

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Josef Šulc

Příprava rekombinantních protilátek s využitím metod proteinového
inženýrství

Protein engineering as a tool for the production of antibody derivatives

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Cyril Bařinka, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele RNDr. Cyrila Bařinky, Ph.D. a konzultantky RNDr. Zory Novákové, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 21.5.2019

Podpis:

Poděkování

Rád bych poděkoval školiteli RNDr. Cyrilu Bařinkovi, Ph.D. a konzultantce RNDr. Zoře Novákové, Ph.D. za pomoc a asistenci při psaní této práce. Další díky patří RNDr. Petrovi Malému, CSc. za ochotu při řešení nestandardní situace spojené s bakalářskou prací. V neposlední řadě patří poděkování i ostatním členům *Laboratoře strukturní biologie* a *Laboratoře inženýrství vazebných proteinů*.

Abstrakt

Tato práce popisuje tvorbu a vlastnosti disulfidicky stabilizovaného variabilního fragmentu protilátky 5D3 specificky rozpoznávající glutamátcarboxypeptidasu II, antigen úzce související s karcinomem prostaty i jinými nádorovými onemocněními. Malé protilátkové deriváty jsou v současnosti masivně využívány pro vývoj diagnostických a terapeutických nástrojů. Některé typy těchto derivátů však vykazují sníženou stabilitu terciární struktury, což může vést k nízkému výtěžku při produkci anebo ke zhoršení až ztrátě funkce proteinu. Tento problém je často řešen zaváděním strukturálních změn pomocí proteinového inženýrství.

Cílem práce bylo zavedení interdoménového disulfidického můstku do struktury jednořetězcového variabilního fragmentu protilátky za účelem zvýšení jeho stability. Vliv zavedené modifikace na stabilitu proteinu byl posuzován z hlediska výtěžku purifikovaného proteinu a jeho afinity k antigenu. Vyvíjený protilátkový derivát byl produkován v prokaryotickém expresním systému *Escherichia coli* s využitím signální sekvence směřující produkovaný derivát do periplasmatického prostoru. Snaha o stabilizaci proteinu probíhala pomocí mutagenese na pozicích G44 variabilní domény těžkého řetězce a G100 variabilní domény lehkého řetězce záměnou glycinů za cysteiny. Charakterizace purifikovaného proteinu proběhla s využitím metody ELISA. Práce dále ukazuje vyřešenou trojrozměrnou strukturu prekursoru produkovaného proteinu, jednořetězcového variabilního fragmentu protilátky 5D3.

Hlavním výsledkem experimentální části této práce bylo zjištění, že zvolená strategie stabilizace nevede ke kýženému výsledku díky příliš velké vzdálenosti mezi mutovanými rezidui, která nedovoluje vzniknout stabilizujícím disulfidickým vazbám. Zároveň však jsou diskutovány alternativní přístupy potenciálně vedoucí ke stabilizaci jednořetězcového fragmentu. Také byly naměřeny hodnoty disociačních konstant protilátky 5D3 a jejích dvou fragmentů. V případě intaktní protilátky souhlasil získaný výsledek s dostupnou literaturou, v případě jednořetězcových variabilních fragmentů se výsledek s literaturou rozcházel. Tento rozpor vznikl pravděpodobně díky nižší čistotě purifikovaných testovaných proteinů.

Abstract

This thesis deals with production and properties of disulfide-stabilized single-chain variable fragments of the 5D3 antibody (dsscFv), which specifically recognizes and binds to glutamate carboxypeptidase II (GCPII), an antigen closely related to the prostate carcinoma processes and other tumor diseases. Small antibody fragments are in current focus of development of diagnostic and therapeutic reagents. However, compromised stability of antibody derivatives often results in low production yield or loss of function. Introduction of structural changes by protein engineering is often used to solve the issue. The aim of the study was based on enhancement of protein stability by the introduction of interdomain disulfide bond into the structure of single-chain variable fragment. The effect of modification was evaluated by estimation of production yield and affinity of studied protein.

The aforementioned antibody derivative was produced using an *Escherichia coli* expression system, using specific signal sequences leading the production to the bacterial periplasm. The attempted stabilization was carried out by introducing mutations at L_V-G44 and H_V-G100 positions, replacing glycines with cysteines. The binding affinity of the derivative for human GCPII was determined using ELISA. This thesis also shows a solved 3D structure of the single-chain variable fragment protein, the parent molecule of dsscFv.

The primary result of the experimental part of this thesis was the discovery that the chosen strategy wasn't a viable method of stabilizing the fragment. Alternative means to potential stabilization are discussed, however. Also measured were dissociation constants of the 5D3 antibody and its two fragments. The obtained value for the intact antibody was in agreement with available literature, values for the single-chain variable fragments differed. This was most likely caused by lower purities of assayed proteins.

(in Czech)

Klíčová slova

GCPII, PSMA, karcinom prostaty, fragmenty protilátek, scFv, dsscFv, 5D3, protilátkové inženýrství

Keywords

GCPII, PSMA, prostate carcinoma, antibody fragments, scFv, dsscFv, 5D3, antibody engineering

Seznam zkratek

bp	pár bází <i>base pair</i>
BSA	bovinní sérový albumin
Dsb	system tvořící disulfidické vazby
dsscFv	disulfidicky stabilizovaný jednořetězcový variabilní fragment <i>disulfide stabilized single chain variable fragment</i>
ELISA	enzymově značený imunotest s využitím pevné fáze <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	fragment vázající antigen <i>fragment antigen-binding</i>
Fc	krystalizovatelný fragment <i>fragment crystallizable</i>
GCPII	glutamátcarboxypeptidasa II <i>glutamate carboxypeptidase II</i>
HRP	křenová peroxidasa <i>horseradish peroxidase</i>
Hv protilátky	variabilní doména těžkého řetězce protilátky
Ig	imunoglobulin
Lv protilátky	variabilní doména lehkého řetězce protilátky
Ni-NTA	Nikl-nitrilotrioctová kyselina <i>Nickel-nitrilotriacetic acid</i>
OD600	optická densita při vlnové délce 600 nm
PCa	karcinom prostaty <i>prostate carcinoma</i>
PSMA	pro prostatu specifický membránový antigen <i>prostate-specific membrane antigen</i>
PVDF	polyviniliden difluorid
scFv	jednořetězcový variabilní fragment <i>single-chain variable fragment</i>
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin

Obsah

1	Teoretický úvod.....	3
1.1	Glutamátcarboxypeptidasa II a její role v patofyziologických projevech karcinomu prostaty.....	3
1.2	Protilátky.....	6
1.2.1	Struktura a funkce protilátek.....	6
1.2.2	Charakterizace protilátek.....	9
1.2.3	Protilátky v klinické praxi.....	10
1.2.4	Využití GCPII specifických protilátek pro diagnostiku a terapii karcinomu prostaty	10
1.2.5	Produkce protilátek a jejich rekombinantních derivátů.....	12
1.3	Protilátka 5D3 a její deriváty.....	15
1.4	Produkce protilátkových derivátů pomocí proteinového inženýrství za využití prokaryotických expresních systémů.....	16
1.4.1	Produkce rekombinantních proteinů pomocí buněk <i>Escherichia coli</i>	17
1.4.2	Produkce proteinů v periplasmatickém prostoru <i>E. coli</i>	18
2	Cíle práce.....	20
3	Materiál a metody.....	21
3.1	Materiál.....	21
3.1.1	Chemikálie a roztoky.....	21
3.1.2	Enzymy a protilátky.....	23
3.1.3	Roztoky připravované autorem v laboratoři.....	23
3.1.4	Kompetentní buňky a vektory.....	25
3.1.5	Kity.....	25
3.1.6	Přístroje.....	25
3.1.7	Syntetické geny.....	26
3.1.8	Primery.....	26
3.2	Metody.....	27
3.2.1	Klonování DNA – příprava rekombinantního vektoru.....	27
3.2.2	Amplifikace a izolace rekombinantních vektorů.....	30

3.2.3	Kontrola rekombinantních vektorů.....	31
3.2.4	Expresce rekombinantních proteinů	32
3.2.5	Extrakce proteinů z periplasmy	33
3.2.6	Purifikace rekombinantních proteinů.....	34
3.2.7	Produkce dsscFv 5D3 HL ve větším objemu.....	36
3.2.8	Upravená purifikace dsscFv 5D3 HL	36
3.2.9	Analýza disociační konstanty proteinů pomocí metody ELISA.....	38
4.	Výsledky a diskuze.....	40
4.1	Geny kódující jednořetězcové fragmenty	40
4.2	Restrikční štěpení syntetických genů a plasmidu pASK85.....	42
4.3	Ligace genů, jejich amplifikace a následná kontrola	44
4.4	Produkce rekombinantních proteinů	47
4.5	Purifikace a analýza produkovaných proteinů	48
4.6	Produkce dsscFv 5D3 HL ve větším objemu, jeho purifikace a analýza.....	51
4.7	Stanovení disociační konstanty proteinů.....	56
4.8	Trojrozměrná struktura scFv 5D3 HL.....	62
5.	Závěr.....	65
6.	Seznam literatury.....	66

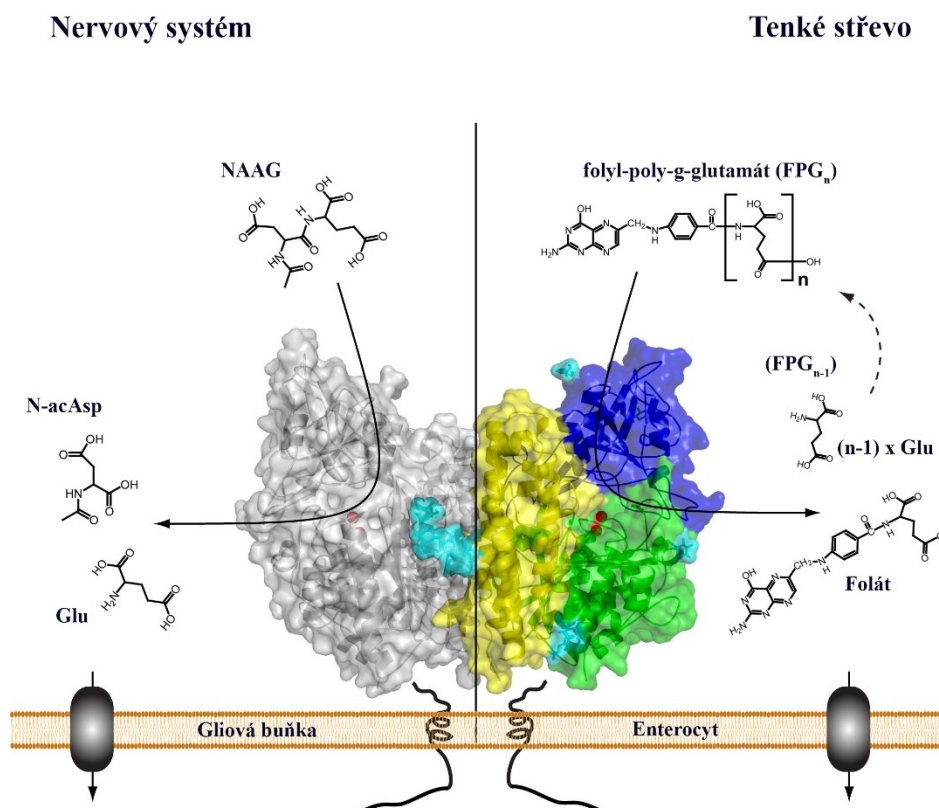
1 Teoretický úvod

Karcinom prostaty (PCa) je v ČR i v zahraničí nejčastěji diagnostikovaným nádorovým onemocněním specifickým pro muže. Za poslední roky se přitom, pravděpodobně díky zdokonalené diagnostice, výrazně zvýšila incidence tohoto onemocnění, která dosahovala v roce 2016 v České republice hodnoty okolo 140 případů na 100 000 osob mužského pohlaví.^{1,2} Pro tuto nemoc je klíčová včasná diagnóza, jelikož je její pokročilá forma jen obtížně léčitelná. Klíčovým proteinem pro včasnou detekci karcinomu prostaty je enzym glutamátcarboxypeptidasa II. Díky své specifické expresi spojené s vývojem karcinomu prostaty je tento enzym ideálním markerem PCa.

1.1 Glutamátcarboxypeptidasa II a její role v patofyziologických projevech karcinomu prostaty

Lidská glutamátcarboxypeptidasa II (GCPII; E.C. 3.4.17.21) je na zinku závislá membránová exopeptidasa produkovaná primárně v tkáních prostaty, v periferním i centrálním nervovém systému, v ledvinách, tenkém i tlustém střevě a v neovaskulatuře asociované s nádorovým bujením.³⁻⁷ Intaktní forma GCPII sestává ze 750 aminokyselin, o molekulové hmotnosti přibližně 84 kDa a na povrchu cytoplasmatické membrány je přítomna v homodimerní formě.³ Funkce tohoto enzymu je vícečetná. Popsána byla jeho role v *jejunu* (láčnicku) tenkého střeva, kde se GCPII také označuje jako folát hydrolasa I. Zde odštěpuje glutamát z folyl-poly- γ -glutamát folátů přijímaných v potravě, čímž umožňuje absorpci mono- γ -glutamát folátů v tenkém střevě.⁸ Další zásadní funkcí GCPII je její aktivita při štěpení N-acetylaspartylglutamátu (NAAG) na N-acetylaspartát a glutamát.⁸ Tato reakce tvoří nedílnou součást funkce centrálního nervového systému, kde je NAAG jedním ze tří nejčastěji zastoupených neurotransmiterů.⁹ Z této enzymové aktivity vychází další označení GCPII, N-acetyl-L-aspartyl-L-glutamát peptidasa I (NAALADasa I). Shrnutí těchto dvou fyziologických funkcí zobrazuje *obrázek 1 (str. 4)*.

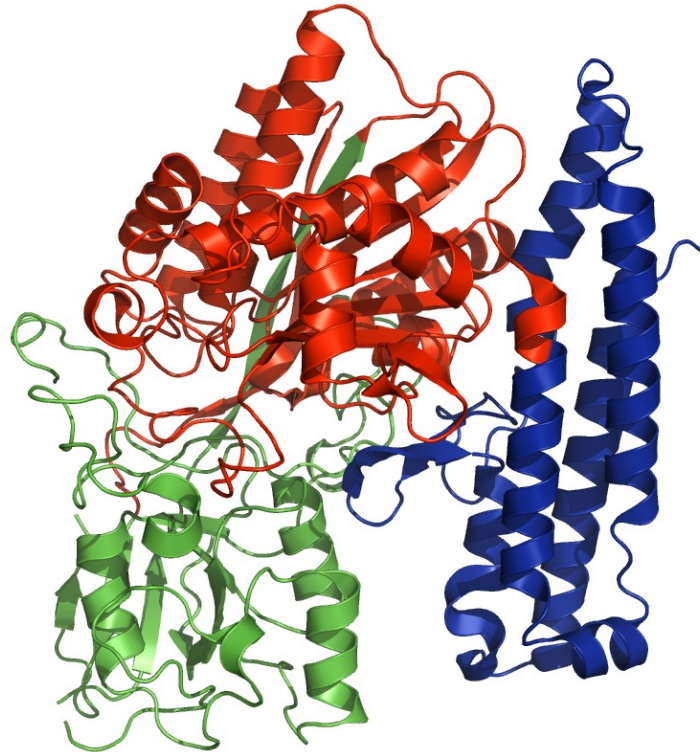
Trojrozměrná struktura GCPII byla popsána pro její extracelulární část. Dle *in silico* modelů můžeme odhadnout, že N-terminální intracelulární konec GCPII (aminokyseliny 1 - 18) nezaujímá stabilní sekundární strukturu a že transmembránová část (aminokyseliny 19 – 43) tvoří α -helikální topologii, typickou pro segmenty proteinů ukotvených v membráně.³



Obrázek 1. Reakce katalyzované enzymem glutamátcarboxypeptidasou II. Zobrazeny jsou katalyzované reakce v gliových buňkách nervového systému a v enterocytech tenkého střeva. Obrázek byl přeložen do češtiny autorem této práce.¹⁰

Extracelulární část enzymu GCPII obsahuje tři distinktivní domény. Proteasovou doménu (tzv. „protease-like domain“) tvořenou aminokyselinami 57 - 116 a 352 - 590, apikální doménu tvořenou aminokyselinami 117 – 351 a C-terminální doménu (aminokyseliny 591 - 750).³ Struktura extracelulární části GCPII, popsaná pomocí rentgenové difrakce, je zobrazena na obrázku 2 (str. 5) vycházejícím ze struktury s rozlišením 1,37 Å získané z internetové databáze PDB pod kódem PDB ID: 3FF3.¹¹

GCPII je intenzivně glykosylovaná – cukry mohou tvořit až 25 % celkové hmotnosti tohoto enzymu. Glykosylace je zároveň vitální pro správnou enzymovou aktivitu.¹² Ve struktuře proteinu se nachází 4 anorganické ionty – dva Zn^{2+} účastníci se katalýzy, dále pak jeden Cl^- anion a jeden Ca^{2+} kation, které mají oba úlohu ve funkci enzymu a stabilizaci terciární struktury.¹³



Obrázek 2. Struktura extracelulární části glutamátcarboxypeptidasy II. Struktura GCPII s rozlišením 1,37 Å byla vyřešena metodou rentgenové difrakce. Model byl získán v internetové databázi PDB jako PDB ID: 3FF3.¹¹ Vizualizace proběhla v aplikaci PyMol™ 1.8.¹⁴ jako „karikatura“ zobrazující sekundární strukturu proteinu. Byly vybarveny jednotlivé domény extracelulární části proteinu – červeně proteasová doména, zeleně apikální doména a modře C-terminální doména.

V kontextu karcinomu prostaty bývá GCPII označována zkratkou PSMA (pro prostatu specifický membránový antigen, „Prostate-Specific Membrane Antigen). Největší množství GCPII na úrovni mRNA bylo nalezeno v mozku, v ledvinách, v prostatě a v tenkém střevě (v sestupném pořadí).¹⁵ Prostata zasažená PCa potom exprimuje minimálně 1000x více GCPII než prostata zdravá.¹⁶ Zvyšující se exprese

GCPII v tkáních prostaty přímo koreluje s progresí nádoru a při PCa výrazně převyšuje expresi v ostatních tkáních.

Biologická funkce zvýšené exprese GCPII na membránách nádorových buněk však není stále zcela objasněna. Spekuluje se o alternativních mechanismech transportu folátů či o možném zapojení do signalizačních drah vedoucích k angiogenezi okolní tkáně.^{4,8} Takřka 100% přítomnost GCPII ve vzdálených metastázách dále naznačuje, že je aktivita tohoto enzymu příznivá pro úspěšnou kolonizaci ostatních tkání (například kostí) metastázemi.

Je patrné, že je GCPII medicínsky atraktivním cílem pro detekci a léčbu karcinomu prostaty. Pokročilé metody specifického značení GCPII v tkáních by mohly umožnit časnější diagnózu, zpřesnit sledování progresu nádoru a zlepšit možnosti detekce a lokalizace metastáz.

1.2 Protilátky

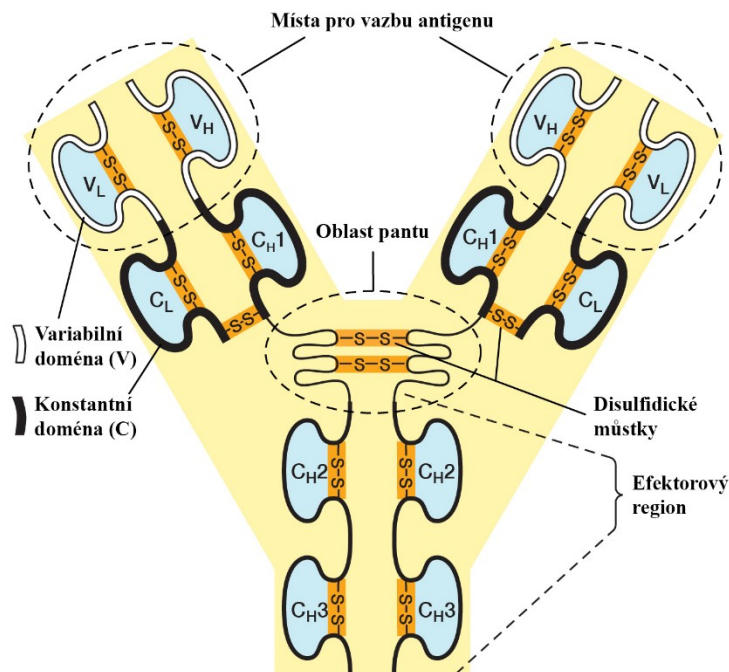
1.2.1 Struktura a funkce protilátek

Evoluce organismů je historií závodů ve zbrojení mezi patogeny a jejich hostiteli. V tomto boji mohou obratlovci stavět dvě hlavní linie obrany – imunitu vrozenou a imunitu adaptivní. Pokud selže vrozená imunitní obrana a patogen zůstane přítomen v těle, je nutné rekrutovat účinný a specifický systém destrukce těchto patogenů, adaptivní imunitu zprostředkovanou B-lymfocyty.

Tyto specializované buňky si vyvinuly schopnost rozpoznávání obrovské škály antigenů, struktur vyvolávajících imunitní odezvu v těle. Antigeny (konkrétně jejich části nazývané epitopy, tvořené buď pouhými úseky primárních sekvencí peptidu, konformačními strukturami, nebo úseky sacharidů) jsou rozpoznávány vysoce specializovanými proteiny na povrchu těchto lymfocytů. Po aktivaci B-lymfocytu skrze vazbu antigenu na receptor dojde k buněčné proliferaci a diferenciaci za vzniku populací plazmatických buněk sekretujících protilátky a paměťových B-lymfocytů. Právě tato produkce protilátek je hlavní efektorovou funkcí B-lymfocytů v adaptivním imunitním systému obratlovců. Funkce protilátky je dvojí – vazba na antigen patogenu nebo jeho produkt a rekrutování ostatních součástí imunitního systému ústící v konečnou destrukci patogenu.

Již pouhá vazba na antigen však může patogen neutralizovat, například narušením jeho schopnosti fúze s hostitelskou buňkou.

Nejčastěji popisovaná třída protilátek IgG (imunoglobulin G) je velký protein o molekulární hmotnosti přibližně 150 kDa, složený ze dvou různých typů polypeptidových řetězců. Typ H (těžký řetězec, z anglického “heavy chain”) má hmotnost přibližně 50 kDa, typ L (lehký řetězec, z anglického „light chain“) má hmotnost přibližně 25 kDa. V každé intaktní molekule protilátky jsou přítomny dva řetězce obou typů. Těžké řetězce jsou navzájem propojeny disulfidickými můstky, každý těžký řetězec je pak propojen stejným způsobem s jedním lehkým řetězcem.¹⁷ Zjednodušené schéma struktury IgG je zobrazeno na *obrázku 3*.



Obrázek 3. Zjednodušené schéma struktury imunoglobulinu. Celkový tvar „písmene Y“ je naznačen žlutě. „V“ označuje variabilní regiony zodpovědné za vazbu antigenu, „C“ pak konstantní regiony nesoucí efektorovou funkci protilátky. Lehké/těžké řetězce jsou označeny „L/H“. Jednotlivé polypeptidové řetězce konstantní oblasti podléhají číslování latinskými číslicemi 1-3 od N-konce (horní část protilátky) po C-konec (spodní část). Oranžově jsou zobrazeny přítomné disulfidické můstky. Obrázek byl přeložen a upraven autorem této práce. Přejat byl z internetové stránky „Encyclopedia Britannica“.¹⁸

Kvarterní struktura protilátky (imunoglobulinu) připomíná písmeno “Y”. Konce ramen „písmena Y“ odpovídají oblastem účastnícím se vazby antigenu, jedná se o takzvané paratopy. Tyto části protilátky vykazují obrovskou strukturní variabilitu, proto se označují jako hypervariabilní oblasti (V region/doména), a v rámci jedné molekuly jsou obě hypervariabilní oblasti identické. Oproti tomu stopka písmene zůstává napříč různými protilátkami vysoce konzervovaná (konstantní oblast, C region) a plní úlohu efektorovou, tedy funkci aktivace dalších částí imunitního systému.

Podle struktury těžkých řetězců rozlišujeme pět distinktivních isotypů protilátek – IgM, IgD, IgG, IgA a IgE. Každá z těchto tříd protilátek plní odlišnou úlohu. IgM jsou první odezvou adaptivního imunitního systému na napadení patogenem (konkrétně humorální části adaptivního imunitního systému) a jsou produkovány B-lymfocyty, které ještě nepodstoupily somatickou hypermutaci variabilních částí genů kódujících imunoglobuliny. Nízká afinita IgM k antigenu je kompenzována formací pentamerů, která ústí v přítomnost celkem 10 vazebných míst pro antigeny (a tak zvyšuje celkovou aviditu, viz dále) – IgM je tak schopen vázat multivalentní agens jako jsou například polysacharidy na bakteriálních stěnách. Imunoglobuliny dalších isotypů díky své monomerní podobě (s výjimkou IgA, které tvoří dimery) difundují snáze z krve do tkání a vykazují (pro zachování účinnosti) vysokou afinitu. IgG se vyskytuje primárně v tkáních těla, IgA na povrchu epitelů, IgE je přítomna především na receptorech žírných buněk (mastocytů) přítomných pod kůží, sliznicemi a v konektivních tkáních.

Imunoglobuliny isotypu G, do kterých spadá většina terapeutických protilátek, jsou rozděleny na funkčně nezaměnitelné subtypy IgG₁, IgG₂, IgG₃ a IgG₄.¹⁹

Další rozdělení protilátek vychází z dvou možných konfigurací lehkých řetězců (typy λ a κ). Kterýkoliv daný imunoglobulin obsahuje buď dvojici lehkých řetězců typu λ , nebo dvojici κ . Funkční rozdíl mezi typy lehkých řetězců nebyl nalezen. Poměr κ : λ imunoglobulinů v populaci závisí na pozorovaném živočišném druhu, u lidí činí 2:1.¹⁷

1.2.2 Charakterizace protilátek

Hlavní kvantifikovatelnou vlastností protilátek je jejich *afinita*, vyjadřovaná obvykle disociační konstantou K_d . Tato hodnota vyjadřuje sílu vazby mezi epitopem a jedním paratopem za rovnovážného stavu. Za předpokladu jednoduchého mechanismu vazby mezi dvěma molekulami, vyjádřeném *vztahem 1*, můžeme rovnovážnou disociační konstantu (tedy konstantu afinity) K_d definovat *vztahem 2*. V uvedených vztazích platí, že *Ag* je antigen, *Ab* je protilátka a *Ag-Ab* je komplex protilátka-antigen. Hodnoty uvedené v hranatých závorkách označují rovnovážné koncentrace. Mezi hodnotou K_D a afinitou protilátky platí nepřímá úměra.



$$K_d = \frac{[Ag][Ab]}{[Ag-Ab]} \quad (2)$$

Dalším parametrem popisujícím vazbu protilátky na antigen je *avidita*. Avidita je mírou celkové síly vazby protilátka-antigen, závislou nejen na afinitě pro epitop, ale i na valenci vazby. V části „Struktura a funkce protilátek“ byly uvedeny multimerizující isotypy protilátek. Pentamerizující isotyp IgM tvoří 10 vazebných míst pro antigen. Avšak i monomerní forma protilátky (IgG) obsahuje celkem dvě vazebná místa. Obecně lze říci, že více vazebných míst (s určitou *afinitou*) zvyšuje *aviditu* protilátky vůči antigenu.

Dalším údajem určujícím vlastnosti směsi protilátek proti stejnému antigenu je jejich *monoklonalita* či *polyklonalita*. *Monoklonální* protilátky jsou tvořeny identickými B-lymfocyty (klony jedné rodičovské buňky), vykazují tedy interakci s identickým epitopem i stejnou afinitu. Oproti nim stojí protilátky *polyklonální*, pocházející z více různých B-lymfocytů. Jedná se o protilátky interagující se stejným antigenem, ale jejich afinita a místo vazby na antigenu (epitop) je odlišné. Typická odezva imunitního systému na přítomnost patogenu je polyklonální.

1.2.3 Protilátky v klinické praxi

Imunoterapie, která je založena na aktivaci vlastního imunitního systému, je v současné době velmi atraktivním oborem, spojujícím multidisciplinárně obory celého vědního spektra. O potenciálu protilátek jako terapeutických agens svědčí i Nobelova cena za fyziologii a medicínu, udělená v roce 2018 společně Jamesonovi P. Allisonovi a Tasuku Honjovi za jejich objev terapie rakoviny inhibicí negativní imunitní regulace.²⁰

Více než kdy jindy jsou protilátky využívány pro velice široké spektrum aplikací. Za renezanční využívání protilátek zodpovídají mimo jiné metody proteinového inženýrství, které umožňují cílené zlepšování vlastností protilátek, ať už se jedná o afinitu, stabilitu či biologickou dostupnost nebo rovnou o tvorbu protilátek nových.²¹ Kromě zřejmých medicínských aplikací mohou protilátky nést i odpověď na zdánlivě nesouvisející otázky, jakými je například chemická katalýza.

V medicíně jsou protilátky obvykle využívány ve formě konjugátů s radioizotopy, toxiny či fluorofory. Příkladem konjugace s toxinem je Mylotarg®, léčivo proti akutní leukémii myeloidů, schválené americkým ústavem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v roce 2017 a o několik měsíců později evropskou agenturou pro léčiva (EMA). Toto léčivo je založené na konjugaci protilátky specifické pro antigen CD33, který je přítomný na hematopoetických kmenových buňkách a má přímou roli v rozvoji tohoto onemocnění, s toxinem kalicheamicinem. Konjugace probíhá skrz spojku („linker“) citlivou na kyselé prostředí. Po přechodu komplexu protilátka-toxin do prostředí lysozomu dojde k intracelulárnímu uvolnění toxinu, který může mít za následek buněčnou smrt cílových buněk.²²

1.2.4 Využití GCPII specifických protilátek pro diagnostiku a terapii karcinomu prostaty

Kromě fyzikálních metod diagnostiky PCa (pozitronová emisní tomografie, počítačová tomografie, ultrazvuk, magnetická rezonance) lze v současné době využít i metody molekulární, založené na zobrazování GCPII. Metody detekce GCPII *in vivo* jsou vedle malých ligandů založeny i na využití monoklonálních protilátek. V současné klinické praxi a výzkumu figurují dvě protilátky specifické pro GCPII – 7E11 a J591.

ProstaScint™

7E11 je monoklonální protilátka, vážící se na sekvenci šesti aminokyselin lokalizovaných v intracelulární části GCPII. ProstaScint™ je detekčním činidlem založeným na této protilátce, radioaktivně značené atomem ^{111}In . Tento systém byl pro účely detekce PCa schválen americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v roce 1997.¹⁵ Bylo popsáno, že ProstaScint™ je schopen detekovat primární nádor (rakoviny prostaty) s 68% přesností, 62% citlivostí a 72% specifitou.²⁴ Tato čísla vypovídají o tom, že je toto řešení detekce sice užitečné, ale nedostačující.

Protilátka 7E11 váže intracelulární epitop, avšak neprochází neporušenou cytoplasmatickou membránou. K vazbě jí tak jsou dostupné pouze epitopy buněk s narušenou membránou (nekrosa, apoptosa). Roztok ProstaScint™ je pacientovi podán týden před samotnou detekcí, aby došlo k maximálnímu proniknutí protilátky k cíli a zároveň se snížilo nespecifické pozadí signálu z tkání. V průběhu doby, která uplyne mezi podáním a detekcí dojde k signifikantnímu zeslabení signálu, díky radioaktivnímu rozpadu ^{111}In značky ($T_{1/2} = 2,8$ dne).²⁵ Tímto se výrazně snižuje citlivost metody.

J591

J591 je monoklonální protilátkou vážící extracelulární doménu GCPII.²⁶ Váže se tedy, oproti 7E11, na intaktní buňky vystavující GCPII na svém povrchu. Pro medicínské účely se využívá s konjugací s 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctovou kyselinou (připojenou přes spojku), která slouží jako chelátor radioaktivních izotopů kovů.²⁷

Radioaktivně značené deriváty protilátky J591 mají však nevýhody obdobné ProstaScintu. Protilátka potřebuje zhruba 7 dní, než s jistotou dosáhne všech GCPII pozitivních cílů. Oproti ProstaScint™ však poskytuje příznivější poměr signál/šum.²⁶

5D3

O protilátce 5D3 je pojednáváno v kapitole *Protilátka 5D3 a její deriváty*.

1.2.5 Produkce protilátek a jejich rekombinantních derivátů

Metody proteinového inženýrství umožňují produkovat rekombinantní protilátky v řadě expresních systémů, jakými jsou bakterie, kvasinky či eukaryotické buňky, včetně buněk lidských. Tyto protilátky mohou být geneticky upravovány s ohledem na požadované vlastnosti nebo vazebné cíle a následně levně a rychle produkovány. Přípravou knihovny protilátek a následnou selekcí z ní mohou být připravovány i nové protilátky proti vybraným antigenům.

Problém vývoje nových protilátek pro klinickou praxi vychází ze samotného postupu jejich produkce. Tento postup, tzv. „Hybridoma Technology“ byl popsán v roce 1975 Milsteinem a Kohlerem. B-lymfocyt vystavený antigenu a izolovaný ze sleziny zvířete (typicky myši) je zřizován s buněčnou linií myelomu za vzniku tzv. hybridomu (hybridní buňky). Tento hybridom získává vlastnosti jak B-lymfocytu (tvorba monoklonálních protilátek), tak rakovinných buněk (rychlé dělení a nesmrtnost) a je přenesen do média, které je pro něj selektivní. Tento proces následuje izolace monoklonálních protilátek. Protilátky vyrobené touto metodou jsou myšího původu a jako takové vyvolávají v lidském těle nepříznivou imunitní odpověď. Organismus drobných savců navíc může na podnět způsobený daným antigenem reagovat odlišně oproti organismu lidskému.

Zabránění nežádoucí imunitní odpovědi je možné realizovat skrz kombinaci vazebných míst takto vzniklé myší protilátky s konstantními oblastmi protilátky lidské (humanizace protilátky), použitím geneticky modifikovaných myší či vývojem lidských protilátek *in vitro*.²⁸ Proteinové inženýrství zároveň umožňuje přípravu chimérických protilátek. Metoda této přípravy spočívá ve výměně konstantních myších domén za lidské varianty.

Obdobnými metodami mohou být připraveny i protilátkové fragmenty. Fragmentace protilátky zachová její variabilní doménu intaktní, ale odštěpí její zbytek. Tak dojde ke vzniku proteinu menšího, než je protilátka, avšak stále schopného vazby na antigen. Tyto fragmenty mají oproti intaktním protilátkám řadu výhod.

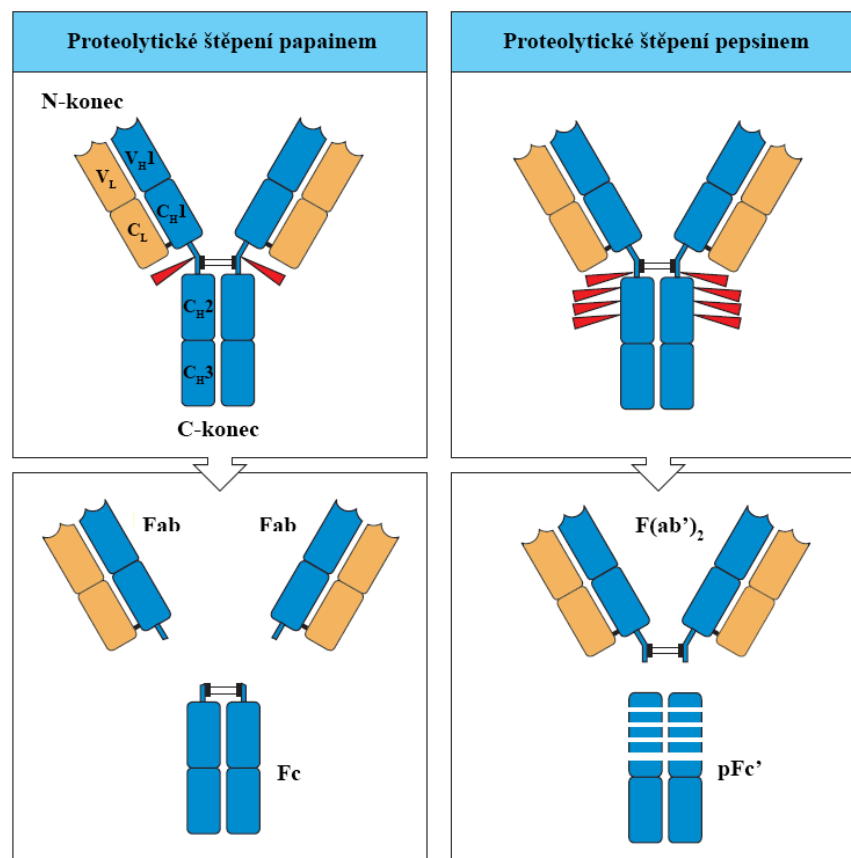
Z produkčního hlediska jsou fragmenty oproti protilátkám dobře produkovatelné v prokaryotických expresních systémech, tedy systémech, umožňujících lehkou, levnou a rychlou produkci prakticky libovolného množství správně sbaleného proteinu.²⁹

Z hlediska medicínského tyto fragmenty lépe prostupují (difundují) tkáněmi a vykazují rychlý ústup nescifického pozadí, čímž při zobrazovacích metodách výrazně zkracují dobu procedury. V kontextu protilátkové terapie nádorů je lepší prostup tkáněmi výhodný i proto, že pevné nádory mají výrazné bariéry bránící standardním protilátkám ve vstupu.³⁰

Fragmenty protilátek díky absenci konstantních regionů (a s nimi spojené aktivaci receptorů pro tyto oblasti), mohou při zobrazování poskytovat vysoce specifický signál v cílové tkáni.

Fab deriváty

Fab deriváty (Antigen vázající fragment, tzv. „antigen-binding fragment“) jsou snadno připravitelné a vysoce stabilní protilátkové deriváty vzniklé proteolytickým štěpením intaktní protilátky v oblasti pantu. Jak je zobrazeno na *obrázku 4 (str. 14)*, štěpení intaktní protilátky papainovou proteasou poskytuje dva identické monovalentní Fab deriváty protilátky (ramena písmene „Y“) a jeden Fc protein (krystalizovatelný fragment, tzv. „fragment crystallizable“) odpovídající C_{H2} a C_{H3} doménám protilátky. Každý Fab protein je tvořen jedním lehkým a částí těžkého řetězce původní protilátky. Proteasa pepsin štěpí protilátku na C-terminální straně disulfidické vazby oblasti pantu. Tímto štěpením vzniká bivalentní fragment F(ab')₂ a několik dalších fragmentů těžkého řetězce.¹⁷



Obrázek 4. Protilátkové deriváty vzniklé štěpením proteasami papainem a pepsinem. Červené klíny označují místa štěpení danou proteasou. Oranžově jsou vybarveny lehké řetězce, modře těžké řetězce. Obrázek byl přejat z učebnice „Janeway’s immunobiology, 9th edition”.¹⁷ Byl upraven a přeložen autorem této práce.

Jednořetězcové variabilní fragmenty (scFv) a jejich stabilizace

Jednořetězcové variabilní fragmenty (zkratka scFv z anglického „single-chain variable fragment“) protilátek jsou fúzními proteiny skládajícími se z variabilních domén lehkého a těžkého řetězce protilátky. Tyto domény jsou vzájemně propojeny krátkou peptidovou spojkou, spojující C-konec V_L (variabilní domény lehkého řetězce) a N-konec V_H (variabilní domény těžkého řetězce) pro takzvanou variantu LH či naopak N-konec V_L a C-konec V_H pro variantu HL. Tyto deriváty protilátek si zachovávají specifitu i afinitu původní protilátky a jsou snadno produkovatelné v prokaryotických expresních systémech.³¹ Přítomnost spojky zvyšuje stabilitu derivátu, který má v některých případech tendenci degradovat. I přes stabilizaci spojkou má však řada jednořetězcových variabilních fragmentů tendenci degradovat.

Stabilita scFv derivátů protilátek může být zvýšena zavedením disulfidických můstků do struktury proteinu. Obvyklým postupem je záměna aminokyselin na pozicích V_H44 a V_L100 za cystein (čísla pozic odpovídají u protilátek běžně používanému „Kabat Numbering Scheme“ a nejsou tedy shodné s pozicemi aminokyselinové sekvence standardního číslování).²¹ Přípustné jsou však i jiné pozice. Takto vzniklé deriváty protilátek jsou nazývány zkratkou dsscFv (disulfidicky stabilizované jednořetězcové variabilní fragmenty). Alternativním způsobem stabilizace by mohla být metoda „knobs-into-holes“ (přeložitelné jako „knoflíky do děr“). Tato metoda byla poprvé využita pro tvorbu heterodimerizovaného derivátu dvou různých protilátek. Spočívá v zavedení aminokyselin tyrosinu / tryptofanu (aminokyseliny s velkými postranními řetězci) do jedné domény a alaninu / threoninu (malé postranní řetězce) do jiné přiléhající domény. Ke stabilizaci následně dochází „zapadnutím“ postranního řetězce nové velké aminokyseliny do „otvoru“ zanechaného ve struktuře novou malou aminokyselinou.³² Tato metoda může být aplikována i pro stabilizaci molekul scFv.³³

1.3 Protilátka 5D3 a její deriváty

Myší monoklonální protilátka 5D3 byla vyvinuta a charakterizována v *Laboratoři strukturní biologie* na Biotechnologickém ústavu AV ČR. Jedná se o protilátku isotypu IgG₁/κ vázající konformační epitop na extracelulárním povrchu lidského GCPII - tato protilátka tedy interaguje s proteinem v nativní konformaci. Afinity protilátky se pohybuje v sub-nanomolárním rozsahu (10x vyšší afinita, než u protilátky J591), metodou ELISA byla stanovena na 0,14 nM.³⁴ Zároveň byla na myším modelu transplantovaného nádoru PCa demonstrována její vysoká specifita pro GCPII *in vivo* a byla potvrzena nepřítomnost křížové reaktivity s ostatními lidskými proteiny. Stejná specifita byla prokázána i pro Fab fragment této protilátky.³⁴

Byly připraveny a charakterizovány dva typy jednořetězcových variabilních fragmentů protilátky 5D3. Varianty těchto scFv, nazývané „scFv 5D3 HL“ a „scFv 5D3 LH“ se liší zejména pozicí pojícího peptidového řetězce (viz *kapitola 4.1*). Stanovení disociačních konstant obou těchto variant poskytlo hodnoty přibližně 10x vyšší oproti intaktní protilátce 5D3. U obou variant bylo prokázáno zachování funkce vazebného místa.³⁵

Dále probíhají práce na stabilizaci scFv derivátů protilátky 5D3. Budoucí využití těchto derivátů v klinické praxi zahrnuje tři hlavní směry zájmu. Chelátorové fúze s radioizotopy ^{111}In a ^{177}Lu pro diagnostické zobrazování GCPII a terapeutické využití, fúze s cytotoxinem saporinem pro terapeutické využití a bispecifické fúze mající za cíl nasměrování imunitních buněk na GCPII-pozitivní tumory.

V současné době probíhá proces patentování unikátních aminokyselinových struktur variabilních domén protilátky 5D3.

1.4 Produkce protilátkových derivátů pomocí proteinového inženýrství za využití prokaryotických expresních systémů

Proteinové inženýrství umožňuje vývoj a produkci proteinů za pomoci biologických struktur jako jsou enzymy, molekulární stroje či celé buňky. Klasická, laboratorní syntéza tak obrovských sloučenin, jakými jsou proteiny, by bez využití těchto biologických systémů byla nemyslitelná.

Metodami proteinového inženýrství je možné připravit knihovny o obrovských komplexitách variant proteinů a následně vybrat jednotky či desítky vhodných variant sloužících výzkumnému záměru. Tyto vybrané proteiny mohou být vylepšeny pomocí mutací ve struktuře.

Produkce proteinů metodami proteinovém inženýrství má společné jmenovatele – expresní systémy. Tyto systémy tvoří prokaryotické či eukaryotické buňky schopné přijmout cizorodou DNA, následně ji přepsat na RNA a tu přeložit do aminokyselinové sekvence proteinu. Nejčastěji používanými expresními systémy jsou bakteriální buňky (geneticky upravené kmeny *Escherichia coli*), buňky kvasinkové (*Saccharomyces cerevisiae*), buňky hmyzí či savčí, a to včetně linií lidských buněk. V souvislosti s těmito metodami obvykle mluvíme o tzv. heterologní expresi, tedy expresi konkrétního proteinu buňkou, v které se gen pro tento protein přirozeně nenachází.

Typická je například produkce eukaryotických proteinů v prokaryotických systémech, při které se využívají optimalizované geny. Tato optimalizace spočívá v úpravě nukleotidové sekvence tak, aby obsahovala především kodony, které jsou

preferovány daným expresním systémem. Variabilita kodonů přitom vychází z degenerovanosti genetického kódu.

1.4.1 Produkce rekombinantních proteinů pomocí buněk *Escherichia coli*

Prokaryotické buňky jsou nejlevnější a zároveň nejrychlejší metodou produkce proteinů. Výhodou těchto buněk je krátká generační doba - po přenesení inokula *E. coli* do růstového média dochází během několika hodin k velmi vysokým nárůstům počtu buněk, buněčné dělení v běžně užívaném LB médiu probíhá při 37 °C zhruba každých 20 min.³⁶ Užívaná růstová média jsou levná a jednoduchá. Zároveň jsou nejčastěji užívané bakteriální buňky, *E. coli*, geneticky velmi dobře popsané a dostupné v široké škále variant optimalizovaných pro různá využití. *E. coli* je gram-negativní bakterií, díky čemuž má možnost produkce rekombinantních proteinů do cytoplasmy i periplasmy. Zároveň se jedná o bakterii relativně bezpečnou (a nesporulující) pro účely experimentální práce.

Problém tohoto expresního systému je ovšem v produkci komplexnějších rekombinantních proteinů. I přes přítomnost tří chaperonových systémů v cytoplasmě *E. coli* často dochází k produkci inkluzních tělísek, která jsou tvořena nesolubilními agregáty proteinů. Pro správné skládání struktury proteinů je vhodná produkce za snížené teploty (méně, než 37 °C), která však zároveň snižuje rychlost produkce. Podle typu produkovaného proteinu je zároveň vhodné upravit densitu kultury, při které je indukována exprese proteinu kódovaného plasmidem.

Tendence k agregaci je nižší u menších proteinů (díky jejich rychlejší kinetice skládání), vývoj je tedy často zaměřen spíše na menší proteiny (například menší proteinová lešení). Ke zvýšené agregaci také může přispívat použití silného promotoru regulujícího expresi rekombinantního proteinu, kdy množství produkovaného proteinu může přesáhnout i množství ostatních bakteriálních proteinů cytoplasmy. Velmi problematické je i skládání komplexních, multi-doménových proteinů nebo proteinů vyžadujících pro správnou strukturu přítomnost disulfidických můstků. Dalším problémem současných prokaryotických expresních systémů je absence schopnosti tvořit komplexní post-translační modifikace proteinů.³⁷ Jako celek je nutné si uvědomit, že

prokaryotická buňka, oproti eukaryotické, obsahuje odlišné prostředí a odlišný systém skládání proteinů.

Tvorba disulfidických můstků je u protilátek a jejich derivátů naprosto klíčová. Tyto vazby stabilizují terciární strukturu proteinu a umožňují mu nabývat funkční, nativní struktury. Redukční prostředí cytoplasmy divokého typu *E. coli*, způsobené přítomností thioredoxinů a glutaredoxinů, znemožňuje formaci těchto můstků.³⁸ Tvorbu disulfidických můstků je možné podpořit využitím geneticky modifikovaných kmenů bakterií (s modifikovanými vlastnostmi cytoplasmy) nebo produkcí proteinu do periplasmatického prostoru.

1.4.2 Produkce proteinů v periplasmatickém prostoru *E. coli*

Produkcí rekombinantních proteinů do periplasmy bakterií *E. coli* zajišťuje signální sekvence na N-konci genu kódujícího produkované proteiny. Běžnými signálními sekvencemi (tzv. „leader sequences“), vedoucími přechod proteinu do periplasmatického prostoru jsou PelB a OmpA. Tyto sekvence kódují peptidy, které jsou následně rozpoznány buněčnými systémy vedoucími nově vzniklý protein do bakteriální periplasmy, kde je signální sekvence odštěpena peptidasami.

Produkce proteinu do periplasmatického prostoru má pro správnou tvorbu disulfidických můstků několik výhod. Jednou z nich je přítomnost Dsb systému (systém tvořící disulfidické vazby) řídicího redoxní reakce. Druhou výhodou je přítomnost menšího množství proteas oproti cytoplasmě. Nespornou praktickou výhodou je i možnost získání proteinu z periplasmy osmotickým šokem bez nutnosti lyzovat celou buňku a způsobit tak uvolnění množství ostatních proteinů.

Dalším faktorem ovlivňujícím kvalitu produkovaných proteinů v periplasmatickém prostoru mohou být inducibilní promotory regulující expresi rekombinantního proteinu v čase. Promotor je region DNA, na který nasedá RNA polymerasa zahajující transkripci genu ležícího ve 3' směru od tohoto regionu. Inducibilní promotory často používané pro účely proteinového inženýrství jsou až do přidání induktoru neaktivní.

Běžně používané promotory založené na lac se aktivují přidáním indukčního činidla (obvykle IPTG, isopropyl β - D - 1 - thiogalaktopyranosidu). Pro periplasmatickou produkci derivátů protilátek jsou nevhodné. V závislosti na mnoha faktorech může na těchto promotorech docházet k přepisu DNA do RNA a k následné produkci proteinu i bez přidání indukčního činidla. Tento efekt, nazývaný v angličtině jako „leaky promoter“ – propouštějící promotor, způsobuje trvalou neregulovanou produkci proteinu, která může být pro bakterii fatální. Toxicita protilátkových fragmentů byla pozorována při produkci protilátkových fragmentů regulovaných lac operátorem, kdy exprese probíhala i v nepřítomnosti IPTG.³⁹ V tomto případě je tedy nutné využití jiného promotoru s vyšší kontrolou.

Pro účely produkce protilátkových fragmentů v periplasmatickém prostoru bakterií *E. coli* vyvinula skupina prof. Arne Skerry sadu plasmidů pASK. Plasmid pASK85 obsahuje tetA/tetR promotor indukovatelný anhydrotetracyklinem (Tet-ON systém). Plasmid dále nese signální sekvenci OmpA, gen pro rezistenci k antibiotiku ampicillin, ori sekvenci pro duplikaci plasmidu a fl ori sekvenci odvozenou z bakteriofágu F1.⁴⁰

2 Cíle práce

Cílem experimentální části této bakalářské práce byla:

- 1) příprava bakteriálních DNA konstruktů dvou variant disulfidicky stabilizovaných jednořetězcových fragmentů anti-GCPII protilátky 5D3
- 2) exprese a purifikace protilátkových konstruktů
- 3) stanovení vazebné afinity protilátkových konstruktů

Tato činnost tvořila jeden z dílčích kroků přípravy vhodného derivátu 5D3 protilátky specifické pro GCPII. Vyvíjený derivát je zamýšlen pro využití v diagnostice a léčbě karcinomu prostaty.

K přípravě protilátkových fragmentů bylo využito metod proteinového inženýrství a prokaryotického expresního systému bakterie *E. coli*. K další analýze byla využita imunochemická metoda ELISA a data rentgenostrukturní analýzy proteinu scFv 5D3 HL. Rentgenostrukturní analýza nebyla předmětem samostatné práce autora.

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie a roztoky

Název	Specifikace od výrobce	Výrobce
1 kb DNA standard		NEB
5x OrangeG + 0,5 % SDS roztok		<i>Připraven v laboratoři</i>
5x Sample Buffer		<i>Připraven v laboratoři</i>
10x CutSmart pufr		NEB
10X FastAP pufr		Thermo Fischer Scientific
Agarosa	BioReagent, for molecular biology, low EEO	Sigma-Aldrich
Ampicillin		Sigma-Aldrich
Anhydrotetracyklinový roztok		Acros Organics
ATP	$c_{ATP} = 10 \text{ mM}$	NEB
BSA	$\geq 98 \%$	Roth
Coomasie Brilliant Blue G-250, roztok		Sigma-Aldrich
D-(+)-Glukosa	BioXtra, $\geq 99.5 \%$ (GC)	Sigma-Aldrich
Dihydrogenfosforečnan sodný, bezvodý	BioReagent, for molecular biology, anhydrous $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
Dodecyl síran sodný	$\geq 98 \%$	Sigma-Aldrich
Ethanol	96% p.a.	Lach:ner
Ethylendiamintetraacetát sodný dihydrát (EDTA)	BioUltra, for molecular biology, $\geq 99.9\%$ (titration)	Sigma-Aldrich
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát	p.a.	Lach:ner
GelRed Nucleic Acid Gel Stain roztok		Biotium
Glycerol	ultra-pure	MPB
Guanidin hydrochlorid	$\geq 98\%$	Sigma-Aldrich
Chlorid draselný	p.a.	Lach:ner
Chlorid hořečnatý hexahydrát	p.a.	Lach:ner
Chlorid sodný	p.a.	Lach:ner

Imidazol	research grade	Serva
Kyselina chlorovodíková	≥35%	Lach:ner
Kyselina octová	99,8% p.a.	Lach:ner
Kyselina sírová	96% p.a.	Lach:ner
Kvasinkový extrakt	Yeast extract Servabacter®	Servabacter®
LB médium		Sigma-Aldrich
Luminata Forte Western HRP substrát	MilliporeSigma™ Luminata Forte Western HRP substrate, 100mL	MilliporeSigma™
Methanol	≥99,5%	Lach:ner
Ni-NTA sefarosa	Ni-NTA Superflow 50% Suspension (sepharose)	IBA
PageRuler Plus proteinový standard		Thermo Fischer Scientific
Ponceau S roztok	0,1 % (w/v) Ponceau S v 5% kyselině octové	Sigma-Aldrich
Sacharosa		Serva
Síran hořečnatý heptahydrát	p.a.	Lach:ner
Síran nikelnatý hexahydrát	p.a.	Penta
Směs inhibitorů proteas, tablety	cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH
Streptavidin	$c \approx 1,0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	<i>Původ neznámý</i>
SYBR™ Safe barvivo	SYBR Safe DNA Gel Stain	Thermo Fischer Scientific
Sušené mléko		Nutristar Aditiva CZ s.r.o.
TE pufr		Obsažen v QIAGEN® Plasmid Midi Kit
TMB-Complete 2		TestLine Clinical Diagnostics s.r.o.
Tris/CAPS Transfer Buffer		Bio-Rad
Trizma® báze	≥99.9% (titration)	Sigma-Aldrich
Trypton		MPB
Tween-20		MPB
Voda bez obsahu nukleas	Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated)	Invitrogen™

3.1.2 Enzymy a protilátky

Název	Specifikace od výrobce	Výrobce
2x Blunt TA ligasa master-mix	2x koncentrovaná	NEB
5D3 protilátka	Monoklonální, myší $c = 6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	Připravena v laboratoři
AleI restriktasa	$10 \text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	NEB
Alkalická fosfatasa	$1 \text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, FastAP Thermo Scientific Alkaline Phosphatase	Thermo Fischer Scientific
Anti-6X His-Tag-HRP (protilátka proti 6x His sekvenci konjugovaná s křenovou peroxidasou)	$c = 0,85 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ Myší, monoklonální	Novus
EcoRV-HF restriktasa	$20 \text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	NEB
GAM-HRP (kozí anti-myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou)	Polyklonální	BioLegend
Avi-GCPII (glutamátcarboxypeptidasa II konjugovaná se sekvencí Avi)	$5,88 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, rekombinantní	Připravena v laboratoři
HindIII-HF restriktasa	$20 \text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	NEB
Lysozym	$10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	Sigma-Aldrich
XbaI restriktasa	$20 \text{U} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	NEB

3.1.3 Roztoky připravované autorem v laboratoři

Název	Složení
2x YT médium	$5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ NaCl $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Kvasinkový extrakt $16 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ Trypton Úprava pomocí NaOH na pH 7,0
Ampicillin zásobní roztok	$c = 100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ve vodě
Anhydrotetracyklin zásobní roztok	$c = 2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ v dimethylformamidu
Ekvilibrační roztok	20 mM imidazol v PBS 10% glycerol

PBS pufr	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ Úprava pomocí HCl na pH 7,4
Pufr pro periplasmatickou extrakci	500 mM Sacharosa 1 mM EDTA 100 mM Trizma báze Úprava pomocí HCl na pH 8,0 Lysozym 20 µg · ml ⁻¹
Přenosový pufr	Přídavek 10% methanolu do Tris/CAPS Transfer Buffer
Regenerační pufr	50 mM EDTA 20 mM Na ₂ HPO ₄ 0,5 M NaCl
Síran nikelnatý roztok	100 mM NiSO ₄
S.O.C. médium	2% (W/V) trypton 0,5% (W/V) kvasinkový extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glukosa Úprava pomocí NaOH na pH 7,0 následovaná filtrací přes 0,22 µm filtr
TAE pufr	40 mM Trizma báze 20 mM Kyselina octová 1 mM EDTA
TBS pufr	50 mM Trizma báze 150 mM NaCl Úprava pomocí HCl na pH 7,5

3.1.4 Kompetentní buňky a vektory

Název	Výrobce
Library Efficiency™ DH5α™ kompetentní buňky	Invitrogen™
pASK85 plasmid	Dar od prof. Arne Skerry
TG1F ⁻ kompetentní buňky	Dar od prof. Arne Skerry

3.1.5 Kity

Název	Výrobce
GelElute™ PCR Clean-Up Kit	Sigma-Aldrich
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Rapid DNA Ligation Kit Thermo	Thermo Fischer Scientific
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research

3.1.6 Přístroje

Název	Celý název (výrobce)
Centrifuga na 1,5/2,0 ml zkumavky	Labnet Prism Microcentrifuge
Centrifuga na 1,5 ml zkumavky, chlazená	Microfuge™ 22R Microcentrifuge Beckman Coulter
Centrifuga na 15/50 ml zkumavky	Allegra™ X-22R centrifuge Beckman Coulter + C0650 rotor (na 50 ml zkumavky) + C1015 rotor (na 15 ml zkumavky)
Inkubátor	Incubator 120ltr digital Nuve EN 120
Inkubátor na kultury, s možností třepání	Innova 44 New Brunswick Scientific
Mikroobjemový spektrofotometr	Thermo Scientific™ NanoDrop™ One ^C Microvolume UV-Vis Spectrophotometer
Promývačka na 96 jamkové destičky	Tecan Hydroflex

Přístroj pro elektropřenos na membránu	Trans-Blot Turbo Transfer Systém Bio-Rad
Sonikátor	Sonicator 3000 Misonix + sonda CL-334 + ultrazvuková sonda 4418
Spektrofotometr	Biowave II WPA
Spektrofotometr na 96 jamkové destičky	EPOCH 2 Microplate reader BioTek
Termomixér	Thermomixer Comfort Eppendorf
Transiluminátor	UVT-20 M Transilluminator 312 nm Herolab
Třepačka	Mini Rocker-Shaker BioSan
Vysokootáčková centrifuga	Avanti JXN-30 centrifuge Beckman Coulter + rotor JLA-9.1000
Zobrazovací systém pro gely a membrány	ImageQuant LAS 4000 GE Healthcare Life Sciences

3.1.7 Syntetické geny

dsscFv 5D3 HL	signální sekvence	LV Cys	Pojící řetězec	HV Cys	6x His- Tag	STOP kodon	Terminátor
dsscFv 5D3 LH	signální sekvence	6x His- Tag	HV Cys	Linker 18 mer	LV Cys	STOP kodon	Terminátor

3.1.8 Primery

Sekvenační přímý primer nasedající na pASK85	25 mM	Připravený na objednávku u Sigma-Aldrich
Sekvenační zpětný primer nasedající na pASK85	25 mM	Připravený na objednávku u Sigma-Aldrich

Přímý primer: AAATGAATAGTTTCGACAAAAATCTAGATAACG

Zpětný primer: ATTTTCACTTCACAGGTCAAGCTTAC

3.2 Metody

3.2.1 Klonování DNA – příprava rekombinantního vektoru

1. Prvním krokem produkce rekombinantních proteinů bylo objednání syntetických molekul DNA nesoucích sekvence scFv 5D3 LH a scFv 5D3 HL variant s aminokyselinovými záměnami G44C ve variabilní doméně těžkého řetězce a G100C ve variabilní doméně lehkého řetězce (dle Kabat číslování) provedenými změnou kodonu GGT za TGT. Syntéza těchto genů byla objednána pomocí internetového formuláře u společnosti Thermo Fischer Scientific.⁴¹
2. Molekuly DNA byly rozpuštěny v TE pufru do výsledné koncentrace $25 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, tedy 1650 ng dsscFv 5D3 HL (**gen HL**) bylo rozpuštěno v 66 μl pufru a 350 ng dsscFv 5D3 LH (**gen LH**) bylo rozpuštěno v 14 μl pufru.
3. Rozpuštěná DNA a plasmid pASK85 byly štěpeny restričními endonukleasami XbaI a HindIII-HF. Roztoky na štěpení měly složení uvedené v *tabulce 1*. Štěpení bylo prováděno po dobu 2 hodin ve 37°C .

Tabulka 1. Restriční štěpení syntetických molekul DNA. Koncentrace genů LH a HL v roztocích činila $25 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, koncentrace pASK85 $111 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.

V μl	Gen LH	Gen HL	pASK85
Voda bez obsahu nukleas	14,5	14,5	7,00
DNA	12,0	30,0	45,0
10x Cut – Smart pufr	3,00	5,00	6,00
XbaI restriktasa	0,25	0,25	1,00
HindIII – HF restriktasa	0,25	0,25	1,00
Celkový objem	30,0	50,0	60,0

4. Do štěpících reakcí genů bylo přidáno 10 % (v/v) roztoku 1% SDS do celkové koncentrace SDS 0,1% (v/v). Do 30 μl roztoku štěpeného genu LH bylo přidáno 3,33 μl roztoku SDS, do 50 μl roztoku štěpeného genu HL pak 5,55 μl .

5. DNA štěpených genů byla čištěna pomocí GenElute™ PCR Clean-Up Kit podle návodu od výrobce.⁴² Všechny centrifugační kroky probíhaly při 16 000 x g 1 minutu při laboratorní teplotě, eluát byl odstraněn. Kolony byly nejprve ekvilibrovány 0,5 ml Column Preparation Solution. K čištěným štěpným reakcím byly přidány objemové pětinásobky Binding Solution (170 μl k LH genu, 280 μl k HL genu), směsi byly převedeny do kolony a centrifugovány. Kolony byly promyty 500 μl Wash Solution. Kolony byly poté centrifugovány 2 minuty bez přidání roztoku. Kolony byly přeneseny do čistých 1.5 ml centrifugačních zkumavek. Na matrice kolon bylo pipetováno 35 μl Elution Solution a byla provedena 5 minutová inkubace při pokojové teplotě. DNA byla eluována z kolon centrifugací po dobu 1 min.
6. K směsi štěpeného plasmidu bylo přidáno 5 μl alkalické fosfatasy 8 μl 10X FastAP pufru a 7 μl vody bez obsahu nukleas. Směs byla inkubována po dobu 10 min při 37 °C, následně proběhla inkubace při 75 °C po dobu 5 min. Oba dva inkubační kroky byly provedeny v termomixéru.
7. Štěpená DNA byla analyzována elektroforetickou separací v 0,8 % agarosovém gelu. Ve 35 ml 1x TAE pufru bylo ohřevem v mikrovlnné troubě rozpuštěno 0,28 g agarosy. Po ochlazení přibližně na 50 °C byly do roztoku přidány 4 μl SYBR™ Safe barviva. Roztok byl protřepán a vlit do připravené nádoby na gel. Byl vložen hřeben. Ztuhlý gel byl přenesen do elektroforetické aparatury. Byly připraveny vzorky smícháním 100 μl defosforylovaného štěpeného pASK85 plasmidu s 25,0 μl vzorkového pufru pro DNA (5x Orange G + 0,5% SDS). K 5 μl neštěpeného pASK85 byl přidán 1,00 μl vzorkového pufru.
8. Vzorky byly pipetovány do jamek agarosového gelu. Vzorek štěpeného plasmidu pASK85 byl rozdělen do posledních třech jamek po přibližně 33,3 μl. Použitým standardem molekulární hmotnosti DNA byl 1 kb DNA standard. Elektroforetická separace probíhala při konstantním napětí 90 V po dobu 30 min v TAE pufru.
9. Po skončení separace byl pod UV zářením transiluminátoru skalpelem vyříznut proužek DNA odpovídající velikosti fragmentu štěpeného plasmidu nesoucí promotor, rezistenci k antibiotiku a ori místo. DNA byla z gelu extrahována pomocí Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit.⁴³ K 390 mg gelu byly přidány 3 hmotnostní ekvivalenty pufru ADB ve kterém byl gel rozpouštěn po dobu 5 min při 51 °C. Roztok byl pipetován na kolonu, která byla dále centrifugována po dobu 1 min při zrychlení 16 000 x g při laboratorní teplotě, eluát byl odstraněn. Všechny ostatní centrifugační

kroky proběhly za stejných podmínek jako výše popsany krok. Kolona byla dvakrát promyta 200 μl Wash Buffer centrifugací po dobu 30 s. Eluce z kolony proběhla přidáním 20 μl DNA Elution Buffer, inkubací po dobu 5 min a následnou centrifugací v čisté 1,5 ml centrifugační zkumavce po dobu 1 min.

10. Štěpené geny i extrahovaný fragment plasmidu byly podrobeny spektrofotometrickému měření koncentrace a čistoty na mikroobjemovém spektrofotometru NanoDrop. Slepým vzorkem pro měření štěpených genů byl Elution Buffer obsažený v GenElute™ PCR Clean-Up Kit, pro plasmid byl slepým vzorkem Elution Buffer ze Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit. Stanovení koncentrace bylo realizováno měřením absorbancí A_{260} , A_{320} a měření čistoty bylo realizováno pomocí měření poměrů absorbancí A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} aplikací obsaženou v programu mikroobjemového spektrofotometru NanoDrop. Aplikované množství vzorků pro měření činilo 2 μl .
11. Štěpené geny LH a HL byly spojeny s fragmentem plasmidu ligací. Plasmid o koncentraci $36,1 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ byl společně se štěpenými inserty a dalšími složkami pipetován dle schématu uvedeného v *tabulce 2*.
12. Po inkubaci ligační směsi (genů LH a genů HL) po dobu 15 min při pokojové teplotě byla prováděna transformace. Ligační směsi byly naředěny 4x tak, že byl vždy 1 μl směsi převeden do 3 μl vody.

Tabulka 2. Ligační reakce.

V μl	Gen LH	Gen HL
Insert DNA	4,47	3,68
Fragment pASK85 plasmidu	1,03	1,32
2x Blunt TA ligasa master-mix	5,50	5,00
Celkový objem	11,0	10,0

3.2.2 Amplifikace a izolace rekombinantních vektorů

1. Ke 20 μl alikvótám kompetentních buněk *Library Efficiency DH5 α* v 1,5 ml centrifugačních zkumavkách bylo přidáno vždy po 1 μl příslušné naředěné ligační směsi. Buňky s přidanou DNA byly inkubovány po dobu 30 min při 4 °C a následně transformovány teplotním šokem při 42 °C po dobu 45 s, po kterém byly opět ponechány po dobu 3 min při 4 °C.
2. K jednotlivým směsím bylo přidáno 200 μl S.O.C. media, s kterým byly buňky inkubovány po dobu 1 h při 37 °C za stálého třepání. Poté byly buňky centrifugovány po dobu 2 min při 7 400 x g. Následně bylo odebráno 130 μl supernatantu a peleta byla resuspendována ve zbylém objemu.
3. Suspenze buněk byla nanášena na agarové plotny obsahující ampicillin o koncentraci 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Kultury byly na agaru rozetřeny pomocí skleněných kuliček a krouživého pohybu zavřenou miskou. Inkubace ploten proběhla přes noc při 37 °C v inkubátoru.
4. Z misek s koloniemi transformovaných bakterií byly sejmuty vždy 4 kolonie mikrobiologickou kličkou. Tyto kolonie byly převedeny do 2 ml LB media s ampicilinem o výsledné koncentraci 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Kultury byly pěstovány přes noc při 37 °C v inkubátoru.
5. Plasmidová DNA byla z bakteriálních kultur izolována pomocí QIAprep® Spin Miniprep Kit podle návodu od výrobce.⁴⁴ Celý objem kultur byl nejprve centrifugován při 16 000 x g po dobu 1 minuty při laboratorní teplotě. Všechny další centrifugace probíhaly za stejných podmínek. Supernatant byl odstraněn a peleta bakterií byla resuspendována ve 250 μl Buffer P1. Bylo přidáno 250 μl Buffer P2 a zkumavky byly promíchávány vertikálním otáčením. Poté do nich bylo přeneseno 350 μl Buffer N3 a opět byly obdobným způsobem promíchány. Následně byly centrifugovány po dobu 10 min. Celý objem supernatantu byl přenesen do kolon, které byly centrifugovány po dobu 1 min. Kolony byly promyty nejprve 500 μl Buffer PB a poté dvakrát 750 μl Buffer PE s inkubací po dobu 5 min. Následně byly kolony přeneseny do čistých zkumavek a ponechány otevřené po dobu 5 min, aby došlo k odpaření zbytku ethanolu. Eluce plasmidové DNA z kolon proběhla přidáním 50 μl Buffer EB, inkubací po dobu 5 min a centrifugací. Buffer EB byl použit zároveň jako slepý vzorek pro

spektrofotometrické měření koncentrací a čistoty DNA na Nanodropu. Aplikované množství vzorku pro toto měření činilo 2 μ l.

3.2.3 Kontrola rekombinantních vektorů

1. Bylo provedeno kontrolní restriční štěpení restričními endonukleasami EcoRV-HF a AleI. Byl připraven roztok potřebných komponent (vyjma DNA) pro štěpení na 10 reakcí. Reakční roztok sestával z 10 μ l 10xCutSmart pufru, 1 μ l EcoRV-HF restriktasy, 1 μ l AleI restriktasy a 68 μ l vody bez obsahu nukleas. Ke všem štěpicím reakcím bylo přidáno po 2 μ l izolovaných DNA a 8 μ l reakčního roztoku. Štěpení bylo provedeno u čtyř vzorků každého konstruktu a u původního plasmidu pASK85. Seznam DNA podrobených kontrolnímu restričnímu štěpení je uveden v *tabulce 3*.

Tabulka 3. DNA podrobené kontrolním restričním štěpením. *První dva sloupce reprezentují izolované plasmidové DNA náležící koloniím odebraným z agarové misky.*

pASK85 dsscFv HL	pASK85 dsscFv LH	Ostatní
Kolonie 1	Kolonie 1	Plasmid pASK85
Kolonie 2	Kolonie 2	
Kolonie 3	Kolonie 3	
Kolonie 4	Kolonie 4	

2. Toto štěpení bylo prováděno po dobu 4 h ve 37 °C v inkubátoru. Ze všech štěpených směsí bylo poté odebráno po 2 μ l, k nim přidáno 8 μ l vody a 2 μ l vzorkového pufru pro DNA. Obdobně byly připraveny i vzorky pro elektroforézu odpovídajících neštěpených DNA.
3. Byla provedena elektroforéza v 0,8 % agarosovém gelu s přidáním Gel Red™ Nucleic Acid Stain roztokem. Na gel byly nanесeny celé objemy příslušných směsí. Gel byl připraven tak, že obsahoval dvě řady jamek pro vzorky (s využitím dvou hřebenů, horní 12 jamek, spodní 15 jamek). Elektroforetická separace byla provedena při 90 V po dobu 15 min. Použitým standardem byl 1 kb DNA Ladder. Jako kontroly sloužily neštěpené izolované plasmidy z kolonií, neštěpený pASK85 vektor, dále restriktasami EcoRV-HF a AleI štěpený pASK85, a nakonec defosforylovaný pASK85 vektor štěpený HindIII-HF a XbaI restriktasami.

4. Byly připraveny sekvenační směsi pro pASK85 dsscFv HL izolované z kolonií 2 a 4. Pro pASK85 dsscFv LH variantu byla připravena k sekvenaci DNA kolonie 1. U společnosti GATC Biotech objednány dvě sady sekvenací pomocí přímého (for.) a zpětného (rev.) primeru. Složení sekvenačních směsí odpovídalo schématu uvedeném v *tabulce 4*.

Tabulka 4. Sekvenační reakce. HL a LH označují, kterou variantu genu daný plasmid potenciálně nese (pASK85 dsscFv HL a pASK85 dsscFv LH). Arabská čísllice označuje, ze které kolonie byla izolována DNA.

V μl	HL, 2 přední	HL, 2 zpětný	HL, 4 přední	HL, 4 zpětný	LH, 1 přední	LH, 1 zpětný
DNA	5,00	5,00	9,00	9,00	7,00	7,00
Přední primer 25 mM	1,00	-	1,00	-	1,00	-
Zpětný primer 25 mM	-	1,00	-	1,00	-	1,00
Voda bez obsahu nukleas	4,00	4,00	-	-	2,00	2,00
Celkový objem	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

3.2.4 Expresa rekombinantních proteinů

1. Bylo překročeno k transformaci plasmidové DNA pASK85 dsscFv 5D3 HL a originální varianty pASK85 scFv 5D3 HL. 1 μl DNA byl přenesen do 20 μl alikvót kompetentních *E.coli* buněk kmene TG1F⁻. Buňky byly ponechány na ledu po dobu 15 min a následně transformovány teplotním šokem při 42 °C po dobu 45 s .
2. Po ponechání na ledu po dobu 5 min bylo k transformovaným buňkám přidáno po 200 μl S.O.C. media, s kterým byly buňky třepány po dobu 1 h při 37 °C v inkubátoru. Po inkubaci byly jednotlivé zkumavky centrifugovány po dobu 2 min při 6000 x g. Následně bylo odebráno 130 μl supernatantu a peleta byla rozsuspendována ve zbylém objemu.

3. Suspenze buněk byla nanášena na Petriho misky s agarovým médiem obsahujícím ampicillin v konečné koncentraci $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Kultury byly po misce rozetřeny pomocí skleněných kuliček a krouživého pohybu zavřenou miskou. Inkubace misek proběhla přes noc při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ v inkubátoru.
4. Další večer bylo z obou Petriho misek odebráno mikrobiologickou kličkou po jedné kolonii. Kolonie byly přeneseny do 3 ml LB media s přídatkem 1000x ředěného ampicilinu ($c(\text{ampicillin}) \approx 100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). Tyto kultury byly inkubovány přes noc za třepání při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ v inkubátoru na kultury.
5. Z narostlých kultur bylo odebráno po 100 μl . K části kultury byl přidán glycerol ve výsledné koncentraci 15 % a konzerva byla uschována v $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Inokula kultur byla přenesena do 50 ml LB média ampicilinem v konečné koncentraci $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v Erlenmeyerových baňkách. Kultury byly třepány přes noc při $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a 200 RPM.
6. Následující den byly celé objemy kultur přeneseny do 2 litrů 2x YT média v 5 – litrových Erlenmeyerových baňkách. Dále byly tyto kultury třepány při $30 \text{ }^\circ\text{C}$ (v inkubátoru na kultury, třepání rychlostí 200 RPM) a růst kultury byl kontrolován měřením optické density při $\lambda = 600 \text{ nm}$ (OD_{600}) v intervalu jedné hodiny. Po třech hodinách od počátku inkubace bylo dosaženo cílové $\text{OD}_{600} \approx 1$.
7. Teplota inkubátoru byla snížena na $22 \text{ }^\circ\text{C}$ a baňky byly dále inkubovány 45 min, aby došlo k úpravě teploty kultury před indukci. Následně byla provedena indukce kultur anhydrotetracyklinem v konečné koncentraci $200 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Indukované kultury byly inkubovány při $22 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 hod za stálého třepání.

3.2.5 Extrakce proteinů z periplasmy

1. Kultury byly centrifugovány při $4500 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 15 min. Pelety byly okamžitě po centrifugaci uloženy na led a resuspendovány v pufru pro periplasmatickou extrakci s použitím 25 ml sérologické pipety opakovaným nasáváním a vysáváním pufru a rozmýváním pelety. Vzniklé suspenze byly ponechány na ledu po dobu 30 min a následně přeneseny do 50 ml centrifugačních zkumavek. Zároveň bylo z obou suspenzí odebráno 10 μl pro provedení elektroforézy.
2. Suspenze byla centrifugována při zrychlení $15\,000 \times g$ při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 15 min. Pelety byly resuspendovány v TBS pufru a uschovány. Ze supernatantů bylo odebráno 10 μl pro pozdější analýzu. Supernatanty byly zmrazeny ponořením do tekutého dusíku a uchovány přes noc v $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

3. Supernatant byl rozmražen, k nim byly přidány (do 100x ředění) směsi inhibitorů proteas z tablet. Dále byl supernatant centrifugován při 40000 x g po dobu 10 min při 4°C. Supernatant z této centrifugace byl přenesen do dialyzačního střeva s limitem propustnosti 7 kDa. Dialýza probíhala ve 4 °C oproti 5 l PBS pufru + 3% (v/v) glycerolu přes noc. Retenát byl následně stočen při 40 000 x g po dobu 30 min při 4 °C.

3.2.6 Purifikace rekombinantních proteinů

4. Všechny purifikační kroky probíhaly v chlazené místnosti, tedy při teplotě přibližně 5 °C. Dvě 15 ml kolony obsahující 2 ml 50% Ni-NTA sefarysy byly regenerovány promytím celého objemu kolony roztokem 6M guanidinu + 5% kyseliny octové. Následovalo promytí dvojnásobným objemem vody, poté jedním objemem regeneračního pufru, a nakonec opět dvěma objemy vody. Tyto matrice zbavené Ni²⁺ byly promyty dvěma objemy roztoku síranu nikelnatého a opět dvěma objemy vody.
5. Kolony byly ekvilibrovány dvěma objemy ekvilibračního roztoku.
6. Obsah zkumavky dialyzované směsi proteinů byl přenesen na zespodu uzavřenou kolonu. Po otevření kolony byly protékající směsi opět chytány do stejné zkumavky. To bylo provedeno celkem třikrát. Takto vzniklé proteklé frakce byly uchovány.
7. Kolony byly promyty 2x 15 ml ekvilibračního pufru, tyto frakce byly sbírány jako oplach 1 a oplach 2.
8. Protein byl eluován frakcemi se zvyšující se koncentrací imidazolu v PBS + 10% glycerol o koncentracích 50 mM, 100 mM, 150 mM, 250 mM (gradientové vytěšňovací provedení). Všechny proteklé eluční frakce byly uschovány.
9. Byla prováděna analýza frakcí získaných purifikací i pelet v TBS pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Z pelet, lyzátu, supernatantu a z proteklé frakce supernatantu bylo odebráno 10 µl a k nim byly přidány 3 µl redukujícího 5x Sample Buffer. Ze všech ostatních získaných frakcí (oplachy a eluční frakce) bylo odebráno 30 µl a k nim přidáno 10 µl redukujícího 5x Sample Buffer.
10. Všechny vzorky byly zahřáty na 95 °C po dobu 5 min a centrifugovány po dobu 1 min při zrychlení 16 000 x g.
11. Vzorky byly nanесeny na dvě sady 15% polyakrylamidových gelů v objemech: 1,2 ul standardu, 2 ul lyzátu, pelety, supernatantu a proteklé frakce supernatantu a 15 ul

oplachů a elučních frakcí. Elektroforetická separace probíhala po dobu 1,5 hod při konstantním napětí 150 V.

12. Jedna sada gelů byla barvena roztokem Coomassie brilantní modři G-250. Gely byly vyjmuty z aparatury a ze skel a 3x po dobu 1 min vařeny ve vodě v mikrovlnné troubě. Následně bylo přidáno barvivo, s ním byly gely opět povařeny a třepány po dobu 10 min. Následně bylo barvivo odstraněno a gely vařeny ve vodě. Poté byly gely odbarveny třepáním ve vodě přes noc. Třepání probíhalo na třepáče Mini Rocker-Shaker.
13. Druhá sada gelů byla zpracována imunochemickou technikou Western Blot. Byl proveden polosuchý elektropřenos (přenos, tzv. „blotting“) pomocí Trans-blot Turbo System Biorad na PVDF membránu v přenosovém pufru. Membrána byla nejprve aktivována přidavkem malého množství methanolu. Přenos byl prováděn s konstantním nastavením 1 A s maximálním limitem 25 V po dobu 30 min.
14. Membrána byla vyňata z aparatury, opláchnuta ve vodě a přes noc uchována v lednici v PBS+0,05% Tween-20 (PBS-T). Následující den byla membrána krátce barvena roztokem Ponceau S v kyselině octové pro kontrolu přenosu proteinů. Následně byla membrána odbarvena několikanásobným promytím v PBS-T.
15. Dále byla PVDF membrána blokována po dobu 45 min v 20 ml roztoku 5% (v/w) sušeného mléka v PBS + 0,05% Tween-20 (roztok PBS-T) na třepáče. Do mléka byl přidán 1 μ l protilátky anti-6xHis-Tag-HRP a proběhla inkubace po dobu 45 min. Membrána byla opláchnuta roztokem PBS-T a 3x po dobu 1 min s PBS-T třepána, pokaždé s výměnou za nový roztok.
16. Membrána byla inkubována s chemiluminiscenčním substrátem Luminata Forte Western HRP. Signál byl snímán zobrazovacím systémem ImageQuant LAS 4000 v módu kumulativní expozice 30 s.
17. Eluce purifikovaných proteinů byly spojeny a proteiny byly zakoncentrovávány pomocí filtrace ve filtrační jednotce s limitem propustnosti 10 kDa. Koncentrační kroky probíhaly centrifugací při 3000 x g při 4 °C do konečného objemu zhruba 500 μ l. Mezi jednotlivými kroky byl obsah filtrační jednotky promíchán pipetováním.
18. Bylo provedeno spektrofotometrické měření absorbancí obou variant koncentrovaných proteinů v mikroobjemovém spektrofotometru NanoDrop oproti slepému vzorku proteklé frakce ve filtrační jednotce.

19. Pomocí internetového nástroje „ExPASy ProtParam tool“ byly z aminokyselinové sekvence produkovaných proteinů vypočteny extinkční koeficienty proteinů.⁴⁵ V obou případech nabývala hodnota extinkčního koeficientu přibližně $2,00 \text{ (mg} \cdot \text{ml}^{-1})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.
20. Byly vypočteny koncentrace proteinů za předpokladu molárního extinkčního koeficientu $\epsilon_{280} = 2,00 \text{ (mg} \cdot \text{ml}^{-1})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a molární hmotnosti $M = 28\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Dále byl proveden odhad celkového množství purifikovaných zakonzentrovaných proteinu.

3.2.7 Produkce dsscFv 5D3 HL ve větším objemu

1. Varianta proteinu dsscFv vycházející z genu HL byla produkována znovu ve větším objemu média.
2. Do čtyř pětilitrových Erlenmeyerových baněk byly připraveny 2 litry 2x YT média.
3. Z bakteriální konzervy kultur TG1F⁻ transformovaných plasmidem byla přenesena alikvóta do 20 ml LB média s ampicilinem v konečné koncentraci $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tato kultura byla inkubována zhruba 8 h při teplotě 37 °C.
4. Po inkubaci bylo do každé Erlenmeyerovy flašky přeneseno po 5 ml této kultury. Takto vzniklé kultury byly přes noc inkubovány při 22 °C za stálého třepání rychlostí 200 RPM v inkubátoru na kultury.
5. Ostatní kroky produkce proběhly dle dříve uvedeného protokolu.

3.2.8 Upravená purifikace dsscFv 5D3 HL

1. Získané pelety byly resuspendovány v přibližně 100 ml periplasmatického extrakčního pufru za pomoci ručního homogenizátoru dle Pottera-Elvehjema. Ze získaného spojeného lyzátu bylo odebráno 10 μl pro pozdější analýzu. Lyzát byl dále centrifugován v 50 ml centrifugačních zkumavkách po dobu 15 min při 4 °C a 5000 x g. Ze supernatantu (supernatant sacharosy) bylo odebráno 10 μl a jeho zbytek byl zamražen.
2. Získané pelety byly resuspendovány (pomocí ručního homogenizátoru) ve 40 ml 5 mM MgSO_4 a centrifugovány 15 min při 4 °C a 5000 x g. Z tohoto supernatantu bylo odebráno 10 μl (supernatant MgSO_4) a jeho zbytek byl zamražen. Peleta byla resuspendována v 37 ml TBS pufru a podrobena sonikací na sonikátoru Sonicator 3000

po dobu přibližně 2 min za chlazení na ledu. Z vzniklého roztoku bylo odebráno 5 μ l, které byly doplněny 5 μ l TBS pufru a zamraženy.

3. Ke všem 10 μ l vzorkům odebraným v předchozích krocích této kapitoly bylo přidáno 40 μ l redukujícího 5x Sample Buffer. vzorky byly zahřívány po dobu 10 min na 95 °C v termomixéru.
4. Elektroforéza byla provedena ve dvou 15% polyakrylamidových gelech s tím, že pořadí vzorku v obou gelech bylo identické, zároveň bylo do poloviny jednoho gelu naneseno po 1 μ l vzorků, do druhé poloviny (ve stejném pořadí) po 5 μ l vzorků. Nános standardu molekulární hmotnosti v obou gelech činil 1 μ l. Elektroforéza probíhala po dobu 1 hod při napětí 150 V.
5. Protein byl dále purifikován dle výše uvedeného protokolu.
6. Filtrace eluátů dsccFv-5D3 probíhaly následujícím způsobem: Eluce 1 (frakce získaná při eluci roztokem s 50 mM imidazolem) byla koncentrována zvlášť, další dvě frakce (Eluce 2, Eluce 3) byly koncentrovány dohromady ve stejném koncentrátoru. Eluce 4 nebyla tomuto kroku podrobena.
7. Obě dvě zkumavky obsahující zakoncentrované roztoky proteinů byly centrifugovány při 21 191 x g v centrifuze Microfuge 22R chlazené na 4 °C po dobu 10 min. Výsledné koncentrované roztoky proteinů z eluce 1 a spojených elucí 2 a 3 o přibližných objemech 850 μ l a 1500 μ l byly spektrofotometricky proměřeny na mikroobjemovém spektrofotometru NanoDrop oproti slepému vzorku proteklých frakcí při koncentrování. Tyto roztoky proteinů byly zamraženy v tekutém dusíku a uschovány v -80 °C.

3.2.9 Analýza disociační konstanty proteinů pomocí metody ELISA

1. Analýza probíhala metodou ELISA v 96-jamkové destičce typu Maxisorp Nunc.
2. Byla stanovena koncentrace streptavidinu neznámého původu pomocí měření absorbance při $\lambda = 280$ nm oproti vodě. Na základě takto zjištěné koncentrace byl připraven vazebný roztok obsahující výslednou koncentraci streptavidinu $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v TBS pufru.
3. Do všech jamek 96 jamkové destičky Maxisorp Nunc bylo nanášeno 8-kanálovou pipetou 50 μl vazebného roztoku streptavidinu v TBS pufru, se kterým byla destička inkubována za nepřístupu světla při 4°C přes noc.
4. Ráno byla deska promyta na promývače Tecan Hydroflex PBS puftrem a blokována 200 μl 5% BSA v PBS pufru. Po 2 hodinách blokace byla destička promyta a do všech jamek bylo pipetováno 50 μl roztoku Avi-GCPII o výsledné koncentraci $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ v PBS. Inkubace s tímto roztokem proběhla po dobu 1 h při pokojové teplotě za nepřístupu světla a následovalo její promytí.
5. Byla připravena 16 bodová dvojková ředící řada proteinu dsscFv-5D3 HL v PBS pufru. První zkumavka obsahovala 240 μl ($3,8 \mu\text{M}$) proteinu. Do dalších zkumavek bylo pipetováno po 120 μl pufru PBS. Následně bylo do každé následující zkumavky (počínaje přenosem z první do druhé) přenášeno 120 μl roztoku ze zkumavky předchozí, tj. probíhalo ředění 2x.
6. Byla připravena 16 bodová dvojková ředící řada proteinu scFv-5D3 HL v PBS pufru. První zkumavka obsahovala 160 μl pufru PBS a 80 μl proteinu ($12 \mu\text{M}$), protein v ní byl tedy ředěn 3x. Do dalších zkumavek bylo pipetováno po 120 μl pufru PBS. Do každé zkumavky bylo přeneseno 120 μl ze zkumavky předchozí (počínaje přenosem z první do druhé), tj. probíhalo ředění 2x.
7. Byla připravena 16 bodová dvojková ředící řada protilátky 5D3. Do první zkumavky bylo pipetováno 110 μl pufru PBS a 1,1 μl protilátky 5D3 ($40 \mu\text{M}$). Do dalších zkumavek bylo přeneseno 55 μl pufru PBS. Do každé zkumavky bylo přeneseno 55 μl ze zkumavky předchozí (počínaje přenosem z první do druhé), tj. probíhalo ředění 2x.
8. Na destičku byly nanášeny analyzované proteiny a kontroly dle schématu uvedeného na *obrázku 5 (str. 39)*. Nanášení prvních 6 řad proteinu dsscFv probíhalo digitální pipetou, další již s pipetou manuální. Kontroly neobsahovaly analyzované scFv

proteiny. Všechny objemy nanášených roztoků tvořily 50 μ l. Inkubace proběhla po dobu 1 hodiny a následovalo promytí desky.

Obrázek 5. Pozice analyzovaných proteinů nanesených na 96 jamkovou destičku při provedení metody ELISA. V levém sloupci a horním řádku jsou uvedeny souřadnice náležící pozici jamky v destičce. Latinské číslice označují pořadí ředění (II tedy odpovídá druhému ředění). Písmeno „k“ s arabskou číslicí označuje kontrolní jamku, „k1“ tedy náleží jamce první kontroly.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	dsscFv I	dsscFv I	dsscFv X	dsscFv X	scFv I	scFv I	scFv X	scFv X	5D3 I	5D3 X	k1	k1
B	dsscFv II	dsscFv II	dsscFv XI	dsscFv XI	scFv II	scFv II	scFv XI	scFv XI	5D3 II	5D3 XI	k1	k1
C	dsscFv III	dsscFv III	dsscFv XII	dsscFv XII	scFv III	scFv III	scFv XII	scFv XII	5D3 III	5D3 XII	k2	k2
D	dsscFv IV	dsscFv IV	dsscFv XIII	dsscFv XIII	scFv IV	scFv IV	scFv XIII	scFv XIII	5D3 IV	5D3 XIII	k2	k2
E	dsscFv V	dsscFv V	dsscFv XIV	dsscFv XIV	scFv V	scFv V	scFv XIV	scFv XIV	5D3 V	5D3 XIV	k2	k2
F	dsscFv VI	dsscFv VI	dsscFv XV	dsscFv XV	scFv VI	scFv VI	scFv XV	scFv XV	5D3 VI	5D3 XV	k3	k3
G	dsscFv VII	dsscFv VII	dsscFv XVI	dsscFv XVI	scFv VII	scFv VII	scFv XVI	scFv XVI	5D3 VII	5D3 XVI	k3	k3
H	dsscFv IX	dsscFv IX	dsscFv XVII	dsscFv XVII	scFv IX	scFv IX	scFv XVII	scFv XVII	5D3 IX	5D3 XVII	k3	k3

9. Dále bylo do všech jamek obsahujících rekombinantní proteiny (dsscFv a scFv) pipetováno 50 μ l anti-6xHis-Tag-HRP protilátky v PBS o výsledné koncentraci 0,1 μ g \cdot ml⁻¹ (ředění 10 000x). Stejně tak byla tato protilátka pipetována i do jamek označených k2 na obrázku 5. Do jamek s protilátkou 5D3 i do jamek k3 byla pipetována za stejných podmínek sekundární protilátka GAM-HRP ředěná 10 000x. Inkubace se sekundárními protilátkami trvala 1 h a následovalo ji promytí desky.
10. Barevná reakce byla vyvolána přidáním 70 μ l TMB-Complete II a ponecháním po dobu 10 min za nepřístupu světla. Barvicí reakce byla zastavena přidáním 100 μ l 2 M H₂SO₄. Intenzita barevné reakce byla měřena spektrofotometrem EPOCH 2 při λ = 450 nm.
11. Analýza získaných dat proběhla v aplikaci Microsoft Excel a QtiPlot 0.9.8.8 svn 2255 (grafická nástavba gnuplot). Data získaná ze spektrofotometru byla nejprve v aplikaci Excel zpracována (byly zprůměrovány dublety, dále byla vypočtena populační směrodatná odchylka hodnot, byly odečteny hodnoty pozadí získané z průměrů kontrol k2 a k3).
12. V aplikaci QtiPlot byly pak známé hodnoty koncentrací převedeny do logaritmické škály, načež byly experimentální hodnoty proloženy s využitím „Scaled Levenberg-Marquardt“ algoritmu s maximem 1000 iterací a tolerancí 0,0001 logistickou funkcí o čtyřech parametrech, z nichž jeden odpovídal hodnotám disociačních konstant příslušné vazebné závislosti proteinu.

4. Výsledky a diskuze

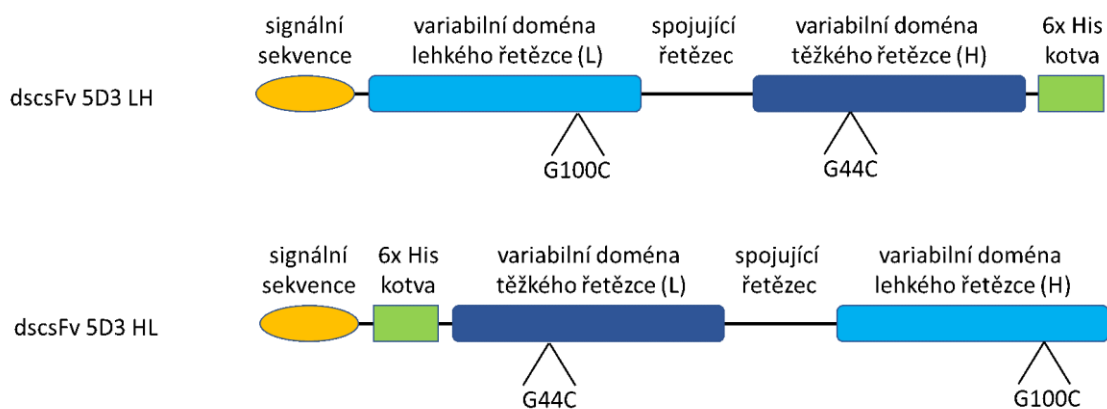
V Laboratoři strukturní biologie byly v nedávné minulosti vyvinuty a charakterizovány dvě funkční varianty jednořetězcového fragmentu 5D3 protilátky. Bakteriální produkce těchto konstruktů však poskytuje pouze malou proporcii proteinu v rozpustné formě a toto množství je nedostačující pro strukturně-biologické experimenty a zobrazovací techniky. Podstatou této práce bylo zavedení disulfidické vazby do struktury jednořetězcového fragmentu protilátky 5D3 pro zvýšení výtěžku funkčního proteinu. Tato modifikace je využívána pro zvýšení stability daného typu fragmentu, který je tvořen dvěma variabilními doménami spojenými flexibilním řetězcem. Nekovalentní interakce mezi oběma doménami jsou u některých konstruktů scFv nedostačující pro udržení struktury proteinu a dochází k částečnému rozvolnění struktury, které může vést ke ztrátě funkce proteinu. Zavedení nové disulfidické vazby by mělo posílit vzájemnou interakci obou domén.

4.1 Geny kódující jednořetězcové fragmenty

V experimentální části práce byly využity syntetické geny kódující dvě varianty disulfidicky stabilizovaného jednořetězcového fragmentu protilátky 5D3. Sekvenční motivy těchto genů jsou zobrazeny na *obrázku 6 (str. 41)* (v současné době probíhá patentování protilátky 5D3, a tak nejsou v této práci uvedeny plné sekvence používaných konstruktů). V práci byly tyto geny označovány jako **Gen LH** a **Gen HL**. Varianty se odlišovaly především v pozici 6x His kotvy, v pořadí jednotlivých domén a ve velikosti molekul. Varianta HL byla dlouhá 914 bp, varianta LH pak 887 bp.

Motivací pro zvolení syntetizovaných genů (oproti například mutagenizi s využitím PCR) byla zejména úspora času a materiálu.

Geny původních variant scFv byly pozměněny mutací vedoucí k aminokyselinovým záměnám G44C ve variabilní doméně těžkého řetězce (H) a G100C ve variabilní doméně lehkého řetězce (L). Tato záměna proběhla změnou jediného nukleotidu v kodonu GGT za vzniku kodonu TGT. Zmíněné pozice odpovídaly systému číslování Kabat, viz *kapitola 1.2.5*. Následně bylo optimalizováno zastoupení kodonů v nukleotidové sekvenci tak, aby zefektivnilo produkci myšího proteinu v bakteriích.



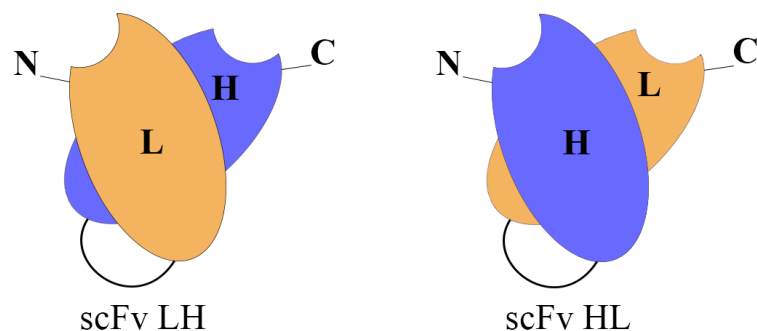
Obrázek 6. Sekvenční motivy použitých syntetických genů. Zobrazeny jsou pozice aminokyselinových záměn oproti původním variantám genů scFv 5D3. Obrázek byl přejat od RNDr. Zory Novákové, Ph.D..

Vzhledem k tomu, že v době návrhu genů nebyla známa trojrozměrná struktura scFv 5D3, byly pozice pro mutace zvoleny ve shodě s nejběžněji zaváděnými mutacemi ve stejném typu protilátkového fragmentu.²¹

Na 5' koncích kódujících vláken byla umístěna sekvence pro štěpení restriktasou XbaI, na 3' koncích potom sekvence pro restriktasu HindIII. Na 3' koncích zadních domén byly zároveň přítomny dva stop kodony následované terminátory transkripce.

Syntetické geny obsahovaly sekvenci kódující histidinovou kotvu (6x His-tag), určenou pro purifikaci produkovaných proteinů metodou IMAC (afinitní chromatografie na principu imobilizovaných iontů kovu, tzv. „Immobilized Metal Affinity Chromatography) s využitím nikelnatých iontů vázaných na sefarosovou matici. Produkované proteiny by tedy měly odpovídat fúznímu konstrukt, ve kterém je 6x His-tag kovalentně připojen k molekule dscsFv.

Rozdíl mezi jednotlivými variantami na úrovni proteinu je zobrazen na *obrázku 7* (str. 42).



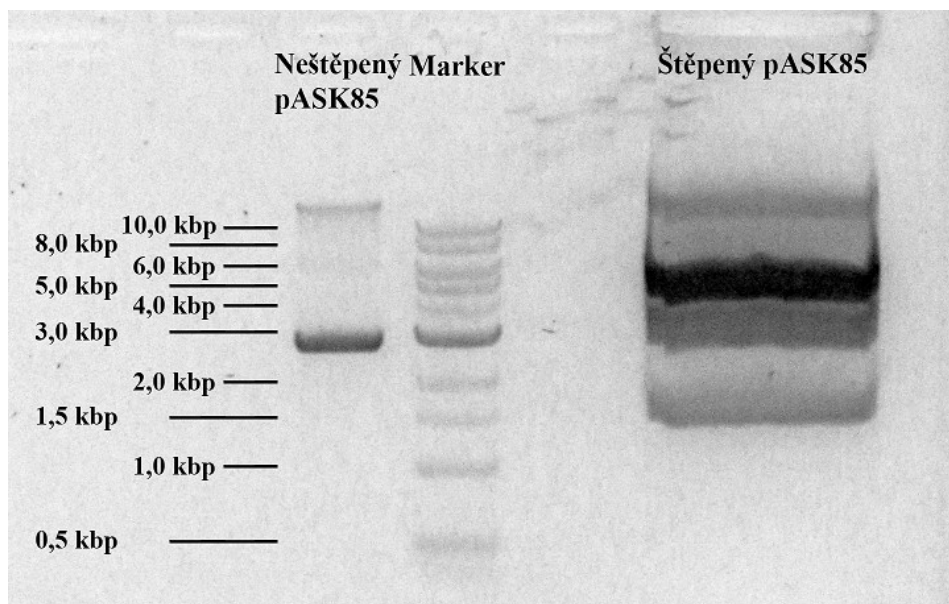
Obrázek 7. Rozdíl mezi variantami scFv LH a HL na úrovni proteinu. Oranžově jsou znázorněny lehké variabilní domény (L), modře těžké variabilní domény (H). Černá křivka znázorňuje spojující peptidový řetězec. Latinská písmena C/N znázorňují pozici C/N konců konstruktů. Vyřiznuté oblasti elips označují vazebná místa variabilních domén. Obrázek byl vytvořen autorem.

4.2 Restriční štěpení syntetických genů a plasmidu pASK85

Expresní vektory dsScFv variant byly konstruovány pomocí syntetických genů a vektoru pASK85. Tento plasmid byl vyvinut pro bakteriální produkci protilátkových fragmentů do periplasmatického prostoru *E.coli*. Syntetické geny a plasmid pASK85 byly štěpeny restričními enzymy XbaI a HindIII-HF („High-fidelity“, obchodní značka enzymů od New England Biolabs vyznačující se vysokou přesností a rychlostí štěpení) v 10x Cut-Smart pufru. Produkty štěpení těmito enzymy mají kohezní konce, které umožňují přesné spojení s obdobně štěpenými sekvencemi DNA.

Štěpené geny byly čištěny pomocí GenElute™ PCR Clean-Up kitu proto, aby byly zbaveny enzymů a solí přidávaných do štěpící směsi. K těmto genům bylo před čištěním přidáno SDS. V tomto případě sloužil přídavek SDS k odstranění některých restričních enzymů, které mohou být velmi pevně navázány na substrátovou DNA.

Štěpený plasmid byl defosforylován alkalickou fosfatase. Důvodem tohoto kroku bylo zabránění ligaci samotného štěpeného plasmidu. Po ukončení defosforylace byla celá směs zahřata na 75 °C, čímž bylo dosaženo deaktivace přítomných enzymů. Plasmid byl podroben elektroforetické separaci v agarosovém gelu, jejíž výsledek je zobrazen na obrázku 8 (str. 43).



Obrázek 8. Výsledek gelové elektroforézy štěpeného plasmidu pASK85. Neštěpený plasmid pASK85 byl přidán jako kontrola. Obrázek byl upraven a oříznut.

Na agarosovém gelu byly pozorovány tři výrazné proužky. Nejsilnější proužek (zhruba na pozici 5 000 bp) odpovídal fragmentu štěpeného plasmidu. Proužek o velikosti 3000 bp odpovídal neštěpenému plasmidu a proužek o velikosti 1500 bp odpovídal malému fragmentu štěpenému z plasmidu pASK85. Vyšší pohyblivost neštěpeného plasmidu v porovnání se štěpeným fragmentem je dána cirkulární, případně superšroubovicovou formou DNA, která se pohybuje v gelu rychleji než lineární molekuly. Proto je migrace neštěpeného plasmidu v gelu vyšší než migrace štěpeného fragmentu, ačkoli délka nukleotidové sekvence intaktního plasmidu je větší než délka štěpeného fragmentu. Extrakce z gelu byla provedena s proužkem na pozici 5000 bp.

Pomocí spektrofotometru byla stanovena koncentrace a čistota extrahované DNA. Výsledky tohoto měření jsou uvedeny v *tabulce 5 (str. 44)*. Nízký poměr A_{260}/A_{230} ukazoval na kontaminaci DNA organickými čidly pocházejícími z extrakčního postupu.

Tabulka 5. Výsledky spektrofotometrického měření vzorků DNA po štěpení restrikťasami a jejich purifikaci/extrakci. Měření proběhlo na mikroobjemovém spektrofotometru NanoDrop oproti slepému vzorku Elution Buffer Zymo.

Měřená DNA	c $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
Gen HL	7,10	1,59	1,24
Gen LH	11,0	1,70	1,19
pASK85	36,1	1,89	0,68

Do štěpící reakce vstupovalo 300 ng genu HL, 1600 ng genu LH a 4995 ng pASK85. Po čištění byly štěpené geny eluovány do 35 μl činidla, plasmid byl po extrakci eluován do 20 μl . Podle výsledků spektrofotometrického měření činil výtěžek pro Gen HL 82,8 %, Gen LH 24,0 % a pro plasmid pASK85 14,5 %.

Měření čistoty všech vzorků ukázalo kontaminaci proteiny pocházející zřejmě z restrikčního štěpení (hodnoty A_{260}/A_{280} se optimálně pohybují okolo 1,8). Měření čistoty s ohledem na organické kontaminanty, soli a chaotropní činidla ukázalo možnou kontaminaci (hodnoty A_{260}/A_{230} leží optimálně v rozmezí 2,0-2,2). Tento problém je u DNA čištěných pomocí kitů relativně běžný, organické reagenty jsou součástí purifikačního postupu.

4.3 Ligace genů, jejich amplifikace a následná kontrola

Štěpené geny byly spojeny s velkým fragmentem plasmidu pASK85 pomocí ligace. Vzniklé konstrukty byly označeny pASK85 dsscFv HL a pASK85 dsscFv LH.

Ligované plasmidy byly pro účely amplifikace transformovány do kompetentních buněk DH5 α . Tento kmen buněk byl zvolen pro svoji vysokou transformační účinnost a schopnost uchovávat plasmid s minimem mutací. S.O.C. médium bylo oproti LB médiu zvoleno pro svoje optimalizované složení, které umožňuje bakteriím, které podstoupily traumatizující teplotní šok, rychleji regenerovat, a tak zlepšuje výsledek transformace.

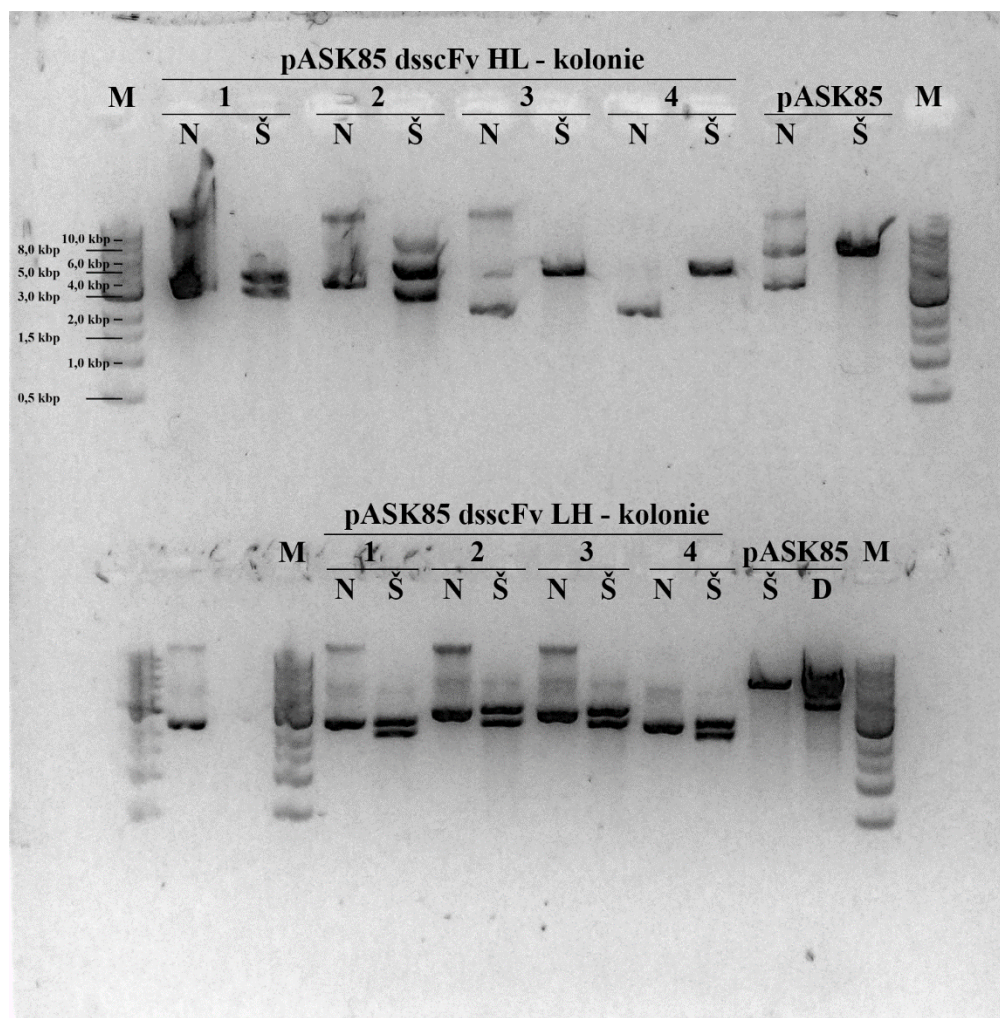
Transformované bakterie byly po inkubaci centrifugovány, aby byla na agarovou plotnu nanesen dostatečný počet bakterií. Agarové médium obsahovalo selekční antibiotikum ampicillin, které umožnilo přežití pouze buněk nesoucích transformovaný vektor. Na misce náležící pASK85 dsscFv HL vyrostlo 17 kolonií, na misce pASK85 dsscFv LH pak 20 kolonií. Ani na jedné misce nebyly pozorovány satelitní kolonie. Z vyrostlých kolonií na miskách byly odebrány vždy čtyři náhodně zvolené kolonie. Z těchto kolonií byly připraveny tekuté kultury, ze kterých byla následně izolována plasmidová DNA. Koncentrace izolované DNA byla stanovena spektrofotometricky, výsledky tohoto měření jsou zobrazeny v *tabulce 6*.

Tabulka 6. Koncentrace DNA izolovaných plasmidů pASK85 dsscFv HL a pASK85 dsscFv LH. Měření bylo provedeno na mikroobjemovém spektrofotometru NanoDrop oproti slepému vzorku Elution Buffer Qiagen.

Kolonie	c(pASK85 HL, kolonie)	c(pASK85 LH, kolonie)
	ng · μl ⁻¹	ng · μl ⁻¹
1	87,9	95,1
2	127	104
3	126	52,7
4	91,5	39,8

Dále bylo provedeno kontrolní restriční štěpení endonukleasami EcoRV-HF a AleI. Výsledky elektroforetické separace štěpených fragmentů jsou zobrazeny na *obrázku 9 (str. 46)*. Štěpení těmito restriktasami bylo zvoleno proto, že samotný plasmid nese pouze jednu z palindromatických sekvencí pro štěpení restriční endonukleasou (AleI). Druhá sekvence pro restriktasu EcoRV se nachází na insertu (konkrétně v sekvenci lehkého řetězce). Pokud v tomto uspořádání není insert zaligován do plasmidu, je plasmid štěpen pouze jednou restriktasou, a tak se po elektroforéze na agarosovém gelu projeví pouze jako jeden proužek (pouze linearizovaný plasmid). Přítomnost dvou proužků tedy indikuje úspěšnou ligaci (přítomnost plasmidu a insertu). Přítomnost tří proužků může indikovat přítomnost jednořetězcových zlomů v některých plasmidových DNA (plasmid tedy putuje gelem v cirkulární, nadšroubovicově vinuté a lineární frakci zároveň).

Očekávané délky lineárních úseků DNA vzniklých štěpením plasmidů nesoucí insertovou DNA byly rovny 2201 bp a 1806 bp. Plasmid neobsahující insertovou DNA (štěpený pouze AleI restriktasou) měl poskytovat 4700 bp dlouhou lineární DNA.



Obrázek 9. Elektroforetická separace izolovaných plasmidových DNA konstruktů pASK85 dsscFv HL a pASK85 dsscFv LH. Tento gel sloužil jako kontrola ligace insertů do transformovaných plasmidů, které byly po amplifikaci a izolaci štěpeny restriktasami *EcoRV-HF* a *AleI*. Jako kontroly byly zároveň přidány neštěpené plasmidy, originální štěpený (restriktasami *EcoRV-HF* a *AleI*) pASK85 vektor a neštěpený pASK85 vektor. M označuje standard, N a Š značí neštěpený a štěpený plasmid a D znamená defosforylovaný fragment plasmidu pASK85.

Na základě výsledku kontrolního štěpení byly zvoleny pro další práci některé plasmidy odpovídající koloniím 2 a 4 pASK85 dsscFv LH a kolonii 1 insertu pASK85 dsscFv HL. Tyto plasmidy byly sekvenovány s pomocí externí sekvenační služby GATC Biotech s využitím předního a zadního primeru nasedajícího na pASK85. Oba primery

byly zvoleny tak, aby byla sekvenací zjištěna celá sekvence vnesených genů včetně okolí klonovacího místa.

Výsledky sekvenací prokázaly, že pouze jediný plasmid izolovaný z kolonie 1 pASK85 dsscFv HL nesl správnou sekvenci společně se správným čtecím rámcem. Plasmid z kolonie 2 pASK85 dsscFv LH neposkytl s použitými primery při sekvenaci žádný signál, plasmidy kolonií 4 poskytly signál části vektoru pASK85 bez přítomnosti insertu. Správně se tedy podařilo zaklonovat pouze variantu dsscFv 5D3 HL.

4.4 Produkce rekombinantních proteinů

Úspěšně byl připraven pouze expresní vektor nesoucí variantu dsscFv 5D3 HL, proto byla dále produkována jen tato forma. Společně s ní byla produkována nemutovaná forma scFv 5D3 HL, sloužící v pozdějších experimentech jako kontrola. K produkci proteinů byly použity buňky kmene TG1F⁻ odvozené od *E. coli* kmene K-12 (TG1 označuje genotyp, F⁻ označuje absenci fertilitního faktoru). Vybrány byly na základě předchozího testování rozdílných kmenů *E. coli* pro produkci fragmentů protilátek. Tyto bakterie byly získány společně s plasmidem pASK85 od spolupracující laboratoře prof. Skerry.

Po transformaci těchto expresních buněk plasmidem izolovaným z kolonie 1 pASK85 dsscFv HL (diskutováno v kapitole 4.3) a transformaci druhé alikvóty buněk plasmidem pASK85 scFv HL byly buňky nejdříve pěstovány přes noc ve 37 °C v objemu 3 ml LB media s ampicilinem o koncentraci 100 µg · ml⁻¹. Tato kultura slouží k zahájení buněčné proliferace. Pokud by byly do většího objemu přidány rovnou buňky z agarové misky, trvalo by dlouho, než by buňky vystoupily z lag fáze do exponenciální fáze a vyrostly do požadované density. Tímto krokem je zároveň dosaženo podobného růstu ve všech kulturách, což má praktické výhody. Z těchto kultur bylo odebráno 100 µl inokula, které bylo přeneseno do 50 ml LB média s ampicilinem o koncentraci 100 µg · ml⁻¹.

Tyto 50 ml kultury byly přes noc pěstovány za snížené teploty při snížené teplotě 30 °C proto, aby se zpomalil jejich růst a kultura nevstoupila do fáze plató. Tyto kultury byly finálně přeneseny do 2 litrů média. Cílové OD₆₀₀ vzniklých kultur bylo vyšší než

obvyklé, jeho hodnota byla 1,0. Produkce protilátkových fragmentů je pro bakterie škodlivá, je tedy výhodné produkovat protein ve větším množství bakterií kratší dobu. Stejně tak je vhodné inkubovat indukované bakterie při snížené teplotě, v tomto případě 22 °C.

Po centrifugaci kultur pro oddělení média od bakteriálních buněk byla provedena extrakce proteinů z periplasmatického prostoru osmotickým šokem (vysokou koncentrací sacharosy) s využitím pufru pro periplasmatickou extrakci. s přidaným lysozymem pro zvýšení účinnosti extrakce.

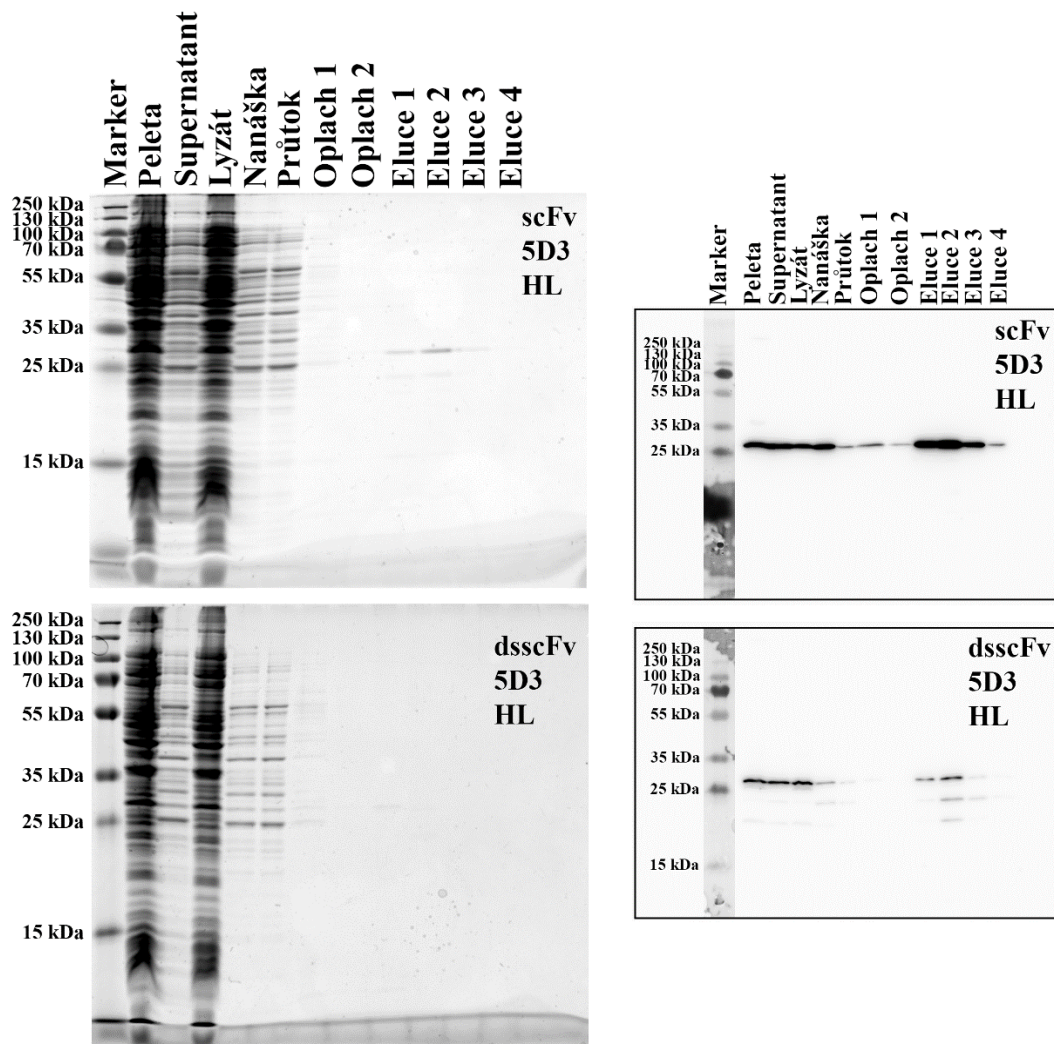
Po centrifugaci sloužící k oddělení buněčných složek od proteinů byla k supernatantům přidávána směs inhibitorů proteas, které jsou v bakteriích běžně přítomny, a které by mohly produkovaný protein degradovat. Další centrifugace sloužila k oddělení rozpustných proteinů (supernatant) od nerozpustných (peleta).

4.5 Purifikace a analýza produkovaných proteinů

Purifikace probíhala metodou IMAC (afinitní chromatografie na imobilizovaných iontech kovu, tzv. „Immobilized Metal Affinity Chromatography) s využitím nikelnatých iontů. K purifikaci proteinů sloužil 6xHis-tag. Jedná se o sekvenci šesti po sobě jdoucích histidinů, které svými zbytky koordinují iont kovu. Po navázání proteinů na nikelnaté ionty imobilizované na sefárosové matici bylo přikročeno k promytí a následné eluci, která probíhala vytěšňovací metodou (přidavkem látky vykazující vyšší afinitu k iontům kovu než histidiny) s využitím gradientu imidazolu. Pro následující elektroforetickou analýzu purifikace byly uchovávány všechny frakce. Výsledky elektroforetické analýzy následované analýzou metodou Western Blot jsou zobrazeny na *obrázku 10 (str. 50)*.

- Proužky mezi 25 kDa a 35 kDa odpovídaly 28 kDa velkým scFv 5D3 HL a dsscFv 5D3
- Výtěžek obou variant proteinů byl relativně nízký, výtěžek dsscFv byl znatelně nižší než výtěžek originální formy scFv.
- Obě dvě varianty scFv byly eluovány stejnou koncentrací imidazolu. Kulminace eluce nastala v 100 mM imidazolu (eluční frakce 2).

- Extrakce či produkce periplasmatických proteinů nebyla dokonalá. V peletě zůstalo velké množství produkovaných proteinů. Mohlo se jednat o nerozpustný konstrukt, který zůstal uložen v cytoplasmě buňky.
- Účinnost purifikačního postupu byla poměrně vysoká, většina proteinu byla zachycena kolonou.
- Analýza pomocí imunodetekce prokázala v elučních frakcích dsscFv 5D3 HL přítomnost dalších proteinů obsahujících His kotvu. Tyto proteiny vykazují rychlejší migraci v gelu než dsscFv 5D3 HL. Mohlo by se tedy jednat o fragmenty purifikovaného proteinu.
- Čistotu purifikovaných proteinů lze hodnotit jen s obtížemi díky nízké nanášce eluátů na gelu.



Obrázek 10. Výsledky analýzy jednotlivých frakcí proteinů. Na levé straně obrázku jsou gely barvené Coomasiie brilantní modří G-250, na pravé PVDF membrány s proteiny detekovanými Anti-6x-His protilátkou metodou Western Blot. K PVDF membránám byl během editace přidán výřez standardu molekulární hmotnosti získaný ve fotosystému fotkou při VIS. Doba expozice membrány činila 90 s. Jako proteinový standard (marker) byl použit Page Ruler Plus.

Jak bylo diskutováno, produkce dsscFv 5D3 HL vykazovala nižší výtěžek i čistotu než scFv 5D3 HL. Po zakoncentrování obou variant proteinů na $V \approx 500 \mu\text{l}$ bylo provedeno spektrofotometrické měření absorbancí.

Dále byly vypočteny koncentrace proteinů za předpokladu molárních extinkčních koeficientů $\epsilon_{280} = 2,00 (\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a molárních hmotností $M = 28\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$. Dále byl proveden odhad celkového množství získaných proteinů ($V \approx 500 \mu\text{l}$). Výsledky jsou uvedeny v *tabulce 7 (str. 51)*.

Tabulka 7. Výsledky spektrofotometrického měření koncentrací vyprodukovaných, purifikovaných a zakonzentrovaných proteinů scFv 5D3 HL a dsScFv 5D3 HL. Výpočet molárních koncentrací a celkových množství proteinů proběhl za předpokladu molárních extinkčních koeficientů $\epsilon_{280} = 2,00 \text{ (mg} \cdot \text{ml}^{-1})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a molárních hmotností $M = 28\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Protein	c mg · ml ⁻¹	c μM	m _{celkové} mg
scFv 5D3 HL	0,336	12	0,17
dsScFv 5D3 HL	0,0500	1,8	0,025

Po tomto testovacím experimentu, kdy bylo zjištěno, že produkce dsScFv 5D3 HL poskytuje nižší výtěžky oproti původní scFv 5D3 HL bylo přikročeno k opětovné produkci dsScFv 5D3 HL s vylepšením podmínek produkce.

4.6 Produkce dsScFv 5D3 HL ve větším objemu, jeho purifikace a analýza

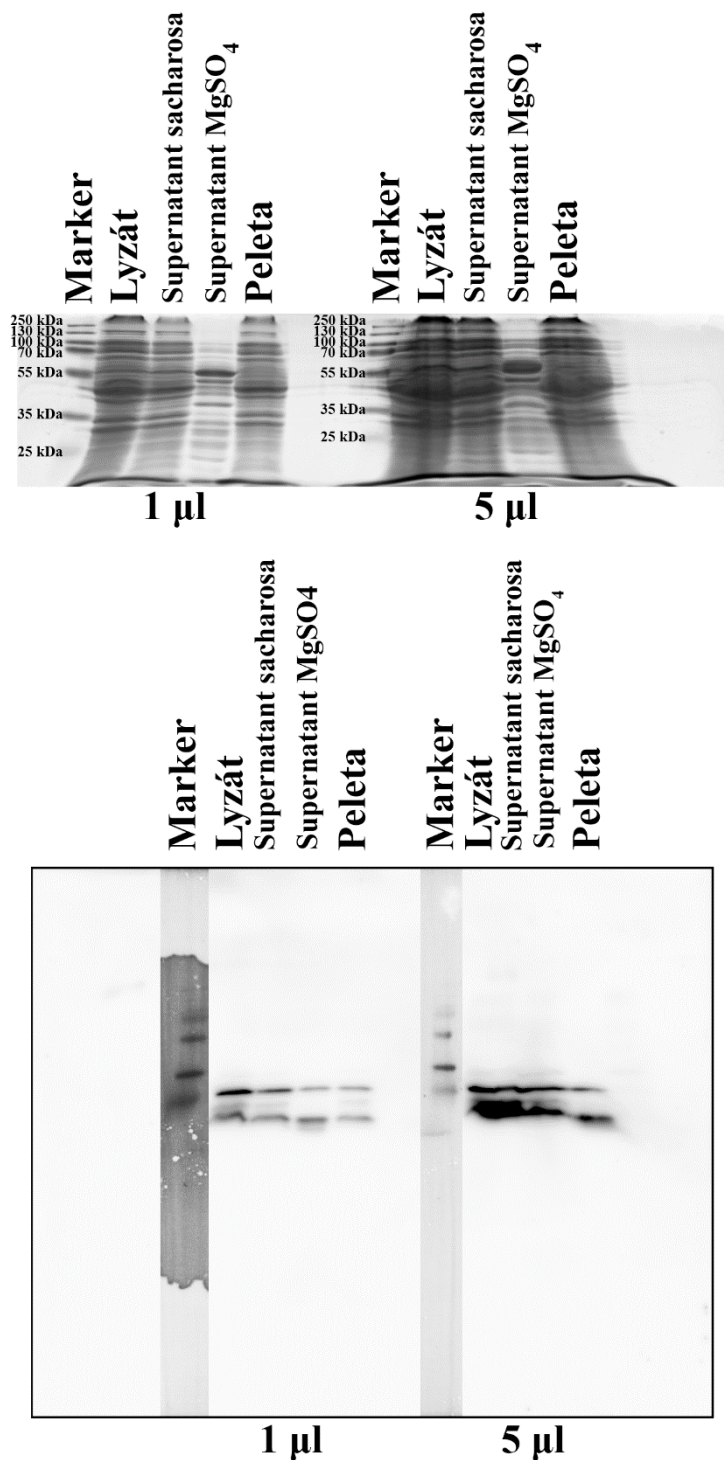
Produkce dsScFv 5D3 HL proběhla znovu ve čtyřnásobném objemu oproti první produkci. Byla odebrána alikvóta bakteriální konzervy natransformovaných TG1F-buněk a přenesena do 20 ml LB média s ampicillinem. Inkubace po dobu 8 hod při 37 °C proběhla pro nastartování buněčné proliferace. 5 ml takto vzniklých kultur bylo přeneseno vždy do 2 litrů 2x YT média, které bylo ponecháno přes noc inkubaci za třepání při 22 °C. Tato teplota byla zvolena pro zpomalení dělení bakterií, které by jinak do dalšího dne výrazně přerostly. I přes toto opatření byly naměřené density všech kultur $OD_{600} = 2,7$.

Indukce i produkce těchto kultur proběhly obdobným způsobem jako v minulém případě. Kulture byly následně centrifugovány a pelety všech přeneseny do jedné nádoby. Díky výraznému objemu spojené pelety bylo přistoupeno k homogenizaci ručním homogenizérem (dle Pottera-Elvehjema) v upraveném extrakčním pufru. Takto získaná frakce byla v nadcházející elektroforéze označována jako „lyzát“.

Tento lyzát byl centrifugován. Vzniklý supernatant byl odebrán pro elektroforézu jako „supernatant sacharosa“. K peletě byl přidán hypotonický roztok 5 mM síranu hořečnatého pro způsobení dalšího osmotického šoku, peleta byla v roztoku resuspendována. Tato suspenze byla centrifugována. Supernatant byl odebrán pro další analýzu jako „supernatant MgSO₄“. Buňky ve vzniklé peletě byly nakonec zcela lyzovány pomocí ultrazvukové sondy.

Důvodem pro tento postup při extrakci byla snaha získat co největší množství proteinu. Kompletní lýza buněk navíc umožnila zcela analyzovat buněčný obsah (včetně cytoplasmy) na přítomnost proteinů. Výsledky elektroforetického a imunochemického stanovení (metodou Western Blot) přítomnosti proteinů v jednotlivých frakcích jsou zobrazeny na *obrázku 11 (str. 53)*.

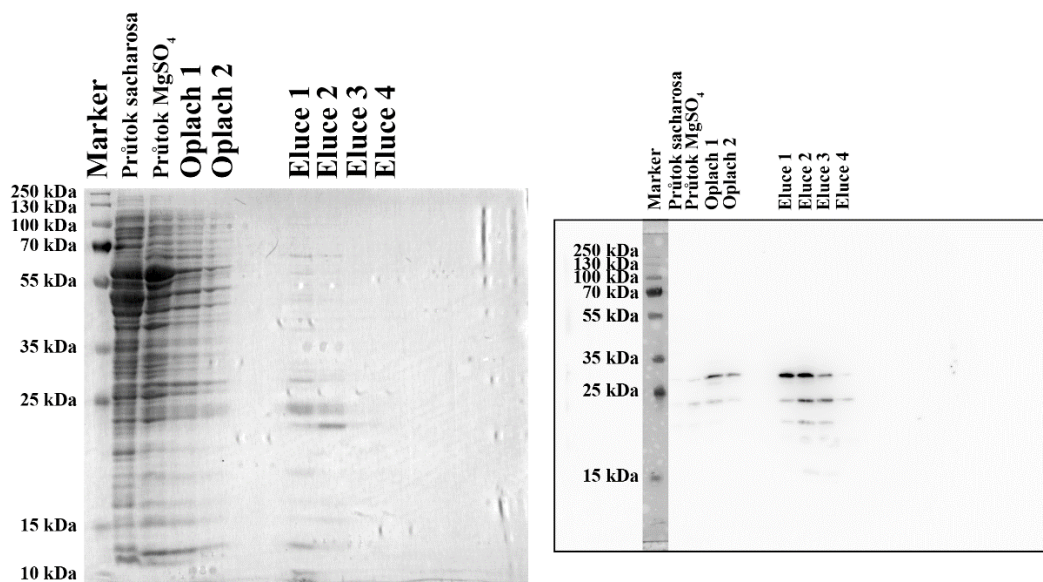
Z analýzy výsledků bylo usouzeno, že extrakce s využitím upraveného periplasmatického extrakčního pufru nebyla dokonalá. Ve frakci získané druhou extrakcí s využitím síranu hořečnatého je stále přítomno menší množství proteinu vykazujícího signál způsobený vazbou Anti-6x-His protilátky. Kvůli problematickému provedení elektroforézy nebylo u PVDF membrány možno uspokojivě určit velikost proužků proteinového standardu. Byl použit předpoklad vycházející z předchozí provedené Western Blot analýzy, že vrchní proužky odpovídají nezkrácenému dsscFv 5D3 proteinu. Zároveň došlo k vzájemnému překrývání signálů na PVDF membráně, odpovídajících 5 μ l naneseného lyzátu a supernatantu sacharosy. Při testovací koloraci membrány roztokem Ponceau S červeně nebylo toto překrývání signálů viditelné, proužky šly lépe rozlišit.



Obrázek 11. Analýza extrahovaných frakcí dsscFv 5D3 HL. Nahoře je gel barvený Coomassie brilantní modří G-250, dole PVDF membrána s proteiny detekovanými Anti-6x-His protilátkou metodou Western Blot. Uvedeny jsou nanesené objemy frakcí v příslušné části gelu/membrány. K PVDF membráně byl přidán výřez standardu molekulární hmotnosti získaný ve fotosystému fotkou při VIS. Doba expozice membrány činila 240 s. Jako proteinový standard (marker) byl použit Page Ruler Plus.

Byla provedena purifikace podruhé produkovaného proteinu dsscFv 5D3 HL. Pro účely co nejvyššího výtěžku byl do kolony přenesen jak supernatant lyzátu (v extrakčním pufru), tak supernatant získaný po přidavku síranu hořečnatého. Purifikační frakce (dle postupu popsaného v kapitole 3.2.8) byly podrobeny elektroforéze a imunochemické analýze metodou Western Blot. Výsledky těchto stanovení jsou zobrazeny na *obrázku 12*.

Purifikované proteiny byly zakonzentrovávány. Frakce eluce 1 byla koncentrována zvlášť do objemu přibližně 850 μ l, frakce elucí 2+3 byly koncentrovány společně do objemu přibližně 1500 μ l. Takto vzniklé roztoky proteinů byly spektrofotometricky měřeny pro získání koncentrací. Dále byly vypočteny molární koncentrace a přibližná celková množství purifikovaných proteinů. Výsledky těchto kroků jsou uvedeny v *tabulce 8 (str. 55)*.



Obrázek 12. Výsledky analýzy jednotlivých frakcí proteinů po purifikaci. Na levé straně obrázku je gel barvený Coomasiie brilantní modří G-250, na pravé PVDF membrána s proteiny detekovanými Anti-6x-His protilátkou metodou Western Blot. K PVDF membráně byl během editace přidán výřez standardu molekulární hmotnosti získaný ve fotosystému fotkou při VIS. Doba expozice membrány činila 60 s. Jako proteinový standard (marker) byl použit Page Ruler Plus. Průtok sacharosa a průtok MgSO₄ označují proteklé frakce po nanesení lyzátu sacharosy a lyzátu MgSO₄.

Z těchto výsledků bylo odvozeno několik zjištění. Prvně, že nanesení proteinu na kolonu zachytilo valnou většinu proteinu na matici. Zároveň však promytí 20 mM imidazolem uvolnilo část dsscFv 5D3 HL z kolony, a tak způsobilo ztrátu výtěžku. Další zhoršení výtěžku způsobila tvorba pravděpodobně zkrácených variant proteinu. S ohledem na tyto kontaminanty se protein dsscFv 5D3 HL zdál být nejčistší v eluční frakci 1.

Tabulka 8. Výsledky spektrofotometrického měření koncentrací vyprodukovaných, purifikovaných a zakonzentrovaných frakcí proteinu dsscFv 5D3 HL. *Výpočet molárních koncentrací a celkových množství proteinů proběhl za předpokladu molárního extinkčního koeficientu $\epsilon_{280} = 2,00 \text{ (mg} \cdot \text{ml}^{-1})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a molární hmotnosti $M = 28\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.*

Frakce	c mg · ml ⁻¹	c μM	V μl	m _{celkové} Mg
Eluce 1	0,226	8,1	850	0,19
Eluce 2+3	0,106	3,8	1500	0,16

Druhou produkcí proteinu dsscFv 5D3 HL se tedy podařilo vyprodukovat a purifikovat přibližně 0,35 mg proteinu (z 8 litrů média). Ve skutečnosti bylo toto množství ještě nižší, vzhledem k jeho poměrně výrazné kontaminaci jinými proteiny i po purifikaci.

Po první produkci dsscFv 5D3 HL bylo ze dvou litrů média získáno přibližně 0,025 mg purifikovaného proteinu. Po druhé bylo z osmi litrů média získáno přibližně 0,35 mg stejného proteinu. V přepočtu bylo z první produkce proteinu na litr média získáno zhruba 12,5 μg proteinu, z druhé produkce potom zhruba 44 μg proteinu na litr média. Množství získaného proteinu na litr bylo tedy během druhé produkce vyšší, což mohlo být způsobeno využitím mnohem více narostlé bakteriální kultury pro indukci. Zároveň je však nutné mít na paměti, že ani v jednom případě nebyl získán protein zcela čistý. Podle elektroforézou získaných gelů byl první produkovaný dsscFv 5D3 HL zdánlivě čistější. Je však možné, že se kontaminace na prvním gelu neprojeví vzhledem k celkově menšímu množství proteinů ve vzorcích nanesených do gelu.

4.7 Stanovení disociační konstanty proteinů

K analýze disociačních konstant proteinů byla zvolena imunochemická metoda ELISA. Tato metoda byla zvolena z důvodu snadného porovnání získaných výsledků s výsledky dostupnými v publikované literatuře, snadného provedení a předchozích zkušeností autora této práce.

Uspořádání ELISA „sendviče“ bylo v pořadí od povrchu jamek destičky následující. Pro detekci variant scFv 5D3 a dsscFv 5D3 byl na povrch nejdříve navázán streptavidin. Na streptavidin pomocí vazby avidin-biotin byla navázána rekombinantní lidská Avi-GCPII, na něj jednořetězcové protilátky obsahující 6x His Tag. Na tento následně nasedala Anti-6x-His protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou. Reakcí křenové peroxidasy (HRP) se substrátem TMB a peroxidem vodíku bylo docíleno signálu detekovatelného při $\lambda = 450 \text{ nm}$. Pro protilátku 5D3 bylo uspořádání až do nasednutí scFv fragmentu na Avi-GCPII obdobné, její sekundární protilátkou však byla GAM-HRP (kozí anti-myší protilátka konjugovaná s křenovou peroxidasou), která byla detekována stejně jako Anti-6x-His protilátka.

Navázání Avi-GCPII přes streptavidin probíhalo s využitím Avi-tagu, který je při rekombinantní expresi ve vhodných bakteriálních kmenech specificky biotinylován. Biotin má k avidinu (a potažmo streptavidinu) vysokou afinitu, která umožňuje velmi specifickou vazbu. Toto uspořádání na desce typu Maxisorp bylo zvoleno pro předchozí zkušenosti s detekcí protilátek proti GCPII. Nepřímé navázání GCPII na desku umožňuje zachování jeho přirozené terciární struktury detekovatelné protilátkou 5D3 a jejími deriváty.

Jediným dostupným streptavidinem byl streptavidin o neznámé koncentraci. S využitím spektrofotometru byla zjištěna koncentrace streptavidinu v roztoku (absorbance 3,2 při $\lambda = 280$ odpovídá koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ streptavidinu) oproti slepému vzorku vody. Zprůměrováním tří měření byla zjištěna koncentrace $c(\text{streptavidin}) = 1,0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tento výsledek je vzhledem k běžně používaným laboratorním ředěním proteinů pravděpodobný, i když měření bylo vztaženo ke slepému vzorku, který nemusel odpovídat složení solventu, ve kterém streptavidin byl. Tento streptavidin byl ředěn v pufru TBS na koncentraci $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Výsledná koncentrace streptavidinu a použitý vazebný roztok byly zvoleny pro předchozí zkušenosti se

standardně prováděnými ELISA v laboratoři. Pro vyšší účinnost navázání streptavidinu na povrch jamek destičky bylo provedeno vázání přes noc.

Po promytí promývačkou následovala blokace 5% roztokem BSA v PBS pufru. Tento krok slouží pro nasycení povrchu jamek proteinem, a tak k omezení nespecifických vazeb, ke kterým může docházet v dalších krocích. Dále byla přidána lidská rekombinantní GCPII nesoucí Avi-tag, který zajistil interakci se streptavidinem.

Pro stanovení disociační konstanty byla využita spojená frakce dsscFv 5D3 HL elucí 2+3 (viz kapitola 4.6) o koncentraci 3,8 μM . Jako kontrola sloužil produkovaný protein scFv 5D3 HL o koncentraci 12 μM .

K jamkám obsahující vázanou GCPII byly dále přidávány roztoky protilátek a jejich derivátů. Ředění všech těchto proteinů bylo zvoleno tak, aby byly s co největší pravděpodobností popsány pozice obou plató sigmoidní křivky (viz dále). Počáteční ředění dsscFv bylo, vzhledem k nízké koncentraci a již provedenému testovacímu experimentu, zvoleno 1x (3,8 μM). Tento protein byl tak do prvního dubletu přidán neředěný. První ředění scFv 5D3 HL bylo zvoleno tak, aby ředící řada začínala stejnou koncentrací jako řada dsscFv. Toto ředění činilo 3x v PBS. Protilátka 5D3 byla nejdříve ředěna 100x v PBS (počáteční koncentrace činila tedy 400 nM.) Následně byly vytvořeny dvojkové šestnáctibodové ředící řady všech proteinů.

Do jamek náležících 1.-3. ředění dsscFv 5D3 HL a scFv 5D3 HL byly roztoky těchto proteinů přidány automatickou pipetou s rozsahem 10 – 300 μl . Do této pipety bylo možné dávat pouze špičky na 300 μl nebo na 1000 μl . Jelikož nebyly menší špičky dostupné, bylo přikročeno k používání špiček větších. S většími špičkami (při pipetovaných objemech 50 μl) však měla pipeta tendenci pěnit roztoky a nasávat vzduch. Pravděpodobně kvůli těmto obtížím s pipetováním byly získány vysoké hodnoty chyb pro několik prvních bodů křivek (viz dále).

Sekundární protilátkou proti scFv 5D3 HL a dsscFv 5D3 HL byla Anti-6x-His protilátka konjugovaná s HRP. Sekundární protilátkou proti 5D3 byla GAM-HRP, kozi anti-myší protilátka konjugovaná s HRP

Po provedení barvicí reakce byly na spektrofotometru pro 96-jamkové destičky proměřeny signály jednotlivých jamek. Neupravovaná získaná data jsou uvedena v *tabulce 9*. Zpracovaná data jsou uvedena v *tabulce 10*.

Tabulka 9. Výsledky spektrofotometrického měření A_{450} v jamkách 96-jamkové destičky použité při metodě ELISA. Vnější čísllice a písmena označují souřadnicovou polohu jamky.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.597	1.976	0.056	0.054	2.233	2.028	0.324	0.242	1.995	1.719	0.042	0.043
B	1.948	1.853	0.055	0.051	2.030	1.943	0.152	0.113	1.963	1.668	0.044	0.043
C	1.405	1.388	0.056	0.055	1.837	2.198	0.085	0.073	1.957	1.459	0.052	0.052
D	0.446	0.492	0.051	0.051	1.915	1.997	0.060	0.057	1.965	1.172	0.051	0.050
E	0.105	0.100	0.064	0.049	2.074	1.856	0.055	0.053	1.898	0.948	0.050	0.048
F	0.064	0.059	0.053	0.051	2.026	1.867	0.058	0.051	1.969	0.595	0.080	0.092
G	0.054	0.052	0.051	0.052	1.232	1.267	0.051	0.051	1.907	0.454	0.061	0.066
H	0.052	0.053	0.053	0.050	0.680	0.659	0.057	0.060	1.934	0.380	0.072	0.074

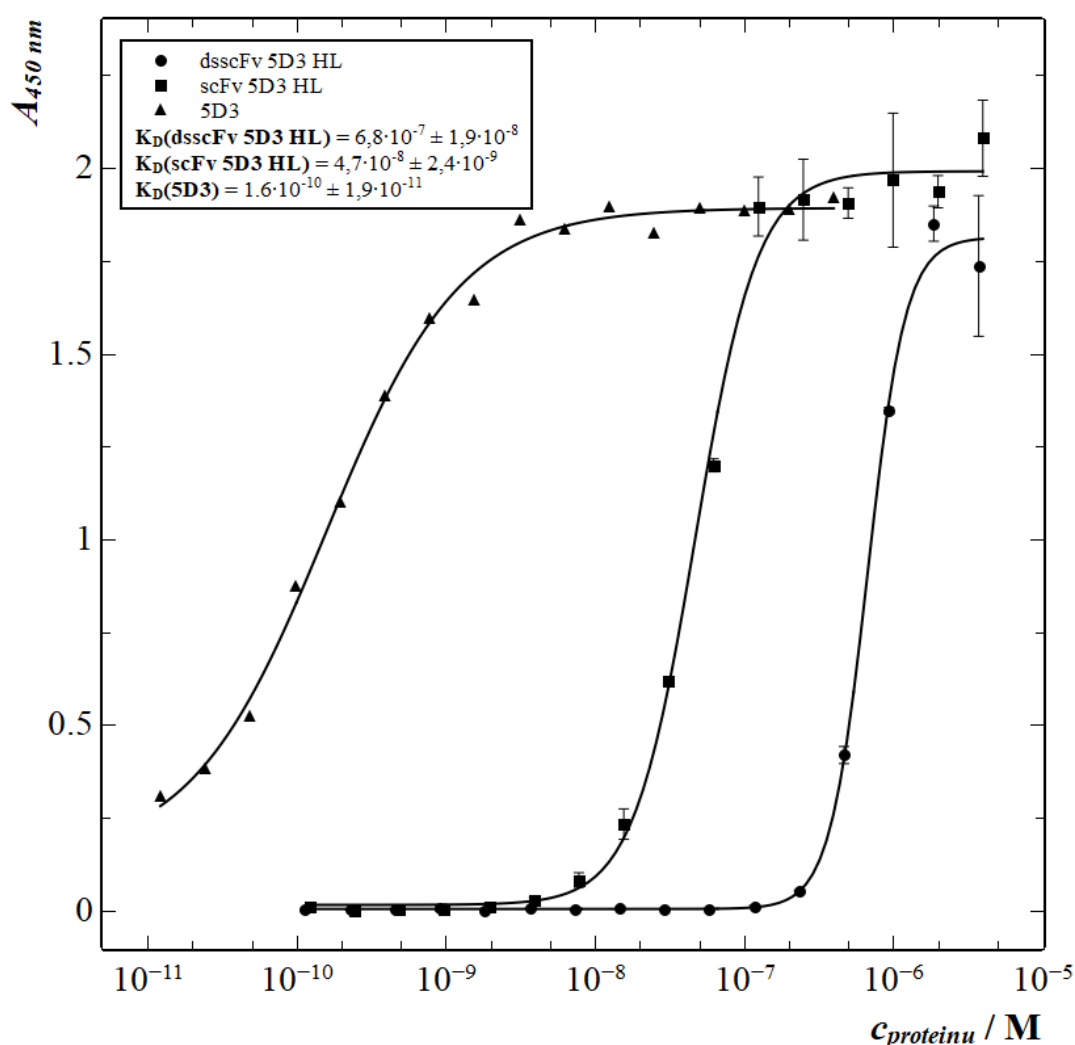
Tabulka 10. Statisticky zpracovaná data získaná ze spektrofotometrického měření jamek 96-jamkové destičky použité při metodě ELISA. Veličiny \bar{A}_{450} označují zprůměrovanou hodnotu získaných absorbancí ($n=2$). Koncentrace jsou uváděny na tři platné číslice, průměry absorbancí a jejich odchylky, získané výpočtem směrodatné odchylky základního vzorku, jsou uvedeny na tři desetinná místa kvůli charakteru měření.

dsscFv 5D3			scFv 5D3			5D3		k1	k2	k3
c nM	\bar{A}_{450}	σ nM	c nM	\bar{A}_{450}	σ nM	c nM	A_{450}	\bar{A}_{450}	\bar{A}_{450}	\bar{A}_{450}
3800	1.787	0.190	4000	2.131	0.103	400	1.995	0,043	0,051	0,074
1900	1.901	0.048	2000	1.987	0.043	200	1.963			
950	1.397	0.009	1000	2.018	0.181	100	1.957			
475	0.469	0.023	500	1.956	0.041	50	1.965			
238	0.103	0.003	250	1.965	0.109	25	1.898			
119	0.062	0.003	125	1.947	0.079	12.5	1.969			
59.4	0.053	0.001	62.5	1.250	0.018	6.25	1.907			
29.7	0.053	0.001	31.3	0.670	0.011	3.13	1.934			
14.8	0.055	0.001	15.6	0.283	0.041	1.56	1.719			
7.42	0.053	0.002	7.81	0.133	0.020	0.781	1.668			
3.71	0.056	0.001	3.91	0.079	0.006	0.391	1.459			
1.86	0.051	0.000	1.95	0.059	0.002	0.195	1.172			
0.928	0.057	0.008	0.977	0.054	0.001	0.0977	0.948			
0.464	0.052	0.001	0.488	0.055	0.004	0.0488	0.595			
0.232	0.052	0.001	0.244	0.051	0.000	0.0244	0.454			
0.116	0.052	0.002	0.122	0.059	0.002	0.0122	0.380			

K vytvoření grafu byla použita aplikace QtiPlot. Pro abscisu bylo využito dekadické logaritmické škály, která převedla vazebnou závislost do sigmoidní podoby. Následně byly experimentální body všech jednotlivých stanovení proloženy *funkcí* (3),

$$A = d + \frac{a-d}{1+\left(\frac{c}{K_D}\right)^b} \quad (3)$$

kde A je absorbance, a minimální hodnota absorbance, d maximální hodnota absorbance, c je koncentrace uváděná v $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, K_D je pozice inflexního bodu/disociační konstanty a b je Hillův koeficient. Vzniklý graf je zobrazen na *obrázku 14*.



Obrázek 14. Graf zobrazující experimentální body získané spektrofotometrickým měřením A_{450} proteinů se snižující se koncentrací v rámci metody ELISA. Symboly ● označují experimentálně získané body dsscFv 5D3 HL, ■ body scFv 5D3 HL a ▲ body 5D3 protilátky. Hodnoty K_D v legendě označují zjištěné pozice inflexních bodů jednotlivých křivek.

Hodnoty získaných disociačních konstant jednotlivých proteinů jsou uvedeny v *tabulce 11* na dvě platné číslice.

Tabulka 11. Hodnoty získaných inflexních bodů při proložení experimentálních bodů získaných metodou ELISA. Body byly proloženy *sigmoidní funkcí obsahující disociační konstantu jako parametr. Rozptyl disociačních konstant vychází z chyb proložení křivkou.*

Varianta	K_d M
dsscFv 5D3 HL	$6,8 \cdot 10^{-7} \pm 1,9 \cdot 10^{-8}$
scFv 5D3 HL	$4,7 \cdot 10^{-8} \pm 2,4 \cdot 10^{-9}$
5D3	$1,6 \cdot 10^{-10} \pm 1,9 \cdot 10^{-11}$

Zjištěné hodnoty disociačních konstant jsou pouze přibližné. Uvedené rozptyly vychází pouze z chyb proložení křivkami experimentálními body a nepočítají s dalšími chybovými faktory, na která jsou stanovení metodou ELISA citlivá. Zároveň nebyly testované proteiny v roztoku čisté. Jak lze vidět na *obrázku 10 (str. 50)* a *obrázku 12 (str. 54)*, purifikovaná scFv 5D3 HL byla méně kontaminovaná jinými proteiny než dsscFv 5D3 HL. Tato skutečnost poskytuje možné vysvětlení zhoršení vazebných vlastností disulfidicky stabilizované varianty, která by jinak měla mít vazebné vlastnosti podobné scFv variantě. Další nepřesnost byla způsobena spektrofotometrickým měřením koncentrací.

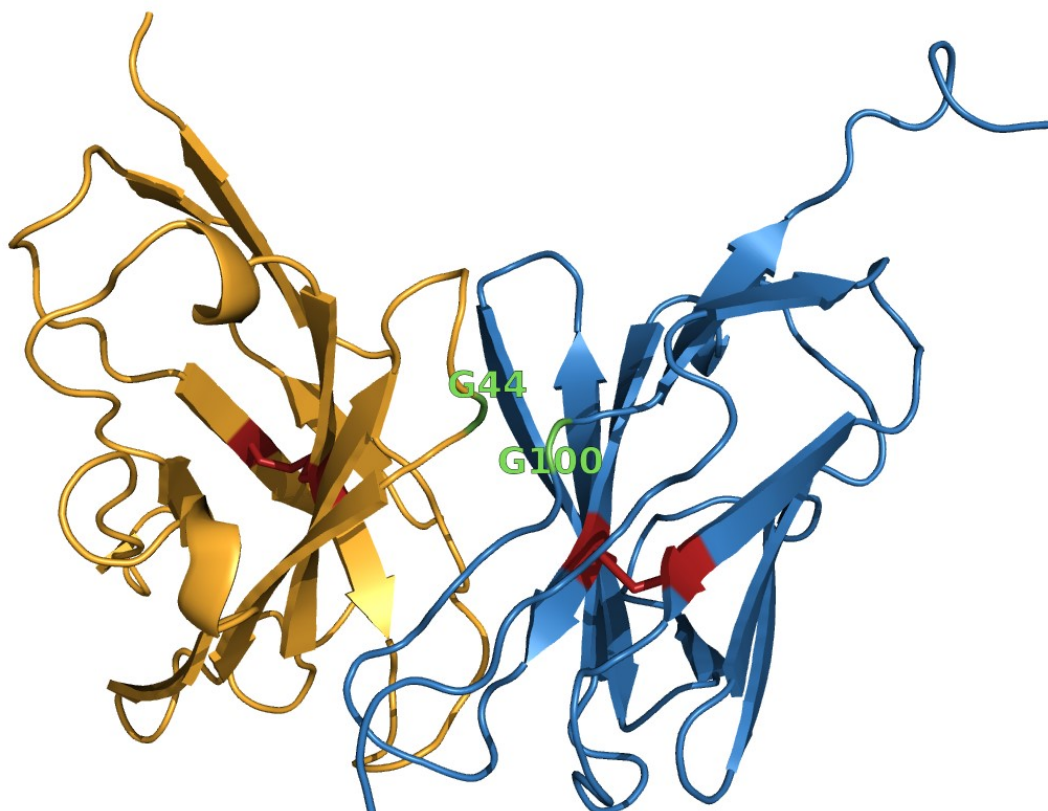
Střední hodnota stanovené disociační konstanty 5D3, $K_d(5D3, \text{stanovená}) = 0,16 \text{ nM} \pm 0,019 \text{ nM}$, je velmi blízká disociační konstantě uvedené v literatuře, $K_d(5D3, \text{literatura}) = 0,14 \text{ nM} \pm 0,01 \text{ nM}$.³⁴ Testování disociační konstanty této protilátky sloužilo primárně jako kontrola.

Hodnota disociační konstanty scFv 5D3 HL dostupná v literatuře činí $K_d(\text{scFv } 5D3 \text{ HL, literatura}) = 5,8 \text{ nM}$.³⁵ V této práci stanovená střední hodnota disociační konstanty, $K_d(\text{scFv } 5D3 \text{ HL, stanovená}) = 47 \text{ nM} \pm 2,4 \text{ nM}$, je řádově vyšší. Autor této práce se domnívá, že byla zvýšená hodnota disociační konstanty způsobena kontaminací purifikovaného proteinu. Experiment stanovení disociační konstanty v citované literatuře byl kvalitně proveden a ověřen i druhým experimentem s využitím průtokové cytometrie.³⁵

Pro stanovení disociační konstanty dsscFv 5D3 HL neexistuje v literatuře srovnání, operovalo se však s předpokladem, že stabilizovaná varianta proteinu má disociační konstantu podobnou (či lepší) než nestabilizovaná forma. Stanovená hodnota $K_d(\text{dsscFv 5D3 HL, stanovená}) = 680 \text{ nM} \pm 19 \text{ nM}$ má svoji střední hodnotu o dva řády vyšší, než je v literatuře dostupná stanovená hodnota disociační konstanty scFv 5D3 HL. Důvodem pro zvýšení disociační konstanty proteinu by mohla být kontaminace ostatními proteiny. V analyzovaném roztoku bylo tak méně dsscFv 5D3 HL, než jaká byla naměřená koncentrace. Zjištění skutečné koncentrace bylo na základě získaných dat nemožné. Protože byl všechn vyprodukovaný protein v rámci experimentů spotřebován, nemohlo být přistoupeno k dalším stanovením.

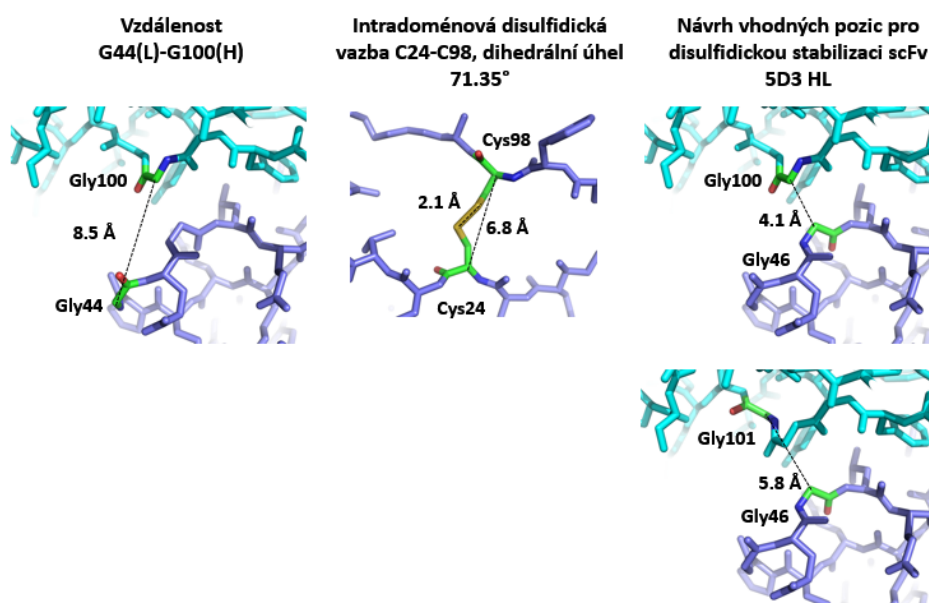
4.8 Trojrozměrná struktura scFv 5D3 HL

Po ukončení experimentální části této práce byla vyřešena krystalová struktura proteinu scFv 5D3 HL s využitím rentgenové difrakce v synchrotronu Bessy II v německém Helmholtz Zentrum Berlin. Vyřešená trojrozměrná struktura o rozlišení 2,13 Å je zobrazena na *obrázku 15*.



Obrázek 15. Trojrozměrná struktura proteinu scFv 5D3 HL. Vizualizace proběhla v aplikaci PyMol 1.8 jako „karikatura“.¹⁴ Oranžově je vynesena lehký variabilní řetězec, modře těžký variabilní řetězec. Červeně jsou zobrazeny cysteiny tvořící ve struktuře intradoménový disulfidické vazby. Zeleně jsou znázorněny glyciny na pozicích G44 a G100 dle Kabat číslování, odpovídající pozicím 46 a 240 dle standardního číslování. Osmnáct aminokyselin dlouhý pojící peptidový řetězec není zobrazen.

Nejdůležitějším zjištěním vyplývajícím z vyřešené struktury scFv 5D3 HL byla vzdálenost mezi dvěma alfa uhlíky aminokyselin na pozicích G44 a G100 (Kabat číslování). Po záměnách G44C a G100C bylo očekáváno, že rezidua těchto dvou blízko sobě se nacházejících aminokyselin vytvoří disulfidickou vazbu, a tak stabilizují strukturu celého proteinu. Tento předpoklad byl vyvrácen. Jak je znázorněno na *obrázku 16*, přejatém od RNDr. Zory Novákové, PhD. a upraveném autorem, vzdálenost alfa uhlíků aminokyselin G44 a G100 (dle Kabat číslování) byla stanovena na 8,5 Å s tím, že aminokyselinové zbytky míří od sebe. Vzdálenost alfa uhlíků cysteinů C24 a C98 tvořících intradoménový disulfidický můstek v odlišné části jednořetězcového variabilního fragmentu činí 6,8 Å a rezidua míří k sobě. Tato vzdálenost a orientace umožňuje vznik disulfidického můstku o délce 2,1 Å (obvyklá délka -S-S- vazby činí 2,05 Å). Je tedy nanejvýš pravděpodobné, že záměnami G44C a G100C v scFv 5D3 HL proteinu nemůže vzniknout stabilizující disulfidický můstek kvůli nepříznivému úhlu a vzdálenosti aminokyselinových zbytků.



Obrázek 16. Výřezy vyřešené struktury scFv 5D3 HL. Zobrazeny jsou vzdálenosti některých významných aminokyselinových zbytků. Zeleně jsou vybarveny skelety aminokyselin vybraných pro tvorbu SS vazby, žlutě disulfidická vazba.

Zároveň byly objeveny dvě dvojice vhodně orientovaných a vzdálených glycinů (G100 a G46, G101 a G46), které by mohly být cílem budoucích snah stabilizace jednořetězcového variabilního fragmentu 5D3. Další výpočty ukázaly, že dvojice G101 G46 nese, vzhledem k vhodnému úhlu potenciálně vzniklé disulfidické vazby, největší potenciál pro vývoj disulfidicky stabilizované verze scFv 5D3 HL.

5. Závěr

Cílem experimentální části této práce byla produkce, purifikace a charakterizace proteinu dsscFv 5D3. Tento protein byl odvozen od existujícího jednořetězcového variabilního fragmentu protilátky 5D3, označovaného jako scFv 5D3 HL. Aminokyselinovými záměnami G44C a G100C mělo být docíleno stabilizace tvorbou interdoménové disulfidické vazby mezi cysteinovými zbytky.

Produkce proběhla s využitím metod proteinového inženýrství v expresním systému *Escherichia coli*. Zaklonovány byly dvě varianty dsscFv 5D3 (varianta HL a LH) lišící se svými sekvencemi, produkována byla pouze varianta dsscFv 5D3 HL. Purifikace proběhla pomocí afinitní chromatografie na imobilizovaných nikelnatých iontech s využitím histidinové sekvence vnesené do sekvence proteinu.

Protein dsscFv 5D3 HL byl charakterizován s ohledem na svoji disociační konstantu imunochemickou metodou ELISA, společně s originálním scFv 5D3 HL a protilátkou 5D3 jako kontrolou.

Střední hodnota disociační konstanty dsscFv 5D3 HL byla stanovena na 680 nM, tento výsledek byl však zatížen velkou chybou způsobenou kontaminací testovaného vzorku.

Analýza disociační konstanty a výtěžku dsscFv 5D3 HL ukázala, že zavedení disulfidického můstku v pozicích C44/C100 nezvýšilo stabilitu konstruktů. Byl diskutován důvod, proč nemohla vést zvolená strategie stabilizace scFv 5D3 HL k pozitivnímu výsledku. Tento důvod vycházel z pozdějšího vyřešení krystalové struktury proteinu. Byly navrženy alternativní způsoby stabilizace, které však již nebyly předmětem této bakalářské práce.

S ohledem na dosavadní výsledky tvorby derivátů protilátky 5D3, specificky vážící významný marker karcinomu prostaty, lze očekávat vysoký potenciál budoucího využití tohoto přístupu pro neinvazivní detekci karcinomu prostaty i některých dalších nádorových onemocnění.

6. Seznam literatury

1. <http://svod.cz/report.php?diag=C61&type=pdf> (Přístup 20.3.2019).
2. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **68**, 394–424 (2018).
3. Pavlíček, J., Ptáček, J. & Barinka, C. Glutamate carboxypeptidase II: an overview of structural studies and their importance for structure-based drug design and deciphering the reaction mechanism of the enzyme. *Curr. Med. Chem.* **19**, 1300–1309 (2012).
4. Yao, V. & Bacich, D. J. Prostate specific membrane antigen (PSMA) expression gives prostate cancer cells a growth advantage in a physiologically relevant folate environment in vitro. *Prostate* **66**, 867–875 (2006).
5. Berger, U. V., Carter, R. E., McKee, M. & Coyle, J. T. N-acetylated alpha-linked acidic dipeptidase is expressed by non-myelinating Schwann cells in the peripheral nervous system. *J. Neurocytol.* **24**, 99–109 (1995).
6. Sácha, P. *et al.* Expression of glutamate carboxypeptidase II in human brain. *Neuroscience* **144**, 1361–1372 (2007).
7. Chang, S. S. *et al.* Five Different Anti-Prostate-specific Membrane Antigen (PSMA) Antibodies Confirm PSMA Expression in Tumor-associated Neovasculature. *Cancer Res* **59**, 3192–3198 (1999).
8. A. Foss, C., C. Mease, R., Y. Cho, S., J. Kim, H. & G. Pomper, M. GCPII Imaging and Cancer. *Current Medicinal Chemistry* **19**, 1346–1359 (2012).

9. Zhou, J., Neale, J. H., Pomper, M. G. & Kozikowski, A. P. NAAG peptidase inhibitors and their potential for diagnosis and therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* **4**, 1015–1026 (2005).
10. Bařinka, C., Rojas, C., Slusher, B. & Pomper, M. Glutamate Carboxypeptidase II in Diagnosis and Treatment of Neurologic Disorders and Prostate Cancer. *Curr Med Chem* **19**, 856–870 (2012).
11. Hlouchova, K., Barinka, C., Konvalinka, J. & Lubkowski, J. Structural insight into the evolutionary and pharmacologic homology of glutamate carboxypeptidases II and III. *The FEBS Journal* **276**, 4448–4462 (2009).
12. Barinka, C. *et al.* Identification of the N-glycosylation sites on glutamate carboxypeptidase II necessary for proteolytic activity. *Protein Sci* **13**, 1627–1635 (2004).
13. Mesters, J. R. *et al.* Structure of glutamate carboxypeptidase II, a drug target in neuronal damage and prostate cancer. *The EMBO Journal* **25**, 1375–1384 (2006).
14. Schrödinger, LLC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. (2015).
15. Michal Navrátil. Human glutamate carboxypeptidases II and III, dizertační práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy. (2016).
16. Murphy, G. P., Su, S., Jarisch, J. & Kenny, G. M. Serum levels of PSMA. *The Prostate* **42**, 318–319 (2000).
17. Kenneth Murphy & Casey Weaver. *Janeway's immunobiology*. (New York, NY : Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC, [2017]).
18. antibody | Definition, Structure, Function, & Types. *Encyclopedia Britannica*
Dostupné na: <https://www.britannica.com/science/antibody>. (Přístup 31.3.2019)
19. *Antibody Engineering Volume 1*. (Springer-Verlag, 2010).

20. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2018. *NobelPrize.org* Available at: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2018/summary>. (Přístup: 31.3.2019)
21. *Antibody Engineering Volume 2*. (Springer-Verlag, 2010).
22. Walter, R. B., Appelbaum, F. R., Estey, E. H. & Bernstein, I. D. Acute myeloid leukemia stem cells and CD33-targeted immunotherapy. *Blood* **119**, 6198–6208 (2012).
23. Ellis, R. J. *et al.* Ten-year outcomes: the clinical utility of single photon emission computed tomography/computed tomography capromab pendetide (Prostascint) in a cohort diagnosed with localized prostate cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **81**, 29–34 (2011).
24. Zuckier, L. S. & DeNardo, G. L. Trials and tribulations: oncological antibody imaging comes to the fore. *Semin Nucl Med* **27**, 10–29 (1997).
25. Haseman, M. K., Rosenthal, S. A. & Polascik, T. J. Capromab Pendetide imaging of prostate cancer. *Cancer Biother. Radiopharm.* **15**, 131–140 (2000).
26. Vallabhajosula, S. *et al.* Pharmacokinetics and biodistribution of ¹¹¹In- and ¹⁷⁷Lu-labeled J591 antibody specific for prostate-specific membrane antigen: prediction of ⁹⁰Y-J591 radiation dosimetry based on ¹¹¹In or ¹⁷⁷Lu? *J. Nucl. Med.* **46**, 634–641 (2005).
27. Smith-Jones, P. M. *et al.* In vitro characterization of radiolabeled monoclonal antibodies specific for the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.* **60**, 5237–5243 (2000).
28. Nikola Bělousová. Lidská glutamát karboxypeptidasa II (GCPII) a deriváty protilátek využitelné k její detekci, bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy (2016).

29. Skerra, A. & Pluckthun, A. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science* **240**, 1038–1041 (1988).
30. Christiansen, J. & Rajasekaran, A. K. Biological impediments to monoclonal antibody-based cancer immunotherapy. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 1493–1501 (2004).
31. Bird, R. E. *et al.* Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**, 423–426 (1988).
32. Ridgway, J. B., Presta, L. G. & Carter, P. ‘Knobs-into-holes’ engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. *Protein Eng.* **9**, 617–621 (1996).
33. Zhu, Z., Presta, L. G., Zapata, G. & Carter, P. Remodeling domain interfaces to enhance heterodimer formation. *Protein Sci* **6**, 781–788 (1997).
34. Nováková, Z. *et al.* Novel Monoclonal Antibodies Recognizing Human Prostate-Specific Membrane Antigen (PSMA) as Research and Theranostic Tools. *The Prostate* **77**, 749–764 (2017).
35. Nikola Bělousová. Deriváty protilátek využitelné k detekci lidské glutamátkarboxypeptidasy II., diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy (2018).
36. Sezonov, G., Joseleau-Petit, D. & D’Ari, R. *Escherichia coli* Physiology in Luria-Bertani Broth. *J Bacteriol* **189**, 8746–8749 (2007).
37. Baneyx, F. & Mujacic, M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1399–1408 (2004).
38. Ritz, D. & Beckwith, J. Roles of Thiol-Redox Pathways in Bacteria. *Annual Review of Microbiology* **55**, 21–48 (2001).
39. Plückthun, A. & Skerra, A. Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Meth. Enzymol.* **178**, 497–515 (1989).

40. Schiweck, W. & Skerra, A. Fermenter production of an artificial fab fragment, rationally designed for the antigen cystatin, and its optimized crystallization through constant domain shuffling. *Proteins* **23**, 561–565 (1995).
41. <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis.html?SID=fr-geneart-main>. (Přístup 29.3.2019).
42. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/na1020bul.pdf>. (Přístup 29.3.2019).
43. Corporation, Z. R. Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit.
https://files.zymoresearch.com/protocols/_D4001T_D4001_D4002_D4007_D4008_Zymoclean_Gel_DNA_Recovery_Kit_ver_1_2_1_LKN-SW_.pdf (Přístup 11.4.2019)
44. QIAprep Spin Miniprep Kit - QIAGEN. Dostupné na:
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=56b0162c-23b0-473c-9229-12e8b5c8d590&lang=en>. (Přístup 11.4.2019)
45. ExPASy - ProtParam tool. Available at: <https://web.expasy.org/protparam/>. (Přístup 7.4.2019)

