

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA ANŽIČ
DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA ANŽIČ

**PREDSTAVITEV PEPTIDNEGA LIGANDA ERITROPOETINSKEGA
RECEPTORJA NA BAKTERIOFAGU ZA UPORABO V FLUORESCENČNIH
TESTIH**

PRESENTATION OF PEPTIDE LIGAND OF
THE ERYTHROPOIETIN RECEPTOR ON BACTERIOPHAGE FOR USE IN
FLUORESCENCE ASSAYS

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder in asist. dr. Petra Moleka. Določitev nukleotidnih zaporedij molekul DNA so izvedli v podjetju GATC Biotech AG (Konstanz, Nemčija).

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Mojci Lunder za možnost opravljanja diplomske naloge na Katedri za farmacevtsko biologijo in strokovno pomoč pri pisanju diplomske naloge ter asist. dr. Petru Moleku za vse nasvete, strokovno pomoč, dostopnost in trud pri izvajanju eksperimentalnega dela in pri pisanju diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi družini za podporo med izdelavo diplomske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Mojce Lunder in somentorstvom asist. dr. Petra Moleka.

Andreja Anžič

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Janez Mravljak

Mentorica: izr. prof. dr. Mojca Lunder

Somentor: asist. dr. Peter Molek

Članica diplomske komisije: asist. dr. Mirjam Gosenca

Kazalo vsebine

POVZETEK	i
ABSTRACT	ii
KLJUČNE BESEDE	iii
SEZNAM OKRAJŠAV	iii
UVOD.....	1
1.1 Bakteriofagi	1
1.1.1 Bakteriofag M13.....	2
1.1.2 Predstavitev na bakteriofagu	3
1.1.3 Bakteriofagne predstavitvene knjižnice.....	3
1.1.4 Terapevtski ligandi	4
1.2 Doping	4
1.2.1 Porast dopinga v športu	5
1.2.2 Lista prepovedanih snovi in postopkov	6
1.2.3 Najbolj pogosto uporabljene prepovedane snovi.....	7
1.2.4 Detekcija prepovedanih snovi	9
NAMEN DELA	12
MATERIALI IN METODE	13
1.3 Materiali.....	13
1.3.1 Laboratorijska oprema in materiali.....	13
1.3.2 Kemikalije	13
1.3.3 Biološki material	14
1.3.4 Raztopine in pufri	15
1.4 Metode	16
1.4.1 Kloniranje zapisa za peptid EMP1 v bakteriofagni vektor.....	16
1.4.2 Pomnoževanje in izolacija klonov M13KBE-EMP1 in kontrolnega klona (vezalec streptavidina M13-K4).....	23
1.4.3 Označevanje bakteriofagov s fluorescenčnim barvilom FITC	24
1.4.4 ELISA: kvalitativno preverjanje vezave bakteriofagov na različne tarčne proteine	24

1.4.5	Kvantitativna fagna ELISA: preverjanje vezave bakteriofagov na EpoR1 v odvisnosti od njihove koncentracije	25
1.4.6	FLISA: spremljanje izpodrivanja fagov M13-EMP1, vezanih naEpoR1, z rekombinantnim EPO	26
REZULTATI		27
1.5	Vstavitev zapisa za peptid EMP1 v bakteriofagni vektor M13KBE	27
1.6	ELISA: kvalitativno preverjanje vezave bakteriofagov na različne tarčne proteine 27	
1.7	ELISA: kvantitativno preverjanje vezave bakteriofagov na EpoR1.....	28
1.8	FLISA: spremljanje izpodrivanja fagov M13-EMP1 z EpoR1z rekombinantnim EPO	29
RAZPRAVA.....		30
SKLEP		32
LITERATURA		33
PRILOGE		35
Priloga 1		35
Priloga 2: Genska karta bakteriofaga M13KBE in njegovo nukleotidno zaporedje.....		36

POVZETEK

Uporaba prepovedanih snovi ali postopkov za doseganje boljših rezultatov v športu (doping) je v svetu znana že skoraj tako dolgo časa kot so stara tekmovanja. Z razvojem tehnologije in zdravstva so se razvile tudi nove metode in nove različice sintetičnih molekul in rekombinantnih hormonov, ki jih športniki uporabljajo za izboljšanje svojih sposobnosti. Z razvojem novih različic takšnih snovi pa se je povečala tudi potreba po novih metodah, s katerimi bi jih detektirali na čim bolj učinkovit način v čim krajšem času. Ker je detekcija usmerjena predvsem v identifikacijo in kvantifikacijo že znanih učinkovin, je za nove substance potrebno vedno znova razviti njim ustrezne analizne metode. Za namen detekcije bi bilo zaželeno razviti robusten presejalni test, s katerim bi lahko v kratkem času hkrati preverili večje število športnikov na prisotnost več skupin substanc s podobnim delovanjem, torej tudi takšnih, ki še niso na listi prepovedanih substanc regulatornih organov oz. katerih kemijska struktura še ni znana.

V diplomski nalogi smo z uporabo tehnologije rekombinantne DNA pripravili bakteriofage, ki bi jih lahko uporabili kot fluorescenčne detekcijske sonde v presejalnih fluorescenčno-imunskih testih, s katerimi bi odkrivali prisotnost do sedaj še nepoznanih ligandov eritropoetinskega receptorja v bioloških vzorcih. Rekombinantne bakteriofagne delce smo pripravili tako, da smo v prirejen vektor M13KE na ustrezno mesto vstavili genski zapis za peptid EMP1, ki se je nato v petih kopijah izrazil na površini rekombinantnega bakteriofaga v obliki fuzijskega proteina s plaščnim proteinom p3. Peptid EMP1 se specifično veže na eritropoetinski receptor. Vezavo rekombinantnih bakteriofagov na eritropoetinski receptor smo preverili z encimsko-imunskim testom (ELISA). Zatem smo bakteriofage kovalentno označili s fluoresceinom in preverili smo tudi sposobnost tekmovanja fluorescenčno označenih rekombinantnih bakteriofagov z eritropoetinom za vezavo na eritropoetinski receptor s fluorescenčno-imunskim testom (FLISA). Ugotovili smo, da smo uspešno vstavili zapis za EMP1 v bakteriofagni genom. Rekombinantni bakteriofagi so v svojem genomu nosili zapis za peptid EMP1 in ga tudi uspešno izrazili na svoji površini, kar smo opazili preko njihove močne in specifične vezave na eritropoetinski receptor. S testom FLISA smo dokazali tudi, da je rekombinantni eritropoetin sposoben izpodriniti bakteriofage, ki so bili vezani na imobiliziran EpoR. Na podlagi tega sklepamo, da bi tako pripravljene bakteriofage, lahko uporabili kot fluorescenčne detekcijske sonde v presejalnih fluorescenčno-imunskih testih za odkrivanje prisotnosti do sedaj še nepoznanih ligandov EpoR v bioloških vzorcih.

ABSTRACT

Banned substances or procedures (doping) have been abused in sport for almost as long as competitions exist. Along with the progress in technology and healthcare, novel methods and new versions of synthetic molecules and recombinant hormones have been developed that athletes use to improve their performance. Because of the appearance of new versions of molecules there is a need for development of new methods which would allow detecting them in the most effective way as quickly as possible. The limitation of current detection is that it is mostly focused on the identification and quantification of the already known specific substances and it has been therefore necessary to develop the appropriate analytical method for every new substance. For the purpose of high-throughput screening of athletes it would be desirable to develop a robust test, which would allow us to test a large number of athletes for the presence of several groups of substances with a similar mechanism of action in a short time and which would also be useful for determining substances not yet on the list of banned substances or even those with unknown chemical structure. The goal of our work was to prepare recombinant bacteriophages, which could be used as fluorescent detection probes in fluorescent immunoassay allowing detection of so far unknown erythropoietin receptor ligands in biological samples. Recombinant bacteriophage particles were prepared by recombinant DNA technology utilizing a modified vector M13KE into which we inserted the gene encoding a peptide EMP1. This allowed the pentavalent display of the EMP1 peptide on the surface of the recombinant phage in the form of a fusion protein with the capsid protein p3. EMP1 binds specifically to the erythropoietin receptor. Binding of recombinant bacteriophages onto the recombinant erythropoietin receptor ectodomain was tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). EMP1-displaying recombinant bacteriophages were then covalently labeled with fluorescein. The ability of fluorescein-labeled bacteriophages to compete with recombinant erythropoietin for binding to the erythropoietin receptor was verified by fluorescence-linked immunosorbent assay (FLISA). The gene encoding EMP1 peptide was successfully inserted into the bacteriophage genome. The recombinant bacteriophages effectively expressed EMP1 on their surface, which was shown by their strong and specific binding to the erythropoietin receptor. By competitive FLISA we have also demonstrated that recombinant erythropoietin is capable of displacing bacteriophages from the immobilized EpoR. On this basis, we conclude that such recombinant bacteriophages could be useful as a fluorescent detection probes in fluorescence-based screening immunoassays to detect the presence of so far unknown ligands EpoR in biological samples.

KLJUČNE BESEDE

Bakteriofagni vektor, predstavitev na bakteriofagu, ligand eritropoetinskega receptorja, fluorescenčni test

SEZNAM OKRAJŠAV

AAS	anabolični androgeni steroidi
BSA	goveji serumski albumin (ang. " <i>bovine serum albumin</i> ")
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DMSO	Dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dsDNA	dvoverižna DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	encimsko-immunski test (ang. " <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> ")
EPO	Eritropoetin
FITC	fluorescein izotiocianat
FLISA	fluorescenčno-immunski test (ang. " <i>fluorescence-linked immunosorbent assay</i> ")
GH	rastni hormon (ang. " <i>growth hormone</i> ")
HRP	hrenova peroksidaza (ang. " <i>horseradish peroxidase</i> ")
IPTG	izopropil-tio-β-D-galaktopiranozid, induktor promotorja lac
K _d	konstanta disociacije
LB	bakterijsko gojišče (ang. " <i>lysogeny broth</i> ")
LD	nanašalni pufer (ang. " <i>Loading Dye</i> ")
MOK	Mednarodni olimpijski komite
nt	nukleotid
PBS	fosfatni pufer s soljo (ang. " <i>phosphate –buffered saline</i> ")
PBST	fosfatni pufer s soljo z dodanim polisorbatom-20 (Tween® 20)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PEG	polietilenglikol
rhEPO	rekombinantni humani eritropoetin
rhGH	rekombinantni humani rastni hormon
vrt./min	število vrtljajev na minuto (ang. " <i>revolutions per minute</i> ")
WADA	Svetovna protidopinška agencija (ang. " <i>World Anti-Doping Agency</i> ")
X-Gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid, kromogeni substrat za β-galaktozidazo

UVOD

1.1 Bakteriofagi

Bakteriofagi ali fagi so virusi, ki imajo sposobnost okužbe in razmnoževanja znotraj bakterijske celice (1). Spadajo med najbolj razširjena živa bitja na zemlji s celokupnim številom reda velikosti 10^{32} . Večinoma jih izolirajo iz vodnih okolij, vendar so na splošno prisotni povsod, kjer prebivajo bakterije. Bakteriofagi lahko okužijo samo bakterijske celice in niso sposobni okužiti sesalskih celic. So zelo specifični, saj lahko posamezen fag napade le eno vrsto, oziroma v nekaterih primerih celo samo posamezen sev bakterije. Okužba se običajno začne tako, da se bakteriofagi vežejo na specifični receptor na površini gostiteljske celice. Ti receptorji se lahko nahajajo v obliki različnih površinskih komponent celice; od proteinov, oligosaharidov, tejhojske kisline, peptidoglikana do lipopolisaharidov (2). Bakteriofage sestavlja dvoverižna ali enoverižna DNA ali RNA, ki je lahko v linearni ali krožni obliki. Genska informacija je obdana z zaščitnim proteinskim plaščem imenovanim kapsida (1).

Po okužbi bakterijskih celic lahko bakteriofagi preidejo v litični ali lizogeni življenjski cikel (1). Litični bakteriofagi svoje DNA ne vgrajujejo v genom gostiteljske celice. Pri srečanju virusa z gostiteljsko celico pride do njegove pritrditve na specifične receptorje gostiteljske celice, čemur sledi prenos genskega materiala virusa v gostiteljsko celico. Prenos se lahko zgodi preko različnih mehanizmov, odvisen je predvsem od morfologije samega virusa, pogosto pa vključuje tudi tvorbo por v steni bakterijske celice.

Po vstopu genskega materiala virusa v bakterijsko celico pride do podvojitve fagnega genoma znotraj bakterije. Ob tem se preusmerijo metabolni procesi gostiteljske celice v izdelavo komponent za sestavo novega virusa. Te strukturne komponente se nato sestavijo in skupaj tvorijo celoten virus (2). Na koncu pomnoženi bakteriofagi izzovejo hitro lizo in posledično propad gostiteljske bakterijske celice in se sprostijo iz celice ter nadaljujejo cikel tako, da okužijo novo bakterijsko celico. Liza bakterijskih celic se na trdnem agarnem gojišču, preraščenim z bakterijskim travnikom, pokaže v obliki bistrega območja, ki se imenuje plak (3).

V nasprotju z litičnim fagom so lizogeni fagi virusi, ki ne vstopijo takoj v litični cikel, ampak so zmožni svojo DNA integrirati v genom gostiteljske celice. Takemu latentnemu bakteriofagu rečemo profag (1). Poleg integriranja virusne DNA v genom gostiteljske

celice pa lahko virusna DNA v lizogenem ciklu obstaja tudi v obliki episoma oz. plazmida (2).

Lizogeni fagi se pri srečanju z gostiteljsko celico pritrdijo na specifične receptorje in svoj genski material prenesejo v gostiteljsko bakterijo. S podvojitvijo bakterijske DNA, se podvoji tudi v genom integrirana fagna DNA in tako vsaka izmed hčerinskih celic vsebuje virusno DNA. Celice grejo nato čez več ciklov podvajanja in pod posebnimi stresnimi pogoji (npr. ob obsevanju z UV svetlobo oz. ob prisotnosti mutagenov) pride do sprostitve profaga iz gostiteljskega genoma in bakteriofag vstopi v litični cikel (opisano zgoraj). Iz ene same bakterijske celice se lahko izgradi 100 in več novih virusov, ki nato lahko okužijo nove celice (2).

1.1.1 Bakteriofag M13

Bakteriofag M13 je nitasti fag s 6407 nt dolgim zaporedjem DNA molekule in je sposoben specifično okužiti bakterijo *Escherichia coli*. Njegov genom je krožne oblike in je poseben zato, ker je sestavljen iz same enoverižne DNA. Kapsida faga M13 je sestavljena iz več kopij samo petih proteinov. Fag M13 ima preprost cikel pomnoževanja, saj svoj genom podvaja v obliki plazmida (tj. dvoverižne krožne DNA) in zato ne potrebuje dodatnih genov za vstavitve njegovega DNA v gostiteljski genom. Vstop DNA molekule M13 v gostiteljsko bakterijsko celico (npr. *E. coli*) poteka preko pilusa, ki drugače služi, da poveže citoplazmi dveh bakterijskih celic med konjugacijo. Po vstopu genoma faga v gostiteljsko citoplazmo, enoverižna molekula DNA (ssDNA) služi kot osnova za sintezo njej komplementarne verige, kar vodi v nastanek krožne dvoverižne molekule DNA (dsDNA). Taka molekula se ne vstavi v bakterijski genom, ampak se podobno kot plazmid podvaja do velikega števila (več kot 100 kopij). S celično delitvijo dobiva vsaka izmed hčerinskih celic polovico kopij virusnega genoma, ki se nato podvaja dalje. Novi fagi se nato sestavijo in sestavljeni sprostijo iz celice (4).

Posebnost bakteriofagov M13 je, da se sprostijo iz gostiteljske celice preko posebnih por, ki jih tvorijo proteini faga, ne da bi pri tem prišlo do lize celice. Celica, ki je okužena s fagom M13, raste počasneje in medtem sprošča novo nastale viruse preko brstenja (5).

Fag M13 je pogosto uporabljen kot vektor za kloniranje zaradi pomembnih prednosti, ki jih nudi. Njegov genom je precej majhen (manj kot 10 kb), zato je olajšano vstavljanje tujih genskih zapisov s pomočjo konvencionalnih tehnik (restrikcije, ligacije, agarozna gelska elektroforeza). Poleg tega replikativna oblika genoma, tj. dvoverižna DNA (dsDNA),

spominja na plazmid in se zato za pomnoževanje in izolacijo dsDNA lahko uporablja metode, kot jih uporabljamo pri delu s plazmidi. Vsebuje tudi neesencialno nekodirajoče zaporedje v genomu, ki se ga da nadomestiti s tujo DNA omejene velikosti (5). Genom v obliki dsDNA enostavno pridobimo iz okuženih kultur *E. coli*, pri pomnoževanju in nastanku fagnih delcev pa se ohranijo tudi vstavljeni tuji zapisi v obliki ssDNA. Oblika ssDNA je primerna za neposredno sekvenciranje segmentov genoma in *in vitro* mutagenezo. Vektorje M13 se uporablja tudi za predstavitev na bakteriofagu, ki omogoča identifikacijo peptidnih ali proteinskih ligandov specifičnih tarč (4).

1.1.2 Predstavitev na bakteriofagu

Tehnologija predstavitve na bakteriofagu vključuje prikaz peptidov oz. proteinov na površini bakteriofaga. To dosežemo z vstavitvijo gena za specifičen protein v poseben tip vektorja M13 tako, da zapis za želeni protein pripojimo genu za določen plaščni protein bakteriofaga. Po vnosu rekombinantnega faga v celico *E. coli* se takšen fuzijski gen prevede v fuzijski protein, ki je sestavljen iz želenega proteina in fagnega plaščnega proteina. Fuzijski protein se nato vgradi v kapsido faga, kar omogoča, da je produkt kloniranega gena izpostavljen na površini fagnih delcev (4).

1.1.3 Bakteriofagne predstavitvene knjižnice

Bakteriofagne predstavitvene knjižnice so sestavljene iz velikega števila rekombinantnih bakteriofagov, kjer vsak izmed fagov predstavlja različen peptid oz. protein. Poleg t.i. sinteznih in kombinatoričnih knjižnic lahko pripravimo s kloniranjem mešanice cDNA iz določenega tkiva tudi knjižnice cDNA ali s kloniranjem fragmentov genomske DNA genomske knjižnice. Bakteriofagne predstavitvene knjižnice navadno vsebujejo zelo velik nabor različnih predstavljenih proteinov in se uporabljajo za identifikacijo ligandov želenega proteina.

Tarčni protein pri tem imobiliziramo v vdolbinice mikrotitrne ploščice ali na delce, ki jih lahko uporabimo v koloni afinitetne kromatografije. Oba tipa nosilcev nato inkubiramo v prisotnosti bakteriofagne predstavitvene knjižnice. Tisti fagi, ki ostanejo vezani na mikrotitrsko ploščo ali kolono po večkratnem spiranju, imajo na svoji površini predstavljene proteine, ki interagirajo z imobiliziranim tarčnim proteinom oziroma receptorjem (4).

1.1.4 Terapevtski ligandi

Tehnologija predstavitve na bakteriofagu je zelo uporabna za določanje epitopov na antigenih. Bakteriofagne predstavitvene knjižnice pa se lahko uporablja tudi za identifikacijo peptidov, ki posnemajo konformacijska vezišča oz. epitope in so lahko zelo uporabni za razvoj novih diagnostičnih in terapevtskih sredstev (6).

Peptidi predstavljajo skupino aktivnih molekul vključno s hormoni, nevrotransmitorji, citokini, antigeni in ravnimi faktorji. Peptidne ligande izberemo in identificiramo iz bakteriofagnih knjižnic v postopku afinitetne selekcije. V večini primerov moramo nato izbrane ligande modificirati, da so ti primerni za klinično uporabo. Modifikacija je potrebna zato, ker prvotno izbrani ligandi običajno izkazujejo slabe farmokokinetične lastnosti (kratka razpolovna doba v telesu zaradi hitre encimske razgradnje, slaba penetracija skozi črevesno steno in hitro izločanje iz telesa), kar prispeva k nizki biološki uporabnosti (7).

Peptide, ki se specifično vežejo na določeno tkivo ali celice, lahko uporabljamo za karakterizacijo celičnih kultur, vizualizacijo določenih struktur *in vivo* in za diagnozo bolezni (8). Za diagnostične in terapevtske namene je pomembno zagotoviti visoko afiniteto peptidov in proteinov, ki jo lahko zopet izboljšamo s pomočjo tehnologije predstavitve na bakteriofagu (7).

1.2 Doping

Zloraba prepovedanih substanc in različnih metod (transfuzije, povečanje volumna plazme) v športu se imenuje »doping«. Doping je najpogostejše posledica velike želje športnikov in trenerjev po zmagi, saj si z njegovo pomočjo športnik izboljša naravne sposobnosti (9).

Mednarodni olimpijski komite (MOK) je leta 1999 ustanovil neodvisno Svetovno protidopinško agencijo (WADA), katere namen je zaščititi temeljno pravico športnikov, da tekmujejo v okolju brez dopinga. Njihovo delovanje temelji na Svetovnem protidopinškem kodeksu (10).

Kršitev protidopinških pravil po kodeksu WADA so:

1. Prisotnost prepovedanih snovi ali njenih presnovkov v športnikovem vzorcu
2. Uporaba ali poskus uporabe prepovedane snovi ali postopka
3. Izogibanje ali zavračanje pristopa k odvzemu vzorca

4. Kršitev veljavnih zahtev glede dostopnosti športnika v primeru testiranja izven časa tekmovanja
5. Nedovoljeno poseganje ali poskus nedovoljenega poseganja v kateri koli del postopka kontrole dopinga
6. Posest prepovedane snovi ali prepovedanega postopka
7. Trgovanje ali poskus trgovanja s katero koli prepovedano snovjo ali prepovedanim postopkom
8. Dajanje ali poskus dajanja prepovedane snovi ali omogočanje prepovedanega postopka
9. Pomoč, spodbuda, podpora, dogovarjanje, prikrivanje ali katera koli druga oblika naklepne udeležbe pri kršitvi protidopinškega pravila
10. Prepovedano sodelovanje športnika ali druge osebe v s športom povezani vlogi s katerim koli članom spremljevalnega osebja, ki prestaja obdobje izločitve ali je bil v kazenskem, disciplinskem ali strokovnem postopku obsojen kršitve protidopinških pravil po določilih Kodeksa (10).

1.2.1 Porast dopinga v športu

Beseda »dope« izvirja iz poživilne pijače, ki so jo uporabljali v južni Afriki med plemenskimi obredi v osemnajstem stoletju. Doping je v športu prisoten že zelo dolgo časa. Že v času antičnih Grkov in Rimljanov so športniki uporabljali naravne produkte, zmlete rastlinske in živalske ekstrakte, s čimer so želeli izboljšati sposobnost športnika (11). Pozneje je šport v glavnem zamrl in z njim tudi doping.

Znova se je v veliki razsežnosti pojavil šele v drugi polovici 19. stoletja. Zaradi razvoja športa in napredka v medicini je posledično tudi doping začel postajati velik problem v športu na vseh stopnjah tekmovanja. V prvi polovici 20. stoletja se je razširil v načrtno vodene programe, ki so jih vodili atleti sami, njihovi trenerji ali zdravniki, vendar je bil tu doping v večini omejen na elitno raven športa. Po drugi svetovni vojni pa se je doping razširil v ekipne sistemske dopinške programe. Zaradi čedalje večjega pojava dopinga in tudi prve smrti povezane z uporabo dopinga so se proti koncu 60-ih let prejšnjega stoletja pojavile prve doping kontrole (9). Leta 1967 je MOK izdal svoj prvi seznam prepovedanih snovi in sprejel definicijo dopinga in leta 1983 prevzel akreditacijo laboratorijev za kontrolo dopinga. Kontrolo dopinga so ugotavljali z uporabo plinske kromatografije in masne spektrometrije s čimer so povečali natančnost in zanesljivost rezultatov (12).

V letih 1960-1970 so se najpogosteje uporabljali amfetamini, kasneje leta 1980 so se pojavili anabolni steroidi in kortizon. Leta 1990 pa je bila v ospredju uporaba ravnega hormona (hGH) in eritropoetina (EPO) (9).

V zadnjih letih se je z napredkom v znanosti, sintezni kemiji in biotehnologiji začela uporaba sintetičnih molekul, rekombinantnih hormonov in genska manipulacija, s čimer si želijo športniki izboljšati svoje sposobnosti (11).

1.2.2 Lista prepovedanih snovi in postopkov

Lista prepovedanih snovi in postopkov je mednarodni standard, ki se posodablja vsako leto in določa, katere snovi in postopki so prepovedani v športu.

Razvrstitev prepovedanih snovi in postopkov v razrede (lista veljavna od 01. 01. 2016) (13)

SNОВI IN METODE, KI SO PREPOVEDANE VEDNO (na tekmovanju in izven tekmovanja)

S0 NEDOVOLJENE SNOVI

S1 Anabolični agensi

1. anabolični androgeni steroidi (AAS)
2. drugi anabolični agensi

S2 Peptidni hormoni, rastni dejavniki, sorodne snovi in posnemovalci

S3 Beta-2-agonisti

S4 Hormoni in metabolični modulatorji

S5 Diuretiki in maskirni agensi

PREPOVEDANE METODE

M1 Manipulacija s krvjo in krvnimi komponentami

M2 Fizična in kemična manipulacija

M3 Genski doping

SNОВI IN METODE PREPOVEDANE NA TEKMOVANJU

S6 Poživila

S7 Narkotiki

S8 Kanabinoidi

S9 glukokortikoidi

SNOVI PREPOVEDANE V DOLOČENIH ŠPORTIH

P1 Alkohol

P2 Beta blokatorji

1.2.3 Najbolj pogosto uporabljene prepovedane snovi

1. Anabolični androgeni steroidi (AAS)

Anabolični androgeni steroidi so eni izmed najbolj pogosto uporabljenih substanc za izboljšanje sposobnosti ali izgleda športnika (14).

Normalno izločanje testosterona je bistvenega pomena za zdravje moškega in njegovo normalno delovanje telesa, medtem ko je dodajanje testosterona športnikom prepovedano. Ta lahko v odvisnosti od trajanja jemanja in odmerka povzroči različne škodljive stranske učinke in bolezni (npr. okvare jeter, težave s srcem, spremembe razpoloženja). Prvotno so AAS, vključno s testosteronom in sintetičnimi derivati testosterona, začeli uporabljati leta 1950 za povečanje sposobnosti dvigovalcev uteži (14). Zelo pogosto se uporabljajo v kombinaciji z drugimi snovmi (15). Za izboljšanje zmogljivosti in moči se uporablja v kombinaciji z rastnim hormonom in inzulinom, za spodbujanje izločanja vode ali maščobe v kombinaciji z diuretiki in za zmanjšanje stranskih učinkov androgenov v kombinaciji z zaviralci aromataz. Športniki pogosto kombinirajo različne steroide in AAS uporabljajo v ciklih (15).

S stimulacijo sinteze AAS prispevamo k povečanju mišične mase. AAS posledično povečajo tudi moč in telesno težo brez zmanjšanja mase maščobe. AAS se v terapevtske namene uporabljajo za sprožitev moške pubertete, za zaviranje propada mišične mase ter povečanje apetita pri bolnikih z AIDS-om in rakom, kjer pogosto nastopi kaheksija.

Uporaba AAS pa lahko privede tudi do neželenih učinkov. Njihova uporaba pri ženskah povzroči hirzutizem, menstrualne nepravilnosti in stalen globlji glas. Pri moških lahko pride do atrofije mod, moške plešavosti in ginekomastije, zloraba AAS v času odraščanja pa se pokaže v zastoju rasti (14). Poleg tega se lahko pojavijo akne, agresivno vedenje, nihanja v razpoloženju in kronične spremembe srca (15). V manjših odmerkih jih atleti in kolesarji uporabljajo za povečanje vzdržljivosti, saj povečajo količino rdečih krvničk in hematokrita, ki poveča dostavo in uporabo kisika ter pomaga tudi pri skrajšanju regeneracijskega časa (9). Ugotavljanje prisotnosti testosterona je lahko oteženo, saj način

aplikacije vpliva na njegovo detekcijo. Testosteron najlažje detektiramo v urinu po intramuskularni aplikaciji (14).

2. Rekombinantni humani rastni hormon (rhGH)

Humani rastni hormon je eden izmed najpogostejše uporabljenih anabolnih hormonov, ki ga skupaj z AAS izkorišča približno 25 % vseh uporabnikov AAS. Med športniki je zlasti priljubljen zaradi zmožnosti povečanja mišične mase in funkcije kot tudi zaradi dejstva, da ga z laboratorijskimi testi težko zaznamo (15). Z dolgotrajno uporabo rhGH pri odraslih, ki imajo pomanjkanje ravnega hormona, pride do normalne sestave telesa s povečanjem telesne mase in zmanjšanjem maščobne mase (14). Pri zdravem mladem moškem rhGH poveča celotno telesno sintezo proteinov in ohrani proteine tekom vadbe, vendar tega učinka ne opazimo pri vseh športnikih z zelo intenzivnimi treningi. Pri nekaterih se z dodatkom rhGH sicer povečuje proteinska telesna masa skupaj s povečanjem volumna zunajcelične tekočine, ne pride pa tudi do povečanja funkcije mišične mase, torej je povečanje mišične telesne mase posledica zastajanja tekočine (14). Šele v kombinaciji rhGH s testosteronom pride do povečanja funkcionalne mišične mase. Z izkoriščanjem rhGH lahko športnik izboljša svojo fizično sposobnost, poveča toleranco za težke treninge, zmanjša čas regeneracije po vadbi, obenem pa je rhGH lahko koristen tudi za zdravljenje poškodb mehkih tkiv. Kot stranski učinki zlorabe rhGH v majhnih odmerkih se pogosto omenja zastajanje tekočine v telesu, zatekanje, utrujenost, vrtoglavica, povečanje dlani, stopal, obraza in notranjih organov ter pojav diabetesa (15).

V športu se rhGH redko uporablja v velikih odmerkih, a ko pride do uporabe v velikih količinah, lahko pride do hujših stranskih učinkov, kot so zlomi kosti, bolečine v mišicah po vadbi, zmanjšanje koncentracije, nenormalne rasti kosti in spremembe v morfologiji srca in njegovi funkciji, pri čemer najpogostejše pride do znatnega povečanja in zadebelitve stene levega prekata (14, 15).

3. Eritropoetin (EPO)

Eritropoetin (EPO) je peptidni hormon, ki se naravno proizvaja v človeškem telesu (10). V glavnem izvira iz ledvic, vendar v manjši meri nastaja tudi v jetrih (16). Rekombinantni humani EPO (rhEPO) se pogosto uporablja v klinične namene pri pacientih z anemijo, ki je lahko posledica kemoterapije, kronične odpovedi ledvic, okužbe s HIV, obenem pa

izkazuje tudi imunostimulatorne in protivnetne učinke (16). Veliko vrhunskih športnikov v svoji želji po izboljšanju rezultatov izkorišča prav rekombinantni humani EPO (rhEPO) zaradi njegove sposobnosti povečanja števila rdečih krvničk, s čimer se poveča kapaciteta za prenos kisika do tkiv in s tem vzdržljivost športnika (14). Najpogosteje ga zlorablajo športniki, ki se ukvarjajo z vzdržljivostnimi športi, kot so kolesarjenje, maraton, atletika in biatlon (16).

Zelo pogosta analoga rhEPO sta darbepoetin z razpolovno dobo 18-24 ur in epoetin delta z razpolovno dobo 6 dni. Tako epoetin delta kot darbepoetin se vežeta na EPO receptor, ki inducira iste znotrajcelične signalne poti kot nativni EPO (14).

Alternativno se za povečanje števila rdečih krvničk uporabljajo avtologne transfuzije, ki jih je zelo težko zaznati. Podoben pristop dopinga predstavljajo višinske priprave. Višinske priprave, ki potekajo na 2000-2500 m, povečajo plazemsko koncentracijo EPO in količino eritrocitov, ne da bi pri tem vplivale na volumen krvi (15).

Zloraba rhEPO ima lahko številne stranske učinke, kot so reakcije na mestu injiciranja, slabost, glavobol, vrtoglavica, bolečine v sklepih in alergijske ter anafilaktične reakcije. Lahko pa povzroči tudi zelo tvegano povečanje viskoznosti krvi, povečano možnost koagulacije in reaktivnost trombocitov, zaradi česar pride tudi do povišanega tveganja za trombozo, miokardni infarkt in možgansko kap (15).

Detekcija rhEPO v bioloških vzorcih je precej otežena, uporabljajo se predvsem testi na osnovi izoelektričnega fokusiranja in imunofluorescenčni oz. encimsko-imunski testi (ELISA) (14).

1.2.4 Detekcija prepovedanih snovi

Športniki uporabljajo različne strategije in načine aplikacije prepovedanih substanc, da bi prelisičili metode testiranja, medtem ko se protidopinške agencije trudijo izboljšati svoje načine testiranja, s katerimi bi hitreje prišli do natančnih in zanesljivih rezultatov. Protidopinški laboratoriji uporabljajo napredne visoko občutljivih kromatografske tehnike. Kljub temu se pojavijo negativni rezultati pri športnikih, ki so priznali, da so se posluževali prepovedanih substanc, kar kaže na probleme pri sami detekciji. Večina protidopinških testov namreč daje prednost specifičnosti na račun občutljivosti. V prvem koraku bi bilo smiselno izvesti visoko-občutljiv test in nato rezultate v naslednjem koraku potrditi z visoko specifičnimi testi, saj daje prenizka občutljivost lažno negativne rezultate. Drugi razlog pa se skriva tudi v principu analiznih metod, kjer se kvantificira točno definirane

substance. Kljub neprestanim izboljšavam in nizkim mejam detekcije športniki pogosto uporabljajo molekule, ki so zaenkrat še neodkrite ali nerazvrščene na seznam prepovedanih snovi protidopinških organizacij (17).

Pri različnih substancah se uporabljajo različni načini analize in detekcije. Za detekcijo prepovedanih substanc, se kot vzorec najpogosteje vzame urin ali pa kri športnika (12).

Zlorabo AAS je možno detektirati s profiliranjem steroidov, vključno z njihovimi prekurzorji in metaboliti, kot tudi preko razmerja testosteron/epitestosteron v urinu, kjer vrednosti ne smejo preseči 4,0. V primeru, da je njuno razmerje višje, se vzorec za potrditev kvantitativno analizira s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (GC/MS) ali tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC/MS/MS). Kljub stalnemu razvoju v prepoznavi zlorabe ASS imajo protidopiške organizacije še vedno problem z detekcijo tako imenovanih načrtovanih zdravil (»designer drugs«), saj so te nove substance oblikovane posebej tako, da se izognejo odkritju (14).

Tudi pri GH se pojavijo problemi pri detekciji. Kot prvo je eksogeni GH identičen svoji endogeni različici GH, zaradi česar je detekcija otežena. Prav tako je tu problem v razlikah med spoloma, starosti in dnevnimi spremembami, saj vse to lahko vpliva na plazemske koncentracije GH. WADA je zato sprejela nekaj osnovnih postopkov za detekcijo GH, in sicer s specifičnim imunskim testom spremljajo izooblike GH 20 in 22. Eksogeni GH predstavlja namreč izoobliko 22 (tudi naravno prisotna v telesu), a vnos eksogenega GH zaradi negativne povratne zanke zniža nivo celokupnega endogenega GH, torej vseh treh izooblik (17, 20 in 22). Zato je kazalec zlorabe razmerje med izooblikama 22 in 20. Ta test je zelo specifičen in občutljiv, a le pod pogojem, da se ga izvede v 12-24 urah po zadnjem vnesenem odmerku GH (17). Novejši bioanalitični pristopi vključujejo uporabo mikromrež za detekcijo izražanja različnih genov, ki jih inducira rhGH. Metode, ki temeljijo na proteomiki, identificirajo markerje biološke aktivnosti rhGH s pomočjo tekočinske kromatografije v kombinaciji z masno spektrometrijo (LC-MS) (14).

Kljub številnim doping kontrolam med profesionalnimi športniki v zadnjih desetletjih je število pozitivnih primerov pri urinskih testih za rekombinantni humani eritropoetin še vedno presenetljivo nizko. Čeprav so določili referenčne vrednosti EPO v urinu, se na kromatogramu le pri okoli 20 % vseh vzorcev pokažejo sledi, povezane z rhEPO, kar kaže

na nizko občutljivost testa. Poleg analitičnih problemov se pojavijo tudi problemi v pred-analitični fazi, kjer se lahko prekriva ali ovira interpretacijo pozitivnih ali negativnih rezultatov EPO testa. Eden izmed razlogov je, da je časovno območje za detekcijo EPO v urinu zelo ozko, le okoli 2-3 dni, še posebej, če rhEPO injiciramo intravensko. Zelo velik problem pri detekciji je tudi uporaba sredstev (npr. kobalt) ali metod za posnemanje hipoksije, s čimer se poveča nastanek endogenega EPO. Nekateri športniki so v preteklosti v svoj urin dodajali proteaze, ki so katalizirale razgradnjo rhEPO (17).

Pri detekciji EPO se uporabljata dve različni analitični tehniki; in sicer izoelektrično fokusiranje (IEF) in kemiluminiscenčni imunski test. Kot že uveljavljena metoda za rutinske kontrole zlorabe rhEPO se uporablja zaporedna deglikozilacija z eksoglikozidaznim tretiranjem vzorca, čemur sledi poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE), ki razkrije strukturne razlike med endogeno prisotnim in rekombinantnim EPO (14). Nove posredne metode, ki naj bi delovale kot presejalno orodje, temeljijo na kombinaciji hematoloških analiz in profiliranju derivatov molekul. Presejalnim metodam bi sledilo nadaljnje testiranje športnikov, z izstopajočimi rezultati. Ta pristop velja za najbolj perspektivnega pri odkrivanju zlorabe EPO (14).

NAMEN DELA

Odkrivanje zlorabe različnih substanc v športu za izboljšanje rezultatov predstavlja čedalje večji izziv, saj se na črnem trgu vedno znova pojavljajo nove, po izvoru, strukturi in načinu priprave različne molekule z delovanjem na specifične signalne osi. Odkrivanje dopinga v športu predstavlja vse večji izziv, ker je razvoj na tem področju usmerjen predvsem v identifikacijo in kvantifikacijo specifičnih poznanih učinkovin, za nove substance pa je potrebno vsakič znova razviti ustrezne analizne metode. S tega vidika je zaželen razvoj robustnih presejalnih testov, s katerimi bi lahko v kratkem času na poljubni lokaciji testirali večje število tekmovalcev na prisotnost točno določene ali več skupin substanc s podobnim delovanjem hkrati; tudi takšnih, katerih kemijska struktura še ni poznana.

V diplomski nalogi bomo z uporabo tehnologije rekombinantne DNA pripravili rekombinantne nitaste bakteriofagne delce, ki bodo imeli na površini izražen peptid EMP1 v obliki fuzijskega proteina s kapsidnim proteinom p3. V bakteriofagni genom bomo na ustrezno mesto vstavili genski zapis za peptid EMP1, ki se specifično veže na eritropoetinski receptor (EpoR).

Vezavo pripravljenih rekombinantnih bakteriofagov s predstavljenim EMP1 na eritropoetinski receptor (EpoR) bomo preverili z različicami encimsko-imunskih testov (ELISA). Bakteriofage bomo nato označili s fluoresceinom (FITC) in preverili sposobnost tekmovanja z rekombinantnim eritropoetinom za vezavo na EpoR s pomočjo fluorescenčno-imunskega testa (FLISA). Tako pripravljeni bakteriofagi bi lahko uporabili kot fluorescenčne detekcijske sonde v presejalnih fluorescenčno-imunskih testih za odkrivanje prisotnosti do sedaj še nepoznanih ligandov EpoR v bioloških vzorcih.

MATERIALI IN METODE

1.3 Materiali

1.3.1 Laboratorijska oprema in materiali

LABORATORIJSKA OPREMA	PROIZVAJALEC
Analitska tehtnica AB 104	Mettler Toledo, Küsnacht , Švica
Avtoklav	Systec 2540 EL; Bel-Art products Pequannock, ZDA
Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka	LFVP12, Iskra PIO, Slovenija
Ciklični termostat AB GeneAmp® PCR System 2700	Applied Biosystems, Forster City, CA, ZDA
Centrifugi Eppendorf 5804 in 5415 R	Eppendorf, Nemčija Mini G, IKA, Nemčija
Čitalec mikrotitrskih ploščic	Tecan Safire ² Tecan Group Ltd., Mannerdorf, Švica
Mikrotitrne ploščice MaxiSorp (brezbarvna in črna)	Nunc, Roskilde, Danska
Pipete 0,5-10;10-100; 100-1000; 1000-5000 µL	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Sistem za opazovanje in fotografiranje gelov ter membran G-box	Syngene, Frederick, MD, ZDA
Spektrofotometer Nanodrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Delaware, ZDA
Stresalnika Vibromix 403 EVT in Vibromix 204 EV	Vibromix 403 EVT in Vibromix 204 EV oba Tehnica, Železniki, Slovenija
Termoblok Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Nemčija

1.3.2 Kemikalije

KEMIKA LIJA	PROIZVAJALEC
Agar	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, ZDA
Agaroz a	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, ZDA

DMSO (dimetilsulfoksid)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, ZDA
Etanol, 96 %	Riedel-de Haën AG, Nemčija
Glicerol	Fluka Chemie, Buchs, Švica
KCl	Carlo Erba, Rodano, Italija
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Nemčija
Koncentrirana žveplova(VI) kislina (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt, Nemčija
IPTG (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid)	Promega, Madison, WI, ZDA
NaCl	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Španija
Na ₂ HPO ₄	Fluka, Buchs, Švica
Nanašalno barvilo za gelsko elektroforezo – DNA LoadingDye (6x)	Thermo Scientific, Rockford, ZDA
Posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne, Murska Sobota, Slovenija
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, ZDA
X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid)	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, ZDA
TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin)	Sigma, St. Louis, MO, ZDA

1.3.3 Biološki material

MATERIAL	PROIZVAJALEC, DRŽAVA POREKLA
Bakteriofagni vektor M13KBE	Pripravljen na Katedri za farmacevtsko biologijo (FFA, UL) z vstavitvijo dodatnega restrikcijskega mesta <i>BspEI</i> v izvorni vektor M13KE iz sistema Ph.D. TM (New England Biolabs, MA, ZDA) za predstavitev na bakteriofagu (18,19). Nukleotidno zaporedje tega dela vektorja M13KBE in vektorska mapa se nahajata v prilogi 2.
Bakterije <i>E. coli</i> ER2738	New England Biolabs, MA, ZDA
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix	New England Biolabs, MA, ZDA
PCR Master Mix (2x)	Thermo Scientific, Rockford, ZDA

Rekombinantni eritropoetin (EPO)	Rek. proteini so bili izraženi v človeških celicah HEK 293T in kromatografsko prečiščeni na Katedri za farmacevtsko biologijo (FFA, UL) (neobjavljeno).
Rekombinantni EpoR (EpoR1)	Rek. proteini so bili izraženi v človeških celicah HEK 293T in kromatografsko prečiščeni na Katedri za farmacevtsko biologijo (FFA, UL) (neobjavljeno).

RESTRIKCIJSKI ENCIMI	PREPOZNAVNO IN CEPITVENO MESTO	PROIZVAJALEC
<i>BspEI</i>	T↓CCGGA AGGCC↑T	New England Biolabs, MA, ZDA
<i>EagI</i>	C↓GGCCG GCCGG↑C	New England Biolabs, MA, ZDA

OLIGONUKLEOTID	NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE (5'→3')	PROIZVAJALEC
F-Bsp-EMP1 (61 nt)	ctttctatttctcactccggaggcacct atagctgccatttttgccccgctgacct gggtgtg	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, ZDA
R-Eag-EMP1 (56 nt)	ttcaacagtttctggccggccgcgcgc tgcggtttgcacacccaggtcagcggg cc	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, ZDA
-96gIII	ccctcatagtttagcgtaacg	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, ZDA

1.3.4 Raztopine in pufri

RAZTOPINA	SESTAVA IN POSTOPEK
PEG/NaCl (20 % (w/v) PEG, 2,5 M NaCl)	Natehmo 8 g PEG in 5,85 g NaCl in raztopimo v vodi ob segrevanju. Nato dopolnimo z vodo do 40 mL. Raztopino avtoklaviramo in shranimo do njene uporabe pri sobni temperaturi.

PUFER	SESTAVA
PBS	NaCl 8 g KCl 0,2 g Na ₂ HPO ₄ 1,44 g KH ₂ PO ₄ 0,24 g Dopolnimo do 800 mL z destilirano vodo in uravnamo pH na 7,4 z 1 M NaOH oz. HCl. Pufer steriliziramo z avtoklavanjem.

Pufer za blokiranje:	5 % (m/v) mleko v prahu v PBS
Pufer za spiranje (PBST):	0,1% (v/v) Tween v PBS
Pufer za redčenje (PZR):	0,5 % (m/v) BSA v 0,1% PBST
Karbonatni pufer	<u>50 mM Na-karbonat</u> NaHCO_3 126 mg Uravnamo pH do 8,9 s HCl in dopolnimo z ddH ₂ O do 30 mL. Pufer steriliziramo s filtracijo (0,22 µm).
Pufer Tris z jodidnimi ioni	Tris 48,5 mg 32% HCl 39,3 µL 0,5 M EDTA 80 µL NaI 23,98 g ddH ₂ O do 40 mL Vrednost pH smo uravnali do 8,0 z 1 M HCl in sterilizirali s filtracijo (0,22 µm).
Pufer TAE	Tris 4,84 g koncentrirana očetna kislina 1,14 mL 0,5 M EDTA 3,7 mL ddH ₂ O do 1 L

Sterilizacija pufov in raztopin z vodno paro (avtoklaviranjem) je potekala pri 121 °C in nadtlaku 1 bar 20 minut. Za sterilizacijo s filtracijo smo uporabili sterilne membranske filtre iz celuloznega acetata (Millipore) z velikostjo por 0,22 µm.

1.4 Metode

1.4.1 Kloniranje zapisa za peptid EMP1 v bakteriofagni vektor

1.4.1.1 Rezanje vektorja M13KBE

Kot osnovni vektor smo uporabili bakteriofagni vektor M13KBE. Za rezanje fragmentov DNA in vektorjev smo uporabili restrikcijske endonukleaze, ki režejo DNA na točno določenih mestih. Te restrikcijske endonukleaze prepoznajo zaporedje 4-8 baznih parov in DNA razcepijo tako, da nastanejo topi ali lepljivi konci. Uporabili smo tudi reakcijske pufre za optimalno delovanje restriktaz po navodilih proizvajalca. Za izračun potrebne količine DNA in encimov smo upoštevali priporočila proizvajalca in podatke o aktivnosti posameznih restriktaz.

Izvedli smo hkratno rezanje plazmida M13KBE z restrikcijskima encimoma *BspEI* in *EagI*-HF.

Restrikcijsko mešanico smo pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirki zmešali 3 μL ($\sim 1 \mu\text{g}$) vektorja M13KBE, 5 μL pufra NEBuffer 3.1 (New England Biolabs), 40 μL vode in po 1 μL vsakega izmed restrikcijskih encimov (*BspEI* in *EagI*-HF). Restrikcijsko mešanico smo nato inkubirali 2 uri pri 37 °C in nato restrikcijske encime inaktivirali tako, da smo mešanico 20 min inkubirali pri 80 °C.

Rezan vektor smo nato izolirali z etanolno precipitacijo tako, da smo raztopini DNA dodali desetino volumna 3 M natrijevega acetata in 2,5-kratni volumen absolutnega etanola. Mešanico smo inkubirali 30 min pri -20 °C. Pri teh pogojih se velike molekule DNA, kot je naš rezan vektor (~ 9200 bp) oborijo, manjše, kot je naš izrezan fragment (~ 45 bp), pa ostanejo raztopljeni. Po inkubaciji smo mešanico centrifugirali (20 min, 4 °C, 10 000 vrt./min) ter odstranili supernatant. Oborino smo sprali s 500 μL hladnega 70 % etanola in ponovno centrifugirali (10 min, 4 °C, 10 000 vrt./min) ter zopet odstranili supernatant. Sediment, ki vsebuje vektorsko DNA, smo nato 30 min sušili v komori z laminarnim pretokom zraka in ga nato raztopili v 20 μL dH₂O.

1.4.1.2 Podaljševanje 3'-koncev ustvarjenega inserta in rezanega vektorja M13KBE (ustvarjanje topih koncev)

Najprej smo pripravili insert s hibridizacijo oligonukleotidov, pri čemer smo združili po 10 μL 100 μM raztopin oligonukleotidov F-Bsp-EMP1 in R-Eag-EMP1 v mikrocentrifugirki in zmes segrevali 3 min pri 96 °C. Sledilo je počasno ohlajanje do sobne temperature v obdobju 30 minut, s čimer smo omogočili ustrezno prileganje oz. hibridizacijo (ang. *annealing*) oligonukleotidov. To mešanico smo po prileganju 20-krat redčili z ddH₂O. 5 μL te redčitve smo dodali 5 μL 2x PCR Mastermix-a in nadaljevali z reakcijo PCR, opisano v nadaljevanju (slika 1).

F-Bsp-EMP1 (61 nt)

ctttctattctcactccggaggcacctatagctgccattttg**ggcccgctgacctgggtgtg**

+

R-Eag-EMP1 (56 nt)

ttcaacagtttcgggcggcgccgcgcctgcggtttg**cacacccaggtcagcgggcc**



Hibridizacija oz. prileganje

ctttctattctcactccggaggcacctatagctgccatttt**ggcccgctgacctgggtgtg**
ccgggcgactggacccacacgtttggcgccccgcgcggccggccttgacaactt



+ PCR MASTER MIX

ctttctattctcactccggaggcacctatagctgccatttt**ggcccgctgacctgggtgtg**caaaccgcagggcgggcgccggccgaaactgttgaa
gaaagataagagtgaggcctccgtggatatcgacggtaaaa**ccgggcgactggacccacac**gtttggcgccccgcgcggccggccttgacaactt

Slika 1: Hibridizacija oligonukleotidov in njihovo podaljševanje z uporabo PCR Master mix.

Rdeče oz. modro obarvane črke predstavljajo dele, ki kodirajo peptid EMP1.

Odebeljene modre in rdeče črke predstavljajo nukleotide, ki se prilegajo med seboj.

Bledo obarvane črke predstavljajo že podaljšano verigo DNA po reakciji PCR.

Podčrtane obarvane črke označujejo mesto delovanja restrikcijski mesti encimov *BspEI* in *EagI*.

Črno označeni nukleotidi predstavljajo regije vektorja M13KBE.

Sivo senčeni deli predstavljajo dele komplementarne rezanemu vektorju M13KBE s topimi konci

V drugi mikrocentrifugirki smo zmešali 3,1 µL (~ 200 ng) dvakrat rezanega vektorja M13KBE in mu dodali enako količino 2x PCR Mastermix. Obe zmesi smo podvrgli temperaturnemu programu za izvedbo reakcije podaljševanja (PCR) po shemi spodaj (preglednica 1). PCR temelji na uporabi termostabilne DNA-polimeraze, ki sintetizira novo verigo DNA, ki je komplementarna osnovni verigi v smeri 5' proti 3', kadar je ob osnovni verigi ustrezen komplementaren začetni oligonukleotid. DNA-polimeraza omogoča pomnoževanje odsekov DNA, ki jih določimo z načrtovanjem ustreznih oligonukleotidov na enem in drugem koncu.

Preglednica 1: prilagojeni program reakcije PCR za podaljševanje koncev vektorja in inserta

5 min	95 °C	} 10 ciklov
30 s	94 °C	
30 s	55 °C	
20 s	72 °C	
6 min	72 °C	

1.4.1.3 Vstavljanje inserta v vektor s pomočjo reakcije sestavljanja po Gibsonu (ang. *Gibson assembly*)

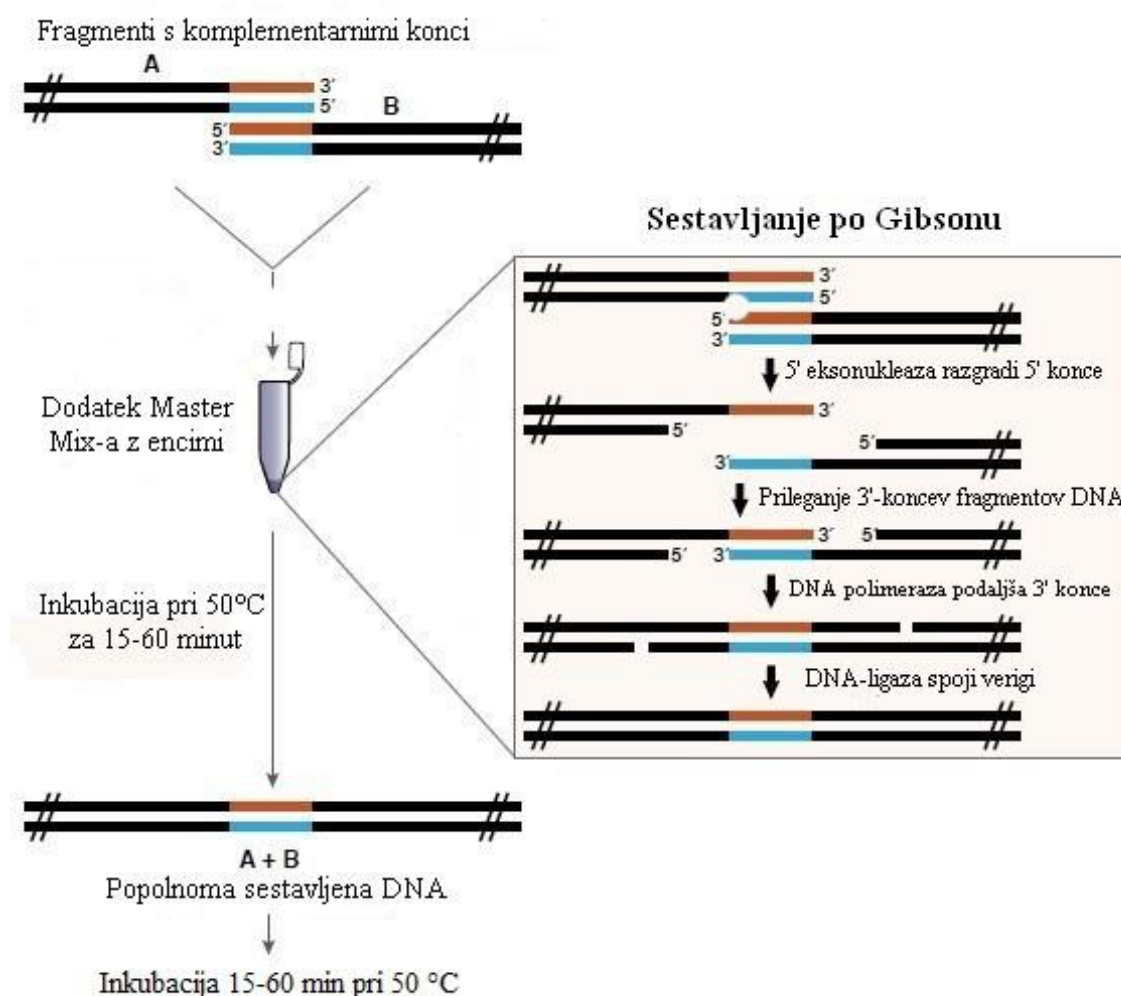
V 2-krat rezan vektor smo insert vstavili z izpopolnjeno različico metode sestavljanja po Gibsonu (ang. *Gibson assembly*), ki vključuje uporabo mešanice NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs, MA, ZDA).

Metoda sestavljanja po Gibsonu omogoča sestavljanje več fragmentov DNA poljubne dolžine v eni reakcijski zmesi v relativno kratkem času (eni uri ali manj). Pri tem je pomembno, da imajo fragmenti, ki jih hočemo združiti, komplementarne 3'-končne dele (vsaj 15 nt).

V osnovni zmesi NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix so vključeni trije različni encimi. Med reakcijo eksonukleaza najprej razgradi 5'-konce dvovertikalnih fragmentov DNA, kar omogoči prileganje 3'-koncev komplementarnih verig.

DNA-polimeraza nato podaljša komplementarne verige v smeri 5'→3' in tako zapolni vrzeli v območju stičišč fragmentov. DNA-ligaza nato kovalentno poveže verige v

sestavljene DNA s tvorbo fosfodiesterne vezi. S tem dobimo dvovertižno popolno povezano DNA molekulo (slika 2). Reakcija predstavlja alternativo konvencionalnim metodam združevanja fragmentov DNA z uporabo restrikcijskih endonukleaz in sledečo ligacijo. Pomembni prednosti reakcije sta robustnost in hitrost, kar lahko s pridom izkoriščamo pri molekularnem kloniranju (20).



Slika 2: Metoda sestavljanja po Gibsonu
Prirejeno po (20)

Za vstavljanje inserta v vektor smo v mikrocentrifugirki zmešali 10 µL NEBuilder HiFi MasterMix, 4,1 µL (~ 100 ng) zmesi po podaljševanju vektorja M13KBE, 0,9 µL (~ 111,95 fmol) 10-krat redčenega inserta EMP1 s topimi konci in 5 µL ddH₂O.

Nato smo reakcijsko zmes najprej inkubirali 15 min pri 45 °C in nato še 60 min pri 50 °C, da smo omogočili potek reakcije sestavljanja po Gibsonu.

Preglednica 2: Sestava reakcijske mešanice za vstavljanje inserta v vektor s pomočjo sestavljanja po Gibsonu

KOMPONENTA	KOLIČINA	VOLUMEN [μL]
NEBuilder HiFi MasterMix	/	10
M13KBE – zmes po podaljševanju	100 ng (22'39 fmol)	4,1
INSERT (podaljšani oligonukleotidi)	111'95 fmol	0,9 (10-krat redčen)
ddH ₂ O		5
		$\Sigma = 20 \mu\text{L}$

1.4.1.4 Vnos zmesi v kompetentne celice *E. Coli* ER2738 (transformacija)

Reakcijsko zmes po sestavljanju po Gibsonu smo uporabili za transformacijo celic *Escherichia coli* ER2738 s klasičnim toplotnim šokom. Kompetentne celice *E.coli* ER2738 smo odtalili na ledu, jim dodali 19 μL reakcijske zmesi sestavljanja po Gibsonu, nežno premešali in inkubirali 20 min na ledu. Mikrocentrifugirko smo nato inkubirali 45 sekund pri 42 °C ter ponovno inkubirali na ledu 3 minute. Zmesi smo dodali 800 μL gojišča LB in med zmernim stresanjem inkubirali 30 min pri 37 °C.

Iz kulture transformiranih celic smo ločeno odvzeli 10 μL , 50 μL in celoten preostanek kulture (skoncentriran s pomočjo centrifugiranja). Vsakega izmed odvzetih alikvotov kultur transformiranih celic smo dodali v po 3 mL raztaljene agaroze, vse skupaj hitro premešali in enakomerno razlili po trdnem agarnem gojišču LB z dodanimi IPTG (0,2 mM), X-gal (0,004 % (m/v)) in tetraciklinom (20 $\mu\text{g/mL}$).

Vse tri plošče smo nato inkubirali čez noč pri 37 °C.

1.4.1.5 Pomnoževanje naključnih bakteriofagnih klonov

Na plošči s celotnim preostankom kulture po transformaciji se je naslednji dan pojavilo okoli 100 modrih plakov – vsak izmed njih je predstavljal posamezen bakteriofagni klon. Z okužbo tekoče bakterijske kulture *E. coli* ER2738 smo pomnožili 4 naključne bakteriofagne klone. To smo storili tako, da smo z vsakim izmed 4 naključnih plakov v aseptičnih pogojih inokulirali po 10 mL tekoče kulture *E. coli* ER2738 optične gostote ~ 0,1. Okužene kulture smo stresali (~ 250 vrt./min) 4,5 ure pri 37 °C. V tem času je prišlo do pomnožitve bakteriofagov.

1.4.1.6 Izolacija bakteriofagov iz bakterijskih kultur

Bakterijske kulture smo po pomnoževanju bakteriofagov centrifugirali (10 min, 4 °C, 10 000 vrt./min), prenesli supernatante v nove centrifugirke ter ponovno centrifugirali pri enakih pogojih. Supernatantom smo nato dodali po 2 mL mešanice 20 % PEG / 2,5 M NaCl, dobro premešali in pustili čez noč pri 4 °C. Dodatek mešanice 20 % PEG / 2,5 M NaCl v supernatant z bakteriofagi povzroči precipitacijo bakteriofagov zaradi odtegnitve vode.

Naslednji dan smo oborjene bakteriofage centrifugirali (15 min, 4 °C, 10 000 vrt./min) in odstranili supernatant. Bakteriofagne usedline smo suspendirali v po 1 mL PBS. Nato smo ponovno centrifugirali (2 min, 4 °C, 10 000 vrt./min), ločili supernatant in mu dodali 250 µL 20 % PEG / 2,5 M NaCl. Sledila je 30-minutna inkubacija na ledu in centrifugiranje (10 min, 4 °C, 10 000×g). Supernatant smo zavrgli in usedlino z bakteriofagi suspendirali v po 100 µL PBS. Po centrifugiranju (2 min, 4 °C, 10 000 vrt./min) smo nato supernatantu, v katerem so bili bakteriofagi, dodali enak volumen glicerola (100 µL), vse skupaj dobro premešali in shranili pri -20°C kot osnovno zalogo.

1.4.1.7 Izolacija enoverižne fagne DNA za sekvenciranje

Bakterijske kulture po pomnoževanju bakteriofagov smo centrifugirali (10 min, 4 °C, 10 000 vrt./min) in v vsako izmed štirih mikrocentrifugirk prenesli po 1 mL supernatanta. V vsako mikrocentrifugirko smo supernatantu nato dodali 300 µL 20% PEG / 2,5 M NaCl, dobro premešali in inkubirali čez noč pri 4 °C, da so se bakteriofagi oborili. Sledilo je centrifugiranje (14 000 vrt./min, 10 min, 4 °C). Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in fagno usedlino suspendirali v 100 µL jodidnega pufra. Tej zmesi smo nato dodali 250 µL absolutnega etanola in inkubirali 20 minut pri sobni temperaturi. Ta kratka inkubacija je omogočila preferenčno precipitacijo enoverižne fagne DNA, medtem ko naj bi večina proteinov ostala raztopljenih. Zatam smo mešanice centrifugirali (15 min, 4 °C, 14 000 vrt./min) in odstranili supernatant. Sedimente smo sprali s po 0,5 mL 70 % etanola, in ponovno centrifugirali (10 min, 4 °C, 14 000 vrt./min). Po centrifugiranju smo ponovno odstranili supernatant in sediment posušili v aseptični komori z laminarnim pretokom zraka. Posušene sedimente smo raztopili v po 30 µL ddH₂O in ocenili koncentracije enoverižne fagne DNA v vzorcih s pomočjo meritev absorbanč (UV-VIS

spektrofotometrija; Nanodrop) Vzorce smo nato ustrezno redčili po priporočilih izvajalca (GATC Biotech, Konstanz, Nemčija) in jih poslali na sekvenciranje.

1.4.1.8 Določanje nukleotidnega zaporedja (sekvenciranje)

Določitev nukleotidnega zaporedja je opravilo podjetje GATC po Sangerjevi dideoksi metodi. Vzorec smo pripravili po navodilih izvajalca, tako da smo zmešali 5 μ L fagne DNA s koncentracijo 50-100 ng/ μ L in 5 μ L začetnega oligonukleotida -96gIII s koncentracijo 5 μ M.

Dobljene rezultate sekvenciranja smo primerjali z želenim teoretičnim zaporedjem, da smo potrdili uspešnost kloniranja in odsotnost mutacij.

Od vseh 4 naključno izbranih klonov je bil samo en klon ustrezen in tega smo nato uporabili za nadaljnje raziskave.

1.4.2 Pomnoževanje in izolacija klonov M13KBE-EMP1 in kontrolnega klona (vezalec streptavidina M13-K4)

V dveh erlenmajericah z utori, ki sta vsebovali po 50 mL kulture *E.coli* ER2738 optične gostote $\sim 0,1$, smo pomnožili klona M13KBE-EMP1 in M13-K4 za namene ELISA in fluorescenčnega označevanja bakteriofagov. Najprej smo iz plošče, kjer smo preko noči namnožili kulture, precepili eno kolonijo *E. coli* ER2738 v 10 mL gojišča LB z 20 μ g/mL tetraciklina in stresali preko noči (37 °C, 250 vrt./min). V dveh sterilnih erlenmajericah smo nato zmešali po 50 mL LB in 50 μ L tetraciklina (20 mg/mL) ter po 500 μ L prekonočne *E. coli* ER2738. Vsako izmed kultur smo nato okužili s po 5 μ L klonov M13KBE-EMP1 oz. M13-K4 iz osnovne zaloge v glicerolu in ju stresali 5 ur pri 37 °C. Po pomnoževanju smo fage izolirali z dvakratnim zaporednim obarjanjem, kot je opisano zgoraj s to razliko, da smo uporabili ustrezno večji volumen mešanice PEG/NaCl.

Po prvem obarjanju smo vsak klon suspendirali v 2 mL PBS in vsako izmed suspenzij razdelili na dva 1 mL-alikvota. V vse štiri bakteriofagne suspenzije smo nato dodali po 250 μ L PEG/NaCl in inkubirali 30 min na ledu. Po inkubaciji je sledilo centrifugiranje (15 min, 4 °C 10 000 $\times$ g), po katerem smo odstranili supernatante in posamezen alikvot vsakega fagnega klona suspendirali v po 100 μ L 50 mM karbonatnega pufra (pH 8,9) oz. 100 μ L PBS, tako da smo imeli vsak klon (M13KBE-EMP1 oz. M13-K4) suspendiran tako v karbonatnem pufu kot pufu PBS.

Vsebinsko vsake izmed mikrocentrifugirke smo dobro premešali in centrifugirali (15 min, 4 °C, 10.000×g), da smo odstranili morebitno prisotne netopne delce, supernatante pa nato prenesli v nove mikrocentrifugirke in jih shranili pri 4 °C. Titre bakteriofagnih suspenzij smo ocenili preko merjenja absorbanca 10-krat redčenim suspenzijam (preglednica 3).

Iz meritev absorbanca lahko s pomočjo formule 1 ocenimo titer bakteriofagov (Rezultati in razprava, preglednica 4):

Formula 1:

$$\frac{\text{št. virusnih delcev}}{\text{mL}} = \frac{(A_{296} - A_{320}) \cdot 6 \times 10^{16}}{\text{velikost fagnega genoma} \left(\frac{\text{število baznih parov}}{\text{vektor}} \right)}$$

1.4.3 Označevanje bakteriofagov s fluorescenčnim barvilom FITC

Bakteriofage smo označili tako, da smo 100 µL vsaki izmed suspenzije bakteriofagov v karbonatnem pufru dodali skupaj 30 µL fluorescentnega barvila FITC, raztopljenega v koncentraciji 2 mg/mL v DMSO. FITC v DMSO smo v reakcijsko zmes dodajali postopoma (po 6 µL na vsakih 8 minut) med stresanjem pri sobni temperaturi. Po zadnjem dodatku barvila smo zmesi stresali pri sobni temperaturi še eno uro. Vsaki izmed reakcijskih zmesi smo nato dodali po 670 µL PBS in po 200 µL PEG/NaCl ter obarjali na ledu 30 minut. Bakteriofage smo izolirali s centrifugiranjem in končno sedimenta suspendirali v po 100 µL PBS ter ju shranili pri 4 °C.

1.4.4 ELISA: kvalitativno preverjanje vezave bakteriofagov na različne tarčne proteine

V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo nanесли tarčna proteina (EpoR1 oz. streptavidin) v koncentraciji 20 µg/mL v po 50 µL PBS in mikrotitrsko ploščico inkubirali preko noči pri 4 °C. Inkubaciji je sledilo blokiranje nezasedene površine, pri čemer smo v vsako vdolbinico dodali po 230 µL 2 % BSA in mikrotitrsko ploščico inkubirali eno uro pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju (50 vrt./min). Nato smo vdolbinice trikrat sprali s po 280 µL 0,1 % PBST. Po spiranju smo nanесли 5×10⁹ fagov posameznega klona v po 100 µL 0,5 % BSA v 0,1 % PBST v vsako vdolbinico: vsak klon (M13-EMP1 in M13-K4) smo v 3 paralelkah inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi ob zmernem stresanju nad

obema tarčama (EpoR1 in streptavidinom). Po ponovnem 3-kratnem spiranju smo v vdolbinice mikrotitrne ploščice nanesti konjugat anti-M13-HRP (redčen 1:5000) v po 100 μ L pufru za redčenje in ploščico zmerno stresali še eno uro pri sobni temperaturi. Sledil je dodatek 200 μ L raztopine kromogenega substrata TMB v vsako izmed vdolbinic. Reakcijo oksidacije TMB, ki jo katalizira hrenova peroksidaza v konjugatu, vezanem na površino, smo prekinili po 5 min z dodatkom po 50 μ L 2 M H_2SO_4 v vsako vdolbinico. Zatem smo pomerili absorbanco vsake vdolbinice pri 450 nm.

1.4.5 Kvantitativna fagna ELISA: preverjanje vezave bakteriofagov na EpoR1 v odvisnosti od njihove koncentracije

Na mikrotitrsko ploščico smo nanesti v vdolbinice prvih treh kolon (1-3) po 50 μ L raztopine EpoR1 v PBS in v vdolbinice naslednjih treh kolon (4-6) po 50 μ L raztopine BSA (oboje v koncentraciji 20 μ g/mL) ter inkubirali čez noč pri 4 °C ob zmernem stresanju (50 vrt./min). Sledilo je blokiranje z dodatkom 230 μ L 2 % BSA v vsako vdolbinico in enournim inkubiranjem pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju (50 vrt./min). Nato smo vdolbinice mikrotitrne ploščice trikrat spirali s po 280 μ L 0,1 % PBST. Po spiranju smo vanje nanesti serijske redčitve fagov (od 2×10^9 fagov/vdolbinico do 0 fagov/vdolbinico) v 100 μ L pufru za redčenje, kot kaže slika 3, in ploščico inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju (50 vrt./min).

	1	2	3	4	5	6
	EpoR1	EpoR1	EpoR1	BSA	BSA	BSA
A	$2,00 \cdot 10^9$					
B	$1,00 \cdot 10^9$					
C	$5,00 \cdot 10^8$					
D	$2,50 \cdot 10^8$					
E	$1,25 \cdot 10^8$					
F	$6,25 \cdot 10^7$					
G	$3,13 \cdot 10^7$					
H	0					

Slika 3: Nanosi bakteriofagov na mikrotitrsko ploščico v po treh paralelkah za vsako koncentracijo

Sledilo je trikratno spiranje vdolbinic s po 280 μ L 0,1 % PBST. Po spiranju smo v vsako

izmed vdolbinic nanesti konjugat anti-M13-HRP (redčen 1:5000) v 100 μ L pufra za redčenje in ploščico rahlo stresali eno uro pri sobni temperaturi. Vdolbinice smo nato štirikrat sprali s po 280 μ L 0,1 % PBST. Sledil je dodatek 200 μ L raztopine TMB v vsako izmed vdolbinic, po 5 min pa še dodatek 50 μ L 2 M H₂SO₄. Zatem smo pomerili absorbanco skozi vsako vdolbinico pri valovni dolžini 450 nm.

1.4.6 FLISA: spremljanje izpodrivanja fagov M13-EMP1, vezanih naEpoR1, z rekombinantnim EPO

V vdolbinice črne mikrotitrne ploščice Nunc MaxiSorp smo najprej nanesti po 50 μ L raztopin EpoR1 ali BSA v konc. 20 μ g/mL v PBS, kot kaže slika 4 in ploščico inkubirali preko noči pri 4 °C. Sledilo je blokiranje z dodatkom 230 μ L 2 % BSA v vsako vdolbinico in enourno inkubiranje ploščice pri sobni temperaturi. Zatem smo vdolbinice trikrat sprali s po 280 μ L 0,1 % PBST. Nato smo vdolbinicam dodali zmesi fluorescenčno označenih fagov ($2,36 \times 10^9$ fagov/vdolbinico) in naraščajočih koncentracij rekombinantnega humanega eritropoetina (rhEPO), kot kaže slika 4.

	1	2	3	TARČA
	EpoR1	EpoR1	EpoR1	
A	fagi + 1 μM rhEPO			EpoR1
B	fagi + 100 nM rhEPO			
C	fagi + 10 nM rhEPO			
D	fagi + 1 nM rhEPO			
E	fagi + 100 pM rhEPO			
F	fagi + 10 pM rhEPO			
G	fagi + 0 μM rhEPO			BSA
H	fagi + 0 μM rhEPO			

Slika 4: Nanosi tarčnih proteinov na mikrotitrsko ploščico v treh paralelkah

Mikrotitrsko ploščico smo stresali (50 vrt./min) 1 uro pri sobni temperaturi ter nato vdolbinice dvakrat sprali s po 280 μ L 0,1 % PBST in zatem še enkrat s po 280 μ L PBS. Po spiranju smo v vsako izmed vdolbinic dodali po 50 μ L PBS ter s pomočjo čitalca mikrotitrskih ploščic pomerili intenziteto fluorescence pri 518 nm ob ekscitaciji pri valovni dolžini 492 nm.

REZULTATI

Opravljen diplomski naloga je del širšega razvoja in optimizacije univerzalnega detekcijskega testa za detekcijo zlorabe prepovedanih substanc v športu, ki bi deloval na osnovi fluorescenčnih metod.

1.5 Vstavitev zapisa za peptid EMP1 v bakteriofagni vektor M13KBE

Zapis za ligand EMP1 smo v vektor vstavili med restrikcijski mesti *BspEI* in *EagI*, kot je predstavljeno na sliki vektorske mape v prilogi (slika 5).

Da je bil naš zapis uspešno vstavljen, smo potrdili z določitvijo nukleotidnega zaporedja (ni prikazano).

Preglednica 3: Meritve absorbanc suspenzij pomnoženih bakteriofagov pri različnih valovnih dolžinah za oceno titra

	A269	A320
M13-EMP1 PBS	0,626	0,012
M13-K4 PBS	1,59	0,028
M13-EMP1 karb. pufer	0,712	0,015
M13-K4 karb. pufer	1,185	0,029

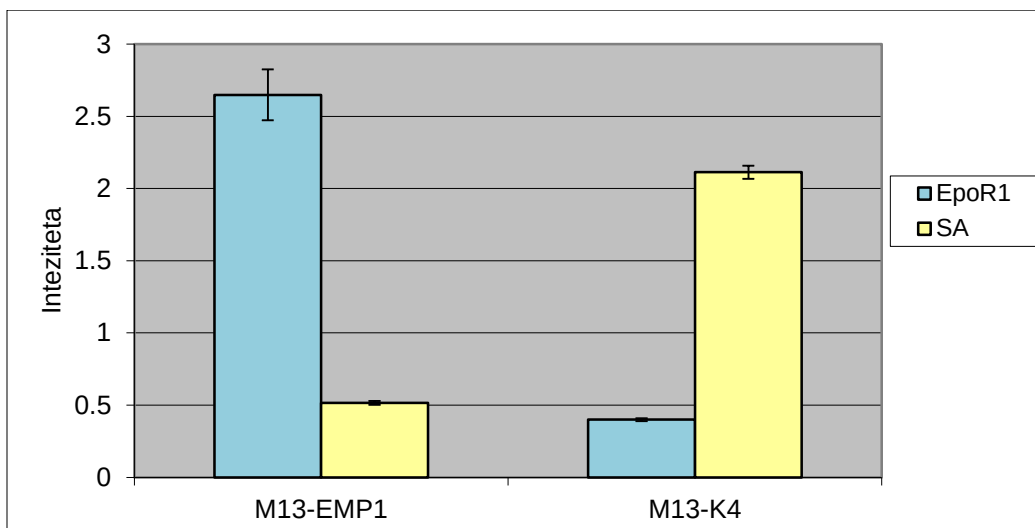
Preglednica 4: Titri bakteriofagov izračunani s pomočjo formule 1 (21)

	Smith (PFU/mL)
M13-EMP1 PBS	$1,32 \times 10^{12}$
M13-K4 PBS	$3,41 \times 10^{12}$
M13-EMP1 karb. pufer	$1,52 \times 10^{12}$
M13-K4 karb. pufer	$2,55 \times 10^{12}$

1.6 ELISA: kvalitativno preverjanje vezave bakteriofagov na različne tarčne proteine

V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo vezali EpoR1 ali streptavidin in spremljali vezavo fagnih klonov M13-EMP1 in M13-K4 na oba tarčna proteina.

Nato smo v vdolbinice dodali še konjugat protiteles proti bakteriofagom s HRP, s katerim smo zaznali vezane bakteriofage na različne tarčne proteine.



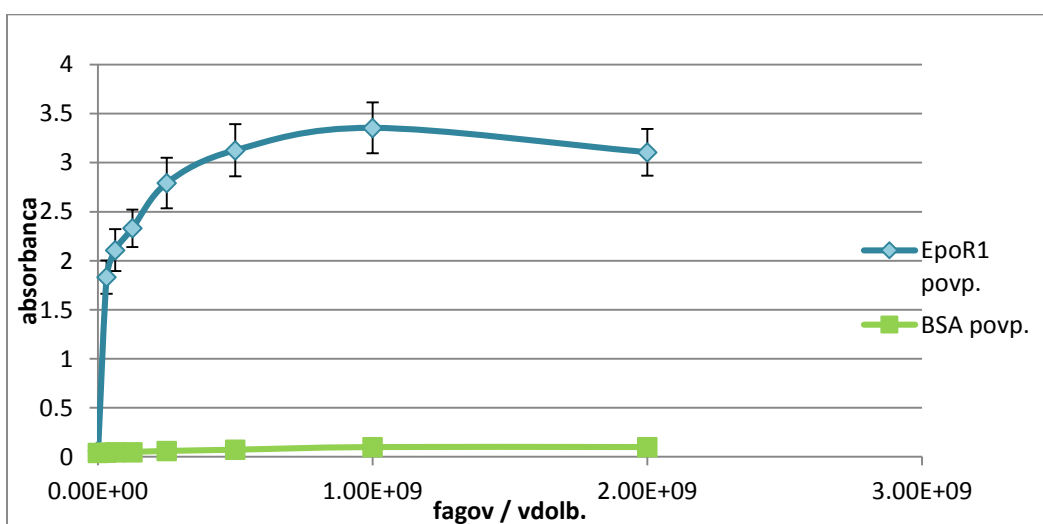
Graf 1: Vezava M13-EMP1 in M13-K4 na EpoR1 in streptavidin

Intervali napak predstavljajo standardne odklone 3 paralelnih poskusov.

Iz grafa je razvidno, da se bakteriofagni klon M13-EMP1 veže na EpoR1, ne pa tudi na streptavidin. Nasprotno se v skladu s pričakovanji bakteriofag K4 veže na streptavidin, ne pa tudi na EpoR1.

1.7 ELISA: kvantitativno preverjanje vezave bakteriofagov na EpoR1

V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo vezali bodisi EpoR1 bodisi BSA in spremljali vezavo bakteriofagov na tarčna proteina v odvisnosti od koncentracije bakteriofagov.



Graf 2: Vezava fagov na EpoR1 in BSA v odvisnosti od različne koncentracije fagov

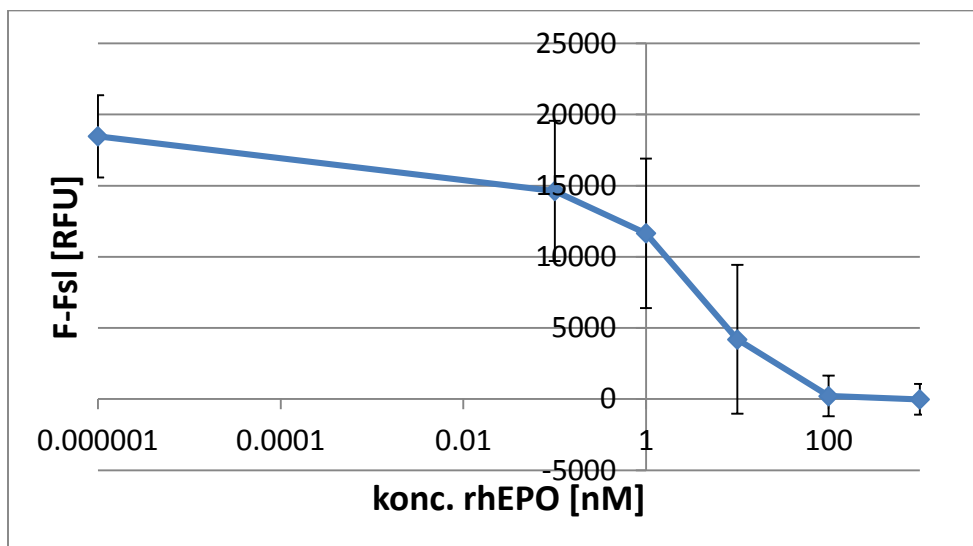
Izrisani intervali napak predstavljajo standardne odklone 3 paralelnih poskusov.

Odzivi z večanjem koncentracij bakteriofagov lepo naraščajo v primeru EpoR1 kot tarče in ostajajo nizki v primeru BSA. Iz tega sklepamo, da je vezava specifična. Ker je v primeru EpoR1 že pri najmanjši redčitvi bakteriofagov signal relativno visok (~ 30-krat višji od slepe brez fagov), sklepamo, da je jakost vezave bakteriofagov (avidnost) zelo visoka.

1.8 FLISA: spremljanje izpodrivanja fagov M13-EMP1 z EpoR1z rekombinantnim EPO

V vdolbinice črne mikrotitrne ploščice smo vezali EpoR1 ali BSA. Nato smo v vse vdolbinice smo nanесли zmesi fluorescenčno označenih fagov in naraščajoče koncentracije rhEPO. Opazovali smo sposobnost izpodrivanja fagov iz EpoR1 z dodatkom različnih koncentracij rhEPO.

Ko ni prisotnosti EPO, so na imobiliziran EpoR1 vezani fluorescenčno označeni bakteriofagi, kar zaznamo preko relativno močne fluorescence v ustreznih vdolbinicah. Dodani EPO pa kompetitivno izpodrine fluorescenčno označene fage z imobiliziranega EpoR1 in intenziteta fluorescence v teh vdolbinicah se posledično zmanjša.



Graf 3: Izpodrivanje fagov M13-EMP1, vezanih na imobiliziran EpoR1, z rhEPO. Izrisani intervali napak predstavljajo standardne odklone 3 paralelnih poskusov.

Iz grafov je razvidno, da se z večanjem koncentracije rhEPO, niža tudi intenziteta fluorescence. Kjer je večja koncentracija rhEPO, je prisotnih manj vezanih bakteriofagov, saj je rhEPO izpodrnil vezane bakteriofage, označene s fluoresceinom. Test bi bilo smiselno optimirati tako, da bi bili standardni odkloni manjši.

RAZPRAVA

Eritropoetin je glikoprotein velikosti 34 kDa, ki spodbuja nastajanje rdečih krvnih celic (22). Njihov nastanek aktivira preko vezave na membranski eritropoetinski receptor (EpoR), ki spada v skupino citokinskih receptorjev tipa-1. Ta receptor je transmembranski protein, ki se nahaja na odzivnih celicah, in se aktivira s pomočjo dimerizacije dveh monomerov EpoR. Pri aktivaciji EpoR z EPO vezava ene same molekule EPO povzroči homodimerizacijo dveh monomerov receptorja (23, 24).

Tudi peptidni mimetiki so sposobni spodbujati eritropoezo na podoben način kot EPO. Eden takih peptidnih agonistov je tudi EMP1, ki se je tako kot EPO, sposoben vezati in aktivirati (tj. povzročiti dimerizacijo) eritropoetinski receptor (22). Odkrili so ga s pomočjo afinitetnih selekcij iz peptidnih bakteriofagno predstavitvenih knjižnic (25).

Kljub vezavi na isti receptor, aminokislinsko zaporedje EMP1 ni sorodno s primarnim zaporedjem EPO, njegova molekulska masa pa je precej manjša, kot je masa naravnega liganda, saj je EMP1 velik le približno 2 kDa (22).

V diplomski nalogi smo zapis za peptid EMP1 vstavili v bakteriofagni vektor M13KBE med restrikcijski mesti *BspEI* in *EagI* ter uspešnost vstavitve potrdili z določitvijo nukleotidnega zaporedja. Nato smo s pomočjo testa ELISA preverili in potrdili vezavo fagnega klona M13-EMP1 na EpoR1.

Opazovali smo tudi specifičnost vezave z večanjem koncentracije bakteriofagov s testom ELISA in ugotovili, da odzivi z večanjem koncentracije bakteriofagov naraščajo v skladu s pričakovanji, v primeru EpoR1 kot tarče. Že pri najmanjši redčitvi je bil signal relativno visok, iz česar lahko sklepamo, da je vezava močna in specifična.

Afiniteta mimetičnih peptidov na EpoR ni tako visoka v primerjavi z afiniteto EPO (23). Medtem ko znaša EPO do EpoR K_d okoli 1 nM, znaša K_d EMP1 med 100-200 nM (26).

Afiniteta mimetičnih peptidov bi morala biti takšna, da bi fiziološke koncentracije EPO bile v linearnem območju izpodrivanja fagov.

Manjšo moč vezave EMP1 smo lahko preverili tako, da smo jih označili s fluoresceinom in s testom FLISA spremljali njihovo sposobnosti tekmovanja z EPO za vezavo na EpoR. Pri tem smo v vdolbinice mikrotitrne plošče vezali EpoR1 ali BSA in nanесли zmesi fluorescenčno označenih fagov ter naraščajoče koncentracije rhEPO. Ugotovili smo, da se v odsotnosti EPO na imobiliziran EpoR1 vežejo fluorescenčno označeni fagi. Ko pa

dodamo rekombinantni eritropoetin, je ta sposoben izpodriniti bakteriofage, vezane na eritropoetinski receptor.

Iz tega lahko sklepamo, da bi tako fluorescenčno označene bakteriofage lahko uporabili kot fluorescenčne detekcijske sonde v testih FLISA za odkrivanje zlorab agonistov EpoR v bioloških vzorcih. S tem bi preverili prisotnost več skupin substanc s podobnim delovanjem, torej tudi takšnih, katerih kemijska struktura še ni znana.

V praksi bi uporaba takega sistema izgledala tako, da bi imeli ploščico, na katero bi bili vezani EpoR1 in fluorescenčno označeni fagi. Na to ploščico bi nato kapnili kapljico krvi testirane osebe, počakali določen čas, ploščico sprali in pomerili fluorescenco na napravi.

EpoR je član družine citokinskih receptorjev, ki vključuje tudi receptorje za GH. Zanje je značilno, da imajo zunajcelično domeno za vezavo liganda in znotrajcelično signalno domeno, ki interagira z ostalimi proteini signalne kaskade (24). Torej bi bilo možno tak koncept izpodrivanja mimetičnih peptidov prenesti tudi na druge receptorje, ki so priljubljene tarče delovanja pri dopingu (npr. GH).

Za razvoj takega testa so potrebne še določene izboljšave in rešitve pomanjkljivosti. Problem predstavljajo precej velika sipanja (standardni odkloni), poleg tega bo test potrebno narediti bolj robusten. Problem bi lahko rešili tako, da bi zagotovili večjo gostoto adsorpcije EpoR1 ali boljši izkoristek označevanja fagov s fluoresceinom.

SKLEP

Namen diplomske naloge je bil, da bi pripravili bakteriofage, ki bi lahko bili uporabni kot fluorescenčne detekcijske sonde v presejalnih fluorescenčno-imunskih testih za odkrivanje prisotnosti še nepoznanih ligandov eritropoetinskega receptorja v bioloških vzorcih.

Pri tem smo želeli pridobiti bakteriofagni vektor z izraženim peptidom EMP1, ki se veže na eritropoetinski receptor. To smo storili tako, da smo v prirejen vektor M13KE vstavili genski zapis za peptid EMP1, ki se je nato izrazil na površini rekombinantnega bakteriofaga v obliki fuzijskega proteina s fagnim kapsidnim proteinom p3. Vezavo tako pripravljenih rekombinantnih bakteriofagov na eritropoetinski receptor smo preverili s pomočjo encimsko-imunskega testa (ELISA), nato pa smo jih označili s fluoresceinom in s pomočjo testa FLISA preverili njihovo sposobnost tekmovanja z rekombinantnim eritropoetinom za vezavo na eritropoetinski receptor.

Z ustreznim načrtovanjem začetnih oligonukleotidov smo v prilagojenem postopku uspešno vstavili zapis za EMP1 v bakteriofagni genom po metodi sestavljanja po Gibsonu.

Bakteriofagi, ki v svojem genomu nosijo zapis za peptid EMP1, le-tega tudi uspešno izrazijo na površini, kar zaznamo preko njihove močne in specifične vezave na eritropoetinski receptor.

Rekombinantni eritropoetin je sposoben izpodriniti bakteriofage, vezane na imobiliziran eritropoetinski receptor, kar smo zaznali s prilagojenim kompetitivnim testom FLISA. Takšne fluorescenčno označene bakteriofage bi lahko uporabili kot fluorescenčne detekcijske sonde v testih FLISA za presejalno preverjanje zlorabe agonistov eritropoetinskega receptorja.

LITERATURA

1. Bratkovič T, Preželj A: Zdravljenje bakterijskih okužb z bakteriofagi. Farmacevtski vestnik 2008; 59: 129-34.
2. Hanlon GW: Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections. Int J Antimicrob Agents 2007; 30 (2): 118-28.
3. Duckworth DH, Gulig PA: Bacteriophages: potential treatment for bacterial infections. BioDrugs. 2002; 16 (1): 57-62.
4. Brown TA. Gene Cloning And Dna Analysis: An Introduction, 6th edition. Blackwell Publishing. Manchester, 2012: 22-220.
5. Onodera K: Molecular Biology and Biotechnology of Bacteriophage. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2010; 119: 17-43.
6. Siegel DL: Diagnostic and Therapeutic Applications of Phage Display Technology. Transfusion. 2015; 56-93.
7. Hamzeh-Mivehroud M, Alizadeh AA, Morris MB, Church WB, Dastmalchi S: Phage display as a technology delivering on the promise of peptide drug discovery. Drug Discov Today. 2013; 18 (23-24): 1144-1157.
8. Nemudraya AA, Richter VA, Kuligina EV: Phage Peptide Libraries As a Source of Targeted Ligands. Acta Naturae. 2016; 8 (1): 48–57.
9. Bird SR, Goebel C, Burke LM, Greaves RF: Doping in sport and exercise: anabolic, ergogenic, health and clinical issues. Ann Clin Biochem. 2016; 53: 196-221.
10. World Anti-Doping Agency, dostopno na naslovu URL: <https://www.wada-ama.org/>, dostopano dne 5.8.2016
11. Lippi G, Franchin M, Guidi CG: Doping in competition or doping in sport?. Br Med Bull. 2008; 86 (1): 95-107.
12. Slovenska antidoping organizacija, dostopno na naslovu URL: <http://www.sloado.si/>, dostopano dne 5.8.2016
13. Slovenska antidoping organizacija: Lista prepovedanih snovi in postopkov, dostopno na naslovu URL: <http://www.sloado.si/kategorija/lista-2016-lista>, dostopano dne 5.8.2016
14. Duntas LH, Popovic V: Hormones as doping in sports. Endocrine. 2013; 43 (2): 303–13.

15. Birzniece V: Doping in sport: effects, harm and misconceptions. *Intern Med J.* 2015; 45 (3): 239-48.
16. Štrukelj B, Kos J: Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. Prva izdaja. Slovensko farmacevtsko društvo. Ljubljana, 2007: 284-307.
17. Delanghe JR, Maenhout TM, Speeckaert MM, De Buyzere ML: Detecting doping use: more than an analytical problem. *Acta Clin Belg.* 2014; 69 (1): 25-9.
18. Rozman P, Bratkovič T, Molek P: Načrtovanje in priprava bakteriofagnega vektorja za dvojno predstavitev s sesalsko ekspresijsko kaseto. 2016
19. M13KE Phage, NEW ENGLAND BioLabs, dostopno na naslovu URL: <https://www.neb.com/products/n0316-m13ke-phage>, dostopano dne 5.8.2016
20. Gibson Assembly® Master Mix, NEW ENGLAND BioLabs, dostopno na naslovu URL: <https://www.neb.com/products/e2611-gibson-assembly-master-mix#pd-description>, dostopano dne 5.8.2016
21. Phage-Display Vectors and Libraries Based on Filamentous Phage Strain fd-tet, dostopno na naslovu URL: [http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsite Index.html](http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsite%20Index.html), dostopano dne 5.8.2016
22. Johnson DL, Farrell FX, Barbone FP, McMahon FJ, Tullai J, Hoey K, Livnah O, Wrighton NC, Middleton SA, Loughney DA, et al.: Identification of a 13 amino acid peptide mimetic of erythropoietin and description of amino acids critical for the mimetic activity of EMP1. *Biochemistry.* 1998; 37, 3699–3710.
23. Johnson DL, Farrell FX, Barbone FP, McMahon FJ, Tullai J, Kroon D, Freedy J, Zivin RA, Mulcahy LS, Jolliffe LK: Amino-terminal dimerization of an erythropoietin mimetic peptide results in increased erythropoietic activity. *Chem Biol.* 1997; 4 (12): 939–950.
24. Johnson DL, Jolliffe LK: Erythropoietin mimetic peptides and the future. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15 (9): 1274-7.
25. Wrighton NC, Farrell FX, Chang R, Kashyap AK, Barbone FP, Mulcahy LS, Johnson DL, Barrett RW, Jolliffe LK, Dower WJ: Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science.* 1996. 26; 273 (5274): 458-64.
26. Bradshaw RA, Dennis EA: Handbook of Cell Signaling, Three-Volume Set. Prva izdaja. Academic Press. California, 2003: 252.

27. M13KE map, NEW ENGLAND BioLabs, dostopno na naslovu URL:

https://www.neb.com/~media/NebUs/Page%20Images/Tools%20and%20Resources/Interactive%20Tools/DNA%20Sequences%20and%20Maps/M13KE_map.pdf,

dostopano dne 5.8.2016

PRILOGE

Priloga 1

Območje z več mesti za kloniranje bakteriofagnega vektorja M13KE. Z rdečo je označeno restrikcijsko mesto *BspEI*, ki je bilo vstavljeno med restrikcijski mesti *KpnI* in *EagI* bakteriofagnega vektorja M13KE.

BsrGI

GGTC**TGTACA**ACCGTTCATCTGTCCTCTTTCAAAGTTGGTCAGTTCGGTTCCTTA
TGATTGACCGTCTGCGCCTCGTTCGCGCTAAGTAACATGGAGCAGGTGCGGA
TTTCGACACAATTTATCAGGCGATGATACAAATCTCCGTTGTACTTTGTTTCGC
GCTTGGTATAATCGCTGGGGGTCAAAGATGAGTGTTTTAGTGTATTCTTTTGCC
TCTTCGTTTTAGGTTGGTGCCTTCGTAGTGGCATTACGTATTTTACCCGTTTAA
TGAAACTTCCTCATGAAAAAGTCTTTAGTCCTCAAAGCCTCTGTAGCCGTTGC
TACCCTCGTTCCGATGCTGTCTTTCGCTGCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAAGC
GGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGGG
CGATGGTTGTTGTCATTGTGCGCGCAACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAGAAAT
TCACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATTAAAGGCTCCTTTTGGAGC
CTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTGCAATTCCTTTAGT

KpnI

BspEI

GGTACCTTTCTATTCTCAC**TCCGGA**TGTGGGATTAAGTCGCTTGAGATGTGCGG
CG

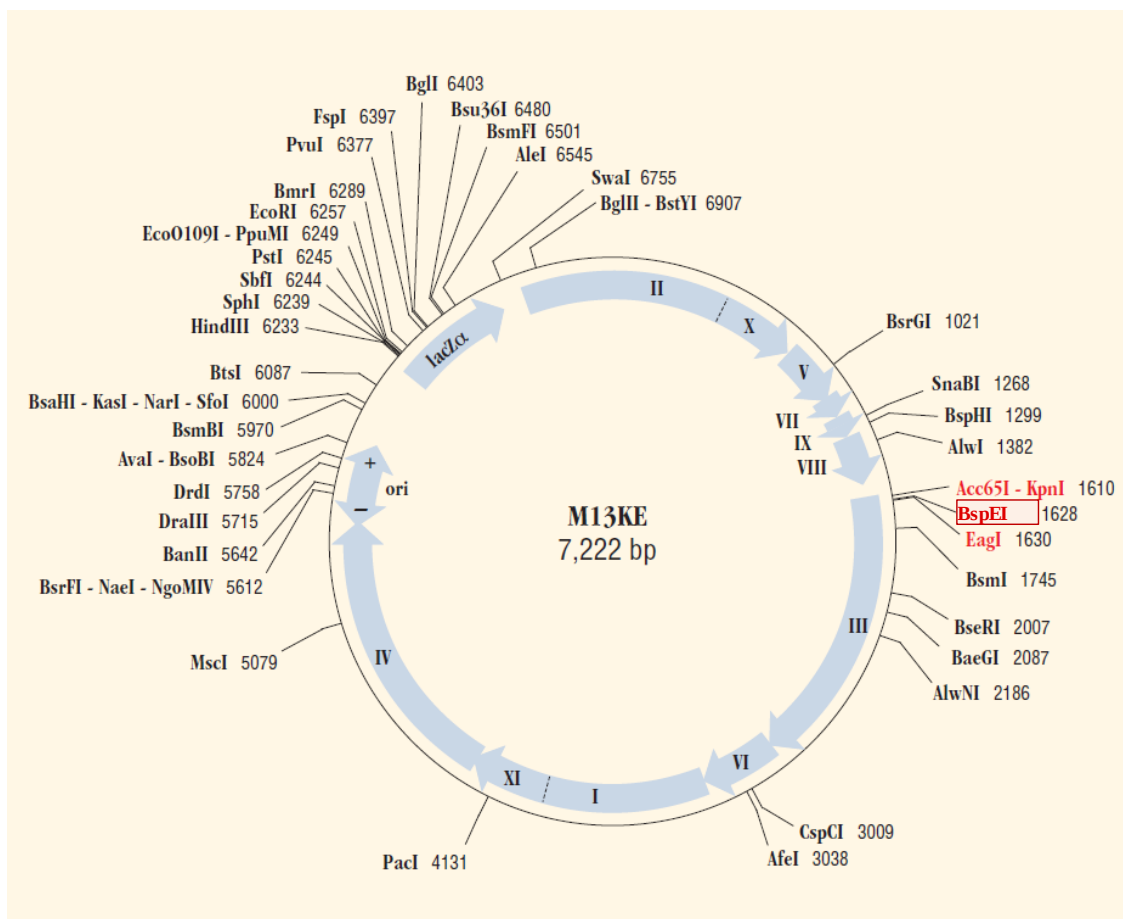
EagI

GTGGCT**CGGCCG**AAACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAATCCCATACAGAAAATTCA
TTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACCTTTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGG
CTGTC
TGTGGAATGCTACAGGCGTTGTAGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTTAC
GGTACATGGGTTCCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCT
GAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTACTAAACCTCC
TGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGG
CACTTATCCGCCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGA
GGAGTCTCAGCCTCTTAATACTTTTCATGTTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAG

BaeGI

GCAGGGGGGCATTAAGTGTGTTATACGGGCACGTGTT

Priloga 2: Genska karta bakteriofaga M13KBE in njegovo nukleotidno zaporedje



Slika 5: Prikaz restrikcijskih mest BspEI in EagI za vstavev liganda EMP1 Prirejeno po (27)

Vektorska karta vektorja M13KBE, ki vsebuje območja z več mesti za kloniranje. V (rdečem) pravokotniku je označeno restrikcijsko mesto BspEI, ki je bilo vstavljeno med restrikcijski mesti KpnI in EagI bakteriofagnega vektorja M13KE (zaporedje z omenjenimi restrikcijskimi mesti je predstavljeno spodaj).

AATGCTACTACTATTAGTAGAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGCGCCCCAAATGAAAATATAGCTAAACAGG
TTATTGACCATTTGCGAAATGTATCTAATGGTCAAATACTACTCGTTCGCAGAATTGGGAATCAACTGT
TATATGGAATGAAACTTCCAGACACCGTACTTTAGTTGCATATTTAAAACATGTTGAGCTACAGCATTATATT
CAGCAATTAAGCTCTAAGCCATCCGCAAAAAATGACCTCTTATCAAAAGGAGCAATTAAAGGTACTCTCTAATC
CTGACCTGTTGGAGTTTGCTTCCGGTCTGGTTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAAAACGCGATATTTGAAGTCTTT
CGGGCTTCCTCTTAATCTTTTGTATGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGTCAGGGTAAAGACCTGATT
TTTGATTTATGGTCATTCTCGTTTTCTGAACTGTTTAAAGCATTTGAGGGGGATTCAATGAATATTTATGACG
ATTCCGCAGTATTGGACGCTATCCAGTCTAAACATTTTACTATTACCCCCTCTGGCAAACTTCTTTTGCAAA

AGCCTCTCGCTATTTTGGTTTTTATCGTCGTCTGGTAAACGAGGGTTATGATAGTGTGCTCTTACTATGCCT
 CGTAATTCCTTTTGGCGTTATGTATCTGCATTAGTTGAATGTGGTATTCCTAAATCTCAACTGATGAATCTTT
 CTACCTGTAATAATGTTGTTCCGTTAGTTTCGTTTTATTAAACGTAGATTTTTCTTCCCAACGTCCTGACTGGTA
 TAATGAGCCAGTTCTTAAAAATCGCATAAGGTAATTCACAATGATTAAAGTTGAAATTAACCATCTCAAGCCC
 AATTTACTACTCGTTCTGGTGTCTCGTCAGGGCAAGCCTTATTCACTGAATGAGCAGCTTTGTTACGTTGA
 TTTGGGTAATGAATATCCGGTCTTGTCAAGATTACTCTTGATGAAGGTCAGCCAGCCTATGCGCCTGGTCTG
 TACACCGTTCATCTGTCTCTTTCAAAGTTGGTCAGTTCGGTTCCTTATGATTGACCGTCTGCGCCTCGTTC
 CGGCTAAGTAACATGGAGCAGGTCGCGGATTTTCGACACAATTTATCAGGCGATGATACAAATCTCCGTTGTAC
 TTTGTTTCGCGCTTGGTATAATCGCTGGGGGTCAAAGATGAGTGTTTTAGTGTATTCTTTTGCCCTCTTTCGTT
 TTAGGTTGGTGCCTTCGTAGTGGCATTACGTATTTTACCCGTTTAAATGGAACCTTCCTCATGAAAAAGTCTTT
 AGTCCTCAAAGCCTCTGTAGCCGTTGCTACCCTCGTTCCGATGCTGTCTTTCGCTGCTGAGGGTGACGATCCC
 GCAAAAGCGGCCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTG
 TCATTGTCGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGATAC
 AATTAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTGG

KpnI

BspEI

AGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTTCGCAATTCCTTTAGTGGTACCTTTCTATTCTCACTCCGGATGTGG
 GA

EagI

TTAAGTCGCTTGAGATGTGCGGCGGTGGCTCGGCCGAAACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAATCCCATACAGA
 AAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACTTTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGGCTGTCTGTGG
 AATGCTACAGGCGTTGTAGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTTACGGTACATGGGTTTCTATTGGGCTTG
 CTATCCCTGAAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTAC
 TAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACCTTATATCAACCTCTCGACGGCACCTATCCG
 CCTGGTACTGAGCAAAACCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTTTTCATGT
 TTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGGGCATTAACCTGTTTATACGGGCACTGTTACTCAAGGCACCTGA
 CCCCCTTAAAACTTATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAAA
 TTCAGAGACTGCGCTTTCATTCTGGCTTTAATGAGGATTTATTTGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTG
 ACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGG
 CTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGAT
 TTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGT
 CTGACGCTAAAGGCAAACTTGATTCTGTCTGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGT
 TTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGATTTTGTCTGGCTCTAATTCCTCAATGGCTCAAGTCGGT
 GACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTC
 GCCCTTTTGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACCTTATTCGGTGG
 TGTCTTTGCGTTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTATGTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATACTGCGTAAT
 AAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCTTTTGGGTATTCCGTTATTATTGCGTTTCCTCGGTTTCCTTCTGGTAAC
 TTTGTTTCGGCTATCTGCTTACTTTTCTTAAAAAGGGCTTCGGTAAGATAGCTATTGCTATTTTATTGTTTCTT
 GCTCTTATTATTGGGCTTAACTCAATTCTTGTGGGTTATCTCTCTGATATTAGCGCTCAATTACCCTCTGACT
 TTGTTTCAGGGTGTTCAAGTTAATCTCCCGTCTAATGCGCTTCCCTGTTTTTATGTTATTCTCTCTGTAAAGGC
 TGCTATTTTTCATTTTTTGACGTTAAACAAAAATTCGTTTCTTATTTGGATTGGGATAAATAATATGGCTGTTTA
 TTTTGTAACCTGGCAAAATTAGGCTCTGGAAGACGCTCGTTAGCGTTGGTAAGATTACAGGATAAAATTGTAGCT
 GGGTGCAAAATAGCAACTAATCTTGATTTAAGGCTTCAAAACCTCCCGCAAGTCGGGAGGTTTCGCTAAAACGC
 CTCGCGTTCCTAGAAATACCGGATAAGCCTTCTATATCTGATTTGCTTGCTATTGGGCGCGGTAATGATTCCTA
 CGATGAAAATAAAAAACGGCTTGCTTGTCTCGATGAGTGCGGTACTTGGTTTAATACCCGTTCTTGGAATGAT
 AAGGAAAGACAGCCGATTATTGATTGGTTTCTACATGCTCGTAAATTAGGATGGGATATTATTTTTCTTGTTC
 AGGACTTATCTATTGTTGATAAACAGGCGCGTTCTGCATTAGCTGAACATGTTGTTTTATTGTCGTCGTCGGA
 CAGAATTACTTTACCTTTTGTGCGTACTTTATATTCTCTTATTACTGGCTCGAAAATGCCTCTGCCTAAATTA
 CATGTTGGCGTTGTAAATATGGCGATTCTCAATTAAGCCCTACTGTTGAGCGTTGGCTTTTACTGTTAAGA
 ATTTGTATAACGCATATGATACTAAACAGGCTTTTTCTAGTAATTATGATTCGGGTGTTTATTCTTATTTAAC
 GCCTTATTTATCACACGGTCGGTATTTCAAACCATTAATTTAGGTCAGAAGATGAAATTAACATAAATATAT
 TTGAAAAAGTTTTCTCGCGTTCTTTGTCTTGCGATTGGATTTGCATCAGCATTTACATATAGTTATATAACCC
 AACCTAAGCCGGAGGTTAAAAAGGTAGTCTCTCAGACCTATGATTTTGATAAATTCACTATTGACTCTTCTCA

GCGTCTTAATCTAAGCTATCGCTATGTTTTCAAGGATTCTAAGGGAAAATTAATTAATAGCGACGATTTACAG
AAGCAAGGTTATTCACTCACATATATTGATTTATGTACTGTTTCCATTAAAAAAGGTAATTCAAATGAAATTG
TTAAATGTAATTAATTTTGTCTTGTATGTTTGTTCATCATCTTCTTTTGCTCAGGTAATTGAAATGAATA
ATTGCGCTCTGCGCGATTTTGTAACTTGGTATTCAAAGCAATCAGGCGAATCCGTTATTGTTTCTCCCGATGT
AAAAGGTAAGTGTACTGTATATTCACTGACGTTAAACCTGAAAATCTACGCAATTTCTTTATTTCTGTTTTA
CGTGCAAATAATTTTGATATGGTAGGTTCTAACCCTTCCATTATTTCAGAAGTATAATCCAAACAATCAGGATT
ATATTGATGAATTGCCATCATCTGATAATCAGGAATATGATGATAATTCCGCTCCTTCTGGTGGTTTCTTTGT
TCCGCAAAATGATAATGTTACTCAAACCTTTAAAAATTAATAACGTTCCGGGCAAAGGATTTAATACGAGTTGTC
GAATTGTTTGTAAGTCTAATACTTCTAAATCCTCAAATGTATTATCTATTGACGGCTCTAATCTATTAGTTG
TTAGTGCTCCTAAAGATATTTTAGATAACCTTCTCAATTCCTTTCAACTGTTGATTTGCCAACTGACCAGAT
ATTGATTGAGGGTTTGATATTTGAGGTTTCAGCAAGGTGATGCTTTAGATTTTTTCATTTGCTGCTGGCTCTCAG
CGTGGCACTGTTGCAGGCGGTGTTAATACTGACCGCTCACCTCTGTTTTATCTTCTGCTGGTGGTTCTGTTCTG
GTATTTTTAATGGCGATGTTTTAGGGCTATCAGTTCGCGCATTAAGACTAATAGCCATTCAAAAATATTGTC
TGTGCCACGTATTCTTACGCTTTCAGGTCAGAAGGGTCTATCTCTGTTGGCCAGAATGTTCTTTTATTACT
GGTCGTGTGACTGGTGAATCTGCCAATGTAAATAATCCATTTTCAGACGATTGAGCGTCAAAATGTAGGTATTT
CCATGAGCGTTTTTCTGTTGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTTCTGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTT
GAGTTCCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTACTAATCAAAGAAGTATTGCTACAACGGTTAATTTGCGTGAT
GGACAGACTCTTTTACTCGGTGGCCTCACTGATTATAAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCTCTGT
CTAAAATCCCTTTAATCGGCCTCTGTTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCACGTTATACGTGCT
CGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGT
GACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCCGCC
GGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACC
CCAAAAAATTTGATTTGGGTGATGGTTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGAC
GTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCATCTCGGGCTAT
TCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGAACCACCATCAAACAGGATTTTCGCCTGCTGGGGCAAAC
CAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTG
GTGAAAAGAAAAACCACCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGC
AGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTC
ATTAGGCACCCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATT
TCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCCTCGAATTCAGTGGCCGT
CGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACAGCACATCCCCCTTTC
GCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAAT
GGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCATCTTCTGAGGCCGA
TACTGTCTGCTGCCCTCAAACCTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCC
ATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCACCGGAGAAATCCGACGGGTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATG
AAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATT
TAACAAAAATTTAATGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTTATACAATCTTCC
TGTTTTTGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATTACCGTTCAT
CGATTCTCTTGTGTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGATCTCTCAAAAATAGCTACC
CTCTCCGGCATTAATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTTT
CTCACCCCTTTTGAATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAAATATATGAGGGTCTAAAAATTT
TTATCCTTTCGCTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTTTTGGTACAACCGAT
TTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATTCCTTTCGCTTGCCTGTATGATTTATTGGATG
TT