

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Biofyzikální chemie



Bc. Robin Kryštůfek

**Vývoj instrumentace a metod s vysokou propustností pro hledání a validaci
peptidových ligandů**

**Development of instrumentation and high-throughput screening methods
for peptide ligand discovery and validation**

Diplomová práce

Školitel: prof. RNDr. Jan Konvalinka CSc.

Praha 2021

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele prof. RNDr. Jana Konvalinky, CSc. a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.6.2021

.....

Bc. Robin Kryštůfek

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli Janu Konvalinkovi za profesionální vedení v průběhu přípravy diplomové práce a předchozí a jistě i další práce na oddělení proteas lidských patogenů. Stejný dík patří i Pavlu Šáchovi, který se rovným dílem zasloužil o zdárné dokončení této práce svými radami a pomocí.

Cennou zpětnou vazbu při vývoji hardware poskytli Michal Lebl a Ondřej Pačes, jimž bych zde rád poděkoval, stejně jako Pavlu Majerovi a Martinu Hradilkovi za diskuze o technických aspektech syntézy peptidů. Velký dík též patří Radku Součkovi za bezpočet provedených analýz a měření, často na poslední chvíli a v pátek odpoledne. Dále bych rád poděkoval Philipu Drobisovi, Ivaně Klikarové a Filipu Trajhanovi, kteří spolupracovali na testování nových funkcí syntetizátoru v první linii, přípravou vlastních peptidových knihoven.

Velikou pomocí při vytvoření automatizované verze mRNA display byla spolupráce s Klárou Hlouchovou a Valeriem Guidem Giacobellim, jimž za jejich cenné rady a sdílené zkušenosti s touto metodou velmi děkuji. Poděkování patří i mé rodině za podporu v průběhu studia a přípravy diplomové práce.

Obsah

| | |
|--|----|
| Seznam zkratk | 1 |
| Abstract | 3 |
| Abstrakt | 4 |
| 1. Teoretická část | 5 |
| 1.1. Peptidy | 5 |
| 1.1.1. Syntéza na pevné fázi | 6 |
| 1.1.2. Automatizace syntézy | 9 |
| 1.1.3. <i>In vitro</i> evoluce | 11 |
| 1.2. Proteinové cíle připravovaných peptidových knihoven | 16 |
| 1.2.1. Imunoglobuliny | 17 |
| 1.2.2. Strukturní proteiny SARS-CoV-2 | 18 |
| 1.2.3. Aspartátová proteasa May1 | 18 |
| 2. Cíle práce | 19 |
| 3. Materiál a metody | 20 |
| 3.1. Materiál a chemikálie | 20 |
| 3.2. Syntéza peptidů na pevné fázi | 23 |
| 3.2.1. Syntetizátor SPENSER | 23 |
| 3.2.2. Pracovní postup | 32 |
| 3.3. Štěpení peptidů z Rinkovy amidové pryskyřice | 34 |
| 3.4. Disulfidová cyklizace peptidů na pryskyřici | 36 |
| 3.5. Analýza preparací peptidů | 37 |
| 3.5.1. Stanovení inhibičních konstant Fc-III variant | 39 |
| 3.5.2. Měření aktivity statinových inhibitorů May1 | 40 |
| 3.6. Vyhodnocení parametrů přenosu kapalin | 41 |
| 3.7. Časoběrné měření tlaku a objemu | 41 |
| 3.8. Protokol ToRNAdo | 43 |
| 3.8.1. Popis protokolu | 43 |
| 3.8.2. Pracovní postup | 47 |
| 3.8.2.1. Transkripce T7 RNA polymerasou | 49 |
| 3.8.2.2. Odstranění templátu DNAsou I | 50 |

| | |
|--|----|
| 3.8.2.3. Hybridizace mRNA-DNA | 50 |
| 3.8.2.4. Y ligace T4 RNA ligasou 1 | 51 |
| 3.8.2.5. <i>In vitro</i> translace | 51 |
| 3.8.2.6. Fúze peptidu a nukleové kyseliny | 52 |
| 3.8.2.7. Chelatace | 52 |
| 3.8.2.8. Ultrafiltrace konjugátu | 52 |
| 3.8.2.9. Vazba na pryskyřici | 53 |
| 3.8.2.10. Filtrace pryskyřice | 53 |
| 3.8.2.11. Promytí pryskyřice | 54 |
| 3.8.2.12. Uvolnění konjugátu a nasednutí primerů | 54 |
| 3.8.2.13. Reverzní transkripce a sestavovací PCR | 55 |
| 3.8.2.14. Ultrafiltrace výstupního fragmentu | 56 |
| 3.8.2.15. Eluce výstupního fragmentu | 56 |
| 3.9. Sestavení vstupních DNA fragmentů | 56 |
| 3.10. Stanovení DNA fragmentů qPCR | 58 |
| 3.11. Agarosová elektroforéza a imunoblot | 59 |
| 3.12. Stanovení účinnosti ultrafiltrace destičkami MultiScreen | 60 |
| 4. Výsledky | 61 |
| 4.1. Příprava peptidových knihoven | 61 |
| 4.1.1. Varianty peptidu Fc-III | 62 |
| 4.1.2. Fragmenty proteinů SARS-CoV-2 | 64 |
| 4.1.3. Statinové inhibitory proteas | 67 |
| 4.2. Aplikace knihoven | 68 |
| 4.3. Validace protokolu ToRNAdo | 70 |
| 5. Diskuze | 74 |
| 5.1. Paralelní syntéza peptidů | 74 |
| 5.2. Automatizace mRNA display | 76 |
| 6. Závěr | 80 |
| Reference | 81 |

Seznam zkratek

| | |
|------------------|---|
| AM | aminomethyl (polystyren) |
| AMC | 2-(7-amino-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-3-yl)octová kyselina |
| Bno | 5-butyl-5-nonyl |
| Boc | <i>tert</i> -butyloxykarbonyl |
| Bzl | benzyl |
| CNC | počítačově číslicově řízené stroje z angl. computer numerical control |
| Cp | přechodový bod z angl. crossing point |
| CV | variační koeficient |
| DBU | 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en |
| DEPC | diethylpyrokarbonát |
| DIC | diisopropylkarbodiimid |
| DMF | dimethylformamid |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| K(DNP) | N- ϵ -2,4-dinitrofenyl-L-lysin |
| DTT | dithiothreitol |
| EDTA | kyselina ethylendiamintetraoctová |
| EPDM | elastomer, z angl. ethylene propylene diene monomer rubber |
| ESI | elektrosprejová ionizace |
| Fc | bazální úsek imunoglobulinu, z angl. fragment, crystallizable |
| FFF | aditivní výroba ze slinuté struny, z angl. fused filament fabrication |
| FLAG | epitopová značka DYKDDDDK |
| Fmoc | fluorenylmethyloxykarbonyl |
| HA | epitopová značka YPYDVPDYA (odvozena z chřipkového hemaglutininu) |
| Hc | 3-fenylpropionová kyselina |
| HEG | hexaethylenglykol (též angl. spacer 18) |
| HRP | křenová peroxidasa, z angl. horseradish peroxidase |
| I ² C | sériová sběrnice z angl. inter-integrated circuit |
| Ig | imunoglobulin |
| May1 | proteasa kvasinky <i>C. neoformans</i> z angl. major aspartyl peptidase 1 |
| NBR | elastomer, z angl. nitrile butadiene rubber |

| | |
|------------|--|
| NCS | N-chlorosukcinimid |
| NMM | N-methylmorfolin |
| Pbf | 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl |
| PEEK | polyether ether keton |
| PEG | polyethylenglykol |
| PES | polyethersulfon |
| PLA | polylaktid, z angl. polylactic acid |
| Pst | fenylstatin - (3S,4S)-4-amino-3-hydroxy-5-fenylpentanová kyselina |
| PTFE | polytetrafluoroethylen |
| PURE | syntéza proteinů pomocí rekombinantních komponent z angl. protein synthesis using recombinant elements |
| Puro, ® | puromycin, 3'-deoxy-N,N-dimethyl-3'-(O-methyl-L-tyrosinamido)adenosin |
| RAMPS | kontrolér krokových motorů z angl. RepRap Arduino Mega Pololu shield |
| RBS | vazebné místo ribosomu z angl. ribosome binding site |
| RFU | relativní fluorescenční jednotky, z angl. relative fluorescence unit |
| SARS-CoV-2 | nový koronavirus z angl. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 |
| SCARA | robotické rameno, z angl. selective compliance articulated robot arm |
| SDS | dodecylsírán sodný, z angl. sodium dodecyl sulfate |
| SMD | součástka pro povrchovou montáž plošných spojů z angl. surface mount device |
| SPENSER | elektronický syntetizátor na pevné fázi z angl. solid phase electronic synthesizer |
| SPPS | syntéza peptidů na pevné fázi z angl. solid phase peptide synthesis |
| STmp | trimethoxyfenylsulfhydryl |
| T(F) | [N-(fluoresceinyl-5-aminobutyl)-3-akrylamido]-deoxyuridin |
| TBS(T) | trisový pufr (s Tween-20), z angl. tris-buffered saline (Tween) |
| tBu | <i>tert</i> -butyl |
| TFA | trifluoroctová kyselina |
| TIS | triisopropylsilan |
| TOF | měření času letu, z angl. time of flight |
| Trt | trifenylmethyl (trityl) |
| TTL | tranzistorově-tranzistorová logika |

Abstract

Peptides are used as synthetically available and easily derivatizable scaffold upon which it is possible to develop ligands targeting broad spectrum of biological targets. A time-tested approach to peptide binder identification is the preparation and screening of combinatorial libraries. Bypassing of this complicated procedure is possible by using biological systems for presentation, identification and selection of peptides based on the principle of *in vitro* evolution – i.e. display techniques.

There are two complementary automated solutions for peptide binder identification described in this work. First is the SPENSER parallel peptide synthesizer, developed as a part of this diploma project, which can be used for peptide ligand discovery and optimization as well as validation of ligands identified using display techniques. Several libraries consisting of a total of 1 052 peptides have been prepared and then used to describe its potential applications. A sample of 154 preparations, representing 14.6 % analytical coverage of the prepared libraries, showed an average purity of 67 ± 19 % according to LC-MS.

The libraries presented illustrate that SPENSER is a suitable tool for the parallel synthesis of linear and disulfide-cyclized peptides with limited variability, or libraries consisting of short peptides. Furthermore, its relatively low reaction scale compared to commercially available synthesizers allows for more economical preparation of libraries from expensive building blocks.

Secondly, the ToRNAdo protocol is presented as an automated variant of the well-established mRNA display method with a minimized number of operations, fully executable by an integrated workcell consisting of commercially available solutions – Agilent Bravo pipetting robot, Biometra T-Gradient PCR cycler and a selective compliance assembly robot arm.

Protocol validation was performed on a model binary library consisting of sequences encoding FLAG and HA epitope tags. Both model sequences were successfully selected with the corresponding antibodies. Necessary modifications of the protocol before its full use outside model libraries are discussed.

Keywords: High-throughput screening; peptide synthesis; *in vitro* evolution; molecular recognition; method development

(In Czech)

Abstrakt

Peptidy tvoří synteticky dostupné a snadno derivatizovatelné „lešení“, na jehož základě je možno vyvíjet ligandy zaměřené na široké spektrum biologických cílů. Tradiční postup k identifikaci těchto výchozích peptidů je příprava a testování kombinatoriálních knihoven. Kombinatoriální syntézu a následný screening je možné obejít využitím biologických systémů prezentace, identifikace a selekce peptidů založených na principu *in vitro* evoluce – tzv. display technik.

V této práci je představen vývoj automatizovaných řešení obou těchto přístupů. Prvním z nich je paralelní syntetizátor peptidů SPENSER vyvinutý v rámci tohoto diplomového projektu jako nástroj k hledání a optimalizaci peptidových ligandů, stejně jako k validaci ligandů nalezených display technikami. K popisu jeho funkčních omezení bylo připraveno několik knihoven sestávajících celkem z 1 052 peptidů. Reprezentativní vzorek 154 preparací, představující 14,6 % analytické pokrytí připravených knihoven, vykazoval dle LC-MS průměrnou čistotu 67 ± 19 %.

Na předložených knihovnách je ilustrováno, že SPENSER je vhodným nástrojem pro paralelní syntézu lineárních i disulfidově cyklizovaných peptidů s omezenou variabilitou, či knihoven sestávajících z krátkých peptidů. Jeho nízký rozsah reakce ve srovnání s komerčně dostupnými syntetizátory dále umožňuje hospodárnější přípravu knihoven z drahých stavebních bloků.

Dále je v této práci je představen protokol ToRNA do jako automatizovaná varianta známé metody mRNA display s minimalizovaným počtem operací, proveditelných v plném rozsahu integrovanou sestavou složenou z komerčně dostupných řešení – pipetovacího robota Agilent Bravo, PCR cyklieru Biometra T-Gradient a robotické ruky SCARA.

Validace protokolu byla provedena na modelové binární knihovně sestávající ze sekvencí kódujících epitopové značky FLAG a HA. Obě modelové sekvence byly úspěšně selektovány odpovídajícími protilátkami. Diskutovány jsou nutné úpravy protokolu před jeho plnou využitelností mimo modelové knihovny.

Klíčová slova: Testování s vysokou propustností; peptidová syntéza; *in vitro* evoluce; molekulární rozpoznávání; vývoj metod

1. Teoretická část

1.1. Peptidy

Peptidy a proteiny se podílí na pestré škále biochemických procesů a fyziologických funkcí. Ačkoli společně sdílí stejnou chemickou strukturu s charakteristickou peptidovou vazbou vznikající dehydratační kondenzací karboxylové a aminové skupiny, jako peptidy označujeme oligomery s délkou do 50 aminokyselinových zbytků a ostatní polymery této třídy označujeme jako proteiny. Ačkoli termín protein se poprvé objevuje již v roce 1838¹, pojem peptid je ustanoven až v roce 1906². Endogenní proteiny a většina peptidů jsou syntetizovány v ribosomech pomocí překladu mRNA ve výhradní enantiomerní čistotě z 20 proteinogenních L-aminokyselin (s méně častými výjimkami např. pyrrolysin, selenocystein), vykazujících pestrou škálu vzájemně komplementárních strukturně-chemických vlastností.

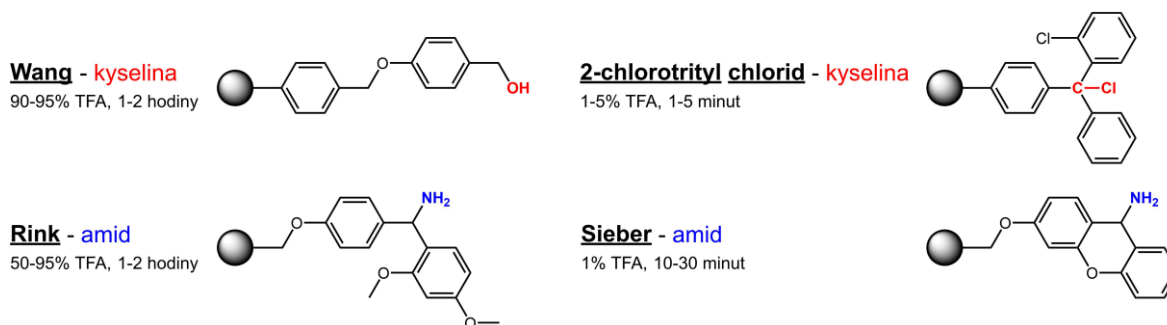
Peptidy se vyznačují omezenějšími sekundárními a vyššími strukturami ve srovnání s proteiny. Svou malou velikostí jsou v živých organismech předurčeny k plnění biologických funkcí v oblasti signalizace (hormony, neurotransmitery, růstové faktory), obrany (antibiotika, toxiny) a udržování homeostázy (antioxidanty). Vhodnost k plnění takto rozmanitých funkcí z peptidů tvoří vhodné lešení (angl. scaffold), na jehož základě jsou ve farmaceutickém výzkumu vyvíjeny rozmanité farmakofory zaměřené na široké spektrum biologických cílů. Důvodem, proč peptidy obvykle (s výjimkou hormonů př. insulin, oxytocin) nejsou cílovými farmakofory, je jejich špatná gastrointestinální absorpce, stabilita a biologická dostupnost. Tyto faktory je však možné překonat modifikacemi peptidu – alkylacemi páteřních α -amino skupin, inkorporací nepřirozených aminokyselin a záměnou amidových vazeb za strukturní analogy. Tyto deriváty peptidů souhrnně označujeme jako peptidová mimetika³.

Prvním příkladem peptidové syntézy v moderním smyslu je práce Emila Fischera z roku 1901 na příkladu glycyglycinu⁴. Průlomem, který umožnil syntézu složitějších molekul, bylo zavedení chránících skupin, které zamezují vedlejším reakcím při zavádění trifunkčních aminokyselin⁵. Tento klíčový koncept vyústil v představení první totální syntézy oxytocinu⁶ a je v řadě variací^{7,8} v peptidové syntéze i mimo ni nadále používán. Peptidová syntéza byla v tomto období prováděna v roztoku, což přinášelo kromě výhod (např. precizní kontrola nad meziprodukty), velké množství nevýhod – zejména vysokou materiální a časovou náročnost a obtížnou škálovatelnost procesu.

1.1.1. Syntéza na pevné fázi

Nevýhody syntézy v roztoku byly potlačeny s první prezentací peptidové syntézy na pevné fázi Robertem B. Merrifieldem roku 1963 na chloromethylovaném zesíťovaném polystyrenu⁹. Ačkoli tato metodika byla přijímána velmi pomalu, dnes je k laboratorní chemické syntéze peptidů využívána takřka výhradně. Syntéza peptidů s využitím připojení na polymerní nosič zjednodušila proces syntézy peptidů a umožnila studium jejich vlastností v rozsahu zcela nepředstavitelném před objevem této metodiky.

Klíčovým konceptem SPPS (zkr. angl. solid phase peptide synthesis) je imobilizace první aminokyseliny pomocí C-konce (v omezeném počtu aplikací se záchyt provádí též přes postranní skupiny¹⁰) k pevné fázi za využití selektivně štěpitelných spojovacích motivů (Obrázek 1). Výběr závisí na tom, zda je cílovou molekulou C-koncová kyselina, či amid, a zda má mít peptid po odštěpení stále postranní ochranné skupiny.



Obrázek 1. Příklady spojovacích motivů s pryskyřicí pro Fmoc SPPS C-koncových kyselin (nahore), nebo amidů (dole) s různou mírou stability vůči kyselé hydrolyze ilustrovanou orientační koncentrací trifluoroctové kyseliny (TFA) a délkou inkubace pro odštěpení^{10, 11}. Znázorněny jsou pouze klíčové koncové části spojovacích motivů, způsob napojení na pryskyřici za nimi se může lišit u různých variant dané pryskyřice. Místo připojení karboxylové skupiny je označeno červeně (ester), nebo modře (amid).

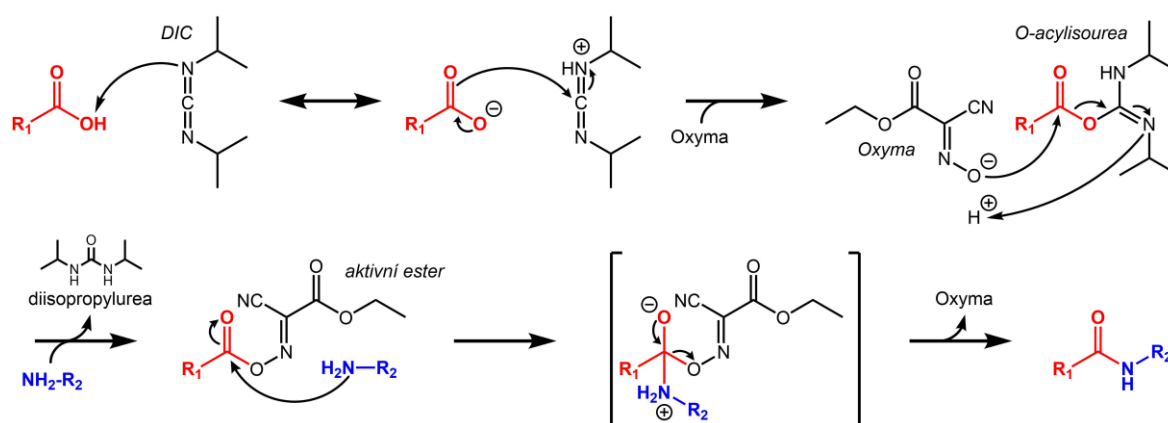
Samotná syntéza peptidu pak probíhá opakováním dvou reakcí – kondenzace chráněné aminokyseliny s α -amino skupinou rostoucího peptidu (též označováno acylace, elongace, či kopulace) a následného odstranění chránící skupiny α -amino skupiny zařazené aminokyseliny po dokončení kondenzace.

Peptidová kondenzace vyžaduje pro provedení při šetrných podmínkách kompatibilních s postranními skupinami a s již existujícími peptidovými vazbami rozdělení do dvou kroků – aktivace karboxylové skupiny následované aminolýzou její aktivované formy¹².

Aktivace je možné dosáhnout řadou postupů mj. formací acylhalidu¹³, anhydridu¹⁴, či esteru⁴.

V této práci je používán k aktivaci aminokyselin diisopropylkarbodiimid (DIC¹⁵), jejichž společnou reakcí vzniká aktivní O-acylisomočovina (Obrázek 2). Následnou esterifikací pomocí ethyl kyanohydroxyiminoacetátu (ozn. ve formě volného hydroxyiminu Oxyma Pure¹⁶) vzniká aktivní ester, který je následně aminolyzován za vzniku peptidové vazby.

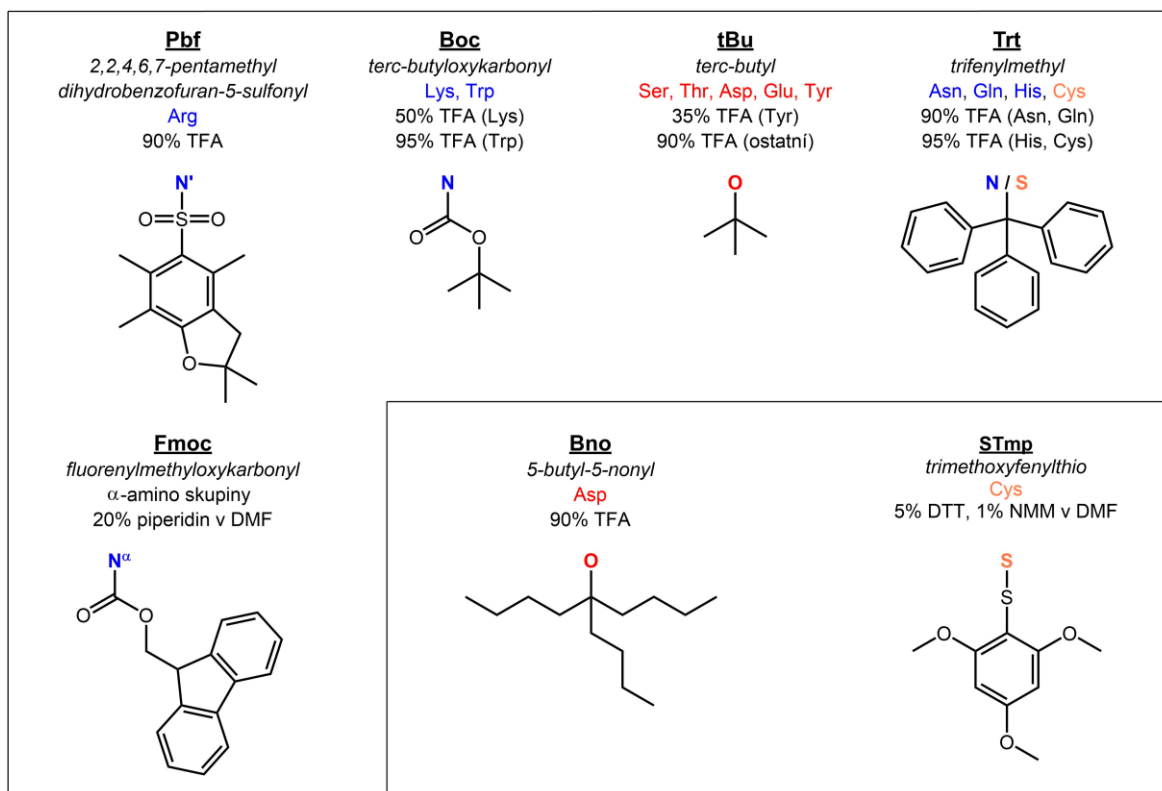
Ačkoli je peptidová kondenzace možná i bez jejich přítomnosti, Oxyma a.j. N-hydroxy aditiva (př. N-hydroxybenzotriazol HOBt a jeho 7-aza derivát HOAt) formující aktivní estery brání vzniku inaktivní N-acylmočoviny O→N přesmykem v průběhu dlouhých reakcí a též omezují racemizaci¹⁶.



Obrázek 2. Mechanismus peptidové kondenzace pomocí DIC jako dehydratačního činidla a Oxyma Pure jako aditiva¹². Kroky na horním řádku představují aktivaci karboxylové kyseliny, níže je popsána aminolýza vzniklého aktivního esteru.

Kombinací chemie chránících skupin a záchytového motivu je možné dosáhnout syntetického protokolu, kde k odstranění chránící skupiny α -amino skupiny, postranních řetězců a odštěpení peptidu z pevné fáze dosahujeme v odlišných podmínkách a zároveň selektivně – zde hovoříme o principu ortogonálního chránění¹⁷, které je taktéž definující charakteristikou SPPS.

V případě že je nutné připravit peptid se zachovanými postranními chránícími skupinami (Obrázek 3) pro další modifikace, je možné zvolit pryskyřici s vyšší labilitou v kyselém prostředí (př. Sieber amidová a 2-chlorotryl chloridová pryskyřice) než potenciálně dotčené postranní skupiny. Použití labilnější pryskyřice však s sebou nese nebezpečí nižšího výtěžku kvůli pozvolným ztrátám peptidu během acylace v kyselém prostředí (jako např. v případě DIC/Oxyma strategie výše).

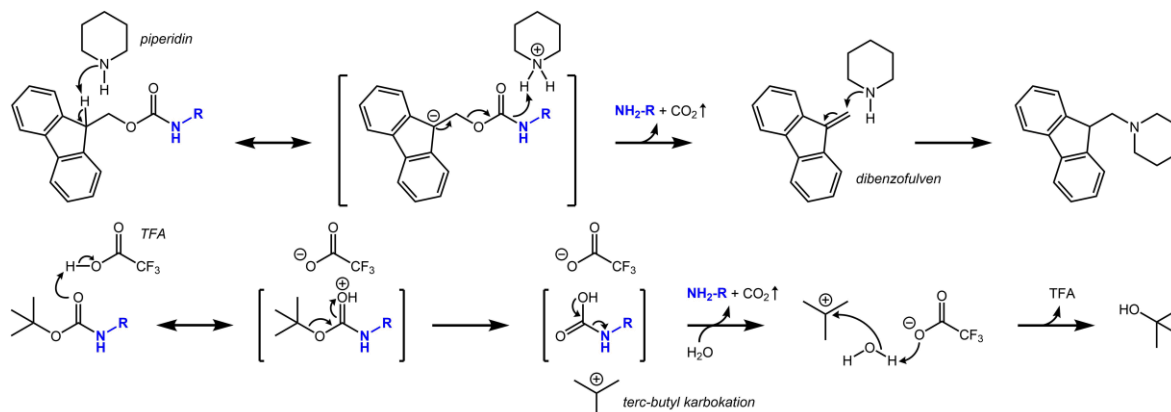


Obrázek 3. Vzorce postranních chránících skupin (Pbf¹⁸, Boc¹⁹, tBu^{20, 21}, Trt²²⁻²⁴) standardních Fmoc-aminokyselin²⁵ (v rámečku) a dvou nestandardních chránících skupin použitých v této práci. Skupina Bno²⁶ snižuje tvorbu aspartimidových vedlejších produktů a STmp²⁷ umožňuje ochránění a oxidaci Cys na pryskyřici. Uvedené koncentrace TFA¹⁷ jsou orientační (v CH₂Cl₂, se zachytávací) a slouží pro ilustraci různé odolnosti vůči kyselé hydrolyze.

Pro aminoskupiny jsou v SPPS používány dvě hlavní chránící skupiny – fluorenylmethoxykarbonyl (Fmoc) odstraňovaný v bazických podmínkách²⁵ a *tert*-butyloxykarbonyl (Boc) odstraňovaný v kyselých podmínkách (Obrázek 4 na další straně)^{28, 29}. Tyto skupiny k zachování ortogonalitě chránění dále diktují repertoár postranních chránících skupin, čímž tvoří dvě hlavní strategie v SPPS označované Boc/Bzl a Fmoc/tBu³⁰.

Při odstraňování chránících skupin dochází vždy ke vzniku reaktivních vedlejších produktů, které je třeba eliminovat vhodnými zachytávacími činidly (angl. scavenger) – vodou³¹ pro *tert*-butyl karbokation (Obrázek 4 dole, platí pro Boc i tBu), triisopropylsilanem³² pro trifenylnmethyl karbokation (Trt) a 2,2,4,6,7-pentamethyl dihydrobenzofuran-5-sulfonyl kation (Pbf), a pro dibenzofulven (Obrázek 4 nahoře) vzniklý při rozkladu Fmoc skupiny tuto roli plní samotná báze (piperidin)²⁵. Mezi další zachytávače často používané v odchraňovacích koktejlech se řadí mj. fenol (tBu),

anisol (tBu trifluoroacetát), 1,2-ethandithiol (tBu a Trt) a thioanisol (Trt, ochrana Met před oxidací)³³.



Obrázek 4. Srovnání mechanismu ochrání ortogonálních chránících skupin Fmoc (nahore²⁵) a Boc (dole^{28, 29}), společně s mechanismem záchytu reaktivních vedlejších produktů.

1.1.2. Automatizace syntézy

Logickým rozšířením metodiky SPPS byl rozvoj technologie kombinatoriální chemie a otevření možnosti přípravy knihoven peptidů umožňující efektivní vyhledávání peptidů s novými užitnými vlastnostmi. Vývoj kombinatoriální chemie dosáhl největšího pokroku v 80. a 90. letech minulého století³⁴ a umožnil syntézu rozsáhlých souborů sloučenin paralelním způsobem mnohem rychleji a levněji, než by bylo dosažitelné syntézou sloučenin v sérii. V čele tohoto vývoje stála právě paralelní syntéza peptidů^{35, 36} díky robustnosti SPPS, která ve většině případů nevyžaduje inertní atmosféru, dlouhé reakční časy, nebo zvýšenou teplotu a tlak.

Ačkoli první přístroj z velké části automatizující SPPS byl popsán již v roce 1966 autorským kolektivem stojícím za zrodem této samotné metodiky³⁷, masovému rozšíření a plné automatizaci syntézy stála v cestě v té době výhradně používaná Boc/Bzl strategie chránění. Kapalinové cesty přístroje musely být odolné vůči TFA používané k ochrání Boc a na závěr protokolu musela být používána HF k odstranění postranních chránících skupin a uvolnění peptidu z pryskyřice. Po uvedení Fmoc/tBu strategie²⁵ byl v roce 1986 popsán první příklad plně automatického syntetizátoru (PEPSYNthesizer, viz Tabulka 1) se zpětnovazebnou kontrolou průběhu reakce³⁸. Ačkoli byl přístroj schopen až dvou syntéz zároveň, otázka paralelní syntézy ve větším rozsahu zůstala stále nedořešena.

První techniky paralelní SPPS byly vyvíjeny v 80. letech např. syntéza na tyčinkách³⁵ a disková syntéza na celulóze³⁹. Disková syntéza je i v dnešní době dochována jako tzv. spot

syntéza⁴⁰ jelikož je snadno proveditelná v malém měřítku (obvykle na archu celulosové matrice pokrytém tečkami rostoucích peptidů) i bez použití automatizace na levném médiu a vzniklá peptidová matice teček může být přímo testována za pomoci analýzy obrazu. Její nevýhodou je omezený rozsah reakce (lze pouze zvětšovat povrch tečky), obtížná analyzovatelnost produktu a nutnost testovat peptid přímo na pevné fázi. Prvním příkladem automatického paralelního syntetizátoru pracujícího se standardními pryskyřicemi se následně stal až Zinsser Analytic SMPS 350 uvedený na trh v roce 1989⁴¹.

Tabulka 1. Přehled komerčních paralelních (tzn. schopných alespoň dvou reakcí zároveň) peptidových syntetizátorů s parametry prototypu syntetizátoru popisovaného v této práci pro porovnání. Převzato s aktualizacemi z literatury^{42, 43}.

| výrobce | model | # reakcí | rozsah reakce | strategie |
|---------------------------------|-------------------|------------|--|-------------|
| AAPPTec | Apogee | 10 | 100–500 μmol | Boc / Fmoc |
| | Triton | 32 | 2–250 μmol | Fmoc |
| | Apex 396 | 384 | 0,015–2 mmol | Boc / Fmoc |
| Applied Biosystems | Pioneer | 32 | 25–100 μmol | Fmoc |
| Argonaut Technologies | Quest 210 | 10 | 50–500 μmol | Boc / Fmoc |
| Biotage | Syro I | 48 | 1–600 μmol | Boc / Fmoc |
| | Syro II | 96 | 1–600 μmol | Boc / Fmoc |
| Chemspeed Technologies | PSW1100 | 80 | 0,005–5 mmol | Boc / Fmoc |
| Cambridge Research Biochemicals | PEPSYNthesizer | 2 | 0,2–1 mmol | Fmoc |
| CSBio | CS336 | 3 | 50–250 μmol | Boc / Fmoc |
| | ResPep | 6 | 25–200 μmol | Fmoc |
| CEM | ResPep Microscale | 24 | 2–5 μmol | Fmoc |
| | MultiPep | 192 | 2–10 μmol | Fmoc |
| | AutoSpot | 800 | 3 nmol | Fmoc |
| Gyros Protein Technologies | Symphony | 12 | 5–350 μmol | Boc / Fmoc |
| Shimadzu | PSSM-8 | 96 | 5–400 μmol | Fmoc |
| Spyder Instruments | Compas 242 | 24 | 10–50 μmol | Fmoc |
| | Compas 768 | 768 | 2–5 μmol | Fmoc |
| Zinsser Analytic | SMPS350 | 144 | 50 μmol | Fmoc |
| | Pepsy-System | 864 | 2 μmol | Fmoc |
| <i>ÚOCHB (tato práce)</i> | <i>SPENSER</i> | <i>384</i> | <i>0,05–2 μmol</i> | <i>Fmoc</i> |

V následujících letech se na trhu objevila řada syntetizátorů umožňujících paralelní SPPS ve větších rozsazích reakce. U dostupných paralelních syntetizátorů je nejnižší pracovní rozsah reakce 1 μmol u Biotage Syro obou verzí, což v případě syntéz s dražšími nestandardními bloky může být stále finančně prohibitivní. Dále popisovaný syntetizátor

SPENSER umožňuje syntézy se standardními pryskyřicemi v nižších rozsazích blízkých spot syntetizátorům (0,05–2 μmol oproti přibližně 3 nmol na příkladu CEM AutoSpot).

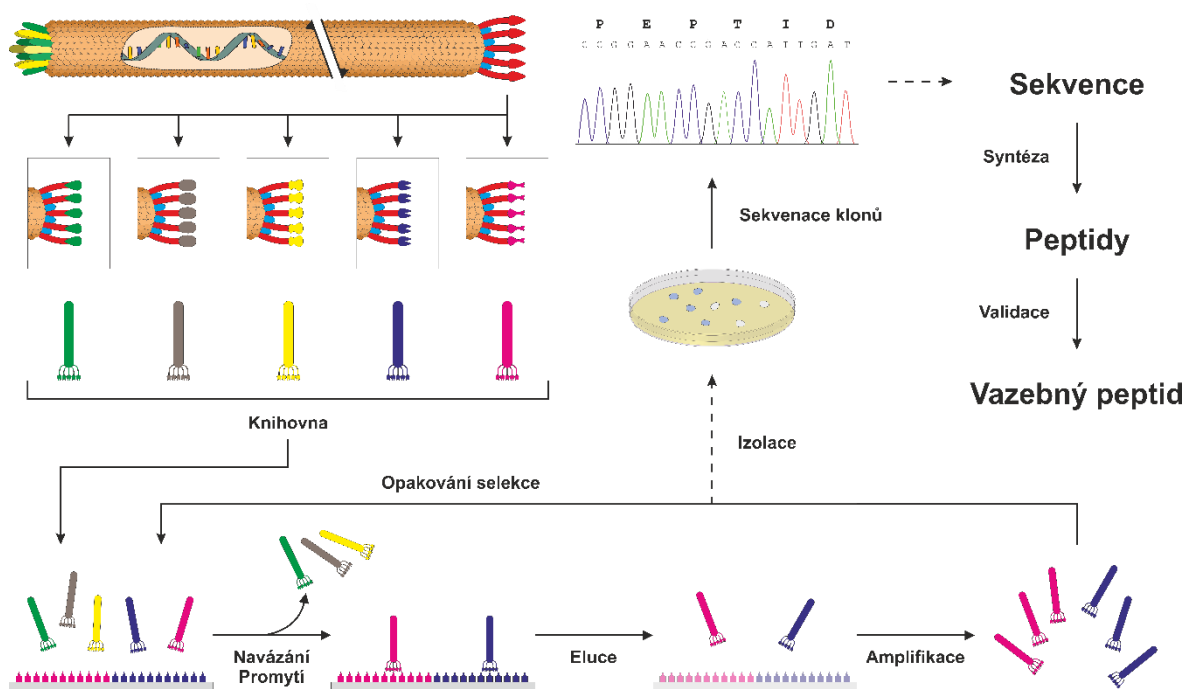
1.1.3. *In vitro* evoluce

Obejití v některých případech komplikované kombinatoriální syntézy a následného screeningu je možné využitím biologických systémů prezentace, identifikace a selekce peptidů založených na principu *in vitro* evoluce. První příklad *in vitro* evoluce byl popsán v 60. letech minulého století na systému Q β RNA-dependentní RNA polymerasy a RNA templátu⁴⁴. Popsaný systém vyvíjel selekční tlak na délku templátu díky rychlejšímu přepisu, jehož výsledkem byl po 74 generacích minimalizovaný fragment přezdívaný „Spiegelman's Monster“ o velikosti 218 bazí z původních 4 500 bazí templátu⁴⁵. Koncept byl v 80. a 90. letech dále rozšířen na vazebné peptidy⁴⁶, protilátky⁴⁷ a enzymy⁴⁸ průkopnickými pracemi George Smithe⁴⁶, Gregory Wintera⁴⁷ a Frances Arnoldové⁴⁸ za jejichž přínos jim byla v roce 2018 udělena Nobelova cena za chemii.

V následujících letech byla vyvinuta řada postupů umožňujících selekci peptidových vazebných motivů označovaných jako display techniky⁴⁹⁻⁵². Tyto techniky jsou souhrnně založené na konjugaci peptidu s nukleovou kyselinou umožňující jeho identifikaci. Rozdíly mezi jednotlivými technikami se projevují pouze ve způsobu této konjugace. Konjugáty jsou selektovány pomocí vazby na cíl a genetická hotovost silných afinantů je nabohacována opakovanými selekčními kroky. Obecnou nevýhodou těchto technik ve srovnání s vysokopropustnostní analýzou kombinatoriálních knihoven je různá míra vlivu peptidového nosiče-identifikátoru (např. fága, kvasinky, či nukleové kyseliny) na vlastnosti prezentovaného peptidu, což může vyústit ve vysoký podíl falešných pozitivit a vyšší náklady na validaci výsledků screeningu, které vždy musí nutně končit SPPS k pozitivnímu stanovení afinity peptidu. Dalším možným úskalím je, zejména v případě ne-enzymových cílů postrádajících dostupný interakční povrch pro malou molekulu, možnost evoluce vazebných motivů pro ostatní komponenty selekčního prostředí – zachycovacích proteinů⁵³, materiálu destičky⁵⁴ či blokačních činidel⁵⁵.

Původnější techniky jako např. fágový display (Obrázek 5 na následující straně) používají k prezentaci peptidů modifikované proteiny na povrchu fága (typicky Ff fágy jako např. M13 a fd^{56, 57}), uvnitř kterého je uložena nukleová kyselina kódující prezentovaný peptid. Nevýhodou fágového display je velká míra vlivu virionového nosiče na vlastnosti prezentovaného peptidu. Toto se může projevit zejména při selekci krátkých peptidů

např. stabilizací vazebného peptidu, který ve volné formě snadno podléhá agregaci, či preferencí slabě vázajících se peptidů, které způsobem své vazby získávají výhodu z geometricky uspořádané multivalentní prezentace na povrchu fága, která je nejčastěji realizována fúzí s kapsidovými proteiny pIII, nebo pVIII (znázorněné červeně napravo, resp. oranžově uprostřed na Obrázku 5)⁵⁸. Amplifikace selektované generace fágů navíc probíhá v bakteriální kultuře, což výrazně limituje možnosti automatizace protokolu.

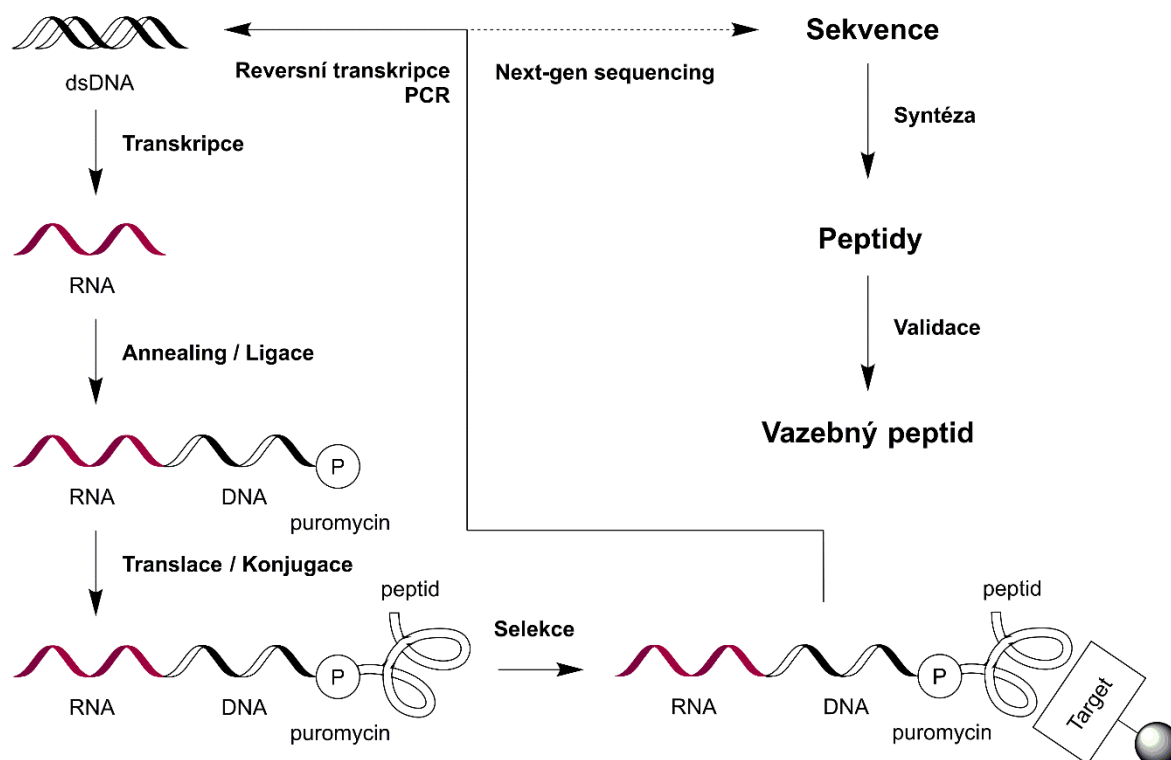


Obrázek 5. Schéma fágového display pro selekci vazebných peptidů. Různé tvary na povrchu pIII proteinu v horní části a různé barvy fágů ve spodní části diagramu představují jednotlivé klony prezentující unikátní peptid.

Odvozenější techniky jako mRNA display (Obrázek 6 na následující straně) používají prostorově úspornější, přímou, konjugaci peptidu k nukleové kyselině^{50, 59}. Výhodou této techniky je možnost screeningu velmi rozmanitých knihoven s diverzitou až 10^{11} . Nevýhodou jsou vyšší materiální náklady spojené se syntézou knihovny (při syntéze z kódujících tripletů; náklady na knihovny založené na degenerovaných nukleotidech náklady nepřevyšují běžné oligonukleotidy), provedením jednotlivých kroků selekčního cyklu s pomocí izolovaných enzymů a analýzou výsledků pomocí sekvenování nové generace.

Počátečním vstupem selekčního cyklu je fragment dsDNA z cyklu přechozího či vstupní knihovna v případě prvního cyklu. Knihovní fragment je sestaven z oligonukleotidu

s degenerovanými kodony a adaptérového primeru komplementárního s jeho konstantním 3' koncem.



Obrázek 6. Posloupnost kroků v mRNA display protokolu pro selekci vazebných peptidů.

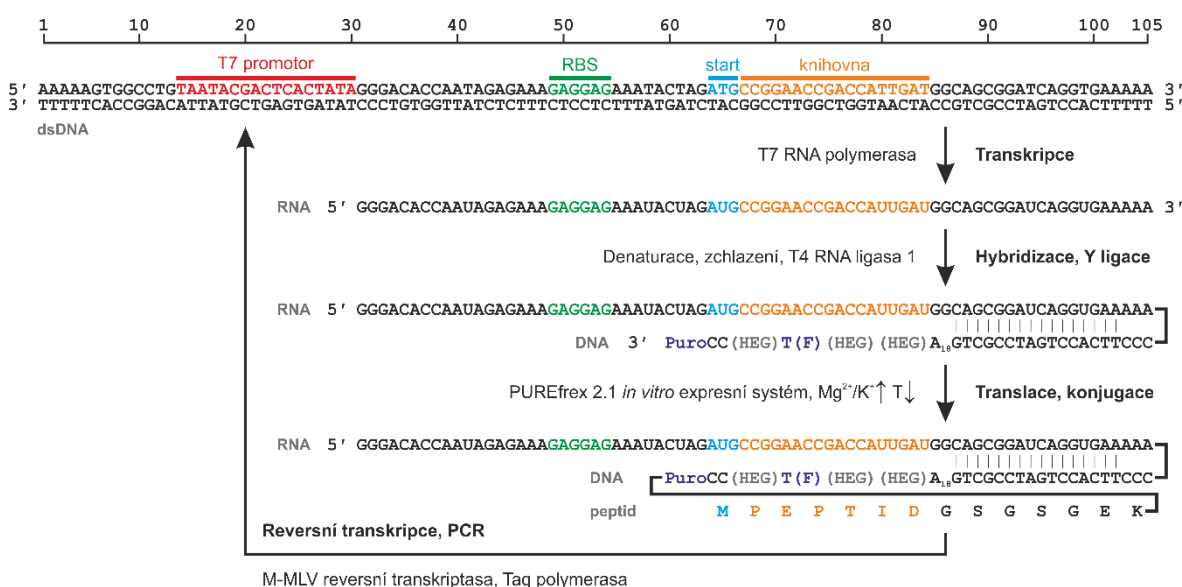
Degenerované kodony jsou do oligonukleotidu synteticky zavedeny pomocí směsi kódujících tripletů, či směsi nukleotidů. Výhodou prvního přístupu je možnost precizní kontroly zastoupení aminokyselin ve výsledném překladu a vyloučení přítomnosti stop kodonů. Nevýhodou je cena syntézy, která musí být prováděna ve větším měřítku za pomoci drahých prekurzorů (trimer fosforoamidity), v závislosti na délce oligonukleotidu až o dva řády vyšší než u syntézy pomocí degenerovaných nukleotidů. Tato levnější alternativa dosahuje při pokrytí všech 20 proteinogenních aminokyselin použitím degenerace formátu NNK či NNS (N: G/A/T/C, K: G/T, S: G/C) minimálního výskytu stop kodonu 3,125 % (jeden z 32 kódovatelných)⁶⁰. Toto omezení může být přijatelné, zejména v případě kratších degenerovaných úseků z důvodu nižší pravděpodobnosti výskytu stop kodonu. Teoretická pravděpodobnost výskytu stop kodonu

$$p = 1 - \left(\frac{31}{32}\right)^n,$$

kde n je počet degenerovaných tripletů, je nižší než 50 % pro knihovny s $n \leq 21$. V případě delších knihoven je třeba zohlednit ceny dalších materiálů a výsledné analýzy pomocí

sekvenování nové generace, jelikož v jejich případě se snaha snížit náklady použitím levnější metody syntézy knihovny může minout účinkem. Přítomnost stop kodonu umožňuje rekrutaci terminačních faktorů, čímž se stává mimořádně problematickou, jelikož na rozdíl od neúčinné konjugace nevyklučuje uvolnění ribosomu pro další produkci. Toto může vést k nadměrné produkci funkčně nedetekovatelných kompetujících peptidů neoznačených nukleovou kyselinou, které efektivně zneplatňují navržené selekční podmínky, pokud nejsou odstraněny.

Pro mRNA display experimenty v této práci byl použit knihovní fragment převzatý z literatury⁶¹. Klíčové motivy DNA knihovního fragmentu jsou popsány na ilustrativní sekvenci na Obrázku 7.

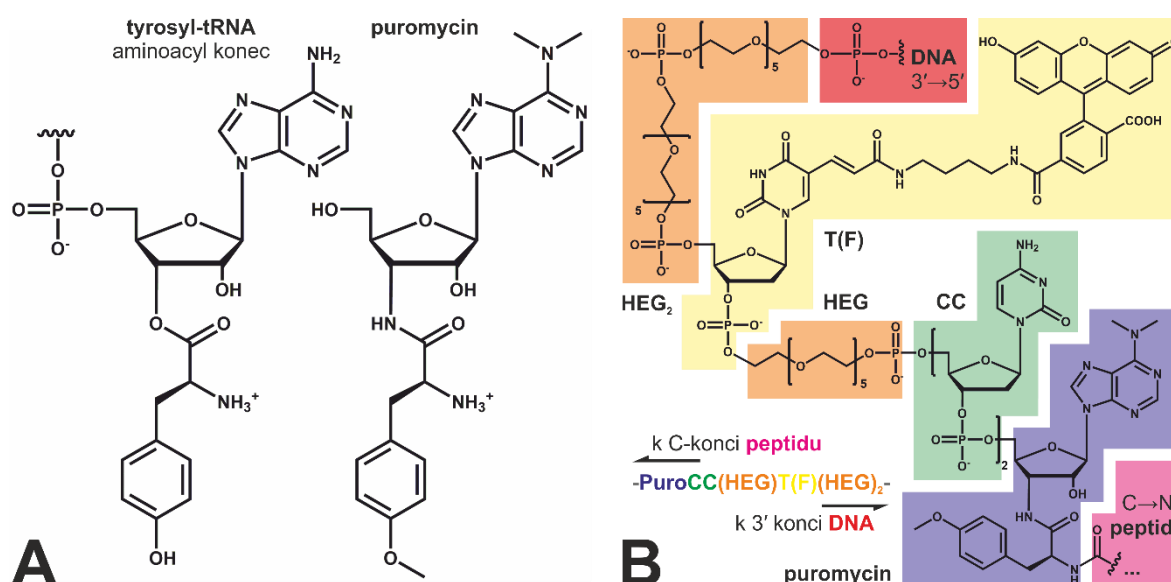


Obrázek 7. Schéma posloupnosti kroků v mRNA display protokolu se zaměřením na sekvence meziproduktů na ilustrativním knihovním fragmentu⁶¹. Spojnice mezi RNA transkriptem a DNA puromycinovým oligonukleotidem představuje pravidelnou fosfodiesterovou vazbu, spojnice mezi puromycinem a C-koncem peptidu představuje amidovou vazbu karboxylu Lys s aminoskupinou O-methyltyrosinylu puromycinu. Přesná struktura nepravidelného propojení je popsána na následujícím Obrázku 8. HEG: hexaethylglykol, T(F): [N-(fluoresceinyl-5-aminobutyl)-3-acrylamido]-deoxyuridin, Puro: puromycin; Z důvodu přehlednosti není použita konvence značení dN/N pro DNA/RNA – jednotlivé třídy biopolymerů jsou na vlastním označeném řádku.

Knihovní DNA je přepsána T7 DNA-dependentní RNA polymerasou, která pro svou funkci vyžaduje na templátu přítomnost T7 promotoru⁶². Transkript, který obsahuje ribosomální vazebné místo (RBS, z angl. ribosome binding site) a iniciační kodon na správné pozici (v předkládaném fragmentu je použito uspořádání dle referenční sekvence BBa_B0035⁶³), by mohl nyní být přeložen do funkčního proteinového produktu,

avšak informace o jeho sekvenci by byla ztracena. Tento problém je překonán zavedením antibiotika puromycinu na 3' konec transkriptu. Toho může být docíleno např. pomocí ligace DNA oligonukleotidu nesoucího puromycin⁶¹ cílené vlásečkovou hybridizací DNA s koncem transkriptu T4 RNA ligasou 1 (ozn. angl. Y ligation⁶⁴).

Puromycin je inhibitor proteosyntézy mimikující aminoacyl konec tyrosyl-tRNA (Obrázek 8A). Ve volné formě způsobující předčasné ukončení translace je používán mj. jako selekční antibiotikum v buněčných kulturách⁶⁵ a při studiu struktury ribosomů⁶⁶. Při vstupu puromycinu konjugovaného k templátu do aminoacyl místa ribosomu během stagnace ribosomu způsobené dosažením RNA-DNA přechodu dochází k amidaci esteru peptidyl-tRNA v peptidyl místě⁶⁷, výsledkem čehož je konjugace C-konce nascentního peptidu k 3' konci nukleové kyseliny pomocí amidové vazby (Obrázek 8B).



Obrázek 8. Strukturní aspekty konjugace peptidu a nukleové kyseliny. (A) Srovnání struktury aminoacyl konce tyrosyl-tRNA a puromycinu. (B) Grafický popis struktury nepravidelného spojovacího motivu mezi DNA-RNA hybridem (červeně) a peptidem (fialově) skládajícího se z HEG linkerů (oranžově), T(F) vizualizační značky (žlutě), pravidelného CC úseku DNA (zeleně) a puromycinu (modře). V případě ilustrativní knihovny na Obrázku 7 by byl puromycin navázán na C-terminální Lys a koncový HEG na první dA z 3' konce DNA-RNA hybridu.

Zatímco k předčasnému zastavení (nikoli pravidelné terminaci) translace s dosažením RNA-DNA přechodu dochází nevyhnutelně, výše popsaná konjugace peptidu s nukleovou kyselinou vyžaduje velmi specifické podmínky a důkladnou optimalizaci spojovacího motivu RNA a puromycinu⁶⁸. Z hlediska vnějších podmínek konjugace dosahuje nejvyšší účinnosti v prostředí s vysokou koncentrací Mg^{2+} a K^+ kationtů a za nízkých teplot

(−20 až −80 °C)^{50, 68}. Jelikož během fázového přechodu může docházet k lokální kryokonztraci solí, v řadě popsanych protokolů je mražení reakční směsi nahrazováno navýšením koncentrace Mg^{2+} a K^+ kationtů s inkubací při laboratorní teplotě^{67, 69, 70}. Tento přístup však nemusí být žádoucí z důvodu možné ne-enzymatické hydrolýzy RNA v prostředí s vysokou koncentrací Mg^{2+} iontů^{71, 72}.

Konjugát je následně purifikován a může být stabilizován hybridizací s komplementárním vláknem DNA po celé délce. Stabilizovaný konjugát je následně selektován na vazbu k představenému cíli. Eluované konjugáty schopné vazby jsou následně reversně přepsány do DNA a amplifikovány pomocí PCR. Analýza průběhu selekce v průběhu protokolu je prováděna pomocí qPCR eluované nukleové kyseliny pro nepřímé zhodnocení průběhu obohacování sekvenční hotovosti o vazebné motivy. Zvyšující se množství kopií v eluátu s probíhajícími selekčními kroky je předběžným indikátorem úspěšné selekce, na jehož základě může být výsledná knihovna sekvenována.

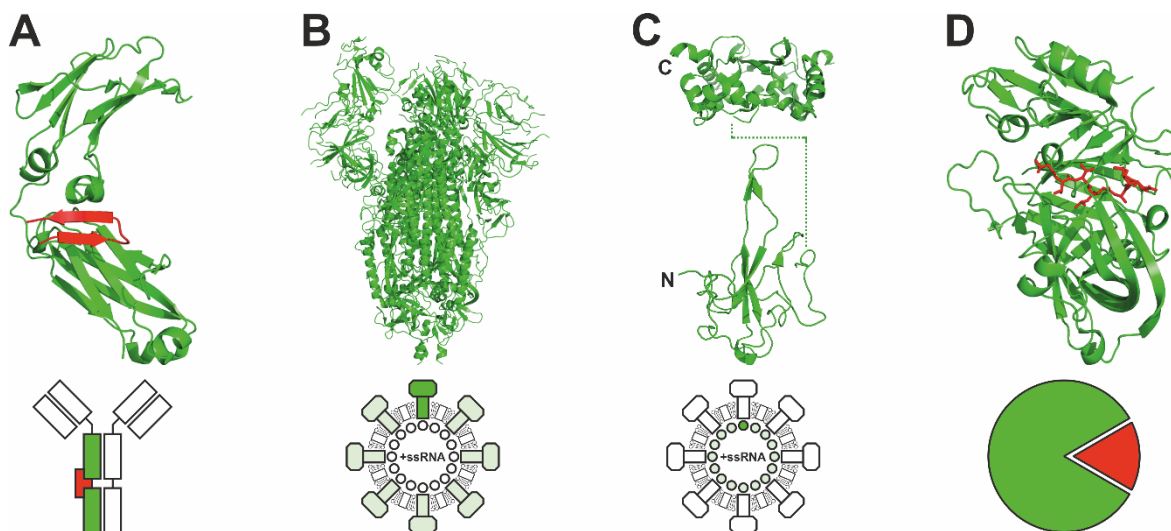
K provedení *in vitro* translace je k dispozici řada komerčních řešení. Nejrozšířenějšími možnostmi jsou původnější směsné systémy – extrakt z pšeničných klíčků⁷³ či lyzát z králíčích retikulocytů^{74, 75} – nebo později uvedené systémy složené z izolovaných rekombinantních komponent (ozn. PURE z angl. protein synthesis using recombinant elements)^{76, 77}. Principiálně není vyloučeno použití mnoha jiných popsanych systémů (např. bakteriální⁷⁸, kvasinkové⁷⁹, savčí lyzáty⁸⁰), které by však ke spolehlivému použití vyžadovaly přípravu a optimalizaci.

Ačkoli jsou PURE systémy díky definovanému složení a vyšší produktivitě preferovatelné oproti systémům směsným⁷⁷, jejich relativně vyšší cena způsobuje, že směsné systémy jsou nadále dostupné a široce používané jako levnější alternativa. Dalším, pravděpodobně dočasným, omezením dostupných PURE systémů (v době psaní práce NEB PURExpress⁸¹ a GeneFrontier PUREfref⁷⁶) je jejich výlučné založení na translačním aparátu *E. coli*, čímž je omezena možnost přímé solubilní exprese proteinů vyžadujících post-translační modifikace, či eukaryotické chaperony.

1.2. Proteinové cíle připravovaných peptidových knihoven

K popsání funkčních vlastností dále popsaneho paralelního syntetizátoru byly zkoumány čtyři modelové proteinové cíle (Obrázek 9 na následující straně) za pomoci kombinatoriálních peptidových knihoven. Následující příklady ilustrují běžné scénáře, se kterými je možno se potýkat při studiu proteinů – interakce ligandu s ne-enzymatickým

cílem (peptid Fc-III a protilátky), protein-proteinová interakce (koronavirové proteiny a protilátky) a interakce inhibitoru s enzymem (statinové inhibitory a aspartátová proteasa).



Obrázek 9. Struktury proteinových cílů připravovaných knihoven. (A) Struktura Fc části lidského IgG1 v komplexu s peptidem Fc-III (PDB 1DN2⁸²). (B) Struktura trimerního S glykoproteinů SARS-CoV-2 (PDB 6VSB⁸³). (C) Struktury domén nukleoproteinů SARS-CoV-2 s označením jejich propojení neuspořádaným řetězcem. N-koncová doména níže (PDB 7CDZ⁸⁴) je orientována ke genomové RNA, C-koncová doména (PDB 7CE0⁸⁴) je orientována excentricky k obálce virionu. (D) Struktura sekretované aspartátové proteasy May1⁸⁵ oportunní kvasinky *Cryptococcus neoformans* v komplexu s pepstatinem A (PDB 6R6A⁸⁶).

1.2.1. Imunoglobuliny

Imunoglobuliny (Ig) jsou proteinovou složkou adaptivního humorálního imunitního systému s pestrou škálou biotechnologických použití⁸⁷. K zapojení Ig do funkčních testů a aplikací jsou používány ligandy schopné jejich specifické vazby⁸⁸. K tomuto účelu jsou nejčastěji používány sekundární protilátky, nebo ne-protilátkové proteiny – z těchto je možno se nejčastěji setkat s bakteriálními proteiny vázajícími Fc fragment (protein A⁸⁹, protein G⁹⁰, či jejich chimery⁹¹), či proteiny vázajícími k lehké řetězce (protein L⁹²).

V roce 2000 byl pomocí fágového displeje identifikován tridekapeptid Fc-III schopný vazby lidského IgG a vytěšňování proteinu G, s nímž sdílí vazebnou topologii, s K_i přibližně 25 nM⁸². Parentální Fc-III je z hlediska sekundární struktury β -vlásečkou stabilizovanou disulfidovým můstkem⁸², jež interaguje s rozhraním domén C_{H2} a C_{H3} Fc (Obrázek 9A). Díky tomu, že se jedná o malou molekulu, je možné Fc-III použít jako molekulárně biologický nástroj např. pro média pro afinitní chromatografii s vyšší vazebnou kapacitou⁹³, či pro selektivní modifikace Ig⁹⁴. Nevýhodou Fc-III je však jeho nespecifická vazba

na všechny podtřídy lidského IgG a IgG různých živočišných druhů⁹⁵. Optimalizací selektivity Fc-III by se otevřela cesta k perspektivnímu využití tohoto ligandu jako biotechnologického nástroje, či jako nízkomolekulárního imunoterapeutika.

1.2.2. Strukturní proteiny SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 je obalený (+) ssRNA koronavirus stojící jako kauzální agens za globální pandemií infekčního onemocnění Covid-19⁹⁶. K imunologickému stanovení tohoto viru jsou převážně používány protilátky cílící S glykoprotein (též ozn. angl. Spike protein), nebo nukleoprotein (N, či Np)⁹⁷⁻⁹⁹. Oba proteiny jsou součástí struktury virionu.

Transmembránový trimerní S glykoprotein (Obrázek 9B na předchozí straně) společně s dalšími obálkovými proteiny (př. M a E) tvoří proteinovou kostru fosfolipidové obálky viru a zprostředkovává vstup do hostitelské buňky interakcí své receptor-vázající domény (RBD, z angl. receptor-binding domain) s transmembránovým angiotensin-konvertujícím enzymem 2 (ACE2, z angl. angiotensin-converting enzyme 2)⁸³. K interakci RBD a ACE2 je nutná proteolytická preaktivace S glykoproteinu hostitelskou serinovou transmembránovou proteasou 2 (TMPRSS2)¹⁰⁰.

Nukleoprotein tvoří dimery vzájemnou interakcí jeho C-terminálních domén⁸⁴ a účastní se procesu skládání virových částic. Tato funkce je zprostředkována interakcí N-terminální domény (Obrázek 9C níže) s virovou ssRNA a interakcí C-terminální domény (Obrázek 9C výše) s membránovými proteiny M, čímž je virová nukleová kyselina v průběhu replikace koordinována do pučících virových částic¹⁰¹.

Knihovny peptidových fragmentů nukleoproteinu a S glykoproteinu mohou být použity k charakterizaci protilátek používaných v imunologických testech a dále k dekonvoluci patientské protilátkové odpovědi v průběhu infekce.

1.2.3. Aspartátová proteasa May1

May1 (z angl. Major aspartyl peptidase 1⁸⁵, též ozn. CnAP1¹⁰², Obrázek 9D) je sekretovanou aspartátovou proteasou kvasinky *Cryptococcus neoformans*. Bazidiomycety *C. neoformans* společně s *C. gattii* způsobují kryptokokální meningitidu, představující častou oportunní infekci u imunosuprimovaných pacientů. Infekce se projevuje zejména u pacientů s rozvinutým AIDS a podle některých odhadů stojí až za 15 % jeho celkové mortality¹⁰³. May1 významně podporuje virulenci a růst kvasinky při nízkém pH⁸⁵. Účinné inhibitory May1 s vhodnými vlastnostmi (nízká cytotoxicita a aktivita proti hostitelským proteasám) mohou být využity jako výchozí farmakofory pro vývoj nových antimykotik.

2. Cíle práce

- Validace protokolu peptidové syntézy na pevné fázi syntetizátoru SPENSER na panelech lineárních peptidů
- Vývoj automatického protokolu pro cyklizaci peptidů na pryskyřici pomocí disulfidového můstku
- Porovnání funkčních omezení syntetizátoru v závislosti na uspořádání knihovny
- Validace vysoko-propustnostního mRNA display protokolu ToRNAdo

3. Materiál a metody

3.1. Materiál a chemikálie

Seznam použitých reagensií a dalších materiálů je v Tabulce 2, resp. 3. K deionizaci vody byl použit systém Millipore Milli-Q (dále voda). Výjimku tvoří protokoly 3.10. Stanovení DNA fragmentů qPCR, kde byla použita voda, která byla součástí LightCycler 480 SYBR Green I Master soupravy, a 3.8. Protokol ToRNAdo, kde byla Milli-Q voda ošetřena DEPC.

Tabulka 2. Seznam použitých chemikálií a dalších reagensií.

| název | výrobce | obj. číslo |
|---|----------------|---------------|
| agarosa pro molekulární biologii | Bioline | BIO-41025 |
| GelRed barvivo nukleových kyselin 10 000× | Biotum | 41003 |
| PUREfrefx 2.1 souprava pro expresi proteinů | GeneFrontier | PF213-0.25-5E |
| Fmoc-Cys(STmp)-OH | Glentham | GX2966 |
| protein G, HRP konjugát | Invitrogen | P21041 |
| Fmoc Rinkova amidová AM pryskyřice 0,62 mmol/g | Iris Biotech | BR-1340 |
| Fmoc-(3S,4S)-AHPPA-OH (fenylstatin, Pst) | Iris Biotech | FAA1629 |
| Fmoc-Gly-OH | Iris Biotech | FAA1050 |
| Fmoc-L-Ala-OH monohydrát | Iris Biotech | FAA1005 |
| Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH | Iris Biotech | FAA1010 |
| Fmoc-L-Asn(Trt)-OH | Iris Biotech | FAA1120 |
| Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH | Iris Biotech | FAA1020 |
| Fmoc-L-Cys(Trt)-OH | Iris Biotech | FAA1040 |
| Fmoc-L-Gln(Trt)-OH | Iris Biotech | FAA1043 |
| Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH monohydrát | Iris Biotech | FAA1045 |
| Fmoc-L-His(Trt)-OH | Iris Biotech | FAA1090 |
| Fmoc-L-Ile-OH | Iris Biotech | FAA1110 |
| Fmoc-L-Leu-OH | Iris Biotech | FAA1120 |
| Fmoc-L-Lys(Boc)-OH | Iris Biotech | FAA1125 |
| Fmoc-L-Met-OH | Iris Biotech | FAA1150 |
| Fmoc-L-Phe-OH | Iris Biotech | FAA1175 |
| Fmoc-L-Pro-OH monohydrát | Iris Biotech | FAA1185 |
| Fmoc-L-Ser(tBu)-OH | Iris Biotech | FAA1190 |
| Fmoc-L-Thr(OtBu)-OH | Iris Biotech | FAA1210 |
| Fmoc-L-Trp(Boc)-OH | Iris Biotech | FAA1225 |
| Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH | Iris Biotech | FAA1230 |
| Fmoc-L-Val-OH | Iris Biotech | FAA1245 |
| <i>H. sapiens</i> γ -globulin (IgG) | Jackson Immuno | 009-000-002 |
| uhlíčitán amonný p.a. | Lach-Ner | 30207-AP0 |
| glycerin bezvodý p.a. | Lach-Ner | 40058-AT0 |
| EDTA disodná sůl, dihydrát p.a. | Lach-Ner | 40076-AP0 |
| chlorid hořečnatý hexahydrát p.a. | Lach-Ner | 30080-AP0 |
| chlorid draselný p.a. | Lach-Ner | 30076-AP0 |
| chlorid sodný p.a. | Lach-Ner | 30093-AP0 |
| N,N-dimethylformamid (DMF) HPLC | Lach-Ner | 20021-LT0 |
| kyselina boritá p.a. | Lach-Ner | 10017-AP0 |
| diethylether stabilizovaný p.a. | Lach-Ner | 20018-AT0 |
| peroxid vodíku 30% nestabilizovaný | Lach-Ner | 10064-A30 |
| kyselina octová p.a. | Lach-Ner | 10047-A80 |
| IRDye 800CW polyklonální kozí anti-myši IgG (H + L) | LI-COR | 926-32210 |
| AmpliScribe T7-Flash transkripční souprava | Lucigen | ASF3257 |

Tabulka 2. (pokračování) Seznam použitých chemikálií a dalších reagensů.

| název | výrobce | obj. číslo |
|---|---------------|---------------|
| RiboGuard inhibitor RNas (40 U/μl) | Lucigen | RG90925 |
| Fmoc-Asp(OBno)-OH | Merck | 8.52418 |
| minerální olej | Merck | M5904 |
| dodecylsulfát sodný (SDS) 98,5 % | Merck | L3771 |
| diethyl pyrokarbonát (DEPC) 97 % | Merck | 159220 |
| DL-dithiothreitol (DTT) ≥98 % | Merck | D0632 |
| 3-fenylpropionová kyselina 99 % | Merck | 135232 |
| 4-methylmorfolin (NMM) 99 % | Merck | M56557 |
| 4-jodofenol 99 % | Merck | I10201 |
| ethyl kyanohydroxyiminoacetát (Oxyma Pure) 99 % | Merck | 8.51086 |
| luminol 97 % | Merck | 123072 |
| piperidin 99 % | Merck | 104094 |
| 1,8-diazabicyklo[5.4.0]undec-7-en (DBU) 98 % | Merck | 139009 |
| trifluoroctová kyselina (TFA) 99 % | Merck | T6508 |
| triisopropylsilan (TIS) 98 % | Merck | 233781 |
| TWEEN-20 ≥ 40 % | Merck | P9416 |
| dimethylsulfoxid (DMSO) ≥99,7 % | Merck | 34869 |
| L-tryptofan ≥99,5 % | Merck | 93659 |
| L-tyrosin ≥99,0 % | Merck | 93829 |
| L-cystin ≥99,7 % | Merck | 30200 |
| roztok deoxynukleotidů (dNTP), 10 mM směs | NEB | N0447 |
| OneTaq jednokroková RT-PCR souprava | NEB | E5315S |
| T4 RNA ligasa 1 (ssRNA ligasa) | NEB | M0204S |
| DNasa I (bez RNas) | NEB | M0303S |
| <i>Pfu</i> DNA polymerasa | Promega | M7745 |
| GelPilot 50 bp marker | Qiagen | 239025 |
| QIAquick PCR purifikační souprava | Qiagen | 28104 |
| LightCycler 480 SYBR Green I souprava | Roche | 4707516001 |
| anti-HA (12CA5), monoklonální myš <i>IgG</i> _{2bκ} | Roche | 11583816001 |
| kasein koncentrát 5,5 % | SDT | CBC2 |
| FungiSPRAY chlorový | Stachema | 8595039311729 |
| Pierce Anti-DYKDDDDK magnetické částice | Thermo Fisher | A36797 |
| Pierce Anti-HA magnetické částice | Thermo Fisher | 88837 |
| NTP set, 100 mM roztoky | Thermo Fisher | R0481 |

Tabulka 3. Seznam použitých spotřebních materiálů.

| název | výrobce | obj. číslo |
|--|-----------------|-------------|
| hliníková uzavírací folie, odstranitelná | Agilent | 24214-001 |
| 70 μL špičky, široké ústí, sterilní s filtrem | Agilent | 19134-022 |
| 70 μL špičky, normální ústí, sterilní s filtrem | Agilent | 19133-142 |
| Echo-kompatibilní 384-jamkové PP destičky | Beckman Coulter | PP-0200 |
| nitrocelulósová membrána, role, 0,45 μm | Bio-Rad | 1620115 |
| UV-Star 384-jamkové destičky | Greiner | 781801 |
| 384-jamkové destičky, průhledné dno | Greiner | 781097 |
| Nunc MaxiSorp 384-jamkové destičky, černé | Merck | P6491 |
| BRAND 384-jamkové destičky, hluboké | Merck | BR701355 |
| MultiScreen PCR384 ultrafiltrační destička | Merck | S384PCR10 |
| BRAND uzavírací folie | Merck | BR701367 |
| AcroPrep 384 destička, 1,0 μm skelné vlákno, dlouhé špičky | Pall Laboratory | 516-0170 |
| AcroPrep 384 destička, 1,2 μm PES, krátké špičky | Pall Laboratory | 736-4006 |
| LightCycler 480 96-jamková destička, bílá | Roche | 04729692001 |
| LightCycler 480 uzavírací folie | Roche | 04729757001 |

Oligonukleotidy použité v této práci jsou popsány v Tabulce 4. Oligonukleotid **9** byl syntetizován firmou Integrated DNA Technologies (Newark, USA) v rozsahu 250 nmol s HPLC purifikací, ostatní oligonukleotidy byly připraveny firmou Merck (Kenilworth, USA) v rozsahu 50 nmol s HPLC purifikací (**1 – 3**), či pouze s odsolením (**4 – 8, 10 a 11**).

Tabulka 4. Seznam použitých oligonukleotidů, které jsou dále referencovány podle uvedených čísel.

| # | název | sekvence (5' → 3') |
|-----------|-----------|---|
| 1 | UExtFwd | AAAAAGTGGCCTGTAATACGACTCACTATAGGGACACCAATAGAGA AAGAGGAGAAATACTAGATG |
| 2 | FLAGRev | TTTTTCACCTGATCCGCTGCCTGAAGATTTGTCATCGTCATCTTTA TAATCATCTGAAGACATCTAGTATTTCTCCTCTTTCTCT |
| 3 | HARev | TTTTTCACCTGATCCGCTGCCTGAAGATGCGTAGTCCGGAACATCG TAAGGATATGAAGACATCTAGTATTTCTCCTCTTTCTCT |
| 4 | Pre/RTFwd | AAAAAGTGGCCTGTAATACGACTCACTATAGG |
| 5 | Pre/RTRev | TTTTTCACCTGATCCGCTGCC |
| 6 | qFwd | AGAGAAAGAGGAGAAATACTAGATGTCTTCA |
| 7 | qFLAGRev | CTGCCTGAAGATTTGTCATCGTCATCTTTATA |
| 8 | qHARev | CGTAGTCCGGAACATCGTAAGGA |
| 9 | Purotag | p-CCCTTCACCTGATCCGCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (HEG) (HEG) T (F) (HEG) CC-Puro ^[a] |
| 10 | RTAuxRew | TGGTGTCCCTATAGTGAGTCGTATTACAGGC |
| 11 | RTAuxFwd | GACTCACTATAGGGACACCAATAGAGAAAGAGG |

[a] pomlčky oddělují modifikace na 5' a 3' konci, struktury nestandardních bloků jsou uvedeny na Obrázku 8 (sekce 1.1.3.)

Klíčové použité přístroje:

- čtečka Infinite M1000 Pro, Tecan Group, Männedorf, Švýcarsko
- čtečka EnSpire 2300, Perkin-Elmer, Waltham, USA
- termocykler Biometra TRIO 48, Analytik Jena, Jena, SRN
- termocykler Biometra T-Gradient, Analytik Jena, Jena, SRN
- transluminátor Quantum ST4-1100, Vilber, Marne-la-Vallée, Francie
- skener Odyssey CLx, LI-COR Biotechnology, Lincoln, USA
- pipetovací robot Bravo, Agilent Technologies, Santa Clara, USA
- přístroj k uzavírání destiček PlateLoc, Agilent Technologies, Santa Clara, USA
- akustický dávkovací systém Echo 550, Beckman Coulter, Brea, USA.
- analytický termocykler LightCycler 480, Hoffmann-La Roche, Basilej, Švýcarsko

Ke statistické analýze a sestavování grafů byl použit GraphPad Prism 6. K analýze obrazu byl použit ImageJ 1.51j8¹⁰⁴. Chemické vzorce a diagramy byly zpracovány v programu ChemDraw 16. Pro práci s biologickými sekvencemi byl použit Unipro UGENE v33.0¹⁰⁵. K obecným grafickým úpravám byl použit CorelDRAW X8 a GIMP 2.10.10. Pro výpočty T_m primerů byla použit kalkulátor¹⁰⁶ využívající metodu nejbližšího souseda¹⁰⁷. Uvedené predikované hodnoty T_m se mohou u shodných sekvencí lišit kvůli rozdílným koncentracím soli, Mg^{2+} , či oligonukleotidu.

CNC frézované mechanické komponenty byly vyrobeny Mgr. Ondřejem Pačesem z Vývojového centra ÚOCHB, nebo firmou Xometry (Gaithersburg, USA). FFF díly byly vyrobeny na 3D tiskárně Anet A3 (Shenzhen Anet Technology, Šen-čen, ČLR) se strunou Prusament 1,75 mm PLA (Průša Development, Praha).

Pro návrh hardware byly použity programy Autodesk Fusion 360, Autodesk EAGLE a Analog Devices LTspice XVII. K návrhu software a ladění byly použity Atmel Studio 7.0, Arduino IDE 1.8.13, Microsoft Visual Studio 2019, Autoit v3.3.14.5, SciTE 4.4.6 a Hype!Terminal.

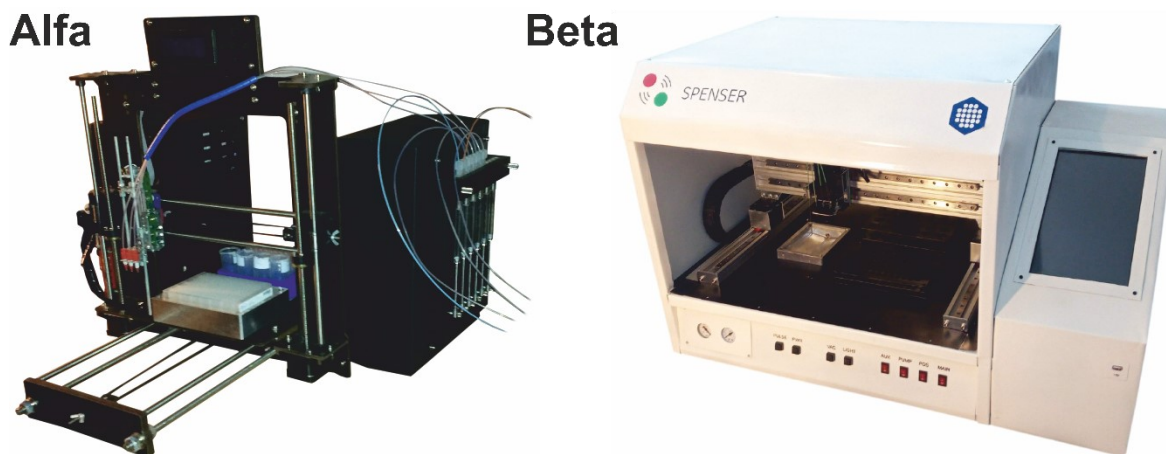
3.2. Syntéza peptidů na pevné fázi

3.2.1. Syntetizátor SPENSER

Na počátku realizace paralelního syntetizátoru SPENSER (z angl. Solid Phase ElectroNic Synthesizer) byla sestavena prvotní alfa verze založená na mechanice komerční 3D tiskárny Anet A8. Tovární řídicí elektronika byla vyměněna za snáze upravitelnou alternativu – Arduino Mega (ATmega2560) s ovládací deskou RAMPS 1.4, která podporovala open-source univerzální CNC firmware Marlin 1.1. Firmware byl upraven pro účely obsluhy syntetizátoru implementací referencování 4. osy (osa E - ližina s tryskami pro pomocné reagentie) a byla upravena logika synchronizačního příkazu M400 ke spolehlivé kontrole stavu dokončení fronty úloh¹⁰⁸. Po neúspěšných prvotních experimentech s vlastními lineárními pumpami bylo k obsluze zvoleno komerční modulové řešení – pumpa Tecan Cavro XMP6006. Jelikož oba systémy podporovaly sériovou komunikaci, k níž byla k dispozici precizní dokumentace¹⁰⁹, a která v případě Marlin firmware mohla být i aktivně upravována, bylo možno rychle navrhnout obslužné rozhraní obsluhující rodící se přístroj.

Vzniklá alfa verze přístroje sestávala ze dvou hlavních řídicích systémů – pozičního modulu obsluhujícího motory pro pohyb os X, Y, Z a E, termostat a ventil k evakuaci

odsávací nádoby, a dávkovacího modulu obsluhujícího čtveřici lineárních pump s ventily. Komunikace s řídicím počítačem je zprostředkována skrz agregátor sjednocující komunikaci do jednoho sériového kanálu a izolační vrstvu (obvod s dvojicí 6N137 optočlenů pro každý modul) k dosažení vyšší stability. Fotografie přístroje je na Obrázku 10.



Obrázek 10. Fotografie syntetizátoru SPENSER verze alfa (upravený překližkový rám Anet A8) a beta (2020 Al rám, 0,75 mm ocel opláštění, 4230 Al pravítkové XYZ osy, integrovaný x86 SBC s 11,8“ dotykovým displejem). Rozměry alfa verze byly 510 × 610 × 490 mm (V × Š × H) s hmotností 11 kg, rozměry beta verze byly 560 × 870 × 540 mm s hmotností 32 kg.

Jelikož oba moduly ve zvoleném uspořádání nejsou schopné vzájemné komunikace, musí být ovládány v reálném čase, což si žádalo zejména v případě komunikace s Marlin důkladnou optimalizaci k dosažení přijatelné rychlosti provozu při zachování spolehlivosti a stability. K dosažení plynulosti ovládání bylo ovládací rozhraní realizované v C# rozděleno do jednoho procesu obsluhujícího komunikaci, procesu s protokolovou smyčkou a parentálního procesu obsluhujícího uživatelské rozhraní. Zápis logů byl též prováděn separátním procesem pro každý ze tří souborů (stav, odeslaná a přijatá komunikace) k potlačení výrazných prodlev během zápisů. Komunikace mezi procesy byla zprostředkována standardním vstupem/výstupem.

Vývoj alfa verze se neobešel bez technických problémů způsobených klíčovou limitací návrhu založeného na 3D tiskárně s pohyblivým podstavcem v ose Y. Tento pohyb znemožňoval použití rigidní kapalinové cesty pro odvod spotřebovaných reagentů z odsávací nádoby z vhodného materiálu, např. polypropylenu. Pro zajištění naprosté flexibility nutné ke spolehlivému udržování pozice podle osy Y bylo nutné použít méně odolnou hadici z materiálu Tygon F-4040-A, která měla omezenou trvanlivost maximálně

72 hodin strojo-času. Pracovní rozpouštědlo DMF bylo materiálem snášeno velmi dobře, avšak odchraňovací roztok 20 % piperidinu s 2 % DBU v DMF již hadici rozpouštěl v průběhu několika dní.

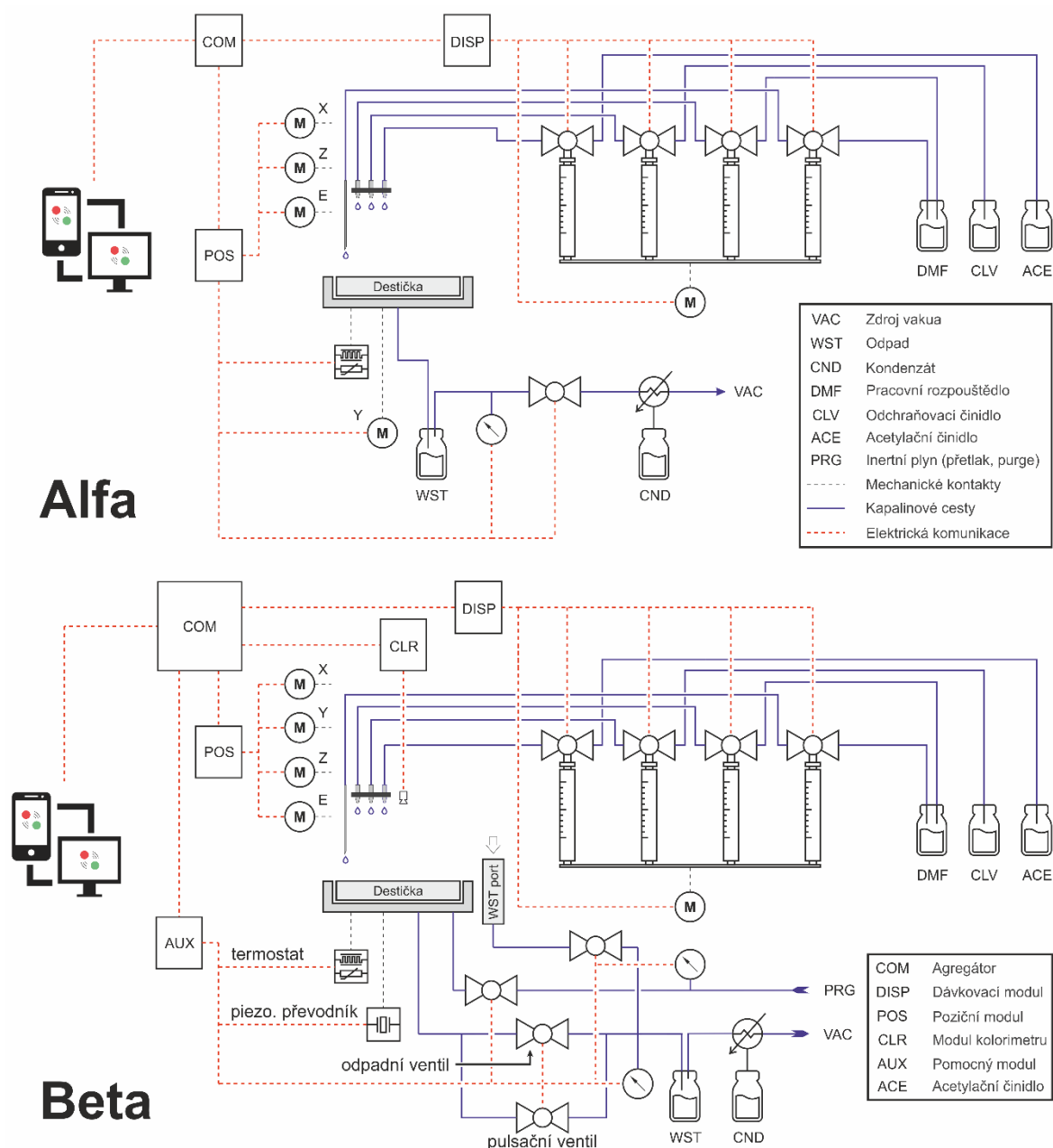
Problémem bylo i zajištění efektivního udržování teploty, jelikož odsávací nádoba postrádala vhodný tepelný vodič, který by přímo dosedal na spodní část reaktorů, a nakládání s odpadním rozpouštědlem z procesu promývání dávkovací jehly. Toto si vyžádalo alokaci rezervních jamek filtrační destičky dedikovaných k vypouštění odpadu z promývání, což snižovalo maximální počet paralelních reakcí v závislosti na počtu používaných aminokyselin až o polovinu.

Alfa verze zároveň postrádala prostředek k efektivnímu míchání reakcí, které je klíčové pro efektivní syntézu⁴². Jako jediná možnost se nabízelo lineární třepání pomocí pohybu osy Y, u kterého však byla výraznou limitací ztráta poziční přesnosti v důsledku periodického trhavého pohybu. Tato limitace si žádala časté referencování osy Y v průběhu inkubace, jinak měl přístroj tendenci posuvným stolem narážet do okraje pracovního prostoru za současného silného opotřebovávání časovacího pásu osy. Z funkčního hlediska míchání osou Y nepřinášelo výrazné zlepšení a bylo tedy nutné prozkoumat možnosti koncepčních změn, které by efektivní míchání umožnily.

Ve finální verzi beta použité k přípravě peptidů v experimentální části byl jako prostředek ke zvýšení účinnosti acylace a odchraňování implementován ultrazvukový generátor, systém k zadržování vsázky v reakčním prostoru za pomoci přetlaku inertního plynu, vakuový pulzační systém a termostat s účinnějším tepelným vodičem.

Z těchto se jako nejužitečnější ukázalo zavedení inertního plynu společně s pulzačním systémem, které fungují v součinnosti. Zároveň byl přidán odpadní port k příjmu promývacího rozpouštědla, čímž se zvýšila kapacita uvolněním jamek alokovaných k promývání jehly.

K dosažení stabilní komunikace o délce v řádu měsíců též pomohlo použití dvou oddělených zdrojů 12 V pro motory a řídicí elektroniku (a 24 V zdroje pro XMP6006) a převedení I²C komunikace s tlakovými sensory BMP180 na analogový signál v blízkosti sensoru, jelikož kabel mezi modulem AUX a senzorem se délkou přibližně 80 cm blíží specifikovaným limitům protokolu¹¹⁰. Schéma obou verzí syntetizátoru pro porovnání je na Obrázku 11 na následující straně.

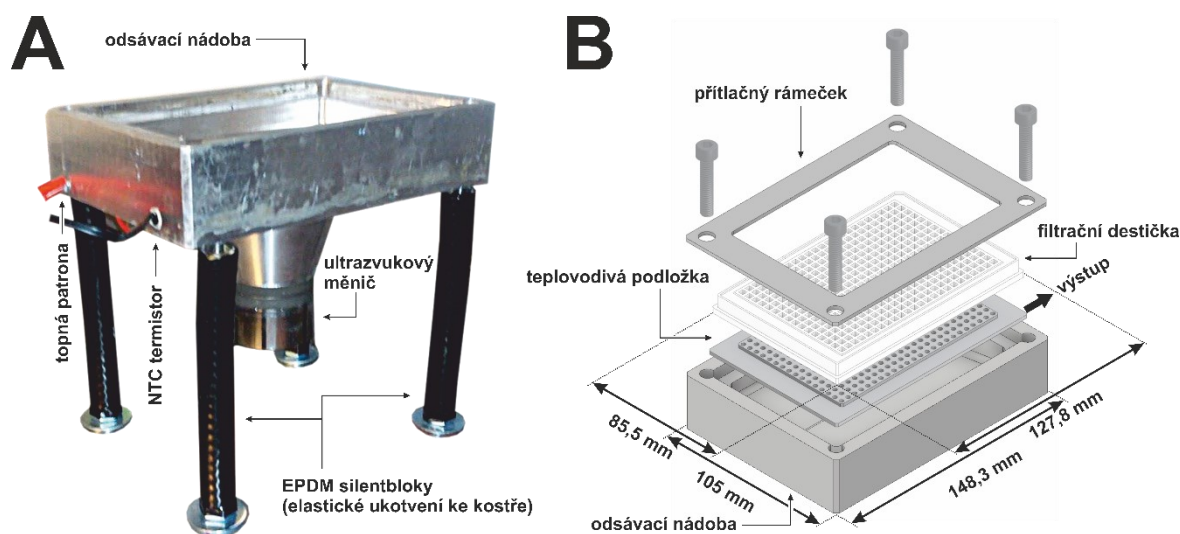


Obrázek 11. Blokový diagram znázorňující uspořádání klíčových komponent syntetizátoru verze alfa a beta. Komunikace mezi moduly AUX (podpůrný modul, ATmega328), POS (poziční modul, ATmega2560), DISP (dávkovací modul; Tecan Cavro XMP6006 s MAX232) a CLR (kolorimetr, OV7670 s TTL převodníkem) a agregátorem COM probíhá po TTL úrovni, kde je opticky oddělena a převedena na RS232 (6N137/MAX232) pro komunikaci s řídicím počítačem. Zdroj vakua z centrálního rozvodu dosahoval $-0,7$ bar, přetlak dusíku byl regulován redukčním ventilem v uzavřeném stavu na 50 mbar.

Beta verze je též vybavena kolorimetrickým modulem k monitorování účinnosti acylace využívající neinvazivní barvení pryskyřice bromfenolovou modří¹¹¹. Vyhodnocení kolorimetrických dat je zahrnuto v ovládacím rozhraní, avšak není možno ho provádět

dostatečně rychle na to, aby přidaný strojo-čas vyvážil potenciálně snížené náklady na kontrolu kvality. Problémem je i fakt, že v paralelním uspořádání není snadno možné operativně opakovat acylaci v případě detekce neúspěchu z důvodu omezené kapacity zásobníku aminokyselin, či nepřiměřených nákladů v případě využití ne-standardních aminokyselin. Použití kolorimetrické analýzy je tak omezeno pouze na kontrolu kvality, kterou je nevyhnutelně nutné provádět metodou schopnou přesného ověření identity i čistoty (LC-MS), čímž se kolorimetrický modul stal redundantním a nebyl tedy používán.

Ultrazvuková agitace byla zajištěna zapojením 200 W 28 kHz ultrazvukového piezoelektrického měniče s reakčním blokem jako akustickou zátěží (Obrázek 12A). Při sériovém provedení dvou identických syntetických programů s použitím a bez použití ultrazvuku však nebyl na panelu 29 lineárních peptidů pozorován statisticky významný rozdíl v žádném případě. Navíc se použití výkonného ultrazvukového generátoru společně s nevhodně navrženou akustickou zátěží ukázalo jako vysoce nekomfortní pro práci v okolí přístroje z důvodu silného hluku.



Obrázek 12. Grafický popis reakčního prostoru syntetizátoru. (A) Fotografie odsávací nádoby s připojeným ultrazvukovým měničem. Znázorněno je též zapojení komponent termostatu. Chlazení je zajištěno ventilátorem, který není zachycen na fotografii. (B) Nákres uspořádání komponent reakčního prostoru. Znázorněný výstup představuje otvor, jímž je reakční prostor evakuován, nebo jím je přiváděn dusík k vytvoření přetlaku.

Použití zvýšené teploty (37–50 °C) v acylační a odchraňovací fázi programu se ukázalo jako kontraproduktivní při shodných reakčních časech. Ačkoli je možné, že při použití kratších reakčních časů by mohlo dojít ke zlepšení, byl průzkum syntézy za zvýšené teploty opuštěn. Důvodem byla konstrukční limitace teplovodivé podložky (viz Obrázek 12B),

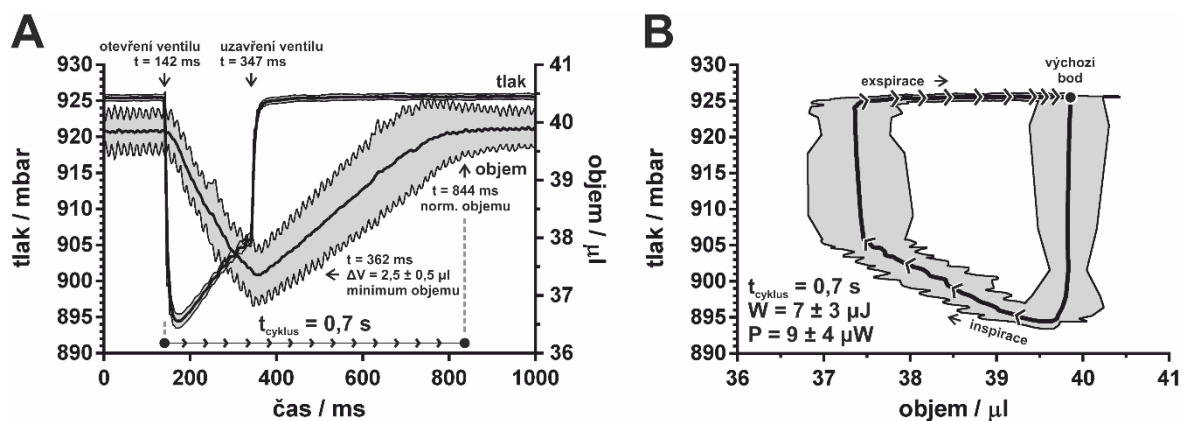
kteřá byla umístěna pod vývody filtrační destičky v reakčním prostoru. Při aplikaci přetlaku docházelo ke vzájemné kontaminaci jednotlivých jamek filtrační destičky z důvodů netěsného kontaktu mezi trny filtrační destičky a otvory teplovodivé podložky, kde se v průběhu programu hromadila kapalina. Jelikož by si vytvoření těsného spoje žádalo výrobu přesného lisovaného PTFE těsnění, což by pro prototyp i případnou malovýrobu představovalo výrazně nepřiměřený náklad, byla odstraněním podložky uvolněna cesta k použití pulsového míchání, které ze zmiňovaných úprav přineslo největší zlepšení (kvantitativně porovnáno v sekci 5.1. Obrázek 35).

Mechanicky je pulsační míchání zajištěno krátkým (přibližně 205 ms) otevřením pomocného vakuového ventilu během inkubace s přetlakem dusíku. Přetlak dusíku (v místě redukčního ventilu před vstupem do přístroje v uzavřeném stavu 50 mbar) zamezuje během dlouhých inkubací prosakování vsázky ložem pryskyřice a jejímu předčasnému opuštění reakčního systému.

K úspěšnému vytvoření krátkého pulsu je nutné využít dvou vhodně umístěných ventilů, jelikož velká 5 l odpadní nádoba na výstupu vakuové soustavy funguje jako expanzní nádoba. V první alfa verzi přístroje byl použit jediný solenoidový ventil k evakuaci reakčního prostoru v zapojení za odpadní nádobou. Díky tomuto uspořádání mohl být použit běžný chemicky neodolný ventil (YAN 629919) s EPDM těsněním. K otevření možnosti vytváření pulsů byla nutná koncepční změna a ventily byly přesunuty před odpadní nádobu, která je permanentně evakuována. K odvádění rozpouštědel a spotřebovaných reaktantů je určen odolný 1“ zónový kulový ventil (A20-T15, nerez AISI304, PTFE) se servopohonem s reakčním časem 5,2 sekundy.

K vytváření pulsu je využít solenoidový ventil 2V025-1/4-12VDC s NBR těsněním, jelikož jeho umístění a způsob jeho využití vylučují přímý kontakt s rozpouštědly. Solenoid je energizován po dobu 300 ms. Jeho reakční charakteristiky (rozdíl časů otevření a uzavření 95 ms) lze odvodit z Obrázku 13A na následující straně. Tah solenoidu při otevírání působí proti podtlaku evakuované strany rozvodu, rozdíl časů je tedy pravděpodobně způsoben zpožděním při otevírání ventilu.

Při pohledu na pV diagram pracovního cyklu pulsového míchání jamky (Obrázek 13B) si lze všimnout vysoké míry hystereze kapalinového sloupce, která diagram posouvá z ideálního diagonálního tvaru podle osy kvadrantu ke tvaru lichoběžníku. Normalizace objemu navíc trvá přibližně dvakrát déle oproti času k dosažení jeho minima (480 vs. 220 ms).



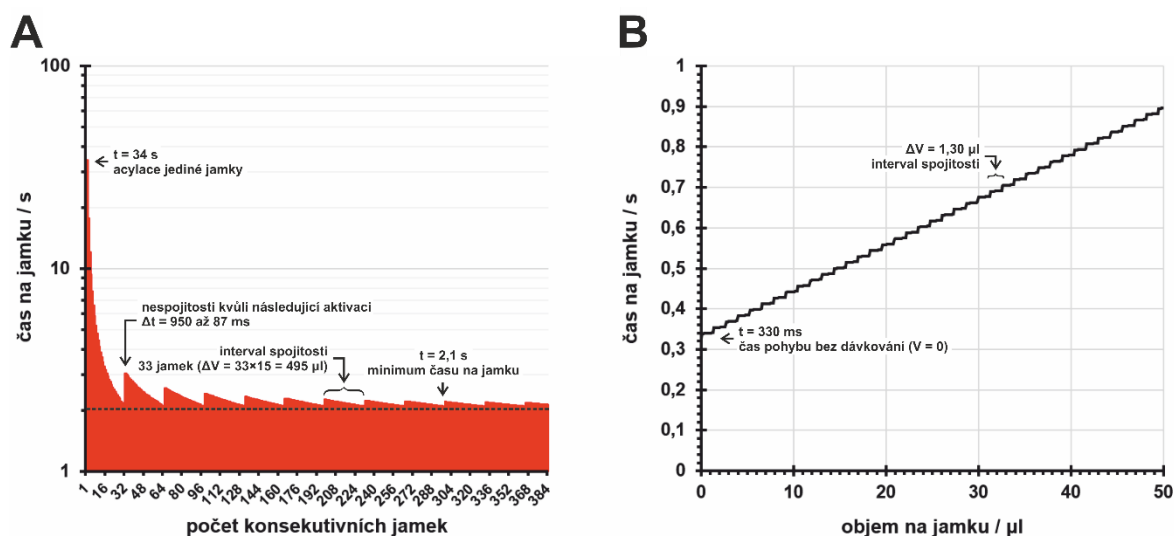
Obrázek 13. Grafický popis pracovního cyklu pulsového míchání jamky s 40 μl 90 % DMF. Absolutní tlak v prostoru pod destičkou byl měřen Bosch BMP180, objem kapaliny v jamce byl měřen konduktometricky. Měření s rozlišením 3,5 ms bylo provedeno v 7 opakováních. Vynesené hodnoty představují jejich průměr, šedé obálky představují interval směrodatné odchylky. (A) Časová závislost tlaku a objemu jamky s vyznačenými událostmi. (B) pV diagram pracovního cyklu s vypočtenou plochou odpovídající vykonané práci. Jako délka cyklu je uvažován rozdíl času normalizace objemu a otevření ventilu. Šipky přibližně označují 50 ms úseky cyklu.

Z funkčního hlediska je však důležitější zhodnocení perfuse lože pryskyřice, což je parametr, jímž lze syntetizátor srovnat s jinými dostupnými řešeními. Průměrná perfuse během pracovního cyklu (podíl dvojnásobku rozdílu výchozího a minimálního objemu a doby cyklu) je $7,2 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$, či $1,46 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ sloupce kapaliny (podíl perfuse a plochy kruhového lože pryskyřice $\varnothing 2,5 \text{ mm}$). V lineárních oblastech dosahuje přístroj perfuse (tj. směrnice regresní přímky) $12,8 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$, $2,6 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ sloupce při inspiraci a $5,7 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$, $1,17 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ sloupce při expiraci obsahu jamky. Pokud zohledníme, že míchání probíhá diskontinuálně s periodou pulsu 5 s, získáme průměrnou kontinuální perfusi $1,01 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$, či $0,21 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ sloupce.

Jako příklad velmi rozšířeného komerčně dostupného řešení pro SPPS s uzavřenou kapalinovou smyčkou lze uvést Gyros Protein Technologies PS3, který dosahuje perfuse $333 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ s $3,1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ sloupce¹¹². Špičková akademická řešení pro syntézu dlouhých peptidů (≤ 164 aminokyselin) v HPLC uspořádání dosahují až $1750 \mu\text{l}\cdot\text{s}^{-1}$ s $28 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ sloupce¹¹³. Dohledané komerčně dostupné paralelní peptidové syntetizátory používají snadněji technicky implementovatelné vortexové míchání¹¹⁴, či spolu s ním umožňují diskontinuální míchání dávkovací pumpou¹¹⁵.

Při paralelní SPPS je dále nutno zohledňovat nepravidelné časové prodlevy způsobené sériovými operacemi. Z těchto je nejvýraznějším příkladem příprava aktivačních směsí v průběhu acylace, zejména v případě aminokyselin s nízkým zastoupením v daném cyklu.

Jelikož je příprava aktivačního mixu (přídavek DIC k roztoku Fmoc-aminokyseliny a Oxyma Pure v DMF) prováděna zvlášť na začátku cyklu před dávkováním do acylované jamky, dochází k neúměrné časové prodlevě až 34 s při acylaci jediné jamky (Obrázek 14A; platí pro objem 15 μl na jamku).



Obrázek 14. Modelové srovnání rychlosti dávkování za různých podmínek. (A) Závislost času dávkování jamky na počtu konsektivních jamek se stejnou aminokyselinou v průběhu acylační fáze programu. Znázorněné časy a distribuce nespojitosti platí pro dávkování 15 μl na jamku. (B) Závislost času dávkování jamky na dávkovaném objemu ve fázích promývání a odchraňování. Znázorněné časy a distribuce nespojitosti platí pro dávkování 384 jamek.

Acylace více jamek stejnou aminokyselinou je oproti tomu výrazně rychlejší – minimálního času 2,1 s na jamku je dosaženo při $33 \times n$ jamek se stejnou aminokyselinou. V této závislosti se projevuje nespojitost zanesená maximálním objemem stříkačky (500 μl) dávkovací pumpy přístroje, která omezuje velikost šarže, v níž je připraven aktivační mix na maximálně 33 po sobě jdoucích jamek. Tato nespojitost se v menší míře projevuje i u jednoduchého dávkování ve fázích promývání a odchraňování (Obrázek 14B). K omezení vlivu těchto časových prodlev jsou operace na destičce prováděny sekvenčně v sudém počtu opakování a operace následujícího opakování jsou vždy prováděny v opačném pořadí.

Dávkování probíhá dvěma způsoby – bezkontaktně (ozn. angl. též jako jet dávkování) vystříknutím z trysky nebo jehly z výšky do cílové jamky a kontaktně přenosem pod hladinu kapaliny (obdobně jako při ručním pipetování). K dosažení spolehlivého výstřiku s minimálním spolehlivým objemem 3 μl je třeba použít co nejvyšší rychlost dávkování (v případě XMP6006 maximální 500 $\mu\text{l/s}$) a trysku optimálního průměru s velmi

pravidelným koncem. Zde se osvědčily běžné jehly 21G (vnitřní \varnothing 0,51 mm) s teoretickou rychlostí pohybu sloupce kapaliny ústím $2,5 \text{ ms}^{-1}$. Průměry větší (př. 18G 0,84 mm) již roztoky DMF opouští spolehlivě až ve vyšších objemech kvůli nižší ústní rychlosti (teoreticky $0,9 \text{ ms}^{-1}$) a většímu povrchu konce trysky usnadňujícímu zadržování kapek a v případě nižších průměrů (př. 23G 0,33 mm) se začínají objevovat úniky ve spojích kapalinových cest kvůli příliš vysokému třecímu tlaku (teoreticky dle Darcy–Weisbachovy rovnice^{116, 117} za předpokladu laminárního toku¹¹⁸ DMF $2,4\times$ vyšší oproti 21G). Dávkování pod hladinu je oproti tomu proveditelné i v nižších objemech až $0,8 \mu\text{l}$, i když s nízkou mírou přesnosti a opakovatelnosti.

Z hlediska zdroje dávkované kapaliny je možné dávkovat ze zásobních lahví, kdy je samotná dávkovaná kapalina pracovním médiem stříkačkové pumpy, a dále z vialek na pracovní ploše syntetizátoru. V tomto uspořádání je pracovním médiem pumpy DMF a kapalina nabíraná jehlou je uložena v pracovní smyčce (PEEK, 0,5 ml, vnitřní \varnothing 0,75 mm), která brání nekontrolovanému míchání kapaliny a média ve stříkačce. Nabíraná kapalina je od média dále oddělena vzduchovým sloupcem o teoretické výšce 2,3 mm. K zamezení kontaminace mezi dávkovanými kapalinami je nutné jehlu a přidružený kapalinový systém po použití čistit. Čištění jehly z vnějšku je prováděno smáčením v rezervované vialce s 2 ml DMF měněného na počátku každého cyklu. Vnitřek jehly a pracovní smyčky je čištěn vypouštěním DMF do odsávaného odpadního portu.

Výraznou nepravidelností, která může ovlivňovat úspěšnost syntéz, je přesnost dávkovací pumpy a variační koeficient (CV) přenášeného objemu, které jsou závislé na dávkovaném objemu a způsobu přenosu kapaliny (Tabulka 5).

Tabulka 5. Porovnání parametrů kontaktního a bezkontaktního přenosu roztoků bromfenolové modři v DMF. Přenesený objem byl stanoven spektrofotometricky ve 12 opakováních.

| bezkontaktní přenos | | | kontaktní přenos | | |
|---------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------|
| objem | CV ^[a] | přesnost ^[b] | objem | CV ^[a] | přesnost ^[b] |
| 3 μl | 20,5% | 13,0% | 0,8 μl | 19,5% | 14,3% |
| 10 μl | 11,6% | 3,5% | 1,5 μl | 7,1% | 6,3% |
| 15 μl | 6,0% | 3,8% | 5 μl | 5,4% | 3,0% |
| 30 μl | 4,9% | 3,7% | 10 μl | 5,2% | 2,4% |
| 50 μl | 4,9% | 0,7% | 50 μl | 5,2% | 1,3% |

[a] $CV = \sigma/\mu$, kde σ je směrodatná odchylka a μ je průměrná hodnota stanoveného objemu,

[b] $\text{přesnost} = \left| \frac{\mu}{V} - 1 \right|$, kde V je předpokládaný přenášený objem

Tato nepravidelnost je důležitá zejména u zmiňovaných acylací aminokyselinami s malým výskytem v daném cyklu. Při přípravě aktivačního mixu je třeba přidat poměrně (5,5 % v/v) malý objem DIC k většímu objemu roztoku aminokyseliny s pomocným aktivátorem. V případě přípravy mixu pro jedinou acylaci by za obvyklého celkového objemu směsi 15 μ l přidávaný objem DIC činil 830 nl, což již není spolehlivě dávkovatelný objem. Toto omezení je překonáno mimořádným navýšením celkového objemu na 30 μ l (přidávaný objem DIC 1,66 μ l) v případě vzácných acylací, čímž je zároveň i zvýšen molární nadbytek aminokyseliny s aktivátory.

Toto opatření přináší další výhodu – navýšení nadbytku je vhodným podpůrným opatřením např. ve skenovacích knihovnách, kde je ve vybraném parentálním peptidu systematicky každá pozice zaměňována za zvolené aminokyseliny, jelikož protokol je obvykle optimalizován na základě parentálního peptidu a zanesení nepravidelné aminokyseliny je často problematické.

3.2.2. Pracovní postup

- Roztok aminokyseliny: 300 mM Fmoc-aminokyselina, 375 mM Oxyma Pure v DMF
- Odchraňovací roztok 1: 20 % v/v piperidin v DMF
- Odchraňovací roztok 2: 20 % v/v piperidin, 2 % v/v DBU v DMF

Do každé jamky 384-jamkové filtrační destičky (Pall, 516-0170), kde probíhala syntéza, byl přenesen 1 mg pryskyřice Fmoc-Rink Amide AM¹¹⁹ (kapacita 0,62 mmol/g) v 50 μ l suspenze v DMF ruční pipetou ze zásobní nádoby s magnetickým mícháním (600 otáček za minutu). Následující kroky byly prováděny syntetizátorem.

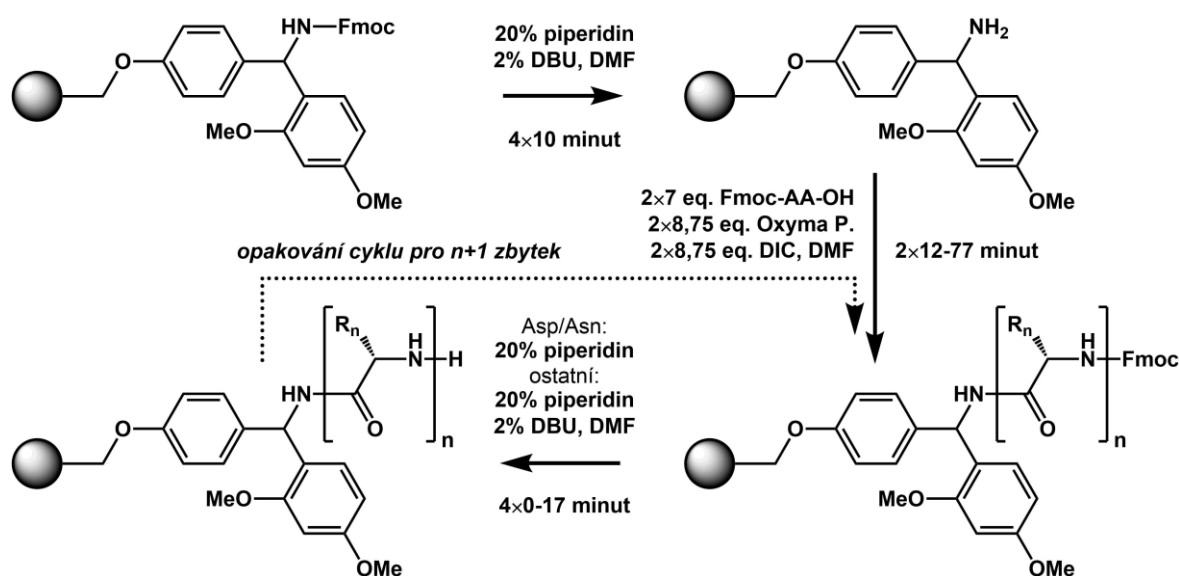
Úvodní ochránění bylo provedeno 4 \times 20 μ l odchraňovacího roztoku 2 s inkubací 10 minut s pulsačním mícháním s periodou 5 s (jako v následujících inkubacích). Mezi jednotlivými opakováními byl objem vsázky odstraněn evakuací odsávací nádoby po dobu 60 sekund, stejně jako v následujících krocích a jejich opakováních. Pryskyřice byla následně promyta 1 \times 15 μ l, 1 \times 60 μ l a 2 \times 15 μ l DMF.

Na počátku pracovního cyklu byla aktivována šarže roztoku aminokyseliny o maximálním objemu 495 μ l přidáním 5,5 % v/v DIC (1,25 ekvivalentů k aminokyselině) k roztoku aminokyseliny v alokované aktivační zkumavce a objem šarže byl dávkován v 15 μ l dílech do všech jamek acylovaných danou aminokyselinou (7 ekv. aminokyseliny ke kapacitě pryskyřice). V případě nedostatečného objemu šarže byla připravena další a postup byl opakován. Po dokončení acylace všech jamek dané aminokyseliny byl postup

opakován pro aminokyselinu následující. Po provedení acylace všech jamek následovala inkubace o čase A (12–77 minut). Acylace byla následně opakována v opačném pořadí. Průmysl byla poté promyta 1 × 15 μl, 1 × 60 μl a 2 × 15 μl DMF.

Odchránění N-konce bylo provedeno 4 × 20 μl odchránovacího roztoku 2 s inkubací o čase D (0–17 minut). Pro aminokyseliny Asp a Asn připojené v daném cyklu byl na místo roztoku 2 použit odchránovací roztok 1. Průmysl byla následně promyta 1 × 15 μl, 1 × 60 μl a 2 × 15 μl DMF.

Cyklus acylace, odchránění a promývání byl opakován, dokud nebyla připojena a odchráněna poslední aminokyselina. Syntéza byla posléze zakončena finálním promytím 4 × 60 μl DMF s odsáváním prodlouženým na 4 minuty. Obecné schéma syntézy je na Obrázku 15.



Obrázek 15. Schéma syntézy peptidů na pevné fázi, kde n je číslo cyklu. Po navázání a odchránění posledního zbytku je průmysl promyta a peptidy na ní jsou dále zpracovány a/nebo odštěpeny.

Časy A a D mohly být zadány jako konstanty, parametricky, nebo mohly být definovány v poli pro jednotlivé cykly. Jejich hodnoty jsou shrnuty v Tabulce 6. Hodnoty A a D představují délku inkubace po skončení dávkování, nezahrnují tedy čas strávený dávkováním reagentů, který je závislý na dávkovaném objemu a počtu jamek zpracovávaných v daném kroku (viz Obrázek 14A pro časy A a 14B pro časy D v sekci 1.2.).

Pro syntézu knihovny Fc-III byla použita kombinace Asp bloků s chráněním OtBu (pro N-koncový Asp) a OBno²⁶ (pro vnitřní záměny) ke snížení spotřeby drahého Fmoc-Asp(OBno)-OH. Pro ostatní knihovny byl používán výlučně Asp(OBno)

kvůli nižšímu zastoupení v sekvencích. Pro zavádění Cys byl používán blok Fmoc-Cys(STmp)-OH²⁷ s výjimkou syntézy oxytocinu v lineárním panelu, kde byl použit též standardní Fmoc-Cys(Trt)-OH pro srovnání metodik disulfidové cyklizace. Ostatní aminokyseliny byly zaváděny pravidelně jednotlivými bloky vyčtenými v sekci 3.1 Materiál a chemikálie.

Tabulka 6. Shrnutí reakčních časů pro prezentované knihovny (sekce 4.1.). Hodnoty časů v seznamu jsou uváděny v pořadí od prvního k poslednímu cyklu (C → N).

| knihovna | celkový čas ^[a] | čas A (acylace) ^[b] | čas D (deprotektce) |
|----------------------|----------------------------|---|---------------------|
| lineární panel | 30:50:56, 13 cyklů | $12 \times 1,06^{n-1}$ min | 7 min |
| Fc-III | 56:53:19, 13 cyklů | A: 46,36,37,37,41,42,56,58,59,53,77,47,62 min D: 11,12,12,12,12,14,11,12,11,17,13,11,0 min | |
| SARS-CoV-2 S | 56:03:05, 15 cyklů | $20 \times 1,09^{n-1}$ min | 4 min |
| SARS-CoV-2 Np | 46:57:31, 15 cyklů | $23 \times 1,04^{n-1}$ min | 5 min |
| statinové inhibitory | 13:03:19, 4 cykly | 45 min | 5 min |

[a] hh:mm:ss, počet cyklů; [b] n = číslo cyklu, počínající 1

3.3. Štěpení peptidů z Rinkovy amidové pryskyřice

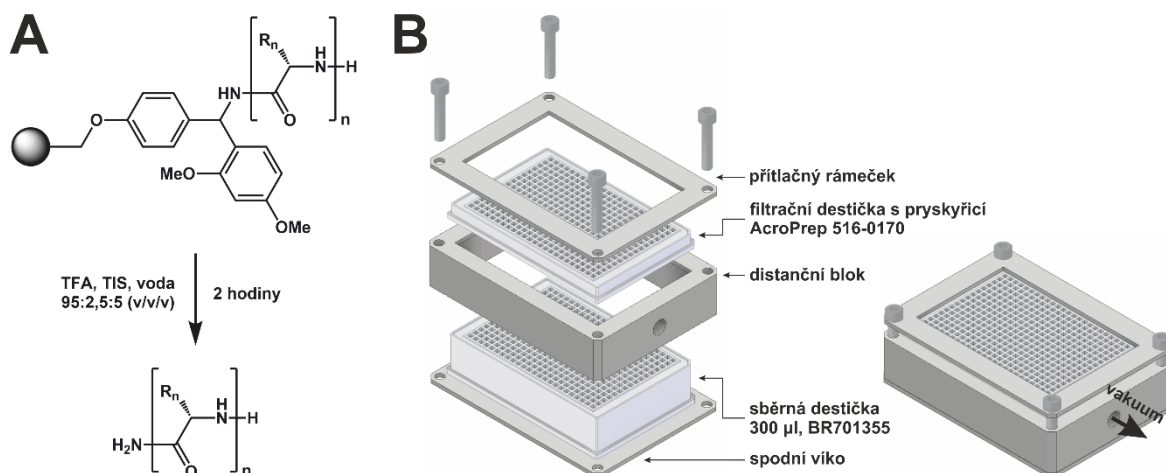
- Štěpící koktejl A: 92,5 % TFA, 5 % voda, 2,5 % TIS v/v/v
- Cyklizační rozpouštědlo: 50 % v/v DMSO, 100 mM (NH₄)₂CO₃, pH ~7,8 (neupravováno)

Diagram štěpení peptidu z pryskyřice se nachází na Obrázku 16A na následující straně. Filtrační destička s Rinkovou amidovou pryskyřicí¹¹⁹ byla osušena ze spodní strany papírovým ubrouskem a byla vložena do sestavené aparatury a zafixována přišroubováním přítlačného rámečku (Obrázek 16B).

Posléze bylo multikanálovou pipetou přidáno 20 μ l, dále 30 μ l v časech 15 min, 45 min, 100 min, a nakonec v čase 120 min 50 μ l štěpícího koktejlu A^{31, 32} k uvolnění peptidu z pryskyřice. V průběhu přidavků nebylo spuštěno vakuové odsávání, průchod koktejlu filtrační destičkou byl zajištěn pouze gravitací. V čase 130 min byl otevřen přívod vakua a aparatura byla ponechána přes noc ke zkoncentrování filtrátu v jamkách sběrné destičky pomocí proudu vzduchu z trnů svrchní filtrační destičky.

Další den byl přívod vakua uzavřen a aparatura byla rozebrána. Pokud nebylo prováděno srážení, protokol byl ukončen přidáním 70 μ l DMSO do každé jamky k rozpuštění peptidů. V případě peptidů, které podstoupily NCS cyklizaci bylo namísto DMSO použito cyklizační

rozpuštědlo¹²⁰ jako pojistné opatření v případě neefektivní cyklizace na pryskyřici (stejně jako v případě následujícího odstavce).



Obrázek 16. Grafický popis štěpení peptidů z Rinkovy amidové pryskyřice. (A) Diagram odstranění chránících skupin a odštěpení peptidu z pryskyřice pomocí štěpícího koktejlu A. (B) Nákres aparatury sloužící k odštěpení peptidů a koncentraci filtrátu v rozloženém a složeném stavu. V diagramu nejsou znázorněna dvě obvodová EPDM těsnění mezi spodním víkem, distančním blokem a filtrační destičkou. Mezi aparaturu a centrální zdroj vakua (−0,7 bar) je zapojen kondenzátor k zachycení korozivních par TFA.

Srážení bylo provedeno přidáním 200 µl diethyletheru, krátkou inkubací 5 minut na orbitální třepačce (200 otáček za minutu) a následným ponořením destičky z přibližně dvou třetin do nádoby s kapalným dusíkem. Když ether zmrzl, byla destička vyjmuta a ihned centrifugována 10 minut při 4 000 × g. Destička byla opatrně vyjmuta z centrifugy a plynulým pohybem obrácena dnem vzhůru nad sběrnou nádobou a takto přibližně minutu ponechána. Následně byla opět otočena dnem dolů a byla ponechána ve vakuovém exsíkátoru minimálně 1 hodinu k odpaření zbytkového etheru. Peptidy byly poté rozpuštěny v 70 µl DMSO či cyklizačního rozpouštědla.

Sběrná destička s roztoky peptidů byla následně uzavřena folií (Agilent, 24214-001) pod ochrannou atmosférou Ar pomocí přístroje Agilent PlateLoc během 2,5 s při 175 °C. Destičky s knihovnami byly před použitím uchovávány při −20°C.

V případě ručního provedení během optimalizace cyklizačních podmínek byla pryskyřice převedena ze zpracovávaných jamek filtrační destičky do 1,5 ml mikrokumavky (následující objemy odpovídají zpracování jedné jamky s 1 mg pryskyřice).

Pryskyřice byla promyta 2 × 50 µl DMF. Rozpuštědlo bylo odebíráno ruční pipetou jejíž špička byla těsně přitisknuta ke dnu mikrokumavky (stejně jako v následujícím kroku).

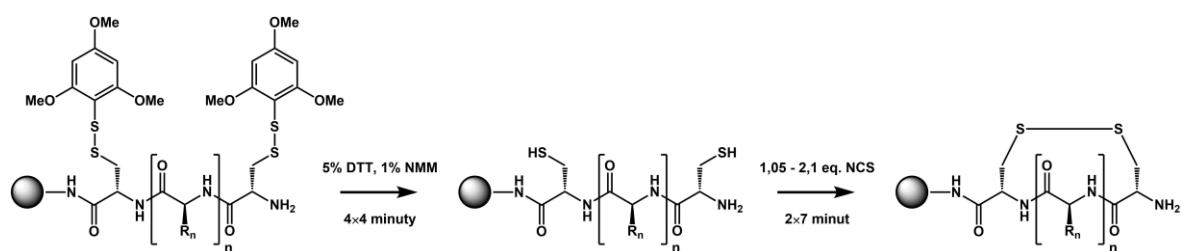
Štěpení bylo provedeno inkubací s 50 μ l štěpícího koktejlu A při laboratorní teplotě po dobu 2 h na orbitální třepačce (200 otáček za minutu). Po inkubaci byl roztok peptidu odebrán do 2 ml mikrozkuřavky, bylo přidáno 1,95 ml diethyletheru a po promíchání byla zkuřavka ponořena do kapalného dusíku. Když ether zmrznul, byla mikrozkuřavka vyjmuta a ihned centrifugována 10 minut při 13 000 \times g. Supernatant byl odebrán ruční pipetou a zkuřavka byla ponechána otevřená k odpaření zbytkového etheru minimálně 20 minut. Peptid byl poté rozpuštěn v 70 μ l DMSO.

3.4. Disulfidová cyklizace peptidů na pryskyřici

- Redukční roztok: 5 % w/v DTT, 1 % v/v NMM v DMF
- Oxidační roztok: 10 mM NCS v DMF

Pro cyklizaci peptidů na pryskyřici byl adaptován publikovaný protokol¹²¹ používající k oxidaci na pryskyřici N-chlorosukcinimid (NCS). Protokol byl prováděn strojově a navazoval na syntézu na pevné fázi v případě nutnosti cyklizace pomocí disulfidové vazby (Obrázek 17).

Všechny cyklizované jamky byly nejprve promyty 5 \times 60 μ l DMF. Mezi jednotlivými opakováními byl objem vsázky odstraněn evakuací odsávací nádoby po dobu 60 sekund, stejně jako v následujících krocích a jejich opakováních. Odstranění STmp²⁷ chránících skupin Cys bylo provedeno přidáním 4 \times 25 μ l redukčního roztoku s inkubací 4 minuty s pulsačním mícháním s periodou 5 s (jako v následujících inkubacích). Pryskyřice byla následně promyta 2 \times 20 μ l DMF bez inkubace a následně 5 \times 60 μ l DMF s inkubací 2 minuty k důkladnému odstranění volných sulfhydrylů, které jinak interferují s oxidací pomocí relativně malého nadbytku oxidačního činidla.



Obrázek 17. Schéma redukčního ochrání STmp skupin Cys a následné disulfidové cyklizace pomocí NCS.

Vytvoření disulfidového můstku bylo provedeno přidáním 2 \times 33 μ l oxidačního roztoku (1,05 ekvivalentu NCS ke kapacitě pryskyřice) s inkubací 7 minut. V následujícím kroku bylo přidání 2 \times 33 μ l oxidačního roztoku (kumulativně 2,1 ekv.) s inkubací opakováno

pro peptidy neobsahující Met ve své sekvenci, ostatní peptidy byly promyty $2 \times 33 \mu\text{l}$ DMF. Pryskyřice byla promyta $2 \times 20 \mu\text{l}$ DMF bez inkubace a následně $5 \times 60 \mu\text{l}$ DMF s inkubací 2 minuty a dobou odsávání mezi opakováními prodlouženou na 4 minuty.

3.5. Analýza preparací peptidů

Aminokyselinové a chromatografické analýzy byly provedeny Radkem Součkem ze skupiny medicínální chemie ÚOCHB Dr. Pavla Majera. Aminokyselinová analýza byla prováděna pomocí Biochrom 30 s ninhydrinovou derivatizací a hydrolyzou 6 N HCl při 110°C v evakuované ampuli po dobu 20 hodin. K analýze bylo předáváno $V_A = 10 \mu\text{l}$ roztoku preparátu v DMSO z celkových $V_C = 70 \mu\text{l}$. DMSO bylo před provedením analýzy odpařeno. Nalezené látkové množství peptidu n bylo vypočteno jako

$$n = \frac{V_C \sum n_{AA}}{V_A \sum x_{AA}} = 7 \frac{\sum n_{AA}}{\sum x_{AA}},$$

kde n_{AA} je nalezené látkové množství aminokyseliny a x_{AA} je její vypočtený stechiometrický koeficient. Směrodatná odchylka σ_n pozorovaného látkového množství peptidu byla vypočtena jako

$$\sigma_n = \sqrt{\frac{\sum \left(\frac{V_C n_{AA}}{V_A x_{AA}} - n \right)^2}{N-1}} = \sqrt{\frac{\sum \left(7 \frac{n_{AA}}{x_{AA}} - n \right)^2}{N-1}},$$

kde N je počet stanovovaných aminokyselin. Z těchto hodnot byly vypočteny hmotnostní výtěžky a dále procentuální výtěžky jako poměr n a teoretické kapacity pryskyřice (620 nmol). Pozorovaný stechiometrický koeficient $x_{AA,obs.}$ byl vypočten jako poměr

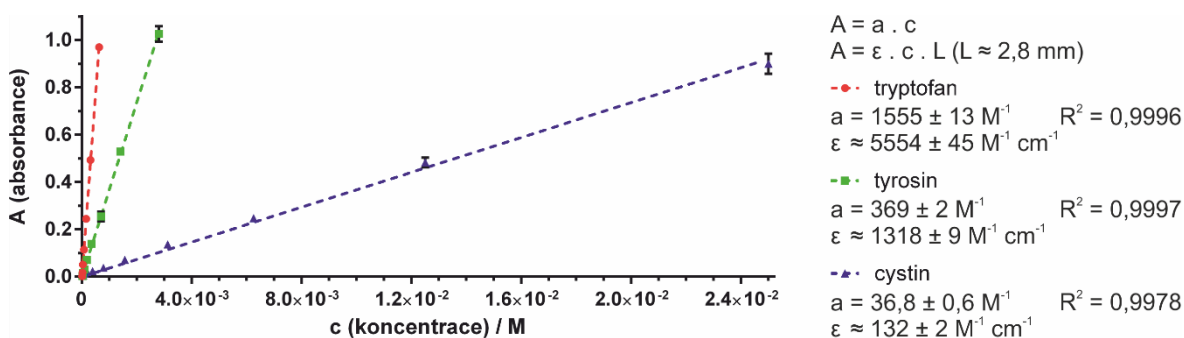
$$x_{AA,obs.} = \frac{V_C n_{AA}}{V_A n} = 7 \frac{n_{AA}}{n}.$$

Nominální ESI hmoty a čistota sloučenin byly vyhodnocovány pomocí Agilent 6230 Accurate-Mass TOF LC/MS (průtok $0,3 \text{ ml min}^{-1}$, gradient 2–100 % acetonitril během 8 min, 0,1 % kyselina mravenčí) se sloupcem Waters ACQUITY UPLC BEH C18 ($1,7 \mu\text{m}$, $100 \times 2,1 \text{ mm}$). Pro stanovení čistoty byly použity chromatogramy s UV detekcí (210 nm). Čistota byla vypočtena jako podíl plochy píku s cílovou hmotou a vůči ploše všech ostatních píků. Z výpočtu byly vyloučeny plochy píků při $t_R = 0,52$ a $1,05 \text{ min}$ představující mrtvý objem (negativní pík), resp. pík rozpouštědla (DMSO).

V rámci souborů analýz jsou souhrnné výsledky uváděny jako průměr ± směrodatná odchylka (s N – 1 korekcí jako výše¹²²), doplněné velikostí souboru (N) a variačním rozpětím R = maximum – minimum souboru.

ESI hmotnostní spektra s vysokým rozlišením byla měřena Dr. Editou Kofroňovou a Kateřinou Novákovou ze skupiny hmotnostní spektrometrie Dr. Josefa Cvačky pomocí hybridního FT hmotnostního spektrometru s Orbitrap hmotnostním analyzátozem (LTQ Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific).

Stanovení koncentrace peptidů pomocí absorbance při 280 nm bylo prováděno v UV-transparentních 384-jamkových destičkách (Greiner, 781801). Všechna měření byla prováděna ve výsledném objemu 30 μl DMSO roztoku, čímž mohly být přímo použity směrnice regresních přímek kalibračních řad (Obrázek 18; výška sloupce kapaliny nebyla přesně měřena).



Obrázek 18. Závislost absorbance při 280 nm na koncentracích aminokyselin Trp, Tyr a cystinu (objem 30 μl DMSO, odečtena absorbance rozpouštědla) se sestrojenými kalibračními přímkami. Literární hodnoty (aq., Gill a von Hippel¹²³): Trp: 5690 M⁻¹ cm⁻¹, Tyr: 1280 M⁻¹ cm⁻¹, cystin: 120 M⁻¹ cm⁻¹.

Ke stanovení bylo použito $V_A = 10$ μl roztoku preparátu naředěných na $V_D = 30$ μl v DMSO z celkových $V_C = 70$ μl. Látkové množství peptidu v preparátu odpovídající pozorované absorbanci A bylo vypočteno jako

$$n = \frac{V_D V_C}{V_A} \frac{A - A_{\text{DMSO}}}{x_{\text{Trp}} a_{\text{Trp}} + x_{\text{Tyr}} a_{\text{Tyr}} + x_{\text{cystin}} a_{\text{cystin}}} = \frac{0,21 \cdot 10^{-3} l (A - A_{\text{DMSO}})}{x_{\text{Trp}} 1555 \text{ M}^{-1} + x_{\text{Tyr}} 369 \text{ M}^{-1} + x_{\text{cystin}} 36,8 \text{ M}^{-1}}$$

kde $x_{\text{Trp/Tyr/cys}}$ představují vypočtené stechiometrické koeficienty (Trp, Tyr a cystinu), $a_{\text{Trp/Tyr/cys}}$ jsou směrnice regresních přímek (viz Obrázek 27 vpravo) a A_{DMSO} je absorbance rozpouštědla. Z hodnot látkových množství byly vypočteny hmotnostní a procentuální výtěžky jako výše.

3.5.1. Stanovení inhibičních konstant Fc-III variant

- Adsorbční pufr: 100 mM borát, pH 9.5
- TBST: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5 % v/v Tween-20, pH 7,6
- Blokační pufr: 0,5 % (w/v) kasein v TBST
- Chemiluminiscenční substrát: 100 mM Tris, 2,5 mM luminol, 2 mM 4-jodofenol, 0,2 % v/v peroxid vodíku, pH 8,0

Pro stanovování disociačních konstant ligandů bylo využito sdílení vazebného místa mezi C_{H2} a C_{H3} doménami IgG s proteinem G, který jako konjugát s HRP sloužil jako reportér. Test je prováděn v 384-jamkových destičkách (Merck, P6491) při laboratorní teplotě.

Na každou analyzovanou jamku titrační destičky bylo zachyceno 10 ng lidského IgG v 50 µl adsorbčního pufru s časem inkubace 60 minut při 100 otáčkách za minutu na orbitální třepačce (jako v následujících krocích). Destička byla vyprázdněna a následovala hodinová blokace se 100 µl blokačního pufru. Po třech promytích 100 µl TBST byla pro stanovení K_i nanesena 11-bodová ředící řada analyzovaného peptidu v TBST s koncentrací reportéru 10 pg/µl v duplikátu. Pro stanovení relativní preference byla použita koncentrace 30 nM blízká K_i parentálního Fc-III se shodnou koncentrací reportéru v triplikátu. Jako pozitivní kontrola byla použita série jamek pouze s reportérem, jako negativní kontrola byla použita série jamek s 10 µM Fc-III. Destička byla po hodinové inkubaci pětkrát promyta 100 µl TBST, bylo přidáno 75 µl chemiluminiscenčního substrátu s bezprostředním čtením luminiscence pomocí Perkin-Elmer EnSpire 2300.

Pro stanovení inhibičních konstanty byly s použitím kontrol hodnoty relativní luminiscence pro jednotlivé body přepočteny na procentuální podíl navázaného reportéru. Tyto hodnoty byly posléze vyneseny v závislosti na logaritmu koncentrace ligandu a byla provedena nelineární regrese této závislosti v programu GraphPad Prism 6 s následným použitím Cheng-Prusoffova modelu¹²⁴ pro stanovení konstanty K_i a jejího 95% intervalu spolehlivosti (koncentrace reportéru 100 pM; K_D = 6,5 nM).

Pro stanovení relativních preferencí variant peptidu Fc-III byla použita lineární transformace

$$\text{relativní preference} = \mu_{\text{var}} \frac{1}{\mu_{\text{FcIII}} - \mu_0} - \frac{\mu_0}{\mu_{\text{FcIII}} - \mu_0},$$

kde μ_{var} je průměr signálů jamek s danou variantou, μ_{FcIII} je průměr signálu jamek s parentálním Fc-III a μ_0 je průměr signálů jamek bez ligandu. Hodnota 100 % odpovídá

signálu reportéru s kompetujícím parentálním peptidem ($\mu_{\text{var}} = \mu_{\text{FcIII}}$), hodnota 0 % odpovídá signálu reportéru bez kompetujících peptidů ($\mu_{\text{var}} = \mu_0$). Tj. relativní preference >100 % označují varianty lépe kompetující s reportérem než parentální peptid, varianty s relativní preferencí <100 % kompetují hůře. Hodnoty relativních preferencí byly vyneseny jako logo-grafy pomocí tabulkového procesoru MS Excel.

3.5.2. Měření aktivity statinových inhibitorů May1

- Reakční pufr: 50 mM octan sodný, 50 mM NaCl, 0,05 % v/v Tween-20, pH 5,0
- Stopovací roztok: 50 μM pepstatin A v reakčním pufru

Měření aktivity bylo prováděno v 384-jamkových destičkách (Greiner, 781097) v duplikátu dle literárního postupu⁸⁶. Testované látky byly naneseny Beckman Coulter Echo 550 v objemu 20 nl DMSO s výslednou 800 nM koncentrací. Ve stejném objemu bylo na každé destičce naneseno 8 jamek s 10 μM pepstatinem A (výsledná koncentrace, negativní kontrola) a 8 jamek pouze s DMSO (pozitivní kontrola). Všechny jamky výsledně obsahovaly 0,8 ‰ (v/v) DMSO. Do všech jamek bylo dále naneseno 15 μl reakčního pufru s 20 μM fluorogenního substrátu IQ-2 AMC-GSPAFLAK(DNP)dR-NH₂⁸⁵. Reakce probíhající při 37 °C byly spuštěny přidáním 5 ng May1 v 10 μl reakčního pufru a po 20 minutách zastaveny přidáním 12 μl stopovacího roztoku.

Dávkování roztoků bylo prováděno pomocí Perkin-Elmer EnSpire 2300. Intenzity fluorescence byly následně stanoveny pomocí čtečky Tecan Infinite M1000 (Ex 328 nm, Em 393 nm). Závislost fluorescenčního signálu na čase se zvoleným množstvím enzymu je v průběhu 20-minutové inkubace přibližně lineární. K validaci výsledků měření byl vypočten faktor

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_+ + \sigma_-)}{|\mu_+ - \mu_-|} = 0,56 \text{ až } 0,60,$$

kde μ_+ a μ_- jsou průměrnými signály jamek pozitivních, resp. negativních kontrol a σ_+ a σ_- jsou jejich odpovídající směrodatné odchylky. Faktor Z' ležel ve všech případech v doporučeném intervalu $0,5 < Z' < 1$ ¹²⁵. Podíl aktivity za přítomnosti zkoumaného inhibitoru byl vypočten jako

$$\text{podíl aktivity} = \frac{\mu_{\text{inh}} - \mu_-}{\mu_+ - \mu_-} \approx \frac{v_i}{v_0},$$

kde μ_{inh} je průměrný signál jamek s daným inhibitorem. Vypočtené hodnoty byly následně vykresleny jako teplotní mapy pomocí tabulkového procesoru MS Excel.

3.6. Vyhodnocení parametrů přenosu kapalin

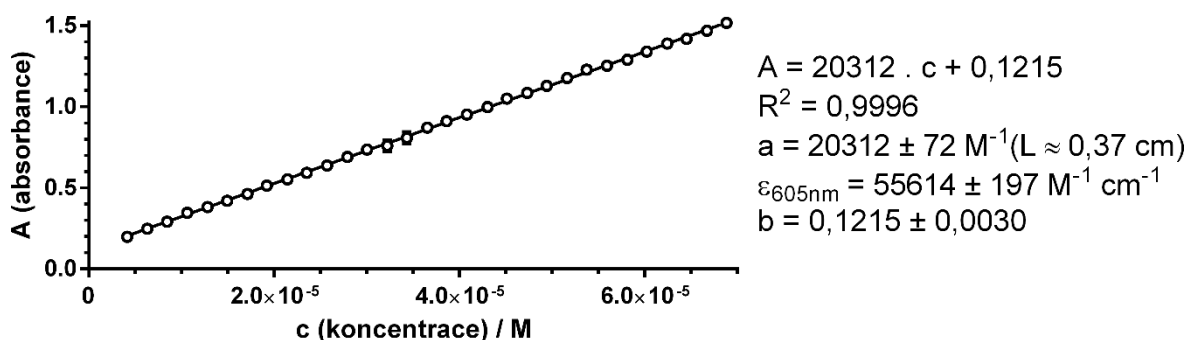
Parametry přenosu kapalin v Tabulce 5 (sekce 3.2.1.) byly stanoveny měřením absorbance roztoků bromfenolové modři (BPB) při 605 nm v 384-jamkových destičkách (Beckman Coulter, PP-0200). Roztoky BPB v DMF uvedených předpokládaných objemů V byly dávkovány do objemu $50 \mu\text{l}$ – V DMF. Hodnota koncentrace dávkovaných roztoků c byla nastavena na

$$c = 50\mu\text{l}/V \cdot 10\mu\text{M},$$

aby po nadávkování do rozpouštědla měly výsledné roztoky o objemu $50 \mu\text{l}$ shodnou teoretickou koncentrací $10 \mu\text{M}$ k vyloučení odchylek způsobených případnou nepravidelností závislosti absorbance na koncentraci. Naměřené hodnoty absorbance A byly přepočteny na přenesené objemy V_p dosazením do vztahu

$$V_p = \frac{V \cdot (A-b)}{10\mu\text{M} \cdot a} = \frac{V \cdot (A-0,1215)}{10\mu\text{M} \cdot 20312 \text{ M}^{-1}},$$

kde a , b jsou parametry regresní přímky (Obrázek 19 vpravo). V rámci 12 opakování byla stanovena směrodatná odchylka σ a průměr μ přenesených objemů V_p , které byly dosazeny do vztahů $CV = \sigma/\mu$ a přesnost $= |\mu/V - 1|$, jejichž výsledky byly výše tabelovány.



Obrázek 19. Závislost absorbance při 605 nm na koncentraci roztoku BPB v DMF (objem $50 \mu\text{l}$, $L \approx 0,37 \text{ cm}$) s regresně stanovenou kalibrační přímkou.

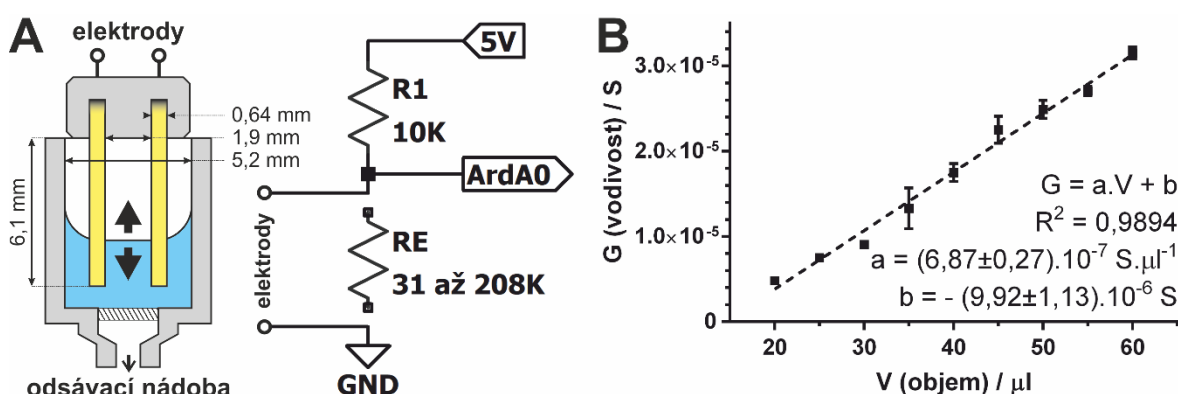
3.7. Časosběrné měření tlaku a objemu

- Měřicí směs: 90 % v/v DMF, 10 % v/v voda, 0,5 mM NaCl

Měření hodnot tlaku a objemu během pracovního cyklu pulsového míchání jamky na Obrázku 13 (sekce 3.2.1.) bylo provedeno pomocí Arduino Nano hlásícího měřené hodnoty přes sériové rozhraní. Absolutní tlak v prostoru pod destičkou byl měřen Bosch

BMP180 integrovaným pomocí I²C (použitá knihovna SFE_BMP180¹²⁶; výstupní hodnoty absolutního tlaku nebyly dále upravovány).

Objem v jamce byl měřen konduktometricky na základě napětí $U = 3,802\text{--}4,770\text{ V}$ (rozsah při kalibraci 20–60 μl) měřeného 10-bitovým převodníkem (rozlišení 4,9 mV) na centrálním uzlu napěťového děliče mezi $R_1 = 10\text{ k}\Omega$ (SMD 1002, měřen jako 9,96–10,01 k Ω , pro výpočty byl použita nominální hodnota) a proměnlivým R_E představujícím odpor rozpouštědla mezi elektrodami (Obrázek 20A). Vnitřní odpor vstupu do převodníku je předpokládán jako velmi vysoký ($R_{\text{ain}} \approx 100\text{ M}\Omega$ ¹²⁷) a byl tedy ve výpočtech zanedbán.



Obrázek 20. Popis postupu konduktometrického stanovení objemu v jamce filtrační destičky. (A) Diagram zapojení elektrod do napěťového děliče (vpravo) a jejich umístění v jamce destičky (vlevo). Jako elektrody byly použity dva pravoúhlé kolíky DuPont 2,54 mm umístěné ve čtvercové jamce o straně 3,7 mm diagonálně k maximalizaci vzdálenosti od stěn jamky. (B) Závislost vodivosti G na objemu V měřící směsi v jamce se sestojenou kalibrační přímkou.

Měření bylo prováděno za laboratorní teploty v průměrných periodách 3,5 ms (minimální doba měření BMP180 při nejnižší hodnotě vzorkování), během nichž bylo prováděno průměrování měření U . Hodnota vodivosti G byla stanovena dosazením do vzorce

$$G = \frac{U_{\text{in}} - U}{U \cdot R_1} = \frac{5\text{ V} - U}{U \cdot 10\text{ k}\Omega} = \frac{1}{R_E},$$

kde $U_{\text{in}} = 5\text{ V}$ je vstupní napětí. Objem V byl stanoven dosazením do regresní rovnice na Obrázku 20B

$$V = \frac{G - b}{a} = \frac{G + 9,92 \cdot 10^{-6}\text{ S}}{6,87 \cdot 10^{-7}\text{ S} \cdot \mu\text{l}^{-1}}$$

po vyjádření V . Měření hodnot tlaku a vypočteného objemu bylo provedeno v 7 opakováních při výchozím objemu 40 μl měřící směsi v jamce destičky. Naměřené křivky byly ručně

zarovnány dle pozice minima tlaku a pro každý bod byl stanoven průměr a směrodatná odchylka.

Pro vynesení chybových intervalů nezávislé proměnné pomocí GraphPad Prism 6 na pV diagramu bylo použito překrytí bitmap grafů s odečtenou, resp. přičtenou směrodatnou odchylkou od průměru objemu (zvolený program pro nezávislou proměnnou vykresluje pouze chybové úsečky). Symetrický rozdíl těchto dvou grafů byl vyplněn šedou barvou jako v případě intervalů odchylky závislé proměnné vykreslované programem.

3.8. Protokol ToRNAdo

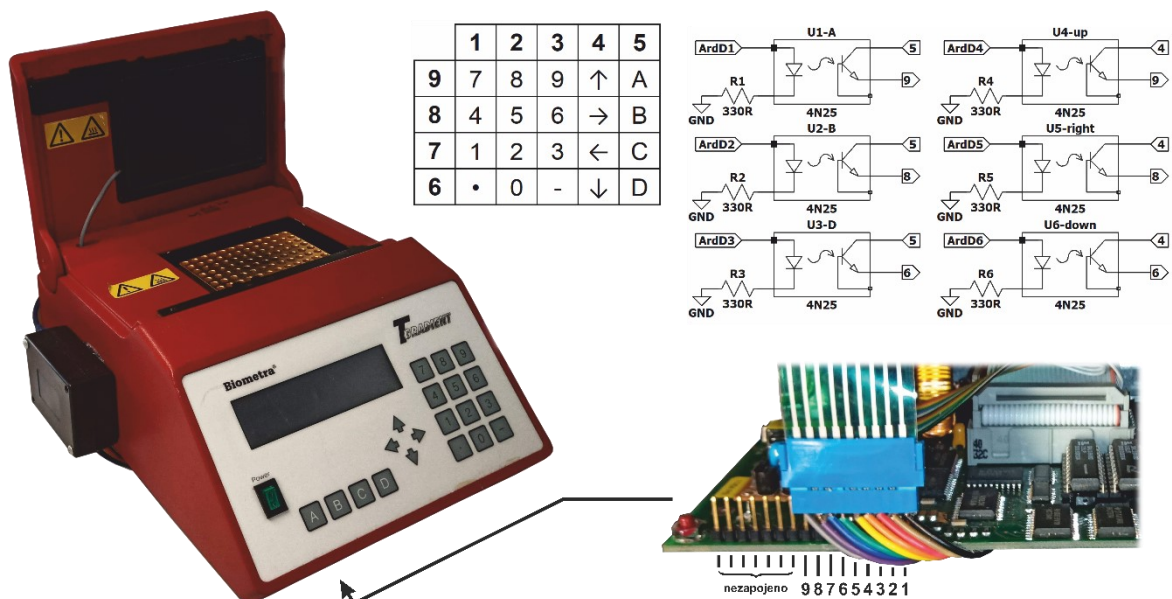
3.8.1. Popis protokolu

Jelikož je mRNA display skutečně *in vitro* evoluční metodou nevyžadující použití živého systému v žádném z kroků selekčního cyklu, je možné jej automatizovat i v minimalistickém přístrojovém uspořádání, které sestává z pipetovacího robota (Agilent Bravo) a PCR termocykleru (Biometra T-Gradient).

Nutnost integrace uzavírání PCR destičky během inkubací při vyšších teplotách byla obejita převrstvováním pracovních roztoků minerálním olejem. Převrstvení olejem zároveň chránilo reagenty v malých objemech, zejm. koncentráty enzymů v objemu 1–3 μ l, před vyschnutím v průběhu selekčního cyklu s dobou trvání 9 až 10 hodin.

Kvůli nefunkčnosti nativního externího ovládání muselo být ovládání přístroje T-Gradient realizováno simulací stisků tlačítek. Sekvence stisků ke spuštění dílčích programů a jejich následné vypnutí byly vyvolávány z rozhraní VWorks 13.0 obsluhujícího pipetovacího robota Bravo spuštěním připraveného skriptu¹²⁸ komunikujícím s Arduino Uno modulem s polem 4N25 optočlenů, které simulovaly stisky tlačítek spojováním tras vedoucím k panelu tlačítek přístroje. Tento způsob úpravy nevyžadoval nevratné úpravy stroje, ani nevylučoval běžné ovládání pomocí tlačítkového panelu.

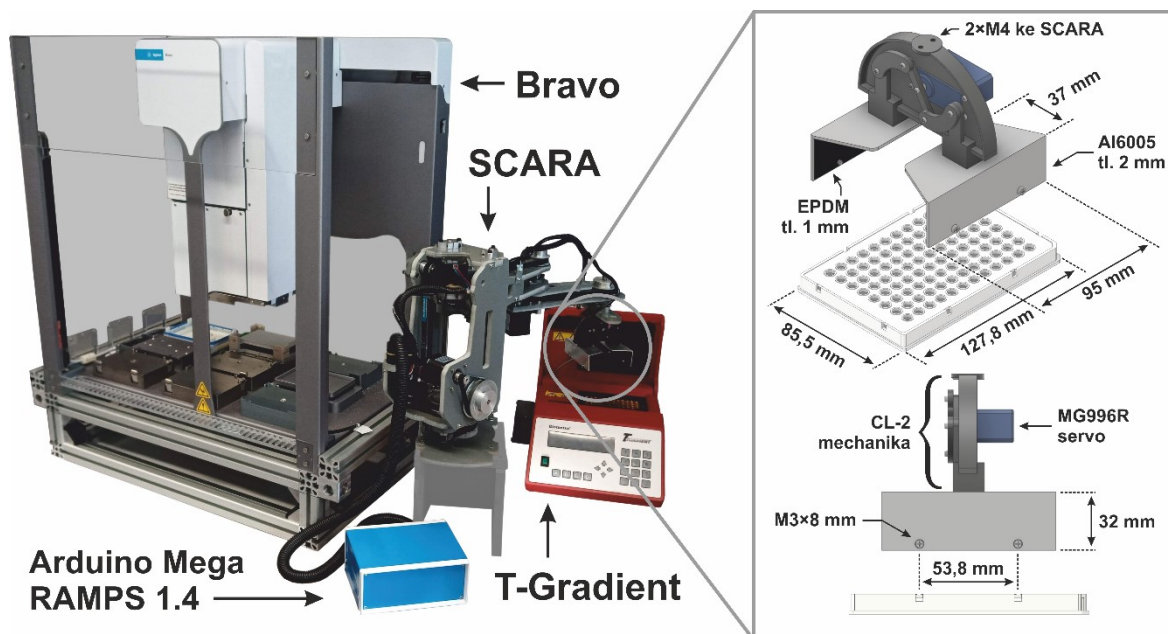
Panel přístroje má 20 tlačítek multiplexovaných do 9 spojů v konfiguraci 5×4 , jež byla odvozena pokusy a je se schématem zapojení na Obrázku 21 na následující straně. Ke spuštění a zastavení libovolného programu v paměti je nutné mít kontrolu pouze nad tlačítky A, B, D, nahoru, dolů a vpravo; ostatní tedy nebyla v ovládacím modulu zapojena.



Obrázek 21. Grafický popis úprav Biometra T-Gradient (vlevo). K tlačítkovým spojům (vpravo dole) bylo přistupeno přes patičky v levé přední části stroje označené šipkou. Tabulka nahoře popisuje způsob přemostění spojů (tučně 9–6 vlevo a 1–5 nahoře) k vyvolání stisků tlačítek (př. přemostění pinů 3 a 8 vyvolá stisk tlačítka 6). Vpravo je znázorněn diagram zapojení tranzistorových optočlenů simulujících stisky. Vstupy ArdD1 až 6 jsou digitálními výstupy Arduino Uno (v černé krabici po levé straně přístroje), číslování výstupů vpravo stejně jako v tabulce odpovídá číslování pinů ve spodní části obrázku.

Kvůli nízkému odběru ovládacího modulu a absenci nutnosti perzistentního připojení byl použit ke komunikaci a napájení modulu integrovaný sériový USB převaděč CH340G desky Uno bez negativního vlivu na stabilitu provozu. Ačkoli rozhraní chybí jakákoli zpětná vazba k potvrzení provedení příkazu (ošetřeno je pouze odeslání), ovládání tímto způsobem nevykazovalo žádné zachytitelné chyby – toto bylo ověřeno zapínáním a vypínáním protokolu společně s přesunem destičky s periodou 1 hodina se záznamem displeje kamerou po dobu 72 h.

K propojení obou přístrojů byla využita komerční SCARA (z angl. selective compliance articulated robot arm) se 4 osami obsluhovanými 42BYGH47-401A krokovými motory. Uchopovací mechanismus byl sestaven z komerční mechaniky CL-2 osazené servomotorem MG996R a hliníkových čelistí s krátkými aretačními šrouby, které zapadají do otvorů na delších stranách přenášených PCR destiček (Roche, 04729692001) k dosažení spolehlivého přesunu, který byl ověřen 72-hodinovým zátěžovým testem obdobně jako výše. Uspořádání sestavy s nákresem uchopovacího mechanismu je na Obrázku 22 na následující straně.

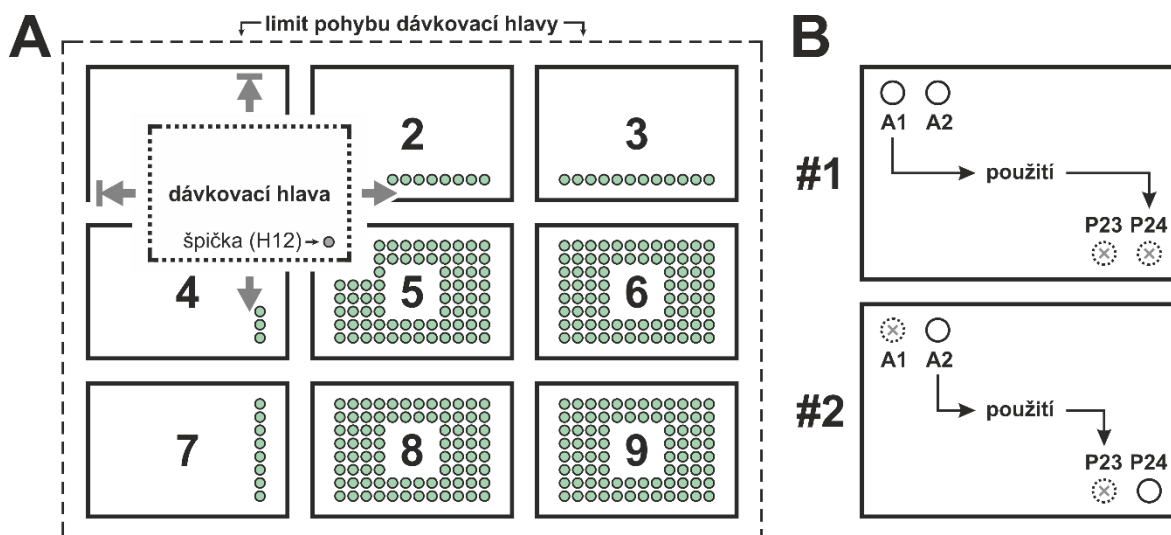


Obrázek 22. Uspořádání komponent sestavy pro protokol ToRNA do s nákresem navrženého uchopovacího mechanismu SCARA.

Jako řídicí elektronika SCARA bylo použito Arduino Mega (ATmega2560) s ovládací deskou RAMPS 1.4 obdobně jako v případě syntetizátoru SPENSER s upravenou verzí Marlin 1.1 s implementací referencování 4. osy¹⁰⁸. Sériová komunikace byla opět opticky izolována obvodem s dvojicí 6N137 optočlenů k dosažení stabilního provozu. K obsluze komunikace s rukou bylo připraveno jednoduché ovládací rozhraní¹²⁹ umožňující sestavování a ukládání pohybových sekvencí a jejich vnější volání z rozhraní VWorks.

Díky tomu, že k nakládání s kapalinami bylo použito stabilní komerční řešení, odpadla optimalizace přesnosti dávkování na úrovni hardware. Cenou za tento komfort však byla nutnost potýkání se s omezeními obslužného rozhraní VWorks a samotného hardware robota Bravo.

Robot dávkuje pomocí 3-osé hlavy s 96 až 384 kanály, na něž jsou nasazeny špičky. Dávkování může probíhat všemi kanály, po řádcích, či sloupcích a dále jednotlivými špičkami. Jelikož má dávkovací hlava pouze jednu obslužnou osu k pohybu dávkovacího pístu, je třeba k dávkování jedním dílčím kanálem nasadit jedinou špičku. Toho lze prakticky dosáhnout pouze v rohových pozicích hlavy (A1, A12, H1 a H12 pro 96-kanálovou hlavu). Rozsah pohybu stroje v osách X a Y je však omezen, což vede k omezení pozic na pracovním prostoru s možností dávkování na 4 z 9 celkem (Obrázek 23A na následující straně).



Obrázek 23. Ilustrace omezení dávkovacího systému Bravo a možností jejich obejití. (A) Znárodnění pozic, kde je možné dávkování do všech jamek (5, 6, 8 a 9) se špičkou nasazenou na pozici hlavy H12. (B) Příklad způsobu využití jedné krabičky pro nasazování i odhazování dvou jednotlivých špiček (plné kruhy) na pozici hlavy H12. Čárkované kruhy značí prázdné pozice.

Jedna z pozic je obsazena krabičkou se špičkami a další dvě PCR reakční destičkou a zásobním blokem. Zbývající pozice tedy musí být sdílena dvěma pracovními kusy – filtrační destičkou a PCR purifikační destičkou. K použití jediné krabičky k nasazování i odhazování implementován postup znázorněný na Obrázku 23B, kdy je špička nasazena na straně krabičky orientované k pozici A1 a po dokončení dávkování odhozena na straně orientované k pozici P24. Pro práci se suspensemi navíc takto mohly být do řady špiček, dle pořadí jejich použití, zahrnuty špičky se širokým ústím, aniž by bylo třeba použít separátní krabičky.

Dalším omezením je výška pracovních kusů – z těchto dominuje krabička s ST70 špičkami s výškou 53 mm. Ostatní kusy se výškou pohybují mezi 19 až 22 mm. V důsledku tohoto výškového rozdílu byla krabička se špičkami umístěna na pozici 8. K vyloučení kolize během dávkování je PCR reakční destička na pozici 9 umístěována do navrženého vyvýšeného adaptéru¹³⁰ (viz Obrázek 24 v následující sekci). Ve zvoleném uspořádání je možno na pozici 9 provádět všechny dávkovací operace s výjimkou míchání. V případě příkazu k míchání je rozhraním zachycena možná kolize a příkaz není proveden, ačkoli opakovaný příkaz k nasátí a vypuštění shodných parametrů je překvapivě proveden bez problémů.

3.8.2. Pracovní postup

- Směs 1 (na dávku 11,7 μ l): 2 μ l 10 \times AmpliScribe T7 reakční pufru, 1,8 μ l 100 mM ATP/CTP/GTP/UTP (7,2 μ l celkem), 2 μ l 100 mM DTT, 0,5 μ l RiboGuard inhibitoru RNas (40 U/ μ l)
- Směs 2 (na dávku 45 μ l): 2 μ l 100 μ M oligonukleotidu **9**, 5 μ l 10 mM ATP, 5 μ l 10 \times reakčního pufru T4 RNA ligasy (NEB), 0,5 μ l RiboGuard inhibitoru RNas (40 U/ μ l), 32,5 μ l vody
- Směs 3 (na dávku 3 μ l): 2 μ l T4 RNA ligasy 1 (10 U/ μ l, NEB), 1 μ l RiboGuard inhibitoru RNas (40 U/ μ l)
- Směs 4 (na dávku 31 μ l): 25 μ l 2 \times OneTaq jednokrokového reakčního pufru (NEB), 1,25 μ l 20 μ M primeru **4**, 1,25 μ l 200 nM primeru **10**, 1,25 μ l 200 nM primeru **11**, 1,25 μ l 20 μ M primeru **5**, 1 μ l vody
- 3 \times Konjugační roztok: 240 mM MgCl₂ 2,4 M KCl
- 6 \times Chelatační roztok: 500 mM EDTA-Na₂
- Blokační roztok: 1 % w/v DNA (*Salmo* III), 1 % w/v RNA (*Torula* IV), 1 % w/v kasein v TBST
- TBST: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,5 % v/v Tween-20, pH 7,6

Před každým provedením protokolu byly připraveny čerstvé směsi 1–4 s bezprostředně předtím rozpuštěným roztokem DTT. Milli-Q voda byla před použitím ošetřena 0,1 % DEPC s inkubací přes noc při 37 °C a následným autoklávováním při 121 °C po dobu 30 minut.

PUREfrefx 2.1 roztoky I–III byly upraveny dle dokumentace výrobce (byla využita možnost přidání DTT) a byly alikvotovány na objemy pro jedno použití dle Tabulky 9 na následující straně, šokově zmrazeny v kapalném dusíku a skladovány při –80 °C. Ostatní komponenty byly skladovány při 4 °C (konjugační roztok, pryskyřice), –20 °C (glycerolové koncentráty), či –80 °C (ostatní). Pryskyřice (anti-HA, či anti-FLAG) byla před použitím převedena do blokačního roztoku.

Před použitím byly komponenty rozmrazeny na ledu a posléze dávkovány ruční pipetou do zásobní 384-jamkové destičky (BR701355) od jamky A1 po řádcích společně s minerálním olejem dle předpisu v Tabulce 7 na následující straně pro jamky označené **a1–a19**.

Tabulka 7. Shrnutí objemů reagensů v zásobní 384-jamkové destičce.

| pozice | reagencie | objem | objem minerálního oleje |
|------------|--|--------------|-------------------------|
| a1 | směs 1 (pufr, NTP) | 11,7 μ l | 10 μ l |
| a2 | AmpliScribe T7 RNA polymerasa | 2 μ l | 10 μ l |
| a3 | směs 2 (pufr, ATP, puromycin oligo) | 45 μ l | 10 μ l |
| a4 | směs 3 (T4 RNA ligasa 1) | 3 μ l | 10 μ l |
| a5 | PUREfrex 2.1 roztok I (pufr, prekurzory aj.) | 10 μ l | 10 μ l |
| a6 | PUREfrex 2.1 roztok II (proteiny) | 1 μ l | 10 μ l |
| a7 | PUREfrex 2.1 roztok III (20 μ M ribosomy) | 2 μ l | 10 μ l |
| a8 | 3 \times konjugační roztok (Mg^{2+}/K^+ soli) | 10 μ l | 10 μ l |
| a9 | 6 \times chelatační roztok (EDTA) | 10 μ l | 10 μ l |
| a10 | TBST | 200 μ l | - |
| a11 | suspenze pryskyřice (α -FLAG, či α -HA) | 20 μ l | - |
| a12 | TBST | 200 μ l | - |
| a13 | TBST | 200 μ l | - |
| a14 | voda | 200 μ l | - |
| a15 | směs 4 (RT PCR pufr, primery) | 31 μ l | 10 μ l |
| a16 | 25 \times OneTaq jednokroková enzymová směs | 2 μ l | 10 μ l |
| a17 | minerální olej | - | 60 μ l |
| a18 | DNasa I (bez RNas, NEB, 2 U/ μ l) | 1 μ l | 10 μ l |
| a19 | TBST | 200 μ l | - |
| b1 | vstupní fragment dsDNA (100 ng/ μ l) | 10 μ l | 10 μ l |
| b2 | výstup – mRNA transkript | - | - |
| b3 | výstup – ligace DNA-mRNA | - | - |
| b4 | výstup – fúze peptid-DNA-mRNA | - | - |
| b5 | výstupní fragment dsDNA | - | - |

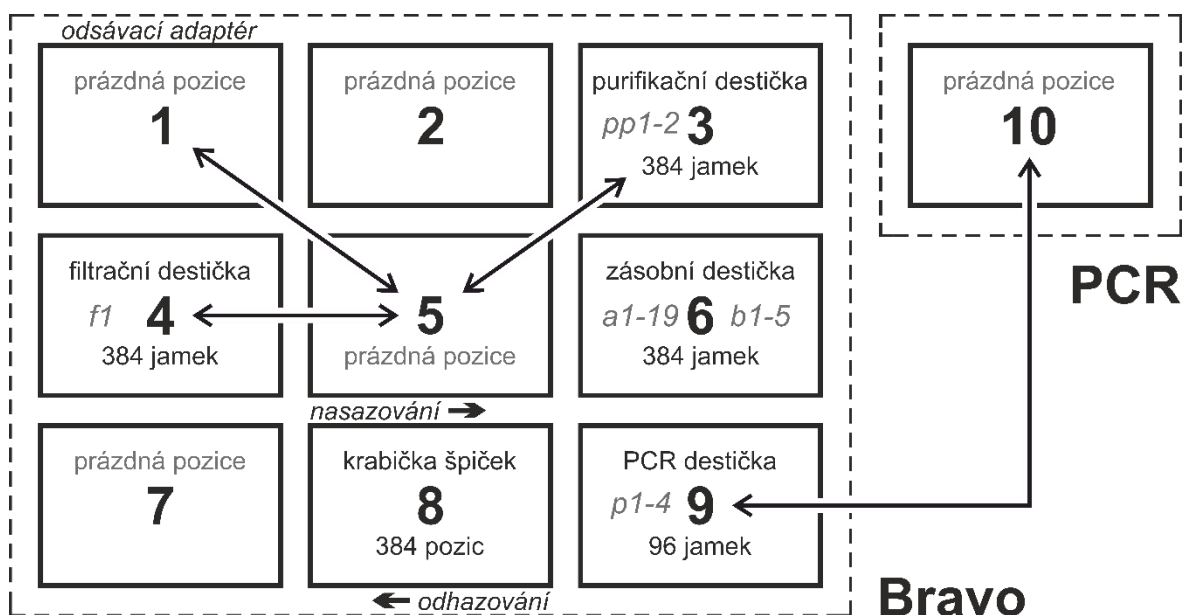
Jamky **b1–b5** jsou rozmístěny od jamky P24 po řádcích sestupně. S výjimkou jamky **b1** (vstupní fragment DNA) jsou jamky řady **b** naplňovány v průběhu protokolu. V případě paralelního provádění n reakcí byly reagencie dávkovány v n opakováních dle druhu (tzn. prokládaně). V závislosti na počtu paralelních reakcí byla naplněna zásobní krabička 70 μ l špičkami s filtrem a širokým (19134-022, ozn. W), či normálním (19133-142, ozn. N) ústím. Špičky byly umístovány od pozice A1 po řádcích v pořadí 8n \times N, 2n \times W, 9n \times N, 1n \times W, 3n \times N, kde n je počet paralelních reakcí.

Na pozice uvedené v Obrázku 24 na následující straně byly rozmístěny pracovní materiály – naplněná zásobní destička a krabička se špičkami, PCR purifikační destička (Merck, S384PCR10; jamky označené v dalším textu **pp1–2**), filtrační destička (Pall, 736-4006; jamka **f1**) a PCR destička (Roche, 04729692001; jamky **p1–4**). Následně byl protokol spuštěn.

V následujícím textu nejsou uvažovány paralelní reakce a jako pozice jamek jsou uváděny „virtuální“ pozice uvozené minuskulami z Tabulky 9 na předchozí straně

k dosažení vyšší přehlednosti. Jamky **pp1–2**, **f1** a **p1–4** byly alokovány na nepoužité úseky destiček, které byly používány opakovaně k omezení spotřeby drahého materiálu. Jamky **pp1–2** a **f1** na filtračních destičkách byly rozmístěny s roztečemi dvou jamek ve směru řádků i sloupců k vyloučení kontaminace.

Každý následující oddíl představuje podproces s vlastní špičkou – na počátku podprocesu je špička nasazena na straně krabičky orientované k pozici A1, na závěr je odhozena na straně orientované k pozici P24 (viz Obrázek 24 dole).



Obrázek 24. Rozpis obsazení pozic Agilent Bravo a Biometra T-Gradient PCR cyklieru ve výchozím stavu. Šipky označují přesuny materiálu v průběhu protokolu. Dávkování je možné pouze na pozicích 5, 6, 8 a 9. Kurzívou jsou vypsány použité jamky pro každou destičku. Nestandardní pozice: 1 – pozice s odsávacím adaptérem, 6 – chlazená pozice (4 °C), 9 – pozice s adaptérem na 96-jamkové destičky s konickými dny, 10 – blok PCR cyklieru.

3.8.2.1. Transkripce T7 RNA polymerasou

| Jamky podprocesu: | | Špička: #1 normální ústí |
|-------------------|----------------------------------|------------------------------|
| pozice | obsah | destička |
| b1 | vstupní fragment DNA (100 ng/μl) | zásobní destička (pozice 6) |
| a1 | směs 1 (pufr, NTP) | zásobní destička (pozice 6) |
| a2 | AmpliScribe T7 RNA polymerasa | zásobní destička (pozice 6) |
| p1 | transkripční jamka | PCR destička (pozice 9 » 10) |

Z jamky **b1** bylo přeneseno 6,3 μl roztoku vstupního DNA fragmentu do jamky **a1** a obsah jamky byl 3× promíchán (rozsah 6 μl). Z jamky **a1** bylo přeneseno 20 μl směsi do jamky **a2** a obsah byl 3× promíchán (10 μl). Těmito kroky byl zkombinován templát,

enzym a pufr s prekurzory. Z jamky **a2** bylo přeneseno 30 μ l směsi do jamky **p1** PCR destičky, která byla posléze přesunuta z pozice 9 na pozici 10 (PCR cyklus). Obsah destičky byl nakonec inkubován 3 hodiny při 42 °C k provedení transkripce s následným rychlým zchlazením na 25 °C.

3.8.2.2. Odstranění templátu DNAsou I

| Jamky podprocesu: | | Špička: #2 normální ústí |
|-------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| pozice | obsah | destička |
| p1 | transkripční jamka | PCR destička (pozice 10 » 9 » 10) |
| a18 | DNasa I (bez RNAs, NEB, 2 U/ μ l) | zásobní destička (pozice 6) |

Po skončení inkubace byla destička přesunuta zpět na pozici 9 a následně byla k reakci v jamce **p1** přidána DNasa I k odstranění DNA templátu. Toho bylo docíleno odebráním 15 μ l z jamky **p1** do jamky **a18**, jejíž obsah byl dále 6 \times promíchán (10 μ l). Z promíchané jamky **a18** bylo posléze přeneseno 25 μ l směsi zpět do jamky **p1** PCR destičky a obsah jamky **p1** byl 3 \times promíchán (15 μ l). Destička byla opět přesunuta z pozice 9 na pozici 10 a obsah destičky byl posléze inkubován 15 minut při 37 °C k rozštěpení DNA a dále 10 minut při 80 °C k inaktivaci DNasy I. Po skončení inkubace byla destička zchlazena na 25 °C a přesunuta zpět na pozici 9.

3.8.2.3. Hybridizace mRNA-DNA

| Jamky podprocesu: | | Špička: #3 normální ústí |
|-------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| pozice | obsah | destička |
| a14 | voda | zásobní destička (pozice 6) |
| p1 | transkripční jamka | PCR destička (pozice 9 » 10) |
| b2 | výstup – mRNA transkript | zásobní destička (pozice 6) |
| a3 | směs 2 (pufr, ATP, puromycin oligo) | zásobní destička (pozice 6) |
| p2 | hybridizační/ligační jamka | PCR destička (pozice 9 » 10) |

Nejprve byla transkripční reakce zbavená DNA templátu naředěna a po odebrání vzorku byla její část přidána ke směsi 2 obsahující DNA-puromycin oligonukleotid k hybridizaci s mRNA. Z jamky **a14** bylo přeneseno 50 μ l vody do jamky **p1** a obsah jamky byl 2 \times promíchán (40 μ l). Z promíchané jamky **p1** bylo posléze odebráno 40 μ l do jamky **b2** jako vzorek transkriptu. Z jamky **p1** byly dále odebrány 2 μ l do jamky **a3**, jejíž obsah byl poté 3 \times promíchán (40 μ l). Z promíchané jamky **a3** bylo posléze přeneseno 2 \times 27,5 μ l směsi do jamky **p2** PCR destičky, která byla poté přesunuta z pozice 9 na pozici 10. Obsah

destičky byl posléze inkubován 10 minut při 80 °C s následným kontrolovaným zchlazením na 25 °C během 5 minut k denaturaci, resp. hybridizaci nukleových kyselin.

3.8.2.4. Y ligace T4 RNA ligasou 1

| Jamky podprocesu: | | Špička: #4 normální ústí |
|-------------------|----------------------------|----------------------------------|
| pozice | obsah | destička |
| p2 | hybridizační/ligační jamka | PCR destička (pozice 9 » 10 » 9) |
| a4 | směs 3 (T4 RNA ligasa 1) | zásobní destička (pozice 6) |

V tomto kroku byla k hybridizační směsi přidána T4 RNA ligasa 1. Po skončení inkubace byla destička přesunuta zpět na pozici 9 a z jamky **p2** bylo odebráno 35 µl do jamky **a4**. Obsah jamky **a4** byl 6× promíchán (25 µl) a byl přenesen v objemu 45 µl zpět do jamky **p2** PCR destičky, která byla následně přesunuta z pozice 9 na pozici 10. Destička byla inkubována 30 minut při 25 °C k provedení Y-ligace, dále 15 minut při 65 °C k inaktivaci ligasy, a nakonec byla destička krátce zchlazena na 25 °C a přesunuta zpět na pozici 9.

3.8.2.5. *In vitro* translace

| Jamky podprocesu: | | Špička: #5 normální ústí |
|-------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| pozice | obsah | destička |
| p2 | hybridizační/ligační jamka | PCR destička (pozice 9 » 10 » 9) |
| b3 | výstup – ligace DNA-mRNA | zásobní destička (pozice 6) |
| a5 | PUREfrex 2.1 roztok I (pufr aj.) | zásobní destička (pozice 6) |
| a6 | PUREfrex 2.1 roztok II (proteiny) | zásobní destička (pozice 6) |
| a7 | PUREfrex 2.1 roztok III (ribosomy) | zásobní destička (pozice 6) |
| p3 | translační jamka | PCR destička (pozice 9 » 10 » 9) |

Z jamky **p2** bylo odebráno 35 µl do jamky **b3** jako vzorek ligovaného mRNA-DNA hybridu. Následujícími kroky byla ligační směs sekvenčně kombinována s roztoky I–III PUREfrex 2.1. Z téže jamky **p2** bylo odebráno 7 µl do jamky **a5**, jejíž obsah byl následně 3× promíchán (10 µl). Obsah jamky **a5** byl přenesen do jamky **a6** v objemu 20 µl a obsah cílové jamky byl 3× promíchán (11 µl). Následně byl obsah jamky **a6** přenesen do jamky **a7** v objemu 25 µl a obsah cílové jamky byl opět 3× promíchán (13 µl). Na závěr byl obsah jamky **a7** přenesen v objemu 30 µl do jamky **p3** PCR destičky, která byla následně přesunuta z pozice 9 na pozici 10. Destička byla inkubována 20 minut při 37 °C k provedení translace a poté byla přesunuta zpět na pozici 9.

3.8.2.6. Fúze peptidu a nukleové kyseliny

| | | |
|-------------------|--|----------------------------------|
| Jamky podprocesu: | | Špička: #6 normální ústí |
| pozice | obsah | destička |
| a8 | 3× konjugační roztok (Mg^{2+}/K^+ soli) | zásobní destička (pozice 6) |
| p3 | translační jamka | PCR destička (pozice 9 » 10 » 9) |

Obsah jamky **a8** byl přenesen v objemu 15 μ l do jamky **p3**, jejíž obsah byl následně 3× promíchán (27 μ l). Tímto krokem byl přidán koncentrát Mg^{2+} a K^+ soli k podpoře konjugace peptidu s nukleovou kyselinou. PCR destička byla následně přesunuta z pozice 9 na pozici 10 a byla inkubována 1 hodinu při 37 °C a poté 1 hodinu při 2 °C k provedení konjugace. Posléze byla destička přesunuta zpět na pozici 9.

3.8.2.7. Chelatace

| | | |
|-------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Jamky podprocesu: | | Špička: #7 normální ústí |
| pozice | obsah | destička |
| a14 | voda | zásobní destička (pozice 6) |
| p3 | translační jamka | PCR destička (pozice 9) |
| a9 | 6× chelatační roztok (EDTA) | zásobní destička (pozice 6) |
| b4 | výstup – fúze peptid-DNA-mRNA | zásobní destička (pozice 6) |

Z jamky **a14** bylo přeneseno 20 μ l vody do jamky **p3**, jejíž obsah byl následně přenesen v objemu 2×27,5 μ l do jamky **a9**. Obsah jamky **a9** byl poté 6× promíchán (40 μ l). Obsah jamky **a9** byl nakonec přenesen do jamky **b4** v objemu 2×35 μ l, jejíž obsah byl inkubován 10 minut při 4 °C. Těmito kroky byla konjugační reakce naředěna a zkombinována s EDTA k chelataci Mg^{2+} vedoucí k uvolnění produktů z ribosomů a stabilizaci RNA.

3.8.2.8. Ultrafiltrace konjugátu

| | | |
|-------------------|-------------------------------|---|
| Jamky podprocesu: | | Špička: #8 normální ústí |
| pozice | obsah | destička |
| a10 | TBST | zásobní destička (pozice 6) |
| b4 | výstup – fúze peptid-DNA-mRNA | zásobní destička (pozice 6) |
| pp1 | purifikační jamka – fúze | PCR purifikační destička (pozice 3 » 5 » 1) |

PCR purifikační destička byla přesunuta z pozice 3 na pozici 5. Z jamky **a10** bylo přeneseno 50 μ l TBST do jamky **b4**, jejíž obsah byl poté 6× promíchán (40 μ l). Z jamky **b4** bylo následně přeneseno 50 μ l do jamky **pp1** purifikační destičky, která byla nakonec přesunuta na pozici 1 s vakuovým adaptérem. Následně byla provedena

ultrafiltrace obsahu destičky při podtlaku $-0,7$ bar po dobu 35 minut. K purifikaci byla použita pouze část reakční směsi, čímž byl v jamce **b4** ve zbytkovém objemu zachován vzorek k analýze a zároveň bylo zamezeno kontaktu minerálního oleje s membránou purifikační destičky.

3.8.2.9. Vazba na pryskyřici

| Jamky podprocesu: | | Špička: #9 široké ústí |
|-------------------|--|---|
| pozice | obsah | destička |
| a10 | TBST | zásobní destička (pozice 6) |
| pp1 | purifikační jamka – konjugát | PCR purifikační destička (pozice 1 » 5 » 3) |
| a11 | suspenze pryskyřice (α FLAG / α HA) | zásobní destička (pozice 6) |

Purifikační destička byla navrácena na pozici 5. Z jamky **a10** bylo přeneseno 50 μ l TBST do jamky **pp1**, jejíž obsah byl poté 60 \times promíchán (40 μ l) k uvolnění retenátu z povrchu membrány. Z jamky **pp1** bylo následně přeneseno 45 μ l do jamky **a11**, která byla poté 20 \times promíchána (40 μ l). Suspenze byla nakonec inkubována při 4 °C po dobu 1 hodiny. Během této doby probíhala vazba konjugátu na cíl imobilizovaný na pryskyřici. Purifikační destička byla posléze navrácena na pozici 3.

3.8.2.10. Filtrace pryskyřice

| Jamky podprocesu: | | Špička: #10 široké ústí |
|-------------------|--|---|
| pozice | obsah | destička |
| a11 | suspenze pryskyřice (α FLAG / α HA) | zásobní destička (pozice 6) |
| f1 | promývací jamka | filtrační destička (pozice 4 » 5 » 1 » 5) |

Filtrační destička byla přesunuta z pozice 4 na pozici 5. Obsah jamky **a11** byl 20 \times promíchán (30 μ l) k vytvoření homogenní suspenze, která byla poté přenesena v objemu 2 \times 32,5 μ l do jamky **f1**. Filtrační destička byla posléze přesunuta na pozici 1 s vakuovým adaptérem, kde byl obsah jamek destičky odsán během 1 minuty. Filtrační destička byla nakonec navrácena na pozici 5.

3.8.2.11. Promytí pryskyřice

| Jamky podprocesů: | | Špička: #11 až #19 normální ústí |
|-------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| pozice | obsah | destička |
| a12 | TBST (použito pro opakování 1–3) | zásobní destička (pozice 6) |
| a13 | TBST (použito pro opakování 4–6) | zásobní destička (pozice 6) |
| a19 | TBST (použito pro opakování 7–9) | zásobní destička (pozice 6) |
| f1 | promývací jamka | filtrační destička (pozice 5 » 1 » 5) |

Pryskyřice byla celkem 9× promyta. Kvůli omezenému objemu jamek zásobní destičky byly pro jednotlivá opakování použity různé zdrojové jamky s TBST. Následuje popis jednoho opakování promývacího cyklu.

Do jamky **f1** bylo přeneseno 50 µl TBST z jamky **a12** (opakování 1–3), **a13** (opakování 4–6), nebo **a19** (opakování 7–9) a obsah cílové jamky byl 9× promíchán (30 µl). Filtrační destička byla následně přesunuta na pozici 1 s vakuovým adaptérem, kde byl obsah jamek destičky odsán během 1 minuty. Filtrační destička byla posléze navrácena na pozici 5.

3.8.2.12. Uvolnění konjugátu a nasednutí primerů

| Jamky podprocesu: | | Špička: #20 široké ústí |
|-------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| pozice | obsah | destička |
| a14 | voda | zásobní destička (pozice 6) |
| f1 | promývací jamka | filtrační destička (pozice 5 » 4) |
| a15 | směs 4 (RT PCR pufr, primery) | zásobní destička (pozice 6) |
| p4 | RT PCR jamka | PCR destička (pozice 9 » 10) |
| a17 | minerální olej | zásobní destička (pozice 6) |

Do jamky **f1** bylo přeneseno 30 µl vody z jamky **a14** a obsah cílové jamky byl 10× promíchán (20 µl). Suspenze z jamky **f1** byla následně přenesena do jamky **a15** v objemu 17 µl. Jamka **a15** byla 2× promíchána (35 µl) a následně byl její obsah přenesen v objemu 2×27,5 µl do jamky **p4**. Nakonec bylo z jamky **a17** přeneseno do jamky **p4** 20 µl minerálního oleje, PCR destička byla přesunuta z pozice 9 na pozici 10 a filtrační destička byla navrácena na výchozí pozici 4. Obsah PCR destičky byl inkubován 15 minut při 80 °C s následným kontrolovaným zchlazením na 25°C během 5 minut k uvolnění konjugátu tepelnou denurací cíle na pryskyřici a nasednutí primerů.

3.8.2.13. Reverzní transkripce a sestavovací PCR

Jamky podprocesu:

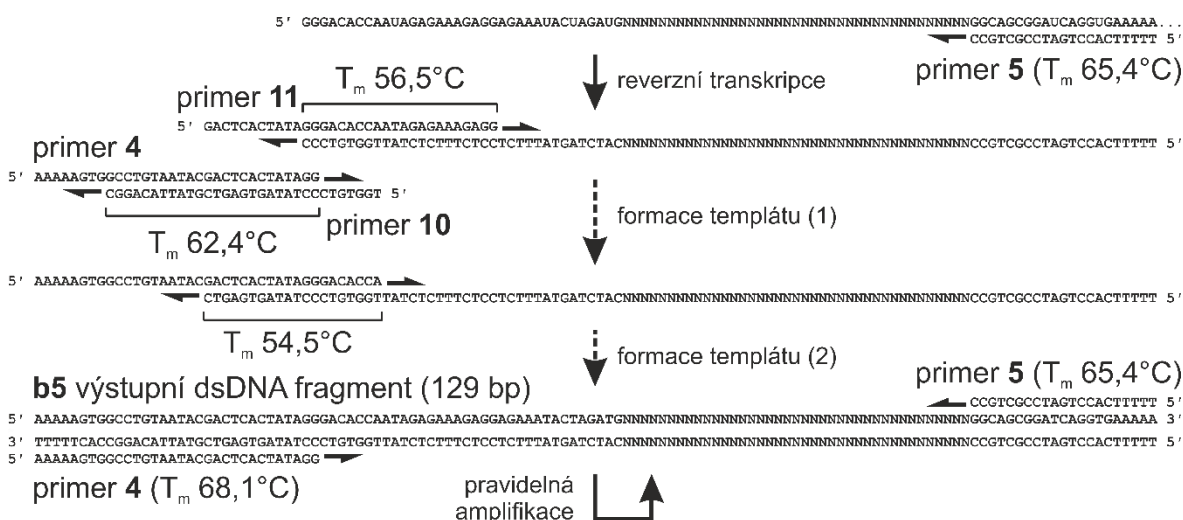
Špička: #21 normální ústí

| pozice | obsah | destička |
|------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| a16 | 25× OneTaq One-Step Enzyme Mix | zásobní destička (pozice 6) |
| p4 | RT PCR jamka | PCR destička (pozice 10 » 9 » 10 » 9) |

Po skončení inkubace byla PCR destička přesunuta zpět na pozici 9. Do jamky **a16** bylo přeneseno 30 μ l reakční směsi z jamky **p4** a obsah cílové jamky byl 5× promíchán (20 μ l). Obsah jamky **a16** byl následně přenesen v objemu 35 μ l zpět do jamky **p4**, která byla poté 2× promíchána (30 μ l). PCR destička byla posléze přesunuta z pozice 9 na pozici 10. Nakonec byl spuštěn RT PCR program popsáný v Tabulce 8 a Obrázku 25 a po jeho skončení byla destička navrácena na pozici 9.

Tabulka 8. Shrnutí sestavovacího RT PCR programu (Biometra T-Gradient).

| | teplota | čas | rychlost změny |
|----------------------|---------|-----------|----------------------|
| reverzní transkripce | 42 °C | 15 minut | 4 °C s ⁻¹ |
| úvodní denaturace | 94 °C | 1 minuta | 4 °C s ⁻¹ |
| denaturace | 94 °C | 15 sekund | 4 °C s ⁻¹ |
| nasednutí | 61 °C | 30 sekund | 3 °C s ⁻¹ |
| elongace | 68 °C | 30 sekund | 4 °C s ⁻¹ |
| závěrečná elongace | 68 °C | 1 minuta | 4 °C s ⁻¹ |
| zchlazení | 25 °C | 30 sekund | 3 °C s ⁻¹ |



Obrázek 25. Diagram reverzní transkripce a sestavovací PCR jejíž produktem byl výstupní dsDNA fragment **b5** (po purifikaci, viz dále). Znázorněny jsou predikované hodnoty T_m zohledňující různé koncentrace primerů¹⁰⁶. Pro přehlednost je uvedena pouze RNA část amplifikované fúze (nahore).

3.8.2.14. Ultrafiltrace výstupního fragmentu

| | | |
|-------------------|------------------------------|---|
| Jamky podprocesu: | Špička: #22 normální ústí | |
| pozice | obsah | destička |
| a14 | voda | zásobní destička (pozice 6) |
| pp2 | purifikační jamka – amplikon | PCR purifikační destička (pozice 3 » 5 » 1) |
| p4 | RT PCR jamka | PCR destička (pozice 9) |

PCR purifikační destička byla přesunuta z pozice 3 na pozici 5. Z jamky **a14** bylo přeneseno 30 µl vody do jamky **pp2** purifikační destičky. Do téže jamky **pp2** bylo dále přeneseno 20 µl reakční směsi z jamky **p4**, obsah cílové jamky byl 3× promíchán (20 µl) a purifikační destička byla poté přesunuta na pozici 1 s vakuovým adaptérem. Následně byla provedena ultrafiltrace obsahu destičky při podtlaku -0,7 bar po dobu 35 minut. K purifikaci byla použita pouze část reakční směsi k vyloučení přenesení sedimentované pryskyřice a minerálního oleje.

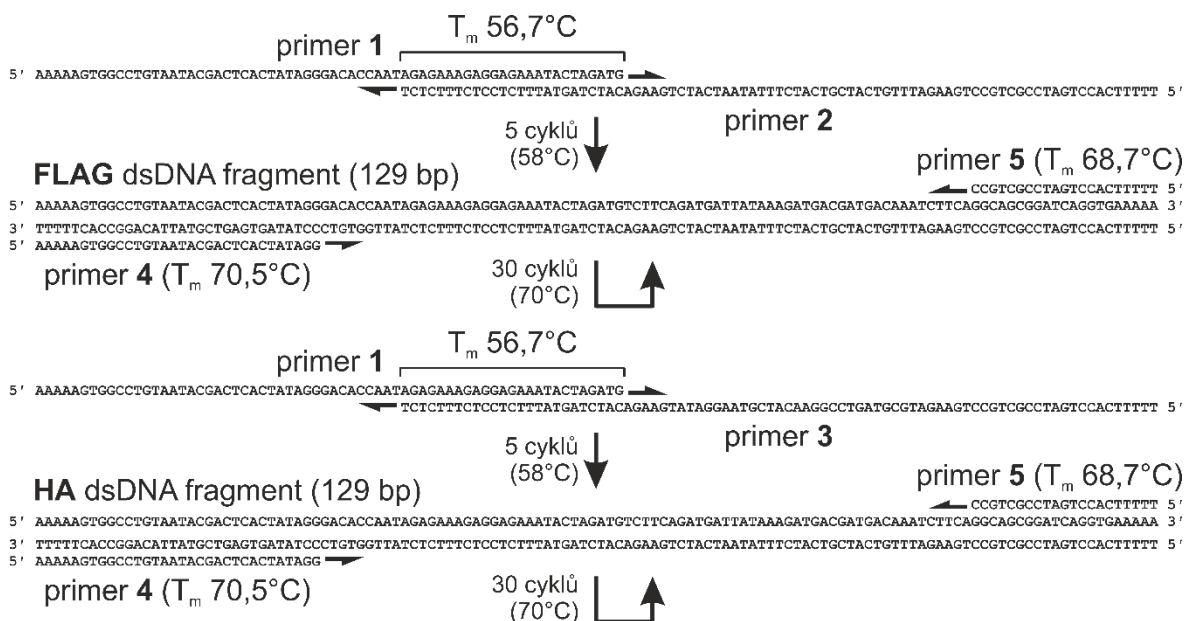
3.8.2.15. Eluce výstupního fragmentu

| | | |
|-------------------|------------------------------|---|
| Jamky podprocesu: | Špička: #23 normální ústí | |
| pozice | obsah | destička |
| a14 | voda | zásobní destička (pozice 6) |
| pp2 | purifikační jamka – amplikon | PCR purifikační destička (pozice 1 » 5 » 3) |
| b5 | výstupní fragment DNA | zásobní destička (pozice 6) |

Destička byla po skončení ultrafiltrace navrácena na pozici 5. Z jamky **a14** bylo přeneseno 50 µl vody do jamky **pp2**, jejíž obsah byl poté 60× promíchán (40 µl) k uvolnění retenátu z povrchu membrány. Z jamky **pp2** bylo následně přeneseno 45 µl do jamky **b5** jako roztok výstupního DNA fragmentu selekčního cyklu. Purifikační destička byla nakonec navrácena na výchozí pozici 3.

3.9. Sestavení vstupních DNA fragmentů

Vstupní dsDNA fragmenty pro mRNA display byly sestaveny nasednutím a doplněním primerů *Pfu* DNA polymerasou (Obrázek 26 na následující straně). Nejprve bylo provedeno sestavení s nižší teplotou nasedání 58 °C odpovídající pouze komplementárnímu úseku primerů 1–3 s následnou pravidelnou PCR amplifikací vzniklého fragmentu primery 4 a 5 při vyšší teplotě nasedání 70°C.



Obrázek 26. Diagram sestavovací PCR, jejíž produkty byly FLAG a HA vstupní dsDNA fragmenty. Znázorněny jsou predikované hodnoty T_m zohledňující různé koncentrace primerů¹⁰⁶ a zvolené teploty nasednutí.

Reakce o celkovém objemu 50 μ l v 1 \times pufru *Pfu* DNA polymerasy (výsledně 20mM Tris.HCl, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 100 μ g/ml BSA, 0,1% Triton X-100, pH 8,8) s 2 U *Pfu* DNA polymerasy obsahovala 200 μ M dNTP, 5 nM primer 1 a 5 nM primer 2 (pro FLAG fragment), nebo primer 3 (pro HA fragment), 500 nM primer 4 a 500 nM primer 5.

Reakce byla sestavována na ledu a polymerasa byla přidávána bezprostředně před spuštěním PCR programu popsaného v Tabulce 9. Po skončení programu byly fragmenty izolovány pomocí purifikační soupravy QIAquick PCR.

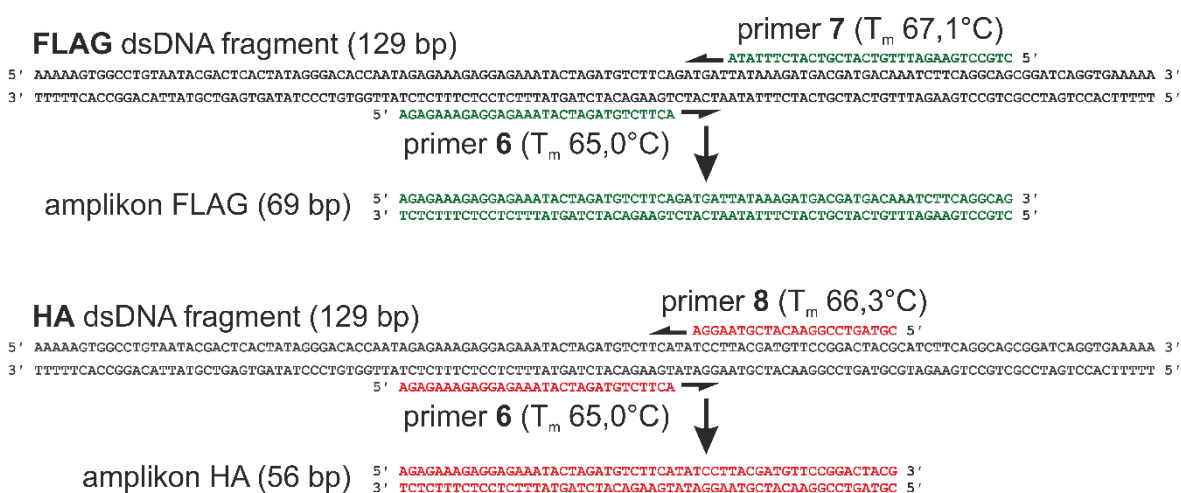
Tabulka 9. Shrnutí PCR programu (Biometra TRIO 48) pro sestavení vstupních DNA fragmentů.

| | teplota | čas | rychlost změny | |
|--------------------|---------|-----------|------------------------|-----|
| úvodní denaturace | 95 °C | 2 minuty | 5,0 °C s ⁻¹ | |
| denaturace | 95 °C | 45 sekund | 5,0 °C s ⁻¹ | 5× |
| nasednutí | 58 °C | 45 sekund | 4,2 °C s ⁻¹ | |
| elongace | 72 °C | 50 sekund | 5,0 °C s ⁻¹ | 30× |
| denaturace | 95 °C | 45 sekund | 5,0 °C s ⁻¹ | |
| nasednutí | 70 °C | 30 sekund | 4,2 °C s ⁻¹ | |
| elongace | 72 °C | 50 sekund | 5,0 °C s ⁻¹ | |
| závěrečná elongace | 72 °C | 2 minuty | 5,0 °C s ⁻¹ | |
| pausa | 16 °C | ∞ | 4,2 °C s ⁻¹ | |

3.10. Stanovení DNA fragmentů qPCR

- 4× primer mix FLAG: 2 μM primer 6, 2 μM primer 7
- 4× primer mix HA: 2 μM primer 6, 2 μM primer 8

Během tohoto protokolu byla používána voda, která byla součástí LightCycler 480 SYBR Green I Master soupravy. Roztok analyzované DNA byl předběžně kvantifikován pomocí absorbance při 260 nm ($\epsilon_w = 0,025 \text{ ml } \mu\text{g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a jeho koncentrace byla přidáním vody upravena na 100 ng/ml. Byl připraven pracovní roztok reakčních komponent smícháním 5 μl 4× primer mixu (FLAG, či HA) a 10 μl 2× SYBR Green I Master mixu. Pro každý vzorek byly připraveny dvě varianty pracovního roztoku pro stanovení FLAG a HA sekvence separátními reakcemi (Obrázek 27) v triplikátu a při zpracování více vzorků byl pracovní roztok připraven dohromady.



Obrázek 27. Diagram qPCR pro stanovení FLAG a HA fragmentů s vypočtenými T_m použitých primerů (při předpokládaných koncentracích 500 nM primeru, 50 mM soli a 1,5 mM Mg^{2+}) a výslednými amplikony detekovanými SYBR Green I.

Do každé pracovní jamky destičky (Roche, 04729692001) bylo přidáno 15 μl pracovního roztoku a posléze 5 μl připraveného roztoku DNA. Pro stanovení počtu kopií jednotlivých fragmentů byla připravena sada reakcí s 5-násobnou koncentrační řadou FLAG a HA dsDNA standardu k sestrojení kalibrační křivky. Destička byla uzavřena folií (Roche, 04729757001), centrifugována 2 minuty při 1 500 × g a analyzována na LightCycler 480 dle PCR programu je popsáno v Tabulce 10 na následující straně. Hodnoty přechodových bodů C_p byly stanoveny pomocí maxima druhé derivace závislosti fluorescenčního signálu kanálu FAM (Ex 465 nm Em 510 nm) na čísle cyklu přímo pomocí LightCycler 480 SW 1.5.1.62 SP3 v režimu „high confidence“.

Tabulka 10. Shrnutí PCR programu (LightCycler 480) pro kvantifikaci vzorků DNA.

| | teplota | čas | rychlost změny |
|-------------------|---------|-----------|------------------------|
| úvodní denaturace | 95 °C | 10 minut | 4,4 °C s ⁻¹ |
| denaturace | 95 °C | 10 sekund | 4,4 °C s ⁻¹ |
| nasednutí | 63 °C | 5 sekund | 2,2 °C s ⁻¹ |
| elongace, čtení | 72 °C | 15 sekund | 4,4 °C s ⁻¹ |
| zchlazení | 25 °C | 1 sekunda | 2,2 °C s ⁻¹ |

← 35×

3.11. Agarosová elektroforéza a imunoblot

- 1× TBE: 90 mM Tris, 90 mM kyselina boritá, 2 mM EDTA, pH 8,3
- 6× Nanášecí pufr: 60 % v/v glycerol, 20 mM Tris, 60 mM EDTA, 0,5 % w/v SDS, pH 8,0
- TBS: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6
- TBST: TBS s 0,5 % v/v Tween-20

Jestliže byl pozorován signál fluoresceinu, byla aparatura a veškeré sdílené nádoby opakovaně promyty – v případě skla vroucí vodou – k odstranění residuálních interkalátorů. Navážka 2,4 g agarosy byla rozpuštěna v 60 ml 1× TBE zahřátím v mikrovlnné troubě 600 W po dobu přibližně 5 minut s průběžným mícháním. K roztoku bylo přidáno 1,8 ml FungiSPRAY (2 % chlornan sodný, k inaktivaci nukleas¹³¹) a roztok byl krátce promíchán. V případě, že nebyl pozorován signál fluoresceinu, byly též přidány 3 µl GelRed 10 000× koncentráty (0,5× výsledně). Roztok byl následně nalit do formy, byl umístěn jamkový hřeben a špičkou byly odstraněny bubliny.

Gel byl po přibližně 20 minutách tuhnutí přenesen do elektroforetické aparatury, byl zalit po rysku 1× TBE a do jeho jamek byly nanášeny vzorky v 1× nanášecím pufru. K nanášení byl použit pufr bez barviv k vyloučení výskytu stínů. Následně byla spuštěna elektroforéza při 120 V po dobu 60 minut. Pro pozorování na transluminátoru byla pro signál fluoresceinu použita lampa 365 nm, pro signál GelRed interkalátoru 312 nm.

Elektropřenos na nitroceluloseovou membránu byl proveden v mokřém uspořádání v 0,5× TBE při 70 V po dobu 1 hodiny. Napětí bylo odpojeno bezprostředně před rozebráním aparatury, membrána byla rychle vyjmuta a ihned osušena horkovzdušnou pistolí (nejnižší výkon s teplotou proudu vzduchu přibližně 40 °C). Následující odstavce popisují též postup zpracování tečkového blotu po natečkování.

Membrána byla fixována při teplotě 80 °C po dobu 4 hodin. Následující kroky byly prováděny při laboratorní teplotě. Blokace byla provedena během 1 hodiny pomocí 3 %

kaseinu v TBS. Membrána byla poté jednou krátce promyta TBS a následně inkubována 1 hodinu s primární protilátkou – 0,5 µg/ml myší IgG_{2bκ} anti-HA 12CA5, nebo 3 µg/ml myší IgG_{1κ} anti-FLAG M2 v TBS s 3 % kaseinem. Membrána byla dvakrát promyta TBS a poté byla přidána sekundární IRDye 800CW anti-myší IgG protilátka ředěná 1:20 000 v TBS s 3 % kaseinem s inkubací též o délce 1 hodiny.

Na závěr byly provedeny během 20 minut čtyři promytí TBST, membrána byla usušena ponecháním na vzduchu mimo dosah světla po dobu 1 hodiny a následně byla analyzována pomocí fluorescenčního skeneru (LI-COR Odyssey CLx „800 kanál“, Ex 785 nm LP 810 nm, 21 µm/px, maximální kvalita, automatická korekce signálu).

3.12. Stanovení účinnosti ultrafiltrace destičkami MultiScreen

Účinnost izolace nukleových kyselin PCR purifikačními destičkami MultiScreen PCR384 byla stanovena densitometricky agarosovou elektroforézou (4 % agarosa, TBE s GelRed, Ex 315 nm, dle sekce 3.11.) v duplikátu pro každý vynesení bod.

Odstraňování oligonukleotidů probíhalo z nanášky 50 µl 10 µM roztoku ve vodě (vysoká koncentrace byla zvolena ke spolehlivé detekci residuálních oligonukleotidů), izolace meziproductů byla prováděna z 50 µl 50 ng/µl roztoku ve vodě. Ultrafiltrace obsahu destičky byla provedena při podtlaku –0,7 bar po dobu 35 minut.

Densitogramy drah byly sestrojeny pomocí doplňku Gel Analyzer v ImageJ 1.51j8¹⁰⁴. Výtěžek izolace byl vypočten jako poměr průměru ploch píků v izolátu a průměru ploch píků v nanášce.

4. Výsledky

4.1. Příprava peptidových knihoven

Jako první byl připraven panel 29 lineárních peptidů o délce 4–13 aminokyselin nevyžadující po SPPS žádné další chemické modifikace k základnímu posouzení funkčnosti syntetizátoru a navazujícího izolačního postupu. Dále byly porovnány dva postupy cyklizace pomocí disulfidového můstku prováděné ručně na modelovém peptidu oxytocinu. SPPS byla provedena s acylačními časy $A_n = 12 \times 1,06^{n-1}$ min, kde n je číslo cyklu (1 až 13), a deprotekcními časy $D = 7$ min. Charakterizace připravených peptidů pomocí LC-MS (stejně jako dále) je shrnuta v Tabulce 11. V rámci panelu bylo dosaženo průměrné čistoty preparací 63 ± 20 % ($N = 31$, $R = 92,8$ – $21,9$ %).

Tabulka 11. Charakterizace panelu lineárních peptidů a dvou preparací oxytocinu.

| název peptidu | sekvence | t_R min | čistota % | ESI m/z (nízké rozlišení) | | |
|------------------------------------|---------------------------------|--------------|--------------|---|-----------|----------|
| | | | | vzorec | vypočteno | nalezeno |
| oxytocin Cys(STmp)/NCS | H-CYIQCPLG-NH ₂ | 5,08 | 92,8 | C ₄₃ H ₆₇ N ₁₂ O ₁₂ S ₂ ⁺ | 1007,44 | 1007,45 |
| oxytocin Cys(Trt)/DMSO | H-CYIQCPLG-NH ₂ | 5,06 | 75,6 | C ₄₃ H ₆₇ N ₁₂ O ₁₂ S ₂ ⁺ | 1007,44 | 1007,45 |
| CCK-4 | H-WMDF-NH ₂ | 5,46 | 90,7 | C ₂₉ H ₃₇ N ₆ O ₆ S ⁺ | 597,25 | 597,25 |
| <i>C. albicans</i> SAP-9 (149-156) | H-KIHNLFG-NH ₂ | 4,12 | 90,1 | C ₄₅ H ₇₅ N ₁₄ O ₉ ⁺ | 955,58 | 955,58 |
| neuromedin N | H-KIPYIL-NH ₂ | 5,17 | 86,9 | C ₃₈ H ₆₅ N ₈ O ₇ ⁺ | 745,50 | 745,50 |
| Leu-enkefalin | H-YGGFL-NH ₂ | 5,21 | 83,0 | C ₂₈ H ₃₉ N ₆ O ₆ ⁺ | 555,29 | 555,30 |
| myc-tag | H-EQKLISEEDL-NH ₂ | 4,71 | 82,4 | C ₅₁ H ₈₈ N ₁₃ O ₂₀ ⁺ | 1202,63 | 1202,63 |
| Ty tag | H-EVHTNQDPLD-NH ₂ | 4,34 | 80,5 | C ₄₈ H ₇₆ N ₁₅ O ₁₉ ⁺ | 1166,54 | 1166,55 |
| kallidin | H-KRPPGFSPFR-NH ₂ | 4,34 | 79,9 | C ₅₆ H ₈₇ N ₁₈ O ₁₁ ⁺ | 1187,68 | 1187,68 |
| proinsulin C (1-13) | H-HEAEDLQVGQVEL-NH ₂ | 4,96 | 79,5 | C ₆₂ H ₁₀₁ N ₁₈ O ₂₃ ⁺ | 1465,73 | 1465,74 |
| G-LHRH | H-GHWSYGLRPG-NH ₂ | 4,49 | 74,1 | C ₅₂ H ₇₄ N ₁₇ O ₁₂ ⁺ | 1128,57 | 1128,57 |
| <i>H. sapiens</i> β-amyloid (1–13) | H-HDAEFRHDSGYEV-NH ₂ | 4,16 | 74,0 | C ₆₇ H ₉₄ N ₂₁ O ₂₃ ⁺ | 1560,68 | 1560,69 |
| bradykinin | H-RPPGFSPFR-NH ₂ | 4,58 | 72,6 | C ₅₀ H ₇₅ N ₁₆ O ₁₀ ⁺ | 1059,58 | 1059,59 |
| angiotensin II | H-DRVYIHPF-NH ₂ | 4,84 | 70,2 | C ₅₀ H ₇₃ N ₁₄ O ₁₁ ⁺ | 1045,56 | 1045,56 |
| <i>H. sapiens</i> AKT-1 (116-123) | H-EEMDFRSG-NH ₂ | 4,35 | 68,4 | C ₃₉ H ₆₁ N ₁₂ O ₁₅ S ⁺ | 969,41 | 969,41 |
| <i>H. sapiens</i> LCAP (151-158) | H-IQPFATNG-NH ₂ | 4,75 | 66,7 | C ₃₈ H ₆₀ N ₁₁ O ₁₁ ⁺ | 846,45 | 846,45 |
| VSV-tag | H-YTDIEMNRLGK-NH ₂ | 4,45 | 63,9 | C ₅₇ H ₉₆ N ₁₇ O ₁₈ S ⁺ | 1338,68 | 1338,69 |
| angiotensin I | H-DRVYIHPFHL-NH ₂ | 4,88 | 60,5 | C ₆₂ H ₉₁ N ₁₈ O ₁₃ ⁺ | 1295,70 | 1295,71 |
| SRV-1 Pol (756-765) | H-SSDIYVWQPI-NH ₂ | 5,49 | 60,1 | C ₅₇ H ₈₄ N ₁₃ O ₁₆ ⁺ | 1206,62 | 1206,62 |
| <i>M. musculus</i> MOG (91-103) | H-MEVGWYRSPFSRV-NH ₂ | 5,13 | 56,4 | C ₇₄ H ₁₁₀ N ₂₁ O ₁₈ S ⁺ | 1612,81 | 1612,81 |
| metorfamid | H-YGGFMRRV-NH ₂ | 4,40 | 55,4 | C ₄₄ H ₇₀ N ₁₃ O ₉ S ⁺ | 984,52 | 984,52 |
| ACP (65-74) | H-VQAAIDYING-NH ₂ | 5,01 | 52,5 | C ₄₇ H ₇₆ N ₁₃ O ₁₅ ⁺ | 1062,56 | 1062,56 |
| Snoop-tag | H-KLGDIEFIKVNK-NH ₂ | 4,78 | 50,8 | C ₆₅ H ₁₁₂ N ₁₇ O ₁₇ ⁺ | 1402,84 | 1402,85 |
| α-neoendorfin | H-YGGFLRKYPK-NH ₂ | 4,26 | 44,5 | C ₆₀ H ₉₁ N ₁₆ O ₁₂ ⁺ | 1227,70 | 1227,70 |
| His ₉ Lys | H-HHHHHHHHHK-NH ₂ | 0,62 | 41,4 | C ₆₀ H ₇₉ N ₃₀ O ₁₀ ⁺ | 1379,66 | 1379,69 |
| His ₉ | H-HHHHHHHHHH-NH ₂ | 0,60 | 39,3 | C ₅₄ H ₆₇ N ₂₈ O ₉ ⁺ | 1251,56 | 1251,59 |
| <i>Influenza A</i> PB1 (1-10) | H-DVNPTLLFLK-NH ₂ | 5,52 | 37,3 | C ₅₅ H ₉₂ N ₁₃ O ₁₄ ⁺ | 1158,69 | 1158,69 |
| Softag 1 | H-SLAELLNAGLGGG-NH ₂ | 5,60 | 32,4 | C ₅₁ H ₉₀ N ₁₅ O ₁₈ ⁺ | 1200,66 | 1200,66 |
| <i>B. taurus</i> BMP | H-KGDESLA-NH ₂ | 1,59 | 28,1 | C ₂₉ H ₅₂ N ₉ O ₁₂ ⁺ | 718,37 | 718,37 |
| <i>H. sapiens</i> amylin (25–37) | H-AILSSTNVGSNTY-NH ₂ | 4,85 | 27,5 | C ₅₆ H ₉₃ N ₁₆ O ₂₁ ⁺ | 1325,67 | 1325,67 |
| dynorfin B | H-YGGFLRRQFKVVT-NH ₂ | 4,71 | 21,9 | C ₇₄ H ₁₁₇ N ₂₂ O ₁₆ ⁺ | 1569,90 | 1569,91 |

Oxytocin oxidovaný pouze pomocí cyklizačního rozpouštědla¹²⁰ (50 % v/v DMSO, 100 mM (NH₄)₂CO₃, pH ~7,8) byl izolován v 75,6 % čistotě. Naproti tomu oxytocin, jehož Cys byly ochráněny a cyklizovány na pryskyřici pomocí NCS¹²¹, byl izolován v 92,8 % čistotě.

Všech 31 peptidů podstoupilo po přípravě srážení diethyletherem. Toto opatření mělo pozitivní vliv na čistotu, ale způsobilo též nekonzistentní výtěžky, které byly stanoveny pomocí absorbance při 280 nm (průměrně 48 ± 22 %, N = 17; Tabulka 12).

Tabulka 12. Kvantifikace vybraných peptidů lineárního panelu pomocí absorbance při 280 nm. Tučně jsou znázorněny absorbující aminokyseliny.

| název peptidu | sekvence | výtěžek | název peptidu | sekvence | výtěžek |
|------------------|------------------|--------------|---------------------|---------------|--------------|
| oxytocin NCS | CYIONCPLG | 506 µg (81%) | angiotensin I | DRVYIHPFHL | 392 µg (49%) |
| oxytocin DMSO | CYIONCPLG | 445 µg (71%) | SRV-1 Pol (756-765) | SSDIYWVQPI | 124 µg (17%) |
| CCK-4 | WMDF | 77 µg (21%) | rMOG (35-47) | MEVGWYRSPFSRV | 135 µg (13%) |
| neuromedin N | KIPYIL | 312 µg (67%) | metorfamid | YGGFMRRV | 325 µg (53%) |
| Leu-enkefalin | YGGFL | 225 µg (66%) | ACP (65-74) | VQAAIDYING | 345 µg (52%) |
| G-LHRH | GHWSYGLRPG | 68 µg (10%) | α-neoendorfin | YGGFLRKYPK | 345 µg (45%) |
| β-amyloid (1-13) | HDAEFRHDSGYEV | 688 µg (71%) | amylin (25-37) | AILSSTNVGSNTY | 280 µg (34%) |
| angiotensin II | DRVYIHPF | 315 µg (49%) | dynorfin B | YGGFLRRQFKVVT | 600 µg (62%) |
| VSV-tag | YTDIEMNRLGK | 581 µg (70%) | | | |

Pro porovnání obou způsobů kvantifikace byla na vybraném vzorku peptidů provedena aminokyselinová analýza (výtěžek průměrně 44 ± 23 %, N = 3; Tabulka 13). Jelikož není možno u všech peptidů spoléhat na dostatečně vysoký extinkční koeficient při 280 nm a provádění aminokyselinových analýz pro každý preparát je nereálné, srážení bylo při přípravě následujících knihoven vypuštěno za účelem dosažení konzistentních výtěžků.

Tabulka 13. Aminokyselinová analýza vybraných peptidů lineárního panelu.

| | | stechiometrie | | | | | | | | | | | výtěžek |
|--------------------|-----------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------------|
| | | D+N | E+Q | F | G | H | I | K | L | M | P | Y | |
| oxytocin | vypočteno | 1 | 1 | - | 1 | - | 1 | - | 1 | - | 1 | 1 | 72 ± 9 % |
| Cys(STmp)/NCS | nalezeno | 0,90 | 0,94 | - | 1,07 | - | 0,86 | - | 0,94 | - | 1,24 | 1,05 | 450 ± 53 µg |
| CCK-4 | vypočteno | 1 | - | 1 | - | - | - | - | - | 1 | - | - | 17 ± 2 % |
| | nalezeno | 1,07 | - | 1,07 | - | - | - | - | - | 0,86 | - | - | 63 ± 6 µg |
| <i>C. albicans</i> | vypočteno | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | - | - | - | 44 ± 8 % |
| | nalezeno | 1,09 | - | 1,13 | 1,28 | 0,78 | 0,98 | 1,39 | 1,04 | - | - | - | 262 ± 49 µg |

4.1.1. Varianty peptidu Fc-III

Jelikož syntetizátor se ukázal být schopen přípravy peptidů v čistotách slučitelných s vysokopropustnostním testováním, bylo přikročeno k přípravě skenovací knihovny peptidů založených na parentálním tridekapeptidu Fc-III⁸² H-DCAWHLGELVWCT-NH₂

s disulfidovým můstkem. Knihovna pokrývala všechny bodové záměny pozic 1, 3–11 a 13 za proteinogenní aminokyseliny s výjimkou Cys (tj. $11 \times 18 = 198$ variant a parentální Fc-III).

K cyklizaci byla na základě předchozího příkladu zvolena NCS/STmp strategie¹²¹. Acylační časy byly na základě optimalizace zvoleny jako A = [46, 36, 37, 37, 41, 42, 56, 58, 59, 53, 77, 47, 62 min] od prvního k 13. cyklu. Deprotekční časy byly nastaveny na D = [11, 12, 12, 12, 12, 14, 11, 12, 11, 17, 13, 11, 0 min]. N-terminální Asp se ukázal jako náchylný k formaci aspartimidů¹³², jeho odchraňovací čas byl tedy zkrácen na absolutní minimum nutné k nadávkování odchraňovací směsi (formálně 0, s dávkováním přibližně 140 s, ihned následováno odsáním). Tímto opatřením nebylo nutné použít k syntéze všech 180 N-koncových Asp odolnější, ale dražší blok s OBno²⁶ chráněním, který byl ve výsledku použit pouze pro 10 vnášených záměn za Asp.

Vzhledem k tomu, že cyklizace se projevuje pouze malým hmotnostním posunem, byly k jednoznačnému ověření identity látek v rámci charakterizace též stanoveny přesné hmoty (Tabulka 14) s variačním rozpětím absolutní hodnoty chyby $R = 1,271 - 0,126$ ppm. Náhodně vybraný vzorek vykazoval průměrnou čistotu 73 ± 12 % ($N = 41$, $R = 94,5 - 42,5$ %).

Tabulka 14. Charakterizace panelu variant peptidu Fc-III H-DCAWHLGELVWCT-NH₂. Varianty peptidu jsou označovány ve formátu: původní aminokyselina, pozice (N→C), zavedená aminokyselina. Řádky označené černou tečkou představují preparáty vybrané k porovnání s postupem SPPS bez pulsačního míchání popsáným dále.

| peptid | t _R min | čistota % | ESI m/z (vysoké rozlišení) | | | |
|--------------------|-----------------------|--------------|---|-----------|-----------|---|
| | | | vzorec | vypočteno | nalezeno | |
| D1F | 5,78 | 79,8 | C ₇₄ H ₁₀₂ N ₁₈ O ₁₆ S ₂ ²⁺ | 781,3576 | 781,3578 | • |
| D1H | 5,36 | 72,9 | C ₇₁ H ₁₀₀ N ₂₀ O ₁₆ S ₂ ²⁺ | 776,3528 | 776,3533 | |
| D1R | 5,35 | 54,0 | C ₇₁ H ₁₀₅ N ₂₁ O ₁₆ S ₂ ²⁺ | 785,8739 | 785,8745 | |
| D1S | 5,71 | 82,6 | C ₆₈ H ₉₈ N ₁₈ O ₁₇ S ₂ ²⁺ | 751,3394 | 751,3396 | • |
| A3M | 5,64 | 86,5 | C ₇₁ H ₁₀₂ N ₁₈ O ₁₈ S ₃ ²⁺ | 795,3385 | 795,3395 | • |
| A3S | 5,87 | 74,8 | C ₆₉ H ₉₈ N ₁₈ O ₁₉ S ₂ ²⁺ | 773,3343 | 773,3346 | • |
| A3W | 5,75 | 62,6 | C ₇₇ H ₁₀₃ N ₁₉ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 822,8579 | 822,8590 | |
| W4D | 5,41 | 52,9 | C ₆₂ H ₉₃ N ₁₇ O ₂₀ S ₂ ²⁺ | 729,8107 | 729,8112 | |
| W4E | 5,55 | 71,1 | C ₆₃ H ₉₅ N ₁₇ O ₂₀ S ₂ ²⁺ | 736,8185 | 736,8186 | • |
| W4R | 5,17 | 70,6 | C ₆₄ H ₁₀₀ N ₂₀ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 750,3477 | 750,3484 | |
| W4S | 5,51 | 85,5 | C ₆₁ H ₉₃ N ₁₇ O ₁₉ S ₂ ²⁺ | 715,8132 | 715,8133 | • |
| H5A | 6,27 | 94,5 | C ₆₆ H ₉₅ N ₁₆ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 1463,6446 | 1463,6452 | • |
| H5E | 6,15 | 80,8 | C ₆₈ H ₉₇ N ₁₆ O ₂₀ S ₂ ²⁺ | 1521,6501 | 1521,6487 | • |
| H5F | 6,57 | 82,1 | C ₇₂ H ₉₉ N ₁₆ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 1539,6759 | 1539,6768 | • |
| H5K | 5,85 | 69,2 | C ₆₉ H ₁₀₃ N ₁₇ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 760,8549 | 760,8552 | • |
| L6E | 5,47 | 80,5 | C ₆₈ H ₉₄ N ₁₈ O ₂₀ S ₂ ²⁺ | 773,3161 | 773,3165 | • |
| L6F | 5,96 | 78,6 | C ₇₂ H ₉₆ N ₁₈ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 782,3290 | 782,3294 | • |
| L6G | 5,41 | 66,0 | C ₆₅ H ₉₀ N ₁₈ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 737,3055 | 737,3061 | • |
| L6S | 5,46 | 59,9 | C ₆₆ H ₉₂ N ₁₈ O ₁₉ S ₂ ²⁺ | 752,3108 | 752,3112 | • |
| G7A | 5,95 | 77,1 | C ₇₀ H ₁₀₀ N ₁₈ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 772,3447 | 772,3451 | • |
| parentální peptid: | | | | | | |
| G7D | 5,69 | 86,2 | C ₇₁ H ₁₀₀ N ₁₈ O ₂₀ S ₂ ²⁺ | 794,3396 | 794,3406 | |
| G7H | 5,31 | 68,5 | C ₇₃ H ₁₀₂ N ₂₀ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 805,3556 | 805,3560 | |
| G7R | 5,53 | 54,4 | C ₇₃ H ₁₀₇ N ₂₁ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 814,8767 | 814,8775 | |
| E8F | 6,22 | 77,0 | C ₇₃ H ₁₀₀ N ₁₈ O ₁₆ S ₂ ²⁺ | 774,3498 | 774,3500 | • |
| E8G | 5,86 | 71,3 | C ₆₆ H ₉₄ N ₁₈ O ₁₆ S ₂ ²⁺ | 729,3263 | 729,3266 | • |
| E8M | 5,86 | 53,8 | C ₆₉ H ₁₀₀ N ₁₈ O ₁₆ S ₃ ²⁺ | 766,3358 | 766,3364 | • |
| L9A | 5,59 | 78,0 | C ₆₆ H ₉₂ N ₁₈ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 744,3134 | 744,3138 | • |
| L9G | 5,63 | 82,6 | C ₆₅ H ₉₀ N ₁₈ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 737,3055 | 737,3062 | • |
| L9R | 5,11 | 67,9 | C ₆₉ H ₉₉ N ₂₁ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 786,8454 | 786,8456 | • |
| V10I | 5,69 | 69,1 | C ₇₀ H ₁₀₀ N ₁₈ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 772,3447 | 772,3451 | |
| V10N | 5,64 | 79,9 | C ₆₈ H ₉₅ N ₁₉ O ₁₉ S ₂ ²⁺ | 772,8241 | 772,8245 | |
| V10W | 5,79 | 78,5 | C ₇₅ H ₉₉ N ₁₉ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 808,8423 | 808,8427 | |
| W11L | 5,73 | 89,4 | C ₆₄ H ₉₉ N ₁₇ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 728,8392 | 728,8397 | |
| W11P | 5,59 | 42,5 | C ₆₃ H ₉₅ N ₁₇ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 720,8236 | 720,8241 | |
| W11Q | 5,40 | 56,5 | C ₆₃ H ₉₆ N ₁₈ O ₁₉ S ₂ ²⁺ | 736,3265 | 736,3270 | |
| W11T | 5,50 | 70,6 | C ₆₂ H ₉₅ N ₁₇ O ₁₉ S ₂ ²⁺ | 722,8210 | 722,8215 | |
| T13A | 5,87 | 85,7 | C ₆₈ H ₉₆ N ₁₈ O ₁₇ S ₂ ²⁺ | 750,3316 | 750,3319 | • |
| T13G | 5,86 | 80,7 | C ₆₇ H ₉₄ N ₁₈ O ₁₇ S ₂ ²⁺ | 743,3237 | 743,3241 | • |
| T13V | 5,87 | 84,9 | C ₇₀ H ₁₀₀ N ₁₈ O ₁₇ S ₂ ²⁺ | 764,3472 | 764,3477 | |
| T13Y | 5,83 | 71,0 | C ₇₄ H ₁₀₀ N ₁₈ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 796,3447 | 796,3449 | |
| Fc-III | 5,79 | 56,0 | C ₆₉ H ₉₈ N ₁₈ O ₁₈ S ₂ ²⁺ | 765,3368 | 765,3374 | • |

Na hmotnostních spektrech preparátů nebyly nalezeny necyklizované peptidy – distribuce hmot přibližně odpovídala teoretickému rozložení bez nárůstu intenzity třetího píku (M+2). U vybraných peptidů byla provedena aminokyselinová analýza (Tabulka 15). Díky vypuštění precipitace bylo dosaženo konzistentnějších výtěžků (průměr $58 \pm 10 \%$, $N = 8$) ve srovnání s lineárním panelem.

Tabulka 15. Aminokyselinová analýza vybraných variant peptidu Fc-III.

| | | stechiometrie | | | | | | | | | | výtěžek |
|------|-----------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--------------------------|
| | | A | D+N | E+Q | F | G | H | L | S | T | V | |
| D1S | vypočteno | 1 | – | 1 | – | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | $55 \pm 7 \%$ |
| | nalezeno | 1,02 | – | 0,95 | – | 1,17 | 0,84 | 1,95 | 1,20 | 1,01 | 0,83 | $517 \pm 65 \mu\text{g}$ |
| W4S | vypočteno | 1 | 1 | 1 | – | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | $54 \pm 6 \%$ |
| | nalezeno | 1,03 | 1,01 | 0,92 | – | 1,15 | 0,94 | 1,92 | 1,19 | 0,97 | 0,83 | $476 \pm 50 \mu\text{g}$ |
| H5A | vypočteno | 2 | 1 | 1 | – | 1 | – | 2 | – | 1 | 1 | $68 \pm 7 \%$ |
| | nalezeno | 1,85 | 1,09 | 0,96 | – | 1,14 | – | 1,94 | – | 1,08 | 0,83 | $613 \pm 62 \mu\text{g}$ |
| H5E | vypočteno | 1 | 1 | 2 | – | 1 | – | 2 | – | 1 | 1 | $67 \pm 7 \%$ |
| | nalezeno | 1,08 | 1,02 | 1,74 | – | 1,14 | – | 1,92 | – | 1,10 | 0,84 | $636 \pm 68 \mu\text{g}$ |
| H5F | vypočteno | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | – | 2 | – | 1 | 1 | $67 \pm 6 \%$ |
| | nalezeno | 1,03 | 1,07 | 0,95 | 1,07 | 1,10 | – | 1,89 | – | 1,03 | 0,81 | $644 \pm 57 \mu\text{g}$ |
| L6E | vypočteno | 1 | 1 | 2 | – | 1 | 1 | 1 | – | 1 | 1 | $62 \pm 8 \%$ |
| | nalezeno | 1,05 | 1,01 | 1,66 | – | 1,22 | 0,90 | 1,06 | – | 1,12 | 0,80 | $596 \pm 81 \mu\text{g}$ |
| L9G | vypočteno | 1 | 1 | 1 | – | 2 | 1 | 1 | – | 1 | 1 | $36 \pm 3 \%$ |
| | nalezeno | 1,03 | 1,10 | 1,00 | – | 1,99 | 0,95 | 1,01 | – | 1,09 | 0,82 | $326 \pm 27 \mu\text{g}$ |
| T13A | vypočteno | 2 | 1 | 1 | – | 1 | 1 | 2 | – | – | 1 | $51 \pm 6 \%$ |
| | nalezeno | 1,80 | 1,09 | 1,07 | – | 1,23 | 0,96 | 1,86 | – | – | 0,83 | $477 \pm 60 \mu\text{g}$ |

Knihovna variant peptidu Fc-III byla dále připravena ve shodném uspořádání bez pulsačního míchání pro porovnání obou postupů syntézy s průměrnou čistotou preparátů $37 \pm 23 \%$ ($N = 21$). K porovnání byly vybrány páry preparátů označené černou tečkou v Tabulce 14 na předchozí straně.

4.1.2. Fragменты proteinů SARS-CoV-2

Dále byla připravena epitopová knihovna peptidových fragmentů S glykoproteinu SARS-CoV-2 dle referenční sekvence Uniprot P0DTC2 (délka 1273 aminokyselin). Knihovna sestávala z 253 peptidů o délce 15 aminokyselin pokrývajících celou sekvenci glykoproteinu se vzájemným překryvem 10 aminokyselin (tj. n-tý fragment pokrývá uzavřený úsek sekvence $5n-4$ až $10+5n$). Poslední C-koncový fragment měl délku 13 aminokyselin. Všechny Cys vyskytující se v původní sekvenci byly zaměněny za Ser.

K přípravě knihovny bylo přistoupeno bez předchozí optimalizace. Jelikož fragmenty postrádaly jakékoli intuitivně odvoditelné společné vlastnosti ve vztahu k jednotlivým syntetickým cyklům, acylační čas byl zvolen jako $A_n = 20 \times 1,09^{n-1}$ min k alespoň hrubé podpoře acylace ke konci programu (1. cyklus $A_1 = 20$ minut, poslední $A_{15} = 1$ h 7 min). Deprotekční časy byly nastaveny na $D = 4$ min. K ověření čistoty a identity bylo vybráno

N = 22 náhodných preparací peptidů (Tabulka 16 na následující straně) vykazujících průměrnou čistotu 50 ± 20 % (R = 77,2–3,5 %).

Tabulka 16. Charakterizace panelu peptidových fragmentů S glykoproteinu SARS-CoV-2.

| úsek | sekvence | t _R min | čistota % | ESI m/z (nízké rozlišení) | | |
|-----------|-----------------------------------|-----------------------|--------------|--|-----------|----------|
| | | | | vzorec | vypočteno | nalezeno |
| 1-15 | H-MFVFLVLLPLVSSQS-NH ₂ | 7,00 | 40,2 | C ₈₁ H ₁₃₂ N ₁₇ O ₁₉ S ⁺ | 1678,96 | 1678,99 |
| 101-115 | H-IRGWIFGTTLDSTQ-NH ₂ | 5,48 | 27,0 | C ₇₈ H ₁₂₆ N ₂₂ O ₂₂ ²⁺ | 861,47 | 861,50 |
| 236-250 | H-TRFQTLLALHRSYLT-NH ₂ | 5,26 | 67,9 | C ₈₃ H ₁₃₆ N ₂₅ O ₂₁ ⁺ | 1819,03 | 1819,08 |
| 256-270 | H-SGWTAGAAAYVGYL-NH ₂ | 6,11 | 77,2 | C ₇₄ H ₁₀₂ N ₁₇ O ₂₀ ⁺ | 1548,75 | 1548,78 |
| 296-310 | H-LSETKSTLKSFTVEK-NH ₂ | 4,59 | 56,9 | C ₇₅ H ₁₃₀ N ₁₉ O ₂₅ ⁺ | 1696,95 | 1696,99 |
| 371-385 | H-SASFSTFKSYGVSP-NH ₂ | 5,20 | 57,0 | C ₇₁ H ₁₀₆ N ₁₇ O ₂₃ ⁺ | 1564,76 | 1564,80 |
| 506-520 | H-QPYRVVLSFELLHA-NH ₂ | 5,99 | 44,1 | C ₈₄ H ₁₃₃ N ₂₂ O ₂₀ ⁺ | 1770,01 | 1770,05 |
| 516-530 | H-ELLHAPATVSGPKKS-NH ₂ | 4,46 | 56,6 | C ₆₈ H ₁₁₇ N ₂₀ O ₂₀ ⁺ | 1533,87 | 1533,91 |
| 681-695 | H-PRRARSVASQSIAY-NH ₂ | 4,64 | 44,7 | C ₇₂ H ₁₂₆ N ₂₆ O ₂₀ ²⁺ | 837,48 | 837,51 |
| 721-735 | H-SVTTEILPVSMTKTS-NH ₂ | 5,36 | 49,6 | C ₆₈ H ₁₂₂ N ₁₇ O ₂₄ S ⁺ | 1592,86 | 1592,90 |
| 781-795 | H-VFAQVKQIYKTPPIK-NH ₂ | 4,85 | 38,6 | C ₈₅ H ₁₄₀ N ₂₁ O ₁₉ ⁺ | 1759,06 | 1759,11 |
| 871-885 | H-AQYTSALLAGTITSG-NH ₂ | 5,60 | 74,0 | C ₆₃ H ₁₀₆ N ₁₇ O ₂₂ ⁺ | 1452,77 | 1452,81 |
| 891-905 | H-GAALQIPFAMQMAYR-NH ₂ | 5,88 | 55,4 | C ₇₅ H ₁₂₀ N ₂₁ O ₁₈ S ₂ ⁺ | 1666,86 | 1666,90 |
| 996-1010 | H-LITGRLQSLQTYVTQ-NH ₂ | 5,43 | 37,4 | C ₇₆ H ₁₃₂ N ₂₂ O ₂₃ ²⁺ | 860,49 | 860,52 |
| 1006-1020 | H-TYVTQQLIRAAEIRA-NH ₂ | 5,42 | 52,9 | C ₇₆ H ₁₃₂ N ₂₄ O ₂₂ ²⁺ | 866,50 | 866,53 |
| 1026-1040 | H-ATKMSSEVLGQSKRV-NH ₂ | 4,41 | 66,5 | C ₆₇ H ₁₂₃ N ₂₂ O ₂₂ S ⁺ | 1619,89 | 1619,94 |
| 1046-1060 | H-GYHLMSFPQSAPHGV-NH ₂ | 5,17 | 56,9 | C ₇₄ H ₁₀₈ N ₂₁ O ₁₉ S ⁺ | 1626,78 | 1626,83 |
| 1056-1070 | H-APHGVVFLHVTVVPA-NH ₂ | 5,37 | 66,3 | C ₇₈ H ₁₁₇ N ₂₀ O ₁₇ ⁺ | 1605,89 | 1605,94 |
| 1201-1215 | H-QELGKYEQYIKWPWY-NH ₂ | 5,79 | 56,2 | C ₁₀₀ H ₁₃₇ N ₂₂ O ₂₄ ⁺ | 2030,02 | 2030,08 |
| 1221-1235 | H-IAGLIAIVMVTIMLS-NH ₂ | 7,69 | 3,5 | C ₇₁ H ₁₃₁ N ₁₆ O ₁₇ S ₂ ⁺ | 1543,93 | 1543,98 |
| 1241-1255 | H-SSSLKGSSSGSSSK-NH ₂ | 1,38 | 5,2 | C ₅₂ H ₉₅ N ₁₈ O ₂₅ ⁺ | 1371,67 | 1371,70 |
| 1261-1273 | H-SEPVLKGVKLHYT-NH ₂ | 4,75 | 72,5 | C ₆₈ H ₁₁₃ N ₁₈ O ₁₈ ⁺ | 1469,85 | 1469,89 |

Na vzorku vybraných preparací byla provedena aminokyselinová analýza (Tabulka 17). Průměrný výtěžek byl 60 ± 12 % (N = 3).

Tabulka 17. Aminokyselinová analýza vybraných fragmentů S glykoproteinu.

| | | stechiometrie | | | | | | | | | | | | | | výtěžek | |
|-----------|-----------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------|-------------|
| | | A | D+N | E+Q | F | G | I | K | L | M | P | R | S | T | V | | Y |
| 256–270 | vypočteno | – | – | 2 | 1 | – | – | 3 | 2 | – | – | – | 3 | 3 | 1 | – | 48 ± 6 % |
| | nalezeno | – | – | 2,06 | 1,11 | – | – | 2,23 | 2,15 | – | – | – | 3,43 | 2,92 | 0,92 | – | 456 ± 58 μg |
| 871–885 | vypočteno | 4 | – | 2 | 1 | 1 | 1 | – | 1 | 2 | 1 | 1 | – | – | – | 1 | 58 ± 8 % |
| | nalezeno | 3,07 | – | 1,91 | 1,04 | 1,12 | 0,83 | – | 1,02 | 1,74 | 1,14 | 1,01 | – | – | – | 1,24 | 522 ± 73 μg |
| 1261–1273 | vypočteno | – | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | – | – | 1 | 1 | 3 | – | – | 76 ± 9 % |
| | nalezeno | – | 0,87 | 1,07 | 1,10 | 2,20 | 1,92 | 0,86 | 1,10 | – | – | 0,98 | 1,15 | 2,45 | – | – | 691 ± 79 μg |

Jako další byla připravena knihovna peptidových fragmentů koronavirového nukleoproteinu dle referenční sekvence Uniprot P0DTC9, sestávající z 208 peptidů o délce 15 aminokyselin pokrývajících celou sekvenci nukleoproteinu se vzájemným překryvem 13 aminokyselin. Menší posun mezi fragmenty mohl být zvolen kvůli kratší délce nukleoproteinu 419 aminokyselin. Posledních 5 C-koncových fragmentů mělo délku 5–13 aminokyselin. Všechny Cys byly opět zaměněny za Ser.

Acylační čas byl zvolen jako $A_n = 23 \times 1,04^{n-1}$ min, což představuje mírně delší acylaci zpočátku a výrazně kratší acylaci ke konci programu než v případě SPPS S glykoproteinu (1. cyklus $A_1 = 23$ minut, poslední $A_{15} = 39$ min 50 s). Depleteční časy byly nastaveny na $D = 5$ min, tedy o 25% delší než u předchozí knihovny. K ověření čistoty a identity bylo opět vybráno $N = 22$ náhodných preparací peptidů (Tabulka 18) vykazujících průměrnou čistotu 62 ± 25 % ($R = 90,5-2,0$ %).

Tabulka 18. Charakterizace panelu peptidových fragmentů nukleoproteinů SARS-CoV-2.

| úsek | sekvence | t_R min | čistota % | ESI m/z (nízké rozlišení) | | |
|---------|------------------------------------|--------------|--------------|--|-----------|----------|
| | | | | vzorec | vypočteno | nalezeno |
| 5-19 | H-GPQNQRNAPRITFGG-NH ₂ | 4,68 | 69,6 | C ₆₈ H ₁₁₁ N ₂₆ O ₂₀ ⁺ | 1611,85 | 1611,87 |
| 31-45 | H-ERSGARSKQRRPQGL-NH ₂ | 1,24 | 2,0 | C ₆₉ H ₁₂₇ N ₃₁ O ₂₁ ²⁺ | 862,99 | 862,99 |
| 59-73 | H-HGKEDLKFPRGQGV-NH ₂ | 4,45 | 69,7 | C ₇₄ H ₁₁₉ N ₂₄ O ₂₀ ⁺ | 1663,90 | 1663,94 |
| 83-97 | H-QIGYYRRATRRIRGG-NH ₂ | 4,21 | 62,8 | C ₇₈ H ₁₃₄ N ₃₂ O ₁₉ ²⁺ | 911,52 | 911,54 |
| 105-119 | H-SPRWYFYLLGTGPEA-NH ₂ | 5,82 | 82,5 | C ₈₈ H ₁₁₇ N ₂₀ O ₂₂ ⁺ | 1805,86 | 1805,89 |
| 111-125 | H-YYLGTGPEAGLPYGA-NH ₂ | 5,62 | 78,7 | C ₇₂ H ₁₀₃ N ₁₆ O ₂₁ ⁺ | 1527,75 | 1527,77 |
| 129-143 | H-GIIWVATEGALNTPK-NH ₂ | 5,66 | 65,1 | C ₇₂ H ₁₁₈ N ₁₉ O ₂₀ ⁺ | 1568,88 | 1568,90 |
| 155-169 | H-AAIVLQLPQGTTLPK-NH ₂ | 5,54 | 85,5 | C ₇₁ H ₁₂₆ N ₁₉ O ₁₉ ⁺ | 1548,95 | 1548,97 |
| 163-177 | H-QGTTLPKGFYAEGSR-NH ₂ | 4,83 | 47,7 | C ₇₁ H ₁₁₃ N ₂₁ O ₂₂ ²⁺ | 805,92 | 805,93 |
| 171-185 | H-FYAEGSRGGSQASSR-NH ₂ | 4,15 | 82,0 | C ₆₄ H ₁₀₀ N ₂₃ O ₂₃ ⁺ | 1558,74 | 1558,75 |
| 195-209 | H-RNSTPGSSRGTSPPAR-NH ₂ | 0,83 | 24,1 | C ₅₉ H ₁₀₆ N ₂₆ O ₂₂ ²⁺ | 765,40 | 765,40 |
| 235-249 | H-SGKGQQQQGQVTTKK-NH ₂ | 0,70 | 86,1 | C ₆₅ H ₁₁₇ N ₂₄ O ₂₃ ⁺ | 1601,87 | 1601,88 |
| 241-255 | H-QQGQVTTKKSAAEAS-NH ₂ | 1,15 | 5,7 | C ₆₂ H ₁₁₀ N ₂₁ O ₂₄ ⁺ | 1532,80 | 1532,82 |
| 253-267 | H-EASKKPRQKRTATKA-NH ₂ | 0,60 | 73,3 | C ₇₁ H ₁₃₂ N ₂₇ O ₂₁ ⁺ | 1699,01 | 1699,02 |
| 269-283 | H-NVTQAFGRRGPEQTQ-NH ₂ | 4,49 | 82,2 | C ₇₀ H ₁₁₅ N ₂₆ O ₂₃ ⁺ | 1687,86 | 1687,88 |
| 287-301 | H-GDQELIRQGTDYKHW-NH ₂ | 4,92 | 75,0 | C ₈₁ H ₁₂₃ N ₂₅ O ₂₅ ²⁺ | 922,96 | 922,97 |
| 299-313 | H-KHWPQIAQFAPSASA-NH ₂ | 5,22 | 59,6 | C ₇₆ H ₁₁₃ N ₂₂ O ₁₉ ⁺ | 1637,85 | 1637,87 |
| 323-337 | H-EVTPSGTWLTYTGAI-NH ₂ | 5,93 | 62,7 | C ₇₃ H ₁₁₂ N ₁₇ O ₂₃ ⁺ | 1594,81 | 1594,83 |
| 355-369 | H-KHIDAYKTFPPTPEPK-NH ₂ | 4,41 | 50,8 | C ₈₃ H ₁₂₉ N ₂₁ O ₂₂ ²⁺ | 885,98 | 885,99 |
| 379-393 | H-TQALPQRQKKQQTVT-NH ₂ | 1,87 | 32,8 | C ₇₄ H ₁₃₄ N ₂₆ O ₂₃ ²⁺ | 877,51 | 877,52 |
| 383-397 | H-PQRQKKQQTVTLLPA-NH ₂ | 4,67 | 90,5 | C ₇₆ H ₁₃₆ N ₂₅ O ₂₁ ⁺ | 1735,03 | 1735,05 |
| 415-419 | H-DSTQA-NH ₂ | 0,91 | 67,1 | C ₁₉ H ₃₄ N ₇ O ₁₀ ⁺ | 520,24 | 520,24 |

Na vzorku vybraných preparací byla provedena aminokyselinová analýza (Tabulka 19). Průměrný výtěžek byl 57 ± 2 % ($N = 3$).

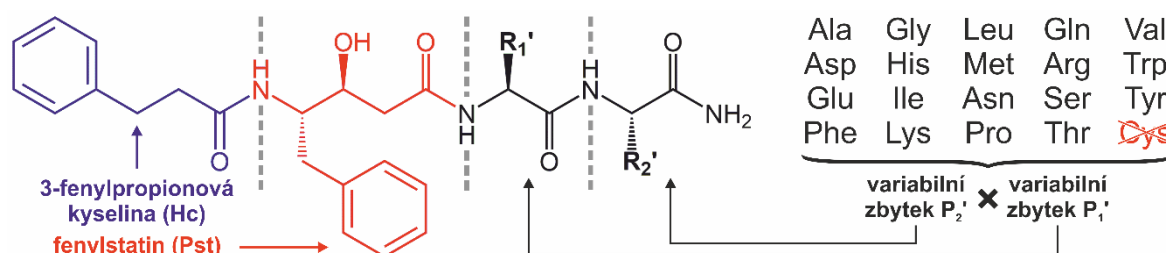
Tabulka 19. Aminokyselinová analýza vybraných fragmentů nukleoproteinů.

| | | stechiometrie | | | | | | | | | | výtěžek | |
|---------|-----------|---------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|---------|-----------------------|
| | | A | E+Q | G | I | K | L | P | R | S | T | | V |
| 155-169 | vypočteno | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 3 | 2 | - | - | 2 | 1 | 58 ± 5 % |
| | nalezeno | 1,99 | 2,01 | 1,20 | 0,98 | 0,88 | 2,79 | 2,17 | - | - | 2,03 | 0,90 | 558 ± 52 μ g |
| 235-249 | vypočteno | - | 5 | 3 | - | 3 | - | - | - | 1 | 2 | 1 | 58 ± 12 % |
| | nalezeno | - | 4,25 | 3,48 | - | 2,09 | - | - | - | 1,31 | 1,94 | 1,01 | 579 ± 115 μ g |
| 383-397 | vypočteno | 1 | 4 | - | - | 2 | 2 | 2 | 1 | - | 2 | 1 | 53 ± 7 % |
| | nalezeno | 1,07 | 3,49 | - | - | 1,54 | 2,17 | 2,34 | 1,12 | - | 2,09 | 0,87 | 572 ± 77 μ g |

4.1.3. Statinové inhibitory proteas

Ve spolupráci s Ivanou Klikarovou byla připravena maticová knihovna inhibitorů aspartátových proteas obsahujících fenylstatin (Pst) jako mimetikum přechodového stavu, jehož N-konec byl maskován 3-fenylpropionylem (Hc, Obrázek 28). Knihovna sestává z $19 \times 19 = 361$ peptidomimetik pokrývajících všechny variace proteinogenních aminokyselin s výjimkou Cys na dvou C-terminálních pozicích.

Obrázek 28. Vzorec připravených Hc-Pst-P₁'-P₂'-NH₂ inhibitorů s popisem složení knihovny.



Acylační čas byl zvolen konstantně jako A = 45 min, jelikož k zavedení všech zbytků byly potřeba pouze čtyři cykly SPPS. Deprotekční časy byly nastaveny na D = 5 min. K ověření čistoty a identity bylo vybráno N = 38 preparací inhibitorů (Tabulka 20) vykazujících průměrnou čistotu $79 \pm 9 \%$ (R = 94,2–52,1 %).

Tabulka 20. Charakterizace panelu Hc-Pst-P₁'-P₂'-NH₂. K označení peptidů jsou použity pouze variabilní C-koncové aminokyseliny P₁' a P₂'.

| peptid | t _R min | čistota % | ESI m/z (nízké rozlišení) | | |
|--------|-----------------------|--------------|--|-----------|----------|
| | | | vzorec | vypočteno | nalezeno |
| LA | 6,97 | 86,9 | C ₂₉ H ₄₁ N ₄ O ₅ ⁺ | 525,31 | 525,33 |
| LD | 6,77 | 83,4 | C ₃₀ H ₄₁ N ₄ O ₇ ⁺ | 569,30 | 569,31 |
| LE | 6,81 | 90,8 | C ₃₁ H ₄₃ N ₄ O ₇ ⁺ | 583,31 | 583,33 |
| LF | 7,70 | 89,3 | C ₃₅ H ₄₅ N ₄ O ₅ ⁺ | 601,34 | 601,36 |
| LG | 6,84 | 72,9 | C ₂₈ H ₃₉ N ₄ O ₅ ⁺ | 511,29 | 511,31 |
| LH | 5,92 | 83,3 | C ₃₂ H ₄₃ N ₆ O ₅ ⁺ | 591,33 | 591,36 |
| LI | 7,51 | 71,8 | C ₃₂ H ₄₇ N ₄ O ₅ ⁺ | 567,35 | 567,38 |
| LK | 5,98 | 84,6 | C ₃₂ H ₄₈ N ₅ O ₅ ⁺ | 582,36 | 582,40 |
| LL | 7,65 | 87,1 | C ₃₂ H ₄₇ N ₄ O ₅ ⁺ | 567,35 | 567,38 |
| LM | 7,40 | 70,6 | C ₃₁ H ₄₅ N ₄ O ₅ S ⁺ | 585,31 | 585,34 |
| LN | 6,66 | 82,5 | C ₃₀ H ₄₂ N ₅ O ₆ ⁺ | 568,31 | 568,34 |
| LP | 6,99 | 85,6 | C ₃₁ H ₄₃ N ₄ O ₅ ⁺ | 551,32 | 551,35 |
| LQ | 6,67 | 75,4 | C ₃₁ H ₄₄ N ₅ O ₆ ⁺ | 582,33 | 582,35 |
| LR | 6,02 | 81,6 | C ₃₂ H ₄₈ N ₇ O ₅ ⁺ | 610,37 | 610,41 |
| LS | 6,77 | 94,2 | C ₂₉ H ₄₁ N ₄ O ₆ ⁺ | 541,30 | 541,33 |
| LT | 6,90 | 72,2 | C ₃₀ H ₄₃ N ₄ O ₆ ⁺ | 555,32 | 555,34 |
| LV | 7,29 | 80,5 | C ₃₁ H ₄₅ N ₄ O ₅ ⁺ | 553,34 | 553,36 |
| LW | 7,53 | 77,9 | C ₃₇ H ₄₆ N ₅ O ₅ ⁺ | 640,35 | 640,38 |
| LY | 7,06 | 92,1 | C ₃₅ H ₄₅ N ₄ O ₆ ⁺ | 617,33 | 617,36 |
| RA | 5,62 | 66,6 | C ₂₉ H ₄₂ N ₇ O ₅ ⁺ | 568,32 | 568,34 |
| RD | 5,55 | 69,2 | C ₃₀ H ₄₂ N ₇ O ₇ ⁺ | 612,31 | 612,34 |
| RE | 5,56 | 73,6 | C ₃₁ H ₄₄ N ₇ O ₇ ⁺ | 626,33 | 626,35 |
| RF | 5,98 | 73,5 | C ₃₅ H ₄₆ N ₇ O ₅ ⁺ | 644,36 | 644,38 |
| RG | 5,54 | 69,4 | C ₂₈ H ₄₀ N ₇ O ₅ ⁺ | 554,31 | 554,33 |
| RH | 5,08 | 73,9 | C ₃₂ H ₄₄ N ₉ O ₅ ⁺ | 634,35 | 634,37 |
| RI | 5,93 | 74,4 | C ₃₂ H ₄₈ N ₇ O ₅ ⁺ | 610,37 | 610,40 |
| RK | 5,20 | 57,9 | C ₃₂ H ₄₉ N ₈ O ₅ ⁺ | 625,38 | 625,41 |
| RL | 6,01 | 83,9 | C ₃₂ H ₄₈ N ₇ O ₅ ⁺ | 610,37 | 610,40 |
| RM | 5,84 | 52,1 | C ₃₁ H ₄₆ N ₇ O ₅ S ⁺ | 628,33 | 628,35 |
| RN | 5,53 | 84,5 | C ₃₀ H ₄₃ N ₈ O ₆ ⁺ | 611,33 | 611,36 |
| RP | 5,69 | 84,8 | C ₃₁ H ₄₄ N ₇ O ₅ ⁺ | 594,34 | 594,37 |
| RQ | 5,53 | 83,2 | C ₃₁ H ₄₅ N ₈ O ₆ ⁺ | 625,35 | 625,37 |
| RR | 5,17 | 72,7 | C ₃₂ H ₄₉ N ₁₀ O ₅ ⁺ | 653,39 | 653,42 |
| RS | 5,54 | 82,3 | C ₂₉ H ₄₂ N ₇ O ₆ ⁺ | 584,32 | 584,34 |
| RT | 5,59 | 82,5 | C ₃₀ H ₄₄ N ₇ O ₆ ⁺ | 598,34 | 598,36 |
| RV | 5,81 | 81,9 | C ₃₁ H ₄₆ N ₇ O ₅ ⁺ | 596,36 | 596,38 |
| RW | 6,04 | 86,9 | C ₃₇ H ₄₇ N ₈ O ₅ ⁺ | 683,37 | 683,39 |
| RY | 5,77 | 83,2 | C ₃₅ H ₄₆ N ₇ O ₆ ⁺ | 660,35 | 660,38 |

Na vzorku vybraných inhibitorů byla provedena aminokyselinová analýza (Tabulka 21) s průměrným nalezeným výtěžkem $64 \pm 6 \%$ ($N = 3$).

Tabulka 21. Aminokyselinová analýza vybraných statinových inhibitorů.

| | | stechiometrie | | | | výtěžek |
|---------------------------|-----------|---------------|------|------|------|--------------------------|
| | | E+Q | L | S | Y | |
| Hc-Pst-LE-NH ₂ | vypočteno | 1 | 1 | – | – | $55 \pm 1 \%$ |
| | nalezeno | 0,98 | 1,02 | – | – | $200 \pm 5 \mu\text{g}$ |
| Hc-Pst-LS-NH ₂ | vypočteno | – | 1 | 1 | – | $69 \pm 2 \%$ |
| | nalezeno | – | 0,96 | 1,04 | – | $230 \pm 8 \mu\text{g}$ |
| Hc-Pst-LY-NH ₂ | vypočteno | – | 1 | – | 1 | $69 \pm 9 \%$ |
| | nalezeno | – | 0,87 | – | 1,13 | $263 \pm 35 \mu\text{g}$ |

4.2. Aplikace knihoven

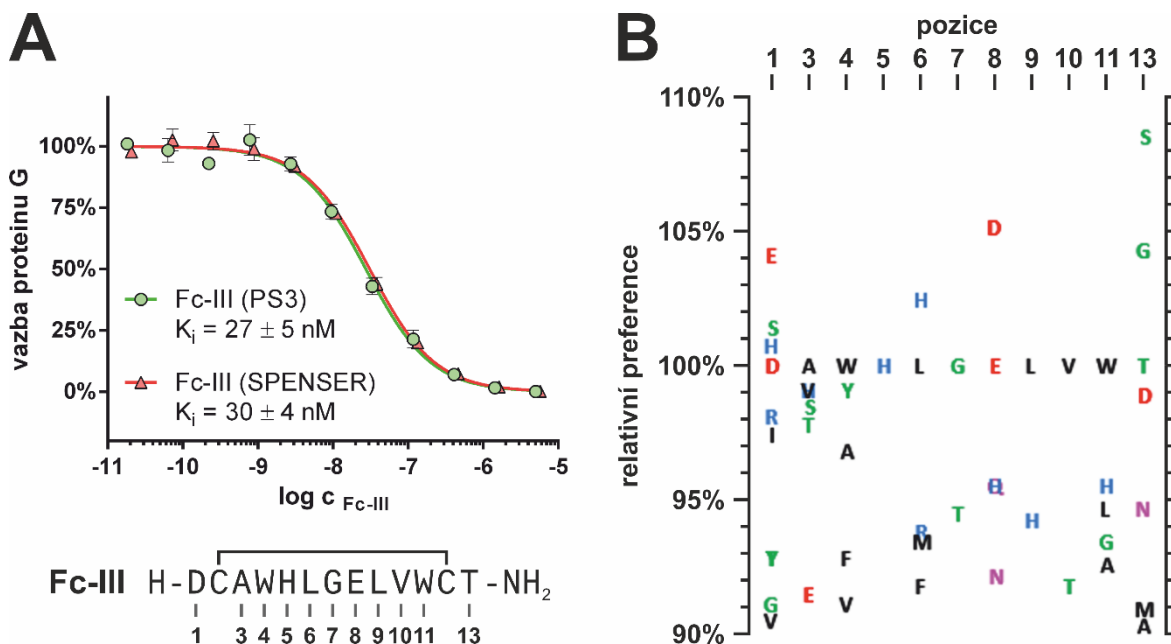
Skenovací knihovna variant Fc-III je určena k analýze sekvenční závislosti interakce tohoto peptidu s imunoglobuliny. Ke studiu této interakce s lidským IgG byl použit chemiluminiscenční kompetiční test založený na vytěsňování navázaného proteinu G značeného HRP Fc-vázajícími peptidy. Parentální Fc-III připravený pomocí SPENSER vykazuje přibližně shodnou inhibiční konstantu $K_i = 30 \pm 4 \text{ nM}$ oproti referenčnímu Fc-III připravenému za pomoci komerčního syntezátoru PS3 (I₂ oxidace, následovaná C18 preparativní HPLC) s $K_i = 27 \pm 5 \text{ nM}$ (Obrázek 29A na následující straně).

K přesnému stanovení konstant byla koncentrace referenčního Fc-III ověřena pomocí aminokyselinové analýzy. Pro paralelně připravený Fc-III byla použita normalizovaná koncentrace knihovny, která v tomto případě dobře odpovídala koncentraci aktivního peptidu. Knihovna byla následně použita k vyšetření relativních preferencí variací peptidu při vazbě na lidské IgG (Obrázek 29B).

Získaná data bohužel nekorelují s předchozími experimenty s použitím peptidových polí prezentujících knihovnu se shodným uspořádáním (PEPperPRINT, Heidelberg, SRN)⁹⁵, což může být vysvětleno odlišným formátem detekce vazby (kompetice peptidů s proteinem G ve vazbě k imobilizovanému IgG vs. detekce fluorescenčně značeného IgG vázajícího se na imobilizované peptidy). Dílčí varianty Fc-III mohou též vykazovat různou míru schopnosti kompetovat s proteinem G ve vazbě k IgG z důvodu změny topologie vazby. K ověření této hypotézy je nyní připravována nová knihovna s C-koncovou biotinylací umožňující přímou detekci bez použití kompetičního reportéru.

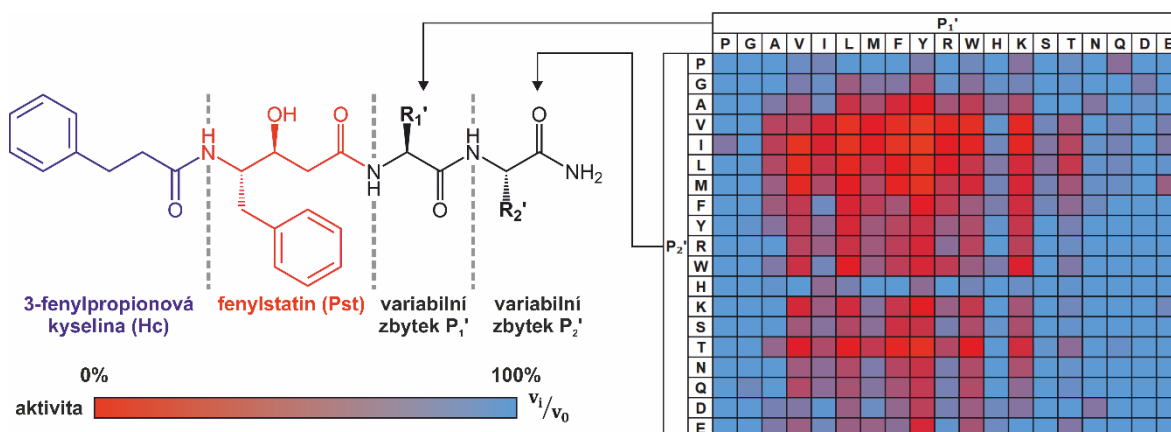
Maticová knihovna statinových inhibitorů byla testována proti sekretované aspartátové protease May1⁸⁵ oportunní kvasinky *C. neoformans*. Na tomto příkladu je možno ilustrovat

možnost stanovení optimálních zbytků na obou C-terminálních variabilních pozicích v jediném experimentu (Obrázek 30).



Obrázek 29. Charakterizace interakce Fc-III s lidským IgG kompetičními testy se značeným proteinem G. (A) Porovnání inhibičních konstant K_i pro Fc-III připraveného pomocí SPENSER a PS3. (B) Relativní preference variací peptidu Fc-III při vazbě na IgG. Relativní preference >100 % označují varianty lépe kompetující s reportérem než parentální peptid, varianty s relativní preferencí <100 % kompetují hůře. Všechny varianty mimo vynesení rozsah kompetují hůře.

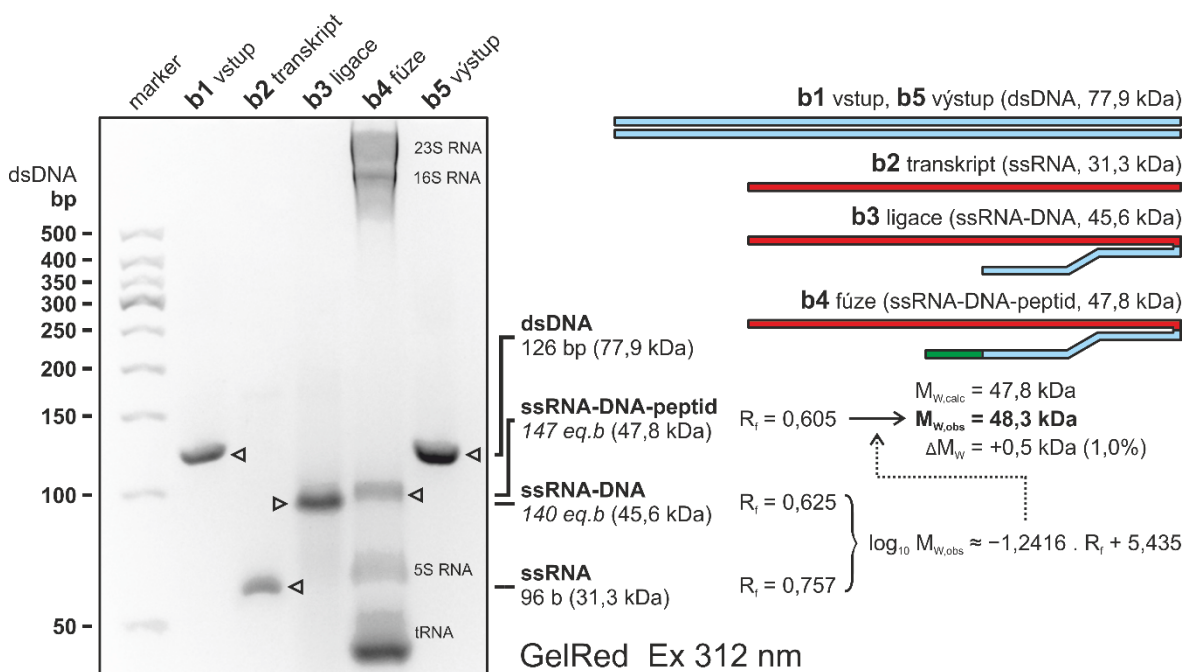
Ačkoli tato knihovna představuje vhodný nástroj pro prvotní charakterizaci aspartátových proteas z hlediska inhibitorové specifity, k plné charakterizaci by bylo vhodné mít k dispozici i substrátové knihovny^{133, 134}. Substrátové knihovny a knihovny inhibitorů cílících další třídy proteas budou předmětem dalších syntéz.



Obrázek 30. Relativní aktivita May1 proteasy v závislosti na dvou variabilních C-terminálních pozicích inhibitorů Hc-Pst-P₁'-P₂'-NH₂ při koncentraci 800 nM. Analýza byla provedena na dvou destičkách se Z' = 0,56 a 0,60¹²⁵.

4.3. Validace protokolu ToRNAdo

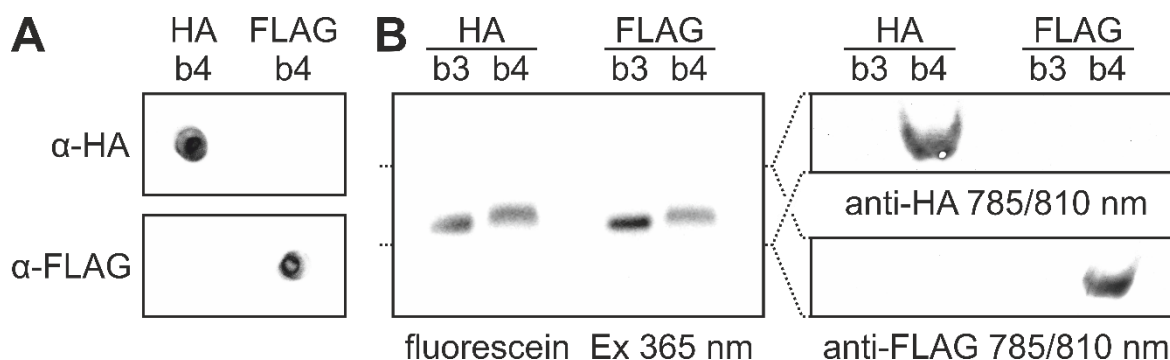
Nejprve byly zhodnoceny čistoty a pozorované molekulové hmoty vzorků meziproductů protokolu ToRNAdo s modelovým vstupním fragmentem **b1** kódujícím pouze FLAG epitop (Obrázek 31).



Obrázek 31. Agarosová elektroforéza (4 %, TBE) meziproductů selekčního cyklu se vstupním dsDNA fragmentem **b1** kódujícím pouze FLAG epitop. Znázorněny jsou vypočtené molekulové hmotnosti meziproductů spolu s postupem odhadu pozorované molekulové hmoty peptidové fúze.

Pozorovaná hmotnost peptidové fúze vykazovala posun přibližně 2,7 kDa proti ligačnímu produktu. Vzhledem k tomu, že k analýze byla použita nativní elektroforéza, byly k hrubému odhadu pozorované molekulové hmoty peptidové fúze použity pouze proužky transkriptu a ligace za předpokladu, že sdílí podobnou sekundární strukturu. Vypočtený posun odpovídající FLAG peptidu MSSDDYKDDDDKSSGSGSGEK činí 2,2 kDa.

Z elektroforetogramu nebylo možné spolehlivě odhadnout podíl zastoupení peptidové fúze proti volné nukleové kyselině. Jelikož však pozorovaný posun hmoty přibližně odpovídal vypočtenému, experiment byl opakován se vstupním fragmentem **b1** kódujícím HA epitop (MSSYPYDVPDYASSGSGSGEK). Přítomnost epitopových značek v plné fúzní reakci **b5** byla nejprve předběžně prokázána tečkovým blotem s odpovídajícími protilátkami (Obrázek 32A na následující straně) a po optimalizaci postupu fixace membrány byl úspěšně proveden i imunoblot dokazující přítomnost epitopových značek v předpokládaných fúzních proužcích (Obrázek 32B).

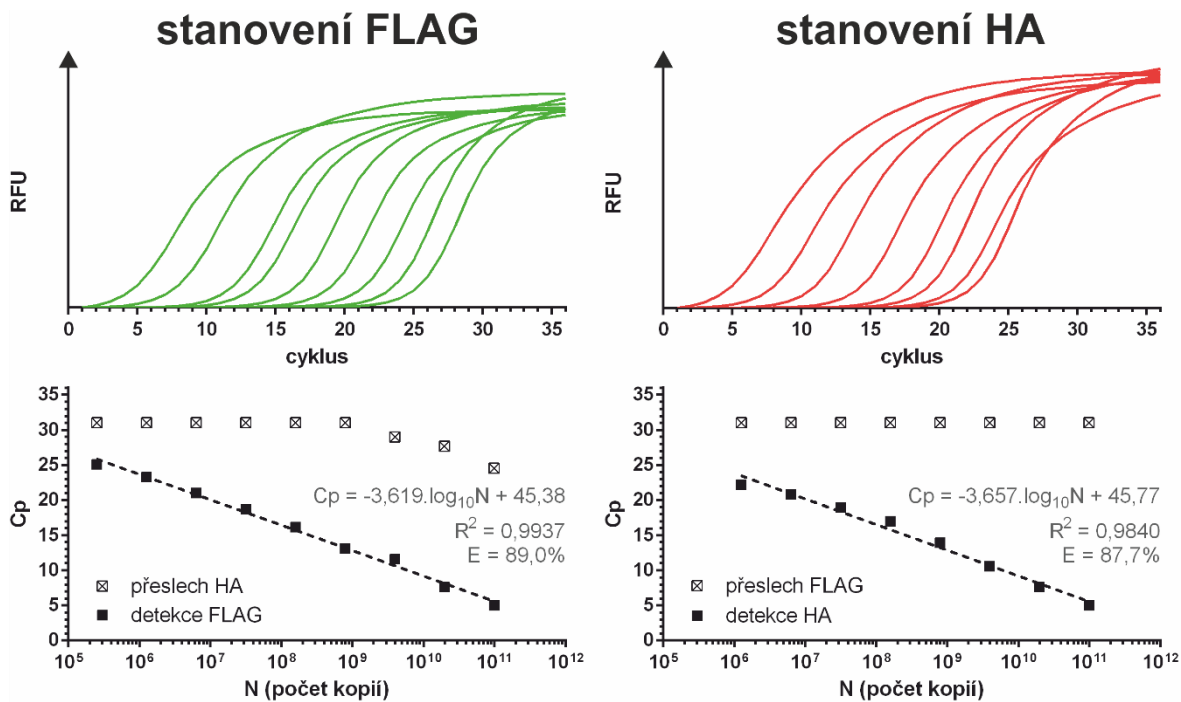


Obrázek 32. Imunologické stanovení exprimovaných epitopových značek. (A) Tečkový blot surových fúzních reakcí (**b4**) s templáty kódujícími pouze HA, nebo FLAG peptid. (B) Agarosová elektroforéza ligačních (**b3**) a fúzních (**b4**) reakcí pro HA, nebo FLAG peptid vizualizovaná pomocí fluoresceinu na ligovaném DNA oligonukleotidu (vlevo). Elektroforéza byla opakována s následným elektropřenosem na nitrocelulosové membrány, jež byly vizualizovány anti-FLAG M2 a anti-HA 12CA5 protilátkami (vpravo).

Za nepřítomnosti interkalátoru bylo též možné pozorovat samotné ligační a fúzní produkty bez ostatních nukleových kyselin přítomných ve vzorku za pomoci fluoresceinu na ligovaném DNA oligonukleotidu. Bohužel ani tento způsob vizualizace neumožnil kvantitativní posouzení efektivity fúze. Po proložení densitometrického výnosu drah křivkami normálního rozdělení byla pouze pozorována o 12 % (FLAG), či 33 % (HA) vyšší regresně stanovená šíře křivky σ fúzních oproti ligačním proužkům.

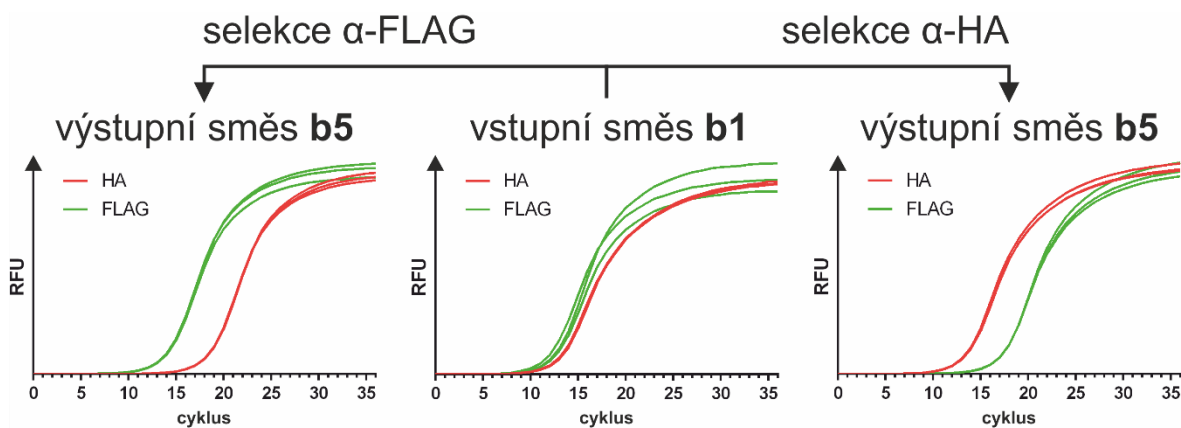
S prokázáním přítomnosti fúzních produktů bylo přistoupeno k vyhodnocení účinnosti selekce na směsných vstupních fragmentech FLAG a HA, představujících zjednodušení reálné knihovny. K tomuto vyhodnocení bylo nutné najít metodu stanovení zastoupení jednotlivých fragmentů ve směsném vzorku. Pro kvantitativní posouzení účinnosti selekce byly navrženy dvě sady qPCR primerů pro selektivní amplifikaci výstupních FLAG (primer 6 a 7) a HA (6 a 8) DNA fragmentů s detekcí interkalátorem SYBR Green I. Pro sestrojení kalibrační křivky a posouzení míry selektivity amplifikace bylo provedeno stanovení ředící řady izolovaných FLAG a HA fragmentů oběma sadami primerů (Obrázek 33 na následující straně).

Ačkoli kalibrační křivky navržených metod stanovení vykazují mírně nižší účinnost $E = 87,7$ až $89,0\%$ oproti doporučené hodnotě alespoň 90% ¹³⁵, jejich koeficienty determinace leží v doporučeném intervalu $R^2 \geq 0,98$ ¹³⁶. Jelikož navržená sada pro stanovení FLAG fragmentu dále vykazovala mírný přeslech při vyšších koncentracích HA fragmentu, bylo pro další stanovení použito nižší vstupní množství DNA (500 pg), při kterém případný přeslech nemůže ovlivnit výslednou hodnotu C_p , potažmo počtu kopií.



Obrázek 33. Amplifikační křivky koncentrační řady FLAG a HA fragmentů detekovaných primery **6** a **7**, resp. **6** a **8** (nahore) a výnos závislosti jejich přechodového bodu C_p na počtu kopií fragmentu v reakci (dole, plné čtverce). Vedle těchto jsou vyneseny C_p nespecifické amplifikace druhého fragmentu (přeslech, překřížené čtverce), regresní přímka s její rovnicí a vypočtená účinnost $E = 10^{-1/a} - 1$, kde a je směrnice regresní přímky.

Dále byly provedeny dvě selekce protokolem ToRNado proti imobilizované anti-FLAG, či anti-HA protilátce, jejichž vstupem **b1** byla v obou případech stejná směs FLAG a HA fragmentů o přibližném zastoupení 1,5:1 (n:n). Uspořádání experimentu spolu s amplifikačními křivkami vstupních a výstupních směsí jsou zachyceny na Obrázku 34.



Obrázek 34. Amplifikační křivky vstupní směsi FLAG a HA fragmentů (**b1**, uprostřed) pro selekční protokol proti anti-FLAG, nebo anti-HA imobilizované protilátce, jejichž výstupní směsi fragmentů **b5** byly podrobeny stejnému stanovení (vlevo, resp. vpravo). Červeně jsou vyobrazeny amplifikační křivky sady HA-specifických primerů, zeleně sady FLAG-specifických primerů.

Uspořádání experimentu se shodnou vstupní směsí **b1** bylo zvoleno k vyloučení vlivu možné kontaminace mezi paralelními reakcemi, jelikož jakákoli pozorovaná asymetrie výsledku může být přisouzena pouze vlivu selekce.

Výstupní směsi **b5** vykazovaly v obou případech posunutí poměru stanovených počtů kopií fragmentů odpovídající protilátce, proti níž byla prováděna selekce (Tabulka 22). V případě selekce proti anti-FLAG protilátce bylo pozorován vyšší poměr selektovaného fragmentu 14,7:1 (n:n, FLAG:HA) než v případě selekce proti anti-HA protilátce (11,7:1 n:n, HA:FLAG), což může být vysvětleno přibližně odpovídajícím vyšším zastoupením FLAG fragmentu ve vstupní směsi. Pokud toto zohledníme výpočtem poměru podílů selektovaných fragmentů ve vstupní směsi **b1** a ve výstupní směsi **b5** získáme hodnotu nabohacení (angl. enrichment^{61, 137}) 1,56× (interval směrodatné odchylky 1,42–1,77×) pro selekci FLAG a 2,31× (1,95–2,71×) pro selekci HA fragmentu.

Tabulka 22. Kvantifikace fragmentů FLAG a HA ve výstupu **b5** jednoho selekčního cyklu proti imobilizované anti-FLAG, nebo anti-HA protilátce. Hodnoty Cp jsou průměrem tří měření s uvedenou směrodatnou odchylkou. Ke stanovení počtu kopií N byl použitý regresní rovnice na Obrázku 33 na předchozí straně.

| | stanovení FLAG | | stanovení HA | | poměr počtů kopií N ^[a] |
|------------------------|------------------|---------------------|------------------|---------------------|---------------------------------------|
| | Cp | N [$\times 10^7$] | Cp | N [$\times 10^7$] | |
| vstupní směs | 12,04 \pm 0,32 | 163 \pm 35 | 12,70 \pm 0,08 | 108 \pm 5 | 1,51 (F:H, 1,13–1,92) |
| selekce α -FLAG | 13,78 \pm 0,03 | 53 \pm 1 | 18,18 \pm 0,08 | 3,6 \pm 0,2 | 14,7 (F:H, 13,7–15,8) |
| selekce α -HA | 16,92 \pm 0,07 | 7,4 \pm 0,3 | 13,06 \pm 0,05 | 86 \pm 3 | 11,7 (H:F, 10,9–12,7) |

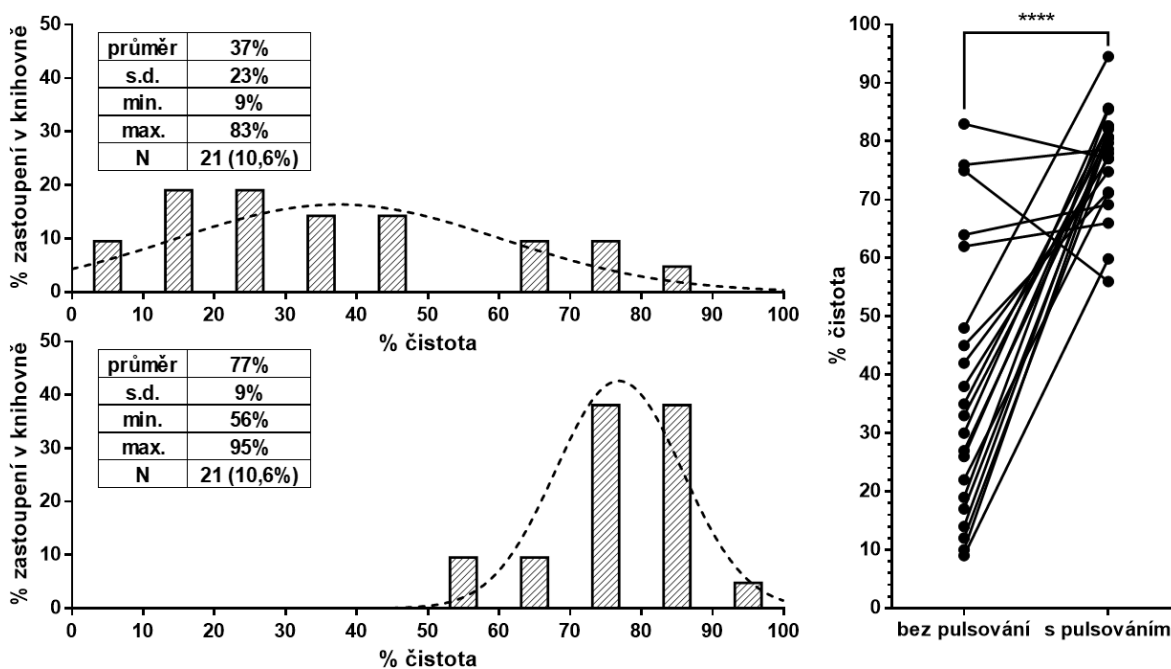
[a] uveden je poměr vyšší hodnoty počtu kopií proti nižší, v závorkách je uveden interval hodnot odpovídající stanoveným směrodatným odchylkám

5. Diskuze

5.1. Paralelní syntéza peptidů

Na cestě k funkčnímu řešení pro paralelní SPPS bylo prozkoumáno několik prostředků k obecné podpoře účinnosti dílčích syntetických kroků popsanych v sekci 3.2.1. Zatímco ultrazvuková agitace, zvýšená teplota a zpětnovazebná kontrola průběhu acylace se ukázaly jako slepé uličky, implementace pulsačního míchání přinesla jasné zlepšení, které umožnilo syntézu popsanych knihoven.

Pro kvantitativní porovnání obou způsobů provedení syntézy, s pulsačním mícháním a bez něj, byla použita knihovna peptidů odvozená od peptidu Fc-III (4.1.1.). Knihovna byla připravena v obou podmínkách se shodnou disulfidovou cyklizací pomocí NCS. Čistota náhodně vybraných párů peptidů z obou knihoven byla následně porovnána (Obrázek 35).



Obrázek 35. Srovnání shodných syntetických programů bez pulsačního míchání (nahore) a s pulsačním mícháním (dole). Histogramy zachycují podíl zastoupení tříd se šířkou 10 % čistoty dle LC-MS ve vzorku 21 náhodných párů analyzovaných peptidů ze 199 peptidů v připravené knihovně (bodové záměny Fc-III⁸², disulfidová cyklizace NCS). Vynesena je též křivka normálního rozdělení odpovídající vypočtenému průměru a směrodatné odchylce a regresně stanovené amplitudě. K vyhodnocení významnosti efektu byl použit párový dvouvýběrový T-test.

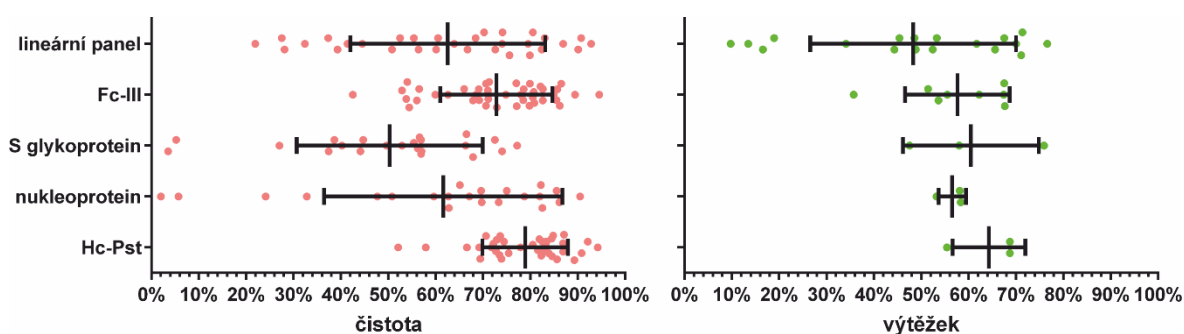
Vzorky připravené protokolem s pulsačním mícháním vykazovaly průměrně více než dvojnásobnou čistotu oproti vzorků připravených bez míchání. Čistota připravených

peptidů a její distribuce je však závislá na uspořádání zamýšlené knihovny. Pokud peptidy sdílí společné motivy, jako např. u skenovací Fc-III knihovny, je možné provést optimalizaci protokolu k dosažení vyšší a konzistentnější čistoty preparátů (Tabulka 23 a Obrázek 36 vlevo).

Tabulka 23. Statistické vyhodnocení čistot analyzovaných vzorků připravených knihoven.

| knihovna | počet preparací | čistota | | počet analýz N (pokrytí) |
|----------------|-----------------|---------------|-----------------|--------------------------|
| | | průměr ± s.d. | R (max. – min.) | |
| lineární panel | 31 | 63 ± 20 % | 92,8 – 21,9 % | 31 (100,0 %) |
| Fc-III | 199 | 73 ± 12 % | 94,5 – 42,5 % | 41 (20,6 %) |
| S glykoprotein | 253 | 50 ± 19 % | 77,2 – 3,5 % | 22 (8,7 %) |
| nukleoprotein | 208 | 62 ± 25 % | 90,5 – 2,0 % | 22 (10,6 %) |
| Hc-Pst | 361 | 79 ± 9 % | 94,2 – 52,1 % | 38 (10,5 %) |
| celkem | 1052 | 67 ± 19 % | 94,5 – 2,0 % | 154 (14,6 %) |

Naproti tomu různorodé knihovny, jako např. epitopové SARS-CoV-2 knihovny, či úvodní lineární panel, představují větší výzvu a optimální podmínky syntézy jsou obtížněji předvídatelné¹³⁸. Parametry popisovaných epitopových knihoven je však vhodné posuzovat v kontextu skutečnosti, že určování epitopu protilátek je obvykle prováděno na imobilizovaných peptidových knihovnách bez jakékoli kontroly kvality^{139, 140}. Na příkladu knihovny statinových inhibitorů však lze ilustrovat, že i velmi výrazná heterogenita knihovny nemusí představovat problém, pokud knihovna sestává z dostatečně krátkých peptidů, u kterých se obvykle nevyskytují obtížné acylační nebo deprotekcí kroky¹³⁸.



Obrázek 36. Srovnání distribucí čistot (vlevo) a výtěžků (vpravo) ve vzorcích připravených knihoven. Vyneseny jsou jednotlivé datové body, průměr a interval směrodatné odchylky.

Neméně důležitým parametrem je však i výtěžek, jelikož připravené knihovny jsou normalizovány na stejnou koncentraci (typicky 1 mM) pomocí jeho průměru. Konzistence

výtěžků vyjádřená směrodatnou odchylkou určuje interval předpokládaných koncentrací látek, které se v knihovně vyskytují (Tabulka 24 a Obrázek 36 vpravo). Testování knihovny může poskytnout neúplné nebo nevěrohodné výsledky, pokud je tento interval příliš široký.

Tabulka 24. Statistické vyhodnocení výtěžku analyzovaných vzorků připravených knihoven. V případě lineárního panelu jsou zahrnuty výsledky kvantifikace pomocí UV i aminokyselinové analýzy. U oxytocinu připraveného NCS strategií a CCK-4 byl použit průměr obou stanovení.

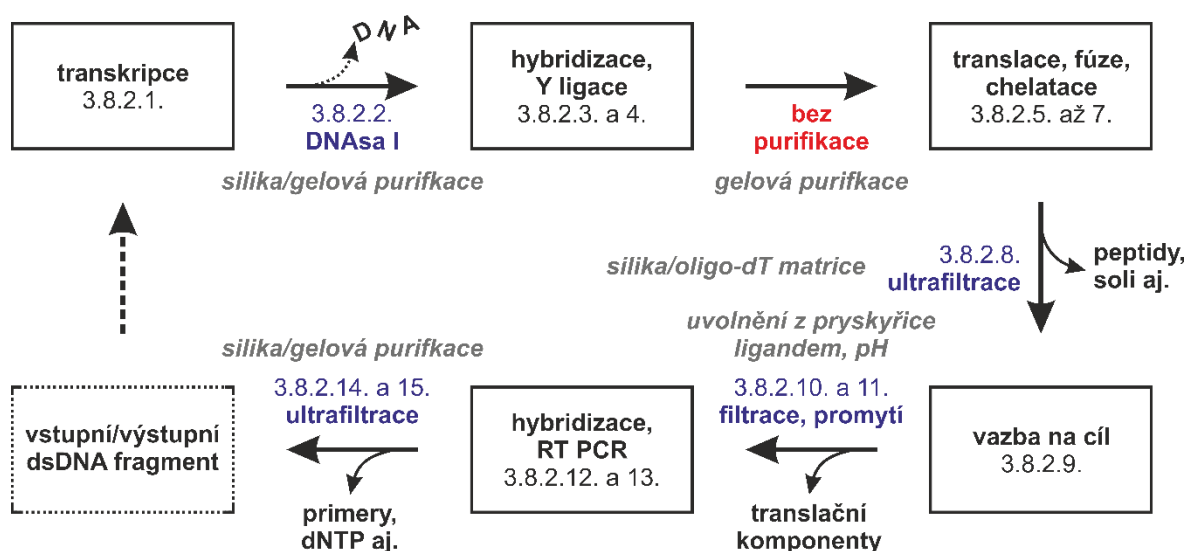
| knihovna | počet preparací | výtěžek | | 95% interval koncentrace ^[a] | počet analýz N (pokrytí) |
|----------------|-----------------|---------------|-----------------|---|--------------------------|
| | | průměr ± s.d. | R (max. – min.) | | |
| lineární panel | 31 | 48 ± 21 % | 76,6 – 9,7 % | 0,13 – 1,87 mM | 18 (58,1 %) |
| Fc-III | 199 | 58 ± 10 % | 67,6 – 35,7 % | 0,64 – 1,36 mM | 8 (4,0 %) |
| S glykoprotein | 253 | 60 ± 12 % | 75,9 – 47,5 % | 0,61 – 1,39 mM | 3 (1,2 %) |
| nukleoprotein | 208 | 57 ± 2 % | 58,3 – 53,2 % | 0,92 – 1,08 mM | 3 (1,4 %) |
| Hc-Pst | 361 | 64 ± 6 % | 68,7 – 55,4 % | 0,80 – 1,20 mM | 3 (0,8 %) |
| celkem | 1052 | 54 ± 17 % | 76,6 – 9,7 % | 0,35 – 1,65 mM | 35 (3,3 %) |

[a] Interval $I_{95} = 1\text{mM}(1 - 2\sigma/\mu) - 1\text{mM}(1 + 2\sigma/\mu)$, kde σ je směrodatná odchylka výtěžku a μ je jeho průměr, platí při normalizaci koncentrace na 1 mM podle průměrné koncentrace naředěním všech preparátů knihovny stejným objemem.

V případě úvodního lineárního panelu peptidů po normalizaci 95 % preparátů vykazuje koncentraci 0,13 až 1,87 mM, což představuje až 15-násobný rozdíl v koncentraci. Důvodem této variability je etherová precipitace. Následující knihovny již tento purifikační krok nepodstoupily, díky čemuž vykazují užší intervaly koncentrace nepřesahující 2,3-násobný rozdíl jejich limitních hodnot. Pokud by aplikace knihovny vyžadovala etherovou precipitaci (např. při použití v buněčných testech), bylo by nutné normalizaci koncentrace provádět na základě koncentrace každého jednotlivého preparátu. Toto by bylo realisticky proveditelné pouze zahrnutím UV-absorbujících aminokyselin (Trp, Tyr, cystin) do každé syntetizované sekvence.

5.2. Automatizace mRNA display

Během mRNA display prováděného manuálně jsou v několika úsecích protokolu zahrnuty purifikace, které by v automatizovaném provedení ve zvoleném uspořádání byly obtížně proveditelné (Obrázek 37 na následující straně). Ke zjednodušení protokolu tedy byly purifikační kroky vypuštěny tam, kde to nevylučovalo funkčnost metody jako celku. V krocích, kde se purifikace ukázala jako nezbytně nutná – po translaci a na závěr protokolu po RT PCR – byla v manuálním způsobu prováděná gelová purifikace nahrazena ultrafiltrací.



Obrázek 37. Posloupnost reakcí protokolu ToRNADO se zaměřením na kroky vyžadující purifikaci produktu. Kurzívou jsou uvedeny příklady řádných purifikačních kroků používaných při manuálním provádění protokolu^{61, 67, 69, 70}. Čísla uvedená u kroků odpovídají sekcím 3.8. Protokolu ToRNADO.

V případě přechodů mezi transkripcí, ligací a translací bylo s výhodou využito vzájemné kompatibility složení reakčních směsí (Tabulka 25) a možnosti inaktivovat všechny jejich enzymatické komponenty vysokou teplotou. Jelikož zvolený PUREfrefx expresní systém obsahuje i T7 RNA polymerasu⁷⁶, ukázalo se jako klíčové po transkripci provést alespoň odstranění DNA templátu pomocí DNAsy I.

Tabulka 25. Orientační složení reakčních směsí T7 RNA polymerasy, T4 RNA ligasy a PUREfrefx (bez proteinů) dle dokumentace výrobců^{76, 141}. V případě T7 nebylo dostupné složení od zvoleného dodavatele (Lucigen) a bylo nahrazeno jiným dostupným složením¹⁴².

| T7 RNA polymerasa | | | | T4 RNA ligasa | | | | PUREfrefx | | | |
|----------------------|--------|--------------------|---------|------------------|-----------|--------------------|-------|------------------------------|--------|-------------------------------|-------|
| pH 7,9 při 25 °C | | | | pH 7,5 při 25 °C | | | | pH 7,3 při 25 °C | | | |
| Tris | 45 mM | Tris | 50,4 mM | aminokyseliny | 19×0,1 mM | | | | | | |
| dithiothreitol | 10 mM | dithiothreitol | 1 mM | dithiothreitol | 1 mM | | | | | | |
| glycerol | 5 % | glycerol | 2 % | glycerol | 3 % | | | | | | |
| spermidin | 2 mM | | | spermidin | 1 mM | | | | | | |
| β-merkaptoethanol | 2 mM | | | putrescin | 8 mM | | | | | | |
| Triton X-100 | 0,1 ‰ | | | 10-CHO-THF | 20 μM | | | | | | |
| kationty | | anionty | | kationty | | anionty | | kationty | | anionty | |
| Na ⁺ | 70 mM | Cl ⁻ | 67 mM | Na ⁺ | 2 mM | Cl ⁻ | 72 mM | Na ⁺ | 22 mM | Cl ⁻ | 6 mM |
| Mg ²⁺ | 6 mM | EDTA ⁴⁻ | 0,1 mM | Mg ²⁺ | 10 mM | EDTA ⁴⁻ | 4 μM | Mg ²⁺ | 9 mM | ATP ⁴⁻ | 2 mM |
| | | ATP ⁴⁻ | 7,5 mM | K ⁺ | 2 mM | ATP ⁴⁻ | 1 mM | K ⁺ | 110 mM | CTP ⁴⁻ | 1 mM |
| Ca ²⁺ | 0,5 mM | CTP ⁴⁻ | 7,5 mM | | | | | NH ₄ ⁺ | 5 mM | GTP ⁴⁻ | 2 mM |
| ↑ nutné pro aktivitu | | GTP ⁴⁻ | 7,5 mM | | | | | Ca ²⁺ | 0,5 mM | UTP ⁴⁻ | 1 mM |
| přidané DNAsy I | | UTP ⁴⁻ | 7,5 mM | | | | | | | AcO ⁻ | 9 mM |
| | | | | | | | | | | PO ₄ ³⁻ | 5 mM |
| | | | | | | | | | | Glu ⁻ | 95 mM |
| | | | | | | | | | | kreatinP ²⁻ | 10 mM |

zkratky: 10-CHO-THF: 10-formyl-tetrahydrofolová kyselina
kreatinP: kreatinfosfát

Purifikace mezi Y ligací a translací naproti tomu byla zcela vynechána, jelikož již při mírném molárním nadbytku puromycinového oligonukleotidu je volná mRNA po proběhnutí reakce funkčně nedetekovatelná (viz Obrázek 31 v sekci 4.3). K ilustraci celkové stechiometrie v průběhu protokolu byla provedena izolace a kvantifikace mRNA transkriptu **b2** u obou selekcí. Vstupní dsDNA **b1** (630 ng) byla přepsána do 89 µg izolovatelné mRNA v případě FLAG selekce a 77 µg v případě HA selekce. Na základě těchto výtěžků byl vypočten molární poměr puromycinového oligonukleotidu **9** k mRNA jako $2,1\times$ a $2,5\times$ pro FLAG, resp. HA selekci.

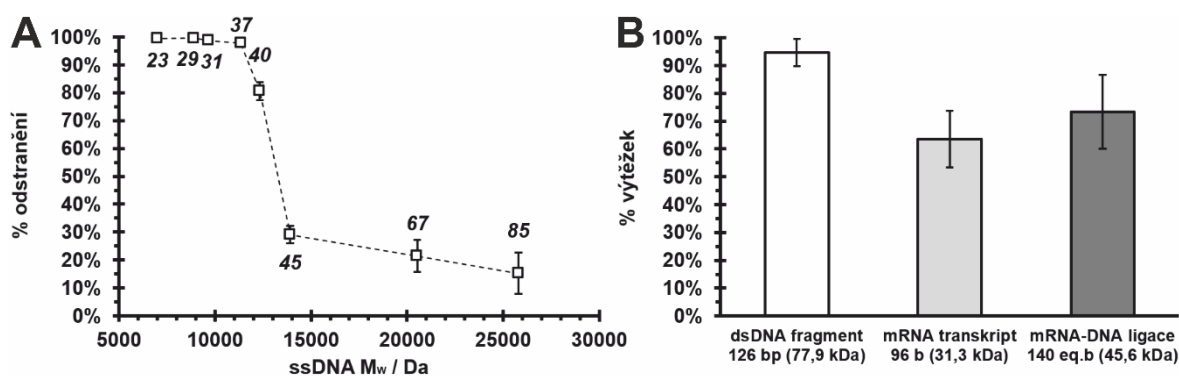
Bez provedení purifikace translační reakce nebyla pozorována selekce, což je možné vysvětlit buď nekompatibilitou složení translační směsi se selekční protilátkou, nebo přítomností volných peptidů kompetujících s fúzemi o vazebná místa na selekční matici. Ultrafiltraci translační reakce obsahující konjugát peptidu a nukleové kyseliny předcházela chelatace nadbytku Mg^{2+} iontů vedoucí k destabilizaci ribosomů, které do tohoto okamžiku stále zadržují konjugáty postrádající terminační kodony vyvolávající spuštění řádného rozpadu komplexu⁵¹. Sekvestrace dvojmocných kationtů, které by mj. též mohly destabilizovat cíl, proti němuž je prováděna selekce, dále pomáhá chránit RNA během následujících dlouhých selekčních kroků před hydrolýzou^{71, 72}. Post-translační ultrafiltrace je zároveň podprocesem, před který je možno v budoucnu vmezeřit derivatizaci prezentovaných peptidů (cyklizací¹⁴³, či připojením motivů podporujících vazbu¹⁴⁴) k rozšíření zkoumaného konformačního prostoru.

Výrazným omezením protokolu je absence míchání v průběhu inkubace peptidových fúzí **b4** s imobilizovaným cílem. Zatímco inkubace při 4°C bez míchání může být dostačující pro modelové knihovny s těsně se vázajícími ligandy (M2-FLAG $K_D = 6,5$ nM¹⁴⁵, 12CA5-HA $K_D = 10$ nM¹⁴⁶), pro reálné knihovny bude pravděpodobně nutné inkubační podmínky upravit. Kontinuální míchání špičkou je při provádění paralelních reakcí nepraktické, míchání tedy bude muset být prováděno třepáním ve vhodném plastiku umožňujícím volný pohyb suspenze (maximálně 96-jamková destička).

Odstranění ostatních translačních komponent, které by mohly interferovat s následným RT PCR, bylo dosaženo samotným promytím pryskyřice s navázanými konjugáty. Je předpokládáno, že konjugáty následně mohly být uvolněny během hybridizační fáze RT PCR zahřátím na 80 °C po dobu 15 minut. Teplotní stabilita použitých protilátek však nebyla zkoumána. Je tedy možné, že reverzní transkripce, či dokonce i následná amplifikace,

probíhá na imobilizovaném konjugátu a k uvolnění dojde až při denaturačních inkubacích při 94 °C v průběhu PCR amplifikace.

Primery použité během RT PCR byly optimalizovány k dosažení jejich efektivního odstranění ultrafiltrací, jelikož použité purifikační destičky spolehlivě odstraňují primery pouze do délky přibližně 37 bazí (Obrázek 38A). Výsledkem byla čtveřice primerů **4**, **5**, **10** a **11** o délce 21 až 33 bazí, s nimiž je obnoven 5'-koncový adapter s T7 promotorem v jediné reakci, a jejichž produkt je možno purifikovat v dostatečném procentuálním výtěžku (Obrázek 38B) i čistotě (Obrázek 31 v sekci 4.3).



Obrázek 38. Přehled účinnosti izolace nukleových kyselin PCR purifikačními destičkami MultiScreen PCR384 stanovené densitometricky agarosovou elektroforézou. (A) Analýza efektivity odstraňování ssDNA oligonukleotidů různých délek uvedených kurzívou v bazích. (B) Porovnání procentuálních výtěžků různých meziproduktů protokolu ToRNADO. Ke stanovení byly použity izolované meziprodukty.

Výstupní roztoky dsDNA fragmentů **b5** vykazovaly dle absorbance při 260 nm koncentraci 141 ng/μl v případě FLAG selekce a 85 ng/μl v případě HA selekce. Rozptyl v koncentraci výstupní směsi může představovat problém, zejména pokud by směs měla být přímým vstupem následujícího selekčního cyklu. Jiné vstupní množství DNA může ovlivnit výtěžek transkripce, na něm závislou stechiometrii ligace a další následující kroky řetězovým způsobem.

K řešení tohoto problému může být přistoupeno pasivně, použitím velmi vysokého vstupního množství DNA (př. 5 μg), jelikož výtěžek transkripce T7 polymerasou se vzrůstajícím množstvím vstupní DNA konverguje k definovatelnému maximu¹⁴⁷. Vhodnějším řešením by však mohla být aktivní regulace přidaného objemu vstupní směsi do transkripční reakce na základě koncentrace výstupní směsi **b5** předchozího cyklu stanovené spektrofotometricky nebo pomocí qPCR. Stanovená koncentrace by zároveň s výhodou mohla být využita ke kontrole úspěšného průběhu selekčního cyklu.

6. Závěr

V této práci je popsán vývoj paralelního syntetizátoru peptidů SPENSER a jeho použití k přípravě několika knihoven sestávajících celkem z 1052 peptidů. Reprezentativní vzorek 154 preparací, představující 14,6 % analytické pokrytí připravených knihoven, vykazoval dle LC-MS průměrnou čistotu 67 ± 19 %.

Na předložených knihovnách je ilustrováno, že SPENSER je vhodným nástrojem pro paralelní syntézu lineárních i disulfidově cyklizovaných peptidů s omezenou variabilitou, či knihoven sestávajících z krátkých peptidů. Jeho menší měřítko reakce ve srovnání s komerčně dostupnými syntetizátory dále umožňuje hospodárnější přípravu knihoven z drahých stavebních bloků.

Dále je představen protokol ToRNAdo jako automatizovaná varianta popsané metody mRNA display^{61, 67, 69, 70} s minimalizovaným počtem operací, proveditelných v plném rozsahu popsanou sestavou pipetovacího robota Agilent Bravo, PCR cykleru Biometra T-Gradient a robotické ruky SCARA.

Validace protokolu byla provedena na modelové binární knihovně sestávající ze sekvencí kódujících FLAG a HA epitopové značky. Obě modelové sekvence byly úspěšně selektovány odpovídajícími protilátkami s faktory nabohacení $1,56\times$ až $2,31\times$ pro FLAG, resp. HA konstrukty. Diskutovány jsou nutné úpravy protokolu před jeho plnou využitelností mimo modelové knihovny.

Spojení obou představených metod bude po optimalizaci velmi užitečným nástrojem pro identifikaci, přípravu a testování peptidových ligandů pomocí *in vitro* evoluce.

Reference

1. Mulder, G. Sur la composition de quelques substances animales. *Bulletin des Sciences Physiques et Naturelles en Néerlande* **1838**, 104.
2. Fischer, E.; Bergmann, M. *Untersuchungen über aminosäuren, polypeptide und proteine*. J. Springer, Berlin: **1906**.
3. Freidinger, R. M. Design and Synthesis of Novel Bioactive Peptides and Peptidomimetics. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, 46, 5553-5566.
4. Fischer, E. Ueber die Ester der Aminosäuren. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1901**, 34, 433-454.
5. Bergmann, M.; Zervas, L. Über ein allgemeines Verfahren der Peptid-Synthese. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)* **1932**, 65, 1192-1201.
6. Vigneaud, V. d.; Ressler, C.; Swan, C. J. M.; Roberts, C. W.; Katsoyannis, P. G.; Gordon, S. The synthesis of an octapeptide amide with the hormonal activity of oxytocin. *Journal of the American Chemical Society* **1953**, 75, 4879-4880.
7. Carpino, L. A.; Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group. *Journal of Organic Chemistry* **1972**, 37, 3404-3409.
8. Anderson, G. W.; McGregor, A. C. t-Butyloxycarbonylamino Acids and Their Use in Peptide Synthesis. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, 79, 6180-6183.
9. Merrifield, R. B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* **1963**, 85, 2149-2154.
10. Moss, J. A. Guide for resin and linker selection in solid-phase peptide synthesis. *Current Protocols in Protein Science* **2005**, Chapter 18, Unit 18.7.
11. Palomo, J. M. Solid-phase peptide synthesis: an overview focused on the preparation of biologically relevant peptides. *RSC Advances* **2014**, 4, 32658-32672.
12. Montalbetti, C. A. G. N.; Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, 61, 10827-10852.
13. Stollé, R.; Bergdoll, R.; Luther, M.; Auerhahn, A.; Wacker, W. Über N-substituierte Oxindole und Isatine. *Journal für Praktische Chemie* **1922**, 105, 137-148.
14. Curtius, T.; Schulz, H. Moleculargröße des Glycins und des Glycinanhydrids. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1890**, 23, 3041-3043.
15. Sheehan, J. C.; Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *Journal of the American Chemical Society* **1955**, 77, 1067-1068.
16. Subiros-Funosas, R.; Prohens, R.; Barbas, R.; El-Faham, A.; Albericio, F. Oxyma: an efficient additive for peptide synthesis to replace the benzotriazole-based HOBt and HOAt with a lower risk of explosion. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2009**, 15, 9394-9403.
17. Isidro-Llobet, A.; Alvarez, M.; Albericio, F. Amino acid-protecting groups. *Chemical Reviews* **2009**, 109, 2455-2504.
18. Carpino, L. A.; Shroff, H.; Triolo, S. A.; Mansour, E. S. M. E. The 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl group (Pbf) as arginine side chain protectant. *Tetrahedron Letters* **1993**, 34, 7829-7829.

19. Carpino, L. A. Oxidative Reactions of Hydrazines. IV. Elimination of Nitrogen from 1,1-Disubstituted-2-arenesulfonylhydrazides 1-4. *Journal of the American Chemical Society* **1957**, 79, 4427-4431.
20. Wünsch, E.; Jentsch, J. Zur Darstellung von Hydroxyaminosäure-tert.-butyläthern. *Chemische Berichte* **1964**, 97, 2490-2496.
21. Anderson, G. W.; Callahan, F. M. t-Butyl Esters of Amino Acids and Peptides and their Use in Peptide Synthesis 1. *Journal of the American Chemical Society* **1960**, 82, 3359-3363.
22. Sieber, P.; Riniker, B. Protection of carboxamide functions by the trityl residue. Application to peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* **1991**, 32, 739-742.
23. Sieber, P.; Riniker, B. Protection of histidine in peptide synthesis: A Reassessment of the trityl group. *Tetrahedron Letters* **1987**, 28, 6031-6034.
24. Zervas, L.; Photaki, I. On Cysteine and Cystine Peptides. I. New S-Protecting Groups for Cysteine. *Journal of the American Chemical Society* **1962**, 84, 3887-3897.
25. Carpino, L. A.; Han, G. Y. 9-Fluorenylmethoxycarbonyl function, a new base-sensitive amino-protecting group. *Journal of the American Chemical Society* **1970**, 92, 5748-5749.
26. Behrendt, R.; Huber, S.; Martí, R.; White, P. New t-butyl based aspartate protecting groups preventing aspartimide formation in Fmoc SPPS. *Journal of Peptide Science* **2015**, 21, 680-687.
27. Postma, T. M.; Giraud, M.; Albericio, F. Trimethoxyphenylthio as a Highly Labile Replacement for tert-Butylthio Cysteine Protection in Fmoc Solid Phase Synthesis. *Organic Letters* **2012**, 14, 5468-5471.
28. Hudson, R. F.; Searle, R. J. G.; Mancuso, A. Mécanisme de l'hydrolyse acide des carbamates. *Helvetica Chimica Acta* **1967**, 50, 997-1002.
29. Ashworth, I. W.; Cox, B. G.; Meyrick, B. Kinetics and Mechanism of N-Boc Cleavage: Evidence of a Second-Order Dependence upon Acid Concentration. *Journal of Organic Chemistry* **2010**, 75, 8117-8125.
30. Albericio, F. *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide*. Taylor & Francis, New York: **2000**.
31. Sieber, P.; Iselin, B. Selektive acidolytische spaltung von aralkyloxycarbonyl-aminoschutzgruppen. *Helvetica Chimica Acta* **1968**, 51, 614-622.
32. Pearson, D. A.; Blanchette, M.; Baker, M. L.; Guindon, C. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Letters* **1989**, 30, 2739-2742.
33. King, D. S.; Fields, C. G.; Fields, G. B. A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1990**, 36, 255-266.
34. Kodadek, T. The rise, fall and reinvention of combinatorial chemistry. *Chemical Communications* **2011**, 47, 9757-9763.
35. Geysen, H. M.; Meloen, R. H.; Barteling, S. J. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1984**, 81, 3998-4002.

36. Houghten, R. A. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1985**, 82, 5131-5135.
37. Merrifield, R. B.; Stewart, J. M.; Jernberg, N. Instrument for automated synthesis of peptides. *Analytical Chemistry* **1966**, 38, 1905-1914.
38. Dryland, A.; Sheppard, R. C. Peptide synthesis. Part 8. A system for solid-phase synthesis under low pressure continuous flow conditions. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* **1986**, 125-137.
39. Frank, R.; Heikens, W.; Heisterberg-Moutsis, G.; Blocker, H. A new general approach for the simultaneous chemical synthesis of large numbers of oligonucleotides: segmental solid supports. *Nucleic Acids Research* **1983**, 11, 4365-4377.
40. Hilpert, K.; Winkler, D. F. H.; Hancock, R. E. W. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nature Protocols* **2007**, 2, 1333.
41. Epton, R. *Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis: Peptides, Proteins and Nucleic Acids : Biological and Biomedical Applications : Collected Papers, Third International Symposium, 31st August - 4th September, 1993, Oxford, England, UK*. Mayflower Worldwide, Oxford: **1994**.
42. Lebl, M.; Hachmann, J. High-Throughput Peptide Synthesis. Kapitola z knihy: *Peptide Synthesis and Applications*, Humana Press, Totowa: **2005**, 167-194.
43. Fields, G. B. Introduction to peptide synthesis. *Current Protocols in Protein Science* **2002**, Chapter 18, Unit 18.1.
44. Spiegelman, S.; Haruna, I.; Holland, I. B.; Beaudreau, G.; Mills, D. The synthesis of a self-propagating and infectious nucleic acid with a purified enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1965**, 54, 919-927.
45. Kacian, D. L.; Mills, D. R.; Kramer, F. R.; Spiegelman, S. A replicating RNA molecule suitable for a detailed analysis of extracellular evolution and replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1972**, 69, 3038-3042.
46. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **1985**, 228, 1315-1317.
47. McCafferty, J.; Griffiths, A. D.; Winter, G.; Chiswell, D. J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **1990**, 348, 552-554.
48. Chen, K.; Arnold, F. H. Tuning the activity of an enzyme for unusual environments: sequential random mutagenesis of subtilisin E for catalysis in dimethylformamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1993**, 90, 5618-5622.
49. Ullman, C. G.; Frigotto, L.; Cooley, R. N. In vitro methods for peptide display and their applications. *Briefings in Functional Genomics* **2011**, 10, 125-134.
50. Wang, R.; Cotten, S. W.; Liu, R. mRNA display using covalent coupling of mRNA to translated proteins. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **2012**, 805, 87-100.
51. Hanes, J.; Plückthun, A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, 94, 4937-4942.
52. Boder, E. T.; Wittrup, K. D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nature Biotechnology* **1997**, 15, 553-557.

53. He, B.; Kang, J.; Ru, B.; Ding, H.; Zhou, P.; Huang, J. SABinder: A Web Service for Predicting Streptavidin-Binding Peptides. *BioMed Research International* **2016**, 9175143.
54. Hu, Y. F.; Gao, X. C.; Xu, T. Q.; Dun, Z.; Yu, X. L. Characterization of Seven New Polystyrene Plates Binding Peptides from a Phage-Displayed Random 12-Peptide Library. *Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening* **2016**, 19, 283-289.
55. Dennis, M. S.; Zhang, M.; Meng, Y. G.; Kadkhodayan, M.; Kirchhofer, D.; Combs, D.; Damico, L. A. Albumin Binding as a General Strategy for Improving the Pharmacokinetics of Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277, 35035-35043.
56. Morag, O.; Abramov, G.; Goldbourt, A. Similarities and Differences within Members of the Ff Family of Filamentous Bacteriophage Viruses. *Journal of Physical Chemistry B* **2011**, 115, 15370-15379.
57. Rakonjac, J.; Bennett, N. J.; Spagnuolo, J.; Gagic, D.; Russel, M. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Current Issues in Molecular Biology* **2011**, 13, 51-76.
58. Smith, G. P.; Petrenko, V. A. Phage Display. *Chemical Reviews* **1997**, 97, 391-410.
59. Roberts, R. W.; Szostak, J. W. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1997**, 94, 12297-12302.
60. Tang, L.; Wang, X.; Ru, B.; Sun, H.; Huang, J.; Gao, H. MDC-Analyzer: A novel degenerate primer design tool for the construction of intelligent mutagenesis libraries with contiguous sites. *BioTechniques* **2014**, 56, 301-310.
61. Reyes, S. G.; Kuruma, Y.; Fujimi, M.; Yamazaki, M.; Eto, S.; Nishikawa, S.; Tamaki, S.; Kobayashi, A.; Mizuuchi, R.; Rothschild, L.; Ditzler, M.; Fujishima, K. PURE mRNA display and cDNA display provide rapid detection of core epitope motif via high-throughput sequencing. *Biotechnology and Bioengineering* **2021**, 118, 1736-1749.
62. Rong, M.; He, B.; McAllister, W. T.; Durbin, R. K. Promoter specificity determinants of T7 RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, 95, 515-519.
63. Kelly, J. R. Tools and reference standards supporting the engineering and evolution of synthetic biological systems. Massachusetts Institute of Technology, Boston: **2008**.
64. Nishigaki, K.; Taguchi, K.; Kinoshita, Y.; Aita, T.; Husimi, Y. Y-ligation: An efficient method for ligating single-stranded DNAs and RNAs with T4 RNA ligase. *Molecular Diversity* **1998**, 4, 187-190.
65. MacDonald, C.; Piper, R. C. Puromycin- and methotrexate-resistance cassettes and optimized Cre-recombinase expression plasmids for use in yeast. *Yeast* **2015**, 32, 423-438.
66. Valle, M.; Zavialov, A.; Sengupta, J.; Rawat, U.; Ehrenberg, M.; Frank, J. Locking and Unlocking of Ribosomal Motions. *Cell* **2003**, 114, 123-134.
67. Valencia, C. A.; Zou, J.; Liu, R. In vitro selection of proteins with desired characteristics using mRNA-display. *Methods (San Diego, Calif.)* **2013**, 60, 55-69.
68. Liu, R.; Barrick, J. E.; Szostak, J. W.; Roberts, R. W. Optimized synthesis of RNA-protein fusions for in vitro protein selection. *Methods in Enzymology* **2000**, 318, 268-293.
69. Wilson, D. S.; Keefe, A. D.; Szostak, J. W. The use of mRNA display to select high-affinity protein-binding peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2001**, 98, 3750-3755.

70. Seelig, B. mRNA display for the selection and evolution of enzymes from in vitro-translated protein libraries. *Nature Protocols* **2011**, 6, 540-552.
71. AbouHaidar, M. G.; Ivanov, I. G. Non-enzymatic RNA hydrolysis promoted by the combined catalytic activity of buffers and magnesium ions. *Zeitschrift fur Naturforschung C* **1999**, 54, 542-548.
72. Barshevskaja, T. N.; Goriunova, L. E.; Bibilashvili, R. Non-specific RNA degradation in the presence of magnesium ions. *Molekuliarnaia biologii* **1987**, 21, 1235-1241.
73. Roberts, B. E.; Paterson, B. M. Efficient Translation of Tobacco Mosaic Virus RNA and Rabbit Globin 9S RNA in a Cell-Free System from Commercial Wheat Germ. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1973**, 70, 2330-2334.
74. Adamson, S. D.; Herbert, E.; Godchaux, W. Factors affecting the rate of protein synthesis in lysate systems from reticulocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1968**, 125, 671-683.
75. Zucker, W. V.; Schulman, H. M. Stimulation of globin-chain initiation by hemin in the reticulocyte cell-free system. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1968**, 59, 582-589.
76. Shimizu, Y.; Inoue, A.; Tomari, Y.; Suzuki, T.; Yokogawa, T.; Nishikawa, K.; Ueda, T. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nature Biotechnology* **2001**, 19, 751-755.
77. Doerr, A.; de Reus, E.; van Nies, P.; van der Haar, M.; Wei, K.; Kattan, J.; Wahl, A.; Danelon, C. Modelling cell-free RNA and protein synthesis with minimal systems. *Physical Biology* **2019**, 16, 025001.
78. Green, P.; Inouye, M. In Vivo and in Vitro systems for studying bacterial membrane biogenesis. *Methods in Enzymology* **1983**, 96, 74-84.
79. Gasior, E.; Herrera, F.; Sadnik, I.; McLaughlin, C. S.; Moldave, K. The preparation and characterization of a cell-free system from *Saccharomyces cerevisiae* that translates natural messenger ribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry* **1979**, 254, 3965-3969.
80. McDowell, M. J.; Joklik, W. K.; Villa-Komaroff, L.; Lodish, H. F. Translation of reovirus messenger RNAs synthesized in vitro into reovirus polypeptides by several mammalian cell-free extracts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1972**, 69, 2649-2653.
81. NEB. PURExpress® In Vitro Protein Synthesis Kit. (Pristoupeno 15.6.2021) <https://international.neb.com/products/e6800-purexpress-invitro-protein-synthesis-kit>
82. DeLano, W. L.; Ultsch, M. H.; de Vos, A. M.; Wells, J. A. Convergent solutions to binding at a protein-protein interface. *Science* **2000**, 287, 1279-1283.
83. Wrapp, D.; Wang, N.; Corbett, K. S.; Goldsmith, J. A.; Hsieh, C. L.; Abiona, O.; Graham, B. S.; McLellan, J. S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science* **2020**, 367, 1260-1263.
84. Peng, Y.; Du, N.; Lei, Y.; Dorje, S.; Qi, J.; Luo, T.; Gao, G. F.; Song, H. Structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design. *EMBO Journal* **2020**, 39, e105938.
85. Clarke, S. C.; Dumesic, P. A.; Homer, C. M.; O'Donoghue, A. J.; La Greca, F.; Pallova, L.; Majer, P.; Madhani, H. D.; Craik, C. S. Integrated Activity and Genetic

Profiling of Secreted Peptidases in *Cryptococcus neoformans* Reveals an Aspartyl Peptidase Required for Low pH Survival and Virulence. *PLOS Pathogens* **2016**, 12, e1006051.

86. Kryštůfek, R.; Šácha, P.; Starková, J.; Brynda, J.; Hradilek, M.; Tloušťová, E.; Grzyska, J.; Rut, W.; Boucher, M. J.; Draž, M.; Majer, P.; Hájek, M.; Řezáčová, P.; Madhani, H. D.; Craik, C. S.; Konvalinka, J. Re-emerging Aspartic Protease Targets: Examining *Cryptococcus neoformans* Major Aspartyl Peptidase 1 as a Target for Antifungal Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* **2021**, 64, 6706-6719.
87. Detrick, B.; Schmitz, J. L.; Hamilton, R. G. *Manual of Molecular and Clinical Laboratory Immunology*. ASM Press, Washington: **2016**.
88. Sidorin, E. V.; Solov'eva, T. F. IgG-binding proteins of bacteria. *Biochemistry (Moscow)* **2011**, 76, 295.
89. Verwey, W. F. A Type-specific Antigenic Protein Derived From The *Staphylococcus*. *Journal of experimental medicine* **1940**, 71, 635-644.
90. Bjorck, L.; Kronvall, G. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *Journal of Immunology* **1984**, 133, 969-974.
91. Eliasson, M.; Olsson, A.; Palmcrantz, E.; Wiberg, K.; Inganäs, M.; Guss, B.; Lindberg, M.; Uhlén, M. Chimeric IgG-binding receptors engineered from staphylococcal protein A and streptococcal protein G. *Journal of Biological Chemistry* **1988**, 263, 4323-4327.
92. Bjorck, L. Protein L. A novel bacterial cell wall protein with affinity for Ig L chains. *Journal of Immunology* **1988**, 140, 1194-1197.
93. Kang, H. J.; Choe, W.; Min, J. K.; Lee, Y. M.; Kim, B. M.; Chung, S. J. Cyclic peptide ligand with high binding capacity for affinity purification of immunoglobulin G. *Journal of Chromatography A* **2016**, 1466, 105-112.
94. Kishimoto, S.; Nakashimada, Y.; Yokota, R.; Hatanaka, T.; Adachi, M.; Ito, Y. Site-Specific Chemical Conjugation of Antibodies by Using Affinity Peptide for the Development of Therapeutic Antibody Format. *Bioconjugate Chemistry* **2019**, 30, 698-702.
95. Kryštůfek, R. Návrh, příprava a charakterisace polymerních konjugátů rozeznávajících proteiny s pomocí peptidových ligandů. Přírodovědecká fakulta UK, Praha: **2019**.
96. Zhu, N.; Zhang, D.; Wang, W.; Li, X.; Yang, B.; Song, J.; Zhao, X.; Huang, B.; Shi, W.; Lu, R.; Niu, P.; Zhan, F.; Ma, X.; Wang, D.; Xu, W.; Wu, G.; Gao, G. F.; Tan, W.; China Novel Coronavirus, I.; Research, T. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine* **2020**, 382, 727-733.
97. Rikhtegaran Tehrani, Z.; Saadat, S.; Saleh, E.; Ouyang, X.; Constantine, N.; DeVico, A. L.; Harris, A. D.; Lewis, G. K.; Kottlil, S.; Sajadi, M. M. Performance of nucleocapsid and spike-based SARS-CoV-2 serologic assays. *PLOS ONE* **2020**, 15, e0237828.
98. Van Elslande, J.; Decru, B.; Jonckheere, S.; Van Wijngaerden, E.; Houben, E.; Vandecandelaere, P.; Indevuyt, C.; Depypere, M.; Desmet, S.; André, E.; Van Ranst, M.; Lagrou, K.; Vermeersch, P. Antibody response against SARS-CoV-2 spike protein and nucleoprotein evaluated by four automated immunoassays and three ELISAs. *Clinical Microbiology and Infection* **2020**, 26, 1557.e1-1557.e7.

99. Mariën, J.; Ceulemans, A.; Michiels, J.; Heyndrickx, L.; Kerkhof, K.; Foque, N.; Widdowson, M.-A.; Mortgat, L.; Duysburgh, E.; Desombere, I.; Jansens, H.; Van Esbroeck, M.; Ariën, K. K. Evaluating SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins as targets for antibody detection in severe and mild COVID-19 cases using a Luminex bead-based assay. *Journal of Virological Methods* **2021**, 288, 114025.
100. Glowacka, I.; Bertram, S.; Müller, M. A.; Allen, P.; Soilleux, E.; Pfefferle, S.; Steffen, I.; Tsegaye, T. S.; He, Y.; Gnirss, K.; Niemeyer, D.; Schneider, H.; Drosten, C.; Pöhlmann, S. Evidence that TMPRSS2 Activates the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Spike Protein for Membrane Fusion and Reduces Viral Control by the Humoral Immune Response. *Journal of Virology* **2011**, 85, 4122-4134.
101. Lu, S.; Ye, Q.; Singh, D.; Cao, Y.; Diedrich, J. K.; Yates, J. R.; Villa, E.; Cleveland, D. W.; Corbett, K. D. The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. *Nature Communications* **2021**, 12, 502.
102. Pinti, M.; Orsi, C. F.; Gibellini, L.; Esposito, R.; Cossarizza, A.; Blasi, E.; Peppoloni, S.; Mussini, C. Identification and characterization of an aspartyl protease from *Cryptococcus neoformans*. *FEBS Letters* **2007**, 581, 3882-3886.
103. Armstrong-James, D.; Meintjes, G.; Brown, G. D. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends in Microbiology* **2014**, 22, 120-127.
104. Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **2012**, 9, 671-675.
105. Okonechnikov, K.; Golosova, O.; Fursov, M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* **2012**, 28, 1166-1167.
106. Base-Stacking Melting Temperature (T_m) Calculations. (Přistoupeno 15.6.2021) <http://insilico.ehu.es/tm.php?formula=BaseStaking>
107. SantaLucia, J. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1998**, 95, 1460-1465.
108. Marlin Firmware adaptation for SPENSER. (Přistoupeno 15.6.2021) <https://github.com/grzegorgf/Marlin-for-SPENSER>
109. Marlin Firmware. (Přistoupeno 15.6.2021) <https://github.com/MarlinFirmware/Marlin>
110. I2C-bus specification Rev 5, NXP Semiconductors. (Přistoupeno 15.6.2021) http://www.nxp.com/documents/user_manual/UM10204.pdf
111. Krchňák, V.; Vágner, J.; Lebl, M. Noninvasive continuous monitoring of solid-phase peptide synthesis by acid-base indicator. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1988**, 32, 415-416.
112. PS3: Self-installed Benchtop Peptide Synthesizer. (Přistoupeno 15.6.2021) <https://www.gyrosproteintechnologies.com/ps3-3-channel-peptide-synthesizer-protein-technologies>
113. Mijalis, A. J.; Thomas, D. A.; Simon, M. D.; Adamo, A.; Beaumont, R.; Jensen, K. F.; Pentelute, B. L. A fully automated flow-based approach for accelerated peptide synthesis. *Nature Chemical Biology* **2017**, 13, 464-466.
114. Syro II: Fully Automated Parallel Peptide Synthesizer. (Přistoupeno 15.6.2021) <https://www.biotage.com/syro-ii-parallel-peptide-synthesizer-0>

115. MultiPep 2: Automated Parallel Peptide Synthesizer. (Přistoupeno 15.6.2021)
<https://cem.com/en/multipep2>
116. Darcy, H. *Recherches expérimentales relatives au mouvement de l'eau dans les tuyaux*. Impr. Impériale, Lausanne: **1857**.
117. Weisbach, J. *Versuche über die unvollkommene Contraction des Wassers beim Ausfluss desselben aus Röhren und Gefässen*. Weidmann, Leipzig: **1843**.
118. Reynolds, O. XXIX. An experimental investigation of the circumstances which determine whether the motion of water shall be direct or sinuous, and of the law of resistance in parallel channels. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1883**, 174, 935-982.
119. Rink, H. Solid-phase synthesis of protected peptide fragments using a trialkoxy-diphenyl-methylester resin. *Tetrahedron Letters* **1987**, 28, 3787-3790.
120. Tam, J. P.; Wu, C. R.; Liu, W.; Zhang, J. W. Disulfide bond formation in peptides by dimethyl sulfoxide. Scope and applications. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, 113, 6657-6662.
121. Postma, T. M.; Albericio, F. N-Chlorosuccinimide, an Efficient Reagent for On-Resin Disulfide Formation in Solid-Phase Peptide Synthesis. *Organic Letters* **2013**, 15, 616-619.
122. Gauss, C. F. *Theoria combinationis observationum erroribus minimis obnoxiae*. H. Dieterich, Ghent: **1823**.
123. Gill, S. C.; von Hippel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Analytical Biochemistry* **1989**, 182, 319-326.
124. Cheng, Y.; Prusoff, W. H. Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology* **1973**, 22, 3099-3108.
125. Ji-Hu, Z.; Thomas, D. Y. C.; Kevin, R. O. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *Journal of Biomolecular Screening* **1999**, 4, 67-73.
126. BMP180 Breakout. (Přistoupeno 15.6.2021)
https://github.com/sparkfun/BMP180_Breakout/
127. Atmel ATmega328P Datasheet 7810D-AVR-01/15. (Přistoupeno 15.6.2021)
https://ww1.microchip.com/downloads/en/DeviceDoc/Atmel-7810-Automotive-Microcontrollers-ATmega328P_Datasheet.pdf
128. tgradientCMD controller for Biometra T-Gradient. (Přistoupeno 15.6.2021)
<https://github.com/grzegorgf/tgradientCMD>
129. SCARAMaster - a simple control interface for SCARA. (Přistoupeno 15.6.2021)
<https://github.com/grzegorgf/scaramaster/>
130. 96 well conical PCR plate adaptor. (Přistoupeno 15.6.2021)
<https://www.thingiverse.com/thing:4807253>
131. Aranda, P. S.; LaJoie, D. M.; Jorcyk, C. L. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis* **2012**, 33, 366-369.
132. Tam, J. P.; Riemen, M. W.; Merrifield, R. B. Mechanisms of aspartimide formation: the effects of protecting groups, acid, base, temperature and time. *Peptide Research* **1988**, 1, 6-18.

133. Poreba, M.; Salvesen, G. S.; Drag, M. Synthesis of a HyCoSuL peptide substrate library to dissect protease substrate specificity. *Nature Protocols* **2017**, 12, 2189-2214.
134. O'Donoghue, A. J.; Eroy-Reveles, A. A.; Knudsen, G. M.; Ingram, J.; Zhou, M.; Statnekov, J. B.; Greninger, A. L.; Hostetter, D. R.; Qu, G.; Maltby, D. A.; Anderson, M. O.; DeRisi, J. L.; McKerrow, J. H.; Burlingame, A. L.; Craik, C. S. Global Identification of Peptidase Specificity by Multiplex Substrate Profiling. *Nature Methods* **2012**, 9, 1095-1100.
135. Svec, D.; Tichopad, A.; Novosadova, V.; Pfaffl, M. W.; Kubista, M. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification* **2015**, 3, 9-16.
136. Broeders, S.; Huber, I.; Grohmann, L.; Berben, G.; Taverniers, I.; Mazzara, M.; Roosens, N.; Morisset, D. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trends in Food Science and Technology* **2014**, 37, 115-126.
137. Nagumo, Y.; Fujiwara, K.; Horisawa, K.; Yanagawa, H.; Doi, N. PURE mRNA display for in vitro selection of single-chain antibodies. *Journal of Biochemistry* **2016**, 159, 519-526.
138. van Woerkom, W. J.; van Nispen, J. W. Difficult couplings in stepwise solid phase peptide synthesis: predictable or just a guess? *International Journal of Peptide and Protein Research* **1991**, 38, 103-113.
139. Loeffler, F. F.; Pfeil, J.; Heiss, K. High-Density Peptide Arrays for Malaria Vaccine Development. *Methods in Molecular Biology* **2016**, 1403, 569-582.
140. Schirwitz, C.; Loeffler, F. F.; Felgenhauer, T.; Stadler, V.; Breitling, F.; Bischoff, F. R. Sensing immune responses with customized peptide microarrays. *Biointerphases* **2012**, 7, 47.
141. NEB. T4 RNA Ligase 1 (ssRNA Ligase). (Přistoupeno 15.6.2021)
<https://international.neb.com/products/m0204-t4-rna-ligase-1-ssrna-ligase>
142. NEB. T7 RNA Polymerase. (Přistoupeno 15.6.2021)
<https://international.neb.com/products/m0251-t7-rna-polymerase>
143. White, C. J.; Yudin, A. K. Contemporary strategies for peptide macrocyclization. *Nature Chemistry* **2011**, 3, 509-524.
144. Rentero, I.; Heinis, C. Screening of large molecule diversities by phage display. *Chimia* **2011**, 65, 843-845.
145. Wegner, G. J.; Lee, H. J.; Corn, R. M. Characterization and optimization of peptide arrays for the study of epitope-antibody interactions using surface plasmon resonance imaging. *Analytical Chemistry* **2002**, 74, 5161-5168.
146. Anti-HA (12CA5) Datasheet. (Přistoupeno 15.6.2021)
<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Roche/Bulletin/1/roahabul.pdf>
147. AmpliScribe™ T7 High Yield Transcription Kit. (Přistoupeno 15.6.2021)
<https://www.lucigen.com/docs/manuals/MA040E-AmpliScribe-Kits.pdf>

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

| Jméno a příjmení, adresa | Číslo OP | Datum vypůjčení | Poznámka |
|--------------------------|----------|-----------------|----------|
| | | | |