

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

AJDA BOŽIČ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA
FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

AJDA BOŽIČ

**OPTIMIZACIJA PRIDOBIVANJA IN ČIŠČENJA DVEH
REKOMBINANTNIH PROTEINOV**

**OPTIMIZATION OF PRODUCTION AND PURIFICATION OF
TWO RECOMBINANT PROTEINS**

MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA
FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala v podjetju Jafral, Biotehnoške raziskave in razvoj, d.o.o. pod so mentorstvom dr. Francija Smrekarja in mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder.

Zahvala

Rada bi se zahvalila vsem sodelavcem v podjetju Jafral d.o.o., ki so me sprejeli in mi tako omogočili opravljanje magistrske naloge v njihovem podjetju. Posebna zahvala gre dr. Franciju Smrekarju za strokovno vodenje, Žigu Kalčič za njegove nasvete glede uporabe kemikalij in Anamariji Alegro za uvajanje v laboratorijsko delo, pomoč tekom naloge, nasvete ter vso potrpežljivost med delom.

Zahvalila bi se tudi svoji mentorici dr. Mojci Lunder za strokovno pomoč pri pisanju naloge, vzpodbudne besede in natančen pregled magistrskega dela.

Zahvala gre tudi mojim staršem, ki so mi stali ob strani in me podpirali tekom celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder in so mentorstvom dr. Francija Smrekarja.

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanko Srčič

Član diplomske komisije: doc. dr. Jožko Cesar

KAZALO

1	UVOD	1
1.1	REKOMBINANTNI PROTEINI	1
1.2	EKSPRESIJSKI SISTEM <i>Escherichia coli</i>	1
1.3	STAFILOKOKNI PROTEIN A	4
1.4	LEPTIN.....	5
1.5	SISTEM ZA IZRAŽANJE pET	8
1.6	POLIHISTIDINSKI PODALJŠEK »His-Tag«	9
1.7	KOVINSKO-KELATNA KROMATOGRAFIJA.....	10
1.8	POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA LAVRILSULFATA	11
1.9	BIOREAKTOR.....	11
1.10	PRENOS TEHNOLOGIJE V VEČJE MERILO	12
2	NAMEN DELA	15
3	MATERIALI IN METODE	16
3.1	MATERIALI	16
3.1.1	Laboratorijska oprema.....	16
3.1.2	Kemikalije	17
3.1.3	Pufri, raztopine in gojišča.....	19
3.2	METODE.....	21
3.2.1	Priprava bakterijske kulture na trdnem gojišču	21
3.2.2	Priprava gojišča	21
3.2.3	Priprava založne kulture	21
3.2.4	Izražanje rekombinante domene B stafilokoknega proteina A v kulturi <i>E. coli</i> BL21/pLysS/pET28/BD	22

3.2.5	Izražanje rekombinantne leptin vezavne domene v kulturi <i>E. coli</i> BL21/pLysS/pET28/LBD.....	23
3.2.6	Določevanje celokupne koncentracije proteinov.....	24
3.2.7	Čiščenje rekombinantnih proteinov s kovinsko-kelatno kromatografijo	24
3.2.8	Ločevanje rekombinantnih proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega laurilsulfata	25
3.2.9	Gojenje v bioreaktorju in prenos v večje merilo	27
4	REZULTATI.....	30
4.1	OPTIMIZACIJA IZRAŽANJA DOMENE B STAFILOKOKNEGA PROTEINA A.....	30
4.2	OPTIMIZACIJA IZRAŽANJA LEPTIN VEZAVNE DOMENE	41
5	RAZPRAVA	49
5.1	OPTIMIZACIJA IZRAŽANJA DOMENE B STAFILOKOKNEGA PROTEINA A.....	49
5.2	OPTIMIZACIJA IZRAŽANJA LEPTIN VEZAVNE DOMENE	53
6	SKLEP.....	56
7	LITERATURA	58

KAZALO SLIK IN TABEL

Preglednica I: Meritve standardne koncentracije proteinov z metodo BCA za umeritveno krivuljo	32
Preglednica II: Izračun koncentracije proteinov z metodo BCA – vzorec (slika 4).....	32
Preglednica III: Izračun koncentracije proteinov z BCA metodo - vzorec (slika 6).....	40
Preglednica IV: Meritve standardne koncentracije proteinov z metodo BCA za umeritveno krivuljo	46
Preglednica V: Izračun koncentracije proteinov z metodo BCA - vzorec (slika 10)	46
Preglednica VI: Izračun koncentracije proteinov z metodo BCA - vzorec (slika 11).....	47

Slika 1: Mesta pridobivanja rekombinantnih proteinov v <i>E. coli</i>	2
Slika 2: Prikaz delovanja pET-sistema za izražanje.....	9
Slika 3: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 7 – potrditev velikosti proteina B-SpA.....	31
Slika 4: Umeritvena krivulja za preglednice II in III	32
Slika 5: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 8 – preizkušanje vpliva različnih koncentracij IPTG.....	33
Slika 6: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 10 – preizkušanje vpliva temperature in gojišča.....	34
Slika 7: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 11 – preizkušanje vpliva časa po indukciji in OD ₆₀₀	35
Slika 8: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 12 – primerjava različnih parametrov in potrditev najbolj optimalnih pogojev gojenja	38
Slika 9: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 40 – čiščenje vzorca z IMAC kromatografijo	39
Slika 10: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 14 – preizkušanje različnih pogojev gojenja na izražanje proteina LBD	43
Slika 11: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 27 – preizkušanje različnih pogojev gojenja na izražanje proteina LBD	44
Slika 12: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 39 – čiščenje LBD proteina z IMAC kromatografijo.....	45
Slika 13: Umeritvena krivulja za preglednice V in VI.....	46
Slika 14: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 42 – čiščenje proteina LBD s kromatografijo IMAC.....	48

POVZETEK

Pri regulaciji apetita in porabe energije se je v zadnjih desetletjih izkazalo, da ima pomembno vlogo hormon leptin. To je pripeljalo do povezav z debelostjo, saj so pri ljudeh s povečano telesno težo odkrili povišane koncentracije leptina v serumu. Vendar pa so zadnja odkritja pokazala, da ima leptin v telesu pomembnejšo vlogo in je v direktni povezavi z imunskim sistemom ter z njim povezanimi boleznimi. Zaradi teh ugotovitev se je povečala želja po odkritju učinkovine, ki bi zavirala njegovo delovanje. Kot potencialna tarča se je izkazala zunajcelična regija leptinskega receptorja oziroma leptin vezavna domena, ki ima ključno vlogo pri vezavi leptina na receptor.

V okviru magistrskega dela smo skušali optimizirati pogoje gojenja bakterije *Escherichia coli*, na tak način, da bi imela čim večji donos rekombinantnih proteinov, domene B stafilokoknega proteina A (B-SpA) in leptin vezavne domene (LBD). V začetku smo celoten proces preizkusili in potrdili na bolj znanem in preprostem rekombinantnem proteinu B-SpA. Raziskavo smo začeli s ponovitvijo pogojev, ki so se izkazali kot najbolj ugodni na podlagi dosedanjega dela. Določili smo velikost proteina na elektroforeznem gelu in s pomočjo tega podatka vrednotili nadaljnje delo. Preizkusili smo vpliv temperature, čas indukcije, čas po indukciji, koncentracije induktorja (IPTG) ter vpliv gojišča na ekspresijo proteina v topni in netopni obliki. Gojenje pod pogoji, ki so se med raziskavo izkazali kot najbolj optimalni, smo ponovili v litrskem bioreaktorju. Na koncu smo proteine očistili s kovinsko-kelatno kromatografijo (IMAC - ang. *Immobilized Metal Affinity Chromatography*) in uspešnost metode preverili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (SDS-PAGE, ang. *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*). Šele, ko smo zaključili z raziskavo proteina B-SpA, smo ponovili še celoten postopek na proteinu LBD.

Optimizacija in čiščenje sta se izkazala zelo uspešno pri proteinu B-SpA. Žal pri proteinu LBD nismo imeli enakih uspehov. Uspelo nam je sicer optimizirati pogoje gojenja do te mere, da smo v topni obliki dobili pozitiven rezultat in smo ga nato uspešno očistili s kromatografijo IMAC. Vendar pa količina ni bila dovolj velika, da bi bila proizvodnja po tem postopku smiselna.

ABSTRACT

Leptin has been in recent years implicated in the regulation of food intake and whole-body energy balance. This led to the connections with obesity, as it was found that in humans with increasing body weight also increases level of leptin in serum. However, it was shown in recent discoveries that leptin has more important role in the body and it is in direct relation to the immune system and its related diseases. Because of these findings the desire for discovery of its inhibitors has increased. Most promising drug target is extracellular region of leptin receptor or leptin binding domain, which plays key role in the binding of leptin to its receptor.

In the context of my master thesis we were trying to optimize the production in *Escherichia coli* of recombinant proteins B domain Staphylococcal protein A (B-SpA) and leptin binding domain (LBD) to get highest yield possible. We started our research with more familiar and simpler recombinant protein B-SpA on which we tested and confirmed whole process. In the beginning we repeated the conditions that have been proven by previous research to be the most effective. We determined the size of protein on electrophoresis and based on this information we evaluated further work. We tested the effect of temperature, time of induction, time period after the induction, the concentration of inducing agent (IPTG), and the impact of the medium on the expression of the proteins in the soluble and insoluble form. Production under the terms which were in the course of research proven to be the most optimal was repeated in the litre bioreactor. Finally, we purified proteins by using IMAC - *Immobilized Metal Affinity Chromatography* and verified the effectiveness of method using SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*. After we finished working with B-SpA protein we repeated whole process on LBD protein.

Optimization of production and purification has proven to be very effective with the B-SpA protein. Unfortunately, with LBD we were not so successful. We have optimized the culture conditions to such an extent that we are able to get soluble form which was purified by IMAC chromatography. However, the amount of this protein was not high enough to make the production in scale up of this protein reasonable.

KLJUČNE BESEDE

Debelost, leptin, domena B stafilokoknega proteina A, rekombinantni protein, kromatografsko čiščenje.

KEY WORDS

Obesity, leptin, B domain staphylococcal protein A, recombinant protein, chromatography.

SEZNAM OKRAJŠAV

BSA – goveji serumski albumin

B-SpA – domena B stafilokoknega proteina A

ddH₂O – ultra čista voda

EDTA – natijev etilendiamintetraacetat

IMAC – kovinsko-kelatna kromatografija

IPTG – izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid

IT – inkluzijska telesa

JAK – Janus Kinaza

LB – *lysogeny broth* (bakterijsko gojišče)

LBD – leptin vezoča domena (ang. *Leptin binding domain*)

LepR – leptinski receptor

NK celice – celice naravne ubijalke

OD₆₀₀ – optična gostota pri 600 nm (ang. *optical density*)

PBS – fosfatni pufer s soljo

SDS-PAGE – poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata

VPB – *Veggie-tones Vegetable Pepton Broth* (bakterijsko gojišče)

1 UVOD

1.1 REKOMBINANTNI PROTEINI

Tehnologija rekombinantne DNA je v 70. letih pomenila prelomnico v razvoju moderne biotehnologije. K temu je pripomoglo odkritje, da je za prenos genske informacije odgovorna DNA. Sledil je razvoj genskih metod za manipulacije *in vitro*, ki so omogočile izolacijo tarčnega gena iz določenega genetskega vira, vstavitve v ustrezen ekspresijski vektor in njegovo izražanje v ekspresijskem sistemu oziroma gostitelju, katerega naloga je biosinteza tarčnega proteina. Rezultat tega je bil inzulin, prvi rekombinantni protein iz bakterije *Escherichia coli*, ki se je pred 25 leti pojavil na ameriškem tržišču. Temu je sledil strm vzpon tovrstnih učinkovin v medicinski uporabi. V zadnjih letih je dosegel več kot 10 % delež vrednosti trga celotne prodaje zdravil [1].

1.2 EKSPRESIJSKI SISTEM *Escherichia coli*

Izmed vseh sistemov, ki so na voljo za proizvodnjo heterolognih proteinov, je gram-negativna bakterija *Escherichia coli* še vedno eden izmed najpogosteje uporabljenih organizmov. Prednosti njene uporabe so hitra rast z veliko gostoto na poceni gojišču, dobro preučena genetika in dostopnost velikega števila vektorjev ter raznolikost gostiteljskih sevov. Zato je *E. coli* postala sinonim za hitro, donosno in ekonomično proizvodnjo heterolognih proteinov. Vendar v *E. coli* ne moremo izraziti vsakega gena učinkovito, zato proizvodnja delujočega evkariontskega proteina z visokimi donosi v *E. coli* ni rutinska zadeva in velikokrat predstavlja izziv [2–5].

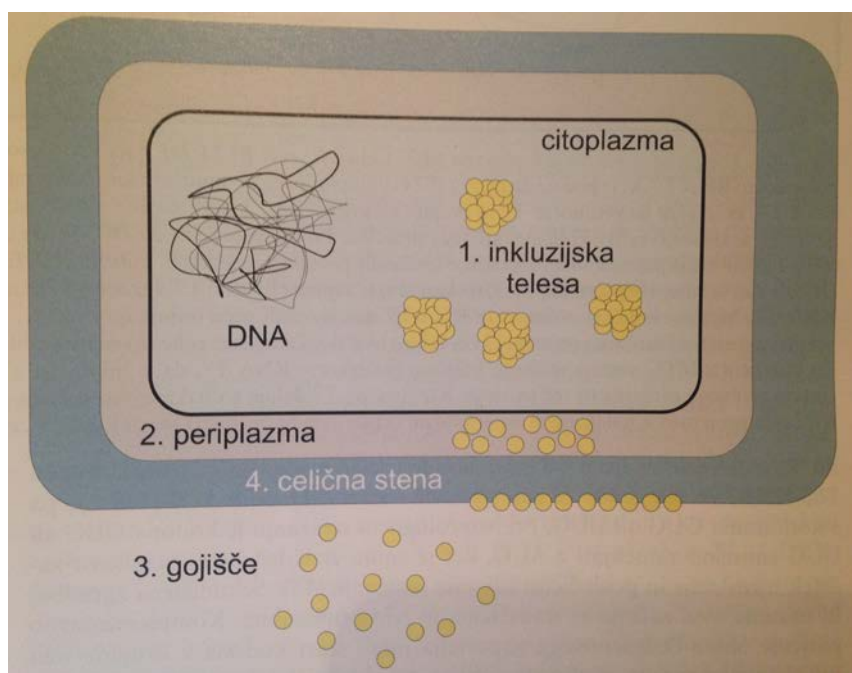
Do teh izzivov pride zaradi edinstvenih in subtilnih strukturnih lastnosti genskega zaporedja, ki ga je treba izraziti, stabilnosti in translacijske učinkovitosti mRNA, hitrosti zvižanja proteina, degradacije proteina zaradi delovanja proteaz gostiteljske celice in toksičnosti proteina na gostiteljsko celico. Raziskali so veliko tehnik optimizacije produkcije heterolognih proteinov v *E. coli* in te ugotovitve so doprinesle k povečanemu donosu tujih evkariontskih proteinov. Pri načrtovanju ekspresijskega sistema lahko uporabimo nekatera pravila, ki veljajo za izbiro gostiteljskih sevov, število kopij plazmida, izbiro promotorja, stabilnost mRNA in uporabo kodonov. S tem pripomoremo k optimizaciji in omejimo

nepredvidljivost izražanja proteina v *E. coli*. Pomemben del optimizacije so tudi pogoji za rast celic in medij, ki je odvisen od tarčnega proteina, in zato zanj ne veljajo empirična pravila [3–6].

Vendar pa *E. coli* ne more proizvajati nekaterih proteinov, ki vsebujejo kompleksne disulfidne vezi in proteinov sesalskih celic, ki zahtevajo posttranslacijske modifikacije za njihovo aktivnost. Kljub temu so veliko rekombinantnih proteinov že uspešno izrazili s pomočjo *E. coli*. Velikokrat se zgodi, da se proteini akumulirajo v obliki inkluzijskih teles, iz katerih lahko biološko aktivno obliko dobimo samo z zapleteno in drago denaturacijo, ki ji sledi proces ponovnega zvijanja. Končni donosi teh topnih ponovno zvitih proteinov so zelo nizki, zaradi agregacije, ki je rezultat interakcij med hidrofobnimi regijami proteina [5, 7].

Ciljno mesto razvrščanja rekombinantnih proteinov po izražanju v celici *E. coli* je lahko:

- citoplazma (reducirajoče okolje), kjer je lahko rekombinantni protein topen ali v obliki inkluzijskih teles in lahko predstavlja tudi do 30 % celotne količine proteinov;
- periplazma (oksidativno okolje), kjer so donosi bistveno nižji;
- površina celic (celična stena, zunanja membrana) oziroma bakterijski prikaz, kar dosežemo s pripravo fuzijskih proteinov z domenami za »sidranje«. Nivo izražanja je nizek, metoda pa ni primerna za izražanje večjih proteinov;
- gojišče, kar dosežemo z uporabo kompleksnejših ekspresijskih vektorjev in bakterijskih sevov ter prilagojenih načinov gojenja [4].



Slika 1: Mesta pridobivanja rekombinantnih proteinov v *E. coli* [14]

Vsaka izmed možnosti izločanja proteina ima svoje prednosti in slabosti [4]. V primerjavi s citoplazmo naj bi bilo v periplazmi manj proteazne aktivnosti. Tudi čiščenje iz periplazme je lažje zaradi manj vsebujočih proteinov, v njej se lahko ustvari pravilna oblika disulfidnih vezi, saj periplazemski prostor vsebuje bolj oksidativno okolje kot citoplazma. Izločanje v medij ima nekatere prednosti v primerjavi z izločanjem v periplazmo. Zunajcelična produkcija ne zahteva uničenja zunanje membrane za pridobitev tarčnega proteina, izogne se znotraj celični protolizi zaradi periplazemskih proteaz in dovoljuje neprekinjeno produkcijo rekombinantnih proteinov. Načeloma je prehod rekombinantnih proteinov iz periplazme v medij rezultat vprašljive integritete zunanje membrane, vendar na njo ne smemo vplivati preveč, da ne poškodujemo celične integritete, kar se lahko konča s celično smrtjo [4, 5].

Strategije, s katerimi so želeli optimizirati pogoje gojenja bakterije in uporabe medija, so temeljile predvsem na povečanju celične gostote zaradi bakterijskega razmnoževanja. Pri tem niso želeli vplivati na bakterijski ekspresijski vektor. Na tak način so povečali produkcijo proteina. Vendar je lahko visoka celična gostota povzročila nekatere probleme, kot so: izguba plazmida iz *E. coli*, bistveno znižanje pH zaradi celičnih metabolitov, omejen dostop bakterijskih celic do raztopljenega kisika. Zato lahko dobimo nizko gostoto proteina ali pa se protein sploh ne izraža visoki celični gostoti navkljub [6].

Pri produkciji rekombinantnih proteinov v mikroorganizmih je eden izmed fenomenov, s katerim se pogosto srečujemo, tvorba inkluzijskih teles; to pomeni, da rekombinantni protein nastaja in se združuje v netopni obliki v citoplazmi ali periplazmi. Tvorba inkluzijskih teles lahko pomeni nove možnosti ali dodatne težave [7, 8].

Za proteine, ki jih razkrajajo proteaze, če se izražajo v mikroorganizmu, je produkcija proteina v obliki inkluzijskih teles dobra možnost za stabilizacijo proteina. Pri čiščenju lahko inkluzijska telesa po razpadu celice ločimo od celičnih ostankov in topnih proteinov s centrifugiranjem. Ampak renaturacija agregiranega proteina v nativno konformacijo po navadi zahteva veliko korakov, ki vključujejo tudi uporabo večjih volumnov topila. Doprinosi so običajno nizki [7, 8].

Mehanizmi za nastanek inkluzijskih teles niso dobro pojasnjeni. Začetne hipoteze so vključevale omejitve topnosti, velikost proteina, tip promoterja, nepravilno tvorjenje disulfidnih vezi, ampak podatki iz literature ne kažejo preproste povezave med temi faktorji in tvorbo inkluzijskih teles. Verjetnost je, da se inkluzijska telesa tvorijo iz intermediatov poti zvijanja pri povišani temperaturi, ki nastane zaradi rasti bakterije in je eden izmed

parametrov, za katerega so opazili, da pripomore k povečani agregaciji rekombinantnih proteinov v inkluzijskih telesih [7].

Velikokrat je proces tvorbe inkluzijskih teles odvisen predvsem od kompetitivnega odnosa med hitrostjo zvijanja proteina in hitrostjo agregacije v povezavi s hitrostjo translacije. V prokariotskih organizmih translacija običajno poteka zelo hitro in se zato večina zvijanja izvede posttranslacijsko. V nasprotju z evkariontskimi organizmi, kjer je translacija počasnejša, zvijanje proteinov pa se pogosto začne že med samim prepisovanjem in se lahko nadaljuje posttranslacijsko po izpustitvi iz ribosoma [7].

Sprememba v pH znotraj celice tudi lahko vpliva na proces zvijanja in konformacije proteinov. Rezultati gojenja z nižanim pH so pokazali, da je sorazmerno z nižanjem pH naraščala količina inkluzijskih teles. Z nižanjem pH so imele celice težave z vzdrževanjem konstantnega pH znotraj celice. Če se je pH zunaj celice znižal iz 7.0 na 5.0, se je pH v celici znižal samo za eno enoto [7].

1.3 STAFILOKOKNI PROTEIN A

Staphylococcus aureus je komenzalni organizem, ki ga najdemo v nosni sluznici pri 25–30 % zdravega prebivalstva in je odgovoren za številne človeške bolezni, vključno z resnimi bolnišničnimi okužbami. *S. aureus* kodira nekatere virulenčne faktorje, med drugim tudi protein A, ki z vezavo na imunoglobuline G (IgG) prepreči fagocitozo bakterijskih celic, ki jo omogoča gostiteljev imunski sistem [9].

Protein A (40–60 kDa), ki ga najdemo v celični steni grampozitivne bakterije *Staphylococcus aureus*, je znan po tem, da je sposoben specifične vezave imunoglobulinov G različnih živalskih vrst in da odraža afiniteto do nekaterih IgM in IgA. Stafilokokni protein A (SpA) je zgrajen iz treh večjih regij: N-končnega signalnega peptida, ki je odgovorna za translakacijo skozi celično membrano, funkcionalne regije, ki veže imunoglobuline in C-končnega sortirnega signala, s katerim se pritrdi na celično steno. Funkcionalna regija je sestavljena iz pet zaporednih imunoglobulin-vezanih domen (E, D, A, B in C). Vsaka od njih je zgrajena iz treh antiparalelnih α -vijačnic in je sposobna vezave na ene molekule imunoglobulina [10].

SpA ima v bakterijski celici zaščitno funkcijo, saj jo ščiti pred opsonizacijo in fagocitozo. S tem predstavlja pomemben virulenčni dejavnik in je del obrambnega

mehanizma bakterije pred gostiteljskim imunskim sistemom, saj z vezavo regij protiteles Fc prepreči njihove efektorske funkcije [11].

V proizvodnji biofarmaceutikov se protein A in njegove izpopolnjene različice uporabljajo pri čiščenju terapevtskih protiteles in različnih fuzijskih proteinov z regijo Fc [11].

Domena B stafilokonega proteina A se uporablja kot modelni protein, saj ima veliko ugodnih lastnosti: je relativno majhna (58 aminokislinskih ostankov, ~ 6,6 kDa), ne vsebuje cisteinskih ostankov, ima relativno stabilno zvitje, je topna kot samostojen protein, neproblematična za izražanje v *E. coli*, dokaj odporna na razgradnjo s proteazami, njena tridimenzionalna struktura je dobro znana in njena sposobnost vezave imunoglobulinov daje možnost za enostavno vrednotenje aktivnosti [11].

1.4 LEPTIN

Debelost je eden izmed vodilnih vzrokov smrti po svetu, zaradi katerega umre vsaj 2,8 milijona ljudi na leto. Klinično je definirana kot stanje, kjer indeks telesne mase presega 30 kg/m³. Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije je bilo v letu 2008 35 %, starejših od 20 let, pretežkih, od tega 12 % debelih, v Sloveniji pa je debelih celo 25 %. Trendi kažejo, da bo v prihodnje število prekomerno težkih strmo naraščalo, pričakujejo, da bo do leta 2020 takšnih ljudi kar 45 %. Prekomerna telesna masa in debelost imata velik vpliv na zdravje, saj povzročata nezaželen presnovni učinek na krvni tlak, raven holesterola, trigliceridov in odpornost na inzulin. S tem se poveča tveganje za srčno žilna obolenja, kap, sladkorno bolezen in nekatere vrste raka (kot so rak dojk, debelega črevesja, prostate, ledvice, žolčnika). Smrtnost narašča premo sorazmerno s povečanjem stopnje debelosti [12]. Nobeno od prizadevanj za zdravljenje tega problema ni prineslo vidnih rezultatov. Najbolj uspešna metoda je kirurška odstranitev tkiva, ki pa ne zmanjša tveganja za razvoj drugih z debelostjo povezanih bolezni [13].

Kljub splošnemu prepričanju, da je debelost predvsem posledica prekomernega hranjenja, so odkrili dejavnike, kot so genetske in endokrine motnje, zdravila ter duševne motnje, ki imajo direkten vpliv na povečanje telesne teže. Verjetno so najpomembnejša odkritja zadnjega desetletja tista, ki so pripeljala do boljšega razumevanja regulacije apetita in porabe energije, katerih začetek je bilo odkritje leptina leta 1994 [14].

Raziskave debelosti pri človeku in njihova zdravljenja so v večini primerov potekali na živalskih modelnih organizmih. Eden izmed prvih modelnih organizmov in tudi

najpomembnejših je bila miška *ob/ob*, ki so jo odkrili leta 1950. Miška *ob/ob* ima recesivni gen za debelost, ki povzroči neplodno odraslo miško s povečanim deležem maščobe za 50 %. Kasneje so odkrili še miške *db/db*, ki so podobno pretežke, vendar so tudi hiperglikemične. Te hipoteze je potrdila skupina, ki jo je vodil Jeffrey Friedman iz Univerze Rockefeller, in je leta 1994 objavila članek o specifični genski okvari miške *ob/ob* [13]. Gen *ob* pravilnem delovanju kodira hormon leptin, ki ga izločajo predvsem maščobne celice [15]. Zdrava miška ima zato med stradanjem nizko koncentracijo leptina, kar sproži apetit in skladiščenje maščob. Bolna miška zaradi genske mutacije na genu *ob* ne proizvaja delujočega leptina [13] oziroma ob okvari obeh alelov sploh ne sintetizira leptina in je zaradi tega predebela ter ima tudi druge zdravstvene težave, kot je nezmožnost reprodukcije. Ker pa pri bolni miški leptin ne nastaja, ne pride do signala za prenehanje hranjenja, je taka miška neprestano lačna in se prehranjuje [14–16].

Pri ljudeh leptin sodi v družino citokinov in ga sestavlja 167 aminokislin. Deluje kot hormon, ki uravnava telesno maso z zaznavanjem količine skladiščenih maščob [14]. Informacijska RNA za leptin nastaja v velikih količinah v maščobnih celicah, medtem ko leptinski receptor (LepR) nastaja v velikih količina v hipotalamusu, T-celicah in žilno endotelijskih celicah. Leptin po telesu kroži kot 16 kDa velik protein, dokler ne pride skozi krvno-možgansko bariero v možgane. Leptin, čigar količina je odvisna od maščobe v telesu, je v plazmi prost ali vezan na vezavne beljakovine za leptin. Najpomembnejša vezavna domena, na katero se leptin lahko veže, je zunajcelična domena leptinskega receptorja. Leptin aktivira specifične »dolge« in »kratke« leptinske receptorje, ki se nahajajo v največji meri v možganih, najdemo pa jih tudi v pljučih, ledvicah, želodcu, jetrih, trebušni slinavki, nadledvičnih žlezah, jajčnikih, matičnih celicah, skeletnih mišicah in osteoblastih. Receptorji v možganih so razporejeni na več območjih, in ko se aktivirajo, pride do prenosa signalov in transkripcije kinaze JAK (Janus Kinaze), zaradi česa pride do izražanja številnih hipotalmičnih neuropeptidov. Z vezavo leptina na leptinski receptor pride do odziva v možganih, imunskem sistemu in žilnem sistemu. Vezava leptina na leptinski receptor odpravi učinke delovanja neuropeptida Y, ki je močan promotor za lakoto, ki ga izločajo črevesne celice in celice v hipotalamusu. Zaradi zmanjšanja izločanja neuropeptidov pride do zmanjšanja apetita in večje porabe energije. Tako spodbuja receptorje v centru za sitost in lakoto ter povzroči občutek sitosti. Raven leptina se spreminja tudi glede na energijsko bilanco, saj se pri hujšanju zmanjša in naraste ob čezmernem hranjenju. Nanj lahko vplivajo tudi sestava hrane, različni hormoni in raven citokinov. Na splošno količina zaužite hrane vpliva na metabolne spremembe, ki indirektno vplivajo na različne sistemske hormone.

Zraven sistemskih učinkov leptin deluje tudi v različnih tkivih. Leptin prav tako vpliva na druge fiziološke procese, kot je regulacija telesne temperature, energije, imunosti, reprodukcije in razvoja [17–19].

Pri ljudeh s povišano telesno maso je serumska raven leptina višja kot pri ljudeh z normalno in se povečuje s količino telesne maščobe. Zato debelost pri ljudeh (razen v redkih primerih) ni posledica okvarjenega leptina ali njegovega pomanjkanje tako kot pri miški. Mutacija gena *ob* je pri ljudeh redka in zato predvidevajo, da gre pri ljudeh za neobčutljivost za leptin oziroma leptinsko rezistenco, saj povišana koncentracija ne zmanjšanja apetita in poveča porabe telesne energije [17].

Zdravljenje z leptinom so preizkusili na različnih vrstah sesalcev. Miška *ob/ob*, ki so ji dodali eksogeni leptin, je zaužila manjšo količino hrane, povečala je porabo telesne energije, postala telesno bolj aktivna in normalizirala hiperglikemijo ter količino inzulina. Pri podganah je leptin povzročil apoptozo maščobnih celic. Kot hormon za zdravljenje debelosti so leptin preizkusili tudi pri človeku, kar pa se je izkazalo za neučinkovito. Hiperleptinemija, ki pri debelih ljudeh ne uspe zavreti apetita in povečati porabe telesne energije, kaže na neobčutljivost za leptin oziroma leptinsko rezistenco [20]. Mehanizmi, zaradi katerih pride do leptinske rezistence, so napačna regulacija leptinske sinteze in/ali sekrecije, nepravilen transport leptina v možgane in neustrezno delovanje leptinskega receptorja in/ali poreceptorskih signalov. Mehanizem delovanja naj bi bil podoben kot pri diabetesu tipa II, kjer bolniki doživljajo rezistenco na inzulin, kljub temu da proizvajajo povečane količine inzulina. Iz teh opazovanj so nadaljevali v smeri odkrivanja in identifikacije leptinskih receptorjev in analiziranja sprejemanja signala leptina [21].

Leptinski receptor pripada superdružini citokinskih receptorjev. Sestavljen je iz 800 aminokislin, zaradi česar je proizvodnja velikih količin rekombinantnega proteina problematična. Ugotovili so, da je za vezavo odgovorna poddomena citokina I, vezavna domena leptina (LBD), ki je velika približno 200 aminokislin. Dokazali so, da je LBD sposobna vezave z leptinom v razmerju 1 : 1. LBD je del receptorja OB-R (obesity receptor), ki ga sestavljajo domena za citokinski receptor na N-terminalnem koncu (CRH-1), imunoglobulinom podobna domena (Ig), sekundarna domena CRH (CRH-2) ali LBD in dve fibronektinski domeni tipa III (FNIII) [22]. Zaradi preproste in cenejše priprave bi LBD lahko uporabili za razvoj antagonistov, ki bi se selektivno vezali na to domeno [23, 24].

Kljub vsem tem odkritjem pa še vedno ni dovolj kliničnih dokazov o učinkovitosti leptina za zdravljenje debelosti pri ljudeh [17]. So pa nadaljnje študije pokazale, da se

leptinski receptorji izražajo tudi na mnogih drugih tkivih in so tako vključeni v bolj raznoliko biološko funkcijo, kot so najprej mislili [25].

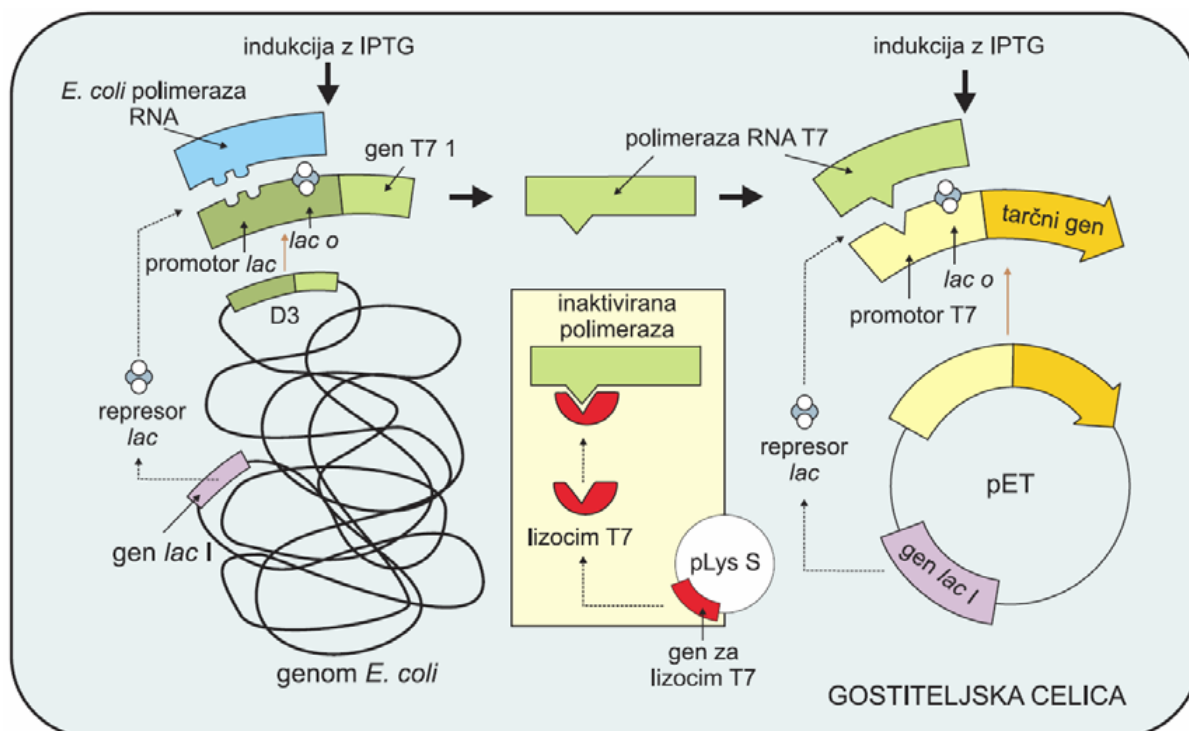
Leptin naj bi imel pomembno vlogo pri dozorevanju reproduktivnih delov, saj z njim lahko ponovno povzročimo puberteto in plodnost pri miški *ob/ob*, povečamo puberteto pri divjem tipu miške in povišamo reproduktivno obnašanje pri glodavcih [25].

Leptin ima pomembno vlogo pri modulaciji imunskega sistema. Receptorje LepR so našli v nevtrofilcih, monocitih in limfocitih. Leptin v imunskem sistemu pospešuje vnetne reakcije, aktivira vnetne celice, začne odziv Th1 in sodeluje v nastajanju drugih vnetnih citokinov, kot so TNF- α , IL-1 ali IL-6. Zato lahko vpliva tako na prirojen kot pridobljen imunski odziv. Veliko raziskav je pokazalo povezavo leptina z avtoimunskimi boleznimi, infekcijami in endokrinimi/metaboličnimi boleznimi, kar kaže na pomembno vlogo leptina v imunski homeostazi in patogenezo v nekaterih vnetnih napakah [26].

1.5 SISTEM ZA IZRAŽANJE pET

Plazmid pET-28(+) je eden izmed najmočnejših sistemov za izražanje vstavljenega gena v bakterijskih celicah, ki nosijo v genomu zapis za RNA-polimerazo bakteriofaga T7 (npr. *E. coli* BL21 (DE3) pLysS). Tarčne gene kloniramo v pET-plazmid, ki je pod močno kontrolo bakteriofagnega promotorja T7. Bakterija BL21 DE3 nosi v genomu zapis za polimerazo T7, ki je pod nadzorom promotorja *lac*. V genomu se nahaja tudi zapis za represor *lac*, ki se izraža konstitutivno. Sev BL21 DE3 pLys vsebuje še majhen plazmid z zapisom za lizocim bakteriofaga T7, ki je naravni inhibitor polimeraze T7. V odsotnosti induktorja IPTG je represor *lac* vezan na promotor *lac*, kar preprečuje izražanje gena za polimerazo T7. Posledično se ne izraža tudi tarčni gen. Morebitno puščanje promotorja *lac* nevtralizira lizocim, ki inaktivira majhne količine polimeraze T7, ki nastajajo kljub odsotnosti IPTG. IPTG prepreči vezavo represorja *lac* na promotor in s tem omogoča vezavo RNA-polimeraze *E. coli*. Nastanejo velike količine RNA-polimeraze T7, ki prepise tarčni gen. Lizocim razgrajuje celično steno bakterije, zato ta sistem ni primeren za izražanje proteinov v periplazmi celice. Ker polimeraza T7 RNA deluje selektivno in je aktivna samo takrat, ko je popolnoma inducirana, saj se skoraj vsi celični viri porabijo za izražanje tarčnega gena; želen produkt lahko predstavlja več kot 50 % vseh proteinov, ki jih izraža celica v času nekaj ur po indukciji. Čeprav je ta sistem zelo močan, je mogoče oslabiti nivo izražanja tako, da

zmanjšamo koncentracijo induktorja. Zmanjšanje nivoja izražanja lahko v nekaterih primerih prispeva k povečanemu izražanju topnega proteina [14, 27].



Slika 2: Prikaz delovanja pET-sistema za izražanje [14]

1.6 POLIHISTIDINSKI PODALJŠEK »His-Tag«

Zaporedje DNA, ki kodira niz šestih do devetih histidinskih ostankov, je pogosto prisotno v vektorju za produkcijo rekombinantnih proteinov. Rezultat je izražanje rekombinantnega proteina z označevalcem 6xHis ali poli-His, pripetim na njegovem *N*- ali *C*-končnem delu [28].

Izražene proteine, označene s histidinom, lahko preprosto očistimo in analiziramo, saj se niz histidinskih ostankov veže na nekatere tipe imobiliziranih kovinskih ionov, kot so nikelj, kobalt in baker, pod specifičnimi pufrskimi pogoji. Tudi protitelesa proti »His-Tag« so komercialno dostopna za uporabo pri analiznih metodah, ki določajo s histidinom označene proteine. Oznaka je sredstvo, ki zagotavlja specifično čiščenje ali detekcijo rekombinantnega proteina brez dodanih protiteles [28].

S to metodo hitro ločimo zelen protein od drugih bakterijskih proteinov, in to kar s 95 % čistostjo. Protein očistimo tako, da izvleček izraženega proteina iz *E. coli* spustimo skozi

agarozni nosilec s kelatnimi skupinami, na katerega je vezan nikelj ali kateri izmed drugih specifičnih kovinskih ionov. Kot kelatorji so najpogosteje uporabljeni ligandi, kot sta nitrilotriocetna kislina (NTA) in iminodiocetna kislina (IDA). Takšno afinitentno čiščenje je znano kot kovinsko-kelatna kromatografija (IMAC, ang. *Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*).

1.7 KOVINSKO-KELATNA KROMATOGRFIJA

Kovinsko-kelatna kromatografija je robustna metoda za čiščenje s polihistidinom označenih rekombinantnih proteinov. Pri tem uporabimo naravne prednosti histidina, ki ima težnjo po tvorbi kompleksa z dvovalentnim kovinskim ionom pri nevtralnem pH. Kovinski ioni, ki jih lahko uporabimo so Fe^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} ... Največkrat se uporablja Ni(II). Njegove prednosti so elektrokemična stabilnost pod kromatografskimi pogoji, mejna polarizacija in redoks stabilnost. Združenje s histidinskim peptidom je trenutno ena izmed najbolj pogosto uporabljenih tehnik za afinitentno čiščenje. Imobilizacija kovinskega iona na kromatografski nosilec s kelacijo omogoča ločevanje s histidinom označenih proteinov od drugih neoznačenih proteinov v vzorcu tudi v denaturacijskih pogojih. Vezavni nosilec je narejen iz mehkih gelov (agaroze, celuloze ali dekstrana), lahko pa uporabimo tudi anorganske nosilce, kot je silikagel, ki pa morajo imeti zaradi nespecifične adsorpcije modificirano površino. Vezavne interakcije z označenim proteinom so odvisne od pH. Protein, ki ga iščemo, se veže na matriks preko interakcij s kovinskimi ioni in ga kasneje lahko eluiramo z raztopino amonijevega klorida, histidina, imidazola, EDTA ali visokimi vsebnostmi kompetitivnega kovinskega iona [29]. Glede na to, da lahko tarčni protein očistimo iz velikih volumnov surovega lizata v enem koraku, IMAC-čiščenje ponuja pomemben prihranek časa v primerjavi z drugimi manj selektivnimi in daljšimi postopki. Optimiziramo lahko nekatere parametre čiščenja in s tem povečamo uspešnost IMAC-kromatografije. Ti parametri so izbira kovinskega iona in nosilca, količina nosilca, ki ga uporabimo, pogoji vezave in elucijski pufer [30].

1.8 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA LAVRILSULFATA

V povezavi s kromatografskimi metodami se velikokrat uporabljajo elektroforezne metode. Tako kot kromatografske metode so tudi elektroforezne tehnike namenjene ločevanju snovi. Kromatografija se uporablja v bolj komercialne namene in ločevanje za večjih volumnov. Medtem ko se elektroforezne tehnike uporabljajo predvsem v laboratorijih, kot raziskovalne tehnike za ločevanje delcev na mikroskopski ravni. Z njimi kontroliramo in ugotavljamo uspešnost posameznih stopenj v separacijskem postopku in homogenost izoliranih snovi. Uporabimo pa jih lahko tudi kot samostojne tehnike za separacije v preparativne namene [31].

Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (SDS-PAGE, ang. *Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) je separacijska metoda, s katero ločujemo proteine na podlagi njihove mase. Hitrost potovanja delca v električnem polju je odvisna od razmerja mase delca in njegovega naboja, vendar je pri SDS-PAGE to razmerje za vse proteine enako, zaradi stehiometrične vezave lavrilsulfata na polipeptidno verigo. Zato je elektroforezna mobilnost proteina odvisna le od velikosti proteina, in sicer manjši proteini potujejo hitreje, saj lažje prodirajo skozi pore gela kot večji. Večji proteini zato ostanejo bližje mestu nanosa, medtem ko manjši potujejo dlje po gelu. Negativno nabiti proteini se po gelu, ki je v električnem polju, pomikajo proti pozitivno nabiti elektrodi – anodi. Po končani elektroforezi gel obarvamo z barvilom [32].

1.9 BIOREAKTOR

Bioreaktor v tehničnem smislu predstavlja reakcijsko posodo ali reaktor, v katerem poteka proces metabolizma in biosinteze produktov, ki jih katalizira vrsta encimov znotraj celice mikroorganizma. Na kratko je bioreaktor umeten sistem, v katerem poteka biološki proces, s katerim pridobimo uporabne snovi. To je kakršenkoli proces od alkoholnega vrenja do zapletenih bioloških procesov v celici. Sestavljen je iz več sestavnih delov, ki so nujni za vodenje in kontrolo procesa. Celica s svojo organiziranostjo je sama po sebi podoba idealnega bioreaktorja, vendar pa v laboratorijih in industriji uporabljamo posode, velike od nekaj litrov do več kubičnih metrov. Največkrat uporabljen organizem za gojenje so mikroorganizmi, saj je produkcija snovi pri njih največja. Med procesom moramo zagotavljati optimalne pogoje za

rast in produkcijo, kot so temperatura, prisotnost hranil in mikroelementov, pretok kisika, učinkovito dovajanje hrane in odvajanje odpadnih produktov ter gostota celic [31].

Bioreaktorji lahko po osnovnem principu delujejo v nesterilnih in sterilnih obratovalnih pogojih. Primer nesterilnih so čistilne naprave, biološki filtri, kompostiranje ... V laboratorijskih ali industrijskih bioprocesih, kjer je celoten proces zasnovan tako, da se pridobi le željen proizvod, brez nepričakovanih stranskih produktov, in ima pri tem bioprodukt čim večje donose, pa je sterilnost nujno potrebna [31].

Poznamo več tipov bioreaktorjev, ki se delijo glede na tehnološke rešitve in zahteve gojenih mikroorganizmov. Glede na princip delovanja ločimo šaržne, kontinuirne in polkontinuirne. Šaržni bioreaktor ali bioreaktor z enkratnim polnjenjem uporabljamo za bioprocen, pri katerem na začetku vnesemo kulturo in vsa potrebna hranila. Organizem se razmnožuje, dokler hranil ne zmanjka oziroma ne prekinemo procesa. Med samim potekom ne dodajamo hranil, niti ne odvezamo produktov, volumen ostaja konstanten skozi celoten proces. Za razliko od hranil, pa se tekom procesa dodajajo komponente za uravnavanje pH, pene in tudi različni plini. To je najenostavnejši način gojenja mikroorganizmov, katerega prednosti so kratkotrajnost in s tem povezana nizka verjetnost okužbe in mutacij. Vendar pa je zanj značilna nizka produktivnost. Nasprotno temu je kontinuirni bioreaktor ali bioprocen z neprestanim polnjenjem. V tem primeru bioreaktor obratuje s konstantnim pretokom medija. Vanj vstopajo hranila, iz njega pa izstopajo biomasa, neporabljen substrat, produkt in raztopljen kisik. S takim načinom gojenja lahko dosežemo optimalno okolje in vzdržujemo mikroorganizem v stacionarnem stanju. Polkontinuirni sistem pa predstavlja vmesno varianto, kjer gojenje začnemo šaržno in v primernem trenutku začnemo dodajati samo substrat. Glede na volumen je ta proces nestacionaren [31].

Pri gojenju mikroorganizmov v bioreaktorju je kisik velikokrat omejujoč faktor. Zato sta potrebna dodaten vnos kisika in mehansko mešanje, ki skrbi za enakomerno porazdelitev po celotni posodi [31].

1.10 PRENOS TEHNOLOGIJE V VEČJE MERILO

Prenos v večje merilo pomeni prenos novega ali izboljšane bioprocesa iz laboratorijskega na pilotni in kasneje na industrijski nivo. Nujen predpogoj za uspešen prenos je zanesljiva simulacija proizvodnih razmer v laboratoriju, saj le tako lahko nadaljujemo vodenje bioprocesa v večjem merilu. Dobro se moramo seznaniti z mikrobno kinetiko rasti in

mikrobno fiziološko-morfološki lastnostmi pri produkciji zelenega produkta. Na začetku razvoja tehnološkega postopka ali ob izolaciji novega visokoproduktivnega seva malo kdaj strategiji za uvedbo in prenos postopka pripišemo toliko pomena, kot ga zahteva. Posledica tega so nižji donosi v industrijskem merilu, kot bi jih pričakovali glede na rezultate, pridobljene z laboratorijskimi raziskavami. To pa prinese večje investicijske in proizvodne stroške. Zato je za prenos bioprocesa v različna merila potreben znanstveni pristop [31, 33].

Problemi, s katerimi se srečujemo pri prenosu v večje merilo, se pojavijo, ko gre za prenos kot so toplota ali masa v obravnavnem sistemu. Pri prenosu se v farmacevtski industriji uporabljajo nekatere zakonitosti. Te zakonitosti so razmerje med vnosom moči na enoto reaktorskega volumna, hitrost prenosa kisika iz plinaste faze v kapljevino, obodna hitrost reaktorskega mešala in parcialni tlak kisika v bioproceni brozgi [31].

Za prenos bioprocesa v večje merilo se pogosto uporabljajo metode, ki slonijo na dimenzijski analizi in na analizi režima kinetičnih in transportnih pojavov. Pri dimenzijskih analizah z brezdimenzijskimi enačbami, ki opišejo ravnovesno stanje sistema, ali s pomočjo principov dobimo brezdimenzijska števila. Vendar pa je pri procesih lažje postaviti kakor rešiti ravnovesne enačbe za opis celotnega sistema. Zato je nemogoče pri prenosu procesa v večje merilo vzdrževati vse brezdimenzijske korelacije na enaki vrednosti. Pomembno je, da dobro analiziramo kinetične ali transportne režime, vendar pa moramo upoštevati le odločilne mehanizme za potek reakcije. Pomembne so časovne konstante, ki se delijo na konstante transporta in konverzije. Konstante transporta so prenos kisika iz plinaste faze v kapljevino, zadrževalni čas plina v kapljevini, prenos kisika iz plinastega mehurčka v kapljevino in prenos toplote. Konstante za konverzijo pa so mikroorganizmova konstanta porabe kisika, konstanta porabe substrata, konstanta rasti mikroorganizma in konstanta za produkcijo toplote. Pri saržno vodenih procesih sta konstanti za mikrobno rast in porabo substrata bistveno večji kot konstante za transportne procese in zato nimajo vpliva na gojenje, čeprav je ravno od njih odvisno trajanje saržnega procesa. Če sta konstanti za vnos in porabo kisika enakega velikostnega razreda, je lahko pri prenosu procesa v večje merilo kisik omejujoč dejavnik [31, 34].

Zraven vseh dimenzijskih, kinetičnih in transportnih analiz pa se velikokrat uporabi tudi pravilo »na oko«, pri katerem uporabimo geometrijske podobnosti in linearne ekstrapolacije določenih procesnih spremenljivk, kar pa še ne zagotavlja podobnega mikrobne okolja in enakovrednih gojitvenih pogojev [31].

2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je optimirati pogoje za ekspresijo v ekspresijskem sistemu *E. coli* s ciljem pridobiti čim večje količine proteinov – domene B stafilokoknega proteina A in zunajcelične domene leptinskega receptorja. Rezultate predhodnega raziskovalnega dela na Katedri za farmacevtsko biologijo bomo uporabili kot izhodišče za začetek dela. Uspešnost ekspresije proteinov bomo vrednotili z analitsko metodo SDS-PAGE. Preizkusili bomo vpliv različnih dejavnikov na ekspresijo proteina v topni in netopni obliki. Preizkusili bomo vplive temperature, časa indukcije, časa po indukciji, koncentracije induktorja (IPTG), vpliv gojišča in drugih pogojev, ki se bodo med poizkusi pokazali kot pomembni. Optimirane pogoje izražanja rekombinantnega proteina bomo poskušali prenesti v večje merilo. Proizvedeni protein bomo v zadnjem koraku čistili z afinitetno kromatografijo.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijska oprema

Analitska tehnica EMB200-3	Kern, Mackay, Avstralija
Avtoklav LS-B100L	Anjue Medical, Anqing, Kitajska
Bioreaktor	Jafral, d. o. o., Ljubljana, Slovenija
Centrifuga MSE Mistral 3000E	Sanyo, Osaka, Japonska
Centrifuga TG 16-WS	Hunan Suncheng Enterprises Corp., Hunan, Kitajska
Čitalec mikrotiterskih ploščic PR-310	Shenzhen Prokan Electronics Inc, Shenzhen, Kitajska
Inkubator I-205C	Kambič, Semič, Slovenija
Kolona Proteus IMAC	Pro-Chem Inc, Littleton, MA, ZDA
pH-meter SG2	Mettler Toledo, Columbus, OH, ZDA
Pipete (0,2–2, 2–20, 20–200, 200–1000)	Dragon Lab, Peking, Kitajska
Ultrasonicator UP50H	Hielscher, Teltow, Germany
Spektrofotometer UV-2100PC	Tsingtao Unicom-Optics Instruments Co., LTD., Shandong, Kitajska
Stresalnik Incu-Shaker Mini	Benchmark Scientific Inc., South Plainfield, NJ, ZDA
Termometer DT-300	Voltcraft, Malmö, Švedska
Vibracijski stresalnik SCI-LOGEX MSX	Sicilogex, Berlin, CT, ZDA
Vir napetosti za elektroforezne kadičke Power PC HC	Bio-Rad, Berkeley, CA, ZDA
Vodna kopel HWS-28	Shinova, Šanghaj, Kitajska

3.1.2 Kemikalije

Agar	Biolife, Milano, Italija
Barvilo Instant Blue	Expedeon, Cambridgeshire, VB
DL-Ditioltreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Elektroforezni gel Tris-Glycin Na 4–20 %	NuSep LTd, Australija
Etanol, 96 %	Itrij, Kropa
Glicin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Glicerol	Fluka, St. Louis, MO, ZDA
Goveji serumski albumin (BSA)	Invitrogen, Calsbad, CA, ZDA
Goveji serumski albumin standard (BSA)	Fermentas, Burlington, Kanada
Gvadinijev klorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
HCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
IPTG	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
KH ₂ PO ₄	Fluka, St. Louis, MO, ZDA
Kalijev fosfat	Fluka, St. Louis, MO, ZDA
Kanamicin sulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Kloramfenikol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
LB-gojišče	Merck, Dormstadt, Nemčija
Označevalec velikosti 2-Color SDS	San Diego, CA, ZDA
NaOH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Natrijev klorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Natrijev dodecilsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Nukleaza Benzonase®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Protipenilec Antifoam 204	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Reagent A	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Reagent B	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Urea	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Tricin	Applichem, Darmnstatd, Nemčija
Tris	Applichem, Darmnstatd, Nemčija

Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
VPB-gojišče	Oxoid LTD, Hampshire, VB

3.1.3 Pufri, raztopine in gojišča

1× PBS-pufer

0,2 g KCl
0,24 g KH_2PO_4
8 g NaCl
1,145 g N_2HPO_4
pH = 7,2

Ekvilibracijski pufer

50 mM Na-fosfat
300 mM NaCl
pH = 7,4

1-% Triton X-100

49,5 mL ddH₂O
0,5 mL Triton X-100
Raztopino smo sterilizirali s filtracijo.

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

956 mg gvanidinijevega klorida
1-% Triton X-100/ddH₂O do 20 mL
Raztopino smo sterilizirali s filtracijo.

Pufer za raztapljanje IT

10 mM Tris
5 M Urea
15 mM DTT
ddH₂O

Gojišče LB

5 g kvasnega ekstrakta
10 g peptona
10 g NaCl
1000 mL ddH₂O
Raztopino smo avtoklavirali.

Gojišče VPB

18 g rastlinskih peptonov
2,5 g dekstroze
2,5 g K_2HPO_4
3 g kvasnega ekstrakta
5 g NaCl
1000 mL ddH₂O
Raztopino smo avtoklavirali.

Gojišče 0.5× LB

2,5 g kvasnega ekstrakta
5 g peptona
5 g NaCl
1000 mL ddH₂O
Raztopino smo avtoklavirali.

1M raztopina IPTG

2,383 g IPTG
10 mL ddH₂O
Raztopino smo sterilizirali s filtracijo in shranili pri -20 °C.

1M DTT

154 mg DTT

1 mL ddH₂O

Elektroforezni pufer za SDS-PAGE

(10×)

30,2 g Tris

144 g glicina

10 g SDS

ddH₂O do 1 L

Raztopino smo pred uporabo redčili
desetkrat.

IMAC-pufer za vezavo

50 mM Na-fosfat

300 mM NaCl

10 mM imidazol

pH = 7,4

IMAC-pufer za spiranje

50 mM Na-fosfat

300 mM NaCl

30 mM imidazol

pH = 7,4

IMAC-pufer za elucijo

50 mM Na-fosfat

300 mM NaCl

300 mM imidazol

pH = 7,4

3.2 METODE

3.2.1 Priprava bakterijske kulture na trdnem gojišču

Za začetek dela smo biološki material pridobili na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo. Bakterije *Escherichia coli* BL21/plyS/pET28-BD in *Escherichia Coli* BL21/plyS/pET28-LBD so shranjene v zamrzovalniku na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pustili smo, da se je biološki material počasi odmrznil, in med tem časom pripravili gojišče. Na predpripravljeno trdo gojišče (LB) v petrijevkah smo dodali antibiotika kanamicin in kloramfenikol v ustreznih koncentracijah – kanamicina $35\text{ }\mu\text{g/mL}$ in kloramfenikola $34\text{ }\mu\text{g/mL}$, tako da smo ustrezno količino antibiotika zmešali s tekočim gojiščem, ga odpipitali na ploščo in s sterilno stekleno palčko razmazali po površini. Na trdo gojišče LB smo z bakterijsko zanko razmazali trajno bakterijsko kulturo. Petrijevke smo preko noči pustili na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, da so se kolonije razrasle.

3.2.2 Priprava gojišča

Priprava gojišča je potekala vedno po istem postopku, razen če je opredeljeno drugače. Najprej smo pripravili $1\times$ LB-gojišče, ki je vsebovalo 25 g LB (*Lysogeny broth*) na 1000 mL vode, in ga avtoklavirali. Ohlajenemu gojišču LB smo nato dodali dva antibiotika v ustreznih koncentracijah; kanamicina $35\text{ }\mu\text{g/mL}$ in kloramfenikola $34\text{ }\mu\text{l/mL}$.

3.2.3 Priprava založne kulture

1. Najprej smo pripravili 1000 mL gojišča LB.
2. 50 mL gojišča smo prelili v erlenmajerice, mu dodali oba antibiotika v ustreznih koncentracijah; kanamicina $35\text{ }\mu\text{g/mL}$ in kloramfenikola $34\text{ }\mu\text{l/mL}$.
3. V gojišče smo z mikrobiološko zanko dodali eno bakterijsko kolonijo, tisto, ki se je na petrijevkah najlepše razrasla in je rastla ločeno od drugih.
4. Erlenmajerice smo na stresalniku inkubirali preko noči pri 200 obr./min na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.
5. Polovico prekonočne kulture smo alikvotirali po $1,52\text{ mL}$ v 2 mL mikrocentrifugirke, dodali $0,38\text{ mL}$ glicerola in jih zamrznili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tako shranjena kultura je predstavljala osnovno banko.

6. Preostali del prekonočne kulture smo alikvotirali po 1,9 mL v 2 mL mikrocentrifugirke in jo shranili v hladilnik (2 – 8 °C).
7. To je bila založna kultura, s katero smo nadaljevali delo.

3.2.4 Izražanje rekombinante domene B stafilokoknega proteina A v kulturi *E. coli* BL21/pLysS/pET28/BD

1. Priprava gojišča LB.
2. Nato smo pripravili 50 mL prekonočne kulture iz 100 µL založne kulture *E. coli* BL21/pLysS/pET28/BD v LB s 35 µg/mL kanamicina in 34 µl/mL kloramfenikola.
3. Po 2,5 mL prekonočne kulture smo prenesli v vsako erlenmajerico z gojiščem LB in gojišča inkubirali na stresalniku pri 37 °C, dokler ni OD₆₀₀ kulture dosegel vrednost ~ 0,4.
4. Izražanje rekombinantne domene B stafilokoknega proteina A (B-SpA) smo sprožili z dodatkom IPTG do koncentracije 1 mM (50 µL) in nadaljevali inkubacijo na stresalniku pri 37 °C.
5. Štiri ure po indukciji izražanja proteina B-SpA smo gojišču odvzeli 9 mL vzorca, ga prenesli v centrifugirke, vzorce centrifugirali (10 min, 9000 vrt./min), supernatant odlili.
6. Celično usedlino smo dvakrat sprali z 1 mL pufra PBS.
7. Nato smo celično usedli suspendirali v 1,9 mL ekvilibracijskega pufra.
8. Celice smo razbili z ultrazvokom tako, da smo jih sonicirali trikrat v 30-s intervalih in vmes ohlajali 1 minuto na ledu.
9. Suspenziji smo dodali nukleazo do koncentracije 10 µL/mL in 2 µL Mg.
10. 20 min smo s stresanjem inkubirali na sobni temperaturi.
11. Nato smo suspenzijo centrifugirali (14.000 vrt./min, 10 min).
12. Supernatant, v katerem je bila topna frakcija proteinov, smo odstranili v novo mikrocentrifugirko in iz njega pripravili vzorec za elektroforezo.
13. Med poizkusom smo spreminjali temperaturo inkubacije po dodanem IPTG, koncentracijo IPTG, čas inkubacije po dodanem IPTG, vrednost OD₆₀₀ pred dodanim IPTG in gojišče.

3.2.5 Izražanje rekombinantne leptin vezavne domene v kulturi *E. coli* BL21/pLysS/pET28/LBD

1. Priprava gojišča LB.
2. Nato smo pripravili 50 mL prekonočne kulture iz 100 μ L založne kulture *E. coli* BL21/pLysS/pET28/LBD v LB s 35 μ g/mL kanamicina in 34 μ l/mL kloramfenikola.
3. Po 2,5 mL prekonočne kulture smo prenesli v vsako erlenmajerico z gojiščem LB in gojišča inkubirali na stresalniku pri 37 °C, dokler ni OD₆₀₀ kulture dosegel vrednost ~ 0,4.
4. Izražanje rekombinantnega proteina leptin vezavne domene (LBD) smo sprožili z dodatkom IPTG do koncentracije 1 mM (50 μ L) in nadaljevali inkubacijo na stresalniku pri 37 °C.
5. Štiri ure po indukciji izražanja proteina LBD smo gojišču odvzeli 9 mL vzorca, ga prenesli v centrifugirke, vzorce centrifugirali (10 min, 9000 vrt./min), supernatant odlili.
6. Celično usedlino suspendirali z 1,9 mL pufru PBS, vzorce centrifugirali, supernatant odlili.
7. Korak 6 smo ponovili še enkrat.
8. Nato smo celično usedlino suspendirali v 1,9 mL ekvilibracijskega pufru.
9. Celice smo razbili z ultrazvokom tako, da smo jih sonicirali trikrat v 30-s intervalih in vmes ohlajali 1 minuto na ledu.
10. Suspenziji smo dodali nukleazo do koncentracije 10 μ L/mL in 0,2 μ L Mg ter 20 min s stresanjem inkubirali na sobni temperaturi.
11. Nato smo suspenzijo centrifugirali (14.000 vrt./min, 10min).
12. Supernatant, ki je vseboval topno frakcijo proteinov, smo odstranili in iz njega pripravili vzorec za elektroforezo.
13. S celično usedlino smo ravnalipo postopku za inkluzijska telesa, kot je navedeno od 14. točke naprej.
14. Tako dobljena inkluzijska telesa smo spirali štirikrat:
 - 1,9 mL 1-% Triton X-100,
 - 1,9 mL 1-% Triton X-100 in 0,5-M gvanidinijev klorid,
 - 1,9 mL ddH₂O,
 - 1,9 mL ddH₂O.
15. Po vsakem koraku smo vzorce centrifugirali (14.000 vrt./min, 5 min) in supernatant odlili.
16. Inkluzijska telesa smo raztopili v pufru za raztapljanje IT.

17. Vzorcem smo dodali DTT do končne koncentracije ~ 33 mM in jim umerili pH na 11,5 z dodatkom NaOH.
18. Po 2 urah inkubacije na sobni temperaturi z občasnim mešanjem smo vzorce centrifugirali (10.000 vrt./min, 15min).
19. Supernatant, ki je vseboval netopno frakcijo proteinov, smo odstranili v novo mikrocentrifugirko in iz njega pripravili vzorec za elektroforezo.
20. Med poizkusom smo spreminjali temperaturo inkubacije po dodanem IPTG, koncentracijo IPTG, čas inkubacije po dodanem IPTG, vrednost OD₆₀₀ pred dodanim IPTG in gojišče.

3.2.6 Določevanje celokupne koncentracije proteinov

Za merjene koncentracije proteinov v vzorcu smo uporabili metodo BCA. BCA (ang. *bicinchoninic acid assay*) je biokemična analizna metoda za določevanje celokupne koncentracije proteinov v raztopini. Deluje na osnovi bikinkoninske kisline, ki v reakcijski zmesi kompleksira ione Cu⁺, pri čemer v alkalnem nastajajo obarvani kompleksi. Glede na količino proteinov raztopina spreminja barvo od zelene do vijolične, kar lahko zaznamo z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 562 nm [35].

Reagent smo pripravili tako, da smo v reagent A, ki vsebuje bikinkoninsko kislino, odpipetirali 2 % končnega volumna reagenta B, ki vsebuje Cu⁺. V 220 µl reagent smo dodali 8 µl standarda oziroma 8 µl vzorca. Standardne koncentracije proteina za umeritveno krivuljo smo pripravili v koncentracijah: 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,3 mg/mL in 0 mg/mL.

Vse vzorce smo inkubirali 10 min na 50°C, jih prenesli na mikrotitersko ploščo in jim izmerili absorbanco s spektrofotometrom pri 562 nm.

3.2.7 Čiščenje rekombinantnih proteinov s kovinsko-kelatno kromatografijo

Pri našem delu smo uporabili kolono za kovinsko-kelatno kromatografijo (IMAC) podjetja Proteus [36]. Potek čiščenja z afinitetno kromatografijo zajema štiri korake. Najprej ekvilibriramo kolono s pufrom, v katerem bo raztopljen vzorec. Nato naneseemo vzorec. V naslednjem koraku spiramo nevezan oziroma nespecifično adsorbiran material in na koncu eluiramo vezane proteine. Pri izbiri pufru za ekvilibracijo kolone in raztapljanje vzorca moramo paziti, da sta tako ligand kot analit v njem stabilna in da pufer ne vpliva na njuno interakcijo.

1. Pred začetkom dela smo morali pripraviti kolono za uporabo. Najprej smo sestavili kolono v skladu z navodili proizvajalca in nanjo vezali ione Ni^{2+} :
 - Spiranje kolone s centrifugiranjem (500 g, 3 min) 20 mL ddH₂O
 - Spiranje kolone s centrifugiranjem (500 g, 3 min) 20 mL 0.1 M NiSO₄ raztopljenim v 1 × pufri PBS, pH 7,4.
2. Za ekvilibracijo smo IMAC kolono najprej centrifugirali (500 g, 3 min) z 10 mL vezavnega pufra, pH 7,4, 10 mM imidazol.
3. Vzorec smo filtrirali skozi filter z velikostjo por 0,22 µm, zato da smo odstranili vse celične ostanke in oborjene proteinske komplekse.
4. Na kolono smo nato nanесли 20 mL vzorca ter nato centrifugirali na 150 g za 30 min oziroma dokler ves vzorec ni prešel skozi kolono.
5. Kolono smo trikrat spirali s centrifugiranjem (500 g, 3 min) z 10 mL pufra za spiranje pH 7,4, 30 mM imidazol. S tem smo odstranili vse ne-tarčne proteine, ki nimajo anfinite do imobiliziranega kovinskega iona.
6. Proteine s histidinskim označevalcem smo eluirali s centrifugiranjem (500 g, 3 min) z 10 mL elucijskega pufra pH 7,4, 300 mM imidazol.
7. Elucijo smo ponovili še s pufrom, ki je vseboval 500 mM imidazol in 1 M imidazol.

3.2.8 Ločevanje rekombinantnih proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega laurilsulfata

Priprava vzorcev za SDS-PAGE:

8. V mikrocentrifugirko smo dodali 20 µl vzorca, 6 µl barvila Sample Buffer in 2 µl DTT reducenta, ter vse skupaj narahlo premešali s pipeto.
9. V eni mikrocentrifugirki smo pripravili označevalec velikosti, tako da smo zmešali 6 µl označevalca velikosti, 6 µl barvila Sample Buffer in 2 µl DTT-reducenta ter vse skupaj narahlo premešali s pipeto.
10. Vzorce in označevalec velikosti smo nato dali v kopel na 75 °C za 10 min.
11. Medtem smo pripravili gel, ki smo ga samo vstali v kadičko in ga zalili z 1 × pufrom Tris-Glicin.
12. Vzorce in označevalec velikosti smo nanесли na elektroforezni gel.
13. Elektroforezo smo priključili na napetost 200 V za ~ 40 min.

14. Po končani elektroforezi smo gel obarvali z barvilom Instant Blue, tako da smo barvilo prelili čez gel, ki smo ga predhodno odstranili iz kadičke in pustili stati čez noč.
15. Obarvani gel smo očistili z vodo.

3.2.9 Gojenje v bioreaktorju in prenos v večje merilo

V naši raziskovalni nalogi je prenos v večje merilo pomenil prenos gojenja iz 50 mL elermanjerice v 1000 mL bioreaktor podjetja Jafrol, d.o.o. Uporabili smo bioproces z enkratnim polnjenjem. To pomeni, da smo na začetku vnesli kulturo in vsa potrebna hranila. Mikroorganizem se razmnožuje, dokler ne zmanjka hranil, med procesom pa hranil ne dodajamo ali ne odvezujemo produktov. Zaradi zagotavljanja optimalnih pogojev za rast smo dovajali kisik (1 L/min) in uvedli mešalo. Hitrost mešala je bila 400 obratov/minuto.

3.2.9.1 Izražanje rekombinante domene B stafilokoknega proteina A v bioreaktorski posodi

1. Priprava gojišča LB.
2. Nato smo pripravili 50 mL prekonočne kulture iz 100 μ L založne kulture *E. coli* BL21/pLysS/pET28/BD v LB s 35 μ g/mL kanamicina in 34 μ l/mL kloramfenikola.
3. Bioreaktor z 800 mL gojiščem VPB in dodanimi antibiotiki; kanamicina 35 μ g/mL in kloramfenikola 34 μ l/mL smo inokulirali z 40 mM prekonočne kulture.
4. Kulturo smo inkubirali pri 37°C.
5. Pri $OD_{600} = 0,5$ smo vključili prezračevanje s hitrostjo 1 L/min in dodali protipenilec.
6. Ko je kultura dosegla OD_{600} 1.0 smo izražanje proteina B-SpA sprožili z dodatkom IPTG do koncentracije 3 mM (2400 μ L) in nadaljevali inkubacijo pri 37 °C.
7. Šest ur po indukciji izražanja proteina B-SpA smo gojišče razdelili v centrifugirke po 50 mL vzorca, jih centrifugirali (10 min, 9000 vrt./min) in supernatant odlili.
8. Celično usedlino smo resuspendirali s pufrom PBS in jo združili, tako da smo dobili 6 mL skoncentriranega vzorca, ki smo ga razdelili v mikrocentrifugirke po 2 mL.
9. Vzorce smo centrifugirali (14.000 vrt./min, 10 min).
10. Celično usedlino smo dvakrat sprali z 1 mL pufra PBS.
11. Nato smo celično usedli suspendirali v 1,9 mL ekvilibracijskega pufra.
12. Celice smo razbili z ultrazvokom tako, da smo jih sonicirali trikrat z 30 s intervali in vmes ohlajali 1 minuto na ledu.
13. Suspenziji smo dodali nukleazo do koncentracije 10 μ L/mL in 1 μ L/mL.
14. 20 min smo s stresanjem inkubirali na sobni temperaturi.
15. Nato smo suspenzijo centrifugirali (14.000 vrt./min, 10 min).

16. Supernatant, v katerem je bila topna frakcija proteinov, smo odstranili v novo mikrocentrifugirko in iz njega odvzeli 20 μL vzorca za elektroforezo.
17. Preostali vzorec smo nanесли na IMAC kolono, po postopku opisanem v točki 3.2.7.
18. Vzorce, ki smo jih dobili po spiranju iz IMAC-kolone smo prav tako obdelali in analizirali z elektroforezo.

3.2.9.2 Izražanje rekombinantne leptin vezavne domene v biorektorski posodi

1. Priprava gojišča LB.
2. Nato smo pripravili 50 mL prekonočne kulture iz 100 μL založne kulture *E. coli* BL21/pLysS/pET28/LBD v LB s 35 $\mu\text{g/mL}$ kanamicina in 34 $\mu\text{l/mL}$ kloramfenikola.
3. Bioreaktor z 800 mL gojiščem VPB in dodanimi antibiotiki; kanamicina 35 $\mu\text{g/mL}$ in kloramfenikola 34 $\mu\text{l/mL}$ smo inokulirali z 40 mM prekonočne kulture.
4. Kulturo smo inkubirali pri 37 °C.
5. Pri $\text{OD}_{600} = 0,5$ smo vključili prezračevanje s hitrostjo 1 L/min in dodali protipenilec.
6. Ko je kultura dosegla OD_{600} 1.0 smo izražanje proteina LBD sprožili z dodatkom IPTG do koncentracije 0,01 mM (8 μL) in 1 mM (800 μL) in nadaljevali z inkubacijo na stresalniku pri 37°C.
7. Šest ur po indukciji izražanja proteina LBD smo gojišče razdelili v centrifugirke po 50 mL vzorca, jih centrifugirali (10 min, 9000 vrt./min) in supernatant odlili.
8. Celično usedlino smo suspendirali s pufrom PBS in jo združili, tako da smo dobili 6 mL skoncentriranega vzorca, ki smo ga razdelili v mikrocentrifugirke po 2 mL.
9. Vzorce smo centrifugirali (14.000 vrt./min, 10 min).
10. Celično usedlino smo suspendirali z 1,9 mL pufru PBS, vzorce centrifugirali, supernatant odlili.
11. Korak 10 smo ponovili še enkrat.
12. Nato smo celično usedlino suspendirali v 1,9 mL ekvilibracijskega pufru.
13. Celice smo razbili z ultrazvokom tako, da smo jih sonicirali trikrat z 30 s intervali in vmes ohlajali 1 minuto na ledu.
14. Suspenziji smo dodali nukleazo do koncentracije 10 $\mu\text{L/mL}$ in 1 $\mu\text{L/mL}$ ter 20 min s stresanjem inkubirali na sobni temperaturi.
15. Nato smo suspenzijo centrifugirali (14.000 vrt./min, 10 min).

16. S celično usedlino smo ravnali po postopku za inkluzijska telesa, kot je naveden od 17. točke naprej.
17. Tako dobljena inkluzijska telesa smo spirali štirikrat:
 - 1,9 mL 1-% Triton X-100
 - 1,9 mL 1-% Triton X-100 in 0,5 M gvanidinijev klorid
 - 1,9 mL ddH₂O
 - 1,9 mL ddH₂O
18. Po vsakem koraku smo vzorce centrifugirali (14.000 vrt./min, 5 min) in supernatant odlili.
19. Inkluzijska telesa smo raztopili v pufri za raztapljanje IT.
20. Vzorcem smo dodali DTT do končne koncentracije ~ 33 mM in jim umerili pH na 11,5 z dodatkom NaOH.
21. Po 2 urah inkubacije na sobni temperaturi z občasnim mešanjem, smo vzorce centrifugirali (10.000 vrt./min, 15 min).
22. Supernatant, ki je vseboval netopno frakcijo proteinov, smo odstranili v novo mikrocentrifugirko in iz njega odvzeli 20 µL vzorca za elektroforezo.
23. Preostali vzorec smo nanegli na IMAC-kolono, po postopku, opisanem v točki 3.2.7.
24. Vzorce, ki smo jih dobili po spiranju z IMAC-kolone, smo prav tako obdelali in nanegli na elektroforezo.

4 REZULTATI

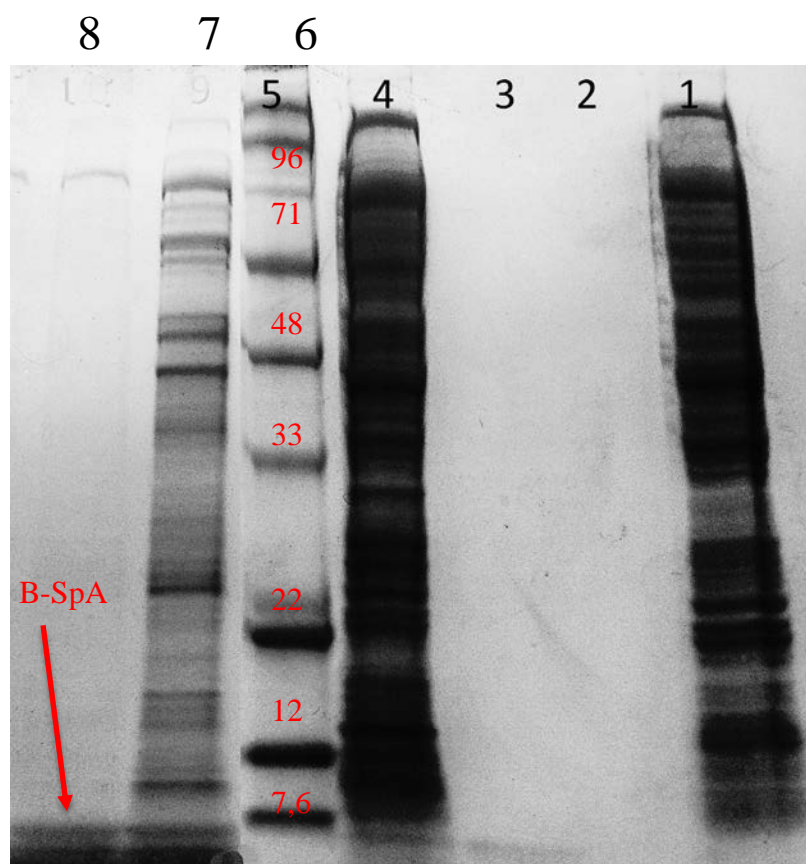
Naše delo je potekalo v treh delih. Najprej smo celotni postopek opravili in preizkusili na proteinu B-SpA (*B domena stafilokoknega proteina A*), saj je delo s tem proteinom lažje in preprostejše, ker se protein B-SpA ne izraža v inkluzijskih telesih. S tem smo postavili osnovni proces. Šele na to smo celotni postopek prenesli na protein LBD (*leptin vezavna domena*). Ko smo optimizirali gojenje obeh proteinov, smo ponovili postopek s prenosom v večje merilo in gojenje ponovili v biorektorski posodi.

4.1 OPTIMIZACIJA IZRAŽANJA DOMENE B STAFILOKOKNEGA PROTEINA A

V prvem koraku smo želeli potrditi ustreznost analizne metode SDS-PAGE za določanje rekombinantnih proteinov. Posledično smo se lahko pri nadaljnjem postopku optimizacije izognili vsakokratnemu čiščenju proteina na IMAC-koloni. Osnovni postopek gojenja je potekal pri pogojih, kot jih izvajajo v okviru vaj na Fakulteti za farmacijo in z njimi zagotovo dobimo ustrezno količino proteina. Bakterijo smo gojili na stresalniku na 37 °C, ji pri $OD_{600}=0,4$, dodali 1 mM IPTG in inkubirali dodatne 4 ure. Nato smo obdelali kulturo po predhodno opisanih postopkih za izolacijo rekombinantnih proteinov. Pri tem postopku smo pred nanosom na gel, vzorce očistili z IMAC-kromatografijo. Protein se je vezal na kolono Ni^{2+} , od koder smo ga sprali s pufrom, ki je vseboval 300 mM imidazol, kakor priporočajo v protokolu proizvajalca Proteus kolone [36]. Nato smo vzorce nanegli na gel za elektroforezo.

Vzorec 7, je v skladu s pričakovanju, tvorili elektroforezno liso (slika 2, označeno s puščico) na mestu, ki pomeni, da je velikosti proteina pod 7.6 kDa, kar ustreza velikosti našega proteina.

S tem, ko smo dokazali, da lahko neposredno z elektroforezo dokazujemo prisotnost oziroma odsotnost tarčnega proteina, kar nam je omogočalo, da smo lahko tekom optimizacije analizirali vzorce brez vsakokratnega predhodnega kromatografskega čiščenja.



Slika 3: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 7 – potrditev velikosti proteina B-SpA

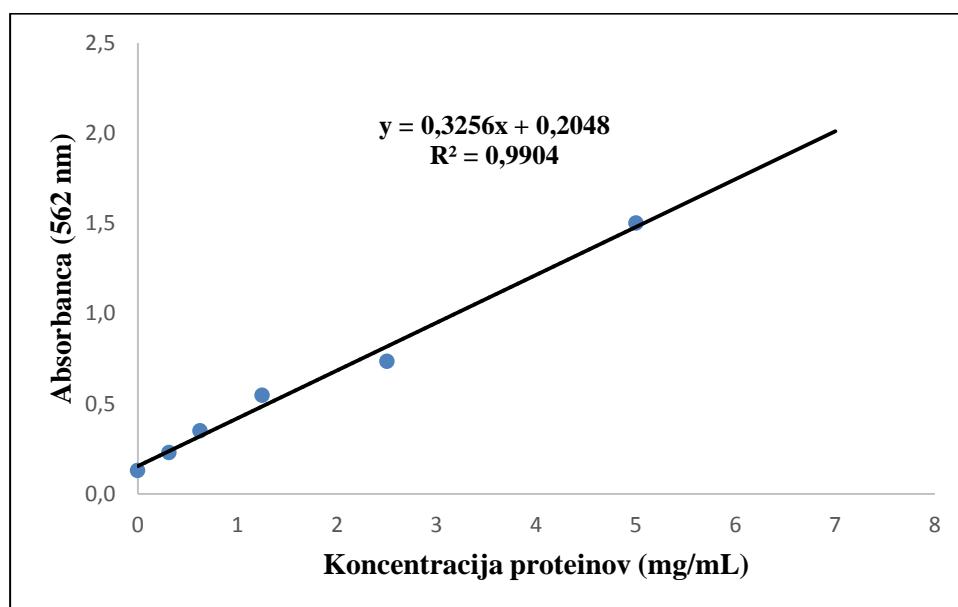
- 1: Kontrola – neinducirana topna frakcija, 20 μ l;
- 2: Kontrola, neinducirana netopna frakcija – izolirana iz inkluzijskih teles, 20 μ l;
- 3: Inducirana topna frakcija vzorca očiščena z IMAC kolono, 40 μ l;
- 4: Inducirana topna frakcija, 20 μ l;
- 5: Označevalec velikosti, označene velikosti v kDa;
- 6: Skupek združenih vzorcev inducirane topne frakcije, prvo spiranje s pufrom za spiranje, 20 μ l;
- 7: Skupek združenih vzorcev inducirane topne frakcije, prvo spiranje s pufrom za eluiranje, 40 μ l – označeno s puščico.

Ko smo potrdili velikost proteina in tako dobili pozitivno kontrolo za elektroforezno analizo, smo lahko nadaljevali optimizacijo pogojev gojenja. Vsakič, ko smo določen parameter potrdili kot najbolj optimalen, smo pri nadaljnjem gojenju uporabili ta pogoj. Prvi dejavnik, ki smo ga preizkusili, je bila sprememba koncentracije IPTG. Bakterije smo inducirali z IPTG v koncentracijah: 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 3 mM in 5 mM.

V tem prvem setu eksperimentov smo vsem vzorcem določili celokupno koncentracijo proteinov v vzorcu z metodo BCA in glede na rezultate preračunali ustrezne volumne, ki smo jih nanесли na gel SDS-PAGE. Glede na pridobljene rezultate smo se za nadaljnje rezultate odločili, da merjenje koncentracije proteinov in s tem nanašanje ustreznih koncentracij na gel ni smiselno, saj smo lahko vse vzorce brez dodatnih redčenj naložili na gele.

Preglednica I: Meritve standardne koncentracije proteinov z metodo BCA za umeritveno krivuljo

Standard (mg/mL)	A _{562 nm}		A povprečna
0	0,100	0,105	0,103
0,3125	0,387	0,235	0,311
0,625	0,500	0,467	0,484
1,25	0,633	0,667	0,650
2,5	1,104	0,949	1,027
5	1,922	1,698	1,810

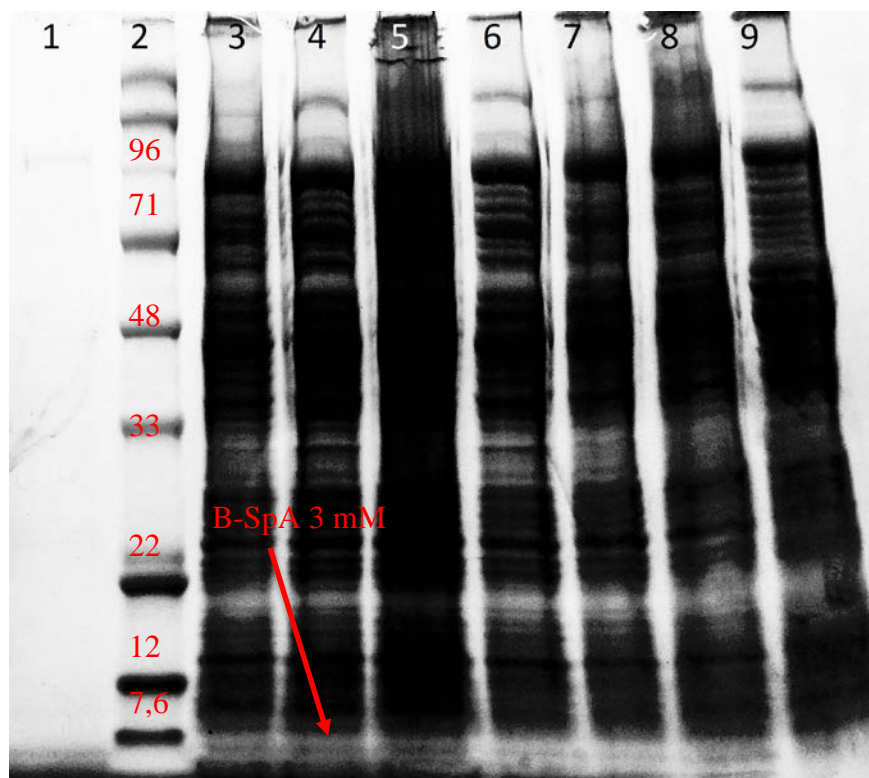


Slika 4: Umeritvena krivulja za preglednice II in III

Preglednica II: Izračun koncentracije proteinov z metodo BCA – vzorec (gel št. 8 - slika 4)

Vzorec	A	Celokupna koncentracija proteinov (mg/mL)
Pozitivna kontrola	0,935	2,243
0,1 mM IPTG	0,812	1,865
0,5 mM IPTG	0,912	2,172
1 mM IPTG	0,874	2,055
3 mM IPTG	0,796	1,816
5 mM IPTG	0,781	1,770

Negativna kontrola	1,507	3,999
--------------------	-------	-------

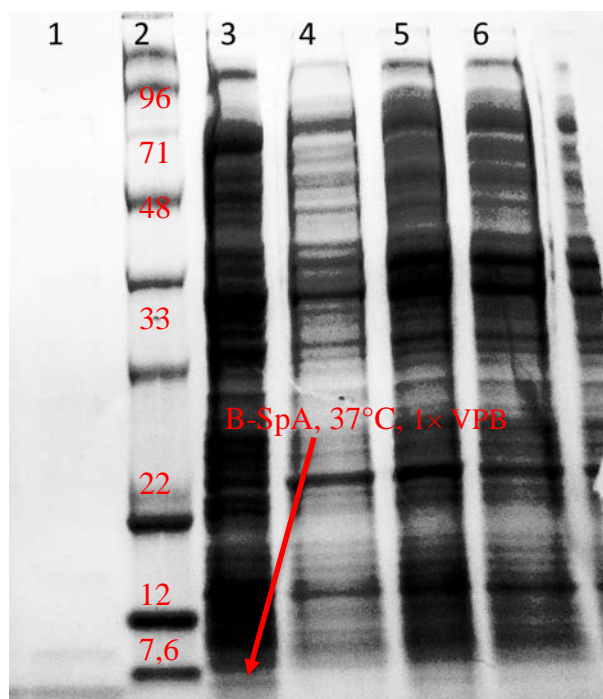


Slika 5: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 8 – preizkušanje vpliva različnih koncentracij IPTG

- 1: Pozitivna kontrola, vzorec z IMAC kolono očiščene inducirane topne frakcije, 40 μ l;
- 2: Označevalec velikosti, označene velikosti v kDa;
- 3: S 5 mM IPTG inducirana topna frakcija, 22,5 μ l;
- 4: S 3 mM IPTG inducirana topna frakcija, 22 μ l, označeno s puščico;
- 5: Z 1 mM IPTG inducirana topna frakcija, 40 μ l;
- 6: Z 1 mM IPTG inducirana topna frakcija, 20 μ l;
- 7: Z 0,5 mM IPTG inducirana topna frakcija, 19 μ l;
- 8: Z 0,1 mM IPTG inducirana topna frakcija, 21,5 μ l;
- 9: Negativna kontrola, neinducirana topna frakcija

Vzorci smo nanesti na elektroforezni gel, iz katerega smo razbrali, da bakterija proizvede največ proteina, če je koncentracija IPTG 3 mM. Na sliki 3 je slabše vidno, da je glede na preračunano koncentracijo proteinov na mestu 4 (označeno s puščico) elektroforezna lisa najmočnejša (na gelu je bila razlika bolj očitna, kot jo lahko vidimo na skenirani sliki gela). Pri nadaljnjem delu smo zato vse vzorce inducirali s 3 mM IPTG. V vseh vzorcih, ki smo jih nanesti na gel 8 (slika 4) je enaka koncentracija proteinov, razen na mestu 5, kjer smo nanesti standardno količino vzorca 40 μ l.

Naslednji parameter, ki smo ga optimizirali, je bil vpliv različnih temperatur na izražanje proteina. Bakterijo smo gojili pri temperaturi 25 °C, 31 °C in 37 °C (rezultat pri 25 °C ni prikazan na slikah). Iz gela smo lahko razbrali, da se protein slabše izraža, če gojimo bakterije pri temperaturah nižjih od 37 °C. Zanimalo nas je tudi ali ima vpliv na izražanje proteina koncentracija gojišča oziroma ali se izražanje spremeni, če gojišče zamenjamo. Zato smo bakterije gojili na gojiščih, ki so vsebovala 0,5× LB, 1× LB in 1× VPB. Kot lahko vidimo na sliki 4, smo pokazali, da v primerjavi z 1× LB gojiščem ne pride do izražanja proteina na 0,5× gojišču LB. Izražanje se poveča, če gojimo bakterije na 1× gojišču VPB, kljub temu, pa nismo preizkusili gojenja tudi na 0,5× VPB. Zato smo v nadaljevanju dela vse vzorce gojili na 1× gojišču VPB.

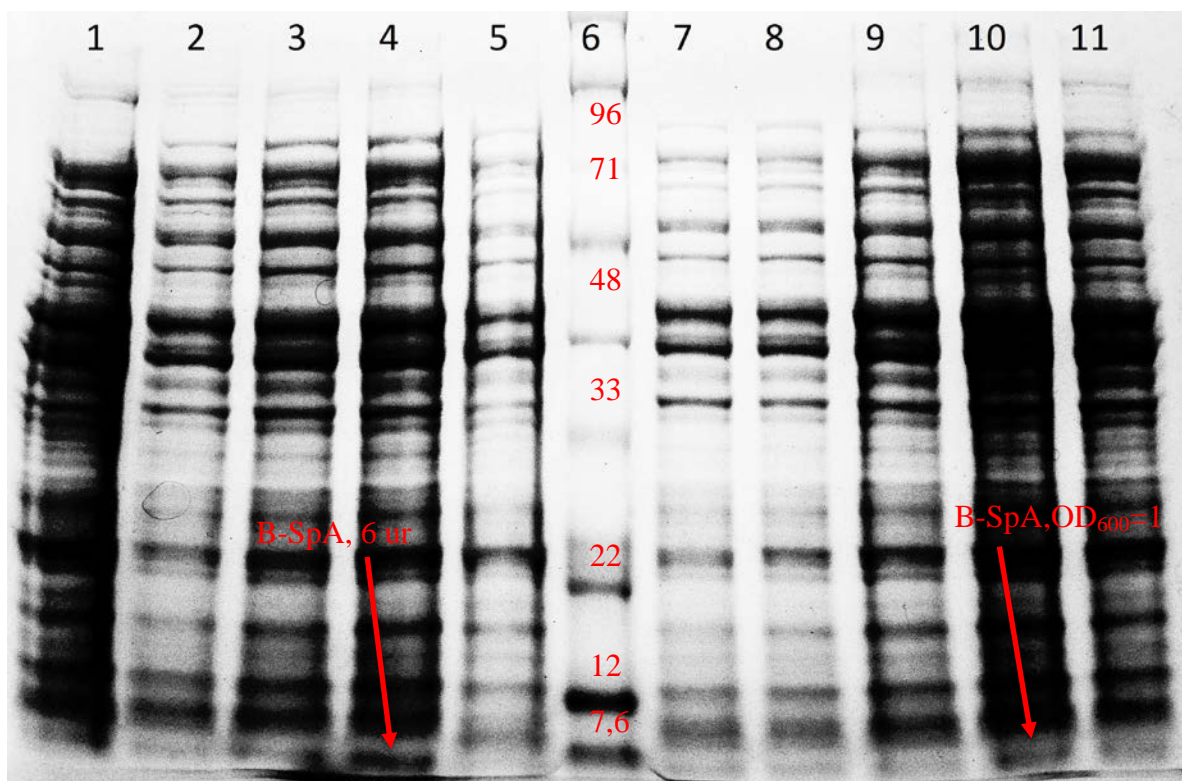


Slika 6: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 10 – preizkušanje vpliva temperature in gojišča

- 1: Pozitivna kontrola, z IMAC kolono očiščena inducirana topna frakcija, 20 µl;
- 2: Označevalec velikosti, označene velikosti v kDa;
- 3: Inducirana topna frakcija vzorca gojenega na 37 °C, 1× VPB, 20 µl;
- 4: Inducirana topna frakcija vzorca gojenega na 37 °C, 0,5× LB, 20 µl;
- 5: Inducirana topna frakcija vzorca gojenega na 37 °C, 1× LB, 20 µl;
- 6: Inducirana topna frakcija vzorca gojenega na 31 °C, 1× LB, 20 µl.

V naslednjem koraku smo želeli preveriti, kateri je najprimernejši trenutek za ustavitev fermentacije, da je koncentracija tarčnega proteina največja. Vzorce smo odvzeli po 2, 4, 6 in 20 urah po dodanem IPTG. Prav tako nas je zanimalo, kdaj je najprimernejši čas za indukcijo proteinov z IPTG. Na sliki 6 lahko vidimo, da je najmočnejša elektroforetska lisa na mestu 4 (označeno s puščico), torej pri vzorcu, ki smo ga odvzeli po 6 urah, kar je bil tudi čas pri katerem smo ustavili gojenje v nadaljnjih poizkusih. Po 20 urah je bila lisa vidno šibkejša (mesto 5).

Zadnja spremenljivka je bil čas za indukcijo z IPTG. IPTG smo dodali pri $OD_{600}=0,1$, $OD_{600}=0,4$, $OD_{600}=0,7$, $OD_{600}=1$ in $OD_{600}=1,4$. Pri $OD_{600}=1$ je bil protein najbolj izražen (mesto 10 – označeno s puščico).

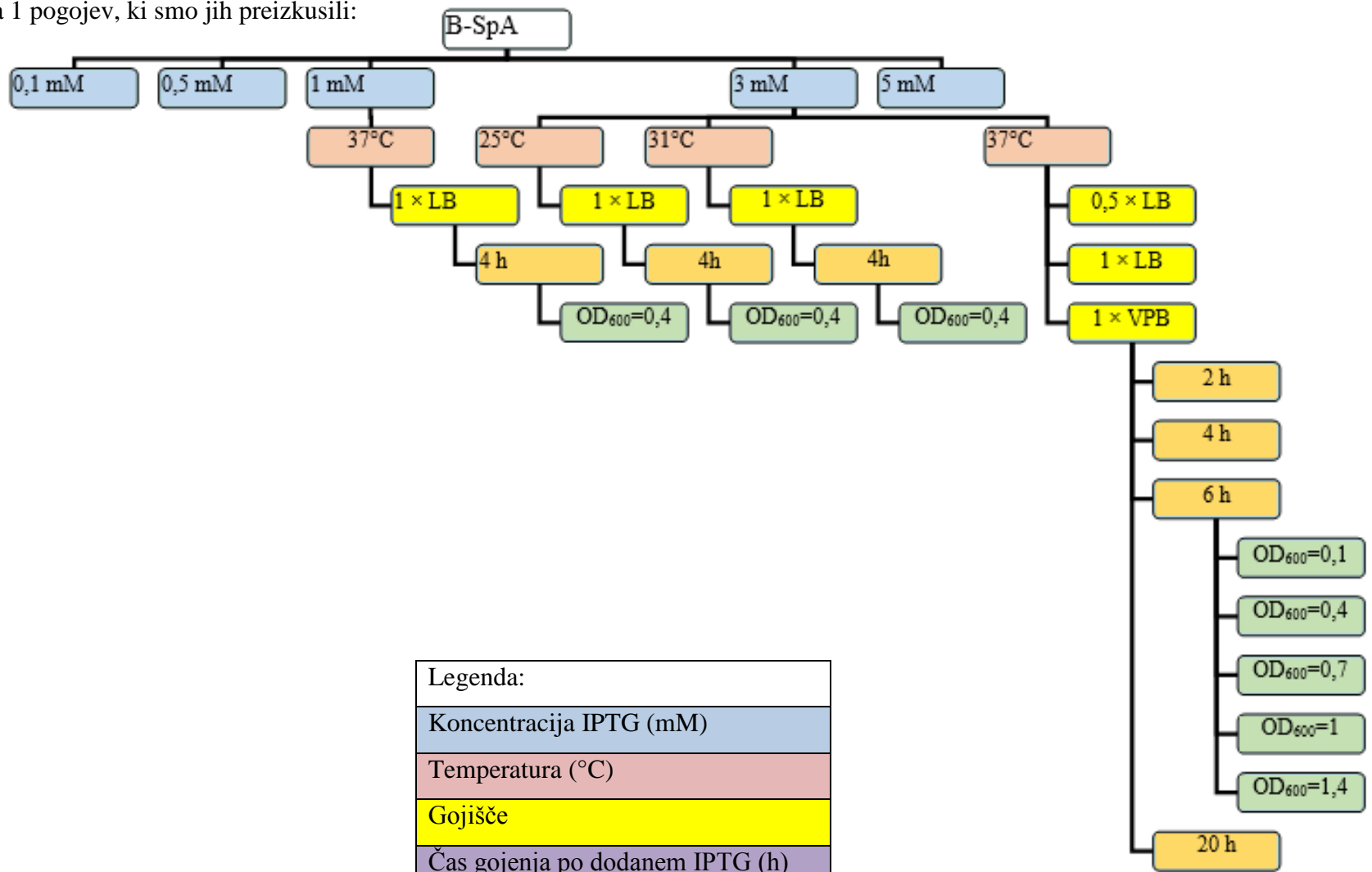


Slika 7: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 11 – preizkušanje vpliva časa po indukciji in OD_{600}

- 1: Negativna kontrola, neinducirana topna frakcija, 20 μ l;
- 2: Inducirana topna frakcija odvzeta 2 urah po dodanem IPTG, 20 μ l;
- 3: Inducirana topna frakcija odvzeta 4 urah po dodanem IPTG, 20 μ l;
- 4: Inducirana topna frakcija odvzeta 6 urah po dodanem IPTG, označeno s puščico, 20 μ l;
- 5: Inducirana topna frakcija odvzeta 20 urah po dodanem IPTG, 20 μ l;
- 6: Označevalce velikosti, označene velikosti v kDa;
- 7: Inducirana topna frakcija IPTG dodan pri $OD_{600}=0,1$, 20 μ l;
- 8: Inducirana topna frakcija IPTG dodan pri $OD_{600}=0,4$, 20 μ l;
- 9: Inducirana topna frakcija IPTG dodan pri $OD_{600}=0,7$, 20 μ l;
- 10: Inducirana topna frakcija IPTG dodan pri $OD_{600}=1$, označeno s puščico, 20 μ l;

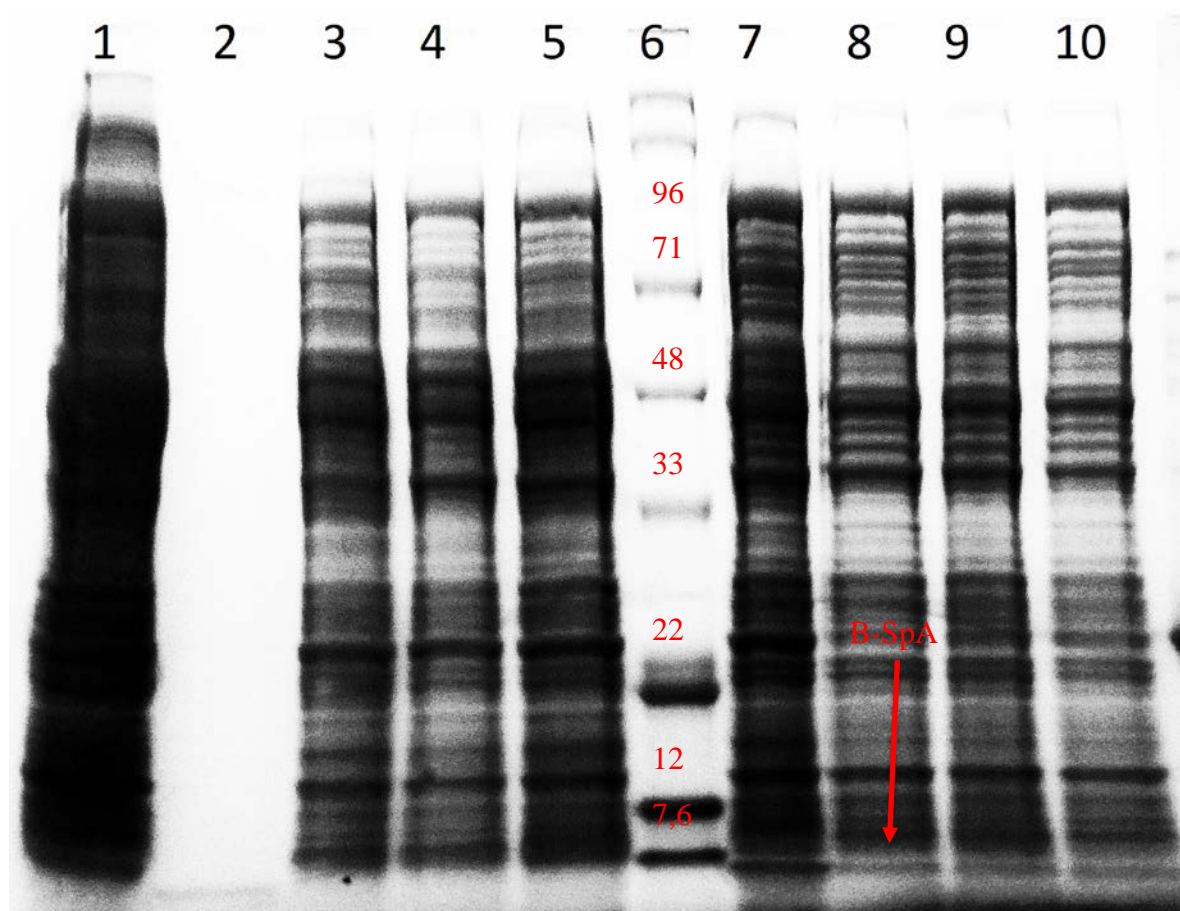
11: Inducirana topna frakcija IPTG dodan pri $OD_{600}=1,4$, 20 μ l.

Shema 1 pogojev, ki smo jih preizkusili:



Legenda:
Koncentracija IPTG (mM)
Temperatura (°C)
Gojišče
Čas gojenja po dodanem IPTG (h)
OD ₆₀₀ (A)

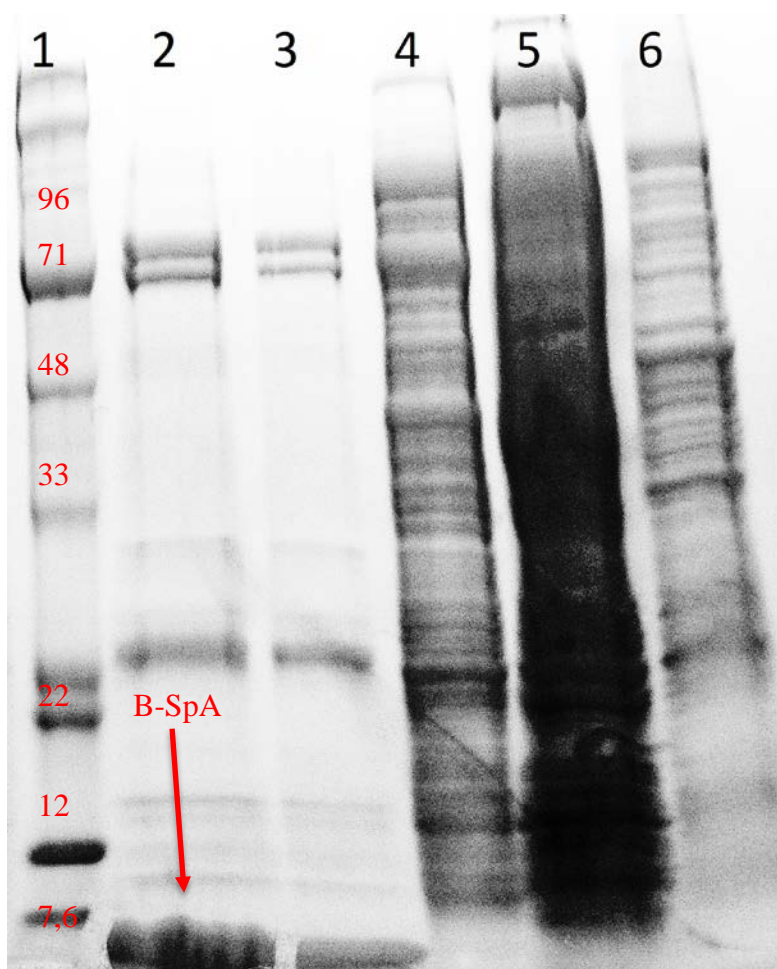
Glede na rezultate, ki smo jih pridobili, smo bakterijo gojili pod pogoji, ki so se pokazali kot najbolj optimalni. Pridobljene vzorce smo nanесли na elektroforetski gel. Na sliki 7 (na gelu je bila razlika bolj očitna, kot jo lahko vidimo na skenirani sliki gela) smo še enkrat želeli pokazati primerjavo med različnimi pogoji gojenja in potrditi rezultate dela. S puščico je na gelu označeno mesto, kjer so prikazani najboljši pogoji gojenja in sicer na gojišču $1 \times$ VPB, če induciramo pri $OD_{600}=1$, s koncentracijo IPTG 3 mM in če pustimo rasti bakterije po dodanem IPTG še 6 ur pri 37°C .



Slika 8: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 12 – primerjava različnih parametrov in potrditev najbolj optimalnih pogojev gojenja

- 1: Negativna kontrola, neinducirana topna frakcija, $20\ \mu\text{l}$;
 - 2: Pozitivna kontrola, inducirana topna frakcija očiščena s kolono IMAC, $20\ \mu\text{l}$;
- Inducirana topna frakcija pod pogoji;
- 3: Gojišče LB, $OD_{600}=1$, čas po dodanem IPTG 20 ur, koncentracija IPTG 3 mM, $20\ \mu\text{l}$;
 - 4: Gojišče LB, $OD_{600}=1$, čas po dodanem IPTG 6 ur, koncentracija IPTG 3 mM, $20\ \mu\text{l}$;
 - 5: Gojišče LB, $OD_{600}=1$, čas po dodanem IPTG 4 ure, koncentracija IPTG 3 mM, $20\ \mu\text{l}$;
 - 6: Označevalec velikosti, označene velikosti v kDa;
 - 7: Gojišče VPB, $OD_{600}=1$, čas po dodanem IPTG 20 ur, koncentracija IPTG 3 mM, $20\ \mu\text{l}$;
 - 8: Gojišče VPB, $OD_{600}=1$, čas po dodanem IPTG 6 ur, koncentracija IPTG 3 mM, $20\ \mu\text{l}$;
 - 9: Gojišče VPB, $OD_{600}=1$, čas po dodanem IPTG 4 ure, koncentracija IPTG 3 mM, $20\ \mu\text{l}$;
 - 10: Gojišče VPB, $OD_{600}=0,4$, čas po dodanem IPTG 6 ur, koncentracija IPTG 3 mM, $20\ \mu\text{l}$.

Gojenje pri pogojih, ki smo jih potrdili kot najbolj optimalne, smo prenesli v večje merilo. Postopek smo ponovili tako, da smo bakterije gojili v litrskem bioreaktorju. Te smo nato skoncentrirali s centrifugiranjem na 6 mL vzorca, ki smo ga obdelali po enakem postopku kot prej. Polovico topne frakcije smo nato vezali na IMAC-kolono in sprali s 300 mM imidazolom. Vzorec smo nanegli na gel SDS-PAGE. Na sliki 8 je na mestu 2 s puščico označena dobro vidna močna lisa. S tem smo pokazali, da pri optimiziranih pogojih pri prenosu v večje merilo, lahko izoliramo veliko količino proteina, ki se veže na IMAC-kolono, in ga tako očistimo.



Slika 9: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 40 – čiščenje vzorca z IMAC kromatografijo

- 1: Označevalec velikosti, označene velikosti v kDa;
- 2: Topna frakcija inducirane vzorca, ki je bil eluiran iz IMAC-kolone, označeno s puščico, 40 µl;
- 3: Topna frakcija inducirane vzorca, ki je bil eluiran iz IMAC-kolone, 20 µl;
- 4: Topna frakcija inducirane vzorca, ki je bil spran iz IMAC-kolone, 20 µl;
- 5: Topna frakcija inducirane vzorca, smo ga nanegli na IMAC-kolono, vendar se ni vezal, 20 µl;
- 6: Negativna kontrola, neinducirana topna frakcija, 20 µl.

Preglednica III: Izračun koncentracije proteinov z BCA metodo - vzorec (gel št. 40 – slika 6)

Vzorec	A	Celokupna koncentracija proteinov (mg/mL)
Eluat 1	0,626	1,294

Glede na dobljene rezultate smo izračunali približno količino proteina v bioreaktorju.

Enačba umeritvene krivulje je:

$$y = 0,3256x + 0,2048.$$

Če vstavimo v enačbo absorbanco vzorca, ki je bila 0,626 dobimo:

$$x = (0,626 - 0,2048) / 0,3256 = 1,294;$$

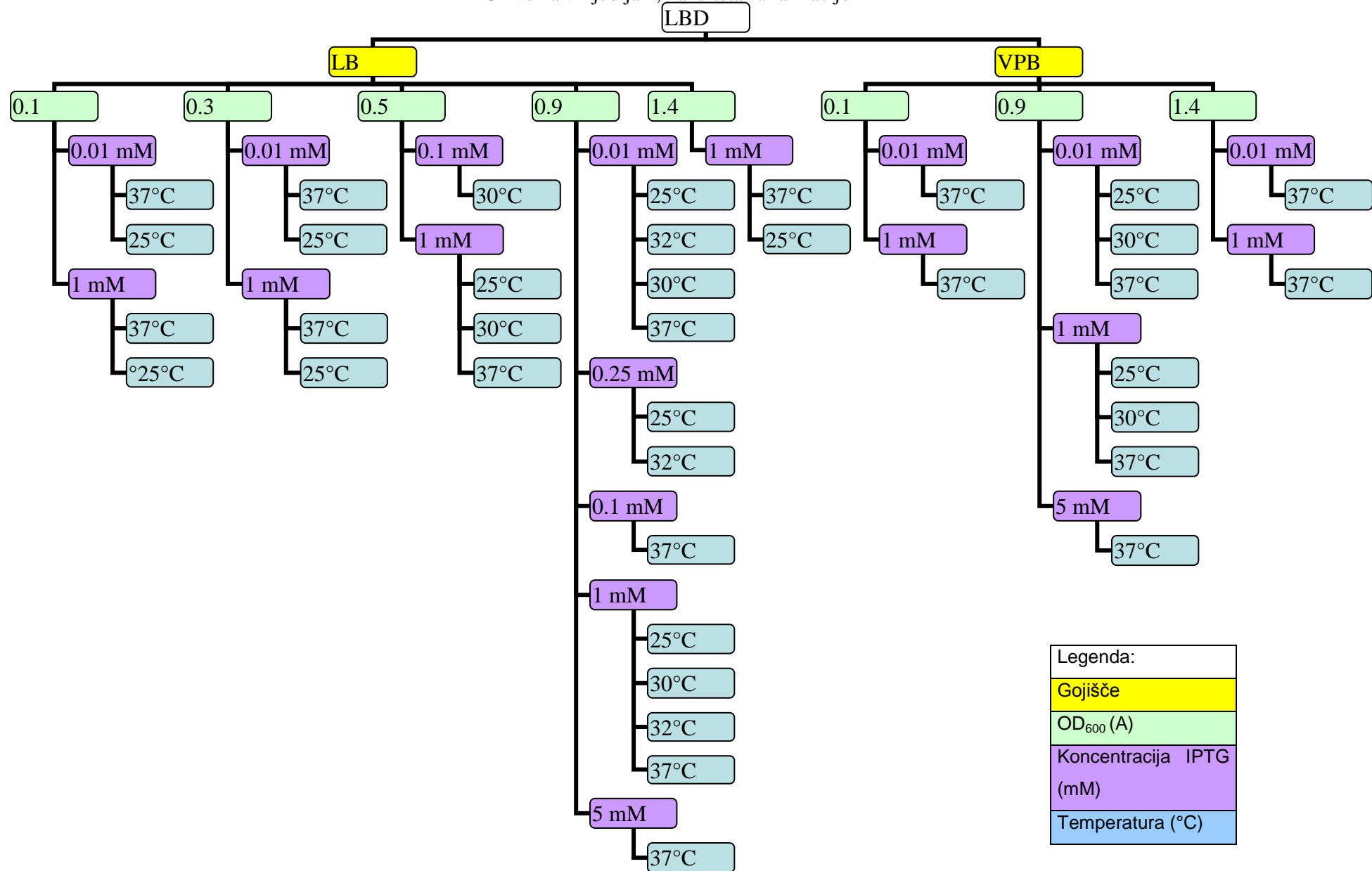
kar pomeni, da je v 1 mL vzorca 2,11 mg proteina.

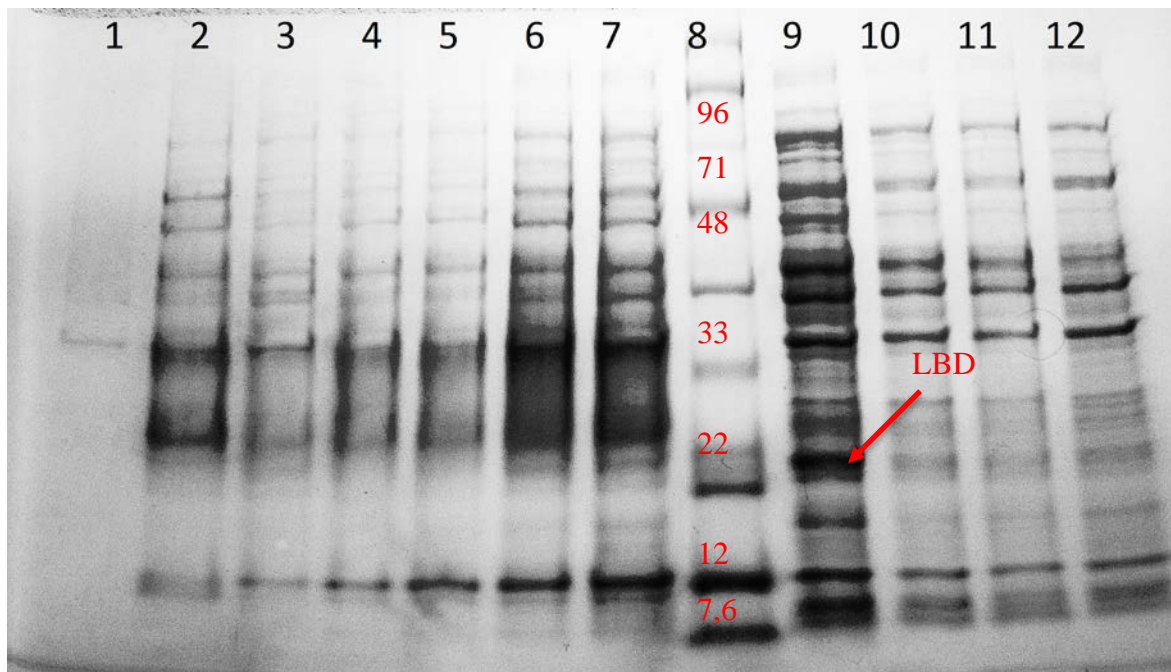
Iz tega lahko izračunamo, da je bakterija v litrskem bioreaktorju proizvedla približno (1,294 mg * 800 mL) ~ 1000 mg proteina.

4.2 OPTIMIZACIJA IZRAŽANJA LEPTIN VEZAVNE DOMENE

Iz podatkov, pridobljenih iz literature, smo vedeli, da proizvodnja proteina LBD poteka predvsem v inkluzijskih telesih in da na gelu tvori liso v velikosti ~ 25 kDa [37]. Postopka optimizacije za ta protein smo se lotili na drugačen način kot pri proteinu B-SpA. Pri proteinu LBD nas ni zanimalo samo, pri katerih pogojih gojenja je celokupna koncentracija proteina največja, ampak pri katerih pogojih dobimo več proteina v topni obliki in manj v netopni obliki, torej v inkluzijskih telesih. Zato smo bakterije gojili istočasno pod čim več različnimi pogoji in jih obdelali tako, da smo dobili vzorce topnih in netopnih frakcij proteinov, ki smo jih nato primerjali na elektroforeznem gelu. Pogoji, ki smo jih preizkusili, so prikazani v shemi 2. Tako kot pri prvem proteinu, smo tudi tukaj glede na podatke iz literature in pridobljene vzorce iz Fakultete za farmacijo, želeli najprej dokazati, pri kateri velikosti na elektroforeznem gelu, se nahaja elektroforezna lisa z iskanim proteinom in potrditi kontrolo oziroma neinduciran vzorec. Kot negativna kontrola je bil neinduciran vzorec, ki smo ga obdelali po postopku za inkluzijska telesa, saj smo ugotovili, da ne proizvaja vidne količine netopnih proteinov (slika 10). Neinducirana kontrola topnih proteinov nam je pokazala, da bakterija sama po sebi proizvaja protein iste velikosti kot netopni protein LBD, vendar pa ne proizvaja proteina v topni obliki (slika 11). Ko smo ugotovili, kateri je najbolj optimalni pogoj, smo proces prenesli v večje merilo. Celotni poizkus smo ponovili v litrskem bioreaktorju in vzorce obdelali po enakem postopku.

Shema 2 prikazuje vse kombinacije pogojev, ki smo jih preizkusili, da smo našli najbolj optimalne pogoje za izražanje proteina LBD v topni obliki:



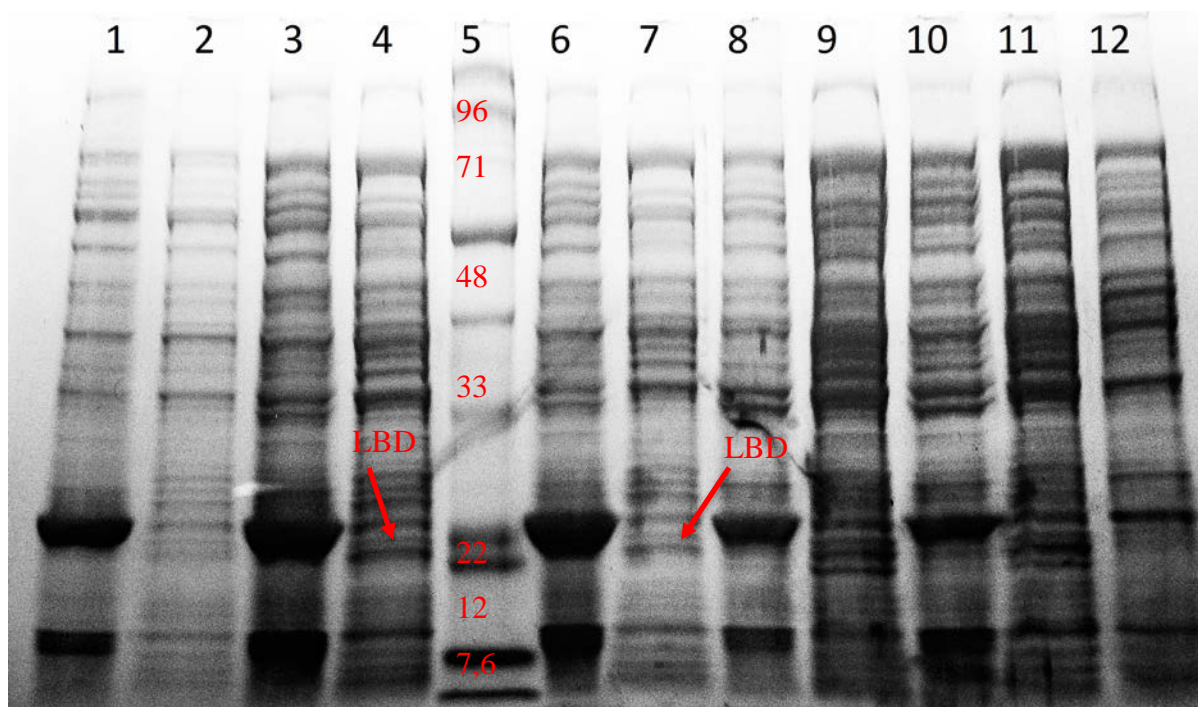


Slika 10: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 14 – preizkušanje različnih pogojev gojenja na izražanje proteina LBD

- 1: Kontrola, neinducirana netopna frakcija, 20 μ l;
 - 2: Inducirana netopna frakcija, $OD_{600}=0.5$, IPTG 1 mM, 37 $^{\circ}$ C, 3 ure, 20 μ l;
 - 3: Inducirana netopna frakcija, $OD_{600}=0.9$, IPTG 1 mM, 37 $^{\circ}$ C, 4 ure, 20 μ l;
 - 4: Inducirana netopna frakcija $OD_{600}=0.5$, IPTG 1 mM, 30 $^{\circ}$ C, 3 ure, 20 μ l;
 - 5: Inducirana netopna frakcija $OD_{600}=0.5$, IPTG 0.1 mM, 30 $^{\circ}$ C, 3 ure, 20 μ l;
 - 6: Inducirana netopna frakcija, $OD_{600}=0.5$, IPTG 1 mM, 25 $^{\circ}$ C, 3 ure, 20 μ l;
 - 7: Inducirana netopna frakcija, $OD_{600}=0.5$, IPTG 0,1 mM, 25 $^{\circ}$ C, 3 ure;
 - 8: Označevalce velikosti, označene velikosti v kDa;
 - 9: Inducirana topna frakcija, $OD_{600}=0.9$, IPTG 1mM, 37 $^{\circ}$ C, 4 ure, 20 μ l, označeno s puščico;
 - 10: Inducirana topna frakcija, $OD_{600}=0.5$, IPTG 1 mM, 30 $^{\circ}$ C, 3 ure; 20 μ l;
 - 11: Inducirana topna frakcija, $OD_{600}=0.5$, IPTG 0,1 mM, 30 $^{\circ}$ C, 3 ure, 20 μ l;
 - 12: Inducirana topna frakcija, $OD_{600}=0.5$, IPTG 1 mM, 25 $^{\circ}$ C, 3 ure, 20 μ l.
- Vse vzorce smo gojili na gojišču LB.

Na sliki 10 je v prvi vrstici nanescena kontrola, ki smo jo očistili po postopku za inkluzijska telesa. Na gelu je vidno, da bakterija brez dodatka IPTG ne proizvaja vidne količine proteinov v inkluzijskih telesih. Topna frakcija na koloni 9, ki je označena s puščico (bakterijo smo gojili pri 37 $^{\circ}$ C na gojišču LB, dodali smo 1 mM IPTG pri $OD_{600}=0,9$ in vzorec odvzeli po 4 urah), vsebuje največjo količino proteina. To so tudi pogoji, za katere smo kasneje ugotovili, da so najbolj optimalni. Ker so se ti pogoji že na začetku izkazali za primerne, smo v nadaljevanju največ preizkusov naredili pod temi

pogoji z manjšimi variacijami. To so tudi pogoji gojenja, kot so jih navedli v članku Sandowski in sod., 2002 [37].



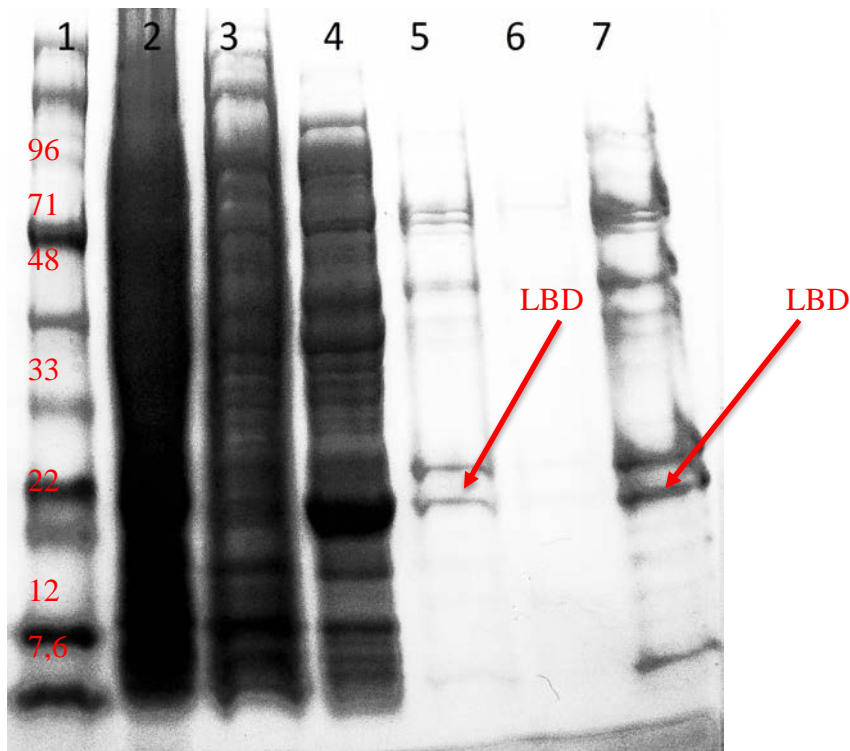
Slika 11: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 27 – preizkušanje različnih pogojev gojenja na izražanje proteina LBD

- 1: Inducirana netopna frakcija, $OD_{600}=0,1$, 1 mM IPTG, 37 °C, 4 ure, 20 μ l;
 - 2: Inducirana topna frakcija, $OD_{600}=0,1$, 1 mM IPTG, 37 °C, 4 ure, 20 μ l;
 - 3: Inducirana netopna frakcija, $OD_{600}=0,9$, 1 mM IPTG, 37 °C, 4 ure, 20 μ l;
 - 4: Inducirana topna frakcija, $OD_{600}=0,9$, 1 mM IPTG, 37 °C, 4 ure, 20 μ l, označeno s puščico;
 - 5: Označevalec velikosti, označene velikosti v kDa;
 - 6: Inducirana netopna frakcija, $OD_{600}=0,9$, 5 mM IPTG, 37 °C, 4 ure, 20 μ l;
 - 7: Inducirana topna frakcija, $OD_{600}=0,9$, 5 mM IPTG, 37 °C, 4 ure, 20 μ l, označeno s puščico;
 - 8: Inducirana netopna frakcija, $OD_{600}=1,4$, 0,01 mM IPTG, 37 °C, 4 ure, 20 μ l;
 - 9: Inducirana topna frakcija, $OD_{600}=1,4$, 0,01 mM IPTG, 37 °C, 4 ure, 20 μ l;
 - 10: Inducirana netopna frakcija, $OD_{600}=1,4$, 1 mM IPTG, 37 °C, 4 ure, 20 μ l;
 - 11: Inducirana topna frakcija, $OD_{600}=1,4$, 1 mM IPTG, 37 °C, 4 ure, 20 μ l;
 - 12: Neinducirana topna frakcija, 20 μ l.
- Vse bakterije smo gojili na gojišču VPB.

V koloni 12 je na sliki 11 prikazana kontrola, neinducirana topna frakcija. V velikosti proteina, ki se proizvaja v inkluzijskih telesih, tudi kontrola proizvaja protein, vendar pa smo na prejšnjem gelu pokazali, da se ta protein pri neinducirani bakteriji ne proizvaja tudi v netopni obliki. V velikosti, kjer inducirana bakterija proizvaja topni protein, kontrola ne proizvaja nobenih proteinov. Prav tako tudi na tej sliki lahko vidimo, da se največ proteina v topni obliki proizvaja, če gojimo bakterija na 37 °C, jim dodamo IPTG pri $OD_{600}=0,9$ ne glede na koncentracijo – kolona 4 in 7, ki sta označeni s puščico.

Ugotovili smo, če bakterijo gojimo pri nižjih temperaturah, ji dodamo IPTG pri nizki gostoti celic, potem se proizvede več proteina v obliki inkluzijskih teles. Zato smo naredili manj poskusov s temi spremenljivkami.

Glede na vse rezultate, ki smo jih dobili, smo zaključili, da so najbolj optimalni pogoji za gojenje na gojišču LB, kjer pri $OD_{600}=0,9$ ali več dodamo 1 mM IPTG in pustimo, da raste še 4 ure. Pri teh pogojih bakterija proizvaja najmanj proteina v inkluzijskih telesih. Zato smo te pogoje izbrali za nadaljnje gojenje v litrskem bioreaktorju. Odločili smo se, da bomo gojili pri dveh različnih pogojih. Bakterijo smo gojili na gojišču LB pri 37 °C in ji pri $OD_{600}=0,9$ dodali 0,01 mM IPTG (bioreaktor 2) in 1 mM IPTG (bioreaktor 1) ter pustili rasti še 4 ure. Vzorce smo nato obdelali po enakem postopku kot prej.



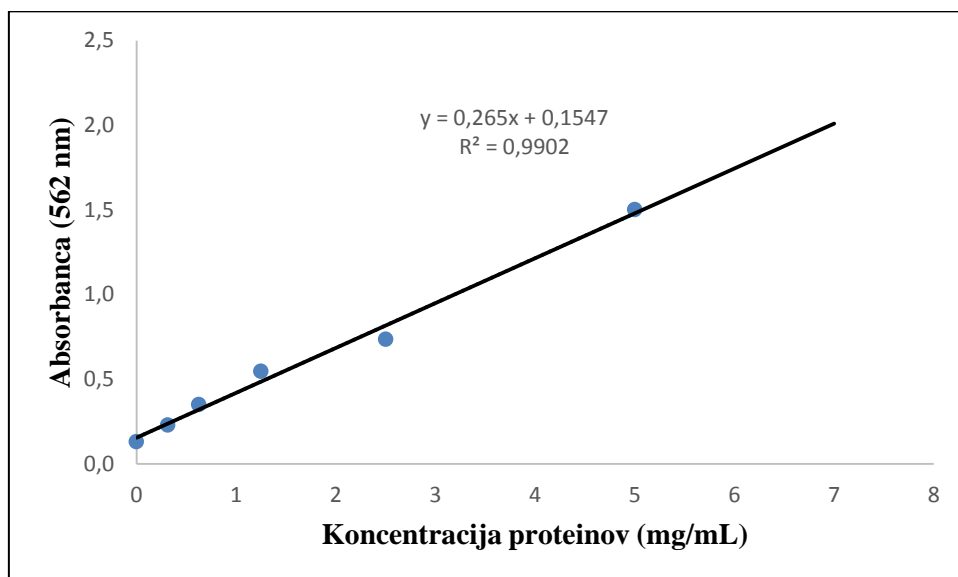
Slika 12: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 39 – čiščenje LBD proteina z IMAC kromatografijo

- 1: Označevalec velikosti, označene velikosti v kDa;
- 2: Topna inducirana frakcija iz bioreaktorja 1, gojen pri 37 °C, $OD_{600}=0,9$, IPTG=1 mM, 4 ure, 20 μ l;
- 3: Topna frakcija inducirane vzorca, smo ga nanesti na IMAC kolono, vendar se ni vezal, 20 μ l;
- 4: Topna frakcija inducirane vzorca, ki je bil spran iz IMAC kolone, 20 μ l;
- 5: Topna frakcija inducirane vzorca, ki je bil eluiran iz IMAC kolone s 300-mM imidazolom, 20 μ l;
- 6: Topna frakcija inducirane vzorca, ki je bil eluiran iz IMAC kolone s 500-mM imidazolom, 20 μ l;

7: Topna frakcija inducirane vzorca, ki je bil eluiran iz IMAC kolone s 300-mM imidazolom, 40 μ l.

Preglednica IV: Meritve standardne koncentracije proteinov z metodo BCA za umeritveno krivuljo

Standard (mg/mL)	$A_{562 \text{ nm}}$		A povprečna
0	0,156	0,105	0,131
0,3125	0,224	0,235	0,230
0,625	0,234	0,467	0,351
1,25	0,427	0,667	0,547
2,5	0,524	0,949	0,737
5	1,305	1,698	1,502



Slika 13: Umeritvena krivulja za preglednice V in VI

Preglednica V: Izračun koncentracije proteinov z metodo BCA - vzorec (gel št. 39 – slika 10)

Vzorec	A	Celokupna koncentracija proteinov (mg/mL)
Kolona 5	0,226	0,269

Če gojimo bakterijo pod temi pogoji potem, dobimo v topni obliki protein, ki ga lahko vežemo na IMAC-kolono in tako očistimo. Lisa, ki je na gelu 39 (slika 12) označena s puščico je naš protein. Da je lisa, ki je nekoliko višje, protein, ki se nespecifično veže na kolono, lahko vidimo na gelu 42 (slika 13), kjer se je prav tako vezal ta protein na kolono pri vzorcu, ki ga nismo inducirali z IPTG. Čeprav se protein LBD veže na kolono, se večina proteina s prvim spiranjem spere iz kolone, v 4 koloni na gelu 39 (slika 12) je prisotna močna lisa.

Glede na dobljene rezultate smo izračunali približno količino proteina v bioreaktorju.

Enačba umeritvene krivulje je:

$$y = 0,265x + 0,1547.$$

Če vstavimo v enačbo absorbanco vzorca, ki je bila 0,226 dobimo:

$$x = (0,226 - 0,1547) / 0,265 = 0,269;$$

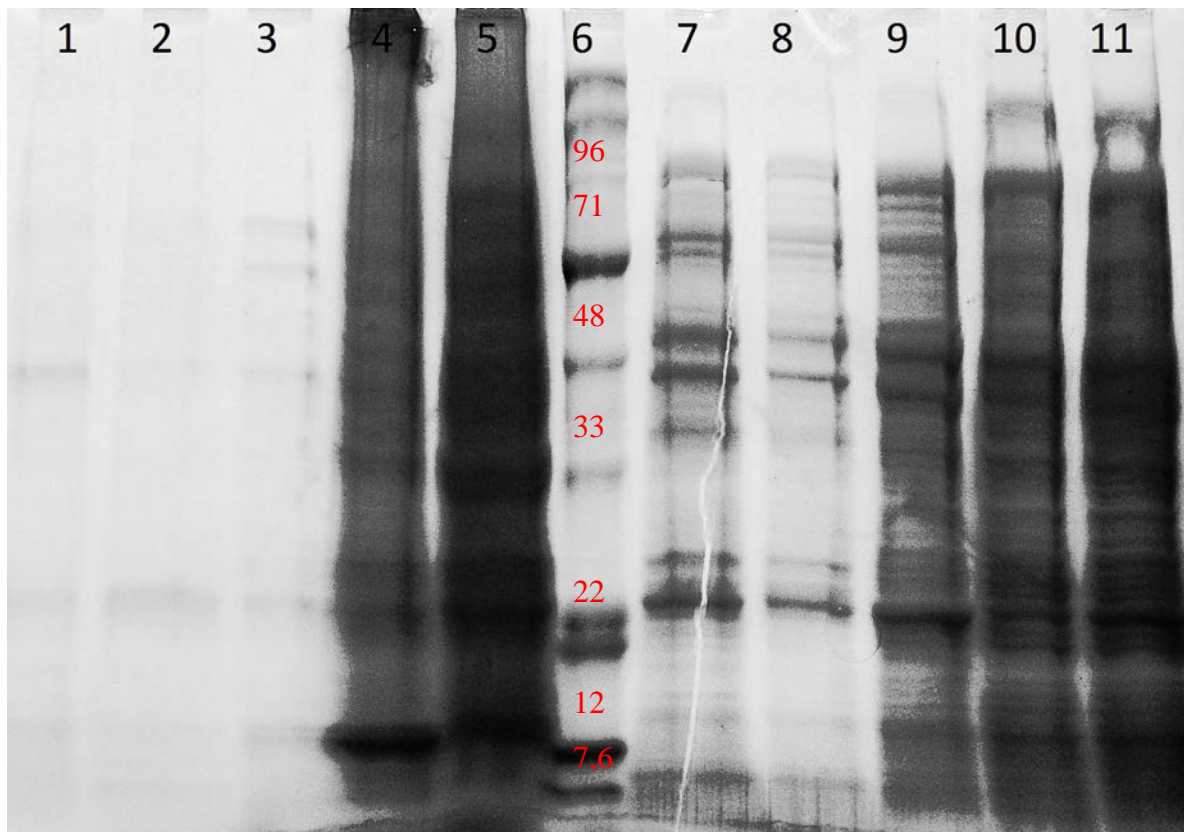
kar pomeni, da je v 1 mL vzorca 0,269 mg proteina.

Iz tega lahko izračunamo, da dobimo v litrskem bioreaktorju $0,269 \text{ mg} * 800 \text{ mL} = 215 \text{ mg}$ proteina.

Na IMAC-kolono smo poizkušali vezati tudi proteine, ki smo jih izolirali iz inkluzijskih teles, vendar v tem primeru ni prišlo do vezave na kolono.

Preglednica VI: Izračun koncentracije proteinov z metodo BCA - vzorec (gel št. 42 – slika 11)

Vzorec	A	Celokupna koncentracija proteinov (mg/mL)
Kolona 1	0,079	0
Kolona 7	0,162	0,028



Slika 14: Ločitev celičnih proteinov na agaroznem gelu št. 42 – čiščenje proteina LBD s kromatografijo IMAC

- 1:** Netopna frakcija inducirane vzorca, ki je bil eluiran iz IMAC-kolone z 1 M imidazolom, 20 μ l;
- 2:** Netopna frakcija inducirane vzorca, ki je bil eluiran iz IMAC-kolone s 300 mM imidazolom, 20 μ l;
- 3:** Netopna frakcija inducirane vzorca, ki je bil spran iz IMAC-kolone, 20 μ l;
- 4:** Netopna frakcija inducirane vzorca, smo ga nanesti na IMAC-kolono, vendar se ni vezal, 20 μ l;
- 5:** Netopna inducirana frakcija iz bioreaktorja 2, 20 μ l;
- 6:** Označevalec velikosti, označene velikosti v kDa;
- 7:** Topna frakcija neinducirane vzorca, ki je bil eluiran iz IMAC-kolone, 40 μ l;
- 8:** Topna frakcija neinducirane vzorca, ki je bil eluiran iz IMAC-kolone, 20 μ l;
- 9:** Topna frakcija inducirane vzorca, ki je bil spran iz IMAC-kolone, 20 μ l;
- 10:** Topna frakcija inducirane vzorca, smo ga nanesti na IMAC-kolono, vendar se ni vezal, 20 μ l;
- 11:** Kontrola, neinducirana topna frakcija, 20 μ l.

5 RAZPRAVA

Gram negativna bakterija *Escherichia coli* ponuja možnosti za hitro, visoko donosno in ekonomično produkcijo rekombinantnih proteinov. Kljub temu pa visoko uporabna produkcija funkcionalnih evkariontskih proteinov ni rutinska zadeva in velikokrat predstavlja pravi izziv. Pogosto se zgodi, da je končni rezultat izražanja rekombinantnih proteinov v prokariontskih ekspresijskih sistemih kopičenje produkta v inkluzijskih telesih [7]. Iz predhodnih raziskav je znano, da se protein LBD izraža predvsem v inkluzijskih telesih. Čeprav lahko inkluzijska telesa pomenijo lažje čiščenje in ločevanje proteinov, v primeru LBD to ni najboljša rešitev, saj je bilo ponovno zvijanje proteina po denaturaciji zaradi čiščenja iz inkluzijskih teles samo delno uspešno [38].

5.1 OPTIMIZACIJA IZRAŽANJA DOMENE B STAFILOKOKNEGA PROTEINA A

Raziskavo smo začeli z rekombinantnim proteinom B-SpA – domeno B stafilokoknega proteina A. S pomočjo tega proteina smo postavili sistem, s katerim smo preverili delovanje vseh procesov in si tako olajšali delo s proteinom LBD. Na tem proteinu smo preizkusili spremenljivke pogojev gojenja in dokazali, pod katerimi pogoji je produkcija v *E. coli* najbolj uspešna. Preverili smo tudi uspešnost čiščenja proteina z IMAC-kromatografijo.

Načrtovanje dela in postavitev procesa pri proteinu B-SpA sta se izkazala za uspešna. Najprej smo bakterijo gojili pod pogoji, ki so jih za gojenje določili predhodno in so bili zato dokazano uspešni. Tako smo zagotovili, da bomo dobili zadostno količino proteina, ki ga bomo lahko nato očistili z IMAC-kromatografijo. Po čiščenju smo vzorec nanesli na elektroforezni gel, kjer se je glede na označevalec velikosti v pravi velikosti pokazala elektroforezna lisa, ki ustreza iskanemu proteinu. Ta vzorec nam je služil kot pozitivna kontrola pri nadaljevanju dela. S tem smo si olajšali in časovno skrajšali postopek, saj smo lahko izpustili kromatografsko čiščenje in na gel nanašali celokupno količino proteinov. Zaradi pozitivne kontrole smo vedeli, katera elektroforetska lisa predstavlja naš protein. Prav tako smo ugotovili, da se na IMAC-kolono ne veže celotna količina rekombinantnega proteina in se že pri spiranju s pufrom za čiščenje nekaj spere s

kolone. To je verjetno posledica prenizke afinitete vezave na nosilec. Po prvem spiranju na nosilcu ni ostalo skoraj nič nečistot in je zato v prvem eluatu ostal samo naš protein.

Nato smo se lotili optimizacije gojenja rekombinantnega proteina B-SpA. Začeli smo s spreminjanjem dodane koncentracije IPTG v gojišče. Ta pogoj smo izbrali kot prvi zato, ker je to najbolj neposreden pogoj, ki vpliva na izražanje proteina in ne na hitrost razmnoževanja bakterije. Zanimalo nas je, ali se z višanjem koncentracije IPTG v gojišče poveča proizvodnja tarčnega proteina, saj smo predvidevali, da se s tem poveča tudi koncentracija induktorja v celici, kar neposredno vpliva na translacijo in tako nastane več rekombinantnega proteina. Naša predvidevanja so se izkazala kot pravilna, saj se je količina proteina povečevala z višanjem koncentracije do 3 mM IPTG. Večje koncentracije se niso izkazale za smiselne, saj količina proteina ni bila občutno večja.

Naslednja parametra, ki smo ju spreminjali, sta bila vpliv temperature in vpliv gojišča. Pri obeh pogojih se je izkazalo, da bakterija v idealnih pogojih proizvaja večje količine rekombinantnega proteina. To je pomenilo, da pri nižjih temperaturah in pri bolj revnem gojišču bakterija ni proizvajala proteina oziroma ga je proizvajala v majhnih količinah. Tudi v tem primeru so bili rezultati smiselni, saj bakterija, če ima vse pogoje idealne, ne porablja energije za preživetje, ampak za produkcijo proteinov. S tem, ko ji otežimo pogoje življenja, ji tudi onemogočimo proizvodnjo proteinov.

Čas gojenja po indukciji z IPTG je bil naslednji vpliv, ki nas je zanimal. Zanimalo nas je, koliko časa po indukciji bakterija proizvaja želeni protein oziroma kdaj se hitrost proizvodnje toliko zmanjša, da ne dobimo več signifikantno večje količine, ki bi opravičila ekonomske stroške daljšanja kulture. Rezultati so pokazali, da se količina proteina v vzorcu veča vsaj 6 ur po indukciji, zato je podaljšani čas smiseln. Vendar pa v vzorcu, ki smo ga pustili 20 ur po indukciji ni bilo vidne količine proteina. Bakterija je v tem času porabila hranila iz gojišča in prešla v fazo odmiranja. S tem smo pokazali, da podaljševanje časov preko 6 ur ni smiselno in ne pomeni boljših rezultatov.

Zadnji parameter, ki smo ga preizkusili, je bil vpliv OD_{600} , pri katerem izvedemo indukcijo z IPTG. Iz literature velja pravilo, da je najbolj optimalna indukcija pri OD_{600} med 0,6 in 0,8, saj so takrat bakterije v eksponentni oziroma logaritemski fazi rasti. Pri tem OD_{600} je bakterija nekje v srednji logaritemski fazi. Na gojišču LB bakterija raste dokaj počasi, saj v gojišču nima na voljo velike količine glukoze. To pomeni, da dokler je v gojišču še na voljo glukoza pride do katabolne represije kar učinkuje na laktozno permeabilno aktivnost. Kot rezultat te represije je prenos laktoze v notranjost celice

onemogočen. Zato je ekspresija heterolognega proteina nizka. Ko je koncentracija ogljika v mediju (predvsem glukoze) dovolj nizka, se katabolna represija ustavi. Če v tem času dodamo IPTG v gojišče na voljo celici, ta inducira ekspresijo proteina. Drugi način, kako povečati količino IPTG v celici, je večja koncentracija v gojišču, vendar to samo po sebi ni efektiven način, saj je koncentracijsko odvisen transport IPTG v celico zelo počasen. Prav tako, tudi če IPTG preide v celico, lahko znotraj celična koncentracija glukoze še vedno ovira indukcijo. IPTG, ki prehaja v celico s pomočjo aktivnega transporta, se nato akumulira znotraj nje. Zato po vsaki celični delitvi znotraj celična koncentracija IPTG pade. To pomeni, da v fazi aktivne delitve celic ekspresija proteina na število celične mase pade, in to vpliva na produkcijo proteina glede na celično maso. Zato je najbolj optimalno, da začnemo indukcijo z IPTG po tem, ko celična rast doseže polovico logaritemske faze. V našem primeru se je izkazalo pri $OD_{600}=1$.

Ko smo potrdili najbolj optimalne pogoje, smo naredili še nekaj poizkusov s smiselnimi variacijami, vendar se je na koncu izkazalo, da so najbolj optimalni pogoji gojenja pri 37 °C, na $1\times$ gojišču VPB, če induciramo pri $OD_{600}=1$ s 3 mM IPTG in pustimo rasti po indukciji še 6 ur. Rezultati so v skladu z našimi predvidevanji in podatki iz primerjalne literature. Gojenje bakterije pod temi pogoji smo prenesli v večje merilo in ponovili postopek v litrskem bioreaktorju. Vzorec, ki smo ga pridobili iz tega gojenja, smo očistili z IMAC-kromatografijo in na tak način dobili izoliran protein. S SDS-PAGE smo dokazali, da se velika količina proteina veže na kolono, saj je na gelu nastala močna lisa.

V primeru proteina B-SpA je bila optimizacija pogojev uspešna, produkcijo proteina v *E. coli* smo povečali, to prenesli v večje merilo, protein uspešno očistili z IMAC-kromatografijo in dokazali, da s tem postopkom dobimo večjo količino rekombinantnega proteina. V molekularni biologiji lahko merimo donos rekombinantnega proteina v gramih, miligramih ali mikrogramih. Primerjalni volumen je 1 liter. Če je donos v gramih na liter, potem je donos velik in je v rangu industrijske produkcije farmacevtikov. Če je donos v miligramih na liter, potem je donos srednje velik in uporaben za večino biokemijskih analiz. Če pa imamo donose v mikrogramih na liter, so ti donosi nizki in so uporabni samo za majhno število biokemijskih analiz [39]. V naši raziskavi je bil donos proteina v litrskem biorektorju v 800 mL gojišča 1035 mg, kar je približno enako enemu gramu, kar pomeni, da smo imeli donos v gramih na liter. Iz tega lahko sklepamo, da bi produkcija proteina B-SpA bila dovolj velika, da bi bila smiselna za uporabo v farmacevtski industriji.

S tem smo postavili proces, preizkusili delovanje laboratorijske opreme in potrdili naše delovne hipoteze. Vsi ti rezultati so nam bili v pomoč in kot vodilo pri reševanju pravega problema, optimizacije gojenja in izolacije proteina LBD.

5.2 OPTIMIZACIJA IZRAŽANJA LEPTIN VEZAVNE DOMENE

Na podlagi podatkov o proteinu LBD iz literature smo vedeli, da pri tem proteinu postopek ne bo tako preprost in da se problema ne moremo lotiti na čisto enak način, prav tako je razumevanje rezultatov težje in zahteva več dela. Največja razlika je bila, da pri proteinu LBD ni bila pomembna samo celokupna koncentracija proteinov v vzorcu, ampak razmerje med koncentracijo proteinov v topni in koncentracijo proteinov v netopni obliki. V predhodnih raziskavah so ugotovili, da v primeru izražanja proteina v inkluzijskih telesih pri čiščenju pride do denaturacije proteina in je ponovno zvijanje zahtevno in drago ter velikokrat neuspešno [38]. Zato je bil naš cilj optimizacija pogojev gojenja, da bi pridobili čim večjo količino rekombinantnega proteina v topni obliki. To je pomenilo, da se postopkov gojenja nismo mogli lotiti na enak način kot pri proteinu B-SpA, saj smo iskali najbolj idealno razmerje med vsemi pogoji gojenja, ki ne usmerja proizvodnje proteina v inkluzijskih telesih.

Vedeli smo in potrdili s poizkusom, da bakterije, ki jih ne induciramo z IPTG, ne proizvajajo inkluzijskih teles. To pomeni, da zaradi indukcije pride do povečane proizvodnje proteinov, ki jih bakterija akumulira. Zato smo predvidevali, da so najboljši pogoji za gojenje tisti, pri katerih bakterija pri dovolj veliki gostoti začne počasno proizvodnjo proteinov. Kar je pomenilo, da z indukcijo počakamo, da bakterija pride čez polovico logaritimske faze in ji v gojišče dodamo nizko koncentracijo IPTG. Kot smo ugotovili pri proteinu B-SpA, velika koncentracija IPTG sicer pomeni povečano produkcijo rekombinantnega proteina, vendar bi v našem primeru to pomenilo, da bi zaradi pospešene produkcije bakterija akumulirala proteine v obliki inkluzijskih teles. Ugotovili smo, da pri povečani koncentraciji IPTG bakterija res proizvede veliko količino rekombinantnega proteina v inkluzijskih telesih. Vendar pa se količina topnega proteina ni spreminjala s koncentracijo IPTG, zato dodajanje večjih količin ni smiselno.

Čeprav bi bilo mogoče predvidevati, da pri nižjih temperaturah prav tako zaradi počasnejšega delovanja bakterije pride do manjše proizvodnje proteinov v inkluzijskih telesih, to ni bilo tako. Že pri proteinu B-SpA smo dokazali, da z nižanjem temperature pride do zmanjševanja produkcije proteinov do te mere, da pri 25 °C ne nastajajo več. To so dokazali tudi v predhodni raziskavi, ki jo je opravil Živec B. v okviru svoje diplomske naloge [38]. Te rezultate smo potrdili in kot najbolj optimalen pogoj gojenja ohranili 37 °C, kar je dokazano najbolj optimalna temperatura rasti za *E. coli*.

V literaturi je bil priporočen OD₆₀₀, pri katerem induciramo z IPTG, 0,9. Zato smo najprej preverili ta pogoj in ga nato prilagajali. Že pri proteinu B-SpA se je OD₆₀₀ okrog 1 izkazal za najbolj idealnega, tako je bilo tudi tukaj. Glede na to, da gre za isto bakterijo, je to pomenilo, da je tudi tukaj v srednji logaritemski fazi, kar je najboljši trenutek za indukcijo. To je bilo v primeru LBD še posebej pomembno. V tej fazi celice rastejo in se delijo. To vključuje tudi ekspresijo šaperonov, ki pomagajo odstraniti napačno zvite proteine. Če induciramo ekspresijo rekombinantnega proteina (ki je pod kontrolo T7 promotorja), ko celice ne izražajo teh šaperonov, bo velika količina proteina napačno zvita in verjetno izražena v inkluzijskih telesih. Če kulturo induciramo prezgodaj (na primer takoj po inokulaciji), bo veliko izražanje našega rekombinantnega proteina inhibiralo bakterijsko rast in tako zmanjšalo gostoto.

Kulturo smo gojili tako na gojišču LB kot na gojišču VPB. Če smo primerjali koncentracije proteinov izolirane iz topne frakcije, smo ne glede na uporabljeno gojišče dobili podobne rezultate. Pri proteinu B-SpA je bilo zaradi hitre, povečane in daljše produkcije pomembno, da je bilo gojišče bolj bogato, kar pa pri proteinu LBD ni igralo pomembne vloge.

V tem delu raziskave nismo namenili toliko časa za preizkus vpliva časa po indukciji, saj smo predvidevali, da ta ne igra tako pomembne vloge. Predvidevali smo, da ta parameter ne vpliva na proizvodnjo proteina v inkluzijskih telesih. Kljub temu smo pustili gojenje čez noč in ugotovili, da po 20 urah ni toliko večje količine rekombinantnega proteina, da bi bil podaljšan čas ekonomsko smiseln.

Med raziskavo smo preizkusili veliko različnih kombinacij spremenljivk, ki bi lahko prinesle čim bolj optimalne rezultate. Prišli smo do ugotovitve, da se najboljše obnese gojenje na 37 °C, kjer pri OD₆₀₀=0,9 dodamo IPTG, katerega količina ne sme presežati koncentracije 1 mM, in pustimo kultivirati bakterijo nadaljnje 4 ure.

Gojenje pod temi pogoji smo nato prenesli v večje merilo in ga ponovili v litrskem bioreaktorju. Vzorec, ki smo ga dobili, smo skoncentrirali s centrifugiranjem in očistili z IMAC-kromatografijo. V primeru netopnih proteinov, izoliranih iz inkluzijskih teles, se zaradi denaturacije in nepravilnega zvijanja na kolono proteini niso vezali. Predvidevali smo, da je afinitetna oznaka skrita v notranjosti proteina in se zato ne more dovolj močno vezati na kolono. V primeru topne frakcije proteina se je ta vezal na IMAC-kolono in smo ga eluirali z elucijskim pufrom. Količina proteina, ki smo jo pridobili v litrskem bioreaktorju, je bila 215 mg. To ustreza količini miligrami na liter, kar zadostuje za

Božič Ajda – Optimizacija pridobivanja in čiščenja dveh rekombinantnih proteinov
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

biokemijske analize, vendar pa količina proteina ni bila tako visoka, da bi opravičila
produkcijo proteina na večjem nivoju oziroma za proizvodnjo v farmacevtski industriji.

6 SKLEP

Pri proizvodnji rekombinantnih proteinov v prokariotskih ekspresijskih sistemih se velikokrat srečujemo s problemi kopičenja produkta v inkluzijskih telesih. Zato je ta kljub veliki količini običajno neaktiven, saj tudi s postopki za ponovno zvijanje ne moremo dobiti proteina v bioaktivni obliki v zadostnih količinah. Pri rekombinantnem proteinu LBD je znano, da se ta kopiči v obliki inkluzijskih teles, vendar smo kljub temu želeli proizvodnjo tega proteina optimizirati na tak način, da bi se izražal v topni obliki, saj se je ponovno zvijanje pokazalo samo kot delno uspešna metoda [38].

V prvi fazi smo s proteinom B-SpA dokazali, da z majhnimi spremembami v postopku gojenja pomembno vplivamo na količino izraženega proteina v celici. Ker se ta protein ne izraža v obliki inkluzijskih teles, smo bili pri optimizaciji in čiščenju uspešni. Dobili smo količino, ki ustreza več kot en gramu na liter proteina v čisti obliki. Z gojenjem tega proteina smo potrdili naše delovne hipoteze in učinkovitost delovanja procesa. Žal vsega znanja in izkušenj nismo mogli direktno prenesti na protein LBD.

Pri proteinu LBD smo se soočali s številnimi težavi že od samega začetka, saj se je delo s tem proteinom izkazalo za zahtevno in pravi izziv. Težave nam je povzročalo že določevanje proteina na elektroforeznem gelu in čiščenje z IMAC-kromatografijo, saj se je protein v topni obliki obnašal drugače in dajal drugačne rezultate od proteina v netopni obliki. Kljub temu nam je uspelo optimizirati pogoje gojenja do te mere, da smo pridobili zadostno količino proteina v topni obliki, ki smo jo lahko dokazali na elektroforeznem gelu. Vendar pa pri optimizaciji pogojev nismo bili zelo uspešni, saj se je povečevala predvsem količina proteinov v inkluzijskih telesih in manj v topni obliki. Rezultat gojenja, ki se je izkazal kot najbolj optimalen smo kljub temu prenesli in ponovili postopek v litrskem bioreaktorju. Ta nam je dal zadostno količino proteina, približno 200 mg na liter, kar zadostuje za izvedbo vseh analiz. To pomeni, da smo ga lahko očistili z IMAC-kromatografijo in na elektroforeznem gelu dobili močnejšo liso. Vendar pa je bila ta količina petkrat manjša v primerjavi s proteinom B-SpA. Iz teh rezultatov sklepamo, da gojenje bakterije za proizvodnjo rekombinantnega proteina LBD ne bi bilo smiselno na večjem nivoju.

V nadaljnjih raziskavah dvomim, da bi s samo optimizacijo gojenja lahko bistveno vplivali na rezultate in pridobili večjo količino proteina. Za potrebe, ki bi zadostovale širši

uporabi proteina za raziskovalne namene, bi bilo smiselno preizkusiti izražanje v katerem drugem celičnem sistemu, najverjetneje takšnem, ki je sposoben proizvodnje velikega proteina in ki omogoča posttranslacijske modifikacije.

7 LITERATURA

- [1] M. Novak Štagoj in M. Podobnik: Kvasovke – tovarne rekombinantnih proteinov, Farmaceutski vestnik 2006, 235–240.
- [2] F. Baneyx: Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, Current opinion in Biotechnology 1999; 10: 411–421.
- [3] M. J. Weickert, D. Doherty in E. Best: Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*, Current opinion in Biotechnology 1996; 7: 494–499, 1996.
- [4] Hannig G. in Makrides S.: Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*, Tibtech 1998; 16: 54–60.
- [5] Choi J., Lee S.: Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 2004; 64: 625–635.
- [6] Sivashanmugam A., Murray V., Cui C., Zhang Y., Wang J., Li Q.: Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*, Protein science 2009; 18: 936–948.
- [7] Strandberg L. in Enfors S.: Factors influencing inclusions body formation in the production of fused protein in *Escherichia coli*, Applied and environmental microbiology 1991; 57: 1669–1674.
- [8] Lilie H., Schwarz E. in Rudolph R.: Advances in refolding of proteins produced in *Escherichia coli*, Current opinion in biotechnology 1998; 9: 497–501.
- [9] A. Votintseva, R. Fung, R. Miller, K. Knox, H. Godwin: Prevalence of *Staphylococcus aureus* protein A (SpA) mutants in the community and hospitals in Oxfordshire, BMC Microbiology 2014; 14: 63.
- [10] M. Freiherr von Roman, A. Koller, D. von Rüden, S. Berensmeier: Improved extracellular expression and purification of recombinant *Staphylococcus aureus* protein A, Protein Expression and Purification 2014; 93: 87–92.
- [11] J. W. Goding: Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent, Journal of Immunological Methods 1978; 20: 241–253.

[12] WHO [Elektronski].

http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/bmi_text/en/. [Poskus dostopa 10. marec 2015].

[13] Houseknecht K., Baile C., Matteri R., Spurlock M.; The biology of leptin: A review, *Journal of Animal Science* 1998; 76: 1405–1420.

[14] B. Štrukelj: *Biološka zdravila – od gena do učinkovine*, Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007.

[15] Fong T., Huang R., Tota M., Maq C., Smith T.; Localization of Leptin Binding Domain in the Leptin Receptor, *Molecular Pharmacology* 1998; 53: 234–240.

[16] C. Montague, S. Farooqi, J. Whitehead, M. Soos in H. Rau: Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans, *Nature* 1997; 387: 903–907.

[17] M. Šabovič in A. Mavri: Leptin in debelost – nevroendokrini, presnovni in aterogeni učinki leptina, *Zdravniški vestnik*, 2003; 72: 19–23.

[18] Wada N., Hirako S., Takenoya F., Kageyama H., Okabe M., Shioda S.; Leptin and its receptors, *Journal of chemical neuroanatomy* 2014.

[19] Niv-Spector L., Raver N., Friedman-Einat M., Grosclaude J.; Mapping leptin-interacting sites in recombinant leptin-binding domain (LBD) subcloned from chicken leptin receptor, *Biochemical Journal* 2005; 390: 475–484.

[20] Houseknecht K., Mantzoros C., Kuliawat R., Hadr E., Evidence for Leptin Binding to proteins in serum of rodents and humans: Modulation with obesity, *Diabetes* 1996, 45: 1638–1643.

[21] Ahima R. in Flier J.; Leptin, *Annual Rev. Physiology* 2000; 62: 413–437.

[22] Carpenter B., Hemsworth G., Wu Z., Maamre M., Strasburger C.; Structure of the human obesity receptor Leptin-Binding Domain reveals the mechanism of Leptin antagonism by monoclonal antibody, *Structure* 2012; 20: 487–497.

[23] Prokop J., Duff R., Ball H., Copeland D., Londraville R.; Leptin and leptin receptor: Analysis of structure to function relationship in interaction and evolution from human to fish, *Elsevier, Peptides* 2012; 38: 326–336.

[24] Tartaglia L., Dembski M., Weng X., Deng N., Culpepper, Davos R.; Identification and expression cloning of Leptin Receptor, OB-R, *Cell* 1995; 83: 1264–1271.

- [25] Stieg M., Sievers C., Farr O., Stalla G., Mantzoros C.; Leptin: A hormone linking activation of neuroendocrine axes with neuropathology, *Psychoneuroendocrinology* 2015; 51: 47–57.
- [26] Procaccini C., Pucino V., Mantzoros C., Matarese G.; Leptin in autoimmune diseases, *Metabolism* 2014.
- [27] Novagen, pET system manual, 11. izdaja.
- [28] T. F. S. Inc.: His-tagged Proteins – Production and Purification [Elektronski]. <http://www.piercenet.com/method/his-tagged-proteins>. [Poskus dostopa 12. marec 2015].
- [29] P. Hengen: Purification of His-Tag fusion proteins from *Escherichia coli*, Elsevier Science 1995; 20: 285–286.
- [30] T. Tao Hu in K. Seeley: IMAC Purification of Polyhistidine-tagged Protein Using the AcroPrep™ 96 Filter Plate [Elektronski]. http://www.pall.com/pdfs/Laboratory/04.0943_IMAC_AcroPrepSTR.pdf. [Poskus dostopa 12. marec 2015].
- [31] P. Raspor, Biotehnologija – osnovna znanja, BIA, d. o. o., Ljubljana, 1996.
- [32] D. College: SDS-PAGE (PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) 2001. [Elektronski]. <http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/SDSPAGE/SDSPAGE.html>. [Poskus dostopa 15. marec 2015].
- [33] M. Thiry in D. Cingolani: Optimizing scale-up fermentation processes, *Trends in Biotechnology* 2002; 20: 103–105.
- [34] B. H. Junker: Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2004; 97: 347–364.
- [35] P. K. Smith, R. Krohn, G. Hermanson in A. Mallia: Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical Biochemistry* 1985; 150: 76–85.
- [36] Proteus: Proteus IMAC Handbook [Elektronski]. <http://www.protein-chem.com/Resources/IMAC%20hbook.pdf>. [Poskus dostopa 15. marec 2015].
- [37] Sondowski Y., Raver N., Gussakovsky E.: Subcloning, expression, purification and characterization of recombinant human Leptin-binding Domain, *The Journal of biological chemistry* 2002; 48: 46304–46309.

- [38] B. Živec in T. Bratkovič, Priprava rekombinantne zunajcelične domene leptinskega receptorja, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2012.
- [39] Expression Technologies Inc.: Protein Yield or protein expression level [Elektronski].
http://www.exptec.com/Expression%20Technologies/Protein%20Yield.htm#Host_and_protein_yield. [Poskus dostopa 12. marec 2015].