

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŽIGA STRMŠEK

**DOSTAVA EKSPRESIJSKIH KASET V SESALSKE
CELIČNE LINIJE Z BAKTERIOFAGNIM
VEKTORJEM**

**DELIVERY OF EXPRESSION CASSETTES INTO
MAMMAL CELL LINES WITH BACTERIOPHAGE
VECTOR**

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko sem opravljal na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko biologijo.

Zahvala

Zahvaljujem se doc. dr. Tomažu Bratkoviču za možnost opravljanja magistrske naloge pod njegovim mentorstvom. Zahvaljujem se tudi dr. Mihu Vodniku za somentorstvo in pomoč pri eksperimentalnem delu. Njuni konstruktivni komentarji, pripravljenost na diskusijo o novih idejah in hiter odziv so me dodatno motivirali. Poleg tega se zahvaljujem dr. Petru Moleku za pomoč pri eksperimentalnem delu ter asist. dr. Tjaši Vižin za pomoč pri delu s konfokalnim fluorescenčnim mikroskopom. Vsem se zahvaljujem za posredovano znanje, prijaznost in dostopnost med celotnim procesom izdelave magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi Petruši Rozman za pripravljenje bakteriofage.

Zahvaljujem se staršem za spodbudo, podporo in razumevanje med študijem in med pisanjem magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča in somentorstvom asist. dr. Miha Vodnika.

Žiga Strmšek

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Stanko Srčič

Mentor: doc. dr. Tomaž Bratkovič

Somentor: asist. dr. Miha Vodnik

Član magistrske komisije: doc. dr. Matej Sova

KAZALO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| KAZALO SLIK | V |
| KAZALO TABEL | VI |
| SEZNAM OKRAJŠAV | VII |
| POVZETEK | VIII |
| ABSTRACT | IX |
| 1. UVOD | 1 |
| 1.1. <i>BAKTERIOFAGI</i> | 2 |
| 1.2. <i>ZAKAJ BAKTERIOFAG IN NE EVKARIONTSKI VIRUS KOT VEKTOR?</i> | 6 |
| 1.3. <i>VSTOP BAKTERIOFAGOV V SESALSKE CELICE</i> | 7 |
| 1.4. <i>RECEPTORSKA ENDOCITOZA KOT METODA DOSTAVE VEKTORJEV NA OSNOVI BAKTERIOFAGOV</i> | 8 |
| 1.4.1 <i>Transferinski receptor</i> | 8 |
| 1.5. <i>OVIRE BAKTERIOFAGOV NA POTI DO JEDRA</i> | 9 |
| 1.5.1 <i>Endosomalna bariera</i> | 10 |
| 2. CILJI | 12 |
| 3. MATERIALI IN METODE | 14 |
| 3.1. <i>MATERIALI</i> | 14 |
| 3.1.1 <i>Laboratorijska oprema</i> | 14 |
| 3.1.2 <i>Reagenti</i> | 16 |
| 3.1.3 <i>Biološki material</i> | 17 |
| 3.1.4 <i>Pufri, raztopine, gojišča</i> | 18 |
| 3.2. <i>METODE</i> | 21 |
| 3.2.1 <i>Priprava prekonočne kulture bakterij E. coli ER2738</i> | 21 |

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.2 | <i>Pomnoževanje bakteriofagov TUP, T12, NL8, C3-4, M2 in L4</i> | 21 |
| 3.2.3 | <i>Izolacija enoverižne bakteriofagne DNA</i> | 22 |
| 3.2.4 | <i>Priprava vzorcev za sekvenciranje</i> | 23 |
| 3.2.5 | <i>Priprava založne raztopine fagov</i> | 23 |
| 3.2.6 | <i>Mikrobiološka titracija</i> | 23 |
| 3.2.7 | <i>Vezava bakteriofagov na celice in internalizacija</i> | 24 |
| 3.2.8 | <i>Spektrofotometrično določanje koncentracije analitov</i> | 25 |
| 3.2.9 | <i>Pomnoževanje bakteriofagov 3TRL-2-GFP, 3TRL-2-PEN, 3TRL-2-FHV, f88-4-GFP in f88-4 Smith</i> | 25 |
| 3.2.10 | <i>Označevanje bakteriofagov s FITC</i> | 26 |
| 3.2.11 | <i>Fluorescenčna mikroskopija</i> | 26 |
| 3.2.12 | <i>Izolacija dvoverižne DNA 3TRL-2-GFP iz transformiranih bakterij s kompletom GenElute HP Miniprep</i> | 28 |
| 3.2.13 | <i>Izolacija enoverižne DNA 3-TRL-2-GFP</i> | 28 |
| 3.2.14 | <i>Priprava lipofektamina</i> | 29 |
| 3.2.15 | <i>Izolacija bakteriofagov f88-4 GFP, 3TRL-2-GFP, 3TRL-2-PEN, 3TRL-2-FHV in f88-4 Smith za dostavo ekspresijskih kaset v celicah HaCaT in HEK</i> | 29 |
| 3.2.16 | <i>Dostava ekspresijske kasete GFP v celice HaCaT</i> | 30 |
| 3.2.17 | <i>Dostava ekspresijske kasete GFP v celice HEK293</i> | 31 |
| 3.2.18 | <i>Merjenje uspešnosti transfekcije celic HEK293 s pretočno citometrijo</i> | 31 |
| 4. | REZULTATI | 32 |
| 4.1. | <i>PRIMERJAVA SPOSOBNOSTI VEZAVE BAKTERIOFAGOV C3-4, TUP IN T12 NA CELICE HaCaT</i> | 32 |
| 4.2. | <i>IZBOR BAKTERIOFAGA ZA NEGATIVNO KONTROLO Z VEZAVO BAKTERIOFAGOV NA CELICE</i> | 33 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.3. SPREMLJANJE INTERNALIZACIJE BAKETRIOFAGOV S KONFOKALNO FLUORESCENČNO MIKROSKOPIO | 35 |
| 4.4. DOSTAVA EKSPRESIJSKIH KASET Z BAKTERIOFAGNIMI VEKTORJI | 39 |
| 4.4.1 Celice <i>HaCaT</i> | 39 |
| 4.4.2 Celice <i>HEK293</i> | 43 |
| 4.5. PRETOČNA CITOMETRIJA | 47 |
| 6. ZAKLJUČEK | 52 |
| 7. LITERATURA | 55 |
| PRILOGE | 57 |

KAZALO SLIK

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Slika 1: Shematski prikaz bakteriofaga..... | 2 |
| Slika 2: Shematski prikaz različnih sistemov za predstavitev peptidov na bakteriofagu | 4 |
| Slika 3: Evolucijsko drevo bakteriofagov, uporabljenih v tej magistrski nalogi. | 5 |
| Slika 4: Glavni dogodki za uspešno internalizacijo bakteriofaga v sesalsko celico preko receptorske endocitoze | 10 |
| Slika 5: Razpored vdolbinic za pripravo vzorcev za fluorescenčno mikroskopijo. | 26 |
| Slika 6: Rezultati konfokalne mikroskopije | 36 |
| Slika 7: Rezultati preizkusa uspešnosti dostave ekspresijske kasete z bakteriofagi v celice HaCaT.... | 40 |
| Slika 8: Rezultati preizkusa uspešnosti dostave ekspresijske kasete z bakteriofagi v celice HaCaT | 41 |
| Slika 9: Rezultati preiskusa uspešnosti dostave ekspresijske kasete z bakteriofagi v celice HEK293 ... | 45 |
| Slika 10: Obdelani rezultati pretočne citometrije..... | 48 |

KAZALO TABEL

Tabela 1: Rezultati mikrobiološke titracije bakteriofagov, vezanih na celice HaCaT 32

Tabela 2: Rezultati mikrobiološke titracije bakteriofagov, vezanih na celice HaCaT 34

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|-------------|-------------------------------------------------------|
| M | mol/liter |
| mRNA | informacijska RNA (angl. <i>messenger RNA</i>) |
| obr./minuto | obrati na minuto |
| pfu | plakotvorna enota (angl. <i>plaque forming unit</i>) |

POVZETEK

Razvoj dostavnih sistemov za ciljano dostavo genskih učinkovin je zadnjih nekaj let deležen velikega razvoja. Idealen tarčni dostavni sistem mora biti varen, učinkovit, tarčno specifičen in poceni za proizvodnjo. Ciljane sisteme za dostavo genskih učinkovin delimo na dve skupini: virusne in nevirusne. Virusni dostavni sistemi so bili po večini omejeni predvsem na uporabo humanih virusov, nevirusni pa na kationske polimere in liposome. Ker dosedanji sistemi niso povsem brez slabosti, je eden od odgovorov na težave razvoj tarčnih dostavnih sistemov na osnovi bakteriofagov. Bakteriofagi so virusi, ki se razmnožujejo v bakterijah in niso sposobni okužbe humanih celic, vendar jih lahko z ustreznimi modifikacijami razvijemo v sisteme za ciljano dostavo.

Cilj te magistrske naloge je bil ovrednotiti vpliv izražanja kratkih peptidov, ligandov transferinskega receptorja, na proteinu pIII ovojnice nitastega bakteriofagana uspešno dostavo in izražanje ekspresijske kasete z zelenim fluorescenčnim proteinom. V prvem delu magistrske naloge smo vrednotili sposobnost vezave nitastega bakteriofaga z dvema različnima ligandoma transferinskega receptorja, izraženima na ovojnici, na celice HaCaT. Nato smo bakteriofage označili s fluoroforom in s fluorescenčno mikroskopijo spremljali prehajanje v celice HaCaT. Končno smo ocenili sposobnost izražanja sesalske ekspresijske kasete bakteriofagnega vektorja v celicah HaCaT in HEK293 ter s pretočno citometrijo ovrednotili uspešnost dostave ekspresijske kasete v celice HEK293.

S to magistrsko nalogo smo potrdili sposobnost razvitih bakteriofagov za uspešno dostavo ekspresijske kasete v celični liniji HaCaT in HEK293. Izražanje kratkih peptidov na bakteriofagni ovojnici, ki so specifični za vezavo na transferinski receptor, poveča sposobnost bakteriofaga za uspešno dostavo in izražanje ekspresijske kasete. Ker so ti kratki peptidi med seboj zamenljivi, lahko na bakteriofagnem proteinu pIII predstavimo katerikoli peptid, ki ima dokazano sposobnost vezave na želeno tarčo. Z opravljenim delom je bil vzpostavljen temeljni kamen za razvoj ciljanih dostavnih sistemov na osnovi bakteriofagov.

ABSTRACT

The development of targeted fectors for gene therapy is a subject of increased development over the past years. Ideal target delivery system has to be safe, efficient, target specific and cheap to mass produce. Target delivery systems are divided into two groups: viral and non-viral. Viral delivery systems are mostly limited to the use of human viruses, while non-viral mostly focus on cationic polymers and liposomes. As delivery systems are not without faults, one of the responses to the problem at hand is to develop target delivery systems based on bacteriophages. Bacteriophages are viruses that replicate in bacteria and are not capable of infecting human cells – but with the right modifications they can be turned into target delivery systems.

The goal of this master thesis was to examine the effect of display of short transferrin ligands on filamentous bacteriophage's minor capsid protein pIII on the successful delivery and expression of model reporter gene green fluorescent protein. In the first part of this master thesis we evaluated the ability of two filamentous bacteriophages each displaying different ligand for transferrin receptor on HaCaT cells. Furthermore we labelled the bacteriophages with fluorescent dye and observed internalisation in HaCaT cells. Lastly we evaluated the ability to express mammal expression cassette deliverd by bacteriophagal vector in HaCaT and HEK293 cells and we also determined the successful delivery and expression of expression cassette in HEK293 cells.

We confirmed the ability of the developed bacteriophages to successfully deliver and express the mammalian expression cassette in HaCaT and HEK293 cell lines *in vitro*. The display of short peptides that are specific to transferrin receptor, enhances the ability of the bateriophage to successfully deliver and express its genetic cargo. Because the short peptides are interchangeable it is possible to display any short peptide with affinity for desired target on protein pIII. With the presented work, we have founded the basis for further development of filamentous phage-based target delivery systems.

1. UVOD

Glavna ideja genskega zdravljenja je ciljana dostava tujih genskih elementov, ki imajo terapevtske sposobnosti, v specifično tkivo ali celice, zato je ključ do uspešnosti genske terapije razvoj varnega in učinkovitega tarčnega dostavnega sistema (Ibraheem et al., 2014). Zadnjih nekaj let je bilo veliko narejenega na razvoju vektorjev za uporabo zdravljenja bolezni. Idealni vektor za dostavo je varen, poceni za proizvodnjo, učinkovit in tarčno specifičen. Nekatere od teh lastnosti so potrebne za dosego selektivnega in dolgotrajnega izražanja genskega terapevtika v tarčnih celicah oz. tkivu brez toksičnih učinkov na zdravo tkivo v telesu (Seow in Wood, 2009). Trenutno uporabljeni strategiji za dostavo in izražanje terapevtskih genov v sesalskih celicah lahko razdelimo na dve glavni skupini: na sisteme, ki izvirajo iz evkariontskih virusov, in na te, ki nimajo virusnega izvora (Nayerossadat et al., 2012). Virusi, ki jih pogosteje uporabljamo za ciljano dostavo genskih konstruktov, so adenovirusi, adeno-asociacijski virusi, retrovirusi in lentivirusi. Nevirusni sistemi, uporabljeni za dostavo genskih konstruktov, so zelo raznoliki, vendar trenutno največ obetajo sistemi na osnovi polimerov in liposomov (Yin et al., 2014).

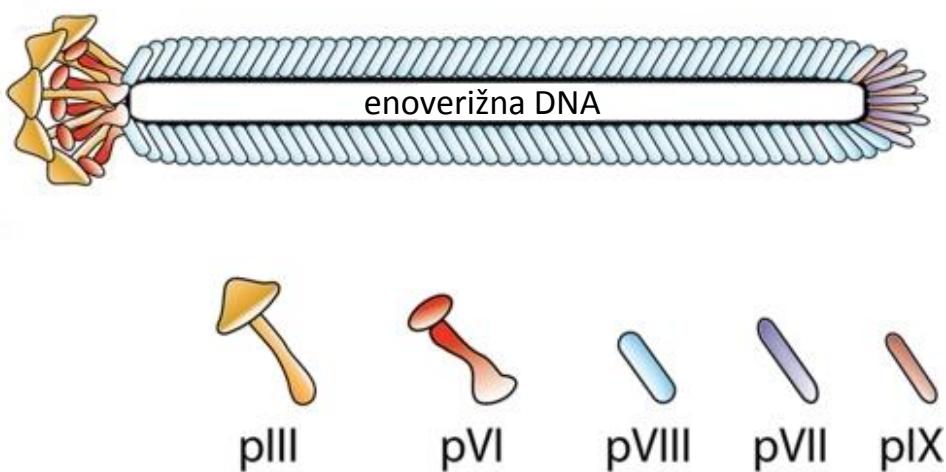
Predstavniki obeh skupin imajo prednosti in slabosti: nevirusni vektorji so cenejši in preprostejši, medtem ko je klinična uporabnost velikokrat problematična, saj so relativno neučinkoviti pri prehodu celične membrane, njihov potencial za nadaljnji razvoj in spremembe je omejen, kar predstavlja največjo oviro pri uporabi (Schmidt-Wolf in Schmidt-Wolf, 2003). Razvoj dostavnih sistemov, osnovanih na osnovi evkariontskih virusov, je težaven, dolgotrajen in drag. Proizvodnja le-teh v evkariontskih delovnih kulturah je otežena in draga zaradi zahteve po pridobitvi vektorjev, ki niso sposobni podvajanja – kljub vsemu vloženemu trudu pa še vedno obstajajo pomisleki o nelobjivih toksičnosti virusnih vektorjev, saj jih imunski sistem prepozna kot tujek, ter njihove zmožnosti sprožitve onkogenih procesov z integracijo v genom gostiteljske celice (Daniel in Smith, 2008).

Zaradi vseh teh zapletov je želja po razvoju novih sistemov za uporabo v genskem zdravljenju velika. Eden od odgovorov na problem je razvoj ciljanih dostavnih sistemov za gensko zdravljenje na osnovi bakterijskih virusov. Sistemi, osnovani na bakteriofagih, so

zelo varni, saj so nezmožni okužiti človeka, bakteriofagi predstavljajo naravno mikrofloro našega telesa, kjer nas ščitijo pred patogenimi bakterijami. Bakteriofage je možno tudi modificirati (kemijsko in genetsko) ter s tem izboljšati njihovo sposobnost za dostavo genskih terapevtikov (Molek in Bratkovič, 2015).

1.1. BAKTERIOFAGI

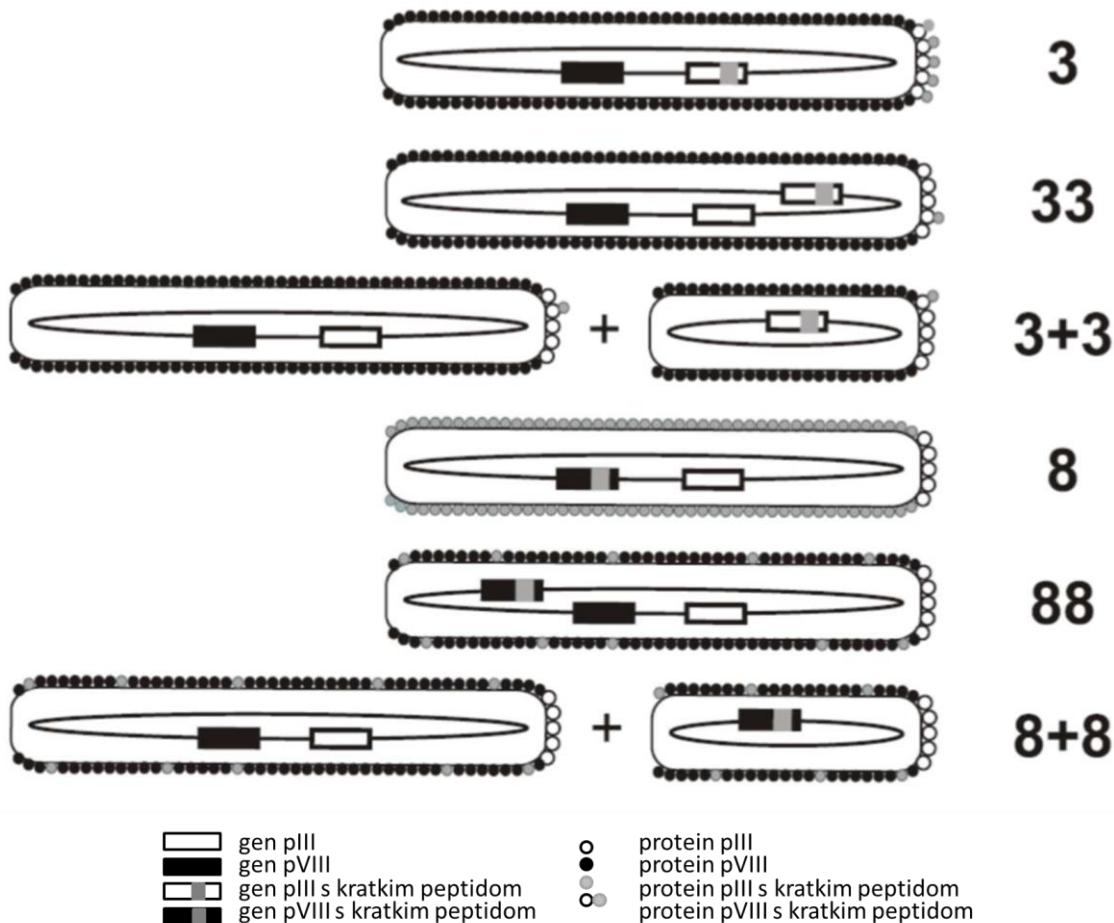
Bakteriofagi so virusi, ki (kot že ime nakazuje) se razmnožujejo v bakterijskih celicah. Svoj genski material nosijo kot DNA ali kot RNA, ki je zapakiran v proteinski ovojnici, imenovani kapsida. Sami bakteriofagi nimajo lastnega metabolizma, zato so za svojo replikacijo odvisni od metabolizma gostiteljske bakterije. Bakteriofagi so najbolj številčni predstavniki biosfere in se nahajajo v različnih okoljih – na dnu oceanov, v vročih vrelcih, arktični pokrajini itd.. Po oceni Clarka in Marcha (2006) je bakteriofagnih delcev na našem planetu približno 10^{30} , kar je 10-krat več, kot je bakterij. Presenetljivo je tudi znotraj naših teles veliko število bakteriofagov – predvsem v okoljih, ki so bogata z bakterijami (kot so naša prebavila), kjer se pomnožujejo s pomočjo simbiotskih in patogenih bakterij ter nas tako ščitijo pred patogeni. Mikrobiologi in virologi tudi ugotavljajo, da imajo bakteriofagi, skupaj s specifičnimi bakterijskimi gostiteljskimi celicami, pomembno vlogo pri vzpostavljanju zdrave mikroflore prebavil.



Slika 1: Shematski prikaz bakteriofaga (prirejeno po (Løset et al., 2011)).

Ovojnica nitastih bakteriofagov je sestavljena iz petih plaščnih proteinov (**slika 1**) – pIII, pVI, pVII, pVIII in pIX. En pol bakteriofaga sestavlja po pet kopij proteinov pIII in pVI, skupaj pa omogočata vezavo bakteriofaga na površino bakterijske membrane. Protein pIII je največkrat uporabljen protein za predstavitev na bakteriofagih, saj je toleranten za vstavitev večjih peptidov. Vendar ker bakteriofag potrebuje za uspešno pomnoževanje v bakterijah delujoc protein pIII, velikokrat izražanje peptidov na pIII zmanjša infektivnost. Telo bakteriofaga je sestavljeno iz več tisoč kopij proteina pVIII. Tudi protein pVIII uporabljamo za predstavitev kratkih peptidov na bakteriofagu. Zaradi načina sestavljanja proteina pVIII v bakteriofagno kapsido in transporta preko membrane bakterije je predstavitev peptidov, daljših od 6 do 8 amino kislin, nemogoča.

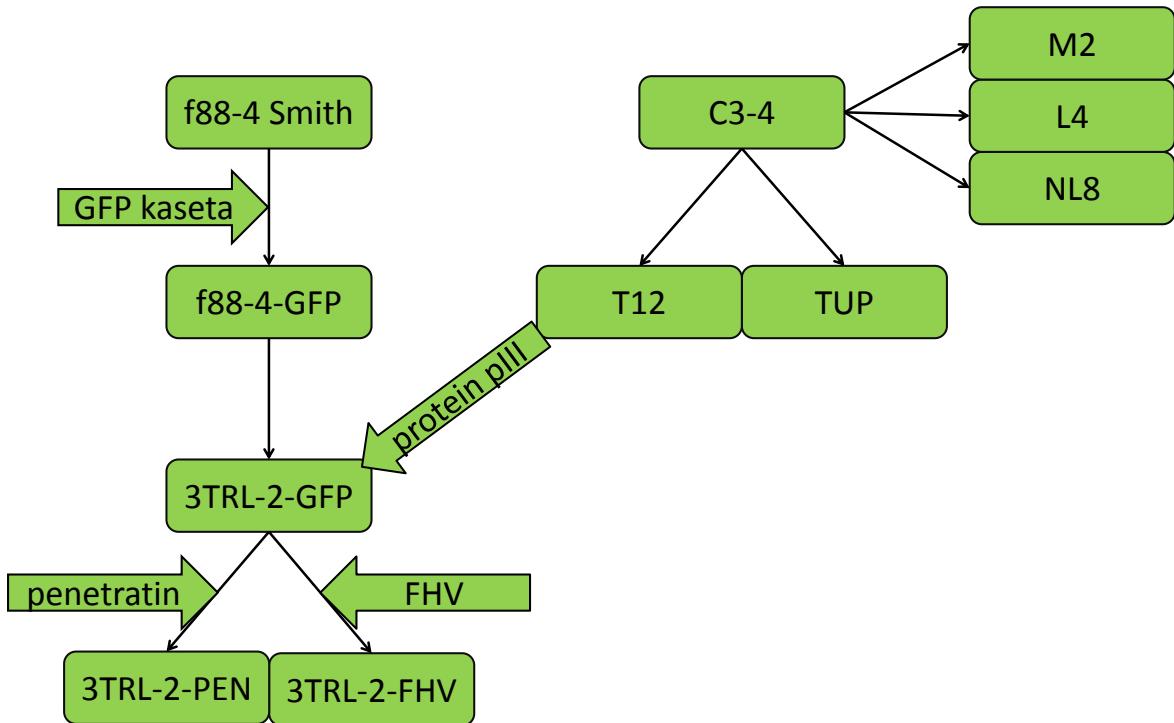
Za predstavitev na bakteriofagnih proteinih je razvitih več sistemov – 3, 33, 3+3, 8, 88 in 8+8 (**slika 2**). Kadar ima bakteriofag samo eno kopijo gena za protein pIII, na kateri je izražen kratek peptid, govorimo o sistemu 3, kjer vsi proteini pIII izražajo predstavljen peptid; če pa ima bakteriofag dve kopiji gena za protein pIII in je le eden fuzijski, vsi proteini pIII na tem bakteriofagu ne izražajo predstavljenega peptida – ta sistem opišemo kot 33. Za sistem 3+3 potrebujemo v isti bakterijski celici plazmid s fuzijskim genom za protein pIII in možnostjo pakiranja v bakteriofagni delec (fagmid) ter pomožni bakteriofag, ki vsebuje normalno kopijo proteinov pIII in pVIII. Ker bakterijska celica sintetizira tako fuzijski kot normalen protein pIII, so nastali bakteriofagni in fagmidni delci, sestavljeni iz obeh kopij – vendar fagmidni delec nosi s seboj zapis s plazmida, v katerem se lahko nahaja zapis za poljubni gen. Enaki principi in poimenovanja veljajo tudi za predstavitev na proteinu pVIII.



Slika 2: Shematski prikaz različnih sistemov za predstavitev peptidov na bakteriofagu. (prirejeno po (Bratkovič, 2010))

Uporabljeni bakteriofagi v tej magistrski nalogi uporabljajo sistem 3 in 388 in so poimenovani: C3-4, NL8, L4, M2, TUP, T12, f88-4 Smith, f88-4 GFP, 3TRL-2-GFP, 3TRL-2-PEN in 3TRL-2-FHV. Bakteriofag C3-4 predstavlja izvorni bakteriofag brez predstavljenih peptidov na katerem od bakteriofagnih proteinov. Iz bakteriofaga C3-4 so izpeljani NL8, L4, M2, TUP in T12 in po sistemu 3 na proteinu pIII predstavljajo peptide – NL8 in L4 proti protitelesu proti grelinu (Vodnik in Lunder, 2013), M2 proti protitelesu proti leptinu ter TUP in T12 proti transferinskemu receptorju (Rozman et al., v pripravi). Bakteriofag f88-4 Smith je osnova sistema 88 in je izvorni bakteriofag druge serije bakteriofagov. Bakteriofag f88-4-GFP je identičen bakteriofagu f88-4 Smith (Scott in Smith, 1990), z izjemo vstavitve ekspresijske kasete GFP. V f88-4-GFP smo z zamenjavo proteina pIII s pIII iz bakteriofaga T12 dobili bakteriofag 3TRL-2-GFP (Rozman et al., v pripravi) – s tem smo ustvarili bakteriofag sistema 3, brez predstavljenega peptida na

proteinu pVIII. V naslednjem koraku smo pripravili dva bakteriofaga s predstavljenimi peptidi, ki omogočajo pobeg iz lizosoma – penetratin in FHV (Dupont et al., 2011, Nakase et al., 2009) – ter s tem ustvarili bakteriofaga 3TRL-2-PEN in 3TRL-2-FHV (Rozman et al., v pripravi). Evolucijsko drevo bakteriofagov je prikazano na **sliki 3**. Bakteriofagi so bili pripravljeni kot del magistrske naloge Petruše Rozman (Rozman et al., v pripravi).



Slika 3: Evolucijsko drevo bakteriofagov, uporabljenih v tej magistrski nalogi.

Bakteriofagi so bili vse od odkritja široko uporabljeni v molekularni biologiji kot orodje za vnos vektorjev v prokarionte in so omogočili raziskovalcem odgovoriti na mnoga vprašanja molekularne biologije. Poleg tega imajo bakteriofagi visoko genetsko variabilnost. Odkrili so, da približno polovica bakteriofagnih genov nima homologov v genetskih podatkovnih zbirkah (Hambly in Suttle, 2005). Ravno ta velika genetska raznolikost v kombinaciji s fleksibilnostjo bakteriofagov, ki je bila dokazana eksperimentalno z vnosom velikega števila mutacij, je pripeljala do hitre prepozname potenciala uporabe bakteriofagov v biotehnologiji. Zadnjih nekaj let je bilo vloženega veliko truda v razvoj bakteriofagov, ki bi bili uporabni v farmaciji in kliniki. Področja potencialne uporabe so zelo raznolika – od same preventive (npr. razvoj cepiv na osnovi

bakteriofagov), diagnostike (npr. uporaba bakteriofagov za detekcijo in tipizacija bakterijskih okužb) do zdravljenja (npr. uporaba bakteriofagov kot dostavnih sistemov za gensko terapijo) (Clark in March, 2006, Molek in Bratkovič, 2015).

Ene najbolj fascinantnih študij bakteriofagov so študije potencialne uporabe bakteriofagov kot tarčnih dostavnih sistemov pri zdravljenju bolezenskih stanj, v katerih je bilo predlagano, da bakteriofagi predstavljajo popoln tarčni dostavni sistem. Bakteriofagi so odporni na velik razpon ostrih okoljskih pogojev, kot so izpostavitev nukleazam, proteazam in širokem spektr pH (Larocca et al., 2002). Odpornost bakteriofagov na nizke pH omogoča preživetje gastro-intestinalnih pogojev, kar omogoča njihovo potencialno uporabo *per os*. Prehod iz prebavil v krvni obtok je bil že dokazan tako pri živalih kot ljudeh (Weber-Dabrowska et al., 1987). Po drugi strani pa bakteriofagi ne povzročajo rekombinacijskih dogodkov, ki bi bili posledica homolognih zaporedij v vektorju ali genomu sesalske celice.

1.2. ZAKAJ BAKTERIOFAG IN NE EVKARIONTSKI VIRUS KOT VEKTOR?

Na prvi pogled je široka sposobnost tropizma evkariontskih virusov velika prednost pri genskem zdravljenju, vendar se ob globljem razmisleku kaj kmalu razkrije, da gre za dvorenzen meč. Ravno širok tropizem evkariontskih virusov nam namreč povzroča probleme pri ciljanem genskem zdravljenju. Vektorji, osnovani na evkariontskih virusih, imajo najvišjo učinkovitost vstopanja v sesalske celice (Thomas et al., 2003), kar je posledica obstoja esencialnih in ključnih mehanizmov za vstop v celico, transport znotraj celice in končno izražanje prinešenega transgena. Ti mehanizmi so se razvili skozi dolga tisočletja evolucije in boja med virusi in evkarionti, uporaba teh mehanizmov pa močno poveča sposobnost vektorja za uspešno izražanje transgena, vendar se zaradi sposobnosti večine evkariontskih virusov, da uspešno okužijo več tipov celic, pojavi težava selektivnosti (Thomas et al., 2003).

Po drugi strani imajo vektorji, osnovani na bakteriofagih, slabšo sposobnost vstopa v evkariotske celice, kar zmanjšuje verjetnost netarčnega vstopa v celice in neželenih učinkov, medtem ko istočasno povečuje varnost pri klinični uporabi (Larocca in Baird,

2001). Posledično ni potrebno spremnjati bakteriofagov, da bi jim zmanjšali tropizem in netarčni vnos, medtem ko je le-to Ahilova peta evkariontskih virusov.

1.3. VSTOP BAKTERIOFAGOV V SESALSKIE CELICE

V začetku 70-ih let so bila objavljena prva poročila o sposobnosti bakteriofagov za vstop v notranjost sesalskih celic. S tem so predstavili prve dokaze o uporabnosti bakteriofagov za vnos in izražanje transgenov v sesalskih celicah (Merril et al., 1971). Sledilo je veliko študij, kjer so ovrednotili sposobnost in mehanizme vstopa bakteriofaga v sesalske celice – eden izmed pomembnih odkritij je bila možnost dostave enoverižne DNA nitastega bakteriofaga, ki jo je celica sama nato prepisala v dvoverižno DNA. To in še druga odkritja so privedla do spoznanja, da bi nitasti bakteriofagi lahko služili kot tarčni dostavnici sistemov za dostavo in izražanje ekspresijskih kaset, vendar te študije niso težile k razvoju bakteriofagov, sposobnih ciljane dostave.

Ena od želenih lastnosti bakteriofagnih vektorjev je dovzetnost njihovega genoma za površinske modifikacije. Relativno preprost genom bakteriofagov in njihova dovzetnost za površinsko modifikacijo proteinov kapside omogoča razvoj bakteriofagov, ki so sposobni vezave na sesalske celične površinske receptorje. Pri tej metodi je peptid za ciljanje izražen kot fuzijski protein z enim od kapsidnih proteinov bakteriofaga (pIII ali pVIII), kar omogoča preferenčno vezavo samo na določen tip celic. Poleg tega je možno z nadaljnjo *in vitro* evolucijo razviti še bolj tarčno specifične bakteriofage, ki imajo boljše lastnosti vezave.

Predstavitev želenih modifikacij skozi prikaz peptidov za ciljanje na površini bakteriofagnih delcev je usmeritev vektorja proti želenemu receptorju. Na proteinu pIII in pVIII lahko izrazimo želen krajši peptid, ki že izkazuje sposobnost vezave na tarčni receptor ter s tem že od samega začetka izboljšamo specifičnost bakteriofagnega vektorja. Ta princip je že bil dokazan s predstavitvijo fibroblastnega rastnega dejavnika 2 na površini bakteriofaga M13, ki je nosil zapis za protein GFP. S pomočjo tega vektorja so dokazali tarčno specifičen prehod bakteriofaga M13 preko receptorske endocitoze v celico, sprostitev dednega materiala bakteriofaga in prepis v funkcionalen protein. Opisan princip je širše uporaben, ker lahko na površini bakteriofaga izrazimo različne molekule, kot so

rastni dejavniki, protitelesa in dele virusnih kapsid, kar nakazuje širšo uporabnost ciljane dostave z bakteriofagi (Bakhshinejad in Sadeghizadeh, 2014).

Na podlagi vseh teh ugotovitev je razvoj vektorjev na osnovi bakteriofagov povsem spremenil pogled na dostavo genskih učinkovin. Poleg tega bakteriofagni vektorji omogočajo razvoj povsem novih strategij za ciljano terapijo za različna bolezenska stanja, ki se razvijejo zaradi nepravilnega delovanja genov.

1.4. RECEPTORSKA ENDOCITOZA KOT METODA DOSTAVE VEKTORJEV NA OSNOVI BAKTERIOFAGOV

Sposobnost ciljane dostave je osnovna zahteva, kadar želimo izraziti želen transgen v točno določenem tipu celic. Kadar ciljamo določen tip celic z bakteriofagi, je sposobnost prenosa le-teh preko endocitoze, sprožene z vezavo na receptorje, zelo zaželena, ker ponuja nov način uporabe (Larocca in Baird, 2001). Vnos s pomočjo receptorske endocitoze je tipična strategija vstopa v celico evkariontskih virusov – ta mehanizem lahko izkoriščamo tudi pri bakteriofagnih vektorjih. Za dosego tega je potrebno na površini bakteriofaga izraziti ligand, ki ima zelo visoko afiniteto do receptorja, izraženega na površini sesalske celice. Vezava bakteriofagnega vektorja na površino receptorja sproži uvihanje membrane ter formacijo veziklov, obdanih s klatrinom. Drug mehanizem receptorske endocitoze je sprožen z zbiranjem receptorjev v skupke (angl. *receptor clustering*). Pri tem mehanizmu pride do vzpostavitve več kontaktnih točk med več bakteriofagi in receptorji, kar povzroči prevzemanje tudi večjih delcev. Za vstop bakteriofagnih vektorjev preko formacije receptorskih skupkov je potrebna predstavitev visoko afinitetnih ligandov na več mestih na bakteriofagih ter tako formacija večivalentnih vektorjev, kar poveča prevzem preko receptorske endocitoze (Wang et al., 2010). Prikazani ligandi so lahko na bakteriofagni vektor naknadno vezani kovalentno s pomočjo kemijskih modifikacij ali pa s pomočjo genskega inženirstva z modifikacijo bakteriofagu lastnih genov dosežemo predstavitev želenega liganda.

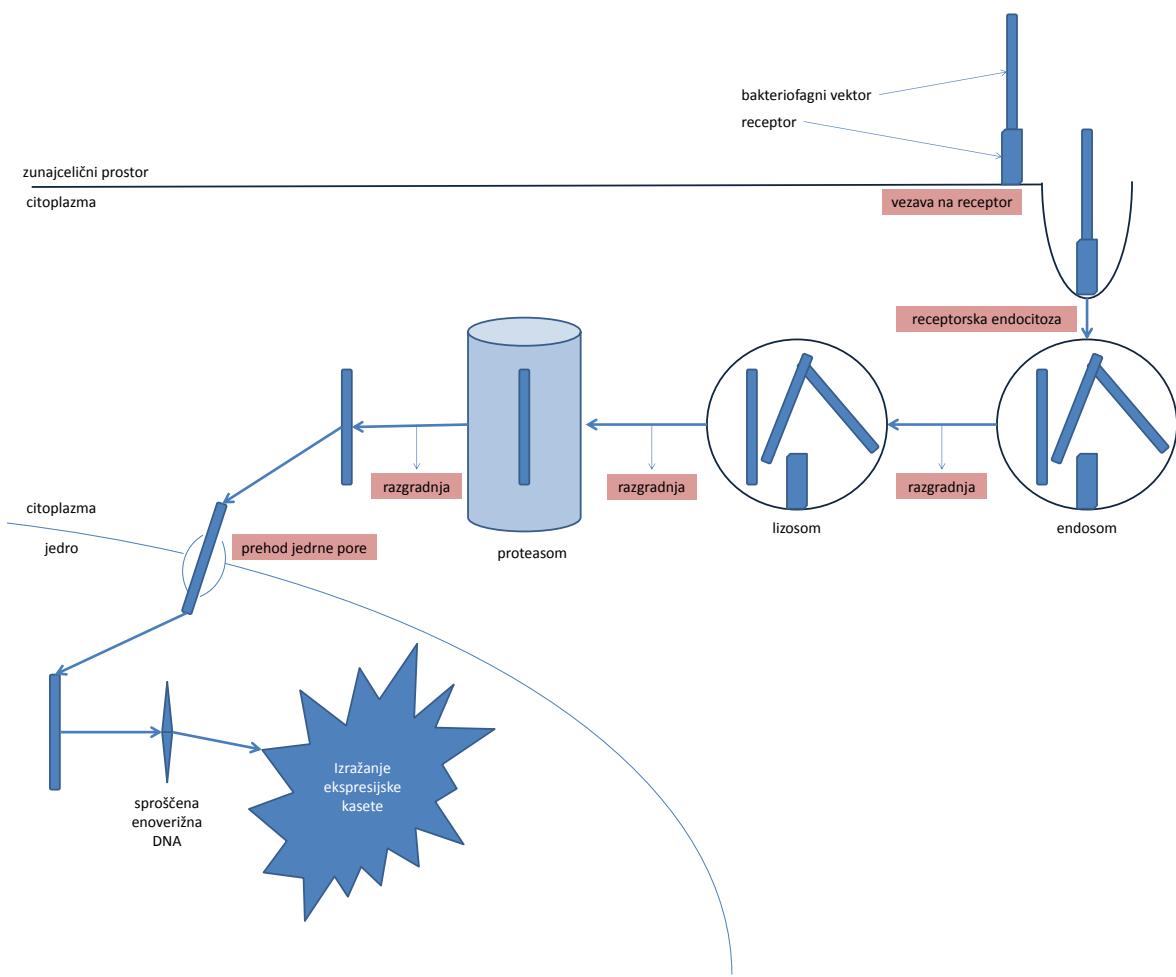
1.4.1 Transferinski receptor

Transferinski receptor je membranski protein, katerega vloga je prevzem železa od plazemskega transportnega proteina – transferina. Prevzem železa je sestavljen iz vezave

transferina na transferinski receptor, internalizacije transferina preko receptorske endocitoze, čemur sledi sprostitev železa zaradi padca pH v endosomu. Transferinski receptor je izražen na večini somatskih celic, čeprav nivo izražanja močno variira – predvsem je izražen na hitro delečih se celicah, tako rakastih kot zdravih (Ponka in Lok, 1999).

1.5. OVIRE BAKTERIOFAGOV NA POTI DO JEDRA

Po uspešni vezavi bakteriofagnega vektorja na receptor in receptorski endocitozi mora v notranjosti sesalske celice vektor premagati veliko prerek, da uspešno izrazi svojo ekspresijsko kaseto. S temi večplastnimi preprekami se sesalska celica ščiti pred različnimi patogeni; ravno ti mehanizmi povzročajo razgradnjo bakteriofagnih vektorjev in onemogočajo uspešno dostavo genske učinkovine. Po uspešnem prehodu celične membrane morajo bakteriofagi prestati ostre pogoje endosoma in lizosoma, pobegniti razgradnji s proteazami, sprostiti se morajo v citosol, priti do jedrne membrane in jo uspešno preiti, šele nato lahko pride do izražanja ekspresijske kasete, ki jo nosi bakteriofagni vektor (slika 4). Nezmožnost preživetja katerekoli izmed opisanih ovir privede do neuspeha pri izražanju ekspresijske kasete.



Slika 4: Glavni dogodki za uspešno internalizacijo bakteriofaga v sesalsko celico preko receptorske endocitoze. Po uspešni vezavi bakteriofagnega vektorja na receptor na površini celične membrane sesalske celice pride do receptorske endocitoze in nastanka endosoma. Z zorenjem endosoma se le-ta spremeni v lizosom, iz katerega mora bakteriofagni vektor pobegniti. Po pobegu iz lizosoma se mora bakteriofagni vektor izogniti proteasomu, preiti jadrno membrano, kjer mora sprostiti svoj genetski tovor, ki ga mora ekvariontski transkripcijski aparat prepoznati in izraziti.

1.5.1 Endosomalna bariera

Po receptorski endocitozi bakteriofagnega vektorja je le-ta izpostavljen kislemu okolju endosoma, ki skupaj s proteolitičnimi encimi povzročijo razgradnjo proteinov vektorja. Sami bakteriofagi imajo slabo zmožnost preživetja opisanih pogojev, kar privede do zmanjšane zmožnosti uspešne dostave tovora. Za razliko od bakteriofagov imajo evkariontski virusi zelo razvite mehanizme izogibanja ali pobega iz endosomov – eden izmed njih je uporaba kratkih peptidov, ki omogočajo pobeg iz endosomov. Z izražanjem

teh kratkih peptidov na površini bakteriofagov povečamo uspešnost prehoda endosomalne bariere in posledično preživetje. Primer uspešne uporabe tega sistema je izražanje adenovirusnega kapsidnega proteina Pb, ki omogoča pobeg razgradnji v endosomu (Piersanti et al., 2004).

2. CILJI

Namen magistrske naloge je ovrednotiti sposobnost vezave rekombinantnega nitastega bakteriofaga za dostavo evkariotske ekspresijske kasete. Ker je razvoj dostavnih sistemov zahteven postopek, je magistrska naloga sestavljena iz več posameznih ciljev.

Prvi cilj bo ovrednotiti sposobnost vezave bakteriofagnih delcev na površino celic ter vpliv dodatka kratkih peptidov specifičnih za vezavo na transferinski receptor na protein pIII bakteriofaga. Prav tako nas bo zanimal delež internaliziranih bakteriofagov, kar bomo preverili z inkubacijo celic z bakteriofagi, spiranjem nevezanih bakteriofagov, kislo elucijo bakteriofagov, vezanih na površino, tretiranjem s tripsinom (zunajcelična razgradnja bakteriofagov), lizo celic in mikrobiološko titracijo sproščenih bakteriofagov.

Drugi cilj bo vizualizacija vezanih bakteriofagov na celicah – zanimala nas bo lokalizacija internaliziranih bakteriofagov. Iskali bomo predvsem morebitne bakteriofage, ki se bodo nahajali v jedru. Bakteriofage bomo označili s fluoroforom FITC in jih v celicah detektirali s konfokalno fluorescenčno mikroskopijo.

Tretji cilj bo preveriti delovanje ekspresijske kasete in vpliv peptidov za pobeg iz lizosoma, vezanih na protein pVIII, ter ovrednotiti dostavni sistem kot celoto.

Na podlagi postavljenih ciljev smo postavili sledeče hipoteze:

Hipoteza 1: Bakteriofagi z dodanimi peptidi, ki omogočajo specifično vezavo na tarčne receptorje, imajo boljšo vezavo na celice.

Hipoteza 2: Bakteriofagi, ki se bolje vežejo na površino celic, imajo boljšo internalizacijo.

Hipoteza 3: Bakteriofagi, ki prehajajo v celico, se večinoma nahajajo v citosolu.

Hipoteza 4: Bakteriofagi lahko v zmanjšanem obsegu prehajajo v celično jedro.

Hipoteza 5: Uspešna internalizacija in prehod bakteriofaga v jedro bo privedla do izražanja ekspresijske kasete in reporterja GFP.

Hipoteza 6: Dodatek kratkih peptidov, ki omogočajo pobeg iz lizosoma na protein pVIII, bo povečal uspešnost izražanja ekspresijske kasete.

Hipoteza 7: Konstruiran dostavni sistem na osnovi nitastih bakteriofagov bo uspešno dostavil ekspresijsko kaseto, ki se bo tudi uspešno izrazila.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1 Laboratorijska oprema

| Laboratorijska oprema | Proizvajalec |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Avtoklav | Systec 2540 EL; Bel-Art products, Pequannock, ZDA |
| Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka | LFVP 12, Iskra PIO, Slovenija |
| Centrifuge | 5804 in 5415 R Eppendorf, Nemčija mini G, IKA, Nemčija |
| Centrifugirke (15 in 50 mL) | TPP, Švica |
| Hladilnik (4 °C) | Gorenje, Slovenija |
| Inkubator | Unihood 650, Uni Equip, Nemčija |
| Magnetna mešala | Tehnica, Slovenija |
| Magnetni mešalnik | Rotamix 550 MMH, Tehnica, Slovenija |
| Mikrocentrifugirke (1,5 mL, 2 mL) (0,5 mL) | Sarstedt, Nemčija Eppendorf, Nemčija |
| Mikropipete | Eppendorf, Nemčija |
| Mikrovalovna pečica | Gorenje, Slovenija |
| Nastavki za mikropipete | Sarstedt, Nemčija |

MATERIALI IN METODE

| | |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Petrijevke | TPP, Švica |
| pH meter | Metrohm, Švica |
| Precizna tehnica | Exacta 610 EB, Tehnica, Slovenija |
| Stresalnik | MS3 digital, IKA, Works, ZDA Thermomixer Comfort 1,5 mL, Eppendorf, Nemčija |
| Vibracijski stresalnik | Vibromix 104 EV, Tehnica, Slovenija Lab dancer, IKA Works, ZDA |
| Zmrzovalnik (-20 °C) | Gorenje, Slovenija |
| Inkubator za gojenje celic | Binder CB 210, Binder, Nemčija |
| Plastenke za gojenje celic (75 cm²) | TPP, Švica |
| Invertni mikroskop | Nikon TMS |
| Fluorescenčni invertni mikroskop | EVOS FL, Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA |
| Števne komore | Thoma |
| Serološke pipete | TPP, Švica |
| Strgala | TPP, Švica |
| 12 well plošče | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA |
| 6 well plošče | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA |

3.1.2 Reagenti

| Reagenti | Proizvajalec |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Advanced DMEM | Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA |
| EDTA | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA |
| FITC | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA |
| Glicerol | Fluka Chemie, Švica |
| Gojišče LB | Invitrogen, Carlsbad, ZDA |
| H₂SO₄ | Merck, Nemčija |
| IPTG (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranotid) | Promega, Madison, ZDA |
| KCl | Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italija |
| KH₂PO₄ | Kemika, Zagreb, Hrvatska |
| L-Glutamin | Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA |
| Na₂HPO₄×2H₂O | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA |
| NaCl | Scharlau Chemie S.A., Barceloma, Španija |
| Nigrozin | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA |
| PEG-8000 | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA |
| Tetraciklin | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA |
| Tween 20 | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA |

MATERIALI IN METODE

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| X- galaktoza (5-bromo-4-kloro-3-indolil- β-D-galaktopirozid) | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|

3.1.3 Biološki material

| Gostiteljski bakterijski sevi | Proizvajalec |
|-------------------------------|--------------------------------------------------|
| E. coli ER2738 | New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA |
| E. coli TG1 | Source BioScience, Nottingham, VB |

| Proteini | Proizvajalec |
|----------------|-----------------------------------------|
| Tripsin | Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA |

| Bakteriofagni kloni | Vir |
|---------------------|---------------------------------------|
| C3-4 | Izoliral dr. Miha Vodnik |
| NL8 | Izoliral dr. Miha Vodnik |
| L4 | Izoliral dr. Miha Vodnik |
| M2 | Izoliral dr. Peter Molek |
| TUP | Izoliral dr. Miha Vodnik |
| T12 | Izoliral dr. Peter Molek |
| f88-4 | (Scott in Smith, 1990) |
| f88-4-GFP | Pripravila dr. Peter Molek in Petruša |

MATERIALI IN METODE

| | |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| | Rozman (Rozman et al., v pripravi) |
| 3TRL-2-GFP | Pripravila dr. Peter Molek in Petruša Rozman (Rozman et al., v pripravi) |
| 3TRL-2-PEN | Pripravila dr. Peter Molek in Petruša Rozman (Rozman et al., v pripravi) |
| 3TRL-2-FHV | Pripravila dr. Peter Molek in Petruša Rozman (Rozman et al., v pripravi) |

3.1.4 Pufri, raztopine, gojišča

| Pufer in sestava | Količine | Postopek |
|------------------------------------------------------|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PBS – fosfatni pufer, pH=7,4 | | Navedene količine snovi smo zatehtali in dodali 400 mL ddH ₂ O. Z magnetnim mešalom smo mešali do nastanka čiste raztopine. pH smo uravnali s pH metrom na pH=7,4. Pufer smo avtoklavirali in shranili do uporabe na sobni temperaturi. |
| NaCl | 3,2 g | |
| KCl | 0,08 g | |
| Na₂HPO₄×2H₂O | 0,722 g | |
| KH₂PO₄ | 0,096 g | |
| ddH₂O | 400 mL | |
| 0,1 % PBST | | V 50 mL PBS smo dodali 50 µL Tween 20 in z magnetnim mešalom premešali. Shranili smo do uporabe pri sobni temperaturi. |
| PBS | 50 mL | |
| Tween 20 | 50 µL | |
| PEG/NaCl | | PEG-8000 in NaCl smo stehtali in raztoplili v 40 mL ddH ₂ O. Raztopino smo avtoklavirali in |
| PEG-8000 | 8 g | |

MATERIALI IN METODE

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NaCl | 5,85 g | shranili do uporabe pri sobni temperaturi. |
| ddH₂O | do 40 mL | |
| 1 M IPTG (izopropil-β-D-tioglalaktopiranozid) | | IPTG smo stehtali in ga raztopili v 10 mL ddH ₂ O. Raztopino smo sterilizirali z membransko filtracijo in jo alikvotirali. Do uporabe smo jih shranjevali pri -20 °C. |
| IPTG | 2,383 g | |
| ddH₂O | 10 mL | |
| 2 % X-galaktoza (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopirozid) | | X-galaktozo smo stehtali in raztopili v DMF. Raztopino smo alikvotirali in do uporabe shranjevali pri -20 °C. |
| X-galaktoza | 0,2 g | |
| DMF | 10 mL | |
| Elucijski pufer | | 75 mg glicina smo zatehtali in raztopili v 50 mL ddH ₂ O. S HCl smo pH uravnali do 2,2. |
| glicin | 75 mg | |
| ddH₂O | 50 mL | |
| Nevtralizacijski pufer | | Zatehtali smo ustrezno količino Tris in raztopili v ddH ₂ O. pH raztopine smo uravnali na 9,1. Raztopino smo nato sterilizirali z membransko filtracijo in jo do uporabe shranjevali pri sobni temperaturi. |
| Tris | 2,423 g | |
| ddH₂O | 20 mL | |
| Raztopina tetraciklina | | Ustrezno zatehto tetraciklina smo raztopili v ddH ₂ O. Raztopino smo sterilizirali z membransko filtracijo. |
| tetraciklin | 1,6 g | |
| ddH₂O | 40 mL | Dodali smo sterilen glicerol. |

MATERIALI IN METODE

| | | |
|---------------------------------------------------|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| glicerol | 40 mL | Raztopino tetraciklina smo do uporabe shranjevali pri -20 °C. |
| Tekoče gojišče LB | | Zatehtali smo ustreznno količino gojišča LB in ga raztopili v ddH ₂ O. Gojišče smo avtoklavirali in do uporabe shranjevali pri sobni temperaturi. |
| gojišče LB | 8 g | |
| ddH₂O | 400 mL | |
| LB agaroza | | Zatehtali smo ustreznno količino agaroze in ji dodali gojišče LB ter MgCl ₂ . LB agarozo smo sterilizirali z avtoklaviranjem in jo do uporabe shranjevali na sobni temperaturi. |
| gojišče LB | 40 mL | |
| 1M MgCl₂ | 197 µL | |
| agarosa | 0,28 g | |
| Diferencialno agarno gojišče LB/IPTG/X-gal | | Zatehtali smo ustreznno količino predpripravljenega gojišča LB agar in dodali 400 mL ddH ₂ O. Raztopino smo avtoklavirali in ko se je še tekoče gojišče ohladilo na približno 50 °C smo dodali IPTG in X-galaktozo. Gojišče smo v komori z laminarnim pretokom zraka prelili v petrijevke. Strjene petrijevke z gojišči smo do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C. |
| gojišče LB agar | 14 g | |
| ddH₂O | 400 mL | |
| 1 M IPTG | 800 µL | |
| 2% X-galaktoza | 84 µL | |
| Gojišče za celice HaCaT in HEK293 | | S serološko pipeto smo aseptično odmerili ustrezne količine sestavin in jih pripravili v sterilnem |
| Advanced DMEM | 98 mL | |

MATERIALI IN METODE

| | | |
|----------------------------------------------|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FBS | 10 mL | vsebniku. Do uporabe smo gojišče hranili v hladilniku pri 4 °C, pred uporabo pa smo segreli na 37 °C. |
| L-Gln | 1 mL | |
| Raztopina penicilina in streptamicina | 1 mL | |
| PBS/0,02% EDTA | | PBS smo dodali ustrezno količino 0,5 % EDTA, premešali in do uporabe shranili v hladilniku na 4 °C. |
| PBS | 100 mL | |
| 0,5 % EDTA | 40 µL | |
| Brezserumsko gojišče | | S serološko pipeto smo aseptično odmerili ustrezne količine sestavin in jih pripravili v sterilnem vsebniku. Do uporabe smo gojišče hranili v hladilniku pri 4 °C, pred uporabo pa smo segreli na 37 °C. |
| Advanced DMEM | 98 mL | |
| L-Gln | 1 mL | |
| Raztopina penicilina in streptamicina | 1 mL | |

3.2. METODE

3.2.1 Priprava prekonočne kulture bakterij *E. coli* ER2738

V sterilni vsebnik smo odmerili 4 mL gojišča LB in dodali raztopino antibiotika tetraciklina do končne koncentracije 20µg/mL. V tako pripravljeni gojišči smo z bakteriološko ezo prenesli eno kolonijo bakterij *E. coli* ER2738. Pripravljeni kulturovi bakterij smo inkubirali čez noč pri 37 °C in intenzivnem mešanju.

3.2.2 Pomnoževanje bakteriofagov TUP, T12, NL8, C3-4, M2 in L4

1. V 250 ml erlenmajerico z utori smo dodali ustrezno količino gojišča LB, založno raztopino tetraciklina do končne koncentracije 20µg/mL in ustrezni volumen prekonočne kulture (OD₆₀₀≈0,01).
2. Bakterijsko kulturo smo stresali 15 minut pri 37 °C oz. do ustrezne motnosti.

MATERIALI IN METODE

3. V erlenmajerico smo dodali 1 µL založne suspenzije bakteriofagov, shranjene v 50 % glicerolu.
4. Kulturo smo inkubirali na stresalniku 4,5 ure pri 37 °C.
5. Suspenzijo smo prenesli v 10- ali 50-mL centrifugirko in centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 11000 obr./minuto.
6. Supernatant smo odlili v svežo centrifugirko ter ponovno centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 11000 obr./minuto.
7. Supernatant smo ponovno odlili v svežo centrifugirko, odmerili 1 mL v 1,5-mL mikrocentrifugirko (za izolacijo bakteriofagne DNA), v obe dodali 1/5 volumna PEG/NaCl in preko noči pustili v hladilniku pri 4 °C.
8. Naslednji dan smo suspenzijo centrifugirali 15 minut pri 4 °C in 11000 obr./minuto.
9. Supernatant smo odlili.
10. Po potrebi smo ponovno na kratko centrifugirali ter s pipeto odstranili vse ostanke supernatanta.
11. Oborino smo suspendirali v 1 mL PBS, inkubirali najmanj 10 minut pri 37 °C in prenesli v 1,5-mL mikrocentrifugirko.
12. Dodali smo 1/5 volumna PEG/NaCl in inkubirali 1 uro na ledu.
13. Suspenzijo smo centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 13200 obr./minuto. Supernatant smo odstranili z mikropipeto.
14. Oborino smo suspendirali v 100 µL PBS, inkubirali najmanj 10 minut pri 37 °C in centrifugirali 2 minuti pri 13200 obr./minuto in sobni temperaturi, da smo odstranili ostanke netopnih snovi.
15. Supernatant smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko. Tako smo dobili pomnožene bakteriofage, ki smo jih do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C ali pa v zamrzovalniku pri -20 °C.

3.2.3 Izolacija enoverižne bakteriofagne DNA

1. Oborjene bakteriofage (iz poglavja 3.2.2, točke 6) smo centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 13200 obr./minuto na mikrocentrifugi. Supernatant smo popolnoma odstranili z mikropipeto.
2. Usedljivo smo suspendirali v 100 µL Tris pufra z jodidnimi ioni s pomočjo vibracijskega mešalnika.
3. Dodali smo 250 µL absolutnega alkohola in inkubirali 20 minut pri sobni temperaturi.

4. Centrifugirali smo mikrocentrifugirke 10 minut pri 4 °C pri 13200 obr./minuto na mikrocentrifugi. Supernatant smo popolnoma odstranili z mikropipeto – v usedlini je ostala bakteriofagna DNA.
5. Oborjeno bakteriofagno enoverižno DNA smo sprali s 500 µL ledeno hladnega 70 % etanola.
6. Centrifugirali smo 10 minut pri 4 °C pri 13200 obr./min in supernatant popolnoma odstranili.
7. Oborjeno DNA smo posušili v laminarju 30 minut pri sobni temperaturi.
8. Raztopili smo bakteriofagno DNA v 20 µL vode brez nukleaz.
9. Spektrofotometrično smo ocenili koncentracijo DNA (protokol 3.2.8).

3.2.4 Priprava vzorcev za sekvenciranje

1. Zmešali smo 5 µL izolirane bakteriofagne DNA (protokol 3.2.3), dodali 5 µL ustreznega začetnega nukleotida (koncentracije 5 µM), označili mikrocentrifugirko z ustrezno črtno kodo in poslali na sekvenciranje (GATC Biotech, Konstanz, Nemčija).

3.2.5 Priprava založne raztopine fagov

1. Vzeli smo 50 µL suspenzije bakteriofaga, pripravljene po postopku 3.2.2 ali 3.2.3.
2. Dodali smo 50 µL sterilnega glicerola. Dobro smo jih premešali in shranili pri -20 °C.

3.2.6 Mikrobiološka titracija

1. Pripravili smo prekonočno kulturo *E. coli* ER2738 (glej prokolol 3.2.1).
2. Pripravili smo 100 µL ustrezne desetiške redčitve vzorca v PBS za:
 - a. pomnožene bakteriogafe (protokol 3.2.2, 3.2.9 in 3.2.15) - od 10^{-8} do 10^{-10} ,
 - b. označene bakteriofage (protokol 3.2.10) - od 10^{-8} do 10^{-9} ,
 - c. bakteriofage po inkubaciji s celicami (protokol 3.2.7) – za površinsko vezane bakteriofage od 10^{-1} do 10^{-3} , za internalizirane bakteriofage do 10^{-1} do 10^{-2} .
3. LB agarozo smo raztalili v mikrovalovni pečici.
4. Raztopljeno LB agarozo smo aseptično alikvotirali po 3 mL v 15-mL centrifugirke ter jih do uporabe hranili v termobloku pri temperaturi 55 °C.
5. Petrijevke LB-agarja z že dodanim X-gal/IPTG smo za najmanj eno uro prestavili v inkubator pri 37 °C.
6. V centrifugirko z LB agarozo smo dodali 10 µL ustrezne redčitve, 100 µL prekonočne bakterijske kulture, hitro premešali na vibracijskem mešalniku, takoj razlili po petrijevkah LB-agarja, s krožnimi gibi razlili LB agarozo po celotni površini in počakali, da se je gojišče strdilo.

7. Plošče smo inkubirali pri 37 °C preko noči in naslednji dan prešteli plake. Titri infektivnih bakteriofagov so bili izračunani s pomočjo sledeče enačbe: titer bakteriofagov = nR/V , kjer je n število modrih plakov na plošči, R faktor redčitve in V volumen redčitve, s katerim smo okužili bakterije ($10 \mu\text{L}$).

3.2.7 Vezava bakteriofagov na celice in internalizacija

1. Celicam smo v gojitveni posodici s serološko pipeto odstranili gojišče in jih sprali s PBS/0,02% EDTA, segretim na 37 °C. Ponovno smo s serološko pipeto odstranili PBS/EDTA, dodali PBS in tripsin v končni koncentraciji 0,25 %. Rahlo smo premešali s krožnimi gibi ter inkubirali 20 minut v inkubatorju pri 37 °C in 5 % atmosferi CO₂.
2. Po končani inkubaciji smo s serološko pipeto vsebino gojitvene posodice sprali in prestavili v 15-mL sterilno centrifugirko. Gojitveno posodico smo sprali s serumskim gojiščem, vsebino dodali celicam v centrifugirki, odvzeli 50 μL celične suspenzije za štetje in centrifugirali 5 minut pri 2000 obr./minuto in sobni temperaturi.
3. 50 μL celične suspenzije smo dodali 50 μL barvila nigrozin in ocenili koncentracijo celic s štetjem.
4. Po končanem centrifugiranju smo supernatant odpipetirali in celicam dodali ustrezno količino serumskega gojišča do končne koncentracije celic $2,5 \times 10^5/\text{mL}$.
5. V mikrotitrsko ploščo s 6 vdolbinicami smo v 2 mL gojišča s serumom nacepili 5×10^5 celic HaCaT, katere smo pred tem pustili v stojalu 5 minut, da so se posedli večji skupki, kasneje smo celice zajemali samo v zgornjem delu. Celice smo gojili preko noči v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂.
6. Naslednji dan smo gojišče odstranili, celice sprali z 2 mL brezserumskega gojišča, ga odstranili ter v vsako vdolbinico dodali 2 mL brezserumskega gojišča in 8 μL založne raztopine klorokina. Celice smo inkubirali v inkubatorju 30 minut pri 37 °C in 5 % CO₂.
7. Dodali smo 1×10^{10} pfu ustreznegata bakteriofaga v vsako vdolbinico. Inkubirali smo eno uro v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂.
8. Po inkubaciji smo odstranili gojišče ter celice trikrat sprali s PBS. V vsako vdolbinico smo nato dodali 1 mL elucijskega pufra ter inkubirali 10 minut na sobni temperaturi.
9. Po inkubaciji smo elucijski pufer odpipetirali v mikrocentrifugirke in dodali 200 μL nevtralizacijskega pufra. Dobljeni suspenziji bakteriofagov smo določili titer s pomočjo mikrobiološke titracije (postopek 3.2.6).
10. Za izolacijo internaliziranih bakteriofagov smo celicam dodali PBS in tripsin v končni koncentraciji 0,25 %. ter inkubirali 20 minut pri 37 °C.

11. Po končani tripsinizaciji smo suspenzijo celic odpipetirali v mikrocentrifugirke, centrifugirali 5 minut pri 13200 obratih in 4 °C, previdno odpipetirali supernatant, celice resuspendirali v PBS in zamrznili pri -20 °C za eno uro.
12. Celice smo odmrznili ter suspenziji določili titer internaliziranih bakteriofagov s pomočjo mikrobiološke titracije (postopek 3.2.6).

3.2.8 Spektrofotometrično določanje koncentracije analitov

1. Merilno površino NanoDropa smo ustrezno očistili z milli Q vodo.
2. Zagnali smo program in izbrali ustrezni način merjenja glede na vzorec. Za merjenje DNA smo izbrali program Nucleic acid ter ustrezni tip DNA (eno- ali dvoverižna DNA), za merjenje absorbance ob določeni valovni dolžini pa smo izbrali program UV-VIS Spectroscopy ter določili valovno dolžino meritve.
3. Ob zagonu programa smo kalibrirali NanoDrop z merjenjem 1,5 µL milli Q vode.
4. Po končani kalibraciji smo očistili merilno površino ter NanoDrop pripravili na umerjanje s topilom, v katerem je pripravljen vzorec. Na NanoDrop smo nanesli 2 µL topila ter pritisnili Blank.
5. Po končanem umerjanju smo s papirnato brisačko očistili merilno površino in nanesli 1,5-2 µL vzorca, po potrebi vnesli parametre meritve in pritisnili Measure. Po končani meritvi smo zabeležili rezultat.
6. Po vseh opravljenih meritvah smo ponovili točko 1.

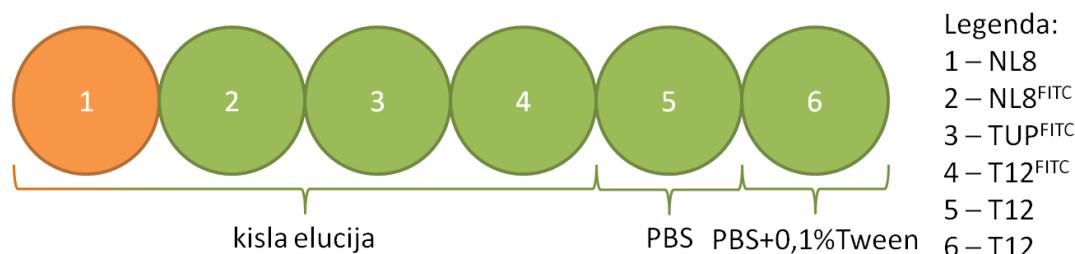
3.2.9 Pomnoževanje bakteriofagov 3TRL-2-GFP, 3TRL-2-PEN, 3TRL-2-FHV, f88-4-GFP in f88-4 Smith

1. V 250 ml erlenmajerico z utori smo dodali ustrezno količino gojišča 2xYT in ustrezni volumen prekonočne kulture TG1 ($OD_{600} \approx 0,01$).
2. Bakterijsko kulturo smo stresali 15 minut pri 37 °C oz. do ustrezne motnosti.
3. V erlenmajerico smo dodali 1 µL založne suspenzije bakteriofagov.
4. Dodali smo tetraciklin do končne koncentracije 0,2 µg/mL in stresali na stresalniku 30 minut pri 37 °C.
5. Dodali smo tetraciklin do končne koncentracije 20 µg/mL. Pri pomnoževanju bakteriofagov 3TRL-2-PEN in 3TRL-2-FHV smo dodali še IPTG do končne koncentracije 1 mM.
6. Kulturo smo inkubirali na stresalniku preko noči pri 37 °C.
7. Bakteriofage smo nadalje izolirali po postopku 3.2.2 od točke 5 do vključno točke 15.

3.2.10 Označevanje bakteriofagov s FITC

1. Bakteriofage TUP, T12 in NL8, pripravljene po postopku 3.2.2 do vključno točke 13 smo raztopili v 100 µL sveže pripravljenega karbonatnega pufra, jih inkubirali 10 minut pri 37 °C in centrifugirali 2 minuti pri 13200 obr./minuto in sobni temperaturi. Supernatant smo prestavili v nove mikrocentrifugirke.
2. Mikrocentrifugirke smo ovili v alu-folijo, v kateri so bile do konca poskusa. Mikrocentrifugirke smo postavili na mešalni termoblok, kjer smo jim med mešanjem petkrat v 10 minutnem intervalu dodajali po 5,69 µL FITC. Reakcija je potekala preko noči v hladilniku pri 4 °C.
3. Naslednji dan smo bakteriofage oborili z dodatkom 25 µL PEG/NaCl in 30 minutno inkubacijo na ledu. Oborjene bakteriofage smo centrifugirali 10 minut pri 13200 obr./minuto in 4 °C.
4. Supernatant smo previdno odstranili z mikropipeto, suspendirali bakteriofage v 90 µL PBS in dodali 20 µL PEG/NaCl. Suspenzijo smo premešali z obračanjem mikrocentrifugirke in jo inkubirali 30 minut na ledu.
5. Centrifugirali smo oborjene bakteriofage 10 minut pri 13200 obr./minuto in 4 °C, previdno odstranili supernatant ter označene bakteriofage suspendirali v 100 µL PBS. Tako pripravljene bakteriofage smo titrirali s pomočjo mikrobiološke titracije (postopek 3.2.6).

3.2.11 Fluorescenčna mikroskopija



Slika 5: Razpored vdolbinic za pripravo vzorcev za fluorescenčno mikroskopijo.

1. Celice smo pripravili po postopku 3.2.7, od točke 1 do vključno točke 3.
2. Po končanem centrifugiranju smo supernatant odpipetirali in celicam dodali ustrezno količino serumskega gojišča do končne koncentracije 5×10^5 /mL.
3. V mikrotitrsko ploščo s 24 vdolbinicami in sterilnimi krovnimi stekelci smo v 1 mL gojišča s serumom nacepili 5×10^5 celic HaCaT, katere smo pred tem pustili v stojalu 5 minut, da so se

MATERIALI IN METODE

- posedli večji skupki, kasneje smo zajemali celice samo v zgornjem delu. Celice smo gojili preko noči v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂.
4. Naslednji dan smo gojišče odstranili, celice sprali z 0,5 mL brezserumskega gojišča, ga odstranili ter v vsako vdolbinico dodali 0,5 mL brezserumskega gojišča in klorokin do končne koncentracije 0,1 µmol/mL. Celice smo inkubirali 30 minut pri 37 °C.
 5. V vsako vdolbinico smo dodali $4,6 \times 10^{10}$ bakteriofagov v skladu s sliko 5 in inkubirali 1 uro pri 37 °C. Označeni bakteriofagi so bili pripravljeni po postopku 3.2.10, neoznačen NL8 pa po postopku 3.2.2.
 6. Celice smo prestavili na led, sledila so različna spiranja:
 - a. vdolbinice 1, 2, 3 in 4:
 - Odstranili smo gojišče in celice dvakrat sprali z 0,5 mL hladnega PBS.
 - Dodali smo 0,5 mL pufra za kislo elucijo in inkubirali 10 minut.
 - Dvakrat smo sprali z 0,5 mL PBS.
 - b. vdolbinica 5:
 - Odstranili smo gojišče in celice dvakrat sprali z 0,5 mL hladnega PBS.
 - c. vdolbinica 6:
 - Odstranili smo gojišče in celice dvakrat sprali z 0,5 mL hladnega PBS z 0,1 % Tween-a.
 7. V vdolbinice smo dodali 0,5 mL 5 % formalina v PBS in inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi.
 8. Celice smo po fiksaciji enkrat sprali z 0,5 mL PBS z 1 % BSA in nato še z 0,5 mL PBS. Dodali smo 0,5 mL PBS z 0,5 % Tween-a in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi; nato smo trikrat sprali z 0,5 mL PBS.
 9. V vsako vdolbinico smo dodali 250 µL 300 nM DAPI v PBS s 3 % BSA in inkubirali 1,5 ure pri sobni temperaturi v temi.
 10. Sprali smo trikrat z 0,5 mL PBS.
 11. Krovna stekelca smo prestavili na filter papir (z navzgor obrnjenimi celicami) in jih sušili pol ure na sobni temperaturi v temi.
 12. Antifade smo nanesli na objektna stekelca ter nanje položili krovna stekelca s celicami, pomočenimi v antifade. Tako pripravljene preparate smo shranili v hladilniku preko noči in jih naslednji dan premazali z lakom za nohte. Tako pripravljeni vzorci so bili pripravljeni za opazovanje na konfokalnem fluorescenčnem mikroskopu.
 13. Po slikanju s fluorescenčnim mikroskopom so bile slike naknadno obdelane s programom ZEN.

3.2.12 Izolacija dvojerižne DNA 3TRL-2-GFP iz transformiranih bakterij s kompletom GenElute HP Miniprep

1. Pripravili smo 20 mL prekonočne kulture bakterij TG1, okuženih z bakteriofagom 3TRL-2-GFP in jo centrifugirali 10 minut pri 11000 obr./minuto in 4 °C. Supernatant smo odlili in zamrznili sediment za 10 minut na -80 °C.
2. Sediment smo suspendirali v 400 µL suspendirnega pufra z dodano RNazo A in prestavili v 1,5 mL epice.
3. Dodali smo 400 µL lizirnega pufra, rahlo premešali z obračanjem mikrocentrifugirke ter inkubirali manj kot 5 minut. Nato smo dodali 400 µL nevtralizacijskega pufra. Vse skupaj smo centrifugirali 10 minut pri 13200 obr./minuto pri sobni temperaturi v mikrocentrifugi. Po centrifugiranju smo bistro raztopino prenesli v novo mikrocentrifugirko.
4. Separacijske kolone smo pripravili tako, da smo na kolone nanesli 500 µL raztopine za pripravo kolon ter kolone centrifugirali 1 minuto pri 13200 obr./minuto in sobni temperaturi.
5. Na separacijsko kolono smo nanesli 700 µL vzorca ter centrifugirali 30 sekund pri 13200 obr./minuto in sobni temperaturi. Izpirek smo ponovno nanesli na separacijsko kolono in ponovno centrifugirali pod enakimi pogoji. Po drugem nanosu na separacijsko kolono smo izpirek zavrgli.
6. Na separacijsko kolono smo nanesli preostanek vzorca in ponovili postopke, opisane v točki 5.
7. Na separacijsko kolono smo nanesli 500 µL pufra za spiranje, centrifugirali 30 sekund pri 13200 obr./minuto in sobni temperaturi. Izpirek smo zavrgli.
8. Ponovili smo točko 7.
9. Separacijske kolone smo prazne centrifugirali 30 sekund pri 13200 obr./minuto in sobni temperaturi. Po končanem centrifugiranju smo zamenjali mikrocentrifugirke.
10. Na sredino separacijske kolone smo dodali 40 µL elucijskega pufra, ogretega na 50 °C. Centrifugirali smo 30 sekund pri 13200 obr./minuto in sobni temperaturi. Spektrofotometrično smo ocenili koncentracijo DNA v eluatu po postopku 3.2.8 in ga shranili do nadaljnje uporabe na -20 °C.

3.2.13 Izolacija enoverižne DNA 3-TRL-2-GFP

1. Pripravili smo 20 mL kulture bakteriofagov 3TRL-2-GFP po postopku 3.2.9 do vključno 8. točke.
2. Supernatant smo ponovno odlili v sveže centrifugirke, dodali 4 mL PEG/NaCl in inkubirali 2 uri na ledu.

MATERIALI IN METODE

3. Suspenzijo smo centrifugirali 20 minut pri 11000 obr./minuto in 4 °C v centrifugi. Po centrifugiranju smo supernatant odlili in nastalo usedlino suspendirali v 1 mL PBS ter inkubirali v inkubatorju pri 37 °C 10 minut.
4. Suspendirane bakteriofage smo prestavili v svežo 1,5 mL mikrocentrifugirko, centrifugirali 2 minuti pri 13200 obr./minuto in sobni temperaturi v mikrocentrifugi. Supernatant smo prestavili v novo 1,5 mL mikrocentrifugirko in dodali 150 µL PEG/NaCl. Zmes smo inkubirali 30 minut na ledu z občasnim mešanjem z obračanjem epice.
5. Suspenzijo smo centrifugirali 15 minut pri 13200 obr./minuto in 4 °C, z mikropipeto smo odstranili ves supernatant.
6. Dobljeno usedlino smo suspendirali v 300 µL Tris pufra z jodidnimi ioni in dodali 750 µL absolutnega etanola ter inkubirali 20 minut na sobni temperaturi.
7. Suspenzijo smo centrifugirali 10 minut pri 13200 obr./minuto in 4 °C. Supernatant smo previdno odstranili, sprali s 70 % ledeno hladnim etanolom, ponovno centrifugirali 10 minut pri 13200 obr./minuto in 4 °C ter odstranili ves supernatant.
8. Usedlino smo raztopili v 30 µL vode brez nukleaz, dodali 3 µL acetatnega pufra in 86 µL absolutnega etanola in vse skupaj nežno zmešali z obračanjem epice. Sledila je enourna inkubacija pri -20 °C.
9. Centrifugirali smo 15 minut pri 13200 obr./minuto in 4 °C, odstranili ves supernatant z mikropipeto in usedlino posušili v laminarju. Suho usedlino smo raztopili v 20 µL vode brez nukleaz.

3.2.14 Priprava lipofektamina

1. Za pet vdolbinic na plošči s 24 vdolbinicami smo pripravili 130 µL DMEM in 7,8 µL lipofektamina, ju rahlo premešali z mikropipeto ter inkubirali 5 minut pri sobni temperaturi.
2. Ustrezno količino DNA smo redčili v DMEM. Pri poizkusih z eno- ali dvoverižno DNA smo upoštevali primerljivo molarno in ne masno koncentracijo.
3. DNA smo pomešali z lipofektaminom in inkubirali 20 minut na sobni temperaturi. Tako pripravljen lipofektamin z DNA smo uporabili za transfekcijo sesalskih celic.

3.2.15 Izolacija bakteriofagov f88-4 GFP, 3TRL-2-GFP, 3TRL-2-PEN, 3TRL-2-FHV in f88-4 Smith za dostavo ekspresijskih kaset v celicah HaCaT in HEK

1. Pripravili smo 80 mL kulture bakteriofagov po postopku 3.2.9 do vključno točke 6 in po postopku 3.2.2 od točke 5 do točke 7.

2. Oborjene bakteriofage smo centrifugirali 20 minut pri 11000 obr./minuto in 4 °C in odstranili ves supernatant. Usedlino smo suspendirali v 0,5 mL PBS in inkubirali 10 minut v inkubatorju pri 37 °C. Suspendirane bakteriofage smo centrifugirali 4 minute pri 13200 obr./minuto in 4 °C ter supernatant prestavili v nove mikrocentrifugirke. Dodali smo 200 µL PEG/NaCl in inkubirali 45 minut na ledu.
3. Oborjene bakteriofage smo centrifugirali 10 minut pri 13200 obr./minuto in 4 °C, odstranili supernatant ter usedlino resuspendirali v 200 µL PBS (z izjemo f88-4 Smith, ki je bil zaradi visoke viskoznosti raztopljen v 400 µL PBS) in inkubirali 10 minut v inkubatorju pri 37 °C. Sledilo je 15-minutno centrifugiranje pri 13200 obr./minuto in supernatant smo prestavili v novo epico.
4. Dodali smo 20 µL 10 % TritonX-114, inkubirali 30 minut na ledu ter na vsakih 5 minut epice na kratko mešali na vibracijskem mešalniku. Sledila je inkubacija 10 minut pri 37 °C in centrifugiranje 10 minut pri 13200 obr./minuto. Po centrifugiranju smo vodno fazo prenesli v novo mikrocentrifugirko.
5. Ponovili smo točko 4, po ponovni prestavitvi vodne faze v nove mikrocentrifugirke smo suspendiranim bakteriofagom spektrofotometrično ocenili titer in jih do nadaljnje uporabe shranili pri 4 °C.

3.2.16 Dostava ekspresijske kasete GFP v celice HaCaT

1. Pripravili smo celice po postopku 3.2.9 do vključno 2. točke., z izjemo končne koncentracije celic $1,8 \times 10^4$ /mL.
2. V mikrotitrsko ploščo s 24 vdolbinicami smo v 0,5 mL gojišča s serumom nacepili 9000 celic HaCaT, katere smo pred tem pustili v stojalu 5 minut, da so se večji skupki posedli, kasneje smo celice zajemali samo v zgornjem delu. Celice smo gojili preko noči v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂.
3. Glede na nadaljnji postopek so bile celice različno tretirane:
 - a. Dostava ekspresijske kasete z bakteriofagi:
 - Pripravili smo 4,5 mL gojišča za vsak bakteriofag (f88-4 GFP, 3-TRL-2-GFP, 3-TRL-2-PEN, 3-TRL-2-FHV in f88-4 Smith) posebej s koncentracijo 1×10^{11} fagov/mL (uporabljeno tudi v postopku 3.2.17).
 - Odstranili smo staro gojišče in dodali po 0,5 mL novega gojišča z bakteriofagi v ustrezne vdolbinice.
 - b. Dostava ekspresijske kasete z lipofektinom:

- Pripravili smo lipofektamin (protokol 3.2.14) in nanesli enako molarnost (590 ng) dvooverižne DNA 3-TRL-2-GFP ali (259 ng) enoverižne DNA 3TRL-2-GFP na vdolbinico.
 - Celice smo sprali s 400 µL DMEM in vsega odstranili.
 - Dodali smo 450 µL segretega DMEM na vdolbinico in dodali 50 µL lipofektamina z DNA.
 - Po 6-ih urah v inkubatorju na 37 °C in 5 % CO₂ smo gojišče odstranili in ga nadomestili s 500 µL serumskega gojišča z antibiotiki.
4. Tako pripravljene celice smo gojili v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂ in jih opazovali pod inverznim fluorescenčnim mikroskopom 48 in 72 ur po infekciji.

3.2.17 Dostava ekspresijske kasete GFP v celice HEK293

1. Pripravili smo vzorce po postopku 3.2.16; uporabili smo celice HEK293 v končni koncentraciji $7,2 \times 10^3/\text{mL}$.

3.2.18 Merjenje uspešnosti transfekcije celic HEK293 s pretočno citometrijo

1. Pripravili smo celice HEK293 po postopku 3.2.16, do vključno 4. točke.
2. V dve mikrotitrski plošči z 12 vdolbinicami smo v 1 mL gojišča s serumom nacepili 18000 celic HEK293 na vdolbinico, katere smo pred tem pustili v stojalu 5 minut, da so se posedli večji skupki, kasneje smo celice zajemali samo v zgornjem delu. Celice smo gojili preko noči v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂.
3. Celice smo tretirali po postopku 3.2.16, točka 3.
4. Tako pripravljene celice smo gojili v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂ 72 ur.
5. Pripravili smo 13 mL PBS/EDTA, kateremu smo dodali tripsin v končni koncentraciji 0,25 %.
6. Iz vseh vdolbinic smo odstranili gojišče, dodali 500 µL PBS/EDTA s tripsinom ter celice inkubirali 7,5 minut pri 37 °C in 5 % CO₂.
7. V vsako vdolbinico smo dodali 500 µL serumskega gojišča. Vsebino vdolbinic smo prenesli v epruvetke za pretočno citometrijo. Epruvetke smo centrifugirali 4 minute pri 2000 obr./minuto in sobni temperaturi.
8. Supernatant smo odlili, dodali 500 µL PBS in kratko mešali na vibrirajočem mešalniku. V vsako epruveto smo dodali 6 µL propodijevega jodida in nežno premešali.
9. Tik pred meritvijo smo celice še dodatno redčili s 300 µL PBS.
10. Po končani meritvi smo rezultate obdelali s programom FlowJo.

4. REZULTATI

4.1. PRIMERJAVA SPOSOBNOSTI VEZAVE BAKTERIOFAGOV C3-4, TUP IN T12 NA CELICE HaCaT

Z namenom ovrednotenja vezave bakteriofagov TUP in T12, ki imata na proteinu pIII predstavljene kratke peptide, ki so specifični za vezavo na transferinski receptor (Rozman et al., v pripravi), smo celice HaCaT tretirali z omenjenima bakteriofagoma, celice spirali ter s kislo elucijo eluirali na površino vezane bakteriofage, katerih titri smo določili z mikrobiološko titracijo. Kot negativno kontrolo smo uporabili bakteriofag C3-4, ki prestavlja izvorni bakteriofag bakteriofagoma TUP in T12 in nima na proteinu pIII predstavljenega dodatnega peptida. Rezultati eksperimenta so prikazani v **tabeli 1**.

Tabela 1: Rezultati mikrobiološke titracije bakteriofagov C3-4, TUP in T12, vezanih na celice HaCaT. Bakteriofagi, ki so se eluirali, predstavljajo titer bakteriofagov, ki se je vezal na površino celic.

- a) Prikazani so neobdelani podatki titracij površinsko vezanih bakteriofagov, eluiranih s kislo elucijo.
- b) Prikazani so obdelani podatki titracij površinsko vezanih bakteriofagov, eluiranih s kislo elucijo. Pod titri so v odebelenem besedilu izračunani povprečni titri (pri izračunu povprečnega titra smo upoštevali samo števne podatke).

| a) | redčitve | C3-4 | TUP | T12 |
|----|-----------|-----------------|-----------------|------------------|
| | 10^{-1} | 90% konfluencia | 95% konfluencia | 100% konfluencia |
| | 10^{-2} | 875 | 1163 | 90% konfluencia |
| | 10^{-3} | 153 | 237 | 633 |

Titri

| b) | redčitve | C3-4 | TUP | T12 |
|----|------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | 10^{-1} | 90% konfluencia | 95% konfluencia | 100% konfluencia |
| | 10^{-2} | $6,6 \times 10^6$ | $8,7 \times 10^6$ | 90% konfluencia |
| | 10^{-3} | $1,2 \times 10^7$ | $1,7 \times 10^7$ | $4,8 \times 10^7$ |
| | povprečje | $9,0 \times 10^6$ | $1,3 \times 10^7$ | $4,8 \times 10^7$ |

Med testiranimi bakteriofagi se je v skladu s pričakovanji najslabše vezal bakteriofag C3-4; sledi mu TUP ter T12, ki je imel najboljšo vezavo. Primerjava redčitve 10^{-1} je mogoča

REZULTATI

samo opisno, saj je štetje plakov na agarskih ploščah s tako velikim številom plakov nemogoče zaradi težavnega razločevanja posameznih plakov, ker se le-ti velikokrat delno prekrivajo; enako velja tudi za redčitev 10^{-2} . Znotraj optimalnega merilnega območja za mikrobiološko titracijo se nahajajo redčitve 10^{-3} , ki predstavljajo najbolj verodostojne rezultate za primerjavo bakteriofagov med seboj. Vezava bakteriofaga C3-4 na celice HaCaT predstavlja ozadje (nespecifično vezavo). Oba bakteriofaga TUP in T12 sta se bolje vezala od bakteriofaga C3-4 – TUP za 55 %, T12 pa kar za 313 % bolje. Ker so bakteriofagi med seboj identični, z izjemo kratkega peptida na proteinu pIII, ki ga izražata TUP in T12, lahko večjo sposobnost vezave pripišemo ravno temu kratkemu peptidu.

Dokazali smo, da predstavitev kratkega peptida na proteinu pIII poveča sposobnost bakteriofaga za vezavo na površino celice. Prav tako smo dokazali sposobnost bakteriofagov TUP in T12 za specifično vezavo na površino celic HaCaT, ki je za 55 % in 313 % večja od nespecifične vezave. S tem eksperimentom smo preverjali dve hipotezi:

Hipoteza 1: Bakteriofagi z dodanimi peptidi, ki omogočajo specifično vezavo na tarčne receptorje, imajo boljšo vezavo na celice.

S poskusom primerjave sposobnosti vezave bakteriofagov C3-4, TUP in T12 na celicah HaCaT smo potrdili hipotezo 1.

4.2. IZBOR BAKTERIOFAGA ZA NEGATIVNO KONTROLO Z VEZAVO BAKTERIOFAGOV NA CELICE

Ker nas je zanimal vpliv dodatka kratkih peptidov na bakteriofagna proteina pIII in pVIII na sposobnost bakteriofaga do vezave in internalizacije, smo morali najprej določiti ustrezno negativno kontrolo. Kot kandidate za kontrole v naslednjih poskusih smo izbrali bakteriofage C3-4, NL8, M2 in L4. Celice HaCaT smo izpostavili bakteriofagom. Po inkubaciji bakteriofagov s celicami smo celice sprali, preostale vezane bakteriofage eluirali s kislo elucijo, določili titer bakteriofagov v eluatu, celice tretirali s tripsinom, jih lizirali in v lizatu s pomočjo mikrobiološke titracije določili titer bakteriofagov. Celice smo spirali z namenom znižanja ozadja z odstranitvijo nevezanih in slabo vezanih bakteriofagov, medtem ko je bil namen kisle elucije odstranitev vseh površinsko vezanih bakteriofagov zaradi spremembe konformacije proteinov v nizkem pH pufra za kislo elucijo. Ker pa kisla

REZULTATI

elucija ne odstrani vseh površinsko vezanih bakteriofagov, smo celice še dodatno tretirali s tripsinom, s čimer smo poleg inaktivacije površinsko vezanih bakteriofagov celice HaCaT tudi odstranili s površine vdolbinic v mikrotitrski plošči. Rezultati so prikazani v **tabeli 2**.

Tabela 2: Rezultati mikrobiološke titracije bakteriofagov, vezanih na celice HaCaT. Bakteriofagi, ki so se eluirali, predstavljajo titer bakteriofagov, ki se je vezal na površino celic, medtem ko bakteriofagi, prešteti po lizi celic, predstavljajo internalizirane bakteriofage. Ker smo iskali najboljši bakteriofag za negativno kontrolo, smo izbrali bakteriofag z najnižjim titrom po eluciji in lizi.

- a) Prikazani so neobdelani podatki titracij; v modrih poljih so prikazani rezultati površinsko vezanih bakteriofagov, eluiranih s kislo elucijo, v zelenih pa internalizirani bakteriofagi.
- b) Prikazani so obdelani podatki titracij; v modrih poljih so prikazani titri površinsko vezanih bakteriofagov, eluiranih s kislo elucijo, v zelenih pa internalizirani bakteriofagi. Pod titri so v odbeljenem besedilu izračunani povprečni titri.

| a) | | M2 | C3-4 | NL8 | L4 |
|------|-----------|------|------|-----|-----|
| | 10^{-1} | 435 | 559 | 339 | 551 |
| | 10^{-2} | 66 | 41 | 25 | 39 |
| | 10^{-3} | 7 | 3 | 5 | 2 |
| liza | M2 | C3-4 | NL8 | L4 | |
| | 10^{-1} | 125 | 167 | 41 | 46 |
| | 10^{-2} | 16 | 14 | 5 | 4 |

| b) | | M2 | C3-4 | NL8 | L4 |
|-----------|-----------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| | 10^{-1} | $4,4 \times 10^{-5}$ | $5,6 \times 10^{-5}$ | $3,4 \times 10^{-5}$ | $5,5 \times 10^{-5}$ |
| | 10^{-2} | $6,6 \times 10^{-5}$ | $4,1 \times 10^{-5}$ | $2,5 \times 10^{-5}$ | $3,9 \times 10^{-5}$ |
| | 10^{-3} | $7,0 \times 10^{-5}$ | $3,0 \times 10^{-5}$ | $5,0 \times 10^{-5}$ | $2,0 \times 10^{-5}$ |
| povprečje | | $6,0 \times 10^{-5}$ | $4,2 \times 10^{-5}$ | $3,6 \times 10^{-5}$ | $3,8 \times 10^{-5}$ |
| liza | M2 | C3-4 | NL8 | L4 | |
| | 10^{-1} | $1,3 \times 10^{-5}$ | $1,7 \times 10^{-5}$ | $4,1 \times 10^{-4}$ | $4,6 \times 10^{-4}$ |
| | 10^{-2} | $1,6 \times 10^{-5}$ | $1,4 \times 10^{-5}$ | $5,0 \times 10^{-4}$ | $4,0 \times 10^{-4}$ |
| povprečje | | $1,4 \times 10^{-5}$ | $1,5 \times 10^{-5}$ | $4,6 \times 10^{-4}$ | $4,3 \times 10^{-4}$ |

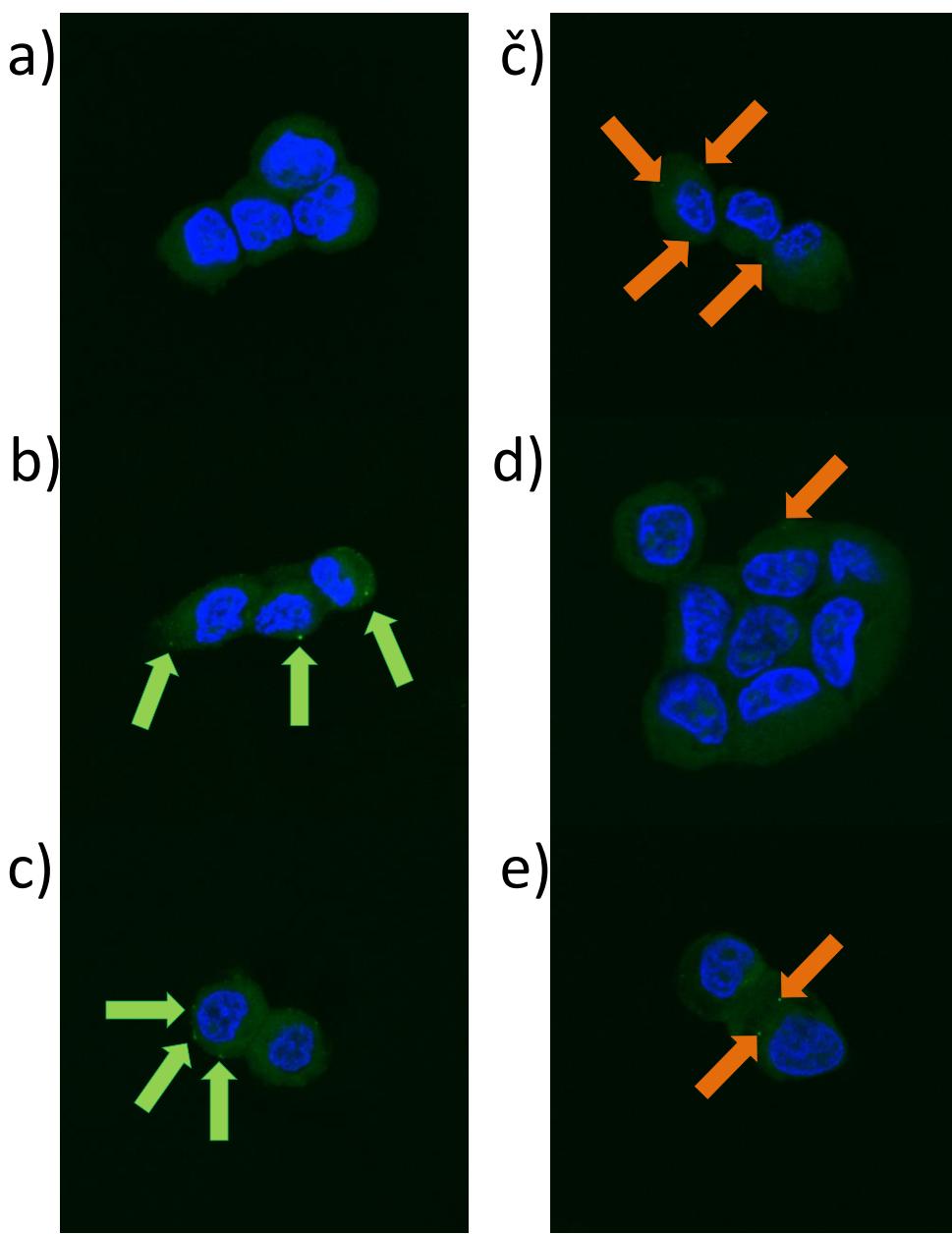
Titri na površini vezanih bakteriofagov so primerljivi med seboj in se nahajajo v enakem velikostnem razredu. Med bakteriofagi so opazne razlike v vezavi na površino –

bakteriofag M2 ima najboljšo vezavo na površino, sledita mu C3-4 in L4, medtem ko ima NL8 najslabšo vezavo. Najbolje se je internaliziral bakteriofag C3-4, kateremu sledi M2. Bakteriofaga NL8 in L4 imata za en velikostni razred nižjo internalizacijo kot bakteriofaga C3-4 in M2. Ker smo iskali bakteriofag za negativno kontrolo, nas zanimajo tisti z najnižjo sposobnostjo vezave na površino celic in internalizacijo. Na podlagi pridobljenih rezultatov smo izbirali med NL8 in L4, saj imata oba zelo nizko sposobnost vezave in internalizacije; izračunani titri so zelo podobni. Za končni izbor bakteriofaga za negativno kontrolo smo se poslužili primerjave primarnih rezultatov. Ker je redčitev 10^{-1} najbližje osnovnemu vzorcu in ker se nahajajo v območju detekcije metode, smo se pri odločanju ozirali predvsem na te meritve. Pri vezavi bakteriofagov na površino se je bakteriofag NL8 vezal slabše in internaliziral v primerjavi z bakteriofagom L4.

Na podlagi pridobljenih in obdelanih rezultatov smo kot negativno kontrolo pri pripravi preparatov za konfokalni fluorescenčni mikroskop izbrali bakteriofag NL8, saj je imel najnižjo vezavo na površino in internalizacijo.

4.3. SPREMLJANJE INTERNALIZACIJE BAKTERIOFAGOV S KONFOKALNO FLUORESCENČNO MIKROSKOPIJO

Z namenom ugotovitve lokalizacije vezanih bakteriofagov smo celice HaCaT izpostavili s FITC označenim bakteriofagom. Bakteriofage NL8, TUP in T12 smo inkubirali s celicami eno uro, celice smo nato spirali pod različnimi pogoji, fiksirali, pripravili preparate in opazovali pod konfokalnim fluorescenčnim mikroskopom. Rezultati mikroskopiranja so prikazani na **sliki 6**.



Slika 6: Rezultati konfokalne mikroskopije. Z modro je prikazano jedro, obarvano z barvilom DAPI, z zeleno pa s FITC označeni bakteriofagi in autofluorescenco celice. Celice so bile tretirane z različnimi bakteriofagi in različnimi spiranji. Z zelenimi puščicami so prikazani skupki označenih bakteriofagov na površini celic, z oranžnimi pa internalizirani bakteriofagi. a) prikazuje celice HaCaT, tretirane z neoznačenim bakteriofagom NL8, spranim s kislo elucijo; b) prikazuje celice HaCaT, tretirane s FITC označenim bakteriofagom NL8, spranim s kislo elucijo; c) prikazuje celice HaCaT, tretirane s FITC označenim bakteriofagom TUP, spranim s kislo elucijo; č) prikazuje celice HaCaT, tretirane s FITC označenim bakteriofagom T12, spranim s kislo elucijo; d) prikazuje s FITC označen bakteriofag T12, trikrat spran z ledeno hladnim PBS; e) prikazuje celice HaCaT, tretirane s FITC označenim bakteriofagom T12, spranim s PBST.

REZULTATI

Že ob prvem pregledu slik, pridobljenih s fluorescenčno mikroskopijo, opazimo visoko ozadje. Ozadje metode je predstavljeno na **sliki 3a**, kjer so bile celice izpostavljene neoznačenim bakteriofagom NL8, saj v tej kombinaciji celic in bakteriofagov ni bilo dodanega nikakršnega barvila, ki bi fluoresciralo v območju GFP. Pri tako visokem ozadju je absolutna lokalizacija označenih bakteriofagov nemogoča – kljub temu se opazi razlike med poskusi. Pri vseh slikah, kjer so bile celice izpostavljene označenim bakteriofagom (**slika 6b-e**), se nahajajo svetlejše zelene pike, ki so lokalizirane tako na površini kot v citoplazmi. Ker se pike nahajajo pri vseh poskusih z označenimi bakteriofagi (tako na celotnih preparatih kot tudi slikah), lahko trdimo, da ne gre za artefakte ali odstopanja, ampak za signifikanten rezultat. Pri negativni kontroli (celice HaCaT z označenim bakteriofagom NL8 – **slika 6b**) se označeni bakteriofagi nahajajo tako na površini kot tudi v sami citoplazmi, kar je presenetljivo. Bakteriofag NL8 namreč nima na pIII izraženega peptida, ki bi omogočal tarčno vezavo na receptor, izražen na površini celice; nastale pike so verjetno posledica nespecifične vezave bakteriofagov na površino celic, ki smo jo opazili pri večini poskusov (rezultati niso prikazani). Sam mehanizem in vzrok vezave bakteriofagov na površino celic je neznan, vendar je mogoče, da poteka na osnovi elektrostatskih sil med proteini bakteriofagne ovojnice in površino celične membrane. Označeni bakteriofagi TUP se prav tako nahajajo na površini celic HaCaT, vendar ne v citoplazmi (**slika 6c**). Ker ima bakteriofag TUP na proteinu pIII izražen peptid, ki omogoča specifično vezavo na transferinski receptor, pike verjetno predstavljajo označene bakteriofage, ki so vezani na transferinski receptor. Bakteriofagov TUP nismo opazili v notranjosti celic, kar je verjetno posledica slabše vezave na receptorje in posledično slabše receptorske endocitoze. Vezava označenih bakteriofagov T12 (**slika 6č-e**) na površino celic je primerljiva s TUP – na površini celic se nahajajo zelene pike, ki predstavljajo bakteriofage, vezane na površini celic. Glavna razlika med preizkušenimi bakteriofagi je v tem, da se pri vseh treh preparatih bakteriofaga T12 in celic HaCaT v citoplazmi nahajajo zelene pike, ki predstavljajo označen bakteriofag T12 v notranjosti celice. Večji delež internaliziranih bakteriofagov kaže v prid boljše sposobnosti vezave bakteriofagov T12 na transferinske receptorje, ki se nahajajo na površini celice. Različni pogoji spiranja bakteriofaga T12 s površine celic ne kažejo vpliva na delež na celično membrano vezanih bakteriofagov. Relativno majhno število bakteriofagov v notranjosti celic je lahko

REZULTATI

posledica časa inkubacije – le-ta je lahko predolg ali prekratek. Če smo celice z bakteriofagi inkubirali predolgo, je prihajalo do receptorske endocitoze, endosomi so se spremenili v lizosome in razgradili vsebino lizosoma – kar so bili pretežno bakteriofagi, medtem ko so se transferinski receptorji lahko reciklirali in vrnili na površino celice, kjer se je sprožil nov val vezave, receptorske endocitoze in internalizacije. Če pa smo celice z bakteriofagi inkubirali prekratek čas, bakteriofagi, vezani na receptorje, niso imeli časa, da bi učinkovito sprožili receptorsko endocitozo. Ta problem bi rešili z ustreznou prilagoditvijo časa inkubacije. Predlagamo poskus, pri katerem bi opazovali celice HaCaT, inkubirane z bakteriofagoma NL8 in T12 v različnih časovnih točkah – 5 minut, 15 minut, 30 minut, ena ura in 3 ure.

Primerjava števila zelenih pik med bakteriofagi NL8 in TUP ter T12 nakazuje na sposobnost proteina pIII bakteriofaga NL8 za vezavo na površino celic HaCaT. Označen bakteriofag NL8 ima kar največje število in najvišjo gostoto zelenih pik, ki so posledica nespecifične vezave, medtem ko jih imata TUP in T12 manj, vendar naj bi pri njiju prihajalo do specifične vezave. Edina razlika med bakteriofagi NL8, TUP in T12 je v izraženem peptidu na pIII, ki je tudi razlog za razliko v vezavi, vendar ker se NL8 ne veže na receptorje, ne sproža receptorske endocitoze, zato slabše prehaja v notranjost celice in ustreza kot kontrola v nadalnjih poskusih.

Na podlagi fluorescenčne mikroskopije smo potrdili internalizacijo bakteriofaga T12, posredno pa njegovo boljšo sposobnost vezave na transferinski receptor. Prav tako smo dokazali, da je možen prehod bakteriofagov v notranjost celic preko vezave na transferinski receptor. Dokazali smo tudi nesposobnost bakteriofagov, ki nimajo izraženih peptidov za vezavo na receptorje, da bi prešli celično membrano. Pri tem poskusu smo preverjali hipoteze:

Hipoteza 2: Bakteriofagi, ki se bolje vežejo na površino celic, imajo boljšo internalizacijo.

Hipoteza 3: Bakteriofagi, ki prehajajo v celico, se večinoma nahajajo v citosolu.

Hipoteza 4: Bakteriofagi lahko v zmanjšanem obsegu prehajajo v celično jedro.

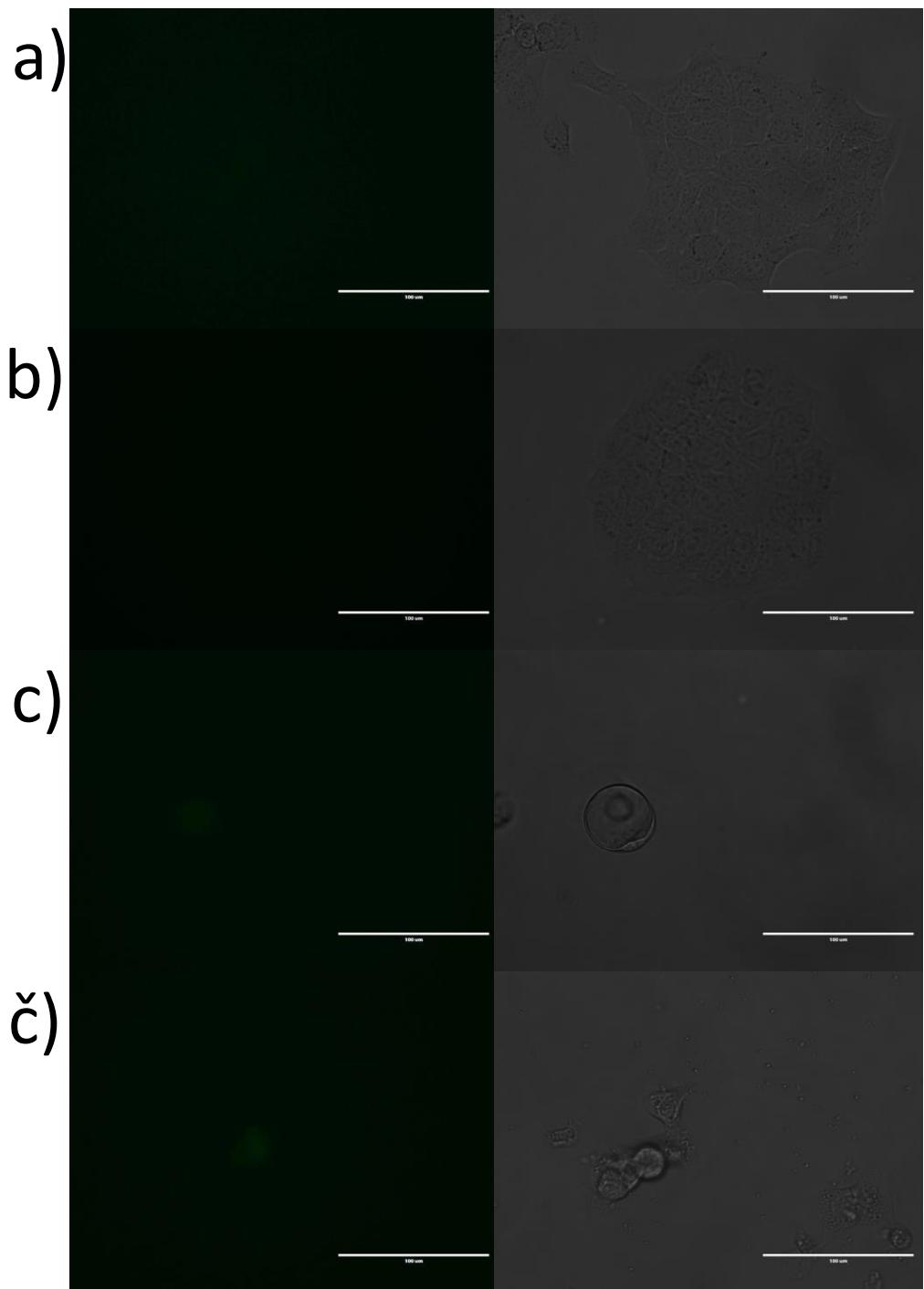
Ni nam uspelo dokončno ovreči ali potrditi hipoteze 3 in hipoteze 4. Za dokončno potrditev ali ovrženje hipotez bi morali bakteriofage označiti z barvilo, katerega ekscitacijski ali emisijski spektri se ne prekrivajo z ekscitacijskimi ali emisijskimi spektri endogenih snovi. Potrdili pa smo hipotezo 2, saj se samo bakteriofag z najboljšo sposobnostjo vezave (poglavlje 4.1) dokazano internalizira v notranjost celic.

4.4. DOSTAVA EKSPRESIJSKIH KASET Z BAKTERIOFAGNIMI VEKTORJI

4.4.1 Celice HaCaT

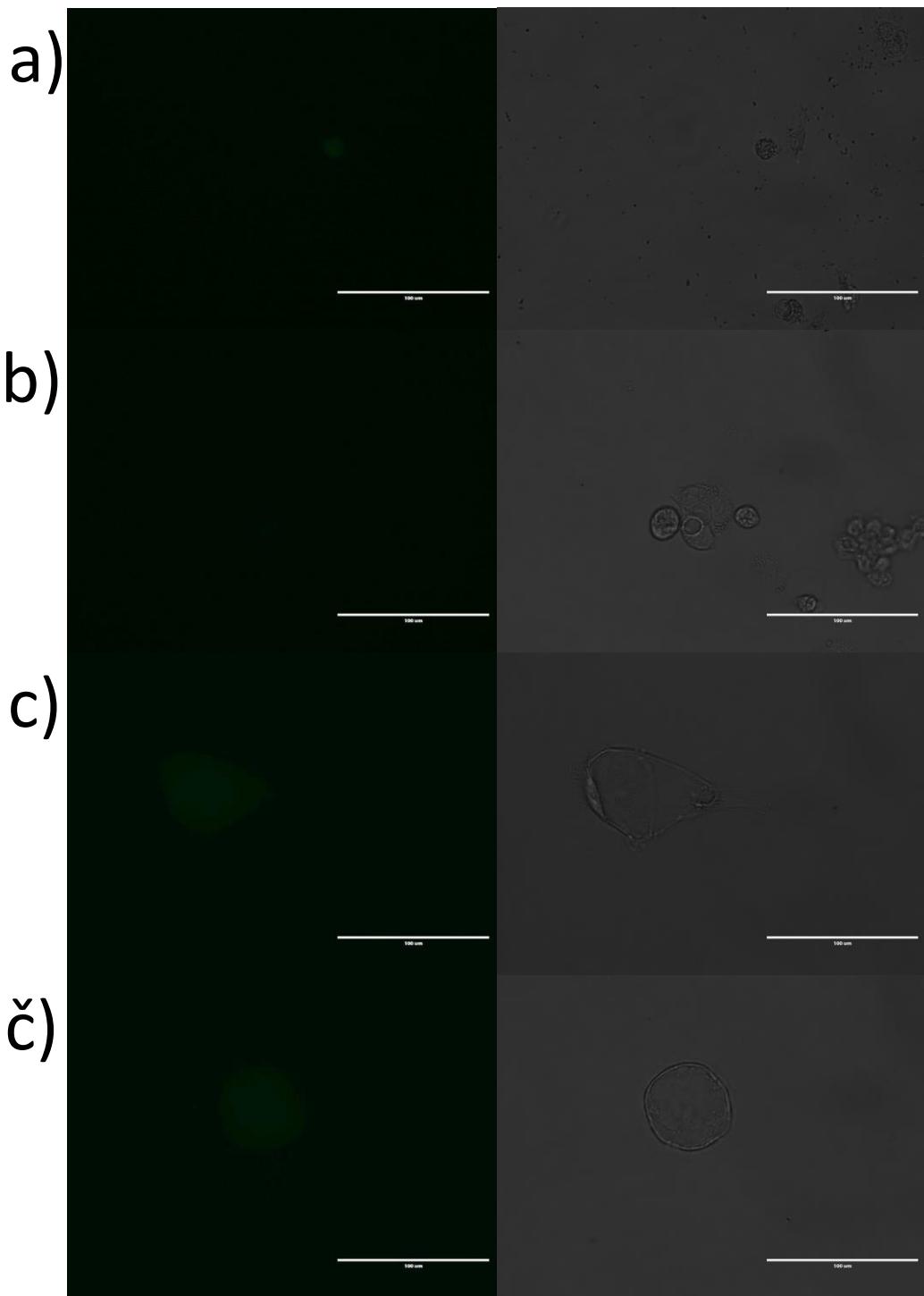
Celice HaCaT smo tretirali z različnimi bakteriofagi ali bakteriofagno DNA z namenom dokazati uspešnost dostave in uspešnost izražanja evkariontske ekspresijske kasete, ki jo nosi bakteriofagni vektor. Celice so bile izpostavljene bakteriofagom f88-4 Smith, f88-4-GFP, 3TRL-2-GFP, 3TRL-2-PEN ter 3TRL-2-FHV. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili izolirano bakteriofagno (enoverižna 3TRL-2-GFP) in plazmidno (dvoverižno 3TRL-2-GFP) DNA, ki smo ju v celice dostavili s pomočjo lipofektamina; kot negativno kontrolo smo uporabili celice, ki jih nismo izpostavili niti bakteriofagom niti DNA. Po 48-ih urah smo celice pogledali pod inverznim fluorescenčnim mikroskopom.

REZULTATI



Slika 7: Rezultati preizkusa uspešnosti dostave ekspresijske kasete z bakteriofagi v celice HaCaT. Na levi strani je prikazan preparat, slikan na kanalu GFP, na desni pa preparat, slikan na vidni svetlobi. a) netretirane celice, kar predstavlja negativno kontrolo; b) celice, tretirane z bakteriofagom f88-4 Smith; c) celice, tretirane z bakteriofagom f88-4 GFP; č) celice, v katere smo z lipofektinom dostavili enoverižno DNA 3TRL-2-GFP.

REZULTATI



Slika 8: Rezultati preizkusa uspešnosti dostave ekspresijske kasete z bakteriofagi v celice HaCaT. Na levi strani je prikazan preparat, slikan na kanalu GFP, na desni pa preparat, slikan na vidni svetlobi. a) celice, v katere smo z lipofektinom dostavili dvooverižno DNA 3TRL-2-GFP; b) celice, tretirane z bakteriofagom 3TRL-2-GFP; c) celice, tretirane z bakteriofagom 3TRL-2-PEN; č) celice, tretirane z bakteriofagom 3TRL-2-FHV.

REZULTATI

Zaradi narave meritve ni bilo moč pridobiti številčnih rezultatov, zato smo se opirali na opisna opažanja. Kaj kmalu po začetku mikroskopiranja smo opazili, da so celice, ki so sprejele ekspresijsko kaseto in so jo izrazile, morfološko spremenjene – normalne celice so imele zvezdasto obliko (**slika 7a**), medtem ko so bile celice z izraženo ekspresijsko kaseto izrazito krogličaste oblike (**slika 7c, č, 8a-č**). Opazili smo tudi, da so bile celice morfološko spremenjene ne glede na način dostave ekspresijske kasete (bakteriofag ali lipofektamin) ali na obliko vektorja (eno- ali dvooverižna DNA) – na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da uspešno izražena ekspresijska kasa spremeni morfologijo celice. Z zamenjavo ekspresijske kasete bi se verjetno spremenil tudi vpliv na morfologijo celice.

Drugo splošno opažanje je bila šibkost signala in njegovo hitro bledenje. Kot je razvidno iz **slik 7 in 8**, je bila fluorescencija zelo šibka oz. je do trenutka zajetja slike že zelo zbledela. Šibek signal je povezan predvsem z izbiro ekspresijskega sistema, saj celice HaCaT niso najbolj primerne za izražanje heterolognih proteinov, posledično je prišlo do slabšega izražanja proteina GFP, kar je privedlo do slabšega signala in njegovega hitrega bledenja. Možno bi bilo, da bi do slabšega signala prišlo zaradi slabega dostavnega sistema, vendar lahko to ovržemo na podlagi pozitivne kontrole, kjer je bil za dostavo kasete uporabljen lipofektamin, za katerega je dokazano, da je dober dostavni sistem, a je tudi tam prišlo do nizkega signala.

Izražanje proteina GFP je bilo moč opaziti pri pozitivnih kontrolah enoverižne DNA 3TRL-2-GFP (**slika 7č**), dvooverižne DNA 3TRL-2-GFP (**slika 8a**), f88-4 GFP (**slika 7c**), 3TRL-2-GFP (**slika 8b**), 3TRL-2-PEN (**slika 8c**) in 3TRL-2-FHV (**slika 8č**). Fluorescencija je bila pri vseh celicah primerljiva med seboj, kar je, kot že omenjeno, posledica izbranega ekspresijskega sistema. Opazili pa smo, da se je *število* svetlečih celic razlikovalo med bakteriofagi – najmanj jih je bilo pri f88-4 GFP, sledil je 3TRL-2-GFP, največ pa jih je bilo pri 3TRL-2-PEN in 3TRL-2-FHV, kar je v skladu s pričakovanji. Ker bakteriofag f88-4 GFP nima izraženih dodatnih peptidov na pIII in pVIII, je vezava le-tega na površino celic omejena predvsem na nespecifično vezavo. Kljub temu je pri nekaterih celicah prišlo do izražanja ekspresijske kasete. Ker ima bakteriofag 3TRL-2-GFP na proteinu pIII izražen peptid, ki je specifičen za vezavo na transferinski receptor, izražen na membrani HaCaT, je bil zaradi tarčne vezave na receptor in receptorske internalizacije prevzem

REZULTATI

bakteriofagov večji, kar je privedlo do izražanja GFP v več celicah. Kljub temu je bil delež celic z izraženim GFP relativno majhen, saj je verjetno le redkim bakteriofagom uspelo preiti tako membrano endosoma kot jedrno membrano in se uspešno izraziti v jedru. Najbolj uspešna pri prehodu endosomalne membrane po tarčni vezavi na transferinski receptor sta bila 3TRL-2-PEN in 3-TRL-2-FHV, ki imata na pVIII izražen kratek peptid, ki omogoča pobeg iz endosoma.

Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko sklepamo, da so dostavni sistemi, osnovani na bakteriofagih, sposobni dostaviti ekspresijsko kaseto, ki se potem tudi izrazi. Opisno smo tudi dokazali vpliv dodatnih kratkih peptidov, izraženih na površino bakteriofaga – bakteriofag, ki ima na pIII dodan kratek peptid, specifičen za vezavo na receptor, poveča uspešnost dostave ekspresijske kasete; največjo razliko v uspešnosti dostave pa smo dosegli z izražanjem kratkih peptidov, ki omogočajo pobeg iz endosomov. S tem poskusom smo preverjali hipoteze:

Hipoteza 5: Uspešna internalizacija in prehod bakteriofaga v jedro bo privedla do izražanja ekspresijske kasete in reporterja GFP.

Hipoteza 6: Dodatek kratkih peptidov, ki omogočajo pobeg iz lizosoma na protein pVIII, bo povečal uspešnost izražanja ekspresijske kasete.

Hipoteza 7: Konstruiran dostavni sistem na osnovi nitastih bakteriofagov bo uspešno dostavil ekspresijsko kaseto, ki se bo tudi uspešno izrazila.

Potrdili smo hipotezo 5 in hipotezo 7 ter opisno dokazali hipotezo 6, ki jo bo potrebno v nadaljnjih poskusih še podrobnejše raziskati.

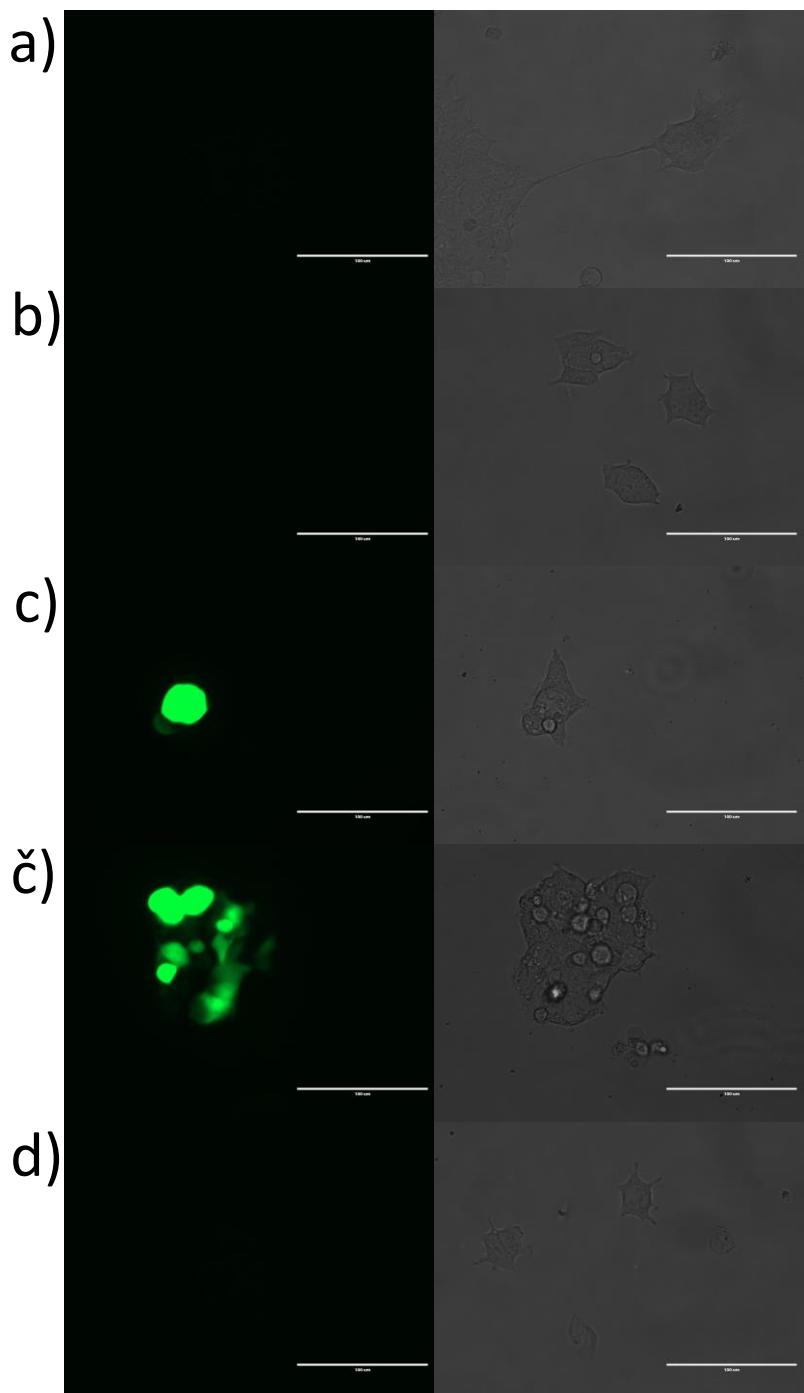
4.4.2 Celice HEK293

Zaradi neustreznosti ekspresijskega sistema smo del poskusa ponovili še s celicami, ki so ustrezejše za izražanje ekspresijskih kaset – HEK293 (Thomas in Smart, 2005). Celice HEK293 smo tretirali enako kot celice HaCaT z bakteriofagi f88-4 Smith, f88-4 GFP, 3TRL-2-GFP, 3TRL-2-PEN ter 3TRL-2-FHV. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili izolirano bakteriofagno (enoverižno 3TRL-2-GFP) in plazmidno (dvoverižno 3TRL-2-GFP) DNA, ki smo jo v celice dostavili s pomočjo lipofektamina; kot negativno kontrolo

REZULTATI

smo uporabili celice, ki jih nismo izpostavili niti bakteriofagom niti DNA. Delni rezultati so prikazani na **sliki 9**. Med rezultati niso prikazane celice, ki niso izrazile GFP (celice, tretirane z bakteriofagi 3TRL-2-GFP, 3TRL-2-PEN ter 3TRL-2-FHV).

REZULTATI



Slika 9: Rezultati preizkusa uspešnosti dostave ekspresijske kasete z bakteriofagi v celice HEK293. Na levi strani je prikazan preparat, slikan na kanalu GFP, na desni pa preparat, slikan na vidni svetlobi. a) prikazuje netretirane celice, kar predstavlja negativno kontrolo; b) celice, tretirane z bakteriofagom f88-4 Smith; c) celice, v katere smo z lipofektaminom dostavili enoverižno DNA 3TRL-2-GFP; č) celice, v katere smo z lipofektaminom dostavili dvoverižno DNA 3TRL-2-GFP; d) celice, tretirane z bakteriofagom f88-4 GFP.

REZULTATI

V skladu s pričakovanji netretirane celice (**slika 9a**) in celice, tretirane s f88-4 Smith (**slika 9b**), ne izražajo GFP; po drugi strani pa celice, v katere smo z lipofektaminom dostavili eno- ali dvooverižno DNA 3TRL-2-GFP, izražajo GFP v veliki meri in oddajajo močan signal (**slika 9c, č**). Če primerjamo signala med enako tretiranimi celicami HaCaT in HEK293, je razlika očitna – celice HaCaT, ki so izražale GFP, so svetile šibko, medtem ko celice HEK293, ki izražajo GFP, oddajajo močan in stabilen signal. Presenetljivo kljub dolgotrajnemu iskanju nismo našli celice HEK293, v katero bi kateri koli bakteriofag uspešno dostavil ekspresijsko kaseto, ki bi se tudi izrazila. Možnih razlogov za to je več, vendar ker se ekspresijska kaseto, ki je bila dostavljena z lipofektaminom, uspešno izrazi, je potrebno iskati razloge za neuspešnost bakteriofagnih vektorjev v vezavi, internalizaciji in/ali sproščanju ekspresijske kasete iz endosoma. Prvi možen razlog je lahko dejstvo, da so bili postopki optimirani za celice HaCaT, zato pogoji za HEK293 niso bili optimalni. Vendar je po drugi strani postopek zelo robusten in dolg čas izpostavitve (48 ur) celic bakteriofagom ter presežen titer bakteriofagov zmanjšuje vpliv neoptimiziranega protokola. Možne razloge je moč iskati tudi v spremenjeni fiziologiji in biokemiji celic – HaCaT so namreč imortalizirani keratinociti, medtem ko so HEK293 rakaste celice. Razlika v metabolizmu rakastih in zdravih celic bi lahko pripeljala do manj intenzivne receptorske endocitoze, spremenjene formacije endosomov, lizosomov, itd. Znano je namreč, da se transferinski receptorji internalizirajo na različne načine, odvisno od tipa celic (Gkouvatsos et al., 2012) in povsem možno je, da celice HEK293 internalizirajo transferinski receptor v manjši meri oz. na drugačen način, ki je manj ugoden za uspešno dostavo ekspresijske kasete z bakteriofagnimi vektorji. Najverjetnejši razlog za neuspešno dostavo je v odsotnosti ali vsaj v močno zmanjšanem izražanju transferinskega receptorja na površini celic HEK293, kar privede do zmanjšane vezave vektorja na površino celic in posledično tudi zmanjšane internalizacije (Uhlén et al., 2005).

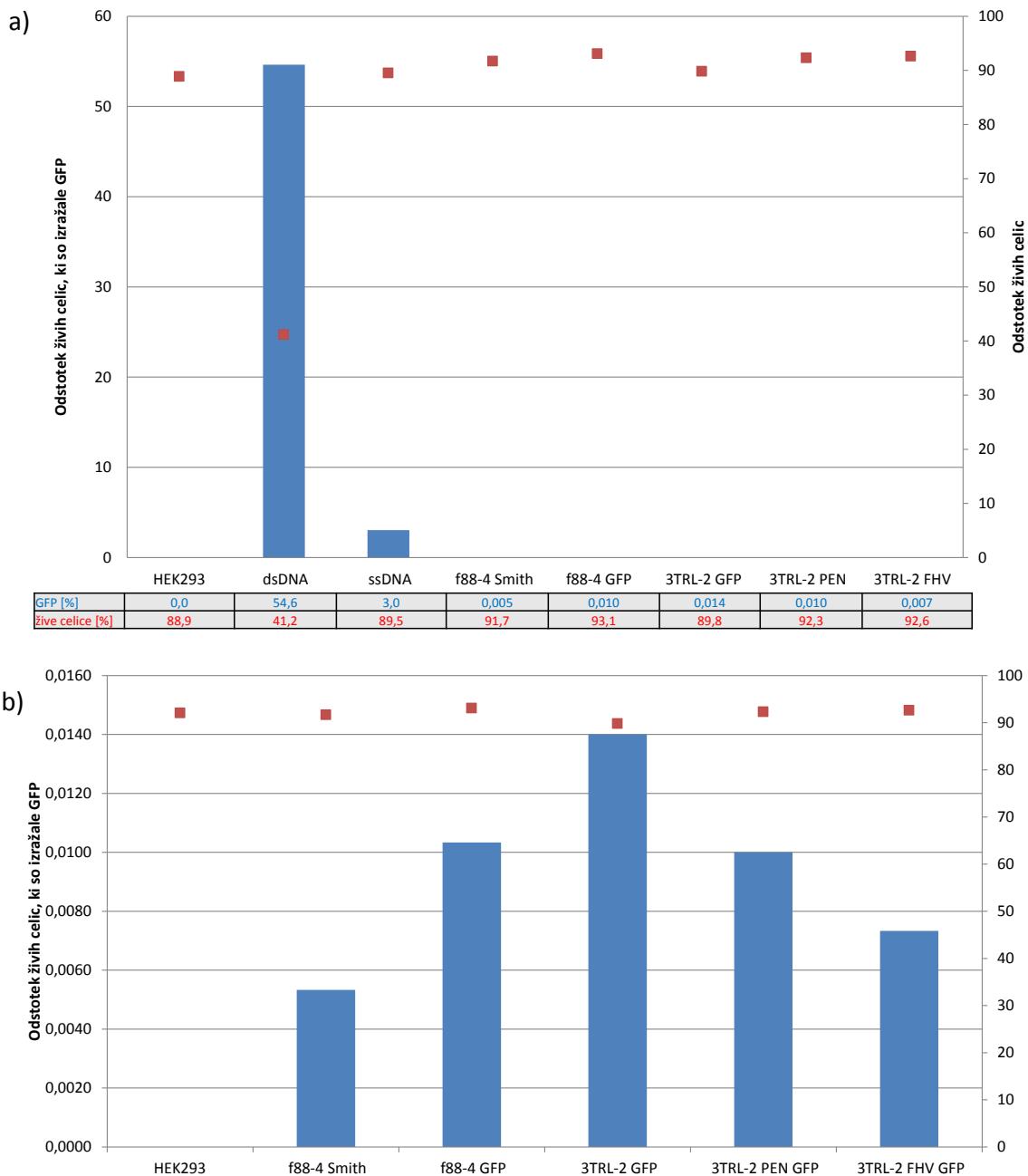
S tem eksperimentom smo vzpostavili povezavo med uspešnostjo dostave ekspresijskih kaset z bakteriofagnimi vektorji med celicami HaCaT in HEK293. Bakteriofagni vektorji so bolj uspešni pri dostavi ekspresijskih kaset v celice HaCaT, vendar je izražanje ekspresijske kasete slabo. Po drugi strani celice HEK293 odlično izražajo ekspresijsko kaseto, dostavljeno z lipofektaminom, vendar bakteriofagni vektorji niso sposobni uspešno dostaviti ekspresijske kasete. Razlog za to se najverjetneje skriva v manjšem izražanju

transferinskega receptorja na površini celic HEK293, kar privede do zelo zmanjšane vezave, internalizacije in uspešne dostave, kar smo v tem eksperimentu opazili kot popolno odsotnost uspešne dostave ekspresijske kasete z GFP.

4.5. PRETOČNA CITOMETRIJA

Pripravili smo celice HEK293 v ustreznih koncentracijih ter jih izpostavili bakteriofagom f88-4 Smith, f88-4 GFP, 3TRL-2-GFP, 3TRL-2-PEN in 3TRL-2-FHV. Za pozitivno kontrolo smo celice tretirali z eno- in dvooverižno DNA 3TRL-2-GFP, ki je bila dostavljena z lipofektaminom. Za negativno kontrolo smo uporabili celice, ki niso bile tretirane ne z DNA ne z bakteriofagi. Tretirane celice smo analizirali na pretočnem citometru. Pri nadaljnji obdelavi podatkov smo upoštevali samo žive celice (torej tiste, ki se niso obarvale s propidijevim jodidom). Izmed vseh živih celic nas je zanimal delež celic, ki so izražale protein GFP. Odstotki živih celic in delež živih celic, ki so izražale GFP, so prikazani na **sliki 10**, podrobnejši rezultati pa so prikazani v **prilogi 1**.

REZULTATI



Slika 10: Obdelani rezultati pretočne citometrije. a) Z modrimi stolpički je prikazan odstotek celic, v katerih se je ekspresijska kaseta uspešno dostavila in tudi izrazila, z rdečimi kvadratki je prikazan delež preživelih celic. b) Izsek podatkov a), prikazan na ustrezni velikostni skali.

Glede na prejšnje poskuse smo dokazali, da so celice HaCaT boljši sistem za dokazovanje uspešne dostave in izražanja ekspresijske kasete, vendar so HaCaT adherentne celice, katere je potrebno za odstranitev s podlage »grobob« tretirati (tripsinizacija 20 minut pri 37

REZULTATI

°C, ali mehanska odstranitev s strgali (angl. *scraper*), kar ima tudi škodljiv vpliv na celice. Celice HEK293 so samo šibko adherirane na površino gojitvenih posodic in jih npr. že samo temperaturni šok (ohladitev na led) odstrani s površine. Ker smo za celično citometrijo potrebovali celice v suspenziji, smo se odločili za uporabo HEK293.

Delež živih celic, ki je v največji meri izražal ekspresijsko kaseto, je z lipofektaminom dostavljena dvojerižna DNA 3TRL-2-GFP, ki ji sledi na enak način dostavljena enoverižna DNA 3TRL-2-GFP. Glede na to, da je med omenjenima serijama edina razlika v obliki DNA (eno- ali dvojerižna), lahko ocenimo vpliv oblike dostavljenе DNA. Dvojerižna DNA ima 16-krat boljše izražanje ekspresijske kasete (54,6 % živih celic je izražalo GFP po tretiranju z dvojerižno DNA, medtem ko je samo 3,0 % živih celic izražalo GFP po tretiranju z enoverižno DNA). Razloge za to gre iskati v naravi eno- in dvojerižne DNA – za uspešen prepis v mRNA potrebuje transkripcijski aparat v jedru dvojerižno DNA – dvojerižna DNA 3TRL-2-GFP že pride v jedro v tej obliki in jo transkripcijski aparat ob ustreznih signalnih zaporedjih na DNA razklene in rekrutira ustrezne transkripcijske dejavnike. Enoverižna 3TRL-2-GFP pa pride v jedro v nepopolni obliki, ki jo mora celica pred prepisom v mRNA dopolniti s sintezo komplementarne verige, kar velikokrat privede do razgradnje enoverižne DNA in posledičnega neuspeha pri izražanju kljub uspešni dostavi.

Pričakovano velik upad v uspešnosti dostave smo opazili pri zamenjavi dostavnega sistema iz lipofetamina na bakteriofagni vektor. Najboljši bakteriofagni vektor (3TRL-2-GFP) je uspešno dostavil ekspresijsko kaseto v 0,014 % živih celic, 214-krat slabše kot primerljivo dostavljena enoverižna DNA z lipofektaminom. Presenetljivo so celice HEK293, tretirane z bakteriofagom f88-4 Smith, oddajale signal na GFP kanalu v večji meri kot netretirane celice, kljub temu da ta bakteriofag nima zapisa za ekspresijsko kaseto za GFP. Možna razloga bi bila, da celice ob stiku z bakteriofagom začnejo sproščati snovi, ki fluorescirajo v območju meritve; eksperiment z bakteriofagom f88-4 Smith zato predstavlja ozadje metode. Bakteriofag f88-4 GFP je pričakovano povzročil povečanje števila flourescirajočih celic za 93 % v primerjavi z bakteriofagom f88-4 Smith. Odziv celic HEK293 na bakteriofag f88-4 GFP je sestavljen iz dveh delov: iz odziva celice na bakteriofag in iz uspešno dostavljenе in izražene ekspresijske kasete. Vendar ker bakteriofag f88-4 GFP

REZULTATI

nima na pIII izraženih dodatnih kratkih peptidov, je uspešna dostava ekspresijske kasete posledica zgolj nespecifične vezave. Bakteriofag 3TRL-2-GFP je uspešno dostavil ekspresijsko kaseto v 0,014 % celic – kar je za 36 % več kot f88-4 GFP. Razlika med 3TRL-2-GFP in f88-4 GFP je posledica dveh lastnosti bakteriofagov: prva je izražen kratek peptid proti transferinskemu receptorju na pIII, ki pozitivno vpliva na uspešnost dostave, medtem ko druga lastnost negativno vpliva na uspešnost dostave ekspresijske kasete – bakteriofag 3TRL-2-GFP je večji od f88-4 GFP, saj nosi 3TRL-2-GFP dodaten gen za pVIII, kar poveča velikost bakteriofaga in otežuje uspešno vezavo in internalizacijo. V primeru da bi bila bakteriofaga primerljive velikosti, bi bila pričakovana razlika glede na prejšnje eksperimente (poglavlje 4.1) štiri-kratna.

Bakteriofaga 3TRL-2-PEN in 3TRL-2-FHV sta uspešno dostavila ekspresijsko kaseto, ki se je tudi izrazila v samo 0,01 % in 0,007 % celic, kar je nepričakovani rezultat. Ker so bakteriofagi 3TRL-2-GFP, 3TRL-2-PEN in 3TRL-2-FHV med seboj identični, z izjemo predstavljenih peptidov na proteinu pVIII, smo pričakovali vsaj tako uspešnost dostave kot pri 3TRL-2-GFP. Ti rezultati tudi niso v skladu s predhodnimi opažanji uspešnosti dostave ekspresijskih kaset z bakteriofagnimi vektorji (poglavlje 4.4). Razlog za nižjo opaženo dostavo od pričakovane se verjetno skriva v obdelavi podatkov, saj lahko z malo bolj ohlapnimi merili opazimo pričakovane rezultate (**priloga 2**). Ker so odstotki uspešno dostavljenih in izraženih ekspresijskih kaset tako nizki, se pogoji obdelave podatkov zelo močno odražajo na končnem rezultatu.

Druga možna razlaga je povezana s prvo - pri uporabi bolj ohlapnih zamejitev citograma v analizo zajamemo tudi celice, ki oddajajo šibkejši signal na kanalu GFP. Ker je število kopij proteina GFP odvisno od števila uspešno dostavljenih in izraženih ekspresijskih kaset, večji delež šibkejše svetlečih celic predstavlja populacijo celic, v katere so bakteriofagi uspešno dostavili ekspresijsko kaseto, vendar ker je bilo v isto celico uspešno dostavljeno manjše število kopij, ta celica oddaja slabši signal – zato teh celic pri analizi z ostrejšimi pogoji ne upoštevamo.

Tretja možna razlaga je: ker celice HEK293 izražajo manj transferinskega receptorja, je tudi internalizacija slabša v primerjavi s celicami HaCaT. Glede na to da nam s fluorescenčno mikroskopijo (poglavlje 4.3.2) ni uspelo najti celice HEK293, v katero bi

REZULTATI

bakteriofagi uspešno dostavili ekspresijsko kaseto, je možno, da so kljub uspešnemu izražanju ekspresijske kasete signali, ki jih oddaja GFP, prenizki zaradi nizkega števila dostavljenih ekspresijskih kaset.

S tem poskusom smo preverjali hipotezo 6: Dodatek kratkih peptidov, ki omogočajo pobeg iz lizosoma na protein pVIII, bo povečal uspešnost izražanja ekspresijske kasete. Hipotezo 6 smo v poglavju 4.4.1 opisno že potrdili, vendar jo moramo na podlagi rezultatov pretočne citometrije ovreči. Ker pa rezultati niso povsem dokončni, predlagamo ponovitev poskusa, vendar tokrat naj bodo celice HEK293 že predhodno transfecirane s transgenom pod uravnavanjem transkripcijskega dejavnika, ki se v celicah HEK293 ne izraža; bakteriofagi pa naj namesto GFP-ekspresijske kasete vsebujejo zapis za transkripcijski dejavnik, sposoben aktivacije izražanja transgena v celici. Na tak način bi dosegli ojačanje signala ter bolj diskriminatorne rezultate. Prav tako predlagamo povečanje izražanja transferinskega receptorja na površini celic HEK293 ali pa zamenjavo celične linije z linijo, ki izraža transferinski receptor v večji meri, vendar se jo pripravi v obliki suspenzije.

6. ZAKLJUČEK

Zadnjih nekaj let je razvoj dostavnih sistemov za ciljano dostavo genskih učinkovin deležen velikega razvoja. Ciljane sisteme za dostavo genskih terapevtikov delimo na dve skupini: virusne in nevirusne. Virusni dostavni sistemi so po večini omejeni na uporabo humanih virusov, nevirusni pa na polimere in liposome. Idealen tarčni dostavni sistem mora biti varen, učinkovit, tarčno specifičen in poceni za proizvodnjo. Ker dosedanji sistemi niso povsem brez slabosti, je eden od odgovorov na težave razvoj tarčnih dostavnih sistemov na osnovi bakteriofagov. Bakteriofagi so virusi, ki se razmnožujejo z okužbo bakterijskih celic, niso pa sposobni okužiti humane celice – vendar jih lahko z ustreznimi modifikacijami razvijemo v tarčne dostavne sisteme.

Cilj te magistrske naloge je bil ovrednotiti vpliv izražanja kratkih peptidov na bakteriofagnih proteinih pIII in pVIII na uspešno dostavo in izražanje ekspresijske kasete z GFP. Z magistrsko nalogo smo preverjali hipoteze:

Hipoteza 1: Bakteriofagi z dodanimi peptidi, ki omogočajo specifično vezavo na tarčne receptorje, imajo boljšo vezavo na celice.

Hipoteza 2: Bakteriofagi, ki se bolje vežejo na površino celic, imajo boljšo internalizacijo.

Hipoteza 3: Bakteriofagi, ki prehajajo v celico, se večinoma nahajajo v citosolu.

Hipoteza 4: Bakteriofagi lahko v zmanjšanem obsegu prehajajo v celično jedro.

Hipoteza 5: Uspešna internalizacija in prehod bakteriofaga v jedro bo privedla do izražanja ekspresijske kasete in reporterja GFP.

Hipoteza 6: Dodatek kratkih peptidov, ki omogočajo pobeg iz lizosoma na protein pVIII, bo povečal uspešnost izražanja ekspresijske kasete.

Hipoteza 7: Konstruiran dostavni sistem na osnovi nitastih bakteriofagov bo uspešno dostavil ekspresijsko kaseto, ki se bo tudi uspešno izrazila.

Hipotezo 1 smo potrdili s primerjavo sposobnosti vezave bakteriofagov C3-4, TUP in T12 na celice HaCaT, kjer smo preverjali površinsko vezavo. Rezultati poskusa nakazujejo na to, da se bakteriofaga TUP in T12 bolje vežeta na površino celic v primerjavi z bakteriofagom, ki na proteinu pIII nima predstavljenih peptidov, specifičnih za vezavo na transferinski receptor. V naslednjem koraku smo izbrali bakteriofag, katerega smo uporabili kot negativno kontrolo – izmed štirih testiranih bakteriofagov se je najslabše vezal NL8, katerega smo uporabili pri spremljanju internalizacije bakteriofagov s konfokalno fluorescenčno mikroskopijo. Za fluorescenčni konfokalni mikroskop smo pripravili preparat celic HaCaT in s FITC označenimi bakteriofagi NL8, TUP in T12. Potrdili smo internalizacijo bakteriofagov T12 ter s tem tudi hipotezo 2. Hipotez 3 in 4 nam ni uspelo dokončno potrditi ali ovreči – za ponovno preverjanje hipotez predlagamo ponovitev poskusa z bakteriofagi, označenimi z barvilom, ki ne emitira v območju avtofluorescence endogenih snovi.

V celice HaCaT smo z bakteriofagi f88-4-GFP, 3TRL-2-GFP, 3TRL-2-PEN ter 3TRL-2-FHV uspešno dostavili in izrazili ekspresijsko kaseto ter s tem potrdili hipotezi 5 in 7, opisno pa smo potrdili tudi hipotezo 6, ki je bila kasneje preverjena še s citometrijo. Ker so se celice HaCaT izkazale za slab ekspresijski sistem (zelo šibek signal izraženega proteina GFP) in zaradi potrebe po primerjavi celičnih linij HaCaT in HEK293, smo v naslednjem koraku preverjali uspešnost dostave in izražanja ekspresijske kasete v celicah HEK293. Dokazali smo, da so celice HEK293 sposobne boljšega izražanja proteina GFP in ekspresijske kasete, dostavljene z lipofektinom, vendar so slabši sistem za dostavo ekspresijskih kaset z uporabo testiranih bakteriofagov, saj nam ni uspelo najti celice, ki bi izrazila protein GFP, dostavljen z bakteriofagom.

S pretočno citometrijo smo preverjali uspešnost izražanja ekspresijske kasete, dostavljene z bakteriofagi, ter vpliv peptidov, predstavljenih na proteinih pIII in pVIII. Dokazali smo, da peptid, specifičen za vezavo na transferinski receptor, predstavljen na proteinu pIII, poveča uspešnost dostave in izražanja ekspresijske kasete. S predstavljivo peptidov na proteinu pVIII smo v nasprotju s pričakovanji zmanjšali uspešnost dostave in izražanja ekspresijske kasete – razlogi za to lahko ležijo v višjem »pražnem« signalu ali v previsoki meji detekcije metode. Na podlagi pridobljenih rezultatov smo hipotezo 6 ovrgli, vendar

ZAKLJUČEK

predlagamo ponovitev eksperimenta z uporabo ekspresijske kasete, ki vsebuje transkripcijski dejavnik za reporterski gen, ki je transfeciran v celico – na tak način bi dosegli ojačanje signala. Prav tako predlagamo uporabo celične linije, ki izraža transferinski receptor v večji meri in jo je mogoče pripraviti v obliki celične suspenzije.

Z opravljenim delom smo potrdili sposobnost razvitih bakteriofagnih vektorjev za uspešno dostavo ekspresijske kasete v sesalski celični liniji HaCaT in HEK273. Predstavitev kratkih peptidov, specifičnih za vezavo na transferinski receptor, poveča sposobnost bakteriofaga za uspešno dostavo in izražanje ekspresijske kasete. Poleg tega so ti kratki peptidi med seboj zamenljivi, zato lahko na bakteriofagnem proteinu pIII predstavimo katerikoli peptid, ki ima dokazano sposobnost vezave na želeno tarčo. Predstavitev peptidov, ki omogočajo pobeg iz lizosoma, daje zaenkrat nedokokočne rezultate, vendar bo z nadaljnjo optimizacijo protokolov in razvojem bakteriofagnih ciljanih sistemov mogoče objektivno ovrednotiti tudi vpliv teh peptidov. Z opravljenim delom te magistrske naloge in magistrske naloge Petruše Rozman (Rozman et al., v pripravi) je bil vzpostavljen temeljni kamen za razvoj ciljanih dostavnih sistemov na osnovi bakteriofagov.

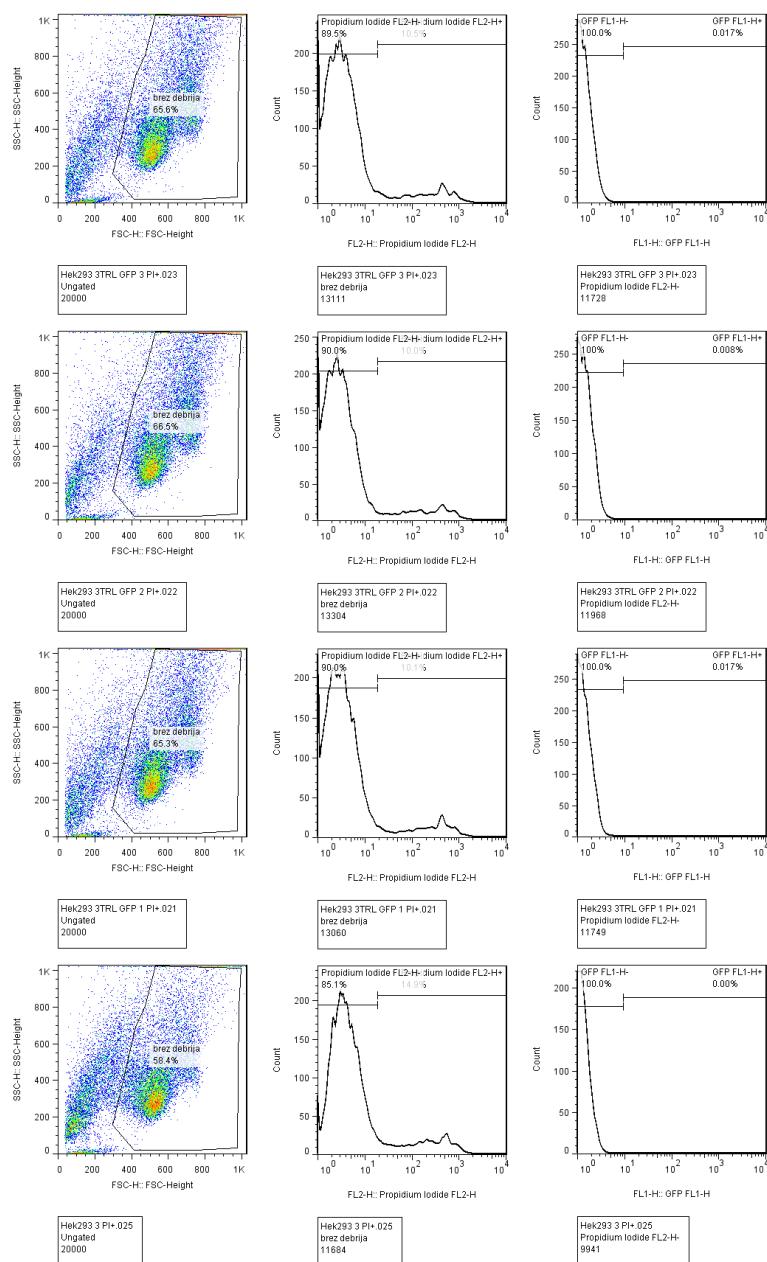
7. LITERATURA

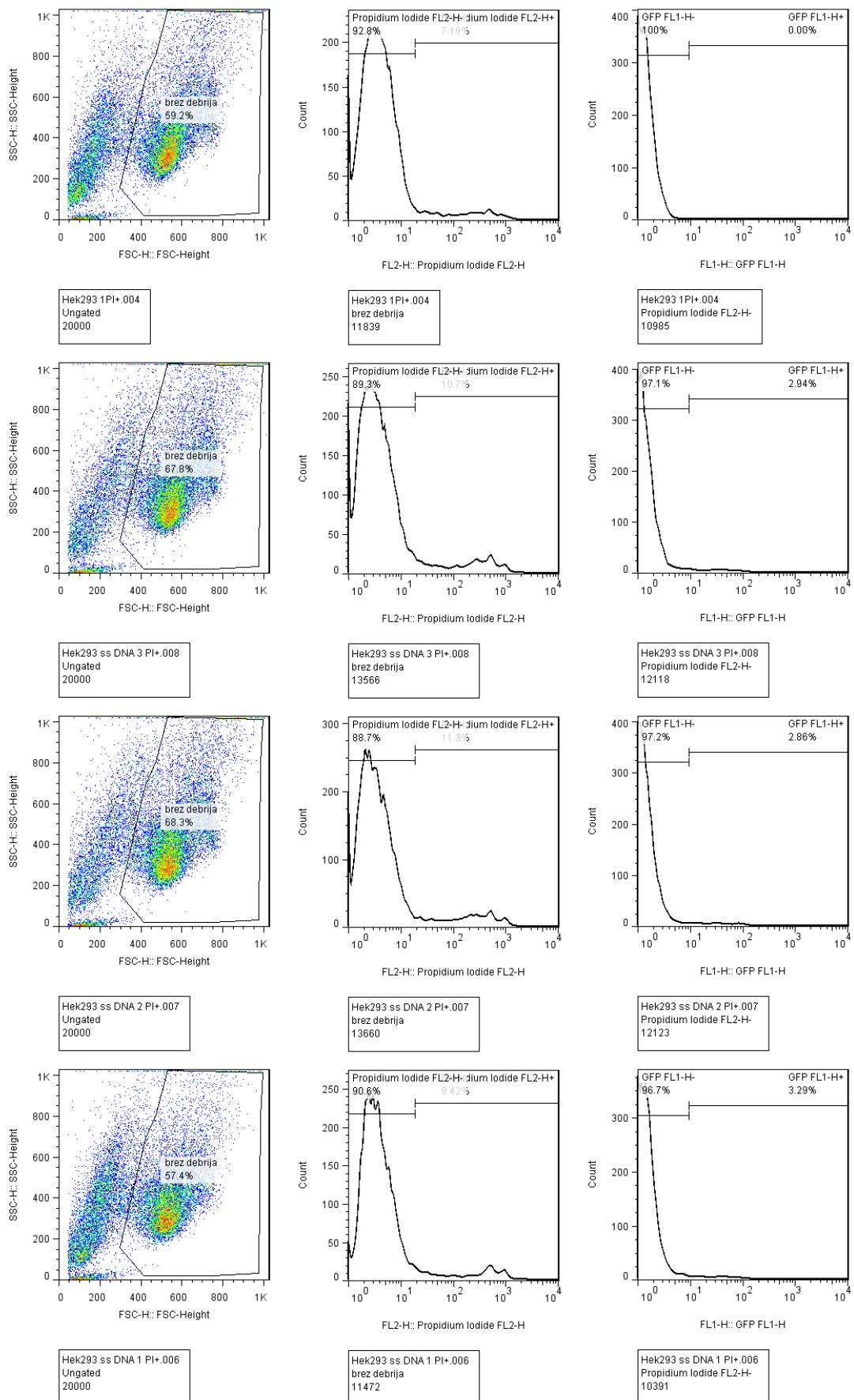
- Bakhshinejad, B. in Sadeghizadeh, M. (2014) 'Bacteriophages as vehicles for gene delivery into mammalian cells: prospects and problems', *Expert Opin Drug Deliv*, 11(10), pp. 1561-74.
- Bratkovič, T. (2010) 'Progress in phage display: evolution of the technique and its application', *Cell Mol Life Sci*, 67(5), pp. 749-67.
- Clark, J. R. in March, J. B. (2006) 'Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials', *Trends Biotechnol*, 24(5), pp. 212-8.
- Daniel, R. in Smith, J. A. (2008) 'Integration site selection by retroviral vectors: molecular mechanism and clinical consequences', *Hum Gene Ther*, 19(6), pp. 557-68.
- Dupont, E., Prochiantz, A. in Joliot, A. (2011) 'Penetratin story: an overview', *Methods Mol Biol*, 683, pp. 21-9.
- Gkouvatsos, K., Papanikolaou, G. in Pantopoulos, K. (2012) 'Regulation of iron transport and the role of transferrin', *Biochim Biophys Acta*, 1820(3), pp. 188-202.
- Hambly, E. in Suttle, C. A. (2005) 'The viriosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities', *Curr Opin Microbiol*, 8(4), pp. 444-50.
- Ibraheem, D., Elaissari, A. in Fessi, H. (2014) 'Gene therapy and DNA delivery systems', *Int J Pharm*, 459(1-2), pp. 70-83.
- Larocca, D. in Baird, A. (2001) 'Receptor-mediated gene transfer by phage-display vectors: applications in functional genomics and gene therapy', *Drug Discov Today*, 6(15), pp. 793-801.
- Larocca, D., Burg, M. A., Jensen-Pergakes, K., Ravey, E. P., Gonzalez, A. M. in Baird, A. (2002) 'Evolving phage vectors for cell targeted gene delivery', *Curr Pharm Biotechnol*, 3(1), pp. 45-57.
- Løset, G., Roos, N., Bogen, B. in Sandlie, I. (2011) 'Expanding the versatility of phage display II: improved affinity selection of folded domains on protein VII and IX of the filamentous phage', *PLoS One*, 6(2), pp. e17433.
- Merril, C. R., Geier, M. R. in Petricciani, J. C. (1971) 'Bacterial virus gene expression in human cells', *Nature*, 233(5319), pp. 398-400.
- Molek, P. in Bratkovič, T. (2015) 'Bacteriophages as scaffolds for bipartite display: designing swiss army knives on a nanoscale', *Bioconjug Chem*, 26(3), pp. 367-78.
- Nakase, I., Hirose, H., Tanaka, G., Tadokoro, A., Kobayashi, S., Takeuchi, T. in Futaki, S. (2009) 'Cell-surface accumulation of flock house virus-derived peptide leads to efficient internalization via macropinocytosis', *Mol Ther*, 17(11), pp. 1868-76.
- Nayerossadat, N., Maedeh, T. in Ali, P. A. (2012) 'Viral and nonviral delivery systems for gene delivery', *Adv Biomed Res*, 1, pp. 27.
- Piersanti, S., Cherubini, G., Martina, Y., Salone, B., Avitabile, D., Grossi, F., Cundari, E., Di Zenzo, G. in Saggio, I. (2004) 'Mammalian cell transduction and internalization properties of lambda phages displaying the full-length adenoviral penton base or its central domain', *J Mol Med (Berl)*, 82(7), pp. 467-76.
- Ponka, P. in Lok, C. N. (1999) 'The transferrin receptor: role in health and disease', *Int J Biochem Cell Biol*, 31(10), pp. 1111-37.
- Rozman, P., Vodnik, M. in Bratkovič, T. (v pripravi) *Magistrska naloga*.
- Schmidt-Wolf, G. D. in Schmidt-Wolf, I. G. (2003) 'Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update', *Trends Mol Med*, 9(2), pp. 67-72.

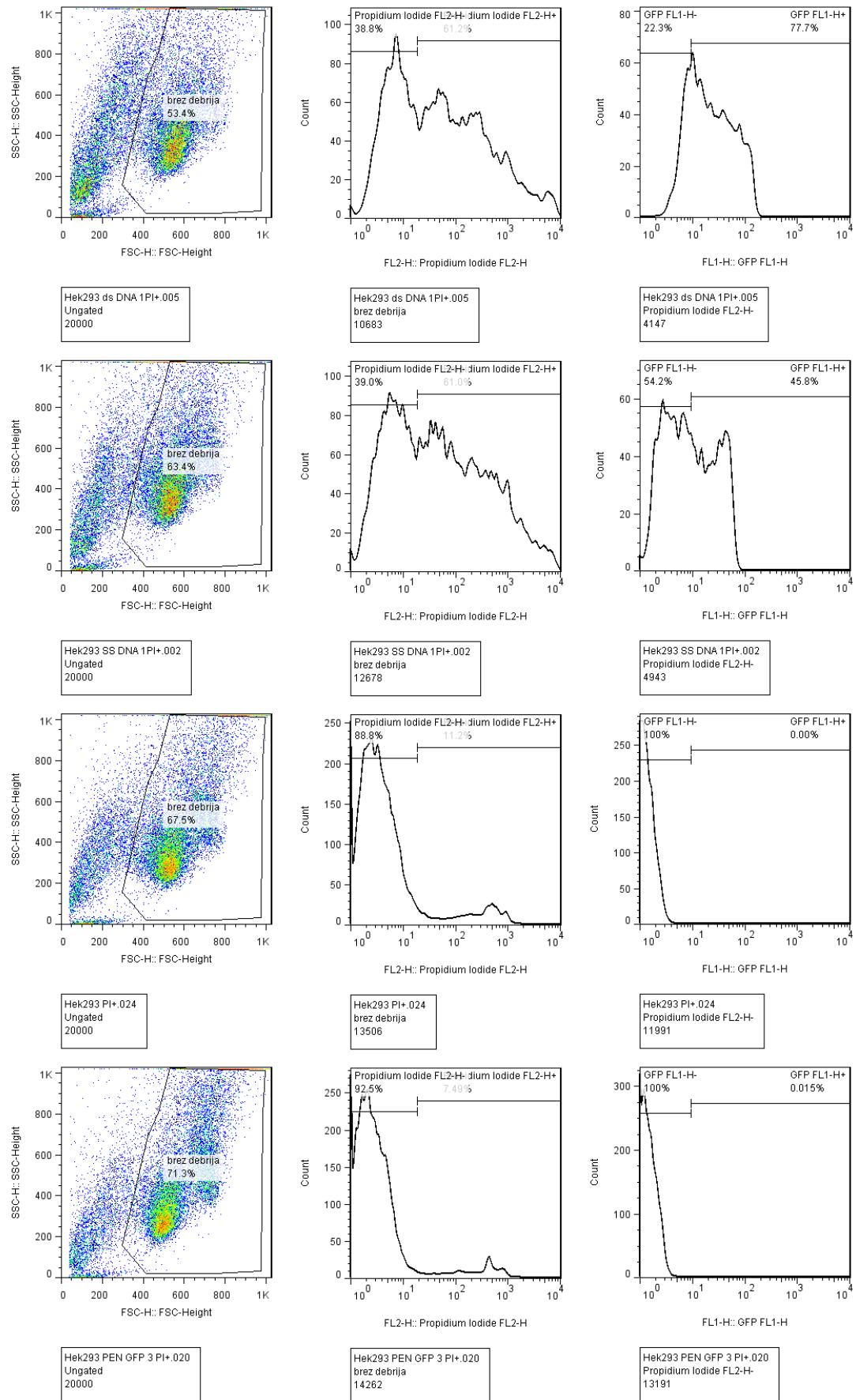
- Scott, J. K. in Smith, G. P. (1990) 'Searching for peptide ligands with an epitope library', *Science*, 249(4967), pp. 386-90.
- Seow, Y. in Wood, M. J. (2009) 'Biological gene delivery vehicles: beyond viral vectors', *Mol Ther*, 17(5), pp. 767-77.
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A. in Kay, M. A. (2003) 'Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy', *Nat Rev Genet*, 4(5), pp. 346-58.
- Thomas, P. in Smart, T. G. (2005) 'HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins', *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51(3), pp. 187-200.
- Uhlén, M., Björling, E., Agaton, C., Szigyarto, C. A., Amini, B., Andersen, E., Andersson, A. C., Angelidou, P., Asplund, A., Asplund, C., Berglund, L., Bergström, K., Brumer, H., Cerjan, D., Ekström, M., Elobeid, A., Eriksson, C., Fagerberg, L., Falk, R., Fall, J., Forsberg, M., Björklund, M. G., Gumbel, K., Halimi, A., Hallin, I., Hamsten, C., Hansson, M., Hedhammar, M., Hercules, G., Kampf, C., Larsson, K., Lindskog, M., Lodewyckx, W., Lund, J., Lundeberg, J., Magnusson, K., Malm, E., Nilsson, P., Odling, J., Oksvold, P., Olsson, I., Oster, E., Ottosson, J., Paavilainen, L., Persson, A., Rimini, R., Rockberg, J., Runeson, M., Sivertsson, A., Skölleramo, A., Steen, J., Stenvall, M., Sterky, F., Strömberg, S., Sundberg, M., Tegel, H., Tourle, S., Wahlund, E., Waldén, A., Wan, J., Wernerus, H., Westberg, J., Wester, K., Wrethagen, U., Xu, L. L., Hoher, S. in Pontén, F. (2005) 'A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics', *Mol Cell Proteomics*, 4(12), pp. 1920-32.
- Vodnik, M. in Lunder, M. (2013) *Razvoj peptidnih učinkovin za poseganje v delovanje grelina in vpliv estrogenih snovi na njegovo izražanje*. doktorat.
- Wang, J., Tian, S., Petros, R. A., Napier, M. E. and Desimone, J. M. (2010) 'The complex role of multivalency in nanoparticles targeting the transferrin receptor for cancer therapies', *J Am Chem Soc*, 132(32), pp. 11306-13.
- Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M. in Slopek, S. (1987) 'Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy', *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 35(5), pp. 563-8.
- Yin, H., Kanasty, R. L., Eltoukhy, A. A., Vegas, A. J., Dorkin, J. R. in Anderson, D. G. (2014) 'Non-viral vectors for gene-based therapy', *Nat Rev Genet*, 15(8), pp. 541-55.

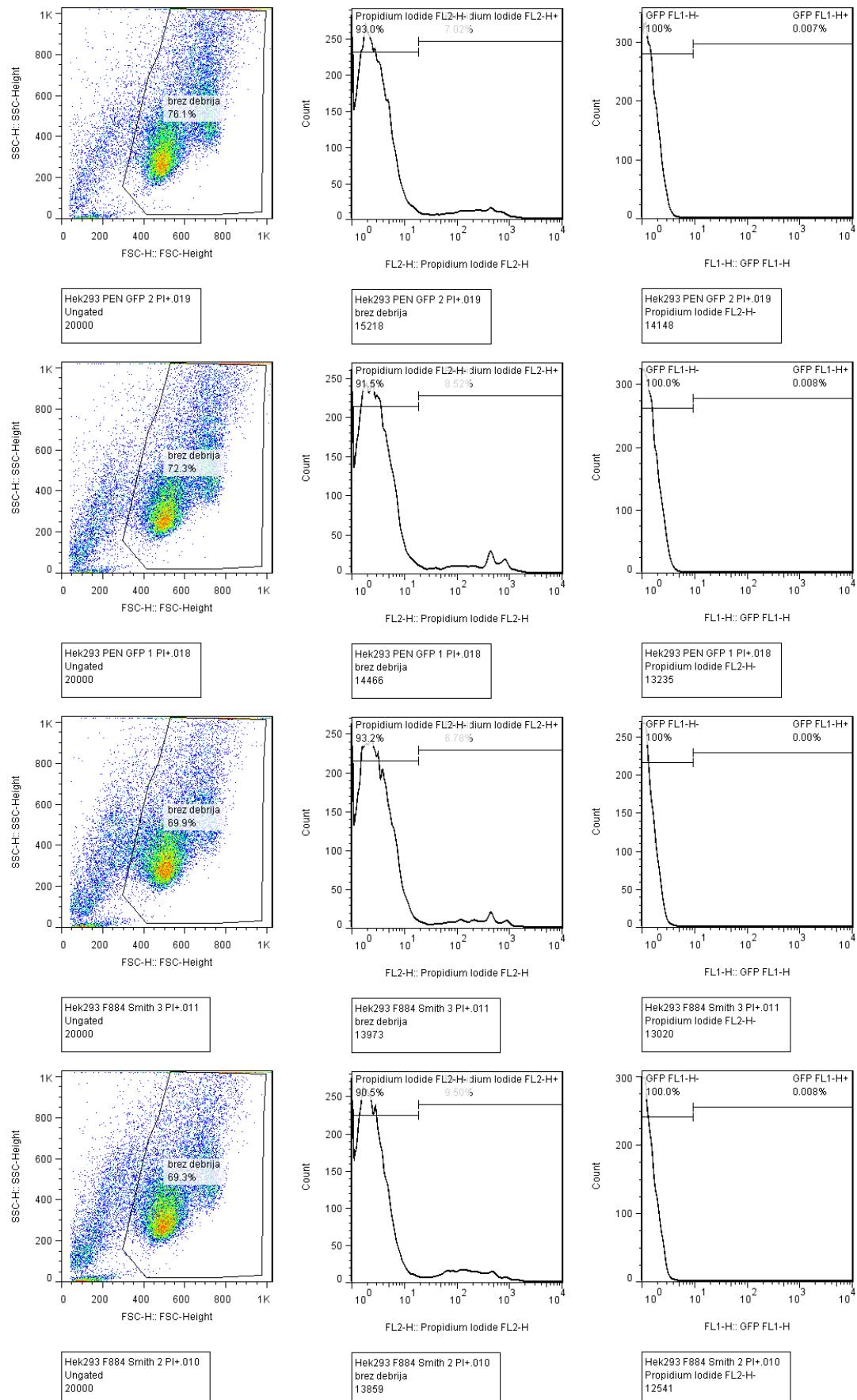
PRILOGE

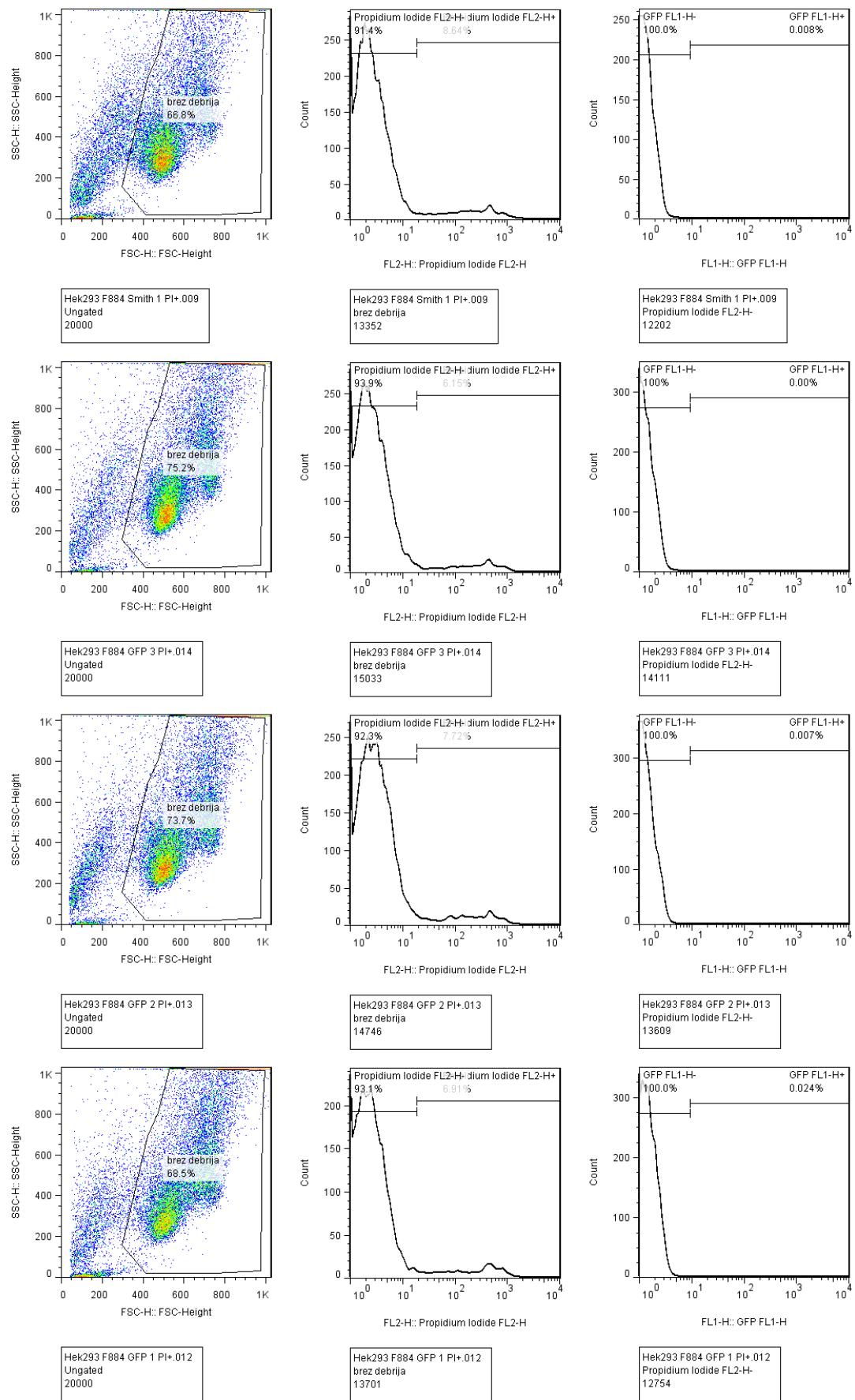
Priloga 1: Prikazani celotni rezultati celic HEK293, tretiranih z bakteriofagi, analizirani s pretočno citometrijo. V levem stolpcu so prikazani citogrami z zaježitvami, v sredini je prikazan histogram celic in signala propidijevega jodida ter zaježitev med živimi in mrtvimi glede na signal propidijevega jodida. Na desni je prikazan histogram živih celic in signala GFP.

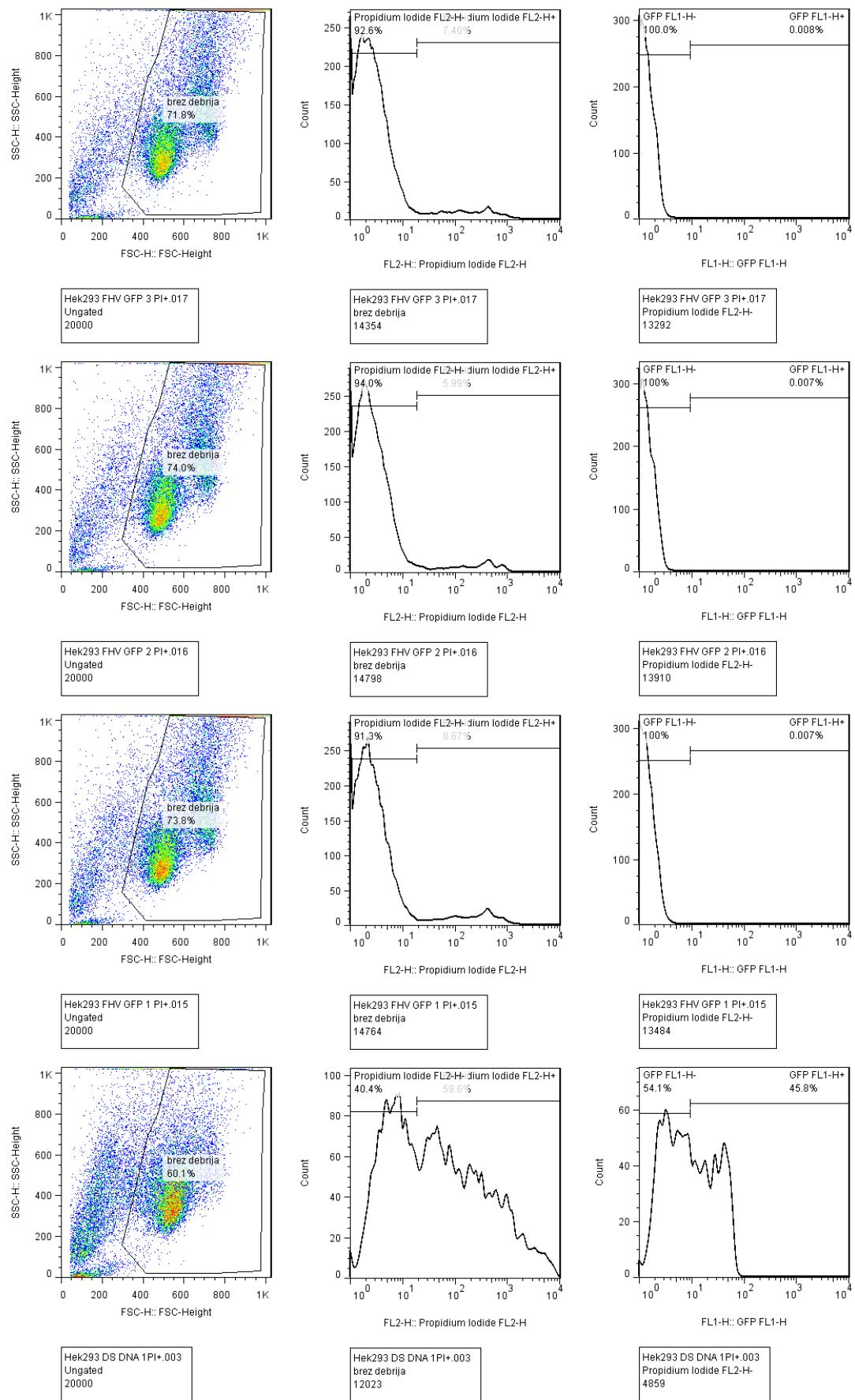












Priloga 2: Delež živih celic, ki je dajal pozitivni signal na GFP kanalu pri uporabi nižjega praznega signala. Delež živih celic, ki izražajo GFP, narašča v skladu s pričakovanji in predhodnimi opažanji – bakteriofaga f88-4 Smith in f88-4-GFP proizvedeta primerljiv signal, kar je pričakovano, saj f88-4 Smith ne vsebuje GFP kasete, medtem ko f88-4-GFP nima predstavljenih peptidov za vezavo na transferinski receptor. Bakteriofag 3TRL-2-GFP ima na pIII predstavljen ligand transferinskega receptorja, zato lahko sproža receptorsko endocitozo, kar privede do povečanja uspešnosti dostave in izražanja ekspresijske kasete. Predstavitev peptidov penetratina in FHV na proteinu pVIII bakteriofagov 3TRL-2-PEN in 3TRL-2-FHV povzroči še večji uspeh pri dostavi in izražanju ekspresijske kasete v celicah. Predstavitev FHV peptida na pVIII povzroči izboljšanje dostave, vendar penetratin povzroči najvišje izboljšanje pri dostavi in izražanju ekspresijske kasete.

