

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA MALJEVAC

**PRIPRAVA PEPTIDOGLIKAN-VEZAVNEGA PROTEINA IN VREDNOTENJE
NJEGOVE VEZAVE NA MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE**

**PREPARATION OF PEPTIDOGLYCAN-BINDING PROTEIN AND
EVALUATION OF ITS BINDING TO LACTIC ACID BACTERIA**

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravila na Institutu Jožefa Stefana, na odseku za biotehnologijo, pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča in somentorstvom dr. Aleša Berleca. Določitev N- končnega aminokislinskega zaporedja rekombinantnega proteina je opravila Adrijana Leonardi z Odseka za molekularne in biomedicinske znanosti na Institutu Jožef Stefan. Pri meritvah velikosti celičnih agregatov v suspenziji sta asistirala izr. prof. dr. Odon Planinšek in doc. dr. Petra Kocbek.

ZAHVALA

Zahvaljujem se doc. dr. Tomažu Bratkoviču, ker mi je omogočil izdelavo diplomskega dela na področju farmacevtske biotehnologije, in za vso pomoč pri izdelavi diplomskega dela.

Posebna zahvala gre somentorju dr. Alešu Berlecu za posredovano znanje, spodbudo k samostojnemu razmišljanju in hkrati pomoč pri eksperimentalnem delu ter pisanju diplomske naloge. Hvala tudi vsem ostalim sodelavcem na Institutu Jožef Stefan za nasvete pri eksperimentalnem delu in prijetno vzdušje v laboratoriju.

Največja zahvala gre moji družini, Andražu in prijateljem, ki so me spremljali tekom celotnega študija, mi stali ob strani in me podpirali tudi v težkih trenutkih.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča, mag. farm. in somentorstvom dr. Aleša Berleca, mag. farm.

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanko Srčič

Član diplomske komisije: doc. dr. Matjaž Jeras

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	PREDSTAVITEV NA POVRŠINI BAKTERIJ	1
1.1.1	UPORABA PREDSTAVITVE NA POVRŠINI	2
1.1.2	GRAMNEGATIVNE (G-) BAKTERIJE	4
1.1.3	GRAMPOZITIVNE (G+) BAKTERIJE	5
1.2	MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE	6
1.2.1	NAČINI PREDSTAVITVE NA POVRŠINI MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ	10
1.2.1.1	Predstavitev na površini preko transmembranske domene	11
1.2.1.2	Lipoproteini	11
1.2.1.3	Kovalentno sidranje na celično steno	12
1.2.1.3.1	Motiv LPXTG	12
1.2.1.4	Nekovalentna vezava	13
1.2.1.4.1	Domena LysM	13
1.2.1.4.2	Proteini S-plasti in domena SLH	14
1.2.2	POTENCIALNA UPORABA MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ V TERAPIJI	15
1.2.2.1	Mlečnokislinske bakterije kot dostavni sistem za cepiva (vaccine)	16
1.2.2.2	Zmanjšanje imunskega odziva z uporabo mlečnokislinskih bakterij v terapiji	19
1.2.2.3	Mlečnokislinske bakterije kot dostavni sistemi za terapevtske proteine	19
2	HIPOTEZA IN NAMEN DELA	21
3	NAČRT DELA	22
4	MATERIALI IN METODE	24
4.1	MATERIALI	24
4.1.1	RAZTOPINE	24
4.1.2	BAKTERIJSKA GOJIŠČA	26
4.1.3	BAKTERIJSKI SEVI	27
4.1.4	PLAZMIDI	27
4.1.4.1	pET-28 in pET-28::B-AcmA	28
4.1.4.2	Plazmida pNZ8148 in pSDLBA3b	29
4.1.5	LABORATORIJSKA OPREMA IN MATERIAL	31
4.1.6	KEMIKALJE	32
4.2	METODE	33

4.2.1	PRIPRAVA KOMPETENTNIH CELIC <i>E. coli</i> BL21(DE3)	33
4.2.2	IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA (minipreparacija)	33
4.2.3	TRANSFORMACIJA BAKTERIJSKIH CELIC	34
4.2.3.1	Transformacija celic <i>E. coli</i> s toplotnim šokom	34
4.2.3.2	Transformacija <i>L. lactis</i> z elektroporacijo	35
4.2.4	PRIPRAVA PREKONOČNE KULTURE	35
4.2.5	IZRAŽANJE B-AcmA V <i>E. coli</i>	36
4.2.6	POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECILSULFATA (NaDS-PAGE)	37
4.2.6.1	Priprava elektroforeznih gelov in kadičke	38
4.2.6.2	Priprava vzorcev, njihov nanos na gel in izvedba elektroforeze	39
4.2.6.2.1	Priprava vzorcev, ki ne vsebujejo gvanidinijevega klorida	39
4.2.6.2.2	Priprava vzorcev, ki vsebujejo gvanidinijev klorid	39
4.2.6.3	Detekcija z elektroforezo ločenih proteinov	39
4.2.6.3.1	Barvanje gelov s Coomassie brilliant blue	39
4.2.6.3.2	Prenos western	40
4.2.7	RAZTAPLJANJE INKLUZIJSKIH TELESC	41
4.2.8	IZOLACIJA B-AcmA Z AFINITETNO KROMATOGRAFIJO	42
4.2.9	PONOVRNO ZVITJE B-AcmA V NATIVNO KONFORMACIJO Z METODO HITREGA RAZREDČEVANJA	43
4.2.10	ULTRAFILTRACIJA VZORCA	44
4.2.11	DOLOČITEV N-KONČNEGA AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA Z EDMANOVO DEGRADACIJO	44
4.2.12	PRIPRAVA GEM-DELCEV (<i>Gram-positive enhancer matrix particles</i>)	45
4.2.13	TESTIRANJE VEZAVE B-AcmA NA POVRŠINO MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ	46
4.2.13.1	Izvedba encimskoimunskega testa	46
4.2.13.2	Barvanje s kristal vijoličnim	48
4.2.13.3	Pretočna citometrija	49
4.2.14	MERJENJE VPLIVA DODATKA B-AcmA NA RAST BAKTERIJ V KULTURI	50
4.2.14.1	Testiranje na mikrotitrskih ploščicah	50
4.2.14.2	Merjenje hitrosti sedimentacije bakterijskih celic v kulturi	51
4.2.14.3	Merjenje velikosti agregatov	51
5	REZULTATI	52
5.1	PRIPRAVA B-AcmA V <i>E. coli</i> IN NJEGOVA IZOLACIJA	52
5.1.1	IZBIRA OPTIMALNIH POGOJEV ZA IZRAŽANJE B-AcmA V <i>E. coli</i>	52
5.1.2	RAZTAPLJANJE INKLUZIJSKIH TELESC IN IZOLACIJA B-AcmA Z AFINITETNO KROMATOGRAFIJO	54
5.1.3	PONOVRNO ZVITJE B-AcmA IN ULTRAFILTRACIJA	56

5.1.4	DOLOČEVANJE N-KONČNEGA AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA RAZGRADNIH PRODUKTOV B-AcmA	58
5.1.5	DETEKCIJA B-AcmA S SPECIFIČNIMI PROTITELESI PO PRENOSU WESTERN	60
5.2	VEZAVA B-AcmA NA POVRŠINO BAKTERIJSKIH CELIC IN GEM-DELCEV	61
5.2.1	ENCIMSKOIMUNSKI TEST	61
5.2.1.1	Primerjava vezave protiteles proti B-domeni na bakterijske celice <i>L. lactis</i> in GEM-delce <i>L. lactis</i>	61
5.2.1.2	Vrednotenje vezave protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površino GEM-delcev <i>L. lactis</i> , v odvisnosti od koncentracije B-AcmA	62
5.2.1.3	Vrednotenje vezave protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površino GEM-delcev <i>L. lactis</i> , v odvisnosti od koncentracije GEM delcev	63
5.2.1.4	Vrednotenje vezave protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površino GEM-delcev <i>L. lactis</i> , v odvisnosti od začetne koncentracije protiteles	63
5.2.1.5	Primerjava vezave protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površini GEM-delcev različnih sevov laktobacilov in GEM-delcev <i>L. lactis</i>	64
5.2.1.6	Primerjava vezave protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površino bakterijskih celic različnih sevov laktobacilov in bakterijskih celic <i>L. lactis</i>	65
5.2.2	BARVANJE S KRISTAL VIJOLIČNIM	66
5.2.3	PRETOČNA CITOMETRIJA	66
5.3	VPLIV DODATKA B-AcmA NA RAST BAKTERIJ V KULTURI	68
5.3.1	TESTIRANJE NA MIKROTITRSKIH PLOŠČAH	68
5.3.2	MERJENJE HITROSTI SEDIMENTACIJE BAKTERIJSKIH CELIC V KULTURI	68
5.3.3	MERJENJE VELIKOSTI CELIČNIH AGREGATOV V SUSPENZIJI	71
6	RAZPRAVA	73
6.1	PRIPRAVA IN IZOLACIJA B-AcmA	74
6.2	TESTIRANJE VEZAVE B-AcmA NA POVRŠINO MKB	76
6.3	VREDNOTENJE VPLIVA DODATKA B-AcmA NA RAST BAKTERIJSKIH CELIC V KULTURI	78
7	SKLEP	80
8	VIRI	81
9	PRILOGE	86

KAZALO SLIK

SLIKA 1: NAČINI VEZAVE NA POVRŠINO MKB	11
SLIKA 2: SHEMA PLAZMIDA PET-28	28
SLIKA 3: SHEMA GENskega KONSTRUKTA B-ACMA, VSTAVLJENEGA V PLAZMID PET-28	29
SLIKA 4: SHEMA PLAZMIDA PNZ8148	29
SLIKA 5: Z NIZINOM NADZOROVANO IZRAŽANJE GENA X (63)	30
SLIKA 6: SHEMA GENskega KONSTRUKTA USP-B-ACMA, VSTAVLJENEGA V PLAZMID PSDLBA3B	30
SLIKA 7: SHEMA PRENOSA WESTERN	41
SLIKA 8: SHEMA VEZAVE REKOMBINANTNEGA PROTEINA S HISTIDINSKIM REPOM NA NOSILEC BD TALON	43
SLIKA 9: PRIKAZ TESTIRANJA VPLIVA DODATKA B-ACMA NA RAST BAKTERIJ V KULTURI NA MIKROTITRSKIH PLOŠČAH	50
SLIKA 10: REZULTATI NADS-PAGE VZORCEV OPTIMIZACIJE IZRAŽANJA B-ACMA V <i>E. COLI</i>	53
SLIKA 11: REZULTATI NADS-PAGE FRAKCIJ BAKTERIJSKE KULTURE, KI JE RASLA PRI POGOJIH ŠT. 10 (RAST CELIC DO $OD_{600}=2$ PRI 37 °C, INDUKCIJA Z 0,4 MM IPTG IN RAST ČEZ NOČ (16 H) PRI 25 °C)	54
SLIKA 12: REZULTATI NADS-PAGE FRAKCIJ RAZTAPLJANJA B-ACMA V GVANIDINIJEVEM KLORIDU	54
SLIKA 13: REZULTATI NADS-PAGE IZBRANIH FRAKCIJ SPIRANJA KOLONE (S) IN IZPIRANJA B-ACMA (E), DOBLJENIH MED AFINITETNO KROMATOGRAFIJO	56
SLIKA 14: REZULTATI NADS-PAGE IZBRANIH FRAKCIJ SPIRANJA KOLONE (S) IN IZPIRANJA B-ACMA (E), DOBLJENIH MED AFINITETNO KROMATOGRAFIJO	56
SLIKA 15: REZULTATI NADS-PAGE SUPERNATANTOV VZORCEV, V KATERIH SMO OPAZILI OBARJANJE PROTEINA	57
SLIKA 16: REZULTATI NADS-PAGE FRAKCIJ, DOBLJENIH MED PROCESOM ČIŠČENJA IN IZOLACIJE B-ACMA IN OZNAČENI VZORCI, KATERIM SMO Z EDMANOVO DEGRADACIJO DOLOČILI N-KONČNO AK-ZAPOREDJE	58
SLIKA 17: PRIKAZ DOLOČENEGA N-KONČNEGA AK-ZAPOREDJA PROTEINSKIH FRAGMENTOV V VZORCIH ŠT. 2 IN ŠT. 3	59
SLIKA 18: REZULTATI PRENOSA WESTERN IZBRANIH PROTEINSKIH FRAKCIJ IN DETEKCIJA B-ACMA S SPECIFIČNIMI PROTITELESI PROTI B-DOMENI	60
SLIKA 19: KRIVULJI VEZAVE PROTITELES NA GEM-DELCE <i>L. LACTIS</i> IN BAKTERIJSKE CELICE <i>L. LACTIS</i> , V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE DODANEGA B-ACMA	61
SLIKA 20: SATURACIJSKA KRIVULJA VEZAVE PROTITELES V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE DODANEGA B-ACMA	62
SLIKA 21: SATURACIJSKA KRIVULJA VEZAVE PROTITELES V ODVISNOSTI OD VREDNOSTI OD_{600} GEM-DELCEV	63
SLIKA 22: LINEARNA VEZAVA PROTITELES V ODVISNOSTI OD NJIHOVE ZAČETNE KONCENTRACIJE	63
SLIKA 23: PRIMERJAVA VEZAVE SPECIFIČNIH PROTITELES PROTI B-DOMENI NA B-ACMA, VEZAN NA POVRŠINE GEM-DELCEV RAZLIČNIH SEVOV LAKTOBACILOV IN GEM-DELCEV <i>L. LACTIS</i>	64
SLIKA 24: PRIMERJAVA VEZAVE PROTITELES PROTI B-DOMENI NA B-ACMA, VEZAN NA POVRŠINO BAKTERIJSKIH CELIC <i>L. LACTIS</i> IN RAZLIČNIH SEVOV LAKTOBACILOV	65
SLIKA 25: PRIKAZ GOSTOTE CELIC GLEDE NA VELIKOST PREDNJEGA (FSC) IN STRANSKEGA (SSC) SIPANJA	66

SLIKA 26: PRIMERJAVA POVPREČNE INTENZITETE FLUORESCENCE NEGATIVNE KONTROLE IN VZORCEV RAZLIČNIH VRST BAKTERIJSKIH CELIC S POVRŠINSKO VEZANIM B-ACMA	67
SLIKA 27: PREMICE HITROSTI SEDIMENTACIJE BAKTERIJSKIH DELCEV V KULTURAH <i>L. LACTIS</i> Z VSTAVLJENIMA PLAZMIDOMA PSDLBA3B IN PNZ8148, S PRIPADAJOČIMA LINEARNIMA ENAČBAMA	69
SLIKA 28: PREMICE HITROSTI SEDIMENTACIJE BAKTERIJSKIH DELCEV V KULTURI <i>L. LACTIS</i> Z VSTAVLJENIMI PLAZMIDI PSDLBA3B, PNZ8148 IN PNZ8148+ B-ACMA, S PRIPADAJOČIMI LINEARNIMI ENAČBAMI	69
SLIKA 29: PREMICE HITROSTI SEDIMENTACIJE BAKTERIJSKIH DELCEV V KULTURI <i>L. LACTIS</i> Z VSTAVLJENIMI PLAZMIDI PSDLBA3B, PNZ8148 IN PNZ8148+ B-ACMA, S PRIPADAJOČIMI LINEARNIMI ENAČBAMI	70
SLIKA 30: PRIKAZ DELEŽA DELCEV V POSAMEZNIH VELIKOSTNIH OBMOČJIH V VZORCIH KULTURE <i>L. LACTIS</i> S PLAZMIDOMA A) PNZ8148 IN B) PSDLBA3B TER C) PRIMERJAVA DELEŽEV RAZLIČNIH VELIKOSTI DELCEV V OBEH VZORCIH	71

KAZALO PREGLEDNIC

PREGLEDNICA I: IZRAŽENI POTNIŠKI PROTEINI KOT MOŽNA CEPIVA	3
PREGLEDNICA II: PREGLED CEPIV NA OSNOVI MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ	18
PREGLEDNICA III: RAZTOPINE, UPORABLJENE PRI EKSPERIMENTALNEM DELU	24
PREGLEDNICA IV: BAKTERIJSKA GOJIŠČA, UPORABLJENA PRI EKSPERIMENTALNEM DELU	26
PREGLEDNICA V: BAKTERIJSKI SEVI, UPORABLJENI PRI EKSPERIMENTALNEM DELU	27
PREGLEDNICA VI: PLAZMIDI, UPORABLJENI PRI EKSPERIMENTALNEM DELU	28
PREGLEDNICA VII LABORATORIJSKA OPREMA IN MATERIAL, UPORABLJENI PRI EKSPERIMENTALNEM DELU	31
PREGLEDNICA VIII: KEMIKALIJE, UPORABLJENE PRI EKSPERIMENTALNEM DELU	32
PREGLEDNICA IX: RAZLIČNI TESTIRANI POGOJI MED OPTIMIZACIJO IZRAŽANJA B-ACMA V <i>E. COLI</i>	36
PREGLEDNICA X: SESTAVINE ZA PRIPRAVO ELEKTROFOREZNEGA GELA IN NJIHOVA KOLIČINA	38
PREGLEDNICA XI: VREDNOST ABSORBANCE A_{280} RAZLIČNIH FRAKCIJ IZPIRANJA B-ACMA Z NOSILCA BD-TALON	55
PREGLEDNICA XII: PRIMERJAVA VEZAVE PROTITELES NA B-ACMA, VEZAN NA RAZLIČNE SEVE LAKTOBACILOV, GLEDE NA B-ACMA, VEZAN NA POVRŠINI <i>L. LACTIS</i>	65

KAZALO PRILOG

PRILOGA 1: NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE GENA ZA PROTEIN B-ACMA, IZRAŽENEGA V <i>E. COLI</i>	86
PRILOGA 2: AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE PROTEINA B-ACMA, IZRAŽENEGA V <i>E. COLI</i>	86
PRILOGA 3: PREGLEDNICA RASTI <i>E. COLI</i> PRI RAZLIČNIH TESTNIH POGOJIH	87
PRILOGA 4: DOLOČANJE N-KONČNEGA AK-ZAPOREDJA Z EDMANOVO DEGRADACIJO V VZORCU ŠT. 1	88
PRILOGA 5: REZULTATI TESTA ELISA IN VREDNOTENJE VEZAVE B-ACMA PRI RAZLIČNIH KONCENTRACIJAH B-ACMA NA POVRŠINO GEM-DELCEV <i>L. LACTIS</i> IN BAKTERIJSKIH CELIC <i>L. LACTIS</i>	89
PRILOGA 6: VREDNOTENJE VEZAVE PROTITELES PROTI B-DOMENI NA B-ACMA, VEZAN NA POVRŠINI GEM-DELCEV <i>L. LACTIS</i> , V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE B-ACMA	90
PRILOGA 7: VREDNOTENJE VEZAVE PROTITELES PROTI B-DOMENI NA B-ACMA, VEZAN NA POVRŠINI GEM-DELCEV <i>L. LACTIS</i> , V ODVISNOSTI OD KONCENTRACIJE GEM-DELCEV	91
PRILOGA 8: VREDNOTENJE VEZAVE PROTITELES PROTI B-DOMENI NA B-ACMA, VEZAN NA POVRŠINI GEM-DELCEV <i>L. LACTIS</i> , V ODVISNOSTI OD ZAČETNE KONCENTRACIJE PROTITELES	92
PRILOGA 9: REZULTATI TESTA ELISA IN VREDNOTENJE B-ACMA NA RAZLIČNE GEM-DELCE LAKTOBACILOV IN GEM-DELCE <i>L. LACTIS</i>	93
PRILOGA 10: REZULTATI TESTA ELISA IN VREDNOTENJE VEZAVE REKOMBINANTNEGA PROTEINA NA RAZLIČNE BAKTERIJSKE SEVE (POSKUS ŠT. 1 IN ŠT. 2)	94
PRILOGA 11: REZULTATI TESTIRANJA VPLIVA REKOMBINANTNEGA PROTEINA NA RAST NA MIKROTITRSKIH PLOŠČICAH	96
PRILOGA 12: REZULTATI MERITEV OD_{600} PRI DOLOČANJU HITROSTI SEDIMENTACIJE V BAKTERIJSKI KULTURI S PLAZMIDOM PSDLBA3B IN PNZ8148	97
PRILOGA 13: REZULTATI MERITEV OD_{600} PRI DOLOČANJU HITROSTI SEDIMENTACIJE V BAKTERIJSKI KULTURI S PLAZMIDOM PSDLBA3B, PNZ8148 IN PNZ8148, Z DODATKOM B-ACMA	97
PRILOGA 14: REZULTATI ANALIZE VELIKOSTI DELCEV ZA <i>L. LACTIS</i> S PLAZMIDOM PNZ8148	98
PRILOGA 15: REZULTATI ANALIZE VELIKOSTI DELCEV ZA <i>L. LACTIS</i> S PLAZMIDOM PSDLBA3B	99

POVZETEK

Mlečnokislinske bakterije v fermentiranih mlečnih, mesnih in rastlinskih izdelkih že stoletja predstavljajo normalno sestavino človeške prehrane. V zadnjih letih pa se, poleg vloge v prehrabni industriji, vedno bolj kaže potencial uporabe mlečnokislinskih bakterij v biotehnoški in terapevtske namene. Ena izmed pomembnejših vrst mlečnokislinskih bakterij je bakterija *Lactococcus lactis*, ki bi jo lahko uporabili kot sistem za dostavo različnih, na površino vezanih farmakološko aktivnih biomolekul, na gastrointestinalno, nazalno, pulmunalno in vaginalno sluznico. Na ta način bi lajšali kronične bolezni, kot so kronična vnetna črevesna bolezen in alergije, ter razvili rekombinantna cepiva proti številnim virusnim, bakterijskim in parazitskim okužbam. Ker v javnosti gensko spremenjeni organizmi (GSO) še vedno veljajo kot grožnja, se raziskave usmerjajo k razvoju bakterijskih dostavnih sistemov, ki bi temeljili na gensko nespremenjenih organizmih. Takšen sistem predstavljajo bakterijske celice, ki na površino vežejo rekombinantni protein, dodan v gojišče, ali GEM-delci, ki jih dobimo z obdelavo bakterijskih celic z močnimi kislinami in organskimi topili. GEM-delci so bakterijski delci, sestavljeni le iz plasti peptidoglikana, na katerega se lahko, preko različnih motivov sidranja na celično steno, veže rekombinanten protein.

V sevu *Escherichia coli* BL21(DE3) smo izrazili rekombinantni protein B-AcmA, sestavljen iz B-domene proteina A iz *Staphylococcus aureus*, treh ponovitev LysM proteina AcmA in histidinskega repa. B-AcmA se je izrazil v obliki inkluzijskih telesc, ki smo jih raztopili v pufru z gvanidinijevim kloridom. Vzorec B-AcmA smo z afinitetno kromatografijo očistili in nato z metodo hitrega razredčevanja omogočili njegovo zvitje v nativno obliko. B-AcmA smo v zadnji stopnji izolacije skoncentrirali z ultrafiltracijo. Njegovo identiteto smo potrdili z določitvijo N-končnega aminokislinskega zaporedja z Edmanovo degradacijo in s specifičnimi protitelesi po prenosu western. V nadaljevanju eksperimentalnega dela smo z encimskoimunskim testiranjem in pretočno citometrijo dokazali vezavo B-AcmA preko domene LysM na površino GEM-delcev in bakterijskih celic *L. lactis*. S saturacijsko odvisnostjo smo opisali vezavo B-AcmA na površino GEM-delcev *L. lactis*, in sicer pri različnih začetnih koncentracijah B-AcmA ali GEM-delcev. Dokazali smo tudi vezavo B-AcmA na GEM-delce in bakterijske celice različnih sevov laktobacilov in jo primerjali z vezavo na GEM-delce in bakterijske celice *L. lactis*. Med eksperimentalnim delom smo ugotovili, da z nizinom inducirano izražanje B-AcmA ali dodatek B-AcmA v bakterijsko gojišče vplivata na rast bakterij, in sicer tako da povzročita združevanje bakterijskih celic v skupke, kar smo potrdili z merjenjem hitrosti sedimentacije bakterijskih celic in velikosti agregatov v suspenziji.

V okviru diplomskega dela smo prikazali možnost vezave rekombinantnega proteina B-AcmA na površino gensko nespremenjenih mlečno kislinskih bakterij. To predstavlja osnovo za razvoj sistema za dostavo rekombinantnih proteinov v prebavni trakt na gensko nespremenjenih organizmih. Primer je dostava afiteles, imobiliziranih na površini mlečnokislinskih bakterij ali GEM-delcev, ki bi jih lahko uporabili za lajšanje številnih kroničnih bolezni, kot je na primer kronična vnetna črevesna bolezen.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria in fermented milk, meat and vegetable products have for centuries been a normal component of the human diet. In recent years, in addition to applications in the food industry, lactic acid bacteria have increasingly demonstrated a potential for use in biotechnological and therapeutic purposes. One of the major species of lactic acid bacteria *Lactococcus lactis* is a bacterium that could be used as a delivery system for a variety of the surface bound pharmacologically active molecules, to the gastrointestinal, nasal, pulmonary and vaginal mucosa. Such an application would help to alleviate symptoms of chronic diseases such as chronic inflammatory bowel disease and allergies, as well as to develop recombinant vaccines against many viral, bacterial and parasitic infections. While the public continues to perceive genetically modified organisms (GMOs) as a threat, research is focused on the development of bacterial delivery systems, based on non-genetically modified organisms. Such a system is represented by bacterial cells, which bind recombinant protein to their surface after having been added to a culture medium or GEM-particles, which are obtained by treating bacterial cells with strong acids and organic solvents. GEM-particles are bacterial particles, consisting of only a layer of peptidoglycan, which through different anchoring motifs binds the recombinant protein to the cell wall.

In *Escherichia coli* strain BL21 (DE3), we expressed recombinant protein B-AcmA, consisting of a B domain of protein A from *Staphylococcus aureus*, three LysM repeats and histidine tail. B-AcmA is expressed in the form of inclusion bodies, which were dissolved in a buffer with guanidine hydrochloride. Model protein B-AcmA was purified by affinity chromatography and refolded using a rapid dilution method. In the final stage of isolation, B-AcmA was concentrated by ultrafiltration. The identity of the isolated B-AcmA was confirmed by determination of the N-terminal amino acid sequence using Edman degradation and with specific antibodies using western blotting. With further experimental work, using enzyme immune assay and flow cytometry we demonstrated the binding of B-AcmA through LysM domains on GEM-particles and the surface of *L. Lactis* bacterial cells. Using saturation kinetics, we described the mechanism of binding of B-AcmA on the surface of GEM-particles *L. lactis* at different initial concentrations of B-AcmA or GEM-particles. We demonstrated the binding of B-AcmA on the GEM-particles and bacterial cells of different strains of *Lactobacillus* and compared this with binding to GEM-particles and the bacterial cells of *L. lactis*. During the experimental work, we found that the nisin-induced expression of B-AcmA or addition of B-AcmA to the bacterial growth medium affects the growth of bacteria and also causes the aggregation of bacterial cells into clumps, which was confirmed by measuring the sedimentation rate of bacterial cells and the size of the aggregates in suspension.

In the thesis we have demonstrated the possibility of binding recombinant protein B-AcmA on the surface of non-genetically modified lactic acid bacteria. This is the basis for developing a system for the delivery of recombinant proteins in the digestive tract on non-genetically modified organisms. An example is the delivery of affibodies, immobilized on the surface of lactic acid bacteria or GEM-particles, which could be used for the relief of many chronic diseases, such as chronic inflammatory bowel disease.

SEZNAM OKRAJŠAV

AcmA	N-acetil muramidaza
AK	aminokislina
APS	amonijev persulfat
bp	bazni par
BSA	goveji serumski albumin
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
ELISA	encimsko imunski testi na trdni podlagi (<i>ang. enzymed-linked immunosorbent assay</i>)
FAO	Organizacija za prehrano in kmetijstvo
g	merska enota za relativno centrifugalno silo (RCF)
G-	gramnegativen
G+	grampozitiven
GEM-delci	delci gram-pozitivno ojačevalnega matriksa (<i>ang. gram-positive enhancer matrix particles</i>)
GRAS	splošno priznani kot varni (<i>ang. generally recognized as safe</i>)
GSO	gensko spremenjeni organizmi
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti
HPV	človeški papiloma virus
IgX	imunoglobulini tipa X (X=A,G)
IL	interlevkin
IMAC	afinitetna kromatografija z imobiliziranimi kovinskimi ioni
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
KVČB	kronična vnetna črevesna bolezen
LB	Luria-Bertanijevo gojišče
MKB	mlečnokislinske bakterije
mRNA	informacijska ribonukleinska kislina (<i>ang. messenger RNA</i>)
NaDS	natrijev dodecil sulfat
NICE	z nizinom nadzorovan sistem za izražanje (<i>ang. nisin-controlled gene expression</i>)
OD ₆₀₀	optična gostota pri 600 nm
OspA	lipoprotein A
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	fosfatni pufer s soljo (<i>ang. phosphate-buffered saline</i>)
PVDF	poliviniliden difluorid
RNA	ribonukleinska kislina
RPM	vrtljaji na minuto
SpA	stafilokokni protein A
TEMED	N,N,N",N"-tetrametiletildiamin
TMB	3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidin
TNF α	dejavnik tumorske nekroze alfa (<i>ang. tumor necrosis factor alpha</i>)
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija

KRATICE IN OKRAJŠAVE ZA AMINOKISLINE

A	Ala	alanin
R	Arg	arginin
N	Asn	asparagin
D	Asp	asparaginska kislina
C	Cys	cistein
Q	Gln	glutamin
E	Glu	glutaminska kislina
G	Gly	glicin
H	His	histidin
I	Ile	izolevcin
L	Leu	levcin
K	Lys	lizin
M	Met	metionin
F	Phe	fenilalanin
P	Pro	prolin
S	Ser	serin
T	Thr	treonin
W	Trp	triptofan
Y	Tyr	tirozin
V	Val	valin

1 UVOD

1.1 PREDSTAVITEV NA POVRŠINI BAKTERIJ

Molekule na površini bakterij so ključne za številne biološke procese, kot so spoznavanje in prenos signala med celicami, kolonizacija, vezava na površino, imunogenost in drugi. V vseh teh procesih kot prevladujoči mehanizem nastopajo povezave med dvema proteinoma ali med proteini in ogljikovimi hidrati (1). V preteklem desetletju so razvili številne ekspresijske sisteme za izražanje heterolognih (gostitelju tujih) proteinov, v manjši meri pa tudi oligosaharidov, na površini bakterij. Ta način predstavitve heterolognih proteinov ima z biotehnološkega vidika številne prednosti. Molekula, ki se izrazi na površini bakterije, je prosto dostopna, zato jo substrat ali vezavni partner lahko doseže brez prehoda membranske bariere. Izkazalo se je, da so proteini, pritrjeni na celično površino, bolj stabilni kot tisti, prosti v gojišču (2). Za predstavitev na površini izkoriščamo proteine, ki so naravno prisotni na površini bakterij ali njihove fragmente. Ti proteini služijo kot nosilci za heterologni protein, saj imajo lastne sekrecijske poti in motive pritrjevanja na površino. Prvo uspešno izražanje tujega proteina na površini bakterij s pomočjo fuzije z nosilnim proteinom, izraženim na površini bakterij, je leta 1986 uspelo Freudlu in sodelavcem ter Charbitu in sodelavcem (1). Metoda je bila v naslednjih letih uporabljena za številne aplikacije v biotehnologiji in na industrijskem nivoju (1).

Protein, ki ga želimo predstaviti na površini (potniški ali tarčni protein), združimo z nosilnim proteinom (motivom sidranja) preko N- ali C-končnega dela, ali pripnemo na sredini (način sendviča). Učinkovitost površinske predstavitve je odvisna od lastnosti nosilnega in tarčnega proteina, gostiteljskih celic in metode fuzije. Idealen sistem bi moral zadovoljiti naslednje zahteve: imeti bi moral čim manj omejitev glede velikosti in strukture tarčnega proteina; lahko bi ga uporabili v standardnih sevih; omogočal bi uporabo standardnih bioloških protokolov in orodij, kar bi omogočalo analizo in vrednotenje uspešnosti izražanja; sistem bi moral biti preprost in enostaven za delo (2).

Definirane so tudi idealne lastnosti posameznih delov sistema:

- Nosilni protein mora imeti naslednje lastnosti: učinkovito signalno zaporedje, ki omogoča prenos tarčnega proteina preko notranje membrane; motiv sidranja, ki omogoča močno vezavo proteina na površino; kompatibilnost s proteinom; odpornost proti razgradnji s proteazami v periplazemskem prostoru in gojišču. Ker ima vsak nosilni protein specifične lastnosti, morajo biti le-te upoštevane pri

njegovi izbiri. Potrebna je tudi identifikacija optimalnega mesta fuzije med tarčnim in nosilnim proteinom, saj ta vpliva na uspešnosti prenosa, stabilnost, specifično aktivnost in posttranslacijske modifikacije združenega proteina (3).

- Tarčni protein, ki ga izberemo glede na želeno aplikacijo, prav tako vpliva na učinkovitost izražanja. Tvorbe disulfidnih vezi med cisteini ali tvorba določenih sekundarnih struktur v periplazmi lahko vplivajo na uspešnost translokacije proteina. Protein z AK zaporedjem z več nabitimi ali lipofilnimi ostanki se težje učinkovito izrazi v bakterijah (3). Problem tvorbe disulfidnih vezi je rešljiv s spremembo AK ostankov z mutagenezo, če cisteina ni mogoče zamenjati, pa lahko v gojišče dodamo ustrezen reducent. Vendar pri takšnih spremembah obstaja možnost izgube biološke aktivnosti proteina (4).
- Pomembno vlogo pri uspešnem izražanju igra tudi izbira ustreznega gostiteljskega seva. Le-ta mora biti kompatibilen s fuzijskim proteinom, imeti mora nizko aktivnost proteaz (zunajceličnih in pritrjenih na celično steno), njegovo gojenje mora biti enostavno in ne sme biti podvržen celični lizi (3). Potrebno je upoštevati tudi biosintezne zahteve proteina, saj številni evkariontski proteini za uspešno zvitje zahtevajo endoplazemski retikulum in Golgijev aparat (glikozilacija in fosforilacija) (5). Kot gostiteljske seve uporabljamo tako gramnegativne (G-) kot grampozitivne (G+) bakterije.

1.1.1 UPORABA PREDSTAVITVE NA POVRŠINI

Predstavitev heterolognih proteinov na površini bakterij v biotehnološki industriji uporabljamo za številne aplikacije. S predstavitvijo antigenov na oslabljenih patogenih bakterijah ali komenzalnih bakterijah so razvili živa rekombinantna cepiva (preglednica I). Bakterije so zanimiv dostavni sistem za cepiva, saj so zaradi lipopolisaharidov in toksinov močno imunogene, sposobne kolonizirati gostiteljevo tkivo, izrazijo lahko številne tuje antigene v različnih oblikah (topni, membranski), polipeptidne antigene, izražene na površini, pa imunski sistem enostavneje prepozna (6).

Poleg antigenov je mogoče na površini bakterij predstaviti tudi fragmente protiteles, kar omogoča preučevanje interakcij med proteini, razvijanje novih diagnostičnih orodij, ustvarjanje fragmentov za imunočiščenje in afinitetno vezavo molekul s površinsko predstavitvijo delov protiteles ali različnih vezavnih proteinov. Z uporabo površinsko

predstavljenih rekombinantnih proteinov je možna ciljana dostava celic na imunoreaktivno mesto ali povečanje sposobnosti za kolonizacijo tarčnega tkiva (1, 7).

Preglednica I: Izraženi potniški proteini kot možna cepiva

CEPIVA		
Nosilni sistem	Potniški protein	Referenca
IgA1, AIDA-I, FimA	toksin kolere	(3)
INP, TraT, LamB	površinski antigen hepatitisa B	(3)
SpA	glikoproteinski fragmenti človeškega sincicijskega virusa	(3)
AIDA-I	podenota ureaze A, <i>H. pylori</i>	(4)
PhoE	epitop hsp65 iz <i>M. tuberculosis</i>	(6)
OprF	epitop parazita malarije	(6)
FliC	epitop HIV1	(6)
LamB	epitop polio virusa tipa 1	(1)
M6	epitop človeškega papiloma virusa	(1)
SLH	fragment toksina tetanusa	(1)

Tehnologijo predstavitve na površini bakterij uporabljamo tudi za predstavitev encimov, s čimer se lahko izognemo njegovemu čiščenju. Na površini *E. coli* izražena organofosfatna hidrolaza je delovala kot biosenzor za neposredno določanje prisotnosti organofosfatov (živčni strupi). Organofosfatno hidrolazo so predstavili na površini *E. coli* tudi hkrati s celulozo-vezavno domeno iz *Cellulomonas fimi*. S sočasnim izražanjem obeh proteinov se celice močno in specifično imobilizirajo na celulozno površino ter so sposobne razgradnje organofosfatov, prisotnih v pesticidih (8).

Razvila se je tudi tehnologija bioadsorbentov predvsem v okoljske namene (odstranjevanje ali detoksifikacija toksičnih kemikalij, težkih kovin in ksenobiotikov). V ta namen so na površini *E. coli* izrazili proteine, bogate s histidinom ali cisteinom, ki so specifično vezali živo srebro (9).

Najhitreje razvijajoča panoga uporabe predstavitve na površini bakterij je reševanje peptidnih knjižnic ter *in vitro* tehnike identifikacije in izolacije peptida ali proteina z želenimi lastnostmi. Peptidne knjižnice so obsežne zbirke različnih, strukturno sorodnih peptidov, ki omogočajo sistematično preučevanje interakcij ciljane makromolekule v kratkem času. Peptidni ligandi, izraženi na površini bakterij, tvorijo specifične interakcije z

biološko pomembnimi deli makromolekul (aktivna in alosterična mesta encimov, paratopi protiteles in druga). Kombinatorne knjižnice, izražene na površini bakterij, so zato uporabne za kartiranje epitopov, zorenje afinitete protiteles, inženirstvo protiteles, za izboljšanje katalitične aktivnosti encimov in spreminjanje njihovih substratnih specifičnosti ter izolacijo encimskih inhibitorjev in receptorskih antagonistov (1, 10).

1.1.2 GRAMNEGATIVNE (G-) BAKTERIJE

G- bakterije imajo zunanjo membrano sestavljeno iz dveh plasti. Notranja plast je iz fosfolipidov, zunanja pa iz polisaharidov. Zunanjo membrano od citoplazemske membrane, sestavljene iz fosfolipidnega dvosloja, loči periplazma in plast peptidoglikana. To pomeni, da mora fuzijski protein iz nosilnega in tarčnega proteina, ki se sintetizira v citoplazmi, potovati čez notranjo membrano, plast peptidoglikana (pri tem procesu sodelujejo proteini sekretornega mehanizma gostitelja), periplazmo ter zunanjo membrano in se v slednji usidrati tako, da je izpostavljen zunanjemu mediju (1, 8). Znani so številni sistemi za predstavitev heterolognih proteinov na površini G- bakterij. Kot nosilni del uporabljamo proteine (ali njihove fragmente) iz skupin zunanjih membranskih proteinov, lipoproteinov, avtotransporterjev, sekrecijskih proteinov in proteinov bakterijskih površinskih struktur. Zunanji membranski proteini večkrat prebadajo zunanjo membrano v obliki antiparalelnih β -ploskev in v njej tvorijo strukturo β -soda. β -ploskve so med seboj povezane s kratkimi zavoji v periplazmi in večjimi zavoji na zunanji strani. Ker so zunanji zavoji hipervariabilni ter dopuščajo določeno mero modifikacije (substitucije, delecije, insercije), so prek sendvične fuzije uporabni kot nosilni sistemi za heterologne proteine (1). V to skupino spadajo proteini OmpA, OprF, LamB, OmpS, PhoE in najpogosteje uporabljeni Lpp'OmpA. Lpp'OmpA sestavljajo signalno zaporedje in prvih devet N-končnih AK zrelega lipoproteina (Lpp) iz *E. coli* ter del OmpA. Fragment Lpp je odgovoren za lokalizacijo v zunanji membrani, OmpA pa za transport proteina preko zunanje membrane (1, 3).

Avtotransporterji so skupina proteinov z značilno zgradbo iz treh glavnih domen. Na N-koncu imajo sekretorni signalni peptid, ki mu sledi potniška domena. Ta je sestavljena iz dela, ki je odgovoren za aktivnost avtotransporterja in avtošaperonske domene, ki poveča učinkovitost translokacije potniškega proteina. Potniški domeni sledi translokacijska domena, ki jo prav tako sestavljata dve podenoti: 250-300 AK dolg odsek, ki tvori β -sod, in povezovalc, ki tvori α -vijačnico. Mehanizem translokacije obsega prenos čez notranjo

membrano in periplazmo, vstavljanje in tvorbo β -soda v notranjosti zunanje membrane, prenos aktivne domene skozi β -sod in izražanje aktivne domene na površini. V skupino avtotransporterjev, ki jih uporabljamo kot nosilni sistem za heterologni protein, spadata proteazi IgA VirG in AIDA-I iz *Neisserie gonorrhoeae* (2, 4).

Kot nosilne proteine uporabljamo še lipoproteine Trat, PAL, Inp, ki tvorijo kovalentne povezave z zunanjo membrano preko lipidnih molekul. Proteini bakterijskih površinskih struktur so proteini fimbrij (FimA, FimH) in bičkov (PapA, flagelin), vendar pa so manj dovzetni za vstavitev heterolognega proteina, saj le-to vpliva na terciarno strukturo (1, 3).

1.1.3 GRAMPOZITIVNE (G+) BAKTERIJE

G+ bakterije imajo zunanjo membrano sestavljeno iz citoplazemske membrane in celične stene, sestavljene predvsem iz peptidoglikana in poliolpolifosfatnih polimerov, imenovanih teihojske kisline. Celična stena ima funkcijo fizikalne bariere, ki ščiti bakterije pred zunanjimi vplivi in rigidnega eksoskeleta, ki ščiti bakterijsko celico pred pokom v nizkem osmolarnem okolju (11). Proteini na površini G+ bakterij so pripeti na citoplazemsko membrano ali na komponente celične stene. Proteini, vezani na citoplazemsko membrano, so lipoproteini (vezava na dolge verige maščobnih kislin v citoplazemski membrani) ali proteini s hidrofobno transmembransko domeno. Proteini, vezani na celično steno, pa so lahko nanjo pritrjeni kovalentno (motiv LPXTG) ali nekovalentno preko sidrnih domen (npr. LysM) (12).

Stafilokokni protein A (SpA) je pogosto uporabljen protein za raziskave mehanizmov sidranja na površino G+ bakterij (3) in je tudi najbolje okarakteriziran protein, izražen na površini G+ bakterij (1). SpA ima signalni peptid na N-koncu in signal za vezavo na celično steno na C-koncu (1). N-končni signalni peptid je navadno *sec*-odvisen, C-končni signal pa je sestavljen iz motiva LPXTG, hidrofobne domene, sestavljene iz približno 23 hidrofobnih ostankov in pozitivno nabitega repa. Zaporedje LPXTG je odgovorno za kovalentno vezavo proteina na celično steno, hidrofobni del za spajanje z membrano, pozitivno nabiti rep pa prepreči izločanje proteina v gojišče (mehanizem vezave opisan v poglavju 1.2.1.3.1) (3, 9). C-končni deli so močno homologni pri številnih proteinih na površini G+ bakterij, kar nakazuje, da so pomembni za sidranje proteinov na celično steno. Motiv LPXTG je prisoten naprimer pri PrtP (kazein serinska proteaza) iz *L. lactis* in M6 iz *Streptococcus pyogenes* (13). Kot nosilne proteine uporabljamo tudi proteine S-slojev, bičkov in fimbrij. S-sloj je najbolj zunanja plast bakterij, ki je sestavljena iz podenot

proteinov ali glikoproteinov. Za proteine S-slojev je značilna močna vezava na celično steno preko nekovalentnih povezav. (12).

G⁺ bakterije imajo določene prednosti pred G⁻ bakterijami s stališča dostave heterolognih proteinov: površinski proteini G⁺ bakterij so bolj dovzetni za vstavljanje daljših zaporedij heterolognih proteinov kot površinski proteini G⁻ bakterij; večina sistemov predstavitev heterolognih proteinov temelji na enakem mehanizmu sidranja, ki je dobro raziskan in omogoča vstavljanje več sto AK dolgega zaporedja heterolognega proteina; da dosežemo željeno površinsko izpostavljenost, je potreben prenos samo preko ene membrane; zaradi debelejših celičnih sten so G⁺ bakterije fizikalno bolj odporne in rigidne (9).

1.2 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE

Mlečnokislinske bakterije (MKB) so v fermentiranih mlečnih, mesnih in rastlinskih izdelkih že stoletja normalna sestavina človeške prehrane in so poleg kvasovk (*Saccharomyces cerevisiae*) industrijsko najpomembnejši mikroorganizmi. Odkril jih je Pasteur leta 1857; leta 1878 pa je Lister iz mleka izoliral prvo čisto kulturo (14). Ime mlečnokislinske bakterije se je uveljavilo konec dvajsetega stoletja, ker kot končni produkt metabolizma ogljikovih hidratov tvorijo mlečno kislino (15).

Skupino MKB sestavljajo G⁺ bakterije, ki imajo podobne morfološke, metabolne in filogenetske značilnosti. Klasifikacija MKB temelji na njihovi morfologiji, načinu fermentacije glukoze, substratnem spektru, rasti pri različnih temperaturah (15 °C-45 °C), koncentraciji soli (6,5 % ali 18 % NaCl) in kisika, toleranci do kislin, baz in etanola, proizvedenemu izomeru mlečne kisline iz glukoze, tvorbi zunajceličnih polisaharidov, zahtevanih ravnih dejavnikov in drugih kriterijih (16). V skupino MKB uvrščamo rodove *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* in *Weisella* ter fiziološko soroden rod *Bifidobacterium*, ki jim je sicer genetsko nesoroden (17). MKB so nesporogeni koki, bacili ali paličaste bakterije z manj kot 55 % deležem gvanina in citozina v nukleotidnem zaporedju genoma (16). Nimajo encima katalaze in ker ne morejo sintetizirati citokromov in porfirinov (deli dihalne verige), ne morejo generirati ATP s pomočjo protonskega gradienta. Spadajo med anaerobne bakterije, saj za proizvodnjo energije ne potrebujejo kisika. Vendar pa v prisotnosti le-tega lahko rastejo kot aerotolerantni anaerobi, saj jih peroksidaze ščitijo pred H₂O₂ (15, 18). MKB so negibljive in ne reducirajo nitratov, zato imajo kompleksne zahteve za rast. Iz okolja potrebujejo

ogljikove hidrate, AK, peptide, nukleotide, maščobne kisline, soli in vitamine. Najdemo jih v mleku, mlečnih izdelkih, mesu in na razpadajočem rastlinskem materialu. Veliko jih je del naravne bakterijske flore v ustni votlini, gastrointestinalnem traktu in vaginalni sluznici sesalcev (19). Z izjemo večine vrst iz rodu *Streptococcus* so večinoma nepatogene za živali. *Streptococcus pyogenes* pri človeku povzroča vneto grlo, pljučnico in povišano telesno temperaturo, *Streptococcus pneumoniae* pa lobarno pljučnico, vnetje srednjega ušesa in meningitis. Nekateri nehemolitični oralni streptokoki pa sodelujejo pri nastanku zobnega kariesa (18).

MKB so kemotropne bakterije, kar pomeni, da vso energijo, ki jo potrebujejo za metabolizem, pridobijo z oksidacijo. Oksidacija sladkorjev predstavlja najpomembnejšo pot metabolizma, po kateri vse MKB tvorijo mlečno kislino (15). Glede na potek in končne produkte metabolizma lahko MKB razdelimo v dve skupini: homofermentativne (tvorijo mlečno kislino kot edini produkt metabolizma sladkorjev) in heterofermentativne (končni produkti metabolizma sladkorjev so mlečna kislina, ogljikov dioksid, očetna kislina in etanol) (20, 21). Med fermentacijo se mlečna kislina kopiči v gojišču, kar povzroči znižanje pH. MKB lahko rastejo pri nižjem pH, njihova rast se ustavi pri pH 4.0-5.0 (14).

MKB poleg mlečne kisline izločajo tudi številne druge snovi z antimikrobnim delovanjem. V biologiji ta proces imenujemo mikrobní antagonizem. Gre za inhibicijo rasti določenih mikroorganizmov s strani drugih mikroorganizmov v istem okolju, navadno zaradi potrebe po hranilih. Mikrobní antagonizem vključuje procese kot so tekmovanje za hranila, tvorba negostoljubnega okolja z izločanjem določenih snovi (npr. ogljikov dioksid, organske kisline, vodikov peroksid) v okolje in boj za prostor za adhezijo (19). Mlečna kislina in drugi končni produkti metabolizma MKB (organske kisline, vodikov peroksid, ogljikov dioksid, butandion, bakteriocini in širokospektralna antimikrobna sredstva kot naprimer reuterin) delujejo zato kot konzervansi hrane, saj onemogočajo rast drugih mikroorganizmov (21). Organske kisline delujejo v nedisociirani obliki tako, da znižajo citoplazemski pH in ustavijo metabolno aktivnost. Nevtralizirajo tudi elektrokemijski potencial citoplazemske membrane in s tem povečajo njeno permeabilnost, kar vodi v bakteriostatično delovanje (19, 22). MKB izločajo predvsem očetno in mlečno kislino, pri čemer ima očetna kislina, zaradi večje disociacijske konstante, močnejše antimikrobno delovanje (21). Vodikov peroksid nastane v MKB ob prisotnosti kisika. Do inhibicije rasti v njegovi prisotnosti pride zaradi oksidacije membranskih lipidov in celičnih proteinov tarčnega mikroorganizma (21). Ogljikov dioksid, ki nastane pri heterofermentativnem

metabolizmu ogljikovih hidratov, je toksičen za aerobne mikroorganizme, saj ustvari anaerobno okolje, zniža znotrajcelični pH in pH gojišča (21). Butandion nastane pri citratnem metabolizmu v bakterijah iz rodu *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* in *Lactobacillus* in je odgovoren za okus in vonj po maslu. Mehanizem protimikrobnega delovanja naj bi izhajal iz vpliva butandiona na možnosti izkoriščanja arginina v bakterijah. Nanj so občutljive G- bakterije, plesni in kvasovke, vendar pa se v mlečnih izdelkih nahaja v prenizki koncentraciji, da bi lahko deloval protimikrobno (21). *Lactobacillus reuteri* v stacionarni fazi rasti v gojišču, ki vsebuje zmesi glukoze in glicerola, kot produkt metabolizma proizvaja reuterin. Ta inhibira ribonukleotidno reduktazo, zato deluje protimikrobno na viruse, glive, praživali in bakterije (21, 22).

Bakteriocini so definirani kot antibakterijski, ribosomalno sintetizirani peptidi in proteini. Od ostalih, klinično uporabljenih peptidnih antibiotikov jih ločimo po tem, da so ribosomalno sintetizirani in zato niso sekundarni metaboliti, da se geni za njihovo sintezo in odpornost nanje nahajajo v gručah na operonu in da delujejo proti ozkemu spektru sorodnih bakterij. Ločitev od antibiotikov je z regulatornega vidika pomembna pri njihovi uporabi v prehranski industriji, saj je prisotnost antibiotikov v hrani prepovedana (21, 23). Glede na njihovo primarno strukturo, bakteriocine delimo v štiri razrede. V razred I (lantibiotiki) sodijo majhni, termostabilni, posttranslacijsko modificirani peptidi, ki vsebujejo značilne tioesterske AK lantionin in metilantionin (24). Med lantibiotiki je najpodrobneje opisan nizin, ki ga proizvaja *L. lactis* subsp. *lactis* (21). Nizin sodi v skupino amfifilnih kationskih lantibiotikov in deluje preko dveh mehanizmov: tvori pore v membrani in inhibira biosintezo celične stene preko vezave na lipid II (peptidoglikanski prekursor celične stene). Tvorba por vodi v izgubo ionov in molekul z majhno molekulsko maso, kar povzroči izgubo membranskega potenciala in posledično nedelovanje protonskega prenašalnega sistema (25). Nizin deluje proti številnim G⁺ bakterijam, zavira pa tudi rast spor bakterij iz rodu *Bacillus* in *Clostridium* (21). Ima status GRAS (splošno priznan kot varen) in ga lahko uporabljamo kot konzervans. V zadnjih desetletjih igra nizin tudi pomembno vlogo pri nadzorovanem izražanju proteinov v MKB preko z nizinom nadzorovanega sistema za izražanje (ang. *Nisin-Controlled gene Expression, NICE*).

MKB imajo pomembno vlogo pri fermentaciji hrane. Proizvodnja fermentirane hrane temelji na uporabi starterskih kultur iz MKB, ki z izločanjem mlečne kisline povzročijo hitro zakisanje surovega materiala (26). Fermentirana hrana je znana že več kot pet tisoč let, starterske kulture pa so bile v proizvodnjo sira in kislega mleka uvedene šele leta 1890.

Starterske kulture so definirane kot mikrobnii pripravki, ki vsebujejo veliko število celic vsaj enega mikroorganizma in jih dodajamo svežemu materialu za pospešitev fermentacijskega procesa (27, 28). Proizvodnja fermentirane hrane je pred uvedbo starterskih kultur temeljila na spontanem razvoju mikrobiološke flore, ki je bila naravno prisotna v materialu. Spontano fermentacijo so izboljšali z inokulacijo svežega materiala z majhno količino predhodno uspešno fermentiranega produkta. Uvedba starterskih kultur v prehrambeno industrijo je pripeljala do visoke stopnje kontrole fermentacijskega procesa, standardizacije končnega produkta in hitrejšega tehnološkega postopka (27). MKB z izločanjem oetne kisline, etanola, aromatičnih sestavin, bakteriocinov in številnih encimov pripomorejo tudi k podaljšanju roka uporabnosti, mikrobiološki neoporečnosti, teksturi, aromi, okusu in prijetnejšemu izgledu za uporabnika. Uporabljamo lahko starterske kulture, ki so odporne proti okužbi s fagi, proizvajajo zdravju koristne snovi ali odstranjujejo neželene snovi in toksine. V uporabi so tudi starterske kulture, ki lahko proizvedejo večjo količino nizkokaloričnih poliolov, s čimer zmanjšajo vsebnost sladkorjev, ali odstranijo laktozo in galaktozo iz fermentiranega mleka ter tako omilijo probleme z laktozno intoleranco (21, 29).

MKB uporabljamo za proizvodnjo naslednjih fermentiranih produktov (27):

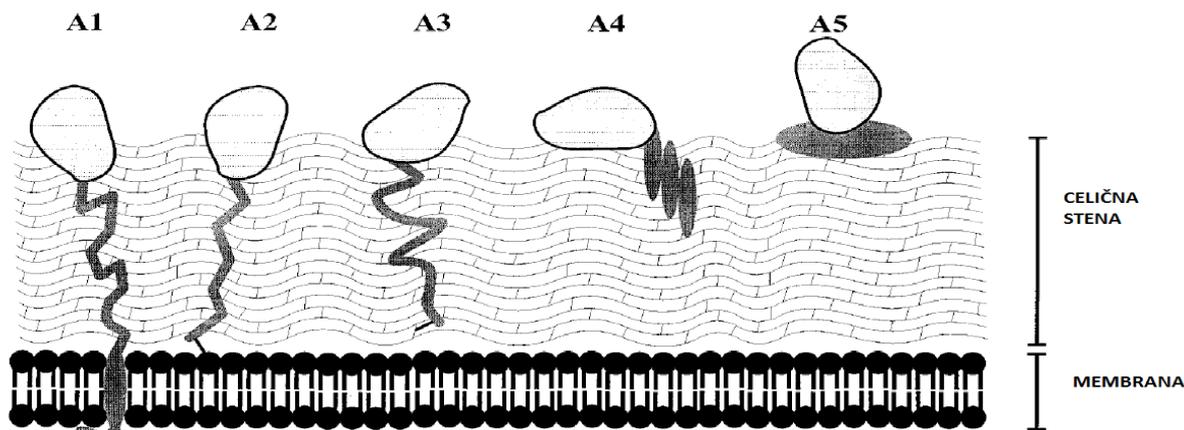
- mlečnih izdelkov, kot so kefir, fermentirano probiotično mleko, jogurt, trdi sir brez lukenj ali z majhnimi luknjami in maslo (pri sirih lahko kot sekundarno mikrofloro uporabljamo tudi plesni, kvasovke ali druge bakterije);
- fermentiranih mesnih izdelkov, kot so fermentirane klobase;
- fermentiranih ribjih produktov;
- fermentirane zelenjave, kot so kisle kumarice, fermentirane olive, kislo zelje, sojina omaka in drugo;
- alkoholnih pijač, predvsem vina in riževega vina;
- fermentiranega žita.

Nekatere MKB so sposobne preživeti prehod preko gastrointestinalnega trakta, nekateri sevi pa so sposobni njegove kolonizacije. MKB imajo nizko intrinzično imunogenost, sposobne so izzvati tako lokalni kot sistemski imunski odziv, nekatere imajo tudi adjuvantne lastnosti. Ker na celični steni ne izražajo lipopolisaharidov, lahko z njihovo uporabo izključimo možnost endotoksičnega šoka (14). MKB se zaradi koristnega delovanja v prebavnem traktu in statusa GRAS uporabljajo tudi kot probiotiki. FAO in

WHO definirata probiotike kot žive mikroorganizme, ki kot sestavina hrane, po zaužitju v zadostnih količinah, ugodno vplivajo na zdravje gostitelja (30). V človeškem gastrointestinalnem traktu živi veliko število različnih bakterij, ki opravljajo številne funkcije, kot so sinteza nekaterih prebavnih encimov, tekmovanje s patogenimi bakterijami pri kolonizaciji, proizvodnja protibakterijskih snovi in druge. Sevi MKB, zastopani v tržnih probiotičnih produktih so predvsem iz rodu *Lactobacillus* (*Lb. bulgaricus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. helveticus*, *Lb. salivarius*, *Lb. plantarum*) in *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis*), v manjši meri pa tudi nekateri sevi iz rodu *Lactococcus* (*L. lactis*), *Enterococcus* in *Streptococcus* (28). Idealen probiotični sev ne sme izkazovati patogenih lastnosti, zmožen je preživeti prehod skozi gastrointestinalni trakt v zadostnem številu, odporen je proti želodčni in žolčni kislini, se adherira in kolonizira prebavni trakt, njegove za zdravje koristne lastnosti pa se morajo ohraniti tekom priprave in shranjevanja produkta (31, 32). Študije funkcijske genomike probiotikov kažejo na različne mehanizme njihovega delovanja v prebavilih. Probiotiki uravnavajo privzem mineralov, sluznične pregrade, vplivajo na funkcije celičnega epitelija, stimulirajo prirojeni in celični imunski odziv ter zmanjšujejo koncentracijo škodljivih metabolitov. Učinkovitost različnih probiotikov je bila z randomiziranimi študijami dokazana pri laktozni intoleranci, vnetnemu gastroenteritisu in z antibiotiki povzročeni diareji (30). Probiotiki naj bi bili učinkoviti tudi pri otroškem nalezljivem gastroenteritisu. Pojavljajo se ugibanja o možnosti uporabe probiotikov pri preprečevanju rakastih obolenj in zmanjševanju holesterola v krvi (30, 33).

1.2.1 NAČINI PREDSTAVITVE NA POVRŠINI MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ

Predstavitev heterolognih proteinov na površini MKB z uporabo genetskih tehnik je raziskovalno področje, ki obeta veliko možnih biotehnoških aplikacij, kot na primer razvoj rekombinantnih cepiv, dostavo terapevtskih proteinov, preprečevanje alergij in lajšanje simptomov metabolnih motenj. Poleg tega pa nam lahko izražanje heterolognih proteinov na površini bakterij pomaga razumeti temeljne mehanizme usmerjanja proteinov na površino ter omogoča nadzor nad interakcijami bakterij z njihovim okoljem. Splošen način predstavitve proteinov na celični površini poteka preko tvorbe himernega proteina med heterolognim proteinom in proteinom, za katerega vemo, da se izrazi na površini. Poznamo pet različnih tipov predstavitve na površini MKB (slika 1), in sicer predstavitev preko transmembranske domene, lipoproteinske domene, preko motiva LPXTG, preko domene LysM in preko proteinov S-sloja (34).



Slika 1: Načini vezave na površino MKB *A1*-transmembranska domena, *A2*- lipoproteinska domena, *A3*-motiv LPXTG, *A4*-domena *LysM*, *A5*-vezava preko proteinov, pritrjenih na celično steno (34)

1.2.1.1 Predstavitev na površini preko transmembranske domene

Za predstavitev heterolognega proteina na površini MKB lahko kot nosilni protein uporabimo katerikoli transmembranski protein, ki večkrat prebada membrano. Mehanizem temelji na vstavljanju zaporedja za potniški protein v tisti del nosilnega proteina, ki se, po vstavitvi v membrano, izrazi na površini. Prve topološke raziskave takšne predstavitve so bile izvedene na proteinu holinu LytP laktokoknega bakteriofaga r1t. S pomočjo fuzije med alkalno fosfatazo (PhoA) in epitopom gp41E virusa HIV so ugotovili mesta fuzije znotraj zavoja, ki se izrazijo zunaj celice in omogočajo uspešno predstavitev na površini. Vendar pa obstajajo omejitve glede velikosti vstavljenega proteina, saj lahko s prevelikim insertom spremenimo topologijo membranskega proteina. Zato je namesto fuzije potniškega proteina znotraj zunanega zavoja transmembranskega proteina bolj zaželena fuzija N-konca potniškega proteina na eno ali več transmembranskih domen proteina. Na ta način sta bila, preko fuzije na N-konec LcnD (pomožni-bakteriocin-transportni protein iz *L. lactis*), na površini uspešno izražena encima β -galaktozidaza in alkalna fosfataza (34).

1.2.1.2 Lipoproteini

Signalni peptid lipoproteinov je sestavljen iz značilnih delov. Za predstavitev na površini je bistveno zaporedje levcin-(alanin ali serin)- (alanin ali glicin)-cistein, ki proteine usmerja v biosintezo lipoproteinov. Vezava na površini bakterij je dosežena preko diacilglicerolne modifikacije cisteinskega ostanka motiva sidranja z encimom diacilglicerolno transferazo. Nato pride do cepitve N-končnega dela pred cisteinskim

ostankom in vezave zrelega proteina na diacilglicerol (lipid) preko tioesterske vezi. Za predstavitev heterolognih proteinov uporabljamo predvsem motiva sidranja proteinov PrtM (z membrano-povezani lipoprotein) in OppA (oligopeptidni transportni protein) iz *L. lactis* (34).

1.2.1.3 Kovalentno sidranje na celično steno

1.2.1.3.1 Motiv LPXTG

Motiv LPXTG sestavljajo trije elementi in sicer kratek, pozitivno nabit del, ki mu sledi hidrofobna domena iz približno 30 AK (optimalno število AK je odvisno od vrste bakterije) na koncu pa še pentapeptid LPXTG (X je oznaka za naključno AK) (35). Navedeni deli se v takem zaporedju nahajajo na C-koncu proteina in so vsi ključni za sidranje v celično steno. Hidrofobni in pozitivno nabiti del upočasnita translokacijo proteina in ga zadržita znotraj membrane, vse dokler AK-zaporedja LPXTG ne prepoznajo sortaze (35). Sortaze so encimi, ki delujejo kot proteaze in transpeptidaze (36). Sortaza uporabi prosto aminsko skupino navzkrižnih povezav v peptidoglikanu (lipid II) za tvorbo amidne vezi s prosto karboksilno skupino, ki nastane po cepitvi zaporedja LPXTG. Površinski proteini, vezani na lipid II, se nato vgradijo v celično steno preko reakcij transglikozilacije in transpeptidacije, pri katerih nastane peptidoglikan. Mehanizem sortazne reakcije poteka v dveh korakih. V prvem sortaza cepi zaporedje LPXTG med treoninom in glicinom, pri čemer pride do tioesterske povezave in acilacije encima na aktivnem cisteinskem preostanku. V drugem koraku pa aminska skupina stranske verige lipida II deluje kot nukleofil in cepi tioestersko vez. Pri tem pride do sprostitve cisteina v aktivnem mestu encima (36, 37).

Površinska predstavitev preko motiva LPXTG je bila uspešna pri prikazu številnih, različno velikih polipeptidov (15-397 AK) na površini MKB. Primeri površinskih proteinov z motivom LPXTG, ki jih uporabljamo kot nosilne proteine za predstavitev heterolognega proteina, so PrtP (kazein serinska proteaza) iz *L. lactis* in iz *Lb. paracasei*, M6 iz *S. Pyogenes*, M streptokokni proteini, protein A (IgG-vezavni protein) iz *S. aureus* (SPA) ter FnBPB (fibronektin-vezavni protein B) iz *S. aureus*. S pomočjo PrtP so na površini predstavili epitop Hackett virusa influence, fragment C toksina tetanusa, protein VP7 rotavirusa ter ureazi A in B iz *Helicobacter pylori*. S pomočjo SPA so predstavili fragment B toksina kolere, streptavidin iz *S. avidinii* in gpG epitop človeškega

respiratornega sincicijskega virusa. S pomočjo M6 pa so predstavili protein E7 papiloma virusa, T celični epitop gp120 in epitop V3 virusa HIV in druge (34).

1.2.1.4 Nekovalentna vezava

1.2.1.4.1 Domena LysM

Domena LysM je najbolj obetaven motiv za vezavo heterolognega proteina na peptidoglikan (38). Največkrat je del izvenceličnih encimov, ki so udeleženi pri metabolizmu celične stene in pri katerih je odgovorna za sidranje katalitične domene na peptidoglikan. Ima pa tudi druge funkcije: glavna zunajcelična mureaza bakterije *Listeria monocytogenes*, p60, ki vsebuje domeno LysM, je udeležena pri bakterijski adheziji; zunanja membrana bakterije *E. coli* vsebuje motive LysM, ki so udeleženi pri pripenjanju bakterije na sesalske celice; domena LysM naj bi prav tako bila ključna pri prepoznavanju simbiotskih bakterij in gliv s strani rastlin (38). Navadno se domena LysM nahaja na N- ali C- koncu (1-6 ponovitev) nekovalentno pripetih proteinov in je dolga približno 40 AK ostankov (12). Najbolje opisan protein z domenami LysM je N-acetil muramidaza (AcmA) iz *L. lactis*.

Za normalno rast in delitev bakterijskih celic je potrebna hidroliza celične stene z encimi, ki razgradijo peptidoglikan. V bakterijah so odkrili avtolitične mehanizme, ki vključujejo različne hidrolitične encime, na primer N-acetilmuramidaze, N-acetilglukozamidaze, N-acetilmuramil-L-alanin amidaze, endopeptidaze in transglikozilaze. Ti encimi so pomembni za ločitve celic ob delitvi, sporulacijo, razvoj kompetence, tvorbo flagel in druge celične aktivnosti (39). V stacionarni fazi ali ob prisotnosti antibiotika pride do prenehanja sinteze peptidoglikana in takrat omenjeni encimi povzročijo avtolizo celic in sprostitev znotrajceličnih komponent (40). Encim AcmA je glavni avtolizin bakterije *L. lactis*. Odgovoren je za ločitev celic ter lizo celic v stacionarni fazi. Encim AcmA spada med N-acetil muramidaze in hidrolizira 1,4- β vez med N-acetilmuraminsko kislino in N-acetil-D-glukozaminom. Ima molekulska maso 40,3 kDa in je sestavljen iz N-končnega aktivnega dela ter C-končne peptidoglikan vezavne domene. Njegov C-konec je sestavljen iz treh 45 AK dolgih, visoko homolognih ponovitev domen LysM, ki so med seboj ločene z distančniki, bogatimi s serinom, treoninom in asparaginom. Distančniki se razlikujejo po dolžini, sestavi in niso homologni (41, 42).

Z AcmA so bile izvedene številne študije, katerih rezultati omogočajo razumevanje pomena in uporabnost domen LysM v biotehnologiji. Ugotovljeno je bilo, da se AcmA najverjetneje veže na N-acetilglukozamin in N-acetilmuraminsko kislino v peptidoglikanu (38), njeno vezavo na bakterijsko steno pa ovirajo lipoteihojske kisline (40, 42). Vezavo AcmA, ki je vrstno-specifična, ovirajo tudi proteini S-plasti (42). V bakteriji *L. lactis* 1363 so tudi izrazili AcmA brez, z eno, dvema, tremi ali štirimi ponovitvami LysM na C-končnem delu. S testiranjem delovanja AcmA so ugotovili, da se AcmA brez ponovitev LysM ne veže na bakterijsko celično steno (43) ter da so za njegovo maksimalno katalitično aktivnost v stacionarni fazi rasti potrebne tri ponovitve LysM (41). Prav tako delecije LysM v AcmA vplivajo na dolžino celičnih verižic. Za funkcionalno ločitev celic sta potrebni vsaj dve ponovitvi domene LysM (41). V kulturi bakterijskih celic, ki so izražale AcmA brez ali z eno ponovitvijo LysM, so opazili predvsem celične verižice, medtem ko so pri tistih, ki so izražale AcmA z dvema, tremi ali štirimi ponovitvami LysM, v kulturi določili predvsem posamezne bakterijske celice in nekaj celičnih verižic, sestavljenih iz največ petih bakterijskih celic.

Uporaba gensko spremenjenih organizmov (GSO) je v aplikacijah, kjer je možno nekontrolirano sproščanje genskega materiala v okolje (prehrambna industrija, cepiva), nezaželena (44). Zato predstavlja postopek vezave rekombinantnega proteina preko domene LysM na površino gensko nespremenjene G⁺ bakterije način, kako se izogniti uporabi GSO. Pri tem rekombinantni protein, ki vsebuje domeno LysM, izrazimo v gostiteljskem sevu, ga izoliramo in dodamo v gojišče nespremenjenih bakterij (45, 46).

S pomočjo ponovitev LysM v proteinu AcmA so na površino *L. lactis* uspešno imobilizirali topna encima α -amilazo iz *E. coli* in β -laktamazo iz *Bacillus licheniformes* (47).

1.2.1.4.2 Proteini S-plasti in domena SLH

Nekatere MKB imajo S-plast, ki je najbolj zunanja plast bakterij. Proteini S-plasti lahko predstavljajo tudi do 20 % vseh bakterijskih proteinov in tvorijo porozno mrežo, ki popolnoma pokriva celično površino (34). Najpodrobneje so raziskani proteini S-plasti *Lb. brevis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. crispatus* in *Lb. helveticus*. Z gensko karakterizacijo so odkrili, da je C-končni del proteinov S plasti v več kot 80 % identičen v vseh proteinih in da je prav ta del odgovoren za nekovalentno vezavo proteinov na celično steno. Del 10-15 ohranjenih AK so poimenovali domena SLH (*s-layer homology domain*) (34, 48). Vezava

na celično steno naj bi potekala preko piruvilacije polisaharidnega receptorja v celični steni. S pomočjo fuzije s SlpA iz *Lb. brevis* so na površini uspešno predstavili epitop VP1 enterovirusa, s fuzijo z drugimi proteini S-plasti pa tudi epitop VP1 poliovirusa (49).

1.2.2 POTENCIALNA UPORABA MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ V TERAPIJI

Parenteralna aplikacija, ki pa ima številne slabosti, je najpogostejši način uporabe terapevtskih peptidov in proteinov. Ker je razpolovni čas proteinov v krvnem obtoku kratek, sta potrebna pogosta aplikacija in visoko odmerjanja. Za bolnika je parenteralna aplikacija neprijetna in boleča, zato jo spremlja slaba sprejemljivost. Zaradi kompleksne proizvodnje, zagotavljanja sterilnosti in potrebe po usposobljenem osebju za tovrstno uporabo je tudi draga. Znanost zato stremi k odkrivanju učinkovitih pripravkov, ki bi omogočili povečano absorpcijo terapevtskega proteina iz črevesja in s tem peroralno uporabo, ki je pacientu prijaznejša in zagotavlja boljšo sprejemljivost (50). Vendar pa ima peroralna uporaba proteinov določene omejitve, kot na primer: veliko molekularno maso proteina (omejena permeabilnost), nestabilnost proteina v gastrointestinalnem traktu in nizko biološko uporabnost (1-2 % peroralno apliciranega odmerka proteina). Privlačno možnost peroralne aplikacije proteinov predstavlja neposredna uporaba rekombinantnih bakterij, ki lahko delujejo kot dostavni sistemi za farmakološko aktivne biomolekule. Poleg sluznice prebavil sta kot tarči zanimivi še nosna in vaginalna sluznica (50, 51).

Začetne raziskave uporabe rekombinantnih bakterij v terapevtske namene so bile izvedene z atenuiranimi bakterijami iz rodov *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Bordetella*, *Shigella* in *Listeria*, ki so dobro prilagojene za interakcije s površino sluznice. Vendar pa uporaba patogenih bakterij ni najboljša rešitev, saj lahko te obnovijo svoj patogeni potencial, njihova uporaba pa je še posebej nevarna pri starejših, otrocih in imunsko oslabljenih pacientih (52, 53).

MKB predstavljajo zanimivo alternativo uporabi atenuiranih patogenih bakterij. Med MKB najpogosteje uporabljamo bakterijo *L. lactis*, saj poznamo zaporedje njenega genoma. Zanja so razvita tudi številna genetska orodja, kar omogoča njeno enostavno genetsko manipulacijo (53). Njena prednost pred ostalimi MKB je tudi v tem, da v gojišče izloča razmeroma malo proteinov, od tega le Usp45 v količinah, ki jih lahko zaznamo z barvanjem s Coomassie Brilliant Blue (54). Želena biomolekula se sintetizira v celicah MKB in se nato prenese na eno od treh različnih lokacij: ostane v celici (znotrajcelično), se

izloči v okolje (zunajcelično) ali pa se pritrdi na površino celice. V celici ostane biomolekula zaščitena pred ostrimi pogoji okolja (želodčni sok in žolčne kisline), vendar pa je za dostavo proteina nato potrebna celična liza. Zunajcelično izražanje proteina omogoča neposredne interakcije z okoljem, kar je pozitivno z vidika doseganja terapevtskih učinkov, vendar pa tudi negativno z vidika stabilnosti proteina. Predstavitev na površini celic združuje prednosti obeh predhodno omenjenih lokacij, saj omogoča neposreden stik proteina z okoljem, obenem pa ga tudi ščiti pred proteolitično razgradnjo (55). Uporabimo lahko žive ali mrtve MKB. Uporaba živih celic je potrebna, če se biomolekula sintetizira *in situ*, vendar pa ta način uporabe spremljajo regulatorne omejitve. Pri peroralni uporabi mrtvih celic se, prav tako kot pri živih celicah, ohrani potencialni adjuvantni učinek MKB. Učinkovitost mrtvih celic za cepiva je odvisna od količine izraženega antigena, metode njihove inaktivacije in lokalizacije proizvedene biomolekule. Zanimiv način dostave biomolekul je tudi z delci gram-pozitivnega ojačevalnega matriksa (GEM: *gram-positive enhancer matrix particles*), ki jih pripravijo z obdelavo celic z močnimi kislinami in organskimi topili. GEM-delci *L. lactis* so sestavljeni le iz peptidoglikana, saj obdelava povzroči odstranitev celotne celične vsebine in na površino vezanih bakterijskih proteinov. GEM-delci služijo kot ogrodje za pritrjevanje biomolekul na površino preko peptidoglikan vezavnih motivov, kot je C-končni motiv proteina AcmA (50). MKB preučujejo za uporabo na področju razvoja cepiv, za dostavo terapevtskih proteinov, preprečevanje alergij in drugo.

1.2.2.1 Mlečnokislinske bakterije kot dostavni sistem za cepiva (vaccine)

Cepljenje predstavlja najučinkovitejši način zaščite pred infekcijskimi boleznimi. V začetni fazi okužbe so številni patogeni omejeni na mukozno membrano ali pa je za okužbo potreben njihov prenos preko le-te. Sluznica predstavlja prvo obrambno linijo pred bakterijskimi, virusnimi in parazitskimi infekcijami. Zato so prizadevanja za vzpostavitev učinkovitega imunskega odziva na mukozni ravni razumljiva (55). Tarčni sistem za tovrstno imunizacijo so različne vrste sluznično- limfatičnega tkiva, ki je povezano z mukozo: limfoidno tkivo nazofarinksa, mandljev, žlez slinavk in zgornjega respiratornega trakta (intranazalna aplikacija, oralna aplikacija), epitelij bronhijev in pljučnih poti, gastrointestinalnega trakta (peroralna aplikacija) ter epitelij moških in ženskih spolnih organov. Vsako od teh tkiv pokriva specifičen epitelij, ki vsebuje celice M in igra pomembno vlogo v ohranjanju mukozne bariere in sprožitvi mukoznega imunskega

odziva, ki temelji na proizvodnji protiteles vrste IgA. Dostava antigenov s pomočjo bakterijskih vektorjev z namenom vakcinacije je bila uspešna pri vzpostavitvi humoralnega in celičnega imunskega odziva, tako na sistemski (protitelesa IgG) kot na mukozni ravni (protitelesa IgA) (55, 56).

Prvo cepivo, ki je temeljilo na uporabi MKB kot dostavnem sistemu, je predstavljal *L. lactis* MG1363, ki je proizvajal fragment C toksina tetanusa iz bakterije *Clostridium tetani* (57). Ostali primeri uporabe MKB za dostavo virusnih in bakterijskih antigenov, toksinov, človeških alergenov in antigenov praživali pa so navedeni v preglednici II. Za dostavo antigenov lahko uporabimo kolonizirajoče ali nekolonizirajoče seve, odvisno do želenega časovnega okvira izražanja antigena. V primeru, da želimo kontinuirano dostavo antigena, moramo kot dostavni sistem uporabiti kolonizirajoče seve laktobacilov (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*). Prednost njihove uporabe je tudi v tem, da so nekateri sevi probiotični. Če pa za dostavo cepiv uporabimo laktokoke (naprimer *L. lactis*), ki ne kolonizirajo sluznice, bomo dosegli visok nivo izražanja antigena za čas prehoda bakterije skozi prebavni trakt (58). Kateri sistem antigenske predstavitve je primernejši za doseganje večje imunogenosti, je odvisno od primera do primera in ga ni mogoče predhodno napovedati (58). Ne glede na izbiro sistema pa so vsi antigeni, dostavljeni z MKB, preveliki, da bi lahko prečkali epiteljske celice in prešli v krvni obtok. V primeru peroralne uporabe lahko bakterije prehajajo epiteljsko plast s pomočjo celic M, ki se nahajajo nad limfatičnimi folikli v ileumu (imenovanimi tudi Peyerjeve plošče). Celice M jih nato predstavijo dendritičnim celicam, ki fagocitirajo bakterije in jih prenesejo v bezgavke, kjer sprožijo tvorbo protiteles vrste IgA. Protitelesa prehajajo nazaj v lumen prebavil, kjer omejujejo bakterijsko populacijo. Poleg mukoznega imunskega odziva lahko dosežemo tudi sistemskega (50). V MKB so izrazili tudi interlevkina IL-2 in IL-6, ki delujeta adjuvantno in okrepi imunski odziv (52).

V zadnjem času razvijajo tudi dostavo cepiv na osnovi DNA za peroralno uporabo s pomočjo MKB. V tem primeru DNA zapis za protein vgradimo v bakterijo, ki vstopi v celico, se razgradi in sprosti DNA. Protein se tvori s pomočjo gostiteljevih transkripcijskih in translacijskih mehanizmov. Z uporabo bakterije *L. lactis* so uspešno vstavili cDNA za goveji β -laktoglobulin, ki je eden glavnih alergenov v kravjem mleku, v celično linijo epiteljskih celic Caco-2. S takšno vakcinacijo lahko izzovemo tako humoralni, kot tudi celični imunski odziv, kar omogoča zdravljenje kroničnih bolezni in virusnih infekcij (55).

Preglednica II: Pregled cepiv na osnovi mlečnokislinskih bakterij

I=protein izločen v medij, C=citoplazemski protein, P= protein, pritrjen na membrano, NP=ni podatka

Cepivo	Aplikacija	Patogeni mikroorganizem, virus ali pražival	Antigen	Bakterijski vektor	Način sinteze proteina
cepivo proti antraksu	peroralna	<i>Bacillus anthracis</i>	PA (<i>protective antigen</i>)	<i>Lb. acidophilus</i>	NP
cepivo proti boreliozi	peroralna	<i>Borrelia burgdorferi</i>	lipoprotein A (OspA)	<i>Lb. plantarum</i>	P
cepivo proti tetanusu	peroralna	<i>Clostridium tetani</i>	fragment C toksina tetanusa (TTFC)	<i>L. lactis, Lb. casei, Lb. plantarum</i>	P
Cepivo proti pnevmokokom	nazalna	<i>S. pneumoniae</i>	pnevmokokni površinski protein A (PsaA)	<i>L. lactis, Lb. casei, Lb. plantarum, Lb. helveticus</i>	C
cepivo proti <i>H. pylori</i>	peroralna	<i>H. pylori</i>	podenota ureaze B	<i>L. lactis, Lb. plantarum</i>	C
	peroralna	<i>H. pylori</i>	Cag12	<i>L. lactis</i>	I
cepivo proti bakteriji <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i>	peroralna	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Enteritidis</i>	flagelin (FliC)	<i>Lb. casei</i>	P
cepivo proti zobnemu kariesu		<i>Streptococcus mutans</i>	površinski protein PAC	<i>L. lactis</i>	NP
		<i>Streptococcus pyogenes</i>	M6	<i>L. lactis</i>	NP
cepivo proti virusi HIV (humani imunodeficientni virus)	peroralna	HIV virus	zavoj V2-V4 proteina ovojnice HIV	<i>L. lactis</i>	P
cepivo proti virusu SARS (sindrom akutne respiratorne stiske)	peroralna, nazalna	koronavirus	protein S (epitop celic B in N-končna receptor vezavne domena)	<i>L. lactis</i>	P
terapevtsko cepivo proti raku materničnega vratu	peroralna	HPV-16	onkoprotein E7	<i>Lb. casei</i>	P
	nazalna	HPV-16	onkoprotein E7	<i>L. lactis</i>	P
profilaktično cepivo proti raku materničnega vratu	subkutana	HPV-16	glavni kapsidni protein L1	<i>Lb. casei</i>	C
cepivo proti rotavirusu	peroralna	rotavirus	hemaglutinin VP4	<i>L. lactis, Lb. casei</i>	P
	peroralna	rotavirus	protein celične pritrditve VP7	<i>L. lactis</i>	P
cepivo proti gripi H5N1	peroralna	virus influence H5N1	antigen HA	<i>L. lactis</i>	NP
cepivo proti hepatitisu B	peroralna	hepatitis B	območje PreS površinskega proteina	<i>L. lactis</i>	NP
cepivo proti malariji	peroralna	<i>Plasmodium yoelii</i>	merozoitni površinski protein MSP1	<i>L. lactis</i>	C
	peroralna	<i>Plasmodium falciparum</i>	MSA2	<i>L. lactis</i>	NP
cepivo proti giardiozi	peroralna	<i>Giardia lamblia</i>	CWP2 (glavna komponenta celične strukture cist)	<i>L. lactis</i>	P

1.2.2.2 Zmanjšanje imunskega odziva z uporabo mlečnokislinskih bakterij v terapiji

Alergijska reakcija tipa 1 je kronična vnetna motnja, za katero je značilen pretiran imunski odziv zrelih celic T pomagalk tipa 2. Alergije lahko premagamo s ponavljajočim izpostavljanjem naraščajočim odmerkom alergena. Dostava alergena s pomočjo MKB se je izkazala za učinkovito in uspešno v mišjih modelih alergij. V MKB so uspešno izrazili alergene pršice in brezovega cvetnega prahu. Uporaba v eksperimentalnih modelih alergije je pokazala uspešno spremembo imunskega odziva v smer zrelih celic T pomagalk tipa 1 (57). Poleg alergenov so v MKB izrazili tudi imunosupresivne citokine, protitelesa proti imunostimulativnim citokinom, interferon α (INF- α), transformirajoči rastni dejavnik β (TGF- β) in druge dejavnike, ki pomagajo spremeniti imunski odziv v prid zrelih celic T pomagalk tipa 1. Poleg alergij je takšna terapija primerna še za astmo, celiakijo ali sladkorno bolezen tipa 1 (14).

1.2.2.3 Mlečnokislinske bakterije kot dostavni sistemi za terapevtske proteine

Dostava fiziološko aktivnih proteinov s pomočjo MKB ima potencial za zdravljenje številnih kroničnih bolezni in alergij. Primarno področje raziskovalnega interesa pa predstavlja lajšanje kronične vnetne črevesne bolezni (KVČB), kamor uvrščamo Crohnovo bolezen in ulcerozni kolitis. Vzrok za nastanek KVČB še ni poznan, ugotovili pa so, da igra pomembno vlogo IL-10, saj so miši z izbitim genom zanj spontano razvile kolitis (50). Z namenom zdravljenja so zato razvili dostavni sistem na osnovi *L. lactis*, ki je v veliki količini proizvajal IL-10. V *L. lactis* so vgradili zapis za fuzijski protein med zrelim evkariontskim IL-10 in sekrecijskim signalom laktokoknega proteina Usp45 (59). Z IL-10 lahko moduliramo imunski odziv in omejimo vnetje, kar je bilo uspešno dokazano v mišjih modelih kolitisa (59). Za zadovoljitev varnostnih zahtev pri uporabi gensko spremenjenih MKB pri človeku so razvili sev *L. lactis*, pri katerem so gen za timidilat sintazo (*thyA*) zamenjali z genom za IL-10. Bakterija *L. lactis* brez gena *thyA* ni sposobna živeti brez timina in timidina, zato je omejena le na gostiteljev gastrointestinalni trakt. S tem sistemom so izvedli tudi klinične raziskave na bolnikih s Crohnovo boleznijo ali kolitisom. Prva faza, v kateri so ugotovili zmanjšanje simptomov Crohnove bolezni in potrdili varnost uporabe, je bila izvedena in zaključena leta 2006 na Nizozemskem. Fazo IIa so zaključili leta 2009 in sicer kot randomizirano, dvojno slepo, s placebom kontrolirano multinacionalno raziskavo. Potrdili so ustreznost apliciranega sistema za človeka, vendar

pa niso dokazali signifikantnih kliničnih prednosti (57). Drugi primeri uporabe gensko spremenjenih MKB za zdravljenje KVČB sta bakteriji *Lb. plantarum* in *L. lactis*, ki izločata encim superoksidno dismutazo in s tem zmanjšata vpliv oksidativnega stresa pri vnetju; *L. lactis*, ki izloča protitelesa proti TNF α , s čimer je preprečena vezava TNF α na receptor, kar zmanjša vnetje; *L. lactis*, ki izraža epidermalni rastni dejavnik, ki poveča velikost intestinalnih resic in vpliva na absorpcijo (14).

S pomočjo MKB bi lahko lajšali simptome metabolnih motenj, kot je pankreatitis, ki ga spremlja pomanjkanje encima lipaze. Razvili so sev *L. lactis*, ki znotrajcelično izraža lipazo *S. hyicus*, z namenom dostave velikih količin tega encima v jejunum (60). Nove dostavne sisteme so opisali v živalskih modelih, med drugim tudi za zdravljenje raka, za kontroliranje telesne teže in odpravljanje debelosti. V prihodnosti lahko pričakujemo razvoj gensko spremenjenih MKB, ki bodo omogočale dostavo terapevtskih molekul ob določenem času na ciljano mesto. Ker se bodo zaključile tudi klinične raziskave, lahko pričakujemo poglobljeno znanje o varnosti uporabe in nove tehnološke izzive pri uporabi MKB (57).

2 HIPOTEZA IN NAMEN DELA

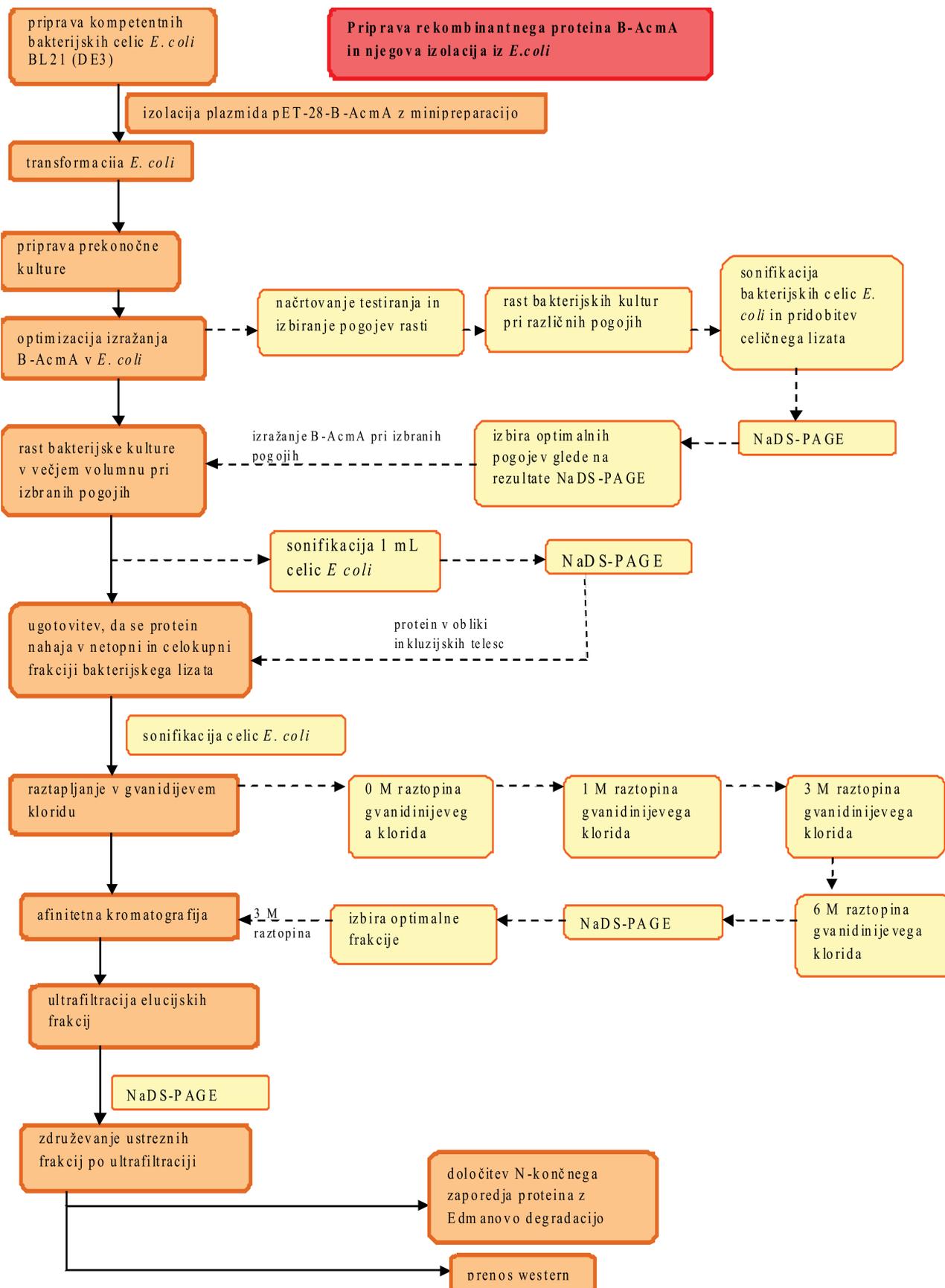
Uspešna vezava rekombinantnih proteinov preko domen LysM na površino G+ bakterij je bila že opisana v številnih znanstvenih člankih. Zato smo predpostavili uspešno vezavo B-domene proteina A iz *Staphylococcus aureus* preko domene LysM tudi na površino mlečnokislinskih bakterij.

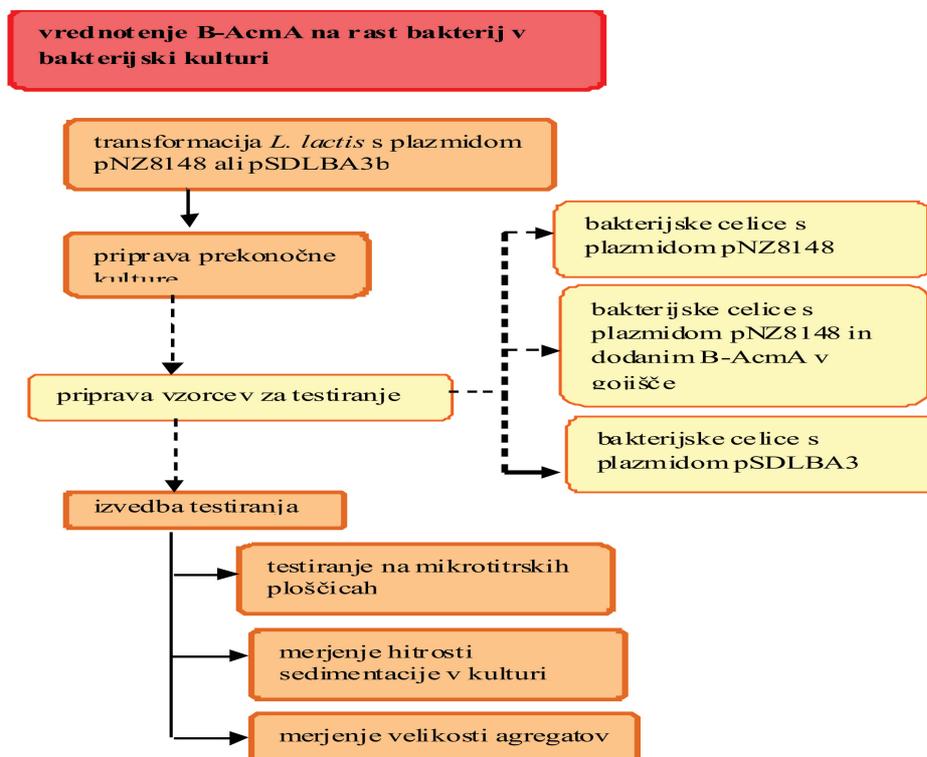
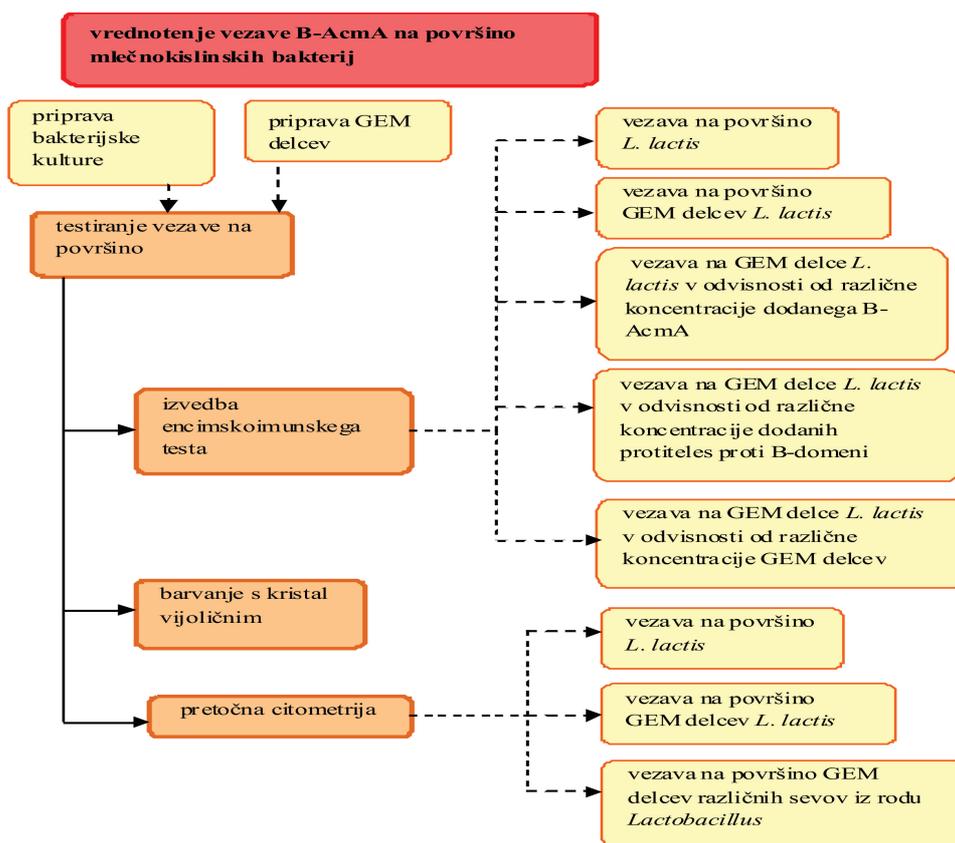
Namen našega dela je priprava rekombinantnega proteina, sestavljenega iz B-domene proteina A iz *Staphylococcus aureus*, treh ponovitev LysM in histidinskega repa ter potrditev vezave rekombinantnega proteina na GEM-delce in bakterijske celice *L. lactis* ter izbrane seve iz rodu *Lactobacillus*. Če bo vezava na površino uspešna, jo bomo poskušali tudi podrobneje opredeliti. V ta namen bomo:

- sev *Escherichia coli* BL21(DE3) transformirali s plazmidom pET-28 z vstavljenim genskim konstruktom pET-28-B-AcmA; po indukciji z izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidom bomo v *E. coli* izrazili rekombinantni protein, sestavljen iz B-domene, treh ponovitev LysM in histidinskega repa (B-AcmA);
- optimizirali pogoje izražanja B-AcmA v *E. coli* BL21(DE3) in nato pri optimalnih pogojih izrazili B-AcmA v večjem volumnu celične kulture;
- določili mesto izražanja B-AcmA v *E. coli* BL21(DE3) (zunajcelično ali v citoplazmi v obliki inkluzijskih telesc) ter glede na rezultate prilagodili prvi korak njegove izolacije;
- z afinitetno kromatografijo z imobiliziranimi kovinskimi ioni odstranili nečistote in pridobili čist B-AcmA;
- z ultrafiltracijo skoncentrirali B-AcmA do raztopine s primerno koncentracijo, s katero bomo izvajali nadaljnja testiranja;
- izoliranemu B-AcmA potrdili identiteto z določanjem N-končnega aminokislinskega zaporedja z Edmanovo degradacijo in s specifičnimi protitelesi po prenosu western.

Vezavo B-AcmA na površino bakterijskih celic in GEM-delcev bomo poskusili dokazati z encimskoimunskim testom, barvanjem s kristal vijoličnim in s pretočno citometrijo. Če bo vezava uspešna, jo bomo ovrednotili pri različnih koncentracijah B-AcmA, bakterijskih celic ali GEM-delcev. Vezavo B-AcmA na površino GEM-delcev in bakterijskih celic izbranih sevov iz rodu *Lactobacillus* bomo primerjali z njegovo vezavo na bakterijske celice in GEM-delce *L. lactis* in ugotavljali, ali obstajajo razlike v afiniteti vezave med različnimi bakterijami.

3 NAČRT DELA





4 MATERIALI IN METODE

4.1 MATERIALI

4.1.1 RAZTOPINE

Preglednica III: Raztopine, uporabljene pri eksperimentalnem delu

raztopina TBCa	raztopina TBCaG
0,238 g HEPES 1,088 g MnCl ₂ 1,1 g CaCl ₂ 1,864 g KCl HEPES, CaCl ₂ in KCl smo z mešanjem raztopili v 100 mL destilirane vode ter uravnali pH s KOH na 6,7. Nato smo raztopili še MnCl ₂ in sterilno filtrirali.	50 mL TBCa 8,8 mL glicerola
pufer za zbiralni gel (0,5 M)	pufer za ločevalni gel (1,5 M)
6,05 g Trisa Tris raztopimo v 100 mL destilirane vode in uravnamo pH s HCl na 6,8.	18,15 g Trisa Tris raztopimo v 100 mL destilirane vode in uravnamo pH s HCl na 8,8.
2x NaDS nanašalni pufer	10x NaDS pufer
2,5 mL Trisa 2,0 mL glicerola 4,0 mL 10 % NaDS 0,5 mL 0,1 % bromfenol modrega Raztopimo, z 0,1 M HCl uravnamo pH na 8,3 in z destilirano vodo dopolnimo do 10 ml.	30 g Trisa 144 g glicina 10 g NaDS Dopolnimo z destilirano vodo do 1 L in z mešanjem raztopimo.
1x NaDS pufer	raztopina Coomassie Brilliant Blue
100 ml 10x NaDS pufera dopolnimo do 1 L z destilirano vodo.	5 tablet Coomassie blue 400 mL destilirane vode 600 mL etanola
10 % razbarvalna raztopina	30 % razbarvalna raztopina
100 mL tehničnega etanola 50 mL očetne kisline 850 mL destilirane vode	300 mL tehničnega etanola 100 mL očetne kisline 600 mL destilirane vode
0,5 % raztopina glukoze	0 M raztopina gvanidina za raztapljanje
0,5 g glukoze 100 ml destilirane vode Glukozo raztopimo in raztopino sterilno prefiltriramo v brezprašni komori.	0,78 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 1,753 g NaCl Dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL.

se nadaljuje

1 M raztopina gvanidina za raztapljanje	3 M raztopina gvanidina za raztapljanje
0,78 g NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O	0,78 g NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O
1,753 g NaCl	1,753 g NaCl
9,55 g gvanidinijevega klorida	28,661 g gvanidinijevega klorida
Dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL.	Dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL.
6 M raztopina gvanidina za raztapljanje	pufer za spiranje kolone
0,78 g NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O	3,5 g NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O
1,753 g NaCl	8,77 g NaCl
57,3 g gvanidinijevega klorida	143,3 g gvanidinijevega klorida
Dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL.	Raztopimo, uravnamo pH na 7 in dopolnimo z destilirano vodo do 500 mL.
pufer za elucijo B-AcmA s kolone	PBS (fosfatni pufer)
3,9 g NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O	6,224 g K ₂ HPO ₄
8,77 g NaCl	1,926 g KH ₂ PO ₄
143,3 g gvanidinijevega klorida	8,766 g NaCl
5,1 g imidazola	Raztopimo, z 1M HCl uravnamo pH na 7,2 in dopolnimo z destilirano vodo do 1 L.
Raztopimo, uravnamo pH na 7 in dopolnimo z destilirano vodo do 500 ml.	
0,5 % blokirna raztopina	3 % blokirna raztopina
0,5 g BSA	3 g BSA
Raztopimo v 100 mL PBS.	Raztopimo v 100 mL PBS.
citratni pufer	2 M H₂SO₄
13,42 g Na ₂ HPO ₄	10,7 ml H ₂ SO ₄
5,105 g citronske kisline	Dopolnimo z destilirano vodo do 100 mL.
Raztopimo, uravnamo pH na 6 in dopolnimo z destilirano vodo do 50 mL.	
25 % formaldehid	5 % očetna kislina
100 mL 37 % formaldehida	5 mL očetne kisline
48 mL destilirane vode	95 mL destilirane vode
TBS	TBST
6,05 g Trisa	V 1 L TBS dodamo 1 mL Tweena 20.
8,76 g NaCl	
Raztopimo, z 1 M HCl uravnamo pH na 7,5 in dopolnimo z destilirano vodo do 1 L.	
10x pufer WB	1x pufer za prenos WB z NaDS
30 g Trisa	100 mL 10xWB
58 g glicina	200 mL metanola
Dopolnimo z destilirano vodo do 1 L.	3,75 mL 10 % NaDS
	Dopolnimo z destilirano vodo do 1 L.
barvilo za barvanje membrane pri določanju N-končnega zaporedja aminokislin	5 % blokirna raztopina za WB
500 µL očetne kisline	5 g mleka v prahu (Pomurske mlekarne)
0,05 g Serva blue R	Raztopimo v 100 mL TBST.
30 mL destilirane vode	
20 ml metanola	

Raztopine smo po potrebi avtoklavirali 20 min pri 121 °C in nadtlaku 1 bar.

4.1.2 BAKTERIJSKA GOJIŠČA

Preglednica IV: Bakterijska gojišča, uporabljena pri eksperimentalnem delu

<p>tekoče gojišče LB, LBK</p> <p>5 g/L kvasnega ekstrakta 10 g/L kazeinskega hidrolizata 10 g/L NaCl</p> <p>Z 0,1 M NaOH uravnamo pH na 7,5 in avtoklaviramo. Gojišče LBK vsebuje kanamicin, ki ga dodamo po ohlajanju do koncentracije 100 µg/mL.</p>	<p>trdno gojišče LB, LBK</p> <p>Za trdno gojišče LB/ LBK dodamo tekočemu gojišču LB 15 g/L agarja, avtoklaviramo, ohladimo in vlijemo v petrijevke. Pri gojišču LBK dodamo kanamicin do končne koncentracije 100 µg/mL.</p>
<p>tekoče gojišče M-17</p> <p>5 g/L sojinega peptona 2,5 g/L govejega peptona 2,5 g/L peptona iz kazeina 2,5 g/L kvasnega ekstrakta 5 g/L govejega ekstrakta 5 g/L D (+) laktoze 0,5 g/L askorbinske kisline 19 g/L natrijevega-β-glicerofosfata 0,25 g/L magnezijevega sulfata</p> <p>Komponente gojišča raztopimo v 1L destilirane vode in avtoklaviramo.</p>	<p>gojišče MRS</p> <p>10,0 g/L peptona iz kazeina 8,0 g/L govejega ekstrakta 4,0 g/L kvasnega ekstrakta 20,0 g/L (+) glukoze 5,0 g/L natrijevega acetata 0,2 g/L magnezijevega sulfata 2,0 g/L dikalijevega hidrogen fosfata 1,0 g/L Tweena 80 2,0 g/l diamonijevega hidrogen citrata 0,04 g/L manganovega sulfata</p> <p>Komponente gojišča raztopimo v 1L destilirane vode in avtoklaviramo.</p>
<p>SGM-17</p> <p>42,5 g/L M-17 0,5 % glukoze 0,5 M saharoze</p> <p>Raztopino v brezprašni komori sterilno prefiltriramo (Minisart filter 0,2 µm).</p>	<p>tekoče gojišče GM-17</p> <p>42,5 g/L M-17 0,5 % glukoze</p> <p>Sterilno raztopino glukoze dodamo po avtoklaviranju in ohlajanju.</p>
<p>trdno gojišče GM-17C10</p> <p>42,5 g/L M-17 0,5 % glukoze 10 µg/mL kloramfenikola</p> <p>Glukozo in antibiotik dodamo po avtoklaviranju in ohlajanju na 45 °C, nato gojišče vlijemo v sterilne petrijevke.</p>	

Raztopine smo avtoklavirali 20 min pri 121 °C in nadtlaku 1 bar.

4.1.3 BAKTERIJSKI SEVI

Preglednica V: Bakterijski sevi, uporabljeni pri eksperimentalnem delu

Sev	Opis seva
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	genotip F – <i>ompT hsdSB (rB– mB–) gal dcm</i> (DE3) (61) Je najpogosteje uporabljen sev za sistem pET.
Laktokoki (<i>Lactococcus</i>)	
<i>L. lactis</i> NZ9000	genotip MG1363 <i>nisRK ΔpepN</i> <i>NZ9000</i> je standardni gostiteljski sev za z nizinom regulirano gensko ekspresijo (NICE). Sev vsebuje regulatorna gena <i>nisR</i> in <i>nisK</i> , ki sta integrirana v <i>pepN</i> seva MG1363 (62). Posledica integracije je negativen <i>pepN</i> fenotip (63).
Laktobacili (<i>Lactobacillus</i>)	
<i>Lb. casei</i> ATCC393	
<i>Lb. paracasei</i> DSM 5622	Sev so izolirali iz mlečnih produktov, grozdnega soka in vina, je tudi del normalne črevesne flore pri človeku (16).
<i>Lb. plantarum</i> ATCC 8014	
<i>Lb. reuteri</i> ATCC 55730	Probiotični sev, pogosto uporabljen v prehranskih dodatkih (33).
<i>Lb. gasseri</i> ATCC 20243	
<i>Lb. rhamonsus</i> ATCC 53103	Sev je del normalne bakterijske flore pri človeku.

4.1.4 PLAZMIDI

Plazmidi so krožne izvenkromosomske molekule DNA, ki se najpogosteje nahajajo v bakterijah, najdemo pa jih tudi v nekaterih evkariontskih organizmih (alge, glive). Pomnožujejo se neodvisno od genoma, njihovo število v bakterijskih celicah pa je zelo različno. Bakterijski plazmidi v naravi sodelujejo pri konjugaciji (horizontalen prenos genov med bakterijami) in omogočajo prenos genskih informacij za bakterijske toksine, metabolne encime in odpornost proti antibiotikom. Plazmidi, ki jih uporabljamo za molekulsko kloniranje, so umetno konstruirani in veliki 1-6 kb. Danes so komercialno dostopni številni plazmidi, ki so načrtovani za zelo specifične aplikacije. Pri eksperimentalnem delu smo uporabili plazmide, navedene v preglednici VI.

Preglednica VI: Plazmidi, uporabljeni pri eksperimentalnem delu

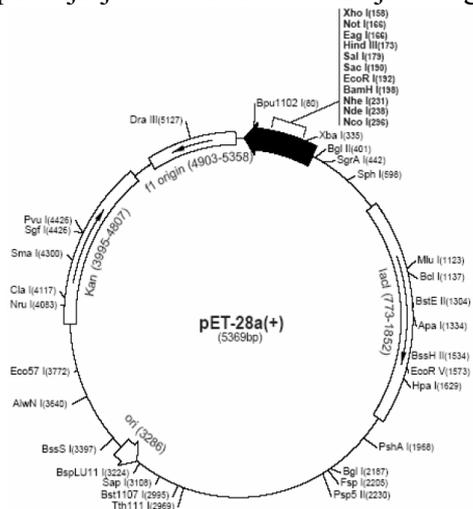
Plazmid	Bakterijski sev	Opis
pET-28	<i>E. coli</i>	brez genskega konstrukta
pET-28::B-AcmA	<i>E. coli</i>	pET-28 z vstavljenim genskim konstruktom B-AcmA
pNZ8148	<i>L. lactis</i>	brez genskega konstrukta
pSDLBA3b	<i>L. lactis</i>	pNZ8148 z genskim konstruktom USP-B-AcmA

4.1.4.1 pET-28 in pET-28::B-AcmA

Sistem pET-28 v kombinaciji z ustreznim bakterijskim produkcijskim sevom omogoča strogo nadzorovano izražanje rekombinantnega proteina, pri čemer pa lahko izbrani protein doseže do 50 % celokupne količine izraženih celičnih proteinov že nekaj ur po indukciji.

Gre za 5369 bp velik vektor (slika 2), ki vsebuje: promotor T7, zaporedje za His•Tag, zaporedje za T7•Tag, gen za *lac* represor (*lacI*), gen za odpornost proti kanamicinu (gen za aminoglikozid 3'-fosfotransferazo II), območje z več mesti za kloniranje: restrikcijska mesta za Xho I, Not I, Nco I, Sac I, EcoR I, Bam HI in druga.

Transkripcija rekombinantnega gena je v plazmidu pod nadzorom poznega bakteriofagnega promotorja T7, ki ga prepozna samo virusna polimeraza RNA T7, katere zaporedje je kodirano v bakterijskem genomu ekspresijskega seva. Polimeraza RNA iz *E.*



Slika 2: Shema plazmida pET-28 (61)

coli ne prepozna promotorja T7. Virusna RNA polimeraza T7 je pod nadzorom promotorja *lac*, ki se aktivira po indukciji z IPTG (izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid). Ob prisotnosti IPTG pride do transkripcije velike količine polimeraze RNA T7, ki se veže na promotor T7 in

prepiše vstavljeni gen. V vektorju imamo tudi gen *LacI*, ki kodira represorski protein LacR. LacR z vezavo na operator operona *lac* prepreči konstruktivno prepisovanje gena (61).

V eksperimentalnem delu smo v bakterijskih celicah *E. coli* BL21(DE3) uporabili plazmid pET-28 z vstavljenim genskim konstruktom B-AcmA (slika 3) za izražanje rekombinantnega proteina B-AcmA ali pa prazen plazmid (negativna kontrola).

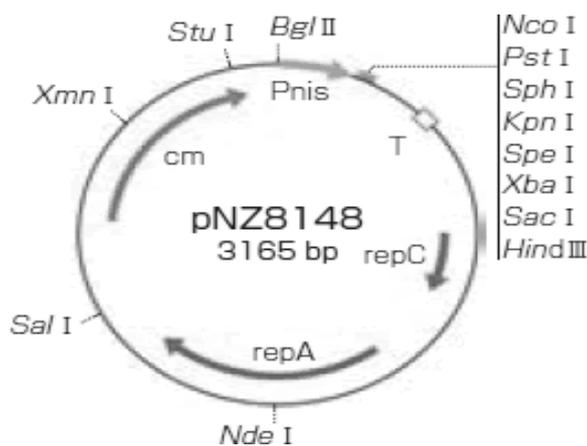


Slika 3: Shema genskega konstrukta B-AcmA, vstavljenega v plazmid pET-28

Genski konstrukt pET-28-B-AcmA je sestavljen iz B-domene stafilokoknega proteina A, regije AcmA, ki je zgrajena iz treh ponovitev LysM in omogoča pritrjevanje na površino MKB ter histidinskega repa, ki je sestavljen iz šestih ponovitev histidina in omogoča izolacijo B-AcmA z afinitetno kromatografijo.

4.1.4.2 Plazmida pNZ8148 in pSDLBA3b

Z nizinom nadzorovan sistem za izražanje (NICE; *Nisin-Controlled gene Expression*) je najuspešnejši in največkrat uporabljen sistem za izražanje genov v G⁺ bakterijah. V biotehnologiji sistem uporabljamo za prekomerno izražanje homolognih in heterolognih proteinov, za funkcionalne študije proteinov, metabolno inženirstvo, izražanje ključnih membranskih proteinov, za izražanje in analizo toksičnih produktov in življenjsko



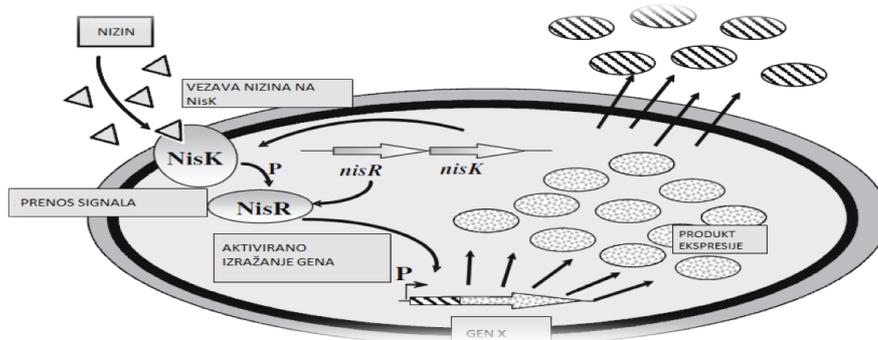
Slika 4: Shema plazmida pNZ8148

pomembnih genov ter za uporabo v industriji v širokem merilu (63, 64).

Izražanje genov v NICE temelji na indukciji izražanja z lantibiotikom nizinom. Indukcijo dosežemo že z dodatkom subinhibitorne koncentracije nizina (0,1-5 ng/mL). Za delovanje sistema NICE sta ključna gena *nisR* in *nisK*, ki sodelujeta pri regulaciji izražanja z nizinom. Gen *nisK* kodira histidinsko

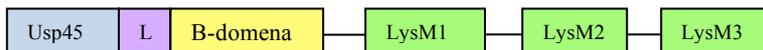
proteinsko kinazo, ki se nahaja na citoplazemski membrani in deluje kot receptor za zreli nizin. Po vezavi nizina na NisK potече avtofosforilacija NisK in prenos fosfatne skupine na regulator odziva NisR, ki se pri tem aktivira. Aktivirani NisR aktivira promotorja PnisA

in PnisF, ki sprožita prepisovanje genov za sintezo nizina. Če pa za promotorjem PnisA vstavimo gen za heterologi protein (gen X; slika 5), se sproži prepisovanje gena in sinteza proteina (53, 63).



Slika 5: Z nizinom nadzorovano izražanje gena X (63)

V eksperimentalnem delu smo bakterijske celice *L. lactis* NZ9000 transformirali bodisi s praznim plazmidom pNZ8148 (negativna kontrola) ali s plazmidom pSDLBA3b (derivat plazmida pNZ8148) z vstavljenim genskim konstruktom USP-B-AcmA (slika 6) za izražanje rekombinantnega proteina.



Slika 6: Shema genskega konstrukta USP-B-AcmA, vstavljenega v plazmid pSDLBA3b

Genski konstrukti B-AcmA je sestavljen iz signalnega peptida Usp45, ki omogoča izločanje v gojišče in se po sintezi proteina odcepi, B-domene stafilokoknega proteina A ter regije AcmA, ki je sestavljena iz treh ponovitev LysM in omogoča pritrdjevanje na površino MKB.

4.1.5 LABORATORIJSKA OPREMA IN MATERIAL

Preglednica VII Laboratorijska oprema in material, uporabljeni pri eksperimentalnem delu

Oprema	Tip, Proizvajalec
pipete	Eppendorf
tehtnice	GH252, A&D instruments Vibra AJ, Tehnica
centrifuge	Eppendorf 5424 Eppendorf 5415R Rotina 380RV, Hettich
namizna centrifuga	Mini centrifuge MCF-2360, LMS
magnetna mešala	Big Squid, IKA Rotamix SHP-10, Tehnica
vibracijski mešalnik (vortex)	Vibromix 10, Tehnica
inkubator (30 °C)	Memmert
inkubator (37 °C)	Binder
inkubator-stresalnik	Certomat HK, Sartorius
termoblok	ThermoShaker, Biometra
stresalnik	MixMate, Eppendorf Vibromix31, Tehnica
digestorij	Wesemann
brezprašna komora	Labcaire
pH meter	SevenEasy, Mettler Toledo
spektrofotometer	Lambda Bio +, PerkinElmer ND 1000, NanoDrop
plastične kivete za spektrofotometer	Brand
kvarčne kivete za spektrofotometer	Hellma
ultrazvočni sonifikator	UPS200S, Hielscher
aparatura za elektroporacijo	Gene Pulser II apparatus, BioRad
kivete za elektroporacijo	Gene Pulser, BioRad
aparatura za ultrafiltracijo	Amicon
filtri za ultrafiltracijo	Omega 62MM 10 K 12/PK
komponente za afinitetno kromatografijo	BD TALON™, BD Biosciences Clontech
mikrotitrne ploščice	96 wall cell culture cluster, Costar Nunc, MaxiSorp
oprema za merjenje absorbance na mikrotitrskih ploščicah	Tecan infinite M1000
material za vlivanje gelov in izvedbo NaDS-PAGE	BioRad
kadičke in material za elektroforezo	Mini Protean 3 cell, BioRad
komora za slikanje gelov	UVItec
skener za slikanje gelov	Image Scanner Amersham Bioscience
tiskalnik za natis slik gelov	P90, Mitsubishi
membrana za prenos western	Immobilon®-P ^{SQ} , Millipore
fluorescenčni skener	Typhoon 9410, Amersham Biosciences
filtri 0,2 µm	Minisart, Sartorius Stedim
pretočni citometer	BD FACSCalibur, Beckton Dickinson Inc.
epruvete za pretočno citometrijo	BD falcon™
Mastersizer S	Malvern Instruments Ltd.

4.1.6 KEMIKALJE

Preglednica VIII: Kemikalije, uporabljene pri eksperimentalnem delu

Kemikalije	Proizvajalec
BSA za pripravo 0,5 % in 3 % blokirne raztopine	Sigma
označevalec velikosti za NaDS-PAGE (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder)	Fermentas
Coomassie Brilliant Blue	Amersham
akrilamid	Merck
amonijev persulfat (10 % APS)	Sigma
TEMED (N, N, N, N-tetrametiletilendiamin)	Merck
DTT (1 M)	Fermentas
HCl	Merck
glukoza monohidrat	Fluka
NaDS	Sigma
kanamicin za pripravo 100 mg/mL raztopine	Sigma
kloramfenikol za pripravo 25 mg/mL raztopine	Sigma
kristal vijolično (crystal violet)	Sigma
IPTG (izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid)	Sigma
nizin	Fluka
glicin	Serva
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Merck
NaCl	Applichem
gvanidinijev klorid	Sigma
imidazol	Sigma
K ₂ HPO ₄	Fluka
KH ₂ PO ₄	Riedel-de Haën
citronska kislina	Serva
TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidin)	Sigma-Aldrich
formaldehid	Merck
očetna kislina	Applichem
etanol (96 %)	Merck
metanol	Applichem
1-butanol	Merck
saharoza	Serva
Tris	Sigma
Tween 20	Sigma
protitelesa Peroxidase-conjugated AffiniPure Mouse Anti-Human IgG (H+L)	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.
protitelesa Anti-Protein A antibody (FITC)	Abcam
Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System	Promega

4.2 METODE

4.2.1 PRIPRAVA KOMPETENTNIH CELIC *E. coli* BL21(DE3)

Pripravili smo 3 mL prekonočne kulture *E. coli* BL21(DE3), nato pa 0,5 mL le-te precepili v 100 mL gojišča LB in inkubirali na stresalniku pri 37 °C do OD₆₀₀ 0,35-0,4. Za pripravo kompetentnih celic je zelo pomembno, da so te v logaritemski fazi rasti. Celice smo nato v brezprašni komori prelili v sterilne centrifugirke, jih 15 min inkubirali na ledu in centrifugirali 10 min pri 3000 g in 4 °C. V brezprašni komori smo odlili supernatant in celice suspendirali v 25 mL ohlajene raztopine TBCa. Suspenzijo smo 30 min inkubirali na ledu in nato ponovno centrifugirali 10 min pri 3000 g in 4 °C. V brezprašni komori smo popolnoma odstranili supernatant in celice s pipetiranjem suspendirali v 1,5 mL ohlajene raztopine TBCaG. Suspenzijo smo alikvotirali (à 50 µL) v predhodno pripravljene in ohlajene mikrocentrifugirke, jih zmrznili v etanolu pri -80 °C ter nato shranili pri -80 °C. Enega alikvota celic nismo zamrznili ampak smo izvedli poskusno transformacijo s pET-28, s katero smo potrdili, da je bila priprava kompetentnih celic uspešna.

4.2.2 IZOLACIJA PLAZMIDNE DNA (minipreparacija)

Izolacijo plazmidne DNA iz *E. coli* in *L. lactis* smo izvedli s kompletom reagentov Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. Metoda predstavlja hiter način za izolacijo plazmidne DNA. Delali smo po protokolu proizvajalca, ki je priložen kompletu reagentov:

1. 1,5 mL prekonočne kulture bakterijskih celic z vstavljenim plazmidom smo odpipetirali v mikrocentrifugirko in centrifugirali 5 min pri 10.000 g. Po centrifugiranju smo odlili supernatant, še enkrat dodali 1,5 mL kulture ter ponovili centrifugiranje.
2. V mikrocentrifugirko smo dodali 250 µL raztopine za suspendiranje in celice popolnoma suspendirali s pipetiranjem.
3. V mikrocentrifugirko smo nato dodali 250 µL raztopine za lizo in vsebino premešali s štirikratnim obračanjem.
4. Nato smo v mikrocentrifugirko dodali 10 µL raztopine alkalne proteaze, ponovno premešali s štirikratnim obračanjem in 5 min inkubirali pri sobni temperaturi.
5. V mikrocentrifugirko smo dodali 350 µL raztopine za nevtralizacijo, premešali s štirikratnim obračanjem in centrifugirali 10 min pri maksimalni hitrosti (16.000 g).

6. Sledila je vezava plazmidne DNA na kolono. Kolono smo vstavili v zbiralno ogrodje in vanjo odpipetirali supernatant. Pustili smo stati 1 min, da se je DNA vezala na kolono in nato ponovno centrifugirali 1 min pri 16.000 g. Iz zbiralnega ogrodja smo odlili zbrano tekočino in kolono sprali s 750 μ L raztopine za spiranje, ki smo ji dodali 95 % etanol. Centrifugirali smo 1 min pri 16.000 g, odstranili zbrano tekočino in spiranje ponovili z 250 μ L raztopine za spiranje z dodanim 95 % etanolom. Sledilo je ponovno centrifugiranje in sicer 2 min pri 16.000 g, nato pa smo kolono prenesli v sterilno mikrocentrifugirko in DNA eluirali s 75 μ L vode brez nukleaz (65).

Opisani in uporabljeni protokol je v navedenih korakih optimalen za izolacijo plazmidne DNA iz *E. coli*. Za izolacijo iz *L. lactis* pa smo protokol v 2. točki spremenili, in sicer smo v mikrocentrifugirko dodali 210 μ L raztopine za suspendiranje in 40 μ L lizocima s koncentracijo 30 mg/mL. Za učinkovito razgradnjo celične stene bakterije *L. lactis* smo suspenzijo še dodatno inkubirali 30 min na 37 °C. Nato smo izolacijo plazmidne DNA nadaljevali po opisanih korakih. Koncentracijo izolirane plazmidne DNA smo izmerili spektrofotometrično.

4.2.3 TRANSFORMACIJA BAKTERIJSKIH CELIC

S pojmom transformacija opisujemo proces privzema in vključitve gole DNA (nevezane na proteine) v gostiteljsko celico. Pri številnih bakterijskih vrstah je transformacija naraven proces, ki vodi v povečano genetsko variabilnost bakterij. Zmožnost, da bakterija privzame DNA, imenujemo kompetenca. Ta je lahko naravna ali umetno inducirana (66).

4.2.3.1 Transformacija celic *E. coli* s toplotnim šokom

Pri transformaciji s toplotnim šokom je bistvenega pomena hitra sprememba temperature okolja. Hiter prenos ledeno mrzlih celic v vodno kopel s temperaturo 42 °C privede do odprtja por v celičnih membranah, kar omogoča vstop DNA v celico. Pri ponovnem ohlajanju se pore zaprejo in DNA ostane ujeta v celicah. Pred nanosom celic na trdno gojišče je potrebna daljša inkubacija pri 37 °C, da si celice opomorejo (sintetizirajo proteine, kodirane na privzetem plazmidu, ki omogočajo odpornost proti antibiotiku na gojišču iz agarja) (67).

Vzorec 50 μ L kompetentnih celic smo odtalili na ledu. Dodali smo jim 2 μ L plazmida in jih nežno premešali tako, da smo mikrocentrifugirko stresali s konico prstov. Zmes celic in

plazmida smo inkubirali 30 min na ledu in nato izvedli toplotni šok (mikrocentrifugirke smo 1 min pustili v vodni kopeli pri 42 °C). Takoj za tem smo jih prenesli na led za 1 min, nato pa vanje odpipetirali po 450 µ gojišča LB. Mikrocentrifugirke smo stresali 1 uro na 37 °C. Različne volumne bakterijske suspenzije smo nato enakomerno razmazali po predhodno pripravljenih agarnih gojiščih LBK in jih inkubirali čez noč pri 37 °C.

4.2.3.2 Transformacija *L. lactis* z elektroporacijo

Transformacija G+ je zahtevnejša od transformacije G- bakterij, saj G+ bakterije v celični steni vsebujejo debelejšo plast peptidoglikana. Transformacija s toplotnim šokom zato ni mogoča, najuspešnejša pa je metoda elektroporacije. Pri tem celice najprej zmešamo s plazmidom, zmes pa nato za kratek čas izpostavimo močnemu električnemu polju. Točen mehanizem privzema DNA pri elektroporaciji še ni znan, vendar domnevajo, da kratek impulz visoke električne napetosti povzroči depolarizacijo membrane in tvorbo prehodnih por, ki omogočajo vstop DNA v celico. Ob prenehanju delovanja električnega toka se pore ponovno zaprejo (68, 69).

Vzorec 50 µL kompetentnih celic smo odtalili na ledu. Dodali smo jim 2 µL plazmida in zmes previdno premešali tako, da smo mikrocentrifugirko stresali s konico prsta. Mešanico smo nato prenesli v na ledu ohlajeno elektroporacijsko kiveto, jo zbrali na dnu kivete in odstranili vse nastale zračne mehurčke. Elektroporacijo smo izvedli pri 2 kV, 25 mF in 200 Ω. Rezultat nastavljenih pogojev se pokaže v času trajanja električnega pulza, ki je bil v primeru plazmida pNZ8148 3,28 ms, v primeru pSDLBA3b pa 4,06 ms. Takoj po koncu pulza smo v kiveto dodali 1 mL gojišča SGM17, vsebino premešali in prenesli v mikrocentrifugirko na ledu. Pred nanosom na trdno gojišče GM17C10 smo celice 2 uri inkubirali pri 30 °C. Po 2 urah smo jih nanegli na trdno gojišče GM17C10 in plošče inkubirali 2 dni pri 30 °C.

4.2.4 PRIPRAVA PREKONOČNE KULTURE

Prekonočne kulture služijo namnožitvi večjih količin bakterij v tekočem gojišču. Uporabili smo jih pri poskusnem izražanju B-AcmA v *E. coli* in iskanju optimalnih pogojev rasti, pri izražanju B-AcmA v *E. coli* v izbranih optimalnih pogojih, pri testiranju vezave B-AcmA na *L. lactis* in izbrane seve iz rodu *Lactobacillus*, pri testiranju vpliva B-AcmA na rast bakterij v kulturi ter pri pripravi GEM-delcev.

Celoten postopek priprave prekonočne kulture smo izvajali aseptično. V stekleno, sterilno epruveto s kovinskim pokrovom smo odpipetirali 10 mL tekočega gojišča (LB za *E. coli*, GM-17 za *L. lactis* in MRS za seve iz rodu *Lactobacillus*). Bakterije smo prenesli v ustrezno gojišče s sterilnim zobotrebcom, ki smo ga držali s prežarjeno pinceto. S konico zobotreba smo se dotaknili določene kolonije. Zobotrebec smo nato spustili v gojišče, obrus epruvete pa na hitro izpostavili plamenu, preden smo jo zaprli. Kulture *E. coli* smo inkubirali čez noč pri 37 °C med stresanjem, kulture sevov iz rodu *Lactobacillus* 2 dni pri 37 °C brez stresanja ter *L. lactis* pri 30 °C, prav tako brez stresanja. Vedno smo pripravili tudi slepi vzorec (10 mL ustreznega gojišča v stekleni, sterilni epruveti), da smo lahko potrdili, da ni prišlo do kontaminacije gojišča ali pribora za pripravo prekonočne kulture.

4.2.5 IZRAŽANJE B-AcmA V *E. coli*

Testirali smo različne pogoje rasti, da bi ugotovili, v katerih bi bakterije proizvedle največjo količino B-AcmA. Spreminjali smo temperaturo, koncentracijo bakterijskih celic, pri kateri smo izvedli indukcijo, koncentracijo IPTG za indukcijo in čas rasti po indukciji. Testirane pogoje prikazuje preglednica IX. Ugotovili so, da na izražanje mRNA v *E. coli* vplivata temperatura in sestava gojišča. Spremembe v sestavi gojišča, temperatura in pH vplivajo tudi na nivo proteolitične aktivnosti ter produkcije in sekrecije proteinov. Rast celic v pogojih osmotskega stresa lahko poveča sintezo topnega in aktivnega proteina tudi za 400-krat. (70).

Preglednica IX: Različni testirani pogoji med optimizacijo izražanja B-AcmA v *E. coli*

Pogoji	Plazmid	T (°C)	OD ₆₀₀ indukcije	c IPTG (mM)	čas rasti po indukciji (h)
1	pET-28-B-AcmA	37°C	0,5	1	3
2	pET-28-B-AcmA	37°C	0,5	1	6
3	pET-28-B-AcmA	37°C	1,0	0,4	3
4	pET-28-B-AcmA	37°C	1,0	0,4	6
5	pET-28-B-AcmA	37°C	1,0	1	3
6	pET-28-B-AcmA	37°C	1,0	1	6
7	pET-28-B-AcmA	37°C	1,5	1	3
8	pET-28-B-AcmA	37°C	1,5	1	6
9	pET-28	37°C	1,0	1	3
10	pET-28-B-AcmA	37°C	2,0	0,4	čez noč pri 25°C
11	pET-28	37°C	2,0	1	čez noč pri 25°C
12	pET-28-B-AcmA	25°C	1,0	1	3
13	pET-28-B-AcmA	25°C	0,5	1	3
14	pET-28-B-AcmA	25°C	1,0	1	3

Za testiranje smo vse bakterijske kulture pripravili na enak način. V 25 mL sterilne erlenmajerice smo odpipetirali po 10 mL gojišča LB, ki smo mu dodali 10 μ L kanamicina in 100 μ L prekonočne kulture *E. coli*. Celice v testiranih vzorcih smo transformirali s plazmidom pET-28-B-AcmA, kontrolne pa s praznim plazmidom pET-28. Nato smo erlenmajerice prenesli na stresalnik pri 37 °C ali pri 25 °C. Pri doseženem zelenem OD₆₀₀ smo dodali IPTG do ustrezne koncentracije. Ko so po indukciji kulture rastle želeni čas, smo jih prelili v centrifugirke in jih centrifugirali 15 min pri 5000 RPM in 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo odlili supernatant, dodali 500 μ L PBS, celice suspendirali in jih do testiranja z NaDS-PAGE shranili v hladilniku.

Po določitvi optimalnih pogojev rasti (rast celic do OD₆₀₀=2 pri 37 °C, indukcija z 0,4 mM IPTG in nadaljnja rast čez noč (16 h) pri 25 °C) smo B-AcmA izrazili v *E. coli* pri izbranih pogojih, in sicer v skupnem volumnu 750 mL.

4.2.6 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECILSULFATA (NaDS-PAGE)

Elektroforeza je proces ločevanja nabitih molekul v električnem polju. Poliakrilamidno gelsko elektroforezo (PAGE) izvajamo v gelskem matriksu, ki nastane zaradi polimerizacije akrilamida in N,N'-metilenbisakrilamida in poteče v prisotnosti prostih radikalov, katerih vir je amonijev persulfat (APS), stabilizira pa jih N, N, N'', N''-tetrametiletildiamin (TEMED) (71). Poroznost gela je odvisna od stopnje njegove zamreženosti. Pri PAGE uporabljamo dve vrsti gela, ki se razlikujeta po stopnji zamreženosti, in sicer zbiralni in ločevalni gel. Zgornji, zbiralni gel, je manj zamrežen od spodnjega, ločevalnega in ne ovira gibanja molekul. V zbiralnem gelu ne prihaja do ločevanja molekul, pač pa se v njem nanos skoncentrira v tanko linijo, kar omogoča hkraten vstop molekul v ločevalni gel in s tem enak začetni položaj za vse molekule. S tem preprečimo razširjanje lis med elektroforezo in poslednično slabo ločljivost (66, 71).

PAGE v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS) je analizna elektroforezna metoda za ločevanje proteinov in peptidov na osnovi njihove mase. Izvajamo jo pri pogojih, ki zagotavljajo denaturacijo in preprečujejo agregacijo proteinov. Da bi dosegli te pogoje, poleg reducenta, ki prekine disulfidne vezi (2-merkaptetanol ali DTT) in segrevanja, uporabljamo še NaDS. To je anionska površinsko aktivna molekula, ki se nespecifično veže na proteine in jih denaturira tako, da podre njihovo sekundarno in terciarno strukturo ter jih linearizira. Ker ima NaDS negativen naboj, pridobijo negativen naboj tudi proteini,

ki zato v električnem polju potujejo proti pozitivno nabiti anodi. Razmerje med nabojem in dolžino verige v kompleksu z NaDS je za vse proteine enako, zato imajo enako elektroforetsko mobilnost. Ločba proteinov poteka izključno zaradi zamreženosti ločevalnega gela, hitrost potovanja pa je obratno sorazmerna velikosti proteinov. Zato večji, zaradi večjega upora nosilca, potujejo počasneje od manjših (66, 72).

4.2.6.1 Priprava elektroforeznih gelov in kadičke

Najprej smo sestavili aparaturo za vlivanje gela. Večje stekelce z distančnikom 1,5 mm smo združili z manjšim na ravni podlagi in ju stisnili skupaj tako, da je med njima nastala ozka reža. Obe stekelci smo nato vstavili v ogrodje in ju fiksirali. V naslednjem koraku smo pripravili zmes za 4 % in 12 % gel tako, da smo zmešali prve štiri komponente iz preglednice X v navedenih količinah. Nato smo v zmes za ločevalni gel dodali APS in TEMED, premešali in med stekelci vlili približno 5 mL nastale zmesi. Da smo površino gela izravnali in odpravili zračne mehurčke, smo na vrh dodali 1 mL butanola, nasičenega z vodo. Počakali smo, da se je gel strdil, nato pa butanol odlili in ostanek popivnali s filter papirjem. Z dodatkom APS in TEMED smo dokončno pripravili zbiralni gel, ga premešali in vlili med stekelci nad strjenim ločevalnim gelom. Med stekelci smo vstavili še glavniček z zelenim številom vdolbinic za nanos (10 ali 15). Po strditvi zbiralnega gela smo previdno odstranili glavniček in nastali gel vpeli v ogrodje za elektroforezo, vse skupaj pa prenesli v elektroforezno kadičko. Kadičko smo napolnili z 1 x NaDS pufrom tako, da je bil gel do vrha potopljen v pufu. Sledil je nanos predhodno pripravljenega vzorca.

Preglednica X: Sestavine za pripravo elektroforeznega gela in njihova količina

Komponente	4 % zbiralni gel	12 % ločevalni gel
akrilamid (40 %)	1 mL	3 mL
puffer	2,50 mL pufra za zbiralni gel (0,5 M)	2,5 mL pufra za ločevalni gel (1,5 M)
10 % NaDS	0,1 mL	0,1 mL
dH ₂ O	6,34 mL	4,34 mL
10 % APS	0,05 mL	0,05 mL
TEMED	0,01 mL	0,01 L

4.2.6.2 Priprava vzorcev, njihov nanos na gel in izvedba elektroforeze

4.2.6.2.1 Priprava vzorcev, ki ne vsebujejo gvanidinijevega klorida

V mikrocentrifugirkah smo zmešali 15 μL vzorca, 1 μL DTT in 5 μL 1xNaDS nanašalnega pufru (5 μL 4xNaDS nanašalnega pufru smo redčili z destilirano vodo do 20 μL). Vzorce smo 7 min kuhali na vodni kopeli (94 °C) in pred nanosom na gel še kratko centrifugirali.

4.2.6.2.2 Priprava vzorcev, ki vsebujejo gvanidinijev klorid

Ker se vzorci, ki vsebujejo gvanidinijev klorid, pri nanosu na gel obarjajo, moramo s pomočjo obarjanja proteinov s trikloroocetno kislino gvanidinijev klorid iz njih pred nanosom povsem odstraniti. To smo naredili tako, da smo 20 μL vzorca za nanos v mikrocentrifugirkah razredčili do 100 μL z destilirano vodo in dodali 100 μL trikloroocetne kisline. Vzorce smo pustili stati na ledu 20 min in jih nato centrifugirali 15 min pri 13200 RPM in 4 °C. Dobljeno usedlino smo sprali s 100 μL ledeno hladnega 100 % etanola, ponovno centrifugirali in odlili supernatant. Odvečni etanol smo odstranili z 20 min sušenjem v inkubatorju pri 37 °C. Oborini smo nato dodali 20 μL 1xNaDS nanašalnega pufru in 1 μL DTT, oborino suspendirali in kuhali 7 min na vodni kopeli. Pred nanosom smo vzorce še na kratko centrifugirali. Pripravljene vzorce smo nato s pipeto nanesli v žepke na gelu. V enega od žepkov smo dodali 5 μL označevalca velikosti proteinov. Elektroforezo smo izvajali pri toku 30 mA/gel tako dolgo, da je elektroforezna fronta pripotovala skoraj do konca gela. Nato smo najprej odlili pufer in razstavili ogrodje in okvir v katerega je bil vpet gel. Gel smo previdno ločili od stekelc in ga pripravili za detekcijo lis.

4.2.6.3 Detekcija z elektroforezo ločenih proteinov

4.2.6.3.1 Barvanje gelov s Coomassie brilliant blue

Coomassie brilliant blue je aminotriarilmetansko barvilo, ki se med hitro in enostavno reakcijo, prek van der Waalsovih in elektrostatskih interakcij, nespecifično veže na proteine, fiksirane na gelu in omogoča njihovo vizualizacijo. Barvilo se veže na aromatske in bazične AK, pri čemer tvori s pozitivno nabitimi aminskimi skupinami stabilne komplekse. Postopek barvanja poteka v dveh stopnjah. V prvi stopnji gel potopimo v metanol-ocetno raztopino barvila Coomassie brilliant blue, s čimer proteine fiksiramo in

pobarvamo. V naslednji stopnji pa z razbarvalno raztopino dosežemo difundiranje odvečne nevezane količine barvila iz gela (66).

Gel smo za 1 uro potopili v raztopino za barvanje in ga postavili na stresalnik. Po barvanju smo gel prenesli v 30 % razbarvalno raztopino, v kateri smo ga pustili 2 uri pri čemer smo raztopino vmes večkrat zamenjali. Gel smo nato prestavili v 10 % razbarvalno raztopino, v kateri smo ga pustili na stresalniku čez noč, da se je do konca razbarval. Pred slikanjem smo gel še rehidrirali tako, da smo ga pustili nekaj ur stati v destilirani vodi.

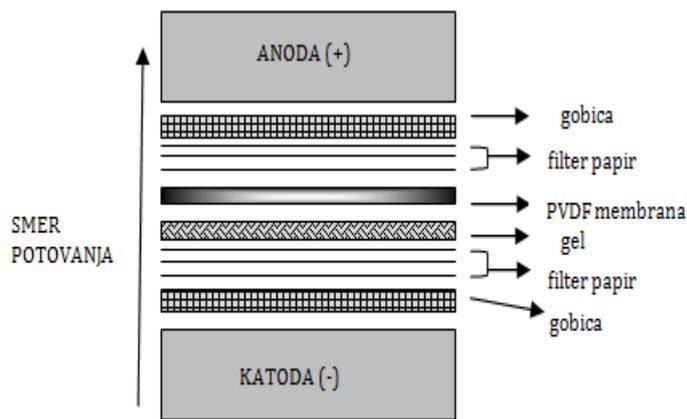
4.2.6.3.2 *Prenos western*

Protein najbolj specifično detektiramo, če uporabimo monoklonska protitelesa proti temu proteinu. Vendar pa takšna neposredna detekcija na gelu ni mogoča, saj zaradi svoje velikosti protitelesa težko difundirajo skozi poliakrilamidni gel. Zato NaDS-PAGE sledi prenos western, ki omogoča prenos proteinov s poliakrilamidnega gela na adsorpcijsko membrano (nitrocelulozna, poliviniliden difluoridna (PVDF) ali najlonska membrana) s pomočjo električnega toka (73). Po prenosu membrano najprej inkubiramo v blokirni raztopini, s čimer blokiramo prosta vezavna mesta na membrani in preprečimo nespecifično vezavo protiteles. Imunodetekcijo izvedemo z inkubacijo membrane v raztopini primarnih, nato pa še sekundarnih, z reporterskim encimom konjugiranih protiteles ali pa kar neposredno v raztopini specifičnih, konjugiranih protiteles. Najpogosteje za konjugacijo uporabljamo encima hrenovo peroksidazo in alkalno fosfatazo. Ob dodatku encimskega substrata, npr. diaminobenzidina (DAB) v primeru hrenove peroksidaze, se tvorijo netopni obarvani produkti, katerih intenziteta je sorazmerna količini proteina. Primarna ali sekundarna protitelesa so lahko namesto z encimom označena s fluorofori, kar omogoča detekcijo z merjenjem fluorescence (73, 74).

Izvedba prenosa western:

Po NaDS-PAGE smo gelu najprej odrezali zbiralni gel, nato pa izrezali filter papir in membrano PVDF v velikosti gela. Gel, filter papir in gobice smo namočili v pufro za prenos. Membrano smo aktivirali v metanolu in jo nato 10 min hidratirali v destilirani vodi ter jo prestavili v pufer za prenos. Gobici, filter papir, membrano PVDF in gel smo nato zložili, kot je prikazano na sliki 7. Pri tem smo bili pozorni, da se nam med plastmi niso tvorili zračni mehurčki. Tako pripravljen "sendvič" smo vstavili v ogrodje za prenos western in ga prenesli v kadičko, napolnjeno s pufrom za prenos. Dodali smo še posodico z

ledom za hlajenje, saj se med prenosom aparatura segreva. Kadičko smo pokrili s pokrovom, priključili na vir napetosti in pustili 1,5 ure pri napetosti 100 V. Po prenosu smo membrano 5 min pustili v pufru TBST in jo nato za 2 uri prenesli v blokirno raztopino. Po 2 urah smo membrano prestavili v raztopino primarnih protiteles proti B-domeni,



označenih s fluoroforom, predhodno redčenih v razmerju 1:2000 in jo, zaščiteno pred svetlobo, čez noč stresali v hladni sobi. Naslednji dan smo membrano štirikrat sprali v pufru TBST. Fluorescenčno označene proteine smo detektirali pri valovni dolžini 520 nm.

Slika 7: Shema prenosa western

4.2.7 RAZTAPLJANJE INKLUZIJSKIH TELESC

Usedlini *E. coli* z izraženim B-AcmA smo dodali 70 mL pufra za raztapljanje z 0 M gvanidinijevim kloridom. Celice smo suspendirali in razdelili v 50 mL-centrifugirki. Za razbitje celične stene in sprostitvev znotrajcelične vsebine smo najprej izvedli cikel zamrzovanja (45 min pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) in odtajevanja pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nato smo celice še sonificirali 5-8 min pri 90 % intenziteti. Postopek smo izvajali na ledu, saj se celična suspenzija pri tem segreva, kar lahko vodi v denaturacijo proteina. Suspenzijo smo ponovno centrifugirali in odvzeli alikvot za analizo. Protein B-AcmA se je nahajal v netopni frakciji, zato smo ga morali raztapljati v gvanidinijevem kloridu. Oborino netopne frakcije smo suspendirali v pufru za raztapljanje z 0 M gvanidinijevim kloridom in jo več ur stresali pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Suspenzijo smo 20 min centrifugirali pri 11000 RPM in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nato smo odlili supernatant (topna frakcija v pufru za raztapljanje z 0 M gvanidinijevim kloridom) in oborino suspendirali v pufru za raztapljanje z 1 M gvanidinijevim kloridom. Suspenzijo smo stresali čez noč pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in naslednji dan ponovili 20-minutno centrifugiranje pri 11000 RPM in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant smo odlili (topna frakcija v pufru za raztapljanje z 1 M gvanidinijevim kloridom). Enak postopek raztapljanja oborine, stresanja preko noči in centrifugiranja pri 11000 RPM in $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ smo ponovili še v puhih za raztapljanje s 3 M in 6 M gvanidinijevim kloridom. Tako smo dobili frakciji, raztopljeni v pufru za raztapljanje s

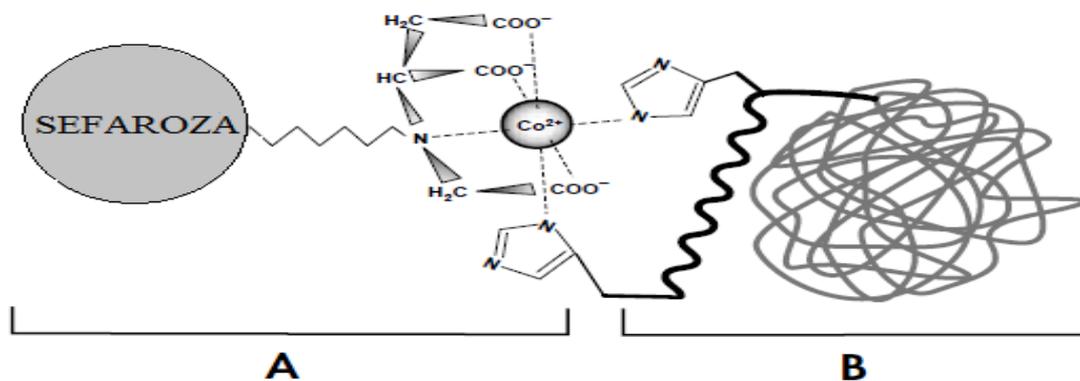
3 M in s 6 M gvanidinijevim kloridom ter netopno frakcijo. Vzorce smo nato nanesli na NaDS-PAGE in ugotavljali, pri katerih pogojih se je raztopilo največ B-AcmA. To frakcijo smo potem uporabili za nadaljnjo izolacijo z afinitetno kromatografijo.

4.2.8 IZOLACIJA B-AcmA Z AFINITETNO KROMATOGRFIJO

Afinitetna kromatografija temelji na izkoriščanju specifičnih bioloških interakcij med imobiliziranim ligandom in želenim proteinom in je zelo učinkovita metoda za izolacijo proteinov. Teoretično lahko že v eni stopnji izoliramo čisto obliko proteina. Protein, ki ga želimo izolirati, tvori reverzibilen kompleks z ligandom, ki je vezan na inertnem nosilcu. Pri nanosu se ostale komponente ne vežejo in se zato s spiranjem odstranijo s kolone. Spiranje želenega proteina dosežemo z dodatkom liganda, ki tekmuje s stacionarno fazo za protein, ali s spremembo sestave mobilne faze (ionska jakost, pH) (66). Izolacijo si lahko olajšamo tako, da DNA zapisu proteina dodamo DNA zaporedje peptida, ki omogoči čiščenje. Afinitetna kromatografija z imobiliziranimi kovinskimi ioni IMAC (*ang. Immobilized Metal Affinity Chromatography*) temelji na reverzibilni interakciji med različnimi stranskimi verigami AK, najpogosteje histidinom, cisteinom in triptofanom ter imobiliziranimi kovinskimi ioni. BD TALON je nosilec za IMAC z vezanimi kobaltovimi ioni. Uporabljamo ga za čiščenje in izolacijo rekombinantnih proteinov z izraženim polihistidinskim repom. Kobalt je preko štirih vezi vezan v žep, drugi dve vezi pa tvori s histidinom polihistidinskega repa preko porazdelitve elektronov med dušikom v imidazolskem obroču in kobaltovim ionom (slika 8). Elucijo vezanega proteina lahko dosežemo s tvorbo pozitivnega naboja na imidazolskem dušiku tako, da spremenimo pH elucijskega pufra. Pri tem se tvorijo odbojne sile med pozitivno nabitim kovinskim ionom in pozitivno nabitim dušikom. Alternativa temu postopku je dodatek imidazola v elucijski puffer, saj je ta identičen stranski verigi histidina in z njo tekmuje za vezavna mesta na kovinskem ionu (75).

2 mL nosilca BD TALON smo razdelili v štiri 50 mL-centrifugirke. Centrifugirali smo jih 2 min pri 700 RPM in 4 °C, odstranili supernatant in vanje dodali po 12 mL pufra za spiranje kolone. Centrifugiranje smo ponovili, odstranili supernatant in ponovili tudi spiranje. Nosilec smo nato suspendirali v raztopini B-AcmA, ki smo jo predhodno centrifugirali. Po nanosu smo nosilec stresali 20 min na stresalniku pri sobni temperaturi in tako omogočili vezavo B-AcmA na kobaltove ione. Nato smo nosilec centrifugirali 5 min pri 700 RPM in 4 °C in odstranili supernatant, ki je predstavljal nevezano frakcijo.

Ponovno smo dodali 48 ml puфра, nosilec suspendirali, ga stresali 10 min na stresalniku pri sobni temperaturi in nato 5 min centrifugirali pri 700 RPM in 4 °C. Supernatant smo odstranili in postopek še enkrat ponovili. Po centrifugiranju smo nosilec suspendirali v 3 mL puфра, ga prenesli v kolono in počakali, da se posede. Nato smo ga spirali s po 5 mL puфра za spiranje kolone, dokler absorbanca pri 280 nm ni bila približno enaka 0, s čimer smo določili končno točko spiranja. Sledila je elucija B-AcmA s kolone z elucijskim pufrom, ki je vseboval 3 M gvanidinijev klorid. S tem smo preprečili obarjanje B-AcmA na koloni. Zbirali smo tri mililitrske frakcije, vse dokler absorbanca pri 280 nm ni bila približno enaka 0, kar je bil znak za končno točko elucije. Frakcije smo analizirali še z NaDS-PAGE. Po končani afinitetni kromatografiji smo eluirane frakcije, ki so vsebovale najvišje koncentracije B-AcmA združili v skupni vzorec (V=42 mL).



Slika 8: Shema vezave rekombinantnega proteina s histidinskim repom na nosilec BD TALON (75)

4.2.9 PONOVRNO ZVITJE B-AcmA V NATIVNO KONFORMACIJO Z METODO HITREGA RAZREDČEVANJA

Ponovno zvitje proteina (*refolding*) je proces, pri katerem pride do spremembe proteinske konformacije iz nezvite v zvito (nativno) obliko (76). V mediju z visoko koncentracijo denaturanta so proteini nezviti, dobro topni in fleksibilni, medtem ko so v vodnem mediju proteini zviti, rigidni in kompaktni. Prehod proteina iz medija z denaturantom v vodni medij prisili protein v tvorbo kompaktne strukture, ki lahko vodi v nepravilno zvitje in agregacijo proteina. Ključno vlogo pri pravilnem zvitju proteina igra vmesna koncentracija denaturanta pri prehodu iz medija z njegovo visoko koncentracijo v vodni medij, ki mora biti dovolj nizka, da prisili protein v tvorbo rigidne strukture, obenem pa dovolj visoka, da omogoči topnost proteina in fleksibilnost za reorganizacijo njegove strukture (77).

Metoda hitrega razredčevanja je najenostavnejša metoda za ponovno zvitje denaturiranega proteina v nativno konformacijo (78) in je zaradi svoje enostavnosti metoda prvega izbora (79). Protein, raztopljen v pufru z visoko koncentracijo denaturanta, prenesemo v velik volumen pufru, ki ne vsebuje denaturanta (77). Med postopkom v pufru, ki ne vsebuje denaturanta, naraščata tako koncentracija proteina, kot koncentracija denaturanta, kar omogoča tvorbo intramolekularnih in prepreči tvorbo intermolekularnih vezi. Časovni interval, v katerem v pufer brez denaturanta dodajamo protein, je odvisen od kinetike njegovega zvijanja. Volumen raztopine dodanega proteina z visoko koncentracijo denaturanta pa je odvisen od največje koncentracije denaturanta, ki jo lahko še dosežemo v pufru brez denaturanta in s katero omogočimo zvitje proteina v nativno konformacijo, obenem pa ne vplivamo na že zvit protein v vzorcu (79).

1 mL vzorca B-AcmA v 3 M gvanidinijevem kloridu smo po kapljicah in ob konstantnem mešanju prenesli v 160 mL PBS. Pri tem smo spremljali morebitno obarjanje proteina. Volumen dodanega B-AcmA smo počasi povečevali do največ 3 mL.

4.2.10 ULTRAFILTRACIJA VZORCA

V PBS razredčeni B-AcmA smo s pomočjo ultrafiltracije v hladni sobi (4-5°C) ob konstantnem mešanju in nadtlaku dušika skoncentrirali približno dvajsetkrat. Uporabili smo ultrafiltracijsko membrano, ki zadrži delce, večje od 10 kDa. Posamezne koncentrate smo hranili v 15 mL centrifugirkah v hladilniku. Po končani ultrafiltraciji smo vse koncentrate testirali z NaDS-PAGE in tiste z optimalno vsebnostjo proteina združili v skupni volumen 45 mL. S tem vzorcem smo izvajali vsa nadaljnja testiranja B-AcmA.

4.2.11 DOLOČITEV N-KONČNEGA AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA Z EDMANOVO DEGRADACIJO

Edmanova degradacija je kemijska reakcija, pri kateri fenilizotiocianat v bazičnem mediju reagira z aaminsko skupino na N-koncu proteina in tvori feniltiokarbamilni derivat. Ob dodatku trifluoroocetne kisline se od peptida odcepi omenjeni derivat, pri čemer se peptid skrajša za eno enoto. Metoda omogoča, da protein večkrat vstopi v cikel Edmanove degradacije in vsakokrat na N-koncu izgubi po eno AK (66). Feniltiohidantoiniske derivate nato prenesemo na kromatografsko kolono, kjer jih detektiramo z merjenjem absorbance pri 270 nm. Na kolono injiciramo tudi standardno mešanico feniltiohidantoiniskih AK derivatov. Na ta način dobimo standardne retencijske čase za vsako od AK, ki jih nato

primerjamo z retencijskim časom, ki smo ga dobili pri analizi posameznega kroga Edmanove degradacije in tako določimo AK-zaporedje. Za določanje proteinskega AK-zaporedja lahko uporabimo avtomatski analizator oziroma sekvenator (80, 81).

Za določanje N-končnega zaporedja našega proteina smo vzorec nanесли na NaDS-PAGE in prenesli na membrano s prenosom western. Membrano smo za 1 min potopili v raztopino Serva Blue R in jo nato prenesli v 50 % raztopino metanola, v kateri smo jo delno razbarvali. Posušili smo jo na filter papirju in s skalpelom previdno izrezali lise proteina. Protein smo nato sprali z membrane in ga analizirali z Edmanovo degradacijo, kar so za nas izvedli na Odseku za molekularne in biomedicinske znanosti na Inštitutu Jožef Stefan (Adrijana Leonardi).

4.2.12 PRIPRAVA GEM-DELCEV (*Gram-positive enhancer matrix particles*)

Če bakterijske celice *L. lactis* kuhamo v kislini in jih nato spiramo s PBS, dobimo nežive bakterijske delce, ki jih imenujemo GEM-delci. Med pripravo ostane plast peptidoglikana nedotaknjena, odstranijo pa se proteini, pritrjeni na celično steno in seveda tudi znotrajcelična vsebina. Delce s premerom okrog 1 μm tako tvori samo plast peptidoglikana, ki zagotavlja rigidnost njihove strukture (82, 83). Ugotovili so, da GEM-delci *L. lactis* vežejo več proteina, dodanega v medij, kot pa nespremenjene bakterijske celice (en GEM-delec veže do milijon peptidoglikan-vezavnih proteinov) (84).

GEM-delce smo pripravili iz bakterijskih celic *L. lactis* in različni sevov iz rodu *Lactobacillus* in jih uporabili za vrednotenje vezave B-AcmA na površino celic s testi ELISA, s pretočno citometrijo ter z medsebojno primerjavo. 10 mL prekonočne kulture zelenih bakterijskih celic smo 10 min centrifugirali pri 3000 RPM in 4 °C. Odlili smo supernatant in oborino suspendirali v 5 mL PBS. Ponovili smo centrifugiranje pri 3000 RPM in 4 °C, ponovno odlili supernatant in oborino suspendirali v 2 mL 10 % trikloroocetne kisline. Po 1 mL suspenzije smo odpipetirali v 15 mL centrifugirke in vzorce 30 min kuhali na vodni kopeli (100 °C). Počakali smo, da se je vsebina v centrifugirkah ohladila in nato vzorce centrifugirali 10 min pri 3000 RPM in 4 °C. Supernatant smo odlili in delce trikrat sprali s PBS tako, kot opisano zgoraj, da smo odstranili trikloroocetno kislino. Pred izvedbo testiranj vezave smo suspenzijo delcev razredčili s PBS do želene koncentracije.

4.2.13 TESTIRANJE VEZAVE B-AcmA NA POVRŠINO MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ

4.2.13.1 Izvedba encimskoimunskega testa

Encimskoimunski test-ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) je najpogostejša metoda za določanje prisotnosti specifičnih protiteles ali antigenov v testiranih vzorcih, saj lahko naenkrat testiramo veliko število vzorcev na kvalitativen ali kvantitativen način. Metoda temelji na specifični interakciji antigen–protitelo (66).

Vezavo B-AcmA na površino MKB smo potrdili in ovrednotili posredno, preko vezave protiteles proti B-domeni na površinsko vezani protein. V prvi stopnji reakcije smo B-AcmA vezali na površino GEM-delcev, bakterijskih celic *L. lactis* NZ9000 ali različnih sevov iz rodu *Lactobacillus*; v drugi stopnji pa smo vezan protein detektirali s protitelesi proti B-domeni, ki so bila označena s peroksidazo. Po dodatku substrata, 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidin (TMB), poteče s peroksidazo reakcija, ki omogoča detekcijo z merjenjem A_{450} . Vezavo B-AcmA na površino bakterijskih celic smo ovrednotili tako, da smo primerjali A_{450} vzorcev in pripadajoče negativne kontrole. V vzorcu, v katerem smo združili bakterijske celice ali GEM-delce, B-AcmA in protitelesa proti B-domeni, smo merili količino odstranjenih protiteles glede na negativno kontrolo. Pri negativni kontroli je bila izmerjena A_{450} višja, saj se protitelesa niso vezala in so po centrifugiranju ostala v supernatantu. Pri vzorcih, kjer smo celicam dodali B-AcmA, pa je bila izmerjena A_{450} nižja, saj so se protitelesa specifično vezala na B-AcmA na površini celic in jih je bilo zato po centrifugiranju v supernatantu manj.

Pred testiranjem smo mikrocentrifugirke blokirali s 5 % raztopino BSA. S tem smo preprečili nespecifično vezavo protiteles na njihove stene, saj BSA zapolni prosta vezavna mesta. Bakterijsko kulturo za testiranje smo pripravili tako, da smo 10 mL prekonočne kulture testiranih celic prelili v centrifugirke in jih centrifugirali 10 min pri 3000 g in 4 °C. Po centrifugiranju smo supernatant odlili in usedlino suspendirali v 10 mL PBS. Centrifugiranje 10 min pri 3000 g in 4 °C smo ponovili ter odlili supernatant. Nato smo koncentracijo celic uravnali na želeni vrednost, pri kateri smo testirali vezavo. Iz mikrocentrifugirk smo odlili blokirno raztopino in dodali po 100 μ L celic ter centrifugirali 5 min pri 5000 g in 4 °C. Previdno smo odpipetirali supernatant. Nato smo v mikrocentrifugirke dodali po 100 μ L ustrezno razredčene raztopine B-AcmA, celično oborino suspendirali in mikrocentrifugirke stresali 1,5 ure pri 1000 RPM. Nato smo

vzorcem dodali raztopino ustrezne koncentracije protiteles proti B-domeni, označenih s peroksidazo. Ponovili smo 1,5-urno stresanje pri 1000 RPM. Temu je sledilo 5 min centrifugiranje pri 5000 RPM in 4 °C. V vdolbinice na mikrotitrski plošči smo odpipetirali po 20 µL supernatanta iz vsake mikrocentrifugirke. Testiranje določenih pogojev smo vedno izvajali v treh neodvisnih paralelah. Vedno smo pripravili tudi kontrolni vzorec in sicer tako, da smo v mikrocentrifugirke dodali samo ustrezno koncentracijo celic in protiteles proti B-domeni. Vzorcem smo dodali po 180 µL raztopine substrata TMB, redčenega v razmerju 1:1 s citratnim pufrom. Pri tem poteče reakcija s peroksidazo, v kateri se tvori modro-zeleno obarvan produkt. Po 15 min smo reakcijo ustavili z dodatkom 50 µL 2 M H₂SO₄, pri čemer se je tvoril rumen produkt, ki je stabilen vsaj 1 uro in ga lahko detektiramo pri valovni dolžini 450 nm. Kot rezultat vezave smo z mikrotitrskim čitalcem Tecan infinite M1000 merili A₄₅₀ in nato primerjali razliko absorbanc med vzorci, ki jim je bil dodan protein in negativno kontrolo. Rezultate vezave smo tudi statistično ovrednotili. Najprej smo izračunali povprečno vrednost in standardno deviacijo treh meritev absorbance za določen pogoj testiranja (enačba 1) in za negativno kontrolo (enačba 2).

$$Ap.vz = \frac{(Avz1+Avz2+Avz3)}{3} \quad (1)$$

Ap.vz- povprečna vrednost absorbanc v vzorcih vz1, vz2 in vz3 pri določenih pogojih testiranja

$$Ap.n.k = \frac{An.k.1+An.k.2+An.k.3}{3} \quad (2)$$

Ap.n.k. - povprečna vrednost absorbanc negativnih kontrol n.k.1, n.k.2 in n.k.3 pri določenih pogojih testiranja

Razmerje med povprečno absorbanco vzorcev, ki smo jim pri definiranih pogojih dodali B-AcmA, in povprečno absorbanco negativne kontrole $\frac{Ap.vz.}{Ap.n.k.}$ je sorazmerno količini protiteles, ki se niso vezala na B-AcmA na površini celic in so ostala v supernatantu. Če vrednost $\frac{Ap.vz.}{Ap.n.k.}$ odštejemo od 1, dobimo vrednost, sorazmerno količini protiteles, ki so se vezala na B-AcmA na površini celic. Koncentracijo (ng/mL) protiteles, ki so se vezala na B-AcmA na površini celic, smo nato izračunali po enačbi 3.

$$Cv.ab\left(\frac{ng}{mL}\right) = \left(1 - \frac{Ap.vz.}{Ap.n.k.}\right) \times Cab\left(\frac{ng}{mL}\right) \quad (3)$$

Cv.ab-koncentracija sprecifičnih protiteles proti B domeni, ki so se vezala na rekombinantni protein na površini celic

Cab-začetna koncentracija sprecifičnih protiteles, dodanih v vzorec

Cv.ab. smo na koncu pomnožili še z volumnom vzorca v mikrocentrifugirki (200 μ L) in tako dobili maso protiteles proti B-domeni *mv.ab* (v ng), ki so se vezala na B-AcmA na površini bakterijskih celic ali GEM-delcev (enačba 4).

$$mv.ab(ng) = \left(\left(1 - \frac{Ap.vz}{Ap.n.k} \right) \times Cab \left(\frac{ng}{mL} \right) \right) \times 0,2 mL \quad (4)$$

Mv.ab smo v odvisnosti od koncentracije dodanega proteina in začetne koncentracije protiteles tudi natančneje ovrednotili. V programu GraphPad Prism5 smo za opis vezave izbrali ukaz *Binding-Saturation* in *One side-specific binding*. Ta ukaza ovrednotita eksperimentalne rezultate kot sprecifično vezavo substrata na ligand. Nespecifično vezavo smo zanemarili, saj pri primerjavi A_{450} med vzorcem, ki je vseboval celice in protitelesa in vzorcem, ki je vseboval samo protitelesa, nismo opazili nobene razlike. Model sprecifične vezave opisuje enačba $Y=B_{max} * X / (Kd+X)$ v kateri predstavlja B_{max} največjo sprecifično vezavo, Kd pa ravnotežno konstanto vezave oziroma disociacijsko konstanto.

4.2.13.2 Barvanje s kristal vijoličnim

Po 100 μ L v PBS ustrezno redčenega B-AcmA smo odpipetirali v vdolbinice na mikrotitrski ploščici MAXISORB in jo inkubirali čez noč pri 4 °C. Naslednji dan smo nevezan B-AcmA trikrat sprali s PBS, nato pa v vdolbinice dodali po 100 μ L 5 % BSA in mikrotitrskе ploščice pustili v inkubaturju 2 uri pri 37 °C. S tem smo povzročili blokiranje prostih vezavnih mest na steni vdolbinic. Nevezan albumin smo trikrat sprali s PBS. Bakterijsko kulturo za testiranje smo pripravili tako, da smo 10 mL prekonočne kulture *L. lactis* prelili v centrifugirke in jih centrifugirali 10 min pri 3000 g in 4 °C. Nato smo odlili supernatante, in celice suspendirali v 10 mL PBS. Ponovili smo 10 min centrifugiranje pri 3000 g in 4 °C, odlili supernatante in oborine suspendirali v PBS do zelene koncentracije. V vdolbinice mikrotitrskе plošče smo nato dodali po 100 μ L bakterijske kulture in jih inkubirali 2 uri pri 30 °C. Nato smo vdolbinice sprali s PBS, vanje dodali po 100 μ L 25 % formaldehida in jih inkubirali pri sobni temperaturi 20 min. S tem smo dosegli fiksacijo vezanih celic. Formaldehid smo sprali s trikratnim spiranjem s PBS. Nato smo bakterije

obarvali z dodatkom 100 μL 0,5 % raztopine kristal vijoličnega. Po 1 min smo vdolbinice pazljivo sprali s PBS, kristal vijolično pa raztopili v 100 μL 5 % očetne kisline in izmerili absorbanco pri 570 nm. Rezultat vezave smo podali kot spremembo absorbance med vzorcem in slepim testom: $\Delta A_{570\text{nm}} = A_{570\text{nm}}(\text{B-AcmA} + \text{bakterijske celice} + \text{kristal vijolično}) - A_{570\text{nm}}(\text{bakterijske celice} + \text{kristal vijolično})$.

4.2.13.3 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija omogoča hitro analizo številnih značilnosti posamezne celice in pridobitev tako kvalitativnih kot kvantitativnih rezultatov. V eni sekundi lahko analiziramo več sto celic, kar nam da zanesljivo podobo o fenotipskih, fizikalnih in biokemijskih lastnostih celične populacije. Celice v suspenziji ena za drugo (hidrodinamsko fokusiranje) potujejo skozi ozek snop laserske svetlobe. Ko žarek zadane celico se lahko odbije, lomi ali absorbira v predhodno vezanih fluorokromih, čemur sledi oddajanje svetlobe drugačne valovne dolžine (85). Pretočni citometer sestavljajo trije glavni sistemi: tekočinski, optični in elektronski. Tekočinski sistem v toku tekočine transportira celice do laserskega žarka; optični sistem sestavljajo laserji, ki ustvarjajo svetlobni signal, in optični filtri, ki omogočajo detekcijo oddanega signala; elektronski sistem pa skrbi za pretvorbo detektiranega svetlobnega signala v elektronski signal, ki ga lahko računalniško obdelamo in prikazemo v obliki diagramov in histogramov (86). Razpršeno svetlobo, ki jo po interakciji z laserskim žarkom oddaja celica, merita dva fotodetektorja. S FALS (*forward angle light scatter*) zapišemo parameter prednjega sipanja FCS (*forward scatter*), ki opisuje količino svetlobe, ki jo celica sipa v smeri laserskega žarka zaradi stika žarka s celičnimi membranami in je sorazmeren velikosti celice. Z RALS (*right angle light scatter*) zapišemo parameter stranskega sipanja SSC (*side scatter*), ki opisuje količino svetlobe, ki jo celica sipa pravokotno na smer laserskega žarka in je premosorazmeren zrnatosti posamezne celice. Poleg fotodetektorjev ima pretočni citometer tudi fluorescenčne detektorje (FL1, FL2), ki merijo svetlobo višjih valovnih dolžin od vzbujevalne (laserske) svetlobe (87, 88).

V našem primeru smo na celice *L. lactis* in celice izbranih sevov iz rodu *Lactobacillus* najprej vezali izolirani B-AcmA, nato pa jih označili s fluorescenčno označenimi protitelesi proti B-domeni streptokoknega proteina A in izvedli meritve.

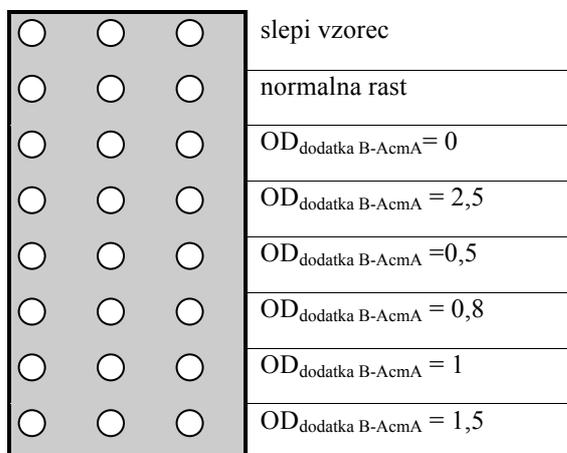
Bakterijsko prekonočno kulturo smo centrifugirali 10 min pri 3000 g in 4 °C, odlili supernatant in oborino suspendirali v takem volumnu PBS, da smo dobili suspenzijo celic z

$OD_{600}=3$. V mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 10 μ L celične suspenzije in po 10 μ L B-AcmA (redčitev 1:10 v PBS) ter jih inkubirali čez noč pri 4 °C. Naslednje jutro smo bakterijske celice označili s protitelesi. V mikrocentrifugirke smo dodali po 500 μ L TBS in jih centrifugirali 3 min pri 5000 g in 4 °C. Nato smo previdno odpipetirali supernatante, dodali po 500 μ L TBS z 1 μ L protiteles in mikrocentrifugirke, zaščitene pred svetlobo, 2 uri stresali na sobni temperaturi. Temu je sledilo centrifugiranje 3 min pri 5000 g in 4 °C, odstranjevanje supernatantov in dodatek po 200 μ L 0,1 % TBST. Centrifugiranje smo ponovili in odstranili supernatante. Spiranje s TBST smo izvedli še dvakrat, nato pa celice suspendirali v po 500 μ L TBS in jih prenesli v epruvete za pretočni citometer. V programu pretočnega citometra smo nastavili zelene parametre meritev in izbrali populacijo celic, ki ji želimo izmeriti povprečno intenziteto fluorescence. Kot negativno kontrolo smo vedno uporabljali bakterijsko kulturo, ki smo jo čez noč inkubirali brez dodatka B-AcmA, označili pa smo jo na enak način kot vzorce, ki so vsebovali B-AcmA.

4.2.14 MERJENJE VPLIVA DODATKA B-AcmA NA RAST BAKTERIJ V KULTURI

4.2.14.1 Testiranje na mikrotitrskih ploščicah

Meritve smo izvedli v treh paralelkah. Pripravili smo ustrezno redčitev celične prekonočne kulture (1. poskus: 1:20, 2. poskus: 1:40). V tri vdolbinice mikrotitrsko plošče smo odpipetirali samo gojišče (slepi vzorec), v tri po 200 μ L celične kulture (predstavlja normalno rast celic), v ostale pa po 200 μ L celične kulture, h kateri smo pri zelenem OD_{600} dodali B-AcmA (redčitev 1:20). Mikrotitrsko ploščo smo nato inkubirali pri 37 °C in merili OD_{600} s pomočjo mikrotitrskega čitalca Tecan infinite M1000. Izvedbo obeh poskusov shematsko prikazuje slika 9.



Slika 9: Prikaz testiranja vpliva dodatka B-AcmA na rast bakterij v kulturi na mikrotitrskih ploščah

4.2.14.2 Merjenje hitrosti sedimentacije bakterijskih celic v kulturi

Vplive na rast celic smo ovrednotili tudi z določitvijo hitrosti sedimentacije. Hitrejše posedanje delcev bi pomenilo prisotnost večjih in težjih agregatov v kulturi. Najprej smo bakterije *L. lactis* transformirali s plazmidoma pSDLBA3b in pNZ8148 in nacepili prekonočne kulture. Naslednji dan smo v 50 mL gojišča GM-17 z dodanimi 20 μ L kloramfenikola, prenesli 500 μ L bakterijske kulture ter jo inkubirali pri 30 °C dokler ni bil $OD_{600}=0,8$. Pri tej vrednosti OD_{600} smo izvedli indukcijo s 50 μ L nizina. K celični kulturi, v kateri so imele celice vstavljen plazmid pNZ8148, smo ob indukciji dodali še B-AcmA, in sicer v redčitvi 1:10. Tako smo dobili tri vzorce: celice, ki so izražale B-AcmA na površini; celice, ki niso izražale B-AcmA in smo ga zato dodali v gojišče; celice, ki niso izražale B-AcmA in so predstavljale vzorec normalne rasti v kulturi. Po indukciji in dodatku B-AcmA smo vse tri kulture inkubirali še 3 ure pri 30 °C in jih nato shranili čez noč v hladilniku. Naslednje jutro smo jih močno premešali z vibracijskim mešalnikom, da so se delci suspendirali. V kivete smo odpipetirali po 900 μ L ustrezne celične kulture. Meritve sedimentacije smo izvajali v več časovnih točkah in za vsako pripravili po tri kivete (tri neodvisne paralelke). V različnih časovnih točkah smo nato merili OD_{600} . Največji OD_{600} smo izmerili v prvi časovni točki ($t=0$ h), ko je bil vzorec zaradi mešanja homogen. S časom pa so se nato večji delci posedali in v liniji žarka, s katerim se izvede meritev OD, je zato OD_{600} s časom padal. Hitrost sedimentacije sferičnih delcev definira Stokesov zakon: $v = \frac{2r^2(\varphi_d - \varphi_m)g}{9\eta}$ (v : hitrost sedimentacije delcev (cm/s), r : radij delca (cm), φ_d : gostota delca (g/cm^3), φ_m : gostota medija (g/cm^3), g : gravitacijski pospešek (cm/s^2), η : viskoznost medija). Ker so gostota delcev, gostota in viskoznost medija v poskusu enaki za vse vzorce, je hitrost sedimentacije premosorazmerna z velikostjo delcev.

4.2.14.3 Merjenje velikosti agregatov

Velikost celičnih agregatov v kulturi smo izmerili z aparatom Mastersizer. Vzorce smo pripravili na enak način kot za testiranje hitrosti sedimentacije. Testirali smo velikost agregatov celic, ki so izražale protein (plazmid pSDLBA3b), glede na velikost tistih celic, ki so predstavljale normalno rast v kulturi (plazmid pNZ8148). Celični kulturi smo čez noč shranili v hladilniku, ju nato centrifugirali 15 min pri 5000 RPM in 4 °C, odlili supernatant in celice suspendirali v enakem volumnu PBS. Vzorce smo prenesli na Fakulteto za farmacijo, kjer sta nam pri meritvah pomagala izr. prof. dr. Odon Planinšk in doc. dr. Petra Kocbek.

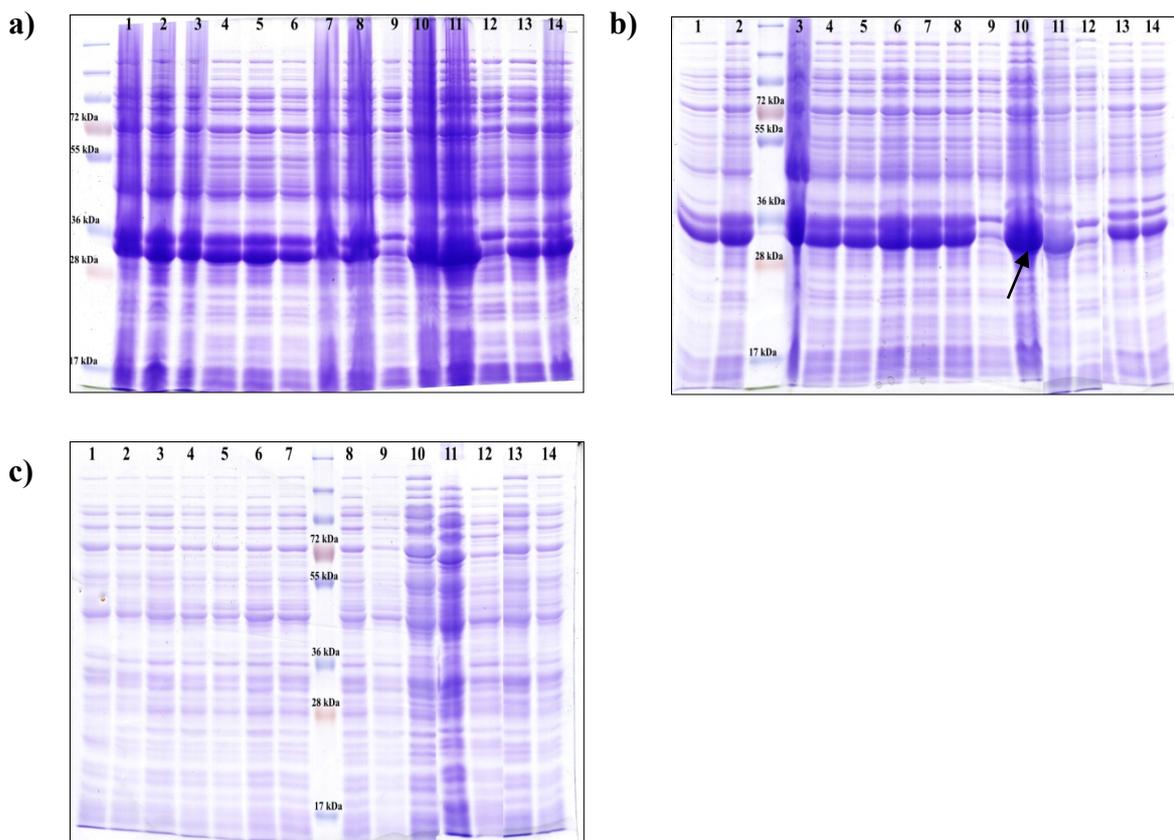
5 REZULTATI

5.1 PRIPRAVA B-AcmA V *E. coli* IN NJEGOVA IZOLACIJA

V prvi stopnji eksperimentalnega dela smo s pomočjo predhodno pripravljenega genskega konstrukta izrazili protein B-AcmA v bakterijskih celicah seva *E. coli* BL21(DE3). Izraženi B-AcmA je bil sestavljen iz treh ključnih delov, in sicer iz B-domene proteina A iz *Staphylococcus aureus*, treh ponovitev LysM, ki omogočajo sidranje na površino bakterij ter histidinskega repa iz šestih histidinov, ki omogoča čiščenje proteina z afinitetno kromatografijo. Na osnovi nukleotidnega in AK-zaporedja (glej prilogi 1 in 2) B-AcmA smo z vnosom le-tega v program Protein Calculator v3.3 izračunali tudi pričakovano molekularno maso B-AcmA (30180,1426 Da). V postopku priprave smo B-AcmA najprej izrazili v *E. coli* v večjem volumnu, pri izbranih optimalnih pogojih, ga izolirali z afinitetno kromatografijo in očistili z ultrafiltracijo. Izoliranemu B-AcmA smo nato določili N-končno AK-zaporedje, izvedli prenos western in detekcijo s specifičnimi protitelesi proti B-domeni stafilokoknega proteina A, s čemer smo potrdili njegovo identiteto.

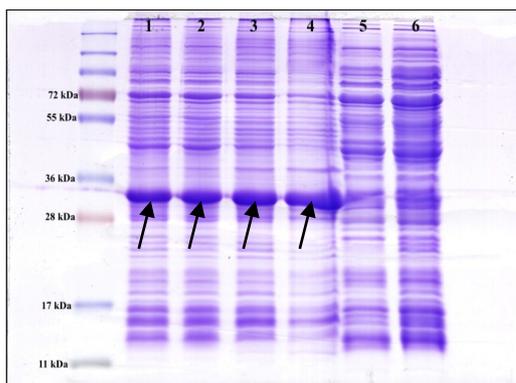
5.1.1 IZBIRA OPTIMALNIH POGOJEV ZA IZRAŽANJE B-AcmA V *E. coli*

Kompetentne celice *E. coli* BL21(DE3) smo s toplotnim šokom transformirali s plazmidom pET-28-B-AcmA ali pET-28 (negativna kontrola). Izražanje bakterijskih celic smo testirali pri štirinajstih različnih pogojih (4.2.5 Optimizacija izražanja B-AcmA v *E. coli*). Natančnejša izvedba poskusa je prikazana v tabeli v prilogi 3. Po indukciji smo pustili kulturo rasti predvideni čas, nato smo iz vsake kulture vzeli po 1 mL vzorca, ga centrifugirali, odlili supernatant in celice suspendirali v po 500 μ L PBS. Celice smo sonificirali in tako dobili celični lizat (celokupna frakcija). Po 1 mL alikvotiranega celičnega lizata smo centrifugirali 5 min pri 5000 g in 4 °C ter previdno odpipetirali supernatant (vzorec topne frakcije lizata). Oborino, ki je ostala po centrifugiranju, smo suspendirali v 1 ml PBS (vzorec netopne frakcije lizata). Vse tri dobljene frakcije; celokupno, topno in netopno, smo nato analizirali z NaDS-PAGE (slika 9).



Slika 10: Rezultati NaDS-PAGE vzorcev optimizacije izražanja B-AcmA v *E. coli*; a) nanos celokupnih frakcij, rast pri pogojih 1-14, b) nanos netopnih frakcij, rast pri pogojih 1-14 c) nanos topnih frakcij, rast pri pogojih 1-14

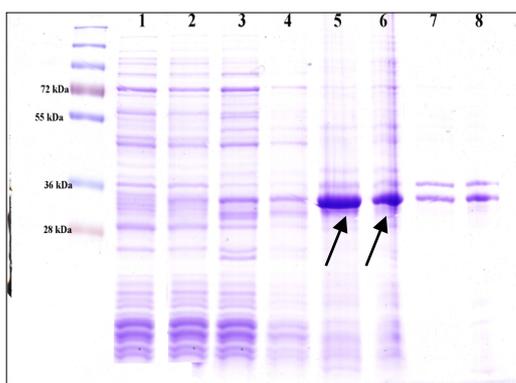
B-AcmA smo zaznali samo v celokupnih in netopnih frakcijah (sliki 10 a in 10 b) kar pomeni, da se protein v *E. coli* izraža v obliki inkluzijskih telesc (agregati nepravilno zvitega proteina v bakterijski citoplazmi). Na sliki 10 b je vidno (označeno s puščico), da se je največ B-AcmA izrazilo pri pogojih št. 10 (rast celic do $OD_{600}=2$ pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, indukcija z $0,4\text{ mM}$ IPTG in nadaljnja rast čez noč (16 h) pri $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Te pogoje smo izbrali kot optimalne za izražanja B-AcmA v *E. coli* BL21(DE3) z vstavljenim plazmidom pET-28-B-AcmA in jih nato uporabili za izražanje proteina v večjem volumnu (prekonočno kulturo smo redčili 1:100 v 750 mL gojišča, B-AcmA izrazili pri pogojih št. 10 in v kulturi izmerili končni $OD_{600}=9,136$). Ponovno smo izvedli NaDS-PAGE analizo, s katero smo zopet potrdili (slika 11), da se B-AcmA nahaja v celokupni in netopni frakciji.



Slika 11: Rezultati NaDS-PAGE frakcij bakterijske kulture, ki je rasla pri pogojih št. 10 (rast celic do $OD_{600}=2$ pri 37 °C, indukcija z 0,4 mM IPTG in rast čez noč (16 h) pri 25 °C); 1,2-nanos celokupne frakcije; 3,4- nanos netopne frakcije; 5,6-nanos topne frakcije

5.1.2 RAZTAPLJANJE INKLUZIJSKIH TELES IN IZOLACIJA B-AcmA Z AFINITETNO KROMATOGRAFIJO

Ker se je B-AcmA izrazil v obliki inkluzijskih teles, smo za prvi korak izolacije izbrali raztapljanje v gvanidinijevem kloridu. Dodatek gvanidinijevega klorida povzroči reverzibilno denaturacijo proteinov. Proteine, ki so se sprostil pri celični lizi, smo raztapljali v naraščajoči koncentraciji gvanidinijevega klorida (0 M, 1 M, 3 M, 6 M). Posamezne frakcije smo analizirali z NaDS-PAGE, da bi ugotovili, pri kateri koncentraciji gvanidinijevega klorida se je raztopil ves B-AcmA (slika 12).



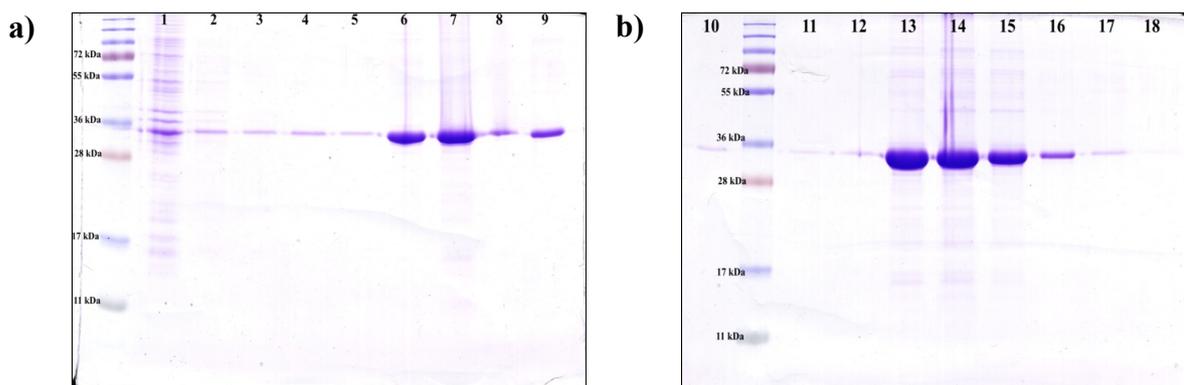
Slika 12: Rezultati NaDS-PAGE frakcij raztapljanja B-AcmA v gvanidinijevem kloridu; 1,2- frakcija proteinov, topnih v pufru za raztapljanje z 0 M gvanidinijevim kloridom; 3,4- frakcija proteinov, topnih v pufru za raztapljanje z 1 M gvanidinijevim kloridom; 5,6- frakcija proteinov, topnih v pufru za raztapljanje s 3 M gvanidinijevim kloridom, 7,8- frakcija proteinov, topnih v pufru za raztapljanje s 6 M gvanidinijevim kloridom

Znotrajcelični proteini, ki so se sprostil ob lizi celic in proteini celične stene so se raztopili predvsem v pufru za raztapljanje z 0 M in z 1 M gvanidinijevim kloridom, B-AcmA pa se

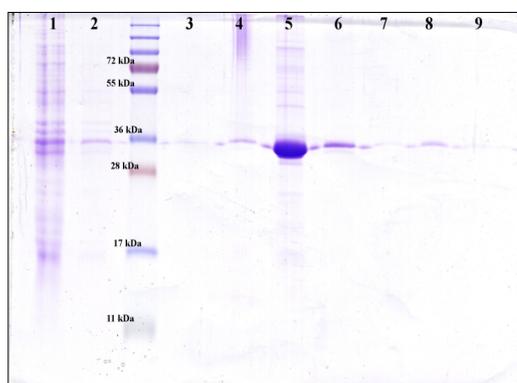
je večinoma raztopil v puftru za raztapljanje s 3 M gvanidinijevim kloridom (slika 12). Proteinsko frakcijo v puftru za raztapljanje s 3 M gvanidinijevim kloridom smo zato izbrali za nadaljnjo izolacijo B-AcMA z afinitetno kromatografijo. Pri izvedbi afinitetne kromatografije smo pri prvih dveh nanosih presegli vezavno kapaciteto nosilca BD TALON, saj smo B-AcMA zaznali tudi v nevezani frakciji in v frakcijah spiranja kolone (slika 13). Zato smo na kolono ponovno nanесли nevezani frakciji prvih dveh nanosov (nanos 3). S kolone smo po nanosu s pufrom za spiranje najprej sprali nevezane nečistote (frakcije S). Spiranje smo izvajali vse dokler vrednost A_{280} ni padla na 0. Nato smo s pufrom za elucijo eluirali B-AcMA v 3 mL-frakcijah (frakcije E) toliko časa, dokler vrednost A_{280} ni ponovno padla približno na vrednost 0. Vrednosti absorbanc med izpiranjem prikazuje preglednica XI. Izbrane frakcije smo analizirali z NaDS-PAGE (sliki 13 in 14).

Preglednica XI: Vrednost absorbance A_{280} različnih frakcij izpiranja B-AcMA z nosilca BD-TALON

Nanos 1		Nanos 2		Nanos 3	
frakcija	A_{280}	frakcija	A_{280}	frakcija	A_{280}
E ₁ 1	>2,5	E ₂ 1	1,843	E ₃ 1	1,433
E ₁ 2	2,189	E ₂ 2	>2,5	E ₃ 2	1,493
E ₁ 3	0,660	E ₂ 3	1,054	E ₃ 3	0,468
E ₁ 4	0,170	E ₂ 4	0,127	E ₃ 4	0,074
E ₁ 5	0,082	E ₂ 5	0,154	E ₃ 5	0,034
E ₁ 6	0,056	E ₂ 6	0,106	E ₃ 6	0,003
E ₁ 7	0,013	E ₂ 7	0,087	E ₃ 7	0,00
E ₁ 8	0,038	E ₂ 8	0,075	E ₃ 8	0,001
E ₁ 9	0,030	E ₂ 9	0,073	E ₃ 9	0,00
E ₁ 10	0,019	E ₂ 10	0,076	E ₃ 10	
E ₁ 11	0,03	E ₂ 11	0,22	E ₃ 11	
E ₁ 12	0,02	E ₂ 12	0,21	E ₃ 12	
E ₁ 13	0,00	E ₂ 13	0,10	E ₃ 13	
E ₁ 14	0,001	E ₂ 14	0,00	E ₃ 14	



Slika 13: Rezultati NaDS-PAGE izbranih frakcij spiranja kolone (S) in izpiranja B-AcmA (E), dobljenih med afinitetno kromatografijo; a) 1-nevezana frakcija; 2- S_{11} ; 3- S_{21} ; 4- S_{12} ; 5- S_{22} ; 6- E_{11} ; 7- E_{12} ; 8- E_{13} ; 9- E_{14} ; b) 10- E_{16} ; 11- E_{18} ; 12- E_{10} ; 13- E_{21} ; 14- E_{22} ; 15- E_{23} ; 16- E_{24} ; 17- E_{26} ; 18- E_{28}



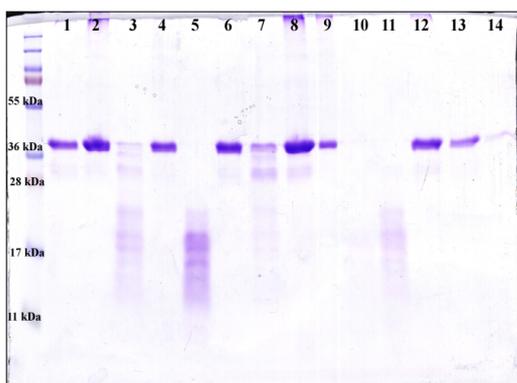
Slika 14: Rezultati NaDS-PAGE izbranih frakcij spiranja kolone (S) in izpiranja B-AcmA (E), dobljenih med afinitetno kromatografijo; 1-nevezana frakcija; 2- S_{31} ; 3- S_{32} ; 4- S_{33} ; 5- E_{31} ; 6- E_{32} ; 7- E_{33} ; 8- E_{34} ; 9- E_{35}

Na osnovi rezultatov analize NaDS-PAGE smo izbrali frakcije elucije B-AcmA vseh treh nanosov, ki so vsebovale višjo koncentracijo čistega B-AcmA in jih združili v skupen vzorec. V končen skupen vzorec (volumen 42 mL) smo združili frakcije E_{11} - E_{16} , E_{21} - E_{26} in E_{31} - E_{32} . Združeni vzorec je imel $A_{280}=1,340$. S programom Protein Calculator v3.3 smo s pomočjo znanega AK-zaporedja izračunali teoretični ekstinkcijski koeficient B-AcmA pri A_{280} , ki znaša $1,2396 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Z znanim ekstinkcijskim koeficientom smo s pomočjo Beer-Lambertovega zakona izračunali koncentracijo B-AcmA v združeni frakciji. Ta je znašala $1,08 \text{ mg/mL}$.

5.1.3 PONOVRNO ZVITJE B-AcmA IN ULTRAFILTRACIJA

Ker smo afinitetno kromatografijo izvajali s pufrom za elucijo, ki je vseboval 3 M gvanidinijev klorid, smo le-tega odstranili z metodo hitrega razredčevanja in tako

omogočili zvitje B-AcmA v nativno konformacijo. Po 2 ml vzorca smo razredčili na 160 mL s PBS in ga z ultrafiltracijo skoncentrirali na 7-10 mL. Skoncentrirane vzorce smo shranili v hladilniku. Po 4 dneh smo v skoncentriranih vzorcih opazili oborino, ki je nakazovala obarjanje B-AcmA. Vzorce smo zato centrifugirali 10 min pri 5000 g in 4 °C ter supernatante ločili od oborine. Pred nadaljevanjem izolacije B-AcmA smo vzorce posameznih supernatantov in oborin preverili z analizo NaDS-PAGE.

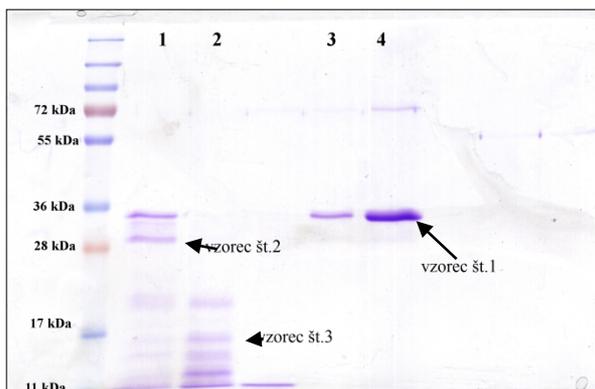


Slika 15: Rezultati NaDS-PAGE supernatantov vzorcev, v katerih smo opazili obarjanje proteina; 1-14: nanos različnih frakcij supernatantov

Iz slike 15 je razvidno, da je v vzorcih 3, 5, 10, 11 in 14 verjetno prišlo do popolne proteolitične razgradnje B-AcmA, saj so se namesto lis, značilnih za B-AcmA, pojavile lise proteinov z nižjo molekularno maso. Za nadaljevanje izolacije B-AcmA smo zato izbrali supernatante frakcij 1, 2, 4, 6, 8, 9, 12 in 13, v katerih se je, glede na elektroforezni gel (slika 15), nahaja nerazgrajeni B-AcmA. Omenjene frakcije smo združili in jih ponovno ultrafiltrirali v skupni vzorec (volumen 50 mL) s končno vrednostjo $A_{280}=0,216$ in izračunano koncentracijo B-AcmA 0,17 mg/mL. Da bi se v nadaljevanju eksperimentalnega dela izognili obarjanju in razgradnji B-AcmA, smo izoliran B-AcmA alikvotirali v mikrocentrifugirke po 1 mL in jih zamrznili pri -20 °C. Pri nadaljnjem izvajanju poskusov vezave B-AcmA na površino MKB in GEM-delcev ter pri vrednotenju vpliva B-AcmA na rast bakterij v kulturi smo odmrznili ustrezno število alikvotov in uporabili vedno svež vzorec, ki smo mu izmerili vrednost A_{280} . Tako smo zagotovili, da koncentracija B-AcmA (0,17 mg/mL) med posameznimi analizami ni varirala.

5.1.4 DOLOČEVANJE N-KONČNEGA AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA RAZGRADNIH PRODUKTOV B-AcmA

Z NaDS-PAGE smo analizirali izbrane frakcije, ki smo jih dobili med procesom čiščenja in izolacije B-AcmA. N-končno AK-zaporedje smo določili najmočnejši lisi v končni proteinski frakciji, dobljeni po izolaciji in čiščenju (vzorec št. 1, slika 16) in dvema produktoma razgradnje B-AcmA z nižjo molekulsko maso (vzorec št. 2 in vzorec št. 3, slika 16).



Slika 16: Rezultati NaDS-PAGE frakcij, dobljenih med procesom čiščenja in izolacije B-AcmA in označeni vzorci, katerim smo z Edmanovo degradacijo določili N-končno AK-zaporedje; 1-združeni frakciji 3 in 7 (glej sliko 15); 2-združeni frakciji 5 in 11 (glej sliko 15); 3-frakcija 13 (glej sliko 15); 4-končna proteinska frakcija, dobljena po izolaciji in čiščenju

Vzorec št. 1 predstavlja rekombinanten protein, ki smo ga izolirali iz *E. coli* in ki glede na ustrezno molekulsko maso predstavlja protein B-AcmA. Proteinu smo določili zaporedje prvih petih AK na N-koncu, in sicer je bilo to zaporedje ADNKF (za natančnejši prikaz analize glej prilogo 4). Po primerjavi določenega AK-zaporedja s pričakovanim N-končnim AK-zaporedjem B-AcmA (priloga 2), smo ugotovili, da se AK-zaporedji na N-koncu ujemata. Kot prva AK je v pričakovanem AK-zaporedju B-AcmA naveden metionin, ki je produkt translacije začetnega kodona in se v procesu posttranslacijskih modifikacij odcepi; začetni metionin se zagotovo odstrani, če mu v AK-zaporedju sledijo alanin, glicin, prolin ali serin (66). Ker se je določeno AK-zaporedje N-konca B-AcmA ujemale s pričakovanim in ker je molekulska masa izoliranega proteina (približno 30 kDa) ustrezala pričakovani, smo lahko s precejšnjo gotovostjo trdili, da smo po postopkih sinteze, izolacije in čiščenja pridobili zeleni rekombinantni protein.

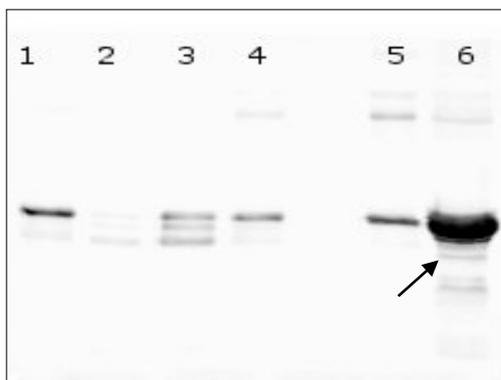
cikel Edmanove degradacije	1.	2.	3.	4.	5.
določeno N- končno zaporedje v vzorcu št.2	A/N	D/G/I	N/T/E	K/S/Q	F/G/Q
določeno N- končno zaporedje v vzorcu št.3	N/T	I/N/G	T/G/N	N/S	N/G

Slika 17: Prikaz določenega N-končnega AK-zaporedja proteinskih fragmentov v vzorcih št. 2 in št. 3

Rezultati določitve N-končnega AK-zaporedja proteina v vzorcu št. 2 in št. 3 niso bili tako nedvoumni, kot v primeru vzorca št. 1, saj smo z analizo dobili več možnih N-končnih AK-zaporedij (slika 17). Najverjetnejše N-končno AK-zaporedje smo določili s primerjavo z AK-zaporedjem B-AcmA in ob upoštevanju molekulske mase posameznega analiziranega proteinskega fragmenta. Protein v vzorcu št. 2 je imel molekulsko maso približno 28 kDa in N-končno AK-zaporedje ADNKF, kar pomeni, da gre za proteinski fragment z ohranjenim N-končnim zaporedjem rekombinantnega proteina. Glede na razliko v molekulski masi smo določili najverjetnejše mesto cepitve peptidne vezi. Ta se nahaja med tretjo ponovitvijo LysM in histidinskim repom. Protein v vzorcu št. 3 pa ima na N-koncu eno od treh možnih AK-zaporedji; NNNSG, TITNN, TNNSN, pri čemer se zaporedji NNNSG in TITNN prekrivata (priloga 2). Ker nismo mogli določiti točne molekulske mase proteinskega fragmenta, tudi nismo mogli ugotoviti katero od možnih AK-zaporedji je "pravilno". V lisi se najverjetneje nahaja več fragmentov B-AcmA. Glede na rezultate smo potrdili, da v vzorcih res prihaja do razgradnje B-AcmA oz. da vsi razgradni produkti izhajajo iz omenjenega proteina.

5.1.5 DETEKCIJA B-AcmA S SPECIFIČNIMI PROTITELESI PO PRENOSU WESTERN

Identiteto želenega rekombinantnega proteina po končani izolaciji smo potrdili še s prenosom western. Z NaDS-PAGE ločene proteine posameznih frakcij ponovnega zvijanja smo prenesli na membrano PVDF in jih detektirali s specifičnimi protitelesi proti B-domeni, ki so bila fluorescenčno označena s FITC.



Slika 18: Rezultati prenosa western izbranih proteinskih frakcij in detekcija B-AcmA s specifičnimi protitelesi proti B-domeni; 1- združeni frakciji 3 in 7 (glej sliko 15); 2- združeni frakciji 5 in 11 (glej sliko 15); 3- frakcija 13 (glej sliko 15); 4- frakcija 14 (glej sliko 15); 5- frakcija 9 (glej sliko 15); 6- končna proteinska frakcija, dobljena po izolaciji in čiščenju

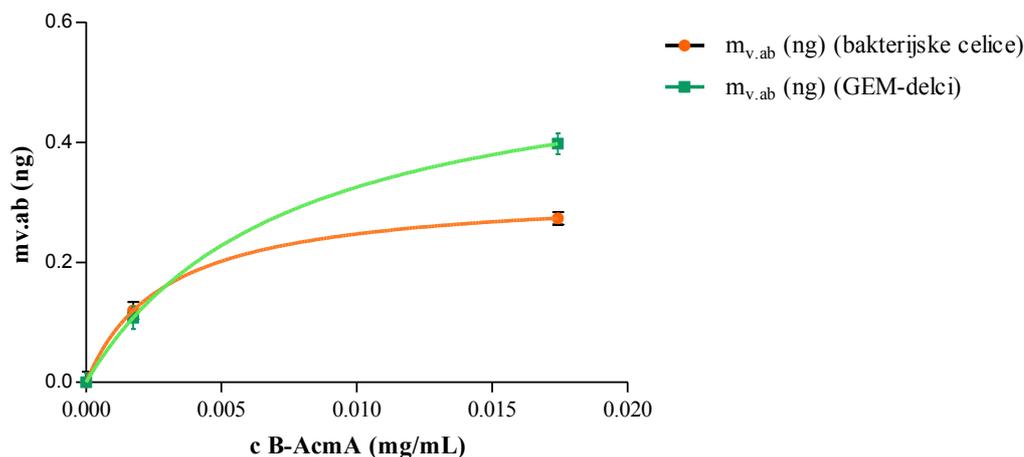
V nanosu št. 6 (slika 18) smo zaznali najvišjo količino proteina z molekulsko maso približno 30 kDa, ki ustreza B-AcmA (na sliki označeno s puščico). S tem smo ponovno potrdili, da se v vzorcu nahaja B-AcmA s funkcionalno B-domeno. V nekaterih frakcijah smo opazili tudi lise z nižjo molekulsko maso, kar ponovno kaže na to, da je prišlo do razgradnje proteina. Protitelesa so se kljub temu vezala na proteinske fragmente, kar pomeni, da se je tudi v teh vzorcih ohranila bodisi cela struktura B-domene ali pa njen del, na katerega se še lahko vežejo protitelesa.

5.2 VEZAVA B-AcmA NA POVRŠINO BAKTERIJSKIH CELIC IN GEM-DELCEV

5.2.1 ENCIMSKOIMUNSKI TEST

Vezavo pripravljenega in izoliranega B-AcmA na površino MKB smo potrdili in ovrednotili z metodo ELISA. Vezavo B-AcmA na površino bakterijskih celic ali GEM-delcev smo določili posredno, preko vezave protiteles proti B-domeni na površinsko vezan B-AcmA in jo ovrednotili z izračunom mase deleža protiteles ($m_{v.ab}$), ki so se vezala na B-AcmA na površini celic.

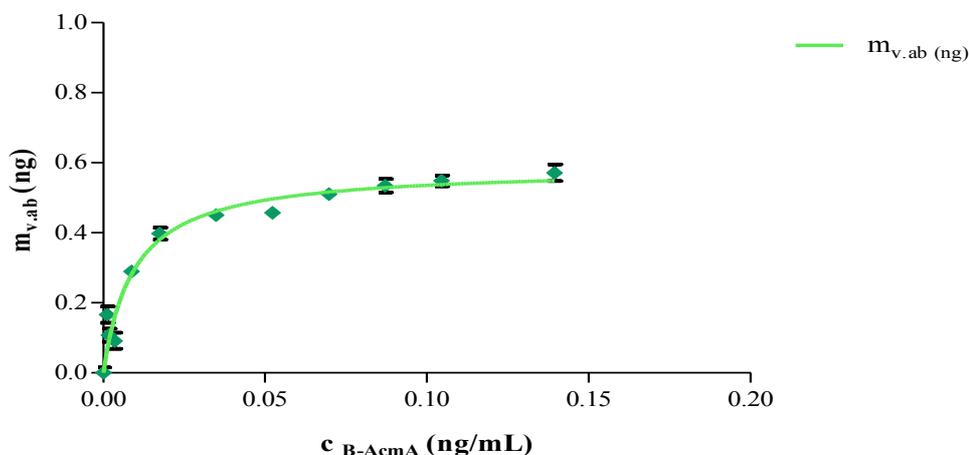
5.2.1.1 Primerjava vezave protiteles proti B-domeni na bakterijske celice *L. lactis* in GEM-delce *L. lactis*



Slika 19: Krivulji vezave protiteles na GEM-delce *L. lactis* in bakterijske celice *L. lactis*, v odvisnosti od koncentracije dodanega B-AcmA

Krivulji na sliki 19 in prikaz dobljenih podatkov v prilogi 5 potrjujeta vezavo B-AcmA na površino bakterijskih celic *L. lactis* in GEM-delcev *L. lactis*, saj smo v obeh vzorcih izmerili padec vrednosti A_{450} glede na pripadajočo negativno kontrolo. Ugotovili smo, da je bila vezava protiteles na GEM-delce večja v primerjavi z njihovo vezavo na bakterijske celice. Zato, smo le-te uporabili pri vrednotenju vezave B-AcmA pri različnih koncentracijah B-AcmA, protiteles in GEM-delcev. Rezultati testiranj in izračuni količine vezanih protiteles na B-AcmA so prikazani v prilogah 6, 7 in 8.

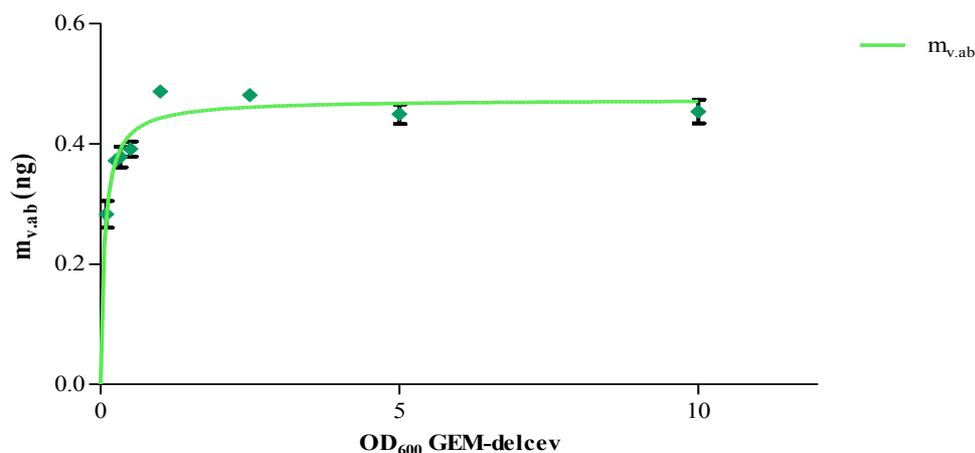
5.2.1.2 Vrednotenje vezave protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površino GEM-delcev *L. lactis*, v odvisnosti od koncentracije B-AcmA



Slika 20: Saturacijska krivulja vezave protiteles v odvisnosti od koncentracije dodanega B-AcmA

Glede na dobljene rezultate lahko vezavo protiteles na B-domeno B-AcmA na površini GEM-delcev *L. lactis* opišemo s saturacijsko odvisnostjo (saturacijska krivulja na sliki 20). V primeru vrednotenja vezave specifičnih protiteles na B-AcmA, pritrjen na površino GEM-delcev, v odvisnosti od njegove koncentracije, smo določili naslednjo enačbo vezave: $m_{v.ab} \text{ (ng)} = 0,5861 * c_{B-AcmA} \text{ (ng/mL)} / (0,0094157 + c_{B-AcmA} \text{ (ng/mL)})$, $R^2 = 0,9572$. S pomočjo te enačbe lahko razberemo, da se pri izbranih pogojih testiranja (OD_{600} GEM-delcev=5, koncentracija specifičnih protiteles proti B-domeni=7,2 ng/mL) na B-AcmA, pritrjen na površino GEM-delcev, lahko veže največ 0,5861 ng protiteles. V eksperimentu smo povečevali koncentracijo B-AcmA, vezava protiteles pa se ni povečevala linearno z njegovim dodatkom, ampak je dosegla plato. Zato lahko na saturacijsko odvisnost sklepamo tako pri opisu vezave B-AcmA na površine GEM-delcev ko tudi samih bakterijskih celic. Če bi pri danih eksperimentalnih pogojih še povečali koncentracijo dodanega B-AcmA, s tem ne bi dosegli večje vezave B-AcmA na površino GEM-delcev in posledično tudi ne protiteles proti B-domeni.

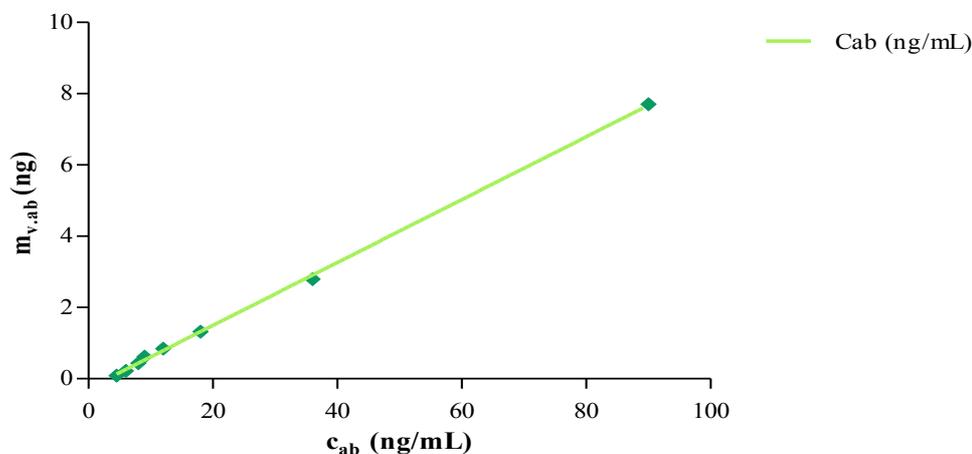
5.2.1.3 Vrednotenje vezave protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površino GEM-delcev *L. lactis*, v odvisnosti od koncentracije GEM delcev



Slika 21: Saturacijska krivulja vezave protiteles v odvisnosti od vrednosti OD₆₀₀ GEM-delcev

Pri določanju odvisnosti vezave protiteles na B-AcmA, vezan na površino GEM-delcev *L. lactis*, od vrednosti OD₆₀₀ GEM-delcev (koncentracije GEM-delcev) smo določili saturacijsko odvisnost te vezave (slika 21). Saturacijsko krivuljo smo opisali z enačbo $m_{v.ab}(ng)=0,4735 \cdot OD_{600} / (0,07021 + OD_{600})$, $R^2=0,8587$. S pomočjo enačbe lahko ugotovimo, da se na B-AcmA, vezan na površini GEM-delcev, pri izbranih pogojih testiranja (koncentracija B-AcmA=0,03484 mg/mL in koncentracija specifičnih protiteles=7,2 ng/mL) lahko veže največ 0,4735 ng protiteles proti B-domeni.

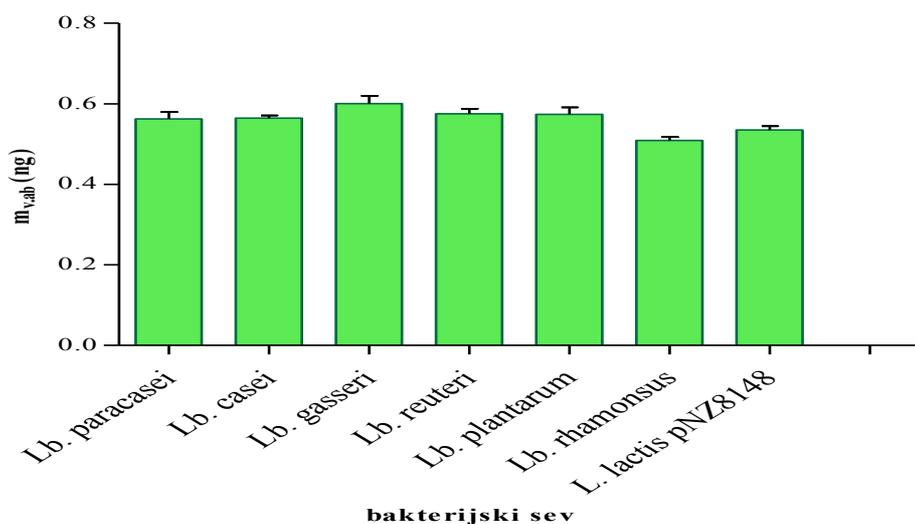
5.2.1.4 Vrednotenje vezave protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površino GEM-delcev *L. lactis*, v odvisnosti od začetne koncentracije protiteles



Slika 22: Linearna vezava protiteles v odvisnosti od njihove začetne koncentracije

Vezavo protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površini GEM-delcev, v odvisnosti od začetne koncentracije dodanih protiteles opisuje linearna premica (slika 22) z enačbo $m_{v,ab}(ng)=0,08804 * m_{ab}-0,2556$ in $R^2=0,9993$. Pri izbranih pogojih testiranja (OD_{600} GEM-delcev=5, koncentracija B-AcmA=0,03484 mg/mL) smo spreminjali koncentracijo protiteles proti B-domeni, in sicer od 4,5 ng/ mL do 90 ng/mL, pri čemer nismo dosegli platoja oziroma nismo opazili saturacijske odvisnosti.

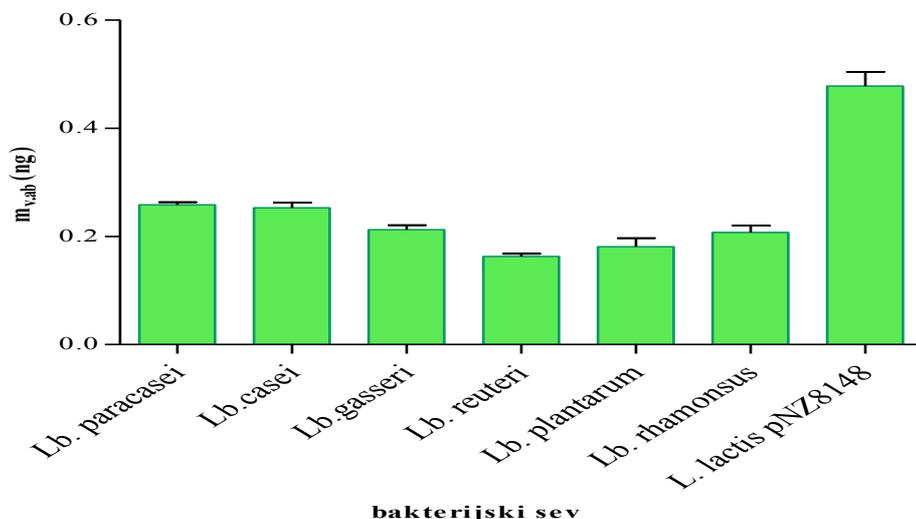
5.2.1.5 Primerjava vezave protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površini GEM-delcev različnih sevov laktobacilov in GEM-delcev *L. lactis*



Slika 23: Primerjava vezave specifičnih protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površini GEM-delcev različnih sevov laktobacilov in GEM-delcev *L. lactis*

Pri primerjavi vezave protiteles na B-AcmA, vezan na površino GEM-delcev *L. lactis* in GEM-delcev različnih sevov laktobacilov (slika 23 in priloga 9), smo opazili le manjše razlike v vezavi proteina. V vseh vzorcih se je na GEM-delce ($OD_{600}=5$) namreč vezala približno enaka količina protiteles proti B-domeni. Na GEM-delce sevov *Lb. paracasei*, *Lb. casei*, *Lb. reuteri*, *Lb. plantarum* in *L. lactis* se je vezalo od 0,5350 ng do 0,5623 ng protiteles. Pri teh s t-testom nismo dokazali nobene statistično značilnih razlik v vezavi protiteles (5 % stopnja tveganja). Največ protiteles se je vezalo na GEM-delce *Lb. gasseri* (0,6007 ng), najmanj pa na tiste, pripravljene iz *Lb. rhamonsus* (0,5087 ng). Med GEM-delci, pripravljenimi iz omenjenih dveh sevov, smo tudi s t-testom dokazali statistično značilno razliko v vezavi protiteles (5 % stopnja tveganja).

5.2.1.6 Primerjava vezave protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površino bakterijskih celic različnih sevov laktobacilov in bakterijskih celic *L. lactis*



Slika 24: Primerjava vezave protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površino bakterijskih celic *L. lactis* in različnih sevov laktobacilov

Pri primerjavi vezave specifičnih protiteles proti B-domeni na B-AcmA, pritrjen na površino bakterijskih celic *L. lactis* in različnih sevov laktobacilov (slika 24, priloga 10) smo opazili statistično značilne razlike med posameznimi bakterijskimi sevi. Testiranje vezave smo izvedli pri pogojih $OD_{600}=5$ in koncentraciji B-AcmA 0,0871 mg/mL. Največ protiteles se je vezalo na B-AcmA na površini bakterijskih celic *L. lactis*, najmanj pa na B-AcmA, pritrjen na površino bakterijskih celic *Lb. reuteri*.

Primerjali smo tudi vezavo protiteles na B-AcmA, pritrjen na površino različnih bakterijskih celic laktobacilov in bakterijskih celic *L. lactis*. Pri tem smo vezavo protiteles na B-AcmA, pritrjen na površini bakterijskih celic *L. lactis* ovrednotili kot 100 % vezavo, nato pa vezave protiteles na B-AcmA, pritrjen na površine bakterijskih celic laktobacilov pretvorili v ustrezne deleže (glede na 100 % vezavo).

Bakterijski sev	Delež vezave (%)
<i>Lb. paracasei</i>	54,0
<i>Lb. casei</i>	52,9
<i>Lb. gasseri</i>	44,4
<i>Lb. reuteri</i>	34,0
<i>Lb. plantarum</i>	37,8
<i>Lb. rhamonsus</i>	43,4
<i>L. lactis</i> pNZ8148	100,0

Preglednica XII: Primerjava vezave protiteles na B-AcmA, vezan na različne seve laktobacilov, glede na B-AcmA, vezan na površini *L. lactis*

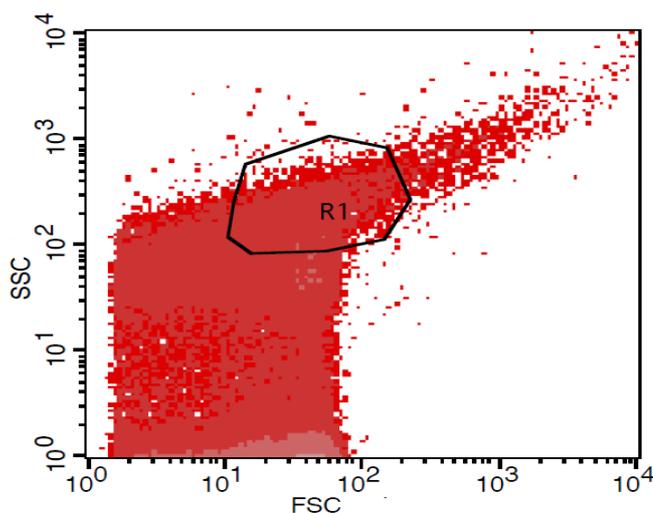
Iz preglednice XII je razvidno, da se je na B-AcmA, pritrjen na različne seve laktobacilov, vezalo vsaj 50 % manj protiteles, kot na B-AcmA, vezan na površino *L. lactis*, kar kaže na manjšo sposobnost vezave B-AcmA na površino laktobacilov.

5.2.2 BARVANJE S KRISTAL VIJOLIČNIM

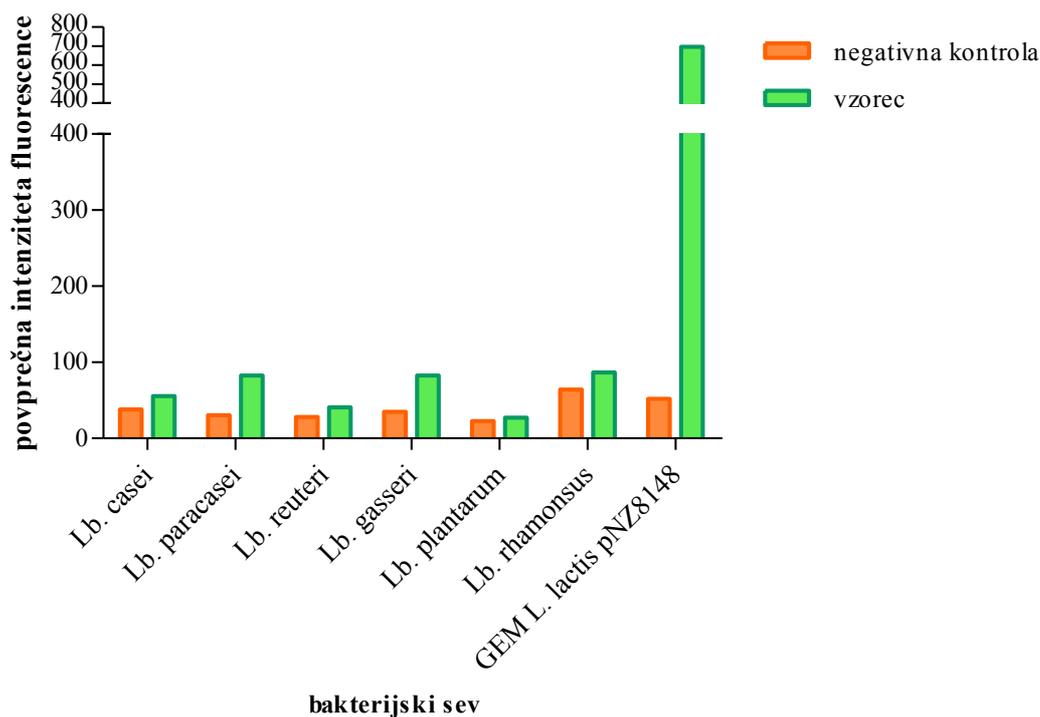
Uspešnost vezave B-AcmA na površino celic *L. lactis* NZ9000 smo poskušali dokazati tudi z barvanjem s kristal vijoličnim. Predvidevali smo, da bomo v primerjavi z negativno kontrolo v vzorcih opazili intenzivnejše obarvanje, zaradi vezave barvila na celično steno bakterij, vendar pa tega nismo uspeli potrditi niti ob zmanjšanem številu spiranj vdolbinic med pripravo vzorca.

5.2.3 PRETOČNA CITOMETRIJA

Vezavo B-AcmA na površine bakterijskih celic različnih sevov iz rodu *Lactobacillus* (*Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. reuteri*, *Lb. gasseri*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamonsus*) in GEM-delcev *L. lactis* smo ovrednotili tudi s pretočno citometrijo. Protein B-AcmA, vezan na površino bakterijskih celic ali GEM-delcev smo označili s fluorescenčno označenimi protitelesi, ki specifično prepoznajo B-domeno streptokoknega proteina A. Za analizo s pretočno citometrijo smo najprej zamejili populacijo celic, ki smo jim želeli izmeriti povprečno intenziteto fluorescence (slika 25). Nato smo izmerili povprečno intenziteto fluorescence negativne kontrole, ki smo jo potem primerjali z izmerjeno povprečno intenziteto fluorescence bakterijskih celic z B-AcmA, vezanim na njihovo površino.



Slika 25: Prikaz gostote celic glede na velikost prednjega (FSC) in stranskega (SSC) sipanja



Slika 26: Primerjava povprečne intenzitete fluorescence negativne kontrole in vzorcev različnih vrst bakterijskih celic s površinsko vezanim B-AcmA

V vseh preiskovanih vzorcih smo izmerili višjo povprečno intenziteto fluorescence (slika 26), kot pa v negativni kontroli. Fluorescenca je sorazmerna s količino vezanega B-AcmA na površini bakterijskih celic. Tako smo potrdili, da so GEM-delci in vsi uporabljeni bakterijski sevi na svojih površinah vezali B-AcmA. Največ proteina se je vezalo na GEM-delce *L. Lactis* pNZ8148, saj se je povprečna intenziteta fluorescence v tem vzorcu povečala kar za trinajstkrat v primerjavi z negativno kontrolo.

5.3 VPLIV DODATKA B-AcmA NA RAST BAKTERIJ V KULTURI

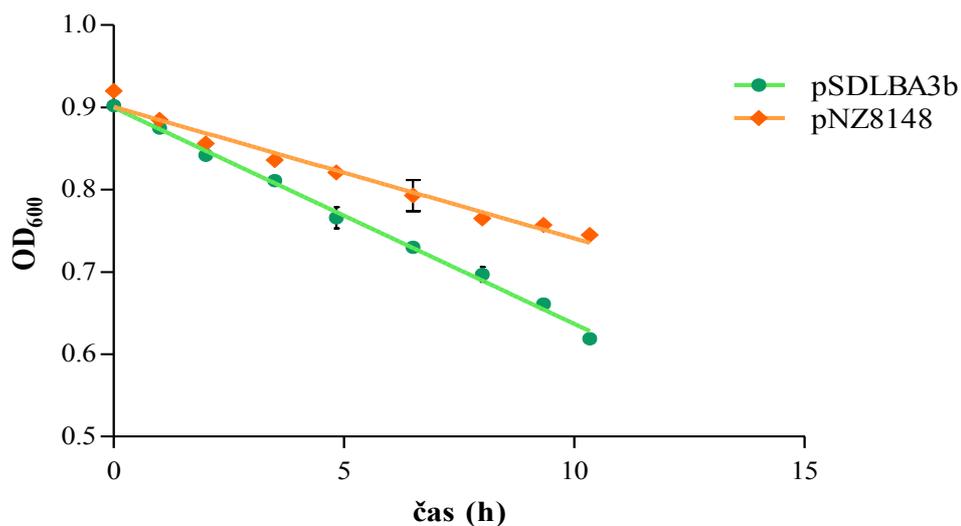
Pri spremljanju rasti kulture *L. lactis* NZ9000, pri kateri smo v gojišče dodali B-AcmA, smo opazili, da so se bakterijske celice združevale v skupke, ki so bili vidni s prostim očesom. Združevanje bakterijskih celic smo opazili tudi v kulturi *L. lactis* NZ9000 z vstavljenim plazmidom pSDLBA3b, v kateri smo z nizinom inducirali izražanje B-AcmA. Vpliv dodajanja B-AcmA na rast bakterij *L. lactis* v kulturi smo ovrednotili s tremi različnimi metodami.

5.3.1 TESTIRANJE NA MIKROTITRSKIH PLOŠČAH

Pri različnih vrednostih OD₆₀₀ smo v bakterijsko kulturo *L. lactis* dodali ustrezno redčitev B-AcmA in spremljali spremembe OD₆₀₀ pri nadaljnji rasti. Vrednosti OD₆₀₀ bakterijske kulture, ki smo ji dodali B-AcmA, smo primerjali z vrednostmi OD₆₀₀ bakterijske kulture, brez dodanega proteina, ki je predstavljala osnovno normalno rast bakterij. Natančnejša izvedba poskusa je opisana v tabeli v prilogi 11. Na osnovi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da testiranje vpliva dodatka B-AcmA na rast bakterij na mikrotitrskih ploščah ne bo mogoče, saj so celice v vdolbinicah lahko zrasle le do vrednosti OD₆₀₀=0,6. Meritve OD₆₀₀ z mikrotitrskim čitalcem Tecan infinite M1000 pa je ovirala tudi kondenzirana vlaga, ki je nastala na pokrovu plošče pri prenosu vzorca iz inkubatorja. Zaradi tega in nizke končne absorbance smo dobili neponovljive rezultate med posameznimi meritvami, kar je onemogočilo zadovoljivo vrednotenje vpliva dodatka B-AcmA.

5.3.2 MERJENJE HITROSTI SEDIMENTACIJE BAKTERIJSKIH CELIC V KULTURI

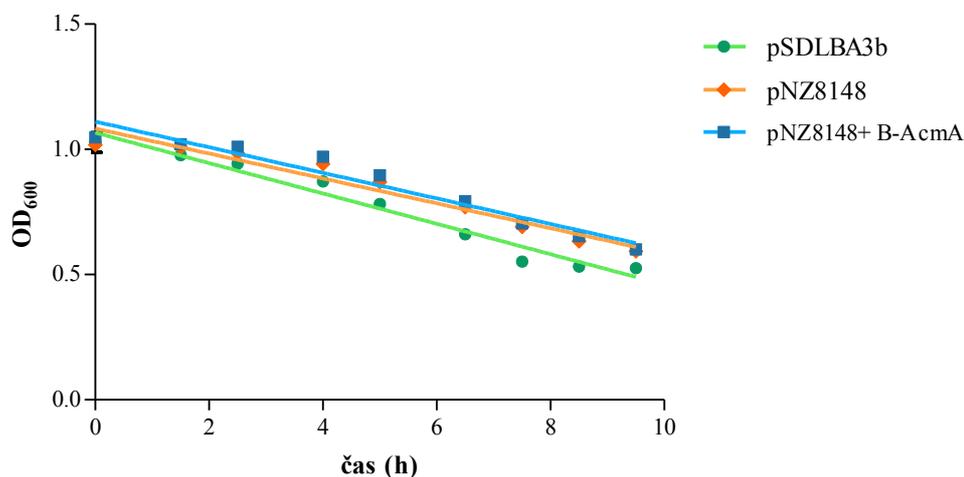
Primerjali smo hitrost sedimentacije bakterijskih celic *L. lactis* NZ9000 z vstavljenim plazmidom pSDLBA3b, pri katerih smo izražanje B-AcmA inducirali z nizinom, s tisto pri bakterijskih celicah *L. lactis* NZ9000 z vstavljenim plazmidom pNZ8148 (negativna kontrola; normalna rast celic v kulturi). Po indukciji se je v kulturi s plazmidom pSDLBA3b izrazil rekombinanten protein USP-B-AcmA, ki je tako kot B-AcmA, ki smo ga izolirali iz *E. coli*, sestavljen in B-domene in treh ponovitev LysM (primerjava genskih konstruktov v poglavju 4.1.4). Vrednost OD₆₀₀ je padala linearno, kar smo lahko opisali z enačbo premice, katere naklon je sorazmeren hitrosti sedimentacije v vzorcu (slika 27; meritve OD₆₀₀ v prilogi 12).



	naklon krivulje	odsek na y-osi	r ²
pSDLBA3b	-0,02630±0,00060	0,9000±0,0037	0,9964
pNZ8148	-0,01599±0,00102	0,9006±0,0063	0,9721

Slika 27: Premici hitrosti sedimentacije bakterijskih delcev v kulturah *L. lactis* z vstavljenima plazmidoma pSDLBA3b in pNZ8148, s pripadajočima linearnima enačbama

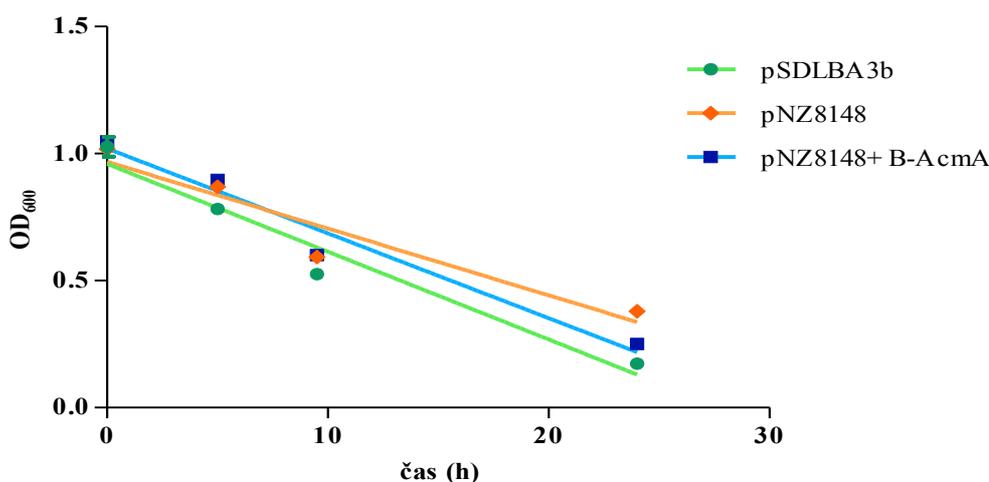
V nadaljevanju smo tema vzorcema bakterijskih kultur s plazmidom pSDLBA3b ali pNZ8148 dodali še vzorec bakterijske kulture s plazmidom pNZ8148, ki smo ji B-AcmA ($c=0,017$ mg/mL) dodali v gojišče (meritve OD₆₀₀ v prilogi 13).



	naklon krivulje	odsek na y-osi	r ²
pSDLBA3b	-0,06064±0,00416	1,067±0,024	0,9681
pNZ8148	-0,04977±0,004307	1,083±0,025	0,9504
pNZ8148+ rekombinanten protein	-0,5110±0,00462	1,111±0,027	0,9460

Slika 28: Premice hitrosti sedimentacije bakterijskih delcev v kulturi *L. lactis* z vstavljenimi plazmidi pSDLBA3b, pNZ8148 in pNZ8148+ B-AcmA, s pripadajočimi linearnimi enačbami

V času 9,5 h nismo določili nobene statistično značilne razlike med hitrostmi sedimentacije v bakterijski kulturi s plazmidom pNZ8148, z ali brez dodatka B-AcmA. Premica hitrosti sedimentacije za bakterijsko kulturo s plazmidom pNZ8148 z dodanim B-AcmA je imela le nekoliko večji naklon kot tista za bakterijsko kulturo s plazmidom pNZ8148 in brez dodatka B-AcmA (slika 28). Zato smo skleпали, da smo meritve OD₆₀₀ izvajali v prekratkem časovnem intervalu, da bi lahko zaznali razlike v hitrosti sedimentacije med obema primerjanima vzorcema.



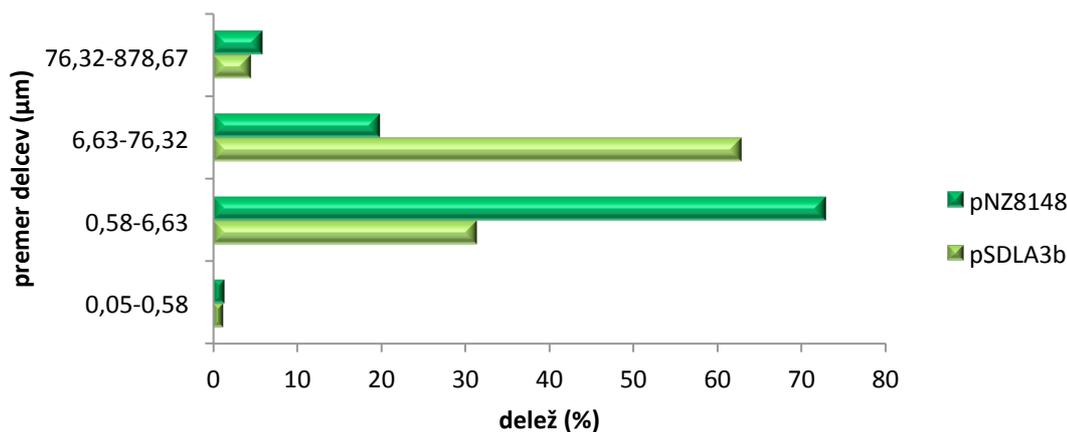
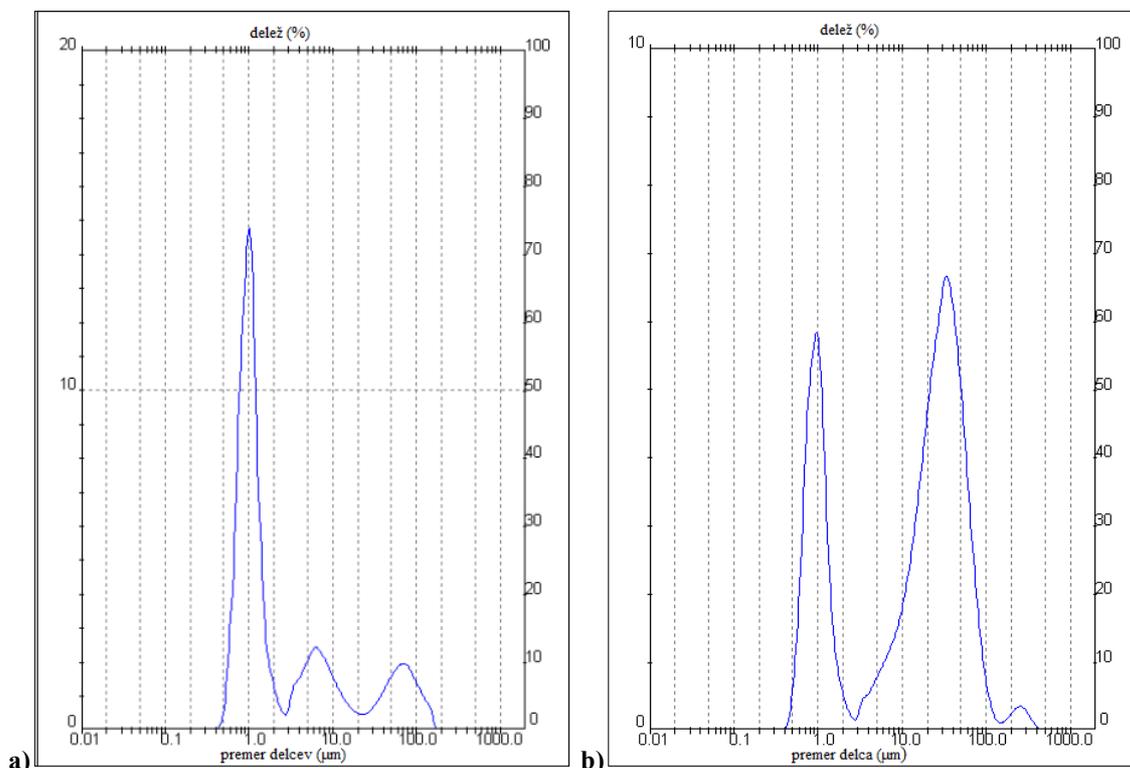
	naklon krivulje	odsek na y-osi	r ²
pSDLBA3b	-0,03455±0,00522	0,9596 ±0,0686	0,9563
pNZ8148	-0,02628 ±0,00573	0,9680±0,0754	0,9131
pNZ8148+ rekombinanten protein	-0,03340 ±0,00468	1,0200±0,0615	0,9623

Slika 29: Premice hitrosti sedimentacije bakterijskih delcev v kulturi *L. lactis* z vstavljenimi plazmidi pSDLBA3b, pNZ8148 in pNZ8148+ B-AcmA, s pripadajočimi linearnimi enačbami

Posledično smo poskus ponovili tako, da smo končno točko sedimentacije izmerili po štiriindvajsetih urah in nato to vrednost upoštevali pri prikazu hitrosti sedimentacije. S podaljšanjem časovnega obdobja meritev z 9,5 ur (slika 28) na 24 ur (slika 29) pa smo opazili statistično značilne razlike v hitrosti sedimentacije v primerjanih vzorcih. Celice so se najhitreje posedale v bakterijski kulturi s plazmidom pSDLA3b, v katerem smo izražanje B-AcmA inducirali z nizinom, najpočasneje pa v negativni kontroli. Hitrost sedimentacije v bakterijski kulturi, v katero smo B-AcmA dodali, je bila prav tako večja kot v negativni kontroli. S tem smo potrdili vpliv B-AcmA na rast bakterijskih celic v kulturi (združevanje v skupke).

5.3.3 MERJENJE VELIKOSTI CELIČNIH AGREGATOV V SUSPENZIJI

Izmerili smo tudi velikost delcev v bakterijski kulturi *L. lactis* NZ9000 z vstavljenim plazmidom pSDLBA3b, v kateri smo izražanje rekombinantnega proteina inducirali z nizinom in v bakterijski kulturi *L. lactis* NZ9000 z vstavljenim plazmidom pNZ8148 (kontrola). Rezultati meritev so zbrani v prilogah 14 in 15.



c)

Slika 30: Prikaz deleža delcev v posameznih velikostnih območjih v vzorcih kulture *L. lactis* s plazmidoma a) pNZ8148 in b) pSDLBA3b ter c) primerjava deležev različnih velikosti delcev v obeh vzorcih

Celice *L. lactis* imajo povprečen premer približno 0,75-0,95 μm (89). V vzorcu bakterijske kulture celic *L. lactis* NZ9000 s plazmidom pNZ8148 je bilo največ (14,64 %) delcev z velikostjo 0,91-1,06 μm (slika 30 a), kar pomeni, da so v tej kulturi prevladovali posamezne celice. V vzorcu kulture bakterijskih celic *L. lactis* NZ9000 s plazmidom pSDLBA3b pa smo uspeli ločiti dve populaciji, ki sta se razlikovali v velikosti (slika 30 b). Prva populacija je imela največji delež celic z velikostjo med 0,91-1,06 μm (5,80 %), druga pa med 30,53-35,56 μm (6,64 %), kar pomeni, da so bile prisotne tako posamezne bakterijske celice kot tudi njihovi skupki. Največji skupki so bili veliki 351,46 μm . Razliko v velikosti agregatov bakterijskih celic v obeh kulturah prikazuje slika 30 c. Vidimo, da je bilo v bakterijski kulturi *L. lactis* NZ9000 s plazmidom pSDLBA3b največ celic v velikostnem razredu med 6,63 in 76,32 μm (62,79 %), medtem ko so v kulturi *L. lactis* NZ9000 s plazmidom pNZ8148 prevladovali celice v velikostnem razredu med 0,58 in 6,63 μm (72,79 %).

6 RAZPRAVA

Parenteralna uporaba je najpogostejši način uporabe terapevtskih peptidov in proteinov, ima pa številne slabosti, kot so: kratek razpolovni čas proteina v krvnem obtoku, pogostost aplikacije, visoki odmerki in slabo sprejemljivost s strani bolnikov. Zaradi zahtevne proizvodnje v sterilnih pogojih ter potrebe po usposobljenosti osebja za tovrstno aplikacijo je tudi precej draga. Zato v zadnjih desetletjih potekajo številne raziskave za razvoj sistemov, ki bi omogočili peroralno aplikacijo farmakološko aktivnih proteinov. Tako bi lahko razvili cepiva proti številnim bakterijskim, virusnim in parazitskim okužbam ter lajšali nekatere kronične bolezni npr. kronično vnetno črevesno bolezen, alergije in druge. Peroralna cepiva bi zaradi nižjih proizvodnih stroškov in enostavnega načina aplikacije lahko postala široko uporabna v vseh delih sveta, predvsem pa v manj razvitih državah tretjega sveta, kjer je zaradi slabih higienskih razmer in neugodnih naravnih dejavnikov prisotnih največ nevarnih okužb.

Privlačno možnost peroralne aplikacije proteinov predstavlja neposredna uporaba rekombinantnih MKB, ki lahko delujejo kot dostavni sistemi farmakološko aktivnih biomolekul. Prednosti uporabe MKB pred ostalimi bakterijami so v tem, da so zaradi dolgotrajne varne uporabe v prehranski industriji pridobile status GRAS. Zaradi ugodnega vpliva v prebavnem traktu nekateri sevi veljajo za probiotične, nekateri sevi pa so sposobni tudi kolonizacije gostiteljevega tkiva. Razvili so že veliko ekspresijskih sistemov, ki omogočajo izražanje rekombinantnih proteinov s pomočjo MKB. V terapevtske namene bi bili najučinkovitejši tisti, ki bi omogočali predstavitev rekombinantnih proteinov na njihovi površini, saj je na ta način omogočen neposreden stik proteina z okoljem, obenem pa ga MKB ščitijo pred ostrimi pogoji okolja (želodčna kislina, žolčne kisline in proteolitična razgradnja). V splošnem poteka predstavitev rekombinantnega proteina na površini MKB preko tvorbe himernega proteina med heterolognim proteinom in proteinom, za katerega vemo, da so konstruktivno izraženi na površini MKB (transmembranski proteini, lipoproteini in proteini S-sloja ter sidranje preko motiva LPXTG ali domene LysM). Po definiciji so vsi organizmi, pri katerih je bil genetski material spremenjen z uporabo postopkov tehnologije rekombinantne DNA, npr. s točkovnimi mutacijami in manjšimi delecijami, gensko spremenjeni organizmi (GSO) (44). Uporaba GSO v širši javnosti še vedno velja za nevarno, zato bo potrebno do aplikacije GSO na ljudeh še dokazati njihovo varnost.

Alternativo uporabi gensko spremenjenih MKB kot dostavnih sistemov za rekombinantne proteine, predstavlja postopek, pri katerem rekombinantni protein, ki vsebuje farmakološko aktivno domeno in motiv za sidranje na celično steno MKB, izrazimo v gostiteljskem sevu in ga izoliramo. Izolirani rekombinantni protein dodamo v gojišče gensko nespremenjenih MKB ali v suspenzijo GEM-delcev, na katere se nato veže. Najbolj obetaven motiv za sidranje heterolognega proteina na peptidoglikan MKB je domena LysM. Ta se nekovalentno veže na bakterijsko celično steno, najverjetneje na N-acetilglukozamin in N-acetilmuraminsko kislino, ki sta sestavini peptidoglikana (38).

V okviru diplomskega dela smo pripravili rekombinantni protein B-AcmA, sestavljen iz B-domene proteina A iz *Staphylococcus aureus*, treh ponovitev LysM iz N-acetil muramidaze AcmA *L. lactis* in histidinskega repa ter ga uspešno izolirali. V nadaljevanju smo ovrednotili njegovo vezavo na površino MKB in nakazali vpliv dodatka B-AcmA na rast bakterijskih celic v kulturi.

6.1 PRIPRAVA IN IZOLACIJA B-AcmA

Najprej smo pripravili kompetentne celice *E. coli* BL21(DE3), ki smo jih nato s toplotnim šokom uspešno transformirali s plazmidoma pET-28-B-AcmA in pET-28 (negativna kontrola) ter izvedli testno izražanje proteina B-AcmA. Z analizo NaDS-PAGE smo v vzorcu prekonočne kulture dokazali prisotnosti B-AcmA in tako potrdili uspešnost njegovega izražaja v *E. coli*. V naslednjem koraku smo poskušali določiti optimalne pogoje rasti *E. coli* z vstavljenim plazmidom pET-28-B-AcmA, pri katerih bi pridobili največjo količino B-AcmA. Testirali smo 14 različnih pogojev, pri katerih smo spreminjali temperaturo, OD₆₀₀ pri indukciji, koncentracijo IPTG za indukcijo ter čas rasti *E. coli* po indukciji. Za optimalne pogoje gojenja *E. coli* z vstavljenim plazmidom pET-28-B-AcmA smo izbrali rast celic pri 37° C do OD₆₀₀=2, nato indukcija z 0,41 mM IPTG ter nadaljnja 16 urna rast pri 25 °C. Ugotovili smo, da se rekombinanten protein izraža v obliki inkluzijskih telesc pri vseh testiranih pogojih, kar je najverjetneje posledica uporabe močnega promotorja T7 (66). Ker se je torej B-AcmA izrazil v obliki inkluzijskih telesc, ki so agregati nepravilno zvitega proteina v bakterijski citoplazmi, smo za prvi korak izolacije izbrali njegovo raztapljanje v gvanidinijevem kloridu. Ta prepreči tvorbo intramolekularnih in intermolekularnih vezi v proteinu in povzroči tvorbo fleksibilne in neorganizirane proteinske strukture. Za gvanidinijev klorid je dokazana koncentracijska odvisnost vezave na proteine, kar pomeni, da je za raztapljanje določenega proteina

potrebno v raztopini doseči njegovo pravo koncentracijo, ki nato omogoča razvitje in raztapljanje proteina (77). S pripravo celičnega lizata s sonifikacijo smo sprostil inkluzijska telesca B-AcmA iz citoplazme *E. coli*, nato pa oborjeni lizat raztapljali v naraščajoči koncentraciji gvanidinijevega klorida (0 M, 1 M, 3 M, 6 M). Z analizo NaDS-PAGE posameznih frakcij raztapljanja smo pokazali, da se je B-AcmA raztopil v pufru za raztapljanje s 3 M gvanidinijevim kloridom. Poleg samega B-AcmA pa smo v frakciji pufra za raztapljanje s 3 M gvanidinijevim kloridom z NaDS-PAGE zaznali tudi celične nečistoče, ki smo jih v nadaljnjem koraku izolacije odstranili z afinitetno kromatografijo na nosilcu BD TALON in tako pridobili čisto frakcijo proteina B-AcmA. Med nadaljnjo izolacijo smo z metodo hitrega razredčevanja dosegli znižanje koncentracije gvanidinijevega klorida, s tem pa ponovno zvitje B-AcmA v nativno konformacijo. Nato smo z ultrafiltracijo vzorec pravilno zvitega B-AcmA še skoncentrirali in odstranili preostali gvanidinijev klorid, ter tako pridobili čisto frakcijo B-AcmA. Njegovo identiteto v vzorcu smo uspešno potrdili z določitvijo N-končnega AK-zaporedja z Edmanovo degradacijo in z detekcijo s specifičnimi protitelesi proti B-domeni po prenosu western. Tako smo potrdili, da smo res izolirali B-AcmA s funkcionalno B-domeno. B-AcmA smo nato uporabljali za testiranje vezave na bakterijske celice in GEM-delce MKB ter testiranje vpliva dodatka B-AcmA na rast bakterijskih celic v kulturi.

V procesu izolacije sta nam težave povzročala obarjanje in razgrajevanje B-AcmA. Z analizo NaDS-PAGE smo v vzorcih supernatantov in raztopljenih oborin detektirali proteinske fragmente z manjšo molekulsko maso od B-AcmA, ki so nakazovali razgradnjo B-AcmA. Z določitvijo N-končnega AK-zaporedja z Edmanovo degradacijo dveh proteinov z manjšo molekulsko maso smo potrdili, da gre res za fragmenta B-AcmA in da v vzorcu prihaja do razgradnje B-AcmA zaradi cepitve labilnih peptidnih vezi. Določili smo položaj nekaterih labilnih vezi v proteinu, ki se nahajajo predvsem v distančnikih med B-domeno in prvo ponovitvijo LysM ali v distančnikih med posameznimi ponovitvami LysM. Da bi se pri izvajanju poskusov z B-AcmA izognili njegovi razgradnji in obarjanju ter tako zagotovili konstantno koncentracijo B-AcmA (0,17 mg/mL) med testiranjem, smo izoliran protein alikvotirali (po 1 ml) v mikrocentrifugirke in jih zamrznili pri -20 °C. Pri nadaljnjem izvajanju poskusov smo jih odmrznili in vedno uporabili svež vzorec, ki smo mu pomerili A_{280} . Da bi se v prihodnjih poskusih izolacije in testiranja B-AcmA izognili težavam zaradi njegove razgradnje v vzorcu, bi bilo smiselno natančno določiti labilne vezi

v proteinu in z zamenjavo ustreznih AK v teh vezeh preprečiti razgradnjo. Pri tem procesu bi morali biti pozorni, da bi ohranili biološko aktivnost B-AcmA.

6.2 TESTIRANJE VEZAVE B-AcmA NA POVRŠINO MKB

Domena LysM je peptidoglikan vezavna domena N-acetil muramidaze (AcmA), ki je glavni avtolizin bakterije *L. lactis*. Omenjena domena se najverjetneje veže na N-acetilglukozamin in N-acetilmuraminsko kislino v peptidoglikanu, njeno vezavo pa ovirajo lipoteihojske kisline. Protein B-AcmA je sestavljena iz treh domen LysM iz AcmA, zato smo pričakovali nekovalentno vezavo B-AcmA na površino G⁺ bakterij, tako kot je to značilno za AcmA.

Poskusili smo dokazati in ovrednotiti njegovo vezavo na površino bakterijskih celic in GEM-delcev *L. lactis*. Vezavo B-AcmA smo določili posredno preko vezave protiteles proti B-domeni na B-AcmA, pritrjen na površino MKB in sicer smo merili količino odstranjenih protiteles v supernatantu vzorca, glede na supernatant negativne kontrole brez dodatka B-AcmA. Prednosti tovrstnega vrednotenja vezave B-AcmA so bile: nezahtevna izvedba reakcije in detekcije, nezahtevno rokovanje z vzorci in možnost spreminjanja parametrov testiranja, možnost kvantitativnega ovrednotenja rezultatov testiranja ter testiranje večjega števila vzorcev hkrati. Ob predpostavki, da se eno protitelo proti B-domeni veže na eno molekulo B-AcmA, smo iz količine na B-AcmA vezanih protiteles lahko sklepali na količino proteina, ki se je vezal na površino bakterijskih celic ali GEM-delcev. Tako smo potrdili uspešnost vezave B-AcmA tako na površino GEM-delcev *L. lactis*, kot tudi na površino samih bakterijskih celic *L. lactis*. Pri optični gostoti 5, ki je merilo za koncentracijo bakterijskih celic ali GEM-delcev, ter koncentraciji dodanega B-AcmA=0,017 mg/mL se je na protein, vezan na površino GEM-delcev, vezalo 0,3976 ng protiteles, na tistega, ki se je vezal na površino bakterijskih celic, pa 0,2735 ng protiteles. Obsežnejšo vezavo B-AcmA na GEM-delce lahko razložimo s specifičnimi lastnostmi le-teh. GEM-delce smo namreč pridobili iz bakterijskih celic *L. lactis* s kuhanjem v trikloroocetni kislini in spiranjem s PBS. S tem postopkom smo pridobili nežive bakterijske delce, ki jih sestavlja smo plast peptidoglikana. Ker vezavo B-AcmA na GEM-delce ne ovirajo lipoteihojske kisline, kot je to v primeru intaktnih bakterijskih celic, se lahko protein veže na GEM-delce v večji količini. To smo potrdili tudi z meritvami s pretočno citometrijo, kjer smo opazili kar 13 x večjo povprečno intenziteto fluorescence pri vezavi B-AcmA na GEM-delce.

Ovrednotili smo tudi vezavo B-AcmA na površino GEM-delcev pri različnih koncentracijah le-teh, dodanega B-AcmA in začetnih koncentracijah protiteles proti B-domeni. Pri optični gostoti GEM-delcev 5 in koncentraciji protiteles 7,2 ng/ml smo spreminjali koncentracijo dodanega B-AcmA od 0,0012 mg/mL do 0,1397 mg/mL in na ta način določili saturacijsko odvisnost vezave. Pri teh pogojih se je na površino GEM-delcev lahko vezalo največ 0,5861 ng protiteles. Najverjetnejša razlaga za tako vezavo B-AcmA je, da je na površini GEM-delcev omejeno število vezavnih mest za B-AcmA, ali pa da prihaja pri večjih koncentracijah B-AcmA do steričnih ovir pri njegovi vezavi.

Pri koncentraciji dodanega B-AcmA 0,03484 mg/mL in koncentraciji protiteles 7,2 ng/mL smo spreminjali optično gostoto GEM-delcev, in sicer od 0,1 do 10 ter določili saturacijsko odvisnost vezave protiteles. Ugotovili smo, da se je pri teh pogojih na GEM-delce lahko vezalo največ 0,4735 ng protiteles. Glede na ugotovljeno saturacijsko krivuljo smo plato dosegli približno pri vrednosti $OD_{600}=5$. Zato lahko sklepamo, da se je pri izbranih pogojih vezal ves funkcionalen B-AcmA ali pa da se je vzpostavilo ravnotežje med vezano in nevezano obliko proteina. S povečevanjem optične gostote GEM-delcev med 5 in 10 zato nismo uspeli doseči učinkovitejše vezava B-AcmA na površino.

Pri koncentraciji dodanega B-AcmA 0,03484 ng/ml in optični gostoti GEM-delcev 5, smo spreminjali koncentracijo dodanih protiteles, in sicer od 4,5 ng/mL do 90 ng/mL ter pri tem določili linearno odvisnost vezave od koncentracije protiteles. Vendar pa domnevamo, da je linearna odvisnost značilna le za nižje koncentracije protiteles. S povečevanjem njihove koncentracije ali z nižjo koncentracijo bodisi B-AcmA ali GEM-delcev bi najverjetneje tudi v tem poskusu dokazali saturacijsko odvisnost vezave. Linearno odvisnost vezave B-AcmA na površino lahko v začetnih točkah krivulje razberemo tudi iz grafov, ki prikazujeta odvisnost vezave B-AcmA od njegove koncentracije in od optične gostote GEM-delcev.

Potrdili smo tudi vezavo B-AcmA na bakterijske celice in GEM-delce različnih sevov rodu *Lactobacillus*. Med GEM-delci različnih sevov smo opazili majhne razlike v vezavi B-AcmA, saj se je na B-AcmA, vezan na njihove površine pri optični gostoti 3 in koncentraciji B-AcmA=0,0871 mg/mL, vezalo od 0,5087 ng do 0,6007 ng protiteles. Ta rezultat je pričakovan, saj so GEM-delce sestavljeni le iz peptidoglikana, katerega struktura je znotraj rodu podobna. Večje razlike v vezavi B-AcmA pa smo opazili pri testiranju njegove vezave na različne bakterijske celice sevov rodu *Lactobacillus*. Ker so bakterijske celice nedotaknjene, so zato prisotne večje razlike v površinskih značilnostih

med posameznimi sevi. Največja količina protiteles se je vezala na *Lb. paracasei* (povprečno 0,2698 ng), najmanjša pa na *Lb. reuteri* (povprečno 0,1628 ng). Vezavo B-AcmA na bakterijske celice različnih sevov iz rodu *Lactobacillus* smo primerjali z njegovo vezavo na *L. lactis* in pri tem ugotovili, da se na B-AcmA, vezan na *L. lactis*, veže največja količina protiteles (povprečno 0,3232 ng). Različen obseg vezave B-AcmA na površino različnih bakterijskih celic lahko razložimo z različno sestavo celičnih sten in površinskih značilnosti (proteini, teihojske kisline in drugo) posameznih sevov. Vezava se razlikuje glede na prisotnost ribitol teihojskih kislin ali glicerol teihojskih kislin, oziroma kombinacijo ali odsotnostjo obeh (90, 91). Različno vezavo B-AcmA na bakterijske celice različnih sevov iz rodu *Lactobacillus* smo potrdili tudi z meritvami vezave s pretočno citometrijo. Glede na dobljene rezultate lahko domnevamo, da je vezava LysM na površino bakterijskih celic vrstno specifična, kar je bilo že navedeno v literaturi (38, 42).

Celoten obseg dobljenih rezultatov vrednotenja vezave B-AcmA kaže na to, da je v primeru vezave rekombinantnega proteina preko domene LysM ustrežnejša uporaba GEM-delcev kot pa intaktnih bakterijskih celic, saj se je B-AcmA vezal na GEM-delce v večjih količinah, ker njegova vezava ni bila ovirana z lipoteihojskimi kislinami. GEM-delci pa imajo pred bakterijskimi celicami še naslednje prednosti: postopek njihove priprave je enostaven, prav tako je enostaven prenos načina izdelave v večji (industrijski) obseg (92); so izredno stabilni tudi pri sobni temperaturi (92); antigeni, predstavljeni na GEM-delcih, izzovejo močnejše imunske odzive, kot uporaba samega antigena, zato so uporabni kot adjuvantni (84), sami pa ne povzročijo imunskega odziva (84).

6.3 VREDNOTENJE VPLIVA DODATKA B-AcmA NA RAST BAKTERIJSKIH CELIC V KULTURI

AcmA je glavni avtolizin bakterije *L. lactis*. Odgovoren je za ločitev celic ter njihovo lizo v stacionarni fazi. AcmA spada med N-acetil muramidaze in je sestavljen iz N-končnega aktivnega dela in C-končne peptidoglikan vezavne domene, sestavljene iz treh domen LysM. Ker smo v bakterijski kulturi, v katero smo dodali B-AcmA, opazili tvorbo skupkov, nas je zanimalo, ali B-AcmA, ki prav tako vsebuje tri ponovitve LysM iz AcmA, vpliva na rast bakterijskih celic v kulturi in tovrstni vpliv skušali ovrednotiti z metodo merjenja hitrosti sedimentacije v celični kulturi in z merjenjem velikosti agregatov v celični suspenziji.

Primerjali smo hitrost sedimentacije bakterijskih celic *L. lactis* z vstavljenim plazmidom pSDLBA3b, v katerih smo izražanje B-AcmA inducirali z nizinom, bakterijskih celic *L.*

lactis, ki smo jim B-AcmA dodali v gojišče in bakterijskih celic *L. lactis* v kulturi, brez dodatka B-AcmA (normalna celična rast). Pri vseh vzorcih so bile meritve OD₆₀₀ v določeni časovni točki ponovljive, prav tako pa smo lahko izračunali nizke vrednosti standardnih deviacij, kar kaže na majhno razpršenost podatkov okrog povprečne vrednosti. Vrednosti koeficienta r^2 nad 0,9 opisujejo dobro linearnost v odvisnosti od časa. Najhitrejšo sedimentacijo smo določili v bakterijski kulturi celic *L. lactis* z vstavljenim plazmidom pSDLBA3b, pri katerih smo izražanje USP-B-AcmA inducirali z nizinom, saj je bil v tem primeru naklon sedimentacijske krivulje največji. Prav tako smo opazili hitrejšo sedimentacijo v bakterijski kulturi *L. lactis*, ki smo ji dodali B-AcmA, in sicer glede na hitrost sedimentacije v kulturi, ki je predstavljala normalno rast. S tako zastavljenim testiranjem smo dokazali, da tako USP-B-AcmA, ki ga celice izrazijo na svoji površini, kot B-AcmA, ki ga dodamo v gojišče, povzročita tvorbo bakterijskih skupkov in s tem vplivata na rast bakterijskih celic v kulturi.

Tvorbo bakterijskih skupkov v kulturi *L. lactis* z vstavljenim plazmidom pSDLBA3b, v katerih smo izražanje USP-B-AcmA inducirali z nizinom, smo dokazali tudi z merjenjem velikosti agregatov v celični suspenziji. V vzorcu kulture, ki je predstavljala normalno rast celic, je bilo največ delcev z velikostjo med 0,91 in 1,06 μm , kar pomeni, da so prevladovale posamezne celice *L. lactis*. V vzorcu kulture *L. lactis* s plazmidom pSDLBA3b pa smo določili dve populaciji, in sicer prvo z velikostjo delcev med 0,91 in 1,06 μm ter drugo z velikostjo delcev med 30,53 in 35,56 μm . To pomeni, da so bile v tej kulturi prisotne tako posamezne celice *L. lactis* kot tudi njihovi skupki. Z obema testoma smo potrdili, da dodatek B-AcmA vpliva na rast bakterijskih celic v kulturi. B-AcmA preko ponovitev LysM najverjetneje tekmuje z AcmA za vezavo na celično steno. Zaradi kompetitivne vezave B-AcmA se AcmA veže v manjši količini, zato je bila v stacionarni fazi ločitev celic ovirana in je prišlo do tvorbe skupkov.

V diplomskem delu smo B-domena uporabili kot modelni protein, s katerim smo potrdili vezavo rekombinantnega proteina na površino MKB in GEM-delcev. Ker pa B-domena tvori interakcije s konstantnimi področji protiteles vrste IgG bi jo, imobilizirano na površino intaktnih MKB ali GEM-delcev, lahko uporabili kot bioadsorbent v zaključnih procesih proizvodnje monoklonskih protiteles ali kot biosenzor. Z gensko manipulacijo B-domen lahko pridobimo tudi tako imenovana "afitelesa", ki imajo veliko afiniteto do različnih tarčnih proteinov. Afitelesa, imobilizirana na površini MKB ali GEM-delcev, bi lahko uporabili za lažanje kroničnih bolezni, kot je kronična vnetna črevesna bolezen.

7 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo:

- v sevju *E. coli* BL21(DE3) uspešno izrazili rekombinantni protein B-AcmA, sestavljen iz B-domene proteina A *Staphylococcus aureus*, treh ponovitev LysM in histidinskega repa;
- z raztapljanjem inkluzijskih teles v pufrih z naraščajočimi koncentracijami gvanidinijevega klorida, z afinitetno kromatografijo na nosilcu BD TALON ter hitrim razredčevanjem in ultrafiltracijo pridobili čist rekombinanten protein B-AcmA;
- z metodama določanja N-končnega AK-zaporedja in detekcije s specifičnimi protitelesi proti B-domeni po prenosu western, potrdili identiteto proteina B-AcmA v končni frakciji po njegovi izolaciji;
- z metodo encimsko-immunskega testiranja in s pretočno citometrijo dokazali vezavo B-AcmA preko domene LysM na bakterijske celice in GEM-delce *L. lactis* ter različnih sevov iz rodu *Lactobacillus*;
- določili močnejšo vezavo B-AcmA na GEM-delce v primerjavi z intaktnimi bakterijskimi celicami in s tem potrdili GEM-delce kot primernejši dostavni sistem za B-AcmA;
- s saturacijsko krivuljo opisali vezavo B-AcmA v odvisnosti od koncentracije dodanega B-AcmA ali od koncentracije GEM-delcev;
- opisali vezavo B-AcmA v odvisnosti od koncentracije protiteles proti B-domeni kot linearno, pri čemer pa smo predvideli saturacijsko odvisnost pri višjih koncentracijah;
- določili različne afinitete vezave B-AcmA na bakterijske celice različnih sevov rodu *Lactobacillus* in bakterijske celice *L. lactis* ter s tem nakazali, da je vezava B-AcmA preko domene LysM vrstno specifična;
- potrdili vpliv B-AcmA na rast bakterijskih celic v kulturah, ki so tvorile B-AcmA bodisi same ali pa smo ga dodali v gojišče. V obeh vrstah kultur smo z metodama merjenja hitrosti sedimentacije bakterijskih celic v gojišču in velikosti celičnih agregatov v celičnih suspenziji, dokazali združevanje bakterijskih celic v skupke.

8 VIRI

1. Stahl S, Samuelson P, Gunneriusson E, Nygren P-A. Display of proteins on bacteria. *Journal of Biotechnology* 2002; 96: 129-154.
2. Jose J. Autodisplay: efficient bacterial surface display of recombinant proteins. *Applied microbiology and biotechnology* 2006; 69: 607-614.
3. Lee SY, Choi JH, Xu Z. Microbial cell-surface display. *Trends in biotechnology* 2003; 21: 45-52.
4. Rutherford N, Mourez M. Surface display of proteins by Gram-negative bacterial autotransporters. *Microbial Cell Factories* 2006; 15: 1-15.
5. Wittrup KD. Protein engineering by cell-surface display. *Current Opinion in Biotechnology* 2001; 12: 395-399.
6. Georgiou G, Stathopoulos C, Daugherty P, Nayak A, Iverson B, Curtiss R 3rd. Display of heterologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nature Biotechnology* 1997; 15: 29-33.
7. Benhar I. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnology advances* 2001 Feb; 19 : 1-33.
8. Chen W, Georgiou G. Cell-Surface display of heterologous proteins: From high-throughput screening to environmental applications. *Biotechnology and bioengineering* 2002; 79: 496-503.
9. Ståhl S, Uhlén M. Bacterial surface display: trends and progress. *Trends in biotechnology* 1997; 15:185-192.
10. Gron H, Hyde-DeRuyscher R. Peptides as tools in drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* 2000; 3: 636-645.
11. Ton-That H, Marraffini AL, Schneewind O. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1694: 269-278.
12. Desvaux M, Dumas E, Chafsey I HM. Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 256: 1-15.
13. Navarre WW, Schneewind O. Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope. *Microbiology and molecular biology reviews*, 1999; 63: 174–229.
14. Berlec A, Štrukelj B. Novel Applications of Recombinant Lactic Acid Bacteria in Therapy and in Metabolic Engineering. *Recent Patents on Biotechnology* 2009; 3: 1-11.
15. Khalid K. An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences* 2011; 1: 1-13.
16. König H, Fröhlich J. Lactic Acid Bacteria. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* 2009; 1: 3-29.
17. Berlec A, Štrukelj B. Gensko spremenjene mlečnokislinske bakterije kot dostavni sistemi za biološka zdravila. *Farmacevtski vestnik* 2008; 59: 115-120.
18. Todar's online textbook of bacteriology: Lactic Acid Bacteria: <http://textbookofbacteriology.net/lactics.html> (20.3.2012)
19. Brashears MM, Amezquita A, Jaroni D. Lactic acid bacteria and their uses in animal feeding to improve food safety. *Advances in Food and Nutrition Research* 2005; 50
20. Gänzle MG, Vermeulen N, Vogel RF. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food microbiology* 2007; 24: 128-138.

21. Caplice E, Fitzgerald GF. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology* 1999; 50: 131-149.
22. Dalié DKD, Deschamps AM, Richard-Forget F. Lactic acid bacteria – Potential for control of mould growth and mycotoxins. *Food Control* 2010; 21: 370-380.
23. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins : safe , natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* 2001;
24. Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P. Bacteriocins : Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 2006; 16: 1058-1071.
25. Héchard Y, Sahl HG. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* 2002; 84: 545-557.
26. El-Ghaish S, Hadji-Sfaxi I, El Mecherfi KE, Bazukyan I, Choiset Y, Siohy M, Popov YG, Kuliev AA, Mozzi F, Haertl T. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends in Food Science & Technology* 2011; 22: 509-5016
27. Leroy F, De Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 2004; 15: 67-78.
28. Heller KJ. Probiotic bacteria in fermented foods : product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition* 2001; 73: 374-379.
29. Asmahan AA. Beneficial Role of Lactic Acid Bacteria in Food Preservation and Human Health. *Research Journal of Microbiology* 2010; 5: 1213-1221.
30. Walker WA, Goulet O, Morelli L, Antoine J-M. Progress in the science of probiotics: from cellular microbiology and applied immunology to clinical nutrition. *European Journal of Nutrition* 2006; 45: 1-18.
31. Tamayo C. Clinical research on probiotics: the interface between science and regulation. *Science and Regulations of Probiotics* 2008; 4: 101-104
32. Musikasang H, Tani A, H-kittikun A, Maneerat S. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from chicken gastrointestinal digestive tract. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2009; 25: 1337-1345.
33. de Vrese M., Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics and synbiotics-approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2001; 73: 361-364.
34. Leenhouts K, Buist G, Kok J. Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999; 76: 367-76.
35. Novick RP. Sortase: the surface protein anchoring transpeptidase and the LPXTG motif. *Trends in microbiology* 2000; 8: 148-151.
36. Dramsi S, Magnet S, Davison S, Arthur M. Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS microbiology reviews* 2008; 32: 307-320.
37. Marraffini LA, Dedent AC, Schneewind O. Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 2006; 70: 192-221.
38. Andre G, Leenhouts K, Hols P, Dufrière YF. Detection and localization of single LysM-peptidoglycan interactions. *Journal of bacteriology* 2008; 190: 7079-7086.
39. Gasson MJ. Lytic systems in lactic acid bacteria and their bacteriophages. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996; 70: 147-59.

40. Meyrand M, Boughammoura A, Courtin P, Mézange C, Guillot A, Chapot-Chartier M-P. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylation decreases autolysis in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 2007; 153: 3275-85.
41. Steen A, Buist G, Horsburgh GJ, Venema G, Kuipers OP, Foster SJ, Kok J. AcmA of *Lactococcus lactis* is an N-acetylglucosaminidase with an optimal number of LysM domains for proper functioning. *The FEBS journal* 2005; 272: 2854-2868.
42. Buist G, Steen A, Kok J, Kuipers OP. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Molecular Microbiology* 2008; 68: 838-847.
43. Steen A, Buist G, Leenhouts KJ, El Khattabi M, Grijpstra F, Zomer AL, Venema G, Kuipers OP, Kok J. Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278: 23874-23881.
47. Kleerebezem M, Hols P, Bernard E, Rolain T, Zhou M, Roland J, Bron PA. The extracellular biology of the lactobacilli. *Federation of European Microbiological Societies* 2010; 34: 199-230
48. Hu S, Kong J, Sun Z, Han L, Kong W, Yang P. Heterologous protein display on the cell surface of lactic acid bacteria mediated by the s-layer protein. *Microbial cell factories* 2011; 10: 86-99.
49. Mesnage S, Fontaine T, Mignot T, Delepierre M, Mock M, Fouet A. Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *The EMBO journal* 2000; 19: 4473-4484.
50. Berlec A, Ravnikar M, Štrukelj B. Lactic acid bacteria as oral delivery systems for biomolecules.; *Die Pharmazie (sprejet v objavo)*
51. Antosova Z, Mackova M, Kral V, Macek T. Therapeutic application of peptides and proteins: parenteral forever? *Trends in biotechnology* 2009; 27: 628-35.
52. Tarahomjoo S. Development of Vaccine Delivery Vehicles Based on Lactic Acid Bacteria. *Molecular Biotechnology* 2012; 51: 183-199
53. Santos D, Santiago M, Azevedo PD, Chatel J-marc, Langella P, Azevedo V, Miyoshi A. *Lactococcus lactis* as a live vector : Heterologous protein production and DNA delivery systems. *Protein Expression and Purification* 2011; 79: 165-175.
54. Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genetics and Molecular Research* 2003; 2: 102-111.
55. Bermudez-humaran LG, Silvia I, Francois L, Chatel J-marc, Langella P. Development of Mucosal Vaccines Based on Lactic Acid Bacteria. *Prebiotics and Probiotics Science and Tehnology* 2009; 1099-1122.
56. Medina E, Guzmán CA Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine* 2001; 19: 1573-1580.
57. Daniel C, Roussel Y, Kleerebezem M, Pot B. Recombinant lactic acid bacteria as mucosal biotherapeutic agents. *Trends in biotechnology* 2011; 29: 499-508.
58. Mercenier a, Müller-Alouf H, Grangette C. Lactic acid bacteria as live vaccines. *Current issues in molecular biology* 2000; 2: 17-25.
59. Leblanc JG, Carmen S, Lima FA, Turk MZ, Miyoshi A. Prospective Uses of Genetically Engineered Lactic Acid Bacteria for the Prevention of Inflammatory Bowel Diseases. 2007; *Current Concepts in Colonic Disorders*; 223-238
60. Renault P. Genetically modified lactic acid bacteria : applications to food or health and risk assessment. *Biochimie* 2002; 84: 1073-1087.

61. Novagen. pET System Manual. In: 10th edition. 2003
62. Kuipers OP, de Ruyter PGG., Kleerebezem M, de Vos WM. Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology* 1998; 64: 15-21.
63. Mierau I, Kleerebezem M. 10 years of the nisin-controlled gene expression system (NICE) in *Lactococcus lactis*. *Applied microbiology and biotechnology* 2005; 68: 705-717.
64. Vos MD. Gene expression systems for lactic acid bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 1999; 2: 289-295.
65. Promega. Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System. Manual. 2009
66. Kos J, Štrukelj B. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. 2007: 69-184
67. Froger A, Hall EJ. Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. *Journal of Visualized Experiments* 2007; 6: 253.
68. Weaver JC, Chizmadzhev YA. Theory of electroporation. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1996; 41: 135-160.
69. Marjanovič I, Miklavčič D. Elektroporacija. Močno orodje, uporabno v biologiji, biotehnologiji in medicini. *Življenje in tehnika* 2011; 7/8: 34-43.
70. Markrides SC. Strategies for Achieving High-Level Expression of Genes in *Escherichia coli*. *Microbiological Reviews* 1996; 72: 512-538.
71. Garfin D. Gel Electrophoresis of Proteins. *Essential Cell Biology* 2003; 1: 197-268.
72. Simpson DG. Electrophoresis and chromatography of wheat proteins : available methods and procedures for statistical evaluation of the data. *Journal of chromatography* 1992; 624: 53-80.
73. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting. *Methods* 2006; 38: 283-293
74. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 1992; 24: 145-149.
75. BD TALON™ Metal Affinity Resins User Manual. BD Biosciences Clontech
76. Clark EDB. Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 1998; 9: 157-163.
77. Tsumoto K, Ejima D, Kumagai I, Arakawa T. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification* 2003; 28: 1-8.
78. Vallejo LF, Rinas U. Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial cell factories* 2004; 3: 1-12.
79. Jungbauer A, Kaar W. Current status of technical protein refolding. *Journal of Biotechnology* 2007; 128: 587-596.
80. Setsuko K. Western Blotting/Edman Sequencing using PVDF Membrane. *Methods in Molecular Biology* 2009; 536: 163-171.
81. Boyer R. Temelji biokemije. 2005.
82. Saluja V, Amorij JP, van Roosmalen ML, Leenhouts K, Huckriede A, Hinrichs WLJ, Frijlink HW. Intranasal delivery of influenza subunit vaccine formulated with GEM particles as an adjuvant. *The AAPS journal* 2010; 12: 109-116

-
83. Saluja V, Visser MR, van Roosmalen ML, Leenhouts K, Huckriede a, Hinrichs WLJ, Frijlink HW. Gastro-intestinal delivery of influenza subunit vaccine formulation adjuvanted with Gram-positive enhancer matrix (GEM) particles. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 2010; 76: 470-474.
 84. van Roosmalen ML, Kanninga R, El Khattabi M, Neef J, Audouy S, Bosma T, Kuipers A, Post E, Steen A, Kok J, Buist G, Kuipers OP, Robillard G, Leenhouts K. Mucosal vaccine delivery of antigens tightly bound to an adjuvant particle made from food-grade bacteria. *Methods* 2006; 38: 144-149.
 85. Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clinical chemistry* 2000; 46: 1221-1229.
 86. DB Biosciences. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide
 87. Ormerod M. Flow Cytometry: a basic introduction. 2008: <http://flowbook.denovosoftware.com/> (4.5.2012)
 88. Díaz M, Herrero M, García L a., Quirós C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 2010; 48: 385-407
 89. Kokkinos A, Fasseas C, Eliopoulos E, Kalantzopoulos G. Cell size of various lactic acid bacteria as determined by scanning electron microscope and image analysis. *Le Lait* 1998; 78: 491-500.
 90. Ikawa M, Snell E. Cell Wall Composition of Lactic Acid Bacteria. *The Journal of biological chemistry* 1960;235:1376-1382.
 91. Baddiley J, Davison L. The occurrence and Location of Teichoic acids in Lactobacilli. *Journal of General Microbiology* 1961;24:295-299.
 92. Saluja V, Visser MR, Ter Veer W, van Roosmalen ML, Leenhouts K, Hinrichs WLJ, Huckriede a, Frijlink HW. Influenza antigen-sparing by immune stimulation with Gram-positive enhancer matrix (GEM) particles. *Vaccine* 2010; 28: 7963-7969

9 PRILOGE

Priloga 1: Nukleotidno zaporedje gena za protein B-AcmA, izraženega v *E. coli*

TCCATGGCTGATAACAAATTCAACAAAGAACAACAAAATGCTTTCTATGAAATTTTACATTACCT
AACTTAAATGAAGAGCAACGCAATGGTTTCATCCAAAGCTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGC
TAACCTTTTAGCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCACAAGCACCAAAAAGAATTCTCTGGTGGCTC
GACAACCACAATTACGAATAATAATTCTGGAACCAATAGCAGTTCAACTACTTATACCGTCAAATC
TGGTGATACTCTTTGGGGAATCTCACAAAGATATGGAATTAGTGTGCTCAAATTCAAAGTGCGAA
TAATCTTAAAAGTACCATTATCTACATTGGTCAAAAACCTTGTACTGACAGGTTGAGTTCTTCTACA
AATTCAGGTGGTTCAAACAATTCCGCAAGCACTACTCCAACCACTTCTGTGACACCTGCAAAAACCA
ACTTCACAAACAACCTGTTAAGGTTAAATCCGGAGATACCCTTTGGGCGCTATCAGTAAAATATAAA
ACTAGTATTGCTCAATTGAAAAGTTGGAATCATTAAAGTTCAGATACCATTTATATTGGTCAAATC
TTATTGTTTACAATCTGCTGCTGCTTCAAATCCTTCGACAGGTTGAGGCTCAACTGCTACCAATAA
CTCAAACCTCGACTTCTTCTAACTCAAATGCCTCAATTCATAAGGTCGTTAAAGGAGATACTCTCTGG
GGACTTTCGCAAAAATCTGGCAGCCCAATTGCTTCAATCAAGGCTTGAATCATTATCTAGCGAT
ACTATTTTAATTGGTCAGTATCTACGAATAAACTCGAGCACCACCACCACCACCACTGA

Priloga 2: Aminokislinsko zaporedje proteina B-AcmA, izraženega v *E. coli*

MADNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNGFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ
APKEFSGGSTTTITNNSGTSNSSSTTYTVKSGDTLWGISQRYGISVAQIQSANNLKSTII
YIGQKL TGSASSTNSGGSNNSASTPPTTSVTPAKPTSQTTVKVKS GDTLWALS VKYKT
SIAQLKSWNHLSSVLDTIYIGQNLIVS QSAAASN PSTGSGSTA TNN SNSTSSNSNASIHK
VVKGDTLWGLSQKSGSPIASIKAWNHLSSDTILIGQYLRIKLEHHHHHH

Legenda:

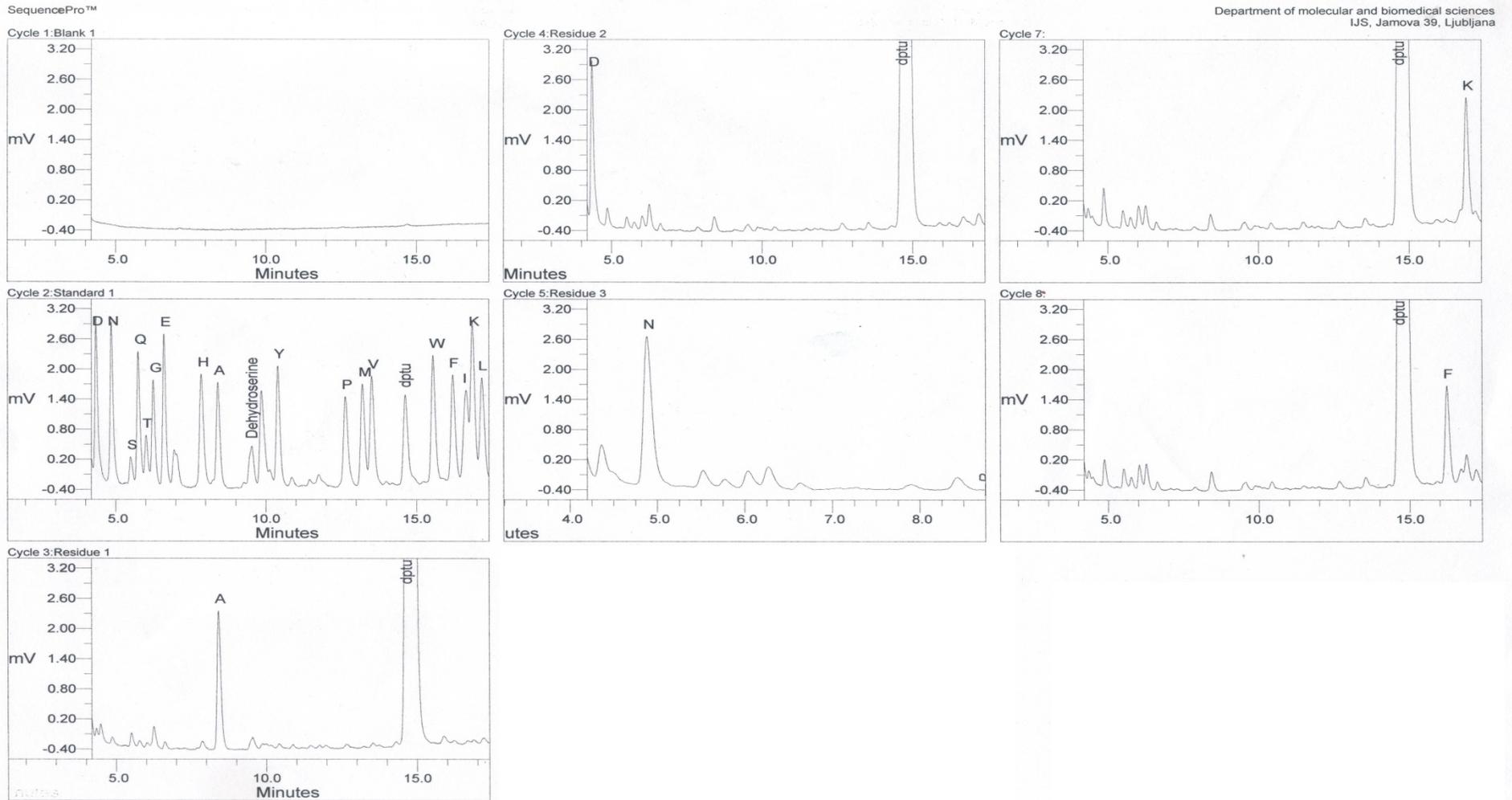
	B-domena
	ponovitve LysM
	histidinski rep
	N-končna zaporedja razgradnih produktov, določena z metodo Edmanove degradacije

Priloga 3: Preglednica rasti *E. coli* pri različnih testnih pogojih

meritve/ št. pogojev	Pogoji					1		2		3		4		5		6		7		Končna točka	
	vstavljen plazmid	T(°C)	OD ₆₀₀ indukcije	c IPTG (mM)	čas rasti po indukciji (h)	rast(h)	OD ₆₀₀	rast (h)	OD ₆₀₀												
1	pET-28+B-AcmA	37°C	0,5	1	3	1:00	0,100	1:35	0,248	2:00	0,388	2:15	0,508							5:23	1,728
2	pET-28+B-AcmA	37°C	0,5	1	6			1:35	0,279	2:00	0,459	2:15	0,636							5:23	2,172
3	pET-28+B-AcmA	37°C	1,0	0,4	3					2:00	0,596									5:40	3,628
4	pET-28+B-AcmA	37°C	1,0	0,4	6							2:15	0,692	2:40	0,996					8:40	3,640
5	pET-28+B-AcmA	37°C	1,0	1	3															5:40	4,128
6	pET-28+B-AcmA	37°C	1,0	1	6			1:35	0,316											8:40	4,000
7	pET-28+B-AcmA	37°C	1,5	1	3									2:40	1,000					5:40	3,824
8	pET-28+B-AcmA	37°C	1,5	1	6	1:00	0,120							2:40	1,408					8:40	3,104
9	prazen pET-28	37°C	1,0	1	3	1:00	0,140													5:40	2,828
10	pET-28+B-AcmA	37°C	2,0	0,4	čez noč na 25°C									4:04	0,288	5:11	1,452	5:41	1,824	23:10	6,404
11	prazen pET-28	37°C	2,0	1	čez noč na 25°C											5:11	1,452	5:41	1,812	23:10	7,800
12	pET-28+B-AcmA	25°C	1,0	1	3			3:10	0,244			4:30	1,160							7:30	2,524
13	pET-28+B-AcmA	25°C	0,5	1	3	2:15	0,112	3:10	0,152	4:04	0,368	4:30	0,680							7:30	2,416
14	pET-28+B-AcmA	25°C	1,0	1	3					4:04	0,464			5:10	0,920					8:10	2,520

Legenda:  -čas in OD₆₀₀ ob indukciji z nizinom

Priloga 4: Določanje N-končnega AK-zaporedja z Edmanovo degradacijo v vzorcu št. 1



Priloga 5: Rezultati testa ELISA in vrednotenje vezave B-Acma pri različnih koncentracijah B-Acma na površino GEM-delcev *L. lactis* in bakterijskih celic *L. lactis*

	pogoji testiranja			meritve			izračun					
vzorec	OD ₆₀₀ celic	c proteina (mg/mL)	c protiteles (ng/mL)	1	2	3	povprečna vrednost	(Ap.vz)/(Ap.n.k)	1- (Ap.vz)/(Ap.n.k)	Cv.ab (ng/mL)	mv.ab (ng)	SD
1	5	0	7,2	0,8719	0,9500	0,8721	0,8980	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0180
2	5	0,01742	7,2	0,7357	0,7222	0,7244	0,7274	0,8101	0,1899	1,3676	0,2735	0,0105
3	5	0,001742	7,2	0,8342	0,7942	0,8418	0,8234	0,9169	0,0831	0,5981	0,1196	0,0141
vzorec	OD ₆₀₀ GEM- delcev	c proteina (mg/mL)	c protiteles (ng/mL)	1	2	3	povprečna vrednost	(Ap.vz)/(Ap.n.k)	1- (Ap.vz)/(Ap.n.k)	Cv.ab (ng/mL)	mv.ab (ng)	SD
1	5	0	7,2	1,8164	1,8246	1,8867	1,8426	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0154
2	5	0,01742	7,2	1,2978	1,3894	1,3658	1,3510	0,7239	0,2761	1,9879	0,3976	0,0172
3	5	0,001742	7,2	1,7793	1,6728	1,7457	1,7326	0,9253	0,0747	0,5381	0,1076	0,0186

Priloga 6: Vrednotenje vezave protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površini GEM-delcev *L. lactis*, v odvisnosti od koncentracije B-AcmA

vzorec	pogoji testiranja			meritve			izračun						
	OD ₆₀₀ GEM- delcev	c proteina (mg/mL)	redčitev protiteles	1	2	3	povprečna vrednost	SD	(Ap.vz)/(Ap.n.k)	1- (Ap.vz)/(Ap.n.k)	Cv.ab (ng/mL)	mv.ab (ng)	SD
1	5	0	7,2	1,8164	1,8246	1,8867	1,8426	0,0384	1,0000	0,0000	0	0	0,003075
2	5	0,0871	7,2	1,2542	1,1408	1,1862	1,1937	0,0571	0,6287	0,3713	2,673239	0,5346478	0,003821
3	5	0,0174	7,2	1,2978	1,3894	1,3658	1,3510	0,0476	0,7239	0,2761	1,9878518	0,3975704	0,00344
4	5	0,0087	7,2	1,4565	1,4943	1,5070	1,4859	0,0263	0,7987	0,2013	1,4490064	0,2898013	0,002588
5	5	0,0035	7,2	1,7851	1,6439	1,7668	1,7319	0,0768	0,9364	0,0636	0,4575608	0,0915122	0,004609
6	5	0,0017	7,2	1,7793	1,6728	1,7457	1,7326	0,0544	0,9253	0,0747	0,5380825	0,1076165	0,003715
7	5	0,0012	7,2	1,7840	1,8212	1,6690	1,7581	0,0793	0,8846	0,1154	0,8307839	0,1661568	0,004711

vzorec	pogoji testiranja			meritve			izračun						
	OD ₆₀₀ GEM- delcev	c proteina (mg/mL)	redčitev protiteles	1	2	3	povprečna vrednost	SD	(Ap.vz)/(Ap.n.k)	1- (Ap.vz)/(Ap.n.k)	Cv.ab (ng/mL)	mv.ab (ng)	SD
1	5	0	7,2	1,5922	1,6909	1,6621	1,6484	0,0508	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,00406
2	5	0,1394	7,2	1,0502	1,0121	0,9198	0,9940	0,0671	0,6030	0,3970	2,8582	0,5716	0,004712
3	5	0,1045	7,2	1,0501	1,0055	1,0063	1,0206	0,0255	0,6192	0,3808	2,7420	0,5484	0,003051
5	5	0,0697	7,2	1,0481	1,0765	1,0669	1,0638	0,0144	0,6454	0,3546	2,5533	0,5107	0,002608
6	5	0,0523	7,2	1,1236	1,1241	1,1268	1,1248	0,0017	0,6824	0,3176	2,2869	0,4574	0,002099
7	5	0,0348	7,2	1,1403	1,1174	1,1401	1,1326	0,0132	0,6871	0,3129	2,2529	0,4506	0,002557

Priloga 7: Vrednotenje vezave protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površini GEM-delcev *L. lactis*, v odvisnosti od koncentracije GEM-delcev

vzorec	pogoji testiranja			meritve			izračun						
	OD ₆₀₀ GEM- delcev	c proteina (mg/mL)	koncentracija protiteles (ng/mL)	A1	A2	A3	povprečna vrednost	SD	(Ap.vz)/ (Ap.n.k)	1- (Ap.vz)/(Ap.n.k)	Cv.ab (ng/mL)	mv.ab (ng)	SD
1	10	0	7,2	1,2075	1,2292	1,1172	1,1846	0,0594	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0238
	10	0,03484	7,2	0,8425	0,8247	0,7677	0,8116	0,0391	0,6851	0,3149	2,2670	0,4534	0,0197
2	5	0	7,2	1,0724	1,2022	1,1695	1,1480	0,0675	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0270
	5	0,03484	7,2	0,7952	0,8004	0,7742	0,7899	0,0139	0,6881	0,3119	2,2459	0,4492	0,0163
3	2,5	0	7,2	1,2154	1,2283	1,1686	1,2041	0,0314	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0126
	2,5	0,03484	7,2	0,8075	0,7946	0,8044	0,8022	0,0067	0,6662	0,3338	2,4034	0,4807	0,0076
4	1	0	7,2	1,2375	1,1932	1,2027	1,2111	0,0233	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0093
	1	0,03484	7,2	0,8096	0,8016	0,7942	0,8018	0,0077	0,6620	0,3380	2,4334	0,4867	0,0062
5	0,5	0	7,2	1,3581	1,2923	1,2503	1,3002	0,0543	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0217
	0,5	0,03484	7,2	0,9456	0,9393	0,956	0,9470	0,0084	0,7283	0,2717	1,9562	0,3912	0,0126
6	0,33	0	7,2	1,2984	1,3074	1,3529	1,3196	0,0292	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0117
	0,33	0,03484	7,2	0,907	1,01	1,0021	0,9730	0,0573	0,7374	0,2626	1,8908	0,3782	0,0173
7	0,25	0	7,2	1,3131	1,3444	1,3291	1,3289	0,0157	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0063
	0,25	0,03484	7,2	0,9959	0,9877	0,9734	0,9857	0,0114	0,7417	0,2583	1,8595	0,3719	0,0054
8	0,1	0	7,2	1,2888	1,3265	1,3967	1,3373	0,0548	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0219
	0,1	0,03484	7,2	1,0096	1,1054	1,1094	1,0748	0,0565	0,8037	0,1963	1,4134	0,2827	0,0223

Priloga 8: Vrednotenje vezave protiteles proti B-domeni na B-AcmA, vezan na površini GEM-delcev *L. lactis*, v odvisnosti od začetne koncentracije protiteles

vzorec	pogoji testiranja			meritve			izračun						
	OD ₆₀₀ GEM- delcev	c proteina (mg/mL)	koncentracija protiteles (ng/mL)	A1	A2	A3	povprečna vrednost	SD	(Ap.vz)/ (Ap.n.k)	1- (Ap.vz)/(Ap.n.k)	Cv.ab (ng/mL)	mv.ab (ng)	SD
1	5	0,03484	90	0,6552	0,6769	0,6851	0,6724	0,0158	1	0	0	0	0,0062
	5	0,03484	90	0,3999	0,3763	0,3778	0,3847	0,0132	0,5721	0,4279	38,5128	7,7025	0,0057
2	5	0,03484	36	0,5181	0,5097	0,6885	0,5721	0,1009	1	0	0	0	0,0404
	5	0,03484	36	0,3515	0,2561	0,4417	0,3498	0,0928	0,6114	0,3886	13,9906	2,7981	0,0387
3	5	0,03484	18	1,7834	1,731	1,8631	1,7925	0,0665	1	0	0	0	0,0266
	5	0,03484	18	1,1062	1,1003	1,1935	1,1333	0,0522	0,6323	0,3677	6,6192	1,3238	0,0237
4	5	0,03484	12	1,696	1,6972	1,7788	1,724	0,0475	1	0	0	0	0,0189
	5	0,03484	12	1,115	1,0868	1,1475	1,1164	0,0304	0,6476	0,3524	4,2290	0,8458	0,0156
5	5	0,03484	9	1,5543	1,5867	1,6593	1,6001	0,0538	1	0	0	0	0,0215
	5	0,03484	9	1,039	1,021	1,0865	1,0488	0,0339	0,6555	0,3445	3,1007	0,6201	0,0175
6	5	0,03484	7,2	1,354	1,5893	1,6965	1,5466	0,1752	1	0	0	0	0,0701
	5	0,03484	7,2	1,0728	1,0464	1,0988	1,0727	0,0262	0,6936	0,3064	2,2063	0,4412	0,0072
7	5	0,03484	6	0,5073	0,504	0,4889	0,5000	0,0098	1	0	0	0	0,0039
	5	0,03484	6	0,4446	0,4398	0,3414	0,4086	0,0582	0,8170	0,1829	1,0975	0,2195	0,0136
8	5	0,03484	4,5	0,3937	0,4277	0,3916	0,4043	0,0203	1	0	0	0	0,0081
	5	0,03484	4,5	0,3585	0,3684	0,3654	0,3641	0,0051	0,9004	0,0995	0,4478	0,0900	0,0051

Priloga 9: Rezultati testa ELISA in vrednotenje B-AcmA na različne GEM-delce laktobacilov in GEM-delce *L. lactis*

vzorec	pogoji testiranja			meritve		izračun						
vzorec	OD ₆₀₀ GEM- delcev	c proteina (mg/mL)	Cab (ng/mL)	A1	A2	povprečna vrednost	SD	(Ap.vz)/(Ap.n.k)	1- (Ap.vz)/(Ap.n.k)	Cv.ab (ng/mL)	mv.ab (ng)	SD
<i>Lb. paracasei</i>	5	0	7,2	1,5564	1,6073	1,5818	0,0360	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0144
<i>Lb. paracasei</i>	5	0,0871	7,2	0,9279	1,0004	0,9641	0,0513	0,6095	0,3905	2,8115	0,5623	0,0175
<i>Lb. casei</i>	5	0	7,2	1,5950	1,6540	1,6245	0,0417	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0167
<i>Lb. casei</i>	5	0,0871	7,2	0,9753	1,0008	0,9881	0,0180	0,6082	0,3918	2,8208	0,5642	0,0072
<i>Lb. gasseri</i>	5	0	7,2	1,6419	1,7138	1,6778	0,0508	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0203
<i>Lb. gasseri</i>	5	0,0871	7,2	0,9449	1,0110	0,9780	0,0467	0,5829	0,4171	3,0034	0,6007	0,0195
<i>Lb. reuteri</i>	5	0	7,2	1,6668	1,6340	1,6504	0,0232	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0093
<i>Lb. reuteri</i>	5	0,0871	7,2	0,9640	1,0186	0,9913	0,0386	0,6006	0,3994	2,8754	0,5751	0,0124
<i>Lb. plantarum</i>	5	0	7,2	1,6052	1,5888	1,5970	0,0116	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0046
<i>Lb. plantarum</i>	5	0,0871	7,2	1,0148	0,9068	0,9608	0,0764	0,6016	0,3984	2,8683	0,5737	0,0176
<i>Lb. rhamonsus</i>	5	0	7,2	1,5741	1,6096	1,5919	0,0251	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0100
<i>Lb. rhamonsus</i>	5	0,0871	7,2	1,0165	1,0426	1,0296	0,0185	0,6468	0,3532	2,5433	0,5087	0,0087
<i>L. lactis</i> pNZ8148	5	0	7,2	1,5980	1,6623	1,6302	0,0455	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0182
<i>L. lactis</i> pNZ8148	5	0,0871	7,2	1,0245	1,0246	1,0246	0,0001	0,6285	0,3715	2,6748	0,5350	0,0091

Priloga 10: Rezultati testa ELISA in vrednotenje vezave rekombinantnega proteina na različne bakterijske seve (poskus št. 1 in št. 2)

Poskus št. 1	pogoji testiranja			meritve		izračun						
Vzorec	OD ₆₀₀ GEM- delcev	c proteina (mg/mL)	c protiteles (ng/mL)	A1	A2	povprečna vrednost	SD	(Ap.vz)/ (Ap.n.k)	1- (Ap.vz)/(Ap. n.k)	Cv.ab (ng/mL)	mv.ab (ng)	SD
<i>Lb. paracasei</i>	5	0	7,2	1,5218	1,4754	1,4986	0,0328	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0656
	5	0,108	7,2	1,2252	1,2281	1,2266	0,0021	0,8185	0,1815	1,3066	0,2613	0,0349
<i>Lb. casei</i>	5	0	7,2	1,5528	1,5483	1,5505	0,0032	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0064
	5	0,108	7,2	1,3477	1,2642	1,3059	0,0590	0,8422	0,1578	1,1358	0,2272	0,0622
<i>Lb. gasseri</i>	5	0	7,2	1,5562	1,4766	1,5164	0,0563	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1126
	5	0,108	7,2	1,3097	1,3309	1,3203	0,0150	0,8707	0,1293	0,9311	0,1862	0,0713
<i>Lb. reuteri</i>	5	0	7,2	1,4590	1,4377	1,4484	0,0151	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0301
	5	0,108	7,2	1,3090	1,2761	1,2926	0,0233	0,8924	0,1076	0,7745	0,1549	0,0383
<i>Lb. plantarum</i>	5	0	7,2	1,5697	1,5397	1,5547	0,0212	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0424
	5	0,108	7,2	1,3983	1,3441	1,3712	0,0383	0,8820	0,1180	0,8498	0,1670	0,0595
<i>Lb. rhamnosus</i>	5	0	7,2	1,4944	1,5419	1,5182	0,0336	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0672
	5	0,108	7,2	1,3039	1,2914	1,2976	0,0088	0,8548	0,1452	1,0457	0,2091	0,0424
<i>L. lactis</i> pNZ8148	5	0	7,2	1,4479	1,4404	1,4442	0,0053	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0106
	5	0,108	7,2	1,1333	1,1337	1,1335	0,0003	0,7849	0,2151	1,5488	0,3098	0,0056

Poskus št. 2	pogoji testiranja			meritve		izračun						
Vzorec	OD ₆₀₀ GEM- delcev	c proteina (mg/mL)	c protiteles (ng/mL)	A ₁	A ₂	povprečna vrednost	SD	(Ap.vz)/(Ap.n.k)	1- (Ap.vz)/(Ap.n. k)	Cv.ab (ng/mL)	mv.ab (ng)	SD
<i>Lb. paracasei</i>	5	0	7,2	1,5276	1,5263	1,5270	0,0009	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0018
	5	0,108	7,2	1,2639	1,2487	1,2563	0,0107	0,8228	0,1772	1,2762	0,2552	0,0117
<i>Lb. casei</i>	5	0	7,2	1,5531	1,5539	1,5535	0,0006	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0011
	5	0,108	7,2	1,2302	1,2764	1,2533	0,0327	0,8068	0,1932	1,3913	0,2783	0,0332
<i>Lb. gasseri</i>	5	0	7,2	1,5248	1,5435	1,5341	0,0132	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0264
	5	0,108	7,2	1,2828	1,2783	1,2806	0,0032	0,8347	0,1653	1,1902	0,2380	0,0164
<i>Lb. reuteri</i>	5	0	7,2	1,5822	1,5975	1,5898	0,0108	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0216
	5	0,108	7,2	1,3987	1,4044	1,4015	0,0040	0,8816	0,1184	0,8528	0,1706	0,0148
<i>Lb. plantarum</i>	5	0	7,2	1,5206	1,4932	1,5069	0,0194	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0387
	5	0,108	7,2	1,2903	1,3225	1,3064	0,0228	0,8669	0,1331	0,9580	0,1916	0,0421
<i>Lb. rhamnosus</i>	5	0	7,2	1,5049	1,5740	1,5394	0,0489	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0977
	5	0,108	7,2	1,2977	1,3420	1,3198	0,0313	0,8574	0,1426	1,0271	0,2054	0,0802
<i>L. lactis</i> pNZ8148	5	0	7,2	1,5099	1,4959	1,5029	0,0099	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0198
	5	0,108	7,2	1,1743	1,1292	1,1517	0,0319	0,7664	0,2336	1,6823	0,3365	0,0418

Priloga 11: Rezultati testiranja vpliva rekombinantnega proteina na rast na mikrotitrskih ploščicah

Vzorec/čas rasti (h)		0		1,5		2,5		3,5		4,5		5		6	
		OD ₆₀₀	RSD (%)												
1	200 µL bakterijskega gojišča-slepi vzorec	0,1973 (0)	3,39	0,1931 (0)	1,15	0,1984 (0)	2,1	0,1993 (0)	4,79	0,2171 (0)	14,76	0,1797	10,28	0,1760 (0)	10,57
2	200 µL bakterijske kulture-normalna rast celic	0,2162 (0,0189)	8,01	0,2396 (0,0465)	3,4	0,3342 (0,1358)	16,14	0,3941 (0,1948)	7,09	0,5706 (0,3535)	20,94	0,5155 (0,3358)	6,76	0,6327 (0,4567)	6,06
3	200 µL bakterijske kulture + dodatek proteina pri OD ₆₀₀ =0	0,2112 (0,0139)	4,82	0,2497 (0,0566)	18,56	0,3396 (0,1412)	21,88	0,3921 (0,1928)	13,88	0,5112 (0,2941)	12,03	0,5963 (0,4166)	15,72	0,7216 (0,5456)	18,03
4	200 µL bakterijske kulture + dodatek proteina pri OD ₆₀₀ =0,20	0,2226 (0,0253)	3,1	0,2404 (0,0473)	4,13	0,3236 (0,1252)	21,67	0,3910 (0,1917)	14,69	0,4702 (0,2531)	10,81	0,5316 (0,3519)	14,00	0,6691 (0,4931)	16,63
5	200 µL bakterijske kulture + dodatek proteina pri OD ₆₀₀ =0,5	0,1992 (0,0019)	5,9	0,2155 (0,0224)	3,65	0,2792 (0,0808)	15,45	0,3213 (0,122)	4,74	0,4394 (0,2223)	4,66	0,4794 (0,2997)	10,47	0,5945 (0,4185)	6,55
6	200 µL bakterijske kulture + dodatek proteina pri OD ₆₀₀ =0,8	0,2004 (0,0031)	3,32	0,2151 (0,022)	3,24	0,2774 (0,079)	17,89	0,3254 (0,1261)	12,85	0,4348 (0,2177)	10,86	0,4816 (0,3019)	11,43	0,5951 (0,4191)	7,78
7	200 µL bakterijske kulture + dodatek proteina pri OD ₆₀₀ =1	0,1881 (0)	7,45	0,2048 (0,0117)	7,65	0,2581 (0,0597)	17,05	0,3110 (0,1117)	13,04	0,4388 (0,2217)	5,89	0,531 (0,3513)	1,16	0,6734 (0,4974)	1,96
8	200 µL bakterijske kulture + dodatek proteina pri OD ₆₀₀ =1,5	0,2115 (0,0142)	15,29	0,2153 (0,0222)	10,59	0,2432 (0,0448)	9,67	0,3339 (0,1346)	19,32	0,4507 (0,2336)	8,86	0,5396 (0,3599)	9,11	0,6658 (0,4898)	7,13

Priloga 12: Rezultati meritev OD₆₀₀ pri določanju hitrosti sedimentacije v bakterijski kulturi s plazmidom pSDLBA3b in pNZ8148

vzorec	pSDLBA3b				pNZ8148			
	OD ₆₀₀ 1	OD ₆₀₀ 2	povprečen OD ₆₀₀	SD	OD ₆₀₀ 1	OD ₆₀₀ 2	povprečen OD ₆₀₀	SD
0	0,904	0,900	0,902	0,003	0,925	0,915	0,920	0,004
1	0,875	0,875	0,875	0,000	0,891	0,879	0,885	0,004
2	0,842	0,842	0,842	0,000	0,856	0,856	0,856	0,000
3,5	0,808	0,814	0,811	0,004	0,832	0,839	0,836	0,002
4,833	0,756	0,775	0,766	0,013	0,821	0,821	0,821	0,000
6,5	0,726	0,733	0,730	0,005	0,820	0,765	0,793	0,019
8	0,690	0,703	0,697	0,009	0,761	0,769	0,765	0,003
9,333	0,664	0,657	0,661	0,005	0,755	0,759	0,757	0,001
10,333	0,620	0,618	0,619	0,001	0,740	0,750	0,745	0,004
29,833	0,453	0,450	0,452	0,002	0,626	0,626	0,626	0,000

Priloga 13: Rezultati meritev OD₆₀₀ pri določanju hitrosti sedimentacije v bakterijski kulturi s plazmidom pSDLBA3b, pNZ8148 in pNZ8148, z dodatkom B-AcMA

vzorec	pSDLBA3b				pNZ8148				pNZ8148+ B-AcMA			
	OD ₆₀₀ 1	OD ₆₀₀ 2	povprečen OD ₆₀₀	SD	OD ₆₀₀ 1	OD ₆₀₀ 2	povprečen OD ₆₀₀	SD	OD ₆₀₀ 1	OD ₆₀₀ 2	povprečen OD ₆₀₀	SD
0	1,054	0,999	1,027	0,039	1,015	1,02	1,018	0,004	1,045	1,050	1,048	0,004
1,5	0,988	0,966	0,977	0,016	1,004	1,01	1,007	0,004	1,022	1,020	1,021	0,001
2,5	0,940	0,945	0,943	0,004	0,988	0,983	0,986	0,004	1,010	1,012	1,011	0,001
4	0,869	0,874	0,872	0,004	0,941	0,942	0,942	0,001	0,970	0,972	0,971	0,001
5	0,776	0,787	0,782	0,008	0,867	0,870	0,869	0,002	0,897	0,897	0,897	0,000
6,5	0,651	0,669	0,660	0,013	0,763	0,777	0,770	0,010	0,793	0,793	0,793	0,000
7,5	0,549	0,554	0,552	0,004	0,689	0,693	0,691	0,003	0,702	0,707	0,705	0,004
8,5	0,529	0,534	0,532	0,004	0,629	0,636	0,633	0,005	0,654	0,652	0,653	0,001
9,5	0,530	0,521	0,526	0,006	0,591	0,594	0,593	0,002	0,600	0,602	0,601	0,001

Priloga 14: Rezultati analize velikosti delcev za *L. lactis* s plazmidom pNZ8148

premer delcev (µm)	delež (%)	premer delcev (µm)	delež (%)	premer delcev (µm)	delež (%)	premer delcev (µm)	delež (%)
0,05	0,00	0,58	3,66	6,63	2,31	76,32	1,83
0,06	0,00	0,67	8,05	7,72	2,02	88,91	1,51
0,07	0,00	0,78	11,88	9,00	1,67	103,58	1,19
0,08	0,00	0,91	14,64	10,48	1,32	120,67	0,87
0,09	0,00	1,06	12,12	12,21	0,99	140,58	0,54
0,11	0,00	1,24	6,39	14,22	0,74	163,77	0,00
0,13	0,00	1,44	3,05	16,57	0,57	190,80	0,00
0,15	0,00	1,68	1,78	19,31	0,48	222,28	0,00
0,17	0,00	1,95	1,03	22,49	0,48	258,95	0,00
0,20	0,00	2,28	0,61	26,20	0,58	301,68	0,00
0,23	0,00	2,65	0,50	30,53	0,78	351,46	0,00
0,27	0,00	3,09	1,22	35,56	1,05	409,45	0,00
0,31	0,00	3,60	1,48	41,43	1,36	477,01	0,00
0,36	0,00	4,19	1,81	48,27	1,66	555,71	0,00
0,42	0,19	4,88	2,14	56,23	1,88	647,41	0,00
0,49	1,23	5,69	2,43	65,51	1,96	754,23	0,00
0,58		6,63		76,32		878,67	
seštevek (%)	1,42		72,79		19,85		5,94

Priloga 15: Rezultati analize velikosti delcev za *L. lactis* s plazmidom pSDLBA3b

premer delcev (µm)	delež (%)	premer delcev (µm)	delež (%)	premer delcev (µm)	delež (%)	premer delcev (µm)	delež (%)
0,05	0,00	0,58	2,38	6,63	1,19	76,32	1,57
0,06	0,00	0,67	4,32	7,72	1,41	88,91	0,87
0,07	0,00	0,78	5,38	9,00	1,71	103,58	0,41
0,08	0,00	0,91	5,80	10,48	2,13	120,67	0,14
0,09	0,00	1,06	4,59	12,21	2,68	140,58	0,12
0,11	0,00	1,24	2,58	14,22	3,35	163,77	0,17
0,13	0,00	1,44	1,32	16,57	4,10	190,80	0,27
0,15	0,00	1,68	0,76	19,31	4,87	222,28	0,35
0,17	0,00	1,95	0,41	22,49	5,57	258,95	0,33
0,20	0,00	2,28	0,23	26,20	6,15	301,68	0,21
0,23	0,00	2,65	0,14	30,53	6,64	351,46	0,10
0,27	0,00	3,09	0,43	35,56	6,39	409,45	0,00
0,31	0,00	3,60	0,52	41,43	5,72	477,01	0,00
0,36	0,00	4,19	0,66	48,27	4,75	555,71	0,00
0,42	0,24	4,88	0,83	56,23	3,62	647,41	0,00
0,49	1,00	5,69	1,00	65,51	2,51	754,23	0,00
0,58		6,63		76,32		878,67	
seštevek (%)	1,24		31,35		62,79		4,54