

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Špela MIKLAVIČ

**PRIPRAVA FUZIJSKIH PROTEINOV  
ZA SAMOSESTAVLJIVE MEMBRANE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Špela MIKLAVIČ

**PRIPRAVA FUZIJSKIH PROTEINOV  
ZA SAMOESTAVLJIVE MEMBRANE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**PREPARATION OF FUSION PROTEINS  
FOR SELF-ASSEMBLING MEMBRANES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Laboratorijsko delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je bila imenovana prof. dr. Mojca Narat, za somentorja prof. dr. Roman Jerala in za recenzenta prof. dr. Peter Maček.

Mentorica: prof. dr. Mojca Narat

Somentor: prof. dr. Roman Jerala

Recenzent: prof. dr. Peter Maček

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Mojca Narat

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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:

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

Špela Miklavič

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

ŠD Dn  
DK UDK 577. 21 : 577.122.6 : 620.3 (043) = 163.6  
KG proteini /načrtovani polipeptidi/fuzijski proteini/proteinske domene/polimerizacija / antiparalelni homodimer/ nanostrukture/nanodelci/samosestavljive proteinske membrane/filtracija  
AV MIKLAVIČ, Špela  
SA NARAT, Mojca (mentorica)/JERALA, Roman (somentor)/MAČEK, Peter (recenzent)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije  
LI 2011  
IN PRIPRAVA FUZIJSKIH PROTEINOV ZA SAMOSESTAVLJIVE MEMBRANE  
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
OP XVI, 96 str., 16 pregl., 42 sl., 52 vir.  
IJ sl  
JI sl/an  
AI V živih organizmih proteini preko samozdruževanja tvorijo vrsto kompleksov nano- in mikrometrskih dimenzijs, kar jim omogočajo različne funkcionalne skupine z različnimi lastnostmi. 3D strukturo proteinov določajo motivi znotraj primarne strukture. Danes vemo, kako kombinirati te elemente z namenom priprave rekombinantnih proteinov, ki se lahko potem pod ustreznimi pogoji združujejo v višje strukture in ponovljive motive. Naš cilj je bil načrtovati in proizvesti 3 različice fuzijskih proteinov za pripravo proteinskih membran. Dva sta bila pripravljena s fuzijo tetramerizacijske in dimerizacijske domene. Za tetramerizacijsko domeno smo uporabili zaporedje tetramerizacijske domene tumorsupresorskega proteina p53. Dimerizacijska domena je bila pri enem proteinu umetno načrtovano zaporedje APH, pri drugem pa del proteina Bcr. Tretji rekombinantni protein je predstavljala sama tetramerizacijska domena. Ta je služil za negativno kontrolo. Proteini so bili izraženi v bakteriji *Escherichia coli*, izolirani in očiščeni. Proteinske membrane so bile pripravljene v pufru s samozdruževanjem proteinskih gradnikov na nosilcu med dializo. S filtriranjem delcev nanovelikosti (modrega dekstrana) smo pokazali, da so proteinske membrane del delcev zadržale. S tehniko DLS je bil izmerjen hidrodinamski radij delcev modrega dekstrana, ki je znašal približno 29 nm.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 577. 21 : 577.122.6 : 620.3 (043) = 163.6  
CX proteins/ designed polypeptides/fusion proteins/protein domains/polymerisation/  
antiparallel homodimer/ /nanostructures/nanoparticles/self-assembling protein membranes  
filtration  
AU MIKLAVIČ, Špela  
AA NARAT, Mojca (supervisor)/JERALA, Roman (co-advisor)/MAČEK, Peter (reviewer)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in  
Microbiology  
PY 2011  
TI PREPARATION OF FUSION PROTEINS FOR SELF-ASSEMBLING MEMBRANES  
DT Graduation thesis (University studies)  
NO XVI, 96 p., 16 tab., 42 fig., 52 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB In living organisms, proteins form a broad spectrum of functional nano- to microscale (repetitive) complexes due to many functional groups with various properties that enable them hierarchical self-assembly. Different primary structure motifs and their combinations determine protein 3D structure. We know how to combine primary structure elements in order to prepare recombinant fusion proteins, that can – under proper conditions – build higher complexes or repetitive motifs. Our aim was to design and produce 3 variants of recombinant fusion proteins with predicted interactions among them in order to prepare protein membranes, functioning as filter systems. Two of them proteins were composed of two domains: one tetramerisation and one dimerisation domain. Tetramerisation domain was identical to tetramerisation domain in tumor suppressor factor p53. Dimerisation domain used was designed APH sequence in one case, and taken from Bcr protein in another. The third protein was tetramerisation domain alone, serving as a negative control. Proteins were produced in *Escherichia coli*, isolated and purified. Protein membranes were prepared by self-assembly of protein building blocks on a filter supporter during dialysis. Filtration of nanoparticles (blue dextran) through protein membranes showed that such filter systems partially retain them. Hydrodynamic radius of retained blue dextran particles, measured by DLS, seized around 29 nm.

## KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG.....	XII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XIII
SLOVARČEK.....	XV
<b>1       UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1    NAMEN DELA .....	1
1.2    DELOVNE HIPOTEZE.....	2
<b>2       PREGLED OBJAV.....</b>	<b>2</b>
2.1    NANOTEHNOLOGIJE .....	2
2.2    NANOKONSTRUKTI V SINTEZNI BIOLOGIJI .....	3
<b>2.2.1   Nanokonstrukt iz DNK.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.2   Nanokonstrukt iz polipeptidov in primerjava z nanokonstrukt iz DNK.....</b>	<b>5</b>
2.1    FILTRIRNE MEMBRANE .....	7
2.2    SESTAVNI ELEMENTI .....	10
<b>2.2.1   Protein APH.....</b>	<b>10</b>
<b>2.2.2   Protein Bcr .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.3   Tumor-supresorski protein p53 .....</b>	<b>14</b>
2.3    KAKO SMO PRIPRAVILI SESTAVLJENE PROTEINE .....	16
<b>2.3.1   Načrtovanje nukleotidnih in proteinskih zaporedij.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.2   Protein APH_p53 .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.3   Protein Bcr_p53.....</b>	<b>20</b>
<b>3       MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>21</b>
3.1    MATERIAL .....	21
<b>3.1.1   Laboratorijska oprema.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.2   Bakterijski sevi .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.3   Gojišča .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.4   Plazmidi.....</b>	<b>24</b>
3.1.4.1   Vektor pSB1A2.....	25
3.1.4.2   Vektor pVIKTOR .....	25
3.1.4.3   Vektor pANY .....	27
<b>3.1.5   Kemikalije.....</b>	<b>28</b>

<b>3.1.6</b>	<b>Standardi.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1.7</b>	<b>Protitelesa .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1.8</b>	<b>Raztopine in pufri .....</b>	<b>30</b>
3.2	METODE .....	32
<b>3.2.1</b>	<b>Sterilizacija .....</b>	<b>32</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Molekularno kloniranje.....</b>	<b>32</b>
3.2.2.1	Sintetični oligonukleotidi .....	32
3.2.2.2	Priprava kompetentnih celic.....	32
3.2.2.3	Izolacija plazmidne DNK.....	33
3.2.2.4	Ugotavljanje koncentracije DNK.....	34
3.2.2.5	Cepitev DNK z restriktivnimi encimi.....	34
3.2.2.6	Elektroforeza DNK na agaroznem gelu .....	35
3.2.2.7	Izolacija DNK iz agaroznega gela .....	36
3.2.2.8	Ligacija DNK .....	36
3.2.2.9	Transformacija kompetentnih celic.....	37
3.2.2.10	Restriktivna analiza .....	37
3.2.2.11	Verižna reakcija s polimerazo .....	38
3.2.2.12	Ugotavljanje zaporedja nukleinskih kislin .....	41
<b>3.2.3</b>	<b>Sistem kloniranja .....</b>	<b>42</b>
3.2.3.1	Standard BBF RFC 37 .....	42
3.2.3.2	Priprava zaporedij konstruktov p53, aph_p53 in bcr_p53 .....	45
3.2.3.3	Capljenje vektorja pVIKTOR in vstavljanje zaporedja p53 .....	45
3.2.3.4	Priprava zaporedij aph in bcr ter njuno vstavljanje v vektor pVIKTOR .....	47
3.2.3.5	Sestavljanje končnih konstruktov .....	49
<b>3.2.1</b>	<b>Producija, izolacija in analiza proteinov .....</b>	<b>51</b>
3.2.1.1	Pomembni parametri pridobljenih proteinov .....	51
3.2.1.2	Transformacija DNK v producijski sev in priprava gojišč .....	52
3.2.1.3	Bioprocес in indukcija sinteze proteinov .....	52
3.2.1.4	Liza in soniciranje celic .....	53
3.2.1.5	Spiranje inkluzijskih teles in raztavljanje v pufru A .....	53
3.2.1.6	Kelatna kromatografija za izolacijo proteinov iz inkluzijskih teles .....	54
3.2.1.7	Izolacija proteinov iz supernatanta .....	55
3.2.1.8	Dializa56	
3.2.1.9	Koncentriranje proteinov .....	57
3.2.1.10	Merjenje koncentracije proteinov v vzorcu .....	57
3.2.1.11	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE) .....	58
3.2.1.12	Barvanje proteinov z barvilm Coomassie modrim .....	59
3.2.1.13	Odtis western.....	59

3.2.1.14	Barvanje proteinov z barvilo Ponceau S .....	61
3.2.1.15	Priprava proteinskih membran na nosilcu.....	61
3.2.1.16	Metoda preverjanje velikosti por proteinskih membran .....	65
3.2.1.17	Postopek filtriranje modrega dekstrana skozi proteinske membrane.....	67
3.2.1.18	Ugotavljanje strukture proteinov z merjenjem cirkularnega dikroizma .....	68
3.2.1.19	Dinamično sisanje svetlobe (DLS) .....	68
<b>3.2.2</b>	<b>Metode statistične obdelave podatkov.....</b>	<b>69</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI Z RAZPRAVO.....</b>	<b>72</b>
4.1	REZULTATI KLONIRANJA .....	72
4.2	PRODUKCIJA PROTEINSKIH GRADNIKOV .....	72
<b>4.2.1</b>	<b>Analiza inkluzijskih telesc in supernatanta .....</b>	<b>72</b>
4.2.1.1	Protein APH_p53 .....	73
4.2.1.2	Protein Bcr_p53 .....	75
4.2.1.3	Tetramerizacijska domena proteina p53 .....	76
<b>4.2.2</b>	<b>Čiščenje inkluzijskih telesc ali supernatanta in analiza proteinov.....</b>	<b>77</b>
4.2.2.1	Protein APH_p53 .....	77
4.2.2.2	Protein Bcr_p53 .....	80
4.2.2.3	Protein p53 .....	82
4.3	ANALIZA PROTEINSKIH MEMBRAN NA NOSILCU Z BARVANJEM S PONCEAUJEVIM BARVILOM .....	82
4.4	MERJENJE CIRKULARNEGA DIKROIZMA.....	84
4.1	DINAMIČNO SIPANJE SVETLOBE (DLS) VZORCA MODREGA .....	
4.2	DEKSTRANA .....	85
4.2	REZULTATI STATISTIČNE OBDELAVE PODATKOV .....	86
<b>4.2.1</b>	<b>Preverjanje ničelne in alternativne hipoteze .....</b>	<b>86</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Grafična predstavitev rezultatov .....</b>	<b>87</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Obravnava rezultatov .....</b>	<b>88</b>
<b>5</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>89</b>
5.1	Perspektive .....	90
<b>6</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>91</b>
	<b>ZAHVALA</b>	
	<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Aminokislinsko zaporedje proteina APH in mesto vsake aminokisline v vsaki heptadi. Z rdečo barvo so označeni kisli, z modro bazni in z zeleno hidrofobni ostanki aminokislin (Gurnon in sod., 2003) .....	11
Preglednica 2: Aminokislinsko zaporedje veče – dimerizacijske domene Bcr, ki smo jo uporabili kot del konstrukta Bcr_p53 in mesto vsake aminokisline v vsaki heptadi.....	14
Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema .....	21
Preglednica 4: Uporabljeni bakterijski sevi.....	22
Preglednica 5: Uporabljena gojišča.....	23
Preglednica 6: Uporabljeni standardi, komercialno dostopni kompleti, encimi in druge kemikalije.....	28
Preglednica 7: Uporabljeni standardi. ....	29
Preglednica 8: Uporabljena protitelesa pri odtisu western. ....	29
Preglednica 9: Uporabljene raztopine in pufri ter njihova sestava.....	30
Preglednica 10: Zaporedja načrtovanih začetnih oligonukleotidov in glavni parametri. ....	40
Preglednica 11: Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje z DNK-polimerazo Platinum <i>Pfx</i> .....	41
Preglednica 12: Temperaturni program pomnoževanja z DNK-polimerazo Platinum <i>Pfx</i> . ....	41
Preglednica 13: Uporabljeni restrikcijski encimi in njihova mesta cepitve. ....	45
Preglednica 14: Proteinski konstrukti, njihova aminokislinska zaporedja in drugi pomembni parametri. ....	51
Preglednica 15: Sestava 15 % (v/v) ločitvenega NaDS gela. Količine so navedene za pripravo dveh gelov. ....	58
Preglednica 16: Sestava 4 % (v/v) koncentracijskega NaDS gela. Količine so navedene za pripravo dveh gelov.....	58

## KAZALO SLIK

Slika 1: DNK origami (Rothemund in sod., 2006).....	5
Slika 2: Primeri različnih peptidnih materialov (Zhang, 2003).....	6
Slika 3: Postopek priprave filtrirne membrane iz feritina in nanovlaken (levo), slika SEM filtrirne membrane (desno) (Peng in sod., 2009).....	9
Slika 4: Združevanje amiloidogenih proteinov v fibrile in nalaganje fibril v proteinski film z nematično strukturo (Knowles in sod., 2010).....	10
Slika 5: Shematični prikaz antiparalelnega homodimera dveh proteinov APH s pripadajočo preglednico, ki prikazuje, katere aminokisline se med stikom proteinov v antiparalelni orientaciji med seboj približajo (Gurnon in sod., 2003).....	11
Slika 6: Prikaz struktur antiparalelno orientiranih dveh vijačnic homodimera APH (Gurnon in sod., 2003)..	12
Slika 7: Dimer proteina Bcr, pri katerem se med seboj povežeta večji domeni (pričazani kot daljši vijčnici na sredini), ki tvorita antiparalelni homodimer (a) in tetramer proteina Bcr, ki nastane z združitvijo dveh dimerov (b) (Taylor in Keating, 2005). ..	13
Slika 8: Štiri tetramerizacijske domene proteina p53, povezane v tetramer (Mateu in Fersht, 1998).....	15
Slika 9: Tetramerizacijska domena p53, dimerizacijski domeni APH in Bcr ter sestavljena konstrukta Bcr_p53 in APH_p53. ....	16
Slika 10: Povezovanje štirih enakih proteinov preko tetramerizacijskih domen proteina p53 in dimerizacija dveh proteinov preko dimerizacijskih domen: Bcr ali APH.....	17
Slika 11: Povezovanje fuzijskih proteinov Bcr_p53 ali APH_p53 v mrežo. ....	18
Slika 12: Shematski prikaz fuzijskega proteina APH_p53.....	19
Slika 13: Shematski prikaz fuzijskega proteina Bcr_p53.....	20
Slika 14: Shematski prikaz vektorja pSB1A2 (Registry of standard biological parts, 2004). ..	26
Slika 15: Shema vstavljenega naročenega sintetičnega zaporedja v vektorju pANY. ....	27
Slika 16: Nastanek povezovalnega dela med izbranimi insertoma, kot je opisano za standard BBF RFC 37 (Jerala in Benčina, 2009).....	42
Slika 17: Splošni princip sestavljanja »front« insertov in »front« vektorjev, tako da med vstavljenima insertoma nastane povezovalni del.....	44
Slika 18: Izrezovanje domene ccdB iz vektorja pVIKTOR, priprava pomnožka tetramerizacijske domene gena p53 za ligacijo v pVIKTOR in ligacija p53 v pVIKTOR. pVIKTOR z vstavljenim zaporedjem p53 predstavlja enega izmed treh končnih konstruktorov za kasnejšo proizvodnjo proteinov.....	46
Slika 19: Izrez sintetično pripravljenih zaporedij aph in bcr iz vektorja pANY ter priprava nastalih dveh fragmentov za vkloniranje v pVIKTOR.....	47

Slika 20: Ligacija zaporedij <i>aph</i> in <i>bcr</i> v vektor pVIKTOR.....	48
Slika 21: Rezanje zaporedij <i>aph</i> in <i>bcr</i> iz pVIKTOR-ja kot »front« inserta ter rezanje pVIKTOR-ja z vstavljenim zaporedjem za tetramerizacijsko domeno gena <i>p53</i> kot »front« vektor.....	49
Slika 22: Ligacija zaporedij <i>aph</i> in <i>bcr</i> v obliki »front« insertov v pVIKTOR z zaporedjem za tetramerizacijsko domeno gena <i>p53</i> , rezanim kot »front« vektor.....	50
Slika 23: Shematski prikaz nosilca – filtrirnega papirja. Pore s premerom 22 µm so prikazane kot beli krogi (a) in nosilec, prekrit s proteinsko mrežo (b). .....	62
Slika 24: Shematski prikaz dializne posode z vključenim mešanjem in pokončno vstavljenimi dializnimi cevkami, ki so s stiščki ločene v prekate.....	62
Slika 25: Fotografija dializne posode z vključenim mešanjem in pokončno vstavljenimi dializnimi cevkami, ki so s stiščki ločene v prekate.....	63
Slika 26: Shematski prikaz dializne posode brez mešanja in s vodoravno vstavljenou dializno cevjo, ki je s stiščki ločena v prekate.....	63
Slika 27: Fotografija dializne posode brez mešanja in z vodoravno vstavljenou dializno cevjo, ki je s stiščki ločena v prekate.....	64
Slika 28: Shematski prikaz nosilca, neprekritega in prekritega s proteinsko membrano ter filtracije delcev nanovelikosti.....	65
Slika 29: Shematski prikaz filtrirne naprave za filtriranje delcev nanovelikosti skozi proteinsko membrano na nosilcu .....	66
Slika 30: Značilne oblike krivulj za sekundarne strukture proteinov, pridobljenih z merjenjem cirkularnega dikroizma.....	68
Slika 31: Ugotavljanje prisotnosti proteina APH_p53 na 15 % poliakrilamidnem gelu po barvanju s Comassie modrim (levo in na sredini) in z western odtisom (desno).....	74
Slika 32: Ugotavljanje prisotnosti proteina Bcr_p53 na 15 % poliakrilamidnem gelu po barvanju s Comassie modrim (levo) in z western odtisom (desno).....	75
Slika 33: Ugotavljanje prisotnosti proteina p53 na 15 % poliakrilamidnem gelu po barvanju s Comassie modrim (levo in na sredini) in z western odtisom (desno).....	76
Slika 34: Nitrocelulozna membrana po odtisu western proteina APH_p53.....	78
Slika 35: Shematski prikaz dializne posode z vodoravno postavljenou dializno cevjo. Dializa je potekala brez mešanja.....	79
Slika 36: Fotografija dializne cevi z oborjenim proteinom APH_p53 v dializni posodi od zgoraj (a) ter vzeta iz dializne posode (b). Vidne so kosmičaste strukture oborjenih proteinov.....	79
Slika 37: Ugotavljanje prisotnosti proteina Bcr_p53 na 15 % poliakrilamidnem gelu po barvanju s Comassie modrim.....	80
Slika 38: Fotografija dializne cevi z oborjenim proteinom Bcr_p53 v dializni posodi od zgoraj (a) ter vzeta iz dializne posode (b). Vidne so plahtice oborjenih proteinov.....	81

Slika 39: Filtrirni papirji z vezanimi proteini Bcr_p53, APH_p53 in domeno tet proteina p53 po dializi proteinov v različnih koncentracijah in barvanju s Ponceaujevim barvilm.....	82
Slika 40: CD spekter proteina APH_p53 v vodi MQ.....	84
Slika 41: Številčna porazdelitev delcev glede na velikost, ugotovljena z metodo DLS.....	85
Slika 42: Stolpčni diagram končnih rezultatov, ki prikazuje koncentracije delcev nanovelikosti pred in po filtriranjih skozi različne proteinske membrane.....	87

## KAZALO PRILOG

- Priloga A: Nukleotidna zaporedja začetnih konstruktov
- Priloga B: Nukleotidna zaporedja končnih konstruktov
- Priloga C: Meritve absorbance modrega dekstrana pred in po filtriranju skozi nosilni filter in skozi proteinske membrane
- Priloga D: Umeritvena krivulja za modri dekstran
- Priloga E: Izračunane koncentracije modrega dekstrana pred in po filtriranju skozi nosilni filter in skozi proteinske membrane
- Priloga F: Statistična obdelava podatkov in preverjanje ničelne domneve s pomočjo t-statistik

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

%	odstotki
% (v/v)	volumski delež topnjeca v volumnu celotne raztopine (angl. volume/volume), pri čemer po dogovoru 1 % (w/v) predstavlja 1 mL topnjeca v 100 mL raztopine
% (w/v)	masni delež topnjeca v volumnu celotne raztopine (angl. weight/volume), pri čemer po dogovoru 1 % (w/v) predstavlja 1g topnjeca v 100 mL raztopine
Ab	protitelo (angl. antibody)
AK	aminokislina
Amp	ampicilin
angl.	angleško
APS	amonijev persulfat
Ax	absorbanca pri valovni dolžini x
bp	bazni pari
BSA	goveji serumski albumin
CD	circularni dikroizem
CPI	mešanica proteaznih inhibitorjev (angl. protease inhibitor cocktail)
Da, kDa	dalton, kilodalton: enota za molekulsko maso
DLS	dinamično sisanje svetlobe (angl. dynamic light scattering)
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DOC	deoksiholična kislina (5b-holan-24-ojska kislina-3a,12a-diol)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	komercialno dostopen substrat za peroksidazo
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina
GvdHCl	gvanidinijev hidroklorid
Hepes	2-[4-(2-hidroksietil) piperazin-1-il]-etansulfonska kislina
His6	histidinski rep sestavljen iz šestih zaporednih histidinov
IgG1	podrazred serumskih imunoglobulinov IgG
IPTG	izopropil β-D-1-tiogalaktopyranozid
IT	inkluzijska telesca
LB	Luria-Bertanijevo gojišče
LBA	Luria-Bertanijevo gojišče z ampicilinom
MQ	zelo čista in deionizirana voda, imenovana tudi Milli-Q
MWCO	mera za velikost por filtra ali dializne cevi, izražena v enotah molske mase molekul (dalton), ki jih filter oziroma dializna cev še zadrži, imenovana tudi izključitvena molska masa (angl. molecular weight cut-off)

NaDS	natrijev dodecil sulfat
nt	nukleotid
obr.	obrat
OD <sub>600</sub>	optična gostota pri 600 nm
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza (angl. polyacrylamide gel electrophoresis)
PEI	polietilenimin
pH	negativni desetiški logaritem koncentracije oksonijevih ionov
RBS	mesto za vezavo ribosoma
RNK	ribonukleinska kislina
SEM	vrstična elektronska mikroskopija
STOP	stop kodon
TAE	pufer Tris, ocetna kislina in EDTA (angl. Tris-acetate-EDTA)
TBS	pufer Tris s soljo (angl. Tris buffered saline)
TEMED	N,N,N,N -tetrametil-etylendiamin
TP53	tumor protein p53
vrt.	vrtljaj
vrt./min	vrtljaji na minuto

## SLOVARČEK

$\beta$ -laktamaza	encim, ki posreduje odpornost proti $\beta$ -laktamskim antibiotikom (kot je penicilin)
<i>aph</i> , APH	<i>aph</i> označuje nukleotidno zaporedje gena za protein APH <sup>1</sup>
<i>bcr</i> , Bcr	<i>bcr</i> označuje nukleotidno zaporedje gena za protein Bcr
<i>ccdB</i>	nukleotidno zaporedje naravnega citotoksičnega gena bakterij <i>Escherichia coli</i> , ki prepreči rast bakterij zaradi vezave proteina CcdB na girazo. S tem prepreči njeno katalitično aktivnost (Smith in Maxwell, 2006).
ligacija samega vektorja	ligacija, ki ima vlogo negativne kontrole, izvedemo pa jo samo s cepljenim vektorjem, brez dodanega inserta (angl. backligation)
pBLA	promotor za izražanje odpornosti proti ampicilinu v vektorju pSB1A2 (Registry of standard biological parts, 2004)
pMB1	mesto začetka podvojevanja v vektorju pANY
pUC	mesto začetka podvojevanja v vektorju pSB1A2
poliklonsko mesto	kratko zaporedje DNK, ki vsebuje do 20 prepoznavnih mest za restriktivne encime; ena izmed značilnosti vektorjev. Restriktivna mesta, ki so v poliklonskem mestu, se v preostalem delu vektorja ne ponavljajo (angl. multiple cloning site, MCS, polylinker)
promotor T7	evolucijsko zelo ohranjeno zaporedje močnega promotorja bakteriofaga T7, na katerega se veže RNK polimeraza T7, ki je v bakteriofagu T7 odgovorna za izražanje 80 % genoma (Ikeda in Richardson, 1986).
<i>p53</i> , p53	<i>p53</i> označuje nukleotidno zaporedje gena za protein p53

<sup>1</sup> Praviloma se ime polipeptida ali proteina piše pokončno s prvo veliko in ostalimi malimi črkami, vendar so avtorji (Gurnon in sod., 2003) protein poimenovali s samimi velikimi črkami, zato smo ta zapis upoštevali.

selekcijski označevalec	gen z izbranim zapisom, ki omogoča umetno selekcijo klonov bakterij, običajno je to gen za odpornost proti izbranemu antibiotiku.
terminator T7	nukleotidni zapis bakteriofaga T7, ki kodira zaporedje RNK, tako da to po prepisu tvori zanko, ki ji sledi 6 uracilov, kar ustavi prepisovanje T7 RNK polimeraze za zadnjim uracilom in povzroči njen sprostitev (He in sod., 1998; Macdonald in sod. 1994)
vektor	rekombinantni DNK plazmid, ki se v molekularni biologiji uporablja za vnos in prenos genskega materiala med organizmi. Vsak vektor vsebuje mesto začetka podvojevanja, poliklonsko mesto in selekcijski označevalec.

## 1 UVOD

Danes že uporabljajo mnogo vrst ultrafiltrirnih sistemov, narejenih iz različnih vrst polimerov. V literaturi doslej še niso opisali sistemov, kjer bi kot gradnike uporabili samosestavljive polipeptide. Proteinski filtrirni sistemi bi imeli določene prednosti v primerjavi z zanimimi neproteinskimi sistemi. Tipi gradnikov – polipeptidov – bi glede na obliko in lastnost lahko določali lastnosti polipeptidne membrane: membrane bi imele večjo ali manjšo obstojnost, velikosti in kemijske lastnosti polipeptidnih membran bi spremenjali s spremenjanjem velikosti gradnikov, membrane bi lahko s spremenjanjem lastnosti gradnika prilagajali različnim funkcijam.

### 1.1 NAMEN DELA

Nameni diplomske naloge so bili naslednji:

- z delovnim mikroorganizmom *Escherichia coli* pripraviti zadostne količine treh proteinov: dveh fuzijskih proteinov, sestavljenih iz dveh oligomerizacijskih domen, tetramerizacijske in dimerizacijske, ter enega proteina, ki bi služil za negativno kontrolo in bi bil sestavljen samo iz tetramerizacijske domene. Prvo domeno fuzijskega proteina bi predstavljala tetramerizacijska domena tumor-supresorskega proteina p53 (v nadaljevanju okrajšano imenovana kot domena tet proteina p53), drugo pa dimerizacijska domena, ki naj bi z istovrstno domeno drugega proteina tvorila antiparalelni homodimer v obliki obvite vijačnice. Fuzijska proteina bi se torej razlikovala v dimerizacijski domeni: pri prvem primeru bi jo predstavljalo zaporedje APH (Gurnon in sod., 2003), pri drugem pa zaporedje BCR (Taylor in Keating, 2005);
- z analitskimi metodami (NaDS-PAGE, barvanjem proteinov s Comassie modrim in odtisom western) pokazati, da se fuzijski proteini sintetizirajo v dovolj čisti obliki in zadostni količini v obliki inkluzijskih teles;
- z merjenjem cirkularnega dikroizma pokazati, da dimerizacijske domene tvorijo alfa vijačnice;
- z metodo ponovnega zvijanja gradnikov v ustreznem pufru na nosilcu pridobiti polipeptidne membrane;
- z barvanjem po Ponceauju pokazati, da so po zvitju polipeptidi prisotni na nosilcu;
- preveriti prepustnost membran, pripravljenih iz dveh različnih fuzijskih proteinov za delce nano velikosti (npr. modri dekstran).

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Zastavili smo si naslednje hipoteze:

- s kloniranjem in sestavljanjem ustreznih zaporedij DNK je mogoče pripraviti fuzijske proteine iz dveh različnih funkcionalnih domen (dimerizacijske in tetramerizacijske), ki se bodo ob ustreznih pogojih predvidljivo samosestavili v dvodimenzionalno mrežo s porami definirane velikosti;
- da se fuzijski proteini sintetizirajo v dovolj čisti obliki in zadostni količini v obliki inkluzijskih teles, bomo lahko pokazali z analitskimi metodami (NaDS-PAGE, odtisom western, čiščenjem proteinov na koloni Ni-NTA, barvanjem proteinov s Comassie modrim in Ponceaujevim barvilm);
- proteinske membrane, pripravljene iz polipeptidnih gradnikov, bodo imele pore nanodimensij, ki ne bodo prepuščale nanodelcev;
- predvidevamo, da samo s tetramerizacijsko domeno (negativna kontrola), ki bo sestavni del obeh fuzijskih proteinov, ne bo mogoče ustvariti samosestavljuive membrane, ki bi zadržala izbrane delce nanometrskej velikosti.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 NANOTEHNOLOGIJE

V zadnjih letih je na znanstvenem področju opazen porast zanimanja za odkrivanje in razvoj materialov z lastnostma samosestavljanja in dobro urejene mikrostrukture. Področje **nanotehnologij** obsega raziskovanje makromorfoloških lastnosti materialov, predvsem tistih, ki izvirajo iz značilnosti posameznih gradnikov, njihovo načrtvano izgradnjo in manipulacije - vse na ravni nanometrskih velikosti. Z izrazom nanotehnologije označujemo tudi proces oblikovanja idej, načrtovanja, sinteze in uporabne aplikativnosti proizvodov, hkrati pa razumevanje in raziskovanje njihovih fizikalnih, kemijskih in bioloških lastnosti na makro- in mikronivoju. V vsakdanjem življenju nanomateriali postajajo vse pomembnejši in so široko uporabljeni na področjih kozmetike, tekstilne industrije, izdelave maziv, sončnih celic in drugod, tudi v medicini (Buzea in sod., 2007).

Kot predpona se beseda **nano** pogosto porablja v sestavljenih izrazih sodobnih znanosti. Ideja nanotehnologij ni nova, vendar se je izraz uveljavil leta 1959, ko je bilo na srečanju

ameriškega združenja fizikov prvič javno predstavljena misel o možnosti sestavljanja posameznih atomov.

Nanometer je metrična dolžinska enota, ki označuje bilijoninko metra. Danes se predpona *nano* uporablja za opisovanje objektov, sistemov in pojavov, katerih karakteristične lastnosti izvirajo iz strukturnih elementov nanometrskih dimenzij. Za razliko od izraza **mikro**, ki v grobem označuje karkoli zelo majhnega, je pri besedi nano poudarek na atomskih strukturah, ki imajo za posledico fenomene, ki jih opazuje nanoznanost. Z izrazom **nanoskala** običajno označujemo velikostno območje, manjše od desetine mikrometra, vendar se izraz uporablja tudi v primerih, ko so objekti manjši od mikrometra. Imenujemo jih **nanodelci**, tiste, ki so večji od enega mikrometra, pa **mikrodelci** (Buzea in sod., 2007).

V fiziki **nanomateriale** predstavljajo predvsem nanokristali kovin, polprevodnikov in različnih oksidov z zanimivimi in uporabnimi mehanskimi, električnimi, magnetnimi, optičnimi, kemijskimi in drugimi lastnostmi, v sintezni biologiji pa so gradniki biološke molekule, kot so lipidi, nukleinske kisline in proteini in jih zato imenujemo (**molekularni**) **biomateriali**; mnogi raje uporabljo izraz bionanomateriali. V nadaljevanju bomo obravnavali le biomateriale, kot jih pojmuje sintezna biologija.

## 2.2 NANOKONSTRUKTI V SINTEZNI BIOLOGIJI

Sintezna biologija je hitro razvijajoča se znanost, ki se je razširila v multidisciplinarno področje, zanimivo za različna področja naravoslovnih znanosti. V grobem ima dva osnovna cilja: razumevanje obstoječih bioloških sistemov in proizvodnja novih s točno določenimi funkcijami. Osredotoča se na biološke komponente sistemov, zato so zanje osnovni gradniki aminokisline, nukleinske kisline, sladkorji in lipidi. Prva višja raven kompleksnosti so t. i. **tektoni**. To so strukture, zgrajene iz kombiniranih osnovnih gradnikov, ki že nosijo informacijo za naslednjo stopnjo združevanja in urejanja. Drugače bi jih lahko opisali kot programirane molekularne komponente nanometrskih dimenzij. Primer tektona na ravni nukleinskih kislin je kratek načrtovan oligonukleotid, na ravni aminokislín je to polipeptid z načrtovano strukturo alfa ali beta, ki že s svojo zgradbo napoveduje, kakšna bo višja ureditev v kombinaciji z drugimi tektoni. Naslednja višja ureditev so **samosestavljeni enoti**, ki se združujejo v **funkcionalne enote** in nazadnje tvorijo **kompleksne sisteme**. Vse to omogoča rekombinantna DNK tehnologija (Channon in sod., 2008).

Ključna pri nastajanju višjih struktur sta molekularna komplementarnosti in strukturalna kompatibilnost, tako da lahko preko šibkih nekovalentnih interakcij (vodikovih, ionskih in

Van der Waalsovih vezi ter hidrofobnih in hidrofilnih interakcij), pride do samozdruževanja bioloških gradnikov. Te interakcije so vsaka zase nesignifikantne, v kombinacijah pa vsaka doprinese del, zato imajo skupaj opazen učinek in omogočijo samozdruževanje. V naravi je to vsakdanji in za življenje neobhoden pojav (Zhang, 2003).

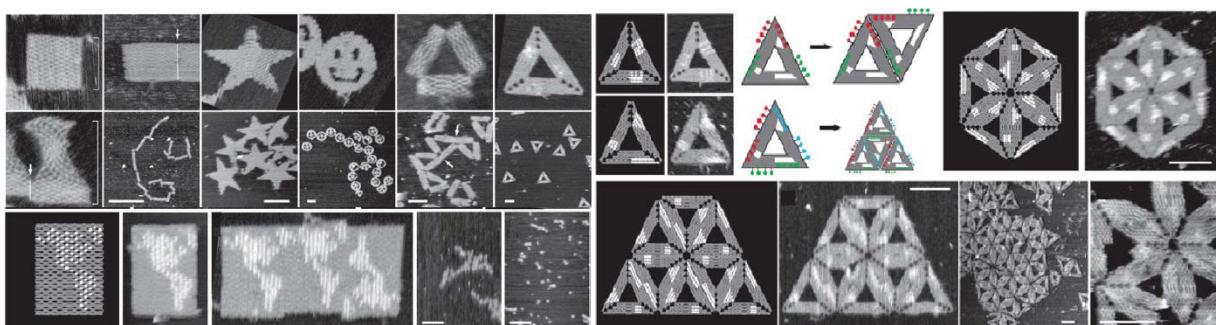
Vendar pa so znanstveniki v zadnjih letih od preučevanja naravnih molekul in višjih kompleksnih struktur stopili korak dlje in iz (spremenjenih) delov ali povsem umetno načrtovanih bioloških molekul pripravljajo številne gradnike – nanodelce – ki se sami sestavljajo v višje strukture. Za izgradnjo molekularnih nanomaterialov se izkorišča lastnost samosestavljanja. Pri izgradnji se uporabljata dva pristopa: »z vrha navzdol« (angl. top-down) in »od spodaj navzgor« (angl. bottom-up). Pri prvem se kompleksne strukture razgradi na njihove osnovne komponente. Drugi pristop je temu nasproten in obravnava sestavljanje molekul eno za drugo (v nekaterih primerih tudi samo atomov), tako da iz njih nastanejo višje molekulske strukture. Drugi pristop se zdi obetavnejši, vendar zahteva poglobljeno razumevanje struktur posameznih molekul in njihovo dinamiko združevanja.

V nadaljevanju sledi kratka predstavitev nekaterih pomembnih znanstvenih dosežkov na področju načrtovanega oblikovanja nanomaterialov iz molekul DNK in polipeptidov.

### 2.2.1 Nanokonstrukti iz DNK

Znanstvenikom je od 90-ih let 20. stoletja dalje uspelo pripraviti različne dvo- in tridimenzionalne konstrukte z uporabo nukleinskih kislin, ki bi lahko v prihodnje našli pomembno mesto uporabnosti na področjih elektronike, senzorjev, medicine in drugih. Načrtovanje temelji na poznavanju dinamike združevanja in zakonitostih povezovanja baznih parov. Takšni konstrukti v naravi sami od sebe ne nastajajo.

Sinteza umetnih nukleotidnih verig je enostavna in cenovno nezahtevna, zato bi lahko bile nanostrukturi iz DNK primerne za uporabo kot ogrodje za anorganske delce (Patolsky in sod., 2002) pa tudi za sestavljanje proteinov (Kuzyk in sod., 2009). Pripravili so že objekte različnih oblik: samosestavljive nanocevke, ki bi lahko bile z vezanimi kovinami osnova za nanovezje (Liu in sod., 2003). V ta namen so raziskovali pogoje, pri katerih bi lahko na DNK vezali čim več nanodelcev zlata (Hurst in sod., 2006), poleg tega pa še celo vrsto poljubnih origamijev (Rothemund, 2006; Goodman in sod., 2004), tridimenzionalnih (He in sod., 2008) in periodičnih planarnih oblik (Li in sod., 2010). Slika 1 prikazuje nekaj takšnih konstruktorov.



Slika 1: DNK origami (Rothemund in sod., 2006).

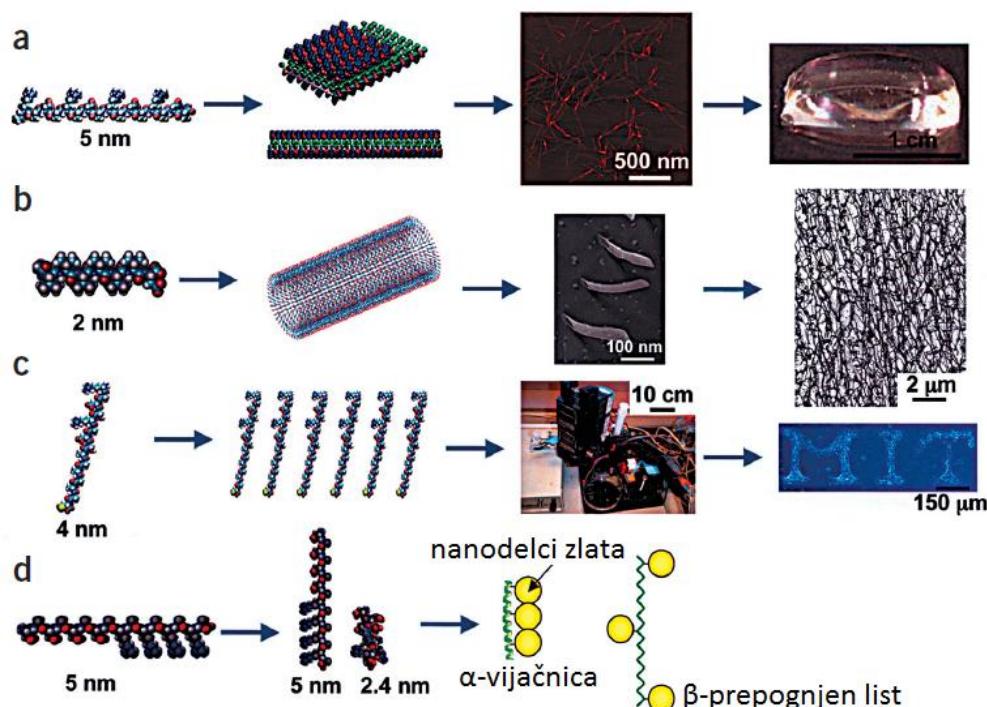
### 2.2.2 Nanokonstrukti iz polipeptidov in primerjava z nanokonstrukti iz DNK

Polipeptidi in proteini so za razliko od DNK strukturno stabilnejši in imajo tudi različne vrste stranskih funkcionalnih skupin, ki omogočajo medsebojne interakcije in katalitično aktivnost. Sestavljeni so iz dvajsetih različnih aminokislin z različnimi kemijskimi lastnostmi, medtem ko molekule DNK le iz štirih različnih nukleotidov. Pri polipeptidih je zato mnogo več možnosti in kombinacij za oblikovanje sekundarne strukture, hkrati pa je tudi napovedovanje interakcij med stranskimi skupinami bistveno težje. V naravi imajo molekule DNK vlogo shranjevanja in prenašanja dednih informacij, polipeptidi in proteini pa tvorijo celo vrsto funkcionalnih »naprav«. Slednji omogočajo tudi vezavo ogljikovih hidratov, lipidov, nukleinskih kislin in kovinskih ionov. Oboji se lahko zvijejo v tridimenzionalne strukture. Programiranje nanokonstruktov iz DNK je preprostejše, saj se upošteva le Watson-Crickove bazne bare, pri polipeptidih pa je informacija o strukturi mnogo bolj kompleksna. Velika prednost polipeptidnih nanodelcev je v tem, da jih lahko enostavno pridelamo v velikih količinah znotraj programiranih celic.

Vsa informacija za tridimenzionalno strukturo polipeptidov je kodirana v njihovem zaporedju, zato se razvite verige v ustremnem okolju v milisekundah spontano in pravilno zvijejo v definirano prostorsko obliko. Proses zvijanja je napovedljiv, ponovljiv in robusten, saj eno polipeptidno zaporedje vodi v eno stabilno tridimenzionalno strukturo ali pa je nabor možnih zvitij zelo omejen. Tako strukture še naprej tvorijo višje organizirane komplekse s potencialnimi različnimi biološkimi funkcijami. Res pa je, da so včasih za to potrebni še dodatni neproteinski kofaktorji in drugi proteini, ki pomagajo pri pravilnem zvijanju novih proteinov (Bromley in sod., 2008).

Polipeptidne strukturne elemente ali njihove dele v sintezni biologiji vzamemo iz narave, jih spremojamo, med seboj kombiniramo ali povsem na novo načrtujemo.

Tako so na primer z metodo rekombinantne DNK pripravili proteine, ki v odvisnosti od vrednosti pH in temperature reverzibilno prehajajo med viskozno in gel obliko. Pod izbranimi pogoji se tvorijo agregati obvitih vijačnic in s tem nastane tridimenzionalna polimerna mreža (Petka in sod., 1998). Zanimivo je področje načrtovanja polipeptidnih nitastih struktur. Tako so Papapostolou in sod. (2007) načrtovali pare polipeptidov, ki se med seboj združujejo in v večjih skupinah v vodi tvorijo debelejša proteinska vlakna, daljša od 10 µm. Opazili so visoko stopnjo urejenosti teh struktur na ravni nanodimensij (nelomljene ponavljače vzorce so opazili na območju več kot 50 µm). Takšno strukturno urejenost tudi sicer opazimo v naravnih vlknastih materialih. Prostori med vlakni naj bi se dalo napovedljivo spremenjati z izbiro ustrezne dolžine osnovnih polipeptidov.



Slika 2: Primeri različnih peptidnih materialov (Zhang, 2003): nanovlakna, ki tvorijo hidrogel (a); nanocevke in nanovezikli iz peptidov z lastnostjo surfaktantov (b); peptidi za vezavo na površino s funkcionalno in pritrjevalno domeno, ki sta ločeni s povezovalnim delom. Z njimi je mogoče kot s črnilom »tiskati« objekte na mikrometrskem velikostnem območju (c); preklopni peptidi, ki lahko pod vplivom zunanjega dražljaja spreminja svojo sekundarno strukturo. Z vezavo kovinskih nanodelcev bi iz njih lahko oblikovali nanostikala (d).

Kljub temu, da je tvorba urejenih struktur v naravi zelo razširjena, predstavlja znanstvenikom in inženirjem velik izziv. V prihodnosti bo raziskovanje verjetno usmerjeno predvsem v odkrivanje, selekcijo in razvoj peptidov, zbranih v vedno obsežnejših podatkovnih zbirkah.

## 2.1 FILTRIRNE MEMBRANE

V literaturi doslej ni zaslediti, da bi znanstvenikom uspelo pripraviti filtrirni sistem iz samih polipeptidnih ali proteinskih gradnikov. Vemo, da je hitrost filtracije delcev premosorazmerna razliki tlakov na eni in drugi strani membrane ter obratno sorazmerna debelini membrane. Odvisna je tudi od zamreženosti in drugih lastnosti membrane. Uporabni filtrirni sistemi naj bi bili zmožni vzdržati velike pretoke raztopin in visoke tlake. Običajno so ti pogoji izpolnjeni s tem, da so komercialni filtrirni sistemi debeline nekaj deset do sto nanometrov.

Večina praktično uporabnih materialov sestoji iz molekul, ki so med seboj ireverzibilno povezane s kovalentnimi vezmi. Na drugi strani so materiali, katerih osnovne gradnike povezujejo nekovalentne interakcije. Pri slednjih obstaja možnost reverzibilne izgradnje in razgradnje, ki bi imela svoje prednosti pri proizvodnji, obdelavi in enostavnejšem racikliranju. Vendar pa so sistemi, temelječi na nekovalentnih interakcijah, relativno krhki, zato mnogokrat v praktičnosti za prvimi precej zaostajajo (Ulbricht, 2006).

Ločevanje delcev glede na velikost ima pomembno mesto tako v procesu bazičnih raziskav, kot tudi v aplikativnih namenih, kajti velikost, kemična čistost in sisanje delcev nanovelikosti so ključne za ugotavljanje njihovih optičnih, elektronskih in kemijskih lastnosti. To velja predvsem za ločevanje kovinskih in polprevodnih nanodelcev, vendar se tehnik takšnega ločevanja obširno poslužujemo tudi na področju ločevanja organskih molekul, predvsem sintetičnih in bioloških polimerov. Ločitvene tehnike obsegajo različne metode kromatografij, precipitacij, gelskih elektroforez in ultracentrifugiranje. Z njimi lahko delce nanometrskih velikosti uspešno ločujemo, vendar so metode časovno in cenovno lahko zahtevne.

Filtracija – delno lahko tudi kot alternativa zgornjim metodam – zahteva majhne volumne vzorcev in je primerna za ločevanje in čiščenje različnih nanodelcev (Huang in sod., 2006; Sweeney in sod., 2006; Akthakul in sod., 2005). Njena uporaba je možna tudi na industrijski ravni. Dosedaj so bili vsi komercialno dostopni filtracijski sistemi narejeni bodisi iz polimerov ali keramike. Polimerni filtracijski sistemi imajo poleg samega filtriranja (uporabni so za namene ločevanja plinskih mešanic, reverzno osmozo, nano-, ultra- in mikrofiltracijo tekočin) tudi druge funkcije, na primer katalitične. Načrtovana produkcija polimerov omogoča

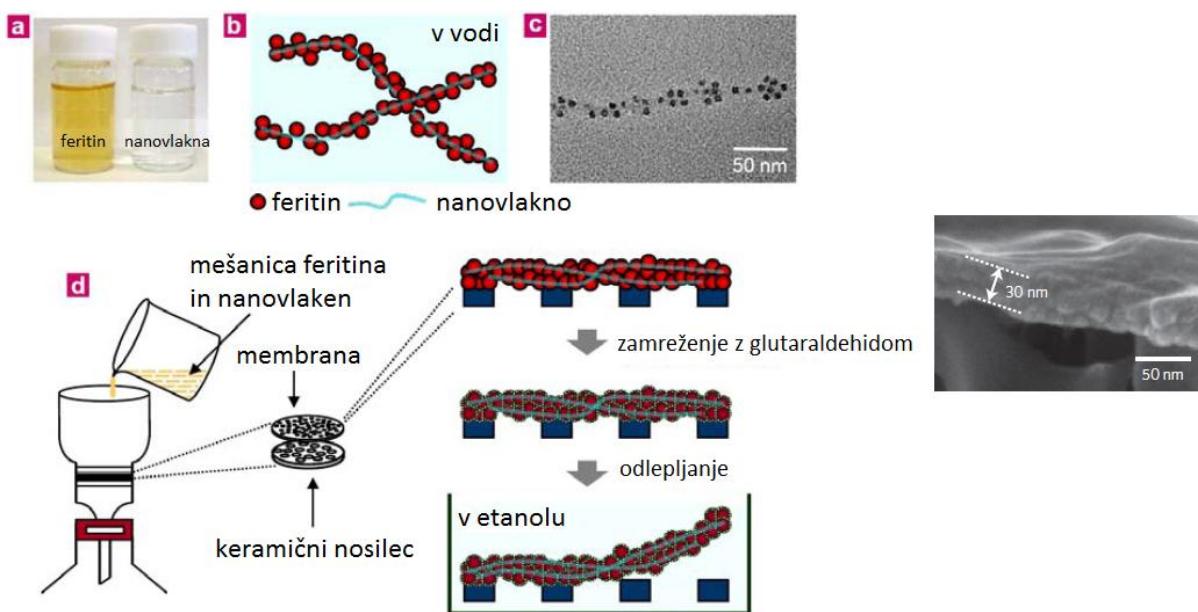
njihovo dobro definirano strukturo, ključna pri vseh pa je lastnost samozdruževanja makromolekulskeih gradnikov (Ulbricht, 2006).

Zelo pomembni in uporabni so postopki ultrafiltriranja skozi porozne membrane z namenom pridobivanja čiste pitne vode iz podtalnice in površinskih voda, za dializo krvi in v prehrambeni industriji (Shannon in sod., 2008). Membrane za reverzno osmozo se uporablajo za pridobivanje pitne vode iz morske, za koncentriranje mleka, sladkih sokov in drugih živilskih izdelkov. Nanofiltracijske membrane imajo nekatere lastnosti ultrafiltrirnih membran in hkrati membran za reverzno osmozo, saj ne prepuščajo multivalentnih ionov in majhnih organskih molekul, zato so uporabne za mehčanje vode in odstranjevanje nekaterih mikroonesnaževalcev iz odpadnih vod (Peng in sod., 2009).

Izziv je torej pripraviti filtrirne sisteme z vsemi prednostmi, ki jih prinese osnovanje na nekovalentnih interakcijah, ki bodo dovolj robustni, da bo njihova struktura prenesla obrmenitve materiala med pretokom raztopine tudi pri povišanih tlakih in da bo velikost por ohranjena.

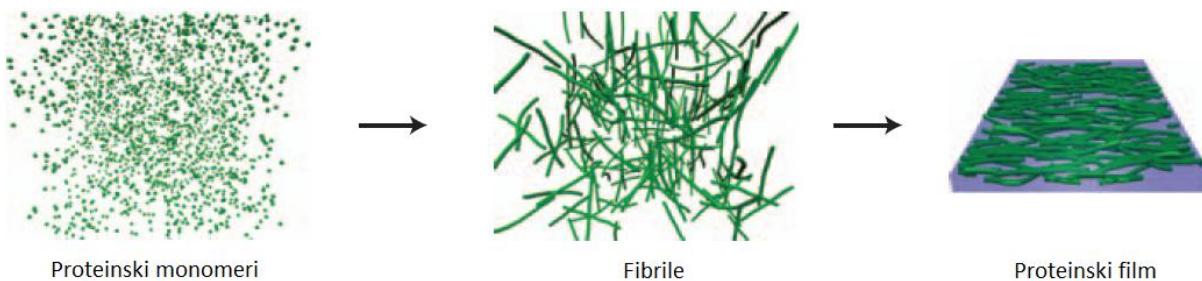
Kriagu in sod. (2010) je uspelo pripraviti nekovalentne membrane iz gradnikov PP2b (kompleksna organska molekula) v mešanici vode in tetrahidrofurana. Sistem se je kljub nekovalentnim interakcijam med gradniki izkazal za dovolj mehansko robustnega.

Peng in sod. (2009) so pripravili filtrirni sistem na osnovi proteinov (izbrali so konjski vranični feritin), ki so jih vezali na nanovlakna kadmijevega hidroksida in zamrežili z glutaraldehidom, tako da je bil premer por na koncu manjši od 2,2 nm (slika 3). Z njimi so uspešno filtrirali vodne raztopine pri bistveno višjih tlakih, kot jih zdržijo uporabljeni komercialni sistemi. Pokazali so, da manjše molekule (urea) prehajajo skozi, večje (protoporfirin) pa ne.



Slika 3: Postopek priprave filtrirne membrane iz feritina in nanovlaken (levo), slika SEM filtrirne membrane (desno) (Peng in sod., 2009).

Knowles in sod. (2010) pa so iz amiloidogenih proteinov pripravili samostoječe proteinske filme makroskopske velikosti. Amiloidogeni proteini so polipeptidne molekule, ki se združujejo v agregate, v katerih prevladujejo strukture beta. Sprva so te proteine raziskovali v povezavi z različnimi bolezenskimi stanji pri človeku (Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen), kasneje so jih našli v ovojih nekaterih bakterij, pomembrno vlogo imajo tudi pri epigenetskem dedovanju. Tvorijo makroskopsko zelo urejeno fibrilarno strukturo na nano- in mikrometrski skali. Vendar tudi nekateri proteini, ki jim niso podobni ne po aminokislinskem zaporedju ne po strukturi, lahko tvorijo fibrilarne agregate. Omenjeni avtorji so iz amiloidogenih proteinov pripravili samostoječe proteinske filme v dveh korakih: po združevanju monomernih proteinov v zelo stabilne in rigidne fibrile je sledilo nalaganje fibril na površino, tako da je nastala tanka plast ali film, struktura se je ohranila tudi po sušenju. Če se je film tvoril v prisotnosti polietilen glikola, so se fibrile v filmu uredile nematično (slika 4).



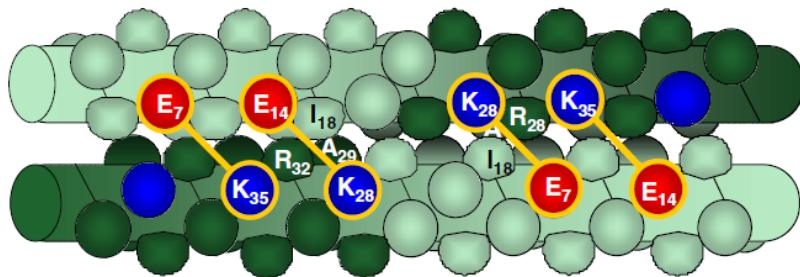
Slika 4: Združevanje amiloidogenih proteinov v fibrile in nalaganje fibril v proteinski film z nematično strukturo (Knowles in sod., 2010).

## 2.2 SESTAVNI ELEMENTI

### 2.2.1 Protein APH

Protein APH (Gurnon in sod., 2003) v enem izmed naših konstruktov predstavlja proteinsko domeno, preko katere lahko osnovni gradniki dimerizirajo. Protein APH ima umetno načrtovano zaporedje, tako da s sebi enako molekulo tvori stabilno, homodimerno, antiparalelno obvito viačnico. Pred načrtovanjem te molekule ni bila poznana nobena naravno obstoječa molekula s tovrstnimi lastnostmi, za fuzijo proteinov so uspešno uporabljali le domene naravnih proteinov, ki tvorijo paralelne homodimere. Za mnoge umetno načrtovane proteine, ki naj bi tvorili obvite viačnice, velja, da se v gostiteljskih celicah sintetizirajo v majhnih količinah ali pa se sploh ne. To ne drži za protein APH, ki so ga uspešno proizvedli v bakterijah *Escherichia coli*. Z merjenjem cirkularnega dikroizma in drugimi metodami so potrdili, da tvori viačni homodimer.

APH sestavlja šest heptad aminokislin. Želeno antiparalelno orientacijo so avtorji dosegli z uvedbo glutamata (Glu, E) na mestih *e* in *g* N-konca ter lizina (Lys, K) na enakih mestih C-konca proteina. Tako protein vsebuje osem aminokislin, ki so ugodne za vzpostavitev antiparalelne usmeritve, in hkrati osem takšnih, ki so neugodne za paralelno usmeritev. Poleg tega so na mestih *a* in *d* levcini (Leu, L) in alanini (Ala, A), tako da se v antiparalelnih viačnicah približajo, kar ugodno prispeva k tvorbi antiparalelne orientacije (slika 5).



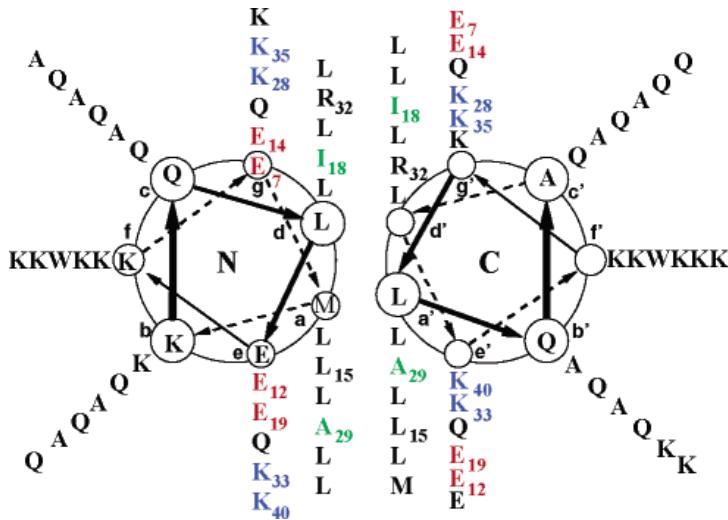
e - e'	g - g'	a - d'	d - a'
E <sub>12</sub> - K <sub>40'</sub>	E <sub>7</sub> - K <sub>35'</sub>	A <sub>29</sub> - I <sub>18'</sub>	I <sub>18</sub> - A <sub>29'</sub>
E <sub>19</sub> - K <sub>33'</sub>	E <sub>14</sub> - K <sub>28'</sub>	L <sub>15</sub> - R <sub>32'</sub>	R <sub>32</sub> - L <sub>15'</sub>
K <sub>33</sub> - E <sub>19'</sub>	K <sub>28</sub> - E <sub>14'</sub>		
K <sub>40</sub> - E <sub>12'</sub>	K <sub>35</sub> - E <sub>7'</sub>		

Slika 5: Shematični prikaz antiparalelnega homodimera dveh proteinov APH s pripadajočo preglednico, ki prikazuje, katere aminokisline se med stikom proteinov v antiparalelni orientaciji med seboj približajo (Gurnon in sod., 2003).

Aminokislinsko zaporedje proteina APH je prikazano v preglednici 1. Nad vsako aminokislino v zaporedju je pripisano mesto (a, b, c, d, e, f ali g), ki ustreza mestu posamezne aminokisline znotraj heptade. Ena heptada aminokislin predstavlja en zavoj.

Preglednica 1: Aminokislinsko zaporedje proteina APH in mesto vsake aminokisline v vsaki heptadi. Z rdečo barvo so označeni kisli, z modro bazični in z zeleno hidrofobni ostanki aminokislin (Gurnon in sod., 2003).

Mesto v heptadi	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdefg
AK zaporedje APH	MKQLEKE	LKQLEKE	LQA <b>I</b> E <b>K</b> Q	LAQL <b>Q</b> W <b>K</b>	<b>A</b> Q <b>A</b> R <b>K</b> KK	LAQL <b>K</b> KK



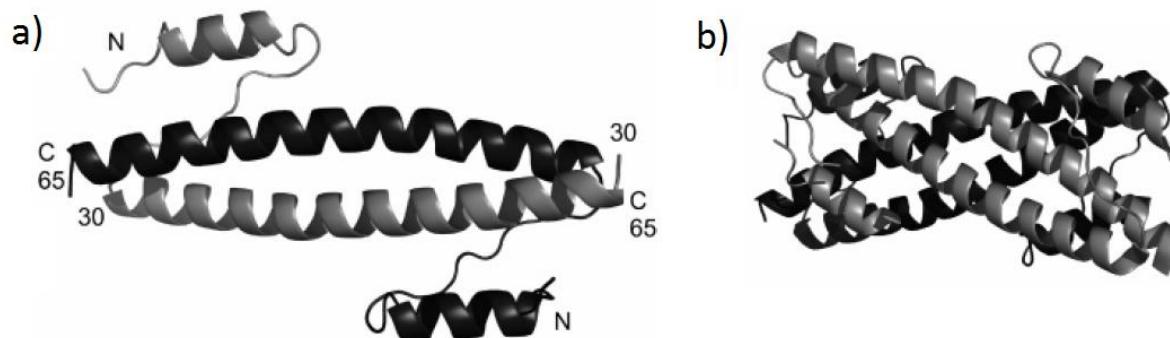
Slika 6: Prikaz struktur antiparalelno orientiranih dveh vijačnic homodimera APH (Gurnon in sod., 2003). Leva vijačnica je prikazana z N-konca, desna pa s C-konca. Z rdečo barvo so tako kot v preglednici 1 označeni kisli, z modro bazični in z zeleno hidrofobni ostanki aminokislin.

Da bi dokazali, da omenjeni protein tvori antiparalelni homodimer, ne pa paralelnega, so avtorji pripravili še dva konstrukta. Prvega je predstavljal protein APH z dodanimi tremi aminokislinami na C-koncu (APH-C), drugega pa enak protein z dodanimi aminokislinami na N-koncu (APH-N). Zadnja med dodanimi tremi aminokislinami je bila v obeh primerih cistein, ki je predstavljal skrajno aminokislino. Ob zračni oksidaciji so se proteini preko cisteinskih mostičkov med seboj povezali, tako da so nastali dimeri dveh vrst: po dva proteina APH, med seboj povezana preko svojih C-koncev (APH-CC), ter po dva proteina APH, med seboj povezana prvi preko N-, drugi pa preko C-konca (APH- NC). S kemično denaturacijo in drugimi metodami so pokazali, da je antiparalelni protein APH-NC bistveno stabilnejši od paralelnega peptida APH-CC, saj tvori znotrajmolekulske antiparalelni homodimer. Proteini APH-CC namesto da bi tvorili znotrajmolekulske paralelne homodimere, tvorijo medmolekulske antiparalelne homodimere. To kaže na močno preferenco teh proteinov do tvorbe antiparalelnih homodimerov, zato avtorji menijo, da bi ti proteini lahko bili zelo uporabni kot domene v fuzijskih proteinih, ki bi usmerjali njihovo združevanje.

## 2.2.2 Protein Bcr

Protein Bcr v naravi predstavlja oligomerizacijsko domeno onkoproteina Bcr-Abl, katerega produkcija je bila opažena pri bolnikih z nekaterimi levkemijami. Onkprotein Bcr-Abl se začne sintetizirati po zamenjavi delov kromosomov 9 in 22, pri kateri pride do recipročne premestitve genov *bcr* in *abl*. Prej ločena gena se nato združita, njun skupni produkt pa je fuzijski protein Bcr-Abl. Znano je, da domena Bcr izraža serinsko in treoninsko kinazno aktivnost, igra pomembno vlogo pri vezavi na F-aktin in vpliva na funkcijo domene Abl v fuzijskem proteinu Bcr-Abl. Bcr zaradi svoje vloge predstavlja obetavno tarčno mesto za razvoj zdravil (McWhirter in sod., 1993).

Po dve domeni Bcr tvorita obvito vijačnico v obliki antiparalelnega homodimera. Taylor in Keating (2005) sta pokazala, kako aminokislinsko zaporedje proteina Bcr narekuje specifičnost vezave. Naravni protein je sestavljen iz dveh domen. Večja obsega 36 aminokislinskih ostankov in se s sebi enako poveže v dimer (antiparalelna obvita vijačnica), dva takšna dimera pa se med seboj povežeta, tako da nastane tetramer (slika 7). Manjša domena, ki ima vlogo križnega povezovanja (angl. swap domain), tudi tvori krajšo vijačnico. Domeni sta med seboj povezani s povezovalnim delom (angl. linker).



Slika 7: Dimer proteina Bcr, pri katerem se med seboj povežeta večji domeni (prikazani kot daljši vijčnici na sredini), ki tvorita antiparalelni homodimer (a) in tetramer proteina Bcr, ki nastane z združitvijo dveh dimerov (b) (Taylor in Keating, 2005).

Ugotovili so, da je samo struktura večje domene že sama po sebi takšna, da določa antiparalelno orientacijo in specifičnost dimerizacije in da pri tem manjša domena in povezovalno zaporedje nimata vloge.

Taylor in Keating (2005) sta v poskusih uporabljala večjo domeno proteina Bcr, ki sta jo na različne načine modificirala, brez povezovalnega zaporedja in manjše domene. Tudi mi smo kot del našega konstrukta Bcr\_p53 za del Bcr uporabili le 36 aminokislinskih ostankov dolgo večjo domeno naravnega proteina Bcr (preglednica 2). V naslednjih poglavjih je zato v tem kontekstu pod oznako proteinski del Bcr ali nukleotidno zaporedje *bcr* mišljena le večja domena naravnega zaporedja za protein Bcr.

Preglednica 2: Aminokislinsko zaporedje veče – dimerizacijske domene Bcr, ki smo jo uporabili kot del konstrukta Bcr\_p53 in mesto vsake aminokisline v vsaki heptadi.

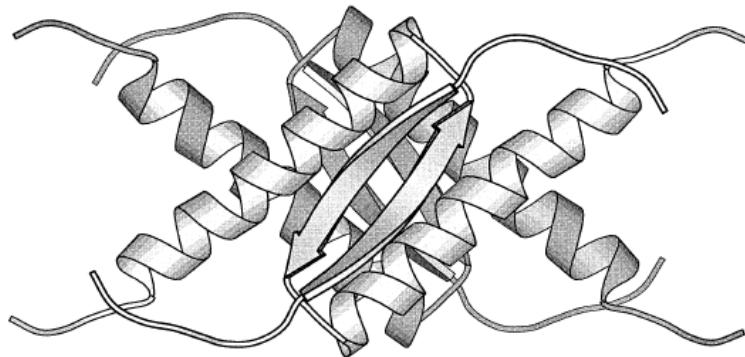
Mesto v heptadi	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdefg	abcdefg
AK zaporedje Bcr	DIEQE	LERAKAS	IRRLEQE	VNQERSR	MAYLQTL	LAK

### 2.2.3 Tumor-supresorski protein p53

Gen *TP53* zapisuje jedrni fosfoprotein p53, ki obsega 393 aminokislinskih ostankov. Pojavlja se v dveh konformacijskih oblikah: ena ima nizko, druga pa visoko afiniteto do vezave na specifično mesto na DNK. Najdemo ga v mnogoceličnih organizmih. Njegova produkcija je vezana na stresne dejavnike, vključen je v kontrolo celičnega cikla, apoptoze, senescence, popravljanje DNK, pri ustavitevi rasti celic in nekaterih metabolnih procesih. Pomembno vlogo ima pri preprečevanju nastanka rakastih celic, zato pravimo, da ima tumor-supresorsko vlogo, saj pripomore k preprečevanju nastanka mutacij v genomih. Sestavlja ga več domen, ki imajo vloge pri aktivaciji prepisa drugih genov, vezave na DNK in oligomerizacije. Mutacije v genu *TP53* lahko zmanjšajo ali preprečijo vezavno sposobnost proteina p53 na DNK, kar pogosto vodi v rakaste spremembe celic (NCBI, 2011).

V raztopini proteini p53 tvorijo homotetramere, za kar je odgovorna ena izmed domen in sicer tetramerizacijska domena, imenovana tudi domena tet. Ta ima med vsemi ostalimi domenami največji delež alfa vijačnic. Odvzemanje aminokislin z obeh koncev tetramerizacijske domene zmanjša tvorbo tetramerov, prav tako ima podoben učinek zamenjava alanina (Ala, A) v tej domeni z drugimi aminokisinami (Sakamoto in sod., 1994).

Prostorska struktura tetramerizacijske domene je znana, sestavljena je iz antiparalelnega traku beta, ki obsega aminokislinske ostanke 326-333, glicina (Gly, G) na mestu 334, ki omogoča pregib, ter alfa vijačnice, ki obsega aminokisline med mestoma 335 in 355. Tetramer, ki ga tvorijo štiri tetramerizacijske domene, je opisan kot dimer dveh dimerov. Vsakega izmed dveh dimerov tvori antiparalelni trak beta in dve antiparalelni alfa vijačnici. Dimera sta v tetrameru vezana pravokotno en na drugega (Johnson in Fersht, 1995).



Slika 8: Štiri tetramerizacijske domene proteina p53, povezane v tetramer (Mateu in Fersht, 1998). V ospredju sta dve tetramerizacijski domeni združeni v dimer, prav tako drugi dve v ozadju.

Mateu in sod. (1999) so pokazali, da se med seboj najprej povežeta po dve tetramerizacijski domeni in tvorita visoko strukturirani prehodni dimerni intermedijat. Dva takšna intermedijata se šele nato povežeta v tetramer, pri čemer je v tetrameru tvorjenih le del tistih vezi, ki so bile prisotne v dimernem intermedijatu, na račun tega pa se med seboj trdno povežeta dimera.

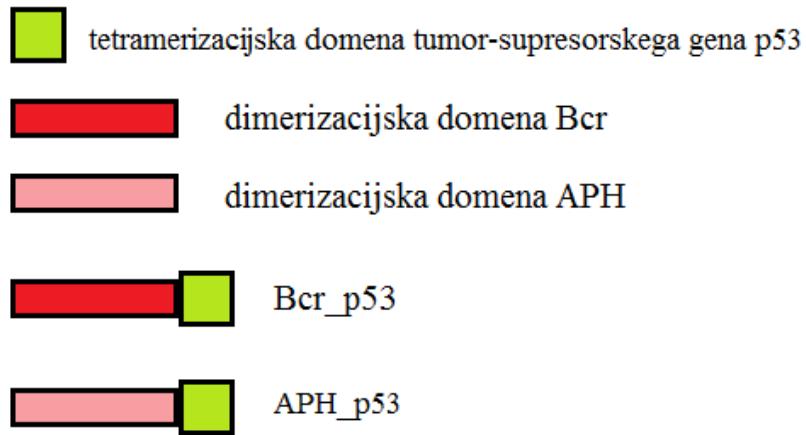
Glavne pri stabilizaciji tetramera so hidrofobne interakcije stranskih verig aminokislinskih ostankov v jedru tetramera, ki ga tvorijo trakovi beta in alfa vijačnice, k stabilnosti pa pripomorejo tudi tiste aminokisline, ki so izpostavljene topilu (Mora in sod., 2004).

## 2.3 KAKO SMO PRIPRAVILI SESTAVLJENE PROTEINE

### 2.3.1 Načrtovanje nukleotidnih in proteinskih zaporedij

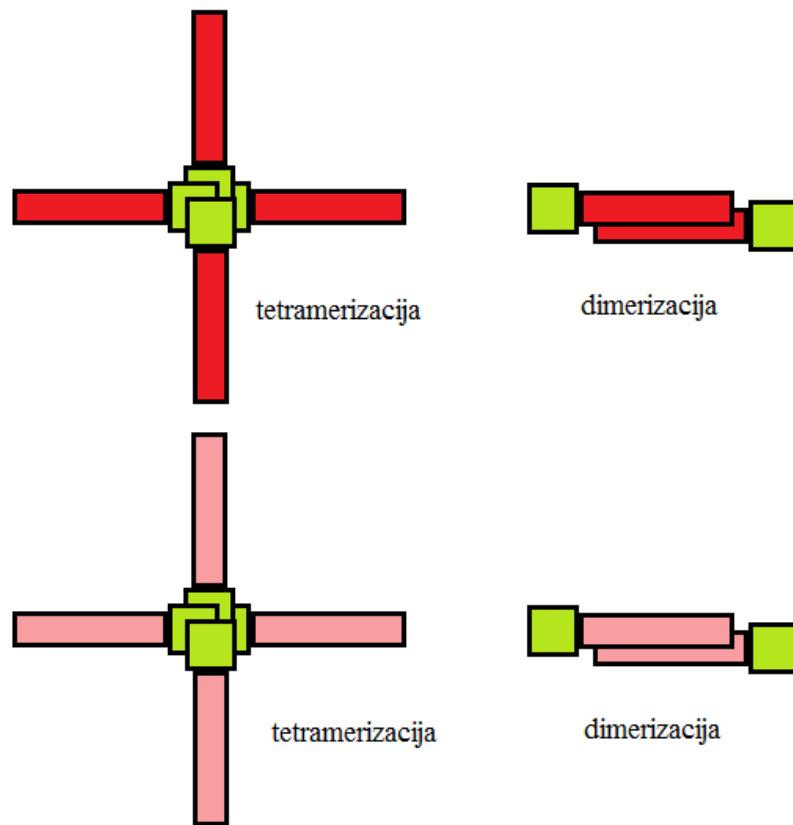
Nukleotidno zaporedje za proteina APH\_p53 ter Bcr\_p53 smo zasnovali v okviru raziskovalnega projekta iGEM leta 2009 na Kemijskem inštitutu (iGEM, 2009).

Naš cilj je bil pripraviti membrane iz proteinskih gradnikov, ki bi se med seboj sestavili s povezovanjem preko dimerizacijskih in tetramerizacijskih domen. Omenjena dva konstrukta sta sestavljena vsak iz dveh domen. Prvo domeno pri obeh predstavlja naravno zaporedje tetramerizacijske domene tumor-supresorskega gena *p53*. Predvideli smo, da bi se preko te domene med seboj povezali po štirje enakovrstni proteini. Poleg te domene pa imata oba konstrukta še vsak po eno dimerizacijsko domeno. Pri prvem proteinu to zaporedje predstavlja zaporedje *APH* (Gurnon in sod., 2003), pri drugem pa zaporedje *Bcr* (Taylor in Keating, 2005). Poleg tega smo za negativno kontrolo uporabili tudi samo domeno tet proteina p53 (slika 9).

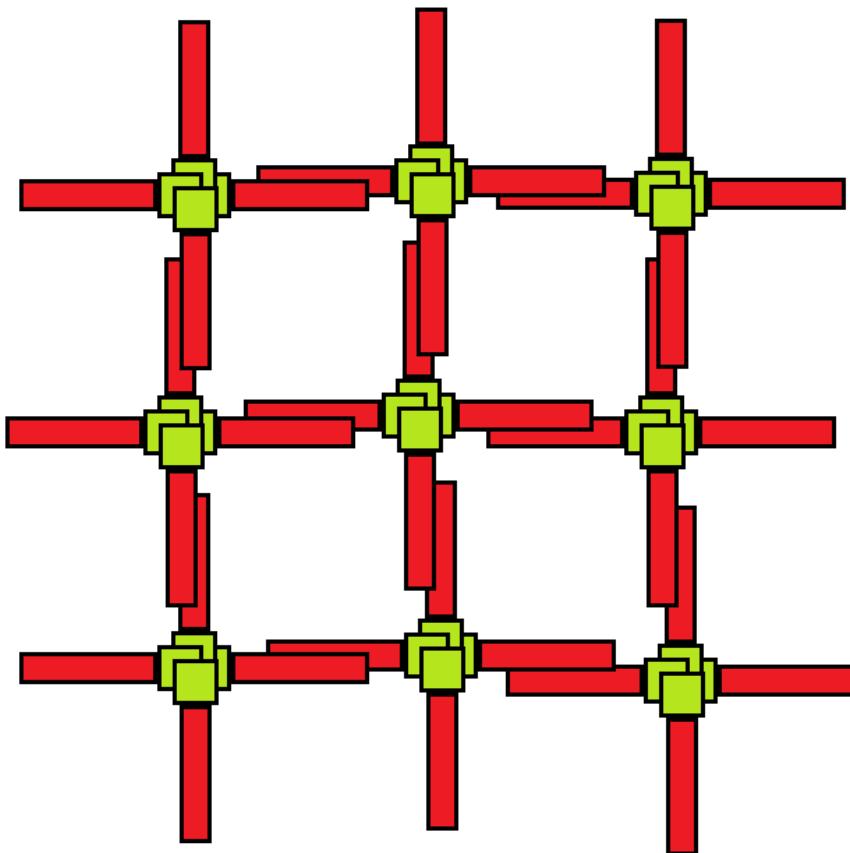


Slika 9: Tetramerizacijska domena p53, dimerizacijski domeni APH in Bcr ter sestavljena konstrukta Bcr\_p53 in APH\_p53.

Predvideli smo, da bi se preko dimerizacijske domene med seboj povezala po dva enaka proteina. V idealnem primeru bi bil tako vsak proteinski gradnik preko tetramerizacijske domene tumor-supresorskega proteina p53 povezan še s tremi istovrstnimi proteini, hkrati pa preko dimerizacijske domene še z enim istovrstnim. Skupaj bi tvorili mrežo oziroma membrano (slike 10 in 11).



Slika 10: Povezovanje štirih enakih proteinov preko tetramerizacijskih domen proteina p53 in dimerizacija dveh proteinov preko dimerizacijskih domen: Bcr ali APH.

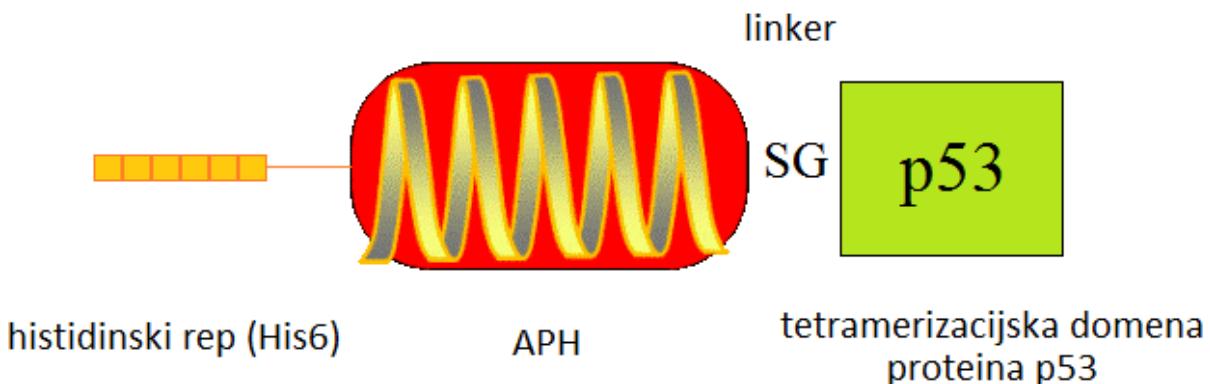


Slika 11: Povezovanje fuzijskih proteinov Bcr\_p53 ali APH\_p53 v mrežo.

Pri delu smo načrtovali osnovne proteinske gradnike za tvorbo membran. Sestavili smo jih iz proteinskih zaporedij, opisanih v prejšnjem poglavju, tako da smo jih po vrsti vklonirali v vektor pVIKTOR (Registry of standard biological parts, 2009). Sistem kloniranja je podrobno opisan v poglavju 3.2.3.

### 2.3.2 Protein APH\_p53

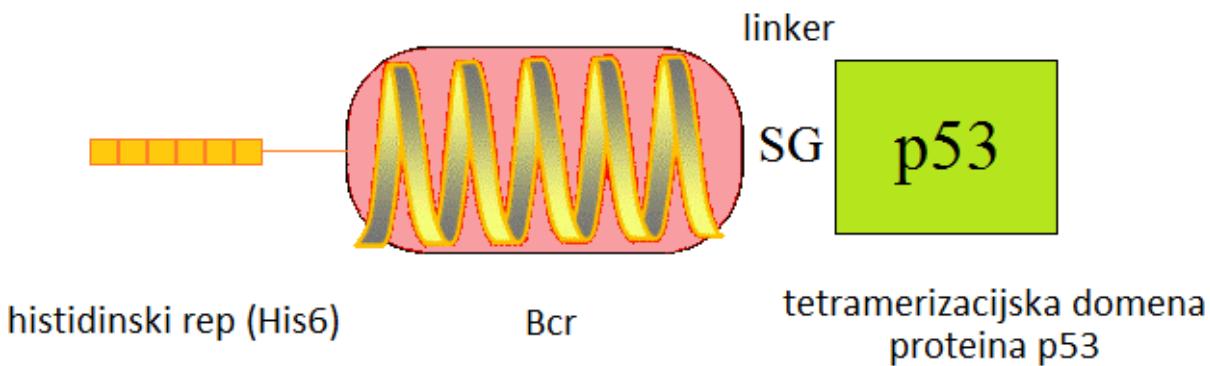
Protein APH\_p53 smo načrtovali z združitvijo zaporedja APH in tetramerizacijske domene gena p53, tako da je nastal fuzijski protein. V prilogah A in B so prikazana nukleotidna zaporedja v vektorju pVIKTOR pred kloniranjem, prav tako tudi zaporedja po koncu kloniranja za sintezo konstruktov. Med proteinskima domenama APH in tetramerizacijsko domeno proteina p53 je povezovalni člen iz dveh aminokislin: serina (Ser, S) in glicina (Gly, G), ki nastane kot posledica sistema kloniranja (poglavje 3.2.3). V izraženem proteinu dovoljuje omejeno gibljivost med domenama. Na N-koncu proteina APH\_p53 je pripet histidinski rep (His6), ki ga predstavlja šest zaporednih histidinskih ostankov. Predvideli smo, da ta ne moti sestavljanja proteina v višje strukture, h konstraktu pa je priključen, ker omogoča vezavo primarnih proteteles pri odtisu western ter vezavo na kolono Ni-NTA pri kelatni kromatografiji. Zapis za histidinski rep (His6) je bil že predhodno vključen v vektor pVIKTOR in se pri translaciji v protein prepiše priključen h konstraktu APH\_p53 (slika 12).



Slika 12: Shematski prikaz fuzijskega proteina APH\_p53.

### 2.3.3 Protein Bcr\_p53

Protein Bcr\_p53 smo prav tako pripravili kot fuzijski protein, združili smo 36 aminokislinskih ostankov dolgo večjo (dimerizacijsko) domeno naravnega proteina Bcr in tetramerizacijsko domeno proteina p53. Prav tako kot pri APH\_p53 sta tudi med Bcr in p53 vmesni povezovalni aminokislini serin (Ser, S) in glicin (Gly, G), na N-koncu pa histidinski rep (His6) iz šestih histidinskih ostankov (His, H) (slika 13). V prilogah A in B so prikazana nukleotidna zaporedja v vektorju pVIKTOR pred kloniranjem, prav tako tudi zaporedja po koncu kloniranja za sintezo konstruktov.



Slika 13: Shematski prikaz fuzijskega proteina Bcr\_p53.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Laboratorijska oprema

Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema

Ime proizvajalca	Laboratorijska oprema
Applied Photophysics	Spektrofotometer Chirascan CD
Beckman Biometra Ti 3	centrifuga J2-HS
BioRad	UV transiluminator
Brand	aparatura za poliakrilamidno gelsko elektroforezo (Mini Protean II) in moker prenos proteinov na membrano (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell), aparatura za agarozno elektroforezo DNK, Ni-NTA sefariza za izolacijo proteinov
Chemass	avtomatske pipete
Corbett Research	spektrofotometer in pripadajoči računalniški program
Eppendorf	naprava za verižne reakcije s polimerazo
Gilson	avtomatske pipete volumnov: 5 ml, 1 ml, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 2,5 µl, centrifuga 5415R, namizna centrifuga MiniSpin, termoblok Thermomixer comfort
Hettich	centrifuga Universal 32R
Hewlett Packard	spektrofotometer
Horizon	kad za elektroforezo
IKA	magnetno mešalo
Kambič	parni sterilizator A-500/700, stresalnik
Knauer	črpalka RP-HPLC
Lauda	termostatirana vodna kopel
Millipore	koncentrator Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-3 membrane, 3 kDa; filtrirni papir tipa GVPP z velikostjo por 0,22 µm

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednica 3: Uporabljena laboratorijska oprema

Ime proizvajalca	Laboratorijska oprema
Moulinex	mikrovalovna pečica SYBIO
Sanyo	skrinja za -80 °C
Serva	dializne cevke SpectraPor® (MWCO 1000, 24,0 mm )
Semlab	stresalnik (mali)
Sigma	nitrocelulozna membrana (0,2 µm), filtrirni papir za transfer proteinov "Quick Draw blotting paper"
Syngene	naprava za slikanje membran, narejenih z odtisom western, G:BOX
Tehnica Železniki	tehnicka ET-1111
Tekmar	sonikator (Tekmar Sonic Disruptor)
Thermo Scientific	centrifuga Sorvall RC5C Plus, NanoDrop 1000 in pripadajoči računalniški program
Zetasizer Malvern	naprava za merjenje dinamičnega sisanja svetlobe (DLS)

### 3.1.2 Bakterijski sevi

Preglednica 4: Uporabljeni bakterijski sevi.

Sev	Genotip	Vir
DH5α	F-/ supE44, ΔlacU169 (f80 lacZDM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	zbirka sevov na Kemijskem inštitutu, Laboratorij za biotehnologijo
BL21(DE3)pLysS	F-, ompT, hNaDSB (rB-, mB-), gal, dcm DE3), pLysS (CamR)	zbirka sevov na Kemijskem inštitutu, Laboratorij za biotehnologijo

### 3.1.3 Gojišča

Preglednica 5: Uporabljeni gojišča.

Gojišče	Sestava	Priprava
Tekoče gojišče LB	Kazeinski hidrolizat (10 g/L), kvasni ekstrakt (5 g/L), NaCL (10 g/L), pH 7.0	V destilirani vodi smo raztopili LB gojišče po Millerju v koncentraciji 25 g/L in ga avtoklavirali
Tekoče gojišče LBA	Kazeinski hidrolizat (10 g/L), kvasni ekstrakt (5 g/L), NaCL (10 g/L), ampicilin (50 mg/L) pH 7.0	V sterilno tekoče gojišče LB smo dodali ampicilin do končne koncentracije 50 mg/mL
Trdno gojišče LBA	Kazeinski hidrolizat (10 g/L), kvasni ekstrakt (5 g/L), NaCL (10 g/L), agar (15 g/L), ampicilin (50 mg/L), pH 7.0	V destilirani vodi smo raztopili LB gojišče po Millerju v koncentraciji 25 g/L in agar v koncentraciji 15 g/L ter ga avtoklavirali. Ko se je ohladilo na 60 °C, smo dodali ampicilin do končne koncentracije 50 mg/L, ga rahlo premešali in razlili v sterilne petrijevke.

V tekoče gojišče smo vcepili tekočo kulturo vcepka *E. coli* s predhodno sterilizirano cepilno zanko ali zobotrebcem. Nacepljeno gojišče smo 14-16 ur inkubirali pri 37 °C in 150 vrt/min.

Trdno gojišče smo nacepili s tekočo kulturo vcepka s predhodno sterilizirano cepilno zanko, potem pa razmazali s sterilno drigalsko spatulo. Nacepljeno trdno gojišče smo inkubirali 16 ur pri 37 °C.

### 3.1.4 Plazmidi

Za pripravo konstruktov smo uporabili uveljavljen sistem BioBrick® (Shetty in sod., 2008). Ta omogoča sestavljanje novih konstruktov, tako da se uporablja vektorje in fragmente s standardizirano sestavo. S tem je omejen tudi nabor restriksijskih encimov, s katerimi se pripravlja rekombinantno DNK. Vsi vektorji iz sistema BioBrick® imajo pet skupnih značilnosti:

- vsebujejo poliklonsko mesto, ki omogoča sestavljanje konstruktov po omenjenem sistemu,
- pozitivni selekcijski označevalec, s katerim se izognemo kontaminaciji ligacijskih mešanic z nerezanimi vektorji. Vse celice, v katere vnesemo vektor iz sistema BioBrick®, začnejo proizvajati protein CcdB (Bernard in sod., 1994), ki prepreči rast celic. Z vstavljivo inserta iz sistema BioBrick® v tak vektor se zaporedje za zapis proteina CcdB izreže.
- vektorji v poliklonskem mestu vsebujejo mesto začetka podvojevanja, ki omogoča, da se v celici nakopiči veliko število vektorjev (angl. high copy origin)
- vsebujejo zaključevalna zaporedja in stop kodone,
- v dovolj veliki oddaljenosti od poliklonskega mesta vsebujejo mesta za naleganje začetnih oligonukleotidov, ki omogočajo kasnejše ugotavljanje zaporedja in s tem preverjanje uspešnosti kloniranja insertov v vektor.

Za kloniranje smo uporabili vektor pVIKTOR (Registry of standard biological parts, 2009), ki smo ga predhodno pripravili iz vektorja pSB1A2 (Registry of standard biological parts, 2004). Oba vektorja sta shematsko prikazana na slikah 14 in 15.

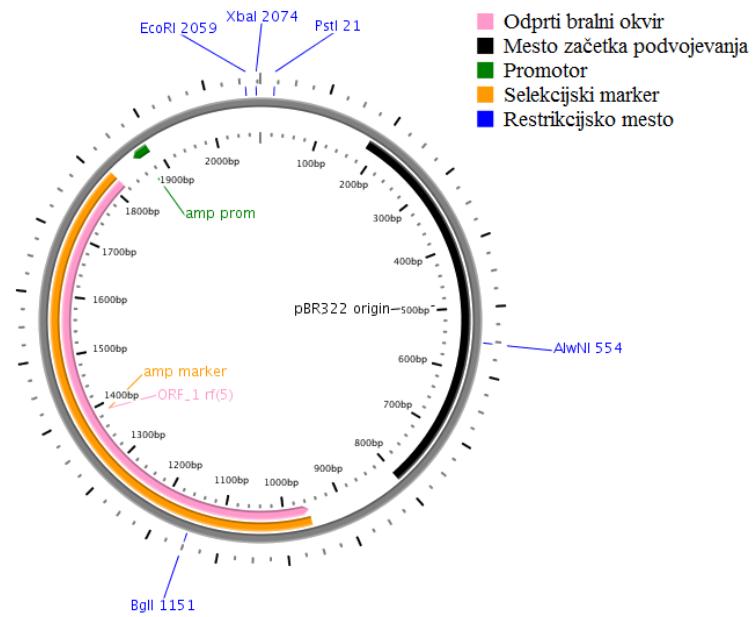
Vektorja sta del zbirke bioloških standardnih konstruktov (Registry of Standard Biological Parts) univerze MIT (Massachusetts Institute of Technology) in predstavljata dva izmed t.i. biobrikov (BioBrick®) v tej zbirki.

### 3.1.4.1 Vektor pSB1A2

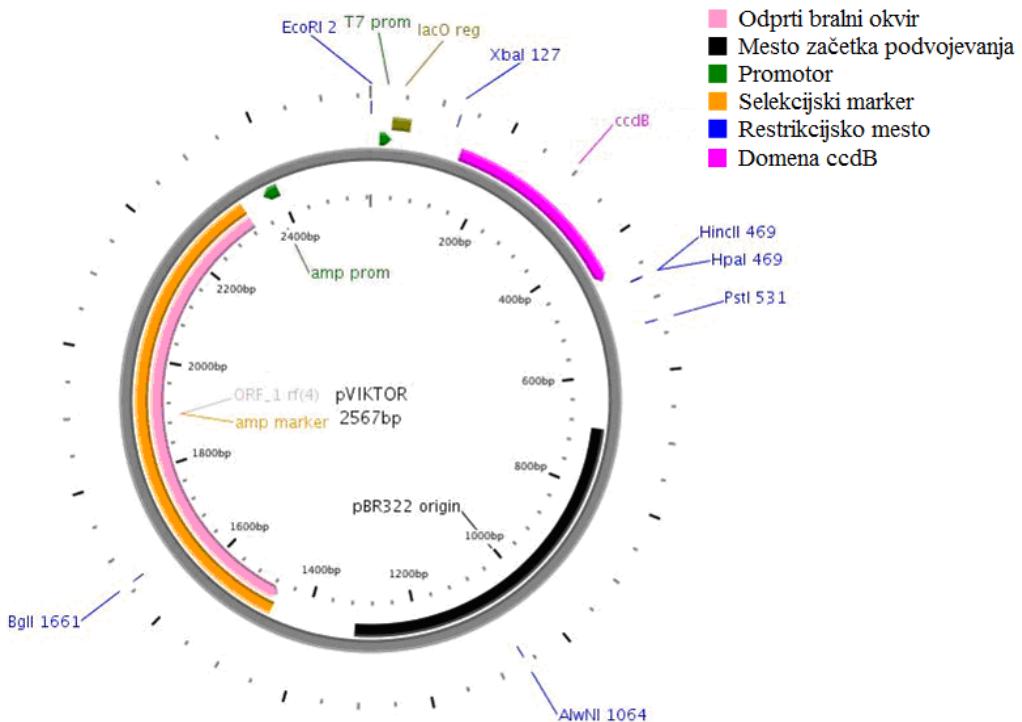
Vektor pSB1A2 ima 2079 bp (baznih parov). V celicah je prisoten v velikem številu kopij (100-300). Vsebuje mesto začetka podvojevanja pUC, poliklonsko mesto in terminator, ki preprečuje, da bi se prevajalo katerokoli zaporedje izven obsega poliklonskega mesta. Seleksijski označevalec je gen *ampR*, ki zapisuje encim β-laktamazo. To omogoča selekcijo bakterij v gojišču z ampicilinom. Promotor za izražanje rezistence proti ampicilinu je *pBLA*.

### 3.1.4.2 Vektor pVIKTOR

Vektor pVIKTOR je spremenjena oblika vektorja pSB1A2. Skupaj z domeno ccdB obsega 2567 bp. V zbirki bioloških standardnih konstruktov je shranjen pod imenom BB-NIC-II-HisN (BB-NIC-II-HisN, Registry of..., 2009). pVIKTOR vsebuje elemente, ki smo jih vklonirali preko restrikcijskih mest EcoRI in PstI: nukleotidno zaporedje močnega bakteriofagnega promotorja T7, mesto za vezavo ribosoma RBS, START kodon, histidinski rep (His6) (tako da ima vsak izražen protein na svojem N-koncu šest zaporednih histidinskih ostankov), poliklonsko mesto, domeno ccdB, STOP kodon in terminator T7. Poliklonsko mesto je drugačno od tistega pri vektorju pSB2A1. Vsebuje štiri dodatna restrikcijska mesta (NgoMIV, AgeI, XmaI in BspEI), ki omogočajo zaporedno vstavljanje novih zaporedij enega za drugim, tako da se stikajo, med njimi pa nastaja povezava v obliki dveh aminokislín: serina (Ser, S) in glicina (Gly, G) oziroma treonina in glicina (Gly, G). Poljubni vstavljeni zapis za protein, vkloniran v pVIKTOR, se zaradi bakteriofagnega promotorja T7 lahko izraža le v bakterijskih sevih, ki v svojem kromosому vsebujejo zapis za RNK polimerazo T7. Takšen bakterijski sev je *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS, ki smo ga uporabili kot ekspresijski sistem. RNK polimeraza T7 se veže na omenjeni promotor in prepiše vstavljeno zaporedje. Prepisovanje RNK polimeraze T7 se inducira z dodatkom IPTG (izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid).



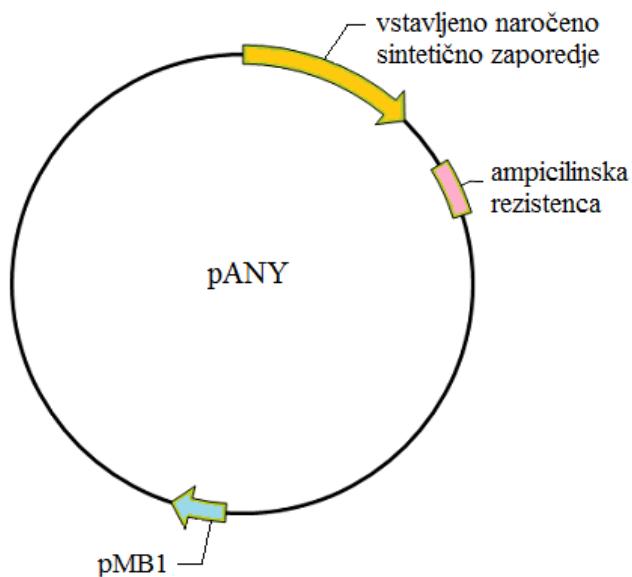
Slika 14: Shematski prikaz vektorja pSB1A2 (Registry of standard biological parts, 2004).



Slika 14: Shematski prikaz vektorja pVIKTOR (Registry of standard biological parts, 2009).

### 3.1.4.3 Vektor pANY

Sintetično narejena polinukleotidna zaporedja *bcr* in *aph* smo naročili pri podjetju GeneArt. Zaporedja smo po pošti prejeli vklonirana v vektor pANY. Shema vektorja je prikazana na sliki 16. Vektor vsebuje mesto začetka podvojevanja pMB1 in gen za odpornost poti ampicilinu. Del vstavljenega sintetičnega zaporedja smo z ustreznimi restrikcijskimi encimi izrezali iz vektorja pANY in ga vstavili v pVIKTOR.



Slika 15: Shema vstavljenega naročenega sintetičnega zaporedja v vektorju pANY.

### 3.1.5 Kemikalije

Preglednica 6: Uporabljeni standardi, komercialno dostopni kompleti, encimi in druge kemikalije.

Ime proizvajalca	Kemikalija
	PEI (polietilenimin)
BioRad	BioRad Protein Assay
Carlo Erba	glicerol
Chemika	Ponceau S
Fermentas	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, ngeMIV), T4 DNA ligaza, 10-kratni ligacijski pufer za DNA-ligaza T4
Fluka	gvanidinijev hidroklorid (GvdHCl), imidazol, NaDS (natrijev dodecil sulfat), DMSO (dimetilsulfoksid)
GE Healthcare	Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents
Ilford	razvijalec in fiksir
Inalco Ph.	IPTG (izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid)
Invitrogen	restrikcijski pufer REact 2, restrikcijski pufer React 4, restrikcijski pufer BSA, proteinski standard SeeBlue Plus 2 PreStained Standard
Merk	etanol, metanol, izopropanol, NaCl, NaOH, ocetna kislina, Na-acetat, bakteriološki agar
New England Biolabs	restrikcijski encimi (SpeI, BamHI, XhoI, HinDIII, SstI, BspEI), DNK-ligaza T4, T4 ligazni pufer
Pharmacia	modri dekstran
Pomurske mlekarne	posneto mleko v prahu
Qiagene	Ni <sup>2+</sup> -NTA agarozno polnilo, komercialno dostopni kompleti za čiščenje in izolacijo DNK: QIAEX II Gel Extraction Kit, QiaQuick Nucleotide Removal Kit, MiniElute Gel Extraction Kit
Serva	TEMED (N,N,N,N -tetrametil-etylendiamin)
Sigma	komplet za izolacijo plazmidne DNA (GenElute Plasmid Miniprep Kit), akrilamid, N,N'-metilen-bis-akrilamid, agaroza, bakteriološka agaroza, gojišče LB po Millerju, nitrocelulozna membrana (45 µm), EDTA, ampicilin, amonijev persulfat, Tris (Trizma base), etidijev bromid, DOC (deoksiholična kislina), Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> -H <sub>2</sub> O, glicerol, CPI (mešanica proteaznih inhibitorjev), barvilo Coomassie modro
Thermo Scientific	SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate, SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate

### 3.1.6 Standardi

Preglednica 7: Uporabljeni standardi.

Standard	Sestava
Gene Ruler DNA Ladder Low Range	mešanica molekul DNK velikosti 25 bp, 50 bp, 75 bp, 100 bp, 150 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 700 bp
PageRuler™ Plus Protein Ladder Plus	Prestained mešanica obarvanih proteinov velikosti 10 kDa, 17 kDa, 28 kDa, 36 kDa, 55 kDa, 72 kDa, 95 kDa, 130 kDa, 250 kDa
Standard λ EcoRI/HindIII	mešanica molekul DNK velikosti 125 bp, 564 bp, 831 bp, 947 bp, 1375 bp, 1584 bp, 1907 bp, 2027 bp, 4973 bp, 5148 bp, 21226 bp,
PageRuler™ Ladder Plus	Prestained Protein mešanica obarvanih proteinov velikosti 4.6 kDa, 10 kDa, 17 kDa, 26 kDa, 42 kDa

### 3.1.7 Protitelesa

Preglednica 8: Uporabljeni protitelesi pri odtisu western.

Protitelo	Opis
Primarna protitelesa	primarna mišja protitelesa, specifična za vezavo na šest histidinskih aminokislinskih ostankov, brez BSA (Qiagen).
Sekundarna protitelesa	kozja poliklonska protitelesa specifična za vezavo na mišja protitelesa IgG1, konjugirana s hrenovo peroksidazo (Sigma).

### 3.1.8 Raztopine in pufri

Preglednica 9: Uporabljene raztopine in pufri ter njihova sestava.

Raztopina ali pufer	Sestavine
Coomassie modro barvilo	0,2 % (w/v) raztopina Coomassie modrega barvila, 30 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) ocetna kislina
Dializni pufer za konstrukt APH_p53	20 mM Hepes pH 7,5
Dializni pufer za konstrukt Bcr_p53	20 mM Hepes pH 8,5
Elektroforezni pufer za NaDS (10-kratni)	30 g Tris, 10 g NaDS, 144 g glicina (Gly, G), dopolnimo do 1 l z dH <sub>2</sub> O. Pred elektroforezo pufer 10-krat redčimo z dH <sub>2</sub> O.
Nanašalni pufer brez reducenta (4-kratni)	0,138 M NaDS, 0,125 M Tris/HCl pH 6,8, 40 % (v/v) glicerol, 0,1 % (v/v) bromfenolmodro barvilo
Nanašalni pufer z reducentom (4-kratni)	0,138 M NaDS, 0,125 M Tris/HCl pH=6,8, 4, % (v/v) glicerol, 0,8 ml β-merkaptoetanol, 0,1 % (v/v) bromfenolmodro barvilo
Nanašalni pufer za agarozno elektroforezo (6-kratni)	0,25 % (v/v) bromfenolmodro, 0,25 % (v/v) ksilencianol, 40 % (w/v) glukoze v dH <sub>2</sub> O.
Proteinski inhibitor CPI-His6	mešanica proteaznih inhibitorjev za proteine s histidinskim repom (His6), brez EDTA
Pufer 1 Mini Prep	50 mM glukoza, 25 mM Tris/HCl (pH=8,0), 10 mM EDTA pH 8,0
Pufer 2 Mini Prep	0,2 M NaOH, 1 % (v/v) NaDS
Pufer 3 Mini Prep	5 M kalijev acetat, CH <sub>3</sub> COOH
Pufer A (za raztpljanje inkluzijskih telesc)	10 mM Tris-a, 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 6M GvdHCl pH 8.0
Pufer D5 (za regeneracijo)	6 M GvdHCl, 100 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM TRIS, 500 mM imidazol, pH 5.8
Pufer E (za elucijo)	10 mM Tris, 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 250 mM imidazol, 6 M GvdHCl pH 5.8
Pufer SP1	10 mM Tris, 100 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 8.0
Pufer SP2	10 mM Tris, 100 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM imidazol pH 8.0)
Pufer SP3	10 mM Tris, 100 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 50 mM imidazol pH 8.0
Pufer EL1	10 mM Tris, 100 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 250 mM imidazol pH 8.0

se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednica 9: Uporabljene raztopine in pufri ter njihova sestava.

Raztopina ali pufer	Sestavine
Pufer TAE za agarozno elektroforezo (50-kratni)	242 g Tris, 57,1 ml ledocetna kislina, 100 ml 0,5 M EDTA, dH <sub>2</sub> O do 1 L pH 8
Pufer TBS (10-kratni)	10 mM Tris, 1,5 M NaCl pH 7,4
Pufer TE	10 mM Tris/HCl pH=8,0, 1 mM EDTA
Pufer TFB 1 (za pripravo kompetentnih celic)	40 mM RbCl, 20 mM MnCl <sub>2</sub> •H <sub>2</sub> O, 12 mM K-acetat, 4 mM CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O,
Pufer TFB 1 (za pripravo kompetentnih celic)	4 mM MOPS, 4 mM RbCl, 30 mM CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O, 15% glicerol (pH 6,8)
Pufer W1 (za spiranje)	10 mM Tris, 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 mM imidazol, 6 M GvdHCl pH 8.0
Pufer W2 (za spiranje)	10 mM Tris, 100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 50 mM imidazol, 6 M GvdHCl pH 8.0
Pufer za blokiranje I (odtis western)	1 X TBS (50mM Tris, 150mM NaCl pH 7,6) 6% (w/v) mleko v prahu
Pufer za lizo	10 mM Tris pH=8, 0,1 % (w/v) DOC (deoksiholična kislina)
Pufer za mokri prenos proteinov na membrano pri odtisu western	25 mM Tris, 192 mM glicin (Gly, G), 20 % metanol, pH 8,3
Pufer za spiranje inkluzijskih teles	10 mM Tris pH 7,5 oz. 8
Raztopina za fiksiranje in shranjevanje NaDS gela	20 % (v/v) ocetna kislina, 10 % (v/v) glicerol
Raztopina za razbarvanje NaDS gela	(v/v) etanol, 10 % (v/v) ocetna kislina

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Sterilizacija

Ves material, ki smo ga uporabili pri kloniranju in gojenju celičnih kultur, smo predhodno sterilizirali v avtoklavu 20 min pri 121 °C in tlaku  $1,2 \cdot 10^5$  Pa.

### 3.2.2 Molekularno kloniranje

Metode, ki smo jih uporabili, so opisane v priročnikih (Sambrook in Russel, 2001; Ausubel in sod., 2002).

#### 3.2.2.1 Sintetični oligonukleotidi

Nukleotidna zaporedja za sintetične gene smo določili in jih optimizirali za izražanje v bakterijah *E. coli* s programom Gene Runner 3.05 (Hastings Software) in Gene Designer (DNA2.0). Sintezo je za nas opravilo podjetje Mr. Gene (GeneArt). Sintetična zaporedja smo prejeli vstavljeni v vektor pANY (poglavlje 3.1.4.3).

Zaporedji *aph* (Gurnon in sod., 2003) in *Bcr* (Taylor in Keating, 2005) smo prejeli skupaj z ustreznimi prepoznavnimi mesti za restrikcijske encime ob zaporedjih v vektorju pANY, potem smo ju z restrikcijskimi encimi izrezali in vstavili vsakega v svoj vektor pVIKTOR.

Golo zaporedje tumor-supresorskega gena *p53* brez dodanih restrikcijskih mest na koncih smo prejeli v drugem vektorju pANY. Zaporedju smo s začetnimi oligonukleotidi in pomnoževanjem z verižno reakcijo s polimerazo na koncih dodali restrikcijska mesta, zato da smo to zaporedje lahko vstavili v vektor pViktor (poglavlje 3.1.4.2).

#### 3.2.2.2 Priprava kompetentnih celic

Kompetentne celice so tiste celice, ki so fiziološko tako spremenjene, da skozi njihovo celično steno ob ustreznih pogojih lahko vstopa DNK iz zunanjosti. Pripravili smo jih tako, da smo na trdno gojišče LB nacepili *E. coli* DH5α ter inkubirali 14-16 ur pri 37 °C. Eno izmed kolonij smo vcepili v 10 mL tekočega gojišča LB in ponovili inkubacijo pri enakih pogojih ob stresanju pri 160 vrt./min. Kulturo smo precepili v 100 mL predhodno ogretega tekočega gojišča LB. Volumen vcepk je bil tolikšen, da je bila začetna vrednost gojišča OD<sub>600</sub> 0,05.

Kulturo smo inkubirali pri 37 °C in stresanju 160 vrt./min, dokler vrednost OD<sub>600</sub> ni narasla na 0,5. Kulturo smo nato na ledu ohlajali 5 minut in celice prenesli v sterilno centrifugirko ter jih centrifugirali 5 minut pri temperature 4 °C in 4000 vrt./min. Gojišče smo nato pazljivo odlili. Med postopkem so bile celice ves čas na ledu. Usedlino celic smo suspendirali v 60 mL na 4 °C ohlajenega pufra TFB 1 v razmerju 30 ml pufra/100 ml kulture. Suspenzijo smo inkubirali na ledu 90 minut. Sledilo je centrifugiranje 5 minut pri temperature 4 °C in 4000 vrt./min. Supernatant smo zavrgli, celice pa resuspendirali v 8 mL pufra TFB 2. V sterilne mikrocentrifugirke smo na ledu prenesli odmerke po 60 µL raztopine s kompetentnimi celicami in jih takoj zatem zamrznili v tekočem dušiku. Tako pripravljene kompetentne celice smo shranili do uporabe pri -80 °C.

### 3.2.2.3 Izolacija plazmidne DNK

Plazmidno DNK smo izolirali na dva načina. Prvi način je cenejši a dolgotrajnejši, DNK pa ni izolirana v zelo čisti obliki. Drugi način je dražji, vendar enostavnejši in hitrejši. Izkoristek pri izolaciji je večji (okoli 150 ng/µL), plazmidna DNK je čistejša. Prvi način smo uporabljali pred restriktično analizo, drugega pa pred cepljenjem plazmidne DNK z restriktičskimi encimi, ki ji je sledila ligacija, ter pred sekvenciranjem.

Za izolacijo plazmidne DNK v manjših količinah smo nacepljene kolonije s trdnega gojišča LBA najprej vcepili v 10 mL tekočega gojišča LBA. Kulturo smo inkubirali 14-16 ur pri 37 °C in 150 vrt./min. V tem času so se namnožile celice, s tem pa tudi plazmidna DNK. V sterilne dvomililiterske mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 2 mL namnožene kulture in centrifugirali 30 s pri 10000 vrt./min. Gojišče smo odlili in še dvakrat ponovili korak pipetiranja in centrifugiranja, tako da smo v posamezni mikrocentrifugirki dobili sediment celic iz 6 mL prekonočne kulture. Sediment smo resuspendirali v 100 µL pufra 1 Mini Prep. Nato smo dodali 200 µL pufra 2 Mini Prep, s čimer smo povzročili lizo celic. Vsebino mikrocentrifugirk smo premešali z nekajkratnim obračanjem in 1 minuto inkubirali na ledu. Sledila je nevtralizacija z dodatkom 150 µL pufra 3 Mini Prep. Vsebino smo premešali na vibracijskem mešalu z narobe obrnjениmi mikrocentrifugirkami, potem pa 5 minut inkubirali na ledu. Mešanico smo nato centrifugirali 5 minut pri 10000 vrt./min in v nove sterilne mikrocentrifugirke prenesli le supernatant s plazmidno DNK. DNK smo iz supernatanta oborili z dodatkom 1 mL absolutnega etanola, ohlajenega na -20 °C. Mešanico smo 2 minuti inkubirali na sobni temperaturi, potem pa oborjeno DNK zbrali s centrifugiranjem 5 minut pri 10000 vrt./min. Supernatant smo zavrgli, usedlini pa dodali 0,5 mL na -20 °C ohlajenega 70 % (v/v) etanola ter centrifugirali 5 minut pri 10000 vrt./min. Supernatant smo zavrgli, plazmidno DNK, ki je ostala na dnu, pa posušili, tako da smo odprte mikrocentrifugirke segrevali pri

temperaturi 40 °C. Na koncu smo plazmidno DNK raztopili v 20 µL pufra TE z dodano RNAAzo.

Za izolacijo plazmidne DNK v čisti obliki smo uporabili komercialno dostopni kompleti in izolacijo izvedli po navodilih proizvajalca (Sigma: GenElute Plasmid Miniprep Kit ali Fermentas: GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit). Sestave pufrov za izolacijo ne poznamo. Izolacija temelji na vezavi plazmidne DNK na kolono po predhodni alkalni lizi celic. Po spiranju nečistoč iz kolone smo plazmidno DNK sprali z vodo MQ.

### 3.2.2.4 Ugotavljanje koncentracije DNK

Koncentracijo plazmidne DNK smo ugotavljali spektrofotometrično s sistemom NanoDrop. Sistem izračuna koncentracijo DNK na podlagi merjenja absorbance pri valovni dolžini 260 nm. Razmerje absorbanc pri 260 nm in 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) mora biti med 1,7 in 1,9, kar pomeni, da v vzorcu ni nečistoč v obliki proteinov, fenola ali RNK.

### 3.2.2.5 Cepitev DNK z restrikcijskimi encimi

Sintetična zaporedja *bcr* in *aph* smo iz vektorjev pANY cepili z restrikcijskimi encimi in jih vklonirali v vektor pVIKTOR, v katerega smo že pred tem vstavili zaporedje tumorsupresorskega gena *p53*. Restrikcijo smo vedno izvajali z dvema različnima restrikcijskima encimoma, ki sta za seboj puščala lepljive konce. Konca na fragmentih in vektorjih sta bila vedno različna, kar je omogočalo vstavljanje fragmenta v vektor v pravilni orientaciji in pri ligaciji, ki je nato sledila, preprečevalo samozapiranje vektorja brez fragmenta.

Za cepitev **vektorjev** smo pripravili reakcijsko zmes, ki je vsebovala:

- 3 µg plazmida,
- 1 µL prvega restrikcijskega encima,
- 1 µL drugega restrikcijskega encima,
- 5 µL 10-kratnega pufra za restrikcijska encima,
- Sterilna MQ do končnega volumna 50 µL.

Mešanice smo inkubirali pri 37 °C, po 1 uri smo ponovno dodali po 1 µL vsakega encima ter pri 37 °C inkubirali še 2 uri. Po končanem cepljenju smo mešanice nanesli na agarozni gel, izrezali linearen plazmid ter ga očistili s komercialnim kompletom za čiščenje DNK.

Za cepitev **fragmentov** smo pripravili reakcijsko zmes, ki je vsebovala:

- 1-2 µg fragmenta,
- 1 µL prvega restrikcijskega encima,
- 1 µL drugega restrikcijskega encima,
- 5 µL 10-kratnega pufra za restrikcijska encima,
- sterilna MQ do končnega volumna 50 µL.

Restrikcijsko mešanico smo tako kot v primeru rezanja vektorjev inkubirali pri 37 °C najprej 1, potem pa 2 uri z vmesnim dodatkom obeh restrikcijskih encimov. Rezan fragment smo nato očistili s komercialno dostopnim kompletem Nucleotide Removal Kit (Qiagen), ki je primeren za čiščenje fragmentov DNK dolžine med 17 in 10000 bp, tako da z njim odstranimo oligonukleotide, ki so kraši od 10 bp<sup>2</sup>.

Pufer za restrikcijo smo vedno izbrali tako, da je bila aktivnost obeh uporabljenih encimov v njem čim večja. Pri tem smo si pomagali s spletnim orodjem *Double Digest Finder* (New England BioLabs...). V nekatere restrikcijske mešanice smo po navodilih proizvajalca dodali tudi 100-kratni goveji serumski albumin (BSA), tako da je končni volumen v restrikcijski mešanici prestavljal 1/100 volumna restrikcijske mešanice.

### 3.2.2.6 Elektroforeza DNK na agaroznem gelu

Elektroforezo DNK na agaroznem gelu smo uporabili za ločevanje in kasnejšo izolacijo DNK izbranih velikosti ali pa le kot analitično metodo. Uporabljali smo agarozne gele z različnimi koncentracijami agaroze. Glede na to, kako velike molekule DNK smo pričakovali v vzorcih, smo izbrali gostoto agaroznega gela. Običajno smo pripravljali med 0,8 in 2,2 % (w/v) agarozne gele. Redkejši gel (0,8 %) smo pripravili, če smo imeli namen iz gela izrezati in očistiti vektorje, 1,2-1,5 % gele smo pripravljali za ločevanje fragmentov dolžine 50-1500 bp, 2,2 % gele pa za ločevanje fragmentov dolžine do 100 bp. Če smo želeli po izrezovanju fragmentov dolžine okrog 100 bp iz gela in čiščenju s komercialnim kompletem imeti boljši izkoristek, smo se namesto 2,2 % raje odločili za 1,5 % agarozni gel.

Gel smo pripravili tako, da smo ustrezno količino agaroze raztopili v 100 mL 1-kratnega pufra TAE s segrevanjem v mikrovalovni pečici, ga ohladili na približno 60 °C, dodali 2 µL

---

<sup>2</sup> Po restrikciji fragmentov je bila ligacija uspešna, tudi če rezanih fragmentov nismo očistili s komercialno dostopnim kompletem Nucleotide Removal Kit (Qiagen).

etidijevega bromida (10 g/L), z rahlimi krožnimi gibi pomešali in pri tem pazili, da ni prišlo do penjenja, nato pa razlili v pripravljeno kadičko za elektroforezo z vstavljenima izbranima glavničkoma. Gel smo pustili na sobni temperaturi strjevati pol ure, ga nato vstavili v elektroforezno kad, napolnjeno s pufrom TAE, v žepke nanesli vzorce DNK ter priklopili na električni tok. Vzorcem (produktom verižne reakcije s polimerazo in restriktionskim mešanicam ter nerezanim vektorjem) smo pred nanosom dodali toliko 6-kratnega nanašalnega pufra, da je bila končna koncentracija tega pufra 1-kratna. Na gel smo poleg vzorcev za primerjavo nanesli tudi izbrani velikostni standard. Elektroforeza je potekala 30-50 minut pri konstantni napetosti 100 V. Po končani elektroforezi smo gel osvetlili z ultravijolično svetlobo, ga fotografirali in po potrebi na transiluminatorju iz njega s skalpelom izrezali izbrane frakcije DNK.

### 3.2.2.7 Izolacija DNK iz agaroznega gela

S skalpelom izrezane frakcije DNK iz agaroznega gela smo prenesli v mikrocentrifugirke ter jih očistili s komercialno dostopnim kompletom MiniElute Gel Extraction Kit po navodilih proizvajalca. Princip čiščenja temelji na vezavi DNK na kolono, spiranju nečistoč s pufri ter na koncu še spiranju vezane DNK s kolone v sterilno mikrocentrifugirko.

### 3.2.2.8 Ligacija DNK

Ligacija je vstavljanje nukleotidnega fragmenta v odprt vektor. Fragmente in odprt vektor smo predhodno pridobili bodisi s cepitvijo v celicah namnoženih vektorjev z restriktionskimi encimi (poglavlje 3.2.2.5), ki mu je sledila izloacija DNK iz agaroznega gela, bodisi smo fragmente pridobili z verižno reakcijo s polimerazo. Tudi v tem primeru smo konce potem cepili z ustreznimi restriktionskimi encimi, da je lahko sledila ligacija.

Pri pripravi ligacijske mešanice smo upoštevali pravilo, da je molarno razmerje med fragmentom in vektorjem 3 proti 1. Maso fragmenta smo izračunali z enačbo 1.

$$\text{masa inserta [ng]} = \frac{\text{masa vektorja [ng] * dolžina inserta [kbp]}}{\text{dolžina vektorja [kbp]}} \quad \dots (1)$$

Ena ligacijska mešanica je vsebovala:

- 100 ng cepljenega vektorja,
- količino cepljenega fragmenta, izračunano po formuli 1,
- 1 µl T4 DNK-ligaze (400 U/µl),

- 2 µl 10-kratnega ligaznega pufra T4,
- sterilno vodo MQ do končnega volumna 20 µl.

Ligacija je potekala 16 ur pri 16 °C ali 3 ure pri sobni temperaturi. Po končani ligaciji smo reakcijo zaustavili z dodatkom 30 µl sterilne MQ in jo po potrebi shranili na temperaturi -20 °C. V kompetentne celice (60 µl) smo nato transformirali po 25 µl razredčene mešanice.

Postopek smo izvedli tudi tako, da smo namesto 2 µl 10-kratnega ligaznega pufra T4 dodali 4 µl 5-kratnega ligaznega pufra T4 in ligacija je potekala 15-20 minut pri sobni temperaturi.

### 3.2.2.9 Transformacija kompetentnih celic

Plazmide smo z namenom pomnoževanja in selekcije vnašali v kompetentne celice *E. coli* DH5α, za namen kasnejše sinteze proteinov pa v kompetentne celice *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Uporabili smo metodo s topotnim šokom.

Kompetentne celice, zamrznjene pri -80 °C, smo 15 minut do pol ure odtajali na ledu. Dodali smo jim 1 µl plazmidne DNK ali 25 µl ligacijske mešanice, ter jih inkubirali pol ure na ledu. Celice smo nato za 3-5 minut izpostavili temperature 42 °C in transformacijsko mešanico prenesli na led za 2 minuti. Na sobni temperature smo nato dodali 1 mL tekočega gojišča LB in inkubirali 1 uro pri 37 °C in stresanju 150 vrt./min. Celice smo nato zbrali s centrifugiranjem pri 7000 vrt./min, zavrgli večino tekočega gojišča in jih z drigalsko spatulo razmazali na trdno gojišče LBA. Gojišče smo narobe obrnjeno inkubirali 14-16 ur pri temperaturi 37 °C.

### 3.2.2.10 Restriktična analiza

Z restriktično analizo smo po končanem kloniranju in pred sekvenciranjem ugotovljali, ali je bilo kloniranje izbranega fragmenta v vektor uspešno. Izvedli smo jo podobno kot restriktično vektorjev in fragmentov med kloniranjem, le da smo zanjo porabili manj DNK in manj encimov.

Po transformaciji kompetentnih celic z rekombinantno DNK in z ligacijo samega vektorja (angl. backligation), smo te nacepili na trdna gojišče LB in jih inkubirali čez noč pri 37 °C. Nato smo nekaj posameznih kolonij vcepili vsako v svoje 10 mL tekoče gojišče LBA.

Običajno smo se odločili za vcepitev 3-4 kolonij za posamezni konstrukt in 1 ligacije samega vektorja. Če je pa na gojišču z ligacijami samega vektorja zraslo veliko kolonij, smo tistih s konstruktmi vcepili več, ker smo predvidevali, da je med njimi manj kolonij takih, ki vsebujejo pravilno rekombinantno DNK.

Naslednji dan smo DNK izolirali z metodo izolacije DNK v manjših količinah, nato pa izvedli restrikcijo. Ena restrikcijska mešanica je vsebovala:

- 5 nL izolirane plazmidne DNK,
- 1 µL prvega restrikcijskega encima,
- 1 µL drugega restrikcijskega encima,
- 3 µL 10-kratnega pufra za restrikcijska encima,
- sterilna MQ do končnega volumna 50 µL.

V nekatere restrikcijske mešanice smo po navodilih proizvajalca dodali tudi 100-kratni goveji serumski albumin (BSA), tako da je končni volumen BSA v restrikcijski mešanici prestavljal 1/100 volumna.

Mešanice smo inkubirali 1 uro pri 37 °C in jih nato nanesli na agarozni gel. Če smo ugotovili, da so se na gelu ločile frakcije DNK pričakovanih velikosti, smo vzorce poslali na sekvenciranje.

### 3.2.2.11 Verižna reakcija s polimerazo

Zaporedje tumor-supresorskega gena *p53* smo pridobili tako, da smo z načrtovanjem ustreznih začetnih oligonukleotidov in z verižno reakcijo s polimerazo pomnožili ta gen iz vektoja pET, v katerem je bil že predhodno vkloniran. Začetna oligonukleotida smo oblikovali tako, da sta vsebovala tudi vsak po dve restrikcijski mesti. Vodilni začetni oligonukleotid smo oblikovali tako, da smo med restrikcijsko mesto in zaporedjem za naleganje na tarčno zaporedje dodali tri nukleotide z zapisom za glutamat (Glu, E). Podobno smo v povratnem začetnem oligonukleotidu dodali zapis za dodatni glicin (Gly, G). Pomnožena zaporedja gena *p53* so zato na N-koncu vsebovala dodatni glutamat (Glu, E), na C-koncu pa dodatni glicin (Gly, G), poleg tega pa so na vsakem koncu imela po dve dodani restrikcijski mesti, da smo jih kasneje lahko z restrikcijskimi encimi ustrezno cepili in jih preko njih ligiral v vektor pVIKTOR. Pri načrtovanju smo uporabili program OligoAnalyzer 3.1 (Owczarzy in sod., 2008).

Pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov smo upoštevali naslednja pravila (PREMIER Biosoft International, 2011):

1. Del začetnega oligonukleotida, ki se prilega tarčno DNK (v našem primeru so bila to krajna zaporedja gena *p53*), obsega 18 do 25 nukleotidov. Začetni oligonukleotidi so tako dovolj dolgi za ustrezno specifičnost ter hkrati dovolj kratki za nemoteno vezavo pri temperaturi naleganja.
2. Temperaturo tališča  $T_m$  je tista temperatura, pri kateri se polovica dvoverižne DNK začetnih oligonukleotidov razklene in postane enoverižna. Izračunamo jo s pomočjo programa OligoAnalyzer 3.1 (Owczarzy in sod., 2008), pri čemer upoštevamo samo tisti del začetnega oligonukleotida, ki se prilega tarčnemu zaporedju. Najbolje je, če je temperatura tališča med 52 °C in 67 °C, pri višjih je verjetnost tvorbe neželenih sekundarnih struktur večja. Med začetnima oligonukleotidoma se ne sme razlikovati za več kot 5 °C.
3. Odstotek baznih parov gvanina in citozina oblega 50 % vseh baznih parov, če ne gre drugače, se lahko giblje med 45 in 60 %.
4. Vsak začetni oligonukleotid se začne in konča z gvaninom ali citozinom, vendar med zadnjimi petimi nukleotidi na 3'-koncu ne smejo biti več kot trije bazni bari gvanina in citozina.
5. Znotraj začetnega oligonukleotida se ne smejo ponoviti več kot štirje zaporedni pari nukleotidov (npr. ATATATAT), prav tako se več kot štirikrat zaporedoma ne sme ponoviti en bazni par (npr. GGGG).
6. Pri temperaturah, ki jih uporabljamo med potekom verižne reakcije s polimerazo, začetni oligonukleotidi ne smejo tvoriti stabilnih sekundarnih struktur ali se med seboj povezovati v homo- ali heterodimere, ki sta bili bili stabilni tudi pri temperaturah, višjih od 50 °C.
7. Če ni mogoče oblikovati začetnih oligonukleotidov, ki ne bi tvorili tako stabilnih sekundarnih struktur, se za naleganje med reakcijo izbere nižjo temperaturo, kot bi jo izbrali sicer.
8. Del začetnega oligonukleotida, ki se ne prilega tarčnemu zaporedju, vsebuje eno ali več zaporedij, ki jih prepoznajo restriktijski encimi ter štiri dodatne nukleotide pred tem zaporedjem na skrajnih koncih začetnega oligonukleotida.
9. Vrsto omenjenih štirih nukleotidov se izbere tako, da so temperature reakcije znotraj dovoljenih meja ter da ne prihaja do povezovanja v neželene višje strukture.
10. Podvojevanje poteka v smeri 5' → 3', zato mora biti 3'-konec začetnega oligonukleotida tisti, na katerega polimeraza pri pomnoževanju veže nadaljnje nukleotide.

Preglednici 10 in 11 prikazujeta zaporedji začetnih oligonukleotidov in glavne parametre, kakšna je bila sestava reakcijske mešanice pri verižni reakciji s polimerazo in kakšen temperaturni program smo uporabili.

Preglednica 10: Zaporedja načrtovanih začetnih oligonukleotidov in glavni parametri.

	Vodilni začetni oligonukleotid p53-f	Povratni začetni oligonukleotid p53-r
Zaporedje 5' → 3'	5' –CAAT <b>TCTAGA</b> <b>GCCGGC</b> GAATAC <b>TTTACC</b> CTGCAGATC – 3'	5' – GACC <b>ACTAGT</b> <b>TCCGGA</b> AC <b>CTGCTTGAGCATCTTCAG</b> – 3'
Del začetnega oligonukleotida, ki nalega na tarčno zaporedje DNK	TACTTACCC <b>TGCAGATC</b>	<b>TGCTTGAGCATCTTCAG</b>
Vsebovani restrikcijski mesti	XbaI ( <b>TCTAGA</b> ), NgoMIV ( <b>GCCGGC</b> )	SpeI ( <b>ACTAGT</b> ), BspEI ( <b>TCCGGA</b> )
Dolžina [nt]	37	37
Temperatura tališča Tm	48,6 °C	51,4 °C
Temperatura tališča najstabilnejše sekundarne strukture znotraj začetnega oligonukleotida	28,1 °C	38,7 °C
Odstotek bp GC	48,6 %	51,4 %

Preglednica 11: Sestava reakcijske mešanice za pomnoževanje z DNK-polimerazo Platinum *Pfx*

Sestavina	Založna koncentracija	Koncentracija v reakcijski mešanici	Volumen [µL]
Tarčna DNK	10 ng/µL	0,4 ng/µL	2
Začetni oligonukleotid 1	20 pmol/µL	0,4 pmol/µL	1
Začetni oligonukleotid 2	20 pmol/µL	0,4 pmol/µL	1
10-kratni pufer za polimerazo Platinum <i>Pfx</i>	10-kraten	1-kraten	5
dNTP	2,5 mM	0,2 mM	4
MgSO <sub>4</sub>	50 mM	1 mM	1
Polimeraza Platinum <i>Pfx</i>	2,5 U/µL	0,05 U/µL	1
MQ			35
Skupaj			50

Preglednica 12: Temperaturni program pomnoževanja z DNK-polimerazo Platinum *Pfx*.

Stopnja	Temperatura [°C]	Čas [min]	Število ciklov
Začetna denaturacija	94	2	1
Denaturacija	94	1	
Prileganje	55	1	
Podaljševanje	68	1 min/1 kbp	30
Končno podaljševanje	68	7	1
Konec	4	neskončno	

### 3.2.2.12 Ugotavljanje zaporedja nukleinskih kislin

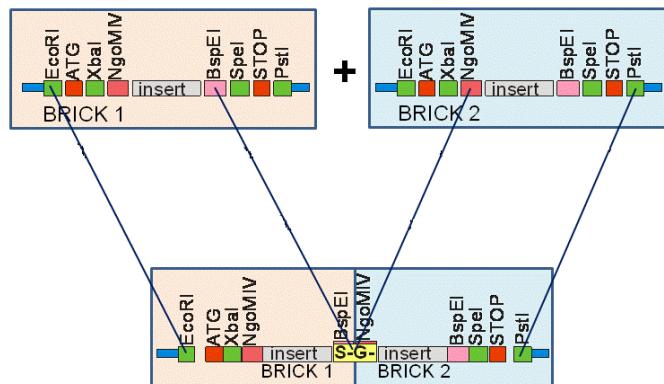
Po koncu kloniranja in uspešni restriktijski analizi smo konstrukte skupaj z ustreznimi začetnimi oligonukleotidi poslali podjetju *Eurofins MWG Operon* (Biotech), v katerem so opravili analizo zaporedja nukleinskih kislin v tistem delu pVIKTOR-ja, kjer smo predhodno vstavili naša zaporedja. Na ta način smo preverili uspešnost kloniranja in odsotnost mutacij. Konstrukte smo podjetju poslali v obliki plazmidov, izoliranih s komercialnim kompletem GenElute Plasmid Miniprep Kit (poglavlje 3.2.2.3). Ugotovljeno dejansko zaporedje nukleinskih kislin smo s pomočjo algoritma EMBOSS Needle – Pairwise Sequence Alignment (EMBL-EBI, 2011) primerjali s predvidenim končnim zaporedjem. Kloniranje je bilo uspešno, ko sta se zaporedji ujemali.

### 3.2.3 Sistem kloniranja

#### 3.2.3.1 Standard BBF RFC 37

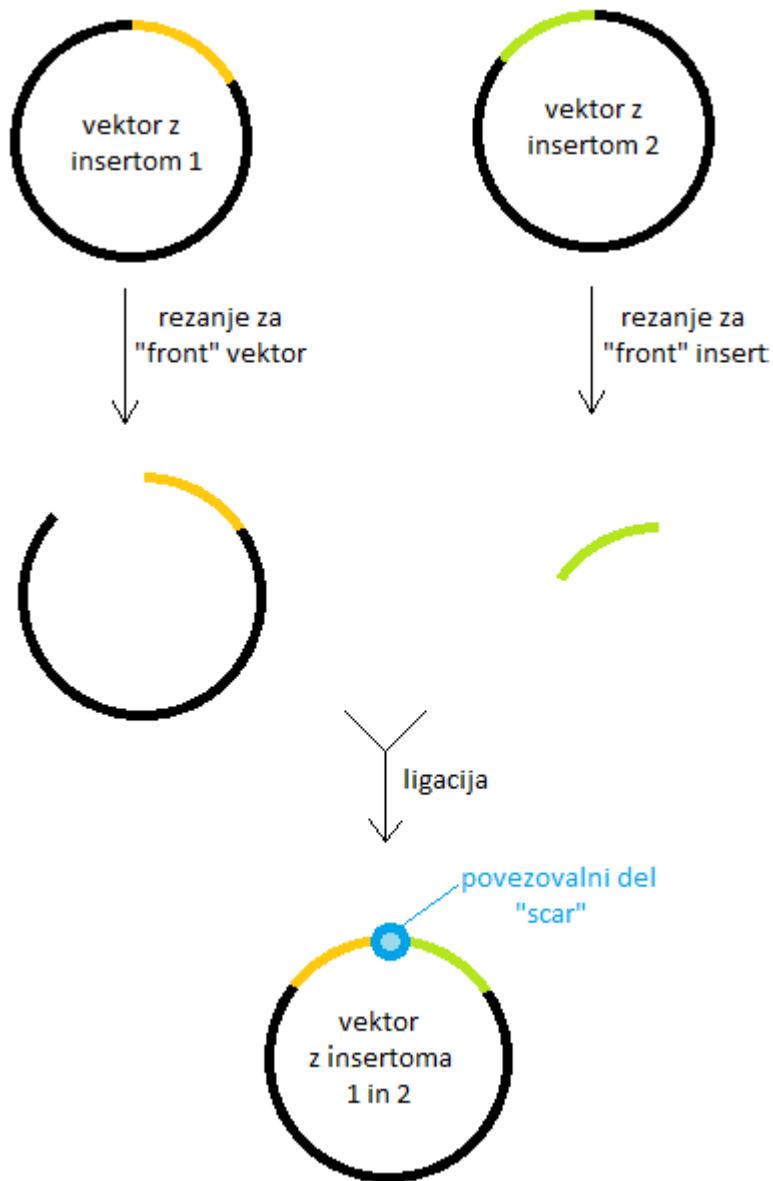
Kloniranje je temeljilo na sistemu BioBrick® (Shetty in sod., 2008). Za pripravo konstruktov smo uporabili standard BBF RFC 37 (Jerala in Benčina, 2009). Ta omogoča postopno dodajanje nukleotidnih zaporedij z zapisi za domene proteinov, tako da med njimi nastajajo povezovalna zaporedja. Teh mest, potem ko so inserti en poleg drugega že vstavljeni v vektor, z restriktionskimi encimi ni več mogoče cepiti. S takšnim ekspresijskim sistemom je mogoče pripraviti proteine, ki imajo med svojimi fukcionalnimi domenami hidrofilne aminokisline, ki predstavljajo nastali povezovalni del (angl. scar). Ta omogoča gibljivost med domenami in je v večini primerov izpostavljen topilu. Od načina kloniranja in izbora restriktionskih encimov je odvisno, katere aminokisline nastopajo v povezovalnem delu: to so bodisi serin (Ser, S), glicin (Gly, G), prolin (Pro, P) ali treonin (Thr, T). Najkrajši povezovalni del med domenama proteina je lahko sestavljen iz dveh ostankov aminokislin, s ponovitvami ciklov kloniranja pa to mesto lahko poljubno podaljšujemo za dve aminokislini.

Pri pripravi konstruktov *aph\_p53* in *bcr\_p53* smo za povezovalni del izbrali aminokislini serin (Ser, S) in glicin (Gly, G), kar smo dosegli z združitvijo koncev, rezanih z encimoma BspEI in NgoMIV, kot je prikazano na sliki 16.



Slika 16: Nastanek povezovalnega dela med izbranimi insertoma, kot je opisano za standard BBF RFC 37 (Jerala in Benčina, 2009).

Posamezne zapise za domene proteinov smo v iste vektorje enega poleg drugega dodajali po principu »front« vektorjev in »front« insertov, kar omogoča standard BBF RFC (Jerala in Benčina, 2009). Omenjeni standard omogoča tudi sestavljanje insertov po principu »back« vektorjev in »back« insertov, vendar smo pri kloniranju uporabili prvo različico. Inserte lahko zaporedno v isti vektor dodajamo enega za drugim, tako da vektor z že vstavljenim izbranim fragmentom režemo kot »front« vektor, naslednji fragment, ki ga želimo vstaviti pred že vstavljeni fragment, pa kot »front« insert. »Front« insert nato ligiramo v »front« vektor in pridobimo vektor z dvema insertoma in vmesnim povezovalnim delom ali *scarom* (slika 17). V vektor tako lahko po istem postopku pred zadnji vstavljeni insert vstavimo poljubno število novih insertov in tako pripravimo ekspresijske sisteme za proteine iz več domen.



Slika 17: Splošni princip sestavljanja »front« insertov in »front« vektorjev, tako da med vstavljenima insertoma nastane povezovalni del.

### 3.2.3.2 Priprava zaporedij konstruktov p53, aph\_p53 in bcr\_p53

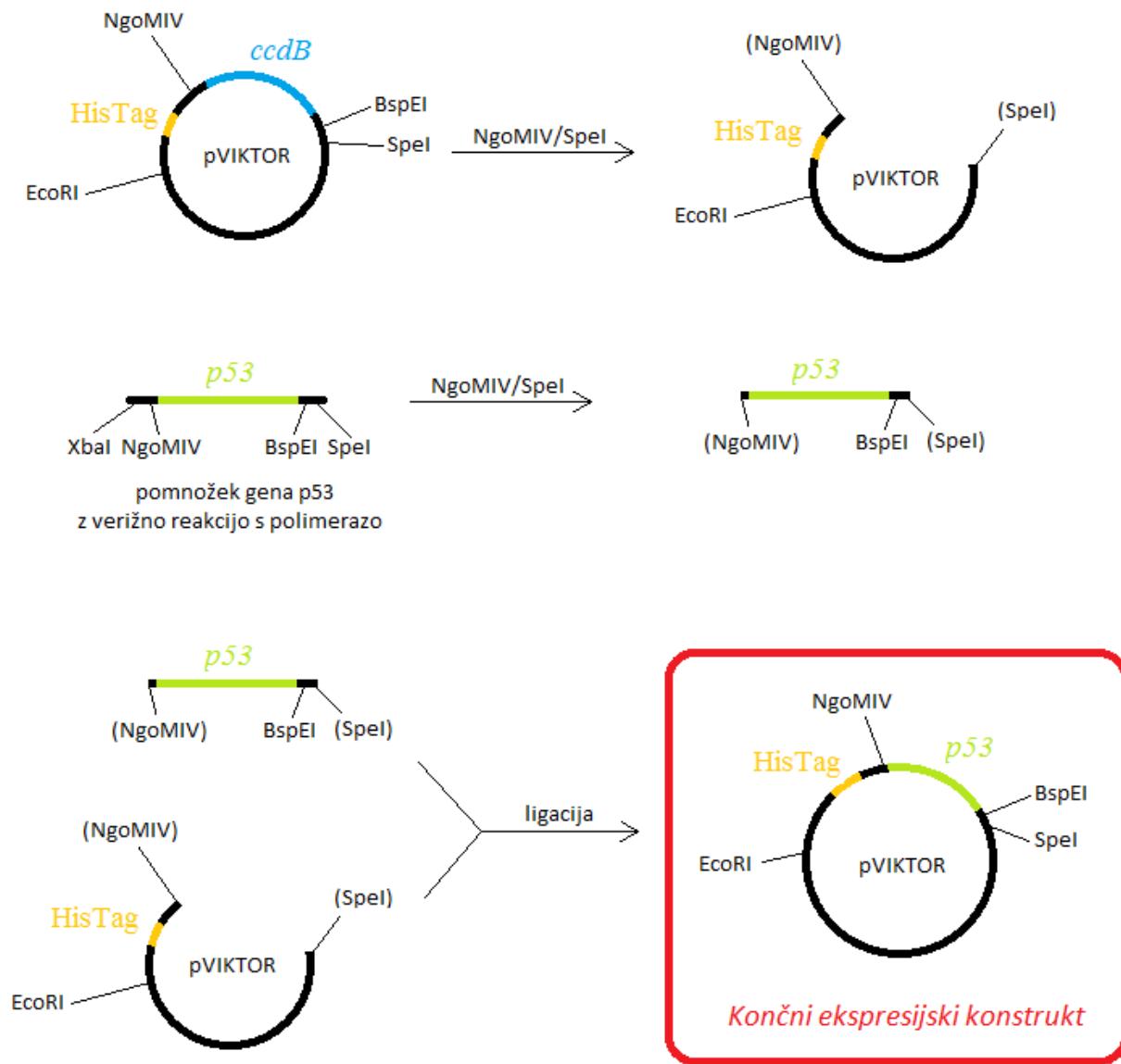
Med pripravo konstruktov *p53*, *aph\_p53* in *bcr\_p53* smo uporabili restrikcijske encime, ki so skupaj s prepoznavnim mestom in mestom cepitve navedeni v preglednici 13. V preglednici niso navedeni encimi, ki so bili uporabljeni pri pripravi vektorja pVIKTOR iz vektorja pSB1A2. Prav tako je na shemah kloniranja v nadaljevanju prikazana le priprava omenjenih konstruktov, ne pa tudi vektorja pVIKTOR.

Preglednica 13: Uporabljeni restrikcijski encimi in njihova mesta cepitve.

Restrikcijski encim	Mesto cepitve
NgoMIV	5' - G/CCGGC - 3'
SpeI	5' - A/CTAGT - 3'
EcoRI	5' - G/AATTC - 3'
HindIII	5' - A/AGCTT - 3'
PstI	5' - CTGCA/G - 3'
BspEI	5' - T/CCGGA - 3'

### 3.2.3.3 Cepljenje vektorja pVIKTOR in vstavljanje zaporedja p53

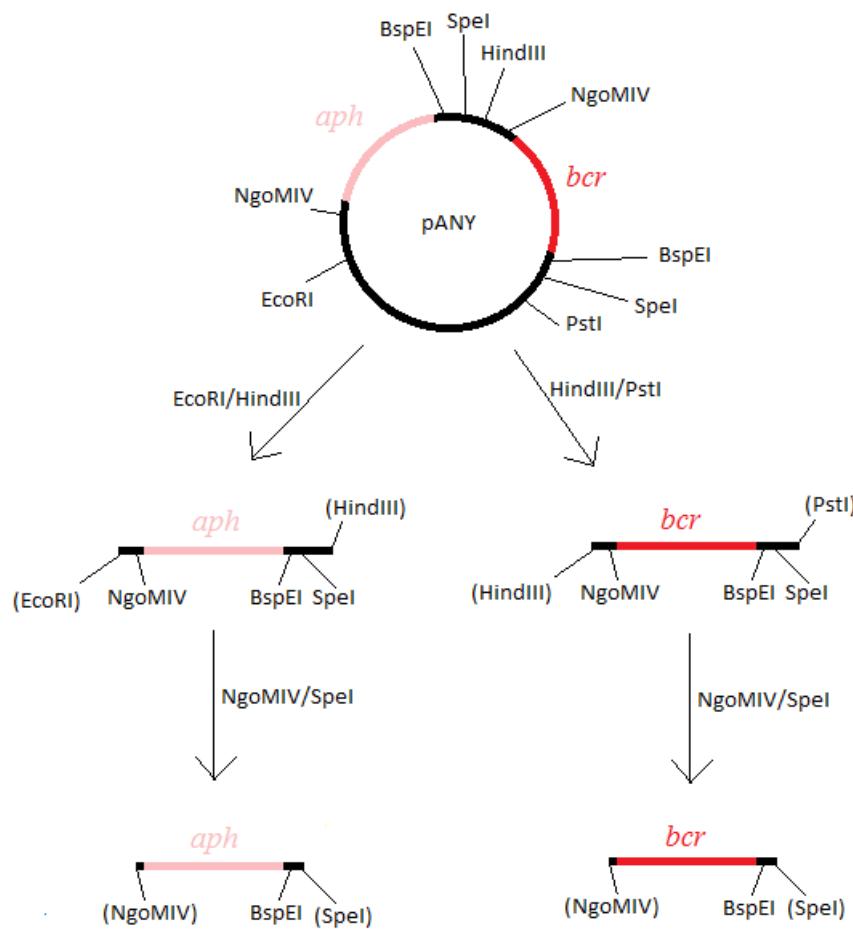
V vektor pVIKTOR smo najprej vstavili zaporedje tumor-supresorskega gena *p53* (slika 20). To smo predhodno pridobili z verižno reakcijo s polimerazo. Pomnožek gena *p53* smo tako kot pVIKTOR cepili z restrikcijskima encimoma NgoMIV in SpeI v pufru NEBuffer 4 in dodatkom BSA. Sledila je ligacija, namnoževanje in restrikcijska analiza, nato pa še sekvenciranje. pVIKTOR z vstavljenim zaporedjem *p53* je predstavljal enega izmed končnih ekspresijskih konstruktov, hkrati pa tudi vmesni konstrukt v postopku priprave konstruktov *aph\_p53* in *bcr\_p53*. Na shemah (slike 18-22) so označena glavna zaporedja in mesta za cepitve z restrikcijskimi encimi. Mesta, ki so označena z restrikcijskimi encimomi v oklepajih, predstavljajo odprte reze.



Slika 18: Izrezovanje domene *ccdB* iz vektorja *pVIKTOR*, priprava pomnožka tetramerizacijske domene gena *p53* za ligacijo v *pVIKTOR* in ligacija *p53* v *pVIKTOR*. *pVIKTOR* z vstavljenim zaporedjem *p53* predstavlja enega izmed treh končnih konstruktorjev za kasnejšo proizvodnjo proteinov.

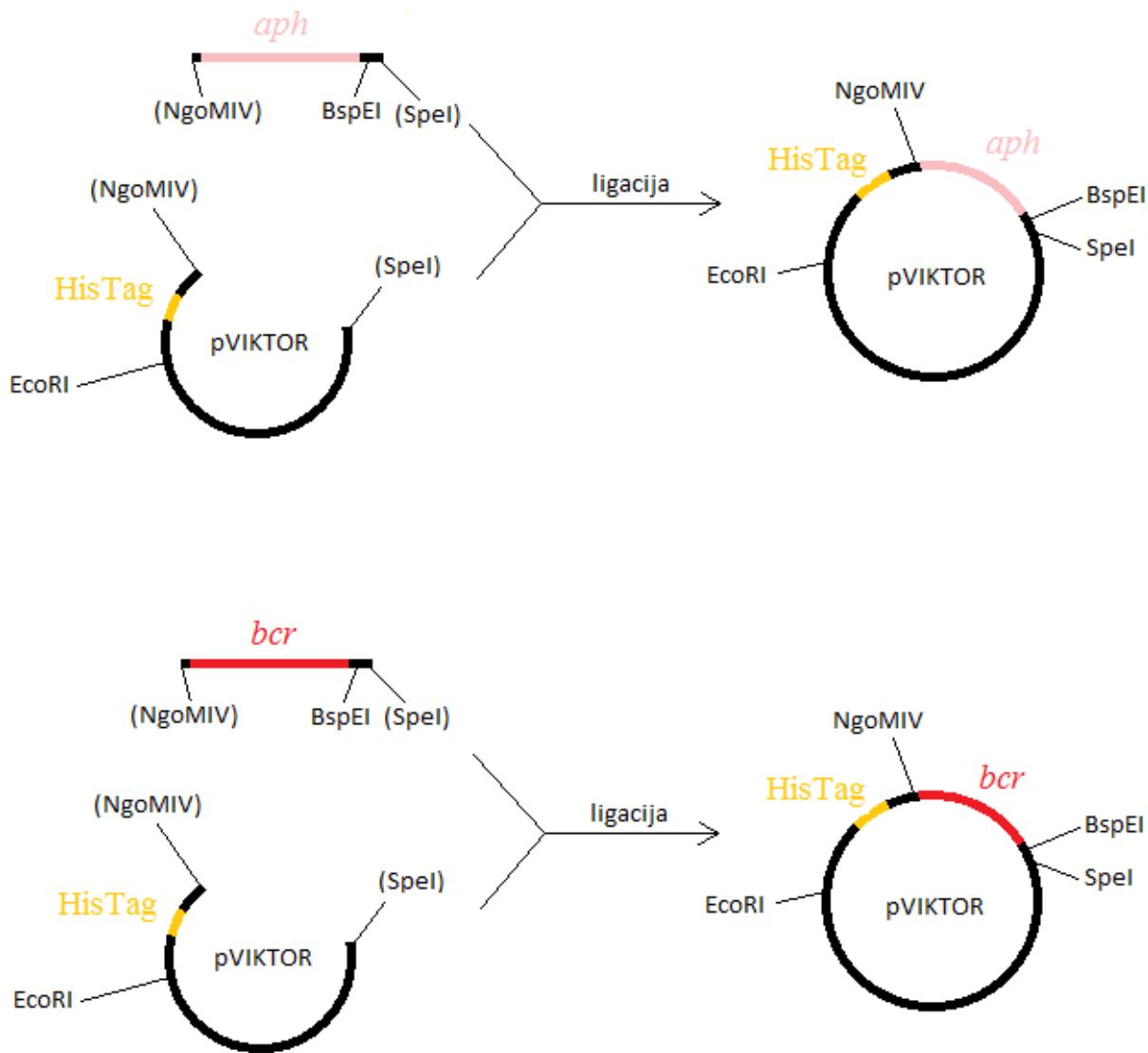
### 3.2.3.4 Priprava zaporedij *aph* in *bcr* ter njuno vstavljanje v vektor pVIKTOR

Zaporedji *aph* in *bcr* je za nas po naročilu sintetiziralo podjetje GeneArt, prejeli smo ju vstavljeni v vektor pANY. Zaporedji *aph* in *bcr* smo iz vektorja izrezali ločeno: prvega z encimoma EcoRI in HindIII v pufru React 2, drugega pa s HindIII in PstI v pufru NEBuffer 2 in dodanim BSA. Obema fragmentoma smo nato končno porezali z encimoma NgoMIV in SpeI v pufru NEBuffer 4 in dodanim BSA (slika 19).



Slika 19: Izrez sintetično pripravljenih zaporedij *aph* in *bcr* iz vektorja pANY ter priprava nastalih dveh fragmentov za vkloniranje v pVIKTOR.

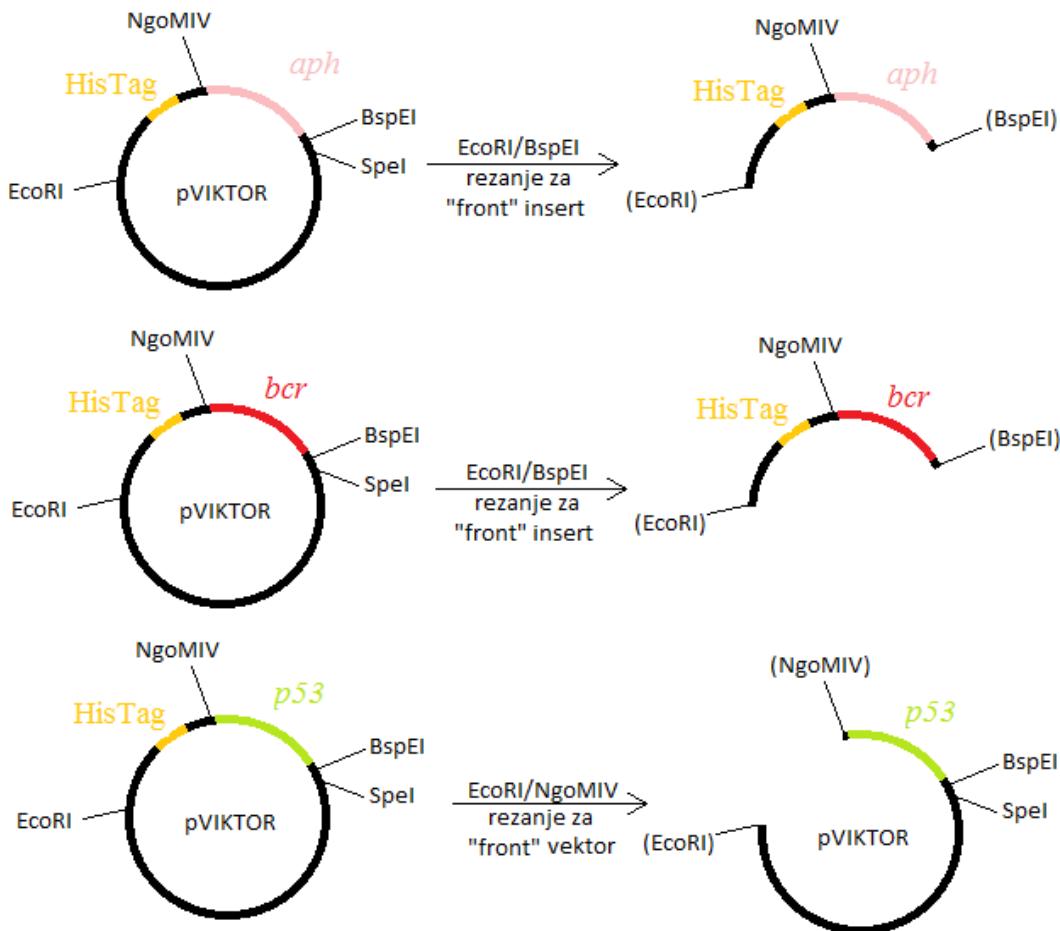
Fragmenta *aph* in *bcr* smo nato vsakega posebej vstavili v pVIKTOR, ki je bil predhodno cepljen z enakima encimoma (slika 20).



Slika 20: Ligacija zaporedij *aph* in *bcr* v vektor pVIKTOR.

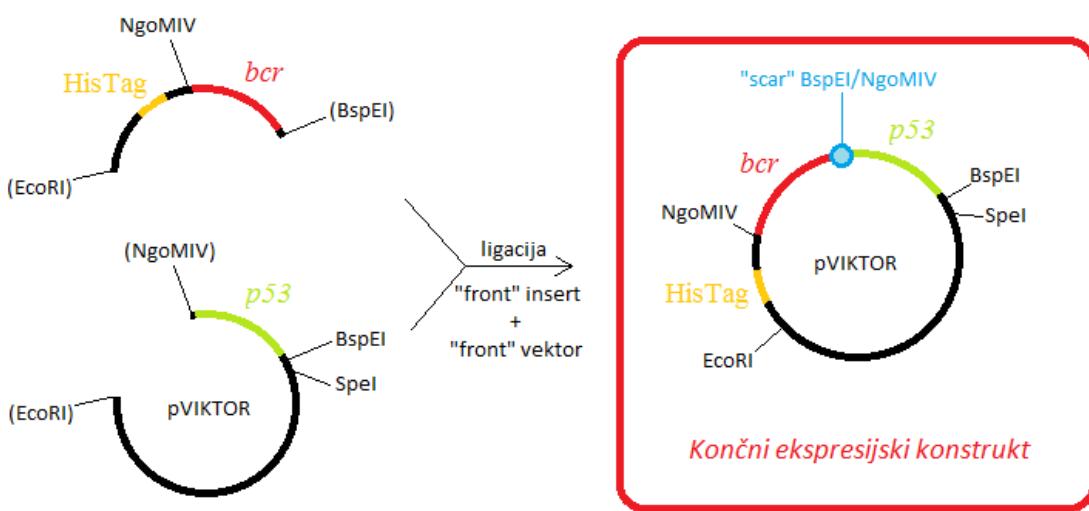
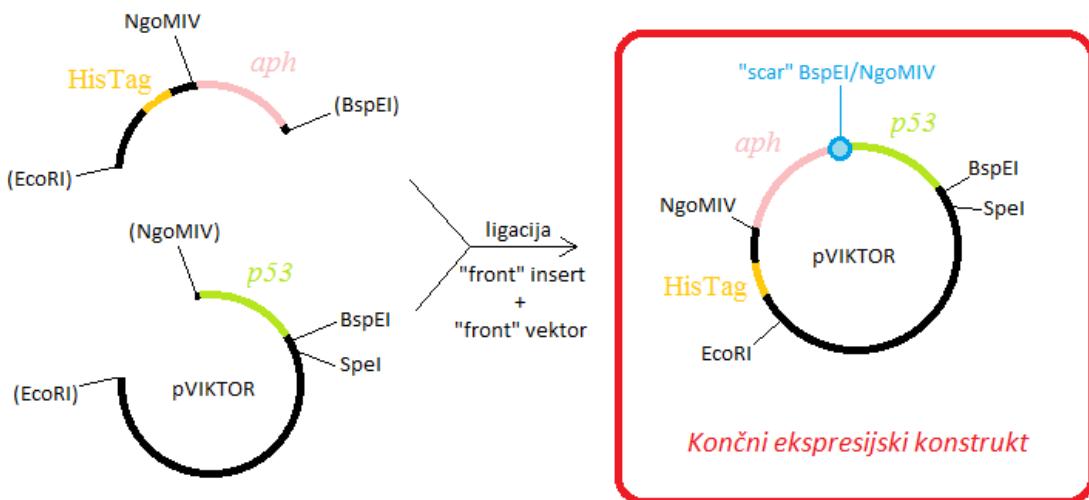
### 3.2.3.5 Sestavljanje končnih konstruktorov

V nadaljevanju smo iz vektorjev pVIKTOR z vstavljenimi zaporedji *p53*, *aph* ali *bcr* pripravili »front« vektorje in »front« inserte. Sistem temelji na standardu BBF RFC 37 (Jerala in Benčina, 2009). Zaporedji *aph* in *bcr* v pVIKTOR-ju smo kot »front« insetra pripravili tako, da smo ju cepili z encimoma EcoRI in BspEI v pufru NEBuffer 3, pVIKTOR z vstavljenim zaporedjem *p53* pa kot »front« vektor z encimoma EcoRI in NgoMIV v pufru NEBuffer 4 (slika 21).



Slika 21: Rezanje zaporedij *aph* in *bcr* iz pVIKTOR-ja kot »front« inserta ter rezanje pVIKTOR-ja z vstavljenim zaporedjem za tetramerizacijsko domeno gena *p53* kot »front« vektor.

Na koncu smo »front« insert *aph* združili s »front« vektorjem pVIKTOR z že vstavljenim zaporedjem *p53*, prav tako pa tudi »front« insert *bcr* z enakim »front« vektorjem (slika 22). Med zaporedjema *aph* in *p53* ter *bcr* in *p53* je nastalo povezovalno mesto ali »scar«, ki ga predstavlja vrinjeno zaporedje šestih nukleotirov, nastalo zaradi ligacije štrlečih koncev, ki so bili rezani z dvema različnima encimoma (BspEI in NgoMIV). To povezovalno mesto zapisuje aminokislini serin (Ser, S) in glicin (Gly, G) (TCCGCC).



Slika 22: Ligacija zaporedij *aph* in *bcr* v obliki »front« insertov v pVIKTOR z zaporedjem za tetramerizacijsko domeno gena *p53*, rezanim kot »front« vektor. Med zaporedjema *aph* in *p53* ter *bcr* in *p53* nastane t.i. »scar«. Na desni strani sta prikazana dva izmed treh končnih konstruktov, ki smo jih uporabili za proizvodnjo proteinov.

### 3.2.1 Producija, izolacija in analiza proteinov

Na podlagi načrtovanih zaporedij, vključenih v DNK bakterij, smo v nadaljevanju pripravili proteine s točno določenim načrtovanim zaporedjem aminokislin, jih očistili, z analitskimi metodami preverili, ali je bila produkcija uspešna, kolikšno količino proteinov smo pridobili ter jih nato uporabili za tvorbo proteinskih membran, s katerimi smo potem lahko izvajali poskuse in ugotavljali, kolikšna je njihova prepustnost.

#### 3.2.1.1 Pomembni parametri pridobljenih proteinov

Pred produkcijo in izolacijo proteinov smo s pomočjo spletnega orodja ProtParam pridobili teoretične izračunane podatke o proteinih (Gasteiger in sod., 1999). Pomembni podatki o uporabljenih proteinih so navedeni v preglednici 14.

Preglednica 14: Proteinski konstrukti, njihova aminokislinska zaporedja in drugi pomembni parametri.

Ime proteina	Zaporedje proteina	Število AK	Velikost (kDa)	Teoretični pI	Ekstinkcijski koeficient ε (Abs 1% (=1 mg/ml))
APH_p53	<b>MYHHHHHHSRAGMEQ</b> LEEELEQLEELQEI EEQLAQQLQWKAEARKE EKLAELKEKLQASGE YFTLQIRGRERFEMF RELNEALELKDAQAG <b>SGTS</b>	94	11,1	5,02	0,764
Bcr_p53	<b>MYHHHHHHSRAGDIE</b> QELEARAKASIRRLEQ EVNQERSRMAYLQTL LAK <b>SGEYFTLQIRGR</b> ERFEMFRELNEALEL KDAQAG <b>SGTS</b>	85	10	6,59	0,448
Tetramerizacijska domena proteina p53	<b>MYHHHHHHSRAGEYF</b> TLQIRGRERFEMFRE LNEALELKDAQAG <b>SG</b> <b>TS</b> <sup>3</sup>	47	5,5	6,57	0,539

<sup>3</sup> V aminokislinskem zaporedju tetramerizacijske domene gena p53 smo 6. aminokislino, ki jo v naravnem zaporedju predstavlja histidin (His, H), z metodo hitre zamenjave (ang. *quick change*) zamenjali za glutamin.

V preglednici 16 so neodebeljeno navedene aminokisline samih zaporedij APH, Bcr in p53, zodebeljeno pa so označene dodane aminokisline: oranžne predstavljajo histidinski rep (His6), ostale pa so posledica nastanka povezovalnih aminokislin na sredini konstrukta (SG) zaradi načina kloniranja ter restrikcijskih mest na začetku in koncu konstrukta.

### 3.2.1.2 Transformacija DNK v produkcijski sev in priprava gojišč

Vektorje pVIKTOR z vstavljenimi ustreznimi zaporedji, ki zapisujejo želene proteine, smo iz celic *E. coli* DH5α izolirali s komercialno dostopnim kompletom GenElute Plasmid Miniprep Kit. Po uspešni analizi zaporedja DNK smo vektorje transformirali v celice *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Ta sev je prilagojen za proizvodnjo rekombinantnih proteinov, katerih produkcija je kontrolirana s promotorjem T7. Bakterije smo gojili na trdnih gojičih LBA 16 ur pri 37 °C. Pridobili smo tri nove seve celic: prvi sev je vseboval vektor pVIKTOR z vstavljenim zaporedjem *bcr\_p53*, drugi sev je vseboval pVIKTOR z vstavljenim *aph\_p53*, tretji sev pa pVIKTOR z vstavljenim zaporedjem *p53*. Posamezne kolonije smo vcepili v 100 mL tekočega gojišča LBA in inkubirali 15-16 ur pri 37 °C in 100 vrt./min.

### 3.2.1.3 Bioprocес in indukcija sinteze proteinov

Po končani inkubaciji (iz prejšnje točke) smo spektrofotometrično izmerili optično gostoto 10-krat redčenega vzorca prekonočne kulture pri valovni dolžini 600 nm ( $OD_{600}$ ) in nato v 2 L svežega tekočega gojišča LBA (ki smo ga že prej pripravili dvakrat po 1 L v dveh velikih erlenmajericah) vcepili toliko kulture, da je bila optična gostota kulture v novem gojišču med 0,05 in 0,1. Pri izračunu, koliko kulture je potrebno vcepiti, smo si pomagali z naslednjo enačbo:

$$V(1) = \frac{OD_{600}(2)*V(2)}{OD_{600}(1)}, \dots (2)$$

pri čemer V(1) predstavlja volumen vcepk, V(2) volumen novega gojišča,  $OD_{600}(1)$  optično gostoto gojišča, iz katerega precepljamo,  $OD_{600}(2)$  pa želeno optično gostoto v novem gojišču (0,05 do 0,1).

(Gln, Q). To je bilo potrebno, zato da je zaporedje ustrezalo standardu konstruktov v okviru iGEM, ki prepoveduje pojavljanje določenih restrikcijskih mest v BioBrick®-ih.

Tekoče gojišče z dodanim ampicilinom in vcepkom smo nekaj ur inkubirali pri 37 °C in 160 vrt./min. Po 2 urah smo prvič izmerili optično gostoto pri 600 nm in jo potem spremajali, dokler ni dosegla vrednosti med 0,6 in 0,8. Takrat smo s dodatkom IPTG, tako da je bila končna koncentracija v gojišču 1 mM, inducirali sintezo proteinov. Po indukciji je sledil 4-urni bioprocес. Nato smo gojišče prelili v centrifugirke, jih uravnotežili na tehnici in centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 5 000 vrt./min. Supernatant smo nato zavrgli, celice pa takoj lizirali, ali pa pred lizo shranili pri -20 °C.

### 3.2.1.4 Liza in soniciranje celic

Zbrane celice smo lizirali, pri čemer je ves postopek potekal na ledu. Celicam smo dodali pufer za lizo proteinov s histidinskim repom (His6) (10 mM Tris pH8.0, 0,1 % DOC), količina dodanega pufra je odvisna od volumna bioprocесne brozge, v kateri smo namnožili bakterije. Celicam iz 1-litrske bioprocесne brozge smo dodali 20 mL pufra za lizo. Nato smo dodali še CPI-His6 (mešanico proteaznih inhibitorjev za proteine s histidinskim repom (His6)) v razmeru 1 : 500 (v/v), s stekleno palčko dobro premešali ter inkubirali 30 minut na ledu<sup>4</sup>. Mešanica je postala sluzasto viskozna.

Sledilo je soniciranje liziranih bakterij s sonikatorjem, pri čimer smo z ultrazvokom razbili celične membrane. Lizat smo odpipetirali v stekleno čašo na ledu in jo prenesli v sonikator. Soniciranje je potekalo pri amplitudi 45 % 30 minut, tako da se je ultrazvok na vsaki 2 sekundi samodejno vklapljal za 1 sekundo. Po soniciranju smo vzorec, ki ni več smel biti viskozen, po 5 mL prenesli v centrifugirke in centrifugirali 10 minut pri 12000 vrt./min in 4 °C. Usedlino, v kateri so bila inkluzijska telesca, in supernatant smo ločeno shranili pri -20 °C. Z metodo NaDS-PAGE smo nato preverili, ali so izraženi proteini v obliki inkluzijskih teles, ali so prisotni v supernatantu. Na podlagi rezultatov smo se odločili za izolacijo proteinov iz inkluzijskih teles ali supernatanta.

### 3.2.1.5 Spiranje inkluzijskih teles in raztapljanje v pufru A

Če smo z metodo NaDS-PAGE ugotovili, da se rekombinantni proteini nahajajo v inkluzijskih telescih (IT), smo IT najprej dvakrat sprali s pufrom za spiranje IT (5 mL 10 mM Trisa pH 7,5 ali 8), tako da smo jih dvakrat po 10 minut centrifugirali pri 10000 vrt./min in pufer odlili. IT smo nato resuspendirali v pufru za lizo (1-2 mL pufra za lizo za IT, ki smo jih pridobili iz 1 L

---

<sup>4</sup> 30-minutna inkubacija na ledu ni nujno potrebna.

biorocesne brozge), centrifugirali 15 minut pri 12000 vrt./min in 4 °C, zavrgli supernatant, dodali nekaj mL vode MQ, ponovili centrifugiranje, ponovno odlili supernatant, nato pa IT v usedlini raztopili v nekaj mL pufra A (10 mM Tris, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 M GvdHCl pH 8.0) ter centrifugirali 10 minut pri 12000 vrt./min. Supernatant smo nato prenesli v sveže falkonke in izmerili absorbanco pri valovni dolžini 280 nm ter izračunali koncentracijo proteinov v vzorcu (enačba 3). Iz tako pripravljenih IT smo nato proteine v čisti obliku izolirali s kelatno kromatografijo, ali pa IT brez dodatne izolacije večkrat dializirali v izbranem pufru ali vodi MQ.

### 3.2.1.6 Kelatna kromatografija za izolacijo proteinov iz inkluzijskih teles

Z metodo kelatne kromatografije smo iz IT v zelo čisti obliku izolirali rekombinantne proteine s histidinskim repom (His6). Težava neoptimizirane metode so lahko velike izgube proteinov.

Kolono smo pripravili tako, da smo s sefarozo Ni-NTA, ki je bila shranjena v 20 % (v/v) etanolu, po rahlem premešanju napolnili plastično kolono, tako da se je posedlo med 2 in 3 mL polnila. Pred nanosom vzorca smo kolono regenerirali, tudi če je bila uporabljena prvič. Regeneracijo kolone smo izvedli po vsakem končanem čiščenju proteinov, isto kolono pa smo večkrat uporabili le za isto vrsto proteinov. Po končani uporabi smo kolono shranili v 20 % (v/v) etanolu na 4 °C.

Regeneracija kolone je potekala po naslednjem postopku:

- spiranje z 20 mM Tris pH 8 v količini 10 volumnov kolone, s tem smo sprali etanol,
- spiranje 10-krat s po 1 mL pufra D5 (10 mM Tris, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM imidazol, 6 M GvdHCl, pH 5,8),
- spiranje z 20 mM Tris pH 8 v količini 10 volumnov kolone,
- tik pred nanosom vzorca še spiranje s pufrom, v katerem je raztopljen protein, v našem primeru s pufrom A v količini 4 volumnov kolone.

Če smo kolono želeli shraniti, smo jo namesto s spiranjem s pufrom A, napolnili z 20 % (v/v) etanolom. Kolona v času, ko ni v uporabi, namreč ne sme biti v pufru, ki vsebuje GvdHCl.

Po regeneraciji je kolona pripravljena na nanos proteinov. Upoštevali smo, da 1 mL kolone veže 20 mg proteinov. Kolono smo na spodnji strani zaprli in po nanisu vzorca dodali še toliko pufra A, da je skupna količina nanešenega vzorca in pufra obsegala 2-kratni volumen kolone. Plastično stojalo smo dobro zaprli, oblepili s parafilmom, rahlo premešali in inkubirali

najmanj 1 uro (lahko pa tudi čez noč) ob rahlem stresanju pri 4 °C. Po inkubaciji smo v falkonko ulovili nevezano frakcijo ter izmerili absorbanco pri 280 nm.

Sledilo je spiranje vezanih proteinov, ki temelji na menjavi pufrov, s katerimi smo v koloni postopno zviševali koncentracijo imidazola. S tem smo postopoma spiralni nespecifično vezane proteine in druge nečistoče. Po vsaki menjavi pufra smo frakcijo prvih 13 mL ujeli v falkonko, da bi kasneje lahko z analizo ugotovili, če se je iskani protein s kolone spiral že prej, t.j. pri nižjih koncentracijah imidazola. Čiščenje je potekalo tako, da smo kolono najprej spiralni s pufrom A in sproti merili absorbanco ulovljenih frakcij. Ko je bila absorbanca nižja od 0,02, smo pričeli spirati s pufrom W1 (10 mM Tris, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM imidazol, 6 M GvdHCl pH 8.0), ponovno do absorbance 0,02, nato s pufrom W2 (10 mM Tris, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM imidazol, 6 M GvdHCl pH 8.0). Omenjene pufre smo dodajali na kolono po 5 mL.

Sledila je elucija rekombinantnega proteina. Na kolono smo zelo počasi (po 1 mL) pričeli nanašati pufer za elucijo E (10 mM Tris, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 250 mM imidazol, 6 M GvdHCl pH 5.8). Frakcije smo po nanosu lovili v 2 mL mikrocentrifugirke. Prvi 0,5 oz. 1 mL smo zavrgli. Vsem frakcijam smo izmerili absorbanco pri 280 nm<sup>5</sup>. Frakcije, ki so vsebovale proteine, smo združili in shranili pri -20 °C.

### 3.2.1.7 Izolacija proteinov iz supernatanta

V primeru, da smo z metodo NaDS-PAGE ugotovili, da se rekombinantni protein nahaja v supernatantu, smo uporabili drugačen postopek izolacije. 5 mL supernatanta smo dodali toliko PEI (polietilenimina) v založni koncentraciji 5 % (w/v), da je bila končna koncentracija PEI v supernatantu 0,05 % (w/v). S tem smo dosegli obarjanje DNK, da ta kasneje ni ovirala pretoka pri kelatni kromatografiji. Mešanico smo centrifugirali 15 minut pri 12000 vrt./min pri 4 °C. Oborjena DNA se je med centrifugiranjem posedla in smo jo zavrgli. Supernatant smo nanesli na kolono Ni-NTA, ki smo jo predhodno regenerirali, kot je opisano v poglavju 3.2.3.5, in tik pred nanosom vzorca kolono še sprali s pufrom SP1 (10 mM Tris, 100 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0) v količini 4 volumnov kolone.

---

<sup>5</sup> Upoštevali smo, da tudi če spekter ni imel oblike, ki je značilna za vzorce s proteini, so ti zelo verjetno vseeno bili v vzorcu. Vzrok za neznačilno obliko spektra je imidazol, ki lahko moti merjenje absorbance.

Kolono smo 1h pri 4 °C izpostavili rahlemu stresanju, da so se na nosilec vezali proteini. Nato smo vezani rekombinantni protein čistili s spiranjem in na koncu zbrali z elucijo, tako kot je opisano v poglavju 3.2.3.5, le da smo postopek izvedli pod nedenaturirajočimi pogoji, tako da smo uporabili pufre brez dodanega GvdHCl.

Po vrsti smo kolono spiralili s:

- pufrom SP1 (10 mM Tris, 100 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0),
- pufrom SP2 (10 mM Tris, 100 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM imidazol pH 8.0),
- pufrom SP3 (10 mM Tris, 100 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM imidazol pH 8.0).

Elucijo smo izvedli s pufrom EL1 (10 mM Tris, 100 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 250 mM imidazol pH 8.0) in frakcije zbirali na enak način, kot je opisano pri čiščenju proteinov iz inkluzijskih teles. Pufer EL1 se od pufra E razlikuje v vrednosti pH in temu, da ne vsebuje gvanidinijevega hidroklorida.

Sledila je dializa in če je bilo potrebno tudi koncentriranje, nato pa analiza z metodo NaDS-PAGE.

### 3.2.1.8 Dializa

Dializirali smo vzorce, ki so vsebovali GvdHCl in/ali imidazol: bodisi združene frakcije eluiranega proteina s kolone Ni-NTA, ki smo ga pridobili iz inkluzijskih teles ali supernatanta, bodisi samo sprana in v pufru A raztopljena inkluzijska telesca. GvdHCl in imidazol namreč zelo motita nadaljnje postopke koncentriranja, prav tako pa morajo biti vzorci za druge analize, poskuse, predvsem pa za nanos na poliakrilamidni gel pri metodi NaDS-PAGE brez omenjenih dveh kemikalij. Dializo smo izvajali z dvema različnima namenoma: pridobiti smo žeeli proteine v vodni raztopini ali ustreznom pufru in s tem odstraniti GvdHCl in imidazol, ali pa smo jo uporabili kot metodo, s pomočjo katere smo izvedli hkratno zvijanje proteinov iz denaturirane v nativno obliko in ob tem istočasno pravilno sestavljanje v proteinske membrane neposredno na filtrirnem papirju.

Vzorce za dializo smo s stiščki zaprli v dializno cev Spectra/Por® širine 24,0 mm s porami MWCO 1000 Da, ki smo jo predhodno sprali z vodo MQ. Dializno cev s proteini smo potopili v 2 L vode MQ ali pufra Tris z umerjeno pH vrednostjo. Dializa je potekala vsaj 4 ure ali preko noči ob mešanju dializnega pufra z magnetnim mešalom (v nekaterih primerih tudi brez), nato smo vodo oziroma pufer nadomestili s svežim in dializo ponovno pustili 4 ure ali preko noči. Po dializi smo vzorcem izmerili absorbanco pri 280 nm in jih zamrznili pri -20 °C.

Dializno cev smo po koncu uporabe sprali z vodo MQ in jo shranili v 20 % (v/v) etanolu. Isto dializno cev smo uporabili samo za eno vrsto proteinov.

### 3.2.1.9 Koncentriranje proteinov

Koncentrirali smo le vzorce proteinov, iz katerih sta bila predhodno z dializo odstranjena GvdHCl in imadazol. Koncentriranje ob prisotnosti teh dveh kemikalij je sicer po navodilih proizvajalca v obsegu koncentracij, ki smo jih uporabljali, dovoljeno, vendar smo empirično ugotovili, da koncentriranje brez predhodne dialize poteka bistveno počasneje.

Vzorce smo nanesli na membrano koncentratorja, predhodno spranega z vodo MQ, ter jih centrifugirali pri 4000 vrt./min toliko časa, dokler jim nismo volumna zmanjšali za izbrani faktor. Uporabili smo koncentratorje Amicon® Ultra-4 s porami velikosti 3 kDa. Po koncu koncentriranja smo koncentratorje shranili napolnjene z vodo MQ pri 4 °C.

### 3.2.1.10 Merjenje koncentracije proteinov v vzorcu

Količino proteinov v vzorcih smo ugotavljali spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 280 nm. Koncentracijo proteina v mg/mL smo izračunali s pomočjo Beer-Lambetrovega zakona:

$$\text{koncentracija proteina [mg/mL]} = \frac{A_{280}}{\varepsilon * \text{dolžina kivete [cm]}} \quad \dots (3)$$

Ekstinkcijski koeficient  $\varepsilon$  je vrednost, ki pove, koliko svetlobe lahko snov absorbira pri izbrani valovni dolžini. Pri proteinih je koeficient odvisen od prisotnosti in količine aromatskih aminokislin, predvsem triptofana. Ekstinkcijski koeficient smo na podlagi vnaprej znanega aminokislinskega zaporedja izračunali s pomočjo spletnega algoritma ProtParam (Gasteiger in sod., 1999).

### 3.2.1.11 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti NaDS (NaDS-PAGE)

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo smo izvajali s sistemom Mini-Protean II, tako kot je navedeno v navodilih proizvajalca.

Poliakrilamidne gele smo pripravljali sami, tako da smo med dve stekelci z razmikom 1,0 mm oziroma 0,75 mm najprej vlili 15 % (v/v) ločitveni gel. Sestavine so navedene v preglednici 13. Zamešali smo jih v čaši, tako kot so navedene po vrsti. S pipeto smo s tekočo mešanico napolnili prostor med stekelcema, vpetima v stojalo, ter jo prelili s 100 µL izopropanola, da se je poravnala gladina med tekočima fazama ter da smo preprečili dostop kisika iz zraka, ki bi lahko motil polimerizacijo ločitvenega gela. Po ½ ure do 45 minut smo izopropanol odstranili z odlitjem in popivnanjem s filtrirnim papirjem, na ločitveni gel pa vlili koncentracijski gel, ki smo ga v času polimeriziranja ločitvenega gela pripravili iz sestavin, tako kot so po vrsti navedene v preglednici 15 in vanj vstavili glavniček za oblikovanje žepkov za nanos vzorca. Koncentracijski gel smo pustili polimerizirati 30 minut. Uporabili smo ga takoj ali pa shranili pri 4 °C, vendar smo pred tem žepke napolnili z vodo MQ, gel ovili v omočeno papirnato brisačo in še v alu folijo.

Preglednica 15: Sestava 15 % (v/v) ločitvenega NaDS gela. Količine so navedene za pripravo dveh gelov.

Sestavina	Volumen
MQ	2,45 ml
1,5 M Tris-HCl, pH=8,8	2,5 ml
10 % (w/v) NaDS	100 µl
30 % (w/v) akrilamid/bisakrilamid	5 ml
10 % APS	50 µl

Preglednica 16: Sestava 4 % (v/v) koncentracijskega NaDS gela. Količine so navedene za pripravo dveh gelov.

Sestavina	Volumen
MQ	3,05 ml
1,5 M Tris-HCl, pH=6,8	1,25 ml
10 % (w/v) NaDS	50 µl
30 % (w/v) akrilamid/bisakrilamid	0,665 ml
10 % (w/v) APS	25 µl
TEMED	5 µl

Vzorcem supernatanta, ki smo jih želeli analizirati, smo pred nanosom na poliakrilamidni gel dodali toliko 4-kratnega nereducirajočega nanašalnega pufra, da je bila končna koncentracija tega pufra 1-kratna. V žepke 1 milimetrskega gela smo nanesli 30 µL mešanice. Vzorcem inkruziskih telesc, ki smo jih najprej centrifugirali in nato v mikrocentrifugirke prenesli z zobotrebcem ali posneli s konico plastičnega pipetnega nastavka, smo dodali 20 µL 2-kratnega nereducirajočega nanašalnega pufra. Sledila je 10-minutna denaturacija mešanic pri 95 °C<sup>6</sup>. Zatem smo sestavili aparaturo za NaDS-PAGE in v žepke nanesli mešanice vzorcev in nanašalnih pufrov, prav tako pa za reference pri kasnejšem ugotavljanju približne velikosti proteinov v vzorcih tudi enega izmed velikostnih standardov PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus, glede na to, kako velike proteine smo pričakovali v vzorcih. Elektroforeza je potekala približno 40 minut pri stalni napetosti 200 V. Med potekom elektroforeze je bilo vidno pomikanje barvila bromfenol-modrega, ki je sestavni del nanašalnega pufra. Ko je barvilo pripotovalo do spodnjega roba ločitvenega gela, smo elektroforezo ustavili, aparaturo razstavili, poliakrilamidni gel pa bodisi pobarvali z barvilm Comassie modrim ali nadaljevali z odtisom western.

### 3.2.1.12 Barvanje proteinov z barvilm Coomassie modrim

Poliakrilamidni gel smo po končani elektroforezi nekajkrat sprali z destilirano vodo, nato pa 10 minut ob rahlem stresanju barvali v barvili Coomassie modro, ki smo ga pripravili tako, da smo v volumskem razmerju 1 : 1 zmešali Coomassie z 20 % (v/v) ocetno kislino. Pripravljeno barvilo smo uporabili za 2-3 barvanja. Nato smo ozadje razbarvali z večkratnim spiranjem z mešanico 30 % (v/v) etanola in 10 % (v/v) ocetne kislino ob rahlem stresanju. Z mešanico 20 % (v/v) ocetne kislino in 10 % (v/v) glicerola smo na koncu gel fiksirali. Gel smo fotografirali.

### 3.2.1.13 Odtis western

Po končani elektroforezi smo z MQ sprani poliakrilamidni gel skupaj z nitrocelulozno membrano s porami velikosti 0,45 µm, filter papirjem in blazinicami enakih velikosti zložili v napravo za imunski odtis. S pomočjo električnega toka so se proteini z gela prenesli in vezali na membrano. Na negativno nabito elektrodo smo po vrsti zložili: blazinico, filtrirni papir, poliakrilamidni gel, membrano, ponovno filtrirni papir in blazinico, ter jo prekrili s pozitivno

---

<sup>6</sup> Poliakrilamidno gelsko elektroforezo smo enako uspešno izvajali tudi tako, da smo 10-minutno denaturacijo vzorcev pri 95 °C izpustili.

nabito elektrodo. To je predstavljalo eno enoto za prenos ali kaseto. Vstavili smo jo v plastično posodo, napolnjeno z ohljenim (4 °C) pufrom za odtis western. Sestava pufra je navedena v preglednici 9 (pufer za mokri prenos proteinov na membrano pri odtisu western). Poleg kasete smo v pufer namestili še hladilno enoto: to je plastična posodica, napolnjena z ledom. Med potekom prenosa je preprečevala, da bi se pufer zaradi električnega toka pregreval in bi prišlo do neželene denaturacije proteinov. Približno na polovici prenosa smo jo zamenjali, saj se je do tedaj led stalil. Prenos je potekal 90 minut pri stalem toku 350 mA ob rahlem mešanju z magnetnim mešalom.

Po končanem prenosu smo membrano sprali z MQ in jo 60 minut ali preko noči blokirali pri 4 °C s pufrom za blokiranje I (TBS s 6 % mlekom v prahu). Membrano smo pri sobni temperaturi nato nekajkrat sprali z 1-kratnim pufrom TBS, ki smo ga predhodno pripravili iz 10-kratnega TBS. Po spiranju smo membrano zavarjeno v vrečki PVC 60 min ob rahlem stresanju inkubirali v raztopini s primarnimi mišjimi protitelesi tetra-His (Quiagen), ki se specifično vežejo na štiri histidinske ostanke aminokislin<sup>7</sup>. Raztopino smo pripravili tako, da smo primarna protitelesa dodali v pufer za blokiranje I v razmerju<sup>8</sup> 1 : 2000. Sledilo je nekajkratno spiranje po 5 minut s pufrom TBS. Nato smo membrano po enakem postopku kot prej inkubirali s sekundarnimi kozjimi protitelesi IgG (Santa Cruz), ki so konjugirana s hrenovo peroksidazo in specifično prepoznajo primarna protitelesa. V pufru za blokiranje I smo jih redčili v razmerju 1 : 3000 in inkubirali ob rahlem stresanju 40 minut. Razmerje redčenja in čas inkubacije s protitelesi je tako kot pri primarnih protitelesih navedeno v navodilih proizvajalca.

Za detekcijo hrenove peroksidaze in s tem ugotavljanje prisotnosti in mesta proteinov na membrani smo uporabili reagent ECL (Amersham™ ECL™ Western Blotting Detection Reagents), ki smo ga pred uporabo svežega pripravili po navodilih proizvajalca. Če se je izkazalo, da je reagent ECL premalo občutljiv in kemoluminiscence nismo zaznali, smo uporabili sveže pripravljen reagent Pico (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate). V primeru, da se je tudi ta izkazal za premalo občutljivega, smo uporabili sveže pripravljen reagent Femto (SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate). 1,5 mL pripravljenega izbranega reagenta smo nakapljali na stekleno ploščo, nanjo pa položili membrano, tako da je bila stran z vezanimi proteini potopljena v reagent. Inkubacija je potekala pri sobni temperaturi toliko časa, kot je navedeno v navodilih proizvajalca.

---

<sup>7</sup> Čas inkubacije membrane v raztopini s protitelesi je odvisen od vrste protiteles in je naveden v navodilih proizvajalca.

<sup>8</sup> Razmerje je odvisno od vrste protiteles in je navedeno v navodilih proizvajalca.

Membrano smo nato vstavili med dve trši plastični foliji in jo posneli v beli svetlobi in v temi (zaradi kemoluminiscence) v napravi za slikanje membran G:BOX. Posnetka smo s pripadajočim računalniškim programom prekrili in ustrezno obdelali. Na območjih vezanih protiteles smo zaznali temnejše lise.

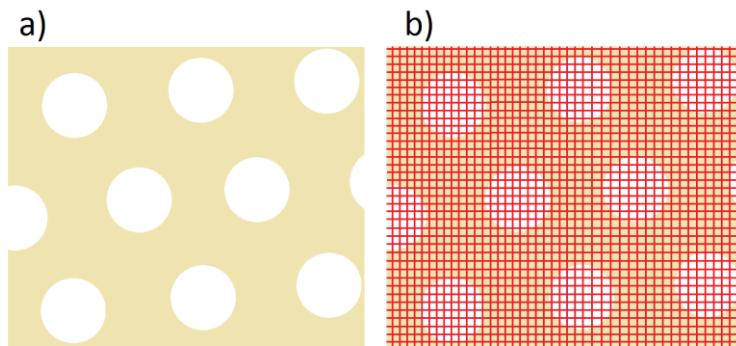
### 3.2.1.14 Barvanje proteinov z barvilo Ponceau S

Filtrirni papir z vezanimi proteini ali filtrirni papir sam smo po dializi z barvilo Ponceau S barvali tako, da smo filtrirni papir potopili v barvilo in rahlo stresali 5 minut na sobni temperaturi, zatem pa ga sprali v destilirani vodi. Barvilo Ponceau S se veže na proteine in jih s tem rdeče obarva.

### 3.2.1.15 Priprava proteinskih membran na nosilcu

Za nastanek proteinskih membran iz fuzijskih proteinov smo potrebovali nosilec, na katerem bi se membrane tvorile. V ta namen smo uporabili filtrirni papir. Proteinske membrane iz omenjenih proteinov smo pripravljali na nosilcu – filtrirnem papirju (tip GVPP) z velikostjo por 0,22 µm. Proteinov na filtrirni papir nismo nanašali s pipeto, temveč smo ga vložili skupaj s spranimi in v pufru A raztopljenimi inkluzijskimi telesci v dializno cev in dializo izvedli dvakrat v 2L 20 mM Hepesa z ustreznim pH.

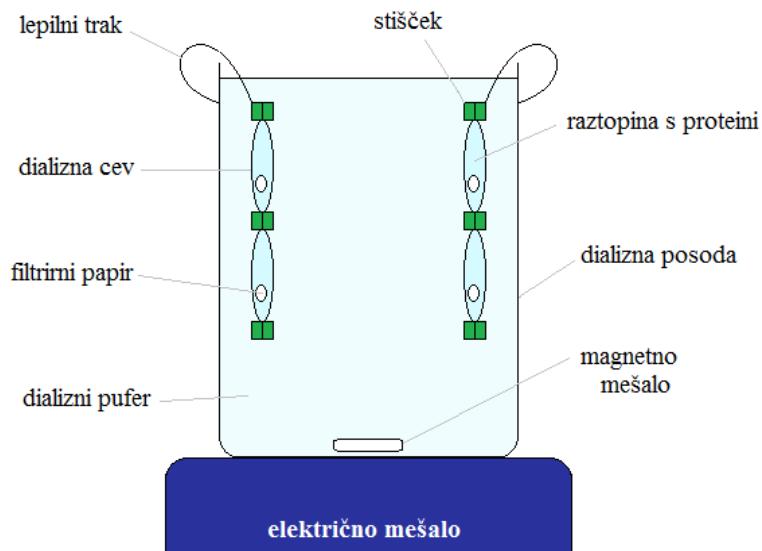
Pufer A je vseboval 6 M gvanidinijev hidroklorid, v katerem so proteini dobro topni. To je močan denaturant proteinov. Med dializo, pri kateri smo gvanidinijev hidroklorid počasi odstranili, je prišlo do postopnega prehoda proteinov iz denaturirane v nativno obliko in močnega obarjanja. V vodnem okolju pri danih pogojih so bili proteini netopni. Ker smo v dializno cev predhodno vstavili nosilec, smo predpostavili, da se bodo proteini med zvijanjem iz denaturirane nazaj v nativno obliko nabrali na nosilcu in se hkrati počasi zložili v mrežo, kot je predvideno glede na njihovo strukturo. Proteinska mreža naj bi tako prekrila nosilec z velikimi porami – filtrirni papir (slika 23).



Slika 23: Shematski prikaz nosilca – filtrirnega papirja. Pore s premerom 22 µm so prikazane kot beli krogi (a) in nosilec, prekrit s proteinsko mrežo (b).

- proteina APH\_p53 in Bcr\_p53

Dializo smo izvedli tako, da smo v dializno posodo z vključenim mešanjem pokončno vstavili dializni cevi s proteinom APH\_p53 v koncentracijah 0,2 mg/mL in 2,0 mg/mL v pufru A in vstavljenim nosilcem v vsakem prekatu dializne cevi, kot je prikazano na slikah 24 in 25.

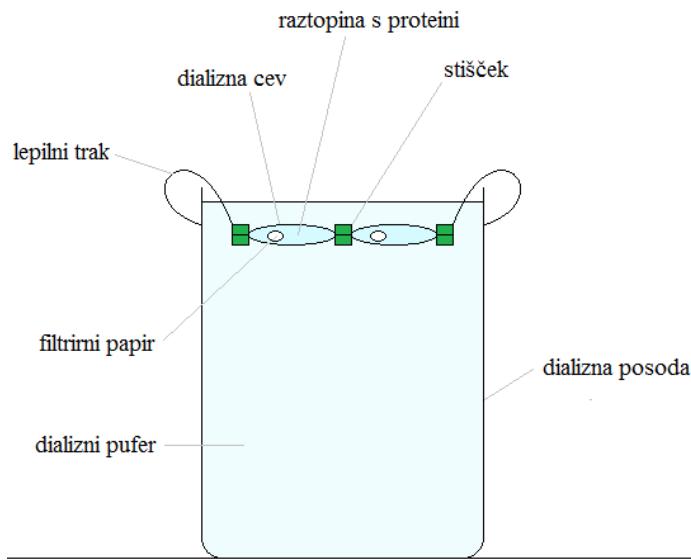


Slika 24: Shematski prikaz dializne posode z vključenim mešanjem in pokončno vstavljenimi dializnimi cevkami, ki so s stički ločene v prekate. V vsakem prekatu je protein z izbrano koncentracijo in nosilec – filtrirni papir. Protein smo pripravili v koncentracijah 0,2 mg/mL in 2,0 mg/mL.



Slika 24: Fotografija dializne posode z vključenim mešanjem in pokončno vstavljenimi dializnimi cevkami, ki so s stiščki ločene v prekate.

V nadaljevanju smo metodo optimizirali, tako da smo dializo izvajali brez mešanja in z vodoravno postavljenou dializno cevjo, prav tako ločeno v prekate s stiščki in vstavljenimi nosilci. V prekate dializne cevi smo, da bi se na filtrirni papir naložila čim debelejša plast proteinov, natočili proteine v bistveno višjih koncentracijah: 10 mg/mL in 20 mg/mL v pufru A (slike 26 in 27).



Slika 25: Shematski prikaz dializne posode brez mešanja in s vodoravno vstavljenou dializno cevjo, ki je s stiščki ločena v prekate. V vsakem prekatu je protein z izbrano koncentracijo in nosilec – filtrirni papir. Protein smo pripravili v koncentracijah 10 mg/mL in 20 mg/mL.



Slika 27: Fotografija dializne posode brez mešanja in z vodoravno vstavljenou dializno cevjo, ki je s stički ločena v prekate.

Popolnoma enako, kot sta opisana oba načina dialize za protein APH\_p53, smo pripravili tudi dialize z nosilci za protein Bcr\_p53.

- domena tet proteina p53

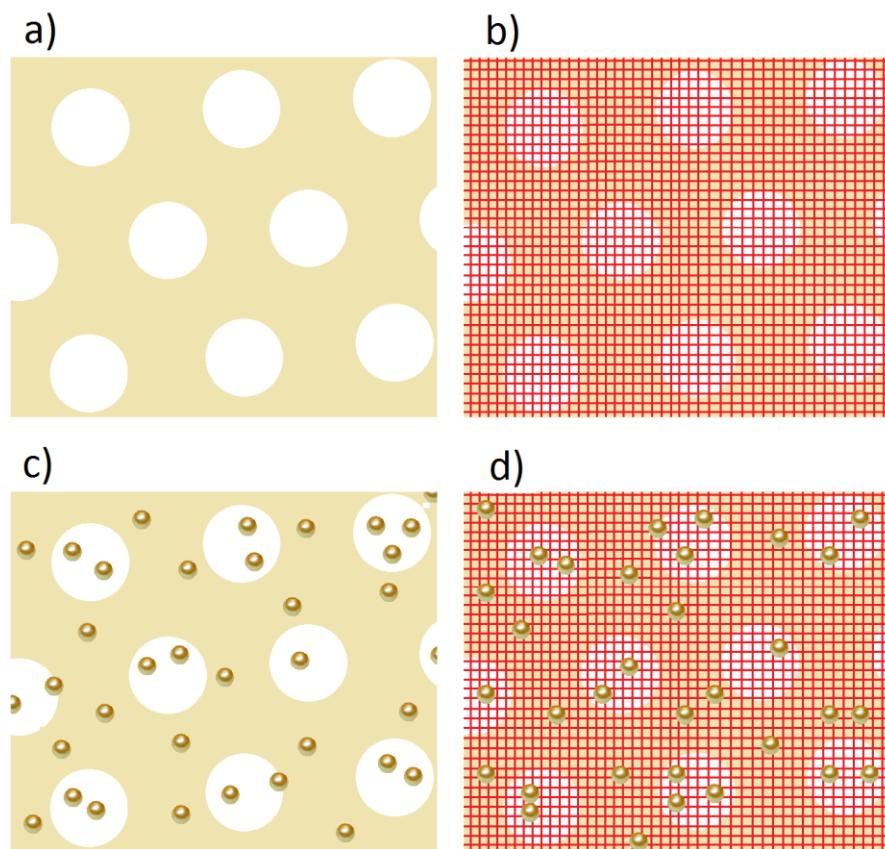
Vzorcu z domeno tet proteina p53 smo po izolaciji na koloni Ni-NTA in dvakratni dializi v 2L vode MQ dodali gvanidinijev hidroklorid do koncentracije 6 M. Tega proteina namreč nismo pridobili kot oborino po dializi, da bi jo raztopili v pufru A (kot smo to napravili pri APH\_p53 in Bcr\_p53), ampak v topni obliku. Najvišja koncentracija proteina, ki smo jo lahko pripravili v 6 M gvanidinijevem hidrokloridu, je bila zato 0,2 mg/mL. S to koncentracijo smo tudi izvedli dializo v pufru 20 mM Hepes pH 8 v dializni cevi s prekatim in vstavljenim nosilcem kot je prikazano na slikah 26 in 27.

Domeno tet proteina p53 smo uporabili kot negativno kontrolo, saj v nasprotju s proteinoma APH\_p53 in Bcr\_p53 nismo pričakovali, da bi se na nosilcu tvorila membrana.

pH dializnega pufra (20 mM Hepes) smo izbrali glede na izoelektrično točko proteinov. Izoelektrična točka proteina APH\_p53 je 5,02, proteina Bcr\_p53 6,59, domene tet proteina p53 pa 6,57. Za dializni pufer prvega smo izbrali pH 7,5, drugega 8,5, za tretjega pa 8,0. Takšne vrednosti pH smo izbrali, ker nismo želeli, da bi se proteini povsem oborili, temveč da bi delno ostali tudi v topni obliku, s čimer bi povečali verjetnost pravilnega sestavljanja proteinov na nosilec. Nizkim pH vrednostim smo se izogibali, da ne bi prišlo do hidrolize v kislem okolju.

### 3.2.1.16 Metoda preverjanje velikosti por proteinskih membran

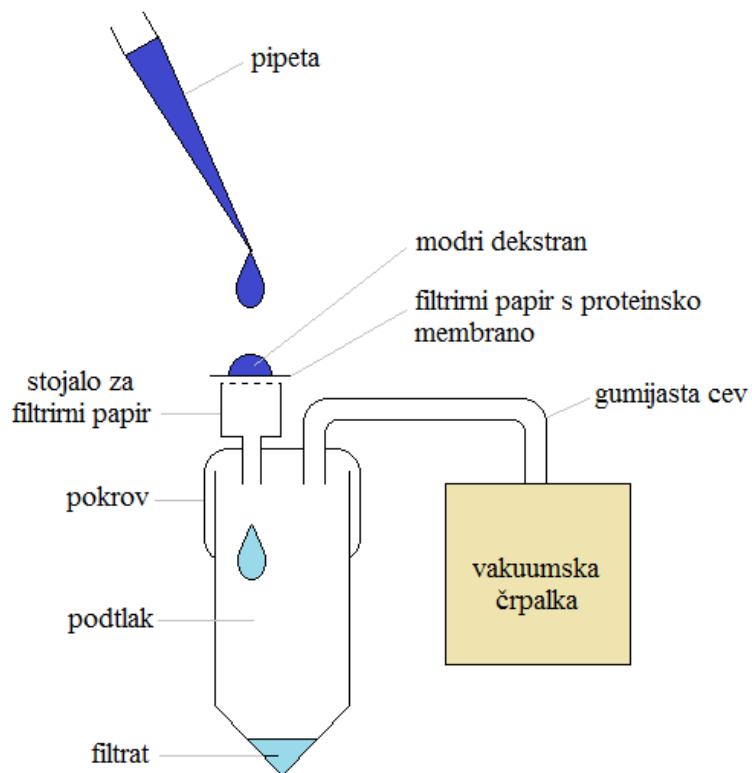
V prejšnjih poglavjih smo opisane postopke izvedli, da bi pridobili proteine, vezane na nosilcu, filtrirnem papirju. Med dializo so se na nosilec vezali proteini, kar smo pokazali z barvanjem po Ponceauju. Na sliki 28 so shematično prikazane stopnje poskusa. Nosilec, ki sam prepušča delce nanometrskih velikosti, smo prekrili s proteinsko membrano, ta pa naj bi delce zadržala.



Slika 26: Shematski prikaz nosilca, neprekritega in prekritega s proteinsko membrano ter filtracije delcev nanovelikosti. a) Nosilec s porami; b) nosilec, prekrit s proteinsko membrano; c) filtriranje nanodelcev skozi sam nosilec; d) filtriranje nanodelcev skozi nosilec, prekrit s proteinsko membrano. Narisani objekti niso v pravilnih velikostnih razmerjih, ker gre za shematski prikaz.

V nadaljevanju smo preverjali, če med proteinskimi gradniki res pride do zamreženosti, tako kot je bilo predvideno glede na njihovo zgradbo. Med seboj naj bi se gradniki APH\_p53 povezali v mrežo. Prav tako gradniki Bcr\_p53, ne pa tudi gradniki domene tet proteina p53.

To smo preverjali tako, da smo skozi proteinske membrane s pomočjo filtrirne naprave, ki je shematsko prikazana na sliki 29, filtrirali delce nanometrskih velikosti. Predvideli smo, da bodo proteinske membrane delce zadržale, če so pore v membranah dovolj majhne.



Slika 29: Shematski prikaz filtrirne naprave za filtriranje delcev nanovelikosti skozi proteinsko membrano na nosilcu.

Filtrirno napravo smo sestavili iz zaprte zbirne posodice, na katero smo pritrdili stojalo, kamor smo položili nosilec – filtrirni papir s proteinsko membrano. Zbirno posodico smo zrakotesno zaprli in jo z gumijasto cevjo povezali s črpalko, tako da smo v posodici ustvarili podtlak. Na nosilec s proteinsko membrano smo nanesli po 200-500  $\mu\text{L}$  raztopine nanodelcev (ki smo ji pred tem izmerili absorbanco), da je ta počasi pronica skozi membrane ali, pri negativni kontroli, skozi sam nosilec.

### 3.2.1.17 Postopek filtriranje modrega dekstrana skozi proteinske membrane

Prepustnost proteinskih membran in s tem posredno velikost por smo preverjali s filtriranjem modrega dekstrana z molsko maso 2000 kDa in hidrodinamskim radiem 29 nm, ki smo ga pripravili v koncentraciji 0,5 mg/mL. Absorpcijski spekter modrega dekstrana doseže svoj maksimum pri valovni dolžini 630 nm (Ulano in Cabib, 1973), zato smo pri tej valovni dolžini merili absorbanco. Nato smo modri dekstran prefiltrirali skozi sam nosilec (filtrirni papir s porami velikosti 22 µm) v desetih ponovitvah. Po vsakem filtriranju smo filtratu izmerili absorbanco.

Filtriranje smo ponovili skozi proteinske membrane, ki so bile pripravljene iz:

- proteina APH\_p53, dializiranega pri koncentracijah 0,2 mg/mL, 2 mg/mL, 10 mg/mL in 20 mg/mL;
- proteina Bcr\_p53, dializiranega pri koncentracijah 0,2 mg/mL, 2 mg/mL, 10 mg/mL in 20 mg/mL;
- domene tet proteina p53, dializirane pri koncentraciji 0,2 mg/mL

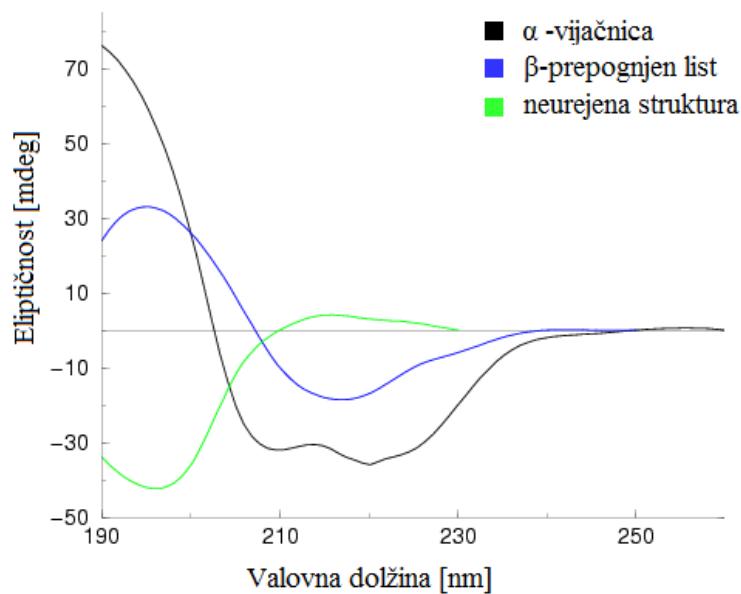
in vsakič izmerili absorbanco filtrata modrega dekstrana pri valovni dolžini 630 nm.

Za vsak protein pri vsaki koncentraciji smo opravili deset ponovitev, vse meritve so navedene v prilogi C. Pred tem smo za modri dekstran pripravili umeritveno krivuljo (priloga D), da smo vse meritve absorbanc lahko preračunali v koncentracije (priloga E).

Rezultati statistične obdelave podatkov so prikazani v poglavju 4.2.

### 3.2.1.18 Ugotavljanje strukture proteinov z merjenjem cirkularnega dikroizma

Z uporabo spektrofotometra Chirascan CD (Applied Photophysics) in pripadajočim računalniškim programom smo preverili sekundarno strukturo proteinov. Sekundarna struktura proteinov je lahko v obliki strukture alfa ali beta ali kot neurejena struktura. Spektre smo merili v območju 200-260 nm valovne dolžine in s primerjavo že znanih krivulj za posamezne strukture (slika 30) predvideli sekundarno strukturo. Dolžina poti, po kateri je svetlobni žarek potoval po vzorcu v kiveti je bila 1 mm, časovni interval med meritvami 1 sekunda, temperatura 20 °C, koncentracija proteinov 0,1-0,5 mg/mL v 10 mM Hepes-u pH 7,5-8,5 ali v MQ.



Slika 30: Značilne oblike krivulj za sekundarne strukture proteinov, pridobljenih z merjenjem cirkularnega dikroizma.

### 3.2.1.19 Dinamično sisanje svetlobe (DLS)

Dinamično sisanje svetlobe je fizikalna tehnika, s katero ugotavljamo, kakšna je velikostna porazdelitev delcev v suspenziji ali polimerov v raztopini. Princip temelji na sisanju svetlobe, ki jo v obliki laserskega žarka pošljemo skozi vzorec. Delci so v raztopini ali suspenziji ves čas podvrženi Brownovemu gibanju. Svetloba se ob prehodu skozi raztopino z delci, ki so glede na valovno dolžino svetlobe zelo majhni, razprši v vse smeri. Zaradi gibanja delcev se ves čas spreminjajo tudi razdalje med njimi, zato tudi intenziteta razprševanja po času stalno

niha. Naprava detektira razpršeno svetlobo pod različnimi koti, ta se spreminja glede na difuzijsko hitrost delcev v raztopini. Difuzijska hitrost je odvisna od velikosti delcev. Z analizo sprememb v intenziteti razpršene svetlobe z omenjeno tehniko ugotavljamo hidrodinamski radij delcev. Ključno je, da so vzorci pred merjenjem dinamičnega sisanja svetlobe filtrirani in centrifugirani, da se na ta način odstrani prašne delce in neželene aggregate, ki bi motili meritve.

Meritve dinamičnega sisanja svetlobe smo opravili z napravo Zetasizer Malvern. Analizirali smo raztopino modrega dekstrana v koncentraciji 0,2 mg/mL.

### 3.2.2 Metode statistične obdelave podatkov

V tem poglavju so navedeni le računski postopki obdelave podatkov. Postavili smo ničelno in alternativno domnevo ter ju s pomočjo t-statistik preverili. Rezultati statistične obdelave so prikazani in razloženi v poglavju 4.2.

Vse izmerjene absorbance filtratov modrega dekstrana, preračunane v koncentracije, smo ovrednotili s statistično analizo (Košmelj, 2007).

Predpostavljamo, da bi bile meritve koncentracij v neskončnih ponovitvah meritev normalno porazdeljene. Poskusi so razdeljeni na izračune koncentracij modrega dekstrana v filtratih posameznih vzorcev, pri čemer je za vsak filtrat izvedenih več ponavljenih meritev, izračunano povprečje, vzorčna varianca (enačba 4) in vzorčni standardni odklon (enačba 5) (priloga E).

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad \dots (4)$$

$$s = \sqrt{s^2} \quad \dots (5)$$

Meritve so bile ponavljane tako, da je bil modri dekstran skozi isti nosilec s proteinsko membrano filtriran desetkrat brez vmesnega spiranja membrane. Meritve absorbance in izračunane pripadajoče koncentracije so v prilogah navedene v vrstnem redu meritev, opaziti je, da se prepustnost tudi po večih meritvah ne spreminja. Iz tega smo sklepali, da isto proteinsko membrano lahko uporabimo večkrat.

Kot že omenjeno, smo za negativno kontrolo izbrali nosilec z naloženimi domenami tet proteina p53. Ta je služila kot osnova za primerjavo vseh filtratov, ki smo jim izmerili koncentracije po filtriranju skozi proteinske membrane APH\_p53 in Bcr\_p53, pripravljene pri različnih koncentracijah. Vsako skupino naslednjih meritev smo torej primerjali z navedeno negativno kontrolo in dobili skupino parov neodvisnih vzorcev. Za vsak par smo postavili ničelno in alternativno domnevo. Katera se je za posamezni par izkazala kot pravilna, smo ugotavljali z računanjem t-statistik pri izbrani stopnji značilnosti 0,02. Pri tej stopnji kritična vrednost t-statistike zavzame vrednost 2,552 ( $\pm t_{001}(18) = \pm 2,552$ ).

Ničelna domneva se glasi: povprečji vzorca 1 in vzorca 2 sta enaki in/ali pa je povprečje vzorca 2 višje od povprečja vzorca 1.

Alternativna domneva se glasi: povprečji vzorca 1 in vzorca 2 nista enaki in/ali pa je povprečje vzorca 2 nižje od povprečja vzorca 1.

Vzorec 1 je vedno predstavljala negativna kontrola (filtrati skozi domeno tet proteina p53), vzorec 2 pa so v posameznih parih dvojic predstavljali filtrati skozi membrane Bcr\_p53 oziroma APH\_p53, ki so bile pripravljene pri različnih koncentracijah.

t-statistike za posamezne pare vzorcev smo izračunali bodisi z enačbo 6, bodisi z enačbo 7, pri čemer  $\bar{x}_1$  in  $\bar{x}_2$  prestavljata povprečji koncentracij filtratov vzorca 1 in 2,  $\delta_0$  razliko povprečij vzorcev 1 in 2, ki je glede na ničelno in alternativno domnevo enaka nič,  $s_1^2$  in  $s_2^2$  vzorčni varianci vzorcev 1 in 2,  $n_1$  in  $n_2$  pa velikosti vzorcev, ki je v vseh primerih enaka 10.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - \delta_0}{\sqrt{s_{sk}^2 * (\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2})}} \quad \dots (6)$$

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - \delta_0}{\sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{n_1 + n_2}}} \quad \dots (7)$$

Enačbo 6 smo uporabili v primeru, ko smo lahko predpostavili, da sta vzorčni varianci vzorca 1 in 2 enaki. Ta pogoj je izpolnjen v primeru, če je razmerje vzorčnih varianc vzorcev manjši od 2 (enačba 8).

$$\frac{\max(s_1^2, s_2^2)}{\min(s_1^2, s_2^2)} < 2 \quad \dots (8)$$

Skupno varianco se izračuna z enačbo 9, ki jo – ker je velikost vzorca 1 in 2 vedno enaka (deset meritev) – lahko poenostavimo (enačba 10):

$$s_{sk}^2 = \frac{(n_1-1)*s_1^2 + (n_2-1)*s_2^2}{n_1+n_2-2} \quad \dots (9)$$

$$s_{sk}^2 = \frac{s_1^2 + s_2^2}{2} \quad \dots (10)$$

Enačbo 7 smo uporabili v primeru, da po enačbi 8 nismo mogli predpostaviti, da sta vzorčni varianci vzorca 1 in 2 enaki.

Vse meritve in izračuni so prikazani v prilogah C, D in E, v prilogi F pa so zbrani rezultati statistične analize.

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 4.1 REZULTATI KLONIRANJA

Sistem kloniranja je podrobno opisan v poglavju 3.2.3.

Nukleotidno zaporedje združenih insertov vseh treh končnih konstruktov konstrukti *APH\_p53*, *Bcr\_p53* in domene tet zaporedja *p53* smo pred transformacijo v produkcijske seve za izražanje proteinov potrdili s sekvenciranjem. Ugotovili smo, da je bilo kloniranje uspešno in da so se vsa tri s sekvenciranjem pridobljena zaporedja ujemala s predvidenimi.

Med zaporedjema *aph* in *p53* ter *bcr* in *p53* je nastalo povezovalno mesto ali »scar«, ki ga predstavlja vrinjeno zaporedje šestih nukleotirov, nastalo zaradi ligacije štrlečih koncev, ki so bili rezani z dvema različima encimoma (BspEI in NgoMIV). To povezovalno mesto zapisuje aminokislini serin (Ser, S) in glicin (Gly, G) (TCCGCC).

### 4.2 PRODUKCIJA PROTEINSKIH GRADNIKOV

#### 4.2.1 Analiza inkluzijskih teles in supernatanta

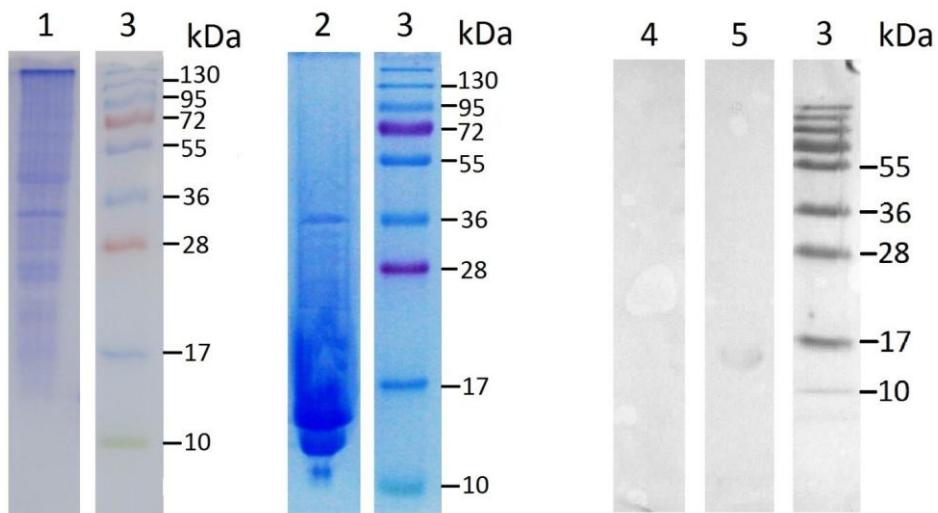
Po fermentaciji, zbiranju celic, lizi, soniciranju in spiranju inkluzijskih teles vsakega posameznega proteina smo z metodo NaDS-PAGE preverili, ali se rekombinantni protein nahaja v netopni frakciji celičnega lizata (t.j. v obliki inkluzijskih telecs) ali v supernatantu. Ugotovili smo, da se sestavljena proteina *APH\_p53* in *Bcr\_p53* pojavljata v netopnih inkluzijskih, protein *p53* pa v supernatantu, kar smo kasneje dokazali tudi z metodo odtisa western. Velikost proteinov smo ocenili v primerjavi z obarvanim proteinskim standardom. Po oceni z NaDS-PAGE in odtisom western je protein *APH\_p53* velik približno 13 kDa, *Bcr\_p53* približno 10 kDa, *p53* pa okoli 0,5 kDa. Številke se za proteina *APH\_p53* in *Bcr\_p53* približno ujemajo s podatki, pridobljenimi s spletnim orodjem ProtParam (Gasteiger in sod., 1999), navedenimi v poglavju 3.2.1.1. Ocena velikosti domene tet proteina *p53* z metodo odtisa western, ki je približno 0,5 kDa, pa se ne ujema s podatkom o velikosti, pridobljenim s spletnim orodjem ProtParam, po katerem naj bi bil protein velik 5,5 kDa. Kljub temu sklepamo, da gre za ta protein, saj smo z omenjeno metodo zelo specifično zaznali proteine s histidinskim repom. Možnih vzrokov za odstopanje ocene velikosti proteinov z metodama NaDS-PAGE in odtisom western od predvidene velikosti je več: na proteine se med postopkom lahko veže manj NaDS kot je predvideno (1,2 g NaDS/g proteinov), zato na gelu potujejo počasneje. To se je lahko zgodilo pri proteinu *APH\_p53*, ki naj bi bil po podatku,

pridobljenim z orodjem ProtParam velik 10 kDa. Pri majhnih proteinih, kot je domena tet protein p53, so lahko odstopanja med predvideno in ocenjeno velikostjo znatnejša kot pri večjih (Hjelmeland in Chrambach, 1981, cit. po Molecular weight..., 2011; Sallantin in sod., 1990, cit. po Molecular weight..., 2011).

#### 4.2.1.1 Protein APH\_p53

Na sliki 31 sta na levi in na sredini prikazana 15 % poliakrilamidna gela s proteinom APH\_p53, pripravljena z metodo NaDS-PAGE po barvanju z barvilm Comassie modro, na desni pa nitrocelulozna membrana z istim proteinom, pripravljena po metodi odtisa western. Za detekcijo hrenove peroksidaze smo uporabili reagent SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate. Številka 1 prikazuje supernatant bakterijskih celic po soniciranju s topnim delom frakcije proteinov. Med njimi je nekaj večjih proteinov, ni pa ustrezne lise proteinov okoli ali malo nad velikostjo 10 kDa, kar pomeni, da se protein APH\_p53 ne nahaja v topni frakciji lizata. Številka 2 prikazuje nanos inkluzijskih teles z netopnim delom frakcije lizata po soniciranju. Vidno je močno obarvanje proteina velikosti približno 13 kDa, kar ustreza velikosti proteina APH\_p53. Sklepamo lahko, da se protein nahaja v obliki inkluzijskih teles, zato smo čiščenje in izolacijo nadaljevali iz netopne frakcije.

Na desni strani je prikazana nitrocelulozna mebrana po odtisu western, kjer je pod številko 4 prikazana odsotnost lis v supernatantu, po številko 5, ki prikazuje netopno frakcijo, pa lisa ustrezne velikosti pribložno 13 kDa. Z metodo odtisa western smo tako tudi nedvomno dokazali, da se APH\_p53 res nahaja v obliki inkluzijskih teles.

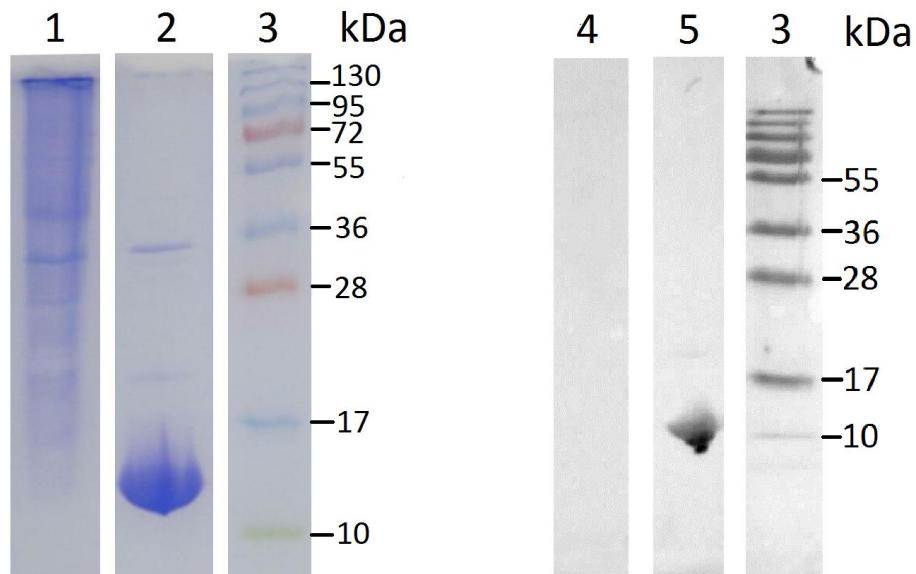


Slika 31: Ugotavljanje prisotnosti proteina APH\_p53 na 15 % poliakrilamidnem gelu po barvanju s Comassie modrim (levo in na sredini) in z western odtisom (desno). 1 – supernatant – topna frakcija celičnega lizata; 2 – inkluzijska telesca – netopni del celičnega lizata s proteinom APH\_p53; 3 – proteinski standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 4 – supernatant – topna frakcija celičnega lizata; 5 – inkluzijska telesca – netopni del celičnega lizata s tetramerizacijsko domeno proteina APH\_p53.

Na desni strani je prikazana nitrocelulozna membrana po odtisu western, kjer je pod številko 4 prikazana odsotnost lis v supernatantu, po številko 5, ki prikazuje netopno frakcijo, pa lisa ustrezne velikosti približno 13 kDa. Z metodo odtisa western smo tako tudi nedvomno dokazali, da se APH\_p53 res nahaja v obliki inkluzijskih teles.

#### 4.2.1.2 Protein Bcr\_p53

Slika 32 na levi strani prikazuje 15 % poliakrilamidni gel s proteinom Bcr\_p53, pripravljen po metodi NaDS-PAGE po barvanju z barvilkom Comassie modro, na desni pa nitrocelulozno membrano z istim proteinom, pripravljeno po metodi odtisa western. Za detekcijo hrenove peroksidaze smo uporabili reagent SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate. Številka 1 prikazuje topni del frakcij v supernatantu, ki prav tako vsebuje nekaj večjih proteinov, ne pa konstrukta Bcr\_p53. Ta se namreč nahaja v obliki inkluzijskih teles v netopnem delu frakcije. Poleg močno obarvane lise pri velikosti približno 11 kDa skoraj ni drugih nečistoč, zato sklepamo, da je protein Bcr\_p53 v inkluzijskih telesih v zelo čisti obliki.



Slika 32: Ugotavljanje prisotnosti proteina Bcr\_p53 na 15 % poliakrilamidnem gelu po barvanju s Comassie modrim (levo) in z western odtisom (desno). 1 – supernatant – topna frakcija celičnega lizata; 2 – inkluzijska telesca – netopni del celičnega lizata s proteinom Bcr\_p53; 3 – proteinski standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 4 - supernatant – topna frakcija celičnega lizata; 5 – inkluzijska telesca – netopni del celičnega lizata s proteinom Bcr\_p53.

Na levi strani je prikazan odtis western proteina Bcr\_p53, s številko 4 je označen supernatant, s številko 5 pa inkluzijska telesca. Vidna je močna obarvanost, ki ustreza velikosti 10 kDa, kar je tudi pričakovano.

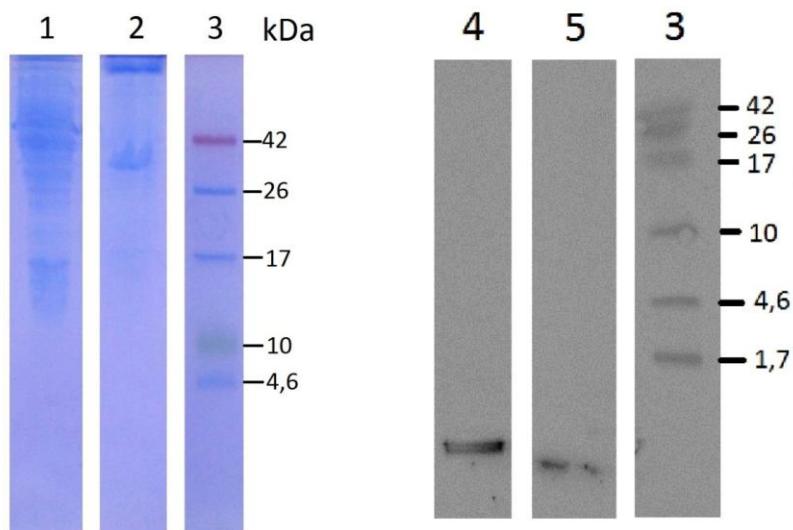
Tako pri številki 2 kot pri številki 5 na sliki 29 so vidne lise, ki ustrezajo večjim velikostim. Glede na to, da je eden izmed dveh višjih lis specifično obarvan tudi pri metodi odtisa western, lahko sklepamo, da so to polimerne oblike proteina Bcr\_p53. Glede na aminokislinsko

zaporedje, strukturo proteina in višino lis bi bilo povsem verjetno, da ti predstavljajo dimere in tetramere tega proteina. Pri metodi NaDS-PAGE smo vedno uporabili nereducirajoči nanašalni pufer, saj v strukturi ni nobenih disulfidnih mostičkov, ki bi jih lahko reducirali.

#### 4.2.1.3 Tetramerizacijska domena proteina p53

Slika 33 levo prikazuje 15 % poliakrilamidni gel z domeno tet proteina p53, pripravljena po metodi NaDS-PAGE po barvanju z barvilkom Comassie modro, desno pa nitrocelulozno membrano z istim proteinom, pripravljeno po metodi odtisa western. Pri slednji je bil uporabljen reagent SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate.

Pod številko 1 je nanešen supernatant, v katerem je razvidno, da se nahajajo večji proteini, pod številko 2 pa so nanešena inkluzijska telesca. Glede na to, da je obarvanost zelo šibka in kontrast majhen, s poliakrilamidnega gela tudi ni razvidno, da bi se v inkluzijskih telescih ali v supernatantu nahajal iskani protein, zato smo izvedli še metodo odtisa western. Ta je pokazala, da se ga del nahaja tako v netopni frakciji v obliki inkluzijskih teles, kot tudi v supernatantu, vendar v slednjem precej več. Izolacijo domene tet proteina p53 smo zato nadaljevali iz supernatanta s kelatno kromatografijo, tudi zato, ker v centrifugirkah z usedlino, kjer naj bi bila inkluzijska telesca, le teh že na videz praktično ni bilo.



Slika 33: Ugotavljanje prisotnosti proteina p53 na 15 % poliakrilamidnem gelu po barvanju s Comassie modrim (levo in na sredini) in z western odtisom (desno). 1 – supernatant – topna frakcija celičnega lizata; 2 – inkluzijska telesca – netopni del celičnega lizata s tetramerizacijsko domeno proteina p53; 3 – proteinski standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus. 4 - supernatant – topna frakcija celičnega lizata; 5 - inkluzijska telesca – netopni del celičnega lizata s tetramerizacijsko domeno proteina p53.

## 4.2.2 Čiščenje inkluzijskih telesc ali supernatanta in analiza proteinov

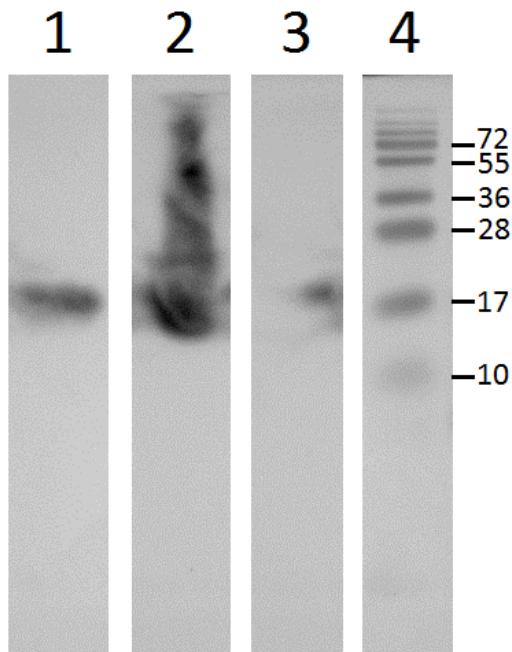
### 4.2.2.1 Protein APH\_p53

Kot je opisano v prejšnjem poglavju, smo ugotovili, da se protein APH\_p53 nahaja v obliki inkluzijskih telesc. Ta smo nato sprali in raztopili v pufru A, nato pa iz polovice raztopljenih inkluzijskih telesc izolirali protein APH\_p53 s kelatno kromatografijo na koloni Ni-NTA. Pred nanosom inkluzijskih telesc na kolono Ni-NTA je bila koncentracija proteinov zelo visoka. Iz enega litra bioprocесне brozge smo v obliki inkluzijskih telesc pridobili približno 55 mg proteina.

Po čiščenju inkluzijskih telesc s kelatno kromatografijo smo frakcije zbrali v pufru E in jih dializirali dvakrat v 2L 10 mM Hepes pH7. Oborine praktično ni bilo, iz supernatanta pa sko po koncentriranju pridobili 0,65 mg očiščenega proteina APH\_p53.

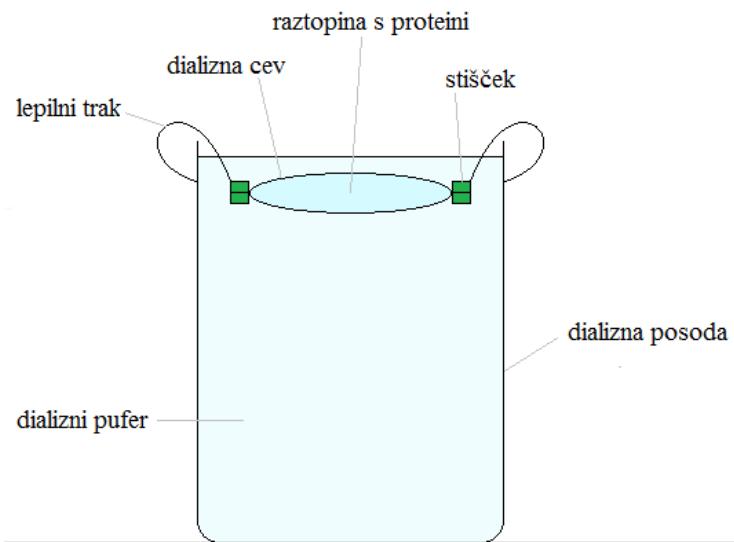
Glede na to, da smo na koloni Ni-NTA iz 26 mg inkluzijskih telesc pridobili le 0,65 mg proteina APH\_p53, lahko sklepamo, da so izgube zelo velike in da se je protein s kolone večinoma spral že pred elucijo. Lahko bi poskusili optimizirati postopek kelatne kromatografije, tako da bi omejili količino katerega izmed pufrov za spiranje z višjo koncentracijo imidazola ali pa ga povsem izpustili. Druga možnost, ki pa smo se je poslužili, je bila, da smo se namesto s proteinom, očiščenim s kelatno kromatografijo v nadaljevanju odločili membrane na nosilcu pripraviti kar iz spranih inkluzijskih telesc, ki niso bila prečiščena s kelatno kromatografijo. Slike gelov NaDS-PAGE so namreč pokazale, da je protein APH\_p53 v inkluzijskih telescih v zelo čisti obliki.

Prisotnost proteina APH\_p53 smo preverili tudi z odtisom western (slika 34). Protein je bil prisoten tako v supernatantu po dializi inkluzijskih telesc v vodi MQ, kot tudi v oborini, le da v slednji bistveno več. Protein smo zaznali tudi v vzorcu inkluzijskih telesc, ki so bila prečiščena s kelatno kromatografijo in dializirana v vodi MQ, vendar je razvidno, da ga je bilo tu bistveno manj.

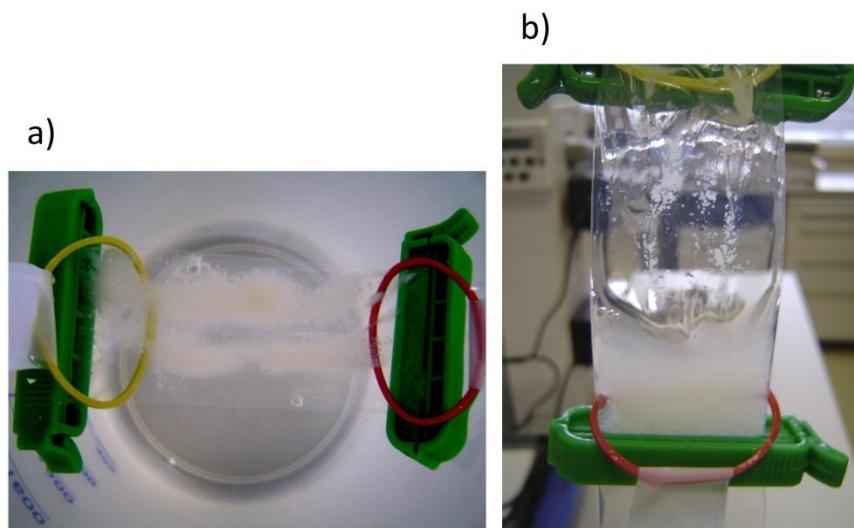


Slika 27: Nitrocelulozna membrana po odtisu western proteina APH\_p53. 1 – supernatant inkluzijskih teles po dializi v MQ – ta inkluzijska telesca niso bila čiščena s kelatno kromatografijo; 2 – oborina inkluzijskih teles, ki je nastala po dializi v MQ – ta inkluzijska telesca niso bila čiščena s kelatno kromatografijo; 3 – inkluzijska telesca po čiščenju s kelatno kromatografijo in dializi. Nanešen je bil supernatant po dializi.; 4 – proteinski standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

V nadaljevanju nas je zato predvsem zanimalo obnašanje inkluzijskih teles, ki niso bila očiščena s kelatno kromatografijo, pri različnih načinih dialize in v različnih pufrih. Drugo polovico prej omenjenih inkluzijskih teles, ki niso bila očiščena s kelatno kromatografijo, smo dializirali dvakrat v 2L vode MQ, ker nas je zanimalo, kako se protein pod takšnimi pogoji obori. Dializo smo izvedli brez mešanja, tako da je bila dializna cev postavljena vodoravno, zato da smo omogočili čim bolj nemoteno sestavljanje oborjenih proteinov, saj smo želeli, da bi se tvorile plahtice. Slika 35 shematično prikazuje, kako smo v dializno posodo vstavili dializno cev, slika 36 pa fotografiji nastalih plahtic oborjenih proteinov, ki ustreza ustrezata omenjeni shemi.



Slika 28: Shematski prikaz dializne posode z vodoravno postavljenou dializno cevjo. Dializa je potekala brez mešanja.



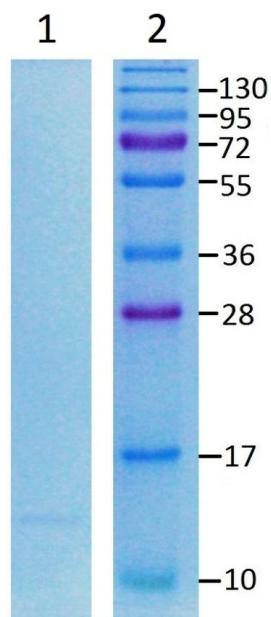
Slika 29: Fotografija dializne cevi z oborjenim proteinom APH\_p53 v dializni posodi od zgoraj (a) ter vzeta iz dializne posode (b). Vidne so kosmičaste strukture oborjenih proteinov.

Z merjenjem absorpcijskega spektra supernatanta v dializni cevi po centrifugiraju smo ugotovili, da v raztopini ni ostalo skoraj nič raztopljenega proteina.

#### 4.2.2.2 Protein Bcr\_p53

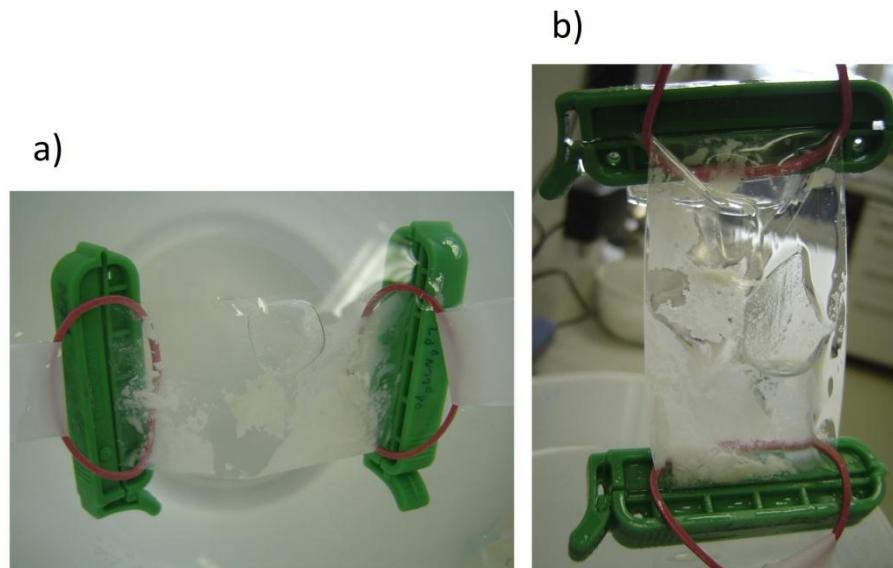
Tudi protein Bcr\_p53 se je po lizi, soniciranju in centrifugirанию nahajal v obliki inkluzijskih teles. Kot pri proteinu APH\_p53 smo tudi ta sprali in raztopili v pufru A. Iz 1L biopresesne brozge smo pridobili 30 mg proteina Bcr\_p53.

Polovico inkluzijskih teles smo očistili s kelatno kromatografijo na koloni Ni-NTA in na koncu frakcije zbrali v pufru E. Sledila je dializa dvakrat v 2L 10 mM Hepes pH7, pri katerem se ga je del oborilo. Supernatant smo skoncentrirali, ga nanesli na 15 % poliakrilamidni gel in z metodo NaDS-PAGE pokazali, da vzorec vsebuje protein pričakovane velikosti (slika 37).



Slika 30: Ugotavljanje prisotnosti proteina Bcr\_p53 na 15 % poliakrilamidnem gelu po barvanju s Comassie modrim: 1 – supernatant inkluzijskih teles proteina Bcr\_p53 po čiščenju na koloni Ni-NTA, dializi v 10 mM Hepes, pH 7, in koncentriranju; 2 – proteinski standard PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

Drugo polovico inkluzijskih teles z Bcr\_p53, ki niso bila očiščena s kelatno kromatografijo, smo tako kot APH\_p53 dializirali dvakrat v 2L vode MQ, ker nas je zanimalo, kako se protein pod takšnimi pogoji obori. Dializo smo tako kot pri APH\_p53 izvedli brez mešanja in z dializno cevjo v vodoravnem položaju, da bi bili pogoji za tvorbo plahtic iz proteinov čim ugodnejši. Za razliko od APH\_p53, kjer smo po dializi opazili oborjen protein v obliki kosmičastih struktur, so pri Bcr\_p53 res nastale plahtice (slika 38).



Slika 31: Fotografija dializne cevi z oborjenim proteinom Bcr\_p53 v dializni posodi od zgoraj (a) ter vzeta iz dializne posode (b). Vidne so plahtice oborjenih proteinov.

Z merjenjem absorpcijskega spektra supernatanta vsebine dializne cevi po centrifugiranju smo pokazali, da v topni obliki skoraj ni bilo proteinov.

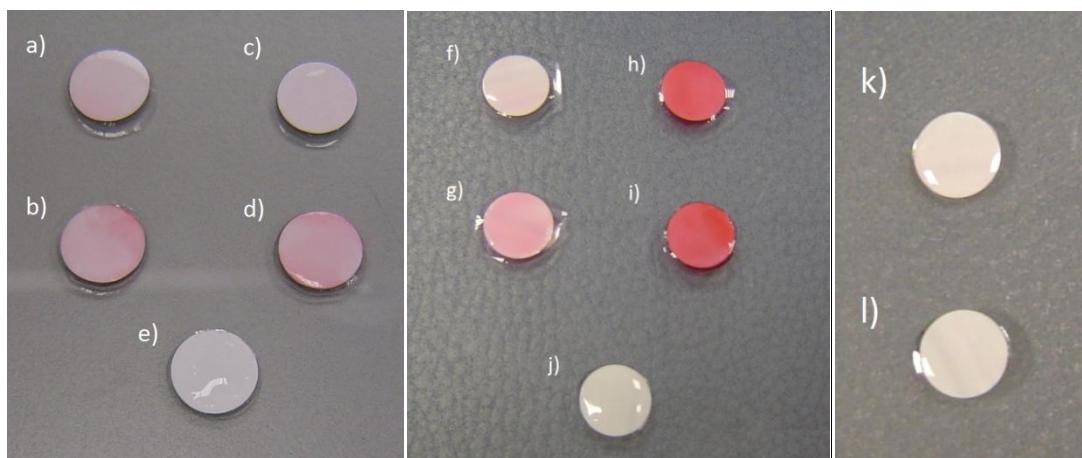
Opisana opažanja so nas navedla k temu, da smo v nadaljevanju za pripravo membran na nosilcu iz vse treh proteinov (APH\_p53, Bcr\_p53 in same domene tet p53) uporabljali inkluzijska telesca, ki so bila sprana, nato raztopnjena v pufru A in dializirana proti 20 mM Hepesu z ustreznim pH. Pri tem smo dializo izvedli za različne koncentracije proteinov hkrati z vstavljenim nosilcem – filtrirnim papirjem v dializni cevi. K temu so nas navedle ugotovitve, da se proteini v inkluzijskih telescih nahajajo v dovolj čisti obliki in da v primeru izolacije s kelatno kromatografijo izgubimo preveč proteinov. To je seveda nezaželeno, ker smo za poskuse, opisane v nadaljevanju, potrebovali relativno velike količine proteinov.

#### 4.2.2.3 Protein p53

Protein p53 se za razliko od obeh fuzijskih proteinov ni produciral v obliki inkluzijskih teles. Izločal se je iz celic, zato smo ga s kelatno kromatografijo izolirali iz supernatanta. Z dializo smo odstranili imidazol in nadaljevali postopek za pripravo proteinske membrane na nosilcu, tako kot smo to naredili s dializo pri proteinih APH\_p53 in Bcr\_p53.

### 4.3 ANALIZA PROTEINSKIH MEMBRAN NA NOSILCU Z BARVANJEM S PONCEAUJEVIM BARVILOM

Filtrirne papirje smo vstavili v prekate dializne cevi, v katerih so se dializirali proteini APH\_p53 in Bcr\_p53 v koncentracijah 0,2 mg/mL, 2 mg/mL, 10 mg/mL in 20 mg/mL ter domena tet proteina p53 v koncentraciji 0,2 mg/mL, ki je kasneje pri filtriranju služila kot ena izmed negativnih kontrol. Po koncu dialize smo filtrirne papirje barvali z barvilm Ponceau, da smo pokazali, da so se med postopkom dialize proteini vezali na filtrirni papir. Kot drugo negativno kontrolo smo barvali tudi sam filtrirni papir, ki ni bil v stiku s proteinimi.

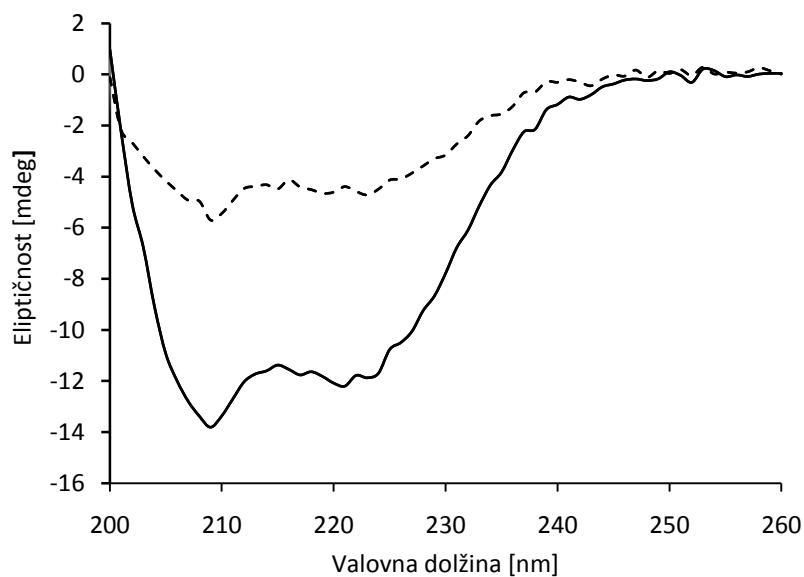


Slika 39: Filtrirni papirji z vezanimi proteini Bcr\_p53, APH\_p53 in domeno tet proteina p53 po dializi proteinov v različnih koncentracijah in barvanju s Ponceaujevim barvilm. Proteini so bili med dializo v različnih koncentracijah in sicer: a) Bcr\_p53 v koncentraciji 0,2 mg/mL, b) Bcr\_p53 (2 mg/mL), c) APH\_p53 (0,2 mg/mL), d) APH\_p53 (2 mg/mL), e) sam filtrirni papir, barvan s Ponceaujevim barvilm, f) Bcr\_p53 (10 mg/mL), g) Bcr\_p53 (20 mg/mL), h) APH\_p53 (10 mg/mL), i) APH\_p53 (20 mg/mL), j) sam filtrirni papir, barvan s Ponceaujevim barvilm, k) negativna kontrola: p53 (0,2 mg/mL), l) filtrirni papir, barvan s Ponceaujevim barvilm.

Na sliki 39 je razvidno, da je obarvanost z barvilo Ponceau S pri različnih koncentracijah proteinov Bcr\_p53 in APH\_p53 različno močna. Pri višjih koncentracijah proteinov je močnejša, pri nižjih šibkejša. Predvidevamo, da se je na filtrirni papir pri višjih koncentracijah vezalo več proteinov. Verjetno so se med seboj povezali v mreže, ki so se naložile v več plasteh. Domnevamo, da pri najnižji koncentraciji proteinov (0,2 mg/mL) ni prišlo do vezave le enega, temveč večih slojev proteinov. Na sliki je tudi barvan filtrirni papir, ki se je dializiral skupaj z domeno tet proteina p53. Pri slednjem nismo pričakovali (močnega) obarvanja, kar se je tudi pokazalo, saj naj bi se v tem primeru membrana na nosilcu ne tvorila.

#### 4.4 MERJENJE CIRKULARNEGA DIKROIZMA

Konstrukta APH\_p53 in Bcr\_p53 sta načrtovana tako, da med komplementarnimi deli (alfa vijačnicami) istovrstnih gradnikov predvideno pride do tvorbe obvitih vijačnic. Uporabili smo metodo počasne kemične renaturacije proteina z dializo, pri kateri smo počasi zmanjševali koncentracijo denaturanta v raztopini in s tem dosegli postopno sestavljanje grdnikov med seboj. Sekundarno strukturo rekombinantnih proteinov smo preverili z merjenjem cirkularnega dikroizma. Pričakovane rezultate smo dobili za konstrukt APH\_p53 (slika 40). Analizirali smo sprana inkluzijska telesca in inkluzijska telesca, očiščena s kelatno kromatografijo (v nekoliko manjši koncentraciji). Pri obeh je prepoznavna oblika krivulje, ki je značilna za večji delež alfa vijačnic, zato sklepamo, da je med rekombinantnimi proteini (vsaj delno) prišlo do predvidenega parjenja in urejene strukture.

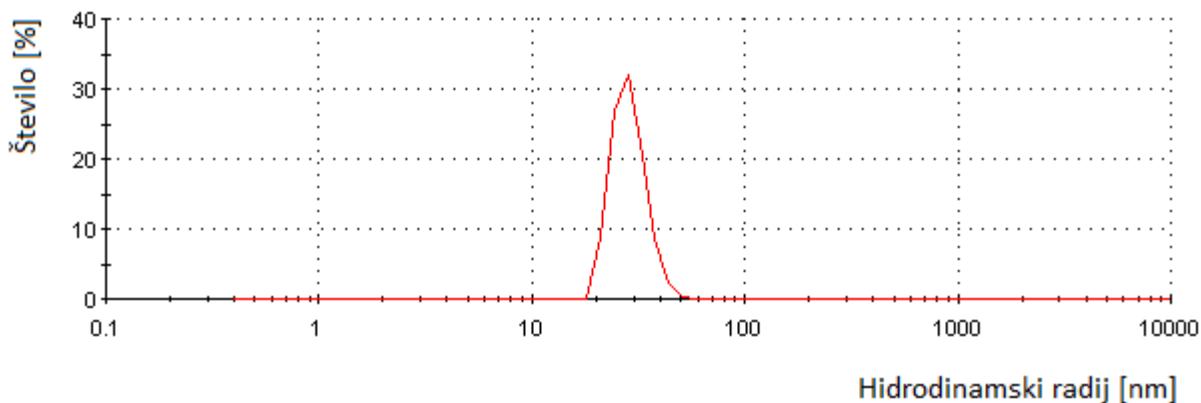


Slika 40: CD spekter proteina APH\_p53 v vodi MQ. Neprekinitvena črta označuje meritve za sprana inkluzijska telesca v koncentraciji 0,1 g/L, črtkana pa inkluzijska telesca, očiščena s kelatno kromatografijo, v koncentraciji 0,07 g/L.

#### 4.1 DINAMIČNO SIPANJE SVETLOBE (DLS) VZORCA MODREGA DEKSTRANA

Z metodo dinamičnega sisanja svetlobe smo ugotavljali velikosti delcev modrega dekstrana in njihov profil porazdelitve. Modri dekstran smo v nadaljevanju uporabili za ugotavljanje velikosti por v proteinskih membranah, tako da smo ga filtrirali skoznje.

Analizirali smo vodno raztopino modrega dekstrana v koncentraciji 0,2 mg/mL pri temperaturi 25 °C (refrakcijski indeks je 1,45) in ugotovili, da je povprečni hidrodinamski radij (premer delcev modrega dekstrana) 29 nm (slika 41).



Slika 41: Številčna porazdelitev delcev glede na velikost, ugotovljena z metodo DLS. 99,6 % delcev je zajetih v vrhu, ki ustreza hidrodinamskemu radiju 29 nm, 0,4 % delcev pa je velikosti 89 nm.

## 4.2 REZULTATI STATISTIČNE OBDELAVE PODATKOV

### 4.2.1 Preverjanje ničelne in alternativne hipoteze

Metode statistične obdelave podatkov in računski postopki so razloženi v poglavju 3.2.2.

Poskusi merjenja koncentracije modrega dekstrana v filtratih posameznih vzorcev so bili za vsako vrsto membrane izvedeni desetkrat. Predpostavili smo, da so meritve koncentracij v neskončnih ponovitvah meritev normalno porazdeljene.

Vse meritve so navedene v prilogah C, D in E, rezultati statistične obdelave pa v prilogi F.

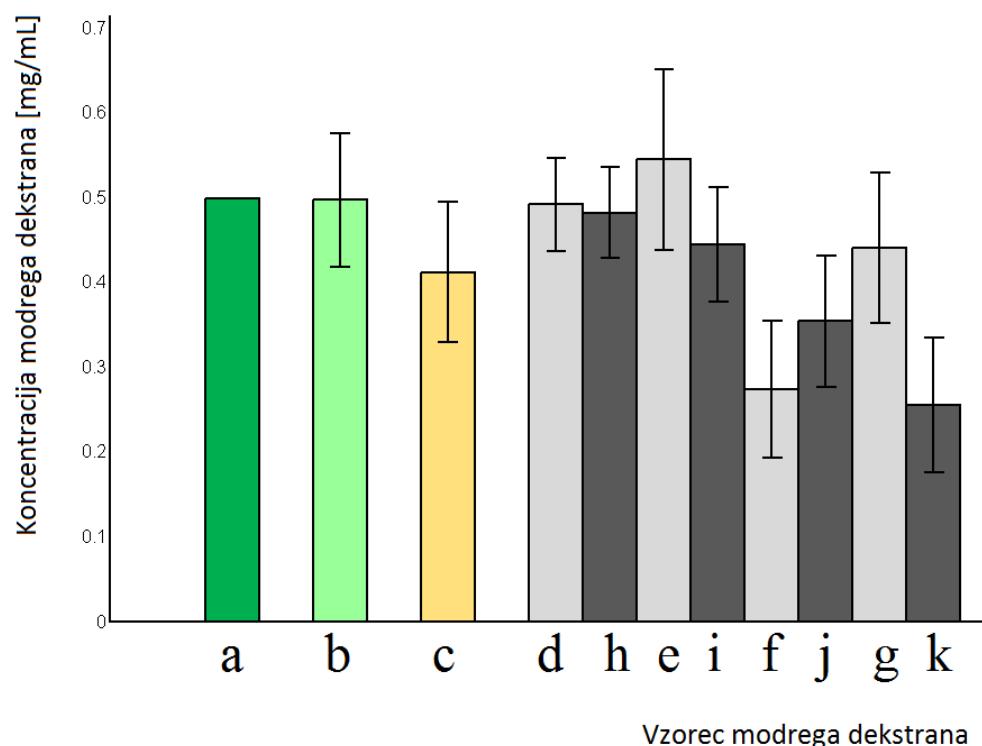
Opazili smo, da se prepustnost vseh membran tudi po večkratnem zaporednem filtriranju modrega dekstrana brez vmesnega spiranja membran ne spreminja. Zato smo isto proteinsko membrano za filtriranje uporabili po desetkrat.

Z računskim preverjanjem ničelne in alternativne domene smo ugotovili, da ničelno domnevo lahko zavržemo samo v primerih filtriranja skozi membrano Bcr\_p53, ki je bila pripravljena pri koncentraciji 10 mg/mL ter v primerih filtriranja skozi membrano APH\_p53, ki je bila pripravljena pri koncentraciji 20 mg/mL. To pomeni, da je povprečna koncentracija modrega dekstrana v filtratu po filtriranju skozi proteinsko membrano manjša od filtriranja skozi proteinsko membrano, ki predstavlja negativno kontrolo (domena tet proteina p53), le v dveh primerih: pri filtriranju skozi membrano Bcr\_p53, ki je bila pripravljena pri koncentraciji 10 mg/mL ter pri filtriranju skozi membrano APH\_p53, ki je bila pripravljena pri koncentraciji 20 mg/mL.

Najučinkoviteje so torej modri dekstrani zadržale membrane, ki so bile z dializo pripravljene pri višjih koncentracijah.

#### 4.2.2 Grafična predstavitev rezultatov

Na sliki 42 so s stolpičnim diagramom prikazane koncentracije modrega dekstrana v filtratih. Višine vseh stolpcev razen prvega predstavljajo povprečja desetih meritev, za te je grafično prikazan standardni odklon. Vse koncentracije in izračunane povprečne vrednosti so navedene v prilogi E.



Slika 42: Stolpčni diagram končnih rezultatov, ki prikazuje koncentracije delcev nanovelikosti pred in po filtriranjih skozi različne proteinske membrane. Koncentracije modrega dekstrana a) pred filtriranjem; b) po filtriranju skozi sam nosilec; c) po filtriranju skozi »membrano« iz domene tet proteina p53 (negativna kontrola). Svetlo sivo obarvani stolpci prikazujejo koncentracije modrega dekstrana v filtratih po filtriranju skozi membrane Bcr\_p53, ki so bile pripravljene z dializo v koncentracijah: d) 0,2 mg/mL, e) 2 mg/mL, f) 10 mg/mL, g) 20 mg/mL. Temno sivo obarvani stolpci prikazujejo koncentracije modrega dekstrana v filtratih po filtriranju skozi membrane APH\_p53, ki so bile pripravljene z dializo v koncentracijah: h) 0,2 mg/mL, i) 2 mg/mL, j) 10 mg/mL, k) 20 mg/mL. Višine vseh stolpcev razen prvega (a) predstavljajo povprečja desetih meritev, za te je prikazan standardni odklon.

#### 4.2.3 Obravnava rezultatov

Pokazali smo, da modri dekstran nemoteno prehaja skozi sam nosilec, saj sta koncentraciji pred filtriranjem in po njem enaki. Zaradi tega lahko vsako zmanjšanje koncentracije modrega dekstrana v filtratih skozi proteinske membrane, naložene na nosilec, pripisemo učinku proteinskih membran. V filtratu po filtriranju skozi domeno tet proteina p53 smo zaznali rahlo zmanjšano koncentracijo. Tu pretiranega zmanjšanja koncentracije nismo pričakovali, saj naj same domene tet proteina p53 ne bi tvorile membrane. Verjetno je le prišlo do adsorbcije delcev modrega dekstrana na proteine na nosilcu. Proteinske membrane Bcr\_p53 so modri dekstran najučinkoviteje zadržale v primeru, ko so bile pripravljene v koncentraciji 10 mg/mL, pri nižjih koncentracijah učinka skorajda ni. V enem primeru filtratov smo v povprečju zaznali celo povečanje koncentracije modrega dekstrana v filtratu, kar gre pripisati eksperimentalni napaki. Obetavnejši in bolj v skladu s predvidevanji so rezultati filtriranja skozi membrane APH\_p53. Tu je iz vseh štirih skupin po deset meritev razvidno, da so bile membrane, pripravljene pri višjih koncentracijah, manj prepustne. Zelo verjetno je, da so se proteini na nosilec pri višjih koncentracijah naložili v več plasteh.

## 5 SKLEPI

V diplomskem delu smo žeeli pripraviti proteine, ki bi se med seboj predvideno samosestavljalni in v naslednji stopnji tvorili tudi višje strukture – urejene mreže, ki smo jih zaradi velikostnega razreda por poimenovali polipeptidne membrane. Na podlagi rezultatov smo zaključili:

- uspešno smo pripravili tri DNK konstrukte: tetramerizacijsko domeno proteina p53 ter dva fuzijska proteina: APH\_p53 in Bcr\_p53;
- v relativno velikih količinah smo izrazili vse tri proteine;
- izolirane proteine smo analizirali in ugotovili, da med postopki čiščenja pride do velikih izgub;
- oba fuzijska proteina se v celicah kopičita v obliki inkluzijskih teles, ki so relativno zelo čista, zato jih kasneje nismo več čistili;
- med dializo v ustreznom pufru s počasnih odstranjevanjem denaturanta pri obeh fuzijskih proteinih pride do tvorbe vidnih kosmičev (APH\_p53) ali celo večjih plahtic (Bcr\_p53), to nakazuje, da se proteini med počasnim ponovnim zvijanjem zbirajo v urejene strukture;
- tetramerizacijska domena proteina p53 se med fermentacijo kopiči v supernatantu, zato so postopki izolacije temu prilagojeni, količina proteina pa je nekoliko manjša kot pri fuzijskih proteinih;
- z barvanjem po Ponceauju smo pokazali, da fuzijski proteini med dializo na nosilcu tvorijo plast – polipeptidno membrano, tetramerizacijska domena proteina p53 pa na nosilcu ne tvori takšne plasti. Pri višjih koncentracijah fuzijskih proteinov med dializo je plast na nosilcu debelejša;
- za fuzijski protein APH\_p53 nam je uspelo pokazati (CD spekter), da tvori obvite vijačnice;
- s filtriranjem delcev modrega dekstrana velikosti 29 nm skozi proteinske membrane smo pokazali, da ga membrane iz fuzijskih proteinov velik del zadržijo, vendar le če so bile pripravljene v precej visokih koncentracijah s postopno vezavo na nosilec med dializo, ki je potekala brez mešanja in z vodoravno postavljenou dializno cevjo;
- pri fuzijskem proteinu APH\_p53 smo opazili, da pri vsakem povišanju koncentracije, pri katerem smo pripravili filtrirno membrano, pride do zmanjšanja prepustnosti za modri dekstran.

## 5.1 Perspektive

V prihodnosti bi bilo morda smiselno natančneje raziskati, na kakšen način se proteinski gradniki membran vežejo na nosilec in pri katerih pogojih bi potekala vezava najbolj optimalno, tako da bi bilo napak v strukturi membran čim manj. Z izboljšanjem metode bi te ali podobne membranske sisteme lahko uporabljali za odstranjevanje virusov ali bakteriofagov iz raztopin.

S spremjanjem velikosti proteinskih gradnikov bi lahko v nekih okvirih določali velikost por v proteinskih membranah.

Vsekakor je namen iz proteinskih gradnikov pridobiti kvaliteten sintetični materiali z želeno prepustnostjo in izbranimi latnostmi. To je mogoče doseči s premišljenim načrtovanjem aminokislinskega zaporedja proteinskih gradnikov. Osnovnim aminokislinskim zaporedjem gradnikov bi lahko dodali izbrana zaporedja aminokislin, ki bi tvorila katalitične centre. Membrane iz takšnih gradnikov bi na ta način lahko med filtriranjem raztopine katalizirale neko reakcijo. S tem bi se izognili dodajanju katalizatorja v raztopino.

Proteinske membranske sisteme bi lahko uporabili tudi za razsoljevanje vode ali odstranjevanje toksičnih snovi iz raztopin. S tem bi lahko nadomestili metodo dialize.

## 6 VIRI

Akthakul, A., Hochbaum, A. I., Stellacci, F., Mayes, A. M. 2005. Size fractionation of metal nanoparticles by membrane filtration. *Advanced Materials*, 17: 532–535

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. 5<sup>th</sup> ed. New York, John Wiley and Sons: 1512 str.

Bernard P., Gabant P., Bahassi E. M., Couturier M. 1994. Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene*, 148, 1: 71-74

Bromley E. H. C., Channon K., Moutevelis E., Wolfson D. N. 2008. Peptide and protein building blocks for synthetic biology: from programming biomolecules to self-organized biomolecular systems. *American Chemical Society Chemical Biology*, 3, 1: 38-50

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

Channon K., Bromley E. H. C., Wolfson D. N. 2008. Synthetic biology through biomolecular design and engineering. *Current Opinion in Structural Biology*, 18: 491-498

EMBL-EBI. 2011. EMBOSS Needle – Pairwise sequence alignment. Hinxton, EMBL-EBI: database  
[http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/nucleotide.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html) (3. maj. 2011)

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 in Molecular Biology*, 112: 531-52

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

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

He B., Kukarin A., Temiakov D., Chin-Bow S. T., Lyakhov D. L., Rong M., Durbin R. K., McAllister W. T. 1998. Characterization of an unusual, sequence-specific termination signal for T7 RNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 30: 18802–18811

Hjelmeland L. M., Chrambach A. 1981. Electrophoresis and electrofocusing in detergent containing media: A discussion of basic concepts. *Electrophoresis*, 2, 1: 1-11. Cit po: Molecular weight estimations and SDS PAGE. 2011. Minnesota, Minnesota State University Moorhead: 3 str.

[http://www.mnstate.edu/provost/SDSPAGE\\_MW\\_Estimation.pdf](http://www.mnstate.edu/provost/SDSPAGE_MW_Estimation.pdf) (2. jul. 2011)

Huang, L., Wang, D., Tang, H., Wang, S. 2005. Separation and purification of nano-Al13 by UF method. *Colloids and Surfaces A*, 275: 200–208

Hurst S. J., Lytton-Jean A. K. R., Mirkin C. A. 2006. Maximizing DNA loading on a range of gold nanoparticle sizes. *Analytical Chemistry*, 76: 8313-8318

iGEM. 2009. nanoBRICKS[pro] iGEM, team Slovenia: Think outside the Box. 2009. Ljubljana, Kemijski inštitut: 11 str.  
<http://2009.igem.org/Team:Slovenia>

Ikeda R. A., Richardson C. C. 1986. Interactions of the RNA polymerase of bacteriophage T7 with its promoter during binding and initiation of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 3614-3618

Jerala R., Benčina M. 2009. BBF RFC 37: Fusion protein BioBrick assembly standard with optional linker extension. Ljubljana, Kemijski inštitut: 6 str.  
<http://dspace.mit.edu/bitstream/handle/1721.1/46705/BBFRFC37.pdf?sequence=1> (15. maj 2011)

Johnson C.M., Fersht A.R. 1995. Protein stability as a function of denaturant concentration: the thermal stability of barnase in the presence of urea. *Biochemistry*, 34: 6795–6804

Knowles T. P. J., Oppenheim, Buell A. K., Chirgadze D. Y., Welland M. E. 2010. Nanostructured films from hierarchical self-assembly of amyloidogenic proteins. *Nature Nanotechnology*, 5: 204-207

Košmelj K. 2007. Uporabna statistika. 2. izd. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 239 str.

[http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna\\_statistika\\_okt\\_2007/Uporabna\\_statistika\\_01.pdf](http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2721/Uporabna_statistika_okt_2007/Uporabna_statistika_01.pdf)

Krieg E., Weissman H., Shirman E., Shimoni E., Rybtchinski B. 2011. A recyclable supramolecular membrane for size-selective separation of nanoparticles. *Nature Nanotechnology Letters*, 6: 141-146

Kuzyk A., Laitinen K. T., Törmä P. 2009. DNA origami as a nonascale template for protein assembly. *Nanotechnology*, 20: 1-5

Li H., Liu M., Wang L., Nangreave J., Yan H., Liu Y. 2010. Molecular behavior of DNK origami in higher-order self-assembly. *Journal of the American Chemical Society*, 132: 5592-5593

Liu D., Park S. H., Reif J. H., LaBean T. H. 2003. DNA nanotubes self-assembled from triple-crossover tiles as templates for conductive nanowires. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United Atates of America*, 101, 3: 717-722

Macdonald L. E., Durbin R. K., Dunn J. J., McAllister W. T. 1994. Characterization of two types of termination signal for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 238, 2: 145-158

Mateu M. G., Del Pino M. M. S., Fersht A. R. 1999. Mechanism of folding and assembly of a small tetrameric protein domain from tumor suppressor p53. *Nature Structural Biology*, 6, 2: 191-198

Mateu M. G., Fersht A. R. 1998. Nine hydrophobic side chains are key determinants of the thermodynamic stability and oligomerization status of tumour suppressor p53 tetramerization domain. *EMBO Journal*, 17, 10: 2748–2758

McWhirter J. R., Galasso D. L., Wang J. Y. J. 1993. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Molecular and Cellular Biology*, 13, 2: 7587-7595

Molecular weight estimations and SDS PAGE. 2011. Minnesota, Minnesota State University Moorhead: 3 str.

[\(2. jul. 2011\)](http://www.mnstate.edu/provost/SDSPAGE_MW_Estimation.pdf)

Mora P., Carbajo R. J., Pineda-Lucena A., Del Pino M. M. S., Pérez-Payá E. 2008. Solvent-exposed residues located in the  $\beta$ -sheet modulate the stability of the tetramerization domain of p53—A structural and combinatorial approach. *Proteins*, 71: 1670-1685

NCBI. 2011. TP53 tumor protein p53 [ *Homo sapiens* ]. Bethesda, NCBI: database  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7157> (11. jun. 2011)

New England BioLabs. 2011. Double Digest Finder. Ipswich, New England BioLabs: software  
<http://www.neb.com/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp?>

Owczarzy R., Tataurov A. V., Wu Y., Manthey J. A., McQuisten K. A., Almabazi H. G., Pedersen K. F., Lin Y., Garretson J., McEntaggart N. O., Sailor C. A., Dawson R. B., Peek A. S. 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Research*, 36: 163-169

Papapostolou D., Smith A. M., Atkins E. D. T., Oliver S. J., Ryadinov M. G., Serpell L. C., Wolfson D. N. 2007. Engineering nanoscale order into a designed protein fiber. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United Atates of America*, 104, 26: 10853-10858

Patolsky F., Weizmann Y., Lioubashevsky. 2002. Au-nanoparticles nanowires based on DNK and polylysine templates. *Angewandte Chemie International Edition*, 41: 2323-2327

Peng X., Jin J., Nakamura Y., Ohno T., Ichinose I. 2009. Ultrafast permeation of water through protein-based membranes. *Nature Nanotechnology*, 4: 353-357

Petka W. A., Harden J. L., McGrath K. P., Wirtz D., Tirrell D. A. 1998. Reversible hydrogels from self-assembling artificial proteins. *Science*, 281: 389-392

PREMIER Biosoft International. 2011. PCR primer design guidelines. Palo Alto, PREMIER Biosoft International: 4 str.  
[http://www.premierbiosoft.com/tech\\_notes/PCR\\_Primer\\_Design.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html) (15. apr. 2011)

Registry of standard biological parts. 2004. pSB1A2. Cambridge, Massachusetts Institute of Technology: 1 str.  
<http://partsregistry.org/Part:pSB1A2> (26. apr. 2011)

Registry of standard biological parts. 2009. BB-NIC-II-HisN. Cambridge, Massachusetts Institute of Technology: 1 str.  
[http://partsregistry.org/wiki/index.php?title=Part:BBa\\_K245005](http://partsregistry.org/wiki/index.php?title=Part:BBa_K245005) (26. apr. 2011)

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

Sakamoto H., Lewis M. S., Kodama H., Appella E., Sakaguchi K. 1994. Specific sequences from the carboxyl terminus of human p53 gene product form anti-parallel tetramers in solution. *Biochemistry*, 91: 8974-8978

Sallantin M. Huet J. C., Demarteau C., Pernollet J. C. 1990. Reassessment of commercially available molecular weight standards for peptide sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis using electroblotting and microsequencing. *Electrophoresis*, 11, 1: 34-36. Cit po: Molecular weight estimations and SDS PAGE. 2011. Minnesota, Minnesota State University Moorhead: 3 str.

[http://www.mnstate.edu/provost/SDSPAGE\\_MW\\_Estimation.pdf](http://www.mnstate.edu/provost/SDSPAGE_MW_Estimation.pdf) (2. jul. 2011)

Sambrook J, Russel D. W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2100 str.

Shannon M. A., Bohn P. W., Elimelech M., Georgiadis J. G., Mariñas B. J., Mayes A. M. 2008. Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature*, 452, 20: 301-310

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

Smith A. B., Maxwell A. 2006. A strand-passage conformation of DNA gyrase is required to allow the bacterial toxin, CcdB, to access its binding site. *Nucleic Acids Research*, 34, 17: 4667-4676

Sweeney S. F., Woehrle G. H., Hutchison J. E. 2006. Rapid purification and size separation of gold nanoparticles via diafiltration. *Journal of the American Chemical Society*, 128: 3190–3197

Taylor C.M., Keating A.E. 2005. Orientation and oligomerization specificity of the Bcr coiled-coil oligomerization domain. *Biochemistry*, 44: 16246-16256

Ulane R. E., Cabib E. 1973. The activating system of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry, 249, 11: 3418-3422

Ulbricht M. 2006. Advanced functional polymer membranes. Polymer, 47, 7: 2219-2262

Zhang S. 2003. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assamblly. Nature Biotechnology, 21, 10: 1171-1178

## ZAHVALA

Somentorju **prof. dr. Romanu Jerala** se zahvaljujem, ker mi je omogočil opravljanje praktičnega dela diplomskega dela v Laboratoriju za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu. Zahvaljujem se mu za vse koristne nasvete in pregled diplomskega dela.

**Dr. Heleni Gradišar** se zahvaljujem za usmerjanje in spremljanje poteka mojega laboratorijskega dela, za pomoč pri izvedbi postopkov, mnoge koristne nasvete in prvi pregled diplomskega dela, predvsem pa za prijaznost in korektnost.

Zahvala gre tudi **Oti Fekonja, Jelki Pohar** in **Robertu Bremšaku**, ki so kot mentorji sodelovali pri projektu iGEM2009 in me naučili mnogih tehnik in postopkov pri laboratorijskem delu ter mi svetovali pri težavicah. Rada bi se zahvalila tudi ostalim sodelavcem Laboratorija za biotehnologijo na Kemijskem inštitutu, ki so mi vedno pomagali, če sem med delom potrebovala pomoč.

**Prof. dr. Petru Mačku** in **prof. dr. Mojci Narat** se zahvaljujem za hiter in natančen pregled in popravke diplomskega dela.

Hvala **ekipi iGEM**, s katerimi sem se med pripravami na tekmovanje in tudi kasneje vedno imela lepo.

Zahvaljujem se sošolcem in prijateljem, ki so mi v času študija nudili prijetno družbo in s katerimi sem v tem obdobju preživel mnogo lepih trenutkov. Prav tako tudi nekaterim odličnim profesorjem na študiju mikrobiologije, ki so pripomogli k temu, da sem ohranila in še pridobila veselje do študija.

Posebej se zahvaljujem **staršem**, ki me ves čas budno spremljajo, podpirajo in spodbujajo...

... in seveda fantu **Juretu** za vso oporo in prijaznost, ki mi veliko pomenita.

## PRILOGE

Priloga A: Nukleotidna zaporedja začetnih konstruktorjev

Zaporedji *aph* in *bcr*, kot sta bili naročeni sintetično v vektorju pANY:

EcoRI XbaI NgoMIV APH BspEI SpeI HindIII XbaI NgoMIV BCR BspEI SpeI PstI

GAATTCCACCTCTAGAGCCGGCATGAAACAGCTGGAAAAAGAGCTGAAACAGTTAGAAAAAAGAACTCAAG  
CAATTGAAAAACAGCTGGCACAGCTGCAATGGAAAGCACAGGCACGTAAAAAAAAACTGGCCCAGCTGA  
AAAAAAAAACTTCAGGCC TCCGGAACTAGT AGGAAGCTTAC TCTAGAGCCGGC GATATTGAACAGGAAC  
TGGAACCGCGAAAAGCAAGCATTGCGTCTGGAACAGGAAGTTAACAGAACGTAGCCGTATGGCAT  
ATCTGCAAACCTGCTGGCAAATCCGGAACTAGTAACCTGCAG

Poliklonsko mesto vektorja pVIKTOR:

EcoRI NotI pT7 RBS ATG Tyr His6 XbaI NgoMIV AgeI ccdB XmaI BspEI SpeI STOP  
terminator NotI PstI

GAATTCGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGGGATTGTGAGCGATAACAATTCCCCTCT  
AGAAATAATTTGTTAACCTTAAGAAGGAGGTAAATAATGTATCATCACCATCACCATCAC  
CTAGAGCCGGCACCGGTATGCAGTTAACGTTACACCTATAAAAGAGAGAGCCGTTATCGTC  
TGTTTGATGTACAGAGTGATATTATTGACACGCCGGGCGACGGATGGTATCCCCCGG  
CCGGTGCACGTCTGCTGTCAGATAAAGTCTCCGTGAACTTACCCGGTGGTGCATATCGGG  
ATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACCGATAACGCCGGTGTGCCGGTCTCCGTATCGGGGAAG  
AACTGGCTGATCTCAGCCACCGCGAAAATGACATAAAAACGCCATTAAACCTGATGTTCTGGG  
GAATATAACCCGGGTCCGGAACTAGTTAACTAGCATAACCCCTGGGCCTCTAACCGGGCT  
AGAGGGGTTTTGGCGGCCGCTGCAG

Fragment tetramerizacijske domene gena *p53* po dodatku restriktijskih mest z verižno reakcijo s polimerazo:

XbaI NgoMIV p53 BspEI SpeI

TCTAGAGCCGGCGAATACTTTACCTGCAAATCCGTGGCGTGAGCGTTTCGAGATGTTCCGCGAACTG  
AATGAAGCCCTGGAACTGAAAGATGCTCAAGCAGGT TCCGGAACTAGT

### Priloga B: Nukleotidna zaporedja končnih konstruktorov

pVIKTOR s tetramerizacijsko domeno gena *p53*:

EcoRI NotI pT7 RBS ATG tyr His6 XbaI NgoMIV **p53** BspEI SpeI STOP terminator NotI Pst

GAATTGCGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGGGATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCT  
AGAAATAATTGTTAACCTTAAGAAGGAGGTAATAATG**TATCATCACCACATCACCACATCAC**T  
CTAGAGCCGGCGAATACTTTACCTGCAAATCCGTGGCGTGAGCGTTTCGAGATGTTCCGCG  
**AACTGAATGAAGCCCTGGAACTGAAAGATGCTCAAGCAGGTTCCGGA**ACTAGTTAACTAGCAT  
AACCCCTTGGGCCTCTAAACGGGTCTAGAGGGTTTTGGCGGCCGCTGCAG

pVIKTOR s konstruktom *aph\_p53*:

EcoRI NotI pT7 RBS ATG tyr His6 XbaI NgoMIV **APH SCAR p53** BspEI SpeI STOP terminator NotI Pst

GAATTGCGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGGGATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCT  
AATTTGTTAACCTTAAGAAGGAGGTAATAATG**TATCATCACCACATCACCACATCAC**TCTAGAGCCGGCA  
TGAAACAGCTGGAAAAAGAGGCTGAAACAGTTAGAAAAAGAAACTCAAGCAATTGAAAAACAGCTGGCAC  
GCTGCAATGGAAAGCACAGGCACGTAAAAAAAAACTGGCCAGCTGAAAAAAAACCTCAGGCC**TCCGC**  
**CGAATACTTTACCTGCAAATCCGTGGCGTGAGCGTTTCGAGATGTTCCGCGA**ACTGAATGA  
**AGCCCTGGAACTGAAAGATGCTCAAGCAGGTTCCGGA**ACTAGTTAACTAGCATAACCCCTTGGGC  
CTCTAAACGGGTCTAGAGGGTTTTGGCGGCCGCTGCAG

pVIKTOR s konstruktom *bcr\_p53*:

EcoRI NotI pT7 RBS ATG tyr His6 XbaI NgoMIV **BCR SCAR p53** BspEI SpeI STOP terminator NotI Pst

GAATTGCGCGGCCGCTAATACGACTCACTATAGGGATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCT  
AATTTGTTAACCTTAAGAAGGAGGTAATAATG**TATCATCACCACATCACCACATCAC**TCTAGAGCCGGCG  
ATATTGAACAGGAACTGGAACCGCGAAAAGCAAGCATTGCTGCTGGAACAGGAAGTTAATCAAGAAC  
GTAGCCGTATGGCATATCTGCAAACCCCTGCTGGAAAA**TCCGCC**GAATACTTTACCTGCAAATCCG  
**TGGCCGTGAGCGTTTCGAGATGTTCCGCGA**ACTGAATGAAGCCCTGGAACTGAAAGATGCTCA  
**AGCAGGTTCCGGA**ACTAGTTAACTAGCATAACCCCTTGGGCCTCTAAACGGGTCTAGAGGGTTTT  
TGGCGGCCGCTGCAG

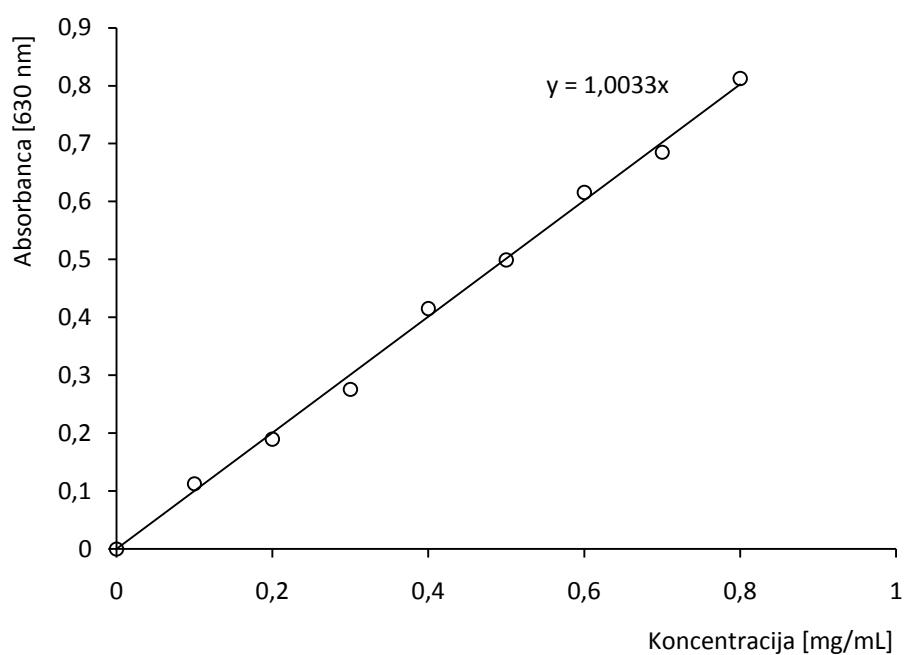
Priloga C: Meritve absorbanc (630 nm) modrega dekstrana pred in po filtriranju skozi nosilni filter in skozi proteinske membrane

		<i>20 mM Hepes</i> <i>pH 8,0</i>
Modri dekstran po filtriranju samo skozi nosilec (=vzorec 1)		p53 0,2 mg/mL
	0,47495	0,36037
	0,54829	0,34378
	0,58131	0,28668
	0,40999	0,29370
	0,60378	0,50890
	0,47949	0,47104
	0,41481	0,49236
	0,58014	0,44131
	0,38846	0,44208
	0,47401	0,46375
Povprečje absorbanc	0,49552	0,40447
Vzorčni standardni odklon	0,07850	0,08486
Vzorčna varianca	0,00616	0,00720

20 mM Hepes pH 8,5				20 mM Hepes pH 7,5				
Bcr_p53 0,2 mg/mL	Bcr_p53 2 mg/mL	Bcr_p53 10 mg/mL	Bcr_p53 20 mg/mL	APH_p53 0,2 mg/mL	APH_p53 2 mg/mL	APH_p53 10 mg/mL	APH_p53 20 mg/mL	
0,45564	0,43379	0,31805	0,25262	0,46597	0,43265	0,31116	0,11401	
0,53526	0,41936	0,37318	0,36436	0,48623	0,51245	0,48369	0,26968	
0,57664	0,57359	0,17688	0,48415	0,45762	0,44527	0,29684	0,35686	
0,50333	0,64919	0,24802	0,41943	0,54326	0,30164	0,46342	0,35875	
0,46624	0,66814	0,18492	0,5264	0,49563	0,52435	0,28297	0,19128	
0,51926	0,42568	0,31349	0,46198	0,39163	0,39546	0,29143	0,33566	
0,37542	0,45167	0,39647	0,42517	0,46538	0,45275	0,42659	0,22861	
0,49993	0,69456	0,19647	0,46417	0,41573	0,39514	0,36713	0,26241	
0,51285	0,58462	0,20941	0,41539	0,55968	0,51257	0,28621	0,20587	
0,45762	0,52643	0,31073	0,57501	0,52326	0,45275	0,31562	0,21838	
Povprečje absorbanc	0,490219	0,542703	0,272762	0,438868	0,480439	0,442503	0,352506	0,254151
Vzorčni standardni odklon	0,0549052	0,1065454	0,0802042	0,0886803	0,05307718	0,06758889	0,07770523	0,07909094
Vzorčna varianca	0,0030146	0,0113519	0,0064327	0,0078642	0,00281719	0,00456826	0,0060381	0,00625538

Priloga D: Umeritvena krivulja za modri dekstran

Koncentracija [mg/mL]	Absorbanca pri 630 nm
0	0
0,1	0,11256
0,2	0,18956
0,3	0,27568
0,4	0,41532
0,5	0,49898
0,6	0,61589
0,7	0,68513
0,8	0,81256



Priloga E: Preračunane koncentracije [mg/mL] modrega dekstrana pred in po filtriranju skozi nosilni filter in skozi proteinske membrane

	<i>20 mM Hepes</i> <i>pH 8,0</i>
Modri dekstran po filtriranju samo skozi nosilec (=vzorec 1)	p53 0,2 mg/mL
0,47652	0,36156
0,55010	0,34491
0,58323	0,28763
0,41134	0,29467
0,60577	0,51058
0,48107	0,47259
0,41618	0,49398
0,58205	0,44277
0,38974	0,44354
0,47557	0,46528
Povprečje [mg/mL]	0,49716
Vzorčni standardni odklon	0,07876
Vzorčna varianca	0,00620

<i>20 mM Hepes pH 8,5</i>				<i>20 mM Hepes pH 7,5</i>			
Bcr_p53 0,2 mg/mL	Bcr_p53 2 mg/mL	Bcr_p53 10 mg/mL	Bcr_p53 20 mg/mL	APH_p53 0,2 mg/mL	APH_p53 2 mg/mL	APH_p53 10 mg/mL	APH_p53 20 mg/mL
0,45714	0,43522	0,31910	0,25345	0,46751	0,43408	0,31219	0,11439
0,53703	0,42074	0,37441	0,36556	0,48783	0,51414	0,48529	0,27057
0,57854	0,57548	0,17746	0,48575	0,45913	0,44674	0,29782	0,35804
0,50499	0,65133	0,24884	0,42081	0,54505	0,30264	0,46495	0,35993
0,46778	0,67034	0,18553	0,52814	0,49727	0,52608	0,28390	0,19191
0,52097	0,42708	0,31452	0,46350	0,39292	0,39677	0,29239	0,33677
0,37666	0,45316	0,39778	0,42657	0,46692	0,45424	0,42800	0,22936
0,50158	0,69685	0,19712	0,46570	0,41710	0,39644	0,36834	0,26328
0,51454	0,58655	0,21010	0,41676	0,56153	0,51426	0,28715	0,20655
0,45913	0,52817	0,31176	0,57691	0,52499	0,45424	0,31666	0,21910
Povprečje [mg/mL]	0,49184	0,54449	0,27366	0,44032	0,48202	0,44396	0,35367
Vzorčni standardni odklon	0,05509	0,10690	0,08047	0,08897	0,05325	0,06781	0,07796
Vzorčna varianca	0,00303	0,01143	0,00648	0,00792	0,00284	0,00460	0,00630

## Priloga F: Statistična obdelava podatkov in preverjanje ničelne domneve s pomočjo t-statistik

Vzorec 1		modri dekstran po filtriranju samo skozi nosilec							
Vzorec 2		m. d. po filtriranju skozi Bcr_p53 (0,2 mg/mL)	m. d. po filtriranju skozi Bcr_p53 (2 mg/mL)	m. d. po filtriranju skozi Bcr_p53 (10 mg/mL)	m. d. po filtriranju skozi Bcr_p53 (20 mg/mL)	m. d. po filtriranju skozi APH_p53 (0,2 mg/mL)	m. d. po filtriranju skozi APH_p53 (2 mg/mL)	m. d. po filtriranju skozi APH_p53 (10 mg/mL)	m. d. po filtriranju skozi APH_p53 (20 mg/mL)
	max( $S_1^2, S_2^2$ )/min( $S_1^2, S_2^2$ )	2,23981	0,59480	1,04965	0,85859	2,39675	1,47805	1,11825	1,07941
Ali lahko privzamemo, da sta varianci obeh populacij enaki?		ne	da	da	da	ne	da	da	da
Skupna varianca $\text{var}(\text{sk}) = (\text{var}1 + \text{var}2)/2$			0,00911	0,00664	0,00736		0,00570	0,00644	0,00655
$S_1^2$	0,00680	/	/	/	0,00680	/	/	/	/
$S_2^2$	0,00303	/	/	/	0,00284	/	/	/	/
Razlika povprečij	0,08009	0,13274	0,13809	0,02856	0,07027	0,03221	0,05808	0,15676	
t-statistika (enačba 6)	/	3,10951	3,79046	0,74470	/	0,95424	1,61872	4,33224	
t-statistika (enačba 7)	2,55417	/	/	/	2,26422	/	/	/	
Ali lahko ničelno domnevo pri stopnji značilnosti 0,02 obdržimo in ali podatki ne nasprotujejo domnevi, da je povprečna vrednost absorbance modrega dekstrana v filtratih po filtriraju skozi sam nosilec (vzorec 1) in izbrano proteinsko membrano (vzorec 2) enaka?		da	da	ne	da	da	da	da	ne

Opomba: Ničelna in alternativna domneva sta navedeni v poglavju 3.2.2. Kritična vrednosti  $\pm t_{001}(18) = \pm 2,552$ . m. d. = modri dekstran