

Matemaattis-luonnontiet. os.

Yleisen mikrobiologian laitos

Tekijä — Författare

Jarna Paananen

Työn nimi — Arbets titel

M13-faagiekspressiomenetelmän soveltaminen P-fimbriaproteiini FsoE:n ilmentämiseen

Oppiaine — Läroämne

yleinen mikrobiologia

Työn laji — Arbets art

pro gradu

Aika — Datum

24.2.1994

Sivumäärä — Sidoantal

58

Tiivistelmä — Referat

P-fimbriallisilla *Escherichia coli*-bakteereilla on todettu olevan kaksi sitoutumisspesifiteettiä: G proteiinista riippuvainen sitoutuminen virtsateiden epiteeleiltä löytyvään digalaktosidirakenteeseen sekä edellisestä sitoutumisesta riippumaton, E- ja/tai F-proteiinivälitteinen sitoutuminen mm. soluväliaineesta tavattavaan liukenemattomaan fibronektiiniin. Sitoutumisspesifiteetin tutkimiseen proteiini tulisi puhdistaa muista fimbriaproteiineista ja tämä on osoittautunut vaikeaksi tehtäväksi. M13-faagiekspressiomenetelmän avulla on mahdollista päästä em. ongelmasta eroon. Haluttu proteiini ilmentetään faagin pintaproteiinin yhteydessä ja tällaisia rekombinantifaageja voidaan suoraa käyttää tutkittavan proteiinin karakterisointiin.

Työn tarkoituksena oli ilmentää FsoE proteiinia M13-faagin G3 pintaproteiiniin fuusioituneena ja tutkia faagin pinnalla ilmennettävän FsoE:n sitoutumista liukenemattomaan fibronektiiniin. Sitoutumistulosten perusteella voitaisiin arvioida FsoE ja FsoF proteiinien vuorovaikutusta fibronektiiniin tarttumiselle. *fsoE* geeni kloonattiin pCANTAB5-phagemidivektoriin, josta voitiin kasvattaa faageja faagipelastuksen avulla käyttämällä M13K07 avustajafaagia. FsoE:tä ilmentäviä faageja rikastettiin fibronektiiniin tarttumisella ns. biorikastusmenetelmällä. *fsoE* geenin sisältävää rekombinantifaagia tutkittiin FsoE:n ilmentämisen suhteen immunologisilla menetelmillä kuten ELISAn, immunoblottauksen ja immunoelektronimikroskopian avulla.

Työn avulla ilmeni, että vain hyvin pieni osa faagipopulaatiosta ilmensi FsoE:tä pinnallaan. Immunoelektronimikroskopian avulla löytyi vain kaksi haluttua proteiinia ilmentävää faagia. Merkittävin syy tulokseen oli FsoE:n heikko affiniteetti biorikastuksessa reseptoriproteiinina käytettyyn liukenemattomaan fibronektiiniin olettaen, että FsoE yksin vastaa sitoutumisesta ko. proteiiniin. On myös mahdollista, että FsoE:n konformaatio fuusioproteiinissa on estänyt proteiinia tunnistamasta fibronektiiniä. Biorikastuksen onnistuminen on siis välttämätön edellytys faagiekspressiomenetelmälle. FsoE:stä riippumaton tekijä voi olla rekombinantifaagin ja avustajafaagin kilpailu G3:n ilmentämisestä. Faagissa on n. 5 G3:a, joista yhden oletetaan sisältävän FsoE:n. Fuusioproteiinin muodostuminen voi olla hitaampaa kuin G3:n, jolloin uuden faagipartikkelin pinnalla voi olla vain avustajafaagin uottamia G3 proteiineja.

G3:a hyödyntävää faagimenetelmää on jatkossa kehitettävä biorikastuksen suhteen. FsoE:n affiniteettia fibronektiiniin voidaan keinoitekoisesti parantaa käyttämällä G8-faagiekspressiota, jossa haluttu proteiini ilmentetään faagin kuoriproteiinissa (n.2700 kpl/faagi). Rekombinantifaagin karakterisointimenetelmät soveltuvat nykyisellään, kunhan taustafaageista päästään eroon. Faagiekspressiomenetelmän käyttöä voisi kehittää myös muille adhesiineille sopivaksi sitoutumisspesifiteettien selvittämiseen.

Avainsanat — Nyckelord

FsoE, phagemidi, faagi, fibronektiini

Säilytyspaikka — Förvaringställe

Yleisen mikrobiologian ltk:n kirjasto

Muita tietoja — Övriga uppgifter