

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BORUT ŽIVEC

PRIPRAVA REKOMBINANTNE ZUNAJCELIČNE
DOMENE LEPTINSKEGA RECEPTORJA

PREPARATION OF THE RECOMBINANT
EXTRACELLULAR DOMAIN OF THE LEPTIN
RECEPTOR

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko biologijo (Fakulteta za farmacijo) pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča. Analizo nukleotidnih zaporedij molekul DNA je opravilo podjetje MWG Operon, Ebersberg, Nemčija.

V prvi vrsti se zahvaljujem mentorju, doc. dr. Tomažu Bratkoviču, za možnost opravljanja diplomskega dela na področju farmacevtske biotehnologije, za strokovno vodenje in praktično pomoč ter za potrpežljivost in spodbudo pri delu. Hvala tudi Petru Moleku za pomoč pri reševanju praktičnih problemov ter vsem ostalim sodelavcem na Katedri za farmacevtsko biologijo, ki so bili vedno pripravljeni pomagati in so ustvarjali zelo prijetno delovno vzdušje.

Posebna zahvala gre moji družini za podporo in razumevanje tekom celotnega študija.

Izjava:

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča.

Ljubljana, maj 2012

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Aleš Mrhar

Član diplomske komisije: doc. dr. Petra Kocbek

Vsebina

POVZETEK	I
ABSTRACT	II
ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV	III
1. UVOD.....	1
1.1. ODKRITJE LEPTINA IN LEPTINSKEGA RECEPTORJA	1
1.2. LEPTIN	2
1.3. IZRAŽANJE REKOMBINANTNIH PROTEINOV V <i>E. COLI</i>	5
1.3.1. Pridobivanje proteina v topni obliki.....	6
1.3.2. Pridobivanje inkluzijskih teles	7
1.3.3. Čiščenje in raztapljanje inkluzijskih teles	7
1.3.4. Ponovno zvijanje rekombinantnega proteina	8
1.4. LOČITEV USTREZNO ZVITEGA PROTEINA OD NEUSTREZNIH KONFORMEROV S KROMATOGRAFSKIMI METODAMI.....	10
1.4.1. Ionsko-izmenjevalna kromatografija.....	10
1.4.2. Gelska izključitvena kromatografija	11
1.4.3. Kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija - IMAC.....	12
1.5. PREDSTAVITEV SISTEMOV pGEM IN pET	14
1.5.1. Sistem pET	14
1.5.2. Izražanje rekombinantnega proteina v fuziji z NusA.....	15
1.5.3. Sistem pGEM	16
2. NAMEN NALOGE	17
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1. MATERIALI	18
3.1.1. Laboratorijska oprema.....	18
3.1.2. Kemikalije	19
3.1.3. Kompleti, reagenti, oligonukleotidi in označevalci.....	20
3.1.4. Biološki materiali	21
3.1.5. Pufri, raztopine in gojišča.....	22

3.2.	METODE.....	27
3.2.1.	Pomnoževanje gena <i>LBD</i> z uvedbo restrikcijskih mest za <i>Bam</i> HI in <i>Xho</i> I	27
3.2.2.	Preverjanje velikosti produkta PCR z gelsko elektroforezo.....	28
3.2.3.	Ekstrakcija pomnoženega gena <i>LBD</i> iz 1,5%-agaroznega gela	28
3.2.4.	Ligacija inserta <i>LBD</i> v vektor pGEM-T Easy	29
3.2.5.	Priprava kompetentnih celic <i>E. coli</i> TOP10 in Origami (DE3) pLysS	29
3.2.6.	Transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> TOP10 z ligacijsko zmesjo pGEM-T Easy/ <i>LBD</i> oz. plazmidom pET44c	30
3.2.7.	Izolacija vektorjev pGEM-T Easy/ <i>LBD</i> in pET44c	31
3.2.8.	Preverjanje prisotnosti inserta <i>LBD</i> v vektorju pGEM-T Easy/ <i>LBD</i> z restrikcijo z <i>Eco</i> RI.....	32
3.2.9.	Restrikcija vektorjev pGEM-T Easy/ <i>LBD</i> in pET44c ter ligacija inserta <i>LBD</i> v razrezani vektor pET44c	33
3.2.10.	Transformacija celic TOP10 z vektorjem pET44c/ <i>LBD</i>	34
3.2.11.	Izolacija pET44c/ <i>LBD</i> in preverjanje uspešnosti ligacije	35
3.2.12.	Transformacija celic <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS z vektorjem pET44c/ <i>LBD</i> in testno izražanje fuzijskega proteina NusA- <i>LBD</i>	36
3.2.13.	Transformacija celic <i>E.coli</i> Origami (DE3) pLysS z vektorjem pET44c/ <i>LBD</i> in testno izražanje fuzijskega proteina NusA- <i>LBD</i>	37
3.2.14.	Preverjanje izražanja in topnosti proteina <i>LBD</i> -NusA z elektroforezo SDS-PAGE	37
3.2.15.	Izražanje rekombinantne <i>LBD</i> v 2 L-kulturi <i>E.coli</i> BL21 (DE3) pLysS/pET28/ <i>LBD</i>	38
3.2.16.	Izolacija, čiščenje in raztapljanje inkluzijskih teles iz celične usedline <i>E. coli</i> BL21/pLysS/pET28/ <i>LBD</i>	39
3.2.17.	Preverjanje vpliva različnih dodatkov na proces zvijanja	40
3.2.18.	Poskus pridobivanja aktivnega proteina <i>LBD</i> s postopkom redčenja v pufer brez denaturantov	42
3.2.19.	Poskus zvijanja proteina <i>LBD</i> z uporabo kolone HiTrap IMAC	43
3.2.20.	Ocena aktivnosti proteinov v eluatih IMAC s testom ELISA.....	44
3.2.21.	Poskus ponovnega zvijanja proteina <i>LBD</i> z izključitveno kromatografijo z uporabo gradienta uree	45
3.2.22.	Preverjanje aktivnosti proteina <i>LBD</i> v eluiranih frakcijah po poskusu zvijanja na koloni Superdex 200 10/300 GL z gradientom uree	46

4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	48
4.1.	IZRAŽANJE PROTEINA LBD S FUZIJSKIM PARTNERJEM NusA	48
4.1.1.	Priprava vektorjev pGEM-T Easy/ <i>LBD</i> in pET44c	48
4.1.2.	Priprava vektorja pET44c/ <i>LBD</i>	51
4.1.3.	Testno izražanje proteina NusA-LBD	53
4.2.	POSKUS PRIPRAVE AKTIVNEGA PROTEINA LBD Z DENATURACIJO IN PONOVNIM ZVIJANJEM	55
4.2.1.	Poskus zvijanja proteina LBD z metodo redčenja v pufer brez denaturanta	55
4.2.2.	Poskus priprave aktivnega proteina LBD z zvijanjem na koloni IMAC	59
4.2.3.	Poskus priprave aktivnega proteina LBD z izključitveno kromatografijo in gradientom uree	61
5.	SKLEP	64
6.	LITERATURA	66

POVZETEK

Eden izmed ključnih dejavnikov v regulaciji hranjenja je leptin, ki deluje centralno preko vezave na leptinske receptorje v hipotalamusu. Pri ljudeh s prekomerno telesno težo je pogosto opaziti povišano koncentracijo leptina v serumu. Hiperleptinemija neugodno vpliva na razvoj in potek številnih bolezni (rakava obolenja, sladkorna bolezen, avtoimunske bolezni, ...), zato bi bilo smiselno učinke leptina na periferiji zavirati z uporabo selektivnih antagonistov. Kot potencialen antagonist so v okviru raziskav izrazili del zunajcelične regije leptinskega receptorja, t.i. leptin vezočo domeno, ki je ključna pri vezavi leptina na receptor. Kljub nezadostni afiniteti do leptina za klinično uporabo, pa je leptin vezoča domena uporabna za iskanje drugih potencialnih leptinskih antagonistov.

V okviru diplomskega dela smo skušali pripraviti aktivno obliko leptin vezoče domene preko izražanja s fuzijskim partnerjem ali s ponovnim zvijanjem denaturiranega proteina. V prvem poskusu smo tarčni gen vstavili v ekspresijski vektor pET44c, ki omogoča izražanje poljubnega proteina v obliki fuzijskega proteina s transkripcijskim dejavnikom NusA. NusA je znan kot fuzijski partner, ki poveča topnost rekombinantnega proteina, izraženega v bakteriji *Escherichia coli*. Fuzijski protein smo izrazili v dveh bakterijskih sevih (*E. coli* BL21 (DE3) pLysS in *E. coli* Origami (DE3) pLysS) pri različnih pogojih rasti, a fuzijski partner ni preprečil nastanka inkluzijskih teles. V nadaljevanju smo leptin vezočo domeno brez fuzijskega partnerja izrazili v obliki inkluzijskih teles, jih raztopili v prisotnosti denaturanta in poskusili ponovno zviti. Najprej smo raztopino proteina postopno dodajali v pufer brez denaturanta, prisotnost potencialnih nastalih monomerov pa preverili z izključitveno in ionsko-izmenjevalno kromatografijo. Pri poskusu zvijanja s kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo smo s heksahistidinskim repom označen protein vezali na stacionarno fazo, zvijanje izvedli z zamenjavo denaturacijskega pufra s kromatografskim pufrom brez denaturantov in protein eluirali z raztopino imidazola. Nazadnje smo poskus zvijanja izvedli z uporabo kolone za izključitveno kromatografijo, v kateri smo predhodno ustvarili gradient denaturanta.

Kot najuspešnejša se je izkazala izključitvena kromatografija z gradientom uree, s katero smo v primerjavi z ostalima metodama pridobili aktivno obliko proteina v uporabno visoki koncentraciji, eluati pa so ob tem izkazovali visoko stopnjo čistote. Aktivnost pridobljenega proteina, ocenjena kot sposobnost vezave rekombinantnega humanega leptina s testom ELISA, je sicer znatno manjša od aktivnosti rekombinantnega humanega leptinskega receptorja, kar lahko vsaj delno pojasnimo z višjo avidnostjo receptorja napram rekombinantni domeni.

ABSTRACT

One of the key factors in regulation of food intake is leptin, which acts by binding to the leptin receptor in hypothalamus to suppress hunger. Leptin over-expression which can be often observed in obese individuals promotes the onset and progression of many diseases such as diabetes, autoimmune diseases, cancer ... The use of selective leptin antagonists to block the leptin's peripheral actions could potentially mitigate the symptoms. One of the extracellular domains of the leptin receptor known as *leptin binding domain* is essential for leptin binding and was proposed as a possible antagonist. Although the leptin binding domain was found not to have a high enough affinity for therapeutic use, it can still be used to design potential new leptin antagonists.

The aim of our research work was to produce a correctly folded leptin binding domain either by expressing it with a fusion partner or by refolding it from inclusion bodies. In our first attempt the target gene was subcloned into pET44c which allows expression of desired proteins fused to transcription factor NusA. NusA was previously shown to enhance solubility of partner proteins. The protein was expressed at various cultivating conditions with the use of two different bacterial strains (*E. coli* BL21 (DE3) pLysS and *E. coli* Origami (DE3) pLysS), but was found to form inclusion bodies nonetheless. Since the experiment failed to produce a soluble product we decided to continue our work with the use of refolding methods. First, the target protein was expressed in the form of inclusion bodies and solubilized with the use of denaturants. In our first attempt, the solubilized inclusion bodies were added drop wise to a denaturant free buffer solution. In our second attempt, an immobilized metal affinity chromatography column was used to bind the his-tagged leptin binding domain to a solid matrix. The refolding was performed by exchanging the denaturing buffer with a denaturant-free buffer. Refolded proteins were eluted with imidazole buffer. In our last experiment, refolding was performed using a size exclusion chromatography column equilibrated with a urea gradient.

Our best results were achieved by the use of a urea gradient with size exclusion chromatography. Collected eluates were shown to be of high purity and contained recombinant protein at higher concentration and activity compared to the samples obtained in the first two attempts. Nevertheless, the activity of the leptin binding domain was noticeably lower than the activity of the leptin receptor. This can partially be explained by the higher avidity of the whole leptin receptor compared to the isolated leptin domain.

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

β -ME	2-merkaptoetanol
B-hLEP	z biotinom označen (biotiniliran) rekombinantni človeški leptin
BSA	goveji serumski albumin
ddH ₂ O	ultra čista voda
hLR-Fc	rekombinantni himerni protein iz zunajcelične regije humanega leptinskega receptorja in Fc-regije humanega IgG
HRP	hrenova peroksidaza (angl. <i>horseradish peroxidase</i>)
IMAC	kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija (angl. <i>immobilised metal ion affinity chromatography</i>)
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktozid (induktor za operon <i>lac</i> v <i>E. coli</i>)
IT	inkluzijska telesa
LB	(angl. <i>lysogeny broth</i>) bakterijsko gojišče
LBD	leptin vezoča domena (angl. <i>leptin-binding domain</i>)
LR	leptinski receptor
MTP	mikrotitrna ploščica
nfH ₂ O	voda brez nukleaz (angl. <i>nuclease-free water</i>)
OD ₆₀₀	optična gostota pri valovni dolžini 600 nm

PBS	fosfatni pufer s soljo
PBST	fosfatni pufer s soljo z dodanim Tween 20
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>)
SA-HRP	s streptavidinom označena hrenova peroksidaza
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecilsulfatom
TB	(angl. <i>terrific broth</i>) bakterijsko gojišče
vrt./min	vrtljaji na minuto
VK	volumen kolone

1. UVOD

1.1.ODKRITJE LEPTINA IN LEPTINSKEGA RECEPTORJA

V zadnjih desetletjih je pojavnost prekomerne telesne teže v Ameriki in Evropi vse večja. Zato ne preseneča, da se je fokus raziskav usmeril v raziskave regulacije hranjenja. Morda najpomembnejše odkritje, povezano z debelostjo, je odkritje leptina leta 1994. Pri tem je bilo ključno odkritje genetske napake v miših seva *ob/ob*, ki povzroča debelost. Prav te miši (*ob/ob*) so pripeljale do dognanja, da obstaja neznana signalna molekula, ki je povezana z uravnavanjem vnosa hranil.

Odkritje tolstih miši (*ob/ob*) je bilo posledica naključnih opazovanj v poletju 1949. Tolste miši so lahko razločili od zdravih že po 4-6 tednih. Od takrat naprej so samo še nabirale telesno težo in so na splošno tehtale štirikrat več kot običajne miši. V prvotnih opazanjih niso opazili nobene razlike v življenjski dobi. So pa zato bile tolste miši neplodne in so razvile sladkorno bolezen. Nadaljnje raziskave so nakazovale, da je bolezen posledica mutacije v enem samem genu in se deduje avtosomno recesivno. Odgovorni gen so označili kot *ob* (*angl. obese*).

Leta 1966 so v Jackson Laboratory odkrili dodatno mutantno linijo tolstih miši. Lokus z odgovornim genom za debelost so imenovali diabetes (*db/db*), saj je mutacija obeh alelov *db* povzročila diabetesu podobno stanje. Diabetični mutant je fenotipsko podoben tolstemu mutantu *ob/ob*, vendar se pri prvem bolezenski znaki pojavijo prej in ima krajše življenje. Prav tako kot gen *ob*, se gen *db* prenaša avtosomno recesivno s popolno penetranco. Diabetični homozigoti so debeli, hiperglikemični in neplodni, heterozigotov pa se ne da vidno ločiti od zdravih homozigotov. Poskusi uravnavanja telesne teže z omejitvijo vnosa hrane, ki so bili uspešni pri miši *ob/ob*, pri miši *db/db* niso uspeli. Slednja zmanjšane vnosa hrane ne preživi.

Kasnejše študije so potrdile, da normalne miši proizvajajo leptin, miši *ob/ob* pa nosijo mutacijo za nefunkcionalen hormon. Ob injiciranju leptina mišim *ob/ob*, zavremo prekomerno hranjenje, njihova telesna teža pa se normalizira. V miših *db/db* mutacija povzroči izgubo funkcionalnega leptinskega receptorja (LR) in posledično razvoj neodzivnosti na leptin [1].

1.2.LEPTIN

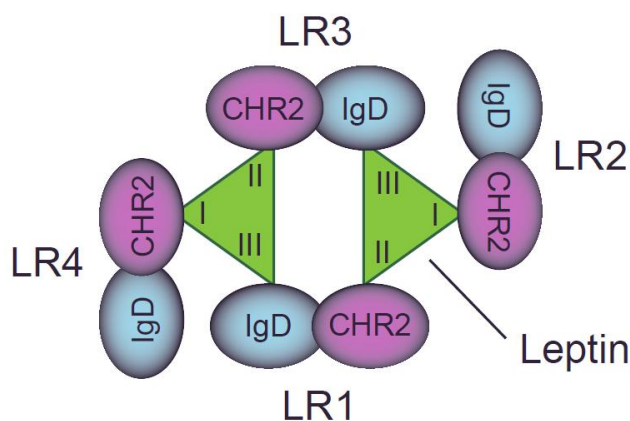
Najmočneje izražen in eden od najpomembnejših učinkov leptina je dolgoročno uravnavanje energijskega ravnovesja preko zaviranja vnosa hrane. Vendar tako fenotip *ob/ob* kot *db/db* izkazujeta še celo paleto drugih zdravstvenih težav. Miši razvijejo kompleksen sindrom, ki ga ponazarjajo abnormalna reproduktivna funkcija, hormonska neuravnoteženost (hiperinulinemija pri obeh fenotipih, hiperleptinemija pri fenotipu *db/db*, ...) in spremembe v hematopoetskem ter imunskem sistemu, kar so opazili tudi pri ljudeh s pomanjkanjem hormona [1- 4]. Sindrom miši *ob/ob* in *db/db* je zelo podoben prilagoditveni reakciji na stradanje. V stanju sitosti obstaja pozitivna korelacija med plazemsko koncentracijo leptina in količino belega maščevja. Ob stradanju pa koncentracija leptina pade nesorazmerno glede na izgubo maščobnega tkiva. Padec koncentracije leptina sporoči možganom, naj sproži prilagoditveni odgovor na stradanje. Miši *ob/ob* in *db/db* zaradi nedelujoče sporočilne osi leptina živijo v navideznem stanju stalnega stradanja in se ob dostopu do hrane prekomerno zredijo. Endokrine spremembe v času stradanja sicer zavrejo reproduktivne procese, delovanje ščitnice in stimulacijo hipotalamo-hipofizne-adrenalinske zanke. Stradanje spremljajo tudi nepravilnosti imunskega odgovora. Ko se kalorični vnos poveča in se energijske zaloge normalizirajo, se zviša tudi koncentracija leptina v krvi, kar pozitivno vpliva na metabolizem in endokrine ter imunske funkcije [2, 5]

Gen *ob* kodira pri ljudeh 167 aminokislin dolg polipeptid. Med sekrecijo v obtok se 21 aminokislin dolg signalni polipeptid odcepi in tako dobimo funkcionalni leptin [1]. Leptin uvrščamo v družino dolgoverižnih vijačnih citokinov. Protein kaže največjo strukturno podobnost z granulocitnim rastnim dejavnikom (G-CSF) in z interleukinom 6 (IL-6). Zreli leptin tvorijo štiri α -vijačnice (A, B, C, D), ki imajo značilen vzorec gor-gor-dol-dol. Z mutagenozo so odkrili tri vezavna mesta (I, II in III) za LR. Vezavno mesto I se nahaja v vijačnici D, vezavno mesto II se nahaja na zunanji površini vijačnic A in C, vezavno mesto III pa se nahaja v bližini N-konca vijačnice D. Ključno za aktivacijo LR je vezavno mesto III [6].

LR spada v skupino I citokinskih receptorjev. Trenutno poznamo šest izooblik (LRa-f), ki nastanejo z alternativnim povezovanjem eksonov. Receptorjem sta skupni zunajcelična (kjer se nahajajo vezavna mesta) in transmembranska domena, razlikujejo pa se v dolžini znotrajceličnega segmenta. Dolga izooblika LRb je odgovorna za večino znanega leptinskega delovanja, saj ima edina celotno znotrajcelično domeno, kjer se signali posredujejo prek štirih signalnih poti: JAK-STAT (*angl. Janus kinase and signal transducer and activator of*

transcription), MAPK (z mitogenom aktivirana protein kinaza), PI3K (fosfatidil inozitol 3'-kinaza) in AMPK (z AMP aktivirana kinaza). Kratka izooblika LRA je vključena v transport leptina skozi krvno-možgansko pregrado. Zanimiva je tudi izooblika LRe, t.i. topni receptor, ki prosto kroži v krvnem obtoku in nastaja s proteolitično cepitvijo iz vseh membranskih oblik. Z vezavo leptina LRe vpliva na njegovo razpoložljivost in farmakokinetiko [7- 9].

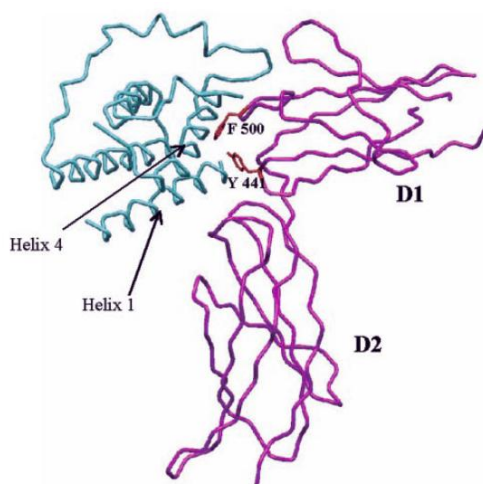
Zunajcelični del LR sestavlja več domen: N-končna citokinskemu receptorju homologna domena (CRH) 1, imunoglobulinu (Ig) podobna domena, domena CRH2 in dve fibrinonektinski domeni tipa III. Domeni CRH2 in Ig sodelujeta pri vezavi leptina in sta ključnega pomena za aktivacijo receptorja. Raziskave z LR s točkovnimi mutacijami v kombinaciji z modeliranjem na osnovi homologije nakazujejo, da se leptin in receptor vežeta v razmerju 2:4. Pri tem vezavno mesto I leptina interagira z domeno CRH2 prvega LR, vezavno mesto II interagira z domeno CHR2 drugega LR in vezavno mesto III interagira z domeno Ig tretjega LR (slika 1). Mutacije v vezavnem mestu I v manjši meri vplivajo na aktivacijo receptorja, a ne vplivajo bistveno na moč vezave. Mutacije v vezavnem mestu II zmanjšajo jakost vezave, a le malo vplivajo na aktivacijo. Leptinski mutanti na vezavnem mestu III imajo enako afiniteto kot naravni leptin, a izgubijo zmožnost aktivacije receptorja [8, 10].



Slika 1: Model heksamernega kompleksa leptin-LR. Vezavno mesto II leptina (zeleni trikotnik) se veže na domeno CHR2 prvega LR (vijoličen), vezavno mesto I se veže na domeno CHR2 drugega LR in vezavno mesto III se veže na domeno Ig (modro) tretjega LR [8].

Serumska koncentracija leptina je pri ljudeh s prekomerno telesno težo povišana in je v pozitivni povezavi z indeksom telesne mase. Hiperleptinemija neugodno vpliva na razvoj in potek številnih bolezni (rakava obolenja, sladkorna bolezen, avtoimunske bolezni, ...), zato bi bilo smiselno učinke leptina na periferiji zavirati z uporabo selektivnih antagonistov [3, 4].

Take snovi so lahko topni leptinski receptorji (vežejo prosti leptin v obtoku), leptinski antagonisti (se vežejo na LR brez aktivacije) in monoklonska protitelesa usmerjena proti LR (se vežejo na receptor in preprečijo vezavo leptina) [11]. Kot topen leptinski receptor lahko uporabimo zunajcelično regijo LR (~800 AK), a je njena priprava zelo zahtevna. Kot alternativo so pripravili rekombinantno domeno CHR2, ki velja za glavno leptin vezočo domeno (LBD), ki se z leptinom veže v razmerju 1:1 (slika 2) [12, 13]. Človeško in kokošjo LBD so subklonirali in izrazili kot rekombinantna proteina. Vendar ti rekombinantni LBD nista najbolj učinkoviti pri zaviranju leptinskega delovanja, saj je njuna afiniteta do leptina nižja od afinitete celega LR [12]. Tudi mutageneza kokošjega LBD ni privedla do muteinov z večjo vezavno afiniteto [13]. Kljub neuspešni uporabi LBD kot antagonista delovanja leptina, so raziskave z LBD pomagale pri določitvi ključnih mest interakcije leptina z receptorjem [12, 13]. Poleg tega lahko LBD uporabimo kot nadomestno tarčo za odkrivanje in preizkušanje afinitete leptinskih antagonistov do LR.



Slika 2: Shematska predstavitev kompleksa humanega leptina (modro) z LBD (vijolično) v razmerju 1:1. D1 je N-končna, D2 pa C-končna domena LBD [12].

1.3. IZRAŽANJE REKOMBINANTNIH PROTEINOV V *E. COLI*

Z uporabo običajnih ekspresijskih vektorjev lahko delež rekombinantnega proteina v citoplazmi doseže do 50 % celotnih celičnih proteinov. V primeru evkariontskih proteinov se le-ti pojavljajo pretežno v obliki netopnih agregatov, t.i. inkluzijskih teles (IT). Čeprav agregati vsebujejo produkt v zelo visoki koncentraciji, so molekule slednjega pretežno v denaturirani obliki [14].

Proces tvorbe IT je odvisen predvsem od kompetitivnega odnosa med hitrostjo zvijanja proteina in hitrostjo agregacije v povezavi s hitrostjo translacije [15]. Prokariontski organizmi imajo zelo hitro translacijo (do 20 AK na sekundo). Zaradi tega se večina zvijanja izvede posttranslacijsko, razen v primerih, ko je translacija upočasnjena zaradi prisotnosti redkih kodonov v mRNA [16, 17]. V evkariontskih celicah je translacija počasnejša, zvijanje proteinov pa se pogosto začne že med samim prepisovanjem in se lahko nadaljuje posttranslacijsko po izpustitvi iz ribosoma [18-20]. Počasnejša translacija omogoči, da imajo različne domene znotraj proteina možnost pravilnega zvitja ena za drugo [21].

Na agregacijo proteinov vplivata tudi količina nezvitega proteina in celokupna koncentracija proteinov. Pri nizkih koncentracijah so favorizirane intramolekularne interakcije, ne pa tudi intermolekularne. Iz tega razloga lahko pri zvijanju v pogojih *in vitro* neželjeno stransko reakcijo omejimo s počasnim dodajanjem denaturiranega proteina v raztopino za zvijanje, saj pri tem nastaja pravilno zvit protein, dejanska koncentracija nezvitega proteina pa ostane nizka [22, 23]. Podobno vpliva na *in vivo* agregacijo hitrost sinteze tarčnega proteina. Agregacija je favorizirana v močnih ekspresijskih sistemih, pri visoki koncentraciji induktorjev, pri uporabi bogatih gojišč in višjih temperaturah gojenja [24]. Tvorba IT je v manjši meri odvisna tudi od velikosti proteina, fuzijskega partnerja, strukture podenot in relativne hidrofobnosti. Tudi tvorba disulfidnih vezi in nekatere točkovne mutacije lahko močno vplivajo na tvorbo IT [25, 26].

1.3.1. Pridobivanje proteina v topni obliki

Jakost indukcije izražanja gena, vrste kodonov in stabilnost mRNA igrajo ključno vlogo pri hitrosti izražanja in pravilnem zvijanju [27]. Preko nivoja indukcije lahko hitrost sinteze upočasnimo in favoriziramo nastanek topnega produkta. Najboljše rezultate pri pripravi topnih proteinov dosežemo pri temperaturi gojenja med 18 in 25 °C in pri uporabi nizkih koncentracij induktorja [24,28]. Hitrost translacije je odvisna tudi od vrste kodonov v mRNA. Akumulacija redkih kodonov znotraj gena lahko povzroča težave in napake pri branju, nestabilnost mRNA in njeno degradacijo, napačno vgraditev aminokislin na redkih kodonih in celo propad celice [29-32]. Težavo lahko rešimo z uvedbo dodatnih kopij genov za tRNA z redkimi antikodoni in pripadajoče aminoacil-tRNA-sintetaze v gostiteljsko celico, kar lahko donos želenega proteina poveča do stokrat [33]. Druga možnost je optimizacija nukleotidnega zaporedja rekombinantne DNA [34-36]. Pri tem je treba upoštevati, da lahko zamenjava redkih kodonov z optimiziranimi privede do agregacije zaradi hitrejše sinteze proteina [16].

Agregacijo proteina in druge omejitve (npr. neuspešna iniciacija translacije, nepopolna odstranitev začetnega metionina) lahko pogosto odpravimo z izražanjem želenega proteina v povezavi s fuzijskim partnerjem. Fuzijski protein lahko pripravimo tako, da nukleotidno zaporedje tarčnega proteina umestimo pred ali za nukleotidno zaporedje fuzijskega partnerja. Stop-kodon v nukleotidnem zaporedju proteina, ki se bo izrazil prvi, odstranimo; posledično se proteina izrazita kot neprekinjen polipeptid. Široko uporabljeni fuzijski partnerji so tako evkariontski (glutation-S-transferaza) kot različni prokariontski proteini (maltozo vezavni protein, tioredoksin,...) [37, 38]. Prozaporedja evkariontskih fuzijskih partnerjev lahko delujejo kot sterični šaperoni; z znižanjem aktivacijske energije in pokrivanjem hidrofobnih regij stabilizirajo intermediate med zvijanjem in posledično spodbujajo pravilno zvitje rekombinantnega proteina [39]. Na topnost končnega produkta lahko vpliva tudi lokacija fuzijskega proteina (npr. maltozo vezavni protein na N-koncu fuzijskega proteina daje v večini primerov topen protein, medtem ko se fuzijski protein z istim fuzijskim partnerjem na C-koncu akumulira v obliki IT) [40-42]. Fuzijske partnerje lahko uporabimo tudi za namene (homogeno) usmerjene imobilizacije in čiščenja rekombinantnih proteinov [43].

Zaradi reducirajočega okolja v citosolu *E. coli*, je tvorba disulfidnih vezi lahko omejujoči dejavnik pri hitrosti nastajanja pravilno zvitega proteina. Z okvaro genov za

tioeredoksin reduktazo (*trxB*) in glutation reduktazo (*gor*) postane okolje citosola bolj oksidirajoče, kar pripomore k nastanku disulfidnih vezi. Čeprav sta oba encima centralnega pomena v glavnih redukcijskih metabolnih poteh *E. coli*, mutaciji za bakterijo nista letalni [44-46]. Okvarjena gena *trxB* in *gor* se nahajata na lastnih plazmidih. Sev *E. coli* z obema mutacijama je imenovan Origami™, ki mutacijo *trxB* nosi na plazmidu z genom za rezistenco proti kanamicinu, *gor* pa na plazmidu z genom za rezistenco proti tetraciklinu. Zato je za produkcijo rekombinantnega proteina priporočena uporaba ekspresijskega plazmida s tretjim selekcijskim označevalcem, npr. z genom za rezistenco proti ampicilinu [47, 48].

1.3.2. Pridobivanje inkluzijskih teles

Pri proizvodnji rekombinantnega proteina v obliki IT je prednost ta, da protein nastaja v velikih količinah, ločba in čiščenje agregatov pa sta izredno enostavna. Za proizvodnjo IT znotraj citoplazme želeni gen umestimo za močni promotor. To omogočajo številni komercialni sistemi, ki vključujejo promotor P10 (iz faga T7), promotorja *tac* ali *lacUV5*, promotor *araB* ali pa s temperaturo induciranimi promotorji P_L in P_R (iz faga λ). Kodoni morajo biti optimizirani tako, da ne omejujejo hitrost translacije in hkrati ne povzročajo tvorbe proteinov z napačnim zaporedjem aminokislin [16].

1.3.3. Čiščenje in raztapljanje inkluzijskih teles

IT imajo relativno visoko specifično gostoto (cca 1,3 mg/mL), zato jih lahko po lizi celic zberemo s centrifugiranjem pri zmernih hitrostih [49, 50]. IT so pretežno sestavljena iz rekombinantnega proteina, vendar lahko vsebujejo tudi znatno količino drugih celičnih proteinov (membranske proteine, RNA-polimeraze, ribosomske podenote), ribosomsko RNA ali DNA. V kolikor se odločimo za minimalno lizo celic, dobimo precej homogen izolat že samo s centrifugiranjem. V takih primerih lahko proteine ponovno zvijemo neposredno po njihovem raztapljanju brez stopnje čiščenja. Vendar lahko (ne)proteinske nečistote vplivajo na nadaljnje zvijanje rekombinantnega proteina. Če so v inkluzijskih telesih prisotne nečistote, jih lahko v veliki meri odstranimo s spiranjem s pufrom, v katerega smo dodali kaotropne snovi (urea ali gvanidinijev klorid) ali detergente (Triton X-100, deoksiholat, oktilglikozid ali sarkozil) v relativno nizki koncentraciji [16].

Čiščenje rekombinantnega proteina lahko izvedemo tudi po raztapljanju IT v primeru, da je protein ustrezno označen (npr. s polihistidinskim repom (*His-tag*)). V tem primeru lahko stopnjo čiščenja izvedemo z metodo IMAC (kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo) v denaturacijskih pogojih. Možno je tudi čiščenje z uporabo drugih kromatografskih tehnik (RP-HPLC, gelska filtracija, ionsko-izmanjevalna kromatografija) [16, 51, 52].

Čeprav polipeptidne molekule v inkluzijskih telesih obdržijo relativno visoko vsebnost elementov sekundarne strukture [50,51], se posamezne molekule ne dispergirajo pod fiziološkimi pogoji za raztapljanje. V večini primerov uporabljamo za dispergiranje močne denaturante, med katerimi prevladujejo kaotropna sredstva kot sta urea in gvanidinijev klorid (GndCl). Slednji je bolj zaželen, saj se v vodnih raztopinah uree tvorijo izocianati, ki lahko karbamilirajo proste aminske skupine polipeptidov, še posebej pri dolgotrajnih inkubacijah pri visokih pH. Denaturante uporabljamo v visokih koncentracijah (6-8 mol/L), da zagotovimo popolno topnost in razvitje proteinov [53]. Druga skupina solubilizatorjev IT so površinsko aktivne snovi. Čeprav so le-te lahko uspešni solubilizatorji, pa lahko vplivajo na ponovno zvijanje in nadaljnje postopke čiščenja. Raztapljanje IT lahko izvedemo tudi z uporabo medijev ekstremnih vrednosti pH (tudi v kombinaciji s prej omenjenimi pristopi). Pri tem pa je potrebno upoštevati dejstvo, da lahko pri ostrih pogojih pride do kemijskih modifikacij produkta [16].

V primerih kjer proteini vsebujejo cisteine, lahko vsebujejo IT tudi določeno količino disulfidnih vezi (intermolekularnih ali neustreznih intramolekularnih), ki zmanjšujejo topnost ob odsotnosti reducirajočih reagentov. Dodatek nizkomolekularnih tiolnih reagentov (kot so ditiotritol, glutation, cistein ali merkptoetanol) omogoči redukcijo disulfidnih vezi. Ker je reaktivna oblika v reakciji tiolatni anion, raztapljanje IT izvajamo pod blagimi alkalnimi pogoji [54].

1.3.4. Ponovno zvijanje rekombinantnega proteina

Ključno pri ponovnem zvijanju je odstranitev denaturantov. Najpogostejša neželena stranska reakcija pri tem procesu je agregacija proteinov. Ker agregacija sledi kinetiki drugega ali višjega reda, so med stopnjo zvijanja priporočene nizke koncentracije proteinov [55].

Klasična metoda za odstranitev denaturantov je dializa proti pufru za ponovno zvijanje, ki omogoča postopno odstranitev denaturanta [52]. Čeprav se metoda v nekaterih primerih (odvisno od proteina) obnese idealno, pride v večini primerov med upadanjem koncentracije denaturantov do agregacije zaradi visoke koncentracije proteina [56]. Večina protokolov je zato usmerjena v neposredno redčenje denaturiranega proteina v pufru brez denaturantov. Na ta način se denaturacijski pogoji ob intenzivnem mešanju praktično takoj izmenjajo z nativnimi [16]. Tako redčenje ne samo zniža koncentracijo denaturanta, ampak zniža tudi koncentracijo proteina, kar zmanjša možnost agregacije. Vendar če želimo na opisan način pridobiti zadostne količine proteina, potrebujemo tudi velike količine pufru. Da se temu izognemo, lahko ponovno zvijanje izvedemo po stopnjah. Ker pravilno zviti proteini običajno ne koprecipitirajo z nepopolno ali napačno zvitimi proteini, lahko izkoristek metode povečamo s počasnim in kontinuiranim dodajanjem razvitega proteina v pufer za zvijanje [54, 57, 58]. Alternativna metoda za izmenjavo pufru in odstranitev denaturantov je gelska izključitvena kromatografija. Rastopino proteina nanese na kolono, ki je bila predhodno ekvilibrirana s pufram brez denaturantov. V tem primeru molekule proteina med potovanjem skozi kolono prehajajo iz okolja z denaturantom v okolje brez denaturanta, kar jim omogoča, da se pravilno zvijejo [59, 60].

Za renaturacijo lahko uporabimo tudi druge vrste kromatografije. V teh kolonah je cilj imobilizacija tarčnega proteina na trden matriks. Po menjavi pufru omogočijo nativni pogoji, da se protein pravilno zvije. Zaradi vezave na trdni nosilec je agregacija molekul proteina med seboj onemogočena. V kolikor imajo proteini ustrezen afinitetni rep (npr. polihistidinski rep) ali pa pripet poli-ionski fuzijski partner (npr. poliargininski podaljšek), lahko imobilizacijo in kasnejšo ponovno zvijanje opravimo s pomočjo IMAC [61, 62] oz. z uporabo ionsko izmenjevalne kolone [63].

Pri ponovnem zvitju proteinov s cisteinskimi ostanki je večkrat potrebno omogočiti pravilno tvorbo disulfidnih vezi. Najpreprostejša metoda za spodbujanje tvorbe disulfidnih vezi je oksidacija z molekularnim kisikom, ki jo katalizirajo kovinski ioni, kot je Cu^{2+} . Pri tem se pogosto ne tvorijo disulfidni mostički na pravih mestih, zato za spodbujanje tvorbe disulfidnih vezi praviloma uporabljamo večinoma majhne molekule s tiolnimi skupinami v oksidirani in reducirani obliki, ki omogočajo ravnotežno reakcijo prerazporejanja disulfidnih mostov. Najpogosteje uporabljena kombinacija sta oksidirani in reducirani glutation. Pogosto uporabljane so tudi kombinacije cistein/cistin, cisteamin/cistamin in 2,2'-ditiolietanol /2-merkaptolietanol. Ker je tvorba disulfidnih vezi ravnotežna reakcija, taki reagenti izboljšajo

tako hitrost kot izkoristek pravilno zviti proteinov, saj prekinejo nepravilne disulfidne vezi in vzpodbudijo nastanek pravih [16]. Bistvenega pomena je seveda koncentracijsko razmerje med reducirano in oksidirano obliko reagenta, ki določa ravnotežje redoks reakcije.

Proces ponovnega zvijanja lahko izboljšamo s spreminjanjem sestave pufru in pogojev reakcije. Pufru lahko spreminjamo sestavo, ionsko moč in pH. Podaljšamo lahko čas namenjen zvijanju, spreminjamo temperaturo in koncentracijo proteina ter uporabimo sredstva za usmerjanje prave tvorbe disulfidnih vezi [16]. Renaturacijo lahko izboljšajo nenedenaturacijske koncentracije uree ali GndCl [64]. Analiza procesa zvijanja v primerjavi s tvorbo agregatov z uporabo lizocima kot modelnega proteina je pokazala, da GndCl primarno upočasni hitrost agregacije, manj pa vpliva na hitrost zvijanja proteinov [65]. Izboljšava ponovnega zvijanja s takimi dodatki pa je mogoča zgolj v primeru, da je nativna oblika proteina pri teh pogojih stabilna. Ne nazadnje izkoristek pravilno zviti proteinov lahko izboljšamo z dodatkom L-arginina v relativno visokih koncentracijah (nad 0,5 mol/L). Kljub temu, da lahko arginin vpliva na stabilnost določenih struktur proteinov, le-ta v večini primerov močno poveča topnost intermediatov, ki bi sicer agregirali [16].

1.4. LOČITEV USTREZNO ZVITEGA PROTEINA OD NEUSTREZNIH KONFORMEROV S KROMATOGRAFSKIMI METODAMI

1.4.1. Ionsko-izmenjevalna kromatografija

Ionsko-izmenjevalna kromatografija je ločitvena metoda, ki omogoča ločitev ionov in molekul na osnovi njihovega naboja. Uporabna je za vse vrste molekul z nabojem, vključno z nukleotidi, aminokislinami in proteini.

Vezava molekule na kolono je posledica ionskih interakcij med anionskimi ali kationskimi funkcionalnimi skupinami stacionarne faze in analitom nasprotnega naboja. Glede na vrsto vezanega analita ločimo anionske (nanje se vežejo negativno nabite molekule) in kationske izmenjevalce (nanje se vežejo pozitivno nabite molekule).

Proteini imajo številne funkcionalne skupine, ki imajo lahko bodisi negativen bodisi pozitiven naboj. Z ionsko-izmenjevalno kromatografijo ločimo proteine glede na njihov neto naboj, ki je odvisen od sestave mobilne faze. S spreminjanjem pH lahko selektivno vežemo proteine z različnimi izoelektričnimi točkami (pI). V kolikor je pH višji od pI, je protein negativno nabit in se bo vezal na anionski izmenjevalec. V kolikor je pH nižji od pI, je protein pozitivno nabit in se bo vezal na kationski izmenjevalec. Elucijo vezanega proteina lahko nato izvedemo na dva načina. V prvem primeru spremenimo pH elucijskega pufra, tako da spremenimo neto naboj proteina. V drugem primeru izvedemo elucijo z nespremenjenim pH, vendar večamo ionsko moč pufra. Pri tem ioni v puftru interagirajo z nabitimi funkcionalnimi skupinami stacionarne faze, kar povzroči elucijo proteina. V kolikor večamo ionsko moč stopenjsko ali gradientno, lahko v eluatih zberemo zvrsti proteinov z različnimi naboji (npr. ločimo monomerni protein od oligomerov) [66].

1.4.2. Gelska izključitvena kromatografija

Gelska izključitvena kromatografija (SEC) je metoda, s katero ločimo molekule na osnovi njihove velikosti in je najbolj uporabna za ločevanje makromolekul, kot so polimeri in proteini. Molekule potujejo po porozni stacionarni fazi, pri čemer (idealno) ne interagirajo s površino stacionarne faze. Manjše molekule lahko prehajajo v pore stacionarne faze, zaradi tega potujejo navidezno počasneje in se eluirajo kasneje. Večje molekule ne morejo vstopati v (vse) pore, zato skozi kolono potujejo krajši čas in se eluirajo hitreje. Na splošno ima SEC nizko ločljivost, saj z njo ne moremo ločiti podobnih molekul, zato jo največkrat uporabimo kot zadnji korak v postopku čiščenja.

SEC lahko uporabimo za spremembo sestave pufra raztopinam proteinov (med drugim za odstranitev denaturantov, reducentov in soli) in ločbo tarčnega proteina od ostalih nečistot (vključno z ločitvijo monomerov od oligomerov). V kolikor kolono ekvilibriramo s pufrom za zvijanje, lahko SEC uporabimo za zvitje denaturiranega proteina in hkrati kot stopnjo čiščenja. Postopek temelji na dejstvu, da zaradi različnih porazdelitvenih koeficientov denaturanti, reducenti in soli potujejo počasneje od proteina. Lokalno znižanje koncentracij dodatkov med elucijo posledično povzroči zvitje proteina [66].

1.4.3. Kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija - IMAC

Leta 1975 so Porath in sodelavci uvedli nov tip kromatografije pod imenom IMAC (*angl. immobilized metal ion affinity chromatography*). V kratki publikaciji so avtorji opisali uporabo imobiliziranih cinkovih in bakrovih kovinskih ionov pri ločevanju frakcij proteinov iz človeškega seruma. Pri tem so za ločevanje proteinov izkoristili naravno prisotne in izpostavljene histidinske ostanke, ki so glavni za vezavo na imobilizirane kovinske ione. Kasneje (leta 1987) so Hochuli in sodelavci razvili uspešno metodo za čiščenje rekombinantnih proteinov s polihistidinskimi repi na C- in N-koncih v kombinaciji z Ni²⁺-nitrilotriacetatnim (Ni-NTA) nosilcem, ki selektivno veže zaporedne histidine [67].

Adsorpcija proteinov pri metodi IMAC je osnovana na tvorbi koordinacijskih vezi med imobiliziranimi kovinskimi ioni in elektrondonorskimi skupinami na proteinski površini (npr. dušikovi atomi imidazolskih obročev v histidinskih ostankih). Pri tem uporabljamo nosilec, na katerega so kovalentno pripete skupine, ki kelirajo kovinske ione. Tako imobilizirani kovinski ioni lahko nato tvorijo dodatne koordinacijske vezi z molekulami analita. Pri tem morajo imeti kovinski ioni v kompleksih prosta koordinacijska mesta, da omogočajo interakcije s proteini [68].

Kovinske ione v uporabi za IMAC delimo na trde (Fe³⁺, Al³⁺,...), mehke (Cu⁺, Hg²⁺,...) in mejne oziroma vmesne ione (Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺,...). Najpogosteje uporabljeni so kovinski ioni v vmesni skupini, predvsem Ni(II), ki ga odlikujejo koordinacijsko število 6, elektrokemična stabilnost pod kromatografskimi pogoji, mejna polarizacija in redoks stabilnost [69, 70].

Stacionarne faze navadno sestavljajo nosilci iz agaroze, celuloze ali prečno povezanega dekstrana, ki so stisljivi, vendar omejeni na majhne pretoke. Kot stacionarno fazo lahko uporabimo tudi anorganske nosilce (npr. silikagel), ki morajo imeti zaradi nespecifične adsorpcije modificirano površino [67].

Retencija proteina na koloni je kombinacija treh sil: a) elektrostatske interakcije med nabitimi biomolekulami in bodisi pozitivno nabitimi kovinskimi ioni bodisi negativno nabitimi predeli na površini matriksa (funkcionalne skupine, ki niso kelirale kovinskega iona), b) hidrofobnih interakcij med biomolekulami in hidrofobnimi predeli na površini matriksa in c) donor-akceptorske interakcije med aminokislinskimi ostanki (npr. imidazolnim obročem

histidina) in ujetimi kovinskimi ioni (67, 71). Na slednje v veliki meri vplivata ionska moč in pH kromatografskega pufra. Za uspešno adsorpcijo mora biti pH-vrednost pufra višja od pKa elektrondonorskih aminokislin (pH 6-7 za polihistidinske označevalce). Za zmanjšanje vpliva nespecifičnih elektrostatskih interakcij v fazi vezave ali spiranja uporabljamo pufre relativno visokih ionskih moči (0,1 – 1,0 M). V fazi elucije lahko uporabimo podobne pristope. Desorpcijo lahko dosežemo z uporabo pufra z nižjim pH od pKa histidinskih ostankov. V kolikor to ni mogoče, lahko desorpcijo dosežemo z uporabo imidazola (metoda zamenjave liganda) ali kelatorjev kovinskih ionov (npr. EDTA – metoda uničenja kelatov) [72, 73].

Za uspešno vezavo na kolono mora protein imeti ustrezna vezavna mesta. V praksi najpogosteje uporabljamo označevanje proteinov z daljšimi ali krajšimi polihistidinskimi verigami na skrajnem N- in/ali C-koncu. Teoretično se z večanjem števila histidinov jakost vezave povečuje, vendar večja vezavna moč veča tudi retencijske volumne, zaradi česar se je najbolj uveljavil označevalec s šestimi zaporednimi histidini (His₆) [74]. S polihistidinskim repom označene proteine lahko uspešno pripravimo tako v evkariontskih kot prokariontskih celicah, pri tem pa se moramo odločiti, ali bo polihistidinski označevalec na C- ali N-koncu [75]. Praksa kaže, da je polihistidinski rep na N- koncu skorajda univerzalno uspešno uporabljen. Če proteina ne nameravamo uporabiti v strukturnih ali fizioloških študijah, polihistidinskega repa po čiščenju ni potrebno odstraniti [67].

IMAC lahko uporabimo za pridobivanje nativnih proteinov iz inkluzijskih teles z metodo zvijanja na stacionarni fazi. Metodo odlikujejo možnost čiščenja v eni stopnji, visoka kapaciteta, uporabnost pri koncentriranju raztopin proteinov nizkih koncentracij in kompatibilnost s pufri visokih ionskih moči ali visokih koncentracij kaotropnih snovi [69, 76]. Za izvedbo zvitja z IMAC moramo v prvem koraku pripraviti s polihistidinskim repom označen protein in ga raztopiti s pomočjo visokih koncentracij denaturiratorov. Protein nato ujamemo na nosilcu z imobiliziranimi kovinskimi ioni. Ponovno zvitje dosežemo z gradientnim ali stopenjskim spiranjem kolone z mešanico pufrov različne sestave, pri čemer prehajajo denaturacijski pogoji v renaturacijske. Po zvijanju nativni protein eluiramo v topni obliki [67].

Prednost te renaturacijske metode je sposobnost vezave proteina na kromatografski nosilec v denaturacijskih pogojih. Je pa zato uporabna le za proteine, kjer polihistidinski označevalec ne vpliva na tvorbo nativne strukture. Težave nastanejo tudi v primeru, ko je za uspešno zvitje potrebno ustrezno redoks okolje, ki lahko vpliva na redukcijo kovinskih ionov

v koloni. V kolikor je za raztapljanje inkluzijskih teles potrebno redukcijsko sredstvo, je potrebno slednjega tik pred adsorpcijo odstraniti (z zamenjavo pufra) [77].

1.5.PREDSTAVITEV SISTEMOV pGEM IN pET

1.5.1. Sistem pET

Sistem pET je nabor plazmidov za kloniranje in izražanje rekombinantnih proteinov v *E. coli*. Geni, vstavljeni v plazmide pET, so pod nadzorom močnega promotorja T7, ki se nahaja tik pred regijo z več mesti za kloniranje. Za izražanje tarčnega proteina v gostiteljski celici je tako potrebna že minimalna količina T7 RNA-polimeraze. Gen za slednjo se običajno nahaja v genomu ustreznega ekspresijskega seva *E. coli* (npr. BL21(DE3)) in je pod nadzorom promotorja *lacUV5*, kar omogoča enostavno in dobro regulacijo izražanja gena, vstavljenega v plazmid družine pET. Z dodatkom izopropil- β -D-tiogalaktozida (IPTG) najprej sprožimo izražanje T7 RNA-polimeraze. T7 RNA-polimeraza je tako selektivna in aktivna, da se ob polni indukciji skoraj vsi presnovni procesi celice usmerijo v izražanje gena, vstavljenega navzdol od promotorja T7 v plazmidu pET. Izražanje je tako izrazito, da lahko v roku nekaj ur tarčni protein predstavlja 50 % celotnih bakterijskih proteinov.

Sistem pET odlikuje možnost popolnega utišanja transkripcije tarčnega gena v stanju, ko proteina ne želimo izraziti. Plazmide z želenim genom pomnožujemo v gostiteljskih celicah, ki ne vsebujejo gena za T7 RNA-polimerazo. Na ta način zagotovimo nastajanje plazmida v večjem številu kopij, saj je izražanje v plazmid vstavljenega gena popolnoma onemogočeno. Uspešno pomnoženi vektor z vstavljenim genom prenesemo v ustrezen ekspresijski bakterijski sev, v katerem lahko izražanje tarčnega proteina sprožimo na dva načina. Transformirane gostiteljske celice lahko tako okužimo s fagom λ CE6, ki nosi gen za T7 RNA-polimerazo pod nadzorom λ p_L in p_i promotorja. V drugem primeru lahko plazmid prenesemo v sistem za izražanje, ki vsebuje kromosomsko kopijo gena za T7 RNA-polimerazo pod nadzorom *lacUV5* (npr. sev BL21 (DE3)). V tem primeru sprožimo izražanje z dodatkom IPTG ali laktoze v bakterijsko kulturo.

T7 RNA-polimeraza se v ekspresijskem bakterijskem sevu *E. coli* BL21(DE3) v manjši meri izraža preko promotorja *lacUV5* tudi v odsotnosti IPTG-ja, kar povzroči bazalno

ekspresijo tarčnega proteina. Številni rekombinantni proteini lahko vplivajo na normalne celične procese in so zato lahko za bakterijo toksični. Če je produkt tarčnega gena dovolj toksičen, lahko vpliva na bazalni metabolizem *E. coli* in prepreči rast bakterije in s tem nižji končni izplen proteina ter pomnožitev plazmida.

Izpopolnjen pristop za boljšo kontrolo izražanja gena je uporaba vektorjev, ki nosijo promotor *T7lac*, hibridno regulatorno regijo, sestavljeno iz promotorja T7 in operatorja *lac*. Ko tak vektor uporabimo v sevu *E. coli* BL21(DE3), se bakterijski represor *lac* veže na operatorsko regijo pred genom za RNA-polimerazo T7 v gostiteljskem kromosomu in prepreči gostiteljski RNA polimerazi transkripcijo gena za T7 RNA-polimerazo. Represor *lac* se veže tudi na promotor *T7lac* na vektorju, s čimer še dodatno prepreči (potencialno prisotni) T7 RNA-polimerazi transkripcijo tarčnega gena.

Dodatno stabilnost tarčnega zaporedja lahko dosežemo z izražanjem v gostiteljskih sevih z dodatnim plazmidom, ki nosi gena za lizocim T7 in odpornost na kloramfenikol. Lizocim T7 se veže na T7 RNA-polimerazo in s tem inhibira transkripcijo genov pod nadzorom promotorja T7. Plazmida pLysS in pLysE so pridobili s kloniranjem gena za lizocim T7 v regiji *Bam*H I plazmida pACYC184. Klonirani fragment vsebuje promotor ϕ 3.8 za T7 RNA-polimerazo takoj za genom za lizocim. Plazmidu, ki ima fragment orientiran tako, da se lizocimski gen izrazi preko promotorja tet pACYC184, pravimo pLysE. Plazmidu, ki ima fragment obrnjen v nasprotno smer, pa pravimo pLysS [78].

1.5.2. Izražanje rekombinantnega proteina v fuziji z NusA

Novejši pristop za izražanje topnih in ustrezno zvitih rekombinantnih proteinov v *E. coli* je uporaba fuzijskih genov, s čimer tarčni protein izrazimo v obliki fuzijskega proteina z ustreznim fuzijskim partnerjem. Prvi sistem za izboljšanje topnosti izražene tarčnega proteina je kot fuzijski partner uporabil N-končno vezan tioredoksin. Široko uporabljana fuzijska partnerja sta kmalu postala maltozo vezavni protein in glutation S-transferaza, saj sočasno omogočata tudi afinitetno čiščenje končnega produkta (maltozo vezavni protein se veže na amilozo, glutation S-transferaza pa na imobiliziran glutation).

Pri raziskavah novih fuzijskih partnerjev so Roger G. Harrison in sodelavci na podlagi teoretičnih modelov ugotovili, da je transkripcijski dejavnik NusA (*angl. N-utilization*

substance A) odličen kandidat za izboljšanje topnosti rekombinantnih proteinov v *E. coli* (teoretično je izkazoval kar 95 %-verjetnost, da bo fuzijski protein topen). Domneve so potrdili v poskusih, kjer so NusA uporabili kot fuzijski partner z različnimi proteini. V večini primerov je topna frakcija predstavljala ~90 % rekombinantnega proteina, poleg tega je fuzija z NusA povečala nivo njegovega izražanja. Na podlagi ugotovitev sta nastala plazmida pET-43 in pET-44, ki omogočata izražanje poljubnega proteina v fuziji z NusA. Ker NusA ne omogoča afinitetne vezave, so pred gen dodali še zapis za N-končni polihistidinski rep (His₆), s katerim je možno fuzijski protein afinitetno vezati z uporabo metode IMAC. Med zaporedjem fuzijskega partnerja in tarčnega protina se nahajata restrikcijski mesti za trombin in enterokinazo, kar omogoča kasnejšo proteolizno cepitev tarčnega proteina od fuzijskega partnerja [79].

1.5.3. Sistem pGEM

pGEM-T Easy je lineariziran vektor s po enim 3'-končnim timidinom na obeh koncih verige. T-štrleči konci bistveno pripomorejo k uspešnejši ligaciji, saj preprečujejo zapiranje vektorja samega vase in hkrati služijo ligaciji zelenega inserta, ki je bil pomnožen v reakciji PCR z določenimi termostabilnimi polimerazami. Nekatere od slednjih (npr. *Taq* DNA-polimeraza) tvorijo produkte s 3'-adenozinskimi štrlečimi konci, ki se nato komplementarno združijo s timidinskimi konci.

pGEM®-T Easy je vektor z velikim številom kopij, ki nosi gen za β -galaktozidazo. Znotraj genskega zapisa za podenoto α se nahaja območje z več mesti za kloniranje (MCS), ki ga obdajata z ene strani promotor za T7 RNA-polimerazo, z druge strani pa promotor za SP6 RNA-polimerazo. Uspešna vključitev fragmenta DNA v območje z več mesti za kloniranje okvari gen za podenoto α , kar nam omogoči, da transformirane celice, ki izražajo podenoto ω β -galaktozidaze, z uspešno vstavljenim fragmentom ločimo z modro-belim testom na indikatorskem gojišču. Na obeh straneh MCS se nahajajo restrikcijska mesta za *EcoRI*, *BstZI* in *NotI*, kar omogoča izrezovanje inserta z uporabo ene same restriktaze [80].

2. NAMEN NALOGE

Leptin je eden izmed ključnih regulatorjev energijskega ravnovesja. Pri prekomerno težkih osebkih je plazemska koncentracija leptina povišana. Prekomerna aktivacija perifernih LR pa lahko vodi v nastanek oz. poslabšanje številnih bolezenskih stanj, kot so rakava obolenja, sladkorna bolezen in ateroskleroza. Z zaviranjem delovanja leptina lahko izboljšamo njihov potek, zaradi česar bi lahko leptinski antagonisti postali nova potencialna zdravila za zdravljenje omenjenih bolezni. LBD je ena izmed zunajceličnih domen LR, ki je ključna za vezavo leptina, a je njena afiniteta do leptina v primerjavi z afiniteto celotnega receptorja prenizka, da bi postala uporaben leptinski antagonist. Kljub temu lahko LBD zaradi preprostejše in cenejše priprave upravičeno uporabimo za razvoj antagonistov, ki bi se selektivno vezali na to domeno.

V okviru diplomskega dela bomo skušali pripraviti aktivno obliko LBD bodisi z izražanjem le-te v obliki fuzijskega proteina z domeno Nus-A bodisi s ponovnim zvijanjem iz inkluzijskih teles. Za izražanje fuzijskega proteina bomo sintezni gen *LBD* pomnožili in vstavili v komercialen ekspresijski vektor pET44c, ki omogoča izražanje poljubnega proteina v povezavi s fuzijskim partnerjem NusA in heksahistidinskim repom. Z vektorjem bomo transformirali celice *E. coli* BL21 (DE3) pLysS oz. Origami (DE3) pLysS in izražanje želenega proteina sprožili z dodatkom IPTG. Prisotnost proteina NusA-LBD v topni ali netopni frakciji celičnega lizata bomo preverili z uporabo poliakrilamidne gelske elektroforeze z natrijevim dodecilsulfatom (SDS-PAGE). V kolikor bomo protein zaznali v topni frakciji, bomo stopnjo čiščenja opravili z vezavo proteina na kolono IMAC. V kolikor bo izražanje fuzijskega proteina NusA-LBD v topni obliki neuspešno, bomo LBD izrazili v obliki IT. IT bomo raztopili v pufru z denaturantom, stopnjo zvijanja pa poskusili izvesti na različne načine, npr. z redčenjem raztopine LBD v pufer brez denaturantov, z zvijanjem na koloni IMAC ali z zvijanjem na koloni za izključitveno kromatografijo z uporabo gradienta uree. Prisotnost monomernih molekul LBD bomo preverili z izključitveno kromatografijo, čistost s SDS-PAGE, afiniteto pridobljene LBD do leptina (v nadaljevanju aktivnost) pa bomo ovrednotili s prirejenim encimskoimunskim testom (ELISA).

3. MATERIALI IN METODE

3.1.MATERIALI

3.1.1. Laboratorijska oprema

Analitska tehtnica AB 104	Mettler, Toledo, Küssnacht, Švica
Centrifuga Micro-centrifuge II GMC-060	Daihan Labtech Co., Namyangju, Koreja
Centrifugi 5804 R in 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Ciklični termostat AB GeneAmp® PCR System 2700	Applied Biosystems, Foster City, CA, ZDA
Čitalec mikrotiterskih ploščic Tecan Safire	Tecan Group Ltd., Männedorf, Švica
Elektroforezna kadička B1A Easy cast mini gel	Owl, Portsmouth, NH, ZDA
FPLC kromatografski sistem ÄKTAexplorer 10	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Velika Britanija
Kolona HiPrep Q XL 16/10	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Velika Britanija
Kolona Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Velika Britanija
pH meter 691	Metrohm, Herisan, Švica
Pipete (0,5-10; 10-100; 100-1000; 1000-5000 µL)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Precizna tehtnica Exacta 610 EB	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Spektrofotometer Nanodrop ND-1000	Nanodrop Technologies, Delaware, ZDA
Spektrofotometer UV/VIS Lambda Bio+	PerkinElmer, Wellesley, MA, ZDA
Stresalnika Vibromix 314 EVT in 403 EVT	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Vibracijski stresalnik Vibromix 104 EV	Tehtnica, Mezniki, Slovenija
Vir napetosti za elektroforezne kadičke Power Ease 500	Novex, Frankfurt, Nemčija
Zaščitena mikrobiološka komora LFVP 12	Iskra PIO, Šentjernej, Slovenija

3.1.2. Kemikalije

3,3',5,5' tetrametilbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich
absolutni etanol	SERVA Electrophoreisis GmbH, Heidelberg, Nemčija
agar	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemčija
agaroz	Sigma, St.Louis, MO, ZDA
ampicilin	Fluka, Buchs, Švica
beta-merkaptioetanol (β -ME)	Sigma, St.Louis, MO, ZDA
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma, St.Louis, MO, ZDA
D-biotin	Sigma, St.Louis, MO, ZDA
ditiotretitol (DTT)	Fluka, Buchs, Švica
etanol, 70 %	Riedel-de Haën AG, Nemčija
etanol, 96 %	Riedel-de Haën AG, Nemčija
glicerol	Fluka, Buchs, Švica
glicin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemčija
goveji serumski albumin (BSA)	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
goveji serumski albumin standard (BSA) – standard (1 mg/mL)	Fermentas, Burlington, Kanada
HCl	Fluka, Buchs, Švica
IPTG (izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid)	Promega, Madison, WI, ZDA
KCl	Carlo Erba, Rodano, Italija
KH_2PO_4	J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, ZDA
kanamicin	Sigma, St.Louis, MO, ZDA
kloramfenikol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemčija
kvasni ekstrakt	Sigma, St.Louis, MO, ZDA
$\text{MgCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Fluka, Buchs, Švica
Na_2HPO_4	Fluka, Buchs, Švica
NaH_2PO_4	Fluka, Buchs, Švica
NaOH	Fluka, Buchs, Švica

nanašalno barvilo za gelsko elektroforezo -DNA Loading Dye (6x)	Fermentas, Burlington, Kanada
natrijev dodecilsulfat (SDS)	Fluka, Buchs, Švica
natrijev etilendiamintetraacetat (EDTA)	SERVA Electrophoreisis GmbH, Heidelberg, Nemčija
očetna kislina, koncentrirana	Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
polietilenglikol 3000 (PEG 3000)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemčija
saharoza	Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
Sybr Gold	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
TEMED (tetrametiletilendiamin)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemčija
tetraciklin	Sigma, St.Louis, MO, ZDA
tripton	Sigma, St.Louis, MO, ZDA
tris (C ₄ H ₁₁ NO ₃ , tris(hidroksimetil)aminometan)	Promega, Madison, WI, ZDA
Tween®20	Fluka, Buchs, Švica
X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid)	Sigma, St.Louis, MO, ZDA

3.1.3. Kompleti, reagenti, oligonukleotidi in označevalci

5'-začetni oligonukleotid F- <i>Bam</i> HI: 5'- (GGATCCAGATTGATGTGAACATTAATATCAGC TGCGAAAC)-3'	Eurofins MWG Synthesis GmbH, Nemčija
3'-začetni oligonukleotid R- <i>Xho</i> I:5'- (CTCGAGGTCCATCACGACG)-3'	Eurofins MWG Synthesis GmbH, Nemčija
5'-začetni oligonukleotid T7 5' (TAATACGACTCACTATAGGG) 3'	Eurofins MWG Synthesis GmbH, Nemčija
Komplet Elute HP Plasmid Miniprep Kit	Sigma, St.Louis, MO, ZDA
Komplet QIAEX® II gel extraction kit	Qiagen, Hilden, Nemčija
PCR Master Mix (2x)	Fermentas, Burlington, Kanada
<i>LBD</i> – sintezni gen v pUC57	Genescript, Piscataway, NJ
označevalec velikosti Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, Burlington, Kanada
označevalec velikosti Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder	Fermentas, Burlington, Kanada
označevalec velikosti Gene Ruler™ low range DNA ladder	Fermentas, Burlington, Kanada
pGEM®-T Easy Vector System I	Promega, Madison, WI, ZDA
označevalec velikosti SeeBlue Plus 2	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA

3.1.4. Biološki materiali

Bakterijski sev *E. coli* TOP10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA)

Genotip: F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*

Bakterijski sev *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)

Genotip: F⁻ *ompT hsdSB*(rB⁻, mB⁻) *gal dcm* (DE3) pLysS (CamR)

Rekombinantni človeški leptin (R&D Systems, Minneapolis, MN)

Biotiniliran humani leptin (B-hLEP) (250 µg/mL)

Biotinilacijo rekombinantnega človeškega leptina je izvedel Peter Molek (Fakulteta za farmacijo).

DNAza I (Sigma, St.Louis, MO, ZDA)

Humani leptin (R&D Systems, Minneapolis, MN, ZDA)

Konjugat streptavidin-HRP (1 mg/mL) (GenScript Corp., Piscataway, NJ, ZDA)

Monoklonsko mišje protitelo proti heksahistidinskemu označevalcu Anti-His-MAb (GenScript Corp., Piscataway, NJ, ZDA)

Gen za LBD, vstavljen v vektor pET28 (pET28/LBD)

Pripravil Peter Molek (Fakulteta za farmacijo)

pET44c (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)

Rekombinantni človeški fuzijski protein hLR-Fc (0,5 mg/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN, ZDA)

100 µg liofilizata smo dodali 200 µL ddH₂O

Restriksijski encim *Bam*HI (New England Biolabs)

Restriksijski encim *Eco*RI (New England Biolabs)

Restriksijski encim *Xho*I (New England Biolabs)

3.1.5. Pufri, raztopine in gojišča

Pufer TAE 50×, pH 8

242 g Tris

57,1 mL koncentrirane očetne kisline

100 mL 0,5 M EDTA

ddH₂O do 1000 mL

pH smo uravnali z NaOH oz. očetno kislino.
Pufer smo pred uporabo petdesetkrat redčili z ddH₂O.

Pufer za DNazo

10 mM Tris

0,25 mM MgCl₂

0,5 mM CaCl₂

ddH₂O

Z NaOH oz. HCl smo uravnali pH na 7,6 in pufer sterilizirali s filtracijo.

1 % Triton X-100

49,5 mL ddH₂O

0,5 mL Triton X-100

Raztopino smo sterilizirali s filtracijo.

1 % Triton X-100/ 0,5 M gvanidinijev klorid/ ddH₂O

956 mg gvanidinijevega klorida

1 % Triton X-100/ddH₂O do 20 mL

Raztopino smo sterilizirali s filtracijo.

Pufer za raztapljanje IT 1

10 mM Tris

5 M urea

15 mM β-ME

ddH₂O

Pufer za zvijanje A

10 mM Tris

100 mM NaH₂PO₄

ddH₂O

Z NaOH oz. HCl smo uravnali pH na 8,5 in pufer avtoklavirali. Po ohladitvi smo dodali še:

0,2 % Tween-20

0,5 mM mg GSSG

1 mM mg GSH

Pufer za zvijanje B

10 mM Tris

100 mM NaH₂PO₄

0,5 M L-arginin

ddH₂O

Z NaOH oz. HCL smo uravnali pH na 8,5 in pufer avtoklavirali. Po ohladitvi smo dodali še:

0,01 % Tween-20

1 mM mg GSSG

3 mM mg GSH

Pufer za gradient A

10 mM Tris

150 mM NaCl

3 mM GSH

0,3 mM GSSG

1 mM EDTA

ddH₂O

Z NaOH oz. HCl smo uravnali pH na 9 in pufer sterilizirali s filtracijo.

Pufer za gradient B

10 mM Tris

150 mM NaCl

5 M urea

3 mM GSH

0,3 mM GSSG

1 mM EDTA

Raztopina NiSO₄

263 mM NiSO₄

ddH₂O

Raztopino smo sterilizirali s filtracijo.

Denaturacijski pufer

10 mM Tris

6 M gvanidinijev klorid

ddH₂O

Z NaOH oz. HCl smo pufru uravnali pH na 11,5 in ga centrifugirali (10.000 g, 10 min, 4 °C).

Pufer E

10 mM Tris

6 M gvanidinijev klorid

500 mM imidazol

ddH₂O

Pufer za raztapljanje IT 2

10 mM Tris

6 M gvanidinijev klorid

15 mM β-ME

Pufer smo centrifugirali (10.000 g, 10 min, 4 °C).

Z NaOH/HCl smo pufru uravnali pH na 11,5 in ga centrifugirali (10.000 g, 10 min, 4 °C).

Pufer za zvijanje C

10 mM Tris

500 mM NaCl

2 mM GSH

0,2 mM GSSG

ddH₂O

Z NaOH oz. HCl smo uravnali pH na 9 in pufer sterilizirali s filtracijo.

Pufer za zvižanje D

10 mM Tris

150 mM NaCl

ddH₂O

Z NaOH oz. HCl smo uravnali pH na 9 in pufer sterilizirali s filtracijo.

Elucijski pufer za IMAC

10 mM Tris

150mM NaCl

500 mM imidazol

ddH₂O

Z NaOH oz. HCl smo uravnali pH na 9 in pufer sterilizirali s filtracijo.

Gel za agarozno gelsko elektroforezo (1,2 oz. 1,5 %-agarozni gel)

a) 0,60 g agaroze za 1,2 %-gel

b) 0,75 g agaroze za 1,5 %-gel

50 mL pufra TAE (1×)

Ustrezno količino agaroze smo s segrevanjem v mikrovalovni pečici raztopili v pufri TAE. Po ohladitvi smo gel vlili na kadičko in namestili glavniček

Fosfatni pufer s soljo PBS

8,01 g NaCl

0.20 g KCl

1.42 g Na₂HPO₄

0,27 g KH₂PO₄

ddH₂O do 1000 mL

Z NaCl oz. HCl smo uravnali pH na 7,4 in pufer avtoklavirali.

Pufer za spiranje (0,1 % PBST)

V 100 mL PBS smo dodali 100 µL Tween-a 20 za 0,1 % PBST

Blokirni pufer BSA (1 % BSA v PBS)

100 mg BSA smo raztopili v 10,0 mL PBS.

Blokirni pufer z mlekom (5 %-mleko v PBS)

500 mg posnetega mleka smo raztopili v 10,0 mL PBS

0,5 %-mleko v 0,05 % PBST

1 mL 5 %-mleka v PBS smo dodali 9 mL PBS in 5 µL Tween-a 20

0,5 %-mleko v 0,1 % PBST

1 mL 5 %-mleka v PBS smo dodali 9 mL PBS in 10 µL Tween-a 20

Gojišče TB (za 400 mL gojišča)

4,8 g triptona

9,6 g kvasnega ekstrakta

3,2 mL glicerola

ddH₂O do 360 mL

Raztopino smo avtoklavirali in ji po ohladitvi dodali 40 mL pufra s kalijevim fosfatom pH 7,2

Pufer s kalijevim fosfatom (za 100 mL pufra):

2,31 g KH₂PO₄

12,54 K₂HPO₄

ddH₂O do 100 mL

Z NaOH oz. HCl smo pufru uravnali pH na 7,2 in ga sterilizirali s filtracijo.

Gojišče LB

2 g kvasnega ekstrakta

4 g peptona

2 g NaCl

400 mL ddH₂O

Raztopino smo avtoklavirali.

Agarno gojišče LB

6 g agarja

400 mL gojišča LB

Mešanico smo avtoklavirali in še vroče gojišče prelili v petrijevke premera 9 cm. Strjena gojišča smo shranili pri 4 °C.

Agarno gojišče LB/IPTG/X-gal

Po postopku za agarno gojišče LB. Mešanico smo po avtoklaviranju ohladili na 70 °C in ji dodali 84 µL 1 M IPTG ter 800 µL 2 % X-gal.

1 M raztopina IPTG

2,383 g IPTG

10 mL ddH₂O

Raztopino smo sterilizirali s filtracijo in shranili pri -20 °C.

Agarno gojišče LB/IPTG/X-gal/amp

Po postopku za agarno gojišče LB. Mešanico smo po avtoklaviranju ohladili na 70 °C in ji dodali 84 µL 1 M IPTG, 800 µL 2 % X-gal ter 800 µL 50mg/mL ampicilina.

Agarno gojišče LB/amp

Po postopku za agarno gojišče LB. Mešanico smo po avtoklaviranju ohladili na 70 °C in ji dodali 800 µL 50mg/mL ampicilina.

Agarno gojišče LB/amp/chlor

Po postopku za agarno gojišče LB. Mešanico smo po avtoklaviranju ohladili na 70 °C in ji dodali 800 µL ampicilina (50 mg/mL) ter 400 µL kloramfenikola (34 mg/mL).

Agarno gojišče LB/amp/chlor/kan/tetra

Po postopku za agarno gojišče LB. Mešanico smo po avtoklaviranju ohladili na 70 °C in ji dodali 800 µL ampicilina (50 mg/mL), 400 µL kloramfenikola (34 mg/mL), 60 µL kanamicina (100 mg/mL) in 250 µL tetraciklina (20 mg/mL).

0,1 M CaCl₂

33,3 mg CaCl₂

30 mL ddH₂O

Raztopino smo avtoklavirali.

Elektroforezni pufer za SDS-PAGE (10×)

30.2 g Tris

144 g glicina

10 g natrijevega dodecilsulfata (SDS)

ddH₂O do 1 L

Raztopino smo pred uporabo redčili desetkrat.

1 M DTT

154 mg DTT

1 mL ddH₂O

Raztopino smo sterilizirali s filtracijo in shranili pri -20 °C.

0,1 M CaCl₂ v 15 % glicerolu

12,9 mg CaCl₂ × 2H₂O

1,5 mL glicerola

ddH₂O do 10 mL

Raztopino smo avtoklavirali.

3.2.METODE

3.2.1. Pomnoževanje gena *LBD* z uvedbo restrikcijskih mest za *Bam*HI in *Xho*I

Za pripravo vektorja za izražanje fuzijskega proteina LBD-NusA je bilo potrebno pripraviti insert z genom za LBD. Z reakcijo PCR smo pomnožili sintezni gen *LBD*, vstavljen v plazmid pUC57. Najprej smo pripravili 100 μ M delovne raztopine začetnih oligonukleotidov iz liofilizatov in jih redčili do koncentracije 5 μ M. Sledila je pomnožitev PCR. V 200 μ L-mikrocentrifugirko smo prenesli:

- 12,5 μ L osnovne zmesi za PCR (PCR master mix, 2 \times),
- 1 μ L 5 μ M F-*Bam*HI,
- 1 μ L 5 μ M R-*Xho*I,
- ~ 1 ng plazmida pUC57 z vstavljenim insertom *LBD*,
- dodali nfH₂O do skupnega volumna 25 μ L in s pipeto rahlo premešali.

Reakcijsko mešanico smo prenesli v ciklični termostat in reakcijo PCR izvedli po programu v tabeli I:

Tabela I: Shematski prikaz poteka reakcije PCR.

Trajanje	Temperatura	Proces
5 min	95 °C	Aktivacija Taq DNA-polimeraze
1 min	95 °C	Denaturacija DNA
30 s	53 °C	Prileganje začetnih oligonukleotidov
1 min	72 °C	Podaljševanje verige
10 min	72 °C	Zaključno podaljševanje

3.2.2. Preverjanje velikosti produkta PCR z gelsko elektroforezo

Nastanek produkta ustrezne velikosti smo preverili z agarozno elektroforezo. Na 1,5 %-agarozni gel smo nanjali dva označevalca velikosti (Gene Ruler™ low range DNA ladder in Gene Ruler™ 50 bp DNA ladder), reakcijsko zmes in slepo kontrolo (reakcijska zmes brez matrične DNA). Elektroforeza je potekala pri napetosti 10 V/cm približno 1 uro. Po elektroforezi smo gel prenesli v kadičko s 50 mL pufra TAE in dodanim Sybr Gold (v volumskem razmerju 1:10000). Kadičko smo pred svetlobo zaščitili z alufolijo in gel rahlo stresali 20 min. Produkta smo detektirali z UV-svetlobo.

3.2.3. Ekstrakcija pomnoženega gena *LBD* iz 1,5%-agaroznega gela

S spatulo smo izrezali košček gela s fragmenti DNA, ki so glede na prepotovano dolžino ustrezali velikosti gena *LBD*, in ga prenesli v 1,5 mL-mikrocentrifugirko. Iz razlik v masi prazne in polne mikrocentrifugirke smo koščku gela določili maso (136 mg). Za izolacijo amplikona smo uporabili komplet QIAEX® II gel extraction kit.

1. V mikrocentrifugirko smo glede na maso izrezanega koščka gela dodali trikratni volumen (408 µL) pufra QX1 in 10 µL suspenzije silikagela QIAEX II, ki smo jo predhodno 30 s mešali na vibracijskem mešalniku. Na silikagel se v šibko kislih pogojih (pH pod 7) in ob prisotnosti visokih koncentracij kaotropnih ionov veže prisotna DNA.
2. Vsebinsko smo ponovno premešali na vibracijskem mešalniku in inkubirali pri 50 °C 10 min. Med inkubacijo smo vsebinsko premešali na vibracijskem mešalniku vsaki 2 min, da smo ohranili QIAEX II v obliki suspenzije.
3. Suspenzijo smo centrifugirali 30 s in supernatant previdno odstranili s pipeto.
4. Usedlini smo dodali 500 µL pufra QX1 in jo ponovno suspendirali na vibracijskem mešalniku.
5. Suspenzijo smo centrifugirali 30 s in supernatant odstranili s pipeto.
6. Usedlini smo dodali 500 µL pufra PE, vsebinsko ponovno suspendirali, centrifugirali 30 sec in nato odstranili supernatant.
7. Korak številka 6 smo ponovili še enkrat.
8. Usedlino smo na zraku sušili 15 min.

9. Posušenemu silikagelu smo dodali 20 μL 10 mM Tris (pH 8,5), ga ponovno suspendirali in nato inkubirali pri sobni temperaturi (25 $^{\circ}\text{C}$) 5 min, da se je s silikagela sprostila vezana DNA.
10. Vzorec smo centrifugirali 30 s, supernatant z vsebujočo DNA pa s pipeto prenesli v čisto mikrocentrifugirko.
11. Tako dobljenim vzorcem smo spektrofotometrično ($\lambda = 260 \text{ nm}$) določili koncentracijo vsebujoče DNA.

3.2.4. Ligacija inserta *LBD* v vektor pGEM-T Easy

Za ligacijo inserta *LBD* v vektor pGEM-T Easy smo uporabili komplet pGEM-T Easy. V 0,5 ml-mikrocentrifugirko smo odpipetirali:

1. 5 μL ligacijskega pufru 2 \times Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase,
2. 1 μL odprtega vektorja pGEM-T Easy (50 ng/ μL),
3. 1,6 μL izoliranega amplikona *LBD*,
4. 1 μL DNA-ligaze T4 (3 Weissove enote/ μL),
5. 1,4 μL H_2O (končni volumen 10 μL).

Vsebino smo premešali s pipeto in pustili, da ligacija poteka preko noči pri 4 $^{\circ}\text{C}$.

3.2.5. Priprava kompetentnih celic *E. coli* TOP10 in Origami (DE3) pLysS

1. S sterilno mikrobiološko zanko smo podržnili po zamrznjeni trajni kulturi celic TOP10, jo pomočili v 5 mL gojišča LB v erlenmajerici in inkubirali preko noči pri 37 $^{\circ}\text{C}$ med stresanjem (250 vrt./min).
2. 1,5 mL prekonočne kulture smo prenesli v erlenmajerico s 150 mL gojišča LB in inkubirali pri 37 $^{\circ}\text{C}$ med stresanjem pri 250 vrt./min do $\text{OD}_{600} \sim 0,4$ (optična gostota merjena pri 600 nm).
3. Erlenmajerico smo inkubirali na ledu 20 min
4. Ohlajeno kulturo smo prenesli v tri predhodno ohlajene 50 ml-centrifugirke in cetrifugirali 15 min pri 4 $^{\circ}\text{C}$ pri 5000 vrt./min.

5. Supernatante smo odlili, usedline pa ponovno suspendirali, vsako v po 10 mL ohlajenega 0,1 M CaCl₂.
6. Centrifugirke smo inkubirali 20 min na ledu in jih nato 15 min centrifugirali pri 4 °C in 5000 vrt./min.
7. Usedline smo ponovno suspendirali v po 10 mL ohlajenega 0,1 M CaCl₂ in vsebine združili v eno samo centrifugirko.
8. Sledila je ponovna inkubacija na ledu (30 min).
9. Po 15 minutnem centrifugiranju (4 °C; 5000 vrt./min) smo usedlino ponovno suspendirali v 4 mL ohlajenega 0,1 M CaCl₂ v 15 % glicerolu.
10. Vzorec smo nato alikvotirali (po 200 µL) v ohlajene 1,5 mL-mikrocentrifugirke in jih zamrznili v tekočem dušiku.
11. Kulture smo shranili pri -80 °C.

Enak postopek smo uporabili za pripravo kompetentnih celic Origami (DE3) pLysS, le da smo uporabili gojišče LB s 34 µg/mL kloramfenikola, 15 µg/mL kanamicina in 12,5 µg/mL tetraciklina.

3.2.6. Transformacija kompetentnih celic *E. coli* TOP10 z ligacijsko zmesjo pGEM-T Easy/LBD oz. plazmidom pET44c

1. Na ledu smo odmrznili kompetentne celice TOP10 (200 µL) in jim dodali ligacijsko zmes pGEM-T Easy/LBD (ali 50 ng plazmida pET44c), nežno premešali s pipeto in inkubirali na ledu 20 min.
2. Po 45-sekundnem toplotnem šoku na vodni kopeli (42 °C) smo mikrocentrifugirko ponovno inkubirali na ledu 5 min.
3. V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 800 µL gojišča LB, vsebino s pipeto rahlo premešali in inkubirali pri 37 °C med stresanjem (250 vtr./min) eno uro.
4. Ob odprtem plamenu smo na agarno gojišče LB/IPTG/X-gal/amp (oz. LB/amp pri transformaciji s pET44c) prenesli 100 µL kulture in jo s spatulo po Drigalskem enakomerno razmazali po gojišču.
5. Petrijevko smo pokrili s pokrovom in rob zatesnili s parafilmom.
6. Preostanek vzorca smo centrifugirali 5 min pri 5000 vrt./min.
7. 800 µL supernatanta smo odstranili in usedlino suspendirali v preostalih 100 µL.

- 100 μL vzorca smo prenesli na novo agarno gojišče, ga razmazali in petrijevko zatesnili s parafilmom.
- Petrijevki smo prenesli v inkubator in inkubirali pri 37 °C.
- Naslednje jutro smo bele kolonije uporabili za pripravo prekonočnih kultur.

3.2.7. Izolacija vektorjev pGEM-T Easy/LBD in pET44c

Dan pred izolacijo smo pripravili pet prekonočnih kultur TOP10/ pGEM-T Easy/LBD in tri prekonočne kulture TOP10/pET44c.

- V erlenmajerice smo odpipetirali po 10 mL gojišča LB in mu dodali 100 $\mu\text{g/mL}$ ampicilina.
- V tako pripravljena gojišča smo s prežarjeno in ohlajeno cepilno zanko iz agarnih gojišč (3.2.6) precepili po eno osamljeno bakterijsko kolonijo. Erlenmajerice smo prekrili s folijo in inkubirali preko noči pri 37 °C med stresanjem (250 vrt./min).

Izolacijo plazmidov smo opravili z uporabo kompleta GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma).

- 1,5 mL prekonočne kulture smo prenesli v 1,5 mL-mikrocentrifugirko in vsebino centrifugirali pri 12.000 g 1 min.
- Supernatant smo previdno odstranili s pipeto, usedlino pa ponovno suspendirali na vibracijskem stresalniku v 200 μL raztopine za suspendiranje celic (Resuspension Solution), ki vsebuje RNazo A.
- Suspendiranim celicam smo dodali 200 μL pufra za lizo (Lysis Buffer) in vsebino nežno premešali z obračanjem centrifugirke, dokler ni vsebina postala bistra in viskozna ter pustili, da liza poteka 1 min.
- V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 350 μL pufra za nevtralizacijo in vsebino rahlo premešali.
- Vsebinsko smo nato centrifugirali pri 10.000 g 10 min, in dobili bister supernatant.
- Kolono GenElute HP Miniprep Binding Column smo vstavili v priloženo mikrocentrifugirko in vanjo odpipetirali 500 μL raztopine za pripravo kolone (Column Preparation Solution).

7. Po 60-sekundnem centrifugiranju pri 10.000 g, smo filtrat zlili v odpad, na kolono pa nanesli bister supernatant, ki smo ga dobili po centrifugiranju lizata (točka 5).
8. Kolono smo ponovno centrifugirali 60 s pri 10.000 g.
9. Filtrat smo odstranili in tokrat na kolono odpipetirali 500 μ L raztopine za spiranje 1 (Wash solution 1) in vsebino ponovno centrifugirali 60 sekund pri 10.000 g.
10. Postopek smo ponovili še s 750 μ L raztopine za spiranje 2 (Wash slution 2).
11. Sledilo je 60-sekundno cetrifugiranje pri 10.000 g brez kakršnegakoli dodatka, da smo odstranili sledove etanola.
12. Kolono smo prestavili v čisto mikrocentrifugirko, vanjo odpipetirali 100 μ L elucijskega pufra (10 mM Tris, pH 8,5) in centrifugirali 45 s pri najvišji hitrosti.

Eluatom z izoliranimi plazmidi smo spektrofotometrično ($\lambda = 260 \text{ nm}$) določili koncentracijo DNA in jih shranili pri $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do nadaljnje uporabe.

3.2.8. Preverjanje prisotnosti inserta *LBD* v vektorju pGEM-T Easy/LBD z restrikcijo z *EcoRI*

Restrikcijo smo opravili z uporabo restrikcijskega encima *EcoRI*. V mikrocentrifugirke smo odpipetirali:

1. 2 μ L pufra za restrikcijo z *EcoRI* (NEBuffer *EcoRI*),
2. 2 μ L vektorja z insertom LBD,
3. 0,5 μ L restriktaze *EcoRI* (20.000 U/mL)
4. 15,5 μ L nfH_2O do skupnega volumna 20 μ L

in pustili, da restrikcija poteka 2 uri pri $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Sledila je ločitev fragmentov DNA z agarozno elektroforezo na 1,5 %-gelu.

Vzorci za elektroforezo in označevalca velikosti (Gene Ruler 50 bp DNA Ladder, Gene Ruler 1 kb DNA Ladder) smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirke odpipetirali:

- | | | |
|--|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • 20 μL restrikcijske zmesi pGEM-T Easy/ LBD • 4 μL nanašalnega barvila za gelsko elektroforezo(6xLD) | <ul style="list-style-type: none"> • 2 μL pET44c • 8 μL ddH₂O • 2 μL 6xLD | <ul style="list-style-type: none"> • 9 μL ddH₂O • 1 μL označevalca • 2 μL 6xLD |
|--|---|--|

Elektroforezo smo izvajali pri napetosti 10 V/cm eno uro. Gel smo obarvali s SYBR Gold in prisotnost lis preverili s pomočjo obsevanja z UV svetlobo.

Plazmide z ustrežno dolžino rezanih insertov smo poslali na analizo nukleotidnega zaporedja.

3.2.9. Restrikcija vektorjev pGEM-T Easy/LBD in pET44c ter ligacija inserta *LBD* v razrezani vektor pET44c

V 0,5-mL mikrocentrifugirke smo odpipetirali reagente po sledeči shemi:

- | | |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • pGEM-t Easy/ LBD • 2 μL pufra za restrikcijo 3 (NEBuffer 3) • 2 μL BSA (10 mg/mL) • 2 μL restriktaze XhoI • 2 μL restriktaze BamHI • 12 μL pGEM-T Easy/LBD | <ul style="list-style-type: none"> • pET44c • 2,5 μL pufra za restrikcijo 3 (NEBuffer 3) • 2,5 μL BSA (10 mg/mL) • 0,7 μL restriktaze XhoI • 0,7 μL restriktaze BamHI • 18,5 μL pET44c (vzorec 3) • 0,1 μL dd H₂O |
|---|---|

Mikrocentrifugirke smo nato inkubirali pri 37 °C in po 2,5 ure izvedli 30-minutno inaktivacijo restriktaz pri 65 °C. Sledila je elektroforeza na 1,2 %-agaroznem gelu in detekcija

DNA s SYBR Gold. Ustrezne fragmente smo izrezali s spatulo in prenesli v 1,5 mL-mikrocentrifugirke.

Izolacijo inserta *LBD* in rezanega vektorja pET44c smo izvedli s kompletom QIAEX II Gel Extraction Kit. Masi koščkov gela s fragmenti *LBD* sta bili 90 in 121 mg, zato smo v mikrocentrifugirki odpipetirali po 270 in 363 μL pufra QX1 in dodali po 10 μL suspenzije silikagela QIAEX II. Za izolacijo rezanega vektorja pET44 smo k 136 mg gela dodali 272 μL ddH₂O in 408 μL pufra QX1 (dodatek ddH₂O, ker je DNA fragment > 4 kbp). Postopek smo nadaljevali kot je opisano v točki 3.2.3. V zadnjem koraku smo vzorec z rezanim insertom *LBD* eluirali s 5-minutno inkubacijo pri sobni temperaturi. Vzorec z rezanim pET44c pa smo eluirali s 5-minutno inkubacijo pri 50 °C. Vzorca smo nato centrifugirali 30 sekund pri 10000 vrt/min, supernatant z vsebujočim produktom restrikcije pa prenesli v čiste mikrocentrifugirke.

Sledila je ligacija inserta *LBD* v vektor pET44c. V 200 μL -mikrocentrifugirko smo odpipetirali:

- 5,9 μL inserta *LBD* (~ 50 ng),
- 3,3 μL rezanega pET44c (~ 40 ng),
- 2 μL ligacijskega pufra (2 \times Rapid Ligation Buffer),
- 1 μL ligaze DNA-T4,
- in 7,8 μL ddH₂O, do skupnega volumna 20 μL .

Ligacija je potekala preko noči pri 16 °C.

3.2.10. Transformacija celic TOP10 z vektorjem pET44c/*LBD*

Ligacijsko zmes smo uporabili pri transformaciji celic Top 10. Najprej smo na ledu odmrznili (200 μL) kompetentnih celic TOP10. Celicam smo dodali ~ 5 μL ligacijske zmesi pET44c /*LBD*, s pipeto rahlo premešali in inkubirali na ledu. Preostanek transformacije smo opravili enako kot po postopku iz točke 3.2.6. Selekcijo celic, transformiranih z vektorjem pET44c/*LBD*, smo izvedli na agarnem gojiščem LB/amp.

3.2.11. Izolacija pET44c/LBD in preverjanje uspešnosti ligacije

Naslednji dan smo kolonije *E. coli* TOP10/pET44c/LBD (3.2.10) uporabili za pripravo prekončnih kultur v gojišču LB s 100 µg/mL ampicilina (postopek v 3.2.7).

Sledila je izolacija plazmida pET44c/LBD s kompletom GenElute HP Plasmid Miniprep Kit (Sigma). Postopek smo izvedli, kot je opisano pod točko 3.2.7. Plazmidno DNA smo s kolone eluirali s 75 µL elucijskega pufra. Eluatu smo spektrofotometrično izmerili koncentracijo, nato pa s PCR preverili ali izolirani plazmid vsebuje fragment prave velikosti. Del eluata smo prenesli v čisto centrifugirko in ga poslali na analizo nukleotidnega zaporedja. Preostanek eluata smo do nadaljnje uporabe shranili pri -20 °C.

Za reakcijo PCR smo v dve 200 µL-mikrocentrifugirki odpipetirali po:

- 12,5 µL osnovne zmesi za PCR,
- 1 µL začetnega oligonukleotida T7,
- 1 µL začetnega oligonukleotida R-*Xho*I,
- 9,5 µL ddH₂O
- in po 1 µL pET44c/LBD oz. ddH₂O (negativna kontrola).

Mikrocentrifugirki smo vstavili v ciklični termostat in izvedli reakcijo po programu (tabela II):

Tabela II: Shematski prikaz poteka reakcije PCR.

Trajanje	Temperatura	Proces
2 min	95 °C	Aktivacija Taq DNA-polimeraze
1 min	94 °C	Denaturacija DNA
1 min	50 °C	Prileganje začetnih oligonukleotidov
2,5 min	72 °C	Podaljševanje
10 min	72 °C	Zaključno podaljševanje

Da bi preverili velikost pomnoženega odseka, smo izvedli elektroforezo na 1 %-agaroznem gelu. Kot označevalec velikosti smo uporabili GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder marker. Elektroforeza je potekala pri napetosti 10 V/cm približno eno uro. Detekcijo DNA smo izvedli s SYBR GOLD.

3.2.12. Transformacija celic *E. coli* BL21 (DE3) pLysS z vektorjem pET44c/LBD in testno izražanje fuzijskega proteina NusA-LBD

Na ledu smo odmrznili kompetentne celice *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (200 μ L) in jim dodali približno 50 ng plazmida pET44c/LBD, nežno premešali s pipeto in inkubirali na ledu 20 min. Delo smo nadaljevali po postopku iz točke 3.2.6. Seleksijski korak smo opravili na agarnem gojišču LB s 100 μ g/mL ampicilina in 34 μ g/mL kloramfenikola (LB/amp/chlor).

Zrasle kolonije smo uporabili za pripravo prekonočne kulture *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET44c/LBD. Slednjo smo pripravili po postopku iz točke 3.2.7 v gojišču LB s 100 μ g/mL ampicilina in 34 μ g/mL kloramfenikola.

Naslednji dan smo v erlenmajerici odpipetirali po 10 mL tekočega gojišča LB z enakima koncentracijama antibiotikov kot za prekonočno kulturo. Eno erlenmajerico smo označili z NEIND (neinducirana), drugo pa z IND (inducirana). V obe smo prenesli po 100 μ L prekonočne kulture *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET44c/LBD in erlenmajerici med močnim stresanjem inkubirali pri 37 °C, dokler nista kulturi dosegli $OD_{600} \sim 0,50$. V erlenmajerico z oznako IND smo nato odpipetirali 10 μ L 1 M IPTG (končna konc. 1 mM) in tako sprožili izražanje rekombinantnega proteina. Erlenmajerici smo med močnim stresanjem inkubirali pri 37 °C.

Po triurni inkubaciji smo induciranemu in neinduciranemu vzorcu izmerili optično gostoto (OD_{600} IND = 5,25; OD_{600} NEIND = 8,10). Bakterijski kulturi smo centrifugirali (10 min, 6000 vrt/min, 4 °C). Supernatanta smo zavrgli, usedlini pa suspendirali v pufri PBS. Volumen pufra PBS za suspendiranje smo izračunali po enačbi:

$$V(\text{dodatka}) = OD_{600} \times 375 \mu\text{L}.$$

$$V(\text{IND}) = 5,25 \times 375 \mu\text{L} = 1,970 \text{ mL}$$

$$V(\text{NEIND}) = 8,10 \times 375 \mu\text{L} = 3,040 \text{ mL}$$

Ponovno suspendirane celice smo na ledu razbili s soniciranjem. Po 100 μ L vzorca smo prenesli v mikrocentrifugirki in ju označili ICF (inducirana celokupna frakcija) in NCF (neinducirana celokupna frakcija). Po 900 μ L vzorca smo prenesli v čisti centrifugirki in centrifugirali 10 min pri 14000 vrt/min pri 4 °C. Supernatanta smo prenesli v novi centrifugirki in ju označili ITF (inducirana topna frakcija) in NTF (neinducirana topna frakcija). Usedlini smo suspendirali v 900 μ L pufra PBS in vzorca označili INF (inducirana

netopna frakcija) in NNF (neinducirana netopna frakcija). Postopek smo ponovili še dvakrat, le da smo tokrat bakterijski kulturi inkubirali pri 15 oz. 26 °C.

3.2.13. Transformacija celic *E.coli* Origami (DE3) pLysS z vektorjem pET44c/LBD in testno izražanje fuzijskega proteina NusA-LBD

Postopek smo izvedli enako kot s celicami BL21 (DE3) pLysS. Kompetentne celice Origami (DE3) pLysS (3.2.5) smo transformirali z vektorjem pET44c/LBD in selekcijo opravili na agarnem gojišču LB/amp/chlor/kan/tetra (po postopku iz 3.2.6). Testno izražanje fuzijskega proteina smo opravili enako kot v točki 3.2.12, le da smo celice gojili v gojišču LB s 100 µg/mL ampicilina, 34 µg/mL kloramfenikola, 15 µg/mL kanamicina in 12,5 µg/mL tetraciklina. Inkubacija bakterijskih kultur je potekala pri 37 °C, izražanje LBD pa smo sprožili z dodatkom IPTG do končne koncentracije 0,2 mM.

3.2.14. Preverjanje izražanja in topnosti proteina LBD-NusA z elektroforezo SDS-PAGE

Uspešnost izražanja smo preverili z ločevanjem proteinov celičnega lizata s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (SDS-PAGE). V ta namen smo pripravili diskontinuirani gel po recepturi iz tabele III.

Tabela III: Receptura za pripravo diskontinuiranega gela za SDS-PAGE. V čašo smo odpipetirali vse reagente razen TEMED-a in jih premešali. Nato smo dodali še TEMED, dobro premešali in vsebino takoj odpipetirali med stekelci komore za vlivanje gela.

	9 %-ločevalni gel	5 %-zbiralni gel
deionizirana voda	1,667 mL	1,46 mL
40 % poliakrilamid	0,742 mL	0,25 mL
1,5M Tris (pH 8,8) / 1M Tris (pH 6,8)	0,825 mL	0,25 mL
10 % amonijev persulfat	33 µL	20 µL
10 % SDS	33 µL	20 µL
TEMED (tetrametiletildiamin)	2 µL	2 µL
SKUPNI VOLUMEN	3,3 mL	2 mL

1. Najprej smo sestavili komoro za vlivanje gela in v 10 mL čaši pripravili 9 %-separacijski gel.
2. 3 mL separacijskega gela smo odpipetirali med stekelci in na vrh previdno nanesti še 1 mL izopropanola.
3. Ko se je gel strdil, smo izopropanol odlili, sprali z ddH₂O in ostanek vode popivnali s filtrirnim papirjem.
4. Nato smo pripravili 5 %-koncentracijski gel in ga med stekelci odpipetirali do vrha.
5. Vstavili smo glavniček in pri tem pazili, da se med vstavljanjem ne ujamejo tudi zračni mehurčki.
6. Strjen gel smo vpeli v celico za izvedbo elektroforeze in prenesli v elektroforezno kadičko.
7. Kadičko smo napolnili z elektroforeznim pufrom za SDS-PAGE in glavniček previdno odstranili.

Vzorci za nanos (ICF, ITF, INF, NCF, NTF in NNF) smo pripravili tako, da smo k 10 µL vsake frakcije dodali 2,7 µL 1 M DTT in 5,3 µL nanašalnega pufru za SDS-PAGE ter jih inkubirali na vreli vodni kopeli 5 min. Vzorce smo rahlo centrifugirali in jih s pipeto v celoti prenesli v žepke poliakrilamidnega gela. Kot označevalec velikosti smo uporabili proteinski standard SeeBlue Plus 2. Elektroforeza je potekala pri napetosti 90 V, dokler ni indikatorsko barvilo doseglo dna gela.

3.2.15. Izražanje rekombinantne LBD v 2 L-kulturi *E.coli* BL21 (DE3) pLysS/pET28/LBD

Za izražanje rekombinantne LBD smo uporabili trajno kulturo *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET28/LBD. Plazmid pET28/LBD in transformacijo celic BL21 (DE3) pLysS je v okviru predhodnega raziskovalnega dela pripravil Peter Molek na Fakulteti za farmacijo.

1. Najprej smo pripravili dvakrat 1000 mL gojišča TF (*Terrific broth*).
2. Nato smo pripravili 25 mL prekonočne kulture *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET28/LBD v LB s 34 µg/mL kloramfenikola in 100 µg/mL kanamicina (postopek iz 3.2.7).
3. Po 10 mL prekonočne kulture smo prenesli v vsako erlenmajerico s TB in inokulirani gojišči inkubirali v stresalniku (250 vrt./min) pri 37 °C, dokler ni OD₆₀₀ kulture dosegla vrednosti ~ 0,5.

4. Izražanje proteina LBD smo sprožili z dodatkom po 1 mL 1 M IPTG in nadaljevali s stresanjem pri 37 °C.
5. Tri ure po indukciji izražanja proteina LBD smo gojišči razdelili v 500 mL-centrifugirke, vzorce centrifugirali (10 min, 6000 vrt/min, 4 °C), supernatante pa odlili.
6. Celični usedlini smo suspendirali vsako v 50 mL ohlajenega pufru PBS, vzorce centrifugirali in supernatante odlili.
7. Korak 6 smo ponovili še enkrat.
8. Celične usedline smo ponovno suspendirali vsako v 40 mL ohlajenega pufru PBS in jih prelili v (predhodno stehtane) 50 mL-centrifugirke.
9. Vzorce smo centrifugirali in supernatante odlili
10. Celičnim usedlinam smo določili maso in jih do nadaljnje uporabe shranili pri -20 °C.

3.2.16. Izolacija, čiščenje in raztapljanje inkluzijskih teles iz celične usedline *E. coli* BL21/pLysS/pET28/LBD

Celično usedlino *E. coli* BL21 (DE3) pLysS/pET28/LBD ($m = 1395$ mg) smo odmrznili na ledu, jo suspendirali v 12,5 mL pufru za DNAzo in jo inkubirali 20 minut med rahlim stresanjem (sobna temperatura). Celice smo nato razbili s soniciranjem. Suspenziji smo dodali 500 μ L DNaze I (0,6 mg/mL) in inkubirali 20 min pri sobni temperaturi med rahlih stresanjem. Suspenzijo smo centrifugirali (10 min, 4 °C, 10.000 g) in supernatant odlili.

Tako dobljena inkluzijska telesa smo spirali štirikrat:

1. 20 mL 1 % Triton X-100
2. 20 mL 1 % Triton X-100/ 0,5 M gvanidinijev klorid
3. 20 mL ddH₂O
4. 20 mL ddH₂O

Po vsakem koraku smo vzorec centrifugirali (10 min, 4 °C, 10.000 g). Po zadnjem centrifugiranju smo očiščenim IT določili maso ($m(\text{IT}) = 645,6$ mg) in jih shranili pri -80 °C.

IT smo odtalili na ledu in jih začeli raztapljati v 20 mL pufru za raztapljanje IT 1. Med mešanjem na magnetnem mešalu smo vzorcju dodali β -ME do končne koncentracije ~33 mM in pH uravnali na 11,5 z dodatkom NaOH. Po dvournem mešanju smo neraztopljene delce

odstranili s centrifugiranjem (15 min, 4 °C, 10.000 g). Supernatant smo alikvotirali v 2 mL-vzorci in jih shranili pri -80 °C.

3.2.17. Preverjanje vpliva različnih dodatkov na proces zvijanja

Za preverjanje vpliva posameznih dodatkov in pH na uspešnost zvijanja smo izvedli test zvijanja na mikrotitrski ploščici (MTP). Najprej smo pripravili založne raztopine dodatkov (PEG 3000, NaCl, Triton X-100, Tween-20 in saharoza) in reducentov/oksidantov (GSH/GSSG). Nato smo pripravili pufre za zvijanje. Prvega smo pripravili s Tris in EDTA, drugega pa s Tris, EDTA in agrininom. Posamezen pufer smo razdelili na 4 enake dele in jim z NaOH/HCl umerili pH vrednosti (7,5; 8,0; 8,5; 9,0). Koncentracije sestavljenih pufrov, založnih raztopin GSH/GSSG, založnih raztopin dodatkov, končne koncentracije dodatkov in shema nanosov se nahajajo v tabeli IV.

V vsako vdolbinico smo nanесли po 10 μ L raztopine denaturirane LBD. Po uri smo posameznim vdolbinicam izmerili absorbanco pri $\lambda = 400$ nm. Proteinski agregati namreč povzročajo sipanje svetlobe, kar zaznamo kot porast absorbance pri valovnih dolžinah, kjer proteini večinoma ne absorbirajo [81].

Tabela IV: Shema nanosov pufrov in dodatkov v vdolbinice mikrotitrške ploščice. V vdolbinice označene z »/« smo odpipetirali 300 µL pufr.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	GSH/GSSG (mM)	50 mM Tris, 1 mM EDTA	
A	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	2,0/0,2	pH 7,5	
B	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	0,2/2,0		
C	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	2,0/0,2	pH 8,0	
D	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	0,2/2,0		
E	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	2,0/0,2	pH 8,5	
F	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	0,2/2,0		
G	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	2,0/0,2	pH 9,0	
H	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	/	PEG 3000	NaCl	Triton X-100	Tween- 20	saharoz	0,2/2,0		
0,5 M L-Arg															
Koncentracije sestavin pufrov				brez L-Arg				Koncentracije založnih raztopin				Končne koncentracije dodatkov			
Tris	75 mM			2,0 + 0,2 mM	12/1,2 mM			PEG 3000	NaCl	0,30 %	600 mM	L-Arg	0,5 M		
EDTA	1,5 mM			0,2+2,0 mM	1,2/12 mM			NaCl	Triton X-100	0,09%	0,09%	PEG 3000	0,05 %		
L-Arg	750 mM							Tween-20	Triton X-100	0,06%	0,06%	NaCl	100 mM		
								Saharoz	Tween-20	1,2 M	1,2 M	Triton X-100	0,015 %		
												Saharoz	0,010 %		
												Saharoz	0,2 M		
	aa 200 µL/vdolbinico			aa 50 µL/vdolbinico				aa 50 µL/vdolbinico						končni volumen 350 µL	

3.2.18. Poskus pridobivanja aktivnega proteina LBD s postopkom redčenja v pufer brez denaturantov

10 mL vzorca (3.2.16) smo po kapljicah dodajali v 1 L pufera za zvijanje A med močnim mešanjem ($T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po dodatku vsega vzorca smo hitrost mešanja zmanjšali, zvijanje pa pustili, da poteka čez noč. Raztopino smo naslednji dan skoncentrirali z ultrafiltracijo do volumna $\sim 20\text{ mL}$. Postopek smo ponovili z uporabo pufera za zvijanje B.

Dobljena filtrata smo analizirali z gelsko izključitveno kromatografijo. Za postopek smo uporabili sistem FPLC (tekočinska kromatografija za hitro ločevanje proteinov) ÄKTAexplorer 10.

Kromatografski postopek je potekal po sledečih parametrih:

- kolona Superdex 200 10/300 GL: volumen kolone (VK) 24 mL
- Volumen injiciranega vzorca: 500 μL
- Pretok: 0,3 mL/min
- Ekvilibracija kolone in elucija s pufrom sestave: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 9
- Volumen zbranih frakcij: 500 μL
- Detekcija analita: spektrofotometrično pri $\lambda = 280\text{ nm}$
- Trajanje celotnega procesa: 1,1 VK oz. 88 min

Ultrafiltrata smo analizirali tudi na ionsko-izmenjevalni koloni, ki smo jo predhodno uravnotežili s pufrom sestave 10 mM Tris (pH 9). Na kolono smo nato nanegli vzorec in kromatografski postopek nadaljevali po sledečih parametrih:

- Anionska kolona HiPrep Q XL 16/10 (VK 20 mL)
- Volumen injiciranega vzorca: 2,0 mL
- Pretok: 2 mL/min
- Elucijski pufer: 10 mM Tris z NaCl (pH 9). Koncentracijo NaCl smo povečevali stopenjsko vsakih 60 mL (3 VK) po sledeči shemi: 0 mM NaCl, 50 mM NaCl, 100 mM NaCl, 125 mM NaCl, 150 mM NaCl, 200 mM NaCl, 300 mM NaCl.
- Volumen zbranih frakcij: 10 mL
- Detekcija analita: spektrofotometrično pri $\lambda = 280\text{ nm}$
- Trajanje celotnega procesa: 450 mL oz. 225 min

3.2.19. Poskus zvijanja proteina LBD z uporabo kolone HiTrap IMAC

Za postopek zvijanja na koloni HiTrap IMAC smo pripravili novo šaržo inkluzijskih teles. Inkluzijska telesa smo pripravili po postopkih iz točke 3.2.15 in 3.2.16 ter jih tokrat raztopili v 30 mL pufru za raztapljanje IT 2. Med raztapljanjem IT smo pufru z NaOH uravnali pH na 11,5. Po dvournem mešanju smo neraztopljene delce odstranili s centrifugiranjem (15 min, 4 °C, 14000 g). Del vzorca smo uporabili za nadaljnje delo, preostanek smo alikvotirali v 2 mL-vzorci in jih shranili pri -80 °C.

5 mL vzorca smo dodali 2 mL denaturacijskega pufru (končna koncentracija β -ME ~10 mM in LBD ~15 mg/mL, končni volumen 7 mL). Tako pripravljen vzorec smo uporabili za poskus zvijanja na kromatografskem sistemu ÄKTAexplorer 10 opremljeno s kolono HiTrap IMAC.

Pred začetkom dela smo morali pripraviti kolono za uporabo. Najprej smo na stacionarno fazo kolone (sefaroza s kovalentno vezanim kelatorjem NTA) vezali ione Ni^{2+} . Z brizgo smo kolono sprali s 5 mL ddH₂O (pretok ~ 1 mL/min), nato pa nanjo nanesti še 2 mL raztopine z NiSO₄. Kolono smo sprali s 5 mL ddH₂O, 5 mL elucijskega pufru za IMAC, takoj zatem pa še s 5 mL pufru E.

Tako pripravljeno kolono smo vpeli v kromatografski sistem ÄKTAexplorer 10. Kolono smo uravnotežili s 5 mL denaturacijskega pufru (pretok 1 mL/min). S črpalko za vzorec smo skozi kolono ob pretoku 0,5 mL/min prečrpali celoten vzorec in nevezano frakcijo zbrali v čisto čašo.

V naslednjem koraku smo izvedli poskus zvijanja na koloni. Denaturacijski pufer z 10 mM β -ME smo gradientno zamenjali s pufrom za zvijanje C tekom štirih minut s pretokom 0,5 mL/min. Nato pa skozi kolono spustili še dodatnih 8 mL pufru za zvijanje C in 5 mL pufru za zvijanje D.

Elucijo proteina smo dosegli z zamenjavo pufru za zvijanje D z elucijskim pufrom za IMAC. Zamenjavo pufru smo izvajali 10 min z linearnim gradientom ob pretoku 1 mL/min. Po zamenjavi pufru smo kolono sprali še z dodatnimi 5 mL elucijskega pufru za IMAC. Eluirane vzorce smo zbirali v frakcijah po 500 μ L in jim takoj dodali ditiotreitrol do končne koncentracije 1 mM.

3.2.20. Ocena aktivnosti proteinov v eluatih IMAC s testom ELISA

V 8 vdolbinic mikrotitrne ploščice smo izmenično nanegli po 50 μL mišjega monoklonskega protitelesa proti polihistidinskemu označevalcu (anti-His) v PBS (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ali 1 % BSA v PBS ter pustili, da se med rahlim stresanjem (50 vrt./min) adsorbirajo preko noči pri 4 °C. Naslednji dan smo v vdolbinice nanegli po 235 μL 5 %-mleka/PBS in med rahlim stresanjem pustili, da se prosta mesta na površini zasedajo 1 uro pri sobni temperaturi. Vsebinsko vdolbinic smo odlili, rezidualno tekočino pa odstranili s trkanjem mikrotitrne ploščice ob papirnato brisačo. Vdolbinice smo nato trikrat spirali s po 280 μL 0,1 % PBST. Vzorce smo za nanos pripravili tako, da smo v 100 μL 0,5 %-mleka/0,1 % PBST dodali po 10 μL posamezne eluirane frakcije (točka 3.2.18, frakcije B8, B9 in B10). Tako pripravljene vzorce smo odpipetirali v vdolbinice A1 do F1. V zadnji dve vdolbinici (G1 in H1) pa smo nanegli pozitivno kontrolo, in sicer po 100 μL rekombinantnega proteina iz zunajcelične regije humanega LR in Fc-regije humanega IgG označene s histidinskim označevalcem (hLR-Fc), redčenega do končne konc. 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ v 0,5 %-mleku/0,1 % PBST. Vezavo na anti-His smo pustili potekati 1 uro pri rahlem stresanju (sobna T). Vsebinsko smo nato odlili in odstranili rezidualno tekočino. Vdolbinice smo nato trikrat spirali s po 280 μL 0,1 % PBST. V vsako vdolbino smo nanegli 100 μL biotiniziranega človeškega leptina (B-hLEP), ki smo ga v 0,5 %-mleku/0,05 % PBST redčili do koncentracije 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Vezava je potekala eno uro pri sobni temperaturi med rahlim stresanjem. Vsebinsko smo odstranili in vdolbinice trikrat spirali s po 280 μL 0,1 % PBST. V zadnjem koraku smo v vdolbinice nanegli po 100 μL streptavidina, označenega s hrenovo peroksidazo (SA-HRP), ki smo ga prehodno redčili v volumskem razmerju 1:2000 z 0,1 % PBST. Vezava je ponovno potekala 1 uro pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju. Shematski prikaz nanosov se nahaja v tabeli V.

Vsebinsko smo odstranili in vdolbinice štirikrat spirali s po 280 μL 0,1 % PBST. V vsako vdolbinico smo odpipetirali po 200 μL kromogenega substrata TMB. TMB je brezbarven substrat, ki ga hrenova peroksidaza (HRP) pretvori v moder produkt. Reakcijo smo pustili potekati 10 min, nakar smo jo ustavili z dodatkom 1 M H_2SO_4 . Pri tem se je produkt obarval rumeno. Mikrotitrsko ploščico smo prenesli na mikrotitrski čitalec Safire in vzorcem izmerili absorbanco pri $\lambda = 450 \text{ nm}$.

Tabela V: Shematski prikaz nanosov na mikrotitrsko ploščico za izvedbo testa »ELISA«. Vsaka kolona predstavlja naslednji korak. Med vsakim korakom smo vdolbinice sprali z 0,1 % PBST.

	Adsorpcija Anti-His in BSA	Blokiranje prostih mest z mlečnimi proteini	Nanos vzorcev in pozitivne kontrole	Vezava biotiniranega leptina na LBD in h-LEP	Vezava SA-HRP na biotinski označevale	Dodatek kromogenega substrata TMB	Prekinitiv reakcije s H ₂ SO ₄ in merjenje absorbance
A	Ani-His	5 % mleko	B8	B-hLEP	SA-HRP	TMB	A450 nm
B	1 % BSA	5 % mleko	B8	B-hLEP	SA-HRP	TMB	
C	Ani-His	5 % mleko	B9	B-hLEP	SA-HRP	TMB	
D	1 % BSA	5 % mleko	B9	B-hLEP	SA-HRP	TMB	
E	Ani-His	5 % mleko	B10	B-hLEP	SA-HRP	TMB	
F	1 % BSA	5 % mleko	B10	B-hLEP	SA-HRP	TMB	
G	Ani-His	5 % mleko	hLR-Fc	B-hLEP	SA-HRP	TMB	
H	1 % BSA	5 % mleko	hLR-Fc	B-hLEP	SA-HRP	TMB	

3.2.21. Poskus ponovnega zvijanja proteina LBD z izključitveno kromatografijo z uporabo gradienta uree

Sedmim mililitrom vzorca IT raztopljenih v pufru za raztapljanje IT 1 (točka 3.2.15) smo pred začetkom dela dodali Tris (končna koncentracija 20 mM), DTT (končna koncentracija ~200 mM) in 14 µL 0,5 M EDTA (končna koncentracija 1 mM). Vzorec smo med rahlim mešanjem pustili 3-4 ure pri sobni temperaturi.

Kolono Superdex 200 10/300 GL smo vpeli na kromatografski sistem ÄKTAexplorer 10 in jo ekvilibrirali z mešanico pufra za gradient A in B v razmerju 4:6, tako da smo kolono napolnili s pufrom s koncentracijo uree 2 M. Nato smo ob pretoku 0,3 mL/min tekom 20 minut delež pufra za gradient B linearno gradientno povečali od 40 % do 100 % (6 mL). Ko smo dosegli 100 %-delež pufra za gradient B, smo skozi kolono spustili še dodatna 2 mL istega pufra. 500 µL-zanko za injiciranje smo povezali na ÄKTAexplorer 10 in jo napolnili z vzorcem.

Kromatografski postopek je potekal po sledečih parametrih:

- Volumen injiciranega vzorca: 300 μ L
- Pretok: 0,3 mL/min
- Izokratska elucija s 100 % pufru za gradient B
- Začetek zbiranja frakcij pri 0,3 VK (7,2 mL) in konec pri 0,8 VK (19,2 mL)
- Volumen zbranih frakcij: 500 μ L
- Trajanje celotnega procesa: 1,1 VK oz. 88 min

3.2.22. Preverjanje aktivnosti proteina LBD v eluiranih frakcijah po poskusu zvižanja na koloni Superdex 200 10/300 GL z gradientom uree

Ocenjevanje aktivnosti je potekalo podobno kot pri ocenjevanju aktivnosti eluatov iz kolone IMAC. Tokrat smo kot negativno kontrolo namesto 1 % BSA v PBS uporabili 2,5 % mleko v PBS. Vzorce za nanos smo pripravili iz eluatov A2, A12 in B6 iz prvega poskusa ter eluatov A5, A10, A14 in B2 iz drugega poizkusa. Čistost proteina LBD v eluatih smo preverili tudi z SDS-PAGE. Shematski prikaz nanosov se nahaja v tabeli VI.

Tabela VI: Shematski prikaz nanosov na mikrotitrsko ploščico za izvedbo testa »ELISA«. Vsaka kolona predstavlja naslednji korak. Med vsakim korakom smo vdolbinice sprali z 0,1 % PBST.

	Adsorpcija Anti-His / 2,5 %-mleka		Blokiranje s 5 %- mlekom		Nanos vzorcev / kontrola		Vezava B- hLEP na LBD oz. hLR-Fc		Vezava SA- HRP na biotiniliran hLEP		Merjenje absorbance	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
A	Anti-His	2,5 %-mleko	5 %-mleko		A2	A2	B-hLEP		SA-HRP		A450 nm	
B					A12	A12						
C					B6	B6						
D					A5	A5						
E					/	/						
F					/	/						
G					/	/						
H					hLR-Fc	hLR-Fc						

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. IZRAŽANJE PROTEINA LBD S FUZIJSKIM PARTNERJEM NusA

LBD se ob izražanju v *E. coli* nalaga v obliki netopnih inkluzijskih telesc. Agregaciji smo se skušali izogniti z izražanjem rekombinantnega proteina s fuzijskim partnerjem. Slednje smo dosegli z vstavitvijo gena *LBD* v vektor pET44c, ki je komercialno dostopen vektor za izražanje poljubnega proteina v fuziji z NusA (N-utilization substance A) [80].

4.1.1. Priprava vektorjev pGEM-T Easy/*LBD* in pET44c

PCR je *in vitro* metoda, s katero lahko v zelo kratkem času pomnožimo izbrane odseke matrične DNA do velikega števila kopij. Vsaka PCR reakcija potrebuje:

- matrično DNA z odsekom, ki ga želimo pomnožiti
- termostabilno DNA polimerazo (npr. Taq polimeraza),
- deoksinukleozid trifosfate (dNTP),
- dva začetna oligonukleotida, ki sta komplementarna matrični DNA
- reakcijski pufer z optimalnim pH, ki vsebuje ione potrebne za reakcijo (Mg^{2+} , Na^+ ,...).

V prvem koraku smo z metodo PCR pomnožili gen za *LBD*, ki smo ga v nadaljevanju ligirali v vektor pGEM-T Easy. Kot začetna nukleotida smo uporabili F-*Bam*HI in R-*Xho*I. Na takšen način smo gen *LBD* hkrati pomnožili in mu dodali restrikcijski mesti za *Bam*HI in *Xho*I, ki smo ju kasneje uporabili za ligacijo *LBD* v vektor pET44c.

Po opravljeni reakciji PCR smo njeno uspešnost preverili z agarozno elektroforezo. Po obarvanju smo košček gela z liso, katere dolžina je ustrezala približno 700 bp velikemu fragmentu, izrezali s spatulo in izvedli ekstrakcijo DNA s kompletom QIAEX® II Gel Extraction Kit. Eluatu smo spektrofotometrično določili koncentracijo (22,4 ng/mL) in čistost ($OD_{260/280} = 1,80$).

V naslednjem koraku smo eluirani gen *LBD* ligirali v vektor pGEM-T Easy in ligacijsko zmes uporabili za transformacijo kompetentnih celic TOP10. Uspešnost ligacije smo preverili z modro-belim testom. Na agarjem gojišču so zrasle tako bele kot modre kolonije. Vzporedno smo opravili tudi transformacijo celic TOP10 s plazmidom pET44c. Na agarjem gojišču so zrasle (bele) kolonije.

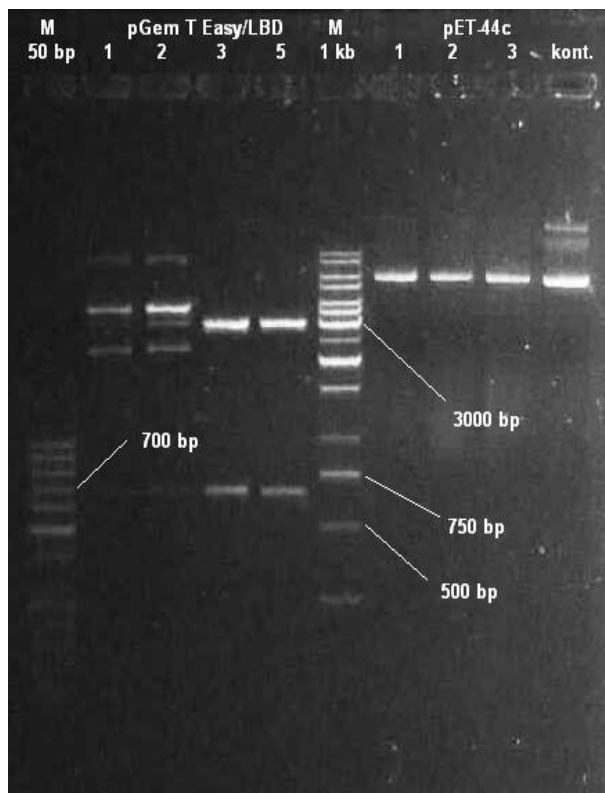
Zrasle bele kolonije smo uporabili za pripravo prekonočnih kultur, iz katerih smo izolirali plazmida pGEM-T Easy/*LBD* in pET44c. Vzorcem smo spektrofotometrično določili koncentracijo in čistost ($A_{260/280}$ in $A_{260/230}$; tabela VII).

Tabela VII: Rezultati spektrofotometrične določitve koncentracije pGEM-T Easy/*LBD* in pET44c.

PLAZMID	c (ng/mL)	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$
pGEM-T Easy/ <i>LBD</i> 1	137	1,87	1,80
pGEM-T Easy/ <i>LBD</i> 2	175	1,88	1,87
pGEM-T Easy/ <i>LBD</i> 3	183	1,81	1,75
pGEM-T Easy/ <i>LBD</i> 4	25	1,87	1,71
pGEM-T Easy/ <i>LBD</i> 5	136	1,85	1,79
pET44c 1	58	1,82	1,81
pET44c 2	48	1,86	1,85
pET44c 3	54	1,86	1,80

Iz prisotnosti belih kolonij in visokih koncentracij pridobljenih plazmidov (tabela VII) je moč sklepati, da so ligacija inserta *LBD* v vektor pGEM-T Easy, priprava kompetentnih celic TOP10 in transformacija celic uspeli. Nepričakovana nizko koncentracijo smo izmerili le pri vzorcu *LBD*4, ki pa jo lahko pripišemo napakam med izvedbo izolacije DNA.

Istovetnost izoliranih plazmidov smo preverili z agarozno elektroforezo. Na 1,5 %-agarozni gel smo nanegli produkte kontrolne restrikcije vzorcev pGEM-T Easy/*LBD* (1, 2, 3, 5) z EcoRI in nerezane pET44c (1-3) (slika 3).



Slika 3: Slika agaroznega gela po elektroforezi produktov restrikcije. V vdolbinice gela smo od leve proti desni nanegli: Gene Ruler™ 50 bp DNA Ladder (M 50 bp), vzorci pGEM-T Easy/LBD 1, 2, 3 in 5, Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (M 1 kb), vzorci pET44c 1-3 in izvorni pET44c (kont.).

Iz slike 3 je razvidno, da je pri vseh vzorcih pGEM-T Easy/LBD prišlo do restrikcije. Najbolj izrazito se to kaže pri vzorcih pGEM-T Easy/LBD 3 in 5, kjer sta vidna samo fragmenta dolžine ~3000 bp (prazen vektor pGEM-T Easy) in ~700 bp (insert *LBD*). Restrikcija je potekla slabše v vzorcih 1 in 2, kar je razvidno iz slabo vidnih lis pri ~3000 bp in ~700 bp. Bolj izrazita pa je lisa med 3500 in 4000 bp, ki predstavlja nerezan pGEM-T Easy/LBD (~3700 bp). Na desni strani gela je razvidno, da so vzorci pET44c 1-3 prepotovali enako pot kot pozitivna kontrola (izvorni pET44c), kar je zadostovalo, da smo z dovolj veliko gotovostjo potrdili istovetnost vektorja. Vzorce pGEM-T Easy/LBD smo poslali na analizo nukleotidnega zaporedja, da smo se prepričali o integriteti inserta *LBD*. Analiza je pokazala, da sta se brez napak pomnožila inserta v vzorcih 1 in 3.

4.1.2. Priprava vektorja pET44c/LBD

Restrikcijo pGEM-T Easy/LBD (1 in 3) in pET44c z smo izvedli z restriktazama *XhoI* in *BamHI*. Restriksijske zmesi smo ločili z agarozno elektroforezo na 1,2 %-gelu. Lise fragmentov velikosti ~700 bp (*LBD*) in ~7300 bp smo izrezali. Koščke gela smo nato uporabili za izolacijo inserta in vektorja ter jim spektrofotometrično določili koncentracije (Tabela VIII).

Tabela VIII: Rezultati spektrofotometrične določitve koncentracije *LBD* in pET44c v eluatih.

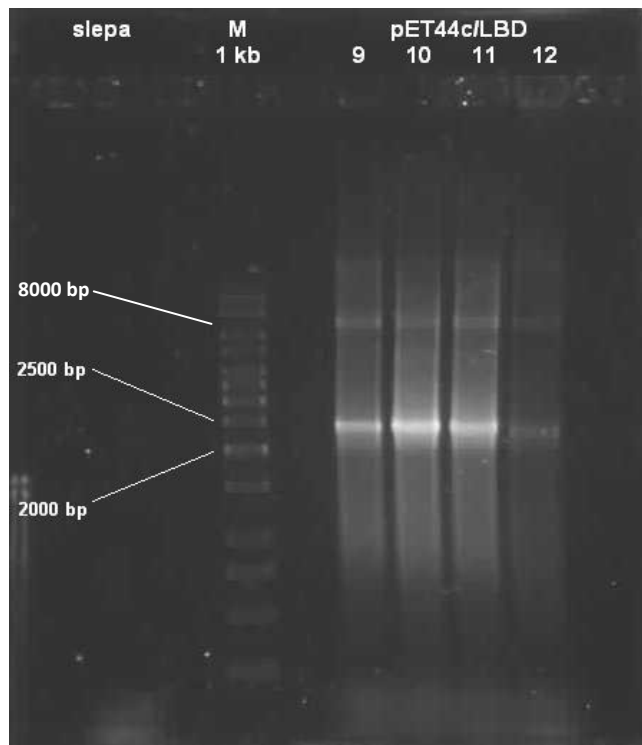
INSERT/PLAZMID	KONCENTRACIJA	A _{260/280}	A _{260/230}
LBD-1	6,1 ng/μL	1,42	1,68
LBD-3	9,0 ng/μL	1,45	1,44
pET44c-3	11,9 ng/μL	1,99	2,00
pET44c-orig.	30,5 ng/μL	1,84	1,95

Za postopek ligacije smo izbrali vzorec LBD-3, saj je poleg višje koncentracije imel tudi izrazitejši nukleotidni vrh pri 260 nm (ni prikazano), in pET44c-3. Pred transformacijo celic *E. coli* BL21(DE3) pLysS z vektorjem pET44c/LBD, smo se želeli prepričati, da se je insert *LBD* umestil na pravo mesto. V ta namen smo ligacijsko zmes uporabili za transformacijo celic TOP10. Kolonije zrasle na agarnem gojišču LB/amp smo uporabili za pripravo prekončnih kultur, iz katerih smo izolirali vektor pET44c/LBD in jim določili koncentracije in čistost (tabela IX).

Tabela IX: Rezultati spektrofotometričnega določevanja koncentracije in čistosti pET44c/LBD v eluatih.

VZOREC	C (ng/μL)	OD 260/280	OD 260/230
pET44c/LBD-9	43,0	1,74	1,32
pET44c/LBD-10	33,2	1,65	0,87
pET44c/LBD-11	38,2	1,72	1,35
pET44c/LBD-12	48,5	1,85	1,77

Izolirane vektorje smo uporabili za izvedbo reakcije PCR, pri čemer smo kot začetna nukleotida uporabili R-*Xho*I in T7 (namesto F-*Bam*HI). Pri tem smo poleg inserta LBD pomnožili tudi zapis za protein NusA, ki se bo fuzijsko izrazil z LBD. Velikosti pomnoženih produktov reakcije PCR smo preverili z gelsko elektroforezo (slika 4).



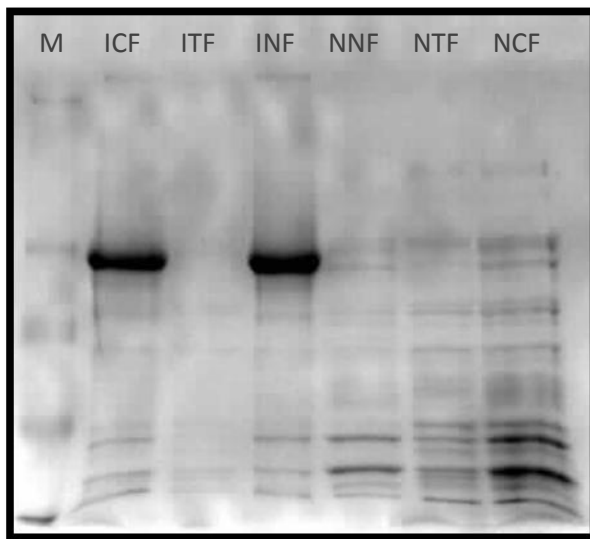
Slika 4: Slika agaroznega gela po elektroforezi produktov reakcije PCR. Od leve proti desni smo nanegli: slepi vzorec (slepa), Gene RulerTM 1 kb DNA Ladder (M 1 kb) in vzorce pET44c/LBD 9-12.

Iz slike je razvidno, da se je pri reakciji PCR pomnožil fragment velikosti med 2000 bp in 2500 bp, ki ustreza pričakovani velikosti inserta NusA-LBD (2411 bp). Vidne so tudi lise velikosti ~8000 bp, ki najverjetneje predstavljajo izhodiščni vektor, ki je služil kot matrična DNA za reakcijo PCR. Dokončno potrditev o uspešnosti ligacije *LBD* v vektor pET44c nam je dala analiza nukleotidnega zaporedja.

4.1.3. Testno izražanje proteina NusA-LBD

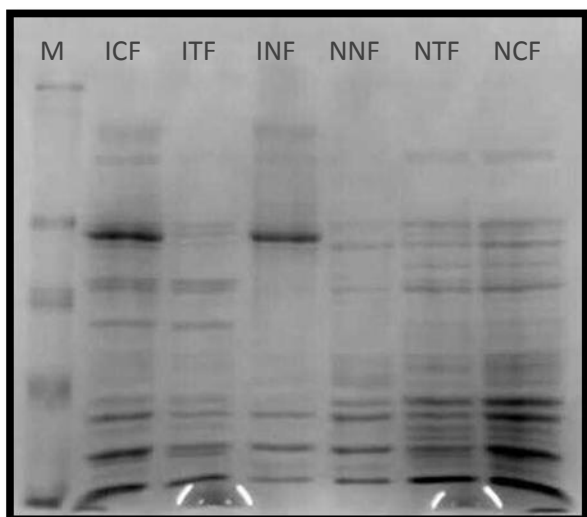
Po prejetju rezultatov analize nukleotidnega zaporedja smo celice *E. coli* BL21 (DE3) pLysS transformirali s plazmidom pET44c/LBD. Selekcijo transformiranih celic smo opravili na agarjem gojišču LB/amp/chlor, zrasle kolonije pa uporabili za pripravo prekonočnih kultur.

Prvo testno izražanje fuzijskega proteina NusA-LBD smo opravili pod standardnimi pogoji (gojišče LB, 37 °C, 1 mM IPTG). Negativna kontrola je bila paralela brez dodatka induktorja. Po triurnem gojenju smo celice razbili z ultrazvokom in prisotnost ter topnost rekombinantnega proteina preverili s SDS-PAGE (slika 5).

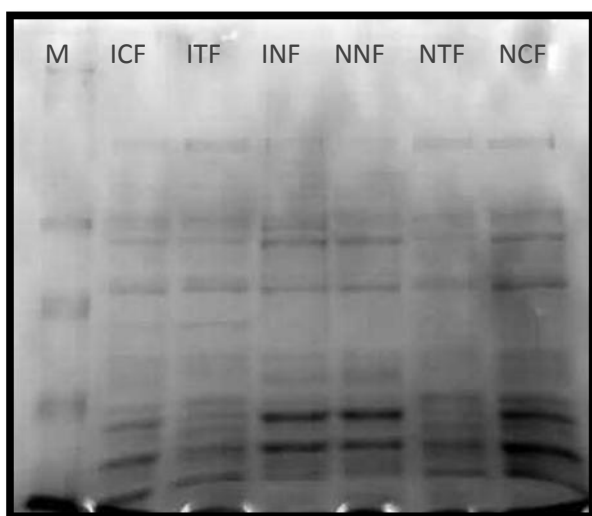


Slika 5: Ločitev celičnih proteinov (celokupna, topna in netopna frakcija) s SDS-PAGE po indukciji ali brez pri 37 °C. Od leve proti desni: označevalec velikosti *SeeBlue*® Plus2 (M), inducirana celokupna frakcija (ICF), inducirana topna frakcija (ITF), inducirana netopna frakcija (INF), neinducirana netopna frakcija (NNF), neinducirana topna frakcija (NTF), neinducirana celokupna frakcija (NCF).

Iz slike je razvidno, da se je pri vzorcu z dodanim IPTG močno izrazil protein velikosti 62-98 kDa, kar po velikosti ustreza proteinu LBD-NusA (86,9 kDa). Lisi sta prisotni zgolj v vzorcih ICF in INF, kar kaže na netopnost izraženega proteina in najverjetneje tvorbo inkluzijskih teles. Poskus smo ponovili z variiranjem temperature (sliki 6 in 7). Ob nižjih temperaturah gojenja se hitrost translacije zmanjša, kar nastajajoči polipeptidni verigi omogoči več časa za zvijanje. Hkrati se okrepi izražanje t.i. proteinov hladnega šoka, ki učinkujejo kot šaperoni. Posledično bi lahko nastalo več pravilno zvitega proteina NusA-LBD, kar bi zaznali kot pojav intenzivnejše lise v topni frakciji.



Slika 6: Ločitev celičnih proteinov (celokupna, topna in netopna frakcija) s SDS-PAGE po indukciji ali brez pri 26 °C. Od leve proti desni: označevalec velikosti *SeeBlue*® Plus2 (M), inducirana celokupna frakcija (ICF), inducirana topna frakcija (ITF), inducirana netopna frakcija (INF), neinducirana netopna frakcija (NNF), neinducirana topna frakcija (NTF), neinducirana celokupna frakcija (NCF).



Slika 7: Ločitev celičnih proteinov (celokupna, topna in netopna frakcija) s SDS-PAGE po indukciji ali brez pri 15 °C. Od leve proti desni: označevalec velikosti *SeeBlue*® Plus2 (M), inducirana celokupna frakcija (ICF), inducirana topna frakcija (ITF), inducirana netopna frakcija (INF), neinducirana netopna frakcija (NNF), neinducirana topna frakcija (NTF), neinducirana celokupna frakcija (NCF).

Rezultati SDS-PAGE kažejo, da z nižanjem temperature ni moč povečati deleža topnega proteina NusA-LBD. Pri izražanju rekombinantnega proteina pri 26 °C je ponovno opaziti intenzivnejši lisi zgolj v celokupni in netopni frakciji. Pri gojenju pri 15 °C pa izrazitejših lis ni moč opaziti.

V naslednjem poskusu smo NusA-LBD izrazili v bakterijskem sevu z bolj oksidirajočo citoplazmo (*E. coli* Origami (DE3) pLysS), ki dopušča tvorbo disulfidnih vezi. Translacijo pa smo upočasnili z nižjo končno koncentracijo IPTG (0,2 mM). Rezultati SDS-PAGE so bili primerljivi s tistimi, prikazanimi zgoraj, tj. intenzivnejše lise v topni frakciji nismo zaznali (ni prikazano).

4.2.POSKUS PRIPRAVE AKTIVNEGA PROTEINA LBD Z DENATURACIJO IN PONOVNIM ZVIJANJEM

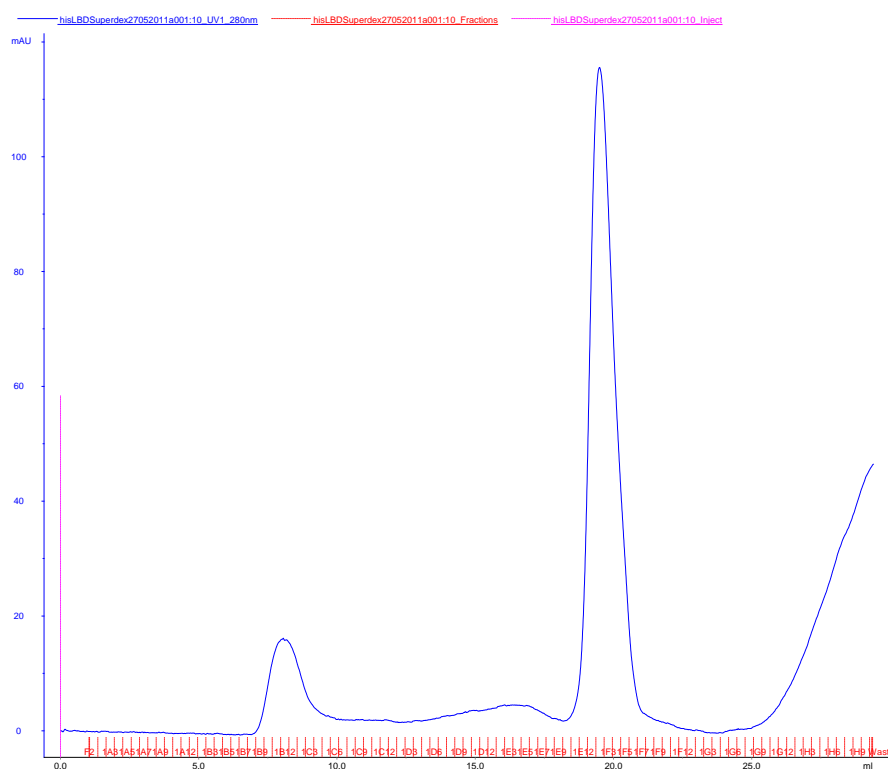
Izražanje rekombinantnega proteina LBD s fuzijskim partnerjem se je kljub spreminjanju pogojev gojenja izkazalo kot neuspešno. Zato smo se odločili delo nadaljevati s ponovnim zvijanjem LBD. Pri tem nam je bilo v oporo eksperimentalno delo Sandowskega in sodelavcev [12], ki so LBD uspešno subklonirali, izrazili v *E.coli*, očistili in zčili. Stopnjo zvijanja so izvedli z dializo denaturiranega proteina proti desetim litrom dializnega pufra (pet ponovitev). Zaradi tehničnih ovir in velike porabe dializnega pufra, smo skušali razviti enostavnejšo metodo za zvijanje LBD.

4.2.1. Poskus zvijanja proteina LBD z metodo redčenja v pufer brez denaturanta

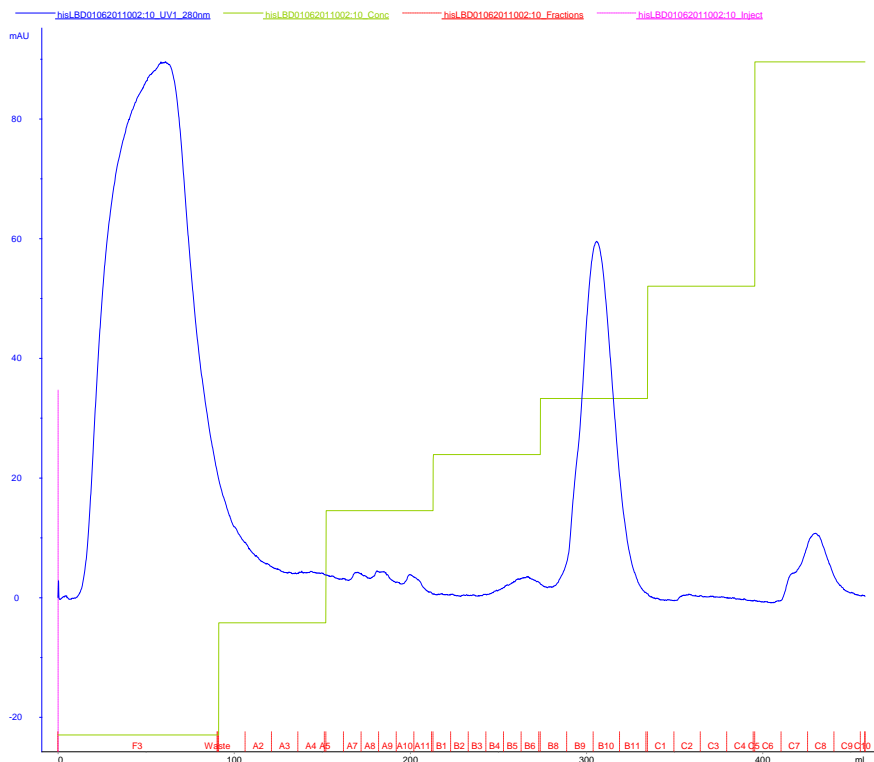
Za razliko od testnega izražanja, kjer smo uporabili gojišče LB (*lysogeny broth*), smo za pripravo IT uporabili gojišče TB (*terrific broth*). Slednje zaradi bogatejše sestave omogoča pridobivanje izraženega proteina v večjih količinah kot LB.

Ker ima na proces zvijanja ključen pomen sestava pufra, smo vpliv posameznega dodatka skušali preveriti z izvedbo testnega zvijanja na mikrotitrski ploščici. V vdolbinice smo nanесли pufre različne sestave, nato pa dodali po 10 μ L raztopine denaturiranega proteina. Po eni uri smo preverili absorbanco raztopin v posameznih vdolbinicah pri 400 nm. Med vzorci ni bilo opaziti signifikantnih razlik. Iz dobljenih rezultatov tako nismo mogli sklepati na vpliv posameznega dodatka na proces zvijanja.

Raztopino proteina smo uporabili tudi za postopek redčenja v pufer brez denaturanta. Raztopino denaturiranega LBD smo kapljali v pufer za zvijanje A. Pri tem je ključno, da je dodajanje vzorca v pufer počasno, mešanje pa intenzivno, da je lokalna koncentracija nezvitega proteina čim nižja. S tem smo skušali favorizirati zvijanje (tvorbo intramolekularnih interakcij) pred agregacijo (tvorbo intermolekularnih interakcij). Po dodatku celotnega vzorca smo hitrost mešanja zmanjšali, raztopino pa pustili mešati čez noč, da se potencialno napačno tvorjene disulfidne vezi pod vplivom GSH/GSSG preuredijo. Postopek smo ponovili z uporabo pufra za zvijanje B. Razredčeni raztopini LBD smo skoncentrirali z ultrafiltracijo in analizirali z izključitveno (sliki 8 in 10) in ionsko-izmenjevalno kromatografijo (sliki 9 in 11).

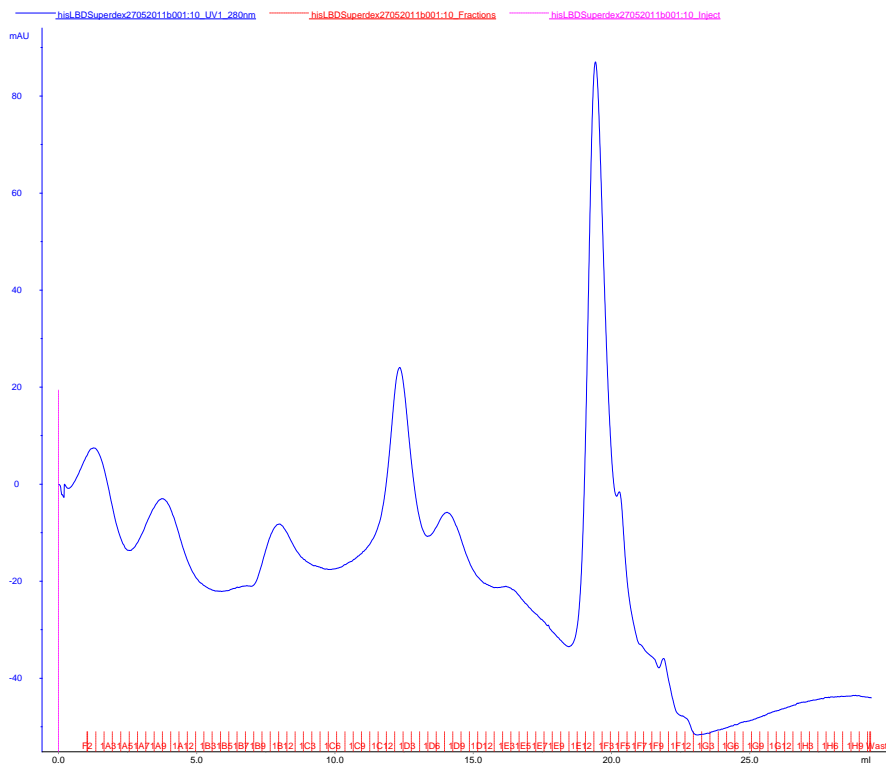


Slika 8: Kromatogram skoncentrirane raztopine LBD v pufru za zvijanje A z izključitveno kromatografijo na koloni Superdex 200 10/300 GL. Modra črta predstavlja absorbanco pri 280 nm.

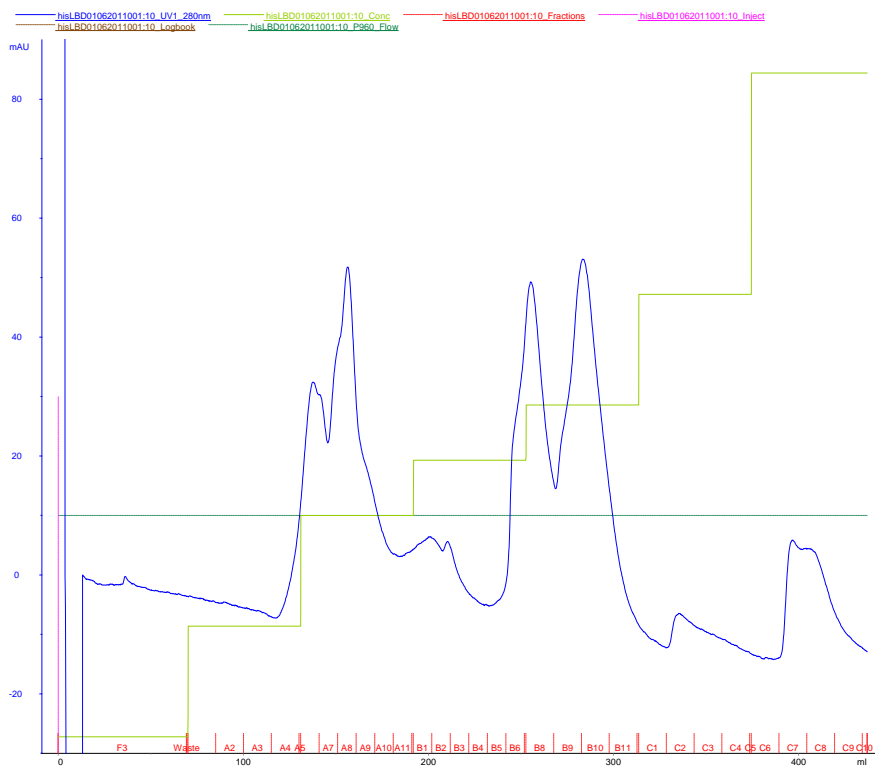


Slika 9: Kromatogram skoncentrirane raztopine LBD v pufru za zvijanje A z ionsko-izmenjevalno kromatografijo na koloni HiPrep Q XL 16/10. Modra črta predstavlja absorbanco pri 280 nm. Zelena črta predstavlja koncentracijo NaCl v elucijskem pufru.

Z redčenjem raztopine LBD v pufer za zvijanje A smo po rezultatih sodeč uspeli pridobiti monomerno LBD. Na kromatogramu na sliki 8 sta razvidna dva ločena vrha. Prvi glede na retencijski čas predstavlja najverjetneje nečistočo z visoko molekularno maso. Drugi vrh pa lahko glede na retencijski čas pripišemo monomerni LBD (po priročniku kolone Superdex 200 10/300 GL bi se morali 25 kDa veliki proteini eluirati pri ~17 mL). Domnevo podpira tudi vrh iz kromatograma na sliki 9, ki se pojavi med elucijo s 150 mM NaCl (Sandowski in sodelavci so monomerno LBD eluirali pri koncentraciji NaCl od 100 do 150 mM [12]). Identifikacije monomera zaradi prenizkega izkoristka (< 1 %) nismo opravili.



Slika 10: Kromatogram skoncentrirane raztopine LBD v pufru za zvijanje B z izključitveno kromatografijo na koloni Superdex 200 10/300 GL. Modra črta predstavlja absorbanco pri 280 nm.

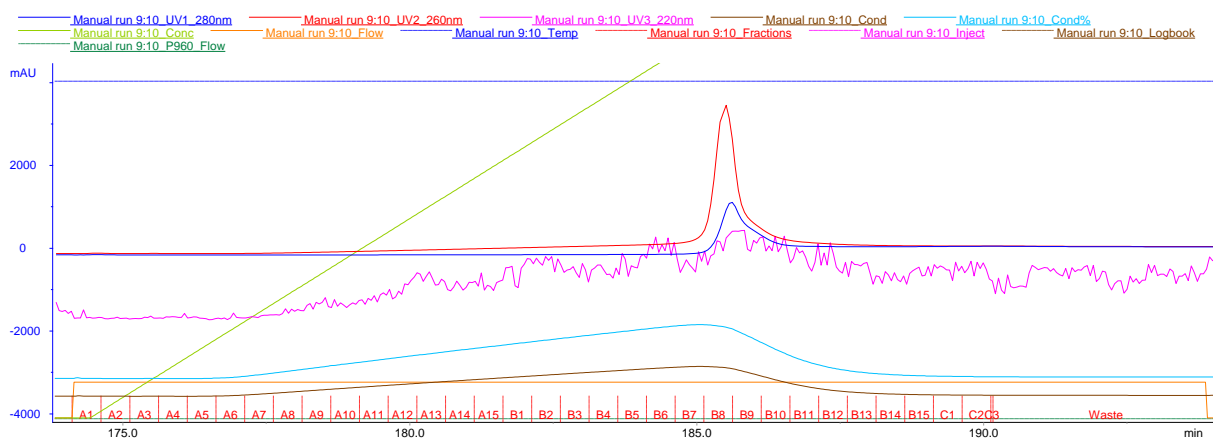


Slika 11: Kromatogram skoncentrirane raztopine LBD v pufru za zvijanje B z ionsko-izmenjevalno kromatografijo na koloni HiPrep Q XL 16/10. Modra črta predstavlja absorbanco pri 280 nm. Zelena črta predstavlja koncentracijo NaCl v elucijskem pufru.

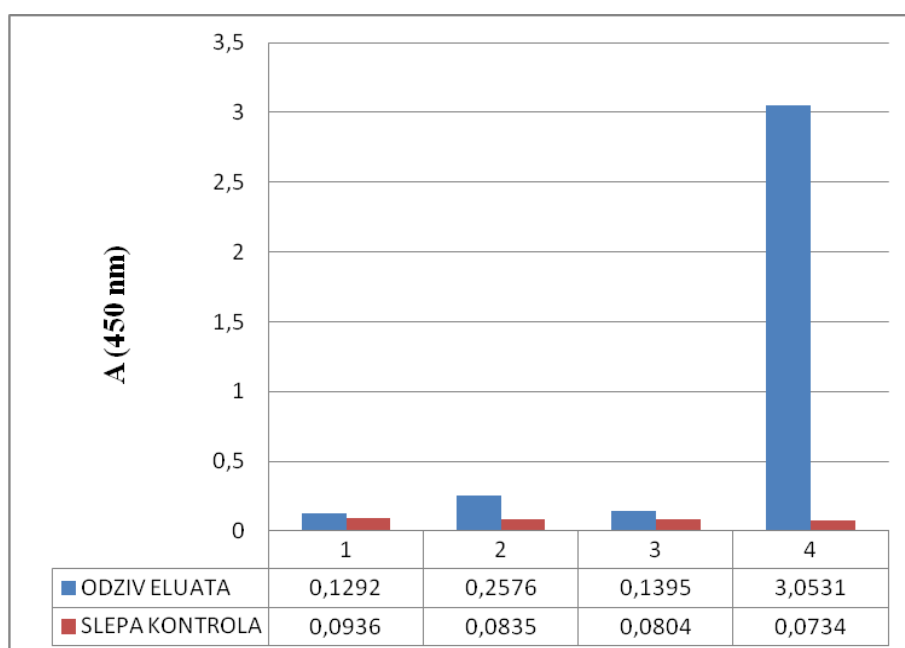
V drugem poskusu smo v pufer za zvijanje dodali L-arginin, ki pa ni bistveno pripomogel k izboljšanju rezultatov. Na kromatogramu na sliki 10 je poleg vrha pri ~20 mL (domnevna monomerna LBD) vidnih precej več vrhov, ki lahko predstavljajo di- in oligomere ter druge nečistoče. Na kromatogramu na sliki 11 je pri koncentracijah NaCl med 100 in 150 mM vidnih več vrhov, ki lahko predstavljajo monomerno LBD. Tudi tokrat zaradi nizkih izkoristkov dodatnih poskusov nismo izvedli.

4.2.2. Poskus priprave aktivnega proteina LBD z zvijanjem na koloni IMAC

Z metodo IMAC smo skušali razvito LBD, označeno s polihistidinskim označevalcem, ujeti na koloni z ioni Ni^{2+} in zvijanje izvesti s pufroma za zvijanje C in D. Stopnjo zvijanja smo začeli s pufrom C, ki vsebuje reducirani in oksidirani glutation. Tiolna reagenta omogočata med procesom zvijanja ravnotežno reakcijo tvorbe disulfidnih vezi, kar naj bi izboljšalo izkoristek pravilno zvitih proteinov. Pufer ima tudi visoko ionsko moč (500 mM NaCl), kar zmanjša ionske interakcije med stacionarno fazo in proteini. S pufrom za zvijanje D smo povrnili nativne pogoje, elucijo vezanih proteinov pa izvedli z elucijskim pufrom za IMAC, ki vsebuje imidazol (slika 12). Med gradientno elucijo smo edini izraziti vrh (~187 min) opazili šele pri koncentracije imidazola 500 mM. Eluatom B8, B9 in B10 smo izmerili absorbanco in jim določili koncentracijo na osnovi primerjave absorbance z raztopino BSA kot standarda ($C_{B8} = 0,10 \text{ mg/mL}$, $C_{B9} = 0,27 \text{ mg/mL}$, $C_{B10} = 0,33 \text{ mg/mL}$). Glede na relativno visoke odzive smo opravili še analizo sestave s SDS-PAGE in ocenili aktivnost eluatov. SDS-PAGE je pokazala, da je v eluatih prisotna znatna količina nečistot in LBD (šibka lisa velikosti ~25 kDa; ni prikazano). Na odsotnost večje količine pravilno zvite LBD kaže ocena aktivnosti LBD v eluatih (slika 13). Izmerjeni signali analiziranih eluatov so le trikrat višji od slepe kontrole.



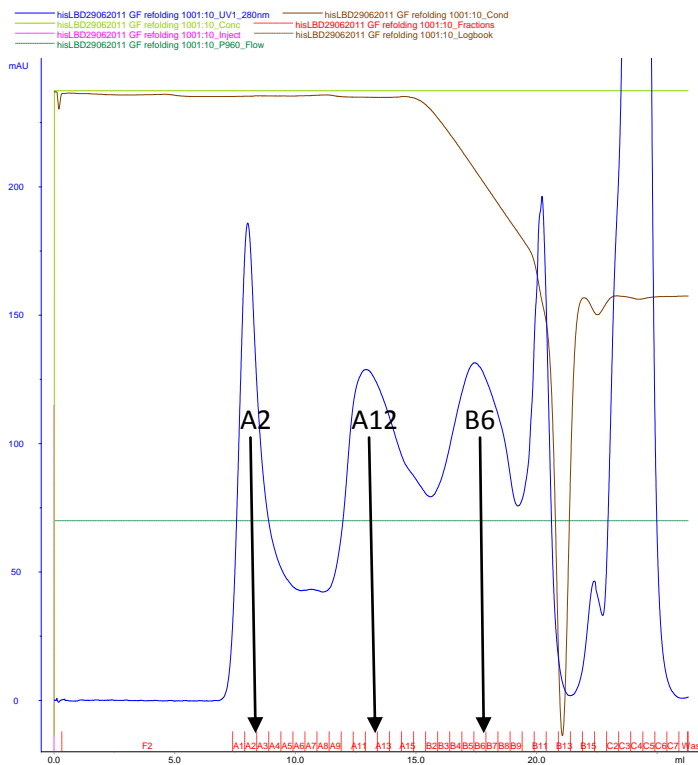
Slika 12: Kromatogram elucije LBD z gradientom imidazola na koloni HiTrap. Modra črta predstavlja absorbanco pri 280 nm. Zelena črta predstavlja koncentracijo imidazola v elucijskem pufru.



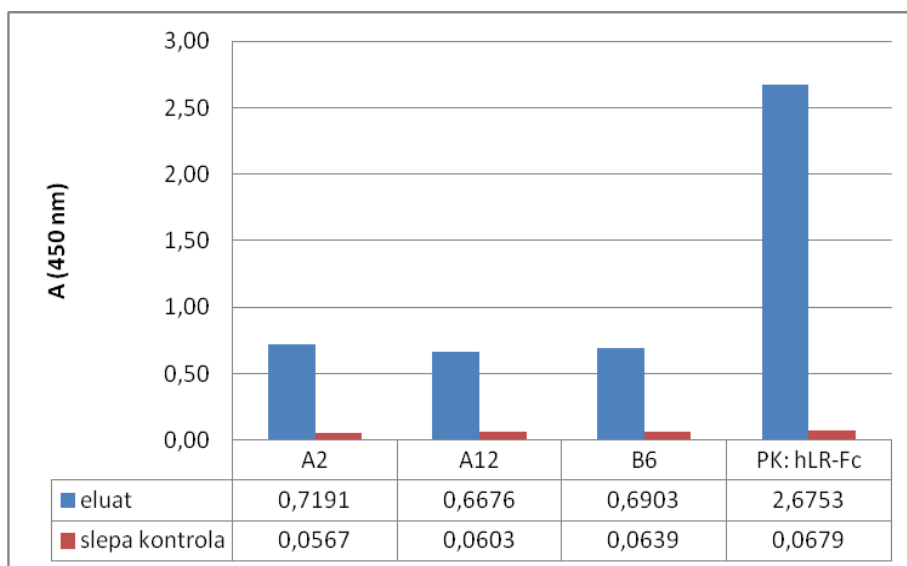
Slika 13: Testiranje biološke aktivnosti LBD v eluatih B8, B9 in B10. Pozitivno kontrolo (PK) je predstavljal himerni humani leptinski receptor (hLR-Fc). Slepne kontrole so označene rdeče.

4.2.3. Poskus priprave aktivenga proteina LBD z izključitveno kromatografijo in gradientom uree

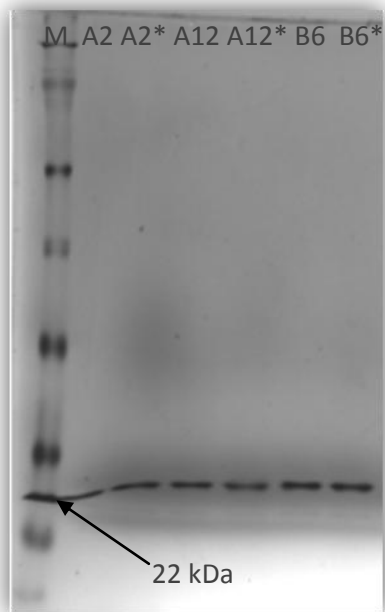
V zadnjem poskusu smo aktivno LBD poskusili pripraviti z izključitveno kromatografijo in gradientom uree. Na kromatogramu (slika 14) so razvidni 4 vrhovi. Glede na retencijske čase smo sklepali, da se je monomerna LBD eluirala pri 20 minutah. S SDS-PAGE smo analizirali sestavo eluatov A2, A12 in B6. Po rezultatih ločevanja proteinov s SDS-PAGE sklepamo (slika 16), da se LBD nahaja v vseh treh frakcijah (lise velikosti ~25 kDa) in izkazuje visoko čistost. Dejstvo, da tako pri nereduciranih kot tudi reduciranih (dodan DTT) vzorcih ni vidnih dodatnih lis, nakazuje na agregacijo proteina, ki ni posledica tvorbe intermolekularnih disulfidnih vezi. Prisotnost pravilno zvite monomerne LBD smo skušali potrditi z oceno aktivnosti proteinov v eluatih. Iz grafa (slika 15) je razvidno, da je aktivnost vzorcev A2, A12 in B6 vsaj desetkrat višja od slepe kontrole. Kljub visoki aktivnosti, je le-ta znatno nižja od aktivnosti rekombinantnega receptorja. Višja aktivnost pozitivne kontrole je vsaj deloma posledica višje avidnosti LR, saj se receptor nahaja v obliki dimera. Poleg tega ima receptor napram LBD na voljo večje število vezavnih mest za leptin (tj. še druge domene). Ne glede na nižjo aktivnost napram receptorju lahko sklepamo, da smo z uporabo kolone Superdex 200 10/300 GL in gradientom uree uspeli vsaj deloma pridobiti monomerno LBD v aktivni obliki.



Slika 14: Kromatogram gelske izključitvene kromatografije z gradientom uree na koloni Superdex 200 10/300 GL. Modra črta predstavlja absorbanco pri 280 nm, rjava črta predstavlja prevodnost, ki je v glavnem odvisna od koncentracije uree. Z A2, A12 in B6 so označene frakcije, ki smo jih uporabili za SDS-PAGE in ocenjevanje aktivnosti.



Slika 15: Testiranje biološke aktivnosti LBD v eluatih A2, A12 in B6. Pozitivno kontrolo (PK) je predstavljal himerni humani leptinski receptor (hLR-Fc). Slepne kontrole so označene rdeče.



Slika 16: Ločitev proteinov v eluatih, pridobljenih z izključitveno kromatografijo z gradientom uree s SDS-PAGE (barvanje s srebrom). Od leve proti desni: SeeBlue Plus2 (M), eluati A2, A12 in B6. Z zvezdico so označeni eluati, katerim je bila namesto DTT-ja dodana voda.

5. SKLEP

Končni rezultat izražanja rekombinantnih proteinov v prokariontskih ekspresijskih sistemih je pogosto kopičenje produkta v obliki inkluzijskih teles. Kljub veliki količini rekombinantnega proteina je le-ta neaktiven, postopki za ponovno zvijanje pa vedno ne omogočajo pridobitve bioaktivnega proteina v zadostnih količinah. Za LBD je znano, da se ob izražanju v *E. coli* kopiči v obliki inkluzijskih teles. Da bi se izognili stopnji ponovnega zvijanja, smo skušali LBD izraziti v topni obliki. Pri tem smo gen LBD subklonirali v vektor pET44c, ki omogoča izražanje tarčnega proteina v fuziji z NusA in polihistidinskim označevalcem, toda tudi fuzijski protein se je nakopičil v obliki inkluzijskih teles. Na tvorbo inkluzijskih teles ni vplivalo niti znižanje temperature gojenja niti zamenjava prvotnega bakterijskega seva s sevom z bolj oksidirajočo citoplazmo. Kljub neuspehu pa bi bilo smotrno preizkusiti izražanje LBD v kombinaciji z drugimi fuzijskimi partnerji, ki bi morda omogočili izražanje tarčnega proteina v topni obliki.

Po neuspešnem izražanju fuzijskega proteina NusA-LBD, smo se usmerili na ponovno zvijanje rekombinantnega proteina iz inkluzijskih teles. Rekombinantno LBD smo izrazili s polihistidinskim označevalcem, s katerim bi lahko LBD selektivno ločili od ostalih proteinov z metodo IMAC. Aktivno monomerno LBD smo poskusili pridobiti na tri načine: a) z metodo redčenja v pufer brez denaturantov, b) z zvijanjem na koloni IMAC in c) z zvijanjem na koloni za izključitveno kromatografijo z uporabo gradienta uree.

Sodeč po rezultatih pridobljenih z gelsko filtracijo in ionsko-izmenjevalno kromatografijo smo z metodo redčenja v pufer brez denaturantov pridobili relativno čisto proteinsko frakcijo. Zaradi nizkega izkoristka pri pridobivanju pravilno zvitega proteina se za nadaljnje postopke identifikacije nismo odločili, na prisotnost monomerne LBD pa lahko vendarle sklepamo glede na retencijski čas in elucijo analita pri predvideni koncentraciji NaCl (med 100 in 150 mM, kar je v skladu z objavljenimi rezultati [12]).

V nadaljevanju smo ponovno zvijanje izvedli z metodo IMAC. Med elucijo vezane frakcije smo rekombinantni protein eluirali šele pri visoki koncentraciji imidazola (~500 mM), kar je nakazovalo na prisotnost oligomerov, ki imajo zaradi večjega števila polihistidinskih označevalcev večjo vezavno energijo kot monomer. Slednje je potrdila tudi SDS-PAGE vzorcev (ni prikazano), kjer je bilo poleg monomerov LBD zaznati precejšen

delež oligomerov povezanih z intermolekularnimi disulfidnimi vezmi. Šibka aktivnost pri testu ELISA je prav tako lahko posledica delne aktivnosti oligomerov.

Kot najbolj uspešna metoda se je izkazala izključitvena kromatografija z uporabo gradienta uree. Zaradi suma prisotnosti oligomerov v raztopini LBD smo le-tej pred pričetkom postopka zvitja dodali DTT do 100 mM. Pridobljeni vzorci proteina so izkazovali visoko čistost, poleg tega pa so imeli višjo koncentracijo in aktivnost kot vzorci proteina pridobljeni z ostalima metodama. Boljše rezultate si lahko razlagamo na tri načine, in sicer a) postopno odstranjevanje denaturanta omogoča proteinu daljši čas za zvijanje in posledično nastanek več aktivnega proteina, b) nedenaturacijska koncentracija uree pozitivno vpliva na nastanek pravilno zvitega proteina ter c) predhodne raztopine IT so zaradi prenizke koncentracije reductentov vsebovale še znatno količino oligomerov, ki smo jih vnesli v postopke ponovnega zvijanja. Kljub boljšim rezultatom je aktivnost pridobljenega proteina bistveno nižja od aktivnosti LR. Pri tem moramo upoštevati, da je lahko nižja aktivnost posledica nižje avidnosti LBD napram hLR, saj se hLR nahaja v obliki dimera in ima večje število vezavnih mest kot LBD. Nižja določena aktivnost je lahko tudi posledica neoptimalne zasnove testa: če je polihistidinski označevalec skrit v notranjosti proteina, ni dostopen protitelesom, preko katerih smo molekule imobilizirali na mikrotitrsko ploščico.

Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je bilo ponovno zvijanje LBD zgolj delno uspešno. V okviru nadaljnjega dela bi lahko preverili pravilnost naših hipotez z optimizacijo posameznega postopka. Ponovno zvijanje z redčenjem v pufer brez denaturantov bi lahko izvedli v pufrih z nedenaturacijsko koncentracijo uree ali gvanidina. Na koloni za gelsko izključitveno kromatografijo bi lahko postopek ponovili z uporabo različnih gradientov uree. Posamezen postopek ponovnega zvijanja bi lahko ponovili z LBD brez histidinskega označevalca in na ta način bi ocenili vpliv označevalca na zvijanje. Potencialno bi lahko poskusili protein izraziti s signalnim zaporedjem za izločanje v periplazmo bakterije ali celo v evkariontskem sistemu.

6. LITERATURA

1. Daniel V C, Michael C H: Leptin, Springer Science+Business Media, LCC, ZDA, 2006.
2. Fantuzzi G , Faggioni R: Leptin in the regulation of immunity, inflammation and hematopoiesis. *Journal of leukocyte biology* 2000; 68: 437–446.
3. Šabovič M, Mavri A: Leptin in debelost – nevroendokrini, presnovni in aterogeni učinki leptina. *Zdravniški vestnik* 2003; 72: 19 – 23
4. Houseknecht K L, Baile C A, Matteri R L, Spurlock M E: The biology of leptin: A review. *Journal of animal science* 1998; 76:1405–1420.
5. Ahima R S, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier J S: Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 1996; 382: 250–252.
6. Peelman F, Van Beneden K, Zabeau L, Iserentant H, Ulrichs P, Defeau D, Verhee A, Cateeuw D, Elewaut D, Tavernier J: Mapping of the leptin binding sites and design of a leptin antagonist. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279:41038-41046.
7. Villanueva EC, Myers MG Jr: Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *International journal of obesity* 2008; 32:8–12.
8. Peelman F, Couturier C, Dam J, Zabeau L, Tavernier J, Jockers R: Techniques: New pharmacological perspectives for the leptin receptor. *Trends in Pharmacological Sciences* 2006; 27:218-225.
9. Tu H, Kastin AJ, Hsueh H, Pan W: Soluble receptor inhibits leptin transport. *Journal of cellular physiology* 2008; 214: 301–305.
10. Peelman F, Iserentant H, De Smet AS, Vandekerckhove J, Zabeau L, Tavernier J: Mapping of binding site III in the leptin receptor and modeling of a hexameric leptin.leptin receptor complex. *The Journal of Biological Chemistry* 2006; 281:15496-15504.
11. Gertler A: Development of leptin antagonists and their potential use in experimental biology and medicine. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 2006; 17:372-378.
12. Sandowski Y, Raver N, Gussakovsky EE, Shochat S, Dym O, Livnah O, Rubinstein M, Krishna R, Gertler A: Subcloning, expression, purification, and characterization of recombinant human leptin-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277:46304 –46309.

13. Niv-Spector L, Raver N, Friedman-Einat M, Grosclaude J, Gussakovsky EE, Livnah O, Gertler A.: Mapping leptin-interacting sites in recombinant leptin-binding domain (LBD) subcloned from chicken leptin receptor. *Biochemical journal* 2005; 390:475-484.
14. Dobson C M, Karplus M: The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Current opinion in structural biology* 1999; 9: 92–101.
15. Rudolph R: Successful protein folding on an industrial scale, in *Principles and practice of protein folding* (Cleland, J. L. & Craik, C. S., eds) (1995) str. 283-298, John Wiley and Sons Inc., New.
16. Fahnert B, Lilie H, Neubauer P: Inclusion bodies: Formation and utilisation. *Advances in biochemical engineering biotechnology* 2004; 89: 93–142.
17. Sorensen M A, Pedersen S: Absolute in vivo translation rates of individual codons in *Escherichia coli*. The two glutamic acid codons GAA and GAG are translated with a threefold difference in rate. *Journal of molecular biology* 1991; 222: 265-280.
18. Frydman J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Hartl FU: Co-translational domain folding as the structural basis for the rapid de novo folding of firefly luciferase. *Nature structural biology* 1999; 6:697–705.
19. Chen W, Helenius J, Braakman I, Helenius A: Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1995; 92:6229-6233.
20. Ellis RJ, Hartl FU: Principles of protein folding in the cellular environment. *Current opinion in structural biology* 1999; 9:102 - 110.
21. Netzer WJ, Hartl FU: Recombination of protein domains facilitated by co-translational folding in eukaryotes. *Nature* 1997; 388:343-349.
22. Ellis RJ: Macromolecular crowding: Obvious but under-appreciated. *Trends in biochemical sciences* 2001; 26:597– 604.
23. Bazarsuren A, Grauschopf U, Wozny M, Reusch D, Hoffmann E, Schaefer W, Panzner S, Rudolph R: In vitro Folding, Functional Characterization, and Disulfide Pattern of the Extracellular Domain of Human GLP-1 Receptor. *Biophysical chemistry* 2002; 96:305-318.
24. Schein CH, Noteborn MH: Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by low growth temperature. *Nature Biotechnology* 1988; 6:291-294.
25. Rinas U, Tsai LB, Lyons D, Fox GM, Stearns G, Fieschko J, Fenton D, Bailey JE: Cysteine to serine substitutions in basic fibroblast growth factor: effect on inclusion

- body formation and proteolytic susceptibility during in vitro refolding. *Biotechnology (NY)* 1992; 10:435-440.
26. Schulze AJ, Degryse E, Speck D, Huber R, Bischoff R: Expression of alpha 1-proteinase inhibitor in *Escherichia coli*: effects of single amino acid substitutions in the active site loop on aggregate formation. *Journal of biotechnology* 1994; 32:231-238
 27. Pines O, Inouye M: Expression and secretion of proteins in *E. coli*. *Molecular biotechnology* 1999; 12:25–34.
 28. Kopetzki E, Schumacher G, Buckel P: Control of formation of active soluble or inactive insoluble baker's yeast alpha-glucosidase PI in *Escherichia coli* by induction and growth conditions. *Molecular and general genetics* 1989; 216:149-155.
 29. Deana A, Ehrlich R, Reiss C: Synonymous codon selection controls in vivo turnover and amount of mRNA in *Escherichia coli* bla and ompA genes. *Journal of bacteriology* 1996; 178:2718–2720.
 30. Coburn GA, Mackie GA: Degradation of mRNA in *Escherichia coli*: an old problem with some new twists. *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 1999; 62:55-108.
 31. Calderone TL, Stevens RD, Oas TG: High-level misincorporation of lysine for arginine at AGA codons in a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* 1996; 262: 407-412.
 32. Zahn K: Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *Journal of bacteriology* 1996; 178:2926–2933.
 33. Kleber-Janke T, Becker WM: Use of modified BL21(DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein expression and purification* 2000; 19:419-424.
 34. Parker J.: Errors and alternatives in reading the universal genetic code. *Microbiological reviews* 1989; 53:273–298.
 35. Spanjaard RA, Chen K, Walker JR, van Duin J: Frameshift suppression at tandem AGA and AGG codons by cloned tRNA genes: assigning a codon to argU tRNA and T4 tRNA(Arg). *Nucleic acids research* 1990; 18:5031-5036.
 36. Rosenberg AH, Goldman E, Dunn JJ, Studier FW, Zubay G: Effects of consecutive AGG codons on translation in *Escherichia coli*, demonstrated with a versatile codon test system. *Journal of bacteriology* 1993; 175:716-722.

37. Winter J, Neubauer P, Glockshuber R, Rudolph R: Increased production of human proinsulin in the periplasmic space of *Escherichia coli* by fusion to DsbA. *Journal of biotechnology* 2001; 84:175–185.
38. LaVallie ER, McCoy JM: Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Current opinion in biotechnology* 1995; 6:501–506.
39. Hidaka Y, Shimono C, Ohno M, Okumura N, Adermann K, Forssmann WG, Shimonishi Y: Dual function of the propeptide of prouroguanylin in the folding of the mature peptide: disulfide-coupled folding and dimerization. *The journal of biological chemistry* 2000; 275:25155-25162.
40. Sachdev D, Chirgwin JM: Order of fusions between mammalian and bacterial proteins can determine solubility in *Escherichia coli*. *Biochemical and biophysical research communications* 1998; 244:933-937.
41. Sachdev D, Chirgwin JM.: Solubility of proteins isolated from inclusion bodies is enhanced by fusion to maltose-binding protein or thioredoxin. *Protein expression and purification* 1998; 12:122-132.
42. Sachdev D, Chirgwin JM.: Fusions to maltose-binding protein to control folding and solubility. *Methods in enzymology* 2000; 326:312-21.
43. Uhlen M, Forsberg G, Moks T, Hartmanis M, Nilsson B: Fusion proteins in biotechnology. *Current opinion in biotechnology* 1992; 3:363-369.
44. Bessette PH, Åslund F, Beckwith J, Georgiou G: Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proceedings of the national academy of sciences of the USA* 1999; 96:13703-13708.
45. Derman AI, Prinz WA, Belin D and Beckwith J: Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science*, 1993; 262:1744–1747.
46. Proba K, Ge L, Plückthun A: Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of *Escherichia coli*: Influence of thioredoxin reductase (TrxB). *Gene* 1995; 159:203-207.
47. <http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/Novagen/Hoststrains.htm>, dostopno 20.04.2012.
48. Prinz WA, Aslund F, Holmgren A, Beckwith J: The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *The journal of biological chemistry* 1997; 272:15661-15667.
49. Mukhopadhyay A: Inclusion bodies and purification of proteins in biologically active forms. *Advances in biochemical engineering biotechnology* 1997; 56:61–109.

50. Taylor G, Hoare M, Gray DR, Marston FAO: Size and Density of Protein Inclusion-Bodies. *Nature biotechnology* 1986; 4:553-557.
51. Hochuli E, Döbeli H, Schacher A: New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues, *Journal of chromatography* 1987; 411:177–184.
52. Grauschopf U, Lilie H, Honold K, Wozny M, Reusch D, Esswein A, Schafer W, Rucknagel KP, Rudolph R: The N-terminal fragment of human parathyroid hormone receptor 1 constitutes a hormone binding domain and reveals a distinct disulfide pattern. *Biochemistry* 2000; 39:8878–8887.
53. Hagel P, Gerding JJ, Fieggen W, Bloemendal H.: Cyanate formation in solutions of urea. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH. *Biochimica et biophysica acta* 1971; 243(3):366–373.
54. Fischer B, Perry B, Sumner I, Goodenough P: A novel sequential procedure to enhance the renaturation of recombinant protein from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Protein engineering* 1992, 5:593-596.
55. Zettlmeissl G, Rudolph R, Jaenicke R.: Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation. 1. Physical properties and kinetics of aggregation. *Biochemistry* 1979; 18:5567–5571.
56. Maeda Y, Ueda T, Imoto T: Effective renaturation of denatured and reduced immunoglobulin G in vitro without assistance of chaperone. *Protein engineering* 1996; 9:95-100.
57. Buchner J, Rudolph R: Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 1991; 9: 157-162.
58. Winter J, Lilie H, Rudolph R: Renaturation of human proinsulin--a study on refolding and conversion to insulin. *Analytical biochemistry* 2002; 310:148-155.
59. Fahey EM, Chaudhuri JB, Binding P: Refolding and purification of a urokinase plasminogen activator fragment by chromatography. *Journal of chromatography b biomedical sciences and applications* 2000; 737:225-235.
60. Fahey EM, Chaudhuri JB, Binding P: Refolding of low molecular weight urokinase plasminogen activator by dilution and size exclusion chromatography: a comparative study. *Science and technology* 2000; 35:1743-1760.
61. Negro A, Onisto M, Grassato L, Caenazzo C, Garbisa S: Recombinant human TIMP-3 from *Escherichia coli*: synthesis, refolding, physico-chemical and functional insights. *Protein engineering* 1997; 10:593-599.

62. Rogl H, Kosemund K, Kühlbrandt W, Collinson I: Refolding of Escherichia coli produced membrane protein inclusion bodies immobilised by nickel chelating chromatography. FEBS letters 1998; 432:21-26 .
63. Stempfer G, Höll-Neugebauer B, Rudolph R: Improved refolding of an immobilized fusion protein. Nature biotechnology 1996; 14:329-334.
64. Orsini G, Goldberg ME: The renaturation of reduced chymotrypsin A in guanidine HCl. The journal of biological chemistry 1978; 253:3453-3458.
65. Hevehan D, De Bernardez Clark E: Oxidative renaturation of lysozyme at high concentrations. Biotechnology and bioengineering 1997; 54:221-230.
66. Jan-Christer Janson: Protein purification : principles, high resolution methods and applications, 3. izdaja, Hoboken, N.J. : Wiley, 2007 .
67. Gutiérrez R, Martín del Valle EM, Galán MA: Immobilized Metal-Ion Affinity Chromatography: Status and Trends. Separation & Purification Reviews 2007; 36:71-111.
68. Sharma S, Agarwal GP: Interactions of proteins with immobilized metal ions: A comparative analysis using various isotherm models. Analytical biochemistry 2001; 288: 126 – 140.
69. Ueda EKM, Gout PW, Morganti L: Current and prospective applications of metal ion-protein binding. Journal of chromatography A 2003; 988:1 - 23.
70. Pearson RG: Hard and soft acids and bases. In Benchmark Papers in Inorganic Chemistry; Pearson, R.G. ed., Hutchinson & Ross: Stroudsburg, PA, 1973; 53 - 59, 67 – 85.
71. Sharma S, Agarwal G: Interactions of proteins with immobilized metal ions: Role of ionic strength and pH. Journal of colloid and interface science 2001; 243:61 – 72.
72. Porath J, Olin B: Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials: serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. Biochemistry 1983; 22:1621 – 1630
73. Sulkowski E: Purification of proteins by IMAC. Trends in biotechnology, 1985; 3:1–7.
74. Arnold FH: Metal-affinity separations: a new dimension in protein processing. Biotechnology (N Y) 1991; 9:151–156.
75. Garberc-Porekar V, Menart V: Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. Journal of biochemical and biophysical methods, 2001; 49:335–360.
76. Porath J: IMAC - Immobilized metal-ion affinity based chromatography. TrAC Trends in analytical chemistry 1988; 7: 254 – 259

77. Jungbauer A, Kaar W, Schlegl R: Folding and refolding of proteins in chromatographic beds. *Current opinion in biotechnology* 2004; 15: 487 – 494
78. Novagen, pET System manual 11th Edition, User protocol TB055 Rev. C 0611JN, dostopno preko strani (20.04.2012) http://www.merckmillipore.com/life-science-research/technical-bulletins/c_IMOb.s1OXkUAAAEj2xsYzMkq
79. Harrison RG: Expression of soluble heterologous proteins via fusion with NusA protein. *InNovations* 2000; 11:4-7
80. pGem-T and pGem-T Easy vector systems, instructions for use of procedures A1360, A1380, A3600, A3610, technical manual. Dostopno preko strani (20.04.2012) <http://www.promega.com/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>
81. Bengt Nölting. *Protein Folding Kinetics: Biophysical Methods*, 2. izdaja, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1999, 2006