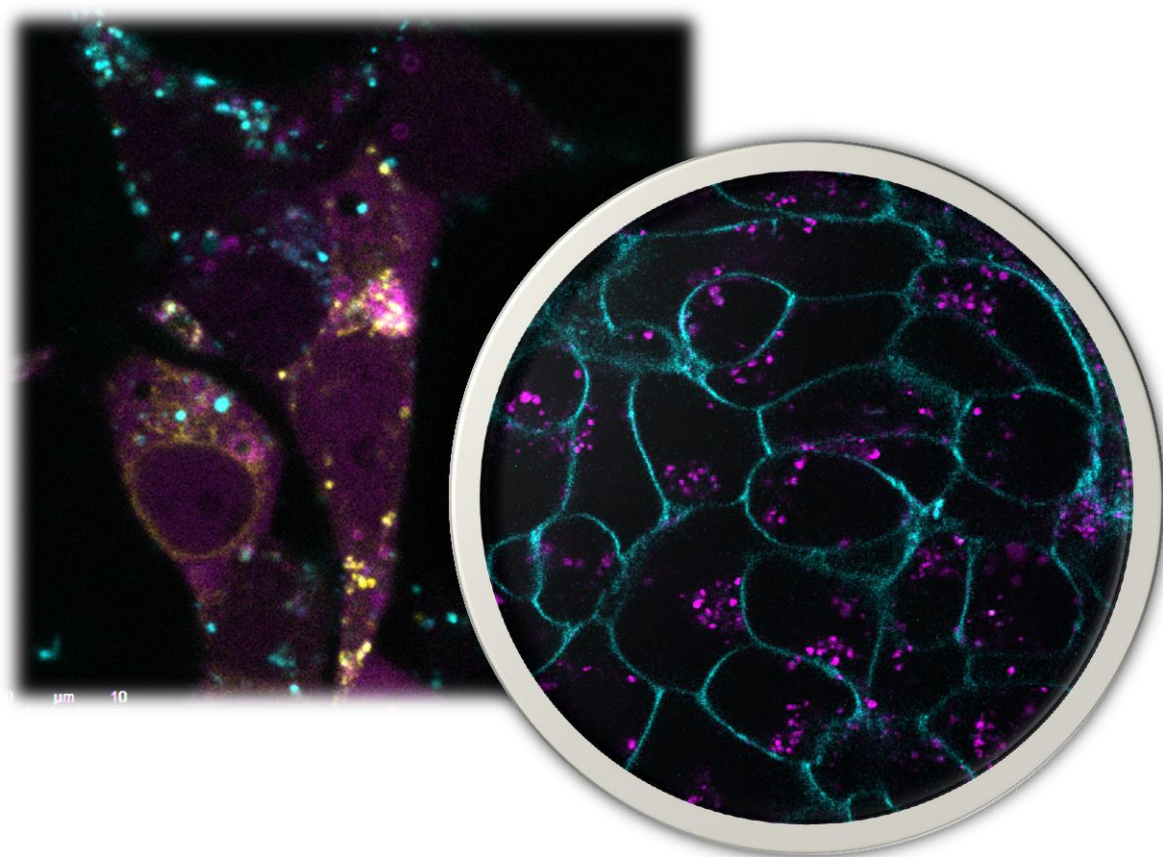


Vpliv pozitivno nabityh proteinov na internalizacijo eksogene DNK



Avtorja

Jan Gojznikar, I. gimnazija v Celju
Nejc Kejžar, I. gimnazija v Celju

Mentorici

dr. Mojca Benčina
L12 Laboratorij za biotehnologijo
Kemijski inštitut, Ljubljana

mag. Mojca Alif
I. gimnazija v Celju

Zahvala

Rada bi se zahvalila vsem organizatorjem projekta *Nova generacija raziskovalcev ved o življenju* in Kemijskemu inštitutu v Ljubljani, ki je omogočil uporabo laboratorijev in sredstev, nujno potrebnih za uspeh te naloge.

Posebna zahvala gre tudi najini mentorici dr. Mojci Benčini, ki je vseskozi pozorno nadzorovala najino delo, naju usmerjala in na naju prenesla ogromno količino novega znanja.

Prijazno se zahvaljujeva tudi prof. Juani Robidi za lektoriranje te raziskovalne naloge.

Omenila bi tudi Dijaški dom Vič, ki nama je med opravljanja praktičnega dela na Kemijskem inštitutu omogočil bivanje v Ljubljani.

Raziskovalna naloga je nastala v sklopu operacije *Nova generacija raziskovalcev ved o življenju*. Operacijo delno sofinancirata Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada ter Ministrstvo za izobraževanje, znanost in šport. Operacija se izvaja v okviru *Operativnega programa razvoja človeških virov v obdobju 2007–2013*, 3. razvojne prioritete *Razvoj človeških virov in vseživljenjskega učenja*, prednostne usmeritve *3.1 Izboljšanje kakovosti in učinkovitosti sistemov izobraževanja in usposabljanja*.



REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA IZOBRAŽEVANJE,
ZNANOST IN ŠPORT



Naložba v vašo prihodnost
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA
Evropski socialni sklad



Kemijski inštitut
Ljubljana
Slovenija



Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo

Povzetek naloge

V raziskovalni nalogi nas je zanimal prenos krajše enoverižne DNK v celico v prisotnosti pozitivno nabitih proteinov. Kot osnovo smo vzeli oligonukleotid (ODN10104), označen s fluorescenčnim barvilom Cy3, in ga celoten eksperiment kombinirali z dvema pozitivno nabitima proteinoma, poli-L- in poli-D-lizinom.

Proteina smo najprej ločeno ustrezno označili s fluorescenčnim barvilom Cy5. Nezreagirano barvilo Cy5 smo iz mešanice odstranili s pomočjo gelske kromatografije. Koncentracijo izoliranih in očiščenih označenih proteinov smo določili z metodo BCA. Za eksperimente *in situ* smo uporabili celične kulture HEK293, HEK293T in celično linijo monocitov MonoMac 6.

V nadaljevanju smo spremljali vnos obeh polilizinov z oligonukleotidom, označenim s Cy5 ali brez njega, v celice HEK in celično linijo monocitov MonoMac6. Pri tem smo uporabili mikroskopske tehnike, pretočno citometrijo in merjenje aktivacije Tollu podobnega receptorja 9 (TLR9) prirojene imunosti. Kolokalizacijo polilizinov z oligonukleotidi in receptorjem TLR9 smo spremljali z mikroskopom. Pri tem smo celične organele barvali s fluorescenčnimi barvili ali s fuzijskimi proteini, označenimi s fluorescirajočimi proteini. Potrdili smo kolokalizacijo polilizinov, oligonukleotida in TLR9 v endosomih in lizosomih.

Aktivacijo TLR9 z oligonukleotidi smo preverjali s celicami HEK, ki smo jim vnesli plazmide, z zapisi za TLR9 in reporterske proteine. Pokazali smo, da dodatek poli-D-lizina ligandu oligonukleotidu močno zniža aktivacijo TLR9, medtem ko ima poli-L-lizin le slabši inhibitorni učinek na aktivacijo TLR9.

Hitrost vstopanja oligonukleotidov v celice HEK in monocite smo spremljali s pretočno citometrijo. Celicam HEK in monocitom smo dodali označena proteina poli-L- in poli-D-lizin brez oligonukleotidov ali z označenimi oligonukleotidi in v časovnih intervalih merili količino označenih kemikalij v celicah. Pokazali smo, da polilizina v prisotnosti oligonukleotida vstopata hitreje v monocite kot v celice HEK. Pokazali smo tudi, da oba proteina izboljšata vnos oligonukleotidov v celico.

Dodatek pozitivno nabitih proteinov izboljša učinkovitost vstopanja enoverižne DNK v celico. Ugotovili smo tudi, da poli-L- in poli-D-lizin vsaj deloma zaščitita oligonukleotida pred delovanjem deoksiribonukleaz v endosomih, vendar zavirata vezavo oligonukleotida na TLR9, s čimer zmanjšata odziv celice.

Research summary

In this research work, we were focusing mainly on the transport of single-stranded DNA into the cell with the help of positively charged proteins. As a base for cellular transport, we took an oligonucleotide (ODN10104) marked with Cy3 fluorescent dye and combined it throughout the entire research with two positively charged proteins, poly-L (PLL) and poly-D-lysine (PDL).

First, we separately marked the two proteins with Cy5 fluorescent dye. Unreacted dye was removed with the help of size exclusion chromatography. The concentration of eluted proteins was determined with the BCA analysis method. For in situ experiments, HEK293, HEK293T and MonoMac 6 cell cultures were used.

Afterwards we monitored the cell's (Macrophages and HEKs) intake of PLL and PDL with or without Cy3 marked ODNs. Here, we were using microscopy techniques, flow cytometry and measurement of Toll-like receptor 9 (TLR9), active in innate immunity. Colocalization of PLL and PDL with ODN and TLR9 receptor was monitored with a microscope. In this process, we dyed different cellular organelles with fluorescent dyes or fusion proteins marked with fluorescent proteins. We confirmed the colocalization of PLL, PDL, ODN and TLR9 in endosomes and lysosomes.

Activation of TLR9 with ODNs was checked in HEK cells, which were transfected with plasmids, carrying the information for TLR9 and reporter proteins. We showed that the addition of PDL ligand to ODN dramatically lowers the activation of TLR9, whereas PLL exhibits only a minor inhibitory effect on activation of TLR9.

The intake speed of ODNs into HEK cells and macrophages was monitored via flow cytometry. The cells were added the PLLs and PDLs with or without ODNs and measurements of marking chemicals in the cells were taken in designated time intervals. We showed that PLLs and PDLs with ODNs enter into the macrophages faster than into the HEK cells. We also concluded that PLLs and PDLs improve ODN internalization.

The addition of positively charged proteins improves the efficiency of single-stranded DNA internalization. We also concluded, that PDL and PLL at least partially provide protection from deoxyribonuclease activity in endosomes, however they also inhibit the binding on TLR9 receptor, consequently decreasing the cell's response.

Kazalo vsebine

Povzetek naloge	3
Research summary	4
1 Namen dela.....	10
2 Hipoteze	10
2.1 Pozitivno nabita proteina poli-L- in poli-D-lizin se vežeta na krajše segmente enoverižne deoksiribonukleinske kisline (oligonukleotide ODN)	10
2.2 Proteina poli-L- in poli-D-lizin izboljšata prenos oligonukleotidov v celico	10
2.3 V celici je polilizin brez ODN ali z njimi v endosomih in lizosomih, ki vsebujejo receptor TLR9	11
2.4 Razgradnja poli-L-lizina v endosomih je ključna za sproščanje ODN in aktivacijo receptorja TLR9.....	11
2.5 Poli-D-lizin inhibira aktivacijo receptorja TLR9	11
3 Teoretični del.....	12
3.1 Prirojena imunost in vloga pri obrambi pred patogeni	12
3.2 Receptorji TLR.....	12
3.3 Ligandi receptorja TLR9	13
3.4 Lokalizacija receptorja TLR9 in vnos ligandov	13
3.5 Endocitoza	14
3.6 Polilizini.....	17
3.7 Fluorescenca in uporaba fluorescenčnih barvil.....	17
3.8 Učinek dušenja fluorescence (angl. <i>quenching effect</i>)	18
3.8.1 Försterjev prenos resonančne energije (angl. <i>Förster Resonance Energy Transfer – FRET</i>)	18
3.8.2 Mehansko oz. kontaktno dušenje fluorescence	19
3.9 Celične linije	19
3.9.1 Človeške embrionalne ledvične celice 293 (angl. <i>Human Embryonic 293 cells – HEK293 cells</i>)	19
3.9.2 Monociti MonoMac6.....	19
4 Teoretične osnove metod	21
4.1 Proteinska analiza BCA	21
4.2 Transfekcija.....	21
4.3 Gelska kromatografija	22
4.4 Fluorescenčna spektroskopija	23
4.5 Luciferazni test	24
4.5.1 Meritev aktivacije	25
4.5.2 Aktivacije TLR9	26
4.6 Pretočna citometrija	26
5 Praktični del	28
5.1 Delo z gensko spremenjenimi organizmi in varnostni postopki	28
5.2 Delo s celičnimi kulturami	28
5.3 Priprava označenih polilizinov	29
5.4 Zasledovanje endocitoze z mikroskopom	31
5.5 Transfekcija TLR9 in preverjanje aktivacije z merjenjem luminescence.....	31
5.6 Zasledovanje endocitoze s pretočnim citometrom	33
5.7 Uporabljene snovi, pripomočki in celične kulture	35
6 Rezultati	38
6.1 Označevanje poli-D- (PDL) in poli-L-lizina (PLL) z barvilom Cy5	38
6.1.1 Označevanje PLL in PDL ter ločevanje označenih proteinov z gelsko kromatografijo.....	40

6.1.2 Določanje prisotnosti barvila v frakcijah po eluciji iz gelske kromatografije	40
6.1.3 Določanje koncentracije proteinov	40
6.1.4 Fluorescenčne lastnosti barvila Cy5 po vezavi na polilizin.....	41
6.1.5 Učinek razgradnje proteina na intenziteto fluorescence – učinek dušenja fluorescence	42
6.1.6 Ocena izgub pri procesu označevanja PLL in PDL	42
6.2 Položaj polilizinov in oligonukleotidov v celici	43
6.2.1 Vstop polilizinov v celico.....	43
6.2.2 Sledenje endosomske aktivnosti	43
6.2.3 Kolokalizacija ODN in polilizinov	44
6.2.4 Prisotnost PDL/PLL v celičnih strukturah.....	44
6.3 Aktivacija TLR9 in razporejanje TLR9 s PDL/PLL	45
6.3.1 Prostorska porazdelitev receptorja TLR9 in polilizina	47
6.4 Hitrost vstopanja polilizina in ODN v celice HEK293T in makrofage MonoMac6	52
6.4.1 Določitev meritvenega območja	52
6.4.2 ODN v prisotnosti proteinov PDL in PLL stimulira celično smrt.....	53
6.4.3 Primerjalno merjenje endocitoze pri HEK293T in makrofagih.....	54
7 Analiza rezultatov	58
7.1 Pozitivno nabita proteina poli-L- in poli-D-lizin se vežeta na krajše segmente enoverižne deoksiribonukleinske kisline (oligonukleotide ODN)	58
7.2 Proteina poli-L- in poli-D-lizin izboljšata prenos oligonukleotidov v celico	58
7.3 V celici je polilizin brez ODN ali z ODN v endosomih in lizosomih, ki vsebujejo receptor TLR9	58
7.4 Razgradnja poli-L-lizina v endosomih je ključna za sproščanje ODN in aktivacijo receptorja TLR9.....	59
7.5 Poli-D-lizin izboljša vstopanje ODN v celice in inhibira aktivacijo receptorja TLR9	59
7.6 Komentar o celični toksičnosti poli-L/D-lizina	59
8 Razprava: Problematika barvno slepih in s tem povezana predstavitev rezultatov znanstvenega dela.....	60
8.1 Barvna slepota	60
8.2 Problemi pri prikazu rezultatov.....	60
8.2.1 Splošni problem percepcije	60
8.2.2 Rdeče-zelena in modra BS	60
8.3 Predlogi za rešitev težav.....	61
8.3.1 Uporaba vzorcev za prikaz grafov in slik	61
8.3.2 Uporaba nadomestnih barv	62
8.3.3 Uporaba novih barvnih kombinacij	62
8.3.4 Spremenjen način govorne predstavitve rezultatov	63
9 Zaključki	63
10 Viri in literatura	64
10.1 Viri besedila	64
10.2 Viri slik	64
11 Priloge	66
11.1 Protokoli	66
11.1.1 Protokol I: Redčenje gojišč celic HEK in precepljanje v 8-well škatlice	66
11.1.2 Protokol II: Priprava označenih polilizinov.....	68
11.1.3 Protokol III: Kromatografija obarvanih proteinov in merjenje absorbance	69
11.1.4 Protokol IV: Umeritvena krivulja za proteine in merjenje absorbance	70
11.1.5 Protokol V: Merjenje fluorescence	71
11.1.6 Protokol VI: Proteazna cepitev poli-D/L-lizinov s proteinazo K	72
11.1.7 Protokol VII: Mikroskopiranje	74

11.1.8 Protokol VIII: Lipofektaminska transfekcija TLR9	76
11.1.9 Protokol IX: Aktivacija transfekiranih celic in merjenje luminescence	78
11.1.10 Protokol X: Cepljenje celičnih kultur na mikrotitrnske plošče (24-well).....	80
11.1.11 Protokol XI: Zasedovanje endocitoze proteinov in ODN s pretočnim citometrom	81
11.1.12 Protokol XII: Lipofektaminska transfekcija 8-well mikroskopičnih plošč	83

Kazalo slik

Slika 1: Vezava ODN s polilizini	10
Slika 2: Internalizacija ODN	10
Slika 3: Zaščita ODN pred DNazami	11
Slika 4: Receptor TLR9 z vezavnimi mesti za DNK	11
Slika 5: Zgradba receptorja TLR.....	12
Slika 6: Model vezave DNK na dimerni receptor TLR9.....	13
Slika 7: Grafični prikaz vseh opisanih tipov endocitoze	14
Slika 8: Slika elektronskega mikroskopa periferije celice	15
Slika 9: Prikaz endocitičnih transportnih poti	16
Slika 10: Struktura poli-L-lizina	17
Slika 11: Jablonski diagram – preprosta predstavitev principa delovanja fluorescence	17
Slika 12: Struktura barvil Cy3 in Cy5	18
Slika 13: FRET.....	18
Slika 14: Statično kvenčanje	19
Slika 15: Celična kultura HEK293T, ki je bila izpostavljena poli-L-lizinu	19
Slika 16: Makrofag miši	20
Slika 17: Bikinkoninska kislina.....	21
Slika 18: Poenostavljen prikaz lipofektaminske transfekcije.....	21
Slika 19: Lipofektaminski reagent za transfekcijo	22
Slika 20: Princip delovanja gelske permeabilne kromatografije.....	22
Slika 21: Sodoben aparat za gelsko kromatografijo	23
Slika 22: Shema delovanja fluorometra	24
Slika 23: Sodoben fluorometer.....	24
Slika 24: Luciferazna reakcija.....	25
Slika 25: Priprava raztopin za meritev aktivacije TLR9	25
Slika 26: Princip delovanja pretočnega citometra	27
Slika 27: Sodoben pretočni citometer na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.....	27
Slika 28: Shematski prikaz nastanka gensko spremenjene rastline s pomočjo kulture <i>Agrobacterium</i>	28
Slika 29: Gojitvena posoda T75	28
Slika 30: Uporaba multikanalnih pipet.....	29
Slika 31: Prikaz tehtanja na analizni tehtnici	29
Slika 32: Shematski prikaz merjenja absorbance frakcij obarvanih proteinov	30
Slika 33: Fluorometer LS55 na Kemijskem inštitutu v Ljubljani	30
Slika 34: Spektrofotometer SynnergyMX proizvajalca BioTec.....	31
Slika 35: Fluorescenčni laserski mikroskop Leica TCS SP5 na Kemijskem inštitutu v Ljubljani	31
Slika 36: Genetski laboratorij na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.....	32
Slika 37: Lipofektaminski reagent proizvajalca Invitrogen	32
Slika 38: Mikroskopična škatlica pod mikroskopom	33

Slika 39: Shematska razporeditev reagentov pri zasledovanju endocitoze	34
Slika 40: Pretočni citomer CyFlow Space.....	34
Slika 41: Prikaz celotnega postopka označevanja PLL in PDL ter čiščenja označenih proteinov	39
Slika 42: Porazdelitev polilizina v celici je točkovna	43
Slika 43: Prikaz turkizno obarvanih endosomov v notranjosti celic	44
Slika 44: Polilizin in ODN sta pogosto v istih veziklih znotraj celic	44
Slika 45: Polilizin po endositoski poti prehaja v lizosome	45
Slika 46: Receptor TLR9 je v istih razdelkih kot polilizin.....	47
Slika 47: Zgodnji endosomi vsebujejo receptor TLR9 in polilizin	48
Slika 48: TLR9 in PLL sta tudi v FYVE-pozitivnih endosomih.....	48
Slika 49: Lokalizacija receptorja TLR9, PLL in ODN v LC3-pozitivnih lizosomih je redka	49
Slika 50: Receptor TLR9 je v istih območjih kot poli-D-lizin.	49
Slika 51: Zgodnji endosomi vsebujejo receptor TLR9 in poli-D-lizin.....	50
Slika 52: TLR9 in PDL sta tudi v FYVE-pozitivnih endosomih	50
Slika 53: Lokalizacija receptorja TLR9, PDL in ODN v LC3-pozitivni lizosomih je pogostejša	51
Slika 54: Točkovni graf stranskega in direktnega sipanja celic po dodatku pufra PBS.....	53
Slika 55: ODN v kombinaciji s PDL in PLL stimulira celično smrt.....	54
Slika 56: Internalizacija kombinacije polilizina in ODN pri celicah HEK293T	55
Slika 57: Internalizacija ODN in polilizonov, označenih s fluorescenčnimi barvili, pri monocitih MonoMac6.	56
Slika 58: Celice z dodanim PLL (Cy5) (magenta) in ODN (cian)	58
Slika 59: Celična smrt	59
Slika 60: Tipičen fluorescenčni mikrograf.....	61
Slika 61: Različno zaznavanje obarvanosti tipičnega fluorescenčnega mikrografa pri različno barvno slepih posameznikih	61
Slika 62: Primer dobrega in slabega grafa.....	62
Slika 63: Primer mikrografa, obarvanega z magento	62
Slika 64: Preglednica primerov barv, ki jih barvno slepi lahko zaznajo	62

Kazalo tabel

Tabela 1: Pufri.....	35
Tabela 2: Gojiščne mešanice.....	35
Tabela 3: Druge kemikalije	35
Tabela 7: Celične kulture	37
Tabela 8: Absorbanca pri 280 nm in 650 nm frakcij proteina po gelski kromatografiji	40
Tabela 9: Podatki za umeritveno krivuljo	41
Tabela 10: Koncentracije proteinov v frakcijah po gelski kromatografiji	41
Tabela 11: Izračun izkoristka čiščenja polilizinov, konjugiranih z barvilom Cy5	43
Tabela 12: Rezultati luminiscenčnih meritev za celice HEK293	45
Tabela 13: Rezultati luminiscenčnih meritev za celice HEK293T	46
Tabela 14: Barvila, uporabljena pri mikroskopiji TLR9-transfekiranih celicah	47
Tabela 15: Prikaz različne obarvanosti napisov pri različno barvno slepih posameznikih	61
Tabela 16: Primeri vida barvno slepih rdeče-zelene barvne kombinacije.....	63
Tabela 17: Primeri vida barvno slepih cian-magentne barvne kombinacije	63

Kazalo grafov

Graf 1: Umeritvena krivulja	41
Graf 2: Emisijska spektra s Cy5 označenih polilizinov pri vzbujanju s svetlobo valovne dolžine 646 nm.....	42
Graf 3: Spreminjanje fluorescence PDL/PLL v odvisnosti od časa ob aktivni proteinazi K	42
Graf 4: Prisotnost PDL popolnoma inhibira aktivacijo TLR9	46
Graf 5: Prisotnost PDL popolnoma inhibira aktivacijo TLR9	46
Graf 6: Delež pozitivnih celic v odvisnosti od časa inkubacije celic z ODN in/ali polilizini	57
Graf 7: Delež pozitivnih celic na ODN.....	57
Graf 8: Graf hitrosti internalizacije pri monocitih MonoMac6.....	58
Graf 9: Prikaz grafa jakosti aktivacije pri celični liniji HEK293	59

1 Namen dela

Tema raziskovalne naloge je ugotoviti, ali pozitivno nabiti proteini izboljšajo prenos enoverižnih oligonukleotidov (ODN) v celico. ODN predstavlja ligand receptorja TLR9, ki bi ob uspešnem prehodu v celico aktiviral receptor TLR9 in izboljšal imunski odziv celice.

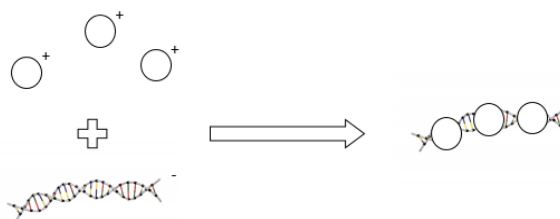
Rezultate bi torej lahko uporabili tudi z drugimi oblikami zdravljenja, ki za svoje učinkovito delovanje potrebujejo aktivacijo receptorja TLR9. Ta v celici sproži specifičen odziv.

2 Hipoteze

Na podlagi znanja o enoverižni DNK, pozitivno nabitih proteinih in endocitozi smo si v sklopu raziskovalne naloge postavili naslednje hipoteze:

1. Pozitivno nabita proteina poli-L- in poli-D-lizin se vežeta na krajše segmente enoverižne deoksiribonukleinske kisline (oligonukleotide ODN)

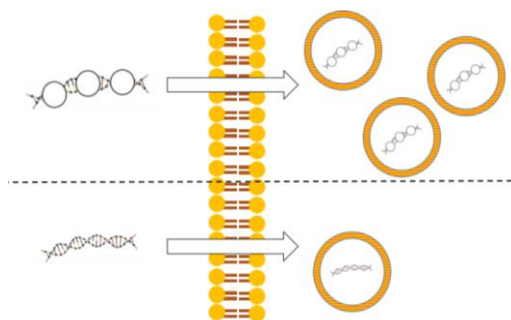
Ker sta poli-L-lizin (PLL) in poli-D-lizin (PDL) pozitivno nabita proteina, sklepamo, da se bo negativno nabita enoverižna DNK vezala na protein preko ionskih vezi (slika 1).



Slika 1: Vežava ODN s polilizini. Razlika v naboju pozitivnih proteinov in negativne DNK omogoči vezavo. (Avtor: J. Gojznikar)

2. Proteina poli-L- in poli-D-lizin izboljšata prenos oligonukleotidov v celico

Predvidevamo, da PLL ali PDL pospešita prenos oligonukleotidov v celico (slika 2), s tem ko tvorita proteinsko-nukleinski kompleks, ki nevtralizira negativni naboj oligonukleotidov.

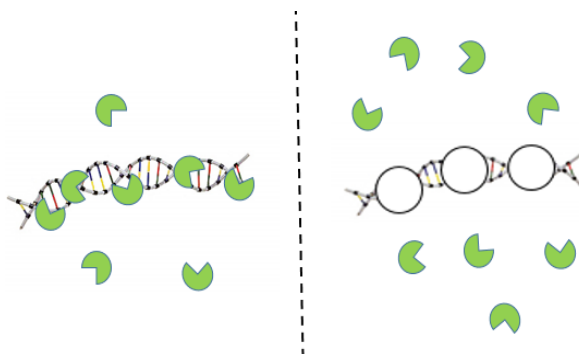


Slika 2: Internalizacija ODN. Predvidevamo, da PLL in PDL pospešita prenos DNK v celico, torej je je v istem času več, kot bi je bilo brez proteinov. Endosomi so zaradi preglednosti prikazani samo shematsko. (Avtor: J. Gojznikar)

3. V celici je polilizin brez ODN ali z njimi v endosomih in lizosomih, ki vsebujejo receptor TLR9

Ker proteina vstopata v celice z endocitozo, lahko sklepamo, da sta polilizina brez ODN ali z njimi v endosomih in lizosomih, ki vsebujejo receptor TLR9.

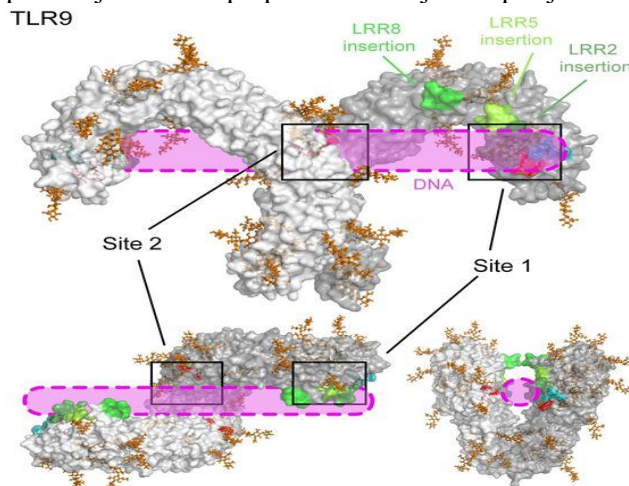
Domnevamo tudi, da tvorba kompleksa med oligonukleotidom in PLL/PDL zaščiti oligonukleotid pred razgradnjo z encimi deoksiribonukleazami, ki so naravno prisotni v endosomih (slika 3).



Slika 3: Zaščita ODN pred DNazami. Hipotetično PLL in PDL (vsaj deloma) zaščita ODN pred delovanjem DNaznih encimov v endosomih. (Avtor: J. Gojznikar)

4. Razgradnja poli-L-lizina v endosomih je ključna za sproščanje ODN in aktivacijo receptorja TLR9

Sklepamo, da kljub vezavi PLL na ODN ta še vedno lahko sproži odziv receptorja TLR9 (slika 4). Menimo, da se PLL v poznih endosomih razgradi v prisotnosti proteaz in sprost ODN, ki se nemoteno veže na receptor TLR9. Proteaze PDL ne razgrajujejo, tako ODN ostane vezan na PDL. V tem primeru PDL prepreči sproščanje ODN in prepreči aktivacijo receptorja TLR9.



Slika 4: Receptor TLR9 z vezavnimi mesti za DNK (Povzeto po: <http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Immunostimulation.102349.0.html>.)

5. Poli-D-lizin inhibira aktivacijo receptorja TLR9

Glede na strukturo PDL sklepamo, da bo zaradi svoje nerazgradljivosti v lizosomih in endosomih inhibiral aktivacijo receptorja TLR9.

3 Teoretični del

3.1 Prirojena imunost in vloga pri obrambi pred patogeni

Prirojena imunost oz. nespecifični imunski sistem predstavlja prvi obrambni odziv organizmov na patogene in je, kot že ime pove, nespecifična. To pomeni, da se celice tega sistema odzovejo na večino tujkov v telesu, vendar pa niso sposobne tvorbe dolgoročne imunosti organizma proti določenemu tujku (ne prihaja do tvorbe spominskih celic). (Povzeto po: Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. /2008/ *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing, Inc., Print.) Ta sistem se osredotoča na hitrost telesnega odziva na patogen. Nespecifični imunski sistem ima več vlog v telesni obrambi, in sicer:

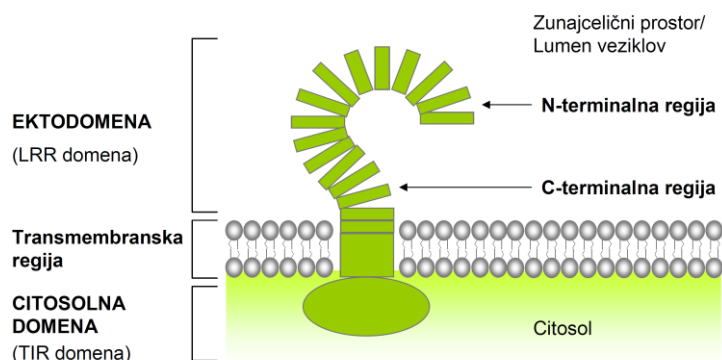
- usmerja imunske celice na mesto okužbe s pomočjo kemičnih faktorjev;
- aktivira komplementarni sistem, ki spodbuja delovanje protiteles in imunskih celic za prepoznavanje antigenov in njihovo uničenje;
- prepoznava tuje snovi v organih in tkivih ter jih odstranjuje s pomočjo belih krvničk;
- aktivira pridobljeni imunski sistem;
- omejuje širjenje okužbe.

Celice, ki sodelujejo v nespecifičnem imunskem odzivu, so levkociti, med katere spadajo makrofagi, mastociti, dendritične celice in celice ubijalke.

3.2 Receptorji TLR

Tollu podobni receptorji (angl. *Toll-like receptors*) oziroma TLR je skupina membranskih proteinov s ključno vlogo v prirojenem imunskem sistemu. Delujejo kot receptorji za molekule mikrobnega izvora in ob njihovi vezavi na TLR ti sprožijo imunski odziv. Najpogosteje so torej izraženi v makrofagih in dendritičnih celicah, ki skrbijo za zaznavo antigenov v organizmu. Gre za nespecifične receptorje, ki prepoznavajo molekule, na splošno prisotne v velikem številu patogenov, a vendar s prepoznavnimi lastnostmi, s čimer se ločijo od gostiteljevih molekul.

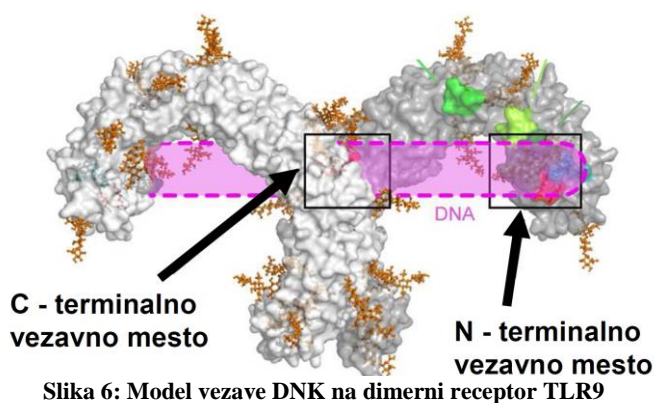
Danes poznamo 13 sesalskih TLR, od katerih jih 10 najdemo tudi pri človeku. Natančneje gre za glikoproteine s štirimi značilnimi domenami: ektodomena oz. z levcini bogata regija (angl. *leucin-rich region* – LRR), domena, ki je v zunajceličnem prostoru in lumnu veziklov, transmembranska regija, ki zaseda membranski del, in citosolna domena oz. domena TIR, ki sega v notranjost celice (slika 5). Za vezavo ligandov skrbi ektodomena, prenos signala za sprožitev imunskega odziva pa sproži citosolna domena.



Slika 5: Zgradba receptorja TLR. Ektodomena v obliki podkve štrli v zunajcelični prostor in veže antigene. Signal se prenese preko transmembranske regije v citosolno domeno, ki je pomembna za nadaljnjo signalizacijo.

Pri površinskih TLR je ektodomena v zunajceličnem prostoru, pri endosomalnih/znotrajceličnih TLR pa je ta v notranjosti endosomov. Ker bomo s TLR preverjali stopnjo in učinkovitost endocitoze, se bomo v svoji raziskavi osredotočili na endosomske TLR. Mednje prištevamo TLR3, TLR7, TLR8 in TLR9, ki zaznavajo večinoma nukleinske kisline patogenov po vstopu v celico. Dvoverižno RNA aktivira TLR3, enoverižno RNA TLR7 in TLR8, TLR9 pa prepoznava enoverižno nemetilirano DNK. Pri tej zaznavi lahko pride tudi do napak, kadar receptorji namesto eksogenih vežejo sebi lastno, endogeno DNK kot posledico avtoimunskih bolezni.

Naša raziskava se osredotoča na endocitozo eksogene DNK, torej bomo količino ODN, ki ni prišla v stik z DNazami, določili z aktivacijo receptorjev TLR9. Zaznava TLR9 poteka v dimerni obliki, kjer sta za vezavo ODN pomembni dve vezavni mesti na C- in N-terminalu (slika 6). Ta model vezave je trenutno edini veljavni, vendar znanstveniki menijo, da je napačen.



Slika 6: Model vezave DNK na dimerni receptor TLR9

Veliko pomembnih faktorjev za uspešno vezavo liganda na TLR9 je odvisnih tudi od same ODN. Za humani TLR9 so pokazali prepoznavanje enoverižne DNK s citozin-fosfat-gvanozin motivi (CpG), število katerih naj bi bilo približno od dva do štiri v razmiku dveh nukleinskih baz (po možnosti timinov). Optimalno zaporedje nukleinskih baz je GTCGTT, kjer se nemetilirana DNK veže neposredno na TLR9, metiliran citozin znotraj prikazanega motiva pa lahko povzroča zmanjšanje interakcije ODN s TLR9. Do vezave pride v kislem pH (v območju 5.0–6.5), ta pogoj pa je izpolnjen šele v poznih endosomih ali lizosomih. Dvoverižna DNK pri TLR9 v primerjavi z enoverižno sproža le šibko interakcijo.

3.3 Ligandi receptorja TLR9

Za aktivacijo receptorja TLR9 smo uporabljali ODN. ODN oz. oligodeoksinukleotidi so enoverižne sintetično pridobljene molekule DNK. Po navadi se označujejo tudi kot CpG ODN, saj vsebujejo ponavljajoče se motive iz citozin deoksinukleotida (C), temu sledi gvanin deoksinukleotid (G), oba pa sta medsebojno povezana z fosfodiestrsko vezjo (p). Če so ti motivi CpG v molekuli ODN prosti oz. nemetilirani, jih lahko uporabljamo kot imunostimulante, kar smo izkoristili tudi v svoji raziskovalni nalogi.

3.4 Lokalizacija receptorja TLR9 in vnosi ligandov

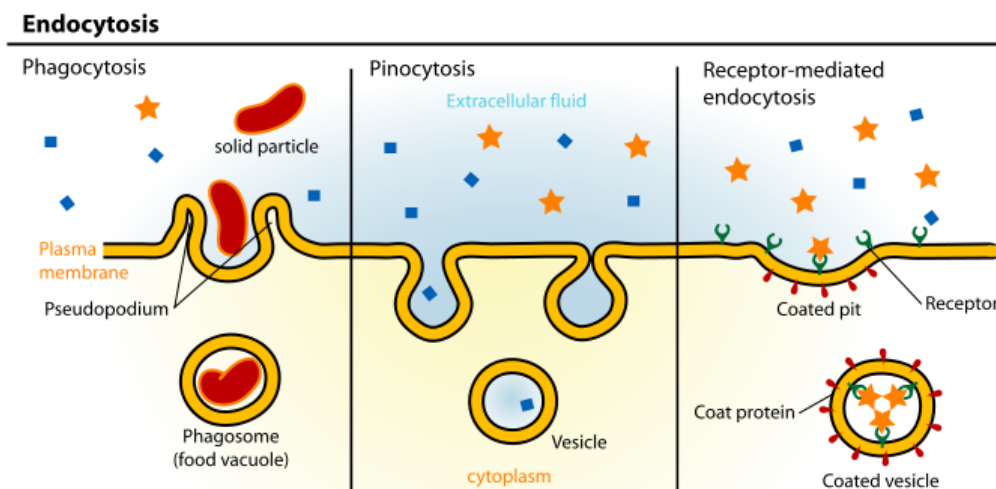
Receptor TLR9 v celici upravlja vlogo receptorja virusne in bakterijske DNK, torej mora biti v celici na takšni lokaciji, da bo imel dostop do molekul DNK patogenov in hkrati ne bo prepoznaval lastnih DNK. Receptor TLR9 je zato lokaliziran večinoma v intraceličnih predelkih, povezanih z vstopom novih snovi v celico, kot so endosomi, in predelkih, preko katerih poteka celični transport, kot na primer endoplazemski retikulum. ODN v celico vstopijo z endocitozo, torej uvihovanjem celične membrane, kar je opisano v naslednjem poglavju. Posledično so tudi ODN v endosomih, kjer lahko zaradi opisanih motivov CpG sprožijo imunski odziv, s tem jih lahko zaznamo in dokažemo v celici.

3.5 Endocitoza

Neposreden prenos v celično notranjost preko plazmaleme (sestavljene iz fosfolipidnega dvosloja) je možen samo pri majhnih polarnih ali nepolarnih molekulah, kamor ioni niso všeti. Makromolekule, ki so velikokrat polarne in torej ne morejo prehajati preko hidrofobne cone plazmaleme, celice internalizirajo s pomočjo energijsko odvisnega procesa uvihovanja celične membrane okoli makromolekul, imenovanim endocitoza. (Povzeto po: *Wikipedia – Endocytosis*: <http://en.wikipedia.org/wiki/Endocytosis>. Dostop: 25. 10. 2013.) Različni tipi internalizacije (začetne faze endocitoze) se med seboj razlikujejo glede na vrsto materiala, ki vstopa v celico.

Poznamo tri osnovne tipe endocitoze (slika 7):

1. Fagocitoza – proces, pri katerem poteka internalizacija trdih delcev, v premeru večjih od 0.75 μm . Mednje spadajo mikroorganizmi, prašni delci, pri poškodbah nastali celični ostanki in tudi apoptotične celice, v katerih fagocitoza poteka večinoma pri dendritičnih celicah. Je edini tip endocitoze, pri kateri se plazmalema izviha in tvori psevdopodije, nastali vezikli pa se imenujejo fagosomi.
2. Pinocitoza – proces, pri katerem poteka internalizacija tekočin. Začne se z izrazitim uvihanjem membrane do tvorbe manjšega žepka, ki se zaključi in odcepi v notranjost celice, pri čemer se zajame večja količina zunajcelične tekočine z velikim številom molekul. Polnjenje pinocitosomskega vezikla je nespecifično.
3. Receptorsko posredovana endocitoza – proces, pri katerem poteče internalizacija specifičnih molekul. Ta lahko poteka na mestih celične membrane, na kateri je povečana koncentracija citosolnega proteina klatrina, imenovanih tudi klatrinske jamice. V njih so skoncentrirane receptorske molekule, ki so usmerjene v izvencelični prostor. Ko se nanje veže zadostna količina specifičnih ligandov (transferin, rastni hormoni, protitelesa itd.), poteče klatrinsko posredovana endocitoza, nastane pa s klatrinom prekrit vezikel.



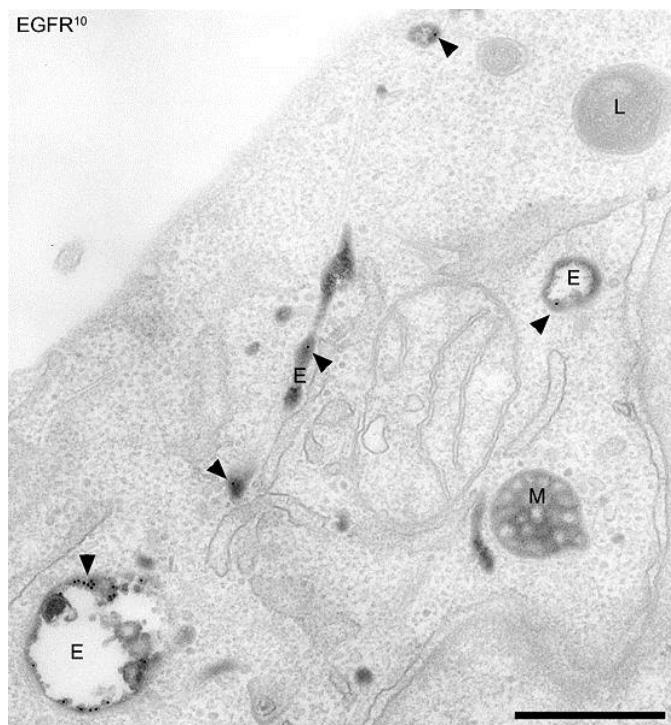
Slika 7: Grafični prikaz vseh opisanih tipov endocitoze (Povzeto po:

http://wpcontent.answcdn.com/wikipedia/commons/thumb/1/1a/Endocytosis_types.svg/400px-Endocytosis_types.svg.png.)

Po končani prvi fazi endocitoza preide v endocitično membransko transportno pot od plazmaleme do lizosomov, kjer poteče končna degradacija, ali pa nazaj do plazmaleme, kjer poteče reciklacija. Možna je tudi pot do Golgijevega aparata in naprej do lizosomov ali spet ponovna reciklacija v golgiju. Glavni sestavni deli te transportne poti so endosomi, ki služijo kot pomembni sortirni organi za večino internaliziranih molekul. Delijo se na tri osnovne faze (slika 8) glede na čas, ki je potreben, da jih vezikli s površine dosežejo, in seveda glede na prepoznavanje specifičnih označevalcev.

1. Zgodnji endosomi – gre za dinamični preplet mikrotubul s premerom okoli 50 nm in veziklov s premerom do 1 μm . Najdemo jih večinoma v periferiji celic in služijo kot prva postaja endocitične transportne poti. Notranjost zgodnjih endosomov je rahlo kislega pH, kar pomembno vpliva na disociacijo ligandov od njihovih receptorjev v klatrinsko posredovani endocitozi.

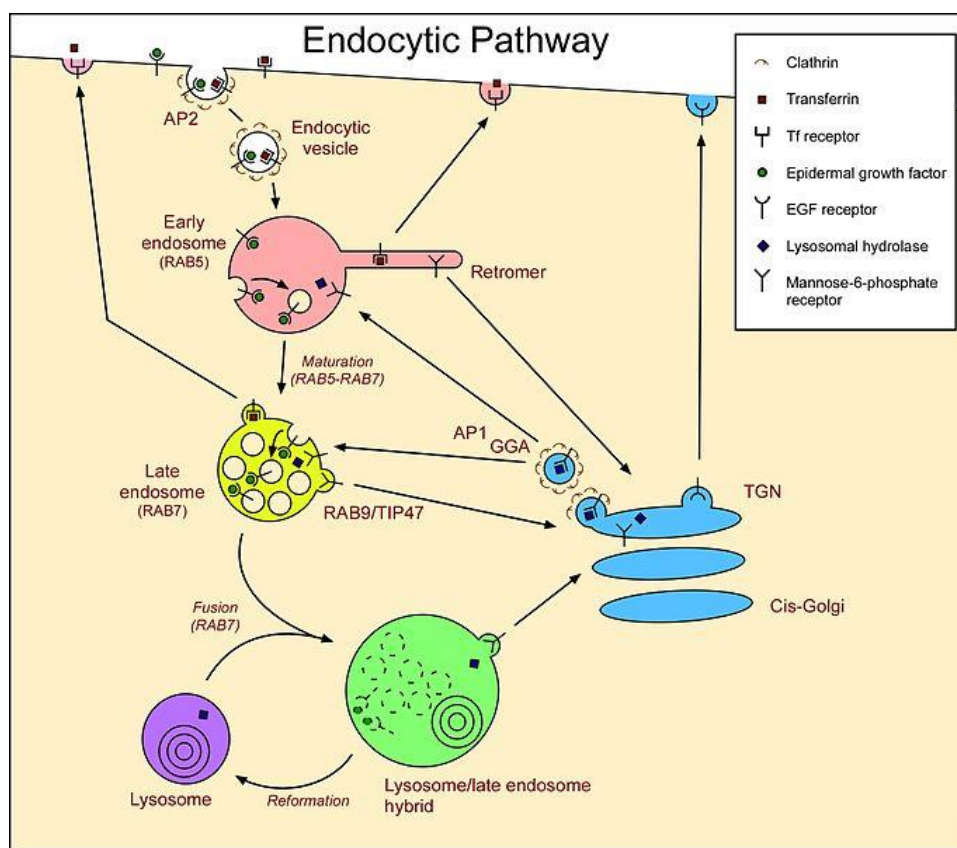
2. Pozni endosomi – ti sprejemajo internaliziran material na poti do lizosomov od zgodnjih endosomov, fagosomov in veziklov iz *trans* Golgijeve biosintezne poti. Imajo kisli pH (okoli 5.5) in so večinoma sferične oblike, brez prisotnih mikrotubul. Vsebujejo veliko število zgoščenih veziklov iz celičnega lumna, kar jih s pomočjo elektronskega mikroskopa naredi lahko prepoznavne. Igrajo pomembno funkcijo v zadnjem sortirnem koraku, pred vstopom v lizosome.
3. Reciklirni endosomi – v večjem številu so skoncentrirani pri mikrotubulnem organizacijskem centru in so sestavljeni po večini iz mreže tubulov. Določen internaliziran material se lahko reciklira direktno preko zgodnjih endosomov nazaj v plazmalemo, a večino reciklirnih prenosov opravijo reciklirni endosomi.



Slika 8: Slika elektronskega mikroskopa periferije celice. Vidni so vsi trije tipi endosomov – zgodnji endosomi (E), pozni endosomi oz. tudi MVB (M) in lizosomi (L). Zgodnji endosomi so prepoznavni po večjem številu veziklov, povezanih v mrežo nizke gostote, medtem ko pri poznih vidimo skoncentrirane vezikle v sferi. Pri lizosomih veziklov ni na spregled, saj v njih pride do degradacije.

(Povzeto po: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/85/HeLa_cell_endocytic_pathway_labeled_for_EGFR_and_transferrin.jpg.)

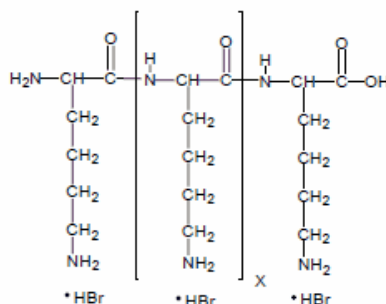
Zgodnji endosomi v endocitični transportni poti (slika 9) dozoriijo v pozne endosome na več načinov. Kislost njihove notranjosti se poveča zaradi delovanja membranske črpalke V-ATPaze, ki v procesu zorenja poveča koncentracijski gradient vodikovih protonov v notranjosti endosomov. Večina tubul se v prehajanju reciklira, zato jih v poznih endosomih ni. Postopno se med zorenjem zaradi homotipičnega združevanja v večje vezikle poveča tudi velikost endosomov. Med združevanjem se sortirajo tudi molekule, ki so za degradacijo označene z vezanim ubikvitinom, v manjše vezikle, ki nastanejo z brstenjem endosomske membrane v endosomalni lumen – nastanejo luminalni vezikli. Zaradi teh imajo pozni endosomi videz vsebnosti večjega števila veziklov, po čemer so tudi dobili ime multivezikularna telesa (angl. *multivesicular bodies* – MVB). Reciklirni materiali (receptorji, uporabljeni za potek klatrinsko posredovane endocitoze) se izločijo s pomočjo brstenja veziklov iz endosomov, kar poteka med procesom zorenja zgodnjih endosomov. Po koncu zorenja v poznih endosomih pride do zamenjave membranskih proteinov iz družine RAB (RAB5A z RAB7A), s čimer postanejo prepoznavni za lizosome in se z njimi tudi združijo. (Povzeto po: *Wikipedia – Endocytosis*: <http://en.wikipedia.org/wiki/Endocytosis>. Dostop: 25. 10. 2013.) V procesu združevanja nastane hibrid lizosoma, ki ima manjšo gostoto lumna kot končni lizosom. Da pride do končne oblike, se s hibridom združi večje število dozorelih poznih endosomov. To je prva izmed osnovnih bioloških transportnih poti, ki vključuje endosome.



Slika 9: Prikaz endocitičnih transportnih poti. Z rdečo so označeni zgodnji endosomi, ki v procesu zorenja menjajo membranske proteine RAB, iz RAB5A v RAB7A, do nastanka poznih endosomov (rumeni). Sledi zlitje z lizosomom (vijolično), kar vodi do formacije lizosom/pozni endosom hibrida (zeleno). Po končni doseženi gostoti hibrida sledi reformacija do prvotnega lizosomskega stanja. Aktivni transport poteka tudi med obema tipoma endosomov in Golgijevim aparatom (modro). Preko zgodnjih endosomov in golgija poteka reciklaža omenjenih receptorjev. (Povzeto po: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5a/Endocytic_pathway_of_animal_cells_showing_EGF_receptors,_transferrin_receptors_and_mannose-6-phosphate_receptors.jpg.)

3.6 Polilizini

Polilizini so majhni naravni polimerni derivati esencialne aminokislina lizina. Glede na prostorsko orientiranost monomernih lizinov ločimo poli-D- (izhaja iz D-lizina) in poli-L-lizin (izhaja iz L-lizina) (slika 10). Za raziskavo smo uporabili te proteine, ker v vodnih raztopinah pridobijo pozitivni naboj na hidrofilni aminoskupini. Posledično lahko inducirani naboj uporabimo za vezavo na negativno nabito enoverižno molekulo DNK, s čimer kompleks navzven elektrostatsko nevtraliziramo in v teoriji olajšamo internalizacijo z endocitozo ter zaščitimo DNK pred vplivi DNaz.



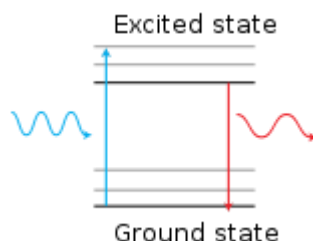
Slika 10: Struktura poli-L-lizina. Na koncu posameznega repa je vidna hidrofilna aminoskupina, ki v vodni raztopini ali v prisotnosti kislin pridobi pozitiven naboj, lastnost, uporabljeno v naši raziskavi. (Povzeto po: <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biofiles/biofiles-volume-31/figure3.gif>.)

Polilizini so sestavljeni iz približno 25–30 monomernih lizinov, kjer nastopa tako imenovana ϵ -peptidna vez. Pri normalni peptidni vezi se ta tvori preko α -karboksilne verige z aminoskupino, medtem ko se pri polilizinu vez vzpostavi preko ϵ -aminskupine na karboksilno skupino, posledično sta kisikov in vodikov atom usmerjena navzgor.

Poli-L-lizin se pojavlja v naravi pri fermentaciji bakterij rodu *Streptomyces*. Uporablja se kot naravni konzervans v hrani, saj so raziskave potrdile antimikrobni učinek poli-L-lizina na glive, bakterije (po Gramu tako pozitivne kot negativne) in kvasovke. Poli-D-lizin je sintetično pridobljena variacija in se naravno ne pojavlja.

3.7 Fluorescenca in uporaba fluorescenčnih barvil

Fluorescenca je fizikalni pojav oddajanja svetlobe pod vplivom prejetja svetlobe ali drugega elektromagnetnega valovanja. Pojav se razloži podobno kot delovanje neonskih luči – valenčne elektrone fluorescenčnih snovi (fluoroforov) vzburi s svetlobo eksitacijske oz. vzbujevalne valovne dolžine. Ti zaradi absorpcije fotonov preskočijo v višjeenergijske orbitale in pri vračanju v standardno stanje oddajo energijo v obliki svetlobe (slika 11). Večinoma je valovna dolžina oddane svetlobe daljša in posledično je energija nižja od absorbiranega valovanja.

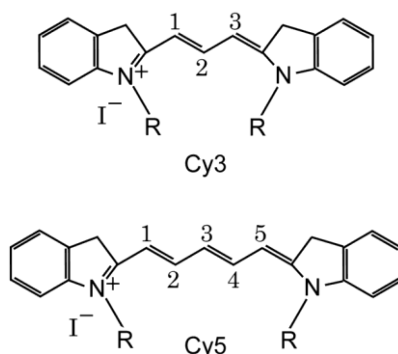


Slika 11: Jablonski diagram – preprosta predstavitev principa delovanja fluorescence. Modra puščica prikazuje absorpcijo energije fotona in posledično doseg vzbujenega stanja. Rdeča puščica je oddana energija v obliki svetlobe ob vračanju eksitiranega elektrona v osnovno stanje.

Ta fizikalni pojav se pogosto uporablja v naravoslovnih znanostih kot nedestruktiven način sledenja ali analiziranja bioloških molekul v živih organizmih. (Povzeto po: Voet D., Voet J. G. /2011/

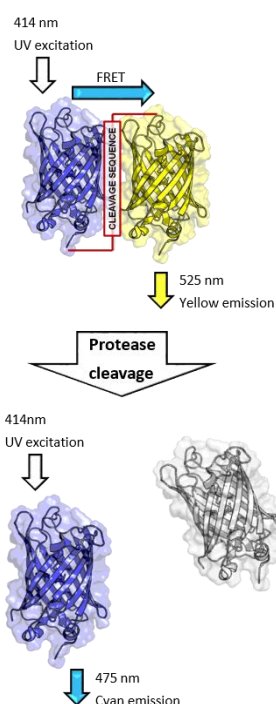
Biochemistry. Fourth Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc., Print.) Določene molekule so že po naravi fluorofori, zato v njihovem primeru ta pojav imenujemo avtofluorescenca oz. intrinzična fluorescenca (npr. klorofil, NADH, triptofan in GFP /zeleni fluorescenčni protein/). Za označevanje nefluorescenčnih molekul pa se uporabljajo ekstrinzični fluorofori. Mednje prištevamo anorganska fluorescenčna barvila, proteine in fluorescenčne polprevodne nanodelce (angl. *quantum dot*). Reaktivna fluorescenčna barvila lahko vsebujejo skupino, s katero jih lahko pritrdimo na proteine. Mednje spadajo npr. amino-, karboksilna, tiolna in azidna skupina, možna pa je tudi nespecifična vezava (npr. glutaraldehid) ali nekovalentna vezava (npr. hidrofobnost/hidrofilnost itd.). V naši raziskavi sta bili najpomembnejši barvili Cy3 in Cy5 (slika 12).

Ti dve barvili sta med najbolj uporabljenimi cianinskimi barvili, ki jih običajno uporabljamo skupaj za dvobarvno detekcijo. Valovna dolžina absorpcijskega maksimuma in valovna dolžina eksitacijskega maksimuma sta najpomembnejša podatka za vsak fluorofor. Vzbujanje fluorofora je najučinkovitejše pri valovni dolžini absorpcijskega maksimuma. Pomembna sta tudi ekstinkcijski koeficient in svetlost, ki definira jakost oddane svetlobe fluorofora. Valovne dolžine vzbujanja in eksitacije za Cy3 so 550 nm/570 nm, za Cy5 pa znašajo 649 nm/670 nm. Različni mikroskopi in fluorescenčni spektrometri za eksitacijo fluoroforov uporabljajo laserje z običajno emisijsko valovno dolžino 532 nm in 635 nm ter filtre z običajnimi valovnimi dolžinami 550–600 nm in 655–695 nm. Podana območja se očitno prekrivajo z navedenimi razmerji fluoroforov Cy3 in Cy5, zato označenih struktur s tema dvema barviloma ni težko ločiti.



Slika 12: Struktura barvil Cy3 in Cy5. Razlika med barviloma je v dolžini verige med obema obročema, iz česar tudi izhaja njuno ime. (Povzeto po: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/90/Cy3_Cy5_dves.gif.)

3.8 Učinek dušenja fluorescence (angl. *quenching effect*)



Kvenčing efekt je fizikalno-kemijski pojav, pri katerem se intenziteta fluoresciranja določene substance ob prisotnosti tako imenovanih kvenčerjev (večinoma kemijskih) zniža. Do kvenčanja lahko pride na več različnih načinov, izmed katerih sta najpogostejša dva.

3.8.1 Försterjev prenos resonančne energije (angl. *Förster Resonance Energy Transfer – FRET*)

Pri FRET (slika 13) gre za mehanizem, ki opisuje kvenčing efekt med dvema kromoforoma. Donorski kromofor je na začetku v svojem vzbujenem stanju in lahko posledično prenese energijo na akceptorski kromofor preko neradioaktivnih dipol-dipol interakcij. Če akceptorski kromofor ni prisoten, bo donorski fluoresciral, v njegovi prisotnosti pa bo akceptorski kromofor takoj absorbiral sproščene fotone, in fluorescenca donorja bo zadušena. Zaradi energijskega prenosa bo zdaj fluoresciral akceptor, kar je prikazano na sliki 13.

Slika 13: FRET. Ob povezavi dveh kromoforov (v tem primeru proteinskih) se energija prenese na akceptor, ki fluorescira z drugačno emisijsko valovno dolžino, kakor če donor nima vezanega akceptorja. (Povzeto po: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bc/Proteolytic_cleavage_of_a_Dual-GFP_fusion_FRET-pair.png.)

3.8.2 Mehansko oz. kontaktno dušenje fluorescence

Mehansko dušenje (slika 14) se pojavi, ko molekule kromoforov tvorijo kompleks v osnovnem, nevzbujenem stanju. Kompleks ima svoje lastnosti, kot na primer nefluorescenčnost in unikaten absorpcijski spekter. Združevanje kromoforov v komplekse je velikokrat posledica hidrofobnosti, saj se s formacijo kompleksa zniža stična površina kromoforov z vodo. Ta princip statičnega kvenčanja smo uporabili tudi v naši raziskavi za preverjanje sposobnosti proteinaze K za razgradnjo poli-L/D-lizinov. Nanje smo predhodno vezali kromofore v prebitku, ki si v neposredni bližini dušijo fluorescenčnost. Ob možni razgradnji polilizinov bi se kromofori med seboj razmaknili in ponovno pridobili fluorescenčne lastnosti, kar bi bilo razvidno v porastu fluorescence.

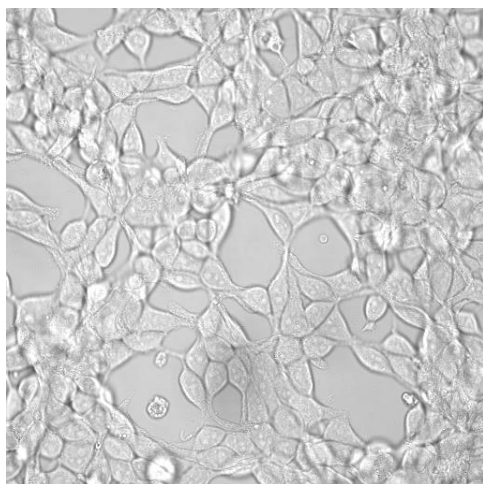
Slika 14: Statično kvenčanje. Na levi imamo viden protein z vezavo prebitka kromoforov, pri katerih v bližini pride do kvenčanja. Ob proteinazni razgradnji se razdalja med njimi poveča, kvenčing efekt se prekine in viden je porast v fluorescenci. (Avtor: N. Kejžar)



3.9 Celične linije

3.9.1 Človeške embrionalne ledvične celice 293 (angl. *Human Embryonic 293 cells – HEK293 cells*)

Celice HEK293 (slika 15) je imortalizirana celična linija, pridobljena na Nizozemskem v zgodnjih sedemdesetih letih s transformacijo normalnih človeških embrionalnih celic z modificirano DNK adenovirusa 5. Celice so bile pridobljene iz zdravega fetusa po zakonitem splavu. Genetski insert je obsegal približno 4.5 kilobaz in se je inkorporiral v človeški kromosom 19. (Povzeto po: *Wikipedia–HEK 293 Cells*: http://en.wikipedia.org/wiki/HEK_293_cells. Dostop: 29. 10. 2013.) Kljub pridobitvi iz embrionalnih ledvičnih celic pa teh ne moremo uporabljati kot *in vitro* model ledvičnih celic, saj lahko njihova celična kultura vsebuje manjše deleže skoraj vseh celičnih tipov človeškega telesa.



Slika 15: Celična kultura HEK293T, ki je bila izpostavljena poli-L-lizinu. Vidna je oblika rasti, značilna za celice HEK. (Foto: N. Kejžar)

Na splošno celice HEK niso primerne kot modeli za človeške celice (tudi tumorogene) zaradi eksperimentalne transformacije. Kljub tej slabosti pa so popolnoma nezahtevne za gojenje in transfekcijo, zaradi česar so izredno koristen pripomoček pri poskusih, pri katerih vedenje celice ni pomembno. Tako jih lahko primerjamo samo kot biološke epruvete, v katerih vodimo naš poskus (npr. transfekciranje genov in analiza pridobljenih proteinov). Pomembna lastnost teh celic pa je tudi njihova nezmožnost izražanja receptorjev TLR9, zato jih uporabljajo za strukturne študije le-teh.

V svoji raziskavi smo uporabljali pomembno različico te celične linije, in sicer HEK293T, ki vsebujejo dodatni SV40

veliki T-antigen. Ta omogoča amplifikacijo transfekciranega plazmidov in podaljša čas izražanja zelenih genov.

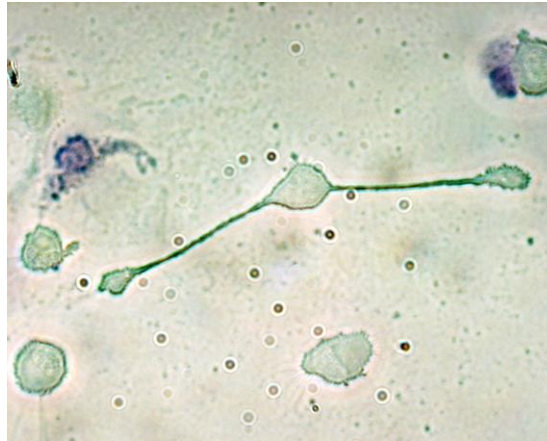
Poleg velike uporabe pri opisani vrsti eksperimentov pa se celične linije HEK293 pogosto uporabljajo za proizvodnjo terapevtskih proteinov in virusov za genske terapije, kot npr. proizvodnjo retrovirusov.

3.9.2 Monociti MonoMac6

Makrofagi (slika 16) so celice prirojenega imunskega odziva in spadajo med levkocite (natančneje fagocite). Delujejo tako v nespecifični imunski obrambi organizma kot tudi v sprožitvi pridobljenega

imunskega odziva in za njihovo aktivacijo uporabljajo fagocitozo antigenov, ki vstopijo v telo. V citosolu makrofagov proteini razgradijo antigene na manjše proteinske odseke, jih inkorporirajo v svojo celično membrano in izpostavijo svoji okolici, da jih lahko zaznajo druge celice imunskega sistema, ki potem sprožijo odziv. Makrofagi so torej iniciatorji imunskega odziva.

Celična linija makrofagov MonoMac je bila ustvarjena iz periferalnih krvnih celic pacienta z monoblastno levkemijo. Izolirana sta bila dva kloni, MonoMac1 in MonoMac6, tega smo uporabljali tudi mi. (Povzeto po: The Macrophage Community Website: <http://www.macrophages.com/references/establishment-human-cell-line-mono-mac-6-characteristics-mature-monocytes>. Dostop: 24. 12. 2013.)

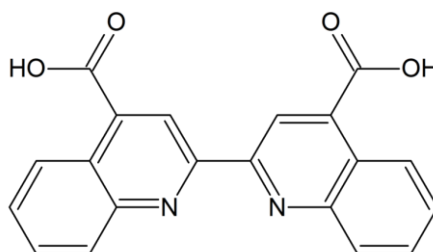


Slika 16: Makrofag miši. Makrofag steguje svoje pseudopodije ("roke"), da zajame delec, ki bi lahko bil patogen. (Povzeto po: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/15/Macrophage.jpg>.)

4 Teoretične osnove metod

4.1 Proteinska analiza BCA

V naši raziskavi smo uporabljali proteinsko analizo Pierce™ BCA proizvajalca Thermo Scientific. Gre za biokemično analizo metodo za določanje končne koncentracije proteina v raztopini z razponom koncentracije 20–2000 µg/mL. Formulirana je na osnovi bikinkoninske kisline (angl. *bicinchonic acid* – BCA) (slika 17). Gre za kombinacijo biuretske reakcije oz. reakcije, pri kateri proteini v alkalnem mediju reducirajo bakrove ione Cu^{2+} do ionov Cu^{1+} in kolorimetrično detekcijo ionov Cu^{1+} z reagentom, ki vsebuje bikinkoninsko kislino. (Povzeto po: Voet D., Voet J. G. /2011/ *Biochemistry*. Fourth Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc., Print.) V reakciji pride do kelatiranja iona Cu^{1+} z dvema molekulama BCA, kar je razvidno iz formacije vijolično obarvanega reakcijskega produkta. Ta vodotopni kompleks ima zelo uporabno lastnost močne absorbanca pri 562 nm valovne dolžine in je skoraj v linearni odvisnosti od rastoče koncentracije proteina v omenjenem dosegu. (Povzeto po: *Wikipedia – Bicinchonic Acid Assay*: http://en.wikipedia.org/wiki/Bicinchonic_acid_assay. Dostop: 15. 11. 2013.)



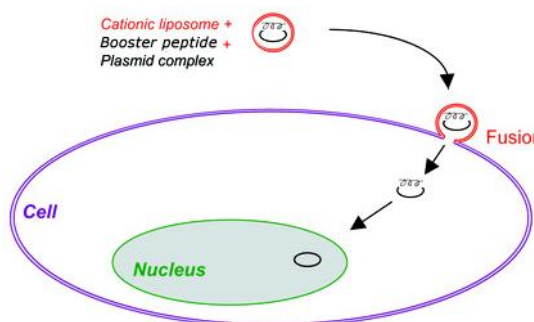
Slika 17: Bikinkoninska kislina (Povzeto po: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e5/Structure_of_bicinchonic_acid.png/800px-Structure_of_bicinchonic_acid.png.)

Raziskave so pokazale, da so za tvorbo obarvanega kelatnega kompleksa odgovorni terciarna/kvartarna struktura proteinov, število peptidnih (amidnih) vezi in prisotnost štirih specifičnih aminokislin (cistein, cistin, triptofan, tirozin). Raziskave metode BCA z oligopeptidi so pokazale, da količina tvorbe obarvanega kompleksa ni preprosta vsota vsebnosti funkcionalnih skupin, ki povzročajo obarvanost. Zato se pri določevanju točne koncentracije proteinov uporabljajo standardi z znanimi koncentracijami, kot je na primer goveji serumski albumin (angl. *bovine serum albumine* – BSA). Pred analizo pripravimo različne razredčitve standardov z znanimi koncentracijami skupaj z razredčitvami svojega vzorca neznane koncentracije in neznano koncentracijo izračunamo iz umeritvene krivulje. Pri izbiri ustreznih standardov je najpriporočljivejša izbira proteina s podobnimi strukturnimi značilnostmi kot preiskovani vzorec.

4.2 Transfekcija

S pojmom transfekcija označujemo postopek načrtnega vnosa tujih nukleinskih kislin v celice določenega organizma. (Povzeto po: Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. /2008/ *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing, Inc., Print.)

Pri svoji raziskavi smo uporabili lipofektaminsko transfekcijo (slika 18), ki spada med kemične lipofektamske metode transfekcije. Lipofektamin oz. tudi Lipofektamin 2000 je pogosto uporabljen transfekcijski reagent v molekularni in celični



Slika 18: Poenostavljen prikaz lipofektaminske transfekcije (Povzeto po: <http://signagen.com/images/VIPsTech.jpg>.)

biologiji. Lipofektaminski reagent v vodnem okolju tvori liposome, ki zajamejo genski material. Formirajo se kationski liposomi, ki nase privlačijo negativno nabito DNK.

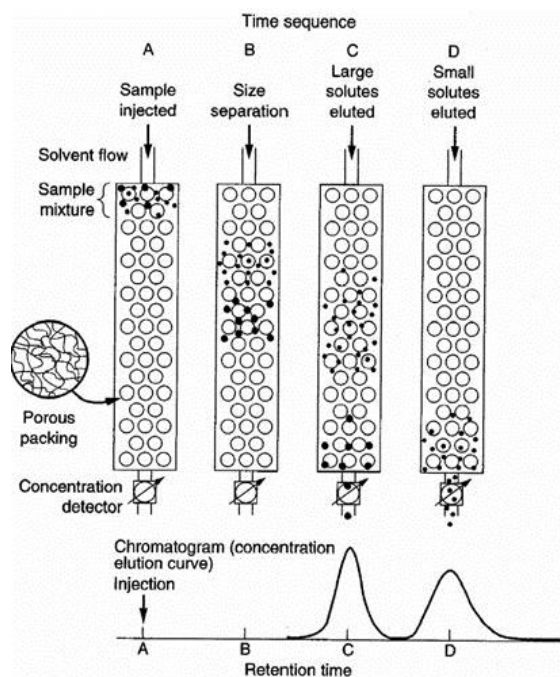


Slika 19: Lipofektaminski reagent za transfekcijo (Povzeto po: <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/prodImages/high/11668027%200.75ml.jpg>.)

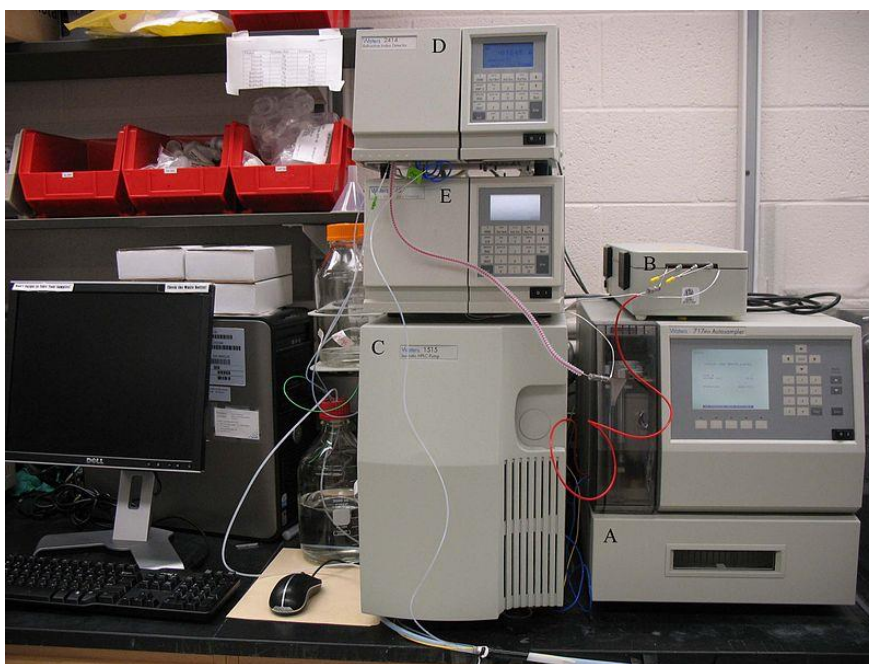
Lipofektamin (slika 19) ima nase vezan tudi nevtralni kolipid in zaradi interakcije tega kolipida s celično membrano je možno izničenje elektrostatskih odbojev negativno nabite plazmaleme in lažji vstop v celico (saj je liposom pozitivno nabit). (Povzeto po: *Promega Transfection Protocols and Applications Guide*: <http://www.ff.ul.pt/~mjgama/transfection%20-%20PROMEGA.pdf>. Dostop: 10. 10. 2013.)

4.3 Gelska kromatografija

Gelska permeabilna kromatografija je ena izmed metod, ki ločuje analite na podlagi velikosti. Kot stacionarna faza gelske kromatografije se uporablja nosilec/polnilo, ki vsebuje pore točno določene velikosti. Na podlagi velikosti analita, ki ga želimo ločiti od nečistoč, izberemo vrsto nosilca z določeno velikostjo por. Mobilna faza kromatografije je eluent, v katerem mora biti analit dobro topen. (Povzeto po: Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. /2008/ *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing, Inc., Print.) Princip delovanja gelske kromatografije je izkoriščanje razlike v velikosti, pri kateri večji delci potujejo skozi gel hitreje kot manjši, saj se ujamejo v pore gela, torej potujejo počasneje (slika 20). Celoten proces se lahko izvaja v preprosti koloni, kjer elucijo omogoča gravitacija, hitrejši postopki pa vključujejo črpalke in detektorje (slika 21). (Povzeto po: *Gel Filtration Chromatography*: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/life-science/proteomics-and-protein/proteomics/chromatography_gel_filtration.pdf. Dostop: 27. 11. 2013.)



Slika 20: Princip delovanja gelske permeabilne kromatografije (Povzeto po: <http://cnx.org/content/m34657/latest/image/3b.jpg>.)



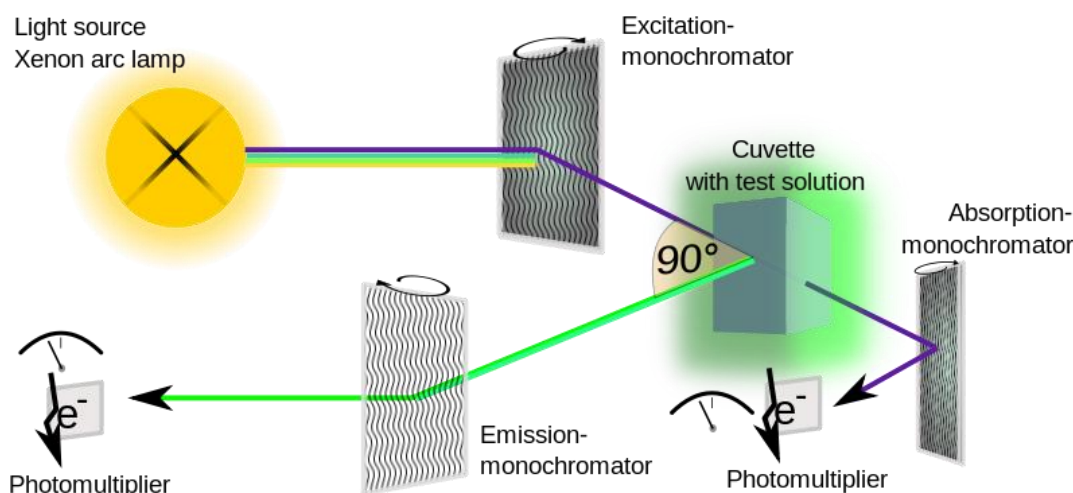
Slika 21: Sodoben aparat za gelsko kromatografijo. S črko A je označen prostor za vzorce, B označuje kolono, C črpalko, D in E pa sta dva različna detektorja koncentracije. (Povzeto po: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5e/GPC_instrument.jpg.)

4.4 Fluorescenčna spektroskopija

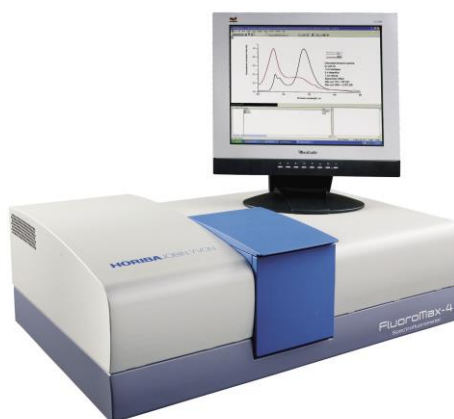
Fluorescenco smo merili s fluorescenčnim spektroskopom. Naprava odčitava jakost fluorescence substance pri določeni valovni dolžini po vzbujanju z določenim spektrom svetlobe. Jakost oddane svetlobe je premosorazmerna s količino substance v vzorcu. Fluorometrija se uporablja v kemiji, biokemiji, medicini, molekularni biologiji itd.

Tipični fluorometer (slika 23) uporablja dvojni žarek, tadva pa delujeta drug proti drugemu, da se preprečijo možna nihanja v energiji. Drug proti drugemu sta usmerjena pod kotom 90° . Zgornji žarek je najprej poslan skozi monokromator (naprava, ki iz širšega spektra izhodne svetlobe osami samo določene valovne dolžine) in zatem skozi vzorec. Spodnji žarek preide skozi attenuator (naprava, ki močno stanjša žarek svetlobe) in poskuša izenačiti moč emisijske fluorescence, ki jo oddaja vzorec. Atenuirani žarek in fluorescenco, ki izhaja iz vzorca, lovita ločena detektorja in intenziteto svetlobe, povečata s pomočjo fotopomnoževalk ter spremenita v električne signale, prikazane na zaslonu računalnika.

Glede na tip vzorca fluorometri uporabljajo različne svetlobne vire za fluorometrično analizo. Med najpogostejšimi je nizkotlačna živosrebrna svetilka. Ustvarja lahko veliko število ekscitacijskih valovnih dolžin, zato je tudi najbolj vsestranska. Vendar ta žarnica ne zagotavlja konstantnega vira sevanja energije. Kjer je to potrebno, se uporablja ksenonova svetilka (slika 22). To sta samo dva izmed mnogih svetlobnih virov, uporabljenih v fluorometrih. (Povzeto po: *An Introduction to Fluorescence Spectroscopy*: <http://www.chem.uci.edu/~dmitryf/manuals/Fluorescence%20Spectroscopy.pdf>. Dostop: 5. 9. 2013.)



Slika 22: Shema delovanja fluorimetra (Povzeto po: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/de/Fluorimeter_diagram_en.svg.)

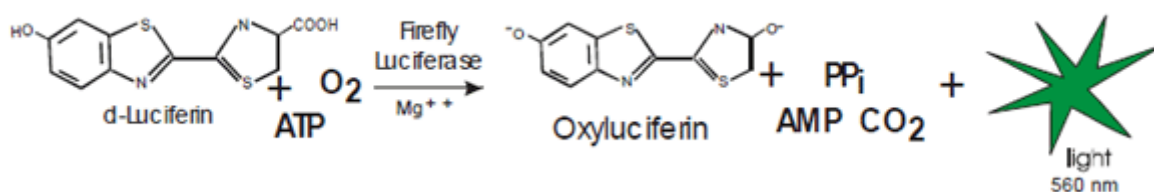


Slika 23: Sodoben fluorometer (Povzeto po: http://img.directindustry.com/images_di/photo-g/spectrofluorometers-25366-5386797.jpg.)

4.5 Luciferazni test

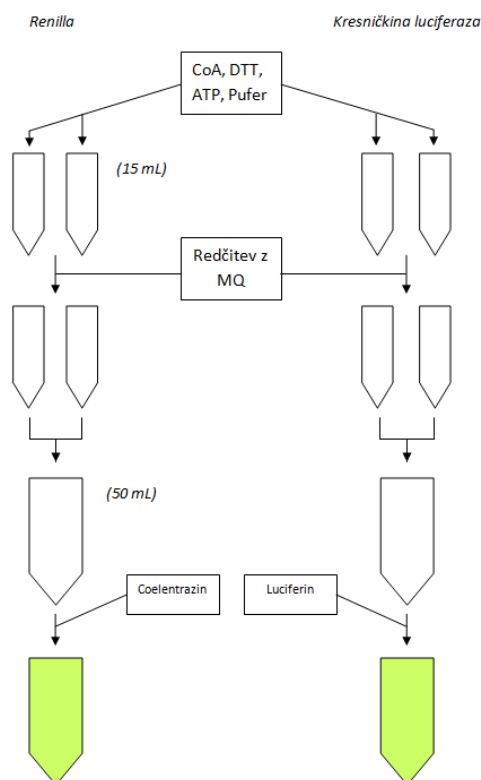
Aktivacijo receptorja TLR9 smo preverjali z dvojnimi luciferaznimi testom. V celice HEK293 smo vnesli reporterska plazmida, ki nosita zapis za luciferazo kresničke in luciferazo koralnjaka *Renilla reniformis*. Poleg smo vnesli tudi plazmid, ki nosi zapis za receptor TLR9 ali plazmid brez inserta in ga uporabili kot negativno kontrolo. Izražanje kresničkine luciferaze je pod kontrolo promotorja za transkripcijski faktor NF- κ B in predstavlja reporterja aktivacije receptorja TLR9. (Povzeto po: Voet D., Voet J. G. /2011/ *Biochemistry*. Fourth Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc., Print.) Renilina luciferaza je kresničkini luciferazi podoben encim, ki ga najdemo večinoma v morskih organizmih. Izraža se konstitutivno in je uporaben kot kontrola učinkovitosti transfekcije. Renila uporablja za substrat koelentrazine. Razmerje med oddano svetlobo luciferaz je merilo aktivacije receptorja.

Ob aktiviranem receptorju TLR9 (kar pomeni uspešno transfekcijo) se k vzorcu celic dodani luciferin ob prisotnosti reagenta kresničkine luciferaze oksidira do oksiluciferina, pri čemer se sprošča tudi zaznavna svetloba, ki jo merimo z luminometrom (slika 24). Reakcija je analogna bioluminiscenci v navadni vzhodni kresnički oz. *Photinus pyralis*, ki vsebuje encim za oksidacijo luciferina, torej kresničkino luciferazo. (Povzeto po: *Promega Luciferase Assay System*: <http://worldwide.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Bulletins/0/Luciferase%20Assay%20System%20Protocol.pdf>. Dostop: 7. 11. 2013.)



Slika 24: Luciferazna reakcija. Oksidacija luciferina ob prisotnosti kresničkine luciferaze do oksiluciferina, pri čemer se sprosti svetloba, ki jo lahko izmerimo z luminometrom. (Povzeto po: http://www.biotech.com/assets/tech_resources/141/lucifer_fig1.jpg.)

4.5.1 Meritev aktivacije



Slika 25: Priprava raztopin za meritev aktivacije TLR9 (Avtorja: N. Kežar in J. Gojznikar)

Transfektiranim celicam smo v prvem koraku dodali 20 μ L pasivnega liznega pufera, ki smo ga razredčili v razmerju 1 + 4 s pufrom PBS. Celice smo zamrznili in se lotili priprave aktivacijske raztopine za TLR9 (slika 25).

Pripravljen reagent smo vstavili v luminometer, ki je v vzorce najprej injiciral kresničkino luciferazo, naredil meritev in nato injiciral še renilino luciferazo. Ta deluje pri pH, ki luciferazo deaktivira, zato do motnje signala ne pride.

Po pridobitvi podatkov smo rezultate normalizirali (Norm.) in izračunali povprečje normalizacij (Avg.). Iz povprečij smo, upoštevajoč standardno deviacijo (\pm SD), izrisali tudi grafe (glej poglavje 6 Rezultati).

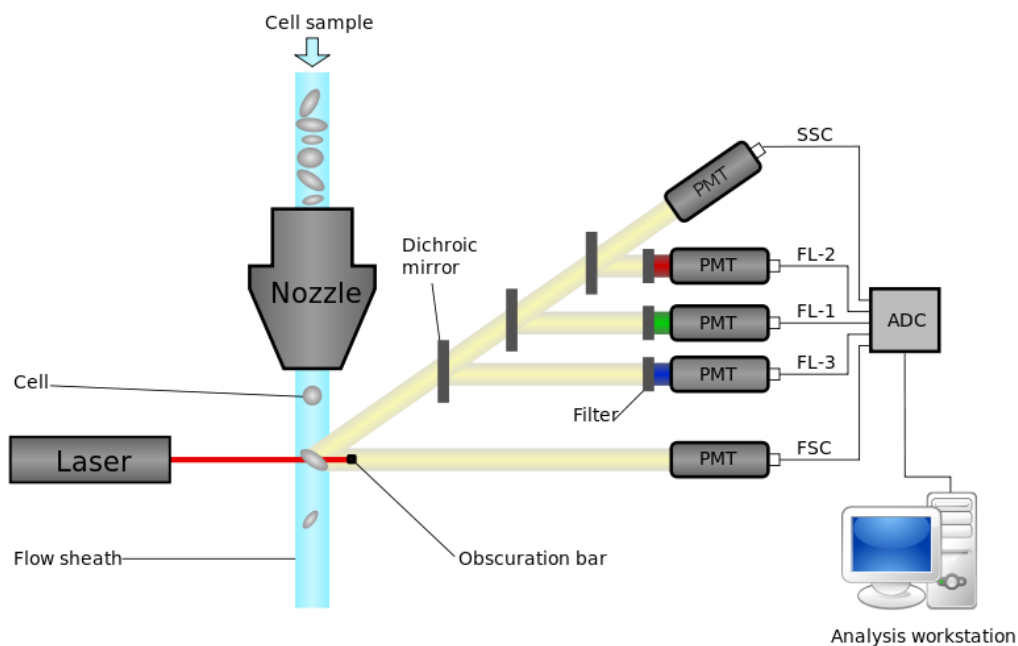
4.5.2 Aktivacije TLR9

Celice HEK293T, ki smo jih nagojili v mikrotitrskih ploščah s 96 vdolbinicami, smo transfekciralni s plazmidi za TLR9 in reporterskimi proteini. 24 ur po transfekciji smo celicam dodali dekstran, BSA, PLL ali PDL brez ODN ali z njimi. Najkasneje 24 ur po dodatku mešanic smo izmerili izražanje reporterskega proteina, kresničkine luciferaze in reniline luciferaze. Dobljene vrednosti kresničkine luciferaze smo normalizirali z vrednostmi reniline luciferaze, ki se izraža ne glede na učinkovitost aktivacije TLR9.

Rezultati so prikazani v tabelah 12 in 13, preračunana normalizirana luminiscenca pa v grafih 4 in 5.

4.6 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je analizna tehnika, ki se uporablja primarno za štetje celic in celično sortiranje ter omogoča multiparametrično analizo fizikalnih in kemijskih lastnosti več kot 1000 delcev na sekundo. Ta biofizikalna tehnologija za zaznavanje celic uporablja laserje. Žarek svetlobe (večinoma laserski) določene valovne dolžine je usmerjen na hidrodinamično zbran curek tekočine, ki vsebuje suspendirane celice. To pomeni, da so celice, usmerjene v tankem curku, prisiljene prehajati skozi tanek tunel, ki omogoča prehod samo ene celice naenkrat. Ko celice prečkajo pot laserja, to povzroča motnje v laserskem žarku, kar zabeležijo detektorji, eden izmed njih je točno nasproti laserja, drugi pa so pravokotno na laser. Detektor nasproti laserja meri tako imenovano direktno sipanje (angl. *Forward Scatter* – FSC), eden od stranskih detektorjev meri stransko sipanje (angl. *Side Scatter* – SSC). Prisotni so tudi detektorji, ki zaznavajo fluorescenco. (Povzeto po: Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. /2008/ *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing, Inc., Print.) Celice, ki vsebujejo fluorescenčne kemikalije (te vnesemo v celice umetno), ob prehodu preko laserja oddajajo svetlobo valovne dolžine, drugačne od izvorne svetlobe. Kombinacija signalov sipanj in različne intenzitete fluorescence na detektorjih, razporejenih okoli curka celic, nam lahko pove veliko informacij o fizikalnih in kemijskih lastnostih delcev, ki jih vodimo preko citometra. Direktno sipanje povezujemo z volumnom celice, medtem ko je stransko sipanje odvisno od notranjosti celice (kot na primer oblike jedra, števila in tipa citoplazmatskih granul ali membranske grobosti). Svetloba, ki jo oddaja laser, vstopi v celico in se odbija od notranjih struktur v različnih smereh. (Povzeto po: *Introduction to Flow Cytometry*: <http://www.abdserotec.com/introduction-to-flow-cytometry.html>. Dostop: 16. 10. 2013.)



Slika 26: Princip delovanja pretočnega citometra. Komponente, označene s PMT, so različni detektorji, ADC pa je ojačevalna enota za signale. (Povzeto po:

<http://wpcontent.answcdn.com/wikipedia/commons/thumb/3/3f/Cytometer.svg/500px-Cytometer.svg.png>.)

Sodobni pretočni citometri (slika 27) so sestavljeni iz petih glavnih komponent (slika 26). Pretočna celica omogoča, da skozi citometrski kanal potujejo posamezne celice. Merilni sistem vsebuje številne optične komponente. Kot vir svetlobe se pretežno uporabljajo laserji. Tretja komponenta vsebuje številne omenjene detektorje oz. fotopomnoževalke. Svetloba do vzorca in od njega potuje preko filtrov in dikroičnih zrcal. Sledita ojačevalna enota za jačanje signala in računalniški sistem za analizo signalov. (Povzeto po: *Wikipedia – Flow Cytometry*: http://en.wikipedia.org/wiki/Flow_cytometry. Dostop: 27. 10. 2013.)



Slika 27: Sodoben pretočni citometer na Kemijskem inštitutu v Ljubljani (Foto: N. Kežar)

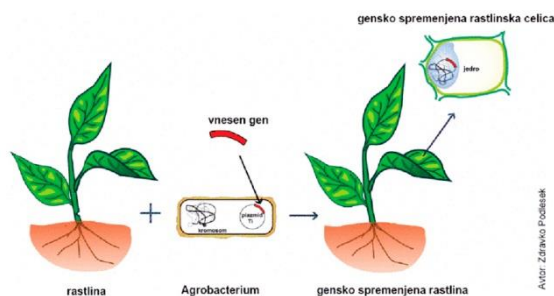
5 Praktični del

5.1 Delo z gensko spremenjenimi organizmi in varnostni postopki

Pred samim začetkom dela smo se seznanili z varnostnimi postopki in principi dela z gensko spremenjenimi organizmi (GSO). Kot GSO se pojmuje vsak organizem, katerega genom se je z vnosom nekega določenega gena z biotehnološkimi procesi spremenil (slika 28). V skladu z *Zakonom o ravnanju z gensko spremenjenimi organizmi* smo bili pred delom v laboratoriju seznanjeni s postopki varnega dela z GSO. Usposabljanje je izvedla dr. Nada Kraševc, pooblaščenka za biološko varnost na Kemijskem inštitutu.

V prvem delu usposabljanja smo se seznanili z osnovnimi definicijami, kot jih narekuje zakon, v drugem pa s procesi dela, ki vključujejo GSO. Seznanili so nas o načelih dobre mikrobiološke prakse, transportu, delu z GSO in načinih uničevanja in dezinfekcije (avtoklaviranja) GSO po končanih eksperimentih. Seznanjeni smo bili s postopki ukrepanja ob nesreči (t. i. izrednem dogodku).

Ker je praktično delo potekalo v certificiranih laboratorijih, smo bili pred začetkom raziskovanja usposobljeni tudi za varno delo v laboratoriju. Usposabljanje je vodil mag. Muharem Husić, odgovorni sodelavec za varnost in zdravlje pri delu na Kemijskem inštitutu.



Slika 28: Shematski prikaz nastanka gensko spremenjene rastline s pomočjo kulture *Agrobacterium* (Povzeto po: http://www.agrosaat.si/Pridelovanje_gensko_spremenjenih_rastlin,190.0.html.)

Med usposabljanjem smo se seznanili s principi varnega dela v laboratoriju, vključno z uporabo obvezne zaščitne opreme, uporabo laboratorijskega inventarja in z načinom dela z nevarnimi snovmi. Seznanjeni smo bili tudi s postopki ravnanja ob delovni nesreči ali požaru v laboratoriju.

5.2 Delo s celičnimi kulturami

Večino dela smo opravili s celično kulturo HEK293T, uporabljali pa smo tudi celično kulturo HEK293 in monocite MonoMac6.

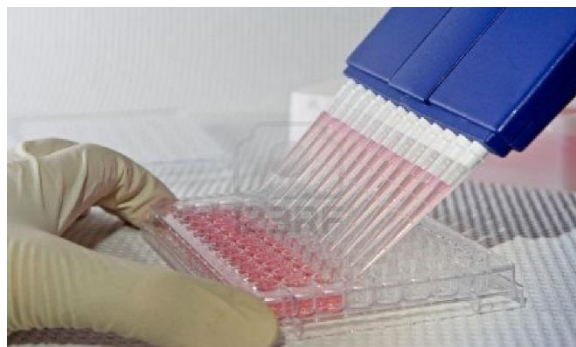
Celične linije smo primarno vzdrževali v gojitvenih posodah T75 (slika 29) v gojišču DMEM Glutamax. Ko so celice prerasle površino posode, smo jih razredčili (glej *Protokol Ia*). To smo začeli z odstranitvijo starega gojišča in spiranjem s pufrom PBS. Nato smo celice odlepili od podlage z dodatkom tripsina, ki celice loči od sten posode. Od podlage odlepljene celice smo zbrali v gojišču, določili koncentracijo z merilnikom Countess, nato pa smo jih redčili s pufrom DMEM do potrebne koncentracije. Tako razredčene celice smo ponovno nasadili v posode T75 in dodali gojišče do ustreznega volumna (15 ml) ter jih inkubirali v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂.



Slika 29: Gojitvena posoda T75. V njih smo gojili HEK293T in makrofage MonoMac 6. (Povzeto po: http://www.celprogen.com/index.php?route=product/product&path=26_44_46_60_67&product_id=1128.)

Za mikroskopiranje smo celice gojili v mikroskopskih škatlicah (z 8 posodicami) (glej *Protokol Ib*). Kamrice mikroskopske škatlice smo najprej primerno označili. Celice smo redčili do ustreznih koncentracij in jih po redčenju prenesli v kamrice ter mikroskopsko škatlico inkubirali na 37 °C v atmosferi 5 % CO₂.

Za merjenje aktivacije receptorja TLR9 smo celice HEK293 ali HEK293T nasadili v mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinami (glej *Protokol VIIIa*). To smo naredili povsem enako kot cepljenje celic v mikroskopijske škatlice. Celice iz gojitvene posode T75 smo redčili do ustrezne gostote in jih prenesli v mikrotitrsko ploščo z multikanalno pipeto (slika 30).



Slika 30: Uporaba multikanalnih pipet. Prenos vzorca v 96-well mikrotitrsko ploščo z multikanalno pipeto z 12 kanali. Pri naših prenosih smo uporabljali 8-kanalno pipeto. (Povzeto po: http://www.123rf.com/photo_3131933_scientist-using-blue-multi-channel-pipet-for-pipetting-a-96-well-plate-with-pink-solution-on-white.html.)

Za citometrijo smo monocite MonoMac6 in celice

HEK293T gojili v mikrotitrskih ploščah s 24 vdolbinami (glej *Protokol X*). Cepljenje HEK293T je podobno cepljenju istega tipa celic na mikrotitrskih ploščah (razlika je ponovno le v volumnih). Pri gojenju makrofagov je bil postopek podoben, le da smo celice gojili v gojišču RPMI 1640-GlutaMax. Po spiranju celic s PBS

smo v gojitveno posodo T75 dodali gojišče RPMI. Namesto tripsina smo uporabili strgalo in celice postrgali z dna posode, resuspendirali v gojišču RPMI ter določili koncentracijo celic v suspenziji.

5.3 Priprava označenih polilizinov

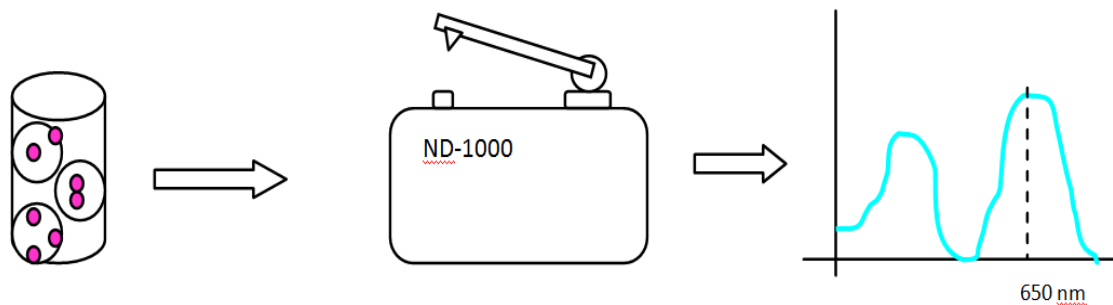
Osrednji del naših poskusov sta bila proteina poli-L-lizin (PLL) in poli-D-lizin (PDL). Za zasledovanje vstopanja polilizinov v celice smo ju označili s fluorescenčnim barvilom Cy5 (glej *Protokol II*).

Najprej smo proteina stehali, saj smo morali poznati maso vzorca, da bi lahko pripravili raztopino ustrezne koncentracije. To smo izvedli v tehtalnem prostoru z analizo tehtnico (slika 31). Iz zatehtanih mas polilizinov smo nato izračunali volumen pufra PBS, ki smo ga morali dodati v mikrocentrifugirke (epice) s proteinoma, da smo dosegli koncentracijo 5 mg/ml. Po dodatku pufra smo mikrocentrifugirke stresali do popolne raztopitve proteinov. Iz raztopljenih vzorcev proteinov smo v dve ločeni mikrocentrifugirki prepipetirali 1 mL raztopine v pufer, namenjen za vezavo Cy5 na proteine. Novonastalo raztopino smo v celoti prepipetirali v mikrocentrifugirko z barvili (ta so bila v prahu). Ob konstantnem mešanju barvila z raztopino polilizina in dodatku N,N-dimetilacetamida za izboljšanje topnosti smo pustili mešanico stati v temi čez noč.



Slika 31: Prikaz tehtanja na analizi tehtnici. Količine naših proteinov so bile tako majhne, da smo morali delati zelo previdno. (Povzeto po: <http://mrsmelsheimersblog.blogspot.com/2010/10/compounding-lip-balms.html>.)

Naslednji dan smo ločili označena proteina od nezreagirane barvila in preverili, ali je do vezave barvil na polilizine sploh prišlo (glej *Protokol III*), kar smo storili z merjenjem absorbance pri valovni dolžini 220 nm (slika 32). Raztopine označenih proteinov smo z uporabo postopka gelske kromatografije ločili od nezreagirane barvila (iz kita z barvilom Cy5). Gelska kromatografija hitreje prepusti večje delce (torej obarvane proteine) od manjših (molekul barvila). Vzorca proteinov smo nanesli na kolono, spirali s pufrom PBS in lovili posamezne frakcije v mikrocentrifugirke.



Slika 32: Shematski prikaz merjenja absorbance frakcij obarvanih proteinov (Avtor: J. Gojznikar)

Posameznim frakcijam proteinov smo izmerili absorbanco, da bi določili, v kateri frakciji je največ obarvanega proteina. Absorbance pri valovnih dolžinah 220 in 650 nm smo izmerili s spektrofotometrom NanoDrop, ki smo ga predhodno kalibrirali s topilom, to je bil v našem primeru puffer PBS. Vzorce smo na merilno konico aparature nanašali s pipeto in po vsaki meritvi očistili napravo. Po ločevanju s kromatografijo sta med zbranimi frakcijami obeh proteinov imeli najvišjo koncentracijo barvila frakciji 3 in 4, zato smo se odločili, da ju bomo uporabili za nadaljnje poskuse.

Izbiri delovne frakcije proteinov je sledilo določanje koncentracije proteina v raztopini z reakcijo BCA (glej *Protokol IV*). Pripravili smo umeritveno krivuljo, ki smo jo uporabili za izračun koncentracije proteinov v vzorcu. Uporabili smo metodo, ki omogoča merjenje koncentracije proteinov v mikrotitrski plošči. V prvih 9 luknjic smo nanесли standarde, ki smo jih pripravili z redčenjem albuminskega standarda z destilirano vodo po navodilih proizvajalca. V naslednje 3 luknjice smo za kontrolo dodali samo vodo. Raztopino polilizinov, označenih s Cy5 iz frakciji 3 in 4, smo razredčili z MQ v razmerjih 1 : 1, 1 : 4 in 1 : 7. Redčine smo dodali v naslednjo vrstico mikrotitrskе plošče. Po navodilih proizvajalca smo pripravili reakcijsko mešanico iz reagenta A in reagenta B. Nato smo pripravljeno reakcijsko mešanico dodali v vsako luknjico z vzorci in ploščo inkubirali za pol ure na 37 °C. Po pretečenem inkubacijskem času smo na spektrofotometru SynergyMX nastavili protokol za reakcijo BCA in izmerili absorbance pri valovni dolžini 562 nm. Izrisali smo umeritveno krivuljo in izračunali dokončne koncentracije proteinov v frakcijah, upoštevajoč redčitve.

Z merjenjem fluorescence (glej *Protokol V*) smo želeli potrditi vezavo Cy5 na PLL in PDL, za kar smo uporabili fluorometer LS55 (slika 33). V kivete smo (posamezno) dodali PLL3/PDL3 in PBS v razmerju 1 : 2 ter izmerili intenziteto fluorescence vzorca med 660 in 750 nm valovne dolžine ob dolžini vzbujanja 646 nm. Kivete smo po končanem postopku očistili s posebno aparaturo za čiščenje kivet.



Slika 33: Fluorometer LS55 na Kemijskem inštitutu v Ljubljani (Foto: N. Kejžar)

Ker bi lahko pri vezavi barvila Cy5 prišlo do efekta dušenja fluorescence (angl. *quenching effect*), smo želeli to preveriti s proteazno cepitvijo PLL in PDL (glej *Protokol VI*). Rastopinama PLL in PDL smo dodali raztopino encima proteinaze K. Spreminjanje fluorescence s časom smo merili na spektrofotometru SynnergyMX (slika 34), pri tem smo uporabljali računalniški program *Gen5*. Na mikrotitrski plošči s 96 luknjicami smo izbrali kvadrat luknjic 3 x 3. V prvo vrsto smo v vsako dodali po 90 µL PLL, v drugo isto količino PDL, v tretjo pa le PBS. Pred dodatkom raztopine proteinaze K smo izmerili fluorescenco vzorca. Po končani meritvi smo v luknjice z vzorci dodali raztopino proteinaze K, in to le v drugi in tretji stolpec v razmerju stolpec 2 : stolpec 3 = 10 : 1. Nato smo fluorescenco vzorca merili v časovnem obdobju ene ure.



Slika 34: Spektrofotometer SynnergyMX proizvajalca BioTec. Na tem aparatu smo izvedli merjenje. (Povzeto po: http://www.biotek.com/products/microplate_detector/compare_luminescence.html.)

5.4 Zasedovanje endocitoze z mikroskopom

Za zasedovanje endocitaz PLL in PDL brez ODN ali z ODN smo uporabili konfokalni mikroskop. Posamezne organele smo označili z označevalci celičnih organelov, ki so bili prav tako označeni s fluorescenčnimi barvili ali pa so bili označevalci organelov povezani s fluorescirajočimi proteini (*Protokol VII*).

Celicam v mikroskopijskih komorah smo dodali 20 µL polilizina, označenega s Cy5 (PLL ali PDL). V določene smo dodali ODN, označen s Cy3, sočasno s polilizinom. Škatlico smo inkubirali pri 37 °C. Vsaj 30 minut pred mikroskopiranjem smo celicam dodali 10 µL označevalcev za organele (glej *Protokol VII*).

Za preverjanje lokalizacije PLL/PDL-Cy5, ODN-Cy3 in receptorja TLR9 smo uporabili celice HEK293, transfekcirane s plazmidom, ki nosi zapis za himerni protein TLR9-mCitirn (glej poglavje 3.2 *Receptorji TLR*).

Obarvane celice smo si ogledali pod mikroskopom. Za to smo uporabili fluorescenčni laserski mikroskop Leica TCS SP5 (slika 35). Mikroskop je bilo treba najprej pravilno prižgati in zagnati program za njegovo upravljanje. Nato smo vključili laserje za vzbujanje fluorescence barvil in nastavili objektiv. Na računalniškem zaslonu je program izrisal posnetke, na katerih smo spremljali razporeditev barvil po svojih vzorcih.



Slika 35: Fluorescenčni laserski mikroskop Leica TCS SP5 na Kemijskem inštitutu v Ljubljani (Foto: N. Kejžar)

5.5 Transfekcija TLR9 in preverjanje aktivacije z merjenjem luminescence

Ker smo želeli potrditi prenos oligonukleotida ODN v celico, v organele z izraženim receptorjem TLR9, smo potrebovali celice, ki izražajo receptor, in ustrezne poročevalce, katerih izražanje se aktivira ob aktivaciji receptorja. Za to smo uporabili celični receptor TLR9 v navezi s kresničkino luciferazo in poročevalcem uspešnosti transfekcije, luciferazo koralnjaka *Renilla reniformis*.

Preden pa smo lahko merili odziv receptorja TLR9, smo morali plazmide vstaviti v celice HEK293. To smo storili z lipofektaminsko transfekcijo (za podrobnejši opis glej *Protokol VIII*). V celice smo poleg gena za TLR9 vključili tudi gene za luciferazo kresničk (Fluc), gene za luciferazo koralnjaka *Renilla reniformis* (Rluc), plazmide UnC93B1 in vektor pcDNA3. Preden smo izvedli transfekcijo, smo s pomočjo računalniškega programa izračunali potrebne volumne transfekcijskega reagenta lipofektamina, gojišča Opti-MEM in plazmidov v mešanici. Zmesi



plazmidov za transfekcijo smo pripravili v genetskem laboratoriju (slika 36). Mešanice smo pripravili v mikrocentrifugirkah in jih pustili stati v hladilniku čez noč. Pripravili smo dve beli plošči s 96 vdolbinicami s celicami HEK293T in HEK293. Pripravili smo jih po postopku 5.2 *Delo s celičnimi kulturami*. Pred transfekcijo smo izdelali podroben načrt razporeditve vzorcev (s TLR9 in brez TLR9).

Slika 36: Genetski laboratorij na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Tu smo opravili večino predpriprav za transfekcijo. (foto: N. Kejžar.)

Na dan transfekcije smo pripravljene raztopine in mikrotitrski plošči prenesli v laminar. V gojišču Opti-MEM smo pripravili mešanico lipofektamina (slika 37) in ločeno še mešanico plazmidnih DNK po predhodnih izračunih za TLR9. Ti dve mešanici smo združili in inkubirali 5 minut. Podobno smo naredili tudi za serijo eksperimentov brez TLR9. Za lažje odmerjanje smo pripravili založno raztopino transfekcijskih mešanic (300 μ L) v prva dva stolpca čiste plošče. Nato smo jih z multikanalno pipeto enakomerno prenesli na celice po predhodno pripravljenem načrtu. Po končanem postopku smo plošče s celicami in transfekcijsko mešanico inkubirali čez noč.

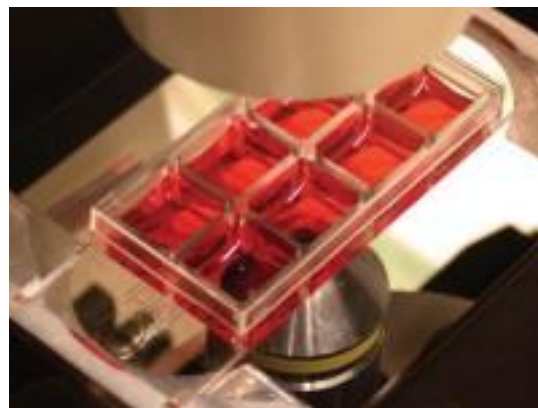
Po transfekciji je sledila aktivacija transfekciranih celic z ligandi receptorja TLR9, tej pa je sledilo merjenje luminescence, s čimer smo želeli poiskati morebitne razlike med aktivacijo receptorja TLR9 z ODN z in brez polilizinov. Pripravili smo raztopine oligonukleotida ODN10104 in ODN z govejim serumskim albuminom (BSA), PLL, PDL in dekstranom. Po izračunu ustreznih redčitev založnih koncentracij s posebnim računalniškim programom smo raztopine za aktivacijo pripravili z redčenjem s PBS. Po končanem redčenju smo si izrisali načrt vnosa aktivacijskih raztopin na mikrotitrski plošče. Aktivacijo smo izvedli tako, da smo v prazno sterilno ploščo odpipetirali reagente (založnih koncentracij) po predhodno pripravljeni shemi in jih z multikanalno pipeto prenesli k transfekciranim celicam. Nato smo plošči ponovno inkubirali čez noč.



Slika 37: Lipofektaminski reagent proizvajalca Invitrogen. Uporabljen je bil tudi za našo transfekcijo. (Povzeto po: <https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/prodImages/high/11668500%2015ml.jpg>.)

Sledilo je merjenje aktivnosti kresničkine luciferaze in luciferaze iz koralnjaka. Za merjenje aktivnosti kresničkine luciferaze (Fluc) smo pripravili zadostno količino mešanic koencimov A, DTT, ATP in posebnega pufru, ki smo jih razredčili s pufrum PBS. Mešanici smo dodali luciferin, raztopljen v dimetil sulfoksidu. Za merjenje luciferaze koralnjaka *Renilla reniformis* (Rluc) smo prav tako pripravili zadostne količine (26 mL) reagentov in dodali v metanolu raztopljen koelenterazin. Oddano svetlobo smo merili z luminometrom Orion 2. Najprej smo nastavili protokol in sprali šobe z vodo. Nato smo na prvi injektor namestili mešanico za kresničkino luciferazo (Fluc), na tretji pa reagente za merjenje luciferaze koralnjaka (Rluc). Mikrotitrski plošče smo vstavili v aparat in po končanih meritvah luminometer očistili z vodo, etanolom in dimetil sulfoksidom.

Med eksperimentalnim delom smo izvedli še eno transfekcijo celic HEK293, ki smo jih vzgojili v mikroskopični škatlici (glej *Protokol XII*). S tem eksperimentom smo želeli pokazati kolokalizacijo TLR9 in polilizinov v celici. Tokrat smo transfekciral plazimide za TLR9, UnC93B1, Fyve-mCherry (za označevanje endosomov), LC3-GFP (označuje fagosome), Golgi dsRed (označuje Golgijeve aparate) in Tomato EEA-1 (označuje zgodnje endosome). S spektrofotometrom ND-1000 smo izmerili absorbanco raztopin plazmidov pri 260 nm in izračunali



koncentracije plazmida v raztopini. Nato smo preračunali potrebne količine/volumne raztopine plazmidov za transfekcije, jih odpipetirali v mikrocentrifugirke, postavili v hladilnik čez noč in si izrisali shemo transfekcije. Naslednji dan smo si pripravili vse potrebno za transfekcijo celic. Pripravili smo si mešanice lipofektamina in gojišča Opti-MEM ter zmesi plazmidov in gojišča Opti-MEM. Obe raztopini smo zmešali in počakali 5 minut. Po pretečenem času smo mešanico plazmidov z lipofektaminom dodali celicam in škatlice postavili v inkubator. Naslednji dan smo celicam zamenjali gojišče in dodali še PLL/PDL in ODN ter ponovno inkubirali čez noč. Sledilo je preverjanje lokalizacije označenih PLL/PDL in ODN, receptorja TLR9 in označevalcev organel v celicah pod mikroskopom (slika 38).

Slika 38: Mikroskopična škatlica pod mikroskopom. Podobno so bili videti tudi naši eksperimenti. (Povzeto po: <http://ibidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Open-Slides-Dishes:-ibidi-Standard-Bottom/m-Slide-8-well.>)

5.6 Zasedovanje endocitoze s pretočnim citometrom

Kot zadnja izmed lastnosti nas je zanimala hitrost endocitoz PLL/PDL in ODN (glej *Protokol XI*) pri celicah HEK293T in monocitih MonoMac6 (zaradi hitrejše endocitoze), predhodno nacepljenih na plošče s 24 vdolbnicami (kot v poglavju 5.2 *Delo s celičnimi kulturami*).

Zasedovali smo hitrost endocitoz dekstrana, BSA, PLL in PDL z dodatkom ODN. Najprej smo preračunali končne koncentracije reagentov in jih nato tudi pripravili iz založnih z redčenjem s PBS. Nato smo si izrisali shemo dodajanja reagentov (slika 39) po časovnem zaporedju 24, 10, 6, 4 in 2 uri pred meritvijo.

HEK293T	1	2	3	4	5	6
A	PBS(50- μ L) 14.7.2013 15.00	PLL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 14.7.2013 15.00	PLL*(10- μ L) 14.7.2013 15.00	PLL*(10- μ L) 15.7.2013 7.00	PLL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 10.00	PDL*(10- μ L) 15.7.2013 12.00
B	PBS(50- μ L) 14.7.2013 15.00	PDL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 14.7.2013 15.00	PDL*(10- μ L) 14.7.2013 15.00	PDL*(10- μ L) 15.7.2013 7.00	PDL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 10.00	PLL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 12.00
C	X	ODN*(50- μ L) 14.7.2013 15.00	PDL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 7.00	PLL*(10- μ L) 15.7.2013 10.00	ODN*(50- μ L) 15.7.2013 10.00	PDL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 12.00
D	X	PLL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 7.00	ODN*(50- μ L) 15.7.2013 7.00	PDL*(10- μ L) 15.7.2013 10.00	PLL*(10- μ L) 15.7.2013 12.00	ODN*(50- μ L) 15.7.2013 12.00

¶

Makrofagi	1	2	3	4	5	6
A	PBS(50- μ L) 15.7.2013 7.00	PLL*(10- μ L) 15.7.2013 7.00	PDL*(10- μ L) 15.7.2013 7.00	PLL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 7.00	PDL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 7.00	ODN*(50- μ L) 15.7.2013 7.00
B	PBS(50- μ L) 15.7.2013 7.00	PLL*(10- μ L) 15.7.2013 10.00	PDL*(10- μ L) 15.7.2013 10.00	PLL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 10.00	PDL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 10.00	ODN*(50- μ L) 15.7.2013 10.00
C	DEX(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 7.00	PLL*(10- μ L) 15.7.2013 12.00	PDL*(10- μ L) 15.7.2013 12.00	PDL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 12.00	PLL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 12.00	ODN*(50- μ L) 15.7.2013 12.00
D	BSA(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 7.00	PLL*(10- μ L) 15.7.2013 14.30	PDL*(10- μ L) 15.7.2013 14.30	PLL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 14.30	PDL(50- μ L)+ ODN*(50- μ L) 15.7.2013 14.30	ODN*(50- μ L) 15.7.2013 14.30

Slika 39: Shematska razporeditev reagentov pri zasledovanju endocitoze, ki smo jo uporabili (Avtor: J. Gojznikar)

Reagente smo dodajali po shemi (slika 39). Iz vsake luknjice smo odvzeli toliko gojišča, kot smo dodali reagentov. Po končanem dodajanju reagentov je sledila preveritev s citometrom CyFlow Space (slika 40). Najprej smo ustrezno pripravili citometer (nastavili smo protokol in očistili šobe), nato smo celice sprali in resuspendirali v pufru PBS. Suspenzije celic smo vnesli v označene kivete in vanje nato dolili še 1.5 mL pufru PBS. Fluorescenco celic smo izmerili s citometrom. Po zadnji meritvi smo aparaturo še očistili in jo zaustavili po navodilih.



Slika 40: Pretočni citomer CyFlow Space. Na njem smo izvedli pretočno citometrijo. (Povzeto po: <http://reviews.productwiki.com/partec-cvflow-ml-space/>.)

5.7 Uporabljene snovi, pripomočki in celične kulture

V tabelah 1, 2 in 3 so navedeni kemikalije in gojišča, ki smo jih uporabili med raziskavo. Aparature in laboratorijski pribor so zbrani v tabelah 4 in 5. V tabelah 6 in 7 so razvrščeni plazmidi in celične linije, ki smo jih uporabili v raziskavi.

Tabela 1: Pufri

Ime	Proizvajalec	Sestava
pufer PBS	Kemijski inštitut	0.137 M NaCl, 0.003 M Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, 0.01 M KCL in 0.007 M KH ₂ PO ₄
<i>coupling</i> pufer	GE Health Care	1M Na ₂ CO ₃
elucijski pufer	GE Health Care	0.1 % NaN ₃ + PBS
luciferazni pufer		

Tabela 2: Gojiščne mešanice

Ime	Kat. št. ¹	Proizvajalec	Dodatki
DMEM Glutamax	21885-025	Gibco	10 % FBS
Opti-MEM	11058-021	Invitrogen	
RPMI 1640-Glutamax	61870-010	Invitrogen	10 % FBS

Tabela 3: Druge kemikalije

Ime	Kat. št.	Proizvajalec	Sestava ²
tripsin		Sigma-Aldrich	
0.4 % Tripan Blue	T10282	Invitrogen	
poli-L-lizin	P2636	Sigma-Aldrich	
poli-D-lizin	P7886	Sigma-Aldrich	
Cy5 Bisfunctional Reactive Dye	Q15008	GE Health Care	
N,N-dimetilacetamid		Merck	
etanol			
MQ		Kemijski inštitut	destilirana voda
goveji serumski albumin (BSA)		Sigma-Aldrich	2 mg/mL, + 0.9 % NaCl, 0.05 % NaN ₃
BCA-reagent 1		Sigma-Aldrich	NaHCO ₃ , bicinkonininska kislina in natrijev tartrat v 0.1 M NaOH
BCA-reagent 2		Sigma-Aldrich	4 % CuSO ₄
proteinaza K	P2308	Sigma-Aldrich	
Dextran Oregon Green 514	D7176	Invitrogen	
DQ Ovalbumin	D12053	Invitrogen	
ER Tracker Red	E12353	Invitrogen	
Lysotracker Red DND-99	L7528	Invitrogen	
Synapto Red C2	70027	Biotium	
Syto 80 Orange	S11361	Invitrogen	
Lipofektamin 2000		Invitrogen	

¹ Kataloška številka proizvajalca.

² Pri mešanicah kemikalij.

dekstran		Sigma	
CoA		Sigma	
DTT		Sigma	
ATP		Sigma	
dimetil sulfoksid		Sigma	
metanol		Sigma	
luciferin		NanoLight	
koelentrazin		NanoLight	
čistilo za pretočni citometer		Partec	

Tabela 4: Laboratorijski pribor

Ime
avtomatska pipeta
mikropipete
centrifugirke 50 mL, 15 mL
sterilni nastavki za mikropipete
čaša
mikroskopska škatlica (8-well)
sterilne mikrocentrifugirke
sterilna petrijevka
pinceta
kolona
stojalo za mikrocentrifugirke
kovinsko stojalo
označevalec
čistilni robčki za optične naprave Linsenpapier
mikrotitrna plošča (96-well)
kiveta (10 mm x 2 mm)
spatula
multikanalna mikropipeta
strgalo
mikrotitrna plošča (24-well)
kivete za citometer

Tabela 5: Aparature

Tip aparata	Proizvajalec
zaščitna mikrobiološka komora DIG9 (laminar)	Iskra Pio
preštevalnik celic Countess	Invitrogen
fluorescenčni mikroskop	Leica Microsystems
analizna tehtnica	
vibracijsko mešalo	Tehtnica
spektrofotomer NanoDrop ND-1000	NanoDrop
računalnik	HP, Lenovo
spektrofotometer SynnergyMX	BioTec
fluorescenčni spektrofotometer LS55	Perkinelmer

vakuumska naprava za čiščenje kivet	
konfokalni fluorescenčni laserski mikroskop TCS SP5	Leica Microsystems
luminometer Orion 2	Berthold
pretočni citometer CyFlow Space	Partec

Tabela 6: Genski material; plazmidi in ODN

Ime	Kratica	Vloga³
oligonukleotid 10104, označen s Cy3	ODN	enoverižna DNK, označena z barvilom Cy3, ligand za receptor TLR9
oligonukleotid 10104, označen s Cy5	ODN	enoverižna DNK, označena z barvilom Cy3, ligand za receptor TLR9
plazmid za TLR9	TLR9	nosilec zapisa za TLR9
plazmid za renilino luciferazo	Rluc	nosilec zapisa za renilino luciferazo
plazmid za luciferazo kresnic	Fluc	nosilec zapisa za luciferazo kresnic
plazmid Unc93B1	Unc	nosilec zapisa za protein Unc93B1, ki omogoča translokacijo receptorja TLR9 v endosome
vektor pcDNA3	pcDNA	
plazmid Fyve-mCherry		nosilec zapisa za označevalce endosomov
plazmid LC3-GFP		nosilec zapisa za označevalce fagosomov
plazmid Golgi dsRed		nosilec zapisa za označevalce Golgijevega aparata
plazmid Tomato EEA-1		nosilec zapisa za označevalce zgodnjih endosomov

Tabela 4: Celične kulture

Ime	Vrsta celic	Uporabljene gojitvene posode
HEK293T	človeške embrionalne ledvične celice	T75, 8-well, 96-well, 24-well
HEK293	človeške embrionalne ledvične celice	T75, 96-well
MonoMac6	človeški monociti	T75, 24-well

³ Vloga genskega zapisa (npr. za označevanje endosomov).

6 Rezultati

6.1 Označevanje poli-D- (PDL) in poli-L-lizina (PLL) z barvilom Cy5

Cilj raziskovalne naloge je pokazati, da PLL in PDL izboljšata vnos ODN v celico. Za potrditev hipoteze smo najprej označili proteina PLL in PDL s fluorescenčnim barvilom, ki omogoča opazovanje vstopanja PLL in PDL z mikroskopom in pretočnim citometrom.

Potek označevanja in čiščenja označenih proteinov je shematsko prikazan na sliki 41. Za označevanje smo uporabili fluorescenčno barvilo Cy5, ki se vzbuja pri 646 nm valovne dolžine in ima višek oddane svetlobe pri 670 nm. Po zaključeni reakciji vezave barvila na proteine smo označene polilizine ločili od odvečnega barvila z gelsko kromatografijo in jih analizirali.

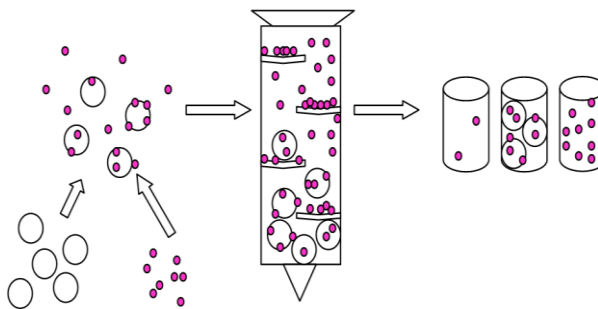
Z merjenjem absorbanca na spektrofotometru NanoDrop v območju od 280 nm do 650 nm smo določili, kateri vzorci vsebujejo največjo koncentracijo barvila.

Koncentracijo označenih polilizinov v vzorcih, pozitivnih na barvilo Cy5, smo potrdili z reagentom BCA. Absorbanco smo izmerili s spektrofotometrom SynergyMX za mikrotitrne plošče.

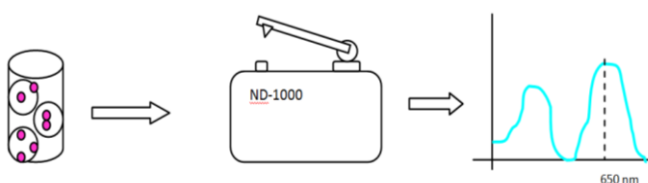
Z merjenjem fluorescence z barvilom označenih proteinov smo potrdili vezavo barvila Cy5 na polilizine, za kar smo uporabili fluorometer LS55.

Za konec smo označena polilizina razgradili s proteinazo K in spremljali spremembe v fluorescenci za možno potrditev dušenja fluorescence, kar smo analizirali s fluorometrom.

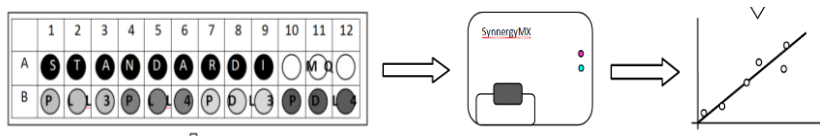
Označevanje PDL in PLL ter ločevanje označenih frakcij od odvečnega barvila z gelsko kromatografijo



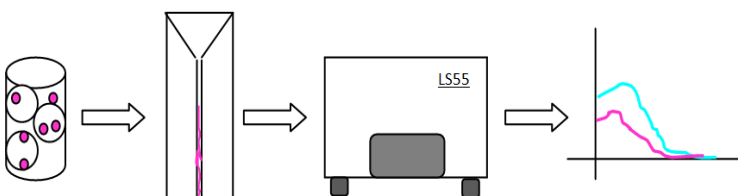
Določanje prisotnosti barvila v frakcijah



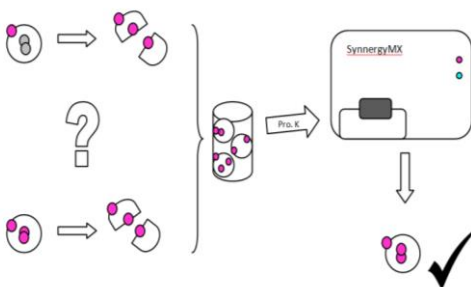
Določanje koncentracije proteinov v frakcijah, pozitivnih na Cy5



Dokazovanje vezave barvila Cy5 na PLL in PDL z merjenjem fluorescence



Merjenje sprememb v fluorescenci po razgradnji PLL/PDL s proteinazo K (preverjanje dušenja fluorescence)



Slika 41: Prikaz celotnega postopka označevanja PLL in PDL ter čiščenja označenih proteinov (Avtor: J. Gojznikar)

6.1.1 Označevanje PLL in PDL ter ločevanje označenih proteinov z gelsko kromatografijo

Za označevanje z barvilom Cy5 smo pripravili raztopini PLL in PDL (koncentracija 5 mg/ml v fosfatnem pufru PBS). 1 ml raztopine smo dodali 50 μ l 1M natrij-karbonatnega pufra s pH 9.3 in celotno mešanico dodali aktiviranemu barvilu Cy5. Reakcijsko mešanico smo dobro premešali in pustili stati v temi čez noč na sobni temperaturi. Po končani reakciji označevanja proteinov smo označene proteine ločili od nezreagirane barvila z gelsko kromatografijo. S to se ločujejo molekule po velikosti, pri čemer so večje molekule hitreje. Na koloni s kromatografskim gelom sta se ločila dva pasova. Proteinski pas, ki potuje hitreje, se je eluiral v petem in šestem mililitru elucijskega pufra (frakciji 3 in 4).

6.1.2 Določanje prisotnosti barvila v frakcijah po eluciji iz gelske kromatografije

Z merjenjem absorbance s spektrofotometrom NanoDrop smo v frakcijah 3 in 4 določili visoko koncentracijo barvila, razvidno z vrha absorbance pri valovni dolžini 650 nm, kar je značilno za barvilo Cy5. Zato smo omenjeni frakciji uporabili za nadaljnjo analizo. Proteini običajno absorbirajo pri 280 nm zaradi prisotnih aromatskih skupin aminokislinskih preostankov. Polilizini aromatskih aminokislin v svoji strukturi ne vsebujejo, zato nismo izmerili absorbance pri 280 nm (tabela 8).

Tabela 5: Absorbanca pri 280 nm in 650 nm frakcij proteina po gelski kromatografiji

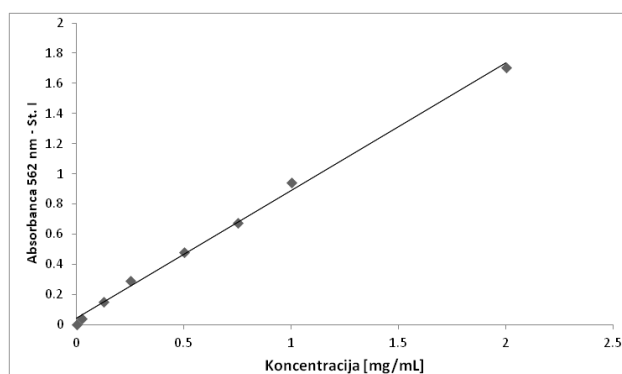
Vzorec	Volumen [mL]	A ₂₈₀	A ₆₅₀
PLL2	2	-0.05	-0.02
PLL3	1	-0.02	0.89
PLL4	1	0.00	1.12
PLL5	1	-0.04	0.04
PLL6	2	0.14	0.04
PDL1	2	0.04	0.03
PDL2	1	0.01	0.02
PDL3	1	0.01	0.35
PDL4	1	0.06	0.36
PDL5	1	0.02	0.04
PDL6	2	0.04	0.05

6.1.3 Določanje koncentracije proteinov

V prejšnjem koraku smo določili frakcije z največjo vsebnostjo barvila. Treba je bilo preveriti, ali vsebujejo višje koncentracije proteinov. Koncentracijo proteinov v posameznih frakcijah smo določali z metodo BCA. Zato smo pripravili serijo standardov (za koncentracije glej tabelo 9) in serijo redčitev vzorcev (PDL in PLL frakcijama 3 in 4) ter dodali reagent BCA. Mešanicam smo po končani reakciji izmerili absorbanco. Ponovitvam analize smo se izognili z različnim redčenjem svojih vzorcev (2-krat, 4-krat in 8-krat). Iz meritev absorpcije standardov smo pripravili umeritveno krivuljo (graf 1) in izračunali koncentracije razredčenih vzorcev, prikazane so v tabeli 3. Zaradi najmanjše številčne razlike med 2-kratno in 4-kratno redčitvijo smo tedve uporabili pri nadaljnjih izračunih.

Tabela 6: Podatki za umeritveno krivuljo

Standard	Masna koncentracija [mg/mL]	A ₅₆₂	A ₅₆₂ – st. I
st. A	2	1.802	1.705
st. B	1.5	0.923	0.822
st. C	1	1.037	0.940
st. D	0.75	0.774	0.677
st. E	0.5	0.574	0.477
st. F	0.25	0.387	0.290
st. G	0.125	0.247	0.150
st. H	0.025	0.135	0.038
st. I	0	0.097	0



Graf 1: Umeritvena krivulja (absorbanca standardov v odvisnosti od koncentracije) (Avtor: J. Gojznikar)

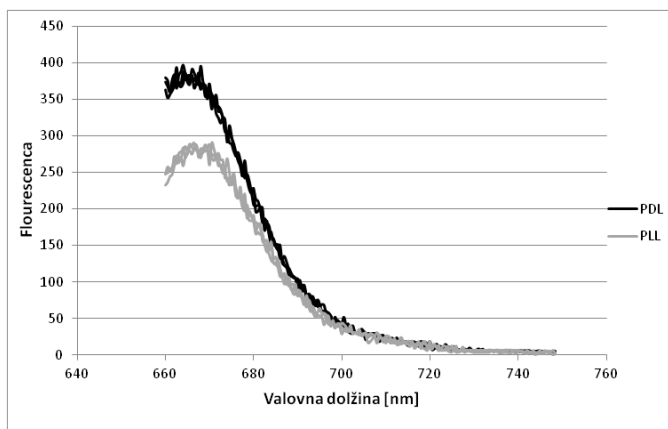
Tabela 7: Koncentracije proteinov v frakcijah po gelski kromatografiji

Vzorec	A ₅₆₂	A ₅₆₂ – st. I	Razredčitev	Izračunana koncentracija (umeritvena krivulja) [mg/mL]	Končna koncentracija (izr. x razr.) [mg/mL]
PLL3	0.176	0.079	2-krat	0.21	0.42
PLL3	0.134	0.037	4-krat	0.16	0.64
PLL3	0.117	0.020	8-krat	0.14	1.12
PLL4	0.186	0.089	2-krat	0.22	0.44
PLL4	0.142	0.045	4-krat	0.17	0.68
PLL4	0.122	0.025	8-krat	0.15	1.20
PDL3	0.170	0.073	2-krat	0.20	0.40
PDL3	0.135	0.038	4-krat	0.16	0.64
PDL3	0.131	0.034	8-krat	0.16	1.28
PDL4	0.167	0.070	2-krat	0.20	0.40
PDL4	0.135	0.038	4-krat	0.16	0.64
PDL4	0.118	0.021	8-krat	0.17	1.36

6.1.4 Fluorescenčne lastnosti barvila Cy5 po vezavi na polilizin

O uspešni vezavi barvila na polilizina smo se prepričali z merjenjem fluorescence raztopine proteina z barvilom. Fluorescenco smo merili s fluorometrom SP55. Barvilo smo vzbujali s svetlobo valovne dolžine 646 nm in merili signal/intenziteto oddane svetlobe v območju od 660 do 750 nm. Meritev

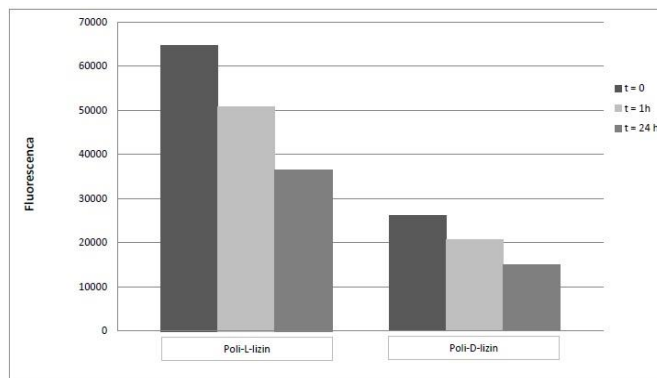
smo ponovili 5-krat za PLL in PDL ter izračunali povprečno intenziteto fluorescence, kar je prikazano v grafu 2. Iz grafa je razvidno, da je v obeh vzorcih PLL4 in PDL3, ki vsebujeta najvišjo koncentracijo proteinov, prisotno barvilo, ki fluorescira. Emisijski spekter ustreza spektru barvila Cy5, kar potrjuje, da je barvilo Cy5 vezano na proteine.



Graf 2: Emisijska spektra s Cy5 označenih polilizinov pri vzbujanju s svetlobo valovne dolžine 646 nm, izmerjena s fluorometrom (Avtor: J. Gojznikar)

6.1.5 Učinek razgradnje proteina na intenziteto fluorescence – učinek dušenja fluorescence

Učinek razgradnje proteinov na intenziteto fluorescence smo preverjali z dodatkom proteinaze K k raztopini označenih proteinov. Meritev smo izvajali v fluorometru SynnergyMX. Učinek dušenja fluorescence zaradi velike gostote barvila tesno skupaj smo ovrgli, saj je med razgradnjo s proteinazo K intenziteta fluorescence v odvisnosti od časa padala (graf 3). Padec intenzitete fluorescence je verjetno posledica uničenja fluorofora (angl. *photobleaching*).



Graf 3: Spreminjanje fluorescence PDL/PLL v odvisnosti od časa ob aktivni proteinazi K (Avtor: J. Gojznikar)

6.1.6 Ocena izgub pri procesu označevanja PLL in PDL

Označevali smo 5 mg proteinov. Po čiščenju smo pridobili 1.09 mg PLL in 1.04 mg PDL, torej sta bila izkoristka za PLL in PDL le 21.8 % in 20.8 %. Ti so domnevno posledica zastajanja proteinov v kromatografski koloni (tabela 11).

Tabela 8: Izračun izkoristka čiščenja polilizinov, konjugiranih z barvilom Cy5

Vzorec	Izhodiščna koncentracija [mg/ml]	Izhodiščna masa [mg]	Frakcije po eluciji	Volumen eluata [mL]	Masna koncentracija [mg/mL]	Končna masa [mg]	Izkoristek čiščenja
PLL	5	5	PLL3	1	0.53 (\pm 0.11)	1.09	21.8 %
			PLL4	1	0.56 (\pm 0.12)		
PDL	5	5	PDL3	1	0.52 (\pm 0.12)	1.04	20.8 %
			PDL4	1	0.52 (\pm 0.12)		

6.2 Položaj polilizinov in oligonukleotidov v celici

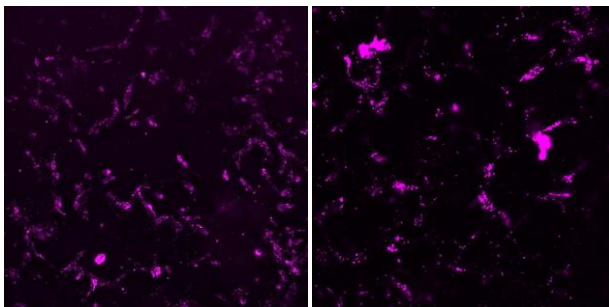
V nadaljevanju nas je zanimalo, ali označena proteina vstopata v celico in kje v celici sta. Predpostavili smo, da proteina v celico prehajata s pomočjo endocitoze, zato smo predvidevali, da se bosta koncentrirala v endosomih. Za potrditev hipoteze smo celice (HEK293T) inkubirali z označenimi proteini in endosome barvali z barvili, ki specifično označujejo endosome. Kot barvila smo uporabili Dextran Oregon Green 514, DQ Ovalbumin, Lyso-Tracker RED DND-99, ER-Tracker Red, Synapto Red C2 in Syto 80 Orange.

Dextran Oregon Green smo uporabljali za zasledovanje endocitoze, DQ Ovalbumin pa za zaznavanje proteazne aktivnosti, saj fluoriscira po proteazni cepitvi ovalbumina. Barvilo ER-Tracker Red se vgrajuje v membrane endoplazmatskega retikuluma, Lyso-Tracker pa fluorescira v kislih lizosomih. Za označevanje jedrne DNK se uporablja Syto 80 Orange, Synapto Red pa fluorescira, ko se vgradi v lipidne membrane (celično membrano in endosomske membrane).

Zanimalo nas je tudi, ali enoverižne molekule DNK, tako imenovani oligonukleotidi, potujejo skupaj s pozitivnimi proteini. Za spremljanje internalizacije ODN smo celicam dodali s Cy3 označen ODN10104.

6.2.1 Vstop polilizinov v celico

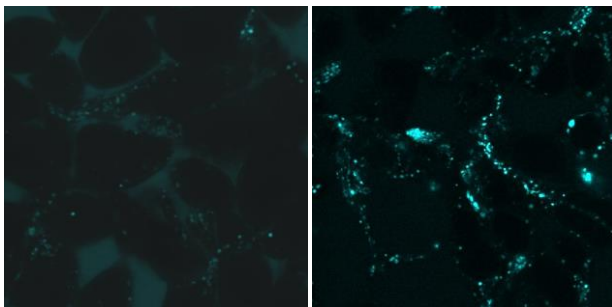
Za označena poli-L- in poli-D lizin je bilo treba dokazati, da vstopata v celice. Barvilo Cy5 se vzbuja pri valovni dolžini 649 nm, seva pa pri 670 nm, zato smo fluorescenčni mikroskop nastavili na to območje delovanja. Iz slike 42 je razvidno, da se PLL in PDL v celicah razporejata točkovno.



Slika 42: Porazdelitev polilizina v celici je točkovna. Vijolične pike prikazujejo razporejanje polilizina. Večja barvna razlitja prikazujejo mrtve celice. PDL je prikazan levo in PLL desno.

6.2.2 Sledenje endosomske aktivnosti

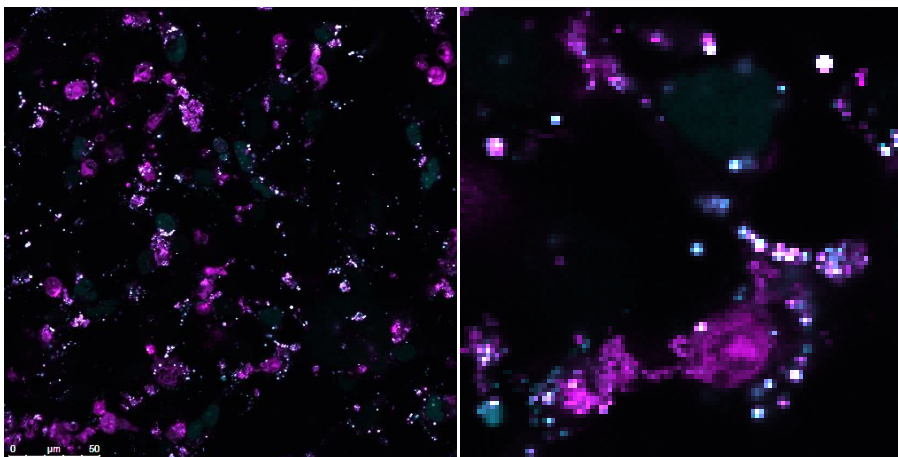
Zanimalo nas je, kako se v celici razporejajo endosomi. Za identifikacijo endosomov smo uporabili barvili Dextran Oregon Green in DQ Ovalbumin. Pokazali smo, da se barvili v celici razporejata točkovno (slika 43), podobno, kot se razporeja polilizin (slika 42).



Slika 43: Prikaz turkizno obarvanih endosomov v notranjosti celic (levo so celice, obarvane z dekstranom, desno pa z DQ Ovalbuminom)

6.2.3 Kolokalizacija ODN in polilizinov

V nadaljevanju nas je zanimalo, ali je razporejanje ODN podobno razporeditvi PLL in PDL v celice. Ker naj bi PLL/PDL vezal ODN, je pričakovati razporejanje v iste endosome. Celice HEK293T smo dodali s Cy5 označene proteine (magenta) in ODN-Cy3 (turkizna) (slika 44). Pokazali smo, da so proteini v istih veziklih kot ODN, kar se vidi s pojavom belih pik, to pa potrjuje našo domnevo, da ODN in PLL/PDL po celici pogosto potujeta skupaj.



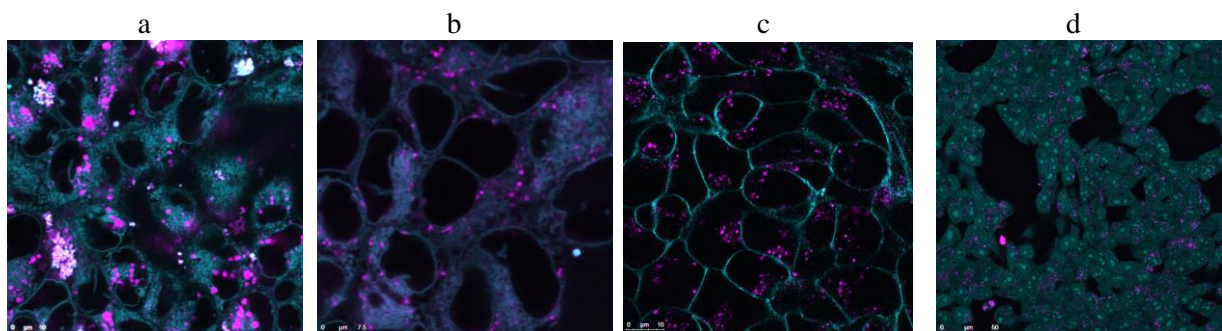
Slika 44: Polilizin in ODN sta pogosto v istih veziklih znotraj celic. Bela barva je indikator obstojanja polilizinov in ODN v skupnih endosomih.

6.2.4 Prisotnost PDL/PLL v celičnih strukturah

Za dokončno določanje nahajanja polilizina v celici, po njegovem vstopu vanjo, smo uporabili specifična barvila za endoplazmatski retikulum, lizosome, jedro in celične membrane.

Zaradi nespecifičnosti barvila ER-Tracker Red (barvila za endoplazmatski retikulum) nismo uspeli zanesljivo ovreči, da polilizina ni v endoplazmeskem retikulumu (slika 45b). Zagotovo smo potrdili, da barvilo LysoTracker (lizosomi) obarva organele, v katerih je tudi polilizin (slika 45a). Sklepamo, da polilizin potuje po endocitotski poti od endosomov v lizosome.

Čeprav nismo pričakovali, da bo polilizin v jedru, smo celice barvali z barvilom, ki specifično obarva jedro DNK, t. i. Syto 80 (slika 45d). Tovrstno barvanje smo uporabili kot negativno kontrolo, ki je potrdila odsotnost polilizinov v celičnem jedru. Tudi s Synapto Red (slika 45c) ni prišlo do kolokalizacije, iz tega lahko sklepamo, da se PLL in PDL ne vežeta na celične lipidne membrane.



Slika 45: Polilizin po endositotski poti prehaja v lizosome. (a) Barvanje celic z LysoTracker Red, ki označuje lizosome. Celice vsebujejo tudi s Cy5 označen polilizin. (b) Endoplazemski retikulum, barvan z ER-Tracker Red, (c) celične membrane s Synpto Red in (d) jedra s Syto80. V vseh treh primerih ni mogoče zaznati kolokalizacije označenega polilizina z barvili.

6.3 Aktivacija TLR9 in razporejanje TLR9 s PDL/PLL

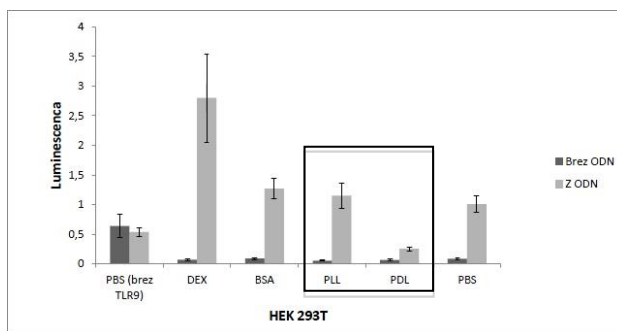
Iz teorije (glej poglavje 3.2 *Receptorji TLR*) vemo, da se receptor TLR9 aktivira ob vezavi liganda enoverižne DNK, t. i. ODN. Predvidevamo, da bo prišlo do aktivacije TLR9, samo če bo polilizin dostavil ODN na mesto, kjer je receptor TLR9, in se bo ODN sprostil iz kompleksa polilizin-ODN. Za dokaz o učinkovitosti vnosa ODN smo uporabili merjenje aktivacije TLR9.

Preverili smo tudi, ali receptor TLR9 pride v kontakt s polilizinom v endosomih. Za to smo ponovno uporabili fluorescenčni mikroskop Leica TCS SP5 in fluorescenčna barvila, naštetja v tabeli 3.

Tabela 9: Rezultati luminiscenčnih meritev za celice HEK293

HEK	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	TLR9 (+)
Reagent	PBS + ODN					PBS			∅		
Kresn.	5712	10002	5600	7940	5564	370	610	459	171	376	
Renilla	1236	2373	3144	2584	1972	2655	3473	2960	981	2272	
Norm.	4.621	4.215	1.781	3.073	2.822	0.139	0.176	0.155	0.174	0.165	
Avg. ± SD	3.557 ± 0.805					0.158 ± 0.019			0.165 ± 0.010		
Reagent	DEX + ODN					DEX			∅		
Kresn.	9498	13719	7541	7026	7542	301	587	368	511	398	
Renilla	1667	2691	2456	2153	1843	1890	3021	1946	2019	1808	
Norm.	5.698	5.098	3.070	3.263	4.092	0.159	0.194	0.189	0.253	0.220	
Avg. ± SD	4.244 ± 1.141					0.177 ± 0.018			0.221 ± 0.032		
Reagent	BSA + ODN					BSA			∅		
Kresn.	763	2151	7454	2144	2380	36	29	245	477	542	
Renilla	186	603	413	425	410	215	225	1345	1842	2142	
Norm.	4.102	3.567	18.1	5.045	5.805	0.167	0.129	0.182	0.259	0.253	
Avg. ± SD	4.408 ± 0.993					0.148 ± 0.019			0.231 ± 0.043		
Reagent	PDL + ODN					PDL			∅		
Kresn.	495	1191	1293	977	1526	8	13	15	554	358	
Renilla	659	1061	1170	906	755	20	13	17	3363	1903	
Norm.	0.751	1.123	1.105	1.078	2.021	0.400	1.000	0.882	0.165	0.188	
Avg. ± SD	1.216 ± 0.476					0.7 ± 0.3			0.412 ± 0.408		
Reagent	PLL + ODN					PLL			∅		
Kresn.	3007	5972	5893	5301	4614	45	29	24	561	497	
Renilla	887	2432	2201	2180	1788	48	36	48	2592	2438	
Norm.	3.39	2.456	2.677	2.432	2.581	0.938	0.8056	0.500	0.216	0.204	
Avg. ± SD	2.707 ± 0.394					0.871 ± 0.066			0.307 ± 0.168		
Reagent	PBS + ODN					PBS			∅		
Kresn.	85	103	76	120	102	110	81	111	107	109	
Renilla	318	684	644	751	842	1001	622	507	446	351	
Norm.	0.267	0.151	0.118	0.160	0.121	0.110	0.130	0.220	0.240	0.311	
Avg. ± SD	0.163 ± 0.061					0.12 ± 0.01			0.224 ± 0.095		

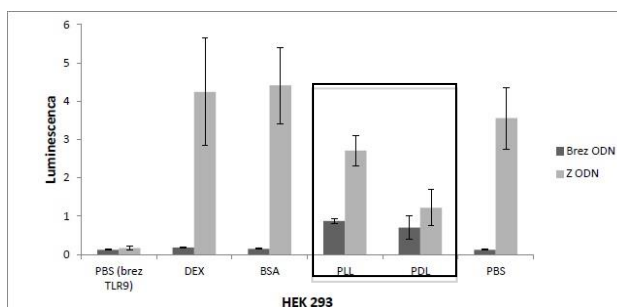
Z rumeno je označen rezultat, ki toliko odstopa, da ga pri izračunu nismo uporabili.



Graf 4: Prisotnost PDL popolnoma inhibira aktivacijo TLR9. Prikazane so normalizirane vrednosti luciferaz pri transfekciranah celicah HEK293T. Odziv celic, ki niso vsebovale TLR9, je prikazan v prvem stolpcu in predstavlja negativno kontrolo. Legenda: DEX – dekstran, PLL – poli-L-lizin, PDL – poli-D-lizin, BSA – goveji serumski albumin, PBS – pufer. (Avtor: J. Gojznikar)

Tabela 10: Rezultati luminiscenčnih meritev za celice HEK293T

HEKT	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11		
B	Reagent	PBS					PBS + ODN					TLR9 (-)
	Kresn.	365	534	366	358	178	232	241	210	358	319	
	Renilla	641	1214	576	371	312	447	528	319	710	583	
	Norm.	0.569	0.440	0.635	0.965	0.571	0.519	0.456	0.658	0.504	0.547	
	Avg. ± SD	0.636 ± 0.197					0.537 ± 0.075					
C	Reagent	PLL					PLL + ODN					TLR9 (+)
	Kresn.	788	638	513	337	742	7797	7434	6914	13135	12757	
	Renilla	16448	12136	7853	6669	16818	7343	8150	6732	9498	9357	
	Norm.	0.048	0.053	0.065	0.051	0.044	1.062	0.912	1.027	1.383	1.363	
	Avg. ± SD	0.052 ± 0.008					1.149 ± 0.212					
D	Reagent	PDL					PDL + ODN					TLR9 (+)
	Kresn.	335	352	451	357	362	1079	988	1052	1940	757	
	Renilla	5699	7245	5771	6716	3978	4279	4627	3576	7065	3282	
	Norm.	0.059	0.049	0.078	0.053	0.091	0.252	0.214	0.294	0.275	0.231	
	Avg. ± SD	0.066 ± 0.018					0.253 ± 0.033					
E	Reagent	DEX					DEX + ODN					TLR9 (+)
	Kresn.	281	465	349	290	352	9942	13932	7660	15093	10545	
	Renilla	5487	6183	4740	4236	4399	3054	3696	3950	5366	4753	
	Norm.	0.051	0.075	0.074	0.069	0.080	3.255	3.769	1.939	2.813	2.219	
	Avg. ± SD	0.0697 ± 0.0111					2.799 ± 0.746					
F	Reagent	BSA					BSA + ODN					TLR9 (+)
	Kresn.	786	961	1214	1054	856	12156	13231	10287	20494	15866	
	Renilla	11246	12880	13339	8850	10835	9832	12841	8278	13559	12051	
	Norm.	0.070	0.075	0.091	0.119	0.079	1.236	1.030	1.243	1.511	1.317	
	Avg. ± SD	0.0867 ± 0.0197					1.268 ± 0.173					
G	Reagent	PBS					PBS + ODN					TLR9 (+)
	Kresn.	119	1387	1095	1475	1184	23241	11965	10494	13949	6066	
	Renilla	10717	17885	14761	12823	13444	27284	11171	10586	15276	5044	
	Norm.	0.011	0.078	0.074	0.115	0.088	0.852	1.071	0.991	0.913	1.203	
	Avg. ± SD	0.086 ± 0.018					1.006 ± 0.138					



Graf 5: Prisotnost PDL popolnoma inhibira aktivacijo TLR9. Prikazane so normalizirane vrednosti luciferaz pri transfekciranah celicah HEK293. Odziv celic, ki niso vsebovale TLR9, je prikazan v prvem stolpcu in predstavlja negativno kontrolo. Legenda: DEX – dekstran, PLL – poli-L-lizin, PDL – poli-D-lizin, BSA – goveji serumski albumin, PBS – pufer. (Avtor: J. Gojznikar)

Kot je razvidno iz grafov 1 in 2, je stopnja aktivacije TLR9 odvisna od prisotnosti ODN. Izkazalo se je, da dekstran, BSA in tudi PLL ne vplivajo bistveno na aktivacijo TLR9 z ODN, in je aktivacija primerljiva s tisto, pri kateri ODN ni primešan protein ali dekstran. Dekstran in BSA sta uporabna kot

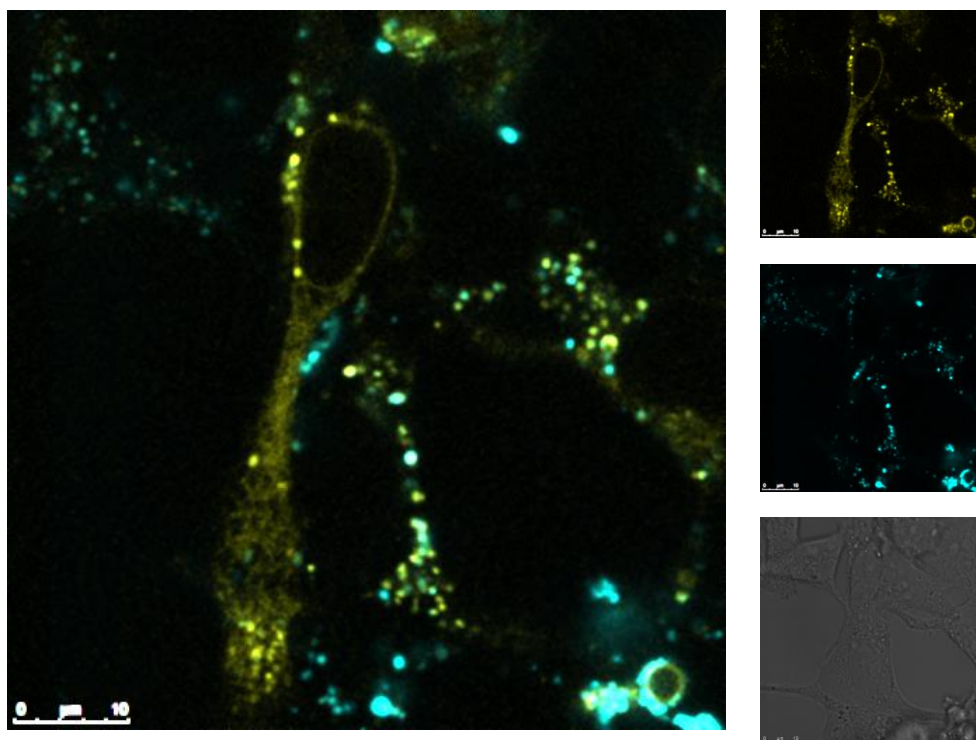
pozitivna kontrola, v okvirčkih pa so meritve naših vzorcev. Poudarili bi, da prisotnost PDL v mešanici z ODN učinkovito inhibira aktivacijo receptorja TLR9. Predvidevamo, da PDL zaradi pozitivnega naboja ODN veže, vendar ga v endomih oz. lizosomih ne sprost. To je lahko posledica tega, da lizosomalne proteinaze ne uspejo razgraditi poli-D-lizina.

6.3.1 Prostorska porazdelitev receptorja TLR9 in polilizina

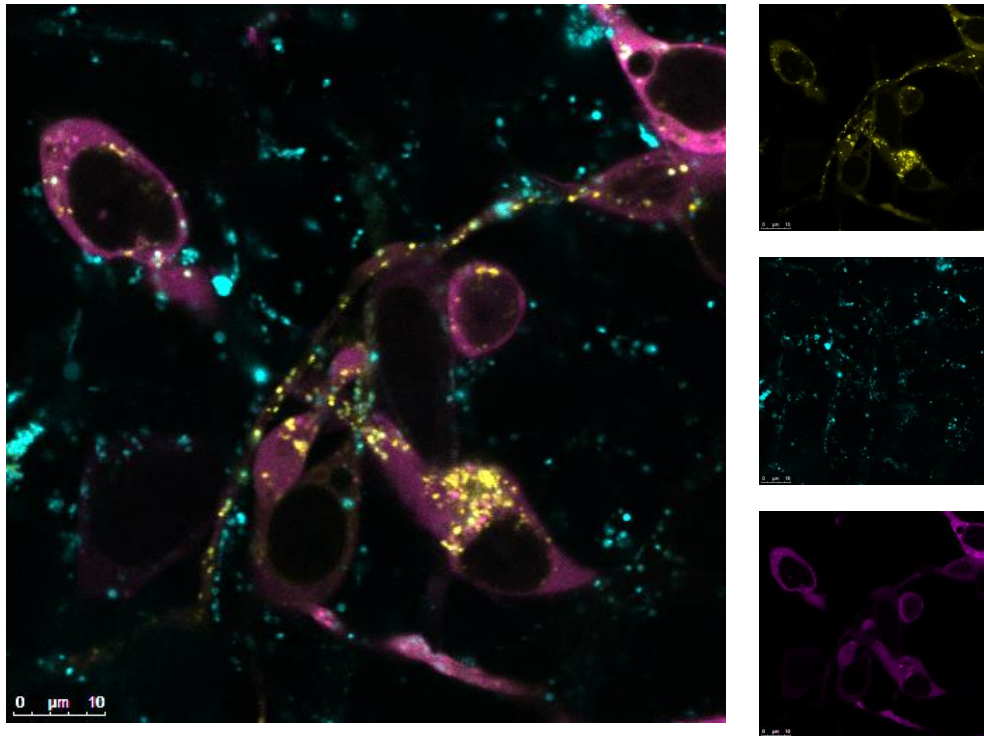
Da ODN aktivira receptor TLR9, mora le-ta priti v kontakt z receptorjem, kar pa je mogoče le, če je receptor TLR9 v ustreznih endosomih v celici. Želeli smo preveriti, ali sta PLL/PDL v istih razdelkih v celici, kot je receptor TLR9. Celice HEK293T smo transfekcirali s fuzijskim proteinom TLR9-mCitin, ki je imel na C-končnem delu TLR9 vezan fluorescirajoči protein mCitin. Za določitev lokalizacije smo celice dodatno transfekcirali s plazmidi, ki nosijo zapise za celične markerje, kot so navedeni v tabeli 14. Celicam smo nato dodali s Cy5 označen polilizin in ODN-Cy3. Lokalizacijo posameznih proteinov smo opazovali z mikroskopom (slike 46–53).

Tabela 11: Barvila, uporabljena pri mikroskopiji TLR9-transfekiranih celicah

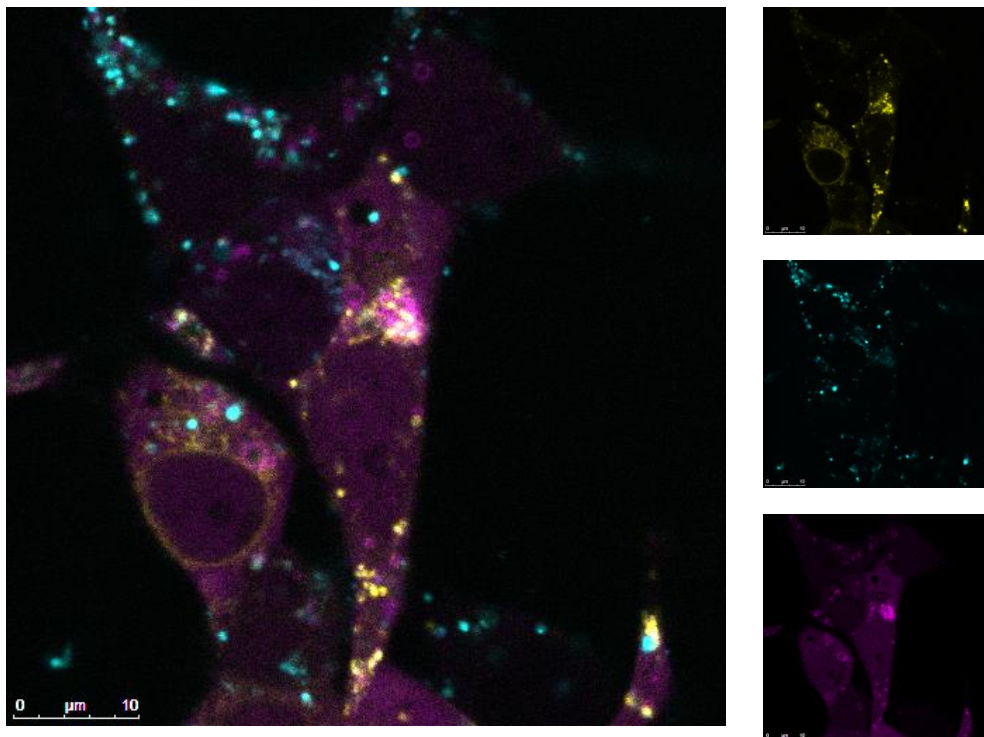
Barvila	Eksitacijska/emisijska valovna dolžina (nm)	Lokalizacija v celici
PDL/PLL-Cy5	649/670	endosomi
ODN-Cy3	550/570	endosomi
Tomato-EEA1	554/581	zgodnji endosomi
FYVE-mCherry	587/610	endosomi
LC3-GFP	448/507	fagociti
TLR9-mCitrin	516/529	endosomi/ER



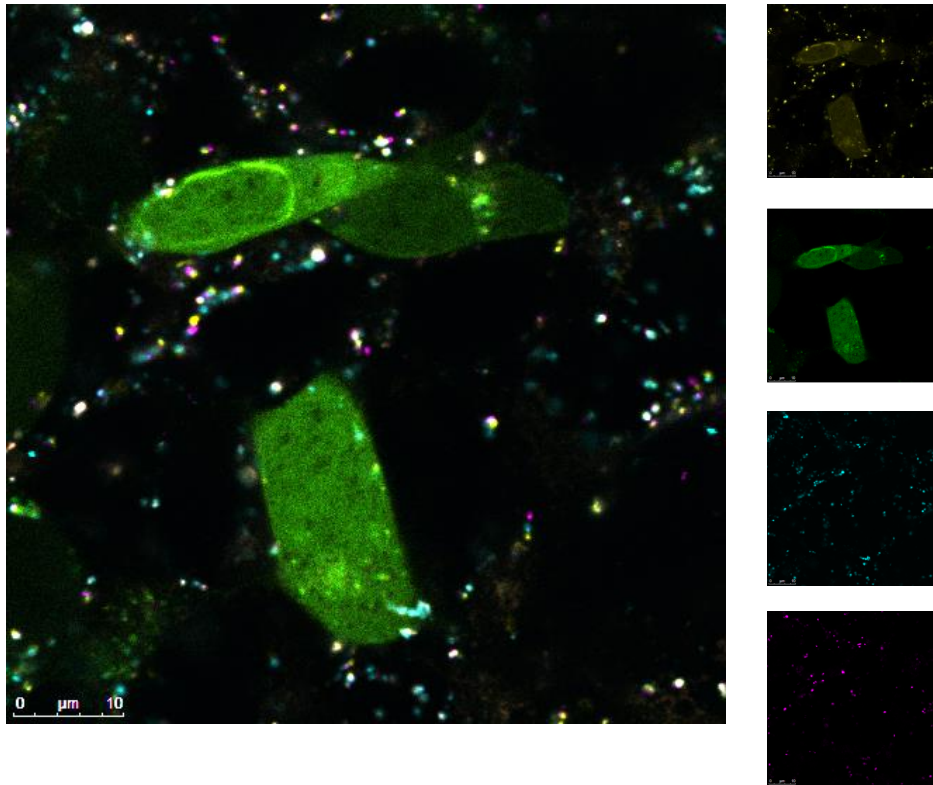
Slika 46: Receptor TLR9 je v istih razdelkih kot polilizin. Celice HEK293 so transfekcirane s plazmidom TLR9-mCitrin (rumeno) in stimulirane s PLL-Cy5 (turkizno). Kolokalizacija je prikazana z belo. Levo je prikazana združena slika, ki smo jo dobili z nalaganjem slik receptorja TLR9 in PLL-Cy5 (desno). Spodaj desno je prikazana slika celic, dobljena s presevno svetlobo.



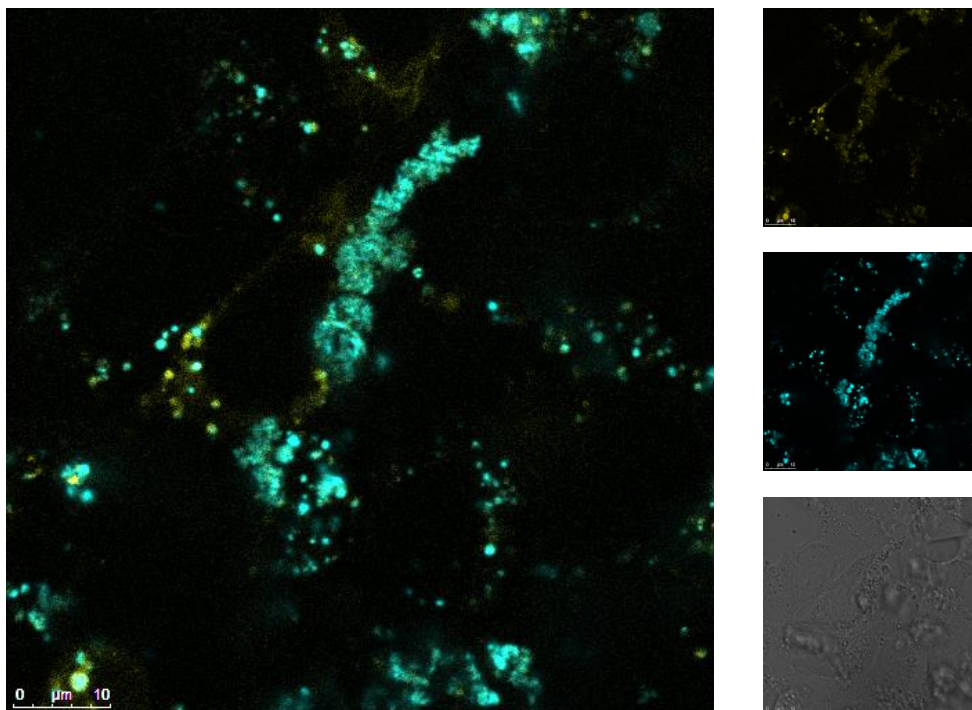
Slika 47: Zgodnji endosomi vsebujejo receptor TLR9 in polilizin. Celice HEK293, transfekcirane s plazmidoma za TLR9-mCitrin (rumeno) in Tomato-EEA1 (vijolično) in stimulirane s PLL-Cy5 (turkizno). Kolokalizacija je prikazana z belo. Levo je prikazana združena slika, ki smo jo dobili z nalaganjem slik receptorja TLR9, zgodnjih endosomov in PLL-Cy5 (desno).



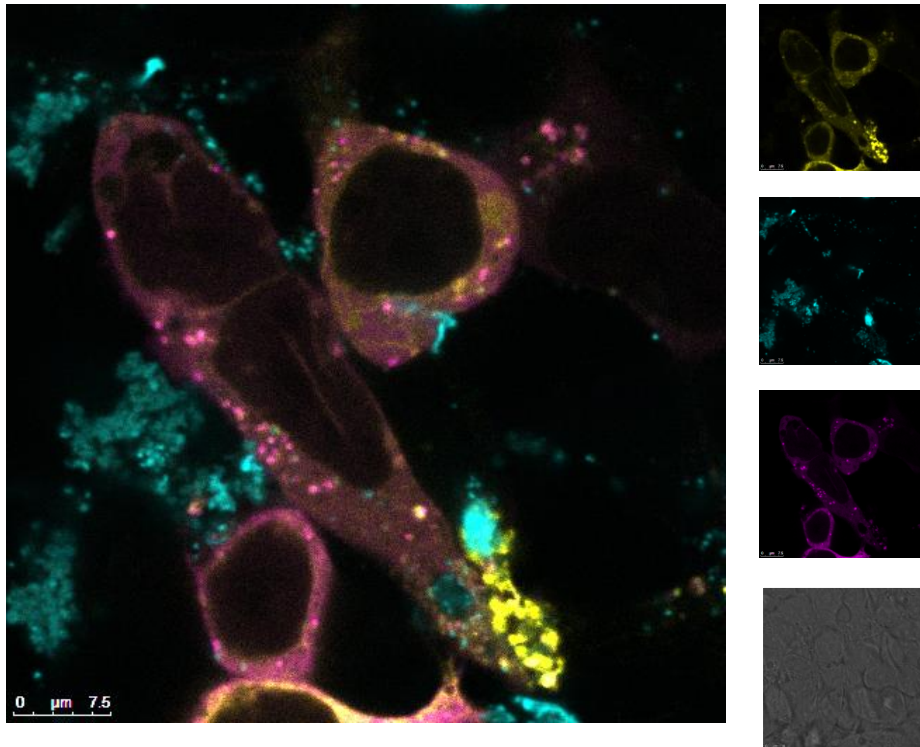
Slika 48: TLR9 in PLL sta tudi v FYVE-pozitivnih endosomih. Celice HEK293T, transfekcirane s plazmidoma TLR9-mCitrin (rumeno) in FYVE-mCherry (vijolično) in stimulirane s PLL-Cy5 (turkizno). Kolokalizacija je prikazana z belo. Levo je prikazana združena slika, ki smo jo dobili z nalaganjem slik receptorja TLR9, endosomov in PLL-Cy5 (desno).



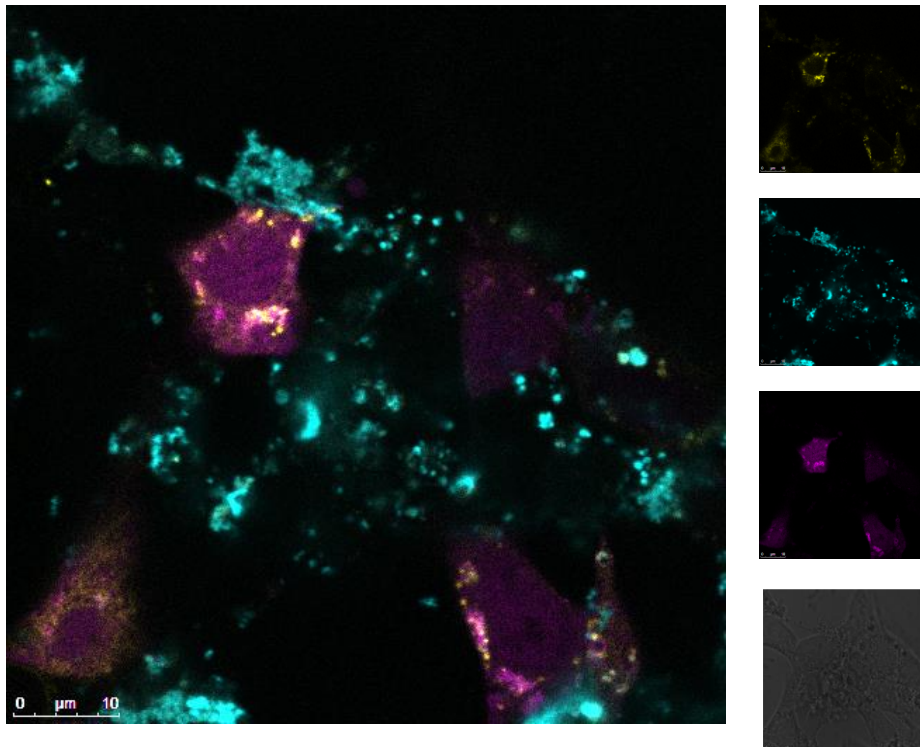
Slika 49: Lokalizacija receptorja TLR9, PLL in ODN v LC3-pozitivnih lizosomih je redka. Celice HEK293T, transfekcirane s plazmidi TLR9-mCitrin (rumeno), ODN-Cy3 (zeleno) in LC3-GFP (vijolično) in stimulirane s PLL-Cy5 (turkizno). Kolokalizacija je prikazana z belo. Levo je prikazana združena slika, ki smo jo dobili z nalaganjem slik receptorja TLR9, ODN, PLL-Cy5 in fagocitov (desno).



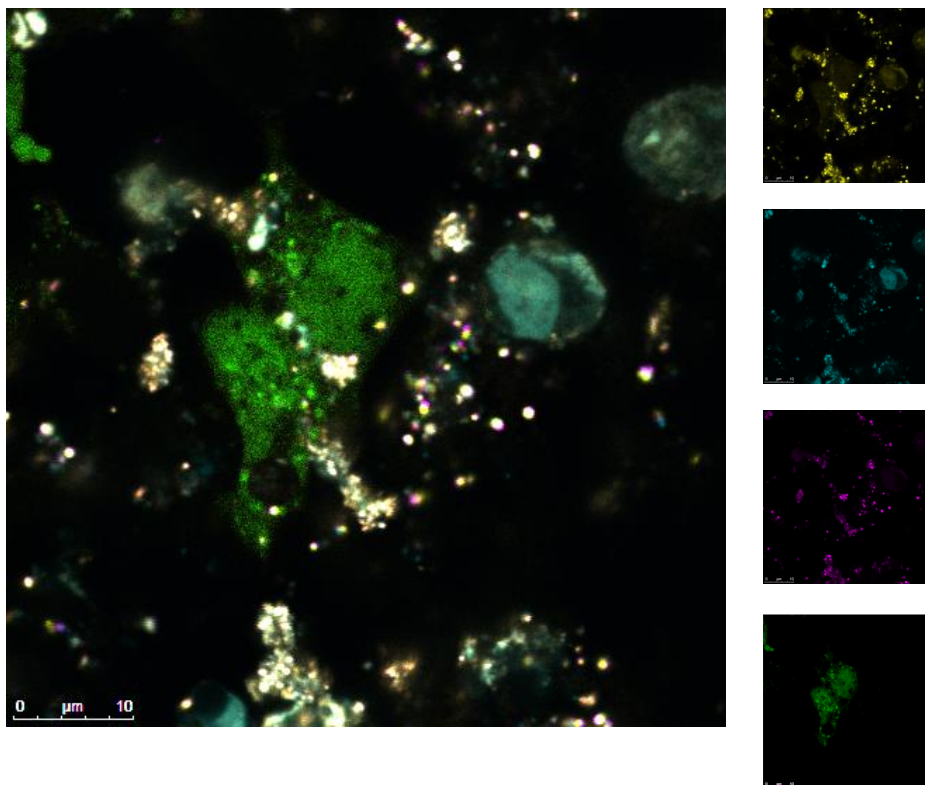
Slika 50: Receptor TLR9 je v istih območjih kot poli-D-lizin. Celice HEK293 so transfekcirane s plazmidom TLR9-mCitrin (rumeno) in stimulirane s PDL-Cy5 (turkizno). Kolokalizacija je vidna na belih območjih. Levo je prikazana združena slika, ki smo jo dobili z nalaganjem slik receptorja TLR9 in PDL-Cy5 (desno). Spodaj desno je prikazana slika celic, dobljena s presevno svetlobo.



Slika 51: Zgodnji endosomi vsebujejo receptor TLR9 in poli-D-lizin. Celice HEK293 so transfekcirane s plazmidoma za TLR9-mCitrin (rumeno) in Tomato-EEA1 (vijolično) ter stimulirane s PDL-Cy5 (turkizno). Kolokalizacija je prikazana z belo. Levo je prikazana združena slika, ki smo jo dobili z nalaganjem slik receptorja TLR9, zgodnjih endosomov in PDL-Cy5 (desno). Spodaj desno je prikazana slika celic, dobljena s presevno svetlobo.



Slika 52: TLR9 in PDL sta tudi v FYVE-pozitivnih endosomih. Celice HEK293T so transfekcirane s plazmidoma TLR9-mCitrin (rumeno) in FYVE-mCherry (vijolično) in stimulirane s PLL-Cy5 (turkizno). Kolokalizacija je prikazana z belo. Levo je prikazana združena slika, ki smo jo dobili z nalaganjem slik receptorja TLR9, endosomov in PLL-Cy5 (desno). Spodaj desno je prikazana slika celic, dobljena s presevno svetlobo.



Slika 53: Lokalizacija receptorja TLR9, PDL in ODN v LC3-pozitivni lizosomih je pogostejša. Celice HEK293T so transfekcirane s plazmidi TLR9-mCitrin (rumeno), ODN-Cy3 (zeleno) in LC3-GFP (vijolično) in stimulirane s PDL-Cy5 (turkizno). Kolokalizacija je prikazana z belo. Levo je prikazana združena slika, ki smo jo dobili z nalaganjem slik receptorja TLR9, ODN, PDL-Cy5 in fagocitov (desno).

S prikrivanjem slik fluorescenčnega mikroskopa posameznih celičnih organelov smo pokazali razporejanje polilizinov z ODN. Na slikah večjega formata, ki predstavljajo naleganje posameznih slik mikroskopiranja, je kolokalizacija preiskovanih molekul prikazana belo. Najbolje je vidna na slikah 48 in 49 za serije PLL ter slikah 52 in 53 za serije PDL. S tem smo pokazali, da so polilizini v istih endosomih kot TLR9. Določena manjša koncentracija polilizinov pa je tudi v fagocitih.

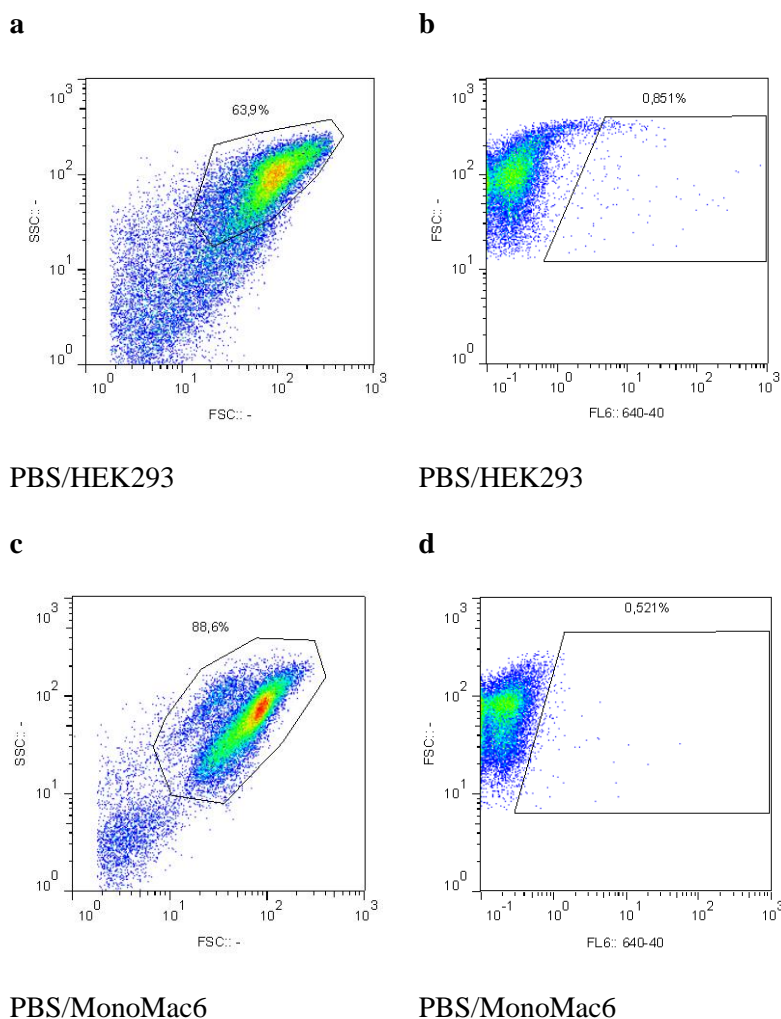
Prostorska porazdelitev receptorja TLR9 je poznana iz literature. (Povzeto po: *Wikipedia – TLR9*: <http://en.wikipedia.org/wiki/TLR9>. Dostop: 25. 10. 2013.) Receptor je pretežno v endoplazemskem retikulumu in v endosomih. Pokazali smo, da polilizina in tudi ODN v celico vstopajo preko endocitoze in so v endosomih in lizosomih, kjer smo dokazali tudi receptor TLR9. Iz podrobnejše analize vrst endosomov je moč opaziti, da je kompleks polilizina z ODN in TLR9 v EEA1 in FYVE-pozitivnih endosomih, medtem ko ga redko najdemo v LC3-pozitivnih endosomih/lizosomih. Protein LC3 je označevalec predvsem fagosomov in občasno barva tudi lizosome. (Povzeto po: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425443>. Dostop: 25. 10. 2013.) Rezultati potrjujejo predvidevanja, da je kompleks polilizina in ODN v endosomih, ki so pozitivni za receptor TLR9, kar smo potrdili tudi z aktivacijo samega receptorja.

6.4 Hitrost vstopanja polilizina in ODN v celice HEK293T in makrofage MonoMac6

Po analizi označenih proteinov in njihove pozicije v celicah smo kot zadnji korak želeli preveriti še hitrost njihovega vstopanja v celice HEK293T. Za primerjavo smo si izbrali makrofage MonoMac6, za katere vemo, da imajo zelo učinkovito endocitozo. Zamislili smo si časovni eksperiment, v katerem smo celicam, pripravljenim v mikrotitrskih ploščah s 24 vdolbinami, dodajali reagente v določenih časovnih razmikih. Po izteku zastavljenega časa smo delež proteinov in ODN, ki so prešli v celice, izmerili s pretočnim citometrom.

6.4.1 Določitev meritvenega območja

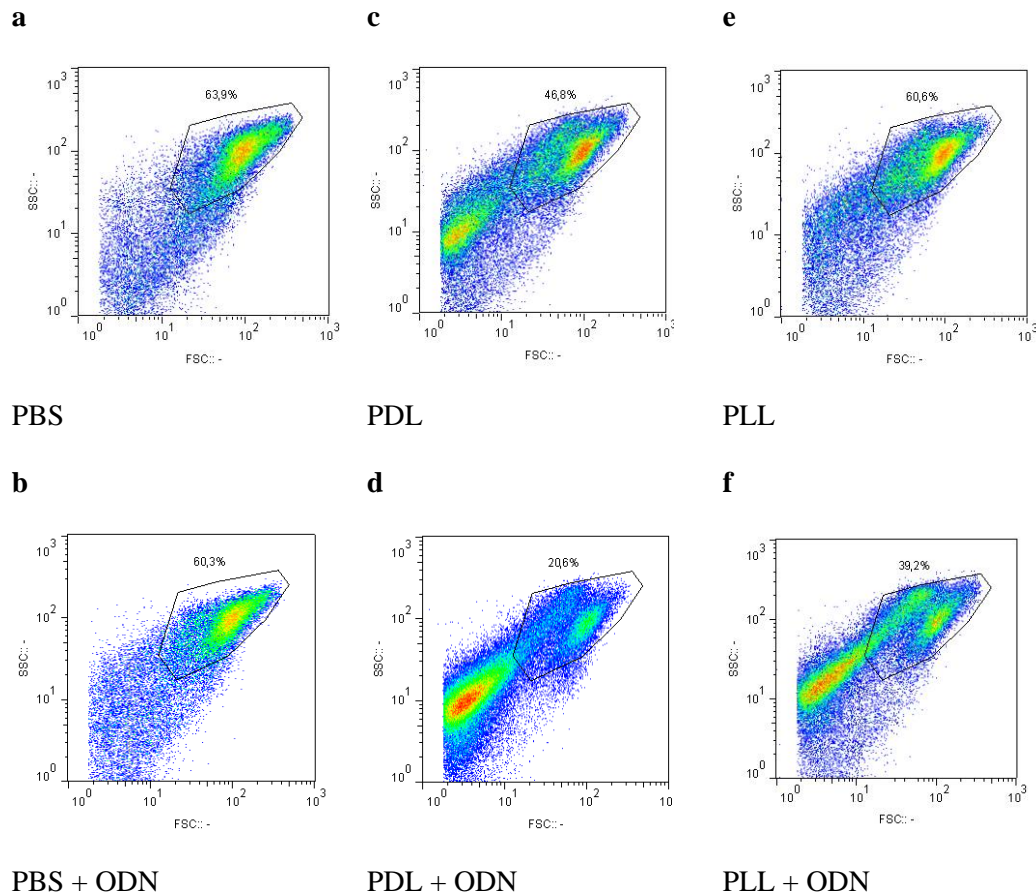
Prvi korak citometričnih meritev je bila izbira območja, ki določa žive celice (slika 54). Za to smo uporabili celice, ki smo jim dodali samo pufer PBS. Pri celicah HEK293T smo določili območje, ki je zavzemalo 63.9 % (slika 54a), pri makrofagih pa 88.6 % vseh delcev (slika 54c). Za prikazana območja smo se odločili na podlagi podatkov direktnega in stranskega sipanja. Celicam, ki so v definiranem območju, smo izmerili tudi intenziteto fluorescence z valovno dolžino nad 640 nm. Ker celicam nismo dodali s Cy5 označenega polilizina ali ODN, nismo pričakovali celic, ki bi fluorescirale. S pomočjo rezultatov merjenja fluorescence smo določili mejo, ki predstavlja celice, pozitivne na fluorescenco z valovno dolžino nad 640 nm. Mejo smo določili tako, da je delež celic negativne kontrole, ki so v za fluorescenco pozitivnem območju, manjši od 1 % (sliki 54b – HEK293T, 54d – makrofagi). S Cy5 označen polilizin ali ODN, ki se internalizira v celice, bi celice uvrstil v t. i. pozitivno območje. Z merjenjem števila celic, ki se uvrščajo v pozitivno območje, smo pridobili informacijo o učinkovitosti vstopanja reagentov v celice (slika 54).



Slika 54: Točkovni graf stranskega in direktnega sipanja celic po dodatku pufru PBS (negativna kontrola). Izbrano območje na sliki a, ki smo ga uporabili za nadaljnje meritve, predstavlja 63.9 % vseh prešteti delcev. Iz tega območja smo odstranili ozadje z izborom prikazanega lika, kjer je delež celic manjši od 1 %. Sliki a in b prikazujeta točkovne grafe za celice HEK293T, c in d pa za makrofage.

6.4.2 ODN v prisotnosti proteinov PDL in PLL stimulira celično smrt

Po nastavitvi parametrov citometričnih meritev smo pregledali, ali izbrana območja ustrezajo vsem celičnim populacijam, to je celicam, ki smo jim dodali PLL, PDL ali ODN. Pri tem smo prišli do zanimive ugotovitve. Kot je razvidno s slike 55a, ODN brez dodanih PLL in PDL ne vpliva na populacijo celic (večina celic je v označenem območju). Ob dodatku ODN k PLL ali PDL je vidno očitno povečanje deleža celic, ki imajo drugačno gostoto kot celice negativne kontrole in so izven označenega območja (sliki 55d, f). Predvidevamo, da je sprememba gostote celic povezana s celično smrtjo. Celične smrti nismo potrdili z barvanjem celic z ustreznimi reagenti. Sklepamo, da kombinacija ODN z označenimi polilizini poveča delež mrtvih celic (slika 55).



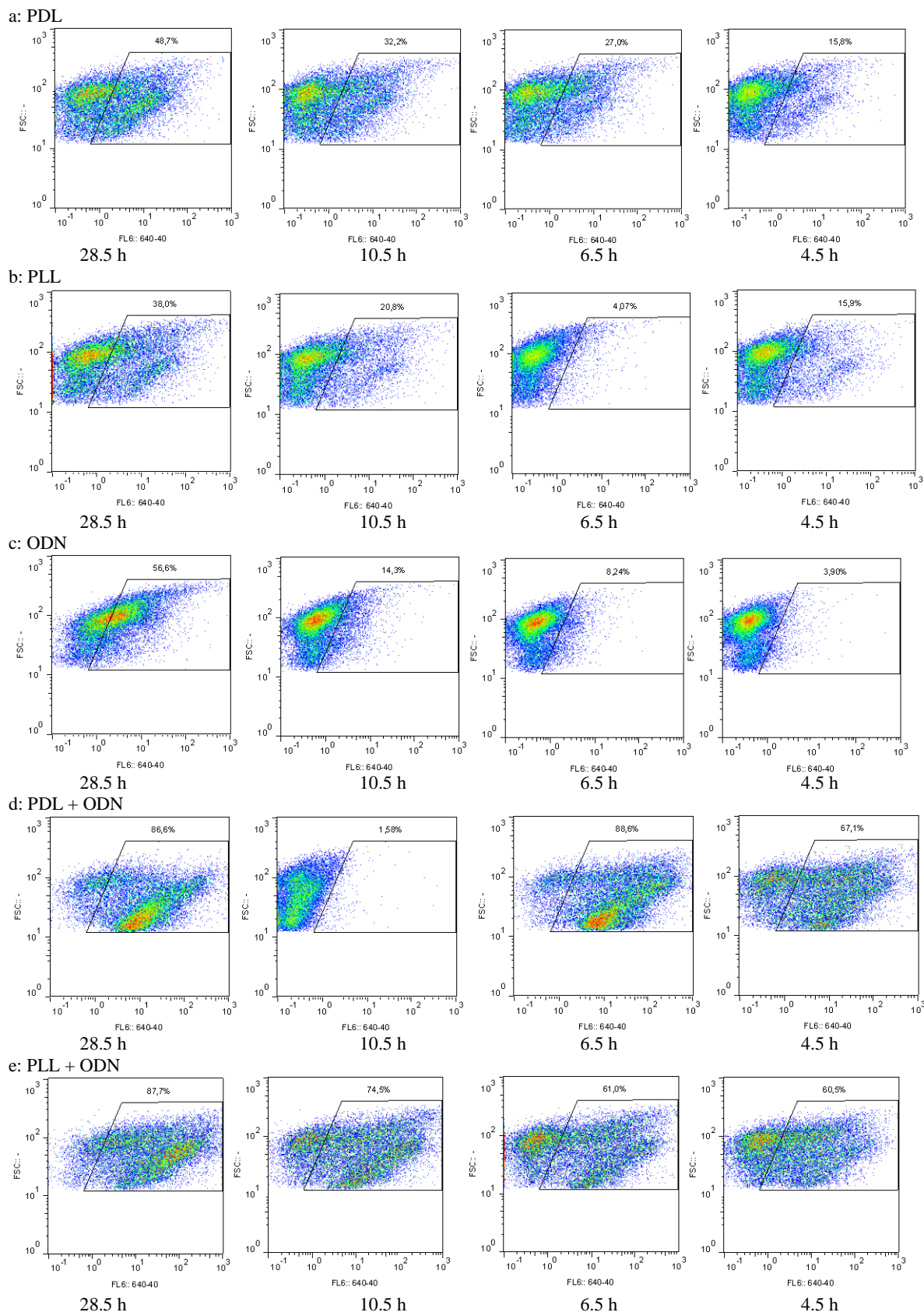
Slika 55: ODN v kombinaciji s PDL in PLL stimulira celično smrt. Na sliki b ni očitnih razlik pred dodatkom ODN in po njem, medtem ko pri slikah d in f prepoznamo očitno razliko v gostoti celic izven označenega območja.

6.4.3 Primerjalno merjenje endocitoze pri HEK293T in makrofagih

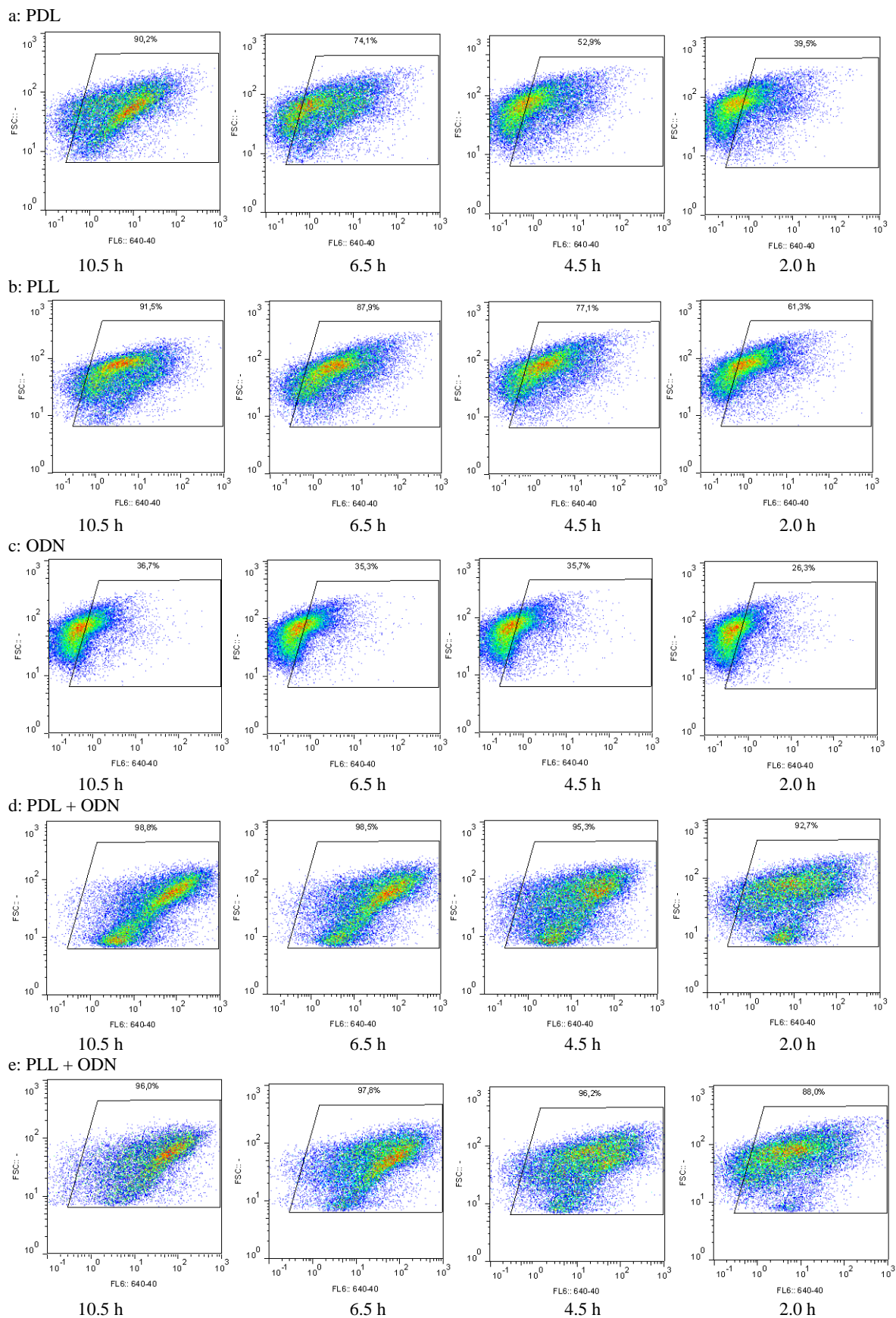
Endocitozo polilizina in ODN smo spremljali v časovnem intervalu od 4.5 do 28 ur za celice HEK293 in od 2 do 10 ur za makrofage MonoMac6.

Pri celicah HEK293 (slika 56) smo ugotovili, da se število celic, pozitivnih na Cy5, ne razlikuje bistveno, če primerjamo PDL in PLL, in to v vseh časovnih intervalih. Prehajanje s Cy5 označenega ODN v celice HEK293 je počasno. Dodatek polilizina k ODN zelo poveča število celic, ki so pozitivne na ODN-Cy5 (slika 56d, e). Po 28 urah je število pozitivnih celic večje od 80 % v prisotnosti polilizina in samo 56 %, ko polilizina ni v mešanici z OD.

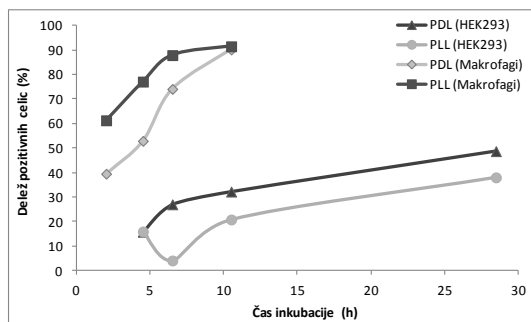
Pri makrofagih (slika 57) je endocitoza učinkovitejša, zato smo časovni interval skrajšali. Podobno kot za celice HEK293 se internalizaciji PLL in PDL v makrofage ne razlikujeta. Že po 10 urah je več kot 90 % celic pozitivnih na s Cy5 označen polilizin (sliki 57a, b). Število celic, ki so pozitivne na ODN-Cy5, je po 10 urah samo 36 % (slika 57c). Dodatek polilizina ODN poveča število pozitivnih celic na več kot 90 % že po 2 urah (sliki 57d, e).



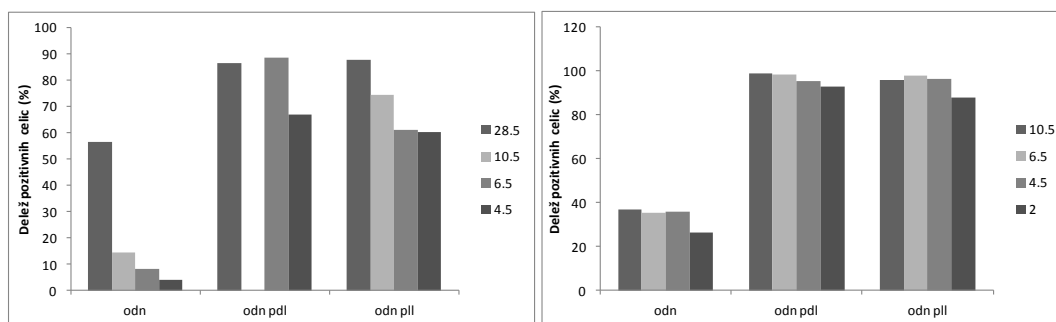
Slika 56: Internalizacija kombinacije polilizina in ODN pri celicah HEK293T. Vstopanje označenih fluorescirajočih reagentov (ODN ali polilizinov) je mogoče detektirati pri vseh celicah. Pri drugem diagramu slike d je najverjetneje prišlo do eksperimentalne napake.



Slika 57: Internalizacija ODN in polilizonov, označenih s fluorescenčnimi barvili, pri monocitih MonoMac6. Pri vseh posameznih eksperimentih je moč zaznati vstopanje fluorescirajočih molekul.



Graf 6: Delež pozitivnih celic v odvisnosti od časa inkubacije celic z ODN in/ali polilizini. Prikaz vstopanja polilizinov pri makrofagih in celicah HEK293. (Avtor: J. Gojznikar)



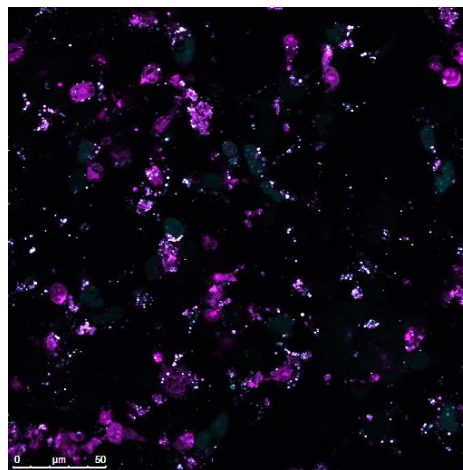
Graf 7: Delež pozitivnih celic na ODN. Grafični prikaz internalizacije fluorescirajočega ODN brez polilizinov ali s polilizini pri HEK293 (1. graf) in monocitih (2. graf). (Avtor: J. Gojznikar)

Ugotovili smo, da je internalizacija polilizina v celice HEK293 in makrofage neodvisna od tipa polilizina. Število celic, ki so pozitivne na ODN-Cy5, je zelo nizko in se občutno poveča ob dodatku polilizina. To je lahko posledica izboljšane endocitoze kompleksa ali pa je pojav povezan z zaščito ODN pred razgradnjo ODN z deoksiribonukleazami.

7 Analiza rezultatov

7.1 Pozitivno nabita proteina poli-L- in poli-D-lizin se vežeta na krajše segmente enoverižne deoksiribonukleinske kisline (oligonukleotide ODN)

Proteina poli-D- in poli-L-lizin smo označili s fluorescenčnim barvilom Cy5, da bi ju lahko pozneje z uporabo fluorescenčnega mikroskopa opazovali v odnosu do celic. Postopek barvanja nam je zagotovil vzorce obarvanega proteina. Raztopino obarvanega polilizina z najvišjo koncentracijo smo uporabili za spremljanje vstopanja v celico. Iz rezultatov je razvidno, da polilizin vstopa v celico z endocitozo, s čimer smo imeli podlago za nadaljnje poskuse. Za potrditev hipoteze smo pozitivno nabitemu polilizinu dodali negativno nabit ODN, označen z barvilom Cy3, in pokazali, da sta polilizin in ODN v istih organelah (slika 58). Iz tega lahko zaključimo, da se pozitivno nabita proteina poli-L- in poli-D-lizin vežeta na krajše segmente DNK.

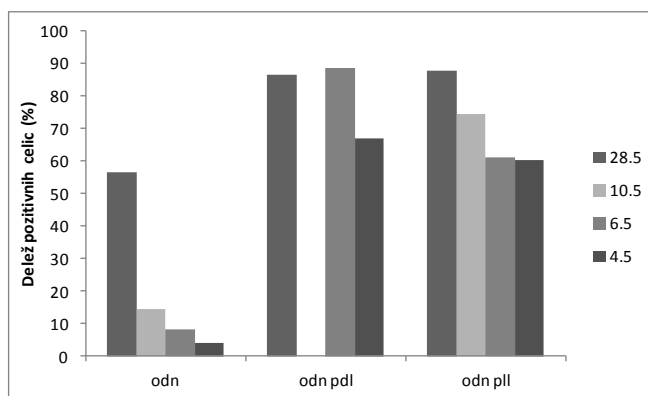


Slika 58: Celice z dodanim PLL (Cy5) (magenta) in ODN (cian). Kolokalizacije so vidne kot bele pike. (Foto: N. Kejžar)

7.2 Proteina poli-L- in poli-D-lizin izboljšata prenos oligonukleotidov v celico

Namen raziskovalne naloge je pokazati, da pozitivno nabiti proteini izboljšajo vnos negativno nabitim enoveržnim segmentom DNK. Predpostavili smo, da tako vezana proteina pospešita prenos DNK v celico. Za merjenje vnosa ODN smo uporabili dve celični liniji – monocite MonoMac6 (ki imajo učinkovitejšo endocitozo) in HEK293T.

Potrdili smo, da poli-L- in poli-D-lizin pospešita endocitozo ODN. Tako smo večje količine posameznih ODN zasledili v celicah šele po npr. 28 urah, v kompleksu s proteinom pa že po 4 urah (ti podatki veljajo za celice HEK293T. Podoben rezultat smo dobili tudi z monociti /glej poglavje 6.4 Rezultati/). S tem smo potrdili, da pozitivno nabiti proteini, ki vežejo oligonukleotide, izboljšajo njihov vnos v celico.



Graf 8: Graf hitrosti internalizacije pri monocitih MonoMac6 (Avtor: J. Gojznikar)

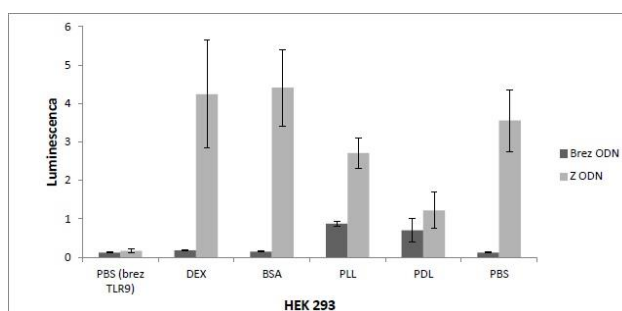
7.3 V celici je polilizin brez ODN ali z ODN v endosomih in lizosomih, ki vsebujejo receptor TLR9

Z mehanizmom aktivacije TLR9 z ODN smo opazovali, kako na proces aktivacije vpliva vezava PLL in PDL na oligonukleotide. Zanimalo nas je tudi, ali ODN v navezi s PLL in PDL sploh doseže TLR9. Kolokalizacijo ODN, polilizinov in TLR9 v celicah HEK293 smo potrdili z barvanjem različnih celičnih struktur ter samega TLR9.

7.4 Razgradnja poli-L-lizina v endosomih je ključna za sproščanje ODN in aktivacijo receptorja TLR9

Pokazali smo, da se ODN vežejo na pozitivni polilizin in kompleks vstopa v celico preko endocitoze. Ugotovili smo tudi, da je kompleks prisoten v endosomih, ki vsebujejo tudi TLR9. Iz literature je poznano, da je za aktivacijo TLR9 potreben ODN, ki se veže na TLR9. Pokazali smo, da ODN iz kompleksa ODN/PLL aktivira TLR9. Iz omenjenega lahko sklepamo, da je kompleks med poli-L-lizinom in ODN v endosomih razpadel, verjetno zaradi razgradnje polilizina z endosomalnimi proteazami.

Ugotovili smo tudi, da dodatek PLL nekoliko inhibira aktivacijo TLR9 z ODN. Dodatek poli-D-lizina ODN občutno inhibira aktivacijo TLR9.



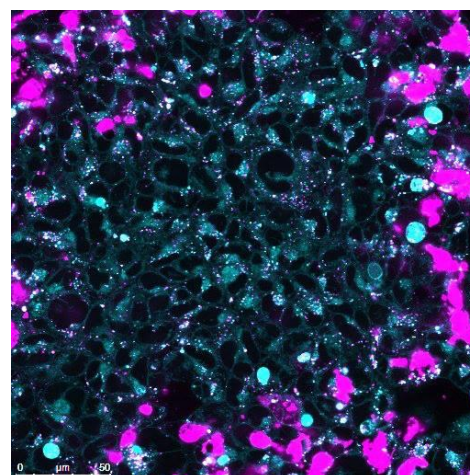
Graf 9: Prikaz grafa jakosti aktivacije pri celični liniji HEK293 (Avtor: J. Gojznikar)

7.5 Poli-D-lizin izboljša vstopanje ODN v celice in inhibira aktivacijo receptorja TLR9

Poli-D-lizin prav tako kot poli-L-lizin veže ODN in v celico vstopa na enak način kot kompleks poli-D-lizin/ODN. Iz rezultatov aktivacije receptorja TLR9 je razvidno, da ODN iz kompleksa PDL/ODN ne aktivira TLR9. Iz literature je poznano, da proteinaze ne razgrajujejo poli-D-lizina. Ker je poli-D-lizin odporen pred razgradnjo endosomalnih proteinaz, ODN ostane vezan v kompleksu in ni na voljo za aktivacijo receptorja TLR9. S tem smo potrdili tudi prejšnjo hipotezo, da je za aktivacijo receptorja potrebna razgradnja pozitivno nabitih proteinov.

7.6 Komentar o celični toksičnosti poli-L/D-lizina

Rezultati citometrije kažejo, da koncentracija poli-L/D-lizina, ki smo jo uporabljali med eksperimentom, sproža celično smrt, ni pa jasno razvidno, ali je PDL bolj toksičen kot PLL. Iz rezultatov internalizacije lahko le domnevamo, da PLL in PDL v kombinaciji z ODN in v večji koncentraciji povzročata celično smrt (slika 59).



Slika 59: Celična smrt. Velike vijolične lise so znanilke celične smrti – pojava, ki nas je spremljal pri celotnem eksperimentalnem delu. (Foto: N. Kežar)

8 Razprava: Problematika barvno slepih in s tem povezana predstavitev rezultatov znanstvenega dela

8.1 Barvna slepota

Barvna slepota (BS) je precej pogosta okvara vida in je navadno gensko pogojena. Zanj je značilna delna ali popolna nezmožnost zaznavanja barv zaradi okvare čepnic v očesu posameznika, ki trpi za BS.

Najpogostejša oblika delne BS je rdeče-zelena barvna slepota. Pojavlja se pri skoraj 8 % moških in 0.5 % žensk severnoevropskega izvora. Zanj je značilno, da prizadeti slabše zaznavajo rdeče-rumeno-zelena območje barvnega spektra. Delimo jo na protanopijo, pri kateri je poleg zaznavanja rdeče, rumene in oranžne barve občutneje prizadeta zaznava jakosti (ti bolniki posledično vse odtenke vijolične zaznajo kot modre), in devteranopijo, ki je zelo podobna protanopiji, le da prizadeti lahko zaznajo različno jakost odtenkov (torej ločujejo odtenke vijolične).

Precej redkejša oblika je modra barvna slepota (tritanopija), pri kateri prizadeti ne zaznavajo modro-vijoličnega spektra vidne svetlobe. Ti bolniki navadno nimajo težav z ločevanjem rdeče-zelenega dela spektra.

Najpopolnejša oblika BS pa je popolna barvna slepota, pri kateri prizadeti sploh ne zaznavajo barv.

8.2 Problemi pri prikazu rezultatov

8.2.1 Splošni problem percepcije

Barvam se je pri predstavitvi rezultatov znanstvenega dela skoraj nemogoče izogniti, potrebne so namreč za prikaz poudarjenih delov predstavitve in pomembne za jasnost teme. Lahko se uporabljajo tudi za prikaz različnosti posameznih elementov. Barve pa imajo tudi estetski vidik, saj barvitejša predstavitev bolj privlači opazovalca kot pa neobarvana.

Toda ker barvno slepi ljudje ne zaznajo dela barvnega spektra, je to lahko problematično pri prikazu znanstvenih rezultatov. BS lahko učinkuje na posameznikovo percepcijo prikazanega, sploh če je prikazani element obarvan tako, da barvno slepi ne vidi razlike med posameznimi obarvanimi deli. To lahko izrazito zmanjša razumevanje prikazanega in tudi interes posameznika, da bi se še naprej angažiral na področju predstavljenе tematike.

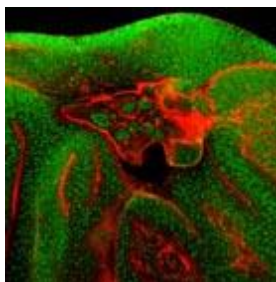
8.2.2 Rdeče-zelena in modra BS

Ker je najpogostejša rdeče-zelena BS, se bomo osredotočila bolj na to obliko. Težave pri obolelih s to obliko nastanejo, ko kombiniramo odtenke rdeče in zelene barve (npr. slika 60). Tako lahko napisi in grafi, ki jih zdravi posamezniki vidijo različno obarvane, za barvno slepe predstavljajo monotono paletto raznih odtenkov iste barve (tabela 15). Še huje je lahko s slikami (npr. obarvanimi celicami), ki prizadetim namesto jasno razločnih barv predstavljajo nerazločen zmazek iste barve z različno jakostjo (slika 61).

Podobno težavo predstavlja tudi modra BS, a je redkejša in variira samo na eno barvo (modro), zato ta ni tako izrazita.

Tabela 12: Prikaz različne obarvanosti napisov pri različno barvno slepih posameznikih

Normalen vid	Protanopija	Devteranopija	Tritanopija
XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX
XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX
XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX
XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX	XXXXXX



Slika 60: Tipičen fluorescenčni mikrograf (Slike 60–64 povzete po: <http://iflv.iam.u-tokvo.ac.jp/color/#stain.>)



Slika 61: Različno zaznavanje obarvanosti tipičnega fluorescenčnega mikrografa pri različno barvno slepih posameznikih

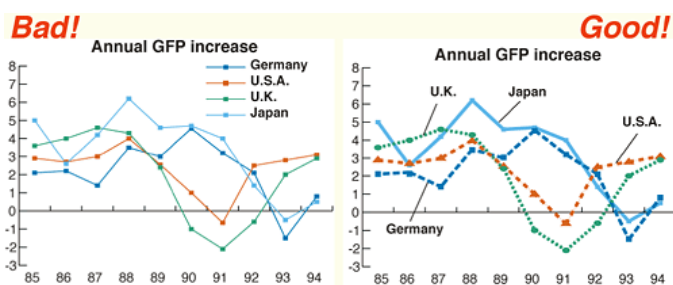
8.3 Predlogi za rešitev težav

8.3.1 Uporaba vzorcev za prikaz grafov in slik

Namesto uporabe barv za razločevanje različnih delov prikaza bi lahko uporabili različne vzorce.

Tako bi npr. grafi namesto neprekinjenih črt lahko upodabljali pikčaste, črtaste ali celo kombinirane vzorce. Namesto enakih točk na mestih spremembe smeri linije grafa bi lahko za različne linije uporabili različne like. Tako bi barvno slepi lažje sledili in razlikovali črte grafa (slika 62).

Slike bi prav tako lahko barvali z vzorci. Tako bi npr. uporabljali pike ali poševne črte. Da bi se izognili pojavu, ko vzorci motijo osnovni namen slike, pa bi jih v sliko vključili z vodnim tiskom (torej bi bili transparentni).

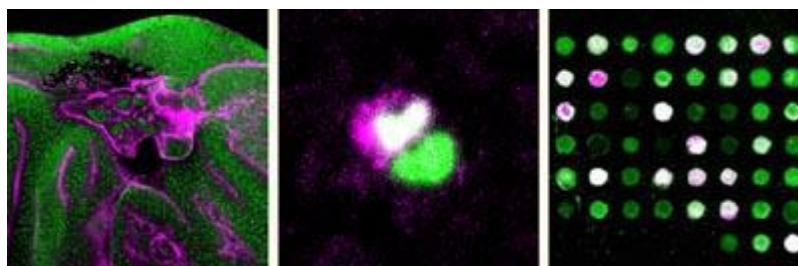


Slika 62: Primer dobrega in slabega grafa

8.3.2 Uporaba nadomestnih barv

Pri rdeče-zeleni BS se težavi ločevanja različnih barv lahko izognemo tako, da namesto rdeče za barvo uporabljamo magento (slika 63). Ta spekter barvno slepi zaznajo belo in ga brez težav ločijo od zelene. Isti princip bi lahko uporabili za zamenjavo zelene. Zanj ima podoben učinek turkizna barva.

Po končanem delu bi lahko slike predelali s programom *Photoshop*.



Slika 63: Primer mikrografa, obarvanega z magento

Z uporabo te ideje bi lahko nadomestili klasične rdeče, zelene in modre odtenke z barvami, ki bi jih barvno slepi lažje ločili. Te bi lahko nato tudi primerno kombinirali. Primeri so prikazani na spodnji preglednici (slika 64).

Original	Simulation			Hue	for Photoshop, Illustrator, for Word, Power Freehand, etc.		
	Protan	Deutan	Tritan		C,M,Y,K (%)	R,G,B (0-255)	R,G,B (%)
1	Black	Black	Black	0°	(0,0,0,100)	(0,0,0)	(0,0,0)
2	Orange	Orange	Orange	41°	(0,50,100,0)	(230,159,0)	(90,60,0)
3	Sky Blue	Sky Blue	Sky Blue	202°	(80,0,0,0)	(86,180,233)	(35,70,90)
4	bluish Green	bluish Green	bluish Green	164°	(97,0,75,0)	(0,158,115)	(0,60,50)
5	Yellow	Yellow	Yellow	56°	(10,5,90,0)	(240,228,66)	(95,90,25)
6	Blue	Blue	Blue	202°	(100,50,0,0)	(0,114,178)	(0,45,70)
7	Vermillion	Vermillion	Vermillion	27°	(0,80,100,0)	(213,94,0)	(80,40,0)
8	reddish Purple	reddish Purple	reddish Purple	326°	(10,70,0,0)	(204,121,167)	(80,60,70)

Slika 64: Preglednica primerov barv, ki jih barvno slepi lahko zaznajo

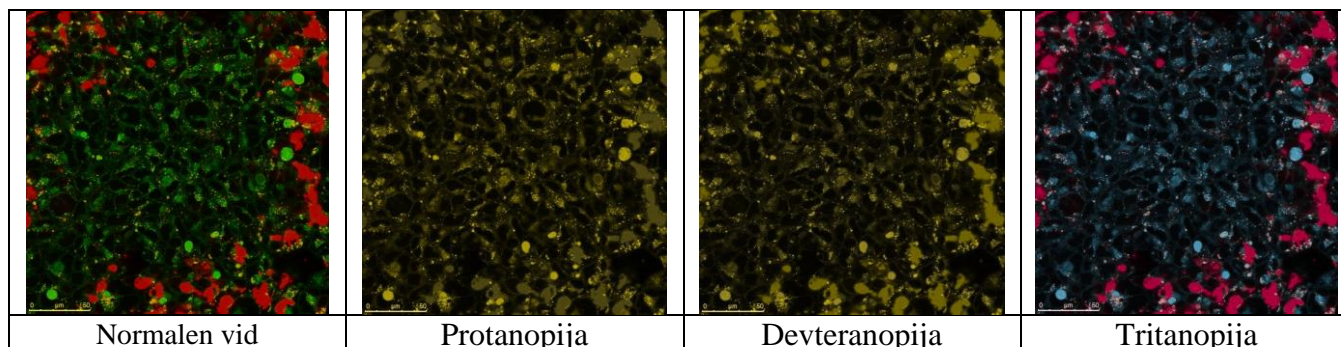
Še ena možna rešitev je uporaba barv različnih jakosti, saj lahko devteranopi zaznajo razlike v jakosti, čeprav ne ločijo rdeče in zelene. Kot nadgradnjo te ideje bi lahko uporabili le eno barvo različnih jakosti, kar bi omogočilo ljudem z BS lažjo prepoznavo slike.

8.3.3 Uporaba novih barvnih kombinacij

V svoji raziskovalni nalogi smo v skladu s problematiko bravno slepih uporabili novo barvno kombinacijo, ki bi omogočila dobro zaznavo kolokalizacije z znanstvenega stališča in tudi olajšala zaznavo barvno slepim.

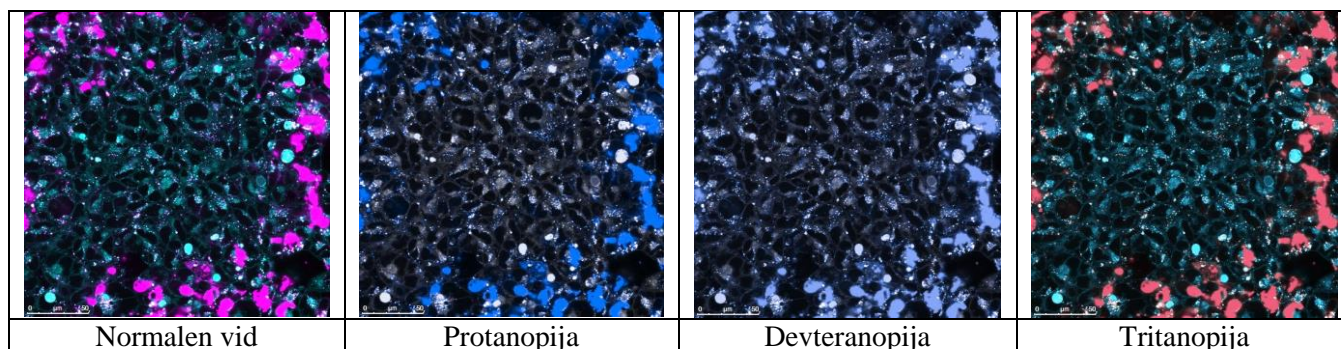
V tabeli 16 še enkrat vidimo našo avtorsko sliko, obarvano s standardno kombinacijo rdeče in zelene, ki pri zdravih ljudeh pokaže kolokalizacijo z izstopajočo rumeno. Vendar, razvidno iz podanih primerov, barvno slepi te razlike ne zaznajo (razen pri tritanopiji), zato ta kombinacija ni dobra izbira.

Tabela 13: Primeri vida barvno slepih rdeče-zelene barvne kombinacije



V tabeli 17 je primer naše avtorske slike z uporabo barvne kombinacije magente in sinje modre (cian). Pri vseh stanjih je kolokalizacija vidna v obliki bele barve, ki od svojega okolja zadosti izstopa za objektivno oceno.

Tabela 14: Primeri vida barvno slepih cian-magentne barvne kombinacije



8.3.4 Spremenjen način govorne predstavitve rezultatov

Ob sami predstavitvi bi se lahko govornik izogibal neposrednemu imenovanju prikazanih elementov samo po imenu, bi pa jih lahko tudi pokazal oz. poudaril območja, o katerih govori.

Težavo predstavljajo tudi zeleni in rdeči laserji, s katerimi se pogosto prikazujejo elementi, ki jih želimo poudariti. Namesto njih bi lahko uporabili kazalno palico ali pa kar roke, če je prikaz na primerni višini.

9 Zaključki

V raziskovalni nalogi smo potrdili, da pozitivno nabiti proteini, kot sta poli-D/L-lizin, izboljšajo prenos oligonukleotidov v celico. Prenos oligonukleotidov v celico je hitrejši, preprečuje razgradnjo oligonukleotidov z deoksiribonuklezami, kar podaljša življenjsko dobo enoverižne DNK v gostiteljskem organizmu in tako izboljša tudi učinkovitost aktivacije receptorja TLR9. Menimo, da bi bila metoda, ki vključuje pozitivno nabite proteine pri vnosu enoverižne DNK v celice, med drugim morda uporabna v medicini.

Spoznali smo tudi težavo prikaza rezultatov barvno slepim in predstavili nekaj rešitev, ki smo jih uporabili tudi v sami nalogi, da bi izboljšali njihovo percepcijo.

10 Viri in literatura

10.1 Viri besedila

- Voet D., Voet J. G. (2011) *Biochemistry*. Fourth Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc., Print.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J. et al. (2008) *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing, Inc., Print.
- Stušek P., Vilhar B. (2010) *Biologija celice in genetika*. Ljubljana: DZS.
- Kraševac N. et al. (2013) Skripta *Polenti raziskovalni tabor Sintezna biologija*. Ljubljana: Nova generacija raziskovalcev ved o življenju, Kemijski inštitut, str. 36–50.
- Albrecht M. (2010) *Color Blindness*. Nature Method, izdaja 7, št. 10, str. 775.
- Wong B. (2011) *Color Blindness*. Nature Methods, izdaja 8, št. 6: str. 441.
- http://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page (Dostop: 5. 6. 2013–17.11.2013.)
- <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/colorblindness.html> (Dostop: 10. 7. 2013.)
- <http://jfly.iam.u-tokyo.ac.jp/color/#stain> (Dostop: 10. 7. 2013.)

10.2 Viri slik

- Slike 1, 2, 3 (uporaba molekule DNK):
http://www.clipart.dk.co.uk/731/az/Future/DNA_molecule
(Dostop: 15. 11. 2013.)
- Slika 4:
<http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Immunostimulation.102349.0.html>
(Dostop: 15. 11. 2013.)
- Slika 7:
http://wpcontent.answcdn.com/wikipedia/commons/thumb/1/1a/Endocytosis_types.svg/400px-Endocytosis_types.svg.png
(Dostop: 27. 10. 2013.)
- Slika 8:
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/85/HeLa_cell_endocytic_pathway_labeled_for_EGFR_and_transferrin.jpg
(Dostop: 27. 10. 2013.)
- Slika 9:
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5a/Endocytic_pathway_of_animal_cells_showing_EGF_receptors,_transferrin_receptors_and_mannose-6-phosphate_receptors.jpg
(Dostop: 29. 10. 2013.)
- Slika 10:
<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biofiles/biofiles-volume-31/figure3.gif>
(Dostop: 22. 10. 2013.)
- Slika 12:
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/90/Cy3_Cy5_dyes.gif
(Dostop: 22. 10. 2013.)
- Slika 13:
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bc/Proteolytic_cleavage_of_a_Dual-GFP_fusion_FRET-pair.png
(Dostop: 15. 11. 2013.)
- Slika 16:
<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/15/Macrophage.jpg>
(Dostop: 24. 12. 2013.)

- Slika 17:
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/e5/Structure_of_bicinchoninic_acid.png/800px-Structure_of_bicinchoninic_acid.png
(Dostop: 17. 11. 2013.)
- Slika 18:
<http://signagen.com/images/VIPsTech.jpg>
(Dostop: 17. 11. 2013.)
- Slika 19:
<https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/prodImages/high/11668027%200.75ml.jpg>
(Dostop: 17. 11. 2013.)
- Slika 20:
<http://cnx.org/content/m34657/latest/image3b.jpg>
(Dostop: 17. 11. 2013.)
- Slika 21:
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5e/GPC_instrument.jpg
(Dostop: 17. 11. 2013.)
- Slika 22:
http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/de/Fluorimeter_diagram_en.svg
(Dostop: 17. 11. 2013.)
- Slika 23: http://img.directindustry.com/images_di/photo-g/spectrofluorometers-25366-5386797.jpg
(Dostop: 17. 11. 2013.)
- Slika 24: http://www.biotek.com/assets/tech_resources/141/lucifer_fig1.jpg
(Dostop: 17. 11. 2013.)
- Slika 26:
<http://wpcontent.answcdn.com/wikipedia/commons/thumb/3/3f/Cytometer.svg/500px-Cytometer.svg.png>
(Dostop: 17. 11. 2013.)
- Slika 28:
http://www.agrosaat.si/Pridelovanje_gensko_spremenjenih_rastlin,190,0.html
(Dostop: 15. 11. 2013.)
- Slika 29:
http://www.celprogen.com/index.php?route=product/product&path=26_44_46_60_67&product_id=1128
(Dostop: 15. 11. 2013.)
- Slika 30:
http://www.123rf.com/photo_3131933_scientist-using-blue-multi-channel-pipet-for-pipetting-a-96-well-plate-with-pink-solution-on-white.html
(Dostop: 15. 11. 2013.)
- Slika 31:
<http://mrsmeishimersblog.blogspot.com/2010/10/compounding-lip-balms.html>
(Dostop: 15. 11. 2013.)
- Slika 34:
http://www.biotek.com/products/microplate_detection/compare_luminescence.html
(Dostop: 8. 11. 2013.)
- Slika 37:
<https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/prodImages/high/11668500%2015ml.jpg>
(Dostop: 8. 11. 2013.)
- Slika 38:
<http://ibidi.com/xtproducts/en/ibidi-Labware/Open-Slides-Dishes:-ibidi-Standard-Bottom/m-Slide-8-well>
(Dostop: 9. 11. 2013.)
- Slika 40:
<http://reviews.productwiki.com/partec-cyflow-ml-space/>
(Dostop: 13. 11. 2013.)

- Slike 60, 61, 62, 63, 64:
<http://jfly.iam.u-tokyo.ac.jp/color/#stain>
(Dostop: 12. 6. 2013.)

11 Priloge

11.1 Protokoli

11.1.1 Protokol I: Redčenje gojišč celic HEK in precepljanje v 8-well škatlice

1.1 Kemikalije

- tripsin
- pufer PBS (0,137 M NaCl, 0,003 M Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,01 M KCl in 0,007 M KH₂PO₄)
- gojišče DMEM Glutamax + 10 % FBS (21885-025), Gibco
- 0.4 % Tripin Blue (T10282), Invitrogen

1.2 Laboratorijski pribor

- laminar
- avtomatska pipeta
- mikropipete
- dve 50 mL centrifugirki
- stojalo za centrifugirke
- sterilni nastavki za mikropipete
- čaša za odpadke
- mikroskopske škatlice (8-well)
- sterilna mikrocentrifugirka (epica)
- merilnik celične koncentracije Countess, Invitrogen
- fluorescenčni mikroskop Leica

1.3 Celične kulture

- gojitvena posoda T75 s kulturo HEK293T

1.4 Metode

a) Redčenje gojišč celic HEK

1. Najprej s 70-% etanolom obrišemo notranjo delovno površino laminarja.
2. Pred vnosom opreme v laminar vso opremo (razen gojišča) obrišemo s 70-% raztopino etanola. Šele potem jo lahko prenesemo.
3. Kulturo celic pred vnosom v laminar pregledamo pod mikroskopom.
4. DMEM + 10 % FBS s 25 mL pipeto prenesemo v prvo centrifugirko in jo označimo.
5. Z 10 mL pipeto iz T75 odstranimo medij v čašo za odpadke.
6. Celice v T75 speremo z 10 mL PBS. PBS nalijemo sprva na dno gojitvene posode T75, nato posodo nagibamo tako, da celice speremo s PBS. PBS nato odstranimo iz T75.
7. Dodamo 2 mL tripsina, T75 zapremo in inkubiramo 2 minuti pri sobni temperaturi.
8. Po 2 minutah dodamo 5-krat več založnega gojišča (DMEM + 10 % FBS), kot smo dodali tripsina. Notranjost T75 večkrat speremo z njeno vsebino.
9. Izpraznimo T75, njeno vsebino pa odpipetiramo v drugo centrifugirko in jo označimo.
10. Iz centrifugirke odvzamemo 10 µL celične suspenzije in jo odpipetiramo v mikrocentrifugirko. Nato ji dodamo 10 µL tripana.
11. Pregledamo, ali je merilnik nastavljen na primeren protokol štetja. V testno posodico dodamo 10 µL vzorca iz mikrocentrifugirke in zaženemo merilnik.

12. Ko merilnik prešteje število mrtvih in število živih celic, izračunamo, koliko suspenzije bomo dodali nazaj v T75, da dosežemo optimalno gostoto živih celic (ta za T75 znaša $7,5 \times 10^5$ celic/mL). V celoti bo v T75 12 mL tekočine.
13. Ko smo izračunali količino suspenzije, jo odpipetiramo v T75. Ostali potrebni volumen do 12 mL zapolnimo z gojiščem DMEM.
14. Po končanem delu vso opremo očistimo s 70 % raztopino etanola, odpadke primerno razvrstimo in zavržemo ter postavimo pripravljeno gojišče v T75 v inkubator na 37 °C. Neporabljene celice v centrifugirki zavržemo. Ko smo povsem zaključili z delom, obrišemo z alkoholom tudi delovno površino laminarja.

b) Precepljanje celic HEK iz gojišča v mikroskopske škatlice⁴

1. Kamrice primerno označimo. V vsako kamrico gre 200 μ L. Njihova optimalna gostota je 8×10^4 celic na kamrico oz. 4×10^5 celic na mL.
2. Glede na to, kolikšno koncentracijo celic ima suspenzija, preračunamo, koliko jo bomo dodali v kamrico, da jo lahko potem do meje 200 μ L razredčimo z gojiščem DMEM.
3. Ko smo izračunali količino, suspenzijo odpipetiramo v kamrice. Nato jim dodamo DMEM do skupne količine 200 μ L.
4. Kamrice inkubiramo pri 37 °C.

⁴ Postopek izvedemo pred zaključkom (13. korakom) redčenja gojišč.

11.1.2 Protokol II: Priprava označenih polilizinov

2.1 Kemikalije

- poli-L-lizin (P2636), Sigma-Aldrich
- poli-D-lizin (P7886), Sigma-Aldrich
- barvilo Cy5 (Q15008), GE Health Care
- N,N-dimetilacetamid, Merck
- *coupling* pufer (1M NaCO₃), GE Health Care
- pufer PBS (0,137 M NaCl, 0,003 M Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,01 M KCl in 0,007 M KH₂PO₄)

2.2 Laboratorijski pribor

- dve sterilni mikrocentrifugirki (epici)
- sterilna petrijevka
- pinceta
- analizna tehtnica
- mikropipete
- sterilni nastavki za mikropipete
- vibracijsko mešalo (vorteks)

2.3 Metode

a) Tehtanje polilizinov

1. Pred vstopom v tehtalni prostor si nadenemo laboratorijsko haljo in rokavice.
2. Za pomoč pri tehtanju si pripravimo petrijevko in pinceto (struktura polilizinov je podobna žvečilnemu dražejju).
3. Sterilne mikrocentrifugirke za tehtanje predhodno ustrezno označimo.
4. Prižgemo tehtnico in jo nastavimo na območje z delovanjem do 30 g.
5. Na petrijevko prenesemo majhne kosmiče polilizinov (vsakega posebej).
6. V tehtnico položimo mikrocentrifugirke in tehtnico zapremo ter tariramo.
7. V mikrocentrifugirke vnesemo majhne kosmiče polilizinov. Zelena količina polilizina je v območju 5–10 mg, končna koncentracija raztopine polilizina pa mora biti 5 mg/mL. Glede na količino tehtanega polilizina izračunamo točen volumen pufru PBS, ki ga bomo dodali kasneje.
8. Tehtnico po potrebi očistimo, zapremo in ugasnemo.

b) Priprava raztopine barvila Cy5 s tarčnim proteinom

1. V ustrezno označene mikrocentrifugirke (PDL/PLL) dodamo izračunane volumne pufru PBS in vsebino premešamo s stresanjem do popolne raztopitve proteina.
2. 1 mL raztopine proteina sterilno prepipetiramo v *coupling* pufer, priložen v kitu za označevanje, in mikrocentrifugirke ponovno ustrezno označimo ter pretresemo.
3. Celotno mešanico pridobljenih polilizinov, PBS in *coupling* pufru sterilno s pipeto prepipetiramo v mikrocentrifugirko z barvilom (saj je v tem primeru barvilo v trdni obliki) in jo ustrezno označimo.
4. S pomočjo pipetiranja s sten epice spraskamo barvilo in skupke barvila razbijemo na manjše skupke.
5. Za nadaljnje mešanje uporabimo vibracijsko mešalo. Ker je barvilo Cy5 v vodi slabše topno, v mešanico dodamo še 20 µL N,N-dimetilacetamida in nadaljujemo z mešanjem.
6. Celotno mešanico zapremo v škatlico (preprečitev dostopa svetlobe) in čez noč pustimo, da pride do vezave barvila naaminske skupine polilizinov.

11.1.3 Protokol III: Kromatografija obarvanih proteinov in merjenje absorbance

3.1 Kemikalije

- pripravljena mešanica obarvanega proteina poli-L-lizina (PLL) in barvila Cy5
- pripravljena mešanica obarvanega proteina poli-D-lizina (PDL) in barvila Cy5
- elucijski pufer (PBS + 0.1 % NaN_3), GE Health Care
- pufer PBS (mešanica 0,137 M NaCl, 0,003 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01 M KCl in 0,007 M KH_2PO_4)
- 70 % etanol

3.2 Laboratorijski pribor

- 12 sterilnih mikrocentrifugirk (epic)
- mikropipete
- sterilni nastavki za mikropipete
- kolona
- 50 mL centrifugirka (falkonka), Falcon
- stojalo za falkonko
- kovinsko držalo za kolono
- stojalo za mikrocentrifugirke
- označevalec
- spektrofotometer ND-1000, NanoDrop
- računalnik
- čistilni robčki za čiščenje optičnih naprav Linsenpapier, Assistent

3.3 Metode

a) Izolacija PLL/PDL (Postopek za oba je enak.)

1. Na stojalo za kolono nastavimo kolono iz kita z barvilom Cy5 (GE Health Care). Pod njo si pripravimo stojalo s centrifugirko in stojalo s sterilnimi mikrocentrifugirkami.
2. Iz kolone spustimo topilo, v katerem je polnilo kolone shranjeno. Počakamo, da se povsem odteče, in nato kolono dvakrat speremo s 15 mL PBS. Ko se tekočina iztoči, zamenjamo falkonko z mikrocentrifugirkami in jih ustrezno označimo.
3. Na kolono nanese vzorec in počakamo, da vstopi v nosilec. Nato vzorec eluiramo z dodatkom 8–9 mL pufru PBS.
4. Tekočino iz kolone začnemo prestrezati v 6 označenih sterilnih mikrocentrifugirk. V začetno in končno mikrocentrifugirko lovimo 2 mL tekočine, v vmesne pa 1 mL.
5. Ko se iz kolone eluira vse barvilo, umaknemo mikrocentrifugirke in podstavimo centrifugirko. Kolono nato štirikrat speremo s 15 mL PBS. Centrifugirko vmes po potrebi izpraznimo.
6. Na kolono namestimo spodnji zamašek, vanjo nalijemo elucijski pufer do roba in zapremo pokrovček. Mikrocentrifugirke z vzorci postavimo v hladilnik.

b) Merjene absorbance

1. Vključimo računalnik in spektrofotometer NanoDrop. V programu *ND-1000* izberemo *Proteins & Labels*.
2. Očistimo čitalnik s 70 % etanolom in nanj odpipetiramo 2 μL pufru PBS. V programu zaženemo opcijo *Blank*.
3. Z robčkom obrišemo čitalnik in nanese 2 μL vzorca. V programu zaženemo *Measure* in počakamo, da računalnik izriše graf. Ta postopek ponovimo glede na število vzorcev.
4. Ko zaključimo z delom, očistimo spektrofotometer in izključimo računalnik.

11.1.4 Protokol IV: Umeritvena krivulja za proteine in merjenje absorbance

4.1 Kemikalije

- MQ (destilirana voda)
- goveji serumski albumin (2 mg/mL, 0.9 % NaCl, 0.05 % NaN₃), Sigma-Aldrich
- BCA-reagent A (NaHCO₃, bicinkonininska kislina in natrijev tartrat v 0,1 M NaOH), Sigma-Aldrich
- BCA-reagent B (4 % CuSO₄), Sigma-Aldrich
- pripravljena vzorca poli-L-lizina (PLL4, PLL3)
- pripravljena vzorca poli-D-lizina (PDL4, PDL3)

4.2 Laboratorijski pribor

- sterilne mikrocentrifugirke
- stojalo za mikrocentrifugirke
- mikropipete
- sterilni nastavki za mikropipete
- mikrotitrna plošča (96-well)
- spektrofotometer SynnergyMX, BioTec
- računalnik

4.3 Metode

a) Reakcija BCA

1. Najprej napravimo standarde, ki jih bomo uporabili za umeritveno krivuljo. V 9 mikrocentrifugirkah po navodilu proizvajalca z MQ razredčimo albuminski standard.
2. Vsak vzorec PDL/PLL razredčimo z MQ v svoji mikrocentrifugirki v razmerju 1 + 1 (1 del vzorca + 1 del MQ), 1 + 3 (1 del vzorca + 3 deli MQ) in 1 + 7 (1 del vzorca + 7 delov MQ). Tako dobimo za vsak vzorec 3 redčitve.
3. Po formuli ((#standardov + #vzorcev) x (#ponovitev) x (volumen delovnega reagenta na vzorec (200 µL))) izračunamo količino potrebnega delovnega reagenta, ki ga dobimo iz reagenta A in reagenta B. Glede na volumen potrebnega delovnega reagenta potem zmešamo reagent A z reagentom B v razmerju 49 + 1.
4. V vrstico A mikrotitrne plošče dodamo v luknjice po 20 µL vseh 9 standardov in 3 negativne kontrole (MQ). V ostale luknjice po predhodno pripravljenem vzorcu (primer: shema 1) porazdelimo redčitve vzorcev.
5. Vsem luknjicam s standardi in vzorci dodamo 200 µL delovnega reagenta.
6. Ploščo inkubiramo 30 minut pri 37 °C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	S	T	A	N	D	A	R	D	I	P	B	S		
B	P	L	3	P	L	4	P	D	L	3	P	D	L	4

Shema 1: Razporeditev vzorcev na mikrotitrski plošči

b) Merjenje absorbance

1. Zaženemo računalnik in spektrofotometer.
2. V programu *Gen5* ustvarimo protokol za reakcijo BCA.
3. V spektrofotometer vstavimo mikrotitrsko ploščo s svojimi vzorci BCA.
4. Zaženemo meritev.
5. Iz dobljenih rezultatov standardov, ki smo jim odšteli vrednosti negativnih kontrol, izrišemo umeritveno krivuljo in izračunamo naklon.
6. Iz umeritvene krivulje preračunamo koncentracije proteina v vzorcu in pri tem upoštevamo redčitve.

11.1.5 Protokol V: Merjenje fluorescence

5.1 Kemikalije

- raztopina obarvanega poli-D-lizina (PDL3)
- raztopina obarvanega poli-L-lizina (PLL3)
- pufer PBS (mešanica 0,137 M NaCl, 0,003 M Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,01 M KCl in 0,007 M KH₂PO₄)
- 70 % etanol
- destilirana voda

5.2 Laboratorijski pribor

- mikropipete
- sterilni nastavki za mikropipete
- kiveta (10 mm x 2 mm), Hellma Analytics
- fluorometer Luminescence spektrometer LS55, Perkinelmer
- računalnik
- vakuumsko napravo za čiščenje kivet

5.3 Metode

1. Vključimo računalnik in fluorometer.
2. Na fluorometru zaženemo program *Fl-WinLab* in vpišemo podatke za meritev. Valovna dolžina vzburjanja je 646 nm pri 10 nm reži za oba vzorca. Emisijo svetlobe spremljamo pri valovni dolžini od 650 do 750 pri 5 nm reži za PLL in 10 nm reži za PDL.
3. V kiveto napipetiramo 100 µL vzorca in nato 200 µL PBS.
4. Kiveto z vzorcem vstavimo v fluorometer in zaženemo meritev.
5. Po končani meritvi vzorec shranimo.
6. Kiveto očistimo z etanolom in vodo, pri tem si pomagamo s posebno napravo za čiščenje kivet.

11.1.6 Protokol VI: Proteazna cepitev poli-D/L-lizinov s proteinazo K

6.1 Kemikalije

- raztopina s Cy5 označenega poli-D-lizina (PDL3)
- raztopina s Cy5 označenega poli-L-lizina (PLL3)
- pufer PBS (mešanica 0,137 M NaCl, 0,003 M Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,01 M KCl in 0,007 M KH₂PO₄)
- proteinaza K (P-2308), Sigma-Aldrich

6.2 Laboratorijski pribor

- črna mikrotitrna plošča (96-well)
- sterilni nastavki za mikropipete
- mikropipete
- spektrofotometer SynnergyMX, BioTec
- računalnik
- sterilna mikrocentrifugirka
- analitska tehtnica
- spatula
- označevalec

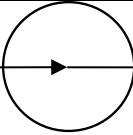
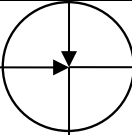
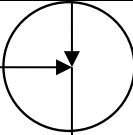
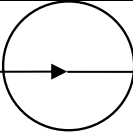
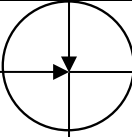
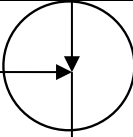
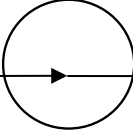
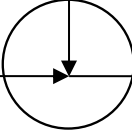
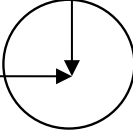
6.3 Metode

a) Priprava mikrotitrne plošče

1. Sterilno mikrocentrifugirko vstavimo v analitsko tehtnico in jo tariramo. Vanjo nato s spatulo prenesemo najmanjšo količino proteinaze K in jo stehamo.
2. Iz zatehte proteinaze K in želene koncentracije raztopine (20 µg/mL) izračunamo volumen PBS, ki ga moramo dodati zatehti.
3. Proteinazo K raztopimo v pufru PBS. Pripravimo raztopino s koncentracijo 20 µg/mL.
4. Na mikrotitrno ploščo v kamrice A1–A3 nanesemo po 90 µL PLL. Enako storimo z B1–B3, le da nanesemo PDL, in s C1–C3, v katere nanesemo le PBS.

b) Merjenje fluorescenčnosti

1. Zaženemo računalnik in spektrofotometer. V programu *Gen5* sestavimo najprej protokol za merjenje fluorescence. Valovna dolžina svetlobe vzburjanja je 645 nm (na 9 nm reži), oddano svetlobo pa spremljamo pri valovni dolžini 675 nm (na 9 nm reži).
2. Pred vnosom proteinaze K naredimo *blank* meritev. Mikrotitrno ploščo prenesemo v stroj in zaženemo meritev.
3. Napišemo nov protokol za kinetiko. Vzorce želimo analizirati 1 uro s frekvenco odčitavanja 5 minut.
4. Poskusno zaženemo meritev za 10 minut, da se prepričamo, ali protokol deluje.
5. Na mikrotitrno ploščo nanesemo raztopino proteinaze K. V vrstico 2 (A2, B2 in C2) nanesemo 10 µL, v vrstico 3 (A3, B3 in C3) pa 1 µL (shema 1). Da se izognemo pipetiranju tako majhnih volumnov, lahko namesto 1 µL odpipetiramo 10 µL naknadno razredčene proteinaze K, ki smo jo pripravili tako, da smo iz založne raztopine vzeli 10 µL proteinaze K in ji dodali 90 µL PBS.
6. Mikrotitrno ploščo vstavimo nazaj v spektrofotometer in odpremo protokol za kinetiko. Zaženemo meritev za 1 uro.
7. Po končani meritvi mikrotitrno ploščo odstranimo iz spektrofotometra in jo shranimo. Spektrofotometer in računalnik ugasnemo.

/	10 μ L proteinaze K	1 μ L proteinaze K	
90 μ L PLL			
90 μ L PDL			
90 μ L PBS			

Shema 1: Nanos vzorcev in proteinaze K

11.1.7 Protokol VII: Mikroskopiranje

7.1 Kemikalije

- raztopina s Cy5 označenega poli-D-lizina (PDL4)
- raztopina s Cy5 označenega poli-L-lizina (PLL4)
- Dextran Oregon Green 514 (D7176), Invitrogen
- DQ Ovalbumin (D12053), Invitrogen
- pufer PBS (mešanica 0,137 M NaCl, 0,003 M Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,01 M KCl in 0,007 M KH₂PO₄)
- ODN10104, označen s Cy3 (0,5 mM)
- barvilo za označevanje endoplazemskega retikuluma, ER Tracker Red (E12353), Invitrogen
- barvilo za označevanje lizosomov, LysoTracker Red DND-99 (L7528), Invitrogen
- barvilo za označevanje celičnih membran, Synapto Red C2 (70027), Biotium
- barvilo za označevanje jedrnih nukleinskih kislin, Syto 80 Orange (S11361), Invitrogen

7.2 Laboratorijski pribor

- sterilni nastavki za mikropipete
- mikropipete
- fluorescenčni laserski mikroskop Leica TCS SP5, Leica Microsystems
- računalnik

7.3 Celične kulture

- mikroskopične plošče (8-well) z nacepljeno kulturo HEK293T

7.3 Metode

a) Barvanje celičnih kultur z barviloma Dextran Oregon Green in DQ Ovalbumin

1. Plošče predhodno pocepimo s celično kulturo HEK293T (4×10^5 celic/mL /glej *Protokol I*) in jih inkubiramo 24 ur pri 37 °C in 5 % CO₂.
2. V posamezne luknjice dodamo 20 ali 2 μL PDL/PLL (shema 1).
3. V luknjice brez PLL in PDL dodamo 10 μL Dextran OG in DQ Ovalbumin.
4. Inkubiramo čez noč pri 37 °C in 5.0 % CO₂.

20 μL PLL4	20 μL PLL 4		10 μL Dextran Oregon Green
20 μL PDL 4	20 μL PDL 4		10 μL DQ Ovalbumin

Shema 1: Primer razporeditve vzorcev

b) Barvanje celičnih kultur z LysoTracker Red in ER Tracker Red

1. Plošče (8-well) pocepimo s celicami HEK293T. Nato plošče inkubiramo 24 ur.
2. Delovne koncentracije barvil pripravimo z redčenjem založne koncentracije s pufrom PBS.
3. ODN ustrezno razredčimo z izračunano količino potrebnega sterilnega pufru PBS.
4. V 4 luknjice (v 2 PLL in v 2 PDL) vnesemo 10 μL ODN.
5. Škatlico pustimo čez noč v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂.
6. Po navodilih proizvajalca izračunamo, s koliko PBS bomo razredčili barvili, da dosežemo želeno delovno koncentracijo (50 μM).
7. Barvili ustrezno razredčimo s PBS.
8. V vsako luknjico s PLL in eno s PDL brez ODN dodamo po 20 μL barvil LysoTracker in ER Tracker (shema 2).

9. Mikroskopično škatlico si ogledamo pod mikroskopom.

5 μ L PLL + 10 μ L ODN	5 μ L PLL + 10 μ L ODN	5 μ L PLL + 20 μ L Lysotracker	5 μ L PLL + 20 μ L ER Tracker
5 μ L PDL + 10 μ L ODN	5 μ L PDL + 10 μ L ODN	5 μ L PLL + 20 μ L Lysotracker	5 μ L PDL + 20 μ L ER Tracker

Shema 2: Primer mikroskopične škatlice za označevanje z ER Tracker Red in Lysotracker Red DND-99

c) Barvanje celičnih kultur s Syto 80 in Synapto Red (shema 2)

1. Ponovimo postopek iz 1., 2. in 5. točke protokola za barvanje z Lysotracker Red in ER Tracker Red.
2. Zelena delovna koncentracija barvil je 50 μ M. Preračunamo, s kolikšno količino PBS bo treba razredčiti barvili, da jo dosežemo.
3. Barvili razredčimo z izračunano koncentracijo sterilnega PBS.
4. 10 μ L barvil dodamo v luknjice po predhodno pripravljenem vzorcu (shema 3).
5. Škatlico z označenimi vzorci si ogledamo pod mikroskopom.

5 μ L PLL + 10 μ L Synapto Red	5 μ L PLL + 10 μ L Syto 80 Orange	5 μ L PLL	5 μ L PLL
5 μ L PDL + 10 μ L Synapto Red	5 μ L PDL + 10 μ L Syto 80 Orange	5 μ L PDL	5 μ L PDL

Shema 3: Primer mikroskopične škatlice s celicami, ki smo jih barvali s Synapto Red C2 in Syto 80 Orange

d) Mikroskopiranje

1. Prižgemo mikroskop in računalnik po navodilih proizvajalca.
2. Prižgemo laserje (405 nm diodni laser, 488 nm laser Multi-ion ARGON, 543 nm in 633 nm helij-neonov laser).
3. Na mizico mikroskopa položimo mikroskopsko ploščo.
4. V programu *LAS AF* izberemo objektiv in nastavimo mikroskop za opazovanje posameznega vzorca.
5. Ko smo uredili vse želene parametre, začnemo z meritvijo. Po končani uporabi ugasnemo mikroskop in računalnik ter umaknemo mikroskopično škatlico izpod objektiva.

11.1.8 Protokol VIII: Lipofektaminska transfekcija TLR9

8.1 Kemikalije

- plazmid z genom za TLR9
- plazmid z genom za luciferazo kresničk (Fluc)
- plazmid z genom za renilino luciferazo (Rluc)
- plazmid UnC93B1
- vektor pcDNA3
- pufer PBS (mešanica 0,137 M NaCl, 0,003 M Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,01 M KCl in 0,007 M KH₂PO₄)
- Lipofektamin 2000, Invitrogen
- gojišče Opti-MEM (11058-021), Invitrogen

8.2 Laboratorijski pribor

- sterilni nastavki za mikropipete
- multikanalna mikropipeta
- mikropipete
- mikrotitrne plošče (96-well)
- sterilne mikrocentrifugirke
- stojalo za mikrocentrifugirke
- 15 mL centrifugirke, Falcon
- stojalo za centrifugirke
- spektrofotometer ND-1000, NanoDrop
- računalnik
- čistilni robčki za čiščenje optičnih naprav Linsenpapier, Assistent
- vibracijsko mešalo (vorteks), tehtnica
- označevalec
- laminar
- čaša za odpadke

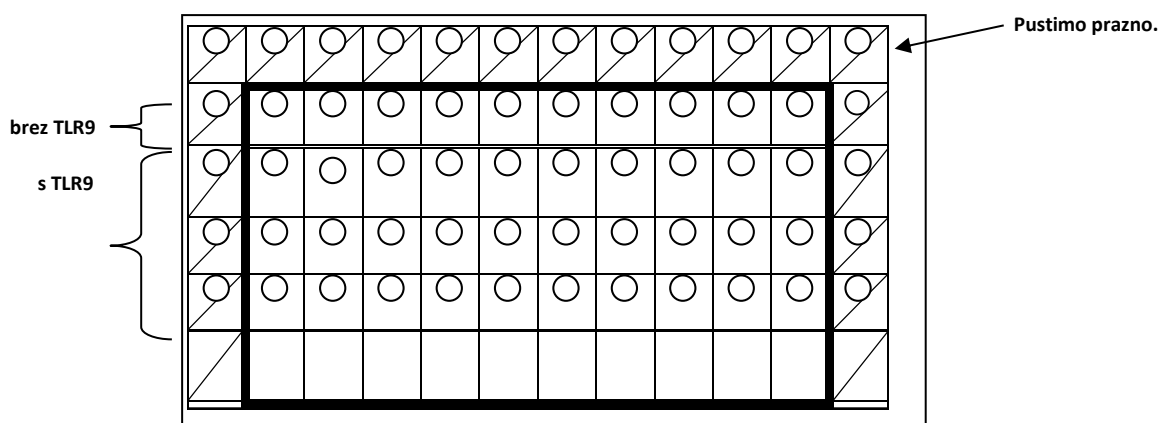
8.3 Celične kulture

- gojilna posoda T75 s celično kulturo HEK293T
- gojilna posoda T75 s celično kulturo HEK293

8.4 Metode

a) Priprava vzorcev in načrtovanje transfekcije

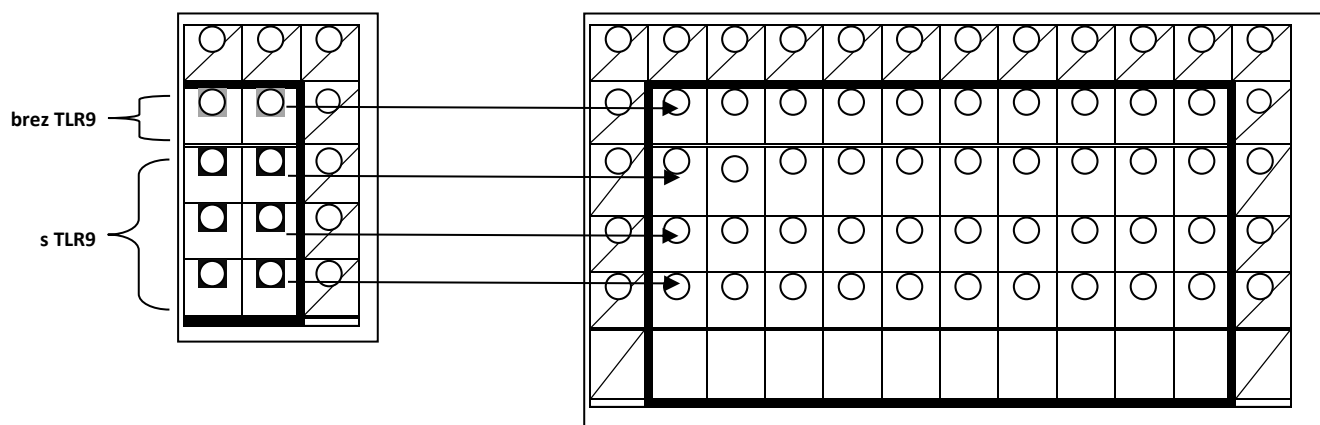
1. Na spektrofotometru ND-1000 izmerimo koncentracije plazmidnih molekul DNK TLR9, Fluc, UnC in Rluc. Koncentracija pcDNA3 je 0.1 mg/mL.
2. Iz koncentracij plazmidov preračunamo potrebne količine plazmidov za transfekcijo celic, nacepljenih na mikrotitrskih ploščah. Vrednosti vnesemo v program, ki nam izračuna volumne raztopin plazmidov, transfekcijskega reagenta lipofektamina in gojišča Opti-MEM, potrebne za transferacijo.
3. Ko nam program izračuna potrebne količine, jih odpipetiramo v mikrocentrifugirke, označimo in zmešamo z vibracijskim mešalom. Vzorce nato čez noč postavimo v hladilnik.
4. V prvo mikrotitrsko ploščo nacepimo kulturo HEK293T, v drugo pa HEK293 in ju inkubiramo čez noč na 37 °C in 5 % CO₂. Za lažjo predstavbo si za mikrotitrski plošči izrišemo razporeditev vzorcev (shema 1).



Shema 1: Razporeditev transfekcijskih vzorcev

b) Transfekcija mikrotitrskih plošč

1. Iz hladilnika vzamemo vzorce. Iz inkubatorja vzamemo mikrotitrski plošči in preverimo, ali so celice prerasle 70 % površine. Oboje prenesemo v laminar.
2. Pripravimo mešanico lipofektamina v gojišču Opti-MEM in mešanico plazmidne DNK v istem mediju po predhodnem izračunu za serijo s TLR9. Tako razredčenemu lipofektaminu dodamo mešanico plazmida v gojišču Opti-MEM, previdno premešamo in inkubiramo 5 minut.
3. Serijo brez TLR9 naredimo enako, le da upoštevamo izračune za to serijo. Tukaj zaradi manjših količin ne potrebujemo centrifugirke.
4. V prazno mikrotitrsko ploščo nanesemo v prva dva stolpca po 300 μ L mešanic lipofektamina in plazmidne DNK v gojišču Opti-MEM po predhodno pripravljeni shemi. To nam bo prišlo prav za lažje odmerjanje vzorcev.
5. Z multikanalno mikropipeto odpipetiramo 50 μ L mešanice lipofektamina in plazmidne DNK ter jih prenesemo po predhodno pripravljeni shemi v luknjice s celicami (shema 2).
6. Mikrotitrski plošči s celicami nato prestavimo nazaj v inkubator in pospravimo za sabo.



Shema 2: Prenos vzorcev z multikanalno pipeto

11.1.9 Protokol IX: Aktivacija transfekciranih celic in merjenje luminescence

9.1 Kemikalije

- ODN10104, označen s Cy3 (0,5 mM)
- goveji serumski albumin BSA (A2153), Sigma-Aldrich, 2mg/mL
- izhodiščna raztopina PLL (5 mg/mL)
- izhodiščna raztopina PDL (5 mg/mL)
- dekstran 10mg/mL
- pufer PBS (mešanica 0,137 M NaCl, 0,003 M Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,01 M KCl in 0,007 M KH₂PO₄)
- CoA
- DTT
- ATP
- luciferazni pufer
- dimetil sulfoksid (DSMO)
- metanol
- luciferin
- coelentrazin
- MQ (destilirana voda)

9.2 Laboratorijski pribor

- mikropipete
- multikanalna mikropipeta
- sterilni nastavki za mikropipete
- mikrocentrifugirke
- stojalo za mikrocentrifugirke
- 15 mL centrifugirke
- 50 mL centrifugirke
- stojalo za centrifugirke
- luminometer Orion 2, Berthold
- računalnik

9.3 Celične kulture

- mikrotitrna plošča (96-well) z nacepljeno transfekciranu kulturo HEK293
- mikrotitrna plošča (96-well) z nacepljeno transfekciranu kulturo HEK293T

9.4 Metode

a) Priprava raztopin za aktivacijo

1. Iz poznanih koncentracij založnih spojin (ODN 10104, BSA, PLL, PDL in dekstran) preračunamo, kolikšna bo končna količina potrebnih reagentov.
2. Podatke vnesemo v računalniški program, da nam izračuna volumne založnih koncentracij, ki jih je treba dodati za pripravo ustrezne redčitve. Pri tem upošteva število paralelnih eksperimentov.
3. Izračunane količine razredčimo s pufrom PBS (ODN 500-krat, BSA 2-krat, PLL/PDL 5-krat, dekstran 10-krat).
4. Ko smo končali s pripravo raztopin, si izrišemo načrt, kako bomo razporedili vzorce na mikrotitrski plošči (slika 1).

b) Aktivacija transfekciranih celic na mikrotitrskih ploščah

1. Mikrotitrsko ploščo s celicami, ki smo jih transeficirali s plazmidi (*Protokol VIII*), vzamemo iz inkubatorja in preverimo, ali so celice prerasle površino.
2. V prazno sterilno ploščo odpipetiramo reagente po predhodno pripravljeni shemi.
3. Z multikanalno pipeto prenesemo reagente v luknjice mikrotitrskе plošče s celicami po predhodno pripravljeni shemi.
4. Plošči inkubiramo čez noč pri 37 °C in 5 % CO₂.

c) Merjenje luminescence

1. Za merjenje aktivnosti kresničkine luciferaze pripravimo dve mešanici CoA, DTT, ATP in poseben pufer v 15 mL centrifugirki, zredčimo na 13 mL s PBS, prenesemo v 50 mL centrifugirko in dodamo v 100 µL dimetil sulfoksida raztopljeni luciferin.
2. Za merjenje aktivnosti reniline luciferaze v dve mešanici zmešamo predhodno pripravljene reagente iz 15 mL centrifugirki v 50 mL in dodamo v 100 µL metanola raztopljen coelentrazin.
3. Vključimo luminometer in računalnik.
4. Zaženemo program *Simplicity*.
5. Nastavimo protokol in speremo injektorje ter šobe z vodo.
6. Na prvi injektor namestimo kresničkino luciferazo, na tretji pa renilino. V aparat vstavimo mikrotitrsko ploščo.
7. Zaženemo protokol in počakamo, da se zaključi.
8. Ko se protokol zaključi, zamenjamo mikrotitrsko ploščo in ponovno zaženemo protokol.
9. Po končanih meritvah speremo injektorje z MQ + DSMO, MQ in etanolom ter izklopimo napravo.

11.1.10 Protokol X: Cepljenje celičnih kultur na mikrotitrne plošče (24-well)

10.1 Kemikalije

- gojišče RPMI 1640-Glutamax (61870-010) + 10 % FBS, Invitrogen
- tripsin
- pufer PBS (0,137 M NaCl, 0,003 M Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,01 M KCl in 0,007 M KH₂PO₄)
- gojišče DMEM GlutaMax (21885-025) + 10 % FBS, Invitrogen
- 0.4 % Tripan Blue (T10282), Invitrogen

10.2 Laboratorijski pribor

- mikropipete
- sterilni nastavki za mikropipete
- 50 ml falkonke
- 15 ml falkonke
- avtomatska pipeta – stojalo za centrifugirke
- laminar
- mikrotitrne plošče, 24-well
- merilnik koncentracije celic Countess, Invivogen
- strgalo

10.3 Celične kulture

- gojitvena posoda T75 s celično kulturo HEK293T
- gojitvena posoda T75 s celično kulturo makrofagov MonoMac6

10.4 Metode

a) Cepljenje kulture celic HEK293T

1. Iz T75 odpipetiramo gojišče in dodamo 10 mL PBS.
2. Celice speremo in odpipetiramo PBS.
3. Dodamo 2 µL tripsina in inkubiramo 5 minut.
4. Dodamo 10 µL gojišča DMEM.
5. Izpraznimo T75 v centrifugirko.
6. Vzamemo 10 µL celic in dodamo 10 µL tripana. Raztopino celic s tripanom damo na ploščo, ki je namenjena štetju celic z aparaturo Countess.
7. Ko smo celice prešteli, preračunamo, kako jih bo treba razredčiti, da dosežemo optimalno gostoto (4×10^5 celic/mL) za mikrotitrne plošče (24-well).
8. Raztopino s celicami ustrezno razredčimo.
9. V vsako luknjico na mikrotitrski plošči dodamo po 500 µL razredčenih celic.
10. Ploščo inkubiramo pri 37 °C in 5 % CO₂.

b) Cepljenje kulture makrofagov MM6

1. Iz T75 odpipetiramo gojišče in dodamo 10 mL PBS.
2. Celice speremo in odstranimo PBS.
3. Dodamo 2 mL gojišča RPMI 1640.
4. Vzamemo strgalo in dobro zdrgnemo površino s celicami v T75, da jih resuspenziramo.
5. Ko smo resuspenzirali večino celic, jih odpipetiramo v 50 mL centrifugirko.
6. Vzamemo 10 µL celic in dodamo 10 µL tripana. Raztopino celic s tripanom damo na ploščo, ki je namenjena štetju celic z aparaturo Countess.
7. Ponovimo postopek iz odseka a, točke 2–5.

11.1.11 Protokol XI: Zasedovanje endocitoze proteinov in ODN s pretočnim citometrom

11.1 Kemikalije

- ODN10104, označen s Cy3 (0,5 mM)
- goveji serumski albumin BSA (A2153), Sigma-Aldrich (2 mg/mL)
- izhodiščna raztopina PLL (5 mg/mL)
- izhodiščna raztopina PDL (5 mg/mL)
- dekstran (10 mg/mL)
- pufer PBS (mešanica 0,137 M NaCl, 0,003 M Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,01 M KCl in 0,007 M KH₂PO₄)
- pripravljena raztopina s Cy5 označenega PLL3
- pripravljena raztopina s Cy5 označenega PDL3
- čistilo za pretočni citometer

11.2 Laboratorijski pribor

- mikropipete
- multikanalna mikropipeta
- sterilni nastavki za mikropipete
- mikrocentrifugirke
- stojalo za mikrocentrifugirke
- kivete
- pretočni citometer CyFlow Space, Partec
- laminar

11.3 Celične kulture

- mikrotitrna plošča (24-well) z nacepljeno kulturo makrofagov MonoMac6
- mikrotitrna plošča (24-well) z nacepljeno kulturo HEK293T

11.4 Metode

a) Priprava

1. S pomočjo programa izračunamo, kakšne volumne založne raztopine potrebujemo za pripravo delovne koncentracije.
2. Iz založnih koncentracij dekstrana, ODN, PDL, PLL in BSA pripravimo delovno koncentracijo reagentov z redčenjem s pufrom PBS (ODN 500-krat, BSA 2-krat, PLL/PDL 5-krat, dekstran 10-krat). Istočasno v mikrocentrifugirki odpipetiramo 90 µL PLL3 in PDL3.
3. Pripravimo si sheme, kako bomo dodajali reagente med procesom (shema 1). Ker nas zanima časovno sosledje in bomo reagente dodajali okvirno 24, 10, 6, 4 in 2 uri pred meritvijo, si zapišemo tudi časovno razporeditev.

b) Dodajanje reagentov

1. Pred vsakim vnosom dobro pregledamo, kaj moramo vnesti po predhodno pripravljene shemi.
2. Z mikropipeto odstranimo iz luknjice toliko gojišča, kot bomo dodali reagentov.
3. V luknjico odpipetiramo reagente. Po vsakem reagentu zamenjamo sterilni nastavek.
4. Ko končamo z delom, pustimo orodje pripravljeno v laminaru. Pospravimo ga šele po zadnjem dodajanju.

c) Citometrija

1. Prižgemo računalnik in citometer ter zaženemo program *FloMax*.
2. Nastavimo protokol merjenja in očistimo šobo.

3. Iz luknjic s pipeto odstranimo gojišče. Nato dodamo 500 μ L PBS in celice resuspendiramo.
4. Raztopino PBS in celic prenesemo v označene kivete. Pred meritvijo v kivete s celicami dolijemo 1,5 mL PBS.
5. Kiveto vstavimo v pretočni citometer. Metoda je nastavljena tako, da analiziramo fluorescence pri vzburjenju pri 640 nm za 20000 celic.
6. Ob zaključku meritve aparaturu s čistilom očistimo po predpisanem postopku.
7. Stroj ugasnemo in izklopimo računalnik.

HEK293T	1	2	3	4	5	6
A	PBS (50 μ L) prejšnji dan 15.00	PLL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) prejšnji dan 15.00	PLL* (10 μ L) prejšnji dan 15.00	PLL* (10 μ L) 7.00	PLL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 10.00	PDL* (10 μ L) 12.00
B	PBS (50 μ L) prejšnji dan 15.00	PDL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) prejšnji dan 15.00	PDL* (10 μ L) prejšnji dan 15.00	PDL* (10 μ L) 7.00	PDL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 10.00	PLL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 12.00
C		ODN* (50 μ L) prejšnji dan 15.00	PDL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 7.00	PLL* (10 μ L) 10.00	ODN* (50 μ L) 10.00	PDL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 12.00
D		PLL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 7.00	ODN* (50 μ L) 7.00	PDL* (10 μ L) 10.00	PLL* (10 μ L) 12.00	ODN* (50 μ L) 12.00

Makrofagi	1	2	3	4	5	6
A	PBS (50 μ L) 7.00	PLL* (10 μ L) 7.00	PDL* (10 μ L) 7.00	PLL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 7.00	PDL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 7.00	ODN* (50 μ L) 7.00
B	PBS (50 μ L) 7.00	PLL* (10 μ L) 10.00	PDL* (10 μ L) 10.00	PLL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 10.00	PDL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 10.00	ODN* (50 μ L) 10.00
C	DEX (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 7.00	PLL* (10 μ L) 12.00	PDL* (10 μ L) 12.00	PDL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 12.00	PLL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 12.00	ODN* (50 μ L) 12.00
D	BSA (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 7.00	PLL* (10 μ L) 14.30	PDL* (10 μ L) 14.30	PLL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 14.30	PDL (50 μ L) + ODN* (50 μ L) 14.30	ODN* (50 μ L) 14.30

Shema 1: Primer razporeditve na mikrotitrski plošči

11.1.12 Protokol XII: Lipofektaminska transfekcija 8-well mikroskopijskih plošč

12.1 Kemikalije

- plazmid z genskim zapisom za TLR9
- plazmid UnC93B1
- vektor pcDNA3
- pufer PBS (mešanica 0,137 M NaCl, 0,003 M Na₂HPO₄ x 2H₂O, 0,01 M KCl in 0,007 M KH₂PO₄)
- Lipofektamin 2000, Invitrogen
- gojišče Opti-MEM (11058-021), Invitrogen
- plazmid z genskim zapisom za FYVE-mCherry (označuje endosome)
- plazmid z genskim zapisom za LC3-GFP (označuje fagosome)
- plazmid z genskim zapisom za Golgi dsRed (označuje Golgijev aparat)
- plazmid z genskim zapisom za Tomato EEA-1 (označuje zgodnje endosome)
- oligonukleotid (ODN) 1014, označen s Cy3
- predhodno pripravljena raztopina s Cy5 označenega poli-L-lizina (PLL3)
- predhodno pripravljena raztopina s Cy5 označenega poli-D-lizina (PDL3)

12.2 Laboratorijski pribor

- sterilni nastavki za mikropipete
- multikanalna mikropipeta
- mikropipete
- sterilne mikrocentrifugirke
- stojalo za mikrocentrifugirke
- 15 mL centrifugirke, Falcon
- stojalo za centrifugirke
- spektrofotometer ND-1000, NanoDrop
- računalnik
- čistilni robčki za čiščenje optičnih naprav Linsenpapier, Assistent
- vibracijsko mešalo (vorteks), Tehtnica
- označevalec
- laminar
- konfokalni fluorescenčni mikroskop Leica TCS SP5, Leica Microsystems

12.3 Celične kulture

- mikroskopijska škatlica (8-well) s kulturo celic HEK293T

12.4 Metode

a) Priprava vzorcev in načrtovanje transfekcije

1. Predhodno v mikroskopijsko škatlico nacepimo kulturo HEK293T in jo inkubiramo čez noč.
2. Na spektrofotometru ND-1000 izmerimo koncentracije DNK plazmidov TLR9, Fyve, LC3, Golgi, EEA1 in UnC. Koncentracija pcDNA3 je 0,1 mg/mL.
3. Iz koncentracij plazmidov v založni raztopini preračunamo potrebne končne količine za transfekcijo. Vrednosti vnesemo v program, ki nam izračuna volumne delovnih raztopin plazmidov, transfekcijskega reagenta lipofektamina in gojišča Opti-MEM, potrebne za transfekcijo.
4. Ko nam program izračuna potrebne količine, jih odpipetiramo v mikrocentrifugirke, označimo in zmešamo z vibracijskim mešalom.
5. Narišemo si shemo transfekcije (shema 1).

b) Transfekcija mikroskopskih škatlic

1. Iz hladilnika vzamemo raztopine plazmidov. Iz inkubatorja vzamemo mikroskopsko škatlico in preverimo, ali so celice v luknjicah prerasle površino.
2. Pripravimo mešanice lipofektamina in gojišča Opti-MEM ter mešanice plazmidnih DNK z istimi gojiščem. Mešanicam z lipofektaminom dodamo plazmidne mešanice v gojišču Opti-MEM, previdno premešamo in inkubiramo 5 minut.
3. Po 5 minutah dodamo mešanico celicam. Mikroskopsko ploščo damo v inkubator.
4. Mikroskopsko ploščo s celicami nato prestavimo nazaj v inkubator in inkubiramo čez noč.
5. Naslednji dan dodamo PLL/PDL (2 μ L) in ODN (2 μ L) ter inkubiramo čez noč.
6. Rezultate preverimo pod mikroskopom.