

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Daniel ŠEGA

**TESTIRANJE AKTIVNOSTI REKOMBINANTNEGA
TOKSINA PARBORLIZINA IZ NITKARJA**

Parborlasia corrugatus

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Daniel ŠEGA

**TESTIRANJE AKTIVNOSTI REKOMBINANTNEGA TOKSINA
PARBORLIZINA IZ NITKARJA *Parborlasia corrugatus***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija

**ASSAYING THE ACTIVITY OF THE RECOMBINANT TOXIN
PARBORLYSIN FROM THE RIBBON WORM *Parborlasia corrugatus***

M. Sc. THESIS

Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa 2. stopnje Mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za biokemijo, Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Toma Turka, za somentorja doc. dr. Mateja Butala, za recenzenta pa prof. dr. Blaža Cigića.

Mentor: prof. dr. Tom Turk

Somentor: doc. dr. Matej Butala

Recenzent: prof. dr. Blaž Cigić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. Tom TURK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Matej BUTALA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: izr. prof. dr. Blaž CIGIĆ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

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

Daniel Šega

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 579.25:602.6:604.4:615.33(043)=163.6
KG	heterologna ekspresija/ <i>Escherichia coli</i> /rekombinantni proteini/protimikrobne snovi/sekundarni metaboliti/parborlizin/ <i>Parborlasia corrugatus</i> /amfipatični toksini/TolAIII/nikelj-afinitetna kromatografija/inkluzijska telesca/biološka aktivnost
AV	ŠEGA, Daniel, dipl. mikrobiol. (UN)
SA	TURK, Tom (mentor)/BUTALA, Matej (somentor)/CIGIĆ, Blaž (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI	2015
IN	TESTIRANJE AKTIVNOSTI REKOMBINANTNEGA TOKSINA PARBORLIZINA IZ NITKARJA <i>Parborlasia corrugatus</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja Mikrobiologija)
OP	XIV, 68 str., 5 pregl., 27 sl., 3 pril., 61 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AB	Dandanes poteka intenzivno iskanje protibakterijskih učinkovin. Bogat rezervoar potencialno uporabnih spojin so proteini v strupih evkarijontov. Parborlizin sintetizira nitkar <i>Parborlasia corrugatus</i> in je 9,8 kDa velik citolitični toksin, ki je glede na zgradbo potencialen protimikrobn peptid, saj je zgrajen iz amfipatičnih alfavijačnic in izkazuje neto pozitiven nabo. <i>P. corrugatus</i> živi v antarktičnem bentoškem okolju, zato je težaven za raziskave. Različne genske konstrukte - eno izmed izoblik parborlizina oziroma parborlizina spojenega z genom za domeno proteina TolA, smo izrazili v sevu <i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami B in v sevu <i>E. coli</i> z okvarjenim genom <i>minC</i> . Rekombinantni parborlizin smo izolirali z nikelj-afinitetno kromatografijo in testirali njegovo biološko aktivnost. Čiščenje proteina se je izkazalo kot težavno, očistili smo le parborlizin, ki ima na N-terminalni konec vezano domeno proteina TolA. <i>In vivo</i> rezultati kažejo, da ena izmed treh testiranih izoblik parborlizina učinkuje bakteriostatično na producentske bakterijske celice. Rezultati tudi nakazujejo, da rekombinantni parborlizin, izoblika 1, sproži odziv SOS pri bakteriji <i>Vibrio ruber</i> .

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Du2
DC	UDC 579.25:602.6:604.4:615.33(043)=163.6
CX	heterologous expression/ <i>Escherichia coli</i> /recombinant proteins/antimicrobials /secondary metabolites/parborlysin/ <i>Parborlasia corrugatus</i> /amphipathic toxins/TolAIII/nickel affinity chromatography/inclusion bodies/biological activity
AU	ŠEGA, Daniel
AA	TURK, Tom (supervisor)/BUTALA, Matej (co-advisor)/CIGIĆ, Blaž (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY	2015
TI	ASSAYING THE ACTIVITY OF THE RECOMBINANT TOXIN PARBORLYSIN FROM THE RIBBON WORM <i>Parborlasia corrugatus</i>
DT	M. SC. THESIS (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO	XIV, 68 p., 5 tab., 27 fig., 3 ann., 61 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	An intense search for novel antibacterial compounds is currently being conducted, and eukaryotic proteinaceous poisons are a rich reservoir of potentially useful compounds. Parborlysin, which is synthesized by the ribbon worm <i>Parborlasia corrugatus</i> , has a molecular weight of approx. 9,8 kDa, contains amphipathic α -helices, and has a positive net charge, which makes it a potential antimicrobial peptide. Due to the antarctic benthic environment in which <i>P. corrugatus</i> lives, research conducted on it has been difficult. Different gene constructs, which contained one isoform of parborlysin and sometimes a TolA region, were expressed in the <i>Escherichia coli</i> strain Rosetta-gami B and a strain with the gene defect <i>minC</i> . The recombinant parborlysin was isolated with nickel affinity chromatography, and used to assay its biological activity. The purification proved to be difficult, as we managed to purify only the protein which was fused to the TolA region on the N-terminal end. The results of <i>in vivo</i> assays suggests that one of three assayed parborlysin isoforms has a bacteriostatic effect on producing bacterial cells. Judging from our results, the recombinant parborlysin isoform 1 triggers the SOS response in <i>Vibrio ruber</i> .

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
SLOVARČEK.....	XIV
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ISKANJE FARMACEVTSKO UPORABNIH SEKUNDARNIH METABOLITOV	3
2.2 <i>PARBORLASIA CORRUGATUS</i>	3
2.3 CL-A-III IN PARBORLIZIN.....	5
2.4 VEČFUNKCIJSKI PEPTIDNI IN PROTEINSKI TOKSINI.....	9
2.5 EVKARIOTSKI PEPTIDI, UPORABLJENI ZA FARMACEVTSKE NAMENE	13
2.6 SISTEMI ZA SINTEZO REKOMBINANTNIH PROTEINOV	16
2.7 POSTOPKI ZA IZBOLJŠAVO SINTEZE REKOMBINANTNIH PROTEINOV ...	19
3 MATERIALI IN METODE	21
3.1 SHEMA POSKUSA.....	21
3.2 MATERIALI.....	22
3.2.1 Komercialni kiti	22
3.2.2 Aparatura in oprema	22
3.2.3 Kemikalije in reagenti.....	22
3.2.4 Gojišča in raztopine.....	24
3.2.4.1 Gojišča.....	24
3.2.4.2 Raztopine.....	25
3.2.5 Uporabljeni izotoksini	29
3.2.6 Uporabljeni sevi, plazmidi in začetni oligonukleotidi	30

3.2.6.1	Evkarijantske celice.....	30
3.2.6.2	Bakterijski sevi.....	30
3.2.6.3	Plazmidi.....	30
3.2.6.4	Začetni oligonukleotidi.....	31
3.3	METODE	32
3.3.1	Verižna reakcija s polimerazo.....	32
3.3.2	Restrikcija fragmenta in plazmidov	33
3.3.3	Agarozna gelska elektroforeza	33
3.3.4	Defosforilacija 5'- konca pri nukleotidnem zaporedju za TolAIII	33
3.3.5	Priprava kompetentnih celic	34
3.3.6	Bioinformatska orodja	34
3.3.7	Ligacija	35
3.3.8	Verižna reakcija s polimerazo na osnovi kolonije	35
3.3.9	Transformacija plazmida v sev DH5α z namenom izolacije plazmidne DNA....	36
3.3.10	Izolacija plazmida.....	36
3.3.11	Sekvenciranje.....	36
3.3.12	Transformacija v seve BL21(DE3), Rosetta-gami B in MinC.....	37
3.3.13	Sprožitev sinteze parborlizina	37
3.3.14	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata....	38
3.3.15	Izolacija rekombinantnega parborlizina pod nativnimi pogoji, z nikelj-afinitetno kromatografijo	39
3.3.16	Razbitje celic in spiranje inkluzijskih teles	39
3.3.17	Izolacija rekombinantnega parborlizina pod denaturirajočimi pogoji, z nikelj-afinitetno kromatografijo	40
3.3.18	Dializa rekombinantnih proteinov.....	40
3.3.19	Koncentriranje rekombinantnega parborlizina	40
3.3.20	Določitev N-terminalnega zaporedja očiščenega parborlizina.....	40
3.3.21	Analiza hemolitične aktivnosti parborlizina	41
3.3.22	Protibakterijska aktivnost očiščenega parborlizina.....	41
4	REZULTATI Z RAZPRAVO	43
4.1	POIMENOVANJE PROTEINOV	43
4.2	BIOINFORMATSKA ANALIZA LASTNOSTI PARBORLIZINOV	44

4.3	PRIPRAVA GENSKIH KONSTRUKTOV	45
4.3.1	Genski konstrukti PARXH, HTPARX in PARXTH.....	45
4.4	SPROŽITEV IN IZRAŽANJE REKOMBINATNIH PARBORLIZINOV.....	48
4.4.1	Toplotna odvisnost izražanja genov za PARXTH in HTPARX in odvisnost njihove sinteze.....	48
4.4.2	Sinteza proteinskega konstrukta PARXH	49
4.4.3	Sinteza proteinskega konstrukta HTPARX.....	50
4.4.4	Sinteza proteinskega konstrukta PARXTH.....	52
4.4.5	Proučevanje vpliva izražanja gena za PAR1TH na rast celic	53
4.4.6	Izražanje konstruktorov HTPARX v celicah <i>E. coli</i> MinC	54
4.5	ČIŠČENJE PROTEINA HTPAR1 IN TESTIRANJE NJEGOVE AKTIVNOSTI ...	55
4.5.1	Izolacija proteina HTPAR1	55
4.5.2	Restrikcija z endopeptidazo trombin in določitev N-terminalnega zaporedja...	56
4.5.3	Biološka aktivnost rekombinantnih parborlizinov	57
5	SKLEPI	62
6	POVZETEK.....	63
7	VIRI	64

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Genski zapisi za tri izoblike parborlizina.....	29
Preglednica 2: Pri delu uporabljeni bakterijski sevi	30
Preglednica 3: Pri delu uporabljeni bakterijski plazmidi.....	30
Preglednica 4: Pri delu uporabljeni začetni oligonukleotidi.....	32
Preglednica 5: Število aminokislin, molekulska masa in teoretični lastnosti različic parborlizina.....	45

KAZALO SLIK

Slika 1: Heteronemertin <i>P. corrugatus</i> v naravnem okolju (Kaiser, 2004)	4
Slika 2: Kovalentna struktura toksina Cl-A-III z označenimi disulfidnimi mostički (Blumenthal, 1980)	6
Slika 3: Primerjava aminokislinskih zaporedij citotoksina A-III in sedmih izooblik parborlizina (Tomc Zidar, 2013).	8
Slika 4: Štirje načini delovanja protimikrobnih peptidov (Li in sod., 2012).	12
Slika 5: Tridimenzionalna struktura in aminokislinsko zaporedje tretje domene periplazmatskega proteina TolA (Anderluh in sod., 2002).	18
Slika 6: Plazmidni ekspresijski vektorji pTol (Anderluh in sod., 2002).....	19
Slika 7: Shema poskusa.	21
Slika 8: Restriktionska mapa 5823 bp velikega plazmidnega vektorja pET-21c(+). Restriktionsko mapo smo ponazorili s programom Vector NTI	31
Slika 9: Nukleotidno zaporedje regije TolAIII v pTolT (Anderluh in sod., 2003).....	31
Slika 10: Prikaz rekombinantnega proteina izooblike parborlizina s His6 na C-terminalnem koncu.	43
Slika 11: Prikaz izooblike parborlizina s His6 in domeno TolAIII ter mestom za endopeptidazo trombin (LVPR/GS) na N-terminalnem koncu	43
Slika 12: Prikaz izooblike parborlizina s His6 in domeno TolAIII ter mestom za proteazo trombin (LVPR/GS) na C-terminalnem koncu.	43
Slika 13: Analiza velikosti rekombinantnih genov PAR1H, PAR2H in PAR3H v plazmidu pET21c z gelsko elektroforezo po izolaciji plazmida in rezanju z restriktionskimi encimoma <i>Xho</i> I in <i>Nde</i> I.	46
Slika 14: Analiza velikosti vključkov HTPAR1 (P1a-c), HTPAR2 (P2a-c) in HTPAR3 (P3a-c) vključenih v pTolt po rezanju z restriktionskima encimoma <i>Bam</i> H I in <i>Mlu</i> I <td>46</td>	46
Slika 15: Analiza konstruktorov PARXTH.....	47
Slika 16: NaDS-PAGE analiza proteinskih profilov v grobih celičnih ekstraktih kultur gojenih pri 20 °C ali 37 °C	48
Slika 17: Reprezentativna rastna krivulja za sev <i>E. coli</i> Rosetta-gami B s plazmidom z genom za PARXH	49
Slika 18: NaDS-PAGE analiza sinteze konstruktorov PARXH.....	50
Slika 19: Reprezentativna rastna krivulja za sev <i>E. coli</i> Rosetta-gami B s plazmidom z genom za HTPARX.....	51
Slika 20: NaDS-PAGE analiza sinteze konstruktorov HTPARX.	51
Slika 21: Reprezentativna rastna krivulja za sev <i>E. coli</i> Rosetta-gami B s plazmidom z genom za PARXTH.....	52
Slika 22: NaDS-PAGE analiza sinteze konstruktorov PARXTH	52
Slika 23: Rast seva <i>E. coli</i> Rosetta-gami B s plazmidom z zapisom za konstrukt PAR1TH	53
Slika 24: NaDS-PAGE analiza sinteze rekombinantnega proteina PAR1TH	54

Slika 25: Izražanje genskega konstrukta HTPAR1 v celicah <i>E. coli</i> MinC pred in po indukciji z 0,8 mM IPTG ter lokacija izoliranega toksina v topni ali netopni frakciji.....	55
Slika 26: Rezultati restrikcije proteina HTPAR1 s trombinom	57
Slika 27: Rezultati protibakterijskega testa rekombinantnega parborlizina z oznako HTPAR1	59

KAZALO PRILOG

Priloga A: Analiza uporabe redkih kodonov pri izooblikah parborlizina P1, P2 in P3.

Priloga B: Rezultati nukleotidnega sekvenciranja pri podjetju Macrogen.

Priloga C: Rezultati N-terminalnega sekvenciranja iz gela izoliranega rekombinantnega proteina HTPAR1.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AEBSF	aminoethylbenzensulfonilfluoridhidroklorid
Ap	ampicilin
APS	amonijev persulfat
bp	bazni par
Cam	kloramfenikol
cAMP	ciklični adenozin mono (angl. cyclic adenosin mono phosphat)
Cip	ciprofloksacin
Da	dalton - enota za molekulsko maso, ki ustreza 1/12 mase čistega izotopa ^{12}C
dH₂O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
DTT	ditiotreitol (treo-1,4-dimerkapto-2,3-butandiol)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
IPTG	izopropil- β -tiogalaktopyranozid
kDa	tisoč Daltonov
Kan	kanamicin
LB	gojišče Luria Bertani
LBA	LB z dodanim ampicilinom
LBAC	LB z dodanim ampicilinom in kloramfenikolom
MES	morfolinoetansulfonijeva kislina
Mw	molekulska masa
MOPS	morfolinopropansulfonijeva kislina
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (angl. messenger RNA)
NaDS	natrijev dodecil sulfat
NaDS-PAGE	elektroforeza na poliakrilamidnem gelu z Na-dodecil sulfatom (angl. Na-dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresys)
Ni-NTA	nikelj-nitritotriocetna kislina
OD₆₀₀	optična gostota pri valovni dolžini 600 nm (angl. optical density)
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	natrijev fosfatni pufer
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
pI	izoelektrična točka
PMSF	fenilmethylsulfonilfluorid
PVDF	polivinilidenfluorid
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
rpm/min	število revolucij na minuto (angl. revolutions per minute)
SAP	alkalna fosfataza kozic (angl. shrimp alkaline phosphatase)

SOB	superoptimalni bujon
TBE	elektroforezni pufer Tris-borova kislina-EDTA
TCA	trikloroocetna kislina
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletilen diamin
Tc	tetraciklin
Tris	trishidroksimetilaminometan
tRNA	transportna RNA
w.t.	divji tip (angl. wild type)
x g/min	večkratnik zemeljske gravitacijske sile, s katerim delujemo na vzorec med centrifugiranjem

SLOVARČEK

BEVS	bakulovirusni ekspresijski vektorski sistemi (angl. Baculovirus Expression Vector Systems). Metoda izražanja rekombinantnega proteina v žuželčjih celičnih linijah, pri kateri so celice okužene z bakulovirusom, ki vsebuje gen za rekombinantni protein in je specifičen za žuželčje celice.
Inkluzijska telesca	netopni agregati, ki običajno vsebujejo heterologne proteine in se nahajajo v bakterijski citoplazmi
Katabolna represija	pri bakterijah kontrolni mehanizem, ki v navzočnosti vira ogljika inhibira sintezo encimov, ki so potrebni pri razgradnji alternativnih virov ogljika.
N-terminalno sekvenciranje	način proteinskega sekvenciranja, pri katerem je vsaka aminokislina na N-terminalnem koncu sproti hidrolizirana in identificirana s kromatografijo.
Odziv SOS	pri bakteriji odgovor na poškodbo DNA, zaradi česar se celični cikel ustavi ter se aktivirajo popravljalni in mutagenski mehanizmi.
Prodigiosin	sekundarni metabolit oz. pigment, ki ga sintetizirajo številne bakterijske vrste iz razreda γ -Proteobacteria.
Trombin	človeška serinska proteaza, ki prepozna konsenzno aminokislinsko zaporedje LVPRGS ter ga cepi med argininom in glicinom.

1 UVOD

Toksine, izolirane iz strupa evkarijontskih organizmov, pogosto poskušamo uporabiti v boju proti patogenim mikroorganizmom in tumorskim celicam. Iskanje novih protibakterijskih spojin se je zadnja desetletja povečalo, saj se danes pojavlja vedno več patogenih bakterijskih sevov, ki so odporni proti tradicionalnim protibakterijskim učinkovinam. Bogat rezervoar takšnih učinkovin, ki imajo za gostitelja pogosto obrambno funkcijo, je antarktični bentoški ekosistem. Parborlizin je citolitični toksin iz antarktičnega nitkarja *Parborlasia corrugatus*. Toksin je homologen dobro opisanemu polipeptidu citotoksinu A-III (Cl-A-III) iz nitkarja *Cerebratulus lacteus* in je hemolitičen za eritrocite iz številnih sesalčjih vrst. Zanimive biotehnološke značilnosti proteina so, da je izredno odporen proti razgradnji s proteolitičnimi encimi in denaturaciji s segrevanjem, stabilen pri nizkih vrednostih pH ali ob izpostavitvi urei. Vzorčenje nitkarja iz antarktičnega morskega okolja je drago in zamudno, zato smo pripravili rekombinantne izooblike parborlizina in testirali njihovo delovanje.

1.1 NAMEN DELA

V ekspresijske seve bakterijske vrste *E. coli* smo poskušali vnesti genski zapis za tri izooblike evkarijontskega toksina parborlizina in kontrolirano izvesti izražanje heterologenega proteina. Izražanje in izolacijo biološko aktivne oblike proteina smo poskušali izboljšati z genetskimi manipulacijami, pri katerih smo ustvarili tri različice rekombinantnega proteina: (i) parborlizin sklopljen s heksahistidinskim repom, ki omogoči izolacijo z nikelj-afinitetno kromatografijo in/ali genom za domeno proteina TolA na (ii) C-terminalnem koncu ali na (iii) N-terminalnem koncu, ki zveča topnost in prispeva k sintezi pravilno zvite oblike proteinskega konstrukta. V nadaljevanju smo želeli pridobiti očiščene različice parborlizina in preveriti njihovo hemolitično ter morebitno protibakterijsko aktivnost rekombinantnih proteinov s spektrofotometričnimi ali gojitvenimi testi.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Zastavili smo si naslednje delovne hipoteze:

- V bakteriji *E. coli* lahko sintetiziramo topno obliko rekombinantnega parborlizina oziroma njegove različice z vezano domeno proteina TolA.
- Izooblike parborlizina niso enako aktivne.
- Parborlizin deluje protimikrobno in hemolitično.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ISKANJE FARMACEVTSKO UPORABNIH SEKUNDARNIH METABOLITOV

Antarktični morski organizmi so izpostavljeni tekmovanju za prostor, svetlobo in hrano, zaradi česar so razvili obrambne mehanizme, kot so protimikrobne učinkovine (Avila in sod., 2008). Do leta 1993 je bilo izoliranih skoraj 7000 različnih strukturnih oblik sekundarnih metabolitov iz morskih organizmov. Med njimi najdemo terpene, alkaloide, poliketide, peptide, spojine, ki so sintetizirane iz intermediatov po različnih biosintetskih poteh in metabolite, katerih prekurzor je šikimska kislina (Avila in sod., 2008). Obstaja hipoteza, da je antarktična favna z biogeografskimi pregradami, kot sta Drakov preliv in antarktični krožni tok, izolirana že 20 do 41 miljonov let, zaradi česar ima visoko stopnjo endemizma (Thornhill in sod., 2008). V antarktičnem bentoškem okolju je plenilstvo zelo pogost način prehranjevanja, vendar so ribe kot plenilci redke. Glavni plenilci so gibljivi makroskopski nevretenčarji, predvsem iglokožci, na primer velike morske zvezde (Avila in sod., 2008). V takem okolju ne obstaja seleksijski pritisk za razvoj fizičnih pregrad, kot so trde skeletne strukture za obrambo proti ribam, temveč se razvije kemična obramba proti morskim zvezdam, ki je veliko bolj uporabna, saj se morske zvezde pogosto prehranjujejo tako, da prekrijejo plen s svojim želodcem. Zato so antarktični ekosistemi, predvsem v morskem okolju nad plitvimi kontinentalnimi policami, kjer je biološka diverziteta velika, bogat rezervoar v glavnem slabo poznanih obrambnih sekundarnih metabolitov (Avila in sod., 2008).

2.2 *PARBORLASIA CORRUGATUS*

Nitkarji (*Nemertea*, tudi Nemertini) je deblo, ki vsebuje kakšnih 1500 vrst v glavnem morskih organizmov, ki uporablja toksine tako za obrambo kot tudi za lovljenje plena. Nemertini poleg genov manj poznanih toksinov vsebujejo tudi gene za številne domnevne toksine, ki so po zaporedju podobni toksinom iz drugih vrst morskih organizmov, kot so glavonožci, morske veternice in ribe iz roda *Synanceia*. Domneva se, da so se ti toksini pojavili med konvergentno evolucijo (Whelan in sod., 2014). *P. corrugatus* je vrsta

nitkarjev, ki jo odlikuje gigantizem, kar je verjetno posledica nizke temperature in nizke koncentracije raztopljenega kisika v okolju, v katerem živi (Davison in Franklin, 2002). Živi v zelo širokem pasu različnih globin (od mediolitorala pa vse do 4000 m) v antarktičnem bentoškem okolju, kar je vsekakor nenavadno. Odrasli osebki običajno dosežejo mokro maso do 140 g in velikost 1-2 m v dolžino in 2 cm v širino, vendar je velikost variabilna in odvisna od količine hrani v okolju (Heine in sod., 1991).



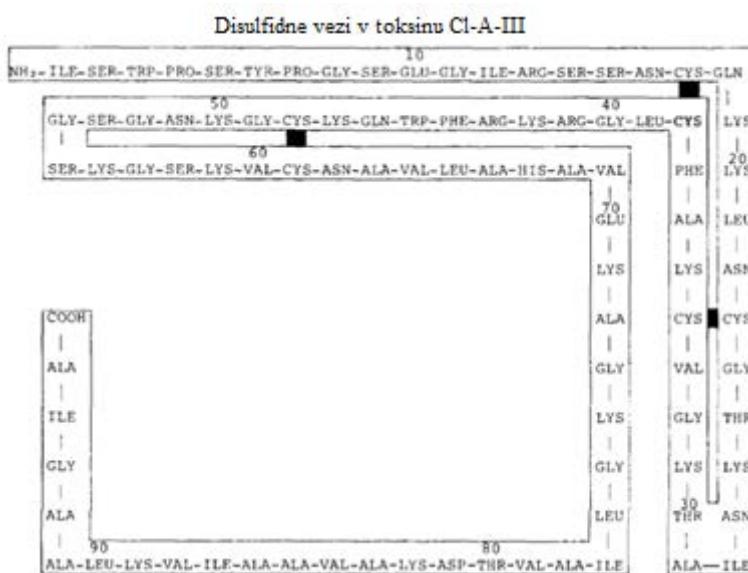
Slika 1: Heteronemertin *P. corrugatus* v naravnem okolju (Kaiser, 2004)

Je žival s počasnim metabolizmom in brez respiratornega sistema. Izmenjava plinov in oskrbovanje notranjih organov s kisikom poteka z difuzijo skozi epidermis. V vodi, nasičeni s kisikom, ima organizem obliko cevi. Ko parcialni tlak kisika pade pod 120 mmHg, prevzame podolgovato in izredno sploščeno obliko, kar poveča površino, skozi katero se lahko izmenjujejo dihalni plini. Pri nizkih vrednostih PO₂ je poraba kisika tudi nižja in črv lahko preživi do vrednosti 27 mmHg (Davison in Franklin, 2002). V priobalnih morskih združbah je pomemben mrhovinar, ki se večinoma hrani le z detritom. Lahko zaužije tudi večje kose hrane in je lahko tudi aktiven plenilec. Takrat se prehranjuje z diatomejami, spužvami, morskimi vetrnicami, iglokožci, polži, postranicami in enakonožci (Thornhill in sod., 2008). Je zelo številčen, kar je verjetno povezano z visoko plodnostjo, planktotrofnimi ličinkami in dioičnem načinom razmnoževanja, ki se dogaja skozi celo leto (Heine in sod., 1991). Iskanje hrane poteka aktivno s pomočjo

kemorecepceji v obsegu 10-20 m (McDermott in sod., 1985). Številčnost in distribucija osebkov je delno odvisna od prisotnosti plena. Nitkar izloča velike količine epitelijске sluzi, ki je kisla ($\text{pH}=3,5$). Raziskave so pokazale, da je celotno telo *P. corrugatus* citotoksično in odbijajoče za ribe in druge morske organizme (McClintock in Slattery, 1991). Zaradi sposobnosti sproščanja obrambnih toksinov in kisle sluzi, je *P. corrugatus* le redko plen, kljub temu da ima izredno visoko energijsko vsebnost (21,9 kJ/g suhe teže) in veliko povprečno populacijsko energijsko gostoto (65 kJ/m²). Agregacija 22 osebkov v bližini vira hrane ima energijsko vsebnost okrog 4554 kJ, kar je za morebitne plenilce bogat vir energije in organskega materiala (Heine in sod., 1991).

2.3 CL-A-III IN PARBORLIZIN

Hoploneermerti imajo obrambne in napadalne toksine predvsem piridinske alkaloide, ki jih injicirajo v druge živali s pomočjo strupene naprave v rilcu. Heteroneermerti, kamor spada tudi *P. corrugatus*, pa toksine izločajo kar na površje svojega telesa oziroma v okolico s pomočjo integumentnih žlez. Kljub nedvomni prisotnosti toksinov na koži heteroneermertinov, o njih vemo malo. Hoploneermerti sintetizirajo kratke bazične polipeptide, velike okrog 6 kDa. Toksini so nevrotoksični, selektivno vplivajo na akcijske potenciale pri rakih in ponavadi delujejo že v manjših količinah. Nekateri heteroneermerti vsebujejo tudi večje polipeptide, ki so citolitični in imajo maso okrog 10 kDa (Berne in sod., 2003). Ti polipeptidi so zelo bazični, verjetno vsebujejo tri do štiri disulfidne mostičke in imajo večinoma alfavijačno sekundarno strukturo (Dumont in Blumenthal, 1985). Štirje polipeptidi, ki so strukturni homologi in spadajo v razred tako imenovanih toksinov »A«, so litični za eritrocite in druge celice. Toksini v razredu »B« so nevrotoksični (Blumenthal, 1982). A-II in A-III vsebujejo tri disulfidne mostičke, A-IV pa štiri (Dumont in Blumenthal, 1985). Izločajo jih integumentne žleze v koži in rilcu živali, zaradi česar je toksine dokaj enostavno izolirati iz izločkov. Tako kot nevrotoksini so citotoksini skoncentrirani v integumentu telesne stene (Kem in Blumenthal, 1978). Vsi toksini »A« delujejo kot surfaktanti/površinsko aktivne snovi ali detergenti, torej učinkujejo na celično membrano podobno kot melitin, ki je bil izoliran iz strupa domače čebele in kardiotoksin, ki je strup iz strupenega goža (Kem, 1985).



Slika 2: Kovalentna struktura toksina Cl-A-III z označenimi disulfidnimi mostički (Blumenthal, 1980)

Najbolj raziskan toksin razreda »A« je 95 aminokislin velik toksin A-III. Je nevrotoksičen, ker deluje na mišične in živčne membrane (Kem, 1994). Poleg tega v koncentracijah od 1 do 10 µg/mL povzroča popolno lizo eritrocitov. Lizira tudi tumorske celice (Kem in Blumenthal, 1978). Verjetno deluje protein A-III neencimsko, saj ne deluje kot fosfolipaza ali proteinaza (Blumenthal, 1985). Sublitične koncentracije tega proteina blokirajo natrijeve kanalčke v aksonih lignja in v Purkinjevh vlaknih v srcu psa, vplivajo pa tudi na delovanje kalcijevih in kalijevih kanalčkov (Kem, 1985). Hemolitična aktivnost toksina A-III za človeške eritrocite je približno štirikrat večja od melitinove in več kot desetkrat večja od kardiotoksinove (Kem in Blumenthal, 1978). Tako kot mnogi drugi citolizini deluje toksin A-III sinergistično s fosfolipazo A₂, s katero se hemolitična aktivnost petkrat poveča. Fosfolipazo A₂ najdemo v apitoksinu oz. čebeljem strupu, ki je kompleksna mešanica proteinov in drugih spojin, kjer prevladuje melitin. Povečana hemolitična aktivnost je verjetno posledica prostih maščobnih kislin, ki se sproščajo zaradi delovanja fosfolipaze, kar olajša vrinjenje A-III v lipidni dvosloj in nastanek membranskih por, ki vodijo v lizo celice (Liu in Blumenthal, 1987).

Tako kakor melitin je tudi A-III zgrajen iz amfipatičnih alfavijačnic, ki so pomembne za vezavo na membrane in samo lizo celic (DeGrado in sod., 1982). Laboratorijski poskusi so pokazali, da visoka koncentracija Ca²⁺ zmanjša učinek, ki ga ima A-III na mirovni in

akcijski potencial celic Purkinjevih vlaken in inhibira litično aktivnost, ki jo ima proti nekaterim drugim vrstam celic (Posner in Kem, 1978). Aktivnost A-III se močno zmanjša tudi zaradi dodatka drugih divalentnih kationov kot so Zn^{2+} , Co^{2+} , Na_2SO_4 , KCl in $NaCl$, medtem ko disaharida saharoza in manzo povečata aktivnost. Poleg tega deluje sinergistično z detergentom Triton X-100 in z drugimi citolizini, ne pa tudi z melitinom (Liu in Blumenthal, 1988).

A-III ima tri disulfidne mostičke na mestih Cys-17-Cys-38, Cys-23-Cys-34 in Cys-48-Cys-61 (Blumenthal, 1982), ki niso v bližini C- ali N-terminalnega konca, ki sta oba prosta (Kem, 1994). A-III je izredno vodotopen protein, a se hitro veže na lipidne membrane ter se z luhkoto vstavi vanje, zato je težko določiti, s katerimi metodami bi lahko napovedali njegovo sekundarno strukturo, saj so metode za vodotopne proteine pogosto neuporabne pri membranskih proteinih (Kem, 1994). Zaradi vsebnosti velikega števila aminokislin lisina, arginina in histidina ter majhnega števila aspartata in glutamatov je zelo bazičen, saj predstavlja bazične aminokisline 18 % aminokislinskega zaporedja (Kem, 1994). Raziskave z vakuumskim cirkularnim dihroizmom kažejo, da je sekundarna struktura A-III sestavljena iz 60 % alfavijačnice, 11 % antiparalelne betaploskve, 2 % paralelne betaploskve, 23 % betazavoja in 4 % preostale strukture (Kem, 1994). Nativna oblika toksina je zelo odporna proti proteolitskim reakcijam in nereduciran protein je izredno težko denaturirati s fizikalnimi metodami, kot so kuhanje/segrevanje, nizek pH in uporaba uree (Blumenthal, 1980). Blumenthal (1982) je dokazal, da lahko N-terminalni konec toksina A-III preči celotno debelino membrane sfingomielinskega liposoma in vsaj prvih trinajst aminokislin na N-terminalnem koncu lahko prečka membrano. Pri preučevanju vezave A-III na eritrocite so ugotovili, da je mesto vezave verjetno membranski protein, saj dodatek inhibitorjev proteina zaščiti eritrocite (Blumenthal, 1985). Protein A-III povzroča hitro hemolizo s tvorbo velikih por v membrani, skozi katere enako hitro prehajajo večje, do 90 Å velike molekule kot tudi manjše celične sestavine, npr. ioni (Kem, 1994).

P4	1 -GWPAYPGPNGIRSSVCQKLLGCGKKNLATKGVCKAFCLGRKRFWQKCGKNGSSGKGSRI
P7	1 --WPAYPGPNGIRSSVCQKLLGCGKKNLATKGVCKAFCLGRKRFWQKCGKNGSSGKGSKI
P2	1 -GWPAYPGSNGIRSSVCQKLLGCGSKNLASLGVCKAFCLGRKRFWQKCGKNGSSGKGSRI
P5	1 -GWPAYPGSNGIRSSVCQKLLGCGSKNLASLGVCKAFCLGRKRFWQKCGKNGSSGKGSRI
P3	1 -GWPAYPGSNGIRSSVCQKLLGCGSKNLASLGVCKAFCPGRKRFWQKCGKNGSSGKGSRI
P6	1 -GWPAYPGSNGIRSSVCQKLLGCGSKNLASLGVCKAFCLGRKRFWQKCGKNGSSGKGSRI
P1	1 -GWPAYPGRNGIRSSVCQKLLGCGWKLASLPVCKAFCLRKRFWQKCGKNGSSGKGSKI
Citotoksin A-III	1 ISWPSPYFGSEGIRSSNCQKKLNCGTKNTIATKGVCKAFCLGRKRFWQKCGKNGSSGKGSKV

P4	60 CNPVLAHAVEKAGKGLIKVTDMAAAIVKYAGKK-
P7	59 CNAVLAHAVEKAGKGLIKVTDMAAAITKYAGKK-
P2	60 SNPVLAAVEKAASKGLIKVTDMAAAIVKYAGKK-
P5	60 CNPVVLAAVEKAGKGLIKVTDMAAAIVKYAGKK-
P3	60 CNPVPAAVEKAGKGLIKVTDMAAAIVKYAGKK-
P6	60 CNPVVLAAVEKAGKGLIKVTDMAAATIIKFAG---
P1	60 CKSVTAHTFEKAGKGLIKVTDMAAATIIKYAGKK-
Citotoksin A-III	61 CNAVLAHAVEKAGKGLIAVTDKAVAAIVVKLAAGIA

Slika 3: Primerjava aminokislinskih zaporedij citotoksina A-III in sedmih izoblik parborlizina. Iz slike je razvidno, da so v vseh zaporedjih cisteini večinoma ohranjeni (Tomc Zidar, 2013)

Parborlizin je toksin, ki je citolitičen, ne pa tudi nevrotoksičen polipeptid. Ima visoko stopnjo homologije s toksinom Cl-A-III, je dolg 93 aminokislin in vsebuje po eno hidrofobno domeno blizu terminalnih koncev. Oba hidrofobna konca lahko prečita fosfolipidno dvojno membrano. Iz Slike 3 je razvidno, da imata Cl-A-III in parborlizin v aminokislinskem zaporedju cisteine na istih mestih, zaradi česar je zelo verjetno, da zavzame parborlizin podobno strukturo kot Cl-A-III (Slika 2). Izoelektrična točka je podobno kot pri A-III v bazičnem (9 ali več) (Berne in sod., 2003). C-terminalni konec proteina je tako kakor pri A-III bolj hidrofoben kakor N-terminalni konec in je zgrajen iz amfipatične alfa-vijačnice, ki ima pomembno vlogo pri penetraciji v biološke membrane. Blumenthal (1982) je dokazal, da ima verjetno tudi N-terminalni konec pri toksinu A-III pomembno vlogo pri vrinjenju v membrano. Za popolno litično aktivnost toksina A-III naj bi bil potreben vsaj del C-terminalne amfipatične alfa-vijačnice (Blumenthal, 1985). Balasubramiam s sodelavci (1986) je sintetiziral umetna fragmenta 1-16 in 63-95, ki ne vsebuje cisteinov oz. disulfidnih vezi, ki lahko vplivajo na strukturo proteina. Fragment 63-95 je izkazoval >90 % hemolitične aktivnosti v primerjavi s celotnim proteinom, verjetno zato, ker se je sposoben zviti v amfipatično alfa-vijačno strukturo, medtem ko fragment 1-16 očitno te sposobnosti nima in ni bil aktivен (Balasubramiam in sod., 1986). Rezultati nakazujejo, da morata biti za popolno aktivnost toksina A-III tako C-

kakor tudi N-terminalni konec nedotaknjena/nespremenjena (Blumenthal, 1982). 33 aminokislin dolg odsek (63-95) blizu C-terminalnega konca je izredno hidrofoben in verjetno služi kot mesto za vezavo na membrano, saj skrajšanje polipeptidne verige na C-terminalnem koncu za 10 do 25 aminokislin drastično zmanjša aktivnost toksina A-III (Dumont in Blumenthal, 1985). V tej regiji sta segmenta aminokislin z nepolarnimi stranskimi verigami 63-72 in 77-92, ki verjetno prevzameta obliko dveh alfa-vijačnic, ki sta povezani z betazavojem (Kem, 1994).

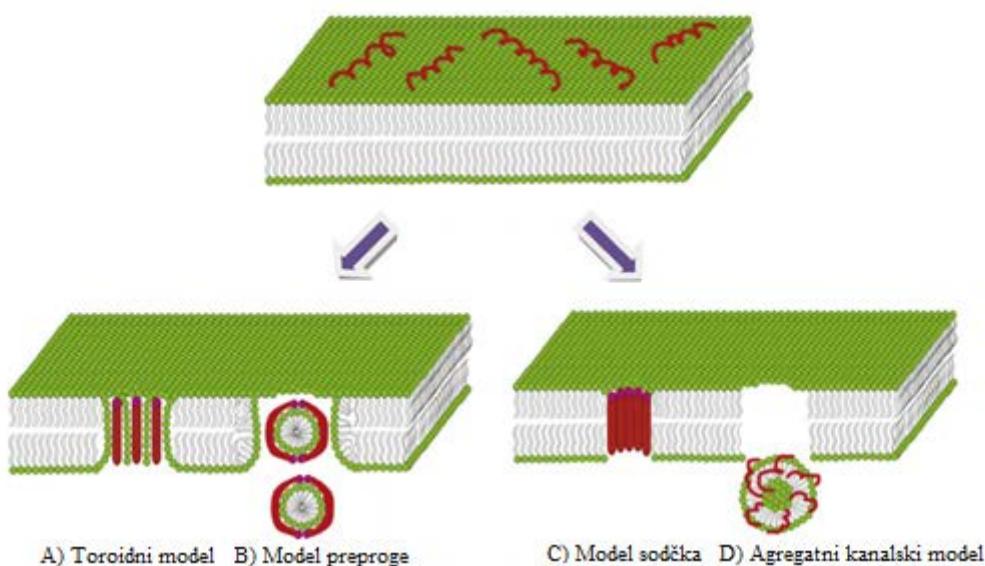
2.4 VEČFUNKCIJSKI PEPTIDNI IN PROTEINSKI TOKSINI

Biološko aktivni evkariontski kratki peptidi proti prokariontom so pri večceličnih organizmih eni izmed prvih razvitih obrambnih mehanizmov proti okužbam. Najdemo jih v rastlinah, rakovicah, vinskih mušicah, žabah iz rodu *Rana* in celo pri človeku, pri katerem protimikrobne peptide sintetizirajo tudi enterociti, Panetove celice in nevtrofilci (Zasloff, 2002). V nižje razvitih živalskih vrstah kationski peptidi predstavljajo glavni odgovor na okužbe s patogenimi mikrobi in spominjajo na imunski odgovor, medtem ko so peptidi v višjih organizmih le lokalni odgovor na okužbo. Večina naravnih protimikrobnih peptidov ima omejen spekter delovanja in so običajno prisotni v količinah, ki so nižje od minimalne inhibitorne koncentracije. Gostitelj lahko v prisotnosti mikrobov sintetizira večje število različnih peptidov s podobno aktivnostjo (Hancock in Patrzykat, 2002). Skoraj vsi peptidi imajo pozitiven neto naboj ter ločene hidrofobne in hidrofilne regije, kar daje peptidu amfipatičen značaj. Razlog za različno delovanje na celično membrano evkariontov in prokariontov je v razliki sestave membrane. Evkariontska membrana vsebuje sfingolipide in holesterol, nabiti lipidi pa so usmerjeni predvsem v citosol. Celična membrana pri bakterijah je običajno sestavljena iz velikega števila negativno nabitih fosfolipidov, kar daje površini celice močno negativen naboj. Protimikrobni peptid, ki ima pozitivno nabito zunanjost, se zaradi elektrostatskih interakcij povezuje z negativno nabito bakterijsko membrano, na evkariontske membrane pa deluje le s hidrofobnimi interakcijami, ki so prešibke za vezavo. Model po Shai-Matsuzaki-Huangu (SMH) prikaže učinek peptida na različne vrste membran. Po stiku med peptidom in bakterijsko celično membrano sledi prerazporeditev lipidov, spremembra membranske strukture in v nekaterih primerih vstop peptida v notranjost celice (Zasloff, 2002). Prečkanje membrane v obliki

monomera ni energetsko ugodno za amfipatično alfavijačnico, zato je za nastanek pore potrebno predhodno kopičenje dovolj monomerov na celični membrani (Shai, 1995). Peptidi, ki delujejo po modelu SMH, uničujejo mikrobe že pri mikromolarnih koncentracijah, poznamo pa tudi peptide, ki so aktivni v še nižjih koncentracijah. Primer takega peptida je amfipatični peptid nizin iz 14 aminokislin, ki ga sintetizirajo bakterije iz rodu *Lactococcus* in je aktiven že v nanomolarnih koncentracijah. Razvoj odpornosti proti protimikrobnim peptidom je malo verjeten, saj je njihova tarča celična membrana, ki jo je težko spremeniti. Mikrob bi lahko pridobil odpornost s preoblikovanjem membrane, s spremembo sestave lipidov in drugih sestavin ali s spremembo organizacije komponent, kar pa je za bakterijsko celico izredno težko. Mikrobne celice bi se lahko zaščitile tudi s sintezo proteaz, a se je ta strategija pogosto izkazala kot neučinkovita, saj peptidi večinoma nimajo prepoznavnih zaporedij za proteaze (Zasloff, 2002).

Protimikrobne peptide razlikujemo na podlagi sekundarne strukture. Osnovno strukturno načelo vseh teh peptidov je sposobnost zvijanja v amfipatično obliko, v kateri so hidrofobne in kationske regije prostorsko ločene bodisi ob vstavljanju v membrano bodisi takoj po sintezi. Vsi protimikrobnii peptidi izhajajo iz daljših prekurzorjev, ki imajo tudi signalno zaporedje. Po translacijske modifikacije vključujejo proteolitsko procesiranje, glikozilacijo, karboksiterminalno amidacijo, aminokislinsko izomerizacijo in halogenacijo (Zasloff, 2002). Amfipatična alfa-vijačnica je pogost strukturni motiv teh peptidov, ki je znan tudi pri velikem številu membranskih proteinov. Nastane v primeru, ko se hidrofobnost aminokislin razlikuje na vsakem tretjem ali četrtem aminokislinskem ostanku v peptidni verigi, saj se na tak način zberejo polarne aminokisline na eni in hidrofobne aminokisline na drugi strani vijačnice. Ta struktura je pomembna za rušenje lipidne membrane, lizo bakterijskih celic, učinkovito vezavo hormonov na receptorje in označevanje proteinov za prenos v mitohondrije. Kljub strukturnim podobnostim se amfipatični polipeptidi precej razlikujejo glede aktivnosti, saj so lahko citolitični, hemolitični ali protibakterijski (Shai, 1995). Raznolikost peptidov je tako velika, da redko najdemo isto aminokislinsko zaporedje v dveh sorodnih živalskih vrstah. Čeprav so antibiotiki učinkovitejši, so prednosti protimikrobnih peptidov izjemna hitrost, s katero uničujejo tarčne celice, široka specifičnost, aktivnost proti patogenim mikrobom, ki so odporni proti antibiotikom in nizka stopnja razvoja odpornosti proti peptidom (Hancock in

Lehrer, 1998). Tri osnovne strukturne lastnosti vseh protimikrobnih peptidov so: (i) pozitivni naboј, saj vsebujejo tri ali več molekul lizina ali arginina, (ii) majhna molekulska masa, saj so sestavljeni le iz 12 do 45 aminokislin in (iii) vsaj polovica vseh aminokislin je hidrofobnih (Hancock in Patrzykat, 2002). Naboј določa, ali se peptid poveže z bakterijsko celično membrano ali ne, amfipatična struktura pa, ali lahko peptid prodre v membrano (Cao in sod., 2010). Protimikrobeni peptidi so lahko grajeni iz alfa-vijačnic, lahko pa vsebujejo tudi beta-ploskve, ter tvorijo več disulfidnih vezi. Peptid iz 33 aminokislin, pardaksin, ki ga sintetizirata vsaj dve vrsti morskih listov iz rodu *Pardachirus*, je podobno kakor parborlizin in Cl-A-III, pozitivno nabit, citolitičen in vsebuje hidrofilne in hidrofobne regije ter izgubi hemolitično aktivnost proti sesalčjim celicam, če odstranimo amfipatično alfa-vijačnico. S tem izgubi sposobnost permeacije skozi celično membrano, v kateri nastajajo transmembranske pore, vendar obdrži visoko protibakterijsko aktivnost. Očitno lahko pardaksin lizira celice na dva načina. Na sesalčje celice deluje tako, da s tvorbo ionskih kanalčkov, ki so odvisni od napetosti in selektivni za katione, moti presinaptično aktivnost in transport ionov v ozmoregulatornem sistemu v epiteliju (Shai in Oren, 1996). Pardaksin ima strukturo vijačnica-tečaj-vijačnica, ki je prisoten tudi pri protibakterijskih peptidih, kot je cekropin, ki je specifičen za bakterije, in citotoksičnih peptidih, kot je melitin, ki ima učinek na številne vrste celic. Poznamo številne citolitične amfipatične peptide z alfa-vijačno strukturo, ki imajo raznolike patološke in farmakološke učinke, kar je mogoče verjetno zato, ker oponašajo proteinske komponente v membranah. Tudi peptid kolicin, ki ga *E. coli* naravno sintetizira, je citolizin, ki vsebuje amfipatične alfa-vijačnice (Kem, 1994).



Slika 4: Širje načini delovanja protimikrobnih peptidov (Li in sod., 2012)

Peptidi in proteini delujejo na biološke membrane na številne načine (Slika 4). Permeabilnost se poveča, ko se polipeptidi vstavijo v membrano, saj se tvorijo sodčku podobne pore, pri katerih je transmembranski del amfipatične alfa-vijačnice obrnjen navzven proti hidrofobnim repom fosfolipidov, hidrofilni del toksina pa proti notranjosti, zaradi česar nastane hidrofilna transmembranska pora oz. kanalček, skozi katero celica izgublja ione. Ta način delovanja se imenuje »model sodčka«. Drug model delovanja toksina, imenovan »model preproge«, ki je pogost predvsem pri protibakterijskih peptidih, je paralelno prekrivanje membrane s polipeptidom ter pojav lukenj in toroidnih agregatov v njej, ko doseže koncentracija peptida določen prag (Li in sod., 2012). Sledi celična smrt zaradi neselektivne permeabilnosti membrane. Posledica propada membrane so številni manjši vezikli, prekriti s peptidom. Ker pri takem mehanizmu amfipatična alfa-vijačnica ni potrebna, se liza bakterijskih celic zgodi z detergentnim načinom (Shai in Oren, 1996). Pri po Gramu negativnih bakterijah se kationski peptidi vežejo na vezavna mesta za divalentne katione na površini lipopolisaharida, saj imajo $10^3\text{-}10^4$ krat večjo afiniteto za ta vezavna mesta kakor divalentni kationi (Hancock in Patrzykat, 2002). Zaradi velikosti peptidov v primerjavi z divalentnimi kationi pride do krivljenja membranske strukture. Skozi nastale odprtine v zunanjji membrani bakterijske celice lahko vstopijo toksični peptidi, pa tudi konvencionalni antibiotiki in lizocim (Hancock in Patrzykat, 2002). V zadnjih letih se je izkazalo, da obstajata še najmanj dva načina delovanja protimikrobnih peptidov (Slika 4).

Prvi način je »toroidni model«, pri katerem vezani peptidi agregirajo, kar povzroči, da se lipidni monosloji zvijejo in dobijo pozitivno krivino. Pore, ki nastanejo, vsebujejo tako peptide kot tudi fosfolipidne glave, ki so v stiku s hidrofilnim prostorom v notranjosti pore (Li in sod., 2012). Drugi način je »agregatni kanalski model«, pri katerem se peptidi vrinejo v membrano in se kopijo v nestrukturirane aggregate, ki se raztezajo čez membrano. Raziskovalci domnevajo, da imajo nastali agregati stik z vodnimi molekulami, zaradi česar bi nastali kanali, skozi katere se izgubijo ioni in večje molekule (Li in sod., 2012). Kljub številnim modelom ne moremo pojasniti mehanizma delovanja vseh protimikrobnih peptidnih toksinov, saj obstajajo primeri, kjer propad celice ni povezan s popolno prekinitev citoplazemskega membranskega potenciala. Obstajajo primeri, kjer se izguba potenciala zgodi postopoma s spremenjanjem koncentracijskega gradiента protibakterijskega peptida. Pri uničevanju bakterijskih celic s peptidi z detergentsko aktivnostjo je delovanje hitro in bakterijske celice propadejo v nekaj minutah. Čeprav so naravni peptidi redkokdaj aktivni pri koncentracijah, nižjih od 1 µg/mL, je molarna koncentracija, pri kateri bakterijske celice propadejo, primerljiva z mnogimi konvencionalnimi antibiotiki (Hancock in Patrzykat, 2002). Poleg delovanja na membrane so peptidi lahko aktivni tudi proti molekulam v celici. Ker so podobno kot histoni večinoma bazični, ob interakciji vplivajo na molekule RNA in DNA in na negativno nabite proteine. Na ta način lahko inhibirajo sintezo celične stene, DNA, RNA ali proteinov, kar še dodatno zveča potencialno uporabnost protimikrobnih peptidov (Li in sod., 2012).

2.5 EVKARIONTSKI PEPTIDI, UPORABLJENI ZA FARMACEVTSKE NAMENE

Čeprav toksini kažejo potencialno uporabnost pri biomedicinskih in drugih aplikacijah, so točne kemijske lastnosti mnogih toksinov še vedno nepojasnjene. Evkariontski strupi so ponavadi heterogena mešanica anorganskih soli, majhnih organskih molekul, velikih proteinov, encimov ter polipeptidov, ki imajo različne lastnosti in delovanje (King, 2011). Peptidi v strupu morajo biti stabilni, da prenesejo kemijsko razgradnjo v raztopini pri sobni temperaturi in encimsko razgradnjo s proteazami, ki so tudi prisotne v strupu. Ta zaščita je navadno posledica postranslacijskih modifikacij in vsebnosti disulfidnih mostičkov, ki prispevajo k stabilnosti proteina (Lewis in Garcia, 2003). Slabost peptidov za farmakološke namene je nesposobnost prečkanja epitelijskih slojev, vključno s krvno-

možgansko pregrado, predvsem zaradi hidrofilnih regij in velikosti molekule, kar pomeni, da je odmerek peptidov potrebno prenesti neposredno na tarčno mesto (Lewis in Garcia, 2003). Leta 2011 je bilo na ameriškem tržišču na voljo šest zdravil, odobrenih s strani ameriške vladne ustanove za nadzorovanje hrane in zdravil (FDA), ki so jih naredili na osnovi toksičnih proteinov ali peptidov, ter še več deset v kliničnih testih in predkliničnem razvoju (King, 2011). Odobrena zdravila so kaptopril, eptifibatid in tirofiban, ki so bili razviti iz različnih kačjih toksinov, bivalirudin, ki izvira iz medicinske pijavke, zikonitid, ki izvira iz polžev stožcev in eksenatid, ki izvira iz strupenega bradavičarja. Poleg tega je izven ZDA v uporabi tudi batroksobin, ki izvira iz kač suličark iz rodu *Bothrops*. Med temi je najmanjši eptifibatid, ki je cikličen peptid, sestavljen iz šestih aminokislin, največji pa batroksobin, ki je sestavljen iz 231 aminokislin in 6 disulfidnih vezi. Povprečno peptidno zdravilo, ki izvira iz peptida vsebuje 35 aminokislin in dve disulfidni vezi (King, 2011). Velika večina zdravil, ki je danes v uporabi, izvira iz kačjega strupa in tarča večine zdravil je kardiovaskularni sistem. Za razliko od zdravil, ki se uporabljajo danes, izvirajo zdravila, ki so trenutno v kliničnem testiranju, iz različnih strupenih živali kot so netopirji, polži, morske vetrnice, škorpijoni in pajki (King, 2011). Čeprav je človek že več tisočletij uporabljal strupene živali pri zdravljenju okužb in bolezni, se je sodobna uporaba zdravil, ki izvirajo iz strupenih živali, začela v osemdesetih letih prejšnjega stoletja. Takrat so razvili antihipertenzno zdravilo kaptopril iz inhibitorja angiotenzin konvertaze (ACE), ki so ga izolirali iz strupa južnoameriške suličarke vrste *Bothrops jararaca* (Cushman in Ondetti, 1991). Razvoj zdravil iz evkariontskih strupov je težavno opravilo. V primerjavi z mikroorganizmi, je strupene živali pogosto težko ujeti in jih vzdrževati v laboratorijskih razmerah. Poleg tega so številne živali majhne in vsebujejo majhne količine strupa (King, 2011). Pri sami uporabi evkariontskih toksinov za zdravstvene namene je največja težava pri sistemski uporabi peptidov, hitro izločanje peptidov iz telesa zaradi delovanja jeter in glomerularne ultrafiltracije v ledvicah (King, 2011). Resna težava so tudi izredno visoke doze, pri katerih so protimikrobnii peptidi učinkoviti v živalskih modelih, ki so pogosto take, da so toksične tudi za gostiteljevo tkivo (Zasloff, 2002). Naravna oblika peptida je lahko problematična, saj pogosto deluje nespecifično, uničuje različne tipe celic in je sicer aktivna proti po Gramu pozitivnim in negativnim bakterijam pa tudi proti glijam, rakastim celicam in virusom z lipidnim ovojem, vendar so lahko taki peptidi toksični tudi za normalne gostiteljske celice. S spremembami v aminokislinskem zaporedju naravnih

peptidov in z ustvarjanjem analogov (Hancock in Patrzykat, 2002) ter enkapsulacijo peptidov v liposomih in polimernih mikrosferah, s katerimi zdravila lahko dostavimo do želenega tkiva, lahko omejimo toksično delovanje v gostiteljskem tkivu (King, 2011).

Zaradi sinergije s konvencionalnimi antiobitiki in drugimi protibakterijskimi učinkovinami so kationski peptidi uporabni v boju proti bakterijskim sevom, ki so odporni proti antibiotikom. Raziskave na živalskem modelu so pokazale, da obstaja sinergija med živalskim protibakterijskim peptidom magaininom in β -laktamskim antibiotikom (Hancock in Patrzykat, 2002). Poleg tega lahko delujejo sinergistično z antibiotiki proti po Gramu pozitivnim bakterijam in s protiglivnimi učnikovinami. Ker imajo kationski peptidi izredno visoko afiniteto za LPS, so lahko uporabni tudi pri nevtralizaciji endotoksina. Raziskave so pokazale, da lahko specifični peptidi vežejo tudi lipotehojsko kislino, ki izvira iz celične stene po Gramu pozitivnih bakterij ter tako kot LPS povzroča sepso (Hancock in Patrzykat, 2002). Najučinkovitejši peptidi imajo zelo širok spekter delovanja proti glivam in proti po Gramu negativnim in pozitivnim bakterijam, minimalna inhibitorna koncentracija pa je pri teh od 0,25 do 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Edina klinično patogena bakterija, ki se je izkazala kot popolnoma odporna proti kationskim peptidom, je *Burkholderia cepacia*, poleg te najdemo nekatere vrste bakterij tudi v rodovih *Serratia* in *Proteus*, ki so lahko odporne (Hancock in Patrzykat, 2002).

Protimikrobní peptidi, npr. cekropin (iz živali), plektasin (iz gliv) in melitin, so učinkoviti tudi pri zdravljenju težavnih bakterijskih okužb, npr. delujejo proti MRSA (Mao in sod., 2013). Poleg tega protimikrobne peptide biotehnološko izkoriščajo v rastlinski in živalski produkciji (Hancock in Lehrer, 1998). Melitin je linearni peptid iz 26 aminokislin in je ključna aktivna komponenta v apitoksinu. Melitin deluje protivnetno, protiartritično in protivirusno v različnih tipih celic. Poleg tega sproži apoptozo in zaustavitev celičnega cikla ter učinkuje na signalno pot v tumorskih celicah (Su in sod., 2015). Kot protivnetna učinkovina je stokrat močnejši od kortizola (Cao in sod., 2010). Obenem so številne funkcije melitina dejavnik, ki omejuje njegovo uporabnost, saj je toksičen za normalno tkivo (Su in sod., 2015). Su in sodelavci so leta 2015 objavili raziskavo, v kateri so ustvarili fuzijski protein, sestavljen iz melitina in človeškega rekombinantnega plazminogenskega aktivatorja urokinaznega tipa, ki ga sintetizira gliva *Pichia pastoris* in

uničuje rakaste celice v jajčniku. Ob tem so ugotovili, da je fuzijski protein specifično inhibiral invazijo tumorskih celic in metastaziranje. Čeprav bi bil melitin lahko uporaben v medicini, je težko izolirati čisto obliko peptida zaradi zapletenega procesa in zaradi kontaminacije s fosfolipazo A₂ v apitoksinu (Su in sod., 2015). Za opredelitev lastnosti in biotehnološko uporabo protimikrobnih peptidov kot antibiotikov sta pomembni čistost in koncentracija peptidov. V izogib visokim stroškom in težavnim postopkom organske kemijske sinteze ali izolacije iz naravnih virov, je rekombinantna produkcija peptidov v heterolognih gostiteljih npr. v bakteriji *E. coli* najprimernejša izbira (Li in sod, 2011).

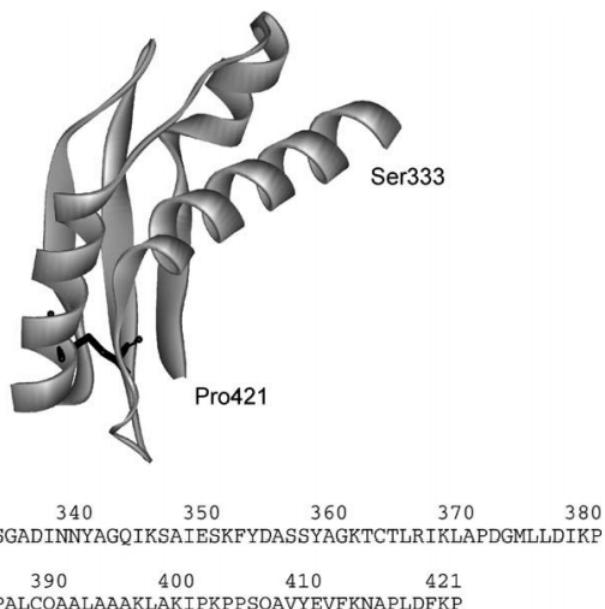
2.6 SISTEMI ZA SINTEZO REKOMBINANTNIH PROTEINOV

V uporabi so predvsem trije sistemi za sintezo heterolognih proteinov: (i) bakterijski ekspresijski sistem v *E. coli*, (ii) metoda z uporabo žuželčjih celic s sistemom BEVS (angl. Baculovirus Expression Vector Systems) in (iii) sinteza proteinov v sesalčjih celicah (Assenberg in sod., 2013). Za sintezo rekombinantnih proteinov iz evkariontov se uporablja predvsem zadnja navedena sistema. Sistem BEVS vključuje okužbo žuželčjih celic z Bakulovirusom, kar je enostaven sistem za gojenje z visokimi izkoristki produkcije rekombinantnih proteinov. Žuželče celice so tako kot sesalčje tkivne kulture sposobne izvesti potranslacijske modifikacije in pravilno zvitje evkariontskih proteinov. V primerjavi s sistemom v *E. coli* pa je sinteza proteinov v teh sistemih zamudna in dražja (Peti in Page, 2006). Pomankljivosti sinteze rekombinantnih proteinov v *E. coli* so nezmožnost nekaterih potranslacijskih modifikacij, kot je tvorba disulfidnih vezi, glikozilacija, dodatek številnih funkcionalnih skupin, kar je lahko ključno za produkcijo pravilno zvitega in aktivnega proteina (Peti in Page, 2006).

Sistemi za produkcijo rekombinantnih proteinov v *E. coli* običajno temeljijo na plazmidnih ekspresijskih vektorjih pET, pri katerih se gen za rekombinantni protein prepiše z RNA polimerazo bakteriofaga T7 producentskega seva. Ta RNA polimeraza je visoko selektivna za promotor, ki je na pET plazmidu in ne v genomu bakterije. Prepis genov z RNA polimerazo T7 je petkrat hitrejši kot z RNA polimerazo iz *E. coli* (Studier in Moffat, 1985). RNA polimeraza T7 je zmožna učinkovite sinteze celotnih prepisov iz skoraj katere

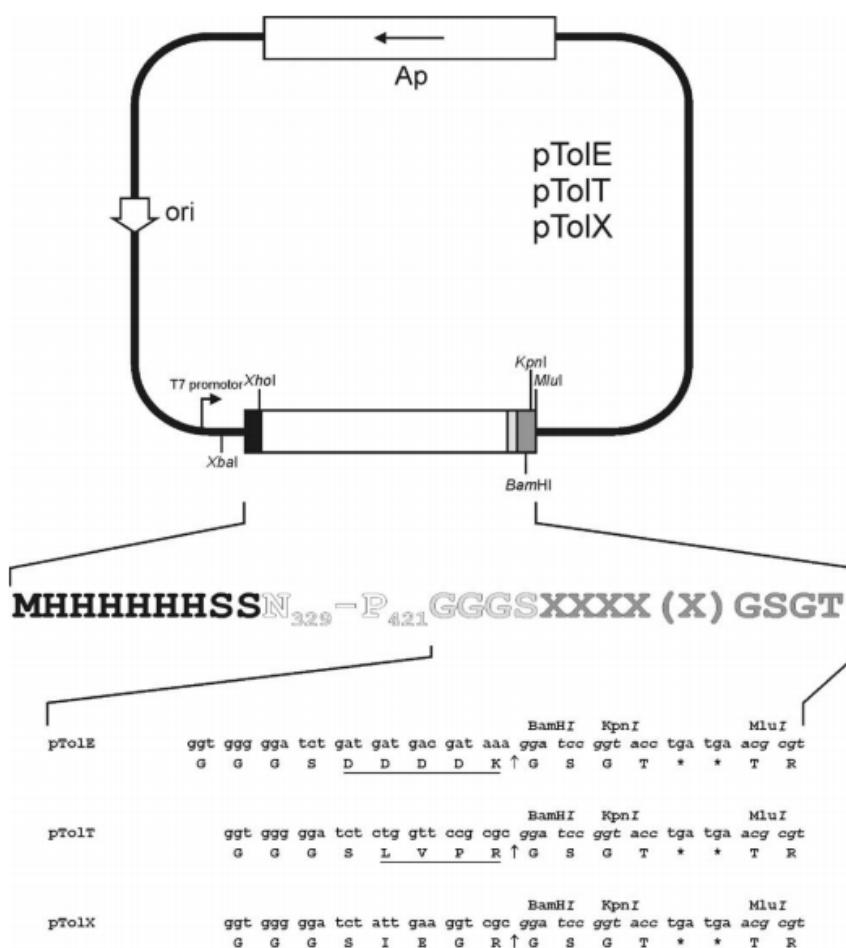
koli molekule DNA, ki je povezana s promotorjem T7, saj ni občutljiva na za bakterije specifična mesta prekinitev transkripcije (Studier in Moffat, 1985).

V *E. coli* izražamo gene za natične ali fuzijske rekombinantne proteine, pri katerih uporabljam aminokislinska zaporedja, ki olajšajo izolacijo (zaporedja histidinov t.i. histidinski repi), povečajo topnost (TolA, glutation-S-transferaza), omogočijo nastanek disulfidnih vezi (tioredoksin) ali omogočijo prenos rekombinantnega proteina v periplazmo (DsbA), kjer so boljše razmere za nastanek disulfidnih vezi (Anderluh in sod., 2002). Protein TolA je transmembranski protein iz seva *E. coli* K12 in ima vlogo vzdrževanja integritete notranje membrane ter prehajanja kolicinov in bakteriofagov v bakterijsko celico. Protein iz treh domen gradi 421 aminokislin. N-terminalna domena je sestavljena iz transmembranske vijačnice, ki omogoča zasidranje TolA v notranjo membrano. Največja domena je polarna, grajena pretežno iz alfa-vijačnic, C-terminalni konec proteina pa imenujemo TolAIII in ga gradi 92 aminokislin. TolAIII vsebuje eno disulfidno vez, je podolgovate strukture ter v raztopini kot monomer topen do koncentracije 30 mg/ml. Posledično je uporaben kot spojitiveni partner za zvečanje topnosti rekombinantnih proteinov (Anderluh in sod., 2002). Poleg tega je primeren za uporabo v *E. coli* zato, ker je njen lastni protein.



Slika 5: Tridimenzionalna struktura in aminokislinsko zaporedje tretje domene periplazmatskega proteina TolA. Cisteina, ki tvorita disulfidno vez sta prikazana v črnom. Ser333 je kratica za serin na mestu 333, pro421 pa za prolin na mestu 421 (Anderluh in sod., 2002)

Plazmidni vektorji pTol so derivati plazmida pET8c in vsebujejo gen za TolAIII in gen *bla* za odpornost proti ampicilinu. Za čiščenje z nikelj-afinitetno kromatografijo vsebuje plazmid zapis za zaporedje šestih histidinov (His6) na N-terminalnem koncu, kateremu sledi območje z več mesti za kloniranje. Poleg tega ima pTol prepoznavno zaporedje oziroma mesto cepitve za endopeptidazo, navadno za to uporabljamo trombin. Anderluh in sodelavci so leta 2002 dokazali, da je številne prokariontske in evkariontske proteine, ki sicer izpadajo v inkluzijskih telesih ob sklopitevi s TolAIII, možno izraziti v topni obliki in jih izolirati z nikelj-afinitetno kromatografijo. Izkazalo se je tudi, da ekspresijski vektorji pTol niso primerni za izražanje membranskih proteinov, saj do izražanja teh fuzijskih proteinov sploh ni prišlo. Razlog za odsotnost proteinov, tako v topni obliki kakor v inkluzijskih telesih, ni znan (Anderluh in sod., 2002).



Slika 6: Plazmidni ekspresijski vektorji pTol. Plazmidi so poimenovani na podlagi prepoznavnega mesta za vrsto endopeptidaze, ki jo vsebujejo. pTolE vsebuje prepoznavno zaporedje za enterokinazo, pTolT prepoznavno zaporedje za trombin in pTolX prepoznavno zaporedje za dejavnik Xa. Na N-terminalnem koncu je heksahistidinski rep, aminokisline 329-421 so TolAIII, GGGS je kratko fleksibilno zaporedje, mesto cepitve je označeno z X in zvezdice predstavljajo stop kodone (Anderluh in sod., 2002)

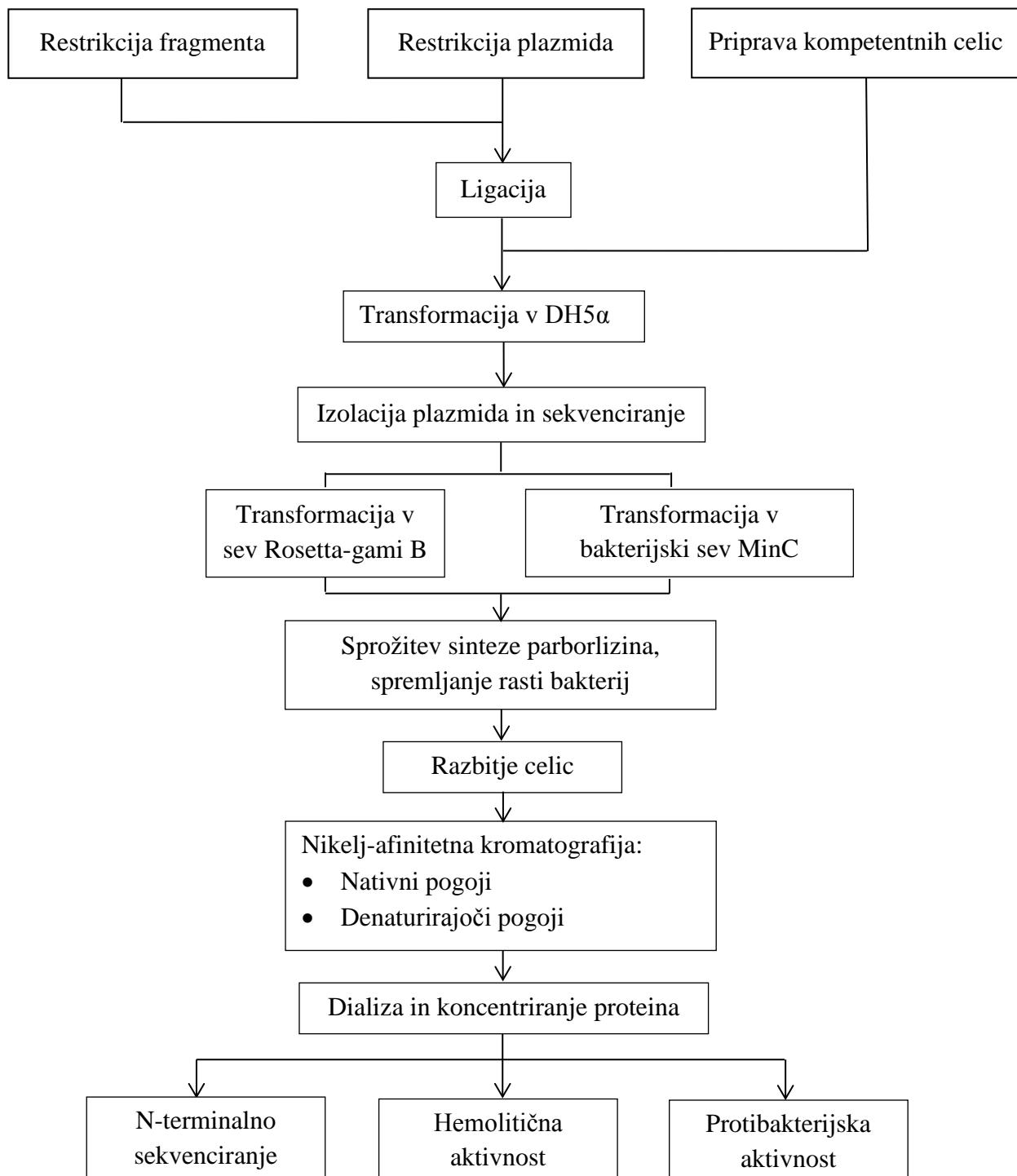
2.7 POSTOPKI ZA IZBOLJŠAVO SINTEZE REKOMBINANTNIH PROTEINOV

Prekomerna sinteza rekombinantnih polipeptidov pogosto vodi v nastanek znotrajceličnih refraktilnih agregatov, ki jih imenujemo inkluzijska telesa. Proteine v inkluzijskih telesih lahko raztopimo v denaturantih, ob odstranitvi le-tega pa sprožimo ponovno zvitje proteina. Pridobivanje aktivnega proteina iz inkluzijskih teles je kompleksen proces, unikaten za vsak posamezni rekombinantni protein. Zaradi visokih stroškov, ki so povezani z iskanjem pogojev potrebnih za ponovno zvitje proteina, je zvijanje proteina v nativno konformacijo zaželeno že znotraj celice. Zvijanje proteina v celici je spontan proces, ki je

odvisen od zaporedja aminokislin v proteinu in od pogojev raztplavljanja v celici. Čeprav je nativno stanje proteina iz termodinamskega vidika ugodno, lahko njegovo zvijanje v pravilno konformacijo traja od nekaj milisekund do več dni (Georgiou in Valax, 1996). Pogoji, ki vplivajo na nastanek inkluzijskih teles, so hitrost prepisovanja tarčnega gena, temperatura med rastjo producentskega seva, sestava in vrednost pH gojišča ter lokacija izražanega proteina v celici (Thomas in Baneyx, 1997). Na pravilno zvitje proteinov pa vplivamo tudi: (i) s substitucijo aminokislin, ki preprečujejo agregacijo, (ii) s sočasnim izražanjem nativnih ali heterolognih šaperonov, ki vplivajo na rastočo polipeptidno verigo ter preprečujejo agregacijo, (iii) z zagotovljenim transportom proteina v periplazmatski prostor in s ko-ekspresijo foldaz, ki katalizirajo tvorbo kovalentnih vezi, kot so disulfidne vezi, (iv) z vzdrževanjem takih znotrajceličnih razmer, ki znižajo težnjo po agregaciji na minimalni obseg ter (v) z izražanjem rekombinantnega proteina v kompleksu z zelo topnim polipeptidom, kar preprečuje agregacijo hibridov (Georgiou in Valax, 1996; Palomares in sod., 2004). Ko je celica *E. coli* izpostavljena različnim vrstam stresa, kot so spremembe temperature, prisotnost organskih topil in kopičenje napačno zvitih proteinov, se sproži sinteza 20-30 proteinov topotnega šoka, ki lahko znatno vplivajo na pravilno zvitje rekombinantnih proteinov (Thomas in Baneyx, 1997). Na splošno velja, da sta sočasno izražanje šaperonov in optimizacija rastnih razmer ključna za izboljšanje topnosti rekombinantnega proteina (Georgiou in Valax, 1996). Na sintezo topnega rekombinantnega proteina pri po Gramu negativnih bakterijah vplivamo tudi s transportom proteinov v periplazemski prostor, saj periplazma vsebuje manj proteaz kakor citoplazma (Assenberg in sod., 2013).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 SHEMA POSKUSA



Slika 7: Shema poskusa

3.2 MATERIALI

3.2.1 Komercialni kiti

- »GeneJet Gel Extraction Kit #K0692« MBI Fermentas, Litva
- »GeneJet MiniPrep Kit #K0503« MBI Fermentas, Litva
- »GeneJet PCR Purification Kit #K0702« MBI Fermentas, Litva
- »Ni-NTA purification kit« MBI Fermentas, Litva
- »TransformAid Bacterial Kit #K2711« MBI Fermentas, Litva

3.2.2 Aparatura in oprema

- Avtomatske pipete
- Mikrogramska tehtnica
- Centrifuga
- Pasteurjeve pipete
- Čitalec mikrotitrnih plošč
- Sonikator
- Dializne vrečke
- Stojala za epruvete
- Epruvete
- Tehnica
- Evaporator
- UV spektrofotometer
- Filtrska pipeta
- Vodna kopel
- Kivete
- Magnetno mešalo
- Vortex

3.2.3 Kemikalije in reagenti

- »Comassie brilliant blue« Merck, Nemčija
- »DreamTaq Green Thermo scientific #K1081« MBI Fermentas, Litva
- »Fermentas 6x DNA loading dye« MBI Fermentas, Litva
- »GeneRuler 1kb DNA ladder #SM0313« MBI Fermentas, Litva
- »His-select Nickel Affinity Gel P6611« Sigma, ZDA
- »6x DNA Loading Dye« MBI Fermentas, Litva
- »NuPage LDS Sample Buffer (4x)« MBI Fermentas, Litva

- »PageRuler Prestained Protein ladder« ThermoScientific, ZDA
- »Rapid ligation buffer #K1423« MBI Fermentas, Litva
- »Shrimp alkaline phosphatase #EF0511« MBI Fermentas, Litva
- »T4 DNA ligase HEL0011« MBI Fermentas, Litva
- »Thermo scientific 10x green fast digest« ThermoScientific, ZDA
- »Columbia Blood Agar Plates« Biolife Solutions, Italija

- Acetat
- Aceton
- AEBSF
- Agar
- Agaroza
- Akrilamid/bisakrilamid
- Amonijev persulfat
- Ampicilin
- *BamHI*
- Benzamidin
- Betamerkaptoetanol
- Borova kislina (H_3BO_4)
- $CaCl_2$
- Ciprofloksacin
- Ditiotreitol (DTT)
- DNaza
- Etanol
- Etilendiamintetraocetna kislina (EDTA)
- Fenilmethylsulfonilfluorid (PMSF)
- Fenol
- Glicerol
- Glukoza
- GuHCl

- HCl
- Hepes
- Imidazol
- Izopropanol
- Izopropil-β-D-tiogalaktopyranozid (IPTG)
- Kloramfenikol
- Lizocim
- Metanol
- $MgCl_2$
- *MluI*
- NaCl
- NaH_2PO_4
- NaOH
- *NdeI*
- PBS
- RNaza
- TCA
- Tetraciklin
- Tetrametiletilendiamin (TEMED)
- Tris
- Tris-HCl
- Triton X-100
- Trombin

- Urea
- *XhoI*

3.2.4 Gojišča in raztopine

3.2.4.1 Gojišča

Medij LB

- 10 g/L kazeinski hidrolizat
- 5 g/L kvasni ekstrakt
- 10 g/L NaCl

Dodamo destilirano vodo do 1 L. Po dodatku sestavin gojišče avtoklaviramo.

Po potrebi dodamo še antibiotike:

- 100 µg/mL ampicilin
- 34 µg/mL kloramfenikol

Antibiotike dodamo pred uporabo v ohlajeno gojišče.

Peptonkvasni agar

- 0,3 % kvasni ekstrakt (w/V)
- 1 % pepton (w/V)
- 1 % glukoza (w/V)
- 2 % agar (w/V)

Dodamo destilirano vodo do 1 L. Po dodatku sestavin gojišče avtoklaviramo.

SOB

- 20 g/L Bacto tripton
- 5 g/L Bacto kvasni ekstrakt
- 0,5 g/L NaCl
- 10 mL 250 mM KCl
- 5 mL 2M MgCl₂

Dodamo destilirano vodo do 1 L. Po dodatku sestavin gojišče avtoklaviramo.

3.2.4.2 Raztopine

Eritrocitni pufer

- 140 mM NaCl
 - 20 mM Tris-HCl
- pH 7,4

Fiziološka raztopina

- 0,9 % NaCl (m/V)

Nanašalni pufer (6x)

- 0,25 % bromfenol modro (m/V)
- 0,25 % ksilen cianol FF (m/V)
- 30 % glicerol (V/V)

NPI-10 (Lysis buffer, Ni-NTA pod nativnimi pogoji)

- 50 mM NaH₂PO₄
 - 300 mM NaCl
 - 10 mM imidazol
- pH 8,0

NPI-20 (Wash buffer, Ni-NTA pod nativnimi pogoji)

- 50 mM NaH₂PO₄
 - 300 mM NaCl
 - 20 mM imidazol
- pH 8,0

NPI-500 (Elution buffer, Ni-NTA pod nativnimi pogoji)

- 50 mM NaH₂PO₄
- 300 mM NaCl
- 300 mM imidazol

pH 8,0

Pufer za spiranje celic

- 20 mM Tris-HCl

pH 8,0

Pufer za spiranje IB

- 20 mM Tris
- 0,5 M NaCl
- 2 % Triton X-100 (V/V)

pH 8,0

Pufer za raztapljanje IB

- 50 mM β-merkaptoetanol
- 6 M GuHCl
- 20 mM Tris
- 500 mM NaCl

β-merkaptoetanol dodamo tik pred uporabo.

pH 8,0

Pufer za razvijanje

- 1 mM β-merkaptoetanol
- 1 mM Tris
- 25 mM NaCl
- 300 mM GuHCl

β-merkaptoetanol dodamo tik pred uporabo.

pH 8,0

Pufer za zvijanje

- 20 mM Tris
- 500 mM NaCl
- 10 % glicerol (V/V)
- 0,05 % Triton X-100

pH 8,0

Pufer za lizo (Ni-NTA pod denaturirajočimi pogoji)

- 20 mM Tris
- 300 mM NaCl
- 10 % glicerol (V/V)
- 0,1 mM imidazol

pH 8,0

Pufer za pranje (Ni-NTA pod denaturirajočimi pogoji)

- 20 mM Tris
- 300 mM NaCl
- 10 % glicerol (V/V)
- 0,75 mM imidazol

pH 8,0

Pufer za elucijo (Ni-NTA pod denaturirajočimi pogoji)

- 20 mM Tris
- 300 mM NaCl
- 10 % glicerol (V/V)
- 1 mM imidazol

pH 8,0

Pufer TBE

- 90 mM Tris-borat
- 2 mM EDTA

Pufer TE

- 10 mM Tris-Cl (pH 8,0)
- 1 mM EDTA

Raztopina za pripravo kompetentnih celic

- 50 mM CaCl₂
- 10 mM Tris-HCl (pH 7,0)
- 10 % glicerol (V/V)

Raztopine za NaDS-PAGE elektroforezo:

SDS

- 25 mM Tris (pH 8,3)
- 1,92 M glicin
- 35 mM NaDS

MES

- 100 mM MES

MOPS

- 20 mM MOPS
- 2 mM natrijev acetat
- 1 mM EDTA

Raztopina za barvanje

- 10 % ocetna kislina (V/V)
- 40 % metanol (V/V)
- 0,5 % Comassie Brilliant Blue (m/V)

Raztopina za razbarvanje

- 10 % ocetna kislina (V/V)
- 40 % metanol (V/V)

Raztopina za razbarvanje proteinskih lis na membrani PVDF

- 0,1 % Coomassie Brilliant Blue (m/V)
- 50 % methanol (V/V)
- 0,5 % ocetna kislina (V/V)

Raztopina za vizualizacijo proteinskih lis na membrani PVDF

- 50 % metanol (V/V)

Raztopina za Western Blot

- 10 % 10x SDS pufra (V/V)
- 20 % MeOH (V/V)

3.2.5 Uporabljeni izotoksini

Pri izvedbi naloge smo uporabljali sintetična nukleotidna zaporedja, ki ustrezajo genom za tri izotoksine citolitičnega proteina parborlizina. Vsa tri zaporedja so dolga 282 bp. Zaporedja sintetičnih oligonukleotidov smo pridobili iz predhodne raziskave, kjer so z reverzno transkriptazo prepisali celokupno RNA, izolirano iz tkiva *P. corrugatus*, v cDNA in osamili ter določili nukleotidna zaporedja za parborlizin (Tomc Zidar, 2013).

Preglednica 1: Genski zapisi za tri izoblike parborlizina (Tomc Zidar, 2013)

Oznaka	Nukleotidno zaporedje
P1	GGGTGGCCGGTATCGGGTCAAATGGTATCAGATCCAGCGTCTGTCAGAAAAAG TTGGGATGTGGATGGAGAAAACTCGCGTCTTACCTGTCTGCAAAGCTTCTGCCTTGC AAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATCGGAAAGAACGGCTCAAGTGGTAAGGGAAGCA AGATATGCAAATCTGTATCGCCCACACTTTGAGAAGGCCGGCAAAGGCTTGATCAA GCTCACTGACATGGCTGTCGCCACCATTATCAAATACGCTGGCAAGAAGTAA
P2	GGGTGGCCGGTATCGGGTCAAATGGTATCAGATCCAGCGTCTGTCAGAAAAAGT TGGGATGTGGATCGAAAACCTCGCGTCATTAGGTGTCTGCAAAGCGTTCTGCCTTGG AAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATCGGAAAGAACGGCTCAAGTGGTAAGGGAAGCA GGATAAGCAACCCTGTCTCGCCCACGCTGTTGAGAAGGCCAGCAAAGGCTTAATCAA GGTCACTGACATGGCTGTTGCCGATTGTCAAATACGCTGGCAAGAAGTAA
P3	GGGTGGCCGGTACCCGGTCAAATGGTATCAGATCCAGCGTCTGTCAGAAAAAGT TGGGATGTGGATCGAAAACCTCGCGTCTTAGGTGTCTGCAAAGCGTTCTGCCTTGG AAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATCGGAAAGAACGGCTCAAGTGGTAAGGGAAGCA GGATATGCAACCCTGTCCCCGCCACGCTGTTGAGAAGGCCGGCAAAGGCTTAATCAA GGTCACTGACATGGCTGTTGCCGATTGCCAAATACGCTGGCAAGAAGTAA

3.2.6 Uporabljeni sevi, plazmidi in začetni oligonukleotidi

3.2.6.1 Evkarijontske celice

Pri preučevanju hemolitične aktivnosti smo uporabljali eritrocitne duhke (angl. erythrocyte ghosts), ki smo jih pripravili na Katedri za biokemijo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani.

3.2.6.2 Bakterijski sevi

V raziskavi uporabljeni bakterijski sevi in njihovi relevantni genotipi so navedeni v Preglednici 2.

Preglednica 2: Pri delu uporabljeni bakterijski sevi

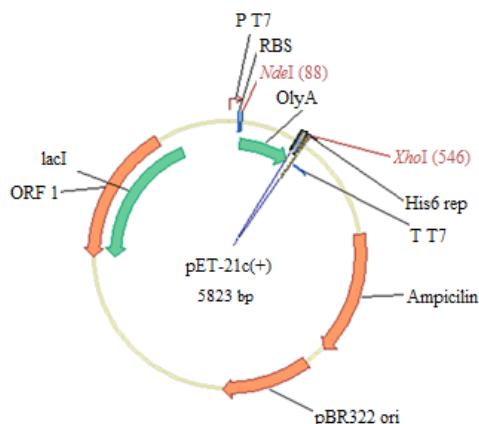
Bakterijski sevi	Genotipske lastnosti	Vir
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (<i>r_k</i> , <i>m_k</i> ⁺) <i>supE44 thi-1 λ recA1 gyrA96</i>	(Novagen, 2004)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) λ(DE3)</i>	(Novagen, 2004)
<i>E. coli</i> Rosetta-gami B	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm lacY1 ahpC</i> (DE3) <i>gor522::Tn10 trxR pRARE</i> (Cam ^R , Kan ^R , Tet ^R)	(Novagen, 2004)
<i>E. coli</i> MinC	<i>minC λDE3</i>	(Baba in sod., 2006)
<i>Bacillus subtilis</i> 168	<i>trpC2</i>	(Zeigler in sod., 2008)
<i>Vibrio rubrum</i> DSM14379	wt	(Borić in sod., 2011)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213	wt	ATCC

3.2.6.3 Plazmidi

V študiji uporabljena izhodna plazmida sta navedena v Preglednici 1. Plazmid pET-21c je shematsko prikazan tudi na Sliki 8.

Preglednica 3: Pri delu uporabljeni bakterijski plazmidi

Plazmidi	Vir
pET-21c(+)	(Novagen, 2003)
pTolT	(Anderluh in sod., 2002)



Slika 8: Restriktionska mapa 5823 bp velikega plazmidnega vektorja pET-21c(+). Za naše delo je pomemben T7 promotor (P T7), ki ob prisotnosti ITPG-ja omogoča izražanje genov v plazmidu, heksahistidinski rep (His6 rep), ki omogoča izolacijo sintetiziranega rekombinantnega proteina z nikelj-afinitetno kromatografijo, gen bla za beta-laktamazo, ki ima v sliki oznako Ampicilin, in restriktionski mesti NdeI in XbaI na pozicijah 88 oz. 546, med kateri smo vstavili genski konstrukt. Restriktionsko mapo smo ponazorili s programom Vector NTI

Na Sliki 9 je prikazano nukleotidno zaporedje domene TolAIII.

Nukleotidno zaporedje

```
ATGCATCACCATCACCATCACTCGAGCAACAATGGCCATCAGGGGCCGATATCAATAACTATG
CCGGGCAGATTAAATCTGCTATCGAAAGTAAGTTCTATGACGCATCGTCCTATGCAGGCAAAAC
CTGTACGGCTGCGCATAAAACTGGCACCCGATGGTATGTTACTGGATATCAAACCTGAAGGTGGC
GATCCCCGACTTTGTCAGGCTGCGTTGGCAGCAGCTAAACTTGCAGAAGATCCCAGAACACCACAA
GCCAGGGAGTATATGAAGTGTTAAAAACGGCCATTGGACTTCAAACCGGGTGGGGATCTCT
GGTCCCGCGCGGATCCGGTACCTGATGAACGGCT
```

Slika 9: Nukleotidno zaporedje regije TolAIII v plazmidu pTolT. S sivo barvo je označen začetni kodon, z vijoličasto barvo histidinski rep, z rdečo barvo regija TolAIII, s svetlo zeleno barvo fleksibilna regija GGGS, z rumeno barvo mesto genskega zapisa za aminokislinsko zaporedje LVPR, ki je restriktionsko mesto za endopeptidazo trombin, z modro barvo restriktionsko mesto za endonukleazo BamHI, s temno rdečo barvo restriktionsko mesto za KpnI, s svetlo modro barvo stop kodona in s temno zeleno barvo restriktionsko mesto za restriktionski encim Mlu (Anderluh in sod., 2003). Dva zaporedna stop kodona zagotovita, da bo prišlo do terminacije translacije

3.2.6.4 Začetni oligonukleotidi

Pri delu uporabljeni začetni oligonukelotidi so prikazani v Preglednici 4.

Preglednica 4: Pri delu uporabljeni začetni oligonukleotidi. Krepko označeni nukleotidi predstavljajo prepoznavna zaporedja restrikcijskih encimov. CATATG je prepoznavno zaporedje za restrikcijski encim *NdeI*, CTCGAG pa prepoznavno zaporedje za restrikcijski encim *XhoI*

Oznaka	Nukleotidno zaporedje (5' proti 3')
P1UPHN	GCGCATATGGGGTGGCCGGCGTATCCGGG
P3UPHN	GCGCATATGGGGTGGCCGGCGTACCCGGG
P1DOHN	GCGCTCGAGCTTCTGCCAGCGTATTTGAT
P2DOHN	GCGCTCGAGCTTCTGCCAGCGTATTTGAC
P3DOHN	GCGCTCGAGCTTCTGCCAGCGTATTTGG
TOLUP	CAACTCGAGCTGGTTCCGCAGCGGATCCAACAATGGCGCATCAGGGG
TOLDOWN	CAACTCGAGCGGTTGAAGTCCAATGGC
T7 TERMINATOR	GCTAGTTATTGCTCAGCGG

3.3 METODE

3.3.1 Verižna reakcija s polimerazo

Reakcijsko zmes za verižno reakcijo s polimerazo smo pripravili z 1 µL tarčne DNA, 0,5 µL prvega začetnega oligonukleotida, 0,5 µL drugega začetnega oligonukleotida, 12,5 µL že pripravljene zmesi »DreamTaq Green Thermo scientific #K1081« (MBI Fermentas, Litva), ki vsebuje polimerazo *Taq*, optimiziran pufer z MgCl₂ ter dNTP-ji. Kombinacije začetnih oligonukleotidov so bile: pri izotoksinu P1 P1UPHN in P1DOHN, pri izotoksinu P2 P1UPHN in P2DOHN in pri izotoksinu P3 P3UPHN in P3DOHN. Pri pomnoževanju fragmentov DNA, ki vsebujejo zapis za izotoksine parborlizina, smo uporabljali začetne oligonukleotide, ki vsebujejo restrikcijska mesta za endonukleaze, ki ustrezajo določenem plazmidu. Razmere v reakciji so bile:

1. Začetna denaturacija pri 94 °C: 2 min
2. Denaturacija pri 94 °C: 30 s
3. Naleganje pri 65 °C: 30 s
4. Elongacija pri 72 °C: 30 s
5. Zaključno podaljševanje pri 72 °C: 7 min

Koraki 2-4 so se ponovili 30-krat.

Pri pomnoževanju genskega zapisa za regijo TolAIII v plazmidu pTol smo uporabljali začetna oligonuklotida TOLUP in TOLDOWN. Pogoji reakcije so bili enaki kot je navedeno zgoraj.

Produkte verižne reakcije s polimerazo smo očistili s kitom »GeneJet PCR Purification Kit #K0702« (MBI Fermentas, Litva) po navodilih proizvajalca in jih analizirali z 1 % agarozno gelsko elektroforezo.

3.3.2 Restrikcija fragmenta in plazmidov

Za restrikcijo fragmentov za vstavljanje v plazmid pET21c ter pri rezanju samega plazmida smo uporabljali encima *NdeI* in *XhoI*. Pri fragmentih za vstavljanje v plazmid pTolT in pri rezanju tega plazmida smo uporabljali encima *BamHI* in *MluI*. Restrikcija je potekala 15 min pri temperaturi 37 °C v 20 µL reakcijski zmesi, ki je vsebovala 10 µL plazmidne DNA ozziroma produkta PCR, 1 µL prvega restrikcijskega encima in 1 µL drugega encima, 2 µL pufru »Thermo scientific 10x green fast digest« (ThermoScientific, ZDA) in 6 µL dH2O.

3.3.3 Agarozna gelska elektroforeza

Gelska elektroforeza, s katero smo preverjali velikost fragmentov ter uspešnost izolacije DNA, je potekala v 0,5x pufru TBE. 1 % agaroznemu gelu smo pred uporabo dodali etidijev bromid do končne koncentracije 0,5 µg/mL. Kot lestvico znanih velikosti fragmentov DNA smo uporabili »GeneRuler 1kb DNA ladder #SM0313« (MBI Fermentas, Litva).

3.3.4 Defosforilacija 5'- konca pri nukleotidnem zaporedju za TolAIII

Konstrukt PARXTH smo ustvarili s kloniranjem pomnoženega nukleotidnega zaporedja za TolAIII v plazmid pET21c. Ta je že vseboval zaporedje za konstrukt PARXH, ki smo ga

rezali z restriktičnim encimom *Xba*I. Ker smo zaporedje vstavili v plazmid, ki je bil rezan le z enim encimom, smo morali konče razrezanega plazmida predhodno obdelati z alkalno fosfatazo SAP (angl. Shrimp Alkaline Phosphatase), da bi preprečili samo-ligacijo vektorja. Reakcijska zmes je vsebovala 90 µL plazmidne DNA ter 1 µL SAP in 10 µL SAP pufrja. Reakcija je potekala 30 min pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo plazmidno DNA očistili s kitom »GeneJet PCR Purification Kit #K0702« (MBI Fermentas, Litva) po navodilih proizvajalca.

3.3.5 Priprava kompetentnih celic

Celice seva *E. coli* DH5α smo inokulirali na plošči LBA ter inkubirali preko noči pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo svežo kolonijo precepili v 100 mL na 37 °C ogretega gojišča LB in inkubirali pri 37 °C in stresanju 180 rpm/min do optične gostote OD₆₀₀ = 0,375. 50 mL bakterijske kulture smo po končani inkubaciji prenesli v ohlajene centrifugirke in jih hladili 10 min v ledeni kopeli. Sledilo je centrifugiranje 10 min pri 4000 rpm/min in 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant ter ponovno centrifugirali pri 4000 rpm/min, 4 °C in ponovno odstranili supernatant. Usedlino smo predhodno resuspendirali v 7 mL v ledeni kopeli ohlajenega 0,1 M CaCl₂ in kulturo inkubirali 10 min na ledu. Sledilo je ponovno centrifugiranje 10 min pri 4000 rpm/min, 4 °C. Odstranili smo supernatant in usedlino ponovno centrifugirali 1 min pri 4000 rpm/min, 4 °C. Supernatant smo ponovno odstranili in usedlino resuspendirali v 1,4 mL ledeno mrzlega 0,1 M CaCl₂. Suspenziji smo dodali 87 % glicerola, jo alikvotirali v ependorfke po 50 µL ter jo zamrznili v tekočem dušiku. Ependorfke s kompetentnimi celicami smo nato hranili pri -80 °C (Sambrook in Russell, 2001).

3.3.6 Bioinformatska orodja

Pri analizi prisotnosti redkih kodonov v naših konstruktih smo uporabljali brezplačni program *E. coli* Codon Usage Analyzer 2.1 (Henaut in Danchin 1996).

Teoretično izoelektrično točko in molekulsko maso rekombinantnih proteinov smo izračunali s programom Compute pI/Mw na spletni strani Expasy (Gasteiger in sod., 2005).

Poleg tega smo izračunali teroretično topnost rekombinantnih proteinov s programom Recombinant Protein Solubility Prediction (Diaz in sod., 2009). Statistični model, ki je bil ustvarjen z logistično regresijo 32 možnih parametrov, izračuna topnostne verjetnosti proteina, ki je prekomerno izražen v *E. coli*. Parametri, ki jih uporabljamo v izračunu verjetnosti, so molekulska masa, delež vsake aminokisline v proteinu, alifatični indeks, nagnjenost k alfa-vijačni strukturi, nagnjenost k strukturi beta-slojev, povprečna vrednost pI, približni povprečni naboj in hidrofilni indeks.

3.3.7 Ligacija

Ligacijo smo izvedli s T4 ligazo (MBI Fermentas, Litva). Reakcijska mešanica je vsebovala 2 µL razrezanega vektorja, 3 µL fragmenta DNA, 0,8 µL T4 ligaze, 2 µL ligacijskega pufra (MBI Fermentas, Litva) in 2 µL dH₂O. Reakcija je potekala 15 min v vodni kopeli pri temperaturi 22 °C. Istočasno smo pripravili kontrolo, v katero smo dali 2 µL vektorja, 0,8 µL T4 ligaze, 5 µL dH₂O in 2 µL ligacijskega pufra.

3.3.8 Verižna reakcija s polimerazo na osnovi kolonije

Pri verižni reakciji s polimerazo na osnovi kolonije smo s sterilnim zobotrebcem odvzeli eno bakterijsko kolonijo iz trdnega gojišča in kolonijo resuspendirali v reakcijski mešanici PCR kot je navedeno zgoraj.

Optimalne razmere PCR za pare oligonukleotidnih začetnikov smo izračunali z modelom Santa Lucia 1998 nearest neighbour thermodynamics (SantaLucia, 1998) na spletni strani NCBI s programom Primer-Blast. Kombinacija začetnih oligonukleotidov pri preverjanju sestave konstruktov PARXTH je bila P1UPHN oz. P3UPHN in T7 terminator. Reakcijske razmere so bile sledeče:

1. Začetna denaturacija pri 95 °C: 1 min
2. Denaturacija pri 95 °C: 30 s
3. Naleganje pri 64 °C: 30 s
4. Elongacija pri 72 °C: 45 s
5. Zaključno podaljševanje pri 72 °C: 7 min

Korake 2-4 smo ponovili 30-krat.

3.3.9 Transformacija plazmida v sev DH5α z namenom izolacije plazmidne DNA

K suspenziji 50 µL kompetentnih celic *E. coli* seva DH5α smo dodali ali 1 µL plazmidne DNA ali 5 µL ligacijske mešanice. Mešanico smo inkubirali na ledu 30 min nato 90 s v vodni kopeli, kjer je bila temperatura 42 °C ter končno še 2 min na ledu. Po končani inkubaciji smo dodali 500 µL na 37 °C segretega gojišča in inkubirali 50 min pri 37 °C in pri stresanju 180 rpm/min. Zmes smo po inkubaciji centrifugirali 5 min pri 8000x g/min in odstranili 450 µL supernatanta. Usedlino smo resuspendirali v ostanku supernatanta, celice razamazali do posameznih kolonij na ploščah LBA in inkubirali preko noči pri 37 °C (Sambrook in Russell, 2001).

Množenje plazmidov z vstavljenimi genskimi konstrukti je potekalo v sevu DH5α. Po inkubaciji preko noči pri 37 °C smo eno kolonijo s sterilnim zobotrebcem precepili v tekoče gojišče LBA in inkubirali preko noči pri 37 °C, 180 rpm/min.

3.3.10 Izolacija plazmida

Izolacijo plazmidne DNA smo izvedli s kitom »GeneJET Plasmid Miniprep kit« (MBI Fermentas, Litva) po navodilih proizvajalca.

3.3.11 Sekvenciranje

Nukleotidno sekvenciranje je izvedlo podjetju Macrogen z začetnim oligonuklotidom, ki se prilega na T7 terminator. Orientacijo dobljenih sekvenc smo popravili s spletnim programom Reverse Complement na spletni strani Bioinformatics (Stothard, 2000). Sekvencirana nukleotidna zaporedja smo primerjali in pregledali zaradi morebitnih mutacij z naleganjem z algoritmom Clustal X v programu MEGA. Pri analizi posameznih zaporedij smo preverili prisotnost in ustreznost elementov T7 promotorja, ribosomalnega vezavnega mesta, začetnega kodona, nukleotidnega zaporedja za domeno TolAIII, za parborlizin in histidinski rep ter prepoznavnega zaporedja za restriktivske encime.

3.3.12 Transformacija v seve BL21(DE3), Rosetta-gami B in MinC

Transformacija pri sevih BL21(DE3) in Rosetta-gami B je potekala po enakem postopku kot v primeru DH5α. Transformirane celice smo razmazali na plošče LBAC in jih inkubirali preko noči pri 37 °C. Po prekonočni inkubaciji smo s sterilnim zobotrebcem prenesli eno kolonijo v 10 mL tekočega gojišča LBAC.

Transformacijo celic seva *E. coli* MinC smo izvedli s komercialnim kitom »Transformaid Bacterial Kit« (MBI Fermentas, Litva) po navodilih proizvajalca. Plošče LBA s transformirano kulturo smo inkubirali preko noči pri 37 °C.

3.3.13 Sprožitev sinteze parborlizina

K 500 mL tekočega gojišča LB z ampicilinom (1,1 µg/mL) smo dodali 10 mL prekonočne kulture. Kulturo smo gojili pri 37 °C in stresanju 180 rpm/min do začetka eksponentne faze rasti, OD₆₀₀ = 0,4, nakar smo sprožili prepis gena za različico parborlizina z dodatkom 0,8 mM IPTG. Producija proteina je potekala 3 ure v enakih razmerah kakor predhodna inkubacija, nato smo bakterijsko kulturo centrifugirali 15 min pri 4400 rpm/min in 4 °C, jo resuspendirali v 5 mL fiziološke raztopine in zamrznili v tekočem dušiku pri -80 °C. Pred in po indukciji smo odvzeli del z volumnom, ki je ustrezal koncentraciji celic OD₆₀₀ = 0,6 ter z NaDS-PAGE elektroforezo analizirali sprožitev sinteze rekombinantnega proteina.

Za preučitev vpliva temperature na izražanje in sintezo rekombinantnega parborlizina smo v sevu Rosetta-gami B s plazmidom, ki ima zapisan gen za proteinski konstrukt PARXTH ali HTPARX bakterijski kulturi, gojili pri 20 °C ali 37 °C. Analiza produkcije rekombinantnega proteina je potekala, kot je opisano zgoraj. Pri preučevanju vpliva izraženega produkta na celično viabilnost smo pri dveh kulturah Rosetta-gami B sprožili izražanje gena za rekombinantni protein, pri tretji pa ne. V eno izmed sproženih kultur smo pred in ob sprožitvi dodali 1 % glukoze (m/V). Pri preučevanju vpliva plazmidnega vektorja na viabilnost celic med izražanjem gena za izotoksin P1 smo štiri kulture Rosetta-

gami B z različnimi konstrukti gojili do $OD_{600} = 0,4$, nato pa smo sprožili izražanje, ki je nato potekalo vsaj 1 uro in 30 min.

Sprožitev in izražanje gena za rekombinantni protein pri kulturi MinC je potekalo podobno kakor pri drugih sevih, vendar brez gojenja bakterijske kulture do $OD_{600} = 0,4$. Namesto tega smo iz vseh plošč LBAC postrgali zrasle kolonije in jih resuspendirali v 500 mL tekočem gojišču LBA. Izražanje gena za rekombinantni protein smo sprožili z 0,8 mM IPTG. Izražanje je potekalo 2 uri. Vsi nadaljnji koraki so potekali kot navedeno zgoraj.

Za nanos na NaDS-PAGE elektroforezo smo celični pelet iz volumna tekoče kulture, ki je ustrezal $OD_{600} = 0,6$, resuspendirali v 200 μL PBS z dodanim PMSF (1 mM) in lizocimom (0,2 mg/mL) ter inkubirali 10 min na ledu. Celice smo razbili s pomočjo obdelave z ultrazvokom v 30 s v sonikatorju na ledu. Topno frakcijo proteinov smo od preostanka celic ločili s 5 min centrifugiranjem pri 13000 rpm/min in 4 °C. V peletu je po centrifugiraju ostala netopna frakcija, v kateri so bila inkluzijska telesca, v supernatantu pa je bila frakcija s topnimi proteinimi.

3.3.14 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata

Za analizo vzorcev celičnega lizata in dobljenega rekombinantnega proteina smo pripravili 15 % poliakrilamidni gel. Nosilni gel smo pripravili s 60 μL 10 % NaDS, 1,125 mL 3M Tris, 3,981 mL dH₂O, 3,375 mL akrilamida, 450 μL 1,5 % APS in 9 μL TEMED. Nanašalni gel smo pripravili s 50 μL 10 % SDS, 1,25 mL 0,5M Tris, 2,945 mL dH₂O, 0,5 mL akrilamida, 250 μL 1,5 % APS in 5 μL TEMED. Uporabljali smo 3,3 μL proteinske lestvice »PageRuler Prestained Protein ladder« (ThermoScientific, ZDA) in nanesli po 20 μL vzorca na gel, v enkratnem nanašalnem pufru in do 1 mM DTT. Vzorce smo pred nanosom segreli za 5 min na 100 °C in jih 5 min centrifugirali pri 13000 rpm/min. Elektroforeza je potekala pri 160 V za 1 uro. Po elektroforezi smo gel trikrat po 5 min namakali v destilirani vodi. Sledilo je barvanje gelčka v predhodno segreti Comassie raztopini za barvanje, gele smo razbarvali v predhodno segreti raztopini za razbarvanje.

3.3.15 Izolacija rekombinantnega parborlizina z nikelj-afinitetno kromatografijo v nativnih razmerah

Pri izolaciji rekombinantnega proteina v nativnih razmerah smo uporabljali komercialni kit »Ni-NTA purification kit« (MBI Fermentas, Litva). Celični pelet pripravljen iz 5 mL bakterijske kulture smo resuspendirali v 630 µL NPI-10, dodali 70 µL lizocima in 3 enote/mL benzonaze (1,4 µL RNAze). Zmes smo inkubirali na ledu 15-30 min, 15-30 min centrifugirali pri 4 °C, 12000 g/min. 600 µL supernatanta smo prenesli na Ni-NTA kolono sprano s pufrom NPI-10 in 5 min centrifugirali pri 890x g/min. Nespecifično vezane proteine smo dvakrat sprali s kolone s 600 µL pufra NPI-20 (890x g/min, 2 min). Proteine smo eluirali s 300 µL pufra NPI-500 (890x g/min, 2 min). Vse frakcije smo shranili za analizo na NaDS-PAGE pri -20 °C.

3.3.16 Razbitje celic in spiranje inkluzijskih teles

Zamrznjeni celični pelet (iz 500 mL kulture) smo odtalili, resuspendirali v 1 mL pufra za spiranje celic z dodanim PMSF do končne koncentracije 1 mM in lizocimom do 0,2 mg/mL ter inkubirali 10 min na ledu. Celice smo razbili s soniciranjem na ledu z 20-sekundnimi pulzi (3 min aktivnega časa). Vsak vzorec smo sonicirali trikrat. Homogenat smo centrifugirali 5 min, 13000 rpm/min, 4 °C. V peletu je po centrifugiranju ostala netopna frakcija, v kateri so bila inkluzijska telesca, v supernatantu pa frakcija s topnimi proteinimi.

Izolirana inkluzijska telesca smo resuspendirali v pufru za spiranje IB (5 mL/g celične suhe mase) in centrifugirali 20 min pri 15500 rpm/min in 4 °C. Usedlino smo resuspendirali v pufru za spiranje IB in inkluzijska telesca sonicirali v skupnem trajanju 3 min. Centrifugiranje smo ponovili še dvakrat, vsakič smo vzorce premešali na vrtinčniku.

3.3.17 Izolacija rekombinantnega parborlizina z nikelj-afinitetno kromatografijo v denaturirajočih razmerah

Vzorce z inkluzijskimi telesci smo resuspendirali v 5 mL pufra za razvijanje IB. Sledilo je mešanje pri 4 °C do bistrosti raztopine in 20 min centrifugiranje pri 26200 rpm/min, 4 °C. Po centrifugiranju smo supernatantu dodali 1 mL s pufrom za lizo predhodno očiščenih agaroznih zrnčic in še eno uro nadaljevali z mešanjem pri 4 °C. Agarozna zrnca vsebujejo kelator nitrilotriocetno kislino, ki veže nikljeve ione, na katere se veže heksahistidinski rep. Supernatant z agaroznimi zrnčicami smo nanesli na kromatografsko kolono in hitrost pretoka naravnali na 2 mL/min. Čez kolono smo spustili 10 mL pufra za spiranje, nato še 2,5 mL pufra za elucijo in frakcije shranili pri -20 °C.

3.3.18 Dializa rekombinantnih proteinov

Po izolaciji z Ni-NTA smo rekombinantnim proteinom zamenjali pufer za dializo. Uporabili smo dializne vrečke (Spectrum Labs, ZDA), ki prepuščajo molekule z molekulsko maso od 6 do 8 kDa in dializo izvedli v pufru za zvijanje. Dializni pufer smo menjali tri dni na vsakih 24 h. Po končani dializi smo preverili koncentracijo proteina z aparaturom NanoDrop 1000.

3.3.19 Koncentriranje rekombinantnega parborlizina

Zaradi nizke koncentracije očiščenega parborlizina smo pred testiranjem hemolitične in protibaterijske aktivnosti rekombinantnega parborlizina protein koncentrirali z obarjanjem proteinov v 10 % TCA za 10 min na ledu. Sledilo je centrifugiranje. Po centrifugiranju (15 min, 14000 rpm/min, 4 °C) smo odstranili supernatant in pelet sprali v 300 µL ledenega acetona, ponovno centrifugirali in pelet posušili pri 37 °C.

3.3.20 Določitev N-terminalnega zaporedja očiščenega parborlizina

Po ločitvi očiščenega rekombinantnega parborlizina z NaDS-PAGE smo proteine prenesli na membrano PVDF: membrano smo 15 s aktivirali v metanolu, nato 2 min v MilliQ in na koncu 5 min v pufru WB (Western blot). Gel smo sprali z prečiščeno vodo MilliQ in ga

takoj namestili na membrano. Gel in membrano smo zaščitili s filtrnim papirjem in blazinico, ter preverili, da med sloji niso bili ujeti zračni mehurčki, kar bi otežilo prenos proteinov iz gela na membrano ter jih namestili v plastično kaseto. Kaseto smo potopili v pufru WB v posodi za Western Blot in pričeli prenos proteinov. Prenos je potekal 90 min pri 150 mA.

Po končanem prenosu smo kaseto razstavili in membrano barvali 1 min v raztopini za vizualizacijo proteinskih lis na PVDF membrani in nato razbarvali 8 min v raztopini za razbarvanje proteinskih lis na PVDF membrani.

Proteinske lise smo iz membrane PVDF izrezali s sterilnim skalpelom in jih do nadaljne uporabe hranili pri -4 °C. N-terminalno sekvenciranje proteinov so izvedli na Inštitutu Jožef Stefan, s pomočjo osebja iz raziskovalne skupine prof. Igorja Križaja.

3.3.21 Analiza hemolitične aktivnosti parborlizina

Hemolitično aktivnost smo preučevali turbidimetrično s sledenjem lize govejih eritrocitov. Goveje eritrocite smo dvakrat sprali s fiziološko raztopino z vmesnim centrifugiranjem (5 min, 2500 rpm/min) in spiranjem v eritrocitnem pufru. V mikrotitrski plošči smo 100 µL govejim eritrocitom ($OD_{600} = 0,5$) dodali 50 µL eritrocitnega pufra in 50 µL očiščenega in s trombinom rezanega ali nerezanega parborlizina. Spremembo optične gostote smo spremljali pri valovni dolžini 630 nm v 30 s intervalih, s programom Revelation.

Hemolitično aktivnost bakterijskih kultur smo preučevali ob spremjanju lize eritrocitov ob rasti bakterij na krvnem agarju ali ob kapanju grobega celičnega ekstrakta pridobljenega z lizocimom in soniciranjem na krvni agar. Plošče s krvnim agarjem smo inkubirali preko noči pri 37 °C.

3.3.22 Protibakterijska aktivnost očiščenega parborlizina

Protibakterijsko aktivnost izoliranega parborlizina smo testirali s kapanjem na trdno gojišče, prelitem z mehkim agarjem (4 mL) in inokuliranim z indikatorsko bakterijsko

kulturo ($40 \mu\text{L}$). Na indikatorsko kulturo smo nakapali očiščeno, s trombinom rezano ali nerezano, različico parborlizina. Kot indikatorsko kulturo smo uporabili bakterijske seve *E. coli* Rosetta-gami B, *B. subtilis* 168, *V. ruber* DSM14379 in *S. aureus* ATCC 29213. Bakterijsko kulturo *E. coli*, *B. subtilis* in *S. aureus* smo pripravili v gojišču LB (37°C , 180 rpm/min, preko noči), kulturo *V. ruber* pa v pepton-kvasnem gojišču (28°C , 180 rpm/min, preko noči). Nakapljali smo $5 \mu\text{L}$ izoliranega proteina, kot negativno kontrolo smo uporabljali kombinacijo $4,5 \mu\text{L}$ pufra za zvijanje in $0,5 \mu\text{L}$ trombina, kot pozitivno kontrolo pa $2 \mu\text{L}$ antibiotikov ampicilina v koncentraciji $100 \mu\text{g/mL}$, tetraciklina v koncentraciji $10 \mu\text{g/mL}$ in ciprofloksacina v koncentraciji $10 \mu\text{g/mL}$.

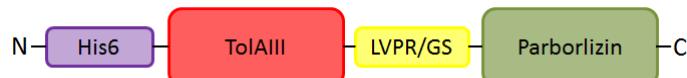
4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 POIMENOVANJE PROTEINOV

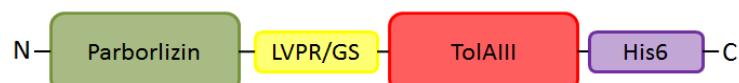
Konstrukte proteinov smo glede na njihovo prisotnost na N- ali C-terminalnem koncu proteina uniformno povsod v tekstu imenovali levo ali desno od oznake PAR. Oznaka: »PARX« – parborlizin izoblika x, »H« – heksahistidinski repek, »T« – domena TolAIII, »GS« – aminokislinska ostanka prikazana v enočrkovnem kodu po cepitvi s trombinom, »LVPR« – aminokislinski ostanki po cepljenju s trombinom. Trombin reže med argininom in glicinom, zaradi česar ostaneta v primeru HTPARX aminokislini glicin in serin na N-terminalnem koncu parborlizina, v primeru PARXTH pa aminokisline levcin, valin, prolin in arginin na C-terminalnem koncu parborlizina, kar bi lahko vplivalo na njegovo aktivnost. Dobavljeni rekombinantni proteini so shematsko prikazani na slikah 10-12.



Slika 10: Prikaz rekombinantnega proteina izoblike parborlizina s His6 na C-terminalnem koncu. Izhodni plazmidni vektor za izražanje tega konstrukta je plazmid pET-21c. Plazmidni konstrukt z genom za parborlizin smo poimenovali PARXH, kjer je X 1, 2 ali 3, odvisno od gena za izotoksin v konstraktu



Slika 11: Prikaz izoblike parborlizina s His6 in domeno TolAIII ter mestom za endopeptidazo trombin (LVPR/GS) na N-terminalnem koncu. Izhodni vektor za izražanje tega konstrukta je plazmid pToLT. Plazmidni konstrukt z genom za parborlizin smo poimenovali HTPARX, kjer je X 1, 2 ali 3, odvisno od gena za izotoksin v konstraktu



Slika 12: Prikaz izoblike parborlizina s His6 in domeno TolAIII ter mestom za proteazo trombin (LVPR/GS) na C-terminalnem koncu. Izhodni vektor za izražanje tega konstrukta je pET-21c. Plazmidni konstrukt z genom za parborlizin smo poimenovali PARXTH, kjer je X 1, 2 ali 3, odvisno od gena za izotoksin v konstraktu

4.2 BIOINFORMATSKA ANALIZA LASTNOSTI PARBORLIZINOV

Redki kodoni v kodirajočih zaporedjih nekaterih proteinov evkariontskega izvora so pogost vzrok za neučinkovito izražanje heterolognega gena, napačno zvitje proteina in včasih za zaustavitev celične rasti (Greene, 2004). Sev *E. coli* Rosetta-gami B je primeren za izražanje heterolognih genov z redkimi kodoni, saj vsebuje plazmid pRARE, na katerem najdemo genske zapise za različne molekule tRNA, ki ustrezajo šestim redkim kodonom (AGG, AGA, AUA, CUA, CCC in GGA) (Novagen, 2004). Preučili smo prisotnost redkih kodonov pri genih za tri izbrane izooblike parborlizina, glede na redke kodone v *E. coli*, in ugotovili, da je v zapisu testiranih zaporedij 20-23 % redkih kodonov (Priloga A). Za sintezo proteina je pomembno, kolikokrat se isti kodon v nukleotidnem zaporedju pojavi in ali je prisotno večje število zaporednih redkih kodonov. Več zaporednih redkih kodonov sicer najdemo pri vseh treh različicah, vendar niso daljši kot dva kodona, razen pri P2, kjer najdemo zaporedje treh kodonov. Plazmid pRARE ima zapis le za štiri različne molekule tRNA, ki ustrezajo štirim različnim redkim kodonom od štirinajstih prisotnih v treh preučevanih genih (priloga A).

Predvideli smo teoretično izoelektrično točko izooblik parborlizina in njihovih proteinskih konstruktov (Preglednica 5). Menimo, da spojitev parborlizina z domeno TolAIII znatno ne vpliva na izoelektrično točko, ki je za nativno obliko parborlizina okrog vrednosti 10. Teoretična topnost vodi je v vseh primerih 100 %, razen pri konstraktu PAR1H. V omenjenem primeru je topnost le 34,9 %, kar bi lahko razložili z visoko vsebnostjo aminokislin s hidrofobno stransko verigo kot so alanin, izolevcin in levcin in s hkratno prisotnostjo heksahistidinskega repa, potrebno pa je poudariti, da je program za izračun teoretične topnosti bolj primeren za nativne proteine kakor za rekombinantne proteinske konstrukte (Diaz in sod., 2009).

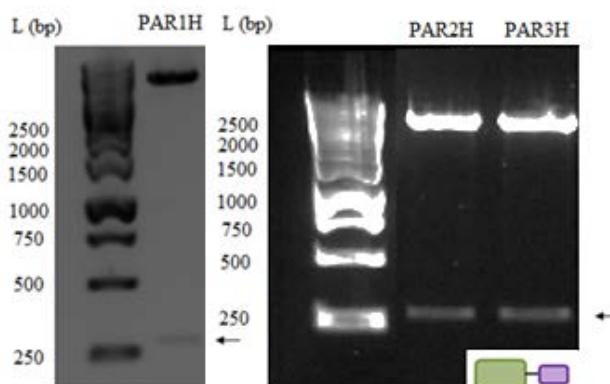
Preglednica 5: Število aminokislin, molekulska masa in teoretični lastnosti različic parborlizina

Oznaka konstrukta	Število AK	pI	Mw (kDa)	Teoretična topnost (%)
Parborlizin P1	93	10,32	10,07509	100,0
Parborlizin P2	93	10,20	9,69839	100,0
Parborlizin P3	93	10,15	9,63836	100,0
PAR1H	102	10,22	11,27140	34,9
PAR2H	102	10,10	10,89471	100,0
PAR3H	102	10,05	10,83467	100,0
HTPAR1	204	9,93	21,67931	100,0
GS-PAR1	95	10,32	10,21922	100,0
HTPAR2	205	9,82	21,43178	100,0
GS-PAR2	95	10,25	9,85659	100,0
HTPAR3	205	9,77	21,35767	100,0
GS-PAR3	95	10,15	9,78249	100,0
PAR1TH	203	9,78	21,84656	100,0
PAR1-LELVPR	100	10,32	10,91415	100,0
PAR2TH	203	9,71	21,48394	100,0
PAR2-LELVPR	100	10,24	10,55153	100,0
PAR3TH	203	9,66	21,40983	100,0
PAR3-LELVPR	100	10,15	10,47742	100,0

4.3 PRIPRAVA GENSKIH KONSTRUKTOV

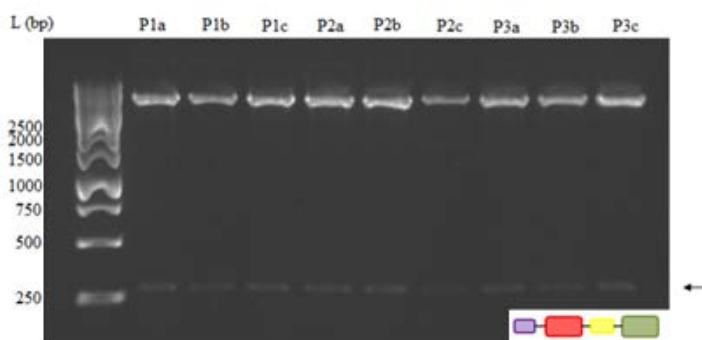
4.3.1 Genski konstrukti PARXH, HTPARX in PARXTH

Sintetična nukleotidna zaporedja, ki ustrezajo genom za izotoksine P1, P2 in P3, smo po verižni reakciji s polimerazo in restrikciji ligirali v ustrezni plazmidni vektor in z ligacijsko mešanico transformirali v celice seva DH5 α . Klone plazmidov smo izolirali in jih analizirali z restriktijsko analizo ter ustreznost velikosti preverili z elektroforezo na agaroznem gelu. Iz Slike 13 je razvidna ustreznost genskih vključkov v vektor pET21c za sintezo proteinov PARXH, po restrikciji izpade DNA fragment velikosti 285 bp.



Slika 13: Analiza velikosti rekombinantnih genov PAR1H, PAR2H in PAR3H v plazmidu pET21c z gelsko elektroforezo po izolaciji plazmida in rezanju z restriktijskima encimoma *Xba*I in *Nde*I. Pri vseh prikazanih fragmentih so vse lise ustrezne velikosti, kar ustreza velikosti gena za parborlizin brez zapisa za heksahistidinski rep, ki ostane v plazmidu po restrikciji. Puščici označujejo velikost 288 bp. V desnem kotu spodaj je shematski prikaz različice rekombinantnega proteina, prikazane v poglavju 4.1

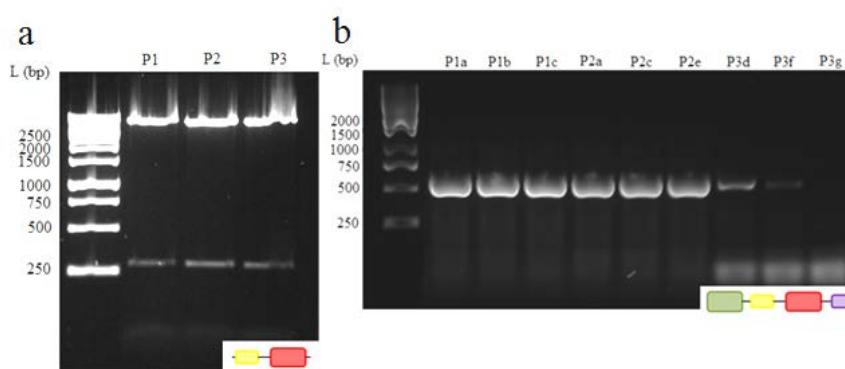
V plazmidni vektor pTolT smo prav tako uspešno klonirali zaporedja za parborlizin. Slika 14 prikazuje ustrezno velik DNA fragment po rezanju iz plazmida pTolT z vključkom gena za izbrani parborlizin, po restrikciji izпадa DNA fragment velikosti 288 bp.



Slika 14: Analiza velikosti vključkov HTPAR1 (P1a-c), HTPAR2 (P2a-c) in HTPAR3 (P3a-c) vključenih v pTolT po rezanju z restriktijskima encimoma *Bam*HI in *Mlu*I. Izrezana DNA je v velikosti gena za parborlizin brez heksahistidinskega repa, zaporedja za domeno TolAIII in cepitvenega mesta za trombin, ki ostanejo v plazmidu po restrikciji. Puščica označuje 288 bp. V desnem kotu spodaj je shematski prikaz različice rekombinantnega proteina, prikazane kot je navedeno v poglavju 4.1

Pripravili smo tudi plazmidne konstrukte za sintezo proteinov PAR1TH, PAR2TH in PAR3TH, saj smo želeli preveriti, ali obstaja razlika v aktivnosti parborlizina v primerih, ko sta N- ali C-terminalni konec parborlizina prosta. Raziskave so pokazale, da imata parborlizin in Cl-A-III mnoge strukturne in biološke lastnosti, ki jih povezujejo s

podobnostmi v N-terminalnem zaporedju (Berne in sod., 2003), zato smo predpostavili, da bomo pri PARXH in PARXTH, pri katerih je N-terminalni konec prost, opazili največjo biološko aktivnost. Z verižno reakcijo s polimerazo smo pomnožili nukleotidno zaporedje za regijo TolAIII in jo vstavili za gen za parborlizin v plazmidu za sintezo PARXH. Iz Slike 15a je razvidno, da po rezanju z *Xba*I izpade gen za TolAIII, fragment velikosti 303 bp. Gena za domeno TolAIII in za parborlizin sta podobnih velikosti, posledično smo pričakovali, da bo izražen izotoksin PARXH približno dvakrat večji kakor nativna oblika parborlizina (Slika 15b).



Slika 15: Analiza konstruktorjev PARXTH. (a) Restriktijska analiza z *Xba*I, pri kateri iz plazmida izpade vključek *tolAIII* v velikosti 303 bp. P1, P2, P3 označuje izobliko parborlizina. (b) Rezultati verižne reakcije s polimerazo na osnovi kolonije za seve s plazmidom za sintezo konstrukta PARXTH. Ustrezna velikost pravilno sestavljenega genskega konstrukta je 588 bp. Oznake nad gelom označujejo izobliko (PX) in z malim črkami delavno označujejo plazmid. V desnem kotu spodaj je shematski prikaz različice rekombinantnega proteina, prikazane kot je navedeno v poglavju 4.1

Ker smo nukleotidno zaporedje za TolAIII vključili v plazmid s pomočjo enega restriktijskega encima, smo morali biti pazljivi na orientacijo vključka. Zato smo izvedli kolonijsko verižno reakcijo s polimerazo z uporabo začetnih oligonukleotidov P1UPHN oz. P3UPHN in TOLDOWN, saj bi nam ta kombinacija dala dvovijačne pomnožke samo v primeru, ko TOLDOWN nalega na tarčno sekvenco, tako da pomnoževanje poteka v smeri proti P1UPHN oz. P3UPHN. S Slike 15b je razvidno, da nam je uspelo ustvariti konstrukt PARXTH.

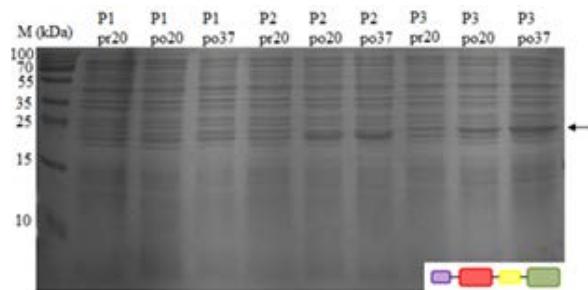
Z določitvijo nukleotidnih zaporedij smo potrdili ustreznost genskih konstruktorjev. Nukleotidna zaporedja z označenimi regijami, ki smo jih uporabljali v našem delu, so navedena v Prilogi B.

4.4 SPROŽITEV IN IZRAŽANJE REKOMBINATNIH PARBORLIZINOV

4.4.1 Toplotna odvisnost izražanja genov za PARXTH in HTPARX in odvisnost njihove sinteze

Nastanek inkluzijskih telesc je pogosto posledica nagle sinteze heterolognega proteina, predvsem pri proteinih, kjer je potranslacijsko zvijanje počasno. Zaradi tega se napačno zviti proteini kopičijo v netopnih agregatih, iz katerih je težavno in zamudno izolirati funkcionalne proteine. Po drugi strani je tvorba inkluzijskih telesc zaželena v primerih, kjer je produkt toksičen za celico ali kjer znotrajcelični proteoliski mehanizmi hitro razgradijo nastali produkt (Palomares in sod., 2004). Prehitro sintezo heterolognega proteina je mogoče preprečiti s številnimi pristopi, med katerimi sta najpogosteje uporabljeni nizka temperatura med izražanjem in nizka koncentracija snovi, ki sproži prepis gena. Preverili smo nivo sinteze rekombinantnega parborlizina pri 20 °C in 37 °C.

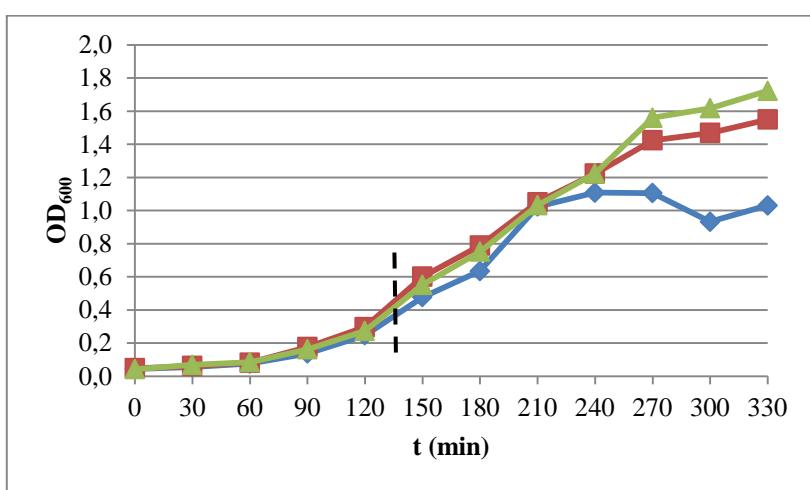
Analiza proteinov v grobih celičnih lizatih bakterijskih kultur, gojenih pri dveh temperaturah, nakazuje na malenkost zvečano sintezo parborlizina HTPARX pri 37 °C v primerjavi s sintezo pri 20 °C. Najnižjo produkcijo smo ugotovili pri konstraktu za sintezo parborlizina izoblike 1. Glede hitrosti rasti bakterij pri uporabljenih temperaturah smo se odločili, da kulture gojimo pri 37 °C.



Slika 16: NaDS-PAGE analiza proteinskih profilov v grobih celičnih ekstraktih kultur gojenih pri 20 °C ali 37 °C. »P1«, »P2« in »P3« so oznake treh različnih izoblik parborlizina, »pr« pomeni, da je bil vzorec odvzet pred indukcijo, »po« da je bil odvzet ob koncu 3h izražanja, »20« da je bila temperatura med izražanjem 20 °C in »37« da je bila 37 °C. Prikazan je lizat celic za sintezo proteinov HTPARX velikih ~21,4 kDa, kar označuje puščica. V desnem kotu spodaj je shematski prikaz različice rekombinantnega proteina, prikazane kot je navedeno v poglavju 4.1

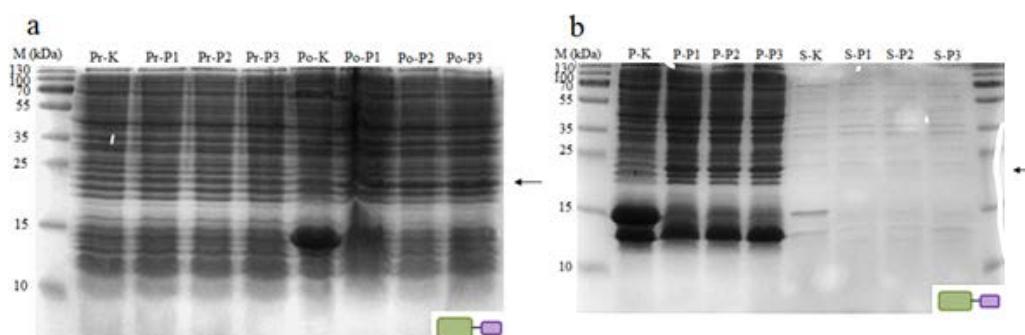
4.4.2 Sinteza proteinskega konstrukta PARXH

Plazmid za sintezo ene od treh testiranih izooblik rekombinantnega proteina PARXH smo transformirali v sev *E. coli* Rosetta-gami B in analizirali rast po sprožitvi izražanja toksina pri 37 °C. Vzorce smo odvzeli tik pred in 3 h po sproženi sintezi izbranega parborlizina. Približno 2 h po indukciji smo glede na OD₆₀₀ opazili zaustavitev bakterijske rasti pri celicah z zapisom za PAR1H, kar se pri drugih dveh kulturah ni zgodilo (Slika 17). Dobljeni rezultat nakazuje na aktiven PAR1H.



Slika 17: Reprezentativna rastna krivulja za sev *E. coli* Rosetta-gami B s plazmidom z genom za PARXH. Prekonočna rast, sprožitev in izražanje je potekalo pri 37 °C in 180 rpm. Sprožitev izražanja smo izvedli z doddakom IPTG-a v končni koncentraciji 0,8 mM, ko je kultura dosegla optično gostoto 0,4 (označeno s prekinjeno črto) pri valovni dolžini 600 nm. Kultura z zapisom za PAR1H je označena kot modri karo, PAR2H kot rdeči kvadrati, PAR3H kot zeleni trikotniki

V nadaljevanju smo analizirali prisotnost rekombinantnega proteina v celičnem lizatu pred in 3 h po indukciji z IPTG (Slika 18a). Ugotovili smo, da se prekomerno izrazi protein velikosti približno 23 kDa, kar je skoraj dvakrat več kot pričakovana velikost, saj je PARXH velik 10,83 do 11,27 kDa (Preglednica 5). Preverili smo, da smo klonirali pravi vključek v plazmid pET21c in transformirali celice *E. coli* Rosetta-gami B z ustreznim plazmidom. Ponovili smo postopke, vendar sta obe biološki ponovitvi potrdili sintezo 23 kDa velikega produkta po indukciji. Predvidevamo, da opazimo homodimer parborlizina, kljub temu, da smo vzorec pred nanosom topotno obdelali in reducirali.

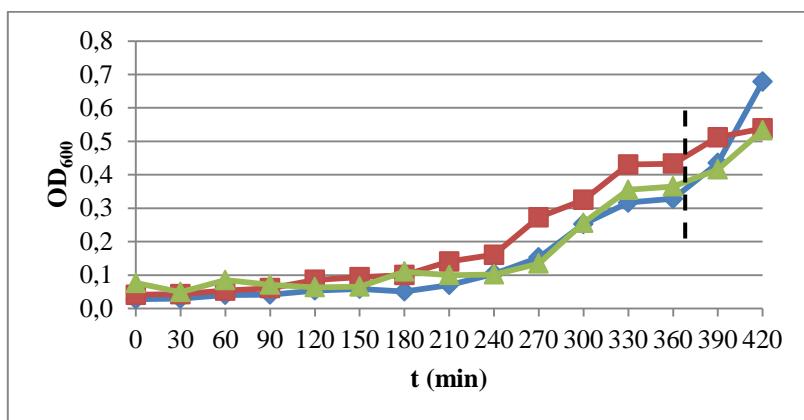


Slika 18: NaDS-PAGE analiza sinteza konstruktov PARXH. P1 – izotoksin P1, P2 – izotoksin P2, P3 – izotoksin P3. Kontrola je sev s plazmidom za prekomerno izražanje glivnega proteina OlyA velikosti 15 kDa. (a) Pred in po sprožitvi z IPTG. Pr – pred indukcijo, Po – po indukciji, K – kontrola. (b) Preučevanje lokacije sintetiziranega proteina v celici. P – pelet, S – supernatant, K – kontrola. Lise z velikosti ~14 kDa predstavljajo lizocim. Puščici označujeta velikost ~22 kDa. V desnem kotu spodaj je shematski prikaz različice rekombinantnega proteina, prikazane kot je navedeno v poglavju 4.1

Po končanem izražanju smo odvzeli vzorce bakterijske kulture in celice razbili z uporabo likocima ter s soniciranjem, da bi ugotovili, ali je sintetizirani protein v topni ali v netopni obliki. Iz slike 18b je razvidno, da konča večina rekombinantnega proteina v netopni frakciji, predvidoma v inkluzijskih telescih.

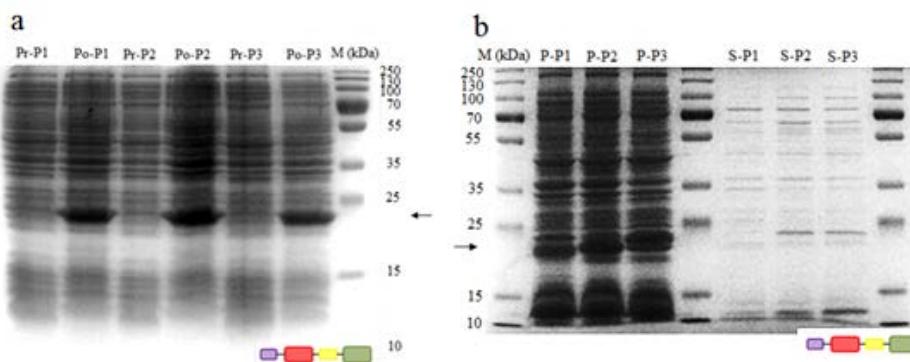
4.4.3 Sinteza proteinskega konstrukta HTPARX

Analizirali smo rast bakterij *E. coli* Rosetta-gami B z genom za HTPARX pred in po sprožitvi prepisa tega gena. Slika 19 prikazuje, da je rast celic do eksponentne faze rasti za seve z genom za konstrukte HTPARX počasnejša kot pri sevih z zapisom za PARXH (Slika 17). Zaradi zelo počasne rasti celic nismo uspeli preučiti vpliva sprožitve prepisa gena oz. sinteze produkta različice PARXH na rast producentskega seva.



Slika 19: Repräsentativna rastna krivulja za sev *E. coli* Rosetta-gami B s plazmidom z genom za HTPARX. Prekonočna rast, sprožitev in izražanje je potekalo pri 37 °C in 180 rpm. Sprožitev izražanja smo izvedli z doddakom IPTG-a v končni koncentraciji 0,8 mM, ko je kultura doseglj optično gostoto 0,4 (označeno s prekinjeno črto) pri valovni dolžini 600 nm. Kultura z zapisom za HTPAR1 je označena kot modri karo, HTPAR2 kot rdeči kvadrati, HTPAR3 kot zeleni trikotniki

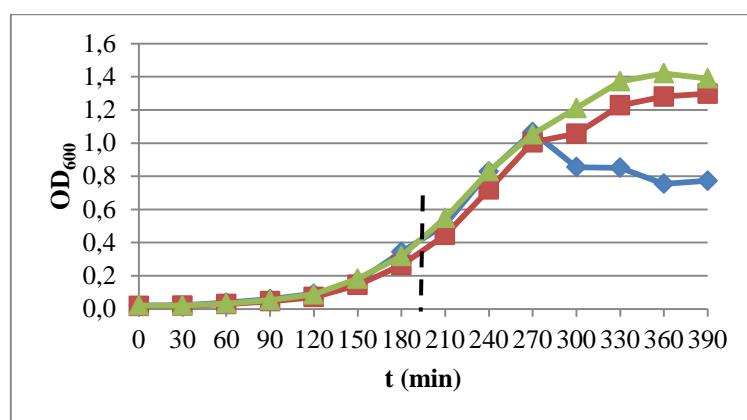
Glede na druge celične proteine je bila produkcija rekombinantnega proteina HTPARX (Slika 20a) večja v primerjavi s PARXH, saj 3 h po indukciji opazimo nastanek intenzivnih lis v velikosti okoli 22,5 kDa (Slika 18a). Kljub temu, da proteinski konstrukti HTPARX vsebujejo domeno TolAIII, ki naj bi povečala topnost proteina, so konstrukti takega parborlizina tako kot PARXH v netopni frakciji (Slika 20b).



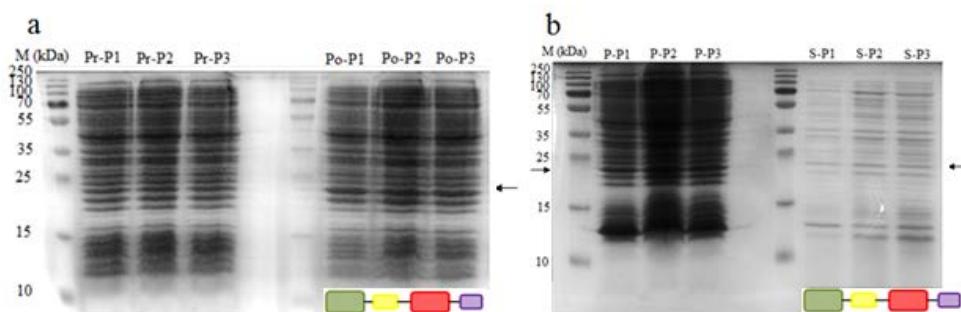
Slika 20: NaDS-PAGE analiza sinteze konstruktorjev HTPARX. P1 – izotoksin P1, P2 – izotoksin P2, P3 – izotoksin P3. (a) Pred in po indukciji z IPTG. Pr – pred indukcijo, Po – po indukciji. (b) Preučevanje lokacije sintetiziranega proteina v celici. P – pelet, S – supernatant. Lise z velikostjo ~14 kDa predstavljajo lizocim. Puščici označujeta velikost ~22,5 kDa. V desnem kotu spodaj je shematski prikaz različice rekombinantnega proteina, prikazane kot je navedeno v poglavju 4.1

4.4.4 Sinteza proteinskega konstrukta PARXTH

Motena rast kmalu po sprožitvi izražanja pri kulturi, ki je vsebovala konstrukt z genom za izotoksin P1, se je pojavila tudi ko smo toksin sintetizirali kot proteinski konstrukt PAR1TH. Potek rasti (Slika 21) je podoben rasti kulture z vključkom PARXH (Slika 17) in nakazuje na bakteriostatičen oz. bakteriociden vpliv parborlizina 1 na rast producentske celice. Na sliki 22 je razvidno, da do sinteze rekombinantnega proteina pride po sprožitvi izražanja in da večinoma konča v netopni frakciji.



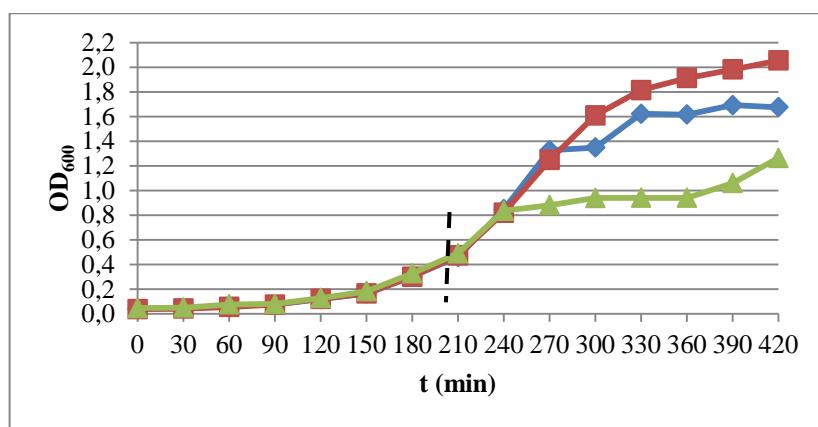
Slika 21: Reprezentativna rastna krivulja za sev *E. coli* Rosetta-gami B s plazmidom z genom za PARXTH. Prekonočna rast, sprožitev in izražanje je potekalo pri 37 °C in 180 rpm. Sprožitev izražanja smo izvedli z dottakom IPTG-a v končni koncentraciji 0,8 mM, ko je kultura dosegla optično gostoto 0,4 (označeno s prekinjeno črto) pri valovni dolžini 600 nm. Kultura z zapisom za PAR1TH je označena kot modri karo, PAR2TH kot rdeči kvadrati, PAR3TH kot zeleni trikotniki



Slika 22: NaDS-PAGE analiza sinteza konstruktorjev PARXTH. P1 – izotoksin P1, P2 – izotoksin P2, P3 – izotoksin P. (a) Pred in po indukcijo z IPTG. Pr – pred indukcijo, Po – 3h po indukciji. (b) Preučevanje lokacije sintetiziranega proteina v celici. P – pelet, S – supernatant, P1 – izotoksin P1, P2 – izotoksin P2, P3 – izotoksin P3. Lise z velikostjo ~14 kDa predstavljajo lizocim. Puščice označujejo velikost ~22,5 kDa. V desnem kotu spodaj je shematski prikaz različice rekombinantnega proteina, prikazane kot je navedeno v poglavju 4.1

4.4.5 Proučevanje vpliva izražanja gena za PAR1TH na rast celic

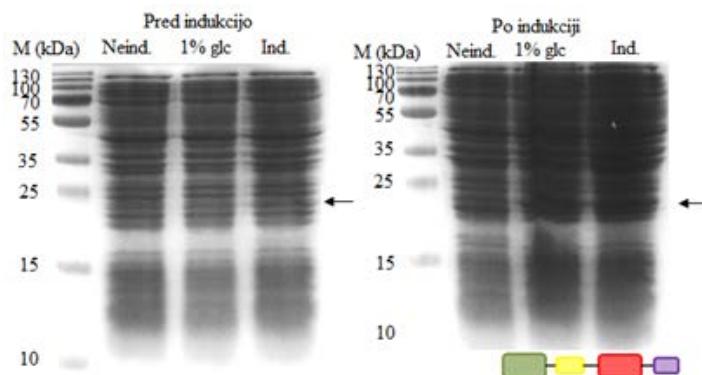
Pri izobliki P1 smo opazili vpliv na rast producentske kulture, kar nakazuje, da sinteza heterolognega proteina vpliva na celično viabilnost. Želeli smo ugotoviti, ali sinteza našega konstrukta res povzroči zaustavitev rasti ali gre le za učinek dodanega IPTG v kombinaciji z izbranim plazmidom. Preverili smo rast bakterijske kulture z zapisom za protein PAR1TH v prisotnosti glukoze, ki ustavi prepis genov prepisanih s T7 RNA polimerazo (Novy in Morris, 2001). Rezultati na Sliki 23 prikazujejo, da se v primerjavi z rastjo bakterijske kulture, ki ni bila izpostavljena IPTG, rast kulture kmalu po dodatku IPTG upočasni, a tega učinka nismo opazili ob sočasnem dodatku IPTG in 1 % glukoze.



Slika 23: Rast seva *E. coli* Rosetta gami B s plazmidom z zapisom za konstrukt PAR1TH. Bakterije so rasle pri 37 °C in ob stresanju pri 180 rpm/min. Rastna krivulja, označena z rdečimi kvadrati, prikazuje rast seva brez indukcije, modra linija s karo simboli rast seva, kateremu smo pri $OD_{600} = 0,4$ dodali IPTG v končni koncentraciji 0,8 M in 1 % glukozo. Rastna krivulja označena z zelenimi trikotniki pa predstavlja rast seva po dodatku le 0,8 M IPTG pri $OD_{600} = 0,4$.

Preverili smo sprožitev sinteze PAR1TH pri bakterijski kulturi *E. coli* Rosetta-gami B s plazmidom z zapisom za ta rekombinantni protein. Vzorce z analizo proteinov smo odvzeli pred ter 3 h po dodatku ali IPTG ali IPTG ter glukoze. Slika 24 prikazuje analizo NaDS-PAGE celičnih lizatov kultur umerjenih na enako vrednost OD_{600} . Sinteze PAR1TH nismo zasledili pri IPTG neizpostavljeni kulturi, zasledili pa smo jo pri obeh kulturah z dodanim IPTG. Predvidevamo, da bakterije že v eni uri po dodatku 1 % glukoze porabijo ta vir ogljika in kot je razvidno tudi iz rastne krivulje (Slika 23, modra krivulja), takrat sprožijo sintezo PAR1TH, kar vpliva na upočasnjeno rast bakterij. Iz tega sklepamo, da bi z

vzorčenjem kulture v krajsih časovnih presledkih lahko potrdili zgoraj navedeno domnevo. Iz rezultatov na Slikah 23 in 24 (zelena krivulja) tudi previdevamo, da ima sinteza PAR1TH prehoden učinek na rast celic *E. coli*, kar traja približno dve uri, potem pa se rast bakterij ponovno pospeši. Sklepamo, da je P1 toksičen za celice in vpliva na celične membrane ter tako povzroči zaustavitev bakterijske rasti ali celo do neke mere lizo z detergentskim delovanjem. To delovanje pa je časovno omejeno bodisi zato ker se bakterije prilagodijo bodisi zaradi visoke koncentracije polipeptida, ki se začne kopčiti v inkluzijskih telescih (Shai in Oren, 1996). Obstaja tudi možnost, da pride do porabe vseh molekul tRNA, ki ustrezajo redkim kodonom v genskem zapisu za izobliko parborlizina 1, zaradi česar se rast bakterijske kulture upočasni (Greene, 2004).

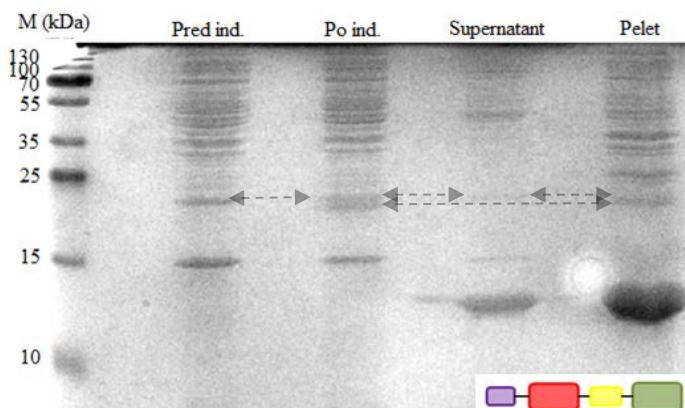


Slika 24: NaDS-PAGE analiza sinteze rekombinantnega proteina PAR1TH. Celični lizat bakterijske kulture pred indukcijo (Neind.), oziroma 3 h po indukciji z 0.8 mM IPTG (Ind.) ali z 0.8 mM IPTG in 1 % glukozo (1% glc). Puščici označujeta velikost proteina PAR1TH, ~22,5 kDa. V desnem kotu spodaj je shematski prikaz različice rekombinantnega proteina, prikazane kot je navedeno v poglavju 4.1

4.4.6 Izražanje konstruktov HTPARX v celicah *E. coli* MinC

Zgornji rezultati nakazujejo (Slike 18, 20, 22), da je med vsemi uporabljenimi konstrukti najmočnejša sinteza proteina HTPARX. Ker heterologno sintetizirana parborlizinska izoblika 1 inhibitorno vpliva na rast celic *E. coli* Rosetta-gami B, smo uporabili drug sev, sev *E. coli* MinC in ga transformirali s plazmidom z genskim konstruktom za HTPAR1. Te celice imajo izbrisani gen *minC*, zato tako ne pride do inhibicije polimerizacije obroča FtsZ, posledično pa pride ob celični delitvi do nekontrolirane septacije. Septacija je značilna predvsem na polarnih koncih celice in pojavi t. i. »minicelic«, ki so majhni vezikli brez

kromosoma (De Boer in sod., 1992). Minicelice so uporabne predvsem pri izražanju proteinov, ki škodljivo vplivajo na producentski organizem in pri proteinih, ki jih hitro razgrajujejo znotrajcelične proteaze. Slike 25 je razvidno, da je prišlo do izražanja rekombinantnega proteina HTPAR1 v MinC celicah in da je protein večinoma v netopni frakciji.



Slika 25: Izražanje genskega konstrukta HTPAR1 v celicah *E. coli* MinC pred in po indukciji z 0,8 mM IPTG ter lokacija izoliranega toksina v topni ali netopni frakciji. Puščice so za lažjo orientacijo, spodnja puščica označuje velikost rekombinantnega proteina. Lisi z velikostjo ~14 kDa predstavljata lizocim. V desnem kotu spodaj je shematski prikaz različice rekombinantnega proteina, prikazane kot je navedeno v poglavju 4.1

4.5 ČIŠČENJE PROTEINA HTPAR1 IN TESTIRANJE NJEGOVE AKTIVNOSTI

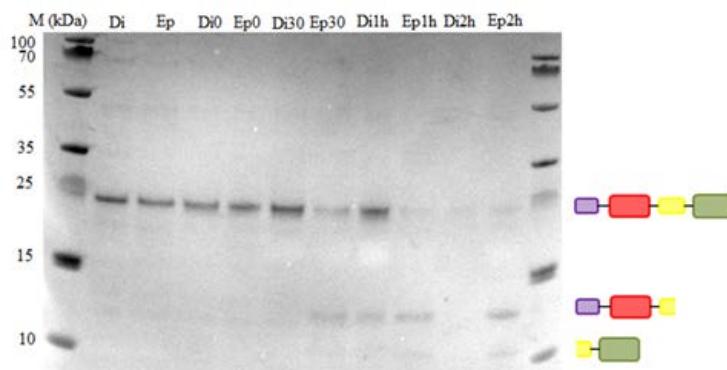
4.5.1 Izolacija proteina HTPAR1

Izolacija parborlizina se je izkazala kot izredno težavna in zamudna. Glede na zgornje rezultate rasti producentskih sevov smo se odločili, da bomo očistili različice parborlizina izoblike 1. Kljub številnim ponovitvam nam je v denaturirajočih razmerah v dovolj veliki količini uspelo izolirati le proteinski konstrukt HTPAR1, sintetiziran v celicah MinC, da smo po renaturaciji z njim lahko izvedli biološke teste. Iz celic Rosetta-gami B nam je sicer uspelo izolirati še PAR1TH, vendar je bila izolirana količina proteina premajhna, da bi lahko z njim nadaljevali raziskave. Problem pri vseh konstruktih je bila slaba topnost proteina, zato jih nismo uspeli izolirati z nikelj-afinitetno kromatografijo. Proteinski konstrukti so po indukciji v inkluzijskih telescih, ki glede na rezultate analize teoretične topnosti rekombinantnega proteina ne nastanejo zaradi nizke topnosti, ampak zaradi hitre

sinteze. Predvidevamo, da sinteza proteina poteka prehitro, kar vodi do nepravilnega zvitja proteina in nastanka inkluzijskih teles (Slika 16). V teh primerih izražanje poteka v razmerah, kjer bi morala biti sinteza zaradi nizke temperature upočasnjena ali kjer je malo časa za sintezo. Vseeno je s slike razvidno, da je količina sintetiziranega proteina pri 20 °C približno enaka kakor pri kulturi, ki je rastla pri 37 °C.

4.5.2 Restrikcija z endopeptidazo trombinom in določitev N-terminalnega aminokislinskega zaporedja

V dokaz, da lise opažene z NaDS-PAGE predstavljajo očiščeni protein HTPAR1, ki vsebuje domeno TolAIII, od parborlizina 1 ločeno z mestom za endopeptidazo trombin, smo protein rezali s trombinom in na poliakrilamidnem gelu preverili cepitev. Ker smo predvideli, da se bo parborlizin hitro lepil na površino po cepitvi od regije TolAIII, smo poskus izvedli v dveh ponovitvah. Rezanje je potekalo v prevlečenih mikrocentrifugirkah in v dializnih vrečkah, saj se na njihovo površino hidrofobni proteini slabo vežejo. Rezanje je potekalo od 30 min do 2 h, nato smo proteine ločili z NaDS-PAGE. Iz slike 26 je razvidno, da se med rezanjem parborlizina sprostijo manjši peptidi in količina proteina z velikostjo 25 kDa sčasoma postaja manjša, medtem ko močnejši postajata lisi velikosti 11 kDa oz. 10 kDa. Lisa, ki potuje kot protein velikosti ~12 kDa najverjetneje predstavlja domeno TolAIII sklopljeno s heksahistidinskim repom, saj je predvidena velikost tega polipeptida 11,46 kDa (Preglednica 5), medtem ko lisa z velikostjo ~10 kDa vsebuje parborlizin 1, saj je velikost le tega 10,22 kDa.



Slika 26: Rezultati restrikcije proteina HTPAR1 s trombinom. Zaradi hidrofobne narave parborlizina smo rekombinantni protein rezali na dializnih vrečkah (»Di«) ter v prevlečenih mikrocentrifugirkah (Ep). Stolca z oznakami »Di« in »Ep« predstavlja nerezan protein, »Di0« in »Ep0« rezan protein takoj po dodatku trombina, »Di30« in »Ep30« 30 min po dodatku, »Di1h« in »Ep1h« eno uro po dodatku, »Di2h« in »Ep2h« pa dve uri po dodatku. Pred nanosom na NaDS-PAGE so bili vzorci izpostavljeni reducentu DTT in inkubirani 3 min pri 95 °C.

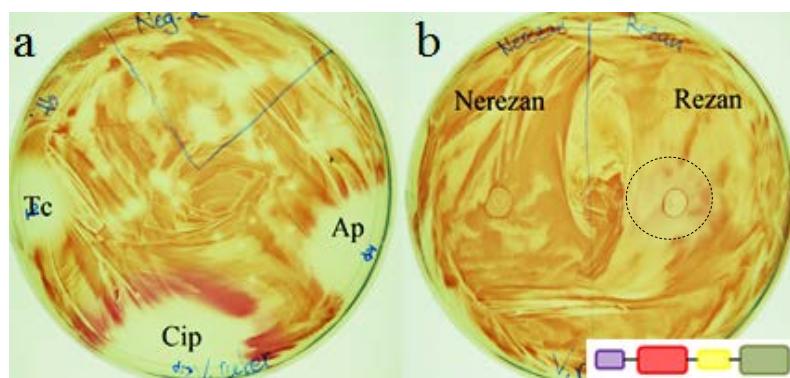
Rezultati cepitve na Sliki 26 prikazujejo, da nam je iz celic seva MinC uspelo izolirati rekombinantni parborlizin. Iz gela smo izrezali lise v velikosti 10 kDa in proteinu poskusili določiti N-terminalno zaporedje. V skupini prof. Igorja Križaja na Inštitutu Jožef Stefan, so na proteinu določili N-terminalno zaporedje AARAPV, ki ga sicer ni v parborlizingu in ostalih regijah rekombinantnega proteina. Rezultati N-terminalnega sekvenciranja so v prilogi C. Očitno je bila količina proteina v vzorcu premajhna ali pa je prišlo do kontaminacije. Z algoritmom BLASTp na spletni strani NCBI smo poskušali določiti identiteto zaporedja AARAPV, kar je dalo kar nekaj rezultatov. Omembne vredne sta 34 aminokislin dolg hipotetični protein X961_5652 iz bakterije *Burkholderia pseudomallei* in 64 aminokislin dolg del hipotetičnega proteina iz *E. coli*.

4.5.3 Biološka aktivnost rekombinantnih parborlizinov

S turbidimetrično metodo na govejih eritrocitih smo testirali hemolitično aktivnost bakterijskih lizatov producentskih sevov za sintezo PARXH, HTPARX ali PARXTH, dodatno pa tudi s kapljicami izoliranih lizatov na krvnem agarju. Pri nobenem od konstruktov nismo dokazali hemolitične aktivnosti. Prav tako ni bil hemolitičen iz celic z delecijo *minC* izoliran protein HTPAR1. Očitno je bilo izoliranega proteina v primeru HTPAR1 premalo za hemolizo ali pa se protein tesno veže na površine laboratorijske

steklovine. Obstaja tudi možnost, da je izolirani protein topen, a neaktivен, ker se v bakterijskih celicah ni zvil v pravilno strukturo. Zgoraj omenjene seve Rosetta-gami B z ustreznimi plazmidnimi konstrukti za sintezo različice rekombinantnega parborlizina smo tudi nacepili na krvna gojišča, a tudi ti sevi niso bili hemolitični.

Z očiščenim proteinom HTPAR1 in izoliranim proteinom PAR1TH smo testirali protibakterijsko delovanje proti bakterijskim vrstam *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* in *V. ruber*. Indikatorske bakterijske seve smo razmazali na trdne agarne plošče in na plošče nakapljali s trombinom rezanim ali nerezanim rekombinantni parborlizin ali le s pufrom, ki je vseboval trombin ali izbrane antibiotike, kar nam je služilo kot negativna in pozitivna kontrola. Na nobeni od agarskih plošč nismo v primerjavi z negativno kontollo opazili znatne cone inhibicije na mestu, kjer smo nakapljali izolirani rekombinantni protein (Slika 27). Ob nanosu antibiotikov (ciprofloksacin in ampicilin), za katere je znano, da pri neletalnih koncentracijah pri bakterijah sprožijo poškodbe DNA in tako imenovani odziv SOS (Miller in sod., 2004), smo nepričakovano opazili intenzivno rdeče pigmentiranje na obrobju cone inhibicije pri bakteriji *V. ruber* (Slika 27a). Znano je, da rdeča barva tej bakteriji daje zaščitni pigment prodigiozin (Starić in sod., 2010; Borić in sod., 2011). Naši rezultati nakazujejo, da je pigment pod kontollo SOS odziva in da se njegova sinteza sproži ob poškodbi DNA. Pri indikatorskem sevu *V. ruber* smo opazili spremembo barve tudi, ko smo nakapljali s trombinom rezani HTPAR1, kar je na Sliki 27b vidno kot območje rožnate barve (omejeno s prekinjenim obročem). Pri konstraktu PAR1TH nismo opazili ne lize bakterijskih celic ne sproščanja prodigiosina.



Slika 27: Rezultati protibakterijskega testa rekombinantnega parborlizina z oznako HTPAR1. Testirali smo tako rezano kot nerezano obliko (b). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili antibiotike ampicilin (Ap), ciprofloksacin (Cip) in tetraciklin (Tc), kot negativno kontrolo pa pufer za zvijanje proteina z dodanim trombinom (a). Prikazani so rezultati protibakterijskega testa pri bakterij *V. ruber*

Parborlizin 1 je v primerjavi z izooblikami 2 in 3 raznolikejši, saj vsebuje 9 aminokislin, ki se razlikujejo od konsenznega zaporedja, medtem ko je pri izooblikah 2 in 3 število aminokislin, ki se razlikujejo od konsenznega zaporedja komaj 2 do 3 (Slika 3). Evkariontski strupi so heterogene mešanice različnih komponent, od katerih ima vsaka komponenta različno specifičnost (King, 2011). Obstaja verjetnost, da je parborlizin 1 bolj specifičen za membrano prokariontov kot izoobliki 2 in 3, zaradi česar ob sintezi rekombinantnega parborlizina 1 pride do bakteriostatičnega vpliva, medtem ko tega pojava ne vidimo pri izooblikah 2 in 3. Nadalje obstaja verjetnost, da se le parborlizin 1 zvije v pravilno strukturo.

Le v primeru, ko smo uporabljali sev MinC z zapisom za proteinski konstrukt za parborlizin 1 smo dobili zadostne koncentracije topnega proteina. Pri ostalih ponovitvah, tudi v primeru parborlizina 1, ki je bil sintetiziran v celicah Rosetta-gami B, nam ni uspelo izolirati proteina v dovolj veliki količini za nadaljnje poskuse. Pri vseh konstruktih smo ugotovili, da je prišlo do prekomernega izražanja parborlizina, vendar nam ga kljub številnim ponovitvam in različnim kombinacijam pufrov ni uspelo izolirati z nikelj-afinitetno kromatografijo. Vemo, da smo v primeru MinC res izolirali parborlizin, saj nam je protein uspelo rezati s trombinom, ne moremo pa vedeti, ali se protein nahaja v aktivni obliki, navzlic temu da rezultati nakazujejo, da ima protein vpliv na fiziologijo bakterije *V. ruber*. Obstaja verjetnost, da se parborlizin v MinC celicah sintetizira, vendar ne v pravilni

konformaciji. V sevu Rosetta-gami B so rekombinantni proteini usmerjeni v periplazmo, kjer je večja verjetnost za pravilno tvorbo disulfidnih vezi, vendar nam rekombinatnih proteinov iz tega seva ni uspelo izolirati. Domnevamo, da je razlika v uspešnosti izolacije odvisna od producentskega seva oz. od nivoja ter lokacije sinteze proteina ter od lastnosti specifične izooblike. Razlog za neuspešno izolacijo rekombinantnega parborlizina iz Rosetta-gami B je lahko ponovno zvijanje po izolaciji iz inkluzijskih teles, ki je empirično in pogosto neučinkovito, saj je izkoristek pogosto nižji kot 10 % (Palomares in sod., 2004).

Izooblika parborlizina 1 je bakteriostatična za rast producentskega seva. Iz seva MinC smo uspeli očistiti protein HTPAR1. Protein ni deloval hemolitično, a rezultati nakazujejo na njegov vpliv na integriteto DNA bakterij *V. ruber*. Hemolitične aktivnosti na eritrocitih nismo uspeli potrditi, verjetno zaradi prenizke koncentracije parborlizina. Pokazali smo tudi, da lahko rekombinantni parborlizin režemo s trombinom. Da bi bil v vzorcu prisoten kakšen drug protein, ki vsebuje za trombin prepoznavno zaporedje aminokislin LVPRGS, je malo verjetno, saj je verjetnost zaporedja teh šest aminokislin $6^{20} = 3,66 * 10^{15}$. Iz rezultatov domnevamo, da se očiščeni protein hitro obori ali lepi na površino. Sklepamo lahko, da dodatek regije TolAIII izboljša topnost parborlizina.

Iz seva Rosetta-gami B nam ni uspelo očistiti rekombinantnih proteinov, smo pa dokazali, da izoobliki parborlizina 2 in 3 ne vplivata na rast producentske bakterije, da lizati sevov Rosetta-gami B niso hemolitični in ne delujejo inhibitorno proti izbranim bakterijam.

Tako kot v primeru melitina, kjer se je izkazalo, da ima močno bakteriocidno aktivnost, kljub temu, da je vloga apitoksina obramba pred makroskopskimi plenilci in ne pred mikroorganizmi (Béven in Wróblewski, 1997), se lahko izkaže, da učinkuje parborlizin 1 tudi na bakterijske membrane, vendar so za jasno opredelitev učinka parborlizina na bakterijske celice potrebne nadaljne raziskave.

Če bi želeli izboljšati sintezo rekombinantnega parborlizina, bi v nadaljnih postopkih izvedli izražanje z dodatkom spojin, ki v celici sprožijo sintezo pomožnih proteinov kot so molekularni šaperoni, kar poveča verjetnost, da se bo sintetizirani protein zvil v nativno obliko in da ne bo končal v inkluzijskih telescih. Za bolj učinkovito sintezo so včasih

potrebne tudi optimizirane rastne razmere in ko-ekspresija pomožnih proteinov. Čeprav se je v številnih raziskavah izkazalo, da imajo dodatki k rastnemu mediju pozitivne učinke na izražanje pravilno zvite in aktivne rekombinantne proteine, je pri vsakem proteinu potreben empirični pristop, saj lahko dodatek etanola, ki je najpogosteji način za sprožitev toplotnega šoka in posledično sintezo šaperonov, na produkcijo proteina vpliva pozitivno ali negativno (Georgiou in Valax, 1996).

5 SKLEPI

Na osnovi zastavljenih hipotez in rezultatov sklepamo sledeče:

- Izbor producentskega seva *E. coli* in sklopitev parborlizina z regijo TolAIII znatno vpliva na sintezo in topnost renaturiranega rekombinantnega parborlizina. Parborlizinska izooblika 1, sklopljena na N-terminalni domeni z domeno TolAIII (HTPAR1), smo v denaturirajočih razmerah uspešno izolirali iz bakterijskega seva z okvarjenim genom *minC* in zaradi izboljšane topnosti renaturirani protein uporabili v nadalnjih analizah.
- Rekombinantne različice parborlizinske izooblike 1, ne pa tudi preostali dve testirani izoobliki, delujejo bakteriostatično na rast producentskega seva.
- Kljub temu, da je parborlizin znan citolitični toksin, ki povzroča hemolizo govejih eritrocitov, nismo uspeli dokazati tovrstne aktivnosti izoliranega rekombinantnega parborlizina ali hemolitičnost lizatov ter producentskih bakterij. Naši rezultati nakazujejo na to, da pri bakteriji *V. ruber* poleg bakteriostatičnega učinka na rast producentske celice očiščeni protein parborlizin 1 sproži tudi SOS odziv.

6 POVZETEK

Parborlizin je evkariontski toksin, ki vsebuje dve glavni značilnosti, ki sta pogosti pri protibakterijskih snoveh peptidne narave: ima pozitiven povprečni površinski naboј, zaradi česar se lahko veže na negativno nabito fosfolipidno membrano, in vsebuje amfipatično alfavijačico, s pomočjo katere se lahko vrine v membrano. Za razliko od kationskih peptidov, ki delujejo protibakterijsko, je nativna oblika parborlizina veliko večja in ima kompleksnejšo strukturo, saj vsebuje tri disulfidne mostičke. Kljub temu je starejša raziskava pokazala, da homologni toksin Cl-A-III ohrani hemolitično aktivnost tudi takrat, ko so odcepljene vse proteinske regije razen amfipatične alfavijačnice. S tem znanjem bi lahko parborlizinu v nadaljnih študijah protibakterijske aktivnosti odstranili večino aminokislinskega zaporedja in uporabljali samo amfipatično alfavijačico. Razvoj analogne spojine za zdravilne namene iz učinkovin izoliranih iz evkariontskega strupa je danes v farmacevtski industriji običajen postopek, kako priti do nove terapevtske spojine peptidne narave, saj so analogi bolj specifični in niso škodljivi za gostiteljsko tkivo. Ker je do antarktičnega nitkarja *P. corrugatus* težko priti in je izolacija toksinov po običajni biokemijski poti zato otežena, je primernejše heterologno izražanje rekombinantnega proteina v ekspresijskem sistemu *E. coli*. Naše delo je pokazalo, da je tudi tovrstno izražanje lahko težavno, saj smo do očiščenega proteina prišli le pri sevu *E. coli* MinC s plazmidom z zapisom za konstrukt HTPAR1, ki ima vpliv že na rast producentskega seva *E. coli*. Poleg tega vsebuje HTPAR1 na N-terminalnem koncu regijo TolAIII, ki je glede na rezultate te analize sicer zvečala topnost renaturiranega parborlizina, po drugi strani pa bi lahko negativno vplivala na hemolitično aktivnost, saj je zanjo pomemben prost N-terminalni konec proteina. Potrebno je poudariti, da sev *E. coli* MinC za razliko od *E. coli* Rosetta-gami B ne vsebuje potrebnih elementov za učinkovit prevod evkariontskih genov, saj nima plazmida pRARE. Poleg tega celice z okvarjenim genom *minC* ne morejo zagotavljati primernega reducirajočega okolja, v katerem nastajajo disulfidni mostički, za kar so bolj primerne celice seva Rosetta-gami B. Da bi pridobili očiščeni in pravilno zvit parborlizin 1 v zadostni koncentraciji, da bi lahko preizkusili njegovo hemolitično aktivnost in bakteriostatični mehanizem rekombinantnega proteina, so potrebne nadaljnje izboljšave postopkov.

7 VIRI

- Anderluh G., Gökce I., Lakey J.H. 2002. Expression of proteins using the third domain of the *Escherichia coli* periplasmic-protein TolA as a fusion partner. *Protein Expression & Purification*, 28, 1: 173-181.
- Assenberg R., Wan P.T., Geisse S., Mayr L.M. 2013. Advances in recombinant protein expression for use in pharmaceutical research. *Current Opinion in Structural Biology*, 23, 3: 393-402.
- Avila C., Taboada S., Núñez-Pons L. 2008. Antarctic marine chemical ecology: what is next? *Marine Ecology*, 29, 1: 1-71.
- Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Hirotada M. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2: 1-11.
- Balasubramaniam A., Murphy R.F., Blumenthal K.M. 1986. Synthesis of sequences 1-16 and 63-95 of *Cerebratulus lacteus* toxin AIII: hemolytic activity in a toxin fragment. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 27, 5: 508-513.
- Berne S., Sepčić K., Križaj I., Kem W.R., McClintock J.B., Turk T. 2003. Isolation and characterisation of a cytolytic protein from mucus secretions of the Antarctic heteronemertine *Parborlasia corrugatus*. *Toxicon*, 41, 4: 483-491.
- Béven L., Wróblewski H. 1997. Effect of natural amphipathic peptides on viability, membrane potential, cell shape and motility of mollicutes. *Research in Microbiology*, 148: 163-175.
- Blumenthal K.M. 1980. Structure and action of heteronemertine polypeptide toxins: disulfide bonds of *Cerebratulus lacteus* toxin A-III. *Journal of Biological Chemistry*, 255: 8273-8274.
- Blumenthal K.M. 1982. Structure and action of heteronemertine polypeptide toxins. Membrane penetration by *Cerebratulus lacteus* toxin A-III. *Biochemistry*, 21, 18: 4229-4233.
- Blumenthal K.M. 1985. Binding of *Cerebratulus cytolysin* A-III to human erythrocyte membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 812, 1: 127-132.
- Borić M., Danevčič T., Stopar D. 2011. Prodigiosin from *Vibrio* sp. DSM 14379; a new UV-protective pigment. *Microbial Ecology*, 62: 528-536.

- Cao Y., Qing R., Liu Y., Zhou H.X., Song L.L., Cao Y., Dai Rong Q. 2010. Design, recombinant expression, and antibacterial activity of the cecropins-melittin hybrid antimicrobial peptides. *Current Microbiology*, 61: 169-175.
- Cushman D.W., Ondetti M.A. 1991. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension*, 17: 589-592.
- Davison W., Franklin C.E. 2002. The Antarctic nemertean *Parborlasia corrugatus*: an example of an extreme oxyconformer. *Polar Biology*, 25, 3: 238-240.
- De Boer P.A., Crossley R.E., Rothfield L.I. 1992. Roles of MinC and MinD in the site-specific septation block mediated by the MinCDE system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174, 1: 63-70.
- DeGrado W.F., Musso G.F., Lieber M., Kaiser E.T., Kézdy F.J. 1982. Kinetics and mechanism of hemolysis induced by melittin and by a synthetic melittin analogue. *Biophysical Journal*, 37, 1: 329-338.
- Diaz A.A., Tomba E., Lennarson R., Richard R., Bagajewicz M.J., Harrison RG. 2009. Prediction of protein solubility in *Escherichia coli* using logistic regression. *Biotechnology and Bioengineering*, 105, 2: 374-383.
- Dumont J.A., Blumenthal K.M. 1985. Structure and action of heteronemertine polypeptide toxins: importance of amphipathic helix for activity of *Cerebratulus lacteus* toxin A-III. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 167-175.
- Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. V: The proteomics protocols handbook. John M. Walker (ed). Totowa, Humana Press: 571-607.
- Georgiou G., Valax P. 1996. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 7, 2: 190-197.
- Greene J.J. 2004. General issues about recombinant gene expression. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. V: Recombinant gene expression reviews and protocols. Balbás P., Lorence A. (eds.). Totowa, Humana Press Inc: 3-14
- Hancock R.E., Lehrer R. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnology*, 16: 82-88.
- Hancock R.E., Patrzykat A. 2002. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Current Drug Targets - Infectious Disorders*, 2: 79-83.

- Heine J.N., McClintock J.B., Slattery M., Weston J. 1991. Energetic composition, biomass, and chemical defense in the common antarctic nemertean *Parborlasia corrugatus* McIntosh. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 153, 1: 15-25.
- Henaut A., Danchin A. 1996. Analysis and predictions from *Escherichia coli* sequences. V: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cellular and molecular biology. Vol. 2. Neidhardt F.C., Curtiss R.I., Ingraham J., Lin E., Brooks Low K., Magasanik B., Reznikoff W., Riley M., Umbarger H. (eds.). Washington D.C., ASM Press: 2047-2066.
- Kaiser H. 2004. Proboscis worms. Arlington, United States Antarctic Program: 1 str.
<http://photolibRARY.usap.gov> (januar, 2015)
- Kem W.R. 1985. Structure and action of nemertine toxins. *American Zoologist*, 25, 1: 99-111.
- Kem W.R. 1994. Structure and membrane actions of a marine worm protein cytolsin, *Cerebratulus* toxin A-III. *Toxicology*, 87, 1-3: 189-203.
- Kem W.R., Blumenthal K.M. 1978. Purification and characterization of the cytotoxic *Cerebratulus* A toxins. *Journal of Biological Chemistry*, 253, 16: 5752-5757.
- King G.F. 2011. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 11, 11: 1469-1484.
- Lewis R.J., Garcia M.L. 2003. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature*, 2, 10: 790-802.
- Li Y., Xiang Q., Zhang Q., Huang Y., Su Z. 2012. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37, 2: 207-215.
- Liu J., Blumenthal K.M. 1987. Functional interaction between *Cerebratulus lacteus* cytolsin A-III and phospholipase A2. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 14: 6619-6624.
- Liu J., Blumenthal K.M. 1988. Membrane damage by *Cerebratulus lacteus* cytolsin A-III. Effects of monovalent and divalent cations on A-III hemolytic activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 937, 1: 153-160.
- Mao R., Teng D., Wang X., Xi D., Zhang Y., Hu X., Yang Y., Wang J. 2013. Design, expression, and characterization of a novel targeted plectasin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 9: 3991-4002.

- McClintock J.B., Slattery M. 1991. Density, energy content, and chemical activity of three conspicuous antarctic benthic marine invertebrates. *Antarctic Journal*, 37, 4: 172-173.
- McDermott J.J., Roe P. 1985. Food, feeding behavior and feeding ecology of nemerteans. *American Zoologist*, 25, 1: 113-125.
- Miller C., Thomsen L.E., Gaggero C., Mosseri R., Ingmer H., Cohen S.N. 2004. SOS response induction by betalactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science*, 305: 1629-1631.
- Novagen. 2003. pET system manual. User Protocol TB055. 10th ed. Rev. B 0403. Darmstadt, EMD Biosciences, Inc, Merck KGaA: 68 str.
www.novagen.com (april 2014)
- Novagen. 2004. Competent cells. User Protocol TB009. Rev. F 0104. Darmstadt. EMD Biosciences, Inc, Merck KGaA: 23 str.
www.novagen.com (april 2014)
- Novy R., Morris B. 2001. Use of glucose to control basal expression in the pET system. *InNovations*, 13: 8-10.
- Palomares L.A., Estrada-Mondaca S., Ramírez O.T. 2004. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. V: Recombinant gene expression reviews and protocols. Balbás P., Lorence A. (eds.). Totowa, Humana Press Inc: 15-51
- Peti W., Page R. 2006. Strategies to maximize heterologous protein expression in *Escherichia coli* with minimal cost. *Protein Expression & Purification*, 51, 1: 1-10.
- Posner P., Kem W.R. 1978. Cardiac effects of toxin A-III from the heteronemertine worm *Cerebratulus lacteus* (Leidy). *Toxicon*, 16, 4: 343-349.
- Sambrook J., Russell D.W. 2001. Preparation and transformation of competent *E. coli* using calcium chloride. V: Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Sambrook J., Russell D. W., Argentine J. (eds.) New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 132-150.
- SantaLucia J.J. 1998. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 4: 1460-1465.
- Shai Y. 1995. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends in Biochemical Sciences*, 20, 11: 460-464.
- Shai Y., Oren Z. 1996. Diastereomers of cytolsins, a novel class of potent sntibacterial peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 13: 7305-7308.

- Starič N., Danevčič T., Stopar D. 2010. *Vibrio* sp. DSM 14379 pigment production – A competitive advantage in the environment? *Microbial Ecology*, 60: 592-598.
- Stothard P. 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *BioTechniques*, 28: 1102-1104
- Studier F.W., Moffatt B.A. 1985. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189, 1: 113-130.
- Su M., Chang W., Cui M., Lin Y., Wu S., Xu T. 2015. Expression and anticancer activity analysis of recombinant human uPA1-43-melittin. *International Journal of Oncology*, 46, 2: 619-626.
- Thomas J.G., Baneyx F. 1997. Divergent effects of chaperone overexpression and ethanol supplementation on inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 11, 3: 289-296.
- Thornhill D.J., Mahon A.R., Norenburg J.L., Halanych K.M. 2008. Open-ocean barriers to dispersal: a test case with the Antarctic polar front and the ribbon worm *Parborlasia corrugatus* (*Nemertea: Lineidae*). *Molecular Ecology*, 17: 5104-5117.
- Tomc Zidar B. 2013. Izolacija in lastnosti citolitičnega proteina parborlizina iz antarktičnega nitkarja *Parborlasia corrugatus*. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 30 str.
- Whelan N.V., Kocot K.M., Santos S.R., Halanych K.M. 2014. Nemertean toxin genes revealed through transcriptome sequencing. *Genome Biology and Evolution*, 6, 12: 3314-3325.
- Zasloff M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 24: 389-395.
- Zeigler D.R., Prágai Z., Rodriguez S., Chevreux B., Muffler A., Albert T., Bai R., Wyss M., Perkins J.B. 2008. The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains. *Journal of Bacteriology*, 190, 21: 6983-6995.

ZAHVALA

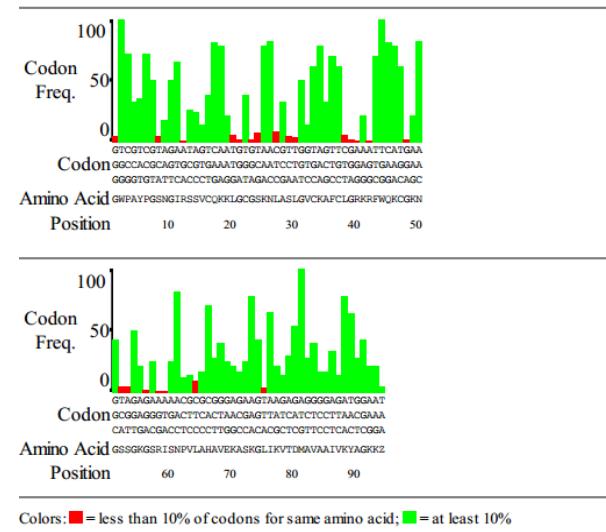
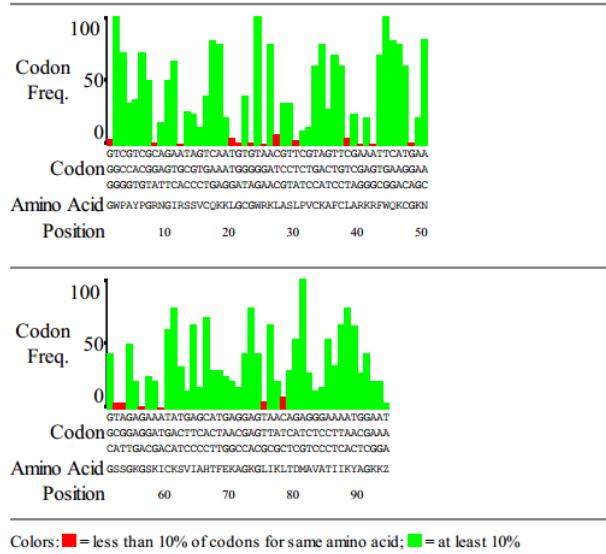
Najprej bi se rad zahvalil mentorju prof. dr. Tomu Turku za prevzem mentorstva, za vodenje in svetovanje ter somentorju doc. dr. Mateju Butali za vso pomoč, nasvete in načrtovanje eksperimentalnega dela in za neutrudljivo podporo. Hvala tudi predsedniku komisije prof. dr. Davidu Stoparju in recenzentu dr. Blažu Cigiću za strokoven, natančen in hiter pregled naloge. Prav tako se zahvaljujem doc. dr. Tjaši Danevčič za bakterijski sev *V. ruber*, dr. Zdravku Podlesku in Nini Orehar za material in nasvete med eksperimentalnim delom ter ostalim zaposlenim na katedri za biokemijo in na katedri za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov za vse nasvete in pomoč.

Iskrena hvala tudi staršem in ostali družini za vso podporo med mojim študijem.

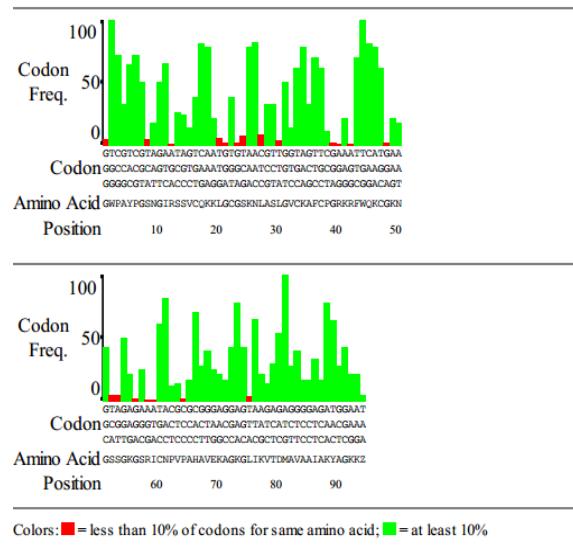
Na koncu bi se lepo zahvalil tudi Mojci, Gregorju in Blažu za vso pomoč, vse skupne lepe trenutke in doživetja v vseh letih mojega študija.

PRILOGE

Priloga A: Analiza uporabe redkih kodonov pri izoblikah parborlizina P1, P2 in P3.



Priloga A3: Slikovni prikaz rezultatov analize uporabe kodonov v izotoksinu P3. Y-os - pogostost kodona. X-os - nukleotidno/aminokislinsko zaporedje gena. Slikovni prikaz smo dobili z uporabo programa Codon Usage Analyzer 2.1 (Henaut in Danchin 1996)



Colors: ■ = less than 10% of codons for same amino acid; ■ = at least 10%

Fraction of sense codons below threshold (=10.00): **20/93 (21%)**

Priloga A3: Slikovni prikaz rezultatov analize uporabe kodonov v izotoksinu P3. Y-os - pogostost kodona. X-os - nukleotidno/aminokislinsko zaporedje gena. Slikovni prikaz smo dobili z uporabo programa Codon Usage Analyzer 2.1 (Henaut in Danchin 1996)

Priloga B: Rezultati nukleotidnega sekvenciranja pri podjetju Macrogen.

Priloga B1: Nukleotidne sekvence sekvenciranih konstruktov. V preglednici je prikazan le del genskega konstrukta, ki vsebuje zaporedje potrebno za izražanje. Z modro zeleno barvo je označen promotor T7, s svetlo modro barvo vmesno zaporedje, s temno zeleno barvo ribosomalno vezavno mesto, s sivo barvo štartni kodon, z zeleno barvo gen za parborlizin, z vijoličasto barvo heksahistidinski rep in z rjavo barvo restriktijsko mesto za restriktijski encim *Xba*I. Restriktijsko mesto (CATATG) za restriktijski encim *Nde*I se nahaja v vmesnem zaporedju med ribosomalno vezavno mesto in startnim kodonom ter v startnem kodonu

Nukleotidno zaporedje

> pET21c-P1_T7term

TAATACGACTCACTATA**GGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTGTT**
TAACTTAAG**AAGGAGATATA**CATATGGGGTGGCCGGCGTATCCGGGTCGAAATGGTATCAGA
TCCAGCGTCTGTCAAGAAAAAGTTGGGATGTGGATGGAGAAAACTCGCGTCTTACCTGTCTGCA
AAGCTTCTGCCTTGCAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATCGGAAAGAACGGCTCAAGTGGTA
AGGGAAAGCAAGATATGCAAATCTGTCATCGCCCACACTTTGAGAAGGCCGCAAAGGCTTGA
TCAAGCTCACTGACATGGCTGTCGCCACCATTATCAAATACGCTGGCAAGAAG**CTCGAGCACCA**
CCACCACCAC

> pET21c-P2_T7term

TAATACGACTCACTATA**GGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTGTT**
TAACTTAAG**AAGGAGGCC**CATATGGGGTGGCCGGCGTATCCGGGTTCAAATGGTATCAGATCC
AGCGTCTGTCAAGAAAAAGTTGGGATGTGGATCGAAAACCTCGCGTCTTAGGTGTCTGCAA
GCGTTCTGCCTTGAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATCGGAAAGAACGGCTCAAGTGGTAAG
GGAAGCAGGATAAGCAACCTGTCTCGCCACGCTGTTGAGAATGCCAGCAAAGGCTTAATC
AAGGTCACTGACATGGCTGTTGCCATTGTCAAATACGCTGGCAAGAAG**GTCGAGCACCA**
CCACCACCAC

> pET21c-P3_T7term

TAATACGACTCACTATA**GGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTGTT**
TAACTTAAG**AAGGAGATATA**CATAGCGCATATGGGGTGGCCGGCGTACCCGGGTTCAAATGG
TATCAGATCCAGCGTCTGTCAAGAAAAAGTTGGGATGTGGATCGAAAACCTCGCGTCTTAGGT
GTCTGCAAAGCGTTCTGCCCTGGAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATCGGAAAGAACGGCTCA
AGTGGTAAGGAAGCAGGATATGCAACCTGTCCCCCCCACGCTGTTGAGAAGGCCGCAA
GGCTTAATCAAGGTCACTGACATGGCTGTTGCCATTGCCAAATACGCTGGCAAGAAG**GCTCG**
AGCACCACCACCA

Priloga B2: Analizirane nukleotidne sekvene sekvenciranih konstruktor. V preglednici je prikazan le del genskega konstrukta, ki vsebuje zaporedje potrebne za izražanje. Z modro zeleno barvo je označen T7 promotor, s svetlo modro barvo vmesno zaporedje, s temno zeleno barvo ribosomalno vezavno mesto, s sivo barvo štartni kodon, z vijoličasto barvo heksahistidinski rep, z rdečo barvo TolAIII regijo, z modro barvo restriktijsko mesto (GGATCC) za restriktijski encim *BamHI* ter restriktijsko mesto (ACGCGT) za restriktijski encim *MluI* in z zeleno barvo gen za parborlizin

Nukleotidno zaporedje

> pTol-P1_T7term

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTCCCTCTAGAAATAATTGTAACTTTAA
GAAGGAGA[TATACCATG]CATCACCATCACCAC[ACTCGAGCAACAATGGCGCATCAGGGCCG]
ATATCAATAACTATGCCGGGCAGATTAAATCTGCTATCGAAAGTAAGTTCTATGACGCATCGTC
CTATGCAGGCAAAACCTGTACGCTGCGCATAAAACTGGCACCCGATGGTATGTTACTGGATATC
AAACCTGAAGGTGGCGATCCGCACCTTGTCAGGCTGCGTTGGCAGCAGCTAAACTTGCAGAAGA
TCCC GAAACCACCAAGCCAGGCAGTATATGAAGTGTCAAAAACGCGCCATTGGACTTCAAAC
CGGGTGGGGGATCTCTGGTTCGGCGCGGATCCGGGTGGCCGGGTATCCGGGTCGAAATGGTAT
CAGATCCAGCGTCTGTCAAGAAAAGTTGGGATGTGGATGGAGAAAACCTCGCTCTTACCTGTC
TGCAAAGCTTCTGCCTTGCAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATGCGGAAAGAACGGCTCAAGT
GGTAAGGGAAAGCAAGATATGCAAATCTGTCATGCCAACACTTTGAGAAGGCCGCAAAGGC
TTGATCAAGTCACTGACATGGCTGCGCCACCATTATCAAATACGCTGGCAAGAAGTAAACGGC
GT

> pTol-P2_T7term

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTCCCTCTAGAAATAATTGTAACTTTAA
GAAGGAGA[TATACCATG]CATCACCATCACCAC[ACTCGAGCAACAATGGCGCATCAGGGCCG]
ATATCAATAACTATGCCGGGCAGATTAAATCTGCTATCGAAAGTAAGTTCTATGACGCATCGTC
CTATGCAGGCAAAACCTGTACGCTGCGCATAAAACTGGCACCCGATGGTATGTTACTGGATATC
AAACCTGAAGGTGGCGATCCGCACCTTGTCAGGCTGCGTTGGCAGCAGCTAAACTTGCAGAAGA
TCCC GAAACCACCAAGCCAGGCAGTATATGAAGTGTCAAAAACGCGCCATTGGACTTCAAAC
CGGGTGGGGGATCTCTGGTTCGGCGCGGATCCGGGTGGCCGGGTATCCGGGTTCAATGGTAT
CAGATCCAGCGTCTGTCAAGAAAAGTTGGGATGTGGATCGAAAAACCTCGCTCTTAGGTGTC
TGCAAAGCGTCTGCCTTGGAAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATGCGGAAAGAACGGCTCAAGT
GGTAAGGGAAAGCAGGATAAGCAACCCCTGTCCCTGCCAACGCTGTTGAGAAGGCCAGCAAAGGC
TTAATCAAGTCACTGACATGGCTGTTGCCCAATTGTCAAATACGCTGGCAAGAAGTAAACGGC
GT

> pTol-P3_T7term

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCACAACGGTTCCCTCTAGAAATAATTGTAACTTTAA
GAAGGAGA[TATACCATG]CATCACCATCACCAC[ACTCGAGCAACAATGGCGCATCAGGGCCG]
ATATCAATAACTATGCCGGGCAGATTAAATCTGCTATCGAAAGTAAGTTCTATGACGCATCGTC
CTATGCAGGCAAAACCTGTACGCTGCGCATAAAACTGGCACCCGATGGTATGTTACTGGATATC
AAACCTGAAGGTGGCGATCCGCACCTTGTCAGGCTGCGTTGGCAGCAGCTAAACTTGCAGAAGA
TCCC GAAACCACCAAGCCAGGCAGTATATGAAGTGTCAAAAACGCGCCATTGGACTTCAAAC
CGGGTGGGGGATCTCTGGTTCGGCGCGGATCCGGGTGGCCGGGTATCCGGGTTCAATGGTAT
CAGATCCAGCGTCTGTCAAGAAAAGTTGGGATGTGGATCGAAAAACCTCGCTCTTAGGTGTC
TGCAAAGCGTCTGCCTTGGAAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATGCGGAAAGAACGGCTCAAGT
GGTAAGGGAAAGCAGGATAAGCAACCCCTGTCCCTGCCAACGCTGTTGAGAAGGCCAGCAAAGGC
TTAATCAAGTCACTGACATGGCTGTTGCCCAATTGTCAAATACGCTGGCAAGAAGTAAACGGC
GT

Priloga B3: Nukleotidne sekvene sekvenciranih konstruktor. V preglednici je prikazan le del genskega konstrukta, ki vsebuje zaporedje potrebno za izražanje. Z modro zeleno barvo je označen T7 promotor, s svetlo modro barvo vmesno zaporedje, s temno zeleno barvo ribosomalno vezavno mesto, s sivo barvo štartni kodon, z zeleno barvo gen za parborlizin, z rdečo barvo TolAIII regijo, z vijoličasto barvo heksahistidinski rep in z modro barvo restriktivno mesto za restriktivni encim *Xba*I. Restriktivno mesto (CATATG) za restriktivni encim *Nde*I se nahaja v vmesnem zaporedju med ribosomalno vezavno mesto in startnim kodonom ter v startnem kodonu

Nukleotidna zaporedja

> pTod-P1b_T7term

TAATACCGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCTCTAGAAATAATTTGTT
TAACTTAACGAGAGAATACATATGGGGCCGGCGTATCCGGGTCGAAATGGTATCAGA
TCCAGCGTCTGTCAGAAAAGTTGGGATGTGGATGGAGAAAACTCGCGTCTTACCTGTCGCA
AAGCTTCTGCCCTGCAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATGCGAAAGAACGGCTCAAGTGGTA
AGGGAAAGCAAGATATGCAAATCTGTCATCGCCCACACTTTGAGAAGGGCCGAAAGGCTTGA
TCAAGCTCACTGACATGGCTGTCGCCACCATTATCAAATACGCTGGCAAGAACGCTCGAGCTGGT
TCCGCGCGGATCCAACAATGGCGCATCAGGGGCCGATATCAAATAACTATGCCGGCAGATTAA
ATCTGCTATCGAAAGTAAGTTCTATGACGCATCGCCTATGCAGGCAAACCTGTACGCTGCGC
ATAAAACTGGCACCCGATGGTATGTTACTGGATATCAAACCTGAAGGTGGCGATCCCGCACTTT
GTCAGGCTGCGTTGGCAGCAGCTAAACTTGCAGAAGATCCGAAACCAAGCCAGGCAGTAT
ATGAAGTGTCAAAAACCGGCCATTGGACTTCAAACCGCTCGAGCACCACCAACCAAC

> pTod-P2c_T7term

TAATACCGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCTCTAGAAATAATTTGTT
TAACTTAACGAGAGAATACATATGGGGCCGGCGTATCCGGGTCGAAATGGTATCAGAT
CCAGCGTCTGTCAGAAAAGTTGGGATGTGGATCGAAAACCTCGCGTCTTAGGTGTCGCAA
AGCGTTCTGCCCTGGAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATGCGAAAGAACGGCTCAAGTGGTA
GGGAAGCAGGATAAGCAACCCCTGTCCTGCCACGCTGTTGAGAAGGCCAGCAAAGGCTTAAT
CAAGGTCACTGACATGGCTGTTGCCGATTGTCAAATACGCTGGCAAGAACGCTCGAGCTGGT
CCGCGCGGATCCAACAATGGCGCATCAGGGGCCGATATCAAATAACTATGCCGGCAGATTAA
TCTGCTATCGAAAGTAAGTTCTATGACGCATCGCCTATGCAGGCAAACCTGTACGCTGCGCA
ATAAAACTGGCACCCGATGGTATGTTACTGGATATCAAACCTGAAGGTGGCGATCCCGCACTTTG
TCAGGCTGCGTTGGCAGCAGCTAAACTTGCAGAAGATCCGAAACCAAGCCAGGCAGTATA
TGAAGTGTCAAAAACCGGCCATTGGACTTCAAACCGCTCGAGCACCACCAACCAAC

> pTod-P3d_T7term

TAATACCGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCTCTAGAAATAATTTGTT
TAACTTAACGAGAGAATACATATGGGGCCGGCGTACCCGGGTCGAAATGGTATCAGAT
CCAGCGTCTGTCAGAAAAGTTGGGATGTGGATCGAAAACCTCGCGTCTTAGGTGTCGCAA
AGCGTTCTGCCCTGGAAGGAAGAGGTTCTGGCAGAAATGCGAAAGAACGGCTCAAGTGGTA
GGGAAGCAGGATATGCAACCCCTGTCCTGCCACGCTGTTGAGAAGGCCAGCAAAGGCTTAAT
CAAGGTCACTGACATGGCTGTTGCCGATTGCCAAATACGCTGGCAAGAACGCTCGAGCTGGT
CCGCGCGGATCCAACAATGGCGCATCAGGGGCCGATATCAAATAACTATGCCGGCAGATTAA
TCTGCTATCGAAAGTAAGTTCTATGACGCATCGCCTATGCAGGCAAACCTGTACGCTGCGCA
ATAAAACTGGCACCCGATGGTATGTTACTGGATATCAAACCTGAAGGTGGCGATCCCGCACTTTG
TCAGGCTGCGTTGGCAGCAGCTAAACTTGCAGAAGATCCGAAACCAAGCCAGGCAGTATA
TGAAGTGTCAAAAACCGGCCATTGGACTTCAAACCGCTCGAGCACCACCAACCAAC

Priloga C: Rezultati N-terminalnega sekvenciranja iz gela izoliranega rekombinantnega proteina HTPAR1. Grafi po analizi s HPLC prikazujejo aminokisline na posameznem mestu (nadpisano nad grafom) N-terminalnega konca proteina. Detektirani peptid: AARAPV.

