

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE BIOLOGIJE

Katja PAJNIČ

**LENTIVIRUSNA INFEKCIJA CELIC CHO-K1 ZA
PROIZVODNJO PROTEINOV IZ SKUPINE B SRCR-
SF**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Molekulska biologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE BIOLOGIJE

Katja PAJNIČ

**LENTIVIRUSNA INFEKCIJA CELIC CHO-K1 ZA PROIZVODNJO PROTEINOV
IZ SKUPINE B SRCR-SF**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Molekulska biologija

**LENTIVIRAL INFECTION OF CHO-K1 CELLS FOR PRODUCTION OF
PROTEINS FROM THE GROUP B SRCR-SF**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Academic Study in Molecular Biology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na oddelku za celično aktivacijo in izražanje genov (CAGE, ang. Cell activation and gene expresion) Inštituta za molekularno in celično biologijo (IBMC, por. Instituto de Biologia Molecular e Celular) Univerze v Portu.

Študijska komisija za študij 1. in 2. stopnje oz. Senat oddelka je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Gregorja Anderluha, za recenzenta doc. dr. Mateja Butalo.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Blagajana HERZOG-VELIKONJA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH
Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za molekularno biologijo in
nanobiotehnologijo

Član: doc. dr. Matej BUTALA
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo magistrskega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Katja PAJNIČ

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 575:602.641(043.2)=163.6
KG	lentivirusi/SRCR/CHO/ekspresijski sistemi/GFP/sesalske celice
AV	PAJNIČ, Katja, dip. mikrobiologinja
SA	ANDERLUH, Gregor (mentor)/ BUTALA, Matej (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske biologije
LI	2014
IN	LENTIVIRUSNA INFEKCIJA CELIC CHO-K1 ZA PROIZVODNJO PROTEINOV IZ SKUPINE B SRCR-SF
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	XI, 66 str., 18 pregl., 17 sl., 2 pril., 47 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Vektorji, ki temeljijo na lentivirusih se uporabljajo za prenos genov s transdukcijo v nedeleče celice. V magistrskem delu smo s pomočjo lentivirusnih vektorjev v celice CHO-K1 prenesli gena za proteina CD6 in Spα. Sprva smo izbrani gen vstavili v plazmid pHR-SIN-BX-IRES-Em. S tako pripravljenim vektorjem smo nato skupaj s plazmidnim vektorjem pMD-G, ki kodira proteine ovojnice in pomožnim plazmidnim vektorjem p8.91, transficirali proizvodne celice HEK 293T. Temu je sledila lentivirusna okužba celic CHO-K1. Le te so nato sintetizirale izbrana proteina CD6 ali Spα skupaj s poročevalskim proteinom Emerald. Na enak način smo izvedli tudi sekundarno infekcijo celic. Intenziteta zelene fluorescence okuženih celic CHO-K1, ki sintetizirajo protein CD6 je bila 2,5 krat večja po sekundarni infekciji v primerjavi z intenziteto po primarni infekciji. Prav tako lahko s primerjavo slik pridobljenih z mikroskopijo trdimo, da se poveča intenziteta fluorescence celic, ki sintetizirajo rekombinantni protein Spα. Oba proteina se izločata v gojišče in se glede na meritve intenzitete fluorescence sintetizirata v višjih koncentracijah po sekundarnih infekcijah celic.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Du2
DC	UDK 575:602.641(043.2)=163.6
CX	lentivirus/SRCR/CHO/expression systems/GFP/mamalian cells
AU	PAJNIČ, Katja
AA	ANDERLUH, Gregor (supervisor)/BUTALA, Matej (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Molecular biology
PY	2014
TI	LENTIVIRAL INFECTION OF CHO-K1 CELLS FOR PRODUCTION OF PROTEINS FROM THE GROUP B SRCR-SF
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Molecular Biology)
NO	XI, 66 p., 18 tab., 17 fig., 2 ann., 47 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Gene-transfer vectors based on lentiviruses are distinguished by their ability to transduce the non-dividing cells. In this master thesis, lentiviral vectors were used to transfer gens for the proteins CD6 and Spα into CHO-K1 cells. To accomplish this, gene for the protein was inserted into the pHR-SIN-BX-IRES-Em plasmid. The transfer vector was prepared and transfected together with the plasmid vector pMD-G, that codes proteins of the envelope and helping plasmid vector p8.91, into HEK 293T cells. After this CHO-K1 cells were infected to produce proteins CD6 and Spα together with reporter protein Emerald. Secondary infection was performed identically as described above. The intensity of the green fluorescence of CD6 producing CHO-K1 cells was 2,5-times higher after secondary infection in comparison to the intesity measured after the first infection. Fluorescence microscopy analysis of the Spα producing infected cells reveals also higher Spα protein levels after second infection. Here we also show that both proteins are secreted into the medium and produced in higher concentrations after the second infection.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VIII
	KAZALO SLIK	IX
	KAZALO PRILOG	X
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1	UVOD	1
1.2	Delovne hipoteze	2
2	PREGLED OBJAV	3
2.1	Superdružina SRCR-SF	3
2.1.1	Protein CD6	5
2.1.2	Protein Spa	8
2.2	LENTIVIRUSI	9
2.2.1	Zgradba genoma	9
2.2.2	Življenjski cikel	11
2.2.3	Lentivirusni ekspresijski vektorji	12
2.2.4	Biovarnost	15
2.3	EKSPRESIJSKI SISTEMI	16
2.3.1	Sesalske celice	17
2.4	FLUORESCENCA IN PROTEIN GFP	18
3	MATERIALI IN METODE	20
3.1	MATERIALI	20
3.1.1	Laboratorijska oprema	20
3.1.2	Kemikalije	22
3.1.3	Raztopine in pufri	23
3.1.4	Gojišča	24
3.1.4.1	Bakterijska gojišča	24
3.1.4.2	Gojišče za celične kulture	24
3.1.5	Restriksijski encimi	25

3.1.6	Protitelesa	25
3.1.7	Organizmi	25
3.1.7.1	Bakterijski sevi	25
3.1.7.2	Celične kulture	26
3.1.8	Plazmidi	26
3.1.8.1	pHR-SIN-BX-IRES-Em	26
3.1.8.2	Plazmidni vektor p8.91	27
3.1.8.3	Plazmidni vektor pMD-G	27
3.2	METODE	28
3.2.1	Osnovne metode molekulskega kloniranja	28
3.2.1.1	Restrikcija DNA	28
3.2.1.2	Ligacija	29
3.2.1.3	Transformacija kompetentnih celic	29
3.2.1.4	Verižna reakcija s polimerazo (PCR) na osnovi kolonije	29
3.2.1.5	Agarozna gelska elektroforeza	31
3.2.1.6	Čiščenje DNA iz agaroznega gela	31
3.2.1.7	Izolacija plazmidne DNA	31
3.2.1.8	Določanje koncentracije DNA	32
3.2.1.9	Določanje nukleotidnega zaporedja	32
3.2.2	Delo s celično kulturo	32
3.2.2.1	Gojenje celične kulture	32
3.2.2.2	Transfekcija celične kulture HEK 293T	33
3.2.2.3	Lentivirusna infekcija celične kulture CHO-K1	34
3.2.3	Pretočna citometrija	34
3.2.4	Delo z rekombinantnimi proteini	34
3.2.4.1	NaDS-PAGE elektroforeza	35
3.2.4.2	Barvanje proteinov z barvilom Coomassie modrim	37
3.2.4.3	Prenos western	38
3.2.5	Nikelj kelatna kromatografija	39
3.2.5.1	Priprava vzorcev in kolone	39
3.2.5.2	Spiranje in elucija	39
3.2.6	Koncentriranje proteina	40

4	REZULTATI	42
4.1	Priprava plazmidnih konstruktov	42
4.1.1	Restrikcija in ligacija	42
4.1.2	Verižna reakcija s polimerazo na osnovi kolonije	43
4.2	Ocena sinteze rekombinantnih proteinov	44
4.2.1	Prenos western	44
4.2.2	Rezultati pretočne citometrije	45
4.2.3	Mikroskopija	47
4.2.4	Nikelj kelatna kromatografija	48
4.2.4.1	Čiščenje proteina CD6	48
4.2.4.2	Čiščenje proteina Sp α	49
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	51
5.1	RAZPRAVA	51
5.1.1	Zaznavanje intenzitete zelene fluorescence	51
5.1.1.1	Pretočna citometrija	52
5.1.1.2	Mikroskopija	52
5.1.2	Določanje prisotnosti proteina v gojišču	53
5.1.3	Čiščenje proteinov	53
5.1.3.1	CD6	54
5.1.3.2	Sp α	55
5.2	SKLEPI	57
6	POVZETEK	59
7	VIRI	61
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Seznam laboratorijske opreme.	20
Pregl. 2: Seznam kemikalij.	22
Pregl. 3: Seznam raztopin in pufrov.	23
Pregl. 4: Sestava tekočega in trdnega LB gojišča.	24
Pregl. 5: Restriksijski encimi uporabljeni v študiji.	25
Pregl. 6: Protitelesa uporabljena pri prenosu western.	25
Pregl. 7: Bakterijski sevi uporabljeni v študiji.	25
Pregl. 8: Celične kulture uporabljene v študiji.	26
Pregl. 9: Plazmidi uporabljeni v študiji.	26
Pregl. 10: Sestava mešanice za PCR.	30
Pregl. 11: Časovni in temperaturni pogoji PCR.	30
Pregl. 12: Začetni oligonukleotidi.	31
Pregl. 13: 7,5 % ločitveni NaDS-PAGE gel (za 2 x 0,75 mm gela).	35
Pregl. 14: 10 % ločitveni NaDS-PAGE gel (za 2 x 0,75 mm gela).	36
Pregl. 15: 3 % vstopni NaDS-PAGE gel (za 2 gela).	36
Pregl. 16: Program za spiranje proteina CD6 iz kolone.	40
Pregl. 17: Program za spiranje proteina Spα iz kolone.	40
Pregl. 18: Geometrijska sredina intenzitete fluorescence po prvi in drugi infekciji celic in stopnja razlike v intenziteti fluorescence med prvo in drugo infekcijo.	47

KAZALO SLIK

Sl. 1: Proteina CD6 in Sp α v primerjavi z drugimi proteini skupine B SRCR-SF (Goncalves in sod., 2009).....	5
Sl. 2: Proteina CD6, CD166 in njuna interakcija (Bowen, 2000).	7
Sl. 3: Genom lentivirusa (Pluta in Kacprzak, 2009).....	10
Sl. 4: Shematski prikaz promotorskih področij in genov lentivirusnega ekspresijskega vektorja (Addgene, 2014).....	15
Sl. 5: Shematski prikaz mape plazmida pHR-SIN-BX-IRES-Em.....	27
Sl. 6: Gelska elektroforeza pHR-SIN-BX-IRES-Em	43
Sl. 7: Gelska elektroforeza iz kolonij izoliranih pHR-SIN-BX-IRES-Em + CD6;	44
Sl. 8: Gelska elektroforeza iz kolonij izoliranih pHR-SIN-BX-IRES-Em + Sp α ;	44
Sl. 9: Prenos western proteina CD6 in Sp α ;	45
Sl. 10: Intenziteta fluorescence celic CHO-K1 s pHR-SIN-BX-IRES-Em + CD6 po primarni infekciji;	46
Sl. 11: Intenziteta fluorescence celic CHO-K1 s pHR-SIN-BX-IRES-Em + CD6 po drugi infekciji;.....	46
Sl. 12: Fluorescenca celic CHO-K1 z vstavljenim plazmidom pHR-SIN-BX-IRES-Em + Sp α	47
Sl. 13: Kromatogram nikelj kelatne kromatografije proteina CD6 s frakcijami zbranimi od 0 do 80 min.	48
Sl. 14: NaDS-PAGE gel s frakcijami proteina CD6 tekom čiščenja;.....	49
Sl. 15: Kromatogram nikelj kelatne kromatografije proteina Sp α s frakcijami zbranimi od 0 do 70 minute.	49
Sl. 16: NaDS-PAGE gel s frakcijami proteina Sp α po čiščenju.	50
Sl. 17: Prenos western proteina Sp α po čiščenju.	50

KAZALO PRILOG

PRILOGA B: Oligonukleotidno zaporedje Sp α

PRILOGA A: Oligonukleotidno zaporedje CD6

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AIM	ang. apoptosis inhibitor of macrophages
APC	antigen predstavitvene celice
BHK	ledvične celice mladiča hrčka (ang. baby hamster kidney cell)
CHO	ovarijske celice kitajskega hrčka (ang. chinese hamster ovary cells)
CMV	citomegalovirus
CTS	centralno terminacijsko zaporedje (ang. central termination sequence)
DIS	dimerizacijski signal (ang. dimerisation initiation site)
DMEM	ang. Dulbecco's Modified Eagle's medium
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. deoxyribonucleic acid)
FBS	fetalni goveji serum (ang. fetal bovine serum)
GFP	zeleni fluorescirajoči protein (ang. green fluorescent protein)
HEK	človeške embrionalne ledvične celice (ang. human embryonic kidney cell)
HIV	virus humane imunske pomanjkljivosti (ang. human immunodeficiency virus)
IMAC	kovinsko kelatna afinitetna kromatografija (ang. immobilized-metal affinity chromatography)
IRES	notranje ribosomsko vstopno mesto (ang. internal ribosome entry site)
LPS	lipopolisaharid
LTA	lipotehojska kislina
LTR	dolge končne ponovitve (ang. long terminal repeats)
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata
NHEJ	nehomogeno združevanje koncev (ang. non-homogeneous end joining)
ORF	odprti bralni okvir (ang. open reading frame)

PAMP	s patogeni povezani molekulski vzorci (ang. pathogen-associated molecular patterns)
PBS	mesto vezave začetnega oligonukleotida (ang. primer binding site)
PVDF	ang. polyvinylidene difluoride
R	ponovljivi elementi (ang. repeated elements)
Rcf	relativna centrifugalna sila (ang. relative centrifugal force)
RCL	ang. replication-competent lentivirus
RNA	ribonukleinska kislina (ang. ribonucleic acid)
RRE	rev odzivni element (ang. rev response element)
RSV	respiratorni sinicijski virus (ang. respiratory syncytial virus)
SFFV	ang. spleen focus-forming virus
Sp α	ang. soluble protein α
SRCR-SF	superdružina odstranjevalnih receptorjev bogatih s cisteinom (ang. scavenger receptor cysteine-rich superfamily)
TAR	transaktivacijski odzivni element (ang. trans-activation response element)
TCR	T celični receptor (ang. T cell receptor)
U3	3' unikatni element
U5	5' unikatni element
VSV	virus vezikularnega stomatitisa (ang. vesicular stomatitis virus)
WPRE	ang. woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element

1 UVOD

Superdružina odstranjevalnih receptorjev bogatih s cisteinom (SRCR-SF, ang. scavenger receptor cystein rich superfamily) danes obsega več kot trideset proteinov. Delimo jo na skupino A in B. Del skupine B predstavljata tudi proteina CD6 in Sp α . CD6 je močno glikoliziran protein in se nahaja na površini celic. Molekulska masa proteina je 117 kDa pod nereducirajočimi pogoji in 130 kDa pod reducirajočimi pogoji, odvisno od pogojev pri katerih protein potuje pri NaDS-PAGE elektroforezi. Sestavljen je iz ekstracelularne domene, ki vsebuje tri domene SRCR v tandemu, transmembransko domeno in citoplazemsko regijo, ki je dobro prilagojena za prenašanje signalov. Sintetizira se v timocitih, zrelih T limfocitih in v subpopulaciji B1a. Sp α pa je 40 kDa velik protein, ki ga izločajo tkivni makrofagi in je sekrecijski predstavnik skupine B SRCR-SF. Domene SRCR so pogoste pri številnih proteinih imunskega sistema. Domneva se, da posredujejo interakcije protein-protein, a funkcija teh proteinov še ni znana. Proteina Sp α in CD6 naj bi sodelovala pri imunskem odgovoru in sta pomembna pri nekaterih avtoimunskih boleznih. Zaradi klinične pomembnosti teh proteinov bi bilo potrebno izboljšati razumevanje prenosa signalov ter funkcije proteinov CD6 in Sp α v celicah. V ta namen bi potrebovali očiščena proteina v visokih koncentracijah.

Pri sintezi proteinov v sesalskih celicah je pomembno, da se gen želenega proteina vstavi v jedro celice. Prve tehnike za prenos genov in izražanje v sesalskih celicah so bile razvite pred 15-25 leti in so temeljile na transfekciji rekombinantne DNA s Ca-fosfatom, elektroporaciji in vnosu DNA ali RNA v celice *in vitro* s pomočjo umetnih membran. Te tehnike imajo nizko učinkovitost transfekcije, rekombinantna DNA pa se v genom transgenih celic vstavi naključno in ne na specifično lokacijo. Virusi omogočajo zvečano učinkovitost prenosa in nadzorovano vstavljanje rekombinantnih DNA molekul v genom transgenih celic. Lentivirusni vektorji so bili oblikovani v sredini devetdesetih let na osnovi virusa HIV-1. Oblikovanje virusnih vektorjev temelji na ločitvi *cis* in *trans* delujočih zaporedji. Običajno je lentivirusni sistem sestavljen iz pakirne ekspresijske kasete, vektorske kasete in kasete, ki izraža ovojnico. Lastnosti lentivirusov, da lahko okužijo nedeleče celice, prenesejo veliko genetskega materiala in dolgo ohranjajo stabilno

izražanje, so njihove prednosti pred ostalimi sistemi in omogočijo uporabo v terapevtske namene.

1.1 Namen magistrskega dela

Namen magistrskega dela je bil s pomočjo tehnik molekulskega kloniranja in lentivirusne infekcije celic CHO-K1 pridobiti dva proteina iz skupine B SRCR-SF, CD6 in Sp α ter spremljati izražanje genov za proteina CD6 in Sp α s pomočjo zelenega fluorescirajočega proteina (ang. GFP, green fluorescent protein).

Tehnike kot so pretočna citometrija, mikroskopija, prenos western in barvanje s Coomassie modrim nam bodo v pomoč pri spremljanju sinteze proteinov in njunega izločanja v gojišče.

1.2 Delovne hipoteze

Postavili smo si naslednji hipotezi:

- Lentivirusna infekcija celic CHO-K1 omogoča proizvodnjo proteinov CD6 in Sp α .
- S sekundarno infekcijo celic CHO-K1 se koncentracija sintentiziranega proteina poveča.

2 PREGLED OBJAV

2.1 Superdružina SRCR-SF

Superdružina SRCR-SF vključuje več kot 30 proteinov. Kljub temu, da je bila večina predstavnikov SRCR-SF opisanih pri sesalcih (človek, miš, podgana, svinja, krava, zajec, ovca), so ti proteini prav tako prisotni tudi pri drugih vrstah vretenčarjev tako visoko razvitih (ptiči, dvoživke), primitivnih (ribe) ali nevretenčarjih (spužve, insekti) ter celo pri algah (Martinez, 2011).

Proteini iz SRCR-SF se sintetizirajo predvsem v celicah, ki so povezane z imunskim sistemom. Nekateri pa so sintetizirani tudi v neimunskih celicah, v številnih tkivih in organih kot so ledvice, jetra, placenta, želodec, možgani in srce (Goncalves, 2009). Pri človeku lahko pripadnike družine SRCR-SF najdemo v limfocitih, večina pa jih je sintetiziranih v epiteliju in mononuklearnem fagocitnem sistemu ter imajo multi adhezivne in/ali encimatske lastnosti (Martinez, 2011).

Sodelujejo pri razvoju in uravnavanju prirojenega in pridobljenega imunskega odziva (Serrias, 2003). Poleg tega so prav tako povezani s številnimi bolezenskimi in patološkimi stanji, aterosklerozo, Alzheimerjevo in avtoimunsko boleznijo ter rakom. Zaradi tega so pomembne tarče za diagnostiko ali terapevtske posege (Martinez, 2011).

Domena SRCR je splošna značilnost proteinov SRCR-SF. Ključni aminokislinski ostanki domen SRCR so se ohranili z majhnimi spremembami skozi evolucijo kljub temu, da so se ostale aminokisliline, ki jih obkrožajo prosto razvile in oblikovale neskončno proteinov z mnogimi funkcionalnimi razlikami. Variabilnost domen SRCR ni omejena samo na strukturo, ampak se prav tako razlikujejo v številu kopij. Lahko imajo od 1 do 14 ponovitev domene (Martinez, 2011). Prav tako so proteini SRCR lahko sestavljeni izključno iz domen SRCR ali pa vključujejo še druge proteinske domene (Goncalves, 2009).

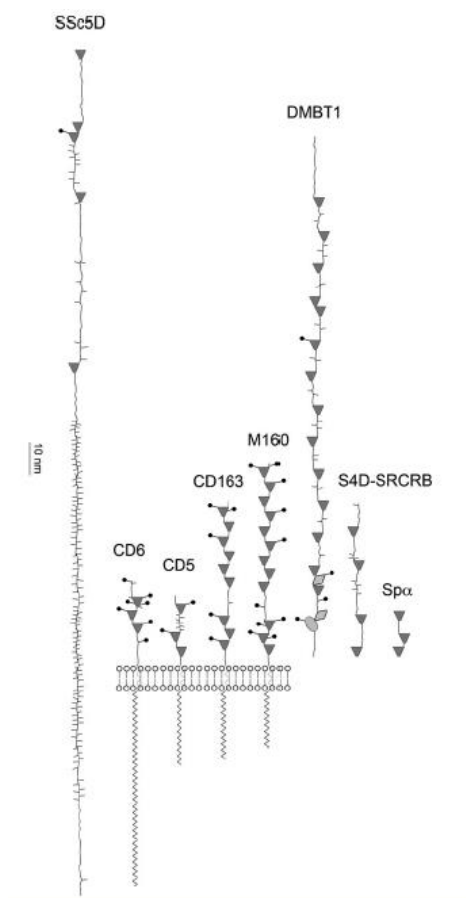
Analize zaporedij so pokazale, da imajo domene SRCR različno stopnjo podobnosti, vendar pa je znotraj domene ohranjen relativen položaj cisteinov kot tudi disulfidnih vezi. Kljub zelo visoki stopnji podobnosti med proteini še vedno ni bila najdena enotna funkcija

in/ali ligand SRCR-SF teh proteinov. Proteini iz superdružine SRCR-SF imajo številne raznolike funkcije, vendar pa trenutno kaže, da bi bile lahko strukturne lastnosti visoko ohranjenih domen SRCR edina skupna lastnost te družine (Goncalves, 2009).

Domene SRCR so sestavljene iz približno stotih aminokislinskih ostankov, ki vsebujejo 6-8 cisteinov (Sarrias, 2005). Pripadniki SRCR-SF so sekrecijski ali pa vezani na membrano in jih ločimo glede na prisotnost ene ali več ponovitev s cisteinom bogatih domen (Sarrias, 2003).

Superdružina SRCR-SF je razdeljena v dve skupini glede na število cisteinskih ostankov v vsaki domeni SRCR ter organizacijo intronov in eksonov: na skupino A in skupino B domen SRCR. Skupina A domen SRCR je kodirana z vsaj dvema eksonoma, predstavniki vsebujejo šest cisteinskih ostankov, ki oblikujejo tri disulfidne vezi. Skupina B domen SRCR (Slika 1) je kodirana z enim eksonom in ti proteini vsebujejo osem cisteinskih ostankov ter štiri disulfidne vezi na domeno. Obstaja tudi nekaj izjem, vendar pa nikoli nista prisotni hkrati domena A in B na istem receptorju SRCR-SF (Goncalves, 2009). Predstavniki obeh skupin pa lahko vsebujejo SRCR kot posamično domeno, kot tandemsko ponovitev ali pa v kombinaciji z domenami drugih proteinov (z domenami epidermalnega rastnega faktorja, domen serinske proteaze, kolagenskih regij in drugih domen) (Sarrias, 2005).

Skupina B SRCR družine vsebuje 8 proteinov med katerimi sta najbolj raziskana proteina CD5 in CD6. Poleg njiju je v tej skupini še topen protein Sp α , ki vsebuje tri domene SRCR in ga sintetizirajo predvsem celice iz limfoidnih predelov. Protein DMBT1 je po molekulski masi največji predstavnik te družine in vsebuje 14 domen SRCR. Nadalje, proteina CD163 in M160 sta bila identificirana v človeških monocitih, protein S4D-SRCRB pa je topen protein s štirimi B domenami. Do sedaj za te molekule ni bilo opisanih specifičnih funkcij. Domneva se, da naj bi bili Sp α , DMBT1, CD163 in celo CD5 ter CD6 sposobni zaznati s patogeni povezane molekulske vzorce (PAMP), se nanje pričvrstiti in odstraniti infektivne bakterije in glive (Goncalves, 2009).



Slika 1: Proteina CD6 in Sp α v primerjavi z drugimi proteini skupine B SRCR-SF (Goncalves in sod., 2009).

2.1.1 Protein CD6

Zrel CD6 je močno glikoliziran celični površinski protein. Odvisno od pogojev NaDS-PAGE elektroforeze lahko proteinu določimo molekulsko maso 117 kDa pod nereducirajočimi pogoji in 130 kDa pod reducirajočimi pogoji, kar kaže na odsotnost disulfidnih vezi. Protein CD6 je sestavljen iz zunajcelične domene, ki vsebuje tri domene SRCR v tandemu, transmembranske domene kot tudi citoplazemske regije. Slednja je dobro prilagojena na prenos celičnih signalov. V membrano vstavljen protein CD6 ima neobičajen citoplazemski rep iz 244 aminokislin, ki vsebuje številne signalne motive. Le ti vključujejo devet tirozinskih ostankov, dve s prolinom bogati regiji ter enajst mest za fosforilacijo, od tega tri za protein kinazo C in osem za kazein kinazo II. Le zadnjih pet je ohranjenih pri človeku, podgani in miši (Pinto in Carmo, 2013).

Genomski lokus CD6 v dolžini 25 kbp vključuje 13 eksonov in se nahaja na kromosomu 11q12.2. Prvih šest eksonov kodira zunajcelično domeno, izmed katerih eksona 3 in 5

nosita zapis za tri domene SRCR, vsaka iz približno 100 aminokislinskih ostankov. Transmembransko domeno kodira ekson 7, eksoni od 8 do 13 pa kodirajo citoplazemsko regijo (Castro, 2007; Pinto in Carmo, 2013).

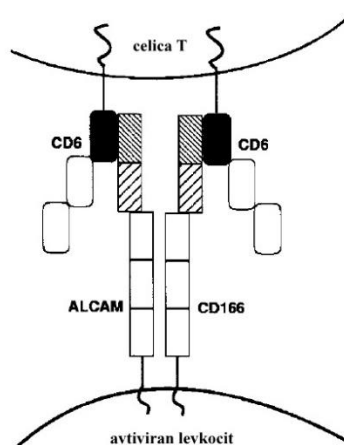
Gen za protein CD6 je izražen v timocitih že v zgodnjem stadiju razvoja, v zrelih T limfocitih in v B1a subpopulaciji, ki proizvaja avtoreaktivna protitelesa IgM. CD6 se sintetizira tudi v nekaterih delih možganov in naravnih celicah ubijalkah. Večina zrelih celic T ima visok nivo izražanja gena za CD6, kljub temu pa obstaja tudi majhna CD6 negativna populacija teh celic (5-6 %), ki proteina CD6 ne sintetizira (Pinto in Carmo, 2013).

Protein CD6 ima verjetno pomembno vlogo pri zorenju timocitov, saj protitelesa CD6 delno blokirajo vezavo timocitov na epitelijske celice timusa. To pa je tudi dokaz, da se ligand CD6 nahaja na površini celic (Castro, 2007). Izražanje gena za CD6 se poveča v času diferenciacije timocitov in aktivacije limfocitov, kar regulira T celični receptor (TCR) (Martinez, 2011). CD6 je verjetno vključen v regulacijo razvoja celic T in njihove aktivacije ter ima pomembno vlogo pri vnetnih procesih pri človeku in razrastu celic (Oliveira, 2012). CD6 fizično sodeluje na površini celic T in je prisoten na imunski sinapsi med celicami T in antigen predstavitvenimi celicami (APC) (Pinto in Carmo, 2013).

Oliveira in sodelavci (2012) so dokazali, da lahko CD6 sproži inhibitorni signal v limfocitih T. Za inhibitorne učinke je odgovorna citoplazemska domena CD6. Izražanje CD6 zatira izločanje citokinov in razmnoževanje celic T.

Glavni ekstracelularni ligand CD6 je molekula CD166 iz imunoglobulinske super družine (IgSF). Je adhezivna molekula aktiviranih levkocitov. Rezultat interakcije med CD6 in CD166 (Slika 2) je lokalizacija obeh molekul v imunološki sinapsi, kjer TCR prepozna poglobitni histokompatibilnostni kompleks (PHK) prisoten na antigen predstavitvenih celicah. Zunajcelična povezava CD6-CD166 večinoma pozitivno prispeva k razmnoževanju celic T (Pinto in Carmo, 2013). Rekombinanten topen humani CD6 inhibira razvoj imunske sinapse in posledično aktivacijo limfocitov, kar kaže na pomembne imunoregulatorne lastnosti (Martinez, 2011). Vezava CD6 s CD166 aktivira

komponente MAP kinazne poti, kot tudi nekatere transkripcijske aktivatorje (Pinto in Carmo, 2013).



Slika 2: Proteina CD6, CD166 in njuna interakcija (Bowen, 2000).

Protein CD6 je izpostavljen predvsem na površinah celic lahko pa je prisoten tudi v serumu. Membransko vezan CD6 lahko zazna prisotnost lipopolisaharidov (LPS) bakterij v okolju, pošlje signal v celico ter se veže na ohranjene bakterijske strukture kot so LPS in lipotehojska kislina (LTA). Kalcij pozitivno vpliva na vezavo CD6 na gram pozitivne in negativne bakterije, in sicer vpliva na strukturo zunanje bakterijske membrane in agregatno stanje LPS. Interakcija CD6 z bakterijsko površino je specifična. Veže se na LTA in LPS preko samostojnih, neprekrivajočih delov molekule (Serrias, 2007).

CD6 povezujejo z razvojem nekaterih avtoimunskih bolezni in rakom (multiplo sklerozo, revmatoidnim artritisom, Sjögrenovim sindromom in kronično limfocitično levkemijo celic B). Protitelesa proti CD6 se uporabljajo v kliniki pri bolnikih z multiplo sklerozo. Zaradi tega bi bilo pomembno, da se bolje opišejo signalne poti, ki jih regulira CD6 (Pinto in Carmo, 2013).

Uspešna aplikacija uporabe protiteles proti CD6 v terapevtske namene je bila tudi v primeru reakcije presadka proti gostitelju (GVHD). Prednost tega je, da protitelesa proti CD6 specifično odstranijo zrele celice T brez večjih vplivov na naravne celice ubijalke, B celice ali mieloidne prekurzorje (Martinez, 2011).

Protein CD6 bi lahko bil pomemben za terapevtsko uporabo, saj bi lahko povečal preživetje bolnikov pri septičnem šoku. Topne oblike CD6, ki krožijo po človeškem serumu so zaznane v času aktivacije limfocitov, kar bi lahko bilo pomembno pri zdravljenju avtoimunskih bolezni pri katerih pride do hiperaktivacije limfocitov. Kljub temu, da je funkcija topne oblike neznana, bi lahko regulirala inhibicijo vnetnega odziva, saj se je zmožna vezati z ligandi, ki so v bližini in blokirati kontakte med celicami, ki so potrebni za tak odziv (Serrias, 2007; Martinez, 2011). Za boljše razumevanje signalne transdukcije CD6 pa še vedno manjka celotna analiza signalnih mediatorjev za prenos signala, ki ga sprejme CD6 (Pinto in Carmo, 2013).

2.1.2 Protein Sp α

Protein AIM (ang. apoptosis inhibitor of macrophages) imenovan tudi Sp α (ang. soluble protein alpha), CD5L ali Api-6 je 40 kDa velik protein, ki ga izločajo tkivni makrofagi (vranica, limfni vozli, timus, kostni mozeg, jetra). Imel naj bi širok spekter bioloških funkcij, predvsem pa naj bi preprečeval apoptozo makrofagov. Z uravnavanjem aktivnosti makrofagov, sodeluje pri patogenezi številnih infektivnih in vnetnih procesov (Sanjurjo in sod., 2013).

Protein Sp α uvrščamo v skupino B SRCR-SF in je slabo raziskan. Je topen protein, ki ne interagira z membrano in ga celice prisotne v limfoidnem tkivu lahko izločajo. Veže se na različne celice imunskega sistema, vključno s perifernimi krvnimi monociti in nekaterimi mirujočimi mielodnimi celicami ter T in B celičnimi linijami. Sp α je prisoten tudi v frakcijah človeškega seruma imunoglobulina M (IgM), ne pa tudi v frakcijah protiteles IgG in IgA. Sp α najverjetneje uravnava homeostazo IgM in regulacijo imunskega sistema (Sarrias, 2003). Lahko bi imel pomembno vlogo pri razvoju in vzdrževanju limfoidnih predelov ter regulaciji prirojenega in pridobljenega imunskega sistema (Gebe, 2000).

Zrel Sp α je sekrecijski protein katerega gradi 331 aminokislin. Sestavljajo ga tri domene in vsaka od teh vsebuje 110 aminokislin. Te so homologne domenam bogatim s cisteinom, ki jih najdemo pri družini proteinov SRCR skupine B. (Gebe, 2000).

Protein Sp α deluje kot receptor za prepoznavo vzorcev LTA in LPS na površini gram pozitivnih in negativnih bakterij ter se nanje veže. Povzroči agregacijo gram pozitivnih in

negativnih bakterij ter inhibira izločanje TNF- α iz človeških monocitov ob stimulaciji z LPS in LTA. Vezava na gram negativne in pozitivne bakterije je olajšana v prisotnosti dvovalentnih ionov kot je Ca²⁺ in je ohranjena znotraj ene domene SRCR (Sarrias, 2005).

Spa sodeluje pri številnih procesih povezanih s homeostazo makrofagov, vključno s preživetjem makrofagov, pritrditvijo na endotelijske ICAM-1 in VCAM-1, kot tudi prevzem oxLDL in posledično oblikovanje penastih celičnih formacij (Amazaga, 2014).

Sanjurjo in sodelavci (2013) so ugotovili, da Spa sodeluje pri številnih ključnih vidikih odgovora makrofagov na bakterijo *Micobacterium tuberculosis*. Izboljša mikobakteriocidno aktivnost makrofagov in tako aktivno sodeluje pri prirojenem imunskem odzivu proti *M.tuberculosis*.

Spa kroži v serumu v relativno visokih količinah in je domnevni serumski biomarker za vnetna stanja kot so atopični dermatitis, kawasakijeva bolezen, kot tudi ciroza jeter. Spa bi lahko bil uporaben marker v diagnostiki in spremljanju bolnikov (Martinez, 2011). Meritve sprememb koncentracij proteina Spa v serumu bi lahko nadomestile biopsijo jeter za diagnostiko in spremljanje fibroze.

2.2 LENTIVIRUSI

2.2.1 Zgradba genoma

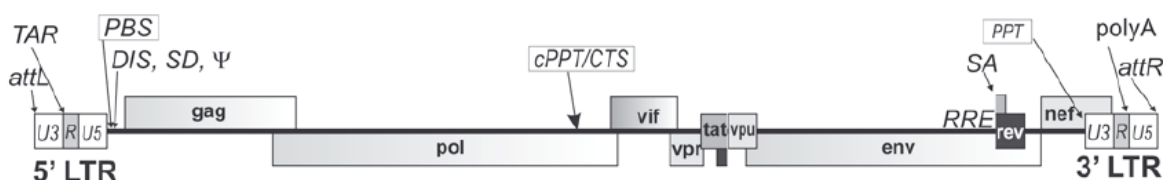
Lentivirusi so kompleksni retrovirusi katerih genom je zgrajen iz genov enostavnih retrovirusov in genov regulatornih proteinov, kar igra pomembno vlogo v produktivnem življenjskem ciklu virusa. Genom lentivirusa je sestavljen iz dveh linearnih, pozitivno orientiranih eno verižnih RNA molekul, ki sta obdani z virusno kapsido (Spirin in sod., 2008).

V provirusni DNA (Slika 3) so *trans* elementi obdani z dolgimi končnimi ponovitvami (ang. LTRs-long terminal repeats) na pet in tri terminalnem koncu (5' in 3') in s tem omejijo *cis* delujoče elemente. Regije, ki kodirajo proteine so označene s 5' in 3' LTR ter so sestavljene iz 3' unikatnih elementov (U3), ponovljivih elementov (R) in 5' unikatnih elementov (U5) ter obdajajo nekatere *cis*-delujoče elemente. *Cis* elementi vsebujejo signale, ki so pomembni za integracijo provirusa v genom gostitelja. In sicer ponovitve *att*,

ki so na 3' in 5' koncih provirusne DNA, zaporedje promotorskih elementov, transaktivacijski odzivni element (TAR) in poliadenilacijski signal (*polyA*). Poleg teh so tudi druga cis-delujoča zaporedja vključno z vezavnim mestom začetnega oligonukleotida (PBS), virusnih RNA pakirnih/dimerizacijskih signalov (Ψ in DIS) in centralno terminacijsko zaporedje (CTS), ki med reverzno transkripcijo vodi do oblikovanja troveržne DNA strukture imenovane centralna DNA. Genom lentivirusa vsebuje tudi odzivni element Rev (RRE), ki je pomemben pri post-transkripcijskem transportu nerezane in nepopolno razrezane virusne mRNA iz jedra v citoplazmo in s purinom bogata regija (polipurinsko področje; PPT), ki zagotavlja drugi RNA začetni oligonukleotid za začetek sinteze pozitivne verige DNA z virusno specifično reverzno transkriptazo (Pluta in Kacprzak, 2009).

Trans elementi provirusa HIV-1 vključujejo devet odprtih bralnih okvirjev (ORF). *Gag-pol*, *gag* in *env* ORF kodirajo strukturne proteine in encime, ki so značilni za vse retroviruse. Dodatni ORF kodirajo ključne regulatorne (geni *tat* in *rev*) ter pomožne proteine (geni *vif*, *vpu*, *vpr* in *nef*). Provirus kodira devetnajst proteinov, ki so vpleteni v sintezo virusnih proteinov v gostiteljski celici in pri oblikovanju ter združevanju virusnih delcev iz membrane okužene celice (Pluta in Kacprzak, 2009).

Produkt gena *gag* je prekursorski protein Gag (Pr55), ki je proteolitično cepljen na matrični p17, kapsidni p24, nukleokapsidni p9 in p6 protein. *Pol* kodira proteazo p11, reverzno transkriptazo (RT) p66/p51 in integrazo p31, ki je rezultat Gag-pol prekursorskega proteina (Rp160). Gen *env* kodira proteine ovojnice in so rezultat proteolitske razgradnje gp160 (Spirin in sod., 2008).



Slika 3: Genom lentivirusa (Pluta in Kacprzak, 2009).

2.2.2 Življenjski cikel

Replikacijski cikel HIV se začne (zgodnja faza infekcije), ko se virusni protein ovojnice gp120 veže na receptor CD4+, ki je izpostavljen na površini CD4 pozitivnih gostiteljskih celic. Vezava sproži številne dogodke, ki vodijo do dokončnega uničenja z virusom okuženih celic. Po vezavi na CD4 se aktiviran gp120 konformacijsko spremeni in nastane vezavno mesto za sekundarne gostiteljske receptorje (Pluta in Kacprzak, 2009; Herbeuval in Shearer, 2007; Spirin in sod., 2008).

Oblikovanje gp120-koreceptor/CD4 kompleksa sproži ponovno zvitje nekovalentno vezanega transmembranskega proteina gp41. Ni znano ali je za nadaljnje korake okužbe potrebna odcepitev gp120, znano je le, da mora za začetek fuzije povezava med gp120 in gp41 postati šibkejša. Aktiviran protein gp41 izpostavi N-terminalni hidrofobni fuzijski peptid, ki je vstavljen v celično plazemsko membrano. Heptadne ponavljajoče regije (HR1 in HR2) gp41 trimera se posledično zvijejo v šest vijačni snop (6HB ali coiled-coil kompleks). Oblikovanje tega kompleksa poveže virusno in celično membrano (oblikovanje tako imenovane fuzijske pore) in sprostí prosto energijo, ki zadostuje za spodbuditev fuzije. Z začetkom fuzije se vsebina virusnega jedra sprostí v citoplazmo (Pluta in Kacprzak, 2009; Spirin in sod., 2008).

V citoplazmi so virioni podvrženi številnim strukturnim spremembam, kar povzroči oblikovanje velike ribonukleinske strukture imenovane reverzno transkripcijski kompleks (RTC), kar vodi do zvečane sinteze virusne DNA. Virusna RNA je delno sproščena in uporabljena kot matrica za sintezo provirusne DNA. Sintezo vodi RT. Pri reverzni transkripciji je za začetek sinteze cDNA potrebna specifična celična tRNA, ki nalega na vezavno mesto začetnega oligonukleotida (PBS). Po naleganju začetnega oligonukleotida in sintezi cDNA reverzna transkripcija vključuje dva obvezna prenosa DNA verig, da se sintetizira dvoverižna provirusna DNA (dsDNA) s podvojenimi LTR. Provirusna DNA se veže s številnimi virusnimi in celičnimi proteini v tako imenovani preintegracijski kompleks (PIC). Kompleks vključuje provirusno DNA, integrazo, virusni protein R (Vpr) in matrični protein. Ti proteini omogočijo provirusni prenos v celično jedro (Pluta in Kacprzak, 2009; Spirin in sod., 2008).

Lentivirusi so zmožni okužiti nedeleče celice, saj se PIC z velikostjo 56 nm aktivno v odvisnosti od ATP prenese preko jedrno pornega kompleksa (ang. NPC, nuclear pore complex) (Pluta in Kacprzak, 2009). Protein Vpr stimulira prenos kompleksa v jedro in vpliva na zaustavitev celičnega cikla v fazi G₂. Ustavitev celičnega cikla v tej fazi spodbudi replikacijo virusa. Podaljšana zaustavitev celičnega cikla v G₂ lahko inducira apoptozo, kar verjetno olajša sprostitve virusa iz okuženih celic. Prvotno so virusni delci sproščeni iz okuženih celic v nezreli obliki. Razgradnja poliproteinov z virusnimi proteazami vodi v razvoj virusa (Spirin in sod., 2008).

Po pretvorbi v cDNA, med virusno invazijo gostiteljske celice, se ta vstavi v kromosomsko DNA kot provirus z nehomogenim združevanjem koncev (NHEJ) in se prenaša v druge generacije preko hčerinskih celic. Kot neodvisna transkripcijska enota ima lastne regulatorne elemente in je prepisana s celičnim transkripcijskim sistemom. Virusna integraza zaokroži provirus v ponovitvah *att* in igra pomembno vlogo pri integraciji v genom gostiteljske celice (Pluta in Kacprzak, 2009). Provirusi so prednostno vključeni v kromosom, ki vsebuje aktivno izražene gene. Vključen provirus je prepisan z encimi gostiteljske celice (Spirin in sod., 2008).

2.2.3 Lentivirusni ekspresijski vektorji

Lentivirusni vektorji so bili najprej oblikovani v sredini devetdesetih na osnovi genoma virusa HIV-1. Nedavno so uporabili tudi številne druge lentiviruse za oblikovanje vektorjev: HIV-2, SIV, FIV, BIV. Vektorji na osnovi HIV-1 so najpogostejši. V zadnjih dveh desetletjih so vektorji, ki temeljijo na HIV-1, sprejeti kot najbolj učinkoviti pripomočki med lentivirusi za prenos genov (Pluta in Kacprzak, 2009; Dropulič, 2011).

Prednost lentivirusnih vektorjev pomembnih za raziskave in gensko terapijo je njihova sposobnost, da lahko okužijo tako deleče kot nedeleče celice. Ta lastnost, ki je posebna med retrovirusi, posledično poveča obseg celic za prenos genov. Lentivirusi transducirajo mirujoče celice, primarne hepatocite, nedeleče monocite in makrofage kot tudi postmitotske nevrone (Pluta in Kacprzak, 2009).

Poleg tega omogočajo stabilno dolgoročno, več mesečno izražanje v širokem spektru tarčnih tkiv. Ni še bilo dokazano, da bi prišlo do utišanja transkripcije vektorja po prenosu genov z lentivirusi (Vigna in Naldini, 2000).

Oblikovanje virusnih vektorjev temelji na ločitvi *cis* delujočih zaporedij, ki so potrebne za prenos virusnega genoma v tarčne celice, od *trans* delujočih zaporedij, ki kodirajo virusne proteine (Vigna in Naldini, 2000).

Nekateri geni virusa HIV-1 niso direktno vpleteni v virusno replikacijo, ampak igrajo pomembno vlogo pri virusni okužbi *in vivo*. Te gene imenujemo pomožni in vključujejo gene *vif*, *vpr*, *vpu* in *nef*. Izbris pomožnih genov iz pakirnega konstrukta ne vpliva na učinkovitost produkcije lentivirusnih delcev v pakirnih celicah. Poleg tega sta lahko tat in rev regulatorna gena izbrisana iz pakirnega lentivirusnega konstrukta ali zamenjana s heterolognimi zaporedji (Spirin in sod., 2008).

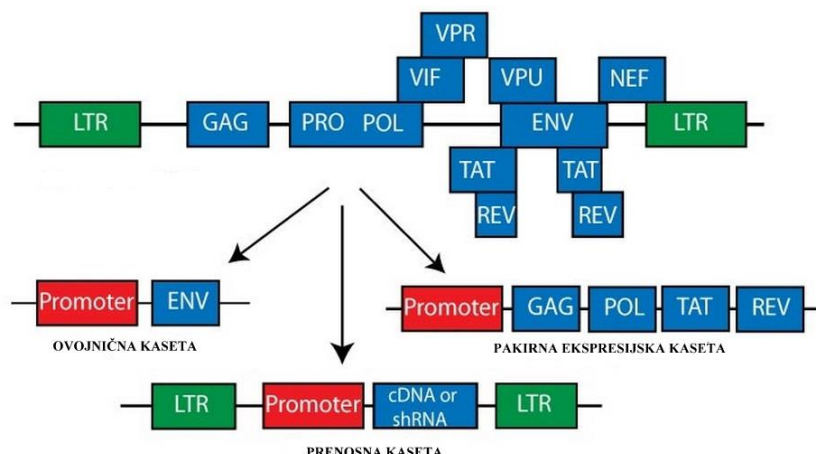
Tipični lentivirusni vektor vključuje vse *cis* elemente pomembne za pakiranje (Ψ regija), reverzno transkripcijo, sintezo druge verige provirusne DNA (PBS, LTR in s purinom bogate regije), integracijo (terminalno att zaporedje) in transkripcijo (5'-LTR ojačevalec/promotor ali interni heterologni promotor uporabljen kot nadomestek). *Trans* elementi (*gag*, *pol* in *env*) so po želji zamenjani z drugimi geni. Ko je potrebno izraziti več kot en transgen v tarčni celici se uporabljajo bi- ali oligocistronski vektorji. Takšnim vektorjem je dodano notranje ribosomsko vstopno mesto (IRES), specifično zaporedje dolgo nekaj sto baznih parov, ki je bilo najprej identificirana v pikonavirusnem genomu. IRES omogoča evkariontskemu ribosomu prevesti policistronsko mRNA. Ribosom se veže na IRES, ki je na notranji regiji mRNA in začne translacijo (Spirin in sod., 2008).

Lentivirusni sistem je po navadi sestavljen iz: pakirne ekspresijske kasete (pomožni vektor), vektorske kasete (prenosni vektor) in kasete, ki izražajo gene za ovojnico (Slika 4). Pakirna ekspresijska kaseta izraža gene za virusne encimske in strukturne proteine (Gag in Pol), ki so potrebni za oblikovanje infektivnih delcev. Izjema je protein Env. Pri prvih pomožnih plazmidih so enostavno zamenjali ovojnico HIV-1 (Env) z ovojnico G proteina virusa vezikularnega stomatitisa (VSV-G) v *trans* na ločenem plazmidu. Originalno je lentivirusni vektorski sistem prve generacije oblikovan leta 1996, vseboval pomožne

proteine Vpu, Vpr, Vif, Nef, Rev in Tat regulatorne proteine, kot funkcionalne komponente pakirnega plazmida. Naslednje izboljšave vključujejo odstranitev LTR kot tudi Ψ in PBS zaporedij. To je preprečilo pakiranje celotne dolžine mRNA, ki kodira *trans* elemente v nastajajoč vektorski delec. V odsotnosti native LTR, je sinteza RNA potekala s promotorji iz drugih virusov, običajno CMV ali RSV, pri čemer so signal poliA pridobili iz SV40 ali inzulinkega gena. Ti pakirni konstrukti so bili posledično izboljšani z odstranitvijo vseh pomožnih proteinov, ki so povezani z virulenco ali citotoksičnostjo in niso potrebni za virusno replikacijo *in vitro*, tako se oblikuje pakirna kasete druge generacije. V tem sistemu sta samo proteina Rev in Tat sintetizirana skupaj s poliproteinoma Gag in Gag-pol. Za izboljšanje biovarnosti sistema, so nato *rev* dali na drugi plazmid, medtem ko so gen *tat* popolnoma odstranili. Funkcija *tat* je bila nadomeščena z uporabo spremenjenega 5' LTR ojačevalca/promotorskih elementov, ki vsebujejo močan, konstitutiven promotor iz RSV ali CMV (Pluta in Kacprzak, 2009; Dropulič 2011, Delenda, 2004).

Vektorska kasete izraža celotno dolžino vektorske mRNA, ki vsebuje vse *cis*-delujoče elemente potrebne za učinkovito pakiranje, reverzno transkripcijo, jedrni vnos, in integracijo v genomsko DNA gostitelja. Večinoma vektorski plazmid vsebuje transgensko ekspresijsko kaseto z genom, ki nas zanima. Vse skupaj je pod uravnavo internega promotorja, ki je običajno med 3' Tat/Rev SA mestom in 3' LTR (Pluta in Kacprzak, 2009; Cocrell in Kafri, 2007).

Zadnji element lentivirusnega sistema je ovojnična kasete, ki zagotavlja nastajajoče delce z ovojničnimi glikoproteini. Pravi gen lentivirusne ovojnice je odstranjen iz sistema, zato se uporablja dodatni plazmid, ki izraža gene za heterologne glikoproteine med samo proizvodnjo vektorja. Tak pristop imenujemo psevdotipiziranje in ima številne pomembne prednosti: poveča varnost vektorja zaradi odstranitve zaporedij, ki so homologne divjemu tipu virusa, razširjena ali selektivna specifičnost psevdotipiziranega vektorskega tropizma glede na tarčne celice, izboljšana stabilnost delca, kar omogoča koncentracijo virusa in dolgoročno shranjevanje virusa (Pluta in Kacprzak, 2009; Cocrell in Kafri, 2007).



Slika 4: Shematski prikaz promotorskih področij in genov lentivirusnega ekspresijskega vektorja (Addgene, 2014).

2.2.4 Biovarnost

V primeru uporabe lentivirusov v klinične namene se je potrebno držati striktnih varnostnih standardov in upoštevati naravo virusa ter bolezen, ki jo sicer povzroča v gostiteljih. Teoretično je možno, da se z večkratnimi rekombinacijskimi dogodki združijo virusna cis-delujoča zaporedja na prenašalnem vektorju s *trans* delujočimi virusnimi geni v pakirnem konstrukt in se oblikujejo lentivirusi kompetentni za rekombinacijo (RCL) (Vigna in Naldini, 2000).

Za zmanjšanje tveganja povezanega z oblikovanjem in uporabo lentivirusnih vektorjev morajo biti odstranjeni vsi esencialni geni, ki kodirajo pomožne proteine in so odgovorni za virulenco (Pluta in Kacprzak, 2009).

Virus se lahko učinkovito podvaja v določenem celičnem gostitelju, vendar ne v drugih celicah. Prav tako so zaradi varnosti lentivirusi narejeni v celicah HEK 293 s kotransfekcijo več plazmidov tako, da gredo lahko virusni delci samo skozi del svojega življenjskega cikla v določenem gostitelju (Hartley, 2012).

Genom HIV-1 je kompleksen, ker vsebuje poleg strukturnih genov tudi dva regulatorna gena *tat* in *rev*, katerih produkti so esencialni za izražanje ter skupino pomožnih genov (*vif*, *vpr*, *vpu* in *nef*), ki niso pomembni za virusno replikacijo, vendar so kritični za patogenezo.

Ta zaporedja, ki so originalno v paketnih konstruktih, so bila kasneje inaktivirana ali izbrisana (Vigna in Naldini, 2000; Delenda, 2004).

Dodaten pomen za biovarnost ima tudi izbris gena *tat*. Poleg tega, pa se protein Rev sintetizira tudi iz ločenega neprekrivajočega ekspresijskega konstrukta (Vigna in Naldini, 2000). Nadalje, je mogoče popolnoma utišati tudi gen *rev* (Spirin in sod., 2008).

Za spremembo *cis* elementov so virusne LTR pogosto zamenjane s heterolognimi promotorji ter poliadenilacijskimi signali. Zaporedje Ψ je zamenjano s heterolognim zaporedjem ($\Delta\Psi$). Gen *env* (*trans* element) je pogosto zamenjan s heterolognim genom, ki kodira površinski protein drugega virusa (Spirin in sod., 2008).

2.3 EKSPRESIJSKI SISTEMI

Univerzalnega ekspresijskega sistema ni. Vsak protein je edinstven in zahteva individualno strategijo za optimalno izražanje. Za določen protein je dobro preizkusiti različne organizme ali celice ter na koncu izbrati najučinkovitejši sistem. Navadno obstaja povezava med kompleksnostjo izbranega proteina in ekspresijskim sistemom. Proteine sestavljene iz ene podenote lahko enostavno pridobivamo v bakterijah, medtem ko kompleksnejše proteine z več podenotami zahtevajo postrnlacijske spremembe in imajo več disulfidnih vezi lahko pridobivamo le s pomočjo višjih evkariontov (Jevnikar, 2007).

Veliko lastnosti produkta je odvisnega od gostitelja. Poleg gostitelja nanje vpliva tudi koncentracija produkta in mesto nalaganja. Koncentracija proteina je obratno sorazmerna z obsegom postrnlacijske obdelave, zato je potrebno najti kompromis med kvaliteto in produktivnostjo. Prav tako gostitelj narekuje uporabo molekularno bioloških tehnik, produkcijski model in strategije pridobivanja produkta. V današnjih časih za sintezo proteinov pogosto uporabljajo živalske celice, glive, kvasovke in bakterije (Palomares in sod., 2004).

Ekspresijski sistem mora za uporabo v proizvodnji zadostiti določenim kriterijem, kot sta stalna kvaliteta produkta in cenovna učinkovitost. Posebna pozornost je namenjena izločanju pravilno zviti proteinov v gojišče. Tak ekspresijski sistem ima določene

prednosti, saj omogoča enostavno in hitro čiščenje produkta ter se izognemo dragemu razbijanju celic, denaturaciji in procesom ponovnega zvijanja proteinov (Schmidt, 2004).

Ločimo dva gostiteljska celična sistema za izražanje heterolognih genov: prokariontski in evkariontski sistem. Oba sistema imata določene prednosti in slabosti. Prokariontski sistemi so na splošno lažji za uporabo in zadostujejo v večini primerov. Kljub temu pa je kar nekaj resnih omejitev pri uporabi prokariontskih celic za proizvodnjo evkariontskih proteinov. Na primer bakterijski ekspresijski sistem nima zmožnosti za postranslacijske modifikacije kot so pravilno zvitje, glikolizacija, fosforilacija. Evkariontski proteinski ekspresijski sistemi so bili oblikovani prav tako z uporabo kvasovk in insektnih celic, vendar pa so glikolizacija in sializacija večinoma različne od tistih, ki jih opazimo pri sesalskih celicah (Gaillet in sod., 2010).

2.3.1 Sesalske celice

Človeški proteini so prioriteta biomedicinskih raziskav, zato so sesalske celice pogost gostitelj za produkcijo aktivnih, pravilno zvityh rekombinantnih proteinov. V sesalskih celicah se uspešno sintetizirajo sekrecijski proteini, le redko tudi citoplazemski. (Hartley, 2012).

Ekspresijski sistem sesalskih celic ima kar nekaj prednosti. Spodbujajo sintezo signalov, signalne procese in lahko izločajo ter glikolizirajo proteine, še posebno evkariontske. Sesalske celice lahko uporabljamo za prehodno ali stabilno izražanje, odvisno od namena ekspresijskega produkta. Za konstitutivno izražanje tujega gena v gostiteljski celici, mora biti le ta vstavljen v kromosom gostiteljske celice (Yin in sod., 2007). Največjo prednost pred vsemi ostalimi (tudi evkariontskimi) sistemi predstavlja zmožnost pristne N- in O-vezane glikolizacije (Jevnikar, 2007).

Poglavitne slabosti sesalskih celic kot ekspresijskih sistemov so počasna rast, rastejo le pri nižjih celičnih gostotah, visoka občutljivost na mehanski stres, zahteve po specializiranih gojiščih in neprestanem dotoku kisika, možnost kontaminacije s patogeni in genska nestabilnost (Jevnikar, 2007).

Za sintezo rekombinantnih učinkovin se v prvi vrsti uporabljajo celice CHO, BHK ter mišje mielomske celice NS0 in mielomske celice Sp2/0 (Jevnikar, 2007).

2.4 FLUORESCENCA IN PROTEIN GFP

Luminiscenca je emisija svetlobe iz katere koli snovi in se pojavi, ko so elektroni v vzbujenem stanju. Luminiscenca se deli na fluorescenco in fosforescenco odvisno od narave vzbujenega stanja (Lakowicz, 2006).

Atomi in molekule lahko obstajajo v številnih samostojnih energijskih stanjih. Za dvig atoma iz osnovnega stanja (S_0) v določeno vzbujeno stanje mora absorbirati določeno količino energije (McCarthy, 2007). Fluorescentna molekula absorbira svetlobno energijo v razponu valovnih dolžin, ki je značilen za kromofor te molekule. Vzbujen elektron nato hitro preide nazaj v osnovno stanje in pri tem odda odvečno energijo v obliki fotona svetlobe. Posledično ima foton, ki odda fluorescenco vedno nižjo energijo (in zato daljšo valovno dolžino) kot osnovni absorbiran foton. To spremembo energijskega stanja imenujemo fluorescenca. Razpon v katerem je fluorescentna molekula lahko vzbujena imenujemo absorpcijski spekter (BD Biosciences, 2000).

Zeleni fluorescirajoči protein (GFP) je kloniran iz meduze *Aequorea victoria*. Absorbira modro svetlobo ter oddaja zeleno fluorescenco (Zeiss, 2014). Fluorescenca GFP je stabilna, neodvisna od vrste in odmerka ter ne potrebuje nobenih substratov ali kofaktorjev. GFP ohrani fluorescenco tudi, ko je združen z drugim proteinom tako na N in C terminalnem koncu. Zaradi tega je pomemben fluorescenten označevalec za zaznavanje znotrajceličnih aktivnosti kot so izražanje genov, interakcije med proteini, transport in lokalizacijo *in vivo* v realnem času. GFP se široko uporablja kot marker za prehodne in stabilne transfekcijske analize (Liu, 1999; Ducrest, 2002).

GFP je naravni protein sestavljen iz 238 amino kislin. Protein fluorescira maksimalno z vzbujanjem pri 400 nm z manjšim ekscitacijskim vrhom pri 475 nm in oddaja fluorescenco pri 509 nm. Ni invaziven in je še posebno stabilen pri različnih pH, temperaturi ter odporen proti proteolitski razgradnji. Fluorescenco je lahko zaznati in kvantificirati prav tako pa za detekcijo ni potrebna fiksacija, drugi kofaktorji ali žrtvovanje gostitelja. Ta fluorescenca je zelo stabilna in običajno ni zaznanega bledenja fluorescence (Chalfie, 1994; Tran, 2014).

Številni komplementarni DNA kloni GFP so bili pridobljeni in izraženi v prokariontskih in evkariontskih celicah pod kontrolo številnih promotorjev vključno s CMV, SV40 in retrovirusnim LTR. Ne dolgo po originalnem poročilu o GFP, so bile izolirale mutante GFP, kar je izboljšalo občutljivost, povečalo izražanje in spremenjen ekscitacijski ali emisijski spekter derivatov (Tran, 2014).

Fluorescentne tehnike kot so fluorescenčna mikroskopija in pretočna citometrija izkoriščajo karakteristike fluorescence z osvetljevanjem celic pri eni valovni dolžini in zaznavanje oddane svetlobe pri daljših valovnih dolžinah (McCarthy, 2007).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijska oprema

Preglednica 1: Seznam laboratorijske opreme.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Applied Biosystems	naprava za verižno reakcijo s polimerazo (Verti™ 96-well thermal cycler)
BD plastipak™	injekcije 50 ml, 10 ml
Binder	inkubator za gojenje celičnih kultur 37 °C
Biometra	naprava za verižno reakcijo s polimerazo Tpersonal
Bio-Rad	električni napajalnik Powerpac basic in Powerpac HC, banjica za elektroforezo, naprava za slikanje gelov, slikanje western membran (Molecular imager gel doc TM xrt), banjice za prenos western, pokrov z elektrodami, ogrodje za NaDS-PAGE, naprava za čiščenje proteinov (Biologic LP), zbiralec frakcij (Biologic fraction collector), skener (GS-800 calibrated densitometer), stekla za NaDS-PAGE 0,75mm, stojala, glavniček, ogrodje,
CBS Scientific company, inc.	kasete za prenos western (Autoradiogram cassette 5" x 7" SQX-1116)
Cobos	tehnica JT-1200C
Corning	25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ² gojitvene posodice, gojitvene posodice s 6 luknjami
Electrolux	zamrzovalnik, hladilnik
Eppendorf	centrifuga 5410, centrifuga 5424, centrifuga 5810R, termoblock termostat plus, avtomatske pipete 1000 µL, 200µl, 100µl, 20µl, 10µl, 2,5µl, nastavki za pipete, stojalo za pipete, mikrocentrifugirke

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 1: Seznam laboratorijske opreme.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Frilab	filtri mali (Cellulose acetate, syringe filter 0,45 0,2)
Frontier mono	laminarij
Fuji film	naprava za razvijanje filmov (FPM-100A)
GE Healthcare Life Sciencies	kolona za čiščenje proteinov (HisTrap exel 1 mL)
Gene flash	naprava za slikanje gelov (2 syngene bio imaging)
Gilson	avtomatska pipeta 1000 µl, 200 µl, 20 µl, črpalka (minipuls 2)
Grant-bio	stresalnik
Haraevs instruments	inkubator za bakterije 37 °C, centrifuga (Megafuge 1 or)
Infors ht	stresalnik
Intergra	pipeta
Invitrogen Life Technologies	naprava za prenos western (iblot gel transfer device invitrogen life technologies), naprava za štetje celic (countness TM, automated cell counter), števna komora (Countness TM cell counting chamber slides), anoda, katoda, filter papir, gobica (iBlot transfer stacks Nitrocellulose, Mini)
Kodak	filmi za prenos western (Biomax MR film 13 x 18 cm)
Matrix	hladna soba
Merck	spiner Eurolab Galaxy min
Milipore	centrifugirke s filtrom (centrifuge filter units), naprava za filtriranje raztopin
Nixon	mikroskop

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 1: Seznam laboratorijske opreme.

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Olimpus	mikroskop CKX41, enota za oskrbovanje z energijo U-RFLT50
Sarsted	centrifugirke 50 ml, 15 ml, steklene pipete
Simport	krioviale
Sorval	centrifuga RC5B plus
Thermo scientific	pretočna komora MSC-advantage, zamzovalnik -80 °C (forma 900 series), NanoDrop ND-1000
Velp scientifica	vorteks 2X ³ , magnetno mešalo
Worten	mikrovalovna pečica

3.1.2 Kemikalije

Preglednica 2: Seznam kemikalij.

Proizvajalec	Kemikalija
BioLabs	DMSO 100 %
Bio-Rad	tween 20 (10 %), Akrilamid/bis 30:8 (% w/v), 1,5 M tris-HCl (pH=8,8), 10 % SDS, 1,5 M tris-HCl (pH=6,8), pufer za nanos vzorcev (laemmli sample buffer), velikostni standard (Precision plus protein TM standards)
GE health care life sciences	raztopine za razvijanje filma (Amersham TM ECL TM prime western blotting detection reagent)
Gibco Life Technologies	trypsin 0,05 %, triple express, natrijev piruvat 100 mM (100 x), optiMEM, DMEM, FBS, glutamin, Pen Strep
Invitrogen Life Technologies	lipofectamine, tripan modro 0,4 %, dNTP (10 mM), dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100 mM), Syber safe, Na ₂ EDTA.H ₂ O, PureLink TM Quick Plasmid Miniprep Kit
Lonza	agaroz
Nestle	mleko v prahu

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 2: Seznam kemikalij.

Proizvajalec	Kemikalija
New England BioLab	pufer za restrikcijo 2 (NEBuffer), pufer za restrikcijo 3 (NEBuffer), BSA
Merc	NaCl, kvasni ekstrakt, agar
Qiagen	QIAquick gel/PCR purification kit, 5 X nanašalno barvilo (gen pilot Loading dye)
MB	Tris-base
Biomediacals	
Panreac	ledoocetna kislina
Promega	pufer (5 x Green GoTaq flexi 100 %), MgCl ₂ 25 mM, glicin, Taq polimeraza
Roch	pufer za ligacijo 10 X, T4 DNA ligaza
Sigma- Aldrich	natrijev butirat, ampicilin, etidijev bromid, Tris baza, TEMED, 10 % APS, β-merkaptoetanol, SDS 0,1 %, NaCl, Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , imidazol, metanol, etanol, KCl, bakto tripton, NaOH, ocetna kislina
Thermo Scientific	marker (GenRuler™ DNA ladder mix), tablete SDS (Oxoid), coomassie briljantno modra

3.1.3 Raztopine in pufri

Preglednica 3: Seznam raztopin in pufrov.

Raztopina/pufer	Sestava
elektroforezni pufer za SDS-PAGE (1X)	Za 1l: 30,3 g Tris baze, 141,1 ml glicina, 1 g SDS 0,1 %, 900 ml ddH ₂ O
TAE elektroforezni pufer (50 X)	Za 1 l: 242 g Tris baze, 57,1 ml ledoocetne kisline, 37,2 g Na ₂ EDTA*2H ₂ O
TBS-T, 5 x, pH=7,6	Za 5 l: 60,55 g Tris-HCl, 200, 2 g NaCl, 25 ml Tween 20 (10 %)
PBS	140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ ali 5 tablet, 500 ml ddH ₂ O
FACS	0,2 % BSA, 0,1 % azid, 0,1 %, PBS
HBS pH= 7,05	280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,42 mM Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O
coomassie briljantno modro	0,13 % Coomassie briljantno modra, 45,5 % metanol, 9,2 % ocetna kislina

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 3: Seznam raztopin in pufrov.

Raztopina/pufer	Sestava
raztopina za razbarvanje I	30 % metanol, 7 % očetna kislina
raztopina za razbarvanje II	5 % metanol, 2 % očetna kislina, 7,5 % glicerol

3.1.4 Gojišča

3.1.4.1 Bakterijska gojišča

Preglednica 4: Sestava tekočega in trdnega LB gojišča.

Kemikalija	Tekoče LB gojišče	Trdno LB gojišče
Baktotripton	10 g/l	10 g/l
Bacto yeast extract	5 g/l	5 g/l
NaCl	10 g/l	10 g/l
NaOH 5M	200 µl/l	200 µl/l
dH ₂ O	do 1 l	do 1 l
Agar	/	15 g/l

Primerno ohlajenemu trdnemu in tekočemu gojišču smo dodali ampicilin v koncentraciji 100 mg/l. Trdno gojišče smo razlili v petrijevke, pustili, da se je strdil ter nato do uporabe hranili na 4 °C.

3.1.4.2 Gojišče za celične kulture

Za gojenje celičnih kultur smo uporabili gojišče DMEM (ang. Dulbecco's modified Eagle's medium), gojišče z 10 % (v/v) FBS (ang. fetal bovine serum), 1 % (v/v) piruvata, 1 % (v/v) penstrepa in 1 % (v/v) glutamina. 500 ml svežega gojišča DMEM smo sterilno dodali 50 ml FBS, 5 ml natrijevega piruvata, 5 ml Pen/Strepa in 5 ml glutamina.

3.1.5 Restriksijski encimi

Preglednica 5: Restriksijski encimi uporabljeni v študiji.

Restriksijski encim	Izvorni organizem	Prepoznavno mesto	Proizvajalec
<i>Bgl</i> II	<i>Bacillus globigii</i>	5' A↓GATCT 3'	New England BioLabs
<i>Sal</i> I	<i>Streptomyces albus G</i>	5' G↓TCGAC 3'	New England BioLabs
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens H</i>	5' G↓GATCC 3'	New England BioLabs
<i>Xho</i> I	<i>Xanthomonas holcicola</i>	5' C↓TCGAG 3'	New England BioLabs

3.1.6 Protitelesa

Preglednica 6: Protitelesa uporabljena pri prenosu western.

Vrsta protitelesa	Ime	Proizvajalec
Primarna protitelesa	mišja monoklonska protitelesa proti hemaglutininu (mouse anti-HA)	Covance
Sekundarna protitelesa	kozja poliklonska protitelesa proti mišjim IgG konjugirana s hrenovo peroksidazo (goat anti-mouse IgG HRP)	Santa cruz biotechnology

3.1.7 Organizmi

3.1.7.1 Bakterijski sevi

Preglednica 7: Bakterijski sevi uporabljeni v študiji.

Sev	Genotip	Uporaba	Vir
One Shot® TOP10 F ⁻ <i>mcrA</i>	$\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$	Kemijsko kompetentne	Invitrogen
Chemically	$\phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1$	celice uporabne za	
Competent <i>E. coli</i>	<i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7967 galU galK$	transformacijo	
	<i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>		

3.1.7.2 Celične kulture

Preglednica 8: Celične kulture uporabljene v študiji.

Celična kultura	Opis	Uporaba	Vir
HEK 293T	Pridobljena iz celične linije HEK293 z dodatkom SV40 velikega antigena T, ki pri nekaterih virusnih vektorjih poveča produkcijo vektorja	Prehodna transfekcija za proizvodnjo lentivirusov	ATCC
CHO-K1	Subklon starševskih celic CHO, ki so bile pridobljene iz ovarijev odraslega kitajskega hrčka. Celice za rast potrebujejo prolin zaradi odsotnosti gena za njegovo sintezo.	Lentivirusna infekcija celic	ATCC

3.1.8 Plazmidi

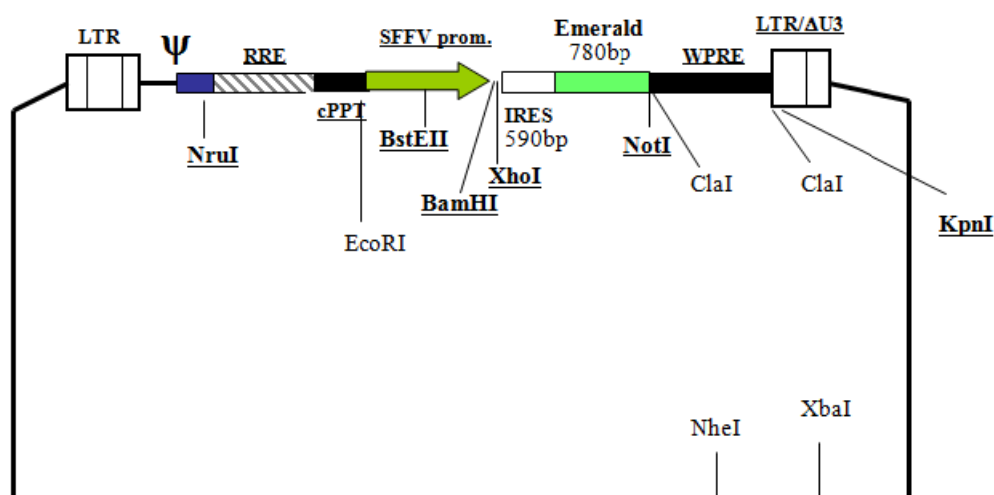
Preglednica 9: Plazmidi uporabljeni v študiji.

Plazmid	Vir
pHR-SIN-BX-IRES-Em	Simone Davis laboratory, Oxford
p8.91	Simone Davis laboratory, Oxford
pMD-G	Simone Davis laboratory, Oxford
pHR-SIN-BX-IRES-Em + CD6	/
pHR-SIN-BX-IRES-Em + Spα	/

3.1.8.1 pHR-SIN-BX-IRES-Em

Plazmidni vektor pHR-SIN-BX-IRES-Em (Slika 5) je velik 9 kbp, vsebuje gen za odpornost proti ampicilinu in za spremenjeni protein eGFP poimenovan kot Emerald (ima tri točkovne mutacije v genu eGFP in ima v primerjavi z izhodnim proteinom petkrat večjo fluorescenco). Prav tako vsebuje IRES, ki omogoča izražanje izbranega gena skupaj z eGFP. Sintetizirana proteina sta proizvedena iz enega transkripta mRNA, kar omogoča prisotnost zelenega proteina v celicah v katerih se sintetizira tudi Emerald. Za izražanje Emeralda iz IRES-Emerald moramo počakati vsaj pet dni, da postanejo vse okužene celice zelene. Poleg tega je v vektorju prisotno tudi ψ zaporedje retrovirusne genomske RNA na katero se veže nukleokapsida, da pride do njenega pakiranja. Vektor ima prav tako WPRE

(ang. woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element), ki poveča stabilnost RNA in izražanje transgena ter RRE na katerega se veže protein Rev HIV-1 za olajšanje transporta genoma virusa v jedro. 3'-LTR ima odstranjeno U3 regijo in zato U3 regija 5'-LTR in U5 regija 3' LTR ne bosta prepisani v RNA v pakirnih celicah. Zaradi tega provirus ne bo vseboval nobenega LTR promotorskega zaporedja in je potreben notranji heterologni promotor SFFV (ang. spleen focus-forming virus), kar prispeva k varnosti vektorja. Zaporedje cPPT omogoča translokacijo preintegracijskega kompleksa v jedro. Med *BamHI* in *XhoI* pa je PD-1 (programmed cell death protein 1), kamor vstavimo zaporedje želenega proteina in s tem odstranimo PD-1.



Slika 5: Shematski prikaz mape plazmida pHR-SIN-BX-IRES-Em.

3.1.8.2 Plazmidni vektor p8.91

Plazmidni vektor p8.91 nosi zapis za gene *gag*, *pol*, *rev* in *tat* ter za gen z zapisom za odpornost proti antibiotiku ampicilinu. Geni se izražajo pod promotorjem CMV. Gen *gag* kodira proteine matriksa, kapside in nukleokapside, *pol* reverzno transkriptazo in integrazo, protein Rev HIV-1, ki se veže na RRE in *tat*, ki je trans aktivator.

3.1.8.3 Plazmidni vektor pMD-G

Plazmidni vektor pMD-G kodira protein ovojnice VSV-G (vesicular stomatitis virus-glicoprotein) in vsebuje gen za odpornost proti ampicilinu. Za razliko od HIV ovojnice,

ima ovojnica VSV-G širši nabor celičnih gostiteljev, kar poveča število celic, ki jih lahko okužimo z lentivirusi. Prav tako vsebuje promotor CMV.

3.2 METODE

Uporabili smo osnovne metode molekulskega kloniranja, delo s celičnimi kulturami in rekombinantnim proteinom, pretočno citometrijo ter mikroskopijo. Najprej smo pripravili plazmidna konstrukta pHR-SIN-BX-IRES-Em + CD6 ali pHR-SIN-BX-IRES-Em + Sp α . Plazmidna konstrukta smo transformirali v celice *E. coli* TOP10. Z določitvijo nukleotidnega zaporedja in pomnožitvijo specifičnega odseka DNA smo v transformantah potrdili pravilnost vključka. Ustrezen plazmidni konstrukt (pHR-SIN-BX-IRES-Em + CD6/ pHR-SIN-BX-IRES-Em + Sp α) smo transfecirali v celice HEK 293T, skupaj še z dvema plazmidoma (pMD-G, p8.91), s tem omogočili proizvodnjo lentivirusov in nato okužili celice CHO-K1 za proizvodnjo zelenega proteina. Fluorescenco celic smo preverjali s pretočno citometrijo in mikroskopiranjem ter naredili prenos western za izbrani protein direktno iz gojišča in za očiščen protein. Poliakrilamidne gele uporabljene pri NaDS-PAGE elektroforezi smo barvali s Coomassie modrim.

3.2.1 Osnovne metode molekulskega kloniranja

3.2.1.1 Restrikcija DNA

Plazmidne vektorje in vključke smo razrezali z restrikcijskimi encimi, ki prepoznavajo specifična nukleotidna zaporedja (Preglednica 5). Restriksijska zmes je vsebovala 1 μ g plazmidnega vektorja ali DNA z izbranim vključkom, 1 μ l vsakega od restrikcijskih encimov, 5 μ l reakcijskega pufra, 0,5 μ l BSA (100 x) in ddH₂O do končnega volumna 50 μ l. Zmes smo pri 37 °C inkubirali 1 h (za vključke) ali 2 h (za plazmidni vektor pHR-SIN-BX-IRES-Em). Po restrikciji smo plazmidne vektorje nanesti na agarozni gel, jih očistili s QIAquick gel purification kit po navodilih proizvajalca in jih shranili na -20°C. Vključke smo očistili z QIAquick PCR purification kit po navodilih proizvajalca ter jih shranili na -20 °C.

3.2.1.2 Ligacija

Z ligacijo smo vnesli DNA vključek v razrezani plazmidni vektor pHR-SIN-BX-IRES-Em. Za ta namen smo uporabili T4 DNA ligazo. Slednja katalizira tvorbo fosfodiesterne vezi med sosednjimi 3'-hidroksilnimi in 5'-fosfatnimi konci v dvoverižni DNA. Molarno razmerje med DNA vključkom in plazmidnim vektorjem je bilo 3:1. DNA fragmente z lepljivimi konci smo inkubirali s T4 DNA ligazo v ustreznem pufru. Ligacijsko mešanico smo nato inkubirali preko noči na 4 °C. Prav tako smo naredili tudi kontrolne ligacijske mešanice. Ena kontrolna reakcijska zmes ni vsebovala vključka, druga reakcijska kontrolna zmes pa je bila brez vključka in ligaze.

3.2.1.3 Transformacija kompetentnih celic

Kompetentne celice TOP10 smo odtalili na ledu in 50 µl celic dodali 2 µl ligacijske mešanice ter inkubirali 30 min na ledu. Nato smo kompetentne bakterije inkubirali eno minuto na 42 °C in dve minuti ponovno na ledu, dodali 500 µl tekočega LB gojišča in celice inkubirali eno uro s stresanjem na 37 °C. Po eno urni inkubaciji smo 100 µl bakterijske mešanice razmazali na selekcijsko trdno LB gojišče z dodanim antibiotikom ampicilinom. Preostalo bakterijsko mešanico smo centrifugirali (5 min, 10621xg), odlili supernatant, pelet resuspendirali in ponovno razmazali na plošče LB z ampicilinom. Plošče smo inkubirali na 37 °C preko noči.

3.2.1.4 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) na osnovi kolonije

Za PCR smo izbrali pri vsakem konstruktu približno deset kolonij, se jih dotaknili s sterilnim zobotrebcem ter prenesli najprej na trdno LB gojišče z dodanim ampicilinom in nato v PCR mešanico. Plošče smo gojili preko noči na 37 °C in jih po tem shranili v hladilniku na 4 °C. Za PCR reakcijo smo uporabili Taq polimerazo. Sestava mešanice za verižno reakcijo s polimerazo, časovni in temperaturni pogoji so opisani v spodnjih preglednicah (Preglednica 10, 11).

Preglednica 10: Sestava mešanice za PCR.

Vsebina	Začetna koncentracija	Končna koncentracija	Volumen (μl)
Začetni oligonukleotid 1	10 μM	1 Mm	1
Začetni oligonukleotid 2	10 μM	1 μM	1
dNTP	10 mM	0,4 mM	0,4
Green GoTaq Flexi reakcijski pufer	5X	1X	2
DMSO	100 g/ml	4 g/ml	0,4
Taq polimeraza	5 U/μL	0,03 U/μL	0,06
MgCl ₂	25 mM	5 mM	2
ddH ₂ O	/	/	3,14
SKUPAJ	/	/	10

Preglednica 11: Časovni in temperaturni pogoji PCR.

Stopnja	Število ciklov	Temperatura (°C)	Čas (min)
Začetna denaturacija	1	95	1
Denaturacija	30	95	0,5
Prileganje začetnih oligonukleotidov		55	0,5
Podaljševanje		72	1
Končno podaljševanje	1	72	5
Konec		4	∞

Preglednica 12: Začetni oligonukleotidi.

Ime začetnega oligonukleotida	Zaporedje
SFFV FWD	5' ATTGATTGACTGCCCACCTC 3'
Spα 300_R	5' AGCCAATGTATCTTCTGTTC 3'
CD6d2R	5' CTCTTTGTGGCCGCAGTAGT3'

3.2.1.5 Agarozna gelska elektroforeza

Z agarozno gelsko elektroforezo smo preverili uspešnost ligacije in izolacije plazmidnih konstruktov. V 100 ml 1 x TAE pufer smo vmešali določeno količino agaroze odvisno od želene gostote gela in segreli v mikrovalovni pečici. Gostoto smo prilagodili glede na pričakovano dolžino DNA fragmentov. Pripravili smo 0,8 %, 1 % in 1,5 % gel, počakali, da se je ohladil na primerno temperaturo ter nato dodali 5 µl etidijevega bromida ali barvila SYBER safe. Gel smo nato vlili v elektroforezno banjico, dodali glavniček, počakali, da se je strdil ter dodali vzorce in 1 kb marker. Nekaterim vzorcem je bilo potrebno pred nanosom dodati še 5 x nanašalni pufer. Elektroforeza je potekala približno 30 minut pri napetosti 130 V v 1 x TEA pufru. Po končani elektroforezi smo gel izpostavili svetlobi UV in gel dokumentirali.

3.2.1.6 Čiščenje DNA iz agaroznega gela

S PCR pomnožene fragmente DNA smo po restrikciji očistili iz agaroznega gela. DNA fragment smo pod UV lučjo izrezali s skalpelom, vnesli v prazno mikrocentrifugirko ter ga očistili s kompletom QIAquick gel purification kit po navodilih proizvajalca. Nato smo DNA shranili na – 20 °C.

3.2.1.7 Izolacija plazmidne DNA

Pomembno za učinkovito transfekcijo je kakovost priprave plazmidne DNA. Plazmidna DNA, ki se uporabi za proizvodnjo vektorjev mora biti brez bakterijskih nečistoč (brez endotoksinov). Prav tako je zaželeno, da je v superzviti obliki (scDNA). Po navadi dobimo DNA dobre kvalitete z visokim donosom s komercialno dostopnimi kiti. (Pluta in Kacprzak, 2009).

Za izolacijo plazmidne DNA smo kolonije precepili v 5 ml tekočega LB gojišča z dodanimi 5 μ l ampicilina in inkubirali s stresanjem na 37 °C. Po prekonočni inkubaciji smo sledili navodilom proizvajalca komercialno dostopnega kita za izolacijo

3.2.1.8 Določanje koncentracije DNA

Koncentracijo izolirane DNA smo nato določili z napravo NanoDrop. Kakovost izolirane DNA smo določili na podlagi razmerja absorbanc A_{260}/A_{280} in A_{260}/A_{230} . Absorbanca pri valovni dolžini 260 nm je merilo za koncentracijo DNA/RNA, 280 nm za koncentracijo proteinov. Pri 230 nm absorbirajo fenoladni ion, tiocianat in druge organske spojine. Glede na to nam razmerji podata podatek o čistosti DNA. Vzorec je čist, ko je razmerje A_{260}/A_{280} približno 1,8 za DNA oz. 2 za RNA. V primeru, da je razmerje signifikantno nižje, lahko nakazuje na to, da je vzorec kontaminiran s fenolom, proteini in drugimi spojinami, ki absorbirajo pri 280 nm. Za A_{260}/A_{230} so pričakovane vrednosti ponavadi med 2,0-2,2.

3.2.1.9 Določanje nukleotidnega zaporedja

Plazmid z DNA vključkom smo poslali na analizo nukleotidnega zaporedja v podjetje MacroGen na Nizozemsko. Potrebovali smo 15 μ l vzorca s 100 ng DNA. Začetnih oligonukleotidov pa smo potrebovali 10 μ l v koncentraciji 100 mM.

3.2.2 Delo s celično kulturo

3.2.2.1 Gojenje celične kulture

Celice HEK 293T in CHO-K1 smo gojili v posodicaх za gojenje celic, ki omogočajo pritrjanje celic na podlago v enosloju. Celice smo gojili v gojišču DMEM z dodanim 10 % FBS, 1 % piruvata, 1 % penstrepa in 1 % glutamina. Ko so celice konfluentno prerasle površino smo jih tripsinizirali. Odstranili smo gojišče in sprali s 5 ml (25 cm² gojitvene posodice) ali 10 ml (75 cm² gojitvene posodice) PBS. Nato smo dodali tripsin in inkubirali na 37 °C za 3-4 min. Nato smo dodali gojišče, ki ustavi reakcijo tripsinizacije, prenesli v centrifugirko in centrifugirali 5 min pri 340 rcf. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant, resuspendirali celice v gojišču, izmerili njihovo koncentracijo ter v gojiščne posodice nacepili želeno količino celic.

Celične linije HEK 293T imajo nekatere edinstvene značilnosti, ki so ključne za produkcijo lentivirusnih vektorjev. Transfekcija pri teh celicah poteče z visokim izkoristkom (70-90 % pozitivnih celic) in dodatno izražajo gen za SV40 T-velik antigen, ki omogoča replikacijo plazmidov z SV40 *ori* mestom za replikacijo. Kritična točka proizvodnje virusnih vektorjev so pogoji v katerih gojimo celično kulturo. Celic HEK 293T ne smemo precepiti več kot 18-20 krat pred transfekcijo. V klasični metodi mora biti celična kultura na dan transfekcije v enem sloju z 10 % FBS subkonfluentna (50-80 % konfluentnost). Enakomerna porazdelitev celic je pri tem ključna (Pluta in Kacprzak, 2009).

3.2.2.2 Transfekcija celične kulture HEK 293T

Tradicionalne metode za produkcijo lentivirusnih vektorjev temeljijo na učinkoviti kotransfekciji proizvodnih celic (HEK 293T) s tremi (druga generacija pakirnega sistema) ali štirimi (tretja generacija pakirnega sistema) plazmidi: pomočnik(i), ovojnica in vektor. Končna količina DNA uporabljena za transfekcijo (mešani plazmidi) je odvisna od obsega celične kulture in je ponavadi med 1 in 10 μg na 10^6 celic. Dodatno mora biti vzpostavljeno še pravilno razmerje med vektorjem, pomočniki in plazmidi ovojnice. Ponavadi je za tri plazmidni sistem razmerje 3: 2: 1 (Pluta in Kacprzak, 2009).

V našem primeru smo uporabili drugo generacijo pakirnega sistema in pred transfekcijo celice HEK 293T nacepili v posodice za gojenje celic s šestimi luknjami. V vsako luknjico smo nacepili 5×10^5 celic v 3 ml gojišča ter jih nato inkubirali na 37 °C 24 h. Ko so celice dosegle 50-70 % konfluentnost smo jih transformirali. Za eno luknjico smo uporabili 0,5 μg p8.91, 0,5 μg pMD-G, 0,5 μg pHR-SIN-BX-IRES-Em z vstavljenim želenim genom (pHR-SIN-BX-IRES-Em + Sp α , pHR-SIN-BX-IRES-Em + CD6), 4,5 μl lipofektamina ter 100 μl Opti-MEM. V eni mikrocentrifugirki smo zmešali vse tri plazmide v 50 μl Opti-MEM, v drugi pa 100 μL Opti-MEM in 4,5 μl lipofektamina. Nato smo DNA mešanico dodali v mešanico lipofektamina in inkubirali pri sobni temperaturi 30 min. Po inkubaciji smo 154,5 μl mešanice dodali celicam HEK 293T in jih inkubirali na 37 °C.

Lipofektamin je kationski lipid s pozitivno nabitimi lipidnimi glavami, ki vodijo interakcijo med lipidi in fosfatnim skeletom nukleinske kisline, kar omogoči kondenzacijo

DNA. Pozitivno nabita površina liposomov prav tako posreduje interakcijo med nukleinsko kislino in celično membrano ter omogoča fuzijo kompleksa liposom-nukleinska kislina s celično membrano. Transfekcijski kompleks vstopi v celico z endocitozo.

3.2.2.3 Lentivirusna infekcija celične kulture CHO-K1

72 h po transfekciji celic HEK 293T smo prenesli supernatant, ki vsebuje virus v 15 ml centrifugirko in centrifugirali (5 min pri 290 rcf), da smo odstranili celice HEK 293T iz supernatanta. Dan pred tem smo v posodice za gojenje celic s šestimi luknjami nacepili celice CHO-K1 v koncentraciji 5×10^5 na luknjico. Naslednji dan smo odstranili gojišče, dodali 2 ml novega gojišča in 2 ml supernatanta z virusom. Celice sme gojili na 37 °C. Po 72 h inkubaciji smo celice precepili v 75 cm² posodico za gojenje celic. Ko so celice konfluentno prerasle posodico smo jih precepili v 175 cm². Nato so prerasle 90 % površine in smo dodali 1 mM natrijevega butirata za ustavitev rasti celic. Ves čas gojenja smo poleg rasti celic z mikroskopom preverjali tudi zeleno fluorescenco celic.

Sekundarna infekcija celične kulture CHO-K1 je potekala po enakem postopku, le da smo v posodice za gojenje celic s šestimi luknjami nacepili celice CHO-K1, ki so bile enkrat že okužene z lentivirusi.

3.2.3 Pretočna citometrija

Za meritev intenzitete zelene fluorescence in določitev števila celic, ki sintetizirajo protein Emerald smo uporabili pretočno citometrijo. Celice smo centrifugirali (5 min, 290 rcf) ter jih nato sprali s pufrom FACS. Celice smo ponovno cetrifugirali pri enakih pogojih kot prej in jih resuspendirali v pufru FACS. Nato smo jih filtrirali, in sicer z 1 ml injekcijo, z 20 G injekcijsko iglo. Za analizo smo uporabili 10.000 celic in določili območje, ki nas je zanimalo.

3.2.4 Delo z rekombinantnimi proteini

Želeni proteini, ki so jih proizvajale celice CHO-K1 so se izločali v gojišče. Gojišče smo približno 7 dni po dodatku natrijevega butirata prenesli v centrifugirke ter centrifugirali

(41837 rcf, 10 min, pri 4 °C), da smo celice odstranili iz gojišča, nato pa ga uporabili za nadaljnje delo.

3.2.4.1 NaDS-PAGE elektroforeza

Metoda NaDS-PAGE omogoča ločitev mešanice proteinov glede na njihovo molekulsko maso in temelji na premikanju nabitih molekul v matriksu gela znotraj električnega polja. S to tehniko je mogoče ločiti kompleksno mešanico proteinov z molekulsko maso od 10-200 kDa. Izvedemo ga lahko pod reducirajočimi ali nereducirajočimi pogoji. Pod reducirajočimi pogoji pride do linearizacije proteinov z razcepom zunanjih in notranjih disulfidnih vezi (Osborne in Brooks, 2006).

3.2.4.1.1 Vlivanje NaDS-PAGE gelov

V ogrodje za vlivanje gelov smo vpeli stekelca z 0,75 mm razmikom in vanj vlili 7,5 % (Preglednica 13) ali 10 % ločitvenega gela (Preglednica 14). Nato smo stekelce do vrha napolnili z ddH₂O in počakali, da je gel polimeriziral. Vodo smo odlili, dodali 3 % vstopni gel (Preglednica 15) in vanj potopili glavniček ter počakali, da je le ta polimeriziral. Vzorci se v vstopnem gelu zberejo v isto ravnino, nato pa v ločevalnem gelu potujejo glede na svojo velikost. Gel smo takoj uporabili ali pa ga shranili namočenega na 4 °C. Sestavine gela smo dodajali v določenem zaporedju.

Preglednica 13: 7,5 % ločitveni NaDS-PAGE gel (za 2 x 0,75 mm gela).

Sestavine gela	Volumen
ddH ₂ O	4,85 ml
Akrilamid/bis 30:8 (% w/v)	2,5 ml
1,5 M tris-HCl, pH=8,8	2,5 ml
10 % NaDS	0,1 ml
TEMED	10 µl
APS	50µl

Preglednica 14: 10 % ločitveni NaDS-PAGE gel (za 2 x 0,75 mm gela).

Sestavine gela	Volumen
ddH ₂ O	4,0 ml
Akrilamid/bis 30:8 (% w/v)	3,33 ml
1,5 M tris-HCl, pH=8,8	2,5 ml
10 % NaDS	0,1 ml
TEMED	10 µl
APS	50 µl

Preglednica 15: 3 % vstopni NaDS-PAGE gel (za 2 gela).

Sestavine gela	Volumen
ddH ₂ O	3,7 ml
Akrilamid/bis 30:8 (% w/v)	650 µl
1,5 M tris-HCl, pH=6,8	625 µl
10 % NaDS	50 µl
TEMED	10 µl
APS	25 µl

3.2.4.1.2 Priprava vzorcev za NaDS-PAGE

Predvsem pri ločevanju proteinov po velikosti je potrebno cepiti disulfidne mostičke v proteinih z uporabo reducenta npr. β-merkaptetanola ali ditiotreitola (DTT). Z dodatkom glicerola nanašalnemu pufru se poveča gostota nanašalnega vzorca ter omogoči, da vzorec ostane na dnu luknjice in preprečuje neenakomerno nanašanje na gel. Običajno je, da vključimo v nanašalni pufer majhno anionsko barvilo (na primer bromfenol modro) in s tem omogočimo vizualizacijo fronte. Ker je barvilo anionsko in majhno se bo premikalo najhitreje glede na ostale komponente v mešanici in je kazalo o napredovanju ločevanja (Abcam, 2007).

25 ul vzorca smo dodali 25 ul 10 % reducirajočega nanašalnega pufra, ki je vseboval reducent β -merkaptonol. β -merkaptonol poleg NaDS (natrijevega dodecil sulfata) še dodatno denaturira proteine z redukcijo disulfidnih vezi. Vzorec smo inkubirali 5 min na 95 °C. Protein je potrebno razviti oziroma denaturirati, da omogočimo dostop protitelesom. Protitelesa običajno prepoznajo majhen del proteina, ki nas zanima (epitop) in ta domena se lahko nahaja znotraj zgradbe proteina. Pred nanosom vzorcev na gel smo luknjice za nanos vzorcev sprali z elektroforeznim pufrom in z injekcijsko iglo odstranili mehurčke. Nato smo stekelca vpeli v ogrodje za NaDS-PAGE in nanесли 30 μ l vzorca. Luknjice smo nato zapolnili do vrha z elektroforeznim pufrom.

3.2.4.1.1 Elektroforeza

Gel smo po nanosu priklopili na električno napetost 140 V za največ 1,5 h. NaDS-PAGE je potekal v 1 x elektroforeznem pufu. Poleg vzorcev smo na gel nanесли tudi 4 μ l velikostnega proteinskega standarda (Precision plus proteinTM standards). Električno napetost smo izklopili, ko je barvilo pripotovalo do konca gela.

NaDS se veže na proteine specifično v masnem razmerju 1,4:1 in pokrije protein z negativnim nabojem sorazmerno z njegovo dolžino. Pri denaturajoči NaDS-PAGE ločitvi premik ni določen z električno nabitostjo polipeptida, ampak z molekulsko maso (Abcam, 2007).

3.2.4.2 Barvanje proteinov z barvilom Coomassie modrim

Barvilo Coomassie se veže na proteine z ionskimi interakcijami med sulfatnimi kislimi skupinami barvila in pozitivno nabitimi aminskimi skupinami proteinov, kot tudi preko Van der Waalsovih vezi.

Gel smo obarvali s Coomassie modrim tako, da smo ga prelili z barvilom in inkubirali 1h z mešanjem. Nato smo barvilo odlili in dodali raztopino za razbarvanje gela ter ga ponovno inkubirali z mešanjem. Ko je bila raztopina že močno modra smo jo odlili in zamenjali s svežo. To smo ponovili tolikokrat dokler se gel ni dovolj razbarval.

3.2.4.3 Prenos western

Prenos western je široko uporabljena tehnika za zaznavanje in analizo proteinov ter temelji na zmožnosti vezave specifičnih protiteles. Razvila se je iz prenosa DNA (Southern) in RNA (Northern) ter omogoča prenos proteinov iz natrijevega dodecil sulfatnega poliakrilamidnega gela na adsorpcijsko membrano. Preneseni proteini tvorijo čisto enako kopijo gela in je začetni korak za številne eksperimente (Kurien in Scofield, 2006).

Po elektroforetski ločitvi sledi prenos proteinov iz nativnega ali NaDS-PAGE gela na nitrocelulozno membrano ali PVDF (ang. polyvinylidene fluoride) membrano. Gel je ob membrani in zaradi električnega toka pride do prenosa proteinov na membrano, kjer se pritrdijo. Membrana je nato replika vzorcev proteinov na gelu in je obarvana s protitelesi. Učinkovit prenos proteinov iz gela na trdni membranski nosilec je v veliki meri odvisen od narave gela, molekulske mase prenesenega proteina in uporabljene membrane (Abcam, 2007).

Prenesen protein lahko zaznamo s specifičnimi primarnimi in sekundarnimi protitelesi označenimi z encimi. Protitelesa se vežejo na specifično zaporedje aminokislin, epitop. Ker se aminokislinska zaporedja razlikujejo od proteina do proteina, protitelesa lahko prepoznajo specifičen protein med vsemi ostalimi. Protein lahko identificiramo iz celičnega lizata, ki vsebuje tisoče drugih proteinov. Najprej so proteini ločeni med seboj glede na velikost. Nato uporabimo protitelesa, da zaznamo želeni protein s pomočjo substrata, ki reagira z encimom in tako lahko vidimo kompleks protein/protitelo (Western Blotting (Theory), 2014).

Prenos na membrano smo izvedli z iBlot® Gel Transfer napravo, po navodilih proizvajalca in je trajal 7 min. Med stalnim mešanjem smo membrano 1 h blokirali v 5 % mleku z 1 x pufrom TBS-T in s tem blokirali vsa nezasedena mesta na membrani. Za tem smo membrano spirali 5 min v 1 x pufru TBS-T. Po zaključenem spiranju smo membrano inkubirali z mišjimi anti-HA protitelesi v razmerju 1:10000 v 3 % mleku v 1 x TBS-T pufru, 1 h pri sobni temperaturi in stalnem mešanju. Membrano smo nato sprali v TBS-T pufru in sicer najprej 20 min in nato še dvakrat po 10 min. Sledila je inkubacija membrane s sekundarnimi protitelesi, kozjimi protitelesi proti mišjim IgG konjugirana s HRP

(1:20000 v 3 % mleku raztopljenem v TBS-T pufru) 1 h s stalnim mešanjem. HRP katalizira pretvorbo kromatogenih substratov v obarvan produkt in proizvaja svetlobo. V prisotnosti vodikovega peroksida oksidira luminol, ta preide v vzbujeno stanje. Pri prehodu v osnovno stanje se sprošča svetloba. Po dodatku sekundarnih protiteles smo ponovili spiranje s TBS-T po 15 min, 10 min in 10 min spiranja. Membrano smo potem 5 min inkubirali v ECL raztopini, ki temelji na kemiluminiscenci luminola. Raztopino smo pripravili tik pred uporabo po navodilih proizvajalca. Membrano smo zaprli v avtoradiografsko kaseto ter v temnici za 5 min nanjo položili film in ga vstavili v napravo za razvijanje filma.

3.2.5 Nikelj kelatna kromatografija

3.2.5.1 Priprava vzorcev in kolone

Supernatant iz celičnih kultur smo centrifugirali (10 min, 41837 rcf, 4 °C). Raztopine, ki smo jih uporabili pa smo predhodno filtrirali s filtrom premera por 2 µm in prepihali s helijem. Pred nanosom vzorcev na kolono smo najprej spirali črpalko 5 min z ddH₂O in nato 10 min z 1 x PBS s pretokom 4 ml/min. Nato smo na črpalko pritrdili kolono (HisTrap excel), jo kapljico po kapljico napolnili z ddH₂O ter jo zaprli. Skozi kolono smo 10 min spuščali ddH₂O in nato še 1 x PBS s pretokom 1 ml/min. Z istim pretokom smo v kolono nato prenesli naš vzorec.

3.2.5.2 Spiranje in elucija

Po prenosu vzorca na kolono smo jo pritrdili na kromatografsko napravo in nastavili program za izpiranje proteinov iz kolone (Preglednica 16, 17). Počakali smo, da se je absorbanca ustalila in jo nastavili na ničlo. Zbirali smo frakcije po 1 ml.

Preglednica 16: Program za spiranje proteina CD6 iz kolone.

Čas (min)	Raztopina	Pretok
0-10	1 x PBS	1 ml/min
20-30	10 mM imidazol	1 ml/min
30-40	20 mM imidazol	1 ml/min
40-50	40 mM imidazol	1 ml/min
50-60	100 mM imidazol	1 ml/min
60-80	500 mM imidazol	1 ml/min

Kolono za čiščenje Sp α smo najprej spirali 10 min z 1 x PBS in nato po naslednjem programu (Preglednica 17).

Preglednica 17: Program za spiranje proteina Sp α iz kolone.

Čas (min)	Raztopina	Pretok
0-20	10 mM imidazol	1 ml/min
20-30	20 mM imidazol	1 ml/min
30-40	40 mM imidazol	1 ml/min
40-50	100 mM imidazol	1 ml/min
50-60	500 mM imidazol	1 ml/min

Po končanem programu smo kolono spirali 20 min v ddH₂O, 5 min v 1 x PBS in na koncu 5 min v etanolu ter jo napolnjeno z etanolom tudi shranili.

Nato smo analizirali kromatogram in izbrali frakcije za katere smo želeli preveriti ali vsebujejo izbrani protein.

3.2.6 Koncentriranje proteina

Frakcije za katere smo menili, da vsebujejo želeni protein smo združili in jih koncentrirali iz 20 ml na 500 μ l. In sicer smo za ta namen uporabili centrifugirke s filtri, ki ne prepustijo proteinov večjih od 10.000 Da. Najprej smo nanesti naš vzorec in centrifugirali pri maksimalni hitrosti centrifuge (3200 rcf, 30 min pri 4 °C). Kar je prišlo skozi filter smo odlili, dodali PBS, centrifugirali pod enakimi pogoji ter nato dodali še HBS. S HBS smo

centrifugirali toliko časa dokler nismo dobili volumna 500 μ l. Po vsakem centrifugiranju smo tekočino, ki je prišla skozi filter odlili.

4 REZULTATI

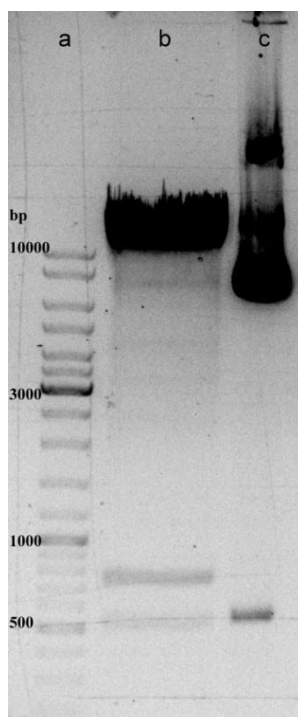
Namen magistrske naloge je bil proizvesti po dva proteina iz skupine SRCR-SF, CD6 ter Sp α , s pomočjo lentivirusne infekcije celic CHO-K1. V ta namen smo uporabili vektorski sistem druge generacije. Lentiviruse smo pridobili s transdukcijo celične linije HEK 293T ter nato okužili celice CHO-K1, ki so proizvajale želena proteina in ju izločale v gojišče. V prvem koraku smo pripravili plazmidne konstrukte, ki so vsebovali želeni gen vstavljen navzgor od gena za Emerald. Nato smo v HEK293T vstavili tri plazmidne vektorje s čimer smo pridobili lentiviruse in z njimi okužili celice CHO-K1. S pomočjo pretočne citometrije in mikroskopije smo preverjali intenzivnost zelene fluorescence celic CHO-K1. Poleg tega smo sintezo proteinov preverili tudi s prenosom western in z barvanjem gelov s Coomassie modrim ter protein poskušali očistiti z nikelj kelatno kromatografijo.

4.1 Priprava plazmidnih konstruktov

4.1.1 Restrikcija in ligacija

Plazmid z genom za Emerald in izbranim vključkom je bil pripravljen s pomočjo osnovnih metod molekulskega kloniranja. V pHR-SIN-BX-IRES-Em je bila med promotor SSFV in IRES-Emerald oziroma med restriksijski mesti *Bam*HI in *Xho*I vstavljeno zaporedje zelenega proteina CD6 ali Sp α . Restrikcija plazmida je bila izvedena z restriksijskima encimoma *Bam*HI in *Xho*I, vključka pa sta bila razrezana z *Bgl*II in *Sal*I. Na agaroznem gelu smo preverili ali je bila restrikcija plazmida uspešna (Slika 6) in nato izvedli ligacijo z zaporedjem vključka, ki kodira želeni protein.

V liniji b (Slika 6) opazimo tri lise. Najpočasneje potujoča lisa v gelu pripada rezanemu plazmidu, naslednja po hitrosti potovanja pripada delu, ki je bil izrezan, najhitreje pa v gelu potuje ostanek komercialnega kita. Slednja se sklada z liso v b liniji, ostale lise v liniji b pa predstavljajo nerezan plazmid.



Slika 6: Gelska elektroforeza pHR-SIN-BX-IRES-Em

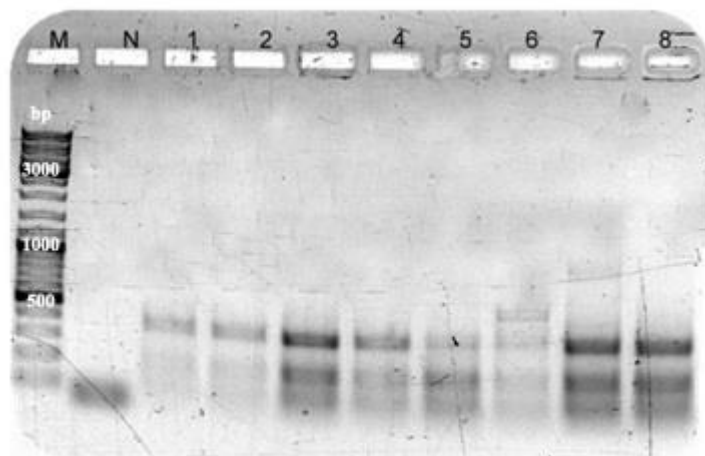
a) marker, b) pHR-SIN-BX-IRES-Em razrezan z *Bam*HI in *Xho*I, c) pHR-SIN-BX-IRES-Em nerazrezan.

4.1.2 Verižna reakcija s polimerazo na osnovi kolonije

Po ligaciji plazmida in vključkov smo s transformacijo prenesli plazmidne konstrukte v celice TOP10, gojili bakterije preko noči na gojišču LB agar z ampicilinom. Plazmidni vektor pHR-SIN-BX-IRES-Em vsebuje ampicilinsko rezistenco tako, da na gojišču z ampicilinom zrastejo samo bakterije, ki so ga sprejele. Naključno smo izbrali kolonije ter naredili PCR na osnovi kolonije. Pomnožke verižne reakcije s polimerazo smo nato nanegli na agarozni gel za gelsko elektroforezo.

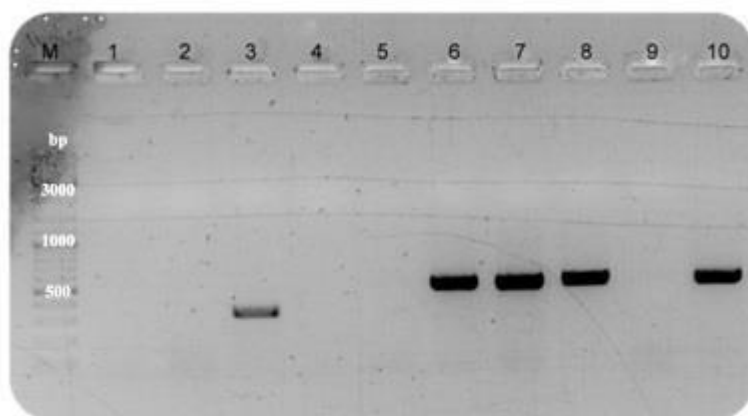
Iz agaroznih gelov, ki so bili rezultat verižne reakcije s polimerazo smo izbrali lise (Sliki 7, 8), ki bi lahko ustrezale dolžini želenega plazmidnega konstrukta za določitev nukleotidnega zaporedja (zaporedja v Prilogi A in B). S tem smo želeli preveriti ustreznost pripravljenega plazmidnega konstrukta, tako da plazmid sedaj vsebuje tudi gen za želeni protein. Po pregledu gela (Sliki 7, 8) plazmidnega vektorja pHR-SIN-BX-IRES-Em + CD6 ali pHR-SIN-BX-IRES-Em + Sp α smo se pri plazmidnem konstrukt z vključkom CD6

odločili, da na analizo nukleotidnega zaporedja pošljemo DNA, ki pripada lisi številka 3 in 7 (Slika 7), pri *Spα* pa liso 7 (Slika 8).



Slika 7: Gelska elektroforeza iz kolonij izoliranih pHR-SIN-BX-IRES-Em + CD6;

M-marker, N-negativna kontrola, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – pomnožki verižne reakcije s polimerazo.



Slika 8: Gelska elektroforeza iz kolonij izoliranih pHR-SIN-BX-IRES-Em + *Spα*;

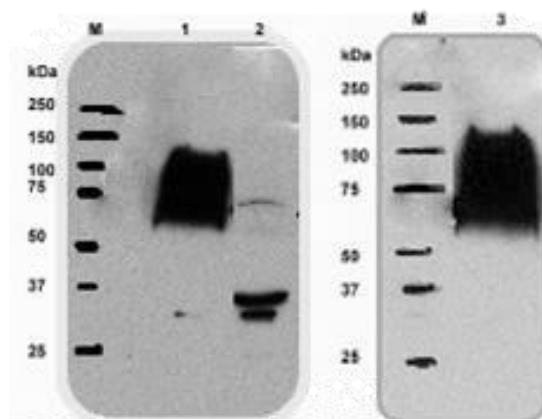
M-marker, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – pomnožki verižne reakcije s polimerazo.

4.2 Ocena sinteze rekombinantnih proteinov

4.2.1 Prenos western

S prenosom western smo želeli preveriti ali je ciljano sintetiziran protein prisoten v gojišču tako po prvi kot po drugi lentivirusni infekciji celic CHO-K1. Vzeli smo vzorec gojišča in ga brez predhodnega čiščenja po protokolu nanесли na poliakrilamidni gel za NaDS-PAGE elektroforezo. Nato smo napravili prenos western obeh proteinov.

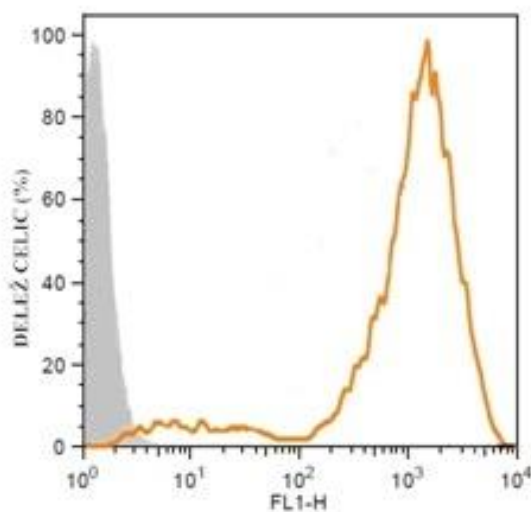
Iz rezultatov je razvidno (Slika 9), da je protein CD6 prisoten v gojišču po prvi in drugi infekciji celic. Prav tako je mogoče protein Sp α zaznati v gojišču po prvi infekciji celic. Prisotnost proteina Sp α v gojišču po sekundarni infekciji nismo preverili.



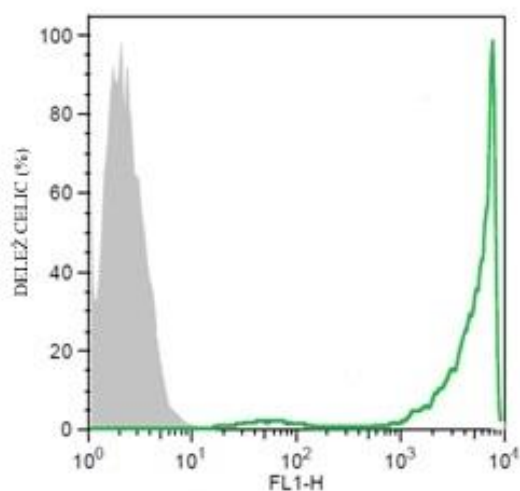
Slika 9: Prenos western proteina CD6 in Sp α ;
M) marker, 1) protein CD6 po prvi infekciji, 2) protein Sp α po prvi infekciji, 3) protein CD6 po sekundarni infekciji celic CHO-K1.

4.2.2 Rezultati pretočne citometrije

S pretočno citometrijo smo pridobili podatke intenzivnosti zelene fluorescence in se s tem prepričali o uspešnosti prve in druge infekcije celic CHO-K1, ki so imele vstavljen gen za Emerald in CD6 (Slika 10, 11). Kot negativno kontrolo smo uporabili celice CHO-K1, ki niso bile okužene z lentivirusi. Merili smo intenziteto zelene fluorescence in s tem dobili število celic pri katerih jo lahko zaznamo in tistih pri katerih zelene fluorescence ni mogoče zaznati ter nato izračunali stopnjo razlike v intenziteti fluorescence med prvo in drugo infekcijo.



Slika 10: Intenziteta fluorescence celic CHO-K1 s pHR-SIN-BX-IRES-Em + CD6 po primarni infekciji; sivo je intenziteta fluorescence neokuženih celic CHO-K1, rdeče intenziteta okuženih CHO-K1 celic s plazmidom po primarni infekciji.



Slika 11: Intenziteta fluorescence celic CHO-K1 s pHR-SIN-BX-IRES-Em + CD6 po drugi infekciji; sivo je intenzitetata fluorescence neokuženih celic CHO-K1, zeleno je intenziteta okuženih celic CHO-K1 s plazmidom po sekundarni infekciji.

Za izračun stopnje razlike v intenziteti fluorescence med prvo in drugo infekcijo (Preglednica 18) je bilo potrebno najprej narediti normalizacijo rezultatov. Geometrijsko sredino okuženih celic po prvi in drugi infekciji smo delili z geometrijsko sredino

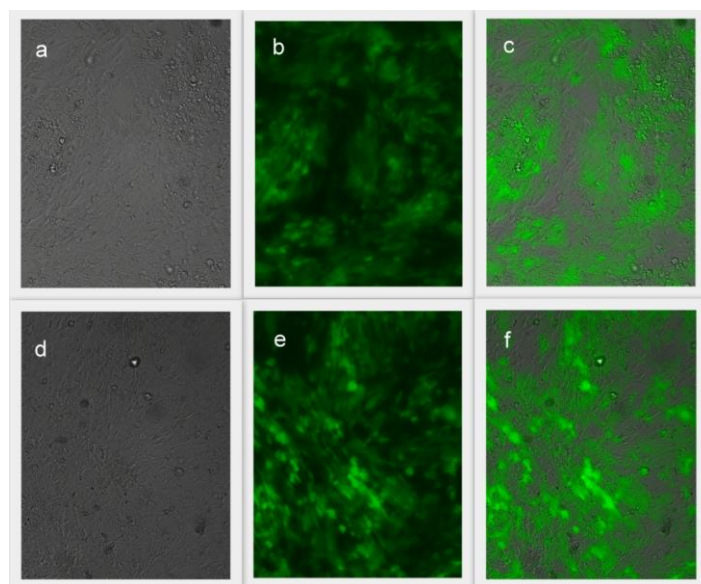
neokuženih celic ter nato med seboj delili normalizirano vrednost po drugi infekciji z normalizirano vrednostjo po prvi infekciji.

Preglednica 18: Geometrijska sredina intenzitete fluorescence po prvi in drugi infekciji celic in stopnja razlike v intenziteti fluorescence med prvo in drugo infekcijo

Celice	Geometrijska sredina po prvi infekciji	Geometrijska sredina po drugi infekciji	Stopnja razlike v intenziteti fluorescence
Neokužene	1,32	2,17	/
CD6	830	3450	2,53

4.2.3 Mikroskopija

S pomočjo mikroskopa smo spremljali intenziteto fluorescence celic CHO-K1 z vstavljenim plazmidom pHR-SIN-BX-IRES-Em + Spα in s tem preverjali uspešnost lentivirusne infekcije po prvi in drugi infekciji (Slika 12). Zanimalo nas je ali se število okuženih celic oziroma intenziteta fluorescence celic po drugi infekciji poveča, kar bi lahko pomenilo tudi večjo količino proizvedenega proteina Spα.



Slika 12: Fluorescenca celic CHO-K1 z vstavljenim plazmidom pHR-SIN-BX-IRES-Em + Spα

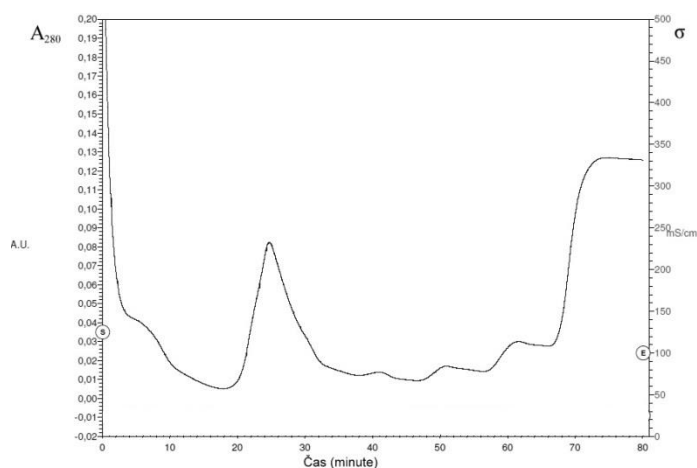
a) konfuentna razraščanost celic po prvi infekciji, b) fluorescenca okuženih celic po prvi infekciji, c) združeni sliki a in b po prvi infekciji, d) konfuentna razraščanost celic po drugi infekciji, e) fluorescenca okuženih celic po drugi infekciji, f) združeni sliki d in e po drugi infekciji.

4.2.4 Nikelj kelatna kromatografija

Z nikelj kelatno kromatografijo smo želeli očistiti izbrani protein iz gojišča. Nato smo s pomočjo prenosa western in z barvanjem s Coomassie modrim poskušali določiti frakcije v katerih se nahaja želeni protein.

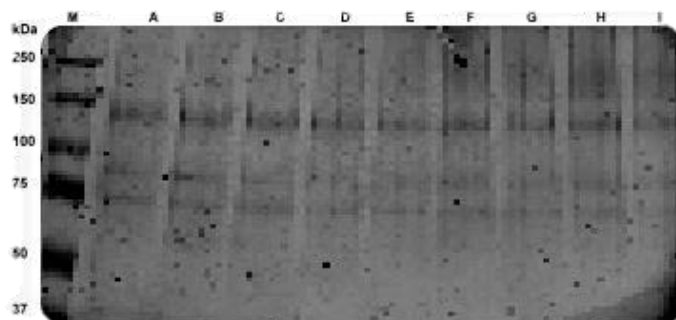
4.2.4.1 Čiščenje proteina CD6

Po nikelj kelatni kromatografiji smo analizirali kromatogram (Slika 13) in izbrali frakcije za katere smo menili, da bi lahko vsebovale izbrani protein. Frakcije smo nanegli na gel, izvedli NaDS-PAGE elektroforezo in gel pobarvali s Coomassie briljantno modro.



Slika 13: Kromatogram nikelj kelatne kromatografije proteina CD6 s frakcijami zbranimi od 0 do 80 min. 0-10 min spiranje z 1xPBS, 10-30 min 10 mM imidazol, 30-40 min 20 mM imidazol, 40-50 min 40 mM imidazol, 50-60 min 100 mM imidazol, 60-80 min 500 mM imidazol. A.U. – arbitrarne enote.

Spodnja slika (Slika 14) predstavlja gel z nanešenimi frakcijami, zbranimi pri nikelj kelatni kromatografiji proteina CD6. Pri vsaki frakciji smo zaznali tri lise, in sicer pri okoli 130 kDa, malo manj kot 100 kDa in 75 kDa.

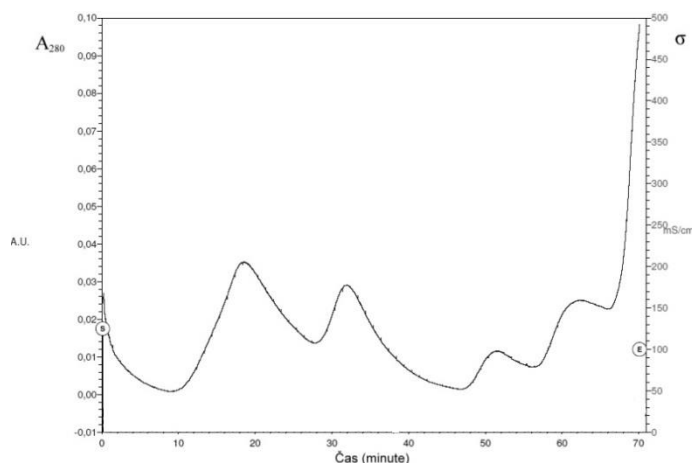


Slika 14: NaDS-PAGE gel s frakcijami proteina CD6 tekom čiščenja;

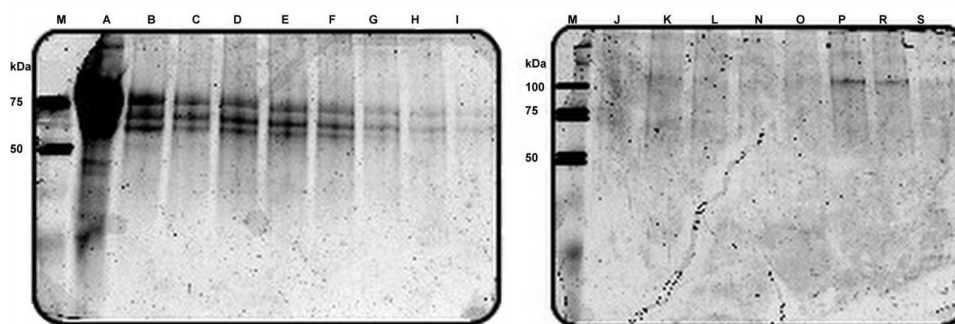
M) marker, A) frakcija zbrana v 51 minuti, B) frakcija zbrana v 53 minuti, C) frakcija zbrana v 54 minuti, D) frakcija zbrana v 56 minuti, E) frakcija zbrana v 58 minuti, F) frakcija zbrana v 60 minuti, G) frakcija zbrana v 61 minuti, H) frakcija zbrana v 62 minuti, I) frakcija zbrana v 63 minuti.

4.2.4.2 Čiščenje proteina Sp α

Podobno kot pri proteinu CD6 smo tudi pri proteinu Sp α izbrali določene frakcije nikelj kelatne kromatografije s pomočjo kromatograma (Slika 15), jih nanесли na poliakrilamidni gel ter izvedli NaDS-PAGE elektroforezo. Gel smo pobarvali s Coomassie modrim ter poskušali ugotoviti katera od frakcij pridobljenih z nikelj kelatno kromatografijo vsebuje želeni protein Sp α . (Slika 16)



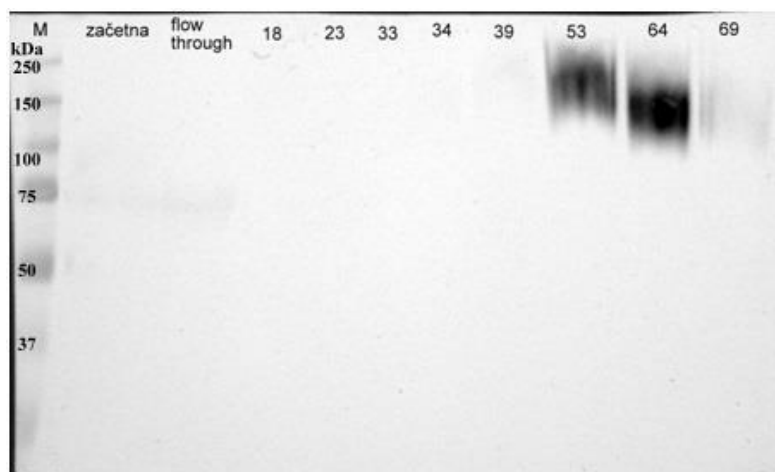
Slika 15: Kromatogram nikelj kelatne kromatografije proteina Sp α s frakcijami zbranimi od 0 do 70 minute. 0-20 min spiranje z 10 mM imidazolom, 20-40 min 20 mM imidazolom, 40-50 min 40 mM imidazolom, 50-60 min 100 mM imidazolom, 60-70 min 500 mM imidazolom. A.U. – arbitrarne enote.



Slika 16: NaDS-PAGE gel s frakcijami proteina Sp α po čiščenju.

Nanos vzorcev po vrsti: M) marker, A) na stacionarno fazo nevezani proteini (»flow through«), B) frakcija zbrana v 18 min, C) frakcija zbrana v 30 min, D) frakcija zbrana v 32 min, E) frakcija zbrana v 35 min, F) frakcija zbrana v 37 min, G) frakcija zbrana v 41 min, H) frakcija zbrana v 45 min, I) frakcija zbrana v 49 min, J) frakcija zbrana v 51 min, K) frakcija zbrana v 53 min, L) frakcija zbrana v 55 min, N) frakcija zbrana v 57 min, O) frakcija zbrana v 59 min, P) frakcija zbrana v 62 min, R) frakcija zbrana v 64 min, S) frakcija zbrana v 67 min.

Velikost sintetiziranega proteina Sp α je okoli 40 kDa. Na gelu obarvanem s Coomassie briljantno modro (Slika 16) pa lise proteina te velikosti nismo zaznali. Glede na to smo uporabili občutljivejšo metodo, izvedli smo prenos western (Slika 17), da bi določili katere frakcije vsebujejo izbrani protein. Iz Slike 17 je razvidno, da lahko s prenosom western zaznamo protein v dveh frakcijah, ki sta bili zbrani v 53 in 64 minuti.



Slika 17: Prenos western proteina Sp α po čiščenju.

Od leve proti desni: marker, gojišče, supernatant, frakcije 18, 23, 33, 34, 39, 53, 64, 69.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Pri sintezi proteinov v sesalskih celicah je pomembno, da gen za želeni protein vnesemo v jedro celice. Virusi so eni tistih, ki so razvili učinkovite načine kako vstopiti v celico in nato v samo jedro. Lentivirusni vektorji, ki izvirajo iz virusa humane imunske pomanjkljivosti (HIV-1), so postali glavno orodje za vnos genov v sesalske celice. Večinoma so ti virusi pripravljeni v celicah HEK 293T, v katerih mora priti do izražanja na plazmidu zapisanih lentivirusni genov.

V naši raziskavi smo poskušali z lentivirusno infekcijo celic CHO-K1 proizvesti proteina CD6 in Sp α , ki ju uvrščamo v skupino B proteinov SRCR-SF. Lentivirusne delce smo pridobili s pomočjo transdukcije celic HEK 293T s katerimi smo nato okužili celice CHO-K1. Po okužbi smo z različnimi metodami spremljali ali se gen za izbrani protein sintetizira, ocenili nivo prepisa transkripta za izbrani protein in poskušali ugotoviti ali sekundarno inficirane celice sintetizirajo več proteina kot primarno inficirane celice. Za spremljanje izražanja gena za izbrani protein smo kot označevalec uporabili zeleni fluorescentni protein. Glede na to smo spremljali stopnjo intenzitete fluorescence s pomočjo pretočne citometrije in mikroskopije. Prav tako smo preverili ali se želeni protein sintetizira in izloča v gojišče s prenosom western in barvanjem poliakrilamidnega gela s Coomassie modrim. Z vsemi temi metodami smo želeli preveriti ali je lentivirusna infekcija celic CHO-K1 uspešna za proizvodnjo izbranih proteinov. Na koncu pa smo protein poskušali izolirati in očistiti s pomočjo nikelj kelatne kromatografije.

5.1.1 Zaznavanje intenzitete zelene fluorescence

Intenziteto zelene fluorescence proteina Emerald smo uporabili kot poročevalec izražanja genov za proteina CD6 in Sp α . Temelji na predpostavki, da je intenziteta fluorescence premo sorazmerna z izražanjem genov za proteina CD6 ali Sp α in posledično najverjetneje tudi sintezo proteina.

Fluorescentni tehniki, ki smo ju uporabili pri naši raziskavi pretočna citometrija in fluorescentna mikroskopija izkoriščata lastnosti fluorescence z osvetljevanjem celic pri eni valovni dolžini in zaznavanjem oddane svetlobe daljših valovnih dolžin.

5.1.1.1 Pretočna citometrija

S pretočno citometrijo smo preverili intenzivnost zelene fluorescence celic CHO-K1 in s tem ocenili izražanje gena za protein CD6. Celice smo okužili dvakrat. Zanimalo nas je ali obstajajo razlike v intenziteti fluorescence med celicami, ki so bile okužene enkrat v primerjavi s tistimi, ki so bile okužene dvakrat. Kot negativno kontrolo smo pri poskusu uporabili neokužene celice CHO-K1.

Iz rezultatov, ki smo jih pridobili z metodo pretočne citometrije razberemo, da je zelena fluorescenca prisotna tako pri celicah, ki so bile z lentivirusi okužene samo enkrat, kot tudi pri celicah pri katerih je prišlo do sekundarne infekcije. Slednje nakazuje na sintezo izbranega proteina tako ob primarni kot tudi po sekundarni infekciji.

Med primarno in sekundarno infekcijo celic CHO-K1 opazimo razlike v intenziteti fluorescence. Glede na izračunano stopnjo intenzitete fluorescence (Preglednica 18) lahko rečemo, da je v primeru proteina CD6 le ta 2,5 krat večja pri sekundarni infekciji. Sklepamo, da je prav tako sinteza proteina CD6 v primeru sekundarne infekcije večja v primerjavi s celicami, ki so bile okužene samo enkrat.

5.1.1.2 Mikroskopija

S fluorescentno mikroskopijo smo kot v primeru celic CHO-K1, ki so proizvajale protein CD6 preverili intenzivnost zelene fluorescence celic, ki proizvajajo protein Spa. V ta namen pa smo namesto pretočne citometrije uporabili fluorescentno mikroskopijo.

Kot je razvidno iz rezultatov (Slika 12) je zelena fluorescenca prisotna tako pri primarni kot pri sekundarni infekciji celic CHO-K1. Dobro je vidno, da je intenziteta fluorescence intenzivnejša pri sekundarni infekciji in prav tako je okuženih dosti več celic oziroma več celic izraža zeleno fluorescenco v primerjavi s primarno infekcijo.

S fluorescentno mikroskopijo kot tudi s pretočno citometrijo je bilo mogoče zaznati višjo intenziteto fluorescence v primeru sekundarne infekcije celic CHO-K1 za dva različna proteina. Se pravi, da s sekundarno infekcijo lahko okužimo še več celic, s tem povečamo izražanje zelenega gena in najverjetneje pridobimo večjo količino proteina.

5.1.2 Določanje prisotnosti proteina v gojišču

Glede na to, da smo detektirali fluorescenco celic CHO-K1 z vstavljenim plazmidom, ki je vseboval gena za izbrani protein CD6 oziroma Sp α smo predvidevali, da se le ta tudi izražata. Prisotnost proteina v gojišču smo nato preverili s prenosom western. To smo naredila za primarno in sekundarno infekcijo pri proteinu CD6 ter za primarno infekcijo celic CHO-K1, ki so vsebovale gen za protein Sp α . Iz slike 5 je razvidno, da se v primeru primarne infekcije kot tudi sekundarne sintetizirajo velike količine proteina CD6. Prav tako pa je bilo zadostno količino proteina Sp α v gojišču zaznati tudi po prvi infekciji celic CHO-K1. S tem smo pokazali, da lahko tako po primarni kot sekundarni lentivirusni infekciji celic CHO-K1 zaznamo prisotnost proteina CD6 oziroma Sp α v gojišču.

5.1.3 Čiščenje proteinov

Sinteza in poznejše čiščenje rekombinantnih proteinov je široko vpeljana v biokemijske študije. Pomembne metode za čiščenje proteinov vključujejo peptidne afinitetne označbe, ki so združene s proteinom, katerega želimo očistiti in so uporabljene za izboljšanje čiščenja proteinov z afinitetno kromatografijo. Široko uporabljena metoda za čiščenje rekombinantnih proteinov, ki vsebujejo kratke afinitetne označbe iz polihistidinskih ostankov je metoda IMAC (Bornhorst in Falke, 2000).

Čiščenje z uporabo polihistidinskih označb se uspešno uporablja pri številnih ekspresijskih sistemih, vključno s sintezo proteinov v *Escherichia coli*, *Sacharomyces cerevisiae*, sesalskih celicah in z baculovirusom okuženimi celicami. Kljub temu pa ta metoda čiščenja ni nujno uspešna za označene proteine sintetizirane v nizkih koncentracijah, ki potrebujejo veliko več kot 100 kratno obogatitev ali pa za pripravo visoko homogenih proteinskih vzorcev (Bornhorst in Falke, 2000).

Proteina CD6 in Sp α , ki so ju celice CHO-K1 izločale v gojišče smo želeli očistiti in izolirati z nikelj kelatno kromatografijo. Kolona, ki smo jo uporabili pri tem je oblikovana za čiščenje sekrecijskih proteinov označenih s histidini in se izločajo v supernatant evkariontskih celičnih kultur kot so insektne ali celice CHO.

5.1.3.1 CD6

Odkrili so več različnih velikosti proteina CD6, kar nakazuje na posttranslacijske modifikacije tega proteina. Protein CD6 ima fosforiliran serin v počivajočih celicah in je lahko hiperfosforiliran, ko so T celice stimulirane (Carmo in Pinto, 2013).

Iz gela (Slika 9) na katerega je nanesen protein pred čiščenjem z nikelj kelatno kromatografijo je opaziti tako v primeru primarne kot tudi sekundarne infekcije veliko liso na gelu, ki pripada večim velikostim proteina. Po očiščenju z nikelj kelatno kromatografijo pa lahko na gelu obarvanim s Coomassie modrim (Slika 14) opazimo v frakcijah po tri lise različnih velikosti od 75 do 130 kDa. To se sklada z rezultati prenosa western (Slika 9), ki smo jih dobili pred čiščenjem proteina CD6 iz gojišča. Ena od lis ustreza velikosti 75 kDa, druga malo manj kot 100 tretja pa 130 kDa. Iz tega bi lahko sklepali, da je mogoče prišlo do dimerizacije proteina ter različnih vzorcev glikolizacije. Poleg tega se enak vzorec lis pojavlja v več frakcijah kar kaže na to, da se je protein izločal pri različnih koncentracijah imidazola.

Swack in sodelavci (1990) so opazili, da ima polipeptid CD6 molekulsko maso 88 kDa, nezrela N-glikolizirana oblika 110 kDa in popolnoma obdelan površinski protein z zrelemi N- in O- vezanimi sladkorji znano velikost 130 kDa. Te velikosti proteinov se ujemajo z velikostjo lis na gelu.

Večina evkariontskih rekombinantnih proteinov je glikoliziranih, kar je še dodatna lastnost zaradi katere je potrebno nadzorovati kakovost sinteze produkta. S številnimi pogoji gojenja lahko vplivamo na glikolizacijo rekombinantnih proteinov kot: pH, osmolarnost, raztopljen kisik, temperatura, uporaba seruma in podobno. Prav tako lahko vplivamo na glikolizacijo z raznimi dodatki kot je natrijev butirat. To pa je odvisno od tipa celic, rekombinantnega proteina in drugih pogojev gojenja.

Sperman in sodelavci (2007) ugotavljajo, da dodatek natrijevega butirata poveča sintezo proteina, vendar pa poveča tudi glikolizacijski profil s povečanjem odstotka visoko razvejanih N-glikanov. Glede na to, da smo naši kulturi dodali natrijev butirat bi bil to lahko tudi eden od razlogov za prisotnost različnih velikosti proteina na NaDS-PAGE gelu.

5.1.3.2 Sp α

Človeški protein Sp α spada v skupino B SRCR-SF in je o njem dostopno malo informacij. Je topen, 38 kDa velik glikoprotein, sestavljen iz treh domen SRCR (Bornhorst in Falke, 2000). Iz gojišča smo ga želeli očistiti z nikelj kelatno kromatografijo pod nativnimi pogoji. Čiščenje proteinov z nikelj kelatno kromatografijo in uporabo polihistidinskih označb lahko izvedemo tako pod nativnimi kot denaturirajočimi pogoji. Uporaba blagega pufra in imidazola kot kompetitivne molekule pogosto privede do biološko aktivnega, čistega produkta. Pod nativnimi pogoji lahko očistimo proteine, ki ostanejo topni v citoplazmi ali pa so izločeni. Kljub temu pa je čiščenje pod nativnimi pogoji lahko ovirano, če tarčni protein ni topen, agregira v inkluzijska telesca ali pa vsebuje terciarno strukturo pri kateri polihistidinske označbe niso izpostavljene in so nedostopne.

Po sami nikelj kelatni kromatografiji smo nekatere frakcije, ki smo jih pridobili nanесли na poliakrilamidni gel in naredili NaDS-PAGE elektroforezo. Gele smo pobarvali s Coomassie modrim. Na Sliki 16 lahko vidimo, da smo v večini frakcij dobili podobne rezultate oziroma lise na gelu, ki ne ustrezajo velikosti izbranega proteina. Enak rezultat smo dobili po večkratnih ponovitvah elektroforeze tudi z drugimi proteini, kjer so se večinoma vsi ustavili na istem položaju.

Problem pri uporabi polihistidinskih afinitetnih označb je lahko nespecifična vezava neoznačenih proteinov. Kljub temu, da se histidin pojavi dokaj poredko (2 % vseh proteinskih ostankov je histidinov), nekateri celični proteini vsebujejo dva ali več sosednjih histidinskih ostankov. Ti proteini imajo afiniteto za matriks IMAC in se lahko izločijo skupaj s proteinom, ki nas zanima. Rezultat tega je velika kontaminacije končnega produkta (Bornhorst in Falke, 2000).

Kljub temu, da lisa na gelu ni ustrezala velikosti izbranega proteina pa smo se odločili, da ugotovimo ali je želeni protein v kateri izmed frakcij ali se je izločil skupaj z ostalimi proteini. Veliko proteinov, ki podajo iste lise se izloči že v začetnih frakcijah.

Glede na to, da sama struktura in funkcija proteina Sp α ni dobro raziskana bi lahko prišlo tudi do tega, da histidinska označba ni bila dostopna imobiliziranemu niklju na stacionarni fazi. Bornhorst in Falke (2000) navajata, da je to lahko eden od potencialnih problemov, ki se pojavijo pri proteinih s histidinskimi označbami, saj je le ta ujeta v notranjost zvitega proteina.

Kljub rezultatom, ki so razvidni iz gela obarvanim s Coomassie modrim (Slika 16) pa smo določene frakcije vseeno ponovno nanesli na gel in opravili prenos western. Pokazalo se je (Slika 17), da izbrani protein lahko zaznamo v frakcijah 53 in 64. Glede na to lahko sklepamo, da se je želeni protein v večjih količinah verjetno izločal v frakcijah, ki so bile sprane z imidazolom v koncentraciji 100 mM in 500 mM.

5.2 SKLEPI

- Potrdimo lahko prvo hipotezo magistrskega dela, in sicer lentivirusna infekcija celic CHO-K1 omogoča proizvodnjo proteinov CD6 in Sp α .
- Prav tako lahko potrdimo drugo hipotezo, ki pravi, da se s sekundarno infekcijo celic CHO-K1 količina proizvedenega proteina poveča.
- Z lentivirusno infekcijo druge generacije lahko v celice CHO-K1 vstavimo gen za protein CD6 ali Sp α in reporterski protein Emerald.
- V celicah CHO-K1 pride do sinteze reporterskega proteina Emerald sočasno s proteinom CD6 oziroma Sp α .
- Intenziteta fluorescence celic CHO-K1 z vstavljenim genom za protein CD6 je 2,5 krat večja po sekundarni infekciji celic, če primerjamo geometrijske sredine intenzitete fluorescence prve in druge infekcije izmerjene s pretočno citometrijo.
- Intenziteta fluorescence celic CHO-K1 z vstavljenim genom za Sp α je večja po sekundarni infekciji celic glede na slike fluorescentne mikroskopije.
- Protein CD6 in Sp α se izločata v gojišče tako po sekundarni kot primarni infekciji celic.
- CD6 je sintetiziran kot protein treh različnih velikostih, približno 75, 90 in 130 kDa.
- Sinteza proteinov CD6 in Sp α je zvečana ob sekundarni infekciji v primerjavi s primarno infekcijo celic CHO-K1.
- Pogoje čiščenja proteinov CD6 in Sp α z nikelj kelatno kromatografijo bi bilo potrebno spremeniti in optimizirati.

- Za izboljšanje čistosti proteina CD6 in Sp α bi bilo potrebno izbrati druge postopke čiščenja pred in po sami nikelj kelatni kromatografiji.
- Potrebne so nadaljnje raziskave strukture proteina CD6 in Sp α , kar bo prispevalo k optimizaciji postopkov čiščenja proteinov.

6 POVZETEK

V zadnjem času se z genskim inženiringom odpirajo nove poti za uporabo rekombinantnih proteinov v terapevtske namene. S tem se povečuje tudi potreba po učinkovitih ekspresijskih sistemih. Smiselno je, da se v ta namen uporabijo celične linije, ki so bolj sorodne celicam, ki prvotno tvorijo nek protein. Za proteine humanega izvora so tako najpogostejša izbira sesalske celice. V farmacevtski industriji se je najbolj uveljavila celična linija CHO. V magistrskem delu smo za proizvodnjo dveh proteinov CD6 in Sp α uporabili celice CHO-K1 v katere smo z letivirusno infekcijo vstavili gen za ta dva proteina.

Znano je, da lentivirusi učinkovito transducirajo nedeleče celice lahko prenesejo velike količine genetskega materiala ter dolgoročno ohranjajo stabilno ekspresijo transgena in ravno te lastnosti postavijo lentiviruse v ospredje orodji za prenos genov v organizme, tako za raziskovalne kot terapevtske namene.

Metode dela, ki smo jih uporabili v magistrskem delu vključujejo osnovne metode molekulskega kloniranja, delo z bakterijskimi celicami, gojenje sesalskih celic, proizvodnjo rekombinantnih proteinov, tehnike zaznavanja fluorescence, pretočno citometrijo in mikroskopijo. Najprej smo preverili ali restrikcijski encimi režejo plazmidni vektor, ki smo si ga izbrali za prenos želenega gena. Sledila je tudi restrikcija vključkov ter nato ligacija, s čimer smo želeni gen vstavili v vektorski plazmid pHR-SIN-BX-IRES-Em in transformirali kompetentne celice TOP10. Naključno smo izbrali zrasle kolonije in DNA pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo na osnovi kolonije ter pomnožke nanесли na agarozni gel in z elektroforezo preverili dolžino pomnožene DNA. Tiste, ki so ustrezale predvideni dolžini smo izolirali in jim določili nukleotidno zaporedje.

Po rezultatih določitve nukleotidnega zaporedja je sledilo delo s celičnima kulturama HEK293T in CHO-K1. Sprva smo celice HEK293T transfecirali hkrati s tremi plazmidi: pHR-SIN-BX-IRES-Em, p8.91 in pMD-G. Ti vektorji vsebujejo določene komponente lentivirusov, ki so med seboj ločene. S tem preprečimo verjetnost rekombinacije in oblikovanja RCL, ki bi bile lahko potencialno nevarne za človeka.

Proizvodnje celice HEK293T so lentiviruse izločale v gojišče. Nato pa smo celice CHO-K1 okužili s proizvedenimi lentivirusi in s pomočjo pretočne citometrije in mikroskopije spremljali intenziteto zelene fluorescence. Celice CHO-K1 smo okužili dvakrat in nato z nikelj kelatno kromatografijo poskušali izolirati proteina iz gojišča. Uspešnost te tehnike smo preverili z barvanjem z barvilom Coomasie modrim in prenosom western proteinov na membrano.

Pokazalo se je, da se intenziteta fluorescence reporterskega proteina Emerald zveča po sekundarni infekciji. To kaže na to, da se prav tako poveča količina proizvedenih proteinov CD6 in Sp α . S pomočjo nikelj kelatne kromatografije smo proteina očistili in jih s prenosom western in brananjem s Coomasie modrim tudi zaznali v frakcijah, vendar pa bi bilo potrebno ta postopek v prihodnje optimizirati in poiskati dodatne možnosti za njuno izolacijo.

Predvidevamo, da bi bila proteina lahko pomembna v farmacevtski industriji za zdravljenje določenih avtoimunskih bolezni, vendar bi jih bilo za ta namen potrebno proizvesti v večjih količinah in natančneje raziskati njuno funkcijo v celici.

7 VIRI

Abcam. 2007. Western blotting- a beginner's guide

<http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/WB-beginner.pdf> (marec 2014)

Addgene: Lentiviral Packaging Plasmids

<https://www.addgene.org/lentiviral/packaging/> (september 2014)

Amazaga, N., Sanjurjo, L., Julve, J., Aran, G., Perez-Cabezas, B., Bastos-Amador, P., Armengol, C., Vilella, R., Escola-Gil, J.C., Blanco-Vaca, F., Borrás, F.E., Villedor, A.F., Sarrias, M.R. 2014. Human scavenger protein AIM increases foam cell formation and CD36-mediated oxLDL uptake. *Journal of leukocyte biology*, 95: 1-12

Bardouille, C. F. 1999. Animal cells used in manufacturing. V: Encyclopedia of bioprocess technology fermentation, Biocatalysis and bioseparation. Vol.1. J. Flickinger M.C., Drew S.W. (ur.). Hoboken, J. Wiley & Sons: 170-177

BD Biosciences. 2000. Introduction to flow cytometry: learning guide. San Jose, Becton, Dickinson and Company: 52 str.
http://www.stemcell.umn.edu/prod/groups/med/@pub/@med/documents/asset/med_80691.pdf (september 2013)

Bornhorst, J.A., Falke, J.J. 2000. Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in enzymology*, 326: 245-254

Bowen, M.A., Aruffo, A.A., Bajorath, J. 2000. Cell surface receptors and their ligands: in vitro analysis of CD6-CD166 interaction. *Proteins*, 40: 420-428

Carmo, A., Pinto, M. 2013. CD6 as a Therapeutic Target in Autoimmune Diseases: Successes and Challenges. *BioDrugs*, 27: 191-202

Castro, M.A.A., Oliveira, M.I., Nunes, R.J., Fabre, S., Barbosa, R., Peixoto, A., Brown,

- M.H., Parnes, J.R., Bismuth, G., Moreira, A., Rocha, B., Carmo, A. 2007. Extracellular isoforms of CD6 generated by alternative splicing regulate targeting of CD6 to the immunological synapse. *The journal of immunology*, 178: 4251-4361
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., Prasher, D. D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263: 802-804
- Cockrell, A.S., Kafri, T. 2007. Gene delivery by lentivirus vectors. *Molecular biotechnology*, 36: 184-204
- Delenda, C. 2004. Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *The journal of gene medicine*, 6: 125-138
- Dropulič, B. 2011. Lentiviral vectors: their molecular design, safety and use in laboratory and preclinical research. *Human gene therapy*, 22: 649-657
- Ducrest, A., Amacker, M., Lingner, J., Nabholz, M. Detection of promoter activity by flow cytometric analysis of GFP reporter expression. *Nucleic acids research*, 30, 14: 1-4
- Gaillet, B., Gilbert, R., Broussau, S., Pilotte, A., Malenfant, F., Mullick, A., Garnier, A., Massie, B. 2010. High-level recombinant protein production in CHO cells using lentiviral vectors and the cumate gene-switch. *Biotechnology and bioengineering*, 106: 203-215
- Gebe, J.A., Llewellyn, M-B.C., Hoggatt, H., Aruffo, A. 2000. Molecular cloning, genomic organization and cell-binding characteristics of mouse Sp α . *Immunology*, 99: 78-86
- Goncalves, C.M., Castro, M.A.A., Henriques, T., Oliveira, M.I., Pinheiro, H.C., Oliveira, C., Sreenu, B.V., Evans, E.J., Davis, S.J., Moreira, A., Carmo, A.M. 2009. Molecular cloning and analysis of SSc5D, a new member of the scavenger receptor cysteine-rich superfamily. *Molecular immunology*, 46: 2585-2596

- Hartley, J.L. 2012. Why proteins in mammalian cells. V: Protein expression in mammalian cells: methods and protocols, Methods in molecular biology. Hartley, J.L. (ed.). New York, Human press: 2-12
- Hochuli, E., Bannwarth, W., Doebeli, H., Gentz, R., Stueber, D. Genetic approach to facilitate purification of recombinant proteins with a novel metal chelate adsorbent. Nature biotechnology, 6: 1321-1325
- Jevnikar, Z. 2007. Ekspresijski sistemi. V: Biološka zdravila: od gena do učinkovine. Štrukelj, B., Kos, J. (ur.). Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo: 67-111
- Kurien, B.T., Scofield, R.H. 2006. Western blotting. Methods, 38:283-293
- Lakowicz, J.R. 2006. Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed. New York, Springer: 954 str.
- Macaraega, N.F., Reilly D.E., Wong, A. W. 2013. Use of anti-apoptotic CHO cell line for transient gene expression. Biotechnology progress, 29: 1050-1058
- Martinez, V.G., Moestrup, S.K., Holmskov, U., Mollenhauer, J., Lozano, F. 2011. The conserved scavenger receptor cysteine-rich superfamily in therapy and diagnosis. Pharmacological reviews. 63: 967-1000
- McCarthy D.A. 2007. Fluorochromes and Fluorescens. V: Flow cytometry: Principles and applications Macey M.G. (ed.). Totowa, Humana press: 59-112
- Oliveira, M.I., Goncalves, C.M., Pinto, M., Fabre, S., Santos, A.M., Lee, S.F., Castro, M.A.A., Nunes, R.J., Barbosa, R.R., Parnes, J.R., Yu, C., Davis, S.J., Moreira, A., Bismuth, G., Carmo, A.M. 2012. CD6 attenuates early and late signaling events, setting thresholds for T-cell activation. European journal of immunology, 42:195-205
- Osborne, C., Brooks, S. A. 2006. SDS-PAGE and western blotting to detect proteins and

glycoproteins of interest in breast cancer research. V: Breast cancer research protocols. Brooks, S., Harris, A. (ur.). Totowa, Human press: 217-229

Palomares, L. A., Estrada-Mondaca S., Ramirez O.T. 2004 Production of recombinant proteins. V: Recombinant gene expreseion: reviews and protocols, Nethids in molecular biology. Balbas, P., Lorence, A. (ed.). Totowa, Human press: 15-51

Pinto, M., Carmo, A.M. 2013. CD6 as a therapeutic target in autoimmune disease: successes and challenges. Biodrugs, 27:191-202

Pluta, K., Kacprzak, M.M. 2009. Use of HIV as a gene transfer vector. Acta biochimica polonica, 56; 4 : 531-595

Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation, Nature, 5536, 258: 598-599

Sanjurjo, L., Amezaga, N., Vilaplana, C., Caceres, N., Marzo, E., Valeri, M., Cardona, P., Serrias, M.R. 2013. The scavenger protein apoptosis inhibitor of macrophages (AIM) potentiates the antimicrobial response against Mycobacterium tuberculosis by enhancing autophagy. PLOS ONE, 8, 11: e76970, doi: 10.1371/journal.pone.0079670: 14 str.

Sarrias, M.R., Farnos, M., Mota, R., Sanchez-Berberero, F., Ibanez, A., Gimferrer, I., Vera, J., Fenutria, R. Casals, C., Yelamos, J., Lozano, F. 2007. CD6 binds to pathogen-associated molecular patterens and protects from LPS-induced septic shock. PNAS, 28, doi: 10.1073/pnas.0702815104: 6 str.

Sarrias, M.R., Padilla, O., Monreal, Y., Carrascal, M., Abian, J., Vives, J., Yelamos, J., Lozano, F. Biochemical characterization of recombinant and circulating human Spα. Tissue antigenes, 63: 335-344

- Sanrias, M.R., Rosello, S., Sanchez-Barbero, F., Sierra, J.M., Vila, J., Yelamos, J., Vives, J., Casals, C., Lozano, F. 2005. A role for human Sp α as a pattern recognition receptor. *Journal of biological chemistry*, 42: 35391-35398
- Schmidt, F.R. 2004. Recombinant expression sistem in pharmaceutical industry. *Applied Microbiology an Biotechnology*, 65: 363-372
- Spearman, M., Rodriguez, J., Huzel, N., Sunley, K., Butler, M. (2007). Effect of culture conditions on glycosylation of recombinant beta-interferon in CHO cells. V: *Cell technology for cell products*. Smith, R. (ur.). Dordrecht, Springer: 71-85
- Sprin, P.V., Vilgelm, A.E., Prassolov V.S. 2008. Lentiviral vectors. *Molecular biology*, 42; 5: 814-825
- Swack, J.A., Mier, J.W., Romain, P.L., Hull, S.R., Rudd, C.E. (1991). Biosynthesis and post-translational modification of CD6, a T cell signal-transducing molecule. *Journal of biological chemistry*, 266: 7137–7143
- Tran, K., Morris, G., Fishwild, D. 2004. Analysis of green fluorescent protein (GFP) expression in mammalian cells using the guava PCA-96 AFP, a novel benchtop microcapillar cell analysis system. *Guava technologies*: 6 str. [http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/755891e8b7f357dd85257a6300527b91/\\$FILE/MK-1041-08-02.pdf](http://www.millipore.com/publications.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/755891e8b7f357dd85257a6300527b91/$FILE/MK-1041-08-02.pdf) (januar 2014)
- Turk, N., Majaron B. 2012 Pretočna citometrija, Ljubljana, Fakulteta za matematiko in fiziko: str. 12
<http://www-f9.ijs.si/~krizan/sola/seminar/1112/turk.pdf> (september 2013)
- Vigna, E., Naldini, L. 2000. Lentiviral vectors: exellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gen therapy. *The journal of gene medicine*, 2: 308-316

Western Blotting (Theory) : Cell biology Virtual Lab I : Biotechnology and Biomedical Engineering : Amrita Vishwa Vidyapeetham Virtual Lab
<http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=187&sim=1331&cnt=1> (marec 2014)

Wurm, F. 1999. Chinese hamster ovary cells, recombinant protein production. V:
Encyclopedia of bioprocess technology fermentation, Biocatalysis and bioseparation.
Vol.1. J. Flickinger M.C., Drew S.W. (ur.). Hoboken, J. Wiley & Sons: 570-580

Wurm, F.M. 2004. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. Nature biotechnology, 22: 1393-1398

Yin, J., Li, G., Ren, X., Herrler, G. 2007. Select what you need: A comparative evaluation of advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign gens. Journal of biotechnology, 127: 335-347

Zeiss. 2014. Introduction to fluorescent proteins. Carl zeiss microscopy online campus. 15 str.
<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html> (januar 2014)

ZAHVALA

First of all, I would like to thank all of the CAGE group from IBMC especially to Catarina Bessa Pereira, Ana Rita Faria dos Santos and Liliana Sofia da Silva Martins de Oliveira that were helping me with the practical part of my master thesis, explaining things and making my stay in Portugal easier. I would also like to thank professor Alexandre Carmo for accepting me in to CAGE group.

Zahvalila bi se tudi mentorju Gregorju Anderluhu in recenzentu Mateju Butali za hitro odzivnost in vse opombe, ki so pomagale izboljšati magistrsko nalogo.

Prav tako bi se rada zahvalila svojim staršem za vso podporo pri študiju, da so mi stali ob strani in mi omogočili študentsko izmenjavo. Nazadnje pa gre zahvala še mojemu fantu, ki mi je olajšal in olepšal bivanje v Portu.

PRILOGE

PRILOGA A: Nukleotidno zaporedje gena za protein CD6

CTCAAGCAGGCCACCATGGGTATCCTTCCCAGCCCTGGGATGCCTGCGCTGCT
CTCCCTCGTGAGCCTTCTCTCCGTGCTGCTGATGGGTTGCGTAGCTGAATACCC
ATACGACGTCCCAGACTACGCTACCGGTGGATCCGACCAGCTCAACACCAGCA
GTGCAGAGAGTGAGCTCTGGGAGCCAGGGGAGCGGCTTCCGGTCCGTCTGACA
AACGGGAGCAGCAGCTGCAGCGGGACGGTGGAGGTGCGGCTCGAGGCGTCCT
GGGAGCCCGCGTGCGGGGCGCTCTGGGACAGCCGCGCCGCCGAGGCCCGTGTG
CCGAGCACTGGGCTGCGGCGGGGCGGAGGCCGCCTCTCAGCTCGCCCCGCCGA
CCCCTGAGCTGCCGCCCCCGCCTGCAGCCGGGAACACCAGCGTAGCAGCTAAT
GCCACTCTGGCCGGGGCGCCCGCCCTCCTGTGCAGCGGCGCCGAGTGGCGGCT
CTGCGAGGTGGTGGAGCACGCGTGCCGCAGCGACGGGAGGCGGGCCCGTGTG
ACCTGTGCAGAGAACCGCGCGCTGCGCCTGGTGGACGGTGGCGGCGCCTGCGC
CGGCCGCGTGGAGATGCTGGAGCATGGCGAGTGGGGATCAGTGTGCGATGAC
ACTTGGGACCTGGAGGACGCCCACGTGGTGTGCAGGCAACTGGGCTGCGGCTG
GGCAGTCCAGGCCCTGCCCGGCTTGCACTTCACGCCCCGGCCGCGGGCCTATCC
ACCGGGACCAGGTGAACTGCTCGGGGGCCGAAGCTTACCTGTGGGACTGCCCG
GGGCTGCCAGGACAGCACTACTGCGGCCACAAAGAGGACGCGGGCGCGGTGT
GCTCAGAGCACCAGTCCTGGCGCCTGACAGGGGGCGCTGACCGCTGCGAGGG
GCAGGTGGAGGTACACTTCCGAGGGGTCTGGAACACAGTGTGTGACAGTGAGT
GGTACCCATCGGAGGCCAAGGTGCTCTGCCAGTCCTTGGGCTGTGGAAGTGC
GTTGAGAGGCCCAAGGGGCTGCCCCACTCCTTGTCCGGCAGGATGTACTACTC
ATGCAATGGGGAGGAGCTCACCTCTCCAAGTCTCCTGGCGGTTCAACAAGT
CCAACCTCTGCAGCCAGTCGCTGGCAGCCAGGGTCCTCTGCTCAGCTTCCCGG
AGTTTGCACAATCTGTCCACTCCCGAAGTCCCTGCAAGTGTTTCAGACAGTCACT
ATAGAATCTTCTGTGACAGTGAAAATAGAGAACAAGGAATCTCGGGAGGGAT
CAGGCCTGAATGACATCTTCGAGGCACAGAAAATCGAGTGGCATCACCATCAC
CATCACTAA

PRILOGA B: Nukleotidno zaporedje gena za protein Spa

CTTAAATTTTCAGCTCATCACCTTCACCTGCCTTGGTCATGGCTCTGCTATTCTCC
TTGATCCTTGCCATTTGCACCAGACCTGGATTCCCTGCGTCTCCATCTGGAGTGC
GGCTGGTGGGGGGCCTCCACCGCTGTGAAGGGCGGGTGGAGGTGGAACAGAA
AGGCCAGTGGGGCACCGTGTGTGATGACGGCTGGGACATTAAGGACGTGGCTG
TGTTGTGCCGGGAGCTGGGCTGTGGAGCTGCCAGCGGAACCCCTAGTGGTATT
TTGTATGAGCCACCAGCAGAAAAAGAGCAAAAGGTCCTCATCCAATCAGTCAG
TTGCACAGGAACAGAAGATAATTGGCTCAGTGTGAGCAAGAAGAAGTTTATG
ATTGTTACATGATGAAGATGCTGGGGCATCGTGTGAGAACCCAGAGAGCTCT
TTCTCCCCAGTCCCAGAGGGTGTGAGGCTGGCTGACGGCCCTGGGCATTGCAA
GGGACGCGTGGAAGTGAAGCACCAGAACCAGTGGTATAACCGTGTGCCAGACA
GGCTGGAGCCTCCGGGCCGCAAAGGTGGTGTGCCGGCAGCTGGGATGTGGGA
GGGCTGTACTGACTCAAAAACGCTGCAACAAGCATGCCTATGGCCGAAAACCC
ATCTGGCTGAGCCAGATGTCATGCTCAGGACGAGAAGCAACCCTTCAGGATTG
CCCTTCTGGGCCTTGGGGGAAGAACACCTGCAACCATGATGAAGACACGTGGG
TCGAATGTGAAGATCCCTTTGACTTGAGACTAGTAGGAGGAGACAACCTCTGC
TCTGGGCGACTGGAGGTGCTGCACAAGGGCGTATGGGGCTCTGTCTGTGATGA
CAACTGGGGAGAAAAGGAGGACCAGGTGGTATGCAAGCAACTGGGCTGTGGG
AAGTCCCTCTCTCCCTCCTTCAGAGACCGGAAATGCTATGGCCCTGGGGTTGGC
CGCATCTGGCTGGATAATGTTTCGTTGCTCAGGGGAGGAGCAGTCCCTGGAGCA
GTGCCAGCACAGATTTTGGGGGTTTCACGACTGCACCCACCAGGAAGATGTGG
CTGTCATCTGCTCAGGATAGTATCCTGGTGTGCTTGACCTGGCCCCCCTGGCC
CCGCCTGCCCTCTGCTTGTTCTCCT