

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Laitos – Institution – Department Biotieteiden laitos
Tekijä – Författare – Author Minna Mäki		
Työn nimi – Arbetets titel – Title <i>Escherichia colin</i> PapG II-adhesiinin karakterisointi OmpS display -systemin avulla		
Oppiaine – Läroämne – Subject yleinen mikrobiologia		
Työn laji – Arbetets art – Level Pro gradu -tutkielma	Aika – Datum – Month and year toukokuu 1997	Sivumäärä – Sidoantal– Number of pages 50
Tiivistelmä – Referat – Abstract		
<p>Munuaistulehdusta ja ylempien virtsatiehyeiden infektiota aiheuttavan <i>Escherichia colin</i> tärkein virulenssitekijä on P-fimbriat, joiden välityksellä <i>E.coli</i>-kannat tarttuvat uroepiteeliin. P-fimbriian päässä sijaiseva PapG-adhesiini on glykolipidireseptorin Galα(1-4)Gal-rakenteen tunnistava alayksikkö. PapG-adhesiineja tunnetaan kolme eri luokkaa (I-III), jotka sitoutuvat eri isoreseptoreihin. Ihmiseltä eristetyt uropatogeeniset <i>E.coli</i>-isolaatit ekspressoivat pääasiassa PapG II-adhesiinia, jonka isoreseptori on globosidi.</p> <p>Koska PapG-proteiinia on vaikea tuottaa ja puhdistaa ilman P-fimbriian muita alayksiköitä, tässä työssä PapG II-adhesiinia tutkittiin fuusioimalla sen N-terminaaliseen alayksiköseen eri aminohappo-sekvenssejä <i>Vibrio choleraen</i> OmpS-maltoporiiniin. Tarkoituksena oli kartoittaa PapG II-adhesiinin reseptorispesifisyydestä vastaava epitooppi. Saatujen tulosten avulla tarkasteltiin myös OmpS display -systemin soveltuvuutta fimbriallisen adhesiinin tutkimiseen.</p> <p><i>papG</i>-geenistä amplifioitiin PCR:llä eri nukleotidisekvenssejä, jotka ligoitiin sekä pHLV440-että pQE30-ekspressiovektoreihin. Työssä käytettiin pääasiassa pQE30-pohjaisia rekombinanttikantoja, sillä pHLV440-vektorista ekspressoitujen OmpS-fuusioproteiinien tuottotaso <i>E.colissa</i> oli liian alhainen, jotta PapG-inserttien funktionaalisuutta olisi voitu tutkia. pQE30-vektorissa proteiinien N-terminukseen koodataan histidiinihantä, jota voitiin käyttää hyväksi puhdistettaessa OmpS-proteiinia ja kahta OmpS-PapG-fuusioproteiinia affiniteettikromatografialla. Puhdistettua OmpS-proteiinia ja OmpS-PapG-fuusioproteiinia vastaan tuotettiin kanissa vasta-aineita, joita käytettiin työn immunologisissa menetelmissä.</p> <p>OmpS-PapG-fuusioproteiinien trimerisaatiota ja kuljetusta rekombinanttikantojen ulkomembraanille tutkittiin Western blottauksella ja epäsuoralla immunofluoresenssimikroskopiolla. Western blotista todettiin fuusioproteiinien trimeeriset muodot ja sekä prosessoidut että prosessoimattomat monomeerit. Prosessoiduissa monomeereissa fuusioproteiinien N-terminaalinen signaalisekvenssi on poistettu. Tulos viittasi siihen, että <i>E.coli</i> pystyi kokoamaan fuusioproteiinit trimeereiksi ja että kokoaminen tapahtuisi ulkomembraanilla. Epäsuorassa immunofluoresenssi-mikroskopiassa varmistettiin OmpS-vasta-aineella, että rekombinanttikantojen solupopulaatit tuottivat pinnallensa fuusioproteiineja. Lisäksi todettiin, että OmpS-PapG-vasta-aine pystyi tunnistamaan P-fimbriallisen <i>E.coli</i>-kannan.</p> <p>PapG-inserttien funktionaalisuutta tutkittiin rekombinanttikantojen tai niiden liukenemattomien fraktioiden adheesiolla immobilisoituun globosidiin ja CDH:hon. CDH on globosidin reseptorianalogi, joka ei sisällä digalaktosirakennetta. Liukenemattomien fraktioiden sitoutumisen tutkimiseksi kehitettiin Night Sky -menetelmä, jossa liukenemattomat fraktiot FITC-leimattiin ja FITC-leimattujen fraktioiden sitoutumista reseptoreihin detektoitiin fluoresenssimikroskopiolla. Adheesiotulokset osoittivat, että rekombinanttikannat, joille oli yhteistä PapG:n N-terminaaliset 52 aminohappoa, sitoutuivat globosidiin. Globosidiin sitoutuneet kannat sitoutuivat heikosti myös CDH:hon.</p> <p>Työssä voitiin rajata PapG II-adhesiinin reseptoriin sitoutuva epitooppi 52:een N-terminaaliseen aminohappoon. Työn tulosten pohjalta todettiin, että OmpS display -systemi soveltuu fimbriallisten adhesiinien tutkimiseen.</p>		
Avainsanat – Nyckelord – Keywords PapG-adhesiini, OmpS, display-systeemi		
Säilytyspaikka – Förvaringsställe – Where deposited Yleisen mikrobiologian osaston kirjasto		
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information		