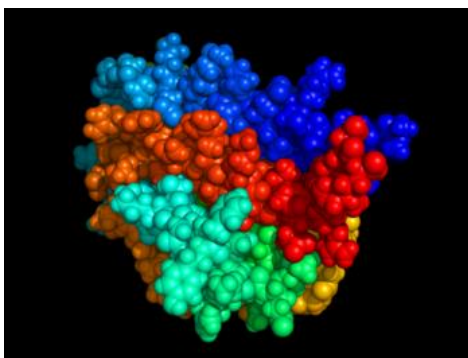




Mestna občina Celje
Komisija Mladi za Celje

UPORABA IN KARAKTERIZACIJA ERITROPOETINA V IN VITRO/IN VIVO SISTEMIH

Raziskovalna naloga



Avtorica:

Maša Smajila

Mentorja:

doc. dr. Iztok Prislan

Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani

mag. Mojca Alif

I. gimnazija v Celju

Celje, 2017

Kazalo vsebine

Kazalo vsebine	1
Kazalo grafov	6
Kazalo tabel.....	6
Zahvala	7
Povzetek	8
Abstract	8
1 Uvod.....	9
1.1 Namen dela in cilji	9
1.2 Hipoteze	9
2 Teoretični del.....	10
2.1 Eritropoetin.....	10
2.2 Liposomi.....	13
2.3 Pufri.....	17
2.4 Teoretične osnove metod	17
2.4.1 Spektrofotometrija.....	17
2.4.2 CD-spektroskopija.....	18
2.4.3 Diferenčna dinamična kalorimetrija.....	20
3 Eksperimentalni del.....	23
3.1 Raziskovanje strukture eritropoetina v odvisnosti od pH	23
3.1.1 Vzorec	23
3.1.2 Uporabljene kemikalije	23
3.1.3 Priprava pufrov (protokol)	23
Postopek	23
3.1.4 Dializiranje vzorca	24
3.1.5 Spektrofotometrija.....	25

Priprava vzorcev za spektrofotometrijo	27
Eritropoetin, dializiran v pufru s pH = 7,06	27
Eritropoetin, dializiran v pufru s pH = 11,07	28
Eritropoetin, dializiran v pufru s pH = 4,00	28
3.1.6 Spektropolarimetrija (CD-spektroskopija)	28
Priprava vzorcev za CD-spektroskopijo.....	28
3.1.7 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)	29
Priprava vzorcev za diferenčno dinamično kalorimetrijo	30
Eritropoetin, dializiran v pufru s pH = 7,06	30
Eritropoetin, dializiran v pufru s pH = 11,07	30
Eritropoetin, dializiran v pufru s pH = 4,00	30
3.2 Preučevanje ujetja eritropoetina v liposome	31
3.2.1 Priprava liposomov	31
3.2.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) liposomov	33
Priprava vzorca in reference za DSC liposomov.....	34
3.3 Preučevanje vpliva eritropoetina na živost kvasovk	35
4 Rezultati	38
4.1 Spektrofotometrija eritropoetina	38
4.1.1 Spektrofotometrija z Varianovim Cary 100 Bio spektrofotometrom.....	38
4.1.2 Spektrofotometrija z nanodropom.....	41
4.2 CD-spektroskopija eritropoetina	43
4.3 Diferenčna dinamična kalorimetrija eritropoetina	47
4.3.1 DSC eritropoetina pri vseh treh pH.....	47
4.3.2 DSC eritropoetina pri pH = 7,06; ugotavljanje reverzibilnosti toplotne denaturacije	52
4.4 Rezultati meritev z liposomi	53

4.4.1 Diferenčna dinamična kalorimetrija liposomov	53
4.5 Vpliv eritropoetina na kvasovke	55
5 Diskusija.....	57
6 Viri	59
6.1 Vsebinski viri	59
6.2 Viri slik.....	60

Kazalo slik

Slika 1: Regulacija tvorbe eritropoetina	11
Slika 2: Vsestranska uporaba EPO	12
Slika 3: Liposom	13
Slika 4: Liposomi po velikosti in številu dvoslojev	14
Slika 5: Liposomi glede na število dvoslojev	14
Slika 6: Vrste liposomov glede na funkcionalnost	15
Slika 7: Prikaz delovanja spektrofotometra	18
Slika 8: Primer optično aktivne snovi, ki bolje absorbira komponento desnosučne polarizirane svetlobe.....	19
Slika 9: Princip CD-spektroskopije.....	20
Slika 10: Princip delovanja DSC.....	22
Slika 11: Primer grafa DSC.....	22
Slika 12: Dializirna membrana.....	25
Slika 13: Priprava za dializo.....	25
Slika 14: Varianov spektrofotometer	26
Slika 15: Kiveta za spektrofotometer	26
Slika 16: Nanodrop	27
Slika 17: Kiveta za nanodrop	27
Slika 18: Čiščenje DSC	29
Slika 19: DSC.....	29
Slika 20: Referenčna in vzorčna celica	30
Slika 21: Polnjenje celic DSC	30
Slika 22: Bučka z raztopljenimi lipidi.....	31
Slika 23: : Bučka v uparjevalniku	31
Slika 24: UV-kopel.....	32
Slika 25: Centrifuga	32
Slika 26: Supernatant in liposomi	33
Slika 27: Hamiltonova brizga.....	34
Slika 28: DSC (uporabljen pri liposomih).....	35
Slika 29: Centrifugirki za delo s kulturami	36

Slika 30: Petrijevka z vzorčnimi razredčitvami	55
Slika 31: Petrijevka s kontrolnimi razredčitvami	55
Slika 32: Drugi poskus s kvasovkami	56

Kazalo grafov

Grafikon 1: Odvisnost absorbance od valovne dolžine (pH = 7,06)	38
Grafikon 2: Odvisnost absorbance od valovne dolžine (pH = 11,07)	39
Grafikon 3: Molarna eliptičnost v odvisnosti od valovne dolžine (pH = 7,06)	43
Grafikon 4: Molarna eliptičnost v odvisnosti od valovne dolžine (pH = 11,07)	44
Grafikon 5: Molarna eliptičnost v odvisnosti od valovne dolžine (pH = 4,00)	44
Grafikon 6: Primerjava strukture eritropoetina, dializiranega v različnih pH.....	45
Grafikon 7: Odvisnost spremembe toplotne kapacitete od temperature; prva ponovitev pri pH = 4,00.....	47
Grafikon 8: Odvisnost spremembe toplotne kapacitete od temperature; druga ponovitev pri pH = 4,00.....	48
Grafikon 9: Odvisnost toplotne kapacitete od temperature; prva ponovitev pri pH = 7,06.....	48
Grafikon 10: Odvisnost spremembe toplotne kapacitete od temperature; druga ponovitev pri pH = 7,06.....	49
Grafikon 11: Odvisnost spremembe toplotne kapacitete od temperature; tretja ponovitev pri pH = 7,06.....	49
Grafikon 12: Odvisnost spremembe toplotne kapacitete od temperature; ponovitev za pH = 11,07	50
Grafikon 13: Odvisnost spremembe toplotne kapacitete od temperature; pH = 7,06; vse tri ponovitve, združene na enem grafu.....	52
Grafikon 14: Prvi termogram liposomov	53
Grafikon 15: Drugi termogram liposomov, z dodanim eritropoetinom	54

Kazalo tabel

Tabela 1: Primerjava med izračunanimi spremembami entalpije za vse tri pH in vse termograme.....	51
--	----

Zahvala

Zahvalila bi se rada doc. dr. Iztoku Prislanu, ki mi je omogočil eksperimentalno delo v laboratorijih Biotehniške fakultete in bil v neizmerno pomoč med raziskovanjem in pisanjem naloge.

Zahvaljujem se tudi mag. Mojci Alif, ki mi je ves čas stala ob strani, mi svetovala in posredovala neprecenljivo znanje s področja kemije.

Zahvala gre tudi profesorici Juani Robida, ki je nalogo lektorirala.

Seveda pa gre zahvala tudi vsem družinskim članom, ki so mi stali ob strani in me podpirali.

Povzetek

Eritropoetin je glikoproteinski hormon, ki je prisoten tako na področju športa kot na področju medicine in farmacije. Ker je zelo obetaven in zanimiv za preučevanje, smo se v nalogi namenili preučiti vpliv pH in temperature na njegovo stabilnost.

Ker se eritropoetin uporablja tudi za zdravljenje anemije, smo želeli ugotoviti, ali ga lahko ujamemo v liposome, možne prenašalce učinkovin po telesu. Zanimalo nas je tudi, ali ima kakšen vpliv na živost modelnih organizmov, kot so kvasovke.

Naši rezultati so pokazali, da je vpliv pH na eritropoetin znaten in da je eritropoetin najstabilnejši v nevtralnem pH. Pri segrevanju se poruši nativna struktura eritropoetina, a denaturacija pri 85 °C je delno reverzibilna. Ugotovili smo tudi, da je ujetje eritropoetina v liposome kar težka naloga in da eritropoetin nima znatnega vpliva na rast kvasovk.

Abstract

Erythropoietin is a glycoprotein hormone, which is important in the field of medicine and pharmacy as well as in the field of sports. Because of its properties and use, we wanted to study its structure and the influence that environmental factors (pH and temperature) have on it.

Because of erythropoietin's use in treating anemia, we were also interested in catching it in liposomes, small vesicles made of lipids. They are often used as vectors of transport for delivering drugs into the body. All the same, we were interested in erythropoietin's influence on the growth and vividness of model organisms, such as yeast fungi.

Our results have shown that pH has an influence on the structure of erythropoietin, which is the most stable at neutral pH. We have found out that catching erythropoietin in liposomes is quite hard to do and that erythropoietin doesn't have a considerable influence on the vividness of yeast fungi.

1 Uvod

1.1 Namen dela in cilji

Eritropoetin je pomemben glikoproteinski hormon. Za raziskovanje je zelo obetaven. Ima številne možnosti uporabe, med drugim pozitivno vpliva na zdravljenje anemije. Srečamo ga tudi v športu, kjer se uporablja kot doping. Kljub njegovi uporabnosti pa se o njegovi strukturi in učinkih, ki jih imajo okoljski dejavniki na njegovo strukturo, še ne ve veliko. Zanimalo nas je, kako je z njegovo stabilnostjo pri različnih pH. Želeli smo ugotoviti, kakšen pH je najprimernejši za skladiščenje hormona, kar je pomembno predvsem na področju farmacije. Tam je pomembno, kako ga prenesemo do tarčnih celic. Ker bi kot vektorje prenosa lahko uporabili tudi liposome, nas je zanimalo, ali lahko eritropoetin ujamemo vanje.

Eritropoetin ima sposobnost aktivacije več receptorjev celice in skrbi za vrsto mehanizmov; med drugim je del sistema, ki skrbi za ustrezno število eritrocitov v krvi. Zanimalo nas je, ali ima tudi kakšen vpliv na modelne organizme, kot so kvasovke. Želeli smo ugotoviti, kako eritropoetin vpliva na živost kvasovk.

1.2 Hipoteze

Hipoteza 1: Struktura eritropoetina bo najstabilnejša pri nevtralnem pH.

Hipoteza 2: Toplotna denaturacija eritropoetina bo v preučevanem temperaturnem območju delno reverzibilna.

Hipoteza 3: Eritropoetin bo stabilnejši pri kislem kot pri bazičnem pH.

Hipoteza 4: Eritropoetin bo najbolj strukturiran pri nevtralnem pH.

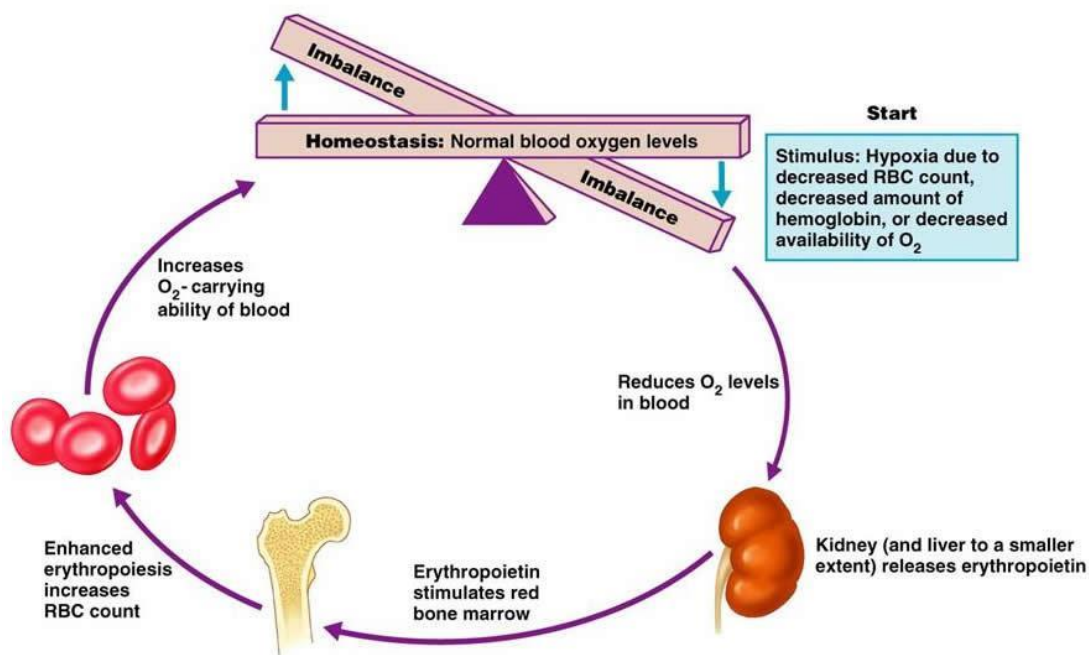
Hipoteza 4: Pričakujemo, da se bo del eritropoetina ujel v liposome.

Hipoteza 5: Eritropoetin bo vplival na živost kvasovk.

2 Teoretični del

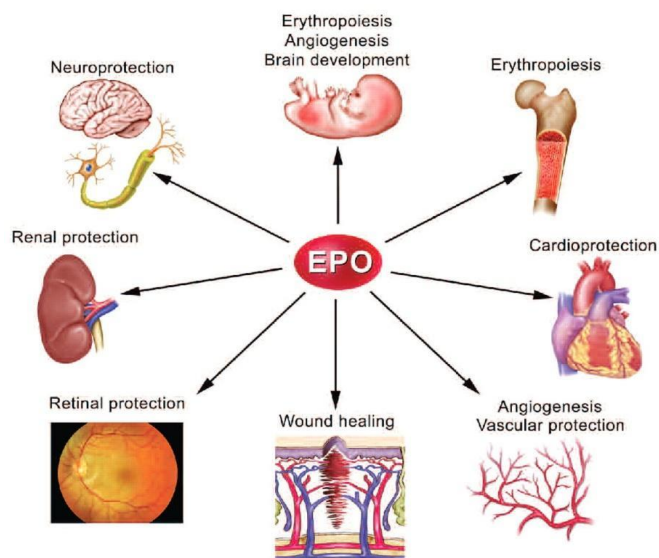
2.1 Eritropoetin

Eritropoetin (EPO) je glikoproteinski hormon, ki ima maso med 30 in 39 kDa. Ker je polaren, ima receptorje na tarčnih celicah na membrani in ne v notranjosti celice. Uravnava proliferacijo (delitev celice) in diferenciacijo eritrocitnih predhodnikov v kostnem mozgu. Pomemben je za tvorbo eritrocitov. Je del sistema, ki prilagaja količino eritrocitov glede na potrebe tkiv po kisiku. Po rojstvu se ga približno 10 % tvori v jetrih, večina pa v ledvicah v ledvični skorji. Učinkuje v kostnem mozgu. Neposredni dražljaj za njegovo tvorbo v ledvični skorji je hipoksija (stanje, ko je vsebnost kisika v telesnih tkivih nižja od normalne), posredni pa zmanjšan hematokrit (delež celic v krvi preiskovanca, ki se izmeri s standardiziranim postopkom centrifugiranja). Uravnavanje njegove tvorbe deluje po principu negativne povratne zanke (slika 1). Hipoksija povzroči tvorbo eritropoetina. Ta po krvnem obtoku pride v kostni mozeg in se veže na specifične receptorje na eritroidnih celicah. Posledica je stimulacija celic BFU-E in CFU-E, stimulacija diferenciacije normoblastov in potem zorenje eritrocitov. Število eritrocitov je tako povečano, posledica pa sta povišana hematokrit in koncentracija hemoglobina v krvi. Zvišana je oksiforna kapaciteta krvi (koliko kisika se lahko prenese na volumsko enoto krvi). Posledica je boljša oskrbljenost tkiv s kisikom, to pa zavira tvorbo eritropoetina. (1)



Slika 1: Regulacija tvorbe eritropoetina (Vir: <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio211/chap17/Slide7.JPG>. Datum dostopa: 11. 3. 2017.)

Eritropoetin se zaradi svojih lastnosti uporablja tudi v medicini (slika 2). Medtem ko se v našem telesu tvori endogeni (notranji, telesni) eritropoetin, pa v medicini uporabljajo rekombinantni humani eritropoetin (rHuEPO). Endogeni eritropoetin in različne oblike rHuEPO se med seboj razlikujejo v glikozilaciji (dodajanje saharidnih komponent na proteinsko molekulo, pri čemer nastane glikoprotein).



Slika 2: Vsestranska uporaba EPO (Vir: <http://dsas9a9gxtv2e.cloudfront.net/content/haematol/95/11/1803/F1.large.jpg>. Datum dostopa: 11. 3. 2017.)

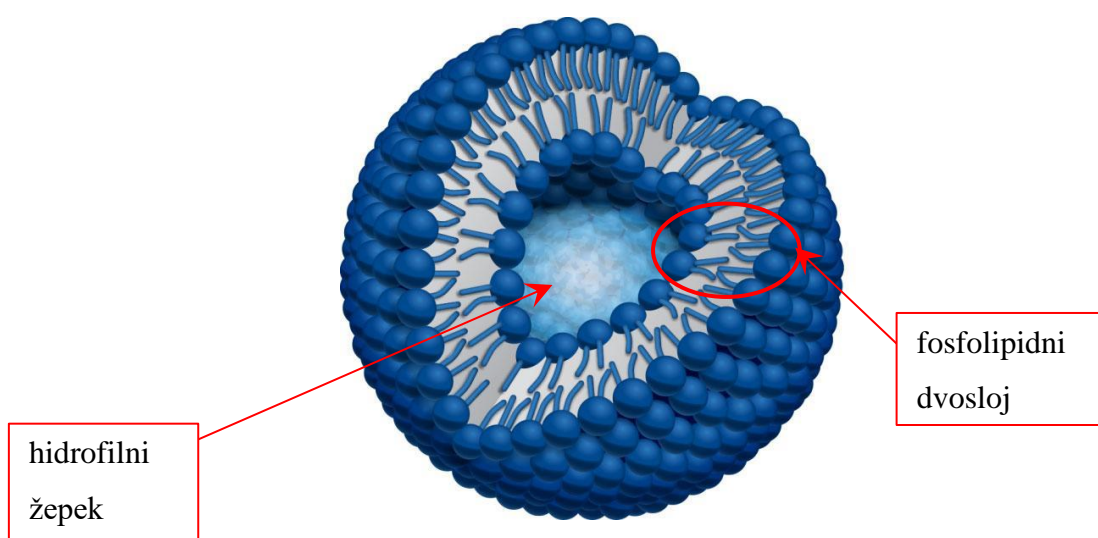
Rekombinantni humani eritropoetin se pridobiva tako, da komplementarni odsek DNA za EPO vstavijo v genom ene izmed celičnih linij, največkrat sta to linija kitajskega hrčka ali pa linija hrčka. Ti dve omogočata pravilno tvorbo disulfidnih vezi in glikozilacijo. (2)

Po tvorbi se rHuEPO uporablja v različne namene, na primer za zdravljenje anemije kot posledice kroničnih vnetij in rakavih bolezni, anemije zaradi kronične ledvične odpovedi, anemije kot posledice citostatskega zdravljenja pri razširjeni rakavi bolezni. Uporablja se tudi pri bolnikih, ki so v programu kronične hemodialize. (3)

Eritropoetin velikokrat zasledimo tudi kot sredstvo dopinga v športu, prav zaradi svoje vloge v nastajanju eritrocitov in tako povečane sposobnosti prenosa kisika po krvi. Ker pa je rekombinantni humani eritropoetin potreben le v primeru, ko endogenega eritropoetina ni dovolj, lahko neutemeljena uporaba pripelje do neugodnih posledic. Zaradi povečanega hematokrita se poveča viskoznost krvi, kar pa lahko privede do nastanka strdkov v pljučih ali krvnih žilah (trombembolija). Na to moramo biti pozorni tudi pri zdravljenju z rHuEPO. Ta ni primeren za ljudi z neurejenim krvnim tlakom pri arterijski hipertenziji. Pozorni moramo biti tudi na uporabo pri ljudeh s slabšim delovanjem jeter. (3)

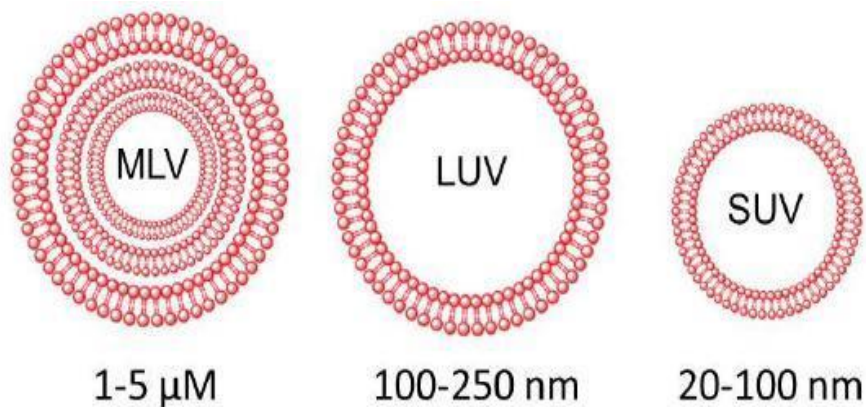
2.2 Liposomi

Liposomi so umetni vezikli sferične oblike, ki jih sestavlja en ali več lipidnih dvoslojev. V notranjosti imajo hidrofilni žep (slika 3). Za preučevanje so zelo zanimivi, saj predstavljajo relativno nov način za transport različnih učinkovin po telesu. Odkrili so jih pred približno tridesetimi leti. Sprva so jih uporabljali kot modelne strukture, sisteme za preučevanje bioloških membran, saj njihova struktura temelji na lipidnem (fosfolipidnem) dvosloju.

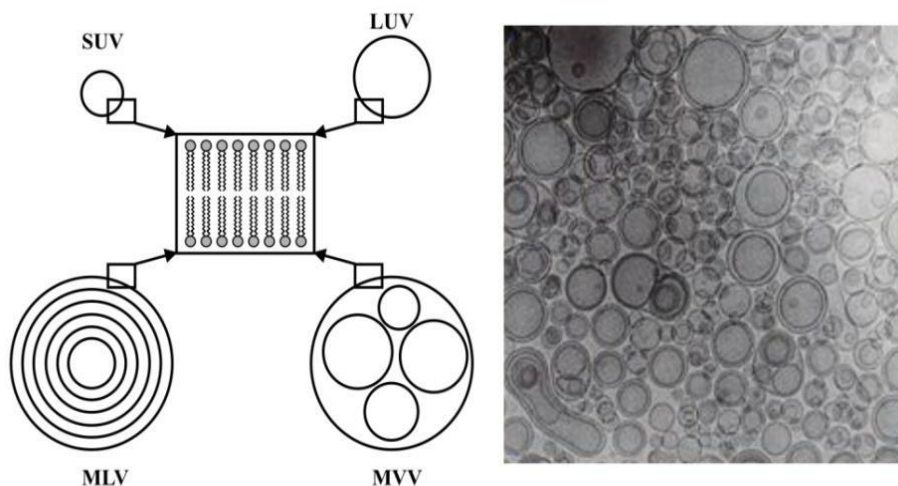


Slika 3: Liposom (Vir: <http://www.probonobio.com/images/liposome-full.jpg>. Datum dostopa: 11. 3. 2017.)

Glede na velikost in število dvoslojev ločimo enoslojne majhne vezikle (SUV), enoslojne velike vezikle (LUV) in velike večslojne vezikle (MLV) (sliki 4 in 5).



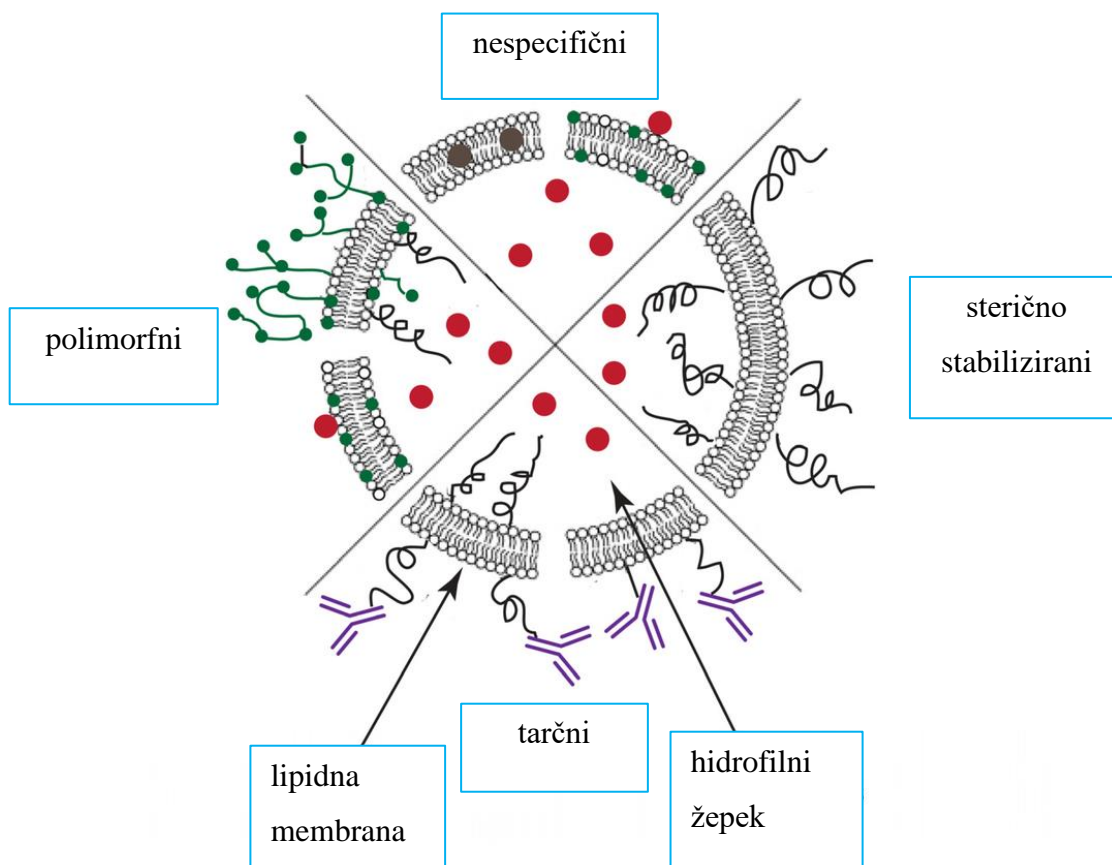
Slika 4: Liposomi po velikosti in številu dvoslojev (Vir: <http://www.scielo.br/img/revistas/babt/v59/1516-8913-babt-2016150477-gf01.jpg>. Datum dostopa: 11. 3. 2017.)



Slika 5: Liposomi glede na število dvoslojev (Vir: <http://www.intechopen.com/source/html/48147/media/image3.jpeg>. Datum dostopa: 11. 3. 2017.)

Glede na funkcionalnost poznamo več vrst liposomov (slika 6). Ločimo konvencionalne oziroma nespecifične liposome, sterično stabilizirane oziroma *stealth* liposome, specifične oziroma tarčne liposome in polimorfne liposome. Konvencionalni liposomi so *in vivo* nestabilni, zato njihovo obnašanje nadzorujejo *in vitro*. *Stealth* liposomi so modificirani oziroma prilagojeni tako, da so *in vivo* tudi do 100-krat stabilnejši kot konvencionalni liposomi. Zato jih lahko uporabljamo za transport učinkovin po telesu. Specifični liposomi

imajo na površino vezane molekule, kot so antigeni, protitelesa, ogljikovi hidrati in podobno. Z njimi tako prepoznajo tarčne celice in molekule. Polimorfni liposomi pa so liposomi, ki spremenijo fazo in strukturo po določenih interakcijah z ioni. Tako dobimo npr. kationske liposome, protonsko občutljive liposome (občutljivi na znižanje pH) idr.



Slika 6: Vrste liposomov glede na funkcionalnost (Vir: http://www.mdpi.com/pharmaceutics/pharmaceutics-06-00137/article_deploy/html/images/pharmaceutics-06-00137-g001-1024.png. Datum dostopa: 11. 3. 2017.)

Liposomi so predvsem prenašalci različnih molekul, kot so razne majhne molekule zdravil, nukleotidi, proteini, plazmidi. Te molekule so lahko v notranjosti liposoma ali na njegovi membrani. Največja težava, ki jo srečamo pri liposomih, je njihova nestabilnost. Konvencionalne liposome lahko uničijo lipoproteini v krvni plazmi tako, da jim odvzamejo lipide. Lahko pa jih uničijo tudi makrofagi, in sicer tako, da se imunostemske molekule vežejo na njihovo površino in jih prepoznajo kot tujek. Ti liposomi se zato akumulirajo le v

mononuklearnem fagocitnem sistemu (jetra in vranica), zato lahko delujejo le nanj. Za druga tkiva pa se uporabljajo *stealth* liposomi, ki imajo daljši rezidenčni čas v krvi. Na njihov bilipidni dvosloj so pripete verige polietilen glikola, ki preprečijo dostop do liposoma molekulam, ki bi lahko povzročile njegov razpad. (4)

2.3 Pufri

Puferske raztopine so raztopine, ki imajo določeno vrednost pH. So zmesi šibke kisline in njene soli ali šibke baze in njene soli. Zaradi ravnotežja v raztopini se njihov pH tudi ob dodani močni kislini ali bazi spremeni zelo malo, to pomeni, da se upirajo spremembi pH. Območje, v katerem se pufri upirajo spremembi pH (jo kompenzirajo), imenujemo pufersko območje. (5)

Pufri so zaradi svoje narave zelo pomembni v bioloških sistemih, saj reakcije znotraj organizmov potekajo pri določenih vrednostih pH. Ker se pufri spremembi pH upirajo, so ključne sestavine telesnih tekočin. Glavni intracelularni pufer je fosfatni, ekstracelularni pa bikarbonatni. (6)

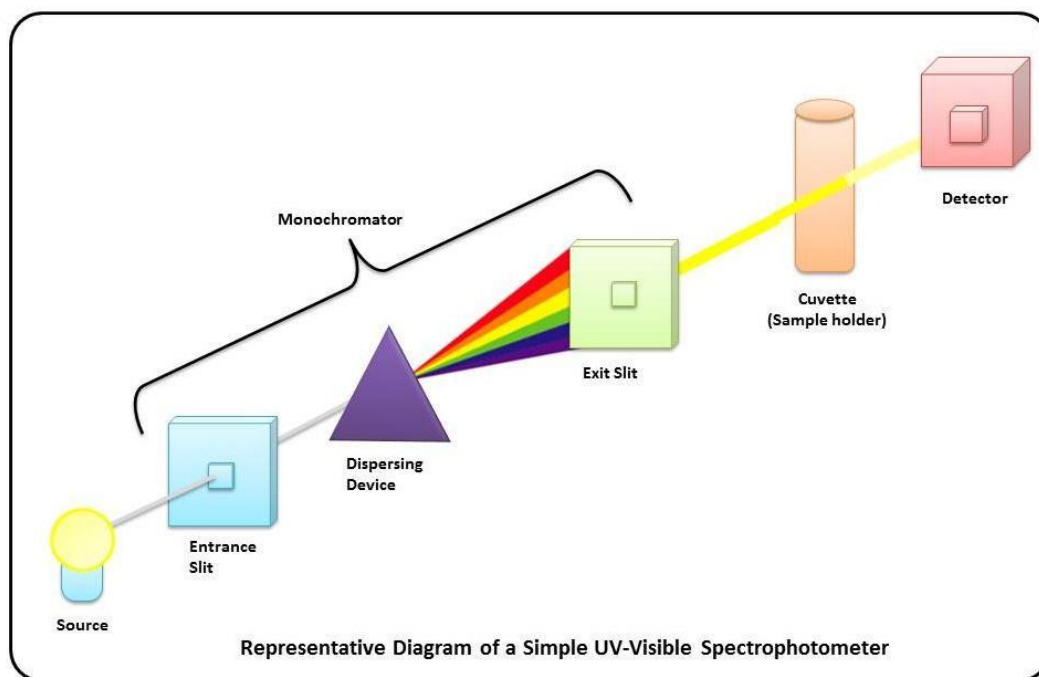
2.4 Teoretične osnove metod

2.4.1 Spektrofotometrija

Spektrofotometrija je spektroskopska metoda, s katero želimo določiti koncentracijo raztopine na podlagi absorpcije svetlobe določene valovne dolžine. Absorpcija svetlobe je odvisna od koncentracije kromoforjev (skupin, ki selektivno absorbirajo svetlobo dane valovne dolžine) in dolžine optične poti. Zvezo med temi parametri podaja Beer-Lambertov zakon:

$$A = \log \left(\frac{I_o}{I_p} \right) = \epsilon c l \quad \lambda = \text{konst.}$$

- A absorbanca
- I_o intenziteta svetlobe, ki jo prepušča kiveta s čistim topilom
- I_p intenziteta svetlobe, ki jo prepušča kiveta z vzorcem
- c koncentracija vzorca [mg/mL] ali [mol/L]
- l dolžina optične poti [cm]
- ϵ molarni absorpcijski/ekstinkcijski koeficient [mL/mg cm] ali [L/mol cm]
- λ valovna dolžina [nm] (7)



Namrata Heda

Slika 7: Prikaz delovanja spektrofotometra (Vir: http://4.bp.blogspot.com/-uQ6pRLd-m88/Ue_jKFI3Dpl/AAAAAAAAAqE/I2BMB53RByg/s1600/Simple+UV-Visible+Spectrophotometer.jpg. Datum dostopa: 11. 3. 2017.)

2.4.2 CD-spektroskopija

CD-spektroskopija je spektroskopska metoda, ki jo uporabljamo za preučevanje strukture pri optično aktivnih snoveh (idealni primer takšnih snovi so biološke makromolekule). Optično aktivne snovi so asimetrične, zato levo- in desnokrožno polarizirane svetlobe ne absorbirajo v enaki meri. Te snovi imajo zato značilen CD-spekter.

Asimetrija optično aktivnih snovi se pri proteinih kaže tako na nivoju primarne strukture (kiralni centri), sekundarne strukture (levo- ali desnosučna vijačnica) kot tudi terciarne strukture (inducirana asimetrija).

Smer krožno polarizirane svetlobe vpliva na njeno absorpcijo v raztopini optično aktivne snovi. Pojav, da snov levo- in desnokrožno polarizirane svetlobe ne absorbira enako, imenujemo cirkularni dikroizem (CD). Od tod tudi ime te spektroskopske metode. Kvantitativna mera za CD je razlika v absorbanci levo- in desnokrožno (cirkularno) polarizirane svetlobe pri določeni valovni dolžini: $\Delta A = A_L - A_D$, kjer je A_D absorbanca

desno, A_L pa absorbanca levokrožno polarizirane svetlobe ($\lambda = \text{konst.}$). Z ΔA je povezana tudi eliptičnost, θ . O eliptičnosti govorimo takrat, ko skozi raztopino prehaja linearno polarizirana svetloba (vsota levo- in desnokrožno polarizirane svetlobe enakih amplitud) in se ena izmed komponent (torej levo- ali desnokrožno polarizirana svetloba) absorbira bolj kot druga. Takrat prepuščeno valovanje ni več linearno, temveč eliptično polarizirano. Eliptičnost je določena kot:

$$\theta = 2,303\Delta A \frac{180^\circ}{4\pi}$$

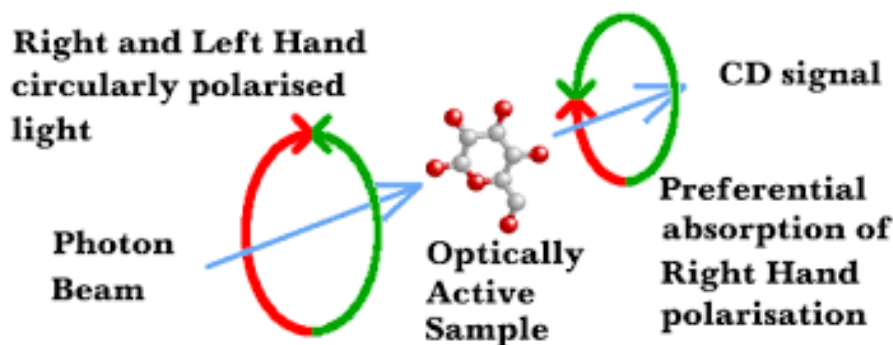
A absorbanca

Običajno jo podajamo v obliki molarne eliptičnosti, ki jo izračunamo iz eliptičnosti, koncentracije vzorca in dolžine optične poti po naslednji enačbi:

$$[\theta] = \frac{\theta}{cl}$$

c molarna koncentracija topjenca [dmol/cm^3]

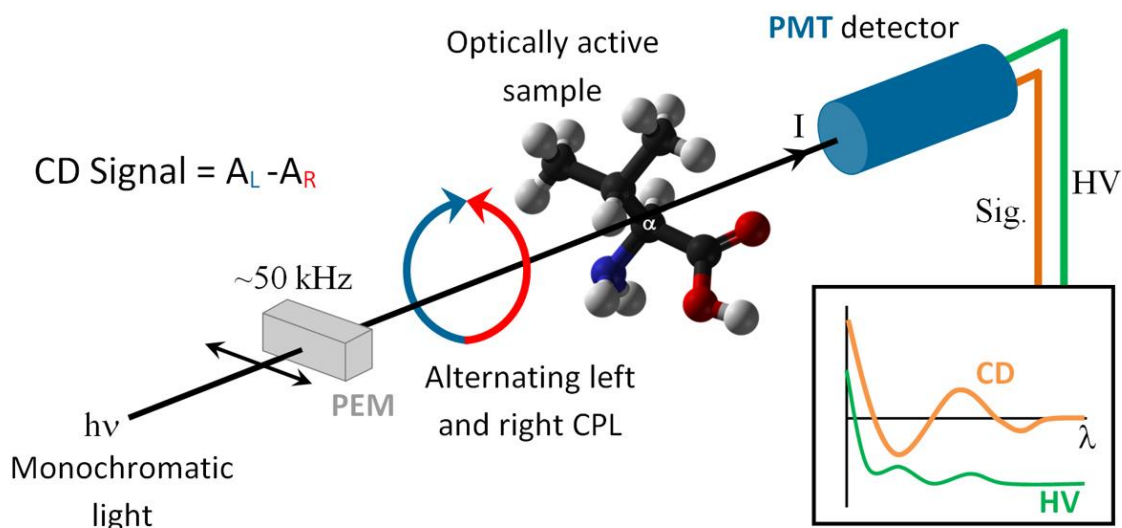
l dolžina optične poti [cm]



Slika 8: Primer optično aktivne snovi, ki bolje absorbira komponento desnokrožno polarizirane svetlobe (Vir: <https://encrypted-tbn3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSv3uqdf5v0aMoGsjBoTntKi1PK47QEDiOI5u0Hc3Xon2vG865s>. Datum dostopa: 11. 3. 2017.)

K CD-spekttru proteina največ prispevajo optično aktivne različne konformacije sekundarne strukture. Na podlagi značilnih CD-spektrov teh konformacij lahko določimo tudi njihov delež v proteinu. Vemo, da sta za α -vijačnico značilna dva minima, in sicer pri

208–210 nm in pri približno 222 nm, za β -strukturo je značilen minimum med 210 in 225 nm, za naključni klobčič pa približno 196 nm. (7)



Slika 9: Princip CD-spektroskopije (Vir:

<http://www.isa.au.dk/facilities/astrid2/beamlines/AU-cd/images/CD-principle-1200px.png>. Datum dostopa: 11. 3. 2017.)

Pri delu s CD-spektrometrom moramo biti zelo pazljivi. Ksenonska žarnica v notranjosti povzroči nastanek ozona (O_3), ko UV-svetloba reagira s kisikom (O_2). Ker je ozon škodljiv tako za zdravje kot za optične instrumente v napravi, se vanjo vpihava dušik, tako da v napravi ni prisotnega kisika (tudi zato, ker absorbira v daljni UV-regiji in bi se s tem lahko zmanjšalo območje valovne dolžine instrumenta). Pomembno je tudi, da je dušik čist in da se njegovo vpihavanje nadzoruje s posebnimi instrumenti za merjenje pretoka plina.

2.4.3 Diferenčna dinamična kalorimetrija

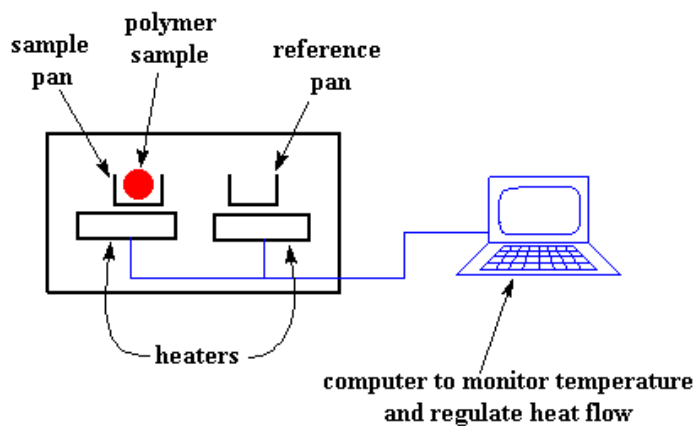
Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) je kalorimetrična metoda, ki se uporablja za preučevanje termodinamike zvitja in razvitja proteinov. Gre za tehniko, pri kateri opazujemo vpliv toplote na razvitje/zvitje preiskovanega vzorca. Potrebujemo referenco in vzorec, ki ju s

pomočjo pipete odpipetiramo v referenčno in vzorčno celico. Spremljamo temperaturno razliko med obema celicama in z instrumentom merimo toplotni tok (dQ/dt), ki je potreben za kompenzacijo toplotnega efekta, ki je posledica konformacijske spremembe na vzorcu. Toplotni tok se torej dovaja vzorčni celici v kalorimetru (pri neki T), da se njena temperatura ne razlikuje od temperature referenčne celice.

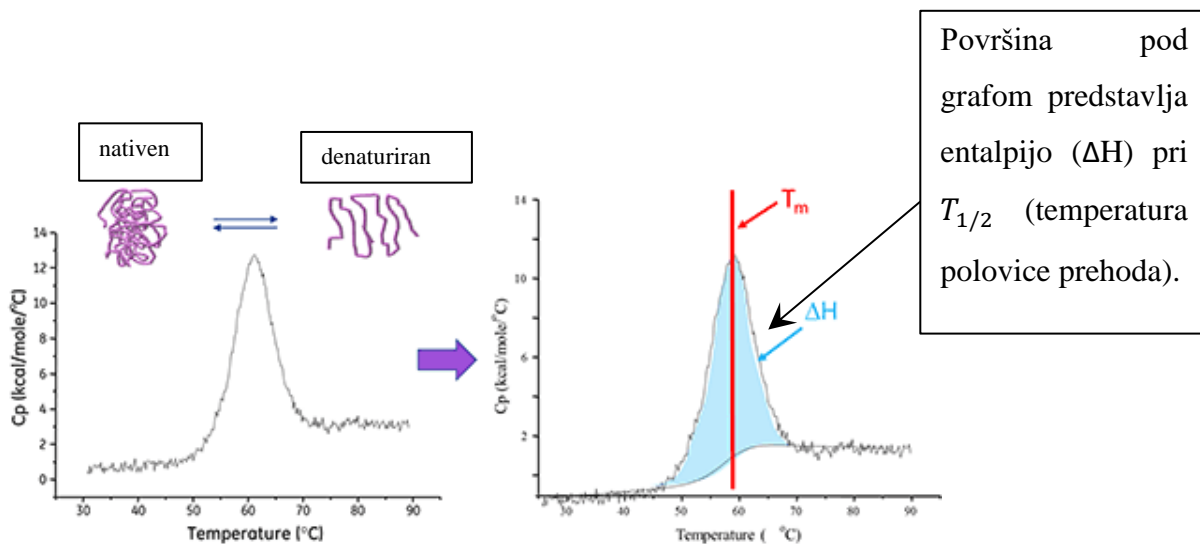
Konformacijska sprememba je povzročena z nadzorovanim višanjem temperature. Izmerjeni toplotni tok je torej posledica razvitja proteina, to pa je toplotno inducirano. Ker je višanje temperature nadzorovano, lahko to opišemo z enačbo:

$$T = T_0 + rt$$

T_0 je začetna temperatura, r je hitrost (*rate*) gretja v $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, t pa čas gretja. Pomemben pri diferenčni dinamični kalorimetriji je tudi stalen tlak nad referenčno in vzorčno celico. Ta je višji od atmosferskega in tako preprečuje nastanek zračnih mehurčkov in omogoča doseganje višjih temperatur brez pojava vrenja. (7)



Slika 10: Princip delovanja DSC (Vir: <http://pslc.ws/macrog/images/dsc01.gif>. Datum dostopa: 11. 3. 2017.)



Slika 11: Primer grafa DSC (Vir: http://www.malvern.com/Assets/Techn_DSC_01.png. Datum dostopa: 11. 3. 2017.)

3 Eksperimentalni del

3.1 Raziskovanje strukture eritropoetina v odvisnosti od pH

3.1.1 Vzorec

Vzorec, s katerim so bile opravljene raziskave, je bila raztopina eritropoetina s koncentracijo 2,2 mg/mL. Hranili smo jo pri temperaturi $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Eritropoetin nam je podarila FKKT (Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani), Katedra za fizikalno kemijo.

3.1.2 Uporabljene kemikalije

Ime kemikalije	Formula	Proizvajalec	Čistost
natrijev fosfat dodekahidrat	$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	Merck	p. a. čistost
natrijev klorid	NaCl	Merck	p. a. čistost
klorovodikova kislina	HCl	Merck	p. a. čistost
deionizirana voda	H_2O	Biotehniška fakulteta	

3.1.3 Priprava pufrov (protokol)

Za delo z vzorcem smo naredili tri 0,1 M fosfatne pufre z 0,3 M koncentracijo NaCl. Da smo dobili želen pH (4,00; 7,06 in 11,07), smo uporabili 2M HCl. Volumen vseh končnih raztopin pufrov je bil 1L. Za dializo smo jih razredčili z destilirano vodo v razmerju 1 : 1, da smo dobili 50 mM fosfatni pufer.

Postopek

Na tehtnico postavimo čašo, v katero previdno položimo magnetno mešalo. Vanjo nato zatehtamo 17,53 g natrijevega klorida (NaCl) in 38,02 g $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Dodamo destilirano vodo – približno do oznake 800 mL. Čašo z raztopino postavimo na magnetni

mešalnik in počakamo, da se raztopina homogenizira. Potem s pomočjo pH-metra, ki smo ga predhodno kalibrirali z raztopinami z znanim pH, izmerimo pH raztopine.

Prvotni pH raztopine je znašal približno 12,8. Da smo pH znižali do želene vrednosti (4,00; 7,06; 11,07), smo uporabili 2M* raztopino HCl. To smo pripravili tako, da smo v digestoriju v merilno bučko najprej odmerili majhno količino destilirane vode, nato pa dodali približno 42 mL 12M HCl. Do oznake 250 mL smo zopet dopolnili z destilirano vodo.

Po dosegu ciljnega pH smo v merilno bučko z volumnom 1L s pomočjo lija prelili raztopino iz čaše. Do oznake smo dopolnili z destilirano vodo. Raztopino smo dobro premešali in jo filtrirali s podtlakom, torej nučirali. Dobljeni prefiltrirani raztopini smo nato zopet izmerili pH in označili čašo z ustreznimi podatki.

*Opomba: Ker nismo želeli preseči volumna 1L že pri dodajanju raztopine HCl, saj je bil to naš ciljni volumen, smo zaradi opažene porabe pri pripravi pufrov s pH = 7,06 in pH = 11,07 za pripravo pufru s pH = 4,00 raje pripravili 250 mL 4M HCl. Torej smo namesto 42 mL pri redčenju uporabili približno 84 mL 12M HCl. Postopek redčenja je enak.

3.1.4 Dializiranje vzorca

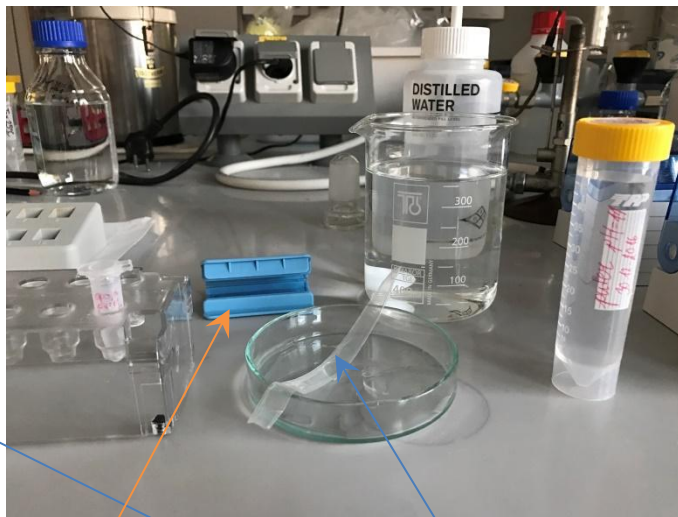
Po pripravi fosfatnih pufrov smo vzorec eritropoetina dializirali v vseh treh raztopinah pufrov (s pH 4,00; 7,06 in 11,07). Dializo smo izvedli zato, da je bil eritropoetin v stiku s pufrom določene vrednosti pH. Tako smo pozneje lahko opazovali vpliv pH na njegovo strukturo in toplotno inducirano razvitje. To smo naredili tako, da smo najprej odrezali 10 cm dializne membrane (spectra/por dializna membrana) s prepustnostjo 14 kD in jo vsaj 30 minut hidrolizirali v destilirani vodi. Tako smo odstranili preservative (glicerin). Po hidrolizaciji smo jo še enkrat sprali z destilirano vodo in nato en konec vpeli v ščipalko za membrano. V membrano smo nato odpipetirali 1 mL vzorca, ko smo eritropoetin dializirali v pufru s pH 7,06 in 500 μ L vzorca, ko smo eritropoetin dializirali v pufru s pH = 4,00 in pH = 11,07. Tako smo se odločili, da bi zmanjšali porabo vzorca. Membrano smo potem na obeh koncih vpeli v ščipalko in jo potopili v čašo s 400 mL 50 mM raztopine pufru, v katero smo predhodno dali magnetno mešalo. Potem smo čašo prenesli do magnetnega mešalnika v hladilniku ($T = -22\text{ }^{\circ}\text{C}$); tam se je vzorec najprej dializiral 1 uro. Po 1 uri smo zamenjali

pufersko raztopino in počakali še 2 uri. Po 2 urah smo opravili še zadnjo zamenjavo pufru in vzorec dializirali čez noč.

Po končani dializi smo ščipalko z membrano previdno vzeli iz čaše. Ščipalko smo odpeli in vsebino membrane prelili v plastično vialo. Vialo smo ustrezno označili in jo do priprave vzorcev za meritve postavili v hladilnik na $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 12: Dializna membrana (Vir: osebni arhiv)



Slika 13: Priprava za dializo (Vir: osebni arhiv)

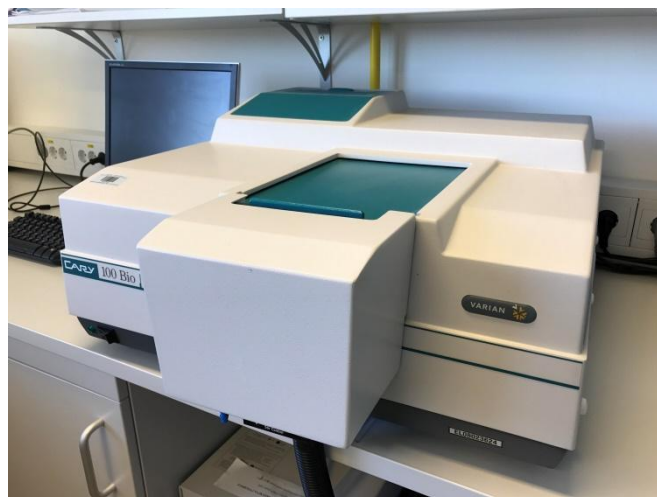
ščipalka za dializno membrano

dializna membrana

3.1.5 Spektrofotometrija

Namen spektrofotometrije je bil izmeriti koncentracijo dializiranega eritropoetina in koncentracije vzorcev za DSC in CD-spektroskopijo. Za spektrofotometrijo smo uporabili dve aparaturni, in sicer Varianov Cary 100 Bio spektrofotometer in Eppendorfov BioSpectrometer (t. i. nanodrop). Pri obeh instrumentih smo pred meritvami posneli bazno črto s pufrom s

pH = 7,06. Pri prvem smo merili v intervalu valovne dolžine 350–240 nm in s hitrostjo 300 nm/min. Ko smo pripravili vzorec za spektrofotometrijo, smo ga dali v kiveto z dolžino optične poti 1 cm. Obrisali smo jo s posebnim papirjem, ki ne pušča sledi in je zato primeren za optične elemente, ter jo vstavili v spektrofotometer. Opravili smo meritev. Iz posnetega spektra smo odčitali absorbanco pri $\lambda = 280$ nm in s pomočjo Beer-Lambertovega zakona izračunali koncentracijo vzorca.



Slika 14: Varianov spektrofotometer (Vir: osebni arhiv)



Slika 15: Kiveta za spektrofotometer (Vir: osebni arhiv)

Pri nanodropu smo za meritve absorbance uporabili svetlobo valovne dolžine 281 nm (ugotovili smo, da je pri tej valovni dolžini metoda najboljčutljivejša). Kiveta, ki smo jo uporabili, je bila drugačna, primerna za manjše količine vzorca. Ko smo pripravili vzorec, smo ga 4 μ L prenesli na kiveto. Kiveto smo zaprli, da se je oblikoval vodni stolpec, in jo vstavili v nanodrop. Opravili smo meritev.



Slika 16: Nanodrop (Vir: osebni arhiv)



Slika 17: Kiveta za nanodrop (Vir: osebni arhiv)

Priprava vzorcev za spektrofotometrijo

Eritropoetin, dializiran v pufru s pH = 7,06

Za pripravo vzorca za spektrofotometrijo smo najprej predvideli koncentracijo vzorca, ki bi pri ekstinkcijskem koeficientu $0,744 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ in optični poti 1 cm absorbiral z absorbenco 0,5. Za dobljeno koncentracijo (približno $0,672 \text{ mg mL}^{-1}$) smo nato izračunali, koliko eritropoetina, katerega koncentracija je bila pred dializo $2,2 \text{ mg mL}^{-1}$, in koliko pufru s pH = 7,06 moramo dodati v kiveto z volumnom 1 ml. Ugotovili smo, da moramo približno 0,7 mL pufru dodati približno 0,3 mL eritropoetina. Tako je bil naš vzorec za spektrofotometrijo pripravljen. Za merjenje absorbance vzorca smo uporabili prvi, Varianov spektrofotometer.

Eritropoetin, dializiran v pufru s pH = 11,07

Za eritropoetin, dializiran v pufru s pH = 11,07, smo najprej uporabili nanodrop spektrofotometer, nato pa še Varianov spektrofotometer. Za nanodrop smo vzorec pripravili tako, da smo eritropoetin redčili s pufrom s pH = 11,07 v razmerju 2 : 1. Za Varianov spektrofotometer pa smo vzorec pripravili tako, da smo 520 μL puфра dodali 80 μL eritropoetina in s tako pripravljeno raztopino napolnili 0,6 ml kiveto z optično potjo $l = 1 \text{ cm}$.

Eritropoetin, dializiran v pufru s pH = 4,00

Pri eritropoetinu, dializiranem v pufru s pH = 4,00, smo uporabili nanodrop spektrofotometer. Vzorec smo pripravili tako, da smo eritropoetin redčili s pufrom s pH = 4,00, in sicer smo 420 μL eritropoetina dodali 300 μL puфра (isti vzorec smo uporabili pri DSC).

3.1.6 Spektropolarimetrija (CD-spektroskopija)

Namen CD-spektroskopije je bil raziskovati strukturo eritropoetina, dializiranega v pufrih z različnimi pH. Zanimalo nas je, kako pH in temperatura vplivata na CD-spekter eritropoetina.

CD-spektroskopijo smo izvedli na instrumentu JASCO J-1500 CD Spectrometer. Kiveta za CD-spektroskopijo je bila široka 1 mm (dolžina optične poti). Nastavljena širina žarka (*bandwidth*) je bila 1,00 nm. Interval svetlobe je bil 199,5–260 nm, hitrost pa 20 nm/min. CD-spekter smo najprej posneli pri temperaturi 20 °C, nato pa pri temperaturi 85 °C. Da bi ugotovili, kakšne so strukturne spremembe po gretju vzorca na 85 °C, smo za to meritvijo opravili še eno pri 20 °C.

Priprava vzorcev za CD-spektroskopijo

Najprej smo s spektrofotometrijo določili koncentracije eritropoetina, dializiranega v vseh treh pufrih. Nato smo se lotili priprave vzorcev, ki bodo imeli koncentracijo približno 0,4 mg/mL. Tako smo za pripravo vzorca 1 (eritropoetin, dializiran v pufru s pH = 7,06) 249,4 μL puфра dodali 50,6 μL eritropoetina. Za pripravo vzorca 2 (eritropoetin, dializiran v pufru s pH = 4,00) smo 208,4 μL puфра dodali 91,6 μL eritropoetina. Za pripravo vzorca 3 (eritropoetin, dializiran v pufru s pH = 11,07) smo 261,3 μL puфра dodali 38,7 μL eritropoetina.

Pozneje smo vsem trem pripravljenim vzorcem s pomočjo nanodrop spektrofotometra izmerili še dejanske koncentracije.

3.1.7 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC)

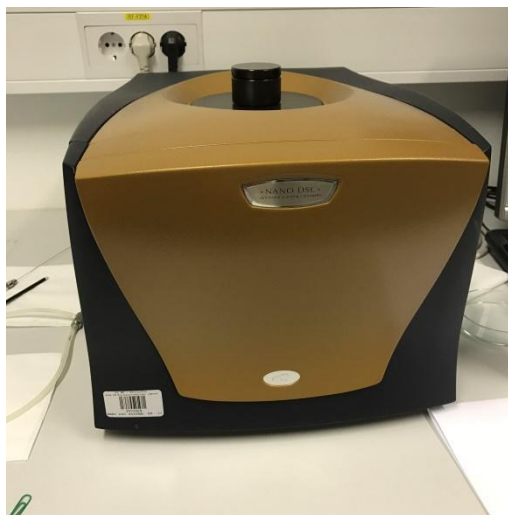
Diferenčno dinamično kalorimetrijo smo izvedli, da bi ugotovili, kakšna je razlika v toploti, ki jo moramo dovesti eritropoetinu, da se razvije, če je bil dializiran v pufrih z različnim pH. Zanimala nas je tudi reverzibilnost toplotne denaturacije eritropoetina.

Za diferenčno dinamično kalorimetrijo smo uporabili NANO DSC proizvajalca TA Instruments. Interval segrevanja je bil 10–85 °C, hitrost segrevanja/ohlajevanja 2 °C/min, nadtlak pa je bil nastavljen na 3 atmosfere. Pri vsakem izmed vzorcev eritropoetina smo poleg segrevanja takoj za njim izvedli še ohlajanje in nato zopet segrevanje, da bi ugotovili reverzibilnost toplotne denaturacije.

Pred izvedbo diferenčne dinamične kalorimetrije smo pred vsakim novim vzorcem očistili referenčno in vzorčno celico. V viali z vzorcem in referenco smo dali majhna magnetna mešala in ju s pomočjo vakuuma razplinili. Tako smo odstranili zračne mehurčke, ki bi lahko motili meritve. Čas razplinjevanja je bil 20 minut. Potem smo napolnili celici GSC, v referenčno celico smo dali pufer z ustreznim pH, v vzorčno pa vzorec. Količina dodane snovi je v obeh celicah bila enaka, in sicer 570 μ L. Celici smo pri izhodu pokrili z zamaški, nato pa vse skupaj dobro pritrdili še s pokrovom. Nastavili smo ustrezne pogoje in opravili meritve.



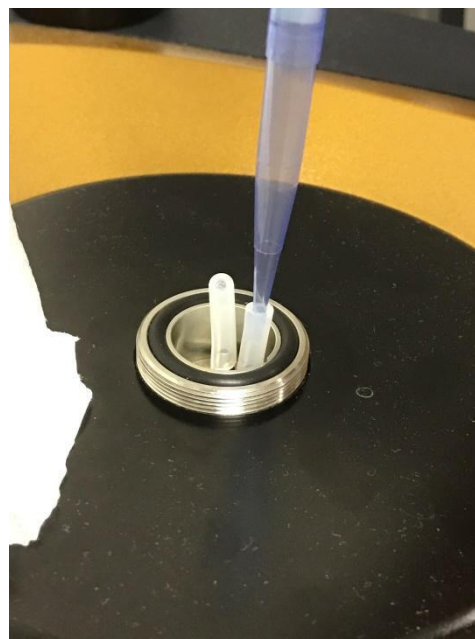
Slika 18: Čiščenje DSC (Vir: osebni arhiv)



Slika 19: DSC (Vir: osebni arhiv)



Slika 20: Referenčna in vzorčna celica (Vir: osebni arhiv)



Slika 21: Polnjenje celic DSC (Vir: osebni arhiv)

Priprava vzorcev za diferenčno dinamično kalorimetrijo

Eritropoetin, dializiran v pufri s pH = 7,06

Dializirano raztopino eritropoetina smo razredčili v razmerju 2 : 1, tako da smo dobili koncentracijo 1,65 mg/mL pri volumnu 600 μ L (koncentracijo smo po DSC preverili s spektrofotometrijo z nanodrop spektrofotometrom). Raztopini eritropoetina (vzorec) in puфра (referenca) smo razplini in posneli termograme po že opisanem postopku.

Eritropoetin, dializiran v pufri s pH = 11,07

Vzorec smo pripravili tako, da smo 400 μ L eritropoetina, dializiranega v pufri s pH = 11,07, razredčili z dodatkom 300 μ L puфра. Tako smo dobili koncentracijo 1,78 mg/mL. Pri tem vzorcu eritropoetina je interval segrevanja bil izjemoma 5–85 $^{\circ}$ C in ne 10–85 $^{\circ}$ C.

Eritropoetin, dializiran v pufri s pH = 4,00

Za eritropoetin, dializiran v tem pufri, smo vzorec pripravili tako, da smo 300 μ L puфра s tem pH dodali 420 μ L eritropoetina. Tako smo dobili koncentracijo 0,82 mg/mL (to smo izmerili s spektrofotometrijo vzorca z nanodrop spektrofotometrom).

3.2 Preučevanje ujetja eritropoetina v liposome

3.2.1 Priprava liposomov

Za pripravo liposomov smo uporabili molekule DPPC. DPPC je fosfolipid, to pomeni, da njegovo strukturo sestavljajo polarna (hidrofilna) glava in dva nepolarna (hidrofobna) repka. Takšna struktura mu omogoča tvorbo liposomov.

Liposome smo pripravili tako, da smo v manjšo bučko z okroglim dnom odpipetirali 1,0 mL kloroforma, v katerem so bile raztopljene molekule DPPC. Koncentracija DPPC v raztopini je bila 10 mg/mL. Bučko z raztopino smo nato dali v rotacijski uparjevalnik za približno 2 uri.

V rotacijskem uparjevalniku s pomočjo nizkega tlaka povzročimo, da se kloroformu zniža temperatura vrelišča, tako da hitreje upari. Na bučki se zaradi rotacij ustvari lipidni film.



Slika 22: Bučka z raztopljenimi lipidi (Vir: osebni arhiv)



Slika 23: Bučka v uparjevalniku (Vir: osebni arhiv)

Ko smo bučko vzeli iz rotacijskega uparjevalnika, smo vanjo odpipetirali 1,0 mL vzorca eritropoetina s koncentracijo 2,2 mg/mL. Ker so molekule DPPC prišle v stik s polarno fazo, so se orientirale tako, da se je njihov polarni del obrnil proti okolju (polarna faza), nepolarni pa v notranjost. Tako so se formirali liposomi oziroma lipidni vezikli.

Bučko smo dali na mešalnik Vibromix, na katerem smo skušali z vibracijami postrgati čim več fosfolipidov z njene stene. To smo poskusili še mehansko s pomočjo steklenih kroglic, ki smo jih dali v bučko, to pa smo potem zopet postavili na mešalnik. Suspenzijo v bučki smo potem degazirali s pomočjo UV-kopeli in vanjo odpipetirali še 1,0 mL fosfatnega pufra s pH 7,06. Snov iz bučke smo nato odpipetirali v 2 plastični viali, v vsako po 984 μ L. Viali smo dali v centrifugo za 1 dan.



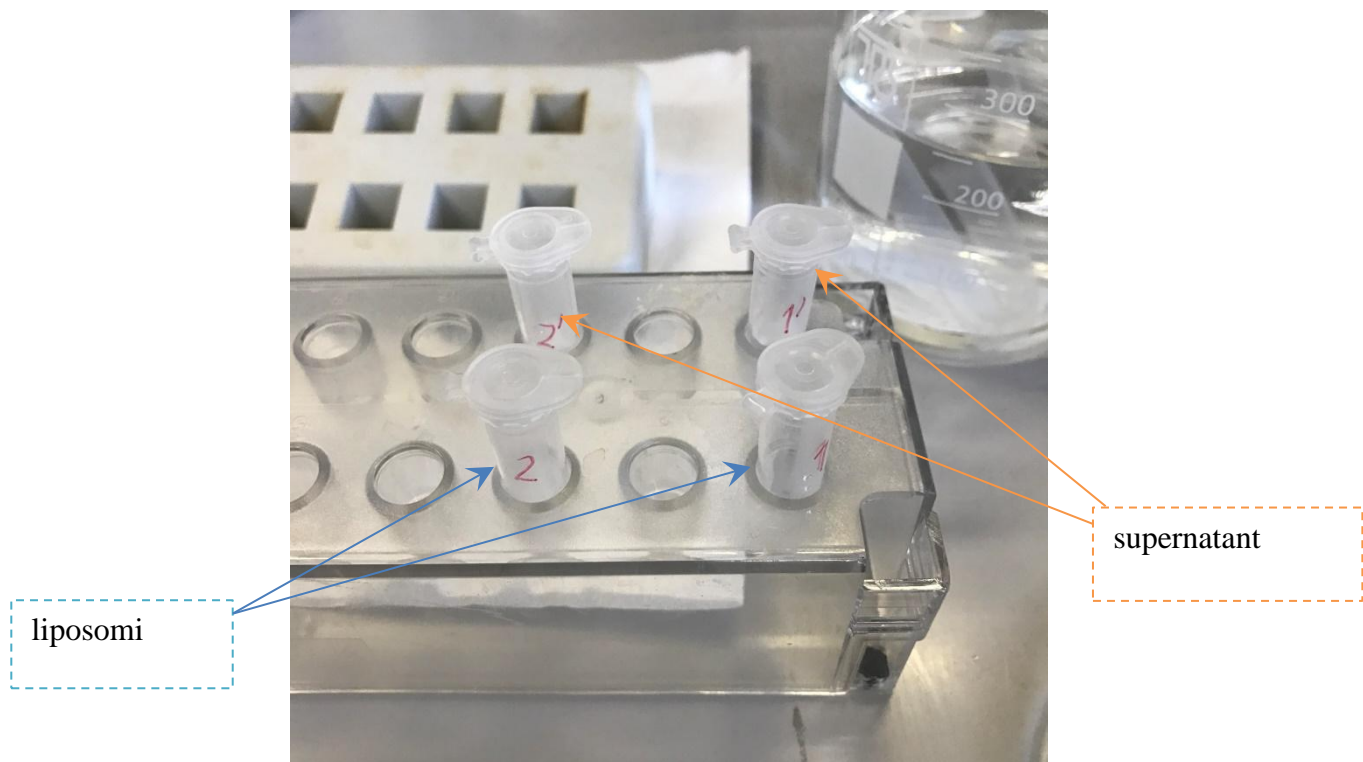
Slika 24: UV-kopel (Vir: osebni arhiv)



Slika 25: Centrifuga (Vir: osebni arhiv)

Po centrifugiranju smo opazili, da imamo v obeh vialah (1, 2) na dnu liposome, nad njimi pa supernatant z neujetim eritropoetinom. Supernatant smo odpipetirali iz obeh vial (1, 2) v dve novi viali (1', 2'). To smo naredili počasi in postopno, da nismo zraven odpipetirali še liposomov. Po pipetiranju smo tako imeli 4 vial; v prvih dveh so bili liposomi (1, 2), v drugih dveh pa supernatant (1', 2'). Začeli smo z analizo supernatanta, tako da smo s pomočjo spektrofotometrije ugotovili koncentracijo eritropoetina v njem. Tako smo lahko sklepali, koliko eritropoetina se je ujelo v liposome oziroma koliko ga je ostalo na njihovi površini.

Liposome smo raztopili v pufri s pH = 7,06 in jih dali na diferenčni dinamični kalorimeter.



Slika 26: Supernatant in liposomi (Vir: osebni arhiv)

3.2.2 Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) liposomov

Namen diference dinamične kalorimetrije liposomov je bil ugotoviti, ali se je kaj eritropoetina ujelo vanje oziroma ostalo na njihovi površini. Na interakcijo med liposomi in proteini bi lahko sklepali, če bi opazili spremembe v obliki DSC-krivulje, ki je sicer značilna za razprtje liposomov.

Priprava vzorca in reference za DSC liposomov

Liposome, ki so se po centrifugiranju usedli na dno vial 1 in 2, smo raztopili v fosfatnem pufru s pH 7,06. To smo naredili tako, da smo v vialo 1 najprej odpipetirali 500 μL pufra. Nato smo jo dali na mešalnik Vibromix, da je nastala suspenzija. Nastalo suspenzijo smo potem odpipetirali v vialo 2. Postopek smo ponovili tako, da smo v vialo 1 odpipetirali še 300 μL pufra. Tako smo s sten prve viala pobrali vse liposome, ki jih nismo pobrali pri prvem prenosu. Vialo smo potem dali na mešalnik Vibromix in vso njeno vsebino odpipetirali v vialo 2. V viali 2 smo tako dobili suspenzijo liposomov iz obeh vial.

Za referenčno raztopino smo v tem primeru vzeli kar fosfatni pufer, s katerim smo pripravili vzorec (liposome). Tudi pufer smo dali v vialo, ki smo jo skupaj z vialo 2, v kateri je bil vzorec, razplinili. Razplinjevanje je potekalo pod vakuumom približno 20 minut.

Za snemanje termogramov suspenzije liposomov smo uporabili N-DSC III kalorimeter s celicami v obliki lizike (t. i. *lollipop cells*). Te vrste kalorimeter je primernejši za suspenzije, saj je celice lažje očistiti. V obe celici, tako vzorčno kot referenčno, smo s pomočjo hamiltonove brizge dali 600 μL vzorca oziroma reference. Interval segrevanja je bil 10–85 $^{\circ}\text{C}$, hitrost segrevanja (*rate*) pa 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Po segrevanju smo celici tudi ohlajali, da smo ugotovili reverzibilnost toplotne denaturacije.



Slika 27: Hamiltonova brizga (Vir: osebni arhiv)



Slika 28: DSC (uporabljen pri liposomih) (Vir: osebni arhiv)

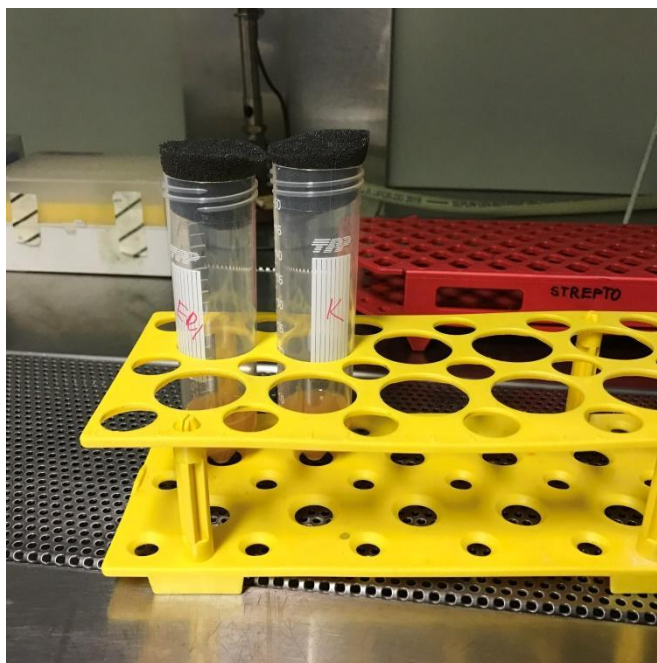
Ker so prvi rezultati pokazali, da je potrebna večja razredčitev vzorca, smo v ta namen pripravili nov, bolj razredčen vzorec. Pripravili smo ga tako, da smo 100 μL suspenzije iz vial 2 (liposomi s pufrom) redčili s 700 μL supernatanta. Referenca je ostala enaka, tj. fosfatni pufer s $\text{pH} = 7,06$.

V vzorčno celico smo dali liposome s supernatantom, v referenčno pa fosfatni pufer s $\text{pH} = 7,06$. Temperaturni interval je bil 10–85 $^{\circ}\text{C}$, hitrost segrevanja pa 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

3.3 Preučevanje vpliva eritropoetina na živost kvasovk

Ker so kvasovke modelni organizmi, na katerih lahko preučujemo vpliv učinkovin na rast, razmnoževanje, metabolizem ipd., smo se odločili, da bomo naredili poskus tudi z njimi. Uporabili smo vrsto kvasovk *Saccharomyces cerevisiae*. Naredili smo suspenzijo kulture in jo stresali 1 uro pri $T = 28,1$ $^{\circ}\text{C}$ in 220 obratih/min. Po stresanju smo začeli s pripravo kontrole in vzorca. Delo je potekalo v laminariju, torej v sterilnem okolju. Vzeli smo 2 centrifugirki in v vsako dali 5 mL suspenzije kulture kvasovk. Pred dodajanjem smo suspenzijo še enkrat

ročno stresali. Nato smo v eno izmed centrifugirk dali še 1 mL pufra s pH = 7,06 (kontrola), v drugo pa 1 mL eritropoetina (vzorec). Obe centrifugirki smo nato ponovno stresali 1 uro na $T = 28,1\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 220 obratih/min.



Slika 29: Centrifugirki za delo s kulturami (Vir: osebni arhiv)

Po stresanju smo s centrifugirkama nadaljevali delo v laminariju. Da bi ugotovili, ali eritropoetin vpliva na živost kvasovk, smo tako z vzorcem kot s kontrolo naredili razredčitve po Kochu. Najprej smo si pripravili vialo, v katerih smo pripravili razredčitve. V prvo vialo smo odpipetirali 100 μL vzorca oziroma kontrole (postopek je bil za obe centrifugirki enak). Dodali smo 900 μL pufra. Vialo smo nato pretresli in vsebino premešali. Potem smo iz prve vialo (vanjo smo naredili prvo razredčitev) odpipetirali 100 μL v drugo vialo. V to smo nato zopet dodali 900 μL pufra in premešali. Tako smo dobili drugo razredčitev. Postopek smo ponovili še 4-krat.

Ko smo pripravili serije razredčitev vzorca, smo si v laminarij postavili dve petrijevki s hranilnim agarjem. Površino petrijevk smo razdelili na 6 približno enakih delov. Vsak del smo označili s številko razredčitve. Potem smo na označena mesta na hranilnem agarju odpipetirali po 10 μL suspenzij. Petrijevki smo pokrili in jih za 48 ur postavili na 28 $^{\circ}\text{C}$ v inkubator. Po

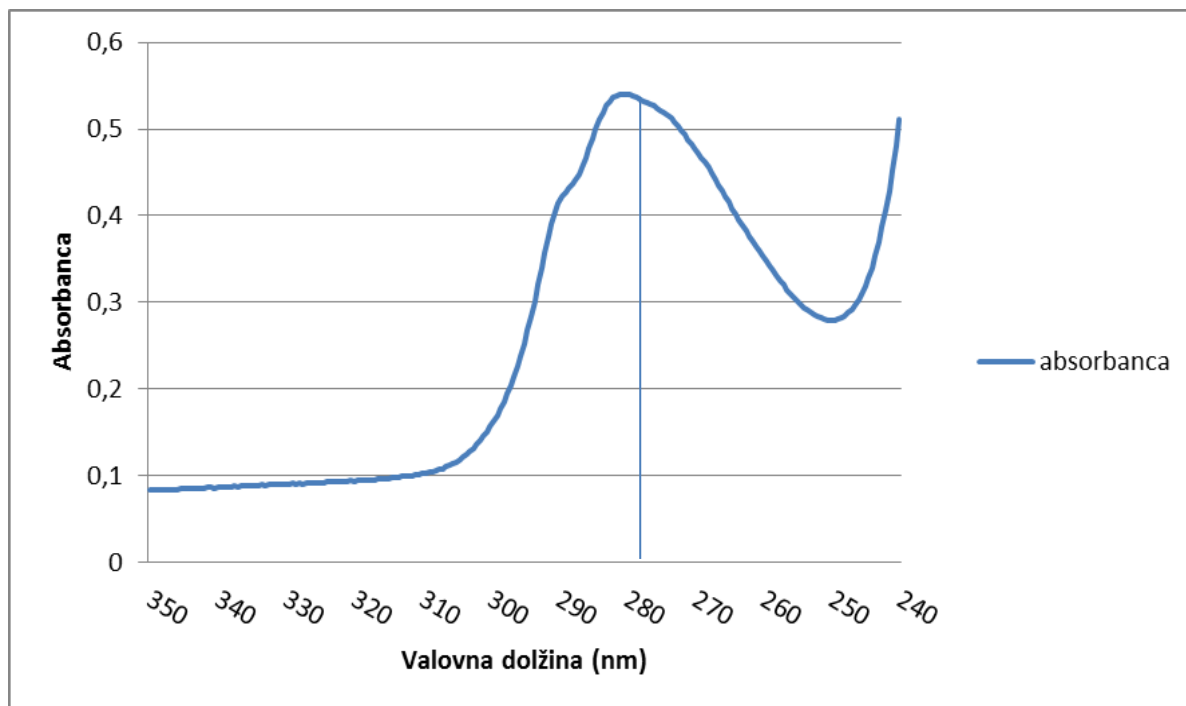
48 urah smo petrijevki vzeli iz inkubatorja in prešteli kolonije. Plošča je bila števna, če je bilo na njej 3–30 kolonij. Število kolonij smo izrazili v cfu/mL (cfu pomeni *colony forming units* oziroma število kolonij). Zaradi razredčitev smo število kolonij pomnožili z ustrežno potenco števila 10.

Ker pri prvem poskusu s kvasovkami nismo dobili rezultatov, s katerimi bi lahko zagotovo sklepali o učinku eritropoetina na živost kvasovk, smo poskus ponovili. Pri ponovitvi smo natančneje raziskali območje med četrto in peto razredčitvijo. Postopek dela je bil enak kot pri prvem poskusu, le da smo, ko smo petrijevko razdelili na 6 delov, na 3 dele nanegli četrto, na 3 dele pa peto razredčitev. Petrijevki smo postavili v inkubator na 28 °C za 48 ur. Nato smo ju vzeli iz inkubatorja in prešteli število kolonij.

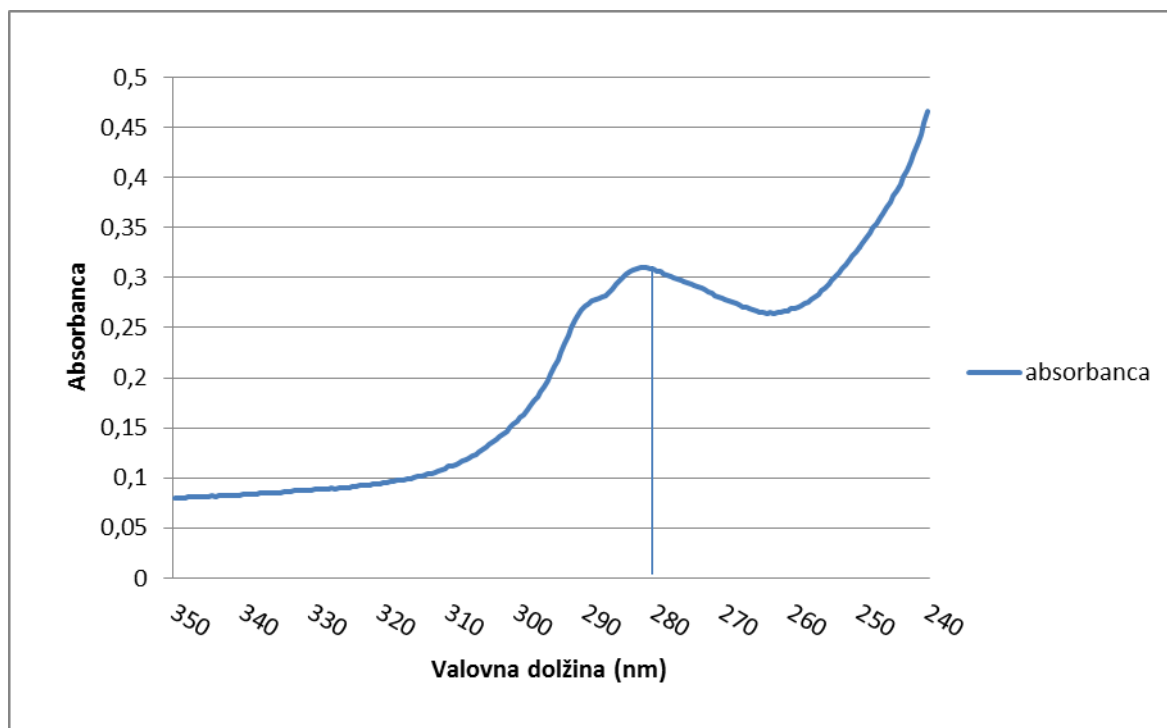
4 Rezultati

4.1 Spektrofotometrija eritropoetina

4.1.1 Spektrofotometrija z Varianovim Cary 100 Bio spektrofotometrom



Grafikon 1: Odvisnost absorbance od valovne dolžine (pH = 7,06)



Grafikon 2: Odvisnost absorbance od valovne dolžine (pH = 11,07)

Pri rezultatih spektrofotometrije smo morali upoštevati prvotne volumne vzorcev eritropoetina po dializi. Ti so znašali:

- V (eritropoetin, dializiran v pufru s pH 7,06) = 1,0 mL,
- V (eritropoetin, dializiran v pufru s pH 4,00) = 0,67 mL,
- V (eritropoetin, dializiran v pufru s pH 11,07) = 0,60 mL.

Na grafikonih spektrofotometrije je prikazana odvisnost absorbance od valovne dolžine. Prikazani sta dve meritvi, in sicer meritev z eritropoetinom, dializiranim v pH = 7,06, in meritev z eritropoetinom, dializiranim v pH = 11,06. Pri obeh meritvah lahko opazimo, da se absorbanca spreminja z valovno dolžino. Da se izognemo velikim napakam, se koncentracija proteinov določa iz ekstinkcijskega koeficienta in absorbance pri $\lambda = 280$ nm. Tudi mi smo absorbanco pri omenjeni valovni dolžini uporabili za izračun koncentracije po Beer-Lambertovem zakonu.

Na prvem grafikonu je prikazan spekter eritropoetina, diliziranega v pufru s pH = 7,06. Opazimo lahko, da pri $\lambda = 280$ nm absorbanca znaša 0,54. Z upoštevanjem Beer-Lambertovega zakona dobimo koncentracijo:

$$c = \frac{0,54}{0,744 \text{ mL mg}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1\text{cm}} = 0,723 \text{ mg mL}^{-1}$$

Dobljena koncentracija je izračunana za 0,3 mL eritropoetina. Z upoštevanjem redčenja dobimo dejansko koncentracijo eritropoetina, ki znaša:

$$c = \frac{0,723 \text{ mg mL}^{-1} \cdot 1\text{mL}}{0,305 \text{ mL}} = 2,37 \text{ mg mL}^{-1}$$

Na drugem grafikonu je predstavljena meritev z eritropoetinom, dializiranim v pH = 11,06. Tudi tu je bil vzorec za meritev pripravljen tako, da smo eritropoetin redčili s pufrom s pH = 11,06. To smo upoštevali pri izračunu koncentracije celotnega volumna eritropoetina.

Opazimo lahko, da absorbanca v najvišji točki (280 nm) znaša 0,308. Z upoštevanjem Beer-Lambertovega zakona dobimo koncentracijo:

$$c = \frac{0,308}{0,744 \text{ mL mg}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1\text{cm}} = 0,414 \text{ mg mL}^{-1}$$

Ta koncentracija velja za 80 μL eritropoetina, dializiranega v pH = 11,07. Z upoštevanjem redčenja dobimo njegovo dejansko koncentracijo:

$$c = \frac{0,600 \text{ mL} \cdot 0,414 \text{ mg mL}^{-1}}{0,080 \text{ mL}} = 3,11 \text{ mg mL}^{-1}$$

Tako visoka koncentracija je posledica tega, da smo isti vzorec eritropoetina uporabili za dializo v pufru s pH = 4,00 in v pufru s pH = 11,07 (1 mL eritropoetina smo razdelili na 2 dela po 0,500 mL). Pri merjenju koncentracije eritropoetina, dializiranega v pufru s pH = 11,07, smo dobili zelo visoko koncentracijo (3,11 mg mL⁻¹), pri merjenju koncentracije eritropoetina, dializiranega v pufru s pH = 4,00, pa zelo majhno (1,31 mg mL⁻¹). Njuna aritmetična sredina pa je ravno 2,2 mg mL⁻¹, kar ustreza koncentraciji vzorca. Sklepamo, da je do tega prišlo, ker vzorca nismo dovolj premešali.

4.1.2 Spektrofotometrija z nanodropom

Ker smo pri spektrofotometriji z Varianovim Cary 100 Bio spektrometrom ugotovili, da je metoda najobčutljivejša pri svetlobi valovne dolžine 280–281 nm, smo pri meritvah s tem spektrofotometrom uporabili svetlobo valovne dolžine 281 nm.

Naredili smo dve meritvi, eno z eritropoetinom, dializiranim v pufru s pH = 11,07, drugo pa z eritropoetinom, dializiranim v pufru s pH = 4,00.

Pri prvi meritvi (eritropoetin, dializiran v pufru s pH = 11,07), smo dobili absorbanco 1,62. Po Beer-Lambertovem zakonu smo izračunali koncentracijo:

$$c = \frac{1,62}{0,744 \text{ mL mg}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1\text{cm}} = 2,18 \text{ mg mL}^{-1}$$

Če upoštevamo, da je bil vzorec redčen v razmerju 2 : 1 s pufrom s pH = 11,07, dobimo dejansko koncentracijo eritropoetina po enačbi:

$$c = \frac{2,18 \text{ mg mL}^{-1} \cdot 3}{2} = 3,27 \text{ mg mL}^{-1}$$

Opazimo, da se meritvi z enim in drugim spektrofotometrom rahlo razlikujeta. Lahko zaključimo, da je koncentracija eritropoetina po dializi v pufru s pH = 11,07 znašala približno 3,2 mg mL⁻¹.

Pri drugi meritvi (eritropoetin, dializiran v pufru s pH = 4,00) smo dobili absorbanco 0,610. Po Beer-Lambertovem zakonu smo izračunali koncentracijo:

$$c = \frac{0,610}{0,744 \text{ mL mg}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1\text{cm}} = 0,820 \text{ mg mL}^{-1}$$

Z upoštevanjem redčenja dobimo dejansko koncentracijo eritropoetina po enačbi:

$$c = \frac{0,670\text{mL} \cdot 0,820 \text{ mg mL}^{-1}}{0,420 \text{ mL}} = 1,31 \text{ mg mL}^{-1}$$

Opazimo lahko, da je koncentracija eritropoetina, dializiranega v pH = 4,00, zelo majhna. To lahko povežemo z visoko koncentracijo eritropoetina, dializiranega v pH = 11,07, do katere pride zaradi razlogov, ki so opisani in pojasnjeni v rezultatih spektrofotometrije z Varianovim Cary 100 Bio spektrofotometrom.

Z Eppendorfovim spektrofotometrom smo poleg zgornjih meritev izmerili tudi koncentracije eritropoetina v vzorcih, ki smo jih analizirali s CD-spektroskopijo. Rezultate, ki smo jih dobili, smo uporabili pri izračunu molarne eliptičnosti.

Opravili smo tri meritve, za vsak CD-vzorec posebej. Pri prvi meritvi smo želeli izmeriti koncentracijo vzorca eritropoetina, dializiranega proti pufru s pH = 7,06. Izmerjena absorbanca je znašala 0,186. Po Beer-Lambertovem zakonu smo izračunali koncentracijo vzorca:

$$c = \frac{0,186}{0,744 \text{ mL mg}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$$

Pri drugi meritvi smo želeli izmeriti koncentracijo vzorca eritropoetina, dializiranega proti pufru s pH = 4,00. Dobili smo absorbanco 0,150 in s pomočjo Beer-Lambertovega zakona izračunali koncentracijo vzorca:

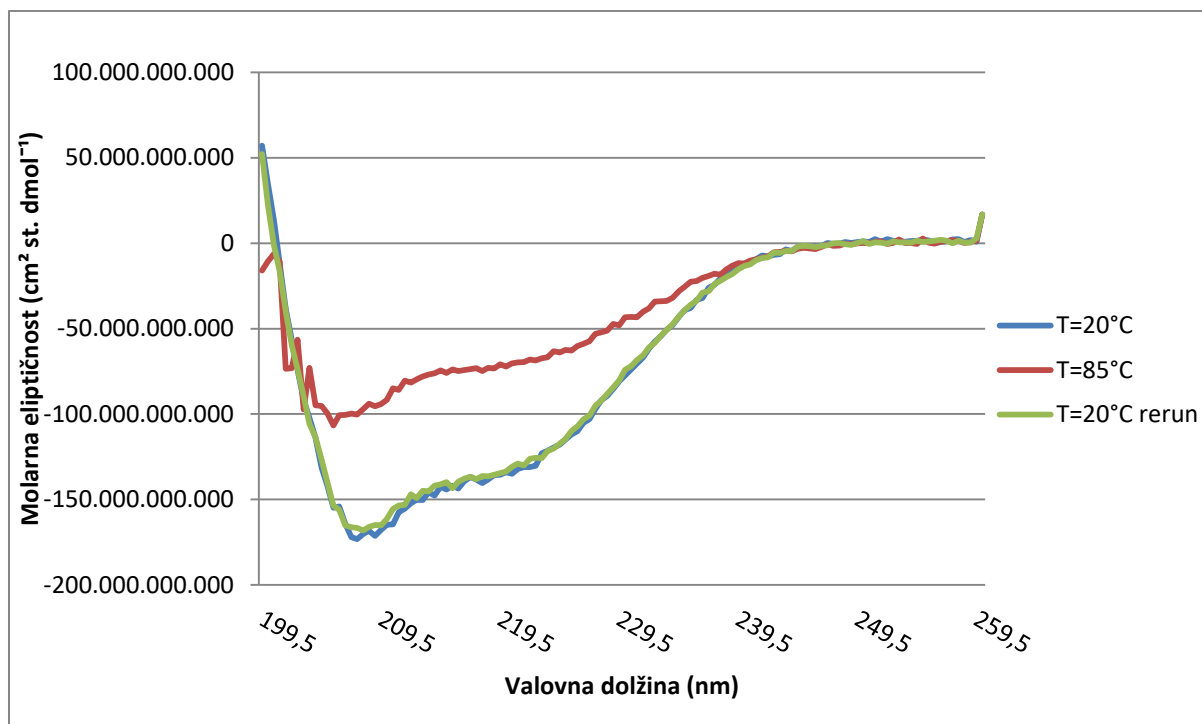
$$c = \frac{0,150}{0,744 \text{ mL mg}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} = 0,20 \text{ mg mL}^{-1}$$

Pri tretji meritvi smo želeli izmeriti koncentracijo vzorca za CD-spekter eritropoetina, dializiranega proti pufru s pH = 11,07. Dobljena absorbanca je znašala 0,182. Na podlagi Beer-Lambertovega zakona smo tako izračunali koncentracijo vzorca:

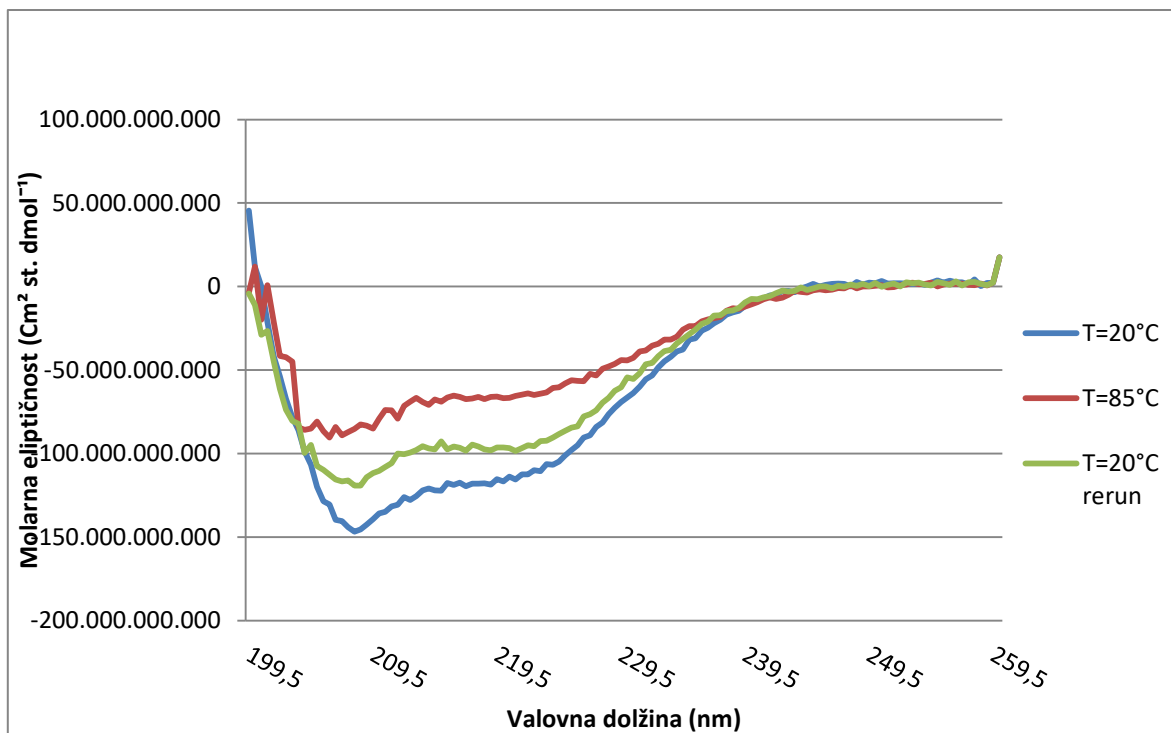
$$c = \frac{0,182}{0,744 \text{ mL mg}^{-1}\text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} = 0,24 \text{ mg mL}^{-1}$$

S pomočjo izračunanih koncentracij vzorcev za CD-spektroskopijo in absorbance, ki smo jo dobili pri CD-meritvah, smo lahko izračunali eliptičnost in iz nje molarno eliptičnost. To smo predstavili kot odvisno spremenljivko.

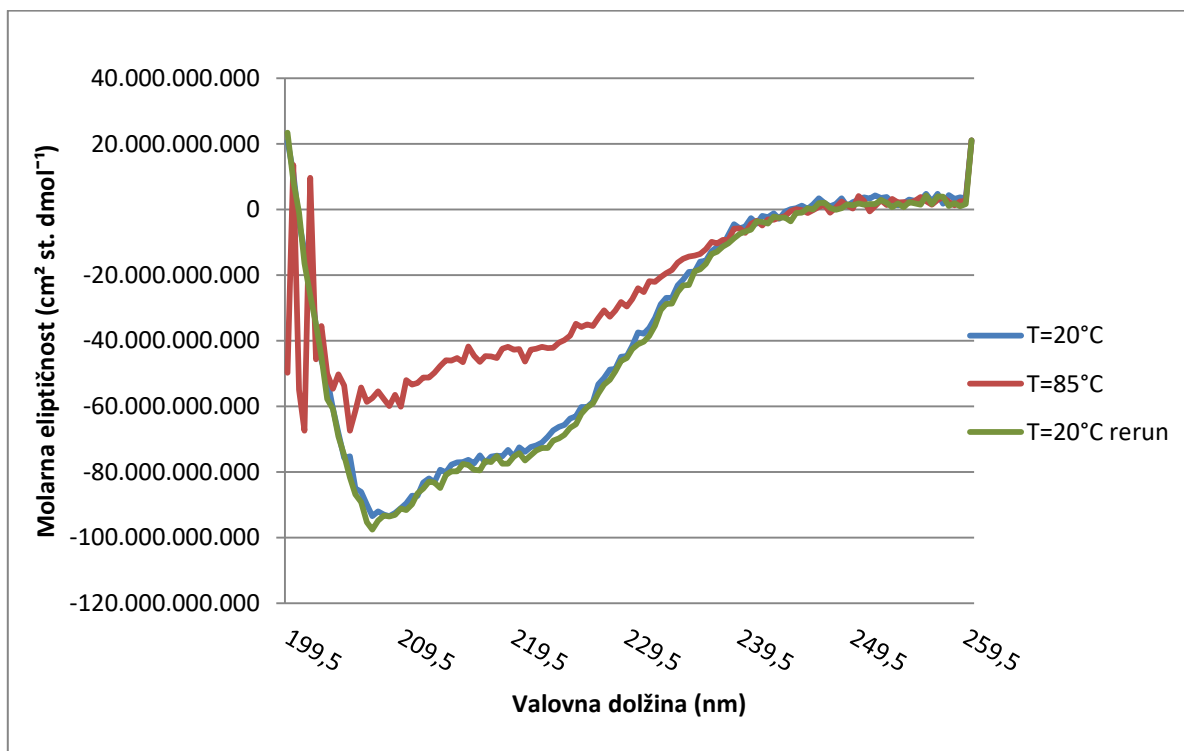
4.2 CD-spektroskopija eritropoetina



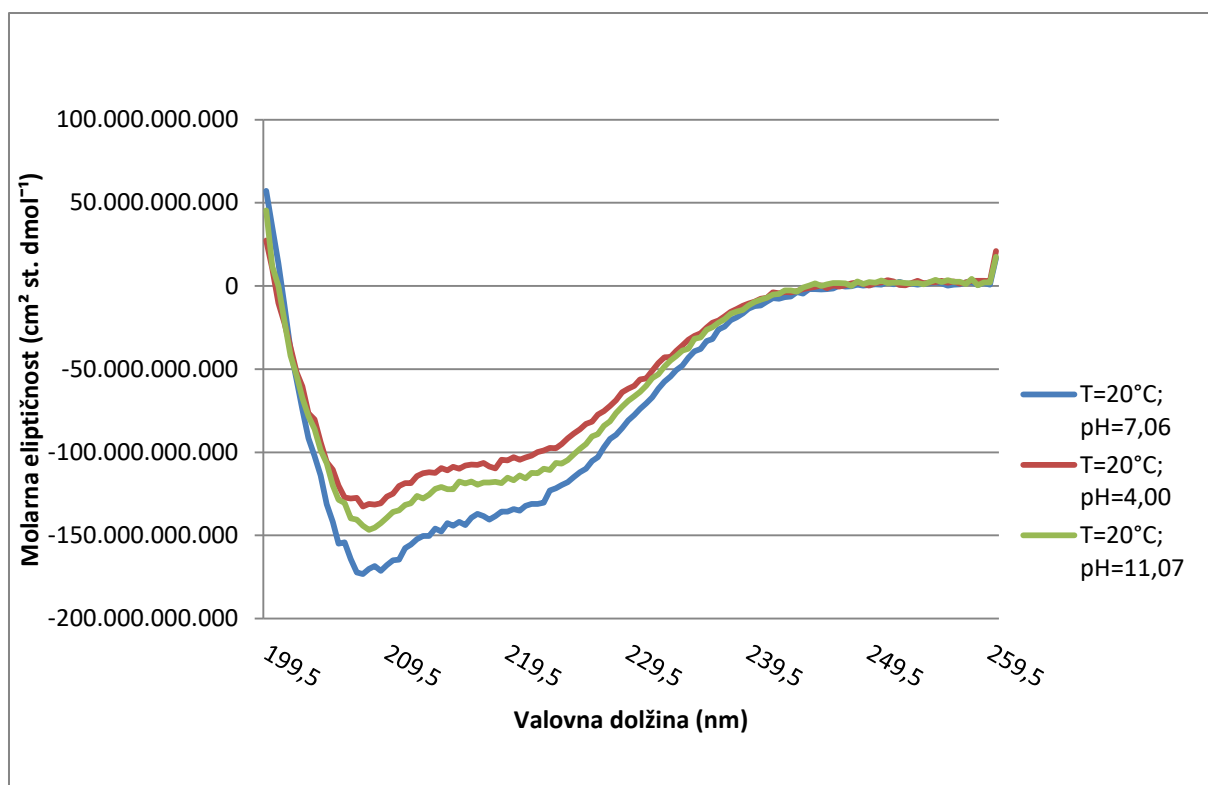
Grafikon 3: Molarna eliptičnost v odvisnosti od valovne dolžine (pH = 7,06)



Grafikon 4: Molarna eliptičnost v odvisnosti od valovne dolžine (pH = 11,07)



Grafikon 5: Molarna eliptičnost v odvisnosti od valovne dolžine (pH = 4,00)



Grafikon 6: Primerjava strukture eritropoetina, dializiranega v različnih pH

CD-spektri eritropoetina, dializiranega v različnih pH, nam povedo o njegovi strukturi. Če vemo, kje oddajo signal α -vijačnica, β -struktura in naključni klobčič, lahko primerjamo njihov delež. Močnejši kot je signal (seveda upoštevamo koncentracijo vzorca), večja je stopnja strukturiranosti proteina.

Zgornji CD-spektri nam prikazujejo odvisnost molarne eliptičnosti od valovne dolžine pri treh različnih temperaturah. Prvi trije grafikoni prikazujejo meritve za vsak vzorec eritropoetina posebej, in sicer pri $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $T = 85\text{ }^{\circ}\text{C}$ in ponovno pri $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zadnji grafikon prikazuje primerjavo molarne eliptičnosti med vzorci pri $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (prva meritev). Glede na velikost signala (molarna eliptičnost), ki ga oddaja optično aktivna snov, lahko sklepamo o strukturi vzorca. Najmočnejši signal je tam, kjer doseže molarna eliptičnost minimum.

Opazimo lahko, predvsem na zadnjem grafikonu, na katerem je prikazana primerjava vzorcev eritropoetina v različnih pH, da najmočnejši signal oddaja eritropoetin, dializiran v pufru s $\text{pH} = 7,06$. Drugi najmočnejši signal dobimo pri eritropoetinu, dializiranem v pufru s $\text{pH} = 11,07$, tretji pa pri eritropoetinu, dializiranem v pufru s $\text{pH} = 4,00$.

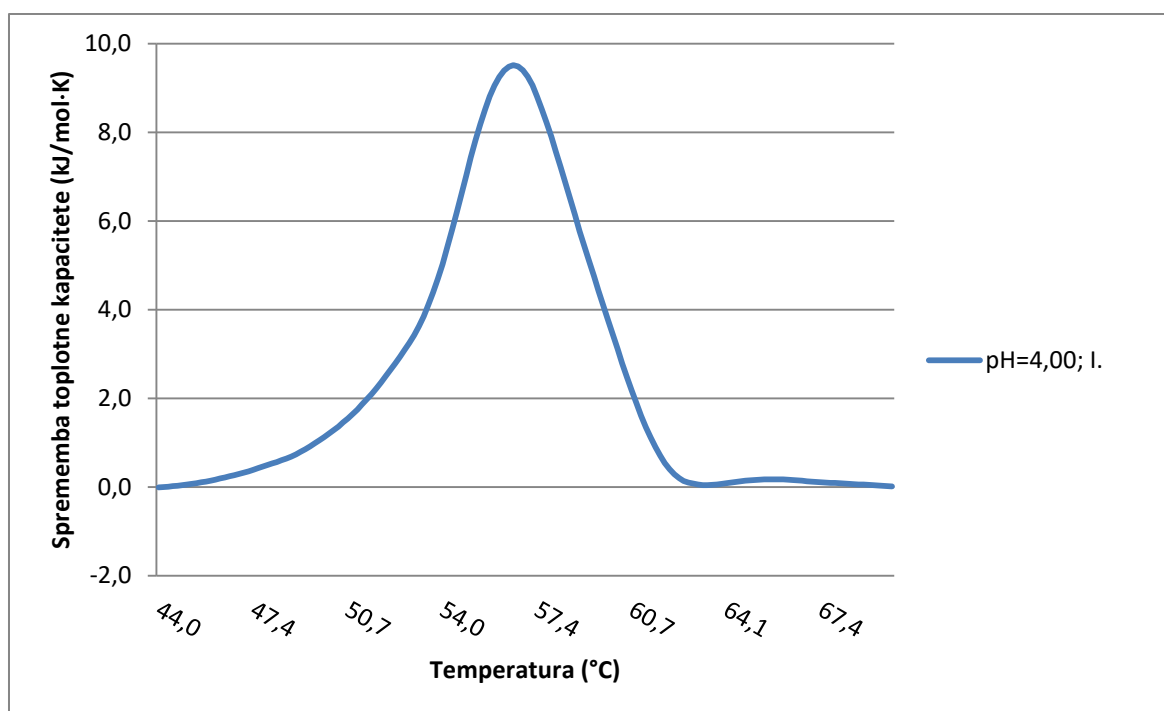
Pri prvih treh CD-spektrih, kjer je eritropoetin dializiran proti pufrom z različnimi pH, lahko opazujemo razliko v signalu pri različnih temperaturah. Povsod opazimo, da je signal najmočnejši pri približno 208 nm, drugi manj intenziven minimum pa je opazen pri približno 219 nm.

Če pri prvih treh grafikonih primerjamo prvi CD-spekter pri 20 °C in drugega pri 85 °C, opazimo, da je signal pri 20 °C pri vseh treh vzorcih občutno močnejši. Prav tako lahko opazimo, da je po ponovnem ohlajanju na 20 °C signal zopet ojačan. To lahko povežemo s strukturo eritropoetina. Ta je bila pri drugi meritvi (na 85 °C) razvita, saj je hormon denaturiral. Ko smo vzorec ohladili, so se nekatere vezi zopet vzpostavile, struktura se je delno zvila nazaj, tako da se je signal ojačal. Lahko pa opazimo, da je predvsem pri eritropoetinu, dializiranem v pH = 11,07, izrazita razlika med prvim merjenjem na 20 °C in drugim merjenjem na 20 °C, torej po segrevanju. Tudi pri drugih dveh vzorcih je razlika opazna, vendar ne tolikšna kot pri pH = 11,07. Sklepamo lahko, da se je struktura eritropoetina spremenila zaradi toplotno inducirane razvitja pri T = 85 °C in da je stopnja reverzibilnosti pri pH = 4,00 in pH = 7,06 precej višja kot pri pH = 11,07.

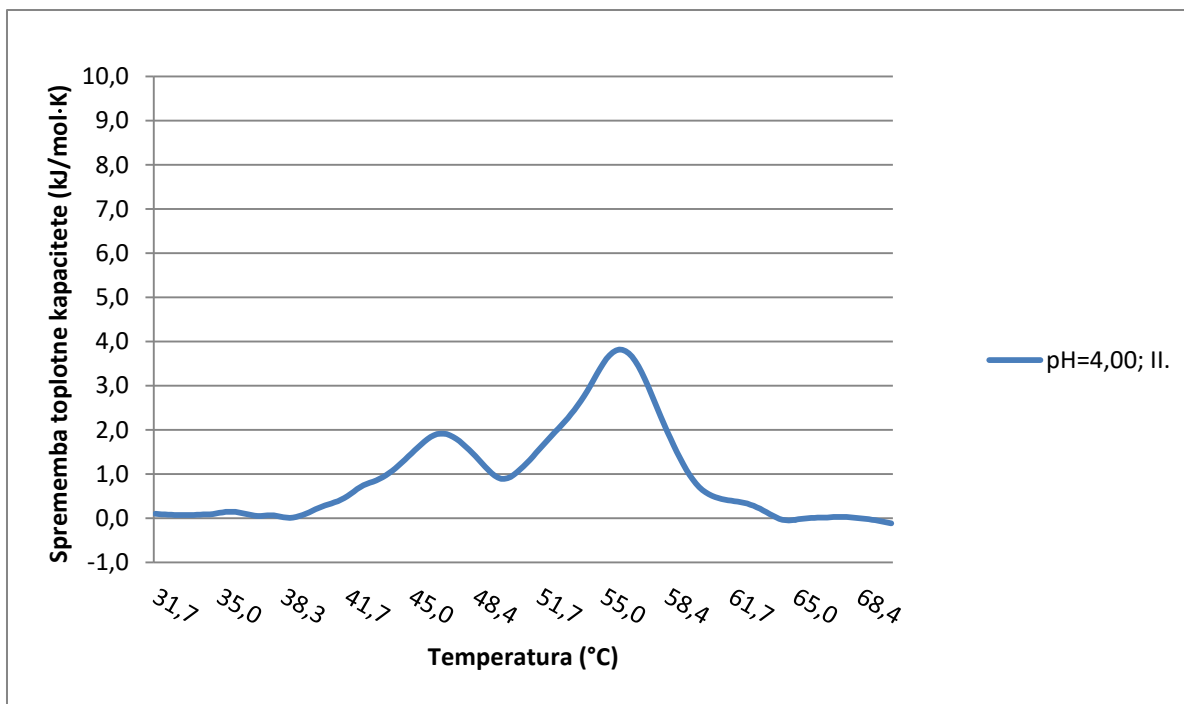
Upoštevati moramo tudi dejstvo, da se pri ohlajanju in ponovnem zvitju strukture lahko nekatere vezi ponovno vzpostavijo, druge pa ne. Lahko pride tudi do nastanka novih vezi. Zato se lahko delež različnih struktur po ohlajanju spremeni (to lahko sklepamo pri grafikonu eritropoetina, dializiranega v pH = 4,00).

4.3 Diferenčna dinamična kalorimetrija eritropoetina

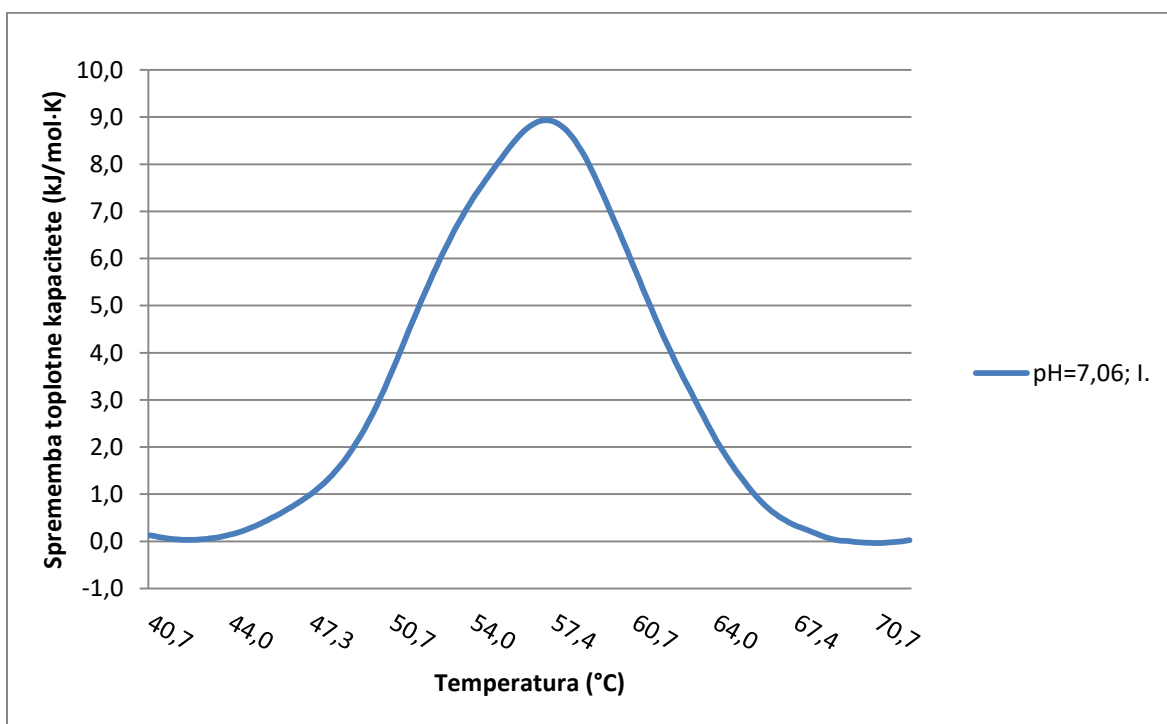
4.3.1 DSC eritropoetina pri vseh treh pH



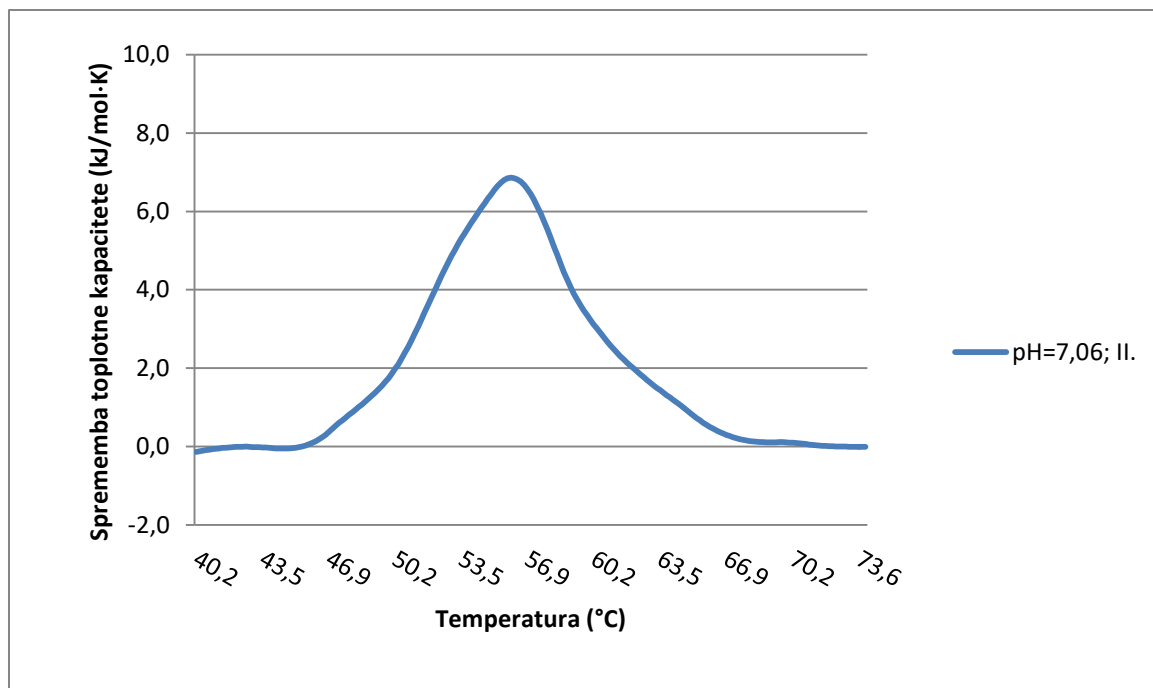
Grafikon 7: Odvisnost spremembe toplotne kapacitete od temperature; prva ponovitev pri pH = 4,00



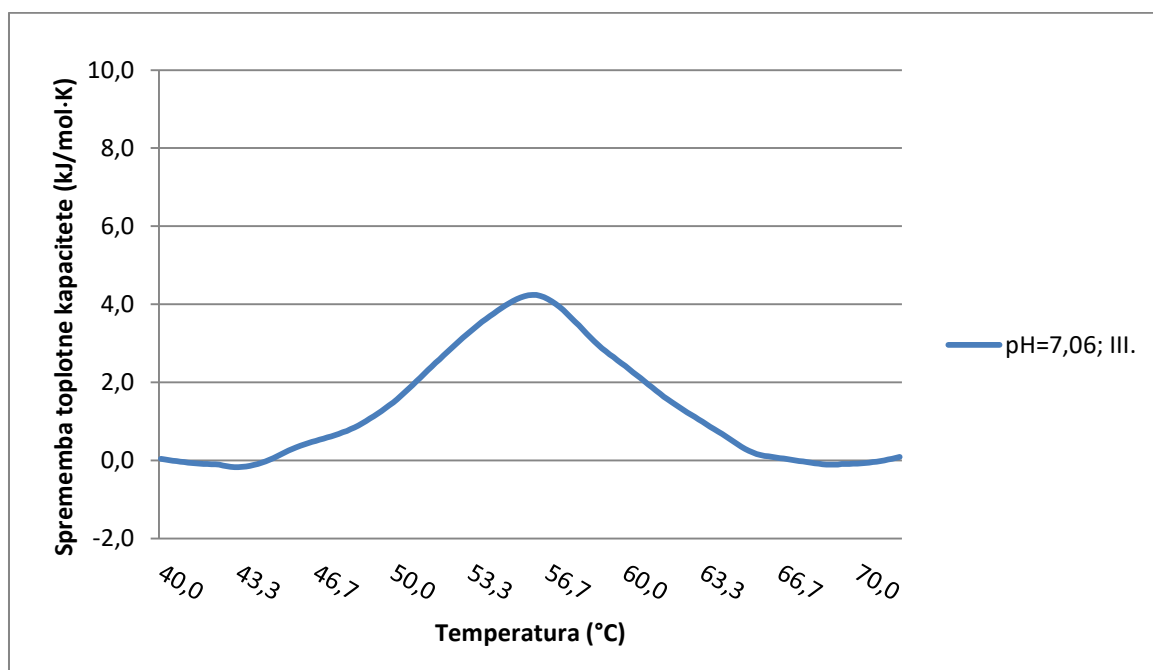
Grafikon 8: Odvisnost spremembe toplotne kapacitete od temperature; druga ponovitev pri pH = 4,00



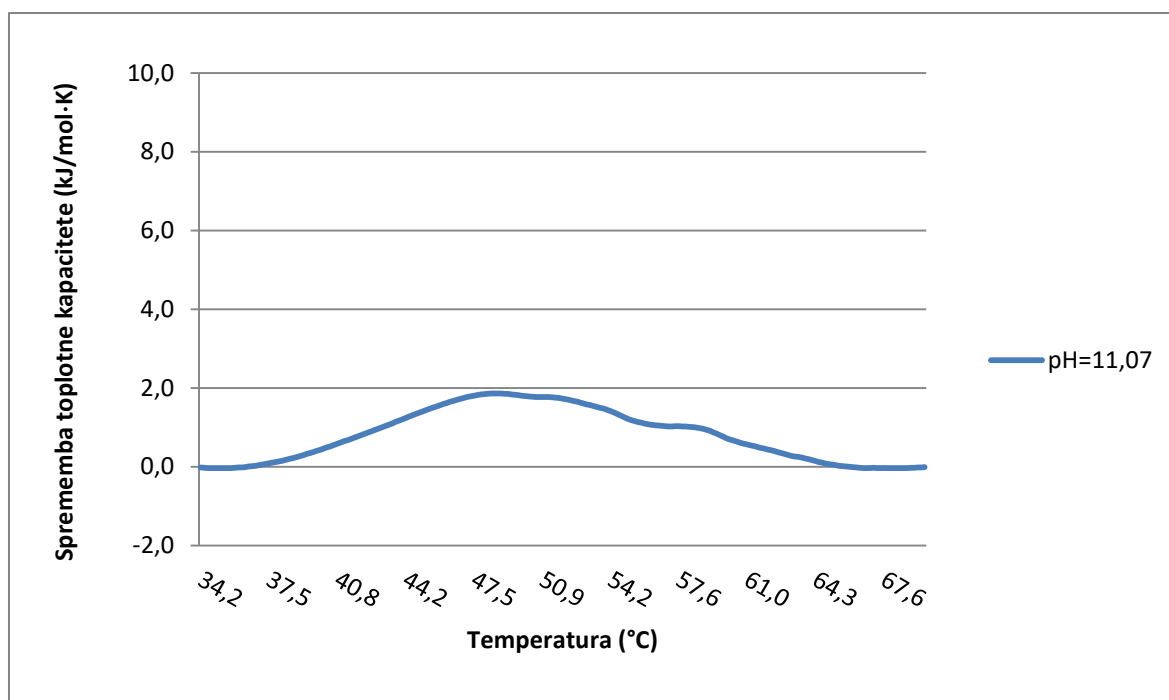
Grafikon 9: Odvisnost toplotne kapacitete od temperature; prva ponovitev pri pH = 7,06



Grafikon 10: Odvisnost spremembe toplotne kapacitete od temperature; druga ponovitev pri pH = 7,06



Grafikon 11: Odvisnost spremembe toplotne kapacitete od temperature; tretja ponovitev pri pH = 7,06



Grafikon 12: Odvisnost spremembe toplotne kapacitete od temperature; ponovitev za pH = 11,07

Grafikoni diference dinamične kalorimetrije nam prikazujejo, koliko toplote je bilo potrebno, da smo eritropoetin pri različnih pH spravili iz nativne (zvite) v denaturirano (razvito) obliko. Gre za odvisnost spremembe toplotne kapacitete (ΔC_p) od temperature. Spremembo toplotne kapacitete dobimo z upoštevanjem toplotnega toka (dQ/dt), ki teče skozi vzorčno celico, in koncentracije vzorca. Večja kot je sprememba toplotne kapacitete, več toplote je bilo potrebno, da se je vzorec razvil. Razliko v toploti, ki smo jo morali dovesti eritropoetinu, dializiranemu v različnih pH, vidimo v površini lika pod krivuljo. Ta namreč predstavlja spremembo entalpije denaturacije (ΔH). Večja kot je entalpija, več toplote je bilo treba dovesti in bolj zvita oziroma stabilnejša je bila nativna oblika eritropoetina. Prva ponovitev pomeni prvi interval segrevanja, druga ponovitev pomeni drugi interval segrevanja in tretja ponovitev pomeni tretji interval segrevanja. Med vsakim intervalom segrevanja smo vzorec ohlajali. Pri pH = 4,00 smo opravili 2 meritvi, pri pH = 7,06 tri meritve, pri pH = 11,07 pa le eno, saj je sprememba entalpije med prehodom iz nativne v denaturirano obliko, izračunana iz prvega termograma, pokazala na precejšen padec, če jo primerjamo s spremembo entalpije, ki smo jo izračunali pri pH = 7,06 (tabela 1). Opazimo lahko, da je

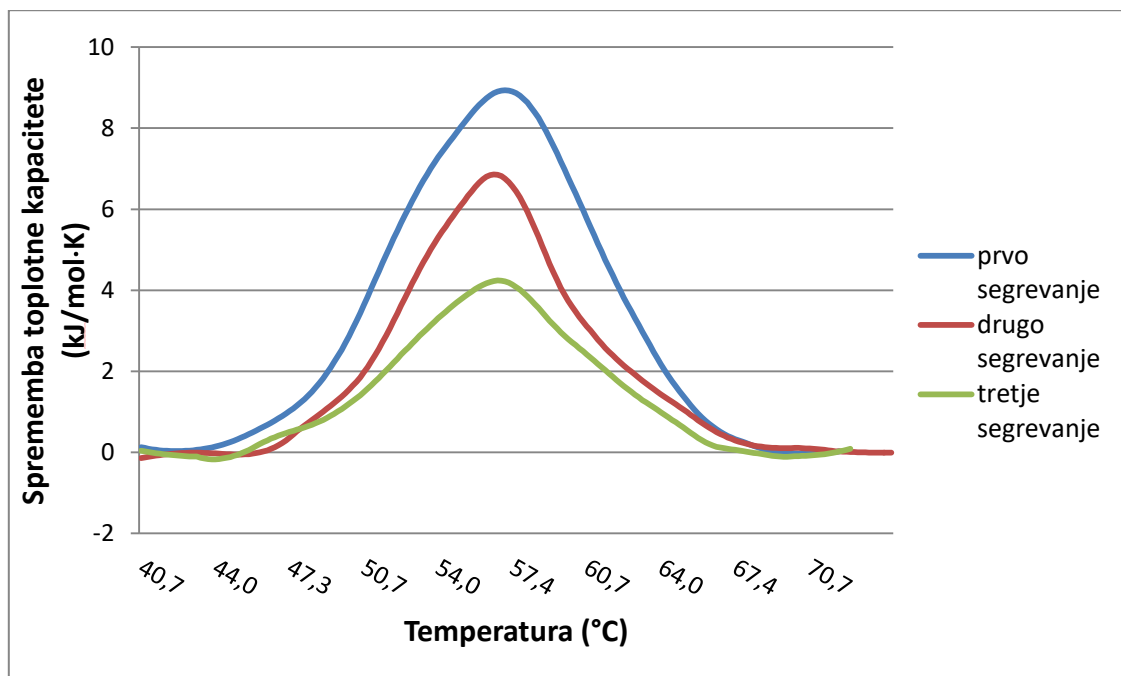
sprememba entalpije največja pri pH = 7,06. Sledi pH = 4,00 in nato pH = 11,07. Opazimo tudi, da se sprememba entalpije z meritvami manjša, kar pomeni, da se je po vsakem segrevanju le del eritropoetina vrnil v prvotno, zvito stanje (tabela 1).

Tabela 1: Primerjava med izračunanimi spremembami entalpije za vse tri pH in vse termograme

pH	Zaporedna številka ponovitve	Tmax. (°C)	ΔH (kJ/mol)
4	1	56,38	60,9
	2	55,69	36,6
7	1	57,18	97,6
	2	56,36	63,4
	3	56,15	42,15
11	1	48,69	28,7

Na grafikonih lahko opazimo tudi vrh. Ta je med 50 in 55 °C. Pomeni stanje pri $T_{1/2}$, ko je polovica eritropoetina v nativni, polovica pa v denaturirani obliki. Višji kot je vrh, stabilnejša je bila nativna oblika eritropoetina. Opazimo, da je vrh najvišji pri pH = 7,06. Sledi pH = 4,00 in nato pH = 11,07. Sklepamo lahko, da je pH = 7,06 najugodnejši za eritropoetin, saj je v tem pH nativna oblika najstabilnejša. Najmanj ugoden je pH = 11,07.

4.3.2 DSC eritropoetina pri pH = 7,06; ugotavljanje reverzibilnosti toplotne denaturacije



Grafikon 13: Odvisnost spremembe toplotne kapacitete od temperature; pH = 7,06; vse tri ponovitve, združene na enem grafu

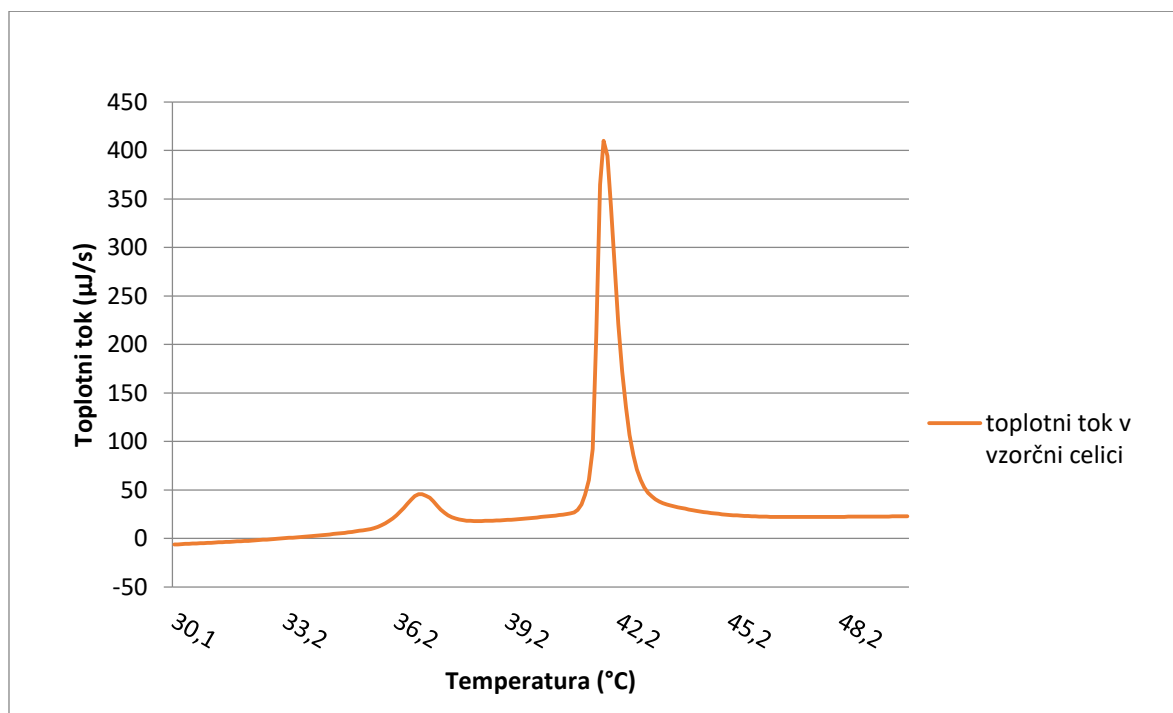
Na zgornjem grafikonu je prikazana odvisnost spremembe toplotne kapacitete od temperature. Prikazane so tri meritve na istem temperaturnem intervalu, pri istem pH (7,06). Med prvim intervalom segrevanja in drugim intervalom segrevanja smo eritropoetin ohlajali. Enako smo storili tudi med drugim intervalom in tretjim intervalom segrevanja. Želeli smo ugotoviti reverzibilnost toplotne denaturacije eritropoetina.

Opazimo lahko, da je pri prvem intervalu površina pod krivuljo največja, pri drugem intervalu je malo manjša, pri tretjem intervalu pa najmanjša. To pomeni, da je pri tretjem intervalu segrevanja bilo potrebno najmanj toplote, da smo eritropoetin spravili iz native v denaturirano obliko (tabela 1). To pomeni, da je bil začetni delež zvitega eritropoetina najmanjši pri tretjem intervalu, malo večji pri drugem intervalu in največji pri prvem intervalu. Sklepamo lahko, da se je po vsakem intervalu segrevanja pri ohlajanju le del

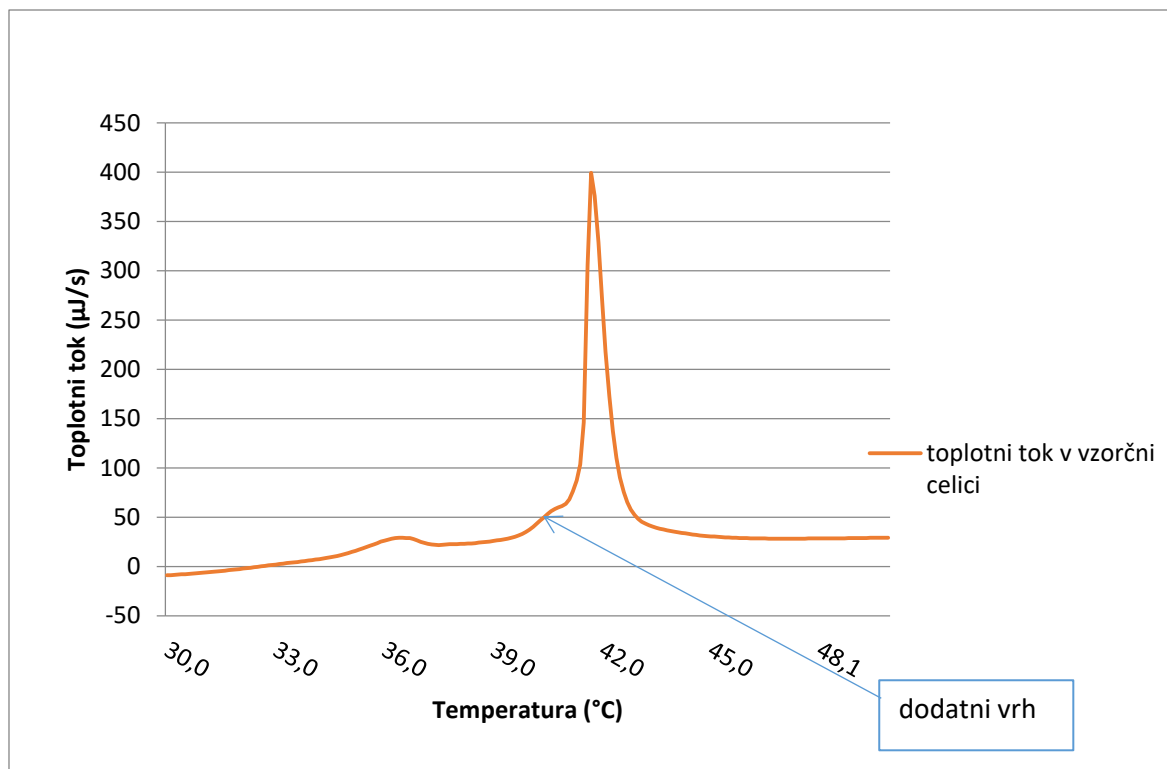
eritropoetina vrnil v svoje prvotno, zvito stanje, torej je njegova toplotna denaturacija delno reverzibilna.

4.4 Rezultati meritev z liposomi

4.4.1 Diferenčna dinamična kalorimetrija liposomov



Grafikon 14: Prvi termogram liposomov



Grafikon 15: Drugi termogram liposomov z dodanim eritropoetinom

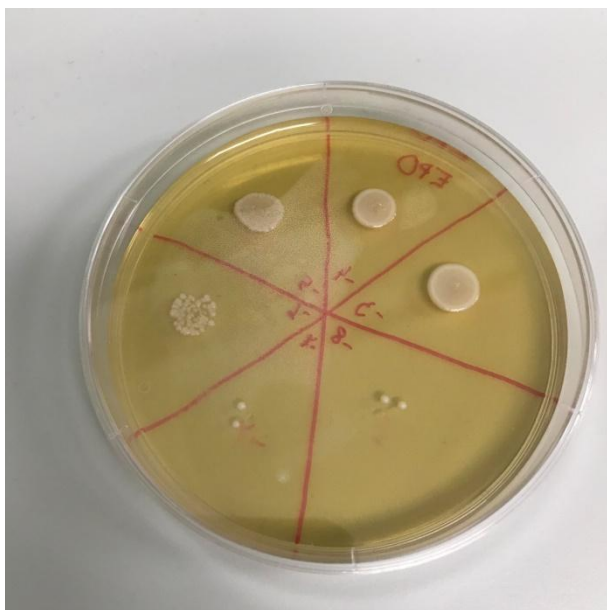
Na grafikonih, ki prikazujeta toplotno inducirano razvitje liposomov v diferenčnem dinamičnem kalorimetru, gre ponovno za odvisnost toplotnega toka, ki smo ga morali dovesti vzorčni celici, od temperature. Površina pod grafom pomeni entalpijo denaturacije (ΔH).

Prvi termogram liposomov predstavlja prvo meritev. Tu je bil referenca pufer s $\text{pH} = 7,06$, vzorec pa liposomi, razredčeni s puferom s $\text{pH} = 7,06$. Drugi termogram liposomov nam predstavlja drugo meritev, pri kateri smo liposome redčili s supernantantom. Tu je bila referenca enaka kot pri prvem termogramu, vzorec pa so predstavljali liposomi s supernantantom.

Opazimo lahko, da sta si termograma precej podobna. Pri približno $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ imamo vrh, ki nam pomeni stanje $T_{1/2}$, kjer je polovica liposomov razprtih. Vrh je na obeh grafih približno enako visok. Poleg glavnega vrha pri približno $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ imamo tudi manjši vrh pri približno $36\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tu lahko opazimo razliko med prvim in drugim termogramom. Na prvem termogramu je ta vrh višji kot na drugem. Prav tako je na prvem termogramu med manjšim vrhom pri $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ in

višjim pri 42 °C ravna linija, na drugem termogramu pa se pojavi krivuja s prevojem pri približno 40 °C. Sklepamo lahko, da je pri drugem merjenju prišlo do interakcije med liposomi in eritropoetinom iz supernatanta.

4.5 Vpliv eritropoetina na kvasovke



Slika 30: Petrijevka z vzorčnimi razredčitvami
(Vir: osebni arhiv)

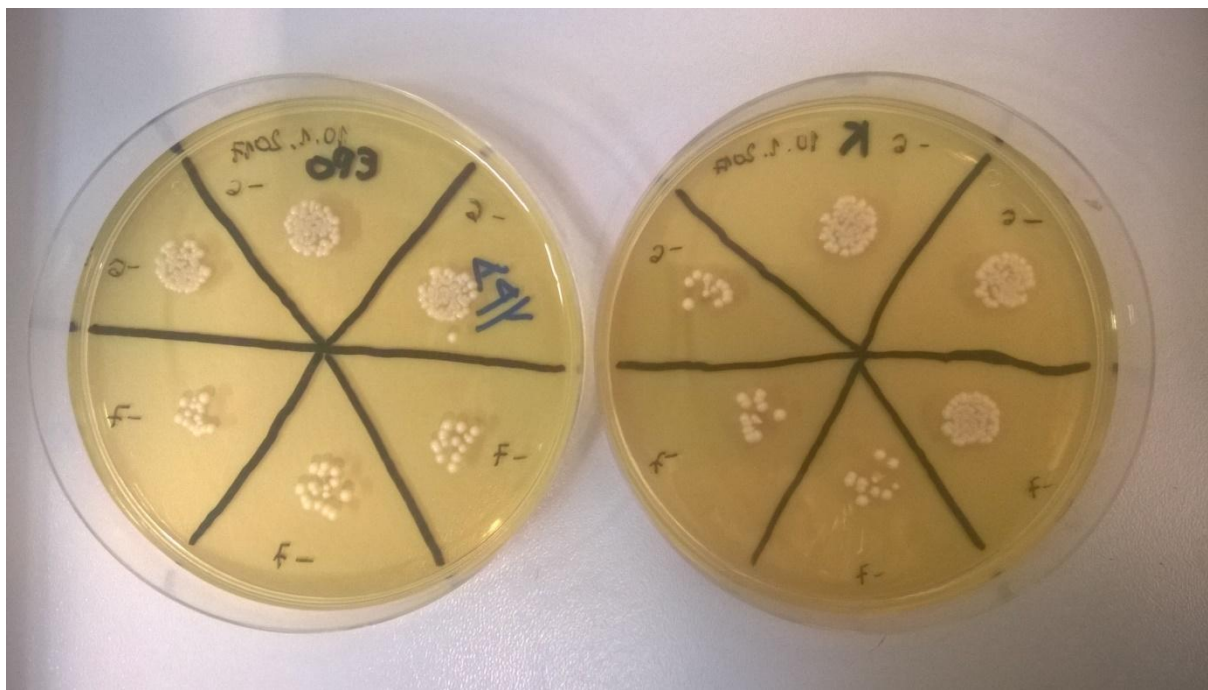


Slika 31: Petrijevka s kontrolnimi razredčitvami
(Vir: osebni arhiv)

Petrijevke na slikah nam prikazujejo število kolonij pri posamezni razredčitvi. Eno kolonijo predstavlja en madež na plošči. Ploščo pa predstavlja vsak posamezni del na petrijevki. Na vsaki petrijevki je torej 6 plošč.

Na petrijevkah vidimo, da na prvi pogled ni večjih razlik med kontrolo in eritropoetinom. Vidne so serije razredčitev, in sicer je največja razredčitev tam, kjer je nastalo najmanj kolonij. Po štetju kolonij smo ugotovili, da ni veliko števnihih plošč (števna plošča je plošča, na kateri je 3–30 kolonij). Števna plošča je peta razredčitev pri kontroli, kjer je nastalo 14 kolonij. Tako lahko rečemo, da je število kolonij pri kontroli $14 \cdot 10^7$ cfu/mL. Pri eritropoetinu nismo dobili števnihih plošč, zato smo se odločili, da izjemoma upoštevamo rezultat pete razredčitve, 2 koloniji. Število kolonij pri eritropoetinu je tako $2 \cdot 10^7$ cfu/mL.

Ker v prvem poskusu nismo dobili rezultatov, na podlagi katerih bi lahko določili inhibitorški ali aktivatorski učinek eritropoetina, smo poskus ponovili. Na sliki 32 so prikazani rezultati drugega poskusa.



Slika 32: Drugi poskus s kvasovkami (Vir: osebni arhiv)

Pri ponovnem poskusu smo tako pri eritropoetinu kot pri kontroli dobili 3 števne plošče. Vse števne plošče so bile pri peti razredčitvi. Pri eritropoetinu smo dobili rezultate: 16, 16 in 15 kolonij. Izračunali smo aritmetično sredino teh vrednosti in dobili število kolonij: $15,667 \cdot 10^7$ cfu/mL. Pri kontroli smo dobili rezultate: 11, 13 in 12 kolonij. Z izračunom aritmetične sredine smo ponovno dobili število kolonij: $12 \cdot 10^7$ kolonij.

Tako pri prvem kot pri drugem poskusu ni večjih razlik med kontrolo in eritropoetinom. Predvsem pri drugem poskusu, pri katerem smo natančneje raziskali četrto in peto razredčitev, so rezultati zelo podobni. Sklepamo lahko, da eritropoetin nima znatnih učinkov na živost kvasovk.

5 Diskusija

Če združimo rezultate meritev, ki smo jih dobili pri spektrofotometriji, CD-spektroskopiji in diferenčni dinamični kalorimetriji, lahko sklepamo, da je najugodnejši pH za skladiščenje in delovanje eritropoetina pH = 7,06, sledi mu pH = 4,00 in nato pH = 11,07. K sklepu o stabilnosti največ pripomorejo rezultati DSC, ki kažejo, da je sprememba entalpije največja pri pH = 7,06, kar pomeni, da je v tem pH vzorec eritropoetina najstabilnejši. S tem smo potrdili prvo hipotezo, ki pravi, da bo struktura eritropoetina najstabilnejša pri nevtralnem pH. Opazimo, da je, kljub temu da je nevtralen pH najugodnejši, kisel pH ugodnejši kot bazičen pH. To lahko sklepamo na podlagi spremembe entalpije denaturacije pri DSC-meritvah (tabela 1). Pri pH = 11,07 je bila površina pod krivuljo pri DSC najmanjša, kar pomeni, da je bil vzorec eritropoetina v tem pH najmanj stabilen. S tem lahko potrdimo tretjo hipotezo, ki pravi, da bo eritropoetin stabilnejši pri kislem kot pri bazičnem pH.

Sklep, da je eritropoetin stabilnejši v kislem kot v bazičnem pH, lahko povežemo s protonacijo. V kislem okolju se eritropoetin protonira, kar pomeni, da se vodikovi protoni H^+ vežejo na njegovo strukturo. V bazičnem okolju pride do obratnega procesa, deprotonacije. Vodikovi protoni H^+ se odcepijo od strukture eritropoetina. V obeh primerih ima nastanek dodatnega naboja na aminokislinah vpliv na strukturo nativnega proteina, vendar naši podatki kažejo, da so strukturne spremembe eritropoetina v kislem okolju manjše kot v bazičnem okolju.

Z upoštevanjem rezultatov, ki smo jih dobili pri DSC-meritvah in CD-meritvah, lahko sklepamo, da je toplotno razvitje eritropoetina delno reverzibilen proces. Tako lahko potrdimo drugo hipotezo, ki pravi, da bo toplotna denaturacija eritropoetina v preučevanem temperaturnem območju delno reverzibilna. S primerjavo meritev za vse tri pH lahko zaključimo, da je stopnja toplotne reverzibilnosti največja pri pH = 7,06, manjša pri pH = 4,00 in najmanjša pri pH = 11,07.

Rezultati CD-meritev kažejo na strukturiranost vzorca. Močnejši kot je signal, bolj je vzorec strukturiran. Ker je bil signal najmočnejši pri nevtralnem pH, lahko potrdimo četrto hipotezo, ki pravi, da bo eritropoetin najbolj strukturiran pri nevtralnem pH.

Za nadaljnje raziskovanje bi bilo zanimivo poglobljeje raziskati vpliv pH, tako da bi namesto treh preiskovali vpliv več različnih vrednosti pH na strukturo eritropoetina. Tako bi razširili

preiskovani pH-spekter in dobili natančnejše rezultate. Lahko bi poskusili tudi povečati termično stabilnost eritropoetina, da bi nanj vezali termično stabilne makromolekule ali pa ga ujeli v termično stabilen vektor.

Z združitvijo rezultatov, ki smo jih dobili z diferenčno dinamično kalorimetrijo liposomov in spektrofotometrijo supernantanta, ne moremo potrditi niti ovreči pete hipoteze. Primerjava prvega (suspenzija DPPC v pufri) in drugega (suspenzija DPPC v supernatantu) termograma je pokazala, da je prišlo do interakcije med liposomi in eritropoetinom iz supernantanta, vendar interakcije na podlagi razpoložljivih rezultatov ne moremo natančno opredeliti.

Kljub temu da nam v osnovi poskus ni najbolje uspel, so zanimivi za nadaljnje raziskovanje predvsem rezultati druge DSC-meritve pri liposomih, ko smo jih redčili s supernatantom. Tu smo sklepali, na podlagi primerjave med grafikonoma prve in druge meritve, da je prišlo do interakcije med liposomi in eritropoetinom iz supernantanta. Zanimivo bi bilo natančno opredeliti interakcijo, torej, ali je prišlo do površinske interakcije z eritropoetinom ali se je morda nekaj eritropoetina ujelo v notranjost liposomov. Za nadaljnje raziskovanje bi bilo morda smiselno poskusiti tudi ujeti eritropoetin v liposome, tako da bi liposome termično razprli, koncentracija eritropoetina v okolju pa bi bila večja, kot je bila koncentracija eritropoetina v supernatantu. S tem bi povečali verjetnost ujetja eritropoetina v liposome.

Na podlagi rezultatov, ki smo jih dobili pri poskusu s kvasovkami, smo ugotovili, da eritropoetin na živost kvasovk nima znatnega vpliva. S tem smo ovrgli šesto hipotezo, v kateri smo predvidevali, da bo eritropoetin vplival na živost kvasovk.

Kvasovke smo si izbrali kot modelne organizme za preučevanje vpliva eritropoetina, saj je z njimi lahko delati. Ker spadajo v kraljestvo gliv, človek pa v kraljestvo živali, je rezultate težko aplicirati na človeške celice, saj so razlike prevelike. Predstavljajo pa osnovo, na kateri lahko gradimo in raziskujemo naprej. Za nadaljnje raziskovanje bi bilo zanimivo preučevati vpliv eritropoetina neposredno na človeške celice. Vendar je treba opozoriti, da je za to potrebno soglasje Komisije za medicinsko etiko.

6 Viri

6.1 Vsebinski viri

- (1) Novljan G. (2002). Uporaba eritropoetina pri otrocih s kronično ledvično odpovedjo. *Zdravljenje novorojenčkov in otrok*. (41–47)
- (2) Španinger K., Debeljak N. (2009). Eritropoetin, epoetini in njihova detekcija. V: Štrukelj B., ur. *Farmacevtski vestnik*. vol. 60. (279–285)
- (3) Boštnar S., Čas Sikošek N., Čufer T., Edelbaher N., Ocvirk J., Cerar O. et al. (2012). Kaj je eritropoetin?. V: Čufer T., ur. *Zdravljenje anemije pri bolnikih z rakom: Osnovna navodila in dnevnik zdravljenja*. Ljubljana: Društvo bolnikov z limfomom. (21–23).
- (4) Slovenski kemijski portal (leto objave ni znano). *Liposomi*. [online] Dostopno na: <http://www.kemija.org/index.php/kemija-mainmenu-38/24-kemijacat/32-liposomi> (Datum dostopa: 11. 3. 2017.)
- (5) Čevdek, A. (leto objave ni znano). *Hidroliza soli in pufri*. [online] Dostopno na: https://si.openprof.com/wb/hidroliza_soli_in_pufri?ch=645#Pufri (Datum dostopa: 11. 3. 2017.)
- (6) Emedicina.si (2012). *Fiziološki pufri*. [online] Dostopno na: <http://www.emedicina.si/fizioloski-pufri/> (Datum dostopa: 11. 3. 2017.)
- (7) Bončina M., Prisljan I., Drobnak I., Lah J. (2015). *Biofizikalna kemija – vaje*. Ljubljana: Univerza v Ljubljani; Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

6.2 Viri slik

- Slika na naslovnici:
<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/a1/Erythropoietin.png/350px-Erythropoietin.png> (Datum dostopa: 11. 3. 2017.)
- Slika 1: <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio211/chap17/Slide7.JPG> (Datum dostopa: 11. 3. 2017.)
- Slika 2: <http://dsas9a9gxtv2e.cloudfront.net/content/haematol/95/11/1803/F1.large.jpg> (Datum dostopa: 11. 3. 2017.)
- Slika 3: <http://www.probonobio.com/images/liposome-full.jpg> (Datum dostopa: 11. 3. 2017.)
- Slika 4: <http://www.scielo.br/img/revistas/babt/v59/1516-8913-babt-2016150477-gf01.jpg> (Datum dostopa: 11. 3. 2017.)
- Slika 5: <http://www.intechopen.com/source/html/48147/media/image3.jpeg> (Datum dostopa: 11. 3. 2017.)
- Slika 6: http://www.mdpi.com/pharmaceutics/pharmaceutics-06-00137/article_deploy/html/images/pharmaceutics-06-00137-g001-1024.png (Datum dostopa: 11. 3. 2017.)
- Slika 7: http://4.bp.blogspot.com/-uQ6pRLd-m88/Ue_jKfI3DpI/AAAAAAAAAqE/12BMB53RByg/s1600/Simple+UV-Visible+Spectrophotometer.jpg (Datum dostopa: 11. 3. 2017.)
- Slika 8: <https://encrypted-tbn3.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcSv3uqdf5v0aMoGsjBoTntKi1PK47QEDiOI5u0Hc3Xon2vG865s> (Datum dostopa: 11. 3. 2017.)
- Slika 9: <http://www.isa.au.dk/facilities/astrid2/beamlines/AU-cd/images/CD-principle-1200px.png> (Datum dostopa: 11. 3. 2017.)
- Slika 10: <http://pslc.ws/macrog/images/dsc01.gif> (Datum dostopa: 11. 3. 2017.)
- Slika 11: http://www.malvern.com/Assets/Techn_DSC_01.png (Datum dostopa: 11. 3. 2017.)