



Linnéuniversitetet

Kalmar Växjö

Fakulteten för hälso- och livsvetenskap

Examensarbete

Flödescytometrisk undersökning av inbindning mellan designade topdomänen från transferrin- receptorn till virala glykoproteiner för potentiell användning inom läkemedelsframtagning



Författare: Emma Rydell
Ämne: Biomedicinsk laboratorievetenskap
Nivå: Grundnivå

Flödescytometrisk undersökning av inbindning mellan designade topdomänen från transferrinreceptorn till virala glykoproteiner för potentiell användning inom läkemedelsframtagning

Emma Rydell

Examensarbete, Biomedicinsk laboratorievetenskap 15 hp

Filosofie Kandidatexamen

Handledare: Docent, Sinisa Bjelic

Linnéuniversitetet, Institutionen för
Kemi och biomedicin
Universitetsplatsen 1
392 31 KALMAR

Examinator: Docent, Björn Karlsson

Linnéuniversitetet, Institutionen för
Kemi och biomedicin
Universitetsplatsen 1
392 31 KALMAR

Examensarbetet ingår i biomedicinska analytikerprogrammet 180 högskolepoäng.

SAMMANFATTNING

Machupovirus är ett virus som kan orsaka hemorragisk feber hos människor. Efter utvärdering av bindning mellan designade proteiner och virala glykoproteiner skulle proteinerna potentiellt kunna användas vid framtagning av ett proteinbaserat läkemedel mot hemorragisk feber. Syftet med studien var att efter riktad evolution och framrening av optimerade varianter av proteinet AP01 undersöka inbindningen till virala glykoproteiner mellan designade AP01 proteiner och transferrinreceptorn med hjälp av flödescytometrisk undersökning. Den fysiologiska nivån av järn i kroppen upprätthålls av transferrin (Tf) och transferrinreceptorn (TfR), ett transmembranprotein bestående av tre domäner. TfR apikala domän används av glykoprotein 1 (MGP1) och *Plasmodium vivax* för att ta sig in i celler genom receptormedierad endocytos. Med rekombinant genteknik kan rekombinanta plasmider skapas där en gen av intresse ligeras in i en plasmid med hjälp av DNA-ligas. I studien skapades rekombinanta plasmider pET29b+/AP01 S2.1, S2.2, S2.3, S3.3, S3.4 och S3.6 som transformerades till *E. coli*. Erhållna resultat från sekvensering visade att samtliga sex AP01-gener hade ligerats i vektorn men sekvensering av rekombinanta plasmider visade att endast pET29b+/AP01 S2.1, S2.2, S2.3 och S3.6 hade nukleotidsekvens utan mutationer. Proteinuttryck inducerades innan proteiner renades fram med immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). Den uppskattade molekylvikten hos de framrenade proteinerna var 18 kDa som bestämdes med sodium dodecyl sulfate – polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE) vilket överrenstämde med den teoretiska molekylvikten. Flödescytometri användes för att undersöka inbindningsförmågan mellan de uttryckta proteinerna och glykoprotein 1 (MGP1). Interaktionsbindningen mellan de designade proteinerna och MGP1 är bättre än interaktionen mellan originalgen AP01 och MGP1. De designade proteinerna visar på en svag effekt i den utförda ”competition assay” som gjorts vilket kan förklaras med en ej optimal struktur hos de designade proteinerna eller närvaro av BSA.

Nyckelord

Transferrinreceptor, rekombinant genteknik, proteinupprening, yeast surface display, flödescytometri

ABSTRACT

Machupovirus is a virus that can cause hemorrhagic fever in humans. After evaluating the binding between designed proteins and viral glycoproteins, the proteins could potentially be used in the development of a protein-based drug for hemorrhagic fever. The aim of the study was to investigate the binding to viral glycoproteins between designed AP01 proteins and the transferrin receptor after directed evolution and purification of optimized variants of the AP01 protein by means of flow cytometric examination. The physiological level of iron in the body is maintained by transferrin (Tf) and the transferrin receptor (TfR), a transmembrane protein consisting of three domains. The apical domain of TfR is used by glycoprotein 1 (MGP1) and *Plasmodium vivax* to enter cells through receptor mediated endocytosis. With recombinant DNA technology, recombinant plasmids can be created where a gene of interest is ligated into a plasmid using DNA ligase. In this study, recombinant plasmids pET29b+/AP01 S2.1, S2.2, S2.3, S3.3, S3.4 and S3.6 were created and transformed into *E. coli*. Sequencing results showed that all six AP01 genes had been ligated into the vector but sequencing of recombinant plasmids showed that only endast pET29b+/AP01 S2.1, S2.2, S2.3 and S3.6 had nucleotid sequence without mutations. Protein expression was induced before proteins were purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC). The estimated molecular weight of the purified proteins was 18 kDa as determined by sodium dodecyl sulfate – polyacrylamid gel electrophoresis (SDS-PAGE) which was consistent with the theoretical molecular weight. Flow cytometry was used to examine the binding ability between the expressed proteins and glycoprotein 1 (MGP1). The interaction binding between the designed proteins and MGP1 is better than the interaction between the original gene AP01 and MGP1. The designed proteins show a weak effect in the “competition assay” preformed, wich can be explained by a non-optimal structure how the designed proteins or the presence of BSA.

Keywords

Transferrin receptor, recombinant DNA techniques, protein purification, yeast surface display, flow cytometry

Förkortningar

FITC – fluorescein isothiocyanate

HFE – hereditary hemochromatosis protein

IMAC – immobilized metal affinity chromatography

IPTG – isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

LB – lysogeny broth

PCR – polymerase chain reaction

RE – restriktionsenzymer

SAPE – streptavidin, R-Phycoerythrin conjugate

SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis

Tf – transferrin

TfR – transferrinreceptor 1

YSD – yeast surface display

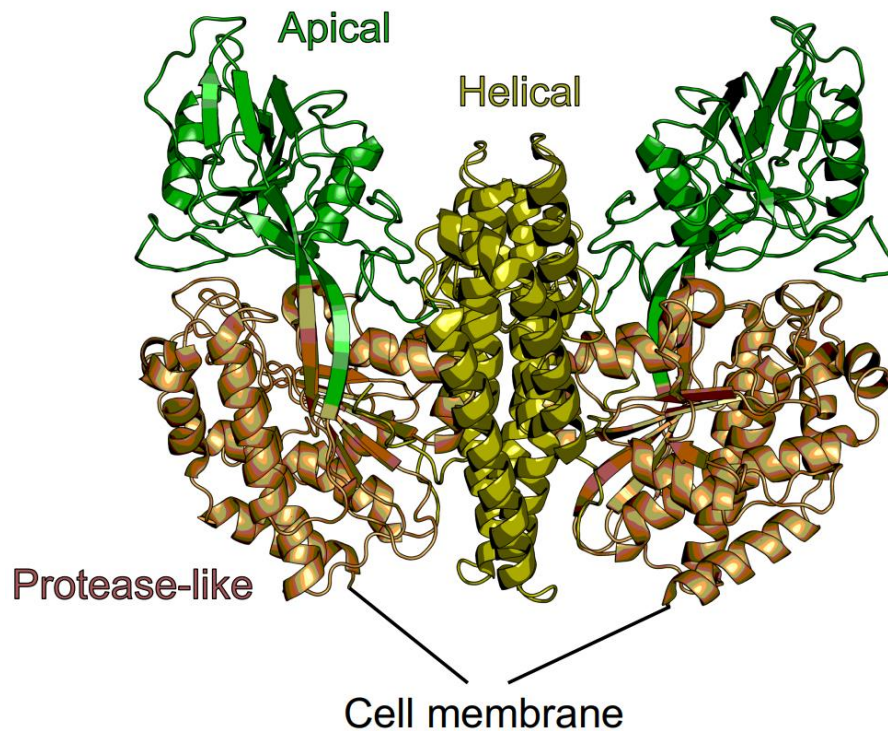
INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INTRODUKTION	1
Transferrinreceptorn och järnhomeostasen	1
Rekombinant genteknik	2
<i>Restriktionsenzymer</i>	2
<i>Ligering</i>	3
<i>Transformerering</i>	4
Polymerase Chain Reaction (PCR)	5
Agarosgelelektrofores	5
Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)	6
Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)	6
Yeast Surface Display	6
Flödescytometri	7
SYFTE	8
MATERIAL OCH METOD	8
Framrening av plasmid pET29b+	8
Amplifiering av AP01-gener	10
Ligering	11
Transformerering av bakterier	12
Koloni-PCR	12
Inducering av proteinuttryck i Tuner-celler och proteinupprening	13
Yeast Surface Display och flödescytometrisk analys	14
RESULTAT	16
Kloning och sekvensering	16
Proteinupprening	17
Flödescytometri	17
DISKUSSION	19
Metoddiskussion	19
Resultatdiskussion	20
<i>Sekvensering</i>	20
<i>Proteinupprening</i>	21
<i>Flödescytometri</i>	22
Hållbar utveckling	23
Slutsats	24
TACK	25
REFERENSER	26
BILAGOR	
Bilaga I	

INTRODUKTION

Transferrinreceptorn och järnhomeostasen

Järn är en viktig ingående kofaktor för proteiner vid bl.a redoxreaktioner (1). Kroppens fysiologiska nivå av järn upprätthålls av transferrin (Tf) tillsammans med transferrinreceptor 1 (TfR) där en Tf-molekyl maximalt kan binda två järnjoner (Fe^{3+}) för transport till celler (1,2). TfR klassas som transmembranprotein och har en liten cytoplasmisk region, en singel-pass transmembranregion och en större extracellulär region. Receptorn är en homodimer där varje monomer har en helikal, en proteaslik och en apikal domän (2). Se Figur 1. Vid pH 7,4 kan TfR binda två järnbärande Tf-molekyler medan Tf utan inbundet järn förblir extracellulärt. Genom receptormedierad endocytos tas Tf/TfR-komplexet upp av cellen. Ett surare pH (\leq pH 6,0) finns i den endosomala lumen vilket medför en konformationsändring hos Tf som då frisätter järnmolekyler (1–3). Järnfri Tf, även kallat apotransferrin (apoTf), är fortsatt bundet till TfR men lösgörs från receptorn då komplexet återförs till cellytan på grund av det fysiologiska pH (1,2,4). De frisatta järnmolekylerna kan lagras vid inbindning till ferritin eller användas vid cellens metabolism (3). Hereditary hemochromatosis protein (HFE) är ett protein vilket reglerar bindningen mellan TfR och Tf och på så sätt regleras den intracellulära järnkoncentrationen till ett optimum. Båda molekylerna Tf och HFE kan binda till TfR helikala domän med överlappande bindnings-site och järnregleringen kan ske på grund av en lägre affinitet hos Tf med inbundet järn än vad HFE har då det finns inbundet till TfR (5,6).



Figur 1. Apikal (grön), helikal (gul) och proteaslik domän hos TfR extracellulära region visas. Från (7), med tillstånd.

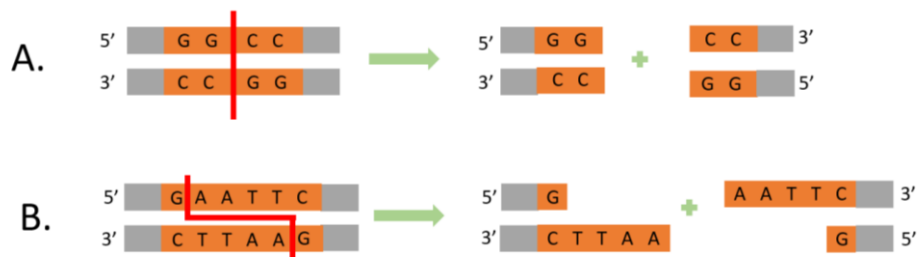
Då den apikala domänen hos TfR inte har en tydlig funktionell relevans utnyttjar exogena partiklar denna region i TfR för inbindning och transport in i cellen via endocytos. Machupo virus är ett arenavirus som kan orsaka hemorragisk feber om det sprids till människor. I bland annat Brasilien och Argentina rapporteras viruset orsaka höga dödstal. Genom glykoprotein 1 (MGP1) kan machupoviruset interagera med TfR apikala domän. Ett annat exempel på en exogen parasit som använder TfR för att komma in i celler är *Plasmodium vivax*, vilken orsakar malaria. Parasiten kan ta sig in i retikulocyter genom att interagera med både den apikala- och den proteaslika domänen hos TfR (2,8). TfR förmåga att plocka upp proteiner används inom biotekniken för transport av bl.a proteiner och läkemedel över cellmembran (2).

Rekombinant genteknik

Restriktionsenzymer

Restriktionsenzymer (RE) har funktionen att klyva DNA vid specifika nukleotidsekvenser där målgenens sekvens avgör var klyvningen kommer ske. Målgenen av intresse och restriktionsenzymerna inkuberas i buffert under värme för att

erhålla en optimal enzymaktivitet (9). Dessa enzymer har sitt ursprung hos bakteriers försvar mot virala infektioner och finns idag att tillgå hos flera återförsäljare (10,11). Enzymernas nomenklatur anger enzymets ursprung men berättar ej var den exakta klyvningen kommer ske i målsekvensen, detta är något som bestäms individuellt för varje enzym (10). Palindroma sekvenser, nukleotidsekvenser vilka efterföljs av dess komplementära sekvens i omvänd ordning, utgör vanligen restriktionsenzymernas igenkänningssekvens i storleksordningen ca fem baspar (10,12). Samma palindroma sekvens kan utgöra igenkänningssekvens för flera restriktionsenzymer som då klyver DNA på olika ställen inom igenkänningssekvensen (10). Klyvning med restriktionsenzym kan resultera i sticky eller blunt ends där sticky ends utgörs av överhängande ändrar av oparade baser och blunt ends utgörs av ändrar utan oparade baser (11). Se Figur 2.



Figur 2. A- Blunt ends bildas då restriktionsenzym klyver DNA-strängarna lika mellan två baspar. B- Sticky ends bildas då klyvningen har medfört oparade baser.

Ligering

Efter klyvning av DNA-fragment med restriktionsenzymer kan fragment ligeras ihop med DNA-ligas (11). Vid ligering bildas en fosfodiesterbindning mellan en hydroxylgrupp i 3'-ändan i det ena fragmentet och en fosfatgrupp i 5'-ändan i det andra fragmentet som katalyseras av DNA-ligas (13). Arbete med DNA-ligas bör ske i rumstemperatur då de flesta DNA-ligas inaktiveras vid högre temperaturer, undantag finns som exempel Taq DNA-ligas. T4 DNA-ligas finns kommersiellt tillgängligt och har sitt ursprung från fag-infekterade *E. coli* där T4 fag-genen 30 har klonats fram (14). Ligering av både blunt och sticky ends är möjligt med T4 DNA-ligas. Enzymet har visats inhiberas av monovalenta katjoner som Li^+ , Na^+ och K^+ vid koncentrationer över

70 mM samt förlorar helt aktivitet vid saltkoncentrationer över 200 mM. Liknande koncentrationer av nukleotider och deoxynukleotider har ej påvisat inhibering av enzymet (14). Förekomst av mismatch-mutationer i ligeringsområdet kan vara en anledning till ej lyckad ligering och olika känslighet för mutationer förekommer hos olika ligas där känsligheten hos T4 DNA-ligas är låg mot mismatch-mutationer. Exempel på mismatch-mutationer som T4 DNA-ligas ej kan ligera är G:A och C:C (14). Ligeringshastigheten mellan både blunt- och sticky ends har visats öka drastiskt i närvaro av makromolekyllära exkluderingsmolekyler, som exempel PEG, bovine plasma serum och glykogen, då T4 DNA-ligas används (15). T4 DNA-ligas är ett ATP-beroende ligas (16).

Transformering

Benämningen transformation syftar på den händelse då exogent DNA tas upp av jäst- eller bakterieceller och processen kan delas in i två faser (17–19). Det första steget i transformationen utgörs av upptaget av DNA genom cellmembranet som följs av det andra steget vilket är att cellen ej degraderar upptaget exogent DNA (19). Metoder som elektroporering, partikelbombning eller kemisk transformation kan användas för transformering av exogent DNA till värdceller (18). För att möjliggöra upptaget av exogent DNA till värdcellerna krävs att cellerna görs kompetenta, vilket kan uppnås genom behandling med divalenta katjoner (17,18). Tillägg bör dock göras att en naturlig kompetens förekommer hos vissa bakteriearter där både upptag av linjärt och cirkulärt DNA är möjligt (20). Vid kemisk transformation kan ämnen som dimetyl sulfoxid (DMSO) och polyetylenglykol (PEG) användas utöver katjoner för att erhålla kompetenta celler, dock har den divalenta katjonen kalcium (Ca^{2+}) visats vara mest effektiv vid kemisk behandling (19). Vanligen används kalcium i kombination med klorid (CaCl_2). Inbindning av katjoner till både exogent DNA och cellmembran minskar den repulsion som naturligt förekommer av deras negativa laddning, vilket kan appliceras hos både cirkulära och linjära DNA-fragment. Vid minskad repulsion kommer exogent DNA närmare bakterien. Den kemiska behandlingen, som även bidrar till en ökad permeabilitet i cellmembranet, kan kombineras med fysikalisk behandling då temperaturen höjs från ca 4 grader och bakterierna utsätts för en värmechock i 42 grader under 30 sekunder. Detta bidrar till upptaget av exogent DNA och en möjlig teori är att porer bildas i cellmembranet som släpper igenom exogent DNA. En sänkning av

temperaturen minskar rörligheten hos cellmembranets lipider som bidrar till ökad bindningsförmåga mellan kalciumjoner och cellmembran (19). Transformationens effektivitet hos bakterier kan öka 15-20 gånger vid närvaro av magnesium i odlingsmediumet jämfört med transformation av bakterier utan närvaro av magnesium (21).

Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR används för att amplifiera DNA och användningsområden för tekniken kan vara sekvensering, mutagenes eller tillverkning av cDNA. Metoden är flexibel och kostnadseffektiv (22). Komponenterna DNA-polymeras, dNTP-blandning, DNA-templat och primrar (forward och reverse) ingår i en PCR-reaktion (23).

Amplifieringen av ett specifikt DNA-fragment sker genom tre steg; denaturering, annealing och extension där dessa steg upprepas 30-40 cykler. Dubbelsträngat DNA denatureras under första steget då temperaturen höjs till 90°C. Då DNA denaturerats kan komplementära primrar binda in till sina målsekvenser på var sida om mål-DNA (40-60°C). Nytt DNA syntetiseras under sista steget av DNA-polymeras. Extensionsfasen sker vid en temperatur omkring 70°C, anpassat efter det DNA-polymeras som används. Som exempel har Taq-DNA-polymeras temperaturoptimum vid 72°C. En exponentiell ökning av mål-DNA sker under amplifieringen (24).

Agarosgelelektrofores

Gelelektrofores är en metod som används för separering av DNA-fragment utefter storlek (25). Då polymeren agaros smälts och löses upp i buffert bildas en gel då molekylerna bundit med vätebindningar till varandra (26). Porer av agaros bildas där storleken på porerna bestäms av agaroskoncentrationen. Mindre DNA-fragment kan separeras vid högre agaroskoncentrationer. Då prov appliceras till brunnar i gelen vandrar de negativt laddade DNA-fragmenten mot anoden i ett elektriskt fält (25).

Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Metoden möjliggör separering av proteinblandningar baserat på deras molekylmassa (27). Inför analys kokas prover i fem minuter tillsammans med ditiotritol (DTT) eller β -merkaptoetanol och SDS där de förstnämnda ämnena bryter disulfidbryggor mellan aminosyror i proteinerna vilket förstör proteinernas tertiärstruktur. Till de denaturerade proteinerna kan sedan SDS binda in, och på grund av SDS-molekylernas negativa laddning får samtliga proteiner en total negativ laddning (27,28). Polyacrylamidgelen är uppdelad i två lager, en stacking gel och en separationsgel. Då prover appliceras till gelens brunnar är det till stacking gelen det sker där provet kommer samlas upp till ett band. Ett elektriskt fält kopplas in över gelen vilket ger upphov till isotakfores då det förekommer skillnader i pH och jonstyrka mellan bufferten i stacking gelen och elektroforesbufferten. I separeringsgelen kan små proteiner vandra lättare och fortare i gelen än vad de större proteinerna gör, de separeras (28). Detektion av separerade proteiner i en polyakrylamidgel kan göras med färgen Coomassie brilliant blue (29).

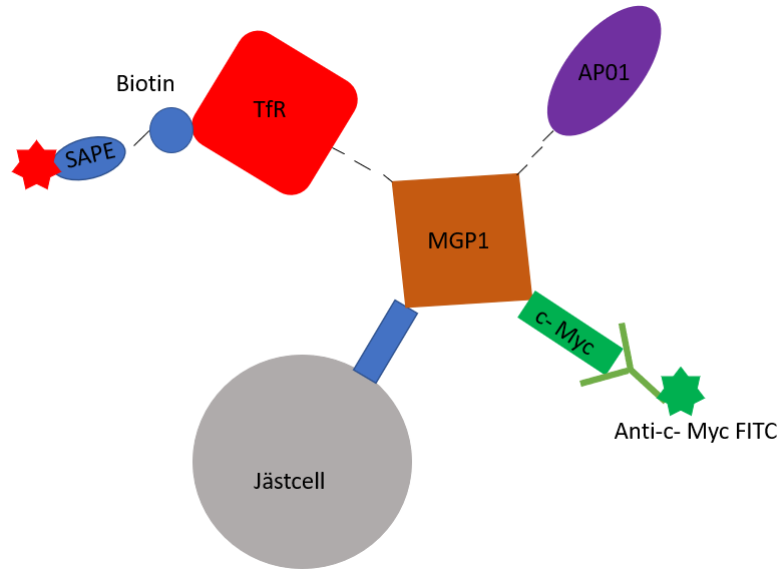
Immobilized metal affinity chromatography (IMAC)

Immobilized metal affinity chromatography (IMAC) är en separationsmetod baserad på interaktioner mellan elektronondonatorer på ytan hos proteiner och metalljoner. Kelatorer finns bundna till den stationära fasen i en kolonn till vilka metalljoner sedan kan binda och skapa ett kelat-metallkomplex. De tvåvärda jonerna Cu^{2+} , Co^{2+} och Ni^{2+} används vanligen. Proteiner kan binda till metalljonerna och immobiliseras då de tillsätts med den rörliga fasen (30). Imidazol används för att eluera protein med histidin-tag, det vill säga protein där sex till nio histidin förekommer efter varandra i nukleotidsekvensens i N- eller C-terminal (31).

Yeast Surface Display

Yeast surface display (YSD) är en metod där en jästcell kan programmeras att uttrycka ett specifikt protein på sin yta. Ett protein av intresse kan isoleras för vidare undersökning av dess egenskaper, exempel affinitet till andra proteiner (32). MGP1 som uttrycks på jästens yta kan binda antingen AP01 (löslig apikal domän) eller TfR vilket i denna studie undersöks med flödescytometri där uttryckt MGP1 detekteras med FITC

och inbunden TfR detekteras med SAPE (streptavidin R-Phycoerythrin conjugate). SAPE binder till TfR genom en biotinmolekyl (Figur 3).



Figur 3. Beskrivning av YSD som använts under arbetet. Uttryckt MGP1 på cellytan detekteras med FITC och inbunden TfR detekteras med SAPE.

Flödescytometri

Med metoden flödescytometri kan en specifik cellpopulation sorteras ut från en heterogen massa av dissocierade celler. Användning av fluorescens möjliggör detektion av specifika egenskaper (33). Inom molekylärbiologin kan metoden bl.a användas för undersökning av proteinuttryck eller protein–proteininteraktioner (33). Instrumentet bygger på de tre systemen, fluidics, optik och elektronik. Partiklar organiseras i en encells-suspension genom hydrodynamisk fokusering, med syfte att varje partikel ska kunna analyseras separat. Den hydrodynamiska fokuseringen skapas genom att sheat fluid (vars uppgift är att föra provet framåt), kraftigare pressas genom kanalen än provet som då hamnar i kanalens mitt. Provets partiklar passerar en monokromatisk laser som avger ljus med en våglängd. Då partiklar i provet passerar lasern används initialt två detektorer, forward scatter (FSC) och side scatter (SSC). Ljus vars riktning är densamma som lasern detekteras med FSC och partikelns storlek kan avgöras. SSC sitter i 90° från lasern och detekterat ljus motsvarar partikelns granularitet (34). Vilken laser som används justeras efter använda fluorokromer (35). Fluorokromer, fotoreaktiva molekyler, kan absorbera ljus med en specifik våglängd för att sedan emittera ljus med

en längre våglängd. Då fluorokromen exciteras det emitterade ljuset (36). För separation av ljuset som emitterats finns speglar och filter (optiksystem) för att rikta ljus med specifika våglängder mot olika detektorer (elektroniksystem). En fotomultiplikator, en typ av detektor, omvandlar ljussignal till en ström som är proportionell mot emitterat ljus. Flödescytometri kan även användas för att fysiskt sortera ut en specifik cellpopulation från ursprungsprovet genom Fluorescence-activated cell sorting (FACS) (37). Antikroppen anti-c-myc fluorescein isothiocyanate (FITC) exciteras vid 488 nm och absorberar ljus i intervallet 400-550 nm. Fluorokromen phycoerythrin (PE) har ett absorptionsmaximum vid 650 nm (35). FITC och SAPE beskrivs i Figur 3.

SYFTE

Syftet med studien var att efter riktad evolution och framrening av designade varianter av proteinet AP01 undersöka inbindningen till virala glykoproteiner mellan designade AP01 proteiner och transferrinreceptorn med hjälp av flödescytometrisk undersökning.

MATERIAL OCH METOD

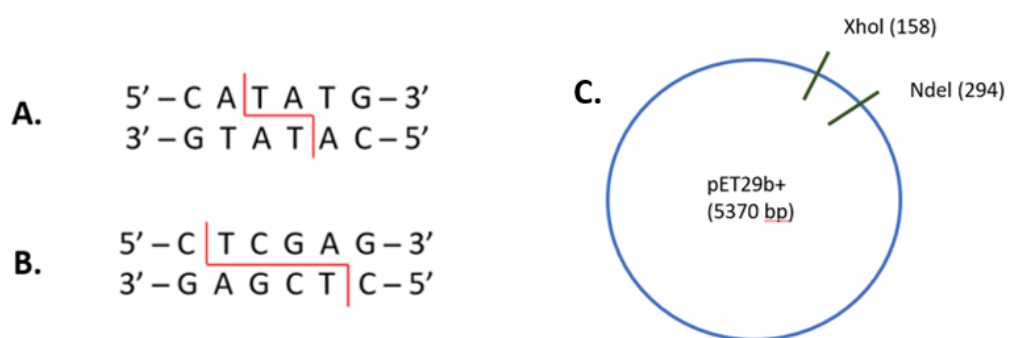
Framrening av plasmid pET29b+

Plasmid pET29b+ (Merck, Solna, Sverige) renades fram från transformerade NovaBlue Singles Competent Cells (Novagen, Darmstadt, Tyskland) med plasmid Midi Kit (QIAGEN, Kista, Sverige). Närvaro av framrenad plasmid undersöktes med gelelektrofores (50 V, 40 minuter) där storleksmarkören FastRuler DNA Ladder (Fermentas, Helsingborg, Sverige) och ursprunglig cirkulär pET29b+ plasmid användes som positiv kontroll. Under hela arbetet användes instrumentet Mupid-exu (Eurogentec, Berlin, Tyskland) och 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, Uppsala, Sverige) vid utförande av gelelektrofores med 1 % agarosgel om inget annat anges. Samtliga koncentrationsbestämningar i arbetet bestämdes med Qubit 3.0 Fluorometer (Invitrogen, Malmö, Sverige). Framrenad cirkulär pET29b+-plasmid (179 ng/μl) klövs med RE NdeI

och XhoI (Figur 4) (Thermo Scientific, Uppsala, Sverige) och FastDigest NdeI Kit (Thermo Scientific, Uppsala, Sverige) enligt tillverkarens anvisningar till två linjära plasmidfragment. Ingående komponenter anges i Tabell I. Klyvning av plasmid kontrollerades med gelelektrofores (O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific, Uppsala, Sverige)) och plasmidfragment motsvarande ca 5 kb renades fram från agarosgel med GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, Uppsala, Sverige). Koncentration linjär plasmid mättes till 49,9 ng/μl.

Tabell I. Ingående komponenter för klyvning av plasmid samt PCR-produkter. Reaktionsblandningarna inkuberades i 37°C i 10 minuter.

Reaktionskomponenter	Plasmid-DNA	PCR-produkt
10X FastDigest Green Buffer (Thermo Scientific, Uppsala, Sverige)	5 μl	2 μl
DNA	27,9 μl (5 μg)	(0,2 μg)
NdeI	2,5 μl	0,5 μl
XhoI	2,5 μl	0,5 μl
Nukleasfritt vatten	Slutlig totalvolym 50 μl	Slutlig totalvolym 30 μl



Figur 4. Nukleotidsekvensen var klyvning med NdeI (A) och XhoI (B) skedde. C – Klyvningssekvensens position i pET29b+-plasmiden.

Amplifiering av AP01-gener

AP01-generna av intresse AP01 S2.1 (4,1 ng/μl), S2.2 (1,8 ng/μl), S2.3 (1,5 ng/μl), S3.3 (5,14 ng/μl), S3.4 (5,9 ng/μl) och S3.6 (6,0 ng/μl) amplifierades med Thermal Cycler (BIOER TECHNOLOGY, Hangzhou, China) där Tabell II anger använt PCR-protokoll och Tabell III anger ingående komponenter i reaktionsblandningarna för AP01-generna. Dessa sex gener skiljer sig från varandra genom olika punktmutationer i nukleotidsekvenserna. Validering av amplifieringsprodukterna utfördes med gelelektroforetisk undersökning där produkterna storleksgraderades utifrån O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific). Cirkulär pET29b+-plasmid (1 ng/μl) med ett större geninsert användes som positiv kontroll under amplifieringen av AP01-generna. Thermal Cycler (BIOER TECHNOLOGY) användes vid alla PCR-analyser under arbetet.

Tabell II. PCR-protokoll där temperaturer och PCR-stegens längd anges. Amplifieringen pågick under 35 cykler.

PCR-steg	Tid	Temperatur (°C)
Denaturering	30 sek	95
Annealing	30 sek	55
Elongering	1 min	72
Slutlig elongering	10 min	72

Tabell III. Ingående komponenter i reaktionsblandningarna för PCR var Taq 2X Mastermix, och primrarna oYfwd samt oYrev utöver nukleasfritt vatten och templat. Slutkoncentrationer och tillverkare av reaktionskomponenterna anges.

Reaktionskomponenter	Slutkoncentration	Tillverkare
Taq 2X Mastermix	1X	(VWR, Stockholm, Sverige)
oYfwd (10 µM) (5' – GCT CTG CAG GCT AGT GG – 3')	0,5 µM	(INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT), Leuven, Belgien)
oYrev (10 µM) (5' – ATC AGA TCT CTA TTA CAA GTC C – 3')	0,5 µM	(INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT), Leuven, Belgien)
Templat	5-50 ng	
Nukleasfritt vatten	Till tot. volym 50 µl	

Amplifierat DNA; S2.1 (92,3 ng/µl), S2.2 (76,6 ng/µl), S2.3 (78,8 ng/µl), S3.3 (104 ng/µl), S3.4 (96,4 ng/µl) och S3.6 (86,3 ng/µl) klövs (se Tabell I) och kontrollerades som beskrivet ovan (plasmidupparbetning). Upprening av amplifierat DNA utfördes innan samt efter klyvning med GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific, Uppsala, Sverige).

Ligering

Ligering av klyvda AP01-gener (insert) S2.1 (8.28 ng/µl), S2.2 (7.38 ng/µl), S2.3 (8.22 ng/µl), S3.3 (5.94 ng/µl), S3.4 (6.74 ng/µl) och S3.6 (7.01 ng/µl) samt linjär plasmid (vektor) utfördes med T4 DNA Ligase Kit (Invitrogen, Malmö, Sverige).

Komponenterna Ligase Reaction Buffer (1X), T4 DNA Ligase (0,1 unit) och linjär vektor (49,9 ng/µl) ingick i ligeringsreaktionerna för respektive AP01-gen med slutvolym 20 µl. Olika ligeringsförhållanden mellan vektor och insert undersöktes under arbetet, förhållandet 1:2 användes för samtliga gener medan S3.3 och S3.4 även ligerades vid förhållandena 1:1 och 5:1. Inkubering skedde i en timme (23-26°C).

Transformering av bakterier

Från erhållna ligeringsreaktioner, innehållande rekombinanta cirkulära pET29b+-plasmider med inkorporerade AP01-gener, tillsattes 3 µl ligeringsreaktion till One Shot TOP10 Competent *E. coli* (Invitrogen, Malmö, Sverige). Heat chock utfördes då inkubation skedde under 30 sekunder i 42 °C efter cellerna förvarats på is 30 minuter. Odlingsmediumet Lysogeny Broth (LB) 2X (20 g/L trypton (FORMEDIUM, Hunstanton, England), 20 g/L natriumklorid (NaCl), 10 g/L jästextrakt båda från (SIGMA, Stockholm, Sverige)). Cellerna som transformerats (50 µl) odlades ut på 2X LB Kanamycin (0,005 ng/µl) (FORMEDIUM, Hunstanton, England) agarplattor. Agarplattorna inkuberades i 37 °C över natten. Celler transformerade med cirkulär pET29b+-plasmid (179 ng/µl) utgjorde positiv odlingskontroll medan de två negativa kontrollerna utgjordes av odling av ej transformerade celler samt odling av celler transformerade med linjär pET29b+ plasmid (49,9 ng/µl).

Koloni-PCR

Transformeringen kontrollerades med koloni-PCR då kolonier från samtliga agarplattor resuspenderades i 20 µl milliQ-vatten. PCR-reaktionerna bereddes enligt Tabell IV. PCR efterföljdes av gelelektrofores (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, Uppsala, Sverige)). Cirkulär pET29b+/AP01 (5,0 ng/µl) användes som positiv kontroll under koloni-PCR och gelelektrofores. Prover innehållande PCR-produkt med längden 700 bp skickades på sekvensering med Mix2Seq Kit (Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland) efter att kvarvarande primers och nukleotider i post-PCR-reaktionerna degraderats med ExoSAP-IT PCR Product Cleanup (Thermo Scientific, Uppsala, Sverige). Se Tabell V. Inför samtliga sekvenseringar under arbetet användes Mix2Seq Kit (Eurofins Genomics).

Tabell IV. Ingående komponenter i reaktionsblandningarna för koloni-PCR var Taq 2X Mastermix, och primrarna T7-fwd samt T7-rev utöver bakteriesuspension. Slutkoncentrationer och tillverkare av reaktionskomponenterna anges.

Reaktionskomponenter	Slutkoncentration	Tillverkare
Taq 2X Mastermix	1X	(VWR, Stockholm, Sverige)
T7-fwd (100 µM) (5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG – 3')	5 µM	(IDT, Leuven, Belgien)
T7-rev (100 µM) (5' – GCT AGT TAT TGC TCA GCG G – 3')	5 µM	(IDT, Leuven, Belgien)
Bakteriesuspension	Till tot. volym 20 µl	

Tabell V. Tabellen anger vid vilka temperaturer ExoSAP-IT-reagens degraderar och inaktiveras samt hur lång tid stegen pågick. En reaktion bestod av 4 µl ExoSAP-IT-reagens och 10 µl PCR-produkt.

PCR-steg	Tid	Temperatur (°C)
Degradering	15 min	37
Inaktivering	15 min	80

TOP10 Competent *E. coli* (Invitrogen) transformerade med rekombinanta plasmider från tidigare nämnda bakteriesuspensioner (11 µl) odlades i 2X LB innehållande kanamycin (FORMEDIUM) (0,005 ng/µl) över natt (37 °C) i skakinkubator (225 rpm). Rekombinanta plasmider renades fram utifrån dessa övernattningskulturer med GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Uppsala, Sverige). Framrenade rekombinanta plasmider pET29b+/AP01 S2.1 (19,2 ng/µl), pET29b+/AP01 S2.2 (19,5 ng/µl), pET29b+/AP01 S2.3 (24,8 ng/µl), pET29b+/AP01 S3.3 (22,6 ng/µl), pET29b+/AP01 S3.4 (21,7 ng/µl) och pET29b+/AP01 S3.6 (20,9 ng/µl) skickades för sekvensering för bekräftelse av korrekta nukleotidsekvenser.

Inducering av proteinuttryck i Tuner-celler och proteinupprening

Framrenade rekombinanta plasmider 2.1, 2.2, 2.3 och 3.6 och AP01 transformerades till BL21 (DE3) Tuner Competent Cells (Invitrogen, Malmö, Sverige), enligt ovan

beskrivning, för proteinuttryck. För varje rekombinant plasmid startades en odlingskultur (2X LB med 0,1 ng/μl kanamycin) från flera kolonier av transformerade Tuner celler (Invitrogen). Inkubering av odlingskulturerna förlöpte i skakinkubator (180 rpm) i 37 °C tills OD₆₀₀ = 0,6 erhöles i samtliga odlingskulturer. Temperaturen sänktes till 20 °C och 0,2 mM IPTG tillsattes för inducering av proteinuttryck och kulturerna inkuberades vidare i 18 timmar. Celler från odlingskulturerna samlades upp genom centrifugering vid 4500×g under 25 minuter där erhållen pellet resuspenderades i 15 ml 100 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH 7,4 innan cellösningarna sonikerades fyra gånger vid 40 % amplitud under 20 sekunder, med 20 sekunders pauser mellan gångerna, med instrumentet Libra Cell 100 (Sonics, Newtown, USA). Efter centrifugering av lyserade celler vid 10 000×g under 30 minuter filtrerades supernatanten genom ett filter (0,2 μm) innan den tillsattes till en HisPur Cobalt resin kolonn (Thermo Scientific, Uppsala, Sverige) som tidigare jämviktats med 100 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH 7,4. Efter prov tillsatts tvättades kolonnen med 100 mM HEPES, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,4 och proteiner eluerades ut från kolonnerna med 100 mM HEPES, 500 mM NaCl, 200 mM imidazol, pH 7,4. För bekräftande av att eluat innehöll protein med korrekt storlek användes SDS-PAGE. Utöver undersökning av alla eluat från respektive framrenat protein undersöktes även prover tagna från lyserade celler efter sonikering samt prover tagna från supernatant efter andra centrifugeringen enligt ovan. För samtliga SDS-PAGE analyser under arbetet användes Laemmli SDS sample buffer 6X (Thermo Scientific, Uppsala, Sverige) och Precision Plus Protein Dual Color Standards (BIO-RAD, Solna, Sverige). För avsättning av eluerade proteiner jämviktades PD-10 Desalting Columns (Sephadex G-25 Medium) (GE Healthcare, Uppsala, Sverige) med 100 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH 7,4 innan eluat från proteinuppreningen tillsattes till respektive kolonn. PBSF-buffert (0,24 g/L KH₂PO₄, 0,2 g/L KCl, 1,44 g/L Na₂HPO₄, 1 g/L BSA) tillsattes till kolonnerna och eluat samlades upp. Avsaltade proteiner kontrollerades med SDS-PAGE.

Yeast Surface Display och flödescytometrisk analys

Jästceller EBY100 (38) odlades ut på C-UT odlingsplattor och inkuberades vid 30 °C under tre dygn för att vidare inokulera några tillväxta kolonier i 1X C – UT (UraTrp) odlingsmedium med glukos (1,85 g/L C-UT, 6,9 g/L YNB, 40 g/L glukos) och

inkuberas vidare i skakinkubator (180 rpm) vid 30°C över natten. OD₆₀₀ mättes för samtliga odlingskulturer och lämpligt antal celler centrifugerades ner (10 000×g, två minuter) för att erhålla OD₆₀₀ = 0,75 i slutvolymen 1,5 ml 1X C-UT med galaktos (1,85 g/L C-UT, 6,9 g/L YNB, 40 g/L galaktos). Alla utförda centrifugeringar vidare i arbetet hade dessa inställningar. Celltillväxten saktas ner medan proteinuttryck initierades och kulturerna inkuberades 24 timmar vid 20 °C (180 rpm).

Tillräckligt antal celler från övernattningskulturerna centrifugerades ner för att erhålla en synlig pellet, OD₆₀₀ mättes för bestämningen då OD₆₀₀ = 1 motsvarade 10⁷ celler/ml. Erhållen pellet suspenderades i 100 µl PBSF för att centrifugeras ytterligare en gång innan supernatanten pipetterades bort. Härifrån utfördes allt arbete på is.

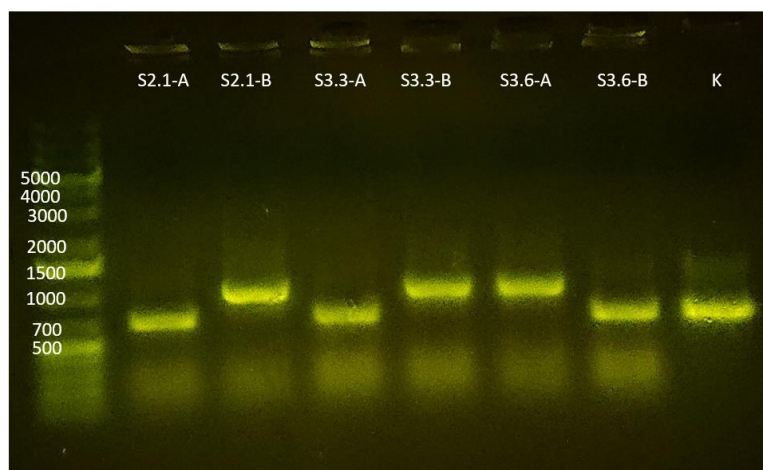
Samtliga prover märktes in med 30 µl TfR (1 µM) följt av 1,5h inkubering på is. Alla nämnda tvättsteg nedan gjordes med 100 µl PBSF. Proverna centrifugerades och tvättades innan supernatanten pipetterades bort. Prover ljusskyddades härifrån.

Antikropparna anti c-myc FITC och SAPE (Invitrogen, Malmö, Sverige) tillsattes till samtliga prover i spädningarna 1:150 för FITC respektive 1:18,9 för SAPE där spädning gjordes med PBSF. FITC-antikroppen band under inmärknigen (30 min) in till MGP1 uttryckt på jästcellen och ingående streptavidin (SA) hos SAPE band till biotin på TfR. Vidare utfördes ytterligare ett centrifugerings- och tvättsteg. Erhållen pellet ljusskyddades och förvarades på is fram till flödescytometrisk analys då instrumentet Accuri C6 (BD Bioscience, Stockholm, Sverige) användes och respektive pellet resuspenderades i PBSF (50 µl) och analyserades en och en. Vid uppstart av flödescytometern Accuri C6 (BD Bioscience) utfördes en metodkontroll. Antal celler som analyserades per prov var 50 000 och FITC fluorescerade i kanal FL1 och SAPE i kanal FL2. Programmet BD Accuri C6 Software (version 264.21, BD Biosciences, Sverige) samlade in mätdata som sedan bearbetades i programmet FlowJo.

RESULTAT

Kloning och sekvensering

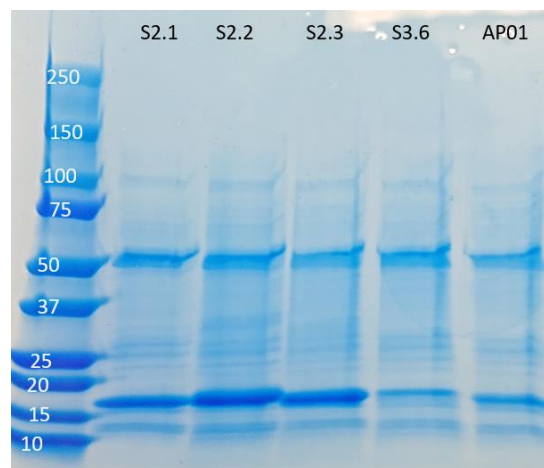
För att funktionstesta proteinvarianterna S2.1, S2.2, S2.3, S3.3, S3.4 och S3.6 efter riktad evolution behövde dessa klonas i korrekt vektor för att vidare kunna uttryckas i bakteriesystem. Utfört funktionstest med koloni-PCR på transformerade One Shot TOP10 Competent *E. coli* visade att minst en koloni från varje proteinvariant innehöll målgen med korrekt storlek (Figur 5). Prover innehållande PCR-produkt med längden 700 bp skickades på sekvensering (Eurofins Genomics). Erhållna sekvenseringsresultat, vid jämförelse med förväntad nukleotidsekvens hos originaltemplet, visade att samtliga AP01-generna hade korrekt nukleotidsekvens. Efter att korrekt inkorporerade gensekvenser bekräftats med sekvensering skickades framrenade rekombinanta plasmider pET29b+/AP01 (19,2 – 24,8 ng/μl) för ytterliggare sekvensering. Resultat från den andra sekvenseringen visade att de rekombinanta plasmiderna pET29b+/AP01 S2.1, pET29b+/AP01 S2.2, pET29b+/AP01 S2.3 och pET29b+/AP01 S3.6 alla hade korrekt nukleotidsekvens utan mutationer. Förändringar i nukleotidsekvens fanns hos de andra två rekombinanta plasmiderna S3.1 och S3.2.



Figur 5. Exempel på agarosgel för analys av PCR-produkternas längd efter genomförd koloni-PCR. Från vänster: storleksmarkör GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific), S2.1 koloni A, S2.1 koloni B, S3.3 koloni A, S3.3 koloni B, S3.6 koloni A, S3.6 koloni B, positiv kontroll (Cirkulär pET29b+/AP01 (5,0 ng/μl)).

Proteinupprening

De fyra rekombinanta plasmiderna med korrekt nukleotidsekvens som anges ovan transformerades till BL21 (DE3) Tuner Competent Cells (Invitrogen) för inducering av proteinuttryck. Upprening av uttryckta proteiner utfördes med IMAC och de uppenade proteinernas storlek bestämdes med SDS-PAGE före och efter imidazolavsaltning. Molekylvikten uppskattades till ca 18 kDa, gällande för samtliga uppenade proteiner (Figur 6). Under uppeningsstegen samlades prover in under olika framreningssteg; SDS-PAGE gelelektrofores av dessa prov redovisas i Bilaga I.

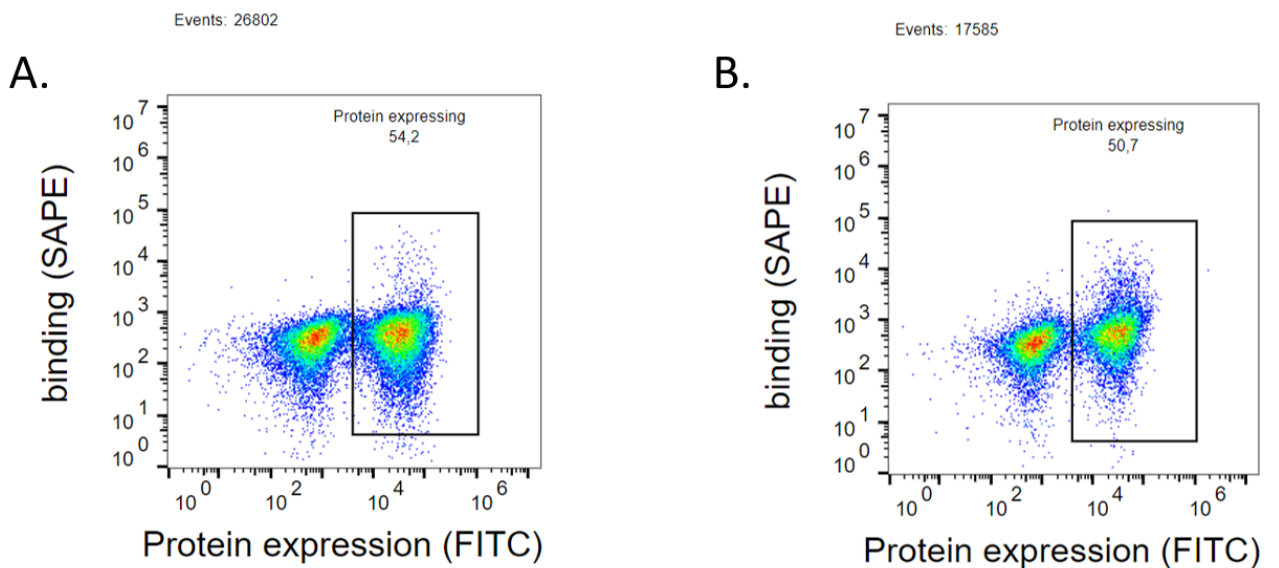


Figur 6. Molekylvikt för AP01 och proteinvarianterna S2.1, S2.2, S2.3 och S3.6 uppskattades till 18 kDa med SDS-PAGE gelelektrofores.

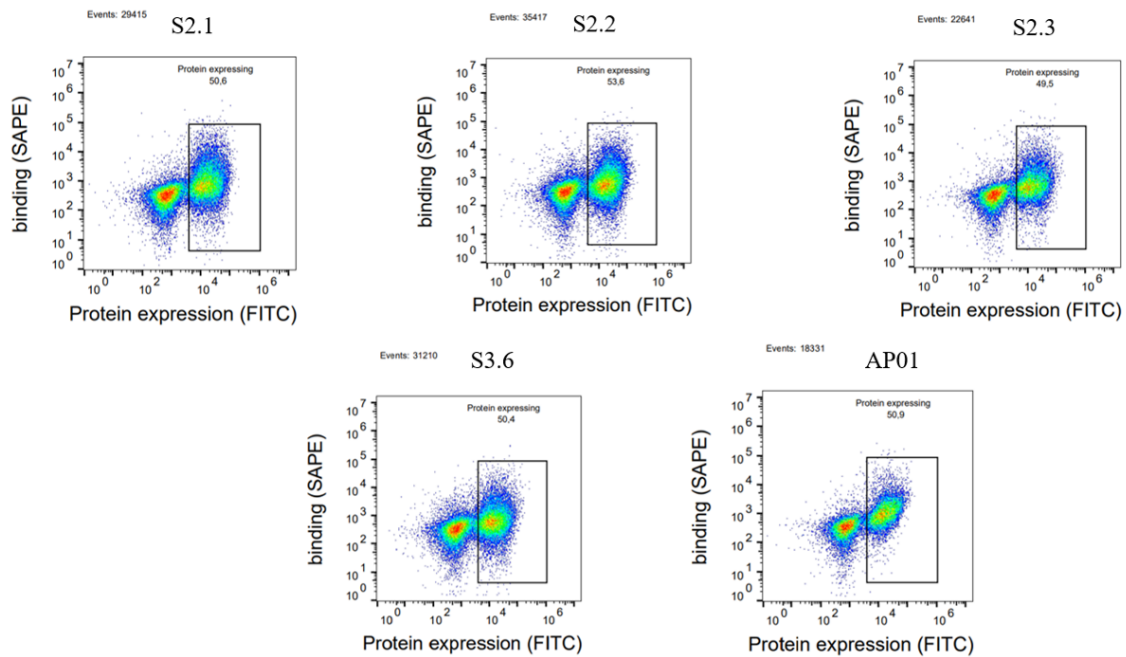
Flödescytometri

Samtliga erhållna dotplottar som erhöles efter flödescytometrisk undersökning redovisas i Figur 8, erhållna dotplottar från positiv och negativ kontroll redovisas i Figur 7. Den negativa kontrollen där TfR ej var tillsatt visade ingen SAPE-signal medan FITC-signal uppvisade tydlig signal med proteinet uttryckt på jästen. Den positiva kontrollen uppvisade en högre SAPE-signal än negativ kontroll utan TfR tillsatt, dock förväntades en högre signal. Generellt testas tre olika kloner för att minimera risken för klonberoende variation.

Dotplottarna för S2.1, S2.2, S2.3, S3.6 och AP01 (Figur 8) liknade varandra på så vis att tydliga populationer av jästceller med inbundet FITC kunde urskiljas som de uttryckande populationerna (till höger i respektive dotplott). Vid avläsning av SAPE-signal fanns events utspridda från höga till låga SAPE-signaler inom den applicerade gaten. Något tydligare avgränsad population kunde ses för AP01 där majoriteten av analyserade events låg i det övre spannet.



Figur 7. FITC-SAPE dotplottar för jästceller med uttryckt protein MGP1 på cellytan. A. Kontroll utan TfR (negativ kontroll) visade en population med FITC-signal. B. Kontroll med TfR (positiv kontroll) visade en population med FITS-signal och en mindre signal för den bindande populationen (SAPE-signal).



Figur 8. FITC-SAPE dotplottar för proteinvarianterna 2.1, S2.2, S2.3, S3.6 och AP01. FITC-uttryckande population sågs till höger i dotplottarna och jästceller med inbundet SAPE sågs högt upp i dotplotten. Samtliga dotplottar visade tydlig jästcellspopulation med uttryckt FITC. Utspridda SAPE-signaler sågs inom större delen av gaten för dotplottarna S2.1, S2.2, S2.3 och S3.6. SAPE-signalen för AP01 sågs mer samlad i det översta området inom gaten.

DISKUSSION

Syftet med studien var att efter riktad evolution och framrening av designade varianter av proteinet AP01 undersöka inbindningen till virala glykoproteiner mellan designade AP01 proteiner och transferrinreceptorn med hjälp av flödescytometrisk undersökning.

Metoddiskussion

Inom molekylärbiologin kan rekombinant genteknik användas för att ta fram bl.a vaccin och läkemedel på ett säkert, effektivt och ekonomiskt vis. Flera tidskrävande steg, ex. långa inkubationstider kan ses som en nackdel (39). Endast en liten mängd ursprungsprov krävs för amplifiering av DNA då PCR används samt att amplifieringen sker snabbare än om en bakteriekultur skulle odlas och tillväxa tills att liknande

koncentration mål-DNA tagits fram. Gensekvenser hos olika arter av bakterier kan vara liknande vilket utgör en risk för falskt positiva PCR-produkter (40).

Gelelektrofores är en flexibel metod att använda för separering av DNA-fragment, dels för att koncentrationen agaros kan justeras inför varje analys men även för att olika typer av DNA-fragment kan analyseras (supercoiled, linjärt- och cirkulärt DNA). För större fragment än 25 kb behövs en annan typ av gelelektrofores användas; pulse field gelelektrofores (25). Med SDS-PAGE finns möjligheten att storleksbedöma enskilda proteiner ur ett prov med flertalet proteiner. Metoden är ej lämpad att användas om strukturförhållanden vill undersökas, ex. proteinbindningar då ett denatureringssteg föregår elektroforesen (27). Då flera proteiner har förmågan att binda till metalljoner kan IMAC användas vid upprening av flera olika proteiner dock bör det noteras att metalljonernas inbindning till den fasta fasen bryts vid närvaro av EDTA (30). Metoden YSD är en enkel metod vilken är kompatibel med flödescytometri. Trots jästcellens relativt lilla yta kan ett stort antal proteiner (10^4 - 10^5) uttryckas per cell. En nackdel med YSD är tidsåtgången, detta är en metod som tar längre tid att utföra jämfört med andra liknande icke-cellulära displaymetoder och innebär mycket manuellt arbete (41). Transformerings effektiviteten är lägre för jästceller jämfört med bakterier (42). Flödescytometri analyserar stora cell-mängder och metodens förmåga att undersöka flertalet parametrar samtidigt hos partiklarna ses som en fördel (35). Vätskeflödet i instrumentet kan störas av partiklar, även rör i instrumentet kan blockeras om de ej elimineras från provet innan analys (43).

Resultatdiskussion

Sekvensering

Genom rekombinant genteknik skapades rekombinanta plasmider utifrån pET29b+ och AP01 S2.1, S2.2, S2.3, S3.3, S3.4 och S3.6. Fyra av dessa sex plasmidvarianter som tagits fram under studien bekräftades ha en korrekt nukleotidsekvens utan mutationer. Vad gäller plasmiderna pET29b+/AP01 S3.3 och pET29b+/AP01 S3.4 med en felaktig nukleotidsekvens utfördes ytterligare flera misslyckade försök att få fram plasmider med korrekt geninsert att använda i kommande studier. På grund av tidsbrist kunde detta moment inte slutföras under studien.

Proteinupprening

Korrekta rekombinanta plasmider transformerades till BL21 Tuner Competent Cells (Invitrogen) för proteinuttryck. Även rekombinant pET29b+/AP01 plasmid innehållande den ursprungliga AP01-varianten, det vill säga transferrinreceptorernas lösliga apikala domän, transformerades till dessa celler. Vid två tillfällen under proteinuppreningen samlades prov in som kontroll av att protein med korrekt storlek fanns i alla steg vid uppreningen. Dessa två tillfällen var efter sonikering samt från supernatant innan prov tillsattes till kolonnen, de benämndes som P1 respektive P2. Då dessa prover, utöver eluat från IMAC, analyserades med SDS-PAGE visade det sig att alla eluat för samtliga fem proteinvarianter innehöll protein med den förväntade storleken ca 18 kDa (Bilaga I). Teoretiskt ska AP01-proteinerna ha storleken 18 027 Da vilket forskargruppen har visat i tidigare studier (2). Även proteiner med storleken 18 kDa kunde noteras i prover P1 och P2 även om dessa sågs mer otydligt. Prov P1 innehöll cellrester efter lysering såsom cellmembran och andra proteiner, vilket gjorde det svårt att se ett tydligt AP01-band.

Ytterligare analys med SDS-PAGE utfördes efter avsättning av proteinerna där imidazol som användes för att eluera proteinerna från IMAC matrisen avlägsnades. Band notrades även här uppskattningsvis vid 18 kDa och för S3.6 samt AP01 sågs banden betydligt svagare jämfört med resterande varianter (Figur 6).

Koncentrationsmätningar visade lägre halt upprenat protein i de två proverna S3.6 och AP01. Ytterligare band sågs vid ca 60 kDa, som ej förväntades (Figur 6). PBSF-bufferten som användes vid elueringen av proteinerna vid avsättning skulle inte ha använts, istället skulle 100 mM HEPES, 500 mM NaCl, pH 7,4 ha använts. BSA fanns i PBSF-bufferten och har molekylvikten 66 463 Da (44). Bandet som visade ett ca 60 kDa stort protein skulle därför kunna vara BSA. För vidare arbete av proverna borde en ny avsättning göras. Fler uppreningsmetoder som size-exclusion chromatography (SEC) kunde ha applicerats för bättre upprening av AP01-proteinerna i studien. Vid SEC renas proteiner i lösning enligt deras storlek, vilket skulle kunna ge en bättre reningshalt av AP01 och dess varianter (2).

Flödescytometri

En ”competition assay” genomfördes där två proteiner i närvaro av varandra konkurrerade om samma inbindningsplats till ett målprotein. Kvalitativa bindningsegenskaper kunde mätas. Förväntat var att AP01 skulle konkurrera ut TfR vid inbindning till MGP1 och därmed se att signalen för TfR (alltså SAPE) går ner. Den positiva kontrollen (Figur 7B) där TfR var tillsatt borde visat på en cellpopulation med hög SAPE-signal då komplexet hade möjlighet att binda till den biotinylerade TfR. Cellpopulationen visade istället låg detektion av SAPE. Detta gjorde att positiv kontroll inte kunde godkännas och för övriga dotplottar gjordes istället en relativ jämförelse emellan (Figur 8). Båda kontrollerna och samtliga prover visade att en cellpopulation med FITC hade detekterats vilket innebar att jästcellerna hade lyckats uttrycka MGP1 korrekt i stor utsträckning.

Rekombinant plasmid med originaltemplet AP01 transformerades till Tunerceller (Invitrogen) för att visa om inbindningsförmågan var bättre mellan originalgenen och MGP1 eller de modifierade varianterna och MGP1. Det har fastslagits att virala glykoproteiner som Machupo virus glycoprotein (MGP1) interagerar med TfR apikala domän (2). Vid jämförelse av den högra cellpopulationen mellan AP01 och de andra fyra proverna noterades att de fyra designade proteinerna hade en bättre interaktionbindning till MGP1 än vad originalgenen hade. Detta kunde utläsas då det fanns betydligt färre event med låg SAPE-signal i dotplotten för AP01.

Dotplottarna för proverna S2.1, S2.2, S2.3 och S3.6 hade liknande utseende. Precis som hos kontrollerna erhöles cellpopulation till höger i dotplottarna som avgränsats med en gate, vilket gav indikation på hur mycket MGP1 som uttryckts på cellytan. I cellpopulationerna till höger för varje av dessa proteinvarianter sågs event utspridda över hela SAPE-intervallet. De designade proteinerna hade delvis konkurrerat ut TfR vilket kunde sägas då det sågs event med låga SAPE-signaler. Samtidigt sågs event med höga SAPE-signaler vilket visade på en bättre inbindningsförmåga mellan TfR och MGP1. I den ”competition assay” som utfördes sågs alltså en svag effekt av att de designade proteinerna konkurrerade ut TfR. Denna svaga effekt kunde tyda på en

konsekvens av designade proteiner som inte hade en tillräckligt optimerad struktur för att fullt ut konkurrera ut TfR.

En relativ jämförelse mellan dotplottarna för S2.1, S2.2, S2.3 och S3.6 var svår att göra då samtliga plottar visade liknande värde för SAPE. Gjordes däremot en kvalitativ jämförelse mellan samma dotplottar kunde det konstateras att provet med bäst kvalite var S2.2 och sämst hade S2.1 och S2.3.

Närvaron av BSA i proverna var möjligen en bidragande orsak till de svaga bindningar som sågs mellan de designade proteinerna och MGPI då BSA möjligen kunde påverka bindningen. BSA kan även ha påverkat utförda koncentrationsbestämningar av proteinvarianterna som gjordes efter avsaltning. Detta skulle i så fall ha medfört att AP01-varianterna tillsattes i mindre mängd än bestämt till proverna som blandades inför flödescytometrin. Preanalytiska felkällor kan ha varit bakomliggande då det är möjligt att proverna ej hade beretts korrekt inför analys. En annan tänkbar orsak var att misstaget som skedde under avsaltningen påverkade den slutliga flödescytometriska datan. Metodkontrollen av instrumentet Accuri C6 (BD Bioscience) utfördes innan analyserna påbörjades där fluorescenta nanopartiklar användes och kontrollen godkändes.

Hållbar utveckling

Åtgången på plastmaterial var stor men krävdes för att uppnå den renlighet som behövdes ur ett molekylärbiologisk synsätt. Biologiska avfall och farliga kemikalier som skulle kunna medföra skada på miljön hanterades efter rutiner kring avfallshantering. Denna typ av material kastades i uppmärkt behållare. Inköp av material för att preparera IMAC-kolonner själv var ekonomiskt hållbart jämfört med om färdigpreparerade kolonner hade införskaffas.

Slutsats

Fyra korrekta rekombinanta plasmider togs framgångsrikt fram med inkorporerade AP01-gener. Rening av proteinerna lyckades med metoden IMAC vilket bekräftades med SDS-PAGE. Utvärdering av bindningen mellan de uppenade proteinerna och virala proteiner visade endast en svag effekt vilket visade på att de designade proteinerna inte hade en optimal struktur för att inhibera glykoproteinernas interaktionsbindning med TfR. En bidragande orsak till de observerat svaga bindningarna mellan designade proteiner och glykoproteiner förmodades bero på närvaron av BSA som möjligen påverkade bindningen. Koncentrationsförhållandet mellan TfR och designade proteiner bör ses över för proteinernas förmåga att binda som dimer till TfR. Det sista som kunde tänkas behöva optimeras i framtiden var protokollet för den flödescytmetriska utvärderingen. Efter vidare förbättring av bindningen mellan proteinvarianterna och MGP1 kan de framtagna proteinvarianterna ha ett potentiellt terapeutisk användningsområde vid framtagning av behandling mot hemorragisk feber. Denna proteinbaserade teknik skulle möjligtvis även kunna riktas mot andra virus och då få en enorm global betydelse både för vetenskapen och den enskilda människan.

TACK

Jag vill tacka institutionen för kemi och biomedicin på Linnéuniversitetet för att jag fick göra mitt examensarbete hos dem. Ett stort tack till Sinisa Bjelic för det stöd och den hjälp jag har fått. Jag vill även rikta ett tack till Dick Sjöström som hjälpte till under flödescytometrin.

REFERENSER

1. Cheng Y, Zak O, Aisen P, Harrison SC, Walz T. Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex. *Cell*. 2004 Feb 20;116(4):565–76.
2. Sjöström DJ, Berger SA, Oberdorfer G, Bjelic S. Computational backbone design enables soluble engineering of transferrin receptor apical domain. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2020;88(12):1569–77.
3. Lebrón JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA, et al. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell*. 1998 Apr 3;93(1):111–23.
4. Lawrence CM, Ray S, Babyonyshev M, Galluser R, Borhani DW, Harrison SC. Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. *Science*. 1999 Oct 22;286(5440):779–82.
5. Sjöström DJ, Mohlin C, Ambrosetti E, Garforth SJ, Teixeira AI, Bjelic S. Motif-driven protein binder design towards transferrin receptor helical domain. *The FEBS Journal* [Internet]. [cited 2022 Apr 14];n/a(n/a). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/febs.16311>
6. Bennett MJ, Lebrón JA, Bjorkman PJ. Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature*. 2000 Jan 6;403(6765):46–53.
7. Sjöström DJ. Design and engineering of human transferrin receptor 1 and its binding proteins. 2021 [cited 2022 Jun 13]; Available from: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:lnu:diva-100507>
8. Abraham J, Corbett KD, Farzan M, Choe H, Harrison SC. Structural basis for receptor recognition by New World hemorrhagic fever arenaviruses. *Nat Struct Mol Biol*. 2010 Apr;17(4):438–44.
9. Restriction Enzymes Digestion|restriction endonuclease-GenScript [Internet]. [cited 2022 Mar 19]. Available from: <https://www.genscript.com/what-is-restriction-digestion.html>
10. Smith DR. Restriction endonuclease digestion of DNA. *Methods Mol Biol*. 1993;18:427–31.
11. Roberts MAJ. Recombinant DNA technology and DNA sequencing. *Essays in Biochemistry*. 2019 Oct 11;63(4):457–68.
12. Ganapathiraju MK, Subramanian S, Chaparala S, Karunakaran KB. A reference catalog of DNA palindromes in the human genome and their variations in 1000 Genomes. *Hum Genome Var*. 2020 Nov 20;7(1):1–12.
13. Lubert Stryer JLT. *BIOCHEMESTRY A Short Course*. Second edition. Kate Ahr Parker; 2013. 607–608 p.

14. Lohman GJS, Tabor S, Nichols NM. DNA Ligases. *Current Protocols in Molecular Biology*. 2011;94(1):3.14.1-3.14.7.
15. Pfeiffer BH, Zimmerman SB. Polymer-stimulated ligation: enhanced blunt- or cohesive-end ligation of DNA or deoxyribooligonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solutions. *Nucleic Acids Res*. 1983 Nov 25;11(22):7853–71.
16. Chen SH, Yu X. Human DNA ligase IV is able to use NAD⁺ as an alternative adenylation donor for DNA ends ligation. *Nucleic Acids Res*. 2019 Feb 20;47(3):1321–34.
17. Froger A, Hall JE. Transformation of Plasmid DNA into *E. coli* Using the Heat Shock Method. *J Vis Exp*. 2007 Aug 1;(6):253.
18. DNA transformation protocol [Internet]. [cited 2022 Mar 18]. Available from: <https://www.genscript.com/transformation-troubleshooting-guide.html>
19. Asif A, Mohsin H, Tanvir R, Rehman Y. Revisiting the Mechanisms Involved in Calcium Chloride Induced Bacterial Transformation. *Front Microbiol*. 2017 Nov 7;8:2169.
20. Swords WE. Chemical transformation of *E. coli*. *Methods Mol Biol*. 2003;235:49–53.
21. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*. 1983 Jun 5;166(4):557–80.
22. Green MR, Sambrook J. Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harb Protoc*. 2019 Jun 1;2019(6):pdb.top095109.
23. Green MR, Sambrook J. The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*. 2018 May 1;2018(5):pdb.prot095117.
24. Samuel Clokie AH. Recombinant DNA Techniques and Molecular Cloning. In: Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. eight edition. United Kingdom: Cambridge University Press; 2018. p. 73–178.
25. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp*. 2012 Apr 20;(62):3923.
26. Duncan R. Smith. Transgenesis Techniques. 1st ed. Humana Totowa; 1993. 433–438 p.
27. Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH. Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins With Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions. *Metallomics*. 2014 May;6(5):1068–78.
28. Samuel Clokie AH. Electrophoretic Techniques. In: Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. eight edition. United Kingdom: Cambridge University Press; 2018. p. 219–52.

29. Brunelle JL, Green R. Coomassie blue staining. *Methods Enzymol.* 2014;541:161–7.
30. Cheung RCF, Wong JH, Ng TB. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012 Dec 1;96(6):1411–20.
31. HisPur™ Cobalt Resin [Internet]. [cited 2022 May 19]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/89964>
32. Cherf GM, Cochran JR. Applications of yeast surface display for protein engineering. *Methods Mol Biol.* 2015;1319:155–75.
33. McKinnon KM. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 2018 Feb 21;120:5.1.1-5.1.11.
34. Betters DM. Use of Flow Cytometry in Clinical Practice. *J Adv Pract Oncol.* 2015 Oct;6(5):435–40.
35. Joanne Konkel JG. Flow Cytometry. In: Wilson and Walker's Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. eight edition. United Kingdom: Cambridge University Press; 2018. p. 287–312.
36. Paul K Wallace JDT Jr. Reagents and Cell Staining for Immunophenotyping by Flow Cytometry. In: Pathobiology of Human Diseases. Academic Press; 2014. p. 3678–701.
37. Liao X, Makris M, Luo XM. Fluorescence-activated Cell Sorting for Purification of Plasmacytoid Dendritic Cells from the Mouse Bone Marrow. *J Vis Exp.* 2016 Nov 4;(117).
38. Chao G, Lau WL, Hackel BJ, Sazinsky SL, Lippow SM, Wittrup KD. Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display. *Nat Protoc.* 2006 Aug;1(2):755–68.
39. Deb R, Chakraborty S, Sengar G, Bhanuprakash V. Pros and Cons of Recombinant DNA Technology in Animal Diseases Diagnosis, Prevention and Control. *Journal of Pure and Applied Microbiology.* 2016 Mar 1;10:451–62.
40. Liu HY, Hopping GC, Vaidyanathan U, Ronquillo YC, Hoopes PC, Moshirfar M. Polymerase Chain Reaction and Its Application in the Diagnosis of Infectious Keratitis. *Med Hypothesis Discov Innov Ophthalmol.* 2019;8(3):152–5.
41. Andreu C, del Olmo M Í. Yeast arming systems: pros and cons of different protein anchors and other elements required for display. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018 Mar 1;102(6):2543–61.
42. James D Marks. CHAPTER 32- Monoclonal Antibodies from Display Libraries. In: *Molecular Biology of B Cells.* Academic Press; 2003. p. 511–31.
43. Jacobsen CN, Jakobsen M. FLOW CYTOMETRY. In: Robinson RK, editor. *Encyclopedia of Food Microbiology.* Oxford: Elsevier; 1999. p. 826–34.

44. Babcock JJ, Brancalion L. Bovine serum albumin oligomers in the E- and B-forms at low protein concentration and ionic strength. *Int J Biol Macromol.* 2013 Feb;53:42–53.

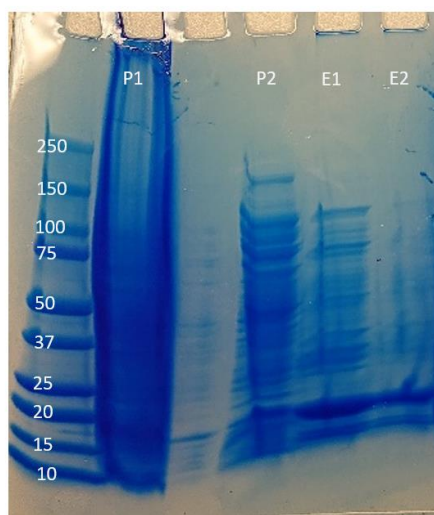
BILAGOR

Bilaga I

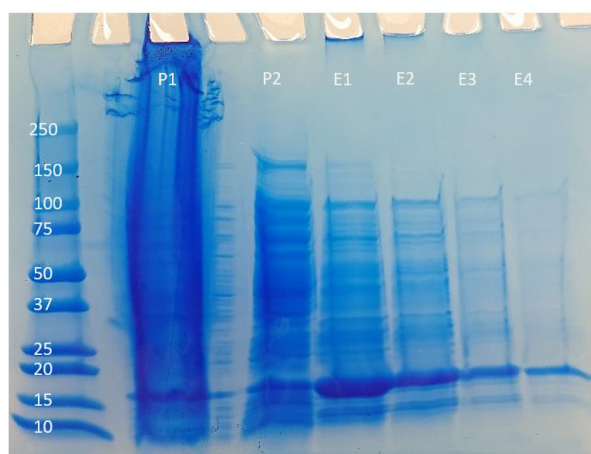
SDS-PAGE gelelektrofores av AP01 varianterna

Utöver uppsamlade eluat (E1, E2 osv.) av uppenade protein från IMAC samlades prov in under uppeningens gång. Prov togs från cellösning efter sonikering (P1), och innehöll då celler, och supernatant (P2) efter att lacerade celler tvättats bort.

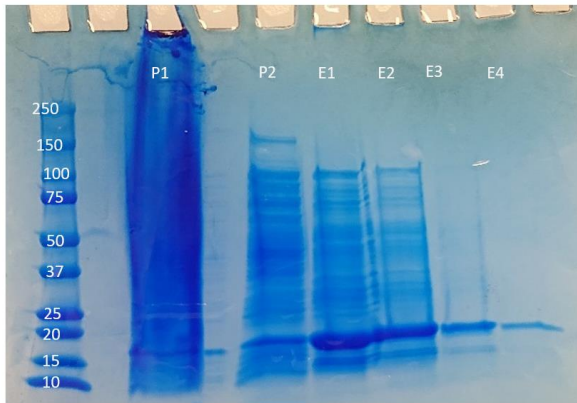
AP01 S2.1



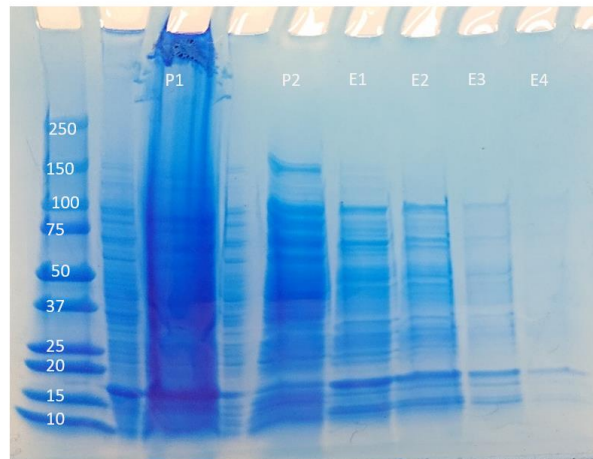
AP01 S2.2



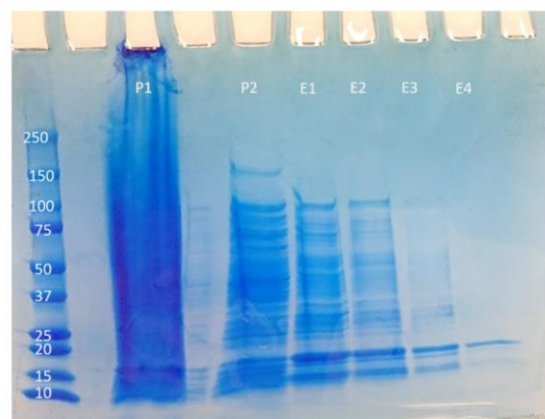
AP01 S2.3



AP01 S3.6



AP01



Linnéuniversitetet
Kalmar Växjö
Lnu.se