

Tekijä — Forfattare

Minja Miettinen

Työn nimi — Arbets titel

P-fimbriin proteiinien FsoE ja FsoF tuottaminen in vitro ja tuotteiden sitoutuminen fibronektiiniin

Oppiaine — Läroämne

Yleinen mikrobiologia

Työn laji — Arbets art

Pro gradu -tutkielma

Aika — Datum

5.9.1994

Sivumäärä — Sidoantal

44

Tiivistelmä — Referat

Ylempien virtsateiden infektiota aiheuttavan Escherichia colin tärkein virulenssitekijä ovat P-fimbriat. P-fimbrioilla on kaksi sitoutumisominaisuutta, joita sen eri alayksikköproteiinit välittävät. E- ja F -proteiinien tiedetään joko yhdessä tai erikseen välittävän sitoutumista liukenemattomaan fibronektiiniin, jota on mm. soluväliaineessa. E:n ja F:n sitoutumisspesifiteetin tarkemmaksi määrittämiseksi on näitä proteiineja yritetty puhdistaa perinteisin menetelmin huonolla menestyksellä.

Työssä testattiin in vitro transkriptio & translaatio -menetelmän soveltuvuutta FsoE- ja FsoF -proteiinien ylituottamiseen. Lisäksi tutkittiin tuotettujen proteiinien sitoutumista liukenemattomaan fibronektiiniin in vitro ja saatiin siten tietoa näiden proteiinien merkityksestä P-fimbriavälitteisessä sitoutumisessa. fsoF-geeni kloonattiin PCR:n avulla pTrc99A-ekspressiovektoriin, kuten myös fsoE:lle oli aiemmin tehty. Plasmidikonstrukteista saatiin in vitro tuotettua proteiiniseokset, joista FsoE ja FsoF puhdistettiin immunosaostuksella. FsoE:n ja FsoF:n sitoutumista fibronektiiniin tutkittiin yksin ja yhdessä sekä periplasmisen PapD:n kanssa, jonka tiedetään vaikuttavan periplasmisten fimbriin alayksikköproteiinien oikeaan konformaatioon.

In vitro tuotetun FsoF:n voitiin osoittaa sitoutuvan liukenemattomaan fibronektiiniin ja olevan merkityksellinen P-fimbriin sitoutumisessa fibronektiiniin. In vitro tuotetulla FsoE:llä näytti olevan FsoF:ää vähäisempi merkitys sitoutumisessa. Käytettyjen menetelmien avulla ei saatu osoitettua PapD:n vaikutusta sitoutumiseen, eikä myöskään FsoE:n ja FsoF:n sitoutumista toisiinsa tai yhdessä fibronektiiniin. Näiden interaktioiden osoittaminen olisi ollut tärkeää sitoutumiskokeiden tulosten tulkinnan kannalta.

Osa proteiinin oikean kolmiulotteisen rakenteen muodostumiseen vaikuttavista tekijöistä puuttuu tuottaessa proteiineja in vitro. Näin tuotetut proteiinit eivät ehkä ole oikein laskostuneita ja mikäli proteiinin laskostumiseen in vivo vaikuttavia tekijöitä ei tunneta tai in vivo olosuhteita ei pystytä jäljittelemään, on työssä käytetyllä menetelmällä tuotettujen proteiinien käyttäminen proteiinien biologista aktiivisuutta kartoittaviin tutkimuksiin ongelmallista.

Avainsanat — Nyckelord

in vitro transkriptio & translaatio, FsoE, FsoF, fibronektiini

Säilytyspaikka — Forvaringställe

Muuta tietoja — Övriga uppgifter