

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Andreja ŠINK

**PRIPRAVA VIRUSOM PODOBNIH DELCEV Z
UPORABO BAKTERIJSKEGA EKSPRESIJSKEGA
SISTEMA**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Andreja ŠINK

**PRIPRAVA VIRUSOM PODOBNIH DELCEV Z UPORABO
BAKTERIJSKEGA EKSPRESIJSKEGA SISTEMA**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**PREPARATION OF VIRUS-LIKE PARTICLES IN BACTERIAL
EXPRESSION SYSTEM**

M. Sc. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje - Biotehnologija. Delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Slike s transmisijskim elektronskim mikroskopom so bile posnete na Nacionalnem inštitutu za biologijo, meritve diferenčne dinamične kalorimetrije so potekale na Biotehniški fakulteti, Univerza v Ljubljani.

Študijska komisija Študija biotehnologije je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Gregorja Anderluha in za recenzentko prof. dr. Natašo Poklar Ulrich.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Branka JAVORNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Nataša POKLAR ULRIH
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora: 10.9.2015

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

Andreja Šink

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 606:61:578.1:577.2(043.2)
KG	rekombinantni proteini/fuzijski proteini/virusom podobni delci/krompirjev virus Y/bakteriofag Q-beta/plaščni protein
AV	ŠINK, Andreja, dipl. bioteh. (UN)
SA	ANDERLUH, Gregor (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2015
IN	PRIPRAVA VIRUSOM PODOBNIH DELCEV Z UPORABO BAKTERIJSKEGA EKSPRESIJSKEGA SISTEMA
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP	XIII, 81 str., 14 pregl., 39 sl., 2 pril., 81 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Virusom podobni delci (VLP) so sestavljeni iz virusnih plaščnih proteinov in so po obliki podobni ali identični nativnim virusom. Pojavljo se v različnih oblikah in velikostih, zato je njihova uporaba zanimiva na mnogo področjih: znanost o materialih, elektronika, biotehnologija, medicina, biofarmacija, biologija... Najpomembnejši del študija uporabnosti VLP je poznавanje njihove zgradbe. Pri nekaterih vrstah virusov je le ta že dobro poznana. Poskušali smo opredeliti lastnosti VLP krompirjevega virusa Y (PVY), saj je njegova zgradba še neznana, poleg tega pa sam virus predstavlja vse večje nevšečnosti pri gojenju krompirja. PVY VLP smo izražali v bakterijskih celicah, postopki čiščenja in izolacije pa vključujejo ultracentrifugiranje z uporabo saharoznega gradiента. Za primerjavo med postopki gojenja, izražanja in čiščenja različnih VLP, smo pripravili tudi VLP bakteriofaga Q-beta. S pomočjo diferenčne dinamične fluorimetrije in diferenčne dinamične kalorimetrije smo ugotovili, da so PVY VLP precej stabilni, na njihovo stabilnost pa vplivata pH in ionska jakost. Merjenje velikosti delcev z metodo dinamičnega sisanja svetlobe pa se je izkazalo uspešno za globularne Q-beta VLP, ne pa tudi za nitaste zgradbe PVY VLP. Zanimal nas je vpliv tujega proteina na sestavljanje virusnega plaščnega proteina (CP) v VLP. Znano je že, da se PVY CP v fuziji z manjšimi proteini sestavijo v VLP, medtem ko izražanje CP v fuziji z zelenim fluorescenčnim proteinom le to onemogoča. V fuziji s PVY CP smo izrazili peptid melitin ter dva večja proteina ekvinatoksin II in ojačani rumeni fluorescenčni protein (eYFP). Da bi v prisotnosti PVY CP dosegli vgradnjo manjšega deleža fuzijskih CP v VLP, smo se odločili za sočasno izražanje obeh konstruktov. Analize s transmisijskim elektronskim mikroskopom kažejo, da v primerih sočasnega izražanja do sestavljanja VLP pride, vendar pa so delci precej krajši od nativnih. Z merjenjem fluorescence vzorcev z eYFP, smo dokazali, da je izraženi eYFP v fuziji s CP pravilno zvit in še vedno aktivен. S konfokalnim mikroskopom smo lahko opazovali razliko v razporejenosti fluorescenčnih molekul v različnih vzorcih, za prepoznavanje posameznih nitastih zgradb pa je ločljivost tega mikroskopa prenizka.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 606:61:578.1:577.2(043.2)
CX recombinant proteins/fusion proteins/virus-like particles/potato virus Y/bacteriophage Q-beta/capsid protein
AU ŠINK, Andreja
AA ANDERLUH, Gregor (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study in Biotechnology
PY 2015
TI PREPARATION OF VIRUS-LIKE PARTICLES IN BACTERIAL EXPRESSION SYSTEM
DT M.Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XIII, 81 p., 14 tab., 39 fig., 2 ann., 81 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Virus-Like particles (VLPs) are structures of self-assembled virus capsid proteins with highly related or identical structure to their corresponding native viruses. As they obtain many different shapes and sizes, they can be used in different fields of research: material science, electronics, biotechnology, medicine, biopharmacy, biology... In studying VLP applications, the most important thing is to know the structure of VLP. We tried to characterize VLP of Potato virus Y (PVY) since its structure is still unknown and moreover the virus itself is listed in top ten most important plant viruses. PVY VLP was expressed in bacteria and later purified by ultracentrifugation on sucrose density gradient. We also prepared VLPs of Q-beta bacteriophage to compare expression, isolation and purification procedures between different VLPs. Differential scanning fluorimetry and Differential scanning calorimetry showed that PVY VLPs are fairly stable. Major effects on stability were caused by different pH and ionic strength. Measuring particle size with Dynamic light scattering was successful only with Q-beta spherical particles, but not with PVY filamentous particles. We were interested in effects of foreign proteins on self-assembly of VLP. It has been already shown that PVY coat protein (CP) in fusion with smaller foreign sequences self-assembles in VLP but on the other hand assembly of CP in fusion with green fluorescent protein was disabled. We expressed PVY CP in fusion with peptide melittin (Mel) and two bigger proteins equinatoxin II (EqII) and enhanced yellow fluorescent protein (eYFP) respectively. Our aim was to produce particles with lower integration of fusion proteins in presence of PVY CP therefore we co-expressed both constructs simultaneously in bacteria. Analysis with transmission electron microscope showed assembled particles in co-expression samples, but length of particles was shorter than in samples with wild type structures. With fluorescence measurements we show that eYFP in fusion is correctly folded and still active. We could only observe distribution of fluorescent molecules under the confocal microscope as the resolution is too low to distinguish individual filamentous structures.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI NALOGE	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 KROMPIRJEV VIRUS Y	3
2.1.1 PVY virusom podobni delci	6
2.2 BAKTERIOFAG Q-BETA	10
2.2.1 Q-beta virusom podobni delci	11
2.3 POTENCIALNE APLIKACIJE VLP	11
2.3.1 VLP pri produkciji cepiv	11
2.3.2 Ostale aplikacije	14
2.4 SOČASNO IZRAŽANJE PODENOT PROTEINSKIH KOMPLEKSOV	16
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Kemikalije	18
3.1.2 Kompleti kemikalij	18
3.1.3 Laboratorijska oprema	19
3.1.4 Gojišča	20
3.1.5 Bakterijski sevi	20
3.1.6 Plazmidi	20
3.1.7 Encimi	20
3.1.8 Protitelesa	21
3.2 METODE	21
3.2.1 Načrt izražanja nativnih in fuzijskih plaščnih proteinov	21
3.2.2 Priprava genov za plaščni protein in fuzijskih proteinov	22
3.2.3 Priprava plazmidov z genskimi konstrukti	26

3.2.4 Transformacija celic, gojenje celic v erlenmajericah in izražanje proteinov.....	30
3.2.5 Izolacija in čiščenje VLP	33
3.2.6 Metode za opredelitev lastnosti VLP	36
4 REZULTATI Z RAZPRAVO	45
4.1 PRIPRAVA KONSTRUKTOV	45
4.1.1 Konstrukti v plazmidu pET28a.....	45
4.1.2 Ko-transformacija plazmidov pET28a in pET7-7 v bakterijske celice	47
4.1.3 Priprava plazmidov pT7-7 s konstrukti in dodatnim RBS mestom	47
4.2 IZRAŽANJE PROTEINOV V CELICAH <i>E.COLI</i>	48
4.3 ČIŠČENJE IN IZOLACIJA VLP	50
4.4 OPREDELITEV LASTNOSTI VLP	52
4.4.1 NaDS-PAGE in Western prenos za izolirane VLP.....	52
4.4.2 Dinamično sipanje svetlobe	53
4.4.3 Modra nativna elektroforeza	55
4.4.4 Spremljanje termične stabilnosti PVY VLP	55
4.4.5 UV-VIS spektrometija.....	61
4.4.6 Fluorescenca VLP z vključenim eYFP	64
4.4.7 Transmisijska elektronska mikroskopija.....	66
4.4.8 Predvideni model prostorske zgradbe PVY CP	69
5 SKLEPI	72
6 POVZETEK	74
7 VIRI	75
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Gojišča uporabljeni za gojenje bakterijskih kultur	20
Preglednica 2: Seznam začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabljali pri delu	23
Preglednica 3: Potek PCR reakcije pri pomnoževanju fragmentov eYFP, EqtII in Mel.....	25
Preglednica 4: Pregled uporabljenih koncentracij saharoze	34
Preglednica 5: Pogoji za inkubacijo PVY VLP pri spremembi zgradbe	40
Preglednica 6: Predvidene velikosti konstruktov za fuzijske proteine po izpostavitvi restrikcijskim encimom.....	45
Preglednica 7: Dolžina plazmida pET28a in končnih vključkov (restrikcija s <i>HindIII</i> in <i>NcoI</i>)	47
Preglednica 8: Velikosti plazmida pT7-7 in končnih vključkov izpostavljenih restrikcijskima encimoma <i>NdeI</i> in <i>HindIII</i>	48
Preglednica 9: Označevanje vzorcev fuzijskih PVY VLP	49
Preglednica 10: Zbrani rezultati DLS meritev za Q-beta VLP, PVY VLP inkubirane v različnih pogojih in PVY VLP v fuziji	54
Preglednica 11: Z DSC izmerjeni Tm prehodi in izračunane entalpije za vzorca s PVY VLP.....	58
Preglednica 12: Zbrane Tm vrednosti VLP po metodah DSF in DSC.....	59
Preglednica 13: Razmerje absorbanc valovnih dolžin A260/A280.....	63
Preglednica 14: Dolžina in širina nitk VLP ter premer agregatov, izmerjeni s TEM.	67

KAZALO SLIK

str.

Slika 1: Genom PVY (Karasev in Gray, 2013) (A) in fleksibilni delci PVY v uranil-formatu (Delgado-Sanchez in Grogan, 1970) (B).....	3
Slika 2: Simptomi na krompirju po okužbi s PVY (Karasev in Gray, 2013).....	6
Slika 3: Potek zlaganja monomernih CP v nitaste zgradbe v ali brez prisotnosti RNA (McDonald in Bancroft, 1977).	9
Slika 4: Oblika plašča bakteriofaga Q-beta (Enterobacteria..., 2004) (A) in shema njegovega genoma (števila označujejo bazne pare) (van Duin, 1988) (B).....	10
Slika 5: Trenutni delež zdravil na podlagi VLP, ki so v kliničnih testiranjih (Rodríguez-Limas in sod., 2013).	14
Slika 6: Spominska naprava na podlagi CPMV (Blum in sod., 2007).	15
Slika 7: Shema detekcije na DNA mikromreži (Soto in sod., 2006).....	16
Slika 8: Shema izražanja različnih CP v bakterijskih celicah	22
Slika 9: Shematski prikaz genskih konstruktov vstavljenih v plazmid pET28a za izražanje fuzijskih proteinov	27
Slika 10: Shematski prikaz genskih konstruktov z dodatnim RBS mestom v plazmidu pT7-7	29
Slika 11: CD spekter treh različnih proteinov, vsak s prevladujočim tipom sekundarne zgradbe (Wallace in Janes, 2009: 10).....	37
Slika 12: Sipanje laserskih žarkov, ko prehajajo skozi raztopino delcev (Zetasizer ..., 2013).....	39
Slika 13: Potek termične denaturacije proteina pri metodi DSF (Ligand Screening ..., 2015).....	41
Slika 14: Agarozna gelska elektroforeza fragmentov PVY (1), eYFP (2), EqtII (3) in Mel (4) po izpostavitvi restriktijskim encimom.....	45
Slika 15: Agarozna gelska elektroforeza pri poskusu ligacije zaporedja za PVY CP s fuzijskim proteinom.	46

Slika 16: Gelska agarozna elektroforeza z izolirani plazmidi pET28a s posameznimi vključki: Mel-PVY (A), EqtII-PVY (B) in eYFP-PVY (C) iz posameznih kolonij transformiranih celic.....	46
Slika 17: Gelska agarozna elektroforeza: preverjanje prisotnosti plazmida pET28a in pT7-7 v vzorcih celic po ko-transformaciji.....	47
Slika 18: Preverjanje velikosti plamidov pT7-7 z vstavljenimi inserti na agarozni gelski elektroforezi.....	48
Slika 19: NaDS-PAGE gel celičnih lizatov pri izražanju Q-beta in PVY VLP.....	49
Slika 20: NaDS-PAGE gel vzorčkov pri izražanju fuzijskih PVY VLP.....	50
Slika 21: NaDS-PAGE geli vzorcev z nativnimi PVY in Q-beta VLP iz frakcij po ultracentrifugiranju.....	50
Slika 22: NaDS-PAGE geli vzorcev s fuzijskimi CP v frakcijah po ultracentrifugiranju ..	51
Slika 23: NaDS-PAGE gel (A) in membrana po Western prenosu (B) koncentriranih vzorcev PVY ter NaDS-PAGE gel koncentriranega vzorca Q-beta (C).....	53
Slika 24: Q-beta (A) in PVY (B) VLP glede na velikost premera, merjeno z DLS.....	54
Slika 25: BN-PAGE gel vzorcev s PVY VLP v različnih pogojih.....	55
Slika 26: Cirkularni dikroizem PVY VLP. Spreminjanje CD spektra glede na temperaturo (A). CD pri valovni dolžini 208 nm glede na temperaturo (B).	56
Slika 27: Potek denaturacije nativnih in fuzijskih VLP v PBS ali fosfatnem pufru z DSF metodo.....	57
Slika 28: Termogrami VLP dobljeni z DSC metodo.....	58
Slika 29: Toplotna denaturacija PVY VLP z DSF metodo pri različnih koncentracijah NaCl.....	60
Slika 30: Temperaturna denaturacija PVY VLP z DSF metodo pri različnih pH.....	61
Slika 31: Primerjava absorpcijskih spektrov vzorcev s PVY VLP izmerjena na UV-VIS spektrofotometru (polna črta) in Nano Drop 1000 (prekinjena črta)..	62
Slika 32: Primerjava absorpcijskih spektrov VLP v nativni obliki in denaturiranih z DTT in SDS.....	63

Slika 33: Gelska agarozna elektroforeza končnega vzorca Q-beta.....	64
Slika 34: Fluorescenčni emisijski spektri vzorcev z nativnimi in fuzijskimi PVY CP po vzbujanju pri 490 nm.....	65
Slika 35: PVY VLP označen s fluorescenčno značko in vzorci s CP v fuziji z eYFP, slikano s konfokalnim mikroskopom.....	65
Slika 36: Vzorci s PVY CP in fuzijskimi PVY CP posneti s transmisionskim elektronskim mikroskopom.....	66
Slika 37: Zgradba PVY VLP (A), nativnega virusa PVY (B) in vzorca ReYFP (C).....	68
Slika 38: Slike različnih vzorcev posnete s transmisionskim elektronskim mikroskopom.. .	69
Slika 39: Predikcija sekundarne in terciarne zgradbe PVY CP (I-TASSER ..., 2015).....	70

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Standardi znanih molekulskih mas uporabljeni pri NaDS-PAGE, BN-PAGE
ali Western prenosu

PRILOGA B: Dolžinski standardi uporabljeni pri gelski agarozni elektroforezi.

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A β	amiloid beta
Ala	alanin
Asp	aspartat
Bis-Tris	2,2-bis(hidroksietil)-imino-tris(hidroksimetil)-metan
bp	bazni par
CaCl ₂	kalcijev klorid
CASP	Critical assessment of protein structure prediction
CCMW	virus klorotične pegavosti črnega fižola
CD	circularni dikroizem
CI	ovalno vključitveno telesce (angl. Cylindrical inclusion body)
CMV	virus mozaika kumar (angl. Cucumber mosaic virus)
CP	plaščni protein (angl. Coat protein)
CPMW	virus mozaika črnega fižola (angl. Cowpea mosaic virus)
DLS	dinamično sisanje svetlobe (angl. Dynamic light scattering)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksiribonukleotid
DSC	diferenčna dinamična kalorimetrija (angl. Differential scanning calorimetry)
DSF	diferenčna dinamična fluorimetrija (angl. Differential scanning fluorimetry)
DTT	ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	etenilen diamin tetraacetna kislina
EqtII	ekvinatoksin II
EtBr	etidijev bromid
eYFP	ojačani rumeni fluorescenčni protein (angl. Enhanced yellow fluorescent protein)
g	relativna centrifugalna sila (angl. Relative centrifugal force)
GFP	zeleni fluorescenčni protein
GLB	zeleni nanašalni pufer (angl. Green loading buffer)
Gly	glicin
HBV	virus hepatitisa B
HC-Pro	proteaza s pomožno komponento (angl. Helper component protein)
HPV	humani papiloma virus
IPTG	izopropil β -D-tiogalaktozid
kDa	kilo Dalton

Mab	monoklonska protitelesa
Mel	melitin
MgCl ₂	magnezijev klorid
MQ	posebej čista, filtrirana in deionizirana voda (Milli-Q)
MRE	povprečna molarna eliptičnost aminokislinskega ostanka (angl. Mean residue ellipticity)
MWCO	velikost delcev ki ne preidejo več skozi membrano (angl. Molecular weight cut off)
NaCl	natrijev klorid
NaDS	natrijev dodecilsulfat
NaDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS
Nla	jedrni vključitveni protein a (angl. Nuclear inclusion protein a)
Nlb	jedrni vključitveni protein b (angl. Nucleasr inclusion protein b)
PapMV	virus mozaika papaje (angl. Papaya mosaic virus)
PBS	fosfatni pufer s soljo
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction)
PDB	Protein Data Bank
Pdl	indeks polidisperznosti
preS1	epitop HBV, aminokisline 20-41
PVX	krompirjev virus X (angl. Potato virus X)
PVY	krompirjev virus Y (angl. Potato virus Y)
RBS	mesto za vezavo ribosoma (angl. Ribosome binding site)
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. Real-time polymerase chain reaction)
sec	sekunda
sfGFP	super-zvita oblika zelenega fluorescenčnega proteina (angl. Superfolder variant of green fluorescent protein)
TBS	Tris pufer s soljo
TBSV	virus razraščanja in pritlikavosti paradižnika (angl. Tomato bushi stunt virus)
TEM	presevni elektronski mikroskop (angl. Transmission electron microscope)
Tm	temperatura denaturacije
TMV	virus mozaika tobaka (angl. Tobacco mosaic virus)
U	enote (angl. Units)
UV	ultravijolično
VLP	virusom podobni delec (angl. Virus-like particle)
VPg	Na genom vezani virusni protein (angl. Viral genome linked protein)
vrt./min	vrtljaji na minuto

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Virusom podobni delci (VLP) so sestavljeni iz virusnih plaščnih proteinov in so po obliki podobni ali identični nativnim virusom. Ne vsebujejo virusnega genetskega materiala, zato so neinfektivni in nezmožni razmnoževanja. Zaradi različnih oblik in velikosti v katerih se pojavljajo, se njihova uporabnost preučuje na mnogih področjih: biotehnologija, elektronika in znanost o materialih (sinteza nano-kompozitov, prevodne nano-cevke, spominske naprave, mikro-baterije), medicina in biofarmacija (cepiva, dostavni sistemi), biologija (biosenzorji, opredelitev virusnih lastnosti, pakiranje bioloških molekul), itn. Razvijanje in odkrivanje novih lastnosti VLP največkrat poteka s kemijsko modifikacijo ali genskim inženiringom. Zgradba VLP mora biti zato zelo dobro poznana, pri fleksibilnih nitastih virusih pa je poznavanje zgradbe največkrat pomanjkljivo. Po skoraj 60 letih raziskav še vedno nimamo na razpolago strukturnih informacij z visoko ločljivostjo o nitastih rastlinskih virusih v obliki vijačnice (Ksenofontov in sod., 2013). Kristalna zgradba nekaterih rastlinskih globularnih virusov je zelo dobro poznana, zato se le ti večkrat pojavljajo med modeli za nove aplikacije: virus mozaika kumar (angl. Cucumber mosaic virus, CMV), virus klorotične pegavosti črnega fižola (angl. Cowpea chlorotic mottle virus, CCMV), virus mozaika črnega fižola (angl. Cowpea mosaic virus, CPMV)... Zelo dobro sta poznana zgradba in način sestavljanja paličastega virusa mozaika tobaka (angl. Tobacco mosaic virus, TMV). Na prvi pogled sta si obliko TMV in krompirjevega virusa Y (PVY) precej podobni, vendar pa so virusi TMV precej bolj rigidni in krajsi od dolge nitaste in fleksibilne zgradbe PVY. Nekoliko bolje so bile opredeljene lastnosti zgradbe dveh nitastih virusov: krompirjevega virusa X (angl. Potato virus X, PVX) in virusa mozaika soje (angl. Soybean mosaic virus, SMV). Zgradba nitastih virusov nizke resolucije se določa s pomočjo metod difrakcije rentgenskih žarkov (angl. Fiber diffraction), krio-elektronske mikroskopije in vrstične elektronske mikroskopije (Kendall in sod., 2008). Do sedaj je bila določena kristalna zgradba le enega plaščnega proteina (angl. coat protein, CP) nitastega virusa in sicer zgradba CP virusa mozaika papaje (angl. Papaya mosaic virus, PapMV) (Yang in sod., 2012).

V magistrski nalogi smo poskušali opredeliti nekatere biokemijske in fizikalne lastnosti PVY VLP, iz katerih se lahko posredno sklepa o določenih lastnostih zgradbe delcev.

1.2 CILJI NALOGE

Pripravili smo sestavljene PVY in Q-beta virusom podobne delce. Izražanje je potekalo v bakterijskih celicah *E. coli*. Želeli smo vzpostaviti čim bolj enoten protokol izolacije in čiščenja različnih vrst VLP, ki bi omogočal produkcijo čistih in homogenih VLP v zadostnih količinah. Zgradba PVY VLP še ni poznana, zato smo opredelili njegove

biokemijske in fizikalne lastnosti. Velikosti CP oz. VLP smo spremljali z modro nativno elektroforezo in dinamičnim sipanjem svetlobe (DLS), velikost denaturiranih CP pa smo spremljali s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (NaDS-PAGE). Z western prenosom smo identificirali prisotnost PVY v vzorcu. Temperaturno stabilnost zgradbe PVY VLP smo merili s spremjanjem temperature med merjenjem cirkularnega dikroizma (CD) ter z diferenčno dinamično kalorimetrijo (DSC) in diferenčno dinamično fluorimetrijo (DSF). Pri slednji smo spremljali tudi vpliv različnih pH in ionske jakosti na terciarno in kvartarno zgradbo delcev.

Glavni cilj drugega dela naloge je bil priprava PVY VLP, ki na površini izražajo tuj peptid ali protein. Izvedli smo fuzijo CP z melitinom (Mel), ekvinatoksinom II (EqtII) in ojačanim rumenim fluorescenčnim proteinom (eYFP). Verjetnost sestavljanja fuzijskih CP v VLP smo povečali s sočasnim izražanjem fuzijskih in PVY CP v bakterijah. Z merjenjem fluorescence na fluorimetru smo preverjali aktivnost eYFP v fuziji. Izmerili smo absorpcijske spekture različnim VLP v nativni in denaturirani obliki. S transmisijskim elektronskim mikroskopom in konfokalnim mikroskopom pa smo analizirali dejansko sestavljanje delcev.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

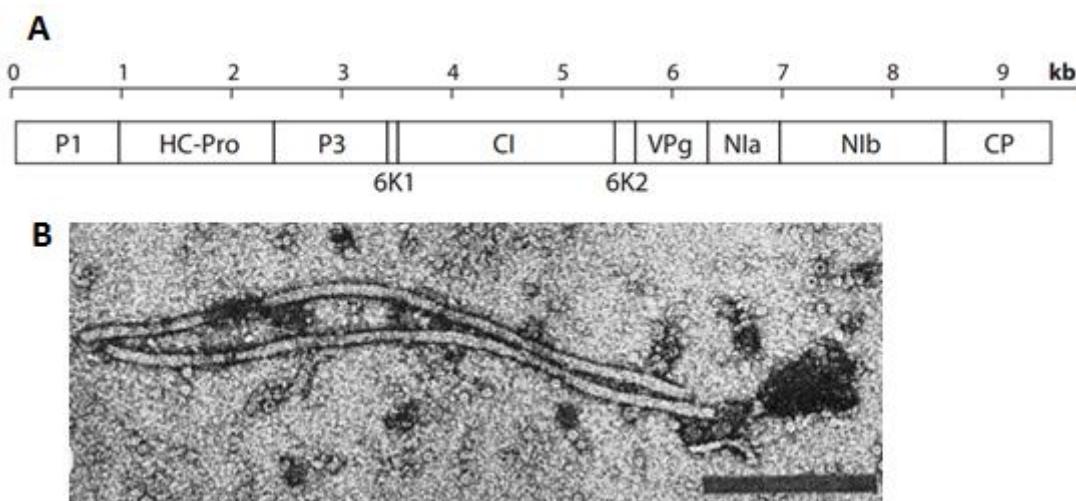
- VLP se sestavijo že med izražanjem v gostiteljskih celicah in bodo po obliki enaki nativnim virusom. Virusne komponente nativnega virusa se med infekcijo samo-sestavijo znotraj gostiteljske celice v aktivni virus. Predvidevamo, da se bodo tudi PVY in Q-beta CP med izražanjem sestavili v organizirano zgradbo VLP v odsotnosti virusne DNA.
- Temperatura, pH in ionska jakost vplivajo na stabilnost zgradbe PVY VLP. Inaktivacija nativnega PVY poteče pri 54-60 °C. Predvidevamo, da pri tej temperaturi tudi VLP ne bodo več stabilni. V primeru, da virusna RNA dodatno stabilizira virion, bodo VLP nestabilni že pri nižjih temperaturah. Ekstremni pH vpliva na strukturne spremembe VLP, kar povzroči razpad na monomere. Ionska jakost lahko vpliva na elektrostatske sile znotraj proteina. Sprememba ionske jakosti bo zato zmanjšala ali povečala stabilnost VLP.
- Prisotnost nativnih in fuzijskih PVY CP med izražanjem omogoča sestavljanje VLP z vključenimi fuzijskimi podenotami. V predhodnih študijah so pokazali, da vezava proteina z večjo molekulsko maso na virusni CP onemogoča sestavljanje VLP. Predvidevamo, da prisotnost nativnih in fuzijskih CP sproži tekmovanje za vgradnjo obeh vrst podenot v VLP. Z manjšim deležem vgrajenih fuzijskih CP pa sestavljanje VLP ne bo popolnoma onemogočeno.

2 PREGLED OBJAV

2.1 KROMPIRJEV VIRUS Y

Krompirjev virus Y je fleksibilni nitasti virus, ki ga uvrščamo v družino Potyviridae iz rodu *Potyvirus*. Scholthof in sod. (2011) so ga uvrstili med prvih deset najpomembnejših rastlinskih virusov, glede na znanstveni in ekonomični pomen. Virus se med rastlinami prenaša preko listnih uši, zato je njegov nadzor zelo zahteven. Poleg tega je prisoten v mnogo različicah, ki imajo zelo variabilno stopnjo virulence. Največ škode povzroči na krompirju, lahko pa okuži tudi tobak, paradižnik in papriko (Scholthof in sod., 2011).

Virusni genom sestavlja enoverižna pozitivno smiselna RNA molekula, dolga približno 9,7 kb (Berger in sod., 2005). Na 5' koncu ima kovalentno pritrjen na genom vezan virusni protein (angl. Viral genome linked protein, VPg), na 3' koncu pa ima poli(A) repek. Obe končni strukturi imata vlogo pri zaščiti in podvojevanju genoma ter regulaciji izražanja genoma. Med izražanjem genoma se sintetizira en sam dolg poliprotein, ki ga kasneje tri virusno-specifične proteaze razrežejo na 10 zrelih proteinov (slika 1A). Na C-koncu je kodiran edini plaščni protein PVY virusa, ki je dolg 167 aminokislin. Sestavljeni CP obdajajo virusno RNA in skupaj tvorijo podolgovate delce v obliki vijačnice, ki so v povprečju dolgi 740 nm in široki 11 nm (Karasev in Gray, 2013).



Slika 1: Genom PVY (Karasev in Gray, 2013) (A) in fleksibilni delci PVY v uranil-formatu (Delgado-Sanchez in Grogan, 1970) (B). Merilo predstavlja 200 nm.

Genom PVY kodira 10 različnih proteinov (povzeto po Urcuqui-Inchima in sod., 2001): Protein P1 (prvi protein, angl. First protein) se nahaja na N-koncu virusnega poliproteina. Kodira serinski tip proteaze, ki sama sebe odcepi od poliproteina. Analize delečij in mutacij so pokazale, da P1 ni nujno potrebna za infektivnost virusa, spodbuja pa njegovo razmnoževanje in premikanje po rastlini.

Naslednji protein na genomu je HC-Pro (proteaza s pomožno komponento, angl. Helper component protein), od katerega je odvisno širjenje virusa z listnimi ušmi. Del proteina na N-koncu se pripne na sesalo uši, drugi del proteina pa reagira z Asp-Ala-Gly motivom na virusnem CP. Poleg prenosa preko uši ima HC-Pro tudi funkcijo pri razmnoževanju, premikanju virusa med celicami in obrambi pred rastlinsko protivirusno zaščito. Jin in sod. (2007) so pokazali, da HC-Pro z vezavo na podenote PAA, PBB in PBE *Arabidopsis* 20S proteasoma zavira utišanje oz. razgradnjo virusne RNA, s katerim se rastlina zavaruje pred virusi.

Protein P3 (tretji protein, angl. Third protein) je najmanj raziskan protein PVY virusa. Običajno je vezan s peptidom 6K1 (prvi 6 kDa velik protein, angl. First 6 kDa protein). Sta edina proteina PVY, ki nimata afinitete do vezave RNA. Na razmnoževanje virusa vplivata preko interakcije z ovalnim vključitvenim proteinom, poleg tega vplivata na pojav bolezenskih simptomov pri rastlinah.

Glavni nalogi proteina CI (ovalni vključitveni protein, angl. Cylindrical inclusion protein) sta ATPazna in RNA helikazna aktivnost. Ima dve vezavni mesti za RNA, ki omogočata razvijanje RNA. Z razgradnjo ATP molekul najverjetneje pomaga tudi pri pomnoževanju virusne RNA in posredno pri premikanju virusa skozi plazmodezme.

Peptid 6K2 (drugi 6 kDa velik protein, angl. Second 6 kDa protein) ima centralno hidrofobno domeno, s katero se veže na membrane. Med pomnoževanjem virusnega genoma zasidra pomnoževalni kompleks na membrane podobne endoplazmatskemu retikulumu. 6K2 se lahko veže na membrane le v kompleksu z VPg, jedrnim vključitvenim proteinom ali celo večjim poliproteinom.

Protein NIa (jedrni vključitveni protein a, angl. Nuclear inclusion protein a) je sestavljen iz dveh domen: na N-koncu je VPg domena, na C-koncu pa proteaza (NIa-Pro). NIa je glavna proteaza PVY, saj cepi poliprotein na funkcionalne proteine. Procesiranje poliproteina je kontroliran proces, saj se različna mesta cepijo le ob določenem času. Največkrat se skupaj z jedrnim vključitvenim proteinom b nahajata v inkluzijskih telescih v jedru okuženih celic. VPg je preko hidroksilne skupine tirozina kovalentno vezan na končni adenin virusne RNA. To povzroči, da je 5' konec RNA izpostavljen zunaj virusnega plašča in na voljo pozitivno in negativno smiselnemu pomnoževanju RNA. VPg ima afiniteto do nekaterih gostiteljevih proteinov, kar lahko sproži prevajanje virusnega genoma. Sodeluje tudi pri premikanju virusa.

Protein NIb (jedrni vključitveni protein b, angl. Nuclear inclusion protein b) tvori vključke v jedra okuženih rastlin, med pomnoževanjem virusnega genoma pa sodeluje s pomnoževalnimi kompleksi.

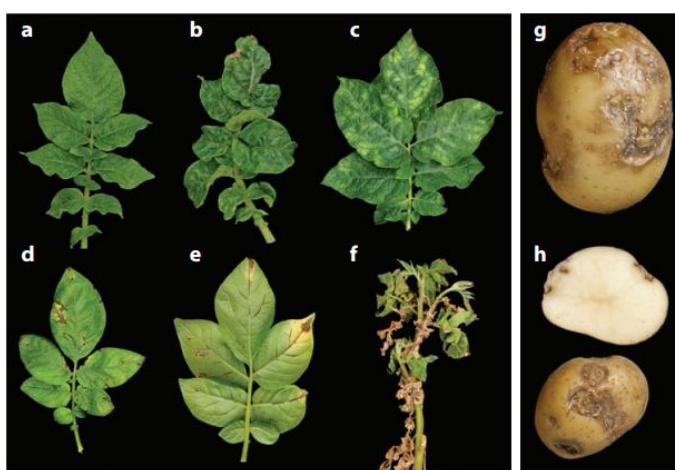
Plaščni protein lahko razdelimo na tri dele: variabilna N- in C- konca, ki sta izpostavljena na površini delca in sta občutljiva na blago delovanje tripsina, ter bolj ohranjeno centralno domeno. N-končna domena nosi največ virusno-specifičnih epitopov. CP ima več funkcij:

- Prenos virusa preko uši: na N-končnem delu se nahaja pri potivirusih zelo ohranjeno zaporedje Asp-Ala-Gly, ki je odgovorno za prenos virusa. Točkovne mutacije znotraj tega zaporedja ali določene spremembe aminokislin v bližini so povzročile izgubo ali veliko zmanjšanje sposobnosti prenosa. Za uspešen prenos mora priti do sestave kompleksa HC-Pro–CP.
- Premikanje med celicami in sistematski premiki: s pomočjo mutacij določenih delov CP, so ugotovili, da je centralna domena odgovorna za premikanje virusa med celicami, obe končni domeni pa sta odgovorni za sistemske premike.
- Enkapsidacija virusne RNA je glavna naloga CP, za to pa je potrebna le centralna domena (delecija 17 aminokislin na C-terminalnem delu ni imela vpliva na sestavljanje). CP in RNA se znotraj viriona stikata in tvorita kontakte, ki omogočajo sestavljanje in stabilnost delca.
- Regulacija pomnoževanja virusne RNA: pomnoževanje je regulirano preko interakcije proteinov CP in NIb. Poleg tega naj bi se eno ali več *cis*-RNA zaporedij, ki kontrolirajo pomnoževanje genoma, nahajalo znotraj zaporedja za CP, med kodonoma 211 in 246. To nakazuje na posebno obliko sekundarne ali terciarne zgradbe, ki lahko reagira z virusnimi ali gostiteljevimi komponentami.

PVY je znani po zelo variabilnem genomu, ki je rezultat rekombinacij in mutacij. Zato iz virusa izhaja velik nabor različic, ki lahko preživijo v različnih gostiteljih in različnih okoljih. V preteklosti so bili sevi PVY opredeljeni glede na simptome povzročene na tobaku in hipersenzitivni odgovor, ki so ga sprožili pri nekaterih sortah krompirja s specifičnimi *N* geni. PVY seve v tem primeru delimo na različice PVY^N, PVY^O, PVY^Z, PVY^E in PVY^C (Singh in sod., 2008). Kasneje, ob razvoju hibrodomske tehnologije, so PVY sevi postali predmet serološke tipizacije. Z monoklonskimi protitelesi (MAb) se lahko razlikuje med posameznimi različki znotraj PVY^N in PVY^O skupin, nekatera MAb pa so postala tudi komercialno dostopna (Gutiérrez-Aguirre in sod., 2014; Nikolaeva in sod., 2012). Od konca 80-ih let se je z razvojem tehnik določanja nukleotidnih zaporedij in napredkov v molekularni rastlinski virologiji, omogočilo karakerizacijo PVY na področju virusnega genoma. V začetku 21. stoletja je postalo jasno, da je veliko PVY različic nastalo z rekombinacijo med PVY^O in PVY^N (Karasev in Gray, 2013).

PVY lahko pri krompirju izzove različne bolezni, ki jih delimo na bolezni listja in bolezni gomolja. Izgled simptomov in intenzivnost bolezni je odvisen od sorte krompirja, seva

PVY, okoljskih pogojev in tipa okužbe. Bolezni listov so lahko mozaik, izkrivljanje listov, nekrotične reakcije in upadanje listov. Nekateri sevi PVY so sposobni izzvati simptome na gomolju dovezetnih sort, kjer povzročijo bolezen obročaste nekroze (angl. Potato tuber necrotic ringspot disease, PTNRD) (Karasev in Gray, 2013). PVY vpliva na produkcijo krompirja na dva načina: pridelek krompirja je lahko zmanjšan za 40-70 %, če pa se pojavi bolezen direktno na gomolju, je pridelek popolnoma neprimeren za prodajo (Romancer in sod., 1994; Nolte in sod., 2004). Najboljša strategija za izogibanje okužbi s PVY je omejevanje vnosa inokuluma v novo letino s sajenjem neokuženega krompirja. Največjo nevarnost za vnos inokuluma na njive predstavlja posaditev že okuženih gomoljev ali ostanki okuženih gomoljev iz predhodne letine (Karasev in Gray, 2013).



Slika 2: Simptomi na krompirju po okužbi s PVY. Mozaik (a); izkrivljanje listov (angl. Rugose mosaic) (b); mozaik, klorotične lise (c); nekrotične poškodbe in nekroza žil na zgornji strani lista (d) in spodnji strani lista (e); nekroza na zgornjih listih, upadanje listov (f); napredna faza PTNRD (g); pozna faza PTNRD, poškodbe so vidne tudi pod kožo krompirja (h) (Karasev in Gray, 2013)

2.1.1 PVY virusom podobni delci

Rastlinski virusi so pri sesalcih ne-infektivni, zato so neprimerni za direktno pripravo cepiv v zdravstvene namene. Vendar pa se lahko umetno pripravljeni rastlinski VLP uporabijo kot nosilci tujih amino kislinskih zaporedij (imunoloških epitopov), ki so izpostavljeni na površini delca (Kalnciema in sod., 2012). Strukturni geni rastlinskih virusov so se že izkazali kot zelo učinkoviti pri konstrukciji nosilcev za tuje epitope. Različna kandidatna cepiva so bila pridobljena s kloniranjem zaporedij na CP gene rastlinskih virusov kot so TMV, CPMW, virus razraščanja in pritlikavosti paradižnika (angl. Tomato bushy stunt virus, TBSV), CMV, PVX, PapMV in drugih (Zeltins, 2009).

Podobno kot pri drugih nitastih virusih, kristalna zgradba PVY še ni pojasnjena, zato je težko predvideti regije, ki so izpostavljene na površini virusa in primerne za pripenjanje

tujih zaporedij. Kalnciema in sod. (2012) so uspeli na PVY CP klonirati 71 aminokislin dolgo zaporedje, pri katerem so CP v fuziji še vedno tvorili dolge nitaste zgradbe. PVY VLP izgledajo morfološko podobno kot nativni PVY virioni. Dolge in fleksibilne nitaste zgradbe imajo premer približno 11 nm in so različnih dolžin, od 30 do 2200 nm, v povprečju pa so dolge 400-800 nm. Presenetljivo lahko rekombinantni PVY CP tvori delce daljše od nativnih PVY virionov.

Podaljševanje CP s tujimi zaporedji bi lahko preprečilo sestavljanje v VLP. Da bi zmanjšali vpliv dodatnih zaporedij na virusne zgradbe, se med obe zaporedji vnese krajše zaporedje s polarnimi aminokislinsnimi, imenovano povezovalec. Kalnciema in sod. (2012) so uporabili povezovalec dolg 17 aminokislin ($G_4S)_3$. Pri testnem kloniranju so na N- oz. C-konec PVY CP pripeli le ($G_4S)_3$ in opazovali spremembe pri tvorjenju VLP. Analize z uporabo elektronskega mikroskopa so pokazale, da 17 aminokislin dolgo zaporedje na N-koncu PVY CP ne moti sestavljanja v VLP, medtem ko se je pri vzorcu z zaporedjem na C-koncu, večina proteinov nahajala v obliki agregatov in le majhen delež v obliki krajsih nitastih zgradb. Iz teh rezultatov je razvidno, da že krajše dodatno zaporedje na C-koncu PVY CP drastično zmanjša sestavljanje v VLP, zato ta način kloniranja ni primeren za pridobitev PVY platforme.

CP s povezovalcem na N-koncu so se normalno sestavili v VLP, zato so Kalnciema in sod. (2012) na povezovalec pripeli še zaporedje epitopa virusa hepatitis B (HBV) preS1 in ustvarili konstrukt PVYCP-($G_4S)_3$ -preS1. Tudi ti delci so bili pravilnih nitastih oblik. Na CP so brez posledic za zgradbo VLP uspeli pripeti tudi rubredoksin s 54 aminokislinsnimi, medtem ko fuzija z GFP ni bila uspešna, saj se VLP v tem primeru niso tvorili. Ugotovili so, da 71 aminokislin (skupna dolžina povezovalca in rubredoksa) še ne vpliva na sestavljanje CP, molekula v velikosti GFP pa je prevelika in onemogoča tvorbo VLP.

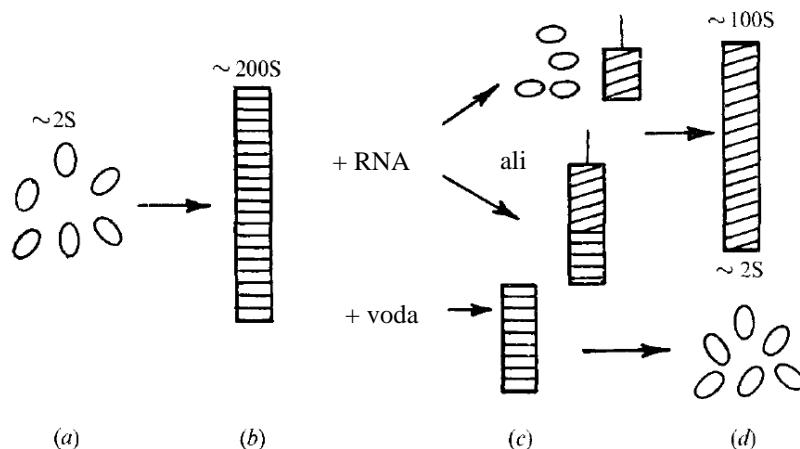
Z masno spektrometrijo (MS) je bila izmerjena molekulska masa PVY CP, in sicer 29,9 kDa. Kljub obsežnemu čiščenju PVY CP vzorca, je z metodama NaDS-PAGE in MS v vseh vzorcih še vedno opaziti dodaten krajiški protein z molekulsko maso 26,4 kDa. Ti skrajšani proteini so v vseh primerih približno enako veliki (pri izražanju nativnih PVY CP ali CP v fuziji), medtem ko se velikost ne-procesiranega CP na N-koncu spremeni za velikost tujega pripetega aminokislinskega zaporedja. Kalnciema in sod. (2012) iz tega predpostavlja, da prihaja do specifičnih cepitev CP na N-koncu. Skrajšani protein je glede na molekulsko maso za približno 42 aminokislin krajiški od nativnega PVY CP, kar ravno ustreza dolžini dela na N-koncu nativnega CP, ki je še odporen proti tripsinu (Shukla in sod., 1988). Skrajšani CP je verjetno posledica prisotnosti bakterijskih tripsinu podobnih encimov med izražanjem proteina (Kalnciema in sod., 2012).

V prisotnosti visokih koncentracij soli in EDTA ter v raztopinah z ekstremnimi pH je opazen razpad PVY VLP kompleksa na monomere. To nakazuje pomembno vlogo ionskih

interakcij med CP podenotami in verjetno med CP in nukleinskimi kislinami. V prisotnosti EDTA izginejo agregirane zgradbe, kar je lahko posredni pokazatelj, da imajo vlogo pri stabilizaciji VLP bi-valentni ioni. Smiselno je predvidevati, da je VLP pri določenih pogojih možno razstaviti in ponovno sestaviti skupaj, tako da se vanje zapakira eksogeni material, npr.: nabiti polimeri, nukleinske kisline ali spojine z nizko molekulsko maso (Kalnciema in sod., 2012).

PVY VLP imajo stabilno zgradbo do 57 °C, kar sovpada s temperaturo inaktivacije nativnih PVY virionov (50-64 °C). PVY v fuziji s HBV preS1 je nekoliko manj stabilen, vendar še vedno vzdrži fiziološke pogoje (denaturacija poteče pri 45-50 °C), kar pomeni zadostno stabilnost za različne aplikacije (Kalnciema in sod., 2012).

McDonald in sod. (1976) so disociacijo PVY dosegli z dodatkom 4 M LiCl in zamrzovanjem VLP ali z dodatkom 4 M CaCl₂ in inkubacijo na 4 °C. Disociirani proteini se po dializi v fosfatni pufer pH 6-9 ponovno sestavijo v nitaste zgradbe. Premer ponovno sestavljenih VLP meri 10,5 nm, kar se ujema s premerom nativnih virusov, razdalja med ponovitvijo dveh zloženih obročev pa je 4 nm v nasprotju z razdaljo posameznega zavoja vijačnice, ki je 3,1-3,3 nm pri nativnih virionih. Zgradbe z zloženimi obroči se pri pH 5 ali 10,5 niso tvorile. Pri pH 5 so bili opazni posamezni obroči (sedimentacijski koeficient nakazuje na 7 podenot, kolikor naj bi jih bilo v posameznem PVY obroču), pri pH 10,5 pa so prisotni le posamezni razpršeni proteini. Pri pH 10,5 ima CP negativen naboj, kar proteinom verjetno onemogoča sestavljanje. Po ponovni dializi iz pH 5 ali 10,5 na pH 8, se VLP ponovno tvorijo. Ob dializi sestavljenih zgradb z zloženimi obroči iz pH 8 na pH 5 zgradbe ne razpadajo, medtem ko so po dializi pri pH 10,5 v vzorcu prisotni le monomerni CP (McDonald et al., 1976). VLP, ki so raztopljeni v raztopinah brez fosfata, se občasno pojavljajo v slabše organiziranih zgradbah, pri katerih pa je še vedno opazna geometrija zloženih obročev. Fosfat spodbuja polimerizacijo, zato je možno, da so sestavljeni CP v fosfatnem pufru manj labilni in zato lažje ohranjajo dobro organizirano zgradbo, vidno pod elektronskim mikroskopom (McDonald in Bancroft, 1977).



Slika 3: Potek zlaganja monomernih CP v nitaste zgradbe v ali brez prisotnosti RNA. Disociirani PVY CP (a). VLP: nitasta zgradba zloženih obročev iz CP (b). Tvorba nukleoproteina v obliki vijačnice po dodatku PVY RNA (dva možna mehanizma tvorbe nukleoproteina: razpad delcev iz zloženih obročev in ponovno sestavljanje okoli RNA ali prodiranje RNA skozi kanalček znotraj zloženih obročev) (c). Dializa proti disociacijskemu pufru na 4 °C povzroči razpad VLP, nukleoprotein pa ostane nedotaknjen (d). 2S, 100S in 200S predstavljajo sedimentacijski koeficient delcev in posredno predstavljajo velikost delcev (McDonald in Bancroft, 1977).

Ob dodatu PVY RNA ali PMV (virus mozaika prosa) RNA disociiranim CP, se tvorijo nukleoproteini (RNA obdana s CP, tako kot pri nativnih virusih). Med sedimentacijo na saharoznem gradientu se nukleoprotein in VLP ne razločita med seboj, saj se oba posedata s podobno hitrostjo. Razlika med njima se pojavi po dializi proti disociacijskemu pufru (20 mM Tris, 0.5 M NaCl, 1 mM DTT, pH 7,5), kjer VLP razpade na posamezne CP, nukleoprotein pa ostane nedotaknjen. Nukleoprotein je glede na fizikalne lastnosti zelo podoben nativnim virusom (enaka razdalja med posameznimi zavoji, gostota, stabilnost), razlika je opazna le v nekoliko krajši zgradbi nukleoproteina (McDonald in Bancroft, 1977).

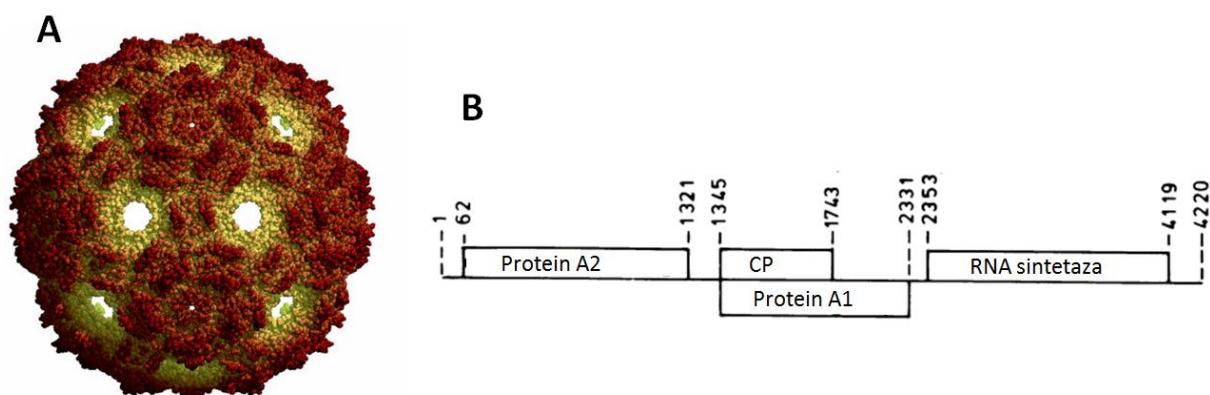
Sestavljanje virusa PVY še ni popolnoma razjasnjeno. Možno je, da prazna nitasta zgradba zloženih obročev predstavlja intermediat med tvorbo viriona. RNA je nato povlečena skozi ozko centralno votlino, ob tem pa se zgradba zloženih obročev pretvori v vijačnico. Če se med infekcijo rastline tvori CP v presežku, bi z natančno analizo tkiva morda odkrili tudi zgradbe zloženih obročev. Druga možnost sestavljanja PVY pa je direktna tvorba iz monomernih CP, ki obdajo virusno RNA. Specifičnost mehanizma sestavljanja je nizka, saj PVY CP enkapsidirajo tako PVY RNA kot tudi PMV RNA (McDonald and Bancroft, 1977).

2.2 BAKTERIOFAG Q-BETA

Bakteriofag Q-beta uvrščamo v družino Leviviridae, rod *Allolevivirus*. RNA kolifage delimo v štiri skupine glede na njihove serološke reakcije, gostoto in molekulsko težo viriona ter hitrost sedimentacije virusne RNA. Q-beta spada v skupino III in je njen najbolje raziskan predstavnik. Kolifage iz skupine III najdemo predvsem v človeku, za razmnoževanje pa potrebujejo celice *E. coli* (van Duin, 1988).

Genom Q-beta predstavlja enoveržna smiselna RNA (Beekwilder in sod., 1995), ki kodira proteine A2, encim RNA sintetazo in plaščni protein (slika 4B). Plaščni protein se zaključi z opal stop kodonom UGA. Med prevajanjem RNA ribosom v 5-odstotkih na to mesto vstavi aminokislino triptofan, zato se prevajanje nadaljuje, nastane pa podaljšani plaščni protein A1. Plašč bakteriofaga sestavlja 180 kopij plaščnega proteina (večina CP in nekaj kopij proteina A1) in ena molekula proteina A2 (Weber in Konigsberg, 1975). Protein A2 omogoča pričetek infekcije bakterijske celice s pritrditvijo faga na stranico spolnega pila bakterije. Enoveržna RNA preko pil prodre v celico in se tam pomnožuje. Pomnoževanje omogoča replikacijski kompleks, ki ga sestavlja 5 podenot. Le podenota RNA sintetaza je kodirana na genomu bakteriofaga, ostale podenote pa so bakterijski proteini (van Duin, 1988).

CP ima v življenskem ciklu Q-beta dvojno vlogo. Njegova glavna naloga je sestavljanje virusnega plašča, poleg tega pa ima v svoji zgradbi tudi prepoznavna mesta za RNA. Z vezavo na RNA deluje kot represor pri prevajanju RNA sintetaze, najverjetneje pa pripomore tudi k enkapsidaciji RNA, saj so prepoznavna mesta izpostavljena v notranjosti sestavljenega plašča (Lim in sod., 1996).



Slika 4: Oblika plašča bakteriofaga Q-beta (Enterobacteria ... , 2004) (A) in shema njegovega genoma (števila označujejo bazne pare) (van Duin, 1988) (B)

2.2.1 Q-beta virusom podobni delci

Tako kot nativni Q-beta virion tudi rekombinantni Q-beta VLP sestavlja 180 kopij 14,2 kDa velikega plaščnega proteina iz 132 aminokislin. Oblika viriona oz. VLP je T=3 ikozaederna oblika s premerom 26-28 nm (Blumenthal in Carmichael, 1979; Rhee in sod., 2011). Kristalna zgradba plašča je raziskana do skoraj-atomske resolucije, plašč pa je stabilen pri ekstremnih temperaturah in pH ter odporen proti kemični obdelavi (Rhee in sod., 2011). Podobno kot pri drugih manjših RNA fagih, je virusni plašč sestavljen iz podenot, ki tvorijo dimere. Plašč je stabiliziran z disulfidnimi vezmi, ki iz dimernih podenot tvorijo pentamere in heksamere, ki se sestavijo v plašč (Golmohammadi in sod., 1996).

Nativni virus uporablja zgradbo zanke v svojem RNA genomu za povezovanje RNA s CP. To interakcijo se lahko izkoristi za tarčno vstavljanje tujih molekul v notranjost VLP. Rhee in sod. (2011) so z genskim inženiringom oblikovali RNA, ki ima na enem koncu zanko za vezavo na CP, na drugi strani pa aptamer, ki veže peptid bogat z argininom. S tem postopkom so uspeli v Q-beta VLP enkapsidirati super-zvito obliko zelenega fluorescenčnega proteina (sfGFP) in nekatera druga barvila, ki so bila konjugirana s peptidom bogatim z argininom. V en sam delec je bilo povprečno enkapsidiranih 10-11 sfGFP molekul, podobno tudi pri ostalih barvilih. Na enak način so Fiedler in sod. (2010) v Q-beta VLP enkapsulirali različne encime: 25 kDa N-končno aspartat dipeptidaza peptidaza E, 62 kDa luciferazo iz kresničk in termostabilno mutanto luciferaze. VLP po enkapsidaciji se od praznih po zunanjosti niso razlikovali, z analitskim ultracentrifugiranjem pa so ugotovili različno gostoto delcev. Enkapsidirana peptidaza E v Q-beta VLP je 60-krat bolj temperaturno stabilna od proste peptidaze. Po izpostavitvi proteazi K je enkapsidirana peptidaza E ohranila 80 % aktivnost, medtem ko je bila prosta popolnoma razgrajena. Rezultati kažejo, da so encimi znotraj VLP veliko bolj zaščiteni pred zunanjimi dejavniki, kot prosti encimi. Ker pride do enkapsidacije in sestavljanja vseh komponent že med izražanjem proteinov v gostiteljskih celicah, bi se ta postopek lahko uporabil za izražanje občutljivih proteinov ali proteinov, ki jih je težko očistiti (Fiedler in sod., 2010).

2.3 POTENCIALNE APLIKACIJE VLP

2.3.1 VLP pri produkciji cepiv

Celotno površino VLP sestavlja mnogo kopij enega samega ali nekaj zelo podobnih plaščnih proteinov, torej se skozi celotno površino ponavlja isti motiv. Zato so VLP še posebej uporabni pri razvoju cepiv. Rezultati številnih študij kažejo, da VLP preko površinsko izraženih ponavljajočih se aminokislinskih motivov stimulirajo visok imunski odziv, sprožijo aktivacijo celic B in visok titer produkcije protiteles. Poleg tega lahko antigen

predstavitevne celice vase vključijo VLP nano-metrskih velikosti in jih razgradijo, kar vodi v aktivacijo celic T. Zaradi simetričnih in visoko ponovljivih aminokislinskih zgradb, so VLP sposobni inducirati močan telesni in celični imunski odziv tudi v odsotnosti pogosto uporabljenih adjuvansov (Zeltins, 2013). Predstavljajo fleksibilno platformo za hitre odgovore na pojavljanja patogenov, izbruhne bolezni in pandemije. Ker je poznanih vedno več dejstev o humani in živalski imunologiji, se na VLP lahko pripnejo različni epitopi in adjuvansi, ki na imunski sistem delujejo na različen način. S tem se lahko zmanjšajo stranski učinki in število doz potrebnih za pridobitev imunosti (Rodríguez-Limas in sod., 2013).

Zeltins (2013) v preglednem članku razkriva, da je bilo na različnih znanstvenih področjih iz virusov konstruiranih in ovrednotenih že več kot 110 VLP iz 35 različnih družin, kar poudarja njihovo raznovrstnost in povečan interes za nove študije. Nekatera cepiva na osnovi VLP se trenutno uporabljajo kot komercialni medicinski in veterinarski proizvodi, veliko proizvodov na osnovi VLP pa je še na različnih stopnjah kliničnih raziskav (Rodríguez-Limas in sod., 2013).

Za bolj kompleksne VLP, npr. toksične VLP ali VLP, ki vsebujejo nenaravne aminokisline, je potrebna produkcija v brezceličnih sistemih. Do sedaj so že bili uspešno proizvedeni v brezceličnih ekstraktih *E. coli* in kvasovk. S produkcijo v mikroorganizmih bi se lahko produksijski stroški za cepiva na osnovi VLP drastično znižali in tako omogočili proizvodnjo zdravil tudi za zapostavljene tropске bolezni. Mednarodne neprofitne organizacije investirajo v nove tehnologije vakcin, ki bi bile sposobne produkcije nizko-cenovnih substanc za skupnosti, ki jih potrebujejo (Rodríguez-Limas et al., 2013).

Eden izmed pristopov za izboljšanje zdravja ljudi je tudi kontrola in odprava bolezni živali, ki se lahko prenašajo na človeka. Domače in hišne živali bodo kmalu lahko cepljene s produkti na osnovi VLP, prednost pa bodo imela cepiva ki bodo prinašala višje prihodke. Pri proizvodnji VLP za veterinarske namene lahko pričakujemo podoben dobiček kot pri tradicionalnih inaktiviranih veterinarskih cepivih (Rodríguez-Limas et al., 2013).

2.3.1.1 Cepiva proti virusnim obolenjem

Cepiva z VLP so varnejša od tradicionalnih cepiv z oslabljenimi ali inaktiviranimi virusi, saj se oslabljeni virusni sev lahko povrne v aktivnega, pri inaktivaciji pa obstaja možnost nepopolne inaktivacije (Roy in Noad, 2009). Novejša cepiva ki temeljijo na VLP predstavljajo napredek v razvoju varnejših cepiv z manj stranskimi učinki in izboljšano imunogenostjo (Rodríguez-Limas in sod., 2013).

Prvo rekombinantno cepivo proti HBV, Recombivax HB®, je leta 1986 odobrila FDA (ameriška Uprava za živila in zdravila, angl. Food and drug administration) in je bilo

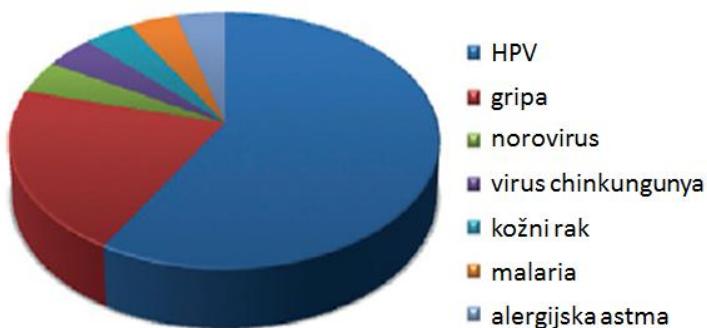
izdelano na podlagi VLP proizvedenih v *Saccharomyces cerevisiae*. Cepivo je sestavljen iz površinskega antigena HBsAg (lipo-protein), ki se sam sestavi v 22 nanometrske sferične neinfektivne VLP (Rustandi in sod., 2014). Danes različna biofarmacevtska podjetja proizvajajo več različic tega zdravila. Kot rezultat vključitve teh cepiv v imunizacijo dojenčkov in otrok je bilo po svetu doseženo zmanjšanje okužb s HBV (Ott in sod., 2012). Nedavno sta dve cepivi proti humanemu papiloma virusu (HPV) dosegli visoko zaščito pred infekcijo. Gardasil® iz *S. cerevisiae* je FDA odobrila leta 2006, Cervarix® iz insektnih celic okuženih z bakulovirusom pa leta 2009 (Rodríguez-Limas in sod., 2013). Obe cepivi vsebujeta plaščni protein L1 HPV, ki se med produkcijo sam sestavi v VLP (Zeltins, 2013). Decembra 2011 je SFDA (kitajska Uprava za živila in zdravila, angl. State Food and Drug Administration) odobrila Hecolin® kot prvo cepivo proti virusu Hepatitis E, ki temelji na rekombinantnih VLP iz plaščnega proteina ORF2 tega virusa. Cepivo se proizvaja v *E. coli* in je po treh dozah 100 % učinkovito (Zhu in sod., 2010).

Potencialna cepiva na bazi VLP za humano zdravljenje, ki so še v postopku kliničnih študij so še cepiva proti gripi, norwalk virusu, kožnemu raku, alergijski astmi, malariji in chikungunya virusu. S pripravo knjižnic s specifičnimi VLP z različnimi konjugiranimi peptidi bi omogočili hitro testiranje imunogenosti z visoko zmogljivimi tehnologijami in tako pospešili odkrivanje novih kandidatnih cepiv. Med drugim so bila testirana tudi cepiva za hipertenzijo, Alzheimerjevo bolezen, diabetes, astmo in osteoporozo in bi lahko bila v prihodnosti uporabna v klinične namene (Rebeaud in Bachmann, 2012).

Na spletni strani clinicaltrials.org z iskalnikom po kliničnih raziskavah dobimo 78 zadetkov s ključnimi besedami »virus like particle«. Od tega poteka 34 kliničnih raziskav na cepivih s HPV VLP, 21 kliničnih raziskav na cepivih z VLP virusa gripe in 8 kliničnih raziskav na cepivih z VLP norovirusa. Kushnir in sod. (2012) so zbrali podatke o cepivih na podlagi VLP na trgu oz. v kliničnih študijah:

- HBV: 14 cepiv (12 licenciranih in dve v 1. fazi kliničnih raziskav),
- gripa: 7 cepiv (1 licencirano cepivo, ostala cepiva v 1. oz. 2. fazi kliničnih raziskav),
- norovirus: 4 cepiva (1. faza kliničnih raziskav),
- HPV: 3 cepiva (2 licencirani cepivi in eno v 3. fazi kliničnih raziskav),
- malarija: 3 cepiva (faza 1, faza 1/2 in faza 3 kliničnih raziskav),
- Hepatitis A: 1 licencirano cepivo,
- Alzheimerjeva bolezen: 1 cepivo v 2. fazi kliničnih raziskav,
- HIV: 1 cepivo v 2. fazi kliničnih raziskav,
- kožni rak: 1 cepivo v 2. fazi kliničnih raziskav,
- Hepatitis C: 1 cepivo v 1. fazi kliničnih raziskav,
- idr ...

Na spodnji sliki so grafično prikazani deleži zdravil na podlagi VLP v kliničnih testiranjih leta 2013:



Slika 5: Trenutni delež zdravil na podlagi VLP, ki so v kliničnih testiranjih (Rodríguez-Limas in sod., 2013).

2.3.1.2 Cepivo proti Alzheimerjevi bolezni

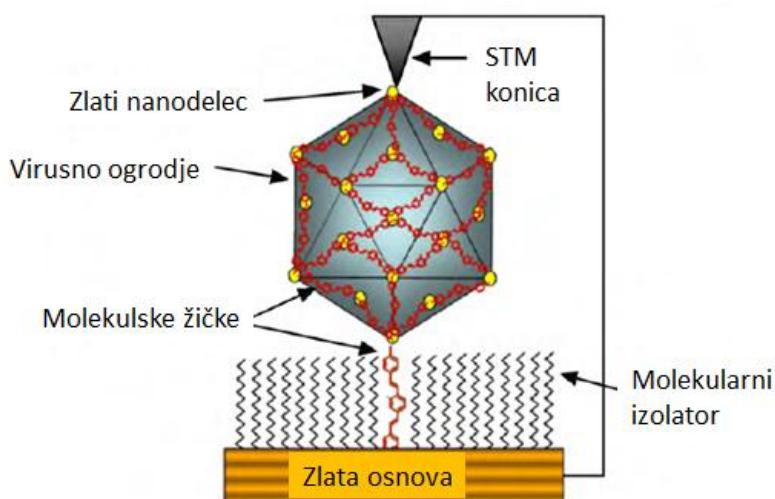
Produkti na osnovi VLP obetajo potencialna cepiva pri imunoterapiji proti Alzheimerjevi bolezni. Glavni vzrok za pojav te bolezni je akumulacija agregiranih amiloid- β (A β) peptidov v možganih. V kliničnih raziskavah zdravljenja, kjer je imunizacija potekala s celotnim zaporedjem peptida A β in dodanim adjuvansom, so ugotovili, da mora biti glavni cilj zdravljenja sprožitev produkcije visokega titra protiteles proti A β , v odsotnosti adjuvansov, ki lahko v možganih sprožijo vnetne procese (Nicoll in sod., 2003). Cepivo na podlagi VLP pa omogoča ravno izpolnitev zgoraj omenjenih ciljev. Aktivacijo celic B in tvorbo Ab proti A β lahko sprožijo tako tuji kot telesu-lastni antigeni izpostavljeni na površini VLP. Za aktivacijo so potrebne precej nižje koncentracije učinkovine kot v primeru imunizacije z antigeni v obliki monomerov. Prav tako ni potrebe po dodanih adjuvansih. Odzivu celic T, ki sprožijo vnetne procese, se je pri oblikovanju rekombinantnih VLP možno izogniti. Namesto celotnega zaporedja A β se na VLP izrazi skrajšani peptid, katerega epitop prepozna le celice B (Chackerian, 2010). Trenutno je cepivo CAD106 proti Alzheimerjevi bolezni na podlagi Q-beta VLP v 2. fazi kliničnih raziskav (Novartis ..., 2014).

2.3.2 Ostale aplikacije

VLP so zaradi lastnosti svoje zgradbe zelo zanimivi na področju znanosti o materialih. Prednost imajo dobro raziskani VLP, katerih kristalna zgradba je znana, saj le ta daje informacije o regijah in aminokislinah, ki so izpostavljene na površini VLP. Lahko se uporablajo za sintezo nano-kompozitov CdS, PbS, Fe₂O₃ (Shenton in sod., 1999) in ZnS (Mao in sod., 2003), ali redukcijo in sintezo simetričnih nanodelcev zlata (Slocik in sod., 2005).

Paličasti VLP, npr. TMV VLP, so po obliki 300 nm dolgi votli delci in zato odlična platforma za proizvodnjo nano-žičk (Niu in sod., 2007), električno prevodnih materialov (Kuncicky in sod., 2006) in mikro-baterij (Gerasopoulos in sod., 2008). Sferični VLP pa se uporabljajo predvsem kot nano-kletke za enkapsulacijo anionskih polimerov (Douglas in Young, 1998), delcev železovega oksida (Liepold in sod., 2005) ali encimov (Fiedler in sod., 2010).

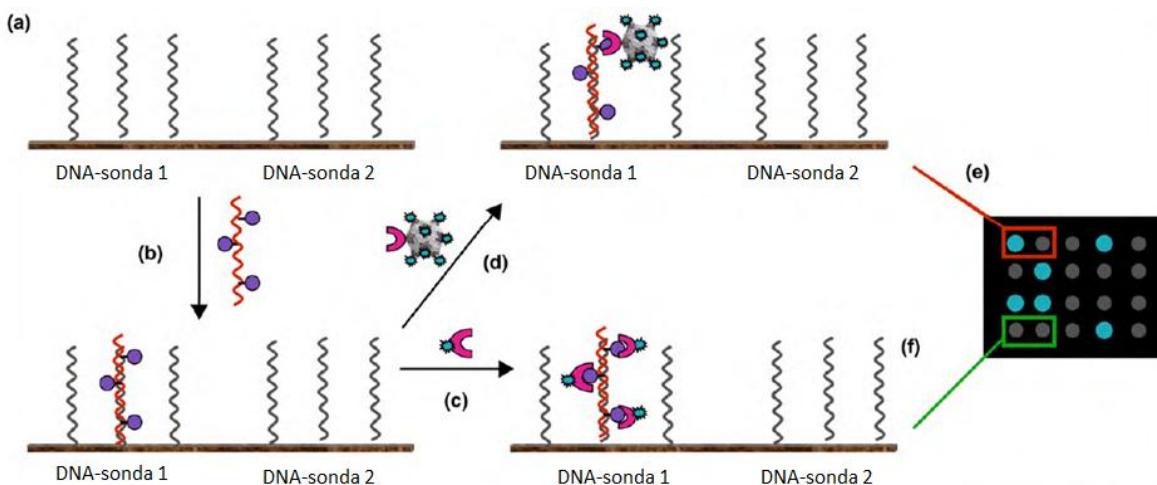
Na VLP ogrodju je z izbiro pravih molekulskih komponent možno zasnovati 3D omrežje. Blum in sod. (2005) so z genetsko modifikacijo spremenili CPMV, da na izbranih mestih podenot izraža cisteinske ostanke. Na tiolne skupine teh cisteinskih ostankov se kemijsko vežejo zlati nanodelci. S primerno izbranimi mesti mutacij in velikostjo zlatih nanodelcev se lahko najbližje sosednje nanodelce poveže med seboj z molekulskimi žičkami in tako ustvari 3D molekulsko omrežje. Izmerjeni tok, ki teče skozi omrežje, je v razmerju s številom molekul, ki so v omrežje povezane. Z zamenjavo prevodnih molekul z molekulami, ki delujejo kot bi-stabilna molekulsa stikala, je možno izgraditi omrežje z možnostjo preklopov. Na ta način je možna izgradnja nanonaprav, npr. visoko zmogljive spominske naprave.



Slika 6: Spominska naprava na podlagi CPMV (Blum in sod., 2007)

Soto in sod. (2006) so CCMV VLP uporabili kot ogrodje pri razvoju visoko specifičnih in občutljivih biosenzorjev za detekcijo DNA in proteinov patogenih organizmov. VLP imajo v tem primeru na površino preko disulfidnih vezi pripeto molekulo za prepoznavanje tarčne molekule (neutravidin ali Ab) in mnogo fluorescenčnih molekul. Detekcija poteka na mikromreži, kamor so predhodno immobilizirani nukleotidi, nato se na mikromrežo doda označeno (npr. z biotinom) tarčno DNA. Neutravidin na VLP se poveže z biotinom na označeni DNA, hibridizacijo pa se zazna zaradi emisije fluorescenčnih molekul barvila na

površini VLP. Rezultati kažejo, da je tak pristop primeren za prepoznavanje genov na mikromrežah z najnižjo koncentracijo matrične DNA (1 do 10 kopij genoma).



Slika 7: Shema detekcije na DNA mikromreži. Imobilizirani DNA-sondi na mikromreži (a). DNA-sonda 1 hibridizira s predhodno biotinilirano tarčno DNA (b), hibridizacija je nato zaznana z barvilom vezanim na streptavidin (c) ali barvilom vezanim na CPMV (d). Positivni signal pri DNA-sondi 1 in negativni signal pri DNA-sondi 2 (e). Lažno negativni signal zaradi fluorescence, ki je pod nivojem detekcije (f) (Soto in sod., 2006).

2.4 SOČASNO IZRAŽANJE PODENOT PROTEINSKIH KOMPLEKSOV

Določanje zgradbe in funkcije proteinskih kompleksov ponavadi zahteva izolacijo posameznih podenot v velikih količinah in nato njihovo sestavljanje v funkcionalno enoto. Soizražanje več proteinov v eni sami celici se je izkazalo kot dober kompromis med izolacijo endogenih kompleksov (kot so RNA polimeraza II in ribosomi) in *in vitro* rekonstrukcijo ločeno izraženih podenot. Slabost izolacije endogenih kompleksov je pogosto nizka zastopanost proteinskih kompleksov v celici, zato je težko pridobiti dovolj velike količine za biokemijske študije in študije zgradbe. Največja težava pri *in vitro* rekonstrukciji pa je dolgotrajnost postopka, saj je zgradbo podenot med sestavljanjem ponavadi potrebno večkrat razviti in ponovno zviti. Soizražanje tako omogoča tudi hkratno zvitje proteinskih partnerjev, ki postanejo netopni, če so izraženi vsak posebej v večjih koncentracijah. Pri soizražanju se kot gostitelja najpogosteje uporablja *E. coli* ali insektne celice (Romier in sod., 2006). Obstajajo različne metode soizražanja v bakterijskih celicah:

- Več vektorjev.** Najlažji pristop pri soizražanju proteinov je uporaba več vektorjev, kjer vsak vsebuje posamezen gen za sintezo določene podenote. Lahko se uporabi vektorje z enakim mestom začetka podvojevanja, vsak vektor pa mora imeti drugačen marker za odpornost. Plazmidi z enakim mestom začetka podvojevanja lahko znotraj celice tekmujejo, posledica pa je lahko slabše pomnoževanje enega

izmed vektorjev. V tem primeru je priporočljiva uporaba vektorjev, ki imajo različna mesta začetkov podvojevanja (Romier in sod., 2006).

- b) **En vektor, ena prepisana RNA molekula.** Druga strategija ko-transformacije je uporaba enega vektorja, na katerem je kloniranih več različnih genov pod vplivom enega samega promotorja. Vsak gen mora imeti svoje mesto za vezavo ribosoma (angl. Ribosome binding site, RBS) (Tan in sod., 2005). V tem primeru med prepisovanjem nastane dolga policistronska mRNA molekula, njena dolžina pa je omejena z zmožnostjo polimeraze in same stabilnosti mRNA. Tudi učinkovitost vezave ribosoma na RBS je odvisna od zgradbe mRNA. Običajno je v DNA zaporedje med koncem prvega gena in RBS naslednjega gena potrebno uvesti nekaj vmesnih baznih parov. Učinkovitost in nivo izražanja sta ponavadi odvisna od zaporedja genov na mRNA (Romier in sod., 2006). Policistronsko izražanje vodi v nižji nivo izraženih proteinov, ki so kodirani bolj proti koncu mRNA, kar pa lahko koristno vpliva na stehiometrijo proteinskega kompleksa (Scheich in sod., 2007).
- c) **En vektor, več prepisanih RNA molekul.** Uporaba individualnih promotorjev za posamezen gen znotraj enega plazmida vodi v prepisovanje več krajsih mRNA. Plazmid je v tem primeru večji, uporabijo pa se lahko različni promotorji (Kim in sod., 2004).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

4x SBnative (Life technologies, ZDA), 5x Bradfordov reagent (BioRad, Nemčija), 20x NativePAGE Cathode Buffer (Life technologies, ZDA), 20x NativePAGE Running Buffer (Life technologies, ZDA), Ampicilin (Sigma), BCIP®/NBT Solution, premixed (Sigma Aldrich), butanol (Merck, Nemčija), CaCl₂ (Fluka, ZDA), citronska kislina (Merck, Nemčija), dolžinska standarda GeneRuler™ DNA Ladder Mix in MassRuler™ DNA Ladder Mix (Life technologies, ZDA), DTT (Sigma ZDA), EDTA (Sigma, Nemčija), GLB pufer (Green loading buffer, pripravljen v Laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo), Glicin (Sigma, S Koreja), HCl (Merck, Nemčija), IPTG (GBT), Kanamicin (GBT), KCl (Sigma-Aldrich, Nemčija), Kloramfenikol (Sigma), kloroform (Sigma, ZDA), kvasni ekstrakt (Bacto™ Yeast Extract) (BD, ZDA), Lambda DNA/HindIII dolžinski standard (pripravljen v Laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo), M9 minimalne soli (Sigma, Združeno kraljestvo), MgCl₂ (Sigma, Nemčija), MgSO₄ (Riedel, Nemčija), NaCl (Merck, Nemčija), NaOH (Sigma, Nemčija), NativeMark™ Unstained Protein Standard (Life technologies, ZDA), natrijev fosfat (NaH₂PO₄ x 2H₂O in Na₂HPO₄ x 2H₂O) (Merck, Nemčija), Novex®Sharp Pre-stained Protein Standard (Life technologies, ZDA), Novex®Sharp Unstained Protein Standard (Life technologies, ZDA), NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) (Life technologies, ZDA), NuPAGE® MES SDS Running Buffer (Life technologies, ZDA), ocetna kislina (Merck, Nemčija), PEG 8000 (Sigma-Aldrich, Nemčija), posneto mleko v prahu (Merck, Nemčija), Precision Plus Protein™ Unstained Standards (BioRad, ZDA), saharoza (Merck, Nemčija), Simply Blue™ SafeStain (Life technologies, ZDA), Sypro® Orange (5000x) (Life technologies, ZDA), tri-natrijev citrat dihidrat (Merck, Nemčija), tripton (Bacto™ Tryptone) (BD, ZDA), Tris baza (Sigma, Nemčija), Triton-X 100 (Sigma, ZDA), Tween 20 (Merck, Nemčija).

3.1.2 Kompleti kemikalij

- a) Za vse PCR reakcije smo uporabili KOD Hot Start komplet (Millipore, Japonska):
 - 10x PCR pufer
 - dNTP (vsak 2 mM)
 - 25 mM MgSO₄
 - KOD Hot Start DNA polimeraza (1,0 U/μl)
- b) Komplet za izolacijo plazmidov: QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAgen, Nemčija)
- c) Komplet za ekstrakcijo DNA iz gela: QIAquick Gel Extraction Kit (QIAgen, Nemčija)

- d) Komplet za barvanje gelov po modri nativni elektroforezi: Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen, ZDA)
- e) Komplet za fluorescenčno označevanje proteinov: Monolith NT™ Protein Labeling Kit RED-NHS (NanoTemper, Nemčija)

3.1.3 Laboratorijska oprema

Amicon® Ultra-15 100 kDa MWCO (Millipore), Amicon® Ultra-4 100 kDa MWCO (Millipore), analitska tehnica (0,1 g – 202 g) (Sartorius analytic), CD-spektrometer Chirascan CD Spectrometer (Applied Photophysics), Celulose Nitrate filtri 0,2 µm (Sartorius GmbH, Nemčija), centrifuga Biofuge 28RS (Heraeus), centrifuga Eppendorf Centrifuge 5415 R (Eppendorf), centrifuga Rotina 35 R in Rotina 38 R (Hettich), centrifuga Sorvall LYNX 4000 (Thermo scientific), dializno črevo Fisherbrand Dialysis Tubing 12000-14000 MWCO (Fisher Scientific, ZDA), dializna kaseta Slide-A-Lyzer (Pierce, ZDA), elektroforezni sistem XCell SureLockTM Mini-Cell Electrophoresis System (Life technologies, ZDA), filtri za brizge 0,22 µm (Millipore, Irska), fluorimeter (PTI), kiveta za snemanje CD-spektra 110 QS (Hellma Analytics), kiveta za merjenje DLS ZEN0040 (Malvern), konfokalni mikroskop Leica TCS SP5 nameščen na invertnem mikroskopu Leica DMI6000 CS (Leica Microsystems, Nemčija), LightCycler® 480 System (Roche, Nemčija), magnetno mešalo vibro-mix (Tehnica), magnetno mešalo MS3000 (Biosan), mikrotiterske plošče Light Cycler® 480 (Roche diagnostics GmbH, Združeno kraljestvo), NanoDrop 1000 (Thermo scientific), naprava za merjenje DLS Zetasizer NanoZS (Malvern), naprava za produkcijo destilirane vode RiOs16 (Millipore), naprava za produkcijo posebno čiste vode MilliQ RG (Millipore), NativePAGE™ Novex 3-12 % Bis-Tris gel (Life technologies, ZDA), NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini gel (Life technologies, ZDA), pH meter Seven easy (Mettler Toledo), pipete 0,2-2 µl, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl (Gilson, Lambda), PVDF membrana (Life technologies), sistem za prenos i-Blot™ Device (Invitrogen), Sonikator Ultrasonic Processor (Cole-Parmer, ZDA), stresalniki ISF-1-V (AdolfKuhner Ag) in Kambič IS-200K (Kambič), termični blok CH-100 (Biosan), transmisijiški elektronski mikroskop CM 100 (Philips, Nizozemska), ultracentrifuga L7-55 Ultracentrifuge (Beckman), UV-VIS spektrofotometer (Agilent technologies), vakuumska črpalka za filtracijo Vacuum Pump XFF54 230 50 (Millipore), vodna kopel tip 1013 (GFL).

3.1.4 Gojišča

Za rast celic in izražanje proteinov smo uporabili naslednja gojišča:

Preglednica 1: Gojišča uporabljeni za gojenje bakterijskih kultur

Gojišče	Sestava
Tekoče Luria Bertanijevo gojišče (LB)	5 g/l kvasni ekstrakt (Bacto™ Yeast Extract) (BD, ZDA) 10 g/l tripton (Bacto™ Tryptone) (BD, ZDA) 10 g/l NaCl v dH ₂ O
Tekoče obogateno gojišče (SOB)	5 g/l kvasni ekstrakt (Bacto™ Yeast Extract) (BD, ZDA) 20 g/l tripton (Bacto™ Tryptone) (BD, ZDA) 0,6 g/l NaCl 0,5 g/l KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ v dH ₂ O
Tekoče 2 x TY gojišče	10 g/l kvasni ekstrakt (Bacto™ Yeast Extract) (BD, ZDA) 16 g/l tripton (Bacto™ Tryptone) (BD, ZDA) 5 g/l NaCl 5 mM MgCl ₂ 2 mM CaCl ₂ v dH ₂ O

3.1.5 Bakterijski sevi

Pri delu smo uporabili naslednje kompetentne bakterijske celice:

- *Escherichia coli* DH5-α: za namnoževanje plazmidov
- *Escherichia coli* BL21(DE3): za izražanje proteinov
- *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS: za izražanje proteinov; vsebuje dodatni plazmid pLysS, ki kodira T7 lizocim in odpornost na kloramfenikol

3.1.6 Plazmidi

Za izražanje proteinov v kompetentnih celicah smo uporabili naslednja plazmida:

- pT7-7: vektor z ampicilinsko odpornostjo. Uporabili smo ga pri izražanju Q-beta CP ter PVY nativnih in fuzijskih CP.
- pET28a: vektor s kanamicinsko odpornostjo. Uporabili smo ga pri izražanju PVY fuzijskih CP.

3.1.7 Encimi

Pri PCR reakcijah smo uporabili polimerazo:

- Kod Hot Start polimeraza (1,0 U/μl)

Restriktijski encimi, ki smo jih uporabili pri sestavljanju genskih konstruktov:

- *AvrII* (4,0 U/ μ l) (BioLabs)
- *HindIII* Fast Digest (Thermo Scientific)
- *NcoI* Fast Digest (Thermo Scientific)
- *EcoRI* (20,0 U/ μ l) (Biolabs)

Encim ligaza, ki smo jo uporabili pri sestavljanju genskih konstruktov:

- T4 DNA ligaza (5 Weiss U/ μ l) (Thermo Scientific)

3.1.8 Protitelesa

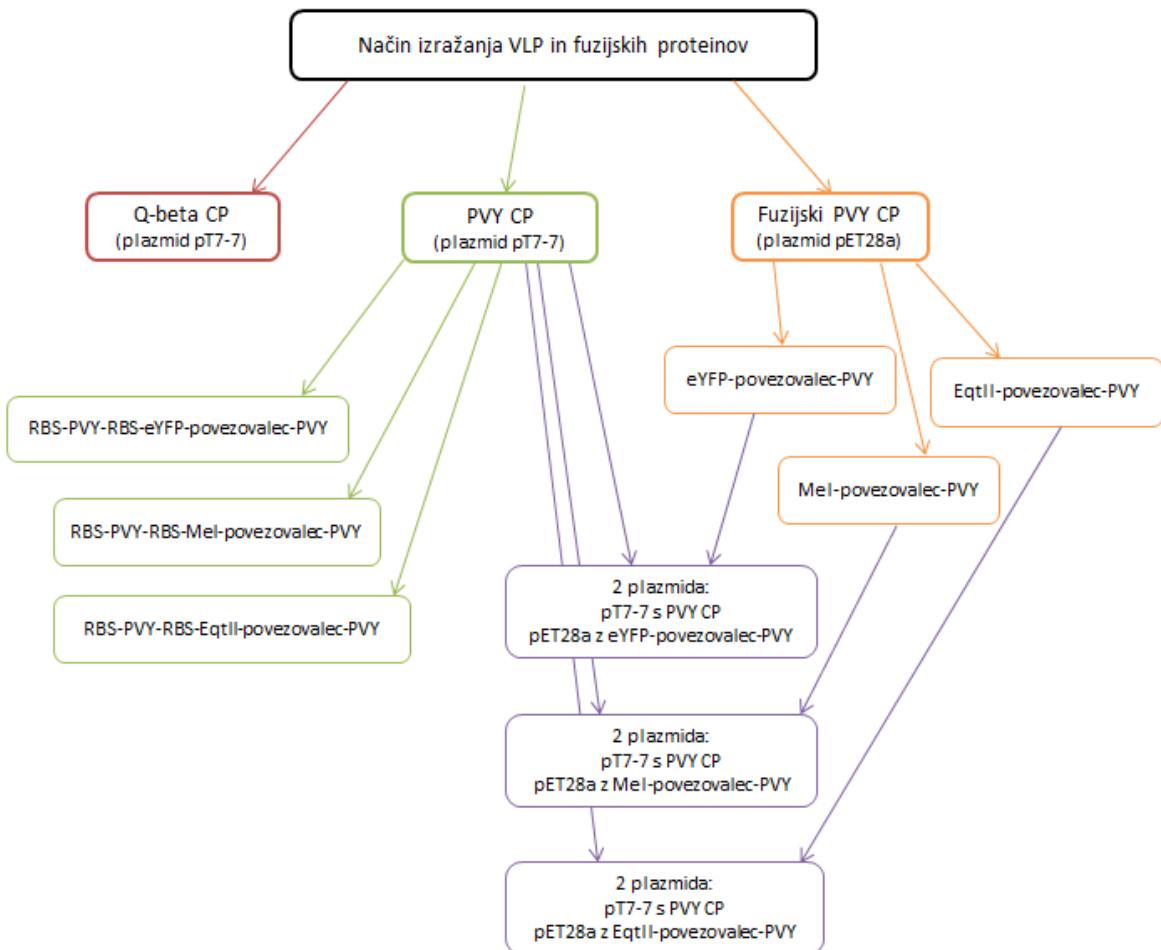
Uporabili smo PVY specifična protitelesa označena z alkalno fosfatazo (Bioreba, Švica).

3.2 METODE

3.2.1 Načrt izražanja nativnih in fuzijskih plaščnih proteinov

V kompetentnih celicah *E. coli* smo izražali plaščni protein krompirjevega virusa Y in bakteriofaga Q-beta. PVY CP smo pripravili tudi v fuziji z ojačanim rumenim fluorescenčnim proteinom (eYFP), ekvinatoksinom II (EqtII) oz. melitinom (Mel). Iz predhodnih objav (Kalnciema in sod., 2012) je razvidno, da se PVY CP v fuziji z manjšimi proteini sestavijo v VLP, fuzija z večjimi proteini pa sestavljanje onemogoči. Da bi opazovali sestavljanje fuzijskih PVY CP, smo poskusili fuzijske proteine izraziti samostojno ali hkrati z divjim tipom. Izražali smo jih na tri načine (slika 8):

- a) Konstrukt fuzijskega proteina smo vstavili v plazmid pET28a. Po izražanju bodo v vzorcu prisotni samo fuzijski CP.
- b) Konstrukt fuzijskega proteina iz plazmida pET28a smo vstavili v plazmid pT7-7 za vstavljenim genom za PVY CP. Pred drugi genski konstrukt smo vstavili še eno RBS mesto, ki omogoča prevajanje drugega vstavljenega konstrukta. Po izražanju v vzorcu pričakujemo PVY CP in v nekoliko nižjih koncentracijah še fuzijske CP.
- c) Ko-transformacija kompetentnih celic s plazmidom pT7-7 z vstavljenim genom za PVY CP ter s plazmidom pET28a z vstavljenim konstruktom za fuzijske PVY CP. V vzorcu po izražanju pričakujemo divji tip PVY CP in fuzijske PVY CP v razmerju 1:1. Prisotnost obeh plazmidov v kompetentnih celicah smo zagotovili z izbiro plazmidov, ki vsebujeta gene za odpornost na različna antibiotika.



Slika 8: Shema izražanja različnih CP v bakterijskih celicah

3.2.2 Priprava genov za plaščni protein in fuzijskih proteinov

Pri pripravi nukleotidnih konstruktov smo uporabili začetne oligonukleotide iz spodnje preglednice, ki smo jih naročili pri podjetju Eurofins Genomics. V vsako epico z liofiliziranimi oligonukleotidi smo dodali MQ, da smo olige resuspendirali do koncentracije 100 pmol/ μ l.

Preglednica 2: Seznam začetnih oligonukleotidov, ki smo jih uporabljali pri delu

Oznaka oligonukleotida	Pridobljeno zaporedje	Nukleotidno zaporedje (5'→ 3')	Uvedena restrikcijska mesta za encim
PVY FWD	PVY CP	ATGAATTCATATGGAAATGACACAATC GATGCAGGAGG	<i>Eco</i> RI, <i>Nde</i> I
PVY REV	PVY CP	TAGAATTCTCACATGTTCTGACTCCAAG TAGAGTATGC	<i>Eco</i> RI
PVY28a FWD	PVY CP	TACCTAGGGAAATGACACAATCGATGC	<i>Avr</i> II
PVY28a REV	PVY CP	ATAAGCTTCATCACATGTTCTGACTCC AAGTAGAG	<i>Hind</i> III
eYFP FWD	eYFP	TACCATGGATCCAATGGTGAGCAAGGGC GAGGAGCTG	<i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI
eYFP REV	eYFP- <i>povezovalec</i>	TACCTAGGACCGGAACCACCAACCGGA GGACTTGTACAGCTCGTCCATGC	<i>Avr</i> II
MEL FWD	Mel	ATCCATGGATCCAGGCATTGGCGCGATT CTGAAAGTGTGGCGACCGGCCTGCCGA CCCTGATTAGCTG	<i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI
MEL REV	Mel- <i>povezovalec</i>	ATACCTAGGACCGGAACCACCAACCGG AGGACTGTTGCCTTGTGTTTAATCCAG CTAACAGGGTCGGCAG	<i>Avr</i> II
EQT FWD	EqtII	ATCCATGGATCCAATGTCCGCAGACGTG GCTGGCGC	<i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI
EQT REV	EqtII- <i>povezovalec</i>	ATACCTAGGACCGGAACCACCAACCGG AGGAAGCTTGTCACGTGAATTTC	<i>Avr</i> II
ReYFP	RBS-eYFP	GCGAATTCAAGGAGGGATCCAATGGTGA GCAAGGGCGAG	<i>Eco</i> RI, <i>Bam</i> HI
REQT	RBS-EqtII	GCGAATTCAAGGAGGGATCCAATGTCCG CAGACGTGGC	<i>Eco</i> RI, <i>Bam</i> HI
RMEL	RBS-Mel	GCGAATTCAAGGAGGGATCCAATGGCAT TGGCGCGATTCTGAAAG	<i>Eco</i> RI, <i>Bam</i> HI

3.2.2.1 Plaščni protein krompirjevega virusa Y

Gen za plaščni protein PVY smo pridobili iz virusne RNA, ki smo jo pridobili na Nacionalnem inštitutu za biologijo (Ljubljana). V Laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo na Kemijskem inštitutu (Ljubljana), so gen za PVY CP pripravili in ga vstavili v plazmid pT7-7. Pri PCR reakciji sta bila uporabljeni začetni oligonukleotidi PVY FWD in PVY REV.

Zaporedje gena za PVY CP, ki smo ga uporabili v fuziji z drugimi proteini, smo v PCR reakciji pomnožili z začetnima oligonukleotidoma PVY28a FWD in PVY28a REV. PCR mešanica je vsebovala 1 µl plazmidne DNA s koncentracijo 58,5 ng/µl, 0,5 µl vsakega oligonukleotida, 5 µl 10 x PCR pufra, 5 µl dNTP, 2 µl MgSO₄, 1 µl KOD Hot Start DNA polimeraze in 35 µl MQ. Z oligonukleotidom PVY28a FWD smo na 5' konec zaporedja uvedli restrikcijsko mesto AvrII, preko katerega smo kasneje nukleinskemu zaporedju

plaščnega proteina dodali genetski zapis za dodatni protein. Plazmid pET28a je običajno namenjen temu, da izraženemu proteinu na C-konec doda histidinski repek. Ker sami tega nismo želeli, smo z oligonukleotidom PVY28a REV na 3' konec uvedli dva stop kodona, ki bosta preprečila prepisovanje histidinskega repka.

Aminokislinsko zaporedje PVY CP:

>PVY CP

```
MGNDTIDAGGSTKKDAKQEQGSIQPNLNKEKEKDGVNGTSGTHTVPRIKAITSKMRMPKSKGATVL  
NLEHLLEYAPQQIDISNTRATQSQFDTWYEAVQLAYDIGETEMPTVMNGLMVWCIE NGTSPNINGV  
WVMMDGDEQVEYPLKPIVENAKPTLRQIMAHFSDVAEAYIEMRNKEPYMPRYGLVRNLRDGLSLAR  
YAFDFYEVTSRTPVRAREAHIQMKAAALKSAQSRLFGLGGISTQEENTERHTTEDVSPSMHTLLG  
VKNM
```

3.2.2.2 Plaščni protein bakteriofaga Q-beta

Gen za plaščni protein bakteriofaga Q-beta smo na podlagi znanih zaporedij iz podatkovne zbirke NCBI naročili pri podjetju GenScript. Zaporedje so optimizirali za izražanje v celicah *E. coli* in vstavili v plazmid pUC57. V Laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo na Kemijskem inštitutu (Ljubljana) so gen za plaščni protein preklonirali v vektor pT7-7 z uvedenima prepoznavnima mestoma za encima *NdeI* in *EcoRI*.

Aminokislinsko zaporedje Q-beta CP:

>Q-beta CP

```
MAKLETVTLGNIGKDGKQTLVLPNGVNPTNGVASLSQAGAVPALEKRVTVSVSQPSRNRKNYKVQ  
VKIQNPTACTANGSCDPSVTRQAYADVTFSFTQYSTDEERA FVRTEL AALLASPLLIDAIDQLNPAY
```

3.2.2.3 Ojačani rumeni fluorescenčni protein

eYFP predstavlja rumeno-zeleno različico zelenega fluorescenčnega proteina (GFP) iz meduze *Aequorea victoria*. eYFP vsebuje štiri aminokislinske zamenjave glede na GFP. Vrh eksitacijskega spektra ima pri 513 nm, vrh emisijskega spektra pa pri 527 nm (pEYFP-N1 ..., 2000). Na voljo smo imeli eYFP vključen v plazmid pEYFP-N1, vendar je ta plazmid zaradi citomegalovirusnega promotorja namenjen le izražanju v sesalskih celicah. Zato smo gen za eYFP pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo (angl. Polymerase chain reaction, PCR) (preglednica 3) in ga kasneje preklonirali v plazmid namenjen izražanju v bakterijskih celicah. Uporabili smo začetna oligonukleotida eYFP FWD in eYFP REV, s slednjim smo na C-koncu eYFP proteina odstranili stop kodon in dodali še glicin-serinski povezovalec. PCR mešanica je vsebovala 1 µl plazmidne DNA s koncentracijo 57 ng/µl,

0,5 µl vsakega oligonukleotida, 5 µl 10x PCR pufra, 5 µl dNTP, 2 µl MgSO₄, 1 µl KOD Hot Start DNA polimeraze in 35 µl MQ.

Preglednica 3: Potek PCR reakcije pri pomnoževanju fragmentov eYFP, EqtII in Mel

Pomnoževanje	Korak	Čas	Temperatura
	Začetna denaturacija	3 min	94 °C
eYFP, EqtII, fragmenti z dodatnim RBS		30 s	94 °C
	30 ciklov	30 s	65 °C
		45 s	72 °C
	Končno podaljševanje	5 min	72 °C
	Začetna denaturacija	3 min	94 °C
		30 s	94 °C
Mel	3 cikli	30 s	60 °C
		45 s	72 °C
	Končno podaljševanje	5 min	72 °C

Aminokislinsko zaporedje eYFP-povezovalec:

>eYFP-povezovalec
MDPMVSKGEELFTGVVPILVLDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVT
TFGYGLQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGI
DFKEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVL
LPDNHYLSYQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYKSSGGGSG

3.2.2.4 Ekvinatoksin II

V Laboratoriju za molekulsko biologijo in nanobiotehnologijo (Kemijski inštitut, Ljubljana) so že imeli pripravljen plazmid z vključenim genom EqtII. Gen smo namnožili s PCR reakcijo (preglednica 3), z začetnima oligonukleotidoma EQT FWD in EQT REV. S slednjim oligonukleotidom smo pri ekvinatoksinu izpustili stop kodon ter mu na C-konec dodali glicin-serinski povezovalec. PCR mešanica je vsebovala 3 µl plazmidne DNA s koncentracijo 17 ng/µl, 0,5 µl vsakega oligonukleotida, 5 µl 10x PCR pufra, 5 µl dNTP, 2 µl MgSO₄, 1 µl KOD Hot Start DNA polimeraze in 33 µl MQ.

Aminokislinsko zaporedje EqtII-povezovalec:

>EqtII-povezovalec
MDPMSADVAGAVIDGASLSFDILKTVLEALGNVKRKIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLP
HKVPHGKALLYNGQKDRGPVATGAVGVLAYLMSDGNTLAVLFSPYDYNWYSNNWNVRIFYKGKRRA
DQRMYEELYYNLSPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFNMSSGHAILIEHVTKASSGGGSG

3.2.2.5 Melitin

Melitin je polipeptid iz čebeljega strupa (*Apis mellifera*). Sestavlja ga 26 aminokislin, zato smo nukleotidno zaporedje sestavili iz dveh prekrivajočih se oligonukleotidov. Zaporedje

aminokislin smo poiskali v podatkovni zbirki NCBI in ga s pomočjo spletnega orodja (http://www.bioinformatics.org/sms2/rev_trans.html) prevedli v nukleotidno zaporedje, ki je najbolj primerno za izražanje v *E. coli*. Uporabili smo začetne oligonukleotide MEL FWD in MEL REV, ki sta se prekrivala z 20 baznimi pari. Zaporedje ni vsebovalo stop kodona, na C-koncu pa je dodan še serin-glicinski povezovalec.

Po 1 µL vsakega oligonukleotida s koncentracijo 100 pmol/µl smo dodali v 5 µl 10x PCR pufru, 5 µl 2 mM dNTP, 2 µl 25 mM MgSO₄, 1 µl KOD Hot Start Polimeraze in 35 µl MQ. PCR reakcija je potekala pod pogoji opisanimi v preglednici 3. V PCR reakcijo smo dodali višjo koncentracijo oligonukleotidov kot pri običajnih pomnoževanjih in izvedli le tri cikle pomnoževanja. Cikli se ponovijo samo trikrat, saj želimo oligonukleotide le podaljšati na podlagi prilegajočega oligonukleotida, ne pa tudi pomnoževati zaporedja DNA.

Aminokislinsko zaporedje melitin-povezovalec:

>Melitin-povezovalec
MDPGIGAILKVLATGLPTLISWIKNKRKQSSGGGGSG

3.2.3 Priprava plazmidov z genskimi konstrukti

3.2.3.1 Priprava plazmida pET28a s konstrukti za fuzijske proteine

PCR produkte (eYFP-povezovalec, EqtII-povezovalec, Mel-povezovalec in PVY CP) smo tretirali z ustreznimi restriktijskimi encimi in tako pripravili fragmente z lepljivimi konci. PCR produkt PVY CP smo razrezali z encimoma *AvrII* in *HindIII*, PCR produkte z eYFP, EqtII in Mel pa smo razrezali z encimoma *AvrII* in *NcoI*. Encimski razrez je potekal z obema encimoma hkrati. Pri posamezni reakcijski mešanici smo uporabili 30 µl PCR produkta, 3 µl posameznega encima, 5 µl GLB pufru in 9 µl MQ. Mešanice smo inkubirali 3-3,5h na 37 °C in nato encime inaktivirali z 20 min inkubacijo na 80 °C. Z encimoma *HindIII* in *NcoI* smo razrezali tudi plazmid pET28a. K 23 µl plazmida pET28a s koncentracijo 180 ng/µl smo dodali 4,5 µl posameznega encima, 4 µl GLB pufru in 4 µl MQ. Restriktijsko mešanico smo inkubirali 15 min na 37 °C in jo nato inaktivirali 10 min na 80 °C. Pridobljene fragmente z lepljivimi konci smo morali očistiti od odrezanih delov in encima, zato smo celotno vsebino vseh restriktijskih mešanic nanesli na 1 % agarozni gel z dodanim etidijevim bromidom (EtBr). Elektroforeza je potekala 30-45 min pri 100 V, uporabili pa smo dolžinske standarde Lambda DNA/*HindII*, GeneRuler DNA Ladder Mix ali MassRuler DNA Ladder Mix (Priloga B).

Razrezane PCR produkte in plazmid smo izrezali iz agaroznega gela in jih očistili s kompletom kemikalij QIAquick Gel Extraction Kit, po navodilih proizvajalca. Sledila je ligacija fragmentov v plazmid pET28a. Molarno razmerje plazmid : vključek 1 : vključek 2

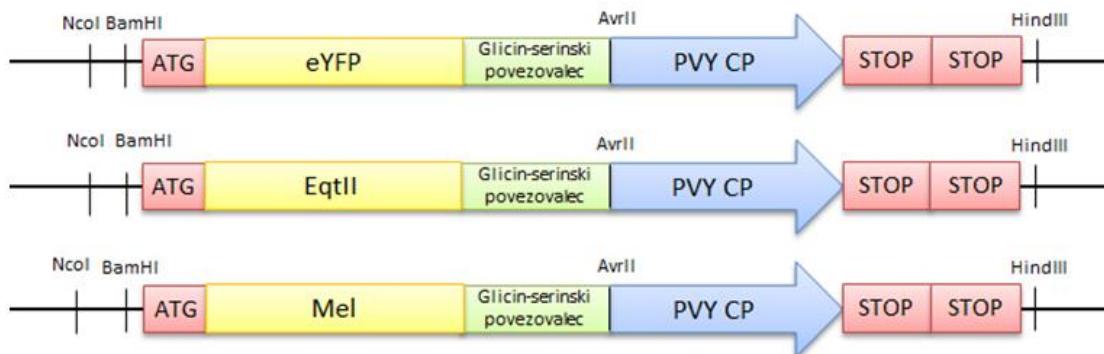
je bilo 1 : 3 : 3 (enačba 1), razen pri sestavljanju konstrukta z melitinom, kjer je bilo molarno razmerje plazmid : vključek 1 : vključek 2 = 1 : 5 : 5 (enačba 2). Potrebne mase posameznih vključkov smo izračunali po spodnjih formulah:

$$\text{Masa vključka ng} = \frac{3 \times \text{masa plazmida ng} \times \text{velikost inserta bp}}{\text{velikost plazmida bp}} \quad \dots(1)$$

$$\text{Masa vključka ng} = \frac{5 \times \text{masa plazmida ng} \times \text{velikost inserta bp}}{\text{velikost plazmida (bp)}} \quad \dots(2)$$

- a) Reakcijska mešanica za sestavljanje konstrukta z eYFP je vsebovala 5 µl plazmida pET28a s koncentracijo 20 ng/µl, 1,7 µl vključka eYFP-povezovalec s koncentracijo 25 ng/µl, 1,2 µl vključka PVY CP s koncentracijo 39,5 ng/µl, 0,5 µl T4 DNA ligaze, 1 µl GLB pufra in 0,6 µl MQ.
- b) Reakcijska mešanica za sestavljanje konstrukta z EqtII je vsebovala 5 µl plazmida pET28a s koncentracijo 20 ng/µl, 1 µl vključka EqtII-povezovalec s koncentracijo 34,5 ng/µl, 1,2 µl vključka PVY CP s koncentracijo 39,5 ng/µl, 0,5 µl T4 DNA ligaze, 1 µl GLB pufra in 1,3 µl MQ.
- c) Reakcijska mešanica za sestavljanje konstrukta z Mel je vsebovala 5 µl plazmida pET28a s koncentracijo 20 ng/µl, 0,25 µl vključka Mel-povezovalec s koncentracijo 46 ng/µl, 2 µl vključka PVY CP s koncentracijo 39,5 ng/µl, 0,5 µl T4 DNA ligaze, 1 µl GLB pufra in 1,25 µl MQ.

Inkubacija je potekala 0,5 h na sobni temperaturi. Na spodnji sliki je prikazana shema sestavljenih konstruktov:



Slika 9: Shematski prikaz genskih konstruktov vstavljenih v plazmid pET28a za izražanje fuzijskih proteinov

Ligaciji je sledil vnos plazmidov v kompetentne celice DH5-α. Uporabili smo metodo transformacije s toplotnim šokom (potek metode je opisan v poglavju 3.2.4.1). Za transformacijo smo v posamezno epico s kompetentnimi celicami dodali vseh 10 µl ligacijske mešanice vektorja pET28a z vključkom za PVY CP v fuziji z eYFP, EqtII ali Mel. Namnožene celične kulture smo razmazali na plošče s trdnim LB gojiščem z dodanim kanamicinom. Plošče smo inkubirali dva dni na 37 °C. Nato smo pripravili 18 erlenmajeric s 7 ml tekočega LB gojišča. V vsako erlenmajerico smo dodali še 7 µl kanamicina (končna

koncentracija: 30 µg/ml). Po 6 kolonij iz vsake plošče s celicami s posameznim genskim konstruktom smo precepili v erlenmajerice in jih 15 h gojili na 37 °C. Naslednji dan smo iz prekonočnih kultur izolirali plazmide s kompletom kemikalij QIAprep Spin Miniprep Kit, po navodilih proizvajalca.

Ustreznost velikosti izoliranih plazmidov smo preverjali z elektroforezo na agaroznem gelu z dodanim EtBr. Najprej smo izvedli restrikcijo, da smo pridobili plazmide v linearni obliki. Restrikcijske mešanice so vsebovale 7 µl izoliranega plazmida, 0,3-0,5 µl encima *HindIII*, 1 µl GLB pufra in 1,5-1,7 µl MQ (končni volumen: 10 µl). Kot kontrolo smo z encimoma *HindIII* in *NcoI* razrezali še prazen plazmid pET28a. Restrikcijska mešanica: 1 µl praznega plazmida pET28a, 0,3 µl posameznega encima, 1 µl GLB pufra in 7,4 µl MQ. Vse restrikcijske mešanice smo inkubirali 15 min na 37°C in jih inaktivirali 10 min na 80 °C. Nato smo celotno vsebino nanesli na agarozni gel, elektroforeza pa je potekala 1,5 h na 80 V.

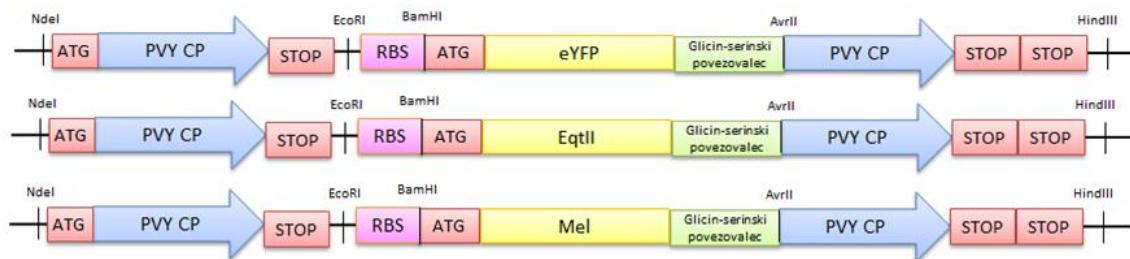
Po 3 vzorčke s posameznim insertom, pri katerih je velikost izoliranega plazmida ustrezaла pričakovanemu, smo poslali na določanje zaporedja po Sangerjevi metodi v podjetje GATC biotech. Posamezen vzorec smo pripravili v dveh epicah (400-500 ng DNA), v prvo smo dodali oligonukleotid za T7 promotor (končna koncentracija: 5 pmol), v drugo pa reverzni oligonukleotid za T7 terminator (končna koncentracija: 5 pmol).

3.2.3.2 Priprava plazmida pT7-7 s konstrukti za fuzijske proteine in dodatnim RBS mestom

Plazmidu pT7-7, ki je že vseboval gen za PVY CP, smo za ta gen vstavili še dodatno RBS mesto in gen za fuzijski CP. Sestavljeni genski konstrukti za fuzijske proteine, ki smo jih predhodno vstavili v plazmid pET28a, smo pomnožili s PCR reakcijo. Uporabili smo forward oligonukleotide ReYFP, REQT in RMEL ter reverse oligonukleotide eYFP REV, EQT REV in MEL REV. S forward oligonukleotidi smo na 5'-konec konstruktov dodali novo RBS mesto. Zaporedje baz novega vstavljenega RBS mesta je bilo enako kot zaporedje baz RBS mesta v plazmidu pT7-7 (AAGGAG).

PCR mešanica je vsebovala 1 µl plazmidne DNA s koncentracijo 45-60 ng/µl, 0,5 µl posameznega oligonukleotida, 5 µl 10x PCR pufra, 5 µl dNTP, 2 µl MgSO₄, 1 µl KOD Hot Start DNA polimeraze in 35 µl MQ. Potek PCR reakcije je opisan v preglednici 3.

Shema sestavljenega konstrukta z dodatnim RBS, genom za PVY CP in genom za fuzijski CP je prikazana na sliki 10. Med stop kodonom in novim RBS je 6 baznih parov, med RBS in start kodonom pa 7 baznih parov.



Slika 10: Shematski prikaz genskih konstruktov z dodatnim RBS mestom v plazmidu pT7-7

PCR produkte in plazmid pT7-7 z vstavljenim genom za PVY CP smo izpostavili restriktičnim encimom, ki so fragmentom izrezali lepljive konce. PCR produkta z melitinom in eYFP ter plazmid pT7-7 z vstavljenim genom za PVY CP smo razrezali z encimoma *Eco*RI in *Hind*III. PCR produkta z EqtII nismo smeli izpostaviti encimu *Hind*III, saj tudi samo zaporedje za ekvinatoksin vsebuje prepoznavno mesto za ta encim. Ta fragment smo zato izpostavili encimoma *Eco*RI in *Avr*II¹.

V posamezni restriktični mešanici smo uporabili 30 µl PCR mešanice, 3 µl posameznega encima, 5 µl 10x GLB pufra in 9 µl MQ. Mešanice smo inkubirali 3,5 h na 37 °C in nato encime inaktivirali z 20 min inkubacijo na 80 °C. Pri restriktiji plazmidne DNA smo uporabili 23 µl plazmida pT7-7 z vstavljenim genom za PVY CP, 4,5 µl posameznega encima, 4 µl 10x GLB pufra in 4 µl MQ. Mešanico smo inkubirali 15 min na 37 °C in nato encime inaktivirali z 20 min inkubacijo na 80 °C. Celotno vsebino reakcijskih mešanic smo nanesli na 1 % agarozni gel z dodanim EtBr. Elektroforeza je potekala 30-45 min pri 100 V. Posamezne delčke gela z našimi fragmenti smo izrezali in jih očistili s kompletom kemikalij QIAquick Gel Extraction Kit, po navodilih proizvajalca.

Sledila je ligacija fragmentov v plazmid z encimom T4 DNA ligazo. Pri vstavljanju fragmentov z eYFP in melitinom v plazmid je bilo molarno razmerje plazmid : vključek enako 1 : 5. Pri vstavljanju fragmenta z ekvinatoksinom smo posebej vstavili še vključek za CP PVY, zato je bilo molarno razmerje plazmid : vključek 1 : vključek 2 enako 1 : 3 : 3. Potrebne mase posameznih vključkov smo izračunali po enačbah (1) in (2).

- Ligacijska mešanica za sestavljanje vektorja z RBS-EqtII fragmentom je vsebovala 4 µl plazmida pT7-7 z vstavljenim genom za PVY CP s koncentracijo 25 ng/µl, 1,2 µl vključka RBS-EqtII-povezovalec s koncentracijo 45 ng/µl, 2 µl vključka PVY CP s koncentracijo 39,5 ng/µl, 0,5 µl T4 DNA ligaze, 1 µl GLB pufra in 1,3 µl MQ.

¹ S tem smo iz plazmida pET28a pridobili zaporedje RBS-EqtII-povezovalec, brez zaporedja PVY CP. Konstrukt smo zopet pravilno sestavili kasneje med ligacijo, kjer smo plazmidu pT7-7 z vstavljenim genom za PVY CP in fragmentu RBS-EqtII-povezovalec dodali še fragment PVY CP, ki je bil pripravljen še od sestavljanja konstruktov v pET28a.

- b) Ligacijska mešanica za sestavljanje vektorja z RBS-eYFP fragmentom je vsebovala 4 µl plazmida pT7-7 z vstavljenim genom za PVY CP s koncentracijo 25 ng/µl, 5 µl inserta RBS-eYFP-povezovalec-PVY CP s koncentracijo 50 ng/µl, 1 µl T4 DNA ligaze, 2 µl GLB pufra in 8 µl MQ.
- c) Ligacijska mešanica za sestavljanje vektorja z RBS-Mel fragmentom je vsebovala 4 µl plazmida pT7-7 z vstavljenim genom za PVY CP s koncentracijo 25 ng/µl, 5 µl inserta RBS-Mel-povezovalec-PVY CP s koncentracijo 62 ng/µl, 0,5 µl T4 DNA ligaze, 1 µl GLB pufra in 2,1 µl MQ.

Vse ligacijske mešanice smo inkubirali 30 min na 37 °C, sledila je transformacija s topotnim šokom v celice DH5-α. Postopek transformacije je opisan v poglavju 3.2.4.1. Namnožene celične kulture smo razmazali na plošče s tekočim LB gojiščem z dodanim ampicilinom. Inkubacija je potekala preko noči na 37 °C. Nato smo pripravili 9 erlenmajeric s 7 ml tekočega LB gojišča. V vsako erlenmajerico smo dodali še 10 µl ampicilina (končna koncentracija: 70 µg/ml). Po 3 kolonije iz vsake plošče s celicami s posameznim genskim konstruktom smo precepili v posamezne erlenmajerice in jih 15 h gojili na 37 °C. Naslednji dan smo iz prekonočnih kultur izolirali plazmide s kompletom kemikalij QIAprep Spin Miniprep Kit, po navodilih proizvajalca.

Ustreznost velikosti izoliranih plazmidov in prisotnost mutacij na prepoznavnih mestih za restrikcijske encime smo preverjali z restrikcijo in elektroforezo. Restrikcijske mešanice z inserti RBS-eYFP in RBS-Mel so vsebovale 2 µl izoliranega plazmida, 0,3 µl encima *Hind*III in 0,3 µl encima *Eco*RI, 1 µl GLB pufra in 6,4 µl MQ. Restrikcijska mešanica z insertom RBS-EqtII je vsebovala 2 µl plazmida, 0,3 µl encima *Eco*RI in 0,3 µl encima *Avr*II, 1 µl GLB pufra in 6,4 µl MQ. Vse restrikcijske mešanice smo inkubirali 3,5 h na 37 °C in jih inaktivirali 20 min na 80 °C. Nato smo celotno vsebino nanesli na 1 % agarozni gel z dodanim EtBr, elektroforeza je potekala 30-45 min pri 100 V.

Plazmide z vstavljenimi konstrukti smo poslali na določanje zaporedja po Sangerjevi metodi v podjetje GATC Biotech.

3.2.4 Transformacija celic, gojenje celic v erlenmajericah in izražanje proteinov

3.2.4.1 Transformacija celic

Celice smo transformirali z uporabo topotnega šoka. Kompetentne celice so bile v Laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo (Kemijski inštitut, Ljubljana) predhodno pripravljene in shranjene v epicah po 100 µl na -80 °C. Epico s celicami smo pred transformacijo pustili 5 min na ledu, da se celice odtalijo, nato smo v epico dodali 1-3 µl plazmidne DNA. Inkubirali smo jih 30 min na ledu, nato smo izvedli topotni šok v vodni kopeli 90 sec na 42 °C. Po 3 min ohlajanja na ledu smo transformiranim celicam

dodali 500 µl LB gojišča in jih stresali 1h na 37 °C pri 165 obr/min. Po končanem gojenju smo gojišče s celicami razmazali na plošče s trdnim LB gojiščem z dodanim ustreznim antibiotikom. Inkubacija je potekala 2 dni na sobni temperaturi ali preko noči na 37 °C. Nato smo posamezne kolonije inokulirali v 7-10 ml tekočega LB gojišča z dodano ustrezeno količino antibiotika.

3.2.4.2 Izražanje plaščnega proteina krompirjevega virusa Y in bakteriofaga Q-beta

V poskusni fazni smo izrazili PVY in Q-beta CP v kompetentnih celicah BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS. Celice smo transformirali s plazmidom pT7-7 z vključenim genom za CP PVY oz. CP bakteriofaga Q-beta. Transformirane celice BL21(DE3) smo razmazali na ploščah s trdnim LB gojiščem z dodanim ampicilinom, transformirane celice BL21(DE3)pLysS pa na ploščah s trdnim LB gojiščem z dodanim ampicilinom in kloramfenikolom. Inkubacija transformiranih celic je potekala 2 dni na sobni temperaturi, nato smo s posameznimi kolonijami, ki so zrasle na ploščah, inokulirali 10 ml tekočega LB gojišča v 50 ml-erlenmajericah. LB gojišču za transformirane celice BL21(DE3) smo pred inokulacijo dodali 20 µl ampicilina (končna koncentracija: 100 µg/ml), LB gojišču za transformirane celice BL21(DE3)pLysS pa 14 µl ampicilina (končna koncentracija: 70 µg/ml) in 7 µl kloramfenikola (končna koncentracija: 24 µg/ml). Celice smo stresali preko noči na 37 °C pri 165 vrt./min. Naslednji dan smo po 5 ml brozge uporabili kot vcepek in ga prenesli v 500 ml-erlenmajerice s 100 ml LB gojišča z dodanimi ustreznimi antibiotiki. V gojišče za transformirane celice BL21(DE3) smo dodali 200 µl ampicilina (končna koncentracija: 100 µg/ml), v gojišče za transformirane celice BL21(DE3)pLysS pa 140 µl ampicilina (končna koncentracija: 70 µg/ml) in 70 µl kloramfenikola (končna koncentracija: 24 µg/ml). Celice namenjene za produkcijo Q-beta CP smo stresali na 37 °C, celice za produkcijo PVY CP pa na 30 °C pri 165 vrt./min. do optične gostote (OD_{600}) 0,7-1 (absorbanca pri 600 nm). Iz vsake erlenmajerice smo odvzeli vzorček celic za kasnejšo analizo. Da je bila količina celic v vseh vzorcih med seboj primerljiva, smo volumen odvzetega vzorčka, *Vvzorčka*, izračunali po enačbi:

$$Vvzorčka \text{ [µl]} = \frac{600}{OD_{600}} \quad \dots (3)$$

Nato smo sprožili izražanje proteinov z dodatkom 80 µl IPTG v erlenmajerice (končna koncentracija: 0,4 mM). Celice za produkcijo Q-beta CP smo nato 5 h stresali na 37 °C, celice za produkcijo PVY CP pa preko noči na 20 °C pri 165 vrt./min. Po končanem izražanju smo iz erlenmajeric ponovno odvzeli vzorček za kasnejšo analizo (enačba (3)). Vse odvzete vzorčke smo najprej centrifugirali 10 min pri 13000 x g. Supernatant smo odlili, celice v peletu pa analizirali z NaDS-PAGE.

Producija plaščnih proteinov je bila pri obeh bakterijskih sevih BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS uspešna, vendar smo se zaradi lažje izolacije in čiščenja proteina odločili za nadaljnjo produkcijo proteinov v kompetentnih celicah BL21(DE3).

Producija proteinov v kompetentnih celicah BL21(DE3) je potekala po enakem postopku kot v poskusni fazi, le da je izražanje proteinov potekalo v 500 ml produkcijskega gojišča. Prehod gojenja celic v večje merilo je potekal po naslednjem postopku: posamezne kolonije iz plošč smo nacepili v 50 ml-erlenmajerice z 10 ml tekočega LB gojišča z dodanim ampicilinom in jih gojili 3-5 h na 37 °C pri 165 vrt./min. 5 ml vcepka smo nato prenesli v 100 ml tekočega LB gojišča z dodanim ampicilinom ter celice stresali preko noči na 37 °C pri 165 vrt./min. Medtem smo v 3 l-erlenmajericah pripravili po 500 ml tekočega gojišča 2 x TY oz. SOB z dodanim 1 mL ampicilina (končna koncentracija: 100 µg/ml):

- a) Gojišče 2xTY smo uporabili kot produkcijsko gojišče za izražanje PVY CP. 10 ml prekonočne kulture smo vcepili v vsako 3 l-erlenmajerico ter celice stresali na 30 °C pri 165 vrt./min. do OD₆₀₀ 0,7-1. Izražanje smo sprožili z dodatkom 200 µl IPTG (končna koncentracija: 0,2 mM), ter celice preko noči gojili na 20 °C.
- b) Gojišče SOB smo uporabili kot produkcijsko gojišče za izražanje Q-beta CP. 10 ml prekonočne kulture smo vcepili v vsako 3 l-erlenmajerico ter celice stresali na 37 °C pri 165 vrt./min. do optične gostote 0,7-1. Izražanje smo sprožili z dodatkom 1 ml IPTG (končna koncentracija: 1 mM), ter celice 5 h gojili na 37 °C.

Po končanem izražanju smo brozgo centrifugirali 20 min na 4000 g, supernatant odlili, celični pelet pa resuspendirali v 5 x M9 soleh. Sledilo je ponovno centrifugiranje 20 min na 8000 g, nato smo supernatant odlili, celični pelet pa shranili na -20°C.

3.2.4.3 Izražanje fuzijskih PVY CP v plazmidu pET28a in plazmidu pT7-7 z dodatnim RBS

Kompetentne celice BL21(DE3) smo transformirali s plazmidom pET28a, ki je vseboval vključek za PVY CP v fuziji z eYFP, EqtII ali Mel. Transformirane celice smo razmazali na plošče s trdnim LB gojiščem in dodanim kanamicinom. Gojenje celic in izražanje proteinov sta potekala po enakem postopku kot gojenje celic za produkcijo PVY CP, le da smo v vseh gojiščih namesto antibiotika ampicilin uporabili kanamicin. K 10 ml tekočega LB gojišča smo dodali 10 µl kanamicina (končna koncentracija: 30 µg/ml), k 100 ml LB gojišča smo dodali 100 µl kanamicina in k 500 ml 2 x TY gojišča smo dodali 500 µl kanamicina.

Hkratno izražanje PVY CP in fuzijskih CP v plazmidu z dodatnim RBS je potekalo po enakem postopku kot izražanje samih PVY CP v poglavju 3.2.4.2.

3.2.4.4 Izražanje nativnih in fuzijskih PVY CP s ko-transformacijo

Kompetentne celice BL21(DE3) smo hkrati transformirali s plazmidom pET28a, ki je vseboval vključek za PVY CP v fuziji, in plazmidom pT7-7, ki je vseboval vključek za PVY CP. H kompetentnim celicam smo v postopku transformacije dodali po 50 ng posameznega plazmida. V prvo epico s kompetentnimi celicami smo dodali 0,6 µl plazmida pET28a z vstavljenim melitinom in 0,2 µl plazmida pT7-7; v drugo epico smo dodali 1,1 µl plazmida pET28a z vstavljenim ekvinatoksinom II in 0,2 µl plazmida pT7-7; v tretjo epico pa smo dodali 0,25 µl plazmida pET28a z vstavljenim eYFP in 0,2 µl plazmida pT7-7. Nadaljnji postopki transformacije, gojenje celic ter izražanje proteinov so potekali enako kot izražanje samega PVY CP.

3.2.5 Izolacija in čiščenje VLP

Vse PVY VLP smo izolirali in očistili po istem postopku, razen kjer je navedeno drugače. Pri Q-beta VLP smo postopek čiščenja nekoliko prilagodili. Za delo s PVY VLP smo uporabljali PBS pufer (1,8 mM KH₂PO₄, 10,1 mM Na₂HPO₄, 140 mM NaCl, 2,4 mM KCl, pH 7,4), pri delu s Q-beta VLP pa TBS pufer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4).

3.2.5.1 Soniciranje celic

Zamrznjen celični pelet smo resuspendirali v PBS oz. TBS pufru in ga še 20 min stresali, da so se zagotovo razbili še vsi neraztopljeni delci. Čašo z resuspendiranimi celicami smo ves čas hranili na ledu. Celice smo nato razbili z ultrazvokom s sonikatorjem Ultrasonic Processor, po programu 5 min (1 s trajajoči pulz, 2 s premor) z veliko potopno sondou, pri 38-odstotni amplitudi. Med soniciranjem smo pazili, da je bila sonda ves čas potopljena v vzorec in da se ni dotikala sten čaše. Sledilo je centrifugiranje razbite bakterijske suspenzije 20 min na 13000 g na 4 °C. VLP so se nahajali v supernatantu, pelet pa smo zavrgli.

3.2.5.2 Precipitacija proteinov

Supernatant z VLP smo ves čas hranili na ledu. Vse vzorce, ki so vsebovali PVY VLP, smo precipitirali z dodatkom PEG 8000 (končna koncentracija: 4 % (m/V)) in NaCl (končna koncentracija: 0,5 M). Mešanico smo na 4 °C nežno mešali dokler brezbarvna raztopina ni postala mlečne barve (približno 20 min). Sledilo je centrifugiranje 30 min pri 14000 g. Supernatant smo zavrgli, pelet pa raztopili v PBS pufru. Raztopino smo stresali še preko noči na 4 °C, da smo zagotovili, da so se raztopili vsi delci s precipitiranimi proteini. Naslednji dan smo raztopino centrifugirali 20 min pri 35000-45000 g. Supernatant smo shranili, pelet pa še enkrat resuspendirali v 1 ml PBS in ga ponovno centrifugirali 20 min

na 45000 g. Pridobljeni supernatant smo dodali k prvemu supernatantu, v njem so bili prisotni VLP.

Q-beta CP v supernatantu smo precipitirali z dodatkom PEG 8000 (končna koncentracija: 10 % (m/V)). Raztopino smo rahlo mešali 40 min na 4 °C. Sledilo je centrifugiranje 30 min na 14000 g. Supernatant smo zavrgli, pelet pa resuspendirali v TBS pufru in ga stresali preko noči na 4 °C.

3.2.5.3 Ekstrakcija z butanolom in kloroformom

Z ekstrakcijo s kloroformom in butanolom iz vzorca odstranimo lipide in membranske proteine. Ta postopek smo izvedli samo pri vzorcu s Q-beta VLP, po precipitaciji s PEG 8000. Pelet po precipitaciji smo resuspendirali v TBS pufru in raztopino ponovno centrifugirali 20 min pri 24000 g. Pelet smo zavrgli, supernatantu z VLP pa smo dodali kloroform in butanol v razmerju 1 : 1. Raztopino smo centrifugirali v steklenih centrifugirkah, 15 min pri 2000 g. Med centrifugiranjem so se v centrifugirkah izoblikovale 3 plasti, za nadaljnje delo s Q-beta VLP pa smo uporabili zgornjo, vodno plast.

3.2.5.4 Ultracentrifugiranje na saharoznem gradientu

Za čiščenje virusov in VLP se največkrat uporablja ultracentrifugiranje pri visokih obratih na saharoznem ali CsCl gradientu. Delci iz vzorca med gradientnim centrifugiranjem potujejo skozi gradient toliko časa, dokler ne pridejo do sloja v gradientu, ki ima enako gostoto kot delec sam, nato se tam ustavijo.

Odločili smo se za ultracentrifugiranje VLP na ročno pripravljenem nezveznem saharoznem gradientu. Uporabili smo 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 in 60-odstotne raztopine saharoze. Zatehtali smo potrebno količino saharoze (preglednica 5) in jo ob rahlem segrevanju med mešanjem raztopili v MQ. Raztopine smo pred uporabo filtrirali skozi 0,22 µm filter.

Preglednica 4: Pregled uporabljenih koncentracij saharoze

Raztopina saharoze % (m:V)	Zatehta saharoze (g za 50 ml raztopine)
20	10,0
25	12,5
30	15,0
35	17,5
40	20,0
45	22,5
50	25,0
55	27,5
60	30,0

S stekleno 500 µl siringo smo raztopine saharoze po vrsti previdno nanesli v ultracentrifugirke. Spodnji sloj je predstavljala 60-odstotna raztopina saharoze, najvišji sloj pa 20-odstotna raztopina. 60-35-odstotne raztopine smo nanesli po 1200 µl, 30-20-odstotne raztopine smo nanesli po 600 µl. Na vrh gradiента smo nanesli 500-750 µl vzorca. Ultracentrifugirke smo na vrhu previdno zatalili in jih prenesli v Beckmann L7 preparativno ultracentrifugo. Ultracentrifugiranje je potekalo 6 h pri 117000 g na 4 °C za vzorce s PVY VLP in 3,5 h pri 152000 g na 4 °C za vzorce s Q-beta VLP. Po končanem ultracentrifugiranju smo centrifugirke na vrhu odrezali in s pipeto previdno z vrha pobirali 1 ml frakcije. Prisotnost VLP v frakcijah smo preverili z NaDS-PAGE. Za nadaljnje analize smo združili zadnjih 4-5 frakcij, ki so glede na NaDS-PAGE vsebovale najvišje koncentracije CP z najmanj prisotnimi nečistočami.

3.2.5.5 Natrijev dodecil sulfat – poliakrilamidna gelska elektroforeza (NaDS-PAGE)

NaDS-PAGE je metoda za ločevanje proteinov znotraj posameznega vzorca. Uporabna je za nadzorovanje čistosti vzorca in za določanje molekulske mase proteinov. Proteine se denaturira s prekuhavanjem v prisotnosti reducentov in detergenta NaDS, ki protein prekrije z negativnim nabojem. Negativni naboj omogoča potovanje v električnem polju skozi gel iz polimeriziranega akrilamida. V povprečju se na vsaka dva aminokislinska preostanka veže ena molekula NaDS in tako popolnoma prekrije osnovni naboj proteina. Ločevanje proteinov po metodi NaDS-PAGE zato temelji le na velikosti, ne pa tudi na naboju proteina (Sangha in Sharma, 2009; Walker, 2000).

Proteinske vzorce za NaDS-PAGE smo pripravili tako, da smo vzorce zmešali s štirikratnim nanašalnim pufrom (NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)) in 1-2 µl 0,5 M DTT (vzorcem v postopku izolacije, ki so vsebovali celice, smo dodali 10 µl 0,5 M DTT). Vzorce z višjimi koncentracijami smo ustrezno redčili z MQ. Vzorce smo nato denaturirali 3 min na 70 °C (vzorce, ki so vsebovali celice, smo denaturirali 15 min na 70 °C). Nanesli smo jih v žepke na zgornji strani NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini gelov s 4-12 % zamreženostjo. Uporabili smo gele z 10, 12 ali 15 žepki. Uporabili smo standarde znanih molekulskih mas Novex®Sharp Unstained Protein Standard ali Precision Plus Protein™ Unstained Standards (Priloga A). Gel je bil vpet v elektroforezni sistem XCell SureLockTM Mini-Cell Electrophoresis System. Elektroforeza je potekala 40 min pri konstantni napetosti 200 V in začetnem toku 125 mA v 5-odstotni raztopini elektroforeznega pufra NuPAGE® MES SDS Running Buffer. Po elektroforetski separaciji proteinov smo gel 3-krat 5 min spirali v MQ. Gel smo nato 30 min inkubirali v ogretem barvilu Simply Blue™ SafeStain in ga nato ponovno spirali v MQ do želenega kontrasta proteinskih lis. Gel smo slikali in ga shranili na -20 °C.

3.2.5.6 Dializa

Dializa je metoda, ki se uporablja pri zamenjavi pufra ali razsoljevanju vzorca, saj poteka preko polprepustne membrane, ki omogoča prehajanje manjših molekul medtem ko večjih ne prepusti skozi. Izbiramo lahko med različnimi velikostmi por, dializa pa poteka v dializnem črevesju ali dializni kaseti.

Dializo z dializnim črevesjem z velikostjo por 12000-14000 MWCO smo izvedli po ultracentrifugiranju vzorcev. CP so se po ultracentrifugiranju nahajali v raztopini saharoze, ki smo jo s tem postopkom zamenjali s PBS oz. TBS pufrom. Dializo z dializnimi kasetami Slide-A-Lyzer z 10000 MWCO smo izvedli pri menjavi PBS pufra z 10 mM fosfatnim pufrom. V tem primeru je bil volumen vzorca manjši, zato smo uporabili dializne kasete s kapaciteto 0,1-0,5 ml. Za vsako dializo smo pripravili 100-kratni volumen ohlajenega dializnega pufra glede na volumen vzorca. Dializno črevo in kaseto smo v obeh primerih pred uporabo omočili v dializnem pufru. V črevo oz. kaseto smo vnesli vzorec, čašo postavili na 4 °C in rahlo mešali. Dializni pufer smo zamenjali 3-krat, najprej po 2-3 h, naslednjič po 3-4 h po prvi menjavi, nazadnje smo dializo pustili teči preko noči.

3.2.5.7 Koncentriranje

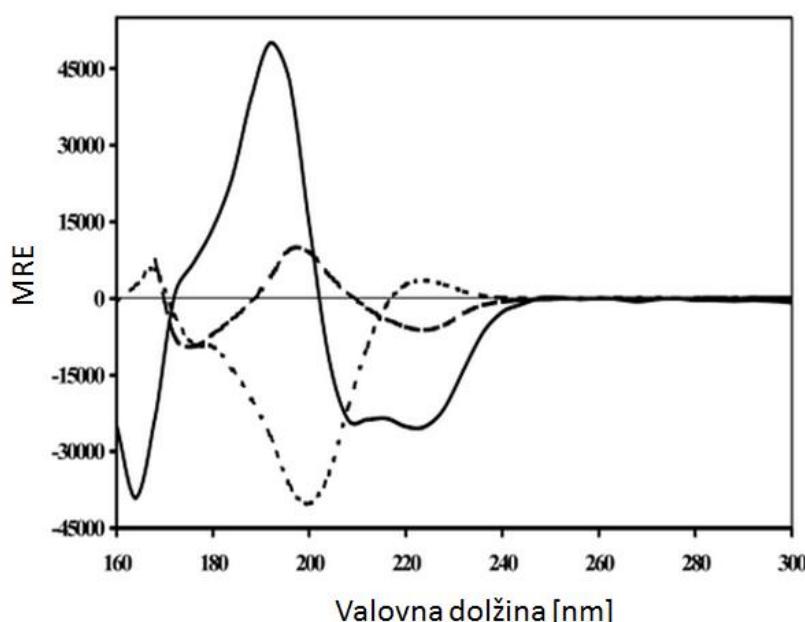
VLP so zelo veliki proteinski delci, ki jih sestavlja tudi po 2000 proteinskih podenot. Pri koncentriranju smo zato lahko uporabili koncentratorje s porami velikimi 100 kDa. S tem smo omogočili prehajanje ostalih manjših proteinov v filtrat in dodatno očistili pridobljene VLP. Koncentriranje je potekalo v 15 ml 100 kDa Amicon Ultra koncentratorjih. Centrifugirali smo v swing-out rotorju pri 3730-4000 g na 4 °C. Med dodajanjem vzorca v koncentrator smo s pipeto ali nežnim vorteksiranjem vsebino tudi premešali. Pred in po končanem centrifugiranju smo z uporabo NanoDrop1000 aparature izmerili absorbanco vzorca pri 280 nm. Koncentracijo PVY CP v vzorcu smo izračunali tako, da smo izmerjeno absorbanco delili z 2,4 (Rupar in sod., 2012). Shranili smo tudi filtrat, v primeru da bi se filter poškodoval in bi VLP prehajali skozi membrano.

3.2.6 Metode za opredelitev lastnosti VLP

3.2.6.1 Cirkularni dikroizem

Cirkularni dikroizem je definiran kot razlika v absorbciiji levo in desnosučne polarizirane svetlobe kiralne molekule. Deli polipeptidne verige znotraj proteina tvorijo različne vrste sekundarnih zgradb, ki so same po sebi kiralne (npr. levo in desnosučni heliks). Lastnosti teh zgradb tvorijo CD spekter peptidnih vezi proteina in tako podajo informacije o sekundarni zgradbi proteina. Zgradba α -heliksa ima na CD spektru dva negativna vrhova pri ~222 nm in ~208 nm in pozitivni vrh pri ~190 nm, zgradba β -plošče pa ima prehoda pri

~215 nm in ~195 nm (slika 11). Pridobljeni CD spekter proteina predstavlja vsoto vseh komponent sekundarnih zgradb. Glede na poznane spektre osnovnih elementov sekundarnih zgradb se lahko na podlagi izmerjenega CD spektra preiskovanega proteina predvidi njegovo zgradbo (Janes in Wallace, 2009).



Slika 11: CD spekter treh različnih proteinov, vsak s prevladajočim tipom sekundarne zgradbe (Wallace in Janes, 2009: 10). Polna črta predstavlja spekter proteina z večinskim deležem α -vijačnice; prekinjena črta predstavlja spekter proteina z večinskim deležem β -plošče; pikasta linija predstavlja protein z večinskim deležem neurejene zgradbe.

CD spekter smo merili pri vzorcu s PVY VLP. Vzorec smo pred merjenjem dializirali proti 10 mM fosfatnemu pufru pH 7,4 in ga ustrezno redčili do koncentracije 0,08-0,06 mg/ml. Merjenje je potekalo v kivetah iz kvarčnega stekla z dolžino optične poti 1 mm, v katero smo odpipetirali 360 μ l vzorca. CD spekter smo izmerili pri valovnih dolzinah 190-250 nm s sekundnim korakom po 0,5 nm pri 20 °C. Temperaturno stabilnost sekundarne zgradbe PVY VLP smo analizirali tako, da smo izmerili CD spektre v temperaturnem območju 20-90 °C in odčitali vrednosti pri valovni dolžini, pri kateri so bile opazne največje spremembe.

Podatke pridobljenega CD spektra PVY VLP pri 20 °C med valovnima dolžinama 190 in 240 nm smo vnesli v javno dostopen program K2D3 (Louis-Jeune in sod., 2011), ki primerja pridobljeni CD spekter s teoretičnimi CD spektri proteinov s poznano tridimenzionalno zgradbo. S programom tako ocenimo delež α in β zgradb v proteinu.

3.2.6.2 Modra nativna poliakrilamidna gelska elektroforeza

Modra nativna poliakrilamidna gelska elektroforeza (BN-PAGE) je elektroforezna metoda, s katero analiziramo ne-disociirane proteinske komplekse glede na sestavo, oligomerno stanje in molekulsko maso (Heuberger et al., 2002). Pri klasični NaDS-PAGE metodi se kot molekula ki protein obda z negativnim nabojem uporablja SDS, ki se veže na denaturiran protein. Pri BN-PAGE se uporablja Coomassie G-250, ki se veže na protein in ga obda z negativnim nabojem, ob tem pa protein obdrži svojo nativno obliko. Negativni naboj proteina omogoča njegovo potovanje proti anodi v električnem polju. Barvilo G-250 je prisotno v katodnem in nanašalnem pufru, kar med elektroforezo omogoča stalen dotok barvila v gel. Zaradi velike raznolikosti zgradb in karakteristik nativnih proteinov, lahko prihaja do 15 % napake pri določanju velikosti proteinov na podlagi BN-PAGE. Do napak pri ocenjevanju velikosti proteinov lahko prihaja zaradi počasnejšega potovanja proteinov po gelu, precenjevanja mase proteina, ki so posledica ne-optimalne vezave G-250, proteinskih zgradb ki bistveno odstopajo od globularne oblike, glikozilacije ali vezave lipidov (NativePAGE ..., 2012).

Pufer za elektroforezo smo si pripravili z redčenjem 20 x NativePAGE Running Buffer pufra v MQ. 200 ml pufra za elektroforezo smo prelimi v dugo čašo in mu dodali 1 ml 20 x NativePAGE Cathode Buffer pufra, ter tako pridobili katodni pufer, ki je vseboval 0,002 % barvila G-250. Vzorcem smo dodali nanašalni pufer 4 x SBnative v razmerju 3 : 1. Vzorce in standard molekulskih mas NativeMark™ Unstained Protein Standard (Priloga A) smo nato nanesli v žepke na vrhu 4-16 % Bis-Tris gela, ki smo ga vpeli v XCell SureLock® Mini Cell sistem. Elektroforeza je potekala prvih 60 min pri 150 V in naslednjih 40-60 min pri 250 V na 4 °C. Gel smo po končani elektroforezi obarvali s kompletom Colloidal Blue Staining Kit, po navodilih proizvajalca.

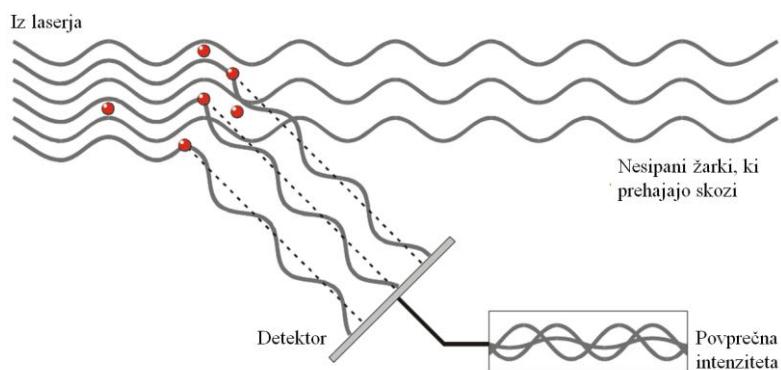
3.2.6.3 Western prenos

Z vzorci, ki so vsebovali PVY CP in fuzijske CP smo izvedli imunološko detekcijo proteinov na membrani. Z metodo smo želeli dokazati prisotnost PVY CP v vzorcih in potrditi in lise na membrani primerjati z lisami na gelu pridobljenimi z NaDS-PAGE. Najprej smo z vsemi vzorčki naredili NaDS-PAGE, kot standard znanih molekulskih mas smo uporabili Novex®Sharp Pre-stained Protein Standard (Priloga A). Po končani elektroforezi smo gel sprali v MQ in s pomočjo aparata i-Blot™ s programom P3 v 7 min prenesli proteine iz gela na PVDF membrano. Prosta vezavna mesta na membrani smo 1 h blokirali v pripravljenem 5-odstotnem mleku v TBS-T (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % (V/V) Tween-20, pH 7,4). Membrano smo nato 2-krat 5 min spirali v TBS-T in jo zatem inkubirali v primarnih protitelesih 1 h na sobni temperaturi pri blagem stresanju. Uporabili smo z alkalno fosfatazo označena protitelesa proti PVY, ki smo jih dobili na Nacionalnem inštitutu za Biologijo (Ljubljana). Protitelesa smo resuspendirali v 5-odstotnem mleku v

TBS-T v razmerju 1 : 1000. Po inkubaciji smo membrano 4-krat 5 min spirali v TBS-T. Proteine na membrani smo nato detektirali z reagentom BCIP®/NBT Solution, premixed 50 min med rahlim stresanjem na sobni temperaturi.

3.2.6.4 Dinamično sisanje svetlobe

DLS s pomočjo spremljanja Brownovega gibanja delcev oceni njihovo velikost. Brownovo gibanje je gibanje delcev kot posledica naključnih trkov z molekulami raztopine, v kateri so delci raztopljeni. Za DLS pomembna lastnost Brownovega gibanja je, da se manjši delci po raztopini premikajo hitreje, večji delci pa počasneje. Meritve velikosti z DLS potekajo tako, da se delce obsveti z laserjem in nato analizira spremembe v intenzivnosti sipane svetlobe v zelo kratkem časovnem razponu (nivo nanosekund ali mikrosekund) (slika 12). Ker se manjši delci premikajo hitreje, je spremenjanje intenzivnosti sipane svetlobe hitrejša kot pri večjih delcih. Povezava med velikostjo delca in njegovo hitrostjo zaradi Brownovega gibanja je podana s Stokes-Einsteinovo enačbo (Zetasizer ..., 2013).



Sipani žarki padajo na detektor.

Slika 12: Sisanje laserskih žarkov, ko prehajajo skozi raztopino delcev (Zetasizer ..., 2013).

Hidrodinamska velikost delcev izmerjena z DLS je definirana kot velikost hipotetične trdne krogle, pri kateri difuzija poteka na enak način kot pri analiziranem delcu. V praksi pa so delci ali makromolekule ne-krogličnih oblik, dinamični in raztopljeni. Zato izračunan premer delca, ki izhaja iz lastnosti njegove difuzije v raztopini, predstavlja velikost dinamičnih hidratiziranih/raztopljenih delcev, parameter pa imenujemo hidrodinamski premer. Hidrodinamski ali Stokesov premer je torej premer kroglastega delca, ki ima enak difuzijski koeficient kot analizirani delci, s predpostavko, da delci obdaja hidratacijski ovoj (Dynamic ..., 2011).

Z DLS smo izmerili hidrodinamski premer vseh pridobljenih VLP, ter spremljali spremembo velikosti PVY VLP inkubiranih v različnih pogojih. Vzorce smo pred merjenjem z DLS centrifugirali 10 min na 16100 g, nato 80 µl vzorca prenesli v kivet in

jo vstavili v napravo Zetasizer Nano ZS. Oceno o točnosti izračunanega premera smo določali s pomočjo parametrov polidisperzni indeks (PDI) in polidisperznost. Podatke smo analizirali s programom Zetasizer v7.11.

Za merjenje velikosti PVY VLP po inkubaciji v različnih pogojih, smo 20 µl PVY vzorca v PBS s koncentracijo 2 mg/ml dodali 200 µl raztopine z naslednjimi pogoji:

Preglednica 5: Pogoji za inkubacijo PVY VLP pri spremeljanju spremembe zgradbe

Pogoji	Priprava raztopine	Inkubacija
PBS	200 µl PBS	30 min, 37 °C
1 M NaCl	160 µl PBS, 40 µl 5 M NaCl	30 min, 37 °C
1 M CaCl₂	100 µl PBS, 100 µl 2 M CaCl ₂	20 min, 4 °C
20 mM DTT	196 µl PBS, 4 µl 1 M DTT	30 min, 37 °C
20 mM EDTA	192 µl PBS, 8 µl 0,5 M EDTA	30 min, 37 °C
pufer pH 2,4	200 µl glicin-HCl pufera	30 min, 37 °C
pufer pH 11	200 µl fosfatnega pufera	30 min, 37 °C
ocetna kislina	200 µl glacialne ocetne kisl.	20 min, 4 °C

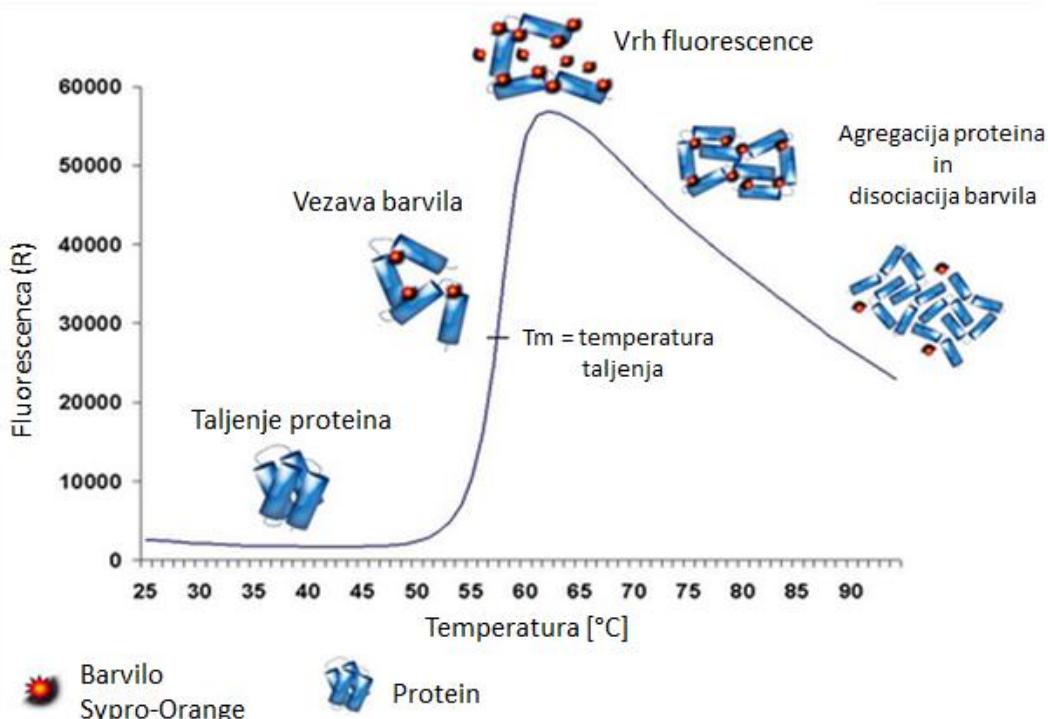
3.2.6.5 Diferenčna dinamična fluorimetrija

DSF je hitra in poceni metoda, s katero merimo termično stabilnost očiščenih proteinov ali stabilnost vezave proteina in liganda. Možno je analizirati veliko vzorcev hkrati, pri posameznem vzorcu pa so potrebne nizke koncentracije proteina, zato je metoda odlična platforma za pregled obnašanja določenega proteina v različnih pogojih.

Stabilnost proteina je povezana s spremembijo Gibbsove proste energije (ΔG_u) razvijanja proteina, ki je odvisna od temperature. Stabilnost večine proteinov se s temperaturo zmanjšuje; s poviševanjem temperature se ΔG_u znižuje in postane enaka nič v točki ravnotežja, ko sta koncentraciji zvitih in razvitih proteinov enaki. Temperaturo v tej točki imenujemo temperatura denaturacije ali prehoda (Tm). Z DSF spremljamo termično razvijanje proteina v prisotnosti fluorescenčnega barvila, meritve pa največkrat potekajo v standardni napravi za RT-PCR. Fluorescenčna barvila, ki se uporabljajo pri DSF, morajo imeti visoko intenziteto fluorescence v nepolarnem okolju, kot so hidrofobna območja na razvitem proteinu, v vodnem okolju pa mora biti fluorescensa nizka. Med merjenjem se intenziteta fluorescence izriše kot funkcija temperature, izriše se sigmoidna krivulja z dvema prehodoma (slika 13). Prevojna točka krivulje (Tm) se izračuna s pomočjo Boltzmannove enačbe (enačba (4)) (Niesen in sod., 2007). Točka prevoja se lahko določi tudi iz minimuma odvoda krivulje.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{(x-x_0)/dx}} + A_2 \quad \dots(4)$$

Boltzmannova enačba. A₁ – začetna vrednost krivulje, A₂ – končna vrednost krivulje, x₀ – prevojna točka krivulje, dx – časovna konstanta.



Slika 13: Potek termične denaturacije proteina pri metodi DSF (povzeto po Ligand Screening, 2015).

DSF meritve so potekale na napravi LightCycler® 480 System. Na aparaturi smo najprej opravili testno merjenje za PVY vzorce v PBS pufru, nato smo opravili meritve pri vzorcih izpostavljenih različnim pogojem. Vzorce smo pripravili v mikrotiterskih ploščah s 96 jamicami s končnim volumnom 30 µl ali 50 µl. Za testno merjenje smo v mikrotiterski plošči pripravili raztopine z različnimi koncentracijami PVY CP (0,01 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,10 mg/ml, 0,20 mg/ml in 0,50 mg/ml) in različnimi koncentracijami barvila Sypro Orange (1 x, 5 x, 20 x in 50 x redčena založna raztopina barvila s koncentracijo xxxy mg/mL) v PBS pufru. Pri spremeljanju termične stabilnosti PVY VLP v različnih pogojih smo pripravili 50 mM pufre z različnimi pH vrednostmi (pH 2,4 in 3 (glicin-HCl pufer), pH 4 in 5 (citratni pufer), pH 6, 7 in 8 (fosfatni pufer), pH 9 in 10 (glicin-NaOH pufer) in pH 11 (fosfatni pufer)) ter fosfatne pufre z različno koncentracijo soli NaCl (0 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, 600 mM, 800 mM in 1000 mM) pri pH 7,4. PVY vzorce smo pred uporabo centrifugirali 10 min na 16100 g. Barvilo Sypro Orange je shranjeno na -70 °C, zato smo ga odtalili na sobni temperaturi in kratko centrifugirali. Po potrebi smo iz 5000 x koncentracije založne raztopine barvila pripravili predredčitve na 500 x ali 50 x koncentracijo. V jamice smo najprej dodali ustrezne količine pufra in vzorca, na koncu pa barvilo, ki smo ga zaščitili pred neposredno svetlobo. Mikrotitersko ploščo z vzorci smo hranili na ledu in jo pred vstavljanjem v napravo LightCycler® 480 System centrifugirali 10 min pri 2140 g. DSF smo merili v temperturnem območju 20 °C do 95 °C s korakom po 0,04 °C na sekundo. Za upravljanje

RT-PCR naprave smo uporabljali program LightCycler® v4.0, rezultate pa smo analizirali s programom Origin v8.1.

3.2.6.6 Diferenčna dinamična kalorimetrija

Podobno kot pri metodi DSF, tudi z metodo DSC analiziramo termično stabilnost proteinov in drugih makromolekul oz. materialov. DSC je najbolj direktna in občutljiva metoda za karakterizacijo termodinamskih parametrov, ki vplivajo na stabilnost in obstoj ne-kovalentnih vezi znotraj proteinov. Z DSC merimo spremembo v energiji dovedeni vzorčni celici v primerjavi z referenčno celico, pri segrevanju ali ohlajanju, pri čemer ostaja temperatura vzorčne in referenčne celice enaka. Tako se določijo absolutni termodinamski parametri termalno induciranih prehodov. Stabilnost proteina pri določenih razmerah (ali je protein pravilno zvit ali razvit) je odvisno od entalpije (ΔH) in entropije (ΔS) sistema, za katerega velja enačba 5. Razvitje proteina se zgodi, ko se $T\Delta S$ zadosti poveča (npr. kot posledica absorbcije toplove), da prevlada stabilizirajoče entalpijske interakcije (ΔH se zmanjša), kot so vodikove vezi, hidrofobne in elektrostatske interakcije. V enem samem poskusu razvijanja proteina lahko z DSC direktno izmerimo in izračunamo vse termodinamske parametre, ki dajejo lastnosti temu proteinu: ΔH_{cal} (entalpija izmerjena s kalorimetrijo) kot posledica termalne denaturacije, T_m , kjer je polovica proteina v denaturiranem stanju in druga polovica v nativni obliki, ΔC_p (sprememba topotne kapacitete) kot posledica termičnega razvijanja, ΔG (Gibbsova prosta energija) in ΔS (Life sciences ..., 2006).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \dots (5)$$

Meritve z DSC so izvedli na Katedri za biokemijo in kemijo živil, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta (Ljubljana). Za meritve smo pripravili po 1 ml posameznega vzorca v PBS ali fosfatnem pufru, s koncentracijo 0,5 mg/ml.

3.2.6.7 Fluorimetrija

S fluorimetrom smo merili fluorescenco vzorcev, ki so vsebovali fuzijske CP z eYFP. Vzorce smo redčili do koncentracije 0,2 mg/ml v PBS pufu. Posamezen vzorec smo prenesli v 500 μ l steklene kivete in izmerili fluorescenco. Kot negativno kontrolo smo fluorescenco izmerili tudi preostalim vzorcem s CP, ki niso vsebovali eYFP. eYFP smo vzbujali pri valovni dolžini 490 nm in spremljali emisijo pri valovnih dolžinah 500-600 nm.

3.2.6.8 UV-VIS spektrometrija

Koncentracijo proteinov v vzorcih smo najprej določili s kolorimetričnim testom z metodo po Bradfordu. Pripravili smo svežo raztopino Bradfordovega reagenta, tako da smo Bradfordov reagent (5 x) redčili v MQ v razmerju 1 : 4. Raztopino smo filtrirali skozi 0,22 µm filter. Nato smo v plastično kiveto odpipetirali 100 µl vzorca in 1 ml Bradfordovega reagenta ter čas inkubacije merili s štoparico. Po točno 2 min smo na UV-VIS spektrofotometru izmerili absorbancijo vzorca pri valovni dolžini 595 nm.

Vzorce smo nato redčili do koncentracije 0,1 oz. 0,2 mg/ml. Po 100 µl posameznega vzorčka s koncentracijo 0,1 mg/ml smo prenesli v stekleno kiveto in na UV-VIS spektrofotometru posneli absorpcijski spekter pri 220-340 nm. Tem vzorcem smo posneli absorpcijski spekter v istem območju tudi na NanoDropu 1000, pri čemer smo na NanoDrop nanesli 2,5 µl vzorca. Proteini imajo ponavadi absorpcijski maksimum pri 280 nm, kar je posledica aromatskih aminokislin triptofana, tirozina in do neke mere fenilalanina, ki pri tej valovni dolžini absorbirajo svetlobo.

Vzorce s koncentracijo 0,2 mg/ml smo denaturirali v raztopini s 4-odstotnim SDS in 40 mM DTT. Posameznemu vzorcu smo dodali raztopino v volumskem razmerju 1 : 1 in jih inkubirali 5 min na 95 °C. Pridobljenim denaturiranim vzorcem s koncentracijo 0,1 mg/ml smo posneli absorpcijski spekter pri 220-340 nm takoj po ohladitvi na sobno temperaturo in še enkrat po 7 dneh inkubacije (vzorci so bili med tem shranjeni na 4 °C).

3.2.6.9 Konfokalna mikroskopija

PVY vzorce, ki so vsebovali eYFP, smo centrifugirali in pripravili v različnih koncentracijah. Po 2 µl vzorca smo nanesli na objektno stekelce in pogledali pod konfokalnim mikroskopom Leica TCS z imerzijskim objektivom pod 63-kratno povečavo. eYFP smo vzbujali z argonovim laserjem pri 514 nm, emisijo pa smo spremljali pri 527 nm.

Vzorec, ki je vseboval le PVY CP, smo fluorescenčno označili z Monolith NTT™ Protein Labelling kompletom. K 100 µl vzorca PVY VLP s koncentracijo 1 mg/ml smo dodali 40 µl predhodno raztopljenega fluorescenčnega barvila iz kompleta. Mešanico smo inkubirali 30 min na sobni temperaturi v temi. Zatem smo označene PVY VLP spirali s centrifugiranjem 5-krat po 3 min pri 3730 g skozi Amicon® Ultra-4 100 kDa koncentrator. Po vsakem centrifugiranju (razen po zadnjem) smo k označenim PVY VLP dodali 2 ml PBS pufr, filtrat pa smo prelili in shranili. Na koncu smo pridobili 200 µl vzorca z označenimi PVY VLP. Vzorec smo nato redčili s faktorjem redčitve 2 in jih pogledali pod konfokalnim mikroskopom. Fluorescenčno barvilo smo vzbujali s HeNe laserjem pri 633

nm, emisijo pa smo spremljali pri 647-691 nm. Posnete slike smo analizirali s programom Leica LAS AF 2.5.1.

3.2.6.10 Transmisijska elektronska mikroskopija

PVY vzorce smo centrifugirali in pripravili različne koncentracije z redčenjem v PBS pufru. Nato so vzorce za transmisijsko elektronsko mikroskopijo (TEM) z metodo negativnega kontrastiranja z uranil acetatom pripravili na Katedri za zoologijo, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta (Ljubljana). Uporabli smo TEM Philips CM100 z vgrajenima digitalnima kamerama BioScan 792 (Gatan) in Orius SC200 (Gatan). Posnete slike smo v .tif formatu analizirali s programom ImageJ v1.48.

3.2.6.11 Modeliranje prostorske zgradbe PVY CP na strežniku I-TASSER

Za modeliranje prostorske zgradbe proteinov obstaja več strežnikov, katerih učinkovitost se vsaki dve leti preverja na CASP-u (angl. Critical Assessment of protein Structure Prediction). V zadnjih letih se kot najuspešnejši pri ocenjevanju zgradbe predstavlja server I-TASSER (Yang in sod., 2015; Roy in sod., 2010; Zhang, 2008). Za pridobitev prostorskega modela PVY CP smo v strežnik I-TASSER vnesli celotno aminokislinsko zaporedje proteina.

4 REZULTATI Z RAZPRAVO

4.1 PRIPRAVA KONSTRUKTOV

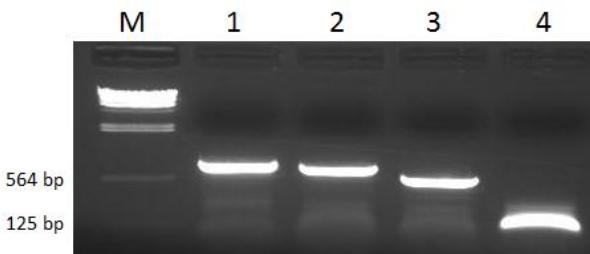
4.1.1 Konstrukti v plazmidu pET28a

S PCR metodo smo pomnožili ustrezna zaporedja, ki kodirajo gene za PVY CP, eYFP-povezovalec, EqtII-povezovalec in Mel-povezovalec. Izpostavili smo jih restrikcijskim encimom, ki so napravili lepljive konce zaporedij. Predvidene velikosti fragmentov z lepljivimi konci so zbrane v preglednici 6.

Preglednica 6: Predvidene velikosti konstruktov za fuzijske proteine po izpostavitvi restrikcijskim encimom

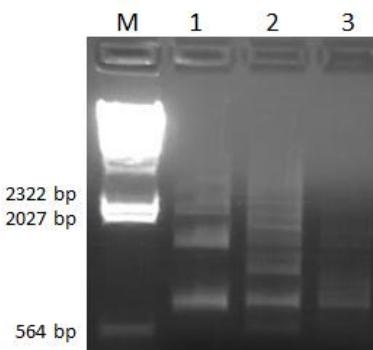
Fragment	Dolžina (bp)	Restrikcijski encimi
PVY CP za fuzijo	813	<i>AvrII, HindIII</i>
eYFP-povezovalec	752	<i>NcoI, AvrII</i>
EqtII-povezovalec	575	<i>NcoI, AvrII</i>
Mel-povezovalec	113	<i>NcoI, AvrII</i>

Dejanske velikosti fragmentov po restrikciji smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (slika 14), kjer smo ugotovili, da lise na gelu ustrezajo pričakovanim velikostim fragmentov.



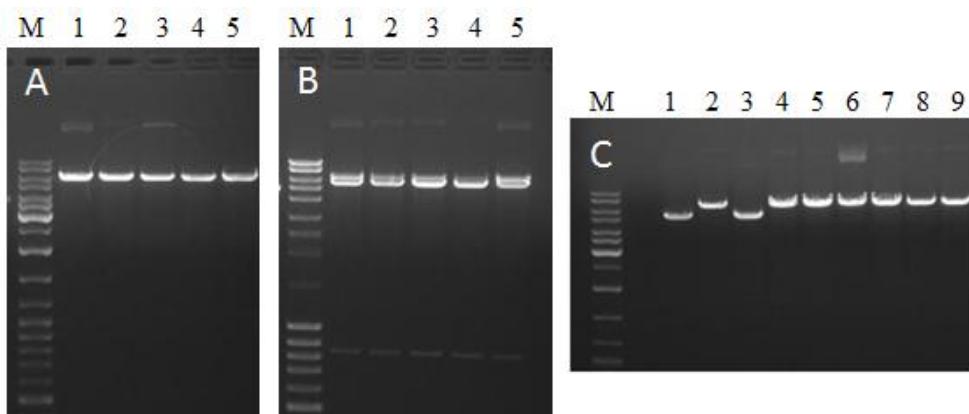
Slika 14: Agarozna gelska elektroforeza fragmentov PVY (1), eYFP (2), EqtII (3) in Mel (4) po izpostavitvi restrikcijskim encimom. Dolžinski standard Lambda DNA/*HindIII* (M).

Sledila je ligacija genov za oba proteina in plazmida pET28a. Najprej smo želeli posebej sestaviti oba fragmenta in ju nato vstaviti v plazmid. Ko smo ligacijsko mešanico obeh fragmentov po ligaciji preverili z agarozno gelsko elektroforezo, smo ugotovili, da s to metodo ne bomo mogli pridobiti pravega sestavljenega konstrukta (slika 15). Na gelu je nastalo preveč lis, ki so nakazovale, da je nastalo več različno velikih fragmentov. Med ligacijo je prišlo do sestavljanja ne le posameznih dveh zaporedij ampak tudi dveh enakih zaporedij ali celo več zaporedij zaporedoma. Ker bi bilo težko ugotoviti katera lisa v gelu vsebuje želeni fragment in bi bila očiščena DNA v zelo majhnih količinah, smo se odločili poskusiti z drugo metodo.



Slika 15: Agarozna gelska elektroforeza pri poskusu ligacije zaporedja za PVY CP s fuzijskim proteinom. Dolžinski standard Lambda DNA/HindIII (M), eYFP-PVY (1), EqtII-PVY (2), Mel-PVY (3).

V drugem primeru smo v ligacijsko mešanico naenkrat dodali oba fragmenta in plazmid ter takoj po ligaciji s celotno vsebino mešanice transformirali bakterijske celice *E. coli*. Po prekonočnem gojenju celic smo izolirali plazmide, jih razrezali z restriktičnim encimom *HindIII* in preverili z agarozno gelsko elektroforezo (slika 15). Tokrat je ligacija fragmentov in plazmida uspela, kar je razvidno iz gela, saj lise ustrezajo pričakovanim velikostim plazmida z ustreznimi vključki (preglednica 7). Vsem konstruktom smo preverili tudi zaporedje. Izkazalo se je, da je pri konstraktu z melitinom prišlo do točkovne mutacije, vendar se aminokislina pri translaciji ne spremeni. Pri nanosih plazmidov z vključenim EqtII so na gelu prisotne po tri lise, saj poleg plazmida tudi ekvinatoksin vsebuje prepoznavno mesto za encim *HindIII*. Lisa v sredini predstavlja plazmid z EqtII, iz katerega se je izrezal fragment povezovalec-PVY (najnižja lisa), saj je encim cepil na obeh mestih. Najvišja lisa predstavlja linearni plazmid s celotnim vključkom, saj je encim cepil le na enem mestu. DNA vzorca 1 in 3 z vključkom eYFP po velikosti odstopata od ostalih, torej v teh dveh vzorcih najverjetneje ni prišlo do vključitve gena v plazmid.



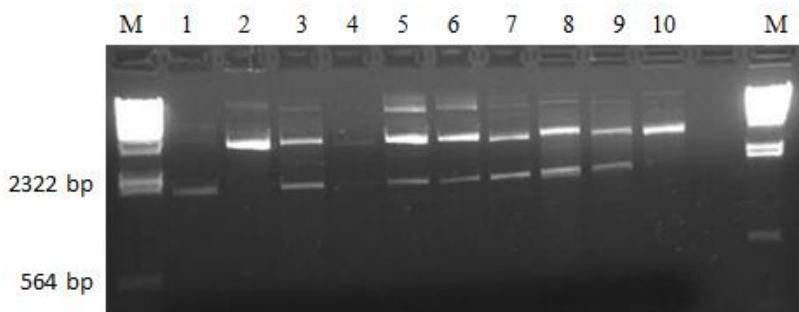
Slika 16: Gelska agarozna elektroforeza z izolirani plazmidi pET28a s posameznimi vključki: Mel-PVY (A), EqtII-PVY (B) in eYFP-PVY (C) iz posameznih kolonij transformiranih celic. M-dolžinski standard GeneRuler™ DNA Ladder Mix (A, C) in MassRuler™ DNA Ladder Mix (B).

Preglednica 7: Dolžina plazmida pET28a in končnih vključkov (restrikcija s *HindIII* in *NcoI*)

Ime	Dolžina (bp)	Velikost izraženega proteina (kDa)
eYFP-povezovalec-PVY	1565	57,7
EqtII-povezovalec-PVY	1388	51,0
Mel-povezovalec-PVY	926	33,8
plazmid pET28a	5346	

4.1.2 Ko-transformacija plazmidov pET28a in pET7-7 v bakterijske celice

S ko-transformacijo smo celice *E. coli* transformirali s plazmidom pET28a, ki vsebuje gen za odpornost na antibiotik kanamicin, in s plazmidom pT7-7, ki vsebuje gen za odpornost na ampicilin. Čeprav smo z dodatkom obeh antibiotikov v gojišče omogočili rast le celicam z obema plazmidoma, smo prisotnost obeh plazmidov preverili še z agarozno gelsko elektroforezo (slika 17). Preverjali smo izolirano DNA iz celic za produkcijo PVY VLP in sočasno produkcijo EqtII-PVY ali Mel-PVY. V vseh preverjenih vzorcih sta bila prisotna oba plazmida, zato smo pri nadaljnjih poskusih dodatno preverjanje z elektroforezo opustili. Kot pozitivne kontrole smo izbrali posamezne plazmide, s katerimi smo celice transformirali. V 4. jamici se prisotnost DNA v celicah po 5 urah gojenja slabše vidi vendar se iz slike vseeno da razbrati, da sta prisotni obe lisi. To potrjujeta tudi lisi v jamici številka 7, ki predstavlja vzorek odvzet isti kulturi, le po 20 urah gojenja. Lisi v 4. jamici se lahko slabše vidita zaradi počasnejše rasti celic na začetku ali izgube DNA materiala med postopkom izolacije plazmidov.



Slika 17: Gelska agarozna elektroforeza: preverjanje prisotnosti plazmidova pET28a in pT7-7 v vzorcih celic po ko-transformaciji. Dolžinski standard Lambda DNA/*HindIII* (M), plazmid pT7-7 z vstavljenim genom za PVY CP (1), plazmid pET28a z vstavljenim genom za EqtII-PVY CP (2), vzorca celic po ko-transformaciji s pT7-7 in pET28a z genom za EqtII-PVY CP po 5h gojenja (3, 4) in po 20h gojenja (5, 6), vzorec iz celic po ko-transformaciji s pT7-7 in pET28a z genom za Mel-PVY CP po 20h gojenja (7) in po 5h gojenja (8, 9), plazmid pET28a z vstavljenim genom za Mel-PVY CP (10).

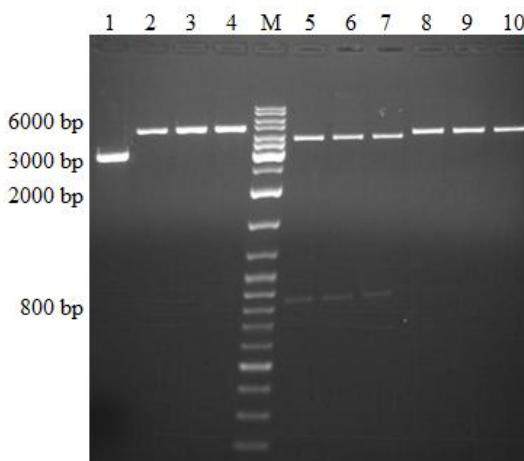
4.1.3 Priprava plazmidov pT7-7 s konstrukti in dodatnim RBS mestom

V preglednici 8 so zbrane teoretične velikosti plazmida pT7-7 in vključkov po restrikciji z *NdeI* in *HindIII*. Dejanske velikosti vključkov po pripravi plazmidov pa smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (slika 18). Pridobljene plazmide smo cepili z restriktionskim encimom *HindIII*, da smo pridobili linearne oblike plazmidov. Zaporedje za EqtII že samo

po sebi vsebuje prepoznavno mesto za encim *HindIII*, zato v tem primeru po restrikciji vidimo dve lisi. Lise vseh plazmidov po elektroforezi so pri pričakovanih velikostih, torej predvidevamo, da je prišlo do pravilnega vstavljanja konstruktov. Prisotnost mutacij smo preverili pri podjetju Biotech, kjer so rezultati pokazali, da med postopki priprave konstruktov ni nastala nobena mutacija.

Preglednica 8: Velikosti plazmida pT7-7 in končnih vključkov izpostavljenih restriksijskim encimomoma *NdeI* in *HindIII*.

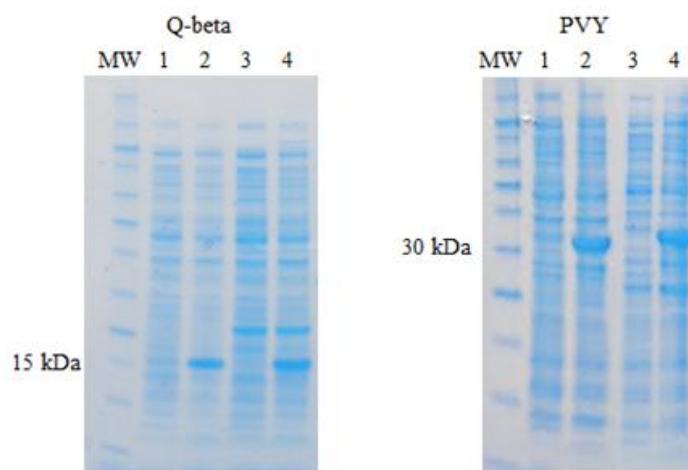
Ime	Dolžina (bp)
plazmid pT7-7	2440
PVY CP – RBS-eYFP-povezovalec-PVY	2380
PVY CP – RBS-EqtII-povezovalec-PVY	2205
PVY CP – RBS-Mel-povezovalec-PVY	1744



Slika 18: Preverjanje velikosti plamidov pT7-7 z vključki na agarozni gelski elektroforezi. Plazmid z vstavljenim genom za PVY CP, restrikcija s *HindIII* in *EcoRI* (1); plazmid z vstavljenim genom za PVY CP in zaporedjem RBS-eYFP-povezovalec-PVY CP, restrikcija s *HindIII* (2-4); plazmid z vstavljenim genom za PVY CP in zaporedjem RBS-EqtII-povezovalec-PVY CP, restrikcija s *HindIII* (5-7); plazmid z vstavljenim genom za PVY CP in zaporedjem RBS-Mel-povezovalec-PVY CP, restrikcija s *HindIII* (8-10); dolžinski standard GeneRuler™ DNA Ladder Mix (M).

4.2 IZRAŽANJE PROTEINOV V CELICAH *E.coli*

Slika 19 prikazuje izražanje PVY in Q-beta CP v bakterijskih sevih BL21(DE3) in BL21(DE3)pLysS po testnem izražanju. Lisa s Q-beta CP se pojavi pri 15 kDa (velikost Q-beta CP je 14,2 kDa), medtem ko se lisa s PVY CP pojavi malo nad 30 kDa, čeprav smo liso pričakovali malo nižje (velikost PVY CP je 29,9 kDa). Ugotovili smo, da sta za izražanje VLP primerna oba seva, saj se v vseh primerih po indukciji z IPTG poveča izražanje CP. Odločili smo se za produkcijo VLP v sevu BL21(DE3), saj celični lizat pri postopkih izolacije ni tako sluzast kot pri sevu BL21(DE3)pLysS, zato je priprava vzorcev lažja. Poleg tega bi za gojenje celic BL21(DE3)pLysS potrebovali gojišče z dvema antibiotikoma, za celice BL21(DE3) pa potrebujemo samo ampicilin.

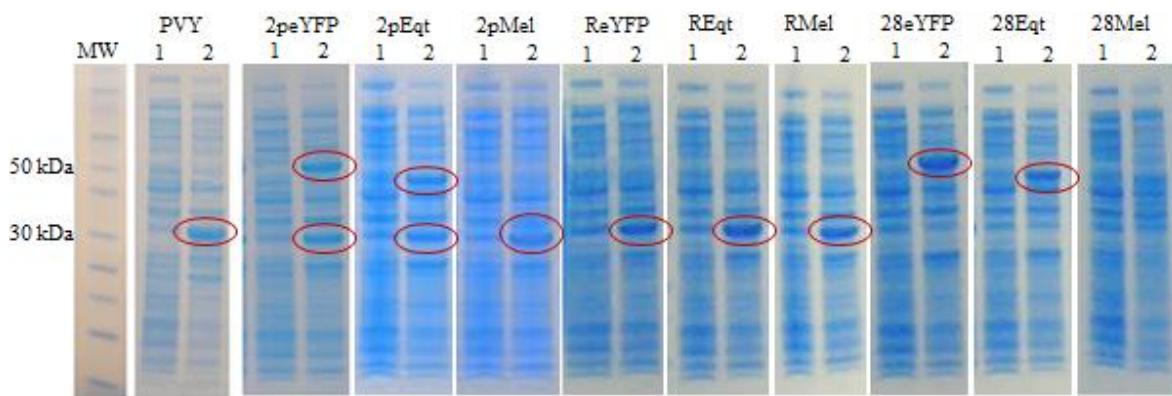


Slika 19: NaDS-PAGE gel celičnih lizatov pri izražanju Q-beta in PVY VLP. MW-standard molekulskih mas Novex®Sharp unstained; stolpca 1 in 2 predstavlja celični lizat celic BL21(DE3) pred (1) in po (2) indukciji z IPTG; stolpca 3 in 4 predstavlja celični lizat celic BL21(DE3)pLysS pred (3) in po (4) indukciji z IPTG.

Producija fuzijskih PVY VLP je potekala v sevih BL21(DE3). V preglednici 9 so prikazane oznake vzorcev glede na način izražanja. Slika 20 prikazuje NaDS-PAGE gele pri izražanju fuzijskih VLP. Po indukciji se pri vzorcih 2peYFP in 2pEqII pojavita dve močnejši lisi. Spodnja predstavlja PVY CP, lisi pri 50 kDa pa predstavlja fuzijske eYFP-PVY in EqII-PVY CP. Pri vzorcu 2pMel sta obe lisi prikazani znotraj enega rdečega kroga, saj je melitin velik samo 3 kDa in je torej razlika v velikosti med fuzijskim CP in divjim tipom le 3 kDa. Ena sama močnejša lisa s PVY CP se pojavi v vzorcih ReYFP, REqtII in RMel. Predvidevamo da je izražanje fuzijskih CP iz gena, ki se nahaja za drugim RBS mestom, precej manjše kot je izražanje proteina za prvim RBS mestom. Fuzijski CP v teh vzorčkih so verjetno prisotni, vendar v tako nizkih koncentracijah, da lisa pri neočiščenem vzorcu še ni vidna. V vzorcih 28eYFP in 28EqII je potekalo le izražanje fuzijskih CP, temu primerno na gelu vidimo le liso pri 50 kDa. Pri vzorcu 28Mel ni bilo videti izrazitejše lise po indukciji, vendar smo s čiščenjem vseeno nadaljevali.

Preglednica 9: Označevanje vzorcev fuzijskih PVY VLP

Oznaka vzorca	Izražen CP	Način izražanja
28eYFP	eYFP-PVY	Izražanje s plazmidom pET28a
28EqII	EqII-PVY	
28Mel	Mel-PVY	
ReYFP	PVY, eYFP-PVY	Izražanje s plazmidom pT7-7 z dodatnim RBS
REqtII	PVY, EqII-PVY	
RMel	PVY, Mel-PVY	
2peYFP	PVY, eYFP-PVY	Izražanje s ko-transformacijo s plazmidoma pET28a in pT7-7
2pEqII	PVY, EqII-PVY	
2pMel	PVY, Mel-PVY	

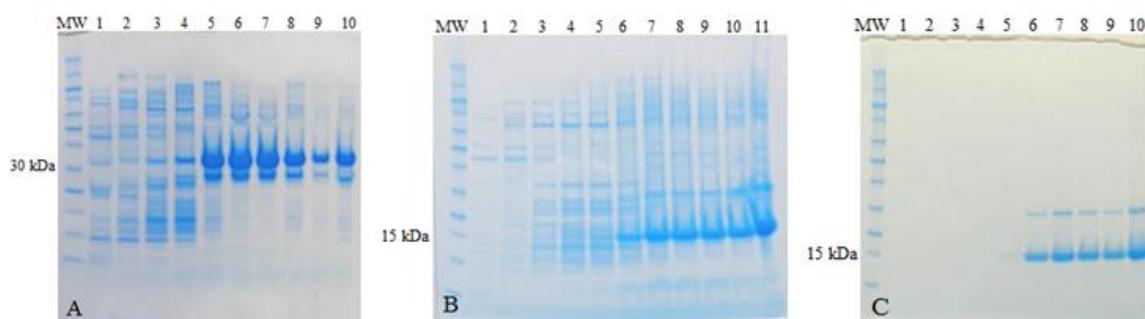


Slika 20: NaDS-PAGE gel vzorčkov pri izražanju fuzijskih PVY CP. MW- standard molekulskih mas Novex®Sharp unstained; stolpec 1 pri vsakem vzorcu predstavlja celični lizat pred indukcijo z IPTG; stolpec 2 predstavlja celični lizat po končanem gojenju. Z rdečo barvo so označene lise, ki so se pojavile po indukciji oz. so postale bolj izrazite.

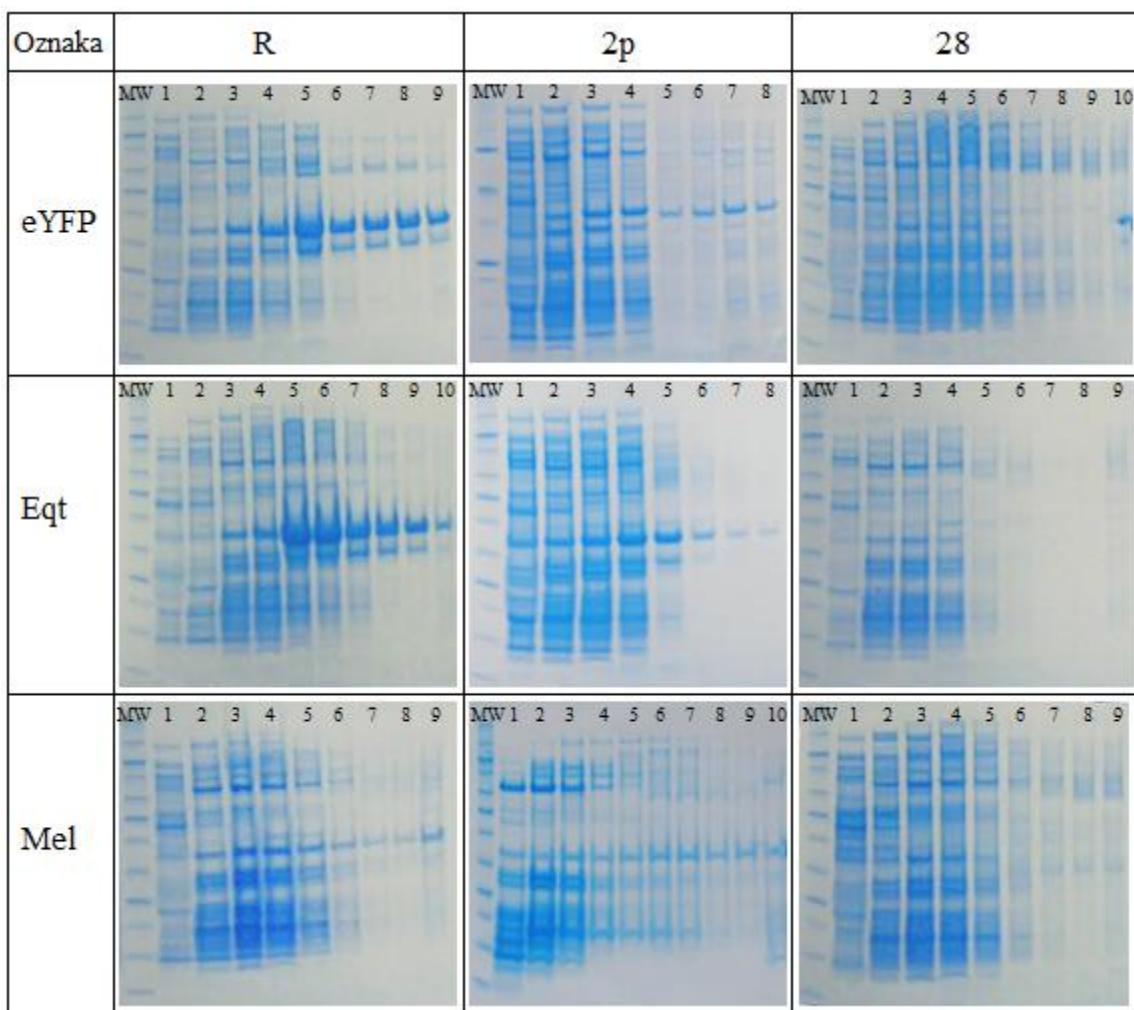
4.3 ČIŠČENJE IN IZOLACIJA VLP

Z ultracentrifugiranjem preko saharoznega gradiента smo VLP ločili od večine ostalih proteinov, ki zaradi nižje gostote niso potovali skozi gradient. Potovanje CP po gradientu smo preverjali z NaDS-PAGE. Pri vzorcih s PVY je večina nečistoč ostala v prvih štirih oz. petih frakcijah, PVY CP pa je potoval do bolj koncentriranega dela saharoznega gradiента (slika 21A).

Iz slike 21B je razvidno, da samo postopek ultracentrifugiranja ni zadoščal za očiščenje Q-beta VLP. Nečistoče so v tem primeru skupaj s CP prisotne v vseh frakcijah, zato smo se odločili za dodaten korak čiščenja pred ultracentrifugiranjem, kot so predlagali Rhee in sod. (2011). Izvedli smo ekstrakcijo s kloroformom in butanolom, ki se je izkazala za zelo učinkovito, saj po ekstrakciji v frakcijah ultracentrifugiranja ni bilo več prisotnih nečistoč (slika 21C).



Slika 21: NaDS-PAGE geli vzorcev s PVY in Q-beta CP iz frakcij po ultracentrifugiraju. Stolci 1-10 prikazujejo frakcije po ultracentrifugiraju z naraščajočo koncentracijo saharoze; MW-standard molekulskih mas Novex®Sharp unstained. Frakcije po ultracentrifugiraju vzorca s PVY VLP (A), Q-beta VLP (B) in frakcije po ultracentrifugiraju Q-beta VLP po predhodni ekstrakciji z butanolom in kloroformom (C).



Slika 22: NaDS-PAGE geli vzorcev s fuzijskimi CP v frakcijah po ultracentrifugiranju. Stolpci 1-10 prikazujejo frakcije po ultracentrifugiranju z naraščajočo koncentracijo saharoze; MW-standard molekulskih mas Novex®Sharp unstained ali Precision Plus Protein™ unstained.

Na sliki 22 so zbrani NaDS-PAGE geli s frakcijami po ultracentrifugiranju različnih PVY vzorcev, ki so vsebovali fuzijske CP. Iz gelov smo lahko v frakcijah razbrali le prisotnost PVY CP, saj so bili fuzijski CP v prenizkih koncentracijah, da bi bile lise na gelu dobro vidne oz. se skrivajo znotraj lis nečistoč. Koncentracija PVY CP je bila najvišja pri vzorcih, kjer so celice vsebovale plazmid z dvema RBS, pri vzorcih, ki so izhajali iz dveh plazmidov, pa je bila koncentracija PVY CP nekoliko nižja. Višjo koncentracijo PVY CP pri vzorcih R smo pričakovali, saj v tem primeru večkrat pride do prevajanja PVY CP, ki je nameščen za prvim RBS, kot pa prevajanja fuzijskega CP, ki je za drugim RBS. Takšno razmerje koncentracij smo pričakovali glede na predhodne objave o izražanju proteinov na policistronskih mRNA. Koncentracijo PVY CP in fuzijskega CP bi vseeno lahko spremenjali z vstavljanjem različno močnih RBS. V primeru vzorcev 2p pa je koncentracija PVY CP nekoliko nižja, saj sta divji tip in fuzijski CP vstavljen v različna plazmida in je zato produkcija obeh proteinov bolj konkurenčna. Pričakovali smo, da bodo v teh vzorcih lise fuzijskih CP na NaDS-PAGE gelih bolj vidne. Koncentracijo bi lahko tudi v tem

primeru spremenjali z različno močnimi promotorji oz. s plazmidi ki imajo manjše ali večje število kopij. Pri vzorcih z oznako 28 PVY CP ni prisoten, saj so celice vsebovale le gen za fuzijski CP. Pričakovali smo da bo produkcija fuzijskih CP višja kot v primerih z vzorci R in 2p vendar tudi tukaj lise fuzijskih CP na gelih po NaDS-PAGE niso izrazite.

PVY CP pri vzorcih, ki vključujejo tudi fuzijske CP, je glede na NaDS-PAGE gele čez vse frakcije razporejen bolj enakomerno kot pri vzorcu, ki vsebuje le PVY CP. Pri PVY CP brez fuzijskih proteinov so lise sicer vidne že v prvi frakciji, vendar koncentracija močno naraste šele v 5. frakciji in je v naslednjih frakcijah konstantna. Pri vzorcih ReYFP, REqtII in 2pEqTII začne koncentracija nativnega PVY CP naraščati v 3. frakciji in doseže višek v 5. frakciji, nato pa začne malenkost padati. V vzorcih RMel, 2peYFP in 2pMel pa je koncentracija nativnega PVY CP enakomerno razporejena skozi vse frakcije. Različno potovanje nativnih PVY CP bi lahko nakazovalo na različne dolžine VLP znotraj vzorcev.

Za nadaljnje postopke smo uporabili zadnjih 4-5 frakcij. Ker v omenjenih frakcijah pri vzorcih 28EqTII in 28Mel ni bilo videti prisotnih proteinov, s tem vzorcema nismo nadaljevali s koncentriranjem in nadaljnjo analizo.

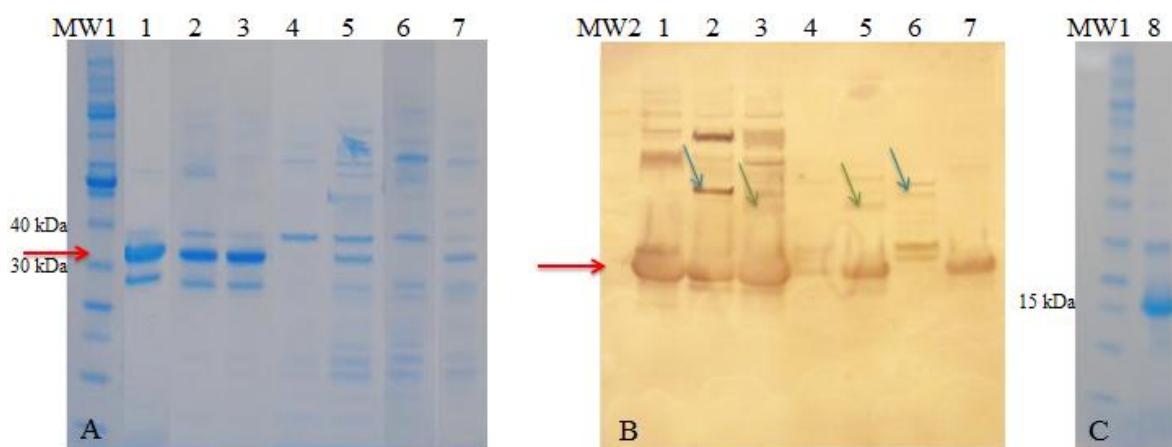
4.4 OPREDELITEV LASTNOSTI VLP

4.4.1 NaDS-PAGE in Western prenos za izolirane VLP

Kot so opazili že Kalcinema in sod. (2012), se pri NaDS-PAGE vzorcih s PVY CP na gelu pod liso s PVY CP pojavi še šibkejša lisa, ki predstavlja protein z molekulsko maso 26,5 kDa. Ta protein se pojavlja od začetka izražanja dalje in ostane prisoten tudi po čiščenju in koncentriranju VLP. Lisa ostane vidna tudi po Western prenosu in detekcijo s protitelesi anti-PVY. Tudi pri pripravi Q-beta VLP po čiščenju ostane še ena šibkejša lisa, v tem primeru predstavlja protein večji od Q-beta CP (slika 23C). Vezi med dimeri Q-beta CP so zelo močne, zato je možno, da po denaturaciji nekaj dimerov še vedno ostane prisotnih. Vzorec smo poskusili tudi denaturirati pri višji temperaturi (10 min na 100 °C) in ob 2-kratni koncentraciji reducenta (120 mM DTT), vendar sta obe lisi ostali nespremenjeni, zato sklepamo, da je povezava med temi CP v dimeru kovalentna.

Ker se po koncentriranju na NaDS-PAGE gelu (slika 23A) še vedno ne razločijo dobro lise s fuzijskimi proteini, v vzorcih v stolpcih 5, 6 in 7 pa je še vedno prisotnih precej nečistoč, smo se odločili prisotnost fuzijskih proteinov preveriti z imunološko detekcijo z anti-PVY protitelesi in višjimi nanosi vzorcev na gel. Na membrani po Western prenosu (slika 21B) so se v večini vzorcev poleg lis, ki predstavljajo eYFP-PVY (modra puščica) in EqTII-PVY (zelena puščica) pojavile dodatne lise proteinov z višjo molekulsko maso, kar nakazuje na agregacijo proteinov, ki vsebujejo PVY CP.

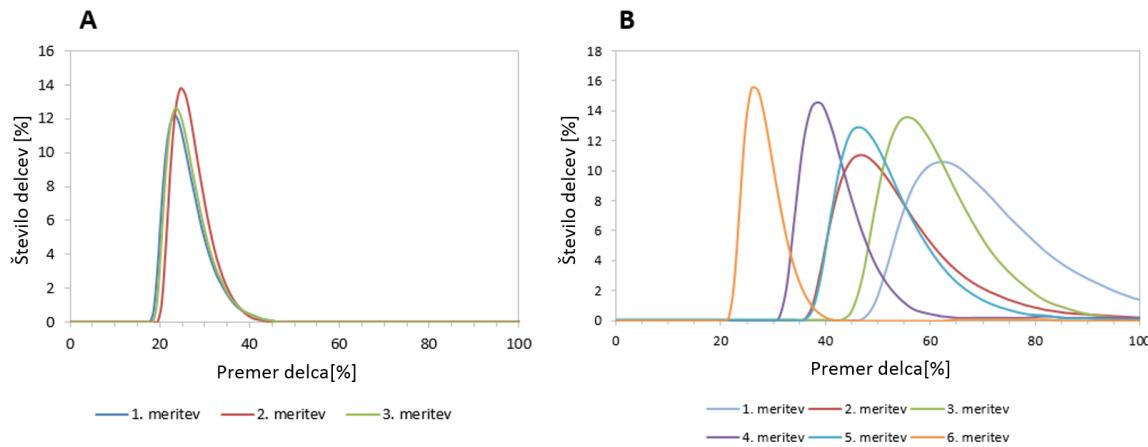
Iz vzorca 2peYFP se je po združitvi frakcij ultracentrifugiranja izgubil nativni PVY CP, saj lisa s tem proteinom ni vidna ne na NaDS-PAGE gelu, na membrani pa je kljub višjim nanosom vidna le šibka lisa. PVY CP v tem vzorcu je v frakcijah po ultracentrifugiranju še viden, po dializi in koncentriranju pa se izgubi. Vsi vzorci so bili očiščeni po enakem postopku, vendar je na gelu v linijah 5-7 opaziti precej več nečistoč. Postopke čiščenja za vzorce, kjer pričakujemo nižje koncentracije PVY CP bi bilo zato potrebno optimizirati. Verjetno bi se več nečistoč znebili že s ponovnim gradientnim ultracentrifugiranjem.



Slika 23: NaDS-PAGE gel (A) in membrana po Western prenosu (B) koncentriranih vzorcev PVY ter NaDS-PAGE gel koncentriranega vzorca Q-beta (C). Vzorec s PVY CP (1), RYFP (2), REqtII (3), 2peYFP (4), 2pEqTII (5), 28eYFP (6), RMel (7), Q-beta VLP (8), standard molekulskih mas Novex®Sharp unstained (MW1), standard molekulskih mas Novex Sharp Pre-stained (MW2). Rdeči puščici označujeta lise z nativnimi PVY CP, modri puščici označujeta lise z eYFP-PVY, zeleni puščici označujeta lise z EqtII-PVY.

4.4.2 Dinamično sipanje svetlobe

Pri merjenju velikosti Q-beta VLP smo iz vseh meritev pridobili zelo uniformne rezultate, kar prikazujeta slika 24A in preglednica 10. S tem smo potrdili, da se Q-beta CP pravilno sestavijo v globularno obliko VLP velikosti 26 nm, ki sovпадa s podatki iz literature (Blumenthal in Carmichael, 1979; Rhee in sod., 2011). Da DLS meritve za vzorce s PVY VLP ne bodo tako natančne, smo predvidevali že pred merjenjem, saj se PVY CP sestavijo v različno dolge nitaste zgradbe, katerim bi težko izmerili hidrodinamski radij. Vseeno smo pričakovali, da bomo lahko z metodo zaznali večje spremembe v velikosti VLP, npr. razpad na monomere po inkubaciji v disociacijskih pogojih. Že pri PVY delcih v PBS so med šestimi ponovitvami meritev (vsaka ponovitev zajema 11-14 merjenj) izmerjene velikosti variirale med 28,2 nm in 70 nm. Indeks polidisperzni (PDI) teh meritev je med 0,466 in 0,682, kar pa pomeni, da naj bi bil vzorec še vedno primeren za merjenje z DLS (vzoreci s PDI večjim od 0,7 imajo prevelik razpon velikosti in niso primerni za merjenje z DLS). PDI manjši od 0,05 je zelo redek in predstavlja visoko monodisperzne vzorce. Blizu teh vrednosti je bil vzorec s Q-beta VLP, saj je bil izračunan PDI treh ponovitev 0,069.



Slika 24: Premer Q-beta (A) in PVY (B) VLP, izmerjeno z DLS

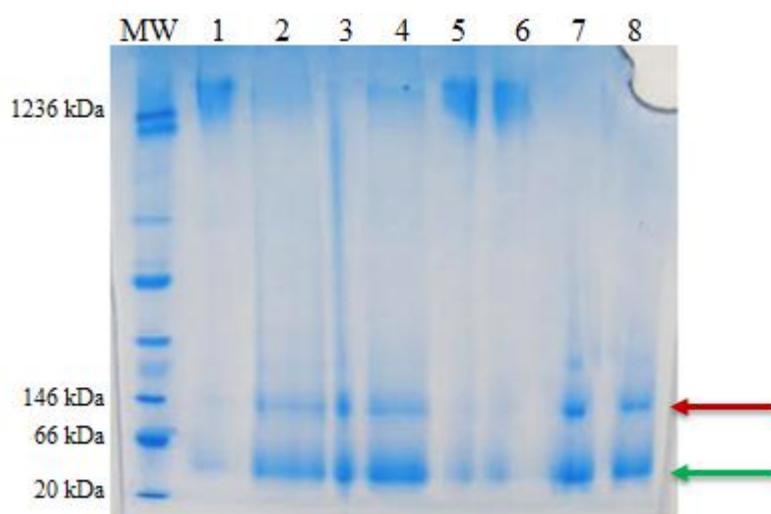
Iz polidisperznega indeksa se oceni homogenost vzorca, podana v odstotkih. Kadar je polidisperznost nižja od 20 %, pomeni, da je vzorec monodisperzen. V našem primeru imata nižjo polidisperznost le vzorec s Q-beta VLP in vzorec s PVY VLP inkubirani v ocetni kislini. Le ta je edini PVY vzorec, katerega izmerjene vrednosti bolj odstopajo od ostalih, saj so premeri precej večji. Očitno PVY VLP ob prisotnosti ocetne kisline tvorijo približno 230 nm velike aggregate.

Preglednica 10: Zbrani rezultati DLS meritev za Q-beta VLP, PVY VLP inkubirane v različnih pogojih in PVY VLP v fuziji

Vzorec	Povprečna velikost (nm)	Največji izmerjeni premer (nm)	Najmanjši izmerjeni premer (nm)	PdI	Polidisperznost (%)
Q-beta	26,0	26,6	25,4	0,069	18,1
PVY v PBS	50,7	70,0	28,2	0,579	35,4
PVY 1 M NaCl	32,8	46,8	25,6	0,238	47,2
PVY EDTA	22,0	22,8	20,9	0,289	44,6
PVY pH 2,4	37,1	54,8	16,1	0,257	43,9
PVY pH 11	37,7	50,1	23,0	0,251	37,4
PVY DTT	21,3	37,5	13,5	0,388	51,8
PVY CaCl₂	32,9	56,8	20,3	0,437	39,4
PVY ocetna kisl.	230,7	246,7	210,9	0,326	9,4
ReYFP	35,6	42,0	28,8	0,461	32,6
REqtII	32,0	43,1	20,8	0,492	31,2
RMel	27,2	29,8	23,6	0,289	43,3
2pEqtII	42,3	49,9	36,1	0,295	50,6
2peYFP	46,8	55,1	41,2	0,208	35,5
28eYFP	28,8	31,4	23,7	0,220	38,0

4.4.3 Modra nativna elektroforeza

Z inkubacijo PVY VLP v različnih pogojih smo žeeli ugotoviti, kateri pogoji vplivajo na razpad VLP. PBS pH 7,4 predstavlja delovno in shranjevalno raztopino za PVY VLP, torej smo v tem primeru pričakovali CP v obliki VLP. Na gelu se le zelo šibka lisa pojavi pri ~30 kDa, ki predstavlja velikost monomera. Enaki rezultati so opazni tudi pri inkubaciji v 20 mM DTT in 20 mM EDTA. Do razpada VLP je prišlo pri zelo visokem (pH 11) in zelo nizkem (pH 2,4) pH ter pri inkubaciji v pufrih z visoko koncentracijo soli (NaCl in CaCl₂). Pri pogojih kjer VLP razpadejo, se na gelu pojavita po dve lisi, pri ~30 kDa (zeleni puščica), ki najverjetneje predstavlja monomerno obliko, in ~120 kDa (rdeča puščica), ki najverjetneje predstavlja tetramer.

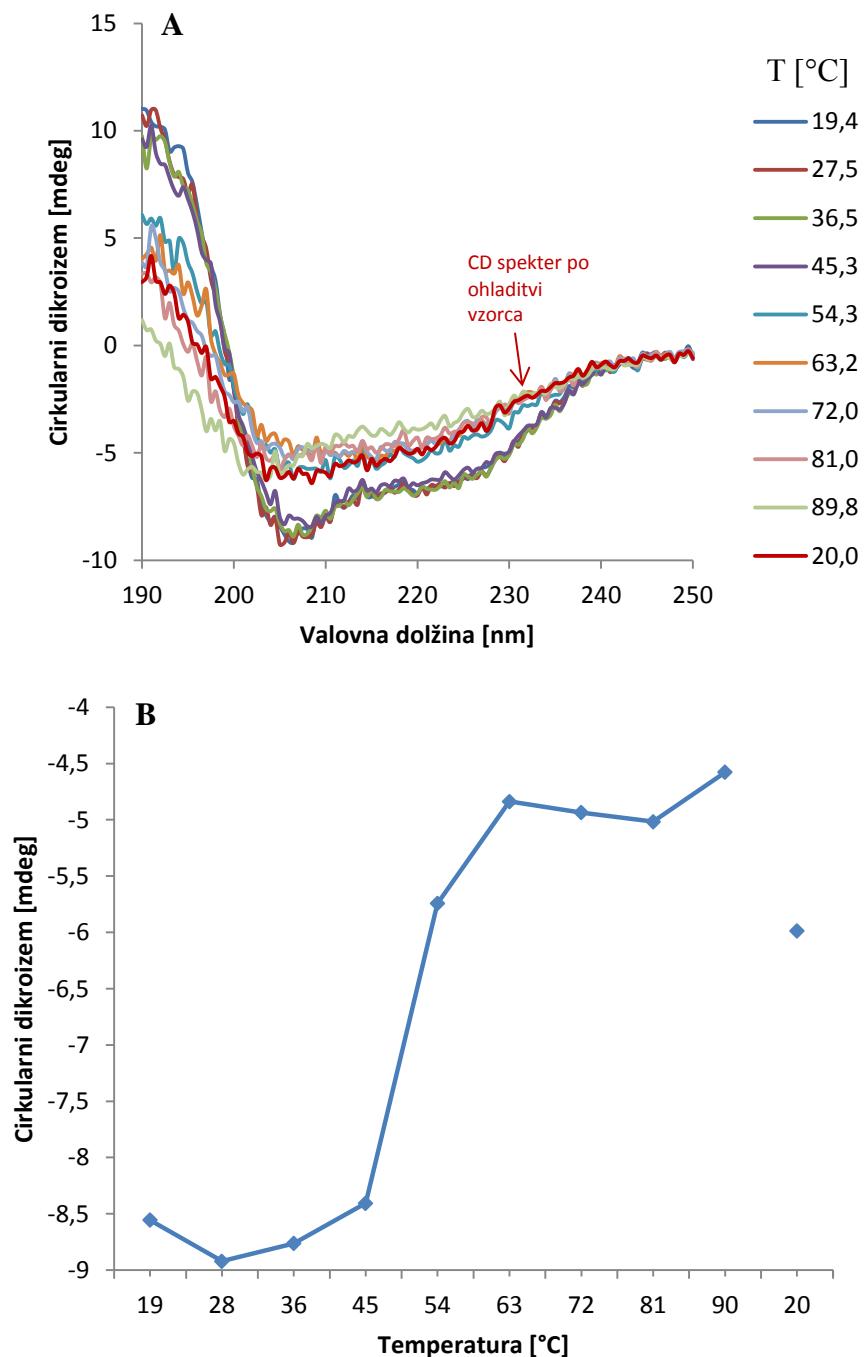


Slika 25: BN-PAGE gel vzorcev s PVY VLP v različnih pogojih. Inkubacija VLP v PBS pufru pH 7,4 (1), fosfatni pufer pH 11 (2), glicin-HCl pufer pH 2,4 (3), 1 M NaCl v PBS (4), 20 mM DTT v PBS (5), 20 mM EDTA v PBS (6), 1 M CaCl₂ v PBS (7), 1 M CaCl₂ v Tris-HCl (8), standard molekulskih mas NativeMark™ unstained (MW).

4.4.4 Spremljanje termične stabilnosti PVY VLP

4.4.4.1 Cirkularni dikroizem

Stabilnost PVY VLP smo spremljali z metodo cirkularnega dikroizma v temperaturnem območju 20-90 °C (slika 26). Posamezni CD spekter je rezultat treh meritev. Na sliki 26B je pri valovni dolžini 208 nm prikazana sprememb cirkularnega dikroizma glede na temperaturo. Do večjih sprememb v sekundarni zgradbi pride med inkubacijo VLP pri temperaturah 45,3 °C do 63,2 °C. Nato je signal do segrevanja na 89,8 °C ustaljen, po ohladitvi vzorca na začetnih 20 °C pa se CD spekter minimalno pomakne proti začetnemu stanju.

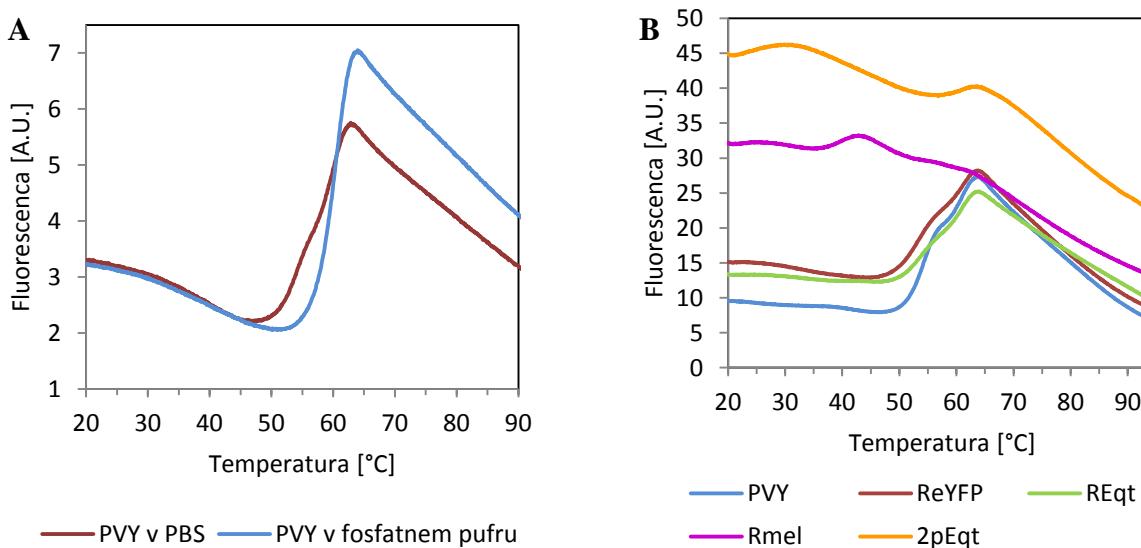


Slika 26: Cirkularni dikroizem PVY VLP. Spreminjanje CD spektra glede na temperaturo (A). CD pri valovni dolžini 208 nm glede na temperaturo (B).

Iz CD spektra PVY VLP pri 20 °C lahko ocenimo, da večji delež PVY CP sestavljajo α -vijačnice, saj sta opazna izrazita minimuma pri ~222 nm in ~208 nm in pozitivni vrh pri ~190 nm. Podobno oceno smo pridobili tudi s programom K2D3, ki je ocenil, da je protein sestavljen iz 60,7 % α -vijačnice in 5,6 % β -plošče.

4.4.4.2 Diferenčna dinamična fluorimetrija

Ugotovili smo, da pri vzorcu PVY VLP resuspendiranem v PBS denaturacija poteče v dveh prehodih, medtem ko je v fosfatnem pufru viden le en prehod iz nativne v denaturirano obliko (slika 27A). Tudi pri vzorcih ReYFP in REqtII v PBS sta vidna oba prehoda, pri vzorcih 2pEqTII in RMel pa je opazen po en slabše izražen prehod (slika 27B). Pri vzorcih 28eYFP in 2peYFP s to metodo nismo mogli določiti prehoda v denaturirano stanje.



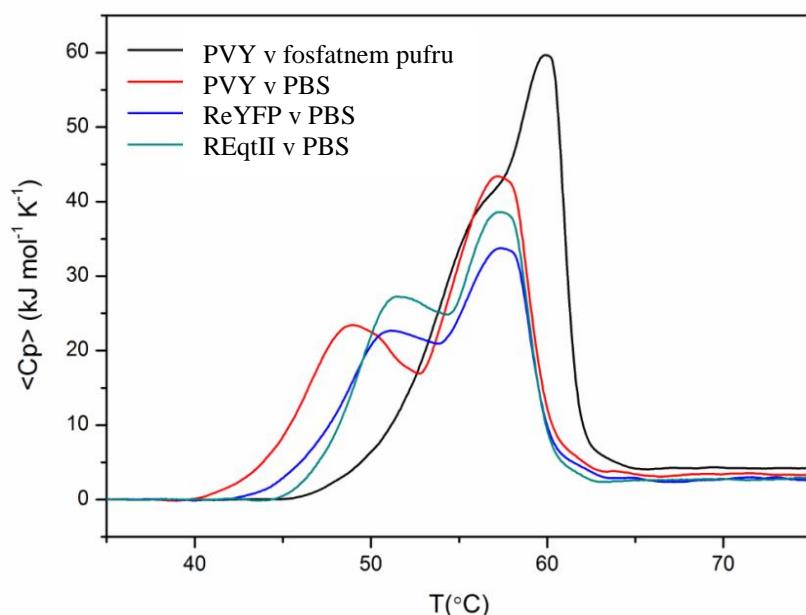
Slika 27: Potelek denaturacije nativnih in fuzijskih VLP v PBS ali fosfatnem pufru z DSF metodo.
Denaturacija PVY VLP v PBS in fosfatnem pufru (A) in denaturacija PVY, RYFP, REQN, RMEL in 2pEQN
v PBS (B).

Temperature denaturacije so med posameznimi vzorci zelo primerljive (preglednica 12). Pri vzorcih, kjer se pojavita dva prehoda v denaturirano stanje, so bile temperature prehodov T_m med 53,5 °C in 54 °C in T_m pri 61 °C. Pri obeh vzorcih z enim prehodom pa je T_m pri 60,5 °C.

Izstopa krivulja vzorca RMel, pri kateri je viden en slabovo izrazit prehod že pri 40 °C. Vendar pa odvod funkcije nakaže še prehoda pri 54,4 °C in 60,6 °C, ki se skladata s T_m pri ostalih vzorcih z dvema prehodoma. Prehod pri 40 °C je lahko posledica slabše očiščenega VLP, saj bi lahko preostali proteini vplivali na krivuljo denaturacije. Druga možnost pa je slabša stabilnost VLP s CP v fuziji z melitinom. Melitin je majhna molekula in ne predstavlja velike ovire pri sestavljanju fuzijskih CP v VLP. V VLP se zato lahko vgradi več fuzijskih CP kot v primerjavi s CP v fuziji z eYFP ali EqTII. Še vedno pa je takšna zgradba zaradi dodatnih peptidov bolj nestabilna in do denaturacije pride pri nižji temperaturi.

4.4.4.3 Diferenčna dinamična kalorimetrija

Termično stabilnost vzorcev s PVY VLP v fosfatnem pufru in PBS ter vzorca ReYFP in REqtII v PBS smo spremljali še med denaturacijo z DSC metodo (slika 28). Pri vseh vzorcih sta med denaturacijo opazna dva prehoda. Ugotovili smo, da je PVY VLP bolj stabilen v fosfatnem pufru brez dodane soli kot v PBS (140 mM NaCl). T_{m_1} PVY VLP je v fosfatnem pufru višja za približno 8 °C, T_{m_2} pa za približno 3 °C od temperatur taljenja PVY VLP v PBS (preglednica 11). Vzorca s fuzijskimi CP se v T_m med seboj ne razlikujeta. Izgleda pa, da je njuna kvartarna zgradba za približno 2,5 °C bolj stabilna od kvartarne zgradbe PVY CP.



Slika 28: Termogrami VLP dobljeni z DSC metodo.

Površina pod krivuljo predstavlja spremembo entalpije (ΔH). Izračunana je bila lahko le za vzorca PVY VLP v PBS in fosfatnem pufru (preglednica 11). Pri vzorcih s fuzijskimi CP bi za natančen izračun morali poznati točen delež CP divjega tipa in delež fuzijskih CP.

Preglednica 11: Z DSC izmerjeni T_m prehodi in izračunane entalpije za vzorca s PVY VLP.

Vzorec	T_{m_1} [°C]	T_{m_2} [°C]	ΔH_1 [kJ/(mol)]	ΔH_2 [kJ/(mol)]	ΔH_{skupno} [kJ/(mol)]
PVY v PBS	49,2	57,0	157,7	193,5	351,2
PVY v fosfatnem pufru	57,0	59,9	233,1	95,3	317,2

4.4.4.4 Primerjava rezultatov DSF, DSC in CD

Pri večini vzorcev sta med denaturacijo opazna dva prehoda. To pomeni, da proteinski delci niso razpadli naenkrat v celoti, ampak v dveh stopnjah. Predvidevamo, da v prvi stopnji razpade VLP na monomerne CP, sekundarna in terciarna zgradba proteina pa sta še ohranjeni. V drugi stopnji, pri nekoliko višji temperaturi, pa se porušita še sekundarna in terciarna zgradba že disociiranih CP. Pri vzorcih z enim prehodom celotna denaturacija poteče v eni stopnji. Porušita se sekundarna in terciarna zgradba, posledično pa razpade tudi kvartarna zgradba proteina. Barvilo Sypro Orange ima afiniteto do hidrofobnih mest, ki se izpostavijo ob razvitju proteina. Ker DSF zazna vezavo barvila na ta mesta pri obeh prehodih, lahko predvidevamo, da hidrofobne interakcije stabilizirajo tako terciarno kot tudi kvartarno zgradbo VLP.

Obstaja razlika med občutljivostjo metod pri določanju T_m proteina. Iz merjenja CD spektra lahko ocenimo sekundarno zgradbo proteina, pri določanju temperaturne stabilnosti pa ugotovimo le, da do spremembe zgradbe proteina pride med $45,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $63,2\text{ }^{\circ}\text{C}$, razloči se le en prehod. Tudi metoda DSF pri PVY VLP v teh pogojih zazna le en prehod denaturacije, medtem ko z metodo DSC zaznamo oba prehoda. Tudi pri ostalih vzorcih, ki smo jih merili z DSF in DSC, so prehodi pri DSC veliko bolj izraziti. T_m tako pri DSF kot pri DSC sovpadajo s temperaturnim območjem, ki ga določimo pri merjenju CD spektrov.

T_m vrednosti so pri vseh vzorcih nekaj stopinj Celzija nižje pri merjenju z DSC kot z DSF. DSF je zaradi merjenja intenzitete fluorescence vezanega barvila le posredna metoda za določanje temperaturne stabilnosti proteinov, zato so podatki, ki jih pridobimo z DSC, precej bolj zanesljivi. Prednosti metode DSF pa so možnost analiziranja veliko vzorcev hkrati, manjša poraba vzorca in hitreje pridobljeni rezultati.

Preglednica 12: Zbrane T_m vrednosti VLP po metodah DSF in DSC

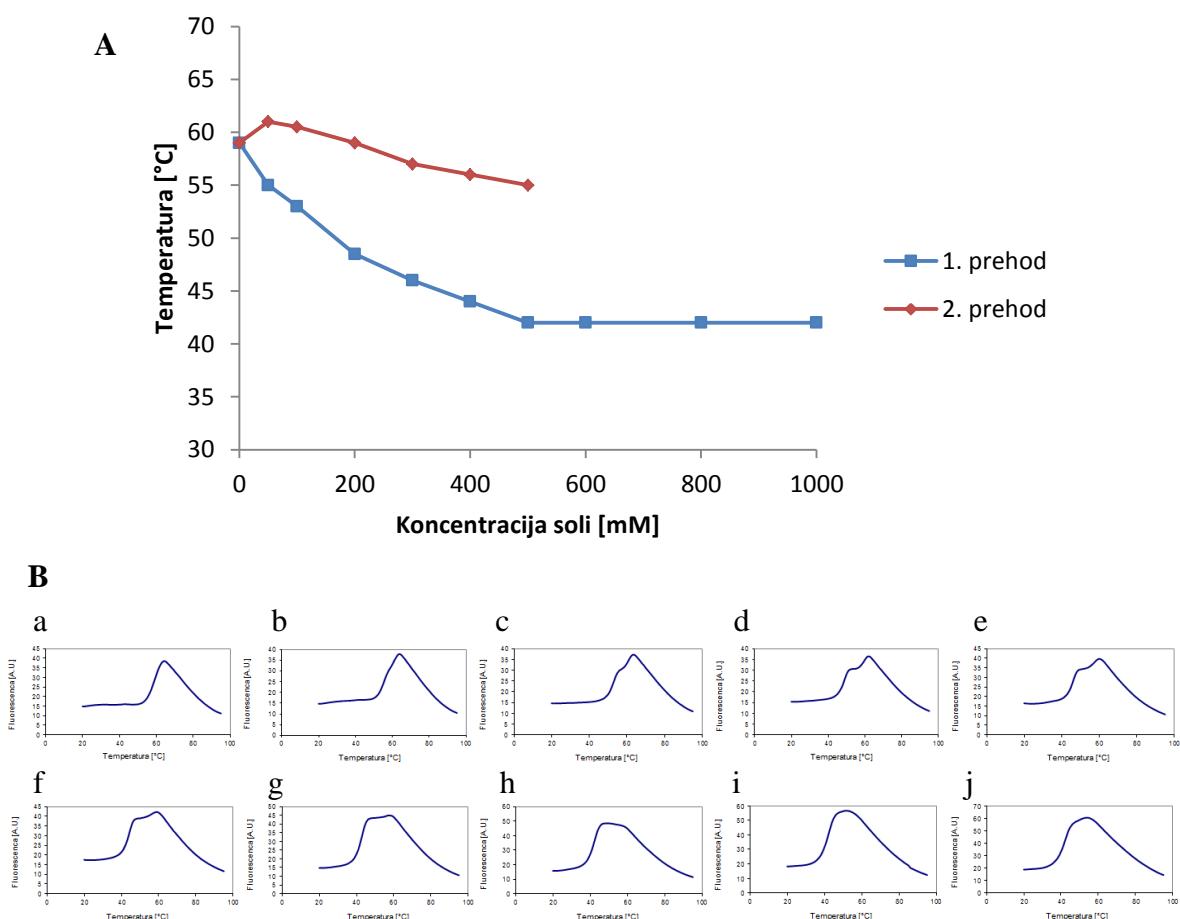
Vzorec	DSF			DSC	
	$T_{m_{\text{Mel}}}$ [°C]	T_{m_1} [°C]	T_{m_2} [°C]	T_{m_1} [°C]	T_{m_2} [°C]
PVY v fosfatnem pufru			60,5	57,0	59,9
PVY v PBS		54,0	61,0	49,2	57,0
ReYFP v PBS		53,5	61,0	51,4	57,4
REqtII v PBS		54,0	61,0	51,8	57,4
2pEqtII v PBS			60,5	/	/
RMel v PBS	39,7	54,4	60,6	/	/

4.4.4.5 Termična stabilnost PVY VLP pri različni ionski jakosti

Termično stabilnost PVY VLP smo spremljali z metodo DSF ob dodatku različnih koncentracij NaCl v fosfatni pufer. V pufru brez dodane soli je bil opazen en sam prehod iz nativne v denaturirano obliko, pri 50 mM koncentraciji NaCl pa se že nakaže drugi prehod, ki ob višanju koncentracije NaCl postaja še bolj izrazit (slika 29B). Pri nižjih koncentracijah NaCl je vrh prvega prehoda precej nižji od vrha drugega prehoda, z

višanjem koncentracije NaCl pa se prvi vrh zvišuje, dokler pri približno 500 mM NaCl oba vrhova ne postaneta enako visoka. V tem primeru je na DSF krivulji viden le en prehod, vendar z zelo širokim vrhom. Širok vrh nakazuje, da denaturacija VLP poteka v dveh stopnjah, vendar sta si točki T_m obeh prehodov tako blizu, da se prehoda med seboj prekrivata, zato T_{m2} ne moremo določiti.

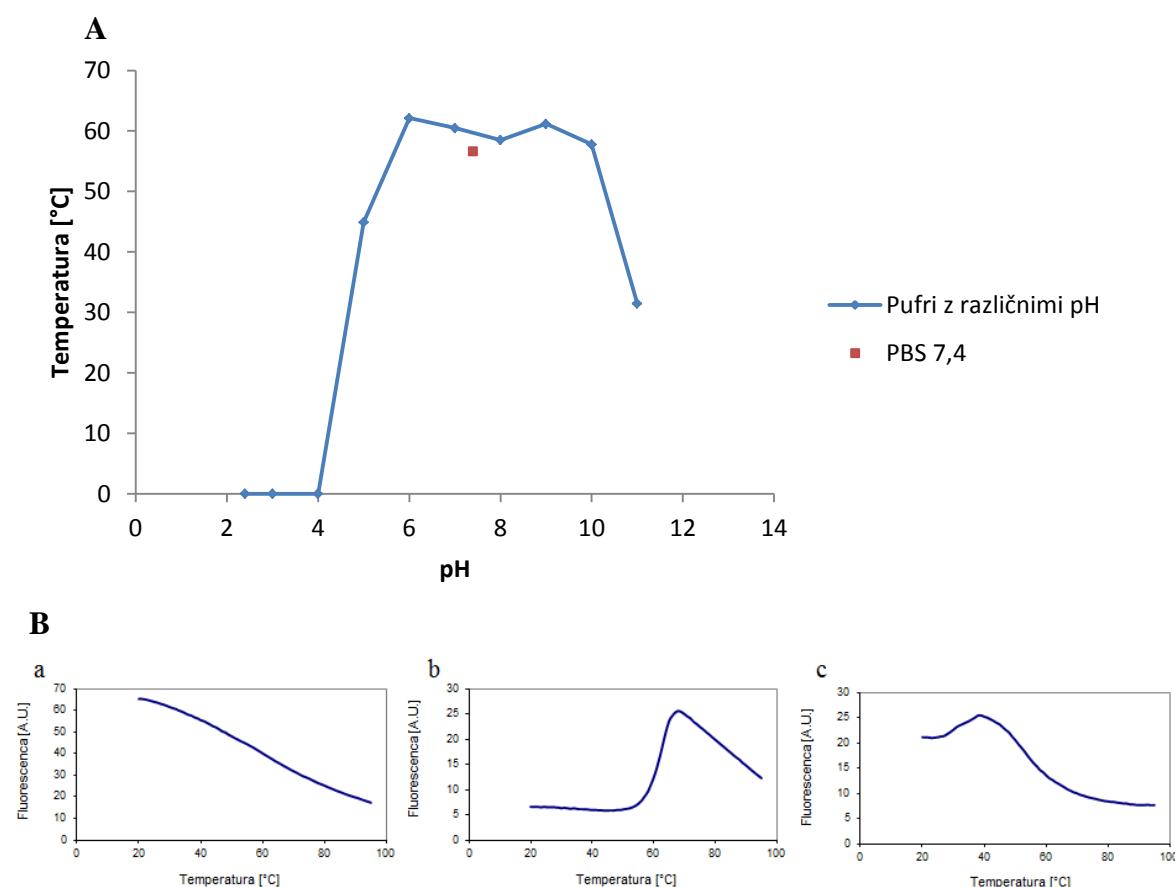
Zviševanje ionske jakosti pufrja običajno stabilizira zgradbo proteina, pri PVY VLP pa opazimo destabilizacijo kvartarne zgradbe, saj VLP razpade na monomere pri nižji temperaturi (prvi prehod) (slika 29A). Na zgradbo monomernega CP ima manjši vpliv, zato denaturacija monomera poteče pri višji temperaturi, v drugem prehodu. V pufru brez dodane soli sta obe zgradbi enako stabilni zato denaturacija poteče v eni stopnji, pri višji temperaturi. Iz tega sklepamo, da na stabilizacijo kvartarne zgradbe proteina vplivajo tudi elektrostatske interakcije.



Slika 29: Toplotna denaturacija PVY VLP z DSF metodo pri različnih koncentracijah NaCl. Graf A prikazuje T_m prehodov iz nativne v denaturirano obliko pri različnih koncentracijah NaCl. Grafi B prikazujejo posamezne poteke denaturacije: 0 mM NaCl (a), 50 mM NaCl (b), 100 mM NaCl (c), 200 mM NaCl (d), 300 mM NaCl (e), 400 mM NaCl (f), 500 mM NaCl (g), 600 mM NaCl (h), 800 mM NaCl (i) in 1000 mM NaCl (j).

4.4.4.6 Termična stabilnost PVY VLP pri različnih pH

Z DSF smo spremljali termično stabilnost PVY VLP tudi pri različnih pH. Ugotovili smo, da so pri pH nižjih od 4 VLP že na začetku popolnoma denaturirani (slika 30Ba). Pri pH 6-10 so VLP najbolj stabilni, s T_m med 57,8 °C in 62,1 °C. Pri višjih pH se stabilnost VLP ponovno zmanjša. Pri pH 11 se T_m zniža že na 31,4 °C, tudi prehod na DSF krivulji je slabše izražen (slika 30Bc). Temperature prehodov PVY VLP v različnih pH so prikazane na sliki 30A.

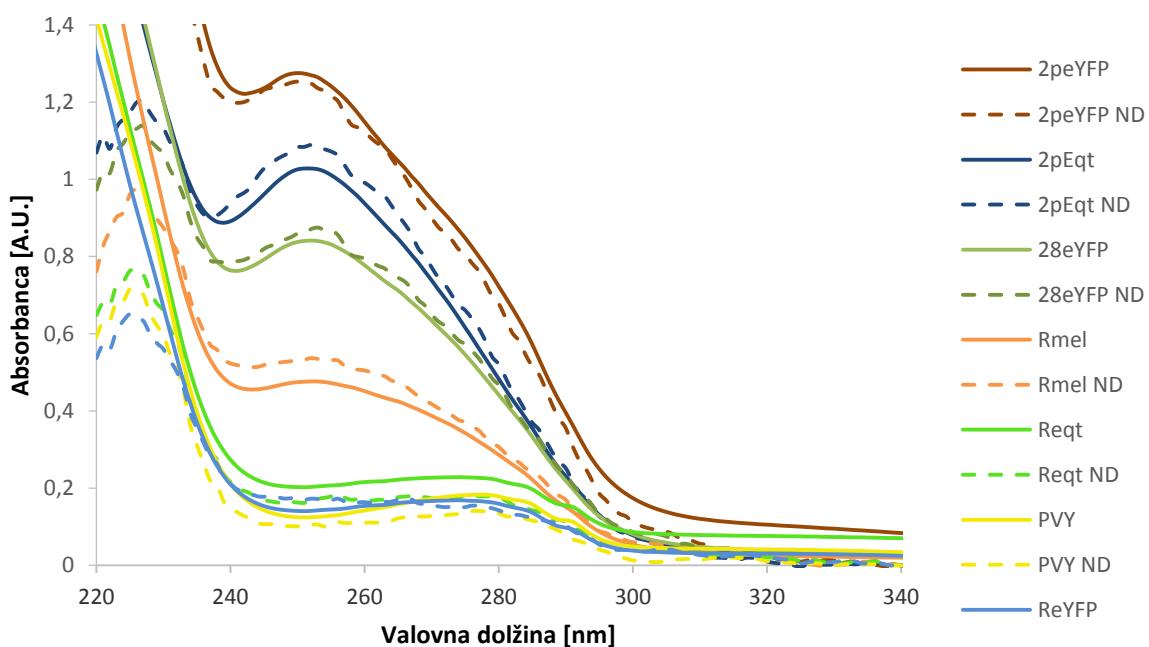


Slika 30: Temperaturna denaturacija PVY VLP z DSF metodo pri različnih pH. Graf A prikazuje T_m prehodov iz nativne v denaturirano obliko pri različnih pH. Grafi B prikazujejo krivulje posameznih denaturacij pri pH 4 (a), pH 6 (b) in pH 11 (c).

4.4.5 UV-VIS spektrometija

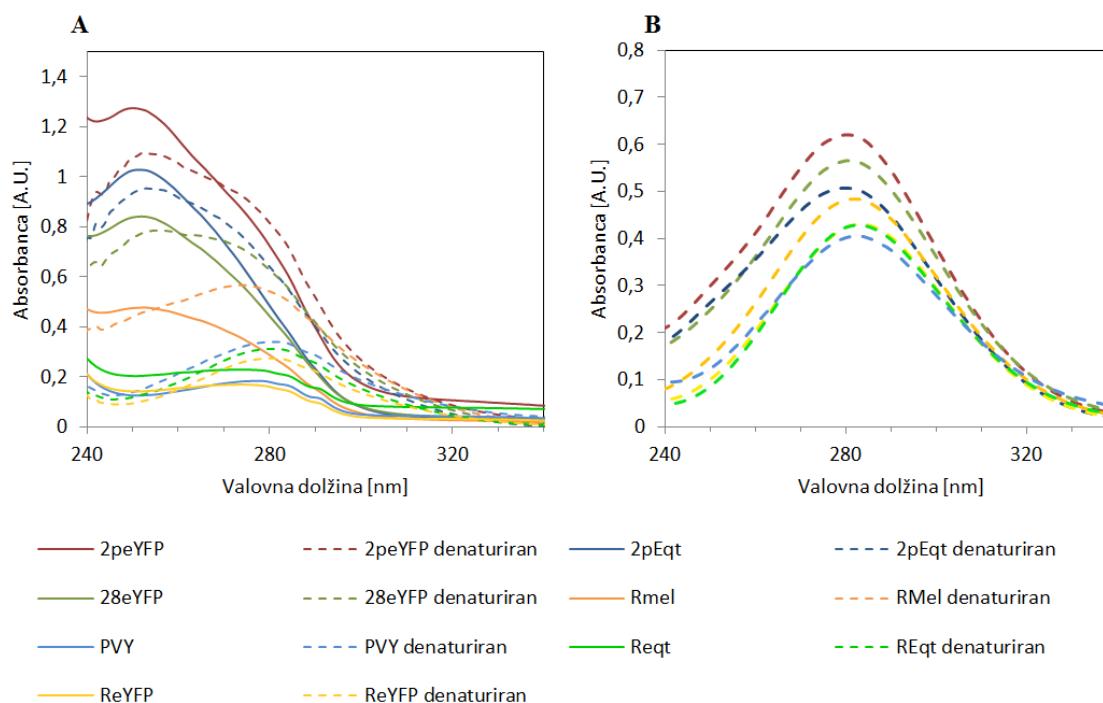
Med absorpcijskima spektroma posnetima na Nanodropu 1000 in UV-VIS spektrofotometru ni bilo opaznih večjih razlik. Po Bradfordovi metodi smo predhodno pripravili 0,1 mg/ml koncentracije proteinov v posameznem vzorcu. Čeprav so koncentracije proteinov v vseh vzorcih enake, se njihovi absorpcijski spektri med seboj

precej ločijo glede na intenzivnost absorpcije. Absorpcijski maksimum smo pričakovali pri valovni dolžini 280 nm, kjer je absorpcijski maksimum proteinov, vendar se vrhovi spektrov v tem primeru v večini vzorcev pojavijo pri približno 250 nm z izraženo ramo pri 280 nm. Vrhovi vzorcev 2peYFP in 2pEqtII presegajo vrednost absorbance 1 A.U. Absorbanca in koncentracija proteinov sta v linearni odvisnosti le v območju do 1 A.U., zato se po navadi vzorce, ki to vrednost presegajo, dodatno redči. V našem primeru vzorcev s previsokimi vrednostmi absorbance nismo redčili, saj nas je zanimala predvsem primerjava posameznih absorpcijskih spektrov med seboj. Spektri posneti z Nanodropom 1000 in UV-VIS spektrofotometrom so med seboj primerljivi (slika 31).



Slika 31: Primerjava absorpcijskih spektrov vzorcev s PVY VLP izmerjena na UV-VIS spektrofotometru (polna črta) in Nano Drop 1000 (prekinjena črta). Koncentracija vzorcev je 0,1 mg/ml.

Nato smo posneli še spektre denaturiranih vzorcev po inkubaciji v DTT, SDS ter segrevanju. Vrhovi spektrov po denaturaciji so se v primerjavi s spektri nativnih vzorcev začeli pomikati bolj proti 280 nm (slika 32A). Denaturirane vzorce smo še 7 dni inkubirali v DTT in SDS na 4°C ter nato ponovno izmerili absorpcijske spektre. Tokrat so bili absorpcijski maksimumi vseh vzorcev pri 280 nm. Ker je absorbanca vzorcev preveč narasla, smo jih morali redčiti na koncentracijo 0,02 mg/ml. Iz absorpcijskih spektrov po 7 dnevni inkubaciji sklepamo, da posneti spektri takoj po denaturaciji še ne predstavljajo popolnoma denaturiranih proteinov ampak le prehodno stanje med nativnimi in denaturiranimi VLP.



Slika 32: Primerjava absorpcijskih spektrov VLP v nativni obliki in denaturiranih z DTT in SDS. Graf A prikazuje primerjavo med spektri VLP v nativni obliki (polna črta) in VLP takoj po denaturaciji (prekinjena črta). Graf B prikazuje VLP po 7 dneh od denaturacije v DTT in SDS. Koncentracije vzorcev iz grafa A so bile 0,1 mg/ml, koncentracije vzorcev iz grafa B pa 0,02 mg/ml.

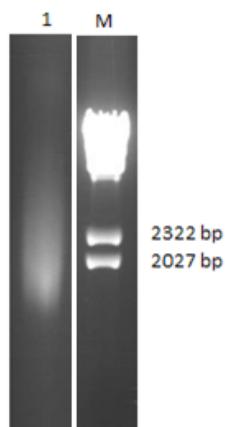
Za vse pridobljene VLP smo izračunali tudi razmerje med absorbancami pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm (preglednica 13), s katerim lahko ocenimo kontaminacijo proteininskih vzorcev z nukleinskimi kislinami. Običajno velja, da je A_{260}/A_{280} pri vzorcih s čisto DNA $\geq 1,8$, pri vzorcih s čisto RNA $\sim 2,0$, pri vzorcih s čistim proteinom pa 0,57.

Preglednica 13: Razmerje absorbanc valovnih dolžin A260/A280

Vzorec	A260/A280
Q-beta	1,96
2pEqtII	1,90
28eYFP	1,70
2peYFP	1,66
RMel	1,65
ReYFP	1,14
REqtII	0,96
PVY	0,82

Vzorci PVY, REqtII in ReYFP imajo najnižja razmerja A260/A280, kar nakazuje, da kontaminacija z nukleinskimi kislinami ni velika, medtem ko imajo ostali vzorci višja razmerja. Pri Q-beta je razmerje 1,96, kar kaže na prisotnost RNA molekul.

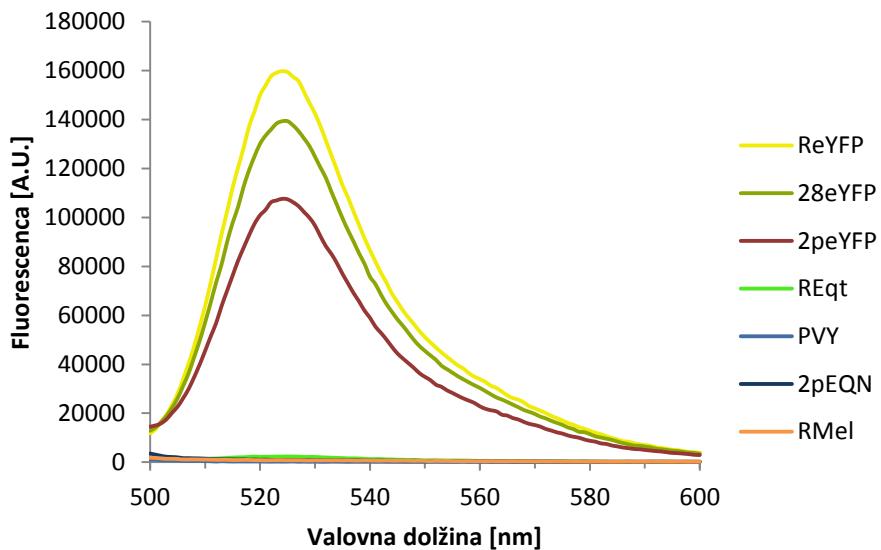
Že iz absorpcijskega spektra vzorca Q-beta smo sklepali na prisotnost nukleinskih kislin, saj ima vzorec absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 260 nm. Po koncentriranju skozi filter s 100 kDa porami, smo preverili tudi absorpcijski spekter filtrata. Meritve so pokazale, da so bile nukleinske kisline še vedno prisotne le v koncentratu s proteinom, v filtrat pa niso prehajale. Predvidevamo, da nukleinske kisline skozi filter niso mogle prehajati, ker so ujetе znotraj Q-beta VLP. Z gelsko agarozno elektroforezo z dodanim EtBr smo potrdili prisotnost nukleinskih kislin, difuznost lise pa nakazuje, da so v vzorcu res prisotne RNA molekule (slika 33).



Slika 33: Gelska agarozna elektroforeza končnega vzorca Q-beta. Stolpec 1 predstavlja vzorec s Q-beta, M - dolžinski standard Lambda DNA/*HindIII*.

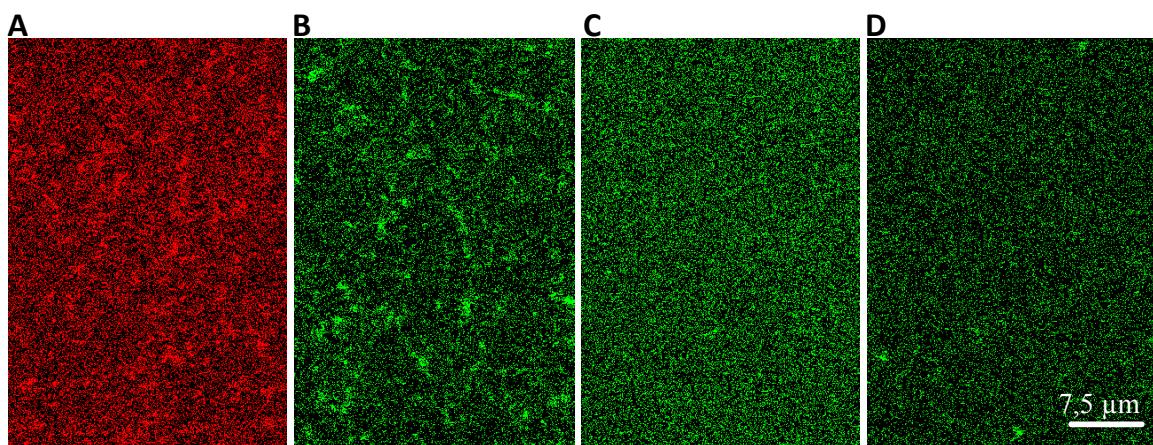
4.4.6 Fluorescencija VLP z vključenim eYFP

S pomočjo fluorimetra smo izmerili fluorescenco vseh pridobljenih vzorcev. Pri vseh treh vzorcih, ki so vsebovali eYFP (ReYFP, 28eYFP in 2peYFP), doseže fluorescencija najvišje vrednosti pri 527 nm, kar je tudi emisijski vrh eYFP. Pričakovano vzorci, ki niso vsebovali eYFP, ne fluorescirajo. Čeprav so bile koncentracije proteinov v vseh vzorcih 0,2 mg/ml, je bila intenziteta fluorescence različna.



Slika 34: Fluorescenčni emisijski spektri vzorcev z divjim tipom in fuzijskimi PVY CP po vzbujanju pri 490 nm.

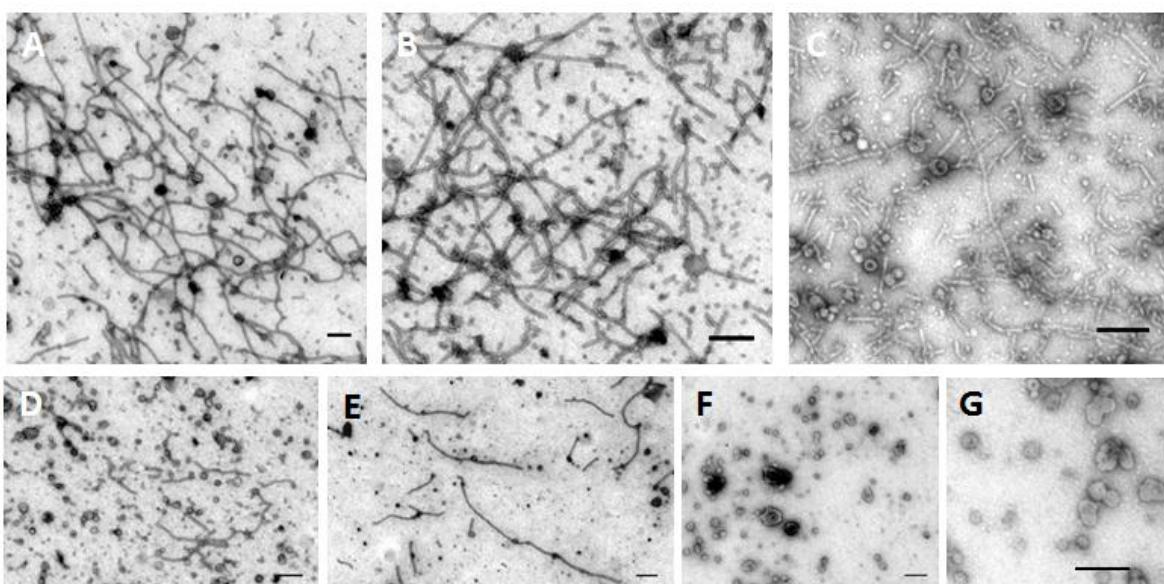
Vzorce smo pregledali tudi s konfokalno mikroskopijo. Zaznali smo fluorescenčni eYFP (slika 35). Tako kot na fluorimetru se tudi na mikroskopu opazi najnižja fluorescencija pri vzorcu 2peYFP. Nativni PVY CP ne bi bili vidni pod konfokalnim mikroskopom, zato smo jih označili s fluorescenčno značko. Posameznih nitk na slikah nismo razločili, opazi pa se specifična razporeditev fluorescenčnih molekul. Pri vzorcu ReYFP je razporeditev fluorescenčnih molekul zelo podobna kot pri vzorcu z nativnimi PVY CP, medtem ko so pri vzorcih 28eYFP in 2peYFP le te razporejene dokaj enakomerno po celotni površini. Predvidevamo, da specifično razporeditev povzročijo fluorescenčne molekule, ki so vezane v nitke. V vzorcih, kjer se CP niso sestavili v VLP, eYFP prosto plava po raztopini, zato je razporeditev na sliki bolj enakomerna.



Slika 35: PVY VLP označen s fluorescenčno značko in vzorci s CP v fuziji z eYFP, slikano s konfokalnim mikroskopom. Vzorci: PVY VLP (A), ReYFP (B), 28eYFP (C) in 2peYFP (D).

4.4.7 Transmisijska elektronska mikroskopija

S transmisijsko elektronsko mikroskopijo smo ugotovili, da so nitaste zgradbe prisotne v vzorcu z nativnimi PVY CP, ReYFP, REqtII, RMEL in 2pEqII (slika 36). V vzorcu 28eYFP nitastih zgradb nismo pričakovali, vendar smo našli 2 nitki dolgi 118 nm in 115 nm, kar pa bi lahko bila tudi posledica kontaminacije. V vzorcu 2peYFP nitastih zgradb ni bilo videti, kar sovpada z rezultati Wetern prenosa, kjer v vzorcu sploh nismo zaznali PVY CP. V tem vzorcu smo pričakovali vsaj nekaj nitastih zgradb, zato bi bilo potrebno za boljše pojasnilo poskus še ponoviti.



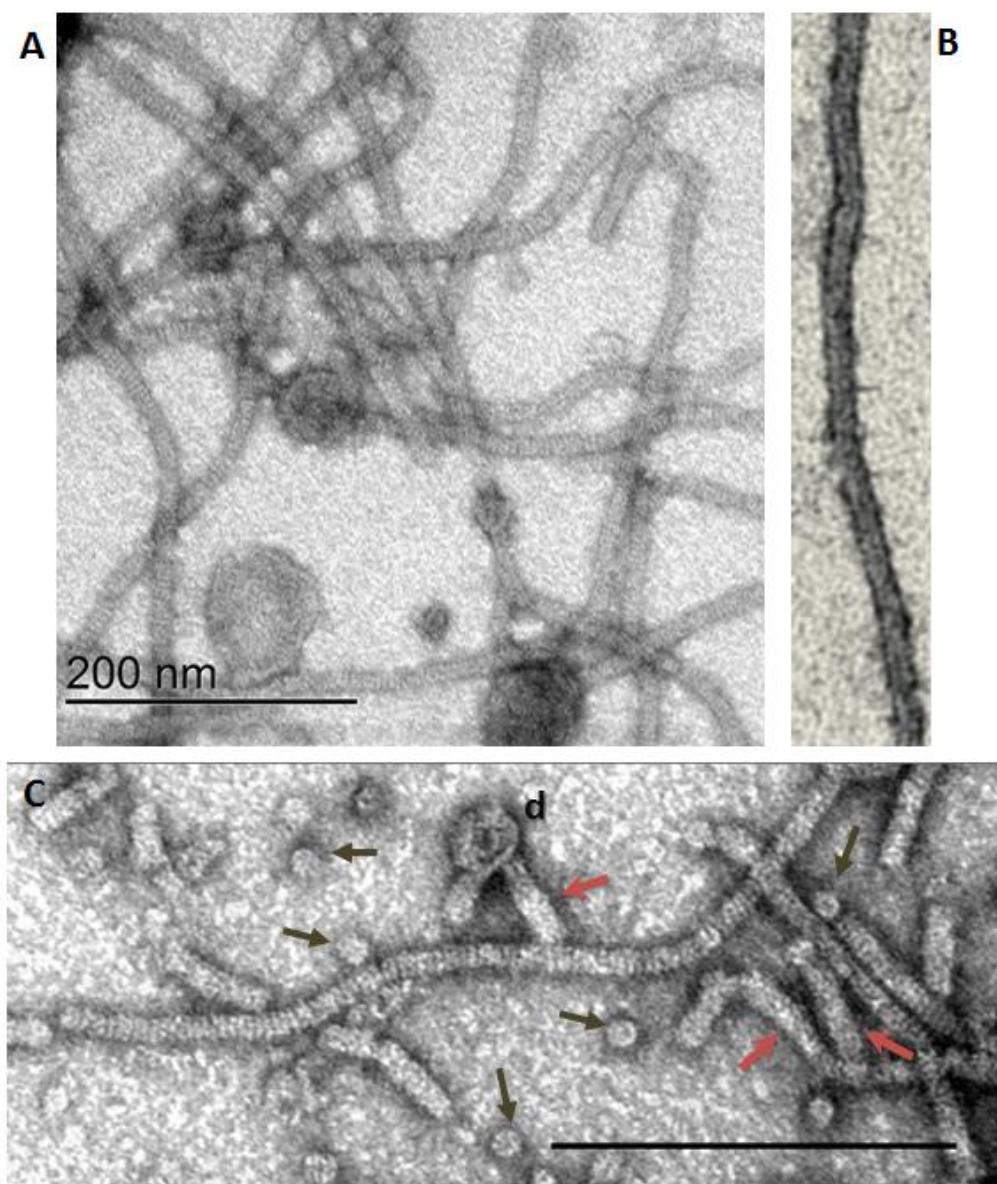
Slika 36: Vzorci s PVY CP in fuzijskimi PVY CP posneti s transmisijskim elektronskim mikroskopom. PVY CP (A), ReYFP (B), REqtII (C), 2pEqII (D), RMel (E), 28eYFP (F), 2peYFP (G). Merilo predstavlja 200 nm.

Nitaste zgradbe s PVY CP so bile dolge tudi preko 2 μm in zelo prepletene, zato je bilo njihovo dolžino težko izmeriti. V povprečju so bile dolge dobrih 900 nm (preglednica 14). V vzorcu RMel je bilo nitk manj kot pri nativnem PVY vzorcu, vendar so bile še vedno precej dolge, v povprečju dobrih 600 nm. V ostalih vzorcih so bile nitke precej kraje. Pri ReYFP so bile dolge povprečno 260 nm, vendar je bilo prisotnih več daljših nitk, ki so izgledale pravilnih oblik. Pri 2pEqII so bile zgradbe dolge približno 164 nm, najkrajše pa so bile pri REqtII in sicer okoli 80 nm.

Preglednica 14: Dolžina in širina nitk VLP ter premer agregatov, izmerjeni s TEM.

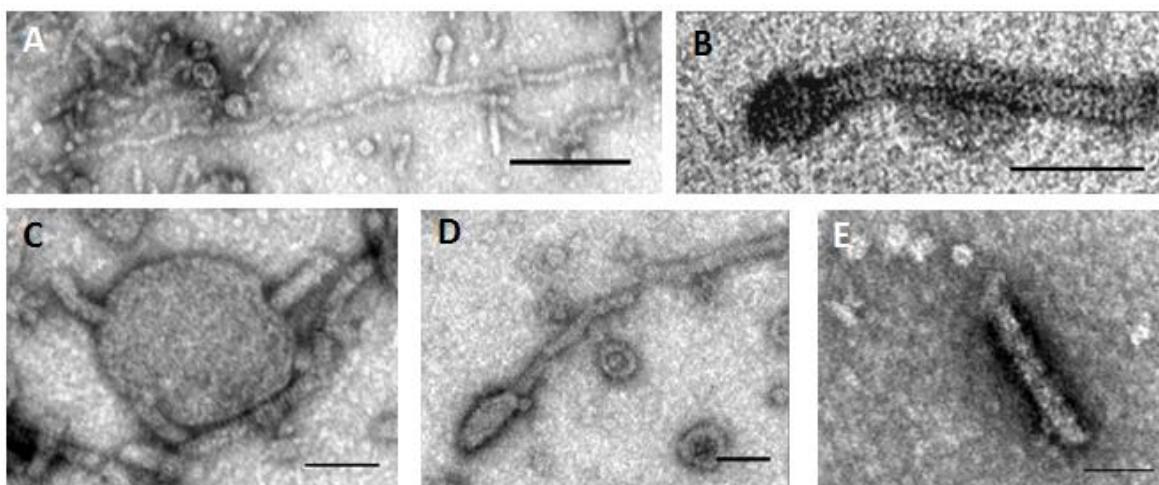
	PVY	ReYFP	Rmel	REqtII	2pEqtII	28eYFP
Dolžina nitk (nm)	919	260	614	80	164	108; 118
Standardni odklon (nm)	621,7	323,1	557,0	62,8	145,7	/
Število meritev	27	45	26	65	60	1; 1
Širina nitk (nm)	13,3	12,9	11,4	13,4	12,8	11,4; 18,0
Standardni odklon (nm)	0,9	1,3	1,1	1,1	2,0	0,2; 1,6
Število meritev	62	46	26	32	16	4; 10
Premer agregatov (nm)	47,9	51,8	29	38,2	43,6	47,6
Standardni odklon (nm)	19,0	19,7	5,0	9,0	12,5	26,7
Število meritev	77	62	8	39	77	55

Na slikah 37A in 37B pri vzorčkih PVY in ReYFP je lepo razvidna zgradba sestavljenih nitk. Razloči se sestavljene obroče, ki se vzporedno naložijo eden na drugega. Očitno je, da imajo nativni VLP popolnoma uniformne nitke, stranice nitk so gladke, brez vmesnih prekinitev in so enakomerno široke. Na sliki 37B pri vzorcu ReYFP je opaznih tudi veliko posameznih obročev, ki jih je bilo največ opaziti ravno v tem vzorcu, pojavljali pa so se tudi pri ostalih vzorcih. Posamezni obroči najverjetneje predstavljajo vmesno stanje med sestavljanju VLP (McDonald, 1976).



Slika 37: Zgradba PVY VLP (A), nativnega virusa PVY (B) in vzorca ReYFP (C). Zelene puščice označujejo zgradbo obročev, rjave puščice označujejo rahle nabrekline znotraj nitastih zgradb, (d) okrogli agregat na koncu nitaste zgradbe. Merilo predstavlja 200 nm.

Iz slik je razvidno, da na sestavljanje VLP slabše vpliva prisotnost EqtII kot eYFP, saj dolgih nitk skoraj ni opaziti, kadar pa se pojavi, so po celotni dolžini natrgane (slika 38A, 38D). Prav tako je bilo pri obeh vzorcih z EqtII prisotnih največ agregatov. Ti agregati so se pojavljali v vseh vzorcih in so bili največkrat pravilne okrogle oblike. Njihovega izvora ne poznamo, z immobilizacijo z Ab proti PVY na mikroskopskih mrežicah pa bi lahko ugotovili, če jih sestavlja PVY CP. Opazili smo, da se večkrat pojavijo na koncih nitastih zgradb oz. prilepljeni ob stranice VLP (slika 37d, 38B, 38C, 38D).

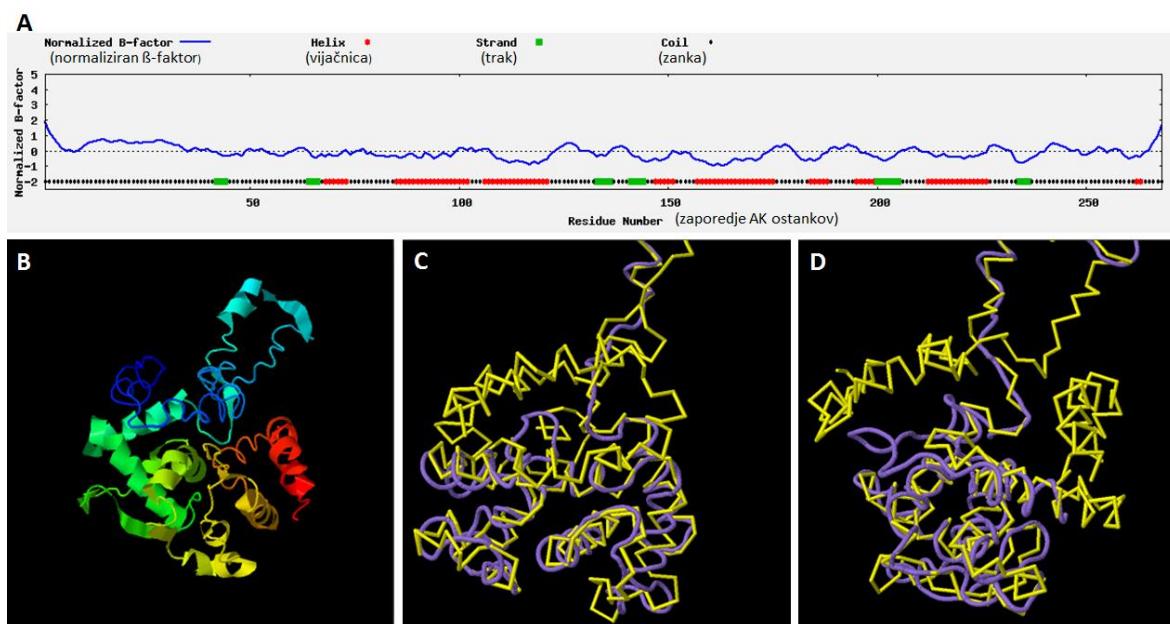


Slika 38: Slike različnih vzorcev posnete s transmisijskim elektronskim mikroskopom. Dalja nitka v vzorcu REqtII, ki pa je po celotni dolžini natrgana (A); agregati na koncih nitk vzorcev RMel (B), ReYFP (C) in 2pEqtII (D); nitasta zgradba v vzorcu 28eYFP (E). Merilo na sliki A predstavlja 200 nm, pri ostalih pa 50 nm.

Pričakovali smo, da bodo VLP s CP v fuziji nekoliko širši od nativnih VLP, vendar pa razen dolžine nitk in števila agregatov največkrat ni bilo opaziti drugih razlik. Povprečna širina nitk vzorcev je merila med 11,4 in 13,3 nm, kar sovpada s podatki o širini PVY VLP iz literature. Pri dveh nitkah v 28eYFP je širina ene merila 11,4 nm, druge pa 18 nm (slika 38E), kar lahko nakazuje na nekoliko drugačen postopek sestavljanja obeh nitk. Pri slednji nitki tudi ni dobro razvidna zgradba sestavljenih obročev, opazi se, da površina ni popolnoma pravilne oblike. Podobno zadebelitev smo opazili pri nekaterih nitkah v ReYFP vzorcu (slika 37B). Ti predeli nitk so široki približno 15 nm, prav tako pa je na teh delih slabše opazna zgradba sestavljenih obročev.

4.4.8 Predvideni model prostorske zgradbe PVY CP

Do sedaj je bila o PVY CP poznana le primarna zgradba proteina. Da bi predvideli njegovo najverjetnejšo možno zgradbo, smo zaporedje proteina vnesli v strežnik I-TASSER. Strežnik na podlagi aminokislinskega zaporedja predvidi sekundarno zgradbo proteina, ki v primeru PVY CP kaže na velik delež α -vijačnice in le nekaj krajših β -plošč (slika 39A). Normaliziran β -faktor je parameter, ki pove, kako stabilni so aminokislinski preostanki znotraj proteina. Preostanki z vrednostmi pod 0 so v eksperimentalni zgradbi proteina bolj stabilni (Yang in sod., 2015). Iz krivulje normaliziranega β -faktorja PVY CP je očitno, da sta konca zaporedja najmanj stabilna, medtem ko se stabilnost aminokislin poveča znotraj α -vijačnic in β -plošč.



Slika 39: Predikcija sekundarne in terciarne zgradbe PVY CP. Predikcija sekundarne zgradbe PVY CP in normaliziran β -faktor (A). Prvi izmed petih 3D modelov PVY CP, ki jih strežnik pridobi na podlagi algoritmov in poznanih zgradb proteinov (B). Poravnava zgradbe prvega modela PVY CP (rumena) s zgradbo PapMV (vijolična) iz leve (C) in sprednje (D) strani (pripravljeno na strežniku I-TASSER, 2015).

I-TASSER na podlagi proteinov s poznano kristalno zgradbo s pomočjo algoritmov poda 5 najbolj verjetnih prostorskih modelov za analizirani protein. Vsak model je sestavljen iz gruč krajših odsekov različnih proteinov, ki najbolj ustreza danemu zaporedju. Verjetnost vsakega modela je podana s C-vrednostjo, ki ima razpon od -5 do 2, pri čemer višje vrednosti pomenijo večjo verjetnost pravilne topologije modela (Roy in sod., 2010). Prvi izmed petih prostorskih modelov ima ponavadi najvišjo C-vrednost in je v našem primeru -2,63 (model na sliki 39B). Server nato pridobljeni model primerja s tridimenzionalno zgradbo vseh proteinov iz zbirke Protein Data Bank (PDB) in izračuna TM-vrednost za posamezen protein. S TM-vrednostjo ocenimo ujemanja zgradbe med dvema proteinskima modeloma, kjer vrednost 1 pomeni popolno ujemanje, pri vrednostih nižjih od 0,17 pa gre za naključno izbrana, nepodobna proteina (Roy in sod., 2010). Izmed vseh proteinov v PDB zbirki nato server pikaže 10 proteinov z najvišjo TM-vrednostjo, ki so torej najbolj podobni zgradbi predvidenega prostorskega modela analiziranega proteina. Kot najboljšo šablono za PVY CP server predlaga plaščni protein PapMV. Na slikah 39C in 39D je prikazana poravnava med PVY CP (rumena) in PapMV CP (vijolična). Zaporedje PapMV CP je krajše od PVY CP in zavzema le centralni del aminokislinskega zaporedja PVY CP (na sliki 39D sta dobro vidna N- in C-konec PVY CP, ki sta daljša od zaporedja PapMV CP). TM-vrednost poravnave modela s zgradbo PapMV je 0,518, kar pomeni dokaj solidno poravnavo zaporedij.

PVY in PapMV CP imata v virusih podobni funkciji, poleg tega pa gre za plaščna proteina dveh fleksibilnih nitastih virusov. Zato lahko predvidevamo, da je server I-TASSER v

PapMV CP našel odlično šablono za predikcijo prostorske zgradbe PVY CP. Ta zgradba vsebuje velik delež α -vijačnice in le nekaj krajših odsekov β -plošče, kar se ujema z izmerjenim CD spektrom PVY VLP, ki nakazuje na zgradbo z večjim deležem α -vijačnice. Po drugi strani pa še ni poznana nobena druga zgradba plaščnega proteina fleksibilnih nitastih virusov, zato ne vemo kakšna je dejanska strukturna podobnost med njimi.

5 SKLEPI

Potrdili smo prvo hipotezo, saj so se virusni CP samo-sestavili v VLP v odsotnosti virusne RNA. Do sestavljanja je najverjetnejše prišlo že med izražanjem, saj smo z gradientnim ultracentrifugiranjem ločili že sestavljene delce od ostalih proteinov. Prav tako so bili PVY in Q-beta VLP po obliku podobni nativnim virusom. Premer Q-beta delcev smo izmerili z DLS in se ujema z velikostjo nativnih virusov. Podobnost PVY VLP z nativnimi virusi pa smo potrdili s transmisijsko elektronsko mikroskopijo. PVY VLP so bili nekoliko daljši od nativnih virusov, širina delcev (~12 nm) pa je enaka pri obojih. Poleg tega so PVY VLP sestavljeni iz vzporednih obročev, medtem ko McDonald in sod. (1976) poročajo, da ima plašč nativnega PVY obliko vijačnice.

Na NaDS-PAGE gelih iz očiščenih VLP lahko tako pri PVY VLP kot pri Q-beta VLP opazimo dve lisi. Pri PVY vzorcu dodatna lisa predstavlja manjši protein, najverjetnejše gre za delno razgrajen CP, kot so predpostavljal že Kalnciema in sod. (2012). Pri Q-beta vzorcu pa dodatna lisa predstavlja večji protein od Q-beta CP. V tem primeru gre najverjetnejše za kovalentno vezane dimere, ki se tekom postopka priprave vzorca niso denaturirali.

Z metodama DSF in DSC smo ugotovili, da denaturacija PVY VLP poteče v dveh stopnjah. V prvi stopnji se poruši kvartarna zgradba proteina, v dugi stopnji pa se porušita terciarna in sekundarna zgradba CP. Meritve z DSC so pokazale, da PVY VLP v celoti denaturira pri 57 °C, kar se ujema s temperaturo inaktivacije nativnih virusov (Kalnciema in sod., 2012). Torej so VLP kljub odsotnosti virusne RNA enako termično stabilni kot virioni, ki vsebujejo RNA. DSF metoda se je po pričakovanjih izkazala za manj natančno kot DSC, še vedno pa je zaradi manjše porabe vzorca in hitrejše pridobitve rezultatov zelo uporabna pri testiranju več vrst pogojev, npr. vpliv ionske jakosti in različnih pH na vzorec. Ugotovili smo, da je kvartarna zgradba PVY VLP bolj stabilna pri nižji ionski jakosti ter da so VLP najbolj stabilni med pH 6 in pH 10.

Z merjenjem fluorescence proteina eYFP v fuziji s CP smo ugotovili, da je eYFP pravilno zvit in aktiven. Slike iz konfokanega mikroskopa pa nakazujejo, da so v vzorcu ReYFP prisotne nitaste zgradbe, saj so fluorescenčne molekle razporejene po gručah tako kot pri fluorescenčno označenih PVY VLP, medtem ko so bile v vzorcih 28eYFP in 2peYFP enakomerno razpršene po celotni površini.

Analiza nitk na transmisijskem elektronskem mikroskopu je pokazala, da se nativni PVY CP sestavijo v uniformne, fleksibilne, nitaste VLP. Potrdili smo tudi tretjo hipotezo, saj do sestavljanja v VLP pride tudi pri vzorcih s sočasnim izražanjem fuzijskih in nativnih CP, vendar so v teh primerih nitke krajše. Iz dolžine nitk sklepamo, da fuzija z melitinom najmanj vpliva na sestavljanje CP, medtem ko ima fuzija z EqtII najslabši vpliv. Če

primerjamo obe metodi transformacije za hkratno izražanje dveh proteinov in predpostavimo, da je delež fuzijskih CP glede na PVY CP večji pri transformaciji z dvema plazmidoma kot pri transformaciji z enim plazmidom in dodatnim RBS, lahko ugotovimo, da večji delež fuzijskih CP dejansko povzroči sintezo krajših nitk. Iz analize vzorcev REqtII in 2pEqII je razvidno, da so daljše nitke prisotne v vzorcu REqtII. Tudi pri vzorcu ReYFP so se pojavljale daljše nitke s pravilno obliko, žal pa ga ne moremo primerjati z dolžino nitk 2peYFP. Predvidevali smo, da bodo nitke, ki so sestavljenе tudi iz fuzijskih proteinov širše od nativnih VLP oz. da bo možno z elektronskim mikroskopom na površini ali na koncih VLP opaziti dodatne proteine. Žal pa smo ugotovili, da se posameznih proteinov ne vidi oz. ne razloči, zato ne moremo trditi koliko fuzijskih proteinov se dejansko sestavi v VLP ter če so prisotni le na koncih ali po celotni površini VLP. Vezavo fuzijskih CP v VLP bi lahko preverili v nadaljnjih študijah na transmisijskem elektronskem mikroskopu z uporabo imobiliziranih Ab proti eYFP, melitinu in EqII, s katerimi bi na mikroskopske mrežice imobilizirali le VLP ki bi vsebovali omenjene proteine.

V vseh PVY vzorcih smo poleg nitastih zgradb opazili tudi okrogle agregate različnih velikosti, zato je možno, da so ti agregati motili meritve DLS oz. so izmerjeni rezultati tudi hidrodinamski premeri aggregatov. Po drugi strani pa se je vzorec Q-beta na DLS meritvah izkazal za zelo monodisperznega, kar pomeni, da je sestavljanje Q-beta CP v VLP zelo dobro regulirano. Ugotovili smo, da je DLS optimalna metoda za merjenje velikosti globularnih delcev, medtem ko za nitaste delce v našem primeru ni podala primernih rezultatov.

6 POVZETEK

Virusom podobni delci so zaradi svoje zgradbe in njenih lastnosti uporabni v mnogih aplikacijah na različnih področjih. Zaenkrat največ aplikacij temelji na globularnih VLP, saj je njihova kristalna zgradba zelo dobro poznana. O zgradbi fleksibilnih nitastih VLP pa je znanega bolj malo, saj zaradi polimerizacije in fleksibilnosti delci niso primerni za kristalizacijo. Poznane so le osnove njihove geometrijskih oblik, medtem ko je kristalna zgradba poznana le pri PapMV CP (Yang in sod., 2012). Tudi nitasti VLP bi lahko bili uporabni v različnih aplikacijah kot ogrodje za nanocevke, prevodne žičke, dostavne sisteme, cepiva...

Določili smo nekatere biokemijske in fizikalne lastnosti PVY VLP, izrazili fuzijske PVY CP ter opazovali njihovo sestavljanje. Kot primerjavo nitastim VLP smo izrazili tudi globularne Q-beta VLP. Postopki izolacije in čiščenja so bili pri obeh VLP podobni, le da smo pri čiščenju Q-beta VLP dodali še korak z ekstrakcijo z butanolom in kloroformom. Premer Q-beta delcev smo izmerili z DLS in meri 26 nm, kar ustreza objavljeni velikosti delcev iz predhodnih raziskav (Blumenthal in Carmichael, 1979; Rhee in sod., 2011). Ker metoda ni bila primerna za merjenje velikosti nitastih delcev, smo velikosti PVY VLP analizirali s transmisijskim elektronskim mikroskopom. Delci s PVY VLP so bili v povprečju dolgi 900 nm in široki 12 nm. Delci, ki so nastali s sočasnim izražanjem fuzijskih in nativnih CP so bili v povprečju dolgi 100-250 nm (razen pri fuziji z melitinom, kjer so bili delci v povprečju dolgi 600 nm) in široki 12 nm. Tudi v vzorcu, ki je vseboval le CP v fuziji z eYFP sta bili prisotni dve nitki dolgi približno 100 nm. Aktivnost in pravilno zvitje proteina eYFP v fuziji s CP smo dokazali z merjenjem fluorescence na fluorimetru in opazovanjem pod konfokalnim mikroskopom.

Termično stabilnost PVY VLP smo preverjali z metodami CD, DSF in DSC, med katerimi se je za najbolj zanesljivo izkazal DSC. Merjenje CD spektra je v prvi vrsti namenjeno pridobivanju podatkov o sekundarni zgradbi, s temi meritvami smo lahko le ocenili širše temperaturno območje v katerem pride do denaturacije PVY VLP. Z DSF in DSC meritvami smo ugotovili, da denaturacija VLP poteče v dveh fazah. V prvi fazi pride do razpada VLP na monomere, v drugi fazi pa denaturirajo monomerni CP. Prvi prehod se zgodi pri izpostavljenosti 49 °C, drugi pa pri temperaturi 57 °C. Hidrofobno barvilo Sypro Orange prične fluorescirati med obema prehodoma, torej se v obeh stopnjah denaturacije razkrijejo hidrofobna mesta znotraj proteina. Poleg tega na stabilnost zgradbe PVY CP (predvsem kvartarne) vpliva tudi ionska jakost. Iz teh rezultatov sklepamo, da je sestavljanje CP v VLP odvisno tako od hidrofobnih kot tudi elektrostatskih sil.

7 VIRI

- Arennds P., Kus. M. 1999. Nasveti za pridelovanje krompirja v Sloveniji. Kranj, Merkator-KŽK Kmetijstvo Kranj, Laboratorij za fiziologijo in virusne bolezni: 241 str.
- Beekwilder M. J., Nieuwenhuizen R., van Duin J. 1995. Secondary structure model for the last two domains of single-stranded RNA phage Q β . Journal of Molecular Biology, 247: 903-917
- Berger P. H., Adams M. J., Barnett O. W., Brunt A. A., Hammond J. 2005. Potyviridae. V: Eighth report of the International Committee on Taxonomy of viruses. Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. (ur.). Elsevier: 819–841
- Blum A. S., Soto C. M., Wilson C. D. Amsinck C., Franzon P., Ratna B. R. 2007. Electronic properties of molecular memory circuits on a nanoscale scaffold. IEEE Transactions on NanoBioscience, 6: 270-274
- Blum A. S., Soto C. M., Wilson C. D., Brower T. L., Pollack S. K., Schull T. L., Chatterji A., Lin T. W., Johnson J. E., Amsinck C. 2005. An engineered virus as a scaffold for three-dimensional self-assembly on the nanoscale. Small, 1, 7: 702-706
- Blumenthal T., Carmichael G. C. 1979. RNA replication: function and structure of Q β replicase. Annual Review of Biochemistry, 48: 525-548
- Chackerian B. 2010. Virus-like particle based vaccines for Alzheimer disease. Human Vaccines, 6: 926–930
- ClinicalTrials.gov. 2015. U. S. National Library of Medicine.
<https://clinicaltrials.gov/ct2/home> (14. avg. 2015)
- Delgado-Sanchez S., Grogan R. G. Potato virus Y. 1970. Association of Applied Biologist.
<http://www.dpweb.net.sci-hub.org/dpv/showadpv.php?dpvno=37> (20. maj 2015)
- Douglas T., Young M. 1998. Host-guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages. Nature, 393: 152-155
- Dynamic light scattering common terms defined. 2011. Worcestershire, Malvern Instruments Limited: 6 str.
http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/wp-content/uploads/2011/02/DLS_Terms_defined_Malvern.pdf (25. maj 2015)
- Enterobacteria phage QBeta PDB_ID: 1QBE. 2004. Jean-Yves Sgro.
<http://www.virology.wisc.edu/virusworld/ICTV8/qbe-bacteriophage-qb-ictv8.jpg> (25. maj 2015)

- Fiedler J. D., Brown S. D., Lau J. L., Finn M. G. 2010. RNA-directed packaging of enzymes within virus-like particles. *Angewandte Chemie International Edition*, 49: 9648–9651
- Gerasopoulos K., McCarthy M., Royston E., Culver J. N., Ghodssi R. 2008. Nanostructured nickel electrodes using the tobacco mosaic virus for microbattery applications. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 18: 104003, doi:10.1088/0960-1317/18/10/104003: 8 str.
- Golmohammadi R., Fridborg K., Bundule M., Valegård K., and Liljas, L. 1996. The crystal structure of bacteriophage Q β at 3.5 Å resolution. *Structure*, 4: 543–554
- Gutiérrez-Aguirre I., Hodnik V., Glais L., Rupar M., Jacquot E., Anderluh G., Ravnikar M. 2014. Surface plasmon resonance for monitoring the interaction of *Potato virus Y* with monoclonal antibodies. *Analytical Biochemistry*, 447: 74–81
- Heuberger E. H., Veenhoff L. M., Duurkens R. H., Friesen R. H., Poolman B. 2002. Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. *Journal of Molecular Biology*, 317: 591–600
- I-TASSER – Protein structure & function predictions. Zhang Lab, University of Michigan.
<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER> (15. maj 2015)
- Jin Y., Ma D., Dong J., Jin J., Li D., Deng C., Wang T. 2007. HC-Pro protein of potato virus y can interact with three arabidopsis 20s proteasome subunits in planta. *Journal of Virology*, 81: 12881–12888
- Kalnciema I., Skrastina D., Ose V., Pumpens P., Zeltins A. 2012. Potato virus Y-like particles as a new carrier for the presentation of foreign protein stretches. *Molecular Biotechnology*, 52: 129–139
- Karasev A. V., Gray S. M. 2013. Continuous and emerging challenges of potato virus Y in potato. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 571–586
- Kendall A., McDonald M., Bian W., Bowles T., Baumgarten S. C., Shi J., Stewart P. L., Bullitt E., Gore D., Irving T. C. in sod. 2008. Structure of flexible filamentous plant viruses. *Journal of Virology*, 82: 9546–9554
- Kim K.-J., Kim H.-E., Lee K.-H., Han W., Yi M.-J., Jeong J., Oh B.-H. 2004. Two-promoter vector is highly efficient for overproduction of protein complexes. *Protein Science*, 13: 1698–1703.

- Ksenofontov A. L., Paalme V., Arutyunyan A. M., Semenyuk P. I., Fedorova N. V., Rumvolt R., Baratova L. A., Järvekülg L., Dobrov E. N. 2013. Partially disordered structure in intravirus coat protein of potyvirus potato virus A. *PLoS ONE*, 8: e67830, doi:10.1371/journal.pone.0067830: 7 str.
- Kuncicky D. M., Naik R. R., Velev O. D. 2006. Rapid deposition and longrange alignment of nanocoatings and arrays of electrically conductive wires from tobacco mosaic virus. *Small*, 2: 1462-1466
- Kushnir N., Streatfield S. J., Yusibov V. 2012. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*, 31: 58-83
- Liepold L. O., Revis J., Allen M., Oltrogge L., Young M., Douglas T. 2005. Structural transitions in cowpea chlorotic mottle virus (CCMV). *Physical Biology*, 2: S166-S172
- Life science applications of DSC overview note. 2006. Lindon, Calorimetry Sciences Corporation.
<http://www.bioch.ox.ac.uk/aspsite/services/equipmentbooking/biophysics/CSCnote2.pdf> (3. jul. 2015)
- Ligand screening. Lemont, Argonne National Laboratory, Bioscience division.
http://www.bio.anl.gov/molecular_and_systems_biology/Sensor/sensor2.html (24. maj 2015)
- Lim F., Spingola M., Peabody D. S. 1996. The RNA-binding site of bacteriophage Q β coat protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 31839–31845
- Louis-Jeune C., Andrade-Navarro M. A., Perez-Iratxeta C. 2012. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins. Structure, function, and bioinformatics*, 80, 2: 374-381
- Mao C., Flynn C. E., Hayhurst A., Sweeney R., Qi J., Georgiou G., Iverson B., Belcher A. M. 2003. Viral assembly of oriented quantum dot nanowires. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100: 6946-6951
- McDonald J. G., Bancroft J. B. 1977. Assembly studies on potato virus Y and its coat protein. *Journal of General Virology*, 35: 251–263
- McDonald J. G., Beveridge T. J., Bancroft J. B. 1976. Self-assembly of protein from a flexuous virus. *Virology*, 69: 327–331
- NativeMark™ unstained protein standard protocol. 2014. Thermo Fischer Scientific Inc.
http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/NativeMarkUnstainedProteinStd_man.pdf (8. avg. 2015)

NativePAGE™ Novex® Bis-Tris gel system user guide. 2012. Carlsbad, Life Technologies Corp.: 44 str.
http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nativepage_man.pdf (26. maj 2015)

Nicoll J. A., Wilkinson D., Holmes C., Steart P., Markham H., Weller R. O. 2003. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nature Medicine*, 9, 4: 448–452

Niesen F. H., Berglund H., Vedadi M. 2007. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols*, 2: 2212–2221

Nikolaeva O. V., Roop D. J., Galvino-Costa S. B. F., dos Reis Figueira A., Gray S. M., Karasev A. V. 2012. Epitope mapping for monoclonal antibodies recognizing tuber necrotic isolates of potato virus Y. *American Journal of Potato Research*, 89: 121–128

Niu Z., Liu J., Lee A., Bruckman M., Zhao D., Koley G., Wang Q. 2007. Biological templated synthesis of watersoluble conductive polymeric nanowires. *Nano Letters*, 7: 3729–3733

Nolte P., Whitworth J. L., Thornton M. K., McIntosh C. S. 2004. Effect of seedborne potato virus Y on performance of russet burbank, russet norkotah, and shepody potato. *Plant Disease Journal*, 88: 248–52

Novartis announces collaboration with Banner Alzheimer's Institute on a pioneering prevention study for Alzheimer's disease. 2014. Basel, Novartis International AG. <http://www.novartis.com/newsroom/media-releases/en/2014/1824651.shtml> (3. jun. 2015)

Novex®Sharp pre-stained protein standard protocol. 2014. Thermo Fischer Scientific Inc. http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/NovexSharpPreStainedProteinStnd_man.pdf (8.avg. 2015)

Novex®Sharp unstained protein standard protocol. 2014. Thermo Fischer Scientific Inc. https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/Novex_SharpUnstainedProteinStnd_man.pdf (8.avg. 2015)

Ott J. J., Stevens G. A., Groeger J., Wiersma S. T. 2012. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine*, 30: 2212–2219

pEYFP-N1 Vector Information. 2000. CLONTECH Laboratories, Inc.
<http://gind-db.ucsf.edu:8000/PDF/pEYFP-N1.4.7kb.pdf> (30. apr. 2015)

Product information: Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladder Mix. 2012. Thermo Fischer Scientific Inc.

https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0013013_GeneRuler_DNA_Ladder_1250ug_UG.pdf (8.avg. 2015)

Product information: Thermo Scientific MassRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use. 2012. Thermo Fischer Scientific Inc.

https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/MAN0013021_MassRuler_DNALadder_RTU_UG.pdf (8.avg. 2015)

Rebeaud F., Bachmann M. 2012. Virus-like particles as efficient delivery platform to induce a potent immune response. V: Innovation in Vaccinology. Baschieri S. (ur.). Dordrecht: Springer Netherlands: 87–122

Rhee J.-K., Hovlid M., Fiedler J. D., Brown S. D., Manzenrieder F., Kitagishi H., Nycholat C., Paulson J. C., and Finn M. G. 2011. Colorful virus-like particles: fluorescent protein packaging by the Q β capsid. *Biomacromolecules*, 12: 3977–3981

Rodríguez-Limas W. A., Sekar K., Tyo K. E. 2013. Virus-like particles: the future of microbial factories and cell-free systems as platforms for vaccine development. *Current Opinion in Biotechnology*, 24: 1089–1093

Romancer M. le, Kerlan C. in sod. 1994. Biological characterisation of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathology*, 43: 138–144

Romier C., Ben Jelloul M., Albeck S., Buchwald G., Busso D., Celie P. H. N., Christodoulou E., De Marco V., van Gerwen S., Knipscheer P. in sod. 2006. Co-expression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: experimental procedures, database tracking and case studies. *Acta Crystallographica section D: Biological Crystallography*, 62: 1232–1242

Roy A., Kucukural A., Zhang Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5: 725–738

Roy P., Noad R. 2009. Virus-like particle as a vaccine delivery system: myths and facts. V: *Pharmaceutical Biotechnology*. Guzman C. A., Feuerstein G. Z. (ur.). Landes Bioscience, Springer Science+Business Media: 145–158

Rustandi R. R., Wang F., Hamm C., Cuciniello J. J., Marley M. L. 2014. Development of imaged capillary isoelectric focusing method and use of capillary zone electrophoresis in hepatitis B vaccine RECOMBIVAX HB ®. *Electrophoresis*, 35: 1072–1078

Sangha S. P. S., Sharma R. K. 2009. Basic techniques in biochemistry and molecular biology. New Delhi, I. K. International Publishers Pvt. Ltd.: 280 str.

- Scheich C., Kummel D., Soumailakakis D., Heinemann U., Bussow K. 2007. Vectors for co-expression of an unrestricted number of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35: e43–e43, doi: 10.1093/nar/gkm067: 7 str.
- Scholthof K.-B. G., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P. in sod. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12: 938–954
- Shenton W., Douglas T., Young M., Stubbs G., Mann S. 1999. Inorganic-organic nanotube composites from template mineralization of tobacco mosaic virus. *Advanced Materials*, 11: 253-256
- Shukla D. D., Strike P. M., Tracy S. L., Gough K. H., Ward C. W. 1988. The N- and C-termini of the coat proteins of potyviruses are surface located and the N-terminus contains the major virus-specific epitopes. *Journal of General Virology*, 69: 1497–1508
- Singh, R. P., Valkonen, J. P. T., Gray, S. M., Boonham, N., Jones, R. A. C., Kerlan, C., Schubert, J. 2008. Discussion paper: The naming of potato virus Y strains infecting potato. *Archives of Virology*, 153: 1–13
- Slocik J. M., Naik R. R., Stone M. O., Wright D. W. 2005. Viral templates for gold nanoparticle synthesis. *Journal of Materials Chemistry*, 15: 749-753
- Soto C. M., Blum A. S., Vora G. J., Lebedev N., Meador C. E., Won A. P., Chatterji A., Johnson J. E., Ratna B. R. 2006. Fluorescent signal amplification of carbocyanine dyes using engineered viral nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 128: 5184-5189
- Soto C. M., Ratna B. R. 2010. Virus hybrids as nanomaterials for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 21: 426–438
- Tan S., Kern R. C., Selleck W. 2005. The pST44 polycistronic expression system for producing protein complexes in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 40: 385-395
- Tribodet M., Glais L., Kerlan C., Jacquot E. 2005. Characterization of potato virus Y (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVY^N isolates in infected Nicotiana tabacum cv. Xanthi. *Journal of General Virology*, 86: 2101–2105
- Unstained protein standards. 2015. Bio-Rad Laboratories, Inc.
<http://www.bio-rad.com/en-si/product/unstained-protein-standards> (8. avg. 2015)
- Urcuqui-Inchima S., Haenni A.-L., Bernardi F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74: 157–175

- van Duin J. 1988. Single-stranded RNA bacteriophages. V: The bacteriophages. Calendar R. (ur.). New York, Plenum Press: 117-167
- Walker J. M. 2000. Electrophoretic techniques V: Principles and techniques of practical biochemistry. 5th ed. Walker J. M., Wilson K. (ur.). Cambridge, Cambridge University Press: 580-618
- Wallace B. A., Janes R. W. 2009. An introduction to circular dichroism and synchotron radiation circular dichroism spectroscopy. V: Modern techniques for circular dichroism and synchrotron radiation circular dichroism spectroscopy. Wallace B. A., Janes R. W. (ur.). Amsterdam, IOS Press: 1-18
- Weber K., Konigsberg W. 1975. 3 proteins of the RNA phages. Cold Spring Harbor Monograph Archive, 5: 51–84
- Yang J., Wang Y., Zhang Y. 2015. ResQ: approach to unified estimation of B-factor and residue-specific error in protein structure prediction, submitted
<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/example/lscore.txt> (15. maj 2015)
- Yang J., Yan R., Roy A., Xu D., Poisson J., Zhang Y. 2015. The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. Nature Methods, 12: 7-8
- Yang S., Wang T., Bohon J., Gagné M.-È.L., Bolduc M., Leclerc D., Li H. 2012. Crystal structure of the coat protein of the flexible filamentous papaya mosaic virus. Journal of Molecular Biology, 422: 263–273
- Zeltins A. 2009. Plant virus biotechnology platforms for expression of medicinal proteins V: Medicinal protein engineering. Y. E. Khudyakov (ur.). Boca Raton, CRC Press: 481–517
- Zetasizer Nano user manual. 2013. Worcestershire, Malvern Instruments Ltd.: 11.1-11.4
<http://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Malvern%20Zetasizer%20ZS%20DLS%20User%20manual.pdf> (27. maj 2015)
- Zhang Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics, 9, 40: 1-8
- Zhu F.-C., Zhang J., Zhang X.-F., Zhou C., Wang Z.-Z., Huang S.-J., Wang H., Yang C.-L., Jiang H.-M., Cai J.-P. in sod. 2010. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. The Lancet, 376: 895–902
- λDNA/HindIII. 2011. Dongsheng Biotech Co., Ltd.
<http://dongshengbio.com/en/UploadFiles/2012518124027574.pdf> (8. avg. 2015)

ZAHVALA

Za vodenje, nasvete in strokovno pomoč pri nastajanju magistrskega dela se najlepše zahvaljujem mentorju prof. dr. Gregorju Anderluhu.

Zahvaljujem se dr. Nejcu Rojku in ostalim sodelavcem v Laboratoriju za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo za potrpežljivost in pomoč pri mojih prvih samostojnih podvigih v laboratoriju.

Zahvaljujem se prof. dr. Nataši Poklar Ulrich za strokovni pregled magistrske naloge.

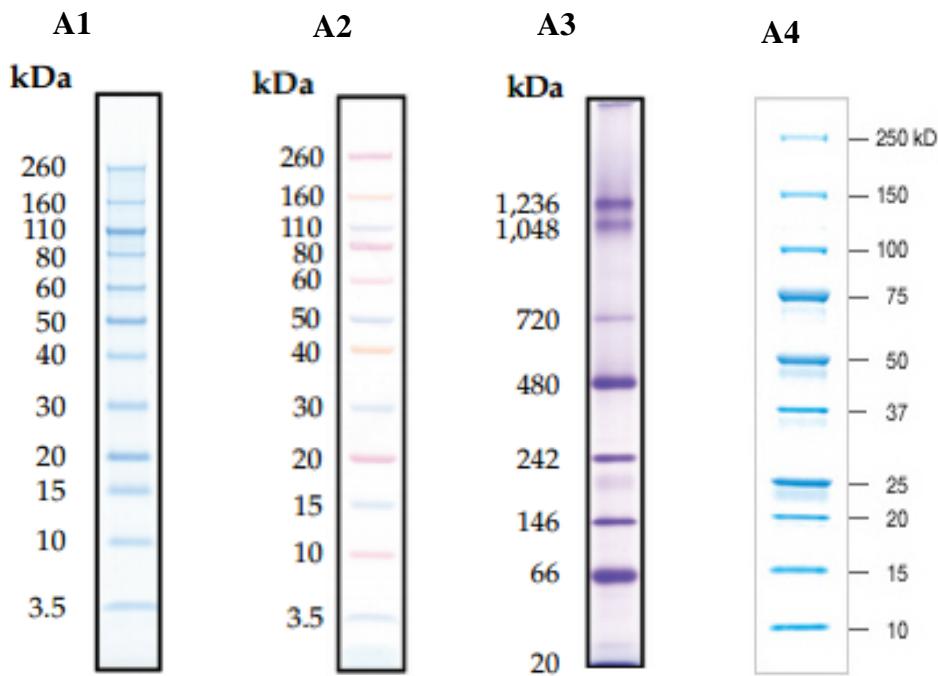
Zahvaljujem se dr. Markotu Šnajderju in Ajdi Ota za izvedbo poskusov z diferenčno dinamično kalorimetrijo.

Zahvaljujem se dr. Magdi Tušek Žnidarič za posnete slike na transmisijskem elektronskem mikroskopu.

Hvala tudi družini in Markotu za potrpežljivost in podporo med pisanjem magistrske naloge.

PRILOGA A

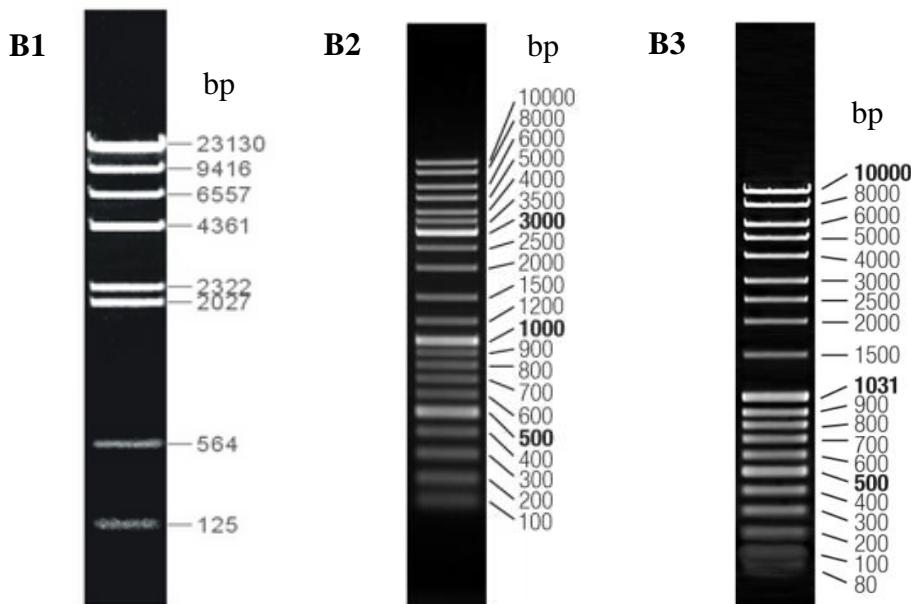
Standardi znanih molekulskih mas uporabljeni pri NaDS-PAGE, BN-PAGE ali Western prenosu:



Pril. A1: Novex®Sharp unstained protein standard (Novex®Sharp unstained ..., 2014); Pril. A2: Novex®Sharp pre-stained protein standard (Novex®Sharp pre-stained ..., 2014); Pril. A3: NativeMark™ unstained protein standard (NativeMark™ ..., 2014); Pril. A4: Precision Plus Protein™ unstained standard (Unstained protein ..., 2015).

PRILOGA B

Dolžinski standardi uporabljeni pri gelski agarozni elektroforezi:



Pril. B1: dolžinski standard Lambda DNA/*Hind*III (λ DNA/*Hind*III, 2011); Pril. B2:
dolžinski standard GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Product information ..., 2012); Pril. B3:
dolžinski standard MassRuler™ DNA Ladder Mix (Product information ..., 2012)