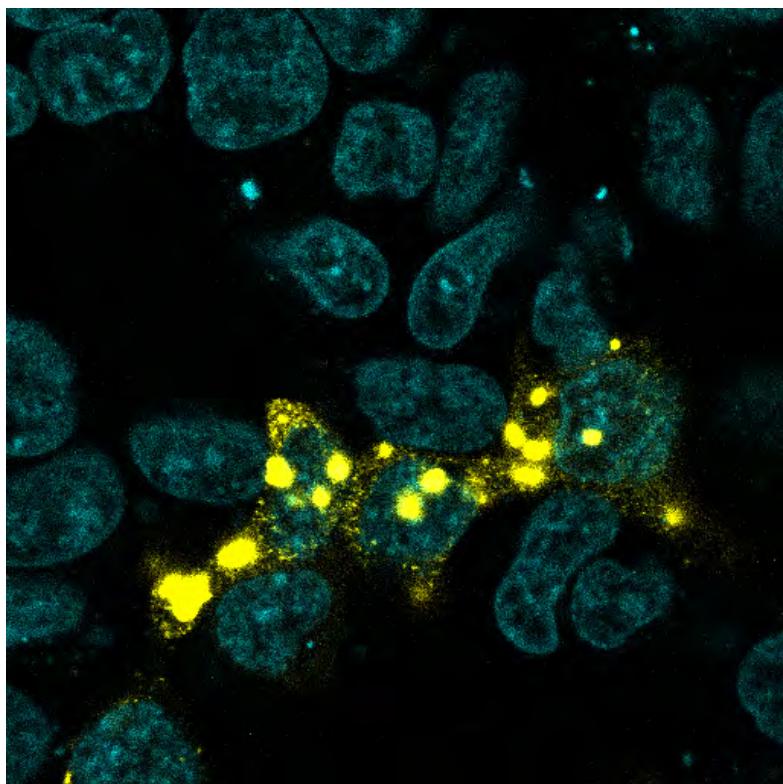


GIMNAZIJA IN SREDNJA ŠOLA RUDOLFA MAISTRA KAMNIK  
Novi trg 41a, 1241 Kamnik

# VNETNA NAPRAVA NA OSNOVI MOLEKULE TRIF ZA POTENCIALNO IMUNOTERAPIJO RAKA

RAZISKOVALNA NALOGA



AVTORJA:

Ana Pibernik  
Jakob Kecelj

MENTORJI:

Renata Capuder Mermal, prof. kemije  
Cirila Jeras, prof. biologije  
mag. Elvira Boršić

Kamnik, marec 2022

**ŠOLA:**

Gimnazija in srednja šola Rudolfa Maistra Kamnik  
Novi trg 41a,  
1241 Kamnik

**NASLOV NALOGE:**

VNETNA NAPRAVA NA OSNOVI MOLEKULE TRIF ZA POTENCIALNO  
IMUNOTERAPIJO RAKA

**PODROČJE:**

Biologija

**AVTORJA:**

**Ana Pibernik**

E-mail pošta: [a.ana.pibernik1@gmail.com](mailto:a.ana.pibernik1@gmail.com)

**Jakob Kecelj**

E-mail pošta: [jakob.kecelj@gmail.com](mailto:jakob.kecelj@gmail.com)

**MENTORJI:**

**Cirila Jeras**, prof. biologije

E-mail pošta: [cirila.jeras@gmail.com](mailto:cirila.jeras@gmail.com)

**Renata Capuder Mermal**, prof. kemije

E-mail pošta: [renata.capuder@guest.arnes.si](mailto:renata.capuder@guest.arnes.si)

**mag. Elvira Boršić**

E-mail pošta: [elvira.borsic@ki.si](mailto:elvira.borsic@ki.si)

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujeva vsem, ki so pomagali in sodelovali pri nastajanju najine raziskovalne naloge. Zahvalila bi se profesoricama Cirili Jeras in Renati Capuder Mermal za vso pomoč in vodenje skozi raziskovalno nalogu.

Zahvaljujeva se mentorici mag. Elviri Boršić za strokovno usmerjanje med raziskovalnim delom, ves trud in vložen čas ter pomoč in nasvete tekom pisanja raziskovalne naloge. Hvaležna sva ji, da naju je popeljala v svet mikrobiologije kljub nama težki in nepoznani temi.

Zahvala gre tudi Kemijskemu inštitutu, Odseku za sintezno biologijo in imunologijo, na katerem sva opravljala praktični del raziskovalne naloge.

## POVZETEK

Z razvojem znanosti je vzporedno prišlo tudi do večjega poznavanja in razumevanja celičnih obolenj, njihovih lastnosti in odzivov. Pomemben del prirojenega imunskega odziva v celicah so različne signalne poti, s katerimi celice odgovarjajo na patogene in bolezenske vplive.

V raziskovalni nalogi smo preučevali možnost boljše aktivacije signalnih poti z uporabo vnetnih naprav. S tehnikami molekulskega kloniranja smo pripravili različne vnetne naprave (konstrukte), sestavljenе iz različnih odsekov molekule TRIF. Zanimalo nas je, ali vezava določenih odsekov TRIF z ogrodnim proteinom TDP-43 močneje aktivira različne signalne poti in vodi v večjo produkcijo citokinov. Ti so potrebni za nadaljnji imunski odziv. Z delom smo želeli preučiti uporabo vnetne naprave na osnovi molekule TRIF in njen potencialno možnost za zdravljenje in imunoterapijo raka. Rakave celice imajo namreč imunskeemu sistemu neprepoznavno celično membrano, kar onemogoča njihovo uničevanje. Z uporabo vnetnih naprav pa bi rakave celice lahko same vzbudile in sprožile imunski odziv.

Pri delu smo raziskovali s celično linijo HEK293, v katero smo vnesli pripravljene konstrukte. Vpliv konstruktorov smo preverili z dvojnim luciferaznim testom ter encimsko-imunskim testom ELISA. Za vizualizacijo in ogled celic pa smo izvedli konfokalno mikroskopijo.

Ugotovili smo, da lahko na osnovi izbranih odsekov TRIF v kombinaciji s TDP-43 pripravimo učinkovito vnetno napravo, kar daje odlično odskočno desko za nadaljnje raziskave izboljšanja pripravljenih vnetnih naprav v tej raziskovalni nalogi, kar bi lahko v prihodnosti pripomoglo k zdravljenju raka.

## ABSTRACT

In parallel with the development of science, there has been an increase in knowledge and understanding of cellular diseases, characteristics and responses. An important part of the innate immune response in cells is the various signalling pathways that cells use to respond to pathogens and disease.

In this research, we investigated the possibility of better activation of signalling pathways using inflammatory devices. Using molecular cloning techniques, we have prepared different inflammatory devices (constructs) composed of different sections of the TRIF molecule. We were interested in whether binding of specific TRIF segments to the TDP-43 scaffold protein strongly activates different signalling pathways and enhances cytokine production. These are needed for further immune response. Our work was aimed at studying TRIF-based inflammatory devices and their potential for cancer therapy and immunotherapy. Cancer cells have an unrecognizable cell membrane to the immune system, making it impossible to destroy them. However, using inflammatory devices, the cells themselves could excite and trigger an immune response.

The work was carried out using the HEK293 cell line, in which the prepared constructs were introduced and their effect was verified by a double luciferase assay and an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Confocal microscopy was used to visualise and view the cells.

We found that we can prepare effective inflammatory device based on the selected segments of TRIF bound to TDP-43, which is an excellent starting point for further research on prepared inflammatory device. Together this could help to treat cancer in the future.

## KAZALO

### Table of Contents

<b>1. UVOD.....</b>	<b>- 11 -</b>
1.1. NAMEN IN CILJ RAZISKOVALNE NALOGE.....	- 11 -
1.2. HIPOTEZE .....	- 11 -
<b>2. TEORETIČNI DEL .....</b>	<b>- 12 -</b>
<b>2.1. IMUNSKI SISTEM .....</b>	<b>- 12 -</b>
2.1.1. Imunski odziv .....	- 13 -
2.1.2. Signaliziranje z receptorji TLR.....	- 14 -
2.1.3. Adaptorski protein TRIF .....	- 16 -
2.1.4. Producija citokinov IFN tipa 1.....	- 17 -
2.1.5. Aktivacija signalne poti NF- $\kappa$ B .....	- 17 -
2.1.6. Rakave celice .....	- 19 -
2.1.7. Imunoterapija raka.....	- 21 -
2.1.8. Vloga TDP-43 .....	- 22 -
<b>2.2. DNA .....</b>	<b>- 23 -</b>
2.2.1. Podvajanje DNA .....	- 24 -
<b>2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR).....</b>	<b>- 25 -</b>
<b>2.4. Vnos DNA v celice.....</b>	<b>- 28 -</b>
2.4.1. Načini vnosa DNA v bakterijske celice.....	- 29 -
2.4.2. Načini vnosa DNA v sesalske celice .....	- 31 -
<b>2.5. Ločevanje molekul DNA z agarozno gelsko elektroforezo (AGE).....</b>	<b>- 33 -</b>
<b>2.6. Združevanje fragmentov DNA z lepljenjem po Gibsonu .....</b>	<b>- 35 -</b>
<b>2.7. Sekvenciranje po Sangerju.....</b>	<b>- 36 -</b>
<b>2.8. Dvojni luciferazni test.....</b>	<b>- 38 -</b>
<b>2.9. ELISA .....</b>	<b>- 41 -</b>
<b>3. RAZISKOVALNI DEL.....</b>	<b>- 43 -</b>
<b>3.1. MATERIALI .....</b>	<b>- 43 -</b>
3.2.1. Laboratorijska oprema .....	- 43 -
3.2.2. KEMIKALIJE .....	- 44 -
<b>3.3. PRAKTIČNI DEL .....</b>	<b>- 46 -</b>
3.3.1. Pomnoževanje DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) .....	- 46 -
3.3.2. Vstavljanje vključkov v vektor (plazmidna DNA) z lepljenjem po Gibsonu .....	- 51 -
3.3.3 Vnos plazmidne DNA v kompetentne bakterijske celice (transformacija) .....	- 52 -
3.3.4. Preverjanje vsebnosti konstrukta v vektorju s PCR na osnovi kolonije .....	- 54 -
3.3.5. Namnožitev bakterij (z vsebovanimi plazmidi) v tekočem gojišču .....	- 56 -
3.3.6. Izolacija plazmida iz tekoče bakterijske kulture .....	- 56 -
3.3.7. Preverjanje ustreznosti nukleotidnega zaporedja s sekvenciranjem po Sangerju .....	- 57 -
3.3.8. Nacepljanje celic HEK 293 .....	- 57 -
3.3.9. Transfekcija .....	- 59 -
3.3.10. Konfokalna mikroskopija.....	- 63 -
3.3.11. ELISA.....	- 64 -
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>- 67 -</b>

<b>4.1. NAČRTOVANJE KONSTRUKTOV (VNETNIH NAPRAV) .....</b>	<b>- 67 -</b>
<b>4.2. NAČRTOVANJE ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV ZA REAKCIJO PCR .....</b>	<b>- 68 -</b>
<b>4.3. REZULTATI IN ANALIZA REZULTATOV DVOJNEGA LUCIFERAZNEGA TESTA, ENCIMSKO- IMUNSKEGA TESTA ELISA TER SLIK S KONFOKALNEGA MIKROSKOPA .....</b>	<b>- 69 -</b>
<b>6. ZAKLJUČEK .....</b>	<b>- 85 -</b>
<b>6.1. VREDNOTENJE HIPOTEZ.....</b>	<b>- 86 -</b>
<b>6.2. NAČRTI ZA NADALJNO RAZISKOVANJE .....</b>	<b>- 89 -</b>
<b>7. VIRI IN LITERATURA .....</b>	<b>- 90 -</b>

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1: Potek fagocitoze</b> (vir: <a href="https://sl.thpanorama.com/articles/biologa/qu-es-la-fagocitosis.html">https://sl.thpanorama.com/articles/biologa/qu-es-la-fagocitosis.html</a> ) ... -	13 -
<b>Slika 2: Potek odziva limfocitov T in B na antigen in tvorba citokinov</b> (vir: učbenik Campbell, Reece; str. 114) .....	14 -
<b>Slika 3: Zgradba TLR</b> (vir: <a href="https://www.researchgate.net/figure/Simplified-model-of-MyD88-mediated-toll-like-receptor-TLR-signaling-in-epithelial_fig1_272412202">https://www.researchgate.net/figure/Simplified-model-of-MyD88-mediated-toll-like-receptor-TLR-signaling-in-epithelial_fig1_272412202</a> , dostop: 24.3.2022).....	15 -
<b>Slika 4: Skica TRIF z označenimi domenami</b> (povzeto po: (Ullah, Sweet, Mansell, Kellie, & Kobe, 2016)).....	16 -
<b>Slika 5: Aktivacija NF-κB. Dve signalni poti, klasična pot (levo) in alternativna pot (desno)</b> (povzeto po: <a href="https://www.jci.org/articles/view/26322/figure/1">https://www.jci.org/articles/view/26322/figure/1</a> ) .....	18 -
<b>Slika 6: Primerjava površine membran normalne in rakave celice</b> (vir: <a href="https://www.revija-vita.com/vita/56/Vpliv_elektromagnetcga_sevanja_na_zdravo_celico">https://www.revija-vita.com/vita/56/Vpliv_elektromagnetcga_sevanja_na_zdravo_celico</a> ) .....	19 -
<b>Slika 7: Primerjava benignega in malignega tumorja</b> (vir: <a href="https://hr.approby.com/razlike-izmedju-malignog-i-benignog-tumora/">https://hr.approby.com/razlike-izmedju-malignog-i-benignog-tumora/</a> , dostop: 24.3.2022) .....	20 -
<b>Slika 8: Zgradba nukleotidov in molekule DNA.</b> A: shema zgradbe DNA-nukleotida, B: veriga nukleotidov, C: prikaz dvojne vijačnice, D: shema dveh verig nukleotidov v dvojni vijačnici (vir: učbenik Stušek, Vilhar; str. 347).....	23 -
<b>Slika 9: Shema delovanja encimov, ki sodelujejo pri podvajjanju DNA</b> (vir: učbenik Stušek, Vilhar; str. 349).....	24 -
<b>Slika 10: Shema denaturacije DNA</b> (povzeto po: <a href="https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/One%20PCR%20Cycle%20Illustration-01den.jpg">https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/One%20PCR%20Cycle%20Illustration-01den.jpg</a> , dostop: 24.3.2022).....	25 -
<b>Slika 11: Shema pripenjanja oligonukleotidov na enoverižno DNA</b> (povzeto po: <a href="https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/One%20PCR%20Cycle%20Illustration-01Anneal.jpg">https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/One%20PCR%20Cycle%20Illustration-01Anneal.jpg</a> , dostop: 24.3.2022) .....	26 -
<b>Slika 12: Shema podaljševanje DNA</b> (povzeto po: <a href="https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/One%20PCR%20Cycle%20Illustration-01Extension.jpg">https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/One%20PCR%20Cycle%20Illustration-01Extension.jpg</a> , dostop: 24.3.2022) .....	26 -
<b>Slika 13: Shema celotne PCR reakcije</b> (povzeto po: <a href="https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ab/Polymerase_chain_reaction-en.svg/1920px-Polymerase_chain_reaction-en.svg.png">https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ab/Polymerase_chain_reaction-en.svg/1920px-Polymerase_chain_reaction-en.svg.png</a> , dostop: 24.3.2022) .....	27 -
<b>Slika 14: Prikaz plazmidne DNA v bakterijski celici</b> (povzeto po: <a href="https://i.differencevs.com/images/002/image-4621-1.jpg">https://i.differencevs.com/images/002/image-4621-1.jpg</a> , dostop: 24.3.2022) .....	28 -
<b>Slika 15: Mikroskopska slika bakterije E.Coli</b> (vir: <a href="http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/dossiers/microbio/micro-c1_gb.htm">http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/dossiers/microbio/micro-c1_gb.htm</a> , dostop: 24.3.2022) .....	28 -
<b>Slika 16: Načini vnosa DNA v prokariontsko celico</b> (Povzeto po: <a href="https://blog.addgene.org/hsf/hubfs/4_19%20to%206_19/TransformationTransductionConjugationTransferction_AC_2019_06_14/transformation-transduction-conjugation-transfection.jpg?width=600&amp;name=transformation-transduction-conjugation-transfection.jpg">https://blog.addgene.org/hsf/hubfs/4_19%20to%206_19/TransformationTransductionConjugationTransferction_AC_2019_06_14/transformation-transduction-conjugation-transfection.jpg?width=600&amp;name=transformation-transduction-conjugation-transfection.jpg</a> , dostop: 25.3.2022) .....	29 -
<b>Slika 17: Razlika med nekompetentno in kompetentno celico</b> (povzeto po: <a href="https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/Prep%20Step.png">https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/Prep%20Step.png</a> , dostop: 24.3.2022) - 30	-
<b>Slika 18: Mikroskopska slika celic HEK293</b> (vir: <a href="https://www.synthego.com/hek293">https://www.synthego.com/hek293</a> , dostop: 24.3.2022) .....	31 -
<b>Slika 19: Prikaz transfekcije v evkariontski celici</b> (povzeto po: <a href="https://www.researchgate.net/publication/353374112/figure/fig1/AS:1048199024373760@1626921530050/The-proposed-mechanism-of-chemical-transfection-A-transfection-reagent-B-Nucleic.png">https://www.researchgate.net/publication/353374112/figure/fig1/AS:1048199024373760@1626921530050/The-proposed-mechanism-of-chemical-transfection-A-transfection-reagent-B-Nucleic.png</a> , dostop: 24.3.2022) .....	32 -

<b>Slika 20: Prikaz agaroznega gela po izvedeni elektroforezi, izpostavljenega svetlobi UV (vir: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/60/Gel_electrophoresis_2.jpg , dostop: 24.3.2022) - 33 -</b>	
<b>Slika 21: Kad za izvedbo elektroforeze, z agaroznim gelom (povzeto po: https://wikinkhte.com/include/agarose/agarose-3.jpg , dostop: 24.3.2022) .....</b>	<b>34 -</b>
<b>Slika 22: Vnos vzorcev na agarozni gel (povzeto po: https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780444593788000062-f06-01-9780444593788.jpg , dostop: 24.3.2022) .....</b>	<b>34 -</b>
<b>Slika 23: Lepljenje po Gibsonu (povzeto po: https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/0AA961B294E444AFBEDD5C4A904C76E6/Long%20Description/E2611a.jpg , dostop: 24.3.2022) .....</b>	<b>35 -</b>
<b>Slika 24: Prikaz lepljenja fragmentov DNA s prekrivajočimi se konci v plazmidno DNA (vektor) (povzeto po: https://www.molecularcloud.org/assets/img/resource/html-1.jpg , dostop: 24.3.2022) - 36 -</b>	
<b>Slika 25: Shema sekvenciranja po Sangerju (povzeto po: https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780128022344000021-f02-37-9780128022344.jpg, dostop: 24.3.2022) .....</b>	<b>37 -</b>
<b>Slika 26: Primera meritev bioluminescentnega signala (povzeto po: https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/Functional%20luc.png , dostop: 24.3.2022) .....</b>	<b>39 -</b>
<b>Slika 27: Shema dvojnega luciferaznega testa (povzeto po: https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/Dual%20luc%20assay.png , dostop: 24.3.2022) .....</b>	<b>40 -</b>
<b>Slika 28: Osnovna zgradba protitelesa (vir: https://issuu.com/pipinovaknjiga/docs/demo_anatomija/49 , dostop: 24.3.2022) .....</b>	<b>41 -</b>
<b>Slika 29: Shematski prikaz mehanizma "sendvič" ELISE (vir: https://repositorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=119276&amp;lang=slv , dostop: 24.3.2022) .....</b>	<b>42 -</b>
<b>Slika 30: Priprava mešanic za reakcijo PCR .....</b>	<b>46 -</b>
<b>Slika 31: Naprava za izvedbo reakcije PCR z vstavljenimi mešanicami .....</b>	<b>47 -</b>
<b>Slika 32: Prikaz nanašanje reakcijskih mešanic na agarozni gel, kjer je potekla elektroforeza - 48 -</b>	
<b>Slika 33: Določanje koncentracije izolirane DNA na napravi NanoDrop .....</b>	<b>50 -</b>
<b>Slika 34: Nanašanje gojišča na LBA ploščo s sterilno paličico .....</b>	<b>53 -</b>
<b>Slika 35: Zrastle kolonije bakterij na LBA ploščah .....</b>	<b>53 -</b>
<b>Slika 36: Nanos reakcije na agarozni gel .....</b>	<b>55 -</b>
<b>Slika 37: Prikaz usedlega peleta po centrifugiranju .....</b>	<b>56 -</b>
<b>Slika 38: Izvedba transfekcije v laminariju .....</b>	<b>59 -</b>
<b>Slika 39: Pipetiranje komponent za dvojni luciferazni test .....</b>	<b>62 -</b>
<b>Slika 40: Prikaz analiza slike iz konfokalnega mikroskopa .....</b>	<b>63 -</b>
<b>Slika 41: Prikaz pipetiranja z multikanalno pipeto med testom ELISA .....</b>	<b>64 -</b>
<b>Slika 42: Prikaz spremembe barve po dodatku H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> .....</b>	<b>65 -</b>
<b>Slika 43: 1D: slika s konfokalnega mikroskopa. Modri deli prikazujejo jedra celic, obarvana z barvilom Hoechst, rumeno obarvani deli pa prikazujejo konstrukte TRIF-a označenega s proteinom YFP (rumen fluorescenčni protein) .....</b>	<b>71 -</b>
<b>Slika 44: 2D: slika s konfokalnega mikroskopa. Modri deli prikazujejo jedra celic, obarvana z barvilom Hoechst, rumeno obarvani deli pa prikazujejo konstrukte TRIF-a označenega z YFP .....</b>	<b>74 -</b>
<b>Slika 45: 3D: slika s konfokalnega mikroskopa. Modri deli prikazujejo jedra celic, obarvana z barvilom Hoechst, rumeno obarvani deli pa prikazujejo konstrukte TRIF-a označena z YFP .....</b>	<b>77 -</b>
<b>Slika 46: 4C: slika s konfokalnega mikroskopa. Modri deli prikazujejo jedra celic, obarvana z barvilom Hoechst, rumeno obarvani deli pa prikazujejo konstrukt TRIF, označen z YFP .....</b>	<b>80 -</b>
<b>Slika 47: 5C: slika s konfokalnega mikroskopa. Modri deli prikazujejo jedra celic, obarvana z barvilom Hoechst, rumeno obarvani deli pa prikazujejo konstrukte TRIF označenega z YFP .....</b>	<b>82 -</b>

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Seznam uporabljene laboratorijske opreme.....	- 43 -
Tabela 2: Seznam uporabljenih kemikalij.....	- 44 -
Tabela 3: Seznam uporabljenih kompletov reagentov.....	- 44 -
Tabela 4: Seznam uporabljenih raztopin in pufrov.....	- 44 -
Tabela 5: Seznam uporabljenih celičnih linij.....	- 45 -
Tabela 6: Seznam uporabljenih bakterijskih kultur.....	- 45 -
Tabela 7: Seznam uporabljenih gojišč za gojenje sesalskih celičnih linij .....	- 45 -
Tabela 8: Seznam uporabljenih gojišč za gojenje bakterijskih kultur.....	- 45 -
Tabela 9: Seznam uporabljenih vektorjev ali vključkov.....	- 45 -
Tabela 10: Uporabljene snovi za izvedbo reakcije PCR, na primeru PCR1 .....	- 46 -
Tabela 11: Program, po katerem je v napravi za PCR potekla reakcija .....	- 48 -
Tabela 12: Reagenti za reakcijo lepljenja po Gibsonu .....	- 52 -
Tabela 13: Prikaz komponent za izvedbo reakcije PCR na osnovi kolonije .....	- 54 -
Tabela 14: Prikazuje potek reakcije PCR na osnovi kolonije .....	- 55 -
Tabela 15: Prikazuje mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami.....	- 61 -
Tabela 16: Predstavlja komponente za dvojni luciferazni test v ustreznih količinah.....	- 61 -
Tabela 17: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov ter njihova zaporedja.....	- 68 -

## KAZALO GRAFOV

Graf 1: <b>1B:</b> grafa prikazujeta vrednosti luminescence za konstrukt TRIF (180-217 658-712) brez in z vezanim TDP-43-YFP za reporterja IFN $\beta$ in NF- $\kappa$ B.....	- 70 -
Graf 2: <b>1C:</b> graf prikazuje vrednosti koncentracij citokina hIL8, ki so bile določene s testom ELISA, za konstrukt TRIF (180-217 658-712) brez ter z vezanim TDP-43-YFP.....	- 71 -
Graf 3: <b>2B:</b> grafa prikazujeta vrednosti luminescence za konstrukt TRIF (180- 367 530-712) brez vezanega in z vezanim TDP-43-YFP za reporterja IFN $\beta$ in NF- $\kappa$ B.....	- 73 -
Graf 4: <b>2C:</b> graf prikazuje vrednosti koncentracij citokina hIL8, ki so bile določene s testom ELISA, za konstrukt TRIF (180-367 530-712) brez ter z vezanim TDP-43-YFP.....	- 74 -
Graf 5: <b>3B:</b> grafa prikazujeta vrednosti luminescence za konstrukt TRIF (180-712) brez vezanega ter z vezanim TDP-43-YFP za reporterja IFN $\beta$ in NF- $\kappa$ B.....	- 76 -
Graf 6: <b>3C:</b> graf prikazuje vrednosti koncentracij citokina hIL8, ki so bile določene s testom ELISA, za konstrukta TRIF (180-712) in TRIF (180-712) TDP-43-YFP.....	- 77 -
Graf 7: <b>4B:</b> graf prikazuje vrednosti luminescence za konstrukt TRIF (180-530) brez ter z vezanim TDP-43 za reporter za IFN $\beta$ .....	- 79 -
Graf 8: <b>5B:</b> graf prikazuje vrednosti luminescence za konstrukt TRIF (180-387) brez in z vezanim TDP-43 za reporter za IFN $\beta$ .....	- 81 -
Graf 9: <b>6B:</b> graf prikazuje vrednosti luminescence za konstrukt TRIF (658-712) brez vezanega TDP-43 ter z vezanim TDP-43, za reporter za NF- $\kappa$ B. ....	- 83 -
Graf 10: <b>6C:</b> graf prikazuje vrednosti koncentracij citokinov hIL8, ki so bile določene s testom ELISA, za konstrukt TRIF (658-712) brez ter z vezanim TDP-43, le za reporter NF- $\kappa$ B. ....	- 84 -

## 1. UVOD

### 1.1. NAMEN IN CILJ RAZISKOVALNE NALOGE

- Preučiti in identificirati domene molekule proteina TRIF, ki so primerne za pripravo vnetnih naprav- konstruktov.
- S tehnikami molekulskega kloniranja pripraviti vnetne naprave in jih vnesti v celice HEK293.
- Preučiti, ali deli molekule proteina TRIF, vezani na ogrodni protein TDP-43, sprožijo močnejšo aktivacijo različnih signalnih poti v primerjavi z molekulami TRIF brez ogrodnega proteina TDP-43.
- Ugotoviti, ali so deli TRIF, vezani na ogrodni protein TDP-43, primerni za potencialno uporabo pri imunoterapiji raka.
- Preučiti vpliv proteina TRIF na povečano izločanje citokinov iz celic.

### 1.2. HIPOTEZE

1. **Hipoteza:** S tehnikami molekulskega kloniranja bomo uspešno pripravili želene konstrukte proteina TRIF z ali brez ogrodnega proteina TDP-43.
2. **Hipoteza:** Pripravljene konstrukte s proteinom TRIF bomo uspešno vnesli v celice HEK293.
3. **Hipoteza:** Vnešeni konstrukti bodo aktivirali signalne poti v celicah HEK293.
4. **Hipoteza:** Pripravljeni konstrukti s proteinom TRIF, ki so vezani na ogrodni protein TDP-43, bodo v celici spodbudili močnejšo produkcijo citokinov preko aktivacije signalne poti NF-κB in aktivacijo produkcije IFN tipa I.
5. **Hipoteza:** Konstrukti proteina TRIF, ki vsebujejo vezavno domeno za TBK1 in so vezani na ogrodni protein TDP-43, bodo v celici spodbudili produkcijo citokinov IFN tipa I.
6. **Hipoteza:** Konstrukti TRIF, ki vsebujejo domeno RHIM in so vezani na TDP-43, bodo v celici spodbudili aktivacijo signalne poti NF-κB in s tem produkcijo citokinov.

## 2. TEORETIČNI DEL

### 2.1. IMUNSKI SISTEM

Imunski sistem nam omogoča, da preživimo v okolju polnem parazitov, bakterij in virusov. Je zapletena in dinamična mreža bioloških dejavnikov, v kateri sodeluje veliko različnih molekul, celic, tkiv in organov. Imunski sistem v telesu prepoznavata in odstranjuje tujke ter spremenjene lastne celice.

Osnova za obrambni odgovor je sposobnost telesa, da sintetizira več kot sto milijonov različnih protiteles in več kot bilijon različnih receptorjev. To omogoča zapleten mehanizem kombiniranja posameznih genskih segmentov, da na osnovo majhnega nabora genov sintetizirajo proteine z zelo različnimi vezavnimi lastnostmi.

Najpomembnejši dejavnik v imunskem sistemu so imunske celice, ki jih imenujemo tudi levkociti ali bele krvne celice. Ti po obtočilih (srčno-žilnem sistemu) krožijo po celiem telesu, v večjih količinah pa se zadržujejo v imunskih tkivih in imunskih organih, torej v bezgavkah, vranici, mandljih in priželjcu.

Imunske celice (levkocite) glede na obliko in nalogo v telesu delimo na granulocite in agranulocite med katere sodijo monociti in limfociti. Najpomembnejši med njimi so limfociti B in limfociti T (Devetak & Devetak, 2011).

#### **Limfociti B**

Nastajajo v kostnem mozgu in dozorevajo v bezgavkah. Njihova najpomembnejša lastnost pa je izločanje protiteles (doc.dr. Dolinar, 2008/2009).

#### **Limfociti T**

Nastajajo v kostnem mozgu in dozorevajo v priželjcu. Delimo jih na dve vrsti:

- citotoksične celice
- celice pomagalke

Citotoksične celice z izločanjem citotoksičnih zrn napadejo okužene celice lastnega organizma in z njihovim uničenjem zaustavijo razmnoževanje mikroorganizmov.

Celice pomagalke med imunskim odzivom tvorijo citokine, kar omogoča aktivacijo ustrezne vrste imunskega odziva. Imunski odziv jim omogočajo makrofagi, ki izločajo signalne molekule oziroma citokine. Makrofagi se nahajajo v tkivih, kjer preko specifičnih receptorjev dobijo informacije o vrsti okužbe. Celice pomagalke so potrebne tudi za aktivacijo celic ubijalk in limfocitov B.

Kjer patogeni vdrejo nastane vnetje, kar izboljša prekrvavljenost inficiranega oziroma prizadetega tkiva in poveča prepustnost kapilar. S tem se omogoči napad imunskeih celic (Ihan, 2020).

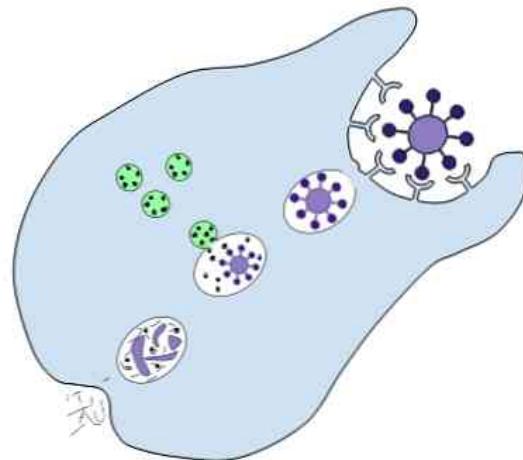
### 2.1.1. Imunski odziv

Vdor tujkov v telo sproži različne obrambne mehanizme. Delimo jih na:

- prijedene (naravne, neadaptivne)
- pridobljene (specifične, adaptivne)

### Mehanizem prijedene odpornosti

Prijedena odpornost se ob vsakem vdoru vedno odzove prva in ima vedno enak vnetni odziv. Imunske celice prijedene odpornosti prepoznavajo povzročitelje okužb z receptorji za prepoznavo molekularnih vzorcev. Med odzive prijedene imunosti uvrščamo fagocitozo in vnetje. Fagocitoza je poseben celični proces, s katerim fagociti tujke požrejo in razgradijo (slika 1). Fagocitozo izvaja več tipov celic imunskega sistema, kot so nevtrofilci, makrofagi, granulociti, dendritične celice in B limfociti (Thpanorama, n.d.).

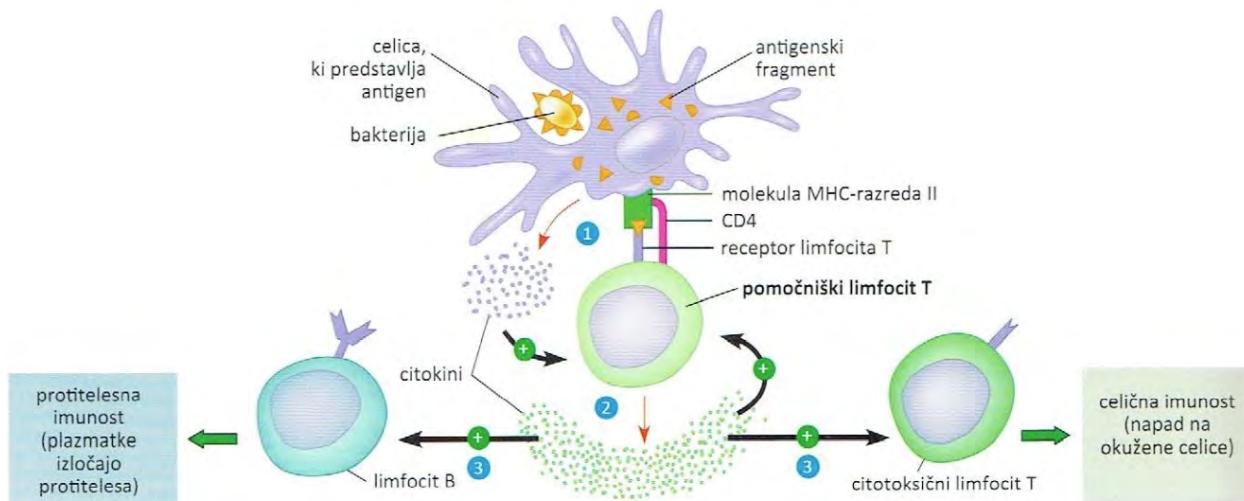


Slika 1: **Potek fagocitoze** (vir:  
<https://sl.thpanorama.com/articles/biologa/qu-es-la-fagocitosis.html>)

### Mehanizem pridobljene odpornosti

Pridobljen odziv je kasnejši, bolj počasen in šibkejši. Zanj so potrebni limfociti. Limfociti T seznanijo limfocite B z antigenom. Ti proizvedejo plazmatke in spominske celice. Njihova najpomembnejša lastnost pa je zapomniti si povzročitelja. Po več stikih postaja odziv vedno hitrejši in učinkovitejši. Pomemben proces, ki to omogoča, je klonsko razmnoževanje spominskih limfocitov, ki so specifično usmerjeni proti tujemu antigenu. Torej jih je ob drugem stiku veliko več in so že vnaprej pripravljeni. Tak odziv imenujemo sekundarni (spominski). V prvem stiku (primarni odziv) pa so tujek še prepoznavali in nanj razmnoževali specifične limfocite (Dolenc, 2020).

Po odstranitvi antigena 90-95 % antigenskih celic umre, preostale pa se spremenijo v spominske celice, ostane imunski spomin. Če je telo pogosto izpostavljeno antigenom razvije močan imunski sistem (Ihan, 2020).



Slika 2: **Potek odziva limfocitov T in B na antigen in tvorba citokinov** (vir: učbenik Campbell, Reece; str. 114)

## Citokini

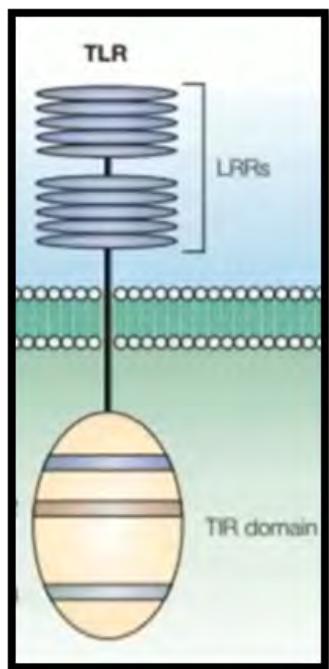
So proteini z zelo majhno molekulsko maso in so izjemnega pomena za aktivacijo številnih drugih imunskih celic, ki sodelujejo pri imunskemu odzivu. Citokini se vežejo na specifične receptorje na membrani celice tarče in sprožijo signal. Ta se prenese v notranjost celice, v kateri se med drugim spremeni izražanje genov.

Poznamo več kot 60 vrst citokinov. Pri najinem delu sva imela opravka z citokinom IL-8 (interlevkin 8), ki je predstavnik družine kemokinov in na mesto vnetja privablja nevrofilce (krvne celice, granulociti, sposobni fagocitoze). Pomemben je za aktivacijo mehanizmov prirojene (naravne) odpornosti (Ihan, 2020).

### 2.1.2. Signaliziranje z receptorji TLR

Tollu podobnu receptorje (TLR) so vrsta proteinov, ki imajo ključno vlogo v imunskega sistema. Spadajo v skupino receptorjev za prepoznavanje vzorcev (PRR). PRR so zelo pomembni v prirojeni imunosti, saj so zmožni zaznavanja in prepoznavanja s patogeni povezane molekule vzorca (PAMP) in s poškodbami povezane molekulske vzorce (DAMP) (UL, 2011). PAMP so molekularni vzorci povezani s patogeni (povzročitelji bolezni) in izvirajo iz mikroorganizmov, npr. Bakterijski lipopolisaharid, virusna dvovijačna RNA itd. DAMP so molekule ali deli molekul, ki imajo funkcijo v notranjosti celic. Ob celični poškodbi ali smrti se sprostijo iz celic, to so npr. ATP, DNA itd. (Kawasaki & Kawai, 2014).

Obstaja več vrst receptorjev TLR, pri človeku 10 različnih (imenujejo se TLR1-TLR10), ki se med seboj razlikujejo glede prepoznavanja PAMP in DAMP in glede na lokacijo v celici (Kawasaki & Kawai, 2014).



Receptorji TLR so transmembranski proteini (nahajajo se znotraj in zunaj celične membrane), ki so zgrajeni iz:

- zunajcelične domene bogate z levcini ali LRR (ta prepoznavata PAMP in DAMP);
- domene v celični membrani;
- znotrajcelične domene Toll/interlevkin-1 receptor ali TIR (sproži signaliziranje).

Slika 3: Zgradba TLR (vir: [https://www.researchgate.net/figure/Simplified-model-of-MyD88-mediated-toll-like-receptor-TLR-signaling-in-epithelial\\_fig1\\_272412202](https://www.researchgate.net/figure/Simplified-model-of-MyD88-mediated-toll-like-receptor-TLR-signaling-in-epithelial_fig1_272412202), dostop: 24.3.2022)

Receptor veže PAMP ali DAMP v obliki homodimera (dve isti molekuli TLR) ali heterodimera (dve različni molekuli TLR), s čimer se aktivira. Aktivacija sproži izražanje genov ter s tem povezano sintezo citokinov. Na ta način se vzpostavi prirojen imunski odziv. Aktivacija TLR povzroči približanje domen TIR, ki omogočijo vezavo adaptorskih proteinov, ki tudi vsebujejo domeno TIR – bodisi MyD88, TRIF, TRAM, SARM ali MAL (O'neill, 2007). Adapterski proteini posledično lahko posredujejo in sodelujejo pri nadaljnji TLR signalizaciji. Selektivno rekrutiranje teh adaptorjev za specifične TLR aktivira različne signalne poti, ki za vsak TLR sprožijo različen imunski odziv.

Signalne poti TLR so na splošno razvrščene v dve skupini:

- Od TRIF odvisna pot
- Od MyD88 odvisna pot

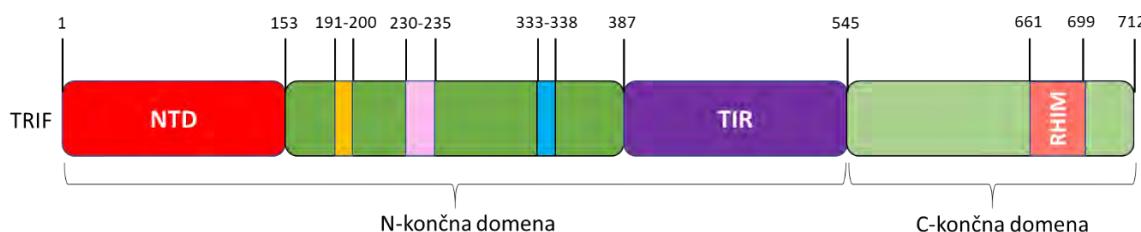
Ti dve poti sta odgovorni za aktivacijo transkripcijskih faktorjev NF- $\kappa$ B in članov skupine IRF (interferonski regulatorni faktor) ter kinaz MAP, ki skupaj regulirajo izražanje citokinov, kemokinov in IFN tipa 1, ki zaščitijo organizem pred (Vižintin & Bezeljak, 2015) (Kawasaki & Kawai, 2014).

Ker je bil predmet najine raziskave TRIF, bova podrobnejše opisala le njegovo funkcijo.

### 2.1.3. Adapterski protein TRIF

TRIF (Toll/IL-1R domain-containing adaptor-inducing IFN-  $\beta$ ) je adapterski protein, ki posreduje interakcije med TLR in komponentami za prenos signalov (NCBI, 2022). TRIF se neposredno veže na TLR3, vezavo na TLR4 pa mu omogoča adaptor TRAM. Aktivira tudi številne transkripcijske faktorje, kot so NF- $\kappa$ B, IRF3 in drugi. Aktivacija IRF void do proizvodnje citokinov IFN tipa 1 (IFN-  $\beta$ ).

Protein TRIF je zgrajen iz 712 aminokislin. V osnovi je sestavljen iz N-končne domene (1-544) in C-končne domene (545-712). TRIF gradilo N-končna domena (NTD; 1-153), odsek TBK1 (191-200), vezna zaporedja za TRAF2 (333-338) ter TRAF6 (230-235), domeno TIR (387-545), ter RHIM (661-699) (slika 4) (Ullah, Sweet, Mansell, Kellie, & Kobe, 2016). TRIF prav tako vsebuje vezavno mesto za TRAF3 (O'Neil & Bowie, 2007).



Slika 4: **Skica TRIF z označenimi domenami** (povzeto po: (Ullah, Sweet, Mansell, Kellie, & Kobe, 2016))

Funkcija NTD je inhibicija signaliziranja s TRIF, verjetno zaradi interakcije z domeno TIR. Vezava TBK1 na TRIF omogoča direktno fosforilacijo in aktivacijo transkripcijskega faktorja IRF3. Domena TIR, kot že omenjeno, omogoča vezavo na ostale protein, ki vsebujejo to domeno. C-končna regija RHIM je odgovorna za aktivacijo NF- $\kappa$ B in sprožitev celične smrti (Ullah, Sweet, Mansell, Kellie, & Kobe, 2016).

### 2.1.4. Producija citokinov IFN tipa 1

Citokini IFN so razdeljeni v dva razreda:

- IFN tipa 1 (citokina IFN $\alpha$  in IFN $\beta$ )
- IFN tipa 2 (citokin IFN $\gamma$ )

Oba razreda citokinov sta pomembna pri premagovanju virusnih infekcij, okužb. Producija IFN tipa 1 (IFN $\beta$ ) je povezana z aktivacijo poti signalne poti TLR odvisne od TRIF. TRIF preko TRAF3 naprej aktivira TBK1, ki je encim kinaza. Ta s fosforilacijo aktivira IRF3 ali IRF7. Dimerata dveh potujeta v jedro, kjer poteče sinteza IFN tipa 1 (O'Neil & Bowie, 2007). Ti citokini sprožajo protivirusni imunski odziv ter "vzdraženje" in aktivacijo T celic (Ullah, Sweet, Mansell, Kellie, & Kobe, 2016).

### 2.1.5. Aktivacija signalne poti NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B je transkripcijski faktor za uravnavanje genov, ki sprožijo signal za nastanek vnetja. Preko tega je s signalizacijo uravnavana aktivacija makrofagov in drugih celic prirojene imunosti. NF- $\kappa$ B je proteinski kompleks, ki se nahaja v citoplazmi v inhibirani obliki (vezan z zaviralnim proteinom I $\kappa$ B $\alpha$ ).

Ob receptorskem aktivacijskem signalu se inhibitor odveže in NF- $\kappa$ B pripotuje v jedro. Tam se veže na specifične genske predele in omogoča prepisovanje različnih genov, vključno z geni za prepisovanje citokinov. NF- $\kappa$ B je zelo pomemben za ustrezeno odzivanje imunskega sistema na okužbe (Ihan, 2020).

Pri signalne poti NF- $\kappa$ B poznamo dve glavni poti (slika 5):

- klasična (kanonična);
- alternativna (nekanonična).

#### Klasična pot:

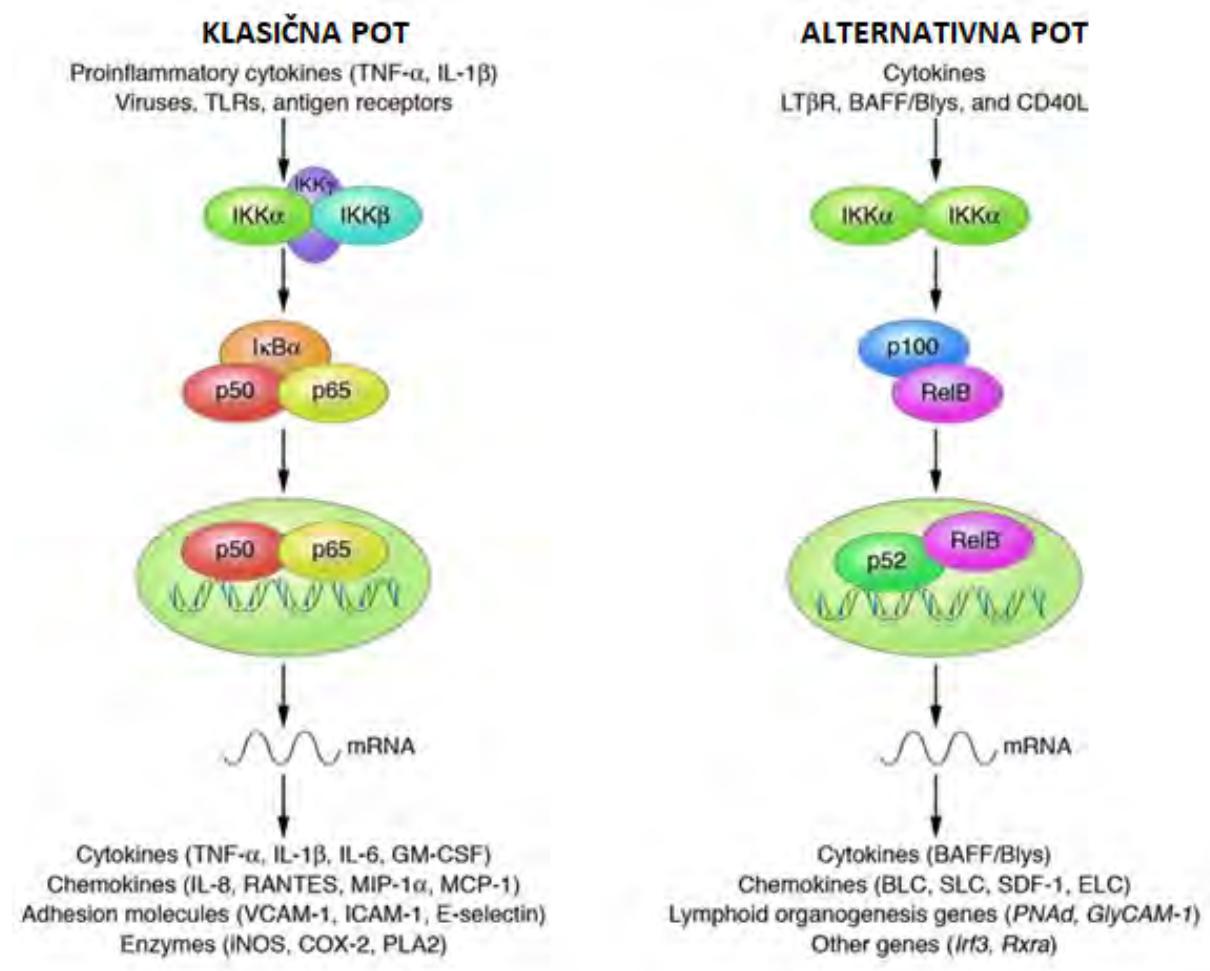
Sproži se kot odziv na mikrobe, virusne okužbe, izpostavljenosti protivnetnim citokinom ter kot odziv na posredovane signale limfocitov T in B. (Žnidarić, 2020)

Osrednji dogodek pri tej poti je fosforilacija I $\kappa$ B, ki omogoči aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- $\kappa$ B. Do osrednjega dogodka void več poti, med drugim tudi aktivacija TLR. Pri poti odvisni od TRIF TRAF6 skupaj s kinazo RIP1 aktivira kompleks, ki nato posredno aktivira NF- $\kappa$ B (Kawasaki & Kawai, 2014).

Druga možna pot v povezavi s TRIF je preko domene RHIM na C-koncu. Kinaza RIP1 prav tako vsebuje RHIM, kar omogoči interakcijo med temi dvema proteinoma. S pomočjo te povezave se aktivira NF- $\kappa$ B (O'Neil & Bowie, 2007).

### Alternativna pot:

Sprožijo jo specifični dražljaji. Ta pot poteka preko aktivacije encima IKK $\alpha$ , ta lahko neposredno fosforilira. Fosforilacija pri proteinih vključuje dodatek fosfatne skupine PO<sub>4</sub> na stransko skupino aminokisline v proteinu. PO<sub>4</sub> dodajajo posebni encimi, imenovani kinase. NF- $\kappa$ B, katera na koncu poti pripotuje v jedro, se veže na DNA in učinkuje. Alternativna pot aktivacije je bistvena za razvoj limfnih organov in pridobljen imunski odziv. (Žnidarić, 2020). TRIF ne omogoča aktivacije preko te poti.

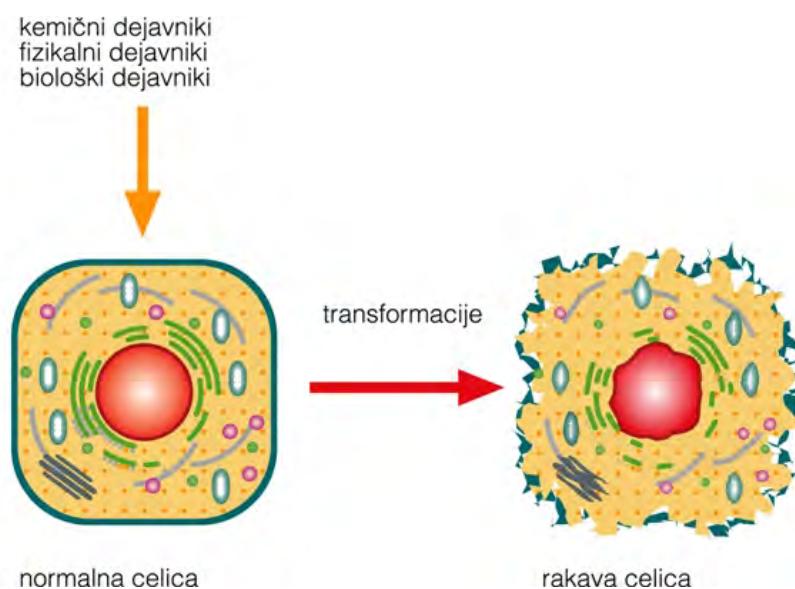


Slika 5: Aktivacija NF- $\kappa$ B. Dve signalni poti, klasična pot (levo) in alternativna pot (desno) (povzeto po: <https://www.jci.org/articles/view/26322/figure/1>.)

## 2.1.6. Rakave celice

Človeško telo je zgrajeno iz različnih tipov celic, ki rastejo in se delijo. Življenska doba večine celic je omejena. Celična delitev, s katero nastajajo nove celice, pa je nujna za obnavljanje tkiv in za ohranitev zdravega organizma.

Včasih pa lahko zaradi različnih dejavnikov pride do prekomerne delitve in kopičenja celic, kar povzroči nastanek tumorja.



Slika 6: **Primerjava površine membran normalne in rakave celice** (vir: [https://www.revija-vita.com/vita/56/Vpliv\\_elektromagnetnega\\_sevanja\\_na\\_zdravo\\_celico](https://www.revija-vita.com/vita/56/Vpliv_elektromagnetnega_sevanja_na_zdravo_celico))

Rak je ime za skupino sorodnih bolezni, ki jim je skupna nenadzorovana delitev celic, ki se lahko širijo v okoliška tkiva. Nastane lahko skoraj povsod v telesu. Ko se rak razvije, se normalni fiziološki procesi porušijo. Celice postajajo vedno bolj nenormalne, stare ali poškodovane. Takšne celice preživijo, kljub temu da bi morale že odmreti in nastanejo nove celice. Novo nastale nenormalne celice se lahko delijo brez ustavljanja in tvorijo spremembe, ki jim pravimo tumorji.

Na rakave celice pritiska imunski sistem in uniči vse, ki jih prepozna. Celic, ki so spremenile svoje lastnosti ne prepozna in mu uidejo. Večji je pritisk imunskega sistema, večja je možnost prepozname celic in njihove uničitve.

Proces uničevanja traja leta in je prava vojna med celicami imunskega sistema in rakavimi celicami. Imenujemo ga imunsko preurejanje in poteka pa v več fazah:

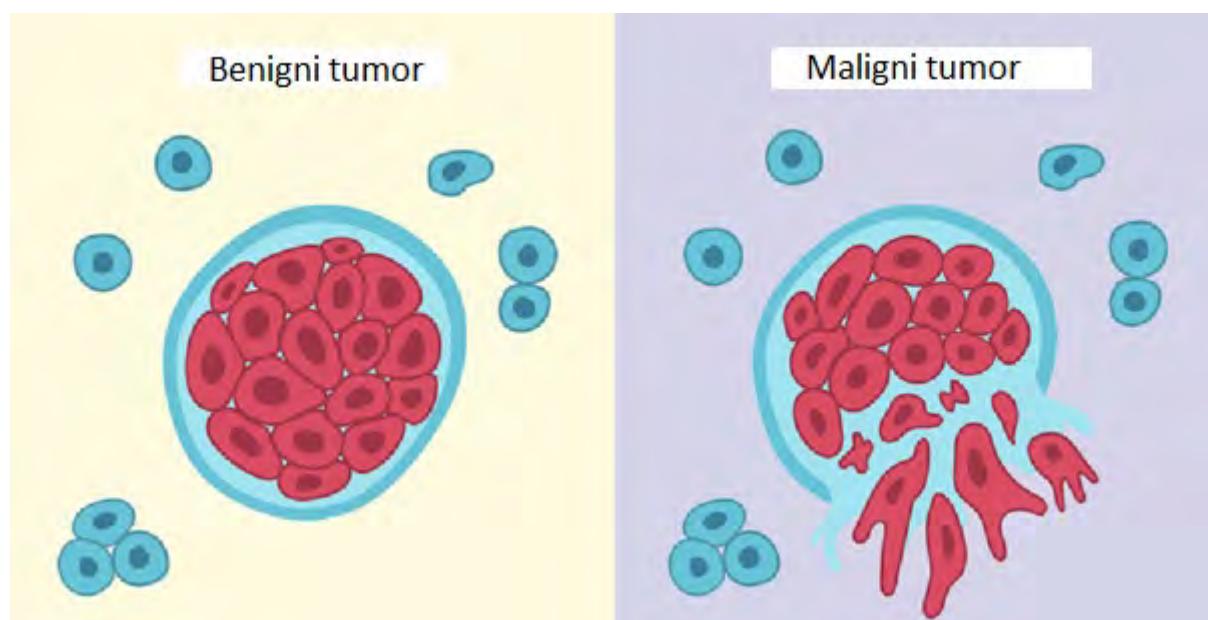
1. faza: Aktivna eliminacija vseh prepoznavno spremenjenih celic;
2. faza: Eliminacija še prepoznavnih celic, vendar ne vseh. Tiste, ki se izognejo, se nekontrolirano delijo. Rak je še obvladljiv;
3. faza: Imunski sistem odpove, tumor nekontrolirano raste in se razvija (Šimenc, 2022).

Tumorji so lahko:

- benigni
- maligni

Benigni tumorji so sestavljeni iz celic, ki so podobne normalnim, le da imajo ti omejeno sposobnost rasti. Če jih odstranimo z operacijo, se običajno ne ponovijo. Benigni tumorji se ne razširijo v druge dele telesa in ne ogrožajo življenja, zato jih ne štejemo med rakaste tvorbe. Medtem ko za maligne tumorje velja, da so sestavljeni iz nenormalnih celic, ki se neurejeno in nenadzorovano delijo ter razraščajo.

Tumorske celice se vraščajo v sosednja tkiva in jih okvarijo.



Slika 7: **Primerjava benignega in malignega tumorja** (vir: <https://hr.approby.com/razlike-izmedju-malignog-i-benignog-tumora/>, dostop: 24.3.2022)

Pomembna razlika med rakastimi celicami in normalnimi je v tem, da so rakaste celice manj specializirane kot normalne celice. To je eden od razlogov, da se za razliko od normalnih celic rakaste celice še naprej delijo brez ustavljanja. Poleg tega so rakaste celice sposobne prezreti signale, ki običajno govorijo celicam, naj se prenehajo deliti ali naj začnejo proces, znan kot programirana celična smrt, ki jo telo uporablja za odpravo nepotrebnih ali okvarjenih celic (Šimenc, 2022).

Rak je genetska bolezen, saj se pojavi z genetskimi spremembami. Lahko jih podedujemo od svojih staršev, se pojavijo spontano zaradi napak med delitvijo celic ali zaradi poškodb DNA, ki jih povzročajo določene izpostavljenosti okolja (kemikalije v tobačnem dimu, ultravijolični žarki Sonca...) (Serša , n.d.).

## 2.1.7. Imunoterapija raka

Poglobljeno razumevanje molekularnih in celičnih procesov, ki sodelujejo pri aktivaciji in delovanju imunskega sistema, je pripeljalo do razvoja številnih različnih oblik imunoterapij.

Imunoterapija je nova oblika učinkovitega sistemskega zdravljenja raka. Zdravila so naprimer monoklonska protitelesa, ki pomagajo imunskemu sistemu prepoznati in uničiti rakave celice.

Imunoterapija deluje popolnoma drugače kot kemoterapija, saj ta vzpodbudi naravni imunski odgovor telesa.

Eno najpomembnejših odkritij v imunoterapiji raka so bile kontrolne točke imunskega sistema in njene zaviralc. Kontrolne točke so receptorji, ki uravnavajo delovanje limfocitov T. Ti se povežejo s snovmi, ki jih rakave celice izražajo na svoji površini in tako zavrejo njihovo delovanje (Turnšek & Unk, 2020).

Prvo imunoterapijo za zdravljenje raka je izvedel William Coley proti koncu 19. stoletja. Na osnovi predhodne literature, ki je nakazovala na zmanjšanje rakavih tumorjev pacientov v primeru infekcije, je oblikoval zdravljenje, pri katerem je rakavim bolnikom injiciral bakterije in njihove toksine. Dandanes imamo na področju imunoterapije proti raku na voljo vrsto različnih pristopov, kot so zaviralc imunskih stikal, onkolitični virusi, cepiva proti raku in celične terapije (Dolenc, 2018).

Klasične terapije, kot so kemoterapija, kirurški posegi in radioterapija (obsevanje) ter razna biološka zdravila, kot so tarčna zdravila, delujejo pri večino rakavih obolenj. Vsem tem zdravljenjem je skupno, da se vsi osredotočijo na tumor oziroma oboleno mesto. Kar ne deluje pri vseh rakavih obolenjih. V ta namen so se razvila nova imunonloška zdravila, ki delujejo, tako da se osredotočijo na imunski sistem telesa. S tem ko imunski sistem prepozna rakave celice, jih lahko nato tudi uniči (Društvo onkoloških bolnikov Slovenije, 2017).

Cilj imunoterapije raka je sprožiti imunski odziv proti rakavim celicam, vendar v omejenem obsegu, saj bi prekomerno vnetje lahko vodilo v avtoimunost. Vloga imunskega sistema pri odstranjevanju rakavih celic je večstopenjska. Med pomembnimi začetnimi stopnjami je izločanje tumorskih antigenov in citokinov iz tumorja (Chen & Mellman, 2013).

### 2.1.8. Vloga TDP-43

TDP-43 ali protein TAR (transaktivten odziv), ki veže DNA, velik 43 kDa je protein, ki lahko veže DNA in RNA. Je jedrni protein in pomaga regulirati številne celične procese, povezane predvsem s presnovo RNA, kot so ohranjanje stabilnosti, spajanje in transkripcijska ter translacijska regulacija mRNA (informacijska RNA) (ALZFORUM, n.d.).

Protein TDP-43 je prisoten tudi kot povzročitelj nekaterih nevrodegenerativnih boleznih, kot so amiotrofična lateralna skleroza (ALS), frontotemporalna demenza (FTD), Alzheimerjeva bolezen in druge. Pri ALS in FTD je značilno, da se koncentracija citoplazemskega TDP-43 poveča, kjer protein tvori in inkluzije (Francois-Moutal & Miller, 2019).

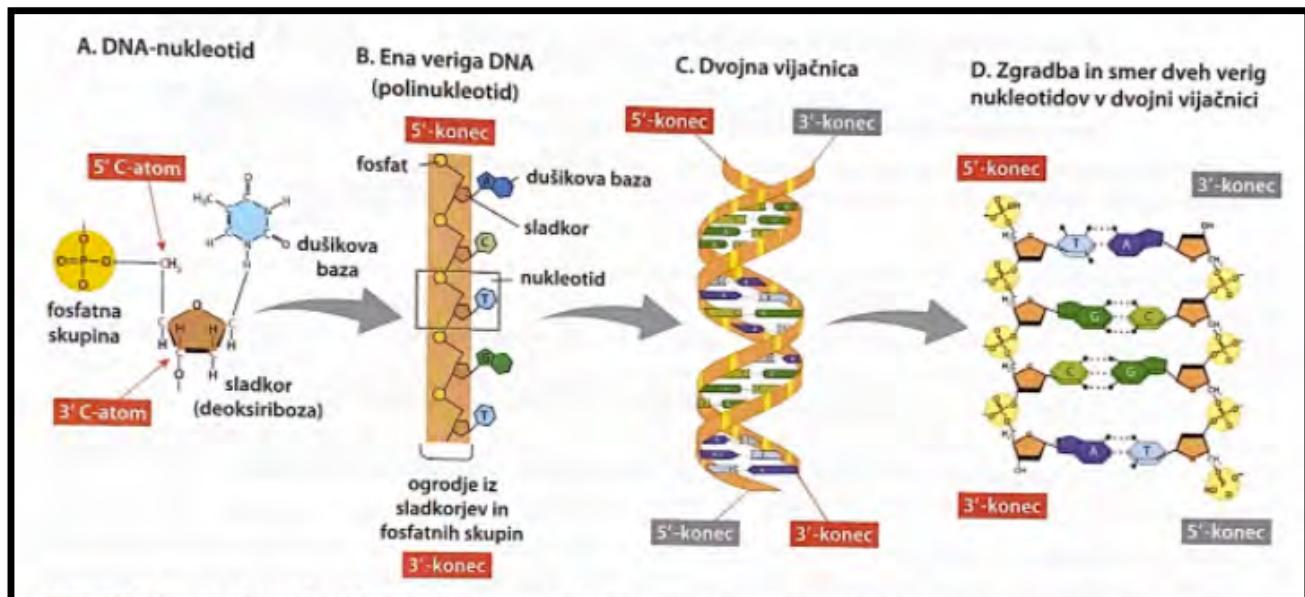
Sposoben je tvoriti skupke oziroma stresne granule, kar služi kot eden izmed obrambnih mehanizmov v celici. To kaže tudi na zaščitno vlogo proteina TDP-43 v celici (ALZFORUM, n.d.).

## 2.2. DNA

DNA (deoksiribonukleinska kislina) je dolga molekula z obliko dvojne vijačnice (dvojni heliks), ki je zgrajena iz nukleotidov. Nukleotid gradijo:

- dušikova baza (adenin (A), gvanin (G), citozin (C) in timin (T))
- sladkor deoksiriboza
- fosfatna skupina

Dušikove baze so med seboj povezane z vodikovimi vezmi. Smer verig nukleotidov v molekuli DNA: v dvojni vijačnici imata komplementarni verigi nasprotno smer, vsaka veriga pa ima dva konca. Tisti konec verige, na katerem je prosta fosfatna skupina se imenuje 5'-konec, drugi konec verige pa je 3'-konec. (Stušek & Vilhar, 2010)



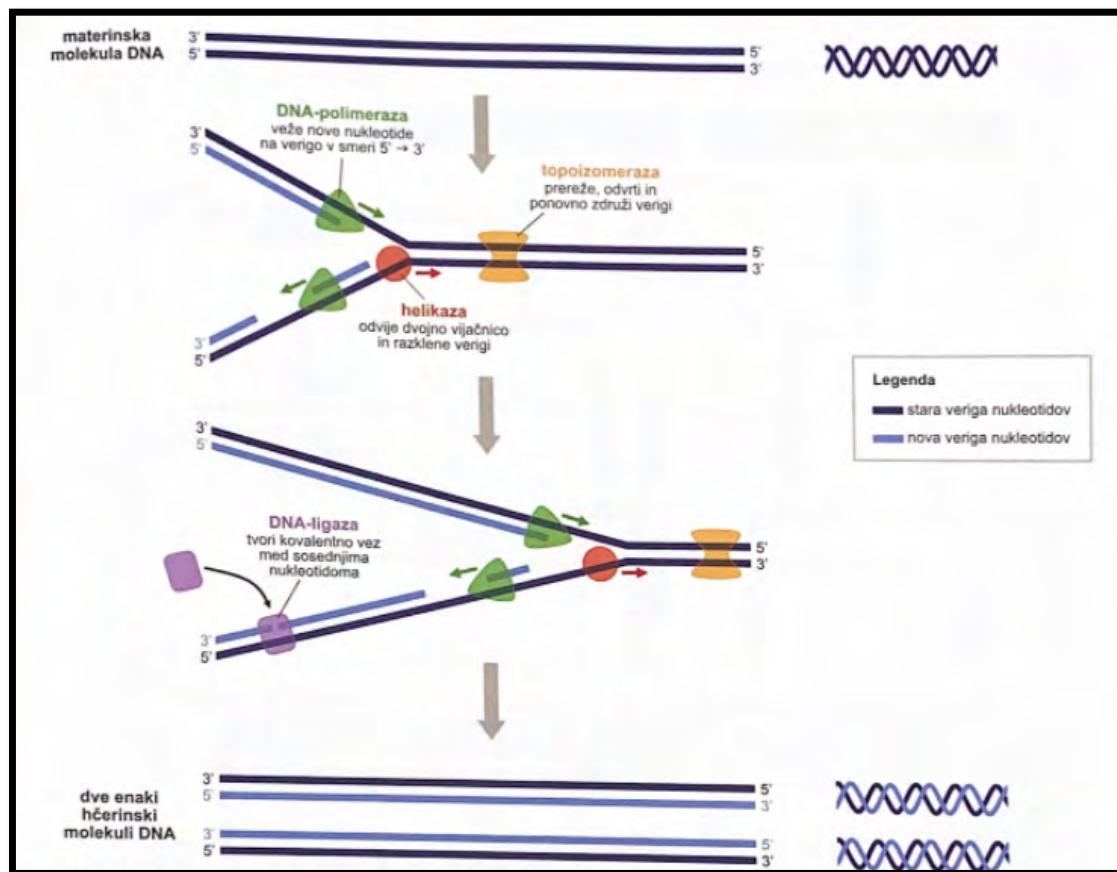
Slika 8: **Zgradba nukleotidov in molekule DNA.** A: shema zgradbe DNA-nukleotida, B: veriga nukleotidov, C: prikaz dvojne vijačnice, D: shema dveh verig nukleotidov v dvojni vijačnici (vir: učbenik Stušek, Vilhar; str. 347)

## 2.2.1. Podvajanje DNA

DNA nosi pomembne dedne, biološke in druge informacije. Za prenos teh informacij iz ene generacije v drugo, je DNA pred vsako celično delitvijo potrebno podvojiti. Podvajanje ali replikacija DNA je proces, pri katerem iz ene molekule nastaneta dve genetsko enaki molekuli DNA. (Slika 2)

Pri podvajjanju pride do nastanka podvojevalnih vilic. To je območje na molekulih DNA, kjer se obe verigi nukleotidov ločita (pride do prekinitev vodikovih vezi med verigama), podobno kot zadrga. Ločitev dvoverižne DNA v dve enojni verigi omogoča encim helikaza. Encim DNA polimeraza, se nato veže na enojno verigo DNA in začne na nastajajočo verigo vezati nove nukleotide, ki so komplementarni nukleotidom v stari verigi, kar vedno poteka v smeri od 5' proti 3'- koncu. Pri podvajjanju DNA nastajata dve verigi nukleotidov. Veriga, ki nastane v enem kosu, se imenuje vodilna veriga. Zastajajoča veriga pa nastaja v več krajsih kosih, ki se imenujejo Okazakijevi fragmenti.

Ker sosednji Okazakijevi fragmenti niso kovalentno povezani med seboj, se na ta mesta veže encim DNA ligaza, ki te fragmente kovalentno poveže. Tako je proces podvojevanja DNA končan, nastali pa sta dve genetsko enaki molekuli DNA (Stušek & Vilhar, 2010).



Slika 9: **Shema delovanja encimov, ki sodelujejo pri podvajanju DNA** (vir: učbenik Stušek, Vilhar; str. 349)

## 2.3 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo je tehnika, ki se uporablja za kopiranje in pomnoževanje specifičnih odsekov DNA iz izbranega vzorca DNA. Lahko rečemo, da gre za kloniranje DNA, ne da bi pri tem potrebovali žive celice.

Verižno reakcijo s polimerazo se izvaja v reakcijski zmesi, raztopini, ki vsebuje:

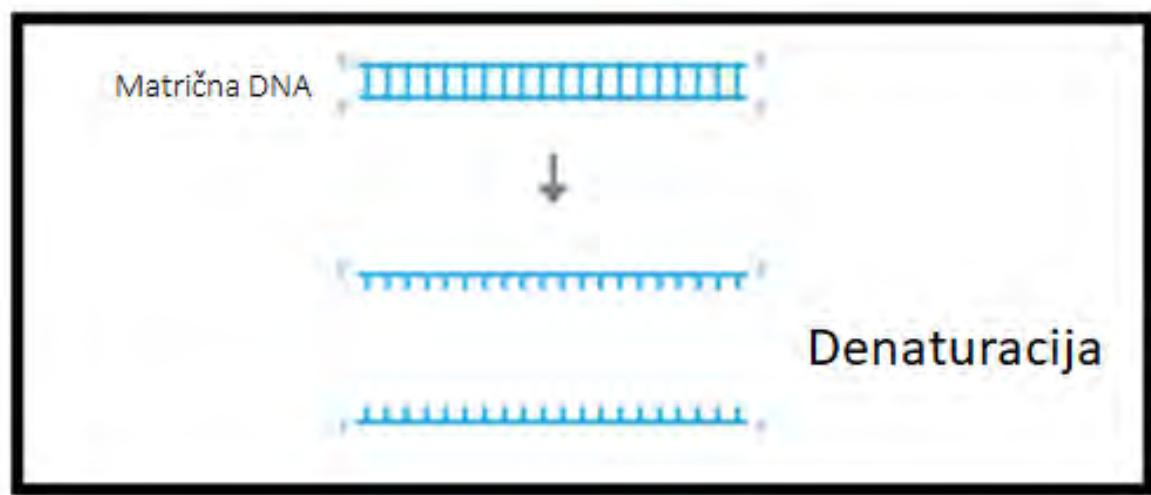
- Matrično DNA
- Začetne oligonukleotide (smerni in protismerni)
- dNTP (deoksinukleotidi v prebitku)
- Termostabilno DNA polimerazo (omogoča kopiranje odsekov DNA)
- Pufrsko raztopino (z dodatki Mg<sup>2+</sup>)

Reakcija PCR je razdeljena na tri faze:

- **Denaturacija**

Je prvi korak v PCR reakciji. Gre za ločitev dveh komplementarnih verig DNA, kar se doseže z dvigom temperature na 96-98°C. To je temperatura, pri kateri se DNA denaturira: pri visokih temperaturah vodikovih vezi ni več mogoče vzdrževati in se zato prekinejo, kar povzroči, da se dvostranska DNA loči v enoverižno DNA.

To je pomembna faza, saj se le tako lahko začetni oligonukleotidi vežejo na DNA v naslednji fazi.

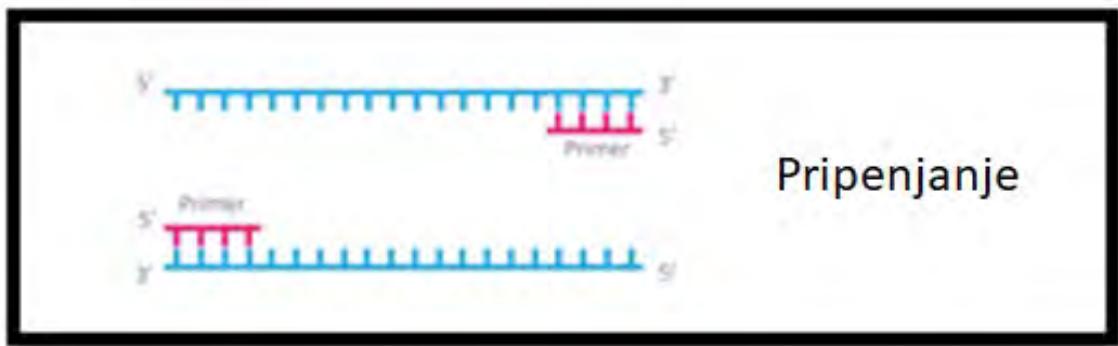


Slika 10: **Shema denaturacije DNA** (povzeto po: <https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/One%20PCR%20Cycle%20Illustration-01den.jpg>, dostop: 24.3.2022)

- **Pripenjanje oligonukleotidov**

Pripenjanje začetnih oligonukleotidov dosežemo z znižanjem temperature raztopine na 55-60 °C. Faza pripenjanja začetnih oligonukleotidov traja 5 sekund, nato sledi faza podaljševanja.

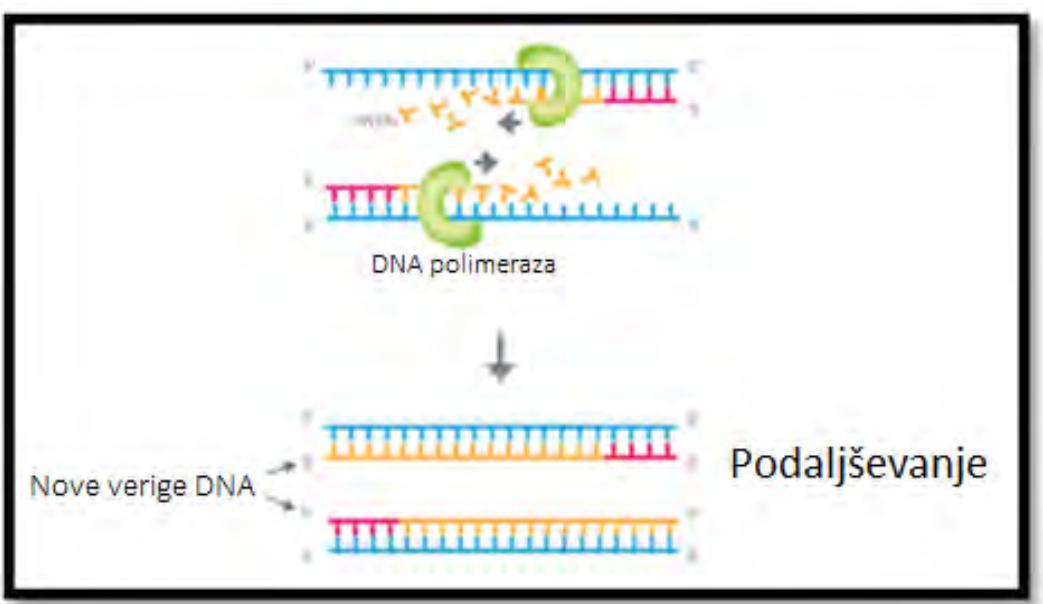
Pri reakciji uporabimo dve vrsti začetnih oligonukleotidov - smerni in protismerni. Smerni se mora ujemati z zaporedjem na začetku odseka DNA, ki ga želimo namnožiti, protismerni pa se mora ujemati z zaporedjem na koncu odseka DNA, ki ga želimo namnožiti.



Slika 11: **Shema pripenjanja oligonukleotidov na enoverižno DNA** (povzeto po: <https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/One%20PCR%20Cycle%20Illustration-01Anneal.jpg>, dostop: 24.3.2022)

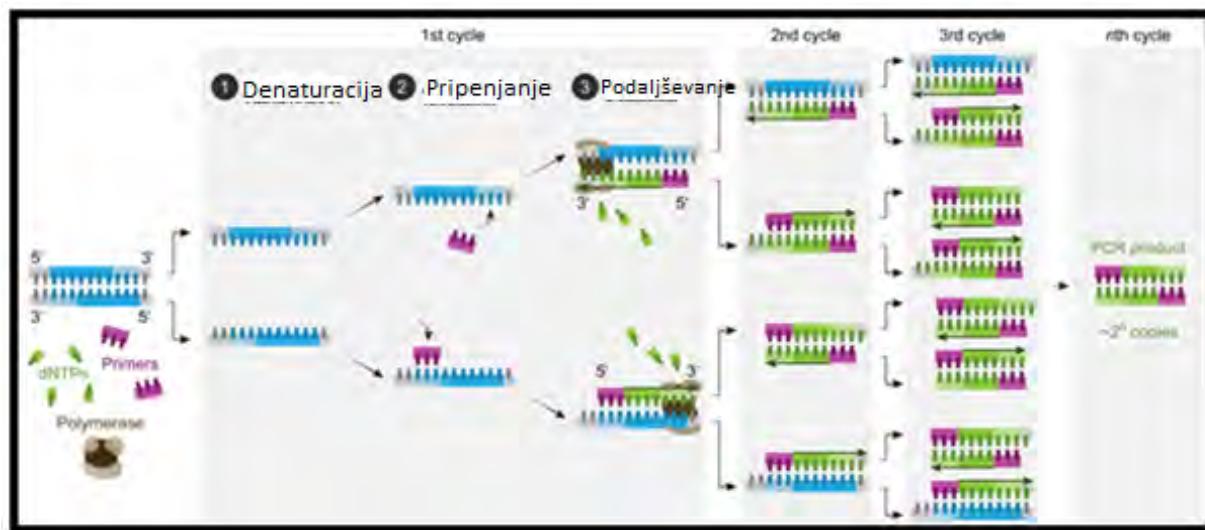
- **Podaljševanje**

Ta faza poteka pri 68-72 °C, kar je optimalna temperatura za delovanje DNA polimeraze (mora biti termostabilna). DNA polimeraza se veže na mesta, kjer so začetni oligonukleotidi vezani na DNA. Nato se pomika vzdolž DNA v smeri 5' proti 3' ter veže komplementarne dNTP (proste deoksinukleotide). Tako tvori novo nastajajočo DNA verigo.



Slika 12: **Shema podaljševanje DNA** (povzeto po: <https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/One%20PCR%20Cycle%20Illustration-01Extension.jpg>, dostop: 24.3.2022)

Reakcija PCR poteka v ciklih. Za prvih nekaj ciklov je značilno, da se pomnožuje matrična DNA, kasneje pa s pomnoževanjem produktov (želenih odsekov DNA) dosežemo eksponentno rast števila produktov iz cikla v cikel. Običajno število ciklov je 40-45 (slika 24).



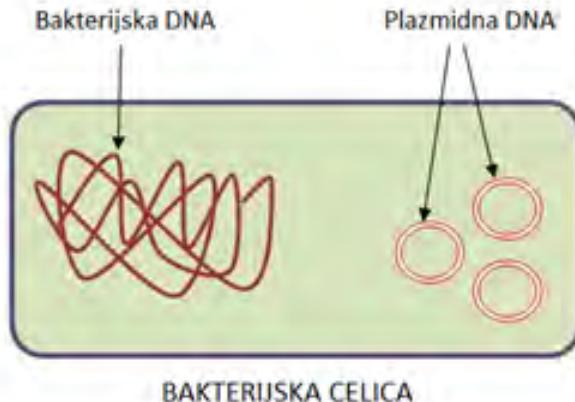
Slika 13: **Shema celotne PCR reakcije** (povzeto po:  
[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ab/Polymerase\\_chain\\_reaction-en.svg/1920px-Polymerase\\_chain\\_reaction-en.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/ab/Polymerase_chain_reaction-en.svg/1920px-Polymerase_chain_reaction-en.svg.png), dostop: 24.3.2022)

Za izvedbo PCR reakcij se uporablja termostate, s katerimi se lahko natančno določa temperature, število ponovitev ciklov, trajanje inkubiranja in drugo.

## 2.4. Vnos DNA v celice

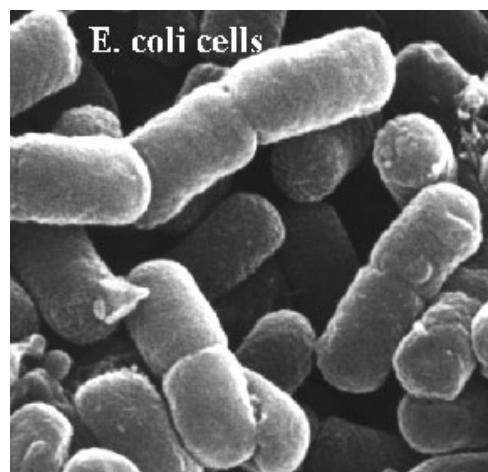
Najpogosteje DNA v celice vnašamo v obliki plazmidov.

**Plazmid** je krožna dvovijačna, ekstrakromosomska molekula DNA (ločena od kromosomske DNA) in sposobna avtonomne replikacije. Običajno se naravno pojavlja v bakterijah, včasih pa ga najdemo v evkariontskih organizmih. Plazmidi, ki se uporabljajo v genskem inženiringu, se imenujejo vektorji. Imajo lastnost dobrega prehajanja v druge celice in se zato uporabljajo za prenos genov v organizme. Plazmidi pogosto vsebujejo gene, ki dajejo bakteriji, ki jih hrani, selektivno prednost, kot je odpornost bakterije na antibiotike (Bionity, n.d.).



Slika 14: Prikaz plazmidne DNA v bakterijski celici  
(povzeto po: <https://i.differencevs.com/images/002/image-4621-1.jpg>, dostop: 24.3.2022)

V molekularni biologiji in biotehnologiji se najpogosteje uporablja bakterije ***Escherichia coli*** (*E. Coli*). Gre za bakterijo, ki jo običajno najdemo v spodnjem črevesju toplokrvnih živali. Večina sevov *E. coli* je neškodljivih. Te bakterije je mogoče enostavno gojiti, njena genetika pa je sorazmerno preprosta in se z njo lahko manipulira, zaradi česar je eden najbolje raziskanih prokarionskih modelnih organizmov in pomembna vrsta v biotehnologiji. *E. coli* je leta 1885 odkril nemški pediater in bakteriolog Theodor Escherich in je zdaj razvrščen kot del družine gama-proteobakterij *Enterobacteriaceae* (WHO, 2018).



Slika 15: Mikroskopska slika bakterije *E.Coli* (vir: [http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/dossiers/microbio/micro-c1\\_gb.htm](http://envlit.ifremer.fr/var/envlit/storage/documents/dossiers/microbio/micro-c1_gb.htm), dostop: 24.3.2022)

#### 2.4.1. Načini vnosa DNA v bakterijske celice

Prokarionti (bakterije) lahko eksogeno (tujo) DNA iz okolja v celico prevzamejo na tri načine:

- **Transdukacija**

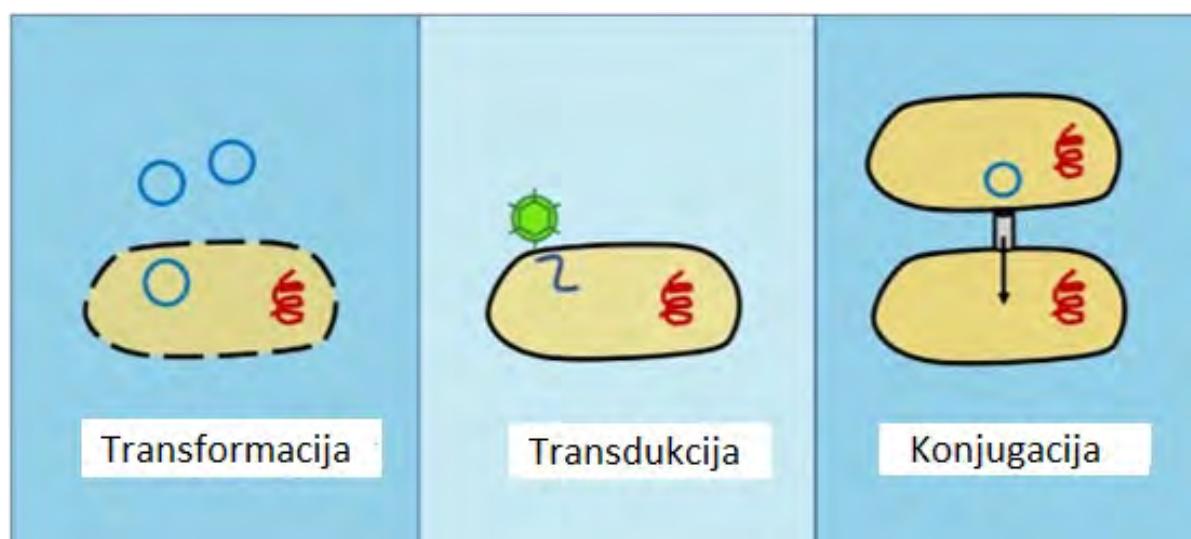
Je mehanizem, kjer virus vnese v bakterijo določen genski material.

- **Konjugacija**

Je mehanizem, kjer se genetski material prenese v bakterijo preko neposrednega stika. pride do začasnega zlitja dveh bakterij, kjer ena bakterija genetski material odda, druga pa genetski material sprejme.

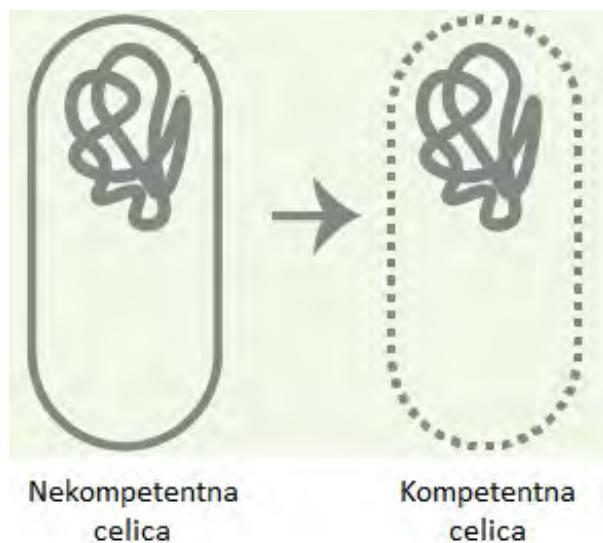
- **Transformacija**

Je mehanizem vnosa gole DNA v celico, s temperaturnim šokom ali elektroporacijo.



Slika 16: **Načini vnosa DNA v prokariontsko celico** (Povzeto po: [https://blog.addgene.org/hfs/hubfs/4\\_19%20to%206\\_19/TransformationTransductionConjugationTransferction\\_AC\\_2019\\_0\\_6\\_14/transformation-transduction-conjugation-transfection.jpg?width=600&name=transformation-transduction-conjugation-transfection.jpg](https://blog.addgene.org/hfs/hubfs/4_19%20to%206_19/TransformationTransductionConjugationTransferction_AC_2019_0_6_14/transformation-transduction-conjugation-transfection.jpg?width=600&name=transformation-transduction-conjugation-transfection.jpg), dostop: 25.3.2022)

V biotehnologiji vnašamo plazmide v kompetentne celice. Površina celic je namreč negativno nabita. Prav tako je negativno nabita tudi DNA. Da so celice zmožne sprejeti plazmidno DNA, morajo postati kompetentne (prepustne). Nekatere celice so že naravno kompetentne, nekatere pa se naredi kompetentne umetno z uporabo  $\text{CaCl}_2$  (slika 17). Poleg tega  $\text{CaCl}_2$  tudi ublaži negativni naboj molekul DNA. S tem prepreči odboje med celično membrano in DNA.



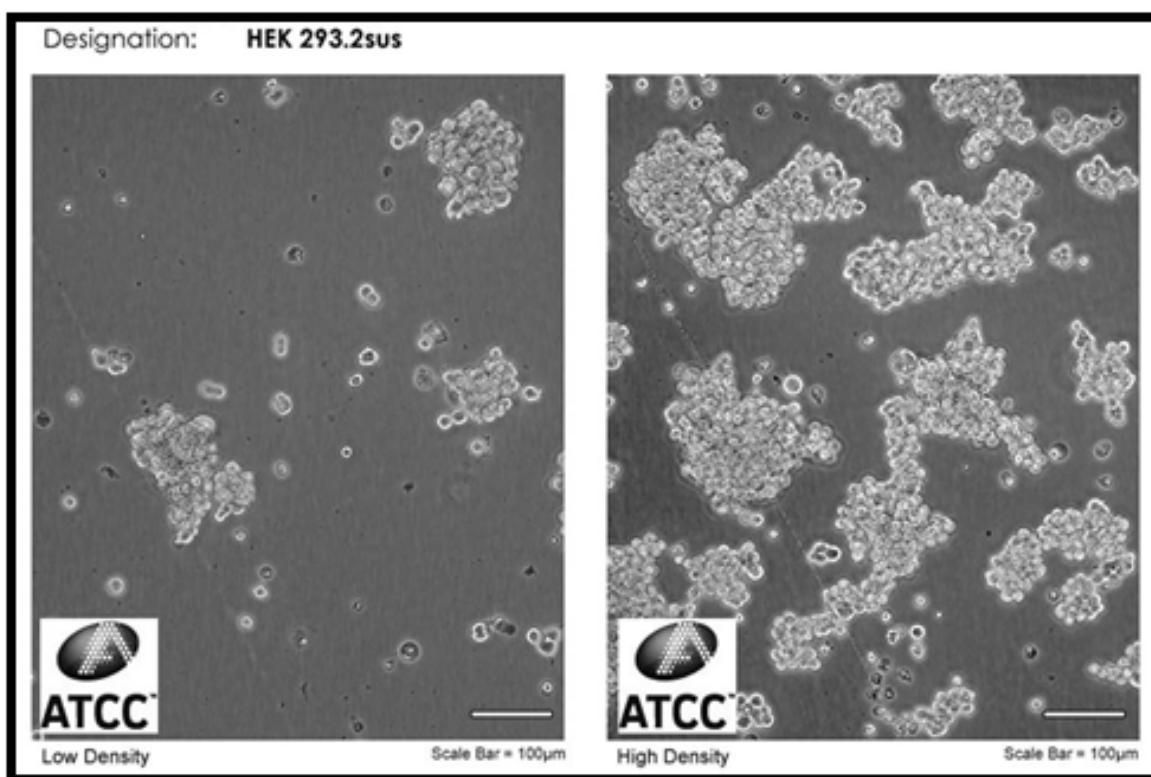
Slika 17: **Razlika med nekompetentno in kompetentno celico** (povzeto po: <https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/Prep%20Step.png>, dostop: 24.3.2022)

Dva glavna načina za transformacijo plazmidne DNA v celice sta elektroporacija in temperaturni šok. Pri prvem zaradi izpostavitve celice električnemu polju pride do povečanja prepustnosti celične membrane in posledično vnosa DNA (Kotnik, in drugi, 2005). Pri temperaturnem šoku pa se zaradi temperature spremeni konsistenco celične stene, nastanejo pore, ki omogočajo prehod plazmidne DNA.

Plazmidna DNA, uporabljena v transformaciji, ne vsebuje le gena, ki se ga proučuje, temveč med drugim tudi zaporedje za odpornost proti antibiotiku. Tako samo bakterije, ki so uspešno sprejele plazmidno DNA, zrastejo na ploščah (MyBioSource, n.d.).

## 2.4.2. Načini vnosa DNA v sesalske celice

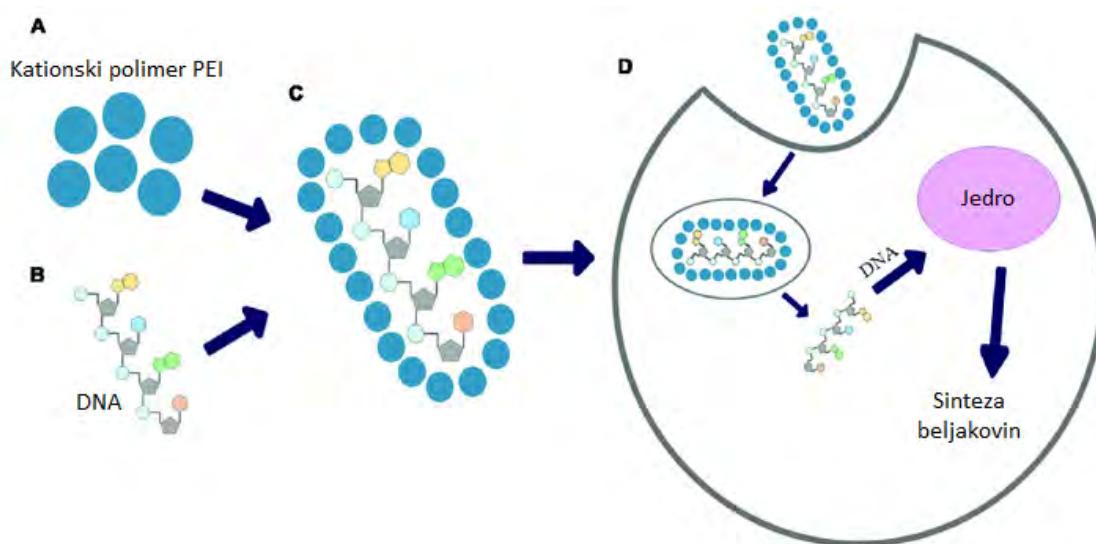
V mikrobioloških raziskavah se že vrsto let pogosto uporablja celice HEK293 (Human Embryonic Kidney Cells). HEK293 so ledvične embrionalne (zarodkove) celice. Celična linija HEK293 je bila prvotno izdelana leta 1973. Njihova uporaba je najbolj razširjena zaradi razmeroma nezahtevnega gojenja in vzdrževanja, odpornosti, hitrega podvojevanja in njihove nagnjenosti k transfekciji (vnos tujé DNA). Zaradi te lastnosti se jih pogosto uporablja kot gostitelje za izražanje genov. So tudi pogosto uporabljena celična kultura pri raziskavah raka. Premer celic HEK293 je med 11 in 15 µm (odvisen tudi od pogojev gojenja), čas njihove podvojitve pa je približno 34 do 36 ur. (HEK293 CELL LINE, 2022)



Slika 18: Mikroskopska slika celic HEK293 (vir: <https://www.synthego.com/hek293>, dostop: 24.3.2022)

## Transfekcija

Transfekcija je proces pri katerem se eksogena (zunajcelična) DNK vnaša v evkariotske živalske celice. Metoda je zelo podobna transformaciji, saj gre v obeh primerih za vnašanje eksogene (zunajcelične) DNA v celice, le da so pri transformaciji to bakterije.



Slika 19: **Prikaz transfekcije v evkariotski celici** (povzeto po:  
[https://www.researchgate.net/publication/353374112/figure/fig1/AS:1048199024373760@1626921530\\_050/The-proposed-mechanism-of-chemical-transfection-A-transfection-reagent-B-Nucleic.png](https://www.researchgate.net/publication/353374112/figure/fig1/AS:1048199024373760@1626921530_050/The-proposed-mechanism-of-chemical-transfection-A-transfection-reagent-B-Nucleic.png),  
dostop: 24.3.2022)

Pogost način vnosa DNA v gostiteljsko celico s transfekcijo je z uporabo stabilnega kationskega polimera PEI (polietilenimin). PEI kompleksira z negativno nabitimi molekulami DNA in nastane pozitivno nabit kompleks DNA-PEI. Ta je zmožen premagovanja elektrostaticnega odbijanja od celične membrane in se je zmožen vezati na anionsko (negativno nabito) celično površino. Posledično lahko celica endocitozira (vnese skozi celično membrano) kompleks DNA-PEI in DNA se tako sprosti v citoplazmo. Za transfekcijo se pogosto uporablja celično linijo HEK293, saj je zanjo značilno, da transfekcija pri njej dobro poteka (Bionity, n.d.).

## 2.5. Ločevanje molekul DNA z agarozno gelsko elektroforezo (AGE)

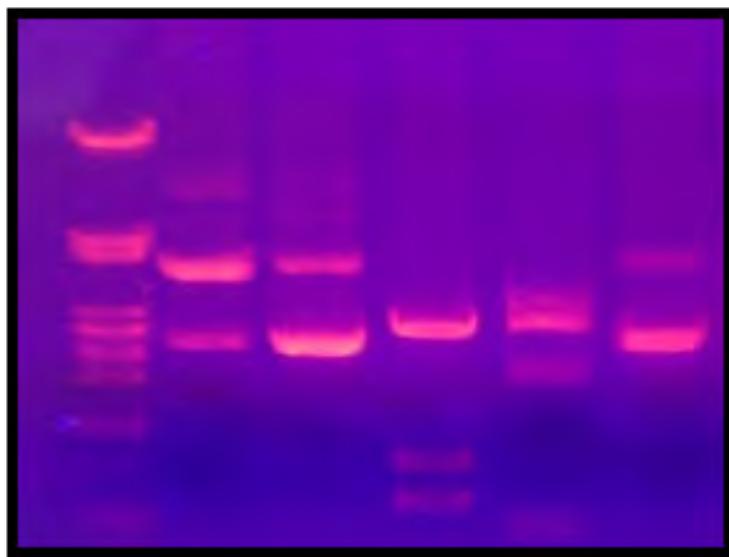
Elektroforeza je proces ločevanja različno nabitih molekul v električnem polju. Gre za dokaj hitro tehniko, ki se uporablja predvsem pri analizi ali čiščenju najrazličnejših biomolekul, na primer proteinov in nukleinskih molekul. Poteka v osnovi, ki je lahko agarozna (za ločevanje DNA) ali poliakrilamidna (za ločevanje proteinov).

Molekule DNA imajo negativni naboj zaradi fosfatnih skupin, zato pri agarozni gelski elektroforezi potujejo v električnem polju proti pozitivnem polu, torej proti anodi.

AGE omogoča ločevanje DNA glede na dolžino (število baznih parov v verigi DNA). Njena gibljivost (mobilnost) je odvisna od velikosti in oblike, tako se večje molekule primikajo počasneje. Krožna DNA se premika hitreje kot linearna DNA iste velikosti. Na mobilnost vpliva tudi lastnost vzorca, večji kot je naboj iona, hitreje potuje, in jakost električnega polja ter sestava elektroforeznega pufera.

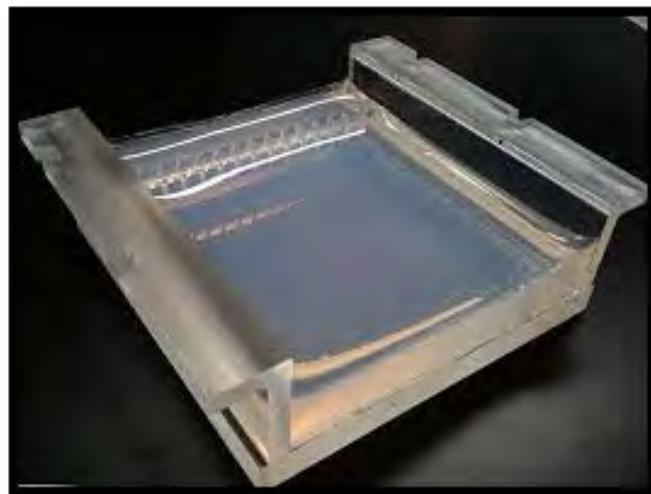
DNA v agaroznem gelu najpogosteje obarvamo z etidijevim bromidom (EtBr). Ta se vrine med bazne pare, kar nam omogoča, da ga vidimo pod svetlobo UV (slika 25).

Kadar je molekula etidijevega bromida (EtBr) izpostavljena UV svetlobi, se elektroni znotraj aromatskega obroča molekule vzbudijo v višja energijska stanja in pri prehajanju nazaj v osnovno oddajajo energijo v obliki svetlobe.



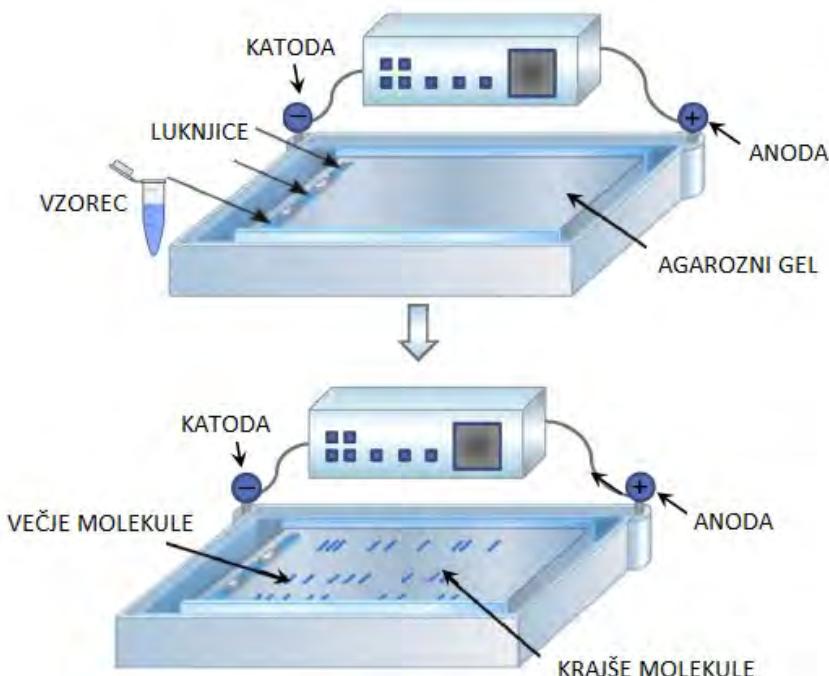
Slika 20: **Prikaz agaroznega gela po izvedeni elektroforezi, izpostavljenega svetlobi UV** (vir: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/60/Gel\\_electrophoresis\\_2.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/60/Gel_electrophoresis_2.jpg), dostop: 24.3.2022)

Agarozni gel pripravimo tako, da trdno agarozo, ki je linearni polimer, v obliki soli s segrevanjem raztopimo v elektroforeznem pufru. Najbolj uporabljeni so tris-acetatni pufer ali TAE (tris/borat/EDTA) ter litijev-boratni pufer. Med ohlajanjem pripravljene raztopine se tvori agarozni gel. Gostota gela je odvisna od koncentracije agaroze.



Slika 21: Kad za izvedbo elektroforeze, z agaroznim gelom  
(povzeto po: <https://wikikinht.com/include/agarose/agarose-3.jpg>, dostop: 24.3.2022)

Po končani elektroforezi lahko izoliramo izbrane fragmente iz agaroznega gela. Najpogosteje se uporablja reagenti, ki temeljijo na principu vezave DNA na silikatne membrane v pogojih visoke ionske moči. Raztopina, ki raztoplji gel, vsebuje kaiotropne soli, te pa omogočajo vezavo DNA na nosilec. Po spiranju nečistoč in zamenjavi pufra se DNA sprosti z nosilca in preide v vodno fazo.

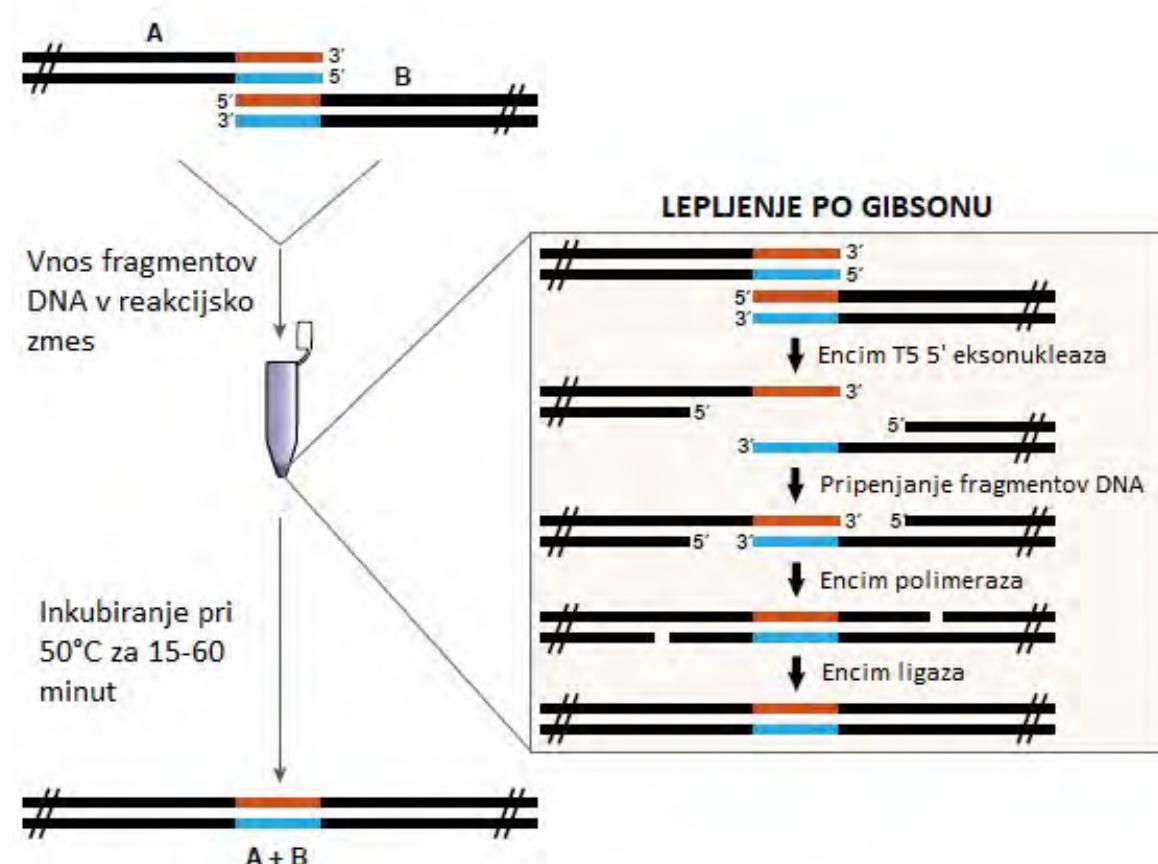


Slika 22: Vnos vzorcev na agarozni gel (povzeto po: <https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780444593788000062-f06-01-9780444593788.jpg>, dostop: 24.3.2022)

## 2.6. Združevanje fragmentov DNA z lepljenjem po Gibsonu

Lepljenje po Gibsonu je tehnika, ki omogoča hitro, enostavno in učinkovito združevanje dveh ali več linearnih fragmentov DNA v en daljši fragment.

Za reakcijo so potrebni fragmenti DNA s prekrivajočimi se konci. Vse komponente je potrebno inkubirati pri 50 °C za 1 uro. Celotna reakcija poteka v eni sami mikrocentrifugirki, kjer so vse komponente združene skupaj, kar ustvarja to metodo lepljenja DNA fragmentov še bolj uporabno (Warwick, 2014).



Slika 23: **Lepljenje po Gibsonu** (povzeto po: <https://www.neb.com/~media/Catalog/All-Products/0AA961B294E444AFBEDD5C4A904C76E6/Long%20Description/E2611a.jpg>, dostop: 24.3.2022)

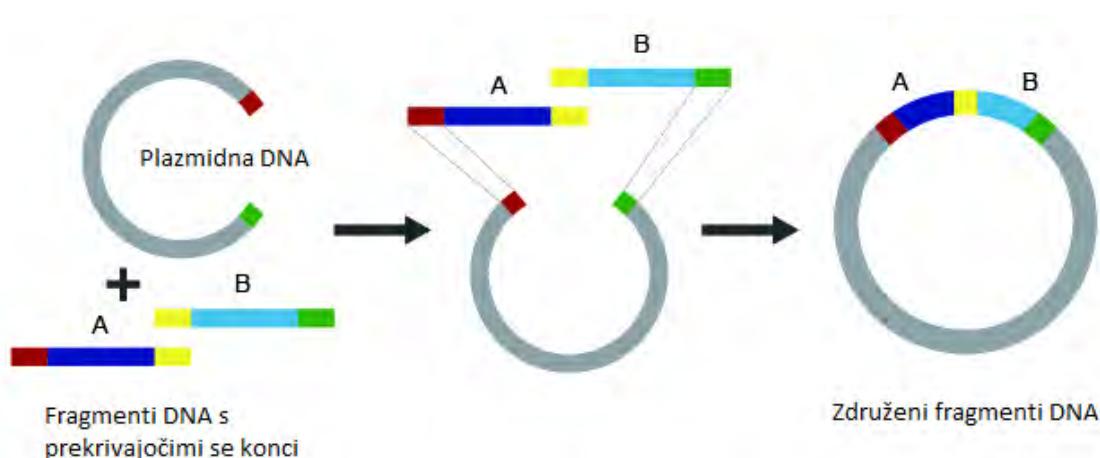
**Ključne komponente za reakcijo so:**

- dvooverižni DNA fragmenti s prekrivajočimi se konci
- T5 5' eksonukleaza
- DNA polimeraza
- ligaza
- lineariziran vektor

### Potek (slika 24):

- Priprava fragmentov DNA s prekrivajočimi se konci, kar se naredi z reakcijo PCR.
- Encim T5 eksonukleaza ustvari enoverižne 3' DNA previse z "žvečenjem" nazaj s 5' konca. Komplementarni fragmenti DNA se lahko posledično spojijo drug z drugim.
- Preostale vrzeli zapolni DNA polimeraza, ki v smeri od 5' proti 3' koncu, vstavlja nukleotide v verigo DNA.
- Encim ligaza tvori manjkajoče kovalentne vezi med sosednjimi nukleotidi in tako ustvari nepretrgano stabilno DNA

(BarrickLab, 2021)



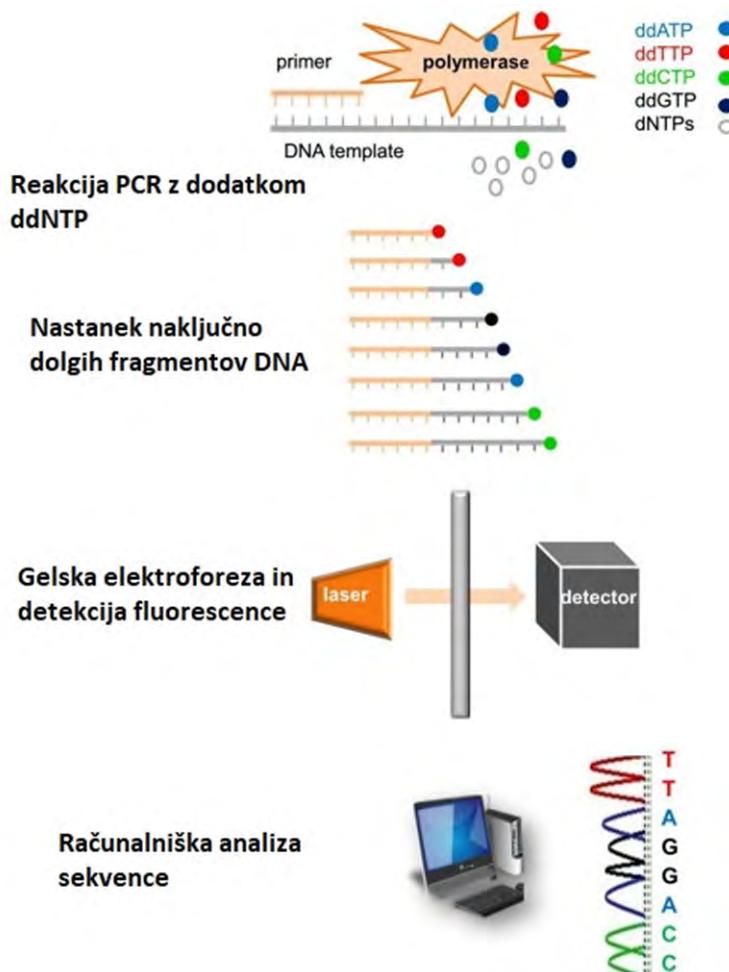
Slika 24: **Prikaz lepljenja fragmentov DNA s prekrivajočimi se konci v plazmidno DNA (vektor)** (povzeto po: <https://www.molecularcloud.org/assets/img/resource/html-1.jpg>, dostop: 24.3.2022)

## 2.7. Sekvenciranje po Sangerju

Sekvenciranje po Sangerju je metoda za določevanje natančnega nukleotidnega zaporedja molekule DNA. To metodo je leta 1977 odkril Friderick Sanger s sodelavci.

Za sekvenciranje po Sangerju se pogosto uporablja tudi imeni sekvenciranje z zaustavitvijo verige z dideoksinukleotidom ali ime dideoksi metoda sekvenciranja, saj temelji na uporabi dideoksinukleotidov (ddNTP), ki se pri reakciji PCR naključno vključijo v novo nastajajočo verigo in tako končajo nastajanje te verige (Merck, 2022).

Običajni nukleotidi, ki gradijo molekule DNA, se imenujejo deoksinukleotidi (dNTP). Ti lahko med seboj tvorijo fosfodiesterske vezi. ddNTP pa nimajo hidroksilne (OH) skupine na 3' mestu, kakor jo imajo dNTP in zato ne morejo tvoriti nadaljnih fosfodiesterskih vezi, to pa onemogoča DNA polimerazi nadaljnjo izgradnjo nukleotidne verige. To lastnost ddNTP izrablja metoda sekvenciranja po Sangerju (Slavec & Geršak, 2022).



Slika 25: **Shema sekvenciranja po Sangerju** (povzeto po: <https://ars.els-cdn.com/content/image/3-s2.0-B9780128022344000021-f02-37-9780128022344.jpg>, dostop: 24.3.2022)

Pri reakciji PCR se doda štiri vrste ddNTP in sicer ddATP, ddTTP, ddCTP in ddGTP. Ti se med seboj razlikujejo po vrsti nukleotida, ki ga gradi (adenin, timin, citozin ali gvanin). Vsakič ko se na nastajajočo verigo vgradi ddNTP, se sinteza verige zaustavi. Tako so produkti reakcije PCR različno dolgi fragmenti DNA, saj je bila vsaka reakcija ustavljena na različni točki. Vsak od štirih različnih dodanih ddNTP je označen s fluorescentnim barviliom, ki oddaja svetlobo pri različni valovni dolžini. Analiza nastalih fragmentov poteka s kapilarno elektroforezo. Ker so predhodno dodani ddNTP fluorescentno obarvani, jih lahko avtomatizirana laserska naprava med potovanjem skozi gel zazna in loči med seboj na podlagi valovne dolžine in intenzivnosti fluorescence. Zaznani rezultati so nato računalniško analizirani. Po analizi računalniški sistemi ustvarijo štiribarvni kromatogram, ki prikazuje rezultate sekvenciranja, kjer vsaka barva predstavlja svoj nukleotid. Kromatogram je sestavljen iz številnih vrhov, kjer vsak vrh predstavlja en sam nukleotid v zaporedju DNA (Merck, 2022).

## 2.8. Dvojni luciferazni test

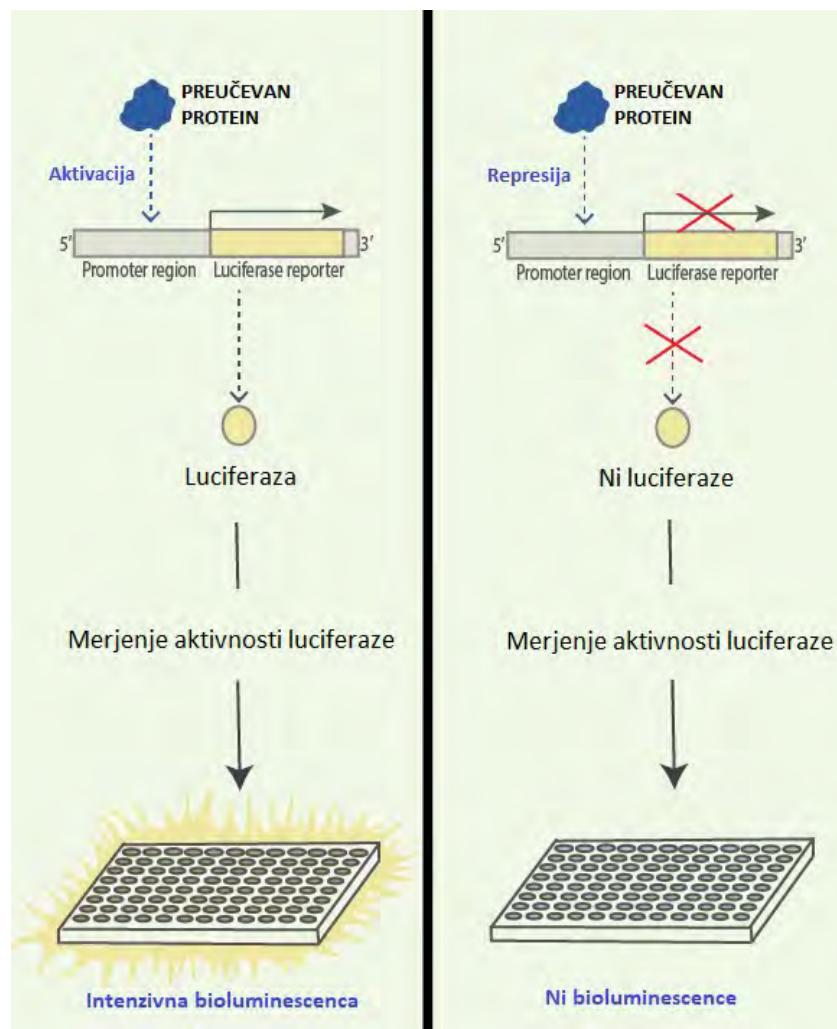
### Luciferaza

Je encim, ki omogoča nastanek bioluminescence (oddajanje svetlobe) v določenih organizmih, kot so bakterije, vodne živali in žuželke. Obstaja več vrst luciferaz. Pogosto uporabljeni za dvojni luciferazni test sta encima kresničkina luciferaza iz organizma *Photinus pyralis* in luciferaza iz koralnjaka *Renilla reniformis*.

V molekularni biologiji se luciferaze običajno uporablja kot poročevalske encime (reporterje), s katerimi se spremišča izražanje genov. Za encime luciferaz je značilno, da katalizirajo kemijsko reakcijo v kateri se luciferin oksidira v oksiluciferin. Ta reakcija je energijsko zelo učinkovita, saj je skoraj vsa vložena energija v reakcijo pretvorjena v svetlobo. Kresničkina luciferaza povzroča rumeno bioluminesenco, *Renilla* luciferaza pa zeleno bioluminesenco.

### Dvojni luciferazni test

Pri dvojnem luciferaznem testu se hkrati uporabi dve luciferazi, in sicer kresničkino luciferazo, ki se inducibilno izraža, ter *Renilla* luciferazo, ki se konstitutivno ali neprestano izraža. Slednjo se uporabi za normalizacijo glede na učinkovitost transfekcije. Dvojni luciferazni test , je test, s katerim se proučuje, ali lahko protein aktivira izražanje (eksprezijo) ciljnega gena z uporabo luciferaze kot reporterskega proteina.

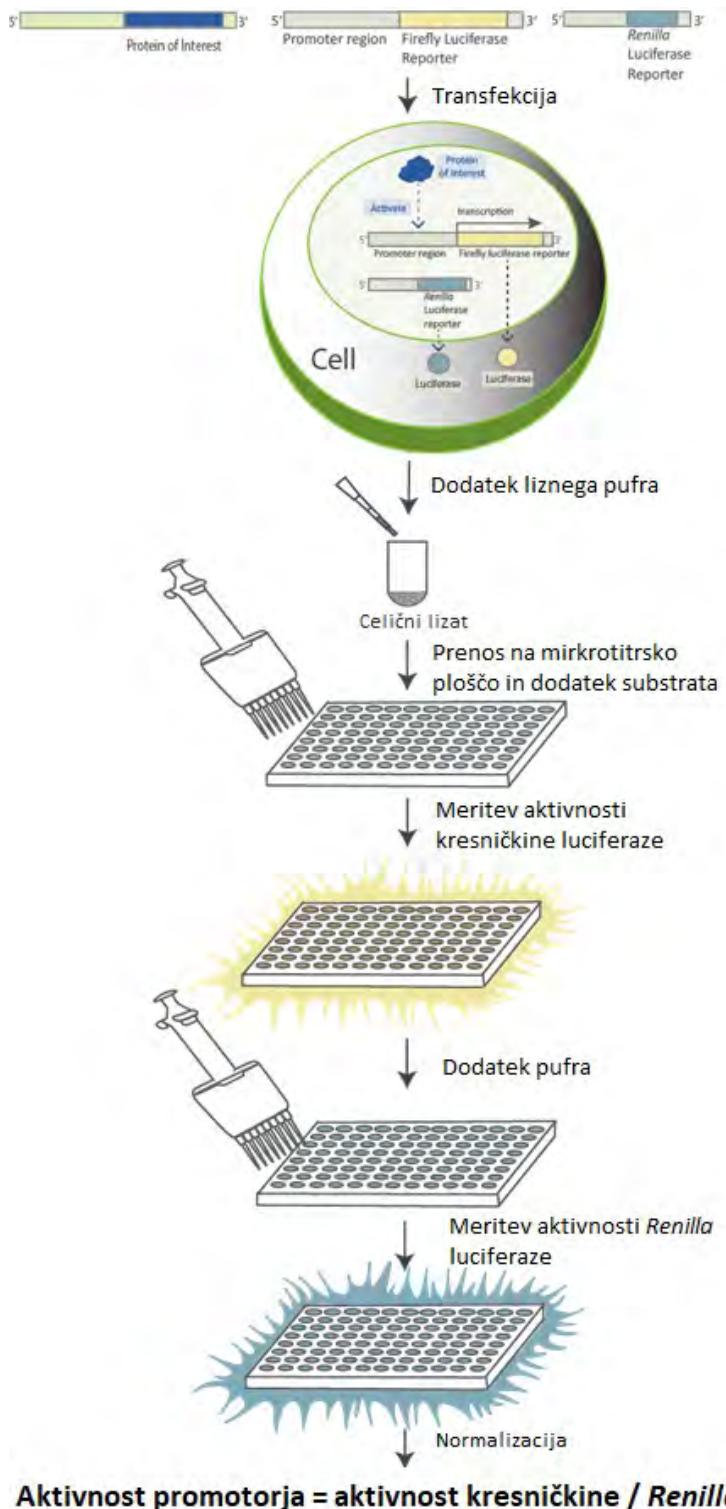


Slika 26: **Primera meritev bioluminescentnega signala** (povzeto po:  
<https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/Functional%20luc.png>, dostop: 24.3.2022)

Reporterski plazmid mora vsebovati promotorsko (regulatorno) regijo, ki se nahaja pred reporterskim genom (gen z zapisom za luciferazo). Ta regulatorna regija je občutljiva oziroma odzivna na vezavo določenih transkripcijskih faktorjev (npr. . NF $\kappa$ B, IRF3 itd.). V primeru, da pride do vezave na to regijo, se prične prepisovati gen za kresničkino luciferazo. Vezava je običajno omogočena, če preučevan protein sproži signalizacijo, ki aktivira transkripcijski faktor.

Konstrukte (plazmide) je potrebno vnesti v celice s transfekcijo. Ker bioluminescence ni možno izmeriti, ko se encim luciferaza nahaja znotraj celice, te liziramo z liznim pufrom. S tem pride do poškodb v celični membrani in naluknjanja celic, pri čemer se iz celice sprostijo vsi proteini, vključno z encimom luciferazo.

Po dodatku ustreznega substrata v celični lizat poteče reakcija, v kateri nastaja bioluminescenza. Oddano svetlobo pri ustrezeni valovni dolžini izmeri naprava luminometer.



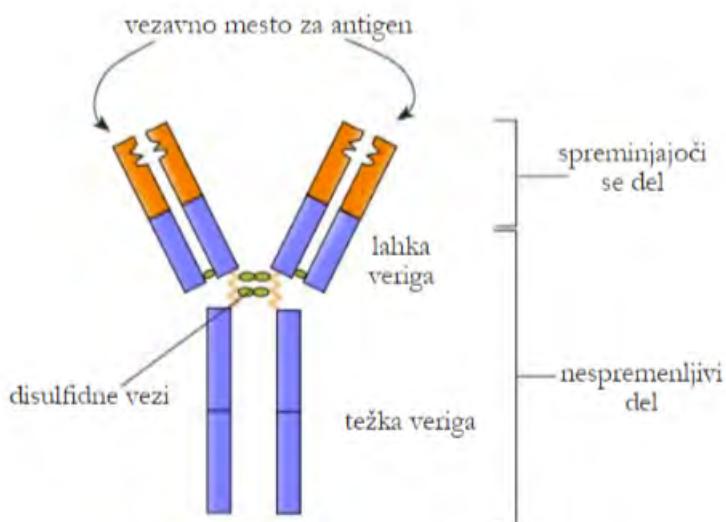
Slika 27: **Shema dvojnega luciferaznega testa** (povzeto po:  
<https://s3.amazonaws.com/commercio/goldbio-2018/pages/Dual%20luc%20assay.png>, dostop: 24.3.2022)

Tako je aktivnost luciferaze (oddana bioluminescensa) pokazatelj za aktivnost promotorja (proteina). Količina proizvedene svetlobe zagotavlja merilo učinka preučevanega proteina oziroma procesa na izražanje ciljnega reporterskega gena. Večja je bioluminescensa, večja je aktivacija promotorja.

## 2.9. ELISA

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) je ime za encimsko-imunski test na trdni podlagi. Je metoda, ki se uporablja za dokazovanje prisotnosti in določanje koncentracije specifičnega analita v biološkem vzorcu, običajno je to protein, z uporabo protiteles.

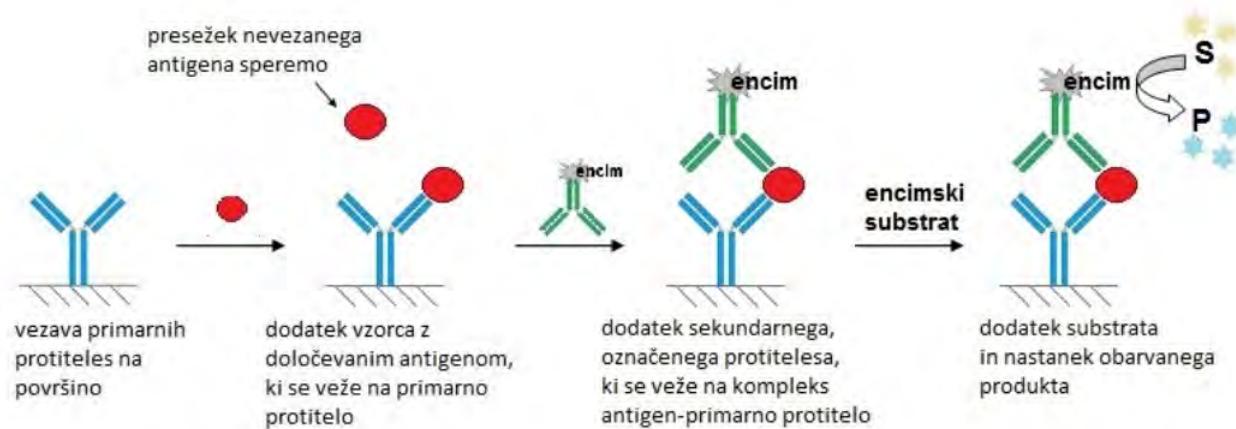
Protitelesa ali krajše Ig, so proteini iz razreda imunoglobulinov. Sestavljena so iz dveh težkih verig in dveh lahkih, ki skupaj tvorijo skupek v obliki črke Y (slika 27). Glede na njihovo zgradbo jih delimo v pet skupin, v IgA, IgD, IgE, IgG in IgM. Protitelesa se vežejo na kratek del antiga, kar imenujemo epitop. Antigen je snov, ki sproži imunski odgovor. Ločimo poliklonska in monoklonska protitelesa. Poliklonska protitelesa imajo več različnih epitopov, ki se vežejo na en antigen. Monoklonska protitelesa imajo enaka variabilna mesta in se vežejo na specifičen del na antigen (doc.dr. Dolinar, 2008/2009).



Slika 28: **Osnovna zgradba protitelesa** (vir:  
[https://issuu.com/pipinovaknjiga/docs/demo\\_anatomija/49](https://issuu.com/pipinovaknjiga/docs/demo_anatomija/49), dostop:  
24.3.2022)

Zelo razširjena je tako imenovana sendvič ELISA, kjer se test izvede z uporabo dveh protiteles, specifičnih za iskan analit in sicer lovilno in detekcijsko protitelo.

Sendvič ELISA je dobila takšno ime, saj se iskan analit veže med lovilnim in detekcijskim protitelesom (slika 28). Obe protitelesi morata biti za iskan analit specifični, kar pomeni, da se lahko vežeta le na iskan analit in ne na katerega drugega. Lovilno protitelo je pri izvedbi testa immobilizirano (pritrjeno) na podlago. Detekcijsko protitelo pa mora biti (pred ali med izvedbo testa) označeno (konjugirano) z encimom, ki ob dodatku encimskega substrata omogoči spremembo barve in tako povzroči vidno spremembo. Intenzivnost signala obarvanega produkta v testu ELISA je sorazmerna količini vezanega analita. Torej ELISA služi za merjenje prisotnosti in določanje koncentracije analita.



Slika 29: **Shematski prikaz mehanizma “sendvič“ ELISE** (vir: <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=119276&lang=slv>, dostop: 24.3.2022)

### 3. RAZISKOVALNI DEL

#### 3.1. MATERIALI

##### 3.2.1. Laboratorijska oprema

Tabela 1: Seznam uporabljene laboratorijske opreme

Proizvajalec	Laboratorijska oprema
Applied Biosystems	Ciklični termostat Veriti 96-Well ThermalCycler
Assistant Reamix	vibracijsko mešalo
Berthold Technologies Bioanalytics	Mithras LB 940
Binder	CO <sub>2</sub> inkubator za celične kulture
Biometra	Transiluminator TI 3
BioTek	Čitalnik mikrotitrskih plošč Synergy Mx
Corning	Banjice za multikanalno pipeto, črna mikrotitrská plošča s prosojnim dnem s 96 vdolbinicami
Eppendorf	Namizna centrifuga MiniSpin, termoblok Thermomixer Compact, avtomatske pipete (1 mL, 200 µL, 100 µL, 20 µL, 10 µL, 2,5 µL), multikanalne avtomatske pipete (300 µL, 100 µL), nastavki za avtomatske pipete
Falcon	Sterilne serološke pipete (5 mL, 10 mL)
Gorenje	Hladilnik, mikrovalovna pećica
Greiner	2 mL pipete za sesanje, mikrotitrské plošče s 96 vdolbinicami s polovično površinou za test ELISA
Hettich	Hlajena centrifuga Universal 320 R
Hygonorm	Mrežice za lase
Hygostar	Copatki za celični laboratorij
Ibidi	Ploščica za mikroskopiranje z 8 vdolbinicami s plastičnim dnem
IKKA	Vibracijski stresalnik MS3 basic
Biocat	Naprava za avtomatsko štetje celic LUNA-II™, ploščica za štetje celic
Iskra PIO	Brezprašna komora M18
Kimberly-Clark	Rokavice KIMTECH
Leica	Invertni svetlobni mikroskop DM IL LED, konfokalni mikroskop TSC SP5
NewBrunswick Scientific	Inkubator s stresalnikom Innova 42
Sanyo	Zamrzovalnik
Sarstedt	Mikrocentrifugirke (2 mL, 1,5 mL, 0,5 mL), sterilne in nesterilne centrifugirke (15 mL, 50 mL), nastavki za avtomatske pipete, 11 mL centrifugirke z okroglim dnem
Tecan	Naprava za spiranje mikrotitrskih plošč HydroSpeed

ThermoFischer Scientific	Spektrofotometer Nanodrop 1000, program ND-1000
TPP	sterilne mikrotitrski plošče s 96 vdolbinicami, sterilne centrifugirke (15 mL in 50 mL), serološke pipete, stojala za centrifugirke, flaške za gojenje celičnih kultur 75 cm <sup>2</sup>
VWR	Sterilne serološke pipete (25 mL, 50 mL)

### 3.2.2. KEMIKALIJE

Tabela 2: Seznam uporabljenih kemikalij

Proizvajalec	Kemikalija
Ecolab	Dezinfeckjsko sredstvo Skinman Soft N
Fermentas	6x DNA nanašalni pufer
Gibco	FBS, gojišče DMEM
Gold Biotechnology	Agaroza
Invitrogen	tripan modro, ELISA/ELISPOT Diluent
Merck	NaCl
Sigma-Aldrich	Etidijev bromid, ampicilin, polietilenimin (PEI), začetni oligonukleotidi
Šampionka	varikina
Thermo Fischer označevalec velikosti za AGE (GeneRuler Mix), TMB, avidin-HRP Scientific	
VWR	repliQa HiFi ToughMix

Tabela 3: Seznam uporabljenih kompletov reagentov

Proizvajalec	Ime
Invitrogen	Human IL-8 Uncoated ELISA
VWR	peqGOLD Gel Extraction Kit

Tabela 4: Seznam uporabljenih raztopin in pufrov

Pufer	Sestava
10 x PBS	1,7 M NaCl, 34 mM KCl, 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH=7,4
50 x TAE	40 mM Tris, 20 mM ocetna kislina, 1 mM EDTA
Pufer za spiranje plošč pri testu ELISA	1 x PBS, 0,05 % Tween-20
Raztopina za zaustavitev reakcije pri testu ELISA	1 M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
6 x nanašalni pufer za AGE	0,25 % bromfenol modro, 0,25 % ksilencianol, 40 % glukoza

Gibson reakcijski pufer	5x ISO pufer (25 % (w/v) PEG-8000, 500 mM Tris, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 mM DTT, 1 mM dNTP, 5 mM NAD+, pH 7,8) s 2 U/μl Phusion polimeraza, 40 U/μl Taq ligaza in 10 U/μl T5 eksonukleaza
Renilla luciferazni pufer (rLuc)	3,8 mM Na4PPi, 25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O, 125 mM NaCl, 2,5 mM CDTA, 1 μM coelentrazin, pH 5
Krisničkin luciferazni pufer (fLuc)	4 mM HEPES, 1,6 mM MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O, 40 μM EGTA, 2 mM NaF, 20 mM DTT, 0,25 mM CoA, 0,50 mM ATP, 0,42 mM luciferin, pH 7,8

Tabela 5: Seznam uporabljenih celičnih linij

Celična linija	Opis
HEK293	Trajna celična kultura človeških embrionalnih ledvičnih celic

Tabela 6: Seznam uporabljenih bakterijskih kultur

Bakterijska kultura	genotip
<i>Escherichia coli</i> TOP10	F- <i>mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 <i>recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>

Tabela 7: Seznam uporabljenih gojišč za gojenje sesalskih celičnih linij

Gojišče	Uporaba
DMEM z 10% FBS	Gojenje HEK293

Tabela 8: Seznam uporabljenih gojišč za gojenje bakterijskih kultur

Gojišče	Sestava
LB (tekoče)	10 g/L tripton, 10 g/L NaCL, 5 g/L kvasni ekstrakt
LBA (tekoče)	10 g/L tripton, 10 g/L NaCL, 5 g/L kvasni ekstrakt, 50 μg/mL ampicilin
LBA (trdno)	10 g/L tripton, 10 g/L NaCL, 5 g/L kvasni ekstrakt, 15 g/L agar, 50 μg/mL ampicilin

Tabela 9: Seznam uporabljenih vektorjev ali vključkov

Proizvajalec (številka)	Vektor/vključek
Addgene (84912)	pcDNA3.2 TDP-43 NLS1 YFP
Addgene (2092)	pcDNA3
Invivogen (puno2-htrif)	pUNO2 hTRIF
Promega	phRL-TK
Addgene (13029)	pGL3-ELAM-luc

### 3.3. PRAKTIČNI DEL

Eksperimentalni del naloge je potekal na Kemijskem inštitutu v Ljubljani, na Odseku za sintezno biologijo in imunologijo (D12).

#### 3.3.1. Pomnoževanje DNA z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

##### 3.3.1.1 Priprava reakcijskih mešanic za PCR

Najina prva naloga je bila izvedba reakcije PCR. Za izvedbo reakcije je potrebna priprava mešanic z vsemi potrebnimi komponentami.

Za reakcijo sva uporabila mešanico RepliQa HiFi ToughMix. Ta mešanica vsebuje pufer, termostabilno polimerazo ter prebitek dNTP. Dodati sva morala le matrično DNA in smerne ter protismerne začetne oligonukleotide. Matrična DNA nama je služila kot ogrodje z želenim genskim materialom, ki sva ga z reakcijo PCR pomnožila.



Slika 30: **Priprava mešanic za reakcijo PCR**

Tabela 10: Uporabljene snovi za izvedbo reakcije PCR, na primeru PCR1

PCR1: TRIF (180-217)	Ime:	Volumen ( $\mu$ L)
Matrična DNA (5ng/ $\mu$ L)	pUNO"-hTRIF	0,5
Smerni začetni oligonukleotid (10 $\mu$ M)	F-TRIF (180)*	0,75
Protismerni začetni oligonukleotid (10 $\mu$ M)	R-TRIF (217-658) *	0,75
MQ (ultračista voda)		10,5
Miks RepliQa Hifi ToughMix		12,5
		Skupaj: 25

\*Variabilni del

Volumni vseh reagentov so bili v vseh reakcijah enaki, razlike so bile le v smernih in protismernih začetnih oligonukleotidih (vsaka reakcija je pomnoževala različne odseke DNA).

- PCR1: TRIF (180-217)
- PCR2: TRIF (658-712)
- PCR3: TRIF (658-712)-link
- PCR4: link-TDP-43-YFP
- PCR5: TRIF (180-387)
- PCR6: TRIF (530-712)
- PCR7: TRIF (530-712)-link
- PCR8: TRIF (180-387)-link
- PCR9: TRIF (180-387)
- PCR10: TRIF (180-530)
- PCR11: TRIF (180-530)-link
- PCR12: TRIF (180-712)
- PCR13: TRIF (180-712)-link
- PCR14: link-YFP
- PCR15: TRIF (658-712)
- PCR16: TRIF (658-712)-link



Slika 31: Naprava za izvedbo reakcije PCR z vstavljenimi mešanicami

Tabela 11: Program, po katerem je v napravi za PCR potekla reakcija

Začetna denaturacija	1x	98°C	2 min
Ciklanje PCR	45 ciklov	Denaturacija	98°C
		Pripenjanje oligonukleotidov	ZO $T_m$ <sup>1</sup> 55-60°C
		Polimerizacija	68°C
Končna polimerizacija	1x	68°C	1 min
Ohlajanje	1x	10°C	/

### 3.3.1.2 Nanos reakcijskih mešanic na 1% agarozni gel



Slika 32: Prikaz nanašanja reakcijskih mešanic na agarozni gel, kjer je potekla elektroforeza

<sup>1</sup> ZO  $T_m$  (melting temperature): temperatura, pri kateri se začetni oligonukleotidi (ZO) pripnejo na enoverižno DNA verigo

S pomočjo agarozne gelske elektroforeze sva lahko ločila fragmente DNA glede na njihovo dolžino (število baznih parov). Še pred tem pa sva s pomočjo računalniškega programa Benchling določila velikosti željenih konstruktov. Spodaj so za vsako reakcijo PCR zapisane pričakovane dolžine konstruktov:

- PCR1: 152 baznih parov
- PCR2: 194 baznih parov
- PCR3: 188 baznih parov
- PCR4: 1999 baznih parov
- PCR5: 662 baznih parov
- PCR6: 578 baznih parov
- PCR7: 572 baznih parov
- PCR8: 675 baznih parov
- PCR9: 670 baznih parov
- PCR10: 1104 baznih parov
- PCR11: 1100 baznih parov
- PCR12: 1650 baznih parov
- PCR13: 1650 baznih parov
- PCR14: 750 baznih parov
- PCR15: 216 baznih parov
- PCR16: 220 baznih parov

Na podlagi teh dolžin sva lahko po izvedeni agarozni gelski elektroforezi na agaroznem gelu določila (in pozneje tudi izolirala) fragmente DNA.

### *3.3.1.3 Izolacija DNA fragmentov iz agaroznega gela in določanje koncentracije izolirane DNA*

#### **Postopek:**

- Za izolacijo željene DNA sva s pomočjo skalpela iz agaroznega gela izrezala ustrezne fragmente, ki sva jih prenesla v označene mikrocentrifugirke.
- V vsako mikrocentrifugirko sva dodala 200 µl pufra XP2
- Inkubirala v termobloku 7 minut pri 60°C z vmesnim stresanjem. S tem korakom se je agarozni gel raztopil.
- Vso raztopino sva prenesla v posebne nastavke, ki vsebujejo kolono, ter centrifugirala 1 minuto pri obratih 13400 rpm. Ti nastavki omogočajo vezavo DNA, ki jo želimo izolirati, na membrano, ki vsebuje silicijev dioksid. Pri tem vse ostale nevezane snovi potujejo skozi membrano in ostanejo na dnu lovilne mikrocentrifugirke. Odpadno tekočino sva zavrgla.
- V nastavek s kolono sva dodala 750 µL 80% etanola, ki DNA obori, s spiranjem z etanolom pa se znebimo ostankov soli iz prejšnjih korakov čiščenja.
- Pri sobni temperaturi sva inkubirala 2 minuti, nato pa centrifugirala 1 minuto pri obratih 13400 rpm.
- Odvečni filtrat sva zavrgla, nato pa ponovila prejšnji korak (dodajanje etanola, inkubiranje, centrifugiranje).
- Po odlijitju etanola sva prazno mikrocentrifugirko centrifugirala še 2 minuti, s čimer sva se znebila vseh sledi etanola.

- Nastavek s kolono sva preložila v sterilno 1,5 mL mikrocentrifugirko, vanj dodala 50 µL MQ.
- Centrifugirala sva 1 minuto pri obratih 13400 rpm. Dodana MQ je omogočila elucijo DNA s kolone v svežo mikrocentrifugirko.
- Za določitev koncentracije izolirane DNA sva uporabila napravo NanoDrop.

## Naprava NanoDrop

Je spektrofotometer, s katerim lahko določamo koncentracijo DNA, RNA in proteinov.

1 µL izolirane DNA sva kapnila na merilno mesto in ga pokrila z ročico. Računalniški program nato sam izračuna koncentracijo DNA v vzorcu. Prehodno sva pomerila tudi MQ, s to meritvijo izločimo vpliv ozadja na vrednost koncentracije DNA.



Slika 33: Določanje koncentracije izolirane DNA na napravi NanoDrop

Koncentracije izolirane DNA:

- |   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>• PCR1: 7,99 ng/µL</li><li>• PCR2: 11,25 ng/µL</li><li>• PCR3: 11,54 ng/µL</li><li>• PCR4: 31,9 ng/µL</li><li>• PCR5: 36,61 ng/µL</li><li>• PCR6: 33,87 ng/µL</li><li>• PCR7: 31,13 ng/µL</li><li>• PCR8: 56,36 ng/µL</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>• PCR9: 37,33 ng/µL</li><li>• PCR10: 49,93 ng/µL</li><li>• PCR11: 56,36 ng/µL</li><li>• PCR12: 49,06 ng/µL</li><li>• PCR13: 46,80 ng/µL</li><li>• PCR14: 28,72 ng/µL</li><li>• PCR15: 15,94 ng/µL</li><li>• PCR16: 12,40 ng/µL</li></ul> |
|---|--|

Te koncentracije sva nato uporabila pri reakciji lepljenja po Gibsonu.

### 3.3.2. Vstavljanje vključkov v vektor (plazmidna DNA) z lepljenjem po Gibsonu

Lepljenje po Gibsonu je tehnika, ki omogoča hitro, enostavno in učinkovito združevanje dveh ali več linearnih DNA fragmentov v en daljši fragment. Za reakcijo so potrebni fragmenti DNA s prekrivajočimi se konci. Z lepljenjem po Gibsonu se ti vežejo v vektor (plazmidno DNA).

Celotna reakcija poteka v eni sami mikrocentrifugirki. Tako so vse komponente potrebne pri reakciji združene skupaj v enem samem koraku, kar ustvarja metodo lepljenja DNA fragmentov še bolj uporabno. Izvedla sva skupaj 13 Gibson reakcij.

#### Postopek za Gibson reakcije:

- Odtalila sva Gibson mešanico
- Dodala sva vektor pcDNA3, lineariziran z BamHI in NotI (če predhodno pripravljen na Kemijskem inštitutu), MQ ter ustrezne inserte.  
Inserti so krajši odseki DNA, ki sva jih dobila z reakcijo PCR.

Pred reakcijo sva morala izračunati ustrezne volumne za vsako snov. Pri računanju sva si pomagala z enačbo  $c=m/V$ , iz kjer sva izpostavila iskan volumen ( $V=m/c$ ).

Koncentracija (c) pcDNA3 BamHI/NotI je znašala 112 ng/ $\mu$ L.

Masa (m) pcDNA3 BamHI/NotI je znašala 30 ng.

Volumen sva izračunala:

$$V_{(pcDNA3\;BamHI/NotI)} = m_{(pcDNA3\;BamHI/NotI)} / c_{(pcDNA3\;BamHI/NotI)}$$

$$V = 30\;ng / 112\;ng/\mu L = 0,27\mu L$$

Na enak način sva izračunala tudi volumne vseh potrebnih insertov.

Skupen volumen celotne reakcije je znašal 15  $\mu$ L, razliko med izračunanim volumnom insertov in volumnom pcDNA3 BamHI/NotI sva dopolnila z MQ.

Vse reaktante (pcDNA3 BamHI/NotI, MQ in ustrezni inserti) sva nato v pravih količinah odpipetirala v mikrocentrifugirke ter 1 uro inkubirala na 50°C.

Tabela 12: Reagenti za reakcijo lepljenja po Gibsonu

Gibson reakcija 1	Masa DNA (ng)	Koncentracija DNA (ng/ $\mu$ L)	Volumen ( $\mu$ L)
Insert 1	30	7,99	3,75
Insert 2	20	11,25	1,78
pcDNA3 BamHI/NotI	30	112	0,27
MQ			9,20
skupaj			15,00

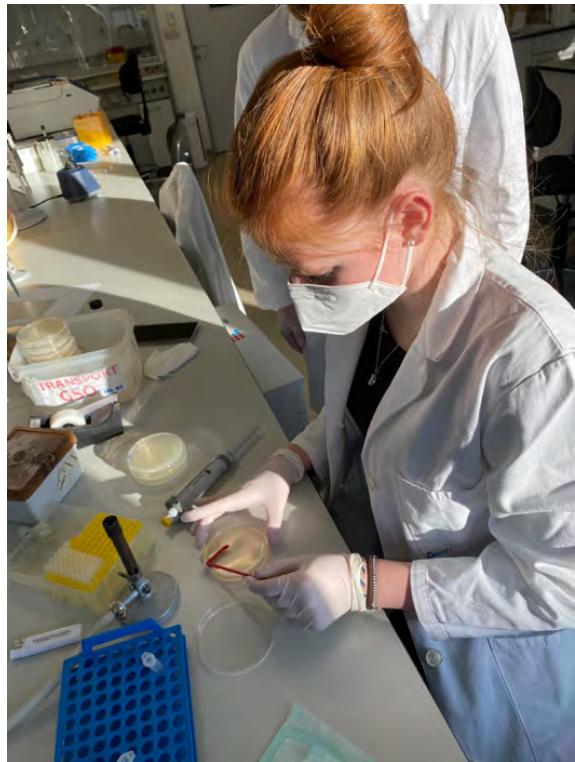
Ostale reakcije so bile izvedene na enak način. Pri določenih konstruktih se je spremenjalo tudi število insertov.

### 3.3.3 Vnos plazmidne DNA v kompetentne bakterijske celice (transformacija)

Za transformacijo se uporablja različne seve bakterij *E. coli*. Sledila sva postopku Inoue-ja iz leta 1990, ki je hiter in preprost.

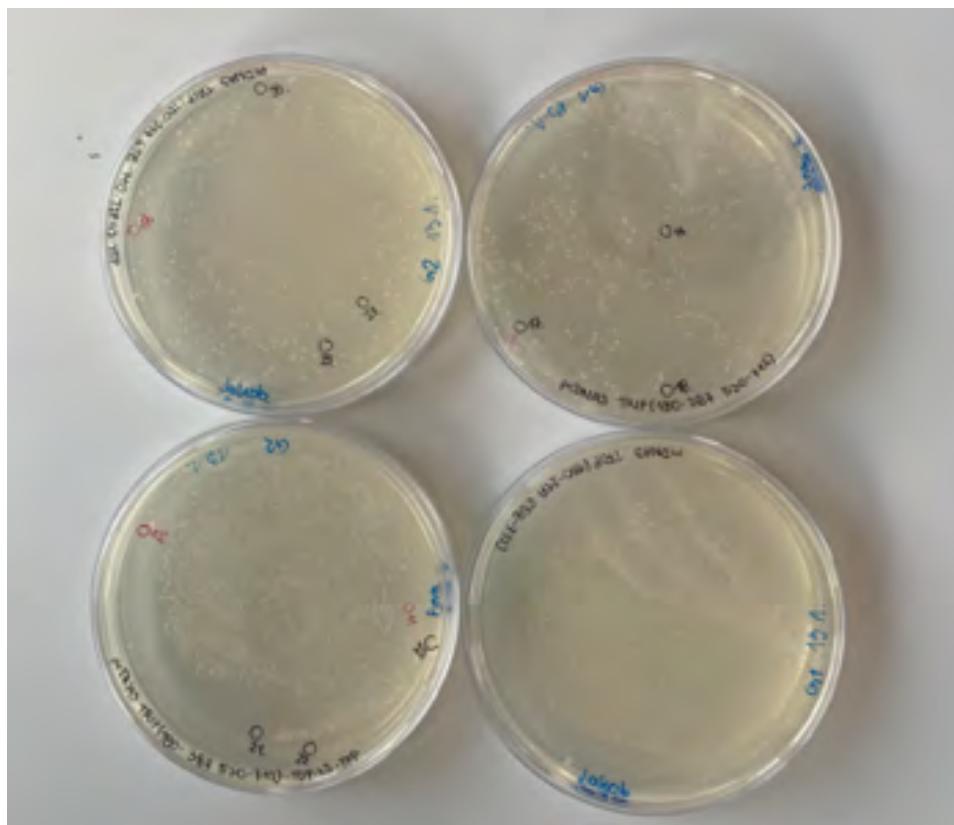
#### Postopek:

- Odtalila sva TOP10 (*E. coli*) in dodala celotno reakcijo Gibson.
- Premešala sva s tapkanjem po mikrocentrifugirki in inkubirala 5 minut.
- Sledil je temperaturni šok. Mikrocentrifugirke sva inkubirala za 3 minute na 42°C nato pa jih vrnila na led.
- V vsako mikrocentrifugirko sva sterilno dodala 800  $\mu$ L medija LB in inkubirala 30- 60 minut pri 37°C s stresanjem na obratih 450 rpm.
- Mikrocentrifugirke sva nato centrifugirala 3 minute pri obratih 7000 rpm, s čimer so se celice posedle na dno.
- Gojišče sva odstranila in celice resuspendirala v 50  $\mu$ L medija LB. Za rast bakterij sva uporabila plošče LBA, na katere sva celice razmazala s posebno sterilno paličico in jih čez noč pustila na 37°C.



*Slika 34: Nanašanje gojišča na LBA ploščo s sterilno paličico*

Na ploščah LBA so zrastle le kolonije bakterij, ki so privzele naš plazmid, to pa zato, ker le ta v sebi vsebuje zapis za odpornost na antibiotik ampicilin.



*Slika 35: Zrastle kolonije bakterij na LBA ploščah*

### 3.3.4. Preverjanje vsebnosti konstrukta v vektorju s PCR na osnovi kolonije

PCR na osnovi kolonije je metoda za hitro presejanje kolonij bakterij, ki so zrasle na selektivnem (izbranem) mediju po transformaciji. S tem se lahko preveri ali je v vektorju prisoten želen genetski konstrukt.

Pri konstruktih brez TDP-43-YFP sva pomnožila del med sekvenčnima začetnima oligonukleotidoma CMV-F in BGH-rev. Pri konstruktih s TDP-43-YFP sva uporabila sekvenčni oligonukleotid CMV-F in začetni oligonukleotid, ki nalega na TDP-43-YFP.

#### Postopek:

- Pripravila sva mešanico (Master mix). Potrebno je bilo izračunati končne volumne vseh komponent te pa pomnožiti s številom mešanic. Končna vsota volumnov ni smela presegati 20 µL, oziroma razliko do 20 µL sva dopolnila z MQ.
- V mikrocentrifugirko sva dodala MQ, sledila sta smerni in protismerni začetni oligonukleotid, na koncu pa še DreamTaq Green PCR Master Mix (2x), ki vsebuje DNA polimerazo, pufer, MgCl<sub>2</sub> in dNTP-je.

Tabela 13: Prikaz komponent za izvedbo reakcije PCR na osnovi kolonije

Komponenta	Založna koncentracija	Končna koncentracija	Končni volumen
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	2x	1x	10 µL
Smerni ZO	10 µM	0,5 µM	1,0 µL
Protismerni ZO	10 µM	0,5 µM	1,0 µL
MQ			8,0 µL
Skupaj			20 µL

- Po pripravljenih mešanic sva označila kolonije na plošči (vsak 3 kolonije na plošči s TRIF in 3 kolonije na plošči TRIF-TDP-43-YFP, skupaj 12). Sterilno sva "piknila" označene kolonije s sterilnimi tipsi in vsako kolonijo (skupaj s tipsi) nato prenesla mikrocentrifugirko (vsaka kolonija bakterij v svojo mikrocentrifugirko).

Tabela 14: Prikazuje potek reakcije PCR na osnovi kolonije

Začetna denaturacija	1x		T=98°C	3 minute
Ciklanje PCR	25 ciklov	Denaturacija	T=98°C	30 sekund
		Pripenjanje oligonukleotidov:	ZO $T_m^2 = 55-61^\circ\text{C}$	30 sekund
		Polimerizacija:	T=72°C	1 minuta
Končna polimerizacija	1x		T=72°C	10 minut
Ohlajanje	1x		T=10°C	$\infty$

- V zadnji fazi sva celotno reakcijo nanesla na 1% agarozni gel.
- Prižgala sva napravo za elektroforezo, da je stekel električni tok skozi agarozni gel in reakcija se je začela pomikati proti anodi.
- Po opravljeni elektroforezi sva dobljene rezultate pogledala še pod svetlobo UV.



Slika 36: **Nanos reakcije na agarozni gel**

---

<sup>2</sup>ZO  $T_m$  (melting temperature): temperatura, pri kateri se začetni oligonukleotidi (ZO) pripnejo na enoverižno DNA verigo

### 3.3.5. Namnožitev bakterij (z vsebovanimi plazmidi) v tekočem gojišču

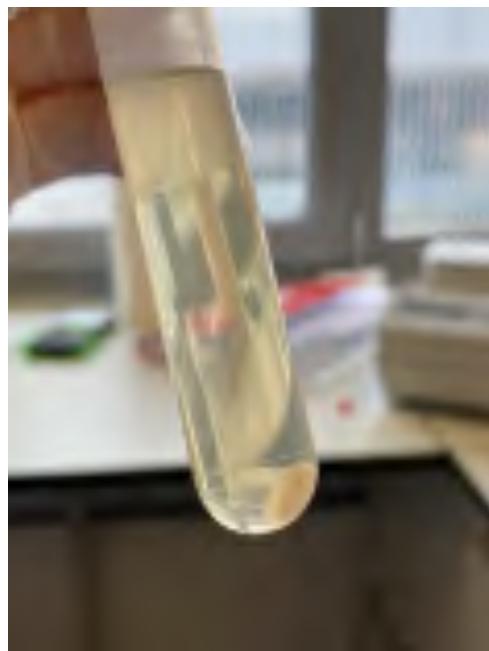
Bakterije tistih kolonij, pri katerih sva z agarozno gelsko elektroforezo po reakciji PCR na osnovi kolonije potrdila uspešnost transformacije, sva vstavila v tekoče gojišče, ki je vsebovalo antibiotik ampicilin. Gojišče sva nato pustila stresati čez noč, na 37 °C. Bakterije so tekom rasti namnoževale tudi vnesene plazmide.

### 3.3.6. Izolacija plazmida iz tekoče bakterijske kulture

V tem koraku sva želela iz bakterij sprostiti plazmidno DNA.

#### Postopek:

- Sprva sva prelila vsebino tekoče kulture v 11 mL tubico in jo centrifugirala 3 minute na 12000 rpm.
- Odlila sva gojišče in nato pelet (usedle bakterije na dnu) resuspendirala v 250 µL pufra za resuspendiranje, ki vsebuje RNazo. Z RNazo se znebimo RNA, saj bi se ta lahko vezala na kolono, s pomočjo katere izvajava izolacijo plazmida. Tega si pa ne želiva.
- Dodala sva še 250 µL liznega pufra in inkubirala 5 min.
- Nato sva dodala 350 µL nevtralizacijskega pufra in centrifugirala 10 minut pri obratih 12000 rpm.



Slika 37: **Prikaz usedlega peleta po centrifugiranju**

- Supernatant sva nanesla na kolono in centrifugirala 1 minuto pri 13400 rpm.
- Po centrifugiranju sva izpraznila mikrocentrifugirko in kolono postavila nazaj.

- Kolono sva sprala s 500 µL 80% etanola ter centrifugirala 1 minuto pri 13400 rpm. Ta korak sva ponovila še enkrat.
- Spodnjo tubico sva izpraznila in centrifugirala prazno kolono 2 minuti pri 13,4 rpm, s tem sva se znebila etanola.
- Kolono sva prestavila v svežo mikrocentrifugirko in dodala 50 µL MQ. Inkubirala sva 2 minuti, nato pa 2 minuti centrifugirala pri 13400 rpm. Ker je DNA topna v vodi se v MQ raztopi in tako sva s tem sprostila DNA z kolone. .
- Zadnji korak je bil, da sva koncentracijo izoliranih plazmidov izmerila na Nanodropu. Dobljene rezultate smo analizirali.

### **3.3.7. Preverjanje ustreznosti nukleotidnega zaporedja s sekvenciranjem po Sangerju**

Ustreznost nukleotidnega zaporedja sva preverila s sekvenciranjem po Sangerju. Kljub temu, da sva izolirala le plazmide iz potrjene kolonije z reakcijo PCR na osnovi kolonije, sva plazmide poslala na sekvenciranje v podjetje Macrogen. Izolirani plazmidi lahko namreč vsebujejo mutacije, ki so nastale pri PCR, ko smo odseke pomnoževali, med UV osvetljevanjem v agaroznem gelu, med lepljenjem po Gibsonu ali med namnoževanjem plazmidov v bakterijah v tekoči kulturi.

### **3.3.8. Nacepljanje celic HEK 293**

Celice HEK293 se goji v gojitvenih posodicah v ustreznem mediju, kjer imajo vse pomembne možnosti za uspešno rast in podvajanje. Lastnost HEK293 celic je, da se pritrdijo na podlago (so adherentne).

#### **Postopek:**

- Celicam sva odstranila gojišče in jih sprala s 5 mL PBS, da sva odstranila vso gojišče.
- Celice sva odlepila z dodatkom 2 mL encima tripsina. Ta cepi proteine, ki omogočajo pritrditev celic na podlago.
- Gojišče s celicami sva prenesla iz gojitvene posodice v večjo centrifugirko.
- Celice sva nato preštela. Iz centrifugirke sva odvzela majhen volumen in mu dodala enako količino barvila tripan modro. To je barvilo, ki nam omogoči, da ločimo med živimi in mrtvimi celicami, saj naju zanima le koncentracija živih celic. Tripan modro vstopi v mrtve celice in jih s tem obarva modro, v žive pa ne more. Naprava za štetje to lahko prepozna in tako določi koncentracijo živih celic.
- Izračunala sva količino celic, ki sva jo potrebovala za nacepljanje na format ploščice s 96 luknjicami, preostanek pa zavrgla.
- Celice sva centrifugirala, odsrkala supernatant in pelet celic resuspendirala v svežem gojišču.

**Primer izračuna volumna celic, potrebnega za nacepitev v želeni koncentraciji:**

Koncentracija celic HEK293 določena po štetju:  $c_1 = 7,29 \cdot 10^5$  celic/mL

Želena končna koncentracija celic HEK293:  $c_2 = 2 \cdot 10^5$  celic/mL

Želen končni skupni volumen:

$$V_2 = \text{število luknjic} * \text{volumen na luknjico} + 0,5 \text{ mL}^* = 10,5 \text{ mL}$$

\* ekstra volumen, za lažje pipetiranje

Volumen potrebovanih celic s koncentracijo  $c_1$ :

$$V_1 = (c_2 * V_2) / c_1 = 2,88 \text{ mL}$$

Koncentracija celic je v najinem primeru odvisna od uporabe transfekcijskega reagenta (PEI (polietilenimin)), volumen dodanih celic na luknjico pa od formata plošče, ki sva jo uporabila. Za luciferazni test sva uporabila ploščo s 96 luknjicami ( $100 \mu\text{L}$  / luknjico) in za mikroskopiranje ploščico z 8 luknjicami ( $250-300 \mu\text{L}$  / luknjico). Izračunan volumen gojišča sva dodala celicam, celice pa nato postavila v inkubator, kjer sva jih inkubirala 24 ur do transfekcije.

### 3.3.9. Transfekcija

Predhodno nacepljene celice HEK293 sva vzela iz inkubatorja in prenesla v laminarij, ki je brezprašna sterilna komora. S transfekcijo sva pripravljene konstrukte (plazmide) vnesla v HEK293 z uporabo transfekcijskega reagenta PEI (polietilenimin). V kombinaciji z NaCl (natrijev klorid) tvori reagent PEI komplekse s konstruktom, ki ga želimo transficirati. Za izenačitev končnih količin DNA sva uporabila pcDNA3.



Slika 38: Izvedba transfekcije v laminariju

### 3.3.9.1. Transfekcija za dvojni luciferazni test

Predhodno sva za lažje računanje vse uporabljene plazmide redčila na koncentracijo 50 ng/µL. Za dvojni luciferazni test sva uporabila mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami, ki jo prikazuje tabela 15. V vsako luknjico sva vnesla naslednje komponente v ustreznih količinah (tabela 16):

- Ustrezni konstrukti\*
- *Renilla* luciferaza
- Reporter s kresničkino luciferazo (NF-κB ali IFNβ)
- Za izenačitev mase DNA sva uporabila prazni vektor pcDNA3

Vsaka mešanica je bila nanešena v triplikatu, torej v tri luknjice.

\*Uporabljeni konstrukti: (z različnima masama, 30 ali 60 ng)

**Konstrukti, ki sva jih testirala z reporterjem za NF-κB** (nanesla sva jih v luknjice označene z zeleno v tabeli 15):

- TRIF (180-712)
- TRIF (180-712)-TDP-43-YFP
- TRIF (180-712)-YFP
- TRIF (658-712)
- TRIF (658-712)-TDP-43-YFP
- TRIF (180-217 658-712)
- TRIF (180-217 658-712)-TDP-43-YFP
- TRIF (180-387 530-712)
- TRIF (180-387 530-712)-TDP-43-YFP

**Konstrukti, ki sva jih testirala z reporterjem za IFNβ** (nanesla sva jih v luknjice, označene z rumeno v tabeli 15):

- TRIF (180-712)
- TRIF (180-712)-TDP-43-YFP
- TRIF (180-712)-YFP
- TRIF (180-387)
- TRIF (180-387)-TDP-43-YFP
- TRIF (180-530)
- TRIF (180-530)-TDP-43-YFP
- TRIF (180-217 658-712)
- TRIF (180-217 658-712)-TDP-43-YFP
- TRIF (180-387 530-712)
- TRIF (180-387 530-712)-TDP-43-YFP

Dodatno sva transficirala tudi posamična reporterja, kar je služilo kot kontrola.

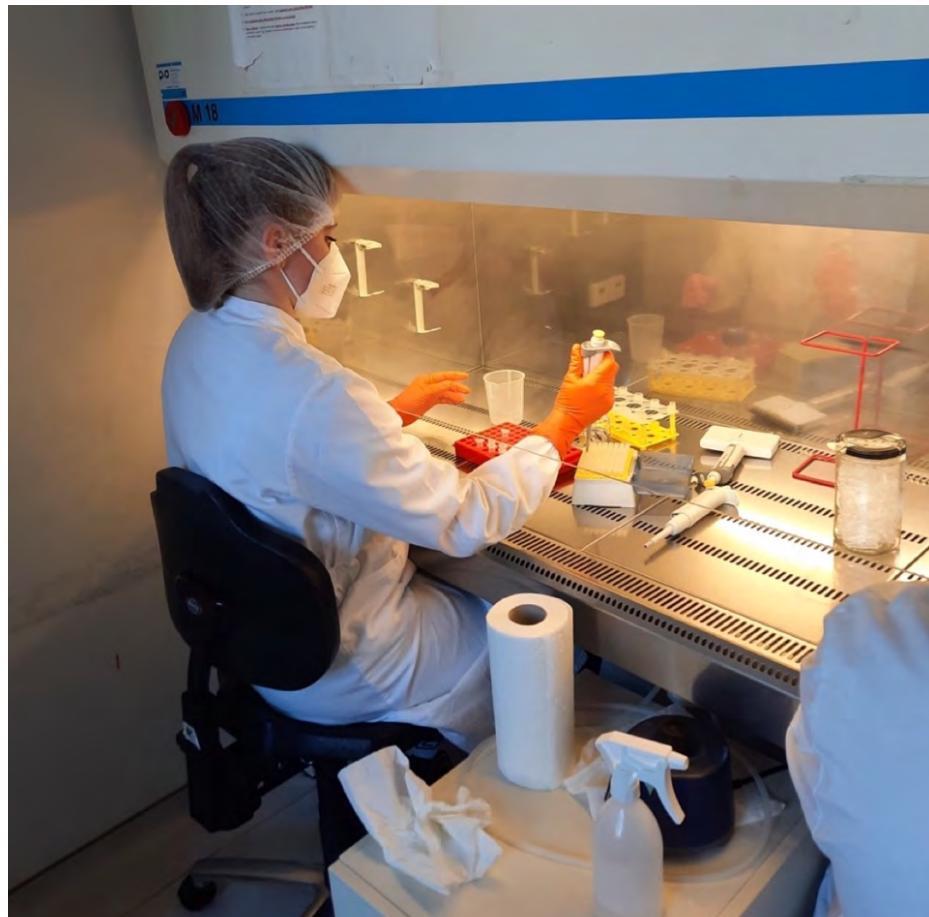
Tabela 15: Prikazuje mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami

PLOŠČA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Tabela 16: Predstavlja komponente za dvojni luciferazni test v ustreznih količinah

Komponenta:	Količina:	Odmerjen volumen za 3 luknjice:
<b>Konstrukt s TRIF</b>	30 ali 60 ng	1,98 µL ali 3,96 µL
<b>Renilla luciferaza</b>	3 ng	0,5 µL
<b>Reporter NFκB ali IFNβ</b>	30 ng	1,98 µL
<b>pcDNA3</b>	do skupno 100 ng	2,64 µL ali 0,66 µL
<b>NaCl</b>	do 33 µL	25,9 µL
<b>PEI</b>	1,2 µL/100 ng DNA	3,96 µL
<b>NaCl</b>	do 33 µL	29 µL

Pripravljene mešanice sva v razmerju 1:1 zmešala s pripravljenim PEI in inkubirala 20 minut na sobni temperature. Nato sva 20 µL mešanice s PEI nanesla v 3 ustrezne luknjice. Ploščo s 96 luknjicami z nanešenimi transfekcijskimi mešanicami sva inkubirala 24h pri 37°C in 5 % CO<sub>2</sub>.



Slika 39: **Pipetiranje komponent za dvojni luciferazni test**

Za merjenje luciferazne aktivnosti sva najprej celicam v mikrotitrski plošči odsrkala gojišče. Sledil je dodatek 25 µL liznega pufra ter inkubacija 15 min na sobni temperaturi. S tem so celice popokale, luciferaza pa se je sprostila iz notranjosti celic. Luciferazne aktivnosti namreč ne moremo meriti, če je encim v notranjosti celic.

Aktivnosti obeh luciferaz sva izmerila z napravo za merjenje mikrotitrskih plošč, imenovano Mitras, ki omogoča injiciranje ustreznih reakcijskih pufrov fLuc in rLuc in merjenje luminescence. Čitalec najprej pomeri ozadje, nato doda pufer za fLuc, pomeri aktivnost kresničkine luciferaze, na koncu pa doda pufer rLuc in pomeri aktivnost *Renilla* luciferaze. Program nam je izpsial tri vrednosti za vsako luknjico.

Izmerjene podatke sva obdelala tako, da sva meritvam aktivnosti obeh luciferaz odštela ozadje. Za normalizacijo pa vrednosti kresničkine luciferaze delimo z *Renilla* luciferazo, s tem dobimo RLU (relativne luciferazne enote). Midva normalizacije nisva naredila, saj raven luciferaze *Renille* pri vseh meritvah ni bila približno enaka.

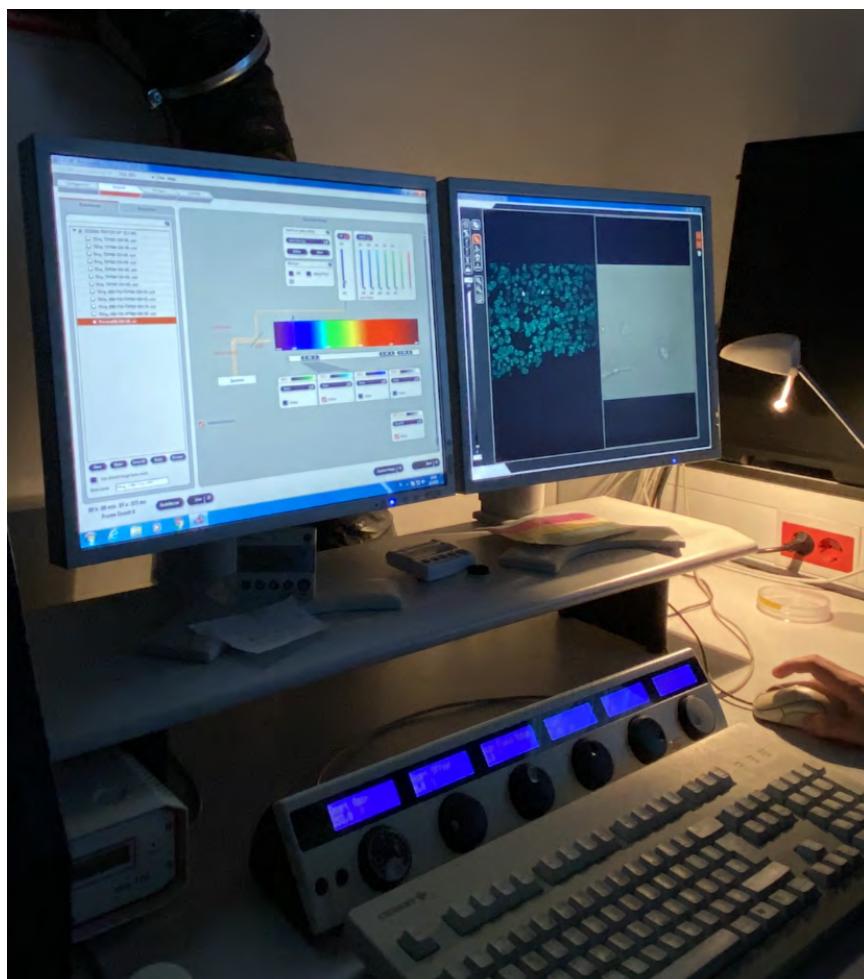
Iz pridobljenih podatkov sva s pomočjo računalniškega programa Excel narisala grafe, ki so v rezultatih.

### 3.3.10. Konfokalna mikroskopija

Transfekcije konstruktov z YFP sva naredila podobno kot za dvojni luciferazni test, le da nisva dodala plazmidov luciferaz in da sva imela celice nacepljene v formatu ploščice z 8 luknjicami, ki je prilagojena za konfokalni mikroskop. V vseh primerih sva transficirala 100 ng ustreznega konstrukta.

Po 18 urah sva jedra celic obarvala z barvilm Hoechst, ki sva ga redčila 1:200. Po inkubaciji pri 37 °C 5 min sva celice dvakrat sprala s PBS in jim na koncu dodala gojišče. Nato smo vzorce slikali s konfokalnim mikroskopom Leica TSC SP5. Uporabili smo argonski laser pri ekscitaciji 514 nm in spremljali signal med 535 in 600 nm. Za vizualizacijo jeder smo uporabili laser z valovno dolžino 405 nm in spremljali signal med 440 ter 485 nm.

Slike smo obdelali v programu LAS X.

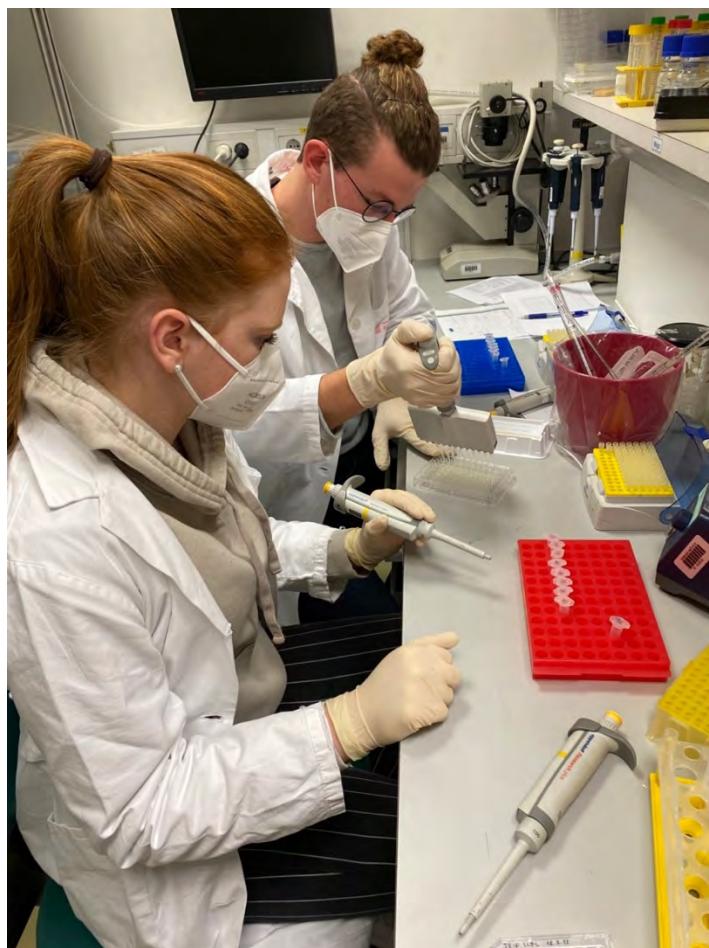


*Slika 40: Prikaz analiza slike iz konfokalnega mikroskopa*

### 3.3.11. ELISA

Encimsko-imunski test (ELISA) sva izvedla le s konstrukti pri katerih sva pričakovala izločanje hIL-8 kot posledico aktivacije transkripcjskega faktorja NF $\kappa$ B.

Vzorce sva pripravila podobno kot za dvojni luciferazni test, le da nisva dodala plazmidov luciferaz. Pri delu sva uporabila komplet reagentov Human IL-8 Uncoated ELISA in sledila priloženim navodilom proizvajalca.



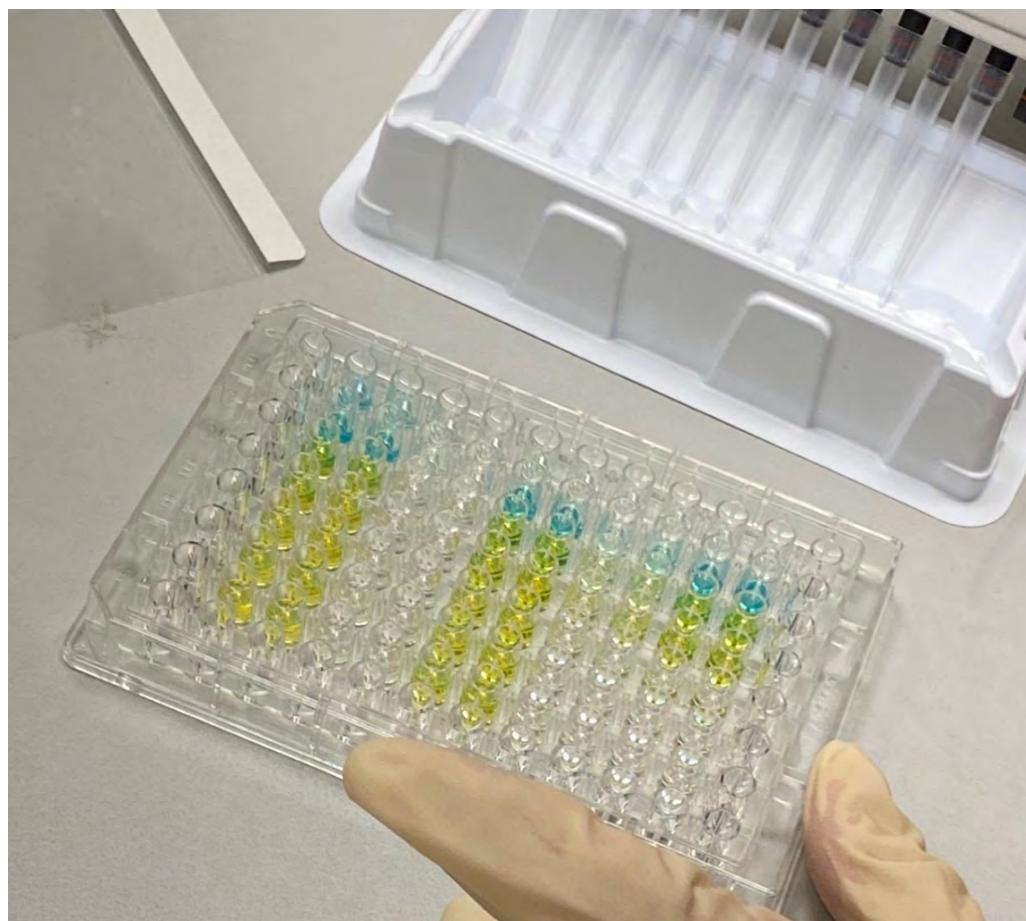
Slika 41: Prikaz pipetiranja z multikanalno pipeto med testom ELISA

Na ploščo s 96 luknjicami sva najprej nanesla lovilna protitelesa za antigen, ki ga določava. Lovilna protitelesa so se vezala na dno plošč. Med vsemi nadalje opisanimi koraki je korak spiranja, ki sva ga izvedla z avtomatiziranim spiralcem mikrotitrskih plošč.

Nato sva blokirala prosta vezavna mesta na dnu plošče z ustreznim pufrom. Na ploščo sva nato nanesla primerno redčene standarde ter njajne vzorce, ki sva jim določala koncentracijo hIL-8.

Antigen prisoten v vzorcih se je vezal na lovilna protitelesa. Sledilo je spiranje nevezanih molekul. Nato sva dodala detekcijsko protitelo vezano z biotinom. Nevezana protitelesa sva ponovno sprala in dodala encim hrenovo peroksidazo, ki je vezana na avidin. Avidin vsebuje vezavno mesto za biotin, ki je vezan na detekcijskem protitelesu.

Za tem sva dodala brezbarven kromogen substrat 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB), ki ga encim hrenova peroksidaza pretvori v oksidiran produkt modre barve (slika 41). Za zaustavitev reakcije sva uporabila 1 M  $H_3PO_4$  (fosforjeva kislina). Tu pa je prišlo do rumenega obarvanja zaradi nadaljnje oksidacije TBM.



Slika 42: Prikaz spremembe barve po dodatku  $H_3PO_4$

Po zaustavljeni reakciji sva s čitalnikom mikrotitrskih plošč izmerila vrednost absorbance pri 450 nm in 570 nm, slednja valovna dolžina predstavlja ozadje.

Kot že omenjeno, je bil na ploščo nanešen tudi standard s postopnimi dvakratnimi redčitvami. Gre za citokin hIL-8 z že znano najvišjo uporabljeno koncentracijo 250 pg/mL. Standard nama je služil kot osnova, s katero sva lahko izračunala koncentracijo citokinov. Iz vrednosti absorbanc za standard sva izrisala umeritveno krivuljo in določila njeno enačbo premice.

Z enačbo premice umeritvene krivulje sva lahko izračunala koncentracije hIL8 v najinih vzorcih. Nato sva podatke s pomočjo računalniškega programa analizirala ter za vsak konstrukt narisala ustrezen graf. Grafi so prikazani v Rezultati pri vsakem konstraktu, pri katerem sva izvedla test ELISA.

## 4. REZULTATI

### 4.1. NAČRTOVANJE KONSTRUKTOV (VNETNIH NAPRAV)

Konstrukti so sestavljeni iz določenih delov proteina TRIF, ogrodnega proteina TDP-43 ter rumenega fluorescenčnega proteina (YFP). Izbira odsekov TRIF je temeljila na podlagi lastnosti teh odsekov. Te so podrobno opisane v poglavju (2.1.3.). Želeli smo uporabiti odseke, ki so nujno potrebni za signaliziranje, zato smo sistematično krajšali protein TRIF.

Želeli smo uporabiti odseke TRIF, ki so nujno potrebni za signaliziranje, zato smo ga sistematično krajšali. Pri vseh smo odvzeli prvih 180 aminokislin, saj se je izkazalo, da njihova odstranitev ne vpliva na signalizacijo (Tatematsu, 2010). Naslednje krajšanje je bilo narejeno na osnovi raziskave, kjer so pokazali, da je za aktivacijo prenosa signala preko TRIF potrebna homooligomerizacija TRIF, ki jo omogoča domena TIR (Funami, 2008). Dodan TDP-43 bi lahko zaradi lastnosti tvorbe skupkov nadomestil vlogo TIR. V ta namen smo izbrali odsek 180-387. Uporabili smo tudi 180-530, ki vključuje domeno TIR, saj je v raziskavi ta odsek še omogočal aktivacijo reporterjev (Funami, 2008). Z alternativnim izrezovanjem mRNA pri nastajanju mRNA za TRIF lahko nastane tudi krajša različica, ki vsebuje zgolj odseka 1-217 ter 658-712 in kljub temu omogoča signaliziranje (Han, 2010). V ta namen smo izbrali še TRIF (180-217 658-712). Odsek 658-712 vsebuje domeno RHIM, ki omogoča posredno aktivacijo transkripcijskega faktorja NFkB, zato smo se odločili testirati tudi ta del.

Konstrukti, ki sva jih s tehnikami molekulskega kloniranja uspešno pripravila so:

- **TRIF (180-217 658-712)**
- **TRIF (180-217 658-712)-TDP-43-YFP**
- **TRIF (180-387 530-712)**
- **TRIF (180-387 530-712)-TDP-43-YFP**
- **TRIF (180-712)**
- **TRIF (180-712) -TDP-43-YFP**
- **TRIF (180-530)**
- **TRIF (180-530) -TDP-43-YFP**
- **TRIF (180-387)**
- **TRIF (180-387) -TDP-43-YFP**
- **TRIF (658-712)**
- **TRIF (658-712)-TDP-43-YFP**

## 4.2. NAČRTOVANJE ZAČETNIH OLIGONUKLEOTIDOV ZA REAKCIJO PCR

Pri načrtovanju začetnih oligonukleotidov sva si pomagala s spletnim računalniškim programom Benchling. To je spletna platforma, ki uporabniku ponuja programska orodja za načrtovanje in urejanje zaporedja DNA, RNA, plazmidnih vektorjev, različnih proteinskih sekvenc in načrtovanje začetnih oligonukleotidov, prav tako pa za analize podatkov ter načrtovanje eksperimentov. S pomočjo Benchling-a sva lahko ustvarila konstrukte začetnih oligonukleotidov, ki sva jih uporabila pri reakciji PCR. V Benchlingu sva določila nukleotidno zaporedje začetnih oligonukleotidov, to zaporedje v smeri 5' proti 3' pa je bilo poslano v podjetje, kjer začetne oligonukleotide izdelujejo.

*Tabela 17: Seznam uporabljenih začetnih oligonukleotidov ter njihova zaporedja*

Ime začetnega oligonukleotida:	Zaporedje začetnega oligonukleotida:
R-TRIF	GCATGCTCGAGCGGCCGCTCATTCTGCCTCCTGCGTC
F-TRIF(658)	CTTGGTACCGAGCTCGGATCCGCCACCATGCCGCAGTCCCCAGCCT
R-TRIF (387)	GCATGCTCGAGCGGCCGCTCATTCCAGGGAGGAAGGGAACAG
R-TRIF (530)	GCATGCTCGAGCGGCCGCTCAGGGCTTGAAGGTGTTGGC
R-TRIF (217 658)	GACTGCGGGAAAGGGCATGGTAGGGGACT
F-TRIF (387 530)	CCCTGGAACCCCACAGGCTTCAGGC
R TRIF (387 530)	CTGTGGGGTTCCAGGGAGGAAGGGAACAG
F TRIF (217 658)	TGCCCTCCCGCAGTCCCCAGCC
R TRIF (712 link)	CCCCCCTGATCCTCCTTCTGCCTCCTGCGTCTTG
R TRIF (387 link)	CCCCCCTGATCCTCCTTCCAGGGAGGAAGGGAACAG
R TRIF (530 link)	CCCCCCTGATCCTCCGGGCTTGAAGGTGTTGGCC
F-TRIF (180)	CTTGGTACCGAGCTCGGATCCGCCACCATGCGCCCCATTGACGGTG T
R-TDP43-YFP	CATGCTCGAGCGGCCGCTCACTTGACAGCTCGTCCATG
F link YFP	GGAGGATCAGGGGGAGCAAGGGCGAGGAGCT
F-TDP43	GGAGGATCAGGGGGTCTGAATATATTGGTAACCGAAGATG

F-forward (smerni začetni oligonukleotid)

R-reverse (protismerni začetni oligonukleotid)

#### 4.3. REZULTATI IN ANALIZA REZULTATOV DVOJNEGA LUCIFERAZNEGA TESTA, ENCIMSKO-IMUNSKEGA TESTA ELISA TER SLIK S KONFOKALNEGA MIKROSKOPA

Po uspešni pripravi konstruktov sva njihovo delovanje testirala na več načinov. Dvojni luciferazni test sva izvedla za vse pripravljene konstrukte, pri katerih sva preverjala aktivacijo dveh reporterjev IFN $\beta$  in NF- $\kappa$ B. Poleg dvojega luciferaznega testa sva pri konstruktih, ki bi naj omogočali aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- $\kappa$ B, izvedla tudi encimsko-imunski test ELISA, s čimer sva izmerila koncentracijo citokinov hIL8. Za vizualizacijo konstruktov, ki vsebujejo YFP, v celicah in primerjavo med različnimi konstrukti sva jedra celic obarvala z barvilom Hoechst ter uporabila konfokalni mikroskop.

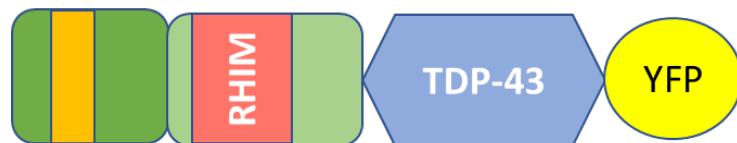
Za lažjo analizo in preglednost sva rezultate pri istih konstruktih združila. Prikazani so kot ena slika.

Poudariti je potrebno, da bi bilo za zagotovitev optimalnih rezultatov eksperimente izvesti večkrat. Midva sva eksperimente izvedla le enkrat, saj sva bila časovno omejena. Prav tako bi bili rezultati bolj natančni, če bi izvedla normalizacijo z *Renilla* luciferazo. Za normalizacijo se nisva odločila, saj vrednosti *Renilla* luciferaze pri vseh meritvah niso bile približno enake. Zaradi neizvedene normalizacije lahko pride do odstopanj na grafih, kar se še posebno vidi pri razlikah v vplivu mas.

## TRIF (180-217 658-712)

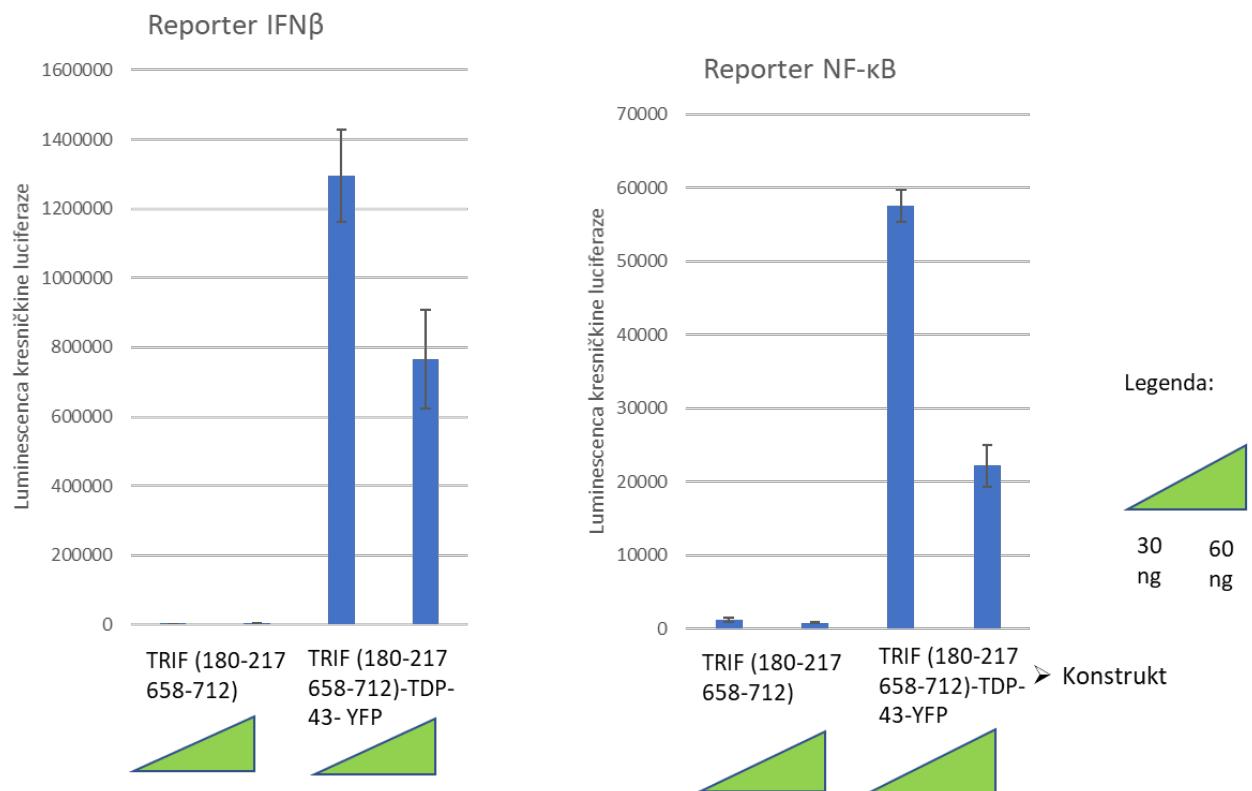
### SLIKA 1:

1A



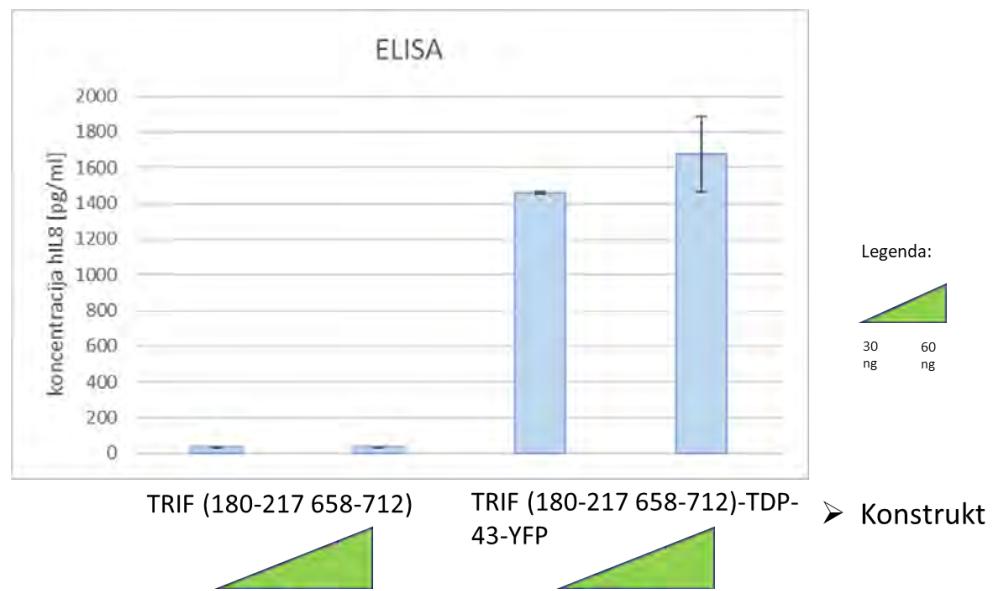
Skica 1: 1A: skica konstrukta TRIF (180-217 658-712) z vezanim TDP-43-YFP.

1B



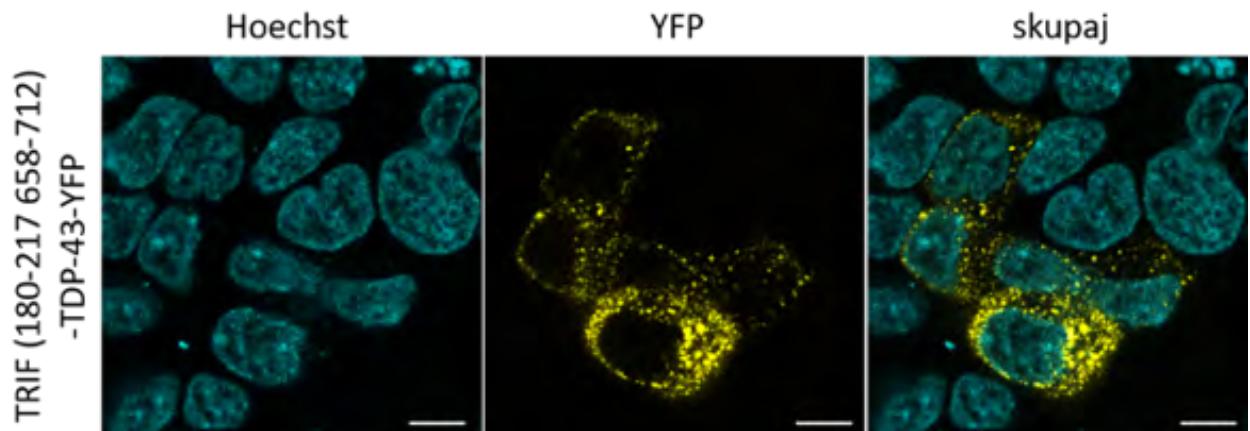
Graf 1: 1B: grafa prikazujeta vrednosti luminescence za konstrukt TRIF (180-217 658-712) brez in z vezanim TDP-43-YFP za reporterja IFN $\beta$  in NF- $\kappa$ B.

### 1C



Graf 2: **1C:** graf prikazuje vrednosti koncentracij citokina hIL8, ki so bile določene s testom ELISA, za konstrukt TRIF (180-217 658-712) brez ter z vezanim TDP-43-YFP.

### 1D



\*MERILO: črta na sliki predstavlja 10 µm.

Slika 43: **1D:** slika s konfokalnega mikroskopa. Modri deli prikazujejo jedra celic, obarvana z barvilkom Hoechst, rumeno obarvani deli pa prikazujejo konstrukte TRIF-a označenega s proteinom YFP (rumen fluorescenčni protein).

## **Analiza slike 1**

Iz skice 1A je razvidno, da konstrukt TRIF (180-217 658-712) vsebuje odsek z vezavnim mestom za TBK1, ki omogoči aktivacijo interferonskega odziva in domeno RHIM, ki omogoča aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- $\kappa$ B. Zato sva za ta konstrukt pričakovala aktivacijo obeh reporterjev.

Grafa 1B prikazujeta majhne vrednosti luminescence kresničkine luciferaze pri konstektu TRIF (180-217 658-712) ter velike vrednosti pri enakem konstektu, ki je vezan na ogrodje TDP-43. Iz tega je razvidno, da v tem primeru konstrukt, ki je vezan na ogrodje TDP-43, veliko bolje vpliva na izraženo kresničkino luciferazo. Tvorba manjših skupkov je opazna na sliki 1D, kar nam pove, da TDP-43 omogoča tvorbo oligomernih struktur, ki ugodno prispevajo k signalizirанию.

Kot je vidno iz grafa 1C je tudi test ELISA potrdil aktivacijo signalnih poti ter izločanje citokina hIL8.

Pri večjih masah konstrukta so bile vrednosti luminescence manjše, kar je razvidno z grafa 1B. Iz tega morda lahko sklepamo, da prevelika masa konstrukta negativno vpliva na aktivacijo. To bi lahko zagotovo potrdili z večkratno ponovitvijo eksperimenta. Na veliko razliko v vplivu pa je lahko vplivala tudi neizvedena normalizacija.

## TRIF (180-367 530-712)

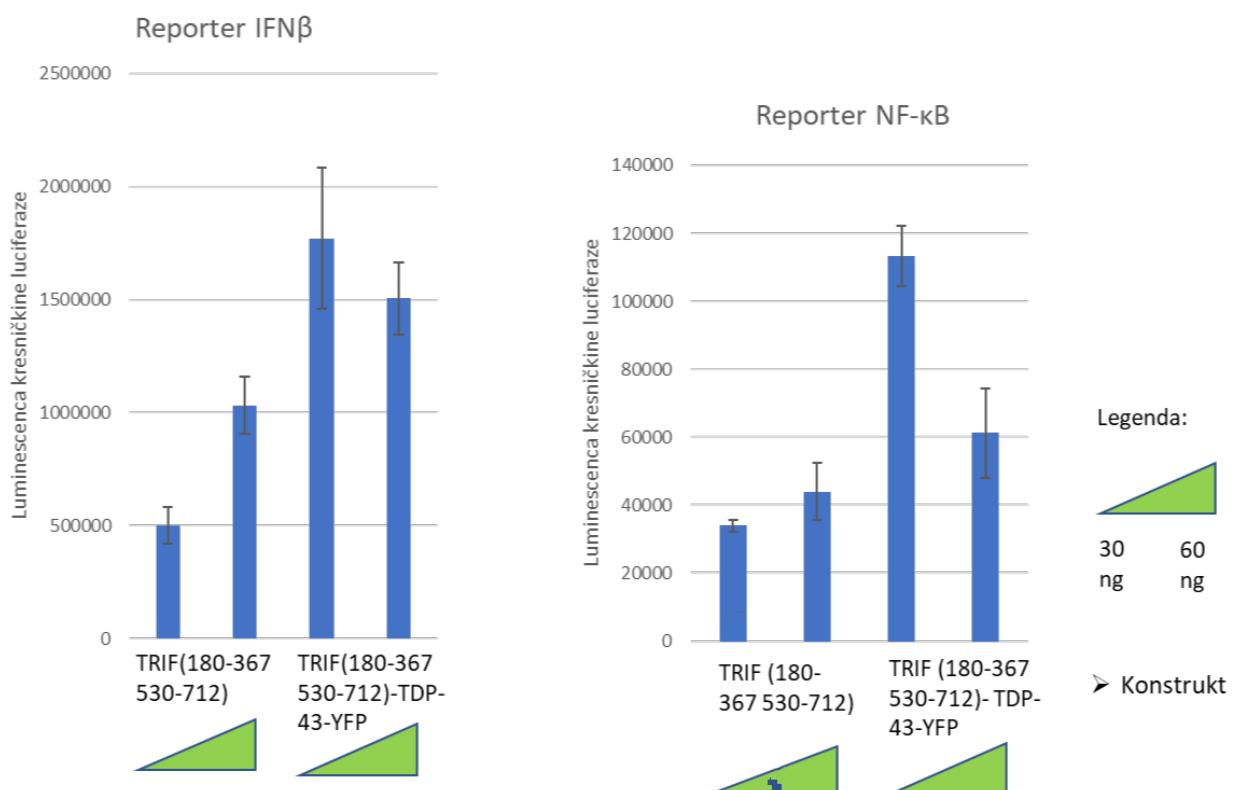
SLIKA 2:

2A



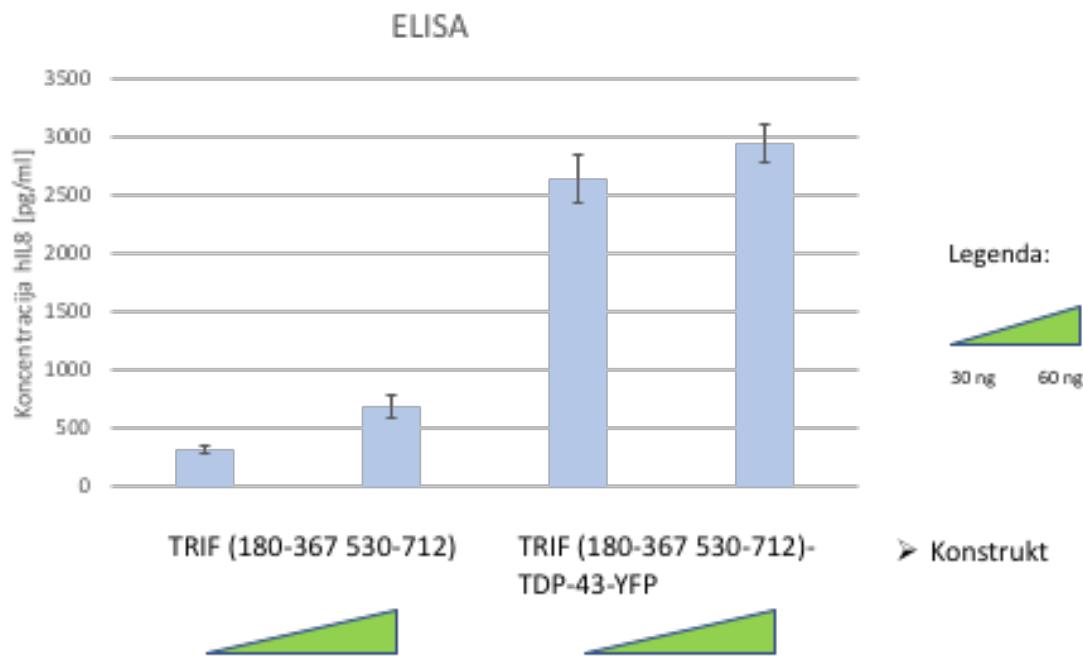
Skica 2: 2A: skica konstrukta TRIF (180-367 530-712) z vezanim TDP-43-YFP.

2B



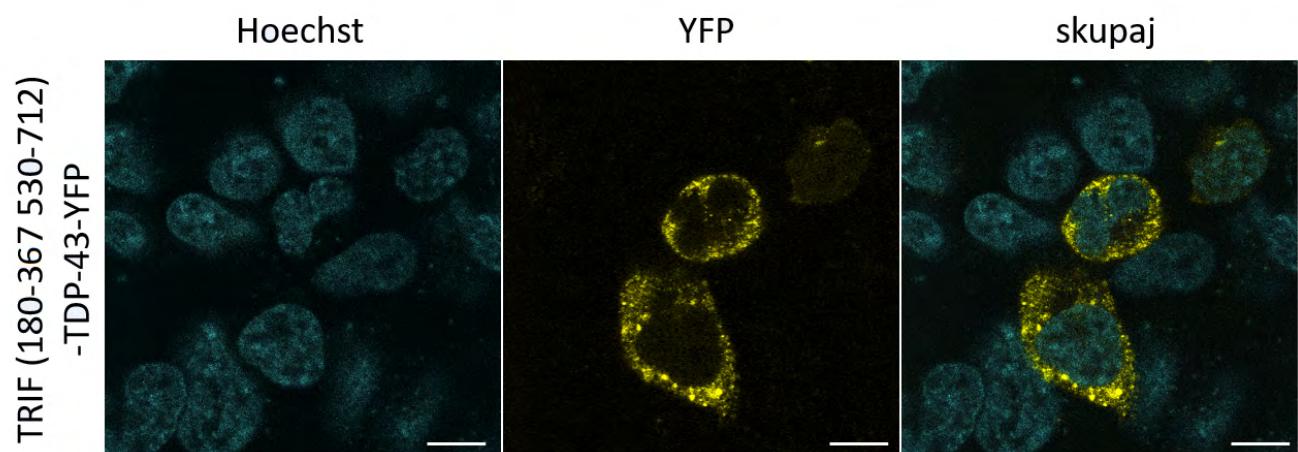
Graf 3: 2B: grafa prikazujeta vrednosti luminescence za konstrukt TRIF (180-367 530-712) brez vezanega in z vezanim TDP-43-YFP za reporterja IFN $\beta$  in NF- $\kappa$ B.

**2C**



Graf 4: **2C:** graf prikazuje vrednosti koncentracij citokina hIL8, ki so bile določene s testom ELISA, za konstrukt TRIF (180-367 530-712) brez ter z vezanim TDP-43-YFP.

**2D**



\*MERILO: črta na sliki predstavlja 10 µm.

Slika 44: **2D:** slika s konfokalnega mikroskopa. Modri deli prikazujejo jedra celic, obarvana z barvilkom Hoechst, rumeno obarvani deli pa prikazujejo konstrukte TRIF-a označenega z YFP.

## **Analiza slike 2**

Za konstrukt TRIF (180-367 530-712) sva pričakovala aktivacijo obeh reporterjev, saj vsebuje odsek TBK1, ki sproža aktivacijo signalnih poti za produkcijo IFN tipa 1 in odsek RHIM, ki povzroči aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- $\kappa$ B.

Konstrukt TRIF (180-387 530-712) že sam po sebi sproži aktivacijo signalnih poti, kar kažeta grafa 2B z dokaj visoko luminescenco tako za reporter IFN $\beta$  kot za NF- $\kappa$ B. Ponovno se kaže pozitivna uporaba ogrodja TDP-43, saj so vrednosti luminescence opazno višje pri konstruktih vezanih na ogrodje TDP-43.

Tudi test ELISA je potrdil aktivacijo signalnih poti ter izločanje citokina hIL8, kar prikazuje graf 2C. Trend na grafu 2C je podoben grafu 2B za reporter NF- $\kappa$ B. Iz tega se lahko sklepa, da so rezultati na reporterjih zanesljivi in primerljivi.

Iz slike 2D so vidni tvorjeni skupki. Skupki niso tako močno izraženi in so veliko bolj razpršeni v okolini jeder celic. Tvorbo skupkov je omogočil TDP-43.

## TRIF (180-712)

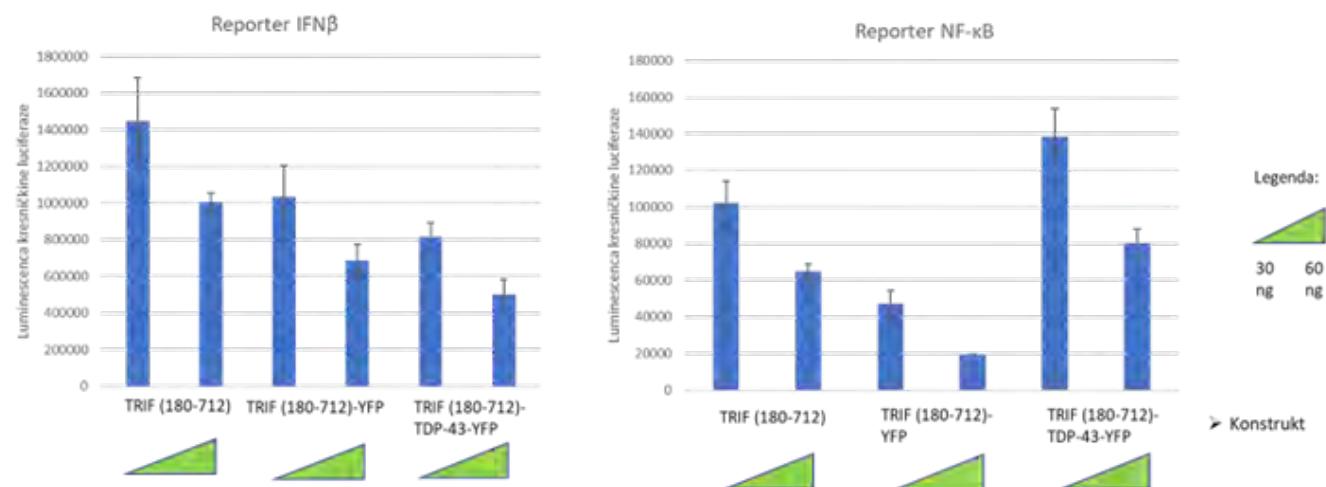
### SLIKA 3:

3A



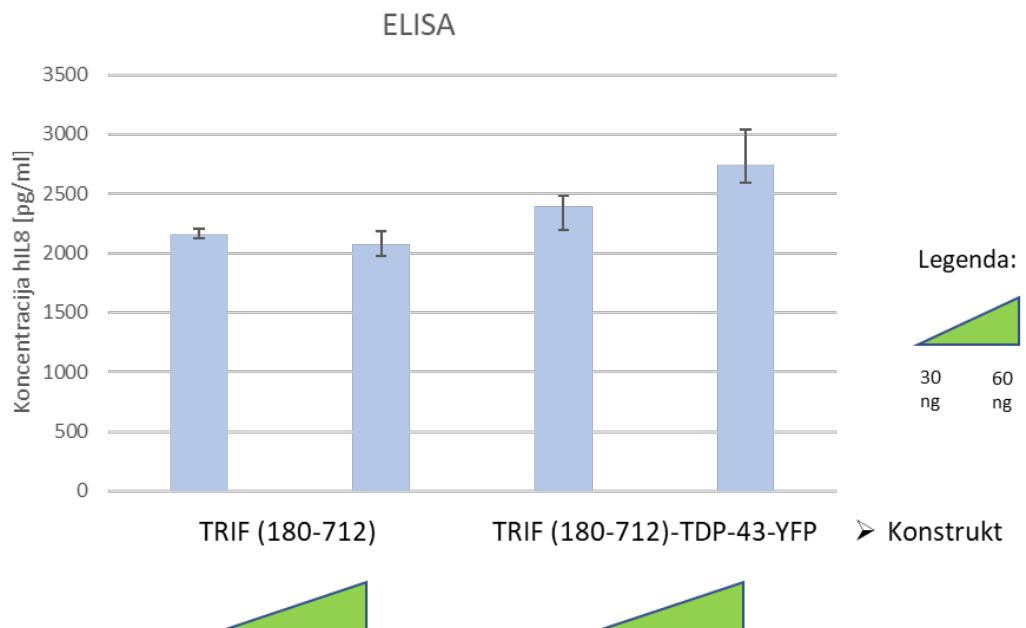
Skica 3: : 3A: skica konstrukta TRIF (180-712) z vezanim TDP-43-YFP.

3B



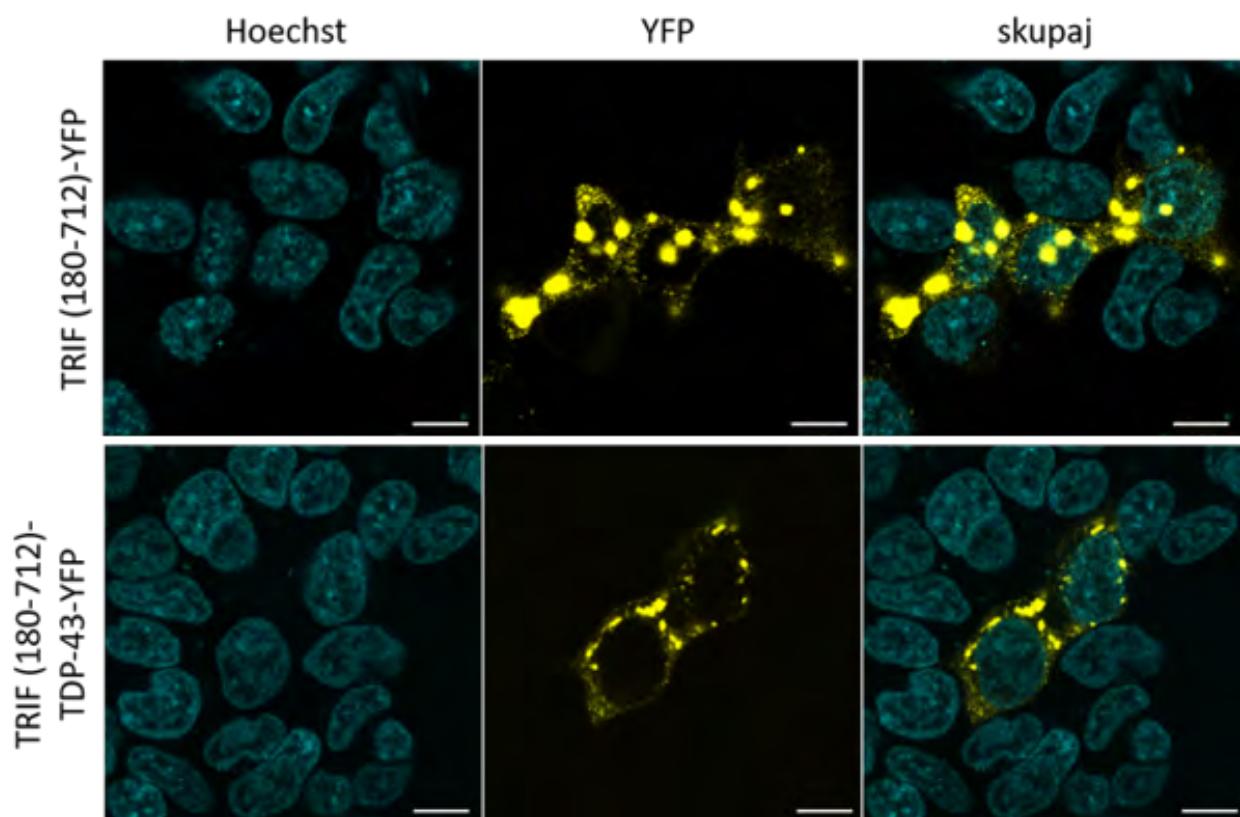
Graf 5: 3B: grafa prikazujeta vrednosti luminescence za konstrukt TRIF (180-712) brez vezanega ter z vezanim TDP-43-YFP za reporterja IFN $\beta$  in NF- $\kappa$ B.

### 3C



Graf 6: **3C:** graf prikazuje vrednosti koncentracij citokina hIL8, ki so bile določene s testom ELISA, za konstrukta TRIF (180-712) in TRIF (180-712) TDP-43-YFP.

### 3D



\*MERILO: črta na sliki predstavlja 10 µm.

Slika 45: **3D:** slika s konfokalnega mikroskopa. Modri deli prikazujejo jedra celic, obarvana z barvilo Hoechst, rumeno obarvani deli pa prikazujejo konstrukte TRIF-a označena z YFP.

### Analiza slike 3

Izbran konstrukt TRIF (180-712) predstavlja celoten TRIF brez NTD (N-terminalna domena). Konstrukt naj bi sprožal aktivacijo signalnih poti za produkcijo IFN tipa 1 in aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- $\kappa$ B, saj vsebuje vse za to potrebne domene. TRIF (180-712) sva opremila z YFP, kar nama je omogočalo spremljanje izražanja v celicah s konfokalnim mikroskopom. Služil nama je kot kontrola za vse različice TRIF. Sočasno z ostalimi sva ga testirala še za aktivacijo reporterjev, saj nisva pričakovala, da bi deloval drugače kot TRIF (180-712), vseeno pa sva želeta preveriti. TDP-43 namreč omogoča tvorbo manjših skupkov v celicah. Pri konstruktih TRIF tvorbe skupkov nisva pričakovala. Zato sva uporabila konstrukt TRIF (180-712)-YFP, ki je služil kot kontrola.

Konstrukta TRIF (180-712) in TRIF (180-712)-YFP precej dobro aktivirata reporter IFN $\beta$ , kar kaže graf 3B. Zanimivo je, da so vrednosti luminescence pri konstraktu z vezanim TDP-43 manjše, vendar v podobnem velikostnem razponu, če se upošteva napako eksperimenta.

Na grafu 3B za reporter NF- $\kappa$ B je opazno, da konstrukt TRIF (180-712) že sam po sebi povzroči aktivacijo signalne poti, ob vezavi tega konstrukta na ogrodje TDP-43 pa so bile vrednosti izmerjene luminescence kresničkine luciferaze nekoliko večje. Ob upoštevanju izračunane napake, so vrednosti precej blizu.

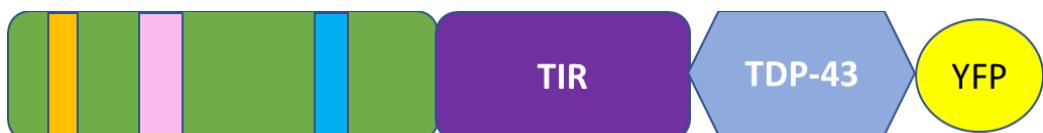
Zopet se opazi razlika vrednosti luminescence pri uporabi različnih mas dodanih konstruktov. Pri manjši masi je luminescencija veliko višja. A spet ne smemo zanemariti potencialnih napak zaradi neizvedene normalizacije ali pipetiranja. Če pride do aktivacije signalne poti NF- $\kappa$ B, začnejo nastajati citokini, med drugim tudi hIL8. Zaradi tega bi pričakovali, da bomo na grafu 3C dobili primerljivo razmerje med testiranimi konstruktoma kot pri eksperimentu na reporterjih (grafa 3B). Z ELISO sva ugotovila, da v tem primeru vezava TRIF (180-712) na TDP-43-YFP ni koristna za signalizacijo, saj ne pride do bistvenega povečanja. Hkrati se kaže tudi to, da smo glede na primerljive vrednosti pri dveh uporabljenih masah že v saturaciji signala, tako da bi za očitnejše razlike morali uporabiti nižje mase dodanega plazmida.

Presenetilo naju je, kako velike in izrazite skupke v celicah je tvoril že sam konstrukt TRIF (180-712), ki so vidni na zgornji sliki 3D. TRIF (180-712) naj ne bi tvoril skupkov, saj je v odsotnosti signala, pri katerem pride do aktivacije (npr. aktivacija receptorja TLR3 ali 4), v monomerni obliki, kar bi morali videti kot citosolno razporejen protein. Na spodnji sliki 3D so vidni nastali skupki pri konstraktu z vezanim TDP-43-YFP, a so ti v primerjavi s TRIF (180-712) veliko manjši in manj izraziti.

## TRIF (180-530)

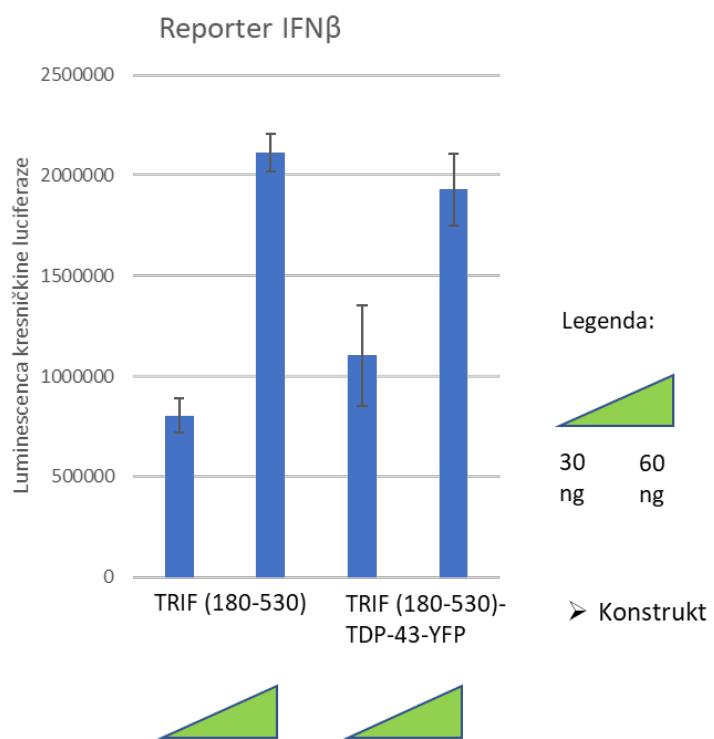
### SLIKA 4:

4A



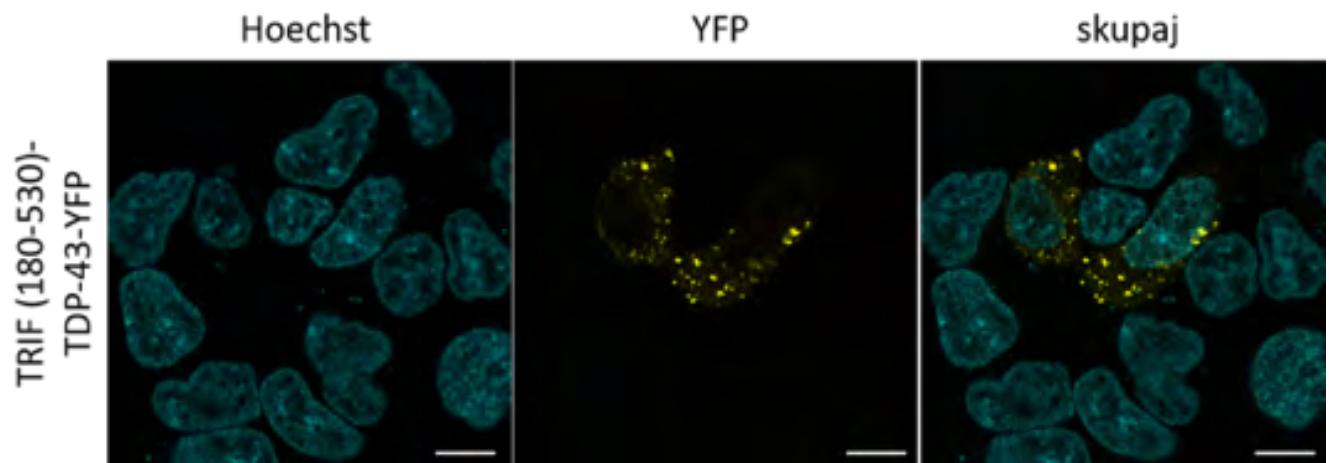
Skica 4: 4A: skica konstrukta TRIF (180-530) z vezanim TDP-43-YFP.

4B



Graf 7: 4B: graf prikazuje vrednosti luminescence za konstrukt TRIF (180-530) brez ter z vezanim TDP-43 za reporter za IFN $\beta$ .

**4C**



\*MERILO: črta na sliki predstavlja 10 µm.

Slika 46: **4C:** slika s konfokalnega mikroskopa. Modri deli prikazujejo jedra celic, obarvana z barvilo Hoechst, rumeno obarvani deli pa prikazujejo konstrukt TRIF, označen z YFP.

#### Analiza slike 4:

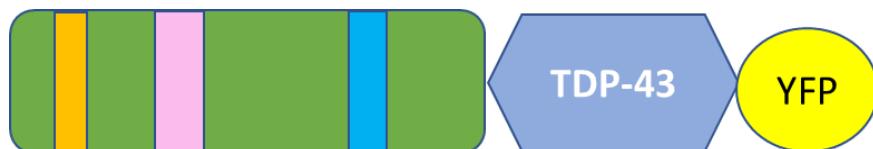
Konstrukt TRIF (180-530) vsebuje le domene za aktivacijo IFN $\beta$ , kar je vidno na skici konstrukta A.

Vrednosti izmerjene luminescence vidne na grafu B so za konstrukt TRIF (180-530) zelo podobne za obe različici, to je z in brez TDP-43-YFP. Iz tega se lahko sklepa, da TDP-43 pri tem konstraktu ni imel velikega vpliva in ni pripomogel k večji aktivaciji IFN $\beta$ . To je razvidno tudi s slike C, kjer je nastalih skupkov številčno malo, so neizraziti in majhni.

## TRIF (180-387)

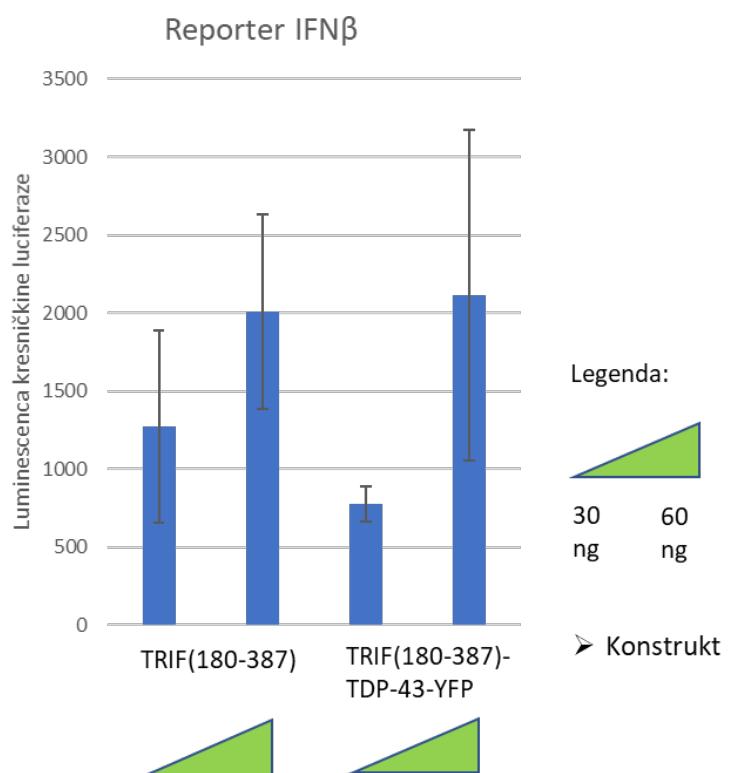
### SLIKA 5:

5A



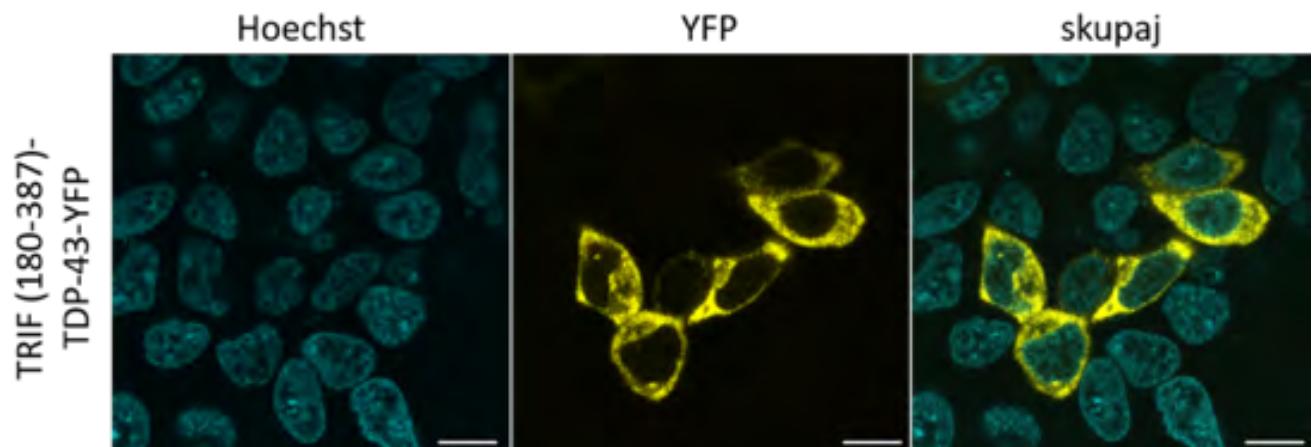
Skica 5: 5A: skica konstrukta TRIF (180-387) z vezanim TDP-43-YFP.

5B



Graf 8: 5B: graf prikazuje vrednosti luminescence za konstrukt TRIF (180-387) brez in z vezanim TDP-43 za reporter za IFN $\beta$ .

5C



\*MERILO: črta na sliki predstavlja 10 µm.

Slika 47: **5C:** slika s konfokalnega mikroskopa. Modri deli prikazujejo jedra celic, obarvana z barvilo Hoechst, rumeno obarvani deli pa prikazujejo konstrukte TRIF označenega z YFP.

### Analiza slike 5:

Konstrukt TRIF (180-387) vsebuje le domene za aktivacijo odziva IFN $\beta$ , kar je vidno na skici konstrukta 5A.

Kot je razvidno iz grafa 5B, so vrednosti luminescence kresničkine luciferaze zelo nizke. Vrednosti luminescence so tako pri konstraktu brez TDP-43, kot pri konstraktu z vezanim TDP-43 zelo podobne, iz česar lahko sklepamo da vloga vezanega TDP-43 za ta konstrukt ni bila velika.

Majhno vlogo TDP-43 lahko opazimo tudi na sliki 5C, kjer skupki niso tvorjeni, so le enakomerno razpršeni okoli jeder celic. Odsotnost skupkov je bil lahko razlog, da sva dobila minimalen odziv na reporterskem sistemu.

## TRIF (658-712)

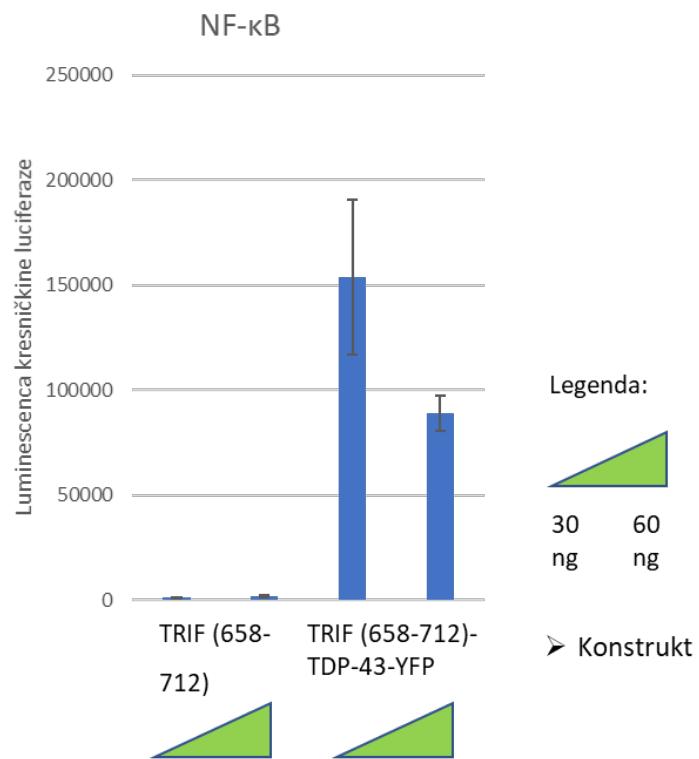
### SLIKA 6:

6A



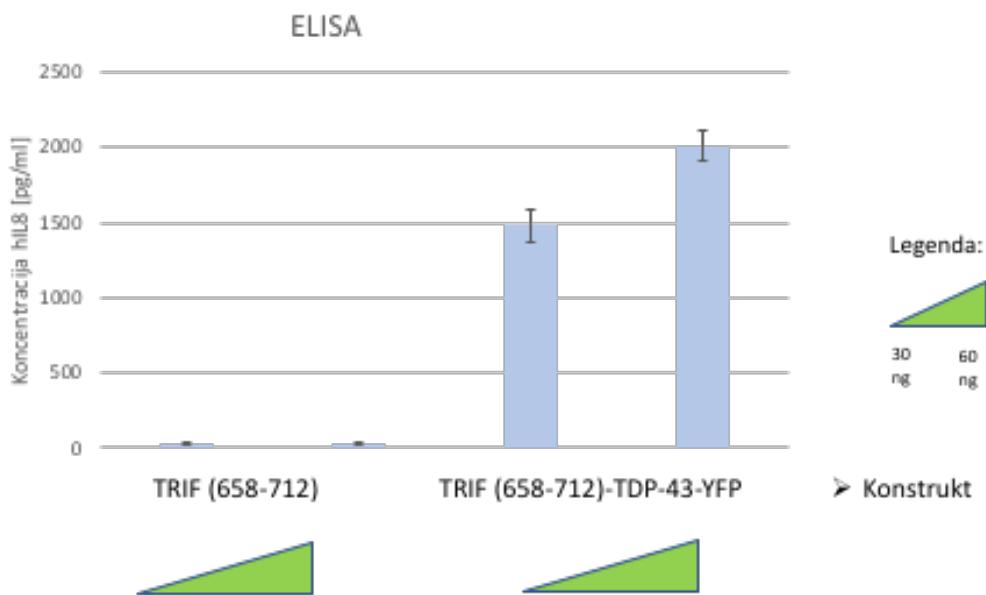
Skica 6: 6A: skica konstrukta TRIF (658-712) z vezanim TDP-43-YFP.

6B



Graf 9: 6B: graf prikazuje vrednosti luminescence za konstrukt TRIF (658-712) brez vezanega TDP-43 ter z vezanim TDP-43, za reporter za NF-κB.

6C



Graf 10: **6C:** graf prikazuje vrednosti koncentracij citokinov hIL8, ki so bile določene s testom ELISA, za konstrukt TRIF (658-712) brez ter z vezanim TDP-43, le za reporter NF- $\kappa$ B.

### Analiza slike 6:

Konstrukt TRIF (658-712) vsebuje le domeno RHIM, pomembno za aktivacijo transkripcijskega faktorja NF- $\kappa$ B.

Iz grafa 6B je razvidno, da konstrukt TRIF (658-712) vezan na ogrodje TDP-43 pozitivno vpliva na izražanje kresničkine luciferaze. TRIF (658-712) je imel zelo nizke vrednosti luminescence. Opazne razlike v vrednostih pri različnih masah so najbrž ponovno posledica neizvedene normalizacije z *Renilla* luciferazo.

Graf 6C daje primerljive rezultate grafu 6B, saj se izločanje citokina hIL8 opazi le v primeru konstrukta TRIF (658-712)-TDP-43-YFP. Pri TRIF (658-712) je odziv v obeh primerih komaj zaznaven.

## 6. ZAKLJUČEK

Rak je glede na podatke svetovne zdravstvene organizacije zelo pogosto obolenje v sodobnem svetu in se lahko konča tudi s smrtjo. Slednje bi lahko preprečili z razvojem novih tehnik za zdravljenje, na primer z imunoterapijo. K napredni imunoterapiji sva želeta prispevati z najino raziskovalno nalogo. Za uspešno odstranitev raka s pomočjo lastnega imunskega sistema je v prvih korakih potrebno izločanje tumorskih antigenov in/ali citokinov iz tumorja (Chen, 2013). Ti pa omogočajo aktivacijo pridobljene imunosti.

Z raziskovalno nalogo sva želeta preučiti, ali lahko pripravimo vnetno napravo na osnovi TRIF, ki bi jo lahko uporabili za imunoterapijo raka. Vnos takšne vnetne naprave v tumor s pomočjo elektroporacije bi namreč lahko privедel do privabljanja celic imunskega sistema v tumor zaradi izločanja citokinov.

Najprej sva identificirala odseke, ki so potrebni za signalizacijo, povezano s TRIF. Posebna komponenta vnetne naprave je TDP-43, ki zaradi nagnjenosti k tvorbi skupkov omogoča skoncentriranje večine molekul TRIF na majhnem delu celice. Predvidevali smo, da bi to lahko ugodno vplivalo na signaliziranje, torej da bi potrebovali zelo malo izraženega proteina za aktivacijo signalnih poti. Načrtane konstrukte sva nato pripravila s pomočjo tehnik molekulskega kloniranja. V naslednjem koraku sva jih vnesla v celice HEK293, kjer sva z dvojnim luciferaznim testom in ELISO preverila, ali je prišlo do signaliziranja. S konfokalno mikroskopijo pa sva preverila razporeditev in organizacijo konstruktov z YFP v celicah HEK293.

## 6.1. VREDNOTENJE HIPOTEZ

Po opravljenem eksperimentalnem delu, meritvah in analizah smo lahko potrdili ali ovrgli hipoteze, ki smo jih postavili na začetku raziskovanja.

### 1. Hipoteza:

**S tehnikami molekulskega kloniranja bomo uspešno pripravili želene konstrukte proteina TRIF z ali brez ogrodnega proteina TDP-43.**

### POTRJENO

Hipotezo lahko v celoti potrdimo, saj smo pripravili vse začrtane konstrukte. Njihovo ustreznost in pravilno nukleotidno zaporedje smo preverili s sekvenciranjem po Sangerju.

### 2. Hipoteza:

**Pripravljene konstrukte s proteinom TRIF bomo uspešno vnesli v celice HEK293.**

### DELNO POTRJENO

Uspešnost vnosa sva neposredno preverila le na konstruktih, ki so vsebovali YFP, z uporabo konfokalnega mikroskopa. Zaradi zaznane aktivacije reporterjev pa lahko rečeva, da sva vse konstrukte uspešno vnesla v celice. Zaradi posredne potrditve vnašanja konstruktov v celice hipoteze ne moremo v celoti potrditi.

Neposredno bi lahko izražanje preverila z izolacijo proteinov iz transficiranih celic. Proteine bi nato ločila z uporabo poliakrilamidne gelske elektroforeze. Po posebnem prenosu na membrano bi jih lahko detektirala s poliklonskimi protitelesi, ki se vežejo na TRIF. Problem uporabe protiteles pri krajših različicah konstruktov bi lahko bil, da se protitelesa ne bi vezala zaradi odsotnosti epitopov. Da se temu izognemo, bi lahko konstrukte opremila s posebnimi kratkimi proteinskimi značkami, na katere se vežejo specifična protitelesa.

### 3. Hipoteza:

**Vnešeni konstrukti bodo aktivirali signalne poti v celicah HEK293.**

### POTRJENO

Aktivacijo signalnih poti v celicah HEK293 smo potrdili tako z dvojnim luciferaznim testom kot tudi z encimsko-imunskim testom ELISA.

#### **4. Hipoteza:**

**Konstruktji proteina TRIF, ki vsebujejo vezavno domeno za TBK1 in so vezani na ogrodni protein TDP-43, bodo v celici spodbudili produkcijo citokinov IFN tipa I.**

#### **POTRJENO**

Producijo citokinov IFN tipa I smo potrjevali pri 5 konstruktih, ki vsebujejo vezavno domeno za TBK1 in so vezani na ogrodni protein TDP-43. Z dvojnim luciferaznim testom smo pri vseh 5 konstruktih to tudi potrdili. Raven aktivacije reporterja je bila odvisna od odseka TRIF, ki ga je konstrukt vseboval. Tako je na primer TRIF (180-387)-TDP-43-YFP sprožil komaj zaznavno aktivacijo reporterja v primerjavi z ostalimi.

#### **5. Hipoteza:**

**Konstruktji TRIF, ki vsebujejo domeno RHIM in so vezani na TDP-43, bodo v celici spodbudili aktivacijo signalne poti NF-κB in s tem produkcijo citokinov.**

#### **POTRJENO**

Domeno RHIM so vsebovali 4 konstruktji, vezani na ogrodni protein TDP-43. Aktivacijo signalne poti NF-κB smo potrdili z dvojnim luciferaznim testom in encimsko-imunskim testom ELISA. S testom ELISA smo pri vseh konstruktih dokazali tudi produkcijo citokina hIL8. Raven aktivacije reporterja je bila odvisna od odseka TRIF, ki ga je konstrukt vseboval.

#### **6. Hipoteza:**

**Pripravljeni konstruktji s proteinom TRIF, ki so vezani na ogrodni protein TDP-43, bodo v celici spodbudili močnejšo produkcijo citokinov preko aktivacije signalne poti NF-κB in aktivacijo produkcije IFN tipa I.**

#### **DELNO POTRJENO**

Hipoteze v celoti nismo mogli potrditi. Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da pri vseh konstruktih vezanih na ogrodni protein TDP-43 ni prišlo do močnejše aktivacije signalnih poti in produkcije citokinov. Pri polovici konstruktov je vezava TDP-43 pripomogla k močnejši signalizaciji, pri drugi polovici pa vezava TDP-43 ni imela vpliva, ali pa je signalizacijo zmanjšala.

Naša želja je bila pridobiti čim krajši konstrukt, saj je s tem olajšan vnos v celice HeLa (Hornstein, Roman, Arevalo-Soliz, Engevik, & Zechiedrich, 2016). Ob upoštevanju letega smo bližje potrditvi hipoteze, saj sta konstrukta TRIF (180-217 658-712)-TDP-43-YFP in TRIF (180-387 530-712)-TDP-43-YFP precej dobro aktivirala reporterje v primerjavi s TRIF (180-712)-TDP-43-YFP. Omenjena konstrukta sta tudi bolj zaželjena za končno vnetno napravo, saj ne vsebujeta domene TIR. Slednje ne želimo, saj lahko

Vnetna naprava na osnovi molekule TRIF za potencialno imunoterapijo raka

zaradi vezave na ostale proteine, ki vsebujejo to domeno, interferira z drugimi signalnimi potmi v celici.

TRIF se izraža v večini celic in se nahaja predvsem v citoplazmi mirujočih celic. Po aktivaciji receptorjev TLR je TRIF najprej vezan na receptor, po določenem času pa se sprosti in se prerazporedi v strukture, ki so podobne pikam. Takšni skupki verjetno služijo za nadaljnje proženje signalov (Ullah, Sweet, Mansell, Kellie, & Kobe, 2016). Za našo raziskavo smo zbrali aktivno obliko TRIF, torej brez regije 1-180, ki omogoča inhibicijo. Verjetno je zaradi tega prišlo do tvorbe skupkov pri konstruktih, ki so vsebovali domeno TIR, že brez dodanega TDP-43. Skupki pa glede na naše rezultate ugodno vplivajo na povečano signaliziranje.

## 6.2. NAČRTI ZA NADALJNO RAZISKOVANJE

Z najino nalogo smo pripravili potrebne temeljne za nadaljne raziskovanje priprav vnetne naprave za imunoterapijo raka na osnovi molecule TRIF.

Vsekakor bi morali najprej ves eksperimentalni del večkrat ponoviti, da bi dobili zanesljivejše rezultate. Prav tako bi lahko optimizirali pogoje, npr. z uporabo nižjih mas konstruktorov. Pri majhnih masah bi se verjetno bolj odrazile razlike med različnimi konstrukti pri aktivaciji signalnih poti. Z večkratnimi ponovitvami bi lahko z gotovostjo potrdili, kateri odseki TRIF so najprimernejši za minimalistično vnetno napravo. Najbolj obetavne konstrukte bi lahko nato testirali v rakavih celičnih linijah in ob ugodnih rezultatih tudi na mišjem tumorskem modelu.

Verjetno bi inducirana celična smrt transficirane celice z vnetno napravo učinkoviteje aktivirala imunski sistem (Chen & Mellman, 2013). Uporaba TRIF kot osnove za vnetno napravo ima tudi ta potencial. Preko domene RHIM lahko v določenih pogojih v celicah sprožimo celično smrt (Ullah, Sweet, Mansell, Kellie, & Kobe, 2016). Te v našem sistemu sicer nismo opazili, tako da bi morali to podrobneje preučiti.

Predvidevamo, da je naša vnetna naprava modularna v smislu, da lahko pripenjamo module z različno aktivnostjo. Dodatek TDP-43 namreč ni spremenil ali okvaril signaliziranja prav tako ne vezan YFP. Namesto YFP bi tako lahko vezali še kak drug protein z dodatno funkcionalnostjo in s tem izpopolnili lastnosti vnetne naprave, kar pa postavlja dobre temelje za delo v prihodnje.

## 7. VIRI IN LITERATURA

- Pylaeva, E., Lang, S., & Jablonska, J. (2016, December 21). *The Essential Role of Type I Interferons in Differentiation and Activation of Tumor-Associated Neutrophils*. Pridobljeno s <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5174087/>
- addgene. (n.d.). *Bacterial Transformation*. Pridobljeno s <https://www.addgene.org/protocols/bacterial-transformation/>
- addgene. (n.d.). *Gibson Assembly Cloning*. Pridobljeno s <https://www.addgene.org/protocols/gibson-assembly/>
- Šimenc, M. (2022, Marec 20). *Zakaj se celica iz normalne spremeni v rakovo in kako hitro?* Pridobljeno s Moje zdravje: <https://www.revijazamojezdravje.si/kako-se-celica-iz-normalne-spremeni-v-rakavo-in-kako-hitro/#>
- ALZFORUM. (n.d.). *TDP-43*. Pridobljeno s <https://www.alzforum.org/alzpedia/tdp-43>
- asisit. dr. Škerget Erjavec, A., & doc.dr. Stangler Herodež, Š. (2011). *Medicinska biotehnologija za študente biologije*. Pridobljeno s [https://biologija.fnm.um.si/wp-content/uploads/2021/03/medicinska\\_biotehnologija\\_za\\_studente\\_bio\\_prirocni\\_k.pdf](https://biologija.fnm.um.si/wp-content/uploads/2021/03/medicinska_biotehnologija_za_studente_bio_prirocni_k.pdf)
- BerrickLab. (2021). *Bibson Assembly*. Pridobljeno s <https://berricklab.org/twiki/bin/view/Lab/ProtocolsGibsonCloning>
- Bionity. (n.d.). *Plasmid*. Pridobljeno s <https://www.bionity.com/en/encyclopedia/Plasmid.html>
- Bionity. (n.d.). *Transfection*. Pridobljeno s <https://www.bionity.com/en/encyclopedia/Transfection.html>
- Boršić, E. (2021). *Vpliv kalijevih ionov in vrste oligomera NLRP3 na aktivacijo inflamasoma*. Pridobljeno s <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=145202&lang=slv>
- Buratti, E., & Baralle, F. A. (2008). *Multiple roles of TDP-43 in gene expression, splicing regulation, and human disease*. Pridobljeno s <https://www.fbscience.com/Landmark/articles/pdf/Landmark2727.pdf>
- Carter, M., & Shieh, J. (2015). *Luciferase Assay*. Pridobljeno s <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/luciferase-assay>
- Chen, & Mellman. (2013). *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*.
- Devetak, B., & Devetak, D. (2011). *Biološke osnove zdravega življenja*. DZS založništvo in trgovina, d.d.
- doc.dr. Dolinar, M. (2008/2009). *Protitelesa in imunski odgovor; Biokemija čutil*. Pridobljeno s [http://web.fkkt.uni-lj.si/biokemija/Biokemija/Imunologija&Cutila\\_KEM0809.pdf](http://web.fkkt.uni-lj.si/biokemija/Biokemija/Imunologija&Cutila_KEM0809.pdf)
- Dolenc, S. (2018, oktober 6). *Kako imunski sistem spodbuditi, da se bo boril proti raku*. Pridobljeno s <https://kvarkadabra.net/2018/10/imunoterapija-raka/>
- Dolenc, S. (2020, Marec 6). *Kako deluje imunski sistem*. Pridobljeno s <https://kvarkadabra.net/2020/03/imunski-sistem-2/>

- Dolinar, M. (2016). *Molekulsко kloniranje*. Pridobljeno s [https://www.fkkt.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/1-O\\_fakulteti/7-Založba/Skripta\\_MK\\_201617.pdf](https://www.fkkt.uni-lj.si/fileadmin/datoteke/1-O_fakulteti/7-Založba/Skripta_MK_201617.pdf)
- Društvo onkoloških bolnikov Slovenije. (2017, maj 12). *Imunski sistem človeka za uničevanje rakavih celic*. Pridobljeno s <http://www.onkologija.org/imunski-sistem-cloveka-za-unicenje-rakavih-celic/>
- Žakelj, M., & Dolinar, M. (2012). *Angleško-slovenski slovar izbranih izrazov iz biokemije in molekularne biologije*. Pridobljeno s [http://www.sbd.si/datoteke/dokumenti/SBD\\_BiokemijskiSlovar2012a.pdf](http://www.sbd.si/datoteke/dokumenti/SBD_BiokemijskiSlovar2012a.pdf)
- Žnidarić, M. (2020). *Signalna pot nuklearnega transkripcijskega faktorja kappa B*. Pridobljeno s <https://dk.um.si/Dokument.php?id=140378>
- Francois-Moutal, L., & Miller, S. P. (2019). *Structural Insights Into TDP-43 and Effects of Post-translational Modifications*. Pridobljeno s <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2019.00301/full>
- Francois-Moutal, Perez-Miller, Scott, Miranda, Mollasalehi, & Khanna. (2019). *Structural insights into TDP-43 and effects of post-translational modifications*.
- Funami, Sasai, Oshiumi, Horiuchi, Inagaki, Seya, & Matsumoto. (2008). *Homo-oligomerization is essential for Toll/interleukin-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated NF-κB and interferon regulatory factor-3 activation*.
- Gibson, D. G. (2011). *Chapter fifteen - Enzymatic Assembly of Overlapping DNA Fragments*. Pridobljeno s <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123851208000152>
- Han, Yang, Xu, & Shu. (2010). *Analysis of a TIR-less splice variant of TRIF reveals an unexpected mechanism of TLR3-mediated signaling*.
- HEK293 CELL LINE. (2022). *HEK293 Protocols: Cell Culture, Transfection, Protein Production*. Pridobljeno s <https://www.hek293.com>
- Hornstein, Roman, Arevalo-Soliz, Engevik, & Zechiedrich. (2016). *Effects of circular DNA length on transfection efficiency by electroporation into HeLa cells*.
- Ihan, A. (2020). *Osnove medicinske imunologije*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani.
- Kadri, K. (2019). *Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications*. Pridobljeno s <https://www.intechopen.com/chapters/67558>
- Kawasaki, & Kawai. (2014). *Toll-like receptor signaling pathways*.
- Klenar, T. (2015). *Možnosti uporabe elektroforeze DNA pri pouku v osnovni šoli*. Pridobljeno s [http://pefprints.pef.uni-lj.si/3066/1/Diplomsko\\_delo\\_Klenar\\_Tadeja.pdf](http://pefprints.pef.uni-lj.si/3066/1/Diplomsko_delo_Klenar_Tadeja.pdf)
- Kotnik, T., Maček, A., Kandušer, M., Pucihar, G., Pavlin, M., Valič, B., & Miklavčič , D. (2005). *Elektroporacija celične membrane: teorija ter poizkusi in vitro*. Pridobljeno s <http://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:DOC-LSJAE7RJ>
- Krivec, E. (2020). *Regulacija signalnih poti limfocitov T z uporabo metod sintezne biologije za izboljšano varnost celične imunoterapije*. Pridobljeno s <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=131168&lang=slv>
- Merck. (2022). *Sanger Sequencing Steps & Method*. Pridobljeno s <https://www.sigmaaldrich.com/SL/en/technical-documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-sequencing>

- MyBioSource. (n.d.). *Gene Transfer Technique*. Pridobljeno s <https://www.mybiosource.com/learn/gene-transfer-technique/>
- NCBI. (2022). *TICAM1 toll like receptor adaptor molecule 1 [ Homo sapiens (human) ]*. Pridobljeno s [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&dopt=default&list\\_uids=148022&rn=1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=retrieve&dopt=default&list_uids=148022&rn=1)
- O'Neil, & Bowie. (2007). *The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling*.
- Pahor, N. (2018). *Vpliv zaviralcev cisteinskih peptidov na signalno pot NF-kB v celicah PC-3*. Pridobljeno s [https://wwwffa.uni-lj.si/docs/default-source/knjiznica/doc/magistrske/2018/pahor\\_nika\\_mag\\_nal\\_2018.pdf?sfvrsn=2](https://wwwffa.uni-lj.si/docs/default-source/knjiznica/doc/magistrske/2018/pahor_nika_mag_nal_2018.pdf?sfvrsn=2)
- Rihtar, E. (2019). *Priprava od majhnih molekul odvisnih dimerizacijskih sistemov na osnovi cepljenih proteinov*. Pridobljeno s <https://repozitorij.uni-lj.si/Dokument.php?id=121633&lang=slv>
- Rozman, D. (2013, Maj 20). *Eksperimentalne metode za delo z nukleinskimi kislinami in proteini*. Pridobljeno s <http://ibk.mf.uni-lj.si/teaching/biokemija1/predavanja/predavanje36R13.pdf>
- Scientific, T. (n.d.). *Interferons Overview*. Pridobljeno s <https://www.thermofisher.com/si/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/immunology-at-work/interferons-overview.html>
- Serša , G. (n.d.). *Dejavniki tveganja in nastanek raka*. Pridobljeno s [https://www.nizj.si/sites/www.nizj.si/files/uploaded/1-dejavniki\\_tveganja\\_za\\_nastanek\\_raka\\_sersa.pdf](https://www.nizj.si/sites/www.nizj.si/files/uploaded/1-dejavniki_tveganja_za_nastanek_raka_sersa.pdf)
- Slavec, L., & Geršak, K. (2022). *Humane genetske spremembe in njihovo določanje: trenutno stabnje in obeti za prihodnost*. Pridobljeno s <http://www.slovenskapediatrija.si/Portals/0/Clanki/2020/Slovpediatr-2020-4-01.pdf>
- Stušek, P., & Vilhar, B. (2010). *Biologija celice in genetika*. Narodna in univerzitetna knjižnica, Ljubljana: DZS, založništvo in trgovina.
- Tang, D. (2012). *PAMPs and DAMPs*. Pridobljeno s <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22889221/>
- Tatematsu, Ishii, Horiuchi, Inagaki, Seya, & Matsumoto. (2010). *A molecular mechanism for Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation*.
- Thpanorama. (n.d.). *Kaj je fagocitoza*. Pridobljeno s <https://sl.thpanorama.com/articles/biologa/qu-es-la-fagocitosis.html>
- Turnšek, N., & Unk, M. (2020). *Imunoterapija pri zdravljenju bolnikov z rakom pljuč*. Pridobljeno s [https://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/Strokovna\\_knjiznica/publikacije\\_za\\_bolnike/imunoterapija\\_pri\\_zdravljenju\\_bolnikov\\_z\\_rakom\\_pljuc\\_2020.pdf](https://www.onko-i.si/fileadmin/onko/datoteke/Strokovna_knjiznica/publikacije_za_bolnike/imunoterapija_pri_zdravljenju_bolnikov_z_rakom_pljuc_2020.pdf)
- UL, W. F. (2011). *Receptorji TLR*. Pridobljeno s [http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Receptorji\\_TLR](http://wiki.fkkt.uni-lj.si/index.php/Receptorji_TLR)

- Ullah, O., Sweet, M. J., Mansell, A., Kellie, S., & Kobe, B. (9. Maj 2016). *JLB Journal of leukocyte biology*. Pridobljeno iz <https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1189/jlb.2RI1115-531R>
- Urry, L. A., Cain, M. L., & Jackson, R. B. (2014). *Biologija 4*. Narodna in univerzitetna knjižnica Ljubljana: Mohorjeva založba Celovec.
- Vižintin, A., & Bezeljak, U. (2015). *ngelika Vižintin in Urban Bezeljak*. Pridobljeno s <http://bio.ijs.si/~krizaj/group/Bioloske%20membrane%202016/Seminarji-2016-2017/Porocila/Tollu-podobni%20receptorji-Bezeljak&Vizintin-seminarska.pdf>
- Warwick. (2014). *A Guide to Gibson Assembly Design*. Pridobljeno s <https://warwick.ac.uk/study/csde/gsp/eportfolio/directory/pg/lsujcw/gibsonguide/>
- WHO. (2018). *E. coli*. Pridobljeno s <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- Zhu, S. (2019). *TIR Domain-Containing Adaptor-Inducing Interferon-β (TRIF) Participates in Antiviral Immune Responses and Hepatic Lipogenesis of Large Yellow Croaker (Larimichthys Crocea)*. Pridobljeno s <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02506/full>