4.5.1.5	Prenos proteinov, TolA-Pfn ₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3) pLysS, po wester	rnu
	in imunoc	letekcija z mišjimi protitelesi proti His-repku in EGF domeni perforina	53
	4.5.2 S	tabilnost zvitih konstruktov	54
5	RAZPR	AVA IN SKLEPI	55
	5.1 RA	ZPRAVA	55
	5.1.1 k	Konstrukt TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎	55
	5.1.1.1	Izražanje in izolacija fuzijskega proteina	55
	5.1.1.2	Rezanje fuzijskega proteina s trombinom in izolacija perforinskega	
	fragmenta	1 56	
	5.1.1.3	Hemolizni test	56
	5.1.2 k	Konstrukti TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₃₆₎ , TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₆₂₎ in TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₉₆₎	57
	5.1.3 k	Konstrukta Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA in TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA	57
	5.1.4 k	Konstrukt TolA-Pfn ₍₁₉₆₋₅₄₀₎	58
	5.2 SK	LEPI	59
6	POVZE	ТЕК	60
7	VIRI		61

KAZALO PREGLEDNIC

Stran

Preglednica 1: Kemikalije, uporabljene v diplomskem delu	13			
Preglednica 2: Kompleta, uporabljena v diplomskem delu.	13			
Preglednica 3: Pufra za agarozno elektroforezo.	13			
Preglednica 4: Raztopini za pripravo kompetentnih celic.	13			
Preglednica 5: Pufri in raztopine, uporabljene za poliakrilamidno gelsko elektroforezo v				
prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE), prenos proteinov po westernu in imunodetekcijo	14			
Preglednica 6: Pufra za dializo.	14			
Preglednica 7: Raztopini za hemolizni test	14			
Preglednica 8: Pufra za ionsko-izmenjevalno kromatografijo.	14			
Preglednica 9: Pufer za gelsko filtracijo	15			
Preglednica 10: Pufri za hidrofobno kromatografijo	15			
Preglednica 11: Pufri za izolacijo fuzije pod nativnimi pogoji z Ni-afinitetno kromatografijo	Preglednica 11: Pufri za izolacijo fuzije pod nativnimi pogoji z Ni-afinitetno			
Preglednica 12 [.] Pufri za izolacijo fuzije pod denaturajočimi pogoji z Ni-afinitetno	15			
kromatografijo	15			
Preglednica 13: Encimi, uporablieni v diplomskem delu	15			
Preglednica 14: Uporabliena laboratoriiska oprema				
Preglednica 15: Sestava gojišč za <i>E. coli</i> .	16			
Preglednica 16: Protitelesa, uporabljenav diplomskem delu	16			
Preglednica 17: Kolone in polnilci kromatografskih kolon, uporabljeni v diplomskem d	elu.			
	16			
Preglednica 18: Uporabljeni sevi <i>E. coli</i> pri diplomskem delu, njhovi genotipi in opis	17			
giavnin znacimosti. Dragladnica 10: Začatni aliganuklastidi za nomnačavanja Dfn. ki prodatavlja C. termina	I / 1mi			
delu fuzije	1111 1 Q			
Dragladnice 20: Začetni alizanuklastidi za konstrukte Dfn – TalA in TalA Dfn	10			
T_{22-12}	.1) - 10			
TOIA Dragladnice 21: Dagaji zvjianje konstrukte TalA DEN	10			
Preglednica 21. Pogoji Zvijalija Kolistiukia TolA-PFIN ₍₁₉₆₋₅₄₀₎	23			
Proglednica 22. Osnovne lastnosti aminokislinskih zaporedij konstruktov	29			
konstruktov s trombinom	20			
Dragladnica 24: Izražanja nosamaznih konstruktov v različnih savih E soli pri različnih	30			
temperaturah	31			
Preglednica 25: Pogoji zvijanja konstrukta TolA-Pfn(106 540) iz Origami (DE3) nLvsS				

KAZALO SLIK

Stran

Slika 1: Glavni mehanizmi prirojene in specifične imunosti (Abbas in Lichtman, 2006)2
Slika 2: Komunikacija med NK celicami in dendritičnimi celicami (DC) (Hamerman,
2004)
Slika 3: Mehanizmi GrB, ki povzročijo smrt celice tarče (Cullen in Martin, 2008)7
Slika 4: Funkcionalne domene človeškega perforina in njegova MACPF domena9
Slika 5: Topološki diagram elementov sekundarne strukture a) Plu-MACPF domene in b)
perfringolizina O (Pfo) (Rosado in sod., 2007)
Slika 6: Mehanizem delovanja proteinov CDC (Rosado in sod., 2007) 10
Slika 7: Podobnosti v strukturi a) Plu-MACPF, b) človeški C8α in c) Pfo (Lukoyanova in
Saibil, 2008)
Slika 8: Konformacijske spremembe pri tvorbi pore s proteini CDC (Lukoyanova in Saibil,
2008)
Slika 9: Model pore proteinov MAC v lipidni membrani (Rosado in sod., 2008)11
Slika 10: Shema vektorja pToIT s fragmentom ToIA, označenim prepoznavnim mestom za
trombin in restrikcijskimi mesti
Slika 11: Shema poteka priprave vektorja z zapisom za TolA- Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA
Slika 12: Shema poteka priprave vektorja z zapisom za Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA
Slika 13: Shema poteka raziskav v diplomskem delu
Slika 14: Izražanje konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ pri 25°C in 37°C v treh različnih
ekspresijskih sistemih <i>E. coli</i>
Slika 15: Izolacija konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLsyE z Ni-afinitetno
kromatografijo
Slika 16: TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLsyE po dializi
Slika 17: Kromatogram vzorca TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLsyE po ionsko-
izmenjevalni kromatografiji
Slika 18: Posamezne frakcije TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLsyE po ionsko
izmenjevalni kromatografiji
Slika 19: Izolacija Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLsyE z Ni-afinitetno kromatografijo po
cepitvi fuzijskega proteina
Slika 20: Izolacija konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz celic Rosetta (DE3) pLsyS z Ni-afinitetno
kromatografijo
Slika 21: TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta (DE3) pLysS po dializi
Slika 22: Optimizaciji rezanja fuzije in imunodetekcija fragmenta TolA s pomočjo mišjih
protiteles proti His-repku
Slika 23: Izolacija Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ fragmenta po cepitvi TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta (DE3) pLysS
z trombinom z Ni-afinitetno kromatografijo
Slika 24: Kromatogram rezanega konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta (DE3) pLysS pri
ločevanju s hidrofobno kromatografijo
Slika 25: Izolacija konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz celic Origami (DE3) pLsyS z Ni-
afinitetno kromatografijo in imunodetekcija His-repka z mišjimi protitelesi
Slika 26: Izolacija TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta-gami B (DE3) pLysS z Ni-afinitetno
kromatografijo
Slika 27: Vzorec konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta gami-B (DE3) pLysS po dializi40

Slika 28: Vzorci konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta gami-B (DE3) pLysS po
prekonočni inkubaciji na -20 °C, 0 °C in 4 °C
Slika 29: Izolacija Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ z Ni-afinitetno kromatografijo po rezanju konstrukta TolA-
Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ s trombinom iz Rosetta gami-B (DE3) pLysS in imunodetekcija z mišjimi
protitelesi proti His-repku
Slika 30: Hemolizni test s konstruktom TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ in fragmentom Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta
gami-B (DE3) pLysS ob prisotnosti in odsotnosti Ca ²⁺ ionov na človeških in govejih
eritrocitih
Slika 31: Izražanje konstruktov TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₃₆₎ , TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₆₂₎ in TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₉₆₎ , pri 25
°C in 37 °C v sevu Origami (DE3) pLysS
Slika 32: Izolacija konstruktaTolA-Pfn ₍₂₂₋₁₉₆₎ iz Origami (DE3) pLysS z Ni-afinitetno
kromatografijo
Slika 33: Izolacija konstruktaTolA-Pfn ₍₂₂₋₁₆₂₎ iz Origami (DE3) pLysS z Ni-afinitetno
kromatografijo
Slika 34: Izolacija konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₃₆₎ iz Origami (DE3) pLysS in Rosetta-gami B
(DE3) pLsyS s pomočjo Ni-afinitetne kromatografije
Slika 35: Vzorec konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₃₆₎ po dializi in imunodetekcijavzorca z mišjimi
protitelesi proti his-repku
Slika 36: Izražanje konstruktov TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ , Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA in TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA v
celicah BL21 (DE3) pLysS
Legenda: Pred ind. – pred indukcijo, Po ind. – po indukciji
Slika 37: Izolacija konstrukta Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA iz BL21 (DE3) pLysS z Ni-afinitetno
kromatografijo
Slika 38: Izolacija konstruktaTolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA iz BL21 (DE3) pLysS z Ni-afinitetno
kromatografijo
Slika 39: Vzorec konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA iz celic BL21 (DE3) pLysS po dializi.46
Slika 40: Optimizacija rezanja konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA iz celic BL21 (DE3)
pLysS
Slika 41: Izolacija konstruktaTolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA iz Rosetta (DE3) pLysS z Ni-afinitetno
kromatografijo
Slika 42: Dializirana vzorec konstruktaTolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA in rezanega konsruktaTolA-
Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA 1z Rosetta (DE3) pLysS
Slika 43: Kromatogram ceplenega konstrukta lolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -lolA po ionsko izmenjevalni
4/
Slika 44: Izolacija konstrukta TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA iz Origami (DE3) pLysS z Ni-
48 Slile 45. Dislising second particular in another late Talla Dec. Talla in
Slika 45: Dializiran vzorec nerezanega in rezanega konstrukta 10IA-P $In_{(22-121)}$ -10IA 12
Origami (DE3) pLyss
Slika 46: Izolacija konstrukta i olA-Pm ₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3) pLysS z Ni-afinitetno
Kromatografijo
Sinka 47. vzoleč 11 konstrukta 10IA-Pin ₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Oliganii (DE3) pLyss po raztapijanju v
o M ulei
sinka 40. izolacija kolisti ukta i olA-r ili(196-540) iz Oliganii (DES) pLyss po iaztapljanju 11 V
Slika 49: Rezultati zvijanja konstrukta TolA_Pfn
nostopnim redčenjem in postopnim zniževanjem koncentracije urce v fosfatnem pufru in
nufru Tris-HCl nH 8
punu mo mo, pm o

Slika 50: Rezultati postopnega zvijanja konstrukta TolA-Pfn ₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3) oLvsS s postopnim redčenjem in postopnim zniževanjem koncentracije uree v Tris-HCl	
bH 6 in pH 7.	, . 52
Slika 51: Rezultati postopnega zvijanja konstrukta TolA-Pfn ₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3)	
oLysS s postopnim redčenjem iz zvijanjem proteina v 20 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA	١,
10 mM ß-MeEtOH, 100 ali 200 mM NaCl, pH 8	. 52
Slika 52: Rezultati postopnega zvijanja konstrukta TolA-Pfn ₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3)	
oLysS s postopnim redčenjem iz zvijanjem proteina v 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 0,5 mM EDTA	٩,
10 mM β-MeEtOH, pH 6 ali 7	. 53
Slika 53: Zvijanje konstrukta TolA-Pfn(196-540) iz Origami (DE3) pLysS v 20 mM Tris-H	Cl,
5 mM EDTA, 20 mM β-MeEtOH, 0,5 M urea, pH 8	. 53
Slika 54: Prenos proteinov po westernu in imunodetekcija z mišjimi protitelesi proti His	-
epku in EGF- domeni perforina.	. 53

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

% (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 volumna te snovi z
	volumnom celotne raztopine
β-MeEtOH	beta-merkaptoetanol
А	absorbanca pri določeni valovni dolžini
Å	angstrem
Ag	antigen
AK	aminokislina
Amp	ampicilin
ang.	angleško
APC	antigen-predstavljajoča celica
APS	amonijev persulfat
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine serum albumine)
C2	domena na C-terminalnem delu perforina, ki služi za vezavo Ca ²⁺
C9	komponenta 9 komplementa
CDC	od holesterola odvisni citolizini (ang. cholesterol-dependent cytolysins)
Cm	kloramfenikol
CTL	citotoksični T limfociti (ang. cytotoxic T limphocytes)
Da	dalton (enota za molekulsko maso)
DC	dendritična celica
DNK	deoksi-ribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	etilendiamin tetraocetna kislina
EGF	domena na C-terminalnem delu perforina (ang. epidermal growth factor)
ER	endoplazmatski retikel
Gr(B)	grancim (B)
IFN	interferon
IL	interlevkin
IPTG	izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid
IT	inkluzijska telesca
kDa	kilo Dalton (1000 Da)
Kn	kanamicin
LB	gojišče Luria-Bertani
MAC pora	(ang. Membrane attacking complex) pora
MACPF/CDC	domena s perforinskim podpisom, ki napada membrane (ang. membrane
	attacking complex perforin)
MHC	poglavitni histokompatibilnostni kompleks (ang. major histocompatibility
	complex)
NK (celice)	naravne celice ubijalke (ang. natural killer cells)
PAMP	molekulski motivi patogenih mikroorganizmov (ang. pathogen-associated
	molecular patterns)
Pfn	perforin
Pfo	perfringolizin O

pH pVDF	negativni desetiški logaritem koncentracije ionov H ₃ O ⁺
NaDS	natrijev dodecil sulfat
NaDS-PAGE	elektroforeza v poliakrilamidnem gelu v prisotnosti NaDS
Т	temperatura
Tc	tetraciklin
TCR	T-celični receptor
TEMED	N,N,N,N -tetrametil-etilendiamin
T _H 1	T celice pomagalke razreda 1 (ang. T helper cells (class) 1)
TLR	Tollu-podoben receptor (ang. Toll-Like Receptor)
ТМН	transmembrnski heliks
TNFα	dejavnik tumorske nekroze α (ang. tumor necrosis factor α)
TolA	protein TolA

SLOVARČEK

- MACPF/CDC domena MACPF/CDC se nahaja v perforinu, proteinih komplementa, bakterijskih litičnih proteinih itn. Imajo podoben mehanizem delovanja kot od holesterola odvisni citolizini (CDC, ang. Cholesterol-Dependent Cytolysins). TMH 1 in 2 se razvijeta v štiri transmembranske ploskve, ki prečkajo membrano. Domena služi za tvorbo pore in oligomerizacijo podenot.
- Perforin je najpomembnejša efektorska molekula v citotoksičnih limfocitih T (CTL), NK-celicah (ang. Natural Killer) in nekaterih drugih populacijah limfocitov. Perforin se nahaja v citotoksičnih granulah v efektorskih celicah. Ob pravem signal se granule zlijejo z membrano in sprostijo v ekstracelularni prostor, kjer je pH nevtralen in več kot 1 mM koncentracija Ca²⁺, ki omogočata njegovo delovanje. Vsebuje tudi domeno MACPF/CDC, s pomočjo katere se vsidra v membrano in tvori poli-perforinsko poro.
- TolA je transmembranski protein iz bakterije *E. coli.* Je ključen protein za ohranjanje integritete membrane. C-terminalni del proteina TolAIII je izpostavljen v citoplazmi, ima le en disulfidni mostiček, je zelo stabilen in ni nagnjen k agregaciji. V biokemiji se ga uporablja, ker v fuziji z nekaterimi proteinom omogoča ali poveča njegovo izražanje v topni obliki.

1 **UVOD**

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Perforin je citolitični protein, ki ga proizvajajo celice ubijalke ter nekatere druge celice imunskega sistema. Sintetizira se na endoplazmatskem retiklu (ER), kjer se iz C-terminalnega dela odcepi signali peptid, zrel Pfn pa se nato transportira v citotoksične granule. Pfn je granulah vezan na proteoglikan serglicin, ki je pomemben za stabilizacijo in prenos v izvencelični prostor. Nizek pH v granulah in odsotnost Ca^{2+} inhibirata delovanje Pfn. Ob pravem signalu se vsebina citotoksičnih granul sprosti v ekstracelularni prostor, kjer Pfn v lipidni membrani tarčnih celic tvori transmembranske pore, ki v končni fazi privedejo do propada celice.

Največja ovira pri preučevanju Pfn je ta, da ga limfociti proizvajajo le v nizkih količinah. Do sedaj izražanje zrelega Pfn v heterolognih ekspresijskih sevih ni bilo uspešno, posledično pa je malo znanega o delovanju Pfn na molekulskem nivoju. Pfn je zelo težko izolirati, po izolaciji je nestabilen in vsak pripravek se kvantitativno obnaša drugače. K agregaciji prispevajo predvsem hidrofobne površine proteina, solni mostički, ki nastanejo med posameznimi molekulami in nepravilno sparjeni cisteini, ki jih v celotni molekuli kar 20.

1.2 CILJ RAZISKOVANJA

V diplomskem delu smo hoteli izraziti posamezne domene človeškega perforina kot fuzijskega proteina s TolAIII fuzijskim partnerjem v bakteriji *Escherichia coli* in na ta način omogočiti pričetek študija delovanja njegovih domen.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

V heterolognem ekspresijskem sistemu *E. coli* bo možno izraziti N-terminalni del perforina in domeno MACPF.

2 PREGLED OBJAV

2.1 IMUNSKI SISTEM

Imunost izvira iz latinske besede *immunitas*, ki je pomenila, da rimskemu državljanu ni bilo treba v vojsko, plačevati davkov ali početi javnih del. Danes je imunost definirana kot rezistenca organizma na bolezni, še posebej tiste infekcijskega izvora (Abbas in Lichtman, 2006).

Imunski odziv pri človeku je lahko specifičen ali nespecifičen (slika 1). Slednji je po izvoru starejši in ga imenujemo prirojena ali naravna imunost. Prirojena imunost za razliko od specifične ne zagotavlja imunskega spomina, saj njegove komponente zaznavajo tako imenovane PAMP-e (ang., pathogen associated molecular patterns), ki so tuji lastnemu organizmu in značilni za drugo skupino organizmov. Komponente naravne imunosti so razširjene tako v živalskem kot rastlinskem kraljestvu (Abbas in Lichtman, 2006).



Slika 1: Glavni mehanizmi prirojene in specifične imunosti (Abbas in Lichtman, 2006).

Elemente naravne imunosti predstavljajo fizične in kemijske bariere (epitelij in protimikrobne snovi, ki jih te celice proizvajajo), fagocitne celice (nevtrofilci, makrofagi), NK celice, komplementni sistem in številni citokini, ki uravnavajo aktivnost celic nativne imunosti. Epitelij predstavlja mikrobom fizično bariero, celice epitelija pa proizvajajo antimikrobne snovi. Mednje so vrinjeni limfociti, ki preprečujejo infekcije in posebne antigen predstavljajoče celice (APC), Langerhansove celice, ki vzorčijo antigene (Ag). Fagocitne celice prepoznajo mikrobe preko TLR (ang. toll-like receptors) receptorjev, jih fagocitirajo in razgradijo. Obenem sproščajo citokine ter pomagajo pri obnovi poškodovanega tkiva. NK-celice eliminirajo celice lastnega tkiva, ki so okužene z intracelularnimi mikroorganizmi, tumorske celice, producirajo pa tudi interferon gama (IFN- γ). IFN- γ aktivira makrofage, ki posledično uničijo fagocitirane mikrobe. Proteini komplementa stimulirajo vnetni odziv in preko MAC (ang. membrane attacking complex) kompleksa lizirajo mikroorganizme. Z vezavo na mikrobe in njihove produkte jih označijo

za fagocitozo, ki jo posredujejo fagocitne celice naravne imunosti. Citokinom bi lahko rekli hormoni imunskega sistema, saj uravnavajo pravilno in ustrezno reakcijo vseh celic imunskega sistema (Abbas in Lichtman, 2006).

Ko govorimo o specifični imunosti, to največkrat pomeni pridobljeno imunost, ki predstavlja drugo linijo obrambe proti tujim Ag. Imunski odziv pridobljene imunosti lahko razdelimo na celičnega in humoralnega. Mediatorji slednjega so protitelesa (Ab, ang antibodies), ki jih proizvajajo limfociti B. Ab lahko najdemo kot membransko vezane receptorje na limfocitih B ali kot proteine, ki jih izločajo stimulirani limfociti B. So specifični za točno določeno molekulo oz. mikroorganizem in so sposobni razlikovati tudi med sorodnimi molekulami. Naloge Ab so prepoznavanje mikrobnih Ag, nevtralizacija mikrobne infektivnosti in označevanje mikrobov za odstranitev z različnimi efektorskimi mehanizmi. Ta del pridobljene imunosti je namenjen odstranjevanju zunajceličnih mikroorganizmov in njihovih toksinov (Abbas in Lichtman, 2006).

Za obrambo pred znotrajceličnimi mikroorganizmi pa je zadolžena celična imunost, katere mediatorji so limfociti T. Slednji spodbudijo uničenje fagocitiranih mikrobov v makrofagih (celice T pomagalke celic razreda 1 (T_H1 , ang. T helper cells 1)) ali pa uničijo okuženo celico (CTL). Po vsaki okužbi ostane v telesu del efektorskih celic, specifičnih za določen Ag, kar pomeni, da je ob ponovnem srečanju z istim Ag odziv hitrejši in močnejši kot ob prvi izpostavitvi (Abbas in Lichtman, 2006).

2.2 POPULACIJE IMUNSKIH CELIC, KI KOT EFEKTORSKE MOLEKULE VSEBUJEJO PERFORIN

2.2.1 Citotoksični limfociti T

Citotoksičnim limfocitom T pravimo tudi citolitični limfociti T. Limfociti T potujejo iz kostnega mozga v timus, kjer pride do diferenciacije v naivne celice CD4⁺ in CD8⁺ in do negativne selekcije, ko T-limfociti prepoznajo lastne Ag. Naivni limfociti niso sposobni efektorskih funkcij, lize okuženih celic, zato morajo biti najprej stimulirani, da se diferencirajo v efektorske celice. Naivne celice T zato potujejo v periferne limfatične organe, kjer so aktivirane s pomočjo APC. Funkcija perifernih limfatičnih organov je koncentriranje Ag. Naivni CTL prepoznajo Ag s pomočjo T-celičnega receptorja (TCR) in koreceptorja CD8. CTL prepoznajo citoplazemske proteinske Ag, ki so izpostavljeni na površini APC v povezavi z molekulami MHC razreda I (MHC I, ang. Major histocompatibility complex I), ki jih izražajo vse celice z jedrom (Abbas in Lichtman, 2006).

Za aktivacijo CTL sta potrebna dva pogoja in sicer prepoznava Ag in tesen stik z okuženo celico, ki ga posredujejo integrini. Tarče CTL so lahko fagocitne celice (makrofagi), ki so fagocitirale določen mikroorganizem, a je ta zbežal v citoplazmo celice, ali inficirane nefagocitne celice. Pri odstranjevanju inficiranih celic v paru sodelujeta populaciji celic CTL in T celic pomagalk razreda 1 ($T_{\rm H}1$ ang. T helper cells 1). Če ostanejo mikrobi po fagocitozi v fagosomih makrofagov, jim na pomoč priskočijo celice $T_{\rm H}1$, ki proizvajajo IFN- γ , ta pa aktivira antimikrobne mehanizme v aktiviranih makrofagih. Če mikrob zbeži iz fagosoma v citoplazmo, priskočijo na pomoč CTL, ki uničijo okuženo celico (Abbas in Lichtman, 2006).

CTL imajo še eno pomembno nalogo v našem telesu. Poseben razred CTL s pomočjo APC pomaga pri odstranjevanju in uničenju tumorskih celic, prav tako odstranjujejo celice tkiv po transplantacijah. CTL prepoznajo tumorske antigene v povezavi z molekulami MHC razreda I, ki se izpostavijo na površini malignih celic. Obenem potrebujejo stimulacijo s strani celic T_H1 , ki prepoznajo tumorske Ag v povezavi z molekulami MHC razreda II. Nekatere tumorske celice prenehajo izražati molekule MHC razreda I. Pri odstranjevanju teh celic zato pomagajo NK-celice ubijalke (Abbas in Lichtman, 2006).

CTL lahko svoje tarče ubijejo na vsaj tri različne načine, od katerih je za dva potreben kontakt s tarčno celico, mediatorji tretjega pa so citokini, ki delujejo na daljavo. Primera teh citokinov sta dejavnik tumorske nekroze α (TNF α , ang. Tumor Necrosis Factor α), ki preko svojega receptorja (TNFR) aktivira kaspazno kaskado v tarčnih celicah, ter IFN- γ , ki spodbudi ubijanje celic, posredovano z ligandom Fas (Andersen in sod., 2006).

Fas-ligand na CTL prepozna in se veže na Fas-receptor (IFNR) na tarči, kar aktivira kaspazno kaskado, ki vodi do apoptoze (Andersen in sod., 2006).

Druga pot ubijanja, za katero je potreben kontakt s tarčno celico, je degranulacija. Ko TCR, heterodimerni protein, zgrajen iz α in β transmembranske verige, na CTL, prepozna ustrezen peptid, predstavljen z molekulami MHC razreda I na celici tarči, se v CTL sproži signalizacija, posredovana s Ca²⁺. Ob prepoznavanju kompleksa peptid/MHC I pride do fosforilacije tirozinskih motivov na proteinih CD3 in ζ. To vodi do aktivacije kinaz družine Src ter posledično do aktivacije fosfolipaze C-y (PLC-y) (Abbas in Lichtman, 2006; Andersen in sod., 2006) in povišanje znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} ([Ca^{2+}]_i) (Huang in Wange, 2004). Inozitol-1,4,5-trifosfat, produkt aktivnosti PLC- γ , je sekundarni obveščevalec, ki sproži sproščanje Ca^{2+} iz endoplazmatskega retikla (ER) v citosol. Zaradi izpraznitve znotrajceličnih zalog Ca²⁺ se aktivirajo Ca²⁺-kanalčki na plazemski membrani, kar tudi sproži prehajanje Ca^{2+} iz zunajceličnega prostora v citosol (Gallo in sod., 2006). Povišana $[Ca^{2+}]_i$ privede tudi do polarizacije celic (Takayama in Sitkovsky, 1987; Esser in sod., 1996). Centrosom se v odvisnosti od Ca^{2+} reorientira proti mestu kontakta s tarčno celico, kar pa je potrebno za polarizirano sekrecijo citotoksičnih granul (Lowin-Kropf in sod., 1998; Stinchcombe in sod., 2001). Ob tem se v imunološko sinapso, ki nastane med obema celicama, sprosti vsebina granul.

2.2.2 NK celice ubijalke

NK celice ubijalke so pomembna komponenta naravne imunosti. Njihove delovanje je usmerjeno predvsem v odstranjevanje tumorskih celic in celic, ki so okužene s intracelularnimi paraziti. Predstavljajo 10 % populacije limfocitov. Na njihovi površini so izraženi številni receptorji za molekule na površini drugih celic (slika 2). Nekateri od teh receptorjev aktivirajo delovanje NK celic, drugi pa zavirajo njihovo delovanje. Med receptorji, ki aktivirajo NK celice, so tudi tisti, ki prepoznajo značilne markerje na celicah, ki doživljajo stres. Med celice, ki ob stresu izražajo značilne površinske markerje, spadajo tudi tiste okužene z intracelularnimi bakterijami in virusi. NK celice prav tako aktivira interlevkin-12 (IL-12), ker pa imajo receptor za Fc (ang. fragment crystalline) regijo imunoglobulinov (Ig) razreda G (IgG), prepoznajo tudi celice, prekrite s protitelesi.

Aktivirane NK celice imajo dva mehanizma delovanja (slika 2). Prvi, ki je podoben delovanju CTL, je degranulacija ob stiku z okuženo celico. Drugi mehanizem ob aktivaciji pa je sproščanje citokina IFN- γ , ki aktivira makrofage. NK celice in makrofagi delujejo sinergistično. Makrofagi po fagocitozi mikrobov producirajo IL-12, ki aktivira NK celice, ki nato začno izločati IFN- γ , kar je za makrofage signal za uničenje mikroba v fagosomu. NK celice so pomembne tudi zato, ker so v evoluciji razvile lastnost, da prepoznajo celice, ki ne izražajo Ag v povezavi z molekulami MHC razreda I, kar pa je eden od načinov, kako se nekateri virusi bojujejo pred detekcijo in uničenjem s strani CTL (Abbas in Lichtman, 2006).



Slika 2: Komunikacija med NK celicami in dendritičnimi celicami (DC). NK celice in DC celice se lahko vzajemno aktivirajo. Komunikacija poteka preko interakcij še neznanih ligandov in s citokini, ki jih proizvajata obe populaciji celic (Hamerman in sod., 2004).

2.2.3 Ostale populacije imunskih celic, ki kot efektorske molekule vsebujejo perforin

2.2.3.1 Regulatorne celice T (Treg)

To so $CD4^+$ $CD25^+$ T limfociti, ki imajo potencial, da eliminirajo avtologno aktivirane T_H in CTL limfocite, $CD14^+$ monocite ter zrele in nezrele DC. Pomembno nalogo imajo tudi pri eliminaciji malignih celic (Grossman in sod., 2004).

2.2.3.2 NK celice T

NK T celice predstavljajo manj kot 5 % vseh T celic. Na svoji površini imajo markerje, ki jih izražajo tudi NK celice. Izražajo α/β TCR, ki prepozna glikolipide in ostale neproteinske molekule. Njihova natančna funkcija še ni dobro znana (Abbas in Lichtman, 2006).

2.2.3.3 $\gamma \delta^+$ celice T

Ta vrsta limfocitov T ima namesto klasičnega $\alpha\beta$ - $\gamma\delta$ -TCR receptor. Prepoznajo proteinske in neproteinske Ag. Za razliko od ostalih populacij limfocitov T, ki gredo v timusu preko pozitivne in negativne selekcije, to ne velja za $\gamma\delta^+$ celice T, ki zapustijo timus kot naivne celice. Ko srečajo Ag, ki so mikrobnega izvora, sprožijo masovno produkcijo interlevkina 17 (IL-17). Receptor za IL-17 imajo nevtrofilci, ki nato pridejo na mesto okužbe. So prva skupina celic, ki zazna poškodbe epitelija in kože (Jensen in Yueh-hsiu, 2009).

2.2.3.4 CD4⁺ CTL

To je subpopulacija T celic pomagalk (CD4⁺). Približno 10 % CD4⁺ celic ob odsotnosti CTL prevzamejo njihovo funkcijo. Njihova citotoksičnost je posredovana preko Fasliganda (Williams N. S. in sod., 2009)

2.3 CITOTOKSIČNE GRANULE

Citotoksičnim granulam bi lahko rekli tudi ubijalski (Page in sod., 1998) ali bifunkcionalni lizosomi (Henkart in sod., 1984). Granule tudi zares opravljajo vlogo lizosomov saj so dokazali, da vnos zunajceličnih proteinov poteka s podobno kinetiko kot vnos v lizosome (Burkhardt in sod., 1990). Pokazali so, da je nizek pH v teh razdelkih nujen pogoj za citolitično aktivnost CTL (Kataoka in sod. 1994, Page in sod. 1998). Zaradi dvojne vloge citotoksičnih granul morajo biti CTL sposobne usmeriti lizosomske in sekretorne proteine v isti razdelek (v ostalih celicah so te poti ločene) (Page in sod., 1998). Granule morajo vzdrževati kisel pH, kar omogoča delovanje lizosomskih hidrolaz, medtem ko sprostitev vsebine med degranulacijo v zunajcelično okolje, kjer je pH nevtralen, omogoča aktivnost tako Pfn kot Gr. Obenem je s tem zagotovljena varnost efektorske celice, ki ima v granulah močno aktivne proteine v neaktivni obliki (Page in sod., 1998).

Perforin (Pfn) in grancimi (Gr) so v granulah vezani s kalertikulinom, ki ima vlogo šaperona in skladišča Ca²⁺. Oba se iz granul sprostita skupaj s kalertikulinom, ki najverjetneje regulira vlogo Pfn pred in po eksocitozi (Andrin in sod., 1998; Fraser in sod., 2000). Pfn in Gr sta vezana tudi na serglicin, negativno nabiti proteoglikan, ki najverjetneje pomaga pri stabilizaciji in prenosu Pfn in Gr do tarčne membrane (Stevens in sod., 1989). Granulizin naj bi pomagal pri uničenju določenega tipa tumorskih celic in z nekaterimi bakterijami okuženih celic (Krensky, 2000).

2.3.1 Grancim B

Gr B je serinska proteaza (Shi in sod., 1992), ki v celicah inducira od kaspaz odvisne ali neodvisne mehanizme apoptoze (Talanian in sod., 1997; Sutton in sod., 2000) (slika 3). Močan pozitivni naboj povzroča relativno visoko izoelektrično točko (Ip ang. Isoelectric point) 10, zaradi katere obstaja več možnosti za internalizacijo preko negativno nabitih membranskih komponent. Ob degranulaciji se GrB ne pojavi kot samostojna molekula, temveč v kompleksu s serglicinom, ki služi za nevtralizacijo naboja (Bird in sod., 2005).



Slika 3: Mehanizmi GrB, ki povzročijo smrt celice tarče (Cullen in Martin, 2008).

2.3.2 **Perforin**

Pfn je citolitični protein, katerega proizvajajo CTL, NK, Treg, NK T, $\gamma\delta^+T$ ter CD4⁺ CTL celice (Bolito in sod., 2007) in je ključnega pomena za uničenje z virusom okuženih in rakavih celic ter za vzdrževanje imunske homeostaze (Baran in sod., 2009). Pfn polimerizira v transmembranske kanale in posledično inducira osmotski stres, prav tako pa pomaga pri internalizaciji proapoptotskih Gr (Baran in sod., 2009).

Po nastanku imunološke sinapse se granule v citosolu efektorske celice usmerijo proti mestu kontakta s tarčo, nato se zlijejo z membrano efektorske celice in izločijo svojo vsebino v imunološko sinapso (Trapani, 1998; Stinchcombe in Griffiths, 2003). Pfn je glavna efektorska molekula citotoksičnih granul in skupaj s proapoptotskimi Gr inducira smrt celice tarče. Gr lahko v celice vstopijo po od Pfn-neodvisni poti s pomočjo endocitoze po elektrostatski vezavi na membrane (Bird in sod., 2005; Trapani in Sutton, 2003). Citolitična aktivnost Pfn je pri tem nujna za reguliran prehod Gr v citosol tarče, kjer inducira smrt celice po poti apoptoze (Nakajima in sod., 1995; Froelich in sod., 1996; Shi in sod., 1997). Mutacije v zapisu za Pfn lahko vodijo do družinske hemofagocitozne limfohistiocitoze (FHL, ang. familial hemophagocytic limphohistiocytosis) (Stepp in sod., 1999; Voskoboink in sod., 2006), z mutacijami v zapisu za Pfn pa so povezane tudi nekatere oblike raka (Clementi in sod., 2005; Mehta in sod., 2006; Voskoboink in sod., 2007).

Menijo, da cepitev N-glikana na C-terminalnem delu Pfn, 6 AK pred koncem zapisa, povzroči strukturno spremembo, ki bi lahko bila pomembna za aktivnost (Uellner in sod., 1997). Dokazali so tudi, da se Pfn brez C-terminalnega dela (do 515 AK) ne transportira v citotoksične granule, temveč ostane v ER, kjer je razgrajen (Uellner in sod., 1997).

Pierre Henkart je že leta 1975 predpostavljal, da imajo CTL posebne proteine, ki naredijo pore v membrani. Pfn so prvič izolirali leta 1980. V prvi polovici osemdesetih so odkrili tudi, da je formiranje litičnega kompleksa na tarči odvisno od Ca^{2+} (Tschopp in sod., 1986; Young in sod., 1986a). Henkartova skupina je navdušila skupino profesorja Echkarda Podacka, ki se je v tistem času ukvarjala s proteini komplementa in nastankom MAC pore. Odkrili so namreč, da je pora, ki jo tvori poli-Pfn neverjetno podobna pori MAC kompleksa komplementih proteinov. Leta 1983 so protein poimenovali perforin. Bili so prva skupina, ki je klonirala gen za Pfn (Blumenthal in sod., 1984; Masson in Tschopp, 1985; Young in sod, 1986b). Dokazali so, da Pfn lizira eritrocite prav tako pa tvori pore v umetnih membranah. Ca^{2+} je nujen za polimerizacijo, vezavo na membrano, vstavitev v membrano in posledično litično aktivnost (Ishiura in sod., 1990).

Poravnava zapisov za Pfn in C9 je presenetila z dejstvom, da imata proteina skupni dve regiji, domeno MACPF/CDC in domeno, podobno domeni EGF (Lichtenheld in sod, 1988; Shinkai in sod, 1988; Kwon in sod., 1989). Več raziskovalnih skupin je predstavilo študije modeliranja strukture Pfn, kjer so trdili, da domeno MACPF/CDC predstavljata dva amfipatična α-heliksa, ki se vsidrata v membrano (Shinkai in sod., 1988; Peitsch in sod, 1990; Persechini in sod, 1992;). Predpostavljali so, da heliks 1 predstavlja zaporedje Pfn od 187 do 203 AK, heliks 2 pa aminokislinski ostanki od 211 do 239. Oba naj bi bila povezana s kratko citoplazemsko zanko, ki naj bi zajemala aminokislinske ostanke od 204 do 210 (Shinkai in sod, 1988; Peitsch in sod., 1990). Kljub temu, da je Pfn najpomembnejša efektorska molekula CTL, NK celic in drugih celic imunskega sistema, je bilo to področje več kot 20 let zelo slabo raziskano. Funkcionalne študije so bile onemogočene, ker se Pfn v heterolognem sistemu zelo težko izrazi.

Prelomno odkritje se je zgodilo leta 2007, ko so odkril, da je domena MACPF/CDC v naravi veliko bolj razširjena kot so sprva domnevali. (Rosado in sod. 2007). Objava dveh kristalnih struktur proteinov MACPF/CDC, človeškega C8α, ki spada med proteine komplementa (Hadders in sod 2007, Slade in sod., 2008) in bakterijskega Plu-MACPF (domnevni toksin iz bakterije *Photorhabdus luminiscens*) (Rosado in sod., 2007) (slika 7), je razumevanje delovanja in 3D-strukture Pfn pomaknila na višjo raven. Strukturne študije so pokazale, da je domena MACPF/CDC veliko dališa kot so do takrat domnevali (okrog 350 ak) (slika 4), obenem naj bi bilo zvitje proteina podobno kot pri proteinih CDC, ki jih proizvajajo bakterije (slika 5 in 6). Mnogi človeški patogeni, bakterije rodov Clostridium, Streptococcus, Chlamydia izločajo toksine, ki imajo podoben mehanizem delovanja kot Pfn (Baran in sod, 2009). Ključna odseka za insercijo sta regiji Pfn 109-162 in 249-295, ki se zvijeta v strukturo podobni TMH1 in TMH2 (Trans-membranski heliks 1 in 2) pri družini toksinov CDC (slika 6 in 8). Prvi odsek je zgrajen iz treh α-heliksov (TMH1), drugi pa iz dveh α-heliksov (TMH2), ki po vezavi na membrano spremenita konformaciji, tako da nastanejo štirje amfipatični β-trakovi, ki se vsidrajo v membrano (Rosado in sod., 2007) (slika 6 in 8). Ta mehanizem tvorbe pore predvideva polimerizacijo po vezavi na membrano in pred insercijo vanjo (Baran in sod., 2009). Za Pfn in ostale proteine MACPF/CDC je značilen motiv Y/W-G-T/S-H-F/Y-X₆-G-G, trije ključni glicini (G) so nujni za oblikovanju pore proteinov CDC (Slade in sod., 2008).

Človeški perforin



MACPF domena človeškega perforina



Slika 4: Funkcionalne domene človeškega perforina in njegova MACPF domena.



Slika 5: Topološki diagram elementov sekundarne strukture a) Plu-MACPF domene in b) perfringolizina O (Pfo) (Rosado in sod., 2007).



Slika 6: Mehanizem delovanja proteinov CDC.

THM1 in THM2 odseka se ob stiku z membrano razvijeta in tvorita štiri amfipatične β -trakove. Oligomerizacija ~30 molekul rezultira v tvorbi β -soda, ki pasira membrano (Rosado in sod., 2007).



Slika 7: Podobnosti v strukturi a) Plu-MACPF, b) človeški C8a in c) Pfo

Modre barve so β -trakovi, nujni za polimerizacijo, zlate barve so α -heliksi, ki po vsidranju v membrano spremenijo konformacijo v β -trakove, z rdečo so označeni ohranjeni trije gliciniski ostanki, ki jih najdemo v vseh domenah MACPF/CDC (Lukoyanova in Saibil, 2008).



Slika 8: Konformacijske spremembe pri tvorbi pore s proteini CDC. a) kristalna struktura Pfo b) konformacija Pfo pri vsidranju v membrano c) pora po oligomerizaciji monomerov Pfo (Lukoyanova in Saibil, 2008).

Najnovejše raziskave kažejo, da je zelo ohranjeno področje Pfn od 187 do 239 aminokislinskega ključno za oligomerizacijo v poli-Pfn (Baran in sod., 2009) (slika 9). MAC proteini naj bi oligomerizirali preko velikih rigidnih odsekov v regiji MAC. Različne podskupine proteinov MAC so razvile različne načine za polimerizacijo in nastanek pore. Pomembno je, da Pfn v CTL ni aktiven. Ker so ključni AK ostanki (D191in E343) pri pH v lizosomih (4,9) v protonirani obliki, je tako preprečena oligomerizacija in delovanje Pfn (Baran in sod., 2009). Delovanje domene domene C2 je regulirano na podoben način, saj je ključni aspartat, ki veže Ca²⁺ v lizosomih v protonirani obliki (Voskoboink in sod., 2005). Tako le en mehanizem kontrolira dva dogodka pri aktivaciji Pfn, torej nastanek intra- in intermolekularnih vezi (Baran in sod., 2009).



Slika 9: Model pore proteinov MAC v lipidni membrani (Rosado in sod., 2008).

2.4 PROTEIN TolA

Protein TolA je membranski protein iz bakterije E. coli. Je ključnega pomena za ohranjanje integritete plazemske membrane, omogoča tudi prevzem kolicinov in bakteriofagov iz okolja (Levengood in sod., 1995; Lazzaroni in sod., 1999; Lakev in sod., 2001). Sestavljen je iz treh delov. Kratek N-terminalni del predstavlja transmembranski heliks, ki omogoča vsidranje proteina v bakterijsko membrano. Druga in največja polarna domena je sestavljena predvsem iz α-heliksov. C-terminalna domena III (TolAIII) je iz 92 amino kislinskih ostankov in ima le en disulfidni mostiček (Lubkowski in sod., 1999). TolAIII je zelo stabilen protein in ni nagnjen k agregaciji tudi pri koncentracijah, višjih od 30 mg/ml (Markides, 1996). Pokazali so, da ekspresija nekaterih, tudi evkariotskih proteinov, v obliki fuzijskih proteinov s partnerjem TolA omogoča visoke donose pri izolaciji (Anderluh in sod., 2002). Ko so gen za EqtII izražali v ekspresijskem sistemu pTol, so ugotovili, da se večina proteina nahaja v netopni frakciji, kljub temu pa se je donos proteina v topni frakciji značilno povečal v primerjavi s prej objavljenimi donosi (Anderluh in sod, 1996). Fuzijski protein se zlahka izolira z Ni-afinitetno kromatografijo. Poznamo tri ekspresijske pTol sisteme, ki se med seboj razlikujejo v prepoznavnih mestih za endopeptidaze in teoretičnih pl. Izoelektrična točka TolAE je 6,6 in ima prepoznavno mesto za enterokinazo, TolAX in TolAT imata bazični karakter z izoelektrično točko 8,8. Prvi ima prepoznavno mesto za faktor Xa, drugi, ki smo uporabljali tudi mi, pa prepoznavno mesto za trombin. (Anderluh in sod., 2003).

2.5 ZAKLJUČEK PREGEDA OBJAV, HIPOTEZA IN NAMEN DELA

V diplomskem delu smo hoteli izraziti različne dele človeškega perforina. Ker se biokemijsko okolje v bakterijski celici zelo razlikuje od tistega v evkariotski celici, smo hoteli Pfn izolirati v obliki fuzijskega proteina s TolAIII partnerjem. Fuzijski proteini tako ne bi bili nagnjeni k agregaciji, kar se zgodi pri izražanju Pfn v bakterijskih celicah. Izražanje proteina pa je tudi prva kritična točka, ki jo moramo obiti na poti do izolacije rekombinantnega Pfn. Fuzijske proteine bi nato cepili s proteazo trombin in s pomočjo histidinskega repka izolirali Pfn fragmente. Tako bi lahko omogočili začetek študije rekombinantnega človeškega Pfn. Obenem bi lahko nadgradili najnovešja spoznanja in odkritja zadnjih nekaj let.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

Preglednica 1: Kemikalije, uporabljene v diplomskem delu.

Proizvajalec	Kemikalije			
Biorad, ZDA	30 % Acrylamide/Bis Solution, Coomassie Brilliant Blue			
Difco Laboratories,	SOB			
ZDA				
Kemika, Hrvaška	MgSO ₄			
Jena Bioscience	začetni oligonukleotidi			
Merck, Nemčija	aceton, agar, NH ₄ Cl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , EtOH, EDTA, glicin, β-D-glukoza, CaCl ₂ ,			
	KH ₂ PO ₄ , NaH ₂ PO ₄ ·1H ₂ 0, NaDS, Na ₂ HPO ₄ , NaOH, NaCl, Tris, Tris/HCl, urea,			
	H ₂ O ₂ , Pefabloc, DTT, ledocetna kislina			
Nunc, Danska	mikrotitrske ploščice			
Operon	začetni oligonukleotidi			
Sartorius, Švedska	filtri 0,2 μm in 0,45 μm			
Serva, Nemčija	APS			
Spectrapor, ZDA	dializne vrečke (M _w 12-14 in 6-8 kDa)			
Sigma, ZDA	4-kloro-1-naftol, agaroza, ampicilin, imidazol, IPTG, kanamicin, kloramfenikol,			
	LB, PVDF, temed, β-MeEtOH, benzamidin HCl, PMSF, tetraciklin, Triton X-			
	100			
Fermentas, Kanada	GeneRuler 1 kb DNA Ladder, PageRuler Prestained Protein Ladder			

3.1.2 Uporabljeni kompleti

Preglednica 2: Kompleta, uporabljena v diplomskem delu.

Proizvajalec	Komplet
Promega, ZDA	»Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system« komplet za izolacijo
	plazmidne DNA
QIAGEN, ZDA	»QIAquick Gel Extraction Kit« komplet za ekstrakcijo DNA iz agaroznega gela

3.1.3 Uporabljene raztopine, pufri in standardi

3.1.3.1 Raztopine za agarozno elektroforezo

Preglednica 3: Pufra za agarozno elektroforezo.

Pufer	Sestavine
10-kratni TAE pufer za agarozno	10 mM EDTA, 400 mM Tris/HCl, 10 % ledocetna kislina (v/v),
elektroforezo	pH 8 v dH ₂ 0
6-kratni nanašalni pufer za agarozno	0,25 % bromfenol modro (m/v), 30 % glicerol, 0,25 %
elektroforezo	ksilencianol (m/v) v dH_20

3.1.3.2 Raztopine za pripravo kompetentnih celic

Preglednica 4: Raztopini za pripravo kompetentnih celic.

Raztopina	Sestavine
0,1 M CaCl ₂ (sterilno filtrirano)	$0,1 \text{ M CaCl}_2 \text{ v } dH_2 0$
CaCl ₂ , Tris-glicerol (sterilno	50 mM CaCl ₂ , 10 mM Tris-HCl, 10 % glicerol (v/v), pH 7 v dH ₂ 0
filtrirano)	

3.1.3.3 Raztopine za NaDS-PAGE in imunodetekcijo

Preglednica 5: Pufri in raztopine, uporabljene za poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE), prenos proteinov po westernu in imunodetekcijo.

Pufer/raztopina/standard	Sestavine
10-kratni pufer z NaDS	1.92 M glicin, 35 mM NaDS, 25 mM Tris v dH ₂ 0
1-kratni nanašalni pufer za NaDS-PAGE	60 mM Tris-HCl, 0,1 % Coomassie Brilliant Blue (m/v), 5 %
-	glicerol, 2 % NaDS, pH 8.8 v dH ₂ 0
2-kratni nanašalni pufer za NaDS-PAGE	120 mM Tris-HCl, 0,2 % Coomassie Brilliant Blue (m/v), 10
-	% glicerol, 4 % NaDS, pH 8.8 v dH ₂ 0
5-kratni nanašalni pufer za NaDS-PAGE	300 mM Tris-HCl, 0,5 % Coomassie Brilliant Blue (m/v), 25
	% glicerol, 10 % NaDS, pH 8.8 v dH ₂ 0
Raztopina za barvanje NaDS-PAGE	0.5 % Coomassie Brilliant Blue (m/v), 40 % metanol (v/v), 10
gelov	% ocetna kislina (v/v)
Raztopina za razbarvanje NaDS-PAGE	40 % metanol (v/v), 10 % ocetna kislina (v/v)
gelov	
12 % ločitveni gel (za dva gela)	1,8 ml akrilamida, 3,104 ml dH ₂ 0, 0,75 ml 3-kratnega Tris
	(pH 8) pufra, 40 µl 10 % NaDS, 300 µl 1,5 % APS, 6 µl
	TEMED
nanašalni gel (za dva gela)	0,5 ml akrilamida, $2,945$ ml dH ₂ 0, $1,25$ ml 0,5-kratnega Tris
	(pH 7,6) pufra, 50 µl 10 % NaDS, 250 µl 1,5 % APS, 5 µl
	TEMED
Pufer za mokri prenos proteinov na	200 metanol (v/v), 100 ml 10-kratni pufra z NaDS, dH ₂ 0 do 1
PVDF membrane	1
20-kratni pufer za spiranje PVDF	20 mM EDTA, 1 M NaCl, 200 mM Tris-HCl, pH 7,4
membran	
Pufer za blokiranje PVDF membran	1-kratni pufer za spiranje PVDF membran, 4 % (m/v) BSA
Pufer za razvijanje PVDF membran	137 mM NaCl, 0.72 mM Na ₂ HPO ₄ , 25 mM Tris
Developing solution	
Raztopina za barvanje PVDF membran	30 mg 4-kloro-1-naftola v 10 ml MeOH, 50 ml pufra za
	razvijanje PVDF membran, 60 µl H ₂ O ₂
Proteinski standardi	Pageruler prestained protein ladder, Fermentas

3.1.3.4 Raztopine za dializo

Preglednica 6: Pufra za dializo.

Pufer	Sestavine
Dializni pufer	5 mM EDTA, 1-kratni fosfatni pufer, 20 mM β-MetOH, pH 7,2
20-kratni fosfatni pufer	140 ml 200 mM NaH ₂ PO ₄ , 360 ml Na ₂ HPO ₄ , dH ₂ O do 1 l

3.1.3.5 Raztopine za hemolizni test

Preglednica 7: Raztopini za hemolizni test.

Pufer/raztopina	Sestavine
Fiziološka raztopina	0,9 % NaCl, pH 7,4 v dH ₂ O
Eritrocitni pufer	130 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,4 v dH ₂ O

3.1.3.6 Raztopine za ionsko izmenjevalno kromatografijo

Pufer	Sestavine
Pufer A (sterilno, odzračeno)	10-kratni fosfatni pufer, pH 6,9, 7,8 in 9,1
Pufer B (sterilno, odzračeno)	10-kratni fosfatni pufer, 1 M NaCl, pH 6,9 7,8 in 9,1

3.1.3.7 Pufri za gelsko filtracijo

Preglednica 9: Pufer za gelsko filtracijo.

Pufer	Sestavine
Pufer za gelsko filtracijo (sterilno	5 mM EDTA, 20 mM Tris, 2 mM DTT, pH 8 v dH ₂ O
filtrirano, odzračeno)	

3.1.3.8 Pufri za hidrofobno kromatografijo

Dragladniag	10.	Dufii 70	hidrofohno	Irromato	arofiio
riegieunica	10.	r uni za	maroroono	KIOIIIato	granjo.

Pufer				Sestavine
Pufer	A1	(sterilno	filtrirano,	10-kratni fosfatni pufer, 250 mM NaCl, pH 7,2
odzrače	no)			
Pufer	A2	(sterilno	filtrirano,	10-kratni fosfatni pufer, 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , pH 7,2
odzrače	no)			
Pufer	В	(sterilno	filtrirano,	10-kratni fosfatni pufer, pH 7,2
odzrače	no)			

3.1.3.9 Pufri za Ni-afinitetno izolacijo pod nativnimi pogoji

|--|

Pufer	Sestavine
Pufer A	10-kratni fosfatni pufer, 20 mM β-MeEtOH, 300 mM NaCl, 10
	mM imidazol, pH 8
Pufer B	10-kratni fosfatni pufer, 20 mM β-MeEtOH, 300 mM NaCl, 20
	mM imidazol, pH 8
Pufer C	10-kratni fosfatni pufer, 20 mM β-MeEtOH, 300 mM NaCl, 300
	mM imidazol, pH 8

3.1.3.10 Pufri za Ni-afinitetno izolacijo fuzije pod denaturajočimi pogoji

Pufer	Sestavine
Pufer A	10-kratni fosfatni pufer, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8
Pufer B	20-kratni fosfatni pufer, 10 mM Tris HCl, 8 M urea, pH 8
Pufer C1	20-kratni fosfatni pufer, 10 mM Tris HCl, 8 M urea, pH 6,3
Pufer C2	20-kratni fosfatni pufer, 10 mM imidazol, 10 mM Tris HCl,
	8 M urea, pH 8
Pufer D1	20-kratni fosfatni pufer, 10 mM Tris HCl, 8 M urea, pH 5,9
Pufer D2	20-kratni fosfatni pufer, 300 mM imidazol, 10 mM Tris HCl,
	8 M urea, pH 8
Pufer E	20-kratni fosfatni pufer, 10 mM Tris HCl, 8 M urea, pH 4,5

Tegreanie 12: 1 ani 2a zenaelje razije pod denadaraje enni pogoji 21: 1 animetno menaegranje

3.1.4 **Encimi**

	Preglednica	13:	Encimi,	uporabl	jeni v	dip	olomskem	delu
--	-------------	-----	---------	---------	--------	-----	----------	------

Proizvajalec	Encim
Fermentas, Kanada	BamHI, KpnI, MluI, RNAza A, T4 DNA ligaza, XhoI, Vent
	DNA polimeraza
Merck, Nemčija	Trombin
Sigma, ZDA	DNAza B, lizocim,

3.1.5 Laboratorijska oprema

Preglednica 14: Uporabljena laboratorijska oprema.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Amersham Pharmacia Biotech, ZDA	Electrophoresis Power Supply EPS 1001, Äkta FPLC
Bio-Rad, ZDA	PowerPac 1000, PowerPac HC
Biosan, Latvija	Thermo Shaker TS-100
Dynex Technologies, ZDA	MRX (čitalec mikrotiterskih ploščic)
Eppendorf, Nemčija	Centrifuga 5415 D
Gilson, ZDA	Pipetman
Hettich, Nemčija	Rotanta 460 R
Laboratory Centrifuges	3K30
LKB-Pharmacia, Nemčija	Multitemp II
MWG-Biotech, Nemčija	Primus PCR machine
Perkin Elmer, ZDA	UV/VIS Spectrometer Lambda Bio
Shimadzu, Japonska	UV-2101 PC
Sonics & Materials, ZDA	Vibra Cell
Tehtnica; Slovenija	Vibromix 10, Vibromix 301 EVT, Centric 322A,

3.1.6 Gojišča za E. coli

Gojišče	Sestava
Tekoče gojišče (LB + M9)	LB (10 g/l kazeinski hidrolizat, 5 g/l kvasni ekstrakt,
	10 g/l NaCl) 25 g/l
	M9 (6 g/l NaCl, 6 g/l Na ₂ HPO ₄ , 1 g/l NH ₄ Cl, 3 g/l KH ₂ PO ₄)
	v ohlajen sterilen medij dodamo še 0,1 mM CaCl ₂ , 1 mM MgSO ₄ in
	0,4% glukoza
	dodamo ustrezne antibiotike (100 µg/ml Amp, 10 µg/ml Cm, 10 µg/ml
	Kn, $30 \mu\text{g/ml}$ Tc)
Trdo gojišče (LB + agar)	LB (10 g/l kazeinski hidrolizat, 5 g/l kvasni ekstrakt,
	10 g/l NaCl) 25 g/l
	agar 15 g/l
	dodamo ustrezne antibiotike (100 µg/ml Amp, 10 µg/ml Cm, 10 µg/ml
	Kn, $30 \mu\text{g/ml}$ Tc)
Tekoče gojišče SOB	5g/l kvasni ekstrakt, 186 mg/l KCl,4 g/l MgSO ₄ , 0,5 g/l NaCl, 20 g/l
	tripton,

3.1.7 Uporabljena protitelesa

Preglednica 16: Protitelesa, uporabljenav diplomskem delu.

Proizvajalec	Protitelo
MABTECH, Švedska	Mišja protitelesa proti EGF domeni perforina (Pf-344)
QiaGen, ZDA	Mišja protitelesa proti pentahistidinskem repku
Santa Cruz biotechnology, ZDA	Kozja proti mišja protitelesa konjugirana s hrenovo peroksidazo

3.1.8 **Polnilci kromatografskih kolon in pripravljene kolone**

reglednica 17: Kolone in	polnilci kromato	grafskih kolon, u	porabljeni v di	plomskem delu.
--------------------------	------------------	-------------------	-----------------	----------------

Proizvajalec	Polnilci kromatografskih kolon in pripravljene kolone
GE Healthcare, ZDA	HiTrap Butyl FF, HiTrapOctyl FF, HiTrap Phenyl FF (low sob),
	HiTrap Phenyl HP
Pharmacia, Švedska	Mono S HR 5/5, Superdex 75 HR 10/30
QUIAGEN, ZDA	Ni-NTA agaroza

3.1.9 Bakterijski sevi

Uporabili smo različne ekspresijske sisteme bakterije *E. coli*. Osnovne značilnosti posameznih sevov so opredeljene v spodnji tabeli (Merck, 2009).

Preglednica 18: Uporabljeni sevi E. coli pri diplomskem delu, njhovi genotipi in opis glavnih značilnosti.

Sev in genotip	Opis
Escherichia coli DH5 α F ⁻ endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r _K ⁻ m _K ⁺) supE44 relA1 F 80D lacZD M15 D (lacZYA-argF) U169	Za sev sta značilna visoka učinkovitost transformacije in visok donos plazmidov ob izolaciji.
E. coli BL21 (DE3) pLysE F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pLysE (Cm ^R)	Ima mutirana zapisa za proteazi OmpT in LonI, kar omogoča izolacijo intaktnih rekombinantnih proteinov. V sevu je profag DE3, ki vsebuje gen za RNA polimerazo faga T7 pod kontrolo lacUV5. Vsebuje plazmid pLysE, ki kodira T7 lizocim in zato je znižano osnovno izražanje tarčnega gena. Plazmid pLysE izraža višjo količino lizocima T7 kot pLysS, kar omogoča še boljšo kontrolo T7 RNA polimeraze. Dobra kontrola T7 RNA polimeraze je še posebej nujna, ko pričakujemo, da bo željeni protein toksičen za bakterijo. Zaradi slednjega plazmida je sev odporen na kloramfenikol.
E. coli BL21 (DE3) pLysS F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pLysS (Cam ^R)	Ima mutirana zapisa za proteazi OmpT in LonI, kar omogoča izolacijo intaktnih rekombinantnih proteinov. V sevu je profag DE3, ki vsebuje gen za RNA polimerazo faga T7 pod kontrolo lacUV5. Ker vsebuje plazmid pLysS, ki kodira T7 lizocim, je znižano osnovno izražanje tarčnega gena. Zaradi slednjega plazmida je sev odporen na kloramfenikol.
E. coli Rosetta (DE3) pLysS FompT hsdS _B (r _B ·m _B ⁻) gal dcm lacY1 (DE3) pLysSRARE (Cm ^R)	Ta sev je izpeljava seva BL21 z delecijo lacY (lac permeaza), kar omogoča boljšo kontrolo nivoja izražanja gena s koncentracijo IPTG. Vsebuje plazmid pLysS, ki kodira T7 lizocim in zato je znižano osnovno izražanje tarčnega gena. Zaradi slednjega plazmida je sev odporen na kloramfenikol. Na istem plazmidu vsebuje kodone za redke tRNA, kar olajša izražanje genov.
E. coli Origami (DE3) pLysS ∆ara-leu7697 ∆lacX74 ∆phoAPvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac ⁺ (lacI ^q)pro] gor522::Tn10(Tc ^R) trxB::kan (DE3) pLysS (Cm ^R)	Izvira iz seva K-12. Mutacija v poti redukcije disulfidov v citoplazmi (trxB/gor) olajša tvorbo disulfidnih mostičkov v citoplazmi <i>E. coli</i> . Vsebuje tudi plazmid pLysS, ki kodira T7 lizocim in zato je znižano osnovno izražanje tarčnega gena. Sev je odporen na tetraciklin, kanamicin (zaradi mutacij trxB in gor) in kloramfenikol (zaradi plazmida pLysS).
E. coli Rosetta-gami B(DE3) pLysS F`ompT hsdS _B (r _B `m _B `) gal dcm lacY1 ahpC (DE3) gor522::Tn10 trxB pLysSRARE (Cam ^R , Kan ^R , Tet ^R)	Izvira iz seva BL21 in združuje glavne značilnosti celic BL21, Origami in Rosetta. Sev ima tako okvarjena zapisa za LonI in OmpT proteazi. Zaradi mutacije v poti redukcije disulfidov v citoplazmi (trxB/gor) se olajša tvorbo disulfidnih mostičkov v citoplazmi E. coli. Zaradi delecije lacY (lac permeaza) je omogočena boljša kontrola izražanja gena s koncentracijo IPTG. Vsebuje plazmid pLysS, ki kodira T7 lizocim in zato je znižano osnovno izražanje tarčnega gena. Zaradi slednjega plazmida je sev odporen na kloramfenikol. Na istem plazmidu vsebuje kodone za redke tRNA, kar olajša izražanje genov, ki le-te vsebujejo. Sev je odporen na tetraciklin, kanamicin (zaradi mutacij trxB in gor).

3.1.10 Oligonukleotidi za verižno reakcijo s polimerazo

3.1.10.1 Začetni oligonukleotidi za konstrukte, pri katerih TolA predstavlja Nterminalni del fuzije

Konstrukt	Začetni oligonukleotid	Obratni začetni oligonukleotid
TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎	fPFN(22-121)	rPFN(22-121)
	5' – ttt ttt gga tcc ccg tgc cac aca	5' – ttt ttt acg cgt tca cgc atc ccg
	gcc gca – '3	ggc cac agc – '3
TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₃₆₎	fPFN(22-121)	mPFN136r
	5' – ttt ttt gga tcc ccg tgc cac aca	5' – cgc acg cgt tta agt cac gtc
	gcc gca – '3	cag ccc gac – '3
TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₆₂₎	fPFN(22-136)	mPFN162r
	5' – ttt ttt gga tcc ccg tgc cac aca	5' - cgc acg cgt tta ggt ctt ctg ggc
	gcc gca – '3	tgc aaa gtt – '3
TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₉₆₎	fPFN(22-136)	mPFN196r
	5' – ttt ttt gga tcc ccg tgc cac aca	5' - cgc acg cgt tta ggc cct ttg gaa
	gcc gca – '3	gtc agg gtg – '3
TolA-Pfn ₍₁₉₆₋₅₄₀₎	mPFN196f	mPFN540r
	5' – cgc ctc gag gcc ctc ggg gac	5' – cgc acg cgt tta aag cat ttg
	ctg – '3	ggg gac ata gtc cag – '3

Preglednica 19: Začetni oligonukleotidi za pomnoževanje Pfn, ki predstavlja C-terminalni delu fuzije.

3.1.10.2 Začetni oligonukleotidi za konstrukta $\mbox{PFN}_{(22-121)}\mbox{-}\mbox{TolA}$ in TolA-PFN $_{(22-121)}\mbox{-}\mbox{TolA}$

Preglednica 20: Začetni oligonukleotidi za konstrukta Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA in TolA- Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA

Konstrukt	Začetni oligonukleotidi za	Začetni oligonukleotidi za
	perforinski del fuzije	TolA del fuzije
Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA	f1PFN22	fTolAIII
	5' – ttt ttt ctc gag ccg tgc cac aca	5' – ttt ttt gga tcc aac aat ggc
	gcc gca – '3	gca tca ggg – '3
	rPFN121	rTolAIII
	5' – aaa aaa gga tcc gcg cgg aac cag	5' – aaa aaa acg cgt tta cgg ttt
	cgc atc ccg ggc – '3	gaa gtc caa – '3
TolA- Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA	f2PFN22	fTolAIII
	5' – ttt ttt ggt acc ccg tgc cac aca	5' – ttt ttt gga tcc aac aat ggc
	gcc gca – '3	gca tca ggg – '3
	rPFN121	rTolAIII
	5' – aaa aaa gga tcc gcg cgg aac cag	5' – aaa aaa acg cgt tta cgg ttt
	cgc atc ccg $ggc - '3$	gaa gtc caa – '3

3.1.10.3 pTolT

Vektor je izpeljanka vektorja pET8c. Uporablja se ga za izražanje fuzijskih proteinov (Anderluh in sod., 2002). N-terminalnemu His-repku sledi zaporedje, ki kodira tretjo domeno periplazemskega bakterijskega proteina TolA. Temu je dodan vmesnik, ki vsebuje fleksibilno regijo (GGGS) in cepitveno zaporedje za trombin (LVPR). V plazmidu so restrikcijska mesta za *Bam*HI, *Kpn*I in *Mlu*I, preko katerih vstavimo v plazmid gen za protein, ki ga želimo izraziti (slika 10).

Skočaj M. Izražanje delov človeškega perforina v bakteriji *Escherichia coli*. Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije, 2009



Slika 10: Shema vektorja pTolT s fragmentom TolA, označenim prepoznavnim mestom za trombin in restrikcijskimi mesti.

- 3.2 METODE
- 3.2.1.1 Izdelava različnih konstruktov Pfn v obliki fuzijskega proteina s TolA
- 3.2.1.2 Priprava konstruktov Pfn, ki predstavljajo C-terminalni del fuzijskega proteina

Z začetnimi oligonukleotidi smo iz plazmida, na katerem je zapis za človeški Pfn, z verižno reakcijo s polimerazo (ang. PCR, polymerase chain reaction) namnožili zaporedja Pfn za konstrukte TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎, TolA-Pfn₍₂₂₋₁₃₆₎, TolA-Pfn₍₂₂₋₁₆₂₎, TolA-Pfn₍₂₂₋₁₉₆₎ in TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎. Vsi konstrukti so imeli na 5' koncu prepoznavno mesto za *Bam*HI, na 3' koncu pa prepoznavno mesto za *MluI* z izjemo PFN₍₁₉₆₋₅₄₀₎, ki je imel prepoznavno mesto za *Kpn*I restriktazo. Produkte PCR in vektor pTolT smo nato rezali z ustreznima paroma restrikcijskih encimov po navodilih proizvajalca (Fermentas, Kanada). Rezane fragmente in rezane dele vektorja smo nato ločili z agarozno elektroforezo in jih iz gela očistili s pomočjo kompleta za ekstrakcijo DNK iz agaroznega gela po navodilih proizvajalca (QiaGen, ZDA). Posamezne fragmente smo nato vključili v vektor pTolT. Ligacija je potekala preko noči pri 16 °C z encimom T4 DNK ligaza. Po končani ligaciji smo T4 DNK ligazo inaktivirali tako, da smo epice z ligacijsko mešanico za deset minut izpostavili temperaturi 65 °C, ligacijske mešanice pa transformirali v kompetentne celice DH5 α . Uspešnost restrikcije in ligacije smo nato potrdili s PCR, pri čemer smo uporabili začetne nukleotide, ki ustrezajo določenemu konstruktu ter s kontrolno restrikcijo. 3.2.1.1 Priprava fragmenta Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ za vektor pTolT tako, da predstavlja Pfn del fuzije N-terminalni (Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA) ali sredinski del (TolA- Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA) fuzijskega proteina

3.2.1.1.1 TolA- Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA

Potek priprave plazmida je prikazan na sliki 11. Z začetnimi oligonukleotidi smo iz plazmida, na katerem je zapis za človeški Pfn, s PCR namnožili zaporedje Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎, iz pTolT vektorja pa smo namnožili še zaporedje za TolA. Pfn in TolA smo cepili z *Bam*HI. Rezane fragmente smo ločili z agarozno elektroforezo in ju očistili iz gela s pomočjo kompleta za ekstrakcijo DNK iz agaroznega gela. Nato smo oba rezana fragmenta ligirali s T4 DNK ligazo, preko noči pri 16 °C. Po končani ligaciji smo T4 DNK ligazo inaktivirali tako, da smo epice z ligacijsko mešanico za 10 minut izpostavili temperaturi 65 °C. Produkt ligacije (Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA) in vektor pTolT smo nato rezali s *Kpn*I in *Mlu*I. Rezane fragmente smo ločili z agarozno elektroforezo in jih očistili iz gela s pomočjo kompleta za ekstrakcijo DNK iz agaroznega gela. Oba rezana fragmenta smo ligirali s T4 DNK ligazo, preko noči pri 16 °C. Po končani ligaciji smo T4 DNK ligazo inaktivirali tako, da smo epice z ligacijsko mešanico za 10 minut izpostavili temperaturi 65 °C, preko noči pri 16 °C. Po končani ligaciji smo T4 DNK ligazo inaktivirali tako, da smo epice z ligacijsko mešanico za 10 minut izpostavili temperaturi 65 °C, preko noči pri 16 °C. Po končani ligaciji smo T4 DNK ligazo inaktivirali tako, da smo epice z ligacijsko mešanico za 10 minut izpostavili temperaturi 65 °C, preko noči pri 16 °C. Po končani ligaciji smo T4 DNK ligazo inaktivirali tako, da smo epice z ligacijsko mešanico za 10 minut izpostavili temperaturi 65 °C, ligacijske mešanice pa transformirali v kompetentne celice DH5α. Uspešnost restrikcije in ligacije smo nato potrdili s PCR, pri čemer smo uporabili začetne nukleotide, ki ustrezajo konstruktu ter s kontrolno restrikcijo.

3.2.1.1.2 Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA

Potek priprave plazmida je prikazan na sliki 12. Vektor pTolT smo najprej rezali z XhoI in MluI, da smo dobili odprt vektor brez zapisa za TolA. Fragment TolA smo z reakcijo PCR pomnožili tako, da je imel na 5' mestu prepoznavno mesto za BamHI, na 3' koncu pa prepoznavno mesto za MluI. Pfn del fuzije smo pomnožili tako, da je imel zapis na 5' koncu prepoznavno mesto za XhoI in na 3' mestu prepoznavno mesto za BamHI. Pfn in TolA produkt smo cepili Z BamHI. Rezane fragmente smo ločili z agarozno elektroforezo in jih očistili iz gela s pomočjo kompleta za ekstrakcijo DNK iz agaroznega gela. Nato smo oba rezana fragmenta ligirali s T4 DNK ligazo, preko noči pri 16 °C. Po končani ligaciji smo T4 DNK ligazo inaktivirali tako, da smo epice z ligacijsko mešanico za 10 minut izpostavili temperaturi 65 °C. Dobljeni fragment smo nato rezali s XhoI in MluI (vektor pTolT je bil že odprt na tak način). Rezan pTolT vektor in rezano fuzijo smo nato ločili z agarozno elektroforezo in ju očistili iz gela s pomočjo kompleta za ekstrakcijo DNK iz gela po navodilih proizvajalca (QiaGen, ZDA). Oba rezana fragmenta smo ligirali s T4 DNK ligazo, preko noči pri 16 °C. Po končani ligaciji smo T4 DNK ligazo inaktivirali tako, da smo epice z ligacijsko mešanico za 10 minut izpostavili temperaturi 65 °C, ligacijske mešanice pa transformirali v kompetentne celice DH5a. Uspešnost restrikcije in ligacije smo nato potrdili s PCR, pri čemer smo uporabili začetne nukleotide, ki ustrezajo konstruktu ter s kontrolno restrikcijo.


Slika 11: Shema poteka priprave vektorja z zapisom za TolA- Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA.



Slika 12: Shema poteka priprave vektorja z zapisom za Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA.

3.2.2 Izražanje in izolacija rekombinantnih proteinov

3.2.2.1 Priprava kompetentnih celic

Za izražanje fuzijskih proteinov smo uporabili različne seve bakterije *E. coli*. Nekaj kulture iz epice smo z ezo nacepili na LB ploščo. Ko so kolonije zrasle, smo eno izmed njih precepili v 50 ml SOB medija in jih pri 300 obratih na minuto gojili do optične gostote ~0,5, ki smo jo merili pri valovni dolžini 600 nm (OD₆₀₀). Suspenzijo celic smo prenesli v ohlajeno in sterilno centrifugirko in suspenzijo inkubirali 10 minut na ledu. Zatem smo celice centrifugirali 10 min pri 4000 obratih in 4 °C. Ko smo supernatant odstranili, smo dobljeno bakterijsko usedlino resuspendirali v 8 ml ledeno hladnega 0,1 M CaCl₂ ter ponovno centrifugirali 10 min pri 4.000 obratih in 4 °C. Sprane celice smo resuspendirali še v 1,8 ml raztopine CaCl₂ in Tris-glicerola, jih alikvotirali po 100 µl, zamrznili v tekočem dušiku in jih nato shranili v zmrzovalni skrinji pri -80 °C.

3.2.2.2 Kemijska transformacija kompetentih celic

Kemijska transformacija je postopek, pri katerem v kompetentne bakterijske celice vnesemo določen gen ali novo lastnost, kodirano na pDNA. Uporabili smo metodo s toplotnim šokom. Kompetentne bakterijske celice (shranjene pri -80 °C) smo inkubirali 30 minut na ledu, dodali 2 µl pDNA in na ledu inkubirali še dodatnih 30 minut. Sledil je toplotni šok z 90 sekundno inkubacijo pri 42 °C. Mikrocentrifugirko s transformacijsko zmesjo smo zatem takoj vrnili na led za 2 minuti. Zatem smo dodali 400 µl LB in inkubirali 1 uro pri 37 °C ob konstantnem stresanju. Po eni uri smo transformirane celice razmazali na LB ploščo z ustreznimi antibiotiki.

3.2.3 Izražanje in izolacija rekombinantnih proteinov

3.2.3.1 Izražanje rekombinantnih proteinov

Vektorje z zapisom za Pfn smo transformirali v različne ekspresijske sisteme bakterije *E. coli.* Gojili smo jih v gojišču M9-LB z ustreznimi antibiotiki. Rast smo spremljali z merjenjem optične gostote OD_{600} . Najprej smo transformirane bakterije gojili pri 37 °C dokler OD_{600} ni dosegla ~0,5. Nato smo v gojišče dodali IPTG (v končni koncentraciji 0,15 mM) in kultivirali še 4 - 5 ur pri temperaturi 25 °C ali 37 °C. Po končanem gojenju smo celice centrifugirali 10 minut pri 4.500 obratih in 4 °C ter preko noči zamrznili pri -20 °C. Prisotnost rekombinantnih proteinov smo zasledovali z NaDS-PAGE.

3.2.3.2 Izolacija rekombinantih proteinov

Rekombinantne proteine smo izolirali po protokolu »The Qia expressionist« proizvajalca QiaGen, ZDA. Konstrukte, ki so se izražali v topni obliki, smo izolirali po protokolu za izolacijo pri nativnih pogojih. Pri izolaciji tistih konstruktov, ki so se izražali v netopni obliki (inkluzijska telesca, IT), smo sledili protokolu za izolacijo pri denaturajočih pogojih

3.2.3.2.1 Izolacija rekombinantnih proteinov pri nativnih pogojih

Fuzijske proteine TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎, TolA-Pfn₍₂₂₋₁₃₆₎ in TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA smo izolirali pri nativnih pogojih. Vzorce smo poizkušali imeti čim več časa na ledu, da smo tako čim bolje

ustavili delovanje proteaz. Bakterijski pelet smo resuspendirali v pufru A za izolacijo pri nativnih pogojih (2 ml pufra/g usedline) in dodali DNazo (v končni koncentraciji 10 µg/ml), RNazo (v končni koncentraciji 20 µg/ml), benzamidin-HCl (v 1 mM končni koncentraciji), lizocim (v končni koncentraciji 1 mg/ml), β-merkaptoetanol (v 20 mM končni koncentraciji) in mešanico inhibitorejev proteaz Pefablock (v koncentraciji 1 mg/ml). Pred uporabo Pefabloc-a smo uporabljali PMSF, ki je reverzibilni inhibitor serinskih proteaz, a se je izkazal kot neučinkovit. Resuspendirane celice smo inkubirali 30 minut pri 4 °C ob konstantnem stresanju. Sledila je sonifikacija (Ultrasonic Disintegrator Mk2, MSE Scientific Instruments, Anglija) 3 x po 1 minuto z deset sekundnimi premori. Suspenzijo smo centrifugirali 30 minut pri 4 °C in 15.500 obratih. Pelet smo resuspendirali v pufru za lizo (1 ml pufra/g mase) in ponovno dodali prej naštete kemikalije. Po polurni inkubacije v hladni sobi na stresalniku smo celični debris sonificirali ter centrifugirali. Po združitvi obeh supernatantov smo fuzijske proteine izolirali z Ni-afinitetno kromatografijo po navodilih proizvajalca (QiaGen, ZDA). Ker rekombinantni proteini vsebujejo Hisrepek, se lahko vežejo na nosilec v koloni. Kolono smo najprej sprali z nekaj ml pufra A in B, da se znebimo nečistoč, čemur je sledilo spiranje s pufrom C. Slednji vsebuje 300 mM imidazol, ki se kompetitivno veže na Ni-afinitetno kolono in izpodrine rekombinantne proteine iz kolone. Prisotnost rekombinantnih proteinov v posameznih frakcijah smo zasledovali z elektroforezo na 12 % NaDS-PAGE. Eluirane proteine smo dializrali, da smo odstranili imidazol.

3.2.3.2.1 Izolacija rekombinantnih proteinov (TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎) pri denaturajočih pogojih

Pri denaturajočih pogojih smo izolirali konstrukt TolA-Pfn(196-540). Bakterijski pelet smo želeli čim bolje očistiti bakterijskih membranskih in ostalih proteinov pred raztapljanjem v pufru za lizo pri denaturajočih pogojih. Usedlino smo zato najprej resuspendirali v pufru za lizo pri nativnih pogojih (2 ml pufra/mg usedlini) in dodali isto količino encimov in kemikalij kot pri izolaciji pri nativnih pogojih. Lizat smo inkubirali 90 minut na ledu, nato pa sonificirali 6 x po 20 sekund z deset-sekundnimi pavzami. Po centrifugiranju lizata 30 minut pri 4 °C in 15.500 obratih smo odstranili supernatant in postopek ponovili. Dobljeno usedlino smo ponovno resuspendirali v pufru za lizo pri nativnih pogojih in dodali 0,5 % Triton X-100 (v/v), sledilo je 15-minutno mešanje na ledu in deset-minutno centrifugiranje pri 4 °C ter 15.500 obratih. Postopek smo ponovili štirikrat. Očiščena inkluzijska telesca smo raztopili v pufru B za lizo pri denaturajočih pogojih pufer (5 ml pufra/g inkluzijskih telesc). Ker se IT preko noči ob konstantnem mešanju v 8 M urei niso raztopila, smo jih sonicirali 20 x po 10 sekund z deset-sekundnimi presledki. Po sonifikaciji smo IT raztapljali preko noči. Ker je bilo poleg konstrukta v inkluzijskih telescih še veliko proteinskih nečistoč, smo ga poizkušali izolirati z Ni-afinitetno kromatografijo po navodilih proizvajalca (QiaGen, ZDA). Rekombinantne proteine iz kolone lahko speremo s serijo pufrov z naraščajočo koncentracijo imidazola ali pa s serijo pufrov s padajočim pH. Prisotnost rekombinantnih proteinov smo zasledovali z elektroforezo na 12 % NaDS-PAGE. Ker so bila inkluzijska telesca raztopljena v 8 M urei, je sledilo zvijanje proteina.

3.2.3.3 Dializa N-terminalnih konstruktov Pfn, ki so bili izolirani pri nativnih pogojih

Po izolaciji rekombinantnih proteinov (TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎, TolA-Pfn₍₂₂₋₁₃₆₎ in TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA) pri nativnih pogojih z Ni-afinitetno kromatografijo smo imidazol, ki je bil prisoten v proteinskih frakcijah, odstranili z dializo proti fosfatnem pufru. Dializa je potekala v dializnih vrečkah s porami, ki prepuščajo delce manjše od 12.000 – 14.000 kDa. Ob konstantnem mešanju pri 4 °C smo vsaj štirikrat na vsake štiri ure zamenjali dializno raztopino ali pa smo pustili dializo teči preko noči. Po končani dializi smo vsebino iz vrečke centrifugirali 30 minut pri 19.800 obratih. Koncentracijo proteinov v supernatantu smo zasledovali spektrofotometrično pri valovnih dolžinah med 360 in 200 nm. Koncentracijo proteinov smo izračunali iz koeficienta vrednosti absorbance pri 280 nm in teoretičnega utežnostnega ekstincijskega faktorja pri koncentraciji 1 mg/ml ($\epsilon^{0.1\%}$), katerega smo določili z orodji ExPASy Proteomics Tools (ProtParm tool (http:us.expasy.org/tools/)).

3.2.3.4 Zvijanje C-terminalnega dela perforina, ki smo ga izolirali pri denaturajočih pogojih

n11	21.	D !!		1	T-1A DENI
rregiednica	21:	rogoji	zvijanja	. konstrukta	10IA-PFN(196-540

Uporabljeni pufer	Metoda zvijanja
50 mM NaH ₂ PO ₄ , 20 mM β-MEtOH, 1 mM EDTA,	redčenje, postopno redčenje, dializa
рН 8	
20 mM Tris-HCl, 20 mM β-MEtOH, 1 mM EDTA,	postopno redčenje, dializa
рН 8	
50 mM NaH ₂ PO ₄ , 20 mM β -MEtOH, 1 mM EDTA,	postopno redčenje, dializa
pH 7	
20 mM Tris-HCl, 20 mM β -MEtOH, 1 mM EDTA,	postopno redčenje, dializa
pH 7	
50 mM NaH ₂ PO ₄ , 20 mM β -MEtOH, 0,5 mM	postopno redčenje, dializa
EDTA, pH 7	
20 mM Tris-HCl, 20 mM β-MEtOH, 0,5 mM EDTA,	postopno redčenje, dializa
рН 6	
20 mM Tris-HCl, 20 mM β -MEtOH, 0,5 mM EDTA,	postopno redčenje, dializa
100 mM NaCl, pH 8	
20 mM Tris-HCl, 20 mM β-MEtOH, 0,5 mM EDTA,	postopno redčenje, dializa
200 mM NaCl, pH 8	

Pogoji za posamezno metodo zvijanja so bili sledeči:

<u>Redčenje</u>: izhodni vzorec smo redčili v različnih razmerjih, ki so podana pri posameznem poskusu in ga šele nato dializirali. Dializa je potekala pri 4°C in ob konstantnem mešanju.

<u>Dializa</u>: dializno cev z vzorcem smo dali v pufer za zvijanje. Pufer za zvijanje smo zamenjali najmanj trikrat (na vsake štiri ure) oz. večkrat, če smo dializirali v več stopnjah in različnih pufrih (npr., ko smo zniževali koncentracijo uree), ali pa ko smo eno izmed stopenj pustili preko noči. Dializa je potekala na 4°C in ob konstantnem mešanju.

<u>Postopno redčenje</u>: majhen volumen v urei denaturiranega proteina smo počasi inicirali v nekaj mililitrov pufra za zvijanje in šele nato dializirali proti nižjim koncentracijam uree. Celoten proces je potekal pri 4 °C in ob konstantnem mešanju.

Koncentracijo proteinov smo zasledovali spektrofotometrično pri valovnih dolžinah med 360 in 200 nm in jo izračunali iz koeficienta vrednosti absorbance pri 280 nm in teoretičnega utežnostnega ekstincijskega faktorja pri koncentraciji 1 mg/ml ($\epsilon^{0.1\%}$), ki smo ga določili z orodji ExPASy Proteomics Tools (ProtParm tool (http:us.expasy.org/tools/)).

3.2.4 Karakterizacija konstruktov

3.2.4.1 Obarjanje proteinov s triklorocetno kislino (TCA)

Proteinskemu vzorcu, ki smo ga želeli oboriti, smo dodali 50 % TCA (m/v) do končne koncentracije 10 % (m/v) in inkubirali 10 min na ledu. Sledilo je 15-minutno centrifugiranje pri 13.200 obratih in 4 °C. Supernatant smo zavrgli, usedlino pa sprali s 300 μ l ledeno hladnega acetona in ponovno centrifugirali pri istih pogojih. Aceton smo odpipetirali, usedlino pa posušili na 37 °C. Pred nanosom na gel smo jo resuspendirali v 1 x nanašalnem pufru.

3.2.4.2 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)

Elektroforezo smo izvajali s PowerPac HC sistemom, na NaDS-PAGE gelih različnih zamreženosti in debelin. Najprej smo vlili ločitveni gel, ga prelili z 1 ml dH₂0 in pustili 30 minut, da je polimeriziral. Nato smo odstranili dH₂0 in na ločitveni gel vlili vstopni gel, v katerega smo vstavili glavniček, s katerim smo naredili žepke za nanos vzorcev. Vstopni gel smo pustili polimerizirati 30 minut. Gele smo nato takoj uporabili ali pa jih shranili za največ en teden pri 4 °C. Elektroforeza je potekala v 1-kratnem elektroforeznem pufru NaDS približno 1eno uro pri konstantni napetosti 160-200 V. Elektroforezo smo ustavili, ko je barvilo bromfenolmodro doseglo spodnji rob ločitvenega gela. Proteine v gelu smo barvali s Coomassie-jevim modrim barvilom (raztopina za barvanje) ali prenašali na PVDF- membrane.

3.2.4.3 Zasledovanje izražanja konstruktov

Ko je bakterijska kultura zrastla toliko, da smo namerili optično gostoto $OD_{600} \sim 0.5$, je bila v eksponentni fazi rasti. Pred dodatkom IPTG, ki je induciral sintezo željenega gena, je bilo potrebno odpipetirati nekaj mikrolitrov kulture. V ta namen optično gostoto kulture delimo s faktorejm 0,6. Dobljeni koeficient predstavlja število mikrolitrov bakterijske suspenzije, ki jo moramo odpipetirati. Celice smo nato centrifugirali 10 minut pri 13.200 obratih in odstranili supernatant. Usedlini smo dodali 10 µl 1 M DTT, 10 µl dH₂0 in 20 µl 2 x nanašalnega pufra. Tak vzorec smo inkubirali 10 minut pri 100 °C in ponovno centrifugirali 10 minut pri 13.200 obratih. Na gel smo nanesli od 2-5 µl. Enako smo ponovili po koncu namnoževanja oz. izražanja željenega konstrukta. Elektroforeza je potekala pri konstantni električni napetosti 160-200 V. Tako smo lahko primerjali profil proteinskih lis vzorcev pred in po indukciji .

3.2.4.4 Zasledovanje poteka izolacije konstruktov

Po 10 μ l vsake frakcije (nevezano, spiranje, elucija) smo zmešali z 10 μ l 1 M DTT in 20 μ l 2 x nanašalnega pufra in po 2-10 μ l nanesli na 12% NaDS-PAGE gel. Elektroforeza je potekala pri konstantni električni napetosti 160-200 V.

3.2.4.5 Zasledovanje topnosti proteinov po končani dializi

Po končani dializi smo vsebino iz dializne cevi 30 minut centrifugirali pri 19.800 obratih in 4 °C. 2-10 µl supernatanta smo zmešali z ustrezno količino DTT in 2 x nanašalnega pufra,

usedlino pa z 1 x nanašalnim pufrom, ki smo mu dodali ustrezno količino 1 M DTT. Če smo v izhodišču imeli zelo malo vzorca, bodisi zaradi nizkega donosa pri izolaciji, bodisi ker smo vzorec močno redčili pred začetkom dialize ali pri zvijanju s postopnim redčenjem, smo proteine oborili s pomočjo protokola za obarjanje proteinov s TCA. Vzorce smo nato nanesli na 12 % NaDS-PAGE.

3.2.4.6 Prenos proteinov po westernu in imunodetekcija

Proteine iz NaDS-PAGE gela smo z mokrim prenosom prenesli na PVDF-membrane. Membrane smo najprej za nekaj sekund namočili v 100 % metanolu, nato smo jih skupaj s penama in filter papirji za 30 minut namakali v pufru za prenos po westernu. Sistem za prenos smo sestavili tako, da sta bila membrana in gel obdana s papirji in peno za prenos. Membrana je bila na strani anode, gel pa na strani katode. Prenos je potekal 90 minut pri 150 mA.

Po končanem prenosu smo membrano preko noči blokirali v pufru za blokiranje PVDFmembran. Naslednji dan smo membrano dve uri inkubirali v pufru za blokiranje s 1000 x redčitvijo primarnih protiteles. Membrano smo spirali 5 x po 10 minut v pufru za spiranje, čemur je sledila inkubacija v pufru za blokiranje s 1000 x redčitvijo sekundarnih protiteles, ki so bila konjugirana s hrenovo peroksidazo. Inkubacija je potekala 90 minut. Po ponovnem spiranju membrane 5 x po 10 minut smo sekundarna protitelesa detektirali s peroksidaznim substratom v pufru za razvijanje PVDF-membran.

3.2.5 **Rezanje fuzije s trombinom**

Proteinski konstrukti so bili sestavljeni tako, da so imeli med delom TolA in perforinskim delom prepoznavno mesto za trombin. Najprej smo določili najnižjo koncentracijo trombina, ki še reže določeno koncentracijo fuzije. Po optimizaciji rezanja smo fuzijske proteine rezali tako, da smo dodali 4 U trombina/mg proteina. V restrikcijsko mešanico smo dodali še ustrezen volumen 10 x pufra za rezanje in pustili reakcijo teči 5 ur pri 20 °C. Po koncu rezanja smo uspešnost preverili s NaDS-PAGE. Fuzijska partnerja smo nato poizkušali ločiti z Ni-afinitetno, ionsko-izmenjevalno in hidrofobno kromatografijo.

3.2.6 Kromatografske metode

3.2.6.1 Gelska kromatografija

Gelsko filtracijo smo uporabili za izolacijo TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎. Do porazdelitve med stacionarno (nosilec v kolni) in mobilno fazo prihaja zaradi različne velikosti molekul. Ta proces omogočajo gelski nosilci v kolni, ki so sestavljeni iz zamreženih sferičnih delcev. Uporabili smo kolono Superdex 75 HR 10/30, ki smo jo pritrdili na aparaturo FPLC

3.2.6.2 Hidrofobna kromatografija

Hidrofobno kromatografijo smo izvajali v kolonski tehniki. Namenjena je ločevanju bolj hidrofobnih molekul od manj hidrofobnih. Ker je tudi Pfn zelo hidrofoben, smo hoteli fuzijska partnerja po cepljenju s trombinom ločiti na ta način. Najprej je bilo potrebno izbrati sol in preveriti, katera je tista koncentracija soli, pri kateri se nam proteini ne oborijo. Za hidrofobno kromatografijo sta potrebna dva pufra. V pufru A je raztopljen protein in ima višjo koncentracijo soli kot pufer B. Pri višji ionski jakosti topila je hidrofobnim površinam v proteinu termodinamsko najugodneje poiskati drugo hidrofobno površino. To je v tem primeru nosilec. Ko pričnemo z nižanjem koncentracije soli, hidrofobne interakcije niso več tako močne in protein speremo iz kolone. Fuzijo po rezanju smo poskušali ločiti s pomočjo treh različnih kolon in dveh vrst soli.

3.2.6.3 Ionsko-izmenjevalna kromatografija

Ionsko-izmenjevalno kromatografijo smo uporabili pri izolaciji fuzijskih proteinov ali Pfn fragmentov po rezanju fuzij. Proteine smo po reaznju in dializi centrifugirali, supernatant pa smo nanesli na kationsko kolono. Pufer A je imel nizko , pufer B pa visoko ionsko jakost. Ločevanje smo izvajali na kationski koloni Mono S HR 5/5. pH pufrov je bil nižji od Ip proteinov, ki so bili tako pozitivno nabiti. Fuzijski proteini bi se tako morali vezati na kolono in nato sprati z linearno naraščajočo koncentracijo soli.

3.2.7 Hemolizni test

Človeške ali goveje eritrocite smo najprej vsaj 4-krat sprali s fiziološko raztopino in še vsaj 2-krat z eritrocitnim pufrom. Optična gostota eritrocitov v 200 μ l volumna mora biti ~0,5. V prvo jamico smo odpipetirali 200 μ l vzorca, v vse ostale, do dvanajste, pa po 100 μ l eritrocitnega pufra. Nato smo iz prve jamice odvzeli 100 μ l vzorca, prenesli v naslednjo jamico, dobro premešali in tako nadaljevali do dvanajste jamice, kjer smo 100 μ l vzorca zavrgli. Na koncu smo dodali še po 100 μ l eritrocitov, z dodajanjem pa začeli na koncu, v dvanajsti vrstici in šli vedno proti nižjim redčitvam do prve vrstice. Za merjenje absorbance smo uporabili čitalec mikrotitrskih plošč MRX in pripadajoči program MRX Revelation.

4 **REZULTATI**

4.1 SHEMA POTEKA RAZISKAV V DIPLOMSKEM DELU



Slika 13: Shema poteka raziskav v diplomskem delu.

4.2 LASTNOSTI AMINOKISLINSKIH ZAPOREDIJ KONSTRUKTOV, KI SMO JIH IZRAŽALI

S pomočjo programa ProtParm, dostopnega na internetni strani ExPASy (SIB, 2009), smo določili lastnosti konstruktov, ki smo jih izražali.

Konstrukt	pI	Dolžina (ak)	$M_w(kDa)$	Število cisteinov
TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA	9,22	312	33,0	9
Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA	9,24	207	22,2	7
TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎	9,24	213	22,6	7
TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₃₆₎	9,33	228	24,3	7
TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₆₂₎	9,49	254	27,0	7
TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₉₆₎	9,29	288	33,0	8
TolA-Pfn(196-540)	6,92	458	50,2	16

Preglednica 22: Osnovne lastnosti aminokislinskih zaporedij konstruktov

Fragmente Pfn smo izražali v obliki fuzijskih proteinov s proteinom TolA iz *E. coli* kot fuzijskim partnerjem. Ta nekaterim slabo topnim proteinom omogoči izražanje v topni obliki. Vsi konstrukti so imeli prepoznavno mesto za trombin, ki reže polipeptidno verigo na meji med obema fuzijskema partnerjema.

Konstrukt	N-terminalni del	Sredinski del	C-terminalni del
TolA-Pfn (22-121)-TolA	His ₆ - TolA	Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎	TolA
pI	8,94	9,63	8,59
Dolžina (število AK)	19	108	95
M _w (kDa)	11,5	11,6	9,9
Število cisteinov	2	5	2
Konstrukt	N-terminalni d	el	C-terminalni del
Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA	His ₆ - Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎		TolA
pI	9,63		8,93
Dolžina (število AK)	112		99
M_w (kDa)	12,3		10,4
Število cisteinov	5		2
TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎	His ₆ -TolA		Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎
pI	8,94		9,35
Dolžina (število AK)	109		104
M_w (kDa)	11,5		11,2
Število cisteinov	2		5
TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₃₆₎	His ₆ -TolA		Pfn ₍₂₂₋₁₃₆₎
pI	8,94		9,55
Dolžina (število AK)	109		119
M_w (kDa)	11,5		12,9
Število cisteinov	2		5
TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₆₂₎	His ₆ -TolA		Pfn ₍₂₂₋₁₆₂₎
pI	8,94		9,86
Dolžina (število AK)	109		145
M_w (kDa)	11,5		15,5
Število cisteinov	2		5
TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₉₆₎	His ₆ -TolA		Pfn ₍₂₂₋₁₉₆
pI	8,94		9,38
Dolžina (število AK)	109		179
M_w (kDa)	11,5		19,6
Število cisteinov	2		6
TolA-Pfn ₍₁₉₆₋₅₄₀₎	His ₆ -TolA		Pfn ₍₁₉₆₋₅₄₀₎
pI	8,94		6,35
Dolžina (število AK)	109		349
$M_w(kDa)$	11,5		38,7
Število cisteinov	2		14

Preglednica 23: Osnovne lastnosti aminokislinskih zaporedij, ki nastanejo po rezanju konstruktov s trombinom

4.3 IZRAŽANJE KONSTRUKTOV

Konstrukte smo izražali pri različnih T in v različnih sevih E. coli.

Konstrukt	Sevi E. coli	T gojenja	Izražanje v topni obliki (TO) ali v obliki inkluzijskih telesc (IT)
Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎ -TolA	BL21 (DE3) pLysS Rosetta (DE3) pLysS	25 °C	Protein se ni izražal
	Origami (DE3) pLyss		
TolA-Pfn(22-121)-TolA	BL21 (DE3) pLysS	25 °C	ТО
()	Rosetta (DE3) pLysS		
	Origami (DE3) pLysS		
TolA- Pfn ₍₂₂₋₁₂₁₎	BL21 (DE3) pLysE	25 °C in 37 °C	ТО
	Rosetta (DE3) pLysS		
	Origami (DE3) pLysS		
	Rosetta gami-B (DE3) pLysS	25 °C	
TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₃₆₎	Origami (DE3) pLysS	25 °C in 37 °C	ТО
	Rosetta-gami B(DE3) pLysS		
TolA-Pfn ₍₂₂₋₁₆₂₎	Origami (DE3) pLysS	25 °C in 37 °C	IT
$TolA-Pfn_{(22-196)}$	Origami (DE3) pLysS	25 °C in 37 °C	IT
T 14 DC		25.00 : 27.00	IT
$1 \text{ olA-Ptn}_{(196-540)}$	Origami (DE3) pLysS	25 °C in 37 °C	11
	Rosetta-gami B(DE3) pLysS		

Preglednica 24: Izražanje posameznih konstruktov v različnih sevih *E.coli* pri različnih temperaturah

Prvi del namnoževanja je vedno potekal pri 37 °C, ob dodatku IPTG smo T znižali na 25 °C ali pustili pri 37 °C. Z izjemo konstrukta Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA so se izrazili vsi konstrukti. Konstrukte, ki so se izražali v topni obliki, smo izolirali pod nativnimi pogoji. Vzorce s konstrukti smo nato dializirali, da smo odstranili imidazol, ki smo ga pridobili med izolacijo. Sledilo je rezanje in različne biokemijske tehnike, s katerimi smo hoteli ločiti fuzijska partnerja. Tako bi lahko izolirali rekombinanti Pfn, ki bi bil uporaben za nadaljnje študije.

Konstrukt TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎, ki se je izražal v netopni obliki, smo izolirali pod denaturajočimi pogoji v obliki IT. Ta smo izolirali in jih dobro očistili. Nato smo denaturiran protein poskušali renaturirati v različnih pufrih in dobiti funkcionalen rekombinantni Pfn.

4.4 KONSTRUKTI N-TERMINALNEGA DELA PFN

Najprej smo pripravili konstrukt TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎, ki se je izkazal za zelo težaven protein. Fuzija je kljub dodanim inhibitorjem proteaz s časom razpadala. Delovanje proteaz bi lahko upočasnili, če bi protein zamrznili pri -20 °C, a je Pfn pri tej T nagnjen k obarjanju in agregaciji. Zato smo poskusili najti primernejši sev za izražanje. Preizkusili smo vrsto sevov (preglednica 25), kar pa se ni izkazalo kot ključno. Težave smo imeli tudi z rezanjem fuzije, saj je v cepitveni mešanici med cepljenjem konstrukta nastajala oborina. Videli smo lahko, da trombin reže fuzijo, a fragmenta Pfn nismo uspeli izolirati. Fragmenta po cepitvi smo poizkusili ločiti z Ni-afinitetno, hidrofobno in ionsko-izmenjevalno kromatografijo, a nam to ni uspelo. Ker smo kljub vsemu želeli dobiti stabilen fragment Pfn, smo eksperimente usmerili v dve smeri.

Po eni strani smo hoteli podaljšati N-terminalno zaporedje Pfn, ki smo ga izražali do 196ega aminokislinskega ostanka. Zato smo pripravili tri nove konstrukte, kateri so vsebovali podaljšano N-terminalno regijo Pfn. Ker se je le TolA-Pfn₍₂₂₋₁₃₆₎ izkazal kot topen protein, smo nekaj eksperimentov naredili tudi s tem konstruktom. Po drugi strani smo razmišljali, da bi pripravili različice fuzije TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ na ta način, da bi bil TolA in Pfn del zamenjali in da bi Pfn del fuzije zaščitili z obeh strani s TolA. Tega do sedaj ni poizkusil še nihče.

4.4.1 Konstrukt TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎

Konstrukt smo najprej izražali v treh različnih ekspresijskih sistemih *E. coli* (slika 14) (pozneje smo poiskusili še v sevu Rosetta-gami B(DE3) pLysS). Hoteli smo izbrati sev, ki bi bil najoptimalnejši za izražanje in stabilnost fuzije. Transformirane bakterije so rastle pri 37 °C in 200 obratih/minuto v LB M9 gojišču z dodanimi antibiotiki do $OD_{(600)}$ ~ 0,5. Takrat smo odvzeli vzorec kulture (na slikah označeno s Pred. ind.) in dodali 300 µl 1M IPTG, ki je induciral sintezo proteina. Celice smo nadaljne 4 ure inkubirali pri 25 °C in 37 °C, da bi videli, če se konstrukt izraža pri obeh T. Takrat smo odvzeli tudi nekaj µl vzorca (na slikah označeno s Po. Ind.), da smo lahko zasledili ali se nam želeni produkt izraža. Obenem smo namnoževali tudi transformirane bakterije, kjer pa nismo inducirali sinteze proteina (na slikah označeno z Brez ind.). Odvzete vzorce smo nanesli na 12 % gel NaDS-PAGE. Protein ima molekulsko maso 22,6 kDa in bi se moral nahajati med višinama lis, ki označujeta molekulski masi 17 in 26 kDa.



Slika 14: Izražanje konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ pri 25°C in 37°C v treh različnih ekspresijskih sistemih *E. coli*. Legenda: Pred ind. - pred indukcijo; Po ind. - po indukciji; Brez ind. - brez indukcije, M - označevalec velikosti.

Iz slike 14 je razvidno, da se je konstrukt primerne velikosti izražal pri obeh T in v vseh treh sevih *E. coli*.

4.4.1.1 Izražanje konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ v BL21 (DE3) pLysE

Sev *E. coli* BL21 /DE3) pLysE ima okvarjen zapis za proteazi OmpT in LonI, zaradi česar je primeren kandidat za izražanje fuzijskega proteina. Plazmid pLysE izraža višjo količino lizocima T7 kot pLysS, kar omogoča še boljšo kontrolo polimeraze T7 RNA. Dobra kontrola slednje je še posebej nujna, ko pričakujemo, da bo protein za bakterijo toksičen.

4.4.1.1.1 Izražanje in izolacija konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLysE

Transformirane bakterijske celice smo namnoževali pri 37 °C. Ko je OD_{600} dosegel ~0,5 smo dodali IPTG, ki je induciral sintezo konstrukta in gojili še nadaljnje 4 ure pri 37 °C. Celice smo s centrifugiranjem ločili od gojišča, jih čez noč zamrznili, naslednji dan pa lizirali. Ker smo fuzijo dobili v topni frakciji, smo jo izolirali pod nativnimi pogoji. Izolirane proteine smo nanesli na Ni-afinitetno kolono. Vzorce po Ni-afinitetni kromatografiji pa na NaDS-PAGE.



Slika 15: Izolacija konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLsyE z Ni-afinitetno kromatografijo. Legenda: Pelet po lizi; SN - vzorec, ki smo ga nanesli na kolono; M - označevalec velikosti; FT - sprano; L1, L2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za lizo; W1, W2, frakciji pri spiranju kolone s pufrom za spiranje; E1, E2, E3, E4, E5, vzorci pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.

Na sliki 15 vidimo, da smo protein izolirali, a vsebuje vzorec veliko nečistoč.

4.4.1.1.2 Dializa konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLysE

Vzorce E1-E4 smo dializirali v 5 mM fosfatnem pufru (5 mM EDTA, 20 mM β -MeEtOH, pH 7,2). Po koncu dialize smo vsebino dializne vrečke centrfugirali. Na NaDS-PAGE smo nanesli nekaj supernatanta in nekaj oborine, ki nastane med dializo. Po dializi smo preverili koncentracijo proteina z merjenjem spektra pri 280 nm.



Slika 16: TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLsyE po dializi. Legenda: Pelet - pelet po dializi; SN (+ DTT) - topna frakcija (z dodanim DTT); M - označevalec velikosti.

4.4.1.1.3 Ionsko-izmenjevalna kromatografija z vzorcem konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLysE

V dializirani fuziji je bilo veliko proteinskih nečistoč (slika 16), zato smo jo želeli dodatno očistiti z ionsko-izmenjevalno kromatografijo. Ker ima izoelektrično točko pri pH 9,24 in bi se ob izbranem pufru A (pH 6,9) morala vezati na kationski izmenjevalec (kationska kolona MonoS). Protein je namreč pri teh pogojih pozitivno nabit. Protein bi morali iz kolone sprati z linearno naraščajočim gradientom soli.



Slika 17: Kromatogram vzorca TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLsyE po ionsko-izmenjevalni kromatografiji. Kolono smo najprej sprali s pufrom A (50 mM fosfatni pufer, pH 6,9) in jo tako umerili. Zatem smo na kolono smo nanesli 2 ml fuzijskega proteina, ki bi se moral pri danem pH vezati na kolono, saj je pozitivno nabit (pI 9,24). Ko je absorbanca nevezanega vzorca postala konstantna, smo pričeli spirati z pufrom B (50 mM fosfatni pufer, 1 M NaCl, pH 6,9). Spirali smo tako, da je koncentracija soli v pufru za spiranje v roku 45 minut prešla iz 0 M na 1 M koncentracijo. Iz kromatograma lahko vidimo, da se nam je fuzijski protein vezal na kolono.

Posamezne frakcije smo za NaDS-PAGE pripravili po protokolu za obarjanje proteinov s TCA.



Slika 18: Posamezne frakcije TolA-Pfn(22-121) iz BL21 (DE3) pLsyE po ionsko izmenjevalni kromatografiji.

Na sliki 18 vzorca 2 in 3 predstavljata nevezan protein. Vidimo le lisi, ki se nahajata na višini okoli 72 kDa iz česar smo sklepali, da nam fuzijski protein agregira. V proteinskih vzorcih, ob eluciji, je bilo največ proteina v frakcijah 13 in 14. Pri vzorcu frakcije 19 je verjetno prišlo do agregacije fuzije v različno velike agregate. Ionsko-izmenjevalno kromatografijo smo s tem vzorcem večkrat ponovili. Kromatogrami so si bili med sabo podobni in tako nismo uspeli zadovoljivo ločiti fuzije od nečistot.

4.4.1.1.4 Cepitev konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLysE s trombinom in izolacija Pfn fragmenta z Ni-afinitetno kolono

1 ml fuzije smo cepili 5 ur pri 25 °C v koncentraciji 1,4 U trombina/mg proteina. Med rezanjem je nastala oborina. Vzorec po cepitvi smo zato centrifugirali in ločili pelet od supernatanta. Pelet smo raztopili v nekaj mikrolitrih 8 M uree, supernatant pa nanesli na Ni-afinitetno kolono. Fragmenta se po molekulski masi razlikujeta za manj kot 0,3 kDa. Pfn fragment smo pričakovali v nevezani frakciji (na sliki označeno s FT), fragment TolA pa naj bi dobili pri spiranju s pufrom za elucijo. Vse vzorce smo nanesli na NaDS-PAGE, da bi preverili, če smo proteina uspešno ločili.



Slika 19: Izolacija Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz BL21 (DE3) pLsyE z Ni-afinitetno kromatografijo po cepitvi fuzijskega proteina.

Legenda: Fuzija - nerezana fuzija; SN - vzorec, ki smo ga nanesli na kolono; M - označevalec velikosti; Pelet; FT - sprano; L1, L2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za lizo; W1, W2, frakciji pri spiranju kolone s pufrom za spiranje; E1, E2, E3, E4, vzorci pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.

Na sliki 19 vidimo, da je trombin rezal fuzijski protein. Po spiranju s 300 mM imidazolom (E1-4) smo dobili liso primerne velikosti, ki predstavlja fragment TolA. Pfn fragment bi moral biti v frakciji FT, a kot že povedano, ga nismo uspeli izolirati. Predvidevali smo, da Pfn ob cepitvi agregira, zato ga ne moremo izolirati z Ni-afinitetno kromatografijo. Pfn fragmenta nismo dobili niti v peletu, ki smo ga raztopili v 8 M urei (slika 19). Najverjetneje so bili visokomulekularni agregati, ki so bili prisotni v peletu tako veliki, da niso potovali skozi gel. Ostali so na vrhu, v spojitvenem gelu, ki smo ga po elektroforezi zavrgli.

4.4.1.2 Izražanje konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ v Rosetta (DE3) pLysS

Za izražanje fuzije smo izbrali nov sev Rosetta (DE3) pLysS. Ta sev *E. coli* je primeren za boljše izražanje evkariotskih genov, saj na plazmidu pLysS vsebuje tRNA za v *E. coli* redkeje uporabljene kodone, kar lahko olajša izražanje evkariotskih genov (Brinkmann in sod., 1989; Kane, 1995).



4.4.1.2.1 Izražanje in izolacija konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta (DE3) pLysS

Slika 20: Izolacija konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz celic Rosetta (DE3) pLsyS z Ni-afinitetno kromatografijo. Legenda: Pred ind. - vzorec pred indukcijo; Po ind. - vzorec po indukciji; SN - vzorec, ki smo ga nanesli na kolono; M - označevalec velikosti; FT - sprano; L1, L2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za lizo; W1, W2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za spiranje; E1, E2, E3, E4, E5 - vzorci pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.

4.4.1.2.2 Dializa konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta (DE3) pLysS

Vzorce E1-E5 smo dializirali proti 5 mM fosfatnem pufru (5 mM EDTA, 20 mM β -MeEtOH, pH 7,2). Po koncu dialize smo vsebino dializne vrečke centrifugirali. Na NaDS-PAGE elektroforezo smo nanesli nekaj supernatanta in oborine, ki nastane med dializo (slika 20). Po dializi smo preverili koncentracijo proteina z merjenjem spektra pri 280 nm.



Slika 21: TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta (DE3) pLysS po dializi.

4.4.1.2.3 Optimizacija rezanja konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta (DE3) pLysS, prenos proteinov po westernu in imunodetekcija z mišjimi protitelesi proti Hisrepku

Fuzijo smo rezali v koncentraciji 1.4 do 0.01 U trombina/mg proteina. Vzorce smo inkubirali 5 ur pri 25 °C in jih nato ločili z NaDS-PAGE elektroforezo. Naredili smo dva gela, eden nam je služil za prenos proteinov na PVDF (polivinil-diflouridno) membrano in imunodetekcijo His-repka, ki je del proteina TolA (slika 22).



Slika 22: Optimizaciji rezanja fuzije in imunodetekcija fragmenta TolA s pomočjo mišjih protiteles proti Hisrepku.

Trombin reže fuzijo do koncentracije 1,4 U trombina/mg proteina (slika 22). Na PVDF membrani opazimo, da se mišja protitelesa proti His-repku vežejo tudi na razgradne produkte fuzije. Lisa na NaDS-PAGE, ki predstavlja rezano fuzijo, je fragment TolA.

4.4.1.2.4 Rezanje konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta (DE3) pLysS s trombinom in izolacija Pfn fragmenta z Ni-afinitetno kromatografijo

Rezali smo 1 ml dializirane fuzije v koncentraciji 1,4 U trombina/mg fuzije. Rezanje je potekalo 5 ur pri 25°C. Uporabili smo 10-kratni pufer za cepitev, a brez CaCl₂. Tak pufer še vedno omogoča več kot 95% aktivnost encima. Opazili smo, da pri takšnih pogojih, oborina ne nastane. Rezano fuzijo smo nanesli na Ni-afinitetno kolono. Pfn fragment bi morali dobiti v nevezani frakciji (FT), fragment TolA pa v frakciji pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.



Slika 23: Izolacija Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ fragmenta po cepitvi TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta (DE3) pLysS z trombinom z Niafinitetno kromatografijo.

Legenda: FT - sprano; M - označevalec velikosti; L1, L2, L3 - frakcije pri spiranju kolone s pufrom za lizo; W1, W2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za spiranje; E1, E2 - vzorca pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.

Na slika 23 lahko vidimo dve lisi v frakciji FT. To naj bi bila TolA in Pfn fragment.

4.4.1.2.5 Hemolizni test vzorca TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta (DE3) pLysS

Z vzorci dializirane fuzije, rezane fuzije in frakcijo FT smo naredili hemolizni test. Hemolize ni bilo. Podatki niso prikazani.

4.4.1.2.6 Hidrofobna kromatografija vzorca TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta (DE3) pLysS

Pred poskusom smo morali določiti koncentracijo NaCl, pri kateri se Pfn oz. rezana fuzija ne obori. Ugotovili smo, da je to 250 mM koncentracija NaCl, kar je relativno malo. Pfn je že po naravi nagnjen k agregaciji, kar pa dodatek soli še bolj pospeši. Uporabili smo kolone Pheny Sepharose 6 Fast Flow (low solubility), HiTrap Butyl FF, HiTrapOctyl FF, HiTrap Phenyl HP. Prav tako smo poizkusili z (NH₄)₂SO₄ namesto NaCl, a fragmentov vseeno nismo uspeli ločiti.



Slika 24: Kromatogram rezanega konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta (DE3) pLysS pri ločevanju s hidrofobno kromatografijo.

Različne kolone, ki smo jih uporabili smo najprej sprali in umerili s pufrom A (50 mM fosfatni pufer), ki je vseboval sol (NaCl ali (NH_4)₂SO₄). Nato smo na kolono nanesli vzorec, ki je vseboval takšno koncentracijo soli kot pufer A. Ko se je črta, ki prikazuje absorbanco vzorca umirila, smo začeli z gradientnim spiranjem s pufrom B (50 mM fosfatni pufer). Spirali smo 45 minut in sicer tako, da je koncentracija soli ob koncu spiranja dosegla 0 mM.

4.4.1.3 Izražanje konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ v Origami (DE3) pLysS

Ker je bilo v konstruktu TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ prisotnih 7 cisteinov (Uellner in sod., 1997), smo preizkusili izražanje tudi v sevu Origami (DE3) pLysS, ki ima v citoplazmi bolj oksidativne razmere kot sicer bakterije te vrste, zaradi mutacij v genih za reduktazne encime (Prinz in sod., 1997).

4.4.1.4 Izražanje in izolacija konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Origami (DE3) pLysS

Transformirane bakterijske celice smo najprej gojili pri 37 °C. Ko je OD₆₀₀ dosegel ~0,5 smo dodali IPTG, ki je induciral sintezo konstrukta in gojili še nadaljnje 4 ure pri 25 °C. Celice smo s centrifugiranjem ločili od gojišča, jih preko noč zamrznili in naslednji dan lizirali. Ker smo fuzijo dobili v topni frakciji, smo jo izolirali pod nativnimi pogoji. Izolirane proteine smo nanesli na Ni-afinitetno kolono, vzorce po Ni-afinitetni kromatografiji pa na NaDS-PAGE elektroforezo. Naredili smo dva gela NaDS-PAGE, eden nam je služil za prenos proteinov na PVDF-membrano in imunodetekcijo fragmenta TolA z mišjimi protitelesi proti His-repku.



Slika 25: Izolacija konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz celic Origami (DE3) pLsyS z Ni-afinitetno kromatografijo in imunodetekcija His-repka z mišjimi protitelesi.

Legenda: M - označevalec velikosti; Pred ind. - vzorec pred indukcijo; Po ind. - vzorec po indukciji; Pelet po lizi; SN - vzorec, ki smo ga nanesli na kolono; FT - sprano; L1, L2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za lizo; W1, W2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za spiranje; E1, E2, E3, E4 - vzorci pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.

Konstrukt se izraža. Profil proteinskih lis je drugačen kot pri BL21 (DE3) pLysS (slika 15) in Rosetta (DE3) pLysS (slika 20). Pri imunodetekciji vidimo, da se protitelesa vežejo na veliko razgradnih produktov (slika 25).

4.4.1.5 Izražanje konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ v Rosetta gami-B (DE3) pLysS

Izvira iz seva BL21 in združuje glavne značilnosti celic BL21, Origami in Rosetta. Sev ima okvarjene zapise za proteazi LonI in OmpT. Zaradi mutacije v poti redukcije disulfidov v citoplazmi (*trxB/gor*) je olajšana tvorba disulfidnih mostičkov v citoplazmi *E. coli*. Na plazmidu pLysS vsebuje kodone za redke tRNA, kar olajša izražanje genov, ki le-te vsebujejo.

4.4.1.5.1 Izražanje in izolacija konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta gami-B (DE3) pLysS

Transformirane bakterijske celice smo najprej gojili pri 37 °C. Ko je OD₆₀₀ dosegel ~0,5 smo dodali IPTG, ki je induciral sintezo konstrukta in gojili še nadaljnje 4 ure na 25 °C. Celice smo s centrifugiranjem ločili od gojišča, jih preko noč zamrznili in naslednji dan lizirali. Ker smo fuzijo dobili v topni frakciji, smo jo izolirali pod nativnimi pogoji. Izolirane proteine smo nanesli na Ni-afinitetno kolono, vzorce po Ni-afinitetni kromatografiji pa na NaDS-PAGE.



Slika 26: Izolacija TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta-gami B (DE3) pLysS z Ni-afinitetno kromatografijo. Legenda: M - označevalec velikosti; Pred ind. - vzorec pred indukcijo; Po ind. - vzorec po indukciji; SN - vzorec, ki smo ga nanesli na kolono; FT – sprano; L1, L2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za lizo; W1, W2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za spiranje; E1, E2; E3 - vzorci pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.

4.4.1.5.2 Dializa konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta gami-B (DE3) pLysS

Vzorce E1-E3 smo dializirali proti 5 mM fosfatnem pufru (5 mM EDTA, 20 mM β -MeEtOH, pH 7,2). Po koncu dialize smo vsebino dializne vrečke centrifugirali. Na NaDS-PAGE smo nanesli vzorec po dializi in oborino, ki nastane med dializo. Po dializi smo preverili koncentracijo proteina z merjenjem spektra pri 280 nm.



Slika 27: Vzorec konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta gami-B (DE3) pLysS po dializi.

4.4.1.5.3 Obstojnost konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta gami-B (DE3) pLysS pri različnih T shranjevanja

Pfn ob zmrzovanju agregira, zato smo po 1 ml fuzije preko noči pustili na 4 °C, 0 °C in zamrznili pri -20 °C. Naslednji dan smo vzorce centrifugirali in pripravili za NaDS-PAGE (slika 28), obenem smo pomerili koncentracijo proteinov z merjenjem absorbance pri 280 nm. Ugotovili smo, da se vzorcu, ki smo ga zamrznili pri -20 °C, koncentracija proteina znižala za 15 % v primerjavi z drugima dvema vzorcema.



Slika 28: Vzorci konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta gami-B (DE3) pLysS po prekonočni inkubaciji na -20 °C, 0 °C in 4 °C.

4.4.1.5.4 Cepitev konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta gami-B (DE3) pLysS, prenos proteinov po westernu in imunodetekcija z mišjimi protitelesi proti His-repku



Slika 29: Izolacija Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ z Ni-afinitetno kromatografijo po rezanju konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ s trombinom iz Rosetta gami-B (DE3) pLysS in imunodetekcija z mišjimi protitelesi proti His-repku. Legenda: M - označevalec velikosti; SN - supernatant; FT - sprano; L1, L2 - vzorca pri spiranju s pufrom za lizo; W1, W2 - vzorca pri spiranju z wash pufrom; E1, E2 - vzorca pri spiranju s pufrom za elucijo.

Ugotovili smo, da se band, ki je v nevezani frakciji, ne barva z anti-His protitelesi in torej ni fragment TolA (slika 29).

4.4.1.5.5 Preverjanje hemolitične aktivnosti konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ in Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta gami-B (DE3) pLysS ob prisotnosti in odsotnosti Ca²⁺ ionov na človeških in govejih eritrocitih

Domnevali smo, da imamo v frakciji FT Pfn del fuzije, zato smo to frakcijo dializirali proti 5 mM fosfatnem pufru (pH 7,2, 20 mM β -MeEtOH, 5 mM EDTA). Ko smo pufer prvič zamenjali, smo dodali 4-krat manj β -MEtOH, da smo omogočili počasno zvijanje proteina in formiranje pravilnih disulfidnih vezi. Ko smo pufer zamenjali tretjič in četrtič, pa β -MeEtOH nismo dodali. 5 mM EDTA je bil prisoten tekom celega poskusa. Ravno tako smo dializirali nerezano fuzijo. Uporabljali smo dializne vrečke, ki prepuščajo molekule, ki so manjše od 8 kDa. Velikost Pfn dela rezane fuzije je 11,2 kDa in bi tako morala ostati v dializni vrečki.

Pripravili smo dva eritrocitna pufra. V enega smo dodali toliko CaCl₂, da je bila njegova končna koncentracija med poskusom 1 mM. Eritrocite smo redčili z eritrocitnim pufrom, tako da je bila njihova končna absorbanca A_{630} med poskusom ~0,5. V vsako luknjico smo odpipetirali po 200 µl vzorca (fuzija in FT). Nato pa v drugo luknjico in vse do zadnje po 100 µl eritrocitnega pufra (z ali brez Ca²⁺). Nato smo iz prve luknjice odpipetirali 100 µl v drugo luknjico, dobro premešali in ponovili vse do zadnje luknjice, kjer smo zavrgli 100 µl redčitve. Nazadnje smo dodali v vsako luknjico po 100 µl eritrocitov (človeške ali goveje), nanašanje smo začeli v dvanajsti in končali v prvi luknjici. Koncentracija fuzijskega proteina v prvi luknjici je bila 0,7 mg/ml, v vsaki naslednji pa dvakrat nižja. Koncentracijo Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ v frakciji FT nismo preverjali zaradi prenizkega volumna



Slika 30: Hemolizni test s konstruktom TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ in fragmentom Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ iz Rosetta gami-B (DE3) pLysS ob prisotnosti in odsotnosti Ca^{2+} ionov na človeških in govejih eritrocitih.

Iz slike 30 lahko vidimo, da smo bili vzorci hemolitični. Hemoliza je bila močnejša na človeških eritrocitih kot govejih. Prav tako je bila hemoliza večja pri vzorcih, ki niso bili

inkubirani s CaCl₂. Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎, ki smo ga imeli izolirali v frakciji FT, je bolj hemolitičen kot fuzijski protein TolA- Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎.

4.4.2 Konstrukti TolA-Pfn₍₂₂₋₁₃₆₎, TolA-Pfn₍₂₂₋₁₆₂₎ in TolA-Pfn₍₂₂₋₁₉₆₎

Ker smo imeli pri delu s konstruktom TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ veliko težav smo se odločili, da bomo poizkusili izraziti daljše N-terminalne dele Pfn. V ta namen smo oblikovali tri nove konstrukte TolA-Pfn₍₂₂₋₁₃₆₎, TolA-Pfn₍₂₂₋₁₆₂₎ in TolA-Pfn₍₂₂₋₁₉₆₎. Najprej smo preverili, ali se nam konstrukti izražajo. Uporabljali smo celice Origami (DE3) pLysS. TolA-Pfn₍₂₂₋₁₃₆₎ je velik 24,3 kDa, TolA-Pfn₍₂₂₋₁₆₂₎ 27 kDa in TolA-Pfn₍₂₂₋₁₉₆₎ 31 kDa.

Transformirane bakterijske celice smo namnoževali pri 37 °C. Ko je OD_{600} dosegel ~0,5, smo dodali IPTG, ki je induciral sintezo konstrukta in gojili še nadaljnje 4 ure pri 37 °C ali 25°C. Na NaDS-PAGE smo nanesli vzorce pred in po indukciji z IPTG.



Slika 31: Izražanje konstruktov TolA-Pfn₍₂₂₋₁₃₆₎, TolA-Pfn₍₂₂₋₁₆₂₎ in TolA-Pfn₍₂₂₋₁₉₆₎, pri 25 °C in 37 °C v sevu Origami (DE3) pLysS.

Legenda: Pred - pred indukcijo; Po - po indukciji

Izražali so se vsi konstrukti (slika 31). Najprej smo poizkušali izolirati fuzijski protein TolA-Pfn₍₂₂₋₁₉₆₎ in nato naslednja dva.

4.4.2.1 Konstrukt TolA-Pfn₍₂₂₋₁₉₆₎

Transformirane bakterijske celice smo najprej gojili pri 37 °C. Ko je OD_{600} dosegel ~0,5 smo dodali IPTG, ki je induciral sintezo konstrukta in gojili še nadaljnje 4 ure pri 25 °C. Celice smo s centrifugiranjem ločili od gojišča, jih preko noči zamrznili in naslednji dan lizirali. Produkt se ni izražal v topni obliki ampak v obliki IT (slika 32).



Slika 32: Izolacija konstruktaTolA-Pfn₍₂₂₋₁₉₆₎ iz Origami (DE3) pLysS z Ni-afinitetno kromatografijo. Legenda: Pred ind. - vzorec pred indukcijo; Po ind. - vzorec po indukciji; SN - vzorec, ki smo ga nanesli na kolono; M - označevalec velikosti; FT - sprano, L1, L2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za lizo; W1, W2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za spiranje; E1, E2, E3, E4 - vzorci pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.

4.4.2.2 Konstrukt TolA-Pfn₍₂₂₋₁₆₂₎

Transformirane bakterijske celice smo najprej gojili pri 37 °C. Ko je OD_{600} dosegel ~0,5, smo dodali IPTG, ki je induciral sintezo konstrukta in gojili še nadaljnje 4 ure pri 25 °C. Celice smo s centrifugiranjem ločili od gojišča, jih preko noči zamrznili in naslednji dan lizirali. Produkt se ni izražal v topni obliki ampak v obliki IT (slika 33). Naredili smo tudi prenos proteinov po westernu in imunodetekcijo z mišjimi protitelesi proti His-repku.



Slika 33: Izolacija konstruktaTolA-Pfn₍₂₂₋₁₆₂₎ iz Origami (DE3) pLysS z Ni-afinitetno kromatografijo. Legenda: M - označevalec velikosti; Pred ind. - vzorec pred indukcijo; Po ind. - vzorec po indukciji; P. po lizi - pelet po lizi; SN - vzorec, ki smo ga nanesli na kolono; FT - sprano; L1, L2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za lizo; W1, W2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za spiranje; E1, E2, E3, E4, E5 - vzorci pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.

Kot lahko vidimo na sliki 33, se nam z anti-His protitelesi ponovno barva veliko razgradnih produktov, ki smo jih dobili tekom izolacije.

4.4.2.3 Konstrukt TolA-Pfn₍₂₂₋₁₃₆₎

Transformirane bakterijske celice smo najprej gojili pri 37 °C. Ko je OD_{600} dosegel ~0,5, smo dodali IPTG, ki je induciral sintezo konstrukta in gojili še nadaljnje 4 ure pri 25 °C. Celice smo s centrifugiranjem ločili od gojišča, jih preko noč zamrznili in naslednji dan lizirali. Ker smo fuzijo dobili v topni frakciji, smo jo izolirali pod nativnimi pogoji. Izolirane proteine smo nanesli na Ni-afinitetno kolono. Vzorce po Ni-afinitetni kromatografiji pa na NaDS-PAGE (slika 34).



Slika 34: Izolacija konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₃₆₎ iz Origami (DE3) pLysS in Rosetta-gami B (DE3) pLsyS s pomočjo Ni-afinitetne kromatografije.

Legenda: M - označevalec velikosti; Pred ind. - vzorec pred indukcijo; Po ind. - vzorec po indukciji; P. po lizi - pelet po lizi; SN - vzorec, ki smo ga nanesli na kolono; FT - sprano; L1, L2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za lizo; W1, W2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za spiranje; E1, E2, E3, E4 - vzorci pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.

Vzorce E1-E3 smo dializirali proti 5 mM fosfatnem pufru (5 mM EDTA, 20 mM β -MeEtOH, pH 7,2). Po koncu dialize smo vsebino dializne vrečke centrfugirali. Na NaDS-PAGE smo nanesli vzorec po dializi in oborino, ki nastane med dializo (slika 35). Naredili smo tudi prenos proteinov po westernu in imunodetekcijo proteinov z mišjimi protitelesi proti His-repku.



Slika 35: Vzorec konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₃₆₎ po dializi in imunodetekcijavzorca z mišjimi protitelesi proti his-repku.

4.4.3 Konstrukti Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA in TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA

Ker smo imeli pri delu s prejšnjimi konstrukti obilico težav, smo se odločili za novo strategijo. Odločili, da bomo partnerja pri fuziji TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ zamenjali. Fuzijske proteine smo najprej izražali v celicah BL21 (DE3) pLysS.



Slika 36: Izražanje konstruktov TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎, Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎, TolA in TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎. TolA v celicah BL21 (DE3) pLysS.

Legenda: Pred ind. - pred indukcijo, Po ind. - po indukciji.

Produkt Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA se nam ni izražal. Ostali produkti so se nam izrazili (slika 36).

4.4.3.1 Konstrukt Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA

Ker se nam konstrukt ni izražal v celicah BL21 (DE3) pLysS, smo ga transformirali v celice Rosetta-gami B (DE3) pLysS. Transformirane bakterijske celice smo najprej gojili pri 37 °C. Ko je OD₆₀₀ dosegel ~0,5, smo dodali IPTG, ki je induciral sintezo konstrukta in gojili še nadaljnje 4 ure pri 25 °C. Celice smo s centrifugiranjem ločili od gojišča, jih preko noči zamrznili in naslednji dan lizirali. Fuzijo smo hoteli izolirati pod nativnimi pogoji. Topne, izolirane proteine smo nanesli na Ni-afinitetno kolono. Vzorce po Ni-afinitetni kromatografiji pa na NaDS-PAGE.



Slika 37: Izolacija konstrukta Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA iz BL21 (DE3) pLysS z Ni-afinitetno kromatografijo. Legenda: M - označevalec velikosti; Pred ind. - vzorec pred indukcijo; Po ind. - vzorec po indukciji; P. po lizi - pelet po lizi; SN - vzorec, ki smo ga nanesli na kolono; FT - sprano; L1, L2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za lizo; W1, W2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za spiranje; E1, E2, E3, E4 - vzorci pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.

Izolacija fuzije ni bila uspešna (slika 37). Ponovno ni prišlo niti do indukcije sinteze gena.

4.4.3.2 Konstrukt TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA

4.4.3.3 Izražanje in izolacija konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA iz celic BL21 (DE3) pLysS

Transformirane bakterijske celice smo najprej gojili pri 37 °C. Ko je OD_{600} dosegel ~0,5, smo dodali IPTG, ki je induciral sintezo konstrukta in gojili še nadaljnje 4 ure pri 25 °C. Celice smo s centrifugiranjem ločili od gojišča, jih preko noči zamrznili in naslednji dan lizirali. Ker smo fuzijo dobili v topni frakciji, smo jo izolirali pod nativnimi pogoji. Izolirane proteine smo nanesli na Ni-afinitetno kolono. Vzorce po Ni-afinitetni kromatografiji pa na NaDS-PAGE (slika 38). Naredili smo tudi prenos po westernu in imunodetekcijo proteinov z mišjimi protitelesi proti His-repku.



Slika 38: Izolacija konstruktaTolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA iz BL21 (DE3) pLysS z Ni-afinitetno kromatografijo. Legenda: M - označevalec velikosti; Pred ind. - vzorec pred indukcijo; Po ind. - vzorec po indukciji; P. po lizi - pelet po lizi; SN - vzorec, ki smo ga nanesli na kolono; FT - sprano; L1, L2, L3 - frakcije pri spiranju kolone s pufrom za lizo; W1, W2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za spiranje; E1, E2, E3, E4 - vzorci pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.

Vzorce E1-E4 smo dializirali proti 5 mM fosfatnem pufru (5 mM EDTA, 20 mM β -MeEtOH, pH 7,2). Po koncu dialize smo vsebino dializne vrečke centrifugirali. Na NaDS-PAGE smo nanesli različne količine vzorca po dializi (slika 39). Po dializi smo preverili tudi koncentracijo proteina z merjenjem spektra pri 280 nm.



Slika 39: Vzorec konstrukta TolA-Pfn(22-121)-TolA iz celic BL21 (DE3) pLysS po dializi.

Preverili smo tudi, katera je najmanjša koncentracija trombina, ki še reže fuzijo (slika 40). Najvišja redčitev je bila 4 U trombina/mg fuzije, najnižja pa 0.03 U trombina/mg fuzije.



Slika 40: Optimizacija rezanja konstrukta TolA-Pfn(22-121)-TolA iz celic BL21 (DE3) pLysS.

Potrebna je vsaj 0,25 U trombina za cepitev mg fuzijskega proteina. Velikost Pfn fragmenta po rezanju je 11,6, fragmentov TolA pa 9,9 in 11,5 kDa (slika 40).

4.4.3.3.1 Izražanje in izolacija konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA iz celic Rosetta (DE3) pLysS

Transformirane bakterijske celice smo najprej gojili pri 37 °C. Ko je OD_{600} dosegel ~0,5, smo dodali IPTG, ki je induciral sintezo konstrukta in gojili še nadaljnje 4 ure pri 25 °C. Celice smo s centrifugiranjem ločili od gojišča, jih preko noči zamrznili in naslednji dan lizirali. Ker smo fuzijo dobili v topni frakciji, smo jo izolirali pod nativnimi pogoji. Izolirane proteine smo nanesli na Ni-afinitetno kolono. Vzorce po Ni-afinitetni kromatografiji pa na NaDS-PAGE (slika 41). Naredili smo tudi prenos po westernu in imunodetekcijo proteinov z mišjimi protitelesi proti His-repku.



Slika 41: Izolacija konstruktaTolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA iz Rosetta (DE3) pLysS z Ni-afinitetno kromatografijo. Legenda: Pred ind. - vzorec pred indukcijo; Po ind. - vzorec po indukciji; Pelet po lizi; M - označevalec velikosti; SN - vzorec, ki smo ga nanesli na kolono; FT - sprano; L1, L2, - frakcije pri spiranju kolone s pufrom za lizo; W1, W2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za spiranje; E1, E2, E3 - vzorci pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.

Vzorce E1-E3 smo dializirali proti 5 mM fosfatnem pufru (5 mM EDTA, 20 mM β -MeEtOH, pH 7,2) (slika 42). Po koncu dialize smo vsebino dializne vrečke centrifugirali in preverili koncentracijo proteina z merjenjem spektra pri 280 nm.



Slika 42: Dializirana vzorec konstrukta Tol
A-Pfn_{(22-121)}-TolA in rezanega konsrukta TolA-Pfn_{(22-121)}-TolA iz Rosetta (DE3) pLys
S .

Fragmente po rezanju fuzije smo želeli ločiti z ionsko izmenjevalno kromatografijo. Teoretični pI fragmentov TolA sta 8,94 in 8,95, pI $Pfn_{(22-121)}$ pa 9,63. Pufra za ionsko izmenjevalno kromatografijo sta imela pH 9,1. Pfn del fuzije bi tako ločili od ostalih dveh delov. Ločevanje ni bilo uspešno (slika 43).



Slika 43: Kromatogram ceplenega konstruktaTolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA po ionsko izmenjevalni kromatografiji. Skozi kolono smo najprej spustili nekaj ml pufra A (20 mM fosfatni pufer, pH 9,1) in tako umerili kolono. Nato smo na kolono nanesli vzorec rezane fuzije. Ker ima Pfn del fuzije izoelektrično točko 9,6, bi se moral vezati na kolono, TolA fragmenta pa imata nižjo izoelekrično točko kot 9,1 in bi se tako morala eluirati iz kolone. Vezane proteine smo spirali s pomočjo pufra B (20 mM fosfatni pufer, 1M NaCl, pH 9,1) in sicer z linearnim naraščajočim gradientom soli, ki se je v roku 45 minut povzpel iz 0 M na 1 M koncentracijo.

Iz slike 43 lahko vidimo, da nismo uspeli ločiti Pfn in TolA dela fuzije. Po spiranju z linearno naraščajočim gradientom soli sicer dobimo nekaj proteina, a bi ta vrh moral biti visok in vitek, ne pa razvlečen kot je na sliki 43.

4.4.3.3.2 Izražanje konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA v celicah Origami (DE3) pLysS

Transformirane bakterijske celice smo najprej gojili pri 37 °C. Ko je OD₆₀₀ dosegel ~0,5, smo dodali IPTG, ki je induciral sintezo konstrukta in gojili še nadaljnje 4 ure pri 25 °C. Celice smo s centrifugiranjem ločili od gojišča, jih preko noči zamrznili in naslednji dan lizirali. Ker smo fuzijo dobili v topni frakciji, smo jo izolirali pod nativnimi pogoji. Izolirane proteine smo nanesli na Ni-afinitetno kolono. Vzorce po Ni-afinitetni kromatografiji pa na NaDS-PAGE (slika 44). Naredili smo tudi prenos po westernu in imunodetekcijo proteinov z mišjimi protitelesi proti His-repku.



Slika 44: Izolacija konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA iz Origami (DE3) pLysS z Ni-afinitetno kromatografijo. Legenda: M - označevalec velikosti; Pred ind. - vzorec pred indukcijo; Po ind. - vzorec po indukciji; P. po lizi - pelet po lizi; SN - vzorec, ki smo ga nanesli na kolono; FT - sprano; L1, L2 - frakcije pri spiranju kolone s pufrom za lizo; W1, W2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za spiranje; E1, E2, E3 - vzorci pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.

Vzorce E1-E3 smo dializirali proti 5 mM fosfatnem pufru (5 mM EDTA, 20 mM β -MeEtOH, pH 7,2). Po koncu dialize smo vsebino dializne vrečke centrfugirali in nekaj vzorca nanesli na NaDS-PAGE (slika 45). Po dializi smo preverili koncentracijo proteina z merjenjem spektra pri 280 nm. Nekaj mikrolitrov fuzijskega proteina smo tudi rezali in prav tako nanesli na NaDS-PAGE (slika 45).



Slika 45: Dializiran vzorec nerezanega in rezanega konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA iz Origami (DE3) pLysS.

Ločevanje fragmentov, po cepitvi fuzijskega proteina s trombinom, z ionsko izmenjevalno kromatografijo ni bilo uspešno. Kromatogram je bil podoben kot pri prejšnjem poskusu (slika 43). Uporabili smo tudi iste pogoje ločevanja.

4.5 KONSTRUKT C-TERMINALNEGA DELA PERFORINA, TOLA-PFN₍₁₉₆₋₅₄₀₎

C-terminalni del Pfn smo ravno tako izražali v obliki fuzijskega proteina s TolA partnerjem. Fuzijo smo izražali v Origami (DE3) pLysS sevu *E. coli*.

4.5.1 **Izražanje in izolacija**

Transformirane bakterijske celice smo najprej gojili pri 37 °C. Ko je OD₆₀₀ dosegel ~0,5, smo dodali IPTG, ki je induciral sintezo konstrukta in gojili še nadaljnje 4 ure na 37 °C. Celice smo s centrifugiranjem ločili od gojišča, jih preko noč zamrznili in naslednji dan lizirali. Izolirane proteine smo nanesli na Ni-afinitetno kolono. Vzorce po Ni-afinitetni kromatografiji pa na NaDS-PAGE (slika 46). Naredili smo tudi prenos po westernu in imunodetekcijo proteinov z mišjimi protitelesi proti His-repku.



Slika 46: Izolacija konstruktaTolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3) pLysS z Ni-afinitetno kromatografijo. Legenda: M - označevalec velikosti; Pred ind. - vzorec pred indukcijo; Po ind. - vzorec po indukciji; P. po lizi - pelet po lizi; SN - vzorec, ki smo ga nanesli na kolono; FT - sprano; L1, L2 - frakcije pri spiranju kolone s pufrom za lizo; W1, W2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za spiranje; E1, E2, E3, E4 - vzorci pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.

Fuzije nismo uspeli izolirati (slika 46). Glede na to, da fuzija se izraža, pa lahko sklepamo, da se nahaja v obliki inkluzijskih telesc (IT).

4.5.1.1 Izolacija in raztapljanje IT

Bakterijski pelet smo resuspendirali v pufru za lizo pod nativnimi pogoji in po protokolu izolirali IT. Preko noči smo jih ob konstantnem mešanju raztapljali v pufru z 8 M ureo. Naslednji dan smo s centrifugiranjem suspenzijo ločili na usedlino in supernatant. Oba vzorca smo pripravili za NaDS-PAGE. Ugotovili smo, da se nam IT niso raztopila. Zato smo usedlino ponovno resuspendirali v pufru z 8 M ureo. Suspenzijo v 8 M urei sem nato sonificiral 15-krat po deset sekund z deset sekundnimi premori. IT sem nato dodatno raztapljal preko noči na sobni temperaturi, ob stalnem mešanju, da se še dodatno raztopijo. Uspešnost raztapljanja fuzijskega proteina smo preverili z NaDS-PAGE elektroforezo (slika 47).



Slika 47: Vzorec IT konstrukta TolA-Pfn(196-540) iz Origami (DE3) pLysS po raztapljanju v 8 M urei.

4.5.1.2 Izolacija konstrukta TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3) pLysS z Ni-afinitetno kromatografijo

Protein, raztopljen v 8 M urei, smo poizkušali dodatno očistiti z Ni-afinitetno kromatografijo (slika 48).



Slika 48: Izolacija konstruktaTolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3) pLysS po raztapljanju IT v pufru z 8 M ureo. Legenda: M - označevalec velikosti; SN - vzorec, ki smo ga nanesli na kolono; FT - sprano; L1, L2 - frakciji pri spiranju kolone s pufrom za lizo; E1, E2, E3, E4 - frakcije pri spiranju kolone s pufrom za elucijo.

Na sliki 48 opazimo, da je v vzorcu prisotnih še veliko nečistot. Prav tako vidimo, da imamo pri prvem in drugem vzorcu pri spiranju s pufrom za elucijo kopico novih nižjih lis v primerjavi z vzorcem, ki smo ga nanesli na kolono.

4.5.1.3 Gelska filtracija z vzorcem konstrukta TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3) pLysS

Nečistoče smo poizkusili odstraniti z gelsko filtracijo. Proteina nismo uspeli očistiti.

4.5.1.4 Zvijanje konstrukta TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3) pLysS

Konstrukte smo izolirali pod denaturajočimi pogoji, zato smo jih morali po končani izolaciji in raztapljanju ponovno renaturirati. Preizkusili smo številne pogoje zvijanja, ki so povzeti v preglednici 26. Rezultate zvijanja smo opredelili kot:

<u>Netopni agregati</u>: protein se je oboril in bil po centrifugiranju prisoten v usedlini.

<u>Topni agregati</u>: po centrifugiranju je bil protein še vedno prisoten v supernatantu, vendar se je na NaDS-PAGE izkazalo, da tvori oligo- in multimere.

<u>Topen protein</u>: po centrifugiranju je bil protein še vedno prisoten v supernatantu in tudi na gelu ni bilo vidnih oligo- ali multimerov.

1000000000000000000000000000000000000	Oliganii (DE5) pLyss.	
Pogoji zvijanja	Rezultat	Opombe
10-krat redčen izhodni vzorec, postopno zniževanje koncentracije uree v 50 mM NaH ₂ PO ₄ pufru, 1 mM EDTA, 10 mM β -MeEtOH, pH 8: 7 M \rightarrow 6 M \rightarrow 5 M \rightarrow 4 M \rightarrow 3 M \rightarrow 2 M \rightarrow 1 M \rightarrow 0,5 M \rightarrow 0 M	Večina proteina netopnega, nekaj topnega,	
20-krat redčen izhodni vzorec, postopno zniževanje koncentracije uree v 50 mM NaH ₂ PO ₄ pufru, 1 mM EDTA, 10 mM β -MeEtOH, pH 8: 7 M \rightarrow 6 M \rightarrow 5 M \rightarrow 4 M \rightarrow 3 M \rightarrow 2 M \rightarrow 1 M \rightarrow 0,5 M \rightarrow brez uree	Večina proteina netopnega, nekaj topnega,	
Postopno redčenje 3 ml fuzije (v 8 M urei) v 7 ml 4 M uree, postopno zniževanje koncentracije uree v 50 mM NaH ₂ PO ₄ pufru, 1 mM EDTA, 10 mM β -MeEtOH, pH 8: 4 M \rightarrow 2 M \rightarrow 1 M \rightarrow 0,5 M \rightarrow brez uree	Večina proteina netopnega, nekaj topnega, topni agregati	Slika 49
Postopno redčenje 3 ml fuzije (v 8 M urei) v 7 ml 4 M uree, postopno zniževanje koncentracije uree v 20 mM Tris-HCl pufru, 1 mM EDTA, 10 mM β -MeEtOH, pH 8: 4 M \rightarrow 2 M \rightarrow 1 M \rightarrow 0,5 M \rightarrow brez uree	Večina proteina netopnega, nekaj topnega, topni agregati	Slika 49
Postopno redčenje 3 ml fuzije (v 8 M urei) v 7 ml 4 M uree, postopno zniževanje koncentracije uree v 20 mM Tris-HCl pufru, 0,5 mM EDTA, 10 mM β -MeEtOH, pH 6: 4 M \rightarrow 2 M \rightarrow 1 M \rightarrow 0,5 M \rightarrow brez uree	Netopni agregati	Slika 50
Postopno redčenje 3 ml fuzije (v 8 M urei) v 7 ml 4 M uree, postopno zniževanje koncentracije uree v 20 mM Tris-HCl pufru, 0,5 mM EDTA, 10 mM β -MeEtOH, pH 7: 4 M \rightarrow 2 M \rightarrow 1 M \rightarrow 0.5 M \rightarrow brez uree	Večina proteina netopnega, nekaj topnega, topni agregati	Slika 50
Postopno redčenje 3 ml fuzije (v 8 M urei) v 7 ml 1,5 M uree, 20 mM Tris-HCl pufer, 0,5 mM EDTA, 10 mM β- MeEtOH, 100 mM NaCl, pH 8	Večina proteina netopnega, nekaj topnega, topni agregati	Slika 51
Postopno redčenje 3 ml fuzije (v 8 M urei) v 7 ml 1,5 M uree, 20 mM Tris-HCl pufer, 0,5 mM EDTA, 10 mM ß-MeEtOH, 200 mM NaCl, pH 8	Večina proteina netopnega, nekaj topnega	Slika 51
Postopno redčenje 3 ml fuzije (v 8 M urei) v 7 ml 1,5 M uree, 50 mM NaH_2PO_4 pufer, 0,5 mM EDTA, 10 mM β -MeEtOH, pH 6	Netopni agregati	Slika 52
Postopno redčenje 3 ml fuzije (v 8 M urei) v 7 ml 1,5 M uree, 50 mM NaH_2PO_4 pufer, 0,5 mM EDTA, 10 mM β -MeEtOH, pH 7	Netopni agregati	Slika 52
20 mM Tris-HCl pufer, 5 mM EDTA, 20 mM β-MeEtOH, 0.5 M urea pH 8		Slika 53

Preglednica 25: Pogoji zvijanja konstrukta TolA-Pfn(196-540) iz Origami (DE3) pLysS.



Slika 49: Rezultati zvijanja konstrukta TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3) pLysS s postopnim redčenjem in postopnim zniževanjem koncentracije uree v fosfatnem pufru in pufru Tris-HCl,, pH 8.

Postopno redčenje 3 ml fuzije (v 8 M urei) v 7 ml 4 M uree, postopno zniževanje koncentracije uree v 50 mM NaH₂PO₄ ali 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM β -MeEtOH, pH 8: 4 M \rightarrow 2 M \rightarrow 1 M \rightarrow 0,5 M \rightarrow brez uree.

Iz slike 49 je razvidno, da dobimo boljši izkoristek zvijanja v Tris-HCl pufru kot v fosfatnem pufru. Opazimo lahko tudi visokomulekularne agregate, prisotne v peletu.



Slika 50: Rezultati postopnega zvijanja konstrukta TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3) pLysS s postopnim redčenjem in postopnim zniževanjem koncentracije uree v Tris-HCl, pH 6 in pH 7.

Postopno redčenje 3 ml fuzije (v 8 M urei) v 7 ml 4 M uree, postopno zniževanje koncentracije uree v 20 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, 10 mM β -MeEtOH, pH 6 ali 7: 4 M \rightarrow 2 M \rightarrow 1 M \rightarrow 0,5 M \rightarrow brez uree.

Iz slike 50 je razvidno, da dobimo boljši izkoristek zvijanja pri pH 7 kot pri pH 6 (v Tris-HCl pufru). Prav tako lahko opazimo visokomolekularne agregate na vrhu gela, ki nastanejo kljub prisotnosti β-MeEtOH v dializni raztopini.



Slika 51: Rezultati postopnega zvijanja konstrukta TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3) pLysS s postopnim redčenjem iz zvijanjem proteina v 20 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, 10 mM β-MeEtOH, 100 ali 200 mM NaCl, pH 8.

Iz slike 51 je razvidno, da dobimo boljši izkoristek fuzijskega proteina pri raztaplju v Tris-HCl pufru s 100 mM NaCl kot pa pri raztapljanju v tris-HCl pufru s 200 mM NaCl.



Slika 52: Rezultati postopnega zvijanja konstrukta TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3) pLysS s postopnim redčenjem iz zvijanjem proteina v 50 mM NaH₂PO₄, 0,5 mM EDTA, 10 mM β-MeEtOH, pH 6 ali 7.

Iz slike 52 je razvidno, da se fuzijski protein ne raztaplja v fosfatnem pufru pri pH 6 in 7.



Slika 53: Zvijanje konstrukta TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3) pLysS v 20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 20 mM β-MeEtOH, 0,5 M urea, pH 8.

Pufer Tris-HCl je primeren za raztapljanje fuzije. S tem poizkusom smo pokazali tudi na prisotnost intramolekularnih disulfidnih vezi, ki jih z dodatkom reducenta DTT razbijemo. Na vrhu žepkov so vidni visokomolekularni agregati, katerih količina se ob dodatku DTT-ja zmanjša.

4.5.1.5 Prenos proteinov, iz vzorca TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎ iz Origami (DE3) pLysS, po westernu in imunodetekcija z mišjimi protitelesi proti His-repku in EGF domeni perforina



Slika 54: Prenos proteinov po westernu in imunodetekcija z mišjimi protitelesi proti His-repku in EGFdomeni perforina.

Anti-his in anti-EGF protitelesa se vežejo na liso primerne velikosti, prav tako pa se vežejo na ostale razgradne oz. nepopolne produkte, ki so prisotni v vzorcu proteina (slika 54).

4.5.2 Stabilnost zvitih konstruktov

Uspešno zvite konstrukte TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎ smo po dveh tednih ponovno nanesli na NaDS-PAGE, da bi ugotovili ali so stabilni. Med tem smo jih shranili v hladilniku pri 4°C. Ugotovili smo, da konstrukti niso stabilni niti pri enem pogoju zvijanja, saj smo večino proteinov po centrifugiranju vzorcev dobili v netopni frakciji (usedlini) ali pa so tvorili visokomulekularne topne agregate (slika ni prikazana).

5 **RAZPRAVA IN SKLEPI**

5.1 RAZPRAVA

V diplomskem delu smo poskušali izraziti različne dele človeškega perforina v različnih ekspresijskih sistemih *E. coli.* Perforin smo izražali kot fuzijski protein s proteinom TolAIII iz bakterije *E. coli.* TolA je zelo stabilen protein in ne agregira, niti pri zelo visokih koncentracijah (Markides, 1996), poleg tega pa omogoča visoke donose tudi nekaterim evkariotskim proteinom (Anderluh in sod., 2002). Pri delu s perforinom smo imeli veliko težav, a smo cilju kljub mnogo bližje kot smo bili pred začetkom eksperimentov. Perforin je zelo težko izolirati, po izolaciji je nestabilen in vsak pripravek se kvantitativno obnaša drugače (Metkar in sod., 2005). Največja ovira pri preučevanju perforina je ta, da ga limfociti proizvajajo le v nizkih količinah (Liu C.C. in sod., 1994). Raziskovalci, ki se ukvarjajo s perforinom, poskušajo že več kot 20 let izolirati rekombinantni perforin. Perforinu se ob izolaciji drastično, za več kot 90%, zmanjša litična sposobnost (Fraser in sod., 2000).

5.1.1 Konstrukt TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎

5.1.1.1 Izražanje in izolacija fuzijskega proteina

To je konstrukt, s katerim smo začeli opredeljene eksperimente. Kljub temu da so v zadnjem času odkrili mnogo dejstev v povezavi z delovanjem in strukturo perforina, je njegov N-terminalni del še vedno slabo okarakteriziran. V diplomskem delu smo zato hoteli izraziti stabilen fragment perforina, ki bi bil primeren za nadaljnje študije.

Fuzijski protein je bil od N- proti C-terminalnemu delu sestavljen iz 6 histidinov in 2 serinov, sledilo mu je zaporedje proteina TolA, kratko cepitveno zaporedje za proteazo trombin in perforinski del fuzije. Fragment smo najprej poskušali izraziti v različnih ekspresijskih sistemih E. coli, kar nam je tudi uspelo (slika 14). Ugotovili smo, da se fragment izraža v topni obliki tako pri 25°C kot pri 37°C, a smo proteine kljub temu raje izražali pri 25 °C. Fuzijske proteine smo izolirali z Ni-afinitetno kromatografijo, kjer smo izkoristili njihovo lastnost, da se vežejo na kromatografski nosilec. Že ob prvi izolaciji smo opazili, da med procesom izolacije pridobimo veliko manjših fragmentov, ki se tudi barvajo z anti-His protitelesi (slika 25). Intenziteta lis, ki predstavljajo razgradne produkte, se je sčasoma povečevala, kar kaže na vpliv proteaz na fuzijski protein. Glede na to, da je bil His-repek na N-terminalnem delu proteina, lahko zaključimo, da so proteaze razgrajevale fuzijski protein na C-terminalnem delu. Na začetku smo kot inhibitorje uporabljali PMSF-inhibitorje proteaz, ki pa se niso izkazali kot dovolj uspešni. Zato smo v nadaljevanju uporabljali Pefablok. Obenem smo imeli proteine raztopljene v pufru, kjer je bil dodan EDTA, ki veže dvovalentne ione in tako inhibira metaloproteaze ter benzamidin, ki je reverzibilni inhibitor serinskih proteaz. Efekt proteaz smo želeli zmanjšati tako, da bi izolirane proteine shranili pri temperaturi 20°C, a perforin pri takih pogojih shranjevanja agregira, kar smo pokazali tudi sami (slika 27).

Nepopolni produkti so morda nastajali že med sintezo proteina, saj smo izražali evkariotski protein v prokariontskem ekspresijskem sistemu. Ta problem smo hoteli obiti tako, da smo uporabili različne ekspresijske sisteme *E. coli*. Seva BL21 (DE3) plysS in pLysE imata

okvarjena zapisa za površinske proteaze, sev Origami (DE3) plysS olajša tvorbo disulfidnih mostičkov, seva Rosetta in Rosestta-gami B (DE3) pLysS imata okvarjena zapisa za površinske proteaze, vsebujeta tudi zapisa za redke tRNA, kar olajša izražanje evkariotskih genov, poleg tega pa ima zadnji sev tudi zapis, s katerim se olajša tvorba disulfidnih mostičkov.

Perforin se sintetizira na endoplazmatskem retiklu, njegovo zorenje se nadaljuje v Golgijevem aparatu od koder se nato transportira v veziklih, podobnih lizosomom. Sinteza proteina in biokemijsko okolje v bakterijski citoplazmi pa še zdaleč ni podobno takšnim razmeram. Bakterijska celica izvaja procesa transkripcije in translacije istočasno, kar pa ne velja za evakarionte, kjer sta ta dva procesa časovno in prostorsko ločena. Tudi pH, ionska jakost in redoks potencial so drugačni od pogojev, pri katerih je omenjeni protein sintetiziran v evkariotski celici. Formiranje pravilnih disulfidnih vezi je v reducirajoči bakterijski citoplazmi onemogočeno, saj ta proces poteka pri evkariotnih v oksidativnih razmerah v endoplazemskem retiklu (Glazer N., Nikaido H., 2007). Konstrukt, ki smo ga izražali, pa je vseboval kar sedem cisteinov, od tega jih je pet pripadalo perforinu.

Ker nismo uspeli osamiti fuzijskega proteina z Ni-afinitetno kromatografijo, smo poskušali z ionsko-izmenjevalno kromatografijo. Ločevanje smo nekajkrat ponovili, a fuzijskega proteina nismo uspeli dovolj dobro osamiti.

5.1.1.2 Rezanje fuzijskega proteina s trombinom in izolacija perforinskega fragmenta

Na začetku smo imeli težave z rezanjem proteina, saj smo v cepitveni mešanici med digestijo dobili oborino, po Ni-afinitetni kromatografiji pa nismo dobili perforinskega fragmenta, ki bi moral biti v nevezani frakciji. Sklepali smo, da protein med cepitvijo agregira. Nato smo s kratkim poskusom ugotovili, da perforin agregira zaradi prisotnosti Ca^{2+} v pufru za cepitev.

Fragmenta smo po cepitvi poskušali ločiti z ionsko-izmenjevalno, hidrofobno in afinitetno (Ni-NTA) kromatografijo. Za ionsko-izmenjevalno kromatografijo smo uporabili kationsko kolono. Perforinski fragment bi se moral pri izbranem pH vezati na kolono, fragment TolA pa bi se moral eluirati. Zaradi kopice drugih fragmentov v cepitveni mešanici nam osamitev Pfn-fragmenta ni uspela. Za hidrofobno kromatografijo smo uporabili štiri vrste kolon in dve različni soli, vendar osamitev in vezava perforinskega fragmenta na kolono prav tako ni uspela. Več sreče smo imeli z afinitetno kromatografijo (slika 28). Tako smo pridobili nekaj mikrogramov fragmeta Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎, s katerim smo naredili hemolizni test (slika 29).

5.1.1.3 Hemolizni test

Ugotovili smo, da je izolirani rekombinantni človeški perfoin ohranil biološko aktivnost. Če na hitro pogledamo sliko, takoj ugotovimo, da deluje protein bolje na človeške kot goveje eritrocite. Možno, je da vezavo na membrano človeških eritrocitov olajša neznana molekula/motiv na membrani. Zanimivo je tudi, da je hemoliza boljša v odsotnosti kalcija. To si lahko razložimo tako, da perforin ob prisotnosti kalcija agregira in posledično se zniža njegova koncentracija in aktivnost. Podoben efekt smo opazli pri rezanju fuzijskega proteina v prisotnosti kalcija, kjer smo po cepitvi dobili oborino. Po drugi strani pa nihče
ne poroča, da bi imel ta del perforina mesto za vezavo kalicja. Zadnji zaključek, ki ga lahko potegnemo je ta, da je bil bolj hemolitičen vzorec fuzije kot pa vzorca z izoliranim perforinom. Tu bi lahko rekli, da nekaj proteina izgubimo že med samo cepitvijo in posledično olajšano agregacijo pa tudi med izolacijo fragmenta. Po cepitvi in izolaciji pa koncentracije proteina nismo zmerili. V enemu izmed poskusov pri drugih konstruktih smo ugotovili, da se koncentracija proteinov po cepitvi zmanjša za okoli 15%. Poudariti moram tudi, da smo med dializo tako zuzije kot Pfn-fragmenta renaturirali disulfidne vezi. To smo naredili tako, da smo postopno zniževali koncentracijo reducenta, in tako omogočili počasno formiranje disulfidnih mostičkov.

5.1.2 Konstrukti TolA-Pfn₍₂₂₋₁₃₆₎, TolA-Pfn₍₂₂₋₁₆₂₎ in TolA-Pfn₍₂₂₋₁₉₆₎

Ker smo imeli s konstruktom TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎ obilico težav, smo se odločili, da bomo poskušali izolirati daljše fragmente N-terminalnega dela perforina v obliki fuzijskih proteinov in tako dobili stabilnejši fragment. Pred začetkom študije smo se odločili, da bomo izražali najdaljši konstrukt, ki se še izraža v topni obliki. Konstrukta TolA-Pfn₍₂₂₋₁₆₂₎ in TolA-Pfn₍₂₂₋₁₉₆₎ sta se izražala v obliki inkluzijskih telesc. Delo z inkluzijskimi telesci je zelo zahtevno, saj je potrebno preizkusiti veliko pogojev zvijanja, obenem pa izgubimo veliko proteina.

Konstrukt TolA-Pfn₍₂₂₋₁₃₆₎ se je izražal v topni obliki. Izražali smo ga v sevih Rosetta in Rosetta-gami B (DE3) pLysS. Tudi v tem primeru v procesu izolacije dobili kopico cepljenih fragmentov, ki so se barvali z anti-His protitelesi.

5.1.3 Konstrukta Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA in TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA

Ker je bilo delo s prejšnjimi konstrukti zelo težavno, smo se odločili, da poskusimo z drugo strategijo. Fuzijska partnerja smo zato zamenjali in perforinski fragment z obeh strani zaščitili s proteinom TolA.

Pri konstruktu Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA ni prišlo do izražanja. Fuzijski protein smo poskušali izraziti v dveh ekspresijskih sistemih, a v obeh primerih brez uspeha. Zanimivo je, da so do istega dejstva prišli, ko so prav tako izražali fuzijski protein, ki je imel na C-terminalnem delu zapis za III domeno proteina TolA, na N-terminalnem delu pa zapis T-domeno kolicina N (Anderluh in sod., 2002).

Konstrukt TolA-Pfn₍₂₂₋₁₂₁₎-TolA smo izražali v treh ekspresijskih sistemih BL21, Origami in Rosetta (DE3) pLysS. Tudi tu smo tekom izolacije pridobili kopico nepopolnih fragmentov, a je bilo v tem primeru razmerje konstrukta proti ostalim fragmentom močno v prid želenega konstrukta. Pri načrtovanju konstrukta smo pozabili na dejstvo, da ob cepljenju fuzijskega proteina s trombinom pridobimo tri fragmente, od katerih ima le Nterminalni fragment TolA His-repek, preostalih dveh fragmentov pa z Ni-afinitetno kromatografijo ni mogoče ločiti. Postopek izolacije bi si lahko olajšali tako, da bi pripeli His-repek obema fragmentoma TolA in bi perforin tako izolirali v nevezani frakciji po Niafinitetni kromatografiji. Fuzijski protein smo zato cepili in razrezan protein nanesli na ionsko-izmenjevalno kromatografijo, kjer bi perforinski del ločili od ostalih dveh delov. Tudi v tem primeru nam ločevanje ni uspelo, saj nismo dobili izrazitega vrha, temveč le raztegnjen vrh, v katrem so bili najverjetneje prisotni želen perforin in ostali proteini, ki so se ob danih pogojih vezali na kromatografski nosilec. Kljub temu lahko rečem, da se mi zdi ta konstrukt nekakšno izhodišče za prihodnje dele. Ker je perforin iz 3' in 5' zaščiten s TolA proteinom je tako bolj odporen na degradacijo s strani celičnih proteaz. Ker ne razpada se dobimo manj razpadnih produktov, posledično pa višji donos ob izolaciji.

5.1.4 Konstrukt TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎

Pri diplomskem delu smo poskušali tudi z izolacijo C-terminalnega dela perforina v obliki fuzijskega proteina. Ker se nam je konstrukt izražal v obliki inkluzijskih telesc, smo ga izolirali pod denaturativnimi pogoji.

Tvorba inkluzijskih telesc je odvisna predvsem od tekmovanja med kinetiko zvijanja, ki je značilna za določen protein, in hitrostjo agregacije, ki pa je povezana s hitrostjo sinteze (Fahnert in sod., 2004). Agregacija je značilna za sisteme prekomernega izražanja, poveča pa se tudi pri uporabi visokih koncentracij induktorja izražanja, bogatih gojiščih ter visoki temperaturi izražanja (Fahnert in sod., 2004). Da bi se izognili tvorbi agregatov, smo poskusili z izražanjem pri nižji temperaturi, a brez uspeha. Nizka temperatura zmanjša hitrost proteinske sinteze in nudi več časa za pravilno zvijanje rastoče polipeptidne verige. Poleg tega pride pri znižani temperaturi do povečanega izražanja proteinov hladnega šoka, ki asistirajo pri zvijanju (Naishihara in sod., 2000). Po eni strani je izražanje proteinov v obliki inkluzijskih telesc dobrodošlo, saj takšni proteini niso dovzetni za razgradnjo s strani gostiteljevih proteaz (Lile H. in sod., 1998). Statistična analiza setave proteinov, ki v E. coli tvorijo inkluzijska telesca, in proteinov, ki jih ne, je pokazala, da z nastankom IT dobro sovpada šest dejavnikov: povprečen naboj proteina, število cisteinov in prolinov, hidrofobnost, količina aminokislin, ki tvorijo zavoje, in celotno število aminokslin (Wilkinson D.L. in sod., 1998). Visoka stopnja izražanja tarčnega gena zelo spremeni celoten profil izražanja genov v celici. Napačno zvijanje proteinov izzove v celici stresno stanje s podobnimi značilnostmi, kot jih srečamo pri odzivu na toplotni šok. Pri tem pride do močne indukcije genov za šaperone DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL/ES, IbpA, IbpB, ClbB, ClpP in La, ki olajšajo pravilno zvijanje proteinov, inhibirajo agregacijo nepravilno zvitih proteinov ali s proteazno aktivnostjo razgrajujejo denaturirane proteine (Lesley S.A., 2002). Zaradi prisotnosti reducirajočih komponent kot so glutation, tioredoksin in glutaredosin, je nastajanje disulfidnih vezi v citoplazmi omejeno (Kadukura in sod., 2003). Perforinski del fragmenta, ki smo ga izražali, je imel 16 cisteinov.

IT smo dobro očistili in raztopili v pufru z 8 M ureo, nato pa smo protein poskusili renaturirati pod različnimi pogoji zvijanja. Ugotovili smo, da se protein bolje obnaša v pufru Tris-HCl kot fosfatnem pufru, poleg tega je proteinu najbolj ustrezal pH 8. Pri nižjem pH (6 in 7) smo uspeli renaturirati mnogo manj proteina. Prav tako je na zvijanje proteina negativo vplivala prisotnost soli. Pri 200 mM koncentraciji soli sploh nismo uspeli dobiti topnega proteina, pri 100 mM koncentraciji soli pa smo uspeli raztopiti le neznatno količno le-tega. Kljub uspešnemu zvijanju konstrukta zviti proteini niso bili stabilni. S časom so se tvorili visokomolekularni agregati ali pa smo proteine dobili v netopni frakciji (usedlini). Ta del človeškega perforina, ki smo ga izražali, vsebuje dve N-glikozilaciji, na mestih 205 in 549. Glikan na mestu 549 naj bi omogočal aktivnost domene C2, poleg tega naj bi bil ta del proteina ključen za njegovo pravilno zvijanje (Uellner in sod, 1997). Perforin brez tega dela ostane namreč v ER in se ne transportira v citotoksične granule, poleg tega je občutljiv na degradacijo, kar kaže na to, da je nepravilno zvit (Uellner in sod,

1997). To je verjetno še slabše vplivalo na pravilno zvijanje proteina. Ker so v prokariontskih sistemih mehanizmi glikozilacije odsotni, je mesto 205 ostalo neglikozilirano, to pa je najverjetneje še dodatno vplivalo na slabšo stabilnost proteina. Zaporedje, ki smo ga izražali, je ključno za oligomerizacijo v poliperforin. Tako si lahko razložimo nastanek visokomolekularnih agregatov in netopne usedline. Ugotovili smo tudi, da se monomeri perforina med seboj povezujejo s disulfidnimi intermolekularnimi vezmi. Če smo vzorec fuzijskega proteina po renaturaciji inkubirali z DTT, ki reducira disulfidne vezi se je količina topnega proteina signifikantno povečala (slika 52). Zradi pomankanja časa nismo uspeli pripraviti konstrukta, ki bi bil iz obeh strani zaščiten s TolA proteinom. Takšen konstrukt bi bil bolj stabilen in bi se mogoče v bakteriji izražal v topni obliki, delo z njim pa bi bilo zato mnogo bolj enostavnejše

5.2 SKLEPI

Iz napisanega lahko vidimo, da bakterijski ekspresijski sistem ni najbolj optimalen za heterologno proizvodnjo perforina. Sinteza perforina je zelo zapleten in fino reguliran proces. Bakterijska citoplazma ne zagotavlja potrebnega biokemijskega okolja za njegovo sintezo. Redutivne razmere v citoplazmi in odsotnost ustreznih posttranslacijskih modifikacij verjetno ključno vplivata na stabilnost izraženih konstruktov. Zapleten in fino reguliran proces sinteze ter visoka aktivnost proteina pri nizkih koncentracijah je tipičen primer, kako so se evkariotske celice zavarovale pred svojim močnim orožjem.

Kljub temu, da uporabljen sistem ni najbolj optimalen, še ne pomeni da ni uporaben. Kot prvo smo dokazali, da je heterologna proizvodnja perforina možna. Med izolacijo proteinov smo sicer dobili veliko nečistoč, ki se jih nismo mogli znebiti, saj so se ravno tako vezale na afinitetno kolono, ali pa nismo mogli osamiti perforinskega fragmenta z ionsko-izmenjevalno ali hidrofobno kromatografijo. Dokazali pa smo tudi, da tako dobljeni perforin ohranja biološko aktivnost.

Pokazali smo tudi nov način uporabe TolA fuzijskega proteina. Pred nami ni še nihče naredil fuzije s TolA partnerjem na 3' in 5' strani polipeptidne verige. Dokazali smo veliko višji donos pri izolaciji kot pri ekvivalentnem konstruktu s TolA proteinom le na 3' koncu. Pri načrtovanju primerjev za TolA-Pfn-TolA konstrukt smo se ušteli pri načrtovanju nukleotidnih začetnikov. Posledično bi bila pot do izolacije želenega fragmenta dosti lažja kot sicer.

Izkazalo se je, da je delo z inkluzijskimi telesci zelo zahtevno. TolA-Pfn₍₁₉₆₋₅₄₀₎ smo poskusili renaturirati na vrsto različnih načinov in pod različnimi pogoji (razpredelnica 26). Pokazalo se je tudi, da fuzije kljub temu, da smo jo uspeli renaturirati, nismo uspeli obdržati v topni, monomerni obliki.

Za zaključek naj povem, da smo se s tem diplomskem delu zelo približali morebitni izolaciji rekombinantnega človeškega perforina. Pokazali smo, da je ekspresija bioaktivnega človeškega perforina v bakterijskem ekspresijskem sistemu možna. Z uporabo sistema TolA-Pfn-TolA, bi si lahko dodatno olajšali izolacijo, povečali stabilnost fuzije in donos ob izolacij. Posledično pa so nadaljnim strukturnim študijem na široko odprta vrata. Mislim, da bo skupini s še nekaj izboljšavami sistema in pogumnim kandidatom v zelo bližnji prihodnosti to tudi uspelo.

6 **POVZETEK**

Perforin se nahaja v citotoksičnih granulah citotoksičnih limfocitov, naravnih celic ubijalk in v nekaterih drugih populacijah limfocitov. Ko efektorska celica prepozna okuženo ali tumorsko celico, se citotoksične granule orientirajo proti plazmeski membrani in se z njo zlijejo. Vsebina granul se tako sprosti v imunološko sinapso, kjer pH nevtralen in prisoten Ca²⁺, kar omogoča delovanje perforina. Monomeri perforina se povežejo v poliperforin in tvorijo transmembrano poro, tarčna celica pa odmre po poti apoptoze.

Perforin je 555 AK dolg protein. Ima dve mesti glikozilacije, sestavljajo pa ga tri domene. Prvih 22 AK predstavlja signalni peptid, ki se med procesiranjem odcepi. Zrel perforin je sestavljen iz domene MACPF/CDC, ki obsega približno 350 AK in domen EGF in C2. C2 domena služi za vezavo kalcija. 3D struktura in mehanizem tvorbe pore je bila razrešena šele pred kratkim. Ključna odseka za insercijo ležita med 109. in 162. ter med 249. in 295. aminokislinskim ostankom. Prvi odsek je zgrajen iz treh α -heliksov, drugi pa iz dveh α heliksov, ki po vezavi na membrano spremenita konformaciji tako, da nastanejo štiri amfipatični β -trakovi, ki prečijo membrano. Mehanizem nastanka pore je podoben nastanku pore proteinov CDC, ki predstavljajo litične proteine nekaterih bakterijskih vrst.

Kljub najnovejšim raziskavam pa raziskovalcem po več kot 20 letih še vedno ni uspelo izolirati rekombinantni človeški perforin. Celotna molekula perforina vsebuje 20 cisteinov, ki pa v bakterijski citoplazmi ne morejo tvoriti pravilnih disulfidnih povezav. Problem bakterijskega ekspresijskega sistema je tudi v odsotnosti ustreznih postranslacijskih modifikacij, saj molekula perforina vsebuje dve N-glikozilaciji. Navsezadnje pa je biosintezni aparat eukariotske celice veliko bolj dovršen kot pri bakterijah. Pri eukariotih potekata procesa transkripcije in translacije časovno in prostorsko ločeno, kar ne velja za bakterije. Prav tako, se perforin sintetizira na endoplazmatskem retiklu, zorenje se nadaljuje v Golgijevem aparatu, kjer se perforin odcepi v obliki citotoksičnih granul, bakterijska celica pa ustreznih kompartmentov ne zagotavlja.

V diplomskem delu smo prišli do spoznanja, da je v bakterijskem ekspresijskem sistemu mogoče izraziti človeški perforin. Fragmente perforina smo izražali kot fuzijske proteine. Fuzijski partner je bil v vseh primerih TolA. TolA omogoča fuzijskemu partnerju boljše izražanje in večji donos pri izolaciji. Tako pridobljene fuzijske proteine smo cepili in dobili fragmente perforina, ki so ohranili biološko aktivnost. Boljši donos ob izolaciji in lažjo izolacijo pa smo dosegli s sistemom TolA-Pfn-TolA. Če to dvoje združimo in še sistem še malo izboljšamo sem prepričan, da bo nekomu kmalu uspelo izolirati in bolje okarkterizirati molekulo perforina. Po nekaj mesecih dela s perforinom povsem razumem zakaj raziskovalcem po več kot 20 letih še vedno ni uspelo izolirati rekombinantnega človeškega perforina.

7 VIRI

- Abbas A. K., Lichtman A. H. 2006. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. 2nd ed. Philadelphia, Saunders Elsevier: 324 str.
- Anderluh G., Gökçe I., Lakey H. J. 2002. Expression of proteins using the third domain of the *Escherichia coli* periplasmic-protein TolA as a fusion partner. Protein Expression and Purification, 28: 173-181.
- Anderluh G., Pungerčar J., Štrukelj B., Maček P., Gubenek F. 1996. Cloning, sequencing and expression of equinatoxin II. Biochemical and Biophysical Research Communications, 220: 437-442.
- Andersen M. H., Schrama D., Straten P. T, Becker J. C. 2006. Cytotoxic T cells. Journal of Investegative Dermatology, 126: 32-41.
- Andrin C., Pinkoski M. J., Burns K., Atkinson E. A., Krahenbuhl O., Huding D., Fraser S. A., Winkler U., Tschopp J., Opas M., Bleackley R. C., Michalak M. 1998. Interactions between a Ca²⁺-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. Biochemistry, 37: 10386-10394.
- Baran K., Dunstone M., Chia J., Ciccone A., Browne K. A., Clarke C. J. P., Lukoyanova N., Saibil H., Whisstock J. C., Voskoboinik I., Trapani J. A. 2009. The molecular basis for perforin oligomerization and transmembrane pore assembly. Immunity, 30: 1-12.
- Bird C. H., Sun J., Ung K., Karambalis D., Whisstock J. C., Trapani J. A. Bird P. I. 2005. Cationic sites og granzyme B contribute to cytotoxicity by promoting its uptake into target cells. Molecular Cell Biology, 25: 7854-7867.
- Blumenthal R.,Millard P. J., Henkart M. P., Reynolds C. W., Henkart, P. A. 1984. Liposomes as targets for granule cytolysin from cytotoxic large granular lymphocyte tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 81: 5551–5555.
- Bolito P., Voskoboinik I., Trapani J. A., Smyth M. J. 2007. Apoptosis induced by the lymphocite effector molecule perforin. Current Opinion in Immunology, 19: 339-347.
- Brinkman U., Mattes R. E., Buckel P. 1989. High-level expression of recombinant genes in *Escerichia coli* is dependent on the availability of the *dnaY* gene product. Gene, 85: 109-114.
- Burkhardt J. K., Hester S., Lapham C. K., Argon Y. 1990. The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. Journal of the Cell Biology, 111: 2327-2340.
- Clementi R., Locatelli F., Dupre L., Garaventa A., Emmi L., Bregni M., Cefalo G., Moretta A., Danesino C., Comis M. 2005. A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. Blood, 105: 4424–4428.
- Cullen S. P., Martin S. J. 2008. Mechanisms of granule-dependent killing. Cell Death and Differentiation, 15: 151-262.

- Esser M. T., Krishnamurthy B., Braciale V. L. 1996. Distinct T cell receptor signaling requirements for perforin- or FasL- mediated cytotoxicity. Journal of Experimental Medicine, 280: 29-35.
- Fahnert B., Lilie H., Neubauer P. 2004. Inclusion bodies: formation and utilisation. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 89:93-142
- Fraser S. A., Karimi R., Michalak M., Hudig D. 2000. Perforin lytic activity is controlled by calreticulin. Journal of Immunology, 164: 4150-4155.
- Fraser S. A., Karimi R., Michalak M., Hudig D. 2002. Empircal relationships between protein structure and carboxyl IKa values in proteins, Proteins, 48: 388-403.
- Froelich C. J., Orth K., Turbov J., Seth P., Gottlieb R., Babior B., Shah G. M., Bleackley R. C., Dixit V. M., Hanna W. 1996. New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. Journal of Biological Chemistry, 271: 29073–29079.
- Gallo E. M., Canté-Barrett K., Crabtree G. R. 2006. Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. Nature Immunology, 7: 25-32.
- Glazer A. N., Nikaido H. 2007. Production of proteines in bacteria and yeast. V: Microbial biotechnology: Fundamentals of applied microbiology. 2nd ed. Cambridge, Cambridge University Press: 90-147
- Grossman W. J., Verbsky J. W., Barchet W., Colonna M., Atkinson J.P., Ley T.J. 2004. Human T regulatory cells can use perforin pathway to cause autologous target death. Immunity, 21: 589-601.
- Hadders M. A., Beringer D. X., Gros P. 2007. Structure of C8alpha-MACPF reveals mechanism of membrane attack in complement immune defense. Science, 317: 1552–1554.
- Hamerman A. J, Ogasawara K., Lanier L. L. 2004. NK cells in innate immunity. Current Opinion in Immunology, 17: 29-35.
- Henkart P. A., Millard P. J., Reynolds C. W., Henkart M. P. 1984. Cytolytic activity of purified cytoplasmic granules from cytotoxic rat large granular lymphocite tumors. Journal of Experimental Medicine, 160: 75-93.
- Huang Y., Wange R. L. 2004. T cell receptor signaling: Beyond complex complexes. Journal of Biological Chemistry, 279: 28827-28830.
- Ishiura S., Matsuda K., Koizumi H., Tsukahara T., Arahata K., Sugita H. 2007. Calcium is essential for both the membrane binding and lytic activity of pore-forming protein (perforin) from cytotoxic T-lymphocyte. Molecular Immunology, 27: 803-807.
- Jensen K. D. C., Yueh-hsiu C., 2009. Thymic maturation determines γδ T cell function, but not their antigen specificities. Current Opinion in Immunology, 21: 140-145.
- Kadoukra H., Katzen F., Beckwith J. 2003. Protein disulfide bond foramtion in prokaryotes. Annual Review of Biochemistry, 72: 111-135.
- Kane J. F. 1995. Effects of rare codon cluster on high-level expression of heterologus proteins in *Escerichia coli*. Current Opinion in Biotechnology, 6: 494-500.

- Kataoka T., Takaku K., Magae J., Shinohara N., Takayama H., Kondo S., Nagai K. 1994. Acidification is essential for maintaining the structure and function of lytic granules of CTL. Effect of concanamycin A, an inhibitor of vacuolar type H(+)-ATPase, on CTL-mediated cytotoxicity. Journal of Immunology, 153: 3938-3947.
- Krensky A. M. 2000. Granulysin: A novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells. Biochemical Pharmacology, 59: 317-320.
- Kwon B. S., Wakulchik M., Liu C. C., Persechini P. M., Trapani J. A., Haq A. K., Kim Y., Young J. D. 1989. The structure of the mouse lymphocyte pore-forming protein perforin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 158: 1–10.
- Lakey J. H., Slatin S. L. 2001. Pore-forming colicins and their relatives. Current Topics in Microbiology and Immunology, 257: 131-161.
- Lazzaroni J. C., Germon P, Ray M. C., Vianney A. 1999. The Tol proteines of *Escherichia coli* and their involvment in the uptake of biomolecules and outer membrane stability. FEMS Microbiology Letters, 177: 191-197.
- Lesly S. A., Granzino J., Cho C. Y., Knuth M. W., Klock H. E. 2002. Gene expression response to misfolded protein as a screen for soluble recombinant protein. Protein Engineering, 15: 153-160.
- Levengood S. K., Beyer W. J., Webster R. E. 1995. Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA. Biotechnology (N. Y.), 13: 982-987.
- Lichtenheld M. G., Olsen K. J., Lu P., Lowrey D. M., Hameed A., Hengartner H., Podack E. R. 1988. Structure and function of human perforin. Nature, 335: 448–451.
- Lile H., Schwarz E., Rudoplh R. 1998. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. Current Opinion in Biotechnology, 9: 497-501.
- Liu C. C., Persechini P. M., Young J. D. E. 1994. Characterization of recombinant mouse perforin expressed in insect cells using the baculovirus system. Biochemical and Biophysical Research Communications, 201: 318-325.
- Lowin-Kropf B., Sharpio V. S., Weiss A. 1998. Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanisem. Journal of Cell Biology, 140: 861-871.
- Lubkowski J., Hennecke F., Pluckthun A., Wlodawer A. 1999. Filamentous phage infection: crystal structure of g3p in complex with its coreceptor, the C-terminal domain of TolA. Structure, 7: 711-722.
- Lukoyanova N., Sibil H. R. 2008. Friend of foe: the same fold for attack and defense. Cell, 29: 51-53.
- Markides S. C., 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 60: 512-538.
- Masson D., Tschopp J. 1985. Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T- lymphocytes. Journal of Biological Chemistry, 260: 9069-9072.
- Mehta P. A., Davies S. M., Kumar A., Devidas M., Lee S., Zamzow T., Elliott J., Villanueva J., Pullen J., Zewge Y., Filipovich, A. 2006. Perforin polymorphism

A91V and susceptibility to B-precursor childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Oncology Group. Leukemia, 20: 1539–1541.

- Merck. 2009. Strains for Protein Expression, Darmstadt, Merch Chemicals <u>http://www.merckbiosciences.co.uk/Products/BrowseProductsByCategory.asp?catid=</u> <u>2558</u> (avgust, 2009): 1 str.
- Metkar S. S., Wang B., Froelich C. J. 2005. Detection of functional cell surface perforin by flow cytometry. Journal of Immunologycal Methods, 299: 117-127.
- Naishihara K., Kanemori M., Yanagi H., Yura T. 2000. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *E. coli*. Applied and Environmental Microbiology, 66: 884-889.
- Nakajima H., Park H. L., Henkart, P. A. 1995. Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemiamast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. Journal of Experimental Medicine, 181: 1037–1046.
- Page L. J., Darmon A. J., Uellner R., Griffiths G. M. 1998. L is for lytic granules: lysosome that kill. Biochimica et Biophysica Acta, 1401: 146-156.
- Peitsch M. C., Amiguet P., Guy R., Brunner J., Maizel J. V. Jr., Tschopp J. 1990. Localization and molecular modelling of the membrane-inserted domain of the ninth component of human complement and perforin. Molecular Immunolology, 27: 589– 602.
- Persechini P. M., Ojcius D. M., Adeodato S. C., Notaroberto P. C., Daniel C. B., Young, J. D. 1992. Channel-forming activity of the perform N-terminus and a putative a-helical region homologous with complement C9. Biochemistry, 31: 5017–5021.
- Prinz W. A., Aslund F., Holmgren A., Beckwith J. 1997. The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escerichia coli* cytoplasm. Journal of Biological Chemistry, 272: 15661-15667.
- Rosado C. J., Buckle A. M., Law R. H., Butcher R. E., Kan W. T., Bird C. H., Ung K., Browne K. A., Baran K., Bashtannyk-Puhalovich T.A. 2007. A common fold mediates vertebrate defense and bacterial attack. Science, 317: 1548–1551.
- Rosado C. J., Kondos S., Bull T. E., Kuiper M. J., La R. H. P., Buckle A. M., Voskoboinik I., Bird P. I., Trapani J. A., Whisstock J. C., Dunstone M. A. 2008. The MACPF/CDC family of pore forming toxins. Cellular Microbiology, 10: 1765–1774.
- Shi L., Mai S., Israels S., Browne K., Trapani J. A., Greenberg A. H. 1997. Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. Journal of Experimental Medicine, 185: 855–866.
- Shi L., Kam C. M., Powers J. C., Aebersold R., Greenberg A. H. 1992. Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis trough distinct substrate and target cell interactions. Journal of Experimental Medicine, 176: 1521-2529.
- Shinkai Y., Takio K., Okumura K. 1988. Homology of perform to the ninth component of complement (C9). Nature, 334: 525–527.

- SIB. 2009. ExPASy proteomics server. Geneva, Swiss Institute of bioinformatics http://www.expasy.ch/ (avgust 2009): 3 str.
- Slade D. J., Lovelace L. L., Chruszcz M., Minor W., Lebioda L., Sodetz J. M. 2008. Crystal structure of the MACPF domain oh human complement protein C8α in complex with the C8γ subunit. Journal of Molecular Biology, 379: 331-342.
- Stevens R. L., Kamada M. M., Serafin W. E. 1989. Structure and function of the family of proteoglycans that reside in the secretory granules of natural killer cells and other effector cells of the immune response. Current Topics in Microbiology and Immunology, 140: 95-108.
- Stinchcombe J. C., Bossi G., Booth S., Griffiths G. M. 2001. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. Immunity, 15: 751-761.
- Stinchcombe J. C., Griffiths G. M. 2003. The role of the secretory immunological synapse in killing by CD8⁺ CTL. Seminars in Immunology, 15: 301-305.
- Stepp S. E., Dufourcq-Lagelouse R., Le Deist F., Bhawan S., Certain S., Mathew P. A., Henter J. I., Bennett M., Fischer A., de Saint Basile G., Kumar V. 1999. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Science, 286: 1957– 1959.
- Sutton V. R., Davis J. E. Cancilla M., Johnstone R. W., Rufeli A. A. Sedelies K., Browne K. A., Trapani J. A. 2000. Initiation of apoptosis by Granzime B requiers direct cleavage of Bid, but not direct Granzyme M-mediated caspase activation. Journal of Experimental Medicine, 192: 1403-1414.
- Takayama H., Sitkovsky M. V. 1987. Antigen receptor-regulated exocytosis in cytotoxic T lymphocytes. Journal of Experimental Medicine, 166: 725-743.
- Talanian R. V., Yang X. H., Turbov J., Seth P., Ghayur T., Casino C. A., Orth K., Froelich C. J. 1997. Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. Journal of Experimental Medicine, 186: 1323-1331.
- Trapani J. A. 1998. Dual mechanisms of apoptosis induction by cytotoxic lymphocytes. International Review of Cytology, 182: 111-191.
- Trapani J. A., Sutton V. R. 2003. Granzyme B: Pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. Current Opinion in Immunology, 15: 533-543.
- Tschopp J., Masson D., Stanley K. K. 1986. Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte mediated cytolysis. Nature, 322: 831–834.
- Uellner R., Zvelebil M. J., Hopkins J., Jones J., MacDougall L. K., Morgan B. P., Podack E., Waterfield M. D., Griffiths G. M. 1997. Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which reveals a phospholipid-binding C2 domain. EMBO Journal, 16: 7287–7296.
- Voskoboinik I., Smyth M. J., Trapani J. A. 2006. Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. Nature Reviews: Immunology, 6: 940–952.
- Voskoboinik I., Sutton V. R., Ciccone A., House C. M., Chia J., Darcy P. K., Yagita, H., Trapani J. A. 2007. Perforin activity and immune homeostasis: The common A91V

polymorphism in perforin results in both presynaptic and postsynaptic defects in function. Blood, 110: 1184–1190.

- Voskoboinik I., Thia M. C., Fletcher J., Ciccone A., Browne K., Smyth M. J., Trapani, J. A. 2005. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin aremediated through its C2 domain: A critical role for aspar- tate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. Journal of Biological Chemistry, 280: 8426–8434.
- Wilkinson D. L., Harrison R. G. 1991. Predicting the solubility of recombinant proteins produced in *Escerichia coli*. Current Oppinion in Biotechonology, 9: 443-448.
- Williams N. S., Engelhard V. H. 2009. Perforin-dependent cytotoxic activity and lymphokine secretion by CD4+ T cells are regulated by CD8+ T cells. Journal of Immunology, 159: 2091-2099.
- Young J. D., Cohn Z. A., Podack, E. R. 1986a. The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: structural, immunological, and functional similarities. Science, 233: 184–190.
- Young J. D., Podack E. R., Cohn Z. A. 1986b. Properties of a purified pore-forming protein (perforin 1) isolated from H-2-restricted cytotoxic T cell granules. Journal of Experimental Medicine, 164: 144–155.

ZAHVALA