

Charles University
Faculty of Science

Study programme: Biochemistry



Mgr. Lucie Vaňková

Novel binding proteins derived from small protein domains targeting diagnostically important molecules

Nové vazebné proteiny odvozené od malých proteinových domén cílené na diagnosticky využitelné terče

Summary of the Doctoral thesis

Supervisor: RNDr. Petr Malý, CSc.

Prague, 2018

Abstract

The rapid development of the gene engineering techniques, especially methods for *in vitro* directed evolution and combinatorial mutagenesis, has triggered the generation of new binding agents to almost any antigen of interest as an alternative to broadly used antibodies. These so-called non-Ig scaffolds are often derived from proteins with useful biophysical properties. While the therapeutic market is still dominated by monoclonal antibodies, the easy option of desired customization of non-Ig binders by conventional methods of gene engineering predestine them largely for the use in the diagnostic area.

The ABD scaffold, derived from a three-helix bundle of albumin-binding domain of streptococcal protein G, represents one of the small non-Ig scaffolds. In our laboratory, we have established a highly complex combinatorial library developed on the ABD scaffold. This ABD scaffold-derived library was used to generate unique binders of human prostate cancer (PCa) biomarkers PSP94, KLK2, KLK11 for the more precise diagnosis of PCa.

The second part of the thesis describes the generation of ABD-derived binders selectively recognizing different phenotypes of circulating tumor cells as a binding component of the cell capture zone of microfluidic chip for lung adenocarcinoma diagnosis. Beside this already proven model, the newly developed libraries derived from the Myomedin scaffold were used to yield a novel type of binders that would recognize other cell-surface epitopes on target molecules.

In the third part of the thesis, a collection of unique protein binders targeted to the Shiga toxin (Stx) B-subunit was generated with the use of ABD-derived combinatorial library. They were optimized for the surface display in *Lactococcus lactis* and functionally characterized. After subsequent improvement of the binding properties of particular S1B variants, Lactic acid bacteria with surface-displayed S1B binders would be useful for antagonizing pathogenic bacteria strains by the removal of Stx from the human gastrointestinal tract.

The last part of the thesis is devoted to the development of unique polyvalent vaccines for immunization of piglets and calves against enteric diseases. Current vaccines offer only a limited number of valences and do not offer protection against some serious diarrheal diseases. For successful introduction of the vaccines to the market, precise and reliable ELISA kits and protocols for verification and validation of their quality were developed. This assay is able to detect serum antibodies against 10 factors of the pathogenicity and is currently being used as a crucial part of the validation process before these highly innovative vaccines enter the market in 12 European countries.

Introduction

Protein scaffolds

Currently, the most widely used structures for detecting various molecules are fabricated monoclonal antibodies. However, the rapid development of the gene engineering techniques, especially methods for *in vitro* directed evolution and combinatorial mutagenesis, has prompted the idea to use other structures as binding agents. These so-called **scaffolds** are often derived from proteins with useful biophysical properties that are in nature able to bind to another partner molecule or molecules. This thesis presents two different protein scaffolds for generating such novel binders.

1. Albumin-binding domain

To generate specific protein binders we used the last C-terminal albumin-binding domain (ABD) of protein G from streptococcal strain G148 as a major scaffold [1]. Randomization of 11 codons of the ABD-encoding sequence is expected to give rise to 2×10^{14} (calculated as 20^{11}) ABD variants [2-5] (Fig. 1. A.).

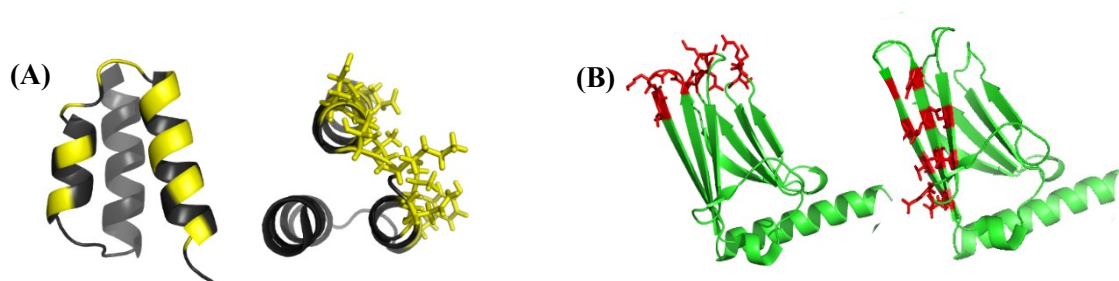


Figure 1. (A) The structural scheme of the albumin-binding domain (ABD). The randomized amino acids are displayed in yellow. **(B) The structural scheme of two proposed strategic approaches to Myomedin randomization.** The randomized amino acids are displayed as sticks in red. In the first model (left), loops are randomized, and in the second model (right), beta sheets were selected for the randomization. Drawings of the structures are based on PDB structures 3RBS (A) and 1GJT (B).

2. Myomedin scaffold

In addition to the collection of binders derived from the ABD scaffold, we were motivated to use newly developed libraries derived from the Myomedin scaffold to yield a novel type of binders that will be able to recognize other epitopes on the target molecules. Two different

strategical approaches were proposed. In the first one, amino acid residues of three different loops were randomized, while in the second case, residues of anti-parallel beta sheets were selected for the randomization (Fig. 1. B.).

Ribosome display

Ribosome display is a broadly used *in vitro* evolution technology, which has been successfully used for selection of binders against many target molecules both for the academic and commercial purposes [6]. The principle of ribosome display is to prevent dissociation of the newly synthesized protein and mRNA encoding it from the ribosome. The resulting ternary complex (mRNA-ribosome-protein) in RD is the consequence of stalled translation caused by a missing stop codon [6]. The detailed procedure of RD is displayed in Figure 2.

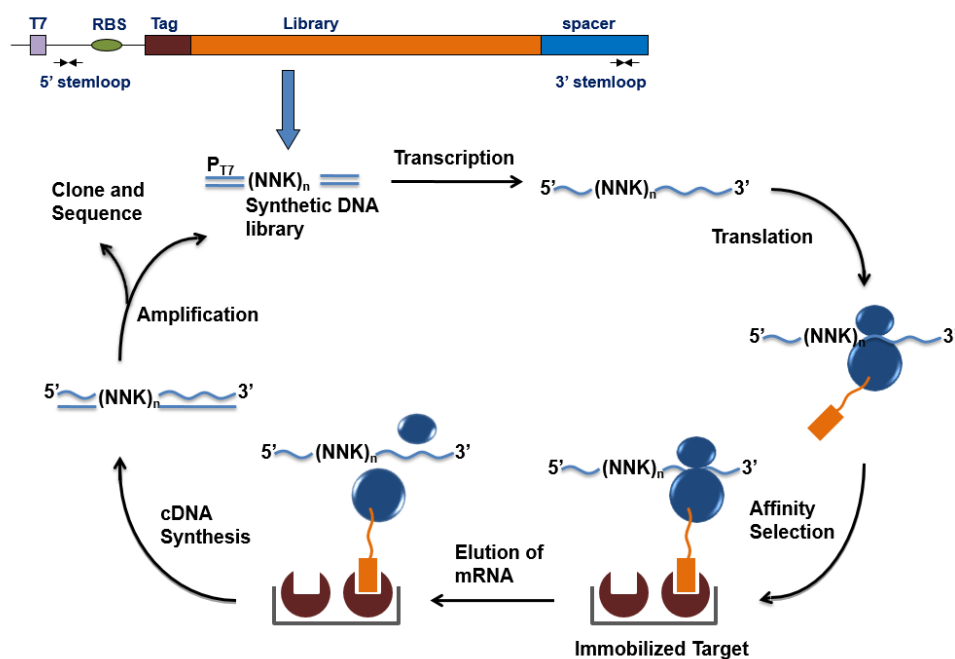


Figure 2. The ribosome display selection cycle. The assembled DNA cassette contains a strong promoter and the ribosome-binding site (RBS) followed by ORF, encoding a combinatorial library, terminated by a spacer sequence without stop codon. Using a cocktail of enzymes comprising the transcription and translation machinery of *E. coli*, the DNA is transcribed into mRNA and then translated. The formed ternary complexes are exposed to immobilized target molecules. The non-binding complexes are washed away. The mRNA from the bound complexes is then released by addition of chelating agents and isolated. Purified mRNA is reverse transcribed and the cDNA is PCR amplified. The resulting PCR product, now enriched by target-binding variants, proceeds to the next round of selection.

Aims of the thesis

1. Development of binding proteins targeted to prostate cancer biomarkers

- 1.1. Generation of binders specific for human PSP94
- 1.2. Development of binders of human kallikrein 2 and kallikrein 11

2. Development of binding proteins targeted to surface markers of epithelial and mesenchymal cells for sorting circulating tumor cells

- 2.1. Generation of binders derived from the ABD scaffold
- 2.2. Generation of binders derived from the Myomedin scaffold

3. Development of binding proteins specific for Shiga toxin 1 B Subunit

4. Development of procedures and tools for validation of polyvalent vaccines against bacterial enteral diseases

1. Development of binding proteins targeted to prostate cancer biomarkers

1.1. Generation of binders specific for human PSP94

1.2. Development of binders of human kallikrein 2 and kallikrein 11

Grant: *Novel binding biomolecule development for tumor in vitro diagnostics.* Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic (programme TIP), reg.# FR-TI4/667, 2012-2014. Collaboration with EXBIO Praha, a.s., Czech Republic and Protean, s.r.o., Czech Republic.

Prostate cancer (PCa) is one of the most serious cancer in advanced countries. The treatment and diagnosis costs of the PCa are enormous. Due to the fact that preventive screening programs based on detection of the serum PSA (prostate specific antigen) level are insufficient, there is a growing pressure on the development of new diagnostics [7, 8]. Targeted diagnostics (and therapeutics) based on monoclonal antibodies have limited utility. The immune system responds poorly to tumor targets, making it difficult to develop specific reagents based on monoclonal antibodies. To overcome this obstacle, state-of-the-art technology based on alternative non-antibody binding agents has been proposed in this project. Their generation does not require limited immune system reactivity, as the whole process takes place *in vitro*, without the involvement of the living organism or individual cells. The major goal of the project is to develop a unique collection of binding biomolecules as alternatives to antibodies on the model of early detection of PCa, which might contribute to the development of more effective microfluidic chip-based multi-parametric serum diagnostics. The use of a suitable combination of particular binding proteins will increase the sensitivity and reliability of the assay.

The fundamental part of the project is devoted to the development of new binding proteins targeted to selected prostate cancer biomarkers PSP94, kallikrein 2 (KLK2), kallikrein 11 (KLK11). To generate novel binders targeting PSP94 (called PAB binders), KLK2 (called KLA binders) and KLK11 (called HIP binders), a high-complex combinatorial library derived from an albumin-binding domain (ABD) scaffold was used in combination with the ribosome display selection technique. The most promising candidates were functionally and biophysically characterized. These binders, after subsequent modification, could serve as a component of a biosensor with multiple biomarkers.

Results

The generation and characterization of unique protein binders of human prostate cancer biomarkers PSP94 (PAB binders), human KLK2 (KLA binders) and human KLK11 (HIP binders) was presented. For selection of the binders, different recombinant variants of target proteins were expressed and characterized. All recombinant targets except for KLK2 were produced in the soluble form in the *E. coli* host. Recombinant KLK2 was produced in the form of inclusion bodies and efficiently refolded. Using a combinatorial library based on the ABD scaffold in combination with RD selection, DNA collections of PAB, KLA and HIP binders, targeting prostate cancer biomarkers, were generated and cloned into a plasmid vector for production and screening of the best binding variants. The thermal stability of the particular clones was determined by the thermal shift assay. The most promising binders were demonstrated to bind to their recombinant protein targets and not to bind to BSA control. Furthermore, PAB046 and PAB050 variants were shown to recognize the PSP94 target protein in its native conformation. Several binding and competition experiments using flow cytometry of the LNCaP prostate cancer cell line were performed (Fig. 3.). With further possible modifications using gene fusion or affinity maturation approaches, the presented binders appear attractive for the development of novel multi-factorial biosensors for more precise PCa and early stage diagnosis, as an improved alternative to the currently used ELISA-based standard PSA tests.

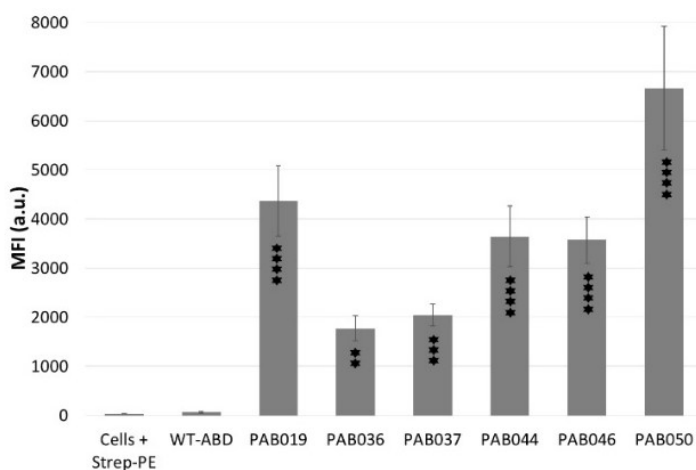


Figure 3. Binding of PAB clones to PSP94 on non-permeabilized LNCaP cells. Soluble PAB clones purified as biotinylated His-PAB-TolA-Avi fusion products were added and the binding was detected by a streptavidin-PE conjugate. WT-ABD = wild-type ABD applied as a negative control. The averaged values of three experiments are shown with standard deviations. In all binding experiments, results are expressed as the arithmetic mean \pm standard deviation of the

mean. Statistical analysis was done using one-way ANOVA followed by Dunnett's post-test, comparing all the samples with the control. GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software) was used to perform statistical analysis. Significant differences are indicated by asterisks (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$).

2. Development of binding proteins targeted to surface markers of epithelial and mesenchymal cells for sorting circulating tumor cells

2.1. Binders derived from the ABD scaffold

2.2. Binders derived from the Myomedin scaffold

Grant: *Detection and evaluation of circulating tumor cells (CTCs) in patients with lung adenocarcinoma by microfluidic chip technology.* Czech Health Research Council, Ministry of Health of the Czech Republic, reg. # 16-29738A, 2016-2019. Partner Organizations: Department of Biology, Faculty of Science, University of J.E. Purkyně, Czech Republic; Krajská zdravotní a.s., Ústí nad Labem, Czech Republic.

Circulating tumor cells (CTCs) represent one of the promising diagnostic targets in monitoring lung adenocarcinoma progression and malignant transformation. Standard methods of CTC isolation from the blood are mostly based on isolation and counting of epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) positive cells, so the other cell phenotypes that may be even more invasive are not taken into account [9, 10]. The running project “Detection and evaluation of CTCs in patients with lung adenocarcinoma by microfluidic chip technology” proposes development of a microfluidic chip that enables fast isolation and scoring of CTCs from a peripheral blood sample of the tested individual and to sort the particular CTC populations based on their respective epithelial/mesenchymal phenotype. The major advantage of this solution is a significant time reduction required for cell-type characterization (from three weeks of *in vitro* cultivation for cell enrichment to only one day) and the possibility of subsequent live cell release important for further cell cultivation and detailed characterization. To construct the Cell Capture Zone of the microfluidic chip, it is necessary to develop a novel type of high-affinity binding proteins specific for epithelial and mesenchymal membrane markers that will be able to selectively capture lung adenocarcinoma CTCs under dynamic cell-sorting conditions. Such differentiation would enable more precise diagnosis of metastatic progression and adjusting the early therapy to individual patients. As target molecules for selection of the new binders, different recombinant forms of epithelial marker EpCAM and mesenchymal marker N-cadherin were designed and produced. To generate the binders, an assembled highly complex combinatorial library derived from ABD or Myomedin scaffold in combination with ribosome display selection were used. The most promising candidates selected by ELISA were characterized by measuring their binding properties using model cell lines of the particular phenotype. Five human cancer cell lines (MCF-7, DU-145, CCD1070Sk, HEK293T, PC-3) were analyzed for the expression of EpCAM and N-cadherin membrane markers using flow

cytometry. The interaction of the binder with the cells was measured in real-time mode using LigandTracer® Green Line. The instrument is suited for monitoring the ligand binding to cell-surface receptors on living cells, allowing determination of the binding affinity and kinetics.

Results

Using a combinatorial library derived from the ABD scaffold in combination with RD selection, DNA collections targeting the mesenchymal membrane marker N-cadherin (CAB binders) and the epithelial membrane marker EpCAM (EBA binders) were generated and cloned into a plasmid vector. Resulted DNA library was produced and screened for the best binding variants. The binding profiles of the most promising variants were analyzed using ELISA with immobilized recombinant EpCAM, N-cadherin, and BSA. Alternatively, an inverted ELISA arrangement was performed. EBA014, EBA062, CAB043, and CAB101 were shown to bind their recombinant protein targets but not the BSA control. EBA014, EBA062, and CAB101 variants exhibited selective binding properties as demonstrated on MCF-7 and CCD1070Sk cell lines using the LigandTracer Green Line (Fig. 4).

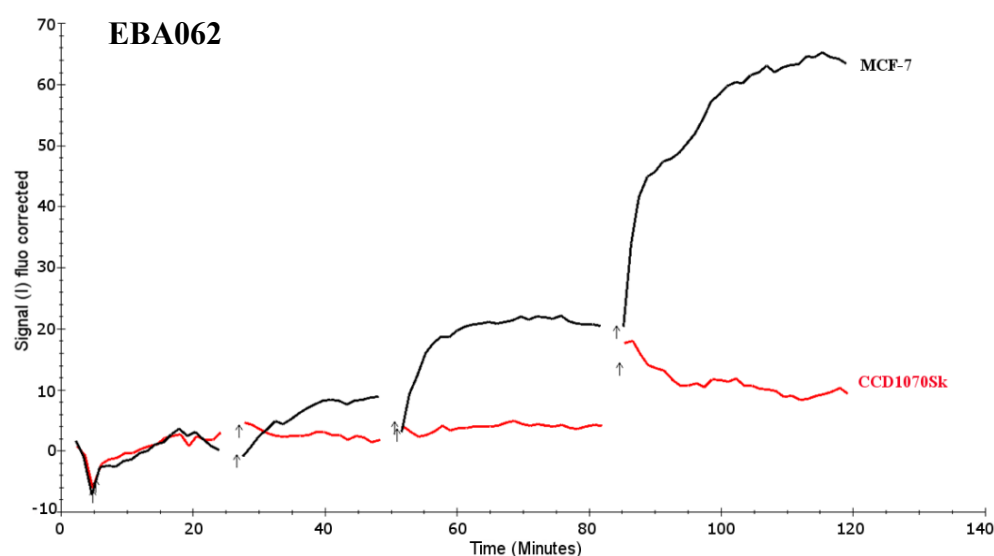


Figure 4. Binding of EBA062 to MCF-7 and CCD1070Sk cells as tested by LigandTracer Green Line in real-time mode. MCF-7 as a model of EpCAM-expressing cell line and CCD1070Sk as a model of N-cadherin-expressing cell line were selected for the binding experiment. *In vivo* biotinylated EBA062 was labeled using a streptavidin-APC conjugate and diluted to the final concentrations of 10 nM, 30 nM, and 90 nM in the cultivation medium. Two separate cell populations of MCF-7 and CCD1070Sk cells were seeded into the same circular plastic dish. Each fluorescently labeled ligand was incubated with the two cell populations simultaneously. The values were obtained by LigandTracer Green Line with an APC-compatible detector and analyzed using Trace Drawer 1.8 (Ridgeview Instruments AB).

All variants showed the binding affinity to living cells in a nanomolar range. Currently, we work on increasing the binding affinity of the EBA014 variant by affinity maturation. Four collections of Myomedin-derived binders, targeting N-cadherin and EpCAM, were generated and cloned into a plasmid vector for the production and screening of the best binding variants. The N-cadherin binders selected from the Myomedin-loop library (LN binders) were expressed, and cell lysates were used for a pilot ELISA experiment. More detailed characterization of the LN clones along with characterization of the particular variants from other Myomedin collections, will yet be performed. The developed binders might serve as robust capture agents required for the development of a microfluidic chip unit for the detection and separation of CTCs. Selection of cell populations of different cell phenotypes via two surface biomarkers might significantly enhance the sensitivity and accuracy of the diagnostic method and serve as an alternative tool for the clinical practice.

3. Development of binding proteins specific for Shiga toxin 1 B Subunit

Grant: *Lactic acid bacteria-mediated intestinal delivery of novel therapeutic protein binders derived from scaffold of albumin-binding domain.* Czech Academy of Sciences, reg.# SAZU-16-01, 2016-2018. Partner Organization: Jozef Stefan Institute, Department of Biotechnology, SAZU, Slovenia.

Shiga toxin (Stx) is produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae*. It has been documented that Stx can cause diarrhea, dysentery and hemorrhagic colitis in human that may further develop into life-threatening hemolytic uremic syndrome, leading to acute renal failure. Stx is composed of the A subunit, responsible for intracellular toxic action, and non-toxic pentameric B subunit, responsible for binding to the host cell surface receptor globotriaosylceramide (Gb3). Because conventional anti-microbial treatment of infections by Stx-producing bacteria increases release of toxins from the killed bacteria, there is a need for the development of new therapies [11]. Engineered lactic acid bacteria with surface-displayed binding proteins targeting Stx from the human gastrointestinal tract have emerged as a potential solution. Lactic acid bacteria are part of the human intestinal flora. They have been demonstrated to have protective health effects in several diseases. Their proven safety to the human organism allows their utilization as vectors for the delivery of recombinant proteins to the gastrointestinal tract. Recently, they have been successfully engineered to display specific binders derived from various scaffolds against different targets on their surface [12-15].

In this project, a collection of unique protein binders (S1B) targeted to Shiga toxin B-subunit has been generated using a complex combinatorial library derived from the ABD scaffold and ribosome display selection technique. The ABD scaffold, as a small, soluble and self-refolding molecule, is an appropriate structure for the surface display in *L. lactis* (Fig. 5.). The binding properties of the most promising S1B binders selected by ELISA were assessed using SPR measurement. After that, they were optimized for the surface display in *L. lactis* and functionally characterized. After subsequent improvement of the binding properties of particular S1B variants by the affinity-maturation approach, lactic acid bacteria with surface-displayed S1B binders would be useful for antagonizing pathogenic bacteria strains by the removal of Stx from the human gastrointestinal tract.

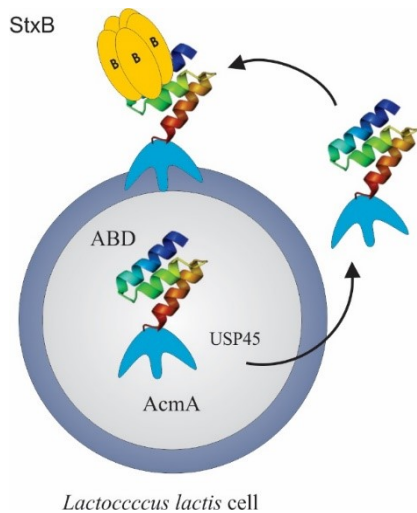


Figure 5. The display of ABD binders on the surface of *L. lactis*. The gene coding a particular ABD variant was fused to the gene for peptidoglycan-binding C terminus of AcmA protein and to the Usp45 secretion signal.

Results

An efficient and functional display of ABD-derived Stx1B binding proteins (named S1B binders) on the surface of *L. lactis* was demonstrated. For the selection of S1B binders using ribosome display, recombinant Stx1B was expressed in the form of inclusion bodies and efficiently refolded. Of all selected S1B variants, four cell lysates that contained S1B binders S1B9, S1B22, S1B26, or S1B28 showed specific binding to immobilized recombinant Stx1B using ELISA. The S1B28 variant showed a lower level of expression, possibly due to unintended mutation in the non-randomized part of the sequence, and this protein was, therefore, excluded from further characterization. Binding of serially diluted S1B9, S1B22, S1B26 binders to immobilized Stx1B was observed. The most promising variants S1B22 and S1B26 were chosen for further biophysical characterization using SPR. The binding affinities of S1B22 and S1B26 were determined to be in the micromolar range (0.70 μM for S1B22 and 1.00 μM for S1B26).

L. lactis capable of binding Stx1B by displaying S1B binders on its surface were engineered. To display the S1B binders on the surface of *L. lactis*, the genes for S1B9, S1B22, S1B26, and ABDwt control without TolA spacer or AviTag were fused to the gene for peptidoglycan-binding C terminus of AcmA protein and to the Usp45 secretion signal. Fusion proteins were expressed in *L. lactis* by using a nisin-controlled expression system (NICE), as confirmed by SDS PAGE analysis. Surface display of all four variants was confirmed using flow cytometry or whole-cell ELISA. The S1B26 binder was indicated as the most promising Stx1B binder for the *L. lactis* surface display.

4. Development of procedures and tools for validation of polyvalent vaccines against bacterial enteral diseases

Grant: *Development of unique vaccines against serious diseases of animals.* Technological Agency of the Czech Republic (programme EPSILON), reg.# TH01010837 2015-2016 Collaboration with Dyntec spol., s.r.o., Czech Republic.

The demand for polyvalent vaccines against enteral disease of pigs and cattle is associated with the increased demand for healthy food without excessive use of antibiotics. The use of antibiotics as growth stimulators has led to changes in the animal intestinal microflora and allowed the emergence of resistant strains of *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* and *Escherichia coli*. Current vaccines offer only a limited number of valences and do not offer protection against Beta2 toxin of *C. perfringens*, which is the main cause of serious diarrheal diseases in the offspring immediately after birth [16]. One part of the project is devoted to the development of unique polyvalent vaccines for immunization of cattle before farrowing against enteric diseases of their offspring. A wide range of antigens contained in the vaccine will permit induction of an effective protection through one or two applications of the vaccine, reducing the negative impact on farrowing and vitality of the offspring caused by stress of repeated vaccinations of females before farrowing.

Successful introduction of the vaccine to the market requires development of precise and reliable diagnostic procedures for verification and validation of its quality. For this purpose, ELISA kits and particular protocols based on engineered recombinant variants of all used antigens in the developing vaccine have been developed, allowing determination of the titer of each of the particular preventative antibodies in the serum of immunized animals. The developed ELISA protocols and kits are able to detect serum antibodies against following recombinant proteins: adhesin K99, adhesin K88, adhesin 987P, adhesin F41, toxoid LT of *E. coli*, and *C. perfringens* toxoid alpha, toxoid beta, toxoid beta2, toxoid epsilon, and *C. difficile* toxoid A. The presented technical solution is able to determine the amount of antibodies against up to 10 factors of the pathogenicity of bacteria causing diarrheal diseases of piglets and calves, thus determining their level of protection against disease. The developed technique is currently being used as a crucial part of testing aimed to determine the effectiveness and efficacy of the 10-valent vaccine by official authorities in the Czech Republic as a part of the validation process before entering the planned market in 12 European countries.

Results

Recombinant toxins CPA, CPB1, CPB2, ETX from *C. perfringens* and TcdA toxin from *C. difficile* were successfully expressed in *E. coli* in the soluble form and characterized using SDS-PAGE and WB. These recombinant antigens were then used as standards for the development of sensitive and specific ELISA protocols for the quantitation of antibodies in murine sera. Parameters and criteria of the acceptability for the ELISA validation were tested, demonstrating that the ELISA test developed in this study provides the required specificity and sensitivity for detection of clostridial toxins CPA, CPB1, CPB2, ETX, and TcdA. In addition, the optimized ELISA protocols were used for comparison of the efficacy of the vaccines, currently under development by Dyntec s.r.o., with the corresponding commercial best-of-class vaccines (Fig. 6.). The results demonstrate that samples of the Dyntec vaccines have at least comparable parameters in the four tested valences as competitor products but novel vaccines will be produced as 10-valent protective vaccines currently not available on the market. These developed ELISA protocols, therefore, form an integral part of the official validation documentation required for certification of the vaccines by both Czech and European veterinary authorities and will be used by Dyntec s.r.o. for the quality testing of their future commercial products.

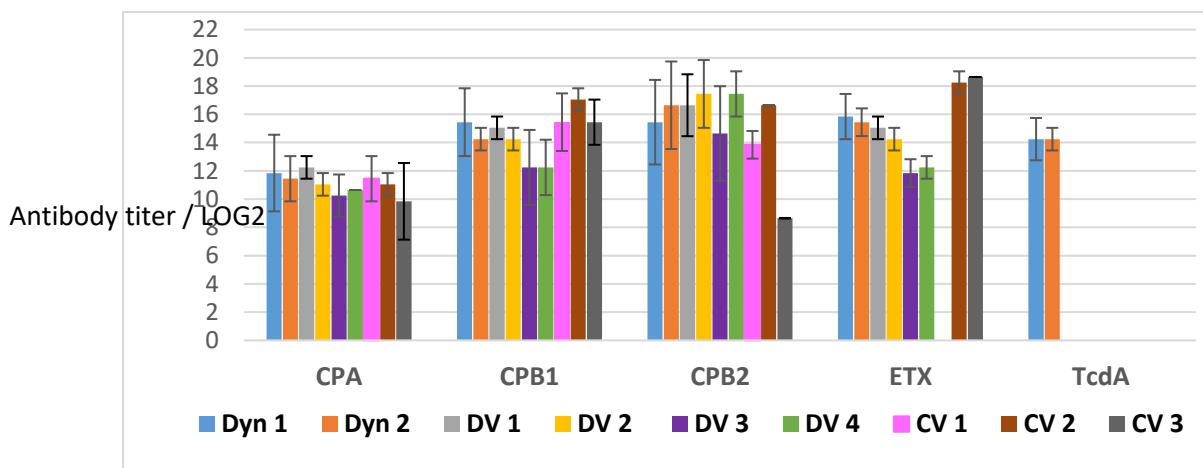


Figure 6. The overall comparison of the efficiency of nine vaccines tested by the validated ELISA protocols. Mice (groups of 5) were immunized with nine different vaccines. Two vaccines already developed by Dyntec, s.r.o. (Dyn 1 and Dyn 2), four vaccines under development by Dyntec, s.r.o. (DV 1-4), and three commercial competitive vaccines (CV 1-3). Altogether, 45 murine sera were compared based on the antibody titer against five different antigens (CPA, CPB1, CPB2, ETX, and TcdA).

Curriculum Vitae

Lucie Vaňková

Born: February 12, 1988 in Znojmo, Czech Republic

Education

2013 – present **Ph.D. study**, Department of Biochemistry, Charles University

Novel binding proteins derived from small protein domains targeting diagnostically important molecules, Supervisor: Petr Malý, Ph.D., Laboratory of Ligand Engineering, Institute of Biotechnology CAS, v.v.i.

2010 – 2012 **M.Sc. degree**, Department of Cell Biology, Charles University

The secreted aspartic proteases of *Candida parapsilosis*, Supervisor: Jiří Dostál, Ph.D., Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry CAS, v.v.i.

2007 – 2010 **Bc. degree**, Biology, Charles University

CUG Codon in Pathogenic Yeasts of the Genus *Candida*, Supervisor: Olga Hrušková Heidingsfeldová, Ph.D., Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry CAS, v.v.i.

Language skills

English FCE (B2, 2014)

Selected special courses and workshops

2016 Motol mini-course in flow cytometry

2015 LigandTracer training

2015 Hands-on qPCR course

Honors and Prizes

2016 Best poster award at the 12th Euro Biotechnology Congress, Alicante, Spain

Conference oral (OP) and poster (PP) presentations:

2017 42nd FEBS Congress and 17th FEBS Young Scientists' Forum, Jerusalem, Israel (OP+PP)

2016 12th Euro Biotechnology Congress, Alicante, Spain (PP)

2016 XIIIth Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady, Czech Republic (PP)

2014 Workshop - Modern drug delivery systems and recombinant vaccines, Telč, Czech Republic (OP)

2014 XIIth Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady, Czech Republic (PP)

2013 XIth Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady, Czech Republic (PP)

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie



Mgr. Lucie Vaňková

Nové vazebné proteiny odvozené od malých proteinových domén cílené na diagnosticky
využitelné terče

Novel binding proteins derived from small protein domains targeting diagnostically important
molecules

Autoreferát disertační práce

Školitel: RNDr. Petr Malý, CSc.

Praha, 2018

Abstrakt

Rychlý vývoj technik genového inženýrství, zejména metod pro *in vitro* řízenou evoluci a kombinatorickou mutagenizi, umožnil rychlý rozvoj nových vazebných proteinů pro téměř jakýkoli požadovaný antigen jako alternativu k dnes široce používaným protilátkám. Tyto tzv. scaffolds jsou často odvozeny od malých proteinových domén s užitečnými biofyzikálními vlastnostmi. Zatímco na biofarmaceutickém trhu stále dominují monoklonální protilátky, možnost snadné cílené modifikace vazebných proteinů je předurčuje především pro použití v diagnostice.

ABD scaffold, odvozený od albumin vázící domény streptokokového proteinu G tvořené třemi spojenými alfa-šroubovicemi, patří do rodiny malých vazebných domén. V naší laboratoři byla na základě ABD scaffoldu vyvinuta vysoce komplexní kombinatorická knihovna vazebných proteinů. Tato knihovna byla použita k selekci nových vazebných proteinů pro lidské sérové biomarkery rakoviny prostaty PSP94, KLK2, KLK11, jež mohou být použity k vývoji nových multifaktoriálních biosenzorů pro její přesnější diagnostiku.

V druhé části dizertace je popsán vývoj vazebných proteinů odvozených od ABD scaffoldu určených pro selektivní rozpoznání různých fenotypů cirkulujících nádorových buněk jako součást mikrofluidního čipu vyvíjeného pro diagnostiku plicního adenokarcinomu. Vedle tohoto již osvědčeného modelu byly k selekci vazebných proteinů použity nově vyvinuté kombinatorické knihovny odvozené od Myomedinového scaffoldu, jehož odlišná struktura vazebného povrchu by mohla sloužit k rozpoznání jiných epitopů na cílových molekulách.

Ve třetí části práce byla vytvořena sbírka unikátních vazebných proteinů odvozených od ABD scaffoldu a cílených na podjednotku B Shiga toxinu (Stx). Tyto varianty byly optimalizovány pro orientované vystavení na povrchu buněk *Lactococcus lactis* a funkčně charakterizovány. Po následném vylepšení vazebných vlastností některých vybraných variant by mohly takto upravené bakterie *L. lactis* sloužit k odstranění Stx z lidského gastrointestinálního traktu, a tím ke snížení účinku patogenních bakterií.

Poslední část práce je zaměřena na vývoj unikátních polyvalentních vakcín pro imunizaci selat a telat proti střevním onemocněním. Současné vakcíny nabízejí jen omezený počet valencí a nenavozují ochranu proti některým závažným průjmovým onemocněním. Pro úspěšné uvedení vakcín na trh byly vyvinuty spolehlivé ELISA soupravy a protokoly pro ověření a validaci jejich kvality. Tyto ELISA sety jsou schopny detekovat sérové protilátky proti 10 faktorům patogenity a v současné době jsou používány v procesu validace před vstupem vakcín na trh ve 12 evropských zemích.

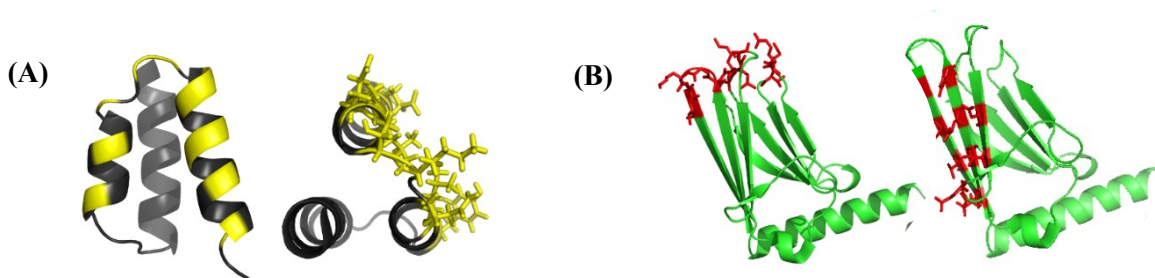
Úvod

Proteinové skafoldy

Nejrozšířenějšími strukturami pro detekci různých molekul jsou v současnosti rutině vyráběné monoklonální protilátky. Rychlý vývoj technik genového inženýrství, zejména metod pro *in vitro* řízenou evoluci a kombinační mutagenezi, umožnil použít pro vazbu i jiné proteinové struktury. Tyto tzv. **skafoldy** jsou často odvozeny z proteinů s užitečnými biofyzikálními vlastnostmi, které jsou v přírodě schopné vázat jiné molekuly. Pro tvorbu nových vazebných proteinů jsou v této práci prezentovány dva různé proteinové skafoldy.

1. Albumin vazebná doména

Pro selekci specifických vazebných proteinů byla jako hlavní skafold použita poslední C-terminální albumin vazebná doména (ABD) Proteinu G streptokoka kmene G148 [1]. Randomizací 11 kodonů v kódující sekvenci ABD by mělo vést ke vzniku 2×10^{14} (tj. 20^{11}) nových variant [2-5] (obr. 1. A.).



Obrázek 1. (A) Schéma struktury albumin vazebné domény (ABD). Randomizované aminokyseliny jsou zobrazeny žlutě. **(B) Struktury dvou navrhovaných strategických přístupů randomizace Myomedinu.** Randomizované aminokyseliny jsou zobrazeny červeně. V prvním modelu (vlevo) jsou randomizovány smyčky, v druhém modelu (vpravo) byly pro randomizaci vybrány beta listy. Struktury jsou odvozené od struktur PDB 3RBS a 1GJT.

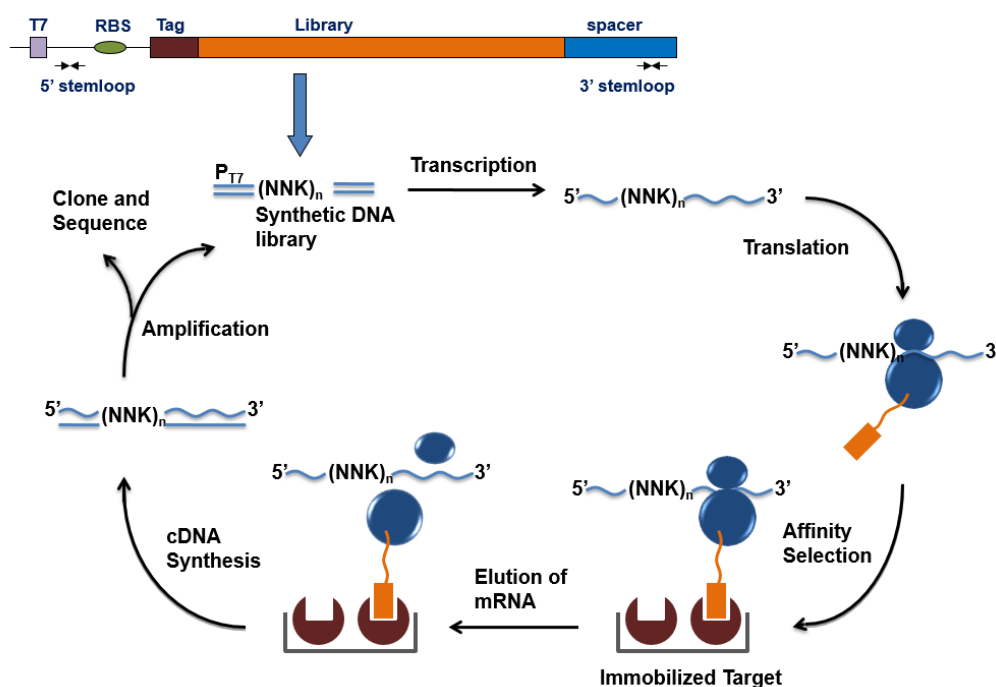
2. Myomedinový skafold

Vedle sbírky vazebných proteinů odvozených z ABD skafoldu vyvíjíme nový skafold pojmenovaný **Myomedin**. Nové vazebné varianty, založené na rozdílné geometrii vazebného povrchu by mohly rozpoznat odlišné epitopy na cílových molekulách. Byly navrženy dva různé strategické přístupy. V prvním z nich byly randomizovány aminokyselinové zbytky tří různých

smyček, zatímco ve druhém případě byly pro randomizaci vybrány aminokyselinové zbytky antiparalelních beta listů (obr. 1. B.).

Ribosomální displej

Ribosomální displej (RD) je široce užívaná *in vitro* evoluční technologie, která již byla úspěšně použita pro vývoj vazebných proteinů proti mnoha cílovým molekulám jak pro akademické, tak pro komerční účely [6]. Princip ribosomálního displeje spočívá v zabránění disociace nově syntetizovaného proteinu a mRNA, která ho kóduje, z ribozomu. Výsledný ternární komplex (mRNA-ribosom-protein) v RD je důsledkem zastavené translace způsobené chybějícím stop kodómem [6]. Podrobný postup RD je popsán na obrázku 2.



Obrázek 2. Znázornění jednoho selekčního cyklu ribosomálního displeje. Složená DNA kazeta obsahuje silný promotor a vazebné místo pro ribosom (RBS), následuje otevřený čtecí rámec (ORF), kódující kombinatoriální knihovnu a zakončený vmezeřenou sekvencí bez stop kodonu sloužící k vystrčení vazebné domény od ribosome (tzv. spacer). Pomocí koktejlu enzymů obsahující transkripční a translační mašinerii *E. coli* je DNA přepsána do mRNA a ta je poté translatována. Vzniklý mix s ternárními komplexy je přidán k imobilizovaným cílovým molekulám. Nenavázané komplexy jsou odmyty a mRNA z navázaných komplexů je uvolněna pomocí chelatačních činidel a izolována. Vyčištěná mRNA je reverzně transkribována na cDNA, jež posléze amplifikována pomocí PCR. Výsledný PCR produkt, nyní obohacený o varianty vážící cílovou molekulu, pokračuje do dalšího selekčního kola.

Cíle dizertační práce

1. Vývoj vazebných proteinů cílených na biomarkery karcinomu prostaty

- 1.1. Vazebné proteiny lidského PSP94
- 1.2. Vazebné proteiny pro lidský kallikrein 2 a kallikrein 11

2. Vývoj vazebných proteinů cílených na povrchové markery epiteliálních a mesenchymálních buněk pro třídění cirkulujících rakovinných buněk

- 2.1. Vazebné proteiny založené na ABD skafoldu
- 2.2. Vazebné proteiny založené na Myomedinovém skafoldu

3. Vývoj vazebných proteinů specifických pro B podjednotku Shiga toxinu

4. Vývoj postupů a nástrojů pro validaci polyvalentních vakcín proti bakteriálním enterálním chorobám

1. Vývoj vazebných proteinů cílených na biomarkery karcinomu prostaty

1.1. Vazebné proteiny lidského PSP94

1.2. Vazebné proteiny pro lidský kallikrein 2 a kallikrein 11

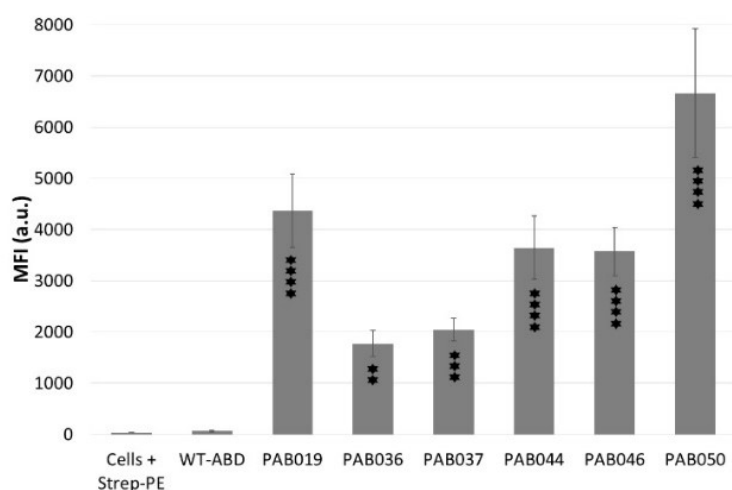
Grant: *Vývoj nových vazebných biomolekul pro in vitro diagnostické použití v onkologii.* Ministerstvo průmyslu a obchodu ČR (program TIP), reg.# FR-TI4/667, 2012-2014. Spolupráce s firmou EXBIO Praha, a.s., a Protean, s.r.o., Česká Republika.

Rakovina prostaty (RP) je jedním z nejmávanějších onemocnění ve vyspělých zemích. Náklady na její diagnózu a léčbu jsou enormní. Vzhledem k tomu, že preventivní screeningové programy založené na detekci hladiny PSA (prostate-specific antigen) v séru jsou nedostatečné, dochází k rostoucímu tlaku na vývoj nových diagnostických metod [7, 8]. Cílená diagnostika (a léčba) založená na monoklonálních protilátkách má jen omezenou využitelnost. Imunitní systém nereaguje na nádorové cíle dostatečně, což komplikuje vývoj specifických nástrojů založených na monoklonálních protilátkách. V tomto projektu byla navržena nejmodernější technologie založená na jiných vazebných molekulách než jsou monoklonální protilátky. K jejich vývoji není zapotřebí imunitní systém, jelikož se celý proces odehrává *in vitro*, bez účasti živého organismu nebo jednotlivých buněk. Hlavním cílem projektu bylo vyvinout jedinečnou sbírku vazebných molekul jako alternativu k protilátkám na modelu včasné detekce RP, což by mohlo přispět k vývoji efektivnější multiparametrické sérové diagnostiky na bázi mikrofluidních čipů. Použitím vhodné kombinace konkrétních vazebných proteinů dojde ke zvýšení citlivosti a spolehlivosti testu.

Klíčová část projektu je zaměřena na vývoj nových vazebných proteinů cílených na vybrané biomarkery karcinomu prostaty PSP94, KLK2, KLK11. Pro selekci vazebných proteinů cílených na PSP94 (nazvané PAB binders), KLK2 (nazvané KLA binders) a KLK11 (nazvané HIP binders), byla použita vysoce komplexní kombinační knihovna odvozená od ABD skafoldu s použitím ribosomálního displeje jako selekční metody. Nejslibnější kandidáti byli funkčně a biofyzikálně charakterizováni. Tyto vazebné molekuly mohou být po další modifikaci použity jako součást biosenzoru pro detekci rakoviny prostaty.

Výsledky

V práci je prezentován vývoj a charakterizace unikátních vazebných proteinů specifických pro lidské biomarkery rakoviny prostaty PSP94 (PAB binders), KLK2 (KLA binders) a KLK11 (HIP binders). Pro selekci vazebných proteinů byly exprimovány a charakterizovány různé rekombinantní varianty cílových proteinů. Všechny rekombinantní cíle s výjimkou KLK2 byly produkovány v rozpustné formě v *Escherichia coli*. Rekombinantní KLK2 byl produkován ve formě nerozpustných inkluzních tělísek a následně úspěšně složen do nativního stavu. Jeho přirozená proteasová aktivita byla ověřena štěpením chromogenního substrátu. Pomocí kombinatoriální knihovny založené na ABD skafoldu byly v kombinaci s RD vyselektovány DNA sbírky PAB, KLA and HIP vazebných proteinů, které byly zaklonovány do plazmidu pro produkci a screening nejlepších variant. Bylo prokázáno, že se tyto varianty váží na příslušné rekombinantní terče a neváží se na negativní kontrolu. Dále byly provedeny vazebné a kompetiční experimenty s použitím průtokové cytometrie na buněčné linii rakoviny prostaty LNCaP (obr. 3.). U variant PAB046 a PAB050 se prokázalo, že rozpoznávají cílový protein PSP94 v jeho nativní konformaci. S dalšími modifikacemi a využitím přístupů proteinového inženýrství a s použitím afinitní maturace pro zvýšení K_D jednotlivých klonů, by mohly být tyto vazebné molekuly zajímavé pro vývoj nových multifaktorových biosenzorů pro přesnější diagnostiku rakoviny prostaty jako lepší alternativa k běžně používaným standardním PSA testům založených na ELISA metodách.



Obrázek 3. Vazba PAB klonů na PSP94 na nepermeabilizovaných buňkách LNCaP. K buňkám LNCaP byly přidány rozpustné PAB varianty purifikované jako biotinylované fúzní produkty His-PAB-TolA-Avi a vazba byla detekována konjugátem streptavidin-PE. WT-ABD = přidáný nerandomizovaný wild-type ABD jako negativní kontrola. Průměrné hodnoty tří experimentů jsou uvedeny se standardními odchylkami. Ve všech vazebných experimentech jsou výsledky vyjádřeny jako aritmetický průměr

± standardní odchylka průměru. Statistická analýza byla provedena pomocí jednosměrné analýzy ANOVA, po níž následoval Dunnettův post-test, porovnáním všech vzorků s kontrolou. Pro statistickou analýzu byl použit GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software). Významné rozdíly jsou označeny hvězdičkami (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$).

2. Vývoj vazebných proteinů cílených na povrchové markery epiteliálních a mezenchymálních buněk pro třídění cirkulujících rakovinných buněk

2.1. Vazebné proteiny založené na ABD skafoldu

2.2. Vazebné proteiny založené na Myomedinovém skafoldu

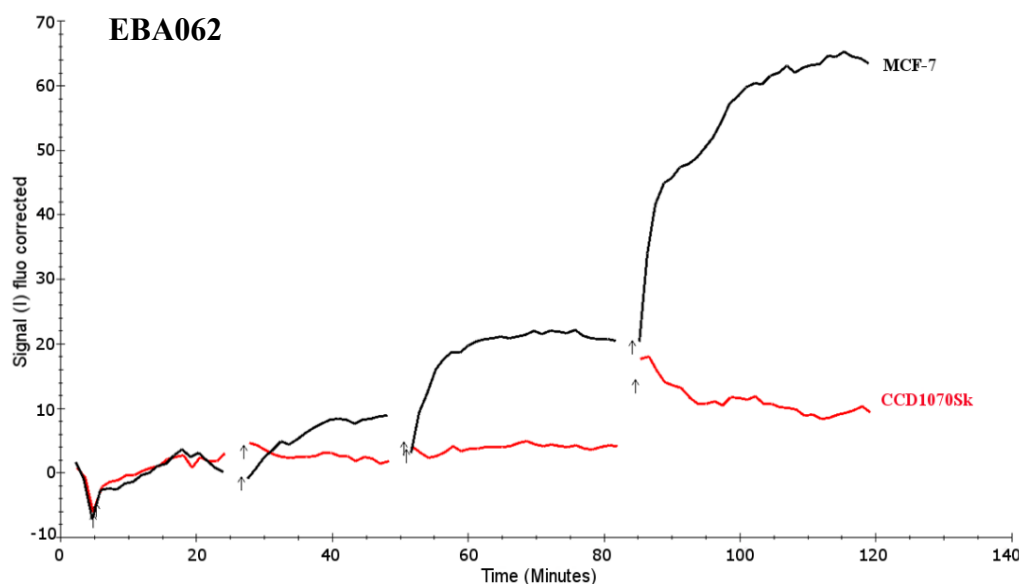
Grant: *Detekce cirkulujících nádorových buněk (CTC) u pacientů s adenokarcinomem plic pomocí mikrofluidního čipu.* Agentura pro zdravotnický výzkum České republiky, reg. # 16-29738A, 2016-2019. Spolupráce s katedrou biologie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity J.E. Purkyně a Krajskou zdravotní a.s., Ústí nad Labem, ČR.

Cirkulující nádorové buňky (CTC) představují jeden ze slibných diagnostických nástrojů pro sledování progresu plicního adenokarcinomu a jeho maligní transformace. Většina standardních metod pro izolaci CTC z krve pacientů je založena na izolaci buněk obsahujících na svém povrchu epiteliální adhezivní molekulu (EpCAM), takže jsou opomíjeny další fenotypy buněk, které mohou být ještě invazivnější [9, 10]. V rámci běžícího projektu “Detekce cirkulujících nádorových buněk u pacientů s adenokarcinomem plic pomocí mikrofluidního čipu” byl navržen vývoj mikrofluidního čipu, který umožňuje rychlou izolaci a vyhodnocení CTC ze vzorků periferní krve a třídění konkrétních populací CTC na základě jejich epiteliálního / mezenchymálního fenotypu. Hlavní výhodou tohoto řešení je významné zkrácení času požadovaného pro charakterizaci buněčného typu (ze tří týdnů *in vitro* kultivace až na jeden den) a zároveň možnost následného uvolnění živých buněk pro další kultivaci a následnou charakterizaci. Pro konstrukci speciální zóny pro selekci buněk bylo nezbytné vyvinout nový typ vysoce afinitních vazebných proteinů specifických pro epiteliální a mezenchymální membránové markery, které budou schopné za dynamických podmínek selektivně zachytit CTC plicního adenokarcinomu. Takové rozlišení by umožnilo přesnější diagnostiku a zvolení vhodné terapie u konkrétních pacientů. Jako cílové molekuly pro selekci vazebných proteinů byly navrženy a vyrobeny různé rekombinantní formy epiteliálního markeru EpCAM a mezenchymového markeru N-cadherinu. Byla použita komplexní kombinační knihovna odvozená z ABD nebo z Myomedinového skafoldu v kombinaci s ribozomálním displejem jako selekční metodou. Nejslibnější kandidáti vybraní na základě ELISA vazebných experimentů byli dále charakterizováni měřením jejich vazebných vlastností pomocí modelových buněčných linií. Pomocí průtokové cytometrie bylo analyzováno pět lidských buněčných linií (MCF-7, DU-145, CCD1070Sk, HEK293T, PC-3) zdali produkují na svém povrchu EpCAM a N-cadherin. Interakce s buňkami byla měřena v reálném čase za použití přístroje LigandTracer®

Green Line. Tento přístroj umožňuje sledovat vazbu ligandu na receptory buněčného povrchu na živých buňkách a zároveň stanovit vazebnou afinitu a kinetiku.

Výsledky

Pomocí kombinatorické knihovny odvozené z ABD skafoldu byly pomocí RD vyselektovány a zaklonovány DNA sbírky CAB vazebných proteinů cílících na mezenchymální membránový marker N-cadherin a EBA vazebných proteinů vážících epiteliální membránový marker EpCAM, pro následnou charakterizaci nejslibnějších variant. Vazebné profily nejslibnějších variant byly analyzovány pomocí metody ELISA s imobilizovaným rekombinantním EpCAM, N-cadherinem a BSA jako negativní kontrolou. Dále byla provedena ELISA s obráceným uspořádáním. Bylo prokázáno, že EBA014, EBA062, CAB043 a CAB101 varianty se vážou na své rekombinantní terče a nevážou se na BSA. EBA014, EBA062 a CAB101 vykazovaly selektivní vazebné vlastnosti, jak bylo demonstrováno na MCF-7 a CCD1070Sk buněčných liniích exprimujících EpCAM nebo N-cadherin za použití přístroje LigandTracer Green Line (obr. 4.).



Obrázek 4. Vazba EBA062 na buňky MCF-7 a CCD1070Sk měřená v reálném čase pomocí LigandTracer Green Line. Pro experiment byly vybrány MCF-7 buňky jako model buněčné linie exprimující EpCAM a CCD1070Sk jako model buněčné linie exprimující N-cadherin. *In vivo* biotinylovaný EBA062 byl označen pomocí streptavidin–APC konjugátu a rozpuštěn v kultivačním médiu na výslednou koncentraci 10 nM, 30 nM a 90 nM. Dvě oddělené buněčné populace buněk MCF-7 a CCD1070Sk byly vysety do stejné kruhové plastové misky. Každý fluorescenčně značený vazebný protein byl inkubován současně se dvěma buněčnými populacemi. Výsledné hodnoty byly získány pomocí LigandTracer Green Line s APC kompatibilním detektorem a analyzovány pomocí Trace Drawer 1.8 (Ridgeview Instruments AB).

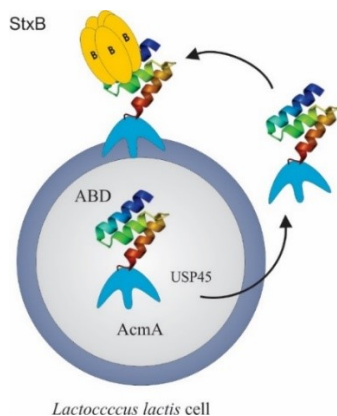
Všechny varianty se k živým buňkám vázaly s afinitou v nanomolárním rozmezí. V současné době pracujeme na zvýšení vazebné afinity varianty EBA014 pomocí afinitní maturace. Dalším cílem bylo vytvoření čtyř sbírek vazebných proteinů odvozených od Myomedinu vážící N-cadherin a EpCAM. N-cadherinové varianty vyselektované z jedné ze dvou variant Myomedinové knihovny (LN varianty) byly exprimovány a jejich buněčné lyzáty byly použity pro pilotní ELISA experiment. Následujícím krokem bude podrobnější charakterizace LN klonů, stejně jako charakterizace jednotlivých variant z dalších sbírek odvozených z Myomedinu. Vytvořené vazebné proteiny mohou být využity jako zachycovací jednotky potřebné pro vývoj mikrofluidního čipu pro detekci a separaci CTC. Třídění buněčných populací různých fenotypů prostřednictvím dvou povrchových biomarkerů může významně zvýšit citlivost a přesnost diagnostické metody a být tak užitečným nástrojem v klinické praxi.

3. Vývoj vazebných proteinů specifických pro B podjednotku Shiga toxinu

Grant: Využití bakterií mléčného kvašení k produkci nových terapeutických proteinů odvozených od struktury albumin vázící domény a k jejich uvolňování ve střevě. Agentura pro zdravotnický výzkum České republiky, reg.# SAZU-16-01, 2016-2018. Partnerské pracoviště: Jozef Stefan Institute, Department of Biotechnology, SAZU, Slovinsko.

Shiga toxin (Stx) je produkován enterohemoragickými bakteriemi *Escherichia coli* a *Shigella dysenteriae*. Bylo prokázáno, že Stx může u člověka způsobit průjem, úplavici a hemoragickou kolitidu, která se může dále rozvinout v život ohrožující hemolyticko-uremický syndrom, který může vést až k akutnímu selhání ledvin. Stx je složen z podjednotky A, zodpovědné za intracelulární toxické působení a netoxické pentamerické B podjednotky, zodpovědné za vazbu na globotriaosylceramid (Gb3) hostitelské buňky. Vzhledem k tomu, že konvenční antimikrobiální léčba infekcí způsobená bakteriemi produkujícími Stx zvyšuje uvolňování toxinů z usmrcených bakterií, je potřeba vyvinout nové alternativní terapie [11]. Jako potenciální řešení byly navrženy modifikované bakterie mléčného kvašení s povrchovými vazebnými proteiny vázící Stx v lidském gastrointestinálním (GI) traktu. Bakterie mléčného kvašení jsou součástí lidské střevní mikroflóry. Byla prokázána jejich bezpečnost při použití jako vektorů pro transport rekombinantních proteinů do GI traktu. Navíc bylo zjištěno, že při některých chorobách mají preventivní ochranné účinky. Nedávno byly úspěšně modifikovány tak, aby na svém povrchu vystavovaly specifické vazebné proteiny odvozené od různých skafoldů proti různým cílům [12-15].

V tomto projektu byla vytvořena sbírka unikátních vazebných proteinů (S1B) zaměřená na podjednotku B Shiga toxinu s použitím komplexní kombinatorické knihovny odvozené z ABD skafoldu pomocí ribozomálního displeje jako selekční metody. ABD skafold je malá, rozpustná a rychle refoldující molekula, která je vhodná pro povrchový displej na buňkách *L. lactis* (Obr. 5.). Vazebné vlastnosti nejslibnějších S1B variant, které byly vybrány pomocí metody ELISA, byly dale vyhodnoceny měřením pomocí povrchové plasmonové resonance (SPR). Poté byly tyto varianty optimalizovány pro povrchový displej v *L. lactis* a funkčně charakterizovány. Po následném zlepšení vazebných vlastností konkrétních S1B variant pomocí afinitní maturace budou modifikované bakterie mléčného kvašení s těmito povrchově vystavenými S1B vazebnými proteiny vhodné pro antagonizaci kmenů patogenních bakterií produkující Stx toxin.



Obrázek 5. Povrchový displej ABD vazebných proteinů na povrchu buněk *L. lactis*. Gen kódující konkrétní ABD variantu byl fúzován s genem kódujícím C-konec peptidoglykan-vazebného proteinu AcmA a se sekrečním signálem Usp45.

Výsledky

Byl prokázán účinný a funkční displej vazebných proteinů odvozených od ABD (pojmenovaných S1B) na povrchu buněk *L. lactis*. Pro selekci S1B variant s použitím ribosomálního displeje byl ve formě inkluzních tělísek vyprodukován a účinně znovu složen rekombinantní Stx1B. Ze všech vybraných S1B variant byla u čtyř buněčných lyzátů, které obsahovaly varianty S1B9, S1B22, S1B26 nebo S1B28, prokázána specifická vazba na imobilizovaný rekombinantní Stx1B s použitím ELISA metody. Varianta S1B28 vykazovala nižší hladinu exprese, pravděpodobně v důsledku náhodné mutace v nerandomizované části sekvence, a byla proto vyřazena z další charakterizace. Sériově zředěné varianty S1B9, S1B22, S1B26 se vážaly na imobilizovaný Stx1B. Nejslibnější kandidáti S1B22 a S1B26 byli zvoleni pro další biofyzikální charakterizaci pomocí SPR. Afinitní konstanty pro S1B22 a S1B26 byly stanoveny v mikromolárním rozmezí (0.70 μM pro S1B22 a 1.00 μM pro S1B26). Byl vytvořen modifikovaný *L. lactis* schopný vystavit na svém povrchu S1B vazebné proteiny vážící Stx1B. Pro vystavení jednotlivých S1B variant na povrchu *L. lactis* byly geny pro S1B9, S1B22, S1B26 a kontrolu ABDwt bez TolA a AviTag sekvence fúzovány s genem pro C-konec peptidoglykan-vazebného proteinu AcmA a se sekrečním signálem Usp45 (Obr. 5.). Fúzní proteiny byly exprimovány v *L. lactis* pomocí nisinem řízeného expresního systému (NICE), což bylo potvrzeno analýzou SDS PAGE. Povrchový displej všech čtyř variant byl potvrzen pomocí průtokové cytometrie a metodou ELISA s celými buňkami. Na základě těchto výsledků byla vazebná varianta S1B26 označena jako nejslibnější pro vazbu Stx1B pomocí povrchového displeje na *L. lactis*.

4. Vývoj postupů a nástrojů pro validaci polyvalentních vakcín proti bakteriálním enterálním chorobám

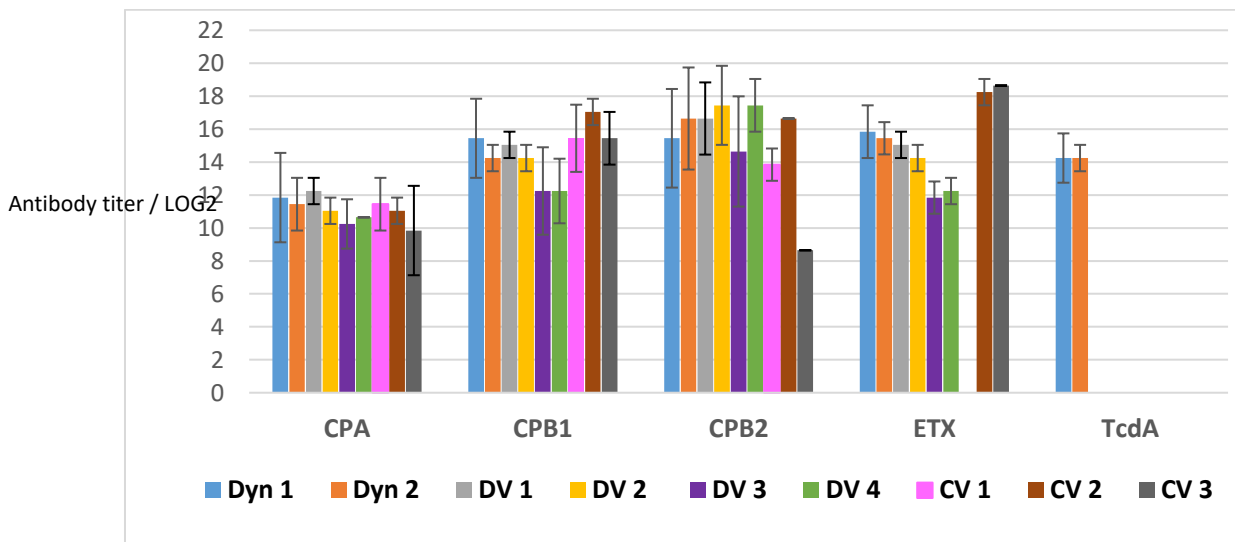
Grant: *Vývoj unikátních vakcín proti závažným onemocněním zvířat.* Technologická agentura ČR (program EPSILON), reg.# TH01010837, 2015-2016. Spolupráce s firmou Dyntec spol., s.r.o., ČR.

Poptávka po polyvalentních vakcínách proti enterálním chorobám prasat a skotu je spojena se zvýšenou poptávkou po zdravých potravinách bez nadměrného užívání antibiotik. Nadměrné používání antibiotik jako růstových stimulátorů vedlo ke změně živočišné střevní mikroflóry a umožnilo vznik rezistentních kmenů *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* a *Escherichia coli*. Aktuální vakcíny nabízejí jen omezený počet valencí a neposkytují ochranu proti Beta 2 toxinu *C. perfringens*, který je hlavní příčinou závažných průjmových onemocnění u mláďat bezprostředně po narození [16]. Jedna část projektu je věnována vývoji unikátních polyvalentních vakcín pro předporodní imunizaci samic skotu proti střevním onemocněním jejich mláďat. Široká škála antigenů obsažených ve vakcíně umožní vyvolání účinné ochrany prostřednictvím jedné nebo dvou aplikací vakcíny, což by snížilo negativní dopad na porod a vitalitu potomků způsobené stresem z opakovaného očkování.

Pro úspěšné zavedení vakcíny na trh je zapotřebí vypracovat přesné a spolehlivé diagnostické postupy pro ověření a validaci její kvality. Za tímto účelem byly vyvinuty ELISA soupravy a protokoly založené na upravených rekombinantních variantách všech použitých antigenů ve vyvíjené vakcíně, umožňující stanovení titru každé z jednotlivých preventivních protilátek v séru imunizovaných zvířat. Vyvinuté ELISA soupravy jsou schopné detekovat sérové protilátky proti následujícím rekombinantním proteinům: adhesin K99, adhesin K88, adhesin 987P, adhesin F41, toxoid LT *E. coli*; toxoid alfa, toxoid beta, toxoid beta2, toxoid epsilon *C. perfringens* a toxoid A *C. difficile*. Předložené technické řešení je schopno stanovit množství protilátek proti až 10 faktorům patogenity bakterií způsobujících průjmové onemocnění selat a telat, a tím stanovit jejich úroveň ochrany proti onemocnění. Vyvinuté ELISA soupravy a protokoly jsou v současné době používány jako důležitá součást testování pro stanovení účinnosti a spolehlivosti deseti-valentní vakcíny oficiálními orgány v České republice jako součást procesu validace před vstupem na plánovaný trh ve 12 evropských zemích.

Výsledky

Rekombinantní toxiny CPA, CPB1, CPB2, ETX *C. perfringens* a TcdA toxin *C. difficile* byly úspěšně exprimovány v rozpustné formě v *E. coli* a charakterizovány s použitím SDS-PAGE a WB. Tyto rekombinantní antigeny byly pak použity jako standardy pro vývoj citlivých a specifických ELISA souprav a protokolů pro kvantifikaci protilátek v myších sérech. Byly testovány parametry a kritéria přijatelnosti metody pro validaci, které prokázaly, že ELISA soupravy vyvinuté v této studii poskytují požadovanou specifitu a citlivost pro detekci klostridiových toxinů CPA, CPB1, CPB2, ETX a TcdA. Optimalizované protokoly ELISA byly navíc použity pro srovnání účinnosti vakcín, které jsou v současné době vyvíjeny firmou Dyntec s.r.o., s odpovídajícími komerčně dostupnými vakcínami (obr. 6.). Výsledky ukazují, že vzorky vakcín společnosti Dyntec mají ve čtyřech testovaných valencích alespoň srovnatelné parametry jako konkurenční produkty. Nové vakcíny budou ovšem vyráběny jako 10-valentní ochranná vakcína, která v současnosti není na trhu dostupná. Tyto vyvinuté ELISA protokoly tvoří nedílnou součást oficiální validační dokumentace požadované pro certifikaci očkovacích látek českými i evropskými veterinárními orgány a budou využívány společností Dyntec pro testování kvality svých budoucích komerčních produktů.



Obrázek 6. Celkové srovnání účinnosti devíti vakcín testovaných pomocí vyvinutých ELISA souprav. Myši (skupiny po 5) byly imunizovány devíti různými vakcínami. Dvě vakcíny vyvíjené společností Dyntec (Dyn 1 a Dyn 2), čtyři vakcíny již vyvinuté společností Dyntec (DV 1-4) a tři komerční konkurenční vakcíny (CV 1-3). Dohromady bylo srovnáno 45 myších sér na základě protilátkového titru proti pěti různým antigenům (CPA, CPB1, CPB2, ETX a TcdA).

Curriculum Vitae

Lucie Vaňková

Narozená: 12. února 1988 ve Znojmě, Česká Republika

Vzdělání

2013 – nyní **Doktorské studium**, Katedra Biochemie, Karlova Univerzita

Nové vazebné proteiny odvozené od malých proteinových domén cílené na diagnosticky využitelné terče, Školitel: Petr Malý, Ph.D., Laboratoř vazebných proteinů, Biotechnologický Ústav AV ČR, v.v.i.

2010 – 2012 **Magisterský titul**, Katedra Buněčné biologie, Karlova Univerzita

Sekretované proteázy kvasinky *Candida parapsilosis*, Školitel: Jiří Dostál, Ph.D., Biochemie a molekulární biologie, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

2007 – 2010 **Bakalářský titul**, Obor Biologie, Karlova Univerzita

CUG kodón u patogenních kvasinek rodu *Candida*, Školitelka: Olga Hrušková Heidingsfeldová, Ph.D., Biochemie a molekulární biologie, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.

Jazykové certifikáty

Anglický jazyk FCE (B2, 2014)

Vybrané speciální kurzy a workshopy

2016 Motolský mini kurz průtokové cytometrie

2015 LigandTracer training

2015 Hands-on qPCR course

Ocenění

2016 Best poster award na konferenci 12th Euro Biotechnology Congress, Alicante, Španělsko

Ústní (ÚP) a plakátové (PP) prezentace na konferencích:

2017 42nd FEBS Congress and 17th FEBS Young Scientists' Forum, Jeruzalém, Izrael (ÚP+PP)

2016 12th Euro Biotechnology Congress, Alicante, Španělsko (PP)

2016 XIIIth Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady, ČR (PP)

2014 Workshop - Modern drug delivery systems and recombinant vaccines, Telč, ČR (ÚP)

2014 XIIth Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady, ČR (PP)

2013 XIth Discussions in Structural Molecular Biology, Nové Hrady, ČR (PP)

References / Literatura

1. Johansson, M.U., et al., *Structure, specificity, and mode of interaction for bacterial albumin-binding modules*. J Biol Chem, 2002. 277(10): p. 8114-20.
2. Ahmad, J.N., et al., *Novel high-affinity binders of human interferon gamma derived from albumin-binding domain of protein G*. Proteins, 2012. 80(3): p. 774-89.
3. Mareckova, L., et al., *Novel binders derived from an albumin-binding domain scaffold targeting human prostate secretory protein 94 (PSP94)*. Protein Cell, 2015. 6(10): p. 774-9.
4. Krizova, L., et al., *p19-targeted ABD-derived protein variants inhibit IL-23 binding and exert suppressive control over IL-23-stimulated expansion of primary human IL-17+ T-cells*. Autoimmunity, 2017. 50(2): p. 102-113.
5. Kuchar, M., et al., *Human interleukin-23 receptor antagonists derived from an albumin-binding domain scaffold inhibit IL-23-dependent ex vivo expansion of IL-17-producing T-cells*. Proteins, 2014. 82(6): p. 975-89.
6. Pluckthun, A., *Ribosome display: a perspective*. Methods Mol Biol, 2012. 805: p. 3-28.
7. Khan, M.A., et al., *Evaluation of proprostate specific antigen for early detection of prostate cancer in men with a total prostate specific antigen range of 4.0 to 10.0 ng/ml*. The Journal of urology, 2003. 170(3): p. 723-6.
8. Lazzeri, M., et al., *Serum index test %[-2]proPSA and Prostate Health Index are more accurate than prostate specific antigen and %fPSA in predicting a positive repeat prostate biopsy*. The Journal of urology, 2012. 188(4): p. 1137-43.
9. Gorin, M.A., et al., *Circulating tumour cells as biomarkers of prostate, bladder, and kidney cancer*. Nat Rev Urol, 2017. 14(2): p. 90-97.
10. Jin, X.R., et al., *Circulating tumor cells in early stage lung adenocarcinoma: a case series report and literature review*. Oncotarget, 2017. 8(14): p. 23130-23141.
11. Bergan, J., et al., *Shiga toxins*. Toxicon, 2012. 60(6): p. 1085-107.
12. Ravnkar, M., et al., *Engineered lactic acid bacterium Lactococcus lactis capable of binding antibodies and tumor necrosis factor alpha*. Appl Environ Microbiol, 2010. 76(20): p. 6928-32.
13. Zadavec, P., B. Strukelj, and A. Berlec, *Improvement of LysM-mediated surface display of designed ankyrin repeat proteins (DARPs) in recombinant and nonrecombinant strains of Lactococcus lactis and Lactobacillus Species*. Appl Environ Microbiol, 2015. 81(6): p. 2098-106.
14. Zadavec, P., et al., *Development of Recombinant Lactococcus lactis Displaying Albumin-Binding Domain Variants against Shiga Toxin 1 B Subunit*. PLoS One, 2016. 11(9): p. e0162625.
15. Kosler, S., B. Strukelj, and A. Berlec, *Lactic Acid Bacteria with Concomitant IL-17, IL-23 and TNFalpha- Binding Ability for the Treatment of Inflammatory Bowel Disease*. Curr Pharm Biotechnol, 2017. 18(4): p. 318-326.
16. Garmory, H.S., et al., *Occurrence of Clostridium perfringens beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays*. Epidemiol Infect, 2000. 124(1): p. 61-7.

List of publications / Seznam publikací

Publication I

Marečková L., Petroková H., Osička R., Kuchař M., Malý P. Novel binders derived from an albumin-binding domain scaffold targeting human prostate secretory protein 94 (PSP94). *Protein & Cell*, 2015, vol. 6, s. 774-779.

Publication II

Zadravec P., **Marečková L.**, Petroková H., Hodnik V., Nanut M., Anderluh G., Strukelj B., Malý P., Berlec A. Development of Recombinant *Lactococcus lactis* Displaying Albumin-Binding Domain Variants against Shiga Toxin 1 B Subunit. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11.

Publication III

Semerádtová A., Štofík M., **Vaňková L.**, Malý P., Staněk O., Malý J. Optical microchips based on high-affinity recombinant protein binders—Human serum albumin detection in urine. *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 2018,

Publication IV

Škrlec K., Zadravec P., Hlavničková M., Kuchař M., **Vaňková L.**, Petroková H., Křížová L., Černý J., Berlec A. and Malý P. p19-Targeting ILP Protein Blockers of IL-23/Th-17 Pro-Inflammatory Axis Displayed on Engineered Bacteria of Food Origin. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, vol. 19.

Publication V

Hlavničková M., Kuchař M., Osička R., **Vaňková L.**, Petroková H., Malý M., Černý J., Arenberger P. and Malý P. ABD-Derived Protein Blockers of Human IL-17 Receptor A as Non-IgG Alternatives for Modulation of IL-17-Dependent Pro-Inflammatory Axis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, vol. 19.

