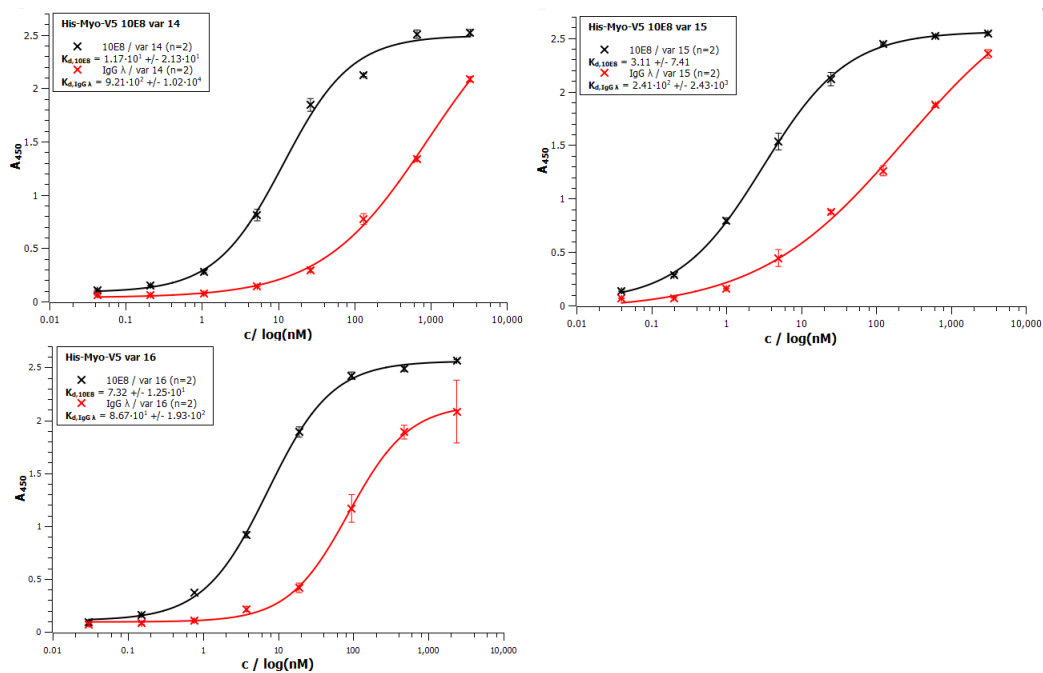
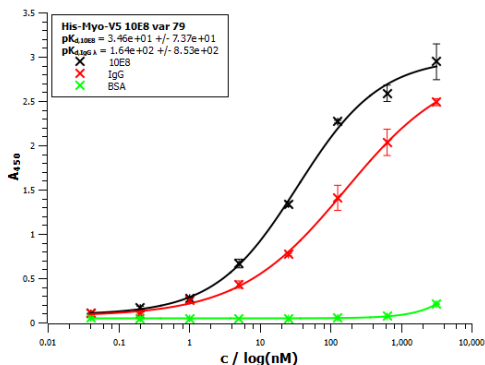
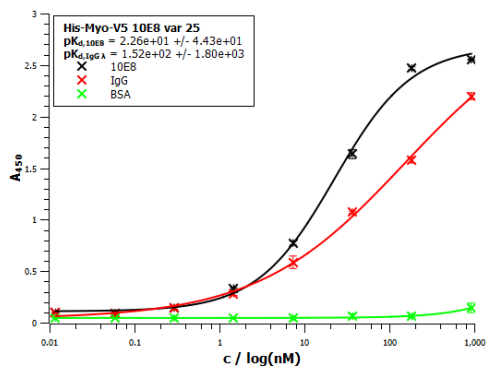
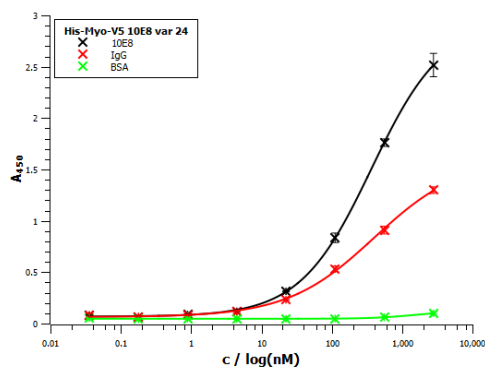


8 Příloha A – experimentální část

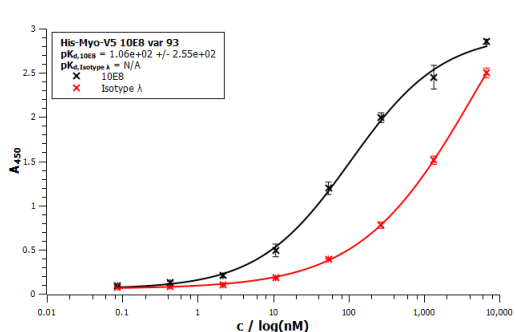
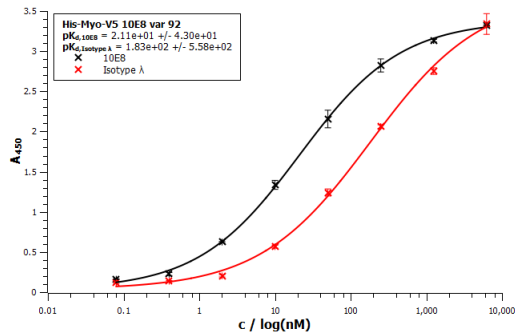
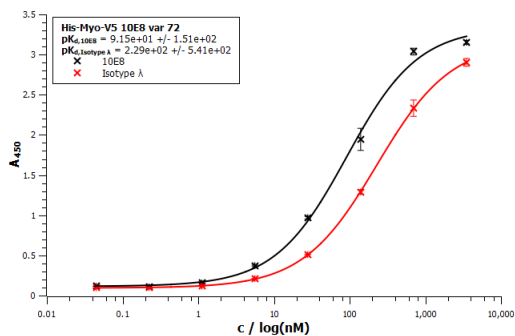
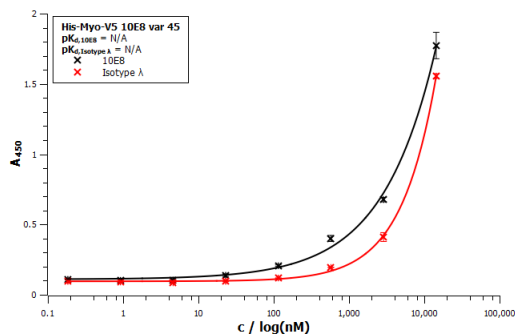
8.1 Analýza vazebné afinity metodou ELISA



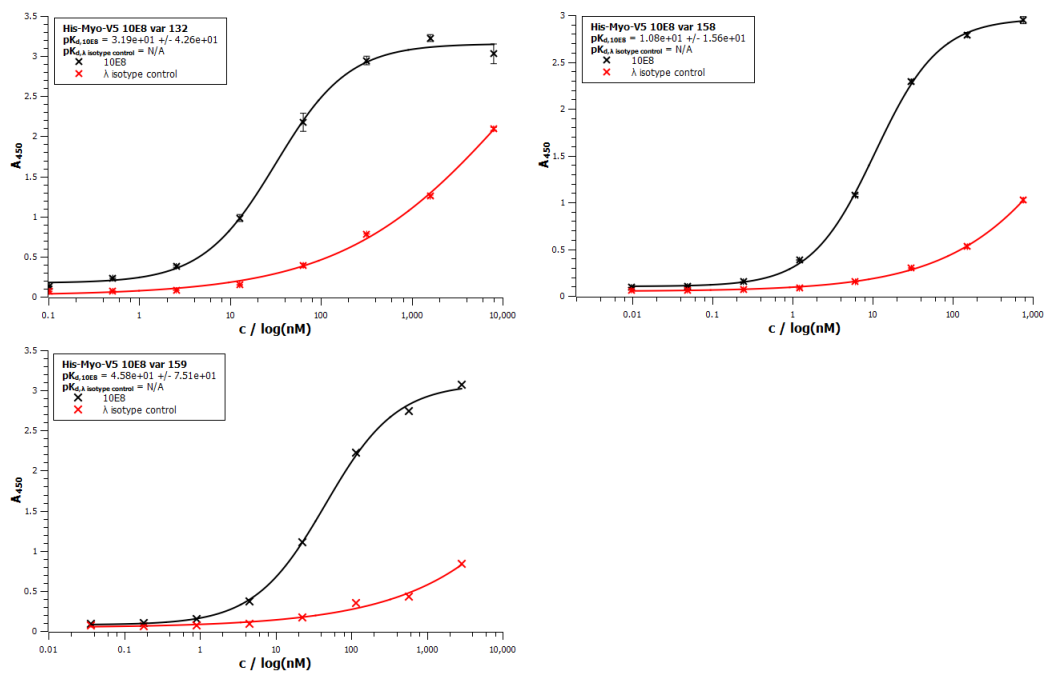
Příloha A 1 – Vazba proteinů MLA014, MLA015, MLA016 na 10E8 a IgG λ . Stanoveno metodou ELISA v konstruktech His-MLA-V5, provedeno v triplikátech a chybové úsečky představují standardní odchylku.



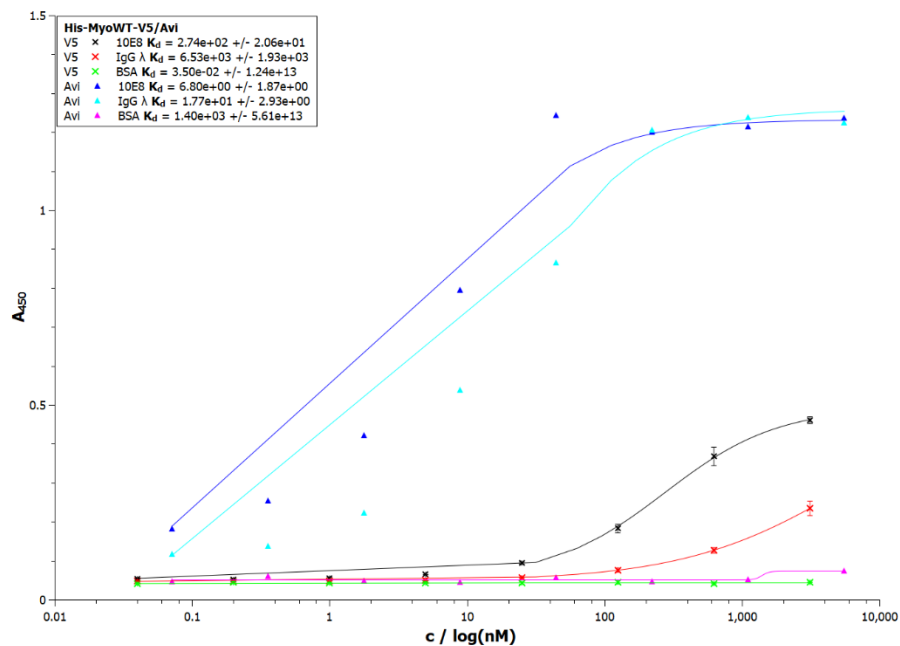
Příloha A 2 – Vazba proteinů MLA024, MLA025, MLA079 na 10E8 a IgG λ . Stanoveno metodou ELISA v konstruktech His-MLA-V5, provedeno v triplikátech a chybové úsečky představují standardní odchylku.



Příloha A 3 – Vazba proteinů MLA045, MLA072, MLA092, MLA093 na 10E8 a IgG λ . Stanoveno metodou ELISA v konstruktech His-MLA-V5. Stanoveno metodou ELISA v konstruktech His-MLA-V5, provedeno v triplikátech a chybové úsečky představují standardní odchylku.

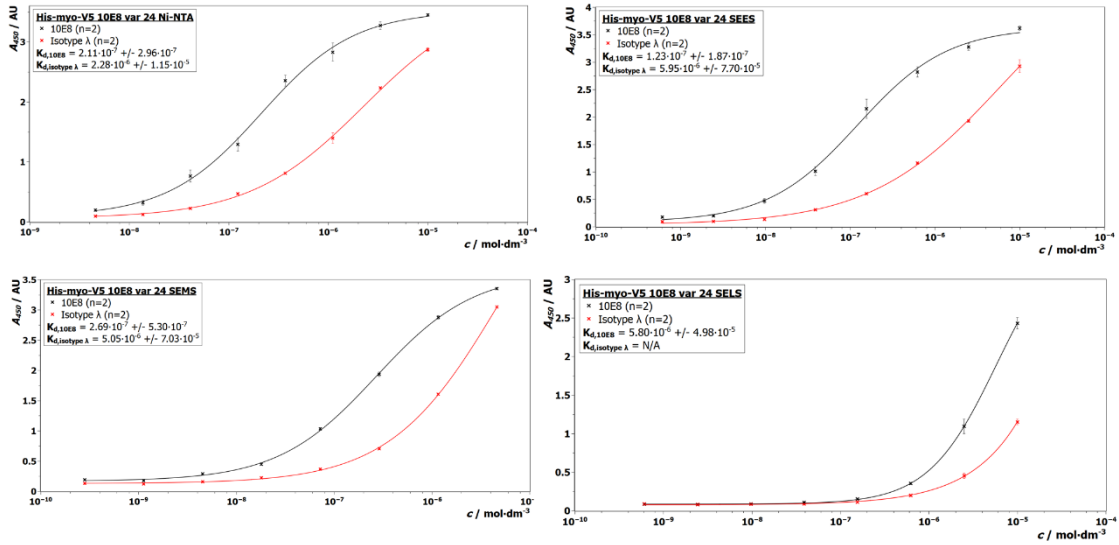


Příloha A 4 – Vazba proteinů MLA132, MLA158, MLA159 na 10E8 a IgG λ . Stanoveno metodou ELISA v konstruktech His-MLA-V5. Stanoveno metodou ELISA v konstruktech His-MLA-V5, provedeno v triplikátech a chybové úsečky představují standardní odchylku.

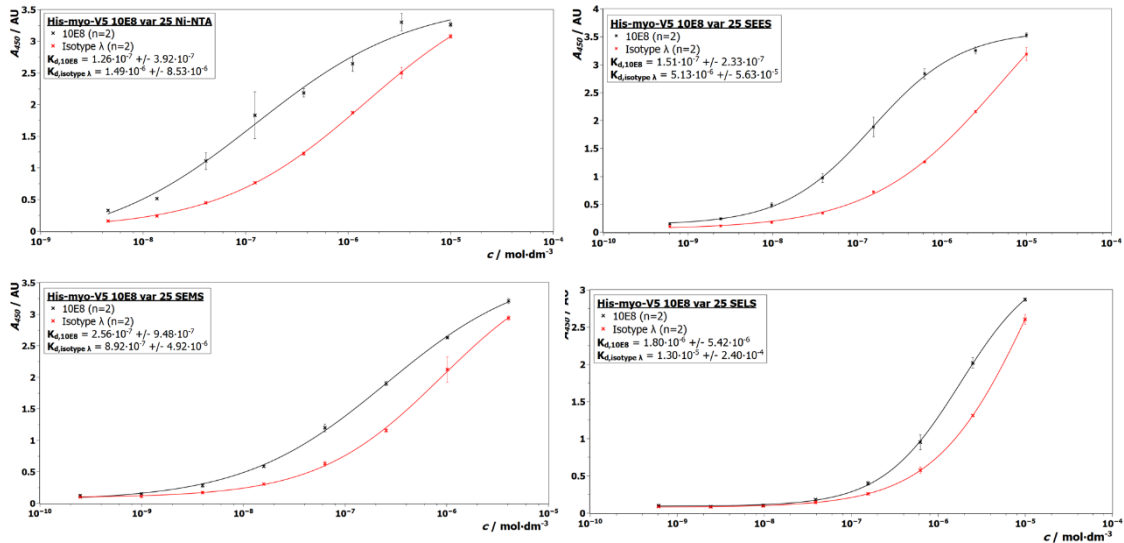


Příloha A 5 – Vazba proteinů His-MyoWT-V5 a His-MyoWT-Avi na 10E8 a IgG λ . Stanoveno metodou ELISA v konstruktech His-MLA-V5, provedeno v triplikátech a chybové úsečky představují standardní odchylku.

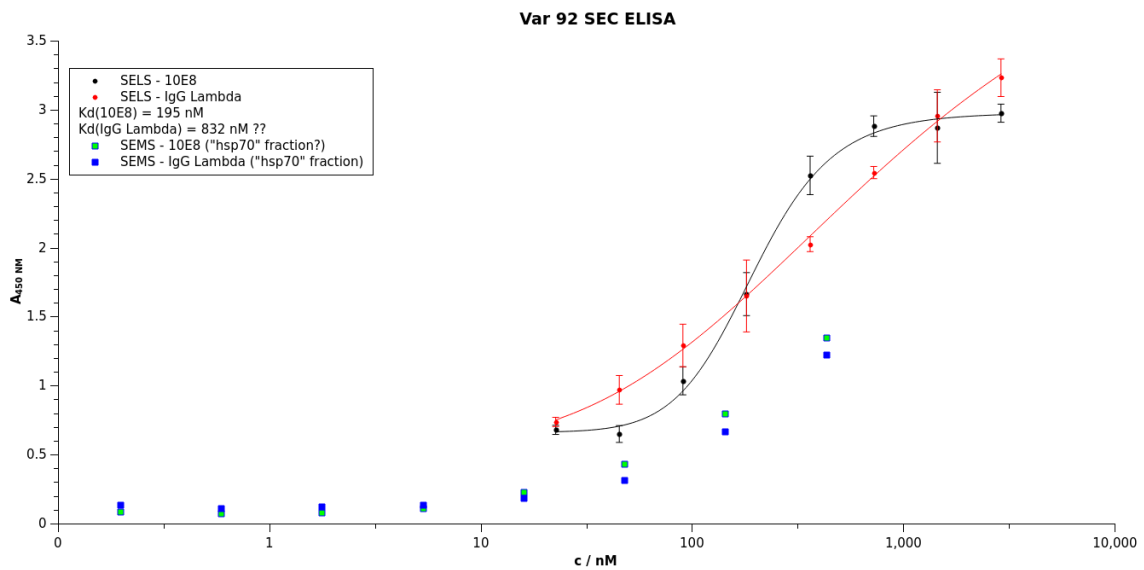
8.2 ELISA jednotlivých SEC separovaných frakcí



Příloha A 6 – Vazba frakcí proteinů His-MLA024-V5 na 10E8 a IgG λ . Stanoveno metodou ELISA, separace frakcí proběhla pomocí gelové permeační chromatografie. Frakce SEES, SEMS a SELS odpovídají po sobě jdoucím třem charakteristickým píkům.



Příloha A 7 – Vazba frakcí proteinů His-MLA025-V5 na 10E8 a IgG λ . Stanoveno metodou ELISA, separace frakcí proběhla pomocí gelové permeační chromatografie. Frakce SEES, SEMS a SELS odpovídají po sobě jdoucím třem charakteristickým píkům.



Příloha A 8 – Vazba frakcí proteinů His-MLA092-V5 na 10E8 a IgG λ . Stanoveno metodou ELISA, separace frakcí proběhla pomocí gelové permeační chromatografie. Frakce SEMS a SELS odpovídají po sobě jdoucím posledním dvěma charakteristickým píkům. Frakce SEES nebyla stanovena.

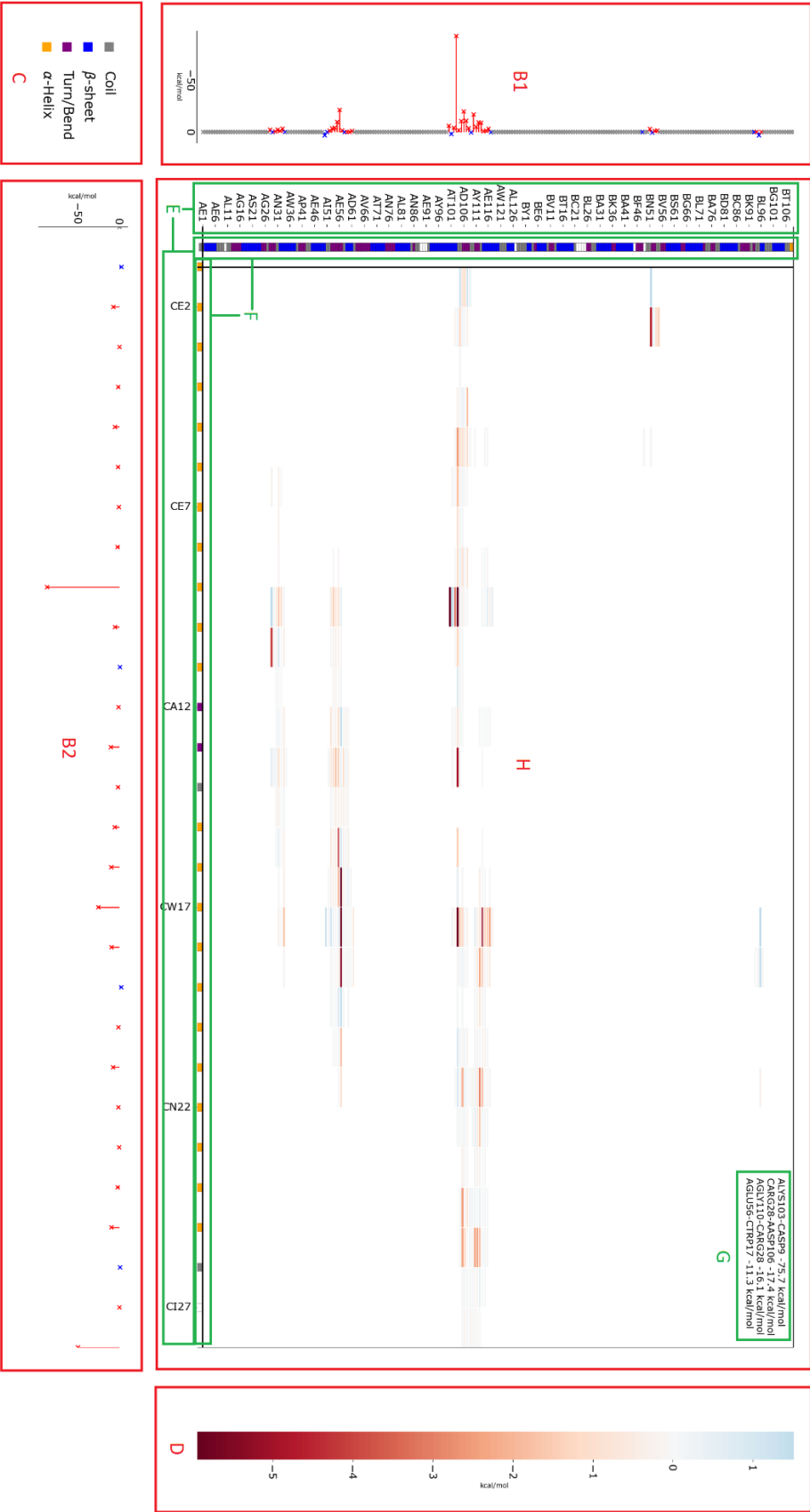
9 Příloha B – *in silico* část

9.1 Orientace ve vizuálních podobách matic volných energií párových interakcí aminokyselin

Maticе volných energií párových interakcí aminokyselin v komplexech byly vytvořeny pomocí skriptu v programovacím jazyce Python. Nesou množství informací. Reference k instrukcím pro orientaci v nich je zobrazena na **Příloha B 1**. Označeny jsou části celého obrázku, které jsou zde popsány:

- A) Název analyzovaného komplexu a charakter matice (zde „total_IEM“ označující celkovou interakční energii. Alternativou je „elec_IEM“ a „vdw_IEM“ pro matice elektrostatických a van der Waalsovských interakcí.
- B) Celkové volné energie interakcí pro jedno konkrétní reziduum se všemi ostatními (B1 zde pro 10E8 fragment, B2 pro MPER)
- C) Legenda DSSP dosazených sekundárních struktur označených na osách samotné matice.
- D) Legenda „heatmap“ popisující barevné schéma. Červeně jsou označeny interakce se zápornou volnou energií, modře s kladnou. Jednotkami jsou kcal/mol
- E) Jednopísmenné kódy a označení řetězce protilátky (osa Y) a MPER/MLA (osa X) ve formátu „Písmeno řetězce + kód aminokyseliny + její pořadí“
- F) Sekundární struktura v daném regionu označená barevnými obdélníky dle legendy v C). Dosazení sekundární struktury probíhá algoritmem DSSP.
- G) Volitelný počet (zde 4) nejlepších interakčních párů a jejich volné energie.
- H) Samotná „heatmap“ vizualizující matici párových interakcí. Pozice X, Y odpovídají aminokyselinám na interagujících partnerech, barevně jsou označeny volné energie dle legendy D)

10E8-MPER mod. original total_IEM A



Příloha B 1 – Reference pro čtení matic párových interakcí.

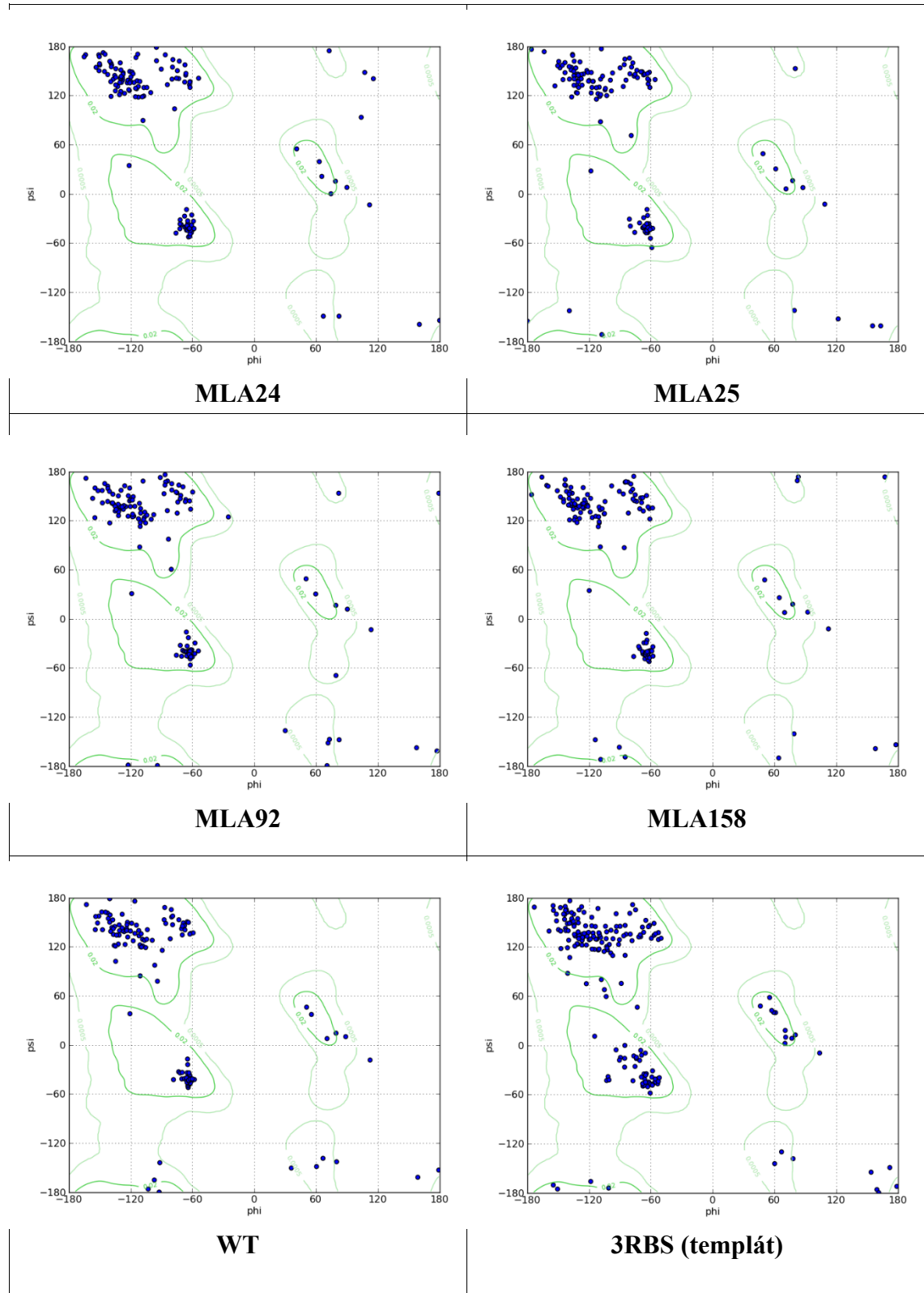
9.2 Materiál a metody

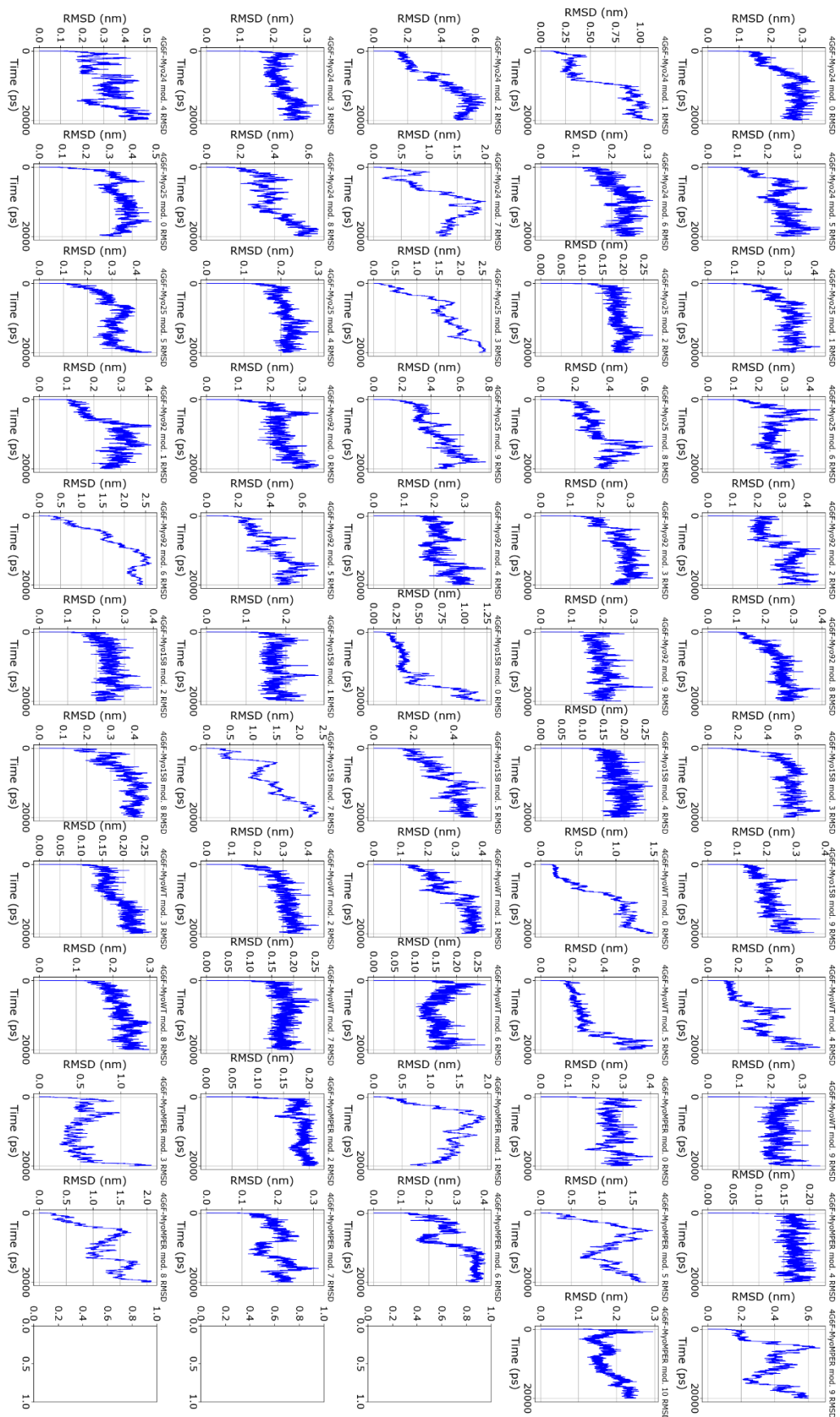
Příloha B 2 - Indexy (selekční algebra) oddělující skupiny pro třetí krok vylepšování homologních modelů balíkem GROMACS – první řádky označují skupiny zmražené, druhé řádky skupiny mobilní.

	24	92
Zmražené skupiny	>!ri22-23&!ri33-34&!aH*&!13&!15	>!ri35&!ri65-66&!ri78-79&!ri82&!ri57&!ri94&!13&!15&!aH*
Mobilní skupiny	>1&!19&!aH*	>1&!aH*&!19

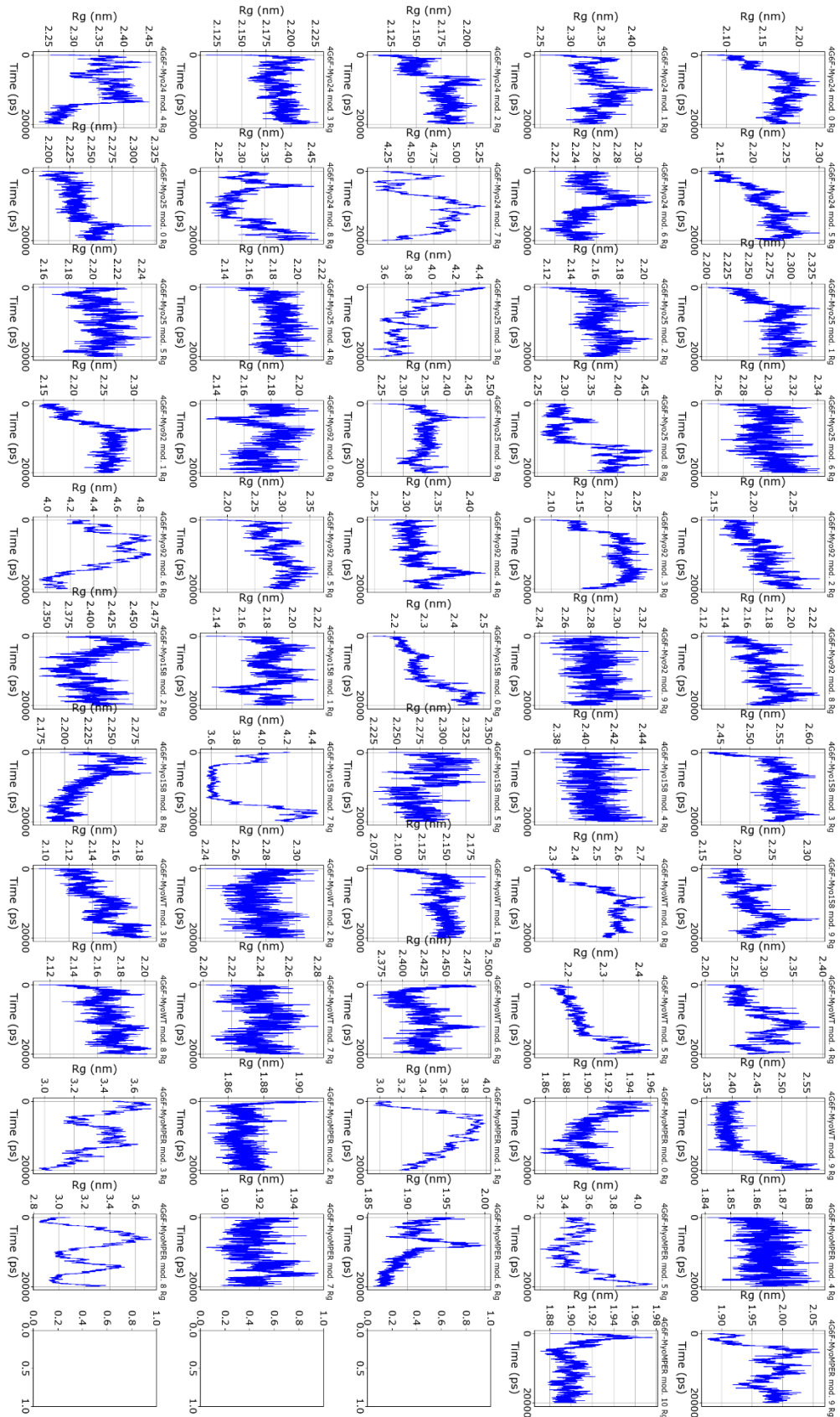
9.3 Výsledky a diskuze

Příloha B 3 – Ramachandranovy výnosy prvotních homologních modelů myomesinových vazebných proteinů.

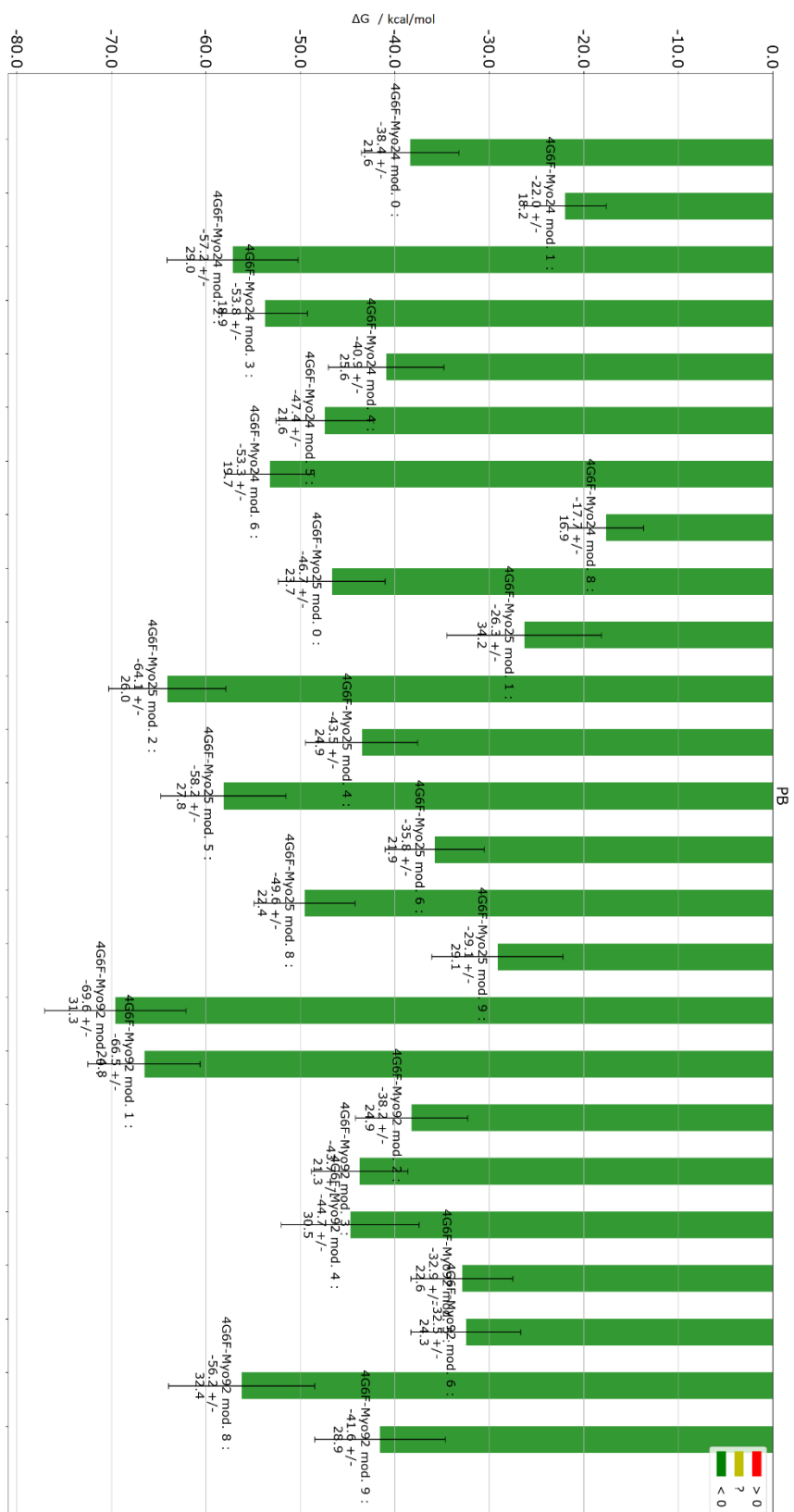




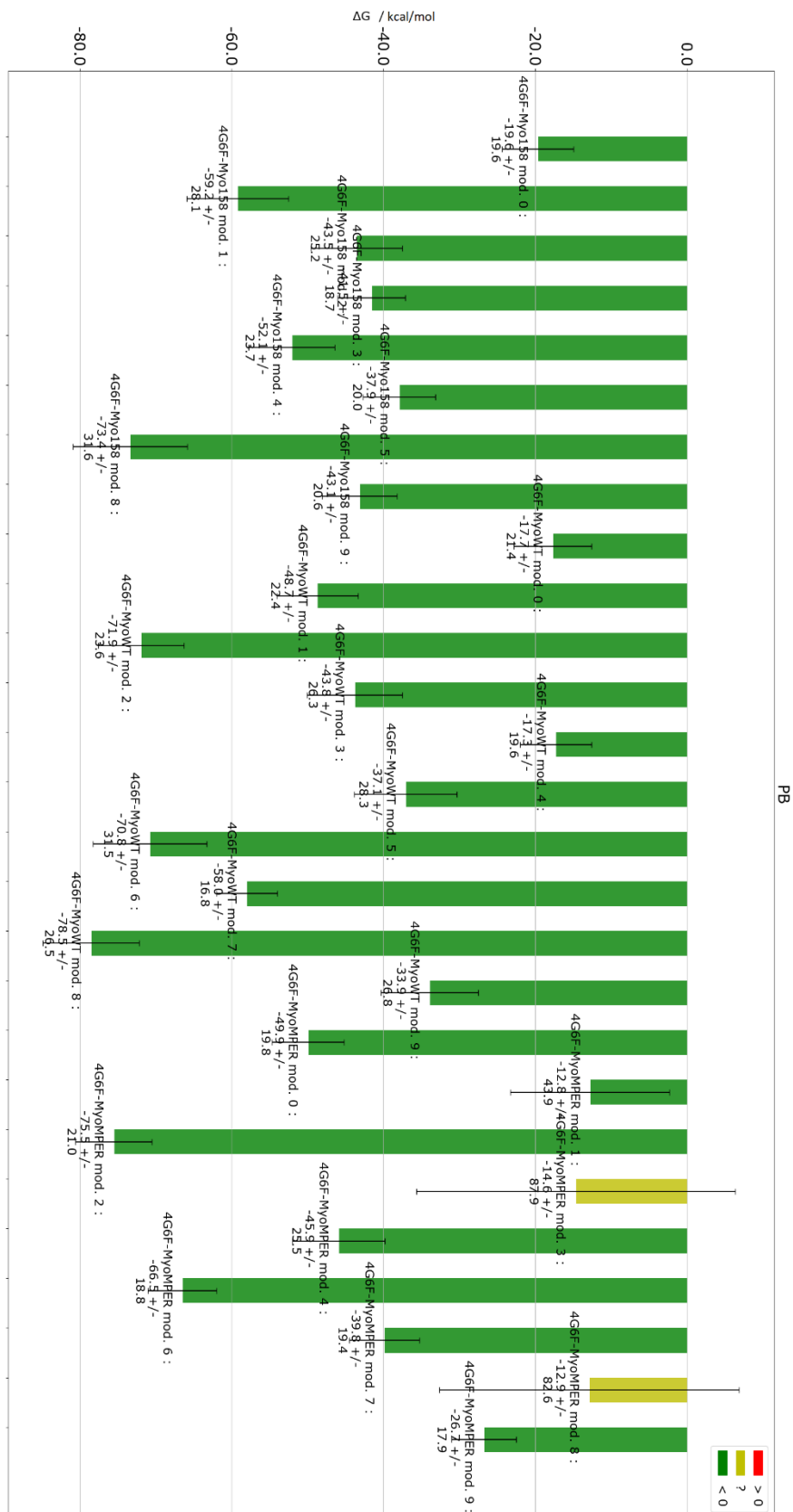
Příloha B 4 – RMSD grafy 20 ns MD simulací komplexu 10E8 Fab (pdb: 4G6F) s MLA/MyoWT/MPER ligandy získanými dokováním pomocí ClusPro2.



Příloha B 5 - Průběhy gyačních poloměrů 20 ns MD simulací komplexů 10E8 Fab (pdb: 4G6F) s MLA/MyoWT/MPER ligandy získanými dokováním pomocí ClusPro2. Uspokojivé konvergence bylo dosaženo u modelů 2 a 6.

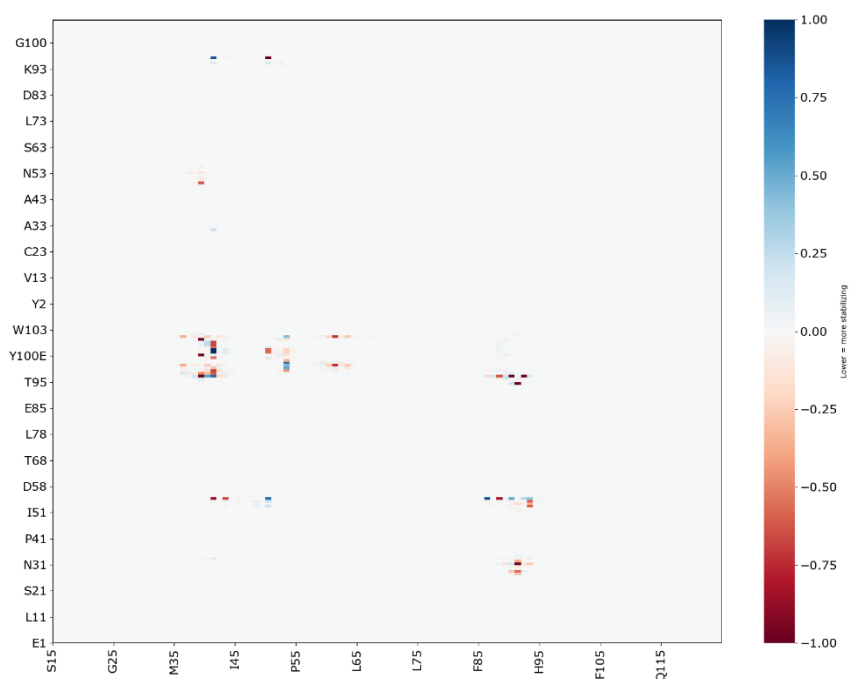


Příloha B 6 – Výsledky MM/PBSA analýz (gmx_MMPBSA) posledních 5 ns MD simulací komplexů 10E8 Fab (pdb: 4G6F) s MLA024, MLA025, MLA092 ligandy získanými dokováním pomocí ClusPro2.



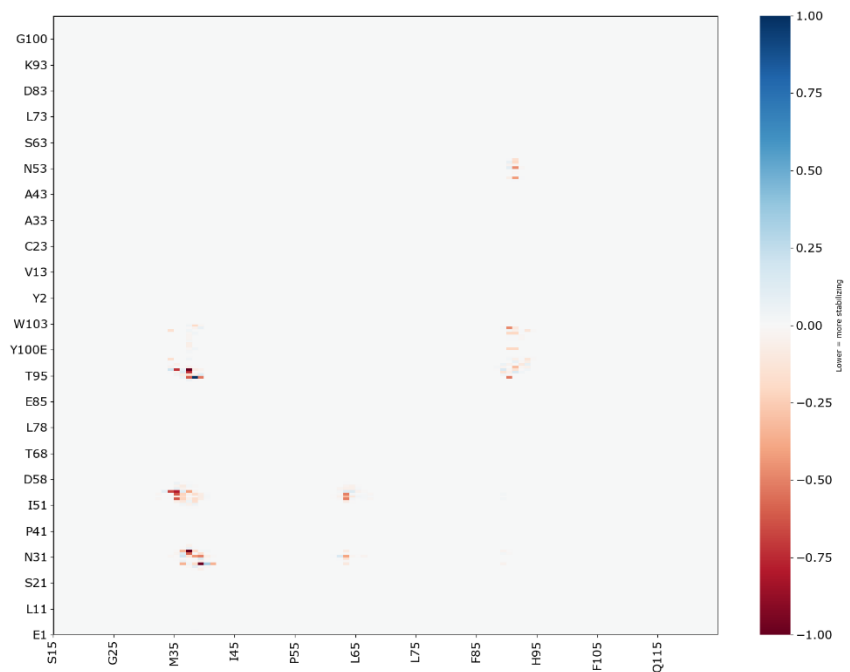
Příloha B 7 - Výsledky MM/PBSA analýz (gmx_MMPBSA) posledních 5 ns MD simulací komplexů 10E8 Fab (pdb: 4G6F) s MLA158, MyoWT a MPER ligandy získanými dokováním pomocí ClusPro2.

Normalized IEM heatmap of 10E8-MLA158 mod. 2



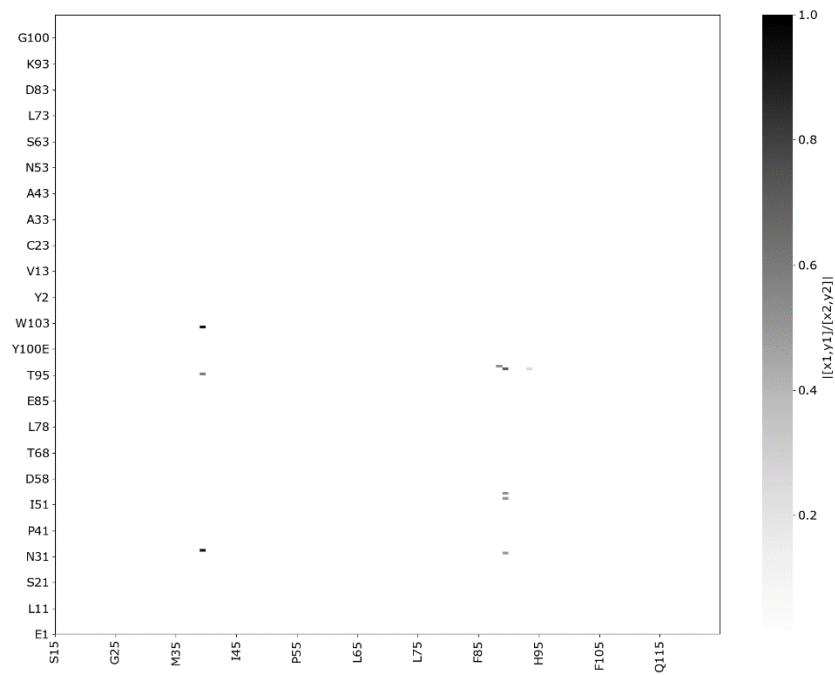
Příloha B 8 – Standardizovaná matice intermolekulových interakcí aminokyselinových párů modelu 2 komplexu 10E8fr.-MLA158.

Normalized IEM heatmap of 10E8-MLA158 mod. 3



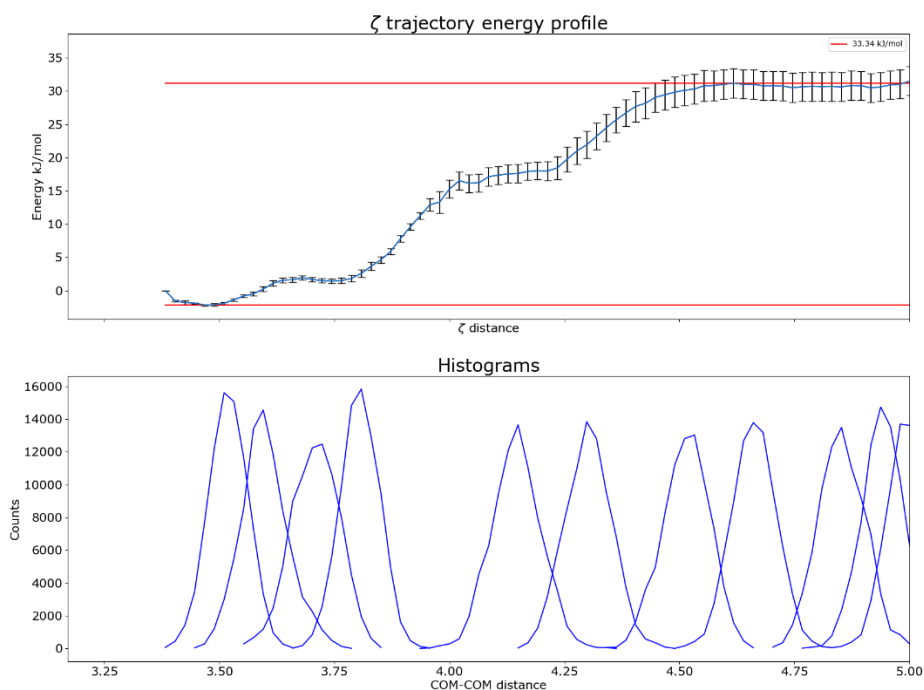
Příloha B 9 – Standardizovaná matice intermolekulových interakcí aminokyselinových párů modelu 3 komplexu 10E8fr.-MLA158.

Δ-matrix of standardized matrices
 10E8-MLA158 mod. 2 10E8-MLA158 mod. 3
 1.00 means absolute similarity



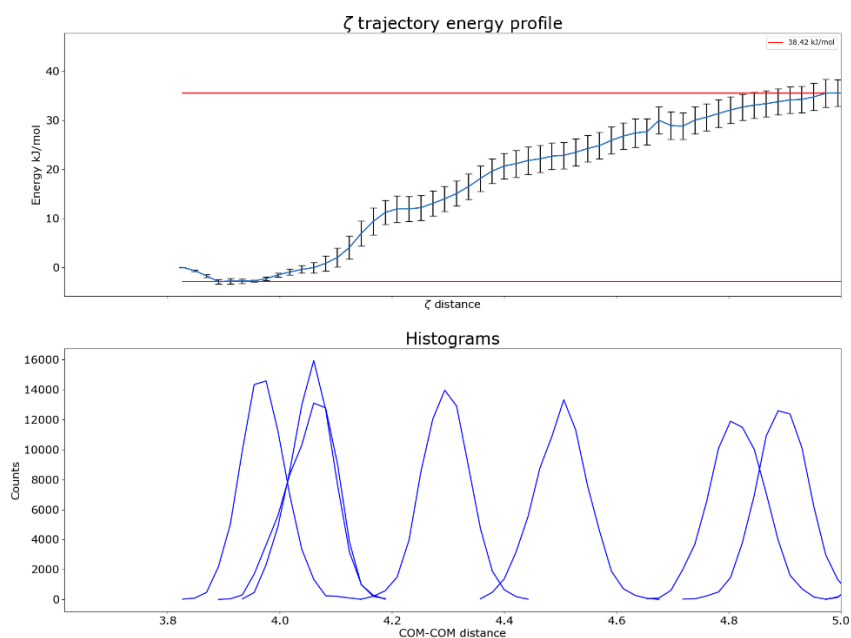
Příloha B 10 - “Diferenční” matice intermolekulových interakcí aminokyselinových párů společných pro modely 2 a 3 MLA158

10E8-158 mod. 2

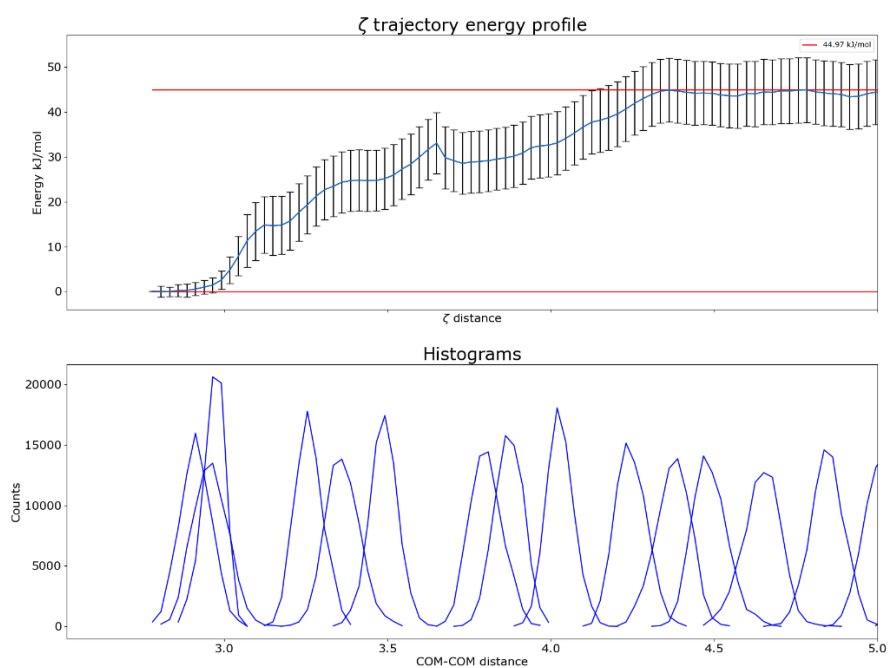


Příloha B 11 – (nahore) Průběh PMF trajektorie tahání 10E8fr. od MLA158 (model vazby 2, v kJ/mol) zjištěný pomocí Umbrella Sampling simulací. (dole) histogram datového pokrytí bodů trajektorie. Zobrazena je trajektorie do 5 nm vzdálenosti mezi těžišti. Svislé úsečky zobrazují chybu stanovení.

10E8-158 mod. 3

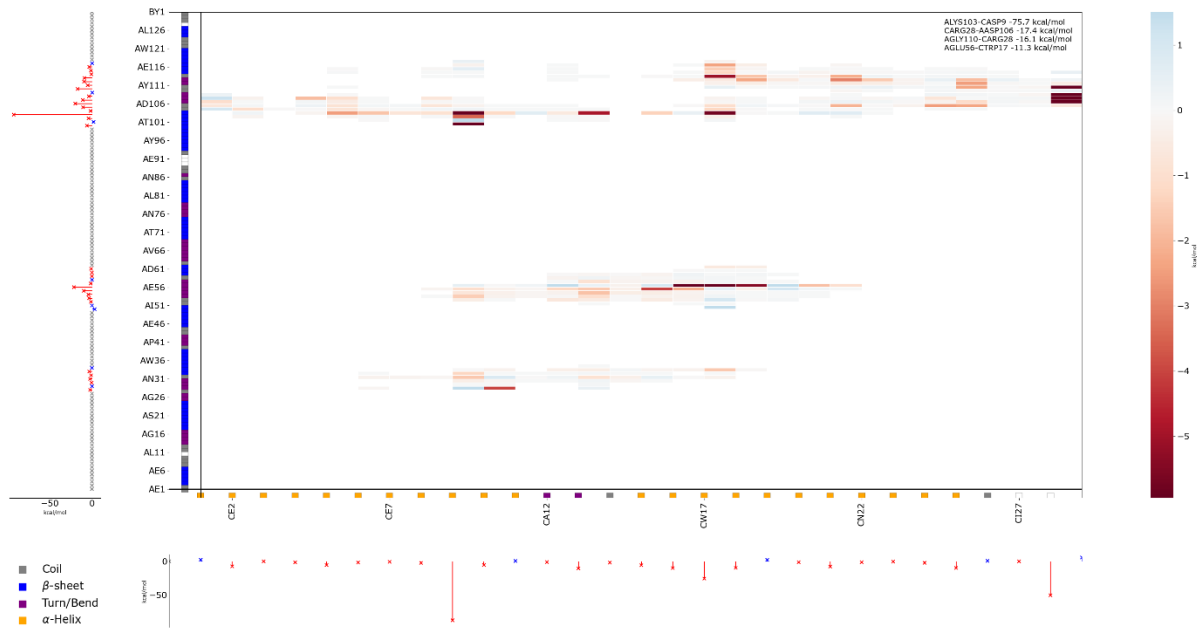


Příloha B 12 – (nahore) Průběh PMF trajektorie tahání 10E8fr. od MLA158 (model vazby 3, v kJ/mol) zjištěný pomocí Umbrella Sampling simulací. (dole) histogram datového pokrytí bodů trajektorie. Zobrazena je trajektorie do 5 nm vzdálenosti mezi těžišti. Svislé úsečky zobrazují chybu stanovení.



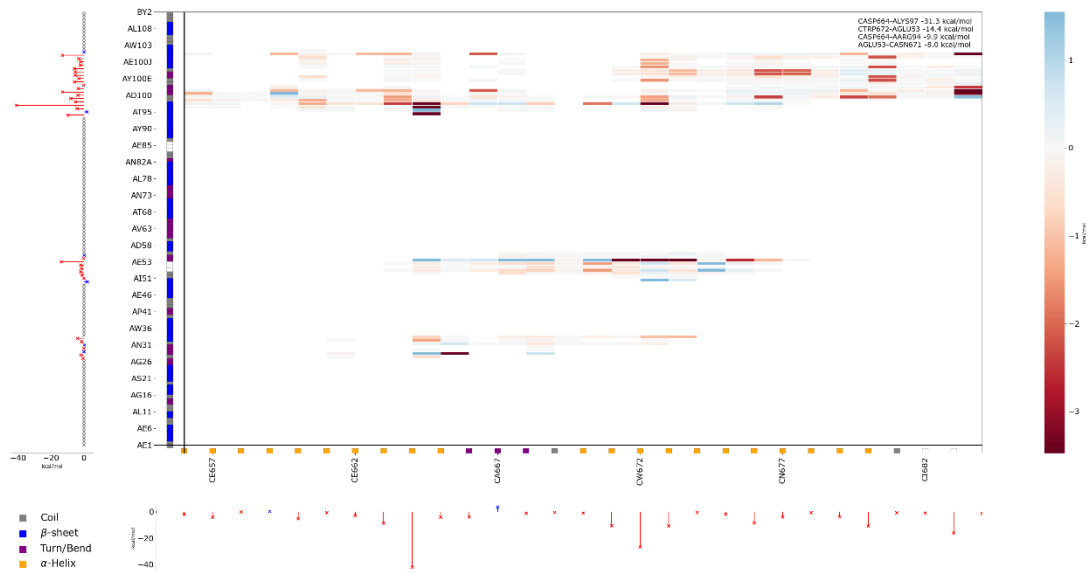
Příloha B 13 – (nahore) Průběh PMF trajektorie tahání 10E8fr. od MLA158 (model vazby 8, v kJ/mol) zjištěný pomocí Umbrella Sampling simulací. (dole) histogram datového pokrytí bodů trajektorie. Zobrazena je trajektorie do 5 nm vzdálenosti mezi těžišti. Svislé úsečky zobrazují chybu stanovení.

10E8-MPER mod. original total_IEM



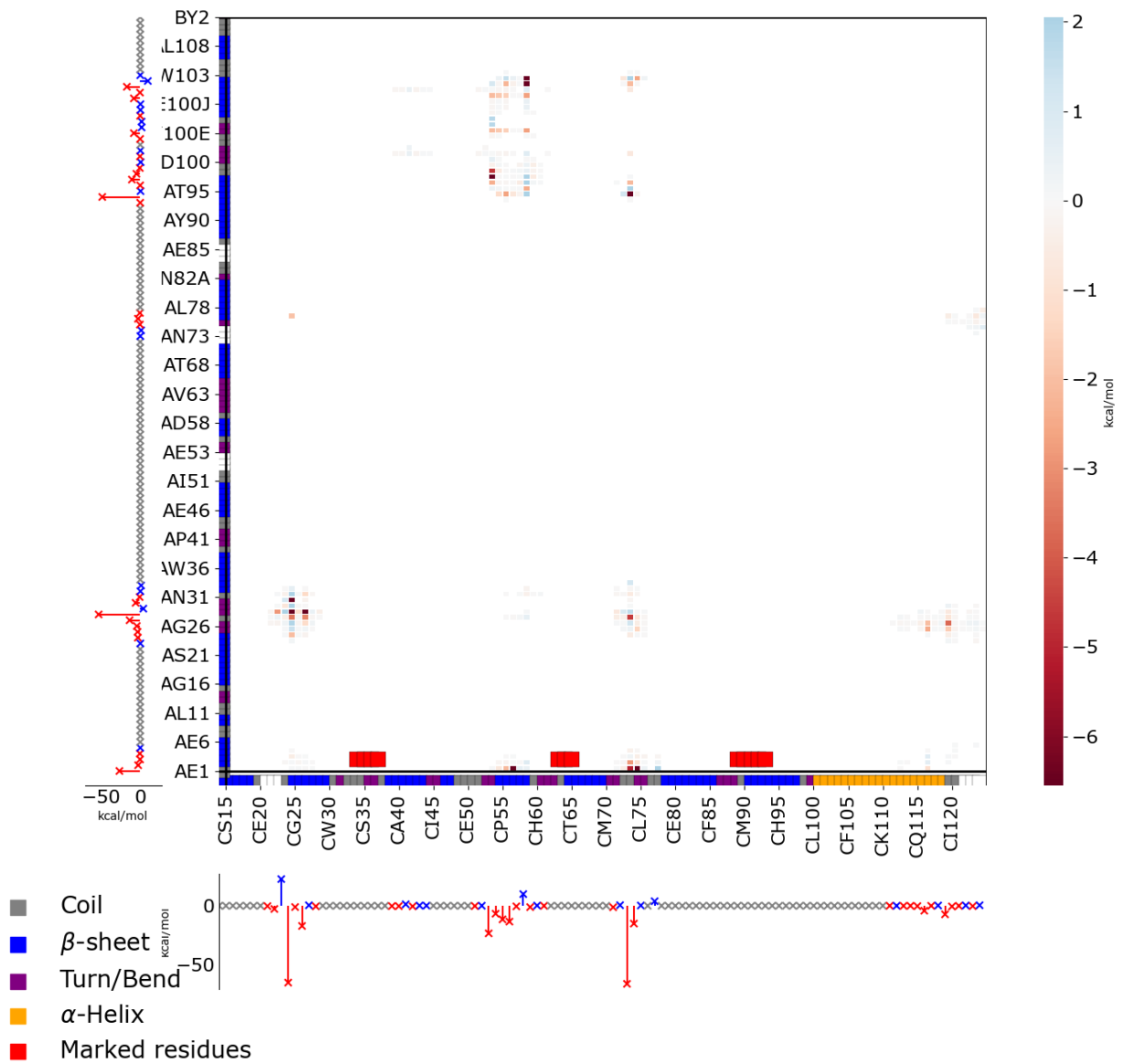
Příloha B 14 - Vizualizovaná matice párových interakcí v komplexu 10E8-MPER (vyřešená struktura).

10E8-MPER mod. 6 total_IEM



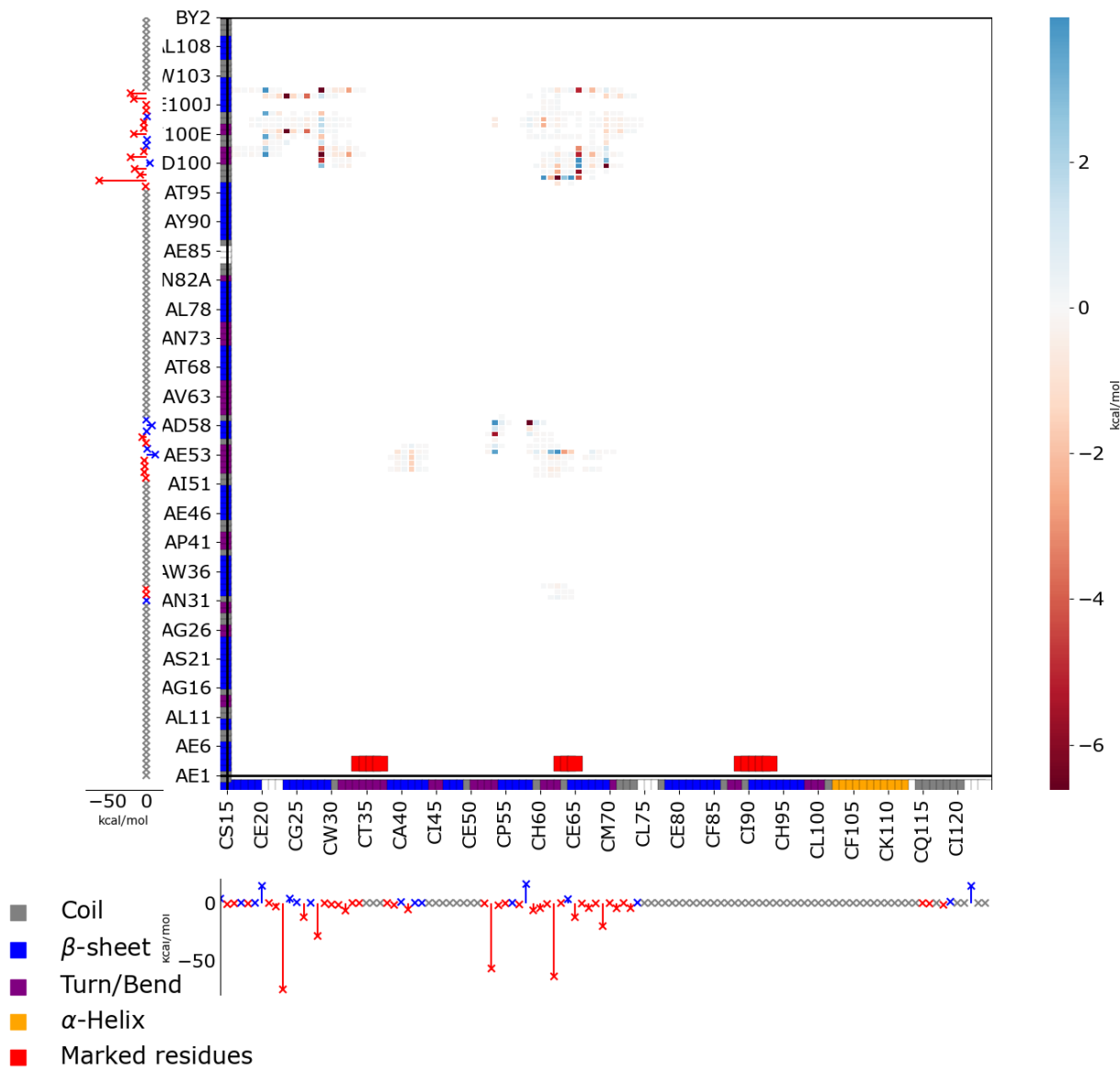
Příloha B 15 - Vizualizovaná matice párových interakcí v komplexu 10E8-MPER (model 6).

10E8-MLA024 mod. 2 total_IEM



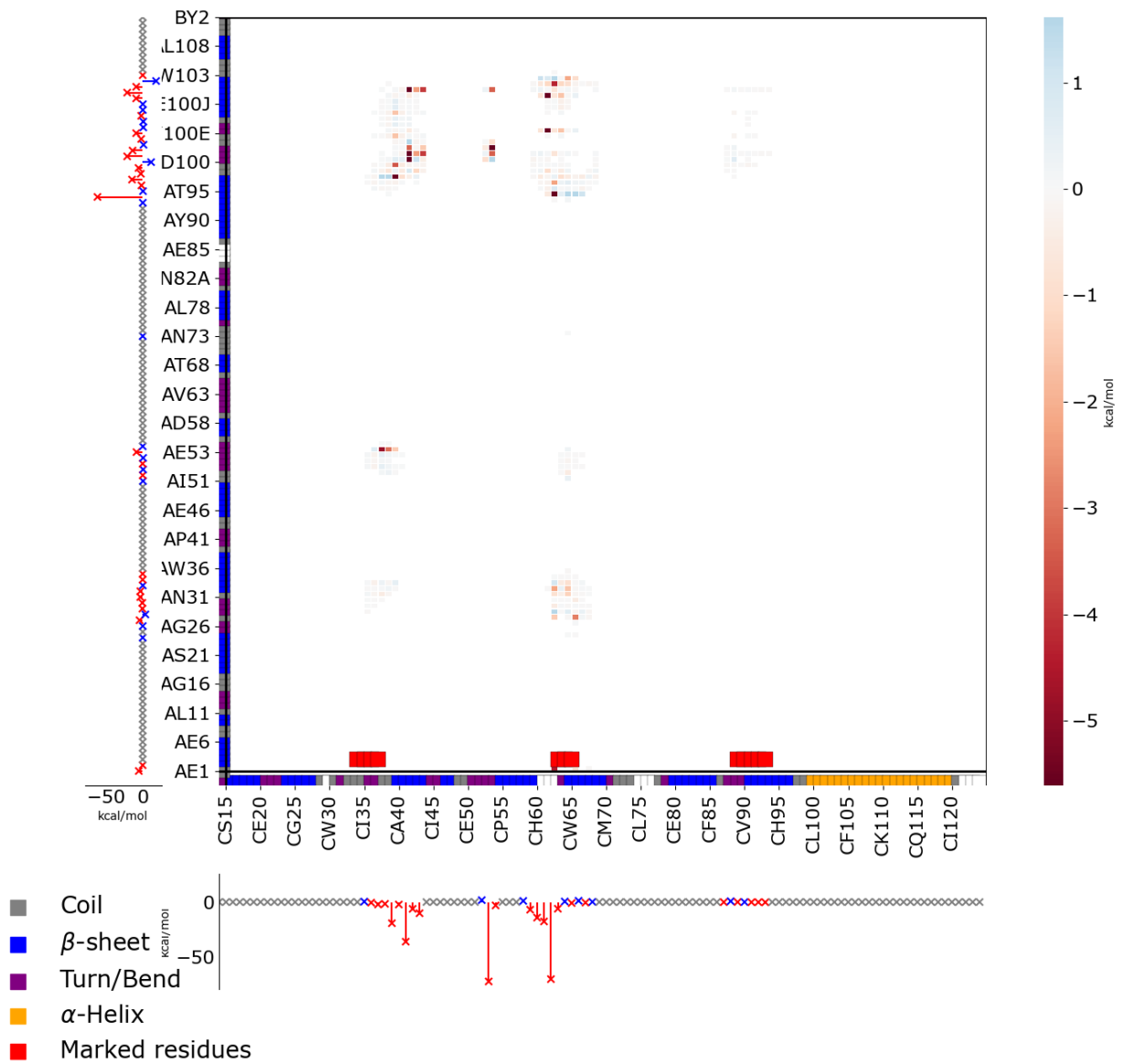
Příloha B 16 – Vizualizovaná matice párových interakcí v komplexu 10E8-MLA024 mod. 2.

10E8-MLA025 mod. 5 total_IEM



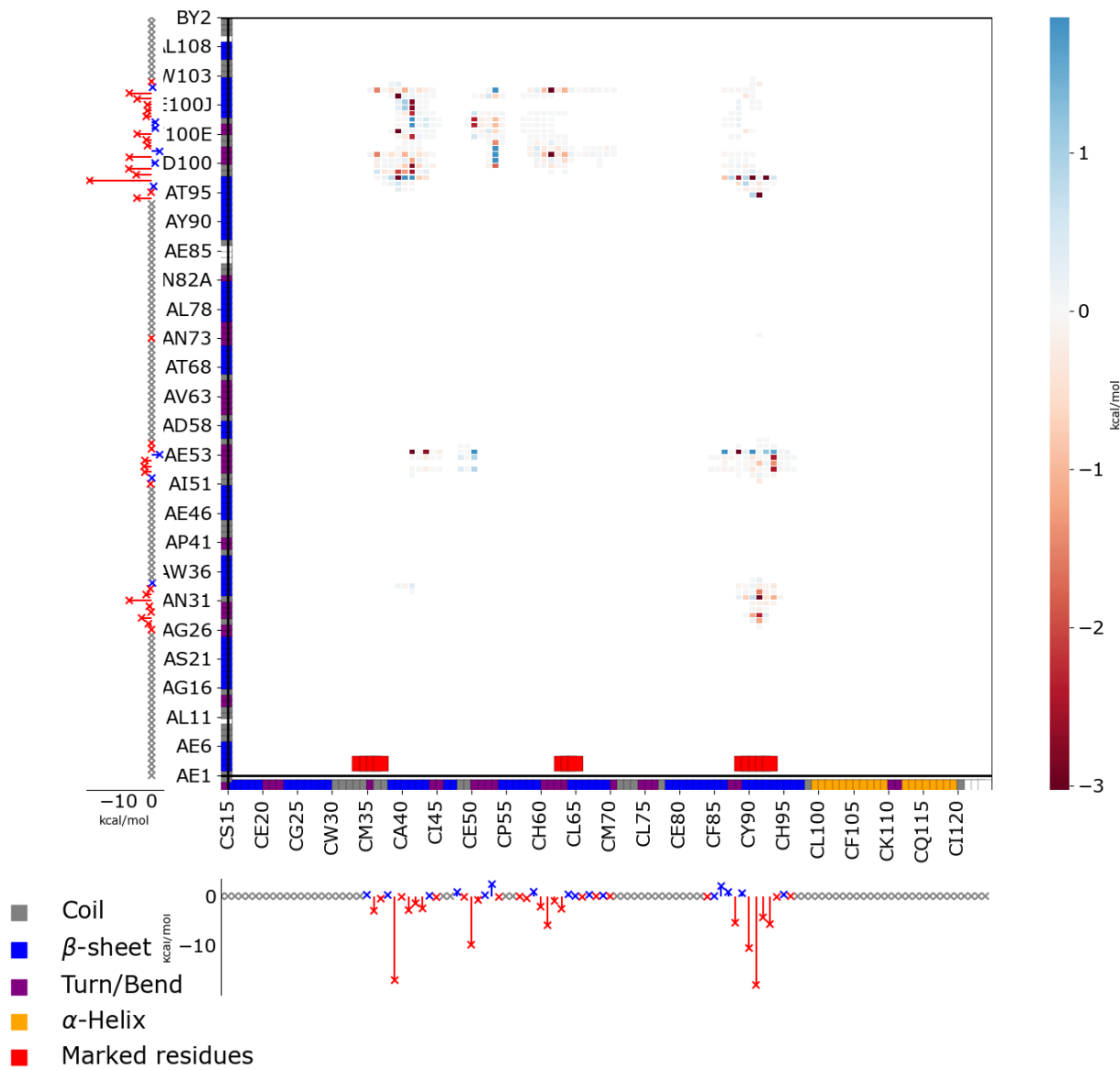
Příloha B 17 - Vizualizovaná matice párových interakcí v komplexu 10E8-MLA025 mod. 5.

10E8-MLA092 mod. 0 total_IEM



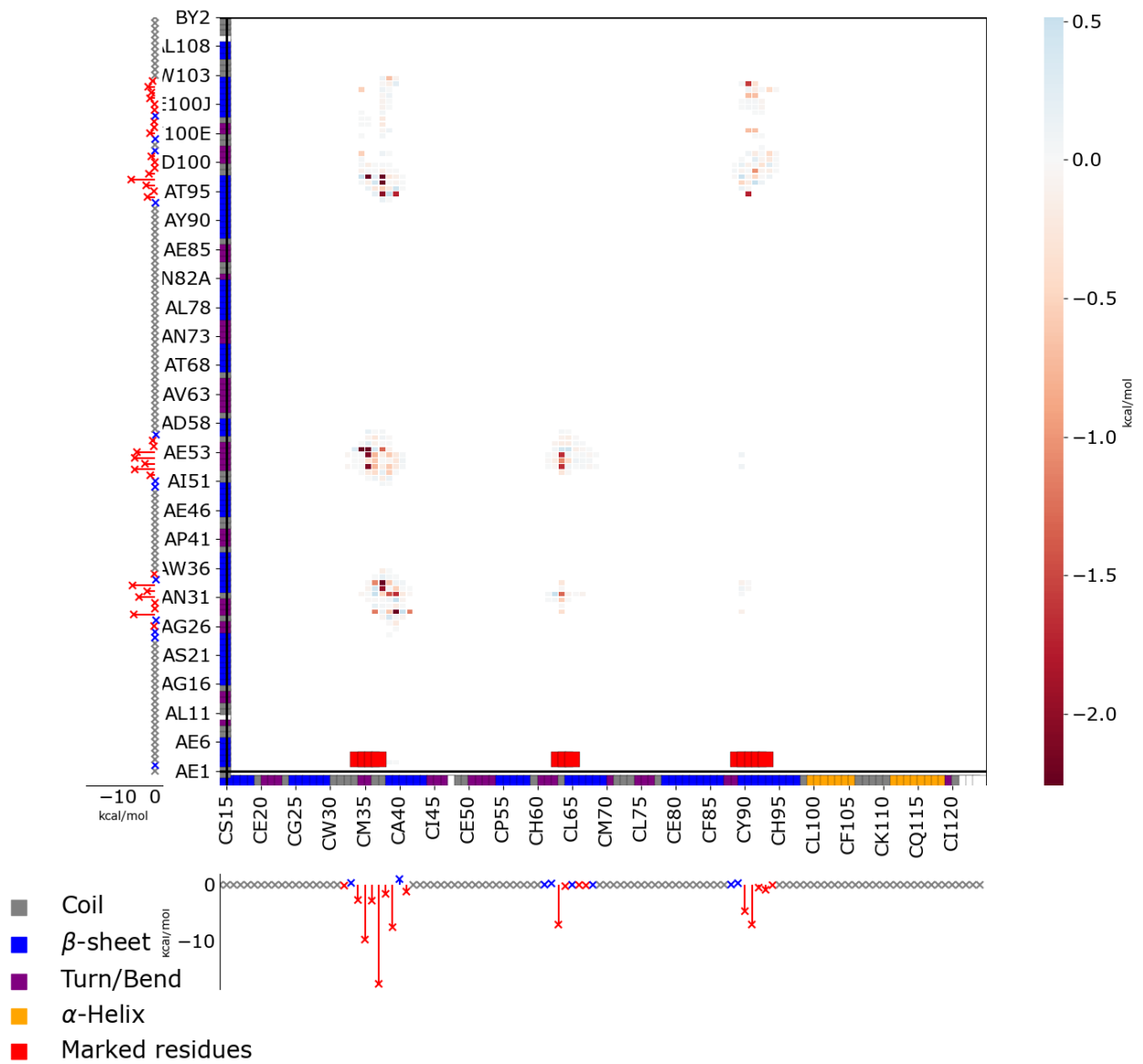
Příloha B 18 - Vizualizovaná matice párových interakcí v komplexu 10E8-MLA092 mod. 0.

10E8-MLA158 mod. 2 total_IEM



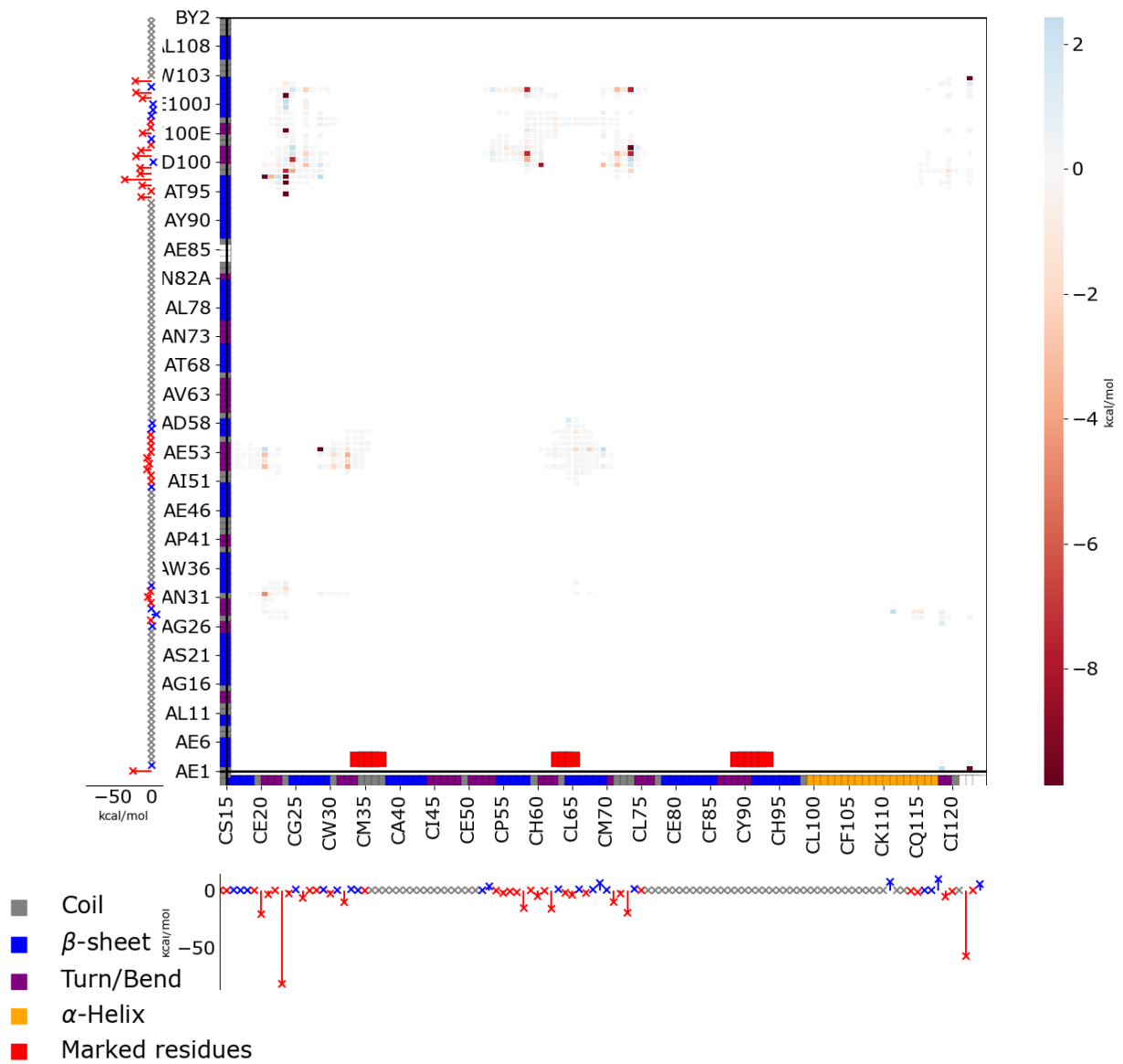
Příloha B 19 - Vizualizovaná matice párových interakcí v komplexu 10E8-MLA158 mod. 2.

10E8-MLA158 mod. 3 total_IEM



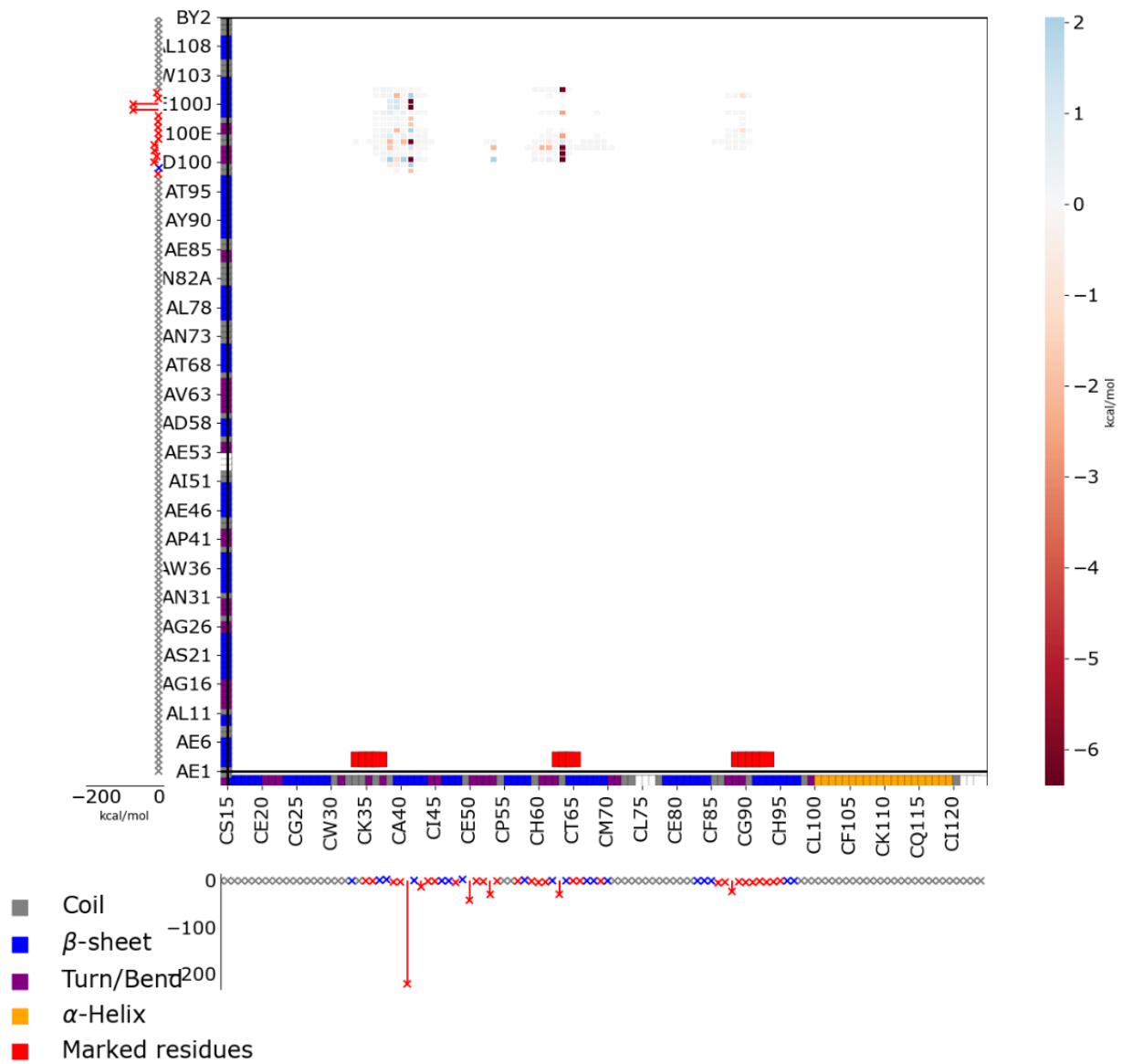
Příloha B 20 - Vizualizovaná matice párových interakcí v komplexu 10E8-MLA158 mod. 3.

10E8-MLA158 mod. 8 total_IEM



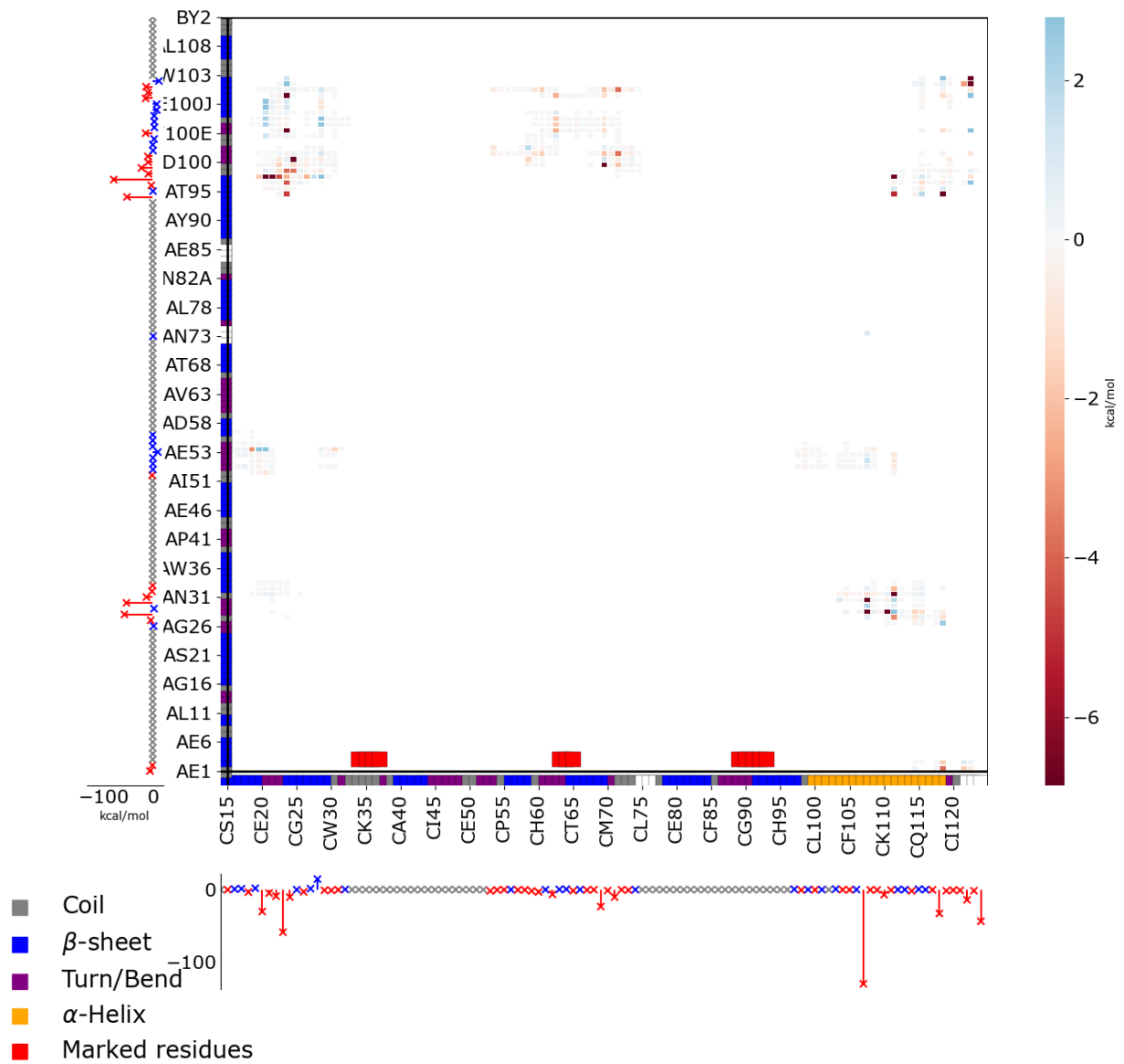
Příloha B 21 - Vizualizovaná matice párových interakcí v komplexu 10E8-MLA158 mod. 8.

10E8-MLAWT mod. 6 total_IEM

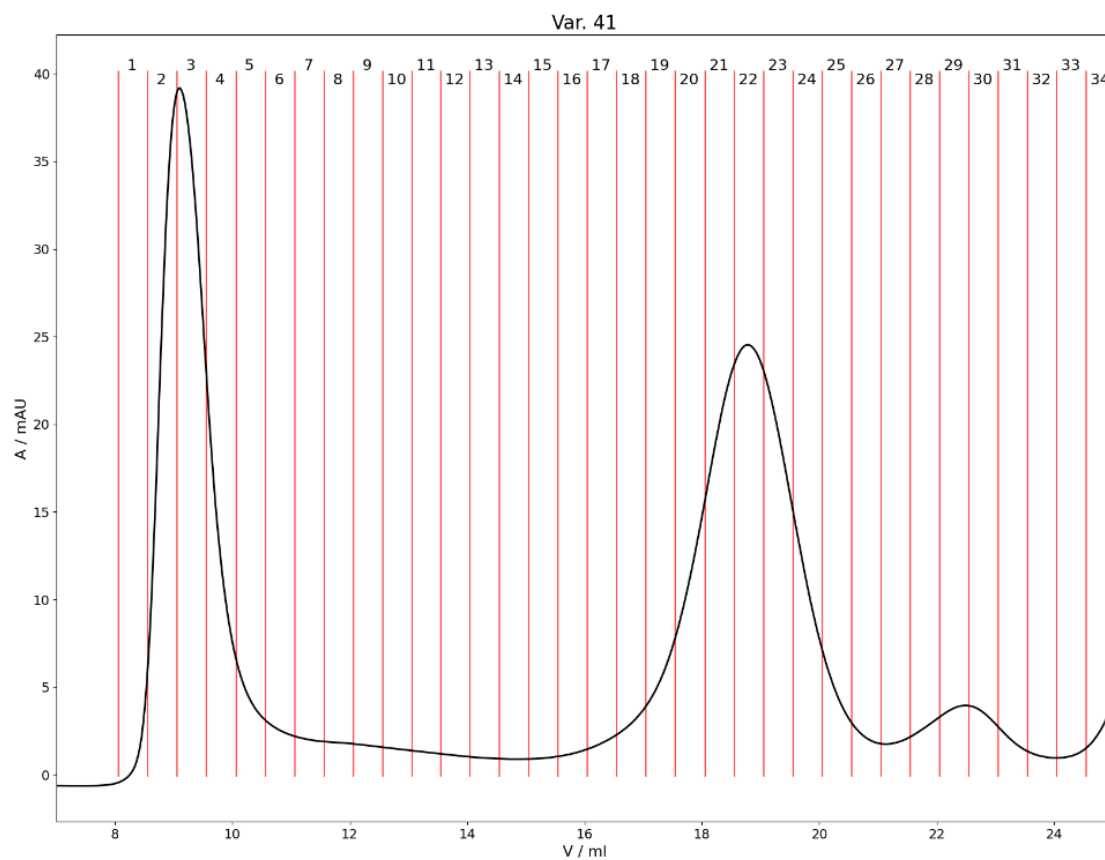


Příloha B 22 - Vizualizovaná matice párových interakcí v komplexu 10E8-MyoWT mod. 6.

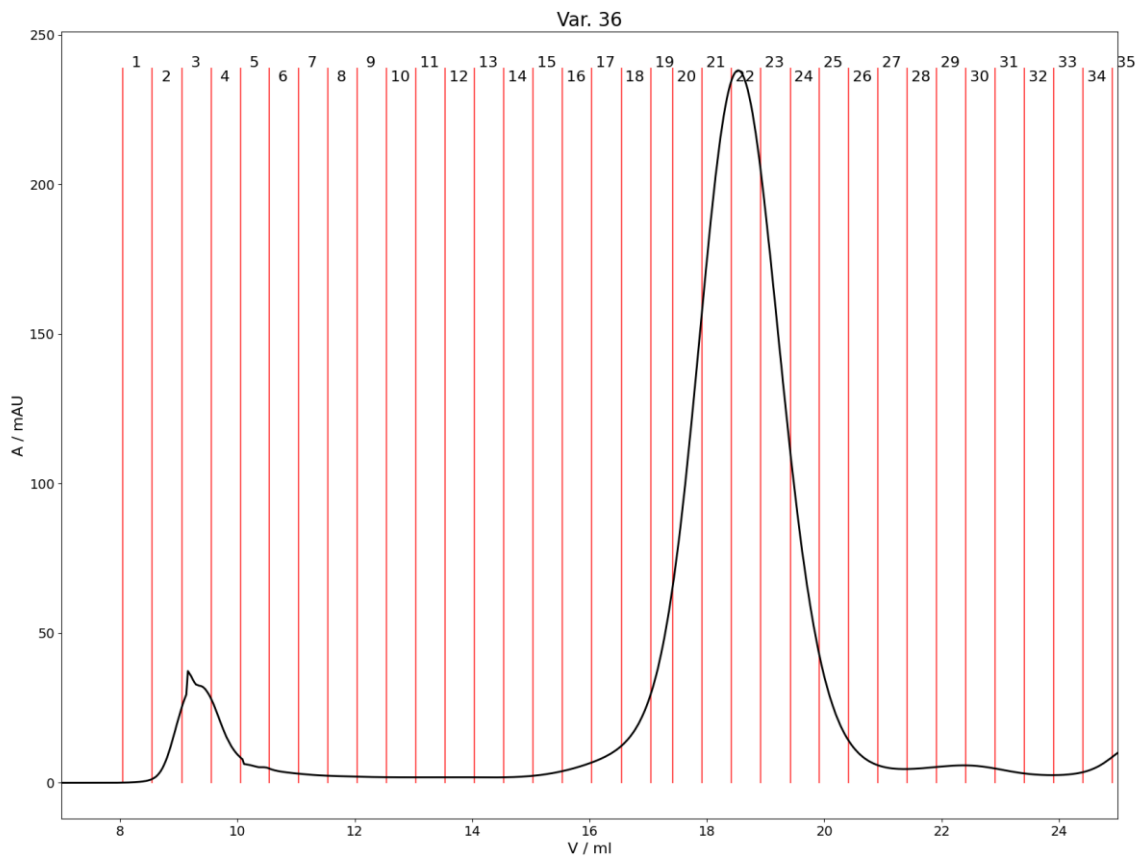
10E8-MLAWT mod. 8 total_IEM



Příloha B 23 - Vizualizovaná matice párových interakcí v komplexu 10E8-MyoWT mod. 8.



Příloha B 24 – Chromatogram SEC purifikace His-TEV-MLB041-V5



Příloha B 25 - Chromatogram HPLC purifikace His-TEV-MLB036-V5