

Tiedekunta/Osasto ⊗ Fakultet/Sektion ⊗ Faculty Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta		Laitos ⊗ Institution ⊗ Department Biotieteiden laitos
Tekijä ⊗ Författare ⊗ Author Järvinen, Nina		
Työn nimi ⊗ Arbetets titel ⊗ Title <i>Escherichia coli</i> SfaS-adhesiinin karakterisointi flagelladisplayn avulla		
Oppiaine ⊗ Läroämne ⊗ Subject Yleinen mikrobiologia		
Työn laji ⊗ Arbetets art ⊗ Level Pro gradu-tutkielma	Aika ⊗ Datum ⊗ Month and year Elokuu 1997	Sivumäärä ⊗ Sidoantal ⊗ Number of pages 72
<p>Tiivistelmä ⊗ Referat ⊗ Abstract <i>Escherichia coli</i> on suoliston normaaliflooraan kuuluva, myös tutkimuksessa eniten käytetty bakteeri. Se on myös patogeeninen bakteeri aiheuttaen suolistoinfektioita, virtsatien tulehdusta, verenmyrkytystä ja pienten lasten aivokalvontulehdusta. Bakteereilla on pinnallaan erilaisia patogeenisyyteen vaikuttavia adhesiivisiä rakenteita, jotka ovat merkittäviä infektion varhaisessa vaiheessa bakteerin kiinnittyessä spesifisesti pintoihin.</p> <p>Eräs näistä adhesiivisistä rakenteista on S-fimbria, jonka on havaittu olevan mukana erityisesti vastasyntyneiden aivokalvontulehdusta ja verenmyrkytystä aiheuttavissa <i>E.coli</i>-kannoissa. S-fimbrioiden tiedetään tarttuvan kohdesolujen glykoproteiinien siaalisokerirakenteisiin. SfaS-proteiini on sitoutumisesta vastaava adhesiini, joka on yhtenä tai ehkä muutamana kopiona fimbriafilamentin päässä.</p> <p>Työn tarkoituksena oli kartoittaa SfaS-proteiinin se kohta, joka on vastuussa sitoutumisesta. Menetelmänä tähän käytettiin flagelladisplayta. Flagellat ovat bakteerien liikkumiseen tarkoitettut pitkät, ohuet ulokkeet, joiden rakenteellisena pääkomponenttina on filamenttiproteiini FliC. Tämä proteiini sisältää sekvenssinsä keskiosassaan vaihtelevan alueen, joka voidaan poistaa tai korvata toisella sekvenssillä sen vaikuttamatta flagellan rakentamiseen.</p> <p>Eri kokoisia osia <i>sfaS</i>-geenistä kloonattiin <i>fliC</i>-geenin vaihtelevan osan tilalle. Nämä alueet ilmnennettiin proteiiniksi FliC-proteiinin mukana flagellafilamenttiin, jossa ne tuhansina kopiaina antoivat flagelloille uuden antigeenisen ominaisuuden. Näiden kimeeristen flagellojen antigeenisia ominaisuuksia tutkittiin immunoblottauksella, immunoelektronimikroskopiolla ja ELISALLA, joilla selvitettiin SfaS-proteiinin osien tunnistamista vasta-aineen avulla. Näillä osoitettiin vieraan proteiinin sijoittuminen flagelliiniin sekä sen laskostuminen tunnistettavaan muotoon.</p> <p>Kimeeristen flagellojen toimivuutta eli SfaS-spesifistä sitoutumista tutkittiin esimerkiksi Immunolektronimikroskopiolla ja ELISALLA, joissa oli mukana glykoproteiineja, joihin S-fimbrioiden tiedetään sitoutuvan kuten laminiini, fibronektiini, Tamm-Horsfall-glykoproteiini ja fetuiini. Kudostasolla flagellojen sitoutumista testattiin adheesiolla munuaisohutleikkeisiin, joiden rakenteissa tiedetään olevan glykoproteiineja. Näissä kokeissa voitiin todeta osan konstrakteista sitoutuvan toisia paremmin S-fimbriolle spesifisiin kohtiin kudoserakenteissa.</p> <p>Kimeeristen flagellojen sitoutumisessa havaittiin tiettyjen konstruktien toimivan toisia paremmin. Nämä olivat kuitenkin suuria inserttejä <i>sfaS</i>-geenistä, joten tiettyä sitoutumisesta vastaavaa kohtaa ei voitu selvittää. Tämä voi myös osoittaa sitä, että sitoutumisesta vastaava kohta voi koostua laskostuneessa muodossa sekvenssin eri osista. Toisena huomioonotettavana seikkana oli SfaS-proteiinin kaksi kysteiiniä, jotka mahdollisesti muodostavat keskenään rikkisillan vaikuttaen näin proteiinin laskostumiseen. Flagellat eivät pysty muodostamaan rikkisilloja, sillä ne tehdään bakteerin soluvälitilassa, johon flagellaproteiinit eivät koskaan päädy. Eräs flagelladisplayn parantamiseksi tähtäävä menetelmä voisi olla rikkisillojen tekeminen proteiiniin <i>in vitro</i>.</p> <p>Menetelmänä flagelladisplay mahdollistaa usein alhaisen affiniteetin omaavien adhesiivisten rakenteiden tutkimisen helpommin esimerkiksi suuren kopiomäärän ja flagellojen helpon puhdistamisen ja käsittelyn vuoksi.</p>		
Säilytyspaikka ⊗ Förvaringsställe ⊗ Where deposited Yleisen mikrobiologian osaston kirjasto		
Muita tietoja ⊗ Övriga uppgifter ⊗ Additional information Työn ohjaajana toimi dosentti Benita Westerlund-Wikström		