

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Marko NAROBÉ

**POSKUS OBOGATITVE PROTEINOV PLAZEMSKÉ MEMBRANE IZ  
ŽELODČNEGA TKIVA TER RAČUNALNIŠKO ISKANJE MOŽNIH  
BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV RAKA ŽELODCA**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**ATTEMPT OF ENRICHMENT OF PLASMA MEMBRANE PROTEINS  
FROM GASTRIC TISSUE, AND A COMPUTER SEARCH OF  
POTENTIAL BIOMARKERS IN GASTRIC CANCER**

GRADUATION THESIS  
University Studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Medicinskem centru za molekularno biologijo, Inštitut za biokemijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja imenovala prof. dr. Radovan Komela, za somentorico dr. Nino Kočevlar-Britovšek, za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: Doc. dr. Matej BUTALA  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: Prof. dr. Kristina SEPČIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: Prof. dr. Radovan KOMEL  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biokemijo

Članica: Dr. Nina KOČEVAR-BRITOVŠEK,  
University of Cambridge, Department of Biochemistry, Cambridge,  
Velika Britanija

Datum zagovora:

Podpisni izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Marko NAROBÉ

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
 DK 616.33(043.2)=163.6  
 KG Proteomika/rak želodca/centrifugiranje v gradientu/2-D elektroforeza/prenos western  
 AV NAROBE, Marko  
 SA KOMEL, Radovan (mentor)/KOČEVAR-BRITOVŠEK, Nina (somentorica)  
 KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
 LI 2016  
 IN POSKUS OBOGATITVE PROTEINOV PLAZEMSKE MEMBRANE IZ ŽELODČNEGA TKIVA TER RAČUNALNIŠKO ISKANJE POTENCIALNIH MEMBRANSKIH BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV RAKA ŽELODCA  
 TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)  
 OP XIII, 90 str., 23 pregl., 64 slik, 15 pril., 52 virov  
 IJ SI  
 JI SI/en  
 AI Proteini plazemske membrane predstavljajo približno  $\frac{1}{3}$  celotnega proteoma in so vitalnega pomena za celico. Membranski proteini so pomembni za identiteto celice, signaliziranje v in med celicami, prenosu skozi membrano in varovanju celic. Obenem so tudi biološki označevalci in tarče za mnoga zdravila. Napake v proteinih plazemske membrane so pomembne pri razvoju raka, saj njihova stalna navzočnost/aktivnost lahko omogoči celicam, da pridobijo rakave lastnosti. Rak želodca je še vedno eden glavnih vzrokov smrti, povezanih z rakom. Velika težava je njegovo pozno odkritje, saj so bolniki brez znakov, dokler bolezen ne napreduje. Zato je pomembno, da bi identificirali biološki označevalec raka želodca, s katerim bi lahko odkrili bolezen, preden se razvije v smrtno obliko. Mi smo poskusili obogatiti frakcijo proteinov plazemske membrane iz želodčnega tkiva s tehniko centrifugiranja v saharoznem gradientu in nato uspešne obogatitve analizirati z 2-D elektroforezo. Hkrati smo z iskanjem po podatkovnih zbirkah želeli sestaviti manjši pregledni seznam možnih bioloških označevalcev raka želodca. Za poskus obogatitve proteinov plazemske membrane smo uporabili 10 različnih protokolov; od teh 6 z uporabo centrifugiranja v gradientu, 2 z uporabo komercialnih kompletov, namenjenih izolaciji membranskih proteinov, en preprost protokol, ki se ni posluževal centrifugiranja v gradientu, in en protokol za izolacijo celokupnih proteinov celice. S slednjim smo primerjali uspešnost obogatitve proteinov plazemskih membran ostalih protokolov. Obogatitev frakcije proteinov plazemskih membran smo preverjali s tehniko prenosa Western in detekcijo kadherinov. Nato smo uspešno obogatene vzorce analizirali z 2-D elektroforezo. Ugotovili smo, da je s tehniko centrifugiranja v saharoznem gradientu možno obogatiti proteine plazemske membrane, vendar je zaradi izgub med potekom postopkov ne priporočamo za majhne vzorce. Prav tako analiza s tehniko 2-D elektroforeze ni najbolj primerna za majhne vzorce, sploh če so ti hidrofobni. Z iskanjem po podatkovnih zbirkah smo našli proteine, ki so objavljeni kot biološki označevalci raka in bi glede na njihovo fiziološko vlogo lahko bili udeleženi pri patologiji želodca. Tiste, ki še niso bili potrjeni za rak želodca, lahko predlagamo za prihodnje raziskave njihove vloge tudi pri omenjeni vrsti raka.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
 DC 616.33(043.2)=163.6  
 CX Proteomics/gastric cancer/gradient centrifugation/2-D electrophoresis/Western blot  
 AU NAROBÉ, Marko  
 AA KOMEL, Radovan (mentor)/KOČEVAR-BRITOVŠEK, Nina (co-mentor)  
 PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
 PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology  
 PY 2016  
 TI ATTEMPT OF ENRICHMENT OF PLASMA MEMBRANE PROTEINS FROM GASTRIC TISSUE, AND A COMPUTER SEARCH OF POTENTIAL BIOMARKERS IN GASTRIC CANCER  
 DT Graduation thesis (University study)  
 NO XIII, 90 p., 23 tab., 64 fig, 15 ann., 52 ref.  
 LA SI  
 AL SI/en  
 AB Plasma membrane proteins represent about one third of the cell proteome, and they are vital for the cell. They are responsible for cell identity, signaling in and between cells, transporting through the plasma membrane, and guarding the cell. At the same time they could serve as biomarkers, and targets for drugs. Disturbances and errors in plasma membrane proteins may be a cause for the development of cancers. Constantly present and active aberrant proteins can contribute to cancer properties. Gastric cancer is still one of the main causes of death associated with cancer. His late discovery is a real challenge because patients are asymptomatic until the disease progresses. Because of this it is very important to identify a biomarker enabling to discover gastric cancer before it becomes deadly. We tried to enrich a fraction with plasma membrane proteins from the gastric tissue with sucrose gradient centrifugation, and to analyze that fraction with 2-D electrophoresis. In parallel we tried with data mining to assemble a smaller list of possible gastric cancer biomarkers. For the enrichment of plasma membrane proteins we used 10 different protocols. From them 6 are employing gradient centrifugation, another 2 are commercial kits designed to isolate plasma membrane proteins, one was a basic protocol, and the last one a protocol for isolating total proteins. The latter was used in order to assess the performance of other protocols. Enrichment was inspected with Western-blotting and cadherin detection. Successfully enriched samples were analyzed with 2-D electrophoresis. We concluded that it is possible to enrich plasma membrane proteins with sucrose gradient centrifugation but because of sample loss during procedure, it is still advised to use this technique for small samples. Likewise, 2D electrophoresis is suitable just for small and especially hydrophobic samples. With data-mining we found proteins that already were published as biomarkers for different forms of cancer but could also play some role in normal physiology of the stomach. In case they were not yet suggested for gastric cancer, we could propose them for future research of their possible role also in this type of cancer.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>Ključna dokumentacijska informacija (KDI) .....</b>	<b>III</b>
<b>Key Words Documentation (KWD) .....</b>	<b>IV</b>
<b>Kazalo vsebine .....</b>	<b>V</b>
<b>Kazalo preglednic.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Kazalo slik.....</b>	<b>IX</b>
<b>Kazalo prilog.....</b>	<b>XII</b>
<b>Okrajšave in simboli .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN	1
1.2 HIPOTEZE	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>2</b>
2.1 RAK	2
2.2 RAK ŽELODCA	3
2.3 MEMBRANSKI PROTEINI IN NJIHOVA VLOGA PRI RAKU	4
2.4 PROTEOMIKA	8
2.5 ISKANJE BIOLOŠKIH OZNAČEVALVEV PRI RAKU ŽELODCA	10
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	<b>12</b>
3.1 SESTAVA PUFROV IN RAZTOPIN	12
3.2 VZORCI	15
3.3 POTEK DELA	15
3.4 GELSKA ELEKTROFOREZA IN PRENOS WESTERN	16
3.5 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA	17
<b>3.5.1 Izoelektrično fokusiranje</b>	<b>17</b>
<b>3.5.2 Ekvilibracija</b>	<b>18</b>
<b>3.5.3 Navpična SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza</b>	<b>18</b>
<b>3.5.4 Barvanje s srebrovim nitratom</b>	<b>18</b>

<b>3.5.5</b>	<b>Računalniška analiza 2-DE gelov</b>	<b>19</b>
3.6	RAZLIČNI NAČINI OBOGATITVE MEMBRANSKIH PROTEINOV IZ VZORCEV ŽELODČNEGA TKIVA	19
<b>3.6.1</b>	<b>Protokol za izolacijo celokupnih proteinov</b>	<b>19</b>
<b>3.6.2</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov I</b>	<b>19</b>
<b>3.6.3</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov II</b>	<b>20</b>
<b>3.6.4</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov III</b>	<b>20</b>
<b>3.6.5</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov IV</b>	<b>21</b>
<b>3.6.6</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov V</b>	<b>22</b>
<b>3.6.7</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov VI</b>	<b>23</b>
<b>3.6.8</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov VII</b>	<b>23</b>
<b>3.6.9</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov VIII</b>	<b>25</b>
3.7	ISKANJE BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV PO RAČUNALNIŠKIH ZBIRKAH	26
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	<b>28</b>
4.1	REZULTATI RAZLIČNIH PROTOKOLOV ZA OBOGATITEV MEMBRANSKIH PROTEINOV	28
<b>4.1.1</b>	<b>Protokol za izolacijo celokupnih proteinov</b>	<b>28</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov I</b>	<b>29</b>
<b>4.1.3</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov II</b>	<b>30</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov III</b>	<b>35</b>
<b>4.1.5</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov IV</b>	<b>39</b>
<b>4.1.6</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov V</b>	<b>50</b>
<b>4.1.7</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov VI</b>	<b>52</b>
<b>4.1.8</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov VII</b>	<b>55</b>
<b>4.1.9</b>	<b>Protokol za obogatitev plazemskih proteinov VIII</b>	<b>72</b>
4.2	RAČUNALNIŠKA ANALIZA 2-DE GELOV	78
4.3	REZULTATI ISKANJA BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV PO RAČUNALNIŠKIH ZBIRKAH	79
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	<b>80</b>

5.1	RAZPRAVA	80
5.2	SKLEPI	84
<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>85</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>86</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Proteini primarnega supernatanta .....	32
Pregl. 2: Proteini primarne oborine .....	34
Pregl. 3: Vzorci plazemskih membran po protokolu Turk in Plemenitaš (2003) .....	36
Pregl. 4: Vzorci supernatantov po centrifugiranju frakcije s plazemskimi membranami.....	38
Pregl. 5: Vzorci primarnega alikvota in vzorci po 16-urnem centrifugiranju v gradientu. ....	40
Pregl. 6: Vzorci po 2-urnem gradientnem centrifugiranju in vzorec supernatanta. ....	41
Pregl. 7: Vzorci mikrosomalnega homogenata po 8-urnem centrifugiranju v gradientu. ....	43
Pregl. 8: Vzorci nuklearnega homogenata po 8-urnem centrifugiranju v gradientu.....	45
Pregl. 9: Vzorci mikrosomalnega homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu. ....	47
Pregl. 10: Vzorci nuklearnega homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu.....	49
Pregl. 11: Vzorci na različnih stopnjah protokola.....	50
Pregl. 12: Vzorci po 33-minutnem centrifugiranju v saharoznem gradientu.....	52
Pregl. 13: Vzorci po 60-minutnem centrifugiranju v saharoznem gradientu.....	54
Pregl. 14: Vzorci DH pred in po centrifugiranju v gradientu. ....	56
Pregl. 15: Vzorci po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirani na različne načine.....	58
Pregl. 16: Vzorci po 150-minutnem centrifugiranju v gradientu.....	60
Pregl. 17: Vzorci po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu.....	62
Pregl. 18: Vzorci ekstrahirani s pufrom za lizo in karbonatom. ....	64
Pregl. 19: Ekstrakcija s Tritonom.....	66
Pregl. 20: Ekstrakcijo s kloroform/metanolom. ....	68
Pregl. 21: Vzorec pred in po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu.....	71
Pregl. 22: Vzorci izoliranih proteinov pri različnih fazah obogatitve.....	73
Pregl. 23: Računalniška analiza in količina dobljenih lis .....	79



## KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Lastnosti celice raka .....	2
Sl. 2: Razredi membranskih proteinov .....	5
Sl. 3: EGFR signaliziranje.....	6
Sl. 4: Ras/Raf/MEK/ERK signalna pot.....	7
Sl. 5: Ras/PI3K/PTEN/Akt/mTOR signalna pot.....	7
Sl. 6: Prenos Western iz protokola za izolacijo celokupnih proteinov in protokola za obogatitev plazemskih proteinov I. ....	28
Sl. 7: 2DE gel vzorca celokupnih proteinov. ....	29
Sl. 8: Primerjava med protokolom za obogatitev plazemskih proteinov I in preprostim protokolom za izolacijo celokupnih proteinov .....	30
Sl. 9: 2-DE gel vzorca po protokolu za obogatitev plazemskih proteinov I. ....	30
Sl. 10: 2-DE gel vzorca primarnega peleta po centrifugiranju v saharoznem gradientu po protokolu za obogatitev plazemskih membran II.....	31
Sl. 11: 2-DE gel vzorca primarnega supernatanta po centrifugiranju v saharoznem gradientu v protokolu za obogatitev plazemskih membran II.....	31
Sl. 12: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov iz primarnega supernatanta (S1).....	33
Sl. 13: Membrana z vzorci izoliranih proteinov iz S1 .....	33
Sl. 14: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov iz primarne oborine (P1) .....	35
Sl. 15: Membrana z vzorci izoliranih proteinov iz P1 .....	35
Sl. 16: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov frakcije plazemskih membran po protokolu, prirejenem po Turk in Plemenitaš (2003) .....	37
Sl. 17: Membrana z vzorci izoliranih proteinov frakcije plazemskih membran po protokolu, prirejenem po Turk in Plemenitaš (2003).....	37
Sl. 18: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih proteinov iz supernatantov (S4) po prirejenem protokolu Turk in Plemenitaš (2003).....	38
Sl. 19: Membrana z vzorci izoliranih proteinov iz supernatanta (S4) po prirejenem protokolu Turk in Plemenitaš (2003).....	39
Sl. 20: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih nuklearnega (N) in mikrosomalnega (M) homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu.....	40
Sl. 21: Membrana z vzorci izoliranih proteinov nuklearnega (N) in mikrosomalnega (M) homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu.....	41
Sl. 22: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov nuklearnega (N) in mikrosomalnega (M) homogenata po 2-urnem centrifugiranju v gradientu .....	42

Sl. 23: Membrana z vzorci izoliranih proteinov nuklearnega (N) in (M) mikrosomalnega homogenata po 2-urnem centrifugiranju v gradientu .....	42
Sl. 24: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov mikrosomalnega (M) homogenata po 8-urnem centrifugiranju v gradientu .....	44
Sl. 25: Membrana z vzorci izoliranih proteinov mikrosomalnega (M) homogenata po 8-urnem centrifugiranju v gradientu .....	44
Sl. 26: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov nuklearnega (N) homogenata po 8-urnem centrifugiranju v gradientu.....	45
Sl. 27: Membrana z vzorci izoliranih proteinov nuklearnega (N) homogenata po 8-urnem centrifugiranju v gradientu .....	46
Sl. 28: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov mikrosomalnega (M) homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu .....	47
Sl. 29: Membrana z vzorci izoliranih proteinov mikrosomalnega (M) homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu .....	48
Sl. 30: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov nuklearnega (N) homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu.....	49
Sl. 31: Membrana z vzorci izoliranih proteinov nuklearnega (N) homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu .....	50
Sl. 32: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov po Hoffmann <i>et al.</i> (2005).....	51
Sl. 33: Membrana z vzorci izoliranih proteinov po Hoffmann <i>et al.</i> (2005) .....	52
Sl. 34: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov po 33-minutnem centrifugiranju v saharoznem gradientu. ....	53
Sl. 35: Membrana z vzorci izoliranih proteinov po 33-minutnem centrifugiranju v saharoznem gradientu. ....	54
Sl. 36: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov po 60-minutnem centrifugiranju v saharoznem gradientu. ....	55
Sl. 37: Membrana z vzorci izoliranih proteinov po 60-minutnem centrifugiranju v saharoznem gradientu .....	55
Sl. 38: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov DH vzorcev pred in po centrifugiranju v gradientu. ....	57
Sl. 39: Membrana z vzorci izoliranih proteinov DH vzorcev pred in po centrifugiranju v gradientu. ....	57
Sl. 40: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov DH in N <sub>2</sub> vzorcev po centrifugiranju v gradientu. ....	59
Sl. 41: Membrana z vzorci izoliranih proteinov DH in N <sub>2</sub> vzorcev po centrifugiranju v gradientu. ....	59
Sl. 42: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov po 150-minutnem centrifugiranju v gradientu .....	60
Sl. 43: Membrana z vzorci izoliranih proteinov po 150-minutnem centrifugiranju v gradientu. ....	61

Sl. 44: Imonodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu .....	62
Sl. 45: Membrana z vzorci izoliranih proteinov po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu.....	63
Sl. 46: Imonodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 in s karbonatom.....	64
Sl. 47: Membrana z vzorci izoliranih proteinov po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 in s karbonatom.....	65
Sl. 48: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s Tritonom X-114.....	66
Sl. 49: Membrana z vzorci izoliranih proteinov po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s Tritonom X-114.....	67
Sl. 50: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s kloroform/metanolom .....	68
Sl. 51: Membrana z vzorci izoliranih proteinov po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s kloroform/metanolom.....	69
Sl. 52: 2DE gel vzorca N <sub>2</sub> -PM-eNP40 po prirejenem protokolu Zhang <i>et al.</i> (2005). .....	70
Sl. 53: 2-DE gel vzorca N <sub>2</sub> -PM-eK-pNP40 po prirejenem protokolu Zhang <i>et al.</i> (2005). .....	70
Sl. 54: Imonodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 in s karbonatom.....	72
Sl. 55: Membrana z vzorci izoliranih proteinov po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 in s karbonatom.....	72
Sl. 56: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih, izoliranih s komercialnima kompletoma Novagen in Calbiochem. ....	73
Sl. 57: Membrana z vzorci, izoliranimi s komercialnima kompletoma Novagen in Calbiochem. ....	74
Sl. 58: 2-DE gel vzorca N-TMA-PM, pripravljenega z Novagenovim kompletom .....	75
Sl. 59: 2-DE gel vzorca N-TMB-PM, pripravljenega z Novagenovim kompletom .....	75
Sl. 60: 2-DE gel vzorca C-PM, pripravljenega s Calbiochemovim kompletom.....	76
Sl. 61: 2-DE gel vzorca, ki je zbirka vseh 3 vzorcev, izoliranih s komercialnima kompletoma Novagen in Calbiochem. ....	76
Sl. 62: 2-DE gel vzorca N-TMB-PM, pripravljenega z Novagenovim kompletom .....	77
Sl. 63: 2-DE gel vzorca C-PM, pripravljenega s Calbiochemovim kompletom.....	77
Sl. 64: 2-DE gel zbirka obeh vzorcev (N-TMB-PM in C-PM), izoliranih s komercialnima kompletoma Novagen in Calbiochem. ....	78

## KAZALO PRILOG

	str.
Priloga 1: Shema protokola za izolacijo celokupnih proteinov	92
Priloga 2: Shema protokola za obogatitev plazemskih proteinov I	93
Priloga 3: Shema protokola za obogatitev plazemskih proteinov II	94
Priloga 4: Shema protokola za obogatitev plazemskih proteinov III	96
Priloga 5: Shema protokola za obogatitev plazemskih proteinov IV	98
Priloga 6: Shema protokola za obogatitev plazemskih proteinov V	100
Priloga 7: Shema protokola za obogatitev plazemskih proteinov VI	102
Priloga 8: Shema protokola za obogatitev plazemskih proteinov VII	104
Priloga 9: Shema protokola za obogatitev plazemskih proteinov VIII	107
Priloga 10: Računalniška analiza 2-DE gela vzorca celokupnih proteinov	111
Priloga 11: Računalniška analiza 2-DE gela protokola za obogatitev plazemskih proteinov I	111
Priloga 12: Računalniška analiza 2-DE gelov protokola za obogatitev plazemskih proteinov II	112
Priloga 13: Računalniška analiza 2-DE gelov protokola za obogatitev plazemskih proteinov VII	113
Priloga 14: Računalniška analiza 2-DE gelov protokola za obogatitev plazemskih proteinov VIII	114
Priloga 15: Preglednica proteinov, povezanih z razvojem raka	118

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AA-BA gel	akril-bisakrilamid poliakrilamidna mešanica
APS	amonijev persulfat
BSA	goveji serumski albumin
CHAPS	3-[(3-kloroamidpropil)dimetilamonio]-1-propansulfonat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EGF	epidermalni rastni faktor
GDP	gvanozin difosfat
GPI	glikofosfatidilinozitol
GTP	gvanozin trifosfat
IAA	jodoacetamid
IEF	izoelektrično fokusiranje
kDa	kilodalton
kVh	kilovoltna ura
MALDI-TOF MS	identifikacija proteinov z masno spektrometrijo z ionizacijo v matriksu z desorpcijo z laserjem in masnim analizatorjem na čas preleta ionov
MES	2-(N-morfolino) etansulfonska kislina
MS	masna spektrometrija
MW	molekulska masa
NP-40	nonident P 40
panCDH	kadherini
PDVF	polivinilidenflourid
pI	izoelektrična točka
RIPA	določanje radioimunoprecipitacije
ROS	reaktivne kisikove skupine
SDS	natrijev dodecil sulfat
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TNF	dejavnik nekroze tumorjev
v/v	volumsko volumski
w/v	utežno volumski

## 1 UVOD

Rak želodca je eno najpogostejših rakavih obolenj. Čeprav njegova pojavnost upada, ostaja smrtnost visoka (Catalano in sod., 2009). Največja težava je namreč pozno odkritje: zgodnja oblika bolezni nima jasnih znakov in simptomov, zato bolnik pogosto poišče pomoč zdravnika šele, ko je ta že napredovala in je težje ozdravljiva.

Tekom nastanka raka se normalne celice postopoma spreminjajo in ob tem pridobivajo številne lastnosti kot so upiranje celični smrti, ohranitev signalizacije za delitev, izmikanje zaviralcem rasti, ožiljenje, izmikanje imunskemu uničenju (Hanahan in Weinberg, 2011).

Pomembno vlogo pri razvoju raka igrajo tudi proteini plazemske membrane, ki hkrati predstavljajo kar dve tretjini obstoječih in možnih proteinskih tarč za zdravila (Shukla in sod., 2012). Zato je nujno natančno razumevanje razlik med zdravim in bolezenskim stanjem na ravni proteinov plazemskih membran.

### 1.1 NAMEN

Namen našega dela je bil optimizacija izolacije oz. obogatitve proteinov plazemske membrane iz želodčnega tkiva. Preizkusili smo več različnih postopkov in jih primerjali z rezultatom izolacije celokupnih proteinov. Najboljši postopek smo želeli uporabiti za analizo z 2-D elektroforezo. Cilj je bil najti in prilagoditi protokol, ki bi bil primeren za analizo kliničnih vzorcev raka želodca.

Drugi del naloge je bil namenjen računalniškemu iskanju po podatkovnih zbirkah; želeli smo narediti manjši pregledni seznam možnih membranskih bioloških označevalcev raka želodca.

Rezultate obeh delov diplomske naloge bi lahko povezali pri nadaljnjih postopkih iskanja in identifikacije membranskih proteinov kot bioznačevalcev raka.

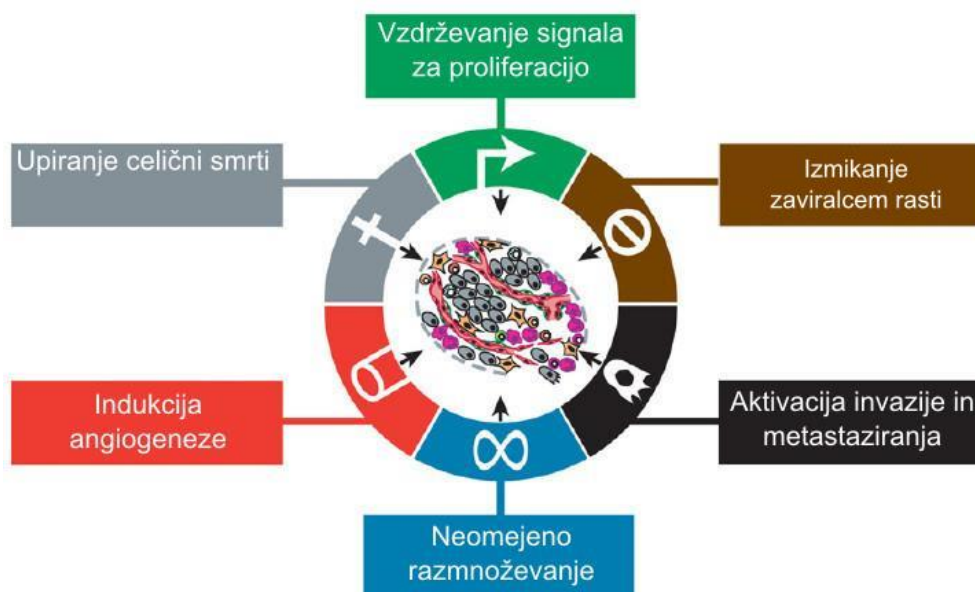
### 1.2 HIPOTEZE

1. S pomočjo centrifugiranja v saharoznem gradientu je možno pridobiti frakcijo s proteini plazemske membrane iz želodčnega tkiva.
2. Dobljene obogatene frakcije s proteini plazemske membrane iz želodčnega tkiva je mogoče analizirati s tehniko 2-D elektroforeze.
3. Z iskanjem po podatkovnih bazah je mogoče predvideti oz. predlagati potencialne biološke označevalce raka želodca.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 RAK

Rak ni le masa homogenih celic, temveč so znotraj tumorja specializirana tkiva (Hanahan in Weinberg, 2011). Sestavlja ga več različnih vrst celic, ki prispevajo k heterotipičnemu medsebojnemu sodelovanju. Tekom nastanka raka normalne celice postopoma napredujejo do rakave oblike in ob tem pridobivajo različne lastnosti: vzdrževanje signala za proliferacijo, izmikanje zaviralcem rasti, upiranje apoptozi, sprožitev angiogeneze, neomejeno razmnoževanje ter aktivacija invazije in metastaziranja (Slika 1). Pridobitev teh lastnosti omogočata genomska nestabilnost in kronično vnetje premalignih in malignih lezij. Genomska nestabilnost v celicah raka povzročajo in njen obstoj poglobljajo naključne mutacije, vključno s kromosomskimi premestitvami, vnetje pa na različne načine olajša napredovanje tumorja (glej stran 3).



Slika 1: Lastnosti celice raka. Povzeto po (Hanahan in Weinberg, 2011).

Glavna značilnost raka je ohranjanje neprestane proliferacije (Hanahan in Weinberg, 2011). Normalne celice natančno uravnavajo proizvodnjo in sproščanje signalov za rast (rastnih faktorjev). Ti nadzorujejo, kdaj naj celice vstopijo in napredujejo v cikel rasti in delitve. Tako ohranjajo celično število in s tem normalno strukturo in funkcijo tkiva. Celice raka vzdržujejo signale za proliferacijo, s čimer pridobijo zmožnost stalnega namnoževanja, hkrati pa obidejo signaliziranje zaviralcev, ki negativno uravnavajo celično proliferacijo. Do slednjega pride, ker imajo rakave celice okvarjene gene, ki zavirajo tumorje. Ti so vpleteni v sprožitev apoptoze: ko protiapoptotični proteini prevladajo nad proteini, ki tumorje zavirajo, celica ne vstopi v programirano celično smrt. Poleg naštetega rak že zgodaj v svojem razvoju preusmeri fiziološki proces angiogeneze. Ta se pri odraslem človeku prehodno aktivira predvsem pri preoblikovanju tkiv in celjenju ran, sicer je v mirovanju. Pri raku pa povzroči nastanek novih žil, s katerimi se tumor oskrbuje s kisikom in hranili, in tako raste.

Za pridobitev osnovnih lastnosti rakavih celic morajo te naslediti spremembe v genih za sprožitev tumorigeneze (Hanahan in Weinberg, 2011). Tako lahko določen mutanten genotip poseduje selektivno prednost med podpopulacijo celic in jih lahko preraste v lokalnem okolju. Do takšnih sprememb genov pride s povečano občutljivostjo na mutagene povzročitelje ali z okvaro enega ali več komponent vzdrževalnega sistema genoma. Ena izmed takih sprememb je izguba telomerne DNA, ki povzroči kariotipično nestabilnost, in je povezana s pomnoževanjem ali izgubo kromosomskih segmentov, s čimer pospeši pridobivanje mutantnih onkogenov in genov, ki zavirajo tumorje. Druga vrsta sprememb so napake v različnih delih vzdrževalnega oz. popravljalnega sistema DNA, imenovanih tudi »geni skrbniki.« Njihovi produkti so vključeni v: odkrivanje poškodb DNA in aktivacijo popravljalnih mehanizmov, neposredno popravljanje poškodovane DNA in prestrežanje ali deaktivacijo mutagenih molekul, preden te poškodujejo DNA. Geni skrbniki se vedejo podobno kot geni, ki zavirajo tumorje, saj je lahko njihovo delovanje izgubljeno tekom napredovanja tumorja. Posebnosti sprememb genoma se razlikujejo glede na vrsto tumorja, vendar nas veliko število napak v genomskem vzdrževalnem sistemu in nestabilnost števila genskih kopij ter nukleotidnih zaporedij prepričajo, da so neločljivo povezane z večino celic raka.

Z razvojem boljših označevalcev za natančno identifikacijo različnih tipov celic so v skoraj vseh neoplastičnih lezijah zaznali celice imunskega sistema. Njihova gostota je variirala od komaj zaznavne s specifičnimi protitelesi do močnega vnetja, kjer so vidne tudi s standardno histokemično tehniko barvanja. Včasih so na taka vnetja gledali kot na poskus imunskega sistema, da izkorenini tumor. Čeprav je slednje za določene vrste raka res, lahko tumor vnetje izkoristi in pospeši svoje razširjanje. Vnetje lahko prispeva k razvoju tumorja z donosom biološko aktivnih molekul kot so rastni faktorji, preživetveni faktorji, dejavniki, ki pospešujejo angiogenezo ter z encimi, ki spreminjajo zunajcelični matriks in s tem pospešujejo angiogenezo, invazijo in metastaziranje v mikrookolje tumorja. V nekaterih primerih je vnetje prisotno že v prvem koraku neoplastičnega napredovanja.

## 2.2 RAK ŽELODCA

Rak želodca je eden najpogostejših rakov in eden glavnih vzrokov smrti, povezanih z rakom (Catalano in sod., 2009). Njegova pojavnost v Evropi in Sloveniji upada: pri nas zboli med 20 in 30 oseb na 100.000 prebivalcev na leto. Težava je visoka smrtnost: pet let preživi približno samo 24 % moških in 27-29 % žensk (Onkološki inštitut Ljubljana, 2013).

Rak želodca se lahko razvije *de novo* iz normalne želodčne sluznice ali pa z večimi zaporednimi spremembami (Catalano in sod., 2009). Intestinalni tip raka želodca vključuje pretvorbo normalne sluznice v sluznico, ki je podobna intestinalnem epiteliju, slednja pa lahko napreduje v displazijo in na koncu v rak želodca. Difuzni tip raka želodca naj bi se razvil kot enocelične spremembe na meji mukoza-vrat želodčnih žlez. V nadaljevanju se lahko te celice razmnožijo in vdrejo iz kript v lamino proprio.



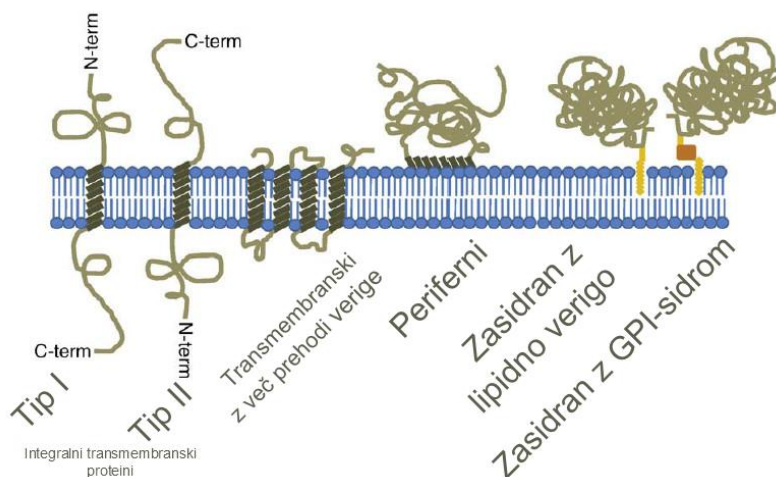
Maligne tumorje želodca lahko razdelimo po morfoloških in histopatoloških značilnostih (Catalano in sod., 2009). Adenokarcinom je glavna oblika raka želodca in predstavlja 95 % vseh neoplazem želodca. Drugi maligni tumorji vključujejo ploščatocelični karcinom, adenoakantom, karcinoidni tumor in leomiosarkom. Makroskopsko je najbolj uporabljen sistem razvrščanja po Bormannu in se deli v štiri tipe: polipoidni, fungirajoči, ulcerirani in infiltrirajoči. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) je razdelila adenokarcinom želodca na difuzni, papilarni, tubularni in mukozni tip. Druga preprosta in velikokrat uporabljena razvrstitev je po Laurénu, ki je razdelil rak želodca na intestinalnega in difuznega. Intestinalni tip je diferenciran in nagnjen k tvorjenju žlez. V nasprotju z njim difuzni tip izkazuje nizko celično kohezijo in je nagnjen k zamenjavi celic sluznice želodca z obročem pečatnoceličnih celic. Poleg omenjenih je Ming predlagal razvrščanje glede na vzorec rasti raka in sicer na prognostično bolj ugoden ekspanzivni tip in manj ugoden infiltrirajoči tip.

Na razvoj raka želodca vpliva več dejavnikov - tako okoljskih kot genetskih. Dva pomembna okoljska dejavnika sta uživanje neprimerne hrane in kajenje tobaka. Pomembna je tudi okužba z bakterijo *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), za katero so ugotovili, da je potrebna, a ne zadostna za razvoj raka želodca (Catalano in sod., 2009). Chiba in sodelavci (2012) opisujejo, kako so prebavni organi zaradi svoje velike površine in izpostavljenosti zunanjemu okolju infiltrirani s celicami imunskega sistema v normalnih in patoloških razmerah. Te ohranjajo kronično vnetje in skupaj z okužbo s *H. pylori* občutno povečajo tveganje za razvoj raka želodca. Natančne preiskave so pokazale, da je s *H. pylori* okuženih več kot 95 % bolnikov z rakom želodca. Intrinzični posredniki vnetja (provnetni citokini, eikozanoidi, rastni faktorji, reaktivne kisikove ter dušikove spojine) vplivajo na celično rast in mobilnost, inducirajo ožiljenje in inhibirajo apoptozo. Interlevkin (IL) 1 $\beta$  in dejavnik nekroze tumorjev (TNF)  $\alpha$  delujeta na epitelne celice in aktivirata jedrni transkripcijski dejavnik  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), ki je ključni transkripcijski dejavnik pri povzročitvi vnetja in v razvoju raka. Aktivacija NF- $\kappa$ B spodbuja rast in zavira apoptozo epitelnih celic. Hkrati poveča delovanje ciklooksigenaze-2 (COX-2) ter nastanek reaktivnih kisikovih skupin (ROS). Prva poveča celično rast in ožiljenje, kopičenje ROS pa povzroči stanje oksidativnega stresa. Slednji je vključen v sprožitev in nadaljevanje razvoja raka preko sproženja genetske nestabilnosti. Purinske in pirimidinske baze, ki so izpostavljene ROS, se oksidativno spremenijo, kar povzroči enojne ali dvojne lome DNA vijačnice, spremeni delovanje mehanizma popravljanja neujemanja in kopiči mutacije v mikrosatelitskih zaporedjih. Na drugi strani virulenten sev *H. pylori* spodbuja nepravilno izražanje encima aktivacijsko inducirane citidin-deaminaze (AID), ki deaminira citidin (C) na DNA in iz njega naredi uracil (U). Tako ima DNA namesto para C:G par U:G, ki se po začetku podvojevanja DNA zamenja za par T:A. S poskusi so pokazali, da konstitutivno izražanje AID izzove genetske spremembe v genih, povezanih z rakom, predvsem v genu *tp53*.

### 2.3 MEMBRANSKI PROTEINI IN NJIHOVA VLOGA PRI RAKU

Biološka membrana je nujno potrebna za obstoj življenja (Helbig in sod., 2010). Celice vseh organizmov so zaprti in predeljeni sistemi z vsaj enim lipidnim dvoslojem, katerega naloga je biti vmesni člen med notranjim in zunanjim okoljem. Uporabnost biološkim

membranam dajejo tudi membranski proteini, ki so sestavni del lipidnega dvosloja ali so pritrjeni nanj. Membranske proteine (Slika 2) delimo na več vrst: integralni membranski proteini, ki prečkajo lipidni dvosloj le enkrat (tip I in II); transmembranski proteini z več prehodi verige; periferni membranski proteini, ki se stikajo z membrano preko delovanja hidrofobnih in/ali ionskih interakcij; in proteini, ki so pritrjeni na membrano z lipidno verigo ali GPI-sidrom. Znanstveniki so ocenili, da približno 30 % vsega celičnega proteoma sestavljajo membranski proteini.



Slika 2: Razredi membranskih proteinov. Povzeto po (Helbig in sod., 2010) .

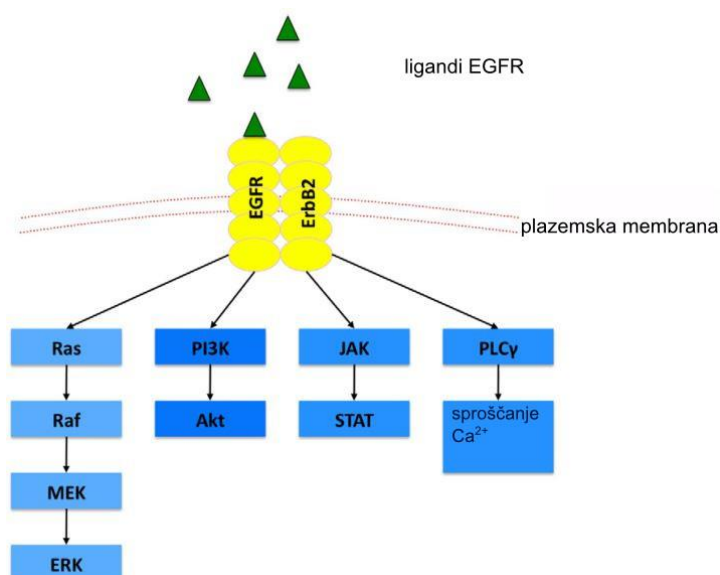
Funkcionalnost membranskih proteinov je odvisna od medsebojnega vpliva med samimi proteini ter proteini in lipidi (Helbig et al., 2010). Pomembni so pri signaliziranju, celični identiteti in varovanju celice pred škodljivimi signali. Ena izmed najpomembnejših nalog integralnih membranskih proteinov je selektivni prenos molekul, kot so metaboliti ali proteini, skozi membrano. Tako se ustvari nadzorovana izmenjava snovi iz celice in vanjo. Zaradi svojega delovanja so membranski proteini pomembni kot tarče za zdravila.

Membranski proteini se lahko aktivirajo z dejavniki, ki se izločajo iz istih celic, na katere omenjeni dejavniki delujejo (avtokrino signaliziranje) (Kampen, 2011). Drugi način aktivacije membranskih proteinov je z delovanjem dejavnikov, ki jih izločajo sosednje celice (parakrino signaliziranje). Tretji način pa poteka preko aktivacije z dejavniki iz oddaljenih celic (endokrino signaliziranje). V večini primerov aktivirani membranski proteini sprožijo signalizacijo v notranjosti celice z avtofosforilacijo in nadaljnjo fosforilacijo notranjih kinaz, pri čemer se pri aktivaciji podobnih kinaz signalne poti prekrivajo. Za razvoj več vrst raka sta zelo pomembni kinazi Erk in Akt, ki postaneta pretirano aktivni zaradi z aktivnejšimi dejavniki sproženih fosforilacij membranskih proteinov. Njuna signalizacija se lahko začne po treh poteh s tremi različnimi membranskimi receptorji: z receptorjem vaskularnega endotelijskega faktorja (VEGFR), z receptorjem epidermalnega rastnega faktorja (EGFR, ErbB-1) in z receptorjem humanega epidermalnega rastnega faktorja 2 (ErbB-2 ali HER-2).

EGFR in HER-2 skupaj z ErbB3 in ErbB4 sodita v družino tirozin-kinaznih receptorjev, poznanih kot receptorji ErbB (Lemmon, 2009). Vsak ima veliko zunajcelično regijo za

vezavo ligandov,  $\alpha$ -vijačnico, ki enkrat preči membrano, in znotrajcelično regijo ob membrani, kateri sledita tirozin-kinazna domena in karboksil-terminalno regulatorno zaporedje. Izmed njih je eden najbolje preučenih receptor EGFR. Bil je prvi tirozin-kinazni receptor, za katerega so predlagali, da ligand sproži dimerizacijo in s tem transmembransko signaliziranje. Sedaj vemo, da vezava liganda EGF-a premakne monomerno-dimerno ravnotežje v dimerno stanje. Aktivacija kinaze avtofosforilizira receptor EGFR in tako rekrutira signalne proteine, ki imajo Src homologijo 2 (SH2) ali domeno za vezavo fosfotirozina, ter tako modulira kompleksne signalne mreže. Receptorji ErbB pa se ne povezujejo samo v homodimere, temveč tudi v različne heterodimere, s čimer se poveča kompleksnost transmembranskega signaliziranja. Okvarjen receptor EGFR veže EGF s 30-kratno večjo afiniteto, opazili pa so tudi, da se ob mutaciji receptorja zniža disociacija liganda z njega.

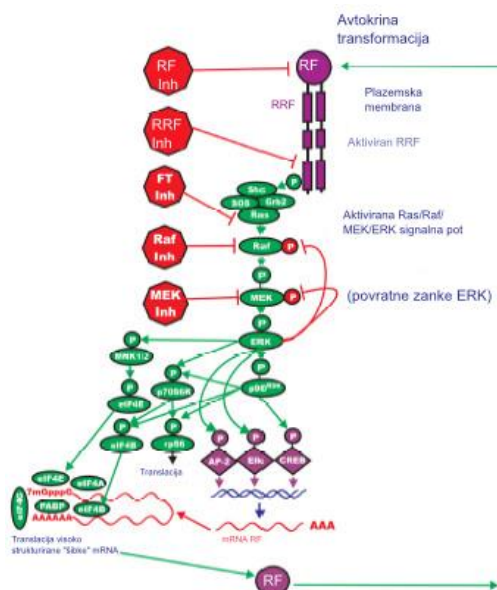
Aktivacija EGFR sproži prenos signala po kaskadnih poteh, ki lahko vplivajo na proliferacijo, diferenciacijo, apoptozo, migracijo in pritrnitev celic raka želodca (W. K. K. Wu in sod., 2010). Signalne poti, ki jih aktivira EGFR, vključujejo Ras/MAPK, JAK-STAT, PLC $\gamma$  in PI3L/Akt (Slika 3). Podobno kot EGFR deluje tudi HER-2.



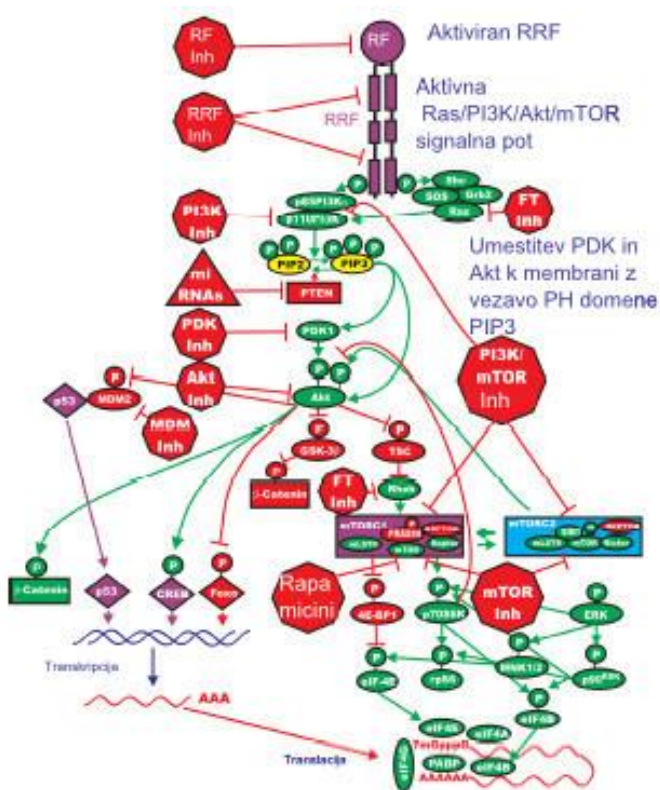
Slika 3: Aktivacija EGFR signaliziranja. Povzeto po (W. K. K. Wu in sod., 2010). Ras = protein Ras, Raf = kinaza Raf, MEK = kinaza z mitogenom aktivirane-ERK-kinaze, ERK = kinaza regulirana z zunajceličnim signalom, PI3K = fosfatidilinozitol 3-kinaza, Akt = kinza proteina-B, JAK-STAT = kinaza Janus-signalni-prenosnik in aktivator prepisovanja, PLC $\gamma$  = fosfolipaza-C $\gamma$ .

Erk in Akt sta del signalnih poti Ras/Raf/MEK/ERK (Slika 4) in Ras/PI3K/PTEN/Akt/mTOR (Slika 5), ki imata glavni vlogi pri prenosu proliferativnega signala od membranskih receptorjev (Steelman in sod., 2011). Obe poti sestojita iz kinaznih kaskad, ki so uravnane z fosforilacijo in defosforilacijo specifičnih kinaz, fosfataz, GTP/GDP izmenjevalnih proteinov, prilagojevalnih proteinov in ogrodnih proteinov. Nadzor kaskad je odvisen od lokacije, saj morajo biti njihovi sestavni členi umeščeni zraven membrane, da so aktivni. Zato mutacije v membranskih receptorjih močno vplivajo na ti dve signalni poti. Tako je za 15 % vseh primerov raka želodca

odgovorna stalna aktivacija obeh poti zaradi prekomernega izražanja in/ali pomnoževanja HER-2.



Slika 4: Pregled Ras/Raf/MEK/ERK signalne poti. RF = rastni faktor, RRF = receptor rastnega faktorja. Povzeto po Steelman in sod. (2011).



Slika 5: Pregled Ras/PI3K/PDK/Akt/mTOR signalne poti. RF = rastni faktor, RRF = receptor rastnega faktorja. Povzeto po Steelman in sod. (2011).

Pri razvoju raku želodca imata stalno aktivirana transmembranski tirozin-kinazni receptor HER-2 in tirozin-kinazni receptor za mezenhimnalno epitelno tranzicijo (MET) pomembno vlogo (Pietrantonio in sod., 2013). Signalna pot, ki jo aktivira HER-2, je odgovorna za popravilo DNA. Poleg tega je nepravilno izražanje HER-2 povezano s kliničnimi značilnostmi kot so globina invazije tumorja, vključenje limfnih vozlov in stopnja razvoja tumorja. Avtofosforilacija MET pa na drugi strani aktivira več vrst prenosov signalov, ki povzročijo proliferacijo celic raka, angiogenezo, invazijo in metastaziranje.

Poleg transmembranskih proteinov, ki aktivirajo tirozin-kinazno pot, so Saqui-Salces in sod. (2010) ugotovili, da lahko tudi proteini signalne poti Hedgehog (Hh) vplivajo na razvoj raka želodca. Trije glavni proteini v tej poti so Sonic (Shh), Desert (Dhh) in Indian (Ihh), ki imajo veliko vlogo pri normalnem razvoju zarodka. Vsi trije proteini se lahko vežejo na transmembranski protein Patched (Ptch1), ki do vezave teh ligandov inhibira transmembranski protein Smoothed (Smo). Natančen mehanizem inhibicije ni poznan. Po vezavi ligandov na Ptch1 se sprostijo Smo. Na citoplazemskem repu slednjega je mesto, kjer se kopičijo proteini glioblastomskega prepisovalnega dejavnika (Gli) v kompleksu z regulatornimi proteini. Po sprostitvi Smo se z njega sprostijo proteini Gli, ki sedaj lahko dozori in se premestijo v jedro kjer sprožijo prepis genov, povezanih s signalno potjo Hh. Pri raku želodca pod vplivom *H. pylori* Shh ni več aktiven. To povzroči, da parietalne celice ne postanejo funkcionalne, mukozne pa se razširijo. Mutacija v kateremkoli posredniku Hh signaliziranja povzroči stalno sproščanje rastnih dejavnikov.

Zdravljenje raka želodca poteka s kirurško resekcijo. Ko rak metastazira, je zdravljenje le še simptomatsko ali paliativno (Catalano in sod., 2009). Da bi izboljšali izid bolezni, je potrebno zgodnje odkritje in spremljanje (Lee in sod., 2012). Ker je rak genska bolezen, je razumevanje njegovih bioloških mehanizmov lahko v veliko pomoč pri identifikaciji novih diagnostičnih in terapevtskih označevalcev. Wu in sodelavci (2010) opisujejo, kako je povečano izražanje EGFR povezano s slabšo prognozo bolezni bolnikov z rakom želodca. Hkrati so odkrili, da se HER-2 preveč izraža v 23 % raka želodca in je preveč aktiven v 27 %. Zato so predlagali EGFR in HER-2 za molekularni tarči zdravljenja raka želodca. Ena možnost je uporaba trastuzumaba (ToGA), humanega monoklonskega protitelesa, ki deluje na HER-2 (Lee in sod., 2012). Zdravljenje s ToGA v kombinaciji s kemoterapijo je podaljšalo življenjsko dobo pri bolnikih z napredovanim, metastaziranim in HER-2 pozitivnim rakom. Še eno monoklonsko protitelo, ki je bilo uspešno pri zdravljenju rakavih bolnikov, je bevacizumab. Uperjen je proti VEGF in je v kombinaciji s kemoterapijo v klinični študiji raka želodca pri Američanih pripomogel k občutno podaljšanem preživetju; po drugi strani pa ni imel vpliva na podaljšanje življenjske dobe pri Azijcih.

## 2.4 PROTEOMIKA

Proteomske tehnologije imajo pomembno vlogo pri opisovanju velike raznolikosti proteinov, prisotnih v celici (Rotilio in sod., 2012). Analiza dinamičnega proteoma je, zaradi širokega dinamičnega razpona, relativne številčnosti proteinov in sprememb po prevajanju, veliko bolj zapletena kot sekvenciranje genoma. Zato je potrebno za preiskavo proteoma uporabiti različne metode, saj z eno samo tehniko ne moremo identificirati in

kvantificirati celotnega kompleksnega proteoma. Eno izmed orodij je dvodimenzionalna gelska elektroforeza (2-DE) v kombinaciji z masno spektrometrijo (MS) in bioinformacijskimi orodji.

2-DE je bila razvita v 70. letih prejšnjega stoletja (Rotilio in sod., 2012). Je prva in verjetno še vedno najbolj uporabljena tehnika ločevanje kompleksnih mešanic proteinov pred nadaljnjo karakterizacijo z MS. Kompleksne mešanice so ločene vzdolž pH gradienta z uporabo izoelektričnega fokusiranja (IEF), ki je prva dimenzija. Tu se proteini ločijo po svoji izoelektrični točki (pI) vzdolž gradienta pH. Druga dimenzija, poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE), loči proteine po molekularni masi z uporabo električnega polja na poliakrilamidnem gelu. Po elektroforetski ločitvi proteinov sledi barvanje in statistična analiza z računalniškim programom. Ta primerja obarvane lise/proteine kvalitativno in kvantitativno.

Največkrat za vizualiziranje proteinov po 2-DE uporabljamo barvanje s srebrovim nitratom ali Coomassie modrim (Rotilio in sod., 2012). Obe metodi sta lahko kompatibilni z MS, pri čemer je omejitev detekcije pri srebrovem nitratu v femtomolarnem, pri Coomassie modrem pa v pikomolarnem redu. Postopek barvanja s srebrom je tako približno stokrat bolj občutljiv, vendar je bolj dolgotrajen in slabše ponovljiv zaradi subjektivno določene končne točke barvanja; težava pa je tudi ožji linearni razpon za kvantifikacijo.

Alternativno možnost zaznavanja lis/proteinov na gelih predstavlja dvodimenzionalna diferenčna gelska elektroforeza (DIGE), ki omogoča ločitev do treh vzorcev na enem gelu. Prva dva ponavadi predstavljata različne preiskovalne razmere (npr. kontrolni in bolezenski vzorec), tretji pa je interni standard, sestavljen iz enake količine vseh uporabljenih vzorcev. Vsi so kovalentno označeni z različnimi fluorescentnimi barvili (Cy2, 3 in 5), od katerih ima vsako svojo vzbujevalno in emisijsko valovno dolžino. Ko so vzorci označeni, jih zmešamo in damo na isti gel. Označevanje z DIGE je zelo občutljivo in je sposobno zaznati proteine v količini do 150 pg, poleg tega pa imajo omenjena barvila linearni razpon signala petih magnitud. Čeprav ta metoda razpolovi število potrebnih gelov, pa oprema in kemikalije, potrebne za eksperimentalno delo, omejujejo širšo uporabo aplikacije.

Po ločitvi z 2-DE in barvanju gele analiziramo in zanimive lise izrežemo za analizo z MS (Rotilio in sod., 2012). Proteine v gelu najprej razbarvamo in nato razgradimo na kratke peptide. Za to uporabljamo različne encime, najpogosteje tripsin, ki specifično reže na C-koncu lizina ali arginina. S tem pridobimo najprimernejšo masno območje za MS. Po potrebi lahko nekatere proteine pred samo analizo še razsolimo in koncentriramo. Dalje imamo več možnosti (Rotilio in sod., 2012). Najpogosteje proteine analiziramo z ionizacijo v matriksu z desorpcijo z laserjem in masnim analizatorjem na čas preleta ionov (MALDI-TOF MS). Metoda je hitra, robustna, prijazna do uporabnika in natančna pri določanju mase. Uporablja se za identifikacijo proteinov iz preprostih mešanic, npr. takih, ki pridejo iz lis 2-DE ali DIGE gela, potrebnih pa je le nekaj peptidov za določitev mase. Kot večina masnih spektrometrov naprava pri MALDI-TOF sestoji iz ionskega vira, masnega analizatorja in detektorja. Vir ionov pretvori molekule vzorca iz trdne ali tekoče faze v ionske analite. Pri MALDI tehniki so vzorci kokristalizirani z organskim matriksom na kovinski plošči. Laser vzbudi matriks, kar povzroči hitro segrevanje molekul in posledično

desorpcijo ionov v plinasto stanje. Po ionizaciji vzorec doseže TOF masni analizator. Tu se ioni ločijo glede na svoje razmerje mase proti naboju ( $m/z$ ). Na gibanje ionov lahko vplivamo s spreminjanjem električnega ali magnetnega polja, ki usmerjata ione na detektor. Ta registrira število ionov za vsako razmerje mase proti naboju.

Glavne omejitve MALDI-TOF za določanje masnega zapisa peptida so:

- nezanesljivost za organizme, katerih genomi nimajo določenega zaporedja in niso anotirani;
- nezmožnost določanja proteinov, ki so bili post-translacijsko spremenjeni;
- slabše delovanje, če je več proteinov v isti lisi 2-DE gela;
- možnost nepravilnosti pri proteinih, ki so si močno podobni.

Druga najpogostejša izbira MS za identifikacijo lis z 2-DE gelov je MS z elektrorazpršilno ionizacijo (ESI) (Rotilio in sod., 2012). Med procesom ionizacije se tekoči vzorec pretaka skozi iglo na koncu kapilarne kromatografske kolone in oblikuje majhne kapljice z visokim električnim potencialom. Zaradi njega se z desorpcijo iz površine kapljice ionskega analita ločijo desolvirani ioni. Peptidi se nato prenesejo v masni spektrometer v nadaljnjo analizo skozi vrsto odprtih za vzorčenje, ki so ločene z zaporednimi stopnjami vakuma. Peptide je mogoče detektirati preko širokega intervala razmerja  $m/z$  in nato izolirati znotraj masnega spektrometra s kvadrupolnim masnim filtrom zaradi disociacije, ki jo povzročijo trki (CID). Tako naprava razvrsti peptide po velikosti in jih nato detektira v sekundarnem masnem spektru. Zadnji korak je identifikacija proteinov z MS/MS fragmentacijskim spektrom s pomočjo podatkovnih baz proteinov.

Kot vsaka metoda ima tudi 2-DE svoje omejitve (Rotilio in sod., 2012). Na konvencionalnih gelih težko zaznamo proteine z molekularno maso nižjo od 10 kDa ali večjo od 150 kDa in proteine z zelo bazično pI. Poleg tega hidrofobni proteini, in s tem tudi membranski proteini, s težavo vstopijo v gel. Do tega pojava pride zaradi njihove slabe topnosti. Prav tako slabo zaznamo proteine v nizkih koncentracijah, kadar jih ovirajo proteini s podobno maso in nabojem.

## 2.5 ISKANJE BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV PRI RAKU ŽELODCA

Bolniki v zgodnjem stadiju raka želodca nimajo značilnih simptomov, ki bi omogočili zanesljivo odkrivanje bolezni (Catalano in sod., 2009). Pojavijo se zgaga, napenjanje, prekomerno izpahovanje in prehitra sitost po obroku. Ko se tumor razširi, se pojavijo hujšanje, anoreksija, anemija, padec splošnega zdravstvenega stanja in nazadnje še bruhanje krvi. V večini primerov bolezni odkrijemo v poznih stadijih, ko je že zelo napredovala, to pa pomeni tudi slabšo prognozo: le petina bolnikov preživi 5 let. Težavo predstavlja tudi ponovitev bolezni po končanem zdravljenju: rak želodca se ponovi pri 40 % do 60 % bolnikov, od tega pri več kot 75% že v prvih dveh letih in pri 98% v roku petih let.



Petletno preživetje se zviša na 90 %, če je rak želodca odkrit v zgodnji fazi (Lin in sod., 2012). Prav zgodnje odkrivanje je pomembna strategija nadzorovanja mnogih vrst raka, tudi raka želodca. Večina bolnikov z rakom želodca je v prvih stopnjah njegovega razvoja brez simptomov. Čeprav obstaja več diagnostičnih orodij za odkrivanje te bolezni, so možnosti zdravljenja omejene. Dosedanji označevalci niso bili dovolj občutljivi in specifični, da bi rak natančno odkrili. Z napredkom tehnike na področju proteomike so se znanstveniki osredotočili na odkrivanje bolj specifičnih in občutljivih označevalcev. Lin s sodelavci je naredil pregled proteomskih študij drugih znanstvenikov. Od membranskih proteinov je kot možni biooznačevalec v serumu kot lahko dostopni klinični vzorec omenjena komponenta komplemента C9. Te je pri bolnikih z rakom želodca več kot pri zdravih ljudeh (Chong in sod., 2010). Podatki tudi kažejo, da označevalci, ki so znani v drugih vrstah raka, lahko služijo kot novi označevalci raka želodca (L.-L. Lin in sod., 2012). Pri proteomskih preiskavah tkiva raka želodca in okoliškega zdravega tkiva so poleg HER-2 so odkrili še 6 membranskih označevalcev. Odkrili so, da je pri bolnikih z rakom želodca selen vezavnega proteina (SELENBP1) veliko manj kot pri zdravih ljudeh (Xia in sod., 2011). V nasprotju z njim pa je alfa-enolaze (ENO1) pri bolnikih z rakom želodca veliko več (Bai in sod., 2011). Prav tako je Chen s sodelavci (2007) ugotovil, da je kloridnega znotrajceličnega kanalnega proteina 1 (CLIC1) pri raku želodca lahko več kot normalno. Proteina S100-A6 (S100A6), ki je vezavni protein za kalcij, je preveč, in ima pomembno vlogo pri napredovanju raka želodca (Balluff in sod., 2011). Kim s sodelavci (2010) je ugotovil, da proteina S100-A8 (S100A8) in S100-A9 (S100A9) pri raku želodca pomenita njegovo maligno napredovanje.

Cheng in sodelavci (2012) so uporabili za odkrivanje zanesljivih bioloških označevalcev za raka želodca proteomsko tehnologijo 2D DIGE. Po preverjanju s prenosom Western in imunohistokemijo so odkrili statistično povečano prisotnost z glukozo nadzorovanega proteina 78 (GRP78) pri bolnikih z rakom želodca. GRP78 je v normalnih tkivih šaperon, ki olajša zvijanje večverižnih proteinov v endoplazemskem retikulumu. Pri razvoju tumorja se lahko premesti v plazemsko membrano, kjer deluje kot receptor za  $\alpha$ 2-makroglobulin (Zhang in Zhang, 2010). S tem sproži aktivacijo PAK signalne poti in napredovanje ter invazijo tumorja. Guo s sodelavci (2012) so naredili kvantitativno analizo površinskih proteinov pri raku želodca. Pri pregledu rakavih tkiv so ugotovili preveliko prisotnost proteinov EPHA2, FGFR2, ITGB4 in MET. Avtorji sklepajo, da ti proteini delujejo sinergijsko in okrepijo onkogeno signaliziranje. ITGB4 je receptor za laminin in skupaj delujeta z MET kot umestitvena ploščad za aktiviranje od PI3K/Akt, Src in Ras odvisnih signalnih poti. Aktiven FGFR2 rekrutira adapterske proteine, ki aktivirajo Ras/MAPK signalno pot. Nevezan EPHA2 je substrat za Akt in okrepi aktivacijo iste signalne poti kot MET. Povečana pozornost je bila namenjena tudi tesnim stikom med karcinogenezo (Chen in sod., 2012). Ugotovili so, da je proteina VSIG1 pri raku želodca manj. Izguba izražanja VSIG1 je povezana z bolj malignim fenotipom in slabšo prognozo. Avtorji sklepajo, da je izguba znotrajcelične adhezije predpogoj za rast tumorja in metastaziranje pri raku želodca.



### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 SESTAVA PUFROV IN RAZTOPIN

##### Pufer za lizo

- 7 M urea
- 2 M tiourea
- 4 % (w/v) CHAPS

##### Pufer za lizo z NP-40

- 7 M urea
- 2 M tiourea
- 4 % (w/v) CHAPS
- 1 % (v/v) NP-40

##### Pufer RIPA

- 50 mM Tris
- 150 mM NaCl
- 0,5 % (w/v) Na-holat
- 0,1 % (v/v) SDS
- 1 % (v/v) NP-40

##### Pufer TE

- 10 mM Tris/Cl
- 0,2 mM EDTA

##### Pufer TEDG

- 80 % (v/v) pufra TE
- 20 % (v/v) glicerol

##### Pufer MES

- 5 mM MES
- 0,2 mM EDTA

##### Pufer A

- 2 mM EDTA
- 25 mM imidazol

##### Pufer B

- 50 mM Tris-Cl, pH 8,5
- 20 % glicerol

##### 0,25 M saharozna raztopina (pH 8)

- 0,25 M saharoza
- 5 mM Tris

#### Homogenatni pufer STM

- 0,25 M saharoza
- 0,01 M Tris/Cl
- 1 mM EDTA

#### 0,25 pufer STM

- 0,25 M saharoza
- 10 mM Tris-Cl
- 1 mM MgCl<sub>2</sub>

#### Pufer C

- 50 mM HEPES
- 1 mM CaCl<sub>2</sub>

#### Pufer D

- 50 mM HEPES

#### Triton X-114 (pH 7,6)

- 2 % (v/v) Triton X-114
- 150 mM NaCl
- 10 mM Tris-HCl

#### TTBS (pH 7,6)

- 50 mM Tris/HCl
- 150 mM NaCl
- 0,1 % (v/v) Tween20

#### Elektroforezni pufer (1-kratni)

- 25 mM Tris
- 192 mM glicin
- 0,1 % (w/v) SDS

#### Elektroforezni pufer (2-kratni)

- 50 mM Tris
- 384 mM glicin
- 0,2 % (w/v) SDS

#### 12% ločevalni gel (Western blot in 2D-elektroforeza)

- 12 % (AA-BA)
- 375 mM Tris-Cl (pH 8,8)
- 0,1 % SDS (v/v)
- 0,1 % APS (v/v)
- 0,04 % TEMED (v/v)

#### 5% zbiralni gel (Western blot)

- 5 % akril-bisakrilamid poliakrilamidne mešanice (AA-BA)
- 125 mM Tris-Cl (pH 6,8)
- 0,1 % SDS (v/v)
- 0,1 % APS (v/v)
- 0,1 % TEMED (v/v)

#### Rehidracijska raztopina

- 7 M urea
- 2 M tiourea
- 2 % (w/v) CHAPS
- dodatek bromofenolmodrega

#### Ekvilibracijska raztopina z DTT

- 6 M urea
- 30 % (v/v) glicerol
- 50 mM Tris-HCl
- 2 % (w/v) SDS
- 1 % (w/v) DTT

#### Ekvalibracijska raztopina z IAA

- 6 M urea
- 30 % (v/v) glicerol
- 50 mM Tris-Hcl
- 2 % (v/v) SDS
- 2,5 % (w/v) IAA

#### Raztopina za shranjevanje gelov

- 375 mM Tris-HCl
- 0,1 % (w/v) SDS

#### Fiksir

- 50 % (v/v) metanol
- 12 % (v/v) očetna kislina
- 0,05 % (v/v) formalin

#### 35% Etanol

- 35 % (v/v) etanol

#### Ojačevalec

- 0,02% (v/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

#### Raztopina s srebrovim nitratom

- 0,2 % (w/v)  $\text{AgNO}_3$
- 0,0004 % (v/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- 0,05 % (v/v) formalina

#### Stop-raztopina

- 50 % (v/v) etanol
- 12 % (v/v) očetna kislina

#### 1% Očetna kislina

- 1% (v/v) očetna kislina

### 3.2 VZORCI

Uporabili smo dva tipa vzorcev glede na potrebe. Za optimizacijo, in če je bila potrebna večja količina tkiva, smo uporabili svinjsko želodčno tkivo. Če je zadostovala manjša količina tkiva, pa smo uporabili človeško želodčno tkivo. Oboje smo do uporabe shranjevali pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Vzorec svinjskega želodčnega tkiva je bilo pridobljeno pri zakolu živali v Farme Ihan-MPR d.o.o., Šentjur. Odvzeto je bilo sprano in spravljeno na ledu do prihoda v laboratorij. Tu je bilo do uporabe shranjeno na  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Vzorec človeškega želodčnega tkiva je bilo odvzeto zdravi osebi mlajši od 35 let. Tkivo smo dobili z Inštituta za sodno medicino Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani. Tam so želodec najprej sprali z vodo, ga vpeli v in nato s postrganjem s parenhimskim nožem odvzeli epiteljsko plast celotne luminalne površine. Vzorec so dali v plastično posodo, ga označili in shranili pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3 POTEK DELA

Iz želodčnega tkiva smo na več načinov poskušali izolirati oz. obogatiti membranske proteine. Pri vsakem protokolu smo na ledu s skalpelom narezali vzorec svinjskega ali človeškega tkiva. Ker smo imeli pri slednjem, zaradi majhnih vzorcev, premajhen izkoristek, smo ga zamenjali za svinjskega in povečali maso vzorcev. Vzorce smo homogenizirali, kar smo naredili tako, da smo jih strli v tekočem dušiku ali z Douncejevim homogenizerjem homogenizirali na ledu in že v ustreznem pufru. Vzorec strte v tekočem dušiku smo nato raztopili v ustreznem pufru z dodanimi proteaznimi inhibitorji. Vzorcju smo odstranili večje delce s filtracijo ali centrifugiranjem pri nizkih obratih. Sledila je priprava na centrifugiranje v gradientu ali dodatno raztapljanje membran v ustreznih pufrih in nato centrifugiranje. Temu je sledilo čiščenje proteinov plazemskih membran in njihovo raztapljanje v ustreznih pufrih. Na vsakem koraku smo jemali alikvote, da smo jih primerjali s končnim rezultatom. Če izoliranih vzorcev nismo porabili isti dan, smo jih za uporabo naslednji dan shranili pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , za daljše shranjevanje pa pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po vsakem končanem protokolu smo izmerili koncentracijo proteinov, ki nam jih je uspelo izolirati. To smo naredili z metodo po Bradfordu in z govejim serumskim albuminom (BSA) kot standardom. V mikrotitrski plošči smo zmešali vzorec, vodo in reagent s Coomassie modrim. Slednji se veže na proteine, kar povzroči spremembo barvo iz rjave v modro. Intenziteta modre barve, ki nastane, je premosorazmerna količini proteinov v vzorcju, izmerili pa smo jo z merjenjem absorbance, praviloma pri valovni dolžini  $595\text{ nm}$ , ali redkeje na  $600\text{ nm}$ . Uspešnost izolacije oziroma obogatitve proteinov plazemskih membran

smo preverili s prenosom western in detekcijo kadherinov kot markerskih proteinov za proteine plazemske membrane. Izbrane vzorce smo analizirali še z 2D-elektroforezo.

### 3.4 GELSKA ELEKTROFOREZA IN PRENOS WESTERN

Prenos western je tehnika, s katero zaznamo, identificiramo in kvantificiramo specifične proteine v danem vzorcu. Postopek imenujemo tudi proteinski imunski prenos. V prvem koraku z gelsko elektroforezo ločimo nativne ali denaturirane proteine, nato jih prenesemo na membrano in zaznamo s specifičnimi protitelesi za tarčni protein. To naredimo tako, da po prenosu proteinov na membrano slednjo blokiramo s posnetim mlekom in označimo s primarnimi in sekundarnimi protitelesi. Blokiranje pomaga zakriti nespecifična vezavna mesta na membrani in tako izloči lažno pozitivne rezultate. Primarna protitelesa se vežejo na iskane proteine, sekundarna pa na primarna. Sekundarna protitelesa so povezana z encimom (npr. hrenovo peroksidazo), ki cepi kemiluminiscentni signal, ki ga zaznamo s CCD-kamero. Na koncu s priloženo programsko opremo analiziramo relativno raven proteinov (Jensen, 2012).

Za prvo stopnjo, SDS poliakrilamidno gelsko elektroforezo (SDS-PAGE), smo uporabljali 12% ločevalni in 5% zbiralni poliakrilamidni gel. Za pripravo dveh gelov smo potrebovali 12 mL raztopine ločevalnega gela in 4 mL raztopine zbiralnega gela. Najprej smo pripravili ločevalni gel, ga vlili v nosilec in prelili s propanolom, ki pospeši strjevanje. Ko se je ločevalni gel strdil, smo odlili propanol in v nosilec vlili zbiralni gel. Takoj smo vstavili še glavniček, ki ločuje mesta za nanos vzorcev. Ko se je gel strdil, smo prenesli nosilec v kadičko za elektroforezo, odstranili glavniček in sprali nastale luknjice z elektroforeznim pufrom. Kadičko smo napolnili s primernim volumnom pufera za elektroforezo. Vzorce smo pred nanosom v žepke zmešali s 5x nanašalnim pufrom in 20x DTT-jem. Vzorce smo nanесли v luknjice, ko je bil pufer za elektroforezo že v kadički. Elektroforeza je najprej potekala pri 100 V do prehoda vzorcev iz zbiralnega v ločevalni gel (približno 15 min), nato smo napetost povečali na 200 V, dokler niso vzorci prišli do konca gela (približno 45 min).

Po končani prvi stopnji smo gele vzeli iz plošč in jih dali v hladen pufer za prenos. Odrezali smo kos polivinilidenfluoridne (PDVF) membrane in jo aktivirali: za 15 s smo jo namočili v metanol, 2 min spirali z ddH<sub>2</sub>O in do uporabe shranili v pufru za prenos. Po uspešni aktivaciji smo sestavili kadičko za prenos po navodilih proizvajalca in jo obložili z ledom. Prenos je potekal 1 h pri 100 V. Po končanem prenosu smo membrano 5 min barvali z barvilom Ponceau S in 5 min razbarvali z ddH<sub>2</sub>O. Membrano smo slikali z optičnim čitalcem, nato dokončno odstranili barvilo s spiranjem s TTBS. Sledilo je enourno blokiranje s 5% posnetim mlekom v prahu pri sobni temperaturi. Po blokiranju smo mleko odlili in membrano preko noči inkubirali s primarnimi protitelesi v 1% mleku pri 4 °C. Primarna protitelesa so bila mišja monoklonska protitelesa proti kadherinom (panCDH) pri redčitvi 1:1500 (ab6528, Abcam). Naslednji dan smo membrano 3-krat sprali s TTBS v času 5 min. Nato je sledila enourna inkubacija s sekundarnimi protitelesi v 1 % mleku. Sekundarna protitelesa so bila kozja, ki so reagirala z mišjimi, redčitev pa je bila 1:5000 (115-035-062, Jackson ImmunoResearch). Membrano smo po inkubaciji 4-krat

sprali s TTBS v času 5 min. Sledila je detekcija: na membrano smo za 5 min dali kemoluminiscentni substrat SuperSignal West Pico in jo slikali s CCD-kamero (LAS-4000, Fujifilm) ter s programom Image Gauge (Fujifilm) analizirali relativno raven zaznanih proteinov.

### 3.5 DVODIMENZIONALNA ELEKTROFOREZA

Z metodo 2-DE ločujemo proteine po dveh neodvisnih lastnostih, v dveh diskretnih korakih. V prvi dimenziji, izoelektričnem fokusiranju (IEF), ločimo proteine po njihovi izoelektrični točki (pI). V drugi dimenziji, natrijev dodecilsulfat poliakrilamidni gelski elektroforezi (SDS-PAGE), ločimo proteine glede na njihovo molekulsko maso (Healthcare, 2004). Skoraj celotni postopek 2-DE elektroforeze je bil enak postopku Kočevar-Britovšek (Kočevar, 2007). Povzet je bil po navodilih proizvajalca naprave za 2-DE (Healthcare, 2004) in poskusih Kočevar-Britovšek (2007).

#### 3.5.1 Izoelektrično fokusiranje

Proteine smo najprej ločili glede na njihovo izoelektrično točko (pI) v sistemu IPGphor™ II IEF (GE Healthcare), ki s pomočjo keramičnih nosilcev omogoča hkratno fokusiranje 6 vzorcev. Ima dve zlati elektrodi, med katerima je ustvarjeno električno polje, ki vpliva na gibanje proteinov. Visok pH se nahaja na katodni strani, nizek pa na anodni, tako da se pozitivno nabiti proteini pomikajo h katodi in negativni k anodi. Medtem postajajo zaradi pH-gradienta vse manj nabiti, dokler ne postane njihov naboj nevtralen, in se zato ustavijo (Healthcare, 2004).

Za ločevanje smo uporabili 24 cm dolge trakove z imobiliziranim pH-gradientom (IPG) in nelinearnim razponom pH od 3 do 11, ki jih je bilo najprej potrebno rehidrirati. IPGphor™ nam ponuja možnost izvajanja rehidracije in samega fokusiranja v posebnih keramičnih nosilcih brez menjave ali prelaganja IPG trakov. Vzorec lahko dodamo že sami rehidracijski raztopini, nato pa na instrumentu nastavimo, da najprej poteka rehidracija in šele nato fokusiranje (Kočevar, 2007).

Pred samo rehidracijo smo vzorcu pred nanosom na nosilec dodali še 4  $\mu$ L 2 M DTT in 0,5% (v/v) IPG pufra. Za en 24 cm dolg trak smo zmešali 90  $\mu$ g proteinov in toliko rehidracijske raztopine, da je skupni volumen znašal 450  $\mu$ l, in to inkubirali 15 min pri sobni temperaturi (ST). Nato smo vzorec v enakomerno debeli črti nanесли po celotni dolžini keramičnega nosilca. Nanj smo položili IPG trak, tako da je bil gel obrnjen navzdol in pri tem pazili na orientacijo pH: pH-vrednost 3 na traku je bila nameščena na zoženi del nosilca, pH-vrednost 11 pa na nezoženega. Da se gel ne bi izsušil, smo čezenj nanесли še približno 2 ml mineralnega olja. Nosilec smo pokrili s pokrovom in ga namestili na IPGphor™ tako, da je bil zoženi del v kontaktu z anodo in nezoženi s katodo. Program, ki smo ga izbrali, je rezultat okvirnih navodil proizvajalca in somentoričnih predhodnih poskusov. Za boljši vstop večjih proteinov in predvsem za migracijo morebitnih ostankov soli, ki bi v nadaljevanju motile fokusiranje, sta desetim uram pasivne rehidracije sledili dve uri aktivne rehidracije z napetostjo pri 50 V. Fokusiranje smo začeli z 200 V 1 h, nato

500 V 1 h, 1000 V 1 h, gradientno naraščanje do 8000 V 3 h in zaključili s stalno napetostjo 8000 V 3 h. Skupna vsota je bila približno 42 kWh. Vse je potekalo pri sobni temperaturi z maksimalnim tokom 50  $\mu$ A/trak. Po končanem fokusiranju smo trakove nalahno sprali s ddH<sub>2</sub>O ter jih shranili v plastično mapo pri -70 °C.

### **3.5.2 Ekvilibracija**

Z ekvilibracijo smo proteine pripravili na naslednjo dimenzijo in jih negativno nabili s SDS, da so med elektroforezo lahko potovali k anodi.

Sama ekvilibracija je potekala v dveh korakih. Pri prvem koraku smo raztopini dodali še 1 % DTT-ja za redukcijo disulfidnih mostičkov in IEF trakove v njej inkubirali na stresalniku 15 min. Nato smo trakove sprali z ddH<sub>2</sub>O in jih ponovno inkubirali 15 min v ekvilibracijski raztopini z 2,5 % IAA (namesto reducenta) za preprečitev reoksidacije tiolnih skupin. Trakove smo sprali z elektroforetskim pufrom in jih nanесли na gel.

### **3.5.3 Navpična SDS poliakrilamidna gelska elektroforeza**

Proteine smo po ekvilibraciji ločili glede na njihovo molekulsko maso z navpično SDS-PAGE v sistemu Ettan<sup>TM</sup> DALTsix (GE Healthcare), ki omogoča hkratno elektroforezo 6 gelov. Nanj sta priključena še mešalni aparat in hladilnik, da se pufer v kadi ne pregreva.

Pripravili smo 12% gele, ki najbolje ločujejo proteine z maso med 14 in 100 kDa. Za en 12% gel dimenzij 26 cm x 20 cm x 0,1 cm smo potrebovali približno 70 ml raztopine. Vse sestavine, razen APS in TEMED, ki ju dodamo za začetek polimerizacije, smo najprej zmešali ob hkratni priklopitvi na vakuum, da niso nastajali mehurčki. Mešanici smo nato dodali APS in TEMED ter jo previdno vlili v nosilec s ploščami za vlivanje gelov. Vse skupaj smo po vrhu poškopili z 0,1% SDS in pustili polimerizirati 2 uri. Nato smo na gele dodali raztopino za shranjevanje gelov, vse skupaj prekrili z aluminijasto folijo in pustili polimerizirati preko noči.

Po ekvilibraciji smo trakove nanесли v jamico v gelu in pri tem posebno pazili na orientacijo. Nato smo jih zalili z 0,5% (w/v) agarozo v elektroforeznem pufru, da so ostali na mestu. Enako orientirane plošče z geli in IPG trakovi smo vstavili v elektroforezno posodo, v katero smo predhodno natočili 1-kratni elektroforezni pufer. Na vrh gelov smo natočili približno 1 L 2-kratnega elektroforeznega pufra. Elektroforeza je potekala v dveh stopnjah: najprej 45 min z močjo 2 W/gel za lažji vstop proteinov, nato pa smo povečali moč na 17 W/gel, dokler fronta barvila ni pripotovala do konca gelov.

### **3.5.4 Barvanje s srebrovim nitratom**

Po koncu elektroforeze smo gele pobarvali s srebrovim nitratom, da so proteini postali vidni kot lise. Uporabili smo protokol po Mortzu in sodelavcih (2001), ki je kompatibilen z masno spektrometrijo.

Gele smo previdno odstranili iz steklenih plošč in jih preko noči inkubirali v fiksirju. S tem smo preprečili nadaljnje premikanje proteinov in sprali odvečne ione in detergente. Nato

smo jih spirali z etanolom (3 x 20 min). Sledilo je namakanje v ojačevalni raztopini za 2 min, s katero smo povečali občutljivost in kontrast barvanja. Ponovno smo gel spirali, tokrat z ddH<sub>2</sub>O (3 x 5 min). Nato smo gele za 20 min dali v raztopino srebrovega nitrata, kjer so se srebrovi ioni vezali na proteine. Gele smo zopet spirali z ddH<sub>2</sub>O (2 x 1 min). Sledil je barvanje v razvijalcu, v katerem smo gele pustili do zelenega videza lis (proteinov) in raztopino nato odlili. Za zaustavitev redukcijske reakcije smo za 5 min dodali stop-raztopino. Na koncu smo gele do shranjevanja pustili v 1% očetni kislini. Za en gel smo uporabili po 200 ml vseh raztopin, razen razvijalca, ki smo ga dodali 400 ml. Vsi koraki so potekali v kadičkah na stresalniku. V nadaljevanju smo gele odčitali z optičnim čitalcem (poskenirali) in jih shranili med 2 plasti folije pri 4 °C.

### **3.5.5 Računalniška analiza 2-DE gelov**

Dobljene podobe z optičnim čitalcem smo obdelali z demo verzijo programa ImageMaster 2D Platinum 7.0. Pri njegovi uporabi smo se držali navodil za uporabo (GE Healthcare Biosciences AB, 2008). Preverili smo količino lis na posameznih gelih: program je obkrožil (zaznal) lise, mi pa smo jih preverili in popravili tiste, ki to niso bile (npr. vodni mehurčki ali natrgan gel). Ponovitev 2-DE v duplikatih ali triplikatih zaradi majhne količine izoliranih proteinov v vzorcih, in s tem povezanega velikega volumnskega nalaganja na gele, nismo delali.

## **3.6 RAZLIČNI NAČINI OBOGATITVE MEMBRANSKIH PROTEINOV IZ VZORCEV ŽELODČNEGA TKIVA**

### **3.6.1 Protokol za izolacijo celokupnih proteinov**

Protokol smo izpeljali po članku Kočvarjeve s sodelavci (2012). Vzorec z maso 67,1 mg smo strli v terilnici s pestilom pod tekočim dušikom. Čez vzorec smo dali pufer za lizo: za vsakih 10 mg tkiva smo dodali 50 µL pufera. Vzorec smo razbijali z ultrazvokom 3-krat po 10 s z vmesnim hlajenjem na ledu. Sledila je enourna inkubacija na ledu in centrifugiranje 1 h pri 12.000 x g in 4 °C. Supernatant smo vzeli kot ekstrakt celokupnih proteinov. Shema protokola je priložena kot priloga 1.

### **3.6.2 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov I**

Protokol smo izpeljali po članku Yeoha s sodelavci (2010). Vzorec z maso 65,6 mg smo strli v tekočem dušiku s pestilom v terilnici. Čez vzorec smo dali 328 µL raztopine 40 mmol/L Tris (1mL Tris 40 mmol/L na 200 mg vzorca) in ga razbijali z ultrazvokom 30 s z vmesnim hlajenjem na ledu. Nato smo ga mešali 5 min z vmesnim hlajenjem na ledu. Sledilo je centrifugiranje 15 min pri 12000 x g in 20 °C. Supernatant smo odlili in shranili pri -20 °C, oborino pa dvakrat spirali s puferom Tris in ga nato resuspendirali v 150 µL pufera za lizo. Vzorec smo ponovno razbijali z ultrazvokom, ga mešali in centrifugirali. Supernatant smo vzeli kot ekstrakt proteinov plazemskih membran. Shema protokola je priložena kot priloga 2.



### 3.6.3 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov II

Uporabili smo protokol, ki je bil prvotno namenjen za izolacijo proteinov plazemskih membran iz kvasnih celic (Canadi Jurešič in Blagović, 2011) in ga priredili, da je ustrezal našim potrebam. Shema protokola je priložena kot priloga 3.

#### Postopek I

Vzorec z maso 68 mg smo strli v tekočem dušiku s pestilom v terilnici, mu dodali 300  $\mu$ L raztopine 30 mmol/L Tris/Cl (pH 8,5) s proteaznimi inhibitorji in ga inkubirali 15 min na ledu. Sledilo je centrifugiranje 10 min pri 700 x g in 4 °C. Prvi dobljeni supernatant (primarni supernatant, S1) smo shranili v mikrocentrifugirko, oborino (primarna oborina, »pelet« P1) pa resuspendirali s toliko pufra TE, da je imela enako težo kot S1. Oboje smo nato centrifugirali 20 min pri 20.000 x g in 4 °C, supernatant iz S1(S2-S1) in iz P1 (S2-P1) smo odlili ter oborini iz S1 (P2-S1) in P1 (P2-P1) resuspendirali v 350  $\mu$ L pufra TEDG.

Vzorca smo pripravili na centrifugiranje v saharoznem gradientu. V vsako od dveh ultracentrifugirk, ki sta imeli maksimalni volumen 5 mL, smo dali 1,5 mL 53% (w/w) saharoze v pufu TE in nanjo previdno še 3,0 mL 43% (w/w) saharoze v pufu TE. Na vrh smo naložili še oba vzorca. Sledilo je gradientno centrifugiranje 2 h pri 25.000 x g in 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo pobrali pas med gradientoma, kjer naj bi se ustavile plazemske membrane (PM). Vzorca smo razredčili z vodo (2 mL) in ju centrifugirali 30 min pri 20.000 x g in 4 °C. Dobljeni oborini (P3) smo poskusili raztopiti v pufu MES. Oba vzorca smo homogenizirali s pestilom in ju dali stresati preko noči v hladno sobo. Da bi bolje raztopili oborino, smo na oba vzorca dodali še po 40  $\mu$ L pufra za lizo.

#### Postopek II

Protokol smo ponovili z vzorcem z večjo maso, to je s 159,3 mg, in s to razliko, da smo po končanem centrifugiranju v gradientu poleg PM pobrali tudi drugi dve nastali frakciji (F1, F3). Vzorce smo razredčili z vodo (2 mL) in jih razdelili na dva dela, nato pa smo jih centrifugirali 30 min pri 20.000 x g in 4 °C. Dobljene oborine (P3) smo raztapljali v 10 mmol/L pufu Tris (pT) ali pufu za lizo (pL), volumen je bil 40  $\mu$ L. Vzorce smo homogenizirali in dali stresati preko noči. PM primarne oborine smo dodatno centrifugirali 10 min pri 15.000 x g in 4 °C in supernatant (S3) uporabili za analizo.

### 3.6.4 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov III

Uporabili smo protokol, ki se uporablja za izolacijo membranskih proteinov iz glivnih celic (Turk in Plemenitaš, 2003). Shema protokola je priložena kot priloga 4.

Vzorca človeškega želodčnega tkiva z maso 83,5 (M) in 157,4 (V) mg smo strli pod tekočim dušikom, jima dodali trikratno težo 0,4 M saharozne raztopine v pufu A s proteaznimi inhibitorji in ju centrifugirali 20 min pri 530 x g in 4 °C. Dobljena prva supernatanta (primarna supernatanta S1) smo odlili v posebno mikrocentrifugirko. V nadaljevanju smo uporabili tudi oborini (primarni oborini, P1), ki sta ju avtorici v originalnem protokolu sicer zavrgli. Dodali smo jima 0,4 M saharozno raztopino v pufu A

do teže enake S1. Nato smo oba ponovno centrifugirali 30 min pri 20.000 x g in 4 °C. Dobljena supernatanta (S2) smo odlili, oborini (P2-S1 in P2-P1) pa resuspendirali v 400 µL 0,4 M saharozne raztopine.

Sledilo je centrifugiranje v saharoznem gradientu. V dve ultracentrifugirki smo dali po 1 mL 2,25 M, 1,65 M in 1,1 M saharozne raztopine v pufrih A. Na vrh ultracentrifugirke smo dali vzorca in ju centrifugirali v saharoznem gradientu 14 h pri 80.000 x g in 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo pri obeh vzorcih iz primarnega supernatanta pobrali frakcijo med 1,65 M in 2,25 M saharoze, kjer naj bi se nahajale plazemske membrane (PM). Pri vzorcih iz primarne oborine smo poleg frakcije s plazemskimi membranami pobrali še frakcijo med 1,1 M in 1,65 M saharozne raztopine (F1). Vse pobrane vzorce smo raztopili v 3-kratnem volumnu pufra A in jih centrifugirali 40 min, pri 20.000 x g in 4 °C. Dobljene supernatante (S3) smo odpipetirali, na oborine (P3) pa dali 100 µL pufra B za shranjevanje, in jih dali stresati preko noči. Vzorce s frakcijo plazemskih membran smo razdelili na dva dela in jih centrifugirali 15 min pri 20.000 x g in 4 °C, ter dobljene supernatante (S4) odpipetirali v nove mikrocentrifugirke. Čez oborine (P4) smo dali pufer RIPA (pR) ali pufer za lizo (pL), in sicer na vzorca iz primarne oborine P1 20 µL, na vzorca iz primarnega supernatanta S1 pa 10 µL. Dva tako razopljena vzorca, oborini plazemskih membran v dveh pufrih, smo ponovno centrifugirali 20 min pri 20.000 x g in 4 °C in za analizo uporabili dobljeni supernatant (S5). Vzorce iz frakcije F1, ki naj ne bi vsebovala plazemskih membran po centrifugiranju v saharoznem gradientu, smo pustili v pufri B.

### 3.6.5 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov IV

Uporabili smo protokol po članku (Touster in sod., 1970), ki temelji na izolaciji plazemskih membran iz nuklearnega (N) in mikrosomalnega (M) dela tkivnega homogenata z uporabo gradientnega centrifugiranja. Shema protokola je priložena kot priloga 5.

#### Postopek I

Narezali smo 2 vzorca svinjskega želodca z maso 1 g. Nanju smo dali po 3 mL 0,25 M saharozne raztopine, kar je predstavljalo začetni volumen. Vzorca smo homogenizirali do utekočinjenja z ročnim homogenizatorjem in prefiltrirali skozi en sloj gaze. Sledilo je centrifugiranje 10 min pri 1000 x g in 4 °C. Supernatanta (S1) smo odlili v novo epruveto, oborini (P1) pa resuspendirali v enakem začetnem volumnu 0,25 M saharozne raztopine. Centrifugiranje smo dvakrat ponovili, pri čemer smo združevali supernatante (S2, S3). Po tretjem centrifugiranju smo oborini (P3) ponovno resuspendirali v začetnem volumnu 0,25 M saharozne raztopine, čemur je sledilo centrifugiranje 8 min pri 33.000 x g in 4 °C. Supernatanta (S4) smo po zadnjem centrifugiranju zavrgli. Tako pripravljene oborini (P4), ki sedaj predstavljata nuklearni del (N) tkivnega homogenata, smo raztopili v 3-kratnem začetnem volumnu 57% (w/w) saharoze. S tem smo dobili okoli 2 mL vzorca v 47% (w/w) saharozi, ki smo ju prestavili v dve ultracentrifugirki. Čez njiju smo nalili enako količino 37,2% (w/w) saharoze, približno 1 mL, in dopolnili ultracentrifugirko z 0,25 M saharozo, tako da je bil skupni volumen približno 3 mL v 3,5-mililitrski ultracentrifugirki. Vzorec smo centrifugirali v saharoznem gradientu 16 h ali 2 h pri 76.000 x g in 4 °C. Čas 2 h je bil izbran zaradi naših manjših ultracentrifugirk. Po centrifugiranju smo pobrali vse frakcije,

ki so nastale: membranska (PM) naj bi bila med 0,25 M saharozno raztopino in 37,2% (w/w) saharozo ter manjši del med 37,2% (w/w) in 47% (w/w) saharozo. Frakcije smo sprali z ddH<sub>2</sub>O s centrifugiranjem 1 h pri 40.000 x g in 4 °C. Supernatante (S5) smo odstranili, oborine (P5) pa raztopili v 10 µL pufru za lizo (pL).

Supernatante, ki smo jih združevali v prvih treh centrifugiranjih 8 min pri 1000 x g in 4 °C (S1, S2, S3), smo ponovno centrifugirali 8 min pri 33.000 x g in 4 °C. Supernatante (S6) smo shranili in oborine (P6) resuspendirali v 3-kratnem volumnu 0,25 M saharozne raztopine. Centrifugiranje, 8 min pri 33.000 x g in 4 °C. smo ponovili, pri čemer smo supernatante (S6, S7) združevali. Te smo nato centrifugirali 100 min 78.000 x g in 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo supernatante (S8) zavrgli. Pripravljene oborine (P8), ki sedaj predstavljajo mikrosomalni (M) del tkivnega homogenata, smo dali v 2,5-kratni volumen originalne teže vzorca 57% (w/w) saharoze, s čimer smo dobili vsaj 49% (w/w) saharozno raztopino in približno 2,5 mL velik vzorec, ki smo ga razdelili na dve ultracentrifugirki. Na vsako ultracentrifugirko smo dodali 1,2 mL 34% (w/w) saharoze in dopolnili z 0,25 M saharozo. Skupni volumen ene ultracentrifugirke je bil približno 3 mL v 3,5-mililitrski ultracentrifugirki. Vzorca smo centrifugirali v saharozem gradientu 16 h ali 2 h pri 76.000 x g in 4 °C. Pobrli smo vse frakcije, ki so nastale: membranska (PM) naj bi bila med 0,25 M in 34% (w/w) saharozo, manjši del pa med 34% (w/w) in 49% (w/w) saharozo. Frakcije smo spirali z ddH<sub>2</sub>O 1 h pri 40.000 x g in 4 °C. Odstranili smo supernatante (S9), oborine (P9) pa raztopili z 10 µL pufru za lizo (pL).

## Postopek II

Postopek smo ponovili na dveh vzorcih svinjskega želodca z maso 1 g, s to razliko, da smo ju strli v tekočem dušiku, ju pri centrifugiranju v saharoznem gradientu dali na vrh in centrifugirali 16 h ali 8 h; slednji čas je bil preračunan z aplikacijo proizvajalca centrifug. Po centrifugiranju smo pobrali vse frakcije, ki so nastale, in jih sprali z ddH<sub>2</sub>O za 10 min pri 20000 x g in 4 °C. Odstranili smo supernatante, oborine pa raztopili s pufrom za lizo (pL) ali pufrom za lizo z dodatkom NP-40 (pNP40). Vzorce smo razbijali z ultrazvokom 2 x 10 s z vmesnim hlajenjem na ledu.

### 3.6.6 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov V

Uporabili smo protokol, prirejen po članku Hoffmann in sod., (2005). Narezali smo 4 vzorce svinjskega želodca z maso 0,5 g. Nanje smo dali 10-kratni volumen homogenatnega pufru in homogenizirali dva vzorčka z desetimi pasažami gor-dol (GD) z ročnim homogenizatorjem in druga dva s potegi do utekočinjenja (UT). Vzorce smo prefiltrirali preko dveh slojev gaze. Sledilo je centrifugiranje 10 min pri 1000 x g in 4 °C. Oborine (P1) smo resuspendirali z 1 mL 1,38 M saharoze v homogenatnem puftru in jih centrifugirali v ultracentrifugi 80 min pri 40.000 x g in 4 °C. Dobljene supernatante (S2) smo ultracentrifugirali 45 min pri 39.000 x g in 4 °C in jih shranili (S3) za primerjavo. Oborine (P3) smo resuspendirali v 1,38 M saharozni v homogenatnem puftru, tako da smo dobili približno 1 mL vzorcev. V ultracentrifugirkah smo čeznje naložili po 2 mL 0,25 M saharoze v homogenatnem puftru in vzorce centrifugirali v saharoznem gradientu 90 min pri 57.000 x g in 4 °C. Po končanem centrifugiranju smo pobrali pasove med gradientoma, kjer naj bi se nahajale plazemske membrane (PM), in jih dvakrat sprali z ddH<sub>2</sub>O 5 min pri

15.000 x g in 4 °C. Nastale oborine (P4) smo raztopili v 10 µL puфра za lizo (pL). Shema protokola je priložena kot priloga 6.

### 3.6.7 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov VI

Uporabili smo protokol za izolacijo plazemskih membran po članku Hubbard in sod., (1983); shema protokola je priložena kot priloga 7. Narezali smo 2 vzorca svinjskega želodca z maso 1 g. Nanju smo dali 4,5-kratni volumen 0,25 M puфра STM in homogenizirali do utekočinjenja. Vzorca smo prefiltrirali skozi dva sloja gaze in ju dopolnili do 5 mL, da smo dobili 20% (w/v) homogenat, kar je predstavljalo originalni volumen. Sledilo je rahlo mešanje, nato centrifugiranje 5 min pri 260 x g in 4 °C. Supernatanta (S1) smo odlili v novo epruveto, oborinama (P1) dodali ½ originalnega volumna 0,25 M puфра STM in ju homogenizirali. Vzorca smo ponovno centrifugirali 5 min pri 260 x g in 4 °C. Supernatanta (S2) smo združili z supernatantoma iz prvega centrifugiranja. Sledilo je centrifugiranje združenih supernatantov za 10 min pri 1500 x g in 4 °C. Supernatante (S3) smo odlili, čez oborine (P3) smo dali 2/3 originalnega volumna 0,25 M puфра STM in nato dopolnili z 2,0 M puфrom STM, ki ima 2 mol/L saharoze, do 2-kratnika originalnega volumna. Tako pripravljena vzorca (2,5 mL) smo dali v ultracentrifugirko, čez dodali približno 1 ml 0,25 M saharozne raztopine in ju centrifugirali v saharoznem gradientu pri 113.000 x g in 4 °C. En vzorec smo centrifugirali 33 min, drugega 60 min; krajši čas smo preračunali z aplikacijo na spletni strani proizvajalca centrifug. Iz obeh vzorcev smo pobrali frakcijo na interfazi, kjer naj bi bile plazemske membrane (PM), in oborino (F1). Vse vzorce smo dvakrat spirali z 0,25 M saharozno raztopino 5 min pri 15.000 x g in 4 °C. Oborine (P4) smo raztopili v 10 µL puфра za lizo (pL) ali puфра RIPA (pR).

### 3.6.8 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov VII

#### Postopek I

Uporabili smo protokol za izolacijo plazemskih membran z uporabo diferencialne ekstrakcije po Zhangu s sodelavci (2005). Shema protokola in njegovih sprememb je priložena kot priloga 8.

Narezali smo štiri vzorce svinjskega želodca z masami približno 1 g. Čez tri smo nalili 8-kratni volumen puфра C (mL/g) in jih homogenizirali, četrtega pa smo predhodno še strli v tekočem N<sub>2</sub>. Prvi vzorec smo prefiltrirali čez dva sloja gaze, preostale skozi enega. Sledilo je centrifugiranje 15 min pri 1500 x g in 4 °C. Supernatante (S1) smo zavrgli, oborine (P1) smo zmešali s 50% saharozo (w/w) v puфru C, tako da smo na koncu dobili vzorce v 44% saharozi: na vzorec 1 z maso 0,32 g smo dali 2,38 g, na vzorec 2 z maso 1,06 g 7,76 g, na vzorec 3 z maso 1,13 g 8,32 g in na vzorec 4 z maso 0,36 g 2,61 g 50% saharoze v puфru C. Zmešane vzorce smo naložili v ultracentrifugirko in nanje dodali še 1 mL 42,3% saharoze v puфru C. Nato smo jih centrifugirali v saharoznem gradientu 150 min pri 100.000 x g in 4 °C. Pobrali smo vrhnji sloj, kjer naj bi bile plazemske membrane (PM), in oborino (F1). Vse frakcije smo dvakrat spirali s puфrom D 5 min pri 15.000 x g in 4 °C, nato pa shranili v puфru D.

Sledile so štiri različne ekstrakcije:

#### Ekstrakcija s karbonatom (eK)

Vzorec smo 200-kratno redčili z 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in tako nanj dodali 1950 µL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Sledila je inkubiracija na ledu za 30 min in centrifugiranje 60 min pri 15.000 x g in 4 °C. Supernatant smo odlili, oborino pa resuspendirali v 30 µL pufra za lizo (pL).

#### Ekstrakcija s kloroformom/metanolom (eK/M)

Vzorec smo redčili s hladno mešanico kloroform/metanol (5:4) v razmerju 1:9, tako da smo nanj dodali 450 µL mešanice kloroform/metanolin in ga 15 min inkubirali na ledu. Nato je sledilo centrifugiranje 20 min pri 12.000 x g in 4 °C. Oborino in supernatant smo pobrali vsakega v svojo mikrocentrifugirko in ju obravnavali kot spodnjo (sp) in zgornjo (zg) fazo. Obe smo posušili s SpeedVac in ju na koncu raztopili v 30 µL pufra za lizo (pL).

#### Ekstrakcija s Tritonom X-114 (eT)

Vzorec smo centrifugirali 5 min pri 15.000 x g in 4 °C. Supernatant smo odlili, oborino resuspendirali v 60 µL raztopine tritona X-114, inkubirali na ledu 15 min, naposled pa centrifugirali 10 min pri 10.000 x g in 4 °C. Supernatant smo pobrali in ga inkubirali pri 37 °C 90 ali 5 min. Sledilo je ponovno centrifugiranje za 10 min pri 1000 x g in sobni temperaturi. Ločili smo zgornjo (zg) in spodnjo (sp) fazo ter vsako posebej obarjali s trikratnim volumnom hladnega acetona, preko noči v zamrzovalniku. Naslednji dan smo vzorce centrifugirali 10 min pri 15.000 x g in 4 °C in jih dokončno posušili v digestoriju. Nanje smo dolili 30 µL pufra za lizo.

#### Ekstrakcija s pufrom za lizo

Vzorec smo centrifugirali 15 min pri 15.000 x g in 4°C. Na nastalo oborino smo dali 30 µL pufra za lizo.

#### Postopek II

Protokol smo ponovili z dvema vzorcema svinjskega želodca z maso približno 1 g. Za razliko od originalnega protokola smo vzorca strli v tekočem dušikom in ju pri centrifugiranju v saharoznem gradientu dali na vrh ultracentrifugirke. En vzorec smo centrifugirali v gradientu 2,5 ure, drugega pa 82 minut. Slednji čas smo preračunali z aplikacijo na internetni strani proizvajalca centrifug. Po centrifugiranju smo pobrali vse frakcije, tudi na meji med 44% in 42,3% saharozo (F2), in jih sprali s pufrom D, nato pa oborine raztapljali s pufrom za lizo (pL) in pufrom za lizo z dodanim NP-40 (pNP40). Vzorca smo dali na stresalnik preko noči v hladni sobi. Sledilo je razbivanje z ultrazvokom 2 x 10 s in centrifugiranje 10 min pri 15.000 x g in 4 °C. Za analizo smo uporabili supernatant.

#### Postopek III

Protokol smo ponovili na vzorcih svinjskega želodca z maso približno 1 g in jih strli v tekočem dušikom, centrifugiranje v gradientu pa je trajalo 82 min. Sledila je ekstrakcija membranskih frakcij po protokolu: s pufrom za lizo z NP-40 (pNP40), s tritonom X-114 (eT), s karbonatom (eK) in s kloroform/metanolom (eK/M), opisana pod točko Postopek I).

#### Postopek IV

Protokol smo ponovili z obema najuspešnejšima ekstrakcijama iz protokola pod točko Postopek III na dveh vzorcih svinjskega želodca z masama približno 1 g in ju strli v tekočem dušiku. Vzorca smo centrifugirali v gradientu 82 minut. Po centrifugiranju smo vzorce ekstrahirali s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 (pNP40) in s karbonatom (eK), opisano pod točko Postopek I.

#### Postopek V

Protokol smo ponovili na dveh vzorcih človeškega želodca z masama približno 0,8 g in ju strli v tekočem dušiku. Vzorca smo centrifugirali v gradientu 82 min. Po centrifugiranju smo vzorca ekstrahirali s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 (pNP40) ali s karbonatom (eK), opisano pod točko Postopek I).

### 3.6.9 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov VIII

Uporabili smo Novagenov (ProteoExtract Transmembrane Protein Extraction Kit), ki se sklicuje na Nakamuro (2008) in Calbiochemov (ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit) po Sun in sod., (2005) komplet za izolacijo membranskih proteinov in se ravnali po navodilih proizvajalcev. Shemi protokolov sta priloženi kot priloga 9.

#### 3.6.9.1 Calbiochemov (C) protokol

Narezali smo vzorec tkiva človeškega želodca z maso 50 mg in mu dodali 10  $\mu$ L proteaznih inhibitorjev in 2 mL ledenohladnega pufra za ekstrakcijo I. Vzorec smo homogenizirali z 20 pasažami, nato ga 10 min inkubirali na ledu. Sledilo je centrifugiranje za 15 min pri 16.000 x g in 4 °C. Supernatant (S1) smo odpipetirali, na oborino (P1) smo dodali 5  $\mu$ L proteaznih inhibitorjev in 1 mL pufra za ekstrakcijo II. Vzorec smo resuspendirali s pipeto in inkubirali na ledu 30 min z občasnim mešanjem. Sledilo je ponovno centrifugiranje za 15 min pri 16.000 x g in 4 °C. Supernatant, ki naj bi vsebovalativne proteine plazemskih membran (PM), smo uporabili za analizo.

#### 3.6.9.2 Novagenov (N) protokol

Ker komplet vsebuje 2 pufra za ekstrakcijo dveh tipov membranskih proteinov, smo narezali dva vzorca tkiva človeškega želodca z maso 50 mg in jima dodali 5  $\mu$ L proteaznih inhibitorjev in 2 mL ledenohladnega pufra za ekstrakcijo I. Vzorca smo homogenizirali z 20 pasažami gor-dol, nato ju 10 min inkubirali na ledu z občasnim mešanjem. Sledilo je centrifugiranje 5 min pri 1000 x g in 4 °C. Supernatanta (S1) smo odstranili, oborini (P1) sprali z 2 mL ledenohladnega fosfatnega pufra z NaCl (PBS) in centrifugirali 5 min pri 1000 x g in 4 °C. Supernatanta (PBS-S2) smo odstranili, oborini ponovno sprali z 2 mL

PBS ter centrifugirali 5 min pri 1000 x g in 4 °C. Supernatanta smo odpipetirali, eni oborini dodali 5 µL proteaznih inhibitorjev in 200 µL pufru za ekstrakcijo 2A, drugi oborini pa 5 µL proteaznih inhibitorjev in 200 µL pufru za ekstrakcijo 2B. Oba pufru smo predhodno pripravili z redčenjem pufru za ekstrakcijo 2 v razmerju 1:2 z reagentoma TM-PEK A in B (TMA in TMB). Vzorca smo z 20 pasažami gor-dol teflonskega pestila popolnoma resuspendirali. Vzorca smo nato inkubirali 15 min na ledu z rahlim mešanjem. Sledilo je centrifugiranje 15 min pri 16.000 x g in 4 °C. Supernatanta, v katerih naj bi bile membrane (PM), smo uporabili za analizo.

Pri 2DE analizi smo v enem poskusu združili vse tri vzorce. Pri ponovitveni analizi nam je zmanjkalo TMA vzorca, zbirke je bil iz vzorcev TMB in Calbiochemovih PM.

### 3.7 ISKANJE BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV PO RAČUNALNIŠKIH ZBIRKAH

Potencialne biološke označevalce raka smo iskali po dveh podatkovnih zbirkah. Prva je bila COSMIC, ki je akronim za katalog somatskih mutacij pri raku (angl. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) po Forbes in sod., (2015) in Wellcome Trust Sanger Institute (2015), druga je bila PubMed (2015).

Pri COSMIC lahko iščemo napake po vrsti raka, genu ali vzorcu. Mi smo pregledali najpogostejše tirozin-kinaze, ki so povzročiteljice raka. Gene tirozin-kinaz smo pregledali na seznamu genov in nato v bazi iskali po posameznem genu. Če je imel gen potrjeno napako in je bila navzoča ugotovitev, da izražen protein povzroča raka, smo tega vpisali v našo tabelo okvarjenih proteinov. Te smo upoštevali kot potencialne biološke označevalce za rak želodca, saj pri njem še niso bili potrjeni.

Vzporedni način je potekal po podatkovni bazi PubMed. Po njej se išče po člankih, ko v iskalno vrstico vpišeš svojo zahtevo. Mi smo po njej iskali »okvarjeni membranski proteini in rak« (angl. aberrant membrane proteins and cancer), »okvarjeni membranski proteini in rak želodca« (angl. aberrant membrane proteins and gastric cancer) ter izpeljanke teh dveh iskalnih nizov. Po dobljenih rezultatih smo pregledali članke in iskali napačno izražene ali na kakšen drug način okvarjene gene, ki so povzročitelji raka oziroma raka želodca. S kombinacijo izsledkov iz obeh pristopov smo sestavili pregledni seznam možnih potencialnih označevalcev raka želodca.

Ko smo našli tako okvarjene proteine, smo vsakega vnesli v preglednico. Za vsak možen potencialni označevalec raka želodca smo poiskali več podatkov. Z iskanjem po podatkovni zbirki UNIPROT (Magrane in Consortium, 2011) smo za vsak posamezen protein izpisali njegovo ime, lokacijo v celici, vlogo, ki jo v njej opravlja, številko referenčnega zaporedja (Pruitt in sod., 2012), sliko 3-D zgradbe ter številko OMIM (McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD), 2015). Iz člankov smo izpisali vlogo, ki jo protein ima pri raku, njegovo izražanje ter vrsto okvare, ki je povzročila raka. Pri vsakem proteinu smo tudi pripisali številko članka v podatkovni zbirki PubMed. Podatke iz zbirk smo uredili tako, da so za vsak okvarjeni protein izpisani vsi navedeni podatki v vrstnem redu: protein, njegovo slovensko ime, njegova lokacija, normalna vloga proteina, vloga pri raku, kako se izraža pri raku, vrsto

okvare proteina, vrsto raka, ki ga okvara povzroča, številko članka, ki se nanaša na napako, številko referenčnega zaporedja in številko OMIM.

UNIPROT je obsežna podatkovna zbirka za proteinske sekvence in bioinformacijsko obdelane podatke. Sestavljena je iz večih podatkovnih podzbirk in se povezuje s podatki drugih podatkovnih zbirk. Referenčno zaporedje je podatkovna zbirka z obsežnim, integriranim obdelanim sklopom zaporedij genomske DNA, prepisov in proteinov ter tvori enega temeljev za poenotenje sekvenčnih zaporedij z genetskimi in funkcionalnimi informacijami. OMIM je okrajšava za angl. »Online Mendelian Inheritance in Man.« Je obsežna, verodostojna podatkovna zbirka človeških genov in njegovih fenotipov. Referenčni pregled vsebuje informacije o vseh Mendelskih motnjah in napakah v več kot 15.000 genih. Zbirka se osredotoča na razmerje med genotipom in fenotipom.



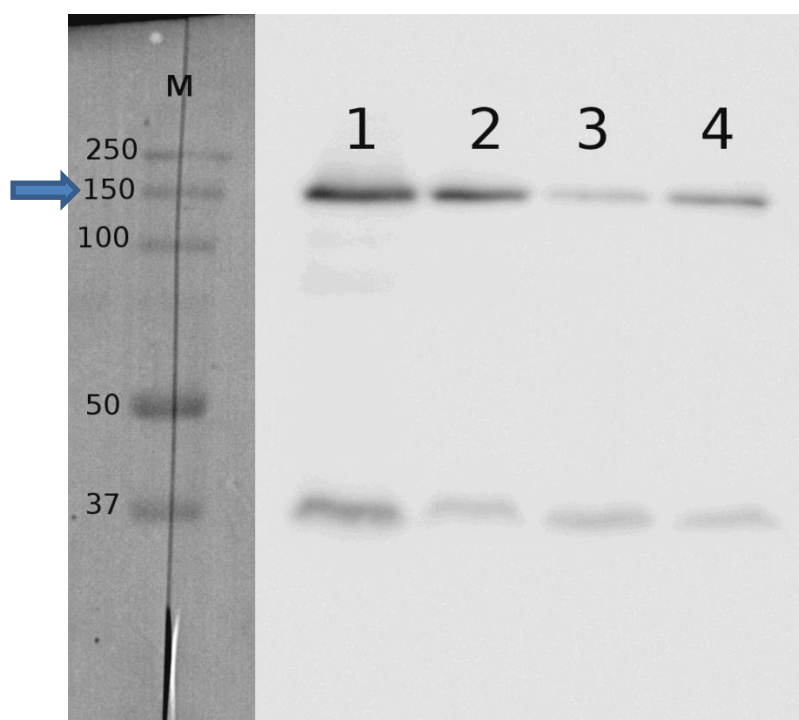
## 4 REZULTATI

### 4.1 REZULTATI RAZLIČNIH PROTOKOLOV ZA OBOGATITEV MEMBRANSKIH PROTEINOV

Med potekom diplomskega dela smo najprej preizkusili različne protokole za izolacijo oz. obogatitev membranskih proteinov iz želodčnega tkiva. Za oceno uspešnosti posameznih protokolov smo uporabljali celokupne proteine želodčne sluznice. Slednje smo preverjali s prenosom western, pri katerem smo uporabili protitelesa proti kadherinom. Ti skrbijo za povezave celica-celica in se zato nahajajo na plazemski membrani. Vzorec celokupnih proteinov in vzorce, za katere smo ocenili, da je bila pri njih izolacija/obogatitev membranskih proteinov uspešna, smo analizirali z 2-DE.

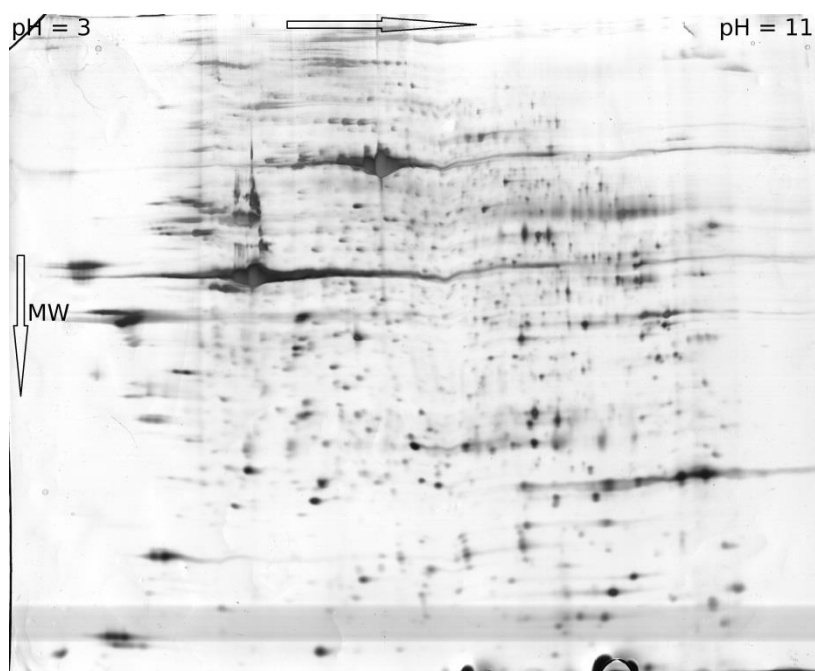
#### 4.1.1 Protokol za izolacijo celokupnih proteinov

Najprej smo izolirali celokupne proteine iz človeškega želodčnega tkiva. Z njimi smo hoteli ugotoviti približno raven membranskih proteinov v ekstraktu, kjer ti po postopku niso obogateni. S preizkusom prenosa western smo pokazali, da so v vzorcu proteini plazemske membrane; ti se vidijo že pri 30  $\mu\text{g}$  izoliranih proteinov (Slika 6). V nadaljevanju smo ta vzorec uporabljali kot kontrolo za preverjanje uspešnosti obogatitve membranskih proteinov po različnih protokolih.



Slika 6: Prikaz prenosa western iz protokola za izolacijo celokupnih proteinov iz tkiva človeškega želodca in protokola za obogatitev plazemskih proteinov I. M, marker; stolpec 1, 50  $\mu\text{g}$  vzorca po protokolu za obogatitev plazemskih proteinov I; stolpec 2, 50  $\mu\text{g}$  vzorca celokupnih proteinov; stolpec 3, 30  $\mu\text{g}$  vzorca po protokolu za obogatitev plazemskih proteinov I; stolpec 4, 30  $\mu\text{g}$  vzorca celokupnih proteinov; glavni signal pan-kadherinov (panCDH) je označen z ležečo puščico. Signal pri 37 kDa je nespecifično vezano protitelo.

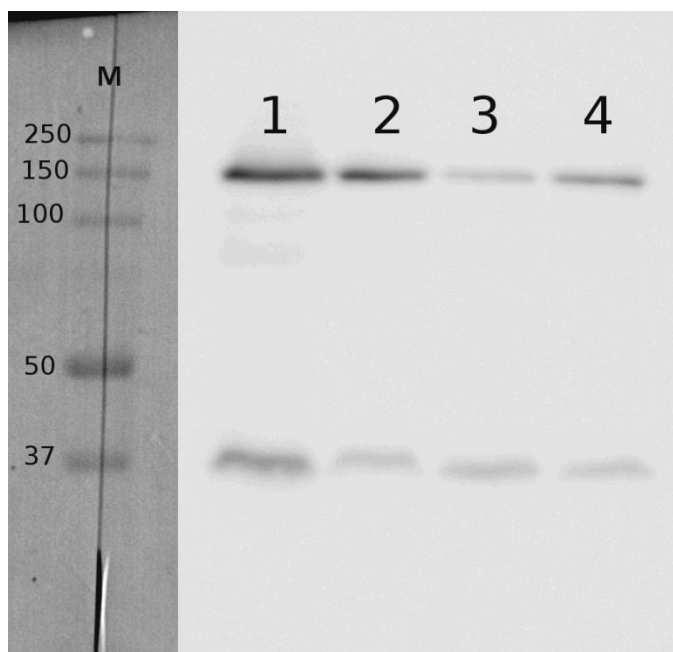
Vzorec celokupnih proteinov smo uporabili tudi za analizo z 2D-elektroforezo (Slika 7).



Slika 7: Slika 2DE gela vzorca celokupnih proteinov iz človeškega tkiva.

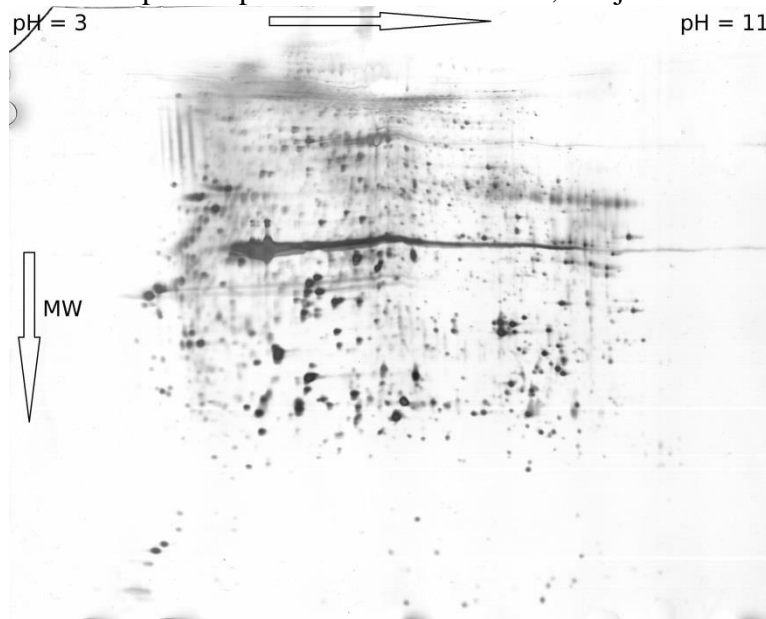
#### 4.1.2 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov I

Pri prvem poskusu obogatitve plazemskih proteinov smo uporabili preprost protokol. Iz enake začetne količine tkiva človeškega želodca kot za izolacijo celokupnih proteinov (4.1.1) smo pri večji količini nanešenih proteinov na gel (50  $\mu\text{g}$ ) dobili močnejši signal pri prenosu Western pri tem protokolu za obogatitev plazemskih proteinov (4.1.2) kot pri protokolu za izolacijo celokupnih proteinov (4.1.1). Nasprotno pa smo dobili manjši signal pri protokolu za obogatitev plazemskih proteinov (4.1.2), ko smo nanesli manjšo količino proteinov na gel (30  $\mu\text{g}$ ) (Slika 8).



Slika 8: Primerjava med protokolom za obogatitev plazemskih proteinov I (1, 50 $\mu$ g vzorca; 3, 30 $\mu$ g vzorca) in preprostim protokolom za izolacijo celokupnih proteinov na vzorcih človeškega tkiva (4.1.1) (2, 50 $\mu$ g vzorca; 4, 30 $\mu$ g vzorca); M, marker.

Na protokolu smo izvedli poskus poteka 2D-elektroforeze, kar je vidno na Sliki 9.

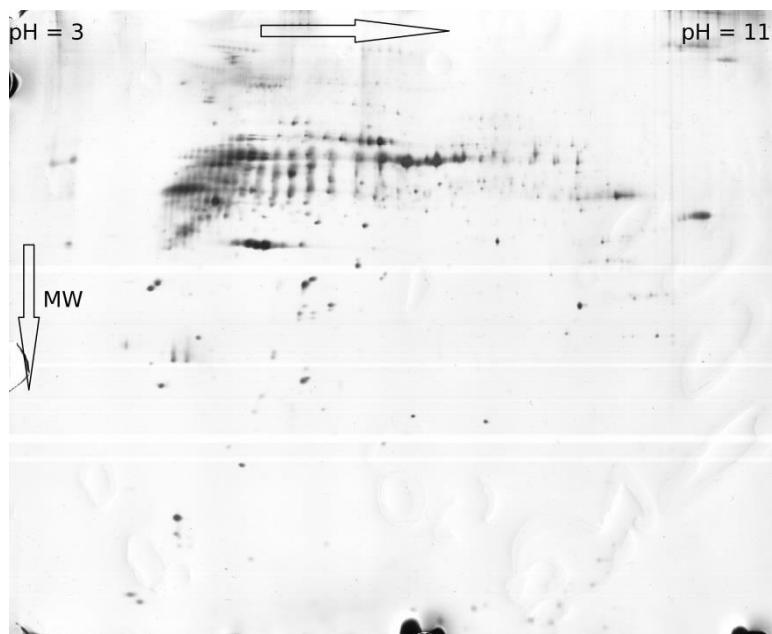


Slika 9: Slika 2-DE gela vzorca po protokolu za obogatitev plazemskih proteinov I iz tkiva človeškega želodca.

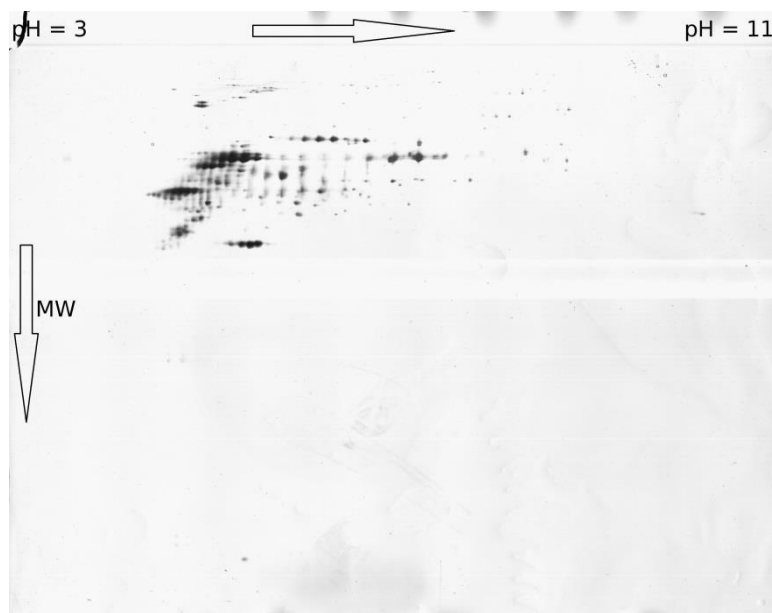
### 4.1.3 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov II

Prvi protokol namenjen obogatitvi proteinov plazemskih membran (4.1.2), ni bil uspešen. Zato smo se lotili obogatitve s centrifugiranjem v saharoznem gradientu. V prvem

poizkusu smo vzorca, pridobljena iz človeškega želodca, raztopljena v mešanici pufra MES in pufra za lizo, podvrgli 2D-elektroforezi (Sliki 10 in 11).



Slika 10: Slika 2-DE gela vzorca primarnega peleta (P3-P1) po centrifugiranju v saharoznem gradientu v protokolu za obogatitev plazemskih membran II iz tkiva človeškega želodca.



Slika 11: Slika 2-DE gela vzorca primarnega supernatanta (P3-S1) po centrifugiranju v saharoznem gradientu v protokolu za obogatitev plazemskih membran II iz tkiva človeškega želodca.

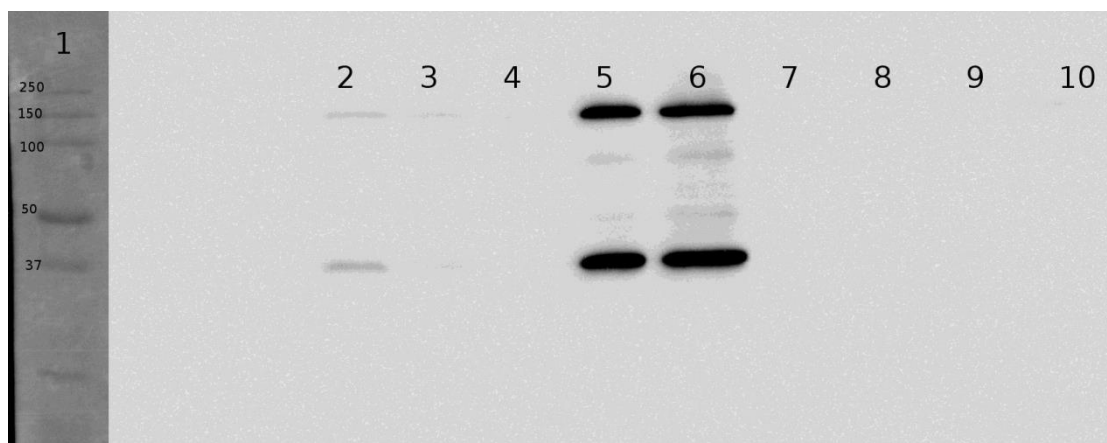
Ker smo po centrifugiranju v saharoznem gradientu dobili zelo majhen vzorec plazemskih membran, smo v naslednjem poskusu povečali količino začetnega vzorca. Analizirali smo ga s prenosom western in imunodetekcijo. V Preglednici 1 ter na Slikah 12 in 13 so

prikazani vzorci izoliranih proteinov iz primarnega supernatanta (S1) pri različnih fazah izolacije/obogatitve membranskih proteinov. Največji signal je bil zaznan v prvi pobrani frakciji po centrifugiranju v saharoznem gradientu (F1-S1-pT in pL, žepka 5 in 6). Signal ni bil odvisen od pufra, v katerem je bil vzorec raztopljen. Vzorci, kjer naj bi bile plazemske membrane (PM-S1-pT in pL, žepka 7 in 8), niso imeli signala.

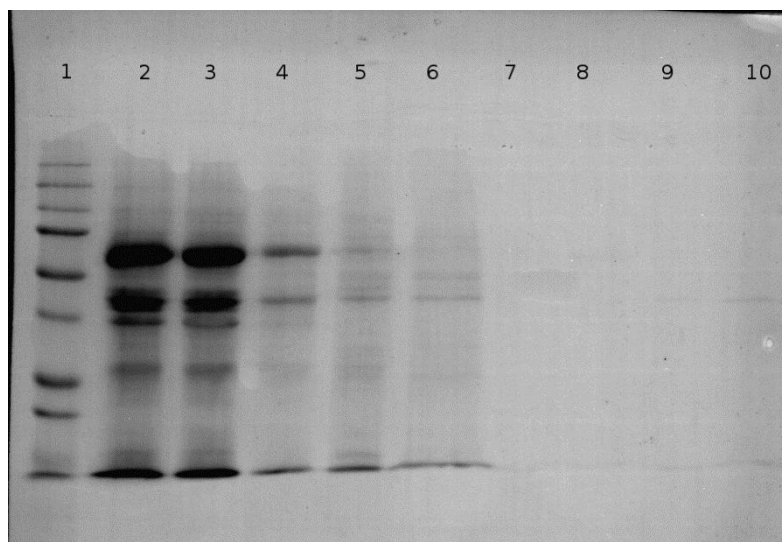
Preglednica 1: Vzorci izoliranih proteinov iz S1 pri različnih fazah izolacije/obogatitve membranskih proteinov po prirejenem protokolu (Canadi Jurešič in Blagović, 2011).

Žepka	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorec	M	S1	S2-S1	S2-P1	F1-S1-pT	F1-S1-pL	PM-S1-Pt	PM-S1-pL	F3-S1-pT	F3-S1-pL
KV	4	9,23	8,96	15	15	15	15	15	15	15
KP		30	30	8,25	9	9,45		0,15		4,8
AU/QL		0,0104	0,0008	0,0013	0,0138	0,01117	0,0020	0,0024	0,0021	0,00066

Legenda: 1: marker; 2: vzorec primarnega supernatanta (S1); 3: supernatant primarnega supernatanta po ponovnem centrifugiranju (S2-S1); 4: supernatant primarne oborine po ponovnem centrifugiranju (S2-P1); 5: prva frakcija primarnega supernatanta po centrifugiranju v gradientu raztopljen v pufru Tris (F1-S1-pT); 6: prva frakcija primarnega supernatanta po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo (F1-S1-pL); 7: druga frakcija primarnega supernatanta po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru Tris (PM-S1-pT); 8: druga frakcija primarnega supernatanta po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo (PM-S1-pL); 9: tretja frakcija primarnega supernatanta po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru Tris (F3-S1-pT); 10: tretja frakcija primarnega supernatanta po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo (F3-S1-pL); KV: količina vzorca v  $\mu$ L; KP: količina proteinov v  $\mu$ g; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov.



Slika 12: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov iz primarnega supernatanta (S1) pri različnih fazah izolacije/obogatitve membranskih proteinov, iz tkiva človeškega želodca, po prirejenem protokolu (Canadi Jurešić in Blagović, 2011). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 1.



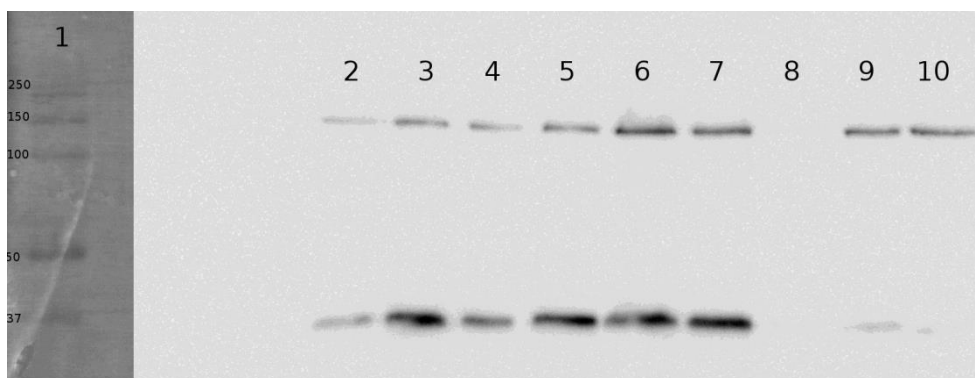
Slika 13: Membrana z vzorci izoliranih proteinov iz S1 pri različnih fazah izolacije/obogatitve membranskih proteinov, iz tkiva človeškega želodca, po prirejenem protokolu (Canadi Jurešić in Blagović, 2011), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 1.

V Preglednici 2 ter Slikah 14 in 15 so prikazani vzorci izoliranih proteinov iz primarne oborine (P1) pri različnih fazah izolacije/obogatitve membranskih proteinov ter njihova primerjava z vzorcem celokupnih proteinov. Najmočnejši signal smo dobili pri vzorcu tretje frakcije primarne oborine po centrifugiranju v saharoznem gradientu, raztopljeni v pufru za lizo (F3-P1-pL, žepek 7). Sorazmerno močan signal smo dobili tudi pri analiziranem supernatantu dodatno centrifugirane frakcije plazemskih membran, raztopljenih v pufru za lizo (PM-S3-pL žepek 9); signal in AU/QL sta močnejša kot brez dodatnega centrifugiranja. Vzorec celokupnih proteinov (CP, žepek 10) ni izstopal glede na ostale vzorce.

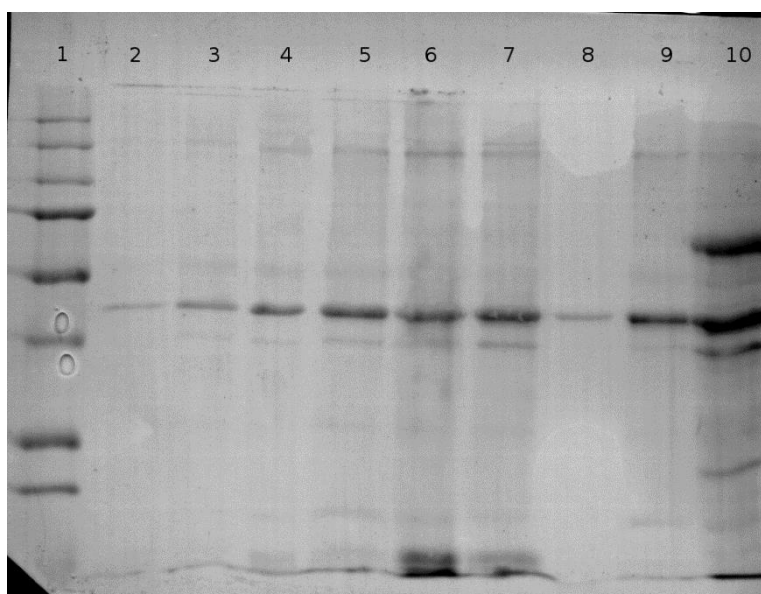
Preglednica 2: Prikazuje vzorce primarne oborine prilagojenega protokola za obogatitev plazemskih proteinov, prirjenega po (Canadi Jurešić in Blagović, 2011).

Žepček	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorec	M	F1-P1-pT	F1-P1-pL	PM-P1-pT	PM-P1-pL	F3-P1-pT	F3-P1-pL	S3-P1-pT	S3-P1-pL	CP
KV	4	15	15	15	15	15	15	15	15	2,75
KP		4,95	7,2	9,75	12	46,5	14,25	/	9,75	30
AU/QL		0,0006	0,0016	0,0011	0,0010	0,0030	0,0023	0,0028	0,0017	0,0020

Legenda: 1: marker; 2: prva frakcija primarne oborine po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru Tris (F1-P1-pT); 3: prva frakcija primarne oborine po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo (F1-P1-pL); 4: druga frakcija primarne oborine po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru Tris (PM-P1-pT); 5: druga frakcija primarne oborine po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo (PM-P1-pL); 6: tretja frakcija primarne oborine po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru Tris (F3-P1-pT); 7: tretja frakcija primarne oborine po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo (F3-P1-pL); 8: supernatant dodatno centrifugirane druge frakcije primarne oborine, raztopljene v pufru Tris (S3-P1-pT); 9: supernatant dodatno centrifugirane druge frakcije primarne oborine, raztopljene v pufru za lizo (S3-P1-pL); 10: vzorec po protokolu za izolacijo celokupnih proteinov (CP); KV: količina vzorca v  $\mu\text{L}$ ; KP: količina proteinov v  $\mu\text{g}$ ; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov.



Slika 14: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov iz primarne oborine (P1) pri različnih fazah izolacije/obogatitve membranskih proteinov, iz tkiva človeškega želodca, po prirejenem protokolu (Canadi Jurešić in Blagović, 2011). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 2.



Slika 15: Membrana z vzorci izoliranih proteinov iz P1 pri različnih fazah izolacije/obogatitve membranskih proteinov, iz tkiva človeškega želodca, po prirejenem protokolu (Canadi Jurešić in Blagović, 2011), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 2.

#### 4.1.4 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov III

S protokolom smo poskusili obogatiti membranske proteine, ker je ta uspešno deloval pri izolaciji plazemskih membran iz glivnih celic. Za poskus smo uporabili človeški želodec. Poleg centrifugiranja v saharoznem gradientu smo poskusili dobiti obogatene proteine plazemske membrane z dodatnimi centrifugiranjem in raztapljanjem s pufrom RIPA ali pufrom za lizo. Vzorce smo analizirali s prenosom western in imunodetekcijo. V Preglednici 3 in na Slikah 16 in 17 sta prikazana vzorca dodatno centrifugiranih plazemskih membran, plazemske membrane večjega vzorca, njegova prva frakcija v pufri B in plazemske membrane primarnega supernatanta (S1) manjšega vzorca. Signal vidimo pri dvakrat dodatno centrifugirani frakciji plazemskih membran primarne oborine večjega vzorca, raztopljenega v pufri za lizo (P4-P1-pR-V, žepok 3). Približno enako močno se vidi prva

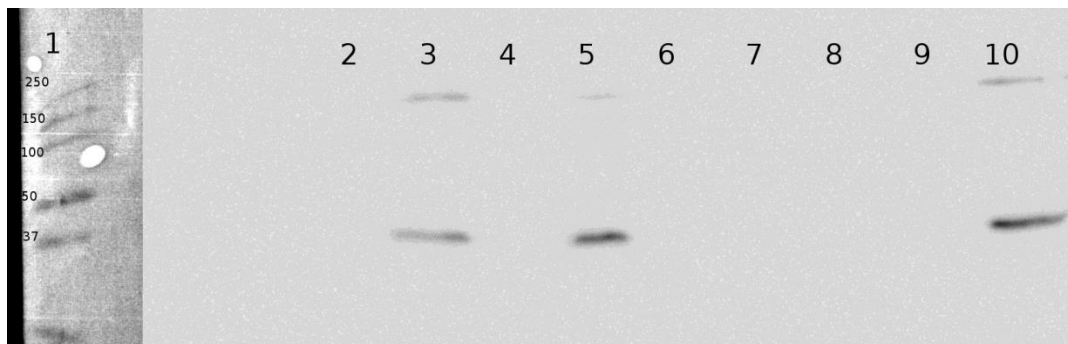


pobrana frakcija primarne oborine po centrifugiranju v gradientu večjega vzorca, ki smo jo pustili v pufru B (F1-P1-V, žepok 10). Zelo šibek signal smo dobili pri dvakrat centrifugirani frakciji plazemskih membran primarne oborine večjega vzorca, raztopljenega v pufru za lizo (P4-P1-pL-V, žepok 5).

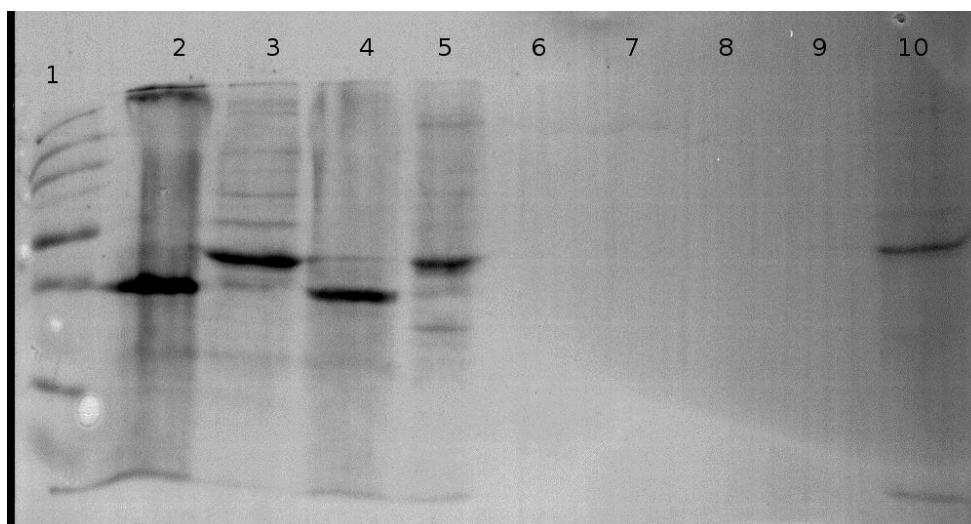
Preglednica 3: Vzorci plazemskih membran v pufru RIPA ali pufru za lizo po protokolu Turk in Plemenitaš (2003).

Žepok	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorec	Marker	S5-P1-pR-M	S5-P1-pL-M	P4-P1-pR-V	P4-P1-pL-V	P4-S1-pR-V	P4-S1-pL-V	P4-S1-pR-M	P4-S1-pL-M	F1-P1-V
KV		15	4,1	15	1,85	10	10	10	10	10
KP			30		30					
AU/QL		0,0025	0,0017	0,0018	0,0011	0,0025	0,0026	0,0025	0,0021	0,0020

Legenda: 1: marker; 2: supernatant dvakratno centrifugiranih plazemskih membran primarne oborine manjšega vzorca, raztopljenih v pufru RIPA (S5-P1-pR-M); 3: supernatant dvakratno centrifugiranih plazemskih membran primarne oborine manjšega vzorca, raztopljenih v pufru za lizo (S5-P1-pL-M); 4: frakcija plazemskih membran primarne oborine večjega vzorca, raztopljenega v pufru RIPA (P4-P1-pR-M); 5: frakcija plazemskih membran primarne oborine večjega vzorca, raztopljenega v pufru za lizo (P4-P1-pL-V); 6: frakcija plazemskih membran primarnega supernatanta večjega vzorca, raztopljenega v pufru RIPA (P4-S1-pR-V); 7: frakcija plazemskih membran primarnega supernatanta večjega vzorca, raztopljenega v pufru za lizo (P4-S1-pL-V); 8: frakcija plazemskih membran primarnega supernatanta manjšega vzorca, raztopljenega v pufru RIPA (P4-S1-pR-M); 9: frakcija plazemskih membran primarnega supernatanta manjšega vzorca, raztopljenega v pufru za lizo (P4-S1-pL-M); 10: prva frakcija primarne oborine večjega vzorca po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru B (F1-P1-V); KV: količina vzorca v  $\mu\text{L}$ ; KP: količina proteinov v  $\mu\text{g}$ ; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov.



Slika 16: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov iz frakcije plazemskih membran izoliranih iz človeškega želodca, po protokolu, prirejenem po Turk in Pleminitaš (2003). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 3.



Slika 17: Membrana z vzorci izoliranih proteinov iz frakcije plazemskih membran izoliranih iz človeškega želodca, po protokolu, prirejenem po Turk in Plemenitaš (2003), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 3.

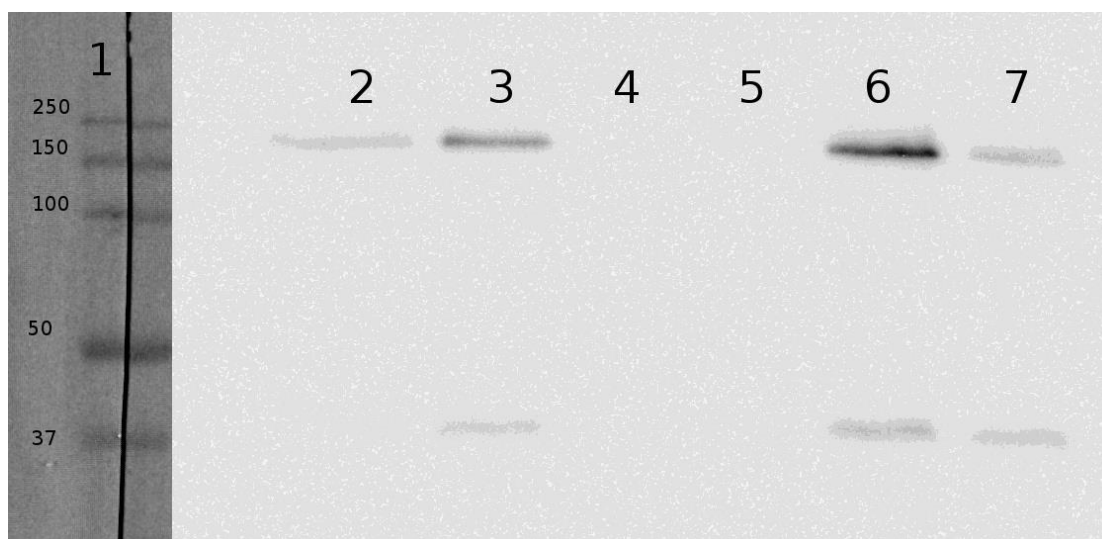
Pri drugem gelu nam prenos western na membrano ni uspel.

V Preglednici 4 in na Slikah 18 in 19 se vidijo vzorci supernatantov S4 po centrifugiranju frakcije s plazemskimi membranami, ki so se čez noč raztapljali v pufru B, ter njihova primerjava z vzorcema celokupnih proteinov (CP, žepok 6) in proteinov po protokolu za obogatitev plazemskih proteinov I (OPP-I, žepok 7). Najmočnejši signal in AU/QL smo dobili pri vzorcu celokupnih proteinov. Pri supernatantu centrifugirane frakcije plazemskih membran primarne oborine večjega vzorca (S4-P1-pB-V, žepok 3) smo dobili veliko slabši signal, AU/QL pa je imel vrednost polovice vzorca celokupnih proteinov. Približno enako močan signal imata vzorca supernatanta po centrifugiranju frakcije s plazemskimi membranami (S4-P1-pB-M, žepok 2) in proteinov po protokolu za obogatitev plazemskih proteinov I. Supernatanta centrifugirane frakcije plazemskih membran primarnih supernatantov (S4-S1-Pb-V in M, žepka 4 in 5) nimata signala.

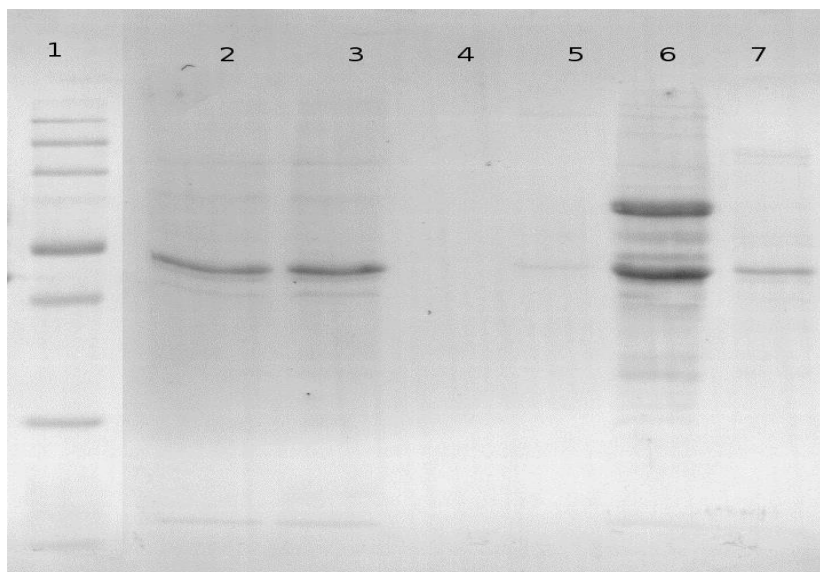
Preglednica 4: Prikazuje vzorce supernatantov po centrifugiranju frakcije s plazemskimi membranami. Za primerjavo sta vzorca celokupnih proteinov ter proteinov, izoliranih po protokolu za obogatitev plazemskih proteinov I.

Žepček	1	2	3	4	5	6	7
Vzorec	Marker	S4-P1-pB-M	S4-P1-pB-V	S4-S1-pB-V	S4-S1-pB-M	CP	OPP-I
KP		30	30	/	/	30	30
KV		14,2	6,05	15	15	2,75	3
AU/QL		0,0007	0,0015	0,0022	0,0023	0,0032	0,0018

Legenda: 1:marker; 2: supernatant po centrifugiranju frakcije plazemskih membran primarne oborine manjšega vzorca (S4-P1-pB-M); 3: supernatant po centrifugiranju frakcije plazemskih membran primarne oborine večjega vzorca (S4-P1-pB-V); 4: supernatant po centrifugiranju frakcije plazemskih membran primarnega supernatanta večjega vzorca (S4-S1-pB-V); 5: supernatant po centrifugiranju frakcije plazemskih membran primarnega supernatanta manjšega vzorca (S4-S1-pB-M); 6: vzorec celokupnih proteinov (CP); 7: vzorec proteinov po protokolu za obogatitev plazemskih proteinov I; KV: količina vzorca v  $\mu\text{L}$ ; KP: količina proteinov v  $\mu\text{g}$ ; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov.



Slika 18: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih proteinov iz supernatantov (S4) po centrifugiranju frakcije s plazemskimi membranami izoliranih iz človeškega želodca, po prirejenem protokolu Turk in Plemenitaš (2003). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 4.



Slika 19: Membrana z vzorci izoliranih proteinov iz supernatanta (S4) centrifugirane frakcije s plazemskimi membranami izoliranih iz človeškega želodca, prirejeno po protokolu Turk in Plemenitaš (2003), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 4.

#### 4.1.5 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov IV

S tem protokolom smo poskusili izolirati proteine plazemske membrane iz nuklearnega (N) in mikrosomalnega (M) dela tkivnega homogenata, iz katerega izoliramo plazemske membrane v izotonični saharozi z uporabo centrifugiranja v saharoznem gradientu. Za poskus smo uporabili svinjski želodec. Preizkusili smo vpliv različnih časov centrifugiranja v saharoznem gradientu in različnih ekstrakcijskih pufrov na uspešnost obogatitve plazemskih proteinov. Različne čase smo uporabili zato, ker se naša ultracentrifuga razlikuje od tistih v člankih, posamezni pufri pa lahko boljše ali slabše ekstrahirajo proteine plazemske membrane. Rezultati so pokazali, da različni časi centrifugiranja v gradientu in uporaba različnih pufrov lahko vplivajo na uspešnost obogatitve.

##### Postopek I

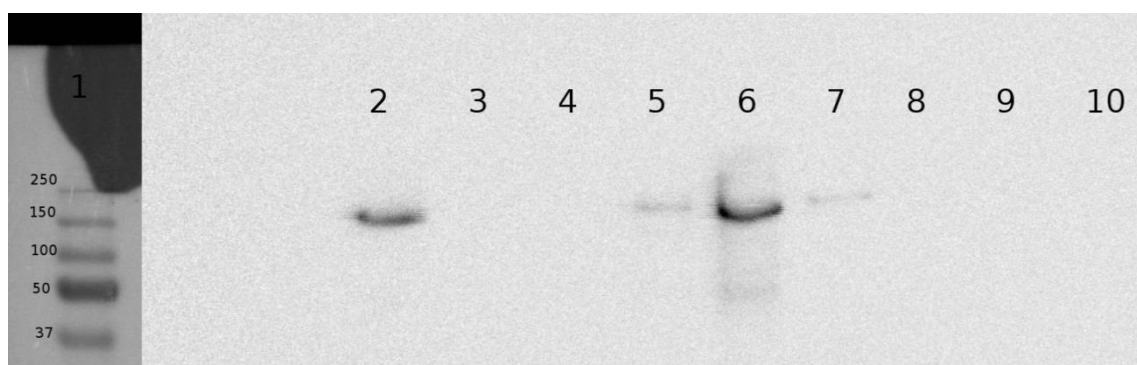
Vzorci smo analizirali s prenosom western in imunodetekcijo. V Preglednici 5 in na Slikah 20 in 21 so pobrane frakcije po 16-urnem centrifugiranju v saharoznem gradientu posameznega vzorca in alikvot primarnega homogenata. Najmočnejši signal smo dobili pri vzorcu oborine po centrifugiranju v gradientu nuklearnega dela homogenata, raztopljenega v pufri za lizo (P5-N4-pL, žepek 6). Dober signal smo dobili pri alikvotu primarnega homogenata (ALI, žepek 2), ki smo ga dodali za primerjavo z vzorci, centrifugiranimi v saharoznem gradientu. Vzorec tretje pobrane frakcije nuklearnega homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu, raztopljene v pufri za lizo (P5-N3-pL, žepek 5), kjer naj bi se nahajali mitohondriji in manjši del plazemskih membran, se na membrani slabo vidijo. Vzorec druge pobrane frakcije nuklearnega dela homogenata po centrifugiranju v gradientu, kjer naj bi bila večina plazemskih membran, se na membrani ne vidi. Prav tako se na membrani ne vidijo vzorci plazemskih frakcij mikrosomalnega dela homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu. Šibek signal smo dobili le pri prvi pobrani frakciji

mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljeni v pufru za lizo (P5-M1-pL, žepček 7), kjer naj bi se nahajale samo maščobe.

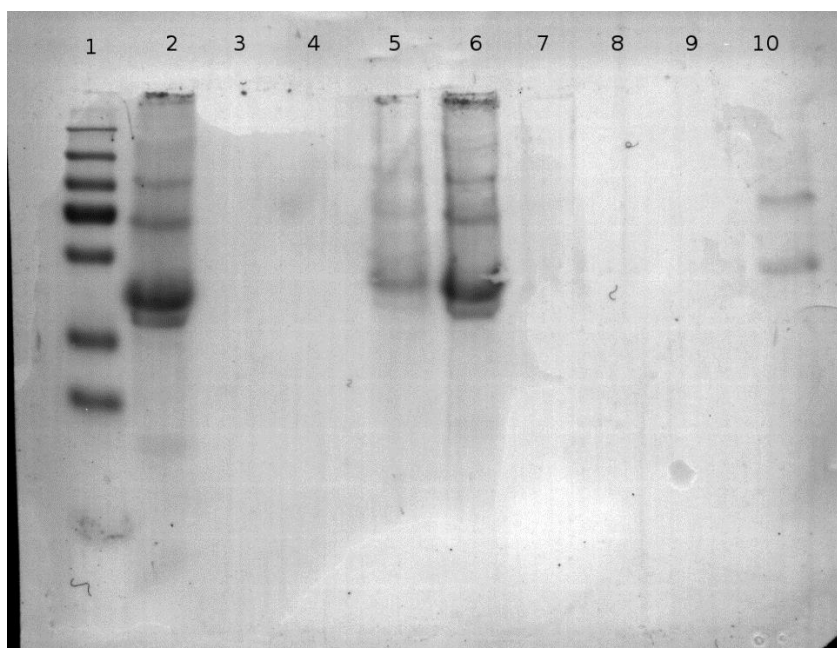
Preglednica 5: Prikazuje vzorce primarnega alikvota in vzorce po 16-urnem centrifugiranju v gradientu.

Žepček	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorec	Marker	ALI	P5-N1-pL	P5-N2-PM-pL	P5-N3-pL	P5-N4-pL	P9-M1-pL	P9-M2-pL	P9-M3-pL	P9-M4-pL
KV	4	10,14	18	18	18	5,10	18	18	18	13,76
KP		30	/	/	24,66	30	4,86	/	3,24	30
AU/QL		0,0043	0,0025	0,0026	0,0016	0,0043	0,0025	0,0023	0,0002	0,0002

Legenda: 1: marker; 2: vzorec primarnega homogenata (ALI); 3: prva frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljeni v pufru za lizo (P5-N1-pL); 4: druga frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljeni v pufru za lizo (P5-N2-PM-pL); 5: tretja frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljeni v pufru za lizo (P5-N3-pL); 6: četrta frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljeni v pufru za lizo (P5-N4-pL); 7: prva frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu raztopljeni, v pufru za lizo (P9-M1-pL); 8: druga frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljeni v pufru za lizo (P9-M2-pL); 9: tretja frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljeni v pufru za lizo (P9-M3-pL); 10: četrta frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljeni v pufru za lizo (P9-M4-pL); KV: količina vzorca v  $\mu$ L; KP: količina proteinov v  $\mu$ g; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov. Oborine pri merjenju absorbnosti pri vzorcih: ALI, P5-N3-pL, P5-N4-pL.



Slika 20:Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih nuklearnega (N) in mikrosomalnega (M) homogenata po 16-urnem centrifugiranju v saharoznem gradientu, izoliranih iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Touster in sod., 1970). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 5.



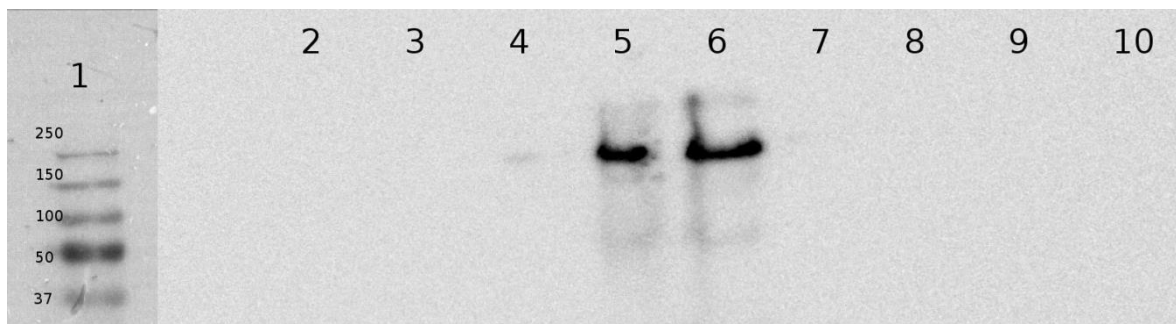
Slika 21: Membrana z vzorci izoliranih proteinov nuklearnega (N) in mikrosomalnega (M) homogenata po 16-urnem centrifugiranju v saharoznem gradientu, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Touster in sod., 1970), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 5.

V Preglednici 6 in na Slikah 22 in 23 se vidijo vzorci nuklearnega in mikrosomalnega homogenata po 2-urnem centrifugiranju v saharoznem gradientu in vzorec supernatanta (S8) po 100-minutnem ultracentrifugiranju. Najmočnejši signal smo dobili pri vzorcu četrte frakcije nuklearnega homogenata, raztopljenega v pufru za lizo (P5-N4-pL, žepček 6). Skoraj enako močan signal in AU/QL smo dobili pri vzorcu tretje frakcije nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljenega v pufru za lizo. V slednjem naj bi se po teoriji nahajal del plazemskih membran. Vzorec druge frakcije nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo (P5-PM-N2-pL, žepček 4), kjer naj bi se nahajala večina plazemskih membran, ni imel signala. Prav tako nismo dobili signala pri nobenem vzorcu mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljenega v pufru za lizo, in pri vzorcu ultracentrifugiranega supernatanta (S8).

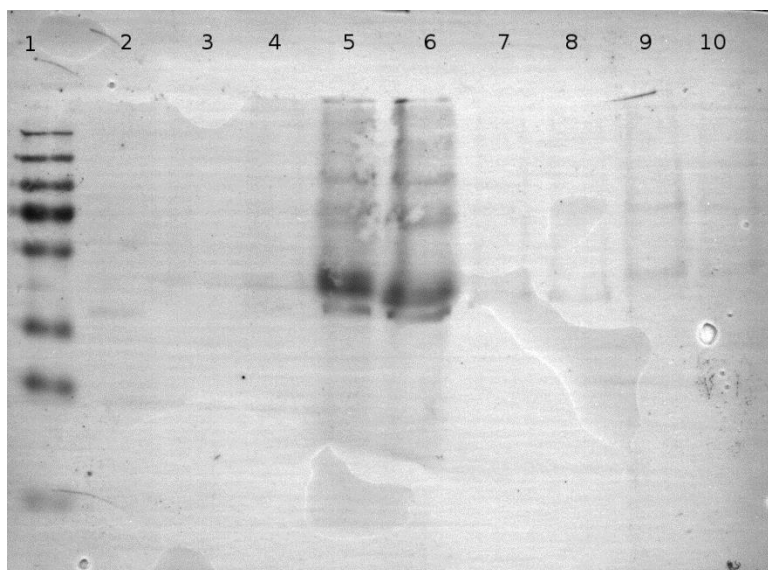
Preglednica 6: Preglednica prikazuje vzorce po 2-urnem gradientnem centrifugiranju in vzorec supernatanta (S8).

Žepček	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorec	Marker	S8	P5-N1-pL	P5-PM-N2-pL	P5-N3-pL	P5-N4-pL	P9-M1-pL	P9-PM-M2-pL	P9-M3-pL	P9-M4-pL
KV	4	18	18	18	18	4,31	18	18	18	18
KP		1,44	/	3,96	5,22	30	8,64	1,08	5,58	4,32
AU/QL		0,0002	0,0001	0,0002	0,0006	0,0007	0,0002	0,0002	0,0002	0,0002

Legenda Preglednice 6: 1: marker; 2: supernatant po ultracentrifugiranju (S8); 3: prva frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo (P5-N1-pL); 4: druga frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo (P5-PM-N2-pL); 5: tretja frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo (P5-N3-pL); 6: četrta frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo (P5-N4-pL); 7: prva frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo (P9-M1-pL); 8: druga frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo (P9-PM-M2-pL); 9: tretja frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo (P9-M3-pL); 10: četrta frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo (P9-M4-pL); KV: količina vzorca v  $\mu\text{L}$ ; KP: količina proteinov v  $\mu\text{g}$ ; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov. Oborina pri vzorcu P5-N4-pL.



Slika 22: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov nuklearnega (N) in mikrosomalnega (M) homogenata po 2-urnem centrifugiranju v gradientu, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Touster in sod., 1970). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 6.



Slika 23: Membrana z vzorci izoliranih proteinov nuklearnega (N) in (M) mikrosomalnega homogenata po 2-urnem centrifugiranju v gradientu, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Touster in sod., 1970), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 6.

## Postopek II

Pri ponovitvi protokola smo preizkusili uspešnost različnih časov centrifugiranja v saharoznem gradientu, ki smo jih preračunali z aplikacijo na spletni strani proizvajalca centrifug. Preizkusili smo tudi uspešnost potovanja plazemskih membran, če vzorec naložimo na vrhno plast v ultracentrifugirki, in njihovo raztapljanje v različnih pufrih.

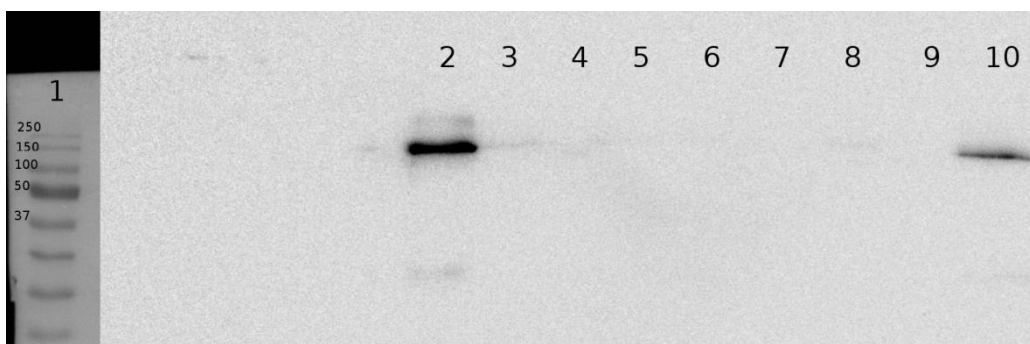
Vzorci smo analizirali s prenosom western in imunodetekcijo. V Preglednici 7 in na Slikah 24 in 25 so prikazani vzorci alikvotov primarnega homogenata in vzorci mikrosomalnega homogenata po 8-urnem centrifugiranju v gradientu ter njihova primerjava z vzorcem pridobljenim po protokolu za izolacijo celokupnih proteinov. Najmočnejši signal in AU/QL imata vzorec primarnega homogenata (ALI, žepek 2) in vzorec celokupnih proteinov (CP, žepek 10). Pri vseh ostalih vzorcih na prenosu Western nismo dobili signala. Tudi pri tistih vzorcih ne, pri katerih naj bi po teoriji v njih bile plazemske membrane.

Preglednica 7: Prikazuje vzorce mikrosomalnega homogenata po 8-urnem centrifugiranju v gradientu.

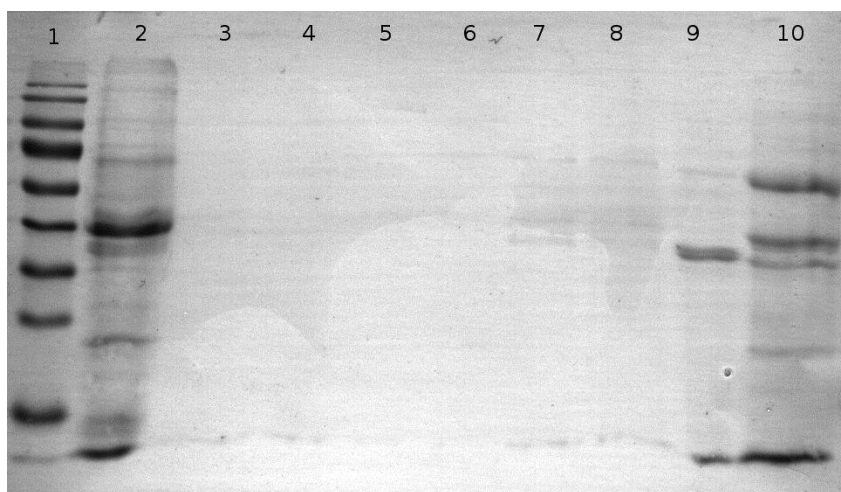
Žepek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorec	Marker	ALI	P9-PM-M2-pL	P9-PM-M2-pNP40	P9-M3-pL	P9-M3-pNP40	P9-M4-pL	P9-M4-pNP40	S8	CP
KV	4	19	19	19	19	19	19	19	19	2,75
KP		19,19	0,57	/	/	15,96	0,76	/	3,8	30
AU/QL		0,0059	0,0015	0,0017	0,0016	0,0015	0,0013	0,0014	0,0015	0,0020

Legenda Preglednice 7: 1: marker; 2: vzorec primarnega homogenata (ALI); 3: druga frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufri za lizo (P9-PM-M2-pL); 4: druga frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufri za lizo z dodatkom NP-40 (P9-PM-M2-pNP40); 5: tretja frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufri za lizo (P9-M3-pL); 6: tretja frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufri za lizo z dodatkom NP-40 (P9-M3-pNP40); 7: četrta frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufri za lizo (P9-M4-pL); 8: četrta frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufri za lizo z dodatkom NP-40 (P9-M4-pNP40); 9: supernatant po ultracentrifugiranju (S8); 10: vzorec celokupnih proteinov po protokolu za izolacijo celokupnih proteinov (CP); KV: količina vzorca v  $\mu$ L; KP: količina proteinov v  $\mu$ g; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov.





Slika 24: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov mikrosomalnega (M) homogenata po 8-urnem centrifugiranju v gradientu, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Touster in sod., 1970). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 7.



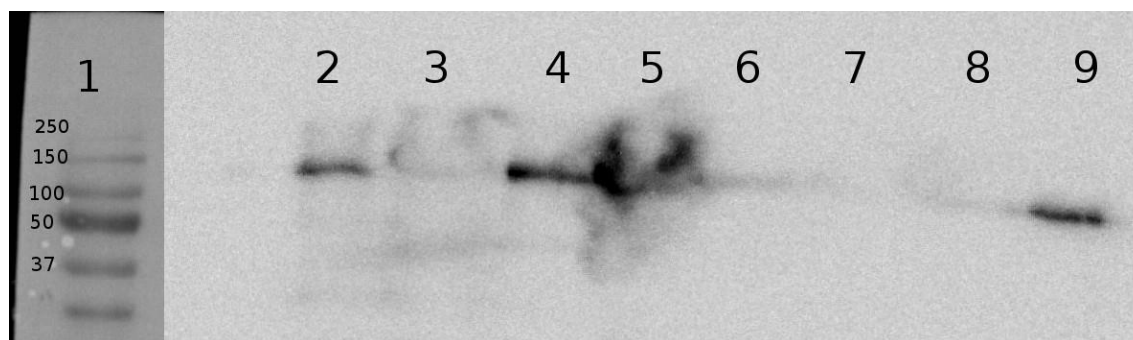
Slika 25: Membrana z vzorci izoliranih proteinov mikrosomalnega (M) homogenata po 8-urnem centrifugiranju v gradientu, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Touster in sod., 1970), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 7.

V Preglednici 8 in na Slikah 26 in 27 so prikazani vzorci nuklearnega homogenata po 8-urnem centrifugiranju v gradientu. Za primerjavo smo na membrano dali vzorec celokupnih proteinov po protokolu za izolacijo celokupnih proteinov in oborino (P7). Pri prenosu western imata najmočnejši signal in AU/QL vzorca tretje frakcije nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu (P5-N3-pL in P5-N3-pNP40, žepka 4 in 5). V teh dveh vzorcih naj bi bili mitohondriji in ostanki plazemskih membran. Pri drugi frakciji nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, kjer naj bi bilo največ plazemskih membran, se najbolje vidi vzorec, raztopljen v pufru za lizo (P5-PM-N2-pL, žepka 2). Njegova inteziteta in AU/QL sta zelo podobni vzorcju celokupnih proteinov (CP, žepka 9). Zelo šibke signale imajo tudi vzorec druge frakcije nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo z dodatkom NP40 (P5-PM-N2-pNP40, žepka 3), četrta frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo (P5-N4-pL, žepka 6), in vzorec oborine po 3-kratnem spiranju ekstraktnega dela (P7-pL, žepka 8).

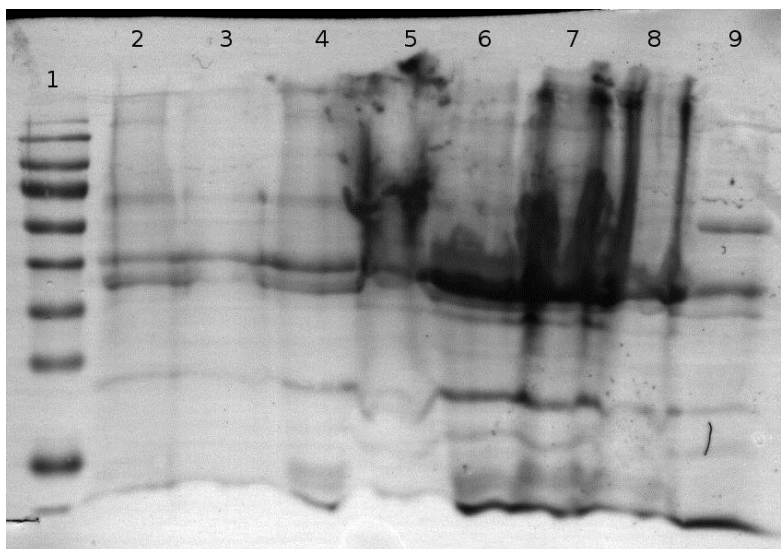
Preglednica 8: Prikazuje vzorce nuklearnega homogenata po 8-urnem centrifugiranju v gradientu raztopljenе v dveh različnih pufrih.

Žepček	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vzorec	Marker	P5-PM-N2-pL	P5-PM-N2-pNP40	P5-N3-pL	P5-N3-pNP40	P5-N4-pL	P5-N4-pNP40	P7-pL	CP
KV	4	19	19	6,04	19	7,94	11,50	13,50	2,75
KP		7,79	/	30	/	30	30	30	30
AU/QL		0,0019	0,0019	0,0033	0,0113	0,0022	0,0012	0,0013	0,0018

Legenda: 1: marker; 2: druga frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljenā v pufri za lizo (P5-PM-N2-pL); 3: druga frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljenā v pufri za lizo z dodatkom NP-40 (P5-N2-pNP40); 4: tretja frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljenā v pufri za lizo (P5-N3-pL); 5: tretja frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljenā v pufri za lizo z dodatkom NP-40 (P5-N3-pNP40); 6: četrta frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljenā v pufri za lizo (P5-N4-pL); 7: četrta frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljenā v pufri za lizo z dodatkom NP40 (P5-N3-pNP40); 8: oborina po trikratnem centrifugiranju oborine P6, raztopljenā v pufri za lizo (P7-pL); 9: vzorec celokupnih proteinov po protokolu za izolacijo celokupnih proteinov (CP); KV: količina vzorca v  $\mu$ L; KP: količina proteinov v  $\mu$ g; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov.



Slika 26: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov nuklearnega (N) homogenata po 8-urnem centrifugiranju v gradientu, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Touster in sod., 1970). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 8.



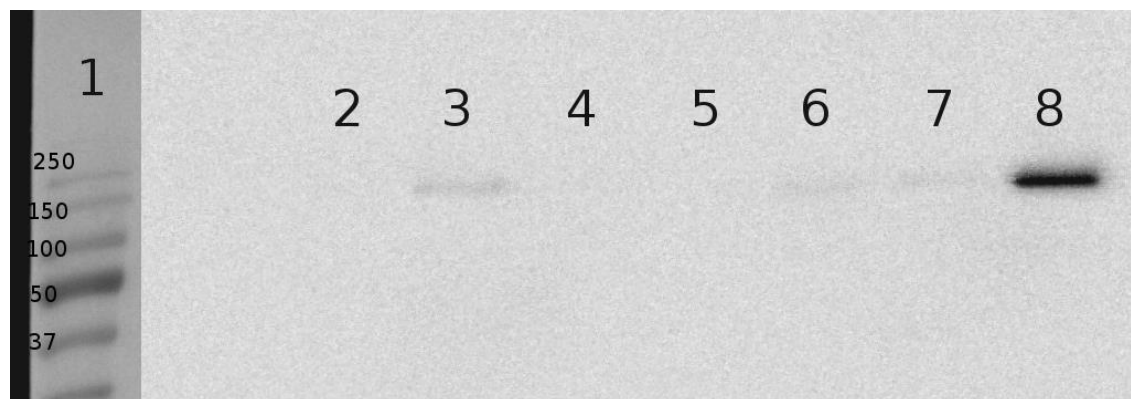
Slika 27: Membrana z vzorci izoliranih proteinov nuklearnega (N) homogenata po 8-urnem centrifugiranju v gradientu, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Touster in sod., 1970), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 8.

V Preglednici 9 in na Slikah 28 in 29 so prikazani vzorci mikrosomalnega homogenata po 16-urnem centrifugiranju v saharoznem gradientu, raztopljeni v dveh pufrih. Najmočnejši signal in AU/QL ima vzorec celokupnih proteinov po protokolu za izolacijo celokupnih proteinov (CP, žepok 8), ki smo ga dali na membrano kot primerjavo. Le zelo šibek signal smo dobili pri vzorcu druge frakcije mikrosomalnega homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu, raztopljenega v pufri za lizo z dodatkom NP-40 (P9-PM-M2-pNP40, žepok 3), kjer bi pričakovali največ plazemskih membran. Enako šibke signale imata tudi oba vzorca četrte frakcije mikrosomalnega homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufri za lizo in z dodatkom NP-40 (P9-M4-pL in P9-M4-pNP40, žepok 6 in 7).

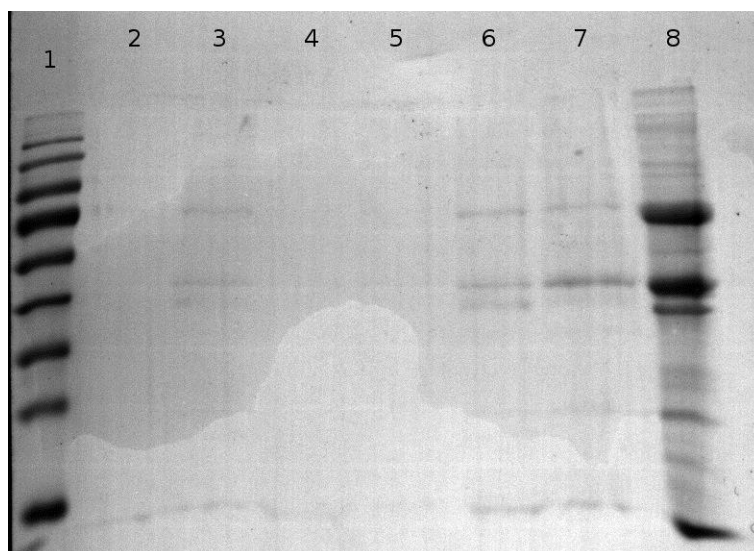
Preglednica 9: Prikazuje vzorce mikrosomalnega homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu, raztopljeni v dveh različnih pufrih.

Žepček	1	2	3	4	5	6	7	8
Vzorec	Marker	P9-PM-M2-pL	P9-PM-M2-pNP40	P9-M3-pL	P9-M3-pNP40	P9-M4-pL	P9-M4-pNP40	CP
KV	4	19	19	19	19	19	19	2,75
KP		1,52	/	/	/	/	/	30
AU/QL		0,00099	0,0014	0,0014	0,0012	0,0014	0,0013	0,0025

Legenda: 1: marker; 2: druga frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo (P9-PM-M2-pL); 3: druga frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (P9-PM-M2-pNP40); 4: tretja frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo (P9-M3-pL); 5: tretja frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (P9-M3-pNP40); 6: četrta frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo (P9-M4-pL); 7: četrta frakcija mikrosomalnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (P9-M4-pNP40); 8: vzorec celokupnih proteinov (CP); KV: količina vzorca v  $\mu\text{L}$ ; KP: količina proteinov v  $\mu\text{g}$ ; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov.



Slika 28: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov mikrosomalnega (M) homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Touster in sod., 1970). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 9.



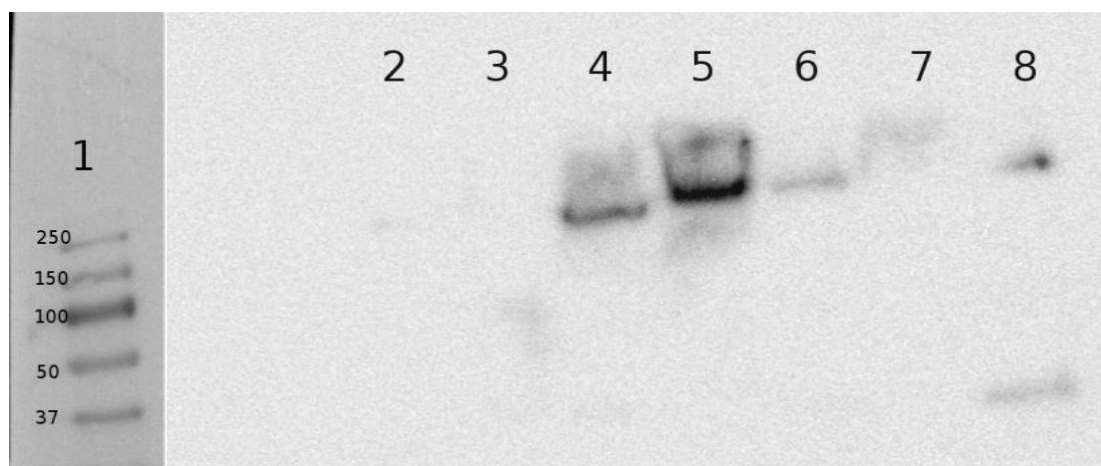
Slika 29: Membrana z vzorci izoliranih proteinov mikrosomalnega (M) homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Touster in sod., 1970), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 9.

V Preglednici 10 in na Slikah 30 in 31 so prikazani vzorci nuklearnega homogenata po 16-urnem centrifugiranju v saharoznem gradientu. Najmočnejša signala in AU/QL imata vzorca tretje frakcije nuklearnega homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu (P5-N3-pL in P5-N3-pNP40, žepka 4 in 5), pri čemer se je vzorec raztapljal bolje v pufru za lizo z dodatkom NP-40. Šibkejša signala in manjši AU/QL imata vzorca četrte frakcije nuklearnega homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu (P5-N4-pL in P5-N4-pNP40, žepka 6 in 7). Zelo šibek signal ima tudi vzorec celokupnih proteinov po protokolu za izolacijo celokupnih proteinov (CP, žepka 8).

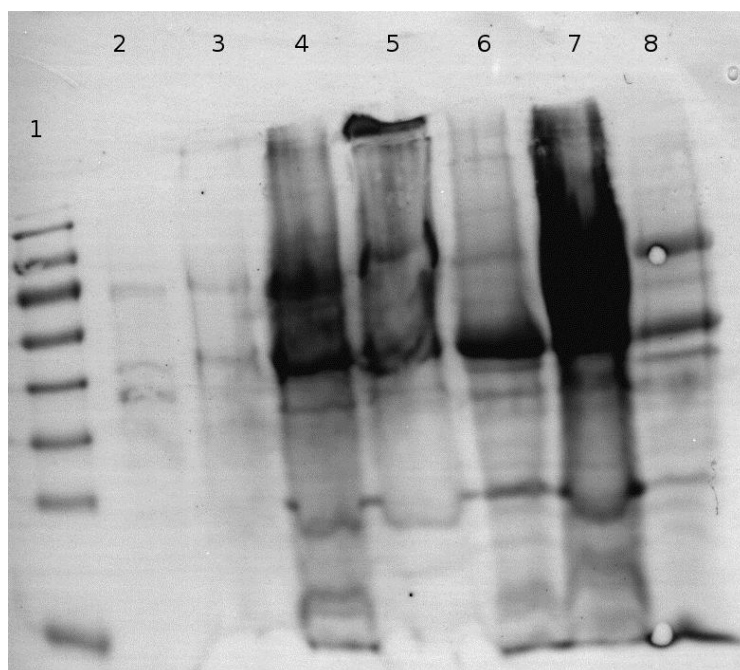
Preglednica 10: Prikazuje vzorce nuklearnega (N) homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu, raztopljene v dveh različnih pufrih.

Žepček	1	2	3	4	5	6	7	8
Vzorec	Marker	P5-PM-N2-pL	P5-PM-N2-pNP40	P5-N3-pL	P5-N3-pNP40	P5-N4-pL	P5-N4-pNP40	CP
KV	4	19	19	19	19	8,24	16	2,75
KP		6,65	/	28,31	/	30	30	30
AU/QL		0,0015	0,0017	0,0022	0,0031	0,0009	0,0010	0,0014

Legenda: 1: marker; 2: druga frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufri za lizo (P5-PM-N2-pL); 3: druga frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufri za lizo z dodatkom NP-40 (P5-N2-pNP40); 4: tretja frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufri za lizo (P5-N3-pL); 5: tretja frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufri za lizo z dodatkom NP-40 (P5-N3-pNP40); 6: četrta frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufri za lizo (P5-N4-pL); 7: četrta frakcija nuklearnega homogenata po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufri za lizo z dodatkom NP40 (P5-N3-pNP40); 8: vzorec celokupnih proteinov (CP); KV: količina vzorca v  $\mu\text{L}$ ; KP: količina proteinov v  $\mu\text{g}$ ; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov.



Slika 30: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov nuklearnega (N) homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Touster in sod., 1970). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 10.



Slika 31: Membrana z vzorci izoliranih proteinov nuklearnega (N) homogenata po 16-urnem centrifugiranju v gradientu, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Touster in sod., 1970), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 10.

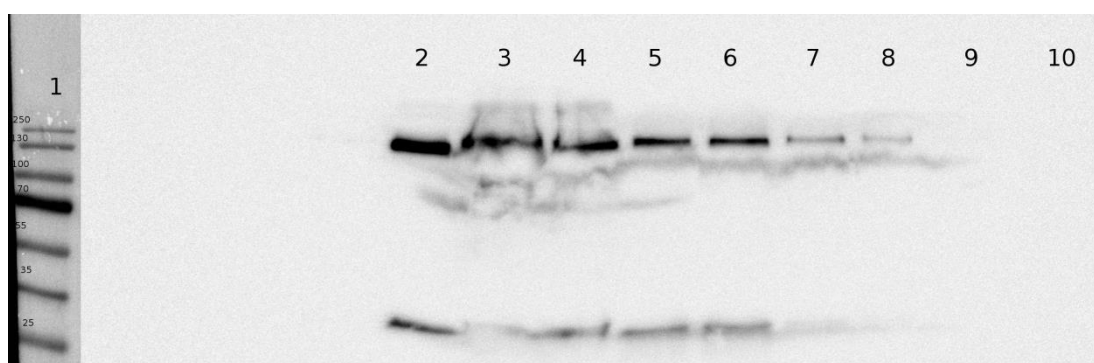
#### 4.1.6 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov V

Preizkusili smo protokol, ki so ga avtorji uporabili za izolacijo maščobnih kislin iz normalnega in rakavega tkiva človeških ledvic. Zato smo predvidevali, da bi bil protokol primeren, da ga priredimo in uporabimo za izolacijo in obogatitev plazemskih proteinov. Za poskus smo uporabili svinjski želodec. Dobljene vzorce smo analizirali s prenosom western in imunodetekcijo. Najmočnejši signal in AU/QL smo dobili pri vzorcu celokupnih proteinov (CP, žepok 2), po protokolu za izolacijo celokupnih proteinov, ki smo ga dodali za primerjavo ostalim vzorcem. Nekoliko šibkejši signal in podoben AU/QL imata vzorca primarnih homogenatov (UT-ALI in GD-ALI, žepka 3 in 4) ter vzorca supernatantov po prvem centrifugiranju (UT-S1 in GD-S1, žepka 5 in 6). Šibek signal imata vzorca supernatantov po tretjem centrifugiranju (UT-S3 in GD-S3, žepka 7 in 8). Vzorca po centrifugiranju v saharoznem gradientu, kjer naj bi bile plazemske membrane (UT-PM-P4-pL in GD-PM-P4pL, žepka 9 in 10), nimata signala.

Preglednica 11: Prikazuje vzorce na različnih stopnjah protokola.

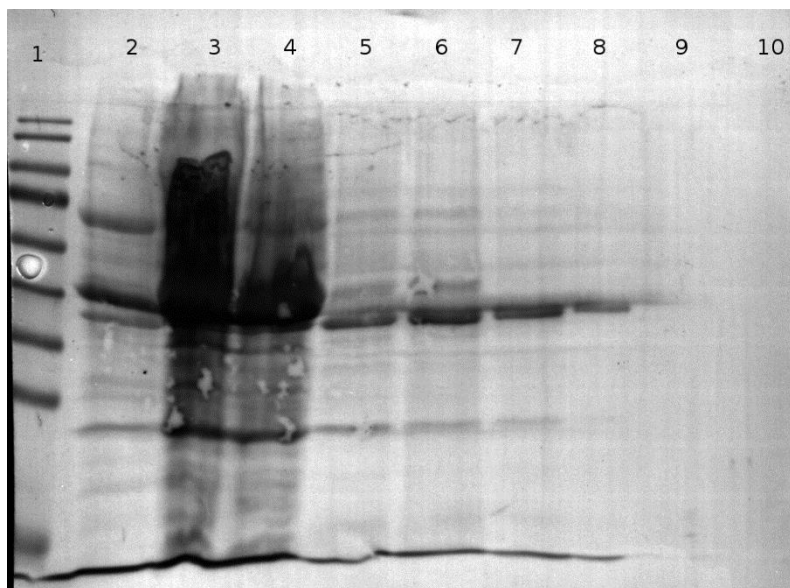
Žepok	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorec	Marker	CP	UT-ALI	GD-ALI	UT-S1	GD-S1	UT-S3	GD-S3	UT-PM-P4-pL	GD-PM-P4-pL
KV	4	2,72	18	18	18	18	18	18	18	18
KP		30	29,286	22,86	14,76	16,74	5,328	/	/	/
AU/QL		0,0184	0,0101	0,0080	0,0077	0,0080	0,0022	0,0017	0,0077	0,0074

Legenda Preglednice 11: 1: marker; 2: celokupni proteini (CP); 3: primarni homogenat, homogeniziran do utekočinjenja (UT-ALI); 4: primarni homogenat, homogeniziran z 10-imi potegi v Dounce homogenizatorju (GD-ALI); 5: supernatant po prvem centrifugiranju, primarni vzorec, homogeniziran do utekočinjenja(UT-S1); 6: supernatant po prvem centrifugiranju, primarni vzorec, homogeniziran z 10-imi potegi homogenizatorja (GD-S1); 7: supernatant po tretjem centrifugiranju, primarni vzorec, homogeniziran do utekočinjenja (UT-S3); 8: supernatant po tretjem centrifugiranju, primarni vzorec, homogeniziran z 10-imi potegi homogenizatorja (GD-S3); 9: frakcija s plazemskimi membranami po centrifugiranju v gradientu, primarni vzorec, homogeniziran do utekočinjenja (UT-PM-P4-pL); 10: frakcija s plazemskimi membranami po centrifugiranju v gradientu, primarni vzorec, homogeniziran z 10-imi potegi homogenizatorja (GD-PM-P4-pL); KV: količina vzorca v  $\mu\text{L}$ ; KP: količina proteinov v  $\mu\text{g}$ ; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov. Oborine pri merjenju absorbnosti pri vzorcih UT-ALI in GD-ALI.



Slika 32: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov iz vzorcev na različnih stopnjah protokola, iz tkiva svinjskega želodca, prirejenega po Hoffmann in sod., (2005). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 11.





Slika 33: Membrana z vzorci izoliranih proteinov na različnih stopnjah protokola, iz tkiva svinjskega želodca, prirejenega po Hoffmann in sod., (2005), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 11.

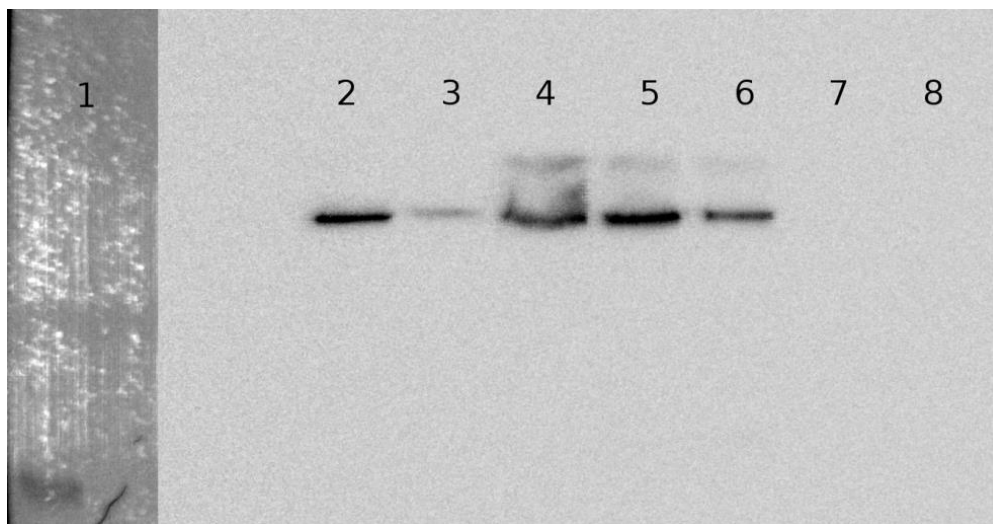
#### 4.1.7 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov VI

Preizkusili smo protokol, ki so ga avtorji uporabili za izolacijo plazemskih membran, ki predstavljajo celotno površino jetrne celice. Mi smo hoteli uporabiti in prirediti protokol za izolacijo proteinov plazemskih membran na želodčnem tkivu. Za poskus smo uporabili svinjski želodec. Da bi izboljšali izolacijo/obogatitev, smo uporabili krajši čas centrifugiranja v saharoznem gradientu, pri čemer smo uporabili aplikacijo na spletni strani proizvajalca centrifug, in raztopili dobljene plazemske membrane z različnima pufroma. Vzorce smo analizirali s prenosom western in imunodetekcijo. V Preglednici 12 in na Slikah 34 in 35 so prikazani vzorci na različnih fazah izolacije in po 33-minutnem (krajšem) centrifugiranju v saharoznem gradientu. Najmočnejši signal in AU/QL imata vzorec oborine po centrifugiranju v saharoznem gradientu, raztopljen v pufu RIPA (P4-F1-pR, žepek 5), in vzorec celokupnih proteinov po protokolu za izolacijo celokupnih proteinov (CP, žepek 2). Dober signal imata vzorec frakcije oborine po centrifugiranju v saharoznem gradientu, raztopljen v pufu za lizo, in vzorec oborine po drugem centrifugiranju (P4-F1-pL in P2, žepek 6 in 4). Slabši signal ima vzorec supernatanta po tretjem centrifugiranju (S3, žepek 3). Vzorca, kjer naj bi bile plazemske membrane, nimata signala.

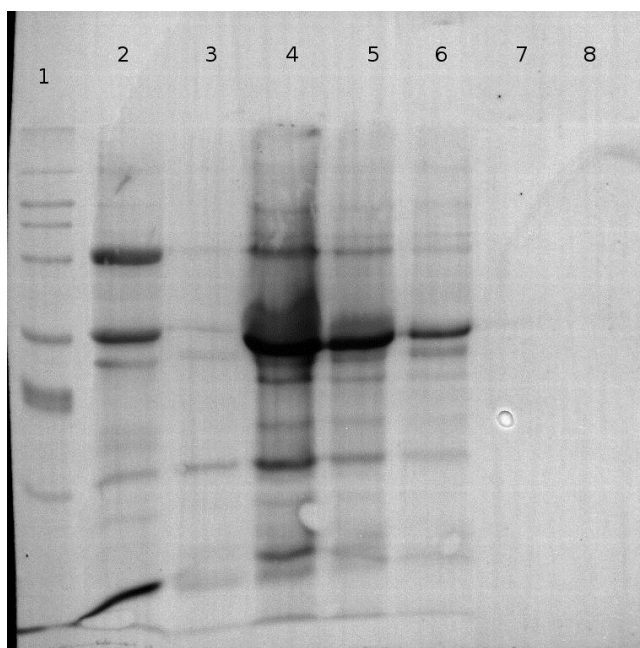
Preglednica 12: Prikazuje vzorce po 33-minutnem (krajšem) centrifugiranju v saharoznem gradientu.

Žepek	1	2	3	4	5	6	7	8
Vzorec	Marker	CP	S3	P2	P4-F1-pR	P4-F1-pL	P4-PM-pR	P4-PM-pL
KV	4	2,72	18	8,52	18	18	18	18
KP		30	5,58	30		14,22		
AU/QL		0,0022	0,0011	0,0021	0,0024	0,0017	0,0021	0,0023

Legenda Preglednice 12: 1: marker; 2: celokupni proteini (CP); 3: supernatant po tretjem centrifugiranju (S3); 4: oborina po drugem centrifugiranju (P2); 5: oborina po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufri RIPA (P4-F1-pR); 6: oborina po centrifugiranju v gradientu, raztopljena v pufri za lizo (P4-F1-pL); 7: plazemske membrane, raztopljene v pufri RIPA (P4-PM-pR); 8: plazemske membrane, raztopljene v pufri za lizo (P4-PM-pL); KV: količina vzorca v  $\mu\text{L}$ ; KP: količina proteinov v  $\mu\text{g}$ ; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov. Oborine pri merjenju absorbnosti pri vzorcih: P2, P4-F1-pR in P4-F1-pL.



Slika 34: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov po 33-minutnem (krajšem) centrifugiranju v saharoznem gradientu, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu Hubbard in sod., (1983). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 12. Marker se zaradi napačnega barvila ne vidi.



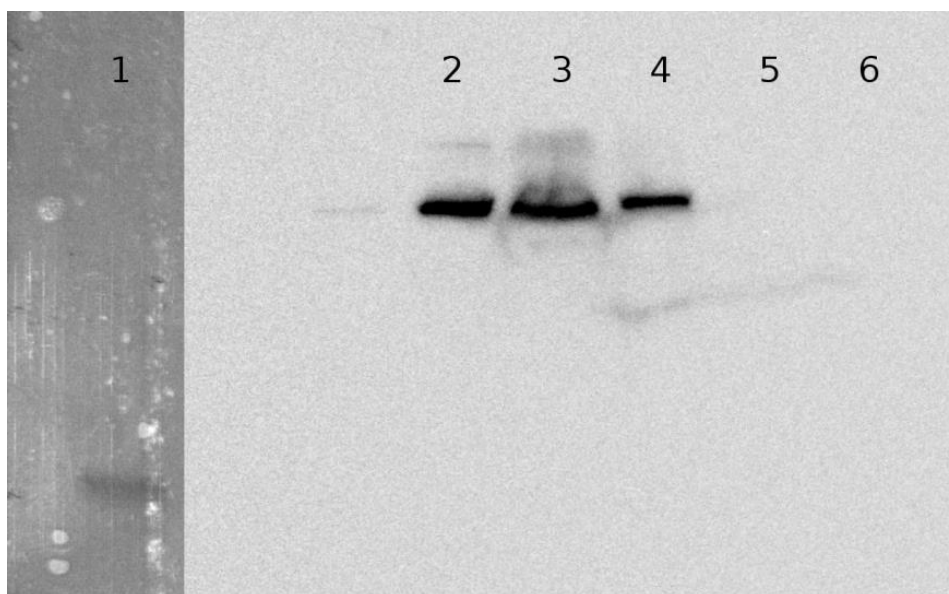
Slika 35: Membrana z vzorci izoliranih proteinov po 33-minutnem (krajšem) centrifugiranju v saharoznem gradientu, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protoklu Hubbard in sod., (1983), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 12.

V Preglednici 13 in na Slikah 36 in 37 so prikazani vzorci po 60-minutnem centrifugiranju v saharoznem gradientu. Najmočnejši signal in AU/QL ima vzorec celokupnih proteinov (CP, žepka 2), ki smo ga dodali za primerjavo. Skoraj enako močna sta vzorca frakcije oborin po centrifugiranju v saharoznem gradientu (P4-F1-pR in P4-F1-pL, žepka 3 in 4). Vzorca, kjer naj bi bile plazemske membrane, nimata signala.

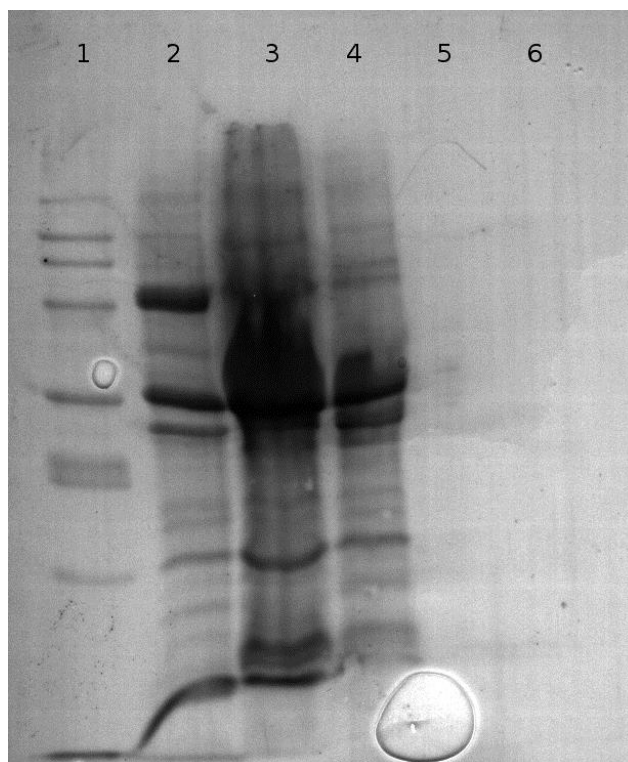
Preglednica 13: Prikazuje vzorce po 60-minutnem centrifugiranju v saharoznem gradientu.

Žepka	1	2	3	4	5	6
Vzorec	Marker	CP	P4-F1-pR	P4-F1-pL	P4-PM-pR	P4-PM-pL
KV	4	2,72	18	18	18	18
KP		30	/	23,94		
AU/QL		0,0031	0,0018	0,0022	0,0023	0,0029

Legenda: 1: marker; 2: celokupni proteini (CP); 3: oborina po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru RIPA (P4-F1-pR); 4: oborina po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo (P4-F1-pL); 5: plazemske membrane, raztopljene v pufru RIPA (P4-PM-pR); 6: plazemske membrane, raztopljene v pufru za lizo (P4-PM-pL); KV: količina vzorca v  $\mu\text{L}$ ; KP: količina proteinov v  $\mu\text{L}$ ; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov. Oborini pri merjenju absorbnosti pri vzorcih; P4-F1-pR in P4-F1-pL.



Slika 36: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov po 60-minutnem centrifugiranju v saharoznem gradientu, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Hubbard in sod., 1983). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 13. Marker se zaradi napačnega barvila ne vidi.



Slika 37: Membrana z vzorci izoliranih proteinov po 60-minutnem centrifugiranju v saharoznem gradientu, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Hubbard in sod., 1983), pobarvana z barvilom Poncea S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 13.

#### 4.1.8 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov VII

Preizkusili smo protokol, ki so ga avtorji uporabili za izolacijo integralnih in perifernih membranskih proteinov iz jeter miši, z uporabo centrifugiranja v saharoznem gradientu in

2-DE. Pri tem protokolu smo preizkusili največ različnih načinov centrifugiranja v saharoznem gradientu in različnih vrst ekstrakcije. Tako smo pri centrifugiranju v gradientu uporabljali različna časa, vzorce pa smo namesto na dno ultracentrifugirke dali na njeno vrhno plast. Pri ekstrahiranjih smo predvsem ugotavljali ali je boljši navaden pufer za lizo ali tisti z dodatkom NP-40 in kako uspešne so ekstrakcijske metode, opisane v protokolu. Vse spremembe smo naredili, da bi protokol prilagodili za želodčno tkivo.

## Postopek I

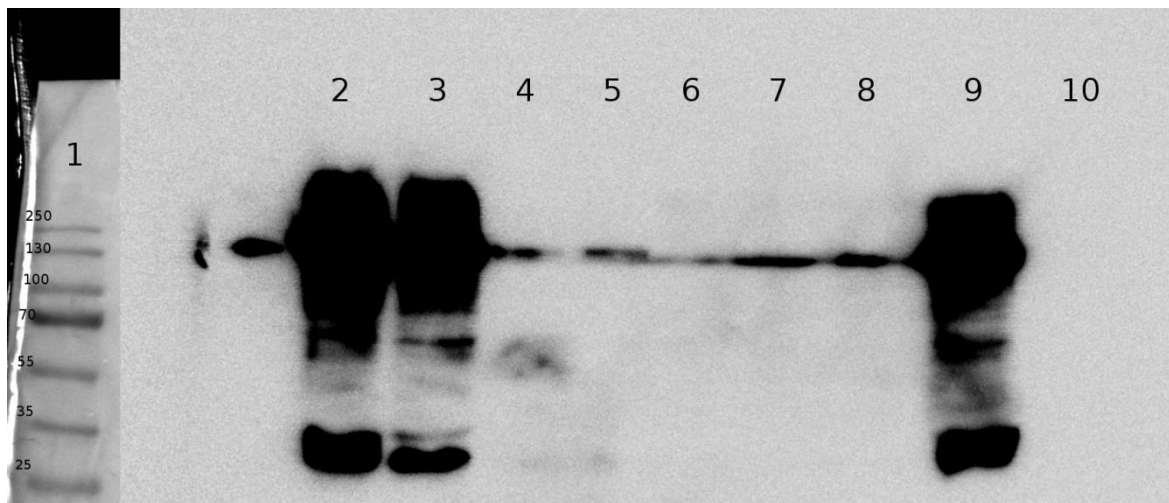
V prvem poskusu nismo spreminjali protokola, le en vzorec smo homogenizirali v tekočem dušikom namesto z Dounce-jevim homogenizatorjem (DH). Vzorce smo analizirali s prenosom western in imunodetekcijo. Za poskus smo uporabili svinjski želodec. V Preglednici 14 in na Slikah 38 in 39 so prikazani vzorci DH po centrifugiranju v gradientu, vzorca primarnih homogenatov ter vzorca S1. Najmočnejši signal in AU/QL ima vzorec primarnega homogenata, ki je homogeniziran z Dounce-jevim homogenizatorjem (DH-ALI, žepek 2). Skoraj enako močan signal in le malo nižji AU/QL ima vzorec frakcije oborine po centrifugiranju v gradientu, ki je bil ekstrahiran s karbonatom (DH-F1-eK, žepek 9). Močan signal ima tudi vzorec primarnega homogenata, ki smo ga strli v tekočem dušiku (N<sub>2</sub>-ALI, žepek 3). V vzorcih frakcij plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu ima najmočnejši signal vzorec, ekstrahiran s karbonatom (DH-PM-eK, žepek 8), sledita mu vzorca, ekstrahirana s Tritonom X-114 (DH-PM-eT, žepek 7) in s pufrom za lizo (DH-PM-eL, žepek 6). Vzorec frakcije plazemskih membran, ekstrahiran s kloroform/metanolom, nima signala (DH-PM-eK/M, žepek 10).

Preglednica 14: Prikazuje vzorce DH pred in po centrifugiranju v gradientu, vzorca primarnih homogenatov in vzorca S1.

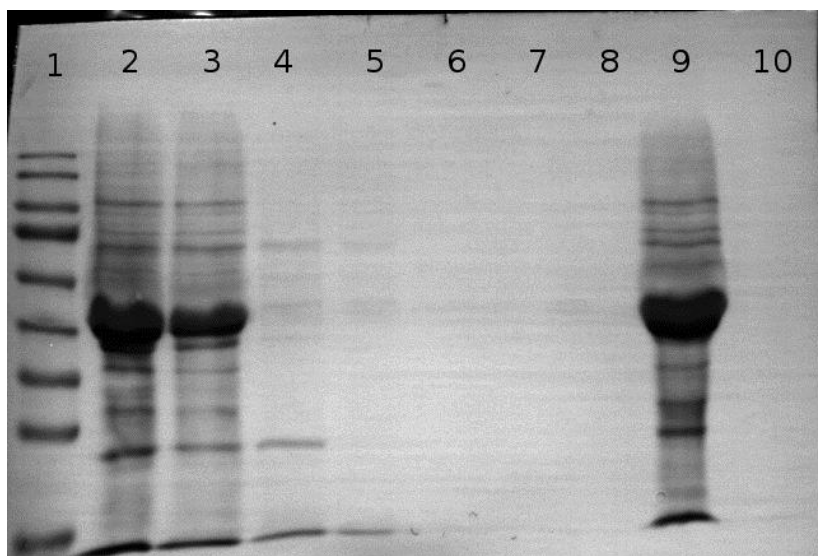
Žepek	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorec	Marker	DH-ALI	N <sub>2</sub> -ALI	DH-S1	N <sub>2</sub> -S1	DH-PM-eL	DH-PM-eT-pL	DH-PM-eK-pL	DH-F1-eK-pL	DH-PM-eK/M-pL
KV	4	10,8	15	15	15	15	15	15	8,6	15
KP		30	1,29	3,77	3,65				30	
AU/QL		0,3280	0,1732	0,0119	0,0039	0,0069	0,0045	0,0057	0,2143	0,0085

Legenda: 1: marker; 2: primarni homogenat, homegiziran z Dounce-jevim homogenizatorjem (DH-ALI); 3: primarni homogenat vzorca strtega v dušiku (N<sub>2</sub>-ALI); 4: supernatant po prvem centrifugiranju homogenata, homogeniranega z Dounce-jevim homogenizatorjem (DH-S1); 5: supernatant po prvem centrifugiranju homogenata, homogeniziranega v tekočem dušiku (N<sub>2</sub>-S1); 6: frakcija plazemskih membran, ekstrahiranih s pufrom za lizo (DH-PM-eL); 7: frakcija plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s Tritonom X-114 in raztopljenih v pufru za lizo (DM-PM-eT-pL); 8: frakcija plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s karbonatom (DH-PM-eK-pL); 9: frakcija oborine po centrifugiranju v

gradientu, ekstrahirana s karbonatom in raztopljena v pufru za lizo (DH-F1-eK-pL); 10: frakcija plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s kloroform/metanolom in raztopljena v pufru za lizo (DH-PM-eK/M-pL); KV: količina vzorca v  $\mu\text{L}$ ; KP: količina proteinov v  $\mu\text{g}$ ; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov.



Slika 38: Imonodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov DH vzorcev pred in po centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih na različne načine, ter primarnih homogenatov in S1, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Zhang in sod., 2005). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 14.



Slika 39: Membrana z vzorci izoliranih proteinov DH vzorcev pred in po centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih na različne načine, ter primarnih homogenatov in S1, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu (Zhang in sod., 2005), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 14.

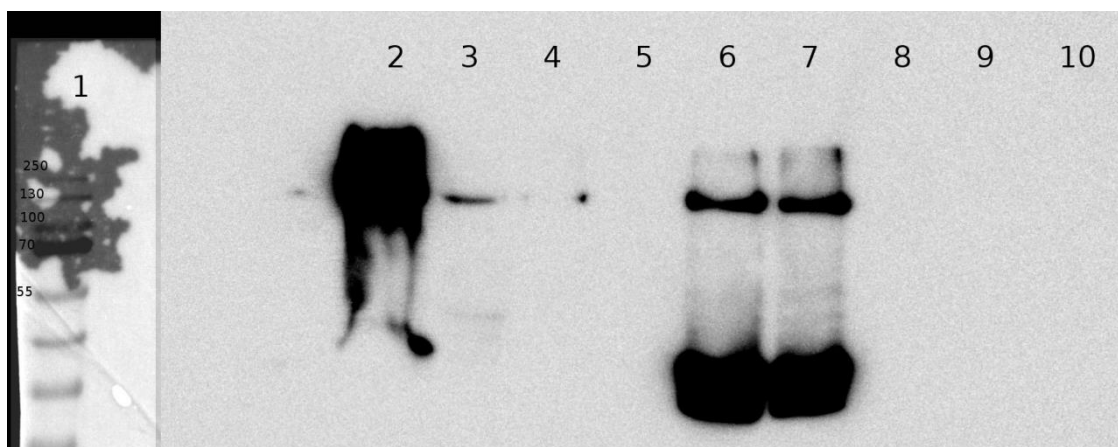
V Preglednici 15 in na Slikah 40 in 41 so prikazani vzorci DH in  $\text{N}_2$  po centrifugiranju v saharoznem gradientu in ekstrahiranih na različne načine. Najmočnejši signal in AU/QL ima vzorec frakcije oborine po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirane s

kloroform/metanolom, in sicer spodnja faza, raztopljena s pufrom za lizo (DH-F1-eK/M(zg)-pL, žepok 2). Močan signal in AU/QL smo dobili pri obeh fazah vzorca frakcije oborine po centrifugiranju v gradientu in ekstrahiranim s Tritinom X-114 (N<sub>2</sub>-F1-eT(zg)-pL in N<sub>2</sub>-F1-eT(sp)-pL, žepka 6 in 7). Edini vzorec frakcije plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, kjer smo dobili zelo šibek signal, je vzorec, ekstrahiran s karbonatom (N<sub>2</sub>-PM-eK-pL, žepok 4). Vsi ostali vzorci frakcij plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu nimajo signala.

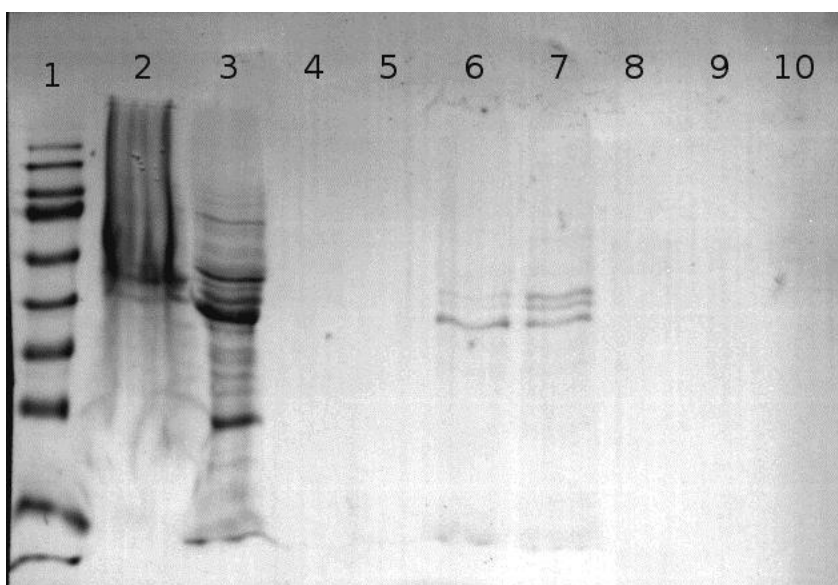
Preglednica 15: Prikazuje vzorce po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirane na različne načine.

Žepok	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorec	Marker	DH-F1-eK/M(zg)-pL	DH-F1-eK(sp)-pL	N <sub>2</sub> -PM-eK-pL	N <sub>2</sub> -PM-eK/M-pL	N <sub>2</sub> -F1-eT(zg)-pL	N <sub>2</sub> -F1-eT(sp)-pL	DH-PM-eL	DH-PM-eT(zg)-pL	DH-PM-eT(sp)-pL
KV	4	15	15	15	15	15	15	15	15	15
KP		9,6	1,17			6,6				
AU/QL		0,1417	0,0027	0,0053	0,0075	0,0117	0,0130	0,0125	0,0108	0,0111

Legenda: 1: marker; 2: frakcija oborine vzorca DH po centrifugiranju v gradientu, zgornja faza po ekstrakciji s kloroform/metanolom, raztopljena v pufu za lizo (DH-F1-eK/M(zg)-pL); 3: frakcija oborine vzorca DH po centrifugiranju v gradientu, spodnja faza po ekstrakciji s kloroform/metanolom, raztopljena v pufu za lizo (DH-F2-eK/M(sp)-pL); 4: frakcija plazemskih membran vzorca N<sub>2</sub> po centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s karbonatom, raztopljena v pufu za lizo (N<sub>2</sub>-PM-eK-pL); 5: frakcija plazemskih membran vzorca N<sub>2</sub> po centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s kloroform/metanolom, raztopljena v pufu za lizo (N<sub>2</sub>-PM-Ek/M-Pl); 6: frakcija oborine vzorca N<sub>2</sub> po centrifugiranju v gradientu, zgornja faza po ekstrakciji s Tritinom X-114, raztopljena v pufu za lizo (N<sub>2</sub>-F1-eT(zg)-pL); 7: frakcija oborine vzorca N<sub>2</sub> po centrifugiranju v gradientu, spodnja faza po ekstrakciji s Tritinom X-114, raztopljena v pufu za lizo (N<sub>2</sub>-F1-eT(sp)-pL); 8: frakcija plazemskih membran vzorca DH po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirana s pufrom za lizo (DH-PM-eL); 9: frakcija plazemskih membran vzorca DH po centrifugiranju v gradientu, zgornja faza po ekstrakciji s Tritinom X-114, raztopljena v pufu za lizo (DH-PM-eT(zg)-pL); 10: frakcija plazemskih membran vzorca DH po centrifugiranju v gradientu, spodnja faza po ekstrakciji s Tritinom X-114, raztopljena v pufu za lizo (DH-PM-eT(sp)-pL); KV: količina vzorca v μL; KP: količina proteinov v μg; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov.



Slika 40: Imonodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov DH in N<sub>2</sub> vzorcev po centrifugiranju v gradientu ekstrahiranih na različne načine, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu Zhang in sod., (2005). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 15.



Slika 41: Membrana z vzorci izoliranih proteinov DH in N<sub>2</sub> vzorcev po centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih na različne načine, iz tkiva svinjskega želodca, po prirejenem protokolu Zhang in sod., (2005), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 15.

## Postopek II

V drugem poskusu smo vzorce homogenizirali le v tekočem dušiku, ker so bili vzorci v prvem poskusu enaki kot v poskusu z Dounce-jevim homogenizatorjem. Pripravljene vzorce za centrifugiranje v saharoznem gradientu smo dali na vrhno plast centrifugirke in poleg 150- minutnega uporabili tudi preračunan čas centrifugiranja v gradientu. Proteine plazemske membrane smo poskusili raztopiti z navadnim pufrom za lizo in s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 ter jih dodatno obdelali z ultrazvokom. Vzorce smo analizirali s prenosom Western in imunodetekcijo. V Preglednici 16 in na Slikah 42 in 43 so prikazani vzorci, pri katerih je centrifugiranje v gradientu trajalo 150 minut. Najmočnejši signal in AU/QL ima vzorec frakcije oborine po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufri za lizo (N<sub>2</sub>-F1-pL, žepok 7). Po moči signala mu sledi vzorec celokupnih proteinov po

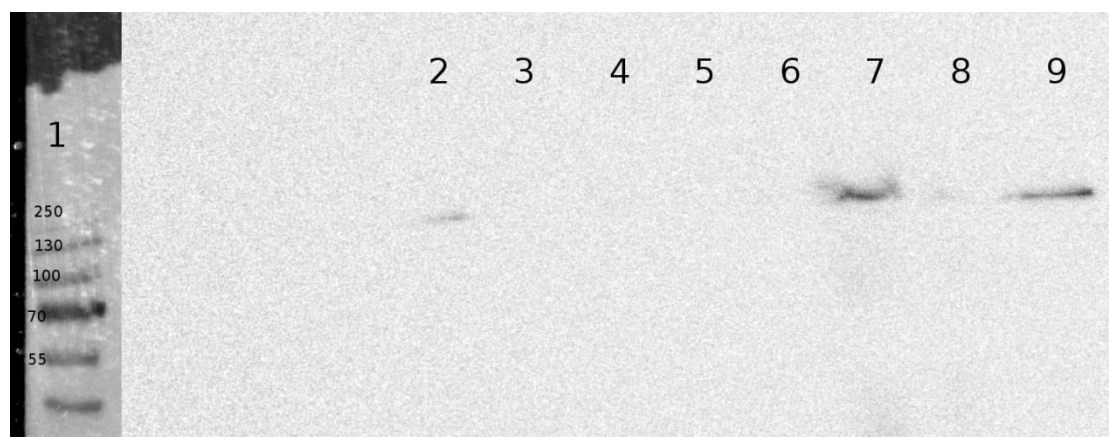


protokolu za izolacijo celokupnih proteinov, ki smo ga dali za primerjavo (CP, žepok 9). Šibek signal ima tudi vzorec supernatanta po prvem centrifugiranju (N<sub>2</sub>-S1, žepok 2). Vzorca s frakcijami plazemskih membran (N<sub>2</sub>-PM-pL in N<sub>2</sub>-PM-pNP40, žepka 3 in 4) nimata signala.

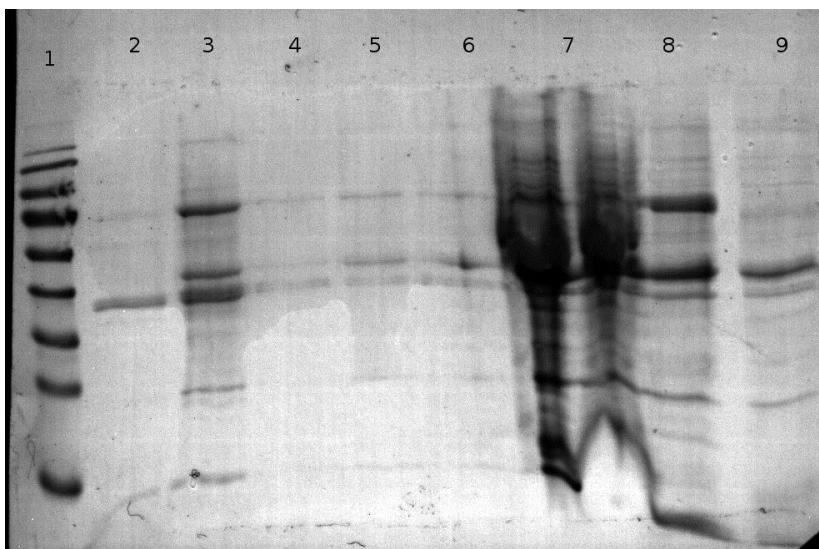
Preglednica 16: Prikazuje vzorce po 150-minutnem centrifugiranju v gradientu. Primerjava vzorcem sta vzorca supernatanta po prvem centrifugiranju vzorca po protokolu in vzorec celokupnih proteinov.

Žepok	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Vzorec	Marker	N <sub>2</sub> -S1	N <sub>2</sub> -PM-pL	N <sub>2</sub> -PM-pNP40	N <sub>2</sub> -F2-pL	N <sub>2</sub> -F2-pNP40	N <sub>2</sub> -F1-pL	N <sub>2</sub> -F1-pNP40	CP
KV	4	19	19	19	19	19	5,14	17,44	2,75
KP		5,89	11,78	16,53	7,03	/	30	30	30
AU/QL		0,0008	0,0018	0,0017	0,0014	0,0015	0,0024	0,0011	0,0010

Legenda: 1: marker; 2: supernatant po prvem centrifugiranju (N<sub>2</sub>-S1); 3: frakcija plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo (N<sub>2</sub>-PM-pL); 4: frakcija plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-PM-pNP40); 5: druga frakcija po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo (N<sub>2</sub>-F2-pL); 6: druga frakcija po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F2-pNP40); 7: frakcija oborine po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo (N<sub>2</sub>-F1-pL); 8: frakcija oborine po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F1-pNP40); 9: celokupni proteini (CP); KV: količina vzorca v μL; KP: količina proteinov v μg; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov. Oborini pri merjenju absorbnosti pri vzorcih N<sub>2</sub>-F2-pL in N<sub>2</sub>-F1-pNP40.



Slika 42: Imonodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov, iz tkiva svinjskega želodca, po 150-minutnem centrifugiranju v gradientu po prirejenem protokolu Zhang in sod., (2005). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 16.



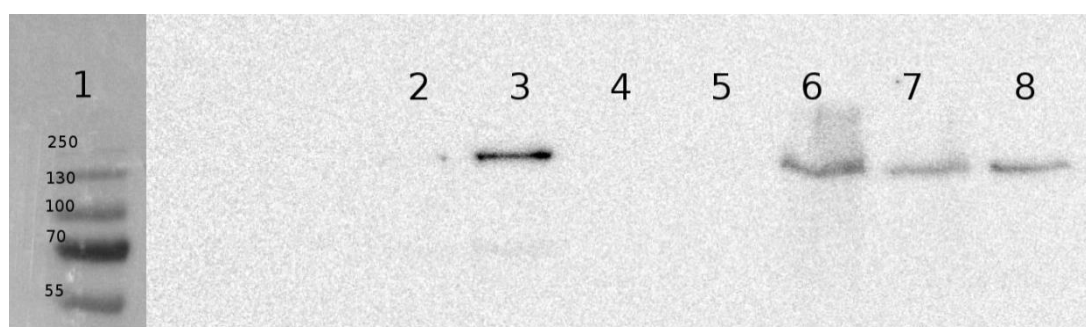
Slika 43: Membrana z vzorci izoliranih proteinov, iz tkiva svinjskega želodca, po 150-minutnem centrifugiranju v gradientu po prirejenem protokolu Zhang in sod., (2005), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 16.

V Preglednici 17 in na Slikah 44 in 45 so prikazani vzorci, pri katerih je centrifugiranje v saharoznem gradientu trajalo 82 minut. Najmočnejši signal in AU/QL smo dobili pri vzorcu frakcije plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, ki je bil raztopljen v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N2-PM-pNP40, žepek 3). Dober signal je imel tudi vzorec frakcije oborine po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo (N2-F1-pL, žepek 6). Malo šibkejši signal imata vzorec frakcije oborine po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N2-F1-pNP40, žepek 7), in vzorec celokupnih po protokolu za izolacijo celokupnih proteinov (CP, žepek8), ki smo ga dali za primerjavo.

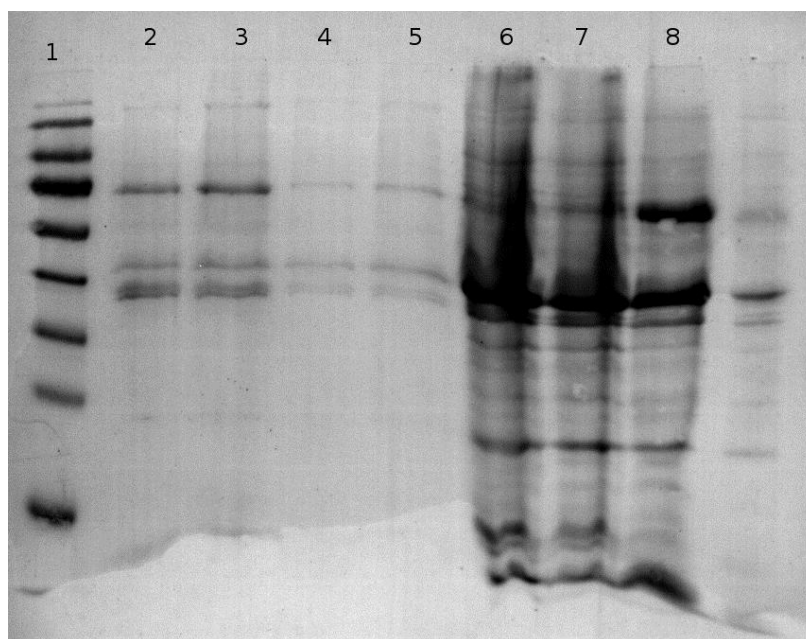
Preglednica 17: Prikazuje vzorce po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu.

Žepček	1	2	3	4	5	6	7	8
Vzorec	Marker	N <sub>2</sub> -PM-pL	N <sub>2</sub> -PM-pNP40	N <sub>2</sub> -F2-pL	N <sub>2</sub> -F2-pNP40	N <sub>2</sub> -F1-pL	N <sub>2</sub> -F1-pNP40	CP
KV	4	19	19	19	19	8,65	6,09	2,75
KP		9,12	/	3,42	/	30	30	30
AU/QL		0,0020	0,0027	0,0020	0,0017	0,0021	0,0016	0,0020

Legenda: 1: marker; 2: frakcija plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo (N<sub>2</sub>-PM-pL); 3: frakcija plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-PM-pNP40); 4: druga frakcija po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo (N<sub>2</sub>-F2-pL); 5: druga frakcija po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F2-pNP40); 6: frakcija oborine po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo (N<sub>2</sub>-F1-pL); 7: frakcija oborine po centrifugiranju v gradientu, raztopljen v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F1-pNP40); 8: celokupni proteini (CP); KV: količina vzorca v µL; KP: količina proteinov v µg; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov. Oborine pri merjenju absorbnosti pri vzorcih N<sub>2</sub>-F1-pL in N<sub>2</sub>-F1-pNP40.



Slika 44: Imonodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov, iz tkiva svinjskega želodca, po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu po prirejenem protokolu Zhang in sod., (2005). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 17.



Slika 45: Membrana z vzorci izoliranih proteinov, iz tkiva svinjskega želodca, po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu po prirejenem protokolu Zhang in sod., (2005), pobarvan z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 17.

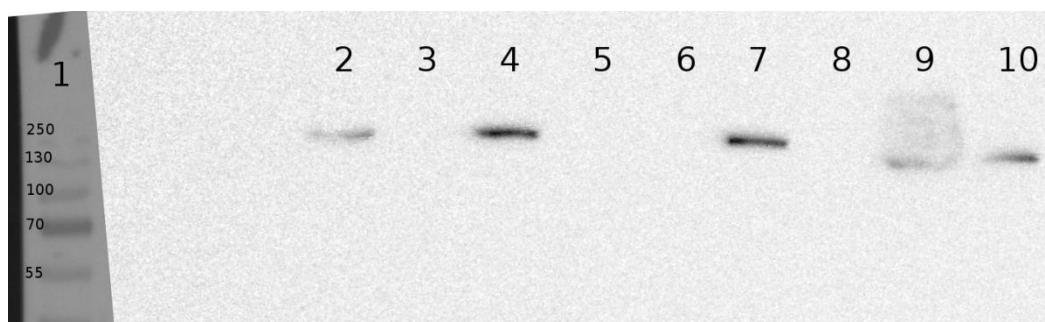
### Postopek III

Ker smo uspešno obogatili proteine plazemske membrane v prejšnem poskusu, smo ponovili celotni protokol z narejenimi prilagoditvami in različnimi ekstrahiranimi. Hoteli smo primerjati njihovo uspešnost pri obogatitvi plazemskih membran z narejenimi prilagoditvami. Vzorce smo analizirali s prenosom Western in imunodetekcijo. V Preglednici 18 in na Slikah 46 in 47 so prikazani vzorci po 82-minutnem centrifugiranju v saharoznem gradientu, ki so bili ekstrahirani s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 in s karbonatom. Najmočnejši signal in AU/QL ima vzorec frakcije plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, ki je bil ekstrahiran s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-PM-eNP40, žepka 4). Približno enako močan signal ima vzorec frakcije plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, ekstrahiran s karbonatom, raztopljen v pufu za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-PM-eK-pNP40, žepka 7). Šibkejši signal smo dobili pri vzorcu primarnega homogenata in vzorcu frakciji oborine po centrifugiranju v gradientu, ekstrahiran s karbonatom (N<sub>2</sub>-ALI in N<sub>2</sub>-F1-eK-pNP40, žepka 2 in 9). Signal celokupnih proteinov po protokolu za izolacijo celokupnih proteinov (CP, žepka 10), ki smo ga dali za primerjavo, ni izstopal. Ostali vzorci niso imeli signala.

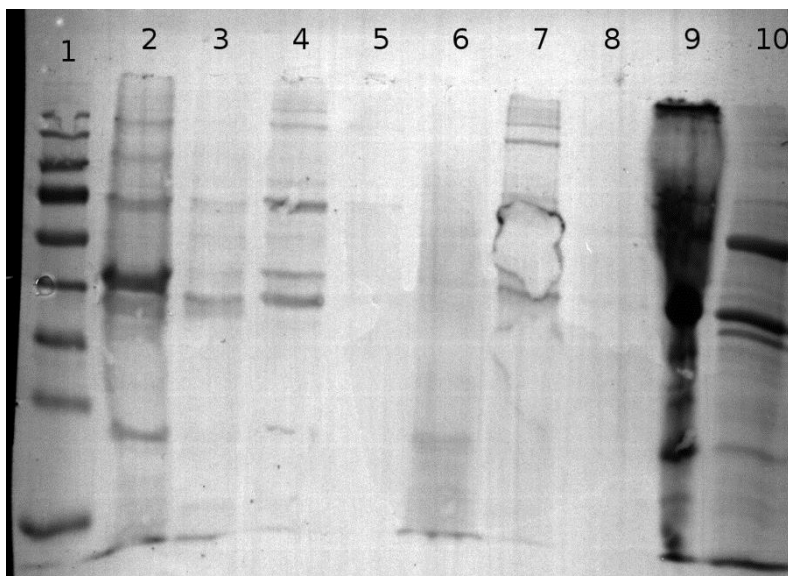
Preglednica 18: Prikazuje vzorce, ekstrahirane s pufrom za lizo in karbonatom. Za primerjavi sta vzorca pred centrifugiranjem v gradientu in vzorec celokupnih proteinov.

Žepček	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorec	Marker	N <sub>2</sub> -ALI	N <sub>2</sub> -S1	N <sub>2</sub> -PM-eNP40	N <sub>2</sub> -F2-eNP40	N <sub>2</sub> -F1-eNP40	N <sub>2</sub> -PM-eK-pNP40	N <sub>2</sub> -F2-eK-pNP40	N <sub>2</sub> -F1-eK-pNP40	CP
KV	4	19	19	19	19	19	19	19	5,70	2,75
KP		18,24	4,18	9,69	/	19,38	/	/	30	30
AU/QL		0,0015	0,0018	0,0025	0,0016	0,0017	0,0021	0,0013	0,0051	0,0015

Legenda: 1: marker; 2: primarni homogenat (N<sub>2</sub>-ALI); 3: supernatant po prvem centrifugiranju (N<sub>2</sub>-S1); 4: frakcija plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirana s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-PM-eNP40); 5: druga frakcija po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirana s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F2-eNP40); 6: frakcija oborine po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirana s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F1-eNP40); 7: frakcija plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirana s karbonatom in raztopljena v pufu za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-PM-eK-pNP40); 8: druga frakcija po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirana s karbonatom in raztopljena v pufu za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F2-eK-pNP40); 9: frakcija oborine po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirana s karbonatom in raztopljena v pufu za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F1-eK-pNP40); 10: celokupni proteini (CP); KV: količina vzorca v  $\mu$ L; KP: količina proteinov v  $\mu$ g; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov. Oborini pri merjenju absorbance pri vzorcih N<sub>2</sub>-PM-eNP40 in N<sub>2</sub>-F1-eNP40.



Slika 46: Imonodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov, iz tkiva svinjskega želodca, po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 in s karbonatom, po prirejenem protokolu Zhang in sod., (2005). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 18.



Slika 47: Membrana z vzorci izoliranih proteinov, iz tkiva svinjskega želodca, po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 in s karbonatom, po prirejenem protokolu Zhang in sod., (2005), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 18.

V Preglednici 19 in na Slikah 48 in 49 so prikazani vzorci po 82-minutnem centrifugiranju v saharoznem gradientu, ekstrahirani s Tritonom X-114. Najmočnejši signal in AU/QL ima vzorec frakcije oborine po centrifugiranju v gradientu, spodnja faza po ekstrakciji s Tritonom X-114, raztopljena v pufu za lizo z dodatkom NP-40 (N2-F1-eT(sp)-pNP40, žep 6). Zelo šibek signal ima vzorec celokupnih proteinov po protokolu za izolacijo celokupnih proteinov (CP, žep 8), ki smo ga imeli za primerjavo. Vsi ostali vzorci, tudi tisti v katerih naj bi bile plazemske membrane, niso imeli signala.

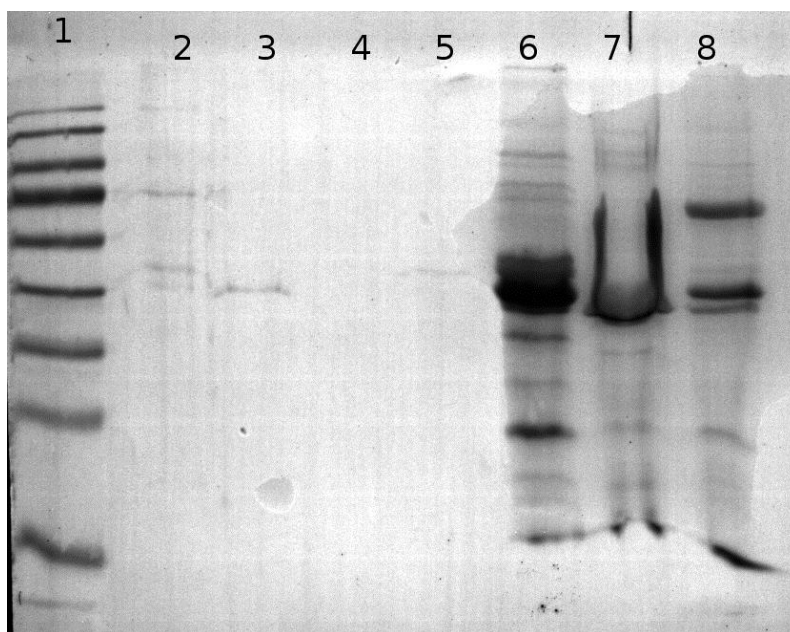
Preglednica 19: Prikazuje ekstrakcijo s Tritonom. Primerjava je vzorec celokupnih proteinov.

Žepček	1	2	3	4	5	6	7	8
Vzorec	Marker	N <sub>2</sub> -PM-eT(sp)-pNP40	N <sub>2</sub> -PM-eT(zg)-pNP40	N <sub>2</sub> -F2-eT(sp)-pNP40	N <sub>2</sub> -F2-eT(zg)-pNP40	N <sub>2</sub> -F1-eT(sp)-pNP40	N <sub>2</sub> -F1-eT(zg)-pNP40	CP
KV	4	19	19	19	19	9,93	19	2,75
KP		3,23	/	1,71	/	30	14,25	30
AU/QL		0,0015	0,0018	0,0014	0,0016	0,0044	0,0019	0,0016

Legenda: 1: marker; 2: frakcija plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, spodnja faza po ekstrakciji s Tritonom X-114, raztopljena v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-PM-eT(sp)-pNP40); 3: frakcija plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, zgornja faza po ekstrakciji s Tritonom X-114, raztopljena v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-PM-eT(zg)-pNP40); 4: druga frakcija po centrifugiranju v gradientu, spodnja faza po ekstrakciji s Tritonom X-114, raztopljena v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F2-eT(sp)-pNP40); 5: druga frakcija po centrifugiranju v gradientu, zgornja faza po ekstrakciji s Tritonom X-114, raztopljena v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F2-eT(zg)-pNP40); 6: frakcija oborine po centrifugiranju v gradientu, spodnja faza po ekstrakciji s Tritonom X-114, raztopljena v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F1-eT(sp)-pNP40); 7: frakcija oborine po centrifugiranju v gradientu, zgornja faza po ekstrakciji s Tritonom X-114, raztopljena v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F1-eT(zg)-pNP40); 8: celokupni proteini; KV: količina vzorca v  $\mu$ L; KP: količina proteinov v  $\mu$ g; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov.



Slika 48: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov, iz tkiva svinjskega želodca, po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s Tritonom X-114, po prirejenem protokolu Zhang in sod., (2005). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 19.



Slika 49: Membrana z vzorci izoliranih proteinov, iz tkiva svinjskega želodca, po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s Tritonom X-114, po prirejenem protokolu Zhang in sod., (2005), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 19.

V Preglednici 20 in na Slikah 50 in 51 so prikazani vzorci po 82-minutnem centrifugiranju v saharoznem gradientu, ekstrahirani s kloroform/metanolom. Najmočnejši signal ima vzorec oborine po centrifugiranju v gradientu, zgornja faza po ekstrakciji s kloroform/metanolom, raztopljen v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N2-F1-eK/M(zg)-pNP40, žepek 7). Vsi ostali vzorci, tudi tisti v katerih naj bi bile plazemske membrane, nimajo signala.



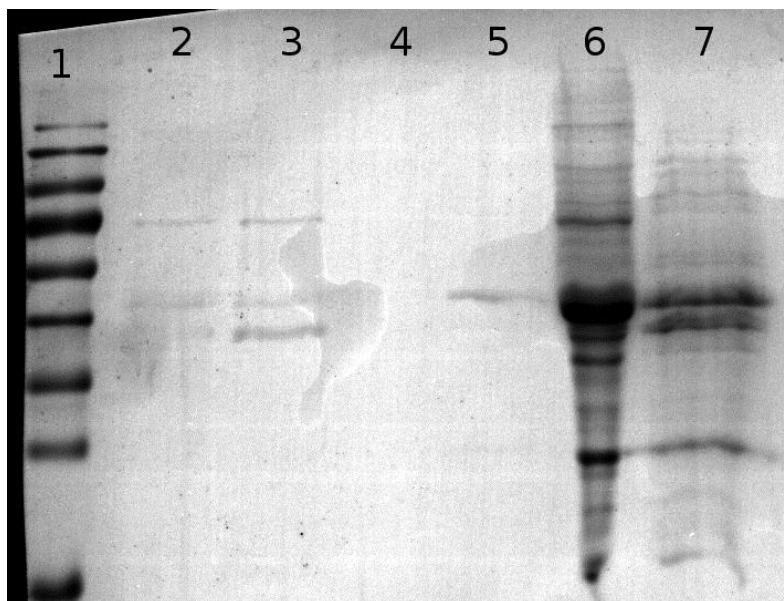
Preglednica 20: Prikazuje ekstrakcijo s kloroformom/metanolom.

Žepček	1	2	3	4	5	6	7
Vzorec	Marker	N <sub>2</sub> -PM-eK/M(sp)-pNP40	N <sub>2</sub> -PM-eK/M(zg)-pNP40	N <sub>2</sub> -F2-eK/M(sp)-pNP40	N <sub>2</sub> -F2-eK/M(zg)-pNP40	N <sub>2</sub> -F1-eK/M(sp)-pNP40	N <sub>2</sub> -F1-eK/M(zg)-pNP40
KV	4	19	19	19	19	19	19
KP		0,19	0,19	/	/	/	13,68
AU/QL		0,0017	0,0012	0,0014	0,0013	0,0023	0,0017

Legenda: 1: marker; 2: frakcija plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, spodnja faza po ekstrakciji s kloroform/metanolom, raztopljen v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-PM-eK/M(sp)-pNP40); 3: frakcija plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, zgornja faza po ekstrakciji s kloroform/metanolom, raztopljen v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-PM-eK/M(zg)-pNP40); 4: druga frakcija po centrifugiranju v gradientu, spodnja faza po ekstrakciji s kloroform/metanolom, raztopljen v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F2-eK/M(sp)-pNP40); 5: druga frakcija po centrifugiranju v gradientu, zgornja faza po ekstrakciji s kloroform/metanolom, raztopljen v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F2-eK/M(zg)-pNP40); 6: frakcija oborine po centrifugiranju v gradientu, spodnja faza po ekstrakciji s kloroform/metanolom, raztopljen v pufru za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F1-eK/M(sp)-pNP40); 7: frakcija oborine po centrifugiranju v gradientu, zgornja faza po ekstrakciji s kloroform/metanolom, raztopljen v pufru za lizo (N<sub>2</sub>-F1-eK/M(zg)-pNP40); KV: količina vzorca v  $\mu$ L; KP: količina proteinov v  $\mu$ g; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov. Oborini pri merjenju absorbnosti pri vzorcih N<sub>2</sub>-F1-eK/M(sp)-pNP40 in N<sub>2</sub>-F1-eK/M(zg)-pNP40.



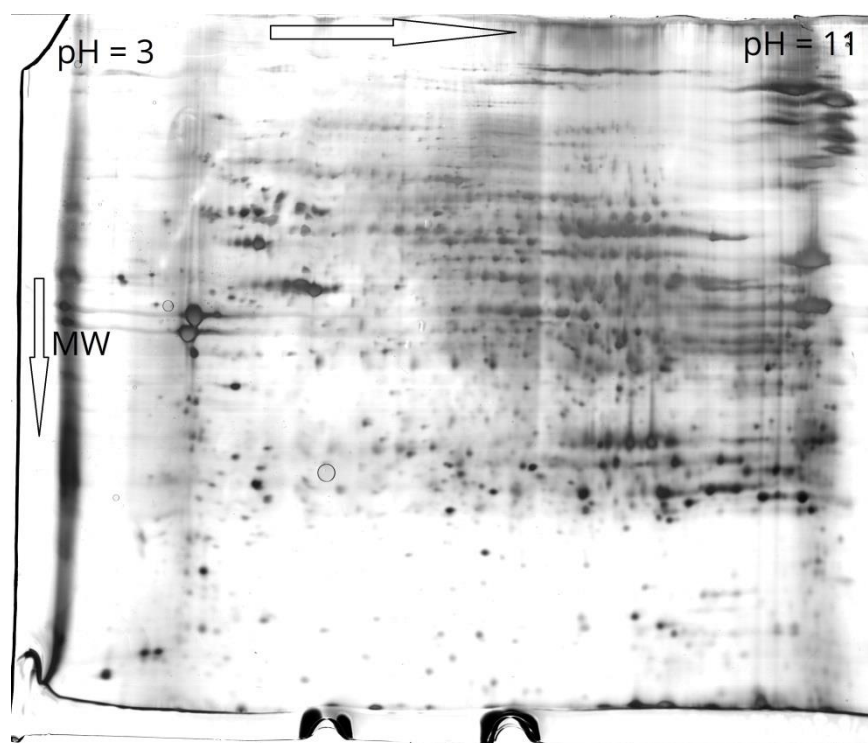
Slika 50: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov, iz tkiva svinjskega želodca, po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s kloroform/metanolom, po prirejenem protokolu Zhang in sod., (2005). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 20.



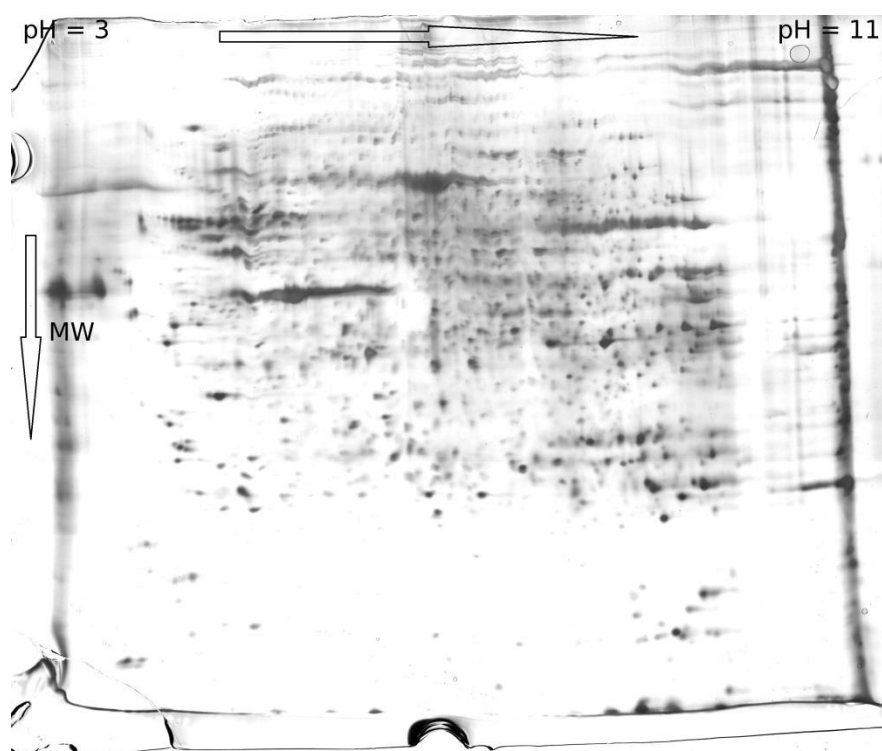
Slika 51: Membrana z vzorci izoliranih proteinov, iz tkiva svinjskega želodca, po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s kloroform/metanolom, po prirejenem protokolu Zhang in sod., (2005), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 20.

#### Postopek IV

V tem poskusu smo, na tkivu svinjskega želodca, uporabili najbolj uspešni obogatitvi proteinov plazemskih membran v prejšnem poskusu in ju analizirali z 2-DE. Na Sliki 52 je prikazan rezultat 2-DE gela vzorca frakcije plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirani s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-PM-eNP40). Na Sliki 53 je prikazan rezultat 2-DE gela vzorca frakcije plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirani s karbonatom in raztopljen v pufri za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-PM-eK-pNP40).



Slika 52: 2-DE gel vzorca  $N_2$ -PM-eNP40, na tkivu svinjskega želodca, pripravljen po prirejenem protokolu Zhang in sod., (2005).



Slika 53: 2-DE gel vzorca  $N_2$ -PM-eK-pNP40, na tkivu svinjskega želodca, pripravljen po prirejenem protokolu Zhang in sod., (2005).

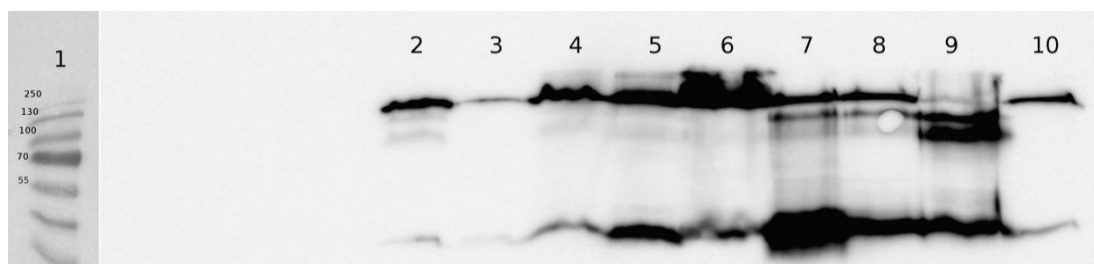
## Postopek V

Po uspešni obogatitvi proteinov plazemskih membran iz svinjskega želodčnega tkiva smo uspešni ekstrakciji prirejenega protokola uporabili na človeškem želodčnem tkivu. Naredili smo ekstrakcijo s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 in s karbonatom. Vzorce smo analizirali s prenosom western in imunodetekcijo. V Preglednici 21 in na Slikah 54 in 55 so prikazani vzorci pred in po ekstrakciji s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 in s karbonatom. Največji signal in AU/QL ima vzorec frakcije oborine po centrifugiranju v gradientu, ekstrahiran s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F1-eNP40, žepok 6). Še vedno zelo močan signal ima vzorec druge frakcije po centrifugiranju v gradientu, ekstrahiran s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F2-eNP40, žepok 5), sledi mu vzorec frakcije plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, ekstrahiran s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-PM-eNP40, žepok 4). Pri vzorcih po centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s karbonatom, ima največji signal frakcija plazemskih membran (N<sub>2</sub>-PM-eK-pNP40, žepok 7), sledita mu druga frakcija in oborina (N<sub>2</sub>-F2-eK-pNP40 in N<sub>2</sub>-F1-eK-pNP40, žepka 8 in 9). Vzorec celokupnih proteinov po protokolu za izolacijo celokupnih proteinov ni izstopal in je imel primerljiv signal z vzorcem primarnega homogenata (CP in N<sub>2</sub>-ALI, žepka 10 in 2).

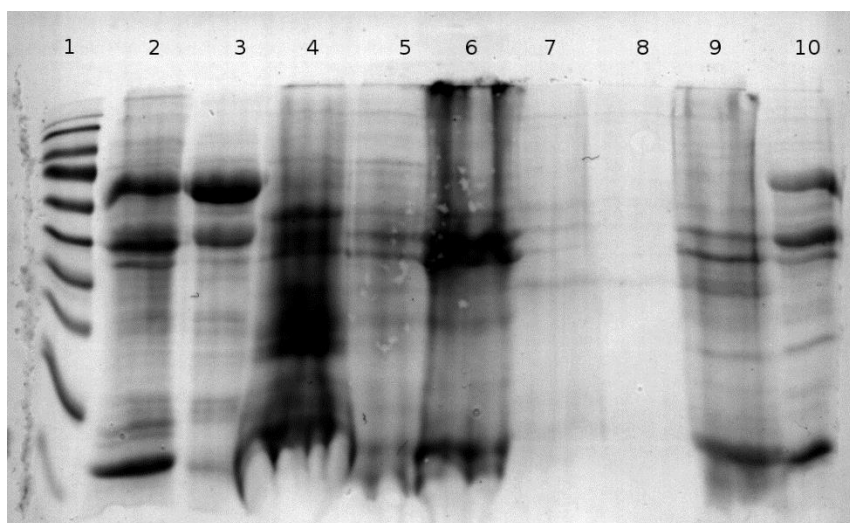
Preglednica 21: Prikazuje vzorec tkiva človeškega želodca pred in po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu.

Žepok	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorec	Marker	N <sub>2</sub> -ALI	N <sub>2</sub> -S1	N <sub>2</sub> -PM-eNP40	N <sub>2</sub> -F2-eNP40	N <sub>2</sub> -F1-eNP40	N <sub>2</sub> -PM-eK-pNP40	N <sub>2</sub> -F2-eK-pNP40	N <sub>2</sub> -F1-eK-pNP40	CP
KV	4	6,41	10,31	19	19	16,22	19	19	7,35	2,75
KP		30	30	24,89	3,04	30	25,46	/	30	30
AU/QL		0,026	0,0067	0,0446	0,0674	0,0951	0,0298	0,0204	0,0083	0,0168

Legenda: 1: marker; 2: primarni homogenat vzorca (N<sub>2</sub>-ALI); 3: supernatant po prvem centrifugiranju (N<sub>2</sub>-S1); 4: frakcija plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirana s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-PM-eNP40); 5: druga frakcija po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirana s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F2-eNP40); 6: frakcija oborine po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirana s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F1-eNP40); 7: frakcija plazemskih membran po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirana s karbonatom in raztopljena v pufu za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-PM-eK-pNP40); 8: druga frakcija po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirana s karbonatom in raztopljena v pufu za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F2-eK-pNP40); 9: frakcija oborine po centrifugiranju v gradientu, ekstrahirana s karbonatom in raztopljena v pufu za lizo z dodatkom NP-40 (N<sub>2</sub>-F1-eK-pNP40); 10: celokupni proteini (CP); KV: količina vzorca v  $\mu$ L; KP: količina proteinov v  $\mu$ g; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov. Oborina pri merjenju absorbnosti pri vzorcu N<sub>2</sub>-F1-eNP40.



Slika 54: Imonodetekcija pan-kadherinov na vzorcih izoliranih proteinov, iz tkiva človeškega želodca, po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 in s karbonatom, po prirejenem protokolu Zhang in sod.,(2005). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 21.



Slika 55: Membrana z vzorci izoliranih proteinov, iz tkiva človeškega želodca, po 82-minutnem centrifugiranju v gradientu, ekstrahiranih s pufrom za lizo z dodatkom NP-40 in s karbonatom, po prirejenem protokolu Zhang in sod., (2005), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 21.

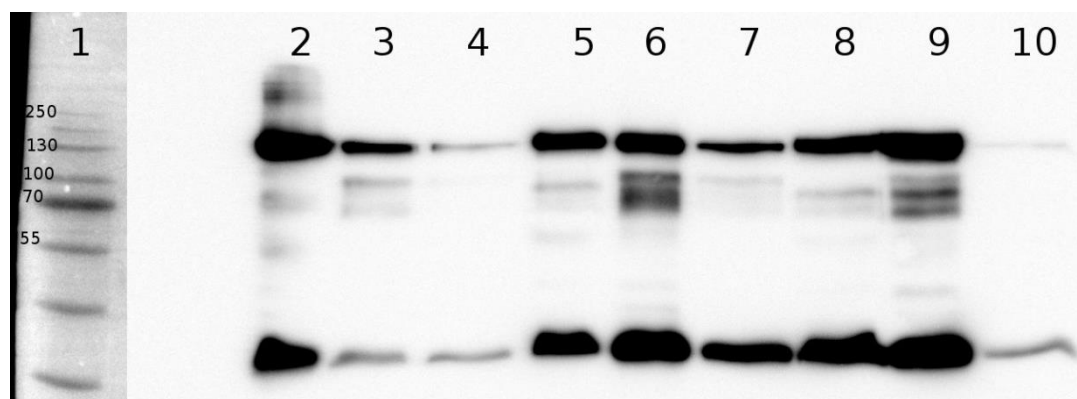
#### 4.1.9 Protokol za obogatitev plazemskih proteinov VIII

Preizkusili smo dva protokola, ki sta priložena kompletoma reagentov za ekstrakcijo proteinov plazemskih membran. Oba sta hitra in nezapletena za uporabo. Vzorce obeh protokolov smo analizirali s prenosom Western in imunodetekcijo ter z 2-DE. V Preglednici 22 in na Slikah 56 in 57 so prikazani vzorci proteinov pri različnih fazah obogatitve proteinov plazemskih membran. Najmočnejši signal in AU/QL ima vzorec želodca, izoliran po Kočevar in sod. (2012) (žepek2). Približno enako močan signal ima vzorec nativnih proteinov plazemskih membran, izoliranih s kompletom Calbiochem-a (C-PM, žepek 9). Šibkejši, a še vedno močan signal ima vzorec krhkejših proteinskih kompleksov plazemskih membran, izoliranih z Novagen-ovim kompletom TM-PEK A (N-TMA-PM, žepek 6). Vzorec kompleksnejših transmembranskih proteinov, izoliranih z Novagen-ovim kompletom TM-PEK B (N-TMB-PM, žepek 3), ima občutno šibkejši signal. Močnejša signala imata vzorca obeh serij citosolnih proteinov (N-S1(B) in N-S1(A), žepek 4 in 8).

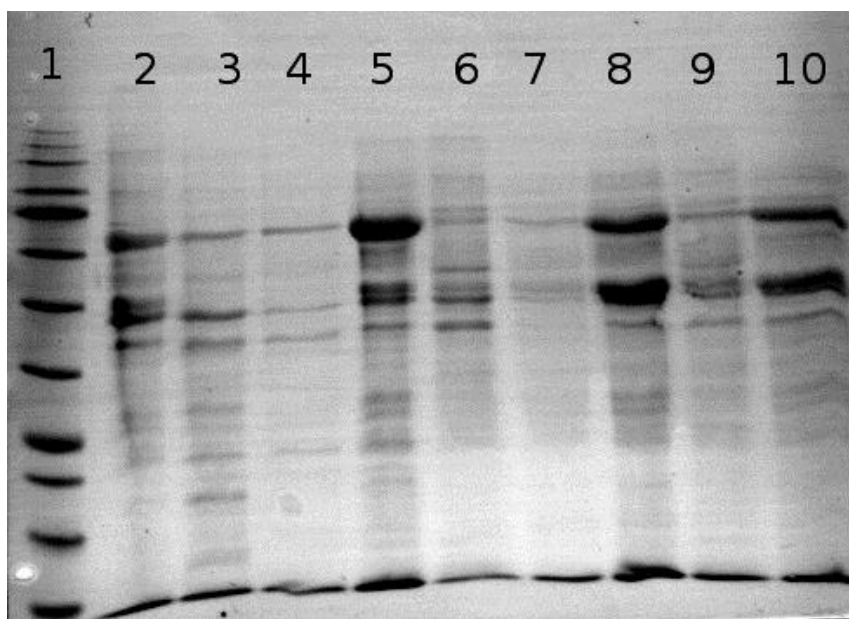
Preglednica 22: Prikazuje vzorce izoliranih proteinov pri različnih fazah obogatitve.

Žepček	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vzorec	Marker	Ž-Nina	N-TMB-PM	N-PBS-S2(B)	N-S1(B)	N-TMA-PM	N-PBS-S2(A)	N-S1(A)	C-PM	C-S1
KV		1,7	7,6	22,5	22,4	22,4	22,5	14,7	10,4	14,7
KP		14	14	3,38	14	14	7,88	14	14	14
AU/QL		0,1546	0,0162	0,0034	0,0591	0,0759	0,0149	0,0479	0,1450	0,0029

Legenda: 1: marker; 2: vzorec želodca po Kočevar (Ž-Nina); 3: kompleksni proteini plazemskih membran (N-TMB-PM); 4: vzorec po prvem spiranju s PBS (N-PBS-S2(B)); 5: citosolni proteini, supernatant S1 (N-S1(B)); 6: krhkejši proteini plazemskih membran (N-TMA-PM); 7: vzorec po prvem spiranju s PBS (N-PBS-S2(A)); 8: citosolni proteini, supernatant S1 (N-S1(A)); 9: nativni proteini plazemskih membran (C-PM); 10: citosolni proteini, supernatant S1 (C-S1); KV: količina vzorca v  $\mu\text{L}$ ; KP: količina proteinov v  $\mu\text{g}$ ; AU/QL: relativna intenziteta signala pan-kadherinov.

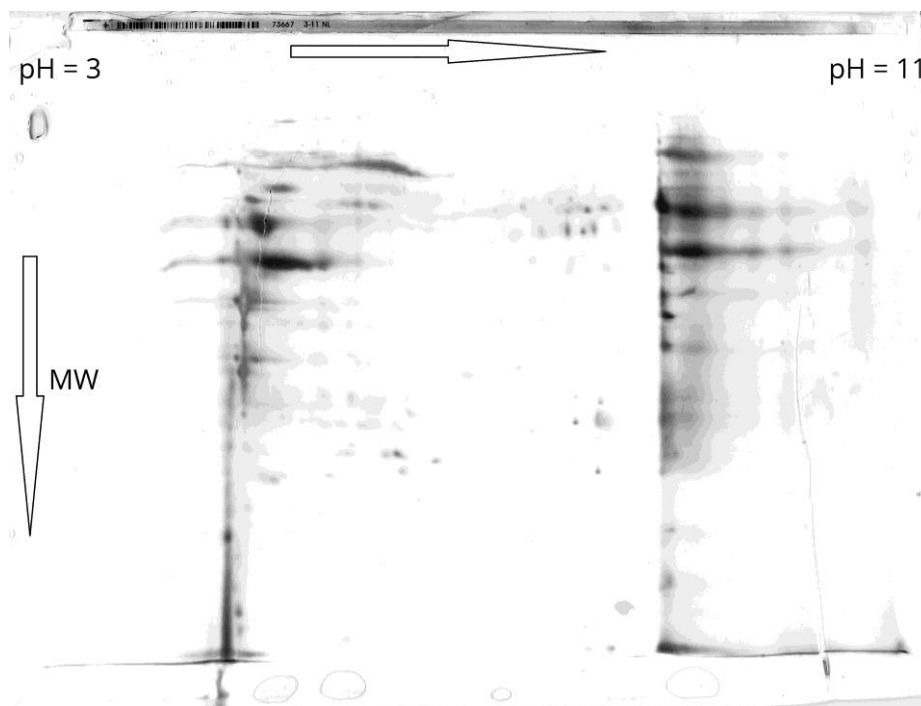


Slika 56: Imunodetekcija pan-kadherinov na vzorcih, izoliranih pri različnih fazah obogatitve proteinov plazemskih membran, iz tkiva človeškega želodca, s komercialnimi kompleti reagentov po protokolih Novagen (ProteoExtract Transmembrane Protein Extraction Kit) in Calbiochem (ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit). Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 22.

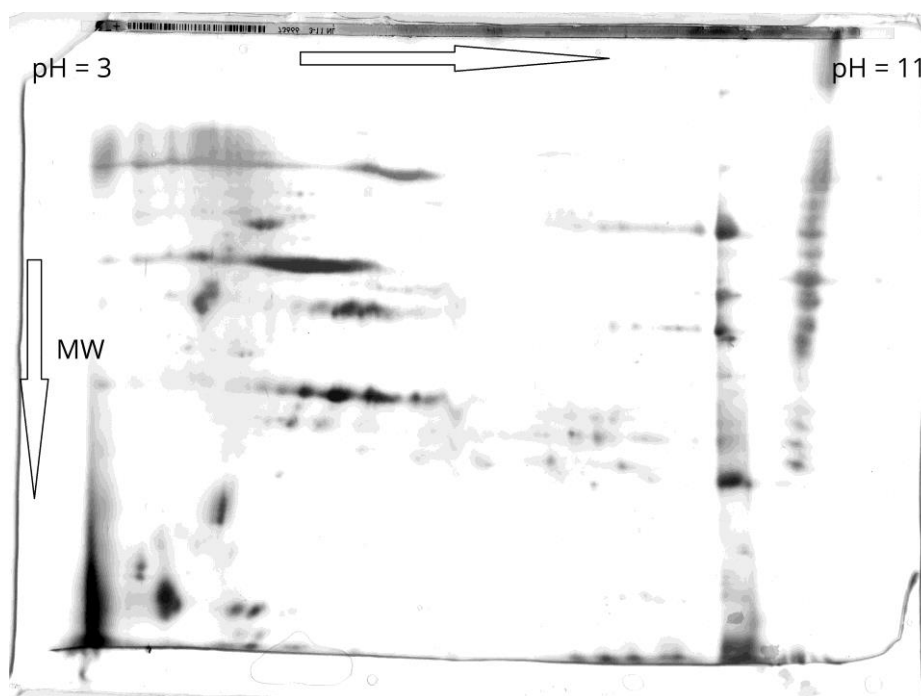


Slika 57: Membrana z vzorci, izoliranimi pri različnih fazah obogatitve proteinov plazemskih membran, iz tkiva človeškega želodca, s komercialnimi kompleti reagentov po protokolih Novagen (ProteoExtract Transmembrane Protein Extraction Kit) in Calbiochem (ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit), pobarvana z barvilom Ponceau S. Številke ustrezajo vzorcem iz Preglednice 22.

Na Slikah 58 in 59 sta prikazani 2-DE analizi končne faze obogatitve proteinov plazemskih membran z Novagenovima kompletoma za krhkejšje proteinske komplekse plazemskih membran TM-PEK A (N-TMA-PM) in kompleksnejše transmembranske proteine TM-PEK B (N-TMB-PM). Na Sliki 60 je prikazana 2-DE analiza končne faze obogatitve nativnih proteinov plazemskih membran, izoliranih s Calbiochemovim kompletom (C-PM). Na Sliki 61 je prikazan zbirnik vseh treh končnih obogatitev.

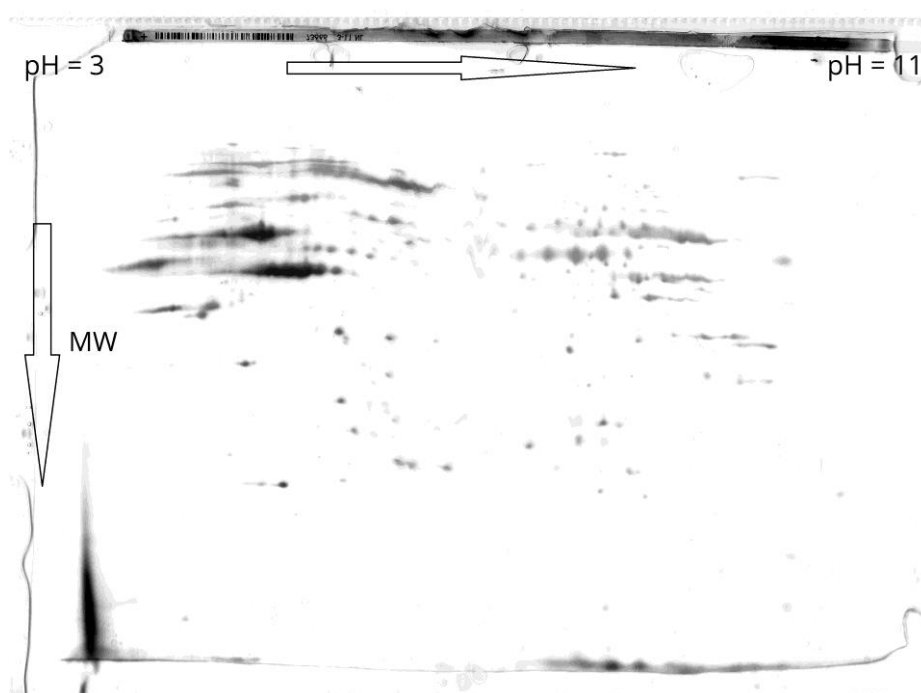


Slika 58: 2-DE gel vzorca N-TMA-PM, iz tkiva človeškega želodca, pripravljenega z Novagenovim kompletom za izolacijo krhkejših proteinskih kompleksov plazemske membrane TM-PEK-A.

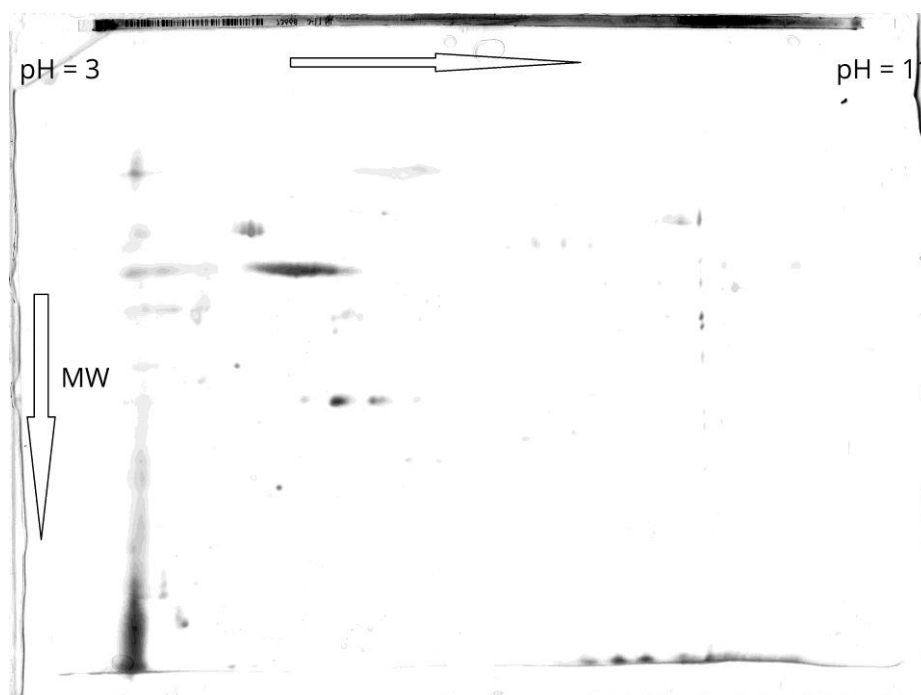


Slika 59: 2-DE gel vzorca N-TMB-PM, iz tkiva človeškega želodca, pripravljenega z Novagenovim kompletom za izolacijo kompleksnejših transmembranskih proteinov TM-PEK-B.



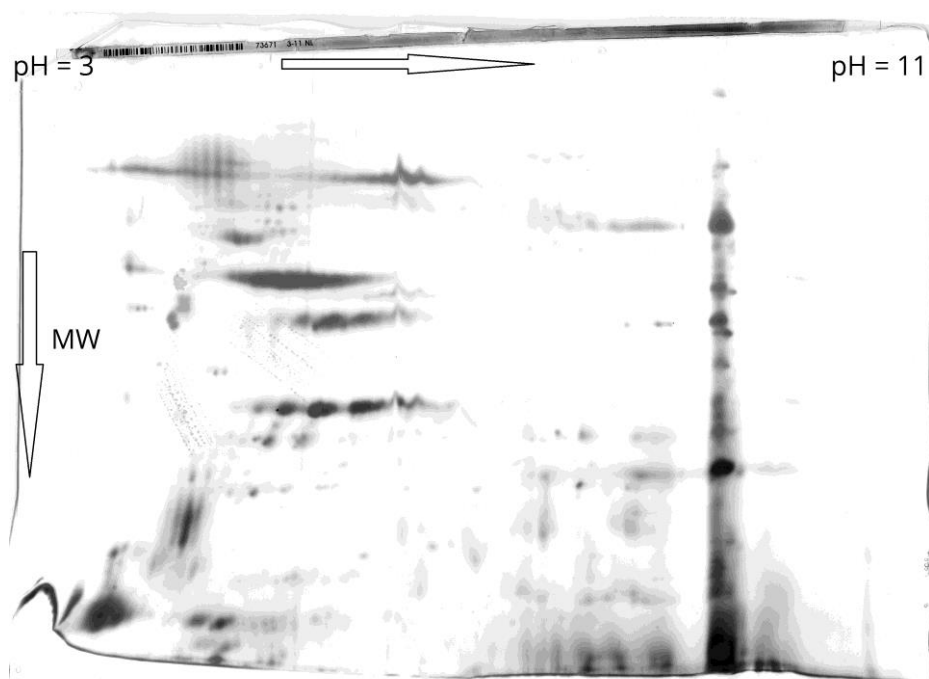


Slika 60: 2-DE gel vzorca C-PM, iz tkiva človeškega želodca, pripravljenega s Calbiochemovim kompletom za izolacijo nativnih proteinov plazemskih membran.

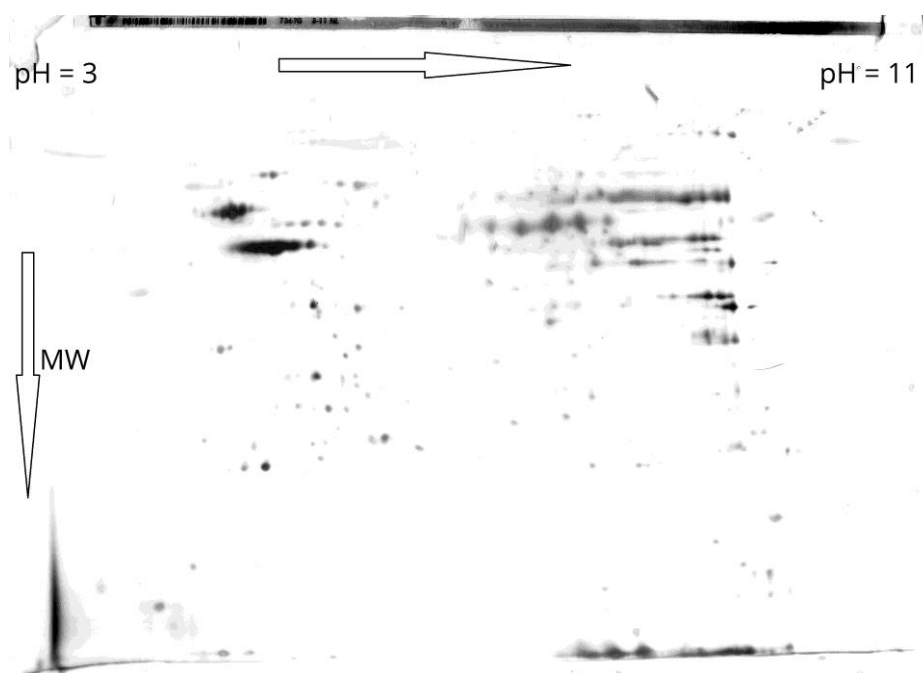


Slika 61: 2-DE gel vzorca, ki je zbirke vseh 3 vzorcev, iz tkiva človeškega želodca, izoliranih s komercialnimi kompletoma Novagen in Calbiochem.

Ker smo dobili na prvi pogled slabše slike, tudi z očitnim pojavom vodoravnih črt ali t.i. proganjem (angl. streaking), smo 2-DE ponovili. Za celotno ponovitev nam je manjkalo vzorca N-TMA-PM, zato smo uporabili preostala 2 vzorca, N-TMB-PM (Slika 62) in C-PM (Slika 63). Iz slednjih je bil narejen tudi zbirke (Slika 64).



Slika 62: 2-DE gel vzorca N-TMB-PM, iz tkiva človeškega želodca, pripravljenega z Novagenovim kompletom za izolacijo kompleksnejših transmembranskih proteinov TM-PEK-B.



Slika 63: 2-DE gel vzorca C-PM, iz tkiva človeškega želodca, pripravljenega s Calbiochemovim kompletom za izolacijo nativnih proteinov plazemskih membran.



Slika 64: 2-DE gel zbirka obeh vzorcev (N-TMB-PM in C-PM), izoliranih s komercialnima kompletoma Novagen in Calbiochem, iz tkiva človeškega želodca.

#### 4.2 RAČUNALNIŠKA ANALIZA 2-DE GELOV

Za pripravo 2-DE gelov, ki smo jih računalniško analizirali, smo vzeli 90  $\mu\text{g}$  vzorca proteinov, razen gelov, kjer smo vzorca izolirali po protokolu za obogatitev plazemskih proteinov VII. Pri tem protokolu smo na gela naložili manj proteinov, in sicer 26 ter 17  $\mu\text{g}$  za ekstrakcijo s pufrom za lizo in s karbonatom. Gele smo ločili na 24-cm trakovih z imobiliziranim pH-gradientom (IPG) 3-11 NL, ekvilibrirali ter nato ločili na 12% poliakrilamidnem gelu. Po barvanju s srebrom nitratom so proteini postali vidni kot lise. Poskenirane gele smo kot slike obdelali s programom ImageMaster 2D Platinum 7.0. Največ lis smo dobili na obeh gelih po protokolu za obogatitev plazemskih proteinov VII (1541 in 1314), pri katerih smo imeli tudi največjo začetno maso vzorca. Sledi jima protokol za obogatitev plazemskih proteinov I s 1125 lisami. Pri protokolu za obogatitev proteinov II smo iz enega vzorca naredili 2 gela s 415 in 190 lisami. Na gelu celokupnih proteinov je 475 lis. Veliko manj lis imajo geli, pri katerih smo vzorce izolirali iz komercialnih kompletov, ki imajo od 70 lis (N-TMA-PM) do 164 lis (C-PM). Najmanj lis (41) ima zbirke vseh treh vzorcev, izoliranih iz komercialnih kompletov. V Preglednici 23 so prikazani rezultati računalniške analize 2-DE gelov, količina dobljenih lis in iz kakšne začetne mase vzorca smo pridobili rezultat. Računalniško obdelane slike so priložene kot Priloge 10-14.

Preglednica 23: Prikazuje rezultate računalniške analize in količino dobljenih lis iz posameznih vzorcev.

Vzorec		Začetna masa vzorca (mg)	Konc. proteinov v vzorcu ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Število lis
Celokupni proteini		67,1	11	475
PZOPP I		65,6	11	1125
PZOPP II		68	P3-P1	415
			P3-S1	190
PZOPP VII (svinjski)	N <sub>2</sub> -PM-eNP40	1131	1,33	1541
	N <sub>2</sub> -PM-eK-pNP40	1013	0,88	1314
PZOPP VIII	N-TMA-PM	50	0,63	70
			1,83	79
	C-PM	50	1,35	164
				164
	ZBIREK I (N-TMA-PM + N-TMB-PM + C-PM)			41
ZBIREK II (N-TMB-PM + C-PM)			197	

Legenda: PZOPP I: protokol za obogatitev plazemskih proteinov I; PZOPP II: protokol za obogatitev plazemskih proteinov II; PZOPP VII: protokol za obogatitev plazemskih proteinov VII; PZOPP VIII: protokol za obogatitev plazemskih proteinov VIII.

#### 4.3 REZULTATI ISKANJA BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV PO RAČUNALNIŠKIH ZBIRKAH

Z iskanjem po računalniških bazah smo želeli najti proteine, ki bi lahko imeli fiziološko vlogo v tkivih želodca in za katere so že ugotovili vlogo pri nastanku in napredovanju različnih oblik raka. Našli smo 97 okvarjenih proteinov, ki so imeli skupaj objavljeno 275 napak. Te variirajo od zamenjav posameznih aminokislin, ki okvarijo posamezen del proteina, do prevelikega ali premajnega izražanja. Od 275 napak jih je 52 povezanih z rakom želodca pri 29 proteinih, za ostale pa lahko predlagamo preučitev njihove vloge pri tej vrsti raka v prihodnjih raziskavah. Vse proteine, ki so povezani z rakom, smo uvrstili v manjši pregledni seznam možnih membranskih bioloških označevalcev raka želodca, kar je prikazano v Prilogi 15, str. 118-138.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Rak želodca je eden najpogostejših rakov in pogost vzrok z rakom povezanih smrti (Catalano in sod., 2009). V zadnjem desetletju so se diagnostične in terapijske možnosti zelo spremenile, vendar še vedno prognoza bolezni ostaja slaba. Čeprav obstaja več diagnostičnih orodij za odkrivanje raka želodca, je možnost zdravljenja omejena (L. L. Lin in sod., 2012). Od odkritja bioloških označevalcev je vedno več tarčnih proteinov, ki jih v diagnostiki uporabljajo kot biološke označevalce raka. Vendar do sedaj še niso odkrili biološkega označevalca za rak želodca, ki bi bil dovolj specifičen in občutljiv. Za tako odkritje in potrditev moramo razumeti razlike proteinov plazemskih membran v zdravem in bolezenskem stanju (Shukla in sod., 2012). Za iskanje teh razlik uporabljamo primerjalno proteomiko, ki omogoča pregled sprememb na ravni proteinov v celici. 2-DE je ena od tehnik primerjalne proteomike (Healthcare, 2004).

V naši raziskavi smo hoteli optimizirati izolacijo ali vsaj obogatitev proteinov plazemske membrane iz želodčnega tkiva. Postopek smo hoteli optimizirati, da bi bil uporaben za analizo in diagnostiko kliničnih vzorcev raka želodca. V grobem smo jih poskusili obogatiti na dva načina: s centrifugiranjem v saharoznem gradientu in s komercialnimi kompleti. Za doseg cilja smo uporabili 10 različnih protokolov, ki smo jih primerjali z vzorcem celokupnih proteinov, izoliranih iz želodčne sluznice. S prenosom western in detekcijo kadherinov smo preverjali ali je prišlo do obogatitve membranskih proteinov. To so transmembranski glikoproteinski receptorji, ki posredujejo od kalcija odvisne stike med celicami. Sprva smo za optimizacijo uporabljali človeške vzorce, ker pa je bil izkoristek nizek, smo za potrebe poskusov prešli na uporabo svinjskega želodca.

Izopiknično centrifugiranje v saharoznem gradientu je bil naš primarni način obogatitve proteinov plazemske membrane. Saharoza je najpogosteje uporabljen medij za očiščenje organelov pri subcelularni frakcionaciji (Harford in Bonifacino, 2009). Visoko kakovostna saharoza je neelektrolit, sorazmerno poceni, zelo topna in se lahko hitro pripravi v različnih gostotah. Poleg tega so znanstveniki že preizkusili različne postopke za očiščenje večine organelov v njej. Gostota saharoze pri centrifugiranju v gradientu narašča od vrha proti dnu centrifugirke. Delci naj bi sedimentirali in se ustavili pri enaki gostoti medija kot jo imajo sami. Čas trajanja centrifugiranja je odvisen od kotne hitrosti in geometrije rotorja. Naš rotor se je razlikoval od tistih, ki so jih uporabili avtorji protokolov, zato smo morali prilagajati čas trajanja gradientnega centrifugiranja. To smo naredili z računalom na spletni strani proizvajalca centrifug Beckman Coulter (BeckmanCoulter, 2013).

Glavni težavi, s katerima smo se srečevali pri protokolih z izopikničnim centrifugiranjem v gradientu, sta bili zelo majhen končni izkupiček dobljenih proteinov in izgubljanje membran oz. membranskih proteinov med postopki. Velikokrat smo namreč dobili močan signal za proteine plazemske membrane v napačni frakciji, npr. v peletu. Almeida in sod. (2014) omenjajo, da je specifičnost pri uporabi in izolaciji posameznih celičnih tipov s centrifugiranjem v gradientu nizka. Tako je možno, da je bila gostota iskanih proteinov plazemske membrane preveč podobna gostoti drugih proteinov in organelov. Tudi različni pufri, v katerih smo na koncu raztapljali proteine plazemske membrane, daljši časi za raztapljanje ali pripomočki (bat, sonifikator) niso zagotovili dovolj velike razlike. Da je

prihajalo do izgub tudi že na začetku, pa se vidi na membranah, pobarvanih s Ponceau S, kjer so proteini navadno dobro vidni v primarnem homogenatu, z naslednjim korakom izolacije pa obarvanost membrane precej pade. Vzrok za to bi lahko bil, da so avtorji uporabljali veliko večje vzorce kot mi in so prilagodili protokole njim. Mi smo namreč začeli poskuse z masami vzorcev okoli 50 mg. To je približna masa pri biopsiji želodca, ki jo odvzamejo bolniku. Da bolnika ne podvržejo novim biopsijam, je potrebno na teh majhnih vzorcih narediti celoten spekter preiskav, s katerimi iščemo molekulske osnove bolezni. Ker so pri kliničnih preiskavah vzorci majhni, smo s tako velikimi vzorci začeli tudi mi. Težavo izgubljanja na posameznih stopnjah smo nato vendarle poskušali rešiti s povečanjem mase vzorcev, najprej iz območja 50 mg na 150 mg in nato na 1 g, a s premalo uspeha.

S tehniko izopikničnega centrifugiranja v gradientu smo dobili dobre rezultate pri spremenjenem protokolu za obogatitev plazemskih proteinov VII (Zhang in sod., 2005). Avtorjev prvotni protokol se poslužuje treh metod diferencialne ekstrakcije, s karbonatom, mešanico kloroform/metanola, tritonom X-114, in centrifugiranja v gradientu saharoze za izolacijo integralnih ter perifernih membranskih proteinov. Mi smo njihov protokol poskusili prilagoditi našemu tkivu in opremi, kjer smo tkivo strli v tekočem dušiku, prvotni čas centrifugiranja v saharoznem gradientu skrajšali, da je ustrezal našemu rotorju, in vzorec namesto na dno, dali na vrh centrifugirke. Z vsemi spremembami, vključno s preračunanim časom centrifugiranja v gradientu, smo dobili boljše rezultate. Plazemske membrane pa so tudi bile v pravi frakciji, kot naj bi bile po teoriji. To pomeni, da je imela saharoza enako gostoto kot obogateni proteini plazemske membrane. Nadalje sta se pri tem protokolu najbolje obnesli ekstrakciji s karbonatom in pufroma za lizo. Pri slednjima je bil učinek boljši, če smo pufru dodali NP-40. Optimiziran protokol na svinjskem želodčnem tkivu smo ponovili s človeškim želodčnim tkivom. Protokol bi bilo potrebno zanj dodatno optimizirati. Poleg obogatenih proteinov plazemske membrane smo na prenosu western namreč dobili še 2 močna signala v obeh naslednjih frakcijah. To pomeni, da centrifugiranje v gradientu ni dobro ločilo proteine plazemske membrane in so se ti pojavljali še v drugih frakcijah.

Najboljši rezultat smo dobili pri izolaciji oz. obogatitvi proteinov plazemskih membran s komercialnima kompletoma reagentov. Ta se ne poslužujeta centrifugiranja v gradientu, poleg tega smo uporabili tudi veliko manjši vzorec kot pri preteklih protokolih. Ker oba kompleta pokrivata nekoliko različne nabore membranskih proteinov, je bilo končne vzorce najbolj smiselno združiti. Najmočnejšo obogatitev smo sicer dobili pri kompletu znamke Calbiochem in imeli pri tem tudi najmanjše izgube pri izločevanju citosolnih proteinov. Pri kompletu znamke Novagen smo dobili močnejši signal pri ekstrakcijskem pufru 2A, s katerim smo obogatili krhkejšje proteine plazemske membrane, vendar smo jih tudi nekaj izgubili pri čiščenju s PBS, kar se lepo vidi pri barvanju s Ponceau S. Z ekstrakcijskim pufrom 2B, s katerim smo obogatili kompleksnejše proteine plazemske membrane, smo iz enako velikega začetnega vzorca obogatili manj proteinov plazemskih membran kot z ekstrakcijskim pufrom 2A.

S komercialnima kompletoma smo tudi najhitreje prišli do končnih rezultatov, njuna slaba stran je le višja cena.

Ko smo potrdili obogatitev proteinov plazemskih membran, smo jih analizirali z 2-DE. To je močna tehnika za analizo razlik med rakastim in normalnim tkivom (L. L. Lin in sod., 2012). Vendar pa tehnika ni najbolj primerna za raztapljanje in ločevanje proteinov plazemskih membran (Helbig in sod., 2010). Proteini plazemske membrane so hidrofobni, slabše topni in se radi oborijo pri IEF. Za raztapljanje hidrofobnih proteinov je najbolje uporabiti sorazmerno visoke koncentracije detergentov (npr. SDS, CHAPS ali Triton X-100) v pufrih za raztapljanje. Ti detergenti porušijo povezave v notrajosti proteinov in med njimi. Dodajanje detergentov v obliki ionov dvojčkov in uporaba agaroze pri trakovih za IEF pa analizo membranskih proteinov olajša. Oliveira in sod. (2014) so predlagali metodo, kjer se proteinske vzorce predhodno frakcionira, nato podvrže IEF. Za slednjo so uporabili IPG trakove z ozkim območjem delovanja. Tako so Chick in sod. (2008) pri preiskavi proteoma jeter podgane odkrili 114 integralnih membranskih proteinov več kot z IPG trakom, ki ima širok razpon pH. Gilmore in sod., (2010) je v preglednem članku predlagal, da se uporabi druge gelske metode, ki so bile uspešne. Tako je predlagal SDS-PAGE pred masno spektrometrijo (MS), kjer se ločene proteine na gelu nareže po velikosti, nato izolira z MS.

Pri naši 2-DE analizi smo nepričakovano najboljši rezultat in največ lis dobili pri prilagojenem protokolu za obogatitev plazemskih proteinov VII, s katerim smo, z uporabo centrifugiranja v gradientu saharoze in nadaljnje diferencialne ekstrakcije z različnimi pufri, uspešno obogatili proteine plazemske membrane. Tu smo uporabili svinjski želodec, kar je bila razlika od vseh ostalih protokolov, kjer smo uporabili 2-DE. To je bil protokol, kjer smo uporabili tudi največji začetni vzorec (1 g), vendar na gela naložili najmanjšo količino proteinov. Količina proteinov je namreč padala med posameznimi koraki postopka obogatitve proteinov. Večje število lis bi zato pričakovali pri protokolu za izolacijo celokupnih proteinov, saj je bilo v tem primeru na gel naloženih več proteinov. Ti proteini so hkrati predstavljali celotni nabor celice, proteini plazemske membrane pa so v njem predstavljali le nek določen odstotek in ne večine vzorca kot pri protokolu za obogatitev proteinov plazemskih proteinov VII. Iz tega lahko sklepamo, da bodo proteini, izolirani po postopku za izolacijo celokupnih proteinov, manj hidrofobni in bodo zato manj verjetno precipitirali pri svoji izoelektrični točki, ko se jih podvrže IEF. Vendar je pri tem postopku IEF je potekala 39.723 Vhs, namesto dobrih 47.000 Vhs, verjetno zaradi preveč amfolitov, zato je naprava omejila napetost ločevanja. Zato se proteini verjetno niso najbolje ločili in smo dobili manj lis na 2-DE gelu.

Večje število lis smo dobili tudi pri protokolu za obogatitev plazemskih proteinov I, ki je enostaven protokol, namenjen izolaciji hidrofobnih proteinov z uporabo mešanice ekstrakcijskih pufrov, brez uporabe centrifugiranja v gradientu saharoze. Pri njem bi pričakovali manj lis zaradi hidrofobnosti vzorca in posledično težje ločitve na IEF. Slednja je potekala normalno, preko 47.000 Vhs. Možen odgovor za pojav večjega števila lis je, da se citosolni proteini, zaradi enostavnosti protokola, niso izločili. Tako je v vzorcu ostal delež citosolnih proteinov, ki ni bil hidrofoben po naravi. Zato je bilo manj verjetno, da bi proteini precipitirali pri svojem pI, ko smo jih podvrgli IEF. Ker so bili proteini boljše ločeni na IEF, smo tudi dobili boljši rezultat pri drugi in končni fazi 2-DE.

Vzorci, izolirani s komercialnima kompletoma, po protokolu za obogatitev plazemskih proteinov VIII so imeli veliko obogatenih proteinov plazemskih membran. Slednje smo

dobro zaznali na prenosu western, slabši rezultat smo pa dobili z 2-DE. Oba kompleta temeljita na ekstrakciji membranskih proteinov v dveh korakih, ki ne zahtevata veliko časa in sta enostavna za uporabo, saj postopek ne vsebuje razbijanja z ultrazvokom, ultracentrifugiranja in inkubacije pri zvišani temperaturi. Calbiochemov komplet je namenjen izolaciji nativnih proteinov plazemskih membran, medtem ko je Novagenov komplet, s svojima ekstrahiranimi pufroma, namenjen izolaciji krhkejših proteinskih kompleksov plazemskih membran ter kompleksnejših transmembranskih proteinov. Sodeč po prenosu Western smo s kompletoma najbolj obogatili proteine plazemske membrane, na 2-DE gelih pa so v nasprotju s pričakovanji imeli najmanj lis. V prvi ponovitvi so se lise slabo videle, kar morda lahko pripišemo slabši ločitvi na IEF, saj je fokusiranje potekalo okoli 44.000 Vhs namesto preko 47.000 Vhs. Mogoč odgovor je tudi, da je prišlo do razlike zaradi uporabe novega čitalca, kjer je za slikanje gelov treba uporabiti folijo, od katere se lahko svetloba odbije. Pri drugi ponovitvi rezultati niso odstopali pri vzorcu C-PM, ki vsebuje nativne proteine plazemske membrane izolirane iz tkiva humanega želodca. Do razlike je prišlo pri vzorcema N-TMB-PM, ki vsebuje kompleksnejše transmembranske proteine, izolirane iz tkiva želodca in drugem zbirku, ki vsebuje vzorca N-TMB-PM ter C-PM, z kompleksnimi transmembranskimi proteini in nativnimi proteini plazemskih membran. Vzorca N-TMA-PM, z krhkimi kompleksi proteinov plazemskih membran, pa nam je zmanjkalo za drugo ponovitev. Vzorec N-TMB-PM je imel okoli 30 % več lis kot v prvi ponovitvi. Do tega je mogoče prišlo zaradi boljše ločitve vzorca, podvrženega IEF, saj je slednja potekala normalno, ali zaradi boljše ulitega gela za drugo stopnjo 2-DE. Do zelo velikega odstopanja od prvega ponovitve pa je prišlo pri drugem zbirku. Tu smo namreč dobili kar 197 lis v nasprotju z 41, ki smo jih dobili prvokrat. Zakaj je prišlo do tako velike razlike, je težko obrazložiti. Drugi zbirki se od prvega razlikuje po tem da ne vsebuje vzorca N-TMA-PM in je IEF potekala normalno 47.000 VHS, namesto okoli 44.000 Vhs. Boljše potekanje IEF in ulivanje gelov lahko obrazloži boljši rezultat, kot smo videli pri drugi ponovitvi vzorca N-TMB-PM. Vendar je razlika pri drugem zbirku prevelika, da bi obrazložila tako razliko v dobljenih rezultatih. Koliko je vplivalo pomanjkanje vzorca N-TMA-PM v drugem zbirku na veliko boljši rezultat druge ponovitve, je težko oceniti. Možno je, da so vzorci v prvem zbirku bili zaradi svojega širokega nabora proteinov plazemskih membran veliko bolj hidrofobni po svoji naravi kot drugi zbirki. Slednje bi obrazložilo boljšo ločitev na IEF, saj bi proteini zbirka manj precipitirali pri svoji pI. Da bi bolje obrazložili rezultat drugega zbirka bi potrebovali v njem še vzorec N-TMA-PM, ki vsebuje krhke komplekse proteinov plazemskih membran.

Z iskanjem za biološkimi označevalci po računalniških zbirkah in s sestavo manjšega preglednega seznama lahko zbrane okvarjene proteine predlagamo za nadaljnje raziskave raka želodca. Če bi bil v nadaljevanju kateri od teh proteinov dokazan kot diagnostični biološki označevalec raka želodca, bi bolezen lahko začeli zdraviti, preden bi postala smrtonosna. Lahko bi celo izdelali protitelo za zdravljenje. Pri posameznih proteinih tudi vidimo napake, ki so povzročile bolezen in te lahko predstavljajo prvi korak v nadaljnjem raziskovanju raka in spremenjene fiziologije želodca. Za vsak protein, ki smo ga vpisali v našo preglednico, smo našli več podatkov, ki se navezujejo na različne podatkovne zbirke. Ti podatki lahko pripeljejo do naslednjega koraka v raziskovanju raka želodca in tudi drugih bolezni, ki jih ti okvarjeni proteini povzročajo.



Z diplomsko nalogo smo dokazali, da je možno obogatiti proteine plazemske membrane iz tkiva želodca s centrifugiranjem v saharoznem gradientu. Vendar je na žalost metoda zelo neučinkovita, sploh za majhne vzorce. Zato bi zanje raje predlagali izolacijo z uporabo komercialnih kompletov, ki so prilagojeni za izolacijo proteinov plazemske membrane. Taki kompleti so veliko bolj učinkoviti za obogatitev proteinov plazemske membrane, njihova slabost je le visoka cena. Pokazali smo, da proteomska tehnika 2-DE za ločevanje zelo hidrofobnih vzorcev ni najbolj primerna. Zaradi njihove precipitacije pri njihovi izoelektrični točki lahko v prvi stopnji izgubimo velik del nabora proteinov. Predlagali bi uporabo alternativnih tehnik, kjer se hidrofobni vzorci ne podvržejo izoelektričnemu fokusiranju in se tako ne izgubijo s precipitacijo. Katera tehnika je najbolj učinkovita, je odvisno od narave vzorca.

## 5.2 SKLEPI

- S cenovno ugodno tehniko centrifugiranja v gradientu je možno obogatiti proteine plazemske membrane, vendar je pri vzorcih izguba prevelika, da bi bila tehnika uporabna za majhne vzorce. Tehniko lahko uporabimo za večje vzorce, kjer dosegljivost večjih količin preiskovanega materiala ne predstavlja težav. Za majhne klinične vzorce pa priporočamo uporabo komercialnih kompletov, čeprav so zaradi tega stroški večji. Odvisno od velikosti vzorca se lahko nato odločimo, katero tehnologijo bomo uporabili.
- 2-DE ni najbolj primerna za ločevanje hidrofobnih proteinov - še posebno, če so vzorci izredno majhni. To je sicer možno, vendar je zaradi izgub pri izoelektričnem fokusiranju zaradi precipitacije, nepriporočljivo. Če je le možno, predlagamo uporabo večjih vzorcev ali pa zamenjavo tehnologije, kjer vzorcev ne podvržemo izoelektričnemu fokusiranju. Kakšno tehniko bomo izbrali je odvisno od narave vzorca.
- Z iskanjem po računalniških bazah lahko najdemo proteine, ki so bili objavljeni kot biološki označevalci raka in imajo verjetno tudi vlogo v splošni fiziologiji želodca. Tiste, ki še niso bili potrjeni za raka želodca, lahko predlagamo za nadaljnje raziskave kot možne označevalce omenjene vrste raka.

## **6 POVZETEK**

Za obogatitev proteinov plazemskih membran smo uporabili 10 različnih protokolov. Z uporabo gradientnega centrifugiranja v saharozi smo ugotovili, da proteine plazemske membrane lahko obogatimo. Vendar je tehnika neuporabna za majhne vzorce in zato po naši presoji ni primerna za obogatitev proteinov plazemskih membran pri majhnih vzorcih iz kliničnih biopsij. Ugotovili smo tudi, da tehnika 2-DE, ki je sicer zelo uporabljana v proteomiki, za ločevanje zelo hidrofobnih proteinov ni primerna. Zato predlagamo uporabo metod, kjer se hidrofobnih vzorcev ne bi podvrglo izoelektričnemu fokusiranju. Z iskanjem po računalniških bazah lahko najdemo potencialne biološke označevalce raka, proteine, ki imajo vlogo v splošni fiziologiji želodčnih tkiv, vendar je nato potrebno še z drugimi tehnikami potrditi, ali so ti tudi možni označevalci raka želodca.

## 7 VIRI

- Almeida M., Garcia-Montero A.C., Orfao A. 2014. Cell purification: a new challenge for biobanks. V: Pathobiology. Basel, Karger: 261–275 str. .
- Bai Z., Ye Y., Liang B., Xu F., Zhang H., Zhang Y., Peng J., Shen D., Cui Z., Zhang Z., Wang S. 2011. Proteomics-based identification of a group of apoptosis-related proteins and biomarkers in gastric cancer. *Int J Oncol*, 38, 2: 375–383
- BeckmanCoulter 2013. Rotors | Beckman Centrifuges - Beckman Coulter, Inc. <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/centrifugation/rotors/index.htm?t=3> (marec 2016)
- Canadi Jurešić G., Blagović B. 2011. The influence of fermentation conditions and recycling on the phospholipid and fatty acid composition of the brewer's yeast plasma membranes. *Folia Microbiol (Praha)*, 56, 3: 215–224
- Catalano V., Labianca R., Beretta G.D., Gatta G., de Braud F., Van Cutsem E. 2009. Gastric cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 71, 2: 127–164
- Chen C.D., Wang C.S., Huang Y.H., Chien K.Y., Liang Y., Chen W.J., Lin K.H. 2007. Overexpression of CLIC1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance. *Proteomics*, 7, 1: 155–167
- Chen Y., Pan K., Li S., Xia J., Wang W., Chen J., Zhao J., Lü L., Wang D., Pan Q., Wang Q., Li Y., He J., Li Q. 2012. Decreased expression of V-set and immunoglobulin domain containing 1 (VSIG1) is associated with poor prognosis in primary gastric cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 106, 3: 286–293
- Cheng C.C., Lu N., Peng C.L., Chang C.C., Mai F.D., Chen L.Y., Liao M.H., Wang W.M., Chang J. 2012. Targeting to overexpressed glucose-regulated protein 78 in gastric cancer discovered by 2D DIGE improves the diagnostic and therapeutic efficacy of micelles-mediated system. *Proteomics*, 12, 15–16: 2584–2597
- Chiba T., Marusawa H., Ushijima T. 2012. Inflammation-associated cancer development in digestive organs: mechanisms and roles for genetic and epigenetic modulation. *Gastroenterology*, 143, 3: 550–563
- Chick J.M., Haynes P.A., Bjellqvist B., Baker M.S. 2008. A combination of immobilised pH gradients improves membrane proteomics. *J Proteome Res*, 7, 11: 4974–4981
- Chong P.K., Lee H., Loh M.C., Choong L.Y., Lin Q., So J.B., Lim K.H., Soo R.A., Yong W.P., Chan S.P., Smoot D.T., Ashktorab H., Yeoh K.G., Lim Y.P. 2010. Upregulation of plasma C9 protein in gastric cancer patients. *Proteomics*, 10, 18: 3210–3221
- Forbes S.A., Beare D., Gunasekaran P., Leung K., Bindal N., Boutselakis H., Ding M., Bamford S., Cole C., Ward S., Kok C.Y., Jia M., De T., Teague J.W., Stratton

- M.R., McDermott U., Campbell P.J. 2015. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Research*, 43, D1: D805–D811
- GE Healthcare Biosciences AB 2008. GE Healthcare, ImageMaster 2D Platinum 7.0, User Manual. 28–9381–02 AA izd., Upssala, GE Healthcare. ([https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc28938102\\_20130526231344.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc28938102_20130526231344.pdf)) (marec 2015)
- Gilmore J.M., Washburn M.P. 2010. Advances in shotgun proteomics and the analysis of membrane proteomes. *J Proteomics*, 73, 11: 2078–2091
- Guo T., Fan L., Ng W.H., Zhu Y., Ho M., Wan W.K., Lim K.H., Ong W.S., Lee S.S., Huang S., Kon O.L., Sze S.K. 2012. Multidimensional Identification of Tissue Biomarkers of Gastric Cancer. *J Proteome Res*, 11, 6: 3405–3413
- Hanahan D., Weinberg R.A. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144, 5: 646–674
- Harford J.B., Bonifacino J.S. 2009. Subcellular Fractionation and Isolation of Organelles. V J. S. Bonifacino in M. Dasso in J. B. Harford in J. Lippincott-Schwartz in K. M. Yamada (ur.). *Current Protocols in Cell Biology*. Hoboken, John Wiley & Sons, Inc.: 3.1.1–3.1.9
- Healthcare G.E. 2004. 2-D Electrophoresis, ([http://www.gelifesciences.com/file\\_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/2-D%20Electrophoresis.pdf](http://www.gelifesciences.com/file_source/GELS/Service%20and%20Support/Documents%20and%20Downloads/Handbooks/pdfs/2-D%20Electrophoresis.pdf)) (marec 2016)
- Helbig A.O., Heck A.J., Slijper M. 2010. Exploring the membrane proteome—challenges and analytical strategies. *J Proteomics*, 73, 5: 868–878
- Hoffmann K., Blaudszun J., Brunken C., Höpker W.W., Tauber R., Steinhart H. 2005. Distribution of polyunsaturated fatty acids including conjugated linoleic acids in total and subcellular fractions from healthy and cancerous parts of human kidneys. *Lipids*, 40, 3: 309–315
- Hubbard A.L., Wall D.A., Ma A. 1983. Isolation of rat hepatocyte plasma membranes. I. Presence of the three major domains. *J Cell Biol*, 96, 1: 217–229
- Jensen E.C. 2012. The basics of western blotting. *Anat Rec (Hoboken)*, 295, 3: 369–371
- Kampen K.R. 2011. Membrane Proteins: The Key Players of a Cancer Cell. *The Journal of Membrane Biology*, 242, 2: 69–74
- Kim H.K., Reyzer M.L., Choi I.J., Kim C.G., Kim H.S., Oshima A., Chertov O., Colantonio S., Fisher R.J., Allen J.L., Caprioli R.M., Green J.E. 2010. Gastric cancer-specific protein profile identified using endoscopic biopsy samples via MALDI mass spectrometry. *J Proteome Res*, 9, 8: 4123–4130

- Kočevar N. 2007. Preiskava proteoma z dvodimenzionalno gelsko elektroforezo pri raku želodca: optimizacija postopka in preliminarni poskusi. Diplomsko naloga. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, 75
- Kočevar N., Odreman F., Vindigni A., Grazio S.F., Komel R. 2012. Proteomic analysis of gastric cancer and immunoblot validation of potential biomarkers. *World J Gastroenterol*, 18, 11: 1216–1228
- Lee J.H., Kim K.M., Cheong J.-H., Noh S.H. 2012. Current Management and Future Strategies of Gastric Cancer. *Yonsei Medical Journal*, 53, 2: 248
- Lemmon M.A. 2009. Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp Cell Res*, 315, 4: 638–648
- Lin L.-L., Huang H.-C., Juan H.-F. 2012. Discovery of biomarkers for gastric cancer: A proteomics approach. *Journal of Proteomics*, 75, 11: 3081–3097
- Magrane M., Consortium U. 2011. UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. Database (Oxford), 2011: bar009  
<http://www.uniprot.org/> (februar 2016)
- McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) 2015. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM.  
<http://omim.org/> (februar 2016)
- Mortz E., Krogh T.N., Vorum H., Görg A. 2001. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics*, 1, 11: 1359–1363
- Nakamura E., Kozaki K., Tsuda H., Suzuki E., Pimkhaokham A., Yamamoto G., Irie T., Tachikawa T., Amagasa T., Inazawa J., Imoto I. 2008. Frequent silencing of a putative tumor suppressor gene melatonin receptor 1 A (MTNR1A) in oral squamous-cell carcinoma. *Cancer Science*, 99, 7: 1390–1400
- Oliveira B.M., Coorssen J.R., Martins-de-Souza D. 2014. 2DE: the phoenix of proteomics. *Journal of proteomics*, 104: 140–150
- Onkološki inštitut Ljubljana R. raka R.S. Epidemiologija in register raka 2013. Rak v Sloveniji 2009, Onkološki inštitut Ljubljana, Epidemiologija in register raka, Register raka Republike Slovenije.
- Pietrantonio F., De Braud F., Da Prat V., Perrone F., Pierotti M.A., Gariboldi M., Fanetti G., Biondani P., Pellegrinelli A., Bossi I., Di Bartolomeo M. 2013. A review on biomarkers for prediction of treatment outcome in gastric cancer. *Anticancer Res*, 33, 4: 1257–1266
- Pruitt K., Brown G., Tatusova T., Maglott D. 2012. The Reference Sequence (RefSeq) Database.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein> (april 2014)

- Rotilio D., Della Corte A., D'Imperio M., Coletta W., Marcone S., Silvestri C., Giordano L., Di Michele M., Donati M.B. 2012. Proteomics: Bases for protein complexity understanding. *Thrombosis Research*, 129, 3: 257–262
- Saqui-Salces M., Merchant J.L. 2010. Hedgehog signaling and gastrointestinal cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1803, 7: 786–795
- Shukla H.D., Vaitiekunas P., Cotter R.J. 2012. Advances in membrane proteomics and cancer biomarker discovery: Current status and future perspective. *PROTEOMICS*, 12, 19–20: 3085–3104
- Steelman L.S., Chappell W.H., Abrams S.L., Kempf R.C., Long J., Laidler P., Mijatovic S., Maksimovic-Ivanic D., Stivala F., Mazzarino M.C., Donia M., Fagone P., Malaponte G., Nicoletti F., Libra M., Milella M., Tafuri A., Bonati A., Bäsecke J., Cocco L., Evangelisti C., Martelli A.M., Montalto G., Cervello M., McCubrey J.A. 2011. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany NY)*, 3, 3: 192–222
- Sun J., Ahmad S., Chen S., Tang W., Zhang Y., Chen P., Lin X. 2005. Cochlear gap junctions coassembled from Cx26 and 30 show faster intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling than homomeric counterparts. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 288, 3: C613-623
- Touster O., Aronson N.N., Dulaney J.T., Hendrickson H. 1970. Isolation of rat liver plasma membranes. Use of nucleotide pyrophosphatase and phosphodiesterase I as marker enzymes. *J Cell Biol*, 47, 3: 604–618
- Turk M., Plemenitaš A. 2003. Signalna pot odziva hog na povečano slanost pri halofilni crni kvasovki *Hortaea weneckii* : doktorska disertacija = Hog signaling pathway in halophilic black yeast *Hortaea werneckii* : doctoral thesis, Ljubljana: [M. Turk].
- US National Library of Medicine National Institutes of Health 2015. Pubmed. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (oktober 2015)
- Wellcome Trust Sanger Institute, Genome Research Limited 2015. Catalogue of somatic mutations in cancer. <http://www.sanger.ac.uk/> (april 2014)
- Wu W.K., Cho C.H., Lee C.W., Fan D., Wu K., Yu J., Sung J.J. 2010. Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer. *Cancer Lett*, 295, 2: 144–153
- Wu W.K.K., Cho C.H., Lee C.W., Fan D., Wu K., Yu J., Sung J.J.Y. 2010. Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer. *Cancer Letters*, 295, 2: 144–153
- Xia Y.-J., Ma Y.-Y., He X.-J., Wang H.-J., Ye Z.-Y., Tao H.-Q. 2011. Suppression of selenium-binding protein 1 in gastric cancer is associated with poor survival. *Human Pathology*, 42, 11: 1620–1628

- Yeoh L.C., Loh C.K., Gooi B.H., Singh M., Gam L.H. 2010. Hydrophobic protein in colorectal cancer in relation to tumor stages and grades. *World J Gastroenterol*, 16, 22: 2754–2763
- Zhang L., Xie J., Wang X., Liu X., Tang X., Cao R., Hu W., Nie S., Fan C., Liang S. 2005. Proteomic analysis of mouse liver plasma membrane: use of differential extraction to enrich hydrophobic membrane proteins. *Proteomics*, 5, 17: 4510–4524
- Zhang L.H., Zhang X. 2010. Roles of GRP78 in physiology and cancer. *J Cell Biochem*, 110, 6: 1299–1305

## **ZAHVALA**

Zahvalil bi se prof. dr. Radovanu Komelu za možnost dela na tem zanimivem področju in za vse nasvete.

Dr. Nini Kočevar-Britovšek za vso pomoč, ki mi jo je nudila in za zvrhano mero potrpežljivosti.

Prof. dr. Matjažu Zorku za vse spodbudne besede.

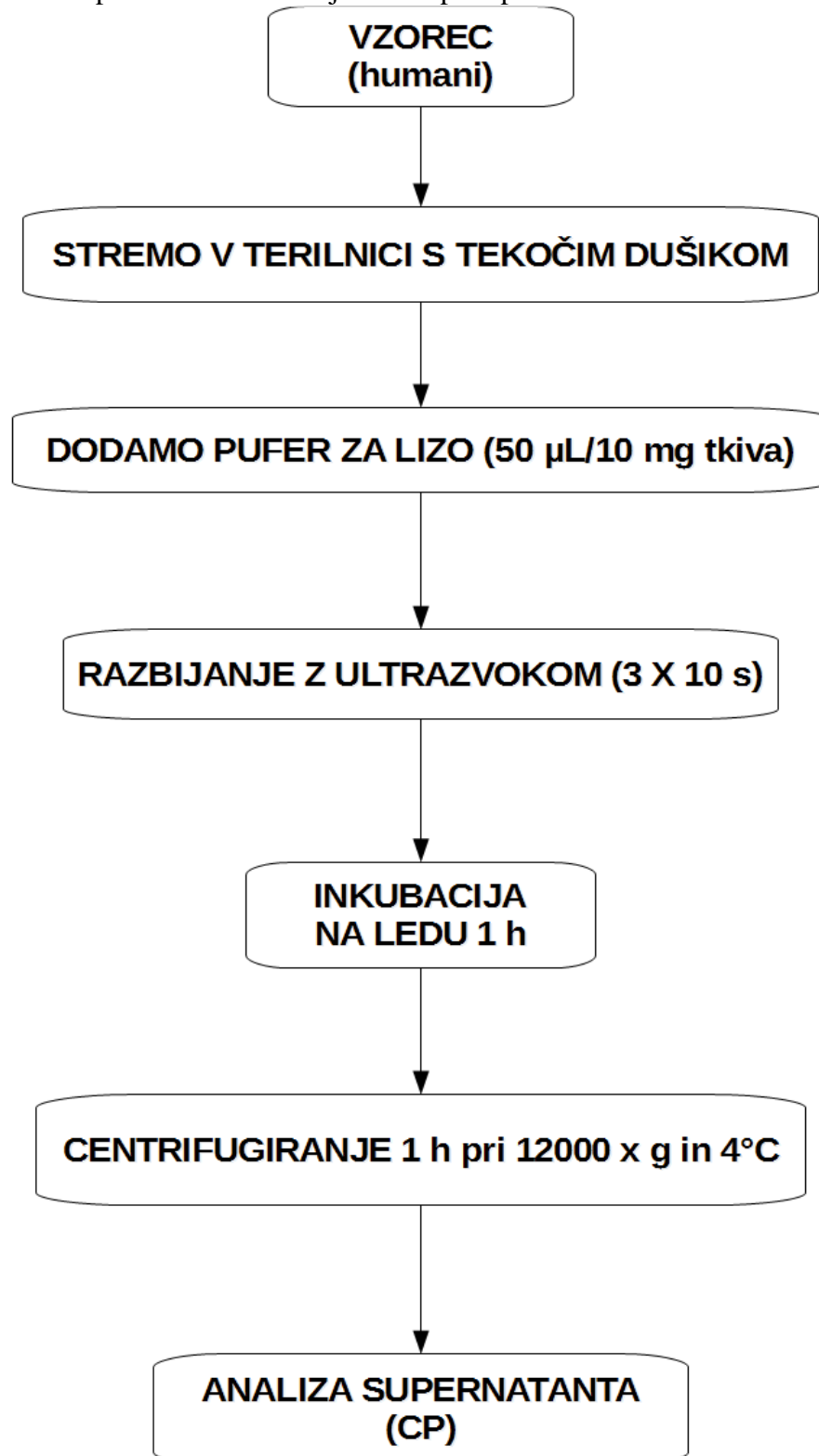
Vsem puncam v L4 za prijetno delovno vzdušje.

Družini za vso podporo.

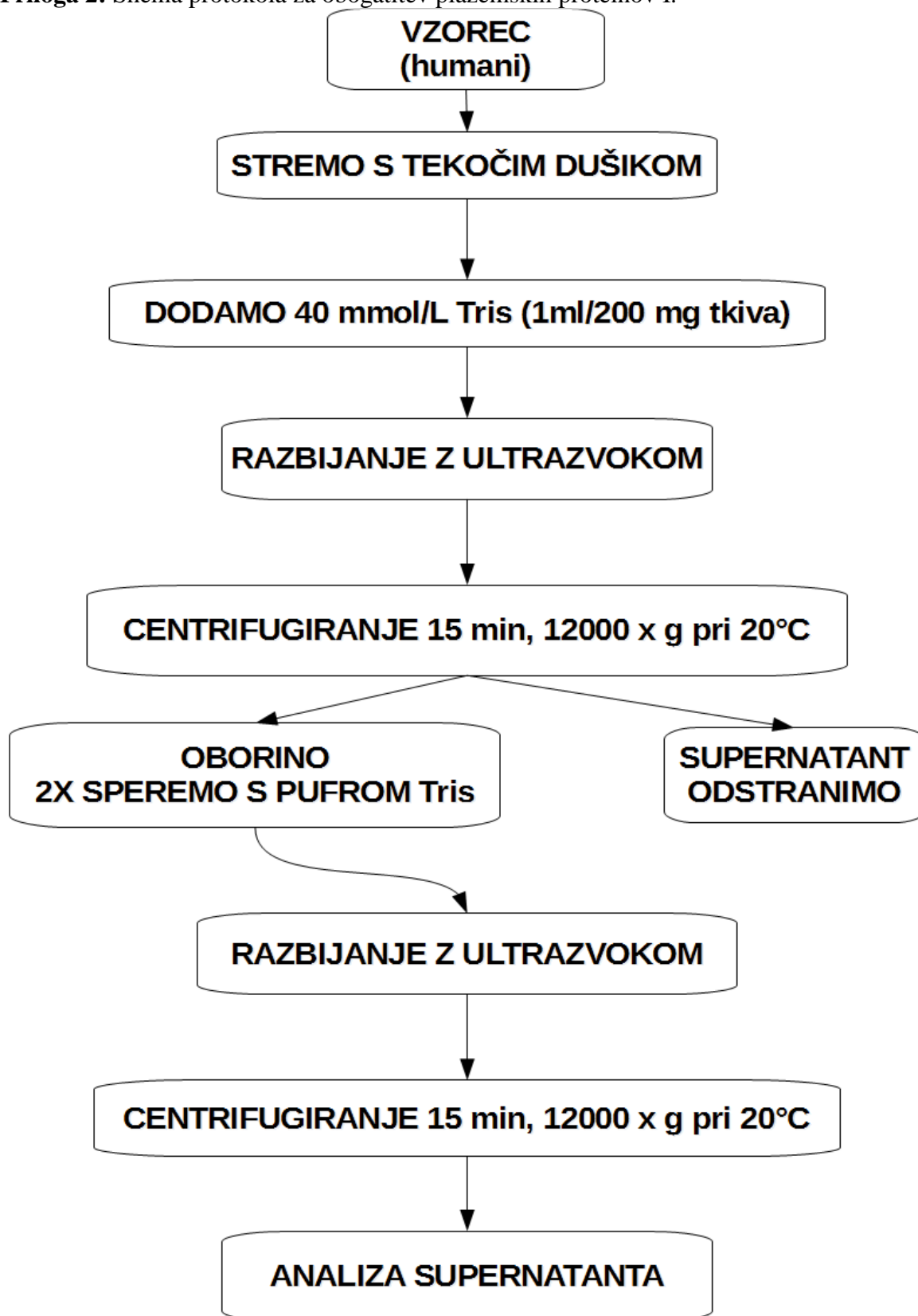


**PRILOGE**

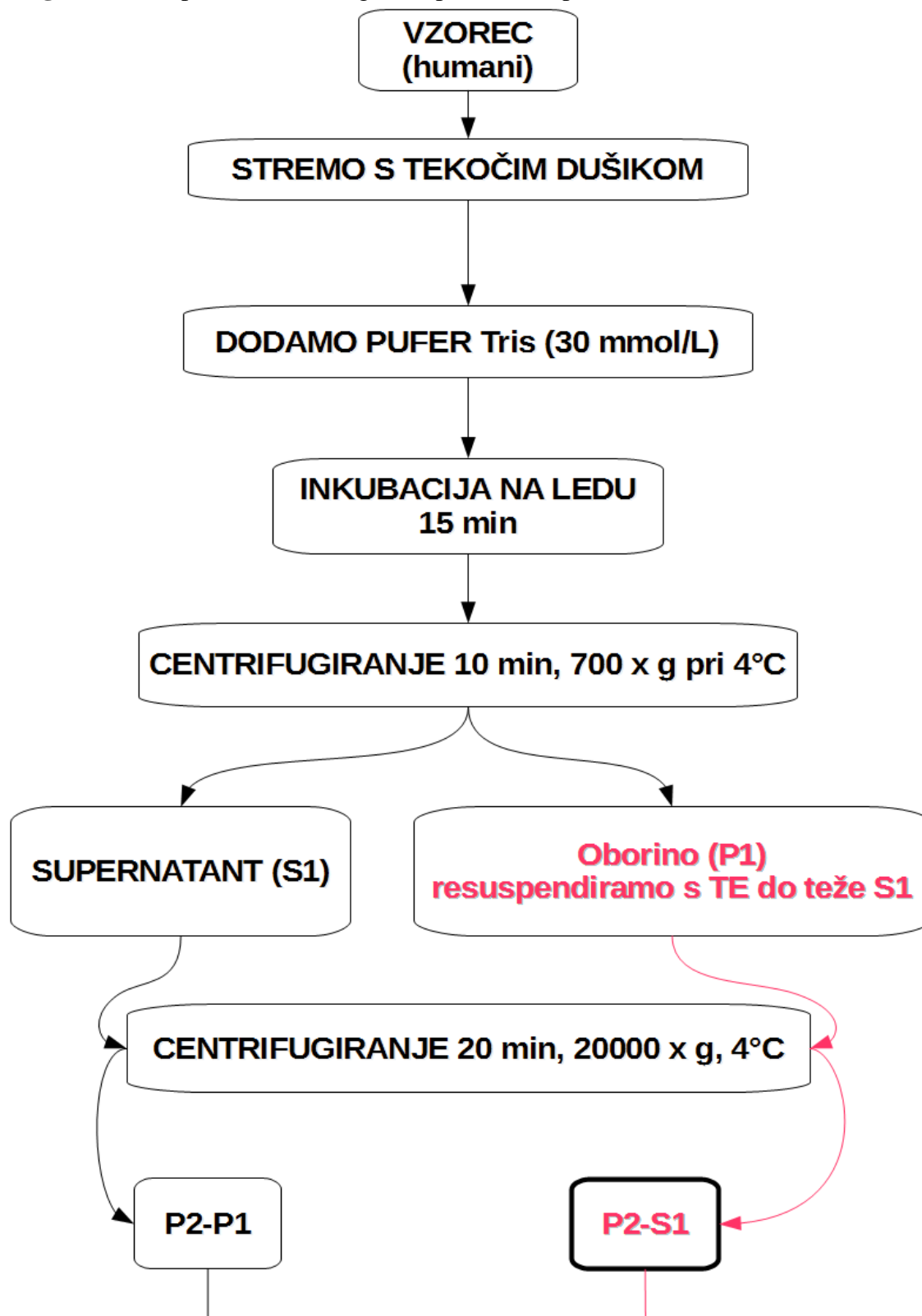
**Priloga 1:** Shema protokola za izolacijo celokupnih proteinov.



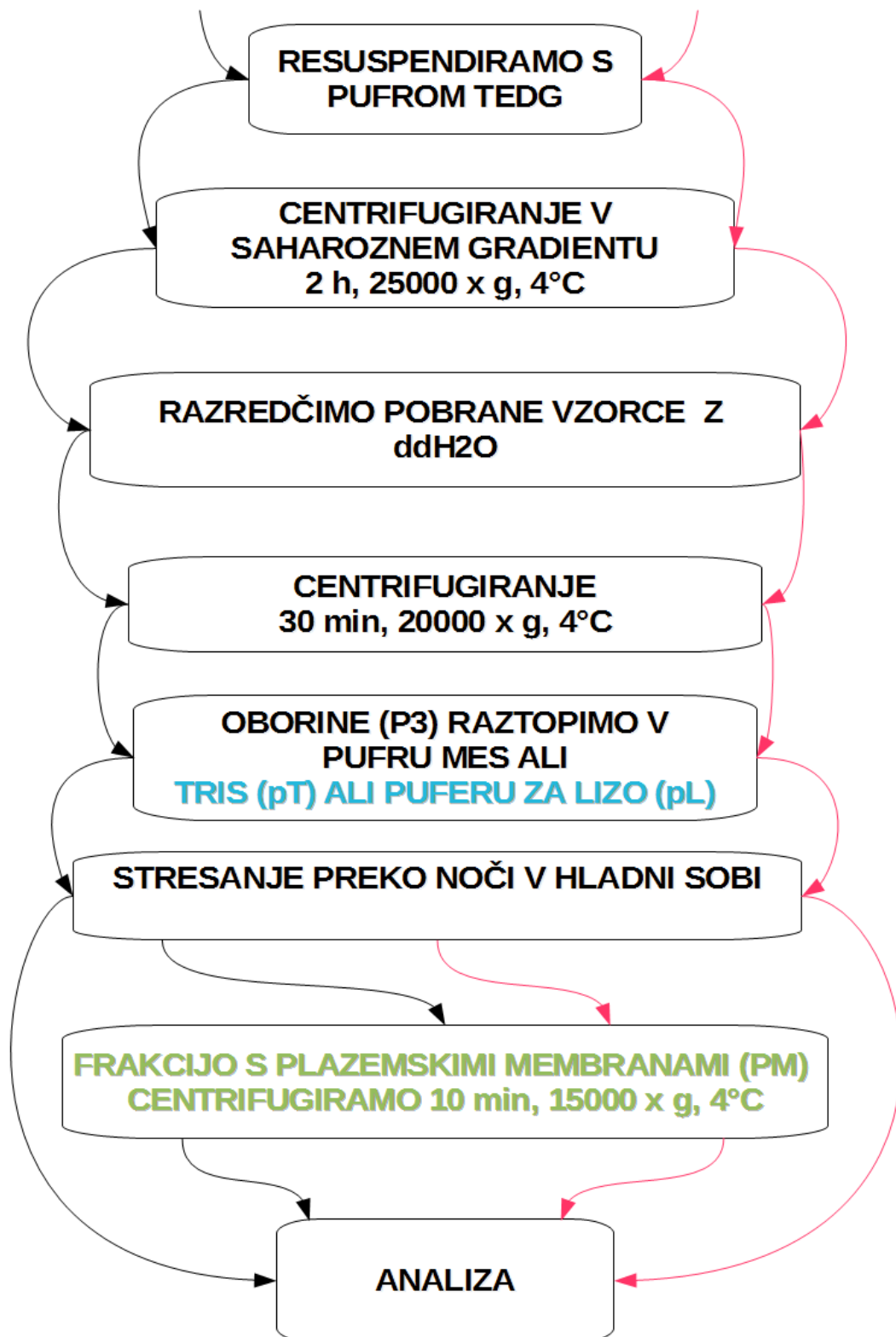
**Priloga 2:** Shema protokola za obogatitev plazemskih proteinov I.



**Priloga 3:** Shema protokola za obogatitev plazemskih proteinov II.

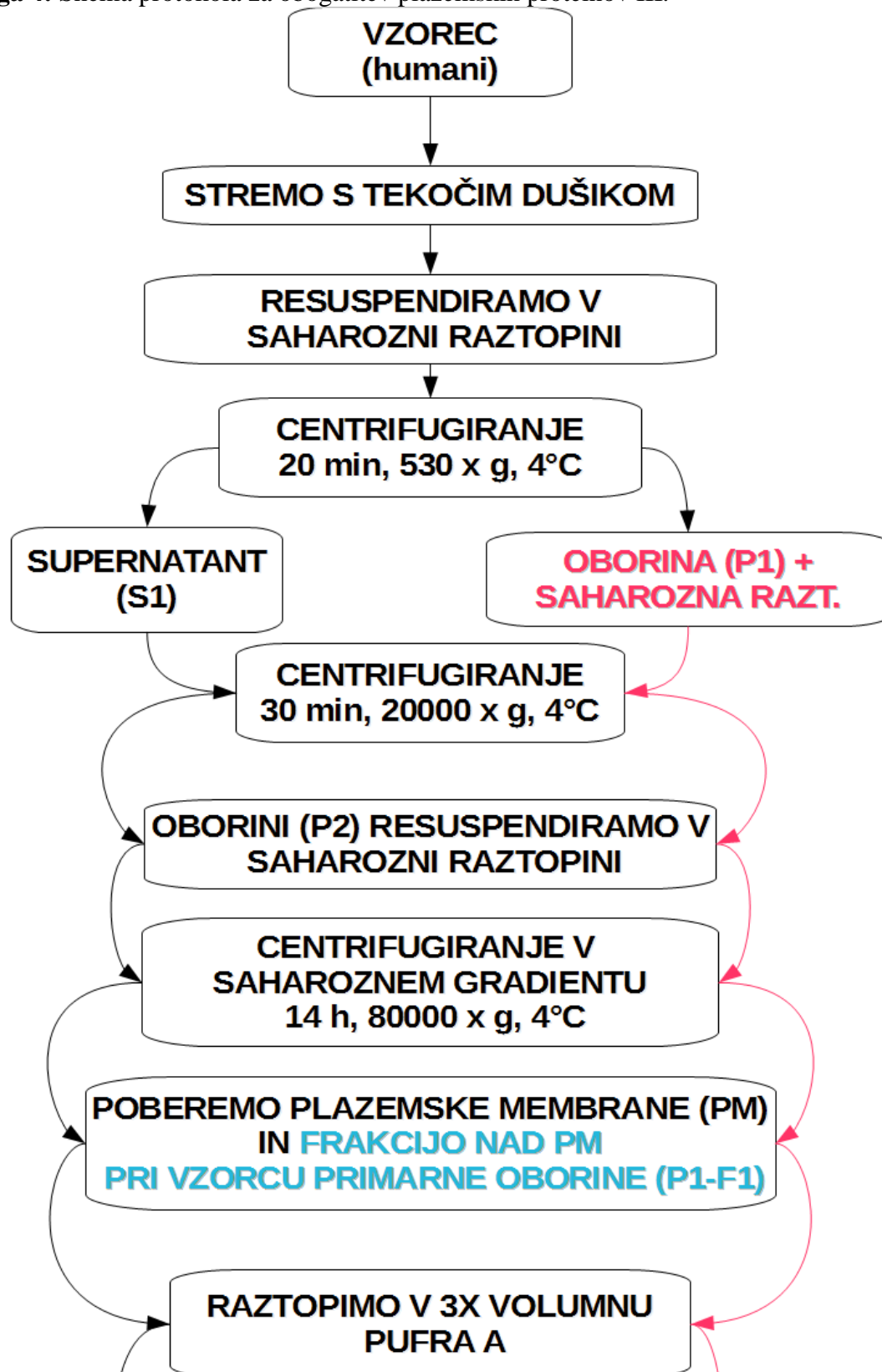


Se nadaljuje na naslednji strani.

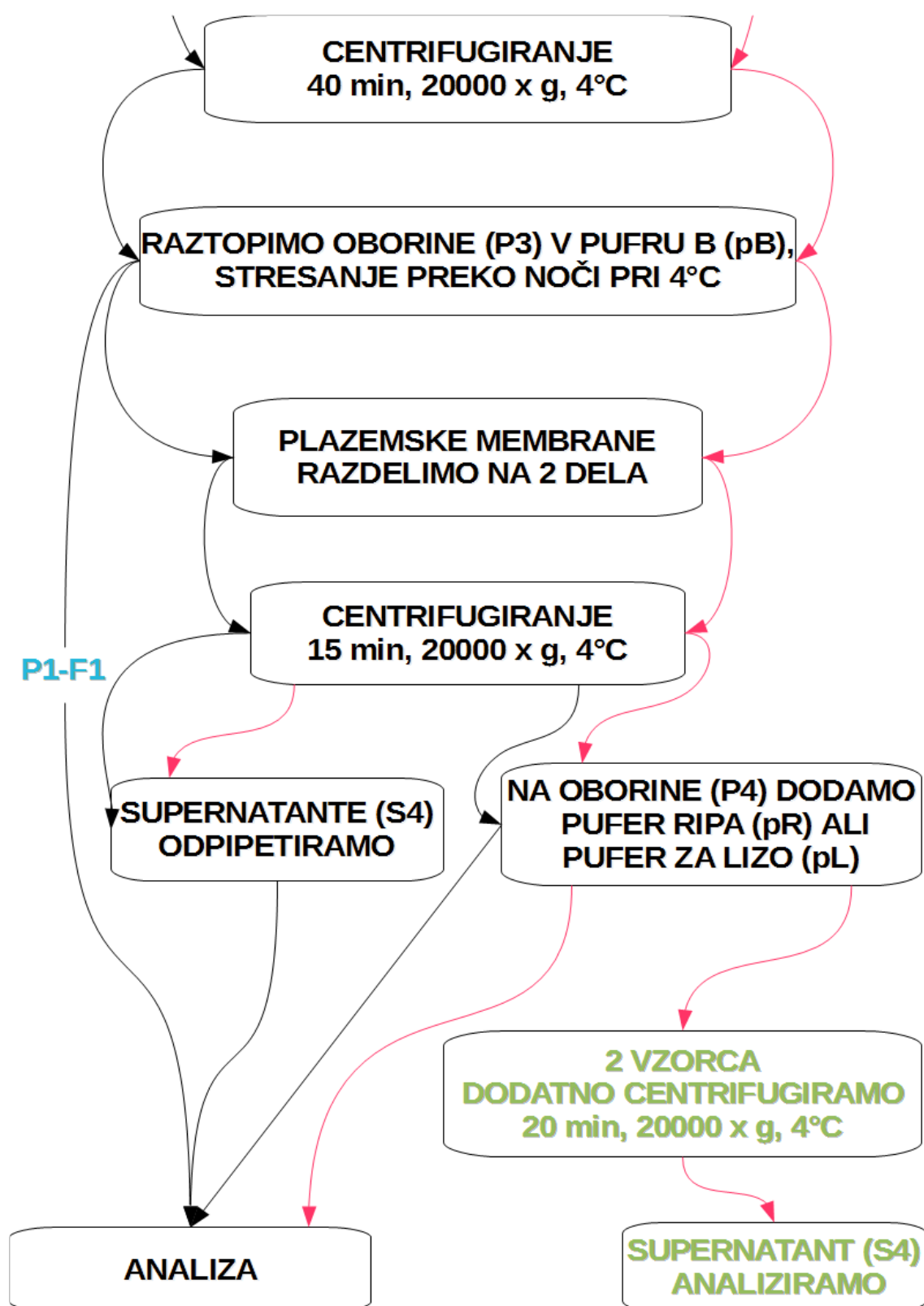


Legenda: Rdeča barva: prva sprememba, ki smo jo naredili glede na originalni protokol in smo jo spremljali do končne analize. Modra barva: druga sprememba originalnega protokola. Zelena barva: tretja sprememba originalnega protokola.

**Priloga 4:** Shema protokola za obogatitev plazemskih proteinov III.

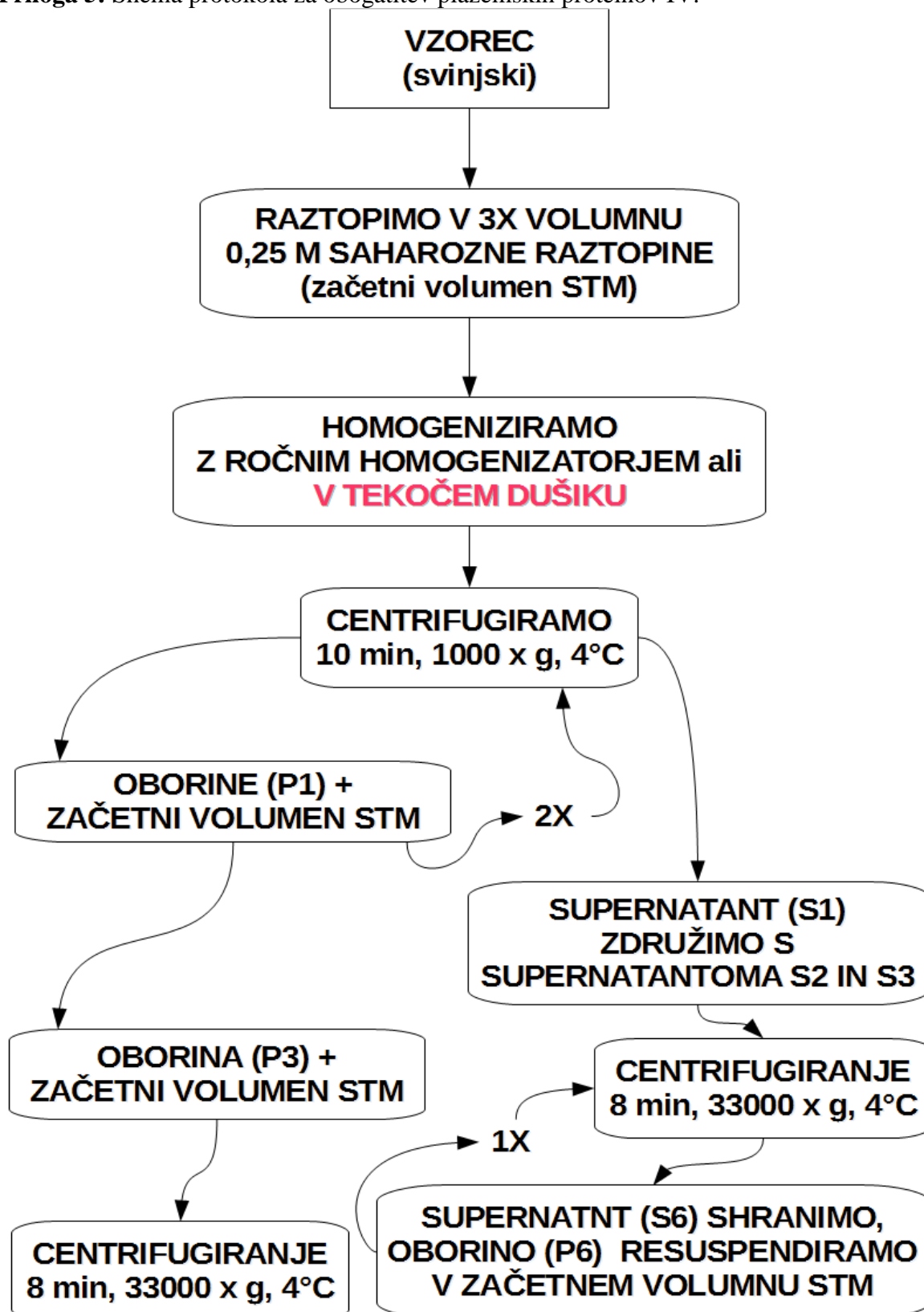


Se nadaljuje na naslednji strani.

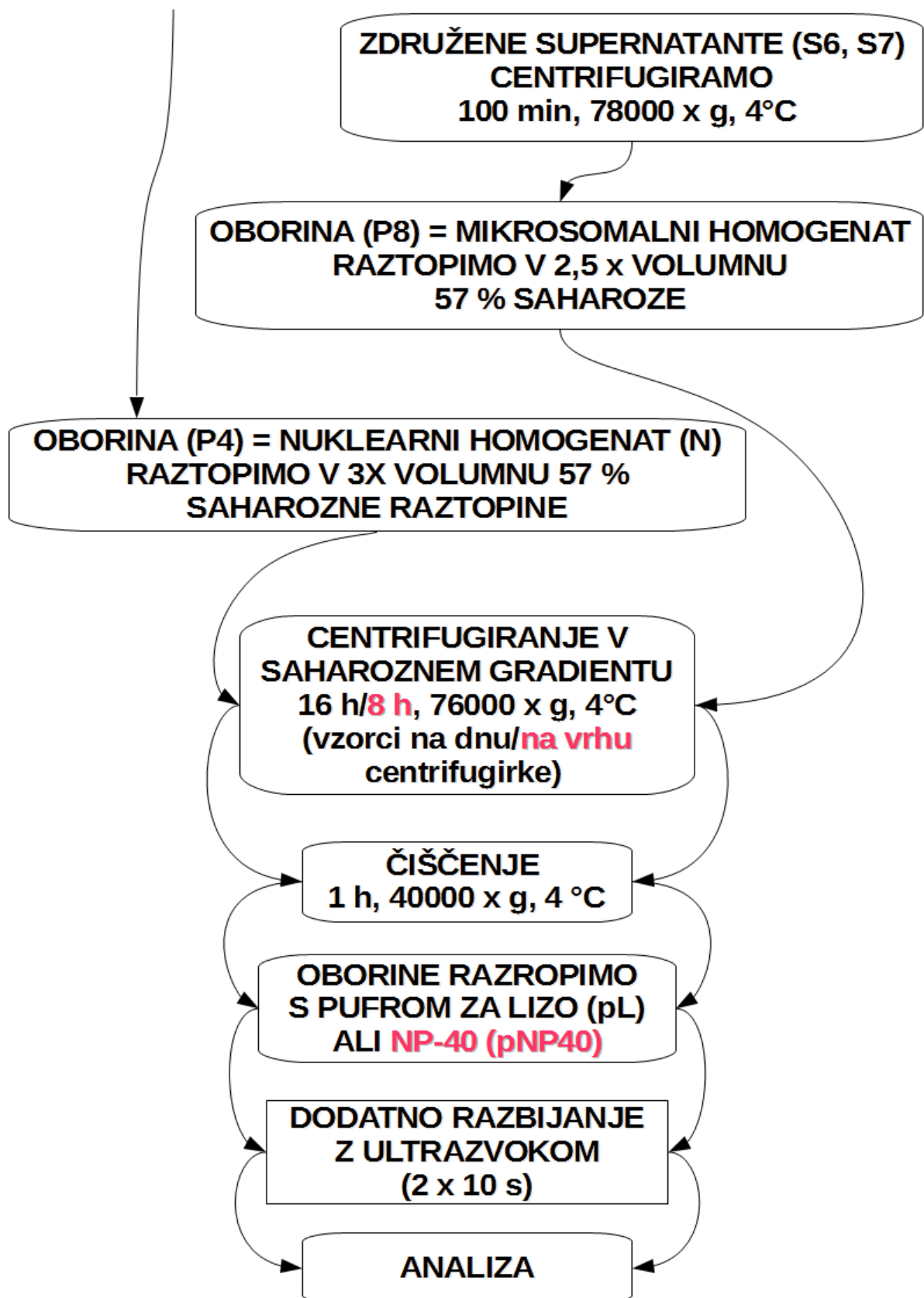


Legenda: Rdeča barva: prva sprememba, ki smo jo naredili glede na originalni protokol in smo jo spremljali do končne analize. Modra barva: druga sprememba originalnega protokola. Zelena barva: tretja sprememba originalnega protokola.

Priloga 5: Shema protokola za obogatitev plazemskih proteinov IV.



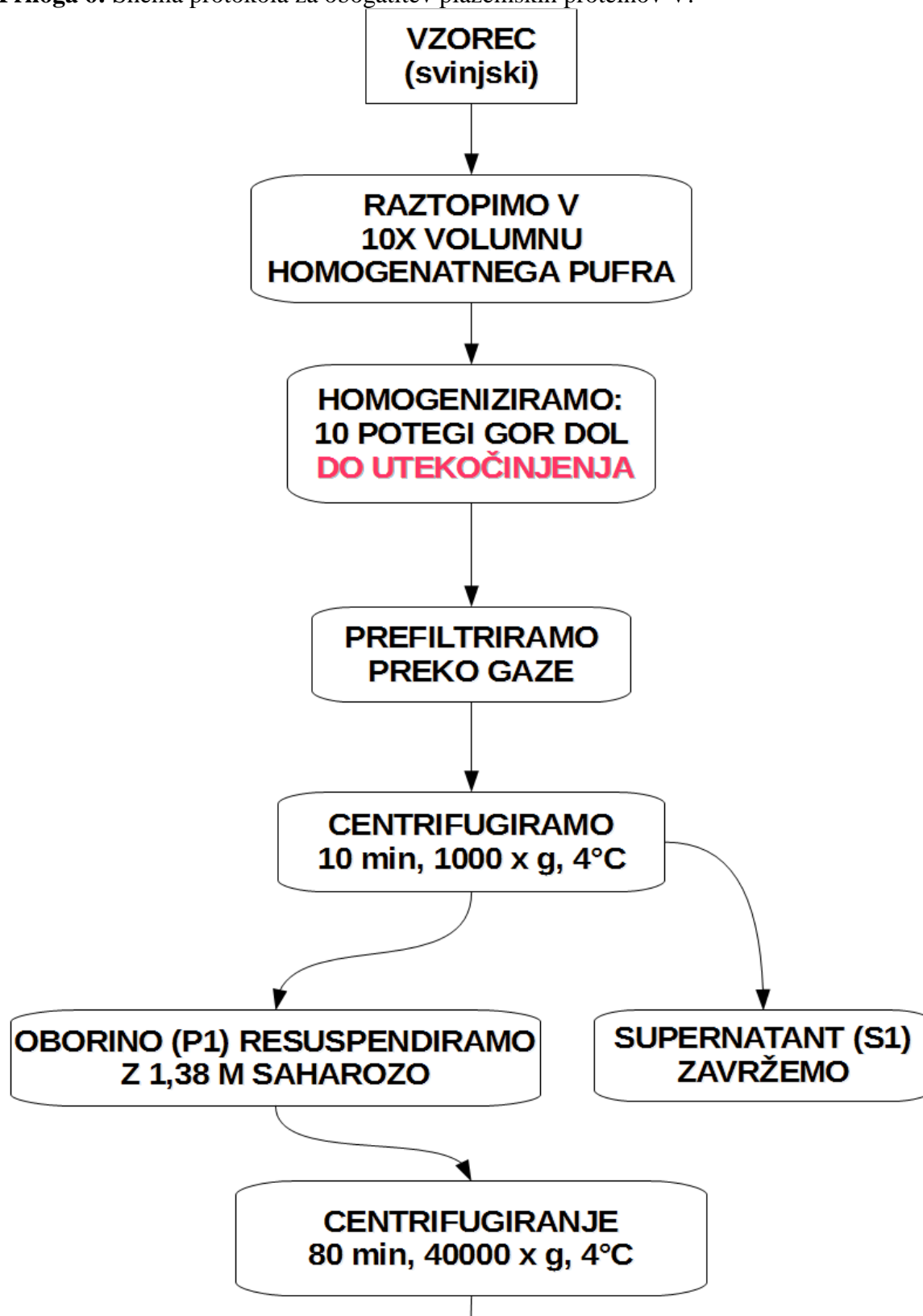
Se nadaljuje na naslednji strani.



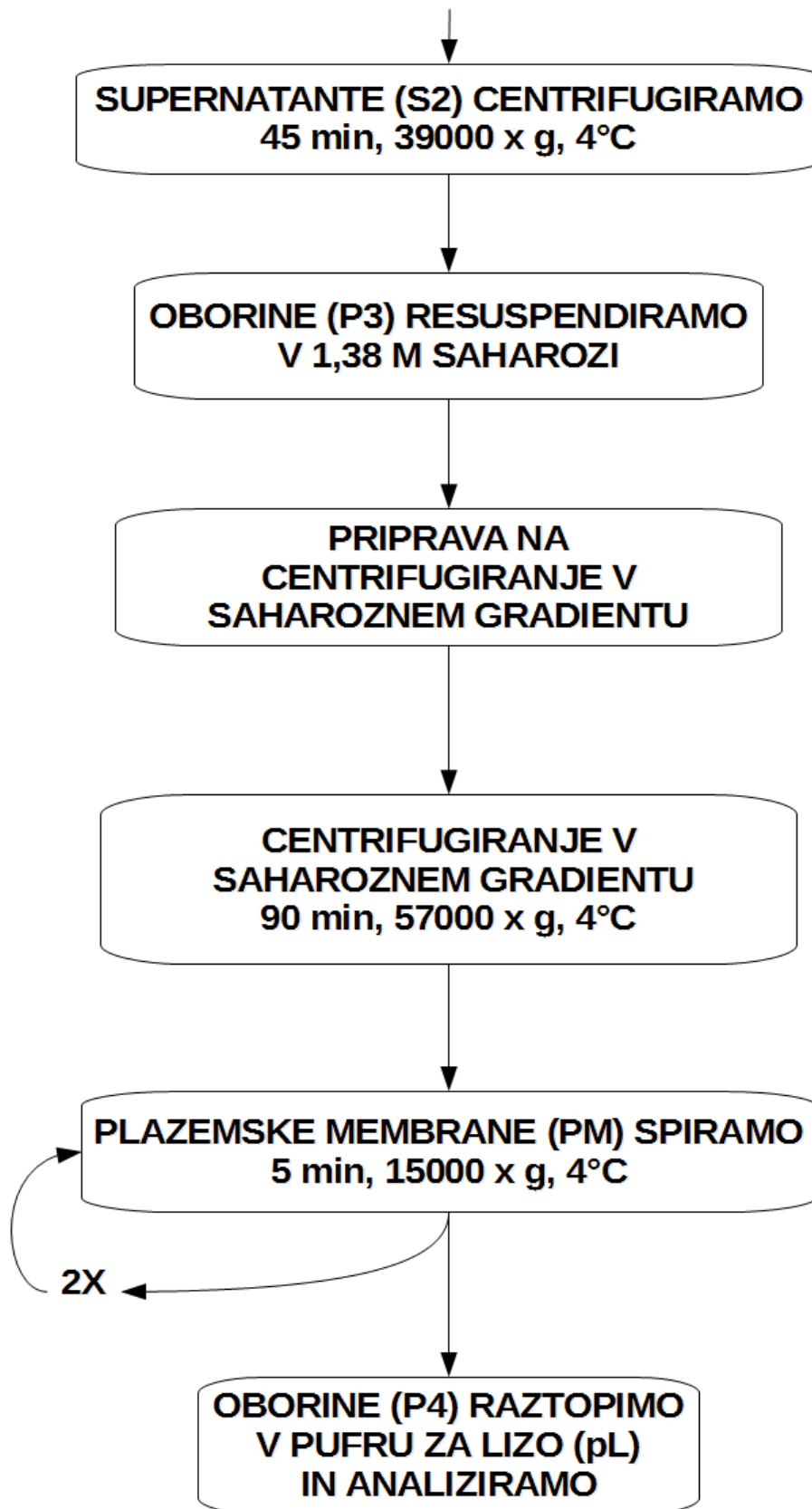
Legenda: Rdeča barva označuje enkratne sprembe v originalnem protokolu.



**Priloga 6:** Shema protokola za obogatitev plazemskih proteinov V.

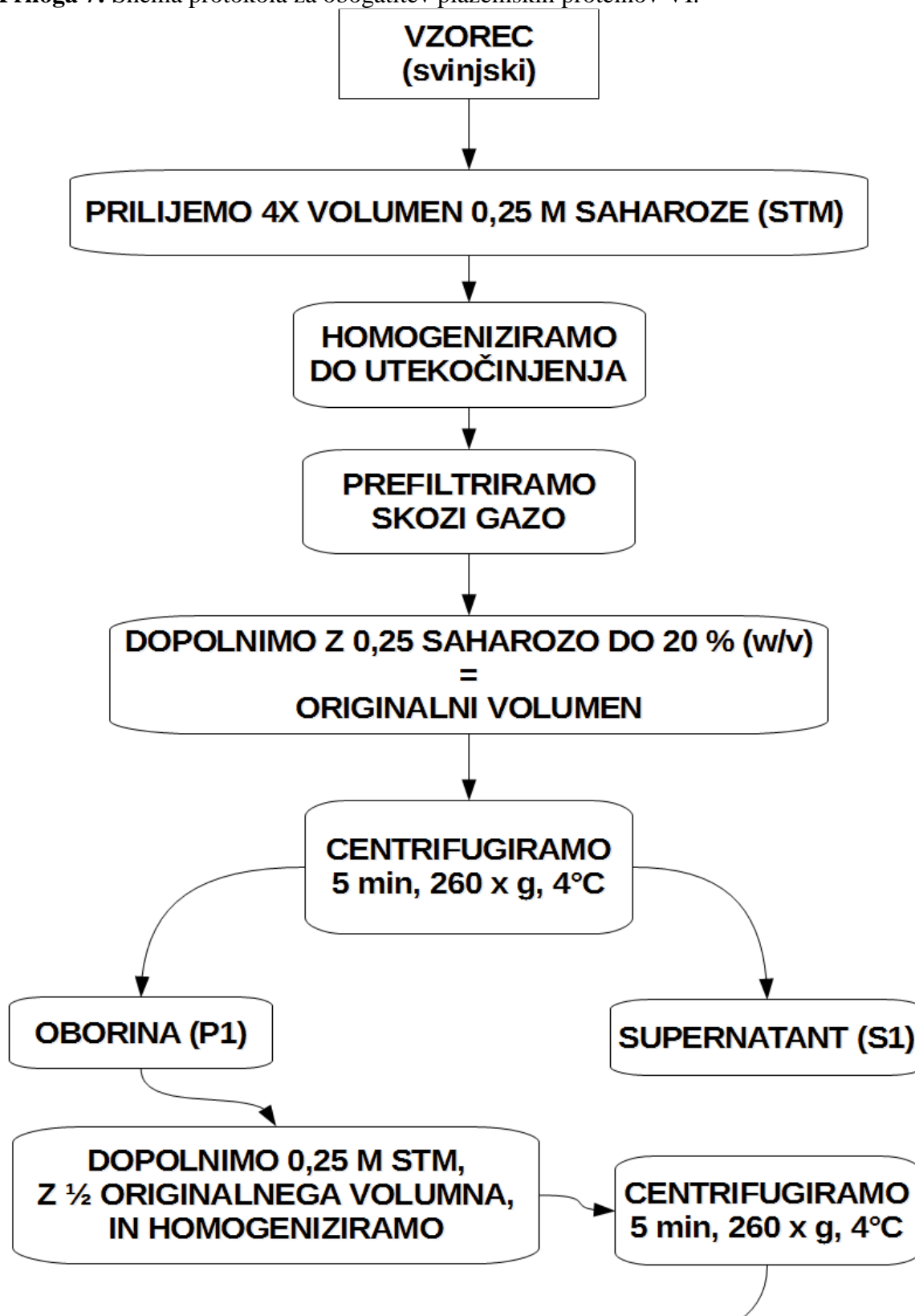


Se nadaljuje na naslednji strani.

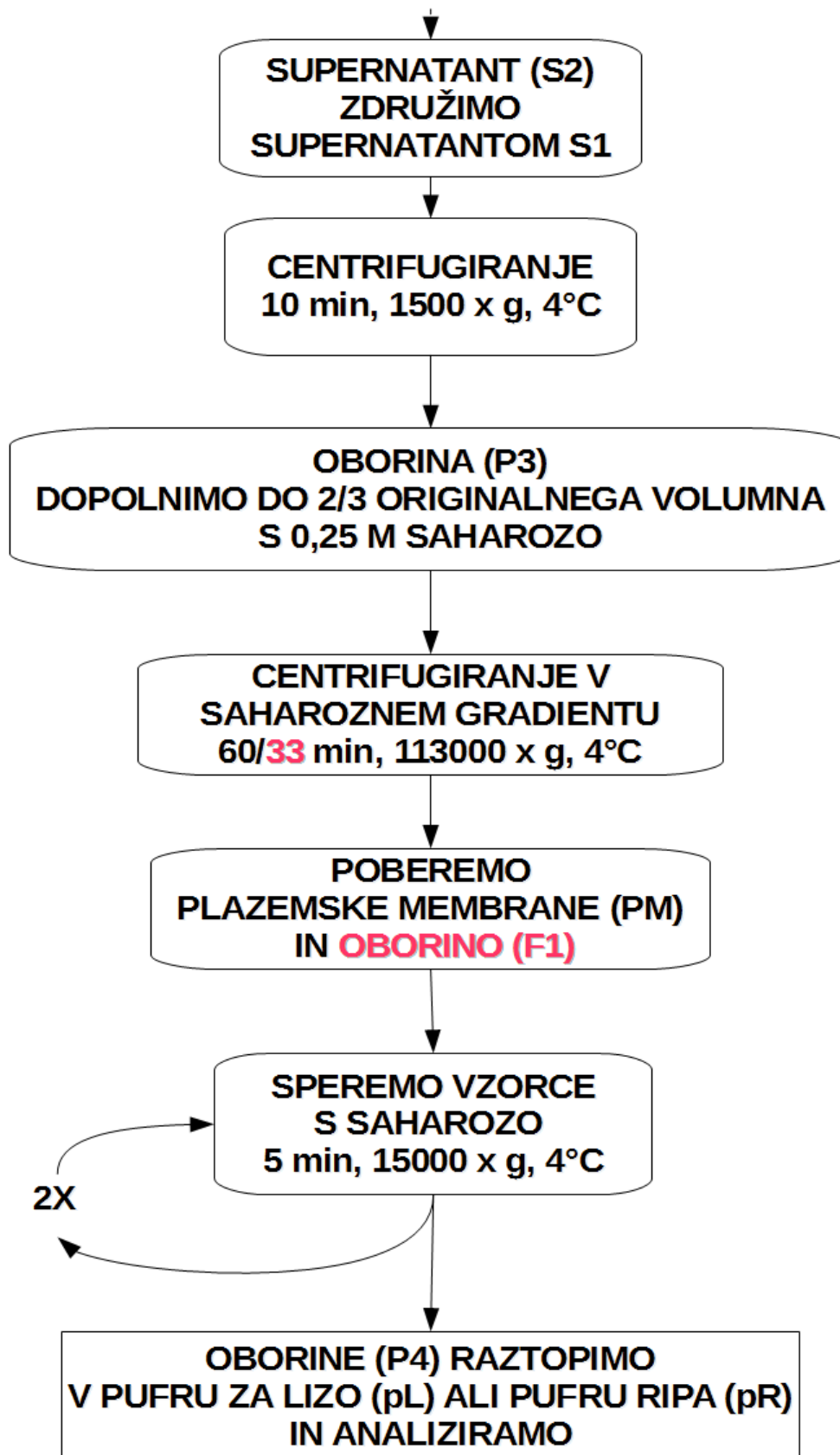


Legenda: Rdeča barva označuje enkratno spremembo originalnega protokola.

**Priloga 7:** Shema protokola za obogatitev plazemskih proteinov VI.

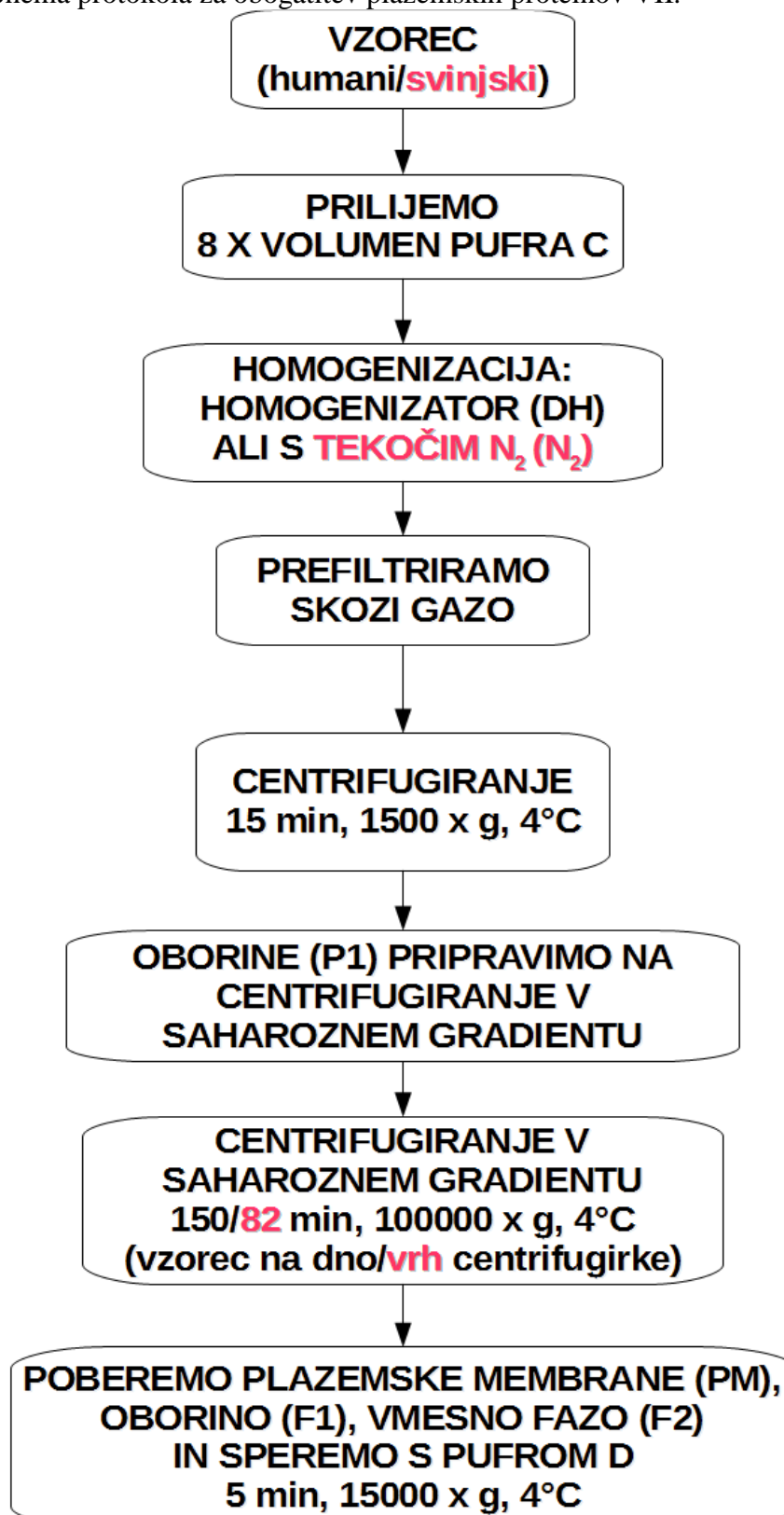


Se nadaljuje na naslednji strani.



Legenda: Rdeča barva označuje enkratno spremembo originalnega protokola.

**Priloga 8:** Shema protokola za obogatitev plazemskih proteinov VII.



Načini ekstrakcije na naslednjih dveh straneh.

# EKSTRAKCIJA

- S TRITONOM X-114 (eT)

VZOREC  
RESUSPENDIRAMO  
S TRITONOM X-114

INKUBIRAMO NA LEDU  
15 min

CENTRIFUGIRANJE  
10 min, 10000 x g, 4°C

SUPERNATANT  
INKUBIRAMO NA 37°C

CENTRIFUGIRANJE  
10 min, 1000 x g, ST

SPODNJO (sp) IN ZGORNJO (zg)  
FAZO OBORIMO S  
HLADNIM ACETONOM

CENTRIFUGIRANJE  
10 min, 15000 x g, 4°C

SUŠENJE V DIGESTORIJU  
IN RAZTAPLJANJE  
S PUFROM ZA LIZO (pL)

- S KLOROFORM/METANOLOM (eK/M)

VZOREC REDČIMO  
S KLOROFORM/METANOLOM

INKUBIRAMO NA LEDU  
15 min

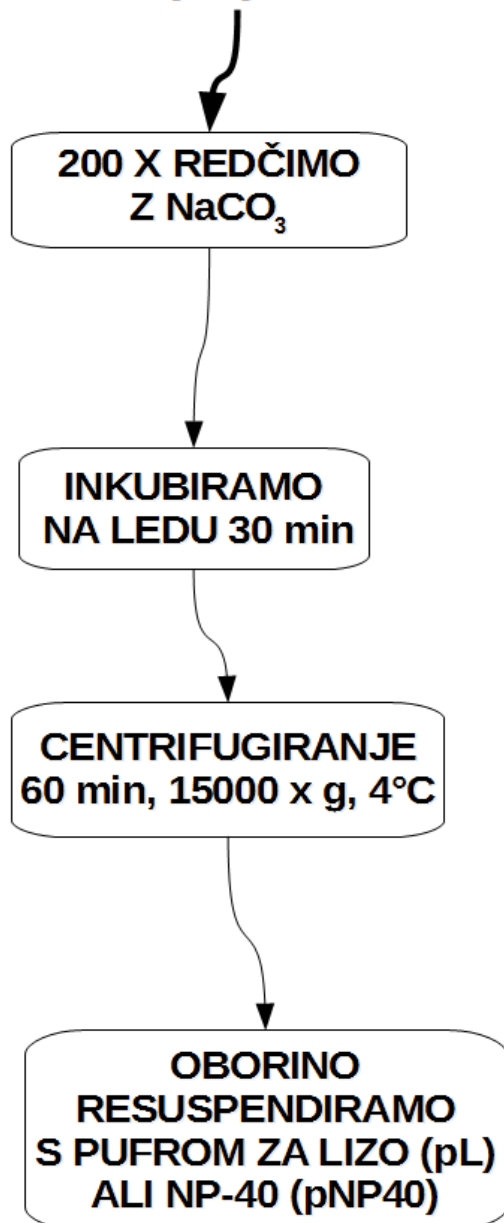
CENTRIFUGIRANJE  
20 min, 12000 x g, 4°C

SPODNJO (sp) IN ZGORNJO (zg)  
FAZO PUSUŠIMO S SPEEDVAC

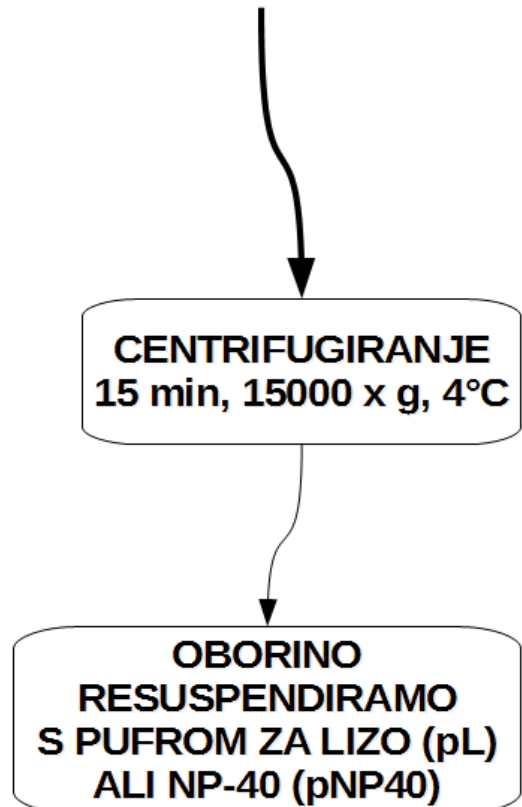
OBE FAZI  
RAZTOPIMO V  
PUFRU ZA LIZO (pL)

# EKSTRAKCIJA

## • S KARBONATOM (eK)



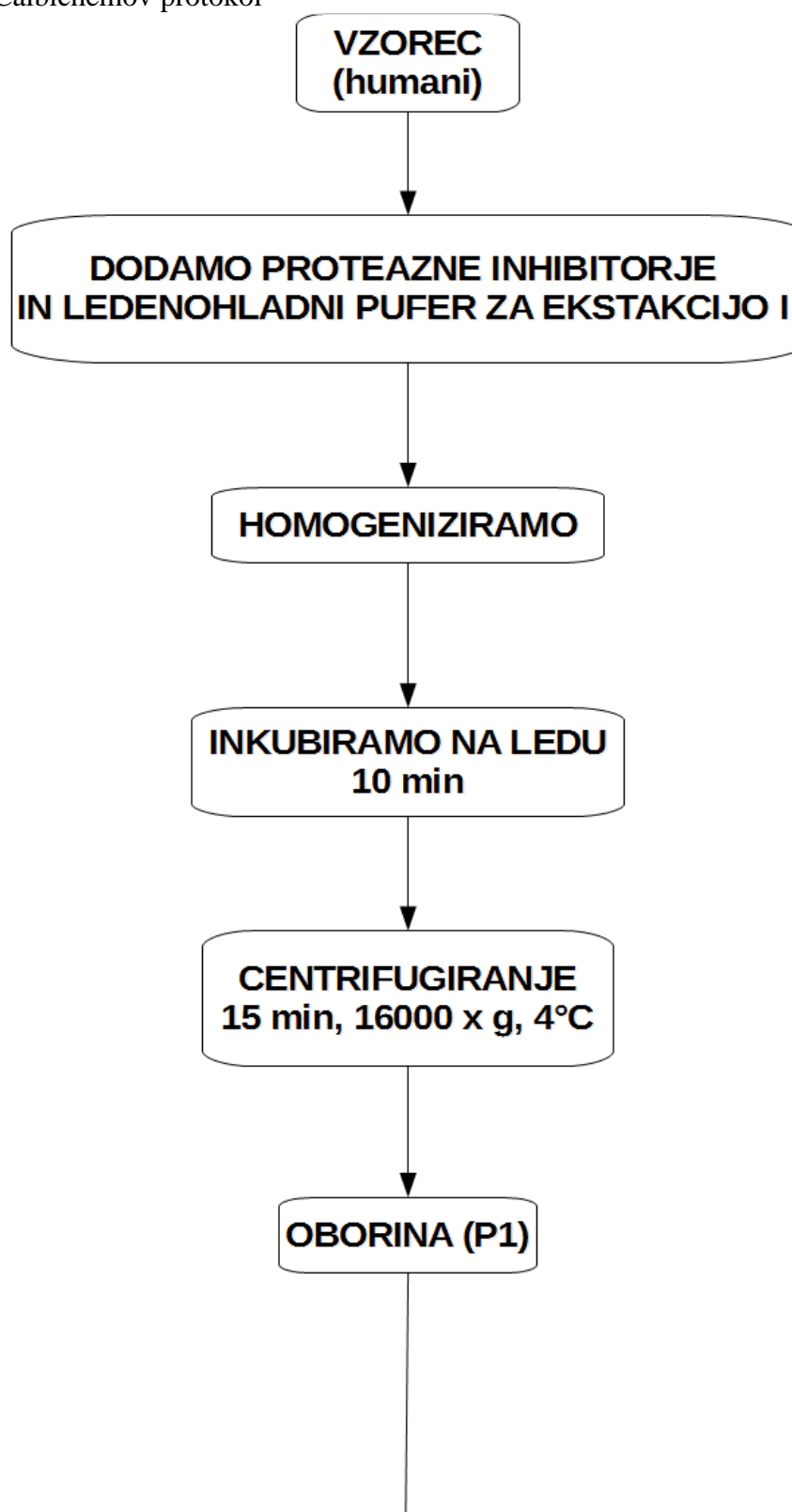
## • S PUFROM ZA LIZO (pL)



Legenda: Rdeča in modra barva označujeta enkratno spremembo originalnega protokola.

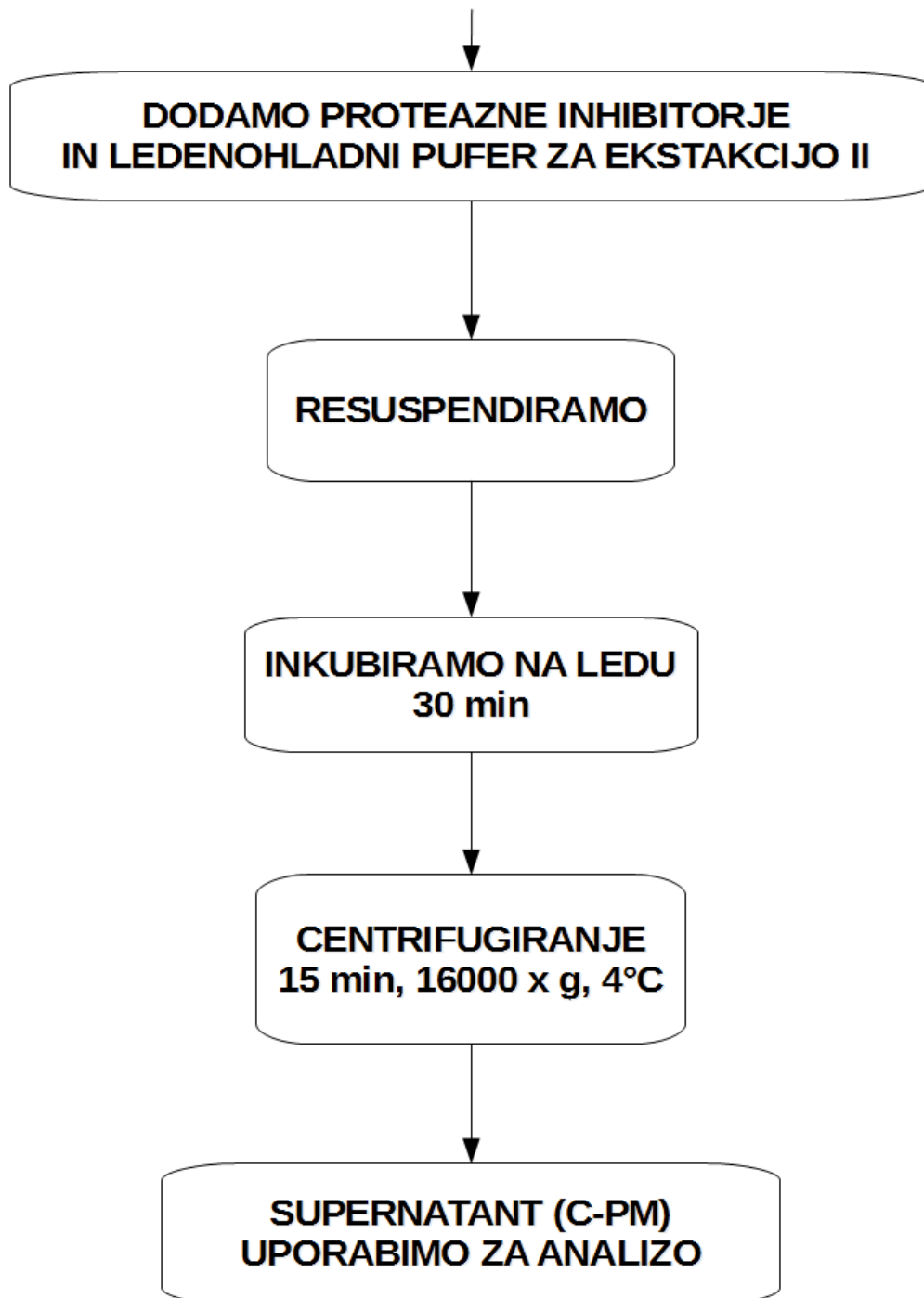
**Priloga 9:** Shemi Protokolov za obogatitev plazemskih proteinov VIII.

I) Calbichemov protokol

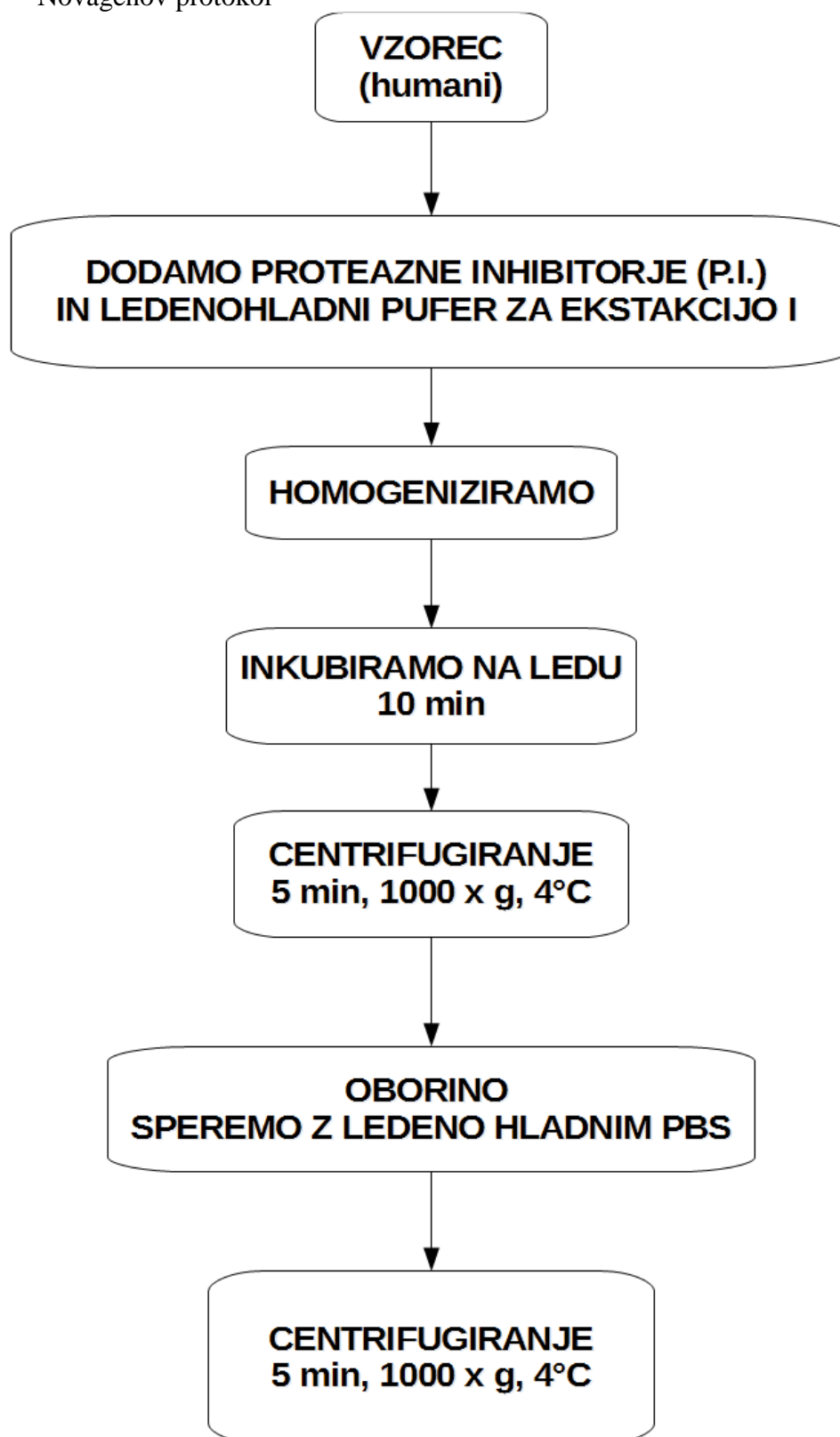


Se nadaljuje na naslednji strani.

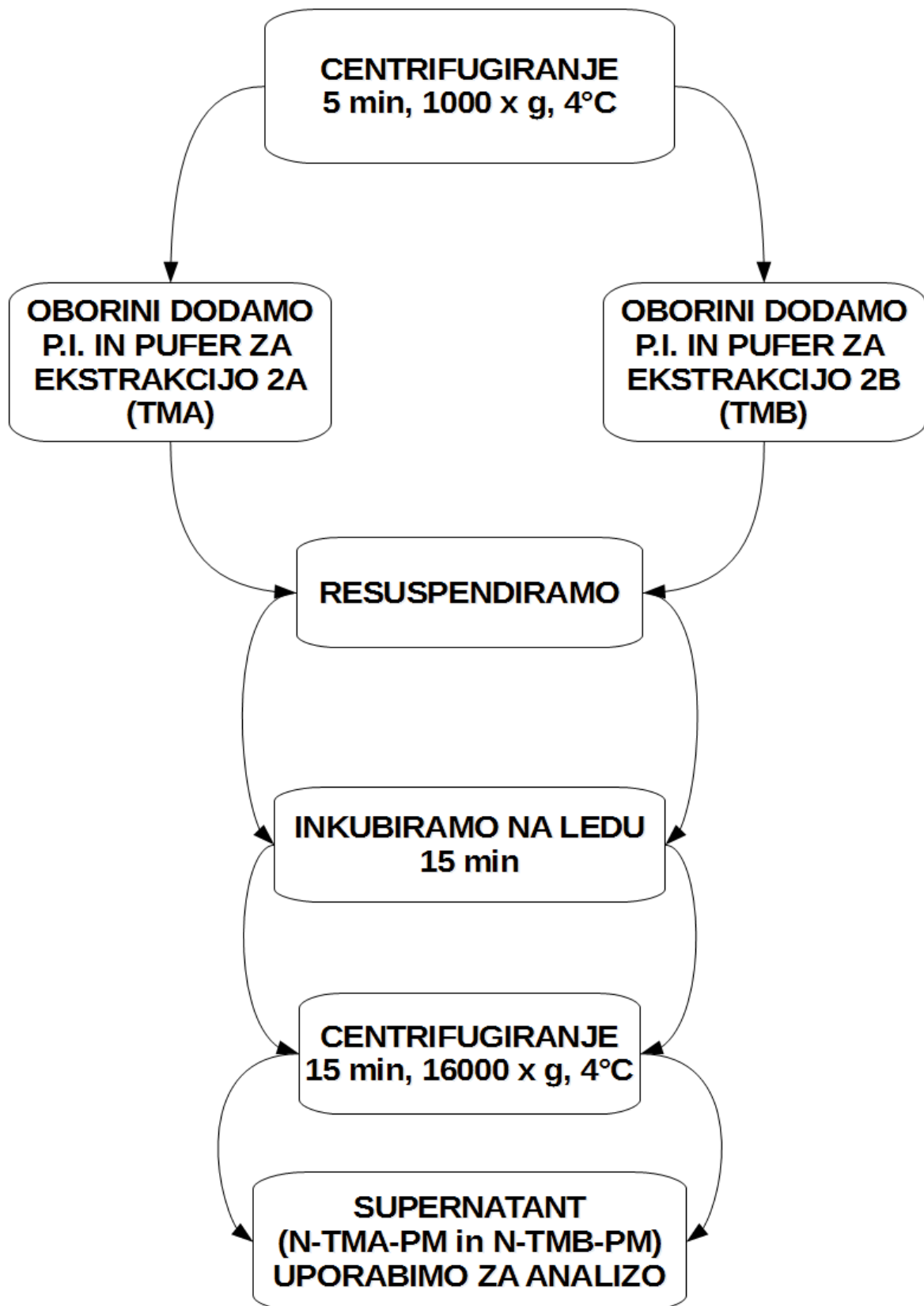




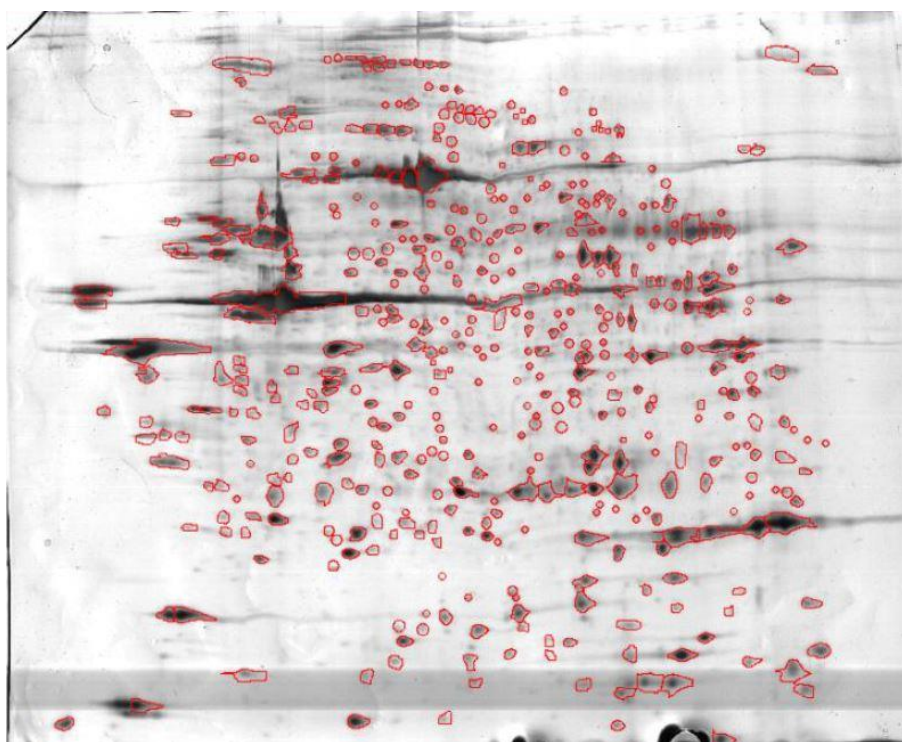
II) Novagenov protokol



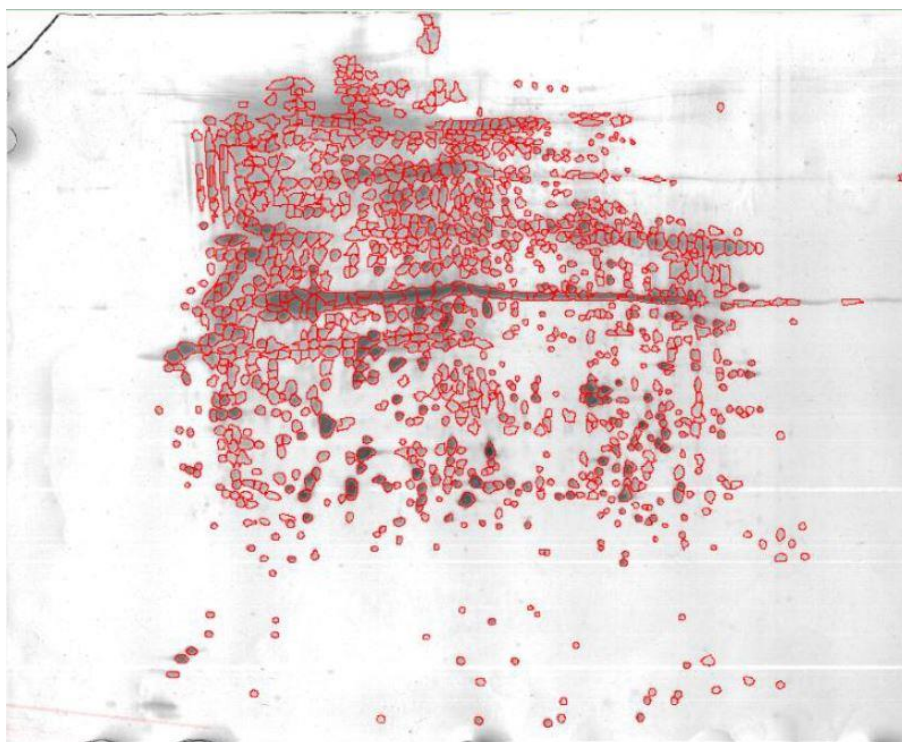
Se nadaljuje na naslednji strani.



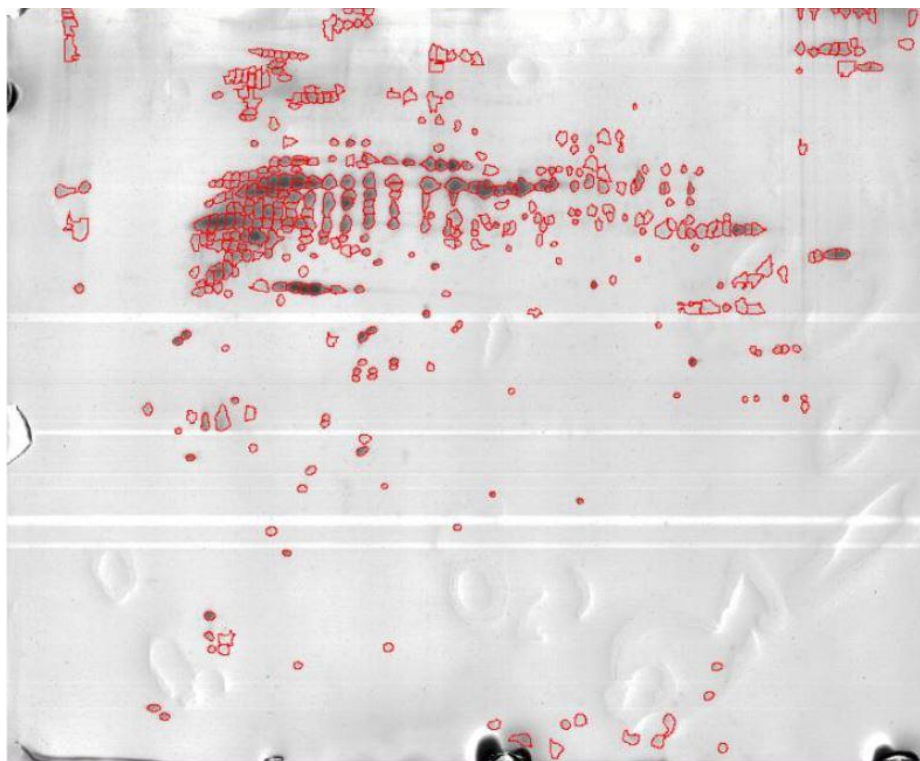
**Priloga 10:** Računalniška analiza 2-DE gela vzorca celokupnih proteinov.



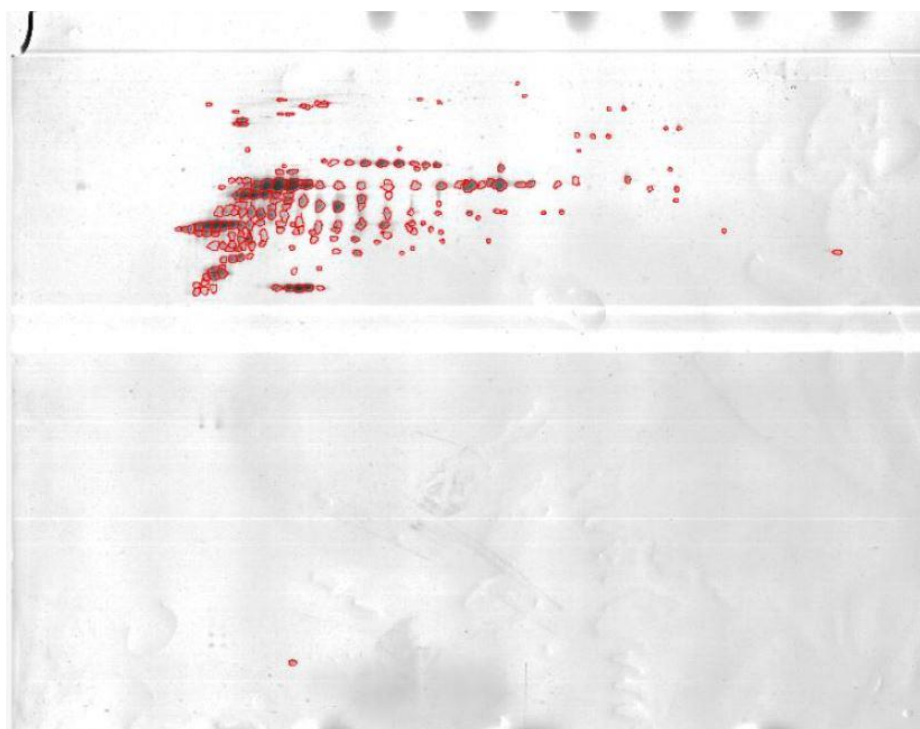
**Priloga 11:** Računalniška analiza 2-DE gela protokola za obogatitev plazemskih proteinov I.



**Priloga 12:** Računalniška analiza 2-DE gelov protokola za obogatitev plazemskih proteinov II. Vzorec P3-P1 (spodaj), P3-S1 (naslednja stran).



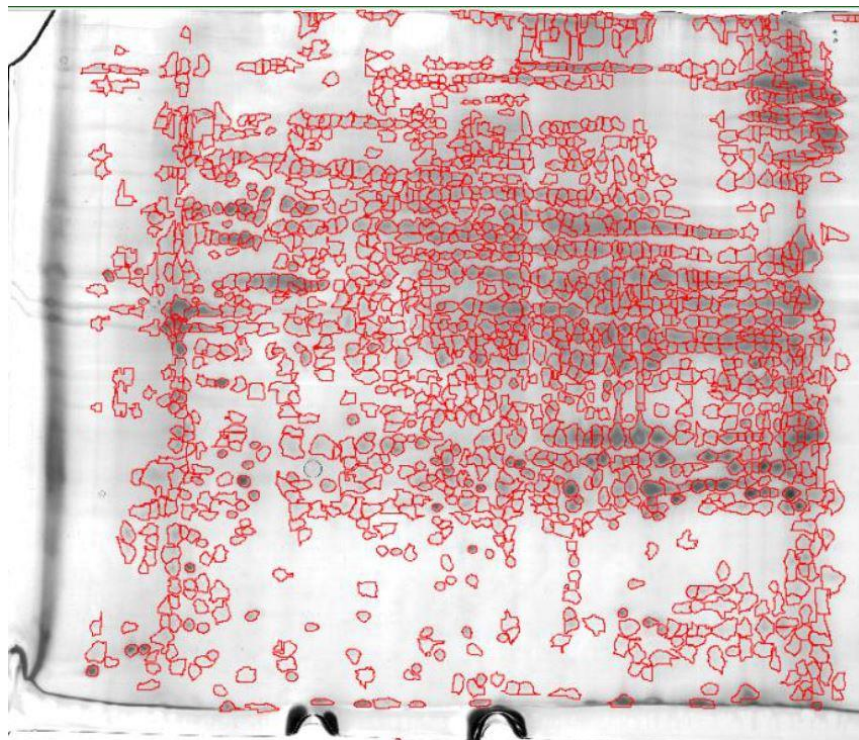
P3-P1



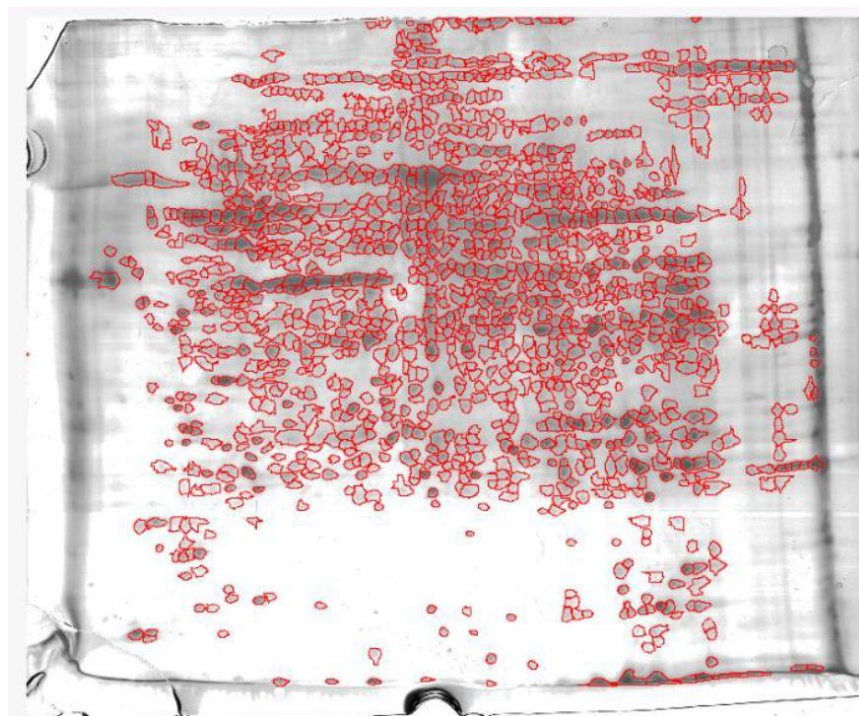
P3-S1



**Priloga 13:** Računalniška analiza 2-DE gelov vzorcev po protokolu za obogatitev plazemskih proteinov VII. Vzorec N<sub>2</sub>-PM-eNP40 (spodaj), N<sub>2</sub>-PM-eK-pNP40 (naslednja stran).

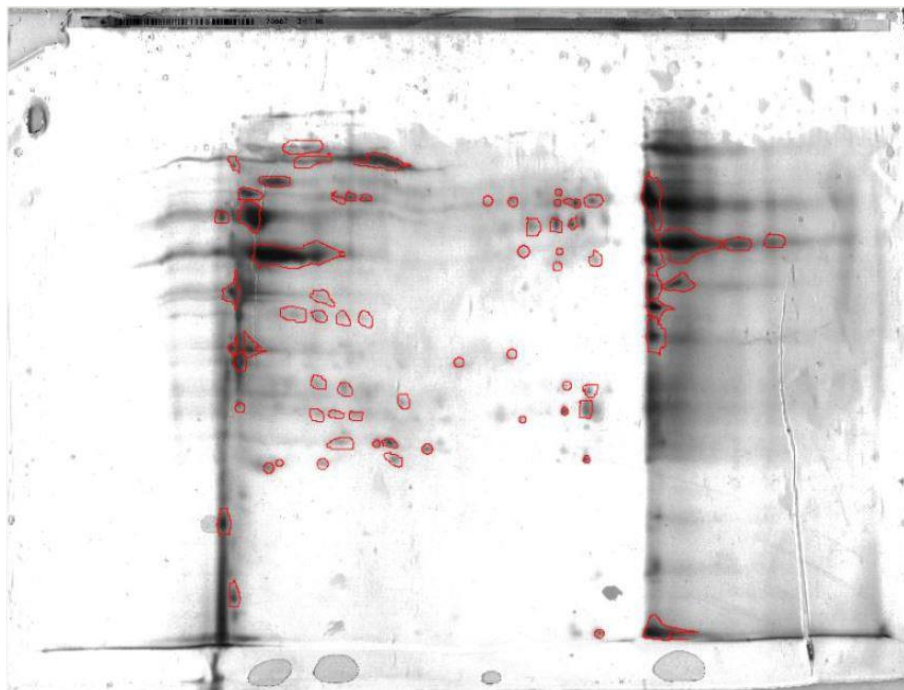


N<sub>2</sub>-PM-eNP40

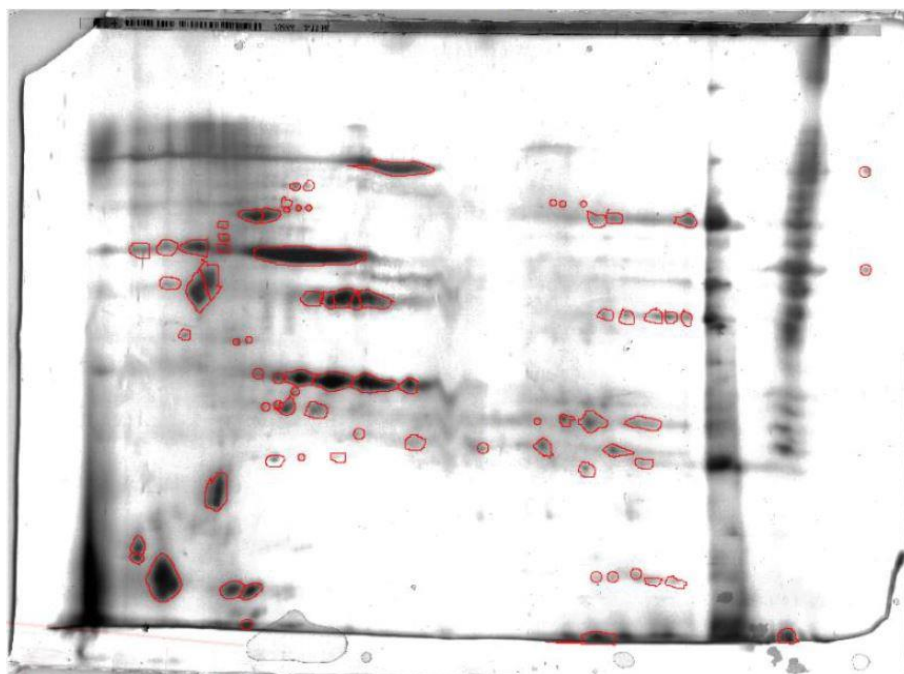


N<sub>2</sub>-PM-eK-pNP40

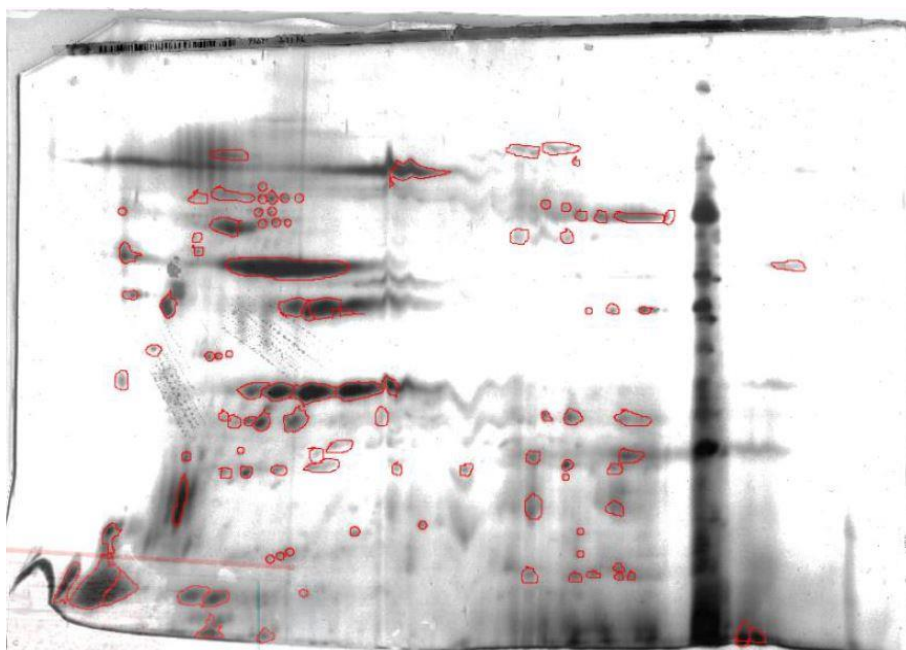
**Priloga 14:** Računalniška analiza 2-DE gelov vzorcev po protokolu za obogatitev plazemskih proteinov VIII. Vzorci si sledijo: N-TMA-PM, N-TMB-PM (2x), C-PM (2x), zbirka.



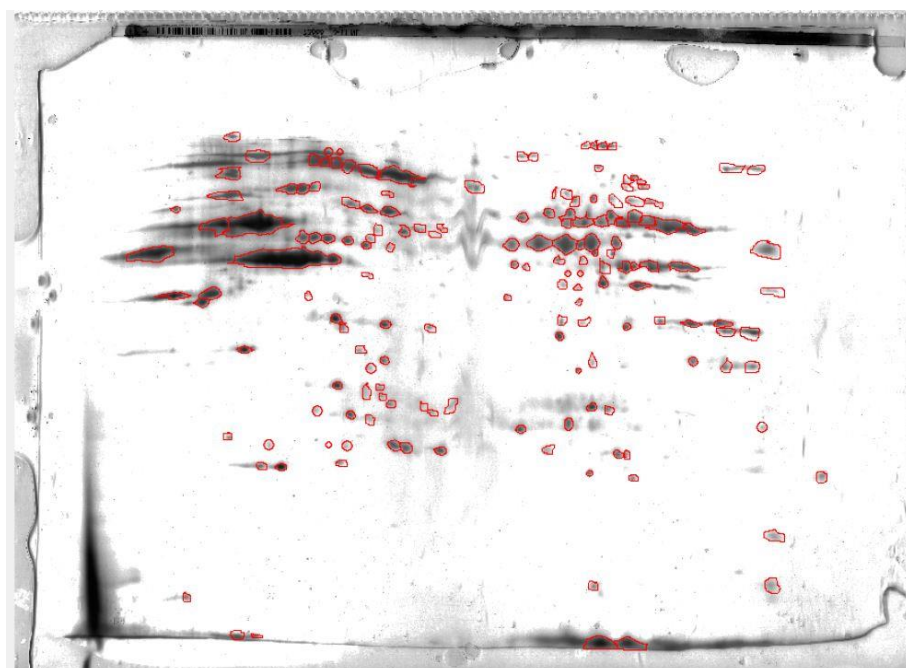
N-TMA-PM



N-TMB-PM

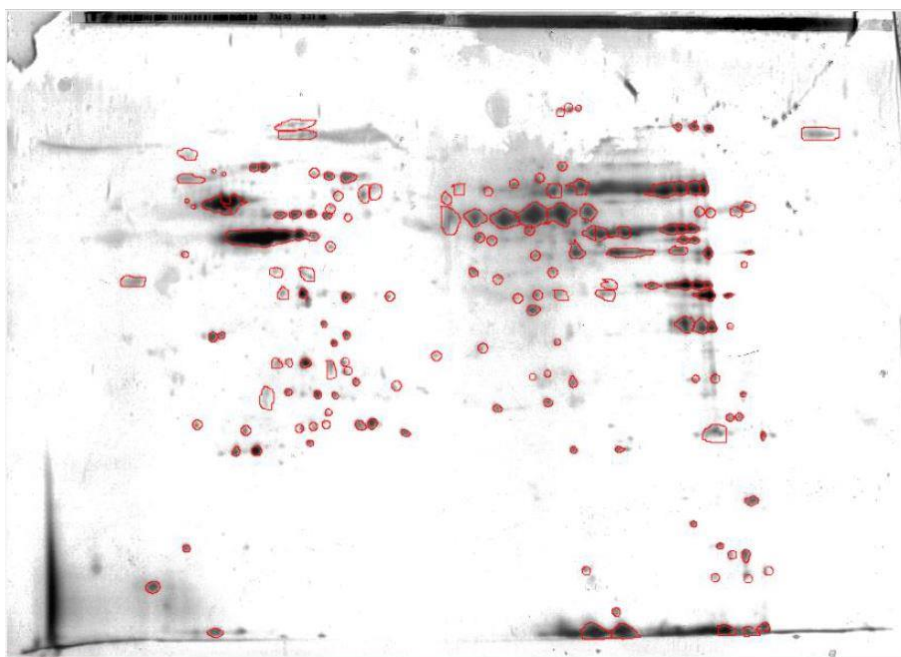


N-TMB-PM

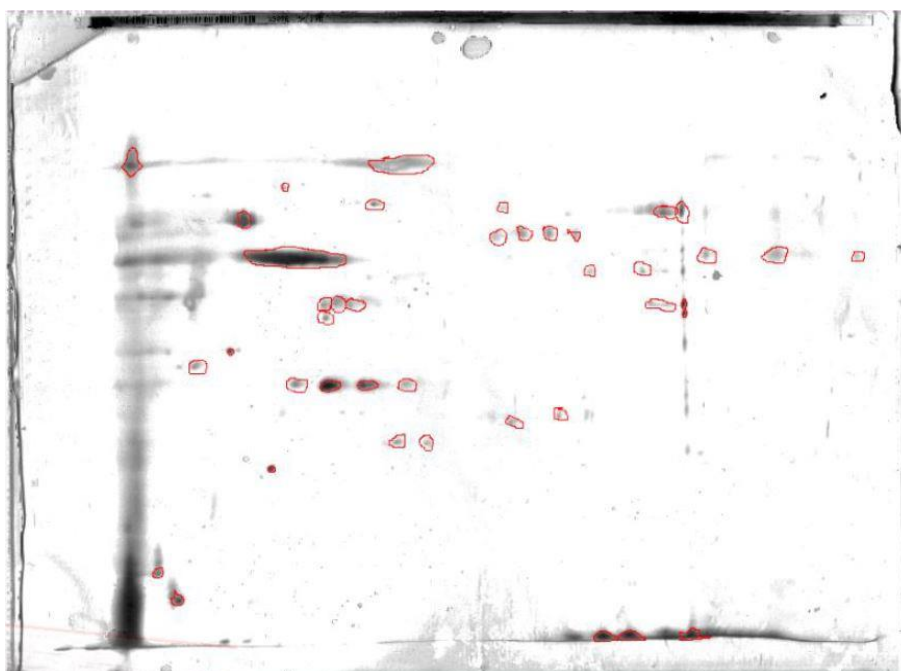


C-PM

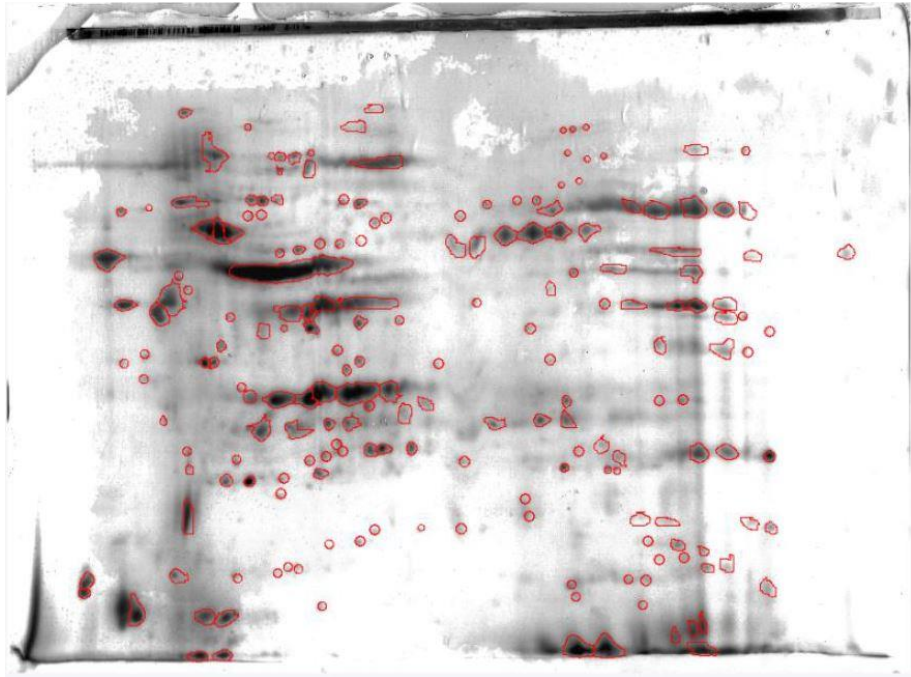




C-PM



Prvi zbirak (N-TMA-PM, N-TMB-PM, C-PM)



Drugi zbirek (N-TMB-PM, C-PM)

**Priloga 15:** Preglednica proteinov povezanih z razvojem raka.

Protein	Ime	Lokacija	Normalna vloga	Vloga pri raku	Izražen je	Vrsta okvare	Vrsta raka	Ref.	Acc.No.	3-D	OMIM
<a href="#">EGFR</a> <a href="#">HUMAN</a>	Receptor epidermalnega ravnega faktorja	Vseprisoten	Vključen v kontrolo celične rasti in diferenciacije	Okvarjena katalitska domena	↑	L858R	Pljučni adenokarcinom	18815398	<a href="#">NP_005219</a>	<a href="#">IIVO</a>	<a href="#">131550</a>
				Okvarjena katalitska domena	↑	Delecija dela eksona 19					
				Napačna vezava ATP	↑	T790M					
				Okvarjena kinazna domena	↑	L861Q		16115929			
				Okvarjena kinazna domena	↑	L718P					
				Okvarjena kinazna domena	↑	L833V		17020982			
				Stalno aktivna signalna pot PI3K-Akt-1	↑	Delecija eksonov 2-7	Glioblastom	20824044			
				Mitogeno aktivirana signalna pot PI3K-Akt-1	↑	Povečanje števila kopij gena	Anaplastični in folikularni tiroidni rak	18492751			
				Okvarjena kinazna domena	↑	G719S ali G719C	Pljučni karcinom	15998907			
				Okvarjena kinazna domena	↑	S768I	Pljučni karcinom				
				Okvara zunajcelične domene	↑	A289V	Gliom	19284481			
				Okvara zunajcelične domene	↑	G598V	Gliom				
				Okvara zunajcelične domene	↑	G620W	Gliom				
				Okvara zunajcelične domene	↑	V60L	Gliom				

Okvara zunajcelične domene	↑	T273N	Gliom	
Okvara zunajcelične domene	↑	R108K	Gliom	17177598
Okvara zunajcelične domene	↑	T263P	Gliom	
Okvara zunajcelične domene	↑	R324L	Gliom	
Okvara zunajcelične domene	↑	P596L	Gliom	
Okvara zunajcelične domene	↑	C620Y	Gliom	18772890
Okvara zunajcelične domene	↑	R680G	Gliom	
Okvara zunajcelične domene	↑	A597P	Gliom	
Okvara zunajcelične domene	↑	V651M	Gliom	
Okvara zunajcelične domene	↑	S703F	Gliom	
Okvara zunajcelične domene	↑	Q105H	Gliom	
Okvara zunajcelične domene	↑	A289T	Gliom	17143531
Okvara zunajcelične domene	↑	R677H	Gliom	
Okvarjena kinazna domena	↑	P752S	Papilarni karcinom tiroide	19253367
Napačno izražanje	↑	Polisomija EGFR	Medularni karcinom tiroide	19776290
Okvarjena kinazna domena	↑	I821T	Adenokarcinom prostate	20208477
Okvarjena kinazna domena	↑	V834A	Adenokarcinom prostate	
Okvarjena kinazna domena	↑	H870N	Adenokarcinom prostate	

<a href="#">ERBB2</a> <a href="#">HUMAN</a>	Receptor tirozin- protein kinaze erbB-2	Citoplazma, nukleus, celična membrana	Signalna transdukcija, ki nadzuruje rast in diferenciacijo	Okvarjena kinazna domena	↑	V85II	Adenokarcinom prostate	21266046	<a href="#">NP_004439.2</a>	<a href="#">1MFG</a>	<a href="#">164870</a>
				Okvarjena kinazna domena	↑	T75II	Adenokarcinom prostate				
				Okvarjena kinazna domena	↑	P810D	Karcinom tonzil	17224267			
				Okvarjena kinazna domena	↑	L862P	Karcinom tonzil				
				Okvarjena kinazna domena	↑	S784Y	Karcinom tonzil				
				Okvarjena kinazna domena	↑	F795S	Karcinom tonzil				
				Okvarjena kinazna domena	↑	P848L	Karcinom tonzil				
				Okvarjena kinazna domena	↑	Y801H	Karcinom tonzil				
				Stalno aktiven protein	↑	Avtofosforilacija tirozina 1248	Znotraj jetni rak žolča	19084911			
				Protein aktivira COX-2 v jedru	↑	ERBB2 se izrazi v jedru	Rak dojke	15380516			
				Drugačna dimerizacija	↑	I655V	Želodčni rak	14520697			
				Napačna vezava ATP	↑	D769H	Pljučni karcinom	16029927			
				Nezmožnost avtoinhibicije	↑	G776 insercija C pred V	Pljučni adenokarcinom	15753357			
				Okvarjena kinazna domena	↑	K724N	Želodčni adenokarcinom	16397024			
				Okvarjena kinazna domena	↑	T733I	Želodčni adenokarcinom				
Okvarjena kinazna domena	↑	L755S	Želodčni adenokarcinom								
Okvarjena kinazna domena	↑	D769H	Želodčni adenokarcinom								

				Okvarjena kinazna domena	↑	Q799P	Želodčni adenokarcinom				
				Okvarjena kinazna domena	↑	L869Q	Želodčni adenokarcinom				
				Okvarjena kinazna domena	↑	V842I	Želodčni adenokarcinom				
				Okvarjena kinazna domena	↑	G776S	Želodčni adenokarcinom				
				Okvarjena kinazna domena	↑	V777L	Želodčni adenokarcinom				
				Okvarjena kinazna domena	↑	V777A	Gliom	18772890			
				Okvara zunajcelične domene	↑	L49H	Gliom				
				Okvara zunajcelične domene	↑	C311R	Gliom				
				Okvarjena kinazna domena	↑	V750E	Gliom				
				Okvara zunajcelične domene	↑	C334S	Gliom				
				Okvara zunajcelične domene	↑	N319D	Gliom				
				Okvara zunajcelične domene	↑	D326G	Gliom				
<a href="#">ERBB4 HUMAN</a>	Receptor tirozin-protein kinaze erbB-4	Membrane. Najbolj izražen v možganih, srcu, ledvicah	Specifično veže in je aktiviran z neuregulini	Apoptoza rakastih celic	↓	Metilacija promoterja	Rak dojke	20603612	<a href="#">NP_001036064</a>	<a href="#">2AHX</a>	<a href="#">600543</a>
<a href="#">PGFRA HUMAN</a>	Receptor ravnega faktorja trombocitov $\alpha$ .	Membrane – debelo črevo	Receptor, ki veže PDGFA in PDGFB in ima kinazno aktivnost	Okvara zunajcelične domene	↑	W349C	Gliom		<a href="#">NP_006197</a>	<a href="#">1GQ5</a>	<a href="#">173490</a>
				Okvara zunajcelične domene	↑	C235Y	Gliom				

Okvara transmembranske domene	↑	V536E	Gliom	
Okvara zunajcelične domene	↑	A210V	Pljučni adenokarcinom	18948947
Okvara transmembranske domene	↑	L580M	Pljučni adenokarcinom	
Okvara zunajcelične domene	↑	M133K	Pljučni adenokarcinom	
Okvara zunajcelične domene	↑	E338Q	Pljučni adenokarcinom	
Okvara zunajcelične domene	↑	D480E	Pljučni adenokarcinom	
Okvara citoplazmne domene?	↑	S566_E571>R	Vnetni fibroidni polip malega črevesa	19448595
Okvara citoplazmne domene?	↑	V561D	Vnetni fibroidni polip malega črevesa	
Okvara citoplazmne domene?	↑	E563_S564insIRWRVIE	Vnetni fibroidni polip malega črevesa	
Okvarjena kinazna domena	↑	D842_H845del	Vnetni fibroidni polip malega črevesa	
Okvarjena kinazna domena	↑	D842V	Rak strome želodca	16685437
Okvara citoplazmne domene?	↑	E563K	Rak strome želodca	
Okvara citoplazmne domene?	↑	V561D	Rak strome želodca, vnetni fibroidni polip malega črevesa	18686281

				Okvarjena kinazna domena	↑	D84I	Vnetni fibroidni polip malega črevesa				
				Okvara citoplazmne domene?	↑	R560_P567>S	Vnetni fibroidni polip malega črevesa				
				Okvara citoplazmne domene?	↑	S566_E571>R	Vnetni fibroidni polip malega črevesa				
				Okvarjena kinazna domena	↑	H845_N848del	Vnetni fibroidni polip malega črevesa				
				Okvarjena kinazna domena	↑	D842_H845del	Vnetni fibroidni polip malega črevesa				
				Okvarjena kinazna domena?	↑	D591H	Vnetni fibroidni polip malega črevesa				
<a href="#">PGFRB HUMAN</a>	Receptor ravnega faktorja trombocitov β	Membrane	Receptor, ki veže PDGFB in PDGFD ter ima kinazno aktivnost	Okvara zunajcelične domene	↑	A74T	Gliom	18772890	<a href="#">NP_002600</a>	<a href="#">1H9O</a>	<a href="#">173410</a>
				Okvarjena kinazna domena?	↑	L986F	Gliom				
				Okvara zunajcelične domene	↑	I182M	Pljučni adenokarcinom	18948947			
				Okvarjena kinazna domena	↑	T545I	Pljučni adenokarcinom				
<a href="#">FGFR1 HUMAN</a>	Receptor osnovnega ravnega fibroblastnega faktorja 1	Membrane, najdene predvsem v astrocitih in nadlečni žlezi	Spodbuja celično delitev ob prisotnosti fibroblastnih rastnih faktorjev	Okvarjena kinazna domena	↑	N546K	Gliom	16186508	<a href="#">NP_056934</a>	<a href="#">1AGW</a>	<a href="#">136350</a>



[FGFR2](#)  
[HUMAN](#)

Receptor  
fibroblastnega  
rastnega faktorja 2

Plazmalema,  
sekretiran

Receptor za kisle  
in bazične  
fibroblastne  
rastne faktorje

Okvarjena kinazna domena	↑	R576W	Gliom					
Okvarjena kinazna domena?	↑	S433F	Gliom	18772890				
Okvarjena kinazna domena	↑	K656E	Gliom					
Okvara citoplazmne domene?	↑	G315E	Gliom					
Okvara zunajcelične domene	↑	T141R	Pljučni adenokarcinom	18948947				
Okvara zunajcelične domene	↑	G70R	Pljučni adenokarcinom					
Okvara receptorja za ligand	↑	S252W	Karcinom endometrija	17525745	<a href="#">NP_000132</a>	<a href="#">1DJS</a>	<a href="#">176943</a>	
Okvara receptorja za ligand	↑	S373C	Karcinom endometrija					
Okvara receptorja za ligand	↑	Y376C	Karcinom endometrija					
Okvara receptorja za ligand	↑	K310R	Karcinom endometrija					
Okvara receptorja za ligand	↑	A315T	Karcinom endometrija					
Okvara transmembranske domene	↑	C383R	Karcinom endometrija					
Okvara transmembranske domene	↑	M392R	Karcinom endometrija					
Okvarjena kinazna domena	↑	N550K	Karcinom endometrija					
Okvarjena kinazna domena	↑	N549K	Karcinom endometrija					

Okvarjena kinazna domena	↑	K659E	Karcinom endometrija	
Okvarjena kinazna domena	↑	I547V	Karcinom endometrija	
Okvara receptorja za ligand	↑	P253R	Karcinom endometrija	18552176
Okvara zunajcelične domene	↑	D101Y	Karcinom endometrija	
Okvarjena kinazna domena	↑	K659N	Karcinom endometrija	
Okvara transmembranske domene	↑	A389T	Karcinom endometrija	
Okvara transmembranske domene	↑	I380V	Pljučni adenokarcinom	18948947
Okvarjena kinazna domena	↑	H544Q	Pljučni adenokarcinom	
Okvara receptorja za ligand	↑	N211I	Pljučni karcinom	18552176
Okvara receptorja za ligand	↑	W290C	Pljučni karcinom	
Okvarjena kinazna domena	↑	I642V	Kožni maligni melanom	19147536
Okvara receptorja za ligand	↑	H213Y	Kožni maligni melanom	
Okvara receptorja za ligand	↑	V77M	Kožni maligni melanom	
Okvarjena kinazna domena	↑	E574K	Kožni maligni melanom	
Okvarjena kinazna domena	↑	S688F	Kožni maligni melanom	
Okvarjena kinazna domena	↑	P708S	Kožni maligni melanom	

[FGFR3](#)  
[HUMAN](#)

Receptor fibroblastnega rastnega faktorja 3	Membrane, izražen v možganih, ledvicah in testisih	Receptor za kisle in bazične fibroblastne rastne faktorje, preferenčno veže FGF1	Okvara receptorja za ligand	↑	G227E	Kožni maligni melanom				
			Okvara receptorja za ligand	↑	S24F	Kožni maligni melanom				
			Okvara receptorja za ligand	↑	S267P	Želodčni adenokarcinom	11325814			
			Okvarjena kinazna domena	↑	P572A	Gliom	18772890	<a href="#">NP_000133</a>	<a href="#">1RY7</a>	<a href="#">134934</a>
			Okvarjena kinazna domena	↑	K650T	Gliom				
			Okvarjena kinazna domena	↑	K650E	Gliom				
			Okvara zunajcelične domene	↑	R248C	Mielom plazmatskih celic	11529856			
			Okvara zunajcelične domene	↑	S249C	Karcinom prostate	19377444			
			Okvara transmembranske domene	↑	A391E	Karcinom prostate				
			Okvara zunajcelične domene	↑	S249C	Benigni rak kože	16778799			
			Okvara zunajcelične domene	↑↑↑	R248C	Benigni rak kože				
			Okvara zunajcelične domene	↑	S371C	Benigni rak kože				
			Okvara zunajcelične domene	↑	G370C	Benigni rak kože				
			Okvarjena kinazna domena	↑	K652E	Benigni rak kože	17585316			
			Okvarjena kinazna domena	↑	K652M	Benigni rak kože				

[VGFR2](#)  
[HUMAN](#)

				Okvara zunajcelične domene	↑	Y375C	Benigni rak kože				
				Okvara zunajcelične domene	↑	G372C	Benigni rak kože				
				Okvara zunajcelične domene	↑	S373C	Benigni rak kože				
				Okvarjena kinazna domena	↑	G697C	Karcinom ustnega področja	15880580			
				Okvarjena kinazna domena	↑	E686K	Premaligni aktinični heilitis ustnic	19327639			
				Okvarjena kinazna domena	↑	V630M	Premaligni aktinični heilitis ustnic				
				Okvarjena kinazna domena	↑	D617G	Kožni rak ustnic				
				Okvarjena kinazna domena	↑	V1041M	Glioblastom	18772396	<a href="#">NP_002244</a>	<a href="#">1VR2</a>	<a href="#">191306</a>
	Receptor vaskulamega endotelijalnega faktorja.2	Membrane	Receptor za VEGF ali VEGFC. Vloga v razvoju žil in njih permeabilnosti	Okvarjena kinazna domena	↑	T1152T	Glioblastom	18772890			
				Okvarjena kinazna domena	↑	T1336T	Glioblastom				
				Okvara zunajcelične domene	↑	A352V	Glioblastom				
				Okvarjena kinazna domena	↑	L1140M	Pljučni adenokarcinom	18948947			
				Okvara zunajcelične domene	↑	V476L	Pljučni adenokarcinom				
				Okvara citoplazmne domene	↑	P1355del	Pljučni adenokarcinom				
				Okvarjena kinazna domena	↑	A973S	Pljučni adenokarcinom				

<a href="#">MET_HUMAN</a>	Receptor hepatocitnega rastnega faktorja	Membrane	Receptor za hepatocitni rastni faktor – ima vlogo v proliferaciji, morfogenezi in preživetju	Okvara citoplazmne domene	↑	P1210L	Pljučni adenokarcinom				
				Okvarjena kinazna domena	↑	S984T	Pljučni adenokarcinom				
				Okvarjena kinazna domena	↑	G1145E	Pljučni adenokarcinom				
				Okvara zunajcelične domene	↑	D717V	Angiosarkom žil v prsih	19723655			
				Okvara transmembranske domene	↑	T771R	Angiosarkom žil v prsih				
				Okvarjena kinazna domena	↑	A1065T	Angiosarkom žil v prsih				
				Okvara receptorja za ligand	↑	E168D	Rak vratu in glave	19318576	<a href="#">NP_000236</a>	<a href="#">LSHY</a>	<a href="#">164860</a>
				Okvara receptorja za ligand	↑	T230M	Rak vratu in glave				
				Okvara citoplazmne domene	↑	T1010I	Rak vratu in glave				
				Okvarjena kinazna domena	↑	T1275I	Rak vratu in glave				
				Okvarjena kinazna domena	↑	V1333I	Rak vratu in glave				
				Okvarjena kinazna domena	↑	H1112R	Rak vratu in glave	12460923			
				Okvarjena kinazna domena	↑	Y1253D	Karcinom žrela	10734314			
Okvarjena kinazna domena	↑	Y1248C	Karcinom žrela								
Okvara receptorja za ligand	↑	N375S	Pljučni karcinom	20126411							
Okvara receptorja za	↑	L211W	Pljučni								

ligand			karcinom	
Okvara citoplazmne domene	↑	T1010I	Pljučni karcinom	14559814
Okvara receptorja za ligand	↑	E168D	Pljučni karcinom	
Okvara citoplazmne domene	↑	Y1021N	Pljučni adenokarcinom	18948947
Okvarjena kinazna domena	↑	G1260C	Pljučni adenokarcinom	
Okvarjena kinazna domena	↑	H1124D	Papilarni renalni karcinom	10327054
Okvarjena kinazna domena	↑	H1112L	Papilarni renalni karcinom	
Okvara zunajcelične domene	↑	V136I	Renalni karcinom	18709663
Okvara citoplazmne domene	↑	Q978L	Renalni karcinom	
Okvarjena kinazna domena	↑	M1178I	Glioblastom	18772890
Okvarjena kinazna domena	↑	A1209G	Karcinom ovarijev	10491015
Okvarjena kinazna domena	↑	T1191I	Hepatocelularni karcinom	9927037
Okvarjena kinazna domena	↑	M1268I	Hepatocelularni karcinom	
Okvarjena kinazna domena	↑	K1262R	Hepatocelularni karcinom	

[NTRK1](#)  
[HUMAN](#)

Visoko afinitetni receptor živčnega faktorja

Celične membrane

Potreben za visoko afinitetno vezavo NGF. Ima poglavitno vlogo pri razvoju in delovanju nociceptivnih receptorjev ter pri procesu termoregulacije

Okvara zunajcelične domene

↑

V420M

Glioblastom

18772890

[NP\\_001007793](#)

[1HE7](#)

[191315](#)

Okvara zunajcelične domene

↑

V422L

Pljučni adenokarcinom

18948947

Okvara zunajcelične domene

↑

R119H

Pljučni adenokarcinom

Okvarjena kinazna domena

↑

D776E

Pljučni adenokarcinom

Okvara zunajcelične domene

↑

S326R

Pljučni adenokarcinom

Okvara zunajcelične domene

↑

G368C

Pljučni adenokarcinom

Okvara zunajcelične domene

↑

M375I

Pljučni adenokarcinom

[NTRK2](#)  
[HUMAN](#)

BDNF/NT-3 receptor ravnega faktorja

Membrane. Izražen predvsem v živčnem tkivu

Vključen v razvoj in/ali vzdrževanje živčnega sistema

Prekinitev apoptoze

↑+

Preveliko izražanje

Nevroblastom

19417027

[NP\\_001007098](#)

[1HCF](#)

[600456](#)

[NTRK3](#)  
[HUMAN](#)

NT-3 receptor ravnega faktorja

Membrane. Večinoma izražen v živčnem tkivu

Receptor za nevrotrofin-3.

Translokacija z genom ETV6

↑

Lom na 1748 nukleotidu NTRK3 in 1283 ETV6

Karcinom dojke

12450792

[NP\\_001007157](#)

Okvara zunajcelične domene

↑

T283K

Pljučni karcinom

18948947

Okvara zunajcelične domene

↑

L248M

Pljučni karcinom

<a href="#">EPHA1 HUMAN</a>	Efrin tip-A receptor 1	Membrane	Receptor za efrin-A družino	Okvara zunajcelične domene	↑	L270M	Pljučni karcinom	18948947	<a href="#">NP_005223</a>	<a href="#">2K1K</a>	<a href="#">179610</a>
<a href="#">EPHA2 HUMAN</a>	Efrin tip-A receptor 2	Membrane. Izražen predvsem v epitelnem tkivu	Veže efrine iz družine A. Vodi od kontakta odvisno dvosmemo signalizacijo	Okvara zunajcelične domene	↑	R337Q	Pljučni adenokarcinom	18948947	<a href="#">NP_005223</a>	<a href="#">2K1K</a>	<a href="#">179610</a>
<a href="#">EPHA2 HUMAN</a>	Efrin tip-A receptor 2	Membrane. Izražen predvsem v epitelnem tkivu	Veže efrine iz družine A. Vodi od kontakta odvisno dvosmemo signalizacijo	Povečano metastaziranje	↑	Amplifikacija na kromosomu 1p36	Rak pankreasa	19260747	<a href="#">NP_004422</a>	<a href="#">2X10</a>	<a href="#">176946</a>
<a href="#">EPHA3 HUMAN</a>	Efrin tip-A receptor 3	Membrane. Široko izražen	Receptor za efrin-A družino	Okvara zunajcelične domene	↑	W250R	Pljučni adenokarcinom	18948947	<a href="#">NP_005224</a>	<a href="#">2GSF</a>	<a href="#">179611</a>
<a href="#">EPHA4 HUMAN</a>	Efrin tip-A receptor 4	Membrane. Široko izražen	Receptor za efrin-A družino	Okvara zunajcelične domene	↑	P332L	Glioblastom	18772890	<a href="#">NP_004429</a>	<a href="#">2WO1</a>	<a href="#">602188</a>
<a href="#">EPHA5 HUMAN</a>	Efrin tip-A receptor 5	Membrane. Močno izražen v živčnem sistemu	Receptor za efrin-A družino	Okvara transmembranske domene	↑	G582E	Pljučni adenokarcinom	16140923	<a href="#">NP_004430</a>	<a href="#">2R2P</a>	<a href="#">600004</a>
<a href="#">EPHA7 HUMAN</a>	Efrin tip-A receptor 7	Membrane. Široko izražen	Receptor za efrin-A družino na sosednjih celicah	Okvara zunajcelične domene	↑	R281S	Pljučni adenokarcinom	18948947	<a href="#">NP_004431</a>	<a href="#">2REI</a>	<a href="#">602190</a>
<a href="#">CLD4 HUMAN</a>	Klavdin-4	Membrane	Velika vloga pri tesnih stikih		↑↑		Pljučni adenokarcinom	21619599	<a href="#">NP_001296</a>		<a href="#">602909</a>
<a href="#">CLD3 HUMAN</a>	Klavdin-3	Membrane	Vloga pri tesnih stikih		↑		Gastrični rak	21515339	<a href="#">NP_001297</a>		<a href="#">602910</a>
<a href="#">CLD7 HUMAN</a>	Klavdin-7	Membrane	Vloga pri tesnih stikih		↑		Gastrični rak		<a href="#">NP_001171951</a>		<a href="#">609131</a>
<a href="#">MUC1 HUMAN</a>	Mucin-1	Apikalna membrana	Zaščita, modulacija signalov		↑		Rak dojke	21501018	<a href="#">NP_001018016</a>	<a href="#">2ACM</a>	<a href="#">158340</a>



<a href="#">TRPM8</a> <a href="#">HUMAN</a>	Prehodni receptor kationskega potenciala poddružina M član 8	Membrane. Izražen predvsem v prostati	Ionski transport	↑	Rak prostate	21932052	<a href="#">NP_076985.4</a>	<a href="#">606678</a>
<a href="#">TRPM4</a> <a href="#">HUMAN</a>	Prehodni receptor kationskega potenciala poddružina M član 4	Membrane	Ionski transport	↑			<a href="#">NP_001182156.1</a>	<a href="#">606936</a>
<a href="#">MUC4</a> <a href="#">HUMAN</a>	Mucin-4	Membrane	Celična adhezija	↑	Rak dojke	21728842	<a href="#">NP_004523.3</a>	<a href="#">158372</a>
<a href="#">CDCP1</a> <a href="#">HUMAN</a>	CUB domena vsebujoči protein-1	Celične membrane	Celična adhezija in povezava celičnega matriksa	↑	Rak debelega črevesa	21812858	<a href="#">NP_073753.3</a>	<a href="#">611735</a>
<a href="#">MYOF</a> <a href="#">HUMAN</a>	Mioferlin	Membrane	Popravilo plazmaleme	↑	Rak pankreasa	20807598	<a href="#">NP_038479.1</a>	<a href="#">2DMH</a> <a href="#">604603</a>
<a href="#">ADA17</a> <a href="#">HUMAN</a>	Disintegrin in metaloproteinazna domena vključujoč protein 17	Membrane	Cepi prekurzorje v zrele oblike	↑	Rak dojke	21752713	<a href="#">NP_003174.3</a>	<a href="#">1BKC</a> <a href="#">603639</a>
<a href="#">ANO1</a> <a href="#">HUMAN</a>	Anoktamin-1	Membrane	Od kalcija aktiviran kloridni kanal	↑	Gastrični rak	21642943	<a href="#">NP_060513</a>	<a href="#">610108</a>
<a href="#">DSG2</a> <a href="#">HUMAN</a>	Desmoglein-2	Celične membrane	Medcelična adhezija	↑	Rak prostate	21989576	<a href="#">NP_001934.2</a>	<a href="#">2YQG</a> <a href="#">125671</a>
<a href="#">DSG3</a> <a href="#">HUMAN</a>	Desmoglein-3	Celične membrane	Medcelična adhezija	↑			<a href="#">NP_001935.2</a>	<a href="#">169615</a>
<a href="#">CADH1</a> <a href="#">HUMAN</a>	Kadherin-1	Celične membrane	Celična adhezija	↓	Gastrični rak	17238139	<a href="#">NP_004351.1</a>	<a href="#">2O72</a> <a href="#">192090</a>
<a href="#">NRP1</a> <a href="#">HUMAN</a>	Neuropilin-1	Celične membrane	Angiogeneza	↑			<a href="#">NP_001019799.1</a>	<a href="#">602069</a>

<a href="#">BRAF</a> <a href="#">HUMAN</a>	Serinska/treoninska kinaza B-raf	Celične membrana	Transdukcija mitogenih signalov s celične membrane na jedro	Okvarjena kinazna domena	↑	V600E	Melanom	22024283	<a href="#">NP_004324.2</a>	<a href="#">IUWH</a>	<a href="#">164757</a>
<a href="#">AKT1</a> <a href="#">HUMAN</a>	RAC-alfa serin/treoninska protein kinaza	Celične membrana, jedro, citoplazma	Inhibicija apoptoze		↑		Rak dojke		<a href="#">NP_005154.2</a>	<a href="#">1H10</a>	<a href="#">164730</a>
<a href="#">STML2</a> <a href="#">HUMAN</a>	Stomatinu podobni protein 2	Membrana	Povezan s citoskeletom		↑		Rak debelega črevesa	20533595	<a href="#">NP_038470.1</a>		<a href="#">608292</a>
<a href="#">S52A3</a> <a href="#">HUMAN</a>	Riboflavinski transporter, član 3	Celične membrana	Transport riboflavina		↓		Gastrični rak	22791947	<a href="#">NP_212134.3</a>		<a href="#">613350</a>
<a href="#">AQP3</a> <a href="#">HUMAN</a>	Akvaporin 3	Celične membrana	Transport vode in glicerina		↑		Rak tiroide	22808259	<a href="#">NP_004916.1</a>		<a href="#">600170</a>
<a href="#">AQP4</a> <a href="#">HUMAN</a>	Akvaporin 4	Celične membrana	Transport vode		↑				<a href="#">NP_001641.1</a>		<a href="#">600308</a>
<a href="#">MRP_HUMAN</a>	MARCKS-soroden protein	Plazmalema	Povezava kalmudolinske in proteinkinazne poti		↑		Rak dojke	22772381	<a href="#">NP_075385.1</a>		<a href="#">602940</a>
<a href="#">CD24</a> <a href="#">HUMAN</a>	Signalni transducer CD24	Celične membrana	Modulira aktivnostni odziv B-celic		↑		Pljučni adenokarcinom	22760497	<a href="#">NP_037362.1</a>		<a href="#">600074</a>
<a href="#">KCMA1</a> <a href="#">HUMAN</a>	Od kalcija aktivirajoči kalijev kanal—podenota 1	Membrana	Eksport kalija		↑		Gliom	22844111	<a href="#">NP_0010147</a> <a href="#">97.1</a>	<a href="#">3MT5</a>	<a href="#">600150</a>
<a href="#">NUCB2</a> <a href="#">HUMAN</a>	Nukleobindin2	Membrana	Veže kalcij, vloga pri homeostazi kalcija		↑		Rak dojke	21988594	<a href="#">NP_005004.1</a>		<a href="#">608020</a>
<a href="#">CXCR2</a> <a href="#">HUMAN</a>	C-X-C kemokinski receptor tipa 2	Celične membrana	Receptor za interleukin 8		↑		Rak dojke		<a href="#">NP_001161770.1</a>		<a href="#">146928</a>

<a href="#">CBPM_HUMAN</a>	Karboksipeptidaza M	Celične membrana	Kontrola peptidnih hormonov	↑			<a href="#">NP_001865.1</a>		<a href="#">114860</a>
<a href="#">MMP2_HUMAN</a>	72 kDa tip IV kolagenaza	Membrana	Degradacija zunajceličnih matričnih proteinov	↑	Rak jezika	23107277	<a href="#">NP_001121363.1</a>	<a href="#">1CK7</a>	<a href="#">120360</a>
<a href="#">RRAS_HUMAN</a>	Ras-soroden protein R-Ras	Membrana	Regulacija aktinskega citoskeleta	↓		22897853	<a href="#">NP_006261.1</a>	<a href="#">2FN4</a>	<a href="#">165090</a>
<a href="#">PIM1_HUMAN</a>	Serinska/reoninska kinaza pim-1	Celične membrana	Vključena v celično preživetje in proliferacijo	↑	Rak prostate	16186805	<a href="#">NP_001230115.1</a>	<a href="#">1XWS</a>	<a href="#">164960</a>
<a href="#">CAV1_HUMAN</a>	Kaveolin-1	Celične membrana	Regulira alfa podenoto G-proteinov	↑	Rak dojke	23128390	<a href="#">NP_001166366.1</a>		<a href="#">601047</a>
<a href="#">PROM1_HUMAN</a>	Prominin-1	Celična membrana	Veže holesterol, organizacija apikalne membrane	↑	Rak debelega črevesa	23084749	<a href="#">NP_001139319.1</a>		<a href="#">604365</a>
<a href="#">KCNH1_HUMAN</a>	Kalijev napetostno reguliran kanal podružina H član 1	Celična membrana	Formiranje pore	↑	Medulablastom	22855790	<a href="#">NP_002229.1</a>		<a href="#">603305</a>
<a href="#">TPOR_HUMAN</a>	Trombopoetinski receptor	Membrana	Receptor za trompoetin	↑		19270706	<a href="#">NP_005364.1</a>		<a href="#">159530</a>
<a href="#">UFO_HUMAN</a>	Tirozinska proteinska kinaza receptor UFO	Celična membrana	Proliferacija, diferenciacija	↑	Renalni karcinom	22806541	<a href="#">NP_001690.2</a>	<a href="#">2C5D</a>	<a href="#">109135</a>
<a href="#">BCAM_HUMAN</a>	Bazalna celična adhezivna molekula	Membrana	Intercelularno sogaloziranje	↓			<a href="#">NP_001013275.1</a>	<a href="#">2PET</a>	<a href="#">612773</a>
<a href="#">CADH2_HUMAN</a>	Kadherin-2	Celična membrana	Celična adhezija	↑			<a href="#">NP_001783.2</a>		<a href="#">114020</a>
<a href="#">CADH6_HUMAN</a>	Kadherin-6	Celična membrana	Celična adhezija	↑			<a href="#">NP_004923.1</a>		<a href="#">603007</a>

<a href="#">TF HUMAN</a>	Tkivni faktor	Membrana	Krvna koagulacija	↑		<a href="#">NP_001984.1</a>	<a href="#">IJ9C</a>	<a href="#">134390</a>
<a href="#">S22A4 HUMAN</a>	Topljeni prenašalec družina 22 član 4	Membrana	Prenos natrija in kamitina	↑		<a href="#">NP_003050.2</a>		<a href="#">604190</a>
<a href="#">GTRI HUMAN</a>	Topljeni transporter družina 2	Celična membrana	Pospešen prenos glukoze	↑		<a href="#">NP_006507.2</a>		<a href="#">138140</a>
<a href="#">EZRI HUMAN</a>	Ezrin	Celična membrana	Povezovanje citoskeletalnih struktur	↑	Želodčni adenokarcinom	23039327 <a href="#">NP_001104547.1</a>	<a href="#">INI2</a>	<a href="#">123900</a>
<a href="#">CXCR4 HUMAN</a>	C-X-C kemokinski receptor tipa 4	Celična membrana	Receptor za zunajcelični ubikvitin	↑		23023480 <a href="#">NP_001008540.1</a>	<a href="#">3ODU</a>	<a href="#">162643</a>
<a href="#">CD276 HUMAN</a>	CD276 antigen	Membrana	Regulacija imunskega odziva T-celic	↑	Pljučni rak	22999863 <a href="#">NP_001019907.1</a>		<a href="#">605715</a>
<a href="#">FLOT1 HUMAN</a>	Flotilin 1	Celična membrana	Formacija kaveole	↑	Pljučni adenokarcinom	22982323 <a href="#">NP_005794.1</a>		<a href="#">606998</a>
<a href="#">B4GT1 HUMAN</a>	Beta-1,4-galaktotiltransferaz a 1	Celična membrana	Prepoznavanje v veliko interakcijah	↑	Rak dojke	22982306 <a href="#">NP_001488.2</a>	<a href="#">2AE7</a>	<a href="#">137060</a>
<a href="#">PDZ1L HUMAN</a>	PDZK1-interaktiven protein 1	Membrana	Vloga pri biologiji tumorjev	↑	Rak dojke	22973555 <a href="#">NP_005755.1</a>		<a href="#">607178</a>
<a href="#">VMPI HUMAN</a>	Vakuolni membranski protein 1	Membrana	Avtofagija, celični stiki	↓	Hepatocelularni karcinom	22971212 <a href="#">NP_112200.2</a>		<a href="#">611753</a>
<a href="#">RAI3 HUMAN</a>	Od retinojske kisline inducirani protein 3	Celična membrana		↑	Rak debelega črevesa	23021913 <a href="#">NP_003970.1</a>		<a href="#">604138</a>
<a href="#">CD97 HUMAN</a>	CD97 antigen	Celična membrana	Vloga pri premikanju levkocitov	↑	Želodčni adenokarcinom	22768192 <a href="#">NP_001020331.1</a>		<a href="#">601211</a>

<a href="#">DLG2</a> <a href="#">HUMAN</a>	Disks veliki homolog 2	Membrana	Vključen v regulacijo sinaptične stabilnosti	↑	Rak želodca	21497372	<a href="#">NP_001136171</a>	<a href="#">2BYG</a>	<a href="#">603583</a>
<a href="#">CAHD1</a> <a href="#">HUMAN</a>	VWFA in začasna domena vsebujoči protein 1	Membrana	Lahko regulira napetostno odvisne kalcijeve kanalčke	↑			<a href="#">NP_065976.2</a>		
<a href="#">VPS28</a> <a href="#">HUMAN</a>	Vakuolni protein povezan s sortiranjem proteinski homolog 28	Celična membrana	Regulator vezikularnega transporta	↑			<a href="#">NP_898880.1</a>		<a href="#">611952</a>
<a href="#">NAR4</a> <a href="#">HUMAN</a>	Ekto-ADP-riboziltransferaza f	Celična membrana	Metabolni procesi L-arginina	↑			<a href="#">NP_066549.2</a>		<a href="#">110600</a>
<a href="#">VDAC1</a> <a href="#">HUMAN</a>	Napetostno odvisni anionsko selektivni kanal protein 1	Celična membrana	Regulacija celičnega volumna in apoptoze	↑		21165559	<a href="#">NP_003365.1</a>	<a href="#">2JK4</a>	<a href="#">604492</a>
<a href="#">ENO4</a> <a href="#">HUMAN</a>	Alfa-enolaza	Celična membrana	Multifunkcijski encim	↑			<a href="#">NP_001188412</a>	<a href="#">2PSN</a>	<a href="#">172430</a>
<a href="#">TNR12</a> <a href="#">HUMAN</a>	Receptor tumor nekroznega faktorja član superdružine 12A	Membrana	Angiogeneza in proliferacija epitelnih celic	↑		21993017	<a href="#">NP_057723.1</a>	<a href="#">2EQP</a>	<a href="#">605914</a>
<a href="#">AMPN</a> <a href="#">HUMAN</a>	Aminopeptidaza N	Celična membrana	Angiogeneza in proteliza			23116296	<a href="#">NP_001141.2</a>	<a href="#">4FYQ</a>	<a href="#">151530</a>
<a href="#">G3P_HUMAN</a>	Gliceraldehid 3-fosfatna dehidrogenaza	Membrana	Glikoliza			21497372	<a href="#">NP_001243728.1</a>	<a href="#">1U8F</a>	<a href="#">138400</a>
<a href="#">ANXA1</a> <a href="#">HUMAN</a>	Aneksin A1	Membrana	Signalna transdukcija	↓		20699381	<a href="#">NP_000691.1</a>	<a href="#">1AIN</a>	<a href="#">151690</a>
<a href="#">VSG1</a> <a href="#">HUMAN</a>	V-oblike in imunoglobulinske domene vsebujoči	Membrana	Tesni stik	↓		22095633	<a href="#">NP_001164024.1</a>		<a href="#">300620</a>

	protein 1								
<a href="#">RUVB2 HUMAN</a>	RuvB-like 2	Membrana	Regulacija rasti		↑	22944598	<a href="#">NP_006657.1</a>	<a href="#">3UK6</a>	<a href="#">604788</a>
<a href="#">ESYT1 HUMAN</a>	Razširjen sinaptotagmin-1	Membrana	Od kalcija reguliran membranski protein		↑		<a href="#">NP_001171725</a>		
<a href="#">2B1C HUMAN</a>	HLA II histokompatibilni antigen, DRB1	Membrana	Imunost						
<a href="#">PLSL HUMAN</a>	Plastin-2	Tesni stik	Veže aktin				<a href="#">NP_002289.2</a>	<a href="#">2D85</a>	<a href="#">153430</a>
<a href="#">CO9 HUMAN</a>	Komponenta komplementa C9	Celična membrana	Del MAC		↑	20707004	<a href="#">NP_001728.1</a>		<a href="#">120940</a>
<a href="#">GRP78 HUMAN</a>	78 kDa z glukozo reguliran protein	Endoplazemski retikulum	Pomoč pri sestavi multimernih proteinov	Prenos v plazemsko membrano	↑	22778057	<a href="#">NP_005338.1</a>	<a href="#">3IUC</a>	<a href="#">138120</a>
<a href="#">ITB4 HUMAN</a>	Integrin beta-4	Membrana	Strukturalna vloga pri hemidesmosomu		↑	22533479	<a href="#">NP_000204.3</a>	<a href="#">1QG3</a>	<a href="#">147557</a>
<a href="#">MET HUMAN</a>	Hepatocitni receptor ravnega faktorja	Membrana	Nadzoruje mnoge fiziološke procese		↑		<a href="#">NP_000236.2</a>	<a href="#">1R1W</a>	<a href="#">164860</a>
<a href="#">ITA6 HUMAN</a>	Integrin alfa-6	Celična membrana	Receptor za laminin na krvnih ploščicah				<a href="#">NP_000201.2</a>		<a href="#">147556</a>
<a href="#">ITB1 HUMAN</a>	Integrin beta-1	Celična membrana	Receptor za kolagen				<a href="#">NP_002202.2</a>	<a href="#">3VI3</a>	<a href="#">135630</a>
<a href="#">ITA2 HUMAN</a>	Integrin alfa-2	Membrana	Adhezija celic na kolagen				<a href="#">NP_002194.2</a>	<a href="#">1AOX</a>	<a href="#">192974</a>
<a href="#">ITAV HUMAN</a>	Integrin alfa-V	Membrana	Celična adhezija				<a href="#">NP_0011384.1</a>	<a href="#">1JV2</a>	<a href="#">193210</a>
<a href="#">ITAS HUMAN</a>	Integrin alfa-5	Membrana	Celična adhezija				<a href="#">NP_002196.2</a>		<a href="#">135620</a>

<a href="#">LICAM HUMAN</a>	Nevralna celična adhezivna molekula L1	Celična membrana	Celična adhezija		<a href="#">NP_000416.1</a>	<a href="#">308840</a>
<a href="#">PVR_HUMAN</a>	Receptor poliovirusa	Celična membrana	Celična adhezija		<a href="#">NP_001129240.1</a>	<a href="#">3EPC</a> <a href="#">173850</a>
<a href="#">CD9_HUMAN</a>	CD9 antigen	Celična membrana	Celična adhezija		<a href="#">NP_001760.1</a>	<a href="#">143030</a>
<a href="#">RASK_HUMAN</a>	GTP-aza K-Ras	Celična membrana	GTP-aza	24861525	<a href="#">NP_203524.1</a>	<a href="#">1D8D</a> <a href="#">190070</a>

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Marko NAROBÉ

**POSKUS OBOGATITVE PROTEINOV PLAZEMSKÉ MEMBRANE IZ  
ŽELODČNEGA TKIVA TER RAČUNALNIŠKO ISKANJE MOŽNIH  
BIOLOŠKIH OZNAČEVALCEV RAKA ŽELODCA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016



