

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TINA VIDA PLAVEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



TINA VIDA PLAVEC

**RAZVOJ SISTEMA ZA PREDSTAVITEV DVEH PROTEINOV NA POVRŠINI
MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE *LACTOCOCCUS LACTIS***

**DEVELOPMENT OF SURFACE DISPLAY SYSTEM FOR TWO PROTEINS ON
*LACTOCOCCUS LACTIS***

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Plavec T. V. Razvoj sistema za predstavitev dveh proteinov na površini ... *L. lactis*
Magistrska naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za Farmacijo.
Eksperimentalno delo sem opravljala pod mentorstvom doc. dr. Aleša Berleca na Inštitutu
Jožefa Stefana.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Borutu Štruklju, da mi je omogočil delo na oddelku Inštituta
Jožefa Stefana in s tem odprl svet v neizmerno zanimivo področje biotehnologije.

Zahvaljujem se doc. dr. Alešu Berlecu za potrežljivo uvajanje v osnove laboratorijskega
dela z rekombinantnimi probiotiki, spodbujanje k samostojnemu opravljanju
eksperimentalnega dela in strokovno usmerjanje.

Hvala predsedniku komisije izr. prof. dr. Matjažu Jerasu in članu komisije doc. dr. Mateju
Sovi za trud vložen v pregled magistrske naloge.

Iskreno se zahvaljujem tudi Katji Škrlec za stalno podporo, neprecenljive nasvete in pomoč
pri praktičnem opravljanju magistrske naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr.
Aleša Berleca.

Tina Vida Plavec

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	i
POVZETEK	iii
KLJUČNE BESEDE	iv
ABSTRACT	v
KEYWORDS	v
SEZNAM OKRAJŠAV.....	vi
1 UVOD.....	1
1.1 Mlečnokislinske bakterije	1
1.2 <i>Lactococcus lactis</i>	1
1.2.1 Terapevtska uporaba	1
1.2.2 Gensko spremenjene bakterije <i>Lactococcus lactis</i>	3
1.3 Oblikovanje genskega konstrukta za predstavitev rekombinantnega proteina na površini	3
1.3.1 Domena B.....	4
1.3.2 Neimunoglobulinska ogrodja	4
1.4 Predstavitev rekombinantnega proteina na bakterijski površini	5
1.5 Sistem za izražanje genov.....	9
1.5.1 Sistem NICE.....	9
2 NAMEN DELA.....	12
3 MATERIALI IN METODE	13
3.1 MATERIALI	13
3.1.1 Bakterijske kulture	13
3.1.2 Plazmidi.....	13
3.1.3 Začetni oligonukleotidi	15
3.1.4 Encimi	16
3.1.5 Reagenti in topila	16
3.1.6 Protitelesa.....	18
3.1.7 Pufri.....	19
3.1.8 Gojišča.....	20
3.1.9 Laboratorijska oprema.....	22
3.2 METODE.....	23
3.2.1 Priprava kompetentnih celic <i>Lactococcus lactis</i> za elektroporacijo	23
3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza	23
3.2.3 Priprava prekonočnih kultur.....	24
3.2.4 PCR za analizo kolonij.....	24
3.2.5 Priprava genskih konstruktov.....	25
3.2.6 Izražanje proteinov v bakteriji <i>L. lactis</i>	30
3.2.7 Celična ELISA (Whole-cell ELISA)	30
3.2.8 Pretočna citometrija	32
3.2.9 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS	33
3.2.10 Soniciranje.....	35

3.2.11 Analiza proteinov z barvilo Coomassie Brilliant Blue	35
3.2.12 Prenos Western.....	36
4 REZULTATI	38
4.1 Preverjanje ustreznosti pripravljenih konstruktov	38
4.2 Izražanje adnektinov in LPxTG	38
4.2.1 Barvanje s Coomassie Brilliant Blue	39
4.2.2 Rezultati prenosa proteinov po Westernu	39
4.3 Kvantifikacija adnektinov na površini <i>L. lactis</i>	40
4.4 Kvantifikacija izraženih LPxTG v fuziji z domeno B	41
4.5 Vrednotenje LPxTG za površinsko izražanje proteinov	42
4.6 Kvantifikacija in vrednotenje novih proteinskih vmesnikov	43
5 RAZPRAVA.....	45
6 SKLEPI.....	49
7 LITERATURA	50
8 PRILOGE	55

POVZETEK

Mlečnokislinske bakterije so raznolika skupina gram-pozitivnih bakterij, katerih glavni produkt presnove sladkorjev je mlečna kislina. Med najpomembnejše mlečnokislinske bakterije spada *Lactococcus lactis*. Zaradi dolgotrajne uporabe v prehrani jo Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) priznava kot varno, kar lahko izkoristimo za njenouporabo v terapevtske namene. Bakterije lahko biotehnološko spremenimo in uporabimo kot gostiteljski sistem ter vektor za izražanje in dostavo različnih rekombinantnih proteinov. Predstavitev rekombinantnih proteinov na površinah tako spremenjenih bakterij omogoča njihovo izpostavitev okolju in ustrezni stik z gostiteljem. S sočasno predstavitevijo dveh rekombinantnih proteinov na bakterijski površini lahko vplivamo na različna prijemališča oz. receptorje v človeškem telesu. Za predstavitev več rekombinantnih proteinov je potreben molekularno-biološki razvoj novih plazmidov in vpeljava ter vrednotenje ustreznih modelnih proteinov.

Pripravili smo laktkokne plazmide z zaporedji za izražanje različnih rekombinantnih proteinov. Uporabili smo plazmide pNZ8148, pSDBA3b in pGEM, ločili fragmente z agarozno elektroforezo in jih zamenjali z genskimi konstrukti za izražanje želenih proteinov. Za sočasno površinsko predstavitev dveh rekombinantnih proteinov smo vstavili konstrukte za dva tipa modelnih proteinov, in sicer domeno B ter adnektin, ki je vezalec neimunoglobulinskega tipa. Hkrati smo preskusili različne načine pritrditve modelnega proteina domene B na površino bakterij, in sicer nekovalentno preko sidrne podenote LysM in kovalentno preko prepoznavnega zaporedja LPxTG. Površinsko predstavitev preko sidrne podenote LysM smo izvedli tudi na specifičen način, s pomočjo peptidov SpyTag in SnoopTag, ki kot nosilca domene B omogočata njenu pritrditev preko tvorbe izopeptidne vezi s pripadajočima proteinoma SpyCatcher in SnoopCatcher.

Izražanje rekombinantnih proteinov smo analizirali z metodo NaDS PAGE, prenosom Western in barvanjem z barvilom Coomassie Brilliant Blue ter na ta način potrdili prisotnost fragmentov ustreznih velikosti. Površinsko predstavitev na bakterijah pa smo ovrednotili s pretočno citometrijo in tehniko ELISA. V primerjavi s celicami z vstavljenim praznim plazmidom, so imele celice z izraženimi rekombinantnimi proteini večjo povprečno intenzitetu fluorescence (pretočna citometrija) in večjo absorbanco (ELISA). Ugotovili smo, da so se na bakterijsko površino v največjem obsegu vezali rekombinantni proteini s sidrnim zaporedjem LysM.

Plavec T. V. Razvoj sistema za predstavitev dveh proteinov na površini ... *L. lactis*
Magistrska naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

KLJUČNE BESEDE

Lactococcus lactis; rekombinantni proteini; površinska predstavitev

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are gram-positive bacteria with main function of carbohydrate conversion into lactic acid. The most used lactic acid bacterium is *Lactococcus lactis* which is considered safe by the World Health Organization due to its long safe usage in dairy industry. Display of recombinant proteins on the bacterial surface is an emerging research area with wide range of potential biotechnological applications. Because of its GRAS (generally recognized as safe) status, lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* represents an attractive host for surface display and promising vector for *in situ* delivery of bioactive proteins. Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria implies not only sufficient exposure but also increased interactions with the host. Displaying two recombinant proteins at the same time opens an opportunity to affect different targets in the body. To be able to achieve that construction of new plasmids and investigation of new model proteins is needed.

We constructed different plasmids for surface display of recombinant proteins using model plasmids pNZ8148, pSDBA3b and pGEM. After agarose electrophoresis we ligated the isolated fragment with construct for recombinant protein expression. We analysed two model proteins, first, B domain capable of binding Fc fragment of human IgG and the second, non-immunoglobulin binder adnectin. Recombinant proteins with B domain were anchored via different mechanisms, noncovalently via LysM and covalently via LPxTG motif. Alternative approach to surface display is binding via isopeptide bond formation. This was assessed through the following two protein/peptide pairs, SpyCatcher/SpyTag and SnoopCatcher/SnoopTag.

Expression of recombinant proteins was demonstrated by SDS PAGE, Western blot and staining with Coomassie Brilliant Blue. To evaluate the surface display, we used flow cytometry and whole cell ELISA. Recombinant proteins-displaying cells demonstrated superior binding capabilities when compared to an empty plasmid containing cells. However, recombinant proteins anchored through LysM anchoring motif showed the strongest binding capabilities.

KEYWORDS

Lactococcus lactis; recombinant proteins; surface display

SEZNAM OKRAJŠAV

Ab - protitelo (ang. antibody)

AGE - agarozna gelska elektroforeza

ATP - adenozin trifosfat

bp - bazni par

CluA - agregacijski protein (ang. sex factor aggregation protein)

DARPin - protein s ponavljačnim zaporedjem ankirina (ang. designed ankyrin repeat protein)

DC - dendritične celice (ang. dendritic cells)

dH₂O - destilirana voda

DNA - deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)

DTT - ditiotreitol

ELISA - encimskoimunski test (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)

GALT - črevesno limfatično tkivo (ang. gut-associated lymphoid tissue)

GRAS - splošno priznano kot varno (ang. generally recognized as safe)

GSO - gensko spremenjeni organizem

HRP - hrenova peroksidaza (ang. horseradish peroxidase)

IL - interlevkin

MCS - multiplo mesto za kloniranje (ang. multiple cloning site)

MFI - povprečna intenziteta fluorescence (ang. mean fluorescence intensity)

MHC - poglavitni kompleks tkivne skladnosti (ang. major histocompatibility complex)

MKB - mlečnokislinske bakterije

NaDS - natrijev dodecilsulfat

NICE - ekspresijski sistem pod nadzorom nizina (ang. nisin-controlled gene expression system)

PCR - verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)

PrtP – proteinaza na bakterijski celični steni

PVDF - poliviniliden difluorid

TEMED - N', N'-tetrametiletilendiamin

TNF-α - dejavnik tumorske nekroze α

WHO - Svetovna zdravstvena organizacija (ang. World Health Organization)

YndF - laktkokni protein z neznano funkcijo, podoben razmnoževalnemu proteinu YndF v nekaterih bakterijah vrst *Bacillus* in *Clostridium*

1 UVOD

1.1 Mlečnokislinske bakterije

Mlečnokislinske bakterije (MKB) sodijo v skupino gram-pozitivnih bakterij. Mednje uvrščamo različne vrste laktokokov, laktobacilov, leukonostokov, oenokokov, pediokokov in streptokokov. Njihova primarna funkcija je pretvorba ogljikovih hidratov v končni produkt, to je mlečno kislino, po kateri so tudi doble ime. Bakterija *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) je najbolj poznana MKB, predvsem zaradi njene razširjene uporabe v prehranski industriji (1). Mlečna kislina, ki jo te bakterije proizvajajo v procesu fermentacije, znižuje pH okolja, v katerem rastejo, kar izkoriščamo za konzerviranje hrane, vpliv na okus in teksturo mlečnih izdelkov, proizvodnjo fermentiranih živil, kot so mlečni izdelki (sir, kefir in jogurt) in zelenjava (kislo zelje, kisle kumare) (2, 3).

1.2 *Lactococcus lactis*

Bakterija *Lactococcus lactis* je nesporogena in fakultativno anaerobna bakterija. Obstaja v obliki štirih podvrst, in sicer *lactis*, *cremoris*, *hordniae* in *tructae*. Industrijsko sta pomembni podvrsti *lactis* in *cremoris*. Naravni habitat podvrste *lactis* so rastline, predvsem trave, koruza, grah in listi sladkornega trsa, podvrsta *cremoris* pa je prisotna v mleku. Čeprav ljudje in živali niso njeni primarni gostitelj, je lahko bakterija prisotna v ustni, črevesni in urogenitalni sluznici, kjer koristno vpliva na mikrobioto s preprečevanjem razmnoževanja patogenih bakterij (1). Poleg uporabe v prehrani je bakterija *L. lactis* vedno pomembnejša tudi biotehnološko, saj predstavlja alternativo pogosto uporabljenim bakterijam *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum* in gram-negativni *Escherichii coli*. Njene glavne lastnosti, zaradi katerih je uporaben gostiteljski sistem in vektor, so odsotnost tvorbe inkluzijskih teles in endotoksinov - lipopolisaharidov, dobro poznan in majhen genom (2,3 Mbp) ter njena varnost. Zaradi njene dolgoletne varne uporabe v živilih ji je Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) dodelila status splošno priznane varne bakterije GRAS (2, 3).

1.2.1 Terapevtska uporaba

L. lactis je kot varna, neinvazivna in nepatogena bakterija uporaben vektor za dostavo zdravilnih učinkovin. Ker ni naravni prebivalec gastrointestinalnega trakta in ga ne kolonizira, je verjetnost za pojav neželenih učinkov tudi po njeni dolgotrajni uporabi zelo majhna. Bakterijo *L. lactis* lahko uporabimo v terapevtske namene s pomočjo površinske

predstavitev želenih rekombinantnih antigenov, protiteles ali drugih proteinov. Zdravljenje ali imunizacijo po peroralni poti promovira tudi WHO, in sicer iz ekonomskih in varnostnih razlogov. Prednost pred sistemsko aplikacijo je namreč manjša možnost za pojav neželenih učinkov, saj lahko učinkovino dostavimo lokalno na mesto delovanja. Tako spodbudimo limfatična tkiva v črevesju (GALT), kar je koristno predvsem v primerih vnetnih črevesnih boleznih, kot so kronična vnetna črevesna bolezen (IBD), Crohnova bolezen, ulcerativni kolitis in mukozitis po kemoterapiji (4, 5, 6). V obliki terapevtskih proteinov lahko na ta način v telo dostavimo protivnetne citokine ali preprečimo delovanje vnetnih citokinov. Tako lahko v primeru Crohновe bolezni in kronične vnetne črevesne bolezni z dostavo protivnetnega IL-10 in zaviranjem aktivnosti provnetnega TNF- α lajšamo lokalno vnetje. Poleg citokinov lahko apliciramo tudi antigene, s katerimi sprožimo imunsko toleranco. Namen tovrstne senzitizacije je zmanjšati pretiran imunski odziv na določen alergen (7, 8). V vlogi pasivne imunizacije ima bakterija *L. lactis* nizko intrinzično imunogenost, ustrezne adjuvantne sposobnosti zaradi prisotnosti proteoglikana v celični steni, poleg tega pa za bolnika predstavlja prijazno in cenejšo alternativo običajnemu cepljenju, saj zaradi neparenteralne uporabe ni potrebna uporaba sterilnih igel in posebnih farmacevtskih oblik. Pri peroralni imunizaciji je pomemben stik s sluznico prebavil. Predstavitev antigenov poteka v limfoidnem tkivu, kamor jih dendritične celice (DC) prenesejo po stiku s celicami M Peyerjevih plošč v epiteliju tankega črevesja. Celice M omogočajo transport bakterij preko epitelijske plasti in nato dostavo dendritičnim celicam, ki po fagocitozi bakterij, njihovi predelavi v peptide in predstavljati v okviru molekul MHC migrirajo v najbližje bezgavke in sprožijo klonsko specifičen T-celični odziv. Do stika med bakterijami in DC lahko pride tudi brez pomoči celic M, saj lahko DC neposredno s svojimi izrastki ali dendriti med epitelijskimi celicami sežejo v sluznico črevesja, kjer vzorčijo oz. privzemajo antigene (8).

Bakterija *L. lactis* s površinsko izraženimi rekombinantnimi proteini je gensko spremenjeni organizem (GSO), kar bi lahko predstavljalo regulatorne ovire in zadržke pri njihovi terapevtski rabi za ljudi. Vendar pa gre za avksotrofen organizem, kar pomeni, da potrebuje za optimalno rast ustrezna hranila in mikrookolje. Njena rast se že v osnovi ustavi med vrednostmi pH 4.0 in 4.5 ter pri temperaturi nad 45 °C. V okolje se po peroralni aplikaciji ne sprošča, saj zaradi občutljivosti na razgradnjo v prebavnem traktu človeka preživi le nekaj ur (8). S strani Evropske komisije je bila, zaradi možnosti njenega genskega modificiranja na način, da postane avksotrofna na določeno aminokislino,

odobrena tudi klinična študija za zdravljenje Crohnove bolezni z bakterijo *L. lactis*, ki izraža rekombinantni IL-10. Obstoj bakterije je bil v tem primeru odvisen od prisotnosti timina ali timidina v njenem neposrednem okolju. Izven človeškega organizma torej ni bila zmožna preživeti, zato ni predstavljala nevarnosti za okolje (3).

1.2.2 Gensko spremenjene bakterije *Lactococcus lactis*

Kot gostiteljski organizem lahko torej bakterijo *L. lactis* uporabimo za izražanje rekombinantnih proteinov. Te lahko bakterija bodisi izraža v citoplazmi, jih izloči v neposredno mikrookolje ali pa pripne na celično membrano ali celično steno. V primerjavi z znotrajcelično izraženimi rekombinantnimi proteini ali tistimi, ki jih gensko spremenjene bakterije izločajo v okolje, so terapevtsko uporabnejši tisti, ki jih izražajo na svojih površinah. Kot gram-pozitivna bakterija ima *L. lactis* eno samo celično membrano in debelo celično steno. Odsotnost dodatne celične membrane, ki je sicer prisotna pri gram-negativnih bakterijah, omogoča lažjo translokacijo in prehod proteinov na njeno površino. Njena debela celična stena pa predstavlja dobre možnosti za sidranje proteinov, pri čemer je protein, ki je vsidran vanjo, manj dostopen za proteolitično razgradnjo v gastrointestinalnem traktu, hkrati pa dovolj izpostavljen mikrookolju, da lahko pride do želenih interakcij s črevesnim epitelijem gostitelja (7). Bakterija *L. lactis* ima aktivno zunajcelično proteazo, vendar pa je njena aktivnost nizka. Razgrajuje predvsem prekomerno izražene proteine, kar je ugodno, saj je tako možnost razgradnje rekombinantnih proteinov majhna (3).

1.3 Oblikovanje genskega konstrukta za predstavitev rekombinantnega proteina na površini

Gen za površinsko predstavitev izbranega proteina na bakterijah običajno sestavljajo tri zaporedja, in sicer za: signalni peptid, za antigen/protitelo/terapevtski protein in za vezavo na površino bakterije oz. sidranje. Za izločanje rekombinantnih proteinov iz celic *L. lactis* se najpogosteje uporablja signalni peptid proteina Usp45. Ta ima molekulsko maso 45 kDa in ga bakterija *L. lactis* izloča v največji količini. Njegova funkcija v bakterijah še ni znana (3, 4). Z uporabo Usp45 dosežemo večjo učinkovitost izločanja rekombinantnih proteinov kot z drugimi signalnimi peptidi (9, 10).

1.3.1 Domena B

Domena B v rekombinantnem proteinu služi kot modelni protein. Izoliramo jo iz proteina A, ki je prisoten v celični steni bakterije *Staphylococcus aureus* in veže konstantno področje Fc imunoglobulinov G (IgG) različnih sesalcev, vključno s človeškimi. Domena B je sestavljena iz 58 aminokislin, ki kodirajo protein s tremi α -vijačnicami. Njene prednosti so majhnost (6,6 kDa), dobra topnost, stabilnost, dobro poznana tridimenzionalna struktura in sposobnost specifične vezave protiteles, kar omogoča njeno detekcijo (11, 12).

1.3.2 Neimunoglobulinska ogrodja

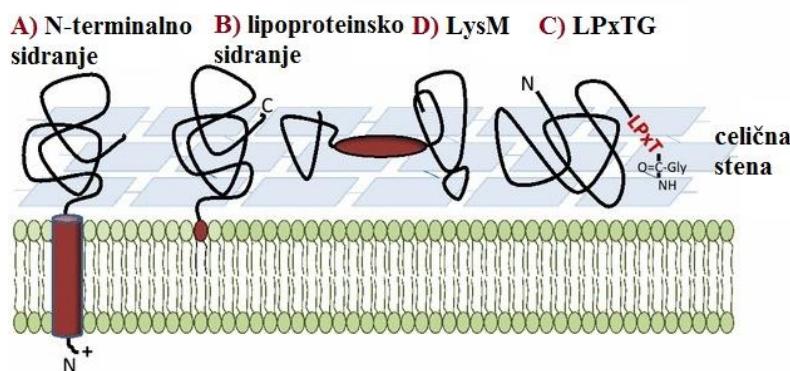
Namesto domene B lahko za vezavo protiteles uporabimo domeno Z, ki je njen sintezi homolog. S spremenjanjem aminokislin v zaporedju domene B so z uporabo genske kombinatorne knjižnice pridobili njene izpeljanke, imenovane afinitetna telesca (ang. affibodies). Gre za predstavnike neimunoglobulinskih ogrodij. To so krajsi proteini, sestavljeni iz ene domene, ki ne zahtevajo posttranslacijskih modifikacij, in omogočajo specifično vezavo tarčnih molekul (13). Neimunoglobulinska ogrodja imajo številne prednosti pred protitelesi. So majhni proteini, dolgi večinoma 40 - 100 aminokislinskih ostankov, z molekulskimi masami do 11 kDa, kar omogoča njihovo hitro prodiranje v tkivo, lažji prihod do tarčnega mesta in izločanje iz krvi. Zaradi odsotnosti disulfidnih vezi so obstojni tudi v reducirajočem znotrajceličnem okolju bakterij. Poleg tega predstavljajo potencial za uporabo v terapiji in diagnostiki, saj jih za detekcijo lahko konjugiramo z radionuklidmi in fluorescentnimi barvili. Neimunoglobulinska ogrodja se med seboj razlikujejo po velikosti, proteinu, iz katerega izvirajo in po afiniteti vezave. Slednja je običajno v nanomolarnem območju, pri nekaterih pa celo v pikomolarnem. Obstaja veliko različnih neimunoglobulinskih ogrodij, primeri novejših in pogosteje uporabljenih pa so: adhironi iz fitocistatinov, afinitetna telesca z domeno Z stafilokoknega proteina A, DARP-ini z afiniteto za regijo Fc človeških protiteles IgG in adnektini človeškega izvora (14).

Za proizvodnjo želenih neimunoglobulinskih ogrodij je potreben razvoj čim bolj raznolike genske kombinatorne knjižnice, ki omogoča izolacijo visokoafinitetnih vezalcev. Raziskovalci preoblikujejo molekule z vnosom mutacij in nato izberejo najboljši klon. Tako sta Hackel in Wittrup za oblikovanje adnektinskih neimunoglobulinskih ogrodij kot modelno molekulo uporabila človeški fibronektin tipa III, in sicer njegovo domeno 10 (15). Z mutagenezo sta spremenila aminokisline v področju β -zavojev fibronektinske molekule in tvorila različne adnektine. Pripravila sta več njihovih različic z vezavno afiniteto za

kozje (gAdn) in kunčje imunoglobuline (rAdn) ter med njimi izbrala najbolj stabilen klon z najvišjo afiniteto. Adnektina z vezavno afiniteto za kozje in kunčje imunoglobuline se razlikujeta v aminokislinskem zaporedju na področju vseh treh β -zavojev in protitelesa vežeta vrstno specifično, pri čemer pa imata različni vezavni afiniteti, in sicer za kozja protitelesa v nanomolarnem, za kunčja pa v pikomolarnem območju (15).

1.4 Predstavitev rekombinantnega proteina na bakterijski površini

Predstavitev proteina na površini bakterije vključuje dva procesa, in sicer izločitev proteina na površino in temu sledeče sidranje. V prvem se nezvit protein, ki je sestavljen iz N-terminalnega vodilnega peptida, hidrofobne sredice in C-terminalnega zaporedja za usmerjanje sekrecije, izloči na površino (16). Sidranje proteinov na površino bakterije lahko dosežemo na različne načine. Proteini se lahko pritrdijo na bakterijsko celično membrano bodisi s pomočjo N-terminalnega transmembranskega sidranja ali kovalentno preko lipoproteinov, na celično steno pa kovalentno preko zaporedij LPxTG ali nekovalentno, preko različnih prepoznavnih zaporedij (Slika 1) (7).



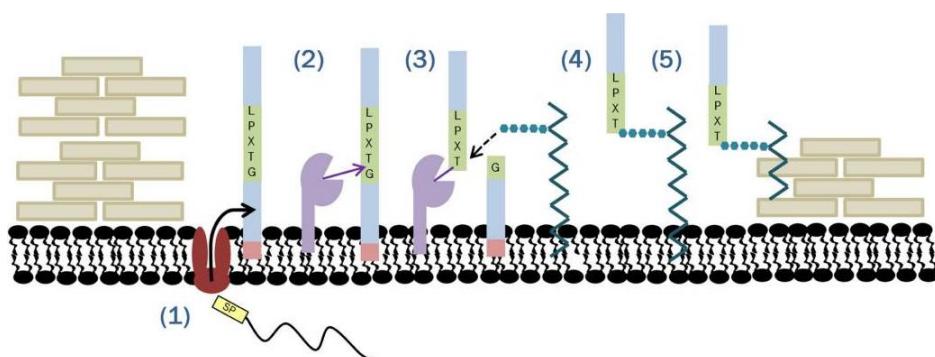
Slika 1: Shematski prikaz različnih načinov površinskih predstavitev proteinov; prizerno po (7).

Slika 1 prikazuje naslednje načine površinskih predstavitev proteinov:

- N-terminalno transmembransko sidranje poteka preko proteina z N-terminalnim signalnim peptidom. Ta se po znotrajcelični prepoznavi in translokaciji nezvit prenese preko celične membrane. Med ali po procesu translokacije se signalni peptid proteina odcepi, njegova transmembranska domena pa se vsidra v celično steno bakterije (7).
- Lipoproteini vsebujejo v C-terminalnem delu signalnega peptida tako imenovani vzorec lipobox s cisteinom. Po izločitvi lipoproteina se signalni peptid odcepi, pri

čemer se tvori kovalentna povezava med cisteinom, ki predstavlja N-terminalni del nastalega zrelega lipoproteina, ter fosfolipidi v celični membrani (7).

C) Kovalentno lahko želeni protein sidramo na bakterijsko površino tudi preko zaporedja aminokislin LPxTG. V ta namen ga spojimo s prepoznavnim vzorcem LPxTG, ki predstavlja aminokisline levcin (L), prolin (P), x (katerakoli aminokislina), treonin (T) in glicin (G). Zaporedje LPxTG namreč prepoznačajo bakterijske transpeptidaze sortaze (7). Sortaza A cepi vez med T in G v zaporedju LPxTG tarčnega proteina in ga preko T kovalentno veže na peptidoglikan. Ta proces poteče v petih korakih, ki jih prikazuje Slika 2: 1) prepoznavanje signalnega peptida proteina in izločitev proteina, ki zaradi hidrofobne sredice peptida ostane vsidran v celični membrani; 2) cepitev proteina na mestu med T in G, ko sortaza in substratni protein prideta v neposredno bližino; 3) nukleofilni napad lipida II na nastalo tioestersko vez in ločitev kompleksa sortaza/protein; 4) povezava proteina z lipidom II preko pentapeptidnega mostu; 5) vsidranje proteina v celično steno s C-terminalno domeno preko lipida II (16, 17). V bakteriji *L. lactis* je sortaza A glavna delujoča sortaza, odgovorna za pritrjevanje proteinov na celično površino. V nekaterih vrstah laktokokov je aktivna tudi sortaza C, vendar pa prepoznavanje drugačno zaporedje kot sortaza A. Njena biološka funkcija je tvorba pilusov, vendar ne v laktokokih, saj v njih do tvorbe pilusov ne pride (16).

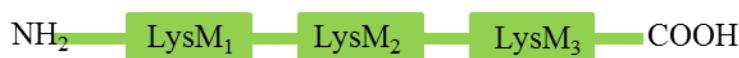


Slika 2: Shematski prikaz petstopenjskega mehanizma kovalentne vezave substratov preko aminokislinskega zaporedja LPxTG. SP je signalni peptid; prizjeno po (16).

Aminokislinsko zaporedje LPxTG predstavlja v proteinu sestavni del večjega konstrukta za pritrjevanje. Protein, ki deluje kot sidro, ima v C-terminalnem delu zaporedje, katerega dolžino lahko spremenimo, 30 hidrofobnih aminokislinskih ostankov in LPxTG. Primeri proteinov, ki se pritrjujejo na *L. lactis* preko zaporedja LPxTG, so PrtP, YndF in CluA (18, 19, 20). V eksperimentalnem delu magistrske

naloge smo uporabili protein CluA. To je površinski protein, velik 136 kDa, katerega izražanje v genomu *L. lactis* kodira gen *cluA*. (20). Njegova funkcija je sodelovanje v procesu konjugacije, v okviru katerega pride do kointegracije plazmida s spolnim faktorjem DNA (21). Prenos spolnih faktorjev povzroči celično agregacijo, ki omogoča prvi stik med donorsko in receptorskjo celico, ki je nujno potreben za učinkovit konjugacijski prenos genskega materiala (22).

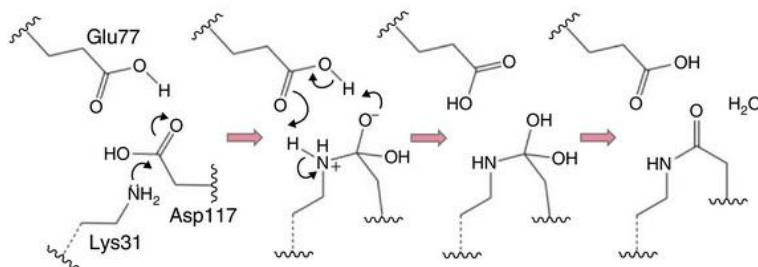
D) Nekovalentno lahko proteine na površino bakterij vežemo preko različnih domen. Pogosto vežemo rekombinantne proteine na površino bakterij *L. lactis* preko lizinskega motiva (LysM). Njegovo zaporedje se specifično veže na *N*-acetilglukozamin v peptidoglikanu. Ta povezava poteka preko več vodikovih vezi in van der Waalsovih interakcij (23). Vezava enega LysM poteka z mikromolarno afiniteto, prisotnost več zaporedij LysM pa jo poveča. Tako se LysM močno veže na peptidoglikan, kar je zelo ugodno, če ga uporabimo za stabilno in obstojno vezavo rekombinantnih proteinov (23). Encim AcmA je *N*-acetilglukozaminidaza oz. avtolizin s funkcijo pri celični delitvi bakterije *L. lactis*. Ker vsebuje aminokislinsko zaporedje LysM, ga pogosto uporabljam za pritrdiritev proteinov na bakterijsko površino (24, 25). Polipeptid AcmA sestavlja 437 aminokislin v velikosti 46 kDa, na C-koncu pa se nahaja sidro, ki vsebuje tri ponovljena področja domene LysM, v velikosti 44 do 65 aminokislinskih ostankov (24, 26) (Slika 3). Omenjena področja so med sabo ločena z nehomolognimi sekvencami, bogatimi s serinskimi, treoninskimi in asparaginskimi ostanki. Lizin je v domenah lahko prisoten bodisi v eni ali več kopijah (26).



Slika 3: Shematski prikaz strukture *N*-acetilglukozaminidaze AcmA; prizjeno po (24).

Domena LysM je zanimiva tudi za oblikovanje nerekombinantnih organizmov za terapevtsko uporabo. Specifična vezava med LysM in peptidoglikanom namreč omogoča, da lahko rekombinantni protein, ki nastane v eni bakteriji, sidramo na površino druge, ki ni GSO. Tak protein imenujemo heterologni protein, saj je proizveden v drugem organizmu, kot ga kasneje uporabimo. Sestavljen je iz signalnega peptida, zaporedja za protein, ki ga želimo preko sidra LysM pripeti na površino nerekombinantne bakterije, in domene LysM (23, 27).

Sidranje želenih proteinskih konstruktov na bakterijsko površino lahko poteka tudi preko specifične tvorbe kovalentnih vezi med nekaterimi proteini in peptidi. Za pridobitev para protein/peptid so v fibronektinskem vezavnem proteinu bakterije *Streptococcus pyogenes* (Spy), domeno adhezina CnaB2 ločili na dva dela in tako dobili par peptid SpyTag (13 aminokislinskih ostankov)/protein SpyCatcher (138 aminokislinskih ostankov) (28). Po cepitvi v par protein/peptid so uvedli mutacije za vzpostavitev čim močnejše in stabilnejše vezi. Proteinski del para so optimizirali s skrajšanjem do dolžine, ki je še omogočala dovolj močno vezavo s peptidom. Ugotovili so, da je vez ustrezno močna, če optimizirani SpyCatcher sestavlja 21 - 104 aminokislinskih ostankov prvotnega proteina SpyCatcher (28, 29, 30). Med parom protein/peptid se spontano tvori močna izopeptidna vez, stabilna pri silah do 1,9 pN ter obstojna pri različnih temperaturah (4 – 37 °C) in pH vrednostih (od 5 do 8). Na njeno stabilnost ne vplivajo niti različni pufri niti neionski detergenti (29, 31, 32). Podoben par protein/peptid so naredili tudi Veggiani in sod., in sicer z uvedbo sprememb v adhezinu RrgA bakterije *Streptococcus pneumoniae* (Snoop). Tvorbo irreverzibilne vezi so dokazali v paru peptida SnoopTag (12 aminokislinskih ostankov) in proteina SnoopCatcher (112 aminokislinskih ostankov) (32). Vez med SnoopTag in SnoopCatcher je obstojna pri različnih temperaturah (4 – 37 °C) in pH vrednostih (od 6 do 9). V primeru obeh parov gre za specifično tvorbo vezi, saj so dokazali odsotnost navzkrižnih reakcij. V nobenem izmed omenjenih parov protein/peptid ni cisteina, kar omogoča stabilnost v reducirajočem okolju (33). V paru SpyTag/SpyCatcher se vez tvori med aminokislinama D v SpyTag-u in K v SpyCatcher-ju, v paru SnoopTag/SnoopCatcher pa med K v SnoopTag-u in N v SnoopCatcher-ju. Predlagali so dva možna mehanizma tvorbe vezi med peptidom in proteinom. Med SpyTag in SpyCatcher naj bi se izopeptidna vez tvorila po nukleofilnem napadu aminokisline K na D, pri čemer pride do izločitve H₂O (Slika 4). Pred nukleofilnim napadom se med E in D tvori dvojna H-vez, ki olajša potek reakcije s sprejemanjem in oddajanjem protona na E. SnoopTag in SnoopCatcher pa se povežeta po nukleofilnem napadu K na N, pri čemer se izloči NH₃ (30, 31). Slabost za terapevtsko uporabo parov Tag/Catcher je v tem, da niso človeškega izvora in so zato potencialno imunogeni. Hkrati pa je to lahko tudi prednost, npr. pri njihovi uporabi v vlogi adjuvantov v cepivu (28). Tako so s parom Tag/Catcher dokazali tvorbo stabilnega cepiva za dostavo antigena z virusom podobnimi delci v vlogi vektorja. Na virusno kapsido so vezali peptid, na antigen pa protein (ali obratno) in potrdili vezavo med njima in s tem tvorbo cepiva (33).



Slika 4: Prikaz mehanizma tvorbe vezi med proteinom SpyCatcher in peptidom SpyTag; povzeto po (28).

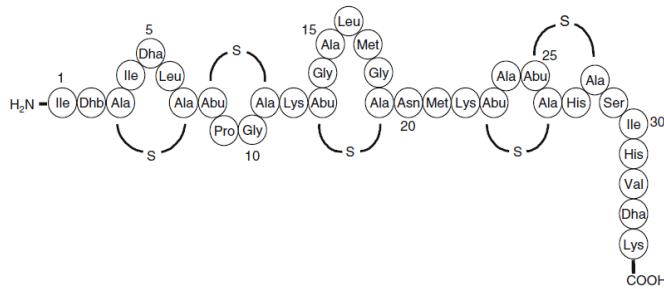
1.5 Sistem za izražanje genov

Sistemi za izražanje genov so lahko pod nadzorom konstitutivnih ali inducibilnih promotorjev. Konstitutivni so stalno izraženi v času bakterijske rasti in omogočajo kontinuirno nastajanje proteinskega produkta. V sistemih, ki temeljijo na konstitutivnih promotorjih, v primerjavi s tistimi, ki so nadzorovani z inducibilnimi promotorji, ne potrebujemo zunanjega dejavnika za indukcijo izražanja genov, vendar je nivo njihove ekspresije običajno nižji. Pri sistemih nadzorovanih z inducibilnimi promotorji pa sprožimo izražanje s pomočjo zunanjega dražljaja, ki inducira delovanje promotorja in prepisovanje gena za želeni protein (34). Zaradi večjega nadzora, ki ga dosežemo z uporabo inducibilnih promotorjev, tako nadzorovane sisteme uporabljamo pogosteje. Za indukcijo izražanja proteinov v laktokokih lahko uporabimo več sistemov:

- sistema, katerega delovanje uravnavamo s prisotnostjo cinkovih ionov;
- sistema, katerega delovanje sprožimo z znižanjem vrednosti pH;
- sistema, katerega delovanje sprožimo s ksilozo;
- sistema nadzorovan z nizinom (NICE) (3).

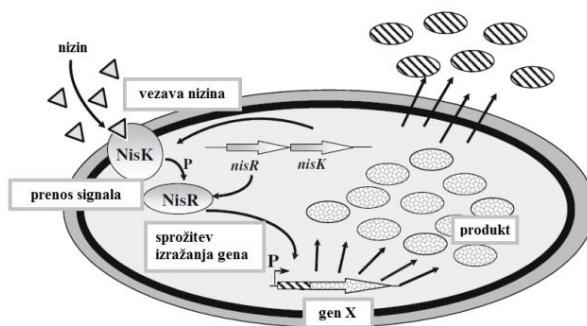
1.5.1 Sistem NICE

Za izražanje rekombinantnih proteinov na površini bakterije *L. lactis* najpogosteje uporabljamo ekspresijski sistem pod nadzorom nizina. To je antibakterijski peptid bakteriocin, ki ga izločajo nekatere vrste bakterij. Po vezavi na lipid II v bakterijski membrani v njej tvori majhne pore, ki povzročijo izgubo ATP in celično smrt. Z njegovo pomočjo lahko učinkovito uravnavamo izražanje genov, membranskih proteinov, izločanje proteinov in njihovo sidranje na bakterijsko površino. Nizin sestavlja 34 aminokislin in pet obročnih struktur (Slika 5) (1).



Slika 5: Shematski prikaz strukture nizina. Dhb je dehidrobutirin, Dha je dehidroalanin, Ala-S-Ala je lantionin, Abu-S-Ala je β -metillantionin; povzeto po (2).

Nizin nastane kot prekurzor z ribosomsko sintezo in je nato podvržen posttranslacijskim modifikacijam, kot sta dehidracija serinskih in treoninskih aminokislinskih ostankov ter tvorba tioesterskih mostičkov lantioninov. Biosintezo nizina omogoča skupina 11 genov. Prvi med njimi, *nisA*, kodira prekurzor za sintezo nizina, ostali pa usmerjajo tvorbo proteinov, pomembnih za modifikacijo, translokacijo in procesiranje končnega produkta (*nisB*, *nisC*, *nisP*, *nisT*), zagotavljanje imunosti gostitelja na nizin (*nisI*, *nisF*, *nisE*, *nisG*) ter regulacijo izražanja genov nizina (*nisR*, *nisK*). NisK je kinaza v citoplazemski membrani in deluje kot receptor za nizin. Po vezavi nizina nanjo avtofosforilira in prenese fosfatno skupino na NisR. Aktivirani NisR* inducira transkripcijo dveh od treh promotorjev P_{nisA} in P_{nisF} , v skupini nizinskih genov. Tretji promotor, ki je konstitutivno izražen, skrbi za izražanje *nisR* in *nisK* in nanj ne vplivamo z zunanjimi dejavniki. Na mesto za inducibilnim promotorjem P_{nisA} v plazmidu lahko vstavimo želeni gen in z dodatkom nizina v gojišče induciramo njegovo izražanje ter posledično tvorbo želenega proteina (Slika 6). Izražanje želenega gena sprožijo že subinhibitorne koncentracije nizina (0,1 - 5 ng/mL) v gojišču. Poleg tega lahko z dodajanjem različnih koncentracij nizina vplivamo tudi na količino izločenega tarčnega proteina (2).



Slika 6: Izražanje želenega proteinskega produkta pod vplivom nizina; pritejeno po (2).

Plavec T. V. Razvoj sistema za predstavitev dveh proteinov na površini ... *L. lactis*
Magistrska naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Za uporabo sistema NICE so razvili različne gostiteljske bakterijske seve in plazmide. Za njegovo vzpostavitev so iz skupine nizinskih genov izolirali *nisR* in *nisK* in ju vstavili v kromosom bakterije *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363, ki nima plazmidov, ne proizvaja zunajceličnih proteaz in v osnovi ne vsebuje nizinskih genov. Z njenega gensko modifikacijo so ustvarili sev NZ9000, ki je največkrat uporabljeni gostiteljski sev za sistem NICE. Za tvorbo želenih konstruktov uporabljamo različne plazmide. Tipičen primer je plazmid pNZ8048, obstajajo pa tudi njegove različice, npr. pNZ8148 z vstavljenim restrikcijskim mestom *NcoI* za tvorbo rekombinantnih proteinov (35).

2 NAMEN DELA

Avtoimunske bolezni lahko blažimo oz. simptomatsko zdravimo z različnimi učinkovinami, ki pa so večinoma namenjene parenteralni aplikaciji, kar zaradi zagotavljanja sterilnosti in apirogenosti povzroča visoke stroške proizvodnje. Poleg tega je parenteralna aplikacija invazivna in za bolnika največkrat neprijetna metoda zdravljenja. Peroralna dostava želene učinkovine s pomočjo bakterij predstavlja cenejšo, predvsem pa bolniku prijaznejšo obliko aplikacije (8). Mlečnokislinske bakterije (MKB) lahko uporabimo kot varen gostiteljski sistem in vektor za dostavo učinkovin, ki so lahko protitelesa, antigeni ali terapevtski proteini. Za pridobitev ustreznega sistema MKB potrebujemo molekularno-biološki razvoj novih plazmidov ter vpeljavo in vrednotenje ustreznih modelnih proteinov.

Namen magistrske naloge je razviti sistem za sočasno predstavitev dveh proteinov na površini MKB *Lactococcus lactis*. To bomo skušali doseči z uporabo različnih modelnih proteinov in metod za njihovo vezavo na bakterijsko površino. Izražanje rekombinantnega proteina na bakterijski površini bomo spodbudili s pomočjo sistema NICE. Ekspresijo ustreznih proteinskih fragmentov bomo analizirali z barvanjem z barvilom Coomassie Brilliant Blue ter prenosom po Westernu. Sidranje želenega proteina s pomočjo različnih mehanizmov ter vezavo ustreznih protiteles na bakterijsko površino, bomo analizirali s pretočno citometrijo in tehniko ELISA. V zaključnem delu pa bomo vrednotili možnosti specifične kovalentne pritrditve rekombinantnih proteinov na površino bakterije *L. lactis*.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijske kulture

V eksperimentalnem delu smo uporabljali dve bakterijski kulturi:

- *Lactococcus lactis* (*L. lactis*) NZ9000, genotip: MG1363 *nisRK ΔpepN*

NZ9000 je standardni gostiteljski sev za z nizinom nadzorovano izražanje genov (NICE®).

Vsebuje regulatorna gena *nisR* in *nisK*, ki sta vstavljeni v gen *pepN* (35). Uporabili smo ga za pripravo kompetentnih celic *L. lactis*, namnožitev plazmidov z vstavljenim genom za izražanje površinskih proteinov, namnožitev genov za površinske proteine s PCR in za izražanje površinskih proteinov.

Bakterija *L. lactis* za rast potrebuje gojišče GM17. Potem, ko celice transformiramo s plazmidom, mu dodamo antibiotik kloramfenikol, s čimer onemogočimo razrast neželenih kultur (36).

- *Escherichia coli* (*E. coli*): DH5α (Invitrogen), genotip: F- φ80lacZΔM15 Δ(*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rk-, mk+) *phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1* (37).

Mutacije genov *recA1* in *endA1* omogočajo večjo stabilnost in kvaliteto pridobljene plazmidne DNA (38).

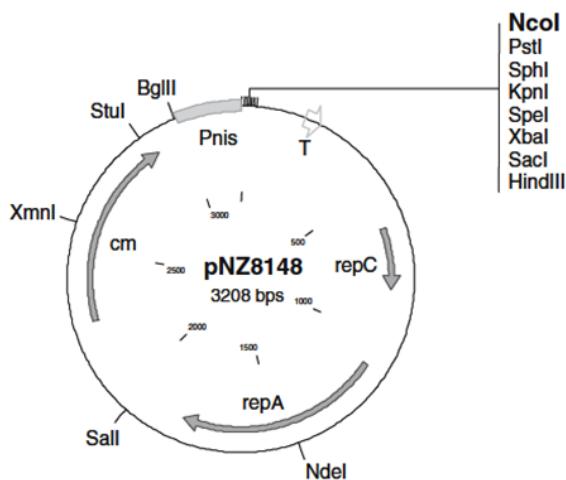
Kompetentne celice DH5α smo uporabili za namnožitev plazmida pGEM-T Easy z vstavljenim genom za površinski protein.

3.1.2 Plazmidi

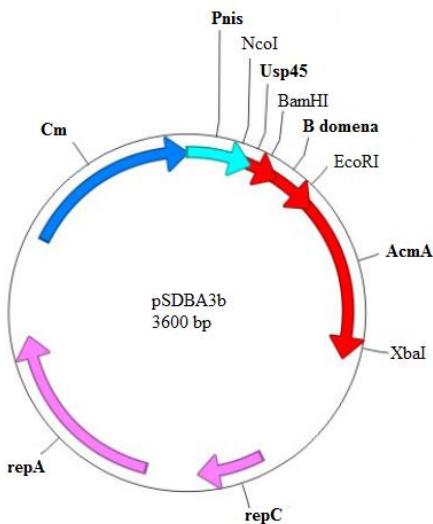
Za pripravo konstruktov smo uporabili naslednje plazmide (23, 35, 39):

- pNZ8148: gostiteljski plazmid za transformacijo v *L. lactis*, s kloramfenikolno rezistenco in z nizinskim promotorjem (Slika 7);
- pSDBA3b: plazmid za površinsko predstavitev rekombinantnih proteinov na površini bakterije *L. lactis*, derivat pNZ8148, s fuzijo genov Usp45, domene B in encima AcmA (Slika 8);
- pGEM®-T Easy Vector (Promega): splošen vektor za kloniranje produktov PCR. Je odprt plazmid, ki ima na obeh 3'-koncih dodan timidin s funkcijo preprečevanja zapiranja plazmida samega vase in prileganja koncem produktov PCR, ki jim nekatere vrste termostabilnih polimeraz (Taq polimeraza) na 5'-koncih dodajo adenin in tako

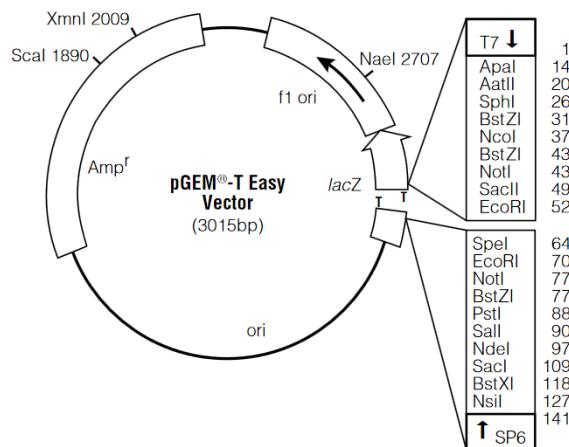
izboljšajo ligacijo produktov PCR v plazmid (Slika 9).



Slika 7: Plazmid pNZ8148. Cm je gen za kloramfenikol acetiltransferazo (omogoča selekcijo uspešno transformiranih bakterij na osnovi rezistence na kloramfenikol); Pnis je nizinski promotor, repA replikacijski gen A, repC pa replikacijski gen C (35).



Slika 8: Plazmid pSDBA3b. Cm je gen za kloramfenikol acetiltransferazo, Pnis je nizinski promotor, Usp45 je signalni peptid, domena B je modelni protein, AcmA zaporedje za sidranje, repA replikacijski gen A, repC pa replikacijski gen C (23).



Slika 9: Plazmid pGEM-T Easy. T7 je iniciacijsko mesto za RNA polimerazo T7, SP6 je iniciacijsko mesto za RNA polimerazo SP6, gen *lacZ* je gen za β -galaktozidazo z multiplim mestom za kloniranje (MCS). MCS vsebuje prepoznavna mesta za encime, ki omogočajo restrikcijo plazmida in nato vstavitev DNA fragmentov. Gen *ampr* je gen za β -laktamazo, ki omogoča selekcijo uspešno transformiranih bakterij na osnovi rezistence na ampicilin (39).

3.1.3 Začetni oligonukleotidi

Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri našem delu, so zbrani v Preglednici I.

Začetni oligonukleotidi ustrezajo naslednjim zahtevam:

- dolžina vsaj 18 bp za specifičnost vezave,
- vsebnost GC 40-60 %,
- talilna temperatura (T_m) začetnih oligonukleotidov 46 - 55 °C,
- razlika T_m med začetnima nukleotidoma < 3°C,
- končni nukleotid je G ali C.

Oligonukleotide smo naročili pri podjetju IDT (ZDA), jih raztopili v predpisanim volumnu dH₂O in nato z dH₂O razredčili do koncentracije 5 μ M.

Preglednica I: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov.

	Nukleotidno zaporedje (5'→3')
pMSuni	GTTAGATACAATGATTTCG
pMSrev	TGCTTTTGCGTATCAATC
M13-uni	TGTAAAACGACGGCCAGT

SP6	CATTTAGGTGACACTATAG
B-R-Kpn-So-Xba	TTCTAGATTATTGTTAACCTTAATAAAATCGATGTCACCC AACTTGGTACCTTTGGTGCTTGTGCATC
B-R-Kpn-Sy-Xba	TTCTAGATTATTGGTGGGTTATATGCATCGACCATTACA ATATGAGCGGTACCTTTGGTGCTTGTGCATC
B-R-Xba	TTCTAGATTGGTGCTTGTGCATC
B-F-BamHI	AGGATCCGCTGATAACAAATTCAAC
Spy-R-Eco	AGAATTCAATATGAGCATCACCTTTGTTG
Sno-R-Eco	AGAATTCCCTTGGTGGGATTGGTTCGTTC

3.1.4 Encimi

V Preglednici II so navedeni vsi uporabljeni encimi.

Preglednica II: Seznam uporabljenih encimov.

Encim	Proizvajalec
NcoI (cepi zaporedje CCATGG)	Thermo Fisher (ZDA)
XbaI (cepi zaporedje TCTAGA)	Thermo Fisher (ZDA)
BamHI (cepi zaporedje GGATCC)	Thermo Fisher (ZDA)
EcoRI (cepi zaporedje GAATTC)	Thermo Fisher (ZDA)
lizocim (razgradi celično steno <i>L. lactis</i>)	Sigma (ZDA)
mutanolizin (razgradi celično steno <i>L. lactis</i>)	Sigma (ZDA)
T4 DNA ligaza	Fermentas (ZDA)
DreamTaq Green DNA polimeraza	Fermentas (ZDA)

3.1.5 Reagenti in topila

V Preglednici III smo zbrali podatke o uporabljenih reagentih in topilih.

Preglednica III: Seznam uporabljenih reagentov in topil.

Reagent	Proizvajalec
akrilamid	Merck (ZDA)
amonijev persulfat	Sigma-Aldrich (ZDA)
Coomassie Brilliant Blue	Amersham (VB)

DTT	Fermentas (ZDA)
glicerol	Carlo Erba (Italija)
mleko v prahu	Pomurske mlekarne (Slovenija)
PBS pufer	pripravimo sami
TBS pufer	pripravimo sami
TBST pufer	pripravimo sami
TEMED	Serva (Nemčija)
Tris-HCl (pH 6,8)	pripravimo sami
Tris-HCl (pH 8,8)	pripravimo sami
Tween 20	Serva (Nemčija)
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Promega (ZDA)
agarozna raztopina za elektroforezo (Agarose Gel Electrophoresis)	BioWhittaker Molecular Applications (ZDA)
SYBR Safe	Invitrogen (ZDA)
6x nanašalna raztopina za elektroforezo (Loading Dye Solution)	Fermentas (ZDA)
označevalec velikosti 100 bp (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder)	Fermentas (ZDA)
označevalec velikosti za NaDS PAGE (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder)	Fermentas (ZDA)
1- butanol	Merck (ZDA)
HCl (37 %)	Merck (ZDA)
TRIS	Serva (Nemčija)
etanol 96 % (v/v)	Carlo Erba (Italija)
glicin	Serva (Nemčija)
saharoza	Serva (Nemčija)
NaDS	Sigma (ZDA)
metanol	Sigma-Aldrich (ZDA)
ampicilin	Sigma (ZDA)

kloramfenikol	Sigma (ZDA)
glukoza monohidrat	Fluka (ZDA)
nizin	Fluka (ZDA)
Lumi-Light Enhancer Solution	Roche (Švica)
Lumi-Light Stable Peroxide Solution	Roche (Švica)
10x ligacijski pufer	New England Biolabs (ZDA)
10x DreamTaq Green pufer	Fermentas (ZDA)

3.1.6 Protitelesa

Preglednica IV vsebuje podatke o primarnih in sekundarnih protitelesih, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu.

Preglednica IV: Seznam uporabljenih protiteles.

Primarna protitelesa	Proizvajalec
kožja protitelesa, specifična za protein A	Abcam, ab7243 (VB)
kunčja protitelesa, specifična za histon H3	Santa Cruz, sc-803 (ZDA)
Sekundarna protitelesa	
oslovska protikozja protitelesa, označena s HRP	Jackson ImmunoResearch, 705-035-003 (VB)
kozja protikunčja protitelesa, označena s HRP	Jackson ImmunoResearch, 111-035-045 (VB)
konjugirana oslovska protikozja protitelesa, fluorescentno označena z barvilom Alexa Fluor 488	Abcam, ab150129 (VB)
konjugirana oslovska protikunčja protitelesa, fluorescentno označena z barvilom Alexa Fluor 488	Invitrogen, A-21206 (ZDA)
kozja protikunčja protitelesa, fluorescentno označena z barvilom Dylight 650	Thermo Scientific, SA5-10034 (ZDA)
človeška IgG protitelesa, fluorescentno označena z barvilom FITC	Jackson ImmunoResearch (VB)

3.1.7 Pufri

V preglednici V so predstavljeni vsi uporabljeni pufri in njihove sestave.

Preglednica V: Seznam uporabljenih pufrov.

Pufer	Sestava	Pufer	Sestava
10-kratni fosfatni pufer (PBS)	80,1 g NaCl 2 g KCl 17,8 g Na ₂ HPO ₄ 2,7 g KH ₂ PO ₄ dopolnimo z dH ₂ O do 1 L, uravnamo pH na 7.4 in pred uporabo 10-krat redčimo z dH ₂ O	Tris pufer z dodatkom Tweena za prenos Western	Za 0,5 L: 50 mL 10-kratnega TBS 450 mL dH ₂ O 250 µL Tweena 20
50-kratni pufer TAE	242 g trisa 57,1 g CH ₃ COOH 18,6 g EDTA dopolnimo z dH ₂ O do 1 L, pH = 8.0	substratni pufer za test ELISA	150 mM Na ₂ HPO ₄ 50 mM citronske kisline pH = 6.0
10-kratni pufer Tris (TBS)	60,48 g trisa 87,6 g NaCl dopolnimo z dH ₂ O do 1 L, uravnamo pH na 7.5, pred uporabo 10-krat redčimo z dH ₂ O	nanašalni pufer	2,5 mL 0,5 M Trisa HCl, pH = 6,8 2,0 mL glicerola 4,0 mL 10% NaDS kapljica bromfenol modrega 1,5 mL dH ₂ O
pufer Tris z dodatkom 0,1% Tweena 20 (TBST)	Za 1 L: 100 mL 10-kratnega TBS 900 mL dH ₂ O 1 mL Tweena 20	10-kratni elektroforezni pufer	29 g trisa 144 g glicina 10 g NaDS dopolnimo z dH ₂ O, pred uporabo 10-krat redčimo z

				dH ₂ O
10-kratni western	pufer	150 g trisa 290 g glicina dH ₂ O do 5 L	pufer za prenos	100 mL 10-kratnega pufra western 200 mL MeOH 3,750 mL 10% NaDS dopolnimo z dH ₂ O do 1 L

3.1.8 Gojišča

V Preglednici VI so navedena gojišča, ki smo jih uporabljali pri eksperimentalnem delu.

Preglednica VI: Seznam uporabljenih gojišč.

Gojišče	Sestava	Gojišče	Sestava
M17	5 g/L peptona 5 g/L sojinega peptona 5 g/L laktoze 5 g/L govejega ekstrakta 2,5 g/L kvasnega ekstrakta 0,5 g/L askorbinske kisline 0,25 g/L magnezijevega sulfata 19 g/L dinatrijevega beta-glicerofosfata	GSGM17	21,25 g M17 85,58 g saharoze (0,5 M) 12,5 g glicina (2,5%) 2,75 g glukoze (0,5%)
tekoče gojišče GM17	42,5 g/L M-17 12,5 mL 40% glukoze (0,5% glukoza) 10 µg/mL kloramfenikola Glukozo in antibiotik dodamo po avtoklaviranju in ohlajanju na 45 °C.	SOC	20 g triptona (2%) 5 g kvasnega ekstrakta (0,5%) 2 ml 5M NaCl 2,5 ml 1M KCl 10 ml 1M MgCl ₂ 10 ml 1M MgSO ₄

			20 ml 1M glukoze dopolnimo z dH ₂ O do 1 L, avtoklaviramo
GM17C10	42,5 g/L M17 15 g agarja dopolnimo z dH ₂ O do 1L, avtoklaviramo. Glukozo (12,5 mL 40%) in antibiotik (400 µL 25 mg/mL) dodamo po avtoklaviranju in ohlajanju na 45 °C, nato gojišče zlijemo v sterilne petrijevke.	tekoče gojišče LB, LBA	10 g/L triptona 5 g/L kvasnega ekstrakta 10 g/L NaCl raztopimo v 950 mL dH ₂ O, z 0,1 M NaOH uravnamo pH na 7,5, dopolnimo z dH ₂ O do 1 L, avtoklaviramo. Za LBA dodamo ampicilin (50 µg/ mL)
SGM17	42,5 g/L M17 0,5 % glukoze 0,5 M saharoze sterilno prefiltriramo v brezprašni komori	trdno gojišče LB, LBA	Za spremembo tekočega gojišča LB/LBA v trdno gojišče dodamo 15 g/L agarja, avtoklaviramo, ohladimo in vlijemo v sterilne petrijevke. Pri gojišču LBA dodamo ampicilin.
SGM17+CaCl ₂ + MgCl ₂	za 50 mL: 2,125 g M17 0,275 g glukoze (0,5 %) 8,56 g saharoze (0,5 M) 0,0952 g MgCl ₂ (20 mM) 0,015 g CaCl ₂ (2 mM) raztopimo v vodi miliQ in umerimo do 50 mL. Nato sterilno prefiltriramo.		

3.1.9 Laboratorijska oprema

Preglednica VII vsebuje podatke o laboratorijskem materialu in napravah, ki smo jih uporabljali pri našem delu.

Preglednica VII: Seznam uporabljeni laboratorijske opreme.

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
avtomatske pipete	Eppendorf (Nemčija)
centrifuga Eppendorf	Eppendorf (Nemčija)
centrifuga Hettich	Hettich (Nemčija)
epruvete za centrifugiranje	Sigma-Aldrich (ZDA)
kadičke in elektroforeznji material	BioRad (ZDA)
hladilnik	Electrolux (Švedska)
zamrzovalnik (-80 °C)	Sanyo (Japonska)
zamrzovalnik (-20 °C)	Liebherr (Švica)
stresalnik Vibromix	Tehtnica (Slovenija)
inkubator 30 °C	Memmert (Nemčija)
inkubator 37 °C	Binder (Nemčija)
inkubator-stresalnik Certomat HK	B. Braun Biotech International (Nemčija)
spektrofotometer Nanodrop ND 1000	Thermo Scientific (ZDA)
nitrocelulozna membrana za prenos Western	GE Healthcare Life Science (ZDA)
membrana za PVDF prenos Western	Immobilon (Nemčija)
termoblok ThermoShaker	Biometra (Nemčija)
aparatura za gelsko elektroforezo POWER PAC 300	BioRad (ZDA)
aparatura za NaDS PAGE in prenos na membrano	BioRad (ZDA)
aparatura za PCR Mastercycler nexus X2	Eppendorf (Nemčija)
tehnci	Genius, Sartorius (Nemčija) 200A, Tehnica (Slovenija)
0,2 µm filtri Minisart	Sartorius Stedim (Francija)
pH meter SevenEasy	Mettler Toledo (Švica)
mikrovalovna pečica ZM21MS	Zannusi (Italija)

brezprašna komora	Labcaire (ZDA)
digestorij	Wesemann (Nemčija)
vakuumski koncentrator Speed Vac SV C100H	Savant Eppendorf 5301 (Nemčija)
spektrofotometer Lambda Bio +	PerkinElmer (ZDA)
aparatura za elektroporacijo Gene Pulser II apparatus	Biorad (ZDA)
kivete za elektroporacijo 0,2 cm GenePulser	BioRad (ZDA)
ultrazvočni razbijalec Cell disruptor W185	Sonifer (Španija)
pretočni citometer BD FACSCalibur	Becton Dickinson Inc. (ZDA)
scanner za western in Coomassie ChemiDoc MP	Biorad (ZDA)
aparatura za slikanje gelov	UVItec (VB)

3.2 METODE

3.2.1 Priprava kompetentnih celic *Lactococcus lactis* za elektroporacijo

Ker ima *L. lactis* kot gram-pozitivna bakterija debelo celično steno, ta med postopkom transformacije predstavlja fizično oviro za vstop DNA v celico. Zato bakterijske celice pred transformacijo obdelamo tako, da jim oslabimo celične stene in s tem izboljšamo prenos DNA vanje. Pred elektroporacijo najprej pripravimo kompetentne celice, ki omogočajo učinkovit sprejem tujih DNA (40). Kompetentne celice smo pripravili po navodilih proizvajalca MoBiTec (Belgija) (35).

3.2.2 Agarozna gelska elektroforeza

Agarozna gelska elektroforeza (AGE) je metoda ločevanja DNA po velikosti fragmentov v agaroznem gelu, pod vplivom delovanja električnega polja. Agaroza je linearen polisaharid, ki je topen v vročem pufru, pri ohlajanju pa polimerizira in tvori gel. DNA zaradi negativnega naboja fosfatnih skupin potuje od negativno nabite katode k pozitivno nabiti anodi. Hitrost njenega potovanja je odvisna od velikosti fragmentov, stopnje premreženosti gela in električne napetosti (41). Pri AGE smo za detekcijo uporabili barvilo SYBR Safe, za določanje velikosti fragmentov pa označevalce velikosti 100 bp. AGE smo uporabili za ločitev produktov DNA nastalih po restrikciji, produktov PCR in za analizo produktov PCR na kolonijah.

Eksperimentalno delo:

Pripravili smo ogrodje za vlivanje gela in vstavili glavnice za nanos vzorcev. V stekleno erlenmajerico smo natehtali ustrezeno količino agaroze v prahu (0,5 g za 1% gel) in ji dodali 50 mL pufra TAE. Obe količini smo prilagajali glede na velikost kadičke. Agarozo smo raztopili v pufru z večkratnim segrevanjem v mikrovalovni pečici do vretja. Po segrevanju smo zmes ohladili, dodali 1 μ L/10 mL barvila SYBR Safe, premešali in vlili v ogrodje. Ko se je gel strdil, smo v pripravljeni ogrodje nalili pufer TAE, odstranili glavnice in v nastale žepke nanesli vzorce, in sicer bodisi celoten volumen produktov restrikcije in produktov PCR ali 10 μ L produkta PCR za analizo kolonij. Za določitev velikosti fragmentov smo pripravili in nanesli tudi 1 μ L označevalca velikosti 100 bp (pomešali smo ga z 2 μ L nanašalnega pufra Loading Dye 6x in 9 μ L dH₂O). Ogrodje z gelom in nanešenimi vzorci smo priključili na napetost 120 V v primeru večjega oz. 95 V v primeru manjšega gela. Po končani elektroforezi smo gel analizirali pod UV lučjo.

3.2.3 Priprava prekonočnih kultur

Prekonočne kulture pripravimo zato, da bakterije namnožimo v večjih količinah za nadaljnje eksperimentalno delo.

Eksperimentalno delo:

V steklene epruvete z zamaški smo aseptično, bodisi v komori z laminarnim pretokom filtriranega zraka ali pa neposredno ob plamenu gorilnika odpipetirali 5 mL gojišča (LB za *E. coli*, GM17 za *L. lactis*). V gojišče LB smo dodali 5 μ L ampicilina, v gojišče GM17 pa 2 μ L kloramfenikola. Bakterijsko kolonijo smo v gojišče prenesli s sterilnim zobotrebcem tako, da smo s prežarjeno pinceto držali zobotrebec, se z njim dotaknili bakterijske kulture na trdnem gojišču in ga nato potopili v tekoče gojišče. Prekonočne kulture *E. coli* smo inkubirali preko noči pri 37 °C, ob stresanju, prekonočne kulture *L. lactis* pa pri 30 °C, brez stresanja.

3.2.4 PCR za analizo kolonij

Za analizo prisotnosti plazmidov z izbranim genskim fragmentom v posameznih bakterijskih kolonijah smo izvedli PCR, pri čemer smo kot šablonu uporabili kar majhen del posamezne kolonije, iz katere se je med postopkom sprostila DNA. Produkte PCR smo analizirali z AGE.

Eksperimentalno delo:

Pripravili smo reakcijske mešanice za analizo s PCR, kot sledi: 3 µL pufra DreamTaq Green, 5 µL dNTP, 1 µL začetnega nukleotida 1, 1 µL začetnega nukleotida 2 in 15 µL dH₂O. V po 25 µL pripravljenih mešanic smo prenesli posamezne kolonije bakterij, tako da smo se s sterilnim koncem nastavka za pipete dotaknili preiskovane kolonije na trdnem gojišču, jo prenesli v mešanico za analizo s PCR in dobro premešali.

Nastavili smo program PCR:

začetna denaturacija	99°C	10 min
	50°C	2 min
denaturacija	94°C	30 s
prileganje	46°C	30 ciklov
podaljševanje	72°C	1 min
končno	72°C	5 min
podaljševanje		
konec reakcije	4°C	∞

10 min po začetku programa smo v vzorce dodali 5 µL mešanice Taq polimeraze z dH₂O (0,1 µL Taq polimeraza in 4,9 µL dH₂O).

Po končani PCR smo celoten volumen produktov nanesli na gel za analizo z AGE.

3.2.5 Priprava genskih konstruktov

3.2.5.1 Konstrukti z adnektini, LPxTG, SpyCatcher-jem in SnoopCatcher-jem (Slike 10, 11 in 12):

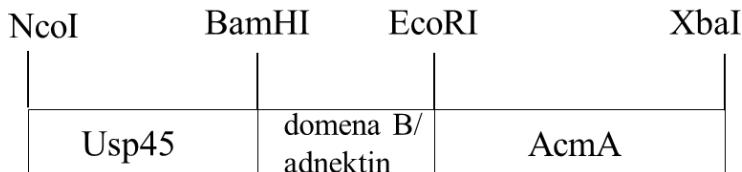
- Zaporedja za konstrukte smo pripravili na podlagi pripadajočih aminokislinskih zaporedij, iz katerih smo, ob upoštevanju tabele pogostosti kodonov, oblikovali gensko zaporedje s programom Gene Designer. Genska zaporedja smo naročili pri podjetju IDT (ZDA).
- Restrikcija: Gene za pripravo konstruktov smo klonirali v plazmid pSDBA3b z uporabo pripadajočih restrikcijskih encimov. Pripravili smo ustrezne mešanice za restrikcijo, kot sledi: 4 µL 10x pufra FastDigest, 2 µL encima 1, 2 µL encima 2, x µL plazmida (2 µg), y µL dH₂O ($\Sigma=40 \mu\text{L}$). Za adnektine, SpyCatcher in SnoopCatcher smo uporabili restrikcijska encima EcoRI in BamHI, za LPxTG pa EcoRI in XbaI. Izbrali smo dva različna adnektina, specifična za različna protitelesa, in sicer gAdn, ki veže kozja, ter rAdn, ki veže kunčja. Pripravili smo tudi dve različno dolgi zaporedji

LPxTG, in sicer daljšega lLPxTG ter krajšega sLPxTG. Pripravljeni mešanice vzorcev smo zmešali z vibracijskim mešalnikom in za kratek čas centrifugirali, nato pa postavili v termoblok na 37°C za 25 minut, da je potekla restrikcija.

- AGE: V mešanice vzorcev smo dodali po 8 µL nanašalnega pufra LoadingDye 6x in izvedli AGE po predhodno opisanem postopku. Po analizi elektroforeznega gela pod UV lučko smo iz gela s spatulo, ki smo jo prej pomočili v EtOH in prežgali, izrezali ločene fragmente DNA.
- Ekstrakcija fragmentov DNA iz gela: skladno z navodili proizvajalca smo s kompletom za izolacijo DNA, NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel, Nemčija) iz izrezanih fragmentov agaroznega gela izolirali DNA (42).
- Ligacija v plazmid pSDBA3b: Po meritvi koncentracij DNA s spektrofotometrom Nanodrop smo pripravili ligacijske mešanice, ki so vsebovale insert, plazmid, 10x ligacijski pufer in encim T4 ligazo, tako da smo dosegli molarno razmerje 1:3 med plazmidom in insertom. Ligacijske mešanice smo inkubirali preko noči pri 16 °C. Plazmidno DNA smo najprej očistili s kompletom NucleoSpin and PCR Clean-Up (Macherey-Nagel, Nemčija) po navodilih proizvajalca, s tem da smo jo v zadnjem koraku eluirali z dH₂O, segreto na 70 °C, očiščeno DNA pa nato skoncentrirali do volumna 2 µL (10 min pri temperaturi 30 °C) (42).
- Transformacija kompetentnih celic *L. lactis*: K 2 µL plazmidne DNA smo dodali 45 µL kompetentnih celic *L. lactis*. Bakterijske celice smo transformirali z elektroporacijo pri naslednjih pogojih: 2 kV, 200 Ω, 25 µF. Po dodatku 1.000 µL gojišča SGM17+CaCl₂+MgCl₂, smo celice inkubirali 2 uri pri 30 °C. Nato smo jih ob plamenu razmazali na gojišče GM17C10, in sicer najprej 100 µL, nato pa, po centrifugiranju (6.000 rpm, 2 min), še preostali del ter inkubirali 2 dni pri 30 °C.
- PCR za analizo kolonij: skladno s predhodno opisanim postopkom.
- Priprava prekonočnih kultur: skladno s predhodno opisanim postopkom.
- Izolacija plazmidne DNA za sekvenciranje in analizo (minipreparacija): Iz prekonočne kulture smo, po navodilih proizvajalca, s kompletom NucleoSpin plasmid (Macherey-Nagel, Nemčija) izolirali plazmid z dodanim korakom 30 min inkubacije pri 37 °C, ob stresanju s 50 µL lizocima in mutanolizina (43).
- Določanje nukleotidnega zaporedja plazmidne DNA: Vse plazmide smo poslali na sekvenciranje v podjetje GATC v Nemčijo. Rezultate prejetih sekvenč smo analizirali s

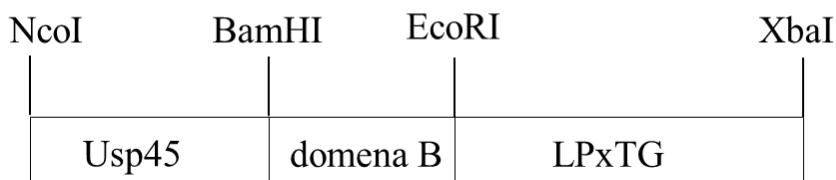
programom Clustal Omega, ki je prosto dostopen na medmrežju. Vzorce s potrjenim nukleotidnim zaporedjem smo uporabili za nadaljnje analize.

pSDBA3b/ konstrukt z adnektinom



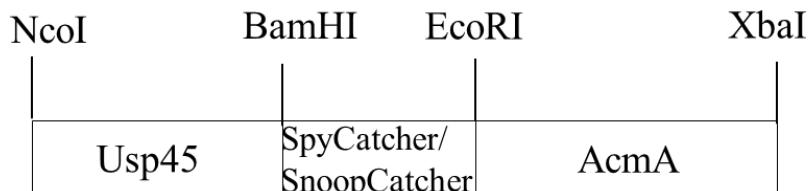
Slika 10: Shematski prikaz genskega konstrukta z domeno B ali adnektinom.

Konstrukt z LPxTG



Slika 11: Shematski prikaz genskega konstrukta z LPxTG.

Konstrukt s SpyCatcher/ SnoopCatcher



Slika 12: Shematski prikaz genskega konstrukta s SpyCatcher-jem/SnoopCatcher-jem.

3.2.5.2 Konstrukti s SpyTag, SnoopTag in domeno B (Sliki 13 in 14):

Za izdelavo konstruktorov s peptidoma SpyTag in SnoopTag smo pripravili začetne nukleotide v 5 µM koncentraciji. Z njimi smo s PCR pripravili gene z zaporedji za SpyTag- domeno B, SnoopTag- domeno B in samo domeno B brez peptidnega označevalca.

- Za pridobitev DNA z ustreznim zaporedjem smo uporabili PCR. V Preglednici VIII so navedene sestave mešanic za pomnoževanje s PCR. Nastavili smo program PCR s 5

min začetno denaturacijo pri 94 °C, 30 cikli inkubacije iz po 3 korakov (30 s denaturacija pri 94 °C, 1 min prileganje pri 48 °C in 1 min podaljševanje verige pri 72 °C) ter končnim 5 min podaljševanjem pri 72 °C in ohlajanjem pri 4 °C.

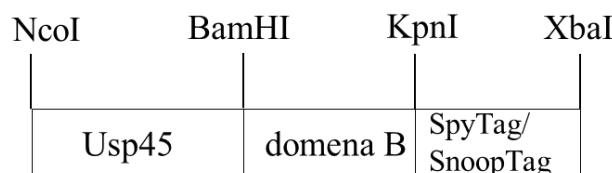
Preglednica VIII: Sestava mešanic za pomnoževanje konstruktov s PCR.

Vzorec	Sestava mešanice za PCR
Spytag-domena B	1 µL pSDBA3b (redčenega 1:10 z dH ₂ O), 2 µL B-F-BamHI, 2 µL B-R-Kpn-Sy-Xba, 5 µL pufra 10x Dream, 8 µL dNTP, 31,75 µL dH ₂ O, 0,25 µL Taq polimeraze
Snooptag-domena B	1 µL pSDBA3b (redčenega 1:10 z dH ₂ O), 2 µL B-F-BamHI, 2 µL B-R-Kpn-So-Xba, 5 µL 10x pufra Dream, 8 µL dNTP, 31,75 µL dH ₂ O, 0,25 µL Taq polimeraze
domena B	1 µL pSDBA3b (redčenega 1:10 z dH ₂ O), 2 µL B-F-BamHI, 2 µL B-R-Xba, 5 µL 10x pufra Dream, 8 µL dNTP, 31,75 µL dH ₂ O, 0,25 µL Taq polimeraze

- AGE: skladno s predhodno opisanim postopkom.
- Ekstrakcija fragmentov DNA iz agaroznega gela: skladno s predhodno opisanim postopkom.
- Ligacija v plazmid pGEM-T Easy: Pripravili smo ligacijske mešanice iz 2,5 µL 2x ligacijskega pufra, 0,5 µL plazmida pGEM-T Easy, 1,75 µL produkta PCR, očiščenega iz gela, ter 0,25 µL ligaze T4 DNA za ligacijo v pGEM (encim ligaza katalizira nastanek fosfodiestranske vezi med bazama). Ligacija je potekala preko noči pri 16 °C.
- Transformacija kompetentnih celic *E. coli* DH5α: Transformacijo kompetentnih celic *E. coli* smo izvedli s temperaturnim šokom. K ligacijski mešanici smo dodali 50 µL na ledu odtaljenih kompetentnih bakterijskih celic, jih 30 min inkubirali na ledu, izvedli 45 s toplotni šok v vodni kopeli s temperaturo 42 °C, suspenzijo ponovno ohladili na ledu za 2 do 3 min, dodali 450 µL gojišča SOC, 1 h stresali pri 37 °C in na plošče z gojiščem LBA najprej razmazali 50 µL bakterijske kulture, nato pa po centrifugiraju (3.000 rpm, 2 min) še preostali del ter inkubirali 1 dan pri 37 °C (44).
- PCR na osnovi kolonije: skladno s predhodno opisanim postopkom.
- Priprava prekonočnih kultur: skladno s predhodno opisanim postopkom.

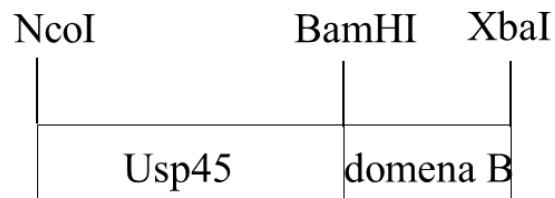
- Izolacija plazmidne DNA za sekvenciranje in analizo (minipreparacija): po navodilih proizvajalca NucleoSpin plasmid (Macherey-Nagel, Nemčija).
- Določanje nukleotidnega zaporedja: skladno s predhodno opisanim postopkom.
- Prekloniranje iz plazmida pGEM v pSDBA3b: SpyTag- domena B, SnoopTag- domena B in domena B, izražene v *E. coli*, smo z uporabo restriktičnih encimov BamHI in XbaI preklonirali v plazmid pSDBA3b. Po čiščenju plazmidne DNA, z reagenčnim sestavom PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Nemčija), skladno z navodili proizvajalca, smo s plazmidom transformirali celice *L. lactis* in jih po inkubaciji v 1.000 µL gojišča SGM17+CaCl₂+MgCl₂ (2h, 30 °C) razmazali na gojišče GM17C10 (42). To smo nato inkubirali 2 dni pri 30 °C, potem pa izvedli PCR za analizo kolonij. Pripravili smo prekonočne kulture za izolacijo plazmida in jih po minipreparaciji pripravili za sekvenciranje. Nukleotidno zaporedje plazmidne DNA smo določili po že predhodno opisanem postopku.

Konstrukt s SpyTag-domena B/ SnoopTag-domena B



Slika 13: Shematski prikaz genskih konstruktov SpyTag- domena B in SnoopTag- domena B.

Konstrukt z domeno B



Slika 14: Shematski prikaz genskega konstrukta z domeno B.

3.2.6 Izražanje proteinov v bakteriji *L. lactis*

Izražanje proteina smo inducirali s sistemom NICE. V času inkubacije smo merili optično gostoto pri 600 nm (OD_{600}), ki predstavlja merilo za število celic/volumen gojišča. Določimo jo turbidimetrično, z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 600 nm. Nizin smo bakterijam dodali glede na izmerjeno vrednost OD_{600} , in sicer v eksponentni fazi rasti, ko je bila $OD_{600} = 0,8 - 1,0$. Ekspresija po dodatku nizina je potekala še 3 h, pri čemer je bila končna izmerjena vrednost $OD_{600} = 2,5 - 3,0$.

Eksperimentalno delo:

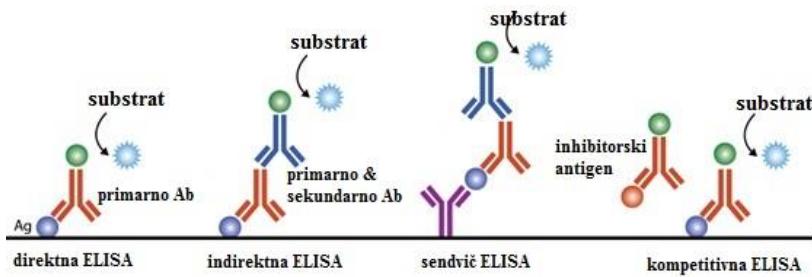
Prekonočne kulture bakterij *L. lactis*, transformiranih s plazmidi s potrjenimi zaporedji, smo redčili 1:50 v 10 mL svežega gojišča GM17 in jih inkubirali približno 3 h pri 30 °C, do eksponentne faze rasti. Izražanje proteina smo sprožili z dodatkom 10 µL 1 mg/mL nizina. Po 3 urah inkubacije pri 30 °C smo izmerili končno vrednost OD_{600} . Nato smo pripravili vzorce za nadaljnjo analizo: 1 mL celične kulture smo shranili za analizo s pretočno citometrijo, 4 mL za analizo s testom ELISA, preostanek pa centrifugirali 10 min pri 5.000 rpm, celice resuspendirali v 400 µL PBS in jih shranili pri -20 °C do analize z NaDS PAGE. Za analizo vezav med proteinom SpyCatcher/SnoopCatcher ter peptidom SpyTag/ SnoopTag smo izvedli tudi koekspresijo. V ta namen smo v začetnem koraku v 10 mL svežega medija dodali po 150 µL prekonočnih kultur SpyCatcher in SpyTag- domena B/domena B ter SnoopCatcher in SnoopTag- domena B/domena B.

3.2.7 Celična ELISA (Whole-cell ELISA)

ELISA je imunska tehnika za dokazovanje prisotnosti antigenov ali protiteles v vzorcu. Izvajamo jo v mikrotitrskih ploščicah, na katere vežemo bodisi specifične antigene ali protitelesa. Imobilizirane reaktante nato spiramo, za detekcijo specifičnih analitov pa inkubiramo z označenimi protitelesi. Označimo jih lahko radioaktivno, s fluorescentnimi barvili ali z encimi, npr. s hrenovo peroksidazo (HRP), ki po dodatku substratov tvorijo obarvane produkte. Obstaja več različic tehnike ELISA. Tako lahko določen antigen detektiramo po vezavi označenega primarnega protitelesa ali s kombinacijo neoznačenega primarnega protitelesa in označenega sekundarnega protitelesa. Primarno protitelo je v tem primeru specifično za antigen, sekundarno pa usmerjeno proti primarnemu in omogoča detekcijo dejanske vezave primarnega protitelesa na antigen (41). Možni so tudi alternativni sistemi. Različne načine izvedbe tehnike ELISA prikazuje Slika 15. Antigen lahko na mikrotitrsko ploščico imobiliziramo neposredno ali posredno preko protiteles, kar

imenujemo sendvič ELISA. Tak način detekcije je visoko občutljiv in specifičen. Enostavnemu sistemu z vezanim antigenom ali protitelesom, ki ga želimo dokazati, lahko dodamo še open antigen, ki inhibira vezavo protiteles ali antiga v drugi stopnji. Tak način uporabljamo, kadar je antigen majhna molekula in ima le en epitop, ki ga prepozna specifično protitelo (45).

Pri našem delu smo uporabili test celične ELISE. Pri tej metodi ni potrebno izolirati posameznega antiga za dokaz vezave protiteles, ampak uporabimo kar celice. Antigen pri celični ELISI torej ni immobiliziran na mikrotitrski plošči, temveč se nahaja na površini celic. Protein oz. antigen smo namreč izrazili na površini bakterije in je bil tako dostopen za vezavo specifičnih detekcijskih protiteles. V zadnji stopnji nato merimo redčeno suspenzijo celic in ne immobiliziranih protiteles. Rezultat je vrednost absorbance izmerjene pri 450 nm, pri čemer višja absorbanca pomeni močnejšo vezavo protitelesa.



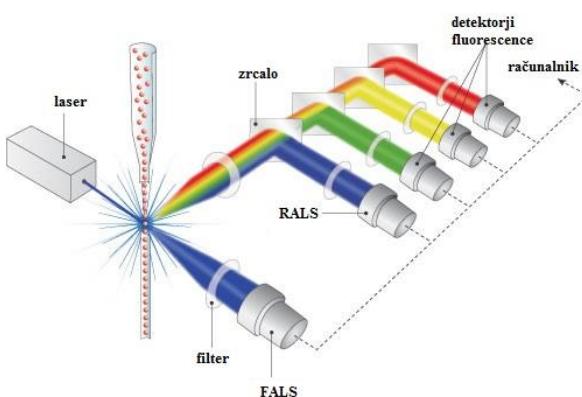
Slika 15: Različni načini detekcije s tehniko ELISA; pritejeno po (45).

Eksperimentalno delo:

Po 4 mL vzorcev po ekspresiji proteina smo centrifugirali 10 min pri 5.000x g in celice resuspendirali v po 4 mL PBS. Vzorce smo redčili s pufrom PBS tako, da smo dosegli vrednost OD₆₀₀ = 1. Nato smo po 750 µL vzorca centrifugirali (5.000x g, 5 min, 4 °C) in dvakrat sprali s PBS. Celice smo resuspendirali v 200 µL raztopine primarnih kozjih protiteles proti proteinu A (redčeno 1:500 v PBS) in jih ob stresanju 1 h inkubirali pri sobni T. Potem smo jih centrifugirali, dvakrat sprali s PBS in resuspendirali v 200 µL raztopine sekundarnih oslovskih protikozjih protiteles, označenih s HRP (redčeno 1:2.500 v PBS). Po 1 h inkubacije ob stresanju pri sobni T, smo celice centrifugirali in sprali, najprej s PBS, nato pa še s substratnim pufrom. Celice smo nato resuspendirali v 500 µL substratnega pufra in v mikrotitrsko ploščico prenesli alikvote po 100 µL, ter redčitvi 1:5 in 1:25. Dodali smo jim po 100 µL substrata TMB in po 50 µL 2M H₂SO₄ za ustavitev reakcije (po 15 min delovanja substrata).

3.2.8 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je metoda za karakterizacijo in merjenje lastnosti celic ter celičnih komponent, ki v kapili potujejo skozi laserski žarek v tekočinskem toku. Celice prehajajo laserski žarek posamezno. Pri interakciji laserskega žarka s celicami pride do razprševanja svetlobe in emisije fluorescentne svetlobe. Glede na velikost celic, njihovo zrnatost (granuliranost), notranjo kompleksnost in intenziteto fluorescence, sklepamo na njihove značilnosti. Razpršeno svetlubo, ki jo oddaja obsevana celica, merita dva fotodetektorja (Slika 16), in sicer FALS (ang. forward angle light scatter) v ravnini poti laserskega žarka in RALS (ang. right angle light scatter) pravokotno na pot laserskega žarka. Detektor FALS omogoča zapis parametra prednjega sisanja FSC (ang. forward scatter), ki nastane zaradi kontakta svetlobe s celičnimi membranami in je sorazmeren velikosti celice, detektor RALS pa omogoča zapis parametra stranskega sisanja SSC (ang. side scatter), premosorazmernega s kompleksnostjo celice. Emitirano fluorescenčno svetlubo, ki jo oddaja določen fluorofor, pripet na detekcijska protitelesa, pa merijo fluorescenčni detektorji, s katerimi pridobimo informacijo o funkcionalnih lastnostih celice (46). Rezultat tovrstne analize je vrednost MFI, ki predstavlja povprečno intenziteto sipane svetlobe. Višja vrednost MFI pomeni obsežnejšo vezavo detekcijskih protiteles, ki je sorazmerna večji količini preiskovanega proteina.



Slika 16: Shematski prikaz pretočnega citometra; pritejeno po (46).

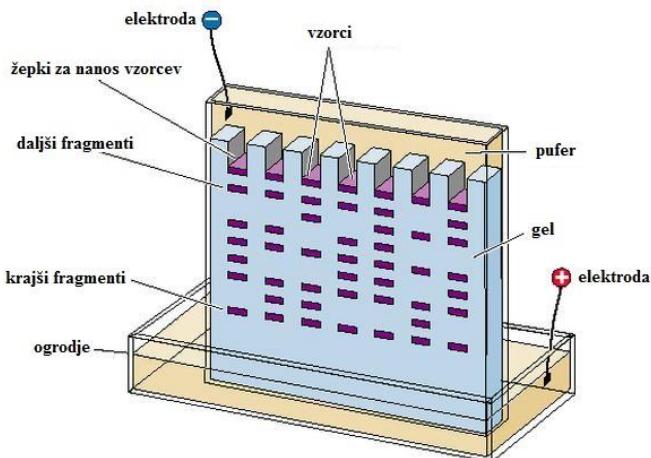
Eksperimentalno delo:

Dvajset μL celične kulture smo dodali k $500 \mu\text{L}$ TBS, centrifugirali ($5.000\times g$, 5 min, 4°C) in celice resuspendirali v $500 \mu\text{L}$ raztopine primarnih kozjih protiteles proti proteinu A (redčeno 1:2.500 s TBS). Po 2 h inkubacije ob stresanju pri sobni T, smo celice trikrat sprali s po $200 \mu\text{L}$ 0,1% TBST in jih resuspendirali v $500 \mu\text{L}$ raztopine sekundarnih

oslovskih protikozjih protiteles, označenih s fluorescentnim barvilmom Alexa 488 (redčeno 1:2.500 v TBS). Sledila je 2 h inkubacija pri sobni T v temi, nato pa smo celice resuspendirali v 500 µL TBS in jih analizirali s pretočnim citometrom. Pri tem smo uporabljali valovno dolžino 488 nm za ekscitacijo in 530 nm za emisijo. Merili smo vrednosti povprečnih fluorescenčnih intenzitet (MFI) najmanj 20.000 bakterijskih celic. Analizo konstruktov z rAdn in gAdn smo izvedli z uporabo različnih protiteles: a) primarnih kunčjih in fluorescentno označenih sekundarnih oslovskih protikunčjih, ter b) primarnih kozjih proti proteinu A in fluorescentno označenih oslovskih protikozjih. Analizo konstruktov s paroma SpyCatcher/SpyTag- domena B in SnoopCatcher/SnoopTag- domena B, pa smo izvedli samo s sekundarnimi fluorescentno označenimi človeškimi protitelesi.

3.2.9 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti NaDS uporabljam za ločevanje proteinov glede na njihove velikosti. Natrijev dodecil sulfat (NaDS) je anionska površinsko aktivna snov s formulo $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$, ki se nespecifično veže na protein in ga pri tem popolnoma denaturira. Poruši njegovo sekundarno in terciarno strukturo in ga tako linearizira. Denaturirana molekula proteina pridobi negativen naboj, kar ji omogoča potovanje v električnem polju. Razmerje med nabojem in velikostjo proteina v kompleksu z NaDS je za vse proteine enako, zato poteka ločitev zgolj na osnovi njihovih velikosti. Polimerizacija akrilamida poteče v prisotnosti amonijevega persulfata in TEMEDA. Ločevanje proteinov izboljšamo z uporabo dveh različno premreženih gelov. Koncentracijski gel je manj premrežen in omogoča skoncentriranje proteinov v ozkem pasu ter s tem boljšo ločljivost. Ločevalni gel pa je bolj premrežen, zato v njem poteka ločevanje proteinov po velikosti (41). Shematski prikaz sistema za izvedbo NaDS PAGE prikazuje Slika 17. Po elektroforezi ločene proteine detektiramo z nespecifičnim barvanjem z barvili, kot je npr. Coomassie Brilliant Blue ali z imunološkimi tehnikami, z uporabo protiteles.



Slika 17: Shematski prikaz ločevanja proteinov z metodo NaDS PAGE; pritejeno po (48).

Eksperimentalno delo:

V stojalo za polimerizacijo smo vstavili stekelci za vlivanje gela, ter pripravili ločevalni in koncentracijski gel. Najprej smo med stekelci vlili ločevalni gel in nanj nalili 1 mL 1-butanol, nasičenega z vodo, da smo izravnali gladino gela. Ko se je gel strdil, smo 1-butanol odlili, ga sprali z vodo, popivnali s filter papirjem in med stekelci vlili koncentracijski gel. Vanj smo vstavili glavniček za tvorbo žepkov za nanos vzorcev in počakali, da se je strdil. Sestava gelov je navedena v Preglednici IX.

Preglednica IX: Sestava ločevalnega in koncentracijskega gela za metodo NaDS PAGE (za 2 gela).

	12% ločevalni gel	4% koncentracijski gel
dH₂O	8,670 mL	3,168 mL
1,5M Tris-HCl, pH = 8,8	5,000 mL	/
0,5M Tris-HCl ,pH = 6,8	/	1,250 mL
10% NaDS	0,200 mL	0,050 mL
40% akrilamid	6,000 mL	0,500 mL
10% APS*	0,100 mL	0,025 mL
TEMED*	0,030 mL	0,008 mL

*dodamo na koncu, tik pred vlivanjem gela

Vzorce smo sonicirali dvakrat po 15 s in jih pripravili za nanos. K 14 µL vsakega soniciranega vzorca smo dodali po 5 µL nanašalnega pufra in 1 µL DTT. Vzorce smo 10 min segrevali pri 100 °C (denaturacija v prisotnosti DTT), pripravili napravo za elektroforezo in na gela nanesli po 20 µL vzorcev ter 7 µL označevalca velikosti proteinov PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas, ZDA). Elektroforezna ločba je potekala pri 70 mA (2 gela). Po končani elektroforezi smo en gel uporabili za analizo z barvilm Coomassie Brilliant Blue, drugega pa za prenos Western.

3.2.10 Soniciranje

Soniciranje je postopek, pri katerem močne vibracije usmerimo v vzorec. Vibracije povzročijo razpad molekul in celic oz. odcepitev celičnih komponent. Z ultrazvočno sondijo vzorce v raztopini izpostavimo kavitaciji. Mehurčki, ki nastajajo zaradi vibracij, pokajo in se posedajo pod težo raztopine, kar povzroča nadaljnje vibracije, te pa omogočijo razpad celic (47). S soniciranjem smo lizirali bakterijske celice, odcepili proteine z njihovih površin in jih sprostili v raztopino.

3.2.11 Analiza proteinov z barvilm Coomassie Brilliant Blue

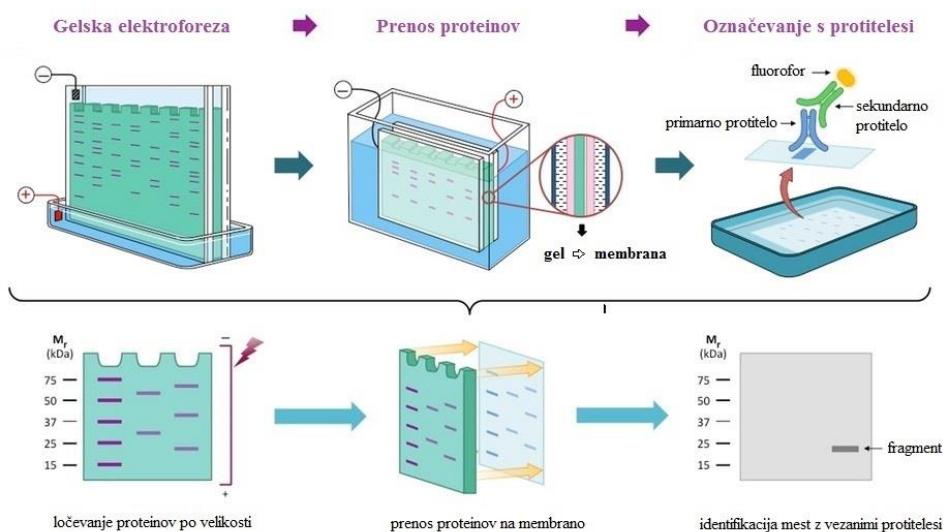
Barvanje proteinov z barvilm Coomassie Brilliant Blue je nespecifično. Večina organskih barvil za detekcijo proteinov naj bi se na njihove molekule vezala z elektrostatskimi vezmi, lahko pa so prisotne tudi vodikove vezi, van der Waalsove in hidrofobne interakcije. Proteine obarvamo tako, da gel po elektroforezi inkubiramo v raztopini barvila, nato pa razbarvamo ozadje. Rezultat predstavlja obarvane lise fragmentov proteinov (41).

Eksperimentalno delo:

Gel smo po končani elektroforezni ločbi prenesli v stekleno petrijevko, vanjo nalili 20 mL raztopine barvila Coomassie Brilliant Blue in 40 mL 20 % ocetne kisline, ter ga ob stalnem stresanju (50 rpm) barvali 1 h. Nato smo gel najprej 30 min stresali v 30 % raztopini za razbarvanje ozadja (300 mL 96 % EtOH, 100 mL CH₃COOH, 600 mL dH₂O), potem pa ga preko noči pustili v 10 % raztopini za razbarvanje ozadja (100 mL 96% EtOH, 50 mL CH₃COOH, 850 ml dH₂O).

3.2.12 Prenos Western

Ker s protitelesi ne moremo neposredno označevati proteinov, ločenih z NaDS PAGE, jih (proteine) prenesemo na membrano (nitrocelulozna ali membrana PVDF) s pomočjo električnega toka, kar imenujemo prenos Western. Po prenosu proteinov membrano inkubiramo v blokirni raztopini, da preprečimo nespecifično vezavo protiteles. Nato membrano označimo s protitelesi. Primarna protitelesa so usmerjena proti specifičnemu proteinu, sekundarna pa proti primarnim protitelesom in so lahko označena radioaktivno, fluorescentno ali z encimom, ki v prisotnosti substrata tvori barvni produkt (41, 48). Poteke NaDS PAGE, prenosa Western in detekcije proteinov prikazuje Slika 18.



Slika 18: Shematski prikaz poteka NaDS PAGE in prenosa Western; prizeleno po (48).

Eksperimentalno delo:

Pripravili smo napravo za prenos Western. Na kaseto za prenos Western smo na katodni plastični nosilec položili mrežico, 3 filter papirje v njeni velikosti, elektroforezni gel, membrano iz PVDF, ki smo jo predhodno aktivirali s pomakanjem v MeOH, dH₂O in pufer western, ter ponovno 3 filter papirje in mrežico. Vsako plast smo previdno polagali, polivali s pufrom western in povlajali z epruveto, da bi preprečili nastanek mehurčkov, ki onemogočajo prenos proteinov na membrano. Kaseto smo zaprli z nastavkom za anodo in sistem priključili na napetost 100 V. Prenos proteinov na membrano je potekal 90 min. Nato smo membrano ob stresanju 1 h inkubirali v 5 % mleku v TBST, po blokadi pa preko noči ob stresanju inkubirali v raztopini primarnih kozjih protiteles proti proteinu A (redčeno 1:5.000 v 5 % mleku v TBST), pri 4 °C. Po inkubaciji s primarnimi protitelesi

Plavec T. V. Razvoj sistema za predstavitev dveh proteinov na površini ... *L. lactis*
Magistrska naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

smo membrano spirali trikrat po 10 min s TBST in jo ob stresanju 2 h inkubirali v prisotnosti 2 µL sekundarnih oslovskih protikozjih protitelesih, označenih s HRP (redčeno 1:5.000 v 5 % mleku v TBST). Nato smo membrano spirali trikrat po 10 min s TBST in jo 2 min inkubirali s substratom Lumi Light (Roche, Švica) za prenos Western. Postopek smo izvedli tudi z nitrocelulozno membrano, razlika v njegovem poteku pa je, da aktivacija nitrocelulozne membrane ni potrebna. Analizo rAdn in gAdn smo izvedli tudi s fluorescentno označenimi (Dylight 650) sekundarnimi kozjimi protikunčjimi protitelesi, ki so se vezala na predhodno uporabljeni primarna kunčja protitelesa (redčena 1:100 v 5 % mleku v TBST).

4 REZULTATI

4.1 Preverjanje ustreznosti pripravljenih konstruktor

Po izvedbi AGE smo pod UV lučko analizirali gel in tako preverili ustreznost velikosti fragmentov tvorjenega konstrukta. Pomnožene dele DNA smo izrezali iz gela, jih očistili, plazmide transformirali v ustrezne bakterije in preverili uspešnost transformacije s PCR za analizo kolonij. Rezultati AGE in PCR za analizo kolonij za preverjanje uspešnosti transformacije bakterij *Lactococcus lactis* s plazmidi z različnimi vstavljenimi genskimi konstrukti so predstavljeni v Prilogi. Uspešnost ligacije v plazmid smo preverili tudi z določanjem nukleotidnega zaporedja plazmida. Za nadaljnje analize smo uporabili le plazmide s potrjenimi nukleotidnimi zaporedji. Rezultati potrjenih nukleotidnih zaporedij so v Prilogi. Pripravili smo naslednje plazmide:

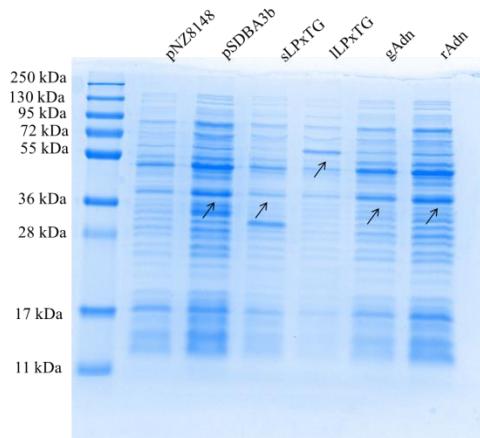
Plazmid	Sestava vstavljenega konstrukta: signalno zaporedje, modelni protein, sidrno zaporedje
pSDBA3b	Usp 45, domena B, AcmA
gAdn	Usp45, gAdn, AcmA
rAdn	Usp45, rAdn, AcmA
sLPxTG	Usp45, domena B, sLPxTG
lLPxTG	Usp45, domena B, lLPxTG
SpyCatcher	Usp45, SpyCatcher, AcmA
SnoopCatcher	Usp45, SnoopCatcher, AcmA
SpyTag- dom B	Usp45, domena B, SpyTag
SnoopTag- dom B	Usp45, domena B, SnoopTag
dom B	Usp45, domena B

4.2 Izražanje adnektinov in LPxTG

Za izražanje proteinov smo uporabili ekspresijski sistem pod nadzorom nizina (NICE). Uspešnost njihovega izražanja smo analizirali z NaDS PAGE in temu sledеčim barvanjem z barvilom Coomassie Brilliant Blue ter prenosom Western.

4.2.1 Barvanje s Coomassie Brilliant Blue

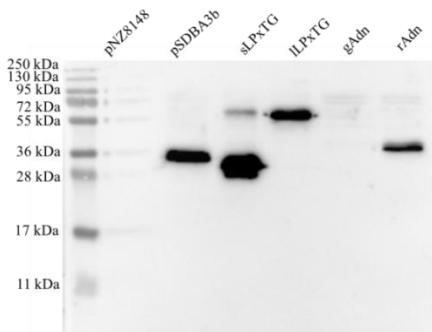
Po NaDS PAGE smo ločene proteine detektirali z barvanjem z barvilkom Commassie Brilliant Blue. Negativno kontrolo je predstavljal plazmid pNZ8148 brez vstavka za domeno B, pozitivno pa plazmid pSDBA3b, z izraženo domeno B. Rezultate NaDS PAGE in barvanja s Commassie Brilliant Blue prikazuje Slika 19, na kateri so vidni fragmenti, odgovorni za vezavo protiteles.



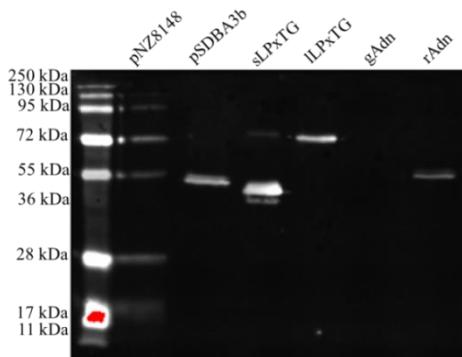
Slika 19: Rezultati analize NaDS PAGE po barvanju s Commassie Brilliant Blue.

4.2.2 Rezultati prenosa proteinov po Westernu

Tudi s prenosom Western smo dokazali prisotnost fragmentov odgovornih za vezavo protiteles (domene B, adnektinov). Za detekcijo smo uporabili primarna kozja protitelesa proti proteinu A in sekundarna oslovska protikozja protitelesa, označena s HRP ter primarna kunčja protitelesa in fluorescentno označena (Dylight 650) sekundarna kozja protikunčja protitelesa. Negativno kontrolo je predstavljal prazen plazmid pNZ8148 (brez domene B), pozitivno pa plazmid pSDBA3b, z izraženo domeno B. Protitelesa (kozja in kunčja) so vezali pozitivna kontrola ter celice s plazmidi sLPxTG, ILPxTG in rAdn. Pri celicah s plazmidom gAdn pa nismo dokazali vezave protiteles (Slike 20 in 21).



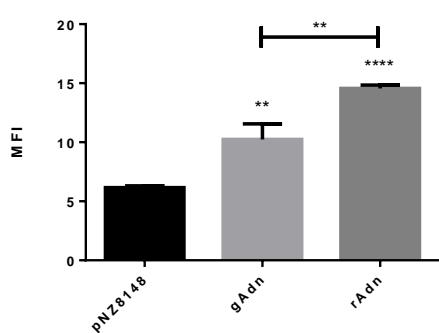
Slika 20: Rezultati analize NaDS PAGE
in prenosa proteinov po Westernu;
detekcija s sekundarnimi kozjimi
protitelesi, označenimi s HRP.



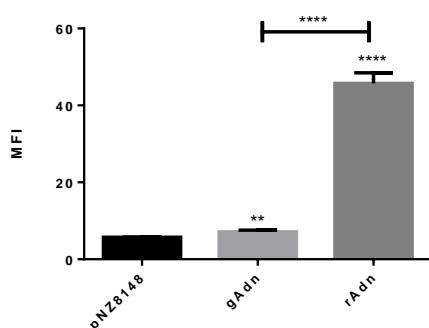
Slika 21: Rezultati analize NaDS PAGE
in prenosa proteinov po Westernu;
detekcija s fluorescentno označenimi
sekundarnimi kunčjimi protitelesi.

4.3 Kvantifikacija adnektinov na površini *L. lactis*

V celicah *L. lactis* NZ9000 smo s sistemom NICE izrazili proteine z neimunoglobulinskim ogrodjem (adnektinom). Bakterijske celice smo transformirali s plazmidoma gAdn in rAdn, ki sta medsebojno primerljiva vezalca protiteles, saj vsebujejo enak tip neimunoglobulinskega ogroda. Analizo smo izvedli s pretočno citometrijo in s testom ELISA. Kot negativno kontrolo smo uporabili prazen plazmid pNZ8148. Na celice z izraženima rAdn in gAdn so se kozja protitelesa vezala statistično značilno bolje kot na negativno kontrolo (Slika 22). Tudi po inkubaciji s kunčjimi protitelesi in njihovi vezavi, so bile izmerjene vrednosti MFI statistično značilno večje od tistih, izmerjenih z negativno kontrolo (Slika 23). Na celice z rAdn so se kozja in kunčja protitelesa vezala statistično značilno bolje kot na tiste z gAdn (Slike 22 in 23).

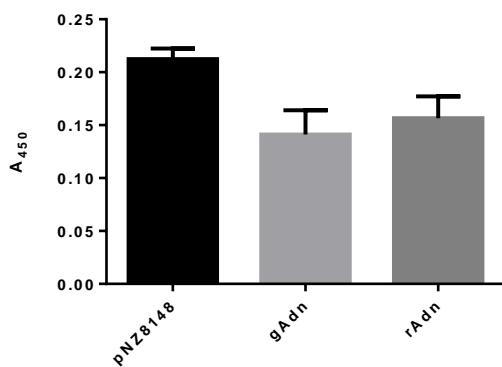


Slika 22: Rezultati analize s pretočno
citometrijo - vezava kozjih protiteles.
Predstavljeni so rezultati meritev treh
paralelnih vzorcev \pm SD; **P<0.01,
****P<0.0001, enostranski t-test.

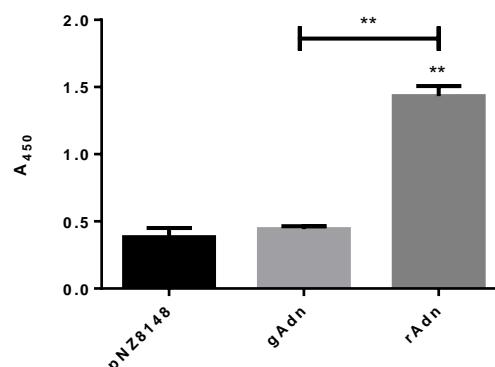


Slika 23: Rezultati analize s pretočno citometrijo - vezava kunčijih protiteles. Predstavljeni so rezultati meritev treh paralelnih vzorcev \pm SD; **P<0.01, ***P<0.0001, enostranski t-test.

Pri analizi s testom ELISA po inkubaciji s kozjimi protitelesi nismo opazili statistično značilnih razlik v njihovi vezavi (Slika 24), kunčja protitelesa pa so se na celice z rAdn pritrdirila statistično značilno bolje kot na negativne kontrole in celice z gAdn (Slika 25).



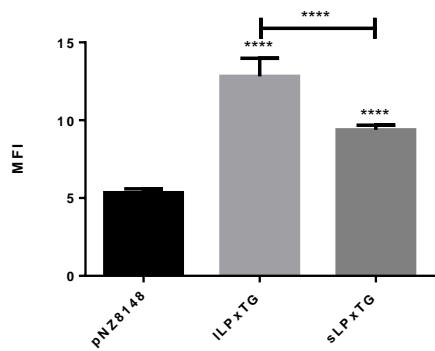
Slika 24: Analiza s testom ELISA - vezava kozjih protiteles. Predstavljeni so rezultati meritev treh paralelnih vzorcev \pm SD.



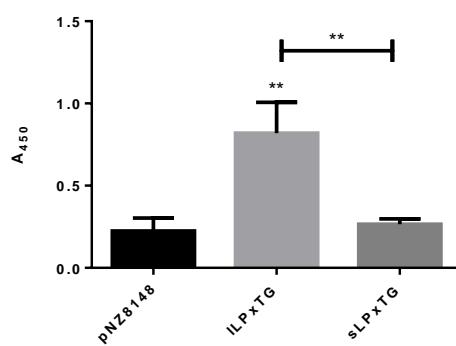
Slika 25: Analiza s testom ELISA - vezava kunčijih protiteles. Predstavljeni so rezultati meritev treh paralelnih vzorcev \pm SD; **P<0.01, enostranski t-test.

4.4 Kvantifikacija izraženih LPxTG v fuziji z domeno B

V celicah *L. lactis* NZ9000 smo z NICE izrazili proteine z domeno B v fuziji z LPxTG dveh različnih dolžin (160 in 400 aminokislin). Analizo smo izvedli s pretočno citometrijo in z ELISO. Kot negativno kontrolo smo uporabili prazen plazmid pNZ8148. Vrednosti MFI pri vezavi protiteles s celicami z sLPxTG in ILPxTG so bile signifikantno večje od negativne kontrole. Protitelesa so se na domeno B z sLPxTG vezala v dvakrat večjem obsegu, na domeno B z ILPxTG pa v trikrat večjem obsegu kot negativna kontrola (Slika 26). S testom ELISA smo statistično značilne razlike v vezavi protiteles dokazali le pri celicah z ILPxTG (Slika 27). Celice s sLPxTG in ILPxTG smo uporabili še za primerjavo pritrditve proteinov z LysM.



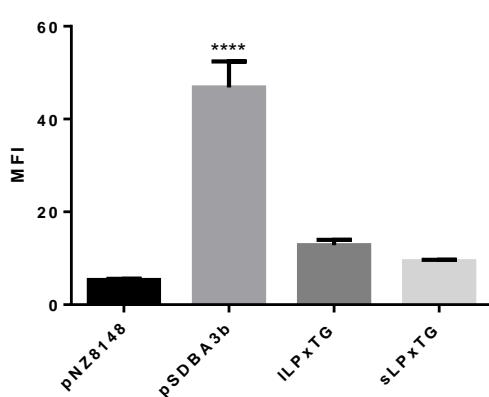
Slika 26: Rezultati analize s pretočno citometrijo - vezava protiteles proti domeni B. Predstavljeni so rezultati meritev šestih paralelnih vzorcev \pm SD; ****P<0.0001, enostranski t-test.



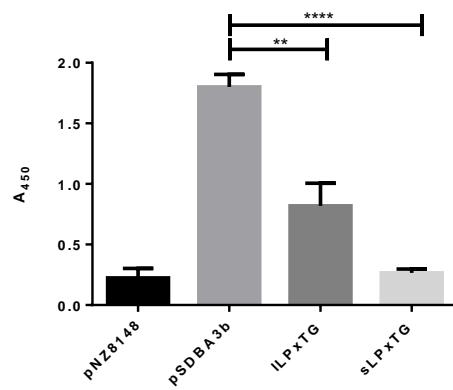
Slika 27: Rezultati analize s testom ELISA - vezava protiteles proti domeni B. Predstavljeni so rezultati meritev treh paralelnih vzorcev \pm SD; **P<0.01, enostranski t-test.

4.5 Vrednotenje LPxTG za površinsko izražanje proteinov

S pretočno citometrijo in testom ELISA smo primerjali vezavo protiteles na proteine s sidrnima zaporedjema LPxTG dveh različnih dolžin (160 in 400 aminokislin), ki izvirata iz C-terminalnega dela proteina CluA, in tistim s sidrnim zaporedjem LysM, ki je prisotno v proteinu AcmA. Obe vrsti konstruktorov sta vezali protitelesa z domeno B. Pri tem pa so vrednosti MFI za celice z LPxTG pokazale trikrat slabšo vezavo protiteles z ILPxTG in petkrat slabšo s sLPxTG, v primerjavi z nekovalentnim pritrjevanjem preko LysM, s plazmidom pSDBA3b (Slika 28). S testom ELISA smo dobili podobne rezultate. Vezava proteinov na površino bakterij preko LysM je bila torej statistično značilno večja kot preko LPxTG (Slika 29).



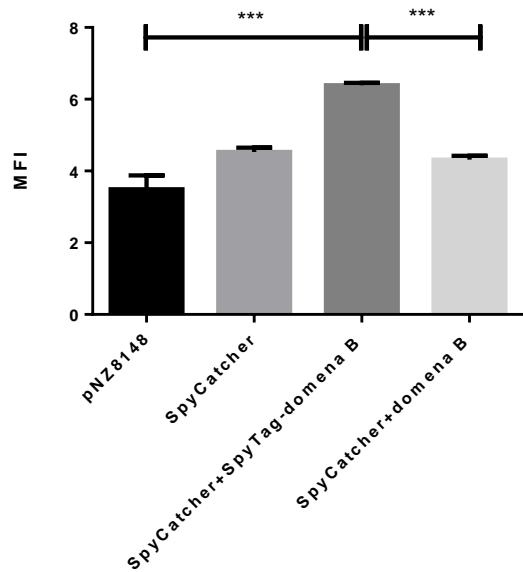
Slika 28: Rezultati analize s pretočno citometrijo - vezava protiteles proti domeni B. Predstavljeni so rezultati meritev šestih paralelnih vzorcev \pm SD; ***P<0.0001, enostranski t-test.



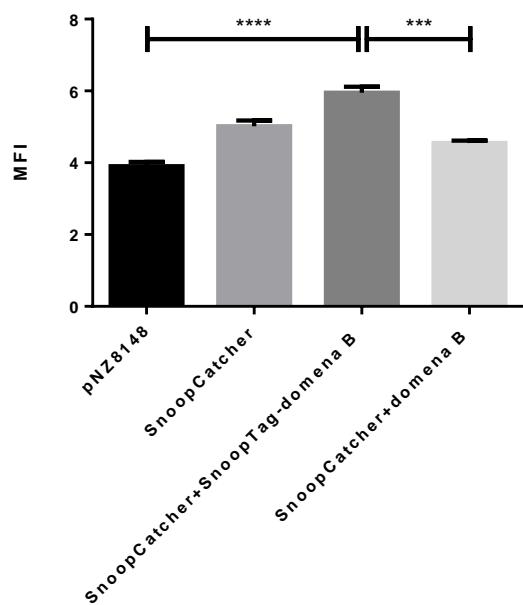
Slika 29: Rezultati analize s testom ELISA - vezava protiteles proti domeni B. Predstavljeni so rezultati meritev treh paralelnih vzorcev \pm SD; **P<0.01, ***P<0.0001, enostranski t-test.

4.6 Kvantifikacija in vrednotenje novih proteinskih vmesnikov

V celicah *L. lactis* NZ9000 smo s pomočjo sisetma NICE izrazili proteina SpyCatcher in SnoopCatcher s sidrnim zaporedjem LysM. Ločeno smo v enakih bakterijah izrazili še pripadajoča peptida SpyTag in SnoopTag, v povezavi z domeno B. Analizirali smo vezavo peptidov z modelnim proteinom, to je domeno B, na površinsko izraženi lovilni protein. V ta namen smo uporabili fluorescentno označena človeška protitelesa IgG in pretočno citometrijo. Za negativno kontrolo so nam služili prazen plazmid pNZ8148 in celice, v katerih smo hkrati spodbudili izražanje SpyCatcher-ja/SnoopCatcher-ja in domene B. Vezava domene B na SpyCatcher/SnoopCatcher ni možna brez peptidov SpyTag/SnoopTag, v vlogi posrednikov za njeno pritrditev na bakterijsko površino. Preverili smo tudi vezavo protiteles na celice z izraženim proteinom SpyCatcher/SnoopCatcher. Vrednosti MFI pri celicah, pri katerih se je tvorila izopeptidna vez med proteinom in peptidom in je zato na njihovi površini prišlo do pritrditve domene B, so bile statistično značilno večje od tistih, ki smo jih izmerili z negativnimi kontrolami (Slike 30 in 31).



Slika 30: Rezultati analize s pretočno citometrijo. Predstavljeni so rezultati meritev treh paralelnih vzorcev \pm SD; ***P<0.001, enostranski t-test.



Slika 31: Rezultati analize s pretočno citometrijo. Predstavljeni so rezultati meritev treh paralelnih vzorcev \pm SD; ***P<0.001, ****P<0.0001, enostranski t-test.

5 RAZPRAVA

Želeli smo razviti sistem za predstavitev dveh proteinov na površini mlečnokislinske bakterije *Lactococcus lactis*. Uporabili smo dva tipa modelnih proteinov za vezavo protiteles, in sicer domeno B ter neimunoglobulinsko ogrodje adnektin. Za ovrednotenje adnektinov smo pripravili dva nova modelna proteina z neimunoglobulinskim ogrodjem za vezavo kozjih (gAdn) in kunčjih imunoglobulinov (rAdn). Zanju je značilno, da predstavljenata primerljiva vezalca z enakim tipom ogrodja, ki vežeta podobne molekule. Izražanje ustreznih fragmentov za vezavo protiteles po prenosu Western smo potrdili z barvanjem s Commassie Brilliant Blue in z označevanjem s protitelesi. Samo v primeru proteina gAdn nismo dokazali vezave protiteles, kar je lahko posledica bodisi nižje afinitete ali pa porušene strukture pod denaturirajočimi pogoji NaDS PAGE in prenosa Western. Rezultate eksperimentalnega dela smo analizirali z dvema metodama, in sicer s pretočno citometrijo in testom ELISA. Kot glavno metodo za analizo in interpretacijo rezultatov smo izbrali pretočno citometrijo, saj je bolj robustna. Analizo smo izvedli po uporabi kozjih in kunčjih protiteles. Celice s površinsko predstavljenima rekombinantnima proteinoma gAdn in rAdn so protitelesa vezale bolje od negativne kontrole. Celice s površinsko predstavljenim proteinom gAdn so vezale kozja protitelesa enako močno kot kunčja, tiste, ki so izražale protein rAdn pa so vezale kunčja protitelesa trikrat bolje kot kozja. Ker sta oba adnektina vezala obe vrsti protiteles, lahko sklepamo, da ni šlo za dovolj specifično vezavo. Če primerjamo naše rezultate glede sposobnosti proteinov gAdn in rAdn za vezavo protiteles, opazimo njihovo skladnost s podatki o vezavnih afinitetah, ki so navedeni v literaturi. Protein rAdn namreč veže protitelesa s pikomolarno afiniteto, gAdn pa z nanomolarno (15). S testom ELISA smo dobili nekoliko drugačne rezultate. Po inkubaciji s kozjimi protitelesi namreč nismo dokazali njihove statistično značilne vezave v primerjavi z negativno kontrolo, kunčja protitelesa pa je rAdn vezal statistično značilno bolje kot negativna kontrola. Za dokaz statistično značilnih razlik v vezavi s testom ELISA sta potrebni močnejša afiniteta vezave protiteles in visoka izmerjena absorbanca, kar seveda otežuje določanje šibkejših interakcij. Močno vezavo smo dokazali le v primeru celic z izraženim proteinom rAdn, ki specifično in z visoko afiniteto veže kunčja protitelesa. Celice z izraženim proteinom gAdn so vezala protitelesa s prenizko afiniteto, da bi lahko s tem testom dokazali statistično značilne razlike. Ne glede na to smo potrdili sposobnost vezave protiteles z neimunoglobulinskim ogrodjem adnektinom. Vendar pa se preskušana adnektina, kljub enakemu neimunoglobulinskemu ogrodju in podobnim tarčam,

nista izkazala kot ustreznna modelna proteina za primerjavo različnih načinov pritrjevanja proteinov na površino bakterijskih celic. Težavo pri izbiri teh dveh modelnih proteinov predstavlja prevelika razlika v njunih afinitetah za vezavo protiteles. Naše raziskave bi tako lahko optimizirali in nadgradili v smeri izbora vezalcev z različnimi neimunoglobulinskimi ogrodji, a s podobno afiniteto vezave.

V nadaljevanju smo želeli ovrednotiti različne možnosti za površinsko predstavitev proteinov na mlečnokislinski bakteriji *L. lactis*. V ta namen smo testirali različne načine pritrjevanja rekombinantnih proteinov na površino *L. lactis*. Preučevali in primerjali smo vezavo modelnih rekombinantnih proteinov z domeno B, bodisi nekovalentno preko LysM v sidrnem proteinu AcmA ali kovalentno preko LPxTG v sidrnem proteinu CluA. Izražanje ustreznih fragmentov, nujnih za vezavo protiteles smo potrdili z barvanjem s Commassie Brilliant Blue in označevanjem s protitelesi po prenosu Western. Rezultate smo analizirali z dvema metodama, s pretočno citometrijo in testom ELISA. Primerjali smo pritrjevanje preko sidrnega zaporedja LPxTG dveh različnih dolžin. V primerjavi z negativno kontrolo smo statistično značilno boljšo vezavo protiteles dosegli s sidrnim zaporedjem LPxTG obeh dolžin, vendar je bila ta precej obsežnejša v prisotnosti daljšega (ILPxTG) kot krajšega (sLPxTG) LPxTG. Zato sklepamo, da so za obsežnejšo pritrditev proteinov na bakterijsko površino potrebni daljši konstrukti. Razlog za to je najverjetneje večje število hidrofobnih mest v daljšem konstraktu, ki lahko interagirajo s celično steno. Večja hidrofobna domena v C-terminalnem delu proteina, ki ga sidramo, omogoča več hidrofobnih interakcij za uspešno pritrditev proteinov na bakterijsko površino, saj je hidrofobnost univerzalni signal za njihovo pritrjevanje na celično površino (49). Naši rezultati so skladni tudi s podatki v literaturi, kjer so analizirali površinsko predstavitev preko sidrnega zaporedja LPxTG kot del proteina PrtP dveh dolžin in z uporabo daljšega fuzijskega proteina prav tako dosegli površinsko pritrditev v večjem obsegu (18, 50, 51). Avtorji navajajo, da je za uspešno površinsko pritrditev proteina potrebno sidrno zaporedje z dolžino vsaj 90 - 100 aminokislin, uporaba daljšega sidra pa še poveča obseg pritrjevanja (50).

Po dokazu pritrditve LPxTG na bakterijsko površino smo med seboj primerjali vezave preko sidrnih domen LPxTG in LysM. Celokupno izražanje proteinov glede na prenos Western je bilo podobno. Po analizi s pretočno citometrijo in testom ELISA pa smo dokazali razlike v pritrjevanju. Protitelesa so se namreč močneje vezala na rekombinantni

protein, ki je bil na bakterijsko površino vezan nekovalentno, preko sidra LysM. To je skladno tudi s podatki v literaturi, kjer so primerjali proteina AcmA s sidrnim zaporedjem LysM in PrtP s sidrnim zaporedjem LPxTG ter dokazali boljše pritrjevanje preko AcmA (51). Možni razlogi za boljšo pritrditev rekombinantnih proteinov preko zaporedja LysM so: večja izpostavljenost rekombinantnega proteina, učinkovitejši mehanizem njegovega izločanja in boljša translokacija na površino. V primerjavi s količino peptidoglikana je prisotnost in aktivnost sortaze A v bakterijah *L. lactis* manjša in zato ne omogoča takšnega obsega pritrjevanja. Sortaza je encim, zato je izločanje rekombinantnega proteina odvisno od njene aktivnosti in količine, medtem ko je pri vezavi preko LysM potrebno le izločanje rekombinantnega proteina na površino. Seveda pa ima tudi pritrjevanje z LysM določene slabosti. Tako pritrjevanje preko LysM ni enakoverno po celotni bakterijski površini, ampak je lokalizirano in poteka predvsem na tistih mestih, kjer se tvori nov peptidoglikan in kjer ni prisotnih ovir za uspešno pritrjevanje. Oviro za pritrditev rekombinantnih proteinov predstavlja tudi neenakoverno razporejena lipoteihoična kislina, vezana na celično membrano. Njen vpliv zmanjšamo tako, da celice spiramo z detergentom Tween (50). Glede na to bi obsežnejšo vezavo proteinov preko LPxTG morda lahko dokazali brez spiranja celic z detergentom, ki smo ga sicer pri našem delu uporabljali kot del standardnega postopka priprave vzorcev za pretočno citometrijo in test celična ELISA. Vsekakor domnevamo, da smo boljšo vezavo z LysM vsaj delno dosegli na račun omejitve vpliva lipoteihoične kisline.

Preskusili smo tudi nov način sidranja, ki temelji na tvorbi specifične interakcije med proteinimi vmesniki. Med proteinom in peptidom namreč pride do spontane tvorbe izopeptidne vezi. S pretočno citometrijo smo analizirali tvorbo vezi med proteinoma SpyCatcher/SnoopCatcher in peptidoma SpyTag/SnoopTag. Omenjena proteina smo na bakterijsko površino vezali preko sidrnega zaporedja LysM. Peptid SpyTag/SnoopTag pa smo izrazili v fuziji z modelnim proteinom, domeno B in ga uporabili v vlogi njenega pritrjevalca, da bi dokazali njeni vezavi. Potrdili smo vezavo protiteles na konstrukt in s tem tvorbo vezi med parom proteinom in peptidom, vendar so bile izmerjene vrednosti MFI nizke. V literaturi sicer opisujejo nastanek močne in stabilne vezi, ampak so pri tem uporabljali predvsem izolirane molekule proteinov in peptidov. V našem primeru pa smo izražanje vrednotili neposredno v gojišču, kjer na sidranje rekombinantnega proteina vplivajo številni različni dejavniki, npr. prisotnost različnih proteinov, sterične ovire in

Plavec T. V. Razvoj sistema za predstavitev dveh proteinov na površini ... *L. lactis*
Magistrska naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

neustrezne vrednosti pH. Menimo, da bi z nadaljnjo optimizacijo, s katero bi omejili vpliv zunanjih ovir oz. dejavnikov, lahko dosegli večji obseg pritrjevanja rekombinantnih proteinov na površino bakterij *L. lactis*.

6 SKLEPI

- Vežavo protiteles na površino bakterije *L. lactis* smo dokazali z dvema modelnima proteinoma, in sicer z domeno B in z adnektinom.
- Analizirali in ovrednotili smo različne načine pritrjevanja rekombinantnih proteinov na bakterijsko površino in dosegli ustrezno vezavo preko sidrnih zaporedij LysM in LPxTG.
- Primerjali smo obsege površinske predstavitev rekombinantnih proteinov preko LysM in LPxTG in večji obseg dokazali v primeru uporabe sidrnega zaporedja LysM.
- Uvedli smo nov način sidranja, ki deluje preko tvorbe izopeptidne vezi med proteinom izraženim na bakterijski površini, in peptidom, ki je združen z modelnim proteinom.

7 LITERATURA

1. Laroute V, Tormo H, Couderc C, Mercier-Bonin M, Le Bourgeois P, Cocaign-Bousquet M, Daveran-Mingot ML: From Genome to Phenotype: An Integrative Approach to Evaluate the Biodiversity of *Lactococcus lactis*. *Microorganisms* 2017; 5 (2).
2. Mierau I, Kleerebezem M: 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2005; 68 (6): 705-17.
3. Song A et al., A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbial Cell Factories* 2017; 16: 55.
4. Carvalho RDO, do Carmo FLR, de Oliveira Junior A, Langella P, Chatel JM, Bermúdez-Humarán LG, Azevedo V, de Azevedo MS: Use of Wild Type or Recombinant Lactic Acid Bacteria as an Alternative Treatment for Gastrointestinal Inflammatory Diseases: A Focus on Inflammatory Bowel Diseases and Mucositis. *Frontiers in Microbiology* 2017; 8: 800.
5. de Azevedo M, Meijerink M, Taverne N, Pereira VB, LeBlanc JG, Azevedo V, Miyoshi A, Langella P, Wells JM, Chatel JM: Recombinant invasive *Lactococcus lactis* can transfer DNA vaccines either directly to dendritic cells or across an epithelial cell monolayer. *Vaccine* 2015; 33(38): 4807-12.
6. Yagnik B, Padh H, Desai P: Construction of a new shuttle vector for DNA delivery into mammalian cells using non-invasive *Lactococcus lactis*. *Microbes and Infection* 2016; 18 (4): 237-44.
7. Michon C, Langella P, Eijsink VG, Mathiesen G, Chatel JM: Display of recombinant proteins at the surface of lactic acid bacteria: strategies and applications. *Microbial Cell Factories* 2016; 15: 70.
8. Berlec A, Ravnikar M, Strukelj B: Lactic acid bacteria as oral delivery systems for biomolecules. *Pharmazie* 2012; 67(11): 891-8.
9. Le Loir Y, Nouaille S, Commissaire J, Bretigny L, Gruss A, Langella P: Signal peptide and propeptide optimization for heterologous protein secretion in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 67 (9): 4119-4127.
10. Ravn P: Optimization of signal peptide SP310 for heterologous protein production in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 2003; 149 (8): 2193-2201.

11. Bratkovic T, Berlec A, Popovic T, Lunder M, Kreft S, Urleb U, Štrukelj B: Engineered staphylococcal protein A's IgG-binding domain with cathepsin L inhibitory activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 349 (1): 449-453.
12. Molek P, Vodnik M, Ravnikar M, Bratkočič T: Skripta za vaje iz Farmacevtske biotehnologije, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012, 115.
13. Ravnikar M, Štrukelj B, Obermajer N, Lunder M, Berlec A: Engineered lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* capable of binding antibodies and tumor necrosis factor alpha. *Applied and Environmental Microbiology* 2010; 76 (20): 6928-32.
14. Škrlec K, Štrukelj B, Berlec A: Non-immunoglobulin scaffolds: a focus on their targets. *Trends in Biotechnology* 2015; 33(7): 408-18.
15. Hackel BJ, Wittrup KD: The full amino acid repertoire is superior to serine/tyrosine for selection of high affinity immunoglobulin G binders from the fibronectin scaffold. *Protein Engineering, Design and Selection* 2010; 23(4): 211-9.
16. Call KE, Klaenhammer RT: Relevance and application of sortase and sortase-dependent proteins in lactic acid bacteria. *Frontiers in Microbiology* 2013; 4: 73.
17. Dieye Y, Oxaran V, Ledue-Clier F, Alkhala W, Buist G, Juillard V, Won Lee C, Piard JC: Functionality of Sortase A in *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology* 2010; 76, 21, 7332-7337.
18. Şimşek Ö, Sabanoğlu S, Çon AH, Karasu N, Akçelik M, Saris PEJ: Immobilization of nisin producer *Lactococcus lactis* strains to chitin with surface-displayed chitin-binding domain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013; 97 (10), 4577–4587.
19. Kobierecka PA, Olech B, Książek M, Derlatka K, Adamska I, Majewski PM, Jagusztyn-Krynicka EK, Wyszyńska AK: Cell Wall Anchoring of the Campylobacter Antigens to *Lactococcus lactis*. *Frontiers in Microbiology* 2016; 18 (7): 165.
20. Godon JJ, Jury K, Shearman CA, Gasson MJ: The *Lactococcus lactis* sex-factor aggregation gene *cluA*. *Molecular Microbiology* 1994; 12 (4): 655-63.
21. Stentz R, Gasson M, Shearman C: The Tra Domain of the Lactococcal CluA Surface Protein Is a Unique Domain That Contributes to Sex Factor DNA Transfer. *Journal of Bacteriology* 2006; 188 (6): 2106-2114.
22. Stentz R, Jury K, Eaton T, Parker M, Narbad A, Gasson M, Shearman C: Controlled expression of CluA in *Lactococcus lactis* and its role in conjugation. *Microbiology* 2004; 150: 2503-2512.

Plavec T. V. Razvoj sistema za predstavitev dveh proteinov na površini ... *L. lactis*
Magistrska naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

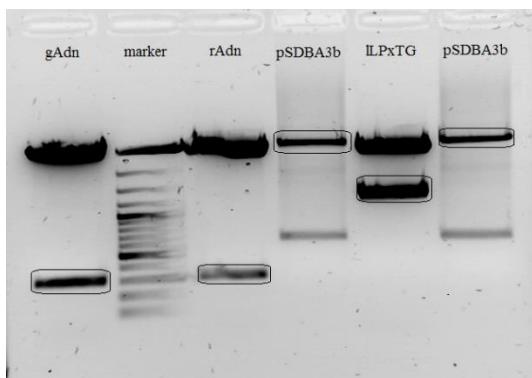
23. Zadravec P, Štrukelj B, Berlec A: Improvement of LysM-Mediated Surface Display of Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPins) in Recombinant and Nonrecombinant Strains of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus* Species, Applied and Environmental Microbiology 2015; 81 (6): 2098–2106.
24. Andre G, Leenhouts K, Hols P, DufrêneYF: Detection and Localization of Single LysM-Peptidoglycan Interactions. Journal of Bacteriology 2008; 190 (21): 7079-7086.
25. Buist G: AcmA of *Lactococcus lactis*, a cell-binding major autolysin, PhD thesis. University of Groningen, Groningen, 1997, 120 str.
<http://www.rug.nl/research/portal/files/3228621/thesis.pdf> (25.4.2017)
26. Visweswaran G, Leenhouts K, van Roosmalen M, Kok J, Buist G: Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology 2014; 98 (10): 4331–4345.
27. Zadravec P, Štrukelj B, Berlec A: Heterologous surface display on lactic acid bacteria: non-GMO alternative? Bioengineered 2015, 6 (3): 179-183.
28. Zakeri B, Fierer JO, Celik E, Chitlock EC, Schwarz-Linek U, Moy VT, Howarth M: Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 2012; 109 (12): E690-7.
29. Li L, Fierer JO, Rapoport TA, Howarth M: Structural analysis and optimization of the covalent association between SpyCatcher and a peptide Tag. Journal of Molecular Biology 2014; 426 (2): 309-17.
30. Reddington SC, Howarth M: Secrets of a covalent interaction for biomaterials and biotechnology: SpyTag and SpyCatcher. Current Opinion in Chemical Biology 2015; 29: 94-9.
31. Veggiani G, Zakeri B, Howarth M: Superglue from bacteria: Unbreakable bridges for protein nanotechnology. Trends in Biotechnology 2014; 32 (10): 506-12.
32. Veggiani G, Nakamura T, Brenner MD, Gayet RV, Yan J, Robinson CV, Howarth M: Programmable polyproteins built using twin peptide superglues. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 2016; 113 (5): 1202-7.
33. Thrane S, Janitzek CM, Matondo S, Resende M, Gustavsson T, de Jongh WA, Clemmensen S, Roeften W, van de Vegte-Bolmer M, van Gemert GJ, Sauerwein R, Schiller JT, Nielsen MA, Theander TG, Salanti A, Sander AF: Bacterial superglue

- enables easy development of efficient virus-like particle based vaccines. Journal of Nanobiotechnology 2016; 14: 30.
34. Vos WM: Gene expression systems for lactic acid bacteria. Current Opinion in Microbiology 1999; 2 (3): 289-95.
35. MoBiTec, NICE® Expression system for *Lactococcus lactis*, 2009, 1-34.
36. Kuipers OP, Ruyter PG, Kleerebezem M, Vos WM: Quorum sensingcontrolled gene expression in lactic acid bacteria. Journal of Biotechnology 1998, 64: 15-21.
37. <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/cloning/competent-cells-for-transformation/chemically-competent/dh5alpha-genotypes.html>, povzeto 25. aprila 17
38. <https://www.mclab.com/Dh5-Alpha-Competent-E.-Coli.html>, povzeto 21.aprila 2017
39. Promega: pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, Instructions for Use of Products.
40. Holo H, Nes IF: Transformation of *Lactococcus* by electroporation. Methods in Molecular Biology 1995; 47:195-9.
41. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine, SFD, Ljubljana, 2007, 143-181.
42. Macherey-Nagel, PCR clean-up Gel extractionUser manual NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Germany, 2017.
43. Macherey-Nagel, Plasmid DNA purification User manual NucleoSpin® Plasmid, Germany, 2015.
44. <https://www.addgene.org/protocols/bacterial-transformation/>, povzeto 29. maja 2017.
45. <https://www.linkedin.com/pulse/all-you-need-know-elisa-learn-buy-experiment-innovate-biotech-kart>, povzeto 28. aprila 17.
46. <https://www.semrock.com/flow-cytometry.aspx>, povzeto 28. aprila 17.
47. <http://sciencing.com/sonication-work-5171302.html>, povzeto 3. maja 2017.
48. <http://ib.bioninja.com.au/standard-level/topic-3-genetics/35-genetic-modification-and/gel-electrophoresis.html>, povzeto 28. aprila 17.
49. Navarre WW, Schneewind O: Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. Microbiology an Molecular Biology Reviews 1999; 174–229.
50. Nikkila KK, Saris PEJ: Immobilization of *Lactococcus lactis* to cellulosic material by cellulose-binding domain of *Cellvibrio japonicus*. Journal of Applied Microbiology 2010; 109 (4): 1274-83.

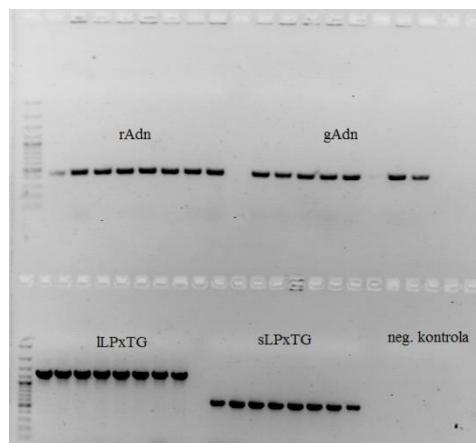
Plavec T. V. Razvoj sistema za predstavitev dveh proteinov na površini ... *L. lactis*
Magistrska naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

51. Lindholm A, Smeds A, Palva A: Receptor Binding Domain of *Escherichia coli* F18
Fimbrial Adhesin FedF Can Be both Efficiently Secreted and Surface Displayed in a
Functional Form in *Lactococcus lactis*. Applied and Environmental Microbiology
2004; 70 (4), 2061-2071.

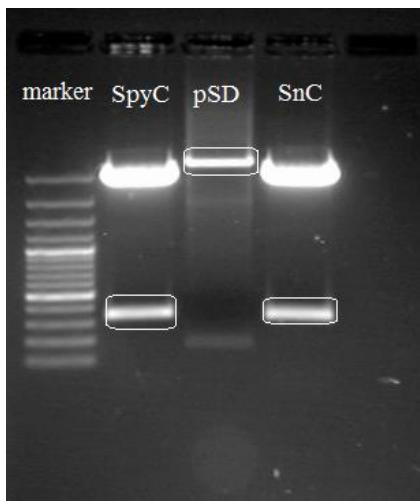
8 PRILOGE



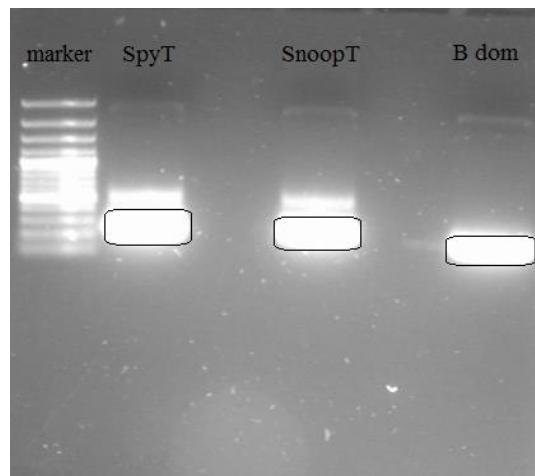
Slika 32: Rezultati AGE - ločeni konstrukti gAdn, rAdn, pSDBA3b in ILPxTG.



Slika 33: Rezultati PCR za analizo kolonij rAdn, gAdn, ILPxTG in sLPxTG.

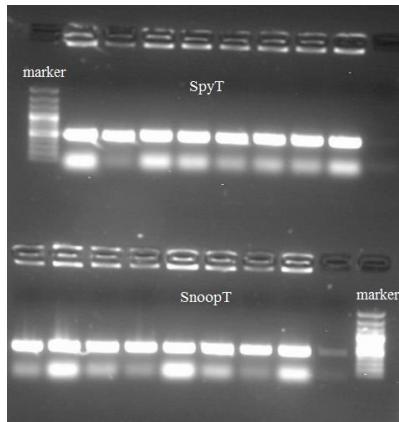


Slika 34: Rezultati AGE - ločeni konstrukti SpyCatcher in SnoopCatcher.

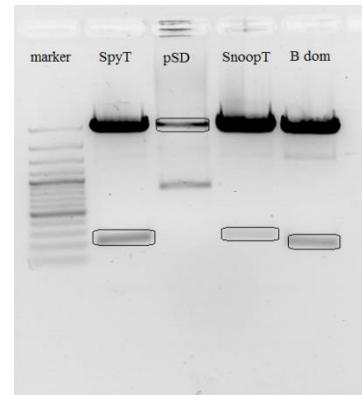


Slika 35: Elektroforezni gel s prikazanimi konstrukti s SpyTag, SnoopTag in domeno B po PCR.

Plavec T. V. Razvoj sistema za predstavitev dveh proteinov na površini ... *L. lactis*
Magistrska naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo



Slika 36: Elektforezni gel produktov PCR za analizo kolonij s SpyTag in SnoopTag.



Slika 37: Rezultati AGE - ločeni konstrukti s SpyTag, SnoopTag, domeno B in plazmid pSDBA3b (pSD).

Analiza nukleotidnih sekvenč s Clustal Omega:

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

38EC28_RC GAGGCACTTCACATCGGCTAAAAAAGAGTTATCTCAGCTTATTATAATGCTCACAGTGATA
38EC26_RC GAGGCACTTCACATCGGCTAAAAAAAGATTTATCTCAGCTTATTATAATGCTCACAGTGATA
38EC27 GaggCACTTCACATCGGCTAAAAGAGTTATCTCAGCTTATTATAATGCTCACAGTGATA
38EC25 nAGGcaCTCaCcTcgGCTAAAAGAGTTATCTCAGCTTATTATAATGCTCACAGTGATA
SDBsLPxTG -----ATGCTCAAAAAGAGTTATCTCAGCTTATTATAATGCTCACAGTGATA

38EC28_RC CTTCCTCGACGCCCGCTGTCACGGTGTGATCCAGGTTGATCCAGGTTGATCCAGGTTAAC
38EC26_RC CGCTCCCTCGACGCCCGCTGTCACGGTGTGATCCAGGTTGATCCAGGTTAAC
38EC27 CTTCCTCGACGCCCGCTGTCACGGTGTGATCCAGGTTGATCCAGGTTAAC
38EC25 CTTCCTCGACGCCCGCTGTCACGGTGTGATCCAGGTTGATCCAGGTTAAC
SDBsLPxTG CTTCCTCGACGCCCGCTGTCACGGTGTGATCCAGGTTGATCCAGGTTAAC

38EC28_RC AAAGAAACAAACAAATGCTTCTATGAAATTTTACATTACCTTAACCTAAATGAAAGCAA
38EC26_RC AAAGAAACAAACAAATGCTTCTATGAAATTTTACATTACCTTAACCTAAATGAAAGCAA
38EC27 AAAGAAACAAACAAATGCTTCTATGAAATTTTACATTACCTTAACCTAAATGAAAGCAA
38EC25 AAAGAAACAAACAAATGCTTCTATGAAATTTTACATTACCTTAACCTAAATGAAAGCAA
SDBsLPxTG AAAGAAACAAACAAATGCTTCTATGAAATTTTACATTACCTTAACCTAAATGAAAGCAA

38EC28_RC CGCAATGGTTTCATCACAAAGCTTAAAGAGATGACCCAAAGCCTAACTTTAGCA
38EC26_RC CGCAATGGTTTCATCACAAAGCTTAAAGAGATGACCCAAAGCCTAACTTTAGCA
38EC27 CGCAATGGTTTCATCACAAAGCTTAAAGAGATGACCCAAAGCCTAACTTTAGCA
38EC25 CGCAATGGTTTCATCACAAAGCTTAAAGAGATGACCCAAAGCCTAACTTTAGCA
SDBsLPxTG CGCAATGGTTTCATCACAAAGCTTAAAGAGATGACCCAAAGCCTAACTTTAGCA

38EC28_RC GAGCCTTAAAGAACTTAAATGCTTCAGACGACCAAAAGAATTCCGAAATTAATGATGATG
38EC26_RC GAGCCTTAAAGAACTTAAATGCTTCAGACGACCAAAAGAATTCCGAAATTAATGATGATG
38EC27 GAGCCTTAAAGAACTTAAATGCTTCAGACGACCAAAAGAATTCCGAAATTAATGATGATG
38EC25 GAGCCTTAAAGAACTTAAATGCTTCAGACGACCAAAAGAATTCCGAAATTAATGATGATG
SDBsLPxTG GAGCCTTAAAGAACTTAAATGCTTCAGACGACCAAAAGAATTCCGAAATTAATGATGATG

38EC28_RC AGAAAATGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATGATGATG
38EC26_RC AGAAAATGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATGATGATG
38EC27 AGAAAATGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATGATGATG
38EC25 AGAAAATGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATGATGATG
SDBsLPxTG AGAAAATGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATGATGATG

38EC28_RC GCTCTTCTGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATGATGATG
38EC26_RC GCTCTTCTGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATGATGATG
38EC27 GCTCTTCTGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATGATGATG
38EC25 GCTCTTCTGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATGATGATG
SDBsLPxTG GCTCTTCTGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATGATGATG

38EC28_RC GAAATTAAGCCAAACGGTGTGACCCCTACTCCAAATGACGAAATTAATGATGATG
38EC26_RC GAAATTAAGCCAAACGGTGTGACCCCTACTCCAAATGACGAAATTAATGATGATG
38EC27 GAAATTAAGCCAAACGGTGTGACCCCTACTCCAAATGACGAAATTAATGATGATG
38EC25 GAAATTAAGCCAAACGGTGTGACCCCTACTCCAAATGACGAAATTAATGATGATG
SDBsLPxTG GAAATTAAGCCAAACGGTGTGACCCCTACTCCAAATGACGAAATTAATGATGATG

38EC28_RC GGTTCATCATCACAGACGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATGATG
38EC26_RC GGTTCATCATCACAGACGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATGATG
38EC27 GGTTCATCATCACAGACGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATGATG
38EC25 GGTTCATCATCACAGACGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATGATG
SDBsLPxTG GGTTCATCATCACAGACGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATGATG

38EC28_RC AAGACAGGAAACATTACTATATTGCGACGATCAATCRAAAAGATGGCGGTACCAAAGAA
38EC26_RC AAGACAGGAAACATTACTATATTGCGACGATCAATCRAAAAGATGGCGGTACCAAAGAA
38EC27 AAGACAGGAAACATTACTATATTGCGACGATCAATCRAAAAGATGGCGGTACCAAAGAA
38EC25 AAGACAGGAAACATTACTATATTGCGACGATCAATCRAAAAGATGGCGGTACCAAAGAA
SDBsLPxTG AAGACAGGAAACATTACTATATTGCGACGATCAATCRAAAAGATGGCGGTACCAAAGAA

38EC28_RC GTTAAAGCTTAACTGCTTCAGACGACGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATG
38EC26_RC GTTAAAGCTTAACTGCTTCAGACGACGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATG
38EC27 GTTAAAGCTTAACTGCTTCAGACGACGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATG
38EC25 GTTAAAGCTTAACTGCTTCAGACGACGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATG
SDBsLPxTG GTTAAAGCTTAACTGCTTCAGACGACGGTGTGATGGCTCTCTAAGAACTTCTGCAAGGAAATTAATG

38EC28_RC TCACTTCCAAAAGCTGGTGAAGGAAAGCTGCTTGGCCCACTCTAATTITGGCTGCA
38EC26_RC TCACTTCCAAAAGCTGGTGAAGGAAAGCTGCTTGGCCCACTCTAATTITGGCTGCA
38EC27 TCACTTCCAAAAGCTGGTGAAGGAAAGCTGCTTGGCCCACTCTAATTITGGCTGCA
38EC25 TCACTTCCAAAAGCTGGTGAAGGAAAGCTGCTTGGCCCACTCTAATTITGGCTGCA
SDBsLPxTG TCACTTCCAAAAGCTGGTGAAGGAAAGCTGCTTGGCCCACTCTAATTITGGCTGCA

Plavec T. V. Razvoj sistema za predstavitev dveh proteinov na površini ... *L. lactis*
Magistrska naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

Plavec T. V. Razvoj sistema za predstavitev dveh proteinov na površini ... *L. lactis*
Magistrska naloga, Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo