

KLONIRANJE PROTEINA TDP-43 S HEKSAHISTIDINSKO OZNAKO NA N-KONCU

BIOTEHNOLOGIJA

RAZISKOVALNA NALOGA

Avtorica: Zoja Rugelj, 4. C

Mentor: Gregor Križ, mag. prof.

Somentorji: prof. dr. Boris Rogelj, Klementina Polanec, mag. biokem.

2023/2024

Gimnazija Bežigrad

ZAHVALA

Raziskovalno delo sem opravila na Institutu "Jožef Stefan", na oddelku za biotehnologijo.

Zahvaljujem se mentorici Klementini Polanec, mag. biokem. za mentorstvo, pomoč in vse strokovne ter praktične nasvete ob nastajanju raziskovalnega dela. Zahvaljujem se tudi prof. dr. Borisu Roglju, ki mi je omogočil sodelovanje v raziskovalni skupini. Zahvala gre tudi Gregorju Križu, mag. prof., za strokovno vodenje pri nastajanju raziskovalnega dela.

POVZETEK

TDP-43 je protein s 414 aminokislinami, ki ga kodira gen TARDBP. Sestavljajo ga štiri domene, prva je N-končna domena (NTD), znotraj nje se nahaja jedrni lokalizacijski signal NLS, sledita še dva RNA-prepoznavna motiva (RRM1 in RRM2) ter z glicinom bogata C-končna domena (CTD). TDP-43 igra pomembno v patofiziologiji nekaterih nevrodegenerativnih bolezni, kot sta ALS in FTLD, pri obeh gre za proces postopnega nazadovanja živčnih struktur v možganih. Pri ALS se protein TDP-43 prične kopičiti v citoplazmi, kjer tvori citoplazemske inkluzije oziroma agregate.

Namen raziskovalne naloge je bila priprava plazmida, ki omogoča izražanje fuzijskega proteina TDP-43-MBP z oznako His na N-koncu. Plazmid smo želeli pripraviti z dvema različnima metodama kloniranja: kloniranje s prilegajočimi se nukleotidi in pa kloniranje s sestavljanjem in vivo (IVA), ter s primerjavo rezultatov pokazati, katera izmed metod je učinkovitejša.

Ključne besede: ALS, TDP-43, kloniranje IVA, kloniranje s prilegajočimi se nukleotidi

KAZALO

1. UVOD	6
1.1 NEVRODEGENERACIJA	6
1.1.1 Nevrodegenerativne bolezni	6
1.1.2 ALS	6
1.1.3 FTLD	6
1.1.4 Proteinopatije	6
1.2 TDP-43	6
1.2.1 Struktura TDP-43	6
1.2.2 Funkcija TDP-43	7
1.2.3 TDP-43 in ALS	7
1.3 MOLEKULSKO KLONIRANJE	8
1.3.1 Kloniranje na osnovi restrikcijskih encimov	8
1.3.2 Kloniranje PCR	8
1.3.3 Kloniranje s prilegajočimi se oligonukleotidi	9
1.3.4 Kloniranje IVA	10
2. NAMEN	11
2.1 HIPOTEZE	11
3. MATERIALI	12
3.1 LABORATORIJSKA OPREMA	12
3.2 KEMIKALJE IN RAZTOPINE	12
3.3 PLAZMIDNI VEKTORJI	12
3.4 BAKTERIJSKI SEV	12
3.5 ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI	13
3.6 GOJIŠČA	13
4. METODE	14
4.1 KLONIRANJE S PRILEGAJOČIMI SE NUKLEOTIDI	14
4.1.1 Prileganje oligonukleotidov	14
4.1.2 Restrikcija plazmida z NdeI	14
4.1.3 Agarozna gelska elektroforeza (AGE)	14
4.1.4 Izolacija plazmida iz agaroznega gela	14
4.1.5 Defosforilacija rezanega plazmida	15
4.1.6 Fosforilacija prileganih oligonukleotidov	15
4.1.7 Ligacija	15
4.1.8 Transformacija bakterijskih celic	16
4.1.9 Izolacija plazmidne DNA iz bakterijskih celic	16
4.1.10 Restrikcijska analiza	16
4.1.11 Določevanje nukleotidnega zaporedja	16
4.2 KLONIRANJE IVA	16
4.2.1 Reakcija PCR	16

4.2.2	Čiščenje produkta PCR	17
4.2.3	Restrikcija plazmida z DpnI	17
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	18
5.1	REZULTATI KLONIRANJA S PRILEGAJOČIMI SE NUKLEOTIDI	18
5.1.1	Rezanje plazmida pJ4M-TDP-43-MBP z restriktazo NdeI	18
5.1.2	Prileganje oligonukleotidov za uvedbo oznake His	19
5.1.3	Ligacija prileganih oligonukleotidov v rezan pJ4M-TDP43-MBP in transformacija bakterijskih celic	19
5.1.4	Izolacija plazmidne DNA	20
5.1.5	Restriksijska analiza plazmidov	21
5.1.6	Sekvenčna analiza plazmidov	21
5.2	REZULTATI KLONIRANJA S SESTAVLJANJEM IN VIVO (IVA)	23
5.2.1	Vnos zapisa za oznako His z kloniranjem IVA	23
5.2.2	Transformacija bakterijskih celic	24
5.2.3	Izolacija plazmidne DNA	25
5.2.4	Sekvenčna analiza plazmidov	25
6.	ZAKLJUČEK	26
	LITERATURA	27

1. UVOD

1.1 NEURODEGENERACIJA

1.1.1 Nevrodegenerativne bolezni

Nevrodegeneracija je proces degeneracije oziroma postopnega nazadovanja živčnih struktur v možganih, ki vodi v razvoj nevrodegenerativnih bolezni, kot so npr.: Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova bolezen, amiotrofična lateralna skleroza (ALS), frontotemporalna lobarna degeneracija (FTLD) itd. Vse te bolezni v različnih oblikah prizadenejo nevrone. Nevroni so celice, ki gradijo živčni sistem. Ob poškodbi jih telo ne more nadomestiti, zato so nevrodegenerativne bolezni neozdravljive. Čeprav obstajajo terapije, ki pomagajo pri lažšanju telesnih in duševnih simptomov, ki jih bolezni povzročajo, upočasnitev njihovega napredovanja trenutno še ni mogoča. Ker se verjetnost razvoja možganskih obolenj s starostjo korenito povečuje, življenjska doba ljudi pa je zaradi medicinskih in znanstvenih napredkov vedno daljša, se s preprečevanjem in zdravljenjem nevrodegenerativnih bolezni dandanes soočajo po vsem svetu. Bolezni nastopijo zahrbtno in vplivajo na spomin, sposobnost razmišljanja in orientacijo prizadetega, povzročijo pa lahko tudi slabenje jezikovnih sposobnosti. [1]

1.1.2 ALS

Pri že omenjeni bolezni ALS, sta prva simptoma propadanja zgornjih in spodnjih motoričnih nevronov mišična oslabelelost in težave z govorom. Sčasoma se stopnjujeta do paralize in oteženega dihanja, ki je tudi najpogostejši razlog, da oboleli izgubijo življenje. Natančen vzrok za razvoj bolezni še vedno ni povsem jasen, vendar se domneva, da je kriva kombinacija genetskih in okolijskih dejavnikov (npr. izpostavljenost toksinom/virusom). Pogosteje obolevajo moški, ki so ob začetku bolezni stari povprečno 58 let, večina pa jih živi le še nadaljnja 3 do 4 leta. [2]

1.1.3 FTLD

FTLD, ki jo imenujejo tudi frontotemporalna demenca (FTD), lahko prizadene čelni reženj, kar se kaže v spremembah osebnosti in nepričakovanem obnašanju. Prizadene pa lahko tudi senčni reženj možganov, takrat so v ospredju težave z govorom. Pri večini bolnikov je bolezen sporadična, kar pomeni, da je nima nihče drug v družini in zato vzrok bolezni najverjetneje ni genetski. [3]

Pri obeh omenjenih boleznih so identificirali vključenost proteina TDP-43.

1.1.4 Proteinopatije

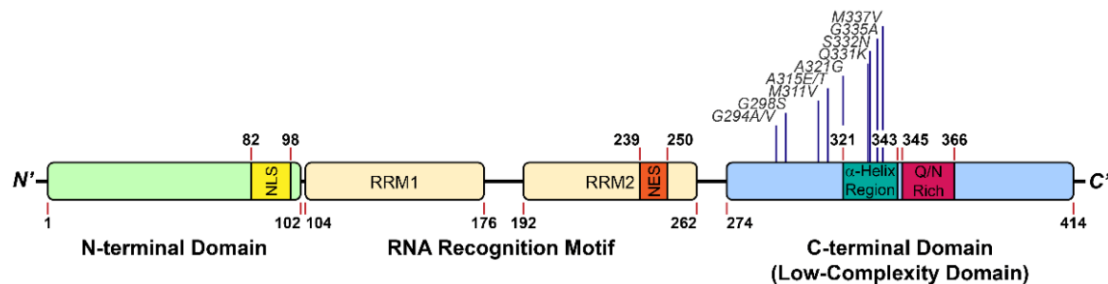
Proteinopatije so družina bolezni, ki jih povzročajo napačno zvite beljakovine, zato se pojavijo proteinski agregati. Pri ALS in FTLD gre za proteinopatije TDP-43; torej za agregate TDP-43. Agregati TDP-43 se pojavljajo v 98 % primerov ALS in 50 % primerov FTD. [3]

1.2 TDP-43

1.2.1 Struktura TDP-43

TDP-43 je protein s 414 aminokislinami, ki ga kodira gen TARDBP (TAR DNA Binding Protein) na prvem kromosomu. Sestavljen je iz štirih domen (prikazanih na *sliki 1*), prva je

N-končna domena (NTD), znotraj nje pa se nahaja jedrni lokalizacijski signal NLS, sledita še dva RNA-prepoznavna motiva (RRM1 in RRM2) ter z glicinom bogata C-končna domena (CTD). Slednja je še posebej nagnjena k agregaciji, v njej pa najdemo tudi največ mutacij povezanih z ALS. [4]



Slika 1: Shematski prikaz strukture TDP-43. Protein je sestavljen iz N-končne domene, dveh RNA-prepoznavnih motivov in z glicinom bogate C-končne domene. Na zanki, ki povezuje NTD in RRM1 se nahaja jedrni lokalizacijski signal. (vir slike: Hung-Ming Chien, Chi-Chang Lee, Joseph Jen-Tse Huang. The Different Faces of the TDP-43 Low-Complexity Domain: The Formation of Liquid Droplets and Amyloid Fibrils. ResearchGate. 2021)

1.2.2 Funkcija TDP-43

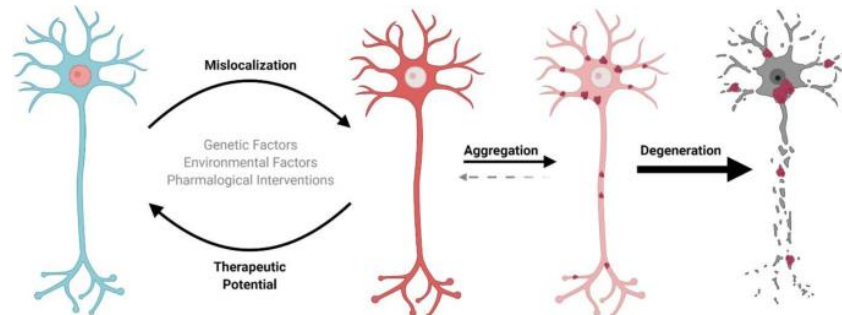
Protein TDP-43 se v normalnih fizioloških pogojih nahaja v celičnem jedru večine tkiv, v manjših koncentracijah, pa ga najdemo tudi v citoplazmi. Sodeluje pri nastanku proteinov, saj se veže na DNA in uravnava transkripcijo. Transkripcija je prvi korak pri tvorbi proteinov iz genov, pri katerem celica iz molekule DNA sintetizira kopijo RNA. TDP-43 pa se lahko veže tudi na RNA in sodeluje pri obdelavi molekul mRNA (messenger RNA oziroma informacijska RNA, ki sodeluje pri prenosu informacije iz DNA do ribosoma). [4]

TDP-43 pomaga tudi pri tvorbi stresnih granul. To so skupki nekaterih celičnih proteinov, ki nastanejo kot odziv na biotski ali abiotski stres (izpostavljenost toksičnosti, virusne okužbe, obsevanje, oksidativni in toplotni stres itd.). Celica se odzove tako, da prekine normalno sintezo proteinov. Nastanejo do 5 mikrometrov veliki kompleksi RNA in proteinov, ki ob prekinitvi stresa razpadejo. Tako tvorbo, kot tudi razpad stresnih granul regulira več proteinov, med njimi tudi TDP-43. [4]

1.2.3 TDP-43 in ALS

Nepravilno prehajanje proteina TDP-43 med jedrom in citoplazmo je bilo identificirano, kot patogeni mehanizem tako pri ALS kot tudi FTLD. Pri ALS se protein TDP-43 odstrani iz jedra in se prične kopičiti v citoplazmi, kjer tvori citoplazemske inkluzije oziroma agregate (skupke netopnih, nepravilno zviti proteinov). Nastanek agregatov je prikazan na *sliki 2*. Sklepali bi lahko, da je eden od vzrokov za okvarjen prenos proteina v jedro napaka v kompleksu transportnih proteinov ali pa nepravilnost v posttranslacijski modifikaciji TDP-43. Znanstveniki so na proteinu odkrili več mutacij, iz česar so sklepali, da imajo te vpliv na nastanek stresnih granul in posledično citoplazemskih inkluzij. Mutacije na TDP-43 pa so prisotne le v 1 do 5% primerih ALS. Na sposobnost proteina, da tvori agregate, bi lahko vplivali tudi že prej omenjeni stresni dejavniki. Ob stresu se TDP-43, ki je primarno jedrni protein, pojavi v citoplazmi v obliki stresnih granul. Kronični stres tako lahko povzroča dolgotrajni obstoj stresnih granul in s tem pomanjkanje proteina v jedru, zaradi česar TDP-43 ne more opravljati svojih fizioloških funkcij. [4]

Po dosedanjih odkritjih, bi lahko zaradi raznolikega obnašanja TDP-43, ALS razdelili v 4 stopnje. V 1. inkluzije TDP-43 nastanejo v motoričnem korteksu. V 2. so inkluzije opazne v frontalnem korteksu, med tem, ko so v 3. stopnji videne širitve vse do bazalnih ganglijev (skupkov nevronov pod možgansko skorjo). V 4. stopnji inkluzije napredujejo do hipokampusa. [5]



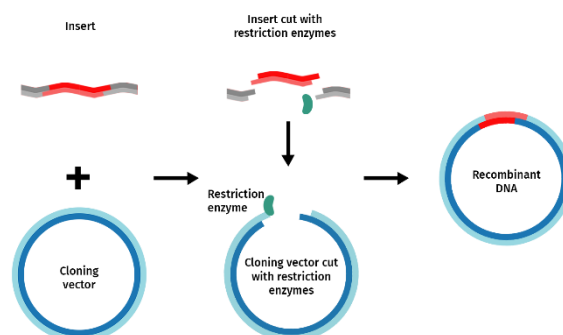
Slika 2: Shematski prikaz vpliva genetskih dejavnikov ter biotskega in abiotskega stresa na degeneracijo nevronov. V celicah pride do napačne lokalizacije jedrnih proteinov, kar privede do nastanka citoplazemskih agregatov in nepovratne degeneracije (vir slike: Terry Suk, Maxime Rousseaux. *The role of TDP-43 mislocalization in amyotrophic lateral sclerosis*. ReseachGate. 2020.)

1.3 MOLEKULSKO KLONIRANJE

Molekulsko kloniranje DNA je postopek izdelave več identičnih kopij določenega dela DNA, pri čemer gre za vstavitvev izoliranega fragmenta DNA, pogosto imenovanega insert, v vektor. Tako nastane rekombinatna DNA (kombinacija fragmentov različnega izvora). Sledi transformacija rekombinatnih plazmidov v bakterije ali drugega primernege gostitelja za razmnoževanje. Zadnji korak molekulskega kloniranja pa je izbiranje in preverjanje gostiteljev, da bi našli tistega, ki vsebuje rekombinatni plazmid. [6]

1.3.1 Kloniranje na osnovi restrikcijskih encimov

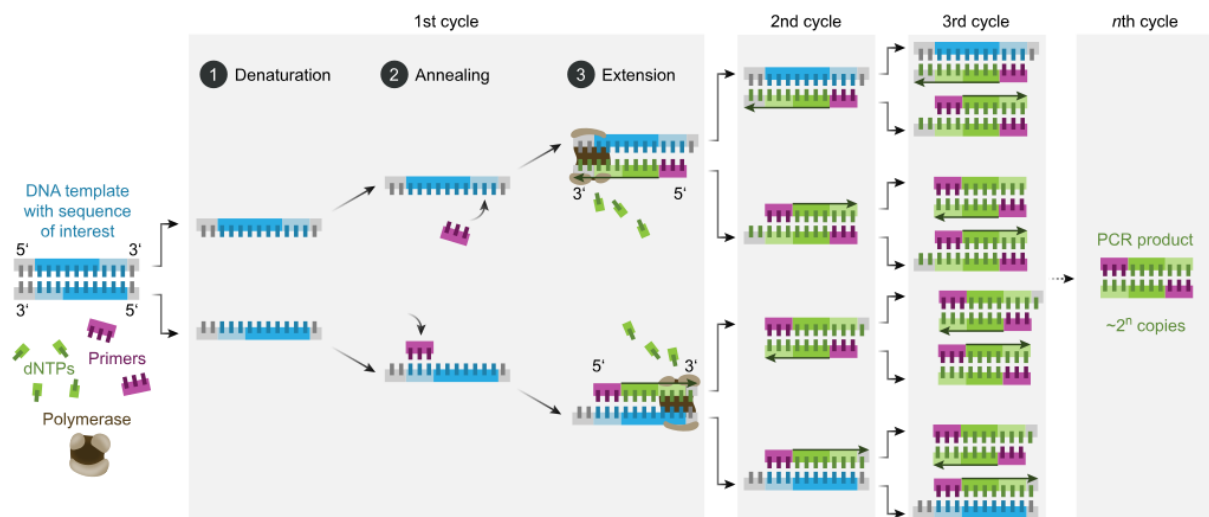
Kloniranje na osnovi restrikcijskih encimov je še danes ena najpogostejših metod kloniranja. Restrikcijski encimi (restriktaze), ki jih proizvajajo določene bakterije in arheje, na specifičnih mestih nukleotidnih sekvenc, imenovanih restrikcijska mesta, razprejo dvojno vijačnico. Tako omogočijo vstavitvev linearnega fragmenta DNA v plazmid, ki so ga rezali komplementarni restrikcijski encimi. Encim ligaza zlepi konce in ustvari krožen plazmid, ki ga lahko vidimo na sliki 3. [6]



Slika 3: Shematski prikaz vstavitve inserta v plazmid rezan z restrikcijskim encimom. Konci inserta in plazmida morajo biti komplementarni, da jih encim ligaza lahko zlepi in ustvari rekombinantni plazmid.

1.3.2 Kloniranje PCR

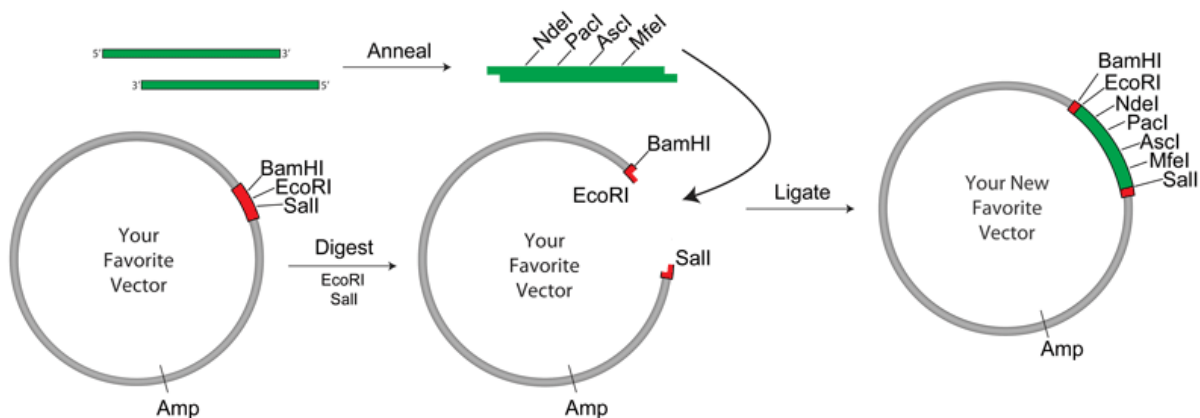
Kloniranje PCR (Polymerase Chain Reaction), kar po slovensko imenujemo verižna reakcija s polimerazo, je metoda kloniranja, ki se pogosto uporablja takrat, ko fragment DNA ni na voljo v dovolj velikih količinah. V le nekaj urah je namreč možno ustvariti milijone kopij DNA. Tako kot pri replikaciji DNA je tudi pri PCR potreben encim DNA-polimeraza, ki na podlagi obstoječih verig tvori nove. Za tvorbo DNA verige so potrebni tudi začetni oligonukleotidi. To so kratka zaporedja nukleotidov, ki zagotavljajo izhodišče za sintezo DNA. V vsaki reakciji PCR sta potrebna dva, da lahko na nasprotnih straneh kopirata željeno regijo, delujeta pa po principu komplementarnega parjenja baz. Prvi korak metode PCR je denaturacija, s katero razčlenimo verigo DNA. Naslednji korak je prileganje, pri katerem reakcijo nekoliko ohladimo, da se začetni oligonukleotidi lahko vežejo na svoja komplementarna mesta na enoverižni DNA. Zadnji korak je podaljševanje. Temperaturo ponovno dvignemo, da lahko DNA polimeraza prične s podaljševanjem začetnih oligonukleotidov v novo verigo DNA. Kloniranje PCR je prikazano na *sliki 4*. [7]



Slika 4: Shematski prikaz treh ključnih korakov pri metodi PCR: denaturacija, prileganje in podaljševanje. (vir slike: Polymerase chain reaction. Wikipedija. 2023)

1.3.3 Kloniranje s prilegajočimi se oligonukleotidi

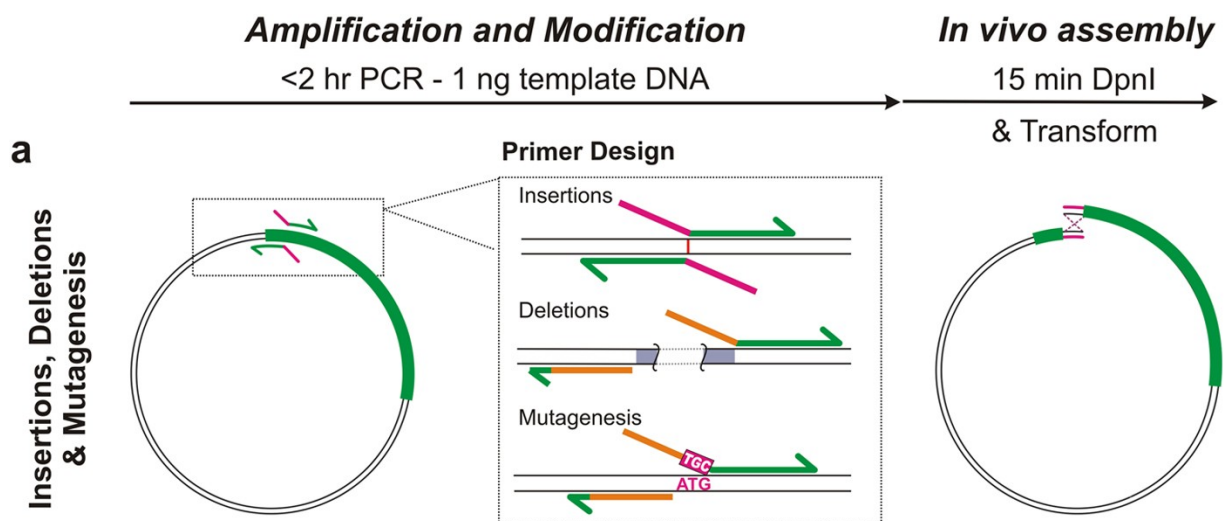
Pri metodi kloniranja s prilegajočimi se oligonukleotidi (*slika 5*) kot insert uporabimo dve enojni verigi (oligonukleotida) s komplementarnima zaporedjema, ki ju predhodno prilegamo. To naredimo tako, da verigi najprej segrevamo, s čimer se prekinejo obstoječe vodikove vezi. Nato verigi počasi ohlajamo, pri tem pa med obema verigama nastanejo nove vezi. [8]



Slika 5: Shematski prikaz kloniranja s prilegajočimi se oligonukleotidi. Prilegana oligonukleotida imata previse, ki so komplementarni previsom na plazmidu, rezanim z ustrezno restriktazo. Za združitev molekul DNA uporabimo ligazo.

1.3.4 Kloniranje IVA

Kloniranje IVA (In Vivo Assembly) oziroma kloniranje s sestavljanjem in vivo, je metoda, pri kateri se rekombinantna DNA sestavi v bakteriji sami, zato ligacija ni potrebna. Celotna metoda temelji na ustrezno načrtanih začetnih oligonukleotidih s homolognimi konci, eni sami reakciji PCR ter transformaciji kompetentnih bakterijskih celic s produktom PCR. Produkt PCR je pred transformacijo potrebno obdelati z DpnI, restriktazo, ki je specifična za metilirano DNA. Kloniranje IVA je prikazano na sliki 6. [9]



Slika 6: Shematski prikaz kloniranja IVA. Z ustrezno načrtanimi začetnimi oligonukleotidi lahko v željen plazmid vstavimo krajša zaporedja, izbrišemo dele plazmida ali zapis na plazmidu mutiramo. Roza oziroma oranžno obarvani deli začetnih oligonukleotidov so si med seboj homologni. (vir slike: Javier García-Nafria, Jake F. Watson & Ingo H. Greger. IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. Scientific reports. 2016.)

2. NAMEN

Namen raziskovalne naloge je pripraviti plazmid, ki omogoča izražanje fuzijskega proteina TDP-43-MBP z oznako His na N-koncu. Plazmid smo želeli pripraviti z dvema različnima metodama kloniranja in s primerjavo rezultatov pokazati, katera izmed metod je učinkovitejša.

2.1 HIPOTEZE

1. Preko restrikcijskega mesta za NdeI je mogoče v vektor pJ4M-TDP-43-MBP z metodo prilagajočih se oligonukleotidov vnesti zapis za oznako His.
2. Z metodo kloniranja s sestavljanjem in vivo lahko v vektor pJ4M-MBP vstavimo zapis za oznako His.
3. Metoda kloniranja s sestavljanjem in vivo je časovno manj zahtevna kot metoda kloniranja s prilagajočimi se oligonukleotidi.

3. MATERIALI

3.1 LABORATORIJSKA OPREMA

Tabela 1: Seznam laboratorijske opreme.

laboratorijska oprema	proizvajalec
Aparatura za PCR Mastecycler Nexus X2	Eppendorf
Aparatura za slikanje agaroznih gelov	Bio-Rad
Centrifuga 5424	Eppendorf
Inkubator-stresalnik Certomat HK	B. Braun Biotech International
Mikrocentrifuga MiniStar	VWR
Spektrofotometer Nanodrop ND 1000	NanoDrop
Termoblok ThermoShaker	Biometra

3.2 KEMIKALJE IN RAZTOPINE

Tabela 2: Uporabljene kemikalije.

kemikalije	proizvajalec	kataloška številka
Agar	Biolite	4021502
Agarozna	Sigma-Aldrich	A9539
Alkalna fosfataza	Thermo scientific	EF0654
10x pufer za DNA polimerazo	Novagen	71155
DMSO	Thermo scientific	F-515
dNTP	Novagen	71154
Dpn1	Thermo scientific	FD1704
EDTA	Serva	11280.02
GeneRuler 1 kb (standard velikosti DNA)	Thermo scientific	SM0311
Kanamicin	Sigma-Aldrich	K0129
KOD Hot start DNA polimeraza	Novagen	71316
MgSO ₄	Novagen	71156
NaCl	Merck	1.06404.1000
6x nanašalni pufer za AGE	Thermo scientific	R0611
Nde1	Thermo scientific	FD0584
Plasmid Easy Pure	Machery-Nagel	740727.250
SYBR Safe	Invitrogen	S33102
Trypton	Gibco	211699
Tris	Serva	37180.04
T-4 DNA ligaza	NewEngland Biolabs	MO20225
T-4 Polynucleotide Kinase	Thermo scientific	EK0031
Yeast extract	CONDA (pronadisa)	1702.00

Tabela 3: Uporabljene raztopine in njihova sestava.

raztopine	sestava
pufer za prileganje	400 μ L 1 M Tris (pH 7,5) 80 μ L 0,5 M EDTA 400 μ L 5 M NaCl dH ₂ O do 40 mL
50 \times TAE (pH 8,0)	242 g Tris 57,1 g CH ₃ COOH 18,6 g EDTA dH ₂ O do 1 L
1 \times TAE	100 mL 50 \times TAE (pH 8,0) dH ₂ O do 5 L

3.3 PLAZMIDNI VEKTORJI

- pJ4M_TDP-43-MBP

3.4 BAKTERIJSKI SEV

- Kompetentne celice so bile pripravljene v laboratoriju. *E. coli* seva DH5 α .

3.5 ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI

1. Za prilegajoče se oligonukleotide:

annHisTDPf TAATGCATCACCATCACCATCATGGCTCTGG

annHisTDPr TACCAGAGCCATGATGGTGATGGTGATGCAT

2. Za IVA kloniranje:

IVAHisTDPf CCATCACCATCATGGCTCTGGTAGCGAGTATATTCGTGTTACCGA

IVAHisTDPr CCATGATGGTGATGGTGATGCATCATATGGGTATATCTCCTTCAA

3. Za določanje nukleotidnega zaporedja:

seqTDP43f AAACGAGCGACCTGATCGTG

seqTDP43r TTGCGACATAACTTTACCTGG

seqMBPf CTGAAAGCGAAAGGTAAGAGC

seqMBPr CCTTTATTAAAGGCAGCTTCTGCG

3.6 GOJIŠČA

1. Tekoče gojišče LB (+kanamicin): 10 g tripton + 10 g NaCl + 5 g kvasni ekstrakt + kanamicin 50 μ g/mL \rightarrow dH₂O do 1 L
2. Trdno gojišče LB (+kanamicin): tekoče + agar (20 g/L)

4. METODE

4.1 KLONIRANJE S PRILEGAJOČIMI SE NUKLEOTDI

4.1.1 Prileganje oligonukleotidov

Začeli smo z resuspendiranjem liofiliziranih oligonukleotidov A in B v pufru za prilagajanje (recept za pripravo pufru je v *tabeli 3*) do osnovne koncentracije 100 μM . V 1.5 mL mikrocentrifugirko smo nato odpipetirali po 10 μL vsakega izmed obeh oligonukleotidov ter 80 μL pufru za prileganje. V termoblok segret na 95°C smo vstavili 1.5 mL mikrocentrifugirko z oligonukleotidi in termoblok takoj ugasnili. V še segretem termobloku smo mikrocentrifugirko inkubirali 15 minut. Po 15 minutah smo grelno enoto skupaj z mikrocentrifugirko previdno odstranili iz termobloka in jo odložili na pult. Mikrocentrifugirko smo v grelni enoti na pultu inkubirali še 45 minut.

4.1.2 Restrikcija plazmida z NdeI

Nastavili smo restrikcijo plazmida pJ4M-TDP-43-MBP z restriktazo NdeI. Uporabili smo FastDigest NdeI. V reakcijo smo dali 500 ng plazmida.

Recept za reakcijo je v *tabeli 4*.

Tabela 4: Recept za restrikcijo plazmida z NdeI.

snov	volumen/masa
voda	Do 20 μL
10x pufer	2 μL
plazmid	500 ng
NdeI	1 μL

Nato smo raztopino kratko premešali in jo za 5 minut inkubirali v toplotnem bloku segretem na 37°C.

4.1.3 Agarozna gelska elektroforeza (AGE)

V erlenmajerici smo stehali 0,5 g agaroze (za 1 % gel) in dodali še 50 mL 1 \times TAE pufru, ki smo ga pripravili iz 50 \times TAE pufru (sestava obeh pufrrov je v *tabeli 3*). Raztopino smo segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se agarozna ni popolnoma raztopila. Raztopino smo nato ohladili do približno 55 °C, ji dodali 5 μL barvila SYBR Safe in jo vlili v kadičko z vstavljenim glavničkom. Ko se je agarozni gel strdil, smo iz njega previdno odstranili glavniček, nato pa gel v kadički prelili z 1 \times TAE pufrom. V žepke gela smo nanegli standardne velikosti DNA in vzorce, ki smo jih pripravili tako, da smo jim dodali 6 \times nanašalni pufer za AGE do končne 1 \times koncentracije. Elektroforeza je potekala pri konstantni napetosti 100 V.

4.1.4 Izolacija plazmida iz agaroznega gela

DNA smo iz gela izolirali s kompletom reagentov NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up. Pri tem smo sledili navodilom proizvajalca.

4.1.5 Defosforilacija rezanega plazmida

Za defosforilacijo plazmida pJ4M-TDP-43-MBP smo uporabili fosfatazo FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase in reakcijo pripravili po protokolu v *tabeli 5*.

Tabela 5: Protokol za pripravo defosforilacije.

snov	volumen/masa
plazmidna DNA	500 ng
10x FastDigest pufer	2 μ L
FastAP alkalna fosfataza	1 μ L
dH₂O	do končnega volumna 20 μ L

Za tem smo raztopino na kratko premešali in jo za 10 minut inkubirali pri 37°C. Reakcijo smo ustavili s 15-minutnim inkubiranjem pri 65°C.

4.1.6 Fosforilacija prileganih oligonukleotidov

Pri fosforilaciji smo uporabili kinazo T4 Polynucleotide Kinase. Protokol, po katerem smo pripravili mešanico, je zapisan v *tabeli 6*.

Tabela 6: Protokol za pripravo fosforilacije.

snov	volumen/masa
dsDNA (prilegani se oligonukleotidi)	10 pmol
10x pufer	2 μ L
10 mM ATP	2 μ L
T4 PNK	1 μ L
dH₂O	do končnega volumna 20 μ L

Raztopino smo na kratko premešali in jo za 20 minut inkubirali pri 37°C ter nato segreli pri 75°C za 10 minut. Encim polinukleotid kinaza je bil po reakciji neaktiven.

4.1.7 Ligacija

Z defosforiliranim rezanim plazmidom in fosforiliranimi prileganimi oligonukleotidi (insert) smo nastavili ligacijo s T4 DNA-ligazo. Pripravili smo 3 različne ligacijske mešanice, ki so se razlikovale v volumnu dodanega inserta. Recept za pripravo ligacijskih mešanic je v *tabeli 7*.

Tabela 7: Recept za pripravo ligacijskih mešanic.

snov	volumen/masa
10 \times pufer za T4 DNA-ligazo	2 μ L
plazmidna DNA	30 ng
insert (prilegani oligonukleotidi)	1 μ L/ 2 μ L/ 5 μ L
voda	do 20 μ L
T4 DNA-ligaza	1 μ L

Pripravljene mešanice smo na kratko premešali in jih inkubirali preko noči pri 16 °C. Naslednji dan smo mešanice segreli pri 65 °C za 10 minut in s tem DNA-ligazo inaktivirali.

4.1.8 Transformacija bakterijskih celic

Celice smo naprej odmrznili na ledu in jim (še vedno na ledu) dodali 10-50 ng plazmida (približno 5 µL ligacijske mešanice). Celice smo nato 20 minut inkubirali na ledu, med čimer smo jih nekajkrat "frcnili". Za tem smo jih za 45 sekund izpostavili toplotnemu šoku pri temperaturi 42°C, in jih takoj, za vsaj dve minuti vrnili na led. Nato smo celicam aseptično dodali 400 µL tekočega gojišča LB in jih pri temperaturi 37°C za eno uro dali na stresanje. Zadnji korak je bil aseptičen razmaz celic na LB ploščo z ustreznim antibiotikom, kjer smo jih pri sobni temperaturi pustili 48 ur, ali preko noči pri 37°C.

4.1.9 Izolacija plazmidne DNA iz bakterijskih celic

Kolonijo transformiranih bakterij smo dan pred izolacijo plazmidov aseptično prenesli s plošče s trdnim gojiščem LB in ustreznim antibiotikom v epruvete s 5 mL. Epruvete smo inkubirali preko noči pri 37 °C in 150 rpm. Naslednji dan smo prekonočno kulturo prenesli v mikrocentrifugirko in celice posedli z 1-minutnim centrifugiranjem pri 7 000 g pri sobni temperaturi. Nato smo sledili navodilom proizvajalca kompleta reagentov za izolacijo plazmidne DNA NucleoSpin Plasmid EasyPure. Plazmidno DNA smo eluirali s 50 µL elucijskega pufra. Koncentracijo plazmidne DNA smo po izolaciji izmerili s spektrofotometrom NanoDrop.

4.1.10 Restriksijska analiza

Pri restriksijski analizi smo uporabljali NdeI. Restrikcijo smo nastavili podobno kot pri poglavju »4.1.2 Restrikcija plazmida z NdeI«, le da smo v mešanico dodali 0,5 µL restriktaze. V restrikcijo smo dali 500 ng plazmidne DNA.

4.1.11 Določevanje nukleotidnega zaporedja

Pri določanju nukleotidnega zaporedja smo uporabili začetne oligonukleotide iz poglavja 3.5 ZAČETNI OLIGONUKLEOTID. Vzorce smo namešali po receptu v *tabeli 8*. Mešanice smo poslali podjetju Eurofins Genomics, ki je izvedlo sekvenčno analizo.

Tabela 8: Sestava mešanice za sekvenčno analizo.

snov	volumen/masa
DNA	500 ng
začetni oligonukleotid [10 µM]	2,5 µL
dH ₂ O	do 10 µL

4.2 KLONIRANJE IVA

4.2.1 Reakcija PCR

Za PCR smo uporabili KOD Hot Start-DNA polimerazo. Pri pripravi mešanice (protokol v *tabeli 9*) smo sledili navodilom proizvajalca, a smo se v okviru raziskovalne skupine odločili za dve optimizaciji:

1. Končna koncentracija MgSO₄ je 2,25 mM in ne 1,5 mM
2. Matrične DNA je v reakciji 50 ng

Naredili smo tri različne mešanice: eno brez DMSO, eno s 5% in eno s 10% DMSO.

Tabela 9: Priprava mešanice za PCR.

snov	volumen	končna koncentracija
10x pufer	2,5 μL	1x
MgSO₄	2,25 μL	2,25 mM
dNTPji	2,5 μL	vsak 0,2 mM
smerni začetni oligonukleotid	0,75 μL	0,3 μM
protismerni začetni oligonukleotid	0,75 μL	0,3 μM
matrična DNA	0,5 μL	50 ng
DMSO	0/1,25/2,5 μL	0/5%/10%
dH₂O	do 25 μL	
KOD polimeraza	0,5 μL	

Program za PCR je predstavljen v tabeli 10.

Tabela 10: Program za PCR.

stopnja:	temperatura:	čas:
začetna denaturacija	95°C	2 min
denaturacija	95°C	20 s
prileganje	60,3°C	10 s
podaljševanje	70°C	160 s
zaključno podaljševanje	70°C	10 min

} 30×

4.2.2 Čiščenje produkta PCR

Po končani reakciji PCR smo mešanice očistili s kompletom reagentov NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up po navodilih proizvajalca. Po čiščenju smo raztopinam izmerili koncentracije s spektrofotometrom NanoDrop.

4.2.3 Restrikcija plazmida z DpnI

Očiščene produkte PCR smo obdelali z restriktazo DpnI po navodilih proizvajalca (FastDigest DpnI). Protokol, po katerem smo pripravili mešanico, je zapisan v tabeli 11.

Tabela 11: Restrikcija plazmida DpnI.

Snov	Volumen [μL]
dH₂O	Do 20 μL
10x pufer	2 μL
DNA (očiščen PCR produkt)	10 μL
DpnI	1 μL

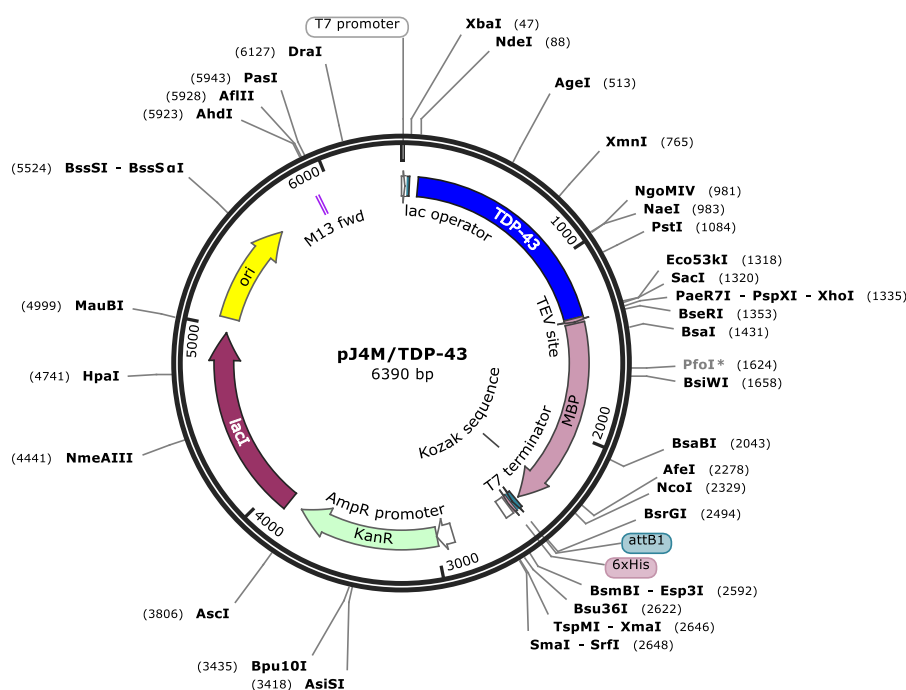
Sledila je 5-minutna inkubacija pri 37°C in inaktivacija DpnI s 5-minutnim gretjem pri 80°C. . Z DpnI obdelanimi produkti PCR smo nato transformirali kompetentne bakterije *E. coli* DH5 α , iz njih izolirali plazmidno DNA in plazmide poslali na sekvenčno analizo po že prej opisanih protokolih.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

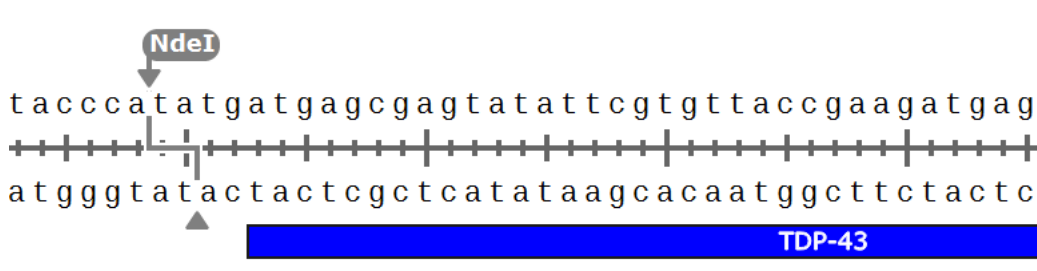
5.1 REZULTATI KLONIRANJA S PRILEGAJOČIMI SE NUKLEOTIDI

5.1.1 Rezanje plazmida pJ4M-TDP-43-MBP z restriktazo NdeI

Pri raziskovalnem delu smo izhajali iz plazmida pJ4M_TDP43-MBP, ki je prikazan na *sliki 7*. Plazmid je velik približno 6400 baznih parov ter omogoča izražanje fuzijskega proteina TDP-43-MBP v bakterijskih celicah. Mesto ori, ki omogoča podvojevanje plazmida v bakterijskih celicah, in zapis za rezistenco na antibiotik kanamicin (KanR) sta pomembna sestavna dela plazmida. Preko restrikcijskega mesta za restriktazo NdeI smo želeli v plazmid vnesti zapis za heksahistidinsko oznako (oznako His). Na *sliki 8* je prikazano, kako restriktaza NdeI cepi plazmid pJ4M_TDP-43-MBP. Cepitveno mesto za restriktazo je na N-koncu zapisa za protein TDP-43.

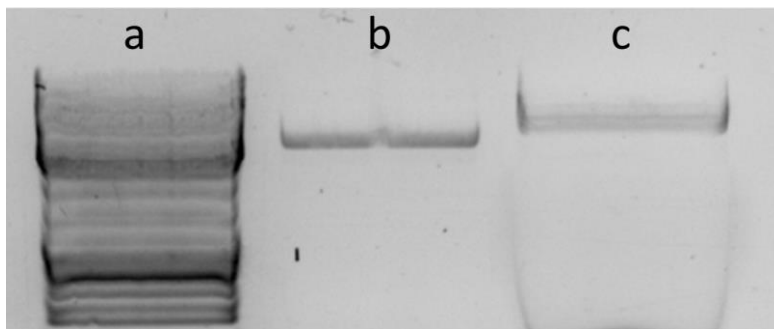


Slika 7: Plazmid pJ4M_TDP-43-MBP. Plazmid vsebuje zapis za fuzijski protein TDP-43-MBP, odpornost proti kanamicinu (KanR) in mesto začetka podvojevanja (ori). Sliko smo pripravili s programom SnapGene.



Slika 8: Cepitveno mesto za restriktazo NdeI v plazmidu pJ4M_TDP-43-MBP. Sliko smo pripravili s programom SnapGene.

Za rezanje plazmida pJ4M_TDP-43-MBP smo uporabili restriktazo NdeI in uspešnost rezanja preverili z agarozno gelsko elektroforezo (slika 9). V primeru, da je rezanje uspešno, se plazmid linearizira in po agaroznem gelu potuje počasneje kot nerezana krožna dodatno zvita oblika plazmida. Slika 9 kaže, da je bilo rezanje plazmida z restriktazo NdeI uspešno, saj je plazmid po rezanju potoval počasneje (slika 9; žepček c) kot plazmid, ki ga nismo rezali (slika 9; žepček b). Na agaroznem gelu lahko lineariziran plazmid vidimo kot liso, ki je zamaknjena nekoliko višje od lise krožnega dodatno zvitega plazmida.

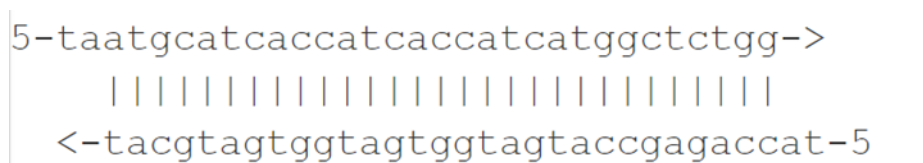


Slika 9: Rezanje plazmida pJ4M_TDP-43-MBP z restriktazo NdeI. V žepček a smo nanegli standard velikosti DNA, v žepček b nerezan plazmid in v žepček c rezan plazmid.

Rezan plazmid smo nato izolirali iz agaroznega gela in ga defosforilirali z alkalno fosfatazo. S tem smo želeli preprečiti, da bi se med ligacijo, ki je sledila, plazmid sam zlepil nazaj skupaj.

5.1.2 Prileganje oligonukleotidov za uvedbo oznake His

Zapis za oznako His smo želeli v plazmid pJ4M_TDP-43-MBP vstaviti z metodo prilegajočih se oligonukleotidov. En oligonukleotid tako vsebuje nukleotidno zaporedje, ki zapisuje oznako His, drugi oligonukleotid pa je komplementaren prvemu. Oba oligonukleotida smo prilegali in s tem dobili dvovertično DNA (slika 10), ki je predstavljala naš insert za ligacijo v rezan plazmid.



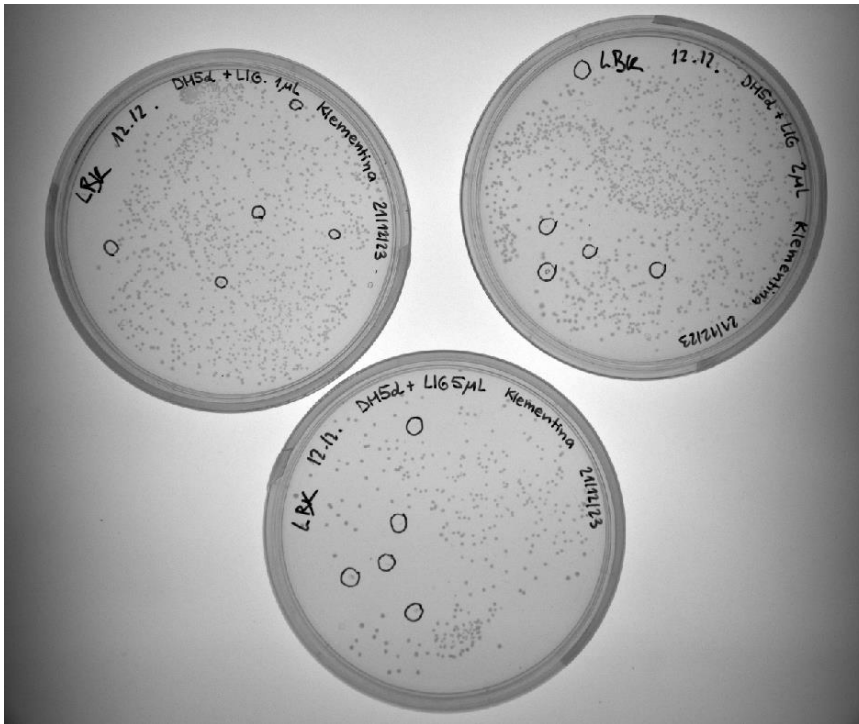
Slika 10: Shema prileganih oligonukleotidov za vnos oznake His v plazmid pJ4M_TDP-43-MBP. Prilegana oligonukleotida imata 5'-previsa, ki sta komplementarna previsoma, ki nastaneta na plazmidu pJ4M_TDP-43-MBP po rezanju z restriktazo NdeI.

Prilegana oligonukleotida smo nato tudi fosforilirali s polinukleotidom kinazo, saj ligacija nefosforiliranega inserta v nefosforiliran rezan plazmid ne bi potekla.

5.1.3 Ligacija prileganih oligonukleotidov v rezan pJ4M-TDP43-MBP in transformacija bakterijskih celic

Nastavili smo tri različne ligacije. V prvi smo v ligacijo vnesli 1 μ L inserta (fosforiliranih prileganih oligonukleotidov), v drugi smo dodali 2 μ L inserta, v tretji pa 5 μ L inserta. Z

ligacijskimi mešanici smo transformirali kompetentne bakterije *E. coli* DH5 α . Kolonije, ki so po transformaciji zrastle na ploščah LBK so prikazane na *sliki 11*.



Slika 11: Kolonije bakterijskih celic E. coli DH5 α po transformaciji z ligacijskimi mešanici. Bakterije na ploščah se razlikujejo po ligacijskih mešanicah s katerimi smo jih transformirali oz. po volumnu inserta, ki smo ga dali v ligacijo. Kolonije, ki so obkrožene, smo uporabili za pripravo prekonočnih kultur.

Prekonočne kulture transformiranih bakterij v tekočem gojišču smo uporabili za izolacijo plazmidne DNA.

5.1.4 Izolacija plazmidne DNA

Plazmidno DNA smo izolirali s kompletom reagentov. Rezultati so prikazani v *tabeli 12*. Prikazane so koncentracije plazmidne DNA in razmerja absorbanc, ki nakazujejo čistost izolirane DNA.

Tabela 12: Koncentracije in čistosti izoliranih plazmidov. Oznake plazmidov 1/2/3 nakazujejo na sestavo ligacijske mešanice, iz katere izvirajo – 1 pomeni 1 μ L inserta, 2 pomeni 2 μ L inserta, ...

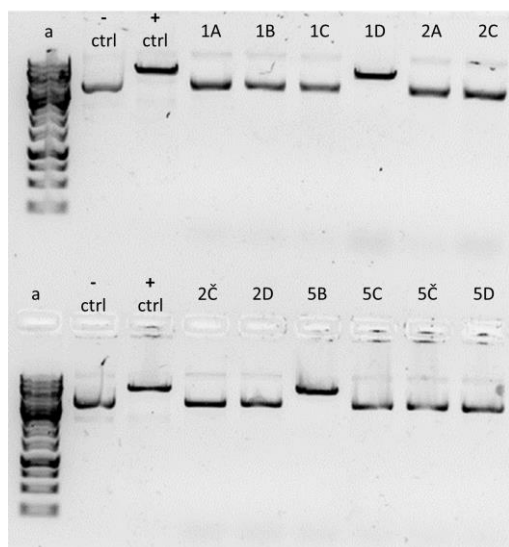
	koncentracija DNA [ng/uL]	A260/A280	A260/A230
1A	448,7	1,96	2,18
1B	378,2	1,97	2,13
1C	349,5	1,98	2,12
1D	566,9	2,0	2,21
2A	395,9	1,96	2,13

2C	475,0	1,99	2,25
2Č	555,2	1,98	2,14
2D	508,2	1,98	2,20
5B	467,5	1,97	2,24
5C	453,8	1,97	2,22
5Č	480,1	1,98	2,22
5D	420,5	1,95	2,12

5.1.5 Restriksijska analiza plazmidov

Za izolirane plazmide smo želeli preveriti ali vsebujejo oznako His in če je bila ligacija uspešna. To smo naredili z restriksijsko analizo. Izbrali smo si določene plazmide iz *tabele 12* (zgornja tabela), jih rezali z restriktazo NdeI in produkte rezanja nanесли na agarozni gel (*slika 12*). Kadar je ligacija inserta (oznake His) v rezan plazmid uspešna, se prepoznavno mesto za restriktazo NdeI izgubi. Plazmidi, ki bi tako potencialno lahko vsebovali oznako His, se z restriktazo NdeI ne režejo.

Na *sliki 12* lahko vidimo, da se izmed vseh analiziranih plazmidov le plazmida 1D in 5B režejo z NdeI. Torej samo pri teh dveh plazmidih ni prišlo do ligacije inserta v rezan vektor. Vsi preostali plazmidi so potencialni končni produkti z vstavljenim zapisom za oznako His pred zapisom za TDP-43.

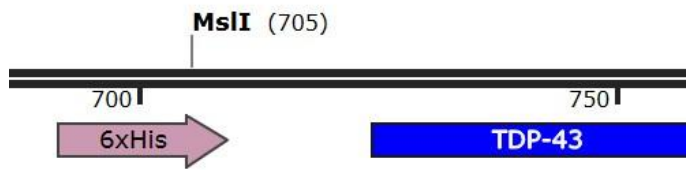


*Slika 12: Restriksijska analiza plazmidov po ligaciji prileganih oligonukleotidov v rezan pJ4M_TDP-43-MBP. V žepka a smo nanесли standard velikosti DNA, v žepka -ctrl smo nanесли nerezan plazmid pJ4M_TDP-43-MBP, v žepka +ctrl pa smo nanесли z NdeI rezan plazmid. V vse preostale žepke smo nanесли ustrezen plazmid iz *tabele 12* rezan z NdeI. Uporabili smo 1 % agarozni gel.*

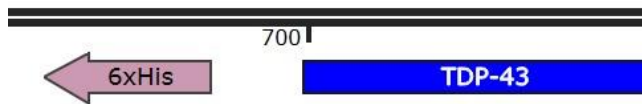
5.1.6 Sekvenčna analiza plazmidov

Po restriksijski analizi smo ustreznost dobljenih plazmidov želeli preveriti še s sekvenčno analizo. Pri tej dobimo natančno zaporedje plazmida in lahko tako vidimo, ali je zaporedje takšno, kot smo si ga želeli.

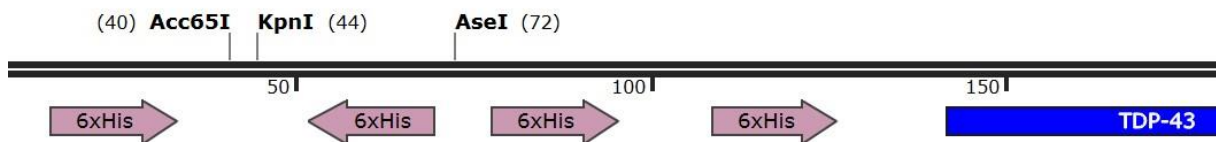
Na sekvenciranje smo poslali plazmide 1A, 2Č in 5Č z začetnimi oligonukleotidi TDP43f, TDP43r, MBPf in MBPr. Rezultati so prikazani na *slikah 13, 14* in *15*.



Slika 13: Zaporedje plazmida 1A pred zapisom za TDP-43. 6×His je zaporedje za oznako His. Puščica v smeri zapisa za TDP-43 nakazuje pravilno orientacijo oznake His. Sliko smo pripravili s programom Snapgene.



Slika 14: Zaporedje plazmida 2Č pred zapisom za TDP-43. 6×His je zaporedje za oznako His. Puščica v obratni smeri zapisa za TDP-43 nakazuje napačno orientacijo oznake His. Sliko smo pripravili s programom Snapgene.



Slika 15: Zaporedje plazmida 5Č pred zapisom za TDP-43. 6×His so zaporedja za oznako His. Sliko smo pripravili s programom Snapgene.

Izmed vseh plazmidov, ki smo jih poslali na sekvenciranje je ustrezen samo A1, saj ima edini le eno pravilno obrnjeno oznako His. Pri plazmidu 2Č je oznaka napačno orientirana, pri 5Č pa je vstavljenih več oznak His.

Pri kloniranju po metodi s prilegajočimi oligonukleotidi je bilo potrebnih več optimizacij in ponovnih poskusov, da smo dobili željen plazmid. Pri prvih dveh poskusih kloniranja, rezanega plazmida nismo obdelali z alkalno fosfatazo, prileganih oligonukleotidov pa ne s polinukleotid kinazo. Pri ligaciji smo nato sicer dobili produkte in z njimi transformirali bakterije, a se nam je po izolaciji plazmidov in njihovi restrikcijiški analizi, plazmid v vseh primerih zlepil nazaj skupaj. Pristop smo zato spremenili in pri ponovnem poskusu uporabili alkalno fosfatazo in polinukleotid kinazo (za defosforilacijo in fosforilacijo). Tako nam je uspelo pridobiti plazmide, ki so na osnovi restrikcijiške analize izgledali kot željeni produkti (slika 12). Šele s sekvenčno analizo smo na osnovi njihovega zaporedja videli, da je le 1 izmed 3 plazmidov ustrezen (slika 13). V primeru prvega neustreznega plazmida, se nam je oznaka His v plazmid

vstavila narobe obrnjena (*slika 14*), v primeru drugega pa se nam je v plazmid vstavilo več oznak His (*slika 15*).

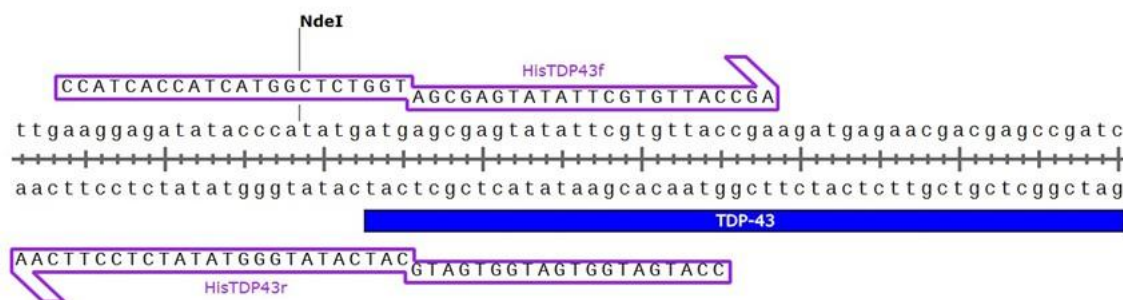
Ugotovili smo, da kloniranje preko enega restrikcijskega mesta v našem primeru ni bila najboljša odločitev. Oba previsa na rezanem plazmidu (*slika 8*) sta namreč komplementarna obema previsoma na našem insertu (*slika 10*). Pri ligaciji se lahko zato naš insert vstavi v plazmid v napačni orientaciji in tudi v večjem številu. Imeli smo srečo, da nam je na sekvenčno analizo uspelo poslati ravno plazmid, kjer se je v pravilni orientaciji vstavila samo ena oznaka His.

5.2 REZULTATI KLONIRANJA S SESTAVLJANJEM IN VIVO (IVA)

5.2.1 Vnos zapisa za oznako His z kloniranjem IVA

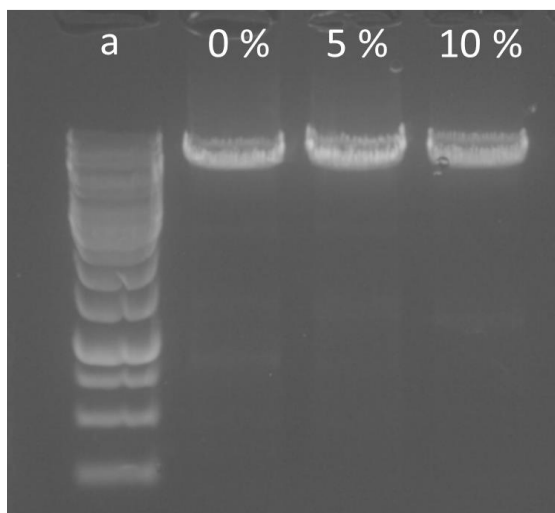
Oznako His smo v plazmid pJ4M_TDP-43-MBP želeli vnesti še na drug način, in sicer s kloniranjem IVA. Zanimalo nas je, kateri izmed obeh načinov je hitrejši in boljši ter ne zahteva toliko optimizacije in ponavljanj neuspešnih poskusov.

Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili pri kloniranju IVA so prikazani na *sliki 16*. 3'-konca začetnih oligonukleotidov se prilegata na matrično DNA (plazmid pJ4M_TDP-43-MBP) in jo pomnožita. Previsa na 5'-konicah pa sta si komplementarna in omogočata insercijo oznake His.



Slika 16: Začetna oligonukleotida za vnos oznake His v plazmid pJ4M_TDP-43-MBP s kloniranjem IVA. Sliko smo pripravili s programom Snapgene.

Reakcijo PCR smo nastavili s 3 različnimi mešanicami (0 %, 5 % in 10 % DMSO). Po reakciji smo produkte nanесли na agarozni gel (*slika 17*). S slike je razvidno, da so bile vse reakcije PCR uspešne, saj povsod opazimo produkte. Če reakcija PCR ne bi bila uspešna, se na agaroznem gelu ne bi videlo nič.

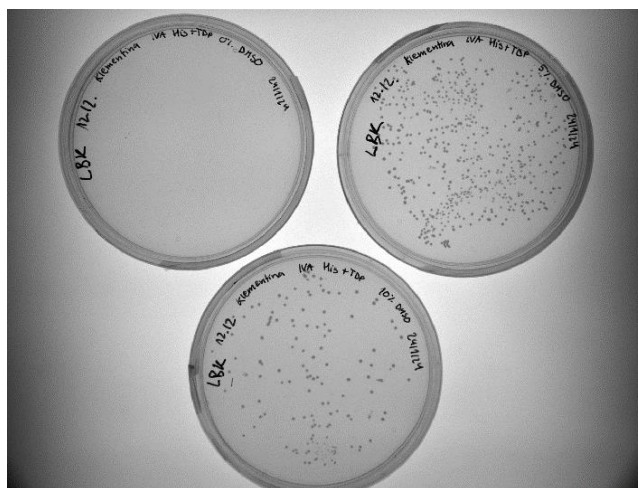


Slika 17: Produkti reakcije PCR pri kloniranju IVA. Vzorce smo nanesti na 1 % agarozni gel. V žepku a smo nanesti standard velikosti DNA, v žepke 0 %, 5 % in 10 % pa ustrezno mešanico po reakciji PCR (z 0 %, 5 % in 10 % DMSO).

5.2.2 Transformacija bakterijskih celic

Po kloniranju IVA smo z očiščenimi produkti PCR transformirali kompetentne bakterije *E. coli* DH5 α (slika 18). Iz slike je razvidno, da so se kolonije razvile le pri 5% in 10% DMSO.

Pripravili smo prekonočne kulture transformiranih bakterij v tekočem gojišču za izolacijo plazmidne DNA.



Slika 18: Kolonije bakterijskih celic *E. coli* DH5 α po transformaciji s produkti PCR. Bakterije na ploščah se razlikujejo po tem, s katero mešanico PCR smo jih transformirali (0 % DMSO, 5 % DMSO ali 10 % DMSO).

5.2.3 Izolacija plazmidne DNA

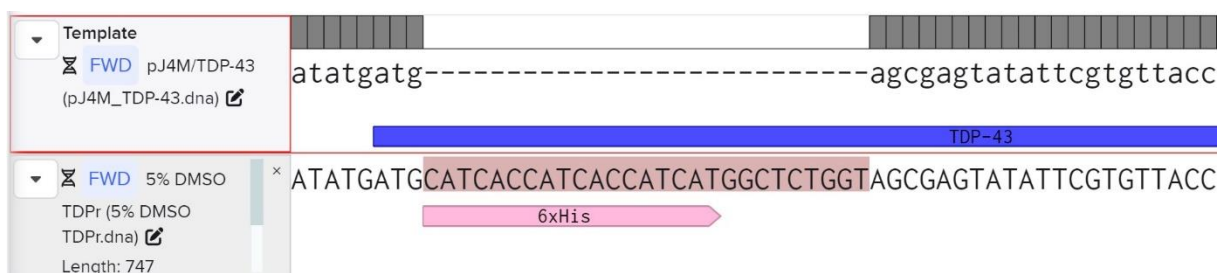
Plazmidno DNA smo izolirali s kompletom reagentov, rezultati izolacije so prikazani v tabeli 13. Čistost izolirane DNA je razvidna iz koncentracije plazmidne DNA in razmerja absorbanc.

Tabela 13: Koncentracije in čistosti izoliranih plazmidov po kloniranju IVA. Oznake plazmidov 5 % in 10 % nakazujejo na sestavo mešanice PCR, iz katerih izvirajo (5 % DMSO ali 10 % DMSO).

	koncentracija [ng/uL]	DNA	A260/A280	A260/A230
5 % A	169,5		1,87	1,94
5 % B	305,9		1,86	2,13
5 % C	246		1,86	2,07
10 % A	232,1		1,84	1,81
10 % B	279,5		1,85	2,12
10 % C	237,6		1,84	1,86

5.2.4 Sekvenčna analiza plazmidov

Restriksijska analiza pri pristopu s kloniranjem IVA ni možna, saj se restriksijsko mesto NdeI ne izgubi. Plazmida 5 % C in 10 % B smo zato takoj poslali na sekvenčno analizo. Na *sliki 19* je prikazan rezultat analize za plazmid 5 % C. Razvidno je, da imamo v plazmidu 5 % C zapis za oznako His na N-koncu TDP-43 v pravilni orientaciji, torej smo dobili željen plazmid.



Slika 19: Oznaka His v plazmidu 5 % C. Na zgornji polovici slike je zaporedje matričnega plazmida pJ4M_TDP-43-MBP, na spodnji polovici slike pa zaporedje plazmida 5 % C. Zaporedji sta prilegani eno na drugo. Sliko smo naredili z internetnim programom Benchling.

Z metodo kloniranja IVA nam je že v prvem poskusu uspelo dobiti ustrezen plazmid. Vzelo nam je le en teden časa, potrebne pa niso bile nikakršne optimizacije. Metoda kloniranja s prilegajočimi se nukleotidi nam je vzela več tednov, ustrezne rezultate pa smo dobili šele po več neuspešnih poskusih in številnih optimizacijah.

6 ZAKLJUČEK

V okviru raziskovalne naloge smo eksperimentirali s kloniranjem z dvema različnima metodama: s kloniranjem IVA in z metodo kloniranja s prilegajočimi se oligonukleotidi. Naloga je bila del večjega projekta, pri katerem se raziskovalna skupina ukvarja s preučevanjem interakcij proteina TDP-43 z drugimi proteini in z RNA. Za nadaljnje eksperimente bodo potrebovali tudi plazmid, ki smo ga pripravili v raziskovalni nalogi.

Vse zastavljene hipoteze nam je uspelo potrditi. Pri kloniranju s prilegajočimi se oligonukleotidi smo preko restrikcijskega mesta za NdeI v vektor pJ4M-TDP-43-MBP uspešno vnesli oznako His in tako potrdili prvo hipotezo, čeprav sama metoda ni bila najbolj učinkovita. Sekvenčna analiza je pokazala, da smo dobili le en dober rezultat (*slika 13*). Pri enem je bila oznaka His napačno orientirana (*slika 14*), pri drugem pa je bilo vnesenih več oznak His (*slika 15*).

Prav tako, nam je vnos oznake His v vektor pJ4M-TDP-43-MBP uspel tudi z metodo kloniranja in vivo, uspešna sekvenčna analiza je razvidna iz *slike 19*. S tem lahko potrdimo tudi našo drugo hipotezo.

Metoda kloniranja in vivo je bila, v primerjavi s kloniranjem s prilegajočimi se oligonukleotidi, manj zahtevna. Potrebne niso bile nobene optimizacije, uspelo pa nam je že v prvem poskusu. S prilegajočimi se oligonukleotidi smo klonirali več tednov, s kloniranjem IVA pa smo ustrezen plazmid dobili že v enem tednu. Tako smo potrdili tudi našo tretjo oz. zadnjo hipotezo.

LITERATURA

- [1] Sofie Voet, Sahana Srinivasan, Mohamed Lamkanfi: Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases. *EMBO Mol Med.* (2019).
- [2] Matthew C Kiernan, Steve Vucic, Benjamin C Cheah, MBIostat, Martin R Turner, Andrew Eisen, Orla Hardiman, James R Burrell, Margaret C Zoing. *The Lancet.* (2011).
- [3] R. M. Liscic, L. T. Grinberg, J. Zidar, M. A. Gitcho, N. J. Cairns. ALS and FTL D: two faces of TDP-43 proteinopathy. (2008).
- [4] A. S. Chen-Plotkin, V. M.-Y. Lee, J. Q. Trojanowski. TAR DNA-binding protein 43 in neurodegenerative disease. 2016.
- [5] M. Jo, S. Lee, Y.-M. Jeon, S. Kim, Y. Kwon, H.-J. Kim: The role of TDP-43 propagation in neurodegenerative diseases: integrating insights from clinical and experimental studies. *Exp. Mol. Med.* 2020.
- [6] Alessandro Bertero, Stephanie Brown, Ludovic Vallier. *Methods of Cloning.* 2017.
- [7] Juliane C. Lessard. *Molecular Cloning.* ScienceDirect. 2012
- [8] Sonia Schoonbroodt, Nicolas Frans, Mark DeSouza, Rachel Eren, Smadar Priel, Naama Brosh, Judith Ben-Porath, Arie Zauberman, EHUD ILAN, Shlomo Dagan, Edward H. Cohen, Hennie R. Hoogenboom, Robert Charles Ladner, and René M. Hoet. Oligonucleotide-assisted cleavage and ligation: a novel directional DNA cloning technology to capture cDNAs. Application in the construction of a human immune antibody phage-display library. *PubMed Central.* 2005.
- [9] Javier García-Nafria, Jake F. Watson & Ingo H. Greger. IVA cloning: A single-tube universal cloning system exploiting bacterial In Vivo Assembly. *Scientific reports.* 2016.