UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA KUNŠEK

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA KUNŠEK

IZOLACIJA ENDOSOMOV IZ CELIC S POLIETILENIMINOM PREVLEČENIMI MAGNETNIMI NANODELCI

THE ISOLATION OF CELL'S ENDOSOMES WITH POLYETHYLENEIMINE COATED MAGNETIC NANOPARTICLES

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Kemijskem inštitutu, na Odseku za sitezno biologijo in imunologijo pod mentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka in somentorstvom dr. Jelke Pohar.

ZAHVALA

Na prvem mestu se moram zahvaliti izr. prof. dr. Mojci Benčina, ki mi je odprla vrata v svet laboratorijskega dela in s tem tudi moji karierni poti. Ves čas študija mi je bila kot mentorica in navdih za delo ter študij, za kar se ji iskreno zahvaljujem.

Druga najpomembnejša oseba na moji poti pa je dr. Jelka Pohar, ki je tudi somentorica magistrske naloge. Z njeno pomočjo sem spoznala ogromno novih metod, se naučila delati v laboratoriju (ob tem tudi uživati) in začela svojo samostojno pot.

Mentorju se zahvaljujem za sprejem mentorstva in natančen pregled magistrske naloge.

Pri zahvali ne smem pozabiti na starša ter brata Luko in Matica, ki so me ves čas študija podpirali in včasih nevede preverjali moje znanje z zanimivimi vprašanji.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka in somentorstvom dr. Jelke Pohar.

KAZALO

KAZAI	LO SI	LIKI
KAZAI	LO PI	REGLEDNIC III
POVZE	ЕТЕК	
ABSTR	RACT	٠ v
SEZNA	MO	KRAJŠAVVI
1UV	OD .	
1.1	Enc	locitoza1
1.2	Enc	losomi2
1.2	.1	Razvrščanje endosomov
1.2	.2	Raziskovanje endosomov
1.3	Me	tode za izolacijo endosomov4
1.3	.1	Izolacija s pomočjo magnetno označenih protiteles4
1.3	.2	Izolacija s pomočjo lateksnih kroglic5
1.3	.3	Ultracentrifugiranje
1.4	Imu	nski odziv endosomskih TLR8
1.4	.1	TLR9
1.5	Dec	oksiribonukleaze (DNAze)11
1.6	S p	olietileniminom prevlečeni magnetni nanodelci12
2NA	MEN	N DELA
3MA	ATER	IALI IN METODE 14
3.1	Ma	teriali14
3.1	.1	Kemikalije
3.1	.2	Protitelesa
3.1	.3	Laboratorijska oprema in potrošni material15
3.1	.4	Programska oprema

3	.1.5	Raztopine in pufri	17
3	.1.6	Celične kulture	18
3.2	Met	tode	19
3	.2.1	Poliakrilamidna gelska DNA elektroforeza	19
3	.2.2	Verižna reakcija s polimerazo	20
3	.2.3	Agarozna gelska elektroforeza	21
3	.2.4	Test BCA	21
3	.2.5	Priprava 10 % poliakrilamidnega gela z NaDS	22
3	.2.6	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodacilsul	lfata
(]	NaDS -	- PAGE)	23
3	.2.7	Prenos western in detekcija proteinov	23
3	.2.8	Izolacija endosomov z magnetnimi nanodelci	24
3	.2.9	Izolacija endosomov z ultracentrifugiranjem	26
3	.2.10	Transfekcija in konfokalna mikroskopija	28
4E	KSPEI	RIMENTALNO DELO	29
4.1	Opt	imizacija poliakrilamidne DNA elektroforeze	29
4	.1.1	Detekcija kratkih oligonukleotidov	29
4	.1.2	Označevanje DNA s fluoroforom in detekcija fluorescentno označe	enih
k	ratkih (oligonukleotidov	30
4.2	Opt	imizacija izolacije endosomov z magnetnimi nanodelci	30
4.3	Zaz	navanje označenih oligonukleotidov v endosomih	31
4.4	Prir	nerjava izolacije z ultracentrifugiranjem in magnetnimi nanodelci	31
4.5	Dol	očitev znotrajcelične lokacije s konfokalno mikroskopijo	32
5R	EZUĽ	ТАТІ	33
5.1	Opt	imizacija poliakrilamidne DNA elektroforeze	33
5	.1.1	Detekcija kratkih oligonukleotidov	33

5.1.2 Označevanje DNA s fluoroforom in detekcija fluorescentno označenih
kratkih oligonukleotidov
5.2 Optimizacija izolacije endosomov z magnetnimi nanodelci
5.3 Zaznavanje označenih oligonukleotidov v endosomih
5.4 Primerjava rezultatov izolacije z ultracentrifugiranjem in magnetnimi nanodelci42
5.5 Določitev znotrajcelične lokacije s konfokalno mikroskopijo
6RAZPRAVA
6.1 Optimizacija DNA elektroforeze
6.1.1 Detekcija kratkih oligonukleotidov
6.1.2 Označevanje DNA s fluoroforom in detekcija fluorescentno označenih
kratkih oligonukleotidov
6.2 Izolacija endosomov
6.3 Zaznavanje označenih oligonukleotidov v endosomih
6.4 Primerjava rezultatov izolacije z ultracentrifugiranjem in magnetnimi nanodelci52
6.5 Določitev znotrajcelične lokacije s konfokalno mikroskopijo
7 SKLEP
8VIRI

KAZALO SLIK

Slika	1: Shematski prikaz različnih vrst endocitoz 1
Slika	2: Shematski prikaz potovanja endosomov
Slika	3: Shematski prikaz izolacije endosomov s pomočjo magnetno označenih protiteles. 5
Slika	4: Shematski prikaz izolacije endosomov s pomočjo lateksnih kroglic
Slika	5: Shematski prikaz razporeditve organelov pri ultracentrifugiranju7
Slika	6: Shematski prikaz strukture TLR
Slika	7: Shematski prikaz imunskih poti po aktivaciji endosomskih TLR10
Slika	8: Shematski prikaz uporabljenih temperatur in časov verižne reakcije s polimerazo20
Slika	9: Shematski prikaz izolacije endosomov s pomočjo z polietileniminom prevlečenimi nanodelci
Slika	10: DNA na 15 % poliakrilamidnem gelu po 30-minutni elektroforezi pri 200 V. Gel
	barvan 30 minut z 0,02 % metilenskim barvilom
Slika	11: DNA na 15 % poliakrilamidnem gelu po 10-minutni elektroforezi pri 200 V. Gel barvan 30 minut z 0,02 % metilenskim barvilom
Slika	12: DNA na 15 % poliakrilamidnem gelu po 15-minutni elektroforezi pri 150 V. Gel barvan 30 minut z 1-kratnim SYBR Gold v TBE pufru
Slika	13: DNA na 20 % poliakrilamidnem gelu po 30-minutni elektroforezi pri 150 V. Gel barvan 20 min z 10-kratnim SYBR Gold v TBE pufru
Slika	14: Produkti reakcije PCR, označeni s fluoroforom FITC, pripravljeni v različnih razmerjih dUTP - FITC : neoznačenim dNTP (1:5, 1:10, 1:20)
Slika	15: Produkti reakcije PCR po čiščenju na 20% poliakrilamidnem gelu (30 minut, 150V), zaznan s sistemom IVIS Lumina
Slika	16: Detekcija kratkih fluorescentno označenih oligonukleotidov na 20 % poliakrilamidnem gelu po 30-minutni elektroforezi pri 150 V
Slika	17: Celice HEK293 v gojišču z in brez magnetnih nanodelcev
Slika	18: Celice HEK293 po homogenizaciji z 22 G iglo (40× povečava)

Slika	19: Frakcije po izolaciji z magnetnimi nanodelci na 20 % poliakrilamidnem gelu z ureo (30 min, 150 V)
Slika	20: Frakcije, izolirane z magnetnimi nanodelci na 20 % poliakrilamidnem gelu (30 min, 150 V)
Slika	21: Razgradnja DNA v različnih frakcijah izolacije na 20 % poliakrilamidnem gelu (30 min, 150 V)
Slika	22: Izolacija endosomov iz celic po inkubaciji s fluorescentno označeno DNA-Cy5 oz. DNA-FITC
Slika	23: Detekcija proteinov v različnih frakcijah po izolaciji z magnetnimi nanodelci iz makrofagov42
Slika	24: Primerjava posameznih frakcij po izolaciji z magnetnimi nanodelci na celicah HEK293 in RAW264.743
Slika	25: Detekcija proteinov v različnih frakcijah po izolaciji z ultracentrifugiranjem44
Slika	26: Lokacija magnetnih nanodelcev v celicah45

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primerjava metod za izolacijo endosomov iz celic
Preglednica 2: Kratek pregled vrst deoksiribonukleaz 11
Preglednica 3: Priprava 15 % in 20 % poliakrilamidnega gela z ureo za DNA elektroforezo
Preglednica 4: Sestavine 10 % poliakrilamidnega gela z NaDS 22
Preglednica 5: Pričakovana vsebina posameznih frakcij izolacije endosomov s pomočjo s polietileniminom prevlečenih magnetnih nanodelcev
Preglednica 6: Predvidena lokacija celičnih organelov po ultracentrifugiranju
Preglednica 7: Ekscitacijske in emisijske valovne dolžine uporabljenih barvil
Preglednica 8: Ekscitacijski in emisijski valovni dolžini barvil FITC in Cy5
Preglednica 9: Lokacija proteinov, značilnih za posamezne znotrajcelične organele 31
Preglednica 10: Pregled pogojev elektroforeze in barvanja in njihovega vpliva na zaznavo kratkih oligonukleotidov DNA na gelu

POVZETEK

Endosomi so celični organeli, katerih glavna naloga je transport spojin po celici. Zaradi njihove pomembne vloge pri homeostazi celic so tema mnogih raziskav, pri čemer je najpomembnejša ustrezna metoda za njihovo izolacijo. Poznamo več izolacijskih metod, vendar so vse drage in zahtevajo posebno opremo, npr. ultracentrifugo. V endosomih se nahajajo tudi tollu podobni receptorji (TLR), ki so pomemben del imunskega odziva celice. Vezava DNA na receptor TLR poteka samo v kislih endosomih. Dolge DNA verige in dvoverižni segmenti se s pomočjo DNAz, ki prav tako potrebujejo kislo okolje, v endosomih razgradijo na manjše.

Tekom magistrske naloge smo optimizirali detekcijo kratkih (manj kot 10 nukleotidov dolgih) oligonukleotidov, fluorescentno označili DNA z verižno reakcijo s polimerazo ter detektirati najmanjšo množino fluorescentno označene DNA znotraj endosomov. Prav tako smo vzpostavili (optimizirali) metodo izolacije endosomov s polietileniminom prevlečenimi nanodelci, detektirali fragmente razgrajene DNA v endosomih in primerjali metodo izolacije endosomov s polietileniminom prevlečenimi nanodelci z metodo izolacije z ultracentrifugiranjem. Preverili smo tudi, če se s polietileniminom prevlečenimi nanodelci nahajajo v endosomih.

Za optimizacijo detekcije kratkih oligonukleotidov smo uporabili poliakriladmidno gelsko elektroforezo z ureo in gel barvali z barvilom SYBR Gold. Specifičnost izolacije endosomov smo preverili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo z dodatkom natrijevega dodecilsulfata in prenosom western. Lokacijo s polietileniminom prevlečenih nanodelcev v celicah smo določili s konfokalno mikroskopijo.

Ugotovili smo, da lahko kratke oligonukleotide DNA zaznamo z 20 % poliakrilamidno elektroforezo z ureo, da je meja zaznave fluorescentno označene DNA 0,5 pmol in da se DNA v endosomih razgradi na 300 nt dolge fragmente. Metoda izolacije endosomov s polietileniminom prevlečenimi nanodelci je ustreznejša od metode z ultracentrifugiranjem. Po endocitozi se s polietileniminom prevlečeni nanodelci v resnici nahajajo v endosomih.

KLJUČNE BESEDE: endosomi, metoda, magnetni nanodelci, TLR, oligonukleotid DNA

ABSTRACT

Endosomes are the major transportation organelles in cells and due to their importance for cells' homeostasis are the subjects of many research projects. Methods, used for endosome isolation are usually very expensive and need special equipment, such as an ultracentrifuge. Endosomes contain also Toll-like receptors (TLR), which are an important part of the immune response of the cells. The DNA can bind to TLR only in the acidic environment of the endosomes. DNAses that degrade long and double stranded oligonucleotides, also require acidic pH.

During this master thesis we optimised the detection of small (less than 10 nucleotides long) oligonucleotides, fluorescently labelled DNA with polymerase chain reaction and detected the minimum quantity of fluorescently labelled DNA, created (optimized) a new method for isolation of endosomes with polyethyleneimine coated magnetic nanoparticles, detected DNA degradation fragments in endosomes, compared the endosome isolation method using polyethyleneimine coated magnetic nanoparticles with the ultracentrifugation isolation method. We also checked if polyethyleneimine coated magnetic nanoparticles are present in endosomes.

For the optimisation of small oligonucleotide detection, we used polyacrylamide gel electrophoresis with urea, and stained the gel with SYBR Gold. Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot were used to determine the specificity of endosomes isolation. The location of polyethyleneimine coated magnetic nanoparticles was determined with confocal microscopy.

We concluded that small oligonucleotides DNA can be detected with 20 % polyacrylamide electrophoresis using urea, that the limit of detection of fluorescently labelled DNA is 0,5 pmol, and that endosomes degrade DNA to 300 nt long fragments. The endosome isolation method using polyethyleneimine coated magnetic nanoparticles is more effective than ultracentrifugation. After endocytosis, polyethyleneimine coated magnetic nanoparticles can be really located in endosomes.

KEYWORDS: endosomes, method, magnetic nanoparticles, TLR, DNA oligonucleotide

SEZNAM OKRAJŠAV

ang.	angleško
bp	bazni par
BCA test	test z bicinhonično kislino (ang. bicinchoninic acid test)
BSA	goveji serumski albumin (ang. bovine albumine serum)
CME	od klatrina odvisna endocitoza (ang. clathrine mediated endocitosys)
Cy5	barvilo cianin 5
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
DMEM	Dulbeccov prilagojen Eaglov medij (ang. Dulbecco's modified Eagle's medium)
dNTP	deoksinukleozid trifosfat (ang. deoxynucleotid triphosphate)
dUTP	deoksiuridin trifosfat (ang. deoxyuridine triphosphate)
Е	endosomska frakcija
EEA1	zgodnji endosomski antigen 1 (ang. early endosome antigen 1)
FBS	serum telečjega zarodka (ang. fetal bovine serum)
FITC	barvilo fluorescein izotiocianat (ang. fluorescein isothiocyanate)
FYVE	cinkova domena FYVE (iz prvih črk Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1 in EEA1)
HEPES	etansulfonska kislina
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. high-performance liquid chromatography)
G	mednarodna oznaka premera igle za homogeniziranje
g	gravitacijski pospešek

kbp	kilobazni par (1000 baznih parov)		
LAMP1	z lizosomom povezani membranski glikoprotein 1 (ang. Lysosome- associated membrane glycoprotein 1)		
LRR	regija bogata z levcinom (ang. leucin rich region)		
mA	miliamper		
min	minuta		
MQ	ultračista voda		
MP	magnetni pelet		
MyD88	protein primarnega odziva pri mieloidni diferenciaciji 88 (ang. myeloid differentiation primary response protein 88)		
NaDS	natrijev dodecilsulfat		
NaDS – PAGE	poliakrilamidna gelska eletroforeza v prisotnosti natrijevega dodacilsulfata		
nt	nukleotid		
PBS	fosfatni pufer (ang. phosphate buffered saline)		
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction)		
PNM	nemagnetni pelet		
Rab	rabenozin		
rpm	obrati v minuti (ang. rounds per minute)		
SDH	sukcinat dehidrogenaza (ang. succinate dehydrogenase)		
SNM	nemagnetni supernatant		
SQSTM1	sekvestosom 1 (ang. sequestosome 1)		
TEMED	tetrametiletilendiamin		
TIR	domena, značilna za toll-u in IL-1 receptorje – Toll/IL-1R		

TLR toll-u podoben receptor (ang. toll like receptor)

TRIF/TICAM-1 TIR domena, ki vsebuje adapterski protein za induciranje INF- β (ang. TIRdomain-containing adaptor protein inducing INF- β)

- Tris tris(hidroksimetil)aminometan
- V volt

1 **UVOD**

Endocitoza je proces, preko katerega celica sprejme makromolekule in ostale delce, ki se nahajajo v medceličnem prostoru. Pri tem igrajo veliko vlogo receptorji na membrani celice, ki zunajcelične delce zaznajo in sprožijo endocitozo. Ta ima ključno vlogo pri razvoju, imunskem odzivu, nevronskem odzivu, znotrajcelični komunikaciji, prenosu signalov in homeostazi [1].

1.1 Endocitoza

Poznamo več različnih vrst endocitoze; glavni dve sta fagocitoza in pinocitoza. S fagocitozo celica sprejema večje trdne delce, medtem ko s pinocitozo sprejema manjše topne delce. Pinocitozi se zato reče tudi celično »pitje«. Pinocitozo razdelimo še na makropinocitozo, od klatrina odvisno endocitozo (CME, ang. clathrin-mediated endocytosis), od kaveolina odvisno endocitozo (ang. caveolae-mediated endocytosis) in od klatrina ter od kaveolina neodvisno endocitozo (ang. clathrin- and caveolae-independent endocytosis). Slika 1 prikazuje različne vrste endocitoze. Najpogostejša endocitoza je od klatrina odvisna endocitoza [2].



Slika 1: Shematski prikaz različnih vrst endocitoz. (Slika povzeta po: [2])

Različne vrste endocitoze se med seboj razlikujejo v velikosti vezikla ter proteinskih sistemih, ki sodelujejo pri tvorbi endosomov. Skupno vsem vrstam endocitoze je oblikovanje vezikla, v katerem je zunanja molekula. Ta vezikel se imenuje endosom, ki ga glede na stopnjo potovanja po celici ločimo na zgodnji endosom, pozni endosom in lizosom [2].

1.2 Endosomi

Endosomi imajo v celici ključno vlogo pri sprejemanju hranil in ostalih esencialnih molekul iz okolice celice. Hkrati pa imajo pomembno vlogo tudi pri izločanju za celice škodljivih in odpadnih snovi. Sodelujejo tudi pri imunskem odzivu. Preko Golgijevega aparata se izločajo vezikli, ki se spajajo z endosomi in nosijo različne imunske receptorje, med njimi tudi tollu podobne receptorje (TLR, ang. toll like receptors), ki sodelujejo pri prirojenem imunskem odzivu celice [3].

1.2.1 Razvrščanje endosomov

Po vstopu v celico se vezikel imenuje zgodnji ali razvrščevalni endosom. Vsebina endosoma se lahko reciklira nazaj v zunajcelični prostor ali pa se razgradi. Vsebina, ki se je pripela na membrano, se v večini primerov reciklira in vrne v zunajcelični prostor (npr. transferin), medtem ko se tekočinska vsebina v večini primerov razgradi. Izbira med recikliranjem in razgradnjo temelji na vrsti receptorjev, ki zaznajo vsebino in določajo razgradnjo ali recikliranje [4, 5].

Tako se oblikujeta dve vrsti zgodnjih endosomov. Zgodnji endosomi, določeni za razgradnjo, se po mikrotubulih hitro premikajo in dozorijo v pozne endosome in lizosome. Vsebina teh endosomov je od adapterskega proteina AP2 neodvisna. Od adapterskega proteina AP2 odvisna vsebina pa je določena za reciklažo, zato je endosom počasnejši in se postopoma spoji z membrano, vsebina pa se izloči iz celice [5].

Zgodnji endosom je označen s proteinom Rab5. V primeru, da je vsebina endosoma ubikvitinirana, se na njegovo membrano veže protein Rabex-5, ki privlači efektorske proteine, kot so protein kinaza VPS15 in kinaza PI(3) družine Vps34. Te privlačijo še druge proteine, s katerimi se ustvari pozitivna povratna zanka prek ubikvitinacije Rabexa-5 v citoplazmi celice. Rabex-5 se na membrani endosoma skupaj z Rab5 stabilizira s proteinoma EEA1 in rabenozin5. S tem se na membrani aktivira tudi protein Rab5, ki je temeljni označevalec zgodnjih endosomov [4].

Za recikliranje vsebine endosomov se na membrano vežeta proteina Rab4 in Rab11. Rab4 se s pomočjo rabenozina5 veže na membrano celice, vsebina endosoma pa se izloči v zunajcelični prostor [4].

Razgradnja vsebine endosoma poteka prek poznega endosoma in nazadnje lizosoma. Pozni endosom je označen z Rab7. Kako natančno se Rab5 na endosomu zamenja z Rab7 ni znano. Ena od možnih razlag je, da se Rab5 na endosomu postopoma zamenja z Rab7, kar se imenuje konverzija Rab (ang. Rab conversion). Druga razlaga temelji na fuziji zgodnjega endosoma, kjer se izločajo domene Rab5, domene Rab7 pa se dodajajo na endosom. Endosom, ki se preobraža v pozni lizosom in ima tako Rab5, kot tudi Rab7 proteine, se imenuje maturacijski endosom [4].

Ko se iz membrane izločijo vse Rab5 domene in na membrani ostanejo pretežno domene Rab7, se pozni endosom zlije skupaj z lizosomom, ki razgradi vsebino endosoma (Slika 2).



Slika 2: Shematski prikaz potovanja endosomov. ZE: zgodnji endosom, ME: maturacijski endosom, RE: reciklirajoči endosom, PE: pozni endosom. AP-2: adapterski protein 2, Ne AP-2: adapterski protein, ki ni AP-2. (Slika povzeta po: [5])

1.2.2 Raziskovanje endosomov

Endosomi so izredno pomembni za vstop snovi v celico zato so njihova struktura, zorenje in vsebina predmet več raziskav. V večini se osredotočajo na proteinske vzorce, pomembne za razgradnjo in reciklažo privzete vsebine endosoma. To je pomembno tudi pri morebitni dostavi zdravil v celico, saj je treba zagotoviti prevzem brez nadaljnje reciklaže [6].

1.3 Metode za izolacijo endosomov

Za natančno raziskovanje je nujna izolacija endosomov. Poznanih je več metod. Najbolj znane so ultracentrifugiranje, izolacija prek magnetno označenih protiteles in tudi direktna izolacija s pomočjo endosomskega izolacijskega reagenta [7–9].

1.3.1 Izolacija s pomočjo magnetno označenih protiteles

To metodo se uporablja predvsem za kvantifikacijo endocitiranega zdravila, ki ga dostavimo celici s pomočjo nanodelcev. S tem lahko ugotovimo, v kolikšni meri celica prejme nanodelce z želeno substanco.

Pri tej metodi so bistvenega pomena protitelesa proti endosomskim proteinom, ki so vezana na magnetne delce. Zato moramo najprej ustrezna protitelesa vezati na magnetne delce. Postopek traja 14 ur, delce pa moramo porabiti v roku 24 ur.

Celično kulturo gojimo v prisotnosti nanodelcev, v katere smo vstavili želene spojine. Celice te nanodelce endocitirajo. Po določenem času celice homogeniziramo in s centrifugiranjem odstranimo jedra in ostanke celic.

Celičnim organelom, ki so ostali v supernatantu, dodamo magnetne delce z vezanimi specifičnimi protitelesi in pustimo 24 ur, da se nanje vežejo proteini, značilni za endosome. Po vezavi z magnetom ločimo endosome od ostalih organelov. Endosome liziramo, za zaznavo spojin v nanodelcih uporabimo tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) [7].

Slika 3 prikazuje shemo izolacije endosomov s pomočjo magnetno označenih protiteles.



Slika 3: Shematski prikaz izolacije endosomov s pomočjo magnetno označenih protiteles. (Slika povzeta po: [7])

1.3.2 Izolacija s pomočjo lateksnih kroglic

Izolacija s pomočjo lateksnih kroglic poteka prek endocitoze lateksnih kroglic, ki nam po ultracenrifugiranju omogočajo boljšo ločbo celičnih organelov. Ta metoda nam zaradi časovnega dejavnika omogoča tudi časovno zaznavo pretvorbe endosoma v lizosom. Za to metodo je najbolje uporabiti celice, ki veliko fagocitirajo. To so celične linije makrofagov, npr. RAW264.7 in J774.

Celice najprej gojimo v petrijevkah do 80 % preraščenosti, nato jim dodamo lateksne kroglice s premerom okoli 1 µm in inkubiramo 30 min. Celice liziramo, homogeniziramo in s centrifugiranjem odstranimo jedra in cele celice. Homogenat prestavimo v 38 % saharozni pufer za ultracentrifugiranje in sestavimo pufre za ultracentrifugiranje tako, da ustvarimo različne gradiente (Slika 4). Po ultracentrifugiranju moramo nato odpipetirati

endosome, ki naj bi se nahajali na interfazi med 10 in 25 % saharoznim pufrom za ultracentrifugiranje. Zaradi lateksnih kroglic nam je bolj znana gostota organelov, kar nam olajša ločbo. Lateksne kroglice imajo namreč znano gostoto, zato lahko točno vemo, kje se bodo organeli z lateksnimi kroglicami nahajali po ultracentrifugiranju, medtem ko sicer gostote organelov ne poznamo. Endosome nato liziramo in določimo koncentracijo proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS-PAGE) in prenosom western [8].



Slika 4: Shematski prikaz izolacije endosomov s pomočjo lateksnih kroglic. (Slika povzeta po:[8])

1.3.3 Ultracentrifugiranje

Metoda je sestavljena iz dveh korakov: homogenizacije in določanja različnih frakcij homogenata. Celice se centrifugira, da se jih loči od gojišča in homogenizira. Po homogenizaciji se jih ponovno centrifugira, da se loči jedro z razpadlimi membranami in proteini od supernatanta, v katerem so organeli. Nato se supernatant z organeli centrifugira v raztopini z gradientom gostote. Po navadi se za izdelavo gradienta uporablja saharozo, ker je poceni, se dobro raztaplja in ne reagira z vsebino vzorca. Obstajajo pa tudi druge alternative, kot sta na primer Ficoll (hidrofobni polisaharidi) in Percoll (koloidni silika delci), s katerimi prav tako tvorimo gradiente gostote.

Med centrifugiranjem organeli potujejo do tiste gostote saharoze, ki zaustavi njihovo posedanje. Ta gostota je odvisna od vsebine, razmerja med proteini in lipidi, oblike in velikosti organelov.

Poznamo dve vrsti ultracentrifugiranja. Zvezno, pri kateri gostota saharoze zvezno narašča, in stopenjsko ultracentrifugiranje, pri kateri imamo različne stopnje gostote saharoze.

Stopenjska temelji na znanih ločitvenih predelih zveznega ultracentrifugiranja, saj so gostotne stopnje tam, kjer se ustavijo določeni organeli v vzorcu. Te stopnje so na interfazi med:

- 8 % in 25 % saharoze za pozne endosome in lizosome,
- 25 % in 35 % saharoze za zgodnje endosome in druge vezikle,
- 35 % in 40.6 % saharoze za Golgijev aparat in endoplazemski retikulum.

Slika 5 prikazuje razporeditev organelov po ultracentrifugiranju z zvezno ali stopenjsko koncentracijo saharoze. V kolikor homogenizacija vzorca pred centrifugiranjem ni bila popolna, v peletu ostanejo jedra in proteini,.



Slika 5: Shematski prikaz razporeditve organelov pri ultracentrifugiranju. PE: pozni endosomi, ZE: zgodnji endosomi, GA: Golgijev aparat in ER: endoplazemski retikulum. (Slika povzeta po: [9])

Pred samim centrifugiranjem je potrebno dodati še proteazne inhibitorje in cikloheksamid, da ostanejo ribosomi vezani na endoplazemski retikulum.

Po ločitvi z ultracentrifugiranjem želene frakcije odstranimo s pomočjo pipete in jih analiziramo z različnimi metodami [9].

Za analizo proteinov uporabimo NaDS-PAGE in prenos western. Za analizo nukleinskih kislin poliakrilamidno ali agarozno elektroforezo, lahko pa tudi prenos northern in po Southernu. Za detekcijo ostalih, neznanih snovi uporabimo kromatografske in spektroskopske metode (npr. HPLC, LC-MS).

V preglednici 1 je primerjava opisanih metod za izolacijo endosomov.

Izolacija z:	Glavna	Časovni	Specifičnost	Metoda zaznave
	komponenta	okvir		vsebine
Magnetno	Na magnetne	40 h	++	HPLC
označenimi	delce vezana			
protitelesi	protitelesa			
Lateksnimi	Lateksne	2 h	+	NaDS-
kroglicami	kroglice,			PAGE/prenos
	saharoza			western
Ultracentrifugiranjem	Saharoza	2 h	0	NaDS-
				PAGE/prenos
				western

Preglednica 1: Primerjava metod za izolacijo endosomov iz celic. Legenda: ++ odlično, + prav dobro, 0 dobro.

1.4 Imunski odziv endosomskih TLR

TLR so člani naddružine receptorjev za interlevkin-1 (IL-1Rs, ang. interleukin-1 receptors). Na N-koncu receptorja TLR, ki se nahaja v zunajceličnem prostoru ali notranjosti endosomov, se nahaja regija bogata z levcinom (LRR, ang. leucin-rich repeat), ki je v obliki podkve. Število ponovitev regije se od receptorja do receptorja razlikuje, vsaka ponovitev pa je sestavljena iz 24 - 29 aminokislinskih ostankov. Ta domena je ključna za prepoznavo ligandov. Nato sledi transmembranska domena, ki se nadaljuje v domeno, značilno za toll in IL-1 receptorje – Toll/IL-1R (TIR) (Slika 6) [10].



Slika 6: Shematski prikaz strukture TLR.

Receptorjem TLR3, TLR7/8 in TLR9 pravimo tudi endosomski TLR, saj za svoje delovanje in uspešno prepoznavo liganda potrebujejo kislo okolje, prepoznavajo pa bakterijske in virusne nukleinske kisline. Virusne nukleinske kisline prepoznajo prek okužbe celice, bakterijske pa prek endocitoze bakterije. TLR3 prepozna enoverižno in dvoverižno RNA virusov (ssRNA, ang. single-stranded RNA in dsRNA, ang. double-stranded RNA), TLR7 in TLR8 prepoznata enoverižno RNA, TLR9 pa bakterijsko in virusno enoverižno DNA z nemetiliranimi CpG motivi [11].

Ob vezavi ligandov na TLR se receptorji zbližajo in dimerizirajo. Pri tem se domene TIR približajo in omogočijo vezavo adapterskih proteinov, ki sprožijo signalne kaskade. Signalne poti so odvisne od celic in receptorja TLR, ki jo stimulira. Aktivacija celic poteka prek proteina primarnega odziva pri mieloidni diferenciaciji 88 (MyD88, ang. myeloid differentiation primary response protein 88) ali pa preko TIR domene, ki vsebuje adapterski protein za induciranje INF- β (TRIF/TICAM-1, ang. TIR-domain-containing adaptor protein inducing INF- β) odvisne poti. TLR7, TLR8 in TLR9 aktivirajo celice prek od MyD88 odvisne poti, TLR3 pa prek TRIF odvisne poti. Slika 7 prikazuje signalne poti ob zaznavi liganda, torej aktivacijo transkripcijskih dejavnikov in njihov premik v jedro in posledično prepis genov. S sivo označen del je podrobna signalna pot, ki pa za enostavno razumevanje delovanja TLR ni pomembna [3, 12].



Slika 7: Shematski prikaz imunskih poti po aktivaciji endosomskih TLR. Ob vezavi ligandov na TLR se sproži signalna pot, katere rezultat je premik v jedro in prepis genov. Signalna pot se sproži prek od MyD88 ali TRIF/TICAM-1 odvisne poti. S sivo je označen del signalne poti, ki za enostavno razumevanje delovanja TLR ni pomembna. (Slika povzeta po: [12])

1.4.1 **TLR9**

TLR9 zaznava DNA v endosomih imunskih celic. Do endosoma potuje s pomočjo šaperona UNC93B1, kjer se nato vgradi v membrano endosoma brez sprememb v regiji bogati z levcinom (Slika 6). TLR9 zazna predvsem nemetilirano enoverižno DNA, v kateri so CpG motivi [13]. TLR9 se aktivira, ko se na sosednja TLR9 hkrati vežeta dve molekuli DNA s CpG motivi. Obe molekuli DNA se z enim koncem vežeta na C-končni del z levcinom bogate regije, z žlebom s CpG motivom pa na N-končni del z levcinom bogate regije drugega receptorja TLR9. Inhibitorni DNA oligonukleotidi se vežejo samo v N-končni del. Metilirana DNA in dvoverižna DNA se težje povežeta na dva TLR9, zato je aktivacija imunskega sistema z njima slabša. Endogena DNA slabše aktivira TLR9, vendar lahko v primeru večje koncentracije vseeno lahko aktivira TLR9 [13].

1.5 Deoksiribonukleaze (DNAze)

Kratki opisi vseh glavnih značilnosti človeških vrst DNAz so prikazani v preglednici 2.

Tip	Nahajanje	Endo/eksonukleaza	Kodirajoči	Mesto	Kofaktor
DNAze			gen	delovanja	
DNAza I	Zunajcelični	Endonukleaza 3' –	DNASE1	ssDNA,	Ca ²⁺ ,
	prostor, jedro	5'		dsDNA,	Mg ²⁺
				kromatin	
DNAza II	Endosomi	Endonukleaza 5' –	DNASE2	dsDNA	/
		3'			
DNAza	Citosol, ER,	Eksonukleaza 3' –	TREX1	ssDNA,	Mg ²⁺
III	jedro	5'		dsDNA	
(Trex1)					

Preglednica 2: Kratek pregled vrst deoksiribonukleaz [14 – 16].

DNAza tipa I je glavna endonukleaza v zunajceličnem prostoru, kjer razgrajuje ostanke DNA celic po apoptozi in nekrozi ter ostanke DNA bakterij, razgrajenih v zunajceličnem prostoru. DNA razgradi do tetramerov. Je tudi ena glavnih endonukleaz za razgradnjo celične DNA v apoptozi celice [13].

DNAza tipa II je edina endonukleaza, ki deluje v kislem pH brez prisotnosti ionov. Nahaja se v endosomih različnih vrst celic, vključno z makrofagi. Ker je prisotna v endosomih, sodeluje pri razgradnji endocitirane DNA. Ob endocitozi velikih oligonukleotidov jih DNAza tipa II zazna in cepi na manjše oligonukleotide, ki jih nato prepozna TLR9 [13].

DNAzo tipa III imenujemo tudi Trex1 (po genu, ki jo zapisuje). Je eksonukleaza, ki razgradi DNA, ki zaide v citosol [13].

Mutacije v DNAzah pripeljejo do hudih avtoimunskih bolezni. Mutacija v DNAzi tipa I povzroča lupus eritematozus, mutacija v DNAzi tipa II pripelje do slabšega imunskega odziva, mutacija v DNAzi tipa III pa je povzročitelj Aikardi-Goutiere sindroma 1 (pogosta smrt v zgodnjem otroštvu) [14 – 16].

TLR9 aktivira prirojeni imunski sistem ob vezavi 11 – 13 nt dolgega oligonukleotida s CpG motivom, ki je lahko dvoverižni (slabša aktivacija) ali enoverižni. Ob mutaciji DNAze tipa II, le-ta ni zmožna cepiti DNA in posledično je TLR9 ne zazna. Ob tem se prirojeni imunski sistem ne aktivira. DNAza tipa II je tako ključna pri aktivaciji TLR9 in s tem prirojenega imunskega sistema [17].

1.6 S polietileniminom prevlečeni magnetni nanodelci

Nanodelci v zadnjih desetletjih postajajo vse bolj pomemben del raziskav. Uporabljajo jih za boljšo kontrastnost slik in kot dostavljavce zdravilnih učinkovin v celice. Magnetni nanodelci se od navadnih razlikujejo po magnetni sredici, katero obdaja ovoj specifičnih substanc. Zaradi specifičnosti se jih lahko uporablja tudi za NMR analize in elektronsko mikroskopijo. Negativna stran specifičnega ovoja pa je citotoksičnost [18].

Polietilenimin (PEI, ang. polyethyleneimine) je kationski polimer z enim od največjih kationskih potencialov, kjer je lahko vsak tretji atom protoniran. To omogoča tvorbo stalnih kompleksov z DNA in njihov prenos v celico (transfekcijo). Zaradi svojega močnega kationskega naboja pa je PEI tudi citotoksičen, kar lahko sproži apoptozo celice. Temu se lahko izognemo z uporabo glutationa ob pripravi magnetnih nanodelcev [18].

2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je zaznavanje kratkih fragmentov DNA (okoli 5 bp). Zato bomo optimizirali poliakrilamidno DNA elektroforezo, s katero sicer uspešno zaznavamo daljše fragmente DNA. DNA bomo tudi fluorescentno označili s florofluori z uporabo verižne reakcije s polimerazo in jo detektirali na poliakrilamidnem gelu.

Z magistrsko nalogo želimo vzpostaviti tudi novo metodo izolacije endosomov, ki bo temeljila na hitri in specifični izolaciji. To bomo dosegli z uporabo s polietileniminom prevlečenimi magnetnimi nanodelci, ki za ločbo od ostalih komponent potrebujejo samo magnetno stojalo. Čistost izolacije bomo potrdili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodacilsulfata in prenosom western.

Namen magistrske naloge je tudi zaznava fragmentov DNA v izoliranih endosomih, ki jih celica ob endocitiranju razgradi z namenom aktivacije imunskega odziva s TLR receptorji. Fluorescentno označeno DNA bodo celice endocitirale, mi pa bomo po izolaciji endosomov določili do kolikšne mere endosomi razgradijo privzeto DNA.

Metodo izolacije endosomov z magnetnimi nanodelci bomo tudi primerjali z znano metodo ultracentrifuiranja. Prav tako bomo s konfokalnim mikroskopom preverili lokacijo endocitiranih magnetnih nanodelcev.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

3.1.1 Kemikalije

Proizvajalec	Kemikalije
Mag. Klemen Strojan in dr. Mojca Pavlin (Fakulteta za elektrotehniko, UL)	S polietileniminom prevlečeni magnetni nanodelci
Addgene	Rab5-mCherry, EEA1-mCherry
Fermentas	RNaza
Gibco	Gojišče DMEM, FBS
Hyclone	Penicilin in streptomicin
Integrated DNA technologies	Oligoverižni nukleotidi (m80, TCGTT, m141, h32 in h70)
Invitrogen	SYBR® Gold
Invivogen	Akrilamid, agaroza
Jena Analytik	Innuprep DNAse I
Jena Bioscience	Aminoallyl-dUTP-Cy5
Omega	Fluorescein-12-dUTP
Pierce	SuperSignal West Femto
Sigma – Aldrich	BCA test kit, InstantBlue, DNA telečjega priželjca, BSA
Thermo Ficher	1 kb DNA standard, GeneRuler Low Range DNA Ladder, 10 bp DNA standard, RIPA pufer, DNA polimeraza DreamTaq
Thermo Scientific	GeneJET PCR Purification Kit

3.1.2 **Protitelesa**

Protitelesa	Proizvajalec
Kozja protitelesa proti zajčjemu IgG konjugirana s HRP	Abcam
Zajčja protitelesa proti EEA1	Abcam
Mišja protitelesa proti β-aktinu	Cell Signalling
Zajčja protitelesa proti katepsinu B	Cell Signalling
Zajčja protitelesa proti SDH	Cell Signalling
Zajčja protitelesa proti SQSTM1/p62	Cell Signalling
Kozja protitelesa proti mišjemu IgG konjugirana s HRP	Santa Cruz

3.1.3 Laboratorijska oprema in potrošni material

Proizvajalec	Laboratorijska oprema	
BD Plastipak	Brizge	
Binder	CO ₂ inkubator za celične kulture	
Bio Rad	Mini protean 3 cell (kaseta za NaDS-PAGE), kaseta za prenos western	
Corning	Serološke pipete za 2 mL, 5 mL, 10 mL in 25 mL; banjice za pipete z več nastavki	
DNR Bioimaging systems	Nastavki za fotografiranje gelov	
Eppendorf	Centrifugi Minispin in 5430R; 2,5 μL, 10 μL, 20 μL, 100 μL, 200 μL, 1000 μL pipete; multikanalne (10 μL, 100 μL, 200 μL) pipete z osmimi ali dvanajstimi nastavki, termomikser	
GE Healthcare	Nitrocelulozna membrana	
Gilson	Pipetman, 5 mL in 10 mL pipeta, nastavki za 5 mL in 10 mL pipeto	

Hettich	Centrifuga universal 320R	
Ibidi	Mikroskopirne ploščice z 8 vdolbinami	
Invitrogen	Komplet za štetje celic, naprava Countess, števne plošče, barvilo tripan modro, iBind Flex	
Iskra PIO	Laminarij	
Leica Mycrosystems	Invertni svetlobni mikroskop DM-IL LED, konfokalni mikroskop TCS SP5	
Perkin Elmer	IVIS Lumina	
Starstedt	10 μL, 200 μL in 1000 μL nastavki za pipete, mikrocentrifugirke	
Synergymix	Spektrofotometer	
Syngene	G:Box Chemi (sistem za slikanje poliakrilamidnih gelov in nitroceluloznih membran)	
Thermo Fisher Scientific	EMD Millipore TM PureProteome TM Magnetic Stand	
ТІК	Igle (22 G)	
TPP	Mikrotitrske plošče z 6 vdolbinicami; 14 mL centrifugirke; petrijevke z 6 cm in 10 cm polmerom	
Veriti	96 well thermal cycler	

3.1.4 **Programska oprema**

Droizvaialac	Programska oprama
TTOIZVajalee	i logramska oprema
Laina	Les LITE (72 alitania aplie a konfoltalnim milmaskanom)
Leica	\Box Las LITE (za shkanje cenc s komokalnim mikroskopom)
~ ·	
Svnergvmix	Gen5 1.10 (za detekcijo koncentracije proteinov po BCA)
- J - 8J	
	(testu)

Syngene	GeneTools (za obdelavo slik po slikanju z G:Box Chemi)

3.1.5 Raztopine in pufri

Pufer	Sestava	
10-kratni PBS	100 g NaCl, 2,5 g KCl, 14,4 g Na ₂ HPO ₄ , 2,5 g KH ₂ PO ₄ ,	
	dodamo MQ do 1 L	
10-kratni NaDS pufer	30 g baze Tris, 144 g glicina, 10 g NaDS, dodamo MQ do 1	
	L	
Pufer za prenos	25 mM baze Tris, 192 mM glicina, 20 % metanola, 0,03 %	
	NaDS v MQ	
10-kratni TBE	108 g baze Tris, 55 g borove kisline, 40 mL 0,5 M EDTA	
	(pH 8,0), dodamo MQ do 1 L	
50-kratni TAE	242 g baze Tris, 57,1 mL etanojske kisline, 100 mL 500 mM	
	EDTA (pH 8,0), dodamo MQ do 1 L	
1,25-kratni formamidni	4,75 mL 95 % formamida, 150 ul 0,5 M EDTA (pH 8,0), 50	
nanašalni pufer	ul 2,5 % barvila bromfenol modro, 50 ul 2,5 % barvila ksilen	
	cianol FF	
10-kratna raztopina za	100 mg metilenskega modrila, 5 mL 10-kratnega TBE, 45	
barvanje z metilenskim	mL MQ	
modrilom		
Hankov pufer	1,6 g NaCl, 0,08 g KCl, 0,007 g Na ₂ HPO ₄ , 0,012 g KH ₂ PO ₄	
	0,027 g CaCl x 2H ₂ O, 0,24 g MgSO ₄ , 0,071 g NaHCO ₃ ,	
	dodamo MQ do 200 mL	
Homogenizacijski pufer za	10 mM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 250 mM	
izolacijo z magnetnimi	saharoza, Roche proteinazni inhibitor in MQ	
nanodelci		

	1	
Hipotonični lizni pufer	10 mM Tris-HCl, 1 % Triton-X100, Roche proteinazni	
	inhibitor in MQ	
Homogenizacijski pufer za	250 mM saharoza, 3 mM imidazol (pH 7,4), 1 mM EDTA,	
ultracentrifugiranje	Roche proteinazni inhibitor in MQ	
25 % saharozni pufer	0,806 M saharoza, 3 mM imidazol (pH 7,4), 1 mM EDTA,	
	MQ	
35 % saharozni pufer	1,177 M saharoza, 3 mM imidazol (pH 7,4), 1 mM EDTA,	
	MQ	
62 % saharozni pufer	2,351 M saharoza, 3 mM imidazol (pH 7,4), 1 mM EDTA,	
	MQ	
Gojišče za celice	DMEM z 10 % FBS, DMEM z 0,5 mg/mL BSA in	
	antibiotikoma penicilinom (Pen) in streptomicinom (Strep)	

3.1.6 Celične kulture

Celično linijo embrionalnih ledvičnih celic (HEK293, ang. human embryonic kidney cells) in celično linijo mišjih makrofagov (RAW264.7) smo pridobili iz Evropske zbirke celičnih kultur (ECACC, ang. European collection of authenticated cell cultures). Gojili smo jih v mediju DMEM z dodatkom 10 % seruma telečjega zarodka (FBS). Vse celične linije smo vzdrževali v inkubatorju s 5 % CO₂ na 37 °C.

3.2 Metode

3.2.1 Poliakrilamidna gelska DNA elektroforeza

Za izdelavo in uporabo poliakrilamidnega gela smo uporabili Mini Protean 3 cell. Kaseto sestavimo po navodilih proizvajalca [19]. Za pripravo gela smo zmešali sestavine, prikazane v preglednici 3, pri čemer smo bili pozorni na pravilni vrstni red dodajanja sestavin (od zgoraj navzdol).

Sestavina	15 % gel	20 % gel
40 % akrilamidna raztopina	5,63 mL	6 mL
Urea	7,2 g	6,6 g
10-kratni TBE pufer	1,5 mL	1,6 mL
MQ	1,9 mL	3,8 mL
10 % APS	75 μL	80 µL
TEMED	7,5 μL	9 μL

Preglednica 3: Priprava 15 % in 20 % poliakrilamidnega gela z ureo za DNA elektroforezo.

Po vnosu (še tekočega) gela med stekelca smo počakali 30 minut, da se je le-ta strdil. Gel v stekelcih smo prestavili v kaseto za elektroforezo in ga priključili za 30 minut na napetost 200 V. Kot prevodnik med anodo in katodo v komori smo uporabili 1-kratni TBE pufer.

Za standard velikosti lis smo uporabili GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder z razponom lis 10 - 300 bp. Standard velikosti in vzorce smo nanesli po navodilih proizvajalca [20].

Vzorce DNA smo pred nanosom inkubirali 2 min na 95 °C v 1-kratnem formamidnem nanašalnem pufru. Pred nanosom smo vdolbine za nanos sprali z 1-kratnim TBE pufrom, nato smo nanesli vzorce. Elektroforezni čas smo določili na podlagi navodil proizvajalca, upoštevali pa smo tudi pot, ki jo je prepotovalo barvilo v liniji nanašalnega pufra. Po zaključeni elektroforezi smo gel vzeli iz stekelc in ga v plastični posodici barvali.

Barvali smo na dva načina:

- 20 minut z 0,02 % metilenskim modrilom in nato še deloma razbarvali z destilirano vodo (MQ) [21],
- 30 minut z barvilom SYBR Gold po navodilih proizvajalca. V 50 mL TBE pufer smo dodali 5 μL 10000× SYBR Gold, tako da je nastala 1× raztopina SYBR Gold
 [22].

3.2.2 Verižna reakcija s polimerazo

Verižna reakcija s polimerazo (PCR, ang. polymerase chain reaction) je reakcija, v kateri pomnožujemo DNA. Pomnoževali smo zapis za mišji TLR9 (mTLR9), ki je dolg 3000 bp. V 0,25 mL PCR mikrocentrifugirko smo namešali 20 µL PCR mešanice, ki je bila sestavljena iz:

- 50 pmol plazmida za mTLR9,
- 20 pmol začetnih oligonukleotidov (10 pmol smerni in 10 pmol protismerni),
- $10 \ \mu L \ 2 \times DreamTaq-a \ brez \ barvila \ in$
- 5 µL MQ brez nukleaz.

V 2× DreamTaq-u je koncentracija dNTP 0,4 mM, torej je v celotni mešanici 0,2 mM dNTP. Glede na to koncentracijo smo nato preračunali želeno koncentracijo označenih dUTP, s katerimi smo zaznavali vsebnost DNA v endosomih.

Slika 8 prikazuje pogoje reakcije PCR.




3.2.3 Agarozna gelska elektroforeza

Za pripravo 1 % agaroznega gela smo 1 g agaroze dodali v 100 mL 1-kratnega TAE pufra v erlenmajerici. Mešanico smo v mikrovalovni pečici segrevali do vretja, jo premešali do čiste raztopine, nato pa ohladili do 50 °C pod tekočo vodo (med hlajenjem smo obračali erlenmajerico, da se na enem mestu ne ohladi preveč). Dodali smo etidijev bromid (EtBr), tako da je bila končna koncentracija EtBr v raztopini 0,5 µg/mL. Dobro smo premešali in še tekoč gel zlili v kadičko. V primeru, da smo naredili gel brez EtBr, EtBr nismo dodali. Preden se gel strdi smo dodali še glavniček, kjer bodo nastale jamice za nanos DNA na gel.

Ko se je gel strdil, smo ga prestavili v kadičko za potovanje DNA, v kateri je 1-kratni TAE pufer (gel je popolnoma potopljen v pufer), pri čemer smo pazili na smer potovanja DNA. V jamice smo nanesli vzorce in standard 1 kb Plus DNA Ladder z razponom lis 100 – 15 000 bp.

Pravilno smo priključili električno napeljavo in pustili 40 minut na 110 V. Po končani elektroforezi smo gel slikali pod UV svetlobo z navadnim fotoaparatom ali s sistemom IVIS Lumina.

Za čiščenje PCR produktov smo uporabili sistem GeneJET PCR Purification Kit, ki smo ga uporabljali po navodilih proizvajalca.

3.2.4 **Test BCA**

Za določanje koncentracije proteinov v vzorcu smo uporabili test BCA, ki temelji na redukciji bakrovega 2^+ iona v bakrov 1^+ ion v bazičnem okolju. Moč redukcije je proporcionalna količini prisotnega proteina. Dve molekuli bicinhonične kisline (BCA) in en bakrov 1^+ ion tvorita vijoličen produkt, ki ga zaznamo s spektrofotometrom. Za standard smo uporabili goveji serumski albumin (BSA, ang. bovine serum albumin), ki smo ga redčili po navodilih proizvajalca. Tako smo dobili umeritveno krivuljo z devetimi stopnjami.

Vzorec smo najprej 15-krat redčili in ga v treh ponovitvah nanesli na ploščo z 96 vdolbinami. V posamezno vdolbino smo nanesli 30 μ L vzorca. Nato smo v vdolbine dodali 200 μ L BCA reagenta, ki je sestavljen iz 49 enot bicinhonične kisline in 1 enote 4 % bakrovega sulfata.

Ploščo smo v temi inkubirali 30 minut na temperaturi 37 °C. Po inkubaciji smo z spektrofotometrom izmerili absorbanco pri 560 nm in iz umeritvene krivulje določili našo koncentracijo proteinov [23].

3.2.5 Priprava 10 % poliakrilamidnega gela z NaDS

Za izdelavo in uporabo poliakrilamidnega gela smo uporabili Mini Protean 3 cell. Kaseto in gel pripravimo po navodilih proizvajalca. Za pripravo ločitvenega in vstopnega gela smo zmešali sestavine, prikazane v preglednici 4.

Sestavina	Ločitveni gel (10 %)	Vstopni gel
MQ	4 mL	4 mL
Tris, pH = 8.8	2,5 mL	/
Tris, pH = 6,8	/	1,25 mL
10 % NaDS	100 μL	50 μL
30 % akrilamid	3,3 mL	665 μL
10 % APS	50 µL	25 μL
TEMED	5 μL	5 μL

Preglednica 4: Sestavine 10 % poliakrilamidnega gela z NaDS

Pripravili smo ločitveni gel, pri čemer smo bili pozorni na pravilni vrstni red korakov (v preglednici 4 od zgoraj navzdol). Med pripravo smo ga večkrat premešali s pipeto. Po dodatku APS in TEMED smo ga takoj odpipetirali med stekelca do približno 2/3 višine stekelca. Nato smo nanesli s pipeto tanko plast izobutanola, ki izravna vrhnji del ločitvenega gela in odstrani mehurčke. Ločitveni gel z izobutanolom smo pustili 30 - 60 minut, da se je gel strdil.

Pred nanosom vstopnega gela (ponovno smo bili pozorni na pravilni vrstni red korakov) smo s filter papirjem popivnali izobutanol. S tem smo omogočili potovanje proteinov iz vstopnega v ločitveni gel. S pipeto smo nanesli vstopni gel med stekelca in na vrh dodali glavniček. Ob dodajanju glavnička smo pazili, da z njim nismo ujeli mehurčkov, saj v tem primeru proteini ne bi enakomerno potovali po gelu. Vstopni gel (z dodanim glavničkom) smo pustili na sobni temperaturi 30 - 60 minut, da se je popolnoma strdil. Po strditvi vstopnega gela smo glavniček previdno ostranili in pri tem pazili, da nismo odtrgali kakšnega dela gela. Po tem smo iz stojala odstranili gel skupaj s stekelcema, ki gel držita. Gel smo zavili v vlažno papirnato brisačko in alufolijo ter shranili v hladilnik do uporabe – največ 1 mesec [19].

3.2.6 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodacilsulfata (NaDS – PAGE)

Po določitvi koncentracije proteinov s testom BCA smo 1 µg proteinov 5 minut inkubirali na 95 °C v NaDS nanašalnem pufru z 2–merkaptoetanolom, kratko centrifugirali in nanesli na 10 % poliakrilamidni gel z NaDS. Med stekelca smo nanesli 1-kratni NaDS pufer do vrha ter ga dodali okoli toliko, da je bila elektroda pokrita. Elektroforezo smo pustili teči pri konstantni napetosti 200 V toliko časa, da je frontna linija z barvilom dosegla spodnji rob gela (cca. 45 min). Po ločitvi proteinov smo proteine iz gela s prenosom western prenesli na nitrocelulozno membrano.

3.2.7 Prenos western in detekcija proteinov

S prenosom western smo prenesli proteine iz poliakrilamidnega gela na nitrocelulozno membrano. Po navodilih proizvajalca smo sestavili kaseto Mini Protean 3 cell, jo do črte napolnili s pufrom za prenos, in prenos izvajali 90 minut pri konstantnem toku 350 mA v ohlajeni celici za prenos.

Po prenosu smo detekcijo posameznih proteinov izvedli z enim od naslednjih specifičnih primarnih protiteles: protitelesa proti EEA1, β-aktinu, SQSTM1/p62, katepsinu B ali SDH. Uporabljena sekundarna protitelesa so bila kozja proti-zajčja IgG, konjugirana s HRP in kozja proti-mišja IgG, konjugirana s HRP. Barvanje smo izvajali po navodilih proizvajalca v napravi iBind flex [24].

Za detekcijo smo membrano inkubirali z barvilom SuperSignal West Femto po navodilih proizvajalca in slikali z napravo G:Box. Slike smo obdelali z ustrezno programsko opremo (Syngene).

3.2.8 Izolacija endosomov z magnetnimi nanodelci

Na petrijevke s polmerom 6 cm smo nacepili $2,5 \times 10^6$ celic HEK293 v gojišču DMEM z 10 % FBS. Celice smo inkubirali 24 ur na 37 °C in 5 % CO₂. Po 24 urah smo zamenjali gojišče, dodali 0,1 mg/mL magnetnih nanodelcev in antibiotika penicilin in streptomicin, redčena 1:100.

Celicam v prvi petrijevki smo dodali 200 μ L PBS. Celicam v drugi petrijevki smo dodali 200 ng/ μ L goveje DNA, celicam v tretji petrijevki pa 100 ng/ μ L oligonukleotida TCGTT (5 nt) in 100 ng/ μ L oligonukleotida m80 (23 nt). Celotni volumen stimulacijske raztopine je 200 μ L. Celice smo inkubirali nadaljnjih 16 - 18 ur na 37 °C in 5 % CO2.

Vse delo od tega koraka naprej je potekalo na ledu. Celice smo trikrat sprali s 5 mL ledeno mrzlega PBS. Dodali smo enak volumen PBS in celice s celičnim strgalom postrgali z dna petrijevke. Celice smo prestavili v 5 mL mikrocentrifugirke, jih resuspendirali in centrifugirali 5 minut na 1200 rpm in +4 °C.

Supernatant smo odstranili in celice resuspendirali v 1 mL homogenizacijskega pufra za izolacijo z magnetnimi nanodelci. Raztopino smo 15 – 20-krat potegnili skozi 22 G iglo, pritrjeno na 2 mL brizgo. Vsakih 5 potegov smo preverili celično strukturo pod invertnim svetlobnim mikroskopom.

Razbite celice smo prestavili v 1,5 mL mikrocentrifugirke in jih postavili na magnetno stojalo. Po 5 minutah so se magnetni delci ločili od ostalih delov celic in se približali magnetu.

Nemagnetni del smo prestavili v druge mikrocentrifugirke in jih centrifugirali 5 minut pri maksimalnih obratih (14300 rpm) pri + 4 °C. Nemagnetni supernatant (SNM) smo prestavili v nove mikrocentrifugirke, pelet (PNM, nemagnetni pelet) pa smo resuspendirali v 20 μ L RIPA pufra. Vse smo shranili na - 80 °C.

Magnetnemu delu, ki vsebuje endosome, smo dodali 0,5 mL homogenizacijskega pufra za izolacijo z magnetnimi nanodelci, vzeli iz stojala in dobro premešali. Mikrocentrifugirko smo dobro pretresli z roko, da se skupki magnetnih nanodelcev niso več videli. Nismo uporabili pipete, saj se magnetni nanodelci prilepijo na pipetne nastavke, vorteksiranje pa bi lahko razbilo prisotne membrane. Mikrocentrifugirko smo nato ponovno položili na

magnetno stojalo in pustili 5 minut, da se je magnetni in nemagnetni del ponovno ločil. Ta postopek smo ponovili 3-krat.

Po zadnjem spiranju smo namesto 0,5 mL dodali 0,2 mL homogenizacijskega pufra in tako kot v prejšnjih korakih počakali 5 minut, da sta se ločila magnetni in nemagnetni del. Nemagnetni del smo odstranili, magnetnim nanodelcem dodali 50 μ L hipotoničnega liznega pufra, resuspendirali s pipeto in inkubirali 15 minut na ledu. Nato smo raztopino zamrznili v tekočem dušiku, odmrznili in ponovno zamrznili. S tem smo razbili endosomsko membrano. Ta postopek smo ponovili trikrat, nato pa smo centrifugirali 10 minut na maksimalnih obratih (14300 rpm) pri + 4 °C. Supernatant z endosomi (E) smo prestavili v nove mikrocentrifugirke, magnetni pelet (MP) pa smo resuspendirali v 20 μ L RIPA pufra. Vse vzorce smo shranili na - 80 °C [25 – 27]. Slika 9 nam shematsko prikazuje postopek izolacije endosomov z magnetnimi nanodelci.





Protokol za celice RAW264.7 je zelo podoben protokolu za celice HEK293. Razlikuje se samo na začetku. Začetni del postopka izolacije DNA iz celic RAW264.7 s pomočjo z polietileniminom prevlečenimi magnetnimi nanodelci je opisan v nadaljevanju.

Na mikrotitrsko ploščo s 6 vdolbinami smo nacepili $1,6 \times 10^6$ celic RAW264.7 na vdolbino v 2 mL DMEM gojišča z 0,5 mg/mL BSA. Dodali smo 0,1 mg/mL magnetnih nanodelcev in antibiotika penicilin in streptomicin, redčena 1:100. Celice smo takoj stimulirali s 40 ng/µL s Cy5 označene DNA ali s 40 ng/µL s FITC označenih oligonukleotidov m80 in jih inkubirali 18 ur.

Celicam smo po trikratnem spiranju z ledeno mrzlim PBS dodali 1 mL Hankovega pufra z 0,01 U/ μ L DNAze tipa I in jih inkubirali 30 minut v inkubatorju na 37 °C in 5 % CO₂.

Po inkubaciji smo celice ponovno trikrat sprali z ledeno mrzlim PBS in izolacijo endosomov nadaljevali s strganjem celic po zgoraj opisani metodi za celice HEK293.

Preglednica 5 predstavlja pričakovano vsebino določenih frakcij po izolaciji endosomov s polietileniminom prevlečenih magnetnih nanodelcev.

Preglednica 5: Pričakovana vsebina posameznih frakcij izolacije endosomov s pomočjo s polietileniminom prevlečenih magnetnih nanodelcev [26].

Frakcije izolacije	Kratica	Predvidena vsebina	
Nemagnetni supernatant	SNM	Citosol, organeli brez magnetnih nanodelcev	
Nemagnetni pelet	PNM	Jedra, ostanki celične membrane	
Magnetni pelet	MP	Magnetni delci z vezanimi deli endosomske membrane	
Endosomska frakcija	E	Vsebina endosomov brez magnetnih nanodelcev	

3.2.9 Izolacija endosomov z ultracentrifugiranjem

Za izolacijo endosomov z ultracentrifugiranjem smo uporabili tako celice HEK293 kot RAW264.7, pri čemer je bil protokol za obe vrsti celic enak. Nacepili smo cca. 5×10^6 celic v petrijevko z 10 cm radijem in jih inkubirali 24 ur na 37 °C in 5 % CO₂. Po inkubaciji smo petrijevko prestavili na led in celice trikrat sprali s 4 mL ledeno mrzlega PBS. Nato smo dodali 4 mL ledeno mrzlega PBS in celice postrgali s celičnim strgalom. Celice v PBS smo prestavili v 15 mL falkonko in centrifugirali 5 minut na 200 g pri 4 °C.

Odsesali smo supernatant (PBS) in dodali trikratni volumen peleta celic homogenizacijskega pufra za ultracentrifugiranje. Z 1 mL pipeto z nastavkom z odstriženo konico pipetirnega nastavka smo resuspendirali celice in jih ponovno centrifugirali, tokrat 10 minut na 1300 g pri 4 °C.

Odsesali smo supernatant in celice resuspendirali z 1 mL pipeto, ki ima na pipetnem nastavku odstriženo konico. Uporabili smo 5-kratni volumen peleta homogenizacijskega pufra za ultracentrifugiranje. Pri resuspendiranju niso nastajali mehurčki in po njem ni bilo več skupkov celic. Po 1 mL raztopine smo prestavili v več mikrocentrifugirk z volumnom 2 mL.

Suspenzijo smo 15 – 20-krat potegnili čez iglo s premerom 22 G (0,7 mm), nameščeno na 2 mL brizgo. Homogenizacijo smo preverili z invertnim svetlobnim mikroskopom, kjer se je moralo videti 70 – 80 % prostih celic. Vsakemu mililitru homogeniziranih celic smo dodali 700 μ L homogenizacijskega pufra za ultracentrifugiranje in centrifugirali 10 minut na 2000 g pri 4 °C.

Po centrifugiranju smo supernatant prestavili v novo mikrocentrifugirko, pelet pa smo resuspendirali v 1 mL PBS.

V ultracentrifugirko smo nanesli 2 mL 62 % saharoznega pufra, nato previdno na prvo plast dodali 3 mL 35 % saharoznega pufra, na tega dodali 2 mL 25 % saharoznega pufra, nato pa dopolnili ultracentrifugirko z 1 mL homogenizacijskega pufra za ultracentrifugiranje v katerega smo dodali naš supernatant. Interfaze med pufri smo označili z alkoholnim flomastrom.

Centrifugirali smo 1,5 ure na 210 000 g pri 4 °C. Po centrifugiranju so na interfazah nastale mlečne plasti, sestavljene iz celičnih organelov, ki smo jih posamezno prenesli v 2 mL ultracentrifugirke. (Protokol povzet po:[9])

Preglednica 6 prikazuje pričakovano lokacijo celičnih organelov po ultracentrifugiranju.

27

Interfaza	Pričakovani celični organeli
	5
Med homogenacijskir	Pozni endosomi, lizosomi
in a second s	
pufrom in 25 % saharozo	
purioni in 25 % sunarozo	
Med 25 % in 35 % saharoz	7 godnji endosomi ostali vezikli
	Zgodnji čildosolni, ostali vezikli
Med 35 % in 62 % saharoz	Golgijev aparat endoplazemski retikulum jedra ostanki
Wied 55 /0 III 02 /0 Salial 02	Olgijev aparat, endoprazelnski retikulum, jedra, ostaliki
	aalia
	cenc

Preglednica 6: Predvidena lokacija celičnih organelov po ultracentrifugiranju

3.2.10 Transfekcija in konfokalna mikroskopija

Celice HEK293 smo nacepili na mikroskopirne plošče z osmimi vdolbinicami s 7×10^4 celic/vdolbinico. Takoj po nacepitvi smo jih transficirali s tranfekcijskim reagentom na osnovi polietilenimina in s 50 ng plazmidne DNA (pcDNA3) z zapisom za enega od dveh endosomskih proteinov, ki sta bila spojena s fluorescentnim proteinom mCherry. Ta konstrukta sta bila EEA1-mCherry in Rab5-mCherry. 24 ur po transfekciji smo zamenjali gojišče, lokalizacijo proteinov v celicah pa smo opazovali po skupno 48 urah.

Pred lokalizacijo proteinov EEA1 in Rab5 v celicah smo v gojišče dodali 0,02 mg/mL magnetnih nanodelcev, označenih z rodamin123 in jih skupaj s celicami inkubirali 2 uri.

Preglednica 7 prikazuje ekscitacijsko in emisijsko valovno dolžino barvil rodamin123 in mCherry.

Barvilo	Ekscitacijska λ	Emisijska λ	
rodamin 123	505 nm	560 nm	
mCherry	587 nm	610 nm	

Preglednica 7: Ekscitacijske in emisijske valovne dolžine uporabljenih barvil.

Nato smo s konfokalnim mikroskopom posneli slike celic in lokacijo nanodelcev primerjali z lokacijo endosomov, ki sta jih označevala proteina EEA1-mCherry oz. Rab5-mCherry. Na konfokalnem mikroskopu smo najprej zaznali lokacijo endosomov, nato pa spremenili nastavitve za zaznavo magnetnih nanodelcev. Na koncu smo obe sliki združili s programom Las LITE.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Optimizacija poliakrilamidne DNA elektroforeze

4.1.1 Detekcija kratkih oligonukleotidov

Ker želimo ugotoviti na kako velike dele se razgradijo nukleinske kisline v endosomih, bomo najprej optimizirali poliakrilamidno elektroforezo za zaznavo kratkih enoverižnih nukleinskih kislin (oligonukleotidov). Za optimizacijo in izbiro najbolj občutljive metode bomo uporabili oligonukleotide z znano dolžino (najkrajši bo imel 5 nukleotidov - nt). Hkrati bomo nanašali tudi genomsko DNA, saj nas bo zanimalo, kako kratke oligonukleotide bomo zaznali v tem vzorcu. Kot genomsko DNA bomo uporabljali DNA iz telečjega priželjca.

Testirali bomo več različnih gostot gela in načinov barvanja. Za detekcijo kratkih oligonukleotidov bomo uporabili poliakrilamidni gel z ureo, ki nam omogoča zaznavo enoverižnih oligonukleotidov, saj denaturira dvoverižno DNA. Prav tako bomo pred nanosom vzorce inkubirali 2 minuti na 95 °C, tudi z namenom denaturacije DNA.

Pri detekciji kratkih oligonukleotidov bomo optimizirali:

- način in čas barvanja gela uporaba 0,02 % metilenskega modrila in SYBR Gold, spremembe v času barvanja
- zamreženost poliakriamidnega gela z ureo 15 % in 20 % poliakrilamidni gel z ureo, hkrati z zamreženostjo bomo optimizirali tudi čas trajanja elektroforeze
- količino nanesenih oligonukleotidov približati se želimo optimalnim pogojem (dobra vidljivost in čim manj nanosa).

Začetni pogoji detekcije oligonukleotidov na poliakrilamidnem gelu z ureo, katere bomo tekom optimizacije spreminjali bodo: 30 minutna elektroforeza 15 % poliakrilamidnega gela z ureo na 200 V. Po elektroforezi bo gel barvan 30 minut z 0,02 % metilenskim modrilom.

4.1.2 Označevanje DNA s fluoroforom in detekcija fluorescentno označenih kratkih oligonukleotidov

Ker želimo izvedeti stopnjo razgradnje DNA v endosomih, bomo DNA fluorescentno označili in jo nato zaznali na gelu. Tako jo bomo lahko tudi ločili od naravno prisotne DNA.

Optimizirali bomo razmerje med dNTP in fluorescentno označenimi dUTP za optimalno zaznavo in čim manjšim vnosom fluorescentno označenimi dUTP. Uporabili bomo fluorofora FITC in Cy5.

Preglednica 8 nam predstavlja ekscitacijsko in emisijsko valovno dolžino fluorescentnih barvil Cy5 in FITC.

Barvilo	Ekscitacijska valovna dolžina [nm]	Emisijska valovna dolžina [nm]
FITC	492	517
Cy5	649	670

Preglednica 8: Ekscitacijski in emisijski valovni dolžini barvil FITC in Cy5. [28], [29]

Prav tako bomo primerjali intenziteto zaznavanja fluorescentno označenih oligonukleotidov z navadnim fotoaparatom in sistemom IVIS Lumina.

4.2 Optimizacija izolacije endosomov z magnetnimi nanodelci

Za optimizacijo izolacije endosomov z magnetnimi nanodelci iz celic HEK293 in RAW264.7 se bomo poslužili nekaterih že znanih postopkov izolacije endosomov - z lateksnimi kroglicami in ultracentrifugiranjem. Postopek je opisan v poglavju 3.2.9 (Izolacija endosomov z magnetnimi nanodelci).

Ob analizi posameznih frakcij bomo preverili specifičnost izolacije. Najprej bomo analizirali vsebnost DNA v posameznih frakcijah. Pri tem bomo pozorni na to, ali zaznamo DNA, RNA ali celo proteine.

Zunajcelično DNA, ki bi motila zaznavanje razgrajene DNA v endosomih bomo odstranili z zamenjavo PBS s Hankovim pufrom (ne vsebuje EDTA), z dodano DNAzo. RNA v

celicah pa bomo odstranili z RNAzo v homogenizacijskem pufru. DNAzo in RNAzo bomo iz vzorca odstranili z dodatnim spiranjem s PBS.

4.3 Zaznavanje označenih oligonukleotidov v endosomih

Za zaznavanje označenih oligonukleotidov v endosomih bomo že optimizirano izolacijo endosomov z magnetnimi nanodelci iz celic HEK293 nadalje optimizirali tako, da bo primerna tudi za celice RAW264.7, za katere pričakujemo boljše rezultate, saj je njihov primarni namen endocitoza. V celice RAW264.7 bomo vnesli tudi fluorescentno označeno DNA.

Najprej bomo optimizirali gojišče v katerem celice gojimo, da bodo hranila nevtralna in ne bodo motila endocitoze. Ker bomo vnesli fluorescentno označeno DNA prek celične membrane bomo morali tudi odstraniti vso DNA, ki je celica ni endocitirala, ker bi drugače motila signal. To bomo naredili z uporabo Hankovega pufra z dodatkom DNAze.

4.4 Primerjava izolacije z ultracentrifugiranjem in magnetnimi nanodelci

Endosome celic HEK293 in RAW264.7 bomo izolirali z metodo ultracentrifugianja in optimizirano metodo s polietileniminom prevlečenimi magnetnimi nanodelci. Specifičnost posamezne metode bomo preverili z nanosom frakcij po izolaciji na NADS-PAGE in s prenosom western.

Preglednica 9 prikazuje zaznane specifične proteine, njihovo lokacijo v celici in predvideno frakcijo po izolaciji z magnetnimi nanodelci.

Protein	Lokacija v celici
EEA1	Zgodnji endosom, citoplazma
Katepsin B	Lizosom, melanosom
SDH	Mitohondrijska notranja membrana
β-aktin	Citoplazma, citoskelet
p62	Jedro, pozni endosom

Preglednica 9: Lokacija proteinov, značilnih za posamezne znotrajcelične organele.

Frakcijam po izolaciji smo s testom BCA izmerili koncentraciji proteinom in nanesli na 10 % NaDS gel:

- Po izolaciji s polietileniminom prevlečenimi magnetnimi nanodelci 1 µg proteinov.
- Po izolaciji z ultracentrifugiranjem 5 µg proteinov.

Po ločitvi proteinov smo prenesli proteine s prenosom western na nitrocelulozno membrano, kjer smo jih zaznali s specifičnimi protitelesi.

4.5 Določitev znotrajcelične lokacije s konfokalno mikroskopijo

Za določitev znotrajcelične lokacije bomo uporabili transfekcijo, s katero bomo v celico vnesli konstrukt, ki bo z barvilom označil endosom. Po transfekciji bomo v gojišče celic RAW264.7 dodali magnetne nanodelce, barvane z rodaminom123, saj le-ta ne spreminja lastnosti magnetnih nanodelcev.

Po kratki skupni inkubaciji celic in magnetnih nanodelcev bomo s konfokalnim mikroskopom in ustreznimi nastavitvami zaznave barvil določili lokacijo endosomov in magnetnih nanodelcev. Slikali bomo isti del celice z različnimi nastavitvami mikroskopa, nato pa bomo sliko sestavili. Tako bomo določili lokacijo magnetnih nanodelcev glede na lokacijo endosomov.

5 REZULTATI

5.1 Optimizacija poliakrilamidne DNA elektroforeze

5.1.1 Detekcija kratkih oligonukleotidov

Slika 10 prikazuje gel po začetnih pogojih optimizacije poliakrilamidne DNA elektroforeze za zaznavo kratkih oligonukleotidov, ki so opisani v poglavju 4.1.1. (Detekcija kratkih oligonukleotidov) (Slika 10).



Slika 10: DNA na 15 % poliakrilamidnem gelu po 30-minutni elektroforezi pri 200 V. Gel barvan 30 minut z 0,02 % metilenskim barvilom.

Elektroforezo smo ponovili z drugačnimi nanosi oligonukleotidov (Slika 11).



Slika 11: DNA na 15 % poliakrilamidnem gelu po 10-minutni elektroforezi pri 200 V. Gel barvan 30 minut z 0,02 % metilenskim barvilom.

Elektroforezo smo ponovili in barvali z barvilom SYBR Gold (Slika 12).



Slika 12: DNA na 15 % poliakrilamidnem gelu po 15-minutni elektroforezi pri 150 V. Gel barvan 30 minut z 1-kratnim SYBR Gold v TBE pufru. Ostanek DNA je viden v nanašalnih vdolbinah.

Naredili smo 15 % gel za DNA elektroforezo brez dodane MQ. Sestava gela: 5,63 mL 40% akrilamidne raztopine, 7,2 g uree, 1,5 mL 10-kratnega TBE pufra, 75 μ L 10 % APS in 7,5 μ L TEMED. Gel je kristaliziral in ni bil uporaben za izvedbo elektroforeze.



Elektroforezo smo ponovili na 20 % poliakrilamidnem gelu (Slika 13).

Slika 13: DNA na 20 % poliakrilamidnem gelu po 30-minutni elektroforezi pri 150 V. Gel barvan 20 min z 10-kratnim SYBR Gold v TBE pufru.

Preglednica 10 prikazuje vse preizkušene pogoje zaznavanja kratkih nukleotidov na gelu.

	Poliakrilamidni	Pogoji	Barvilo	Pogoji	Najkrajši zaznani
	gel	elektroforeze		barvanja	oligonukleotid in
					njegov nanos
1.	15 %	30 min, 200 V	Metilensko	0,02 %, 30 min	23 nt (500 pmol)
			modrilo		
2.	15 %	10 min, 200 V	Metilensko	0,02 %, 30 min	15 nt (1000
			modrilo		pmol)
3.	15 %	15 min, 150 V	SYBR Gold	1×, 30 min	11 nt (1000
					pmol)
4.	20 %	30 min, 150 V	SYBR Gold	10×, 20 min	5 nt (8000 pmol)

Preglednica 10: Pregled pogojev elektroforeze in barvanja in njihovega vpliva na zaznavo kratkih oligonukleotidov DNA na gelu.

5.1.2 Označevanje DNA s fluoroforom in detekcija fluorescentno označenih kratkih oligonukleotidov

DNA, namenjeno vnosu v celice, smo z metodo PCR fluorescentno označili tako, da smo poleg običajnih neoznačenih dNTP v reakcijo dodali dUTP, označen s fluoroforoma Cy5 ali FITC.

Nanos na 1 % agarozno gel z različnimi razmerji med dNTP in fluorescentno označenimi dUTP (Slika 14).



Slika 14: Produkti reakcije PCR, označeni s fluoroforom FITC, pripravljeni v različnih razmerjih dUTP - FITC : neoznačenim dNTP (1:5, 1:10, 1:20).. Za kontrolo je nanesena neoznačena DNA. Elektroforeza je potekala v 1 % agaroznem gelu, 40 min, 110 V, pri kateri ni prisotnega EtBr (dodan le v neoznačeno DNA in standard velikosti).

Produkti reakcije PCR slikani s sistemom IVIS Lumina (Slika 15).





Na 20 % poliakrilamidni gel smo nanesli oligonukleotida dolžine 5 nt in 23 nt, označena s fluoroforoma (Cy5 in FITC) (Slika 16).



Slika 16: Detekcija kratkih fluorescentno označenih oligonukleotidov na 20 % poliakrilamidnem gelu po 30-minutni elektroforezi pri 150 V. Množina nanesenih oligonukleotidov je bila od 0,5 - 25 pmol. Detekcija s sistemom IVIS Lumina.

5.2 Optimizacija izolacije endosomov magnetnimi Ζ nanodelci

Celice smo gojili v prisotnosti magnetnih nanodelcev kot je opisano v metodah, poglavje 3.2.9 (Izolacija endosomov z magnetnimi nanodelci). Magnetni nanodelci so veliki do 1 μm.

Celice brez magnetnih nanodelcev

Celice z magnetnimi nanodelci



Slika 17: Celice HEK293 v gojišču z in brez magnetnih nanodelcev. Slikano z invertnim svetlobnim mikroskopom (40× povečava). Puščice označujejo magnetne nanodelce.

Na sliki 17 vidimo celice pred samo homogenizacijo, na sliki 18 pa celice po homogenizaciji z 22 G iglo.

15-kratni poteg skozi iglo

20-kratni poteg skozi iglo



Slika 18: Celice HEK293 po homogenizaciji z 22 G iglo (40× povečava). Slikano z invertnim svetlobnim mikroskopom.

ANA KUNŠEK

Frakcije po izolaciji z magnetnimi nanodelci, smo nanesli na 20 % poliakrilamidni gel z ureo in izvedli elektroforezo (Slika 19).



Slika 19: Frakcije po izolaciji z magnetnimi nanodelci na 20 % poliakrilamidnem gelu z ureo (30 min, 150 V). SNM - magnetni supernatant, E - endosomska frakcija. 1- nestimulirane celice, 2-celice, stimulirane z DNA, 3-celice, stimulirane z TTCGT in m80

Frakcijam smo ločeno dodali DNAzo in RNAzo (Slika 20).



Slika 20: Frakcije, izolirane z magnetnimi nanodelci na 20 % poliakrilamidnem gelu (30 min, 150 V). Frakcijama SNM in E smo dodatno dodali DNAzo oz. RNAzo. SNM - magnetni supernatant, E endosomska frakcija. 1- nestimulirane celice, 2-celice stimulirane z DNA.

ANA KUNŠEK

Ponovno smo nanesli vzorce na 20 % poliakrilamidni gel z dodatkom 0,1 mg/mL RNAze v homogenizacijskem pufru (Slika 21).



Slika 21: Razgradnja DNA v različnih frakcijah izolacije na 20 % poliakrilamidnem gelu (30 min, 150 V). SNM - magnetni supernatant, E - endosomska frakcija. 1- nestimulirane celice, 2-celice stimulirane z DNA, 3-celice stimulirane z TCGTT in m80.

5.3 Zaznavanje označenih oligonukleotidov v endosomih

Uporabili smo celice RAW264.7, kjer smo FBS v gojišču zamenjali s 0,5 mg/mL BSA. Endosomske frakcije po izolaciji smo nanesli na 20 % poliakrilamidni gel z ureo (Slika 22).



Slika 22: Izolacija endosomov iz celic po inkubaciji s fluorescentno označeno DNA-Cy5 oz. DNA-FITC. Posneto z napravo IVIS Lumina. Nastavitve se razlikujejo za posamezno vezano barvilo. 1, 2 in 4 so endosomske frakcije, izolirane iz celic, stimuliranih z označeno DNA. 3, 5 in 6 so posnetki kontrolnih DNA, uporabljenih za nastavitev naprave.

5.4 Primerjava rezultatov izolacije z ultracentrifugiranjem in magnetnimi nanodelci

Z NaDS-PAGE in prenosom western določimo proteine v posameznih frakcijah po izolaciji s polietileniminom prevlečenimi magnetnimi nanodelci (Slika 23).



Slika 23: Detekcija proteinov v različnih frakcijah po izolaciji z magnetnimi nanodelci iz makrofagov. EEA1 (160 kDa) in katepsin B (25 – 30 kDa) sta značilna za endosome, SDH (70 kDa) je značilen za mitohondrije, β -aktin (42 kDa) pa je značilen za citosol.

Izolacijo s polietileniminom prevlečenimi nanodelci smo primerjali med celicami HEK293 in RAW264.7. Za lažjo primerjavo izolacije med celicami HEK293 in RAW264.7 naredimo grafični prikaz, na katerem primerjamo zaznavo posameznega proteina v frakciji pri večih ponovitvah. Slika 23 prikazuje primer ene membrane s katero smo zaznali

ANA KUNŠEK

proteine v posameznih frakcijah. Izolacijo smo na celicah HEK293 naredili 7-krat, na celicah RAW264.7 pa 3-krat.

Slika 24 prikazuje graf s katerim primerjamo specifičnost izolacije med celicami HEK293 in RAW264.7. 100 % na grafu pomeni, da smo protein zaznali pri vseh ponovitvah, 0 % pa pri nobeni od ponovitev. Višina posameznega stolpca nam prikazuje seštevek vseh prisotnih proteinov v določeni frakciji (višji kot je stolpec, več proteinov smo zaznali v tej frakciji).



Slika 24: Primerjava posameznih frakcij po izolaciji z magnetnimi nanodelci na celicah HEK293 in RAW264.7. Primerjamo odstotke zaznave različnih proteinov v frakcijah pri več ponovitvah (n) izolacij endosomov: SNM (nemagnetni supernatant), PNM (nemagnetni pelet), MP (magnetni pelet) in E (endosomska frakcija). n = 7 (HEK293), n = 3 (RAW264.7)

Endosome smo izolirali tudi z metodo z ultracentrifugiranjem. Postopek je natančneje opisan v poglavju 3.2.8 (Izolacija endosomov z ultracentrifugiranjem) (Slika 25).



Slika 25: Detekcija proteinov v različnih frakcijah po izolaciji z ultracentrifugiranjem. EEA1 (160 kDa) in katepsin B (25 – 30 kDa) sta značilna za endosome, SDH (70 kDa) za mitohondrije, p62 (62 kDa) za jedrsko frakcijo, β -aktin (42 kDa) pa je značilen za citosol.

5.5 Določitev znotrajcelične lokacije s konfokalno mikroskopijo

S konfokalno mikroskopijo smo preverili dejansko lokacijo endocitiranih magnetnih nanodelcev, označenih z barvilom rodamin123 (Slika 26).

FYVE - mCherry







Rab5 - mCherry



Slika 26: Lokacija magnetnih nanodelcev v celicah. Vijolično so obarvani proteini (FYVE ali Rab5), ki označujejo zgodnje endosome, z modro pa magnetni nanodelci. Rumene puščice označujejo endosome, v katerih so magnetni nanodelci. Regije, ker je zaznati isto lokacijo proteina in magnetnih nanodelcev, so na sliki prekrivanja obarvane belo. Merilo velikosti je 10 µm (daljica bele barve).

6 RAZPRAVA

6.1 Optimizacija DNA elektroforeze

6.1.1 Detekcija kratkih oligonukleotidov

Ker nas zanimajo manjši oligonukleotidi DNA, katerih velikosti ne poznamo, smo najprej izbrali protokol za zaznavo kratkih oligonukleotidov. Uporabili smo 15 % poliakrilamidni gel za DNA elektroforezo, ki je sicer optimiziran za določevanje oligonukleotidov po reakcijah PCR, ki imajo 18 - 30 bp [21]. Poleg tega pa gel vsebuje še ureo, ki denaturira sekundarno strukturo DNA in omogoči ločbo enoverižnih oligonukleotidov le na osnovi njihove dolžine.

Za barvanje smo uporabili metilensko modrilo oziroma barvilo SYBR Gold, ki barvata enoverižne oligonukleotide, medtem ko EtBr dobro barva le dvoverižno DNA zaradi interkalacije med dvojno vijačnico.

Na 15 % poliakrilamidnem gelu smo po 30-minutni elektroforezi pri 200 V zaznali oligonukleotide daljše od 23 nukleotidov (nt), ne pa 5 nt dolgih oligonukleotidov. Pri 23 nt zaznamo liso tako pri nanosu 500 pmol kot 1000 pmol oligonukleotida, vendar je lisa v obeh primerih brez jasnih mej zaradi difuzije v gel. Najlepše je na gelu viden oligonukleotid dolžine 32 nt. Velikost lise je sorazmerna količini nanesenega oligonukleotida. Zaznali smo tudi genomsko DNA in opazili značilno razporeditev v obliki sledi (ang. smear). Najkrajša dolžina oligonukleotidov, ki smo jo zaznali je bila tudi pri genomski DNA okoli 23 nt.

Da bi zaznali tudi krajše nukleotide smo poleg 5 nt in 23 nt dolgih oligonukletodov nanesli tudi 11 in 15 nt dolga oligonukleotida, za primer, če bi bila zaznava med 5 nt in 23 nt.

Na 15 % poliakrilamidnem gelu po 10-minutni elektroforezi pri 200 V smo zaznali šibko liso pri oligonukleotidu s 15 nt pri nanosu 1000 pmol, medtem ko nismo zaznali lis pri oligonukleotidih z 11 nt in 5 nt. Poleg tega nam je uspelo povečati občutljivost, saj smo uspešno zaznali 23 nt dolge oligonukleotide že pri nanosu 200 pmol. Opazili smo, da je pri krajših oligonukleotidih, ne glede na količino nanesene DNA, ostrina lis manjša, zato smo predvideli, da krajši oligonukleotidi hitreje kot daljši izplavajo iz gela med barvanjem.

Namesto metilenskega modrila, smo za barvanje gela uporabili SYBR Gold, ki po navedbah proizvajalca omogoča večjo občutljivost [22].

Z zamenjavo metilenskega modrila z barvilom SYBR Gold smo na gelu zaznali oligonukleotid 11 nt, kar potrjuje boljšo občutljivost barvanja. Prav tako smo boljše zaznali tudi oligonukleotid s 15 nt in 23 nt pri obeh nanosih. Še vedno pa nismo zaznali oligonukleotidov s 5 nt. Predvidevali smo, da manjši oligonukleotidi tudi z uporabo SYBR Gold ob barvanju izplavajo iz gela, zato smo poskusili narediti bolj zamrežen 15 % gel za DNA elektroforezo, ki pa ni bil uporaben. Poskusili smo tudi dodati barvilo hkrati z vzorci (kljub temu, da proizvajalec tega ne priporoča), saj nam vzorci zaradi izpuščenega postopka barvanja ne bi izplavali iz gela. Vendar tudi ta poskus ni uspel, saj na gelu brez dodatnega barvanja ni bilo mogoče zaznati DNA.

Poskusili smo še z 20 % poliakrilamidnim gelom [30], ki se je rutinsko uporabljal za zaznavo kratkih oligonukleotidov DNA po sekvenciranju. Da bi preprečili izpiranje oligonukleotidov, smo skrajšali čas barvanja (iz 30 na 20 min) in za 10-krat povečali koncentracijo barvila SYBR Gold.

Po elektroforezi na 20 % poliakrilamidnem gelu sled genomske DNA sega dlje od zadnje lise (10 nt) standarda velikosti, kar pomeni, da zaznamo fragmente DNA, ki so manjši od 10 nt. Oligonukleotida s 15 in 23 nt sta glede na standard velikosti na želenem položaju, medtem ko je oligonukleotid s 5 nt celo malenkost višje kot oligonukleotid z 11 nt. Počasnejše potovanje 5 nt je najbrž posledica velikega nanosa (8000 pmol in 16000 pmol) v primerjavi z ostalimi nukleotidi (1000 pmol). Glede na to, da je pri vseh oligonukleotidih nad liso pričakovane velikosti prisotna še vsaj ena dodatna lisa sklepamo, da se posamezni oligonukleotidi med seboj povežejo kljub predhodni denaturaciji. Pri lisi 23 nt dolgega oligonukleotida pa opazimo tudi manjše oligonukleotide, kar lahko pomeni, da je deloma razpadel.

Po vseh izboljšavah smo zaznali 5 nt dolge oligonukleotide, kar je bil naš cilj. Ugotovili smo, da najkrajši oligonukleotid med barvanjem dejansko izplava iz gela, zato smo barvanje omejili na največ 30 minut. Optimirani način detekcije omogoča tudi zaznavanje genomske DNA. Količina kratkih oligonukleotidov, ki smo jo bili sposobni zaznati, je še vedno zelo visoka (najnižja testirana količina 8000 pmol), kar bi bila lahko predstavljalo

omejitev pri zaznavi teh oligonukleotidov pri DNA, izolirani iz endosomov, zato smo se lotili še optimizacije detekcije fluorescentno označenih oligonukleotidov.

6.1.2 Označevanje DNA s fluoroforom in detekcija fluorescentno označenih kratkih oligonukleotidov

Prednost fluorescentno označene DNA je v visoki občutljivosti, slabost pa, ker na tak način ne moremo zaznati v celicah normalno prisotne DNA. Za fluorescentno označitev smo izbrali 3000 bp dolg genski zapis za mišji TLR9, ker nam je njegova velikost v naprej znana.

DNA smo označili z dUTP, ki je bil označen s FITC ali Cy5. dUTP se sicer nahaja v RNA, ker pa nismo imeli fluorescentno označenega dTTP smo v DNA vnesli dUTP. Preko nukleotida se tako fluorofora vgradita v strukturo DNA. Cy5 je za razliko od FITC bolj foto in pH stabilno barvilo ter ima manjšo avtofluorescenco. Znotraj DNA se Cy5 veže v mali in veliki žleb, zaradi drugačne ekscitacijske in emisijske valovne dolžine kot FITC pa smo ga lahko zaznali samo s sistemom IVIS Lumina [31].

Za določitev ustrezne koncentracije označenega nukleotida smo uporabili barvilo FITC, ki ne vpliva na stabilnost DNA in se ga lahko zazna z običajno kamero za slikanje DNA agaroznih gelov [32].

Najprej smo optimizirali razmerje med označenim dUTP in neoznačenimi dNTPji v PCR mešanici. Označene produkte smo zaznali z agaroznim gelom brez dodanega EtBr. Želeli smo namreč zaznati le s fluoroforom označeno DNA. EtBr smo dodali le v vzorec neoznačene DNA in v DNA standard velikosti.

Intenziteta produkta DNA pri razmerju dUTP-FITC : dNTP 1:10 je enaka kot pri razmerju 1:5, pri razmerju 1:20 pa bistveno slabša, zato smo za označevanje DNA izbrali razmerje dUTP-FITC : dNTP 1:10. V zmesi PCR ostane veliko nezreagiranih označenih dUTP, ki motijo zaznavo DNA na gelu, zato smo produkte PCR očistili.

Produkte reakcije PCR smo preverili tudi s sistemom IVIS Lumina, ki poleg DNA, označene z FITC, lahko zazna tudi DNA, označeno z Cy5. Jakost lis, ki ustrezajo produktu reakcije PCR, se s količino nanosa povečuje, hkrati pa pri očiščenih produktih reakcije PCR ni več vidnega ostanka nevezanih označenih dUTP.

Kratki označeni oligonukleotidi difundirajo v gelu, s čimer se izgublja ostrina lise. Pri daljšem oligonukleotidu je difuzija manj izrazita. S poskusom smo določili tudi nastavitve aparata IVIS Lumina (fotoaparat za slikanje bioloških preparatov, ki so lahko fluorescentno označeni, ang. bioimaging), ki smo ga uporabili za detekcijo označenih oligonukleotidov. Pokazali smo, da je zaznavanje fluorescentno označenimi oligonukleotidov občutljivejše kot zaznavanje neoznačenih oligonukleotidov, saj smo zaznali že 0,5 pmol fluorescentno označene DNA.

6.2 Izolacija endosomov

Za izolacijo endosomov iz celic poznamo kar nekaj metod, za izvedbo katerih so potrebni bodisi dragi reagenti, bodisi potrebujemo drago opremo; draga magnetno označena protitelesa oz. drage ultracentrifuge (tudi pri izolaciji s pomočjo lateksnih kroglic). S pomočjo magnetnih nanodelcev, prevlečenih s polietileniminom in brez dragih protiteles in/ali ultracentrifug smo dosegli izolacijo, ki loči endosome od drugih organelov celic in je zato ustrezna ter stroškovno ugodna metoda za nadaljnje raziskave endosomov. Magnetni nanodelci so veliki do 1 µm, zato smo pričakovali, da jih bodo celice endocitirale.

Pri izolaciji endosomov s polietileniminom prevlečenimi nanodelci nastane več frakcij. Predvidevali smo, da bodo v frakciji PNM prisotna jedra in deli membran, v frakciji SNM pa organeli, ki niso privzeli magnetnih nanodelcev. Medtem, ko smo v frakciji MP predvidevali prisotnost magnetnih nanodelcev z vezanimi deli membran, v frakciji E pa prisotnost liziranih endosomov brez magnetnih nanodelcev [25].

Frakciji SNM in E smo nanesli na 20 % poliakrilamidni gel z ureo. Ugotovili smo, da so nukleinske kisline prisotne tako v frakciji SNM kot v endosomski frakciji (E) pri nestimuliranih in z DNA stimuliranimi celicami. Zato smo podvomili, da zaznavamo samo DNA. Poleg tega tudi v endosomski frakciji, ki smo ji dodali m80 in TCGTT ne vidimo enako dolgih produktov, kot sta m80 in TCGTT.

Frakcijama smo zato ločeno dodali DNAzo in RNAzo, pri čemer nismo nanesli oligonukleotida m80, ker nas zanimajo predvsem manjše dolžine oligonukleotidov.

V vzorcih je večinoma prisotna RNA, saj po dodatku RNAze lise na gelu izginejo. Po dodatku DNAze pa se lise na gelu ne spremenijo. Ker nas zanima samo detekcija DNA, smo pri nadaljnjih izolacijah v homogenizacijski pufer dodali RNAzo.

49

Preverili smo tudi, če so na gelu slučajno prisotni tudi proteini. Zato smo vzorce predhodno inkubirali v pufru z NaDS in nato gel barvali z Instant Blue. Ugotovili smo, da zaznamo le nukleinske kisline in da so vsi proteini ostali v nanašalnih vdolbinah.

Pri ponovnem nanosu vzorcev (z dodatkom RNAze v homogenizacijskem pufru) na 20 % poliakrilamidni gel pri kontroli TCGTT opazimo poleg šibke lise pri 5 nt tudi močnejšo liso pri 40 nt. Te lise pri ostalih elektroforezah kot tudi tekom same optimizacije nismo opazili. Pri tej velikosti bi lahko lisa predstavljala medsebojno povezane produkte TCGTT. Med endosomskimi frakcijami je največ DNA v vzorcu, kjer smo celicam dodali m80 in TCGTT, nekoliko manj je je v vzorcu z dodano DNA (stimulirane celice), medtem ko je v vzorcu, kjer je celicam dodan samo PBS (nestimulirane celice) najmanj DNA. V frakcijah nemagnetnega supernatanta je količina DNA med različnimi vzorci približno enaka.

Ugotovili smo, da zaznamo DNA v vseh frakcijah izolacije endosomov, kar bi lahko pomenilo, da zaznamo tudi celično DNA in ne samo stimulacijske. Problema z zaznavo celične DNA se bomo izognili z uporabo fluorescentno označene DNA, ki jo bomo zaznali s sistemom IVIS Lumina.

Ker primarni namen endotelijskih celic HEK293 ni endocitoza, smo za zaznavo označenih oligonukleotidov DNA v izoliranih endosomih uporabili mišje makrofage – celice RAW264.7. HEK293 smo uporabljali, ker nas je zanimala primerjava metode med različnimi vrstami celic.

Zamenjali smo tudi gojišče celic. Pri prejšnjih poskusih s celicami HEK293 smo celice inkubirali v gojišču DMEM z 10 % FBS, kjer je v gojišču ostalo precej magnetnih nanodelcev. Pri inkubaciji RAW264.7 smo FBS zamenjali z 0,5 mg/mL BSA, ker zmanjša pozitivni naboj na magnetnih nanodelcih in omogoča lažjo vezavo DNA na magnetne delce. Zamenjava gojišča ne vpliva na čistost izolacije, ampak samo na količino DNA, vezane na magnetne nanodelce.

Izolacija endosomov s polietileniminom prevlečenimi nanodelci je bolj učinkovita na celicah RAW264.7. Izolacija endosomov iz celic HEK293 ni bila tako uspešna, saj zaznamo endosome v skoraj vseh frakcijah izolacije (proteina EEA1 in katepsin B), kar nakazuje, da magnetni nanodelci niso prišli v vse endosome. To je pričakovano, saj primarna funkcija celic HEK293 ni endocitoza. Endosomi so pri izolaciji iz celic RAW264.7 zagotovo prisotni le v endosomski frakciji. Hkrati smo pri celicah RAW264.7

bolje odstranili citoplazmo (protein β -aktin), saj je bila v endosomski frakciji prisotna samo v polovici primerov. Jedra so pri izolaciji celic HEK293 prisotna v vseh frakcijah, medtem ko so pri izolaciji iz celic RAW264.7 samo v PNM, kjer smo jih tudi pričakovali. Mitohondrijske proteine zaznamo pri obeh vrstah celic v nemagnetnem peletu, kjer jih pričakujemo, in v endosomski frakciji. Razlaga za prisotnost mitohondrijskih proteinov v endosomski frakciji je lahko, da so se mitohondriji razgradili v endosomih, tako da zaznamo njihove proteine.

Pri izolaciji endosomov s polietileniminom prevlečenimi magnetnimi nanodelci smo ugotovili, da se bolje izolira endosome iz celic, katerih primarna naloga je endocitiranje, to so npr. celice RAW264.7. Endosome smo izolirali tudi z ultracentrifugiranjem, tako da smo s tem preverili, v kolikšni meri se čistost endosomskih frakcij razlikuje.

6.3 Zaznavanje označenih oligonukleotidov v endosomih

Magnetni nanodelci z označeno DNA se lahko prilepijo tudi na membrane celice, zato smo morali zunajcelično DNA odstraniti. Ker je v homogenizacijskem pufru prisotna EDTA, ki DNAzo inhibira, smo en korak spiranja s PBS zamenjali s Hankovim pufrom z DNAzo. Tako smo razgradili vso označeno DNA, ki je bila prisotna na membrani celic in s tem omogočili zaznavo samo endocitirane označene DNA. Endosomske frakcije po izolaciji smo nanesli na 20 % poliakrilamidni gel z ureo.

V celicah, ki niso bile stimulirane z DNA-Cy5, le-te ni prisotne, 300 nt produkte pa opazimo v vzorcu endosomov iz celic, ki smo jim dodali DNA-Cy5. Iz tega sklepamo, da je do razgradnje prišlo, saj nerazgrajena DNA-Cy5 velikosti 3000 nt potuje višje. V endosomski frakciji iz celic, ki smo jim dodali m80-FITC velikosti 23 nt, nismo opazili razgradnih produktov. Kontrolna oligonukleotida TCGTT-FITC in m80-FITC sta prisotna, torej je zaznava barvila FITC ustrezna. Vsi vzorci so bili naneseni na isti gel in podvrženi enakim elektroforeznim pogojem. Uspelo nam je torej zaznati 300 nt dolge oligonukleotide.

Sama razgradnja DNA je lahko zaradi vgrajenih fluorescentno označenih dUTP slabša, ker DNAza težje pride do same verige DNA. Zaradi tega bi lahko označili DNA samo na 3' ali 5' koncu. Tako razgradnja zagotovo ne bi bila ovirana, bi pa dobili slabši signal, saj bi na eno molekulo DNA prišel samo en fluorofor.

6.4 Primerjava rezultatov izolacije z ultracentrifugiranjem in magnetnimi nanodelci

Različne izolacije endosomov smo primerjali med seboj, da bi ugotovili, če je metoda izolacije endosomov s polietileniminom prevlečenimi nanodelci primerljiva metodi izolacije z ultracentrifugiranjem. Preverili smo tudi specifičnost obeh metod tako, da smo primerjali proteine, značilne za posamezne celične organele, ki smo jih zaznali z NaDS-PAGE in prenosom western.

Označevalce za endosome (EEA1 in katepsin B) smo pri metodi ultracentrifugiranja glede na vrsto celic zaznali v različnih interfazah. Pri HEK293 so bili endosomi v interfazi med 25 in 35 % saharoznim pufrom, pri celicah RAW264.7 pa v 35 % saharoznem pufru in v interfazi med 35 in 62 % saharoznim pufrom. Mitohondrijski protein SDH smo zaznali v vseh frakcijah ultracentrifugiranja. V progah z intenzivnejšimi lisami označevalcev opazimo pri 25 kDa dodatno liso, kar pripisujemo nespecifični vezavi protitelesa. Citosolni protein β -aktin smo zaznali pri celicah RAW264.7 v vseh frakcijah, pri HEK293 pa samo v supernatantu pred ultracentrifugiranjem.

Pri izolaciji z ultracentrifugiranjem smo v frakciji, kjer so prisotni endosomi, pri obeh vrstah celic zaznali tudi jedrne proteine (p62), kar pomeni, da izolacija ni tako čista. Pri izolaciji s polietileiminom prevlečenimi magnetnimi nanodelci smo namreč jedrni protein zaznali v endosomski frakciji samo pri izolaciji iz celic HEK293. Tako kot pri izolaciji z magnetnimi nanodelci smo pri obeh vrstah celic dobili v vseh frakcijah tudi mitohondrije. Zanimivo je, da smo pri ultracentrifugiranju zaznali pri obeh vrstah celic v frakcijah z endosomi tudi notranjo membrano mitohondrija, kar bi lahko pomenilo, da se mitohondriji med ultracentrifugiranjem delno lizirajo in ustavijo na drugih interfazah. Tako kot pri izolaciji endosomov z magnetnimi nanodelci se tudi pri izolaciji z ultracentrifugiranjem tekom analize mitohondriji razgrajujejo v endosomih, zato jih zaznamo v endosomskih frakcijah [33].

6.5 Določitev znotrajcelične lokacije s konfokalno mikroskopijo

Za določitev lokacije magnetnih nanodelcev v endosomih smo uporabili celice RAW264.7, ker smo z njimi tudi dobili boljše rezultate pri izolaciji endosomov kot s celicami HEK293. Za študij endosomov so zaradi svojih lastnosti bolj primerne celice RAW264.7.

Za zaznavo zgodnjih endosomov smo uporabili genske konstrukte z genskim zapisom za proteina FYVE in Rab5, ki sta bila spojena z genskim zapisom za fluorescentni protein mCherry. Zgodnje endosome smo izbrali, ker se lahko njihova vsebina razgradi znotraj celice ali pa se izloči v zunajcelični prostor.

Med izolacijo endosomov iz celic so se magnetni nanodelci akumulirali predvsem v zgodnjih endosomih. Prisotni so bili tudi v okolici celic in v samem citosolu celice, kar pa ločbe endosomov ne moti, saj se te magnetne nanodelce odstrani že v prvi stopnji ločbe. S konfokalno mikroskopijo nanodelcev ne zaznamo v vseh endosomih, kar je pričakovano, saj celica ne porabi vseh endosomov za endocitiranje. Dokazali smo, da celice magnetne delce endocitirajo.

7 SKLEP

Raziskave endosomov in dinamike njihove vsebine so za potrebe razvoja zdravil izredno pomembne, zato potrebujemo tudi metode, ki nam omogočajo zaznavo vsebine endosomov in njihovega razvoja. Zato smo tudi vzpostavili metodo, ki temelji na hitri in natančni detekciji.

Ugotovili smo da:

- za ločbo oligonukleotidov manjših od 20 nt potrebujemo 20 % poliakrilamidni gel z ureo, ki ga barvamo z barvilom SYBR Gold,
- je ustrezno razmerje dNTP : fluorescentno označenimi dUTP 1 : 10,
- manjši oligonukleotidi hitreje difundirajo iz gela,
- fluorescentno označeno DNA zaznamo pri veliko nižji množini kot navadno DNA,
- celice DNA v endosomih razgradijo na 300 nt dolge fragmente,
- so za raziskave endosomov boljše celice, katerih glavna naloga je endocitiranje (npr. RAW264.7),
- je metoda izolacije endosomov s polietileniminom prevlečenimi nanodelci boljša od metode ultracentrifugiranja,
- s polietileniminom prevlečene magnetne nanodelce celica endocitira in se nahajajo v zgodnjih endosomih.

Z izolacijo endosomov s polietileniminom prevlečenimi nanodelci bi lahko zaznavali dinamično razgradnjo DNA. To bi naredili z različno dolgo inkubacijo celic z DNA in uporabo različnih inhibitorjev DNAze tipa II.

Na magnetne nanodelce bi lahko tudi pripeli različne ligande, za katere želimo izvedeti, če jih endosomi razgradijo (proteine, različna zdravila, itd.). Tako bi dobili direkten vpogled v sposobnosti celične razgradnje.

8 **VIRI**

- B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts in P. Walter, *Essential cell biology*, Četrta izdaja. New York: Garland science, 2013.503-523
- [2] S. D. Conner in S. L. Schmid, "Regulated portals of entry into the cell," *Nature*, 422: 37–44, 2003.
- K. A. Abbas, A. H. Lichtman in S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*, Osma izdaj. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015. 51-83
- [4] A. Spang, "On the fate of early endosomes," *Biol. Chem.*, 390: 753–759, 2009.
- [5] M. Lakadamyali, M. J. Rust in X. Zhuang, "Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes," *Cell*, 124 (5): 997–1009, 2006.
- [6] "Endosomes," *Nature*. [Online]. Available: https://www.nature.com/subjects/endosomes. [Dostopano: 01-Nov-2017].
- [7] A. Nowacek, I. Kadiu, J. Mcmillan in H. E. Gendelman, "Immunoisolation of Nanoparticles Containing Endocytic Vesicles for Drug Quantitation," *Methods Mol. Biol.*, 991: 41–46, 2013.
- [8] R. Botelho, Ed., *Phagocytosis and phagosomes: Methods and protocols*, 2017. 241-248
- [9] G. M. E. De Araújo, L. A. Huber in T. Stasyk, "Isolation of Endocitic Organelles by Density Gradient Centrifugation," *Methods Mol.*, 424 (1): 317–331, 2009.
- [10] S. Akira, S. Uematsu in O. Takeuchi, "Pathogen Recognition and Innate Immunity," *Cell*, 124: 783–801, 2006.
- [11] H. Kumar, T. Kawai in S. Akira, "Pathogen recognition by the innate immune system.," *Int. Rev. Immunol.*, 30 (1): 16–34, 2011.
- [12] R. Thwaites, G. Chamberlain in S. Sacre, "Emerging role of endosomal toll-like receptors in rheumatoid arthritis," *Front. Immunol.*, 5: 1–8, 2014.

- [13] G. Hartmann, "Nucleic Acid Immunity," in *Advances in Immunology*, Prva izdaja, Elsevier Inc., 2017, 121–169.
- [14] "DNASE2," UniProt, 2017. [Online]. Available: https://www.uniprot.org/uniprot/O00115. [Dostopano: 18-Feb-2018].
- [15] "TREX1," UniProt, 2018. [Online]. Available: http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NSU2. [Dostopano: 18-Feb-2018].
- [16] "DNASE1," UniProt, 2018. [Online]. Available: https://www.uniprot.org/uniprot/P24855. [Dostopano: 18-Feb-2018].
- [17] M. P. Chan, M. Onji, R. Fukui, K. Kawane, T. Shibata, S. I. Saitoh, U. Ohto, T. Shimizu, G. N. Barber in K. Miyake, "DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9," *Nat. Commun.*, 6: 1–10, 2015.
- [18] K. Strojan, J. Lojk, V. B. Bregar, P. Veranič in M. Pavlin, "Glutathione reduces cytotoxicity of polyethyleneimine coated magnetic nanoparticles in CHO cells," *Toxicol. Vitr.*,41: 12–20, 2017.
- [19] BIO-RAD, "Mini-PROTEAN ® 3 Cell Instruction Manual." Bio-rad.
- [20] Thermo Scientific, "Thermo Scientific GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder," 2016.
- [21] Qiagen, "Polyacrylamide gel analysis of oligonucleotides," 2002.
- [22] Molecular Probes, "SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain," 2006.
- [23] "Bicinchoninic Acid Kit," Protein quantitation. [Online]. Available: http://www.sigmaaldrich.com/life-science/proteomics/proteinquantitation/bicinchoninic-acid-kit.html. [Dostopano: 03-Jan-2018].
- [24] T. F. Scientific, "iBind Flex Western System." 2015.
- [25] H. S. Li, D. B. Stolz in G. Romero, "Characterization of endocytic vesicles using magnetic microbeads coated with signalling ligands," *Traffic*, 6: 324–334, 2005.
- [26] A. Wittrup, S. Zhang, K. J. Svensson, P. Kucharzewska, M. C. Johansson in M. Mörgelin, "Magnetic nanoparticle-based isolation of endocytic vesicles reveals a
role of the heat shock protein GRP75 in macromolecular delivery," *Proc. Natl. Acad. Sci. United State Am.*, 107 (30): 13342–13347, 2010.

- [27] C. J. Schröter, M. Braun, J. Englert, H. Beck, H. Schmid in H. Kalbacher, "A rapid method to separate endosomes from lysosomal contents using differential centrifugation and hypotonic lysis of lysosomes," *J. Immunol. Methods*, 227: 161-168, 1999.
- [28] "Fluorescein-12-dUTP," Jena Bioscience GmbH. 2017.
- [29] "Aminoallyl-dUTP Cy5," Jena Bioscience GmbH. 2017.
- [30] "Polyacrylamide Gel Electrophoresis Sequencing Gel. (for DNA polymerase kinetics)," *Penn State Health Milton S. Hershey Medical Center*. .
- [31] O. Kroutil, I. Romancová, M. Šíp in Z. Chval, "Cy3 and Cy5 dyes terminally attached to 5'C End of DNA: Structure, dynamics, and energetics," *J. Phys. Chem. B*, 118 (47): 13564–13572, 2014.
- [32] T. Brown, D. Brown, T. J. Brown in A. Brown, "SYNTHESIS AND PROPERTIES OF FLUORESCENT OLIGONUCLEOTIDES," *Nucleic acids book*, 2018. [Online]. Available: https://www.atdbio.com/content/18/Synthesis-and-propertiesof-fluorescent-oligonucleotides. [Dostopano: 04-Mar-2018].
- [33] Y. Fujiwara, K. Wada in T. Kabuta, "Lysosomal degradation of intracellular nucleic acids-multiple autophagic pathways," *J. Biochem.*, 161 (2): 145–154, 2017.