

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MONIKA OVEN
MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI ŠTUDIJ INDUSTRIJSKE FARMACIJE

Ljubljana, 2018

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

MONIKA OVEN

**IZRAŽANJE MIMETIKOV RECEPTORJEV ZA ENDOTELIN-1 NA
NITASTIH BAKTERIOFAGIH IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**EXPRESSION OF MIMETICS OF RECEPTORS FOR ENDOTELIN-1
ON PHILAMENTOUS BACTERIOPHAGES AND *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE***

Ljubljana, 2018

Magistrsko naložko sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča. Analizo nukleotidnih zaporedij je opravilo podjetje GATC Biotech, Konstanz, Nemčija. Elektroporacija celic *Saccharomyces cerevisiae* je bila izvedena na Inštitutu Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko izdelala sama pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča.

Ljubljana, 2018

Predsednik komisije za zagovor: izr. prof. dr. Petra Kocbek

Član komisije za zagovor: doc. dr. Stane Pajk

Kazalo vsebine

Abecedni seznam okrajšav	VII
1 Uvod.....	1
1.1 Endotelini in njihova biosinteza	1
1.2 Endotelinski receptorji.....	3
1.3 Koncentracije endotelinov in njihovo odstranjevanje iz organizma	3
1.4 Bolezenska stanja ob povišanju ET-1.....	4
1.4.1 Krvožilne bolezni	4
1.4.2 Srčno popuščanje.....	5
1.4.3 Ishemična bolezen srca.....	5
1.4.4 Migrena	5
1.4.5 Raynaudova bolezen	5
1.4.6 Subarahnoidna krvavitev.....	5
1.4.7 Prinzmetalova angina	6
1.4.8 Primarna pljučna hipertenzija.....	6
1.4.9 Rak	6
1.4.10 Ledvične bolezni in vpliv na ledvično hemodinamiko	7
1.5 Obstojeci antagonisti endotelinskih receptorjev in učinkovine za zmanjševanje učinkov endotelinov	8
1.6 Potencialni načini preprečevanja povišanih ravni ET-1	10
1.6.1 Sekvestracija ET-1 s protitelesom.....	10
1.6.2 Sekvestracija z umetnim topnim receptorjem	10
1.7 Predstavitev na bakteriofagu	11
1.8 Predstavitev na kvasovkah.....	12
2 Načrt za delo	14
3 Materiali in metode	18
3.1 Materiali.....	18
3.1.1 Naprave	18
3.1.2 Kemikalije in kompleti kemikalij.....	19
3.1.3 Biološki material	21
3.1.4 Recepture gojišč in pufrov	22
3.2 Metode za pripravo plazmidov	23
3.2.1 Plazmidi in ETt inserti.....	23

3.2.1.1	Vektor pIT2 za izražanje mimetikov endotelinskih receptorjev na kapsidi nitastih bakteriofagov	23
3.2.1.2	Vektor pYD1 za izražanje mimetikov endotelinskih receptorjev na površini kvasovke	24
3.2.1.3	Inserti mimetikov endotelinskih receptorjev	27
3.2.2	Elektroforeza	27
3.2.3	Ekstrakcija DNA iz gela.....	28
3.2.4	Obarjanje DNA	28
3.2.5	Restrikcija.....	29
3.2.5.1	Restrikcija vektorja pIT2 in insertov ETt z encimoma NcoI in NotI	29
3.2.5.2	Restrikcija vektorja pYD1 in amplikonov ETt z encimoma NheI in XhoI	29
3.2.6	Defosforilacija DNA	30
3.2.7	Ligacija DNA	30
3.2.8	Transformacija plazmidne DNA s topotnim šokom in selekcija na agarnem gojišču z ampicilinom	31
3.2.9	Izolacija plazmidne DNA iz <i>E. coli</i>	31
3.2.10	Verižna reakcija s polimerazo	32
3.2.11	Določitev nukleotidnega zaporedja	33
3.2.12	Elektroporacija <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
3.2.13	Verižna reakcija s polimerazo na osnovi kolonije kvasovk	34
3.3	Priprava in vrednotenje fagmidnih virionov s predstavljenimi konstrukti ETt	35
3.3.1	Pomnoževanje fagmidnih virionov v <i>E. coli</i>	35
3.3.2	Izolacija fagmidnih virionov	35
3.3.3	Ocena izražanja konstruktov ETt na fagmidnih virionih s testom ELISA.....	37
3.3.4	Ocena vezave endotelina s testom ELISA na paramagnetsnih kroglicah.....	38
3.3.5	Zamenjava aminokislinskega ostanka cisteina s serinom na mestu 106 v ETt17	
	39	
3.4	Izražanje konstruktov ETt na kvasovkah.....	40
3.4.1	Pomnoževanje kvasovk in izražanje fuzijskega proteina	40
3.4.2	Detekcija rekombinantnih konstruktov ETt	41
3.4.3	Pretočna citometrija.....	41
4	Rezultati in razprava	42
4.1	Izražanje konstruktov ETt na nitastih bakteriofagih in primerjalno vrednotenje njihove afinitete do endotelina	42
4.1.1	Ocena nivojev izražanja ETt na bakteriofagu	42

4.1.2	Primerjalno vrednotenje vezave konstruktov ETt na endotelin-1	45
4.2	Mutacija ETt-17.....	48
4.2.1	Vrednotenje izražanja konstrukta ETt-17mut na fagu	48
4.2.2	Primerjalno vrednotenje vezave ETt-17 in ETt-17mut na endotelin-1	49
4.3	Izražanje konstruktov ETt na kvasovkah <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100	50
4.4	Potencial endotelinskih pasti za uporabo v farmaciji	55
5	Sklep	57

Povzetek

Endotelini so peptidi z močnim vazokonstriksijskim delovanjem. Najpogostejši med njimi je endotelin-1, ki se najmočneje izraža v endotelijskih celicah krvožilnega sistema. Povečane ravni endotelinov se pojavljajo pri številnih bolezenskih stanjih (kardiovaskularne bolezni, srčno popuščanje, ishemična bolezen srca, migrena, Raynaudova bolezen, subarahnoidna krvavitev, Prinzmetalova angina, primarna pljučna hipertenzija, rak, ...), zato antagoniste endotelinskih receptorjev že uporabljamo v terapevtske namene. Alternativni pristop je vezava prostega endotelina z nevtralizacijskimi protitelesi ali topnimi receptorji, s čimer bi preprečili njegovo delovanje. Fragmente podtipa endotelinskega receptorja A₁, povezane z rigidnimi in/ali fleksibilnimi pentapeptidnimi linkerji, smo kot mimetike endotelinskega receptorja A izrazili na proteinskem plašču (kapsidi) nitastih bakteriofagov v obliki fuzije s kapsidnim proteinom p3 (uporabili smo predstavitev tipa 3+3, tj. fagmidni vektor) in na celični steni kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v obliki fuzije z aglutininom 2. Obseg izražanja konstruktov na bakteriofagu smo primerjalno ocenili posredno z encimskoimunskim testom, z analizo izražanja peptidnega zaporedja distančnika med endotelinskimi pastmi in nosilnim kapsidnim proteinom p3. V nadaljevanju smo s fagmidnimi delci, ki so na kapsidi izražali konstrukte endotelinskih pasti, izvedli še funkcijске teste. Izpostavili smo jih s streptavidinom prekritimi paramagnetnim kroglicam, na katere smo predhodno vezali biotiniliran endotelin-1, in interakcijo potrdili s konjugatom hrenove peroksidaze in protitelesa proti nitastim bakteriofagom. Ker nekaterih konstruktov endotelinskih pasti na kapsidi nitastega bakteriofaga nismo uspeli izraziti, smo poskusili še s predstavitvijo na kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*. V tem primeru smo stopnjo izražanja ocenili s fluorescenčno mikroskopijo in pretočno citometrijo, pri čemer smo uporabili fluorescenčno označena protitelesa proti peptidnemu zaporedju V5, dodanem na C-konec endotelinskih pasti. Endotelinske pasti, ki se niso izrazile na bakteriofagu, nismo uspeli izraziti niti na kvasovki. Endotelinska past z najvišjo afiniteto do endotelina-1 je vsebovala 5 cisteinskih ostankov. Ker se proteini s prostimi (nesparjenimi) cistenimi slabo izražajo na nitastem bakteriofagu, pri izražanju tovrstnih topnih rekombinantnih proteinov pa obstaja nevarnost tvorbe dimerov, smo z usmerjeno mutagenezo domnevno nesparjeni cisteinski ostanek zamenjali s serinom. Mutanta se je na bakteriofagu izražala dvakrat bolje in imela primerljivo afiniteto do endotelina-1 z izhodnim konstruktom ETt. Uspešno smo izrazili endotelinske pasti na obeh ekspresijskih sistemih, a bodo za razvoj zdravila, potrebne še dodatne raziskave.

Ključne besede: endotelin, nitasti bakteriofagi, *Saccharomyces cerevisiae*, fuzijski proteini

Abstract

Endothelins are peptides with strong vasoconstriction activity. The most prevalent of them is endothelin-1, which is also most strongly expressed in the endothelial cells of the vascular system. Increased endothelin levels occur in a number of diseases (cardiovascular disease, heart failure, ischemic heart disease, migraine, Raynaud's disease, subarachnoid haemorrhage, Prinzmetal angina, primary pulmonary hypertension, cancer, etc.) and endothelin receptor antagonists are already used therapeutically. An alternative therapeutic approach is to neutralize free endothelin via neutralizing antibodies or soluble receptors, thereby disabling its function. Fragments of the endothelin receptor subtype A connected with rigid and/or flexible pentapeptide linkers (i.e. endothelin receptor A mimetics or endothelin traps) were displayed on the protein coat (capsid) of filamentous bacteriophage as fusions to capsid protein p3 (we used phagemid display, i.e. type 3+3 display) and cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisiae* as fusions to agglutinin 2. On-phage expression levels were assessed comparatively using enzyme-linked immunosorbent assay by detecting the peptide sequence of a linker spliced between the endothelin trap and anchor protein p3. Next, phagemid particles displaying endothelin traps were subjected to functional assays; they were contacted with paramagnetic streptavidin-coated beads on which biotinylated endothelin-1 was coupled, and the interaction was confirmed with anti-phage–horse radish peroxidase conjugate antibodies. As some of the endothelin traps could not be displayed on filamentous phage, we tried to display them on yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We monitored expression levels by fluorescence microscopy and flow cytometry, whereby we used fluorescently labeled antibodies directed against the V5 tag fused to the endothelin traps constructs' C-termini. Endothelin traps that were not displayed on phage could not be efficiently displayed on yeast either. The endothelin trap with highest affinity for endothelin-1 contained 5 cysteine residues. As proteins with free (unpaired) cysteines are poorly displayed on filamentous phage and because ectopic expression of such recombinant proteins can result in formation of dimers, we used site-directed mutagenesis to exchange the presumed unpaired cysteine residue with serine. The on-phage expression level of endothelin trap mutant was two-fold higher compared to the parent construct and showed comparable endothelin-1 affinity. We have successfully expressed endothelin traps on both expression systems, but for the development of such a drug further research would be needed.

Key words: endothelin, filamentous bacteriophages, *Saccharomyces cerevisiae*, fusion proteins

Abecedni seznam okrajšav

2YT – bogato bakterijsko gojišče s triptonom, kvasnim ekstraktom in NaCl

AGA1 in **AGA2** – gena za adhezijski glikoprotein a-aglutinin

anti-V5-PE – protitelo, ki veže V5, označeno s fikoeritrinom (angl. *anti-V5 antibody-phycoerythrin*)

CHO – celična linija, ki izvira iz jajčnika kitajskega hrčka (angl. chinese hamster ovary)

Da – Dalton, enota relativne molekulske mase

ddH₂O - bidestilirana voda

dH₂O - destilirana voda

ECE-1/2/3 – proteaze, udeležene v proteolitično procesiranje prekurzorjev endotelina (angl. *endothelin converting enzyme -1/2/3*)

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina

ELISA – encimskoimunski test (angl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

ET-1/2/3 – endotelin-1/2/3

ET_{A/B} – receptor za endotelin A/B

F_{ab} – regija protitelesa, ki veže antigen

FasL – ligand prvega signala apoptoze (angl. *first apoptosis signal ligand*)

HEK – celična linija iz ledvice človeškega zarodka (angl. human embryonic kidney)

LB – bakterijsko gojišče (angl. *lysogeny broth*)

mRNA – informacijska ribonukleinska kislina

PBS – fosfatni pufer s soljo (angl. *phosphate-buffered saline*)

PCR – verižna reakcija z polimerazo (angl. *polimerase chain reaction*)

PEG – polietilenglikol

p3, p6, p7, p8, p9 – plaščni proteini nitastega bakteriofaga

pufer TAE – pufer za elektroforezo, sestavljen iz tris(hidroksimetil)aminometana, ocetne kisline in EDTA

SDS - natrijev dodecilsulfat (angl. *sodium dodecyl sulfate*)

ssDNA – enoverižna deoksiribonukleinska kislina

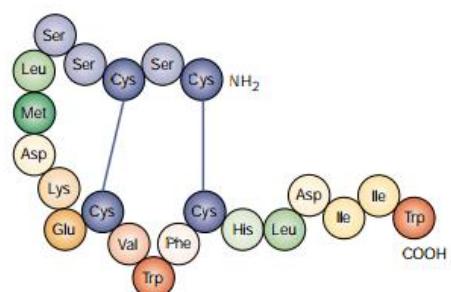
TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

YPD – bogato gojišče za kvasovke s kvasnim ekstraktom, peptonom in glukozo

YNB-CAA – kompleksno gojišče za kvasovke s kazamino kislinami

1 Uvod

1.1 Endotelini in njihova biosinteza



Slika 1: Primarna struktura endotelina-1 (1).

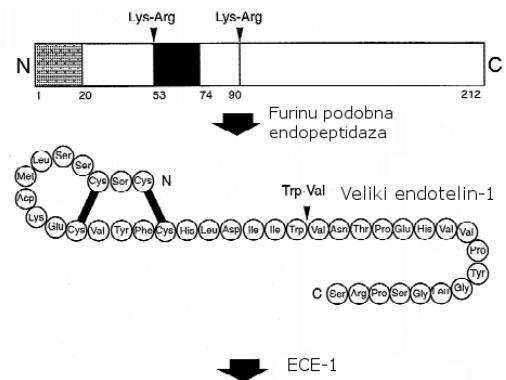
Endotelini so skupina vazoaktivnih peptidov s predstavniki endotelinom-1 (ET-1), endotelinom-2 (ET-2) in endotelinom-3 (ET-3) (1). ET-1 (slika 1) so odkrili leta 1985, ko so Hickey in sodelavci v gojišču celične kulture govejih endotelijskih celic odkrili spojino z

vazokonstriktijskim delovanjem, za katero so predvidevali, da je peptidne narave (2). Kasnejše raziskave so pokazale, da je homologen peptid prisoten tudi pri ljudeh – gen zanj se nahaja na kromosому 6, in sicer na lokusu 6p23-p24 (3), ki se prepiše v ~2000 nukleotidov dolgo mRNA, sestavljeno iz petih eksonov (4).

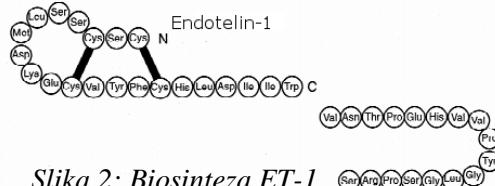
Prepisovanje te mRNA sprožijo številne signalne snovi, kot so nekateri vazokonstriktorji (vazopresin, angiotenzin, epinefrin, norepinefrin), trombin, citokini in rastni dejavniki (interlevkina 1 in 3, dejavnik tumorske nekroze α , granulocitno-makrofagne kolonije stimulirajoči dejavnik, interferon- γ , transformirajoči rastni dejavnik β), povišane ravni glukoze, leptina, holesterola, serotonina, inzulina, kortikosteroidov, eritropoetina, ciklosporinov in oksidiranih lipoproteinov nizke gostote. Na povišano izražanje endotelina-1 vplivajo tudi nekateri fizikalno-kemijski dejavniki (mehanski stres, hipoksija) ter fiziološki dejavniki, kot so agregacija trombocitov, starost, debelost in raven gibanja (5).

Poleg spodbujevalcev na prepisovanje gena seveda vplivajo tudi nekateri zaviralci, kot so vazodilatatorji (dušikov oksid, prostaglandina E₂ in I₂, bradikinin, atrijski natriuretični peptid, možganski natriuretični peptid), antikoagulantni (heparin, hirudin), progesteron, montelukast, tiazolidindioni, fibrati in β -blokatorji (5).

Iz mRNA gena za ET-1 se na ribosomih nato tvori prekurzorski protein preprotoendotelin, sestavljen iz 212 aminokislinskih ostankov. Ta ima na N-koncu signalno peptidno zaporedje, ki se odstrani prvo,



Slika 2: Biosinteza ET-1.



nato pa polipeptid cepi furinu podobna endopeptidaza ali peptidaza PC7 (slika 2) (6). Ta s cepitvijo proendotelina pred 53. in 90. aminokislino (tj. med argininom in lizinom) katalizira nastanek t.i. velikega ET-1 (7). Ta je že prisoten v krvožilnem sistemu in ima določeno vazokonstrikcijsko delovanje. Tam ga cepita membranski metaloproteinazi ECE-1 in ECE-2 (angl. *endothelin converting enzyme-1/2*). Cepitev poteka med aminokislinskima ostankoma na mestih 21 (tryptofan) in 22 (valin). Enaka cepitev se zgodi tudi pri endotelinih ET-2 in ET-3, a tako ECE-1 kot ECE-2 bolj učinkovito pretvarjata ET-1, kot ET-2 in ET-3 (8-10).

Končni polipeptid je sestavljen iz zaporedja 21 aminokislinskih ostankov, pri čimer se zveplovi atomi na štirih cisteinskih aminokislinskih ostankih povezujejo v dva disulfidna mostička, masa molekule pa je 2492 Da (7). Endotelini se izražajo v različnih tkivih, pri čemer je ET-1 najpogostešji in se primarno izraža v žilnih endotelijskih celicah, v srčnih mišičnih celicah in ledvičnih celicah, ET-2 v ledvicah in črevesju, ET-3 pa najdemo pretežno v možganih, črevesju in nadledvični žlezi (1, 4, 11).

Tudi encimi ECE se pojavljajo na številnih različnih tkivih v telesu. ECE-1 se izraža povsod po telesu, najboljsežneje v žilnem endoteliju, jajčnikih, testisih, v pljučih in sredici nadledvične žleze. ECE-2 se izraža predvsem v živčnih tkivih (7). Na šarenici goveda so odkrili tudi tretjo izobliko ECE-3, ki deluje specifično na veliki ET-3 (12).

ECE-1 ima strukturo, podobno nevtralni endopeptidazi, in obstaja v več izoblikah – pri ljudeh se pojavljajo štiri: ECE-1a, ECE-1b, ECE-1c in ECE-1d. Izoblike nastanejo zaradi alternativnega združevanja eksonov gena in se razlikujejo le na N-koncu molekule, kar vpliva na njihovo lokalizacijo v celici (13, 14). ECE-1a je najpogostešja izoblika in se skupaj z izoblikama ECE-1c in ECE-1d izraža na zunanji membrani celic, pri čemer je ECE-1d lahko tudi na membrani endosomov. Izoblika ECE-1b se nahaja v notranjosti celice v endosomalnem predelu ob trans delu Golgijskega aparata (13-15). Prav tako se v notranjosti celic izražajo vse štiri izoblike encima ECE-2, ki se razlikujejo le po N-končnem zaporedju, ki je del v citoplazmi. Analiza govejih tkiv je pokazala, da se izobliki ECE-2a-1 in ECE-2a-2 izražata v različnih tkivih vključno z ledvicami, jetri, testisi in endotelijskimi celicami, medtem ko se ECE-2b-1 in ECE-2b-2 izražata pretežno v možganih in nadledvični žlezi. Izobliki ECE-2a-1 in ECE-2b-2 sta pogostešji v primerjavi z drugima dvema (16).

Nahajanje encimov ECE v notranjosti celice je pokazatelj, da se ET-1 lahko shranjuje v sekretornih veziklih in sprošča ob prejetem signalu. To so potrdili pri endotelijskih celicah,

kjer se ET-1 shranjuje v Weibel Paladijevih telescih, ki degranulirajo ob kemični ali mehanski stimulaciji (17).

Odkrili so tudi od ECE neodvisno sintezno pot ET-1, pri kateri cepitev velikega ET-1 prevzamejo tkivne himaze in druge metaloproteaze. Himaza človeških mastocitov selektivno cepi veliki endotelin med tirozinom 31 in glicinom na mestu 32, s čimer nastane posebna oblika endotelina-1 iz 31 aminokislinskih ostankov. Ta oblika ima večjo vazokonstriksko aktivnost v primerjavi z velikim endotelinom, pri ET-2 pa je oblika iz 31 aminokislinskih ostankov celo močnejša od 21-aminokislinske oblike (18).

1.2 Endotelinski receptorji

Endotelini posredujejo učinke z vezavo na receptorja ET_A in ET_B na površini celic. Receptorja izkazujeta relativno visoko stopnjo homologije, saj se njuni strukturi ujemata v 68 % zaporedja aminokislin (19). Vezava endotelina pri obeh sproži s proteinom G povezano aktivacijo fosfolipaze C. Ta v naslednjem koraku cepi fosfatidilinozitol 4,5-bisfosfat na diacilglicerol in inozitol 1,4,5-trifosfat. Slednji se veže na kalcijeve kanalčke na endoplazemskem retikulumu, kar povzroči sproščanje Ca^{2+} v citosol in povzroči diferenciacijo, popravilo in rast tkiv (1, 20-22).

Receptor ET_A ima mnogo višjo afiniteto do ET-1 in ET-2 kot ET-3, medtem ko ima receptor ET_B praktično enako afiniteto za vse izoblike. Receptorji ET_A se pojavljajo predvsem na celicah gladkih mišic žil in ob vezavi z ET-1 sprožajo vazokonstrikcijo. Vezava endotelina na ET_B na žilnem endoteliju povzroči prehodni vazodilatacijski učinek, saj sproži v endotelijskih celicah sproščanje dušikovega oksida in/ali prostaciklina, ki deluje kot vazodilatatorja. Pod določenimi pogoji pa vezava ET-1 na ET_B povzroči tudi vazokonstrikcijo (22-24).

1.3 Koncentracije endotelinov in njihovo odstranjevanje iz organizma

Koncentracije endotelinov v krvožilnem sistemu so relativno nizke – približno 10 pmol/L, kar predstavlja približno 60 % ET-1, 30 % ET-2 in 10 % ET-3 (25-27). Endotelini tako nimajo tako velikega vpliva na celotno krvožilje, ampak delujejo večinoma lokalno, kot parakrina signalna molekula na celice gladkih mišic pod endotelijem, saj se v večji meri sproščajo iz endotelijskih celic na bazalno stran (28-30). Koncentracija endotelinov in njihovih prekurzorjev s podobnim delovanjem v krvi pa nam lahko služi kot označevalec za določanje celotne sinteze endotelina v sistemu.

Na koncentracijo endotelinov vplivajo številni spodbujevalci in zaviralci, omenjeni v podpoglavlju 1.1, ki regulirajo biosintezo, poleg tega pa se koncentracije endotelinov zmanjšujejo tudi zaradi metabolizma in izločanja v pljučih in jetrih. Razpolovni čas endotelina v krvi je manj kot 2 minuti. Odstranjevanje endotelinov v pljučih in jetrih se začne z vezavo na površino celic preko receptorja ET_B, kateri sledi internalizacija in hidroliza endotelina v lizosomih z deamidazo (31). Druga pot razgradnje endotelinov je s pomočjo nevtralne endopeptidaze, ki se v največji koncentraciji nahaja v veziklih proksimalnih tubulov v ledvicah (32, 33). Zaradi teh dveh načinov izločanja koncentracije endotelina v plazmi močno nihajo z različnim delovanjem jeter

Kljub temu da razpolovna doba traja le dve minuti, pa biološki učinek molekule traja veliko dlje – okoli 60 minut, saj je vezava ET-1 na receptor izredno močna. Poizkus je pokazal, da ET-1 ostane vezan na receptor tudi do 2 uri po endocitozi (34).

1.4 Bolezenska stanja ob povišanju ET-1

1.4.1 Krvožilne bolezni

ET-1 z delovanjem na celice žilnega endotelija deluje kot eden od najmočnejših vazokonstriktorjev v arterijah. Enako visoke koncentracije endotelina povzročijo večje zvišanje krvnega tlaka, če jih v krvni sistem dovajamo počasi (35). Ko so Vierhaper in sodelavci v študiji iz leta 1990 ET-1 odmerjali 60 minut v koncentraciji 1 pmol/kg/min, je prišlo do zvišanja tlaka iz povprečne vrednosti $87,1 \pm 7,3$ na $92,6 \pm 8,2$ mm Hg ($p < 0,01$) (36). Hkrati posredno ET-1, -2 in -3 vplivajo tudi na vazodilatacijo, saj v endotelnih celicah sprožijo izločanje dušikovega oksida in prostaciklinov (23, 37). Do te posredne vazodilatacije ne pride pri počasnem dviganju koncentracije endotelinov v krvi, kar se večinoma zgodi v normalnih fizioloških pogojih (38). V manjši meri ima ta učinek tudi veliki ET-1, a je njegova moč vazokonstrikcije vsaj za dva velikostna reda manjša (15). Prav tako endotelijske celice začnejo pod vplivom ET-1 proizvajati povečano koncentracijo adrenomedulina (39). Vsi vplivi na vazodilatacijo so posredovani preko vezave na receptor ET_B, ki v manjši meri deluje antagonistično na učinke ET_A. Krvni tlak tako lahko zmanjšamo preko antagonistov ET_A, ki zavirajo njihovo delovanje, ali pa z zaviralci ECE, ki zavirajo biosintezo endotelinov. Podoben učinek imajo tudi neselektivni antagonisti endotelinskih receptorjev ET_A in ET_B, vendar so učinki manjši kot pri selektivnih antagonistih ET_A (40).

1.4.2 Srčno popuščanje

Raven endotelina v krvi je povečana pri živalskih modelih srčnega popuščanja in pri bolnikih s srčnim popuščanjem. Pri bolnikih koncentracija endotelina v krvi močno korelira z ravnjo hemodinamične in funkcijalne okvare in je pokazatelj nevarnosti smrti. Koncentracijo endotelina v endotelijskih celicah krvožilja povečujejo angiotenzin II, vazopresin, norepinefrin in mehanski dejavniki, kot je raztegovanje endotelija (41).

1.4.3 Ishemična bolezen srca

V študijah na ljudeh so se povišane ravni endotelinov v krvi pojavile pri nestabilni obliki angine pektoris in akutnem miokardnem infarktu, ne pa pri stabilni angini pektoris (42, 43). Bolj ko so ravni endotelina povišane, večja je verjetnost smrti (44). Tudi po operativnem posegu lahko pride do ponovnega pojava ožanja arterije ali zaklopke, pri čemer endotelin po vsej verjetnosti vpliva s pospeševanjem deljenja celic gladkih mišic v steni žil (45).

1.4.4 Migrena

Med glavoboli zaradi migren pride do povečanih koncentracij endotelinov. Med napadi povišanih ravni niso opazili pri pacientih, pri katerih se migrene pojavljajo epizodično ali kronično (46). Vazokonstrikcijo, do katere pride med prvo stopnjo migrene, lahko pripisemo vsaj deloma izločanju vazoaktivnih snovi, kot so endotelini (47).

1.4.5 Raynaudova bolezen

Raynaudova bolezen je stanje, pri katerem pride do občasne prekinitve dotoka krvi v roke in noge, včasih pa tudi v druge dele telesa, in je povezana z nekaterimi vazospastičnimi stanji, kot sta migrena in Prinzmetalova angina. Koncentracije endotelina so se v krvi hitro povečale po tem, ko so zdravim prostovoljcem roko za eno minuto potopili v ledeno vodo. Največja koncentracija je bila 4 minute po potopitvi roke v vodo. Pri pacientih z Raynaudovo boleznijo se koncentracije endotelina po takem testu še bolj povečajo (48).

1.4.6 Subarahnoidna krvavitev

Subarahnoidna krvavitev je krvavitev iz možganskih arterij v prostoru med dvema možganskima ovojnico – pajčevnico (arachnoideo) in žilnico (pio mater). ET-1 povzroča močno ožanje žil, ki je posledica take krvavitve in lahko povzroči odmiranje tkiv. Na eksperimentalnih modelih ter pri pacientih po krvavitvi so opazili povišano raven endotelinov, sploh pri tistih, pri katerih pride do močnega ožanja žil (46).

1.4.7 Prinzmetalova angina

Posledica Prinzmetalove angine je nepravilno delovanje endotelija, ki vpliva na možnost proizvajanja dušikovega oksida iz L-arginina. Dušikov oksid je signalna molekula, ki izzove širjenje žil in niža pritisk. Endotelin-1 je kot močan vazokonstriktor povezan s to boleznijo, saj okrepi ožanje žil, ki ga inducirata serotonin in noradrenalin v izoliranih človeških arterijah. Pacienti s Prinzmetalovo angino imajo prav tako večjo možnost Raynaudove bolezni in pojava migren, ker sta obe stanji povezani s povisanimi koncentracijami endotelinov v krvi (49).

1.4.8 Primarna pljučna hipertenzija

Pri primarni pljučni hipertenziji pride do pospešenega deljenja celic gladkih mišic pljučnih arterij in poškodbe endoteljskega tkiva. Glede na količino pritiska na celice gladkih mišic žil v pljučih lahko endotelini povzročijo vazodilatacijo ali vazokonstrikcijo. Pri normalnih pogojih pride do krčenja mišic in povečanja pritiska, kadar pa je ta že visok, pride do razširitve žil in zmanjšanja pritiska. Povečanje pritiska posreduje receptor ET_A, zmanjšanje pa receptor ET_B. ET-1 prav tako pospešuje deljenje celic gladkih mišic pljučnih arterij. Infuzija antagonistov endotelinskih receptorjev zavre napredovanje pljučne hipertenzije in prepreči debelitev pljučnih arterij (50, 51).

1.4.9 Rak

Vpliv endotelinov na regulacijo vaskularnega tonusa so sprva opazili prav pri pacientih z malignim žilnim rakom hemangioendoteliom. En od simptomov te vrste raka so povisane koncentracije ET-1 in povišan pritisk. Po kirurški odstranitvi rakavega tkiva oba simptoma izgineta, ob ponovnem pojavi raka pa se zopet pojavit (52). Povišane ravni endotelina so povezane še z mnogimi drugimi vrstami raka, kot so rak prostate, jajčnikov, pljuč, debelega črevesja, materničnega vratu, ledvic ter raka nevroglijskih celic, ki sestavljajo živčno oporno tkivo (1).

Endotelin je povezan s številnimi mehanizmi, ki pospešujejo rast tumorjev, vključno s pospeševanjem deljenja celic, preprečevanjem apoptoze, spremnjanjem medceličnega matriksa ter tvorbo skeletnih metastaz za aktivacijo osteoblastov. ET-1 aktivira številne kinaze, ki so del signalizacije med celicami ter cikla proliferacije, vključno s protein kinazo C, epidermalnim rastnim dejavnikom, inzulinu podobnim rastnim dejavnikom in z mitogeni aktivirano protein kinazo (1, 53, 54). Po aktivaciji receptorja ET_A z endotelinom ta sproži kaskado, katere del je tudi receptor za epidermalni rastni dejavnik, ki sproži aktivacijo kinaze,

povezane z medcelično signalizacijo. Povečano izražanje in delovanje receptorja za epidermalni rastni dejavnik je povezano s številnimi vrstami raka. Ta reakcija je verjetno razlog za vpliv endotelina na višanje krvnega tlaka in pospeševanje deljenja celic (55).

Poleg proliferacije rakavih celic ET-1 preprečuje tudi njihovo apoptozo. V rakavih celicah črevesja ET-1 z vezavo na receptorje ET_A preprečuje apoptozo, ki so jo inducirali s paklitakselom ali ligandom prvega signala apoptoze (FasL) (56, 57). Receptor Fas (FasR) je del družine receptorjev dejavnika tumorske nekroze in veže FasL, kar povzroči celično smrt z aktivacijo kaspaze. V rakavih celicah jajčnikov ET-1 preprečuje apoptozo preko vezave na receptor ET_A , kar sproži protiapoptozno signalizacijo preko serin-treonin kinaze, ki je kritični celični regulator preživetja in delitve (55). ET-1 tako vpliva na celično delitev in preživetje celic preko receptorjev ET_A na fibroblastih, celicah gladkih mišic in epitelnih celicah, preko receptorjev ET_B pa na endotelijskih celicah (1, 53-55).

ET-1 prav tako stimulira mitogenezo v osteoblastih in zmanjša resorpcijo kosti s strani osteoklastov ter njihovo gibljivost. Pri bolnikih z rakom na prsih ali prostati se pogosto pojavijo metastaze v kosteh, pri obeh vrstah raka pa se pojavljajo tudi povečane količine ET-1 v krvožilnem sistemu. Podatki iz različnih študij so pokazali, da ET-1 stimulira nastajanje rakavih osteoklastov (povezano z metastaznimi tumorji), antagonisti ET_A pa zavirajo njihovo nastajanje (58-62).

Pri nastanku tumorjev je zelo pomemben tudi proces angiogeneze, saj novonastale rakave celice potrebujete povezavo do žil, da dobijo potrebne hranične snovi in kisik za nadaljnje deljenje. Predklinični modeli so pokazali, da endotelini pospešujejo ta proces. ET-1 pospeši rast endotelijskih celic z vezavo na receptorje ET_B na njihovi površini, medtem ko deljenje celic gladkih mišic v steni žil ter pericitov (celic vezivnega tkiva okoli kapilar in drugih majhnih žil) povzroči z vezavo na njihove ET_A (63, 64). ET-1 vpliva na različne stopnje nastajanja novih žil, vključno s pospeševanjem deljenja endotelijskih celic, migracijo in vdorom krvožilnih celic na mesto nastajanja nove žile, povečanim izražanjem proteaz in oblikovanjem cevaste oblike žil *in vivo* (65, 66).

1.4.10 Ledvične bolezni in vpliv na ledvično hemodinamiko

Študije na psih in mačkah so pokazale, da endotelini vplivajo na povečanje kontrakcij in deljenje mezangijskih celic, specializiranih celic, ki se nahajajo v neposredni bližini žil nefrona, tj. aferentnih in eferentnih arteriol ter kapilarnega klobčiča (glomerulusa). Te endotelini spodbudijo, da iz faze G_0 ponovno prehajajo v fazo G_1 proliferacijskega cikla. Prav

tako v njih poveča topoizomeražno aktivnost, kar še dodatno spodbudi hitrost njihovega deljenja. Pod vplivom endotelinov mezangjske celice začnejo izločati več arahidonske kisline in prostaglandina E₂ (67). Povečajo tudi nastajanje atrijskega natriuretičnega peptida, ki pa, kot smo že omenjali v poglavju 1.1, nato zavira prepisovanje gena za endotelin in tudi manjša njegove učinke na pospeševanje mitogeneze gladkih mišičnih celic v vaskularnem tkivu (68).

Koncentracije endotelina v krvi so povečane tudi po akutni odpovedi ledvic po ledvični ishemiji (69, 70).

Endotelinski antagonisti pomagajo pri nekaterih ledvičnih motnjah. Njihova uporaba je pomagala pri težavah, kot so nalaganje kalcija v mitohondriih in razgradnji tubulov pri podganah (71).

1.5 Obstojeci antagonisti endotelinskih receptorjev in učinkovine za zmanjševanje učinkov endotelinov

Za zdravljenje bolezenskih stanj, povezanih s povišanimi ravnimi endotelinov, so razvili več peptidnih in nepeptidnih antagonistov. Prvi je bil odkrit ciklični pentapeptid BQ-123. Prav tako je koncentracijo nastalih endotelinov možno zmanjšati z zaviralci encimov ECE. Preglednica I prikazuje učinkovine za zaviranje aktivnosti endogenih endotelinov (72).

Preglednica I: Potencialne učinkovine za zaviranje aktivnosti endotelinov (72)

Antagonisti receptorjev ET_A	Antagonisti receptorjev ET_A in ET_B	Antagonisti receptorjev ET_B	Zaviralci ECE
A-127722 (nepeptidni)	A-182086 (nepeptidni)	A-192621 (nepeptidni)	B-90063 (nepeptidni)
ABT-627 (nepeptidni)	CGS 27830 (nepeptidni)	A-308165 (nepeptidni)	CGS 26393 (nepeptidni)
BMS 182874 (nepeptidni)	CP 170687 (nepeptidni)	BQ-788 (peptidni)	CGS 26303 (nepeptidni)
BQ-123 (peptidni)	J-104132 (nepeptidni)	BQ-017 (peptidni)	CGS 35066 (nepeptidni)
BQ-153 (peptidni)	L-751281 (nepeptidni)	IRL 1038 (peptidni)	Fosforamidon (peptidni)
BQ-162 (peptidni)	L-754142 (nepeptidni)	IRL 2500 (peptidni)	PP-36 (peptidni)
BQ-485 (peptidni)	LU 224332 (nepeptidni)	PD-161721 (nepeptidni)	SM-19712 (nepeptidni)
BQ-518 (peptidni)	LU 302872 (nepeptidni)	RES 701-1 (peptidni)	TMC-66 (nepeptidni)
BQ-610 (peptidni)	PD 142893 (peptidni)	RO 468443 (nepeptidni)	
EMD-122946 (nepeptidni)	PD 145065 (peptidni)		
FR 139317 (peptidni)	PD 160672 (nepeptidni)		
IPI-725 (peptidni)	RO-470203 (bosentan) (nepeptidni)		
L-744453 (nepeptidni)	RO 462005 (nepeptidni)		
LU 127043 (nepeptidni)	RO 470203 (nepeptidni)		
LU 135252 (nepeptidni)	SB 209670 (nepeptidni)		
PABSA (nepeptidni)	SB 217242 (nepeptidni)		
PD 147953 (peptidni)	TAK-044 (peptidni)		
PD 151242 (peptidni)			
PD 155080 (nepeptidni)			
PD 156707 (nepeptidni)			
RO 611790 (nepeptidni)			
SB-247083 (nepeptidni)			
Natrijev sitaksentan (nepeptidni)			
TA-0201 (nepeptidni)			
TBC 11251 (nepeptidni)			
TTA-386 (peptidni)			
WS-7338B (peptidni)			
ZD-1611 (nepeptidni)			
Acetilsalicilna kislina (nepeptidni)			

Pri nekaterih stanjih, kot so nevrodegenerativne bolezni, so opazili povečano aktivnost ECE, raziskave pa kažejo, da je za povečane ravni endotelina lahko kriva tudi biosinteza pot, kjer pretvorba velikega ET-1 v ET-1 poteka preko matriksne metaloproteaze-2. Ta naj bi bila delni razlog za povečano koncentracijo endotelina v krvi bolnikov z multiplo sklerozo (73, 74). Pri Alzheimerjevi bolezni so odkrili povečane koncentracije ECE-2, ki ima enako aktivnost kot ECE-1, niso pa vsi zaviralci enako učinkoviti pri zaviranju obeh izoblik (75). Zaviralci ECE tako niso vedno najboljša rešitev.

Prav tako je možno podoben učinek kot z antagonistimi doseči tudi z zmanjšanjem nastajanja endotelinskih receptorjev s pomočjo različnih dejavnikov. Angiotenzin II in forbolni estri zavirajo prepisovanje genov za endotelinske receptorje (76).

1.6 Potencialni načini preprečevanja povišanih ravni ET-1

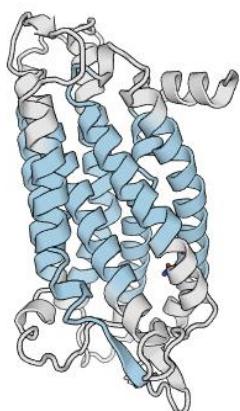
1.6.1 Sekvestracija ET-1 s protitelesom

S protitelesi lahko dokaj natančno ciljamo endotelin in ga s sekvestracijo označimo za uničenje z mehanizmi imunskih celic. Obstajajo že monoklonska protitelesa, ki vežejo ET-1 (77), in protitelesa, ki vežejo veliki ET-1 (78), ki ima že sam določeno vazokonstriktivno aktivnost, poleg tega pa še preprečijo nastanek ET-1. Prav tako je mogoče s protitelesi ciljati encime ECE in s tem onemogočiti njihovo aktivnost.

Protiteesa so velike in kompleksne molekule in se zaradi tega počasi porazdelijo po telesu ter jih je nemogoče proizvajati v organizmih, kot so bakterije, ki nimajo sposobnosti enakega zvijanja proteinov, kot sesalske celice. Protiteesa lahko zmanjšamo tako, da vključimo le dele, ključne za njihovo aktivnost – na primer regija za vezavo antiga F_{ab} ali pa fuzijski proteini, kot so enoverižni variabilni fragmenti, kjer sta variabilni domeni težke in lahke verige povezani s kratkim peptidnim zaporedjem (med 10 in 25 aminokislin). Ta kratka peptidna zaporedja ponavadi vsebujejo velik delež glicina za boljšo gibljivost ter velik delež serina in treonina za boljšo topnost (79, 80).

1.6.2 Sekvestracija z umetnim topnim receptorjem

Umetni topni receptorji so sestavljeni iz aminokislinskih zaporedij, ki so ključna za vezavo tarčne molekule – v našem primeru endotelina – povezana pa naj bi bila tako, da tvorijo pravilno obliko aktivnega mesta. Receptor ET_A je v osnovi velik transmembranski protein, ki sedemkrat prebada membrano, kot vidimo na sliki 3 (81).



Slika 3: 3D model receptorja ET_A . Modra barva prikazuje del, ki prebada celično membrano (81).

Economides in sodelavci so leta 2003 (82) pripravili pasti za citokine, ki so bile sestavljeni kot fuzijski proteini iz topnih zunajceličnih delov receptorjev za citokine in verige F_c človeških imunoglobulinov razreda G. Te pasti so vezale citokine z visoko afiniteto in blokirale njihovo delovanje. Po podobnem principu bi lahko sestavili tudi topne receptorje, sestavljeni iz zunajceličnih delov receptorjev za endotelin. Poznana je 3D struktura ET-1 (83), iz katere lahko sklepamo, kateri

predeli so pomembni za vezavo na receptor. Tertiarna struktura, ki jo tvori N-konec aminokislinskega zaporedja in stranska veriga na poziciji 2 sta pomembni za vezavo na receptor ET_A . Receptor ET_B močneje veže determinante, ki ležijo na heliksnem C-koncu ET.

Razlike med posameznimi izooblikami endotelinov moramo prav tako vzeti v zakup, saj lahko spremembe v sekvenci vplivajo na sposobnost endotelinskih pasti, da vežejo druge izooblike, a smo se v magistrski nalogi osredotočili predvsem na vezavo ET-1 na proteinske mimetike receptorja ET_A ali endotelinske pasti, ki smo jih sestavili iz delov receptorja in vmesno povezali z rigidnimi in fleksibilnimi pentapeptidnimi zaporedji. Tako na primer zamenjava serina s treoninom na poziciji 2 pri ET-3 zelo zmanjša afiniteto za vezavo na receptor ET_A saj se treoninska veriga, ki je daljša od serinske, slabše veže v aktivno mesto.

1.7 Predstavitev na bakteriofagu

Bakteriofagi so virusi, ki okužijo bakterijske celice, v biotehnologiji pa jih pogosto uporabljamo kot vektorje. Vanje lahko tako vključimo dele tujih DNA, ki je lahko iz drugega organizma ali pa umetno sintetizirana. Ko z bakteriofagom okužimo bakterijsko celico (v našem primeru smo uporabljali bakterijo *Escherichia coli*) se vstavljeni DNA podvojuje skupaj z DNA bakteriofaga. Vektor lahko skonstruiramo tako, da se s pomočjo gostiteljske *E. coli* vstavljena DNA izraža na nivoju proteina. Za predstavitev na površini bakteriofaga v vektor vstavimo določen gen neposredno pred gen za plaščni (kapsidni) protein bakteriofaga, pri čemer pazimo na ohranitev bralnega okvira, tako da se produkt izraža kot fuzijski protein. Ko se zreli virusni delci – virioni – sprostijo iz gostiteljske celice, se fuzijski proteini vgradijo v kapsido. Ker so obrnjeni proti vodnemu okolju (stran od kapside), se navadno obnašajo enako, kot če ne bi bili na površini virionov. Tako polipeptidi, ki so receptorji za ligande, ohranijo svojo afiniteto in specifičnost za vezavo liganda in so primeren sistem za testiranje vezave (84).

Nitasti bakteriofagi so podolgovate oblike – merijo približno 1 μm v dolžino in 6 nm v premer. Glede na njihovo velikost imajo veliko površino, plašč pa predstavlja kar 87 % njihove mase. Največji del tega predstavlja plaščni protein p8 (v približno 2700 kopijah), obstajajo pa še manj pogosti plaščni proteini - p3 in p6 se izražata na enem koncu bakteriofaga, proteina p7 in p9 pa na drugem (vsi v po pet kopijah). Nitasti bakteriofagi okužijo seve *E. coli*, ki izražajo F-pilus. Okužba se začne tako, da se domena na N-koncu proteina p3 pripne na konico pilusa. To je del, ki prvi vstopi v celico, nato pa se plaščni proteini zligejo s plazmalemo in fagna genomska enoverižna DNA (ssDNA) vstopi v citoplazmo. Tam se dopolni s komplementarno verigo in nastane dvoeverižna replikativna oblika, ki se lahko v gostiteljski celici pomnožuje in s transkripcijo omogoča nastanke bakteriofagnih proteinov. Nastajajoči plaščni proteini in ssDNA se sestavijo in sproščajo iz celice postopoma, ne da bi pri tem prišlo do lize gostiteljske celice (84).

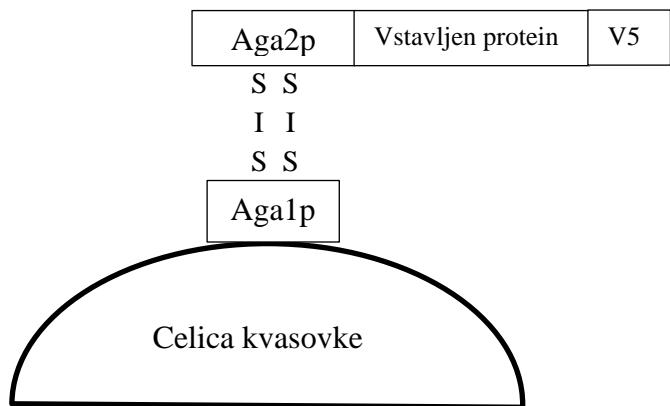
Vrste predstavitev na bakteriofagu lahko ločimo glede na kapsidni protein, ki ga uporabimo kot nosilec fuzijskega partnerja, in vrsto vektorjev. Pri predstavitvi tipa 3+3 imamo dve kopiji gena za p3 na ločenih vektorjih. Divji tip gena je na pomožnem bakteriofagu, medtem ko je rekombinantna verzija na posebni vrsti plazmida, ki ga imenujemo fagmid. Ta vsebuje nukleotidna zaporedja, ki signalizirajo začetek replikacije v *E. coli* in gen za odpornost proti antibiotiku, ki omogoča selekcijo. Hkrati vsebuje tudi pakirni signal za sestavljanje ssDNA s kapsidnimi proteini v nove virione, ki pa ni aktivен do okužbe celice s pomožnim bakteriofagom. Ta vsebuje vektor katerega pakirni signal ni okvarjen, kar dovoljuje preferenčno pakiranje fagmidne ssDNA. Iz celic *E. coli* se začnejo sproščati nitasti bakteriofagi, ki v svojem plašču vsebujejo tako plaščne proteine divjega tipa, kot rekombinantne proteine (84).

1.8 Predstavitev na kvasovkah

Predstavitev na kvasovkah predstavlja alternativo predstavitvi na bakteriofagu. Tudi tu gre za predstavitev proteina na površini mikroorganizma, a ima kvasovka, kot evkariont (gliva) nekoliko drugačno post-translacijsko obdelavo proteinov, kar bi lahko imelo vpliv na učinkovitost izražanja, zvitja in transmembranskega transporta tujih polipeptidov.

Predstavitev peptidov na površini kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* je možno doseči s pomočjo fuzije peptida z aglutininom a (85). V naravi aglutinin a deluje kot adhezijska molekula, ki stabilizira interakcije med celicami kvasovk med spolnim razmnoževanjem celic. Aglutinin a je sestavljen iz dveh polipeptidnih verig, ki ju kodirata gena *AGA1* in *AGA2*.

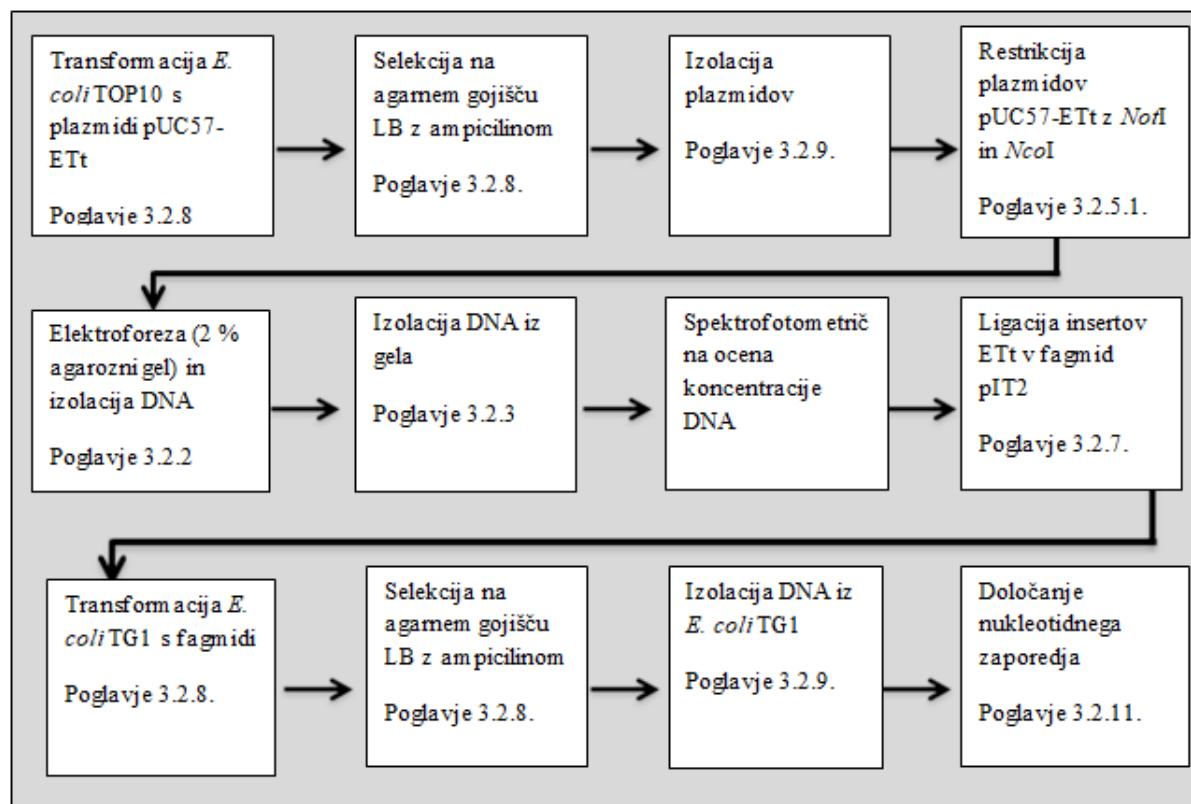
Protein Agalp, sestavljen iz 725 aminokislinskih ostankov, se izloča iz celice in se kovalentno veže na β -glukan v celični steni kvasovk (86). Protein Aga2p, sestavljen iz 69 aminokislinskih ostankov, se veže na Agalp z dvema disulfidnima vezema in po sekreciji ostane vezan na celični površini (87-89). Del proteina Aga2p na N-koncu je nujen za vezavo na Agalp, medtem ko na C-konec lahko pripnemo fuzijskega partnerja, ki bo tako izražen na površini celice (slika 4) (85).



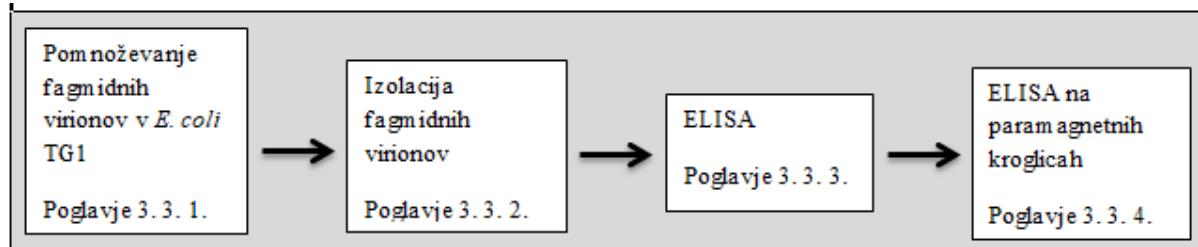
Slika 4: Shema predstavitev proteina na kvasovki preko aglutininskih proteinov Agalp in Aga2p. Na C-konec fuzijskega proteina je pripeto aminokislinsko zaporedje V5, preko katerega lahko detektiramo predstavljen protein.

2 Načrt za delo

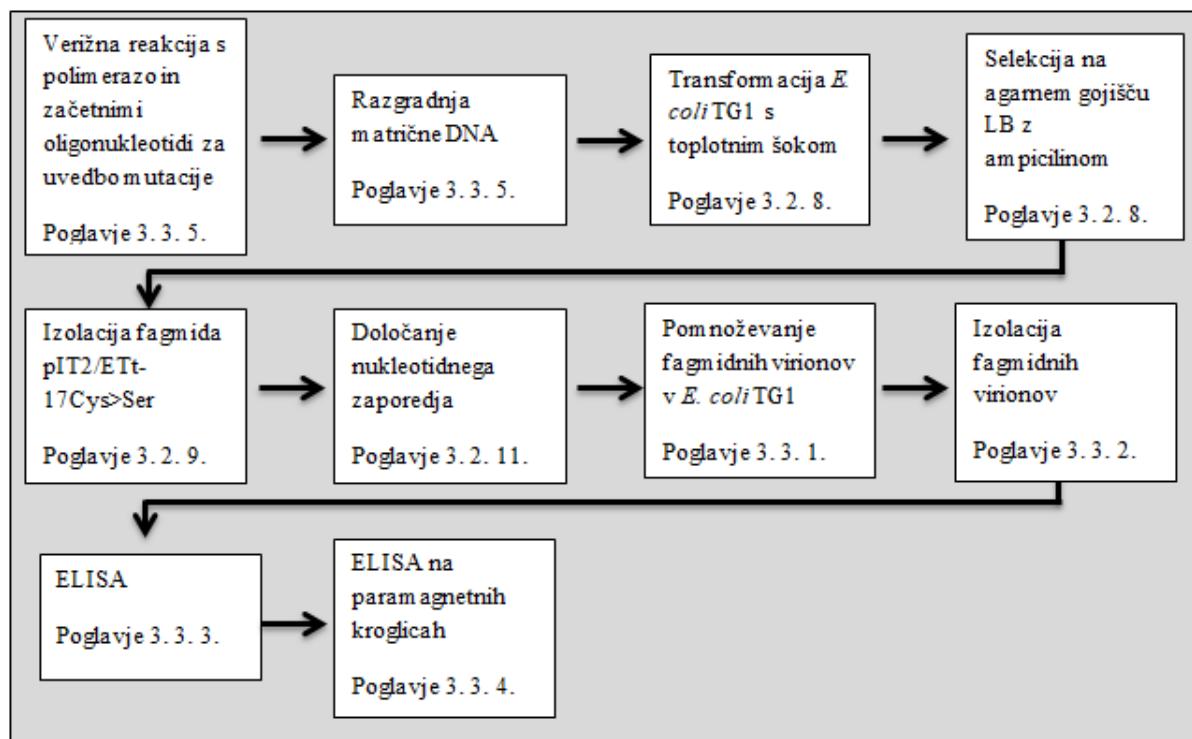
Namen magistrske naloge je preveriti možnost sekvestracije endotelina z umetnim topnim receptorjem, sestavljenim po principu citokinskih pasti, kar bi kazalo na možnost uporabe takšnih topnih receptorjev kot učinkovine. Testirali bomo pet različnih konstruktov topnih receptorjev (ETt), ki vključujejo ETt-1, ETt-2, ETt-15, ETt-16 ter ETt-17, ki bodo vsebovali različne dele endotelinskega receptorja tipa A (ET_A), povezane z rigidnimi ali fleksibilnimi pentapeptidnimi linkerji, in štiri negativne kontrole z nepovezanim aminokislinskim zaporedjem ETt-9, ETt-10, ETt-11, ETt-14, a enakimi linkerji. Preverili bomo, kateri deli ET_A so pomembni za vezavo endotelina-1 in kako morajo biti med seboj povezani. S pomočjo genskega inženirstva bomo sestavili ustrezne fagmide za izražanje konstruktov ETt na kapsidi nitastega bakteriofaga ali plazmide za predstavitev na celični steni kvasovke *Saccharomyces cerevisiae*. Mikroorganizme bomo nato namnožili ter preizkusiti aktivnost (tj. sposobnost vezave endotelina-1) izraženih konstruktov (potencialnih mimetikov endotelinskega receptorja) *in vitro*. Izražanje mimetikov endotelinskega receptorja na površini bakteriofagov bomo preverili z imunokemijskimi testi ELISA (angl. *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), predstavitev na površini kvasovke pa bomo ocenili s pomočjo fluorescenčne mikroskopije in pretočne citometrije. Afiniteto mimetikov endotelinskega receptorja (ETt) do endotelina-1 bomo primerjalno ocenili s prirejenim testom ELISA (za imobilizacijo sinteznega biotiniliranega endotelina-1 bomo uporabili paramagnetne kroglice, prekrite s streptavidinom). Eksperimenti bodo potekali po postopkih prikazanih na slikah 5, 6, 7 in 8.



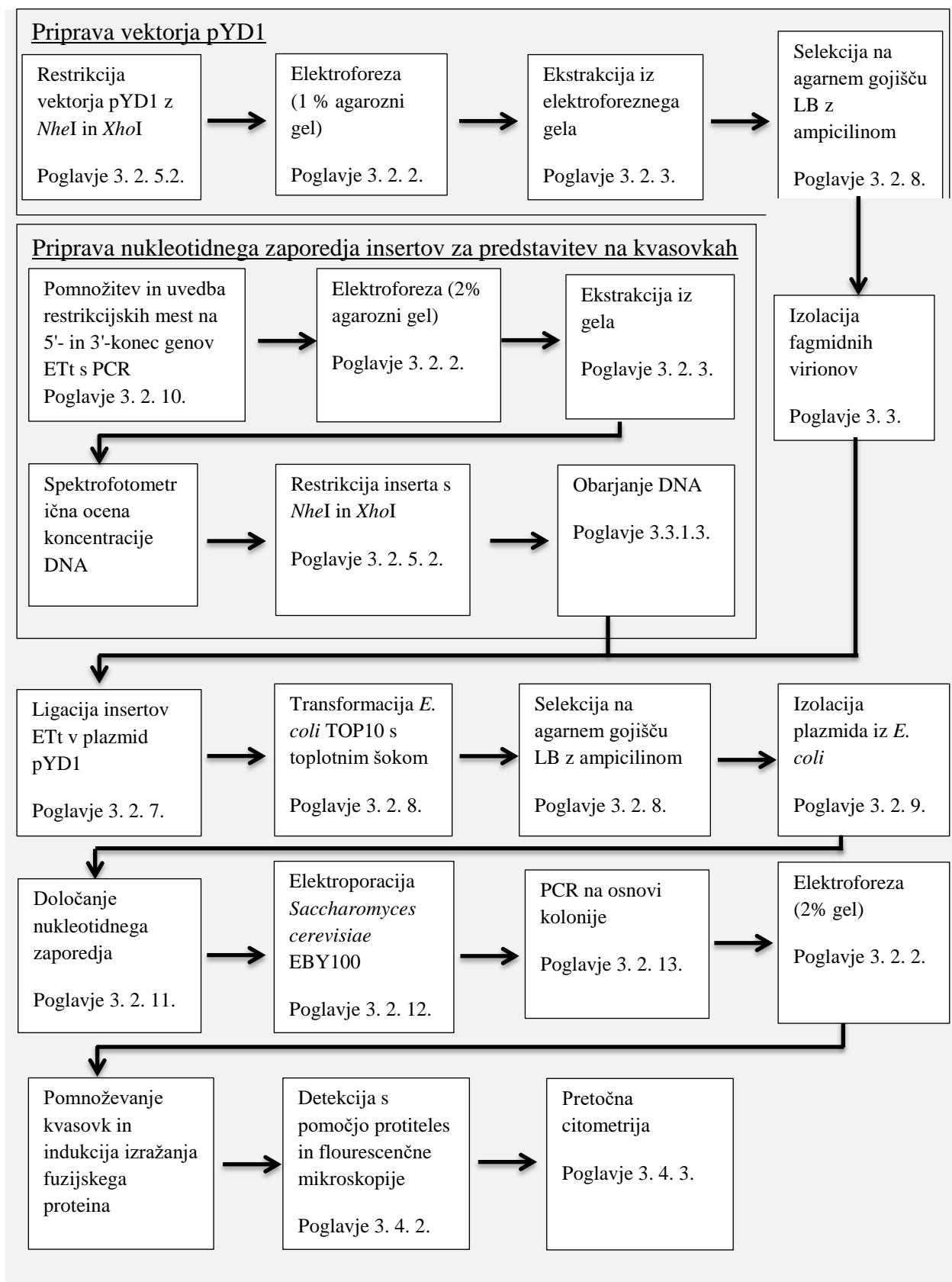
Slika 5: Priprava plazmida za izražanje potencialnih mimetikov endotelinskega receptorja na fagmidnih virionih



Slika 6: Izražanje potencialnih mimetikov endotelinskega receptorja na fagmidnih virionih in njihovo vrednotenje



Slika 7: Uvedba mutacije na ETt-17 in vrednotenje mutante



Slika 8: Predstavitev ETt na *Saccharomyces cerevisiae* EBY100

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Naprave

Naprava	Proizvajalec
Analitska tehnica AB 104	Mettler Toledo, Kusnacht, Švica
Avtoklav Systec 254 EL	Bel-Art Products, Pequannock, New Jersey, ZDA
Avtoklav Kambič A-21	Kambič laboratorijska oprema, Semič, Slovenija
Sistem za vertikalno elektroforezo Mini Protean 3 Cell	Bio-Rad, Richmond, Kalifornija, ZDA
Centrifuga IKA mini G	IKA Works, Wilmington, Severna Karolina, ZDA
Centrifuga Micro-centrifuge II GMC-060	Daihan Labtech Co., Namyangju, Južna Koreja
Centrifuga 5804 (F-34-6-38)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Centrifuga 5415 R (F-45-24-11)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Centrifugirke (50 mL)	TPP, Trasadingen, Švica
Ciklični termostat AB GeneAmp® PCR System 2700	Applied Biosystems, Forster City, Kalifornija, ZDA
Elektroforezna kadička B1A Easy cast mini gel	Owl, Portsmouth, New Hampshire, ZDA
Fluorescenčni mikroskop	Olympus America, Center Valley, Pennsylvania, ZDA
Hladilnik	Gorenja, Velenje, Slovenija
Inkubator Sanyo orbital shaker	Sanyo electric Biomedical co., Tokio, Japonska
Komora z laminarnim pretokom zraka Iskara PIO LFVP 12	Iskra, Šentjernej, Slovenija
Magnetni mešalnik Rotamix 550 MMH	Tehnica, Železniki, Slovenija
Magnetno stojalo	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Spektrofotometer Lambda Bio +	PerkineElmer; Waltham, Massachusetts, ZDA
Spektrofotometer Epoch BioTek	Bioteck Instruments, Winooski, Vermont, USA
Mikrocentrifugirke (1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt AG & Co, Numbrecht, Nemčija
Mikrotitrskie plošče Nunc-Immuno™ Module F8 MaxiSorp loose	Nunc, Roskilde, Danska
Mikrovalovna pečica	LG, Seul, Južna Koreja
Multikanalna pipeta (1200 µL)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Nastavki za pipete (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	Sarstedt AG & Co, Numbrecht, Nemčija
pH-meter 691	Metrolum, Herisan, Švica
Pipete (0,5-10; 10-100; 100-1000 µL)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Ploščice za mikroskopiranje celic Nunc® Lab-Tek®	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, ZDA
Precizna tehnica Exacta 610 EB	Tehnica, Železniki, Slovenija
Pretočni citometer Attune NxT	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, ZDA
Spektrofotometer NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington,

	Delaware, ZDA
Stresalnik za mikrotitrskе plošče IKA MS 3 digital	IKA Works, Wilmington, Severna Karolina, ZDA
Stresalnik Eppendorf Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg Nemčija
Stresalnik Vibromix 10	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Stresalnik Vibromix 104 EV	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Stresalnik Vibromix 403 EV	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Transluminator	
Vir napetosti elektroforezne kadičke powerEase 500	Novex, Frankfurt, Nemčija

3.1.2 Kemikalije in kompleti kemikalij

Kemikalije

Kemikalija	Proizvajalec
3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Agaroza	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Ampicilin	Fluka, Buchs, Švica
Anti M13/HRP (protitelesa proti bakteriofagu M13, konjugirana s hrenovo peroksidazo)	GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, ZDA
Anti-cmcy protitelesa	GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, ZDA
Fluorescenčno barvilo za vizualizacijo DNA MIDORI green	Nippon Genetics Europe
Pufer cutsmart 10X	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Difco kvasno dušikova baza (YNB)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, ZDA
Dinatrijev hidrogenfosfat	Fluka, Buchs, Švica
DNA Loding Dye, nanašalno barvilo za gelsko elektroforezo	Fermentas, Burlington, Kanada
Edta	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Humani endotelin-1, konjugiran z biotinom	Phoenix Pharmaceuticals Inc.
Etanojska kislina	Merck, Darmstadt, Nemčija
Etanol 96%	Riedel-de Haën AG, Nemčija
Galaktoza	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Gene Ruler™ DNA ladder	Fermentas, Burlington, Kanada
Glikogen	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, ZDA
Glukoza	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Goveji serumski albumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Kalijev hidrogen fosfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Kalijev klorid	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, ZDA

Kanamicin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Kazamino kisline	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Kvasni ekstrakt (Bacto™ Yeast extract)	Becton Dickinson and Co., Sparks, Maryland, ZDA
Mleko v prahu	Pomurske mlekarne, Murska Sobota, Slovenija
Levcin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Natrijev acetat	Merck, Darmstadt, Nemčija
Natrijev klorid	Merck, Darmstadt, Nemčija
Natrijev hidroksid	Fluka, Buchs, Švica
NEBuffer 2.1	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
NEBuffer 3.1	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Paramagnetni delci Dynabeads Protein G	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, ZDA
PCR Master Mix (2x)	Fermentas, Burlington, Kanada
Pfu HF DNA-polimeraza	Agilent Technologies, St. Clara, Kalifornija, ZDA
Pepton	Becto Dickinson and co., Sparks, ZDA
Polietilenglikol 8000 (PEG 8000)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Alkalna fosfataza rsap	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Restrikcijski encim <i>NheI</i>	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Restrikcijski encim <i>XhoI</i>	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Restrikcijski encim <i>NcoI</i>	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Restrikcijski encim <i>NotI</i>	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Sorbitol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
DNA-ligaza T4	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Pufer za DNA-ligazo T4	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Tmb	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Triptofan	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Tripton	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Tris	Riedel de Haen AG, Nemčija
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Vodikov peroksid	Merck, Darmstadt, Nemčija
Žveplova kislina	Merck, Darmstadt, Nemčija

Kompleti	Proizvajalec
GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit	Sigma, St. Louis, Missouri, ZDA
QIAEX® II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden Nemčija
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, St. Clara, Kalifornija, ZDA

3.1.3 Biološki material

Sevi	Proizvajalec
<i>E. coli</i> TOP10	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, ZDA
<i>E. coli</i> TG1	Source BioScience, Nottingham, Velika Britanija
Pomožni bakteriofag KM13	Source BioScience, Nottingham, Velika Britanija
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, ZDA

Plazmidi in inserti	Proizvajalec
pIT2	iz bakteriofagne knjižnice fragmentov scFv (Source BioScience, Nottingham, Velika Britanija)
pYD1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, ZDA
Sintezni geni ETt (ETt-1, ETt-2, ETt-9, ETt-10, ETt-11, ETt-14, ETt-15, ETt-16 in ETt-17)	GenScript, New Jersey, ZDA

Začetni oligonukleotid	Nukleotidno zaporedje	Proizvajalec
F1yd	CAAAGCTAGCCCGATCGAGATTAAAG GAAACCTTCAAATAC	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
F2yd	AAAAGCTAGCAAAGGTGACCGTACC GCG	
R1yd	GAAACTCGAGCAGGCAGCTTTAAA GCAGTTCTTG	
R2yd	TTGACTCGAGCAGGCAGCTTTAAA GCAGTTTGAAA	
F-ETt1/2/17YD	ATCAGCTAGCGACAACCCGGAGCGT TACAG	
R-ETt1/2YD/17	TCGCCTCGAGAAAGCAGTTTGAA TTTCTTGCTCTCGC	
F-ETt17_C106S	GTGAACAAACACAAGACCAGCATGCT GAACGCGACC	
R-ETt17_C106S	GGTCGCGTTCAGCATGCTGGTCTTG TGTTGTTCAC	
LMB3	CAGGAAACAGCTATGAC	
F-pYD1	AGTAACGTTGTCAGTAATTGC	
R-pYD1	GTCGATTGTTACATCTACAC	

3.1.4 Recepture gojišč in pufrov

Gojišče 2YT (1 liter)
16 g tripton
10 g kvasni ekstrakt
5 g NaCl
950 mL dH ₂ O
pH umerimo na 7,4 nato dodamo dH ₂ O do skupnega volumna 1L in avtoklaviramo.

Agarno gojišče LB (1 liter) z ampicilinom
10 g tripton
5 g kvasni ekstrakt
10 g NaCl
15 g agar
950 ml dH ₂ O
pH umerimo na 7 z dodatkom NaOH, nato dodamo dH ₂ O do volumna 1 L in avtoklaviramo.
Ampicilin dodamo po avtoklaviranju, ko se je gojišče ohladi na 55 °C.

Gojišče YPD (ang. yeast extract peptone dextrose) (1 liter)
10 g kvasni ekstrakt
20 g pepton
900 ml dH ₂ O
Avtoklaviramo in dodamo 100 ml 20 % glukoze (sterilizirane s filtracijo), ko se gojišče ohladi do 55 °C.

Minimalno agarno gojšče z glukozo (1 liter)
6,7 g YNB (ang. yeast nitrogen base – kvasno dušikova osnova)
15 g agar
900 mL dH ₂ O
100 mL 20 % glukoze (sterilizirane s filtracijo) smo dodali, ko se je gojišče ohladilo do 55°C
Avtoklaviramo in dodamo 10 ml (10 mg/ml) levcina in 10 ml (10 mg/ml) triptofana (sterilizirana s filtracijo), ko se je gojišče ohladi do 55 °C.

Gojišče YNB-CAA (1 liter)
6,7 g YNB (ang. yeast nitrogen base – kvasno dušikova osnova)
5 g kazamino kislin
900 mL dH ₂ O
Avtoklaviramo in dodamo 100 ml 20 % glukoze (sterilizirane s filtracijo), 10 ml (10 mg/ml) levcina in 10 ml (10 mg/ml) triptofana (sterilizirana s filtracijo), ko se je gojišče ohladi do 55 °C.

Fosfatni pufer s soljo (1 L)
3,2 g NaCl
0,08 g KCl
0,576 g Na ₂ HPO ₄

0,096 g KHPO ₄
Dodamo 900 mL dH ₂ O, umerimo pH na 7,4 in dopolnimo z dH ₂ O DO 1 l

| **Puffer TAE** |
| 30,25 g Tris |
| 12,5 mL 0,5 M EDTA |
| 7,14 mL etanojske kisline |
| ddH₂O do 1 L |

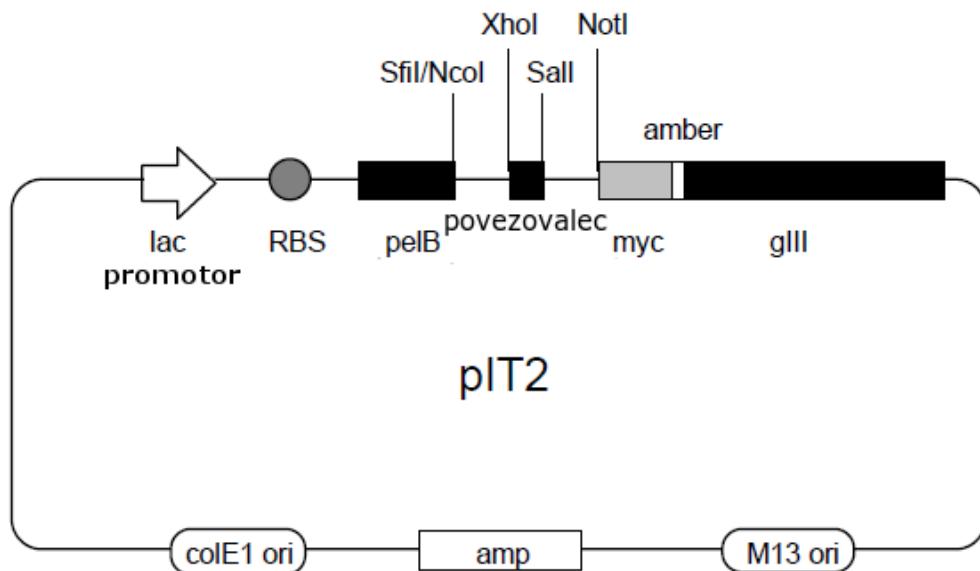
3.2 Metode za pripravo plazmidov

3.2.1 Plazmidi in ETt inserti

Za vstavljanje insertov (genov za endotelinske mimetike ETt) v nitaste bakteriofage smo uporabili vektor pIT2, za predstavitev na kvasovki pa vektor pYD1.

3.2.1.1 Vektor pIT2 za izražanje mimetikov endotelinskih receptorjev na kapsidi nitastih bakteriofagov

Osnovni vektor, v katerega smo vstavljali inserte mimetikov endotelinskih receptorjev za izražanje na nitastih bakteriofagih, je fagmid pIT2, predstavljen na sliki 9 in opisan v preglednici II.



Slika 9: Shema delov vektorja pIT2 (90).

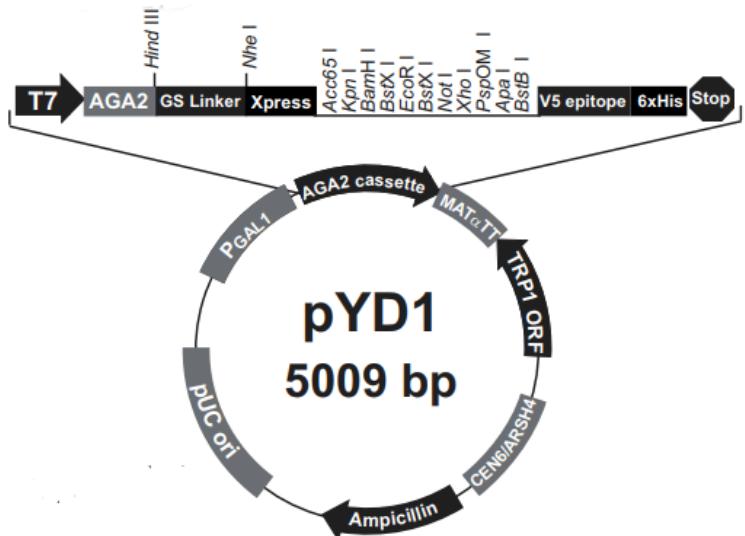
Preglednica II: Funkcija posameznih elementov, ki sestavljajo pIT2 vektor (slika 9).

Element	Funkcija
lac-promotor	omogoča inducibilno izražanje rekombinantnega gena
RBS	vezavno mesto za ribosom na mRNA
SfiI, NcoI, XhoI, SalI, NotI	restriktijska mesta za vstavljanje genov
pelB	signalno zaporedje
linker	kodira povezovalec, ki omogoča povezovanje proteinov iz dveh vstavljenih genov
myc	kodira oznako, ki omogoča zaznavanje rekombinantnih proteinov s pomočjo anti-cMyc protiteles
amber	zaključni kodon, ki omogoča sproščanje prostih rekombinantnih proteinov (ne vezanih na p3) v nesupresorskih bakterijskih sevih
gIII	gen, ki kodira plaščni protein p3 nitastega bakteriofaga, na katerem je predstavljen tuj protein
colE1 ori	mesto začetka podvajanja; omogoča veliko število kopij fagmida v <i>E. coli</i>
amp	gen za beta laktamazo; omogoča selekcijo bakterij <i>E. coli</i> , saj so transformirane celice odporne proti ampicilinu
M13 ori	mesto začetka podvajanja; omogoča nastajanje enoverižne fagmidne DNA, ki se pakira v fagmidne virione

Velikost praznega vektorja pIT2 je približno 4,2 kb. V našem primeru smo v vsak vektor vstavljeni le po eno gensko zaporedje, tako da smo povezovalec (linker) odstranili med restrikcijo. Uporabili smo amber-supresorski sev bakterije *E. coli* (TG1), ki zaključni kodon amber prepozna, kot kodon za aminokislino glutamin. Tako se tuji proteini izrazijo v obliki fuzijskega proteina s p3 na površini nitastih bakteriofagov.

3.2.1.2 Vektor pYD1 za izražanje mimetikov endotelinskih receptorjev na površini kvasovke

Osnovni vektor, v katerega smo vstavljeni gene za mimetike endotelinskih receptorjev, za predstavitev na kvasovkah, je plazmid pYD1, katerega shema je predstavljena na sliki 10 (91).



Slika 10: Shema vektorja pYD1, v katerega smo vstavljeni inserte za predstavitev na kvasovkah (91).

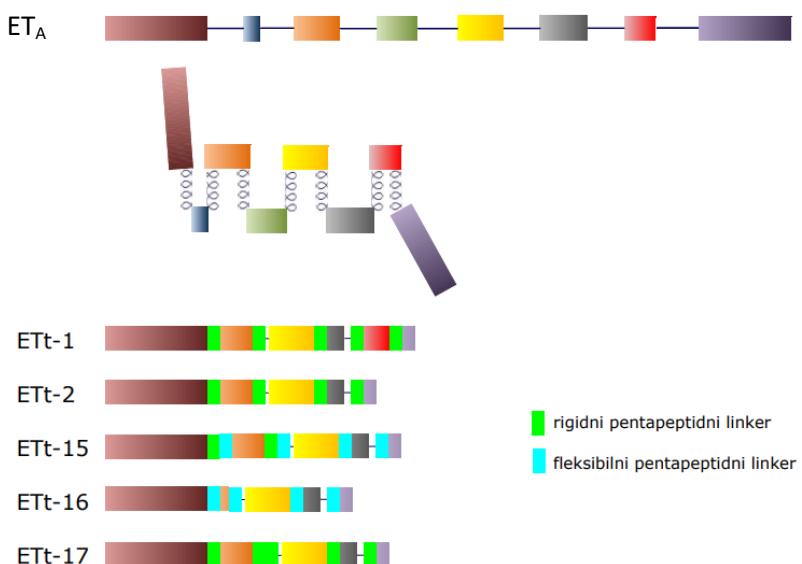
Vektor je sestavljen iz 5009 nukleotidnih parov, ki obsegajo dele, opisane v preglednici III.

Preglednica III: Položaj in funkcija posameznih elementov, ki sestavljajo vektor pYD1 (slika 10).

Element	Položaj (nukleotidno zaporedje)	Funkcija
promotor GAL1	1-451	omogoča inducibilno izražanje rekombinantnega proteina (92, 93)
promotor T7	475-494	omogoča transkripcijo <i>in vitro</i>
AGA2	534-794	gen za nosilni protein Aga2p; omogoča izločanje fuzijskega proteina
mesto za naleganje oligonukleotidnega začetnika	751-770	omogoča določitev nukleotidnega zaporedja inserta
Povezovalec iz glicina in serina	807-857	ločuje vstavljeni protein od nosilnega proteina Aga2p
Xpress™ epitop	891-914	omogoča detekcijo predstavljenega proteina s protitelesi z AntiXpress
območje z več mest za kloniranje	914-992	omogoča vstavljanje tujih genov v plazmid
V5 epitop	993-1034	omogoča detekcijo predstavljenega proteina s protitelesi Anti-V5
polihistidinska regija	1044-1061	omogoča detekcijo proteinov s protitelesi Anti-His in lahko pomaga pri kromatografski izolaciji fuzijskih proteinov (94)
mesto za zaključek transkripcije MAT α	1385-1098	konča prepisovanje v mRNA (poliadenilacijsko zaporedje)
TRP1 ORF	2107-1433	omogoča selekcijo transformiranih kvasovk s pomočjo gojenja na gojišču brez triptofana
cen6/ARS4	2797-2282	omogoča stabilno episomalno replikacijo in porazdeljevanje v hčerinske celice kvasovk
gen za odpornost proti ampicilinu (beta laktamaza)	2931-3791	omogoča selekcijo v <i>E. coli</i> - transformirane celice so odporne proti ampicilinu
pUC ori	3936-4609	mesto začetka podvajanja; omogoča veliko število kopij plazmida v <i>E. coli</i>

3.2.1.3 Inserti mimetikov endotelinskih receptorjev

Inserti so bili sestavljeni iz različnih delov endotelinskega receptorja tipa A, ki so bili med seboj povezani z rigidnimi in/ali fleksibilnimi pentapeptidnimi linkerji. Pripravili in ovrednotili smo 9 različnih konstruktorjev ETt (ETt-1, ETt-2, ETt-9, ETt-10, ETt-11, ETt-14, ETt-15, ETt-16 in ETt-17). Sheme proteinov ETt so predstavljene na sliki 11. Poleg fagmidnih virionov, na površini katerih smo izrazili konstrukte ETt, smo poizkuse izvajali tudi s pomožnim bakterifagom, ki je služil kot negativna kontrola.



Slika 11: Shema endotelinskega receptorja tipa A (ET_A) ter konstruktorjev ETt -1, ETt -2, ETt -15, ETt -16, ETt -17.

3.2.2 Elektroforeza

Za ločevanje lineariziranega plazmida pYD1 smo uporabili 1%- agarozni gel, medtem ko smo za ločevanje insertov ETt (po restrikciji iz plazmida pUC57) uporabili bolj premrežen 2%- agarozni gel. 1%- gel smo pripravili tako, da smo v erlenmajerico zatehtali 0,5 g agaroze in dodali 50 mL pufra TAE, 2%- gel pa tako, da smo k 1 g agaroze dodali 50 mL pufra TAE. Gel smo segrevali s pomočjo mikrovalovne pečice dokler se vsa agaroza ni raztopila. Ko se je gel ohladil do \sim 60 °C, smo dodali 2,5 μ L barvila MIDORI Green.

Še vroč gel smo vlili v kadičko ter dodali glavniček za vdolbinice, v katere smo kasneje nanašali vzorce. Gel smo pustili strjevati in ohlajati 30 minut.

Vzorce za nanos (restrikcijske mešanice) smo pripravili tako, da smo k 50 μ L restrikcijske mešanice dodali 10 μ L nanašalnega barvila DNA Loding Dye. Kot marker (standard velikosti

fragmentov DNA) smo pripravili mešanico 1,5 μL merila GeneRuler, 2 μL nanašalnega barvila DNA Loding Dye ter 8,5 μL bidestilirane vode. Vzorce smo pred nanosom rahlo premešali s pipetiranjem.

Ko se je agarozni gel strdil, smo odstranili nastavek za vdolbinice ter dolili pufer TAE do oznake na kadički. V vdolbinice smo nato nanesli marker ter vzorce, nato pa kadičko priklopili na vir napetosti powerEase 500, in sicer pri napetosti 120 V toliko časa, da so fragmenti prepotovali čez polovico gela ter se ločili. Vir napetosti smo nato izklopili in pod UV-lučjo (na transiluminatorju) pogledali položaj posameznih lis na elektroforeznem gelu.

3.2.3 Ekstrakcija DNA iz gela

Za ekstrakcijo DNA, ki smo jo ločili s pomočjo elektroforeze, smo uporabili komplet QIAEX II Gel Extraction Kit. Košček elektroforeznega gela, ki je vseboval fragment DNA pričakovane velikosti, smo prenesli v mikrocentrifugirko in stehtali. Fragmentom velikosti med 100 bp in 4000 bp smo dodali trikratni volumen QX1 pufra, fragmentom, večjim od 4000 bp, pa trikratni volumen raztopine QX1 in dvakratni volumen vode ter 10 μL suspenzije silikagela QIAEX II. Vzorce smo nato inkubirali 10 minut pri 50 °C. Med inkubacijo smo vsaki dve minuti vzorce močno premešali z vibracijskim mešalom, da je silikagel ostal v obliki suspenzije. Vzorce smo centrifugirali 30 sekund (pri sobni temperaturi in 13 000 vrt./min), nato pa s pipeto previdno odstranili supernatant. Usedlino smo sprali s 500 μL raztopine QX1 in dvakrat s 500 μL pufra PE. Tako smo odstranili vso preostalo agarozo in soli. Po zadnjem spiranju smo usedlino sušili 10-15 minut na zraku, dokler ni postala bela. Silikagel z adsorbirano DNA smo nato suspendirali v 20 μL bidestilirane vode in inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi. Vzorce smo nato centrifugirali 30 sekund in supernatant z DNA prenesli v novo mikrocentrifugirko.

3.2.4 Obarjanje DNA

Obarjanje DNA smo izvajali tako, da smo 50 μL raztopine DNA dodali 5 μL 3 M natrijevega acetata, 0,5 μL glikogena, na koncu pa še 125 μL 96%-etanola. Zmes smo nato 1 uro inkubirali pri -20 °C, nato pa centrifugirali 30 min (pri 4 °C in 14 000 vrt./min). S pipeto smo odstranili supernatant, nato pa oborjeno DNA sprali s 300 μL 80%-etanola. Vzorec smo ponovno centrifugirali (15 min pri 4 °C in 14 000 vrt./min). S pipeto smo nato odstranili supernatant in usedlino sušili 5 minut pri sobni temperaturi, nato pa DNA raztoplili v vodi brez nukleaz. Na tak način smo DNA koncentrirali in odstranjevali zelo kratke fragmente DNA (ki se pri uporabljenih pogojih ne obarjajo) od daljših.

3.2.5 Restrikcija

3.2.5.1 Restrikcija vektorja pIT2 in insertov ETt z encimoma NcoI in NotI

Za restrikcijo vektorja pIT2 in insertov ETt smo uporabili encima *NcoI* in *NotI* (sliki 12 in 13).



Slika 12: Restriktijsko mesto encima *NcoI* (95)



Slika 13: Restriktijsko mesto encima *NotI* (94)

Za izrez insertov (tj. sinteznih genov ETt iz plazmida pUC57) in linearizacijo vektorja pIT2 smo smo pripravili naslednje reakcijske mešanice:

- 1,5 µg plazmida pUC57 z vstavljenim sinteznim genom ETt ali fagmida pIT2
- 5 µL desetkratno koncentriranega pufra NEBuffer 3.1
- 1 µL encima *NotI* s koncentracijo 10 enot/µL
- 2 µL encima *NcoI* s koncentracijo 10 enot/µL
- destilirana voda do 50 µL.

Vzorce smo rahlo premešali in inkubirali dve uri pri 37 °C.

3.2.5.2 Restrikcija vektorja pYD1 in amplikonov ETt z encimoma NheI in XhoI

Za restrikcijo smo uporabili encima *NheI* in *XhoI* podjetja New England Biolabs (restriktijski mesti encimov sta prikazani na slikah 14 in 15).



Slika 14: Restriktijsko mesto encima *NheI* (94)



Slika 15: Restriktijsko mesto encima *XhoI* (94)

Za linearizacijo plazmida pYD1 smo pripravili smo naslednjo restriktijsko mešanico:

- 1,5 µg plazmida pYD1

- 5 µL desetkratno koncentriranega pufra NEBuffer 2.1
- 2 µL encima *NheI* s koncentracijo 10 enot/µL
- 1 µL encima *XhoI* s koncentracijo 20 enot/µL
- destilirana voda do 50 µL

Za restrikcijo amplikonov ETt smo pripravili naslednje restriktivne mešanice:

- 100 ng amplikona ETt
- 5 µL desetkratno koncentriranega pufra NEBuffer 2.1
- 2,5 µL encima *NheI* encima s koncentracijo 10 enot/µL
- 1,25 µL encima *XhoI* encima s koncentracijo 20 enot/µL
- destilirana voda do 50 µL

Vzorce smo rahlo premešali in inkubirali dve uri pri 37 °C.

3.2.6 Defosforilacija DNA

Defosforilirali smo lineariziran plazmid pYD1 s ciljem preprečiti povratno ligacijo (tj. ponovno ciklizacijo). 1 pmol plazmida smo redčili v 20 µL pufra Cutsmart in dodali 1 µL alkalne fosfataze iz rakcev (rSAP) s koncentracijo 1 enota/µL. Raztopino smo nato inkubirali na 30 minut pri 37 °C, nakar smo encim deaktivirali s 5-minutno inkubacijo pri 65 °C.

3.2.7 Ligacija DNA

Za izvedbo ligacij smo pripravili 10 µL ligacijske mešanice, ki je vsebovala 0,5 µL DNA-ligaze T4, 1 µL desetkrat koncentriranega ligacijskega pufra, 50 ng plazmida ter vsaj 37,5 ng posameznega inserta, a smo zaradi slabše čistosti izolirane DNA to dodali v presežku:

Primer ligacijske mešanice za ligacijo insertov konstruktov ETt v fagmid pIT2:

- 2,5 µL (50 ng) lineariziranega fagmida pIT2, ki smo ga pridobili z izolacijo iz elektroforeznega gela (poglavlji 3.2.5.1 in 3.2.3)
- 6 µL (>37,5 ng) inserta ETt, ki smo ga dobili s pomočjo obarjanje DNA (poglavlji 3.2.5.1 in 3.2.4)
- 0,5 µL DNA-ligaze T4
- 1 µL desetkrat koncentriranega ligacijskega pufra

Primer ligacijske mešanice za ligacijo insertov konstruktov ETt v plazmid:

- 1,84 µL (50 ng) lineariziranega plazmida pYD1, ki smo ga pridobili z izolacijo iz elektroforeznega gela (poglavlji 3.2.5.2 in 3.2.3)
- 5 µL inserta ETt, ki smo ga dobili s pomočjo precipitacije (3.2.5.2 in 3.2.4)

- 0,5 µL DNA-ligaze T4
- 1 µL desetkrat koncentriranega ligacijskega pufra
- 1,66 µL ddH₂O

Reakcijsko mešanico smo nato rahlo premešali s pipetiranjem, nato pa inkubirali prek noči pri 16 °C. Po inkubaciji smo ligazo deaktivirali, tako da smo mešanico inkubirali 10 minut pri 65 °C. Celice *E. coli* smo nato transformirali z ligacijsko mešanico (3.2.8).

3.2.8 Transformacija plazmidne DNA s topotnim šokom in selekcija na agarnem gojišču z ampicilinom

Za pomnoževanje plazmidov pYD1 smo uporabili sev *E. coli* TOP10, fagmide pIT2 pa smo pomnoževali v *E. coli* TG1. V 200 µL odmrznjenih kompetentnih celic smo aseptično primešali 10 µL ligacijske zmesi (poglavlje 3.2.7) oz. 10 ng plazmida. Celice smo nato inkubirali 20 minut na ledu, nato pa izvedli topotni šok, tako da smo mikrocentrifugirko s kulturo premaknili v vodno kopel na 42 °C za 45 sekund. Celice smo postavili nazaj na led za 2 minuti, nato pa jim dodali 800 µL gojišča 2YT. Celice smo stresali pri temperaturi 37 °C 1 uro. Bakterije smo nato razmazali na agarno gojišče LB z dodanim 1 g/L ampicilina. Petrijevke smo inkubirali prek noči pri temperaturi 37 °C.

3.2.9 Izolacija plazmidne DNA iz *E. coli*

Iz selekcijskih agarnih gojišč s transformiranimi bakterijami *E. coli* (poglavlje 3.2.8) smo prenesli po eno kolonijo v tekoče selekcijsko gojišče v erlenmajerici in med močnim stresanjem kulturo inkubirali prek noči pri 37 °C. Naslednji dan smo 4 mL kulture centrifugirali 1 minuto (pri sobni temperaturi in 14 000 vrt./min). Plazmide smo izolirali s kompletom GenElute HP Plasmid Miniprep Kit. Posedle bakterije smo suspendirali v 200 µL raztopine za suspendiranje, ki je vsebovala RNazo. Celice smo nato lizirali z dodatkom 200 µL lizirnega pufra (vsebuje natrijev dodecilsulfat (SDS) in NaOH) in nežnim mešanjem (obračanjem mikrocentrifugirk). Dodali smo 350 µL nevtralizacijskega pufra in mikrocentrifugirke centrifugirali 10 minut pri sobni temperaturi in 14 000 vrt./min. Pri tem je plazmidna DNA ostala raztopljena v supernatantu, medtem ko so se delci celic, vključno s proteini, lipidi, SDS in kromosomska DNA oborili. Plazmidno DNA iz supernatanta smo prenesli v posebne kolonice in jih adsorbirali na silikagelno membrano (med centrifugiranjem 1 minuto pri 14 000 vrt./min in sobni temperaturi). Kolonice smo sprali s po 500 µL raztopine za spiranje 1 in 750 µL raztopine za spiranje 2, ki sta bili del kompleta GenElute HP Plasmid Miniprep Kit. Tako smo odstranili večino kontaminantov (npr. lipopolisaharid) in soli.

Kolonice smo nato prenesli v nove mikrocentrifugirke in DNA eluirali v 65 µL elucijskega pufra (10 mM Tris·HCl, pH 8). Spektrofotometrično s pomočjo naprave NanoDrop ND-1000 smo v 2 µL raztopine DNA določili koncentracijo plazmidov s standardno metodo proizvajalca, za določanje DNA in preverili ustreznost vstavljenega nukleotidnega zaporedja.

3.2.10 Verižna reakcija s polimerazo

Z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo pomnožili gene za konstrukte ETt, ki smo jih nameravali izraziti na površini kvasovke (ETt-1, -2, -9, -11, -14 in -17), in jih hkrati opremili z restriktionskima mestoma *NheI* in *XhoI* (na začetku oz. koncu gena) za prenos v plazmid pYD1. Pripravili smo po 25 µL reakcijskih mešanic, od česar je bilo 12,5 µL osnovne zmesi za verižno reakcijo s polimerazo PCR Master Mix 2× (pufer, DNA-polimeraza in mešanica deoksiribonukleotid trifosfatov). Temu smo nato dodali po 1 µL začetnih oligonukleotidov (5 µM), naštetih v preglednici IV, in matrično plazmidno DNA.

*Preglednica IV: Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabili za pomnoževanje genov za konstrukte ETt-1, -2, -9, -11, -14 in -17. Restriktionski mesti *NheI* (GCTAGC) in *XhoI* (CTCGAG) sta označeni s pošavnimi črkami. Majhne črke označujejo štiri nukleotide, dodane na začetek in konec genov, potrebne za uspešen potek kasnejše restrikcije amplikonov. Tm – talilna temperatura*

Ime	Nukleotidno zaporedje (5'→3')	T _m [°C]	Matrična DNA (plazmid pUC57 z ustreznim insertom)
F1yd	caaaGCTAGCCGATCGAGATTAAGGAAACCTTCAAATAC	59	9, 14
F2yd	aaaaGCTAGCAAAGGTGACCGTACCGCG	61	11
R1yd	gaaaCTCGAGCAGGCAGCTTTAAAGCAGTTCTTG	59	9, 11
R2yd	ttgaCTCGAGCAGGCAGCTTTAAAGCAGTTTGAAA	59	14
F-ETt1/2/17YD	atcaGCTAGCGACAACCCGGAGCGTTACAG	61	1,2,17
R-ETt1/2/17YD	tcgcCTCGAGAAAGCAGTTTGAAATTCTTGCTTCGC	60	1, 2, 17

Matrične plazmidne DNA (pUC57 z ustreznim sinteznim genom za ETt; preglednica IV) smo glede na koncentracije, izmerjene spektrofotometrično, dodali za približno 20 – 50 ng v mešanico za reakcijo z verižno polimerazo, nato pa dopolnili do 25 µL z vodo brez nukleaz.

Reakcijo smo izvajali na cikličnem termostatu AB GeneAmp® PCR System 2700 in sicer pri pogojih, podanih v preglednici V.

Preglednica V: Pogoji poteka verižne reakcije s polimerazo

Čas [s]	Temperatura [°C]	Število ciklov
180	95	1
20	95	30
20	54	
40	72	
420	72	1

3.2.11 Določitev nukleotidnega zaporedja

Izolirane plazmide (poglavlje 3.2.9) smo redčili do koncentracije 80-100 ng/µL. 5 µL plazmida smo dodali 5 µL začetnega oligonukleotida (5 µM). Za določanje nukleotidnih zaporedij insertov v fagmidu pIT2 smo uporabili začetni oligonukleotid LMB3 (CAGGAAACAGCTATGAC), za tiste v plazmidu pYD1 pa začetni oligonukleotid F-pYD1 (AGTAACGTTGTCAGTAATTGC).

Določitev zaporedja nukleotidnih baz je opravilo podjetje GATC Biotech s Sangerjevo dideoksi-terminacijsko metodo.

3.2.12 Elektroporacija *Saccharomyces cerevisiae*

Celice *S. cerevisiae* EBY100 smo najprej pripravili tako, da bi zvišali njihovo elektrokompetentnost (sposobnost sprejetja tuje DNA z elektroporacijo). Kvasovke iz trajne kulture (zamrznjena pri -80 °C) smo razmazali na agarno minimalno gojišče z glukozo, levcinom in triptofanom in jih 2 dni inkubirali pri 30 °C. 500 mL gojišča YPD smo inokulirali z eno kolonijo *S. cerevisiae* EBY100 in stresali prek noči pri 30 °C do optične gostote OD₆₀₀ 1,5. V centrifugi, ohljeni na 4 °C, smo celice nato centrifugirali 5 minut pri 4000 g. Posedle kvasovke smo nato sprali s 500 mL in nato še z 250 mL ledeno hladne sterilne vode. Kvasovke smo suspendirali v 20 mL ledeno hladne raztopine 1 M sorbitola. Celice smo še enkrat centrifugirali pri enakih pogojih, nato pa jih suspendirali v 0,5 mL ledeno hladne raztopine 1 M sorbitola ter jih shranili na ledu.

Pred elektroporacijo smo 65-µL alikvotom elektrokompetentnih celic dodali po 0,1 µg plazmidov pYD1 z geni za posamezen konstrukt ETt. Vzorce smo nežno premešali in inkubirali 5 minut na ledu. Mešanice smo nato prenesli v ohljene elektroporacijske kivete.

Elektroporacije smo izvedli pri napetosti 5000 V in časovni konstanti 5 ms. Kvasovkam smo takoj po elektroporaciji dodali 1 mL hladnega 1 M sorbitola in jih razmazali na selekcijsko agarno minimalno gojišče z glukozo, levcinom in 1 M sorbitolom. Ploščam nismo dodali triptofana, saj plazmid, s katerim smo transformirali kvasovke, vsebuje kot selekcijski označevalec gen za sintezo triptofana.

3.2.13 Verižna reakcija s polimerazo na osnovi kolonije kvasovk

Verižno reakcijo s polimerazo na osnovi kolonije kvasovk smo izvedli tako, da smo inokulirali posamezne kolonije kvasovk po elektroporaciji iz selekcijskih agarnih gojišč (poglavlje 3.2.12) v 5 mL gojišča YNB-CAA z 2 % glukoze in jih inkubirali prek noči pri 30 °C s stresanjem. Vzeli smo 100 µL kulture in jo prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko. Kulturo smo centrifugirali 5 minut pri 5000 g, odstranili smo supernatant in kvasovke suspendirali v 20 µL 0,02 mol/L NaOH. Mikrocentrifugirke z vzorci smo nato 10 minut inkubirali v vreli vodi in jih centrifugirali 2 minuti pri 14 000 vrt./min. 1 µL supernatanta smo uporabili za pripravo naslednje reakcijske mešanice za verižno reakcijo s polimerazo:

- 1 µL supernatanta
- 5 µL osnovne zmesi za verižno reakcijo s polimerazo PCR Master Mix 2×
- 0,4 µL začetnega oligonukleotida F-pYD1 (AGTAACGTTGTCAGTAATTGC)
- 0,4 µL začetnega oligonukleotida R-pYD1 (GTCGATTTGTTACATCTACAC)
- 3,2 µL bdestilirane vode (ddH₂O)

Poleg testiranih vzorcev smo po prej opisanem postopku pripravili tudi reakcijski zmesi za pozitivno kontrolo, kjer smo namesto supernatanta dodali 10 ng plazmida, raztopljenega v 1 µL ddH₂O, ter za negativno kontrolo, kjer smo namesto supernatanta dodali 1 µL ddH₂O. Vzorce smo nato inkubirali na cikličnem termostatu AB GeneAmp® PCR System 2700 pri pogojih, podanih v preglednici VI.

Preglednica VI: Pogoji poteka verižne reakcije s polimerazo na osnovi kolonije kvasovk

Čas [s]	Temperatura [°C]	Število ciklov
180	95	1
20	95	40
20	45	
80	72	
420	72	1

3.3 Priprava in vrednotenje fagmidnih virionov s predstavljenimi konstrukti ETt

Mimetike endotelinskega receptorja (ETt) smo poskušali izraziti na nitastih bakteriofagih. Te smo morali sprva pomnožiti ter izolirati (poglavlji 3.3.1 in 3.3.2). Za primerjavo izražanja posameznih mimetikov endotelinskih receptorjev na nitastih bakteriofagih smo izvedli test ELISA (poglavlje 3.3.3). Za določanje razlik v afiniteti za vezavo endotelinskih mimetikov pa smo izvedli test ELISA s streptavidinskimi paramagnetenimi kroglicami, na katere smo predhodno vezali biotiniliran endotelin-1 (poglavlje 3.3.4).

3.3.1 Pomnoževanje fagmidnih virionov v *E. coli*

Konstrukte z različnimi deli endotelinskega receptorja tipa A, povezane z rigidnimi in fleksibilnimi pentapeptidnimi linkerji (ETt-1, ETt -2, ETt -9, ETt -10, ETt -11, ETt -14, ETt -15, ETt -16 in ETt -17; slika 11), smo izrazili na kapsidi nitastih bakteriofagov v obliki fuzijskega produkta s kapsidnim proteinom p3 (uporabili smo predstavitev tipa 3+3, tj. fagmidni vektor pIT2). Z rekombinantnimi fagmidi smo transformirali sev *E. coli* TG1 (poglavlje 3.2.8).

Transformirane bakterije smo pomnoževali med stresanjem pri 37 °C prek noči v 20 mL gojišča 2YT, ki smo mu dodali še 1 g/L glukoze in 100 µg/mL ampicilina. Naslednji dan smo kulture redčili v sveže gojšče 2YT z 1 g/L glukoze in 100 µg/mL ampicilina v razmerju 1:100 (V/V) in nadaljevali z gojenjem, dokler optična gostota OD₆₀₀ ni doseгла vrednosti ~0,4. V vsako od kultur smo dodali po 4×10^{10} transducirajočih enot (TU, tj. infektivnih virionov) pomožnega bakteriofaga KM13. Kulture smo nato brez stresanja inkubirali 30 minut pri temperaturi 37 °C, nato pa jih centrifugirali, supernatant zavrgli, bakterije pa suspendirali v po 20 mL gojišča 2YT z 0,1% glukoze, 100 µg/mL ampicilina in 50 µg/mL kanamicina. Kulture smo med intenzivnim stresanjem gojili pri 30 °C prek noči.

Za pomnoževanje pomožnega bakteriofaga, ki smo ga uporabili kot negativno kontrolo v kasnejših testih ELISA, smo uporabili kulturo *E. coli* TG1 brez fagmida, zato gojšče ni vsebovalo ampicilina.

3.3.2 Izolacija fagmidnih virionov

S t.i. superinfekcijo s pomožnim bakteriofagom KM13 smo v kulturah *E. coli* TG1, ki so vsebovale fagmid pIT2 s fuzijskimi proteini ETt-p3, inducirali nastajanje rekombinantnih bakteriofagov (poglavlje 3.3.1). Po približno 16 urah gojenja smo kulture centrifugirali 10

minut pri 4 °C in 10000 vrt./min. Supernatante (20 mL) smo prenesli v centrifugirke in jim dodali 5 mL raztopine PEG/NaCl (20 % (m/V) polietilenglikol 8000 v 2,5 M NaCl). Pomožne bakteriofage smo izolirali iz 40 mL supernatanta. Suspenzijo smo premešali in inkubirali na ledu 1 uro, da je prišlo do obarjanja fagov. Končno smo oborjene bakteriofage poželi s centrifugiranjem (15 minut pri 4 °C in 10 000 vrt./min). Odstranili smo supernatant in usedlino bakteriofagov suspendirali v po 0,5 mL hladnega fosfatnega pufra s soljo (PBS). Suspenzije smo še enkrat centrifugirali pri enakih pogojih, da smo odstranili morebitne netopne delce, in supernatante prenesli v nove mikrocentrifugirke. Fagmidne virione smo hranili v hladilniku pri 4 °C.

Koncentracijo izoliranih fagmidnih virionov smo ocenili sprekrotometrično. S spektrometrom Nanodrop smo pomerili absorbanci pri valovnih dolžinah 269 nm in 320 nm. Za meritev absorbance ozadja smo uporabili pufer PBS. V nasprotju s sferičnimi fagi, ki imajo približno enako masno razmerje med proteini in DNA, imajo nitasti fagi približno šestkrat več proteinov, kot DNA. Proteini tako veliko bolj prispevajo k absorpcijskemu spektru med 260 – 280 nm, z maksimumom pri 269 nm. Na podlagi študije Daya in Wissmana (96) smo iz absorbanc pri 269 nm in 320 nm po naslednji enačbi izračunali koncentracijo fagov (v virionih na mililiter):

$$Virioni/mL = \frac{(A_{269} - A_{320}) * 6 * 10^{16}}{\text{Število baz/virion}} \quad (\text{enačba I})$$

Pri valovni dolžini 320 nm bakteriofagi le malo absorbirajo, zato smo z odštevanjem te absorbance nekoliko popravili napako zaradi sisanja svetlobe in nečistot. Število nukleinskih baz za posamezne fagmidne virione in pomožni bakteriofag KM13 je prikazano v preglednici VII.

Preglednica VII: Število nukleinskih baz posameznih virionov.

Vstavljen insert	Število baz
ETt-1	4960
ETt-2	4890
ETt-9	5000
ETt-10	4860
ETt-11	5050
ETt-14	5040
ETt-15	5070
ETt-16	5080
ETt-17	5100
Pomožni virion KM13	8670

3.3.3 Ocena izražanja konstruktov ETt na fagmidnih virionih s testom ELISA

Nivo izražanja (predstavitev) konstruktov ETt na nitastih bakteriofagih smo primerjalno ocenili s testom ELISA (encimskoimunski test, angl. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Nivo izražanja smo vrednotili posredno, z detekcijo peptidnega zaporedja cMyc (slika 9), ki se nahaja v rekombinantnih fuzijskih proteinih med konstruktom ETt in proteinom p3.

Test smo izvajali v mikrotitrskih ploščah MaxiSorp. En dan pred izvedbo testa smo v posamezne vdolbinice odpipetirali po $50 \mu\text{L}$ protiteles anti-cMyc ($1 \mu\text{g/mL}$), redčenih s 1 M solno raztopino fosfatnega pufra (PBS) in mikrotitrsko ploščico inkubirali pri 4°C . Vzporedno smo za vsak testiran bakteriofag po eno vdolbinico prihranili nezasedeno (vanjo nismo adsorbirali protiteles) za oceno ozadja testa.

Naslednji dan smo vdolbinice napolnili s 5% raztopino mleka v prahu v pufru PBS in mikrotitrsko ploščo stresali eno uro pri sobni temperaturi. Raztopino za blokiranje smo odstranili in vdolbinice dvakrat sprali s po $285 \mu\text{L}$ pufra PBS z 0,05 % Tweena-20. V vdolbinice smo nato dodali po 5×10^{10} fagmidnih virionov (poglavlje 3.3.2), redčenih v $200 \mu\text{L}$ pufra PBS z 0,05 % Tweena 20 in 0,5 % mleka ter mikrotitrsko ploščo stresali 1,5 ure pri sobni temperaturi. Raztopino z virioni smo odstranili in vdolbinice štirikrat spirali s po $280 \mu\text{L}$ pufra PBS z 0,05 % Tweena 20. Kot detekcijska protitelesa smo nato uporabili protitelesa anti-M13, konjugirana s hrenovo peroksidazo. Ta smo redčili v razmerju 1:5000 (V/V) s pufrom PBS z 0,05 % (V/V) Tweena 20 in 0,5 % mleka (m/V) in v vsako vdolbinico dodali po $200 \mu\text{L}$ te raztopine, nato pa mikrotitrsko ploščo stresali 1 uro pri sobni temperaturi. Vdolbinice smo zopet štirikrat spirali in jih napolnili s po $200 \mu\text{L}$ raztopine kromogenega substrata hrenove peroksidaze 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). Po 3-5 minutah smo encimsko reakcijo ustavili z dodatkom $50 \mu\text{L}$ $2 \text{ M H}_2\text{SO}_4$. S čitalcem mikrotitrskih ploščic BioTek Epoch smo izmerili absorbanco raztopin v vdolbinicah pri 450 nm . Vrednosti absorbanc v vdolbinicah brez adsorbiranih protiteles anti-cMyc smo odšteli od absorbanc v testnih vdolbinicah posameznih bakteriofagov. Rezultate smo nato normalizirali na vrednosti ET-2, tako da smo vse absorbanc vzorcev z odštetimi vrednostmi ozadja delili z vrednostjo ET-2 z odštetim ozadjem po enačbi:

$$ETt - 2 \text{ normalizirana vrednost} = \frac{A_{450\text{ETt-x}} - A_{450\text{ETt-x(ozadje)}}}{A_{450\text{ETt-2}} - A_{450\text{ETt-2(ozadje)}}} \quad (\text{enačba 2})$$

3.3.4 Ocena vezave endotelina s testom ELISA na paramagnetnih kroglicah

Afiniteto konstruktorov ETt do endotelina-1 smo kvalitativno primerjalno ovrednotili z modificiranim testom ELISA. Na paramagnetne kroglice, prekrite s streptavidinom, smo vezali sintezi biotiniliran humani endotelin-1 in jih inkubirali s posameznimi fagmidnimi virioni. Po spiranju smo vezane bakteriofage detektirali s protitelesi M13, konjugiranimi s hrenovo peroksidazo.

Po 10 µL paramagnetnih kroglic Dynabeads MyOne Streptavidin T1 smo odpipetirali v mikrocentrifugirko z 1 mL pufra PBS z 0,1 % (V/V) Tweena 20, dobro premešali, nato pa mikrocentrifugirko postavili v magnetno stojalo in počakali, da so se paramagnetne kroglice zbrale ob steni. S pipeto smo previdno odstranili tekočino in kroglice še enkrat sprali z 1 mL pufra PBS z 0,1 % (V/V) Tweena 20, nato pa jih suspendirali v 400 µL pufra PBS z 0,1 % Tweenom 20. Suspenzijo smo razdelili v dve mikrocentrifugirki po 200 µL in v eno od njiju dodali 0,75 µL raztopine 1 mg/mL biotiniliranega ET-1. Obe mikrocentrifugirki smo nato 30 minut inkubirali pri sobni temperaturi med nežnim stresanjem, da se je ET-1 vezal na kroglice. Kroglice smo trikrat sprali s pufrom PBS z 0,1 % Tweena 20. Na koncu smo paramagnetne kroglice suspendirali v po 20 µL pufra PBS z 0,05 % Tweena 20.

Po dve mikrocentrifugirki za vsak vzorec (bakteriofag s predstavljenim posameznim konstruktom ETt) smo predhodno blokirali z 2 mL pufra PBS s 5 % govejim serumskim albuminom. Mikrocentrifugirke smo stresali eno uro pri 37 °C, nato pa tekočino odstranili in dodali 1 mL pufra PBS z 0,1 % Tweena 20. V mikrocentrifugirke smo nato dodali 5×10^{10} fagmidnih virionov. 500 µL redčenih fagmidnih virionov istega vzorca, smo odpipetirali v dve predhodno blokirani mikrocentrifugirki. V eno smo nato dodali 20 µL suspenzije paramagnetnih kroglic z vezanim ET-1, v drugo mikrocentrifugirko pa 20 µL suspenzije paramagnetnih kroglic brez ET-1. Bakteriofage in paramagnetne kroglice smo inkubirali 1 uro med nežnim stresanjem pri sobni temperaturi, nakar smo kroglice trikrat sprali z 1 mL pufra PBS z 0,1 % Tweena-20. Paramagnetne kroglice smo suspendirali v 200 µL raztopine protiteles anti-M13/HRP, v pufru PBS z 0,05 % Tweena 20 in 3 % mleka. Mikrocentrifugirke smo nežno stresali 30 minut pri sobni temperaturi, nakar smo kroglice trikrat sprali. Na koncu smo kroglice suspendirali v 180 µL raztopine TMB. Po desetih minut smo encimsko reakcijo ustavili z dodatkom 45 µL 2 M H₂SO₄. Paramagnetne kroglice smo nato zbrali z magnetnim stojalom in po 200 µL supernatantov odpipetirali v vdolbinice mikrotitrsko plošče z ravnim dnom. Vzorcem smo nato pomerili absorbanci raztopin iz testov posameznih bakteriofagov s kroglicami BioTek Epoch. Vrednosti absorbanci raztopin iz testov posameznih bakteriofagov s kroglicami

brez ET-1 smo odšteli od absorbanc v testnih vdolbinicah. S pomočjo programa Microsoft Office Excel smo izvedli še statistično analizo; primerjali smo razmerja signalov različnih bakteriofagov (s predstavljenimi različnimi konstrukti ETt) in vrednosti normalizirali glede na signal bakteriofagnega klena ETt-2 po enačbi 2 (poglavlje 3.3.3). Pri endotelinkih pasteh, ki so se bolje izražale na nitastih bakteriofagih, bi od enaki afiniteti do endotelina izmerili višji rezultat, zato smo ET-2 normalizirane vrednosti, delili še z relativno ET-2 normalizirano vrednostjo izražanja, ki ga je pokazal test ELISA (poglavlje 3.3.3.).

3.3.5 Zamenjava aminokislinskega ostanka cisteina s serinom na mestu 106 v ETt17

Konstrukt ETt-17 z najvišjo afiniteto do endotelina-1 je vseboval pet cisteinskih ostankov. Ker se proteini s prostimi (nesparjenimi) cisteini praviloma slabo izražajo na nitastem bakteriofagu, pri izražanju tovrstnih topnih rekombinantnih proteinov pa obstaja nevarnost tvorbe dimerov, smo z usmerjeno mutagenezo domnevno nesparjeni cisteinski ostanek na mestu 106 mimetika endotelinskega receptorja ETt-17 zamenjali za serin, ki ima podobne fizikalno-kemijske lastnosti (slika 16).



Slika 16: Shema konstrukta ETt-17 in lokacija usmerjene mutacije cisteina v serin.

Za izvedbo točkovne mutacije smo uporabili komplet QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit, ki je omogočil spremembo ene nukleotidne baze v kodonu za cistein (gvanina v timidin), s čimer smo v konstraktu ETt-17 zamenjali cistein s serinom. Za pripravo 25 µL reakcijske mešanice smo združili 2,5 µL desetkrat koncentriranega reakcijskega pufra, 0,5 µL zmesi deoksiribonukleotid trifosfatov, 12,5 ng fagmida pIT2/ETt-17, 62,5 ng vsakega od začetnih oligonukleotidov (F-ETt17_C106S in R-ETt17_C106S) ter vodo brez nukleaz. Na koncu smo dodali še 0,5 µL DNA-polimeraze PFUltra HF s koncentracijo 2,5 enot/µL.

Sintezna reakcija je potekala na cikličnem termostatu AB GeneAmp® PCR System 2700, in sicer najprej 30 s pri 95 °C, nato 12 ciklov po 30 s pri 95 °C, 1 minuto pri 55 °C in 5 minut pri 68 °C. V prvi fazi pri 95 °C je zaradi visoke temperature prišlo do denaturacije matrice DNA, pri 55 °C je prišlo do prileganja začetnih oligonukleotidov z vsebujočo mutacijo. V zadnji fazi pri 68 °C je najbolj optimalno delovanje PFUltra HF DNA polimeraze in je zato v tem temperaturnem območju potekalo podaljševanje verige DNA. Za sintezo 1 kb plazmida je

priporočena približno 1 minuta pri 68 °C, zato smo za podaljševanje našega 5,1-kb plazmida pIT2-ETt-17 pustili, da cikel teče 5 minut.

Začetna oligonukleotida sta omogočila sintezo komplementarnih verig fagmida s točkovno mutacijo, v zmesi pa je bila še vedno prisotna originalna matrica. Slednjo smo razgradili z dodatkom 0,5 µL raztopine restrikcijskega encima *DpnI* s koncentracijo 10 enot/µL. Restrikcijska reakcija je potekala 1 uro pri 37 °C, nakar smo celice *E. coli* TG1 transformirali z reakcijsko zmesjo. Z določitvijo nukleotidnega zaporedja inserta (poglavlje 3.2.11) smo potrdili prisotnost točkovne mutacije in pripravili fagmidne virione ETt-17mut s superinfekcijo s pomožnim bakteriofagom (poglavlje 3.3.1).

3.4 Izražanje konstruktov ETt na kvasovkah

Po pripravi plazmidov za predstavitev konstruktov na kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 (poglavlja 3.2.10, 3.2.12 in 3.2.7) smo površinsko izražanje mimetikov endotelinskih receptorjev testirali s pomočjo fluorescenčne mikroskopije (poglavlje 3.4.2) ter pretočne citometrije (poglavlje 3.4.3).

3.4.1 Pomnoževanje kvasovk in izražanje fuzijskega proteina

Trajne kulture kvasovk *S. cerevisiae* EBY100, ki so vsebovale plazmid pYD1 z vstavljenim genom za posamezen konstrukt ETt (poglavlje 3.2.13), smo inokulirali v erlenmajerice s po 5 mL gojišča YNB-CAA z 2 % glukoze in jih intenzivno stresali prek noči pri 30 °C. Kot negativno kontrolo smo uporabili *Saccharomyces cerevisiae* EBY100, v katero nismo elektroporirali vektorja pYD1, kot pozitivno kontrolo pa kvasovke, transformirane s pYD1 brez vstavljenega gena. Ker se na plazmidu pYD1 nahaja tudi gen za izdelavo triptofana (*TRP1*; slika 10), smo v gojišče, v katerem smo pomnoževali netransformirane kvasovke, dodali 0.01 % triptofana. Analizirali smo izražanje konstruktov ETt-1, ETt -2, ETt -9, ETt -11, ETt -14 in ETt -17. Klon s plazmidom pYD1/ETt-17 smo inokulirali v dve erlenmajericici, pri čemer v eni nismo inducirali izražanja rekombinantnega fuzijskega proteina (dodatna negativna kontrola).

Naslednji dan smo kulturam izmerili optično gostoto OD₆₀₀ in jih centrifugirali 10 minut pri sobni temperaturi in 5000 vrt./min. Posedle kvasovke smo nato suspendirali v toliko indukcijskega gojišča (YNB-CAA z 2 % (m/m) galaktoze), da je bila končna vrednost OD₆₀₀ 0,5. Indukcija je potekala nadaljnjih 48 h pri 30 °C in z intenzivnim stresanjem. V eni od kultur EBY100 pYD1/ETt17 indukcije nismo izzvali, zato smo kvasovke suspendirali v gojišču YNB-CAA z 2 % (m/m) glukoze.

3.4.2 Detekcija rekombinantnih konstruktov ETt

Inducirane kulture (poglavje 3.4.1) smo centrifugirali 10 minut pri 4 °C s 5000 vrt./min. Po odstranitvi supernatanta smo celice suspendirali v 250 µL hladnega pufra PBS in ponovno centrifugirali. Posedle kvasovke smo suspendirali v 250 µL PBS z 1 mg/mL BSA in dodali 2,5 µL fluorescenčno označenega protitelesa anti-V5 (anti-V5-PE). Protitelesa so vezala peptidno zaporedje V5, ki je dodano na C-konec konstruktov ETt (slika 9). Vzorce smo nato inkubirali 1 uro v temi na ledu z občasnim rahlim mešanjem. Kvasovke smo dvakrat sprali s 1 mL PBS z vmesnim centrifugiranjem in jih suspendirali v 40 µL PBS. Preparate za mikroskopiranje smo pripravili tako, smo nekaj kapljic nakapljali na objektno stekelce, čezenj poveznili krovno stekelce nato pa kvasovke opazovali s fluorescenčnim mikroskopom EVOS FL. Celice smo posneli pri 40× povečavo pri in sicer pod fluorescentno svetlobo pod katero smo videli vezavo protiteles na celice kvasovk s predstavljenim proteinom pri 60 % in 90 % intenzitete eksitacijske svetlobe ter pri normalni svetlobi.

3.4.3 Pretočna citometrija

Kvasovke s predstavljenimi mimetiki endotelinskih receptorjev, ki smo jih enako kot v poglavju 3.4.2 inkubirali v 250 µL PBS z 1 mg/mL BSA in 2,5 µL fluorescenčno označenega protitelesa anti-V5-PE, smo analizirali s pomočjo pretočnega citometra Attune NxT. Ta je celice razvrstil in jih eno po eno vodil čez laserski žarek, in jih glede na prekinitve žarka preštel ter zaznal, na kakšnem deležu celic je bila prisotna fluorescencija, ki so jo oddajala fluorescenčna protitelesa anti-V5-PE, vezana na površino kvasovk. Valovna dolžina eksitacijskega laserja je bila 488 nm, uporabili pa smo detektor BL2. Izračunali smo delež celic, ki je oddajal rdečo fluorescenco. Pri testu s pretočnim citometrom smo kot neinducirano kontrolo, ki smo jo gojili v gojišču z glukozo namesto galaktoze, uporabili klon ETt-1.

4 Rezultati in razprava

4.1 Izražanje konstruktov ETt na nitastih bakteriofagih in primerjalno vrednotenje njihove afinitete do endotelina

Sintezne gene za konstrukte ETt (sestavljeni iz različnih segmentov endotelinskega receptorja tipa A (slika 11), povezane z rigidnimi in/ali fleksibilnimi pentapeptidnimi linkerji; poimenovani ETt-1, ETt-2, ETt-15, ETt-16 in ETt-17) smo subklonirali v fagmid pIT2. Z vektorjem smo transformirali bakterije *E. coli* TG1 in inducirali nastajanje rekombinantnih virusnih delcev z naknadno infekcijo s pomožnim bakteriofagom. Na podoben način smo na kapsidi nitastih bakteriofagov izrazili tudi konstrukte ETt-9, -10 in -14, sestavljeni iz aminokislinksih zaporedij, nepovezanih z ET_A, z enakimi rigidnimi oz. fleksibilnimi linkerji, ki smo jih uporabili kot kontrole (tj. za te konstrukte nismo pričakovali, da bi izkazovali afiniteto do endotelina-1).

4.1.1 Ocena nivojev izražanja ETt na bakteriofagu

S pomočjo prirejenega testa ELISA smo sprva primerjalno ovrednotili nivo izražanja konstruktov ETt na kapsidi bakteriofagov. To smo naredili posredno. Na dno mikrotitrskih ploščic smo adsorbirali protitelesa, usmerjena proti peptidnemu zaporedju cMyc, ki se nahaja v regiji fuzijskega proteina, ki konstrukte ETt povezuje s kapsidnim proteinom p3. Ko smo v vdolbinicah inkubirali suspenzije posameznih fagmidnih virionov, so se na imobilizirana protitelesa ujeli zgolj tisti, ki v kapsidi nosijo fuzijski protein ETt-p3. Vezane bakteriofage smo detektirali s konjugatom protiteles, usmerjenih proti kapsidnim proteinom nitastih fagov, in hrenove peroksidaze. Odziv testa (absorbanca A₄₅₀) je tako premosorazmeren deležu virionov, ki na kapsidi izražajo konstrukt ETt. Kot negativno kontrolo smo uporabili pomožni bakteriofag, katerega kapsida je sestavljena zgolj iz proteinov divjega tipa.

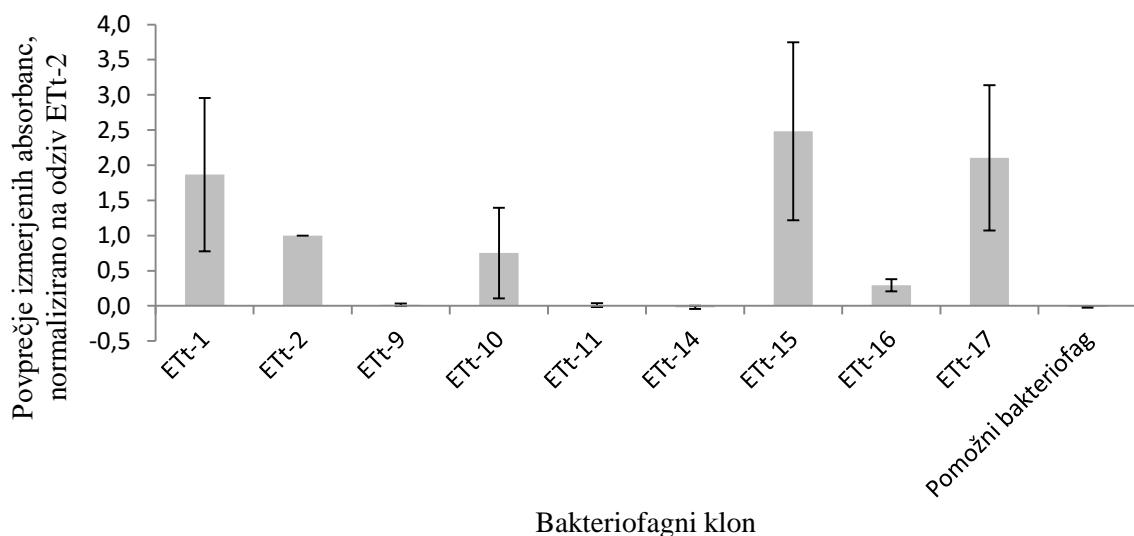
Posamezne fagmidne virione smo neodvisno pomnožili vsaj trikrat in vselej s testom ELISA primerjalno ovrednotili izražanje konstruktov ETt (preglednica VII). Signale, izmerjene v vdolbinicah brez protiteles anti-cMyc (ozadja), smo odšteli od signalov testnih vdolbinic. Rezultate neodvisnih testov smo normalizirali na odziv klona ETt-2 (slika 17), da smo jih lahko primerjali med seboj.

Preglednica VIII: Vrednosti izmerjenih absorbanc A450 prirejenega testa ELISA za oceno nivojev izražanja konstruktov ETt na nitastih bakteriofagih ter iste vrednosti, normalizirane na odziv klona ETt2, iz posameznih neodvisnih poskusov.

Poskus	Klon	A₄₅₀ (anti-cMyc)	A₄₅₀ (ozadje)	Razlika med A₄₅₀ vzorca in ozadja	Odziv normaliziran na ET-2
1.	ETt-1	1,477	0,322	1,155	2,29
	ETt-2	0,691	0,187	0,504	1,00
	ETt-9	0,148	0,129	0,019	0,04
	ETt-10	0,779	0,142	0,637	1,26
	ETt-11	0,152	0,13	0,022	0,04
	ETt-14	0,128	0,148	-0,02	-0,04
	ETt-15	1,654	0,211	1,443	2,86
	ETt-16	0,263	0,128	0,135	0,27
	ETt-17	2,154	0,702	1,452	2,88
	Pomožni bakteriofag	0,138	0,151	-0,013	-0,03
2.	ETt-1	1,641	0,240	1,401	3,19
	ETt-2	0,600	0,161	0,439	1,00
	ETt-9	0,124	0,122	0,002	0,00
	ETt-10	0,733	0,142	0,591	1,35
	ETt-11	0,127	0,129	-0,002	0,00
	ETt-14	0,123	0,134	-0,011	-0,03
	ETt-15	1,760	0,218	1,542	3,51
	ETt-16	0,217	0,120	0,097	0,22
	ETt-17	1,745	0,648	1,097	2,50
	Pomožni bakteriofag	0,133	0,138	-0,005	-0,01
3.	ETt-1	1,250	0,178	1,072	1,22
	ETt-2	1,089	0,209	0,880	1,00

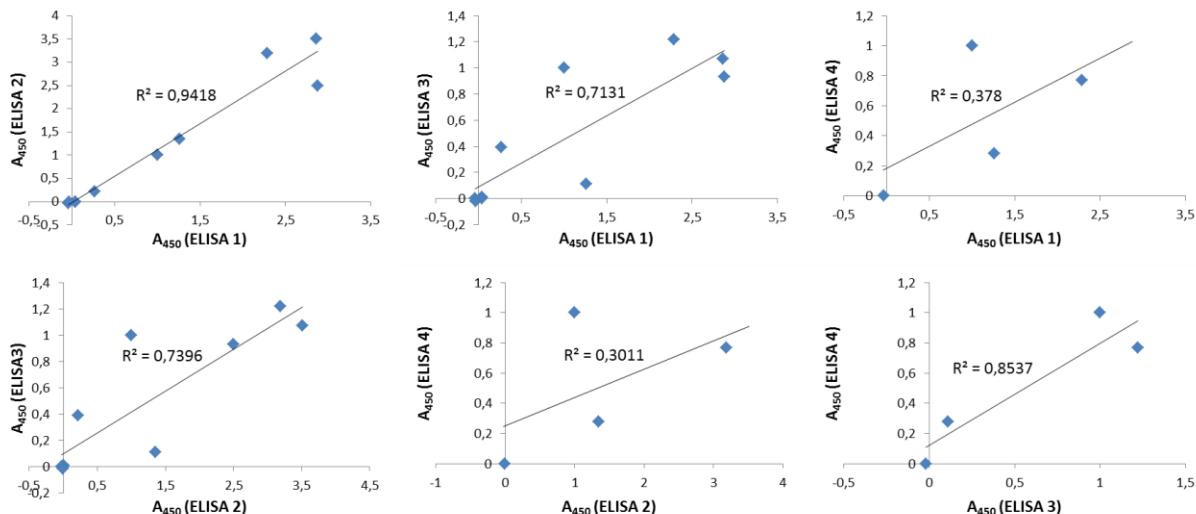
	ETt-9	0,128	0,120	0,008	0,01
	ETt-10	0,220	0,120	0,100	0,11
	ETt-11	0,123	0,127	-0,004	0,00
	ETt-14	0,122	0,121	0,001	0,00
	ETt-15	1,105	0,162	0,943	1,07
	ETt-16	0,471	0,129	0,342	0,39
	ETt-17	1,035	0,215	0,820	0,93
	Pomožni bakteriofag	0,121	0,139	-0,018	-0,02
4.	ETt-1	0,575	0,163	0,412	0,77
	ETt-2	0,705	0,168	0,537	1,00
	ETt-10	0,290	0,138	0,152	0,28
	Pomožni bakteriofag	0,131	0,130	0,001	0,00

Iz normaliziranih vrednosti odzivov smo izračunali povprečja ter standardne odklone neodvisnih testov ELISA za posamezne klone. Rezultati so povzeti v preglednici I v prilogi 1 ter na sliki 17.



Slika 17: Povprečno relativno izražanje konstruktov ETt na nitastih bakteriofagih. Odzivi so normalizirani na odziv klena ETt-2.

Kot je razvidno iz slike 17 ter preglednice II v prilogi 1, so se na bakteriofagih najboljše izrazili konstrukti ETt-15, ETt-1, ETt-17 in ETt-2. Zaznavno, a v manjši meri, je tudi izražanje konstruktov ETt-10 in ETt-16, medtem ko se konstrukti ETt-9, ETt-11 in ETt-14 praktično niso izrazili. Opažene razlike v obsegu predstavitev na bakteriofagu so lahko posledica odlaganja rekombinantnih fuzijskih proteinov v inkluzijska telesca (v citosolu ali periplazmi) ali nekompatibilnosti nekaterih konstruktov ETt s prehajanjem v bakterijsko periplazmo, kar je pogoj za vgrajevanje v bakteriofagno kapsido. Odzivi pomožnega bakteriofaga (uporabljenega kot negativna kontrola), na katerega površini ni prisotnega peptidnega zaporedja cMyc, so bili pričakovano nizki. Pri vseh klonih so bile opazne precejšnje razlike v odzivih med neodvisnimi testi, kar verjetno nakazuje različno učinkovitost vgrajevanja fuzijskih proteinov v kapsido med posameznimi pomnoževanji klonov, deloma pa so odkloni lahko tudi posledica eksperimentalnih napak pri testu ELISA. Primerljivost podatkov, zbranih v neodvisnih poskusih, prikazuje slika 18 (regresijske premice odzivov, normaliziranih na odziv klena ETt2, za posamezne pare testov ELISA).



Slika 18: Korelacije odzivov posameznih klonov, izmerjenih v ponovljenih testih ELISA (ELISA 1 – 1. eksperiment ELISA, ELISA 2 – 2. eksperiment ELISA ELISA 3 – 3. eksperiment ELISA). Odzivi so normalizirani na signale klena ETt2.

4.1.2 Primerjalno vrednotenje vezave konstruktov ETt na endotelin-1

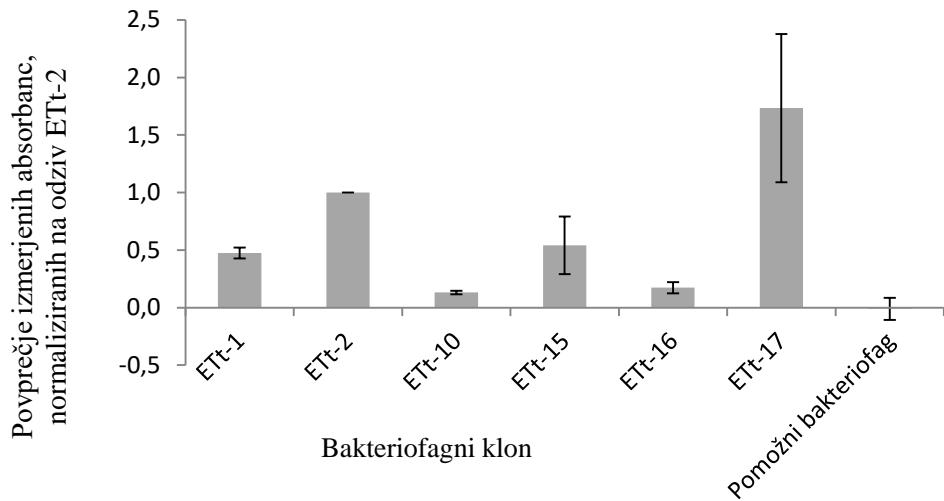
V nadaljevanju smo primerjalno ovrednotili vezavo konstruktov, ki smo jih uspeli predstaviti na nitastih bakteriofagih, na endotelin-1. Na paramagnetne kroglice mikrometrskih dimenzij, prekrite s streptavidinom, smo vezali sintezi biotiniliran endotelin-1 in dodali posamezne klone bakteriofagov. Po intenzivnem spiranju smo bakteriofage, vezane na kroglice,

detektirali s konjugatom protiteles, usmerjenih proti kapsidnim proteinom nitastih fagov, in hrenove peroksidaze. Odziv testa (absorbanca A_{450}) je tako premosorazmeren afiniteti konstruktorov ETt. Kot negativno kontrolo smo ponovno uporabili pomožni bakteriofag, katerega kapsida je sestavljena zgolj iz proteinov divjega tipa. Poskuse smo ponovili z vsakim klonom vsaj trikrat (preglednica IX). Signale, izmerjene v poskusih brez endotelina-1 (ozadja), smo odšteli od signalov v poskusih z endotelinom-1. Rezultate testov smo normalizirali na odziv klona ETt-2 (slika 19), da smo jih lahko primerjali med seboj.

Preglednica IX Vrednosti izmerjenih absorbanc A_{450} prirejenega testa ELISA za vrednotenje vezave konstruktorov ETt na endotelin-1 ter iste vrednosti, normalizirane na odziv klona ETt2, iz posameznih poskusov.

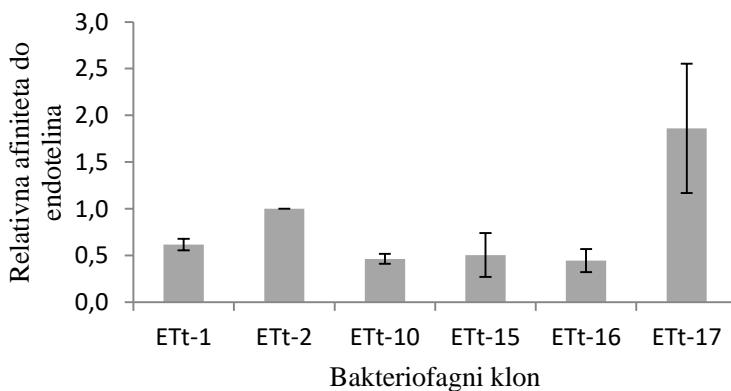
Poskus	Klon	A_{450} (ET-1)	A_{450} (ozadje)	Razlika med A_{450} vzorca in ozadja	Odziv, normaliziran na ETt-2
1.	ETt-2	0,474	0,203	0,271	1,00
	ETt-15	0,269	0,199	0,070	0,26
	ETt-16	0,198	0,163	0,035	0,13
	ETt-17	0,545	0,271	0,274	1,01
	Pomožni bakteriofag	0,172	0,193	-0,021	-0,08
2.	ETt-2	0,438	0,246	0,192	1,00
	ETt-15	0,395	0,274	0,121	0,63
	ETt-16	0,244	0,212	0,032	0,17
	ETt-17	0,695	0,263	0,432	2,25
	Pomožni bakteriofag	0,210	0,220	-0,010	-0,05
3.	ETt-2	0,629	0,264	0,365	1,00
	ETt-10	0,169	0,151	0,018	0,05
	ETt-15	0,488	0,219	0,269	0,74
	ETt-16	0,263	0,181	0,082	0,22
	ETt-17	0,968	0,260	0,708	1,94
	Pomožni bakteriofag	0,211	0,523	-0,312	-0,85
4.	ETt-1	0,328	0,150	0,178	0,49
	ETt-1	0,334	0,151	0,183	0,51
	ETt-1	0,300	0,149	0,151	0,42
	ETt-2	0,557	0,197	0,360	1,00
	ETt-10	0,199	0,157	0,042	0,12
	ETt-10	0,198	0,145	0,053	0,15
	ETt-10	0,220	0,173	0,047	0,13
	Pomožni bakteriofag	0,179	0,143	0,036	0,10

Iz normaliziranih vrednosti odzivov smo izračunali povprečja ter standardne odklone testov ELISA za posamezne klone. Rezultati so povzeti v preglednici II priloge 1 ter na sliki 19.



Slika 19: Povprečen relativen obseg vezave konstruktorov ETt na podlagi izmerjenih absorbanc, predstavljenih na nitastih bakteriofagih, na sintezi endotelin-1. Odzivi so normalizirani na odziv klena ETt2.

Pri tem eksperimentu smo najvišjo afiniteto zaznali pri endotelinski pasti ETt-17. Druga najvišjo afiniteto je izkazoval konstrukt ETt-2, na tretjem mestu pa sta bila ETt-1 in ETt-15. Pri tolmačenju rezultatov je smiselno upoštevati, da se nivoji izražanja posameznih endotelinskih pasti razlikujejo (slika 17). Če torej upoštevamo razlike v nivojih izražanja ETt pri oceni relativne afinitete do endotelina-1 (tj. ocenjene relativne afinitete normaliziramo na nivo izražanja posameznega konstrukta ETt), dobimo vrednosti, prikazane v preglednici III priloge 2 in na sliki 20.



Slika 20: Relativne afinitete vezave konstruktorov ETt na endotelin-1, normalizirane na nivo izražanja posameznega ETt.

Tudi ob upoštevanju nivojev izražanja imata konstrukta ETt-17 in ETt-2 najboljšo sposobnost vezave endotelina-1, so pa razlike med ostalimi endotelinskimi pastmi postale veliko manjše. Glede na to, da konstrukt ETt-10 predstavlja negativno kontrolo (tj. brez pričakovane vezave na endotelin-1), zaključujemo, da le konstrukta ETt-17 in ETt-2 dejansko vežeta endotelin-1. Strukturni ETt-2 in ETt-17 sta zelo podobni (slika 11) - kar nakazuje kakšne so minimalne strukturne zahteve za interakcijo z endotelinom-1, edina razlika je, da ima ETt-17 glede na ETt-2 vsebuje dodaten rigidni linker med drugim in tretjim segmentom ET_A, kar je verjetno razlog za boljšo vezavo endotelina na ETt-17.

4.2 Mutacija ETt-17

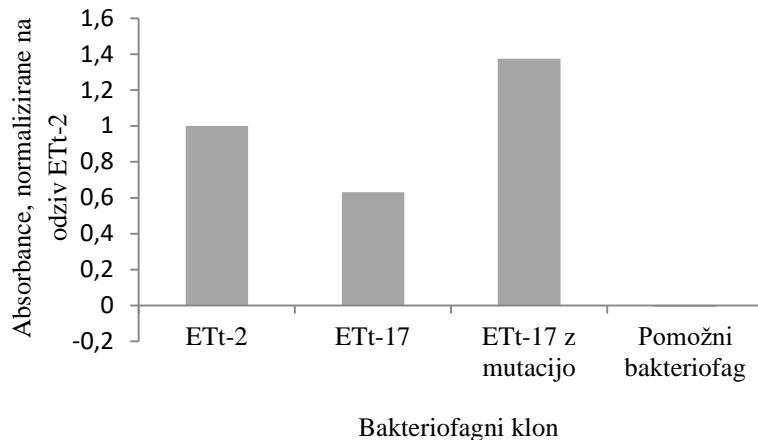
ETt-17, ki se je izkazal za mimetik endotelinskega receptorja z najvišjo afiniteto do endotelina-1, smo želeli še izboljšati. V aminokislinskem zaporedju ETt-17 se nahaja neporno število (pet) cisteinskih ostankov, kar utegne biti razlog za tvorbo dimerov fuzijskih proteinov v bakterijski periplazmi in posledično slabše vgrajevanje v kapsido nitastega bakteriofaga. Da bi preprečili nastanek dimerov, smo z usmerjeno mutagenezo domnevno nesparjeni cisteinski ostanek na mestu 106 zamenjali za serin, ki ima podobne fizikalno-kemijske lastnosti. Mutacijo kodona smo uvedli s pomnoževanjem celotnega fagmida pIT2-ETt-17 v reakciji PCR, pri čemer smo uporabili začetna oligonukleotida, popolnoma komplementarna matrični DNA na 5'- in 3'- koncih. Nasprotno sta se v osrednjem delu oligonukleotidov nahajala spremenjena nukleotida (odgovorna za spremembo kodona za cistein v kodon za serin). Po pomnoževanju smo fagmid, ki je kodiral konstrukt ETt-17 (izoliran iz bakterije in uporabljen kot matrica za PCR) razgradili z endonukleazo, ki prepozna le metilirano DNA, medtem ko je sintezna nemetilirana DNA fagmida pIT2-ETt-17mut ostala intaktna. S to smo transformirali bakterije *E. coli* TG1 in z naknadno okužbo s pomožnim bakteriofagom izzvali nastajanje rekombinantnih fagmidnih virionov s predstavljenim konstruktom ETt-17mut na kapsidi.

4.2.1 Vrednotenje izražanja konstrukta ETt-17mut na fagu

Konstrukt ETt-17mut smo izrazili na nitastem bakteriofagu in nivo izražanja ovrednotili na enak način, kot je opisano zgoraj (4.1.1). Želeli smo preveriti, ali se po uvedbi mutacije izražanje rekombinantnega konstrukta poveča. Odzive smo normalizirali na odziv klona ETt-2. Rezultati testa ELISA so povzeti v preglednica IV priloge 1 in na sliki 21.

Rezultati nakazujejo, da mutacija Cys106Ser pozitivno vpliva na nivo predstavitev ETt-17 na nitastem bakteriofagu, saj je normaliziran odziv klona ETt-17mut v testu ELISA več kot dvakrat višji od odziva klona ETt-17. Po drugi strani je bil ocenjen nivo izražanja

endotelinske pasti klena ETt-17 tokrat nižji kot pri kontrolnem klonu ETt-2, kar je v nasprotju z rezultati, ki smo jih za ETt-2 in ETt-17 dobili v prvem poskusu (slika 17). Za zaneslivejšo oceno obsega izražanja ETt-17 bi morali test ELISA večkrat ponoviti.



Slika 21: Relativno izražanje konstruktov ETt-2, -17 in 17mut na nitastih bakteriofagih.

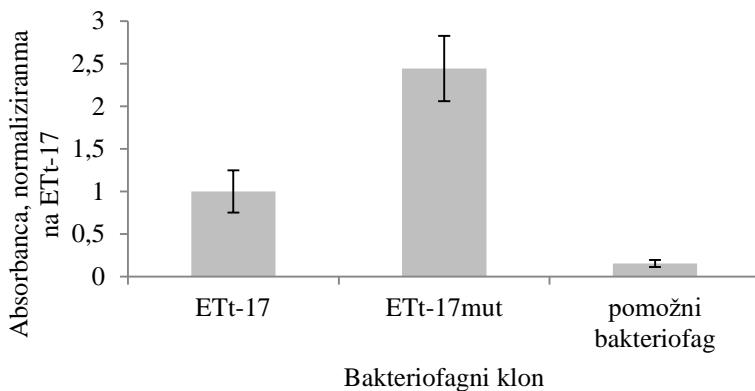
4.2.2 Primerjalno vrednotenje vezave ETt-17 in ETt-17mut na endotelin-1

Kljud nezanesljivi oceni nivojev izražanja ETt-17mut na bakteriofagu smo ovrednotili še vezavo tega konstrukta na endotelin-1 glede na izhodni konstrukt ETt-17. Test smo izvedli na enak način, kot je opisano zgoraj (poglavje 4.1.2). Izvedli smo dva neodvisna testa ELISA; rezultati posameznih eksperimentov so prikazani v preglednici X.

Preglednica X: Vrednosti izmerjenih absorbanc A450 prirejenega testa ELISA za vrednotenje vezave konstruktov ETt-17 in ETt-17mut na endotelin-1 ter iste vrednosti, normalizirane na odziv klena ETt-17, iz posameznih poskusov.

Poskus	Klon	A ₄₅₀ (ET-1)	A ₄₅₀ (ozadje)	Razlika med A ₄₅₀ vzorca in ozadja	Odzivi, normalizirana ni na ETt-17
1	ETt-17	0,381	0,122	0,259	1,248
	ETt-17	0,266	0,11	0,156	0,752
	ETt-17mut	0,603	0,163	0,440	2,120
	ETt-17mut	0,726	0,131	0,595	2,867
	Pomožni bakteriofag	0,139	0,101	0,038	0,183
2	ETt-17	0,509	0,166	0,343	1,000
	ETt-17mut	1,268	0,465	0,803	2,341
	Pomožni bakteriofag	0,146	0,103	0,043	0,125

Če iz posameznih eksperimentov preračunamo povprečja in standardne odklone vrednosti, ki smo jih predhodno normalizirali glede na odzive klena ETt-17 dobimo rezultate, predstavljene v preglednici IV priloge 1 ter na sliki 22.



Slika 22: Povprečen relativen obseg vezave konstruktorjev ETt, predstavljenih na nitastih bakteriofagi, na sintezni endotelin-1. Odzivi so normalizirani na odziv klena ETt-17.

Kljub temu, da je rezultat pokazal večji obseg vezave endotelina pa moramo upoštevati tudi, da je izražanje konstrukta ETt-17mut na kapsidi nitastega bakteriofaga približno dvakrat večje, kot to za ETt-17 (slika 21). Iz tega lahko zaključimo, da mutacija Cys106Ser ne vpliva na afiniteto konstrukta do endotelina-1. Ob normalizaciji relativnih afinitet ETt-17 in ETt-17mut na obseg izražanja konstruktorjev ta za konstrukt ETt-17mut namreč znaša 1,12, torej le malo več, kot ETt-17.

4.3 Izražanje konstruktorjev ETt na kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae* EBY100

Konstrukte ETt-9, ETt-11 in ETt-14, ki jih nismo uspeli predstaviti na kapsidi nitastega bakteriofaga, smo skušali izraziti na celični steni kvasovke *S. cerevisiae*. Sintezne gene za omenjene konstrukte (in ETt-1, ETt-2 ter ETt-17 kot kontrole) smo z verižno reakcijo s polimerazo pomnožili iz plazmidov pUC57, ki so vsebovali ustrezne sintezne gene ETt. Amplikone smo subklonirali v plazmid pYD1 in jih elektroporirali v *S. cerevisiae* EBY100. Kot pozitivno kontrolo predstavitev na kvasovki smo uporabili *S. cerevisiae* EBY100, transformirano z izvornim plazmidom (takim, ki ne vsebuje gena za ETt). Na celični steni se torej usidra nosilni protein Aga2p, ki ga lahko – podobno kot fuzijske proteine z ETt – detektiramo prek peptidnega zaporedja V5 (GKPIPPLLGLDST) na C-koncu (slika 8). Tuj proteina, ki bi utegnil motiti prenos fuzijskega proteina v zunajcelični prostor, ni prisoten, zato smo pričakovali visok nivo izražanja nosilnega proteina Aga2p na površini kvasovk. Kot

negativno kontrolo predstavitev na kvasovki smo uporabili *S. cerevisiae* EBY100, v katere nismo vnesli plazmida pYD1, ter kvasovke, transformirane s pYD1-ETt-17, v katerih izražanja fuzijskega proteina med gojenjem nismo inducirali (t.i. neinducirana kontrola). Za predstavitev na kvasovki smo se odločili, ker je *S. cerevisiae* evkariontski ekspresijski sistem z razvitim posttranslacijskim mehanizmi in sposobnostjo izločanja (rekombinantnih) proteinov v zunajcelični prostor.

Nivo izražanja konstruktov ETt smo posredno vrednotili na dva načina. Sprva smo na celični steni vezan nosilni protein označili s fluorescenčno označenimi protiteles, usmerjenimi proti peptidnemu zaporedju V5 (slika 8) in kvasovke opazovali s fluorescenčnim mikroskopom (priloga 2). Na osnovi štetja smo izračunali delež celic, ki izražajo fuzijske proteine s posameznimi konstrukti ETt (preglednica XI).

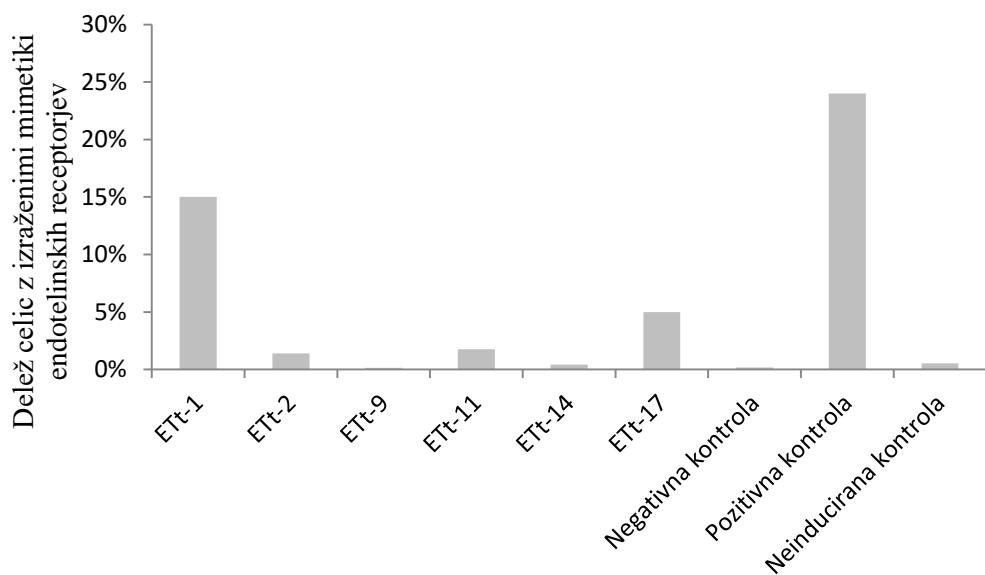
Preglednica XI: Delež kvasovk z izraženimi konstrukti ETt, ocenjen s fluorescenčno mikroskopijo.

	Občutljivost fotopomnoževalke: 60%			Občutljivost fotopomnoževalke: 90%		
	Število celic kvasovk	Število celic, z izraženim fuzijskim proteinom	Delež celic z izraženim fuzijskim proteinom	Število celic kvasovk	Število celic, z izraženim fuzijskim proteinom	Delež celic z izraženim fuzijskim proteinom
Pozitivna kontrola	35	11	31 %	18	7	39 %
Negativna kontrola	200	0	0 %	46	0	0 %
ETt-1	52	26	50 %	27	20	74 %
ETt-2	15	0	0 %	22	0	0 %
ETt-8	12	0	0 %	42	0	0 %
ETt-9	19	0	0 %	18	0	0 %
ETt-11	25	0	0 %	24	0	0 %
ETt-12	31	0	0 %	127	0	0 %
ETt-13	126	0	0 %	50	0	0 %
ETt-17	48	13	27 %	11	5	45 %
ETt-17 neinducirana kontrola	57	0	0 %	47	0	0 %

Poleg tega smo celice s fluorescenčno označenimi protitelesi anti-V5-PE prešteli tudi s pomočjo pretočnega citometra Attune NxT in tako določili delež celic, na katerih se je izražal rekombinantni konstrukt ETt. Rezultati so prikazani v preglednici XII in na sliki 23.

Preglednica XII: Delež kvasovk z izraženimi konstrukti ETt, določen s pretočno citometrijo.

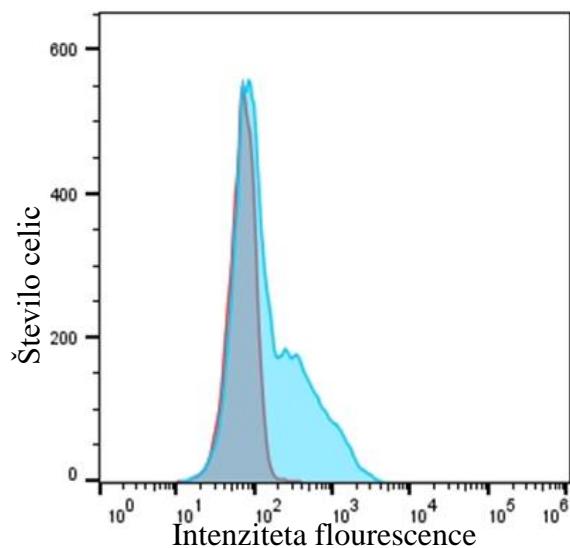
Klon	Delež kvasovk s predstavljenim konstruktom ETt
ETt-1	15,00 %
ETt-2	1,41 %
ETt-9	0,14 %
ETt-11	1,75 %
ETt-14	0,41 %
ETt-17	4,99 %
Negativna kontrola	0,18 %
Pozitivna kontrola	24,00 %
Neinducirana kontrola - vzorca ETt-1	0,53 %



Slika 23: Delež celic, na katerih se je izrazil rekombinantni fuzijski protein Aga2 (sklopljen s konstrukti ETt); določeno s pretočno citometrijo

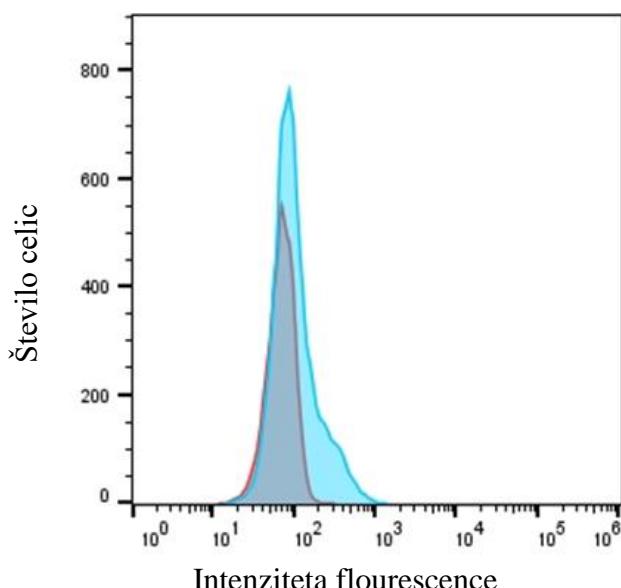
Iz slik v prilogi 2 vidimo, da se na negativno kontrolo – kvasovkah *S. cerevisiae* EBY100 brez vstavljenega plazmida – niso vezala protitelesa anti-V5-PE. Ti rezultati so pričakovani, povedo pa nam, da ni prišlo do neselektivne vezave na površino kvasovk. To so potrdili tudi rezultati pretočne citometrije, kjer smo zaznali rdečo fluorescenco le pri 0,18 % celic, kar je verjetno posledica protiteles, ki se med spiranjem niso odstanile iz vzorca ali pa minimalne neselektivne vezave.

Iz slik pozitivne kontrole (priloga 2) – kvasovk *S. cerevisiae* EBY100 z vstavljenim



plazmidom brez ETt inserta – vidimo, da je prišlo do vezave anti-V5-PE protiteles. Protitelesa so se vezala na nosilec Aga2, ki je bil v drugih vzorcih sklopljen s konstrukti ETt. Do vezave protiteles je glede na rezultate pretočne citometrije (slika 24) prišlo pri približno 24 % celic, kar je skladno s pričakovanji (uspešna predstavitev se tipično odraža v 10 do 50 % flourescentno obarvanih celic (91)).

Slika 24: Analiza nivojev predstavivte na kvasovki s pretočno citometrijo (modra barva prikazuje signal pozitivne kontrole, rdeča pa negativne kontrole).



Iz rezultatov pretočne citometrije kvasovk, ki so na nosilcu Aga2 izražale endotelinsko past ETt-1 (slika 25), vidimo, da je prišlo do relativno nizke stopnje izražanja – fluorescenco smo zaznali pri 15 % celic, kar je najvišji rezultat v primerjavi z ostalimi analiziranimi vzorci (z izjemo pozitivne kontrole).

Slika 25: Analiza obseg predstavivte na kvasovki s pretočno citometrijo (modra barva prikazuje signal celic, transformiranih s pYD1-ETt1, rdeča pa signal negativne kontrole).

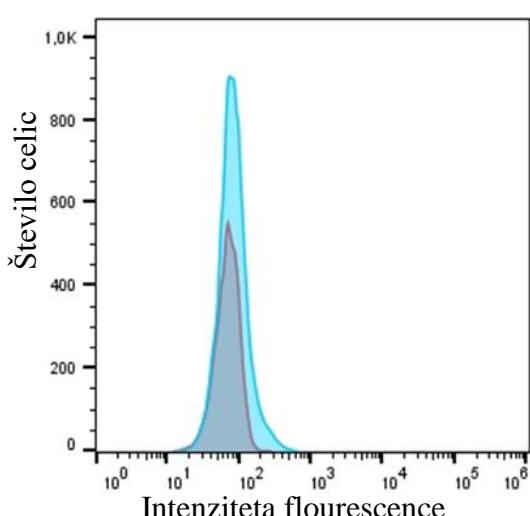
Iz slik, posnetih s fluorescenčnim mikroskopom (priloga 2), vidimo, da intenziteta fluorescence celic, ki so izražale endotelinske pasti ni bila tako visoka kot pri nekaterih celicah pozitivne kontrole. To verjetno kaže na manjše izražanje rekombinantnih proteinov, lahko pa pomeni tudi manjšo dostopnost peptida V5 za vezavo detekcijskih protiteles zaradi fuzijskega partnerja (ETt).

Kvasovke z izraženim ETt-2, so glede na rezultate pretočne citometrije pokazale zelo nizko stopnjo izražanja na kvasovkah – 1,41 %. Tudi tu smo v primerjavi z nekaterimi celicami pozitivne kontrole na slikah fluorescenčne mikroskopije zaznali manjšo intenziteto fluorescence.

Iz rezultatov pretočne citometrije kvasovk, transformiranih s pYD1-ETt-9, smo izražanje rekombinantnega proteina s pomočjo anti-V5-PE zaznali le pri 0,14 % celic, kar je podoben rezultat, kot pri negativni kontroli, zato sklepamo, da do izražanja konstrukta ETt-9 ni prišlo.

Pri kvasovkah, katerim smo vstavili gen za rekombinantni protein z ETt-11, je bila intenziteta fluorescence na slikah fluorescenčne mikroskopije zelo nizka. Tudi rezultati pretočne citometrije so pokazali, da je do izražanja prišlo le na 1,75 % celic, kar pa je v primerjavi z negativno kontrolo znatno več.

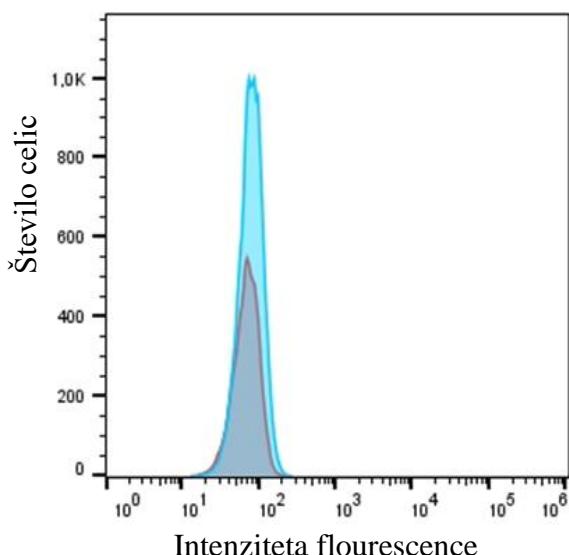
Pri testu s pretočno citometrijo smo opazili, da kvasovke, katerim smo vstavili gen za predstavitev ETt-14, konstrukta skoraj ne predstavljajo. Fluorescenco smo opazili le pri 0,41 % celic, kar je več kot pri negativni kontroli, a povsem primerljivo z neinducirano kontrolo (0,53 %), tako da je tudi tu izražanje praktično zanemarljivo.



Pri celicah, transformiranih s plazmidom pYD1-ETt-17, smo opazili, da je do vezave fluorescentnih protiteles prišlo pri približno 5 % celic, kar je majhen delež, a v primerjavi z drugimi konstrukti relativno veliko. Rezultati pretočne citometrije teh celic so predstavljeni na sliki 26. Večji delež celic je izražal rekombinantne fuzijske proteine le pri pozitivni kontroli ter vzorcu ETt-1.

Slika 26: Analiza obsega predstavitve na kvasovki s pretočno citometrijo (modra barva prikazuje signal celic z vstavljenim genom za konstrukt ETt-17, rdeča pa signal negativne kontrole).

Pri kvasovkah, transformiranih s plazmidom pYD1-ETt-17, ki pa niso bile gojene v gojišču z galaktozo, kar bi induciralo izražanje fuzijskega proteina, se je v analizi s pretočnim



citometrom fluorescenca pokazala pri nekoliko večjem deležu celic, kot pri negativni kontroli (slika 27), tako da predvidevamo, da v zelo majhni meri pride do izražanja tudi v odsotnosti indukcije (t.i. »puščanje« promotorja). Na testu pretočne citometrije smo za neinducirano kontrolo vzeli kvasovke z insertom ETt-1 in tudi tu smo dobili rezultat, nekoliko višji od negativne kontrole, a manjši od pozitivne ter nekaterih vzorcev.

Slika 27: Analiza obsega predstavitev na kvasovki s pretočno citometrijo (modra barva prikazuje signal celic, transformiranih s plazmidom pYD1-ETt-1, ki niso bile inducirane z dodatkom galaktoze gojišču, rdeča pa signal negativne kontrole)

Konstrukt ETt-1 se je na površini kvasovk najboljše izražal, temu pa so sledili konstrukti ETt-17, ETt-11 ter ETt-2. Intenziteta in delež fluorescirajočih celic pri teh klonih nista presegli pozitivne kontrole, kar lahko kaže, da je bilo izražanje rekombinantnih proteinov na kvasovkah slabše v primerjavi s samim nosilcem Aga2, ali pa je vezava protiteles na rekombinantne proteine slabša (npr. zaradi steričnih ovir ob V5). Na splošno lahko zaključimo, da so rezultati pokazali, da z vidika obsega izražanja kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 niso najboljši organizem za izražanje mimetikov endotelinskih receptorjev, zato funkcionalnih testov (vezave endotelina-1) z rekombinantnimi kvasovkami, ki bi izražale konstrukte ETt nismo izvajali.

4.4 Potencial endotelinskih pasti za uporabo v farmaciji

Glede na število bolezni, pri katerih so povisane ravni endotelina razlog ali pa simptom bolezenskega stanja, bi zdravilo, ki veže prosti endotelin v krvožilnem sistemu, imelo številne možne aplikacije ter s tem tržni potencial. S to magistrsko nalogo smo pokazali, da imajo mimetiki endotelinskih receptorjev potencial za vezavo endotelina-1 v *in vitro* pogojih, težko pa predvidimo, kako bi se odrezale *in vivo* kot potencialno biološko zdravilo. V *in vivo* pogojih bi bil volumen po katerem bi se potencialna učinkovina porazdelila mnogo večji,

koncentracije endotelina so v krvožilnem sistemu relativno nizke. Endotelinske pasti ne bi bile spojene z nosilci na celicah, kar bi lahko vplivalo na njihovo stabilnost. Potrebno bi bilo izvesti predklinične in klinične študije ter ugotoviti učinkovitost in varnost mimetikov endotelinskih receptorjev kot zdravil. Mimetički endotelinskih receptorjev so sestavljeni iz aminokislinskih zaporedij, prisotnih na človeškem receptorju za endotelin, tako da v kolikor bi zdravilo sprožilo imunski odziv lahko ta izzove imunizacijo tudi proti antigenom na endogenih receptorjih za endotelin.

Glede na naše raziskave lahko predvidevamo, da bi bilo takšne konstrukte možno proizvajati s pomočjo gensko spremenjene *E. coli* (ki je proizvajala protein, ki se je kasneje vgradil v nitaste bakteriofage) in gensko spremenjene *S. cerevisiae*. Oba ekspresijska sistema, sta dobra zaradi njune hitre rasti ter možnosti za gojenje na enostavnih in poceni gojiščih. Na učinkovitost ter imunogenost takšnih endotelinskih pasti bi lahko vplivali različni način zvijanja proteinov v ekspresijskih sistemih ter razlike v postranslacijski obdelavi - *E. coli* nima sistemov za posttranslacijske modifikacije, *S. cerevisiae* pa povzroča (hiper)glikolizacijo produkta. Hiperglikolizacijo je sicer možno odpraviti tudi s humanizacijo glikozilacijske poti, tako da vstavimo gene za encime, ki postranslacijske spremembe opravlja pri ljudeh ter preprečiti izražanje tistih, ki so prisotni v kvasovkah. Če bi to predstavljal težavo, bi bilo smiselno razmisli ti o proizvodnji v celičnih linijah sesalcev – na primer v celični liniji HEK, ki izvira iz ledvice človeškega zarodka (angl. human embryonic kidney) ali CHO iz jajčnika kitajskega hrčka (angl. chinese hamster ovary), ki sta dobro raziskani. Sesalske celične linije zahtevajo veliko kompleksnejša in dražja gojišča ter rastejo veliko počasneje in imajo navadno nižjo stopnjo izražanja proteina. Za cenejšo proizvodnjo bi bila boljša tudi možnost izločanja rekombinantnih proteinov v gojišče, ki pa je mogoča pri proizvodnji s *S. cerevisiae* ter sesalskimi celičnimi kulturami, medtem ko je izločanje v zunajcelični prostor ali periplazmo pri *E. coli* skrajno neučinkovito (97).

5 Sklep

V magistrski nalogi smo uspešno na nitastih bakteriofagih predstavili potencialne mimetike receptorja za endotelin kot del fuzijskih proteinov s plaščnim proteinom p3. Izražanje je bilo uspešno pri konstruktih ETt-1, ETt-2, ETt-15, ETt-16 in ETt-17, v manjši meri pa je prišlo do izražanja negativne kontrole ETt-10. Dokazali smo tudi, da s takšnimi mimetiki endotelinskih receptorjev lahko vežemo endotelin-1, kar smo preverili s testom ELISA na paramagnetnih kroglicah. Med testiranimi mimetiki je imel največjo afiniteto do endotelina-1 konstrukt ETt-17. Pri testiranju vezave endotelina smo imeli kar veliko razpršenost meritev, tako da bi morali za večjo zanesljivost rezultatov eksperimente ponoviti.

Konstruktu ETt-17, ki se je izkazal za mimetik endotelinskega receptorja z najvišjo afiniteto do endotelina-1, smo poskusili izboljšali izražanje z uvedbo mutacije. Opazili smo, da ima ETt-17 v aminokislinskem zaporedju neporno število cisteinskih aminokislinskih ostankov. Da bi preprečili nastanek dimerov, smo z usmerjeno mutagenezo domnevno nesparjeni cisteinski ostanek na mestu 106 zamenjali s serinom. Ko smo protein predstavili na nitastem bakteriofagu, smo s pomočjo testa ELISA opazili izboljšanje izražanja, medtem ko smo s pomočjo testa ELISA na paramagnetnih kroglicah ugotovili, da je mutanta ohranila afiniteto do endotelina-1.

Gene za mimetike endotelinskega receptorja smo vstavili tudi v vektor pYD1 in jih kot del fuzijskega proteina z Aga2 izrazili na površini kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* EBY100. Izražanje smo vrednotili s pomočjo fluorescentno označenih protiteles in fluorescenčne mikroskopije ter pretočne citometrije. Ugotovili smo, da pri negativnih kontrolnih vzorcih ETt-9 ter ETt-14 ni prišlo do izražanja, pri vseh ostalih konstruktih pa je bilo to slabše kot pri pozitivni kontroli. Konstrukt ETt-1 se je najboljše izražal, temu pa so sledili konstrukt ETt-17, ETt-11 ter ETt-2.

V nadaljevanju bi lahko testirali še druge ekspresijske sisteme, vključno s sesalskimi celicami.

6 Viri

1. Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nature reviews Cancer* 2003; 3 (2): 110-6.
2. Hickey KA, Rubanyi G, Paul RJ, Highsmith RF. Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. *The American journal of physiology* 1985; 248 (5): C550-6.
3. Arinami T, Ishikawa M, Inoue A, Yanagisawa M, Masaki T, Yoshida MC, et al. Chromosomal assignments of the human endothelin family genes: the endothelin-1 gene (EDN1) to 6p23-p24, the endothelin-2 gene (EDN2) to 1p34, and the endothelin-3 gene (EDN3) to 20q13.2-q13.3. *American journal of human genetics* 1991; 48(5): 990-6.
4. Inoue A, Yanagisawa M, Takuwa Y, Mitsui Y, Kobayashi M, Masaki T. The human preproendothelin-1 gene. Complete nucleotide sequence and regulation of expression. *The Journal of biological chemistry* 1989; 264(25): 14954-9.
5. Levin ER. Endothelins. *The New England journal of medicine* 1995; 333(6): 356-63.
6. Blais V, Fugere M, Denault JB, Klarskov K, Day R, Leduc R. Processing of proendothelin-1 by members of the subtilisin-like pro-protein convertase family. *FEBS letters* 2002; 524(1-3): 43-8.
7. Masaki T. The discovery of endothelins. *Cardiovascular research*. 1998;39(3):530-3.
8. Shimada K, Takahashi M, Tanzawa K. Cloning and functional expression of endothelin-converting enzyme from rat endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 1994; 269(28): 18275-8.
9. Emoto N, Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive metalloprotease with acidic pH optimum. *The Journal of biological chemistry* 1995; 270(25): 15262-8.
10. Xu D, Emoto N, Giard A, Slaughter C, Kaw S, deWit D, et al. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1. *Cell* 1994; 78(3): 473-85.
11. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, et al. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; 86(8): 2863-7.
12. Hasegawa H, Hiki K, Sawamura T, Aoyama T, Okamoto Y, Miwa S, et al. Purification of a novel endothelin-converting enzyme specific for big endothelin-3. *FEBS letters* 1998; 428(3): 304-8.
13. Schweizer A, Valdenaire O, Nelbock P, Deuschle U, Dumas Milne Edwards JB, Stumpf JG, et al. Human endothelin-converting enzyme (ECE-1): three isoforms with distinct subcellular localizations. *The Biochemical journal* 1997; 328 (3): 871-7.
14. Valdenaire O, Lepailleur-Enouf D, Egidy G, Thouard A, Barret A, Vranckx R, et al. A fourth isoform of endothelin-converting enzyme (ECE-1) is generated from an additional promoter molecular cloning and characterization. *European journal of biochemistry* 1999; 264(2): 341-9.
15. D'Orleans-Juste P, Plante M, Honore JC, Carrier E, Labonte J. Synthesis and degradation of endothelin-1. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 2003; 81(6): 503-10.
16. Ikeda S, Emoto N, Alimsardjono H, Yokoyama M, Matsuo M. Molecular isolation and characterization of novel four subisoforms of ECE-2. *Biochemical and biophysical research communications* 2002; 293(1): 421-6.

17. Russell FD, Skepper JN, Davenport AP. Human endothelial cell storage granules: a novel intracellular site for isoforms of the endothelin-converting enzyme. *Circulation research* 1998; 83(3): 314-21.
18. Nakano A, Kishi F, Minami K, Wakabayashi H, Nakaya Y, Kido H. Selective conversion of big endothelins to tracheal smooth muscle-constricting 31-amino acid-length endothelins by chymase from human mast cells. *Journal of immunology* 1997; 159(4): 1987-92.
19. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, et al. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348(6303): 732-5.
20. Jain A. Endothelin-1-induced endoplasmic reticulum stress in disease. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2013; 346(2): 163-72.
21. Jain A, Olovsson M, Burton GJ, Yung HW. Endothelin-1 induces endoplasmic reticulum stress by activating the PLC-IP(3) pathway: implications for placental pathophysiology in preeclampsia. *The American journal of pathology* 2012; 180(6): 2309-20.
22. Seo B, Oemar BS, Siebenmann R, von Segesser L, Luscher TF. Both ETA and ETB receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* 1994; 89(3): 1203-8.
23. de Nucci G, Thomas R, D'Orleans-Juste P, Antunes E, Walder C, Warner TD, et al. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85(24): 9797-800.
24. Moreland S, McMullen DM, Delaney CL, Lee VG, Hunt JT. Venous smooth muscle contains vasoconstrictor ETB-like receptors. *Biochemical and biophysical research communications* 1992; 184(1): 100-6.
25. Haynes WG, Webb DJ. Endothelin as a regulator of cardiovascular function in health and disease. *Journal of hypertension* 1998; 16(8): 1081-98.
26. Miyauchi T, Suzuki N, Kurihara T, Yamaguchi I, Sugishita Y, Matsumoto H, et al. Endothelin-1 and endothelin-3 play different roles in acute and chronic alterations of blood pressure in patients with chronic hemodialysis. *Biochemical and biophysical research communications* 1991; 178(1): 276-81.
27. Rolinski B, Sadri I, Bogner J, Goebel FD. Determination of endothelin-1 immunoreactivity in plasma, cerebrospinal fluid and urine. *Research in experimental medicine Zeitschrift fur die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie* 1994; 194(1): 9-24.
28. Suzuki N, Matsumoto H, Kitada C, Masaki T, Fujino M. A sensitive sandwich-enzyme immunoassay for human endothelin. *Journal of immunological methods* 1989; 118(2): 245-50.
29. Kitamura K, Yukawa T, Morita S, Ichiki Y, Eto T, Tanaka K. Distribution and molecular form of immunoreactive big endothelin-1 in porcine tissue. *Biochemical and biophysical research communications* 1990; 170(2): 497-503.
30. Yoshimoto S, Ishizaki Y, Sasaki T, Murota S. Effect of carbon dioxide and oxygen on endothelin production by cultured porcine cerebral endothelial cells. *Stroke* 1991; 22(3): 378-83.
31. Jackman HL, Morris PW, Deddish PA, Skidgel RA, Erdos EG. Inactivation of endothelin I by deamidase (lysosomal protective protein). *The Journal of biological chemistry* 1992; 267(5): 2872-5.

32. Vijayaraghavan J, Scicli AG, Carretero OA, Slaughter C, Moomaw C, Hersh LB. The hydrolysis of endothelins by neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase). *The Journal of biological chemistry* 1990; 265(24): 14150-5.
33. Abassi ZA, Tate JE, Golomb E, Keiser HR. Role of neutral endopeptidase in the metabolism of endothelin. *Hypertension* 1992; 20(1): 89-95.
34. Chun M, Lin HY, Henis YI, Lodish HF. Endothelin-induced endocytosis of cell surface ETA receptors. Endothelin remains intact and bound to the ETA receptor. *The Journal of biological chemistry* 1995; 270(18): 10855-60.
35. Haynes WG, Strachan FE, Webb DJ. Endothelin ETA and ETB receptors cause vasoconstriction of human resistance and capacitance vessels in vivo. *Circulation* 1995; 92(3): 357-63.
36. Vierhapper H, Wagner O, Nowotny P, Waldhausl W. Effect of endothelin-1 in man. *Circulation* 1990; 81(4): 1415-8.
37. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, 3rd, Panza JA. Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. *Hypertension* 2000; 35(6): 1237-41.
38. Mortensen LH, Fink GD. Hemodynamic effect of human and rat endothelin administration into conscious rats. *The American journal of physiology* 1990; 258(2): H362-8.
39. Jougasaki M, Schirger JA, Simari RD, Burnett JC, Jr. Autocrine role for the endothelin-B receptor in the secretion of adrenomedullin. *Hypertension* 1998; 32(5): 917-22.
40. Haynes WG, Ferro CJ, O'Kane KP, Somerville D, Lomax CC, Webb DJ. Systemic endothelin receptor blockade decreases peripheral vascular resistance and blood pressure in humans. *Circulation* 1996; 93(10): 1860-70.
41. Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Brandt RR, Wright S, et al. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* 1994; 89(4): 1580-6.
42. Wieczorek I, Haynes WG, Webb DJ, Ludlam CA, Fox KA. Raised plasma endothelin in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction: relation to cardiovascular outcome. *British heart journal* 1994; 72(5): 436-41.
43. Remuzzi G, Benigni A. Endothelins in the control of cardiovascular and renal function. *Lancet* 1993; 342(8871): 589-93.
44. Watanabe T, Suzuki N, Shimamoto N, Fujino M, Imada A. Contribution of endogenous endothelin to the extension of myocardial infarct size in rats. *Circulation research* 1991; 69(2): 370-7.
45. Tahara A, Kohno M, Yanagi S, Itagane H, Toda I, Akioka K, et al. Circulating immunoreactive endothelin in patients undergoing percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Metabolism: clinical and experimental* 1991; 40(12): 1235-7.
46. Asano T, Ikegaki I, Suzuki Y, Satoh S, Shibuya M. Endothelin and the production of cerebral vasospasm in dogs. *Biochemical and biophysical research communications* 1989; 159(3): 1345-51.
47. Woods RP, Iacoboni M, Mazziotta JC. Brief report: bilateral spreading cerebral hypoperfusion during spontaneous migraine headache. *The New England journal of medicine* 1994; 331(25): 1689-92.
48. O'Keeffe ST, Tsapatsaris NP, Beetham WP, Jr. Increased prevalence of migraine and chest pain in patients with primary Raynaud disease. *Annals of internal medicine* 1992; 116(12 Pt 1): 985-9.
49. Ray SG, McMurray JJ, Morton JJ, Dargie HJ. Circulating endothelin in acute ischaemic syndromes. *British heart journal* 1992; 67(5): 383-6.

50. Giard A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, et al. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *The New England journal of medicine* 1993; 328(24): 1732-9.
51. Willette RN, Ohlstein EH, Mitchell MP, Sauermelch CF, Beck GR, Luttmann MA, et al. Nonpeptide endothelin receptor antagonists. VIII: attenuation of acute hypoxia-induced pulmonary hypertension in the dog. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1997; 280(2): 695-701.
52. Yokokawa K, Tahara H, Kohno M, Murakawa K, Yasunari K, Nakagawa K, et al. Hypertension associated with endothelin-secreting malignant hemangioendothelioma. *Annals of internal medicine* 1991; 114(3): 213-5.
53. Bagnato A, Catt KJ. Endothelins as autocrine regulators of tumor cell growth. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 1998; 9(9): 378-83.
54. Battistini B, Chailler P, D'Orleans-Juste P, Briere N, Sirois P. Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides* 1993; 14(2): 385-99.
55. Vacca F, Bagnato A, Catt KJ, Tecce R. Transactivation of the epidermal growth factor receptor in endothelin-1-induced mitogenic signaling in human ovarian carcinoma cells. *Cancer research* 2000; 60(18): 5310-7.
56. Eberl LP, Egidy G, Pinet F, Juillerat-Jeanneret L. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in colon carcinoma cells via the protein kinase C-pathway. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2000; 36(5 Suppl 1): S354-6.
57. Eberl LP, Valdenaire O, Saintgiorgio V, Jeannin JF, Juillerat-Jeanneret L. Endothelin receptor blockade potentiates FasL-induced apoptosis in rat colon carcinoma cells. *International journal of cancer* 2000; 86(2): 182-7.
58. Boyce BF, Yoneda T, Guise TA. Factors regulating the growth of metastatic cancer in bone. *Endocrine-related cancer* 1999; 6(3): 333-47.
59. Chiao JW, Moonga BS, Yang YM, Kancherla R, Mittelman A, Wu-Wong JR, et al. Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoclastic bone resorption. *British journal of cancer* 2000; 83(3): 360-5.
60. Guise TA. Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases. *Cancer* 2000; 88(12 Suppl): 2892-8.
61. Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nature reviews Cancer* 2002; 2(8): 584-93.
62. Nelson JB, Nguyen SH, Wu-Wong JR, Opgenorth TJ, Dixon DB, Chung LW, et al. New bone formation in an osteoblastic tumor model is increased by endothelin-1 overexpression and decreased by endothelin A receptor blockade. *Urology* 1999; 53(5): 1063-9.
63. Bek EL, McMillen MA. Endothelins are angiogenic. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2000; 36(5 Suppl 1): S135-9.
64. Salani D, Di Castro V, Nicotra MR, Rosano L, Tecce R, Venuti A, et al. Role of endothelin-1 in neovascularization of ovarian carcinoma. *The American journal of pathology* 2000; 157(5): 1537-47.
65. Bagnato A, Salani D, Di Castro V, Wu-Wong JR, Tecce R, Nicotra MR, et al. Expression of endothelin 1 and endothelin A receptor in ovarian carcinoma: evidence for an autocrine role in tumor growth. *Cancer research* 1999; 59(3): 720-7.
66. Salani D, Taraboletti G, Rosano L, Di Castro V, Borsotti P, Giavazzi R, et al. Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *The American journal of pathology* 2000; 157(5): 1703-11.
67. Brooks DP, dePalma PD, Gellai M, Nambi P, Ohlstein EH, Elliott JD, et al. Nonpeptide endothelin receptor antagonists. III. Effect of SB 209670 and BQ123 on acute

- renal failure in anesthetized dogs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1994; 271(2): 769-75.
68. Simonson MS. Endothelins: multifunctional renal peptides. *Physiological reviews* 1993; 73(2): 375-411.
69. Lopez-Farre A, Gomez-Garre D, Bernabeu F, Lopez-Novoa JM. A role for endothelin in the maintenance of post-ischaemic renal failure in the rat. *The Journal of physiology* 1991; 444: 513-22.
70. Takahashi K, Totsune K, Mouri T. Endothelin in chronic renal failure. *Nephron* 1994; 66(4): 373-9.
71. Nobuyuki M, Masahiko K, Akira N, Hiromi A, Kohji S, Kiyofumi I, Keiko W, Watanabe M, Masaru N, Mitsuo Y, Fumihiko, I. Protective effect of a selective endothelin receptor antagonist, BQ-123, in ischemic acute renal failure in rats. *European journal of pharmacology* 1992; 221(1), 77-83.
72. Agapitov AV, Haynes WG. Role of endothelin in cardiovascular disease. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS* 2002; 3(1): 1-15.
73. Pache M, Kaiser HJ, Akhalbedashvili N, Lienert C, Dubler B, Kappos L, et al. Extraocular blood flow and endothelin-1 plasma levels in patients with multiple sclerosis. *European neurology* 2003; 49(3): 164-8.
74. Speciale L, Sarasella M, Ruzzante S, Caputo D, Mancuso R, Calvo MG, et al. Endothelin and nitric oxide levels in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Journal of neurovirology* 2000; 6 Suppl 2: S62-6.
75. Palmer JC, Baig S, Kehoe PG, Love S. Endothelin-converting enzyme-2 is increased in Alzheimer's disease and up-regulated by Abeta. *The American journal of pathology* 2009; 175(1): 262-70.
76. Roubert P, Gillard V, Plas P, Guillon JM, Chabrier PE, Braquet P. Angiotensin II and phorbol-esters potently down-regulate endothelin (ET-1) binding sites in vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications* 1989; 164(2): 809-15.
77. Imura H, Nakao K. Monoclonal antibody against endothelin, hybridoma capable of producing the same and radioimmunoassay for endothelin by using the same. Google Patents; 1994.
78. Morton LC, Macdonald D. Anti-big-endothelin-1 (big-et-1) antibodies and uses thereof. Google Patents; 2013.
79. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotny J, Margolies MN, et al. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988; 85(16): 5879-83.
80. Reddy MP, Kinney CA, Chaikin MA, Payne A, Fishman-Lobell J, Tsui P, et al. Elimination of Fc receptor-dependent effector functions of a modified IgG4 monoclonal antibody to human CD4. *Journal of immunology* 2000; 164(4): 1925-33.
81. <https://swissmodel.expasy.org/repository/uniprot/P25101?csm=207272D4A231404F> (citirano 1.6.2018)
82. Economides AN, Carpenter LR, Rudge JS, Wong V, Koehler-Stec EM, Hartnett C, et al. Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nature medicine* 2003; 9(1): 47-52.
83. Janes RW, Wallace BA. Modelling the structures of the isoforms of human endothelins based on the crystal structure of human endothelin-I. *Biochemical Society transactions* 1994; 22(4): 1037-43.
84. Smith GP, Petrenko VA. Phage Display. *Chemical reviews* 1997; 97(2): 391-410.
85. Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature biotechnology* 1997; 15(6): 553-7.

86. Lu CF, Montijn RC, Brown JL, Klis F, Kurjan J, Bussey H, et al. Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *The Journal of cell biology* 1995; 128(3): 333-40.
87. Cappellaro C, Baldermann C, Rachel R, Tanner W. Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. *The EMBO journal* 1994; 13(20): 4737-44.
88. Cappellaro C, Hauser K, Mrsa V, Watzele M, Watzele G, Gruber C, et al. *Saccharomyces cerevisiae* a- and alpha-agglutinin: characterization of their molecular interaction. *The EMBO journal* 1991; 10(13): 4081-8.
89. Roy A, Lu CF, Marykwas DL, Lipke PN, Kurjan J. The AGA1 product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Molecular and cellular biology* 1991; 11(8): 4196-206.
90. AlKhalifah, M. A. Recombinant antibodies against *Clostridium difficile* toxin . Doctoral dissertation, University of Glasgow. 2007.
91. Invitrogen: pYD1 Yeast Display Vector Kit. Invitrogen, 2002; 1-22
92. Giniger E, Varnum SM, Ptashne M. Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 1985; 40(4): 767-74.
93. West RW, Jr., Yocom RR, Ptashne M. *Saccharomyces cerevisiae* GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG. *Molecular and cellular biology* 1984; 4(11): 2467-78.
94. Lindner P, Bauer K, Krebber A, Nieba L, Kremmer E, Krebber C, et al. Specific detection of his-tagged proteins with recombinant anti-His tag scFv-phosphatase or scFv-phage fusions. *BioTechniques* 1997; 22(1): 140-9.
95. <https://www.neb.com/> (citirano 1.6.2018)
96. Denhardt, D.T., Dressler, D. and Ray, D.S. *The Single-Stranded DNA Phages*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1978; 605–625
97. Schmidt, F. R. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied microbiology and biotechnology* 2004; 65.4: 363-372.

Priloga 1: Preglednice povprečnih vrednosti in standardnih odklonov ocen nivojev izražanja ter primerjalnega vrednotenja vezave endotelinskih pasti na ET-1

Preglednica I: Povprečja in standardni odkloni odzivov (A_{450}) za posamezne klone, izračunani na osnovi štirih neodvisnih testov ELISA, s katerimi smo vrednotili nivoje izražanja konstruktorov ETt na kapsidi. Odzivi so normalizirani na odziv klona ETt2.

Vzorec	Povprečje	Standardni odklon
ETt-1	1,867	1,090
ETt-2	1,000	0,000
ETt-9	0,017	0,018
ETt-10	0,752	0,644
ETt-11	0,012	0,028
ETt-14	-0,021	0,021
ETt-15	2,482	1,264
ETt-16	0,292	0,087
ETt-17	2,104	1,033
Pomožni bakteriofag	-0,014	0,012

Preglednica II: Povprečja in standardni odkloni odzivov (A_{450}) za posamezne klone, izračunani na osnovi štirih testov ELISA na paramagnetnih kroglicah, s katerimi smo vrednotili vezavo konstruktorov ETt na sintezni endotelin-1. Odzivi so normalizirani na odziv klona ETt2.

Vzorec	Povprečje	Standardni odklon
ETt-1	0,474	0,048
ETt-2	1,000	0,000
ETt-10	0,131	0,015
ETt-15	0,542	0,251
ETt-16	0,173	0,048
ETt-17	1,734	0,645
Pomožni bakteriofag	-0,010	0,096

Preglednica III: Relativne afinitete vezave konstruktov ETt na endotelin-1, normalizirane na nivo izražanja posameznega ETt.

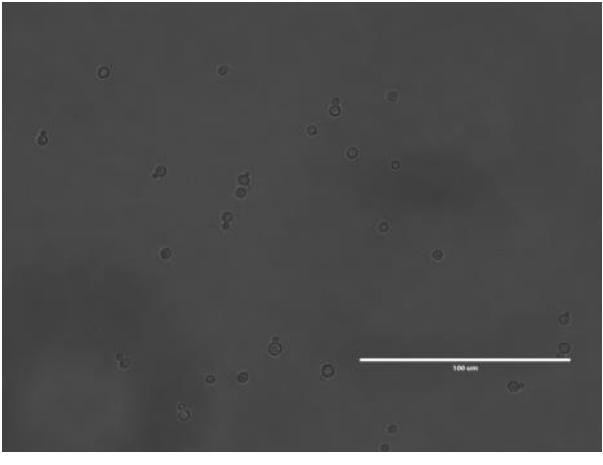
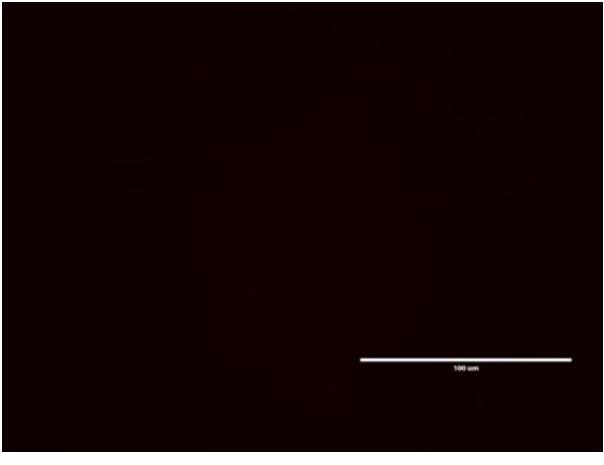
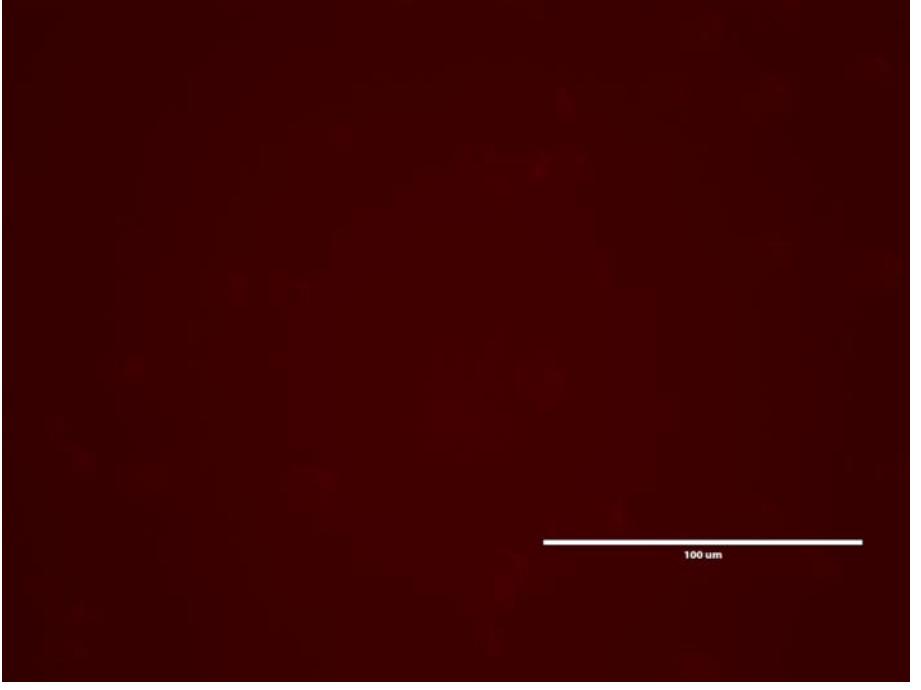
Konstrukt	Relativna afiniteta	Standardni odklon
ETt-1	0,618	0,062
ETt-2	1,000	0,000
ETt-10	0,465	0,054
ETt-15	0,506	0,234
ETt-16	0,446	0,124
ETt-17	1,860	0,692

Preglednica IV: Vrednosti izmerjenih absorbanc A450 prirejenega testa ELISA za primerjalno vrednotenje nivojev izražanja konstruktov ETt-17 in ETt-17mut na nitastih bakteriofagih ter iste vrednosti, normalizirane na odziv klona ETt-2.

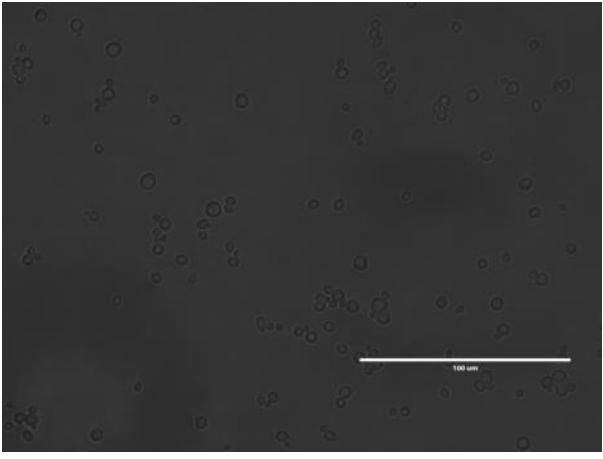
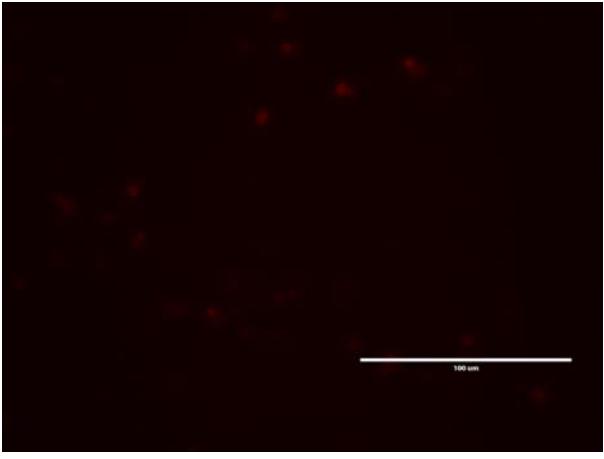
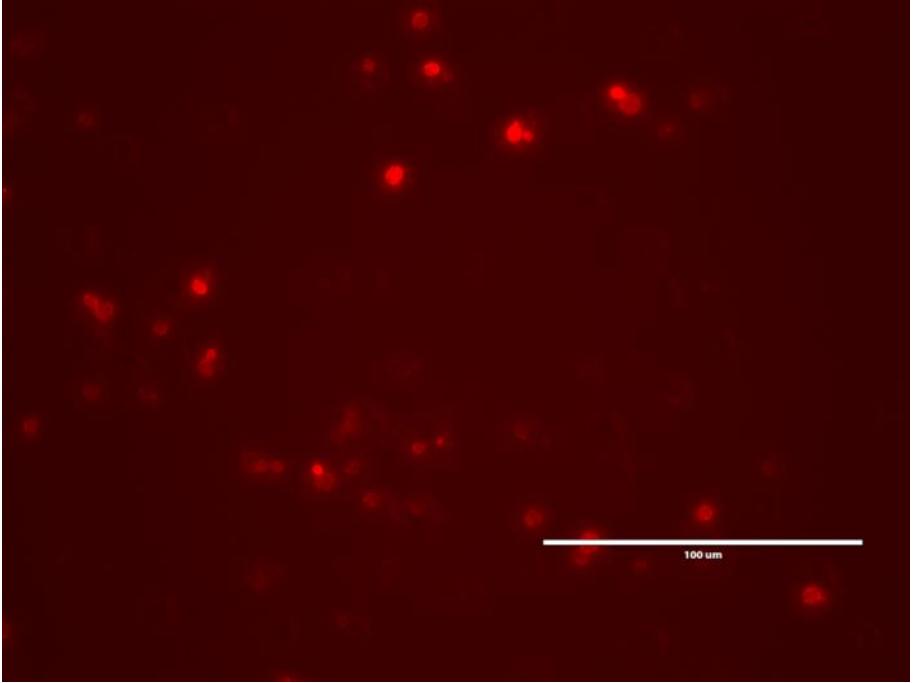
	A₄₅₀ (anti-cMyc)	A₄₅₀ (ozadje)	Razlika med A₄₅₀ vzorca in ozadja	Odziv, normaliziran na ETt-2
ETt-2	1,331	0,312	1,019	1
ETt-17	1,034	0,390	0,644	0,632
ETt-17mut	1,710	0,309	1,401	1,375
Pomožni bakteriofag	0,109	0,116	-0,007	-0,007

Priloga 2: Slike flourescenčne mikroskopije kvasovk

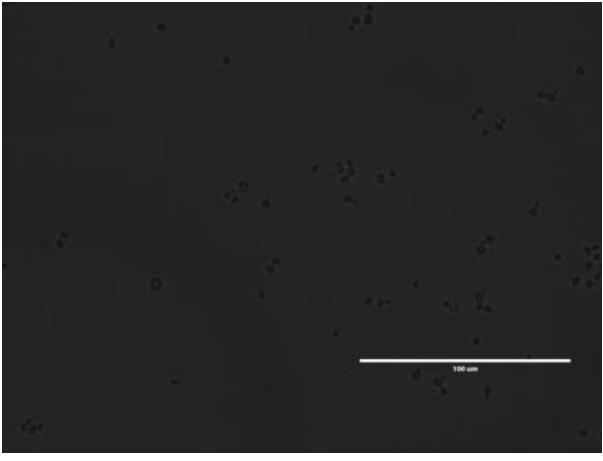
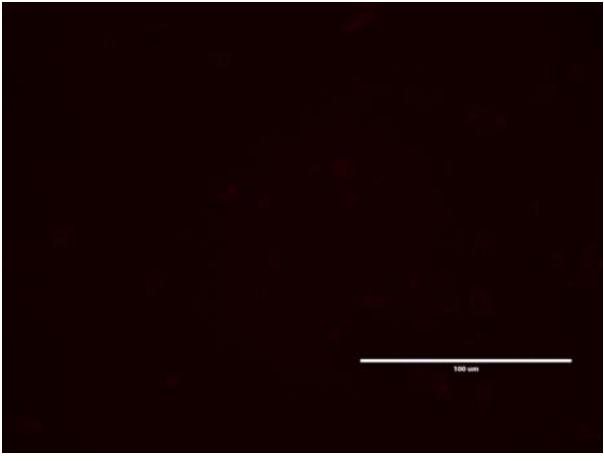
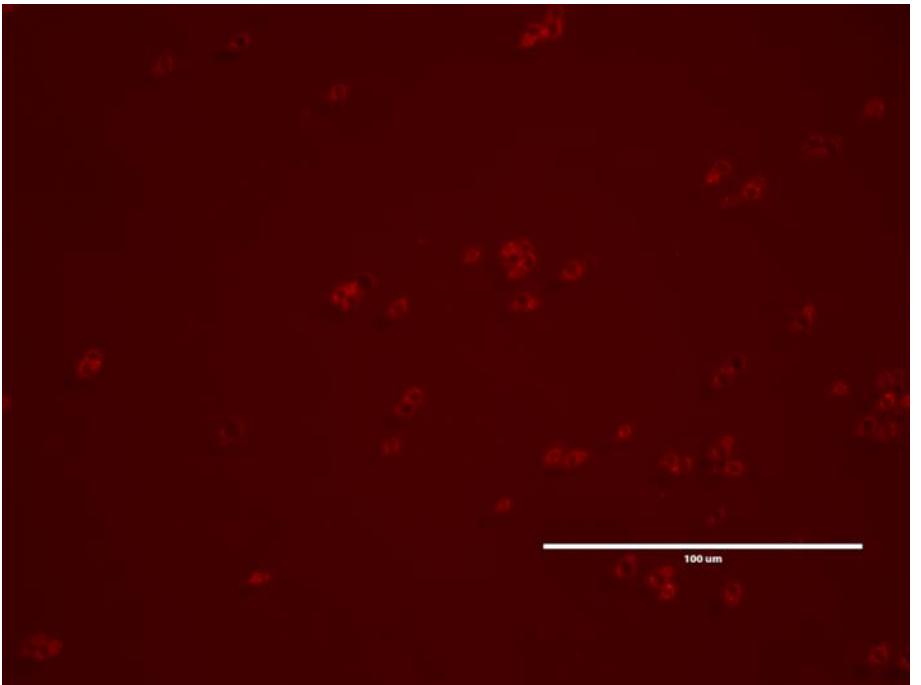
1. Negativna kontrola

Presevna svetloba	Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 60 %
	
Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 90 %	
	

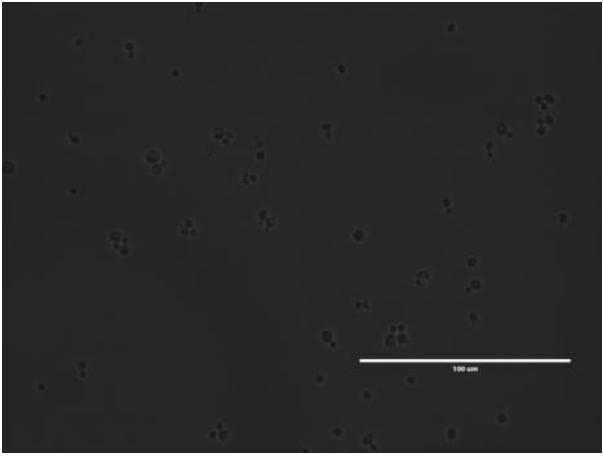
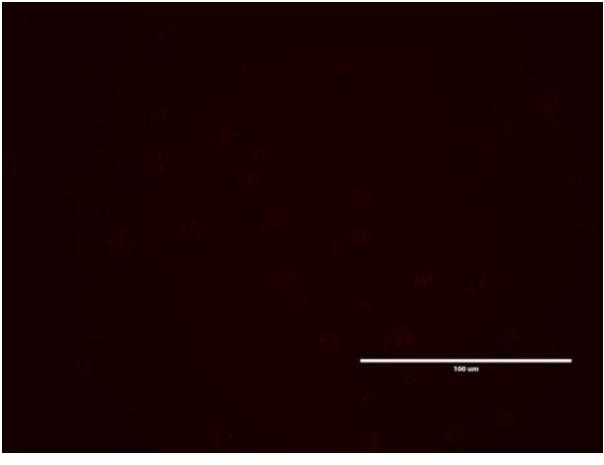
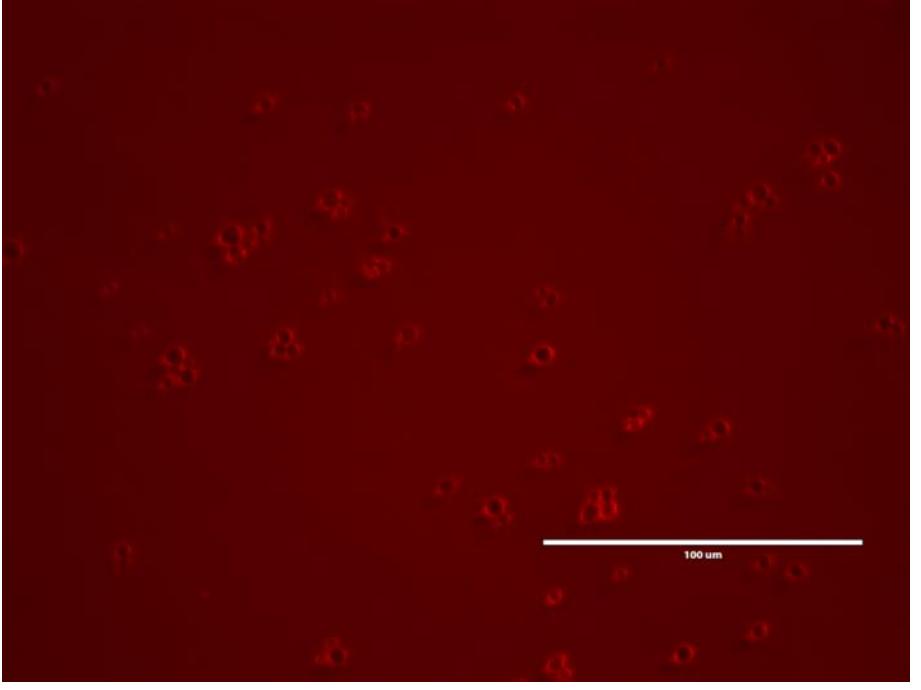
2. Pozitivna kontrola

Presevna svetloba	Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 60 %
	
Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 90 %	
	

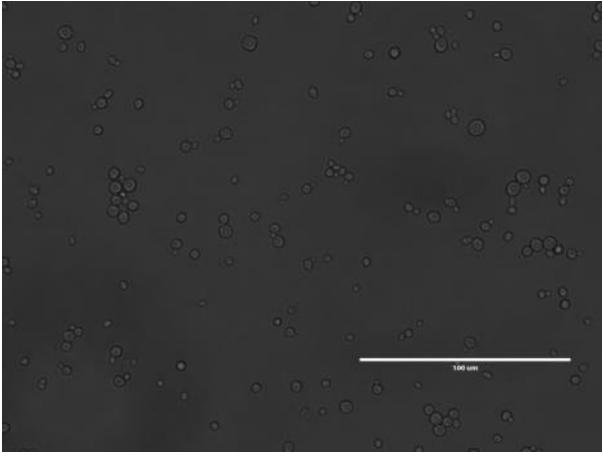
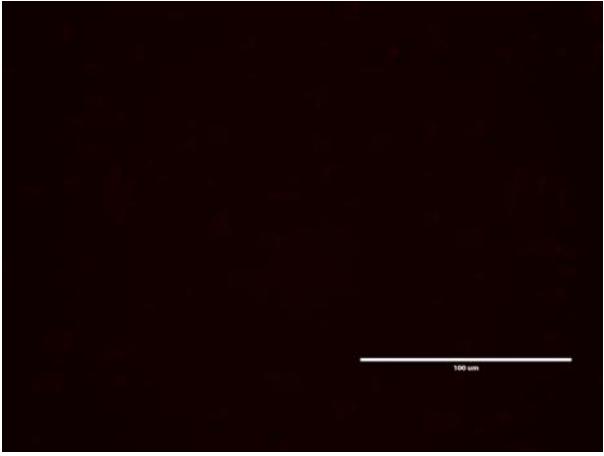
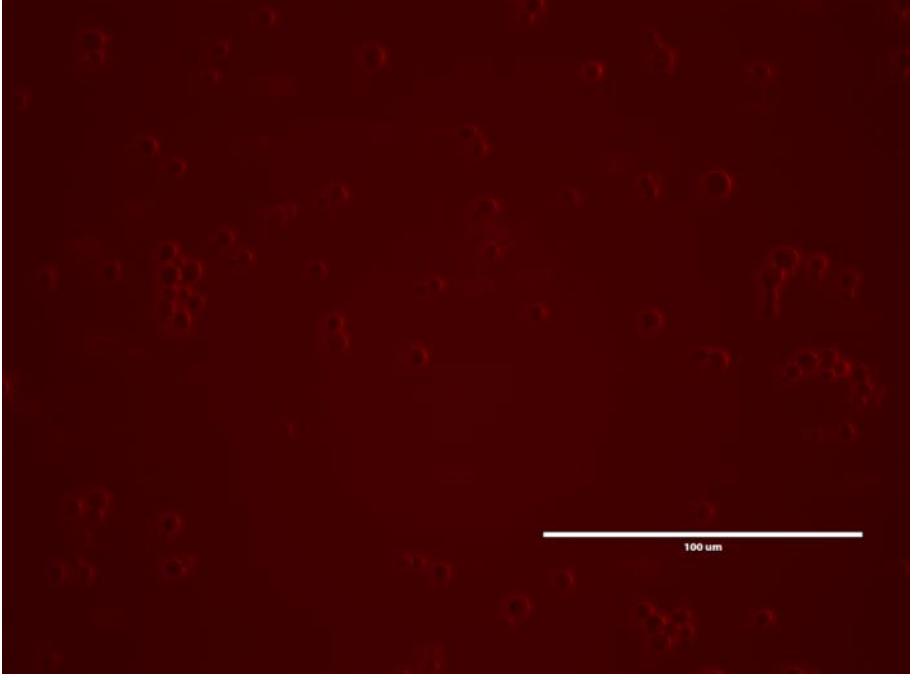
3. Kvasovke z ETt-1 insertom

Presevna svetloba	Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 60 %
	
Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 90 %	
	

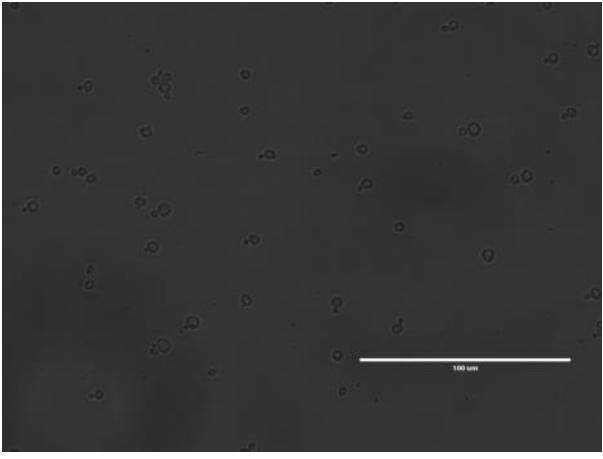
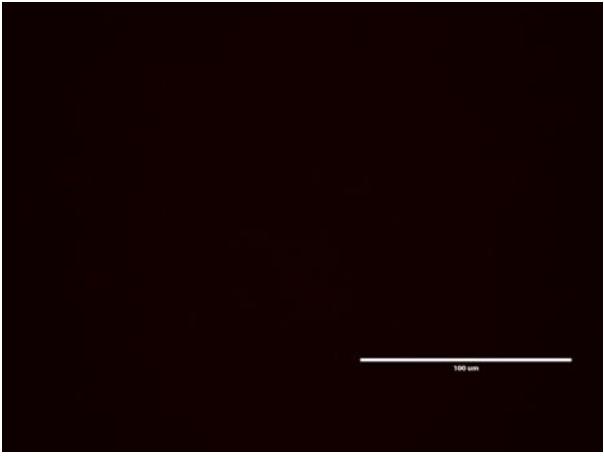
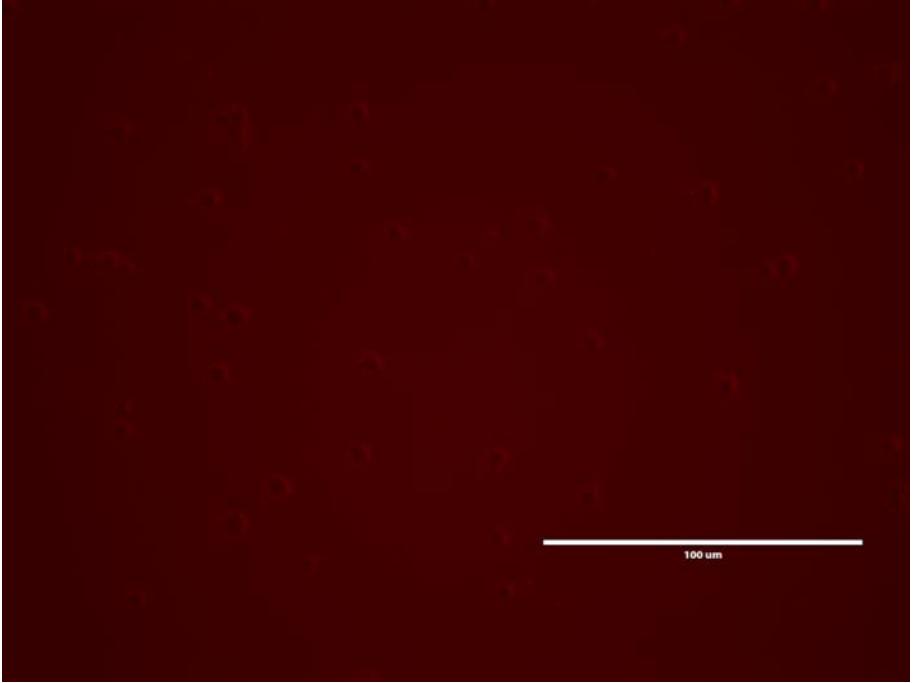
4. Kvasovke z ETt-2 insertom

Presevna svetloba	Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 60 %
	
Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 90 %	
	

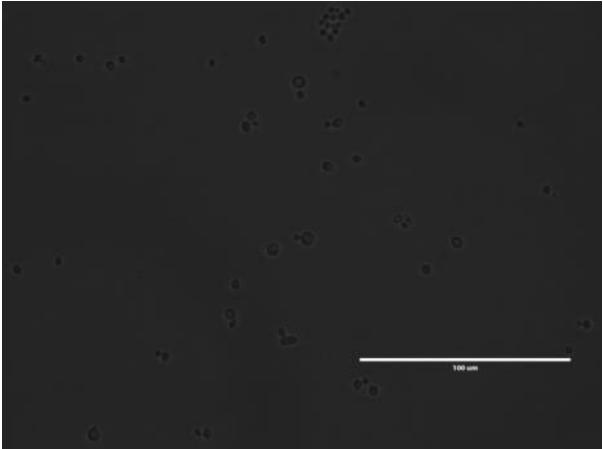
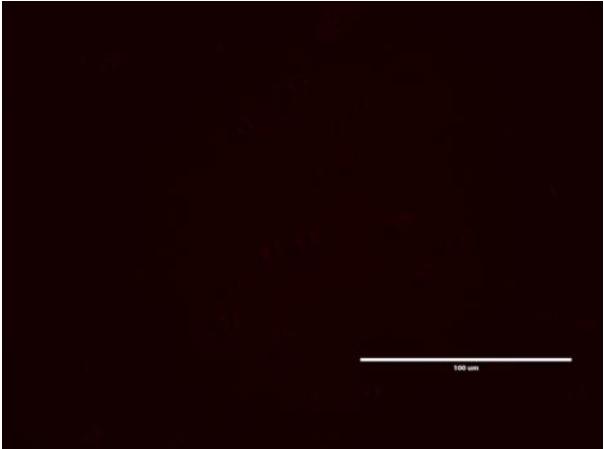
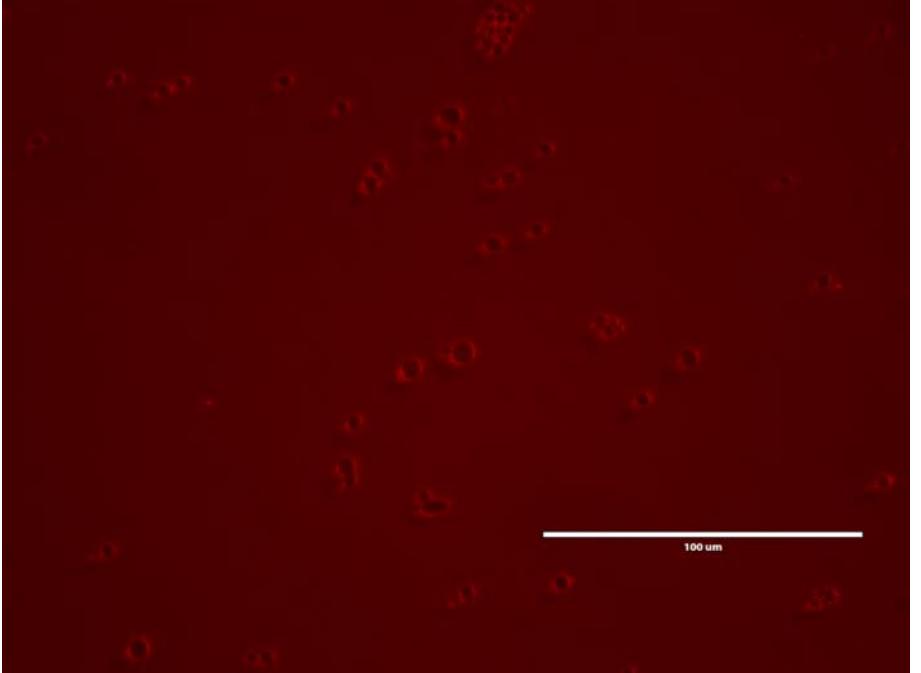
5. Kvasovke z ETt-9 insertom

Presevna svetloba	Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 60 %
	
Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 90 %	
	

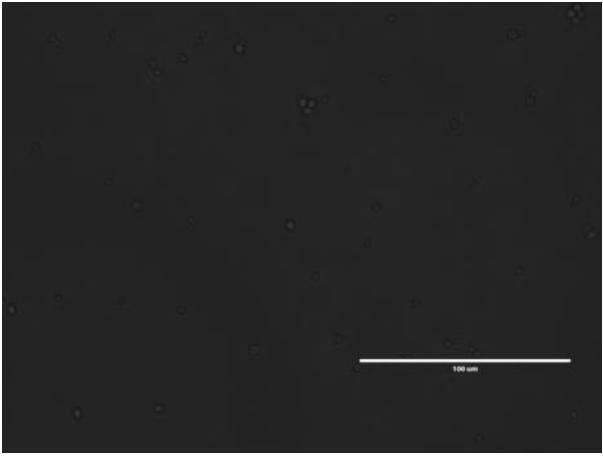
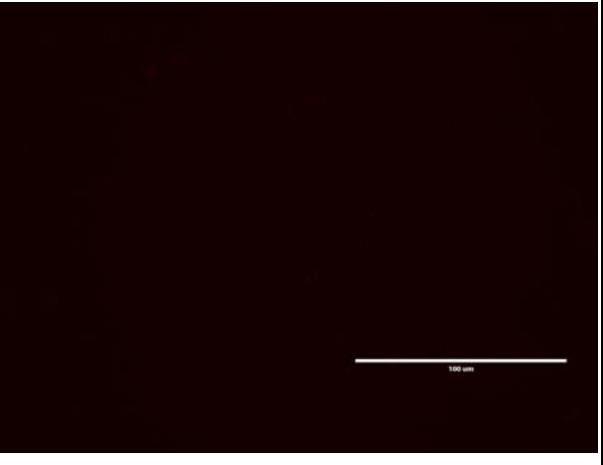
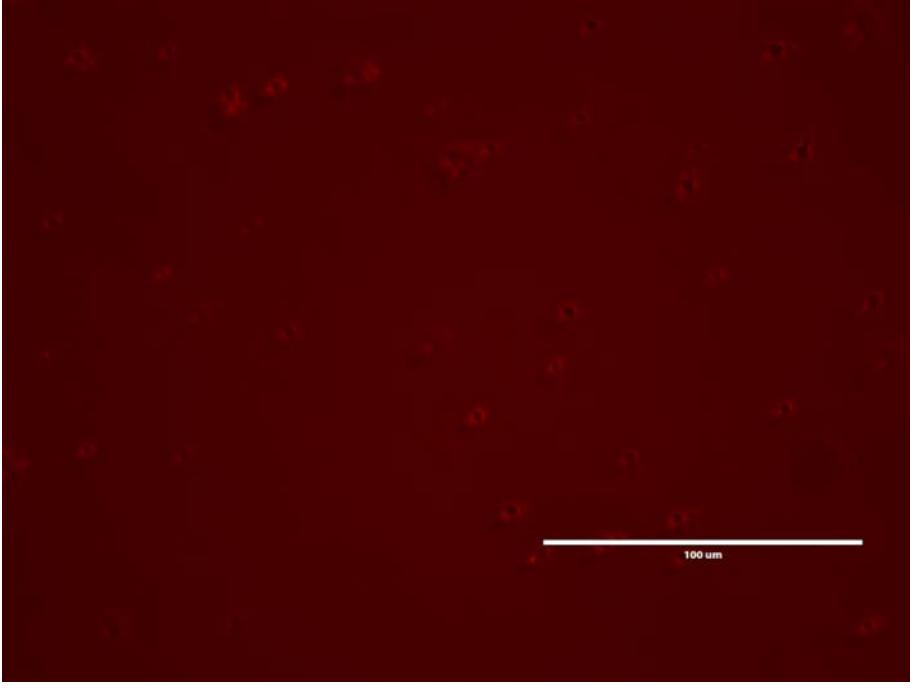
6. Kvasovke z ETt-11 insertom

Presevna svetloba	Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 60 %
	
Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 90 %	
	

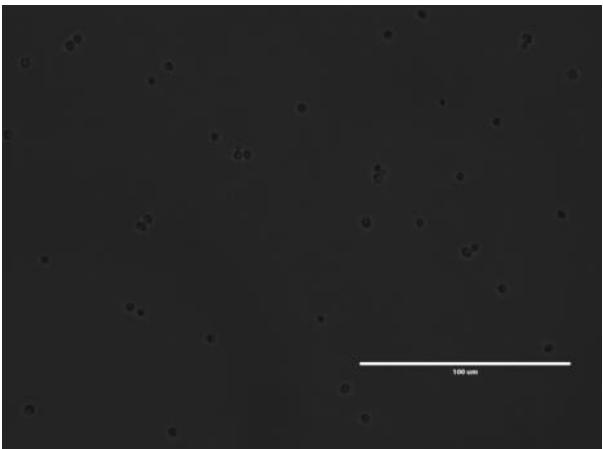
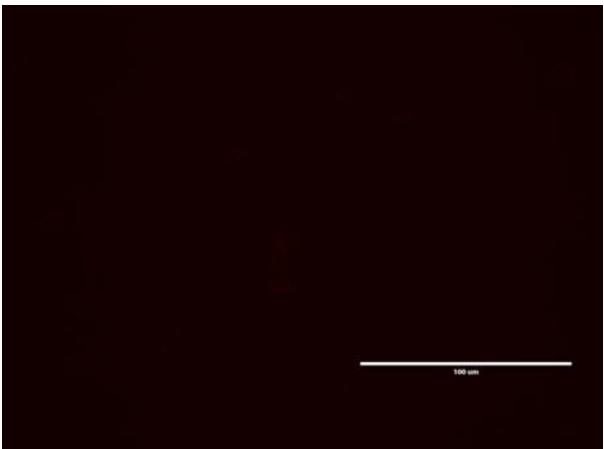
7. Kvasovke z ETt-14 insertom

Presevna svetloba	Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 60 %
	
Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 90 %	

8. Kvasovke z ETt-17 insertom

Presevna svetloba	Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 60 %
	
Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 90 %	
	

9. Kvasovke z ETt-17 insertom, ki pa niso bile gojene v gojišču z galaktozo, ki bi induciralo izražanje inserta

Presevna svetloba	Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 60 %
	
Nastavitev občutljivosti fotopomnoževalke: 90 %	
