

Abstrakt

Skafohy jsou proteiny s vysokou konformační stabilitou, díky kterým mohou být do určitých úseků proteinu zaváděny vícečetné mutace. I přes tyto mutace zůstává celková strukturální integrita proteinu zachována, stejně tak jeho fyzikálně-chemické vlastnosti. Mutacemi získává daný skafold nové vlastnosti, přičemž ve většině případů se jedná o vazebnou specifitu vůči předem určené molekule. Hlavní výhodou skafoldů je malá velikost, stabilita, nízká výrobní cena a snadnost přípravy. Skafold, se kterým bylo v této práci pracováno, je unikátní tím, že měl navržené dva vazebné povrchy, na kterých mohl být mutován. Každý z obou vazebných povrchů je možné nezávisle mutovat tak, aby na nich vzniklo vazebné místo pro jiný protein. V našem případě šlo o mutace vedoucí k vazbě dvou různých receptorů lidského cytokinu. Mutace se provádí pomocí kvasinkového displeje, jednou z metod řízené evoluce. Předmětem této diplomové práce je přenesení vazebných proteinů z kvasinkového expresního systému do systému bakteriálního, jejich produkce a purifikace a jejich následná charakterizace pomocí vybraných biofyzikálních metod. Pomocí těchto metod byla hodnocena stabilita struktury vazebných proteinů, jejich teplotní stabilita a vazebná afinita vůči oběma receptorům. Širším cílem projektu, jehož je tato práce součástí, je navrhnout, vytvořit a charakterizovat vazebný protein, který bude specificky vázat oba cytokinové receptory a simulovat tím funkci přirozeného cytokinu, tedy vázat se na daný receptorový komplex a spouštět signalizaci vedoucí k imunitní odpovědi. Vazebné proteiny mají potenciální diagnostické a léčebné použití při léčbě autoimunitních onemocnění.

Klíčová slova: skafold, cytokin, řízená evoluce proteinů, kvasinkový displej, DLS, MST, CD, teplotní stabilita, gelová permeační chromatografie