

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MONIKA KUMPERŠČAK

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKE FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MONIKA KUMPERŠČAK

**OVREDNOTENJE NOVE METODE IZOLACIJE
REKOMBINANTNEGA KEMOKINA CCL2 IZ
INKLUZIJSKIH TELESČ S KOMBINACIJO
POVRŠINSKO AKTIVNIH SNOVI**

**EVALUATION OF THE NEW METHOD OF ISOLATION
RECOMBINANT CHEMOKINE CCL2 FROM
INCLUSION BODIES BY USING A COMBINATION OF
SURFACTANTS**

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča.

Zahvala

V prvi vrsti se zahvaljujem mentorju, doc. dr. Tomažu Bratkoviču za možnost opravljanja magistrskega dela na področju farmacevtske biotehnologije, za strokovno svetovanje in pomoč pri eksperimentalnem delu ter za potrpežljivost in spodbudo pri pisanju naloge. Prav tako se zahvaljujem vsem ostalim sodelavcem na Katedri za farmacevtsko biologijo, ki so bili vedno pripravljeni pomagati in so ustvarjali prijetno delovno vzdušje.

Iskrena hvala tudi dragima mami in očetu za moralno in finančno podporo v času študija, ter bratu Boštjanu in fantu Igorju za neskončno razumevanje in potrpežljivost. Hvala, ker ste verjeli vame v vseh mojih vzponih in padcih, me optimistično spodbujali ter mi nesebično pomagali.

Hvala tudi vsem prijateljem in sorodnikom, ki ste mi skozi vsa ta leta stali ob strani, brez vaše pomoči mi ne bi uspelo.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča.

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Odon Planinšek

Član diplomske komisije: doc. dr. Tomaž Vovk, mag. farm

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	I
ABSTRACT	III
SEZNAM OKRAJŠAV	V
1. UVOD.....	1
1.1 IZRAŽANJE REKOMBINANTNIH PROTEINOV V EKSPRESIJSKEM SISTEMU <i>E. COLI</i>	1
1.2 IZOLACIJA INKLUZIJSKIH TELESC IN RAZTAPLJANJE PROTEINA POD DENATURACIJSKIMI POGOJI	3
1.3 PONOVO ZVIJANJE REKOMBINANTNEGA PROTEINA	5
1.3.1 Redčenje v pufer brez denaturantov in dializa	6
1.3.2 Gelska filtracija.....	7
1.3.3 Kovinsko - kelatna afinitetna kromatografija.....	8
1.3.4 Raztapljanje proteina v prisotnosti sarkozila in naknadno prehajanje sarkozila v mešane micelle CHAPS in Tritona X-100	10
1.4 KEMOKINI.....	12
1.4.1 CCL2 (MCP-1).....	13
1.5 PREDHODNI POSKUSI IZOLACIJE REKOMBINANTNEGA PROTEINA CCL2	15
2. NAMEN DELA	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1 MATERIALI	17
3.1.1 Kemikalije	17
3.1.2 Gojišča.....	19
3.1.3 Biološki material	20
3.1.4 Pufri in raztopine	20
3.1.5 Geli	25
3.2 LABORATORIJSKA OPREMA	27
3.3 EKSPERIMENTALNA SHEMA	28
3.4 METODE	29
3.4.1 IZRAŽANJE rCCL2	29

3.4.1.1 PRIPRAVA BAKTERIJSKIH KOLONIJ <i>E. coli</i> BL21 DE3 pLysS/pET44-MCP1b.....	29
3.4.1.2 IZRAŽANJE PROTEINA CCL2	29
3.4.2 LIZA BAKTERIJ	29
3.4.2.1 LIZA BAKTERIJ VELIKEGA ALIKVOTA	30
3.4.3 SDS-PAGE (POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA LAVRIL SULFATA)	30
3.4.3.1 SDS-PAGE (POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA) – po gelski izključitveni kromatografiji (Superdex 200 10/300 GL)	32
3.4.3.2 SDS-PAGE (POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA) – po gelski izključitveni kromatografiji (Sephacryl S200 16/60 HR).....	33
3.4.3.3 SDS-PAGE (POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA) – po gelski izključitveni kromatografiji (Superdex 200 10/300 GL)	33
3.4.4 PRENOS WESTERN	34
3.4.5 RAZTAPLJANJE rCCL2 V PRISOTNOSTI 10 % SARKOZILA	35
3.4.5.1 RAZTAPLJANJE rCCL2 V PRISOTNOSTI 10 % SARKOZILA (VELIK ALIKVOT)	35
3.4.6 REDČENJE rCCL2 IN DODATEK 20 mM CHAPS-A TER 2 % TRITONA X-100	35
3.4.6.1 REDČENJE rCCL2 IN DODATEK 20 mM CHAPS-A TER 2 % TRITONA X-100 (VELIK ALIKVOT).....	35
3.4.7 TOČKOVNI NANOS	36
3.4.7.1 TOČKOVNI NANOS po gelski izključitveni kromatografiji (Superdex 200 10/300 GL)	36
3.4.7.2 TOČKOVNI NANOS po gelski izključitveni kromatografiji (Sephacryl S200 16/60 HR)	36
3.4.7.3 TOČKOVNI NANOS za oceno ustreznosti zvitja rCCL2	37
3.4.8 KROMATOGRAFSKE METODE	39
3.4.8.1 SEC (GELSKA IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA).....	39
3.4.8.1.1 GELSKA IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA – (Superdex 200 10/300 GL)	39
3.4.8.1.2 GELSKA IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA – (Sephacryl S200 16/60 HR)	39
3.4.8.1.3 GELSKA IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA – (Superdex 200 10/300 GL)	40
3.4.8.2 IMAC (KOVINSKO-KELATNA AFINITETNA KROMATOGRAFIJA)....	40

3.4.8.3 KOVINSKO-KELATNA AFINITETNA KROMATOGRFIJA.....	40
3.4.9 DOLOČITEV KONCENTRACIJE PROTEINOV PO BRADFORDU	41
4. REZULTATI IN DISKUSIJA.....	42
4.1 IZRAŽANJE PROTEINA CCL2	42
4.2 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE CCL2	42
4.2.1 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA LAVRIL SULFATA (SDS-PAGE)	42
4.2.2 PRENOS WESTERN.....	43
4.2.3 RAZTAPLJANJE PROTEINOV INKLUZIJSKIH TELESČ	44
4.2.4 IMAC (KOVINSKO-KELATNA AFINITETNA KROMATOGRFIJA)	46
4.2.5 PRELIMINAREN POSKUS LOČITVE MICELOV OD RAZTOPLJENEGA REKOMBINANTNEGA PROTEINA.....	48
4.2.6 PREPARATIVNA GELSKA IZKLJUČITVENA KROMATOGRFIJA	51
4.2.7 KOVINSKO – KELATNA AFINITETNA KROMATOGRFIJA	55
4.2.8 DOLOČITEV KONCENTRACIJE CCL2 PO BRADFORDU	56
4.2.9 TOČKOVNI NANOS za oceno ustreznosti zvitja rCCL2	57
4.2.10 ANALIZNA GELSKA IZKLJUČITVENA KROMATOGRFIJA	59
5. SKLEP.....	63
6. LITERATURA.....	65

POVZETEK

Escherichia coli je gram negativna bakterija in ena izmed najbolj pogosto uporabljenih gostiteljev za izražanje rekombinantnih proteinov. Široka uporabnost ekspresijskega sistema *E. coli* je posledica številnih prednosti, ki jih ponuja ta sistem, kot so hitra rast, enostavno in poceni gojenje, genetska stabilnost, enostavnost čiščenja proizvoda, dostopnost vektorjev za vnos tujih genov in enostavnost vnosa ustreznih vektorjev.

Humani kemokin CCL2, imenovan tudi monocitni kemoatraktivni protein (angl. *monocyte chemoattractive protein 1*, MCP-1) je kemotaktični citokin, ki spada v družino CC kemokinov in je učinkovit kemotaktični dejavnik za monocite. Pri izražanju humanega CCL2 kemokina v prokariotskem ekspresijskem sistemu *E. coli* ta tvori netopne agregate, t.i. inkluzijska telesa, zaradi česar je izkoristek pridobivanja rekombinantnega proteina izjemno nizek.

V okviru diplomske naloge smo s pomočjo ekspresijskega sistema *E. coli* BL21 DE3 pLysS/pET44-MCP1b izrazili protein CCL2 in iz celičnega lizata v nadaljevanju izolirali rekombinantni protein. Cilj naloge je bil primerjati izkoristek nove metode izolacije in čistost izoliranega rekombinantnega proteina s predhodno razvito metodo, ki sloni na raztapljanju inkluzijskih telesc v 4 M gvanidinijevem kloridu in naknadni dializi v pufer brez denaturanta.

Najprej smo s pomočjo prenosa western dokazali prisotnost rekombinantnega CCL2 v lizatu, natančneje v netopni frakciji lizata inducirane kulture, s čimer smo potrdili, da se rekombinantni protein v *E. coli* izraža v obliki inkluzijskih telesc. Nato smo rekombinantni protein izolirali iz inkluzijskih telesc s solubilizacijo s kombinacijo površinsko aktivnih snovi (sarkozil, CHAPS in Triton X-100). Raztapljanje inkluzijskih telesc in topnost rekombinantnega proteina v kombinaciji površinsko aktivnih snovi smo tudi dokazali z metodo točkovnega nanosa na nitrocelulozno membrano. S preparativno gelsko izključitveno kromatografijo smo uspeli ločiti raztopljene proteine od micelov, ki jih tvorijo površinsko aktivne snovi.

Rekombinantni CCL2 smo izolirali s kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo. Ustreznost zvitja rekombinantnega proteina CCL2 smo posredno dokazali z metodo točkovnega nanosa z detekcijo z monoklonskimi protitelesi, ki prepoznajo le nativni antigen za razliko od poliklonskih, ki prepoznavajo tako nativni kot denaturiran CCL2.

V primerjavi s prvotno metodo izolacije in čiščenja omogoča nova metoda nekoliko nižji izkoristek, rekombinantni protein CCL2 pa je tudi nekoliko manj čist. Tako preizkušena metoda ne predstavlja izboljšave postopka izolacije.

ABSTRACT

Escherichia coli is a gram negative bacteria and is one of the most widely used hosts for expressing recombinant proteins. The wide applicability of the *E. coli* expression system is due to the many advantages offered by this system, such as rapid growth, easy and inexpensive cultivation, genetic stability, ease of product purification, the accessibility of vectors introduction of foreign genes and ease of transformation.

Human chemokine CCL2, also known as a monocyte chemoattractive protein – MCP1 is a chemotactic cytokine that belongs to the CC chemokine family and is an efficient chemotactic factor for monocytes. Upon expression of human chemokine CCL2 in a procaryotic expression system of *E. coli*, recombinant protein formed insoluble aggregates called inclusion bodies, resulting in extremely low yield of properly folded recombinant protein after purification.

We used an expression system *E. coli* BL21 DE3 pLysS/pET44-MCP1b for the expression of protein CCL2 and isolated recombinant protein from the cell lysate. The aim of the thesis was to compare the yield of the new method of isolation and purity of the isolated recombinant protein with a previously development method, which is based on the dissolution of inclusion body in 4 M guanidinium chloride and subsequent dialysis in buffer without the denaturant.

Using the western blot technique, we have demonstrated the presence of the recombinant protein CCL2 in cell lysate, more specifically in the insoluble fraction of the lysate of induced culture, thereby confirming that the recombinant protein in *E. coli* is expressed in the form of inclusion bodies. We have solubilized the recombinant protein from inclusion bodies using a combination of surfactants (sarcosyl, CHAPS and Triton X-100). Solubilization of the inclusion bodies and solubility of the recombinant protein was confirmed with a dot blot on a nitrocellulose membrane. With preparative size exclusion chromatography we have managed to separate the dissolved proteins from the mixed micelles formed by the surfactants.

Finally, we have isolated the recombinant CCL2 with an immobilized-metal affinity chromatography. Proper folding of the recombinant protein CCL2 was indirectly demonstrated by the dot blot method and detection of the recombinant product by monoclonal antibodies which recognized only the native antigen in contrast to polyclonal antibodies, which recognized both, the native and denatured CCL2.

Compared with the previously developed method of isolation and purification, the new approach results in a slightly lower yield, and the recombinant protein CCL2 is somewhat less pure. Therefore, the new approach does not represent a superior method of recombinant CCL2 isolation.

SEZNAM OKRAJŠAV

β -ME	2-merkaptetoetanol
BSA	goveji serumski albumin (angl. <i>bovine serum albumin</i>)
CCL2/MCP-1	monocitni kemoatraktivni protein 1 (angl. <i>monocyte chemoattractive protein 1</i>)
CHAPS	(3-[3-holamidopropil]dimetilamonio-1-propansulfonat)
CTAB	n-cetiltrimetilamonijev bromid (angl. <i>n-cetyl trimethylammonium bromide</i>)
ddH ₂ O	ultra čista voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DTT	ditiotreitol (angl. <i>dithiothreitol</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GdmCl	gvanidinijev klorid (angl. <i>guanidinium chloride</i>)
GPCR	z G-proteinom sklopljeni receptorji (angl. <i>G protein-coupled receptors</i>)
GST	glutation S-transferaza (angl. <i>glutathione S-transferase</i>)
IMAC	kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija (angl. <i>immobilized-metal affinity chromatography</i>)
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
IT	inkluzijska telesa
LB	bakterijsko gojišče (angl. <i>lysogeny broth</i>)
mAb	monoklonska protitelesa (angl. <i>monoclonal antibody</i>)
MBP	maltoza-vezavni protein (angl. <i>maltose-binding protein</i>)
NMR	jedrska magnetna resonanca (angl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
OD ₆₀₀	optična gostota pri valovni dolžini 600 nm (angl. <i>optical density</i>)
pAb	poliklonska protitelesa (angl. <i>polyclonal antibody</i>)
PAS	površinsko aktivna snov
PBS	fosfatni pufer s soljo (angl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PBST	pufer PBS z dodanim polisorbatom-20 (Tween® 20)
PEG	polietilenglikol (angl. <i>polyethylene glycol</i>)
SDS	natrijev dodecilsulfat (angl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)

SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecilsulfatom
SEC	gelska izključitvena kromatografija (angl. <i>size exclusion chromatography</i>)
TB	bakterijsko gojišče (angl. <i>terrific broth</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (angl. N,N,N',N'- <i>tetramethylethylenediamine</i>)
VEGF	vaskularni endotelijski rastni dejavnik
vrt./min	število vrtljajev na minuto

1. UVOD

1.1 IZRAŽANJE REKOMBINANTNIH PROTEINOV V EKSPRESIJSKEM SISTEMU *E. COLI*

Izraz ekspresijski sistem v širšem smislu pomeni ustrezen par vektor-gostitelj. Ker pa je gostiteljski organizem (oz. celica) osnova sistema, velikokrat z izrazom ekspresijski sistem posplošeno imenujemo kar gostiteljski sistem. Uveljavljen izraz je tudi ekspresijski kvartet, ki združuje ustrezen sistem gen-vektor-gostitelj-protein. Pri tem so vsi elementi med seboj tesno povezani in le s pravilnim izborom je možno uspešno izražanje želenega rekombinantnega proteina (1).

E. coli je gram negativna bakterija in ena izmed najbolj pogosto uporabljenih gostiteljev za izražanje rekombinantnih proteinov tako v laboratoriju kot tudi v industriji, njena genetika pa je veliko bolje definirana kot pri vseh drugih mikroorganizmih (1-3). Ekspresijski sistem *E. coli* še vedno prevladuje med bakterijskimi ekspresijskimi sistemi in ostaja prva izbira za laboratorijske raziskave in začetni razvoj ali kot koristno merilo za primerjavo med različnimi ekspresijskimi sistemi (4). Široka uporabnost ekspresijskega sistema *E. coli* je posledica številnih prednosti, ki jih ponuja ta sistem, kot so hitra rast, enostavno in poceni gojenje, genetska stabilnost, enostavnost čiščenja proizvoda, velik izbor (komercialno dostopnih) vektorjev za vnos tujih genov, nizka stopnja tveganja (varnost) in enostavnost vnosa ustreznih vektorjev (1-3). Po drugi strani pa se uporaba *E. coli* za proizvodnjo rekombinantnih proteinov sooča s številnimi problemi. Na primer, *E. coli* ni primerna za proizvodnjo številnih velikih, kompleksnih proteinov, ki vsebujejo disulfidne vezi, ali proteinov, ki zahtevajo posttranslacijske modifikacije. Poleg tega se lahko tudi stabilnost tujih proteinov, ki so proizvedeni v *E. coli*, zmanjša zaradi proteolitične razgradnje, prekomerno izraženi proteini pa so pogosto proizvedeni v obliki inkluzijskih telesc, ki kasneje zahtevajo zapleteno in drago denaturacijo in procese ponovnega zvižanja, da proteini postanejo funkcionalni (5).

Rekombinantni proteini so lahko usmerjeni na tri različne lokacije: v citoplazmo, perioplazmo ali v gojišče. Različne prednosti in pomanjkljivosti se nanašajo na smer izločanja rekombinantnega proteina na specifičnem celičnem prostoru (6).

Izločanje rekombinantnih proteinov v gojišče ali periplazmo *E. coli* ima več prednosti pred znotrajcelično proizvodnjo. Te prednosti vključujejo poenostavljeno nižjo stopnjo obdelave, izboljšano biološko aktivnost, višjo stabilnost in topnost rekombinantnega proteina, ter N-končno avtentičnost izraženega peptida (7). Po drugi strani pa je citoplazma prostor, kjer lahko rekombinantni protein (topen ali v obliki inkluzijskih telesc) predstavlja do ~30 % celotne količine proteinov, v primerjavi s periplazmo, kjer so donosi bistveno nižji (običajno do ~0,2 % vseh celičnih proteinov) (1).

Pogosta posledica visoke stopnje izražanja rekombinantnih proteinov v *E. coli* je kopičenje rekombinantnih proteinov v obliki netopnih agregatov, imenovanih inkluzijska telesa (IT) (8-10). Inkluzijska telesa so gosti agregati proteina, ki jih najdemo tako v citoplazmi, kot tudi v periplazemskem prostoru *E. coli* (11, 12). IT lahko dosežejo velikosti od 0,5–1,3 μm in imajo amorfno ali parakristalno strukturo (8, 11). Imajo večjo gostoto (~ 1,3 mg/mL) od mnogih drugih celičnih komponent, zato jih je mogoče po lizi celic enostavno ločiti s centrifugiranjem. IT so kljub visoki gostoti zelo hidrirana in imajo porozno strukturo. Vsebujejo zelo malo proteinov gostiteljske celice, ribosomskih komponent ali fragmentov DNA/RNA. Pogosto vsebujejo več izraženega proteina, agregacija v inkluzijskih telescih pa je reverzibilna. Raziskave so pokazale, da agregacija vodi do nastanka IT zaradi intermolekularnih interakcij med eno vrsto proteinske molekule. IT oblikujejo dinamično strukturo, ki nastane z neuravnoteženim ravnovesjem med agregati in topnimi proteini *E. coli*. Na voljo je vse več informacij, ki kažejo, da je nastanek IT posledica znotrajceličnega kopičenja delno zvitih izraženih proteinov, ki so povezani z nekovalentnimi hidrofobnimi ali ionskimi interakcijami, ali kombinacijo obeh. Pomembne lastnosti proteinskih agregatov v IT so obstoj sekundarne strukture izraženega proteina in odpornost na proteolitično razgradnjo (11).

Izražanje proteina v obliki IT pogosto obravnavamo kot neželen pojav, po drugi strani pa ima njihovo nastajanje tudi prednosti, saj je ločitev IT od drugih komponent celičnega lizata enostaven in učinkovit način čiščenja proteina (11).

Glavne prednosti, povezane z oblikovanjem inkluzijskih telesc so:

- izražanje proteina na zelo visoki ravni; v nekaterih primerih tudi več kot 30 % vseh proteinov v celici,
- enostavna izolacija IT iz celic zaradi razlik v velikosti in gostoti v primerjavi s celičnimi kontaminanti,
- odpornost proti proteolitični razgradnji, povzročeni s celičnimi proteazami,
- homogenost proteina v IT pomaga pri zmanjšanju števila korakov čiščenja (5, 11, 13).

Protein, ki ga celica odloži v IT, sicer ni biološko aktiven, a zaradi zgoraj naštetih prednosti metodo izražanja rekombinantnih proteinov v obliki IT v *E. coli* pogosto uporabljamo za proizvodnjo proteinov (14).

1.2 IZOLACIJA INKLUZIJSKIH TELESC IN RAZTAPLJANJE PROTEINA POD DENATURACIJSKIMI POGOJI

Povrnitev nativne konformacije proteina, odloženega v inkluzijska telesa, vključuje štiri korake, in sicer:

- izolacijo inkluzijskih telesc iz lizata celic *E. coli*,
- raztapljanje proteinskih agregatov,
- ponovno zvijanje denaturiranega proteina in
- fino čiščenje raztopljenega proteina (11).

Med temi koraki sta raztapljanje in ponovno zvijanje najpomembnejša koraka za visoko povrnitev nativnega stanja proteina, učinkovitost izolacije in raztapljanja pa je lahko relativno visoka (11, 13).

Celice, ki vsebujejo inkluzijska telesa, običajno liziramo s pomočjo homogenizacije pod visokim tlakom ali kombinacije mehanskih, kemijskih in encimskih metod (13). Dobljeno suspenzijo (lizat) nato bodisi centrifugiramo ali filtriramo, s čimer ločimo IT od topnih celičnih komponent (8, 11). Najtežje odstranimo proteine, povezane z membrano, ki se sproščajo pri lizi celic (13).

Za raztapljanje inkluzijskih telesc lahko uporabljamo različne metode, pri čemer izbira reagenta za raztapljanje močno vpliva na kasnejši korak ponovnega zvijanja in stroške celotnega procesa. Najpogosteje uporabljeni reagenti za raztapljanje so denaturanti, kot so gvanidinijev klorid (GdmCl) in urea. Pri uporabi denaturantov dosežemo raztapljanje s popolno prekinitvijo višjih nivojev proteinske strukture (razvitje). Čeprav so poročali o uspešnem ponovnem zvitju proteinov iz denaturiranega stanja, se pogosto izkaže, da je težavna ravno pretvorba iz delno zvitega v nativno konformacijo (13).

Za raztapljanje IT uporabljamo tudi površinsko aktivne snovi, npr. natrijev dodecilsulfat (SDS–angl. *sodium dodecyl sulfate*) in n-cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB–angl. *n-cetyl trimethylammonium bromide*). Površinsko aktivne snovi nudijo to prednost, da lahko raztopljeni proteini morda že izkazujejo aktivnost, s čimer se izognemo koraku ponovnega zvijanja. Če je tako, je pomembno, da uspemo odstraniti proteaze, da bi se izognili proteolitični razgradnji solubiliziranega rekombinantnega proteina. Površinsko aktivne snovi lahko motijo nadaljnje kromatografske korake, zato jih je potrebno odstraniti. Ena možnost je, da površinsko aktivne snovi odstranimo s pomočjo ekstrakcije iz raztopine z uporabo ciklodekstrinov, linearnih dekstrinov ali cikloamiloze (13).

Ključnega pomena pri procesu solubilizacije je dodatek reducenta, ki omogoča vzdrževanje cisteinskih ostankov v reduciranem stanju, s čimer prepreči tvorbo nenativnih intra- in intermolekularnih disulfidnih vezi v raztopini visoke koncentracije proteina. Običajno uporabljeni reducenti so ditiotritol (DTT), ditioeritritol in 2-merkaptoetanol. Dodajamo jih nekoliko v presežku, da zagotovimo popolno redukcijo vseh cisteinskih ostankov. Običajno dodajamo še kelatorje, da preprečimo oksidacijo cisteina s kovinskimi ioni. Druga možnost, s katero lahko zaščitimo reducirane cisteine pred oksidacijo, je s tvorbo S-sulfonatnih derivatov ali mešanih disulfidov (13). Solubilizacijo lahko izvedemo tudi z uporabo visokega hidrostatičnega tlaka (1-2 kbar) v prisotnosti reducenta in nizke koncentracije denaturanta (GdmCl in urea) za raztapljanje (13). V povprečju pripravki inkluzijskih telesc vsebuje več kot 50 % rekombinantnega proteina, čistost preparata pa lahko doseže 90 % (8).

1.3 PONOVO ZVIJANJE REKOMBINANTNEGA PROTEINA

Ponovno zvijanje oz. renaturacija raztopljenih rekombinantnih proteinov je najpomembnejši korak za doseg biološke aktivnosti proteina (12). Renaturacija raztopljenih proteinov inkluzijskih telesc se prične z odstranitvijo denaturanta bodisi z dializo, redčenjem ali s pomočjo kromatografskih metod (8).

Eden izmed glavnih problemov, ki je povezan s ponovnim zvijanjem denaturiranih proteinov, je agregacija (15). Agregacija je posledica intermolekularnih interakcij, ki tekmujejo z intramolekularnimi interakcijami. Agregati so večinoma oblikovani s hidrofobnimi interakcijami med zvitimi intermedii, v katerih so izpostavljeni hidrofobni deli. Raztapljanje proteinskih agregatov v visoki koncentraciji kaotropnih reagentov povzroča nastanek naključne polipeptidne strukture, v kateri so izpostavljeni hidrofobni aminokislinski ostanki. To povečuje nagnjenost k agregaciji med procesom ponovnega zvijanja (15). Za omejitev procesa agregacije je potrebno koncentracijo proteina znižati na 10-100 $\mu\text{g/mL}$. Pogoje renaturacije je potrebno skrbno optimirati glede na zunanje parametre, kot so temperatura, pH, redoks pogoji ali ionska moč (8). Tudi pri optimiranem sistemu je izkoristek renaturacije lahko razmeroma nizek. Na izkoristek renaturacije lahko vpliva tudi prisotnost spojin z nizko molekularno maso. Specifični kofaktorji, kot sta Zn^{2+} ali Ca^{2+} , lahko stabilizirajo proteine že na stopnji intermediatov, s čimer preprečujejo interakcije izven načrtovane poti (8). V nekaterih primerih so zelo učinkoviti pospeševalci zvijanja kaotropne snovi v nizkih (t.i. nedenaturirajočih) koncentracijah (npr. urea ali GdmCl) in aditivi, kot so aceton, acetoamid, kratkoveržni alkoholi in polietilenglikol (PEG) (8, 11). Pogosto uporabljen aditiv z nizko molekularno maso je še L-arginin, ki ima pozitiven učinek pri zmanjšanju agregacije proteinov.

Povečano raztapljanje intermediatov zvitja lahko razloži pozitiven učinek površinsko aktivnih snovi na izkoristek renaturacije. Uporabljamo tako ionske kot neionske površinsko aktivne snovi v relativno nizkih koncentracijah. Uporaba lavril maltozida, CHAPS (3-[3-holamidopropil]dimetilamonio-1-propansulfonat) ali katerih drugih površinsko aktivnih snovi med renaturacijo lahko izboljša izkoristek zvitja (8).

Če proteini vsebujejo disulfidne vezi, je potrebno renaturacijski pufer dopolniti z redoks sistemom. Dodatek mešanice reduciranih in oksidiranih oblik tiolnih reagentov z nizko molekulsko maso, kot so glutation, cistein in cisteamin (molarno razmerje med reducirano in oksidirano spojino 1:1 do 5:1) običajno zagotavlja ustrezen redoks potencial, da je omogočeno oblikovanje in reorganizacija disulfidov (8).

V zadnjih letih so bile razvite številne nove proizvodne metode ponovnega zvijanja proteinov (11). Te vključujejo redčenje, dializo, gelsko izključitveno kromatografijo in kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo (16). Različne metode redčenja in dialize skupaj z uporabo aditivov izboljšajo povrnitev native konformacije proteinov. Kromatografska pristopa vključujeta fizikalno separacijo delno zvitih proteinskih molekul med izmenjavo pufra, kar pomaga pri zmanjševanju interakcij protein-protein, s čimer se zniža agregacija (11). Gelska-izključitvena kromatografija ponuja številne prednosti pri procesih, kot so izmenjava pufra, ponovno zvijanje proteina in ločevanje monomerov od agregatov, zato ta metoda zagotavlja najboljši način za ponovno zvijanje rekombinantnega proteina pri visoki koncentraciji (17).

1.3.1 Redčenje v pufer brez denaturantov in dializa

Zaradi enostavnosti metode je redčenje raztopljenega proteina neposredno v renaturacijski pufer najpogosteje uporabljena metoda za ponovno zvijanje rekombinantnih proteinov v majhnem obsegu. Glavna slabost redčenja pri ponovnem zvijanju za komercialne namene je potreba po večjih volumnih in dodaten korak koncentriranja po renaturaciji.

Ključ za uspešno redčenje pri ponovnem zvijanju je uravnavanje hitrosti dodajanja denaturiranega proteina v renaturacijski pufer in zagotavljanje dobrega mešanja, da je ohranjena nizka lokalna koncentracija proteina med ponovnim zvijanjem, saj tako omejimo agregacijo (13). Uporabljamo lahko tudi pristop t.i. pulzne renaturacije. Pulzna renaturacija vključuje dodajanje majhnih količin raztopljenega proteina v renaturacijski pufer v zaporednih časovnih intervalih (18, 19). Uspeh tega procesa temelji na dejstvu, da se enkratna majhna količina denaturiranega proteina zvije v nativno obliko in ne oblikuje agregatov. Z izbiro koncentracije proteina in časa zaporednega dodajanja raztopljenega proteina bi se lahko velike količine proteinov ponovno zvile v enaki raztopini pufra. To pomaga pri zmanjšanju volumna pufra in izboljšanju splošne učinkovitosti procesa ponovnega zvijanja proteina (20).

Izmenjavo pufra za odstranjevanje visokih koncentracij denaturanta lahko dosežemo tudi z diafiltracijo (tj. dializo z uporabo ultrafiltracijske membrane s konstantnim dovajanjem renaturacijskega pufra), ki predstavlja klasično metodo pri odstranjevanju denaturantov (13). Omenjena metoda se v nekaterih primerih (odvisno od proteina) obnese idealno, saj v večini primerov pride med upadanjem koncentracije denaturantov do agregacije proteinov (21).

1.3.2 Gelska filtracija

Gelska izključitvena kromatografija–SEC (angl. *size exclusion chromatography*), imenovana tudi gelska filtracija, gelska permeacija ali molekularno sito, je separacijska tehnika, ki jo uporabljamo za ločevanje molekul na osnovi njihove velikosti in oblike (hidrodinamični volumen) (22). SEC za ločevanje molekul različnih velikosti uporablja porozne delce s porami definirane velikosti, ki predstavljajo kromatografsko stacionarno fazo (23, 24). Izbira materiala stacionarne faze temelji na poznavanju območja velikosti molekul, ki jih je potrebno ločiti (22).

Ker molekule niso adsorbirane znotraj kolone, temveč se samo zadržujejo v koloni SEC, se proteini eluirajo izokratsko (25). Sposobnost ločevanja v celoti temelji na difuziji topljencev v makropore delcev stacionarne faze. Molekule različnih velikosti in oblik se premikajo z različno hitrostjo (26). Dejanska hitrost gibanja posamezne komponente je odvisna od lahkotnosti, s katero lahko molekule prehajajo v gel in se tam tudi zadržujejo (27). Molekule, ki so manjše od velikosti por, lahko vstopijo vanje in opravijo zato daljšo pot oz. imajo daljši čas potovanja skozi kolono. Molekule, ki so večje od velikosti por, ne morejo vstopiti v pore in opravijo najkrajšo pot in imajo krajši čas potovanja skozi kolono. To stanje se imenuje popolna izključitev (23). Velike molekule se zato iz kolone eluirajo prve, manjše molekule pa kot zadnje; tako se molekule med potovanjem skozi kolono učinkovito razvrstijo po velikosti (28).

SEC pogosto uporabljamo za zamenjavo pufra raztopinam proteinov (25). Zamenjava pufra ali razsoljevanje se nanaša na položaj, kjer so molekule z nizko molekulsko maso, ki so komponente vzorca, npr. soli, zamenjane za drugo pufersko snov ali topilo (25). SEC pogosto uporabljamo tudi za čiščenje proteinov, določanje molekulske mase, ločevanje bioloških molekul in ločbo tarčnega proteina od ostalih kontaminantov (22, 23).

Kolono SEC lahko uporabimo tudi za renaturacijo raztopljenih proteinov po raztapljanju s pomočjo denaturantov. Raztopino, v kateri so prisotni proteini in denaturanti, nanese na kolono SEC in tako na koloni pride do ločevanja proteina od molekul denuranta, saj protein potuje hitreje v primerjavi z molekulami denuranta. Lokalno znižanje koncentracije denuranta na koloni omogoči zvitje proteina (29).

1.3.3 Kovinsko - kelatna afinitetna kromatografija

Leta 1975 so Porath in sodelavci uvedli novo vrsto kromatografije, ki so jo poimenovali kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija (angl. *immobilized-metal affinity chromatography*, IMAC) (30). Tehnologija temelji na razliki v afiniteti proteinov do dvovalentnih kovinskih ionov (npr. Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+}), vezanih na kelirajočo snov, ki je imobilizirana na kromatografski nosilec (31).

Moč vezi med proteinom in kovinskimi ioni variira od proteina do proteina (odvisna je od prisotnosti specifičnih aminokislinskih ostankov, zlasti histidinskih, cisteinskih in triptofanskih, na površini proteina), in v številnih primerih to razliko lahko izkoristimo za učinkovito ločevanje in izolacijo specifičnih proteinov (31). Če rekombinantne proteine na N- ali C-koncu označimo z zaporedjem šestih ali več histidinskih ostankov (t.i. polihistidinski podaljšek), se njihova afiniteta do kovinskih ionov močno poveša (32).

Zaradi relativno visoke afinitete in specifičnosti interakcije polihistidinskih zaporedij z dvovalentnimi kovinskimi ioni običajno za doseganje čistote, primerne za večino aplikacij, zadošča že en sam korak čiščenja z IMAC. Dolžina in položaj oznake na rekombinantnem proteinu lahko vplivata na nivo izražanja, dostopnost za vezavo na kovinske ione na afinitetni koloni, prostorsko strukturo polipeptidne verige, kristalizacijo proteina ter na njegovo topnost in aktivnost (33).

Razliko v afiniteti proteinov do kovinskih ionov lahko vsaj delno razložimo z načeli »trdih« in »mehkih« kislin in baz (HSAB), ki jih je opisal Pearson (34). Ta teorija pravi, da kadar dva atoma tvorita vez, en atom deluje kot Lewisova kislina, drug pa kot Lewisova baza. HSAB narekuje, da so vezi med atomi s podobno oceno, npr. trda kislina v kombinaciji s trdo bazo najmočnejše. Po konceptu HSAB so kovinski ioni, kot so K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} in Fe^{3+} , razvrščeni kot »trde« Lewisove kisline, medtem ko so večji enovalentni kovinski ioni, kot sta Ag^+ in Cu^+ , kategorizirani kot »mehke« Lewisove kisline.

Prehodne kovinske ione, kot so Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} in Ni^{2+} , pa štejemo med mejne kisline. Te kovinske ione najpogosteje uporabljamo v IMAC, zlasti Ni^{2+} , ki zagotavlja koordinacijsko število šest, elektrokemijsko stabilnost pri kromatografskih pogojih in redoks stabilnost (35).

Zadrževanje proteina na kovinsko-kelatnem afinitetnem gelu je skupen učinek elektrostatskih (ali ionskih), hidrofobnih, in/ali koordinacijskih interakcij med donorjem in akceptorjem. Potrebno je upoštevati vse tri vrste reakcij, vendar ni vedno mogoče določiti njihovega relativnega prispevka. Prevlado določene vrste interakcij nad drugimi določa več spremenljivk, kot so narava kelirnega liganda, vrsta kovinskega iona, aminokislinska sestava površine proteina, pH, vrsta pufru, ionska moč in površinsko aktivne snovi (36).

Elucijo tarčnega proteina z IMAC-kolone lahko dosežemo s protoniranjem histidinskih ostankov z znižanjem vrednosti pH na 4-5. Za proteine, ki so občutljivi na nizek pH, obstaja možnost kompetitivne elucije z imidazolom pri skoraj nevtralnem pH-ju. Vendar pa lahko dodatek imidazola povzroči obarjanje (precipitacijo) vzorca (37). Alternativno lahko protein s kolone odpustimo s pomočjo kelacijskih spojin, kot je EDTA, vendar bomo tako eluirali vse proteine, ki se v njej zadržujejo, skupaj s kovinskimi ioni, s čimer se zmanjša ločljivost in selektivnost (32).

Metoda IMAC je relativno poceni in enostavna, hkrati pa izkazuje lastnosti, kot sta učinkovito čiščenje v enem koraku in relativno visoka kapaciteta vezave proteina (v primerjavi z drugimi afinitetnimi kromatografskimi tehnikami). IMAC je uporabna za koncentriranje razredčene raztopine proteina, kompatibilna je s številnimi pufrji, ki vsebujejo visoko ionsko jakost, in ne vpliva na negativno strukturo proteina, stacionarno fazo pa lahko regeneriramo nekaj stokrat brez izgube kromatografskih značilnosti (38). IMAC pogosto uporabljamo tudi v primeru renaturacije, kjer lahko proteine v denaturacijskem pufru vežemo na kolono in nato kolono spiramo z nativnim pufrom, s katerim zagotovimo nativne pogoje. Imobilizacija proteina na koloni preprečuje nespecifične interakcije protein-protein, saj so proteinske molekule tako prostorsko ločene in ne vstopajo v medmolekulske interakcije, kar preprečuje neželen nastanek agregatov, zaradi česar prevladajo intramolekularne interakcije in protein se ustrezno zvije. Protein nato eluiramo iz kolone in ga tako tudi sočasno skoncentriramo (32).

1.3.4 Raztapljanje proteina v prisotnosti sarkozila in naknadno prehajanje sarkozila v mešane micelle CHAPS in Tritona X-100

Rekombinantne proteine, ki jih izražamo v *E. coli*, običajno označimo s fuzijskim partnerjem, pogosto z glutation S-transferazo (GST), polihistidinskim zaporedjem (tj. zaporedjem šest ali več histidinov), SUMO (angl. *small ubiquitin-like modifier*), tioredoksinom ali maltozo-vezavnim proteinom (MBP) (38). Fuzijski partner lahko zagotavlja povečano topnost ciljnih proteinov in omogoča izolacijo in čiščenje z afinitetno kromatografijo v enem samem koraku.

Številni rekombinantni proteini, zlasti tisti, ki so evkariontskega izvora, v citosolu bakterije agregirajo (tj. odlagajo se v inkluzijska telesca) (38). Izolacija rekombinantnih proteinov iz inkluzijskih telesc predstavlja izziv, saj je pravilnost zvitja proteina v agregatih zelo nizka (39, 40). Številni rekombinantni proteini oblikujejo inkluzijska telesca v *E. coli* tudi pod optimiranimi pogoji izražanja. Težava je še večja, kadar celice gojimo na minimalnem gojišču M9, kar je potrebno za izotopsko označevanje proteinov za strukturne študije z nuklearno magnetno resonanco (NMR) (41, 42).

Lizirni pufer z 0,3-2% sarkozila (natrijevega lavrinoilsarkozinata, anionske površinsko aktivne snovi (PAS)) pogosto uporabljamo za solubilizacijo netopnih proteinov v celičnem lizatu *E. coli*. Tao in sodelavci (38) so rekombinantne proteine, odložene v inkluzijska telesca, poskusili raztopiti v pufru z različnimi koncentracijami sarkozila. Ugotovili so, da je 10 % raztopina sarkozila optimalna, saj omogoča 95 % solubilizacijo, hkrati pa še ni preveč viskozna za nadaljnje aplikacije. Raztapljanje proteinov v pufru z višjimi koncentracijami sarkozila je bilo slabše. Čeprav lahko sarkozil raztaplja proteinske agregate, je čiščenje proteinov v prisotnosti PAS zahtevno (40). Dokazali so, da solubilizirane proteine lahko tudi redčijo do končne 2 %-koncentracije sarkozila, pri čemer stabilnost proteina ni ogrožena (raztopine je mogoče shranjevati pri 4 °C vsaj en teden). Pred nanosom GST-fuzijskih proteinov na afinitetno kolono (z glutationom (GSH) kot ligandom) so vzorcu dodali še dve površinsko aktivni snovi, Triton X-100 (neionska PAS) do 4 %-koncentracije in 40 mM CHAPS (zwitterionska PAS). Pod temi pogoji so se GST-fuzijski proteini učinkovito vezali na kolono in uspeli so izolirati proteine z nativnim zvitjem v visokem izkoristku (38).

Kombinacija treh PAS rezultira v znatno večji vezavi GST do GSH-sefaroze. Oba, tako Triton X-100 kot CHAPS, imata večji sinergistični učinek s sarkozilom kot vsak posebej, prav tako pa posamezno ne omogočata raztapljanja GST-fuzijskega proteina. Da bi razumeli, kako te površinsko aktivne snovi delujejo, so raziskovalci opravili kinetični test z GST. Detergente so bodisi samostojno ali v kombinaciji v različnih razmerjih dodali GST, da bi določili njihov učinek na aktivnost encima (38). V prisotnosti 0,3 % sarkozila je bila GST neaktivna. Z dodatkom 1 % Triton X-100 in 10 mM CHAPS v raztopino GST z 1 % sarkozilom so rešili ~10 % prvotne aktivnosti, med tem ko je izmerjena aktivnost po dodatku 2 % Triton X-100 in 20 mM CHAPS poskočila na ~60 %, po dodatku 3 % Triton X-100 in 30 mM CHAPS pa na ~80 % prvotne encimske aktivnosti (38). Posamično sta Triton X-100 in CHAPS pri teh koncentracijah povrnila le ~30-40 % aktivnosti GST. V kontrolnem preizkusu 1 % Triton X-100 in 10 mM CHAPS brez sarkozila nista vplivala na encimsko aktivnost GST. Vezava GSH-sefaroze se je tudi znatno povečala v prisotnosti vseh treh površinsko aktivnih snovi, saj je bila tri- do petkrat boljša v primerjavi s prosto GST (38).

Raziskovalci so izvedli raziskavo z več fuzijskimi proteini, vključno s takimi, označenimi s heksahistidinskim zaporedjem (His_6) ali s His_6 -MBP in vsebujočimi intramolekularnimi disulfidnimi vezmi (ki so v splošnem še posebej problematični). V vseh primerih so uspeli izolirati aktivne proteine s kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo. Na podlagi teh ugotovitev raziskovalci menijo, da je pomembno, da uporabimo vse tri detergente, ki povečajo izkoristek izolacije (38).

Domnevajo, da naj bi molekule sarkozila zaobjele oz. obdale proteine in tako raztopile agregate. Triton X-100 in CHAPS s kritičnima micelarnima koncentracijama 0,25 mM in 6-10 mM tvorita velike mešane micelle (bicelne strukture), ki naj bi vključevali molekule sarkozila iz raztopine. Pri tem se zmanjša navidezna koncentracija sarkozila v okolici rekombinantnega proteina, posledično pa lahko pride do sprostitve aktivnih mest in pravilnega zvitja proteina. Več kot 80 % uspešnost izolacije proteinov močno presega izkoristke s konvencionalmi metodami indukcije zvitja (npr. redčenje v pufer brez denaturantov/površinsko aktivnih snovi, gelska filtracija skozi gradient denaturantov ali postopna dializa proti pufrom s padajočimi koncentracijami denaturantov) (38).

1.4 KEMOKINI

Kemokini ali kemotaktični citokini so majhni heparin-vezavni proteini (sestavljani iz 60-100 aminokislinskih ostankov z molekularno maso od 8-14 kDa), ki predstavljajo veliko družino polipeptidov (43, 44). Kemokini so strukturno podobni citokinom, katerih glavna naloga je uravnavanje celične komunikacije (44).

Prvi kemokin (trombocitni dejavnik 4 (CXCL4)) so identificirani leta 1977. Od takrat pa do danes, so odkrili več kot 50 humanih kemokinov in 20 kemokinskih receptorjev (44). Kot že samo ime pove, kemokini delujejo kot kemotaktični dejavniki, ki privabljajo levkocite na mesto vnetja (45).

Številni izkazujejo kemoatraktivni učinek na različne vrste celic, ki izražajo ustrezne receptorje in tako igrajo ključno vlogo pri imunskem odzivu. Kemokine lahko razdelimo v štiri poddružine, na podlagi števila in lokacije cisteinskega ostanka na N-končnem delu molekule in jih imenujemo kot α , β , γ in δ ali CXC, CC, CX₃C in C, skladno s sistematično nomenklaturou (46). C se nanaša na ohranjene cisteinske ostanke, X pa na število aminokislin med cisteini (47). Večina kemokinov pripada družinama CXC in CC (48). Člani družine CC so usmerjeni na monocite in T-celice, medtem ko CXC kemokini vplivajo predvsem na nevtrofilce. Pet članov družine monocitnih kemoatraktivnih proteinov, ki so jih doslej odkrili, so MCP-1 (CCL2), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13) in MCP-5 (CCL12) in predstavljajo podskupino CC-kemokinov (49).

Na podlagi njihove funkcije lahko kemokine razdelimo v dve glavni poddružini, in sicer na inflamatorne in homeostatske proteine. Inflamatorni kemokini okrepijo levkocitni odziv pri vnetju in poškodbah tkiv, med tem ko homeostatski kemokini uravnavajo levkocite v sekundarnih limfnih organih, v kostnem mozgu in timusu med hematopoezo (50). Te velike biološke funkcije kažejo ključne vloge kemokinov v razvoju, hematopoezi, nastanku limfocitov, angiogenezi in malignosti (51).

Struktura kemokinov zajema tri različna področja: prilagodljivo N-končno domeno, ki je zasidrana na preostanek molekule z disulfidnimi vezmi in vključuje dva N-končna cisteinska ostanka. Temu sledi podaljšana zanka, ki vodi v tri antiparalelne β -trakove, ki zagotavljajo ravno osnovo preko katere se razprostira C-končna α -vijačnica (52).

Čeprav so prve raziskave identificirale te molekule kot regulatorje levkocitov, so kasnejše raziskave opozorile na njihovo vključenost pri drugih inflamatornih procesih, kot so fibroza, preoblikovanje tkiva in angiogeneza (53, 54). Kemokini nadzorujejo migracijo nevtrofilcev, limfocitov, antigen predstavitevni celic, vključno z dendritičnimi celicami in monociti/makrofagi (55). Kemokini koordinirajo privabljanje, aktivacijo in zadrževanje levkocitov na mestu vnetja med različnimi fazami vnetnega procesa, tako med prirojenimi kot pridobljenimi imunskimi odzivi (56).

Poleg svoje vloge v imunskem sistemu, so kemokini in kemokinski receptorji vključeni tudi v patologijo številnih bolezni (npr. HIV-1/AIDS), avtoimunskih bolezni (npr. psoriaza, revmatoidni artritis in multipla skleroza), pljučnih bolezni (astma in kronična obstruktivna pljučna bolezen), pri zavrnitvi transplantata, raku in žilnih bolezni (55).

1.4.1 CCL2 (MCP-1)

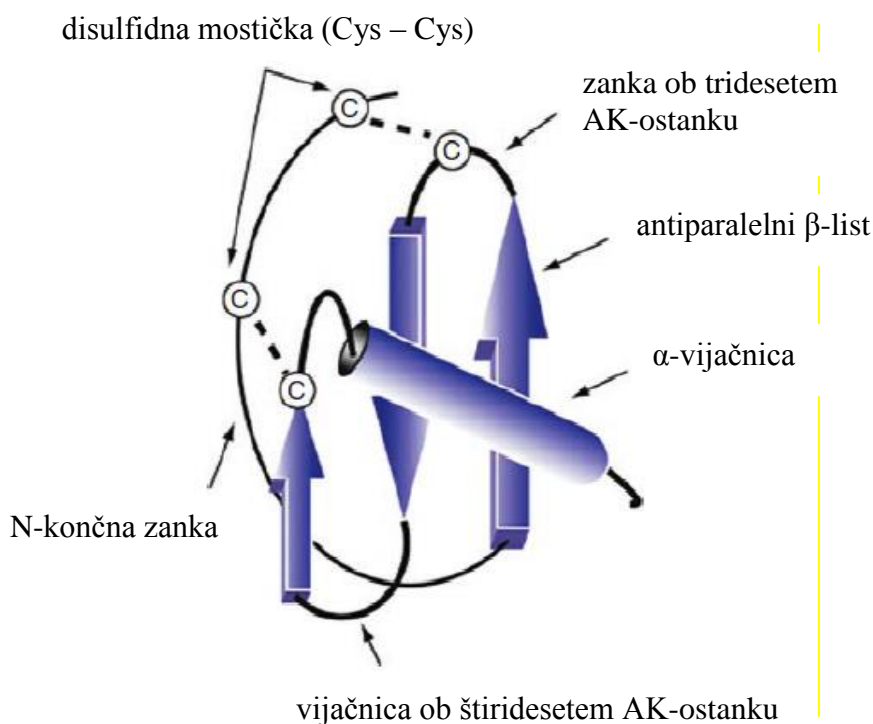
CCL2, imenovan tudi monocitni kemoatraktivni protein (angl. *monocyte chemoattractive protein 1*, MCP-1), spada v družino CC-kemokinov in je učinkovit kemotaktični dejavnik za monocite (55). Prvotno je bil izoliran iz mišjih fibroblastov 3T3. Človeško verzijo CCL2 so kmalu zatem izolirali iz tumorskih celic (43).

Humani CCL2 je sestavljen iz 76 aminokislin in je velik 13 kDa (55). Gen za CCL2 se nahaja na kromosomu 17, njegovo izražanje pa je lahko inducirano z različnimi mediatorji, vključno s trombocitnim rastnim dejavnikom (PDGF), interlevkinoma 1 in 4 (IL-1 in IL-4), dejavnikom tumorske nekroze α (TNF- α), vaskularnim endotelijskim rastnim dejavnikom (VEGF), bakterijskim lipopolisaharidom in interferonom γ (IFN- γ) (43). CCL2 pripada družini, ki je sestavljena iz petih kemokinov, imenovanih MCP-1-5 (CCL2, CCL7, CCL8, CCL12 in CCL13) (57). Vsi ti kemokini se lahko z različno afiniteto vežejo na različne receptorje, s čimer nato lahko delujejo na številne podskupine levkocitov (57).

CCL2 nastaja v različnih vrstah celic, bodisi konstitutivno ali po indukciji, ki jo povzroči oksidativni stres, citokini ali rastni dejavniki (43). CCL2 sproščajo endotelijske celice, fibroblasti, epiteljske celice, celice gladkih mišic, astrociti, monociti in celice mikroglije. Te celice so pomembne za protivirusni imunski odziv v perifernem krvnem obtoku in tkivih. CCL2 regulira migracijo in infiltracijo monocitov, spominskih limfocitov T in naravnih celic ubijalk (NK-celic) (55).

CCL2 izkazuje svoje učinke preko vezave na z G-proteinom sklopljenim receptorjem, ki se nahaja na površini levkocitov. Aktivacija receptorja posredno sproži preurejanje citoskeletnih filamentov, kar omogoči migracijo imunskih celic na mesto vnetja (58). Za vse humane CCL je znano, da se vežejo na vsaj dva receptorja (55). CCL2 se lahko veže na receptorja CCR2 in CCR11. CCR2 je primarni receptor CCL2. Vezava CCL2 na CCR2 sproža številne odzive, vključno s sprostitvijo znotrajceličnega kalcija, preureditvijo citoskeleta in aktivacijo MAP-kinaze. Za CCL2 se je izkazalo, da je ključnega pomena za migracijo monocitov, tako *in vivo* kot tudi *in vitro* (59, 60).

Tericiarno strukturo CCL2 so določili s pomočjo rentgenske kristalografske difrakcije in NMR-spektroskopije. CCL2 je strukturno podoben kemokinom iz družine CC, saj vsebuje N-končno zanko, tri antiparalelne β -nagubane liste, C-končno α -vijačnico in dva disulfidna mostička (61) (slika 1).



Slika 1: Struktura CCL2 (55).

CCL2 je eden izmed najbolj raziskanih kemokinov. Dragocene informacije o CCL2 so raziskovalci pridobili iz strukturnih študij. Čeprav je bil CCL2 povezan s številnimi patološkimi stanji, kot so kardiovaskularne bolezni, multipla skleroza in revmatoidni artritis, ima CCL2 prav tako pomembno vlogo pri imunosti in pri prebolevanju akutnih virusnih okužb (55). Za CCL2 in za njegov receptor CCR2 so ugotovili, da sta povišana in da igrata ključno vlogo pri razvoju ateroskleroze (62). Koncentracija CCL2 je znatno povečana tudi pri ljudeh z astmo. CCL2 lahko prispeva k neobčutljivosti tkiv na inzulin pri sladkornih bolnikih, prav tako pa lahko sodeluje pri nevroloških motnjah (55).

1.5 PREDHODNI POSKUSI IZOLACIJE REKOMBINANTNEGA PROTEINA CCL2

Pri predhodnih poskusih izolacije rekombinantnega proteina CCL2 (63) so za izražanje CCL2 proteina uporabili ekspresijski sistem *E. coli* BL21 DE3 pLysS/pET44-MCP1b. Bakterijske celice so lizirali z ultrazvokom in lizat redčili v fosfatni pufer z gvanidinom, s čimer so dosegli solubilizacijo rekombinantnega proteina iz inkluzijskih teles. S kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo (IMAC) pod denaturacijskimi pogoji so iz lizata izolirali rekombinantni CCL2, označen s heksahistidinskim podaljškom.

Posamezne frakcije, v katerih so z metodo prenosa western potrdili prisotnost rekombinantnega proteina, so združili in proteine pred ločbo na koloni za gelsko filtracijo skoncentrirali z ultrafiltracijo. Z izključitveno kromatografijo pod denaturacijskimi pogoji (prisotnost gvanidina) so uspešno ločili monomere CCL2 od oligomerov. Frakcije z eluirano *monomerno* obliko CCL2 so postopno dializirali proti puffrom s padajočimi koncentracijami gvanidina in glutationa in tako dosegli, da se je denaturiran protein zvil v nativno konformacijo. Čistost rekombinantnega proteina so analizirali z izključitveno kromatografijo in SDS-PAGE, ustreznost zvitja pa posredno potrdili z imunskimi testi. Izkoristek izolacije rekombinantnega CCL2 so ocenili na 440 µg/L bakterijske kulture.

2. NAMEN DELA

E. coli je gram negativna bakterija in ena izmed najbolj pogosto uporabljenih gostiteljev za izražanje rekombinantnih proteinov. Široka uporabnost ekspresijskega sistema *E. coli* je posledica številnih prednosti, ki jih ponuja ta sistem, vendar se po drugi strani uporaba *E. coli* za proizvodnjo rekombinantnih proteinov sooča s številnimi problemi. Pogosta posledica visoke stopnje izražanja rekombinantnih proteinov v *E. coli* je kopičenje rekombinantnih proteinov v obliki netopnih agregatov, imenovanih inkluzijska telesca (IT).

Humani kemokin CCL2 (MCP-1) je kemotaktični citokin, ki spada v družino CC kemokinov in je učinkovit kemotaktični dejavnik za monocite. Pri izražanju humanega CCL2 kemokina v prokariontskem ekspresijskem sistemu *E. coli* ta tvori netopne agregate, t.i. inkluzijska telesca, zaradi česar je izkoristek pridobivanja rekombinantnega proteina izjemno nizek.

V okviru magistrske naloge bomo poskusili humani kemokin CCL2 izolirati iz inkluzijskih telesc s pomočjo solubilizacije s kombinacijo površinsko aktivnih snovi in kromatografskimi metodami. Ovrednotili bomo čistost rekombinantnega proteina CCL2, ustreznost zvitja in ocenili izkoristek metode ter te karakteristike primerjali s tistimi, ki jih je dala predhodno vzpostavljena metoda (63).

3. MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

REAGENT	PROIZVAJALEC
1 M DTT (ditiotreitol)	Fluka Chemie, Buchs, Švica
10 % amonijev persulfat (APS)	Merck, Darmstadt, Nemčija
10 % SDS (natrijev dodecilsulfat)	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
40 % akrilamid/bisakrilamid	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
agar	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemčija
ampicilin	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
CaCl ₂	Kemika, Zagreb, Hrvaška
CHAPS	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
etanol, 95 %	Riedel-de Haën AG, Nemčija
formaldehid	Merck, Darmstadt, Nemčija
glicerol	Fluka Chemie, Buchs, Švica
glicin	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
HCl	Fluka Chemie, Buchs, Švica
imidazol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemčija
IPTG (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid)	Promega, Madison, Wisconsin, ZDA
K ₂ HPO ₄	Fluka Chemie, Buchs, Švica
KCl	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Nemčija
kloramfenikol	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
kvasni ekstrakt Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson and Co., Sparks, ZDA
LB Agar	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
LB Broth	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA

REAGENT	PROIZVAJALEC
luminiscenčni substrat Super Signal® West Dura	Thermo Scientific, Waltham, MA, ZDA
metanol	Merck, Darmstadt, Nemčija
MgCl ₂	Fluka Chemie, Buchs, Švica
Na ₂ CO ₃	Carlo Erba, Rodano, Italija
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
NaCl	Carlo Erba, Rodano, Italija
nanašalno barvilo za gelsko elektroforezo (<i>loading dye</i>)	Fermentas, Burlington, Kanada
NaOH	Fluka Chemie, Buchs, Švica
natrijev acetat	Merck, Darmstadt, Nemčija
Ni ²⁺ -NTA agarozna	Qiagen, Hilden, Nemčija
ocetna kislina	Merck, Darmstadt, Nemčija
posneto mleku v prahu	Pomurske mlekarne, Slovenija
proteinski standard (marker) SeeBlue Plus2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA
sarkozil	Calbiochemie, an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija
TEMED (tetrametiletilendiamin)	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
Tris·HCl (tris(hidroksimetil)aminometan)	Merck, Darmstadt, Nemčija
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
urea	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
β-merkaptetanol	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA

3.1.2 Gojišča

Gojišča, pufre in ostale raztopine smo sterilizirali z nasičeno vodno paro–nadtlak 1 bar, temperatura = 121°C, čas = 15 minut.

AGARNO GOJIŠČE LB

SESTAVA	KOLIČINA
pepton	0,5 g
NaCl	0,25 g
kvasni ekstrakt	0,25 g
agar	0,75 g
ddH ₂ O	do 50 mL

V komori z laminarnim pretokom zraka smo avtoklavirano gojišče prelili v petrijevke in počakali, da se je gojišče strdilo. Gojišča smo hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

TEKOČE GOJIŠČE TB

SESTAVA	KOLIČINA
pepton	12 g
kvasni ekstrakt	24 g
glicerol	4 mL
ddH ₂ O	do 900 mL

Fosfatni pufer

SESTAVA	KOLIČINA
KH ₂ PO ₄	2,31 g
K ₂ HPO ₄	12,54 g
ddH ₂ O	do 100 mL

Pepton, kvasni ekstrakt in glicerol smo raztopili v ustrezni količini vode in z vodo dopolnili do 900 mL. Posebej smo pripravili 100 mL fosfatnega pufra. Z NaOH oz. HCl smo pufru uravnali pH na 7,2. Raztopini smo ločeno avtoklavirali, ju ohladili in pomešali v aseptičnih pogojih. Gojišče smo shranjevali pri sobni temperaturi.

TEKOČE GOJIŠČE LB

SESTAVA	KOLIČINA
pepton	1 g
NaCl	0,5 g
kvasni ekstrakt	0,5 g
ddH ₂ O	do 100 mL

Avtoklavirano gojišče smo shranjevali pri sobni temperaturi.

3.1.3 Biološki material

PEPTIDI IN PROTEINI	PROIZVAJALEC
BSA (goveji serumski albumin)	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
DNA-za	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
Kozje protikunčje IgG-HRP	Millipore, Billerica, ZDA
HRP-Goat Anti-Mouse IgG+A+M	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA

GOSTITELJSKI BAKTERIJSKI SEV	PROIZVAJALEC
<i>E. coli</i> BL21 DE3 pLysS	Merck, Darmstadt, Nemčija

NEVTRALIZACIJSKA PROTITELESA	PROIZVAJALEC
Kunčje poliklonsko protitelo, usmerjeno proti humanemu CCL2, ab9669	Abcam, Cambridge, Velika Britanija
Mišje monoklonsko protitelo, usmerjeno proti humanemu CCL2, S101	Abcam, Cambridge, Velika Britanija

3.1.4 Pufri in raztopine

PBS - fosfatni pufer

SESTAVA	KOLIČINA
NaCl	3,2 g
KCl	0,08 g
Na ₂ HPO ₄	0,576 g
KH ₂ PO ₄	0,096 g
ddH ₂ O	do 400 mL

Pufri smo najprej uravnali pH na 7,4 in nato smo ga avtoklavirali. Pufer smo shranjevalni pri sobni temperaturi.

PUFER 1 – za suspendiranje celic

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
Tris·HCl	20 mM	126 mg
MgCl ₂ (1 M)	2,5 mM	0,1 mL
CaCl ₂	0,5 mM	2,2 mg
ddH ₂ O		do 40 mL

Pufri smo najprej uravnali pH na 7,4 in nato smo ga avtoklavirali. Puffer smo shranjevalni pri sobni temperaturi.

PUFER 2 – PUFER ZA PRENOS WB

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
Tris·HCl	24 mM	2,93 g
glicin	77 mM	5,81 g
SDS	10 %	3,75 mL
MeOH	20 %	200 mL
ddH ₂ O		do 1 L

PUFER 3 – ELEKTROFOREZNI PUFER ZA SDS-PAGE

SESTAVA	KOLIČINA
Tris HCl	29,0 g
glicin	144,0 g
SDS	10 g
ddH ₂ O	do 1 L

PUFER 4 – VEZAVNI PUFER IMAC A

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
Na ₂ HPO ₄	20 mM	0,71 g
NaCl	500 mM	7,31 g
imidazol	10 mM	170,25 mg
ddH ₂ O		do 250 mL

Pufri smo umerili pH na 7,5. Pred uporabo smo puffer filtrirali s pomočjo vakuumske črpalke preko filtra iz celuloznega acetata z velikostjo por 0,2 µm in ga nato degazirali.

PUFER 5 – ELUCIJSKI PUFER IMAC B

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
Na ₂ HPO ₄	20 mM	283,92 mg
NaCl	500 mM	2,93 g
imidazol	300 mM	2,04 g
ddH ₂ O		do 100 mL

Pufri smo umerili pH na 7,5. Pred uporabo smo pufer filtrirali s pomočjo vakuumske črpalke preko filtra iz celuloznega acetata z velikostjo por 0,2 µm in ga nato degazirali.

PUFER 6 – PUFER SEC

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
Na ₂ HPO ₄	50 mM	1,77 g
NaCl	150 mM	2,19 g
ddH ₂ O		do 250 mL

Pufri smo umerili pH na 7,5. Pred uporabo smo pufer filtrirali s pomočjo vakuumske črpalke preko filtra iz celuloznega acetata z velikostjo por 0,2 µm in ga nato degazirali.

10 % RAZTOPINA SARKOZILA 1

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
Na ₂ HPO ₄	50 mM	141,96 mg
NaCl	500 mM	0,59 g
ddH ₂ O		do 20 mL

Najprej smo pripravili pufer A in mu umerili pH na 7,5. Za pripravo 10 % raztopine sarkozila smo 2 mL pufra dodali predpisano količino β-merkaptetanola in sarkozila.

β-merkaptetanol	100 mM	14 µL
sarkozil	10 %	200 mg

10 % RAZTOPINA SARKOZILA 2

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
Na ₂ HPO ₄	50 mM	4,25 g
NaCl	150 mM	5,26 g
ddH ₂ O		600 mL

Najprej smo pripravili pufer A in mu umerili pH na 7,4. Za pripravo 10 % raztopine sarkozila smo 500 µL pufra dodali predpisano količino β-merkaptetanola in sarkozila.

β-merkaptetanol	100 mM	3,5 µL
sarkozil	10 %	50 mg

RAZTOPINA Triton X-100 in CHAPS

SESTAVA	KONCENTRACIJA
Triton X-100	2,22 %
CHAPS	1,37 %, 20 mM
pufur A	50 mM Na ₂ HPO ₄ , 150 mM NaCl

PUFER 7

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
Na ₂ HPO ₄	20 mM	283,92 mg
NaCl	500 mM	2,93 g
ddH ₂ O		do 100 mL

Pufuru smo umerili pH na 7,5.

RAZTOPINA ZA BARVANJE S COOMASSIE BRILLIANT BLUE

SESTAVA	KOLIČINA
ocetna kislina	500 µL
Coomassie Brilliant Blue	0,05 g
metanol	20 mL
ddH ₂ O	do 50 mL

RAZTOPINA ZA RAZBARVANJE

SESTAVA	KOLIČINA
etanol (95 %)	60 mL
ocetna kislina	20 mL
ddH ₂ O	do 200 mL

RAZTOPINA ZA FIKSIRANJE

SESTAVA	KOLIČINA
etanol (95 %)	100 mL
ocetna kislina	25 mL
ddH ₂ O	do 250 mL

10 % RAZTOPINA Na₂S₂O₃

SESTAVA	KOLIČINA
Na ₂ S ₂ O ₃ · 5H ₂ O	15,7 g
ddH ₂ O	do 100 mL

Pripravljena raztopina je stabilna 6 mesecev pri sobni temperaturi.

RAZTOPINA ZA PREDTRETIRANJE

SESTAVA	KOLIČINA
etanol (95 %)	75 mL
AcONa	17 g
ddH ₂ O	do 250 mL

50 mL pripravljene raztopine smo dodali 1 mL 10 % Na₂S₂O₃.

RAZTOPINA ZA BARVANJE

SESTAVA	KOLIČINA
AgNO ₃ (20 % w/v)	625 µL
ddH ₂ O	do 50 mL

RAZTOPINA ZA RAZVIJANJE

SESTAVA	KOLIČINA
Na ₂ CO ₃	7,42 g
ddH ₂ O	do 250 mL

50 mL pripravljene raztopine smo dodali 25 µL 36 % formaldehida (raztopino smo vedno pripravili tik pred uporabo).

0,5 M RAZTOPINA NaOH

SESTAVA	KOLIČINA
NaOH	2 g
ddH ₂ O	do 100 mL

PUFER 8 – PUFER ZA SPIRANJE (0,05 % RAZTOPINA PBST)

SESTAVA	KOLIČINA
PBS	300 mL
Tween 20	150 µL

PUFER 9 – BLOKIRNI PUFER

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
mleko prahu	5 %	750 mg
PBST	0,05 %	15 mL

1 M RAZTOPINA DTT

SESTAVA	KOLIČINA
DTT	154 mg
ddH ₂ O	1 mL

Raztopino smo sterilizirali s pomočjo filtracije in jo nato shranjevali pri -20 °C.

1 M RAZTOPINA IPTG

SESTAVA	KOLIČINA
IPTG	2,38 g
ddH ₂ O	10 mL

Raztopino smo sterilizirali s pomočjo filtracije in jo nato shranjevali pri -20 °C.

8 M UREA

SESTAVA	KOLIČINA
urea	2,4 g
ddH ₂ O	do 5 mL

Raztopino smo pripravili neposredno pred uporabo.

3.1.5 Geli

GEL 1 – LOČEVALNI GEL (14 %)

SESTAVA	KOLIČINA*
1 M Tris HCl, pH 8,8	1,25 mL
40 % akrilamid/bisakrilamid	1,75 mL
10 % amonijev persulfat (APS)	50 µL
10% natrijev dodecilsulfat (SDS)	50 µL
tetrametiletilendiamin (TEMED)	2 µL
ddH ₂ O	1,90 mL

*(Količine so preračunane za gel debeline 0,75 mm.)

Po predpisani recepturi smo najprej pripravili 14 % ločevalni gel tako, da smo vse navedene sestavine pomešali v čaši, nazadnje smo dodali TEMED (povzroči polimerizacijo gela).

Gel smo nato s pipeto odpipetirali med dve stekelci, ki sta bili vpeti v stojalo. Na gel smo nato nanesti izopropanol, s pomočjo katerega smo zagotovili anaerobne pogoje (pri katerih gel polimerizira). Po tem ko se je gel strdil, smo izopropanol odlili in površino gela sprali z vodo ter ga na koncu osušili s filter papirjem.

GEL 2 – ZBIRALNI GEL (5 %)

SESTAVA	KOLIČINA*
1 M Tris HCl, pH 6,8	250 µL
40 % akrilamid/bisakrilamid	250 µL
10 % amonijev persulfat	20 µL
10% natrijev dodecilsulfat (SDS)	20 µL
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	2 µL
ddH ₂ O	1,46 mL

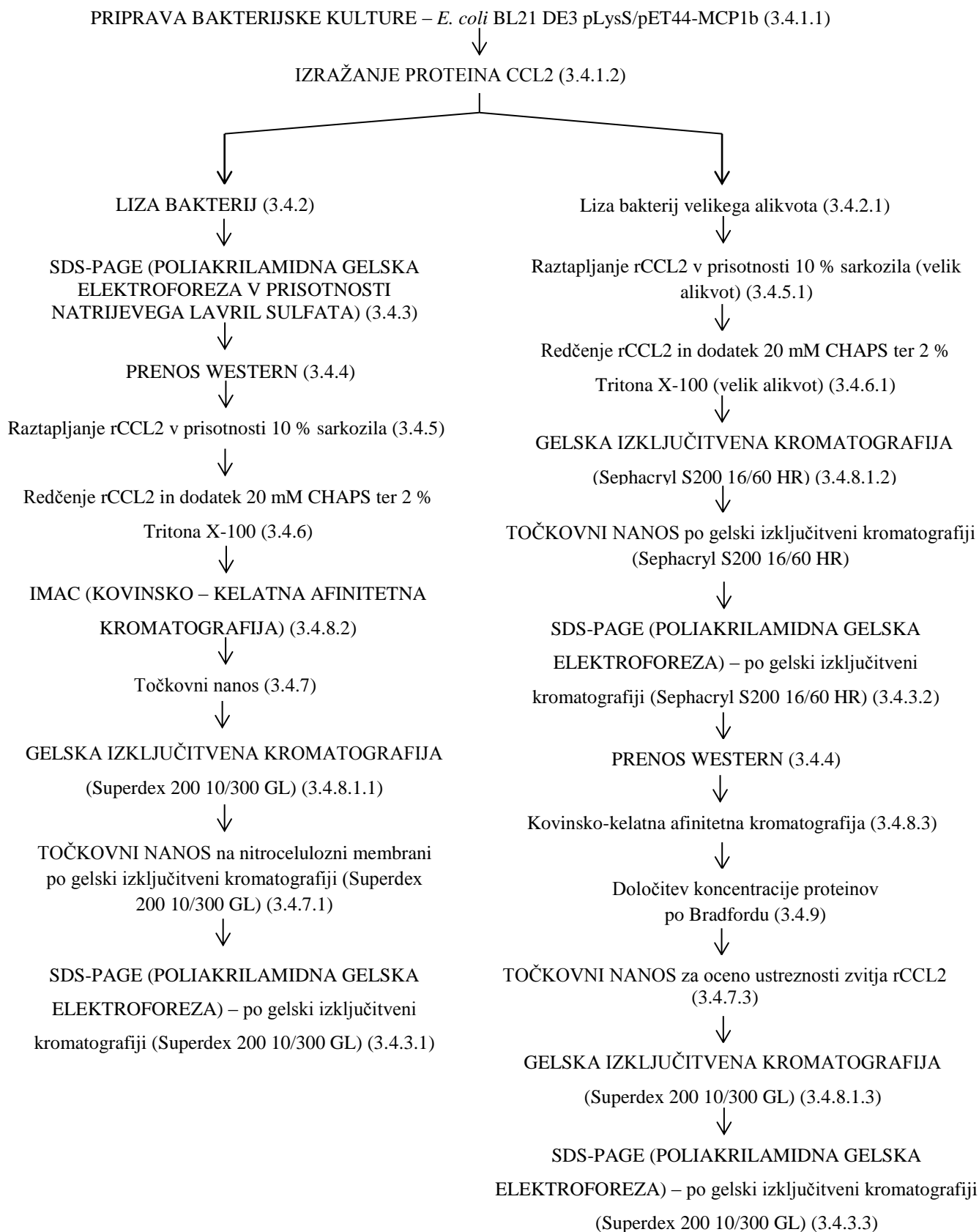
*(Količine so preračunane za gel debeline 0,75 mm.)

Nato smo pripravili še 5 % zbiralni gel tako, da smo vse navedene sestavine pomešali v čaši, nazadnje smo dodali TEMED. Gel smo prav tako s pipeto odpipetirali med dve stekelci, tokrat na že pripravljen ločevalni gel. Takoj po nanosu zbiralnega gela smo med stekelci vstavili glavniček, ki je ustvaril žepke, v katere smo nanесли vzorce.

3.2 LABORATORIJSKA OPREMA

OPREMA	OZNAKA	PROIZVAJALEC
Analitska tehtnica	AB 104	Mettler Toledo, Küssnacht, Švica
Avtoklav Systec	2540	Bel-Art products, Pequannock, ZDA
Centrifugi	5804 R 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Centrifugirka za ultrafiltracijo Amicon	NMWL 3 kDa	Millipore
Elektroforezna kadička	B1A Easy cast mini gel	Owl, Portsmouth, NH, ZDA
Inkubator (37 °C)	WTC	Binder GmbH, Tuttlingen, Nemčija
Kolona HiTrap	HiTrap IMAC HP 1 mL	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Velika Britanija
Kolona Sephacryl	S200 16/60 HR	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Velika Britanija
Kolona SUPERDEX	200 10/300 GL	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Velika Britanija
Komora za fotografiranje gelov in WB-membran	G-BOX	Syngene, Cambridge, Združeno kraljestvo
LAF-komora	LFVP 12	Iskra PIO, Šentjernej, Slovenija
Magnetni mešalnik	Rotamix 550 MMH	Tehtnica, Železniki, Slovenija
pH meter	691	Metrohm, Herisan, Švica
Pipete	0,5 - 10 µL 10 - 100 µL 100 - 1000 µL 1000 – 5000 µL	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Precizna tehtnica	Exacta 610 EB	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Vibracijski stresalnik Vibromix	104 EV	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Vir napetosti za elektroforezne kadičke	Power Ease 500	Novex, Frankfurt, Nemčija

3.3 EKSPERIMENTALNA SHEMA



3.4 METODE

3.4.1 IZRAŽANJE rCCL2

3.4.1.1 PRIPRAVA BAKTERIJSKIH KOLONIJ *E. coli* BL21 DE3 pLysS/pET44-MCP1b

S pomočjo sterilizirane mikrobiološke zanke smo se dotaknili zamrznjenih bakterij (trajne bakterijske kulture), ki smo jih nato nacepili na agarno gojišče LB z dvema antibiotikoma, ampicilinom (50 µg/mL) in kloramfenikolom (34 µg/mL). Petrijevko z nacepljenimi bakterijami smo inkubirali preko noči pri 37 °C. Posamezne kolonije bakterij smo v nadaljevanju uporabili za pripravo bakterijskih kultur v tekočem gojišču.

3.4.1.2 IZRAŽANJE PROTEINA CCL2

Eno kolonijo *E. coli* BL21 DE3 pLysS/pET44-MCP1b (3.4.1.1) smo precepili v 100 mL gojišča LB z ampicilinom (50 µg/mL) in kloramfenikolom (34 µg/mL). Kulturo smo inkubirali preko noči pri 37 °C med močnim stresanjem.

Naslednji dan smo kulturo redčili v razmerju 1:100 v dvakrat po 1 L gojišča TB z ampicilinom (50 µg/mL) in kloramfenikolom (34 µg/mL). Vzporedno smo na enak način pripravili še dve 20 mL kulturi. Pripravljene kulture smo nato inkubirali pri 37 °C med močnim stresanjem, dokler kulture niso dosegle optične gostote (OD₆₀₀) 0,5. Velikima (1 L) in enemu manjšemu alikvotu (20 mL) smo dodali 1 mM IPTG (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid). Kulture smo gojili še nadaljnjih 5 ur.

Celice smo od gojišča ločili s pomočjo centrifugiranja (10 min pri 5000 vrt./min) in jih nato sprali z ohlajenim pufrom PBS. Celice smo ponovno centrifugirali (10 min pri 5000 vrt./min pri 4 °C). Po centrifugiranju smo supernatant odlili in celice zamrznili pri -80 °C.

3.4.2 LIZA BAKTERIJ

Iz zamrzovalnika smo vzeli dva manjša alikvota celic (tj. iz 20-mL kultur), in sicer celice inducirane (IND.; tj. z dodatkom IPTG) in neinducirane kulture (NEIND.; tj. brez dodanega IPTG). Na podlagi optične gostote kultur smo izračunali, v kolikšnem volumnu pufrna bomo suspendirali IND. in NEIND. celice. Optična gostota IND. kulture je znašala 16,25, NEIND. kulture pa 28,75.

Za eno enoto absorbance smo posameznima alikvotoma celic dodali 0,4 mL pufra 1 (celicam IND. kulture smo dodali 6,5 mL, celicam NEIND. kulture pa 11,5 mL pufra 1). Celice smo nato sonicirali pri amplitudi 30 % s 5 sekundnimi pulzi ultrazvoka in z 10 s razmiki. Proces sonikacije je trajal od 3 do 4 min.

Po sonikaciji smo obema lizatoma dodali DNazo (10 µg/mL) in ju med nežnim stresanjem inkubirali pri sobni temperaturi ~15 min.

Shranili smo po 100 µL lizatov (t.i. celokupna frakcija proteinov), preostanek lizatov pa smo centrifugirali 10 min pri 10 000 vrt./min in supernatanta shranili ločeno (t.i. frakciji topnih proteinov). Usedlini smo suspendirali v začetnem volumnu pufra 1 (t.i. frakciji netopnih proteinov) s pomočjo vibracijskega mešalnika. Ločene proteinske frakcije smo shranili pri temperaturi –80 °C do analize.

3.4.2.1 LIZA BAKTERIJ VELIKEGA ALIKVOTA

Velik alikvot celic (iz po ~0,5 L kulture), ki smo ga shranili pri –80 °C, smo odtalili na ledu in mu dodali 15 mL pufra 1. Celice smo nato lizirali po enakem postopku kot je opisan pod točko 3.4.2, nato pa smo lizatu dodali DNazo in ga med nežnim stresanjem inkubirali pri sobni temperaturi ~ 15 min.

Lizat smo po inkubaciji 10 min centrifugirali pri 10 000 vrt./min in supernatant shranili pri 4 °C (TF – frakcija topnih proteinov), netopni del lizata pa smo suspendirali v raztopini 10 % sarkozila 1.

3.4.3 SDS-PAGE (POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA LAVRIL SULFATA)

Priprava vzorcev:

V posamezne mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 22 µL posameznega vzorca (preglednica I), razen standarda rCCL2 (rekombinantni protein CCL2), ki smo ga odpipetirali 5 µL. Vzorcem smo pred nanosom na gel za poliakrilamidno gelsko elektroforezo dodali 11,7 µL nanašalnega pufra in 5,9 µL 1 M DTT. Tako pripravljene vzorce smo nato postavili na vodno kopel (100 °C) za 5 min, s čimer smo zagotovili popolno denaturacijo proteinov.

Preglednica I: Nanos vzorcev na gelu poliakrilamidne gelske elektroforeze.

1	2	3	4	5	6	7	8
rCCL2	CF _{IND.}	TF _{IND.}	NF _{IND.}	M	CF _{NEIND.}	TF _{NEIND.}	NF _{NEIND.}

- rCCL2 – rekombinantni protein CCL2 (standard (»Matelič A., Diplomaska naloga, Kartiranje epitopov nevtralizacijskih protiteles proti kemokinu CCL2, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2013«))
- CF_{IND.} – celokupna frakcija proteinov iz inducirane kulture
- TF_{IND.} – topna frakcija proteinov iz inducirane kulture
- NF_{IND.} – netopna frakcija proteinov iz inducirane kulture
- M – marker (proteinski standard, označevalec velikosti)
- CF_{NEIND.} – celokupna frakcija proteinov iz neinducirane kulture
- TF_{NEIND.} – topna frakcija proteinov iz neinducirane kulture
- NF_{NEIND.} – netopna frakcija proteinov iz neinducirane kulture

Postopek:

Gel za SDS-PAGE smo vpeli v stojalo in stojalo prenesli v kadičko za poliakrilamidno gelsko elektroforezo, ki smo jo napolnili z elektroforeznim pufrom (pufer 3). Nato smo v posamezne žepke na gelu odpipetirali po 18 µL vzorcev in kadičko priključili na napetost 100 V.

Proteini so se skoncentrirali na meji med zbiralnim in ločevalnim gelom, nato pa so se na ločevalnem gelu ločili glede na njihovo velikost.

Barvanje gela:

Po končani gelski elektroforezi je sledilo barvanje gela s Coomassie Brilliant Blue:

Gel smo najprej potopili v raztopino za barvanje s Coomassie Brilliant Blue za približno 1 uro ob rahlem stresanju. Po pretečenem času smo gel prenesli v raztopino za razbarvanje za 1 uro ob rahlem stresanju. Med postopkom razbarvanja smo raztopino za razbarvanje menjali na 15 min.

Po barvanju gela s Coomassie Brilliant Blue smo barvanje gela nadaljevali z metodo barvanja s srebrom, ki je do stokrat bolj občutljiva:

Gel smo potopili v raztopino za predtretiranje za 30 min ob rahlem stresanju. Po pretečenih 30 min smo gel trikrat sprali z vodo po 15 min, nato pa je sledila faza barvanja z raztopino za barvanje. Barvanje je potekalo 20 min ob rahlem stresanju. Fazi barvanja je sledilo spiranje z vodo, kjer smo gel samo enkrat na hitro sprali, nato pa smo gel potopili v raztopino za razvijanje za nekaj minut, dokler na gelu niso bili vidni proteini. Gel smo nato večkrat sprali z vodo.

3.4.3.1 SDS-PAGE (POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA) – po gelski izključitveni kromatografiji (Superdex 200 10/300 GL)

Priprava vzorcev:

Za pripravo vzorcev za nanos na gel za poliakrilamidno gelsko elektroforezo smo uporabili posamezne frakcije, ki smo jih pridobili pri gelski izključitveni kromatografiji (3.4.8.1.1). Uporabili smo naslednje frakcije: A2, A3, A8, A10, A12, A13, B1 in B3. Na gel smo poleg omenjenih frakcij nanесли tudi vzorec STC (protein rCCL2, raztopljen v prisotnosti treh površinsko aktivnih snovi: CHAPS, Triton X-100 in sarkozil) in standard (protein rCCL2).

Proteine v vzorcih smo obarjali tako, da smo 150 μL posamezne frakcije dodali 1350 μL absolutnega etanola (1 del vzorca : 9 delov 100 % EtOH), 50 μL vzorca STC pa 450 μL absolutnega etanola. Vzorce smo nato dobro premešali in jih čez noč pustili pri temperaturi $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Naslednji dan smo vzorce 15 minut centrifugirali pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 13200 vrt./min. Po centrifugiranju smo supernatant previdno odlili in oborino sprali z 0,5 mL 90 % etanola. Vzorce smo nato dobro premešali na vibracijskem mešalniku, jih ponovno centrifugirali 5 minut in jih nato sušili pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, da smo odstranili ves etanol.

Po končanem sušenju smo precipitirane proteine iz vzorcev raztopili v 10 μL pufra PBS in jim dodali 2,7 μL 1 M DTT in 5,3 μL nanašalnega pufra in jih nato postavili na vodno kopel ($100\text{ }^{\circ}\text{C}$) za 5 min. Postopek celotne metode in barvanje gela s srebrom je potekal enako, kot je opisano zgoraj (poglavje 3.4.3).

3.4.3.2 SDS-PAGE (POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA) – po gelski izključitveni kromatografiji (Sephacryl S200 16/60 HR)

Priprava vzorcev:

Za pripravo vzorcev za nanos na gel za poliakrilamidno gelsko elektroforezo smo uporabili frakcije, ki smo jih pridobili pri gelski izključitveni kromatografiji (3.4.8.1.2). Uporabili smo naslednje frakcije: A1, A3, A6, A8, A9, A10, A11, A12, B1, B2 in B12. Na gel smo poleg omenjenih frakcij nanесли tudi standard (protein rCCL2), S-TF (frakcija proteinov, topnih v 10 % sarkozilu), S-NF (frakcija proteinov, netopnih v 10 % sarkozilu) in M (marker).

V posamezne mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 15 μ L posameznih vzorcev, ki so predstavljeni v preglednici II in celoten postopek priprave vzorcev in procesa nadaljevali po enakem postopku kot je opisan pod točko 3.4.3.

Vzporedno smo izdelali dva enaka gela, enega od teh smo uporabili za metodo prenosa western.

Preglednica II: Nanos vzorcev na gelu poliakrilamidne gelske elektroforeze.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
A1	A3	A6	A8	A9	A10	A11	A12	B1	B2	CCL2	M	B12	S-TF	S-NF

3.4.3.3 SDS-PAGE (POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA) – po gelski izključitveni kromatografiji (Superdex 200 10/300 GL)

Priprava vzorcev:

Na gel poliakrilamidne gelske elektroforeze smo nanесли vzorec združenega koncentriranega eluata (3 in 4), ki smo ga pridobili po kovinsko-kelatni afinitetni kromatografiji (3.4.8.3). Na gel smo poleg omenjenega eluata nanесли tudi standard (protein rCCL2) in M (marker).

Vzorec eluata smo pred nanosom na gel poliakrilamidne gelske elektroforeze pripravili po enakem postopku (in enakem razmerju reagentov), prav tako smo potek celotne metode in barvanje gela s srebrom nadaljevali po enakem postopku, kot je opisan pod točko 3.4.3 – priprava vzorcev.

3.4.4 PRENOS WESTERN

Priprava vzorcev:

Postopek priprave vzorcev je popolnoma enak kot pri poliakrilamidni gelski elektroforezi (3.4.3).

Postopek:

Za izvedbo metode prenosa western je bilo potrebno najprej proteine v vzorcih ločiti s poliakrilamidno gelsko elektroforezo. Po končani elektroforezi smo proteine iz gela prenesli na nitrocelulozno membrano in nato izvedli imunodetekcijo.

Prenos western:

Najprej smo vzorce iz gela prenesli na nitrocelulozno membrano. Za prenos vzorcev iz gela na membrano smo si pripravili petrijevko s pufrom 2, v katerem smo omočili kaseto in ves potreben material (filter papir, gobice, membrane), ki smo ga potrebovali za izvedbo metode. V kaseto smo po vrstnem redu zložili najprej gobico, nato tri filter papirje, gel, membrano in nato ponovno tri filter papirje in gobico. Kaseto smo nato zaprli in jo vstavili v kadičko za poliakrilamidno gelsko elektroforezo.

Kadičko smo napolnili s pufrom 2 in jo priključili na napetost 100 V za 1,5 ure. V tem času je potekal elektro prenos proteinov iz gela na nitrocelulozno membrano, nato pa je sledila še imunodetekcija proteinov.

Imunodetekcija:

Membrano smo potopili v raztopino 5 % mleka v pufu PBS pri 4 °C preko noči z namenom blokirati prosta mesta na membrani. Pri tem so se proteini iz mleka vezali na prosta mesta na membrani in s tem preprečili kasnejšo nespecifično vezavo protiteles.

Naslednje jutro smo membrano sprali s 25 mL 0,05 % Tween 20 (0,05 % PBST), nato pa smo membrano 2 uri inkubirali v raztopini kunčjih anti-hMCP-1 pAb 9669 (1 µg/mL) v blokirnem pufu ob rahlem stresanju. Po pretečenih 2 urah smo membrano trikrat spirali po 15 minut s 25 mL 0,05 % PBST ob rahlem stresanju.

Nato smo membrano inkubirali v raztopini sekundarnih protiteles – kozja protikunčja IgG, konjugirana s HRP (1:10000) v blokirnem pufru ob rahlem stresanju. Po eni uri smo membrano ponovno trikrat spirali po 15 minut s 25 mL 0,05 % PBST ob rahlem stresanju, nato pa je sledila detekcija s kemiluminiscenčnim substratom.

Na membrano smo nato nanegli substrat Super Signal® West Dura. Po 5 minutah smo luminiscenčne lise na membrani detektirali z digitalno kamero (G-BOX, Syngene).

3.4.5 RAZTAPLJANJE rCCL2 V PRISOTNOSTI 10 % SARKOZILA

Frakciji netopnih proteinov iz lizata inducirane 20 mL kulture *E. coli* BL21 DE3 pLysS pET-44/MCP-1b smo dodali 1 mL 10 % raztopine sarkozila 1. Pripravljeno raztopino smo čez noč inkubirali pri 4 °C ob rahlem stresanju.

3.4.5.1 RAZTAPLJANJE rCCL2 V PRISOTNOSTI 10 % SARKOZILA (VELIK ALIKVOT)

Netopnemu delu lizata, ki smo ga dobili po lizi bakterij, smo dodali 0,5 mL 10 % raztopine sarkozila 2. Pripravljeno raztopino smo čez noč inkubirali pri 4 °C ob rahlem stresanju.

3.4.6 REDČENJE rCCL2 IN DODATEK 20 mM CHAPS-A TER 2 % TRITONA X-100

Raztopino proteinov v 10 % sarkozilu (3.4.5) smo centrifugirali in ji dodali 8 mL pufra A ter 1 mL raztopine Triton X-100 in CHAPS. Pripravljeno raztopino smo nato inkubirali 1 uro pri 4 °C ob rahlem stresanju, jo centrifugirali in supernatant nanegli na kolono IMAC (glej poglavje 3.4.8.2).

3.4.6.1 REDČENJE rCCL2 IN DODATEK 20 mM CHAPS-A TER 2 % TRITONA X-100 (VELIK ALIKVOT)

Raztopino smo po inkubaciji najprej centrifugirali, nato pa smo ji dodali 4,5 mL raztopine 2,2 % Triton X-100 in 1,37 % CHAPS ter jo inkubirali 1 uro pri 4 °C ob rahlem stresanju. Po 1 uri inkubacije smo raztopino centrifugirali in supernatant nanegli na kolono Sephacryl S200 16/60 HR (3.4.8.1.2).

3.4.7 TOČKOVNI NANOS

Na nitrocelulozno membrano smo v točko odpipetirali določene volumne posameznih vzorcev (preglednica III) in pustili, da se je membrana posušila. Po eni uri smo izvedli imunodetekcijo po enakem postopku, kot je opisan pri prenosu western (3.4.4).

Preglednica III: Nanos vzorcev na nitrocelulozni membrani.

Vzorec	V vzorca (μL)	V vzorca (μL)
PK – pozitivna kontrola (standard rCCL2)	1 μL	/
NK – negativna kontrola (lizat neinducirane kulture)	5 μL	/
W – spirek inkluzijskih telesc (v pufu za DNazo)	10 μL	5 μL
S – proteini, topni v 10 % sarkozilu (supernatant)	1,5 μL	0,8 μL
NT – proteini, netopni v 10 % sarkozilu (naknadno raztopljeni v 1 mL 8 M uree)	1,5 μL	0,8 μL
STC – proteini, topni v 1 % sarkozilu, 1,23 % CHAPS	15 μL	7,5 μL

3.4.7.1 TOČKOVNI NANOS na nitrocelulozni membrani po gelski izključitveni kromatografiji (Superdex 200 10/300 GL)

Na nitrocelulozno membrano smo odpipetirali po 5 μL posameznih frakcij, ki smo jih pridobili z gelsko izključitveno kromatografijo (3.4.8.1.1).

Na nitrocelulozno membrano smo nanесли posamezne frakcije (A1, A2, A3, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14, A15, B1, B2, B3 in B4), 1 μL pozitivne (protein rCCL2) in 5 μL negativne kontrole (lizat neinducirane kulture) in 5 μL spirka kolone z 0,5 M NaOH. Nitrocelulozno membrano smo eno uro pustili, da se je posušila, nato pa smo izvedli imunodetekcijo po enakem postopku, kot je opisan pri prenosu western (3.4.4).

3.4.7.2 TOČKOVNI NANOS po gelski izključitveni kromatografiji (Sephacryl S200 16/60 HR)

Za pripravo vzorcev za nanos na nitrocelulozno membrano smo uporabili frakcije, ki smo jih pridobili pri gelski izključitveni kromatografiji (3.4.8.1.2). Uporabili smo naslednje frakcije: A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, B11, B12, C1, C2, C3, C4, C5, C6+C7, C8, C9, C10, C11, C12.

Na nitrocelulozno membrano smo poleg omenjenih frakcij nanesli tudi vzorec STC (protein rCCL2, raztopljen v prisotnosti treh površinsko aktivnih snovi: CHAPS, Triton X-100 in sarkozil), PK (pozitivna kontrola, protein rCCL2), NK (lizat neinducirane kulture) S-TF (solubilizat lizata oz. proteini, topni v 10 % sarkozilu), S-NF (netopna frakcija lizata oz. proteini, netopni v 10 % sarkozilu).

Vzorci smo pred nanosom na membrano pripravili po enakem postopku (in enakem razmerju reagentov), kot je opisan pod točko 3.4.3.1 – priprava vzorcev. Po precipitaciji smo vzorce raztopili v 10 μL pufru PBS in jih po 5 μL nanesli na nitrocelulozno membrano. Nitrocelulozno membrano smo posušili, nato pa smo izvedli imunodetekcijo po enakem postopku, kot je opisan pri prenosu western (3.4.4).

3.4.7.3 TOČKOVNI NANOS za oceno ustreznosti zvitja rCCL2

Priprava vzorcev:

V mikrocentrifugirkah smo pripravili ustrezne redčitve vzorcev z različnimi koncentracijami proteina CCL2 v pufru 5 (170 ng/ μL , 34 ng/ μL , 6,8 ng/ μL in 1,4 ng/ μL) za nanos na nitrocelulozno membrano.

Ponovno smo si pripravili štiri mikrocentrifugirke, v katerih smo prav tako pripravili vzorce za nanos na nitrocelulozno membrano z različnimi koncentracijami proteina CCL2 v pufru 5 (170 ng/ μL , 34 ng/ μL , 6,8 ng/ μL in 1,4 ng/ μL) s tem, da smo tem vzorcem dodali raztopino 1 % SDS in β -merkaptotanol.

Vzorci, ki so vsebovali 1 % SDS in β -merkaptotanol, smo postavili na vodno kopel (100 $^{\circ}\text{C}$) za 5 min, s čimer smo zagotovili popolno denaturacijo proteinov, ostale vzorce pa smo pred nanosom na membrano centrifugirali. Tako pripravljene vzorce smo nato odpipetirali na dve nitrocelulozni membrani na način, kot je predstavljen v spodnji preglednici IV. Nitrocelulozno membrano smo eno uro sušili, nato pa smo izvedli imunodetekcijo proteinov.

Preglednica IV: Nanos vzorcev na nitrocelulozni membrani.

1 μ L	PK – pozitivna kontrola (rCCL2)	1 μ L
2 μ L	NK – negativna kontrola (lizat neinducirane kulture)	2 μ L
3 μ L	denaturiran protein (1 % SDS) - 170 ng	3 μ L
3 μ L	denaturiran protein (1 % SDS) - 34 ng	3 μ L
3 μ L	denaturiran protein (1 % SDS) - 7 ng	3 μ L
3 μ L	denaturiran protein (1 % SDS) – 1,4 ng	3 μ L
3 μ L	nativen protein – 170 ng	3 μ L
3 μ L	nativen protein – 34 ng	3 μ L
3 μ L	nativen protein – 7 ng	3 μ L
3 μ L	nativen protein – 1,4 ng	3 μ L

Imunodetekcija:

Imunodetekcijo proteinov smo izvedli po enakem postopku, kot je opisan pri točki 3.4.4 s to razliko, da smo uporabili drugačna protitelesa. Eno membrano smo inkubirali v raztopini kunčjih anti-hMCP-1 pAb 9669 (1 μ g/mL) v blokirnem pufu ob rahlem stresanju, drugo membrano pa v raztopini mišjih anti-hMCP-1 mAb S101 (1 μ g/mL) v blokirnem pufu ob rahlem stresanju za dve uri.

Po pretečenih 2 urah smo membrani sprali in ju inkubirali v raztopini sekundarnih protiteles. Membrano, ki smo jo inkubirali v prisotnosti kunčjih protiteles pAb 9669, smo kasneje inkubirali v raztopini kozjih protikunčjih IgG, konjugiranih s HRP (1:10000) v blokirnem pufu ob rahlem stresanju.

Membrano, ki smo jo prej inkubirali v prisotnosti mišjih protiteles mAb S101, smo tokrat inkubirali v raztopini kozjih protimišjih IgG+A+M, konjugiranih s HRP (1:5000) v blokirnem pufu (1 μ L v 5 mL 5 % raztopine mleka v 0,05 % pufu PBST) ob rahlem stresanju za eno uro. Po eni uri smo membrani sprali, nato pa je sledila detekcija s kemiluminiscenčnim substratom po postopku, kot je opisan pod točko 3.4.4.

3.4.8 KROMATOGRAFSKE METODE

3.4.8.1 SEC (GELSKA IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA)

3.4.8.1.1 GELSKA IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA – (Superdex 200 10/300 GL)

Priprava kolone za gelsko izključitveno kromatografijo:

Kolono Superdex 200 10/300 GL smo najprej sprali s 50 mL vode s pretokom 0,5 mL/min. Nato smo kolono sprali še s 50 mL pufra SEC (s pretokom 0,5 mL/min).

Postopek:

S pomočjo injekcijske brizge smo na kolono injicirali 500 µL vzorca (3.4.6). Kolono smo spirali s pufrom SEC s pretokom 0,5 mL/min in ob eluciji zbirali frakcije po 1 mL, ki smo jih nato shranili pri 4 °C.

Po končani gelski izključitveni kromatografiji smo kolono sprali še s 50 mL 0,5 M NaOH s pretokom 0,5 mL/min in s 50 mL vode, prav tako s pretokom 0,5 mL/min.

3.4.8.1.2 GELSKA IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA – (Sephacryl S200 16/60 HR)

Priprava kolone za gelsko izključitveno kromatografijo:

Kolono Sephacryl S200 16/60 smo najprej sprali s 60 mL vode s pretokom 0,5 mL/min. Nato smo kolono spirali še s 240 mL pufra SEC s pretokom 0,5 mL/min.

Postopek:

S pomočjo injekcijske brizge smo na kolono injicirali 4,5 mL vzorca (3.4.6.1). Kolono smo spirali s pufrom SEC s pretokom 0,5 mL/min in ob eluciji zbirali frakcije po 4 mL, ki smo jih nato shranili pri 4 °C.

Po končani gelski izključitveni kromatografiji smo kolono najprej sprali s 60 mL vode s pretokom 0,5 mL/min. Nato smo kolono sprali s 60 mL 0,2 M NaOH s pretokom 0,5 mL/min.

3.4.8.1.3 GELSKA IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA – (Superdex 200 10/300 GL)

Postopek:

S pomočjo injekcijske brizge smo na kolono injicirali 100 μ L združenega koncentriranega eluata (3 in 4) (3.4.8.3), ki smo ga pred nanosom na kolono redčili v razmerju 1:4 s pufrom SEC. Kolono smo spirali s pufrom SEC s pretokom 0,5 mL/min in ob eluciji zbirali frakcije po 1 mL, ki smo jih nato shranili pri 4 °C.

3.4.8.2 IMAC (KOVINSKO-KELATNA AFINITETNA KROMATOGRAFIJA)

Priprava kolone za kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo:

Kolono HiTrap IMAC HP 1 mL smo najprej sprali s 5 mL vode ter 5 mL pufra B in 10 mL pufra A.

Postopek:

S pomočjo injekcijske brizge smo v zanko injicirali 1 mL slepega vzorčka, ki je bil sestavljen iz 110 μ L 10 % raztopine sarkozila, 880 μ L pufra A in 110 μ L raztopine CHAPS in Triton X-100. Nato smo kolono ponovno sprali s pufrom A.

Prav tako smo s pomočjo injekcijske brizge v zanko injicirali 1 mL vzorca (3.4.6). Kolono smo ponovno spirali s pufrom A in ob eluciji s pufrom B zbirali frakcije. Delež pufra B smo postopoma povečevali, in sicer tako, da smo delež pufra najprej povišali na 3,3 % nato na 10 % in končno sistem nastavili, da je v 10 min delež pufra B dosegel 100 %. Ves čas smo v sistemu vzdrževali pretok 1 mL/min in zbirali frakcije po 1 mL. Eluirane frakcije smo shranili pri 4 °C.

3.4.8.3 KOVINSKO-KELATNA AFINITETNA KROMATOGRAFIJA

Ni²⁺-NTA agaroz (stacionarna faza za kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo) je v obliki suspenzije shranjena v 20 % etanolu. Suspenzijo smo sprali z vodo, nato pa še s pufrom 7. Po spiranju smo agarozo inkubirali z združenimi frakcijami, ki smo jih pridobili z gelsko izključitveno kromatografijo (pod točko 3.4.8.1.2; frakcije A11, A12 in B1) preko noči pri 4 °C ob rahlem stresanju.

Naslednji dan smo suspenzijo agaroze najprej centrifugirali pri 500 g za 5 minut, nato pa smo agarozo dvakrat sprali s pufrom 7. Po spiranju smo raztopino inkubirali pri 4 °C za ~5 minut ob rahlem stresanju.

Po 5 minutah smo suspenzijo prelili v majhno kolono, ki ima na dnu membrano, nad katero se zbere agarozni gel, raztopina pa odteče. Ko je vsa raztopina prešla čez kolono, smo v kolono pričeli dodajati elucijski pufer B po 500 µL, istočasno pa smo pričeli zbirati frakcije, prav tako po 500 µL. Zbrali smo 10 frakcij in spremljali njihovo absorbanco pri valovni dolžini 280 nm. Eluata 3 in 4 smo združili in ju koncentrirali s pomočjo ultrafiltracije do končnega volumna ~ 100 µL. Koncentrirana eluata smo nato centrifugirali pri 15000 vrt./min 15 minut in supernatanta združili v novi mikrocentrifugirki.

3.4.9 DOLOČITEV KONCENTRACIJE PROTEINOV PO BRADFORDU

Koncentracijo proteina CCL2 v združenem koncentriranem eluatu (3 in 4), ki smo ga pridobili po kovinsko-kelatni afinitetni kromatografiji (3.4.8.3), smo določili s pomočjo metode po Bradfordu.

Na mikrotitrski plošči smo k 10 µL standarda (BSA v koncentracijah 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 in 500 µg/mL) in vzorca (združen koncentriran eluat 3 in 4) dodali 300 µL Bradfordovega reagenta. Po 10 min smo izmerili absorbanco pri 595 nm in s pomočjo standarda ocenili koncentracijo proteina CCL2 v eluatu.

4. REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 IZRAŽANJE PROTEINA CCL2

Protein CCL2 smo izrazili s pomočjo ekspresijskega sistema *E. coli* BL21 DE3 pLysS/pET44-MCP1b. Izražanje rekombinantnega proteina smo spodbudili z dodatkom 1 mM IPTG. Po peturni indukciji smo celice od gojišča ločili s centrifugiranjem in jih suspendirali v pufru PBS. Celice smo nato lizirali z ultrazvokom in jim po lizi dodali DNazo. Lizat smo med nežnim stresanjem inkubirali pri sobni temperaturi ~15 min, da smo dosegli razgradnjo celične DNA in s tem znižanje viskoznosti lizata. Del lizata (100 µL) smo shranili, preostanek pa smo centrifugirali. Po centrifugiranju smo supernatant in netopno proteinsko frakcijo ločeno shranili pri temperaturi -80 °C do analize. Netopne proteine smo pred tem suspendirali v pufru 1.

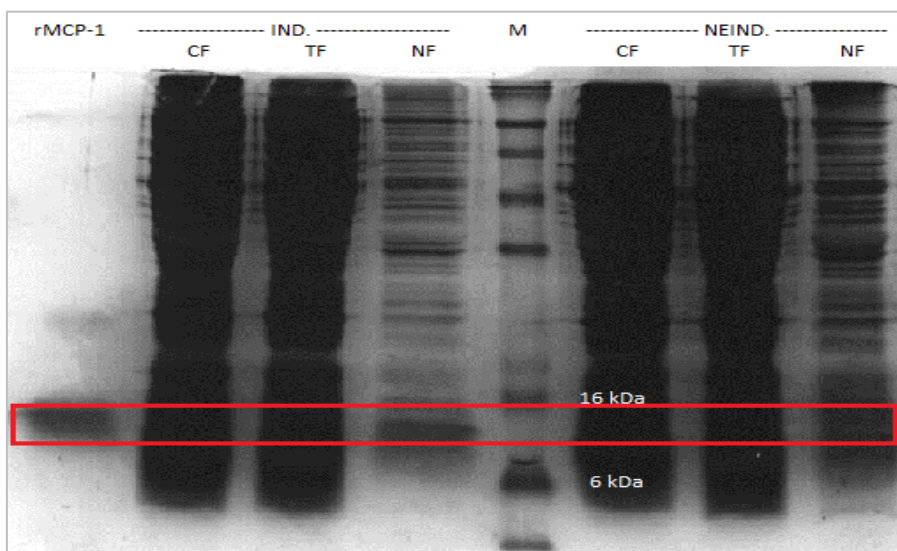
4.2 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE CCL2

4.2.1 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA LAVRIL SULFATA (SDS-PAGE)

Poliakrilamidna gelska elektroforeza je metoda, ki omogoča ločevanje molekul na osnovi njihove velikosti oz. relativne molekulske mase. Elektroforezna mobilnost oz. hitrost potovanja nabitih proteinov je odvisna od razmerja med nabojem in maso proteina, a je zaradi nespecifične vezave lavrilsulfata na polipeptidno verigo to razmerje za vse proteine enako. Hitrost potovanja nabitega proteina, ki potuje skozi zamrežen gel, je tako odvisna le od velikosti proteina oz. dolžine polipeptidne verige. Vsi proteini so negativno nabiti, zato potujejo proti pozitivno nabiti anodi.

Z metodo poliakrilamidne gelske elektroforeze v prisotnosti natrijevega lavril sulfata smo želeli ugotoviti, v katerih frakcijah se nahaja rekombinantni protein CCL2, katerega izražanje smo izvedli s pomočjo ekspresijskega sistema *E. coli*. Izražanje proteina smo spodbudili z dodatkom IPTG, zato smo prisotnost rekombinantnega proteina pričakovali v induciranih frakcijah. Največji delež proteina smo pričakovali v netopni frakciji, saj se protein med izražanjem v *E. coli* odlaga v obliki inkluzijskih telesc, ki so netopna. Majhen delež rekombinantnega proteina smo pričakovali tudi v drugih dveh frakcijah.

Na gel poliakrilamidne gelske elektroforeze smo nanesti po 22 μ L posameznega vzorca, ki smo jih pridobili med postopkom lize bakterij. Gel smo prvotno barvali s Coomassie Brilliant Blue, a ker se je s tem barvilom CCL2 slabo obarval (ni prikazano), smo naknadno proteine detektirali še z barvanjem s srebrom (slika 2).



Slika 2: Slika gela po poliakrilamidni gelski elektroforezi: rCCL2 – rekombinantni CCL2 protein (standard), CF_{IND.} – celokupna, TF_{IND.} – topna in NF_{IND.} – netopna frakcija proteinov iz inducirane kulture, M – marker (proteinski standard, označevalec velikosti), CF_{NEIND.} – celokupna, TF_{NEIND.} – topna in NF_{NEIND.} – netopna frakcija proteinov iz neinducirane kulture.

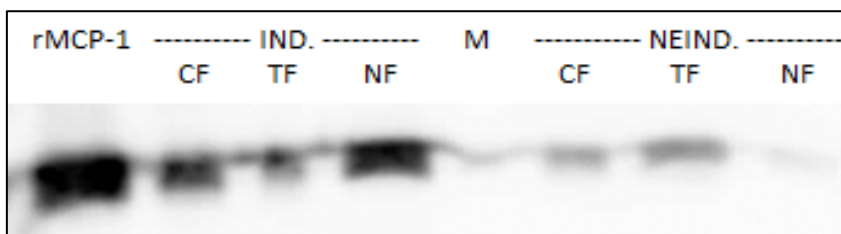
Iz slike gela je zelo slabo razvidno, na katerih mestih oz. v katerih frakcijah se nahaja rekombinantni protein CCL2, saj se je gel pri barvanju s srebrom preveč intenzivno obarval. Iz vzorca rCCL2, ki smo ga uporabili kot standard, lahko sklepamo o položaju našega proteina (velikosti \sim 10 kDa) v posameznih frakcijah lizata.

Zaradi slabe razpoznavnosti rekombinantnega proteina v posameznih frakcijah na gelu poliakrilamidne gelske elektroforeze smo raziskavo nadaljevali z metodo prenosa western.

4.2.2 PRENOS WESTERN

Po poliakrilamidni gelski elektroforezi, kjer smo proteine iz vzorcev ločili na osnovi njihove velikosti, smo pri prenosu western proteine iz poliakrilamidnega gela prenesli na nitrocelulozno membrano s pomočjo električnega toka. Proteine na membrani smo detektirali s poliklonskimi protitelesi proti CCL2 (kunčja anti-hMCP-1 pAb 9669), katere prepoznajo sekundarna protitelesa – kozja protikunčja IgG, konjugirana s HRP.

Prenos western je za razliko od barvanja poliakrilamidnih gelov s srebrom specifična metoda za posamezen protein. S to metodo na nitrocelulozni membrani s pomočjo imunodetekcije oz. protiteles detektiramo specifične proteine, v našem primeru rekombinantni protein CCL2 (slika 3).



Slika 3: Slika nitrocelulozne membrana po prenosu western. rMCP-1–rekombinantni protein CCL2 (standard), CF_{IND.} – celokupna, TF_{IND.} – topna in NF_{IND.} – netopna frakcija proteinov iz inducirane kulture, M – marker (proteinski standard, označevalec velikosti), CF_{NEIND.} – celokupna, TF_{NEIND.} – topna in NF_{NEIND.} – netopna frakcija proteinov iz neinducirane kulture.

Na sliki 3 vidimo, da se CCL2 protein nahaja v induciranih frakcijah v znatno višjih koncentracijah, kot v neinduciranih frakcijah, saj smo njegovo izražanje spodbudili z dodatkom 1 mM IPTG. Majhen delež rekombinantnega proteina CCL2 se nahaja tudi v neinduciranih frakcijah, saj se v majhni meri izraža tudi v neinduciranih frakcijah, kar je posledica »puščanja« promotorja. Največ rekombinantnega proteina pa se nahaja v netopni frakciji lizata inducirane kulture, kar je bilo pričakovano, glede na predhodne dokaze (63), saj se protein CCL2 v ekspresijskem sistemu *E. coli* izraža v obliki inkluzijskih telesc.

Z metodo western smo dokazali, da se rekombinantni protein CCL2 res nahaja v netopni frakciji lizata inducirane kulture, zato smo ta vzorec uporabili v nadaljevanju.

4.2.3 RAZTAPLJANJE PROTEINOV INKLUZIJSKIH TELESC

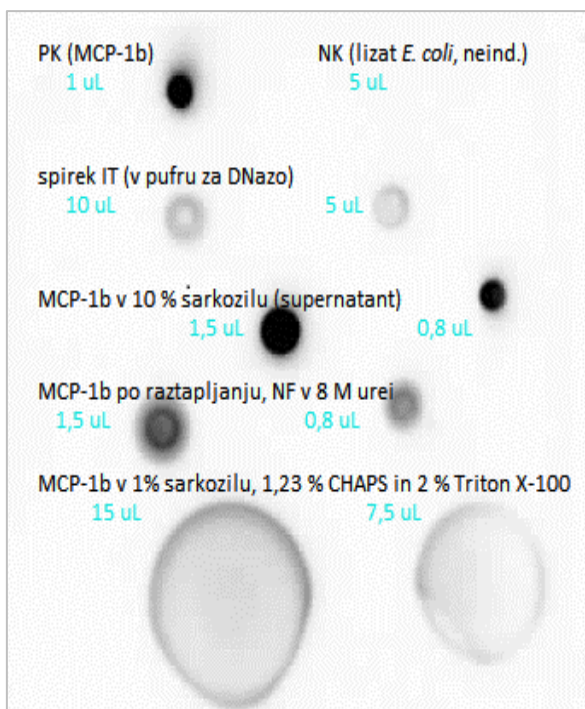
Z metodo točkovnega nanosa smo želeli preveriti raztapljanje inkluzijskih telesc in topnost rekombinantnega proteina CCL2 v prisotnosti 10 % sarkozila in v kombinaciji treh površinsko aktivnih snovi: sarkozil, CHAPS in Triton X-100.

Na nitrocelulozno membrano smo nanegli vzorce in sicer: (1) spirek IT v pufri za DNazo, (2) frakcijo netopnih proteinov, za katero smo z metodo western dokazali, da vsebuje rekombinantni protein CCL2, smo raztopili v 10 % sarkozilu (supernatant), (3) proteine, ki se niso raztopili s pomočjo 10 % sarkozila, pa smo jih naknadno raztopili v 8 M urei, (4) proteine, prvotno raztopljene v 10 % sarkozilu, kasneje redčene v puffer A s CHAPS in Triton X-100 (1 % sarkozil, 1,23 % CHAPS in 2 % Triton X-100).

Na nitrocelulozno membrano smo nanegli tudi pozitivno (PK) in negativno (NK) kontrolo, s katerima lahko potrdimo ustreznost metode. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili rekombinantni protein CCL2, kot negativno kontrolo pa smo uporabili lizat neinducirane kulture.

Točkovni nanos je metoda, ki je podobna metodi prenosa western, s to razliko, da pri tej metodi vzorce nanesimo s pomočjo pipete neposredno na nitrocelulozno membrano brez predhodne elektroforezne ločbe. Po nanosu vzorcev na nitrocelulozno membrano prav tako sledi imunodetekcija proteinov. Metoda točkovnega nanosa je prav tako specifična metoda, s pomočjo katere lahko na nitrocelulozni membrani detektiramo specifične proteine z uporabo protiteles.

S pozitivno in negativno kontrolo smo potrdili ustreznost metode (preverili smo, ali se protitelesa specifično vežejo na mesta, kjer je prisoten protein CCL2). Iz rezultatov (slika 4) je razvidno, da pride do močnega obarvanja na mestu pozitivne kontrole in da ni prisotnega obarvanja na mestu negativne kontrole, zato je metoda ustrezna. Iz pridobljenih rezultatov je lepo razvidno, da smo nekaj rekombinantnega proteina izgubili pri samem spiranju IT. Iz rezultatov je prav tako razvidno, da 10 % sarkozil raztopi proteine iz IT, vendar ne v celoti, nekaj je ostalo neraztopljenega in ta del smo nato naknadno raztopili v 8 M urei. S točkovnim nanosom smo prav tako dokazali, da je rekombinantni protein topen v raztopini 1 % sarkozila, 1,23 % CHAPS-a in 2 % Triton X-100.

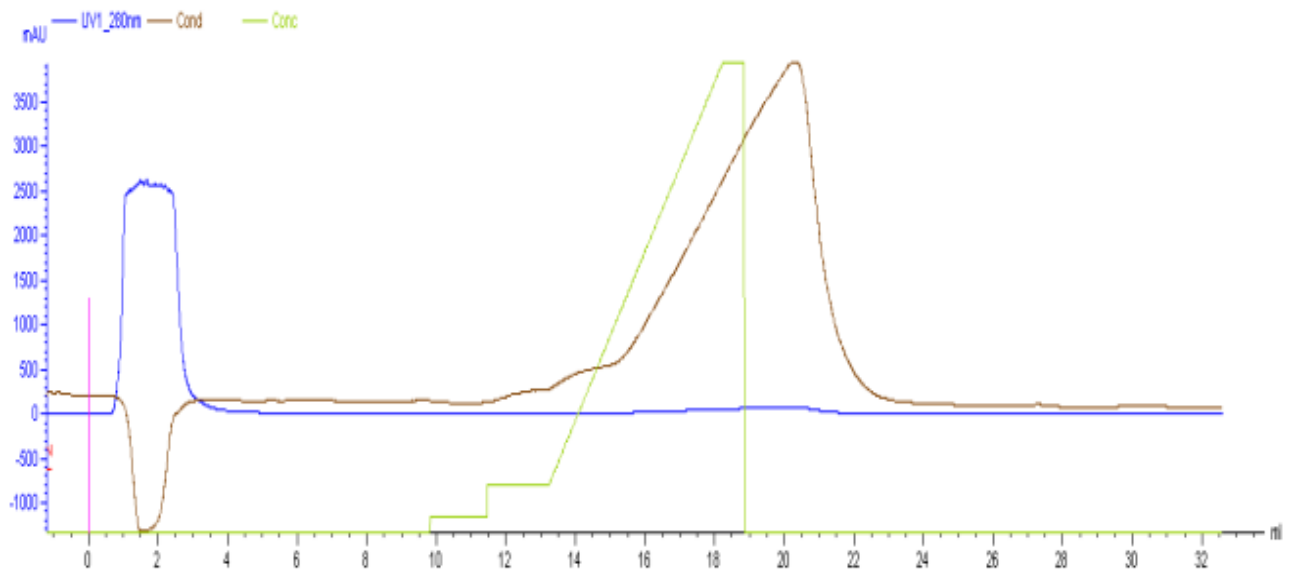


Slika 4: Slika nitrocelulozne membrane po točkovnem nanosu vzorcev. PK – pozitivna kontrola (rCCL2), NK – negativna kontrola (lizat neinducirane kulture), (1) spirek inkluzijskih telesc (v pufu za DNazo), (2) proteini, topni v 10 % sarkozilu (supernatant), (3) proteini, netopni v 10 % sarkozilu, (naknadno raztopljeni v 1 mL 8 M uree), (4) proteini, topni v 1 % sarkozilu, 1,23 % CHAPS in 2% Triton X-100 in.

4.2.4 IMAC (KOVINSKO-KELATNA AFINITETNA KROMATOGRAFIJA)

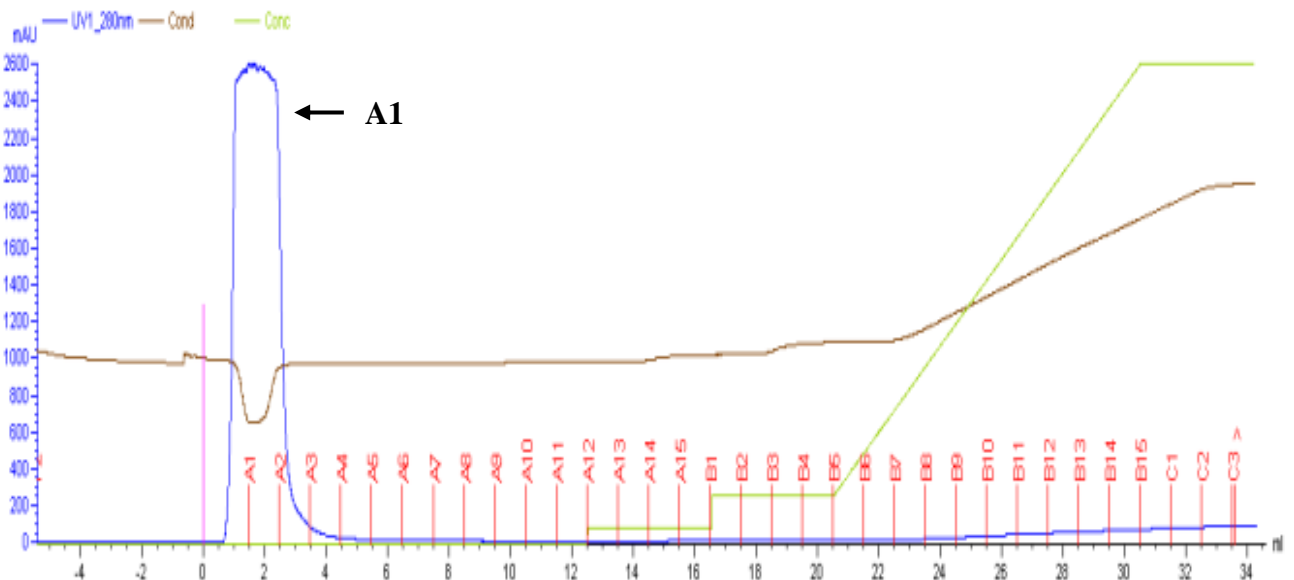
Rekombinantni protein CCL2 smo iz netopne frakcije lizata inducirane kulture poskušali izolirati s kromatografijo IMAC na koloni HiTrap IMAC HP 1 mL, ki je namenjena čiščenju proteinov s heksahistidinskim koncem. Preko peptidne oznake se rekombinantni proteini vežejo na stacionarno fazo imobiliziranih dvovalentnih kovinskih ionov (Ni^{2+}) z relativno visoko specifičnostjo.

Na kolono kovinsko-kelatne afinitetne kromatografije smo najprej nanegli 1 mL slepega vzorca (enaka sestava kot preiskovani vzorec, a brez prisotnosti lizata) in spremljali porast absorbance pri 280 nm. Do porasta absorbance (slika 5) je prišlo zaradi prisotnosti Tritona X-100. Kot vzorec za nanos na kolono smo uporabili netopno frakcijo proteinov iz lizata inducirane kulture, v kateri smo s prenosom western dokazali prisotnost rekombinantnega proteina CCL2.



Slika 5: Kromatogram kovinsko – kelatne afinitetne kromatografije. Na kromatogramu je predstavljena aplikacija 1 mL slepega vzorca.

Pred nanosom netopne frakcije proteinov na kolono smo vzorec najprej raztopili v 10 % raztopini sarkozila, nato pa smo vzorcu dodali še raztopino dveh površinsko aktivnih snovi, raztopljenih v pufri A, Triton X-100 in CHAPS, s katerima smo v kombinaciji s sarkozilom dosegli raztapljanje inkluzijskih telesc in topnost rekombinantnega proteina CCL2 (slika 4). 1 mL tako pripravljenega vzorca smo nanegli na kolono kovinsko-kelatne afinitetne kromatografije.



Slika 6: Kromatogram kovinsko-kelatne afinitetne kromatografije. Na kromatogramu je predstavljena aplikacija 1 mL vzorca na kolono. S puščico je označen vrh, ki pripada na kolono nevezanim komponentam vzorca, ki smo jih analizirali v nadaljevanju.

Po aplikaciji vzorca na kolono smo spremljali porast absorbance pri 280 nm. Do porasta absorbance zaradi prisotnosti proteina ni prišlo (slika 6), saj smo elucijo proteina pričakovali v kasnejših eluiranih frakcijah. Frakcijo A1, pri kateri je prišlo do porasta absorbance, pa smo uporabili v nadaljevanju za metodo točkovnega nanosa, s čimer smo želeli ugotoviti, ali je mogoče v frakciji A1 (ki se ne veže na kolono) prisoten rekombinantni protein CCL2.

Z metodo točkovnega nanosa proteina CCL2 v eluirani frakciji A1 (kjer so prisotni mešani miceli) nismo uspeli detektirati (ni prikazano).

Izolacija rekombinantnega proteina CCL2 s kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo ni bila uspešna. Razlogi za neuspešno izolacijo proteina so lahko različni. Eden od morebitnih razlogov je ta, da je protein CCL2 relativno slabo topen v prisotnosti površinsko aktivnih snovi. Druga, bolj verjetna možnost je, da površinsko aktivne snovi ovirajo interakcijo rekombinantnega proteina z imobiliziranimi nikeljevimi ioni.

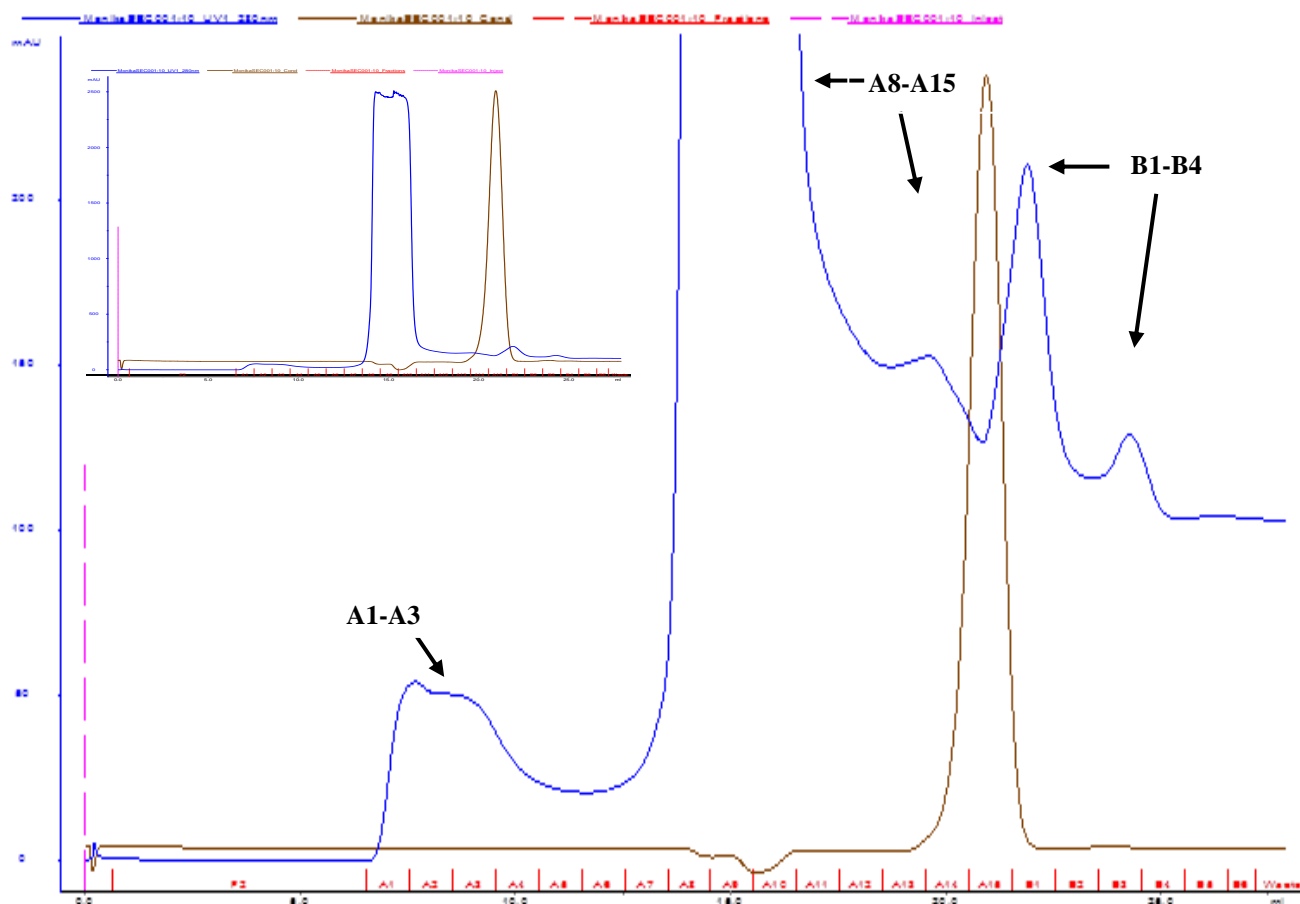
4.2.5 PRELIMINAREN POSKUS LOČITVE MICELOV OD RAZTOPLJENEGA REKOMBINANTNEGA PROTEINA

Gelsko izključitveno kromatografijo smo uporabili kot alternativno metodo kovinsko-kelatni afinitetni kromatografiji, kjer smo želeli ločiti proteine od micelov inkluzijskih telesc.

Kot vzorec za nanos na kolono smo uporabili netopno frakcijo proteinov iz lizata inducirane kulture. Pred nanosom na kolono smo vzorec najprej raztopili v 10 % raztopini sarkozila, nato pa smo vzorcu dodali še raztopino dveh površinsko aktivnih snovi v pufru A, Triton X-100 in CHAPS. 500 μ L tako pripravljenega vzorca smo nato nanegli na kolono gelske izključitvene kromatografije.

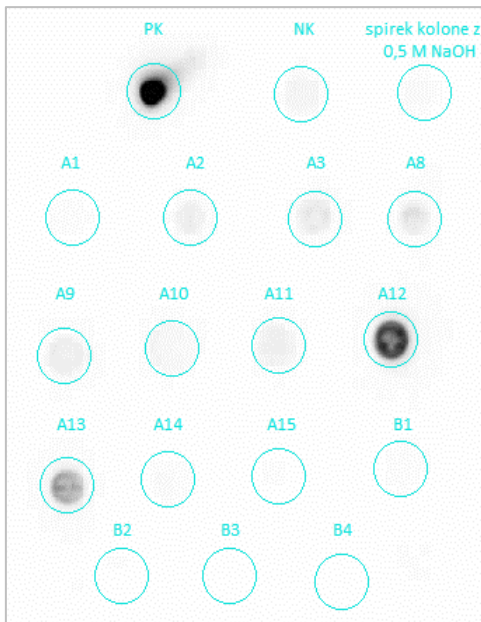
Po aplikaciji vzorca na kolono smo spremljali porast absorbance pri 280 nm (slika 7). Do porasta absorbance je prišlo pri frakcijah od A8-A15, B1-B4, prav tako pa je prišlo do majhnega porasta absorbance pri frakcijah od A1-A3 (slika 7). Zaradi slabe ločbe med posameznimi frakcijami je iz kromatograma slabo razvidno, v katerih frakcijah se nahaja naš protein. Pričakovali smo, da se bo rekombinantni protein CCL2 eluiral med 18-20 mL.

Zaradi slabe ločbe posameznih frakcij ne moremo stodstotno trditi, v kateri frakciji je prisoten rekombinantni protein CCL2, zato smo v nadaljevanju posamezne frakcije uporabili pri točkovnem nanosu, s pomočjo katerega smo ugotavljali, v katerih frakcijah se nahaja rekombinantni protein CCL2.



Slika 7: Kromatogram gelske izključitvene kromatografije. S puščicami so označeni vrhovi s pripadajočimi eluiranimi frakcijami, ki smo jih analizirali v nadaljevanju.

Z metodo točkovnega nanosa smo nato preverili prisotnost rekombinantnega proteina CCL2 v posameznih frakcijah, ki ustrezajo vrhom na kromatogramu (slika 7: A1-A3, A8-A15 in B1-B4). Na nitrocelulozno membrano smo poleg frakcij iz kolone nanесли tudi pozitivno (PK) in negativno (NK) kontrolo, s katerima smo potrdili ustreznost metode, ter spirek kolone z 0,5 M NaOH. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili rekombinantni protein CCL2, kot negativno kontrolo pa smo uporabili lizat neinducirane kulture. Rekombinantne proteine smo detektirani s poliklonskimi protitelesi proti CCL2.



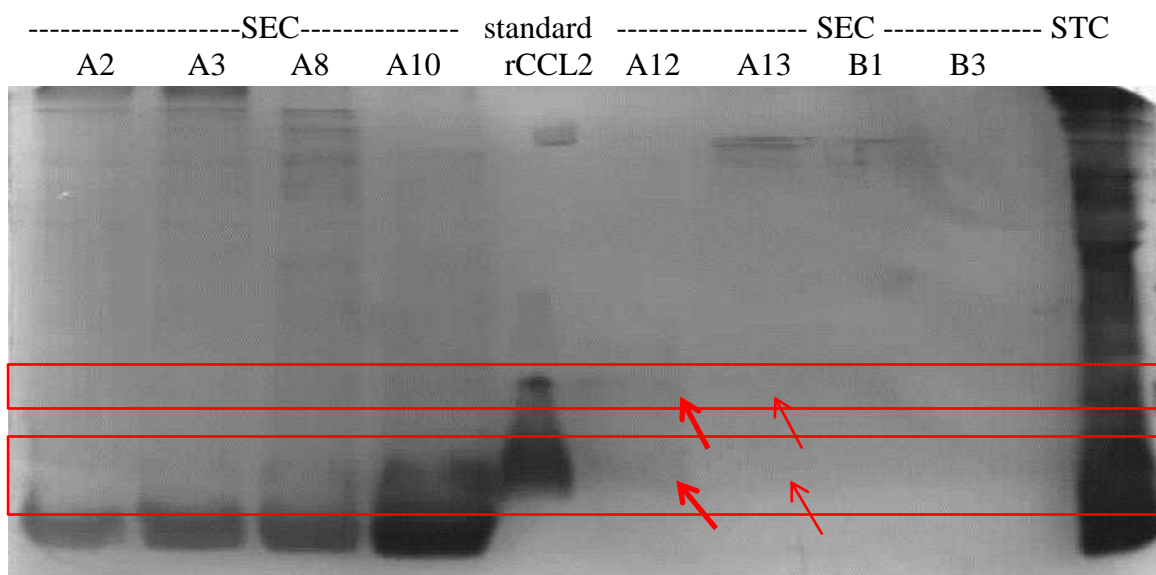
Slika 8: Slika nitrocelulozne membrane po točkovnem nanosu vzorcev. PK – pozitivna (protein CCL2) in NK - negativna kontrola (lizat neinducirane kulture) in spirek kolone z 0,5 M NaOH skupaj z eluiranimi frakcijami, pridobljenimi pri gelski izključitveni kromatografiji.

Iz pridobljenih rezultatov je razvidno (slika 8), da je rekombinantni protein CCL2 prisoten v frakcijah A12 in A13, z večjo intenziteto na mestu nanosa frakcije A12. Pri ostalih frakcijah, ki smo jih nanесли na nitrocelulozno membrano, ni prišlo do obarvanja, zato lahko potrdimo, da v teh frakcijah ni bilo prisotnega proteina CCL2 in da so v vzorcu, ki smo ga nanесли na kolono gelske izključitvene kromatografije poleg našega proteina prisotni tudi drugi proteini in kratki peptidi. V frakcijah od A1-A3 so bili prisotni veliki agregati, ki so prvi prepotovali kolono, v frakcijah od B1-B4 pa so se nahajali majhni proteini, ki so kolono zapustili kot zadnji. Prav tako ni prišlo do obarvanja na mestu, kjer smo nanесли spirek kolone z 0,5 M NaOH, ki predstavlja zelo ostre pogoje na koloni, zato lahko potrdimo, da rekombinantni CCL2 ni precipitiral v koloni.

S pomočjo kromatograma gelske izključitvene kromatografije smo si najprej izbrali frakcije (A2, A3, A8, A10, A12, A13, B1 in B3), ki ustrezajo posameznim vrhom, kjer je prišlo do porasta absorbance (slika 7).

Proteine v frakcijah smo oborili s pomočjo etanola, nato pa smo proteine med seboj ločili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo, s pomočjo katere lahko detektiramo tudi ostale nečistote, ki so prisotne v vzoru. Molekule iz posameznih frakcij so se med seboj ločile na osnovi njihove velikosti oz. relativne molekulske mase.

Na gel poliakrilamidne gelske elektroforeze smo poleg posameznih frakcij, ki smo jih pridobili z gelsko izključitveno kromatografijo, nanegli tudi vzorec STC (netopno frakcijo proteinov iz inducirane kulture velikega alikvota, ki smo jo pridobili po lizi bakterij, smo uporabili za raztapljanje v prisotnosti treh površinsko aktivnih snovi: CHAPS, Triton X-100 in sarkozila).

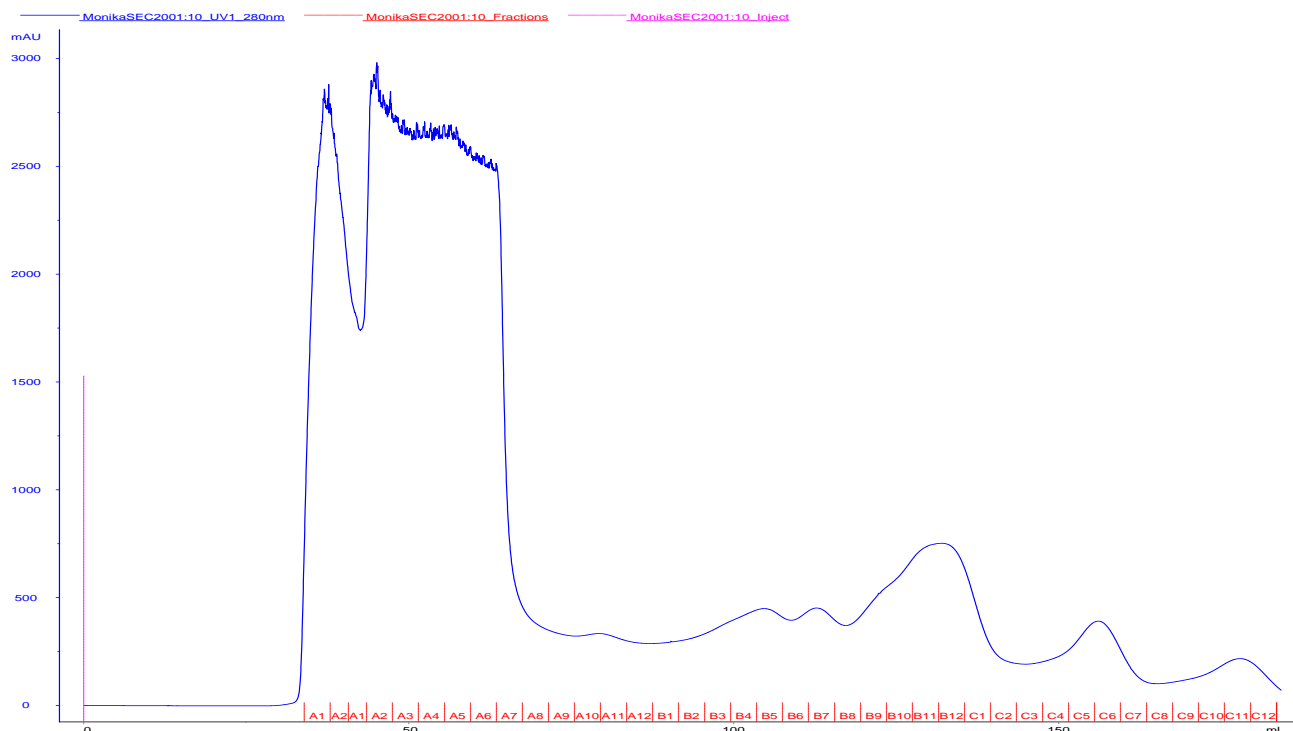


Slika 9: Slika gela po poliakrilamidni gelski elektroforezi. STC – proteini, topni v raztopini 1 % sarkozila, 1,23 % CHAPS in 2% Triton X-100, rCCL2 – rekombinantni CCL2 protein (standard) in eluirane frakcije po gelski izključitveni kromatografiji. S puščicami so označene lise na mestu, kjer se nahaja protein CCL2.

Iz slike gela po poliakrilamidni gelski elektroforezi je razvidno, da je rekombinantni protein CCL2 prisoten v frakciji A12 in A13, vendar v zelo majhni koncentraciji. Tudi do obarvanja je prišlo na pravem mestu glede na standard. Pri vseh ostalih frakcijah ni vidnega obarvanja na mestu, kjer bi se naj (glede na standard) nahajal rekombinantni protein CCL2. Pri vzorcu STC zaradi preveč intenzivnega obarvanja gela s srebrom ni vidna specifična prisotnost rekombinantnega proteina CCL2.

4.2.6 PREPARATIVNA GELSKA IZKLJUČITVENA KROMATOGRFIJA

V tem primeru smo uporabili preparativno kolono Sephacryl S200 16/60 HR, ki dovoljuje nanose vzorcev volumna do 5 mL.

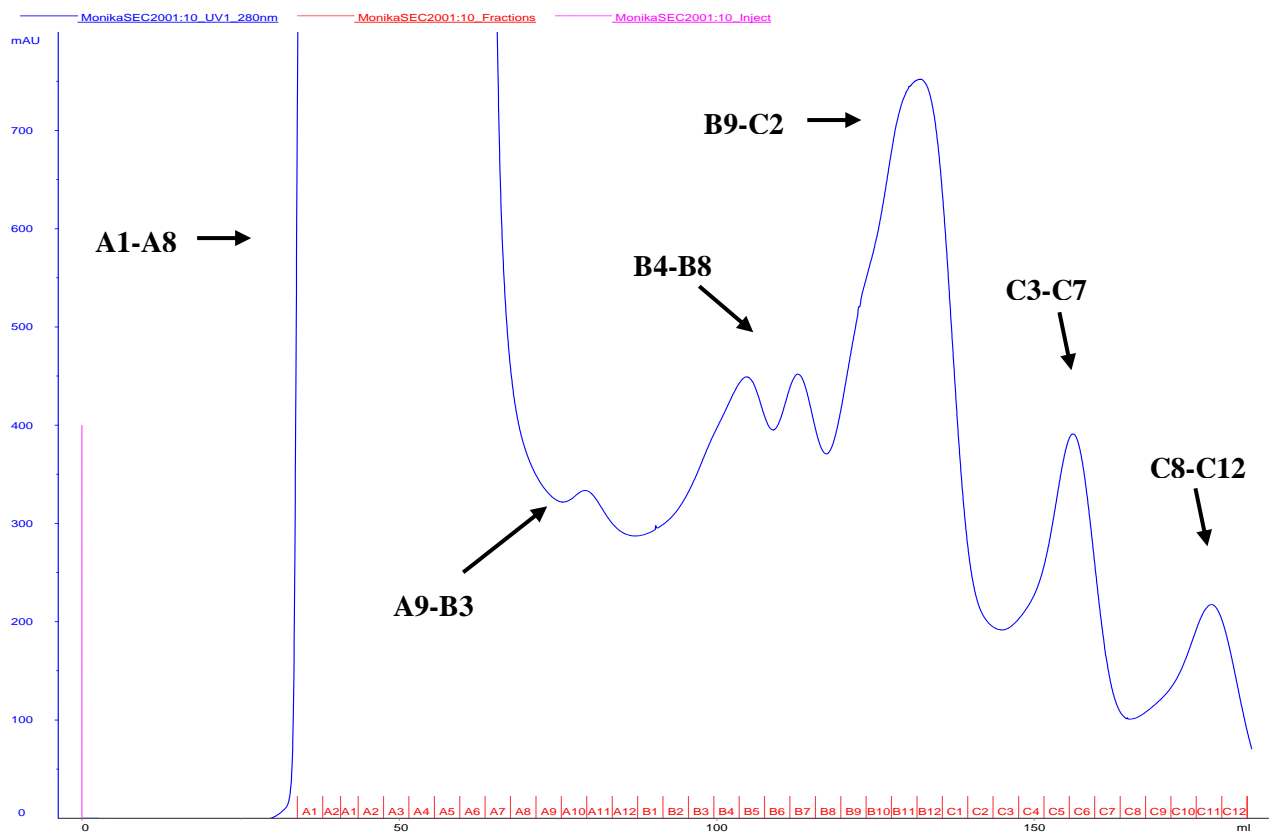


Slika 10: Kromatogram gelske izključitvene kromatografije. Na kolono smo nanegli 4,5 mL vzorca (netopna frakcija proteinov lizata inducirane kulture). Spremljali smo porast absorbance pri 280 nm.

Kot vzorec za nanos na kolono smo uporabili netopno frakcijo proteinov iz lizata inducirane kulture velikega alikvota, ki smo jo pridobili po lizi bakterij. Omenjen vzorec smo pred nanosom na kolono pripravili na enak način kot pri točki 4.2.5. 4,5 mL tako pripravljene vzorca smo nato nanegli na kolono gelske izključitvene kromatografije (sliki 10 in 11).

Po aplikaciji vzorca na kolono smo spremljali porast absorbance pri 280 nm. Do porasta absorbance je prišlo pri frakcijah od A1-A8, A9-B3, B4-B8, B9-C2, C3-C7, prav tako pa je prišlo do majhnega porasta absorbance pri frakcijah od C8-C12 (slika 11). Omenjene frakcije smo nato uporabili pri različnih metodah, ki so opisane v nadaljevanju.

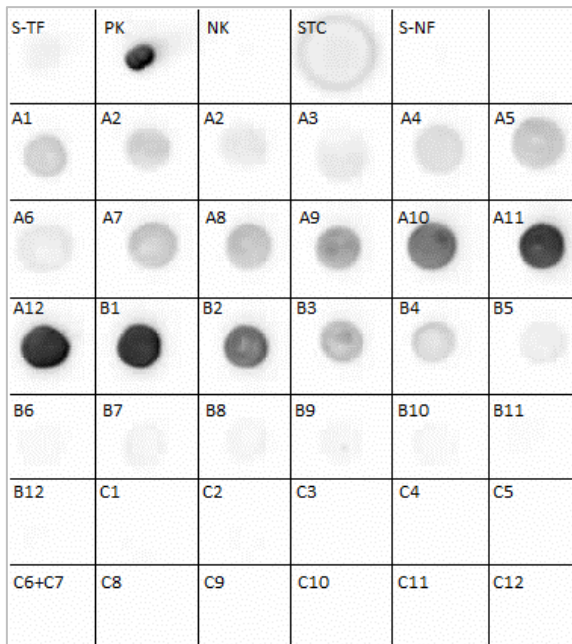
Če med seboj primerjamo kromatograma obeh SEC, tako analizne (4.2.5; slika 7) kot preparativne gelske izključitvene kromatografije (slika 11), lahko opazimo nekatere podobnosti, in sicer velik porast absorbance na začetku in nato majhen vrh tik za njim.



Slika 11: Povečava kromatograma gelske izključitvene kromatografije (slika 10). S puščicami so označeni vrhovi s pripadajočimi eluiranimi frakcijami, ki smo jih analizirali v nadaljevanju.

Z metodo točkovnega nanosa smo v nadaljevanju preverili prisotnost rekombinantnega proteina CCL2 v posameznih frakcijah, ki ustrezajo vrhovom na kromatogramu (slika 11: A1-A8, A9-B3, B4-B8, B9-C2, C3-C7 in C8-C12). Na nitrocelulozno membrano smo poleg frakcij iz kolone nanegli tudi pozitivno (PK) in negativno (NK) kontrolo, s katerima smo potrdili ustreznost metode. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili rekombinantni protein CCL2, kot negativno kontrolo pa smo uporabili lizat neinducirane kulture.

Na nitrocelulozno membrano smo nanegli tudi vzorce, in sicer: S-TF (netopno frakcijo proteinov iz inducirane kulture velikega alikvota, ki smo jo pridobili po lizi bakterij, smo raztopili v 10 % sarkozilu (supernatant)), STC (netopno proteinsko frakcijo smo prav tako uporabili za raztapljanje v prisotnosti treh površinsko aktivnih snovi: CHAPS, Triton X-100 in sarkozil) in S-NF (netopna proteinska frakcija, netopni proteini, ki se niso raztopili v 10 % sarkozilu). Po nanosu vzorcev na membrano je sledila imunodetekcija proteinov s poliklonskimi protitelesi proti CCL2.



Slika 12: Slika nitrocelulozne membrane po točkovnem nanosu vzorcev. STC (protein rCCL2, raztopljen v prisotnosti treh detergentov: CHAPS, Triton X-100 in sarkozil), PK (pozitivna kontrola, standard rCCL2), NK (lizat neinducirane kulture), S-TF (solubilizat lizata oz. proteini, topni v 10 % sarkozilu), S-NF (frakcija lizata oz. proteini, netopni v 10 % sarkozilu) skupaj z eluiranimi frakcijami, pridobljenimi pri gelski izključitveni kromatografiji.

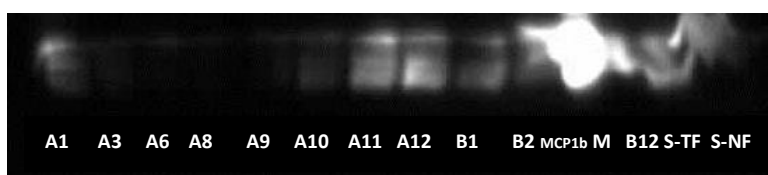
Iz pridobljenih rezultatov je razvidno (slika 12), da je prišlo do obarvanja na mestu nanosa frakcij A8, A9, A10, A11, A12, B1, in B2, to pomeni, da je rekombinantni protein CCL2 prisoten v omenjenih frakcijah. Do rahlega obarvanja je prišlo tudi na mestu nanosa vzorca STC. Pri ostalih frakcijah, ki smo jih nanесли na nitrocelulozno membrano, ni prišlo do obarvanja, zato lahko potrdimo, da v teh frakcijah ni bilo prisotnega proteina CCL2.

Frakcije, v katerih je prisoten protein CCL2, smo v nadaljevanju uporabili pri metodi prenosa western (WB).

Posamezne frakcije (A1, A3, A6, A8, A9, A10, A11, A12, B1, B2 in B12), ki smo jih pridobili pri gelski izključitveni kromatografiji (slika 11), smo nanесли na gel poliakrilamidne gelske elektroforeze, kjer smo proteine iz vzorcev ločili na osnovi njihove velikosti. Vzoredno smo izdelali dva enaka gela, enega od teh smo uporabili za metodo prenosa western, drug gel pa smo po elektroforezni ločitvi obarvali s srebrom. Zaradi slabe obarvanosti rekombinantnega proteina CCL2 (posledica nizke koncentracije proteina v vzorcu) na gelu poliakrilamidne gelske elektroforeze slike nismo prikazali.

S prenosom western smo proteine iz poliakrilamidnega gela prenesli na nitrocelulozno membrano s pomočjo električnega toka. Proteine na membrani smo detektirali s poliklonskimi protitelesi proti CCL2 (kunčje anti-hMCP-1 pAb 9669), katere prepoznajo sekundarna protitelesa – kozja protikunčja IgG, konjugirana s HRP.

Na gel poliakrilamidne gelske elektroforeze smo nanesti tudi vzorce S-TF (netopna frakcija proteinov iz lizata inducirane kulture velikega alikvota, raztopljena v 10 % sarkozilu (supernatant)), S-NF (netopna proteinska frakcija; proteini, ki se niso raztopili v 10 % sarkozilu) in standard (rekombinantni protein CCL2).



Slika 13: Slika nitrocelulozne membrane po prenosu western. S-TF (solubilizat lizata oz. topni proteini v 10 % sarkozilu), S-NF (frakcija lizata oz. netopni proteini v 10 % sarkozilu), rekombinantni CCL2 protein (standard), M – marker (proteinski standard, označevalec velikosti) skupaj z eluiranimi frakcijami, pridobljenimi pri gelski izključitveni kromatografiji.

Z metodo prenosa western smo dokazali, da se rekombinantni protein CCL2 res nahaja v vzorcu S-TF, to pomeni, da se večina rekombinantnega proteina CCL2 raztopi v 10 % sarkozilu. Iz pridobljenih rezultatov je prav tako razvidno, da se protein CCL2 nahaja v frakciji A11, A12 in B1, vendar v relativno majhni koncentraciji. Pri ostalih frakcijah, ki smo jih analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo, ni vidnega obarvanja, kar pomeni, da v teh frakcijah ni prisotnega rekombinantnega proteina CCL2.

4.2.7 KOVINSKO – KELATNA AFINITETNA KROMATOGRFIJA

Ligand Ni^{2+} -NTA je vezan na nosilec, v našem primeru je to agarozna, ki predstavlja stacionarno fazo kovinsko-kelatne afinitetne kromatografije. Prednost te metode je visoka učinkovitost in visoka specifičnost.

Kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija omogoča učinkovito izolacijo in čiščenje fuzijskih proteinov s polihistidinskim koncem. Moč oz. učinkovitost vezave proteina na stacionarno fazo pa je odvisna od kovinskega iona in vrednosti pH mobilne faze.

Agarozo s koordinatno vezanimi Ni²⁺-ioni smo inkubirali z združenimi frakcijami, ki smo jih pridobili pri gelski izključitveni kromatografiji (pod točko 4.2.6; frakcije A11, A12 in B1) in za katere smo s pomočjo metode prenosa western dokazali, da vsebujejo rekombinantni protein CCL2. Po spiranju smo v kolono pričeli dodajati elucijski pufer B po 500 µL, istočasno pa smo zbirali frakcije po 500 µL. Zbrali smo 10 frakcij in spremljali njihovo absorbanco pri valovni dolžini 280 nm. Najvišjo absorbanco sta imela eluata 3 in 4 (ni prikazano), zato smo ju združili. Eluata smo skoncentrirali s pomočjo ultrafiltracije in z metodo po Bradfordu določili koncentracijo proteinov (CCL2).

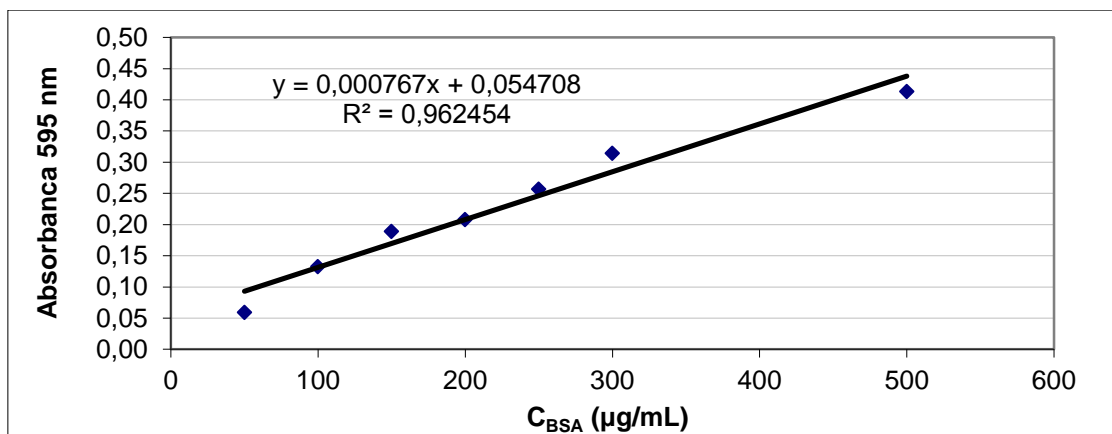
4.2.8 DOLOČITEV KONCENTRACIJE CCL2 PO BRADFORDU

S pomočjo metode po Bradfordu smo v združenem koncentriranem eluatu, ki smo ga pridobili po kovinsko-kelatni afinitetni kromatografiji, določili koncentracijo proteina CCL2. Za standard smo uporabili raztopino BSA različnih koncentracij v elucijskem pufru, kot je predstavljeno v preglednici V. Pri izdelavi umeritvene premice smo uporabili znane koncentracije BSA v območju od 50 do 500 µg/mL.

Preglednica V: Rezultati meritev absorbance vzorcev pri 595 nm.

C _{BSA} [µg/mL]	A _{595 nm}		A povprečna	A povprečna - A-slepa
0	0,3398	0,3489	0,3444	0,0000
50	0,4038	0,3998	0,4034	0,0591
100	0,4791	0,4746	0,4769	0,1325
150	0,5239	0,5421	0,5330	0,1887
200	0,5977	0,5043	0,5521	0,2078
250	0,5692	0,6323	0,6008	0,2564
300	0,677	0,6394	0,6582	0,3139
500	0,7565	0,7587	0,7576	0,4133

Absorbanco vsakega standarda smo neodvisno pomerili dvakrat (A₁ in A₂), nato pa iz teh podatkov izračunali povprečno vrednost (A_{povprečna}). Od povprečne vrednosti smo nato odšteli absorbanco slepega vzorca (A_{povprečna} - A_{slepa}) (preglednica V).



Slika 14: Umeritvena premica za določitev koncentracije CCL2 z metodo po Bradfordu na osnovi znanih koncentracij BSA, ki smo ga uporabili kot standard.

S pomočjo umeritvene premice (slika 14) smo ocenili koncentracijo proteina CCL2 na ~970 µg/mL (preglednica VI). Ocena je zgolj približna, saj je izmerjena vrednost absorbance vzorca nekoliko višja od absorbance standarda najvišje koncentracije, poleg tega smo kot standard uporabili drug protein (BSA in ne CCL2). Upoštevajoč volumen 100 µL je masa rekombinantnega CCL2 v izolatu ~97 µg, kar pomeni izplen ~194 µg/liter bakterijske kulture.

Preglednica VI: Določitev koncentracije CCL2 v koncentriranem eluatu z metodo po Bradfordu.

eluat	A _{595 nm}		A povprečna	A povprečna - A-slepa
2x redčeno	0,7760	0,7678	0,7719	0,4276
				↓
			ocenjena koncentracija CCL2	486 µg/mL
			C ₀ *=	972 µg/mL*

* Vzorec smo pred merjenjem redčili v razmerju 1:1 z elucijskim pufrom B.

4.2.9 TOČKOVNI NANOS za oceno ustreznosti zvitja rCCL2

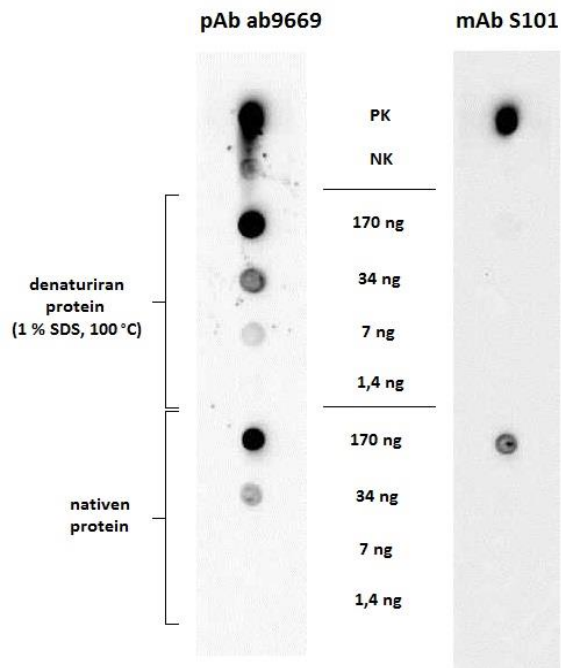
Z metodo točkovnega nanosa z detekcijo z monoklonskimi protitelesi mAb S101 smo želeli ugotoviti, ali se rekombinantni protein CCL2 zvije v nativno konformacijo. Monoklonska protitelesa mAb S101 prepoznajo le nativni CCL2, medtem ko poliklonska protitelesa pAb ab9669 prepoznajo tako nativni kot tudi denaturiran CCL2.

Na dve nitrocelulozni membrani smo najprej nanegli pozitivno (PK) in negativno (NK) kontrolo (rekombinantni protein CCL2 oz. lizat neinducirane kulture). Na nitrocelulozni membrani smo nato nanegli vzorce na način, kot je predstavljen v preglednici VII. Pripravili smo 8 vzorcev z različnimi koncentracijami proteina CCL2. Štirim od teh vzorcev smo dodali raztopino 1 % SDS in β -merkaptotanol in jih postavili na vodno kopel (100 °C), s čimer smo zagotovili popolno denaturacijo proteinov. Po nanosu vzorcev na membrano je sledila imunodetekcija proteinov s poliklonskimi in monoklonskimi protitelesi proti CCL2.

Preglednica VII: Nanos vzorcev na nitrocelulozni membrani.

1 μ L	PK – pozitivna kontrola (CCL2)	1 μ L
2 μ L	NK – negativna kontrola (lizat neinducirane kulture)	2 μ L
3 μ L	denaturiran protein (1 % SDS) - 170 ng	3 μ L
3 μ L	denaturiran protein (1 % SDS) - 34 ng	3 μ L
3 μ L	denaturiran protein (1 % SDS) - 7 ng	3 μ L
3 μ L	denaturiran protein (1 % SDS) – 1,4 ng	3 μ L
3 μ L	nativen protein - 170 ng	3 μ L
3 μ L	nativen protein – 34 ng	3 μ L
3 μ L	nativen protein – 7 ng	3 μ L
3 μ L	nativen protein – 1,4 ng	3 μ L

Iz nitrocelulozne membrane, kjer smo uporabili poliklonska protitelesa, lahko vidimo (slika 15), da pride do obarvanja tako pri denaturiranem, kot tudi pri nativnem proteinu, saj poliklonska protitelesa prepoznavajo denaturiran in nativen CCL2. Do močnejše intenzitete obarvanja je prišlo pri denaturiranih vzorcih v primerjavi z vzorci, ki jih nismo denaturirali. Moč obarvanja pa s koncentracijo pada tako pri denaturiranem kot tudi pri nativnem proteinu.



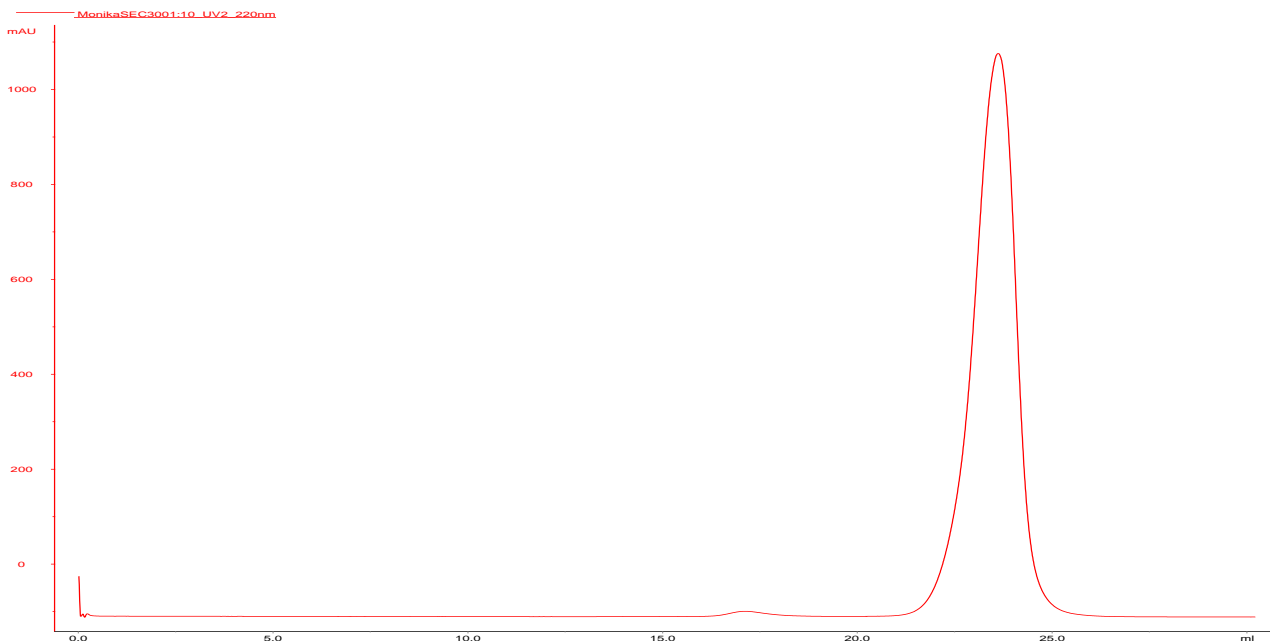
Slika 15: Slika nitrocelulozne membrane po točkovnem nanosu. PK (pozitivna kontrola, protein CCL2) in NK (lizat neinducirane kulture) skupaj z vzorci, ki smo jih pripravili pred nanosom na membrano.

Na nitrocelulozni membrani, kjer smo za detekcijo uporabili monoklonska protitelesa, pa lahko vidimo, da je prišlo do rahlega obarvanja samo pri nedenaturiranem vzorcu najvišje koncentracije, saj monoklonska protitelesa prepoznava samo nativni CCL2, zato ni prišlo do obarvanja pri denaturiranih vzorcih.

S tem ko so monoklonska protitelesa prepoznala le CCL2, ki ga nismo denaturirali, smo posredno dokazali, da se je rekombinantni protein CCL2 ustrezno zvil v nativno konformacijo.

4.2.10 ANALIZNA GELSKA IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA

V tem primeru smo uporabili kolono SUPERDEX 200 10/300 GL, s pomočjo katere smo želeli določiti čistost rekombinantnega proteina CCL2 v vzorcu.

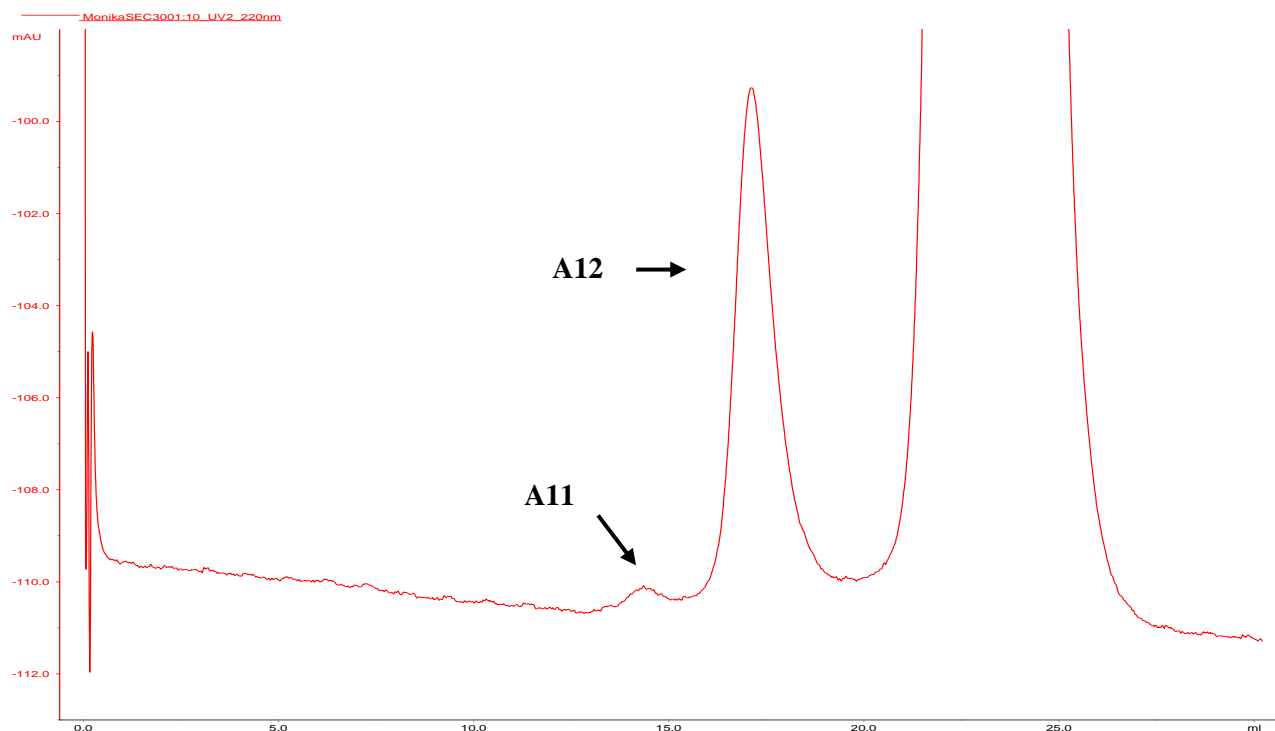


Slika 16: Kromatogram gelske izključitvene kromatografije. Na kolono smo nanесли 100 μ L vzorca. Spremljali smo porast absorbance pri 220 nm.

Kot vzorec za nanos na kolono smo uporabili združen koncentriran eluat (3 in 4), ki smo ga pridobili pri kovinsko-kelatni afinitetni kromatografiji (4.2.7). Na kolono analize gelske izključitvene kromatografije smo nanесли 100 μ L vzorca (slika 16).

Po aplikaciji vzorca na kolono smo spremljali porast absorbance pri 280 nm. Do porasta absorbance je prišlo pri frakciji A11 in A12, kar je razvidno tudi iz kromatograma (slika 17).

Do porasta absorbance je prišlo na mestih, kjer smo pričakovali (glede na predhodne raziskave, ki so pokazale, da se dimer CCL2 eluira pri \sim 15 mL, monomer pa med 17-18 mL) (63). Zadnji velik vrh na kromatogramu je posledica prisotnosti imidazola, ki absorbira pri enaki absorbanci kot protein CCL2. Vrha, označena z A11 in A12 verjetno pripadata dimeru in monomeru CCL2.

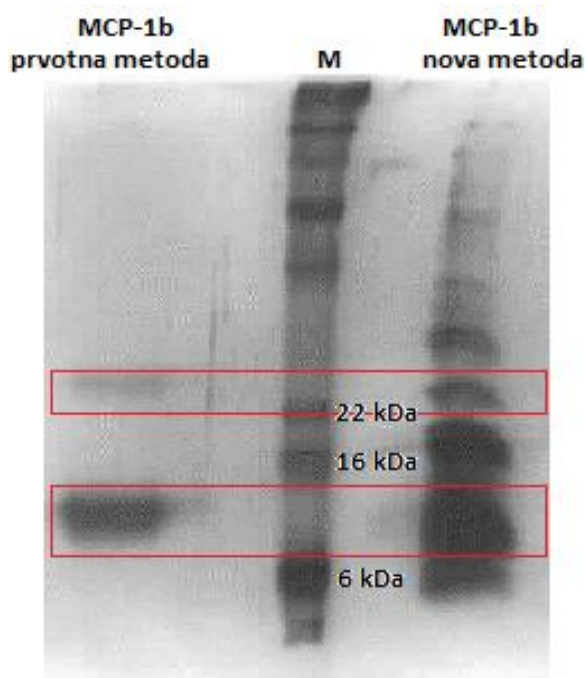


Slika 17: Povečava kromatograma gelske izključitvene kromatografije (slika 16). S puščicami so označeni vrhovi s pripadajočimi eluiranimi frakcijami, ki smo jih analizirali v nadaljevanju.

Izoliran protein rCCL2 (koncentrirani eluirani frakciji 3 in 4 po kovinsko-kelatni afinitetni kromatografiji) smo analizirali še s SDS-PAGE primerjalno z rCCL2, izoliranim po prvotni metodi (63), in smo ga tekom celotne diplomske naloge uporabljali kot standard.

Za detekcijo rekombinantnih proteinov CCL2 na gelu poliakrilamidne gelske elektroforeze smo uporabili metodo barvanja s srebrom, ki ni kvantitativna metoda. Pri metodi barvanja s srebrom se lahko močno obarvajo tudi proteini, ki so prisotni v relativno majhnih količinah, saj ni linearne povezave med maso proteina in odzivom. Zaradi nelinearne povezave med maso proteina in odzivom je po barvanju s srebrom na gelu možno opaziti številne nečistote (slika 18), ki pa jih na kromatogramu gelske izključitvene kromatografije (slika 17) nismo opazili in verjetno predstavljajo relativno majhen odstotek vseh proteinov.

Kljub temu je koncentracija rekombinantnega proteina CCL2 v končnem vzorcu, ki smo jo ocenili z metodo po Bradfordu, precenjena.



Slika 18: Slika s srebrom obarvanega gela po poliakrilamidni gelski elektroforezi. rCCL2 (prvotna metoda) – rekombinantni CCL2 protein (standard), M – marker (proteinski standard, označevalec velikosti) in rCCL2 (nova metoda) – rekombinantni CCL2 protein v našem vzorcu.

S poliakrilamidno gelsko elektroforezo smo potrdili, da je rekombinantni protein CCL2 prisoten v koncentriranem združenem eluatu (3 in 4), saj pride do obarvanja na mestu, kjer se glede na standard nahaja rekombinantni protein CCL2, kar je razvidno iz slike gela (slika 18). Na podoben način smo analizirali tudi eluirani frakcij A11 in A12 (analizna izključitvena kromatografija, slika 17), a rekombinantnega proteina nismo uspeli detektirati, kar pripisujemo zelo nizki koncentraciji CCL2 v eluatih (ni prikazano).

Iz zbranih rezultatov lahko sklepamo, da smo rekombinantni CCL2 z uporabo kombinacije površinsko aktivnih snovi sicer uspeli izolirati, a je bil ta precej manj čist kot tisti, izoliran s prvotno metodo. Hkrati ima nova metoda glede na staro približno 2,3-krat nižji izkoristek (194 $\mu\text{g/L}$ proti 440 $\mu\text{g/L}$ bakterijske kulture) in ne predstavlja pomembne izboljšave postopka izolacije.

5. SKLEP

V magistrskem delu smo na primeru humanega proteina CCL2 preizkusili metodo izolacije rekombinantnega proteina CCL2 iz inkluzijskih telesc s solubilizacijo s kombinacijo površinsko aktivnih snovi sakrozila, CHAPS in Triton X-100. Molekule sakrozila obdajo proteine in na tak način raztopijo agregate. Triton X-100 in CHAPS pa tvorita velike mešane micele, ki domnevno vključujejo molekule sakrozila iz raztopine. Pri tem se zmanjša koncentracija sakrozila v neposredni okolici rekombinantnega proteina, posledično pa pride do sprostitve aktivnih mest in pravilnega zvitja rekombinantnega proteina CCL2.

Po raztapljanju inkluzijskih telesc smo s pomočjo kovinsko-kelatne afinitetne kromatografije (IMAC) poskušali izolirati in koncentrirati rekombinantni protein CCL2 iz raztopine, vendar je bil poskus žal neuspešen. Domnevamo, da so miceli motili interakcije rekombinantnega proteina CCL2 z imobiliziranimi nikljevimimi ioni. Zato smo micele in rekombinantni protein ločili s pomočjo gelske izključitvene kromatografije (SEC) in nato ponovili poskus vezave rCCL2 iz raztopine na kolono za kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo. Poskus izolacije in koncentriranja rekombinantnega proteina CCL2 je bil tokrat uspešen.

Izoliran rekombinantni protein CCL2 smo nato analizirali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (SDS-PAGE), gelsko izključitveno kromatografijo (SEC) in točkovnim nanosom (DB-dot blot), s katerim smo želeli ugotoviti ustreznost zvitja rekombinantnega proteina CCL2 v nativno konformacijo. Uporabili smo monoklonska (mAb) in poliklonska (pAb) protitelesa, kjer monoklonska protitelesa-mAb prepoznajo le nativni CCL2, med tem ko poliklonska protitelesa-pAb prepoznajo tako nativni, kot tudi denaturiran CCL2.

Čistost izoliranega rekombinantnega proteina CCL2 smo primerjali s tistim, ki ga je v svojem magistrskem delu izolirala Ana Matelič (63) po prvotni metodi. Ugotovili smo, da je rekombinantni protein CCL2, pridobljen z novo metodo, precej manj čist v primerjavi z rekombinantnim proteinom, pridobljenim po prvotni metodi.

Prav tako smo primerjali izkoristek izolacije obeh metod in ugotovili, da je izkoristek izolacije rekombinantnega proteina CCL2 pridobljenega po novi metodi približno 2,3-krat manjši v primerjavi z izkoristkom izolacije rekombinantnega proteina CCL2 po prvotni metodi (194 $\mu\text{g/L}$ proti 440 $\mu\text{g/L}$ bakterijske kulture).

Glede na pridobljene rezultate in nadaljnje ugotovitve lahko zaključimo, da je poskus izolacije rekombinantnega proteina CCL2 z novo metodo ustrezen, saj smo izolirali rekombinantni protein CCL2 v nativni konformaciji. V primerjavi nove metode s prvotno pa nova metoda ne predstavlja pomembne izboljšave postopka izolacije rekombinantnega proteina, saj sta čistost proteina in izkoristek izolacije veliko nižja.

6. LITERATURA

1. Arakawa T, Philo JS. Biophysical and Biochemical Analysis of Recombinant Proteins. V: Crommelin DJA, Sindelar RD: Pharmaceutical Biotechnology: An Introduction for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists, Second Edition. Taylor & Francis, London, VB, 2002: 46-49.
2. Pines O, Inouye M: Expression and Secretion of Proteins in *E. coli*. Molecular Biotechnology 1999; 12: 25-34.
3. Baneyx F: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Current Opinion in Biotechnology 1999; 10: 411-421.
4. Chen R: Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. Biotechnology Advances 2012; 12: 1102–1107.
5. Jong HC, Ki Chang K, SangYL: Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli*. Chemical Engineering Science 2006; 61: 876–885.
6. Sørensen HP, Mortensen KK: Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology 2005; 115: 113–128.
7. Mergulhão FJM, Summers DK, Monteiro GA: Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. Biotechnology Advances 2005; 23: 177–202.
8. Hauke L, Schwarz E, Rainer R: Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. Current Opinion in Biotechnology 1998; 9: 497-501.
9. Kane JF, Hartley DL: Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. Trends in Biotechnology 1988; 6: 95–101.
10. Fahnert B, Lilie H, Neubauer P: Inclusion bodies: Formation and utilization. Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology 2004; 89: 93-142.
11. Surinder MS, Amulya KP: Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. Journal of Bioscience and Bioengineering 2005 No. 4; Vol. 99: 303–310.
12. Jungbauer A, Kaar W, Schlegl R: Folding and refolding of proteins in chromatographic beds. Current Opinion in Biotechnology 2004; 15: 487–494.
13. De Bernardez Clark E: Protein refolding for industrial processes. Current Opinion in Biotechnology 2001; 12: 202–207.

14. Walsh G: Biopharmaceutical benchmarks 2003. *Nature Biotechnology* 2003; 21: 865–870.
15. Speed MA, Wang DI, King J: Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: The molecular basis of inclusion body composition. *Nature Biotechnology* 1996; 14: 1283–1287.
16. Clark ED: Refolding of recombinant proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 1998; 9: 157–163.
17. 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; 37: 225–235.
18. Katoh S, Katoh Y: Continuous refolding of lysozyme with fed-batch addition of denatured protein solution. *Process Biochemistry* 2000; 35: 1119–1124.
19. Valejo LF, Rinas U: Optimized procedures for renaturation of recombinant human bone morphogenic protein-2 at high protein concentration. *Biotechnology and Bioengineering* 2004; 85: 601–609.
20. Batas B, Chaudhuri JB: Protein folding at high concentration using size exclusion chromatography. *Biotechnology and Bioengineering* 1996; 50: 16–23.
21. 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.
22. Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL: *Size Exclusion Chromatography (SEC) Separations Module: Practical HPLC Method Development*; Wiley; New York 1997.
23. Size Exclusion Chromatography (SEC), <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/sep/lc/size-exc.html>, 03-2014.
24. Size Exclusion Chromatography Protocol/Guide, <http://web.mnstate.edu/provost/SizeExclusionProtocol.pdf>, 03-2014.
25. Karlström AE, Hober S: Chromatographic methods for protein purification. Royal Institute of Technology, AlbaNova University Center, Department of Biotechnology, Stockholm, Sweden; 5: 27-29.
26. Jian L, Weiqing Z, Zhiguo S, Guanghui M, Tingyue G: Comparison of fully-porous beads and cored beads in size exclusion chromatography for protein purification. *Chemical Engineering Science* 2013; 102: 99–105.

27. Tayyab S, Qamar S, Mozaffarul I: Size Exclusion Chromatography and Size Exclusion HPLC of Proteins. *Biochemical Education* 1991; Vol.9 Issue 3: 149-152.
28. Size Exclusion Chromatography, <http://www.shimadzu.com/an/hplc/support/lib/lectalk/55/55intro.html>, 04-2014.
29. Jan-Christen Janson: Protein purification: principles, high resolution methods and applications, 3.izdaja, Hoboken, N.J.:Wiley 2007.
30. Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G: Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 1975; 258: 598-599.
31. Kågedal L, Janson JC, Rydén L: Protein Purification: Principles, High-Resolution Methods, and Applications. 2 izdaja, Wiley-VCH, New York, 1998; 8: 311-342.
32. Ueda EKM, Gout PW, Morganti L: Current and prospective applications of metal ion-protein binding. *Journal of Chromatography A* 2003; 988: 1-23.
33. Knecht S, Ricklin D, Eberle AN, Ernst B: Oligohis-tags: Mechanisms of binding to Ni²⁺ NTA surfaces. *Journal of Molecular Recognition* 2009; 22: 270-279.
34. Pearson RG: Hard and soft acids and bases, HSAB. *Journal of Chemical Education* 1968; 45: 549-624.
35. Porath J: IMAC-immobilized metal ion affinity based chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 1988; 7: 254-259.
36. Porath J, Olin B: Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity of chromatography of biomaterials: serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry* 1983; 22: 1621-1630.
37. Karlström AE, Hober S: Chromatographic methods for protein purification. Royal Institute of Technology, AlbaNova University Center, Department of Biotechnology, Stockholm, Sweden; 4: 24-26.
38. Tao H, Liu W, Simmons BN, Harris HK, Cox TC, Massiah MA: Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS. *BioTechniques* 2010; 48:61-64.
39. Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K: *Short Protocols in Molecular Biology* 1995, John Wiley & Sons.
40. Lilie H, Schwarz E, Rudolph R: Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 1998; 9: 497-501.
41. Arakawa T, Timasheff SN: The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical Journal* 1985; 47:411-414.

42. Bogdanov M, Dowhan W: Lipid-assisted protein folding. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 36827-36830.
43. Yadav A, Saini V, Arora S: MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. *Clinica Chimica Acta* 2010; 411: 1570–1579.
44. Wu VY, Walz DA, McCoy LE: Purification and characterization of human and bovine platelet factor 4. *Preparative Biochemistry* 1977; 7:479–493.
45. Dzenko KA, Andjelkovic AV, Kuziel WA, Pachter JS: The Chemokine Receptor CCR2 Mediates the Binding and Internalization of Monocyte Chemoattractant Protein-1 along Brain Microvessels. *The Journal of Neuroscience* 2001; 21(23): 9214–9223.
46. Rollins BJ: Chemokines. *Blood* 1997; 90: 909–928.
47. Rossi D, Zlotnick A: The biology of chemokines and chemokine receptors. *Annual Review of Immunology* 2000; 18: 217–242.
48. Fouillet A, Mawsona J, Sulimana O, Sharrack B, Romero IA, Woodroffe MN: CCL2 binding is CCR2 independent in primary adult human astrocytes. *Brain Research* 2012; 115-126.
49. Proost P, Wuyts A, Van Damme J: Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *Journal of Leukocyte Biology* 1996; 59: 67–74.
50. Wagner W, Roderburg C, Wein F: Molecular and secretory profiles of human mesenchymal stromal cells and their abilities to maintain primitive hematopoietic progenitors. *Stem Cells* 2007; 25: 2638–2647.
51. Xia Y, Frangogiannis NG: MCP-1/CCL2 as a therapeutic target in myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy. *Inflammation and Allergy Drug Targets* 2007; 6: 101–107.
52. Baggiolini M, Loetscher P: Chemokines in inflammation and immunity. *Immunology Today* 2000; 21: 418–20.
53. Schall TJ, Bacon KB: Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Current Opinion in Immunology* 1994; 6: 865–873.
54. Lukacs NW: Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nature Reviews Immunology* 2001; 1: 108–116.

55. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE: Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1): An overview. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 2009; 29(6):313–326.
56. Rot A, von Andrian UH: Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annual Reviews in Immunology* 2004; 22: 891–928.
57. Gouwy M, Struyf S, Catusse J, Proost P, Van Damme J: Synergy between proinflammatory ligands of G-protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration. *Journal of Leukocyte Biology* 2004; 76: 185-194.
58. Lodi PJ, Garrett DS, Kuszewski J: High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR. *Science* 1994; 263: 1762–7.
59. Gu L, Tseng SC, Rollins BJ: Monocyte chemoattractant protein-1. *Chemical Immunology* 1999; 72: 7–29.
60. Newton RC, Vaddi K: Biological responses to C-C chemokines. *Methods in Enzymology* 1997; 287:174–186.
61. Reid C, Rushe M, Jarpe M, van Vlijmen H, Dolinski B, Cachero TG, Cuervo H, Yanachkova M, Nwankwo C, Wang X, Etienne N, Garber E, Bailly V, de Fougères A, Boriack-Sjodin PA: Structure activity relationships of monocyte chemoattractant proteins in complex with a blocking antibody. *Protein Engineering, Design and Selection* 2006; 19(7): 317-324.
62. Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, Ozaki M, Hirase T, Ishida T, Inoue N, Hirata K, Matsukawa A, Morishita R, Kaneda Y, Yokoyama M: Local overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2002; 22: 115–120.
63. Matelič A: Diplomska naloga: Kartiranje epitopov nevtralizacijskih protiteles proti kemokinu CCL2. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2013.