

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tibor DOLES

**SAMOSESTA VLJIVE POLIPEPTIDNE
NANOSTRUKTURE IZ OBVITIH VIJAČNIC**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tibor DOLES

**SAMOESTAVLJIVE POLIPEPTIDNE NANOSTRUKTURE IZ OBVITIH
VIJAČNIC**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**SELF-ASSEMBLED POLYPEPTIDE NANOSTRUCTURES BASED ON COILED
COILS**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Po sklepu Študijske komisije univerzitetnega dodiplomskega študija biologije in na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Gregor Anderluh, za somentorja prof. dr. Roman Jerala in za recenzenta prof. dr. Peter Maček.

Mentor: prof. dr. Gregor Anderluh

Somentor: prof. dr. Roman Jerala

Recenzent: prof. dr. Peter Maček

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Damjana DROBNE
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Član: prof. dr. Roman JERALA,
 Kemijski inštitut Ljubljana, Laboratorij za biotehnologijo

Član: prof. dr. Peter MAČEK
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 23.9.2010

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni starni Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Tibor Doles

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK
KG	nanostrukture/polipeptid/obvita vijačnica/samozdruževanje/načrtovani peptidi/paralelen homodimer/antiparalelen heterodimer
AV	DOLES, Tibor
SA	ANDERLUH, Gregor (mentor)/JERALA, Roman (somentor)/ MAČEK, Peter (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2010
IN	SAMOSESTAVLJIVE POLIPEPTIDNE NANOSTRUKTURE IZ OBVITIH VIJAČNIC
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 76 str., 11 pregл., 39 sl., 42 vir.,
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Narava nudi številne primere nanostruktur s posebnimi lastnostmi, ki jih proizvajajo živi organizmi in tvorijo samoorganizirane strukture od nano do makroskopskih velikosti. V naravi so za gradnjo večine struktur v uporabi proteini, ker so zelo stabilni in vsebujejo funkcionalne skupine z različnimi lastnostmi. Kompleksne samosestavljljive strukture lahko zgradimo iz osnovnih gradnikov. Eden v naravi pogosto uporabljenih gradnikov so obvite vijačnice, kjer peptidne vijačnice tvorijo prepletene paralelne ali antiparalelne obvite vijačnice. Naš namen je bil pripraviti nanostrukture iz polipeptidov. Zato smo zasnovali peptide, ki so sposobni dimerizacije v paralelno heterodimerno obvito vijačnico. Uporabili smo jih za oblikovanje polipeptida, ki je potencialno sposoben samozdruževanja v nano-kocke, nano-tetraedre ali heksagonalno mrežo. Polipeptid je bil sestavljen iz treh vijačnih segmentov. Sredinski segment APH tvori antiparalelne homodimere, robna segmenta pa predstavlja načrtovana peptida P3 in P4, ki tvorita paralelne homodimere. Protein smo izražali v <i>E. coli</i> , ga izolirali in očistili. Z merjenjem cirkularnega dikroizma smo dokazali, da protein zavzame predvideno strukturo alfa vijačnice, ki je zelo stabilna in se denaturira reverzibilno. Z gelsko filtracijo smo potrdili nastajanje diskretnih proteinskih agregatov in z metodo merjenja dinamičnega sipanja svetlobe izmerili njihov radij, ki je bil okoli 30 nm. Elektronska transmisijska mikroskopija je potrdila prisotnost struktur v obliki kvadratov in mreže.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC
CX	nanostructure/polypeptide/coiled coil/self-assemblydesigned peptide/ antiparallel homodimer/parallel heterodimer
AU	DOLES, Tibor
AA	ANDERLUH, Gregor (supervisor)/JERALA, Roman (co - advisor)/ MAČEK, Peter (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of biology
PY	2010
TI	SELF-ASSEMBLED POLYPEPTIDE NANOSTRUCTURES BASED ON COILED COILS
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	XII, 76 p., 11 tab., 39 fig., 42 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Nature offers numerous examples of materials with special features, produced by living organisms that form structures sized from nano to macroscopic scales. In nature, proteins are used instead of nucleotides for construction of most of the molecular assemblies since proteins are more stable and contain functional groups with various properties. We can build more complex structures from basic building blocks. Coiled-coil segments in which peptide helices form intertwined parallel or antiparallel coiled coils are among the most often used natural building blocks. Our aim was to prepare nanostructures from polypeptides. We designed parallel heterodimeric coiled-coil forming peptides and used them to form polypeptide, which is capable of self-assembling into nanocubes, nanotetrahedron or a hexagonal lattice. Polypeptide was made of three coiled-coil forming segment. Middle segment APH forms antiparallel homodimers, designed peptides P3 and P4 form parallel heterodimers at the edges of the polypeptide chain. Protein was produced in <i>E. coli</i> , isolated and purified. Circular dichroism confirmed the formation of expected coiled-coils, which are very stable and their denaturation is reversible. Gel filtration chromatography showed formation of discrete protein aggregates. Their hydrodynamic radius was measured by DLS. Size of protein particles were around 30 nm. TEM identified quadratic shapes and lattices.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI

1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NANOMATERIALI.....	3
2.2 BIOLOŠKI NANOMATERIALI.....	4
2.2.1 DNA nanomateriali.....	4
2.2.2 Nanomateriali iz polipeptidov	5
2.3 NANOMATERIALI NA PODLAGI OBVITIH VIJAČNIC.....	7
2.3.1 Obvite vijačnice	7
2.3.2 Načrtovanje polipeptidnih vijačnic.....	8
2.3.3 Primeri uporabe obvitih vijačnic za pripravo nanomaterialov	10
2.4 POLIPEPTID IZ TREH SEGMENTOV, KI TVORIJO OBVITE VIJAČNICE	10
2.4.1 Analiza topologije	10
2.4.2 Sestavni elementi	12
2.4.3 Končni konstrukt P3APHP4	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Kemikalije	15
3.1.1.1 Kemikalije, encimi in komercialno dostopni kompleti	15
3.1.1.2 Raztopine in pufri	16
3.1.1.3 Standardi	17
3.1.1.4 Protitelesa	17

3.1.2 Gojišča	17
3.1.3 Laboratorijska oprema	18
3.1.4 Plazmidi in sintetični polinukleotidi	19
3.1.5 Bakterijski sevi.....	20
3.2 METODE	21
3.2.1 Načrtovanje proteinskih zaporedij	21
3.2.2 Sterilizacija steklovine, gojišč in raztopin.....	22
3.2.3 Osnovne metode molekularnega kloniranja	22
3.2.3.1 Naročanje sintetičnih oligonukleotidov.....	22
3.2.3.2 Restrikcija DNA	22
3.2.3.3 Ligacija	25
3.2.3.4 DNA elektroforeza na agaroznem gelu	26
3.2.3.5 Izolacija fragmentov DNA iz agaroznih gelov	26
3.2.3.6 Transformacija kompetentnih celic <i>E. coli</i> DH5α.....	26
3.2.3.7 Izolacija plazmidne DNA mini prep.....	27
3.2.3.8 Določanje zaporedja nukleinskih kislin.....	27
3.2.3.9 Določanje koncentracije nukleinskih kislin.....	28
3.2.3.10 Priprava kompetentnih celic	28
3.2.4 Pridobivanje in izolacija proteina	29
3.2.4.1 Transformacija kulture in pridobivanje proteina v kulutri <i>E. coli</i>	29
3.2.4.2 Liza in sonikacija celic	29
3.2.4.3 Kelatna kromatografija z Ni-NTA kolono	30
3.2.4.4 Merjenje absorbance in določanje koncentracije proteina	31
3.2.4.5 Dializa in koncentriranje vzorcev proteina.....	31
3.2.4.6 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS.....	32
3.2.4.7 Barvanje proteinov z barvilm Coomassie modro	32
3.2.4.8 Prenos Western in imunodetekcija	32
3.2.5 Masna spektroskopija	33
3.2.6 Določanje sekundarne strukture proteinov s CD spektroskopijo.....	34
3.2.7 Počasno zvijanje proteina	35
3.2.8 Presevna elektronska mikroskopija.....	36
3.2.9 Gelska kromatografija	37

3.2.10	Dinamično sisanje svetlobe	37
3.2.11	AFM mikroskopija	37
4	REZULTATI	39
4.1	NAČRTOVANI POLIPEPTIDNI GRADNIK P3APHP4	39
4.2	PRIPRAVA EKSPRESIJSKEGA VEKTORJA	40
4.2.1	Ekspresijski vektor pVIKTOR	40
4.2.2	Rezultati kloniranja.....	41
4.2.2.1	Vnašanje sintetičnih genov v pVIKTOR.....	41
4.2.2.2	Priprava vektorskega konstrukta P3APHP4/pVIKOTR	43
4.3	PRIDOBIVANJE IN IZOLACIJA PROTEINA P3APHP4.....	46
4.3.1	Pridobivanje proteina	46
4.3.2	Izolacija in identifikacija rekombinatnega proteina P3APHP4.....	46
4.4	DOLOČANJE SEKUNDARNE STRUKTURE PROTEINA P3APHP4.....	50
4.5	KONTROLIRANO ZVIJANJE PROTEINA.....	55
4.6	ANALIZA TVORBE UREJENIH NANOSTRUKTUR.....	56
4.6.1	Gelska filtracija	56
4.6.2	Dinamično sisanje svetlobe	57
4.6.3	Transmisijkska elektronska mikroskopija.....	58
4.6.4	Mikroskopija na atomsko silo	63
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	64
5.1	RAZPRAVA.....	64
5.1.1	Priprava vektorskega konstrukta P3APHP4.....	65
5.1.2	Izolacija in identifikacija P3APHP4	65
5.1.3	Določanje sekundarne strukture.....	66
5.1.4	Določanje velikosti sestavljenih nanostruktur	67
5.1.5	TEM in AFM mikroskopija.....	68
5.2	ZAKLJUČKI	70
6	POVZETEK	71
7	VIRI	72

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Aminokislinsko zaporedje polipeptida P3-APH-P4	12
Preglednica 2: AK zaporedja načrtovanih peptidov P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 in P8	13
Preglednica 3: Uporabljene kemikalije, encimi in komercialno dostopni kompleti.....	15
Preglednica 4: Uporabljene raztopine in pufri.....	16
Preglednica 5: Uporabljeni standardi	17
Preglednica 6: Uporabljena protitelesa.....	17
Preglednica 7: Uporabljena gojišča	17
Preglednica 8: Uporabljena laboratorijska oprema	18
Preglednica 9: Uporabljeni sevi <i>E. coli</i>	20
Preglednica 10: Lastnosti proteina P3-APH-P4, izračunane z programom ProtParam.....	46
Preglednica 11: Vrednosti A ₆₀₀ med fermentacijo kulture <i>E.coli</i>	46

KAZALO SLIK

Slika 1: Model Buckminsterskega fulerena in nanocevk (Iijima, 2008)	4
Slika 2: Primeri nanostuktur pripravljenih iz DNA (Rothemund in sod., 2006).....	5
Slika 3: (A) Interakcije med aminokislinskimi ostanki v paralelni obviti vijačnici znotraj ene heptade (abcdefg), (B) 3-D struktura paralelne obvite vijačnice GCN4, določena z NMR (Mason in sod., 2007).....	7
Slika 4: Slika: Možne oblike zvitja proteina iz treh vijačnih segmentov.	11
Slika 5: Prikaz strukture α -vijačnice antiparalelnega homodimera APH (Gurnon in sod., 2003).....	12
Slika 6: Shema konstrukta polipeptida P3-APH-P4.	14
Slika 7: Shema vektorja pVIKTOR.....	19
Slika 8: Shemi naročenih sintetičnih polipeptidov v vektorju pANY.....	20
Slika 9: Shema uporabe BioBrick standarda BBF RCF 37 in nastanek mešanega mesta, ki kodira povezovalni člen iz Ser in Gly (Jerala in Benčina, 2009).	23
Slika 10: Shema priprave »front« vektorja in »front« inserta ter njihova ligacija.....	24
Slika 11: Prikaz krivulj za različne sekundarne strukture proteinov.....	34
Slika 12: Shema postopka počasnega redčenja denaturanta.....	36
Slika 13: Shema konstrukta polipeptida P3-APH-P4, ki je sestavljen iz treh vijačnih segmentov P3, APH, P4, vmesnih povezovalnih členov iz Ser in Gly ter heksahistidinskega označevalca.....	39
Slika 14: Aminokislinski zaporedji peptidov P3 in P4.....	40
Slika 15: Shematski prikaz rezanja sintetičnih genov iz vektorja pANY in njihova priprava za ligacijo.....	41
Slika 16: Shematski prikaz vnosa insertov P3, P4 APH v pVIKTOR in priprava »front insertov«.....	42
Slika 17: 1,2 % agarozni gel s produkti, nastalimi po restriktijski analizi vektorja pVIKTOR z vnešenimi sintetičnimi fragmenti.	43
Slika 18: Shematski prikaz priprave ekspresijskega vektorskega konstrukta P3-APH-P4/pVIKTOR.....	44
Slika 19: Kontrolna restriktijska analiza končnega ekspresijskega konstrukta pVIKTOR/P3-APH-P4 na 1.2% agaroznem gelu.....	45
Slika 20: A,B,C) 15 % poliakrilamidni gel po NaDS-PAGE, barvan s Coomassie modrim..	47
Slika 21: A, B, C, D, E) 15 % poliakrilamidni gel po NaDS-PAGE, barvan s Coomassie modrim, F, G, H, I, J) Western prenos s 15 % poliakrilamidnega gela po NaDS-PAGE.	48
Slika 22: A, B) 15 % poliakrilamidni gel po NaDS-PAGE, barvan s Coomassie modrim. ...	49
Slika 23: CD spekter proteina P3-APH-P4 v 20 mM HEPES pH 7,5.....	51
Slika 24: CD spekter proteinskega vzorca P3-APH-P4 v 20 mM HEPES pH (7,5)	51
Slika 25: P3-APH-P4 v 20 mM Hepes pH 7,5 pri 222 nm v odvisnosti od temperature... .	52
Slika 26: CD spekter proteina P3-APH-P4 v 20 mM HEPES (pH 7,5),1 M GvdHCl.....	53
Slika 27: P3-APH-P4 v 1 M GvdHCl pri 222 nm v odvisnosti od temperature.....	53
Slika 28: CD spekter proteina P3-APH-P4 pri različnih koncentracijah GvdHCl.....	54
Slika 29: P3-APH-P4 pri 222 nm v odvisnosti od koncentracije denaturanta GvdHCl.....	54
Slika 30: Kromatogram po gelski filtraciji P3-APH-P4 z dodanimi molskimi masami proteinskih standardov.....	56
Slika 31: Velikosti hidrodinamskih radijev določenih z DLS	57

Slika 32: Elektronski posnetek proteina P3-APH-P4 po počasnem redčenju denaturanta.	
Koncentracija proteina je 50 µg/ml 100.000 x povečava.....	59
Slika 33: Elektronski posnetek proteina P3-APH-P4 po počasnem redčenju denaturanta.	
100.000 x	59
Slika 34: Elektronski posnetek proteina P3-APH-P4 po počasnem ohlajanju iz 70 °C na 20 °C. 150.000 x	60
Slika 35: Elektronski posnetek proteina P3-APH-P4 po počasnem ohlajanju iz 70 °C na 20 °C. 250.000 x	60
Slika 36: Elektronski posnetek proteina P3-APH-P4 po počasnem redčenju denaturanta in gelski filtraciji.....	61
Slika 37: Elektronski posnetek proteina P3-APH-P4 po neskončno dolgemu redčenju denaturanta in gelski filtraciji.....	61
Slika 38: Elektronski posnetek proteina P3-APH-P4 po počasnem redčenju denaturanta in gelski filtraciji.....	62
Slika 39: AFM posnetek proteina P3-APH-P4 po počasnem redčenju denaturanta.	
Opazimo lahko nekaj delcev višine do treh nanometrov.....	63

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

A	absorbanca pri določeni valovni dolžini
Ab	protitelo (ang. antibody)
AK	aminokislina, aminokislinski ostanek
Amp	ampicilin
Ang.	angleško
APS	amonijev persulfat
bp	bazni par
β-ME	β-merkaptoetanol
CD	circularni dikroizem
CPI	mešanica proteaznih inhibitorjev (ang. protease inhibitor cocktail)
Da	dalton, enota za molekulsko maso
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DOC	deoksiholična kislina (5b-holan-24-ojska kislina-3a,12a-diol)
DTT	ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	komercialno dostopen substrat za peroksidazo
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina
EtBr	etidijev bromid
GvdHCl	gvanidinijev hidroklorid
HEPES	4-(2-hidrosietil)-1-piperazinetan sulfonska kislina
His	histidinski rep sestavljen iz 6 histidinov
IPTG	izopropil β-D-1-thiogalaktopyranozid (ang. Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)
kDa	kilo Da (1000 Da)
LB	gojišče Luria-Bertani
LBA	gojišče Luria-Bertani z ampicilinom
MQ	mili Q voda, dodatno očiščena deionizirana voda
MWCO	izključitvena molekulská masa (ang. molecular weight cut off)
nm	nanometer
NMR	jedrska magnetna resonanca
nt	nukleotid
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza (ang. polyacrylamide gel electrophoresis)
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije ionov H_3O^+
RGD	tripeptid iz aminokislin arginina, glicina in asparaginske kisline
Rnaza	ribonukleaza
RNA	ribonukleinska kislina
NaDS	natrijev dodecil sulfat

Stop	stop kodon
TAE	pufer Tris, ocetna kislina, EDTA (ang. Tris-acetate-EDTA)
TBS	pufer s Tris-om in soljo (ang. Tris buffered saline)
TEMED	N,N,N,N -tetrametil-etilendiamin
Tween 20	polioksietilensorbitan monolavrat
vrt./min	vrtljaji na minuto
% (m/V)	odstotek, delež neke snovi, določen kot razmerje mase te snovi z volumnom celotne raztopine
% (V/V)	odstotek, delež neke snovi, določen kot razmerje prostornine te snovi s prostornino celotne raztopine

1 UVOD

Človeštvo že od nekdaj žene potreba po odkrivanju neznanega. Z napredkom znanosti in razvojem novih tehnologij smo dobili možnost preučevati svet na atomski ravni, kar nam daje natančen vpogled in možnost ustvarjanja novih nanomaterialov.

Nanomateriali so sestavljeni iz delcev, ki so manjši od 100 nm in imajo zaradi svoje zgradbe na nanometrski skali specifične lastnosti. Slednje nam omogoča raznovrstno uporabo delcev: od vsakdanje (kozmetika, tekstil, pralna sredstva, barvila v prehrani.) do specialnih namenov, kot so biosenzorji, tkivno inženirstvo in dostava zdravil. Večina nanomaterialov v razvoju in uporabi je pripravljena na osnovi ogljikovih ali kovinskih nanodelcev. Dober zgled za načrtovanje in pripravo nanodelcev nam ponuja živa narava. Osnovni gradbeni in katalitski sestavnici deli živih organizmov so namreč prav nanodelci, ki so sestavljeni iz aminokislin, nukleinskih kislin, lipidov ter ogljikovih hidratov. Zaradi njihove biokompatibilnosti in sposobnosti samozdruževanja so biološke makromolekule primerne za pripravo nanomaterialov in nanonaprav s kompleksnimi lastnostmi.

V zadnjih letih so znanstveniki pripravili številne primere bionanodelcev, ki se sami sestavljajo v supramolekulske strukture. Primer uspešnega posnemanja naravnih zakonitosti za pripravo samosestavljivih nanostruktur je uporaba nukleinskih kislin. Na osnovi enostavnega parjenja preko baznih parov so pripravili molekule DNA, ki se zvijejo v vnaprej definirane dvo- ali tridimenzionalne strukture. Vendar se pri gradnji struktur v naravi ne uporabljam nukleinske kisline, temveč proteini. Ti so bolj strukturno stabilni in imajo tudi stranske funkcionalne skupine (hidrofobne, polarne, kisle, bazične, reaktivne), ki omogočajo interakcijo in katalitično aktivnost z drugimi makromolekulami. Kompleksne samosestavljive strukture lahko zgradimo iz osnovnih gradnikov. Pri polipeptidih ti lahko predstavljajo oligomerizacijske domene. Od združevanja in zaporedja osnovnih domen je odvisna terciarna in kvartarna zgradba proteinov. Z metodami sintezne biologije in proteinskega inženirstva lahko proteine modificiramo in pripravimo gradnike, ki se na podlagi nekovalentnih medmolekulskeih interakcij samosestavijo v zaželjene strukture, kot so na primer: mreže, tetraedri, kocke).

1.1 NAMEN DELA IN HIPOTEZE

V diplomske nalogi smo skušali doseči naslednje cilje:

- S pomočjo bioinformatike in računalniškega načrtovanja ustvariti umetno polipeptidno zaporedje, ki bi ustrezalo zahtevam za tvorbo samosestavljinih kompleksnih struktur z določeno terciarno strukturo.
- Pripraviti ekspresijski vektor z zapisom za izbrani polipeptid P3-APH-P4, ki lahko tvori samosestavljive komplekse strukture na podlagi obvitih vijačnic.
- Pridobiti rekombinantni protein P3-APH-P4 v ekspresijskem sistemu bakterije *E. coli*.
- Karakterizirati nastale strukture in eksperimentalno dokazati tvorbo samosestavljinih nanostruktur na podlagi polipeptidnih verig.

Hipoteze, ki smo si jih postavili, so naslednje:

- Z načrtovanjem aminokislinskega zaporedja peptidnih segmentov lahko pripravimo zaporedja, ki tvorijo obvite vijačnice, ter jih sestavimo v polipeptid iz treh segmentov.
- Polipeptidi iz treh segmentov, ki tvorijo obvite vijačnice, se sami sestavijo v kompleksne nanostrukture definiranih oblik.
- S spremenjanjem pogojev zvijanja proteina lahko regulirano samosestavljanje kompleksnih nanostruktur definiranih oblik.

2 PREGLED OBJAV

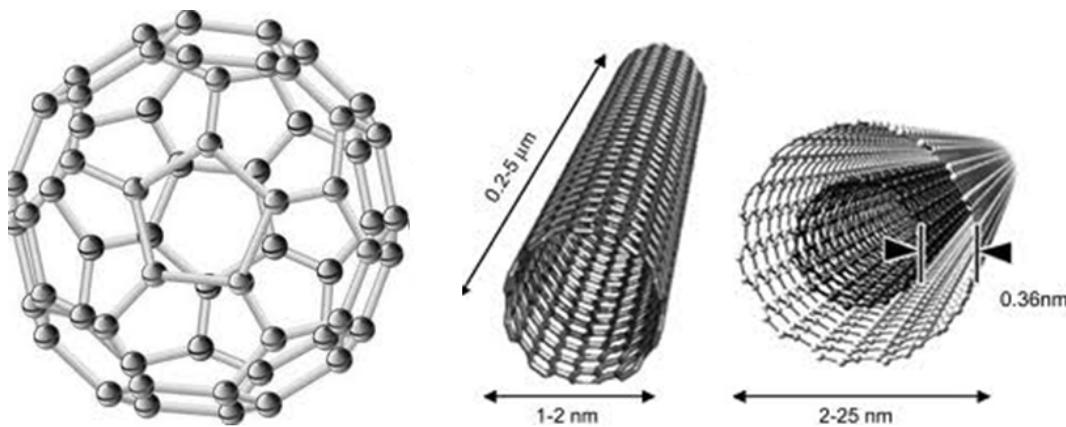
2.1 NANOMATERIALI

Nanomateriali so strukture, sestavljene iz delcev, ki so manjši od 100 nm. Zaradi svoje zgradbe na nanometrski skali dobijo nove posebne lastnosti, ki nam omogočajo uporabo v različne namene: možnost izvedbe miniaturnih naprav in sistemov z več funkcionalnostmi; doseganje visokih razmerij površine proti volumnu; nove fizikalne, kemične in mehanske lastnosti (tališče, prevodnost, trdnost, reaktivnost, samozložljivost) ipd. Nanomateriali postajajo vse pomembnejši v rabi za vsakdanje življenje (kozmetika, tekstil, maziva, sončne celice) kot tudi v znanosti in medicini (kataliza, nanoroboti, procesne enote, tarčna dostava zdravil) (Buzea in sod., 2007).

Za pripravo nanomaterialov se uporablja dva pristopa: »z vrha navzdol« (»top down«) in »od spodaj navzgor« (»bottom up«). Pri metodi »z vrha navzdol« uporabljam proces litografije, ki omogoča pripravo delcev od velikosti atoma do 100 nm v obliki dvodimenzionalnih ploskev (Parikh in sod., 2008). Ta metoda pa ima tudi nekaj pomanjkljivosti, kot so 1) zahtevna priprava litografskih vzorcev, ki bi omogočali pripravo kompleksnih tridimenzionalnih struktur in 2) majhno število pridobljenih nanodelcev; zato vedno bolj prevladuje uporaba pristopa »od spodaj navzgor«.

Pristop »od spodaj navzgor« temelji na sposobnosti delcev, da se na podlagi medsebojnih interakcij (brez vpliva na vsakega posebej) sami sestavijo v urejene strukture. Urejanje struktur lahko poteka na znotrajmolekulski ali na medmolekulski ravni. Interakcije, ki omogočajo to urejanje, so nekovalentnega značaja: vodikove vezi, hidrofobne interakcije, elektrostatske in van der Waalsove sile, koordinacija kovinskih mrež in π-π povezave (Lehn, 1988). Samosestavljlivost, ki je vezana na privlačne in odbojne sile med delci, omogoča nove optične, mehanske in električne lastnosti nanoobjektov kot so nanomotorji, membrane in mediji, ki hranijo informacije (Ikkala in ten Brinke, 2002).

Večina nanomaterialov v razvoju in uporabi je pripravljena na osnovi ogljika (fulereni, nanocevke, grafitni stožci, nanokristalni diamanti) (Slika 1), kovinskih nanodelcev (titanov dioksid, silikatni kristali, koloidi iz zlata, srebra) ali polimerov (Kumar, 2009; Gogots 2008). Dober zgled za načrtovanje in pripravo nanodelcev pa najdemo tudi v živi naravi. Osnovni gradbeni in katalitski sestavni deli živih organizmov so namreč prav nanodelci, ki so sestavljeni iz aminokislin, nukleinskih kislin, lipidov ter ogljikovih hidratov. Zaradi njihove biokompatibilnosti in sposobnosti samozdruževanja so biološke makromolekule primerne za pripravo nanomaterialov in nanonaprav s kompleksnimi lastnostmi (Yin in sod., 2008).



Slika 1: Model Buckminsterfulerena in nanocevk (Iijima, 2008).

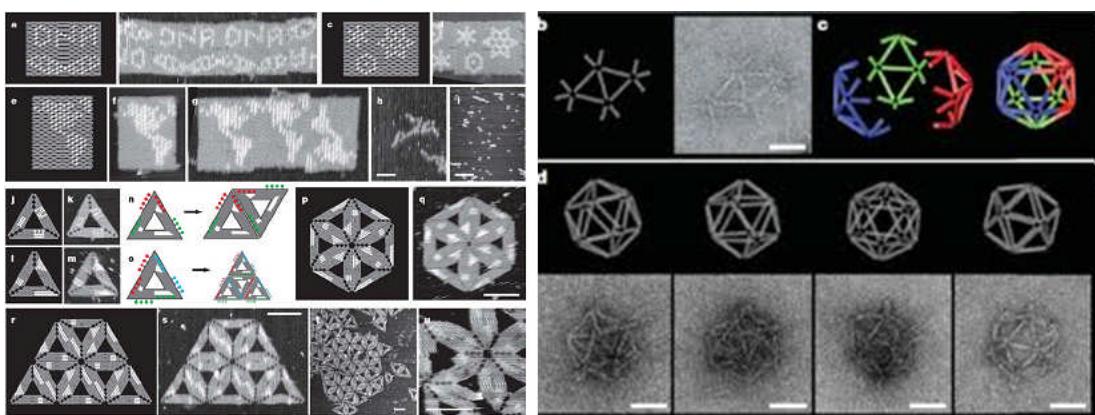
2.2 BIOLOŠKI NANOMATERIALI

Številni naravnici so sposobni samozdruževanja v kompleksne sestave, iz katerih so sestavljene celice. Iz narave lahko vzamemo in preoblikujemo osnovne gradnike, iz katerih bomo zgradili nanostrukture, poleg tega pa lahko za njihovo pripravo izkoristimo biosintetski potencial celic. Kot najbolj primerni kandidati so se za pripravo nanodelcev izkazale nukleinske kisline in proteini.

2.2.1 DNA nanomateriali

Raziskave o povezovanju nukelinskih kislin za tvorbo nenavadnih struktur in oblik segajo že v 90. leta 20. stoletja (Seeman, 1996). Kot osnovo za pripravo DNA molekul, ki se

zvijejo v vnaprej definirane strukture, so vzeli parjenje preko »Watson-Crickovih parov« nukleinskih baz. Tako so pripravili dvodimenzionalne objekte poljubnih oblik (Rothemund in sod., 2006, Goodman in sod., 2004), tridimenzionalne nanostrukture, kot so tetraedri, kocke in oktaedri (He in sod., 2008) ter periodične planarne strukture (Li in sod., 2010) (Slika 2). Ti motivi zagotavljajo orodje za racionalno načrtovanje različnih struktur DNA. S poznavanjem medsebojnih interakcij in osnovnih motivov lahko pripravimo katerokoli obliko. Sinteza umetnih nukleotidnih verig je poceni in enostavna, zato bi lahko bile DNA nanostrukture primerne kot šablona ali ogrodje za anorganske nanodelce (Patolsky, 2002).



Slika 2: Primeri nanostuktur pripravljenih iz DNA (Rothemund in sod., 2006).

2.2.2 Nanomateriali iz polipeptidov

Proteini so se v živem svetu izkazali kot najboljši gradbeni elementi. Imajo dvajset različnih osnovnih sestavnih elementov (aminokislin) z zelo različnimi lastnostmi, ki se lahko v zaporedju poljubno kombinirajo. Polipeptidi so strukturno zelo stabilni; raznolikost aminokislinskega sestava pa omogoča različne funkcionalnosti stranskih spojin: hidrofobnost, polarnost, kislost, bazičnost, reaktivnost, planarnost in razvejanost.

Omenjene lastnosti omogočajo 1) samosestavljanje molekul na višje gradbene nivoje, 2) njihovo encimsko aktivnost ter 3) vezavo ogljikovih hidratov, lipidov, nukleinskih kislin in kovinskih ionov. Zaradi vsega navedenega so polipeptidi primerni kandidati za funkcionalne biološke nanomateriale (Zhang, 2003). Precejšnje število naravnih polimerov, ki jih uporabljamo v tehnologiji, je proteinskega izvora (fibroin v svili, keratin v volni, kolagen v usnju itd.). Iz narave lahko vzamemo ali preoblikujemo osnovne

strukturne motive in elemente, iz katerih lahko nato zgradimo nanostrukture. Velika prednost nanodelcev iz polipeptidov je v tem, da jih lahko z metodami rekombinantne tehnologije pripravimo v večjih količinah znotraj živih celic. Tovrstna proizvodnja je enostavna in poceni.

V zadnjem času lahko opazimo porast raziskav o pripravi in uporabnosti bioloških nanomaterialov za številne potencialne aplikacije. Fibrile in filamenti so zelo pogoste strukture v naravi. Najpogosteje so zgrajene iz alfa vijačnic, ki tvorijo obvite vijačnice ali pa so iz beta struktur. Z izdelavo novih zaporedij, ki upoštevajo hidrofobne in elektrostatske interakcije, so raziskovalci pripravili kraje filamente velikosti nekaj mikrometrov (Pandya in sod., 2000; Poteckhin in sod., 2001). Dosegli so samozložitev peptidnih molekul iz 28 aminokislin v fibrile. Na posamezne polipeptidne verige z lizinskimi ostanki so s kovalentno vezjo vezali funkcionalne skupine (biotin, vezavna mesta za zlato). Tako so pridobili fibrile s stranskimi verigami, na katere so se vezali kovinski atomi (Ryadnov in Woolfson, 2004).

S študijami beta struktur, ki lahko preidejo v amiloidne fibrile, in obvitih vijačnic, ki s spremenjanjem pogojev prehajajo v beta ploskve, so razvili molekularna stikala (Altman in sod., 2000). Sviло, ki jo sestavlajo fibrile iz beta ploskev, so združili z tripeptidom RGD in na ta način pridobili material, ki pospešuje ahezijo osteoklastov na podlago (Sofia in sod., 2001). Pri proteinu K24, ki je analog naravnega IsK (protein, ki aktivira K^+ kanalčke), so ugotovili, da lahko s spremenjanjem ionske jakosti regulirajo tvorbo beta ploskev, ki vežejo vodo. Na ta način so pridobili regulirano tvorbo hidrogela (Aggeli in sod., 1997).

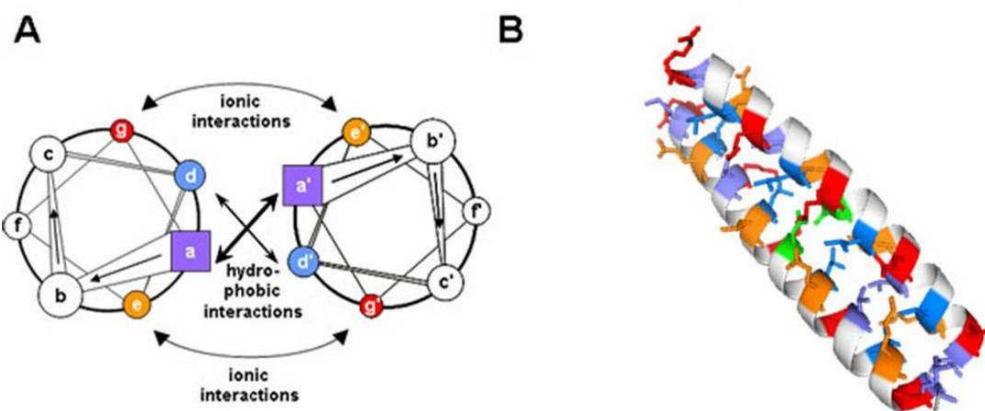
Proteinski nanomateriali so primerni tudi za biominerizacijo. Hartgerink in sodelavci (2003) so tako pripravili površinsko aktivne hibridne polipeptide, ki tvorijo cilindrične micle. Ti lahko usmerjajo nalaganje hidroksiapatita, glavne gradbene snovi kosti, in tako omogočijo regeneracijo tkiva. Polipeptide lahko uporabljam tudi kot prenašalce DNA molekul. Schwartz in Zhang (2003) sta iz proteinov s pozitivno nabitim N-koncem in hidrofobnim C-koncem pripravila samozložljive nanodelce, ki so se v raztopini z DNA in ob spremembji pH zložili v nanocevko ter tako obdali negativno nabito DNA.

2.3 NANOMATERIALI NA PODLAGI OBVITIH VIJAČNIC

Obvite vijačnice je ena najenostavnnejših proteinskih strukturnih motivov in je zelo pogosta pri vzpostavljavi proteinskih interakcij. V zadnjih letih so dobro preučili mehanizme samosestavljanja in tudi interakcije, ki omogočajo nastanek večjih struktur iz obvitih vijačnic. Zato so dobra izbira pri pripravi samosestavljlivih nanostruktur.

2.3.1 Obvite vijačnice

V naravi se obvite vijačnice pojavljajo pri 8% znanih proteinov in so pomembne pri mnogih bioloških procesih: pri nadzoru transkripcije, krčenju mišic, virusni infekciji, celični signalizaciji, molekulskih šaperonih in oploditvi (Mason in sod., 2007). Gre za elemente sekundarne strukture proteina, pri katerih se 2 do 7 α -vijačnic obvije ena okoli druge v levošučni orientaciji in skupaj tvorijo obvito vijačno. En zavoj sestavlja 3,5 aminokislinskih ostankov, kar pomeni, da dva zavoja predstavlja približno 1 nm dolgo heptado. Za nastanek obvite vijačnice je ključnega pomena, da protein vsebuje določeno sekvenco aminokislin. Na nivoju primarne strukture peptida se tako na točno določenih mestih v heptadnih ponovitvah (mesta *a-b-c-d-e-f-g*) nahajajo značilni aminokislinski ostanki (Slika 3A).



Slika 3: (A) Interakcije med aminokislinskimi ostanki v paralelni obviti vijačni znotraj ene heptade (abcdefg). Interakcije med aminokislinami na mestih *a* in *d'* ter *a'* in *d* so hidrofobne in tvorijo hidrofobno jedro. Na mestih *e* in *g'* ter *g* in *e'* se lahko nahajajo nabite aminokisline, ki tvorijo medsebojne elektrostatske interakcije. (B) 3-D struktura paralelne obvite vijačnice GCN4, določena z NMR (Mason in sod., 2007).

Na mestih *a* in *d* so običajno hidrofobne aminokisline. Te so zelo pomembne za nastanek obvite vijačnice, saj tvorijo hidrofobno sredico obvite vijačnice, ki določa njeno stabilnost in stopnjo oligomerizacije. Na mestu *d* pogosto najdemo levcin, zato se za obvite vijačnice uporablja tudi izraz levcinska zadrga. Mesti *e* in *g* sta izpostavljeni topilu, zato so aminokisline na tem mestu polarne in tvorijo elektrostatske interakcije z aminokisinami na mestih *e'* in *g'* komplementarne vijačnice. Pri paralelnih levcinskih zadrgah pride do interakcije med aminokislinskimi ostanki na mestih *e* in *g'*; pri antiparalelnih pa med aminokislinama na mestih *e* in *e'* ter *g* in *g'*. Aminokislinski ostanki na *b*, *c* in *f* mestih so prav tako izpostavljeni topilu in so hidrofilni. Uvedba cisteina na teh mestih omogoča kovalentno modifikacijo SH skupine s kovinskimi atomi. Za vezavo slednjih je bolj primeren histidin, saj deluje kot kelator.

Poznavanje medmolekulskih interakcij je zelo pomembno pri načrtovanju sintetičnih peptidov za tvorbo obvitih vijačnic, saj jih lahko izkoristimo za stabilizacijo oziroma destabilizacijo oligomerov z uporabo pozitivnega in negativnega dizajna polipeptidnih verig. Obvite vijačnice najdemo tako v obliki homodimerov kot heterodimerov v paralelni ali antiparalelni orientaciji.

2.3.2 Načrtovanje polipeptidnih vijačnic

Proteinsko načrtovanje predstavlja pot do novih struktur in funkcij, ki imajo potencial za koristno uporabo. Za pripravo polipeptidov, ki bi imeli točno določeno zvitje, moramo dobro poznati pravila o povezovanju aminokislinskega zaporedja in strukture. Vendar pa slednje zahteva zanesljiva pravila o povezovanju proteinske sekvene s strukturo in funkcijo. Z načrtovanjem in modeliranjem nastanejo *de novo* protienska zaporedja. Obstajata dva pomembna koncepta *de novo* protienske zasnove: pozitivno in negativno načrtovanje.

V pozitivni zasnovi so v zaporedju podana pravila, ki neposredno oblikujejo ciljno strukturo in vplivajo na njeno stabilizacijo. Negativni dizajn pa je usmerjen k destabilizaciji možnih konkurenčnih in nezaželenih struktur. Ta pristop je uveljavljen pri ustvarjanju specifičnih in terapevtsko pomembnih peptidnih zdravilnih učinkovin,

proteinov z minimalno navzkrižno reaktivnostjo z morebitnimi homologi ali analogi ter v nanobiotehničkih načrtovanjih (Mason in sod., 2007).

Zakonitosti dizajna obvitih vijačnic so dobro preučena in predstavljajo zanesljivo osnovo za gradnjo *de novo* proteinskih zasnov (Woolfson in sod., 2005; Mason in sod., 2007; Potehkin in sod., 2001). Za hidrofobne interakcije med ostanki na pozicijah *a* in *d* so najbolj ugodne hidrofobne aminokisline Ile, Leu in Val, od katerih najbolj stabilno kombinacijo tvorita Ile ter Leu. Od aminokislin na tem mestu je odvisno, ali bo nastal dimer ali kateri drugi multimer. Kombinacija *a* = Ile in *d* = Leu spodbuja nastanek dimera; *a* = Leu in *d* = Ile nastanek tetramera; Ile na obeh mestih pa podpira tvorbo trimera. Na teh dveh pozicijah se včasih nahajajo tudi hidrofilne aminokisline – predvsem »zakopani« Asn in Lys, ki na račun manjše stabilnosti zagotavlja specifičnost dimerizacije.

Med mestoma *e* in *g* (najpogosteje preko interakcij med Lys ter Glu) potekajo elektrostatske interakcije, ki dodatno stabilizirajo obvite vijačnice; obenem pa v veliki meri določajo, ali bo vijačica paralelna ali antiparalelna. Mesta *b*, *c*, *e* ne prispevajo k interakcijam s sosednjimi vijačnicami. Na teh mestih so ponavadi hidrofilne aminokisline (Glu), ki imajo večjo težnjo k nastanku α -vijačnic in obenem tudi poskrbijo za dobro topnost v vodi. Na ta mesta lahko tudi uvedemo določene funkcionalne skupine. Z negativnim načrtovanjem pa so dokazali, da prolin in glicin prekineta α -vijačico (Woolfson, 2005).

Najkrajša možna dolžina verige, ki še tvori stabilno obvito vijačico, je tri ali štiri heptade (Lau in sod., 1984, Litowski in sod., 2001). Stabilnost obvitih vijačnic je torej odvisna od interakcij med heptadami, orientacije in dolžine monomerov. Upoštevajoč pravila za načrtovanje obvitih vijačnic so že pripravili stabilne sintetične polipeptide vseh omenjenih oblik in orientacij (Woolfson, 2005). Načrtovanje sintetičnih peptidov bistveno olajšajo dokaj natančni algoritmi, ki na osnovi doslej zbranih podatkov predvidijo stabilnost obvite vijačnice (Mason in sod., 2007). Osnovali so tudi zbirkovo podatkov o obvitih vijačnicah CC+ (Testa in sod., 2009).

2.3.3 Primeri uporabe obvitih vijačnic za pripravo nanomaterialov

Z izdelavo *de novo* zaporedij, ki upoštevajo hidrofobne in elektrostatske interakcije, so na podlagi obvitih vijačnic pripravili krajše filamente velikosti nekaj mikrometrov (Pandya in sod., 2000; Potehkin in sod., 2001). Drugje so s spremenjanjem pogojev dosegli samozložitev peptidnih molekul iz 4 heptad v fibrile. Na posamezne polipeptidne verige z lizinskimi ostanki so s kovalentno vezjo vezali funkcionalne skupine (biotin, vezavna mesta za zlato). Tako so pridobili fibrile s stranskimi verigami, na katere so se vezali kovinski atomi (Ryadnov in Woolfson, 2004). V literaturi smo zasledili zelo malo poročil o vijačnicah, ki so sposobne združevanja v urejene dvo- (2D) oz. tridimenzionalne (3D) oblike. Redek primer 3D struktur iz obvitih vijačnic so samosestavljeni poliedri iz verige, ki ima dve oligomerizacijski domeni za obvite vijačnice (Raman in sod., 2006).

Nanodelci na osnovi obvitih vijačnic bi bili zelo uporabni v medicini, natančneje za ciljno dostavo zdravil, ali za predstavitev antigena v več ponovitvah. Lahko bi jih uporabljali tudi na primer kot sidra pri čiščenju na osnovi afinitetnih repov in imobilizaciji v biosenzorjih; možna pa bi bila tudi vezava na receptorska mesta v organizmu.

2.4 POLIPEPTID IZ TREH SEGMENTOV, KI TVORIJO OBVITE VIJAČNICE

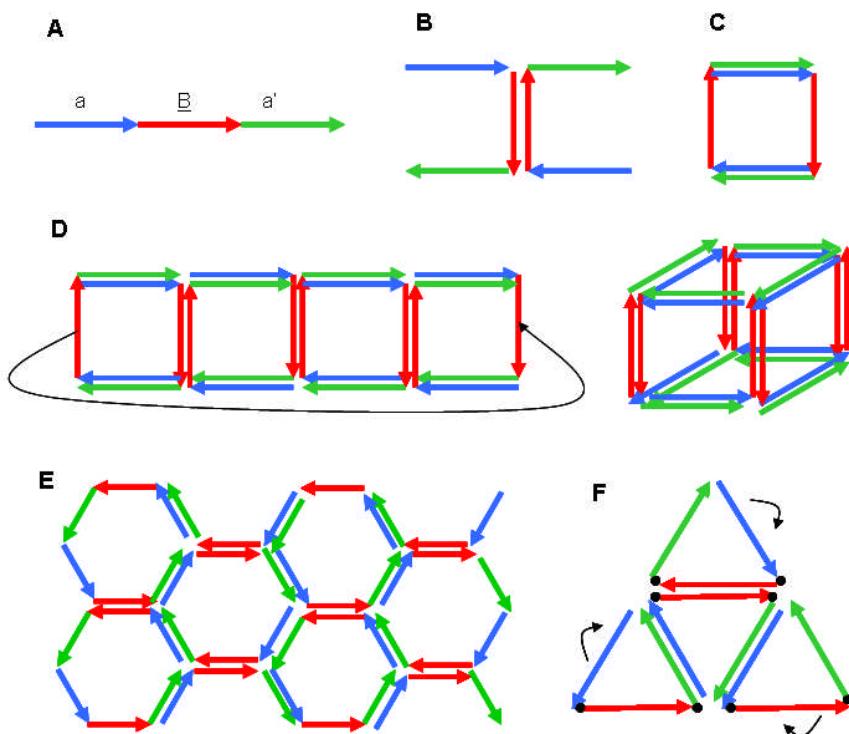
2.4.1 Analiza topologije

Cilj, ki smo si ga zastavili, je zgraditi strukture iz najmanjšega števila polipeptidnih verig, s katerimi bi lahko sestavili dvo- in tridimenzionalne strukture definirane sestave. Pri pripravi dvo- ali tridimenzionalnih struktur je v eni polipeptidni verigi treba kombinirati vsaj tri oligomerizacijske segmente, saj je z dvema segmentoma možna tvorba le linearnih struktur (fibrile in filamenti).

Kot osnovni element smo definirali segment vijačnic iz heptadnih ponovitev, ki tvori dimer z drugim, komplementarnim elementom. Preko segmentov obvitih vijačnic bi se tvoril rob

v sestavljenih nanostrukturah (Slika 4). Med segmente obvitih vijačnic bi vstavili krajši nevijačni povezovalni segment, ki omogoč gibljivost.

Na izbiro smo imeli elemente, ki tvorijo paralelne homodimere, antiparalelne homodimere in paralelne heterodimere. S topološko analizo možnih kombinacij vijačnih segmentov na polipeptidni verigi smo ugotovili, da zaporedje, ki je sestavljeno iz treh vijačnih segmentov, katerih stranska dva tvorita med seboj paralelne heterodimere in vmesni segment, ki tvori antiparalelne homodimere (Slika 4A), lahko tvori dvo- in tridimenzionalne strukture. Možne kombinacije so heksagonalna mreža (Slika 4E), kocka (Slika 4D) in tetraeder (Slika 4F).



Slika 4: Slika: Možne oblike zvitja proteina iz treh vijačnih segmentov. (A) Osnovni gradnik sestavljen iz treh vijačnih segmentov (a, a' tvorita paralelni heterodimer, B tvori antiparalelni homodimer). (B, C) Samozdruževanje polipeptidnih verig iz treh segmentov v dimer. Srednji segment tvori paralelni homodimer (B), krajna segmenta tvorita paralelni heterodimer (C). (D) Samozdruževanje polipeptidnih verig v kocko. (E) Samozdruževanje polipeptidov v heksagonalno mrežo. (F) Samozdruževanje v tetraeder.

2.4.2 Sestavni elementi

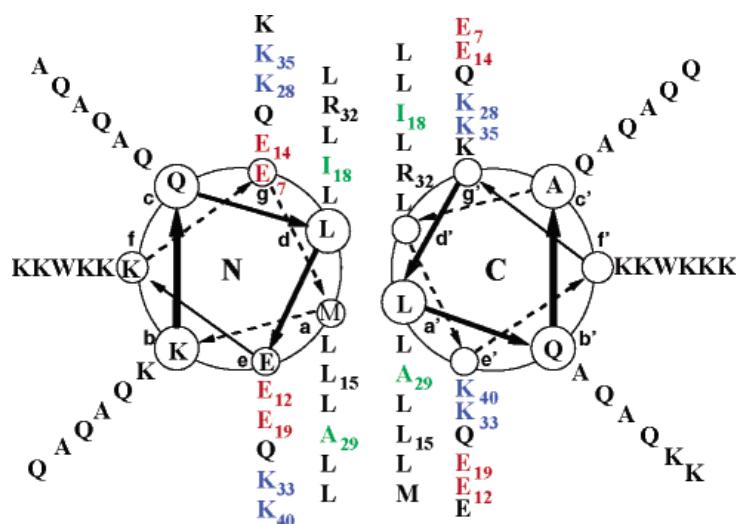
- Peptid APH

APH je sestavljen iz šestih heptad in tvori homodimerno obvito vijačnico, ki favorizira antiparalelno orientacijo. Željeno orientacijo so dosegli preko elektrostatskih interakcij z uvedbo Glu na *e* in *g* pozicijah N-konca polipeptida ter uvedbo Lys na *e'* in *g'* mestih C-konca polipeptida (Preglednica 1 in Slika 5). Na ta način je v peptidu prisotnih kar osem potencialnih ugodnih interakcij za antiparalelno orientacijo in osem neugodnih za paralelno (Slika 5) (Gurnon in sod., 2003).

Preglednica 1: Aminokislinsko zaporedje polipeptida P3-APH-P4

	abcdefg abcdefg abcdefg abcdefg abcdefg abcdefg
APH	M KQL EKE L KQL EKE L QA I EKQ L AQL Q WK A QARK KKK L AQL KKK L QA

Z modro so označeni bazni, z rdečo kisli in z zeleno hidrofobni aminokislinski ostanki



Slika 5: Prikaz strukture α -vijačnice antiparalelnega homodimera APH. Leva vijačnica predstavlja N – terminalni del APH, desna vijačnica pa C – terminalni del vijačnice APH. Z modro so označeni bazni, z rdečo kisli in z zeleno hidrofobni aminokislinski ostanki. (Gurnon in sod., 2003).

- Načrtovani peptidi P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 in P8

Med projektom IGEM 2009 Team Slovenia smo na podlagi znanih pravil za oblikovanje obvitih vijačnic in s pomočjo algoritmov za določanje stabilnosti načrtovali osem peptidov, sestavljenih iz štirih heptad: P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 in P8 (Preglednica 2). Po dva peptida, ki sestavlja ortogonalni par (P1-P2, P3-P4, P5-P6 in P7-P8), tvorita paralelni heterodimer. Ortogonalnost v tem primeru pomeni, da izključno ena kombinacija dveh peptidov tvori dimer. Na N-terminalnem delu je dodano zaporedje štirih aminokislin (SPED), ki stabilizira začetek α -vijačnice, preprečuje njeno propagacijo na sosednje domene in obenem omogoča prepogibanje obvitih vijačnic na robovih. Na C-terminalnem koncu je tirozinski ostanek, ki omogoča spektrometrično detekcijo polipeptida. V vseh heptadah smo na d mesta namestili Leu, na mesta a pa bodisi Ile bodisi Asn. Dva Asn na komplementarnih mestih stabilizirata dimer, medtem ko ga Asn in Ile, če prideta skupaj, močno destabilizirata, kar je dober mehanizem zagotavljanja specifičnosti parjenja monomerov. Poleg tega uporaba Asn močno zmanjša afiniteto do tvorbe antiparalelnih obvitih vijačnic, saj bi se v tem primeru parila Asn in Leu, kar je zelo neugodno. Z uvedbo nabitih aminokislin na mestih e in g lahko tudi močno prispevamo k specifičnosti parjenja monomerov. Izkoristili smo dejstvo, da nasprotno nabiti aminokislini na mestih e in g' oziroma e' in g stabilizirata dimer, enako nabiti pa ga močno destabilizirata. Da bi predvideli stabilnost vsakega od peptidnih parov, smo se poslužili algoritma, ki so ga pripravili Hagemann in sodelavci (2009).

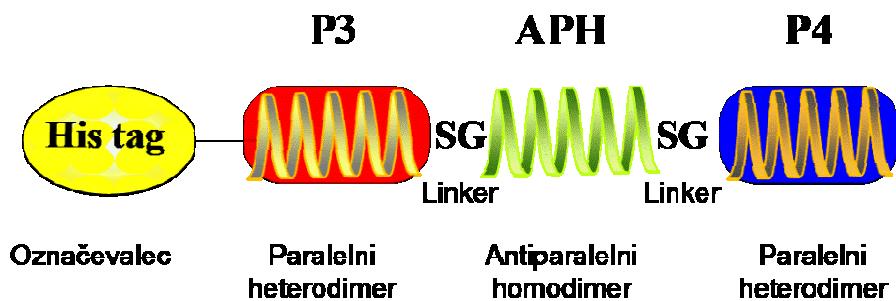
Preglednica 2: Aminokislinska zaporedja načrtovanih peptidov P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 in P8.

	gabcdef	gabcdef	gabcdef	gabcdef
P1	SPED EIQALEE ENAQLEQ ENAALEE EIAQLEY G			
P2	SPED KIAQLKE KNAALKE KNQQLKE KIQALKY G			
P3	SPED EIQQLEE EIAQLEQ KNAALKE KNQALKY G			
P4	SPED KIAQLKQ KIQALKQ ENQQLEE ENAALEY G			
P5	SPED ENAALEE KIAQLKQ KNAALKE EIQALEY G			
P6	SPED KNAALKE EIQALEE ENQALEE KIAQLKY G			
P7	SPED EIQALEE KNAQLKQ EIAALEE KNQALKY G			
P8	SPED KIAQLKE ENQQLEQ KIQALKE ENAALEY G			

Z modro so označeni bazične, z rdečo kisile, z zeleno hidrofobne in podprtane AK.

2.4.3 Konstrukt P3-APH-P4

Pri našem delu smo načrtovali osnovne gradnike nanostruktur – polipeptide, sestavljene iz treh vijačnih segmentov. Za diplomsko nalogo smo študirali polipeptid s sredinskim segmentom, ki tvori antiparalelne homodimere (APH) in stranskima segmentoma (P3 in P4), katera tvorita paralelne heterodimere. Med vsako domeno smo dodali še povezovalni člen iz aminokislin serina in glicina, ki dovoljuje omejeno gibanje segmentov obvitih vijačnic. Polipeptidna veriga ima dodan heksa-histidinski peptidni označevalec, ki omogoča enostavno izolacijo in čiščenje proteina ter vezavo funkcionalnih skupin za različne aplikacije (Slika 6).



Slika 6: Shema konstrukta polipeptida P3-APH-P4, ki je sestavljen iz treh vijačnih segmentov P3, APH, P4, vmesnih povezovalnih členov iz Ser in Gly ter heksa-histidinskega označevalca.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Kemikalije

3.1.1.1 Kemikalije, encimi in komercialno dostopni kompleti

Preglednica 3: Uporabljene kemikalije, encimi in komercialno dostopni kompleti

Ime proizvajalca	Kemikalije
Carlo Erba	Glicerol
Fermentas	DNA-standardi: Gene Ruler DNA Ladder (100 bp), lambda DNA, komercialno dostopni kompleti za čiščenje DNA (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit), PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, restrikcijski encimi (XbaI, PstI, EcoRI, ngoMIV), T4 DNA ligaza, 10-kratni ligacijski pufer za DNA-ligazo T4
Fluka	gvanidinijev hidroklorid, imidazol, NaDS (natrijev dodecil sulfat)
Ilford	Razvijalec in fiksir
Inalco Ph.	IPTG
Invitrogen	restrikcijski pufer REact 2, restrikcijski pufer React 4, restrikcijski pufer BSA
Kodak	Film in kaseta za filme (Kodak X-omat AR Film XAR-5, Kodak X-omatic Cassette)
Merk	Etanol, metanol, izopropanol, NaCl, NaOH, ocetna kislina, Na-acetat
New England Biolabs	Restrikcijski encimi (SpeI, BamHI, XhoI, HinDIII, SstI, BspEI)
Pierce	Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate
Pomurske mlekarne	Posneto mleko v prahu
Qiagene	Ni ²⁺ -NTA agarosa, MiniElute Gel Extraction Kit
Serva	TEMED
Sigma	Komplet za izolacijo plazmidne DNA (GenElute Plasmid Miniprep Kit), akrilamid, N,N'-metilen-bis-akrilamid, agarosa, bakteriološka agarosa, bromfenolmodro barvilo, gojišče LB po Millerju, nitrocelulozna membrana (45 µm), EDTA, ampicilin, amonijev persulfat, Tris (Trizma base), etidijev bromid, DOC, Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O, glicerol, β-merkaptoetanol, CPI (mešanica proteaznih inhibitorjev), Coomassie blue barvilo

3.1.1.2 Raztopine in pufri

Preglednica 4: Uporabljene raztopine in pufri

Raztopina / pufer	Sestavine:
50-kratni pufer za agarozno elektroforezo	242 g TRISa, 57,1 ml ledocetne kisline, 100 ml 0,5 M EDTA, dH ₂ O do 1 l
6-kratni nanašalni pufer	0,25 % (m/V) bromfenolmodrega barvila, 0,25 % (m/V) ksilencianola, dH ₂ O
Pufer Mini Prep1	50 mM glukoze, 25 mM TRIS/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)
Pufer Mini Prep 2	0,2 M NaOH, 1 % NaDS
Pufer Mini Prep 3	5 M kalijevega acetata, ocetna kislina
TE pufer	10 mM TRIS/HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
CPI-His prot. inhibitor	Mešanica proteaznih inhibitorjev za His tag proteine brez EDTA
Pufer za lizo	0,1 % DOC, 10 mM TRISa (pH 8,0)
Vezavni pufer W1	6 M GvdHCl, 100 mM Na ₃ PO ₄ , 10 mM TRISa (pH 8,0)
Pufer W2 za spiranje	6 M GvdHCl, 100 mM Na ₃ PO ₄ , 10 mM TRISa, 10 mM imidazola (pH 8,0)
Pufer W3 za spiranje	6 M GvdHCl, 100 mM Na ₃ PO ₄ , 10 mM TRISa, 50 mM imidazola (pH 8,0)
Pufer W4 za elucijo	6M GvdHCl, 100 mM Na ₃ PO ₄ , 10 mM TRISa, 250 mM imidazola (pH 5,8)
Pufer W5 za regeneracijo	6 M GvdHCl, 100 mM Na ₃ PO ₄ , 10 mM TRISa, 500 mM imidazola (pH 5,8)
Dializni pufer	20 mM HEPES (pH 7,5)
15% ločitveni gel	2,45 ml MQ vode, 2,5 ml 1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8), 100 µl 10 % (w/v) NaDS, 5 ml 30 % akrilamida, 50 µl 10 % (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ in 5 µl TEMED-a
4% nanašalni gel	3,05 ml MilliQ, 1,25 ml 1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8), 50 µl 10 % (w/v) NaDS, 665 µl akrilamida, 25 ml 10 % (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ in 5 µl TEMED-a
4-kratni NaDS nanašalni pufer brez reducenta	0,138 M NaDS, 0,125 M TRIS/HCl (pH 6,8), 40 % (V/V) glicerol, 0,1 % bromfenolmodro barvilo
1-kratni NaDS elektroforezni pufer	0,248 M TRIS, 35 mM NaDS, 1,92 M glicin. Pred elektroforezo pufer 10-krat redčimo z dH ₂ O.
Coomassie raztopina	0,2 % (w/v) raztopina Coomassie modrega barvila, 30 % metanol, 10 % ocet
Pufer za Western blot	48 mM TRIS (pH 9,2), 39 mM glicin, 20 % (V/V) metanol, 0,025 % NaDS
TBS pufer	10 mM TRIS/HCl, 150 mM NaCl (pH 7,4)
TFB 1	40 mM RbCl, 20 mM MnCl ₂ •H ₂ O, 12mM K-acetat, 4 mM CaCl ₂ •2H ₂ O,
TFB2	4 mM MOPS, 4 mM RbCl, 30 mM CaCl ₂ •2H ₂ O ⁻ , 15% glicerol (pH 6,8)
Pufer za gelsko filtracijo	20 mM NaAc pH 4, 150 mM NaCl

3.1.1.3 Standardi

Preglednica 5: Uporabljeni standardi

Standard	Opis standarda
Standard λ EcoRI/HinDIII	Vsebuje DNA bakteriofaga naslednjih λ velikosti: 21226 bp, 5148 bp, 4973 bp, 2027 bp, 1907 bp, 1584 bp, 1375 bp, 947 bp, 831 bp, 564 bp, 125 bp
Gene Ruler 100 bp DNA Ladder	Vsebuje DNA naslednjih velikosti: 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp
PageRuler Prestained Protein Ladder Plus	Vsebuje proteine naslednjih velikosti: 250 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 17 kDa, 11 kDa

3.1.1.4 Protitelesa

Preglednica 6: Uporabljeni protitelesi

Protitelesa	Opis protitelesa
Primarna protitelesa proti histidinskemu repu (za Western prenos)	Primarna mišja protitelesa, ki prepozna štiri histidinske ostanke brez BSA (Qiagen).
Sekundarna protitelesa proti mišjim IgG1, konjugirana s hrenovo peroksidazo	Kozja poliklonska protitelesa proti mišjim protitelesom IgG, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Sigma).

3.1.2 Gojišča

Preglednica 7: Uporabljeni gojišča

Gojišče	Priprava in sestava gojišča
Tekoče gojišče LB	V 1 litru destilirane vode smo raztopili 25 g LB gojišča po Millerju. Nato smo gojišče avtoklavirali. Sestava LB gojišča: kazeinski hidrolizat, 10 g/l kvasni ekstrakt, 5 g/l, NaCl, 10 g/l (pH 7.0).
Tekoče gojišče LBA	V sterilno gojišče LB smo dodali ampicilin do končne koncentracije 50 µg/ml.
Trdno gojišče LBA	V 1 litru destilirane vode smo raztopili 25 g LB gojišča po Millerju in 15 g agarja. Nato smo gojišče avtoklavirali. Ko se je ohladilo na 60 °C, smo dodali ampicilin do končne koncentracije 100 µg/ml.

3.1.3 Laboratorijska oprema

Preglednica 8: Uporabljena laboratorijska oprema

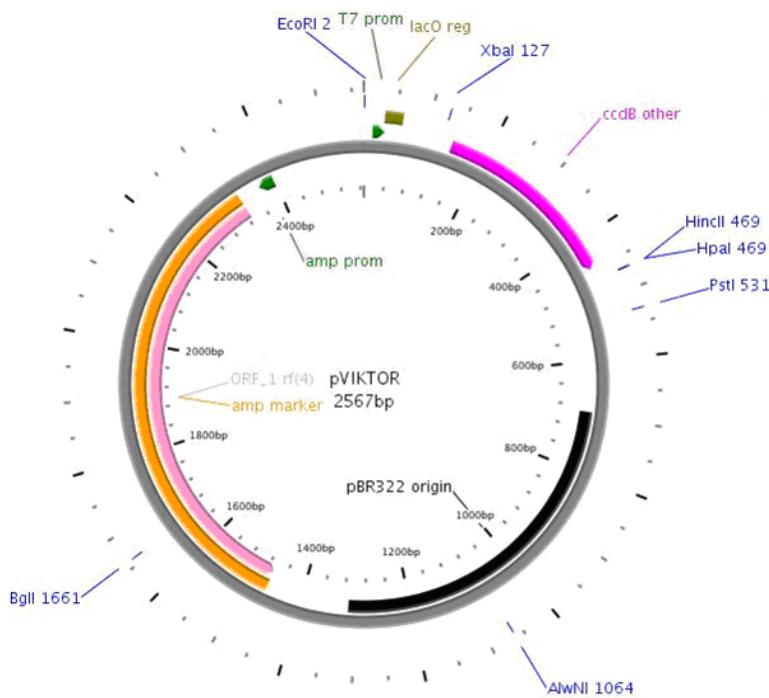
Ime proizvajalca	Laboratorijska oprema
Agilent Technologies	Aparatura za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HP 1100 Series HPLC system), 5500 Scanning Probe Microscope
Amicon	Centriprep koncentrator (modeli 100)
Applied Photophysics	Spektropolarimeter Chirascan
Beckman	Centrifuga J2-HS
BioRad	Aparatura za poliakrilamidno gelsko elektroforezo (Mini Protean II) in moker prenos proteinov na membrano (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell)
Eppendorf	Namizna centrifuga MiniSpin, centrifuga 5415R, termoblok Thermomixer comfort, avtomatske pipete naslednjih volumnov: 5 ml, 1 ml, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 0,1-2,5 µl.
Gilson	Avtomatske pipete naslednjih volumnov: 5 ml, 1 ml, 200 µl, 100 µl, 20 µl
Hettich	Centrifuga Universal 32R
Hewlett Packard	spektrofotometer 8452 A
IKA	Magnetno mešalo
Kambič	Parni sterilizator A-500/700
Knauer	RP-HPLC črpalka
Lauda	Termostatirana vodna kopel
NovaGen	Dializne epice (3 500 kDa, 6-8 kDa)
SpectraPor	Dializne cevke (MWCO: 3 500)
Tehnica Železniki	Tehnica ET-1111
Sigma	nitrocelulozna membrana (0,2 µm), filtrirni papir za transfer proteinov "Quick Draw blotting paper"
Tekmar	sonifikator "TMX 400"
Thermo Scientific	NanoDrop 1000

3.1.4 Plazmidi in sintetični polinukleotidi

- pVIKTOR

pVIKTOR je modificirana oblika vektorja pSB1A2. Izvorna (nemodificirana) oblika vektorja pSB1A2 sodi med vektorje, ki so v celicah prisotni v velikem številu kopij (100-300). Zanj je značilno tudi, da vsebuje mesto začetka podvojevanja pUC in nukleotidni zapis za β -laktamazo, kar omogoča selekcijo bakterij v gojišču z ampicilinom.

Vektor pSB1A2 smo modificirali tako, da smo preko restriktionskih mest EcoRI in PstI vstavili nukleotidna zaporedja za naslednje elemente: promotor T7, RBS mesto, start kodon, histidinski rep, poliklonsko mesto, ccdB domeno (znotraj poliklonskega mesta), stop kodon in terminator T7. Izražanje vstavljenega proteina v sistemu pVIKTOR je pod kontrolo močnega bakteriofagnega promotorja T7. Protein se lahko namreč sintetizira le v tistih bakterijskih sevih, ki imajo v kromosому zapis za RNA-polimerazo T7 (npr. v *E. coli* BL21(DE3)). Z dodatkom IPTG se inducira prepisovanje RNA-polimeraze T7, ki se veže na promotor T7 in prepiše vstavljen insert.



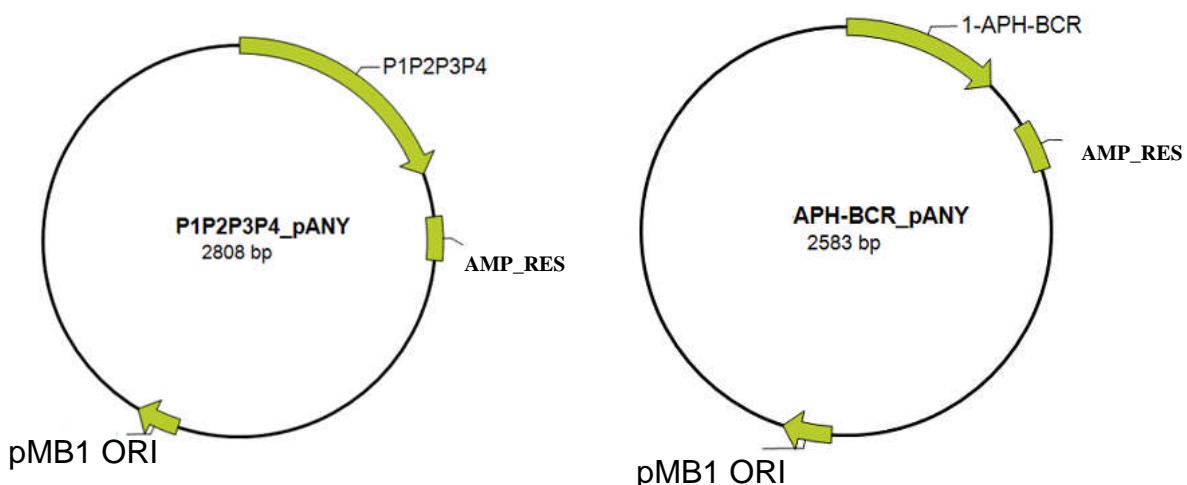
Slika 7: Shema vektorja pVIKTOR.

- pANY

pANY je plazmid, v katerem so vstavljeni umetno sintetizirani polinukleotidni fragmenti.

V njem smo prejeli sintetične fragmente, ki smo jih naročili pri podjetju GeneArt.

Plazmid vsebuje replikatorsko mesto iz pMB1 in gen za ampicilinsko rezistenco (Slika 8), zato je primeren za izražanje v *E. coli*.



Slika 8: Shemi naročenih sintetičnih polipeptidov v vektorju pANY.

3.1.5 Bakterijski sevi

Preglednica 9: Uporabljeni sevi *E. coli*

Sev	Genotip	Vir
<i>E. coli</i> DH5α	F/ supE44, ΔlacU169 (φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	Zbirka sevov na Kemijskem inštitutu Ljubljana
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	F-, ompT, hsdS _B (r _B , m _B), gal, dcm DE3) pLysS, (Cam ^R)	Zbirka sevov na Kemijskem inštitutu Ljubljana

3.2 METODE

3.2.1 Načrtovanje proteinskih zaporedij

Že uvodoma omenjeno proteinsko zaporedje P3-APH-P4 za gradnjo samosestavljivih polipeptidnih nanomaterialov smo zasnovali med raziskovalnim projektom »IGEM 2009 Team Slovenia« na Kemijskem inštitutu.

Na osnovi znanih procesov iz narave smo se odločili posnemati samosestavljanje proteinov med biološkimi procesi. V naravi je prisotnih veliko različnih struktur polipeptidnih verig, med katerimi so v literaturi najpogosteje omenjene α -vijačnice. Te se lahko med seboj samozdružujejo in tvorijo dele proteinov ali njihovih domen, ki so sestavljene iz 2 do 7 vijačnic. Takšne strukture vsebuje približno 8 % vseh proteinov v naravi.

Dve komplementarni α -vijačnici se lahko združita in ovijeta ena okoli druge ter tako tvorita obvito vijačnico. Iz slednjega izhaja princip samosestavljivih nanostruktur, na čemer temelji raziskovalni problem diplomske naloge.

Pri pripravi obvitih vijačnic smo uporabili načrtovana peptidna zaporedja, katera smo zasnovali s pomočjo principov pozitivnega in negativnega dizajna. Pri *pozitivnem dizajnu* smo izkoristili znanje o naravnih polipeptidnih zaporedjih, ki tvorijo ustrezne medsebojne interakcije in omogočajo pravilno sestavljanje obvitih vijačnic. *Negativni dizajn* pa smo uporabili za povečanje energijske razlike med željenim in neželjenim parjenjem obvitih vijačnic. Z uporabo obeh principov smo dobili peptidne sekvene, ki so zelo stabilne, obenem pa omogočajo ekskluzivnost parjenja posameznih peptidov.

Podatke in modele za preučevanje in pripravo modificiranih zaporedij smo dobili iz proteinske banke podatkov o obvitih vijačnicah CC+ (Testa in sod., 2009).

Za napovedovanje zlaganja in stabilnosti parov, ki tvorijo obvite vijačnice smo uporabili program bCIPA - bZIP Coiled-coil Interaction Prediction Algorithm (Hagemann in sod., 2009). Podatke o stabilnosti parov smo obdelali v programu Excel 2003 (Microsoft).

3.2.2 Sterilizacija steklovine, gojišč in raztopin

Raztopine, pripomočke in gojišča za delo z bakterijskimi kulturami smo z avtoklaviranjem sterilizirali 20 minut pri temperaturi $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ in tlaku $1,2 \cdot 10^5\text{ Pa}$. Snovi, ki so občutljive na povišano temperaturo, smo sterilizirali s filtracijo preko filtra s premerom por $0,2\text{ }\mu\text{m}$.

3.2.3 Osnovne metode molekularnega kloniranja

Večino metod, ki smo jih uporabili, lahko zasledimo v različnih priročnikih (Ausubel in sod., 2002; Sambrook, 2001). V nadaljevanju bomo predstavili le najpomembnejše.

3.2.3.1 Naročanje sintetičnih oligonukleotidov

Nukleotidno zaporedje smo zasnovali in optimizirali za izražanje v celicah *E.coli* s programom *Gene Runner 3.05* (Hastings Software). Umetno sintetizirano nukleotidno zaporedje smo naročili pri podjetju *Mr.Gene* (GeneArt), ki nam je dostavilo nukleotidno zaporedje v obliki vektorja pANY.

3.2.3.2 Restrikcija DNA

Restriktivne encime, ki prepoznajo in režejo točno določene dele nukleinskih kislin smo uporabili za različne namene. Z restriktazami smo pripravili fragmente sintetičnih oligonukleotidnih zaporedij, ki so bila predhodno sintetizirana v obliki pANY vektorjev, ter linearno obliko vektorja pVIKTOR. S kombinacijo restrikcije in ligacije smo naredili »front« inserte in »front« vektorje za izdelavo končnega konstrukta.

Restriktivne mešanice so vsebovale:

- $3\text{ }\mu\text{g DNA},$
- $5\text{ }\mu\text{L 10-kratnega pufra za restriktivski encim},$
- $1\text{ }\mu\text{l restriktivskega encima (10 ali 20U}/\mu\text{l})$
- in sterilno vodo (MQ) do končnega volumna $50\text{ }\mu\text{l}.$

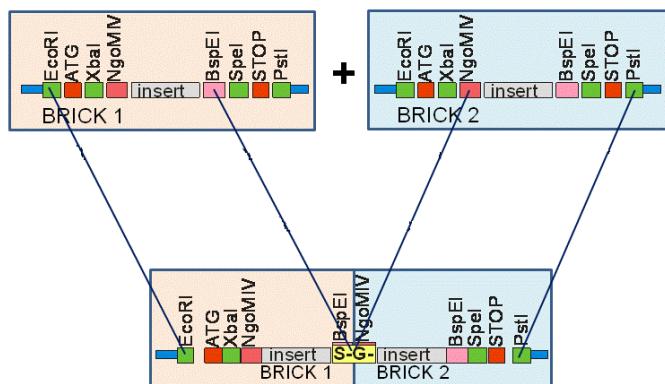
Pri vsaki restrikciji smo izbrali pufer, ki je bil najbolj primeren za aktivnost uporabljenega encima. Rezanje DNA zaporedij smo večinoma izvajali z dvema restrikcijskima encimoma, zato smo skušali izbrati tisti pufer, v katerem bi bila aktivnost obeh encimov ustrezna. Restrikcijski mešanici smo hkrati dodali 1 µL posameznega encima ter 2 uri inkubirali pri temperaturi 37 °C. Po dveh urah smo postopek ponovili. Mešanici smo zopet dodali 1 µL vsakega encima ter inkubirali nadaljnji 2 uri pri temperaturi 37 °C.

V primeru, ko reakcijski pufer ni bil primeren za oba restrikcijska encima, smo dodali vsak encim posebej. Po dodatku drugega encima smo nato pufer popravili z vnosom ustrezne količine NaCl in MgCl₂, ki naj bi ustrezala delovanju drugega encima.

Pri cepitvi DNA smo uporabili 9 različnih encimov oziroma natančneje: *EcoRI* (reže na mestu 5' G/AATT 3'), *HindIII* (reže na mestu 5' A/AGCTT 3'), *XbaI* (reže na mestu 5' T/CTAGA 3'), *SpeI* (reže na mestu 5' A/CTAGT 3'), *PstI* (reže na mestu 5' CTGCA/G 3'), *XhoI* (reže na mestu 5' C/TCGAG 3'), *SstI* (reže na mestu 5' GAGCT/C 3'), *NgoMIV* (reže na mestu 5'G/CCGGC 3') ter encim *BspEI* (reže na mestu 5' T/CCGGA 3').

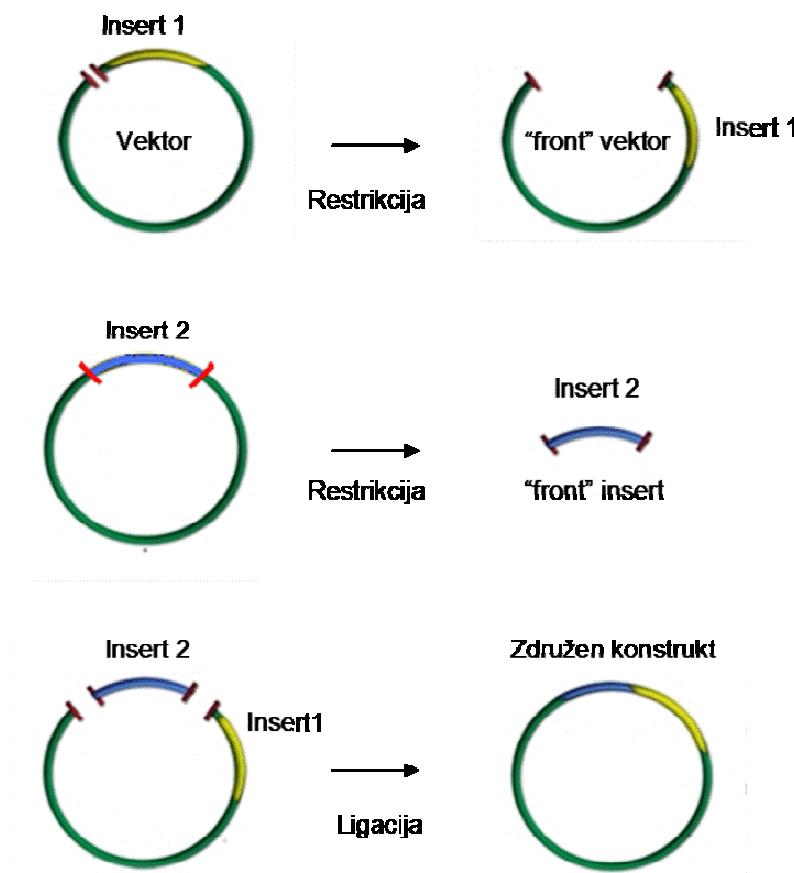
Za pripravo konstruktov smo uporabili sistem BioBrick (Shetty in sod., 2008), ki omogoča sestavljanje konstruktov z uporabo vektorjev in fragmentov s standardizirano sestavo in kombinacijo restrikcijskih mest za ekspresijo v modelnih organizmih.

Uporabili smo BioBrick standard BBF RCF 37 (Jerala in Benčina 2009), ki nam omogoča enostavno sestavljanje proteinskih domen in gradnjo poljubno dolgih vmesnih povezovalnih delov iz aminokislin Ser, Gly, Pro in Thr (Slika 9).



Slika 9: Shema uporabe BioBrick standarda BBF RCF 37 in nastanek mešanega mesta, ki kodira povezovalni člen iz Ser in Gly (Jerala in Benčina, 2009).

Posamezne fragmente lahko pripravimo tako, da jih uporabimo kot »front« ali »back« insert. Ko fragment vnašamo kot »front« insert, moramo vektor pripraviti kot »front« vektor in obratno – pri vnosu »back« inserta pripravimo vektor kot »back« vektor. Pri našem delu smo se posluževali metode vnosa front inserta v front vektor.



Slika 10: Shema priprave »front« vektorja in »front« inserta ter njihova ligacija.

Postopek smo začeli tako, da smo najprej izrezali naročene sintetične oligonukleotidne fragmente iz vektorja pANY: fragment P3 smo izrezali z encimoma XhoI in SstI v pufru React 2; fragment P4 smo izrezali s SstI in PstI v pufru React 2; fragment APH pa smo izrezali z EcoRI in HindIII v pufru React 2.

Velikost fragmentov smo preverili z elektroforezo. Vsak fragment posebej smo vnesli v vektor pVIKTOR. Slednjega smo linearizirali tako, da smo z encimoma NgoMIV in SpeI izrezali ccdb domeno v pufru React 4 z dodatkom BSA. Fragmente P3, P4 in APH smo pripravili za vnos v vektor pVIKTOR z restriktazama NgoMIV in SpeI v pufru React 4 z dodatkom BSA. Po ligaciji T4 smo dobili posamezne fragmente v pVIKTOR-ju.

Vektor pVIKTOR z P4 smo pripravili kot front vektor z EcoRI in NgoMIV v pufru React 1. Iz vektorja pVIKTOR z vnešenim zaporedjem za APH pa smo izrezali fragment APH kot front insert z EcoRI in BspEI v pufru React 3. Po ligaciji smo dobili konstrukt APHP4 v pVIKTOR-ju. Tega smo ponovno rezali kot front vektor z EcoRI in NgoMIV v pufru React 1; P3 v pVIKTOR-ju pa kot front insert z EcoRI in BspEI v pufru React 3. Po ponovni ligaciji smo dobili končni konstrukt P3-APH-P4.

Zaradi uporabe BioBrick standarda je po ligaciji med vnešeno domeno in domeno v front vektorju nastalo mešano mesto, ki kodira povezovalni člen iz serina in glicina (NgoMIV in BspEI tvorita lepljive konce, ki se po ligaciji zlepijo in nastane mešano mesto TCCGCC).

3.2.3.3 Ligacija

Ligacija je ključna stopnja molekulskega kloniranja pri vstavljanju fragmenta v vektor. Omogoča lepljenje rezanih koncev. V našem primeru smo imeli vse vektorje in fragmente rezane z dvema različnima restriktionskimi encimoma, ki ustvarita lepljive konce. To je sicer onemogočalo samozapiranje vektorja, a je na drugi strani omogočilo vstavljanje fragmenta v vektor v pravilni orientaciji. V primeru standardne ligacije, pri kateri v vektor vstavljamo le en fragment, je molarno razmerje med fragmentom in vektorjem 3 proti 1 (Enačba 1).

$$količina inserta (ng) = \frac{količina vektorja (ng) \times dolžina inserta (kbp)}{dolžina vektorja (kbp)} \times 3 \quad (1)$$

Reakcijske mešanice za ligacijo so vsebovale:

- 100 ng rezanega vektorja,
- ustrezno količino rezanega fragmenta (izračunano po enačbi 1),
- 1 µL DNA-ligaze T4 (400 U/µL),
- 2 µL 10-kratnega ligaznega pufra
- in sterilno MQ do končnega volumna 20 µL.

Ligacija je potekala 4 ure pri sobni temperaturi ali preko noči pri 16 °C.

3.2.3.4 DNA elektroforeza na agaroznem gelu

Elektroforezo DNA na agaroznem gelu smo uporabili za analizo različnih vzorcev DNA. Koncentracija agaroznega gela je bila odvisna od velikosti pričakovanega fragmenta. Običajno smo uporabili 1,2-odstotni (m/V) gel, za velike fragmente pa redkejšega.

1,2 g agaroze smo raztopili v 100 ml 1-kratnega pufra TAE prek segrevanja v mikrovalovni pečici. Nato smo raztopino ohladili na 60 °C, dodali 2 µl EtBr ter vlili v pripravljeno kadičko za elektroforezo. Potem ko se je gel strdil, smo nanesli vzorce DNA, katerim smo predhodno dodali 1/6 končnega volumna 6-kratnega nanašalnega pufra za agarozno elektroforezo. Na gel smo nanesli tudi ustrezni velikostni DNA standard. Elektroforeza je potekala v pufru TAE pri konstantni napetosti 100 V. Ob koncu postopka smo gel osvetlili z UV svetlobo in ga fotografirali.

3.2.3.5 Izolacija fragmentov DNA iz agaroznih gelov

Po gelski elektroforezi smo iz agaroznega gela s skalpelom izrezali fragmente (rezane fragmente ali rezane vektorje) ustreznih velikosti. DNA smo očistili s komercialnim kompletom MiniElute Gel Extraction Kit (za fragmente v velikosti 70-4.000 bp) po navodilih proizvajalca. DNA se veže na kremenasto kolono pri nizkem pH in visoki koncentraciji soli, nečistoče pa se sperejo. DNA se eluira iz kolone z MQ vodo.

3.2.3.6 Transformacija kompetentnih celic *E. coli* DH5α

Pri vnašanju rekombinantnega plazmida v bakterijske celice *E. coli* DH5α smo uporabili metodo s temperaturnim šokom.

Kompetentne bakterijske celice, ki so bile shranjene pri temperaturi -80 °C, smo odtalili na ledu, jim dodali 25 µl ligacijske mešanice (oz. izbrano količino plazmidne DNA) ter jih inkubirali na ledu za 30 minut. Sledil je toplotni šok s 4-minutno inkubacijo pri temperaturi 42 °C. Mikrocentrifugirko s transformacijsko zmesjo smo nato takoj vrnili na led za dve minuti, dodali 1 ml gojišča LB ter inkubirali eno uro pri temperaturi 37 °C in stresanju 150 vrt./min.

S centrifugiranjem pri 7000 vrt./min smo zbrali celice, jih resuspendirali v 50 µL gojišča LB ter razmazali na ploščo LB z ustreznim antibiotikom. Plošče smo čez noč inkubirali pri temperaturi 37 °C.

3.2.3.7 Izolacija plazmidne DNA mini prep

Posamezne kolonije, ki so bile na plošči LB z dodanim ustreznim antibiotikom, smo precepili v posode z 10 ml sterilnega tekočega gojišča LB in jim dodali antibiotik. Tekoč kulturo smo 16 ur inkubirali pri temperaturi 37 °C in 150 vrt./min. Nato smo 1,5 ml kulture odpipetirali v sterilne mikrocentrifugirke ter jo centrifugirali 30 sekund pri 10.000 vrt./min. Zatem smo odstranili supernatant in usedlino resuspendirali v 100 µl Pufra Mini Prep 1.

Potem ko smo lizirali celice z 200 µl Pufra Mini Prep 2, smo mirkocentrifugirko rahlo pretresli in jo eno minuto inkubirali na ledu. Pufer 2 Mini Prep smo nevtralizirali s 150 µl Pufra Mini Prep 3, ga premešali in zatem 5 minut inkubirali na ledu. Mešanico smo centrifugirali 5 minut pri 10.000 vrt./min ter nato supernatant s plazmidno DNA previdno prenesli v sveže mikrocentrifugirke. DNA smo iz supernatanta oborili z dodatkom 2-kratnega volumna absolutnega etanola, ohlajenega na -20 °C. Po dveh minutah inkubacije pri sobni temperaturi smo oborjeno DNA zbrali s 5-minutnim centrifugiranjem pri 10.000 vrt./min. Supernatant smo nato odstranili in usedlino sprali z 0,5 ml 70-odstotnega etanola (ohlajenega na -20 °C) ter ponovno centrifugirali 5 minut pri 10.000 vrt./min. Na koncu smo supernatant odstranili, oborino pa posušili in jo raztopili v 20 µl TE pufra (z dodatkom RNAAze).

3.2.3.8 Določanje zaporedja nukleinskih kislin

Najprej smo z restriktijsko analizo potrdili prisotnost ustreznih plazmidov. Iz teh klonov smo s komercialnim kompletom GenElute Plasmid Miniprep kit izolirali rekombinant plazmid. Izolirano DNA in njej prilegajoče začetne oligonukleotide smo poslali podjetju Eurofins MWG Operon (Biotech), ki jim je nato določilo nukleotidno zaporedje. Zaporedje smo analizirali s programoma Gene Runner v. 3.05 (Hastings Software) in EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms (EBI) ter tako preverili pravilnost zaporedja in odsotnost mutacij.

3.2.3.9 Določanje koncentracije nukleinskih kislin

Koncentracije plazmidne DNA smo merili spektrofotometrično, in sicer s sistemom NanoDrop. Naprava določa koncentracijo DNA prek merjenja absorbance pri 260 nm in 280 nm valovne dolžine svetlobe. Razmerje $A_{260} : A_{280} = 1,7 - 1,9$ nam pove, da so pripravljeni vzorci čisti ter brez proteinskih primesi, fenola ali RNA.

3.2.3.10 Priprava kompetentnih celic

Na LB ploščo smo nacepili *E. coli* DH5 α . Zrasle so posamezne kolonije, ki smo jih naslednji dan precepili v 10 ml tekočega LB gojišča ter jih čez noč inkubirali pri temperaturi 37 °C in stresanju 160 vrt./min. Zjutraj smo inokulum precepili v 100 ml predhodno ogretega tekočega LB gojišča, tako da je bil začetni A_{600} v gojišču 0,05. Nato smo kulturo inkubirali pri temperaturi 37 °C in stresanju 160 vrt./min, dokler A_{600} ni narasel do 0,5. Kulturo smo za 5 minut ohladili na ledu in celice prenesli v sterilno centrifugirko ter jih 5 minut centrifugirali pri 4.000 vrt./min in 4 °C. Potem smo gojišče odstranili in pri tem pazili, da so bile celice ves čas na ledu. Celice smo nato resuspendirali v 60 ml hladnega (4 °C) TFB 1 pufra (30 ml pufra/100 ml kulture) in suspenzijo 90 minut inkubirali na ledu. Sledilo je 5-minutno centrifugiranje pri 4.000 vrt./min in temperaturi 4 °C. Zatem smo odstranili supernatant ter celice resuspendirali v 8 ml TFB 2 pufra. V sterilne mikrocentrifugirke smo prenesli po 60 µl kompetentnih celic in jih zamrznili v tekočem dušiku ter shranili do uporabe na -80 °C.

3.2.4 Pridobivanje in izolacija proteina

3.2.4.1 Transformacija kulture in pridobivanje proteina v kulturi *E. coli*

Plazmid pVIKTOR z zapisom za ustreznji protein smo transformirali v celice *E. coli* sev BL21(DE3)pLysS, ki so primerne za izražanje rekombinantnih proteinov, ki ga uravnava T7-promotor. Transformirane bakterijske celice smo gojili 16 ur na trdnem gojišču LB (pri 37°C) z dodanim antibiotikom ampicilinom koncentracije 50 µg/ml. Nato smo kolonije precepili v 100 ml sterilnega tekočega gojišča LB z ampicilinom (100 µg/ml). Celice smo preko noči inkubirali na stresalniku pri 37 °C in 180 vrt./min.

Prekonočno kulturo *E. coli* smo precepili v 500 ml LB gojišča, da bi dosegli gostoto celic z vrednostjo absorbance okoli 0,2. Pri tem postopku smo gostoto celic spremajali z merjenjem absorbance pri 600 nm vrednosti. Kulturi smo dodali ampicilin v koncentraciji 100 µg/ml in inkubirali pri 37°C na 180 vrt./min. Med inkubacijo smo spremajali absorbanco kulture. Po dveh urah in pol smo izmerili A₆₀₀ 0,8 in nato dodali 0,5 mM IPTG za indukcijo izražanja rekombinantnega proteina. Nazadnje smo kulturo 4 ure inkubirali v stresalniku pri nespremenjenih pogojih.

3.2.4.2 Liza in sonikacija celic

Po končani inkubaciji smo bakterijsko kulturo prelili v centrifugirke in jo 10 minut centrifugirali na 5.000 vrt./min pri temperaturi 4°C. Supernatant smo odlili, usedljino celic pa raztopili v Pufru za lizo. Lizatu smo dodali CPI-His proteinazne inhibitorje (v razmerju 1:500 V/V) in vse skupaj resuspendirali s pomočjo steklene palčke. Lizat smo ves čas inkubirali na ledu. Celice smo še dodatno razbili s pomočjo ultrazvoka na sonikatorju. Sondo sonikatorja smo potopili v časo z vzorcem, katero smo imeli ves čas na ledu. Vzorec smo 10 min sonicirali z 1-sekundnim delovnim intervalom, kateremu je sledila 2-sekundna prekinitev pri amplitudi 40%. Lizat smo nato prelili v centrifugirke in centrifugirali 15 minut na 15,000 vrt./ min pri 4°C.

Supernatant smo ločili od inkluzijskih teles na dnu centrifugirk. Centrifugirke s inkluzijskimi telesi smo shranili na temperaturi -20°C, supernatant pa zavrgli.

3.2.4.3 Kelatna kromatografija z Ni-NTA kolono

Zaradi prisotnih nečistoč smo inkluzijska telesca sprali s Pufrom za lizo in s MQ vodo. Po vsakem spiranju smo inkluzijska telesca 15 minut centrifugirali na 15000 vrt./ min pri 4°C. Sprana inkluzijska telesca smo raztopili v vezavnem pufru W1 (6 M GvdHCl, 100 mM Na₃PO₄, 10 mM TRIS, pH 8.0).

Raztopini smo izmerili absorbanco pri 280 nm in določili koncentracijo raztopljenega proteina. Ni-NTA kolono smo pripravili iz 2 g Ni-NTA agaroznega gela ter jo ekvilibrirali s pufrom za spiranje inkluzijskih telesc W1. Na pripravljeno kolono smo nanesli inkluzijska telesca, raztopljena v pufru W1. Na kolono smo tako nanesli približno 20 mg raztopljenega proteina, kolikor znaša vezavna kapaciteta kolone. Kolono s proteinom smo za dve uri dali na stresalnik pri temperaturi 4°C. Po stresanju smo kolono namestili na stojalo in počakali da se Ni-NTA polnilo posede. Nevezano frakcijo smo ulovili v falkonko, izmerili absorbanco pri 280 nm in shranili vzorec pri 4 °C. Nato smo kolono spirali z vezavnim pufrom W1, dokler se absorbanca pri 280 nm ni spustila pod 0,02 oziroma ni bilo več proteinskega spektra. Nečistoče smo dalje spirali z pufrom za spiranje W2 (6 M GvdHCl, 100 mM Na₃PO₄, 10 mM TRIS, 10 mM imidazol, pH 8), dokler ni absorbanca padla pod 0,02. Spiranje smo nadaljevali z pufrom za spiranje W3 (6 M GvdHCl, 100 mM Na₃PO₄, 10 mM TRIS, 50 mM imidazol, pH 8), dokler ni absorbanca padla pod 0,02. Protein smo eluirali s pufrom W4 (6 M GvdHCl, 100 mM Na₃PO₄, 10 mM TRIS, 250 mM imidazol, pH 5,8). Na kolono smo nanašali elucijski pufer in lovili proteinsko frakcijo v 2 ml mikrocentrifugirke. Vsaki frakciji smo izmerili absorbanco pri 280 nm. Ko se je absorbanca elucijske frakcije spustila pod 0,02, oziroma ko ni bilo več proteinskega spektra, smo z elucijo prenehali. Posamezne elucijske frakcije smo združili in jim zmerili skupni proteinski spekter. Združeno frakcijo smo shranili v hladilniku na -20°C.

Elucijsko kolono smo regenerirali z regeneracijskim pufrom W5 (6 M GvdHCl, 100 mM Na₃PO₄, 10 mM TRIS, 500 mM imidazol, pH 5,8), sprali z MQ vodo ter jo shranili v 20% etanolu v hladilniku pri 4°C.

3.2.4.4 Merjenje absorbance in določanje koncentracije proteina

Na podlagi absorbance smo v posamezni frakciji izračunali koncentracijo proteina (mg/ml) s pomočjo Lambert-Beerovega zakona (Enačba 2).

$$\text{Koncentracija protein} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{absorbanca } 280\text{nm}}{\text{ekstinkcijski koeficient} \times \text{dolžina (kiveta)} 1\text{cm}} \quad (2)$$

Ekstinkcijski koeficient je vrednost, ki pove, koliko svetlobe lahko snov absorbira pri določeni valovni dolžini. Vrednost za proteine je odvisna predvsem od prisotnosti aromatskih aminokislin, še posebej triptofana, in jo lahko na podlagi znanega aminokislinskega zaporedja vnaprej izračunamo.

3.2.4.5 Dializa in koncentriranje vzorcev proteina

Pri izolaciji proteina iz kolone smo tako dobili tri različne frakcije: 1) frakcija sprana z nanašalnim pufrom W1, 2) frakcija sprana z pufrom za spiranje W2 ter 3) frakcija sprana s elucijskim pufrom W4. Vse tri frakcije smo dializirali in koncentrirali, da smo lahko preverili prisotnost proteina.

Posamezno frakcijo smo prelili v dializno cevko in jo dializirali proti Dializnemu pufru (20 mM HEPES pH 7,5). Dializo smo ponovili dvakrat v dveh litrih Dializnega pufra z rahlim mešanjem na magnetnem mešalu v hladilniku pri 4°C. Posamezna stopnja dialize je trajala 4 ure. S dializo smo se znebili prisotnosti elucijskih pufrov.

Po dializi smo opazili, da se je protein, ki je bil pred dializo raztopljen v elucijskem pufru W4, oboril. Protein smo nato centrifugirali na 12.000 vrt./min, da smo ločili oborjeni protein od dializata.

V frakcijah W1 in W2 se protein ni oboril, zato smo dializirani frakciji skoncentrirali s pomočjo koncentrinih falkonk Centriprep. Koncentrirali smo ju 4-krat po 30 minut pri 3.000 vrt./min. Absorbanca proteina je po koncentriranju znašala 0,2.

Čistost proteina v koncentriranih frakcijah smo preverili s poliakrilamidno elektroforezo s Coomase barvanjem in Western prenosom.

3.2.4.6 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS

Za elektroforezo smo uporabili vertikalni sistem Mini-Protean II. Gele smo pripravili po navodilih proizvajalca (BioRad). Med dve stekelci, ločeni za 1 mm, smo najprej vlili 15 % ločitveni gel. Prelili smo ga s 100 µL izobutanola, nasičenega z vodo, in pustili 1 uro, da je polimeriziral. Odstranili smo izobutanol in na ločitveni gel vlili 4 % nanašalni gel. Na koncu smo vstavili glavnicek z želenim številom žepkov za nanos vzorcev. Nanašalni gel polimerizira 30 minut.

Vzorce smo pripravili tako, da smo jim dodali 4-kratni NaDS nanašalni pufer. Nato smo jih redčili z MQ vodo, da bi bila končna koncentracija nanašalnega NaDS pufra enkratna. Vzorce smo 10 minut denaturirali pri 95°C in jih 1 minuto centrifugirali pri 13.200 vrt./min. Zatem smo jih s pipeto nanesli v žepke na poliakrilamidnem gelu. V en žepek smo dodali tudi obarvani proteinski standard PageRuler. Elektroforeza je potekala 45 min v 1-kratnem NaDS elektroforeznem pufru pri konstantni napetosti 200 V. Ustavili smo jo, ko je barvilo bromfenol modro v nanašalnem gelu priprovalo do konca ločevalnega gela.

3.2.4.7 Barvanje proteinov z barvilom Coomassie modro

S to metodo lahko zaznamo do 0,5 µg proteinov. Sicer je manj občutljiva kot zaznavanje s srebrom ali imunodetekcija po Westernovem prenosu, vendar je hkrati enostavna in hitrejša. Gel smo po ekektroforezi dva- do trikrat sprali z MQ vodo. Spran gel smo obarvali s Coomassie raztopino, ki je bila predhodno razredčena v volumskem razmerju 1 : 1 z 20 % ocetno kislino. Nato smo gel 10 minut stresali, da se je dobro obarval. Barvilo smo odstranili, ozadje gela pa razbarvali z mešanico 30 % etanola in 10 % ocetne kisline. Razbarvanje je potekalo ob počasnem stresanju. Za fiksiranje gela smo uporabili mešanico iz 10 % ocetne kisline in 5 % glicerola.

3.2.4.8 Western prenos in imunodetekcija

Po NaDS-PAGE elektroforezi smo ločitveni gel, filtrne papirje, nitrocelulozno membrano in blazinice namakali v pufru za mokri prenos. Na nosilec smo v sledečem vrstnem redu položili

omočeno blazinico, filter papir, ločitveni gel, membrano, filter papir ter blazinico. Pri tem je bila membrana obrnjena proti pozitivni elektrodi, kar je omogočalo prenos negativno nabitih proteinov iz gela na membrano. Prenos je potekal 90 minut v ohlajenem pufru za mokri prenos proteinov pri konstantnem toku 300 mA. Po prenosu smo membrano sprali z MQ vodo.

Po Western prenosu smo membrano 120 minut blokirali z blokirnim pufrom (5 % raztopina mleka v prahu v pufru TBS) na stresalniku pri 4°C.

Po blokiranju smo membrano dvakrat spirali po 5 minut s pufrom TBS. Prenesli smo jo v plastično vrečko in dodali ustrezeno redčena mišja anti-His protitelesa (raztopljena v pufru TBS, redčena 1:2000). Zavarjeno vrečko smo inkubirali 1 uro s stresanjem 50 vrt./min pri sobni temperaturi. Zatem smo nevezana protitelesa 4-krat po 5 minut spirali v pufru TBS. Sprano membrano smo inkubirali v zavarjeni vrečki skupaj z raztopino sekundarnih kozjih protimišjih protiteles (redčenih 1 : 3.000, konjugirana s hrenovo peroksidazo v pufru TBS). Konjugacija protiteles je potekala 45 minut. Membrano smo zopet sprali štirikrat po 5 minut s pufrom TBS. Za detekcijo hrenove peroksidaze smo uporabili SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate. Ta je ob prisotnosti hrenove peroksidaze sprožila nastanek fotonov svetlobe, ki smo jih posneli na fotografski film. Membrano smo 2 minuti inkubirali z reagentom ter jo dali v fotografsko kaseto. V temnici smo na membrano položili film za določen čas (15, 30, 60 sekund). Nato smo fotografski film prenesli v razvijalec za 2 minuti, ga sprali z vodo in ga za 1 minuto inkubirali v fiksirni raztopini. Film smo na koncu sprali z vodo in posušili na zraku.

Na mestih vezave sekundarnih protiteles, konjugiranih s hrenovo peroksidazo na primarna anti his-tag protitelesa, smo na filmu zaznali temne lise.

3.2.5 Masna spektroskopija

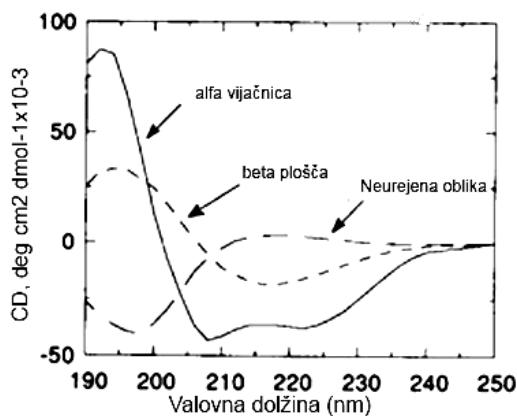
Za preverjanje identitete proteinskih produktov smo uporabili masno spektrometrijo, ki je bila narejena na Inštitutu Jožef Stefan pri dr. Bogdanu Kralju. Masni spekter za rekombinantni protein P3-APH-P4 je bil posnet z uporabo ESI ionizacije na masnem spektrometeru AutospecQ (Micromass).

3.2.6 Določanje sekundarne strukture proteinov s CD spektroskopijo

Meritve smo opravili na aparaturi Chirascan (Applied photophysics). Sekundarna struktura je lahko v obliki α -vijačnice, β -plošče ali v obliki neurejenih struktur (Slika 11). Daljne UV CD spektre smo posneli v območju 195-260 nm s korakom 1 nm in zbiranjem po 1 sekundo na točko. Merili smo v 1 mm kiveti pri 20 °C, koncentracija raztopljenega proteina v 20 mM pufru HEPES pH 7,5 pa je bila 0,15 mg/ml. Rezultat predstavlja povprečje 3 meritev. Na podlagi že znanih krivulj spektrov proteinov smo določili sekundarno strukturo proteinov.

Kemijsko denaturacijo proteina z gvanidinijevim hidrokloridom (GvdHCl) smo spremljali z merjenjem cirkularnega dikroizma v območju 210-260 nm s korakom 1 nm in zbiranjem po 1 sekundo na točko. Merili smo v 1 mm kiveti pri 20 °C, koncentracija proteina je bila 0,15 mg/ml. Spekter smo posneli z naraščajočo koncentracijo GvdHCl v koncentracijah 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M, in 6 M.

Temperaturno denaturacijo smo merili v 1 mm kiveti, koncentracija proteina v 20 mM pufru HEPES pH 7,5 je bila 0,15 mg/ml. Signale smo spremljali pri 208 nm in 222 nm v odvisnosti od temperature (od 20 °C do 95 °C). Meritev smo ponovili pri istih pogojih z dodatkom 1 M GvdHCl.



Slika 11: Prikaz krivulj za različne sekundarne strukture proteinov, pridobljenih z merjenjem CD.

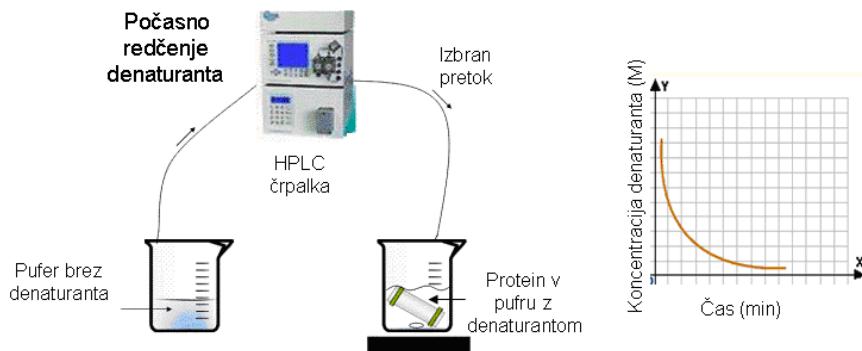
3.2.7 Počasno zvijanje proteina

Urejene in pravilno sestavljeneproteinske nanostrukture lahko nastanejo le v primeru, ko se osnovni gradniki pravilno zvijejo in vežejo v urejenem vrstnem redu. To lahko dosežemo s počasnim in kontroliranim zvijanjem denaturiranih proteinov. Za pripravo pravilno zvitih proteinov smo se poslužili dveh metod – temperaturne in kemijske renaturacije proteina.

Počasno temperaturno renaturacijo smo izvedli tako, da smo vzorec proteina nanesli na mrežico za elektronsko mikroskopijo in jo položili na nosilec iz stiropora, ki je služil kot plovec. V veliko stekleno čašo smo nalili 3 litre vode, katero smo predhodno segreli na 70 °C. Čašo z vodo smo nato dali v izolacijsko posodo iz stiropora. Plovec z mrežicami smo položili v segreto vodo, tako da je lebdel na površju. Izolacijsko posodo smo dobro zaprli in jo pustili za 48 ur na sobni temperaturi, da se je vsebina počasi ohladila.

Običajna kemijska renaturacija proteina z dializo v našem primeru ni bila ustrezna. Zaradi visoke koncentracijske razlike med denaturantom in dializno tekočino bi se ustvaril visok koncentracijski gradient na mejni ploskvi dializne membrane. Na takšen način se protein najbrž ne bi uspešno sestavil v pravilno nanostrukutro. Zato smo razvili poseben postopek renaturacije proteina, s katerim smo lahko poljubno dolgo zniževali koncentracijo denaturanta, v katerem je raztopljen protein. Na ta način smo zmanjšali kinetično komponento pri sestavljanju proteina in jim povečali verjetnost nastanka pravilnih struktur.

Oborjen protein smo raztopili v 5 M GvdHCl in 20 mM HEPES pufru pH 7,0 do koncentracije 50 µg/ml. 50 ml raztopine proteina smo prelili v dializno vrečko (s prepustnostjo membrane za proteine do velikosti do 3,5 kDa) in jo položili v 2-litrsko čašo, ki je vsebovala 200 ml 5 M GvdHCl in 20 mM HEPES pufra pH 7,0. Raztopino smo s pomočjo magnetnega mešala mešali na sobni temperaturi pri 1000 vrt./min. Na dno dializne raztopine smo v bližini rotorja magnetnega mešala s pomočjo črpalke s pretokom 1,4 ml/min dodajali raztopino 20 mM HEPES pH 7,0. V 12 urah dodajanja pufra je koncentracija denaturanta v raztopini padla na 1 M GvdHCl (Slika 12). Potem smo dializno vrečko s proteinom dvakrat dializirali po 3 ure v 2 litrih 10 mM HEPESA pH 7,0, da smo odstranili ves denaturant.



Slika 12: Shema postopka počasnega redčenja denaturanta.

3.2.8 Presevna elektronska mikroskopija

Presevna elektronska mikroskopija je tehnika, kjer za opazovanje vzorca uporabimo snop elektronov, ki prehajajo skozi vzorec. Slika nastane zaradi različnega sisanja elektronov na atomih z različnimi atomskimi števili, ki se nahajajo na različnih mestih v preparatu. Zelo kratka valovna dolžina elektrona nam omogoča opazovanje objektov nanometrskih velikosti. V primerjavi s svetlobno mikroskopijo, ki omogoča 2000-kratne povečave, nam elektronski mikroskop lahko poveča sliko objekta do milijonkrat.

Elektronsko mikroskopijo proteinskih vzorcev je z elektronskim mikroskopom JEM-200FX (JEOL) opravil Damjan Vengust, Center za elektronsko mikroskopijo na Inštitutu Jožef Štefan.

Vzorce za mikroskopijo smo pripravili tako, da smo na kovinske mrežice za elektronsko mikroskopijo (SPI supplies – holey formvar bakrene mrežice, obložene z ogljikom) nanesli 10 µl vzorca in pustili 3 minute, da se adsorbira. Nato smo mrežico 3-krat sprali z MQ vodo, jo osušili s filter papirčkom in dodali na mrežico 10 µl nasičenega 2 % uranil acetata. Po 90 sekundah smo preostanek kontrastirne raztopine odstranili s filter papirčkom. Potem ko se je mrežica osušila, je bil vzorec pripravljen za mikroskopijo.

Vzorce smo pripravili tudi na drug način, in sicer tako, da smo z bakreno mrežico bredli 30 sekund po raztopini vzorca in jo osušili s filter papirčkom. Vzorca nismo kontrastirali.

3.2.9 Gelska kromatografija

Gelska ali izključitvena kromatografija ločuje molekule na osnovi njihove velikosti. Kolona vsebuje polnilo z zamreženo strukturo, v katero se ujamejo manjše molekule, velike pa potujejo mimo. Večja kot je molekula, prej se bo izločila iz kolone. Gelsko kromatografijo smo uporabili, da bi potrdili prisotnost monomerov in različnih multimerov proteinskega vzorca. Poizkus smo izvedli na HPLC napravi Agilent 1100, na katero smo namestili kolono BioSep-SEC S4000 (Phenomenex). Na kolono smo nanesli 200 µl proteinskega vzorca s koncentracijo 0,5 mg/ml. Pufer, ki smo ga uporabili za pretok skozi kolono, je bil 20 mM NaAc pH 4, 150 mM NaCl.

3.2.10 Dinamično sisanje svetlobe

Dinamično sisanje svetlobe (DLS) je tehnika, s katero lahko izmerimo velikost delcev, ki so v raztopini, in njihov profil porazdelitve. Delci so podvrženi Brownovemu gibanju v raztopini. Ko jih osvetlimo z laserjem, se svetloba na njih razprši. Intenziteta razpršene svetlobe, ki jo naprava detektira pod različnimi koti, se spreminja glede na difuzijsko hitrost delcev v raztopini. Ta pa je odvisna od velikosti delcev. Velikost delcev oziroma njihov hidrodinamski radij določimo iz analize sprememb v intenziteti razpršene svetlobe. Meritve dinamičnega sisanja svetlobe je opravila dr. Alenka Mertelj z Inštituta Jožef Štefan na napravi Zetasizer Malvern 3000 (Malvern instruments). Analizirali smo frakcije, ki smo jih dobili po nanosu proteinskega vzorca na kolono za gelsko kromatografijo.

3.2.11 AFM mikroskopija

Mikroskop na atomsko silo (AFM) je naprava, ki omogoča opazovanje organskih snovi s tanko plastnato strukturo ter slikanje organskih molekul. Mikroskop ima zelo visoko resolucijo (povečava do milijonkrat). Deluje na principu merjenja privlaka med konico tipala in površja na nanometerski razdalji. Sila privlaka povzroči odklon ročice, kar zazna detektor. S premikanjem tipala po površini se odklon ročice spreminja. Konstantno silo na tipalu lahko vzdržujemo s povratno zanko, kar dosežemo z ustreznim približevanjem in

oddaljevanjem vzorca. Napetostni signal iz povratne zanke računalnik pretvori v topografsko sliko površine.

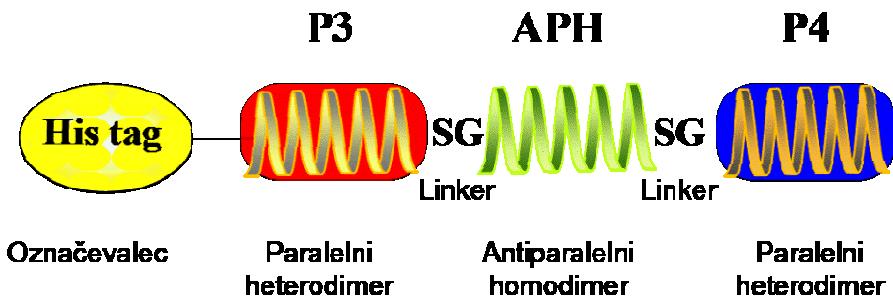
Vzorce smo opazovali na Agilent Technologies 5500 Scanning Probe Microscope z metodo AFM akustičnega izmeničnega toka na silicijevi PPP-NCH konzoli s konstantno silo 42 N/m in s tipalom z radijem manjšim od 7 nm (Nanosensors).

Za pripravo vzorca smo uporabili sljudo Grade V1 (Ted Pella ind.). Na sljudo smo nanesli 50 µl vzorca in pustili 10 minut, da se absorbira. Nato smo sljudo z vzorcem večkrat sprali z MQ vodo in jo pri sobni temperaturi posušili v komori z dušikom.

4 REZULTATI

4.1 NAČRTOVANI POLIPEPTIDNI GRADNIK P3-APH-P4

Za osnovni gradnik nanostruktur, ki smo jih želeli pridobiti, smo načrtali polipeptid, sestavljen iz treh segmentov, ki tvorijo obvite vijačnice. Gre torej za polipeptid, ki je zgrajen iz dveh vijačnih segmentov (P3 in P4), ki tvorita paralelne heterodimere, in vmesnega vijačnega segmenta APH, ki tvori antiparalelne homodimere. Med vsakim vijačnim segmentom je povezovalni člen iz aminokislin serina in glicina, ki dovoljuje omejeno gibanje segmentov obvitih vijačnic. Konstruktu za polipeptid P3-APH-P4 smo dodali še zapis za heksa-histidinski peptidni označevalc, ki omogoča enostavno izolacijo in čiščenje proteina ter vezavo funkcionalnih skupin za različne aplikacije (Slika 13).



Slika 13: Shema konstrukta polipeptida P3-APH-P4, ki je sestavljen iz treh vijačnih segmentov P3, APH, P4, vmesnih povezovalnih členov iz Ser in Gly ter heksa-histidinskega označevalca.

Segmenta P3 in P4 smo zasnovali med projektom IGEM 2009 Team Slovenia. Načrtovali smo sekvence osmih peptidov, ki paroma tvorijo paralelne heterodimere (Hagemann in sod., 2009, Gradišar in Jerala, 2010, članek v recenziji pri reviji Journal of peptide science). Poglavitna lastnost teh načrtovanih peptidnih segmentov je ta, da vsak peptid tvori obvito vijačnico samo s točno določenim peptidom; interakcije z ostalimi peptidi v setu in s samim seboj pa so zelo neugodne, zato z njimi ne tvori obvitih vijačnic.

Peptida P3 in P4 sta sestavljena iz štirih aminokislinskih heptad, ki so potrebne za tvorbo hidrofobnih in elektrostatskih interakcij med vijačnicami, da lahko nadalje nastane obvita

vijačnica. Na N-terminalnem delu je dodano zaporedje štirih aminokislin (SPED), ki preprečuje propagacijo α -vijačnice na sosednje domene. Na C-terminalnem koncu je tirozinski ostanek, ki omogoča fotometrično detekcijo (Slika 14). Peptidni segment APH tvori antiparalelni homodimer, ki tvori obvite vijačnice samo s sebi enakimi vijačnicami. Zasnovan je bil kot *de novo* zaporedje (Gunron, 2003).

	1. heptada	2. heptada	3. heptada	4. heptada	
P3	SPED	EIQQLEE	EIAQLEQ	KNAALKE	KNQALKY G
P4	SPED	KIAQLKQ	KIQALKQ	ENQQLEE	ENAALEY G

Slika 14: Aminokislinski zaporedji peptidov P3 in P4.

Osnovni gradnik P3-APH-P4 se lahko samosestavi v različne strukture. Analiza topologije nam je pokazala naslednje možnosti: kocka (Slika 4D), heksagonalna mreža (Slika 4E) in tetraeder (Slika 4F).

4.2 PRIPRAVA EKSPRESIJSKEGA VEKTORJA

4.2.1 Ekspresijski vektor pVIKTOR

Vektor pSB1A2 smo modificirali tako, da smo preko restrikcijskih mest EcoRI in PstI vstavili nukleotidna zaporedja za: promotor T7, RBS mesto, start kodon, histidinski rep, poliklonsko mesto s ccdB domeno, stop kodon in terminator T7. Tako je nastal vektor pVIKTOR.

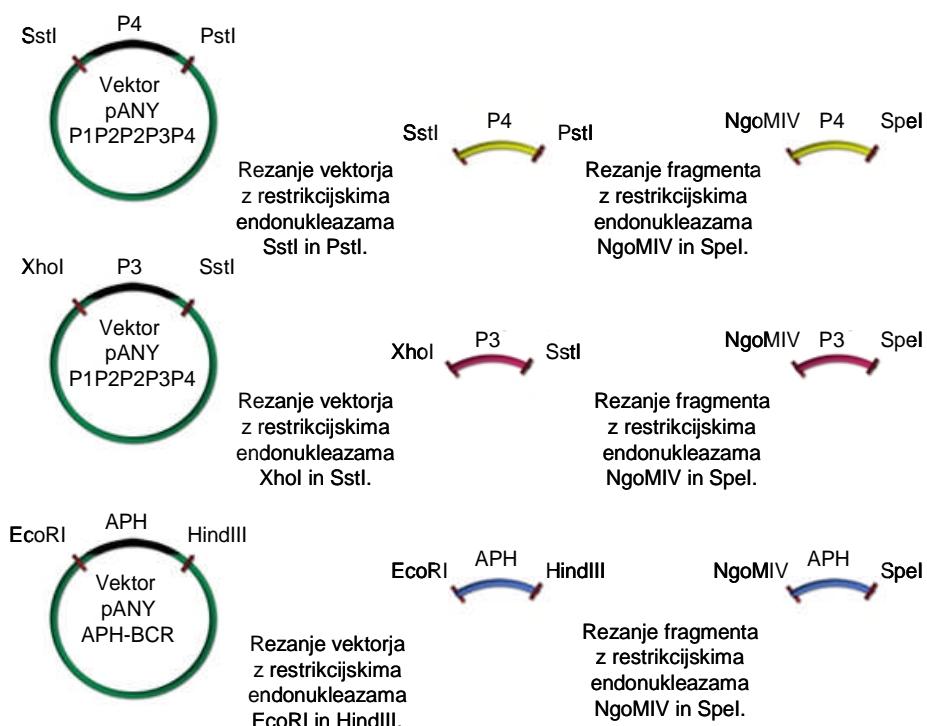
Poliklonsko mesto je bilo zasnovano v skladu z BioBrick standardom BBF RCF 37 (Jerala in Benčina, 2009). Ta standard nam na nivoju DNA omogoča enostavno sestavljanje proteinskih domen, povezanih s povezovalnim členom iz aminokislin serina in glicina (Slika 9).

4.2.2 Rezultati kloniranja

Ekspresijski vektor smo pripravili v času projekta iGEM 2009 Team Slovenia. DNA sekvence posameznih segmentov, ki tvorijo obvite vijačnice, so umetno sintetizirali v podjetju GeneArt. Naročena sintetična nukleotidna zaporedja so prišla v obliki vektorja pANY, pozneje pa smo jih preklonirali v pVIKTOR. Nato smo z uporabo kombinacije restrikcij in ligacij sestavili ustrezno zaporedje, ki kodira protein P3-APH-P4. Med posamezno domeno je po ligaciji komplementarnih koncov nastalo mešano mesto, ki kodira Ser in Gly.

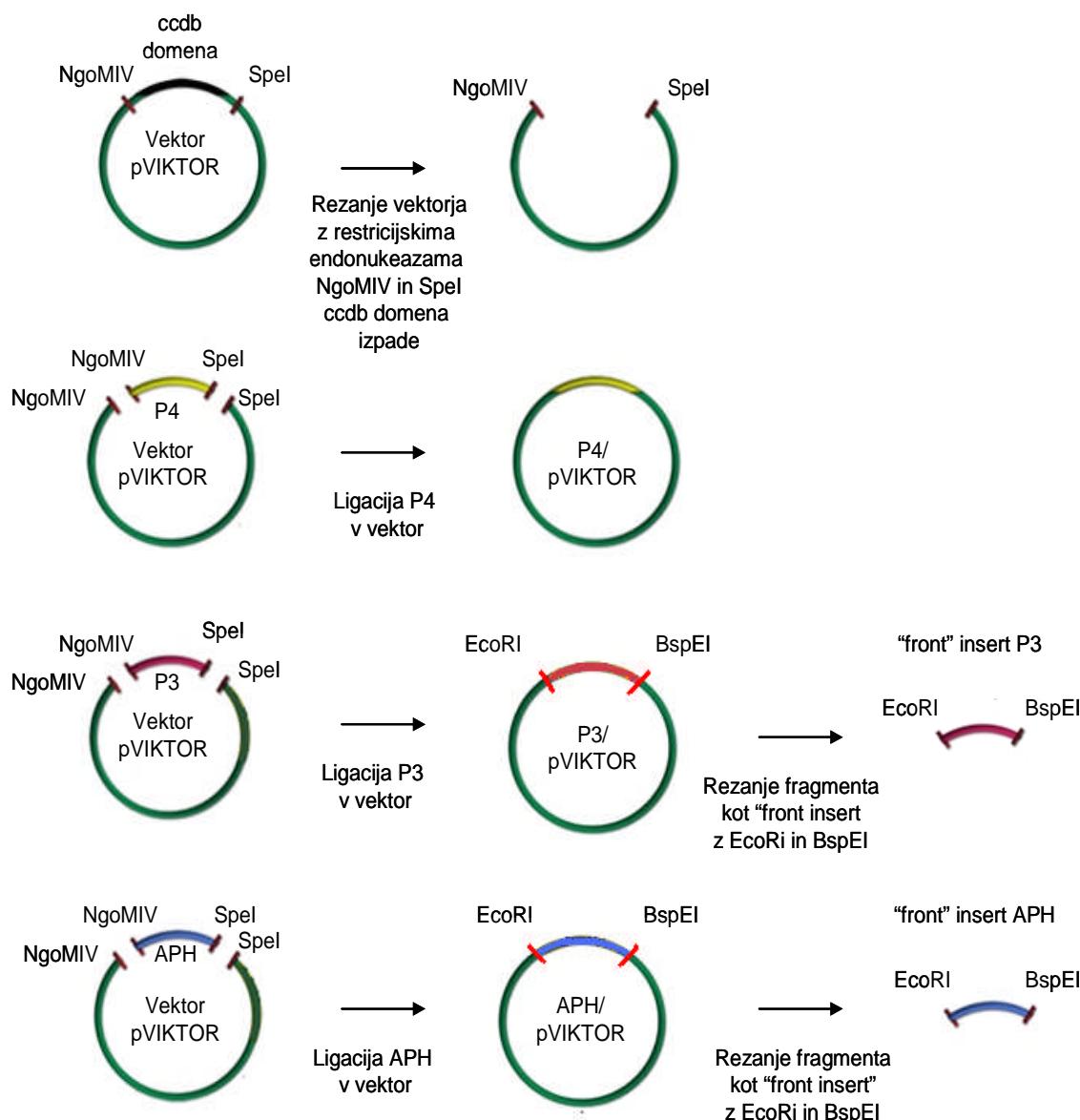
4.2.2.1 Vnašanje sintetičnih genov v pVIKTOR

Fragment P3 smo izrezali iz vektorja pANY z encimoma XhoI in SstI v pufru React 2; P4 pa s SstI in PstI v pufru React 2. Fragment APH smo izrezali z EcoRI in HindIII v pufru React 2 (Slika 15). Restriktijske mešanice smo nanesli na agarozni gel in pognali elektroforezo. Fragmente ustrezne velikosti (P3, P4 139 bp, APH 174 bp) smo izrezali iz gela in jih očistili.



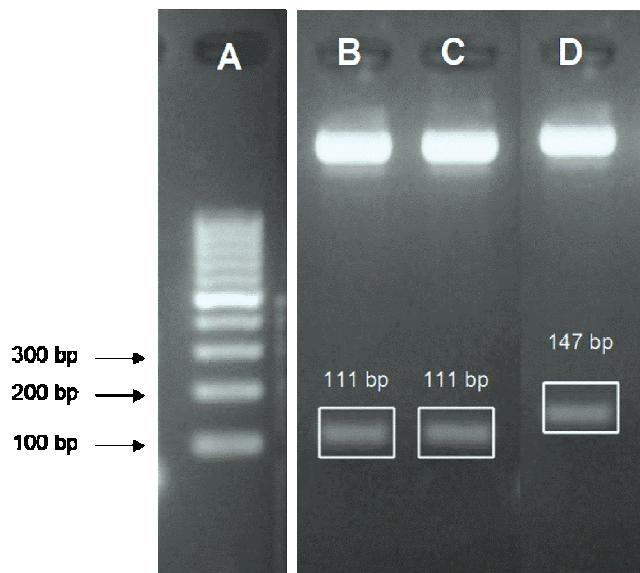
Slika 15: Shematski prikaz rezanja sintetičnih genov iz vektorja pANY in njihova priprava za ligacijo.

Vsak fragment posebej smo vnesli v vektor pVIKTOR, katerega smo linearizirali tako, da smo mu z encimoma NgoMIV in SpeI izrezali ccdB domeno v pufru React 4 z dodatkom BSA. Fragmente P3, P4 in APH smo pripravili za vnos v vektor pVIKTOR z restriktionskimi encimi NgoMIV in SpeI v pufru React 4 z dodatkom BSA. Sledila je ligacija komplementarnih koncov NgoMIV/SpeI s T4 ligazo. Posamezne fragmente smo dobili vstavljeni v pVIKTOR (Slika 16).



Slika 16: Shematski prikaz vnosa insertov P3, P4 APH v pVIKTOR in priprava »front insertov«.

Ligacijsko zmes smo transformirali v *E. coli* DH5α, izolirali plazmid ter preverili ustreznost vstavljenega inserta s kontrolno restrikcijo (NgoMIV/SpeI), ki smo jo nanesli na agarozni gel (Slika 17). Dobili smo tri fragmente – prvega v velikosti okrog 110 bp (P3), drugega okoli 110 bp (P4) in tretjega v velikosti okrog 150 bp (APH). Restriktionska analiza je potrdila prisotnost ustreznih fragmentov v vektorju pVIKTOR.

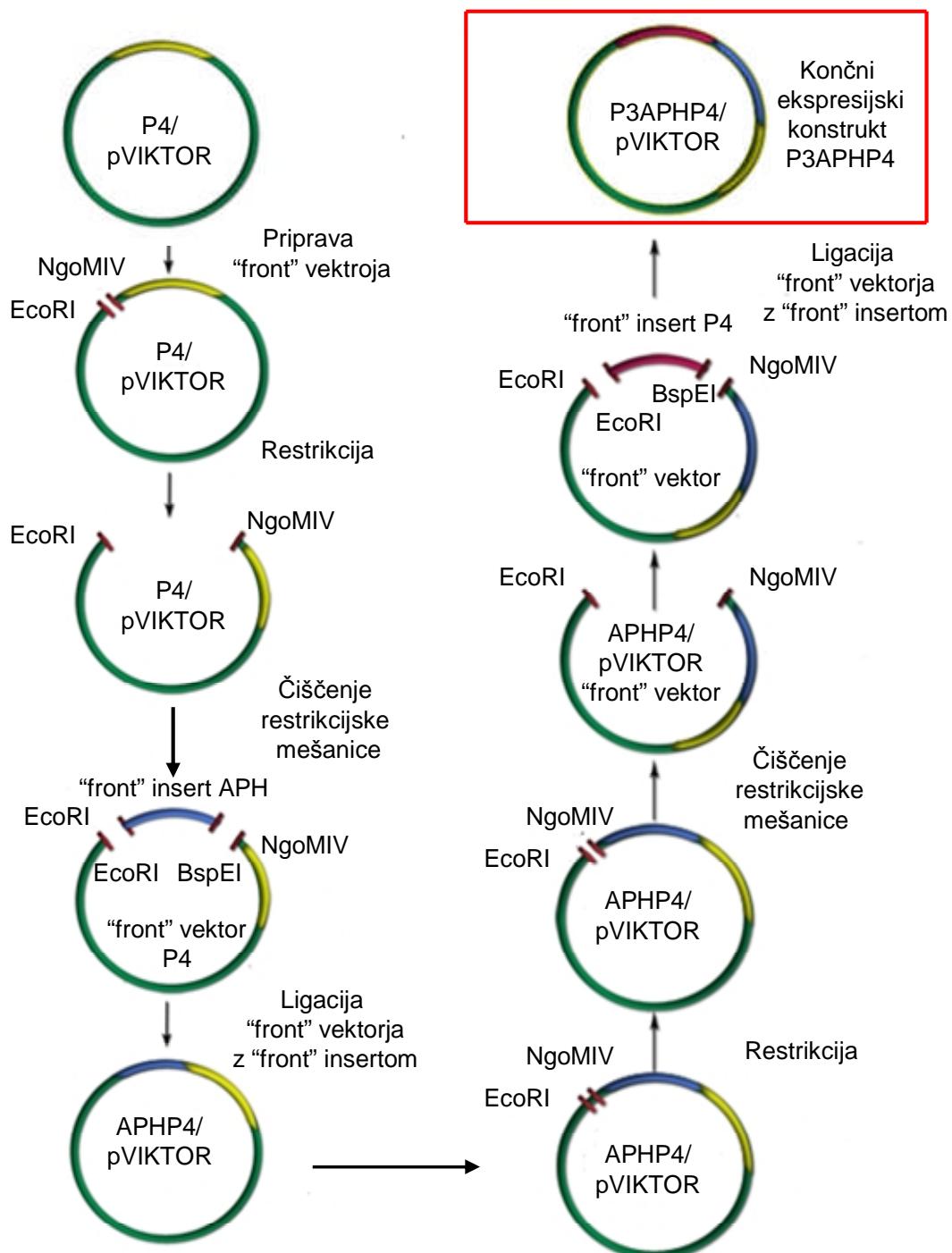


Slika 17: 1,2 % agarozni gel s produkti, nastalimi po restriktionski analizi vektorja pVIKTOR z vnešenimi sintetičnimi fragmenti. A) DNA standard Gene Ruler 100 bp DNA Ladder. B) pVIKTOR/P3 rezan z NgoMIV /SpeI. C) pVIKTOR/P4 rezan z NgoMIV /SpeI. D) pVIKTOR/APH rezan z NgoMIV /SpeI.

4.2.2.2 Priprava vektorskega konstrukt P3-APH-P4/pVIKTOR

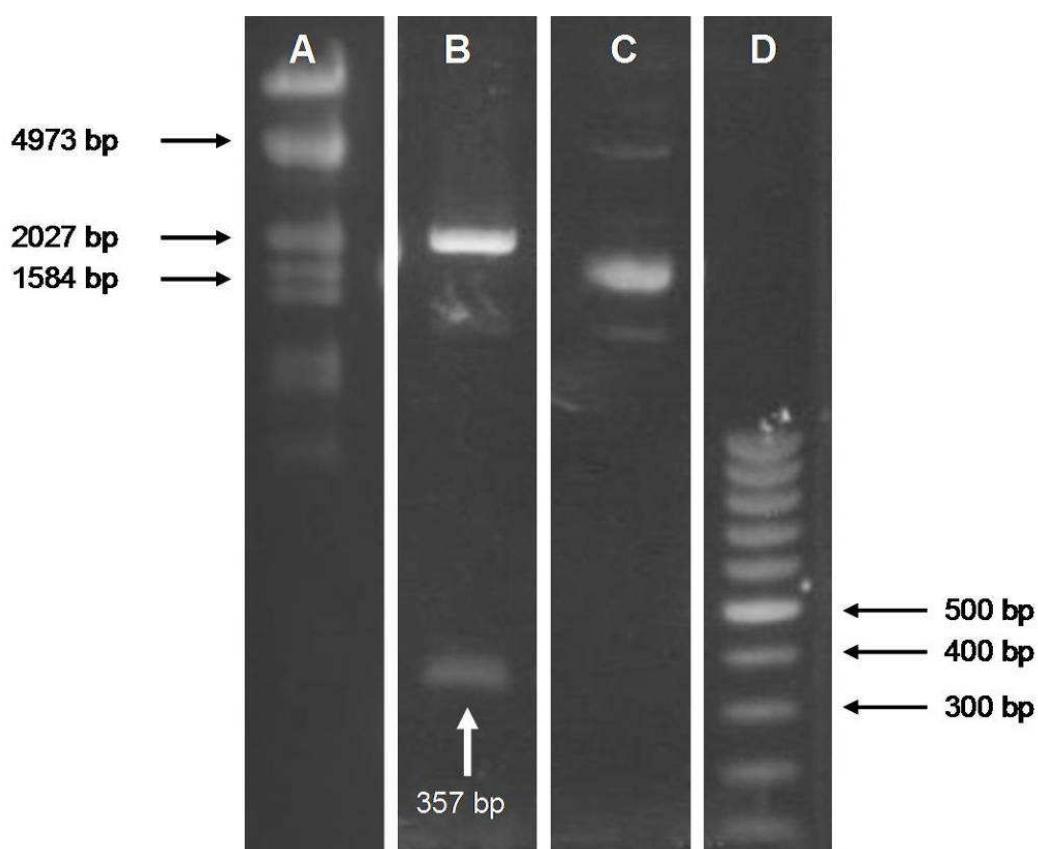
Vektor pVIKTOR s P4 smo pripravili kot »front« vektor z EcoRI in NgoMIV v pufru React 1. Iz vektorja pVIKTOR z vnešenim zaporedjem za APH pa smo izrezali fragment APH kot front insert z EcoRI in BspEI v pufru React 3 (Slika 16).

Po ligaciji smo dobili konstrukt APHP4 v pVIKTOR-ju. Tega smo ponovno rezali kot front vektor z EcoRI in NgoMIV v pufru React 1; P3 v pVIKTOR-ju pa kot front insert z EcoRI in BspEI v pufru React 3. Po ligaciji inserta z vektorjem smo dobili končni konstrukt P3-APH-P4 v vektorju pVIKTOR (Slika 18). Z uporabo BioBrick standarda je po ligaciji med vnešeno domeno in domeno v »front« vektorju nastalo mešano mesto, ki kodira povezovalni člen iz Ser in Gly.



Slika 18: Shematski prikaz priprave ekspresijskega vektorskega konstrukta P3-APH-P4/pVIKTOR.

Novo ustvarjen konstrukt P3-APH-P4 v pVIKTOR-ju smo transformirali v *E. coli* DH5 α in izolirali plazmid s komercialnim kompletom. Ustreznost vstavljenega inserta P3-APH-P4 smo preverili s kontrolno restrikcijo in ločitvijo fragmentov z elektroforezo (Slika 19). Tako smo dobili fragment velikosti okrog 350 bp, ki se ujema z velikostjo vnešenega konstrukta P3-APH-P4 (357 bp). Po kontrolni restrikciji smo ustreznost DNA zaporedja preverili z določitvijo nukleotidnega zaporedja (Eurofins MWG Operon).



Slika 19: Kontrolna restrikcija končnega ekspresijskega konstrukta pVIKTOR/P3-APH-P4 na 1.2% agaroznem gelu. A) DNA-standard λ HindIII/EcoRI. B) Rezan vektor pVIKTOR/P3-APH-P4 (restrikcija z encimoma NgoMIV/PstI). C) Nerezan vektor pVIKTOR/P3-APH-P4. D) DNA standard Gene Ruler 100 bp DNA Ladder.

4.3 PRIDOBIVANJE IN IZOLACIJA PROTEINA P3-APH-P4

Na osnovi dizajniranega aminokislinskega zaporedja smo s pomočjo bioinformacijskih orodij pridobili podatke, pomembne za izolacijo proteina (Preglednica 10). Pri tem delu smo si pomagali z internetnim programom ProtParam (Gasteiger, 1999).

Preglednica 10: Lastnosti proteina P3-APH-P4, izračunane z programom ProtParam.

P3-APH-P4	Aminokislinsko zaporedje			
	MY HHHHHH SRAG SPEDEIQQLEEEIAQLEQKNAALKEKNQALKYGSG MKQLEKELKQLEKELQAIKEQLAQWLWKAQARKKKLAQLKKKLQASG SPEDKIAQLKQKIQALKQENQQLEEEENAALYEGSG TS			
	Število AK	Velikost (Da)	Teoretična pI	ϵ (Abs 1 mg/ml)
	131	15031.2	8.67	0.663

4.3.1 Pridobivanje proteina

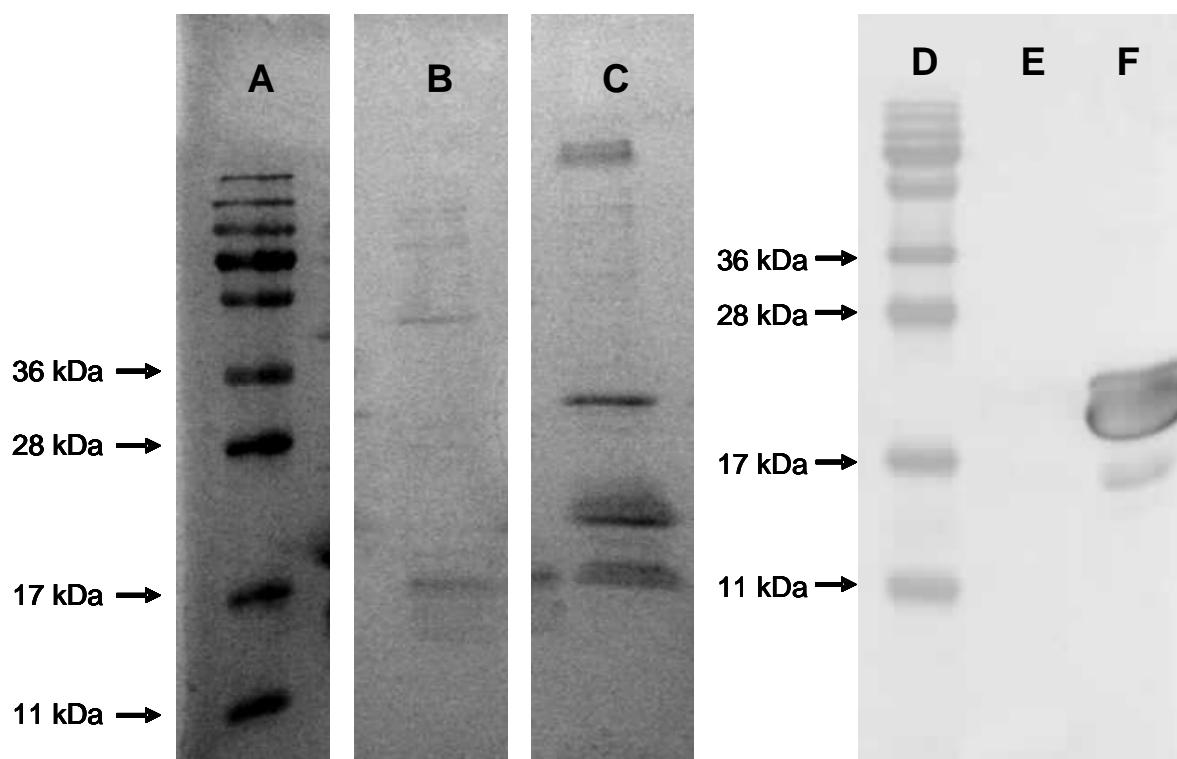
Plazmid pVIKTOR z zapisom za P3-APH-P4 smo transformirali v celice *E. coli* sev BL21(DE3)pLysS in s fermentacijo pridobili rekombinantni protein (Preglednica 11).

Preglednica 11: Vrednosti A₆₀₀ med fermentacijo kulture *E.coli*

Plazmid	A ₆₀₀ prekonočne kulture	A ₆₀₀ po 120 min fermentacije	A ₆₀₀ po 150 min (indukcija)	A ₆₀₀ po koncu fermentacije
P3-APH-P4/ pVIKTOR	5.94	0.49	0.79	4.12

4.3.2 Izolacija in identifikacija rekombinatnega proteina P3-APH-P4

Glede na predvidene lastnosti rekombinantnega proteina smo pričakovali, da bo P3-APH-P4 v netopni frakciji celičnega lizata. Z metodama NaDS-PAGE, Western prenosom in imunodetekcijo smo preverili prisotnost proteina tako v topnem delu celičnega lizata (supernatant) kot tudi v netopnem (usedlina) (Slika 20).

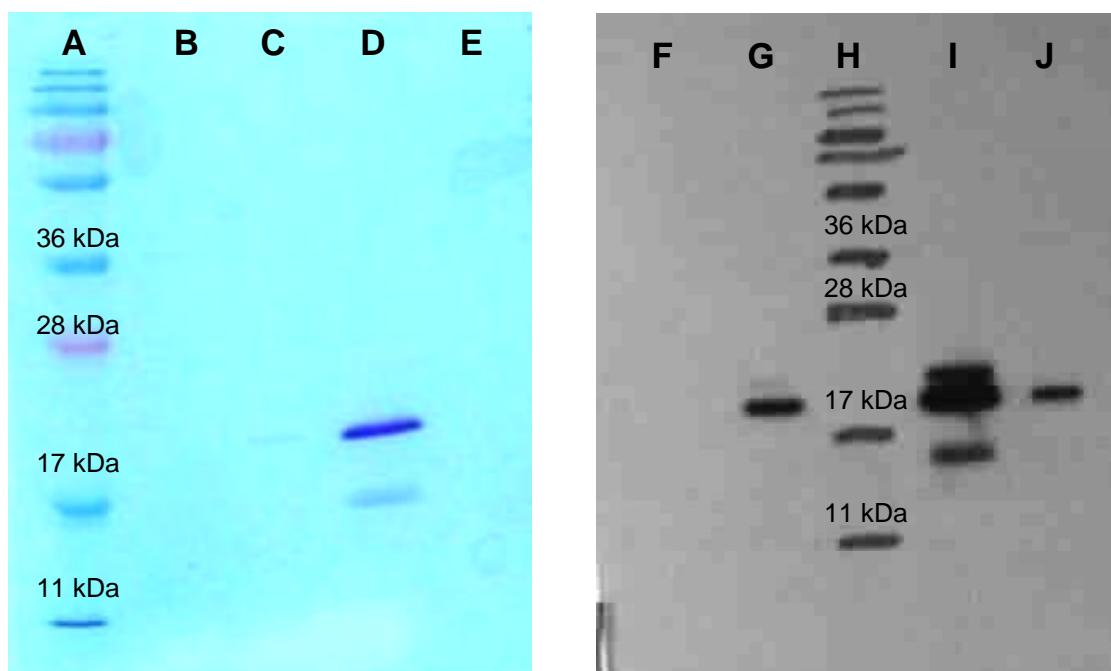


Slika 20: A,B,C) 15 % poliakrilamidni gel po NaDS-PAGE, barvan s Coomassie modrim. A) Proteinski standard PageRuler Prestained Protein Ladder. B) Supernatant – topna frakcija celičnega lizata. C) Inkluzijska telesca – netopni del celičnega lizata. D,E,F) Western prenos s 15 % poliakrilamidnega gela po NaDS-PAGE, označevanje s protitelesi in detekcija z reagentom Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate. Ekspozicija 2 minuti. D) Proteinski standard PageRuler Prestained Protein Ladder. E) Supernatant – topna frakcija celičnega lizata. F) Inkluzijska telesca – netopni del celičnega lizata.

Rezultati NaDS-PAGE in Western prenosa so nam potrdili, da je večji del rekombinantnega proteina prisoten v netopnih inkluzijskih telescih. Velikost proteina na gelu smo ocenili na podlagi obarvanega proteinskega standarda in je znašala okoli 17 kDa.

Na podlagi rezultatov NaDS-PAGE in imunodetekcije celičnega lizata smo se odločili za izolacijo rekombinantnega proteina iz netopne frakcije celičnega lizata. Histidinski rep na N-terminalnem koncu proteina nam omogoča izolacijo proteina na Ni-NTA koloni. Izolacijo smo izvedli pod denaturirajočimi pogoji, ob prisotnosti 6 M GvdHCl, pri katerih je protein v razviti obliki. Uporabili smo protokol proizvajalca Qiagene (The QIAexpressionist, 2003)

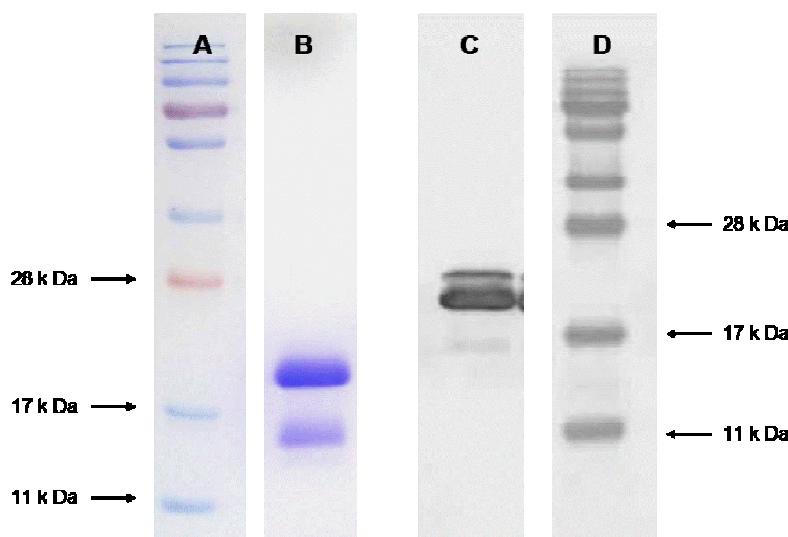
Posamezne frakcije po spiranju s kolone smo dializirali proti 20 mM HEPES (pH 7,5), da smo protein zvili v nativno stanje in se znebili imidazola. Protein v frakciji W3 se nam je pri tem oboril, ostale frakcije pa smo zaradi nizke vsebnosti proteinov koncentrirali. Z NaDS-PAGE in Western prenosom smo preverili prisotnost proteina v posameznih frakcijah (Slika 21). Rezultati detekcije proteina v frakcijah W1, W2, W3 in W4 so nam pokazali, da je največja količina očiščenega proteina v frakciji W3, medtem ko v elucijski frakciji W4 proteina skoraj ni. To pomeni, da se protein dobro spira s kolone že pri 50 mM koncentraciji imidazola. Tudi v frakciji W1 in W2 ni bilo prisotnih veliko nečistoč in drugih proteinov, kar pomeni, da so izražena inkluzijska telesca zelo čista.



Slika 21: A, B, C, D, E) 15 % poliakrilamidni gel po NaDS-PAGE, barvan s Coomassie modrim. A) Proteinski standard PageRuler Prestained Protein Ladder. B) Frakcija W1, C) Frakcija W2. D) Frakcija W3, E) Frakcija W4; F, G, H, I, J) Western prenos s 15 % poliakrilamidnega gela po NaDS-PAGE, označevanje s protitelesi in detekcija z reagentom Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate. Ekspozicija 1 minuto. F) Frakcija W1, G) Frakcija W2, H) Proteinski standard PageRuler Prestained Protein Ladder. I) Frakcija W3. J) Frakcija W4.

Postopek izolacije proteina na Ni-NTA koloni smo ponovili, a izpustili spiranje s pufrom W3, da bi preprečili predčasno spiranje proteina. Protein P3-APH-P4 smo eluirali s pufrom W4. Znova smo preverili posamezne frakcije za prisotnost rekombinantnega proteina s

Coomassie barvilom po NaDS-PAGE elektroforezi in imunodetekcijo po Western prenosu. Rezultati modificiranega protokola so nam pokazali, da smo v elucijski frakciji W4 dobili visoko koncentracijo očiščenega proteina P3-APH-P4 (Slika 22). Na sliki smo opazili dve proteinski lisi molske mase 17 in 20 kDa.



Slika 22: A, B) 15 % poliakrilamidni gel po NaDS-PAGE, barvan s Coomassie modrim. A) Proteinski standard PageRuler Prestained Protein Ladder. B) Elucijska frakcija W4. C, D) Western prenos s 15 % poliakrilamidnega gela po NaDS-PAGE, označevanje s protitelesi in detekcija z reagentom Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate. Ekspozicija 15 sekund. C) Elucijska frakcija W4. D) Proteinski standard PageRuler Prestained Protein Ladder.

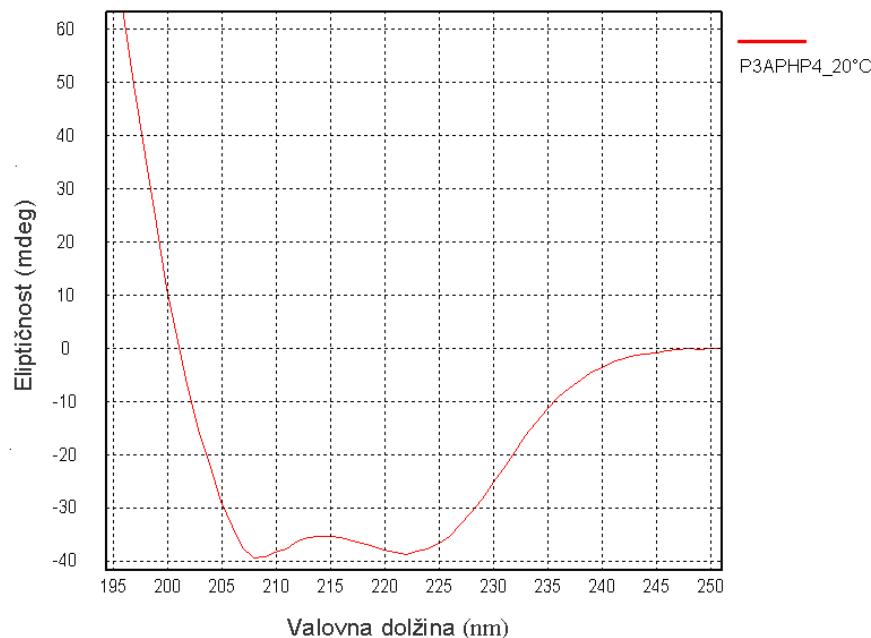
Molsko maso rekombinantnega proteina smo dodatno preverili s pomočjo ESI masne spektroskopije na masnem spektrometu AutospecQ. Znašala je 15032,7 Da in se od teoretično izračunane molske mase razlikuje le za 1,5 Da. Rezultati vseh treh metod (masne spektroskopije, barvanja s Coomassie barvilom in imunodetekcijo) so potrdili produkcijo želenega rekombinantnega proteina in njegovo ustrezeno čistost. Pridobili smo večjo količino proteina (200 mg), s katero smo izvedli nadaljnjo karakterizacijo fizikalno-kemijskih lastnosti in sposobnosti samosestavljenosti proteina v nanostrukture.

4.4 DOLOČANJE SEKUNDARNE STRUKTURE PROTEINA P3-APH-P4

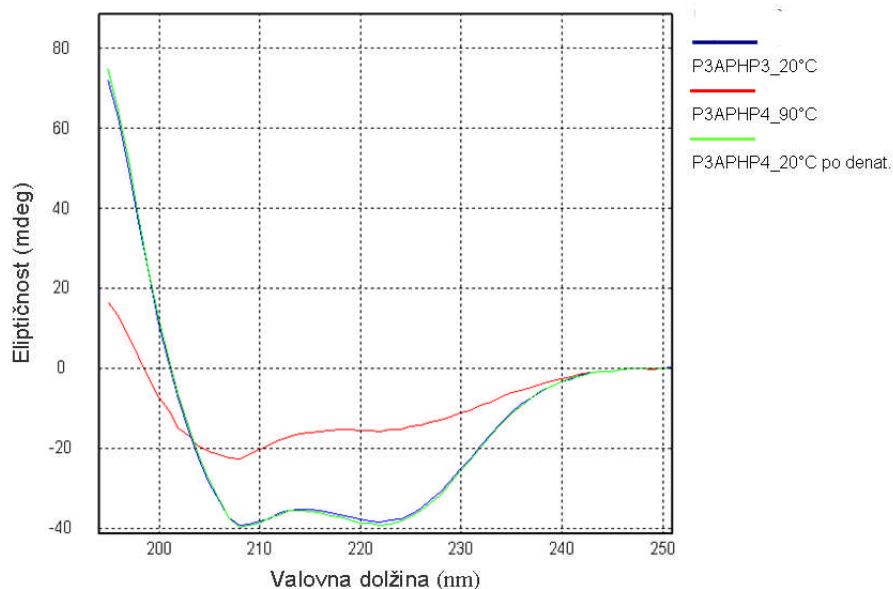
Rekombinantni protein P3-APH-P4 je oblikovan tako, da posamezne domene znotraj polipeptidne verige – ob parjenju z ustrezeno domeno sosednjega polipeptida – tvorijo obvito vijačnico iz dveh α -vijačnic. S pomočjo merjenja cirkularnega dikroizma smo preverili sekundarno strukturo rekombinantnega proteina. Visok delež oblike alfa vijačnice nakazuje na urejeno parjenje posameznih segmentov in tvorbo obvitih vijačnic, ki bi lahko gradile urejene strukture.

Meritve temperaturne in kemijske danaturacije proteina smo izvajali na očiščenem proteinu P3-APH-P4. Oborjen protein smo raztopili v pufru s 6 M GvdHCl ter ga počasi zvili v pravilno obliko z dializo v 20 mM HEPES pufru (pH 7,5). Protein smo razredčili na končno koncentracijo 0,1 mg/ml in v 1mm kvarčni kivetki pomerili cirkularni dikroizem. Posneti spektri imajo minimum pri 208 nm in 220 nm, kar je značilno za α -vijačnico in to potrjuje naša predvidevanja (Slika 23).

Tako pripravljen protein smo denaturirali s segrevanjem od 20 °C do 90 °C s korakom po 1°C/min. Spremljali smo vrednost minimuma eliptičnosti pri 222 nm in iskali točko prevoja. Iz podatkov, pridobljenih pri temperaturni denaturaciji, smo lahko izpeljali stabilnost medmolekulskih interakcij, ki tvorijo obvito vijačnico in poiskali mejne pogoje, pri katerih se razviti protein zvija v urejeno definirano strukturo.



Slika 23: CD spekter proteina P3-APH-P4 v 20 mM HEPES pH 7,5

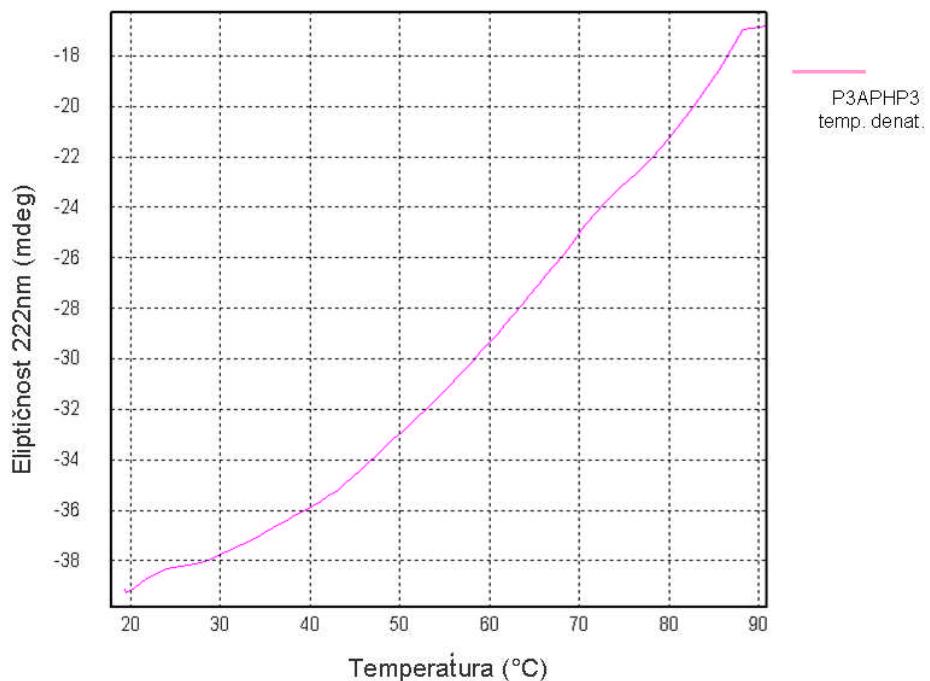


Slika 24: CD spekter proteinskega vzorca P3-APH-P4 v 20 mM HEPES pH (7,5) pri temperaturi 20 °C (modra barva), 90 °C (rdeča barva) in ponovno ohlajen na 20 °C (zelena barva).

Protein smo denaturirali s segrevanjem na 90 °C in posneli CD spekter. Le-ta je bil kljub visoki temperaturi še vedno značilen za helikalno obliko, z minimumoma pri 208 in 222

nm (Slika 26). Protein smo ohladili na prvotnih 20 °C in ponovno posneli CD spekter, ki je bil identičen spektru pred segrevanjem (Slika 24).

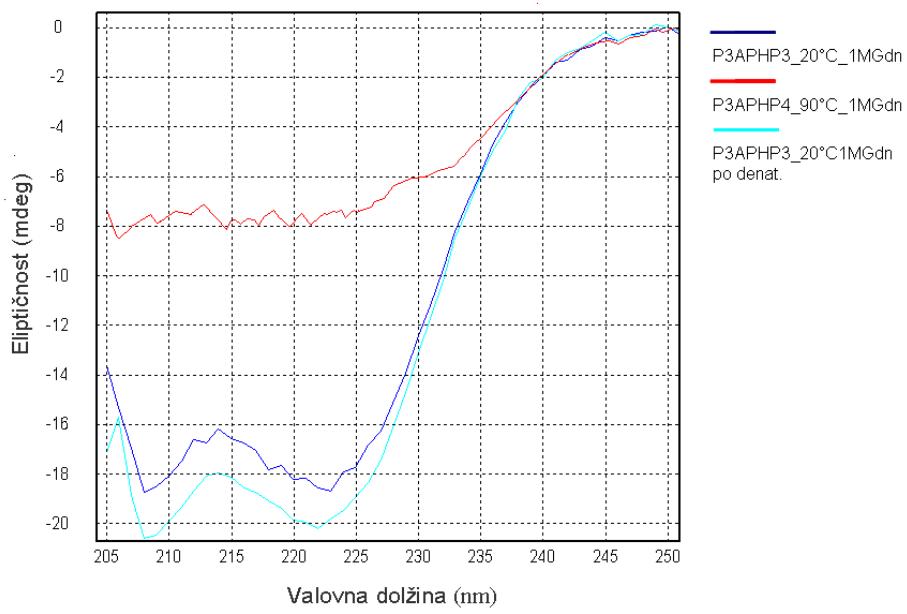
Eliptičnost proteina je sicer z višanjem temperature padala, a pri tem nismo dosegli točke prehoda, pri kateri bi razpadla polovica povezav med verigami v obvitih vijačnicah (Slika 25). Iz povedanega lahko sklepamo, da so povezave med obvitimi vijačnicami zelo stabilne, zato temperaturna denaturacija do 90 °C ni dovolj za prekinitve medmolekulskih interakcij.



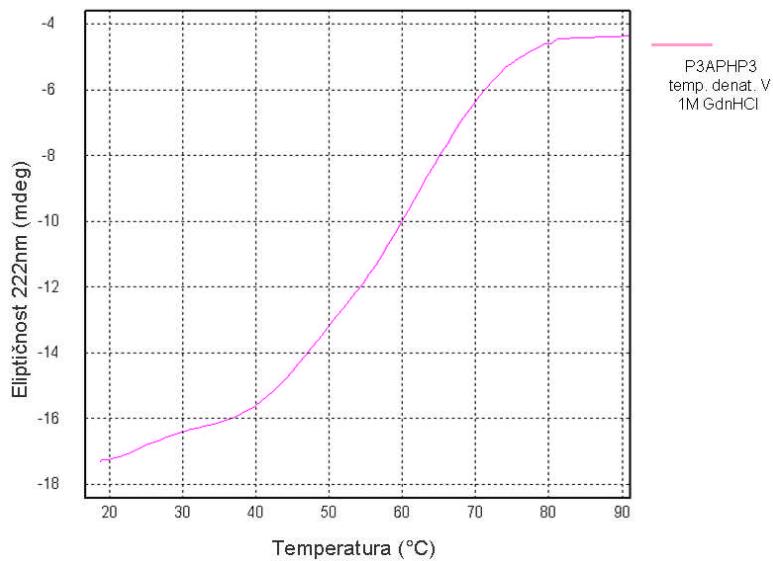
Slika 25: P3-APH-P4 v 20 mM Hepes pH 7,5 pri 222 nm v odvisnosti od temperature.

Ponovili smo gradientno temperaturno denaturacijo s proteinom, raztopljenim v 1 M GvdHCl. Z dodatkom kemijskega denaturanta smo oslabili medmolekulske interakcije in deloma razvili polipeptidno verigo. Oblika CD spektra proteina v 20 mM HEPES (pH 7,5), 1M GvdHCl je bila tipična za alfa helikalno obliko (Slika 26). S segrevanjem na 90 °C je α -vijačna struktura skoraj izginila (Slika 26), vendar se je po ohlajanju na 20 °C zopet vzpostavila. Na CD spektru ohlajenega proteina smo opazili, da imata minimuma pri 208 in 222 nm višjo vrednost eliptičnosti kot pred segrevanjem. Iz tega lahko sklepamo, da je denaturacija reverzibilna; pri ponovnem zvijanju proteina pa nastanejo še bolj stabilne

strukture z višjim deležem obvitih vijačnic. Iz sigmoidne oblike krivulje je razvidno, da je v prisotnosti denaturanta prišlo do razvijanja vijačnic. Temperatura, pri kateri pride do 50% razvijanja polipeptida, je 59 °C (Slika 27).

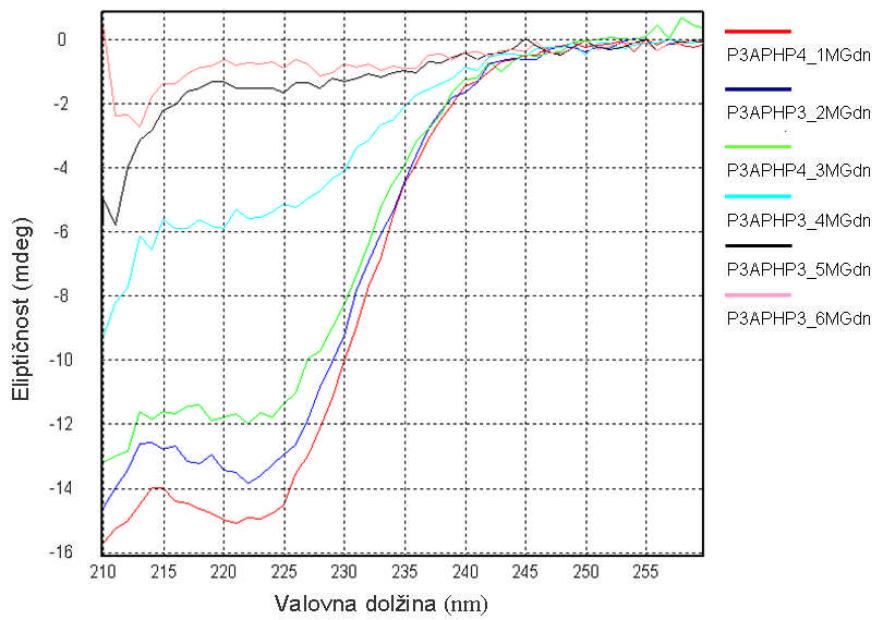


Slika 26: CD spekter proteina P3-APH-P4 v 20 mM HEPES (pH 7,5), 1 M GvdHCl 20 °C (temno modra barva), P3-APH-P4 v 20 mM HEPES (pH 7,5), 1 M GvdHCl segrevanje 90 °C (rdeča barva) in P3-APH-P4 v 20 mM HEPES (pH 7,5), 1 M GvdHCl ohlajen iz 90 °C na 20 °C (svetlo modra barva).

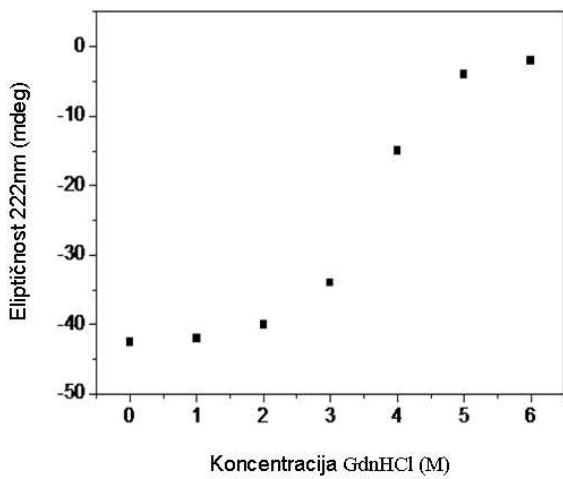


Slika 27: P3-APH-P4 v 1 M GvdHCl pri 222 nm v odvisnosti od temperature.

Poleg temperaturne denaturacije smo izvedli še kemijsko denaturacijo. Pripravili smo protein v 20 mM HEPES (pH 7,5) z različnimi koncentracijami denaturanta (1 M GvdHCl, 2 M GvdHCl, 3 M GvdHCl, 4 M GvdHCl, 5 M GvdHCl, 6 M GvdHCl) ter vsakič pomerili eliptičnost pri 222 nm (Slika 28). Iz grafa je razvidno, da je točka prehoda pri 3,5 M koncentraciji denaturanta (Slika 29).



Slika 28: CD spekter proteina P3-APH-P4 pri različnih koncentracijah GvdHCl pri 20°C.



Slika 29: P3-APH-P4 pri 222 nm v odvisnosti od koncentracije denaturanta GvdHCl.

4.5 KONTROLIRANO ZVIJANJE PROTEINA

Predvidevamo, da željene proteinske nanostrukture (mreža, tetraeder, kocka) lahko nastanejo le v primeru, ko se osnovni gradniki pravilno zvijejo in vežejo v urejenem vrstnem redu. Običajna počasna kemična renaturacija proteina z dializo v našem primeru ni bila ustrezna, zato smo za naš namen razvili posebno metodo, s katero smo lahko poljubno dolgo zniževali koncentracijo denaturanta. Na ta način smo odstranili kinetično komponento in povečali pravilno nalaganje proteinov.

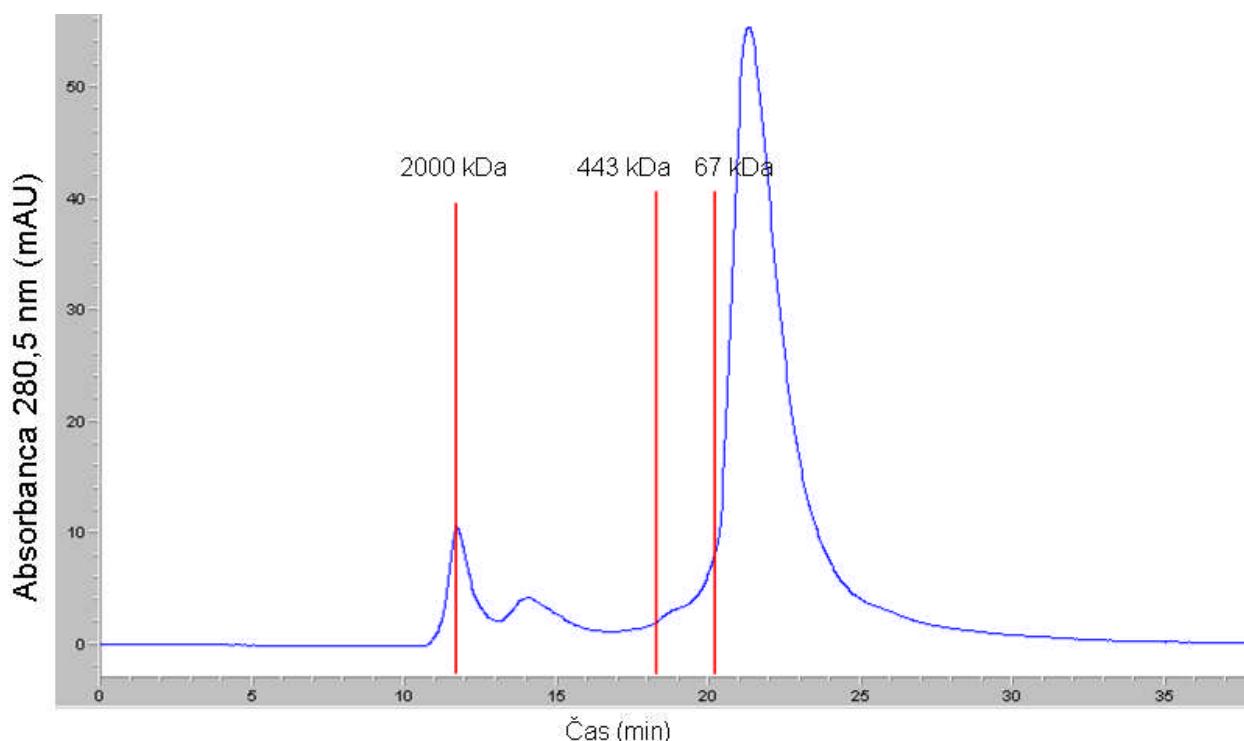
Pri načrtovanju postopka za počasno kontrolirano zvitje proteina P3-APH-P4 smo uporabili rezultate merjenja CD, kjer smo pridobili podatke o temperaturi in koncentraciji denaturanta (GvnHCl), ki sta potrebna za razvitje polovice polipeptida. Na ta način smo dosegli poljubno dolg padec koncentracije denaturanta v obliki logaritemske funkcije (Slika 12).

4.6 ANALIZA TVORBE UREJENIH NANOSTRUKTUR

Osnovni polipeptidni gradnik samosestavljljivih nanomaterialov je sestavljen iz treh segmentov za tvorbo obvitih vijačnic, ki so v povprečju dolgi 5 nm. Glavni dokaz za obstoj samosestavljljivih nanostruktur bi bila zasleditev delcev z velikostjo osnovne stranice 5 nm (kocka, ki je oktamer z molsko maso 120 kDa in tetraeder, ki je tetramer molske mase 60 kDa) ali heksagonalne mreže z 10 nm premera osnovne celice (masa več 100 kDa).

4.6.1 Gelska filtracija

Vzorec za gelsko filtracijo smo pripravili s pomočjo počasnega redčenja denaturanta. Protein v 5 M GvdHCl, 150 mM NaCl in 20 mM HEPES (pH 7,5) s koncentracijo 5 µg/ml smo zvili s počasnim redčenjem denaturanta do končne koncentracije 1 M GvdHCl 150 mM NaCl in 20 mM HEPES (pH 7,5). Nastale strukture v vzorcu proteina smo analizirali z gelsko filtracijo.

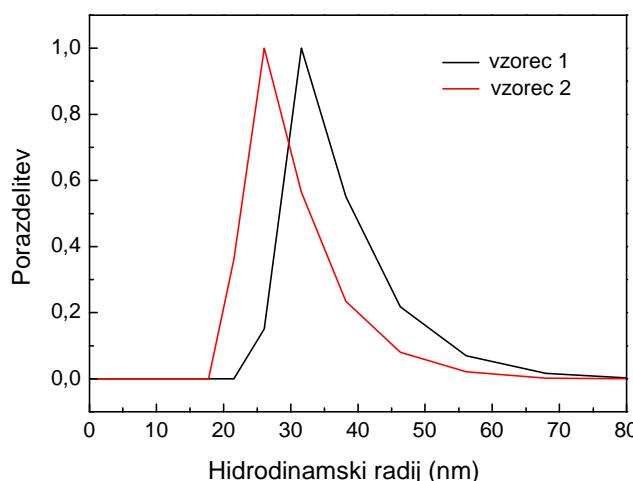


Slika 30: Kromatogram po gelski filtraciji P3-APH-P4 z dodanimi molskimi masami proteinskih standardov.

Na kromatogramu gelske filtracije smo dobili tri vrhove, ki predstavljajo tri populacije delcev podobne velikosti in oblike. Če primerjamo retenzijske čase posameznih vrhov s časi potovanja proteinskih standardov, dobimo približno oceno velikosti delcev v posameznem vrhu. Prvi vrh smo dobili pri času 11,8 minute, ki je tik za izključitvenim volumnom kolone in se ujema z velikostjo standarda Blue dextran (2000 kDa). Drugi vrh je potoval 14,0 minute (velikost bi lahko ocenili 1200 kDa), tretji pa 21,5 minute (delci v njem so manjši od albuminskega standarda 67 kDa). Molski masi delcev v prvem in drugem vrhu se ne ujemata s predpostavljenimi molskimi masami nanostruktur, kot sta kocka (oktamer 120 kDa) in tetraeder (tetramer 60 kDa), lahko bi bila heksagonalna mreža (nekaj 100 kDa). Tretji vrh predstavljajo delci z maso manjšo od 67 kDa, kar so najverjetneje monomeri (15 kDa) ali dimeri (30 kDa) (Slika 30). Vse tri frakcije smo ločeno zbrali za nadaljnjo analizo.

4.6.2 Dinamično sisanje svetlobe

Z DLS metodo lahko pridobimo podatke o velikosti hidrodinamskega radija delcev v raztopini. Za analizo velikosti delcev smo uporabili vzorce iz frakcij po gelski filtraciji. Analizirali smo frakcijo vrha z retenzijskim časom 11,8 (delci velikosti 2000 kDa) in frakcijo s z retenzijskim časom 14,0 (delci velikosti okoli 1200 kDa) (Slika 31).



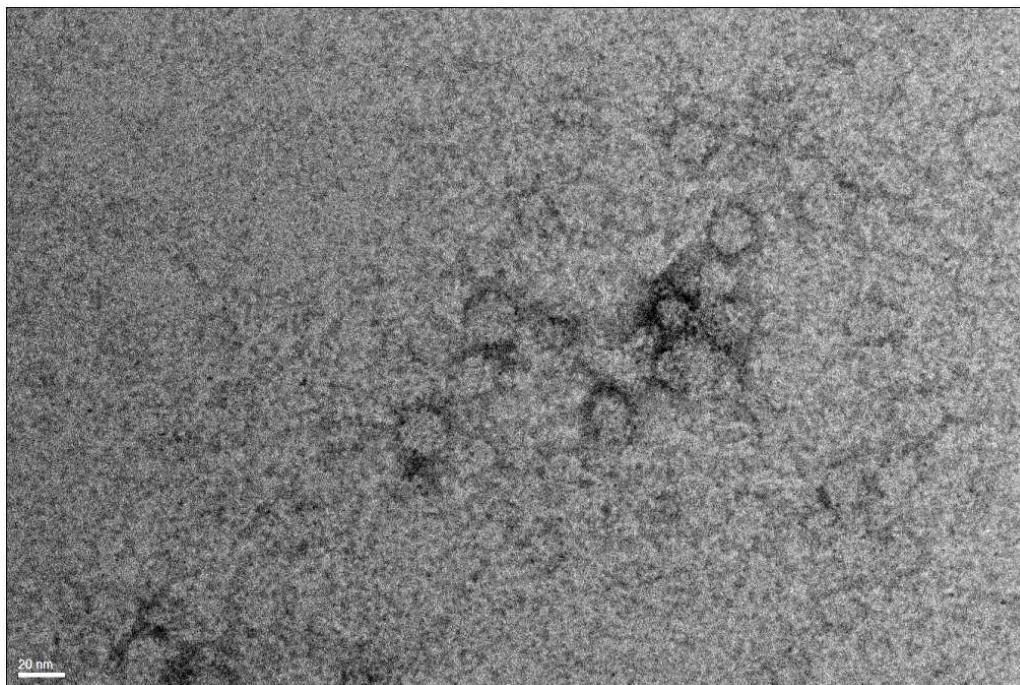
Slika 31: Velikosti hidrodinamskih radijev določenih z DLS. Vzorec 1 (črna barva) predstavlja DLS analizo prvega vrha na kromatogramu pri 2.000 kDa, vzorec 2 (rdeča barva) predstavlja DLS analizo drugega vrha na kromatogramu pri 1200 kDa). Vrednost porazdelitve delcev je normalizirana.

DLS analiza frakcij po gelski filtraciji je pokazala, da so v frakciji, ki je prišla takoj za izključitvenim volumnom pri času 11,8 minute, prisotni delci z velikostjo hidrodinamskega radija od 22 nm do 65 nm. V populaciji so prevladovali delci z radijem 33 nm. V frakciji, ki se je izločila iz kolone pri 14,0 minute, smo dobili delce z radijem med 18 in 55 nm. Največji delež delcev je bil velikosti 27 nm.

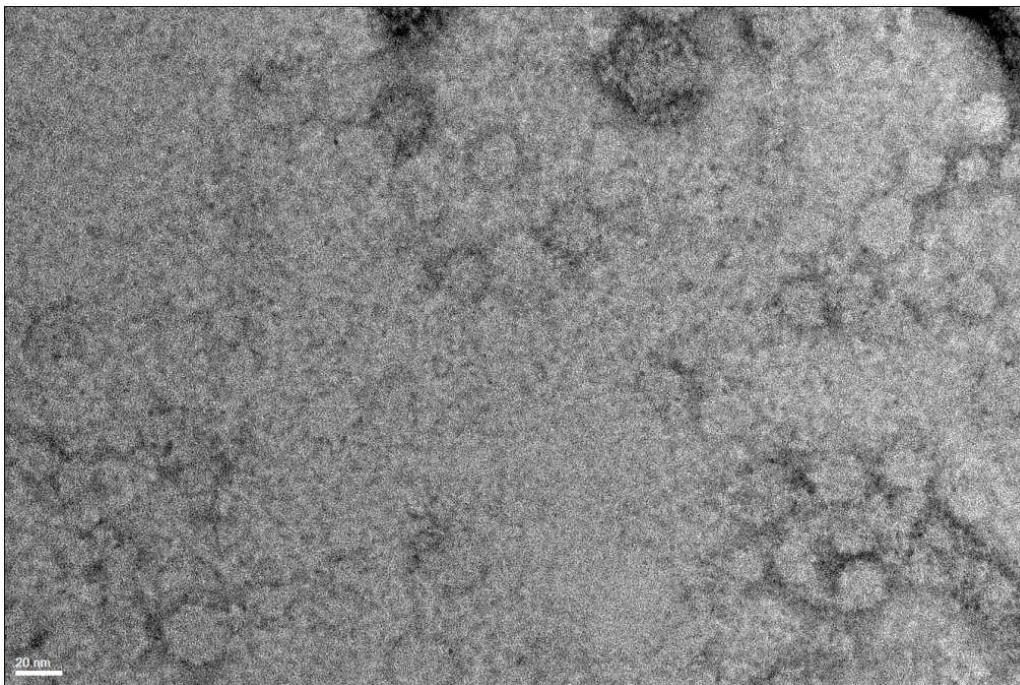
4.6.3 Transmisijska elektronska mikroskopija

S transmisijsko elektronsko mikroskopijo lahko neposredno določimo velikost in obliko opazovanih delcev na nanometrski skali. Ključen korak za uspešno opazovanje nanodelcev je priprava vzorcev, katere smo pripravili na tri različne načine.

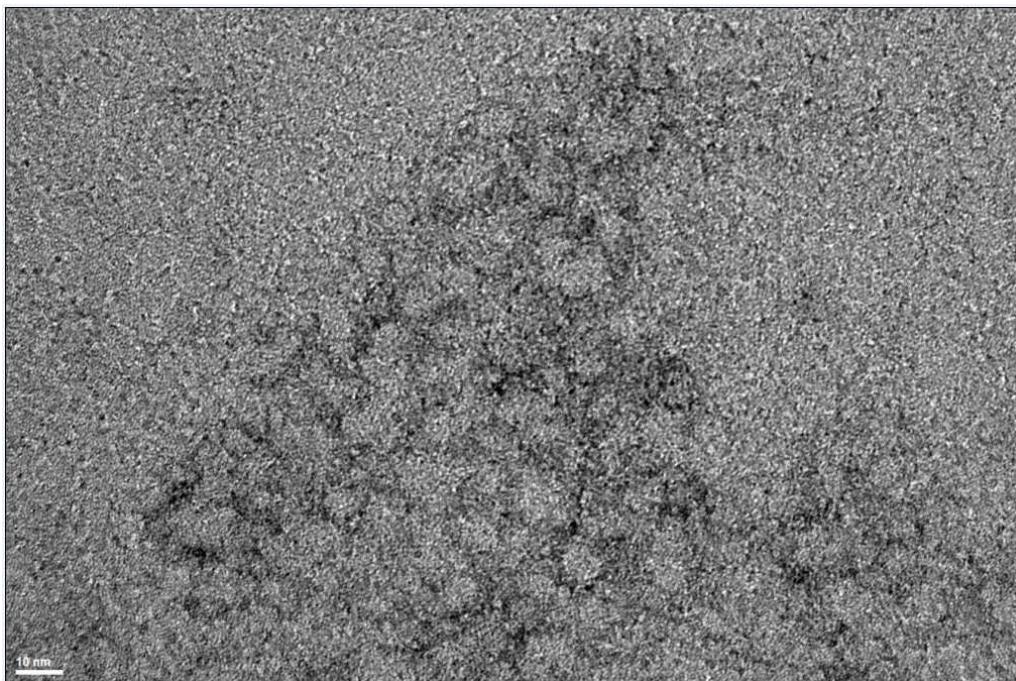
Osnovna priprava je bila počasno redčenje denaturanta proteina, po kateri smo vzorec še dodatno dializirali, da bi odstranili preostali denaturant. Z mrežicami za elektronsko mikroskopijo smo bredli po dializirani raztopini proteina, mrežico osušili in kontrastirali z 2 % raztopino uranil acetata. *Drugi* način priprave je enak prvemu, le da smo proteinske delce po dializi ločili z gelsko filtracijo. Posamezne frakcije, ki bi lahko vsebovale ustrezne nanostrukture, smo nanesli na mrežaste nosilce za elektronsko mikroskopijo, sprali z MQ vodo in kontrastirali z 2 % uranil acetatom. Pri *tretji* metodi priprave vzorcev smo za pravilno zvijanje proteinov uporabili temperaturno denaturacijo proteina. Očiščeni protein smo raztopili v 20 mM HEPES pufru (pH 7,5) do koncentracije 0,5 µg/ml in ga nanesli na mrežice. Mrežice smo segreli na 70°C in skupaj z večjo količino vode (70°C), ki je služila kot rezervoar toplote, položili v termoizolirano posodo. Sistem se je zelo počasi ohljal na sobno temperaturo nadaljnjih 48 ur. Po koncu postopka smo mrežico z vzorcem kontrastirali z 2 % uranil acetatom.



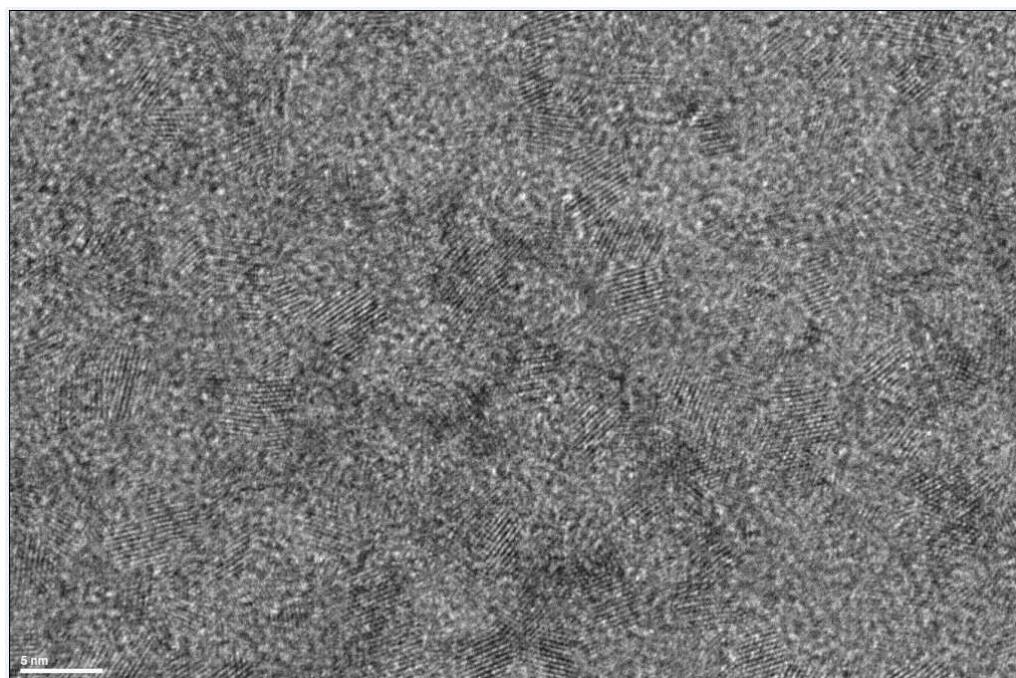
Slika 32: Elektronski posnetek proteina P3-APH-P4 po počasnem redčenju denaturanta. Koncentracija proteina je 50 µg/ml 100.000 x povečava. Na sliki vidimo strukture, ki bi lahko predstavljale polipeptidno mrežo.



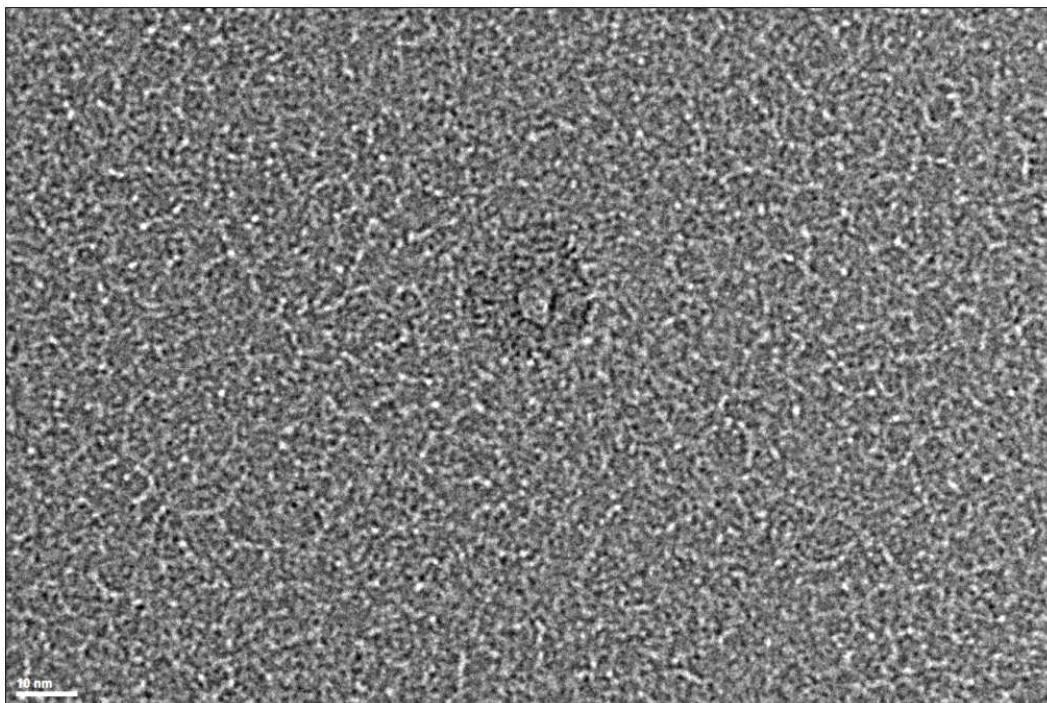
Slika 33: Elektronski posnetek proteina P3-APH-P4 po počasnem redčenju denaturanta. 100.000 x povečava. Koncentracija proteina je 50 µg/ml. Na sliki vidimo strukture, ki bi lahko predstavljale polipeptidno mrežo.



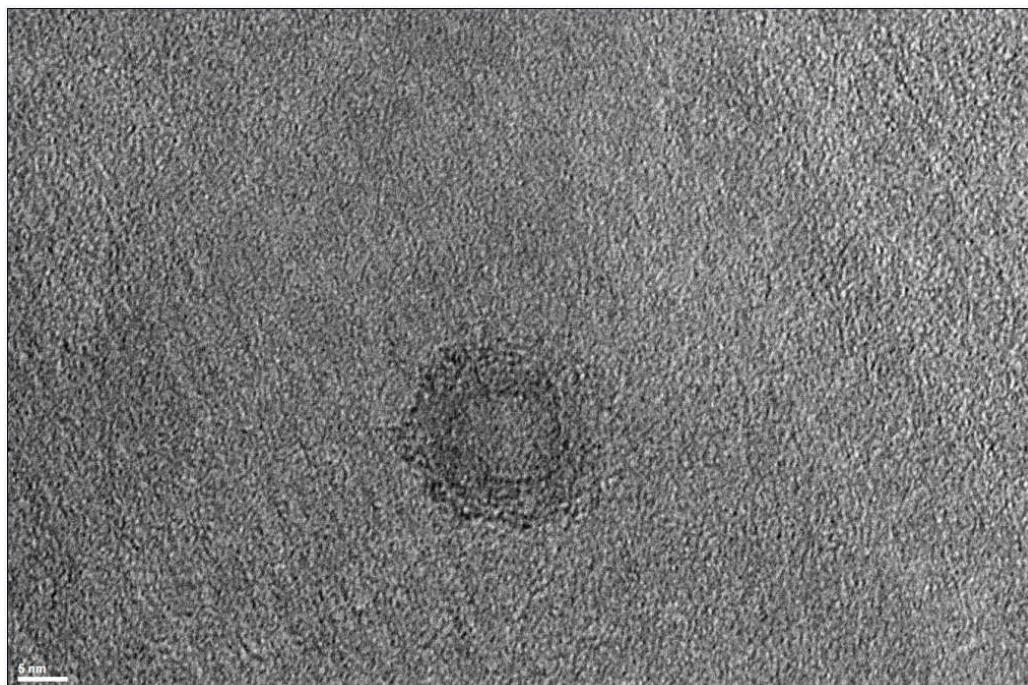
Slika 34: Elektronski posnetek proteina P3-APH-P4 po počasnem ohlajanju iz 70 °C na 20 °C. 150.000 x povečava Koncentracija proteina je 50 µg/ml. Na sliki vidimo strukture, ki bi lahko predstavljale polipeptidno mrežo.



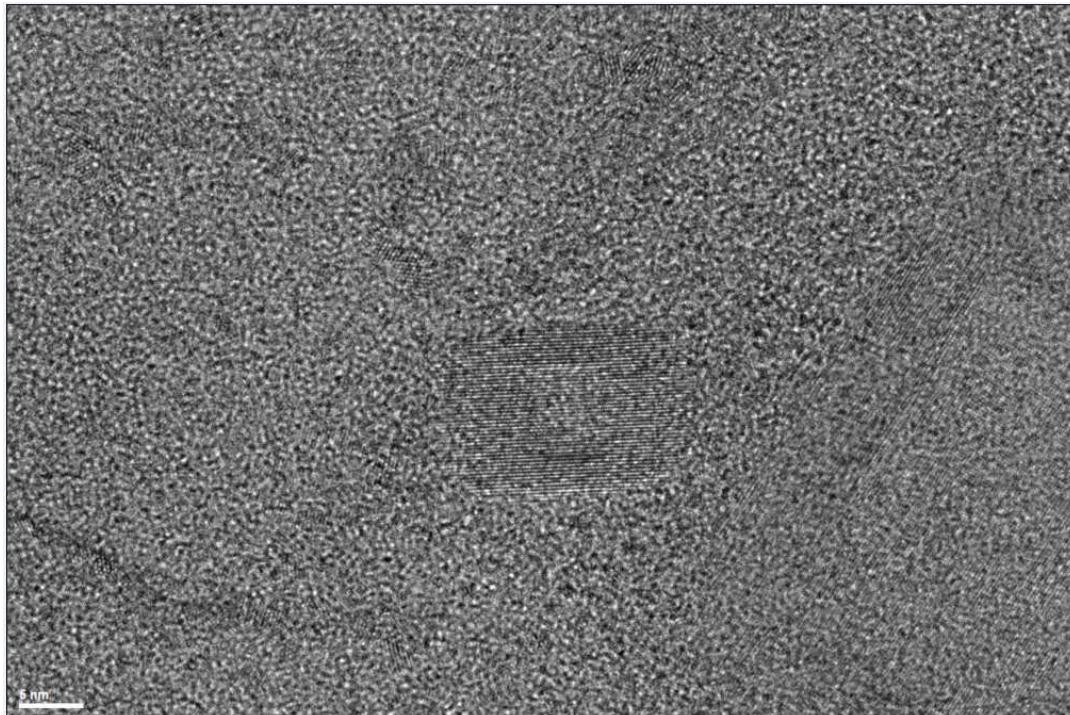
Slika 35: Elektronski posnetek proteina P3-APH-P4 po počasnem ohlajanju iz 70 °C na 20 °C. 250.000 x povečava. Koncentracija proteina je 5 µg/ml Na sliki vidimo strukture, ki bi lahko predstavljale kocke s stranico 5 nm.



Slika 36: Elektronski posnetek proteina P3-APH-P4 po počasnem redčenju denaturanta in gelski filtraciji (drugi vrh, Slika 30). Koncentracija proteina je 5 µg/ml. Senčeno z uranil acetatom. 150.000 x povečava. Na sliki vidimo strukturo, ki bi lahko predstavljala kocko s stranicami 5 nm.



Slika 37: Elektronski posnetek proteina P3-APH-P4 po neskončno dolgemu redčenju denaturanta in gelski filtraciji (drugi vrh, Slika 30). Koncentracija proteina je 5 µg/ml. Senčeno z uranil acetatom. 200.000 x povečava. Na sliki vidimo strukturo, ki bi lahko predstavljala kocko s stranicami 5 nm.

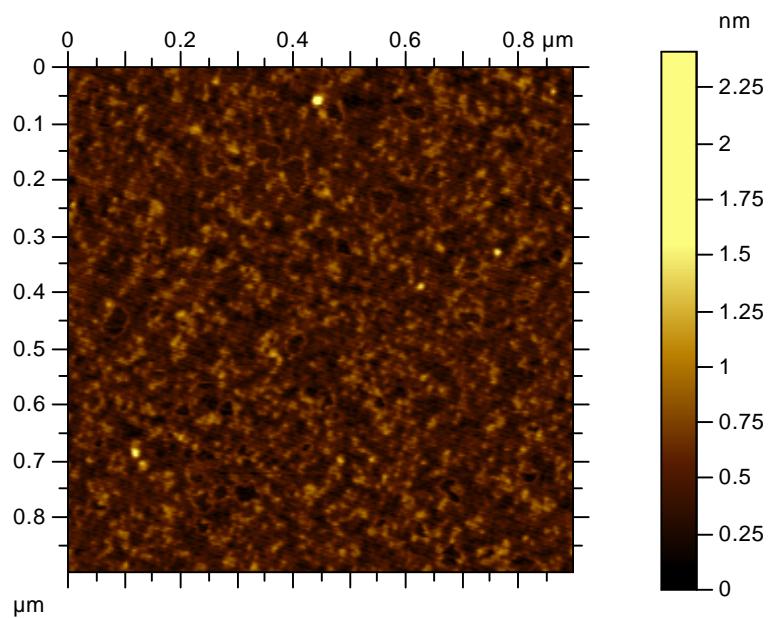


Slika 38: Elektronski posnetek proteina P3-APH-P4 po počasnem redčenju denaturanta in gelski filtraciji (drugi vrh, Slika 30). Koncentracija proteina je 5 µg/ml. Senčeno z uranil acetatom. 250.000 x povečava. Na sliki vidimo strukturo, ki bi lahko predstavljala kocko s stranicami 5 nm.

Slike na transmisijskem mikroskopu so nam pokazale, da lahko po počasnem zvijanju proteinov s počasnim redčenjem denaturanta dobimo mreže s premerom osnovne celice 15 nm (Slika 32, 33), kar se ujema z obliko in velikostjo predpostavljenega modela zlaganja proteina P3-APH-P4 v mrežno strukturo. Z uporabo temperaturne denaturacije pri pripravi vzorca za TEM dobimo agregat v obliki mreže (Slika 34) ali pa pravokotnikov (Slika 35). Če smo kombinirali metodo počasnega zvijanja proteinov s počasnim redčenjem denaturanta in gelsko filtracijo, smo dobili posamezne delce v obliki pravokotnikov (Slika 36, 37, 38). Dimenzijske stranice vseh pravokotnikov so bile okrog 5 nm, kar se sklada z dolžino posameznega viačnega segmenta, ki tvori posamezno stranico.

4.6.4 Mikroskopija na atomsko silo

Vzorce smo po počasnem redčenju denaturanta nanesli na nosilec iz sljude in posušili v atmosferi z dušikom. Posneli smo nekaj aggregatov nanometerskih dimenzij (Slika 39).



Slika 39: AFM posnetek proteina P3-APH-P4 po počasnem redčenju denaturanta. Opazimo lahko nekaj delcev višine do treh nanometrov.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Sintetično proizvedeni materiali na osnovi bioloških sestavnih elementov, kot so aminokisline, imajo velik potencial za aplikacije, kot so dostava zdravil, kemijska kataliza, tkivno inženirstvo, nanosenzorji (Fairman in Akerfeldt, 2005). Doslej so bile na osnovi *de novo* načrtovanih elementov iz obvitih vijačnic pripravljene samo enostavne nanostrukture, kot so fibrile (Pandya in sod., 2000; Potehkin in sod., 2001). Razumevanje interakcij v ovitih vijačnicah pa nam omogoča, da načrtovanje nanostruktur privedemo v bolj kompleksne strukture (Woolfson 2005). V ovitih vijačnicah peptidne vijačnice tvorijo prepletene paralelne ali antiparalelne ovite strukture in imajo heptadno periodičnost, z dimenzijo približno 1 nm (Gurnon in sod., 2003). Specifičnost sestavljanja in stabilnost zagotavljajo hidrofobni ostanki na mestih *a* in *d* ter nabiti ostanki na pozicijah *e* in *g* heptapeptadne ponovitve (Mason, 2007). Po zgledu DNA origami struktur (He in sod., 2008) smo se odločili, da pripravimo samosestavljive urejne strukture (kocke, tetraedri, poliedri, mreže), pri katerih bo osnovno stranico predstavljala obvita vijačnica.

Najkrajša dolžina verige, ki še tvori stabilno obvito vijačnico je tri ali štiri heptade (Lau in sod., 1984, Litowski in sod., 2001). Stabilnost obvitih vijačnic je torej odvisna od interakcij med heptadami, orientacije in dolžine monomerov. Pri načrtovanju sintetičnih peptidov smo si pomagali z algoritmi, ki na osnovi dosedaj zbranih podatkov predvidijo stabilnost obvite vijačnice (Mason in sod., 2007) in zbirkovo podatkov o obvitih vijačnicah CC+ (Testa in sod., 2009).

Na izbiro smo imeli elemente ki tvorijo paralelne homodimere, antiparalelne homodimere in paralelne heterodimere. S topološko analizo možnih kombinacij vijačnih segmentov na polipeptidni verigi smo izbrali zaporedje, ki je sestavljeno iz treh vijačnih segmentov, (stranska dva gradita med seboj paralelne heterodimere in vmesni segment, ki tvori antiparalelne homodimere), kar omogoča nastanek večih dvo- in tridimenzionalnih struktur (heksagonalno mrežo, kocko in tetraeder).

Pripravili smo set ortogonalnih peptidov (P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 in P8), ki tvorijo paralelne heterodimerne obvite vijačnice (pari: P1-P2, P3-P4, P5-P6, P7-P8). Stabilnost vsakega od parov smo predvideli s pomočjo algoritma oblikovanega po vzoru tistega, ki so ga pripravili Hagemann in sod., 2009. Najmanjša napovedana razlika v T_m med najmanj stabilno željeno in najbolj stabilno neželjeno kombinacijo je kar 60°C . Specifičnost parjenja in stabilnost načrtovanih ortogonalnih peptidnih parov je bila tudi eksperimentalno potrjena s sintetičnimi peptidi (Gradišar in Jerala, 2010, članek v recenziji za revijo Journal of peptide science).

Za segmente polipeptidne verige, ki bi lahko tvorila samosestavljive nanostrukture, smo izbrali ortogonalni par P3-P4, ki tvori paralelni heterodimer, in segment APH, ki težki k nastanku antiparalelnih homodimerov.

5.1.1 Priprava vektorskega konstrukta P3-APH-P4

Pripravili smo vektorski konstrukt, ki je vseboval zapis za polipeptid iz treh segmentov, v zaporedju P3-APH-P4, ter zapis za histidinski rep za lažjo izolacijo izraženih proteinov.

Vektor pVIKTOR smo preobilkovali v skladu z BioBrick standardi BBF RCF 37 (Jerala in Benčina, 2009), tako da lahko vanj vstavljammo inserte v poljubni kombinaciji, pri čemer z izbiro ustreznih restrikcijskih encimov med inserti nastajajo zaporedja, ki kodirajo za aminokislini serin in glicin, ti dve pa zaradi svoje majhnosti in nevtralnosti ne vplivata na zvijanje peptida. Ustreznost pripravljenega končnega konstrukta smo potrdili s restrikcijsko analizo, 357 bp (Slika 19), in sekveniranjem (MWG Operon).

5.1.2 Izolacija in identifikacija P3-APH-P4

Konstrukt P3-APH-P4 smo transformirali v celice *E. coli* seva BL21(DE3) pLysS. Sledila je produkcija proteina. Protein se je izražal v netopni frakciji v obliki inkluzijskih teles, zato smo se odločili za izolacijo proteina pod denaturajočimi pogoji. Protein se je slabo vezal na Ni-NTA kolono, saj se je spiral že pri nižjih koncentracijah imidazola, zato smo pri ponovni izolaciji izpustili spiranje z 50 mM imidazolom. Prisotnost polipeptida smo preverili z NaDS-PAGE elektroforezo (Slika 21). Izračunana molska masa za protein P3-

APH-P4 je 15031 Da. Na NaDS-PAGE elektroforeznih gelih pa smo dobili dve lisi, pri velikostih okoli 17 kDa in 20 kDa. Najverjetnejše gre manjšo mobilnost proteina pripisati nepopolni denaturaciji ob prisotnosti NaDS (Robyt, 1990). Sledila je Western prenos in imunodetekcija, ki je dala podobne rezultate kot NaDS-PAGE (Slika 22). Dve proteinski lisi istega proteina na gelu lahko razložimo kot prisotnost monomera in dimera, možno pa je, da so v očiščenem proteinu prisotni njegovi razpadni produkti nižjih molskih mas. Molsko maso proteina smo dodatno potrdili s ESI masno spektroskopijo. Tako določena molska masa se je z izračunano ujemala na 1 Da natančno.

5.1.3 Določanje sekundarne strukture

Rekombinantni protein P3-APH-P4 je oblikovan tako, da posamezni segmenti znotraj polipeptidne verige – ob parjenju z ustreznim segmentom sosednjega polipeptida – tvorijo obvito vijačnico. Le-ta je grajena iz dveh α -vijačnic. S pomočjo CD spektra smo preverili sekundarno strukturo rekombinantnega proteina in nato sklepali, ali tvori ustrezne interakcije, ki vodijo do nastanka obvitih vijačnic.

Meritve CD so dale spektre z lepo razvidnima minimuma pri 208 nm in 220 nm, kar potrjuje prisotnost obvitih vijačnic. Izvedli smo tudi analizo temperaturne stabilnosti proteina. Vzorec smo segrevали s hitrostjo 1°C / min, iz 20°C na 90°C, in spremljali spremembe cirkularnega dikroizma. Meritve so pokazale, da je protein P3-APH-P4 zelo stabilen, saj se do temperature 90°C ni popolnoma denaturiral (Slika 24). Protein smo ohladili nazaj na 20 °C in ponovno posneli CD spekter, ki je bil identičen spektru pred segrevanjem (Slika 24), kar kaže na reverzibilno, a nepopolno denaturacijo. Eliptičnost proteina je sicer z višanjem temperature padala, a pri tem nismo dosegli točke prehoda, pri kateri bi razpadla polovica povezav med verigami v obvitih vijačnicah (Slika 25). Iz naštetege lahko sklepamo, da so povezave med obvitimi vijačnicami zelo stabilne, zato postopna temperaturna denaturacija do 90 °C ni dovolj za prekinitev medmolekulskih interakcij. Da bi dobili sigmoidno krivuljo temperaturne denaturacije, iz katere bi lahko določili temperaturo polovice prehoda, smo ponovili meritve ob prisotnosti 1 M GvdHCl v vzorcu. Pri takšnih pogojih ima protein P3-APH-P4 temperaturo polovice prehoda 62°C. Iz grafa temperaturne denaturacije je razvidno, da eliptičnost pada postopoma, kar kaže na

delno kooperativnost prekinitve medmolekulskih interakcij (Slika 25). Na CD spektru ohlajenega proteina smo opazili, da imata minimuma pri 208 in 222 nm višjo negativno vrednost eliptičnosti kot pred segrevanjem. Sklepamo, da se pri ohlajanju proteina v 1 M GvdHCl uspe spariti večji delež obvitih vijačnic (Slika 26). Protein smo pripravili še v pufru 10 mM HEPES-a pH 7.5 in različnih koncentracijah denaturanta GvdHCl, ter vsakič pomerili eliptičnost pri 222 nm. Točko prevoja, ki pomeni 50 % razvitje proteinov, smo dobili pri 3.5 M GvdHCl (Slika 28).

5.1.4 Določanje velikosti sestavljenih nanostruktur

Osnovni polipeptidni gradnik samosestavljljivih nanostruktur je sestavljen iz treh segmentov, ki so dolgi 5 nm. Glavni dokaz za obstoj samosestavljljivih nanostruktur bi bila zasleditev delcev z velikostjo osnovne stranice 5 nm (kvadrat, kocka, tetraeder) ali heksagonalna mreža z 10 nm premera osnovne celice.

Za gelsko filtracijo smo pripravili vzorec s pomočjo počasnega redčenja denaturanta. Analiza kromatograma po izvedeni gelski filtraciji je pokazala 3 vrhe z delci različnih velikosti. Prvi vrh smo dobili pri času 11,8 minute, ki je tik za izključitvenim volumnom kolone in se ujema z velikostjo standarda Blue dextran (2000 kDa). Drugi vrh je potoval 14,0 minut (velikost okoli 1200 kDa); tretji pa 21,5 minute (delci v njem so manjši od albuminskega standarda 67 kDa in so najverjetneje monomeri (15 kDa) ali dimeri (30 kDa) (Slika 33)).

Gelska filtracija ločuje delce na podlagi velikosti in oblike delcev. Standardi, ki jih uporabljo za določanje molske mase so globularne oblike (García De La Torre in sod., 2000), zato jih ne moremo neposredno primerjati z delci proteina P3-APH-P4, za katere ne poznamo točne oblike v vodnem mediju. Zato smo vrha, ki vsebujeta delce velikosti 2000 in 1200 kDa dodatno preverili z dinamičnim sipanjem svetlobe, ki nam poda približen hidrodinamski radij molekul.

DLS analiza frakcij proteina P3-APH-P4, ločenih z gelsko filtracijo, je pokazala, da so v frakciji, ki je prišla takoj za izključitvenim volumnom pri času 11,8 minute, prisotni delci z velikostjo hidrodinamskega radija velikosti od 22 do 65 nm. V populaciji so prevladovali delci z radijem 33 nm. V frakciji, ki se je izločila iz kolone pri 14,0 minute, smo dobili delce z radijem med 18 in 55 nm. Največji delež delcev je bil velikosti 27 nm.

Rezultati gelske filtracije in dinamičnega sisanja svetlobe nam niso potrdili delcev s stranico velikosti 5 nm. Dobili smo večje aggregate, ki bi lahko bili v obliki heksagonalne mreže ali pa sestavljeni iz več skupkov pravilnih oblik nanostruktur. Mogoče bi bilo smiselno pridobiti strukturne informacije o molekulu P3-APH-P4 s izgradnjo modela, na podlagi katerega bi lahko s pomočjo računalniških orodij napovedali hidrodinamski radij posameznih oblik delcev (Erickson, 2009).

5.1.5 TEM in AFM mikroskopija

S transmisijsko elektronsko mikroskopijo lahko neposredno določimo velikost in obliko opazovanih delcev na nanometrski skali. Ključen korak za uspešno detekcijo nanodelcev je priprava vzorcev, katere smo pripravili na tri različne načine. Za pripravo nanostruktur, katere smo preverili na TEM smo uporabili neskončno dolgo redčenje denaturanta proteina, po kateri smo vzorec še dodatno dializirali, da bi odstranili preostali denaturant. Drug način priprave je enak prvemu, le da smo proteinske delce po dializi ločili z gelsko filtracijo. Pri tretji metodi priprave vzorcev smo uporabili temperaturni gradient za pravilno zvijanje proteinov.

Na mrežicah z vzorci, ki smo jih pripravili s počasnim redčenjem denaturanta, ter mrežicah z vzorci po temperaturnem gradientu smo opazili veliko struktur, ki so bile v obliki urejene mreže, nismo pa našli urejenih tridimenzionalnih struktur.

Na mrežicah z vzorci, ki smo jih pripravili s počasnim redčenjem denaturanta in gelsko filtracijo pa smo v vseh primerih opazili urejene strukture v obliki pravokotnikov, s stranicami dimenzijske velikosti 5 nm. Iz tega lahko sklepamo da urejene heksagonalne mreže nastajajo tako pri počasnem redčenju denaturanta, kot pri temperaturnem gradientu. Teh mrež pa ne najdemo v vzorcih po gelski filtraciji, saj so prevelikih dimenzij in ostanejo

ujete na koloni. Na drugi strani pa smo strukture kock našli samo v vzorcih po gelski filtraciji, saj na ta način ločimo manjše kocke od večjih agregatov in tako postanejo vidne pod elektronskim mikroskopom. Ugotovili smo tudi, da mreže nastajano pri višjih koncentracijah proteina ($50 \mu\text{g/ml}$), tako pri počasnem redčenju denaturanta, kot pri počasnem ohlajanju. Pri nižji koncentraciji $5 \mu\text{g/ml}$ pa dobimo pravokotne strukture (temperaturno ohljanje in gelska filtracija po počasnem redčenju denaturanta). Iz tega lahko sklepamo, da s koncentracijo proteina reguliramo obliko v katero se bodo zvile polipeptidne verige. Ker smo s transmisijskim elektronskim mikroskopom dobili samo dvodimensionalni pogled na strukture, zato smo dodatno uporabili še AFM.

Za nadaljnje preučevanje preučevanje proteinskih nanomaterialov s transmisijskim elektronskim mikroskopom, bi bilo potrebno metodo mikroskopije še dodatno optimizirati, saj se vzorci med mikroskopiranjem močno segrejejo, vakum v miroskopu pa še dodatno popači oblike. Za opazovanje nanostruktur iz DNA so uporabili krioelektronski mikroskop in se takim težavam izognili (He, 2008). Dodatno bi lahko izboljšali slike s programi, ki obdelajo večje število slik in podajo reprezentativno sliko povprečja posnetih vzorcev. Dodatno bi lahko izboljšali zaznavo proteinskih delcev na TEM z vezavo nanodelcev zlata na histidinske repe polipeptidnih verig, ki gradijo pravilne strukture.

Tudi z AFM mikroskopijo smo na vzorcu po počasnem redčenju denaturanta opazili strukture, ki so velike nekaj nanometrov, vendar moramo upoštevati da pri tej metodi opazujemo dehidrirane proteinske strukture, saj vzorce med pripravo za mikroskopijo posušimo.

Dodatno bi lahko uporabili za potrditev prisotnosti urejenih struktur sredstvo za mreženje (BS3, formaldehid), ki bi dodatno okrepilo povezave med polipeptidnimi verigami v nanostrukutrah. Tako stabilizirane strukture bi bile lažje za detekcijo. Druga možnost je uporaba razdeljenega zeleno fluorescirajočega proteina (split GFP). Tega bi namestili na N- in C-terminalni konec fuzijskega proteina P3-APH-P4. Če bi se polipeptidne verige sestavile v predpostavljenou ustreznou strukturo (kocka, mreža, tetraeder), bi C in N-konca sosednjih verig prišla skupaj, kar bi povzročilo fluorescenco sestavljenega GFP proteina.

5.2 ZAKLJUČKI

V diplomskem delu smo želeli pripraviti protein, ki bi bil sposoben samozdruževanja v nanostrukture – kocke, tetraedre in heksagonalne mreže. Pripravili smo protein P3-APH-P4. Zanimalo nas je, ali ta protein dejansko oblikuje predvidene urejene geometrijske oblike. Na podlagi rezultatov smo zaključili:

- Uspešno smo pripravili DNA konstrukt za polipeptid P3-APH-P4
- Pridobili smo polipeptid in njegovo ustrezeno molsko maso potrdili z SDS-PAGE elektroforezo, Western prenosom in imunodetekcijo, ter z analizo ESI masno spektroskopijo.
- Protein tvori zelo stabilne obvite vijačnice z segmenti, ki so za to predvideni.
- P3-APH-P4 se združuje v večje proteinske aggregate.
- Slike z elektronskega transmisijskega mikroskopa je pokazala prisotnost struktur kvadratne oblike, ki bi lahko predstavljale kocke, in strukture v obliki heksagonalne mreže.

6 POVZETEK

Narava nudi številne primere nanostruktur s posebnimi lastnostmi, ki jih proizvajajo živi organizmi in tvorijo samoorganizirane strukture od nano do makroskopskih velikosti. V naravi so za gradnjo večine struktur v uporabi proteini, ker so zelo stabilni in vsebujejo funkcionalne skupine z različnimi lastnostmi. Kompleksne samosestavljive strukture lahko zgradimo iz osnovnih gradnikov. Eden v naravi pogosto uporabljenih gradnikov so obvite vijačnice, kjer peptidne vijačnice tvorijo prepletene paralelne ali antiparalelne obvite vijačnice. Naš namen je bil pripraviti nanostrukture iz polipeptidov. Zato smo zasnovali peptide, ki so sposobni dimerizacije v paralelno heterodimerno obvito vijačnico. Uporabili smo jih za oblikovanje polipeptida, ki je potencialno sposoben samozdruževanja v nanokocke, nano-tetraedre ali heksagonalno mrežo. Polipeptid je bil sestavljen iz treh vijačnih segmentov. Sredinski segment APH tvori antiparalelne homodimere, robna segmenta pa predstavljata načrtovana peptida P3 in P4, ki tvorita paralelne homodimere. Protein smo izražali v *E. coli*, ga izolirali in očistili. S cirkularnim dikroizmom smo dokazali, da protein zavzame predvideno strukturo alfa vijačnice, ki je zelo stabilna in se denaturira reverzibilno. Z gelsko filtracijo smo potrdili nastajanje diskretnih proteinskih agregatov in z dinamičnim sipanjem svetlobe izmerili njihov radij, ki je bil okoli 30 nm. Elektronska transmisijska mikroskopija je potrdila prisotnost struktur v obliki kvadratov in mreže.

7 VIRI

Aggeli A., Bell M, Boden N., Keen J.N., Knowles P.F., McLeish T.C., Pitkeathly M., Radford S.E. 1997. Responsive gels formed by the spontaneous self-assembly of peptides into polymeric betasheet tapes. *Nature*, 386: 259-262

Altman M., Lee P., Rich A., Zhang S. 2000. Conformational behavior of ionicself-complementary peptides. *Protein Science*, 9: 1095–1105

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K. 2002. Short protocols in molecular biology. 5th ed. New York, John Wiley and Sons: 1512 str.

Buzea C., Pacheco I., Robbie K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2: 17–71

Erickson, H. P., 2009. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration and electron microscopy. *Biological Procedures Online*, 11, 1: 32-51

Fairman R., Åkerfeldt K. S., 2005. Peptides as smart materials. *Current Opinion in Structural Biology*, 15, 4: 453-463

García De La Torre J., Huertas M. L., Carrasco B., 2000. Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys J.*, 78, 2: 719–730.

Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A. 1999. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *Methods Mol. Biol.*, 112: 531-52.

Gogotsi Y. 2006. Carbon Nanomaterials. 2nd edition, Philadelphia, CRC Press: 344 str.

Goodman R. P., Heilemann M., Doose S., Erben C. M., Kapanidis A. N., Turberfield R. J. 2004. Reconfigurable, braced, three-dimensional DNA nanostructures. *Nature nanotechnology*, 3: 93-96

Gradišar H., Jerala R. 2010 »Članek v objavi: De novo design of orthogonal coiled-coil peptide pairs for polypeptide origami«. Ljubljana, Kemijski inštitut (osebni vir, avgust 2010)

Gurnon D.G., Whitaker J.A., Oakley M.G. 2003. Design and characterization of a homodimeric antiparallel coiled coil. *Journal of the American Chemical Society*, 125: 7518-7519

Hagemann U.B., Mason J.M., Müller K.M., Arndt K.M. 2009. Selectional and mutational scope of peptides sequestering the Jun-Fos coiled-coil domain. *Journal of Molecular Biology*, 381: 73-88

Hartgerink J.D., Beniash E., Stupp S.I. 2001. Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers. *Science*, 294: 1684-1688

He Y., Ye T., Su M., Zhang C., Ribbe A.E., Jiang W., Mao C. 2008. Hierarchical self-assembly of DNA into symmetric supramolecular polyhedra. *Nature*, 452: 198-202

Ikkala O., ten Brinke, G. 2002 Functional Materials Based on Self-Assembly of Polymeric Supramolecules. *Science*, 295: 2407-2409

Iijima S. 2002. Carbon nanotubes: past, present, and future. *Phys B.*, 323: 1–5

Jerala R., Benčina M. BBF RFC 37: Fusion protein BioBrick assembly standard with optional linker extension. 2009. The BioBricks Foundation (2. sep. 2009).
<http://dspace.mit.edu/bitstream/handle/1721.1/46705/BBFRFC37.pdf?sequence=1> (20. avg. 2010)

Kumar C., 2009. Mixed Metal Nanomaterials. 1st edition. Weinheim. Wiley-VCH: 507 str.

Lau S.Y., Taneja A.K., Hodges R.S. 1984. Synthesis of a model protein of defined secondary and quaternary structure. Effect of chain length on the stabilization and formation of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J. Biol. Chem.* 259, 21: 13253-61

Lehn H. 1988. Perspectives in Supramolecular Chemistry-From Molecular Recognition towards Molecular Information Processing and Self-Organization. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 27, 11: 89–121

Li H., Liu M., Wang L., Nangreave J., Yan H., Liu Y. 2010. Molecular Behavior of DNA Origami in Higher-Order Self-Assembly. *J. Am. Chem. Soc.* 132: 5592-5593

Litowski J.R., Hodges R.S. 2001. Designing heterodimeric two-stranded alpha-helical coiled-coils: the effect of chain length on protein folding, stability and specificity. *J. Pept. Res.* 58, 6: 477-92

Mason J.M., Müller K.M., Arndt K.M. 2007. Considerations in the design and optimization of coiled-coil structures. *Methods in Molecular Biology*, 352: 35-70

Pandya M.J., Spooner G.M., Sunde M., Thorpe J.R., Rodger A., Woolfson D.N. 2000. Sticky-end assembly of a designed peptide fiber provides insight into protein fibrillogenesis. *Biochemistry*, 39, 30: 8728-34

Parikh D., Craver B., Nounu H., N., Fong F., Wolfe J. C. 2008. Nanoscale Pattern Definition on Nonplanar Surfaces Using Ion Beam Proximity Lithography and Conformal Plasma-Deposited Resist. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 17, 3: 735-740

Patolsky F., Weizmann Y., Lioubashevsky. 2002. Au-nanoparticles nanowires based on DNA and polylysine templates. *Angew Chem Int Ed*, 41: 2323-2327

Potekhin S.A., Melnik T.N., Popov V., Lanina N.F., Vazina A.A., Rigler P., Verdini A.S., Corradin G., Kajava A.V. 2001. De novo design of fibrils made of short alpha-helical coiled coil peptides. *Chem. Biol.*, 8: 1025-1032

Raman S., Machaidze G., Lustig A., Aebi U., Burkhard P. 2006. Structure-based design of peptides that self-assemble into regular polyhedral nanoparticles. *Nanomedicine*. 2: 95-102

Robyt, J. F., White, B. J. 1990. *Biochemical Techniques Theory and Practice*. 2nd edition, Illinois, Waveland Press: 314 str.

Rothenmund P. W. K. 2006. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*, 440: 297-302

Ryadnov M.G., Woolfson D.N: 2004. Fiber recruiting peptides: noncovalent decoration of an engineered protein scaffold. *J Am Chem Soc.*, 126: 7454-7455

Sambrook J., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2100 str.

Schwartz J.J., Zhang S. 2000. Peptide-mediated cellular delivery. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, 2: 162-167

Seeman N.C., 1996. Design and Engineering of Nucleic Acid Nanoscale Assemblies. *Current Opinion in Structural Biology*, 6: 519-526

Shetty R.P., Endy D., Knight T. F. 2008. Engineering BioBrick vectors from BioBrick parts. *Journal of Biological Engineering*, 2: 5-17

Sofia S., McCarthy M.B., Gronowicz G., Kaplan D.L. 2001. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 54: 139-148

Testa O.D., Moutevelis E., Woolfson D. 2009. CC+: A relational database of coiled coil structures. *Nucleic acid research*, 37: 315-322

The Qia Expressionist. 2003. 5th edition. Hilden, QIAGEN: 126 str.

Woolfson D.N. 2005. The design of coiled-coil structures and assemblies. *Advances in Protein Chemistry*, 70: 79-112

Yin P., Choi H. M. T., Calvert C. R., Pierce N. A. 2008. Programming biomolecular self-assembly pathways. *Nature*, 451: 318-322

Zhang S. 2003. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nature Biotechnology*, 21, 10: 1171-11

ZAHVALA

*Zahvaljujem se somentorju prof. dr. **Romanu Jerali**, ki mi je omogočil opravljanje diplomskega dela v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu. Iskreno se mu zahvaljujem tudi za številne nasvete in ideje ter za izredno hiter in natančen pregled diplomske naloge.*

Heleni Gradišar se zahvaljujem za nasvete ob pisanju diplomske naloge ter podporo med laboratorijskim delom.

Zahvalil bi se tudi Robertu Bremšaku, Oti Fekonja, Jelki Poha in Ivi Hafner, ki so kot mentorji sodelovali pri projektu iGEM2009 in mi veliko pomagali tudi v času pisanja diplome. Zahvala gre tudi vsem ostalim sodelavcem oddelka L12 na Kemijskem inštitutu, ki so mi bili vedno pripravljeni pomagati.

*Hvala tudi prof. dr. **Petru Mačku** za opravljeno recenzijo diplomske naloge.*

*Zahvala gre celotni **iGEM ekipi**, s katero sem preživel številne lepe trenutke v laboratoriju in še lepša ter nepozabna doživetja izven njega.*

Zahvaljujem se sošolcem in prijateljem, ki ste me spremljali skozi študijska leta, me podpirali in mi polepšali študijsko obdobje, ki je žal prehitro minilo.

*Posebna zahvala pa gre mojim najbližnjim – hvala predvsem punci **Maji**, staršem ter starim staršem, ki me razveseljujete, podpirate in me imate radi. Vesel sem, da vas imam.*