

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Biofyzikální chemie



Bc. Tereza Nepokojová

MODULACE INTERAKCÍ INTERLEUKINŮ A JEJICH RECEPTORŮ
MODULATION OF INTERACTIONS BETWEEN INTERLEUKINS
AND THEIR RECEPTORS

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: prof. Ing. Bohdan Schneider, CSc., DSc.

Konzultant závěrečné práce: RNDr. Pavel Mikulecký, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, že jsem řádně uvedla všechny citované zdroje a že tato práce ani její část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis:

Poděkování

Zde bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce panu prof. Ing. Bohdanu Schneiderovi, CSc., DSc. a svému konzultantovi RNDr. Pavlu Mikuleckému, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, cenné rady a připomínky během sepisování. Dále bych ráda poděkovala celému kolektivu Laboratoře biomolekulárního rozpoznávání Biotechnologického ústavu AV ČR, v. v. i., za vytvoření příjemné a přátelské pracovní atmosféry. A samozřejmě také celé své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Abstrakt

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

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

Abstract

Scaffolds are proteins with high conformational stability, allowing us to implement multiple mutations into specific parts of the protein. Even with these mutations, the structural integrity of the protein is maintained as well as its physical-chemical properties. These mutations give the specific scaffold new properties. In most cases it is the binding specificity towards previously chosen target. The biggest advantages of scaffolds are their small size, stability, low-cost manufacturing, and easiness of preparation. Scaffold utilized in this thesis is unique for having two binding surfaces designed on which it can be mutated. Each of those two surfaces can be separately mutated to develop a binding site for two different proteins. In our case these mutations led to binding two nonidentical receptors of a human cytokine. Mutations are made with a use of yeast display, one of the methods of directed evolution. The main focus of this thesis is changing an expression system of the binding proteins from the yeast system to a bacterial one, their production and purification followed by characterization of those binding proteins using biophysical methods. These methods were used to evaluate structural and thermal stability, and binding affinity to both receptors of the beforementioned binding proteins. This thesis is a part of a broader project which focus lies on designing, creating and characterizing binding proteins with the ability to specifically bind two cytokine receptors to simulate function of natural cytokine. The binding proteins should be able to bind to the chosen receptor complex and to start signalization that leads to an immune response. These binding proteins have potential diagnostic and therapeutic utilization in treating autoimmune diseases.

Key words: scaffold, cytokine, protein evolution, yeast display, DLS, MST, CD, thermal stability, gel permeation chromatography

Obsah

1	Seznam zkratk.....	10
2	Úvod.....	15
2.1	LIDSKÉ CYTOKINY.....	16
2.1.1	Cytokiny skupiny IL-10 a jejich receptory.....	18
2.1.1.1	Struktura.....	18
2.1.1.2	Členové skupiny IL-10.....	19
2.1.1.2.1	IL-10.....	19
2.1.1.2.2	IL-19.....	20
2.1.1.2.3	IL-20.....	20
2.1.1.2.4	IL-22.....	21
2.1.1.2.5	IL-24.....	21
2.1.1.2.6	IL-26.....	22
2.1.1.3	Receptory skupiny IL-10.....	22
2.1.1.4	JAK/STAT signalizace.....	24
2.2	SKAFOLDY.....	26
2.2.1	Příklady skafoldových proteinů neodvozených od protilátek.....	27
2.2.1.1	Anticaliny.....	27
2.2.1.2	DARPiny.....	27
2.3	ŘÍZENÁ EVOLUCE PROTEINŮ POMOCÍ KVASINKOVÉHO DISPLEJE.....	28
2.4	VYBRANÉ BIOFYZIKÁLNÍ METODY PRO CHARAKTERIZACI VAZEBNÝCH PROTEINŮ.....	30
2.4.1	Měření tepelné stability - nanoDSF.....	30
2.4.2	Měření cirkulárního dichroismu proteinů – CD měření.....	31
2.4.3	Mikrotermoforéza - MST.....	33
2.4.4	Dynamický rozptyl světla - DLS.....	35

3	Cíle práce.....	37
4	Materiál.....	38
4.1	Laboratorní pomůcky.....	38
4.2	Roztoky, Chemikálie.....	38
4.3	Pufry.....	40
4.4	Enzymy.....	40
4.5	Komerční soupravy.....	41
4.6	Buňky.....	41
4.7	Přístroje.....	41
4.8	Primery.....	42
4.9	Plasmidy.....	43
5	Metody.....	44
5.1	VSTUPNÍ MATERIÁL.....	44
5.2	KLONOVÁNÍ.....	44
5.2.1	Vazebné proteiny Receptoru 1 (označené R1A-X a R1B-X).....	44
5.2.1.1	Izolace DNA z kvasinek.....	44
5.2.1.2	Transformace pomocí elektroporace.....	44
5.2.1.3	Maloobjemová produkce DNA z bakterií.....	45
5.2.1.4	Prodlužovací reakce – prodloužení konstruktů o streptavidinovou kotvu ..	45
5.2.1.5	První reakce Restriction free klonování – klonování bez použití restrikčních enzymů.....	46
5.2.1.6	Izolace DNA z PCR směsi.....	47
5.2.1.7	Druhá reakce Restriction free klonování – klonování bez použití restrikčních enzymů.....	47
5.2.1.8	DpnI reakce.....	48
5.2.1.9	Transformace do bakterií.....	48
5.2.1.10	PCR z kolonií.....	49

5.2.1.11	Maloobjemová produkce DNA	50
5.2.1.12	Sekvenace	50
5.2.2	Vazebné proteiny Receptoru 2 (označené R2A-X)	50
5.2.2.1	Transformace vyizolované DNA z kvasinek a transformace knihovny klonů	50
5.2.2.2	Maloobjemová produkce DNA	50
5.2.2.3	Zmnožení DNA insertu pomocí PCR reakce	50
5.2.2.4	Izolace DNA z gelu	51
5.2.2.5	Štěpení insertu a plasmidu pomocí restričních enzymů	52
5.2.2.6	Ligační reakce	52
5.2.2.7	Chemická transformace ligovaných konstruktů	52
5.2.2.8	PCR z kolonií	53
5.2.2.9	Maloobjemová produkce DNA	53
5.2.2.10	Sekvenace	53
5.3	PĚSTOVÁNÍ A SKLIZENÍ PRODUKCE	54
5.3.1	Chemická transformace do E. coli BL21(DE3).....	54
5.3.2	Pěstování	54
5.3.3	SDS-PAGE po produkci	54
5.3.4	Sklizení produkce	54
5.4	PURIFIKACE	55
5.4.1	Rozbíjení bakteriálních buněk pomocí sonikace	55
5.4.2	Purifikace na streptactinové koloně	55
5.4.3	Zakoncentrování proteinů a gelová permeační chromatografie	55
5.4.4	SDS-PAGE	56
5.5	CHARAKTERIZACE PROTEINŮ BIOFYZIKÁLNÍMI METODAMI.....	57

5.5.1	Měření teplotní stability proteinů	57
5.5.2	Cirkulární dichroismus - CD.....	57
5.5.3	Dynamický rozptyl světla - DLS	57
5.5.4	Mikrotermoforéza - MST.....	58
5.6	KRYSTALIZACE.....	59
5.6.1	Zakoncentrování proteinů	59
5.6.2	Nasazování krystalů.....	59
5.7	PĚSTOVÁNÍ A PURIFIKACE RECEPTORU 2.....	59
5.7.1	Pěstování.....	59
5.7.2	Purifikace	60
6	Výsledky.....	61
6.1	VAZEBNÉ PROTEINY RECEPTORU 1	61
6.1.1	Klonování.....	61
6.1.2	Produkce vazebných proteinů v bakteriálních buňkách a purifikace	64
6.1.3	Biofyzikální charakterizace vazebných proteinů	69
6.2	VAZEBNÉ PROTEINY RECEPTORU 2	74
6.2.1	Klonování.....	74
6.2.2	Produkce vazebných proteinů v bakteriálních buňkách a purifikace	75
6.2.3	Biofyzikální charakterizace vazebných proteinů	80
6.3	Expres a purifikace Receptoru 2	86
7	Diskuse	89
8	Závěr.....	96
9	Seznam použité literatury	97

1 Seznam zkratek

A280	Absorbance při 280 nm
Aga1p	Podjednotka 1 proteinu α -aglutininu
Aga2p	Podjednotka 2 proteinu α -aglutininu
APS	Peroxodisíran amonný, z angl. Ammonium persulfate
AR proteiny	Ankyrinové proteiny
BCS screen	Komerční souprava roztoků pro krystalizaci, z angl. Basic Chemical Space
$B_{k,\lambda}$	Proteinové spektrum „čistých proteinových struktur“
bp	Páry bazí, z angl. Base pairs
BW	Primer nasedající na 5'konec prvního vlákna DNA
CaCl_2	Chlorid vápenatý
CD	Cirkulární dichroismus
CD19	Antigen B-lymfocytů
CD20	Antigen B-lymfocytů
CD3	Proteinový komplex a T-buněčný koreceptor, který se podílí na aktivaci jak cytotoxických a pomocných T-buněk
CD4+	T-lymfocyty, které mají na svém povrchu glykoproteiny na povrchu vážící se na antigeny prezentované na MHC třídy II
C_{cold}	Koncentrace molekul vně koncentračního gradientu
C_{hot}	Koncentrace molekul uvnitř teplotního gradientu

c-Met onkogen	Receptor tyrosin kinas, z angl. Mesenchymal to Epithelial Transition
CuSO ₄	Síran měďnatý
DARPiny	Scaffoldy, navržené Ankyrinové proteiny, z angl. Designed Ankyrin Repeat Proteins
dH ₂ O	Destilovaná voda
DLS	Dynamický rozptyl světla, z angl. Dynamic light scattering
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	Modifikované nukleotidy, 2'-deoxynukleosid 5'-trifosfáty
DSC	Diferenční skenovací kalorimetrie
DTT	1,4-Dithiothreitol
EBV	Herpetický vir, Epstein-Barrové virus
EDTA	2,2',2'',2'''-(ethan-1,2-diylidinitrilo)tetraoctová kyselina
ELU2	Druhá eluce při purifikaci na streptactinové koloně
FBS	Sérum pro kultivaci buněk, z angl. Fetal Bovine Serum
F _{cold}	Fluorescence molekul vně teplotního gradientu
F _{hot}	Fluorescence molekul uvnitř teplotního gradientu
f _k	Frakce sekundární struktury
FT	Vzorek odebraný po prokapaní kolonou, z angl. Flow Through
FW	Primer nasedající na 3'konec druhého vlákna DNA
GAL1	Galaktosou indukovatelný promotor

GM-CSF	Faktor stimulující granulocytové a makrofágové kolonie
HVS	Herpetický vir, Herpesvirus saimiri
IFN	Interferon
IFN- λ R/IL-28R1	Receptor Interferonu- λ / Receptor 1 Interleukinu 28
IL	Interleukin
IL10-R1	Receptor 1 Interleukinu 10
IL-10R2	Receptor 2 Interleukinu 10
IL-20R1	Receptor 1 Interleukinu 20
IL-20R2	Receptor 2 Interleukinu 20
IL-22R1	Receptor 1 Interleukinu 22
IN	Vzorek odebraný z roztoku před nanesením na kolonu
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
IR	Infračervený, z angl. Infra red
JAK kinasy	Janusovy kinázy
JAK/STAT signalizace	Signalizace do níž jsou zapojeny JAK kinasy a STAT transkripční faktory
K _D	Disociační konstanta
LB medium	Vysoce výživné medium pro pěstování bakterií z angl. Lysogeny broth
LPS	Lipasa
M	Standard, z angl. Marker
MADLS	Více-úhlový dynamický rozptyl světla, z angl. Multi-angled light scattering

MgCl ₂	Chlorid hořečnatý
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
MST	Mikrotermoforéza, z angl. Microscale thermophoresis
NaCl	Chlorid sodný
nanoDSF	Nano diferenční skenovací fluorimetrie, z angl. Nano differential scanning fluorimetry
NaOH	Chlorid sodný
NiSO ₄	Síran nikelnatý
NK buňky	Přirozené zabíječské buňky, z angl. Natural killer cells
OD	Optická densita
PBMC	Leukocyty periferní krve
PBS	Fosfátový pufr, z angl. Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasová řetězová reakce, z angl. Polymerase chain reaction
R1A-X	Vazebné proteiny Receptoru 1 s mutacemi na vazebném povrchu A
R1B-X	Vazebné proteiny Receptoru 1 s mutacemi na vazebném povrchu B
R2A-X	Vazebné proteiny Receptoru 2 s mutacemi na vazebném povrchu A
rpm	Otáčky za minutu, z angl. Revolutions per minute
RV	Primer nasedající na 3'konec prvního vlákna DNA
SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecyl-síranu sodného

SG1 screen	Komerční soupravu roztoků pro krystalizaci, z angl. ShotGun
SH2 doména	Fosfotyrosin vázající doména, z angl. Src-homology 2
S _T	Sorretův koeficient
STAT	Transkripční faktor, „převaděč signálu a aktivátor transkripce“ z angl. Signal Transducers and Activators of Transcription
T _C buňky	Cytotoxické T-buňky
TEMED	Tetramethylethylenediamin
TGF	Transformující růstový faktor, z angl. Transforming growth factor
T _H buňky	Pomocné T-buňky
T _m	Teplota tání, z angl. Melting temperature
TNF	Faktor nádorové nekrózy, z angl. Tumor necrosis factor
T _{REG}	Regulační T-buňky
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUES	Pufr, který obsahuje Tris, močovinu, EDTA a SDS
VEGF-A	Vaskulární endotelový růstový faktor, z angl. Vascular endothelial growth factor
WT	Původní nemutovaný gen/protein, z angl. Wild type
w/v	hmotnost/objem, z angl. weight/volume
ΔF_{norm}	Normalizovaný rozdíl fluorescence $F_{\text{hot}}/F_{\text{cold}}$ fluorescence násobené 1000
ΔT	Rozdíl teplot napříč teplotním gradientem

2 Úvod

Předmětem studia Laboratoře biomolekulárního rozpoznávání Biotechnologického ústavu AV ČR, v. v. i. jsou mimo jiné lidské cytokiny a jejich buněčné receptory, proteiny signálních drah imunitního systému s potenciálním diagnostickým a lékařským využitím. Pro výzkum těchto proteinů jsou využívány experimentální i výpočetní metody proteinového inženýrství a molekulární biologie a pro jejich následnou charakterizaci metody strukturní biologie, bioinformatiky, a biofyzikální metody. Cílem dlouhodobějšího projektu, kterého je tato práce součástí, je příprava cíleně navrženého vazebného proteinu, který bude vázat dva různé receptory lidského cytokinu obdobně jako přirozený cytokin a buď spouštět imunitní signalizaci, nebo ji naopak cíleně blokovat. Vyvíjené vazebné proteiny mají potenciální využití v léčbě autoimunitních onemocnění a z důvodu jejich potenciální ochrany nejsou v práci uvedena jména receptorů, cytokinu ani skafoldu, který byl podroben mutacím v experimentech řízené evoluce.

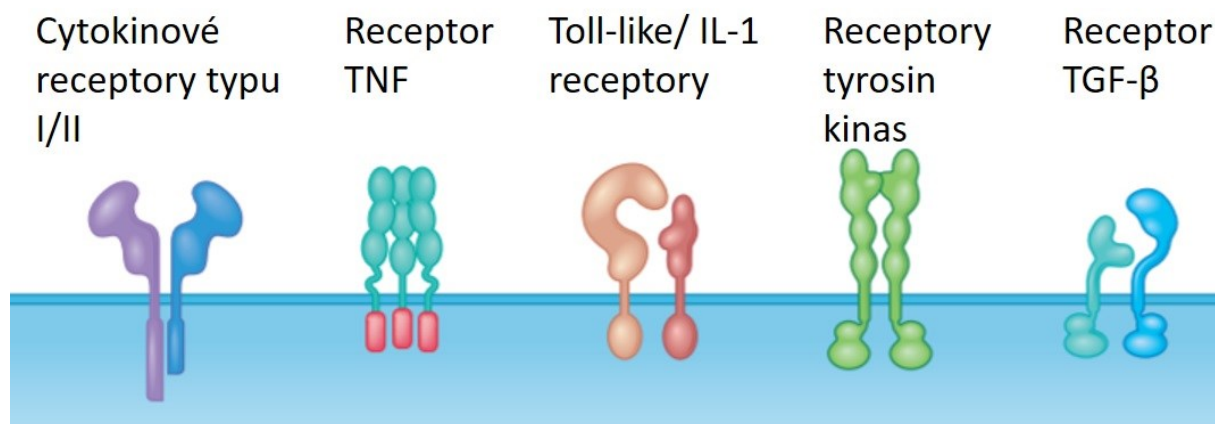
Předmětem této práce byla příprava proteinů specificky a současně se vážících na oba receptory jednoho z lidských cytokinů, jejich biofyzikální charakterizace a průkaz jejich vazby na oba receptory. Studované vazebné proteiny byly selektovány pomocí kvasinkového displeje, jedné z metod řízené evoluce.

2.1 LIDSKÉ CYTOKINY

Cytokiny jsou proteiny o nízké molekulové váze [1]. Jedná se o molekuly, které jsou sekretované leukocyty a dalšími buňkami imunitního systému [2]. Jsou základními regulátory, které působí prostřednictvím vysokoafinitní vazby na specifické receptory na povrchu buněk imunitního systému i mimo něj. Účinek většiny cytokinů je do určité míry redundantní, pleiotropní a často působí v kaskádě. Jsou vylučovány mnoha typy buněk v lokálně vysokých koncentracích a podílejí se na interakcích buňka-buňka [3]. Mají tedy účinek na těsně sousedící buňky, a proto fungují převážně parakrinním způsobem. Mohou také působit na dálku vylučováním rozpustných produktů do oběhu (endokrinní účinek), také mohou mít účinky na samotnou buňku, která daný cytokin vylučuje (autokrinní účinek) [2]. Cytokiny hrají v organismu důležitou roli, která není zcela omezena pouze na imunitní systém, ale také např. na regeneraci tkání, embryonální vývoj, angiogenezi, karcinogenezi a jiné. To, které cytokiny jsou produkovány, určí nejprve, jestli nastane imunitní odpověď, a následně zda je tato odpověď cytotoxická, humorální, buněčně zprostředkovaná nebo alergická [4]. Odpovědí na působení cytokinu je zpravidla kaskáda reakcí, která indukuje tvorbu dalších cytokinů. Cytokiny mohou mít různé funkce v závislosti na buněčném zdroji, cílové buňce a na tom, v jaké fázi imunitní odpovědi působí. Mnoho cytokinů má prozánětlivý i protizánětlivý potenciál. Která aktivita je spuštěna, závisí na přítomných imunitních buňkách a jejich míře citlivosti na daný cytokin. V mnoha případech je nutná integrace více signálních drah najednou.

Cytokiny signalizují prostřednictvím řady společných sdílených receptorů, které se ukázaly jako užitečné pro funkčnější klasifikaci cytokinů [5]. Podle této klasifikace lze cytokiny rozdělit do sedmi rodin (angl. superfamilies), a to na cytokinové receptory typu I (hematopoetinová rodina), cytokinové receptory typu II (interferonová rodina), receptory interleukinu-1 (dále IL) a jim příbuzné Toll-like receptory, receptory faktorů nádorové nekrózy (TNF), receptory serinových kinas rodiny TGF- β (z angl. transforming growth factor β), receptory tyrosin kinas a receptory IL-17. Na Obrázku 1, str. 17 je schématicky vyobrazeno pět receptorů pro hlavní cytokinové rodiny. Další skupinou cytokinů jsou chemokiny, které tvoří samostatnou rodinu a vážou sedm transmembránových doménových receptorů (spřažené s G-proteiny).

Homologie v rodinách jsou okolo 15 – 25 % [6]. Konzervované aminokyseliny v rodinách jsou často seskupeny do domén nebo repetic (opakování), přestože homologie konzervovaných aminokyselin, seskupených do malých sekvencí v průměru 40 - 110 aminokyselinových zbytků (tvořících domény a opakování u jednotlivých rodin), může být nízká. Je také důležité, že mnoho cytokinových receptorů má kombinace různých domén nebo repetic. Vedle extracelulárních domén, mají rodiny receptorů také často konzervované cytosolické domény, které jsou zapojené do přenosů signálu. Pro příklad lze uvést cytokinové receptory typu I a receptory typu II, které mají tzv. „box 1 motiv“ potřebný pro signalizaci. Dále někteří členové rodiny receptorů TNF mají tzv. „death doménu“, prostřednictvím které dochází k indukci apoptózy (programované buněčné smrti) [7]. U členů rodiny Toll/IL-1 receptorů lze najít Toll/IL-1 (TIR) doménu, která iniciuje signalizační kaskádu.



Obrázek 1: Schématické znázornění pěti receptorů z hlavních rodin cytokinů. Receptory typu I a II mohou být jak homodimerní tak heterodimerní, receptory TNF jsou trimerní proteiny většinou asociované s buněčným povrchem, Toll-like/IL-1 receptory pouze jednou prochází membránou a obsahují Toll-IL-1 receptorovou doménu, receptory tyrosin kinas jsou receptory spojené s enzymy fosforylující tyrosinové zbytky a receptory TGF- β jsou receptory serin/treonin kinas. Obrázek byl převzat a upraven [5].

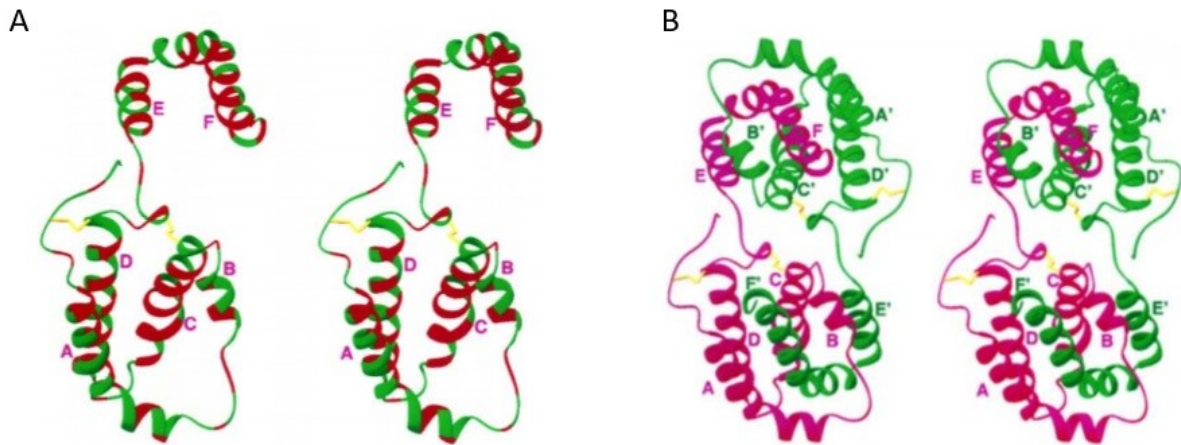
2.1.1 Cytokiny skupiny IL-10 a jejich receptory

Jak již bylo zmíněno výše, cytokiny lze rozdělit do určitých skupin. Existuje mnoho různých rozdělení dle jejich struktury a funkce. Pro příklad helikální cytokiny mohou být rozděleny do dvou tříd, podle primárních strukturních rysů jejich receptorů [8]. Cytokiny třídy 1 (a do ní patří např. IL-12, IL-4 a IL-6) využívají receptory rodiny cytokinových receptorů třídy 1. Tyto receptory mají extracelulární části obsahující jednu nebo více kopií domény s konzervovaným disulfidickým můstkem a membránově proximální sekvenci tryptofan-serin-X-tryptofan-serin (WSXWS). Naproti tomu cytokiny třídy 2 sdílejí členy cytokinových receptorů typu 2, kterým chybí intaktní motiv WSXWS. Cytokiny třídy 2 sestávají z různých typů interferonu (dále IFN), tj. IFN- α , - β , - ϵ , - κ , - ω , - δ , - τ , - γ a molekul podobných interferonům (př. IL-28A, IL-28B a IL-29), jakož i šesti cytokinů souvisejících s IL-10 [9]. Cytokiny IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL24 a IL-26 byly zařazeny do podskupiny cytokinů IL-10 (cytokiny skupiny IL-10). Významná podobnost cytokinů skupiny 10 existuje nejen v podobnosti sdílených receptorů, ale také prostřednictvím konzervovaných signálních kaskád [10]. Členové této skupiny zprostředkovávají různé aktivity, včetně potlačení imunitního systému, zesílení antibakteriální a antivirové imunity, protinádorové aktivity a podpory tolerance struktur tělu vlastních u autoimunitních onemocnění.

2.1.1.1 Struktura

Interleukiny skupiny 10 mají společnou homodimerní helikální strukturu [11]. Struktura IL-10 je vyobrazena na Obrázku 2, str. 19. Amfipatický vzorec hydrofobních a hydrofilních zbytků pro šest helixů je zachován ve všech sekvencích. Obecně jsou nejvíce konzervované úseky sekvence, nacházející se v C-terminální polovině třetí (C) šroubovice a N-terminální polovině šesté šroubovice (F), které tvoří výrazný ohyb. Tyto dvě oblasti také obsahují čtyři (Phe71, Tyr72, Ala139 a Glu142) z pěti aminokyselin (Leu47, Phe71, Tyr72, Ala139 a Glu142), o nichž se uvádí, že jsou klíčovými aminokyselinovými zbytky při stabilizaci strukturního jádra v IL-10 a IFN- γ . Tyto zbytky jsou konzervovány u většiny členů rodiny IL-10, což naznačuje podobné uspořádání šroubovice. Naproti tomu vzor a rozmístění čtyř cysteinů, tvořících dvě intramolekulární disulfidické vazby v IL-10, není v rodině plně konzervován. Tento fakt naznačuje, že přítomnost disulfidické vazby nemusí být pro udržení sbalení IL-10 nezbytné (př. IFN- γ má stejné sbalení jako ostatní cytokiny této skupiny, ale neobsahuje žádné disulfidové

vazby). Každý interleukin dále obsahuje specifické receptor-vázající zbytky, které jsou variabilní a definují interakci se specifickými heterodimery různých cytokinových receptorů typu 2. Tato interakce vede ke spuštění signalizace a aktivaci transkripčních (STAT) faktorů, které mají různé biologické účinky.



Obrázek 2: Struktura IL-10. A – Strukturální model monomerního IL-10, hydrofobní AK zbytky jsou znázorněny červeně. B – Strukturální model dimerního IL-10, monomerní IL-10 jsou znázorněny fialově a zeleně, disulfidové vazby jsou znázorněny žlutě. Obrázek byl převzat a upraven [12].

2.1.1.2 Členové skupiny IL-10

2.1.1.2.1 IL-10

Jedná se o multifunkční cytokin s různými účinky na většinu typů hematopoetických buněk [13]. IL-10 je schopný inhibovat aktivaci a efektorovou funkci T-buněk, monocytů a makrofágů. Jedna z hlavních rutinních funkcí IL-10 je omezit a nakonec ukončit zánětlivé reakce, dále reguluje růst a diferenciaci B-buněk, NK buněk (z angl. Natural killer cells, přirozené zabíječské buňky), cytotoxických (T_C) a pomocných (T_H) T-buněk, žírných buněk, granulocytů, dendritických buněk, keratinocytů a endoteliálních buněk. IL-10 také hraje klíčovou roli v diferenciaci a funkci nově vzniklých regulačních T-buněk (T_{REG}), které se mohou významně podílet na kontrole imunitních odpovědí a toleranci. IL-10 tvoří homodimer a signalizuje pomocí komplexu s IL-10R1 (IL-10 Receptorem 1) a IL-10R2 (IL-10

Receptorem 2) [10]. Vazbou a tvorbou komplexu s těmito receptory dochází k aktivaci Janusových kinas (JAK), což jsou přenašeči signálu a aktivátory transkripčních faktorů STAT 1 a STAT 3.

2.1.1.2.2 IL-19

Mezi IL-19 a IL-10 lze nalézt výraznou podobnost. Tyto cytokiny mají stejnou délku aminokyselinové sekvence a strukturu skládající se ze šesti helixů stabilizovaných pomocí disulfidických vazeb ve stejných pozicích [14]. IL-19 je v imunitním systému produkován převážně monocyty. Jeho exprese může být indukována lipasou (LPS), IL-4 a GM-CSF (faktor stimulující granulocytové a makrofágové kolonie) [10]. Produkce IL-19 je negativně regulována IFN- γ . Úlohy IL-19 byly primárně zkoumány u lupénky a alergických poruch. IL-19 signalizuje prostřednictvím receptorového komplexu IL-20R1 a IL-20R2. Vazba IL-19 na receptorový komplex vede k fosforylaci STAT 3 a následné aktivaci reportérového genu řízeného promotorem obsahujícího vazebná místa pro STAT [15]. Touto signální drahou dochází k aktivaci monocytů autokrinním a parakrinním způsobem, k uvolnění cytokinů IL-6, TNF- α a četných reaktivních forem kyslíku.

2.1.1.2.3 IL-20

Aminokyselinová sekvence IL-20 je pouze z 28 % identická s IL-10. Rekombinantní lidský IL-20 tvoří monomer namísto charakteristického dimeru, jak je tomu u IL-10 [10]. IL-20 je produkován především monocyty a také neimunitními tkáňovými buňkami (keratinocyty) v zánětlivých podmínkách [16]. IL-20 působí prostřednictvím receptorového komplexu, který se skládá z řetězců IL-20R1 a IL-20R2. Exprese receptorů je patrná především na buňkách kůže, plic, reprodukčních orgánů a také na buňkách žláz. IL-20 se dále váže na receptorový komplex skládající se z IL-22R1 a IL-20R2. Každý z těchto komplexů heterodimerních receptorů funguje částečně cestou JAK/STAT. Tento cytokin je stejně jako IL-19 zapojen do procesů spojených s lupénkou a s revmatoidní artritidou (usuzováno podle vyšších koncentrací v synoviální tekutině u pacientů trpících těmito onemocněními). Dále byla naznačena role IL-20 v procesech aterosklerózy a angiogeneze.

2.1.1.2.4 IL-22

IL-22 (neboli TIF, indukovatelný faktor odvozený od T-buněk) je cytokin, který je důležitý pro modulaci tkáňových odpovědí během zánětu [17], [18]. K expresi IL-22 dochází v aktivovaných T-buňkách, v menší úrovni také v aktivovaných NK buňkách. V podskupinách T-lymfocytů je IL-22 přednostně exprimován CD4⁺ T_H buňkami. V makrofázích, dendritických buňkách nebo neimunních buňkách k expresi nedochází. Tento cytokin signalizuje prostřednictvím receptorového komplexu, který je tvořen ligand-vázajícím IL-10R1 a IL-10R2, který podporuje signalizaci prostřednictvím řetězce IL-10R1 [9]. Vazba na tento receptorový komplex aktivuje STAT 3, dochází k indukci proliferativní a antiapoptotické dráhy a produkci antimikrobiálních molekul, které pomáhají předcházet poškození tkáně a pomáhají při jejich opravě.

2.1.1.2.5 IL-24

IL-24 je protein, který vykazuje významnou strukturní homologii s cytokininovou skupinou IL-10 [19]. Porovnání aminokyselinové sekvence IL-10 a IL-24 ukazuje pouze 23% homologii, ovšem kvůli typické struktuře je řazen do této skupiny [20]. IL-24 je exprimován buňkami a tkáněmi, které jsou spojené s imunitním systémem, jako jsou thymus, slezina a leukocyty periferní krve (PBMC). IL-24 je ligandem pro dva heterodimerní receptory, IL-22R1/IL-20R2 a IL-20R1/IL-20R2 [19]. Vazbou na receptor dochází k aktivaci STATu, konkrétně STATu 1 a STATu 3. Vedle působení prostřednictvím receptorů může tento cytokin působit intracelulárně jako cytotoxické činidlo způsobem nezprostředkovaným receptorem na určité rakovinné buňky [21]. IL-24 může indukovat expresi jiných cytokinů, jako jsou např. TNF- α , IL-6 a IFN- γ , prostřednictvím PBMC. Signální dráhy mají různé biologické funkce související s buněčnou diferenciací, proliferací, vývojem, apoptózou a zánětem [22]. IL-24 má apoptotický účinek na rakovinné buňky (zatímco na normální buňky ne). Z tohoto důvodu je tento cytokin testován pro potenciální aplikaci v léčbě rakoviny.

2.1.1.2.6 *IL-26*

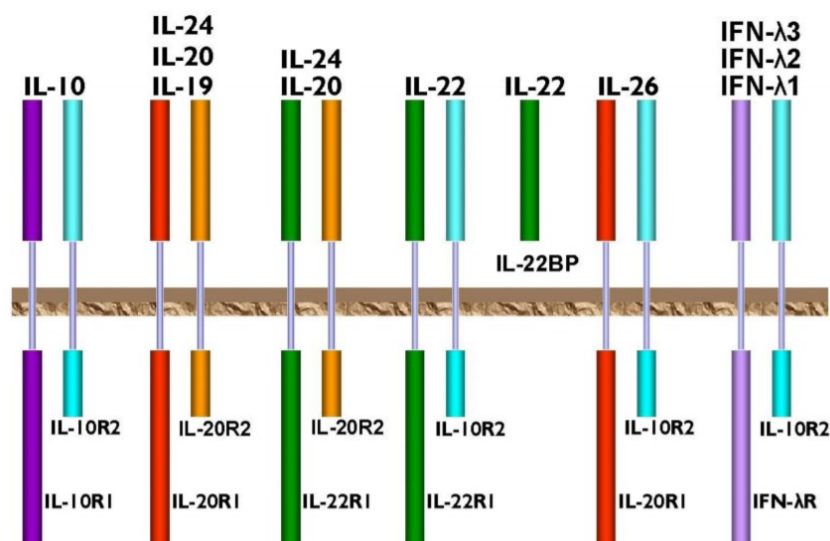
IL-26 tvoří homodimery podobně jako IL-10 [23]. IL-26 byl původně popisován jako gen pozitivně regulovaný po infekci HVS (Herpesvirus saimiri) v T-buňkách, podobně, jako je tomu u B-buněk po infekci EBV (Epstein Barr virus) [10]. IL-26 signalizuje prostřednictvím heterodimerního receptoru, který je tvořen IL-20R1 a IL-10R2. IL-10R2 je exprimován na široké škále tkání, zatímco IL-20R1 exprimuje pouze omezený počet tkání [24]. Schopnost reagovat na IL-26 je proto omezena expresí IL-20R1. Vazba na receptor IL-26 vede k fosforylaci STAT 1 a STAT 3 a indukcii IL-8, IL-10 a intracelulární adhezivní molekuly 1 (ICAM-1). Stimulace IL-26 dále také zvyšuje expresi mRNA prozánětlivých cytokinů a snižuje proliferaci buněk. U pacientů s Crohnovou chorobou byla zjištěna zvýšená exprese mRNA IL-26, která vysoce korelovala s expresí IL-8 a IL-22 [23].

2.1.1.3 *Receptory skupiny IL-10*

Cytokinové receptory skupiny IL-10 jsou heterodimery, které se skládají ze dvou receptorových řetězců. První receptorový řetězec je specifický pro daný cytokin, zatímco druhý je méně specifický a je sdílen receptory pro více cytokinů [25]. Z tohoto hlediska, tedy podle sdíleného méně specifického řetězce receptoru, lze cytokiny skupiny IL-10 rozdělit do dvou podskupin. U první podskupiny tvoří druhý řetězec IL-10R2 a u druhé IL-20R2. Do první podskupiny (IL-10R2) se řadí IL-10, IL-22, IL-26, a IFN- λ (třída 2 α -helikální cytokin). Do druhé podskupiny (IL-20R2) patří IL-19, IL-20 a IL-24 [26]. Heterodimerní receptory pro cytokiny skupiny IL-10 jsou schématicky znázorněny na Obrázku 3, str. 23.

Jak již bylo řečeno, některé cytokiny sdílejí s IL-10 společný receptorový řetězec, ovšem ligand-vázající receptorový řetězec (R1) mají IL-22, IL-26 a IFN- λ od IL-10 rozdílný [25]. Vazba na receptorový řetězec R1 indukuje konformační změnu, která umožní interakci s nově vzniklým ligand-receptorovým komplexem. Interakce těchto tří proteinů aktivuje přenos signálu do buňky, rozvoj signalizační kaskády, která zahrnuje několik transkripčních faktorů, především STAT 3 a v menší míře také STAT 1 transkripčního faktoru. R2 (IL-10R2) je exprimován na mnoha různých druzích tkání, naproti tomu R1 je exprimován pouze na některých z nich. Mezi specifické tkáně patří také buněčné linie odvozené od nádorů.

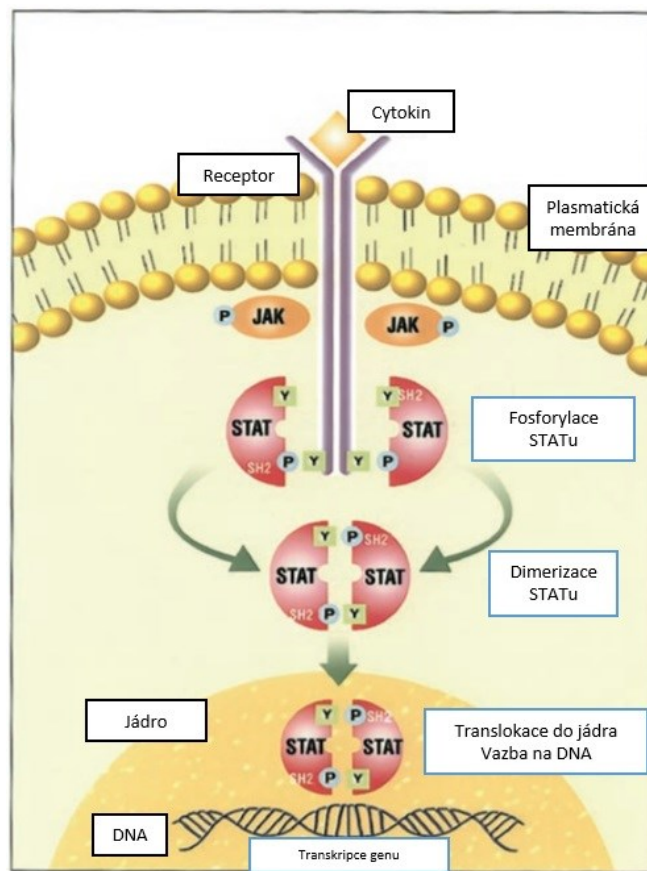
IL-20 indukuje buněčnou signalizaci pomocí heterodimerního receptoru skládajícího se z receptorových řetězců IL-20R1 a IL-20R2 (receptor typu I) [27]. Stejný receptorový komplex používá pro svou signalizaci také IL-19 a IL-24. IL-20 a IL-24 dále také signalizují prostřednictvím heterodimeru IL-22R1/IL-20R2 (receptor typu II). Jak je možné si povšimnout, tak IL-20R1 a IL-22R1 tvoří heterodimery s receptorovým řetězcem IL-10R2 (receptory pro IL-22 a IL-26). Přes promiskuitní párování řetězců R2 nemůže IL-20R2 nahradit IL-10R2 v signalizaci IL-22. Mimo to se zdá, že IL-19, IL-20 a IL-24 mají z velké části neredundantní biologické aktivity *in vivo*, což naznačuje, že mohou heterodimery receptorů typu I a II zapojit odlišně. Mechanistický základ pro tyto rozdíly však nebyl stanoven.



Obrázek 3: Schéma heterodimerních receptorů pro jednotlivé cytokiny skupiny IL-10 a IFN-λ. Modře je znázorněn receptorový řetězec IL-10R2 a žlutě je znázorněn řetězec IL-20R2. Dále jsou ostatními barvami znázorněny specifické řetězce pro jednotlivé cytokiny (fialově je znázorněn receptorový řetězec IL-10R1, červeně IL-20R1, zeleně IL-22R1 a světle fialově je znázorněn IFN-λR známý také jako IL-28R1). Dle receptorového řetězce R2 lze cytokiny skupiny IL-10 dělit do dvou podskupin - u první podskupiny tvoří druhý řetězec IL-10R2 a u druhé IL-20R2. Obrázek byl převzat [26].

2.1.1.4 *JAK/STAT signalizace*

JAK/STAT signalizace je signalizační dráha, která je využívána velkým množstvím cytokinů a růstových faktorů [28], [29]. Aktivace JAK (Janusových kinas) stimuluje proliferaci, diferenciaci, migraci a apoptózu buněk. Tyto procesy jsou důležité v krvevorbě, vývoji imunity, vývoji mléčných žláz a laktaci, diferenciaci tukových buněk, pohlavně dimorfního růstu a v dalších procesech. Signalizace je iniciovaná vazbou cytokinu na příslušný receptor, což zapříčiní jeho oligomerizaci, následovanou sérií koordinovaných fosforylací tyrosinových zbytků, která vede k aktivaci mnoha rozličných signálních molekul včetně „převaděčů signálu a aktivátorů transkripce“ – STATu (z angl. Signal Transducers and Activators of Transcription). Jak již název této signalizační dráhy naznačuje, dvěma hlavními členy jsou JAK kinasy a STAT transkripční faktory. JAK tyrosin kinasy jsou asociované s cytoplasmatickými doménami řetězců (podjednotek) receptorů. JAK kinasy jsou dále charakteristické tím, že na svém C-konci mají dvojici homologních domén s kinasovou aktivitou. První je regulační doména bez katalytické aktivity, druhá doména má tyrosin kinasovou aktivitu. U savců zahrnuje rodina JAK čtyři členy: JAK 1, JAK 2, JAK 3 a Tyk 2. K aktivaci JAK dochází po oligomerizaci receptoru zprostředkované ligandem. Dvě JAK jsou přivedeny do těsné blízkosti, což umožňuje trans-fosforylací. Aktivované JAK následně fosforylují další molekuly, včetně receptorů a hlavních molekul STATu. Rodina STAT transkripčních faktorů se skládá ze sedmi členů: STAT 1, STAT 2, STAT 3, STAT 4, STAT 5a, STAT 5b a STAT 6 [30]. V signalizaci cytokinů skupiny IL-10 se uplatňují především STAT 1 a STAT 3. STAT proteiny jsou unikátní oproti ostatním transkripčním faktorům v tom, že obsahují SH2 (src-homology 2) doménu. Tato doména interaguje s fosforylovaným tyrosinem na receptoru za účelem integrace STATu do receptorového komplexu. Po fosforylaci tyrosinu v molekule STATu dochází k dimerizaci mezi doménami SH2 a karboxy-terminálně lokalizovanou doménou obsahující fosfotyrosin. Dimerní STAT molekula poté vstupuje do jádra, kde se váže na specifické elementy v DNA promotorech. Tím aktivuje transkripci příslušných genů, což vede ke změně buněčného fenotypu. Schématicky je tato signalizace vyobrazena na Obrázku 4, str. 25.



Obrázek 4: Schéma JAK/STAT signalizace. Vazba ligandu na receptor způsobí jeho oligomerizaci, aktivaci JAK kinas, které fosforylují tyrosinové zbytky na cytoplazmatické receptorových doménách. Monomery STATu interagují pomocí SH2 domén s ukotvovacími místy pro fosfotyrosin na aktivovaném receptoru. Molekuly STATu jsou fosforylovány pomocí JAK kinas. STATy poté disociují od receptoru, dimerizují a translokují se do jádra. V jádře se vážou na specifické elementy v promotorech genů a indukují jejich transkripci. Obrázek byl převzat a upraven [31].

2.2 SKAFOLDY

V posledních letech začalo využití klasických afinitních molekul založených na protilátkách soupeřit s využitím nových typů vazebných proteinů založených na principech kombinatorického proteinového inženýrství [32]. Navrhování nových proteinových skafoldů (z angl. scaffold, česky „lešení“), jakožto alternativ k protilátkám je v současné době hlouběji zkoumáno [33]. Výhodou skafoldů je nižší výrobní cena a lepší průchodnost tkáněmi (např. do nádorů) díky menší velikosti, než jakou mají protilátky. Některé proteinové skafoldy, s vysoce specifickými vazebnými vlastnostmi odvozenými z přírodních lidských proteinů, jsou v současné době testovány v klinických studiích [34], [35].

Vývoj skafoldů započal myšlenkou, že imunoglobuliny váží antigeny pomocí konzervované rámcové oblasti v prostorově dobře definovaném místě, jenž je vytvořené z peptidových segmentů, které jsou hypervariabilní jak v sekvenci, tak v konformaci [36]. Poté, co byly do praxe uvedeny fragmenty protilátek, začaly se využívat také další typy proteinových architektur pro konstrukci vazebných proteinů, jejichž hlavní výhodou byly vlastnosti jako malá velikost receptorového proteinu, stabilita a snadnost přípravy. Proto byly vedle jednotlivých domén protilátek nebo imunoglobulinové rodiny zkoumány také proteasy inhibitorů, helixové proteiny (helix-bundle proteins), lipokaliny a peptidy vázané disulfidy (disulphide-knotted peptides). Termín „skafold“ popisuje polypeptidovou kostru s vysokou tolerancí svého sbalení při modifikacích, jakož jsou vícenásobné inserce, delece a substituce [37]. Tato vnitřní konformační stabilita umožňuje začleňovat drastické změny v definované oblasti proteinu. Pomocí těchto změn získává daný skafold nové vlastnosti, zatímco jeho celková strukturální integrita a fyzikálně-chemické vlastnosti zůstávají zachované. Ve většině případů zahrnuje tato nová vlastnost vazebnou specifitu pro předem definovanou molekulu. Získání nové vlastnosti skafoldu zahrnuje obecně dva kroky: diverzifikaci (zavedení náhodných mutací do předem stanovené oblasti – tvorba knihoven) a selekci (výběr). Pro skafoldy byly zavedeny strukturální podmínky, které jsou základem jednotlivých struktur, které by mohly poskytnout dutiny nebo štěrbinu pro pevné vázání malých molekul, flexibilní smyčky prostupující štěrbinou a dále pak i rozšířené vazebné povrchy pro vazbu proteinů. Oba tyto mechanismy (zprostředkování vazby smyčkou nebo „tuhým povrchem“, z angl. rigid body) jsou vhodné pro generování vysokých afinit. Většina nových skafoldů je vyvíjena proti cílům souvisejících s nemocemi,

jako jsou tumorové nekrosové faktory- α (TNF- α), CD20, vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), CD19 a CD3, které se ukázaly jako účinné v cílených terapiích u onkologických a zánětlivých onemocnění [38].

2.2.1 Příklady skafoldových proteinů neodvozených od protilátek

2.2.1.1 Anticaliny

Anticaliny jsou odvozené od přírodních lipocalinových proteinů [39]. Lipocaliny jsou typicky malé sekretované proteiny, které se vyznačují řadou různých vlastností rozpoznávání molekul [40]. Typická je pro ně schopnost vázat malé, hlavně hydrofobní molekuly (jako je retinol), vazba na specifické receptory buněčného povrchu a tvorba makromolekulárních komplexů. Struktura Anticalinů se skládá ze stabilního β -barelu obsahujícího čtyři smyčky, které jsou určeny pro randomizaci [39]. Struktura Anticalinů vykazuje podobnosti s protilátkami, přesněji s regionem hypervariabilní smyčky [41]. Anticaliny (respektive lipocaliny) jsou naproti protilátkám složeny pouze z jednoho polypeptidového řetězce, obsahujícího 160 až 180 aminokyselinových zbytků a čtyř namísto šesti smyček, obsahují jeden nebo žádný disulfidický můstek a nejsou glykosylované. Anticaliny jsou dobře produkovatelné v *E. coli* a kvasinkách [38]. Několik Anticalinů bylo selektováno proti relevantním lékařským cílům, včetně cytotoxického T-lymfocytárního antigenu 4 (CTLA-4), VEGF-A a c-Met onkogenu se silou vazby v nanomolárním až pikomolárním rozmezí.

2.2.1.2 DARPiny

Navržené ankyrinové proteiny, zkráceně DARPiny (z angl. Designed Ankyrin Repeat Proteins) jsou skafoldy plně navržené tak, aby se podobaly přirozeným lidským AR proteinům [38]. DARPiny jsou tvořeny z těsně pospojovaných repetit, které obsahují 33 aminokyselinových zbytků [42]. Každá repetice formuje strukturní jednotku, která se skládá z β -otočky a dvou antiparalelních α -helixů. V jednom proteinu lze nalézt až 29 po sobě jdoucích opakování. Domény ankyrinových proteinů se obvykle skládají ze čtyř až šesti opakování, čímž vzniká pravotočivá solenoidová struktura s kontinuálním hydrofobním jádrem a velkým povrchem přístupným rozpouštědlu. DARPiny obvykle obsahují na N- a C-terminálních koncích krycí motivy (čepičky, z angl. cap/capping), které chrání hydrofobní oblasti a umožňují zvýšenou rozpustnost [38]. DARPiny jsou dobře produkovatelné v *E. coli*, neagregují a vykazují

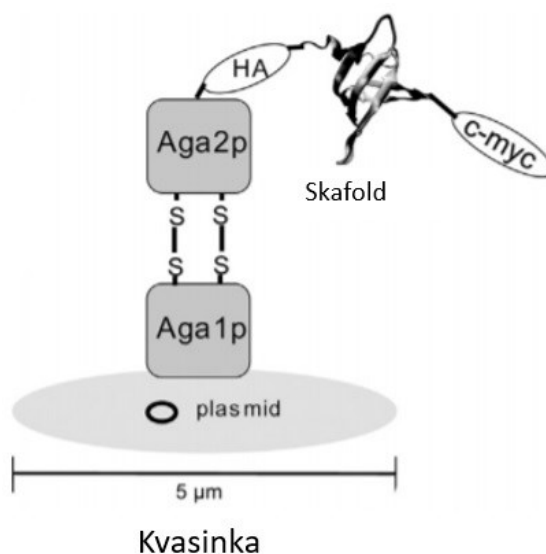
vysokou termodynamickou stabilitu. Nejpokročilejší projekt využívající DARPIn funkci odpovídá vysoce účinnému inhibitoru VEGF-A.

2.3 ŘÍZENÁ EVOLUCE PROTEINŮ POMOCÍ KVASINKOVÉHO DISPLEJE

Schopnost produkovat proteiny s vysokou afinitou a specifitou vůči danému cíli (angl. target), je klíčové pro aplikaci v medicíně, biotechnologii a výzkumu [43]. Vazebné proteiny jsou většinou izolovány z knihovny mutantů daného proteinu vzniklé pomocí mutagenese určitých oblastí na stabilní proteinové struktuře. Poté je ovšem nutné v knihovně identifikovat ty klony, které váží cílovou molekulu s nejvyšší afinitou. To lze provádět pomocí jednoho z mnoha dostupných nástrojů pro prohledávání (z angl. screening) knihoven. Těchto nástrojů/metod na prohledávání knihoven je více, avšak běžným principem jakéhokoliv nástroje je propojení každého mutantního proteinu s jeho genetickým kódem a jeho izolace po vazbě na cíl. Kvasinkový displej (angl. yeast surface display) je jedna z metod řízené evoluce proteinů [44]. Od uvedení na trh, je kvasinkový displej využíván ve vývoji různých proteinů pro zlepšení afinity, specifity, exprese, stability a katalytické aktivity. Selektce u kvasinkového displeje obvykle zahrnuje krok třídění pomocí průtokové cytometrie, což usnadňuje kvantitativní analýzu během selektce [45]. Navíc zahrnutím expresní značky je také možné normalizovat expresi proteinu, což dodává metodě citlivost. Důležitým rysem kvasinkového displeje je použití eukaryotického hostitele, který má sekreto-biosyntetický aparát, díky němuž dochází k efektivnímu skládání proteinu a N-glykosylaci.

V případě kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (nejpoužívanější systém) používá kvasinka k vystavení proteinu na svém povrchu spojovací protein α -aglutinin, který se skládá ze dvou podjednotek [45]. Podjednotka Aga1p, která je ukotvená do buněčné stěny kvasinky a je kovalentně vázaná na podjednotku Aga2p pomocí dvou disulfidických vazeb. Gen kódující mutovaný skafold je klonován do kvasinkového plasmidového vektoru jako fúze s genem Aga2p, přičemž použitý kmen kvasinek má gen Aga1p stabilně integrovaný do chromozomu [43]. Exprese Aga1p a Aga2p je řízena galaktózou indukovatelným GAL1 promotorem. V přítomnosti galaktózy je mutantní protein zobrazen na buněčném povrchu kvasinek jako C- nebo N-terminální fúze k podjednotce Aga2p. Orientace s C-terminální fúzí je více využívána, jelikož volný N-konec je u některých proteinů rozhodující pro efektivní funkci

daného proteinu [46]. Skafold vystavený na kvasince je schématicky znázorněn na Obrázku 5. Pro následné prohledávání knihoven skafoldů vystavených na kvasinkách byly zavedeny epitopové značky, které byly fúzovány s C-terminální částí proteinu nebo mezi Aga2p a daným proteinem. Po imunofluorescenčním barvení těchto značek může být exprese skafoldů v plné délce ověřena pomocí průtokové cytometrie. Po inkubaci kvasinkových buněk s příslušným cílovým proteinem může být interakce analyzována pomocí detekčních činidel značených fluorescenčně specificky zaměřených na cílenou molekulu (vazebného partnera).



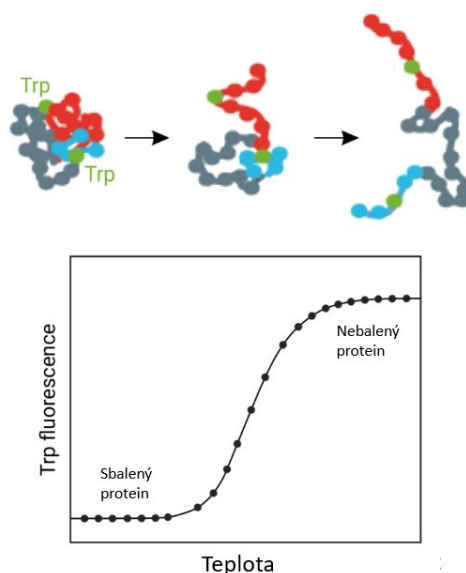
Obrázek 5: Schéma proteinu vystaveného na povrchu kvasinky. Mutantní skafold fúzovaný s Aga2p vystaveny na buněčné stěně kvasinky. Epitopy hemagglutinin (HA) a c-myc mohou být použity pro imunofluorescenční značení a detekci. Obrázek byl převzat a upraven [43].

2.4 VYBRANÉ BIOFYZIKÁLNÍ METODY PRO CHARAKTERIZACI VAZEBNÝCH PROTEINŮ

2.4.1 Měření tepelné stability - nanoDSF

Rozbalování proteinu (tedy ztráta 3D struktury) je jedna z hlavních příčin ztráty funkce daného proteinu. Různé proteiny mohou odlišně reagovat na mechanický a termální stres [47]. Posouzení stability proteinu je důležité jak pro základní výzkum, tak i pro výzkum a vývoj léčiv [48]. Sleduje se jak tepelná, tak chemická stabilita molekul proteinu, aby se vytvořili ideální podmínky pro hledání vhodných molekul, výrobu a také jejich dlouhodobé skladování.

Měření tepelné stability se tradičně prováděla pomocí diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) [49]. Měření DSC jsou však často omezena na určité rozmezí koncentrací a vyžadují velká množství materiálu. Pomocí metody nanoDSF (z angl. nano differential scanning fluorimetry, česky nano diferenční skenovací fluorimetrie) lze určit stabilitu proteinu s vysokým rozlišením a reprodukovatelností dat, avšak se spotřebou malého množství vzorku [47]. Tato metoda využívá vnitřní fluorescence tryptofanů (měření probíhá při 330 a 350 nm vlnové délky) a tyrosinů, není tedy nutné fluorescenční značení. Měření lze provádět za podmínek blízcích se nativním, v jakémkoli pufru, v přítomnosti detergentů a v rozmezí koncentrací 150 mg/ml až 5 µg/ml [48]. Vnitřní fluorescence tryptofanů silně závisí na 3D struktuře, tedy na okolí daného tryptofanového zbytku [50]. Pomocí působení chemických denaturantů nebo teplotního gradientu se mohou proteiny rozbalit, tedy ztratit svou 3D strukturu, což vede ke změnám vnitřní fluorescence tryptofanů. To se promítá do posunů píku fluorescence a změn intenzity. Při měření teplotní stability se sleduje míra fluorescence v závislosti na zvyšující se teplotě. Konformační stabilita proteinu je popsána pomocí teploty tání, T_m (°C), což je bod, ve kterém je rozbalena přesně polovina proteinu. Vzorky jsou měřeny ve skleněných kapilárách, které mají objem přibližně 15 µl. Dále se dá pomocí metody nanoDSF sledovat agregace proteinů. Viditelné světlo, jež prochází kapilárami, je odraženo zrcadlem na kapilárním podnosu a nakonec kvantifikováno detektorem. Pokud vzorek proteinu obsahuje agregované částice, dopadající světlo je těmito částicemi více rozptýleno. Ztráta intenzity odrazu je přesným měřítkem agregace proteinů. Naznačení rozbalování proteinu a míry fluorescence v závislosti na zvyšující se teplotě je znázorněno na Obrázku 6, str. 31.



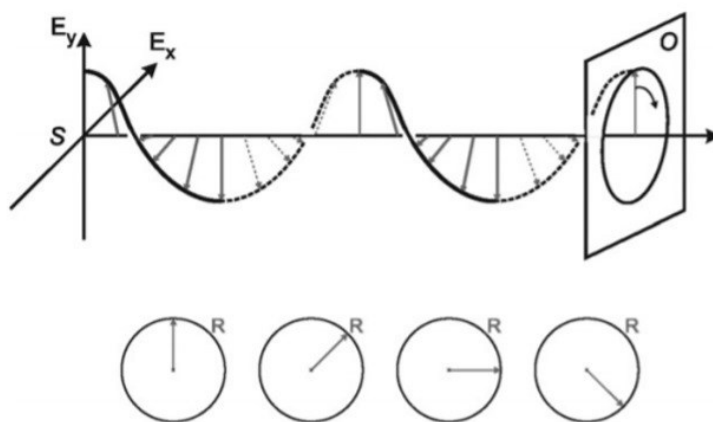
Obrázek 6: Grafické znázornění závislosti rozbalování proteinu a míry fluorescence na zvyšující se teplotě. Obrázek byl převzat a upraven [51].

2.4.2 Měření cirkulárního dichroismu proteinů – CD měření

Cirkulární dichroismus (CD) je důležitá technika ve strukturní charakterizaci proteinů, především v predikci sekundární struktury [52]. Rychlá charakterizace nových proteinů má velký význam v oblasti proteomiky a strukturální genomiky [53]. Cirkulární dichroismus (CD) je vhodnou metodou pro rychlé vyhodnocení sekundární struktury, skládání a vazebných vlastností proteinů.

Cirkulární dichroismus je definován jako rozdíl mezi absorpcí levotočivého a pravotočivého kruhově polarizovaného světla [53]. Paprsek světla má časově závislé elektrické (E) a s ním související magnetické (M) pole. Pokud je paprsek světla lineárně polarizován, bude E oscilovat v jedné rovině, přičemž M bude oscilovat v rovině kolmé na E. Kruhově polarizované světlo (sinusovou vlnu) lze při pohledu zpředu vizualizovat jako výsledek dvou vektorů stejné délky, které vykreslují kruhy, jeden se otáčí ve směru hodinových ručiček (EP) a druhý proti směru hodinových ručiček (EL). Vlny jsou 90° mimo fázi (1/4 vlnové délky). CD tedy využívá zdroj kruhově polarizovaného světla, ve kterém vektor E osciluje rotačně doprava nebo doleva a tvoří tím šroubovici kolem osy šíření [54], [55]. Šíření kruhově

polarizovaného světla je znázorněno na Obrázku 7. Pokud asymetrické molekuly interagují s kruhově polarizovaným světlem, mohou absorbovat pravo a levotočivě kruhově polarizované světlo v různém rozsahu a také mít rozdílné indexy lomu pro obě vlny [53]. Dochází k tomu, že složka L a P mají různé amplitudy a výsledkem je vznik vektoru, který vykresluje elipsu a světlo je označováno jako elipticky polarizované. CD je uváděno v jednotkách ΔE , jedná se o rozdíl absorpance EP a EL asymetrickou molekulou, nebo ve stupních elipticity, která je definována jako úhel, jehož tangens je poměr menší k hlavní ose elipsy. $[\theta]$, molární elipticita se uvádí v $^{\circ}\text{cm}^2/\text{dmol}$ (což se rovná $3298 \times \Delta E$).

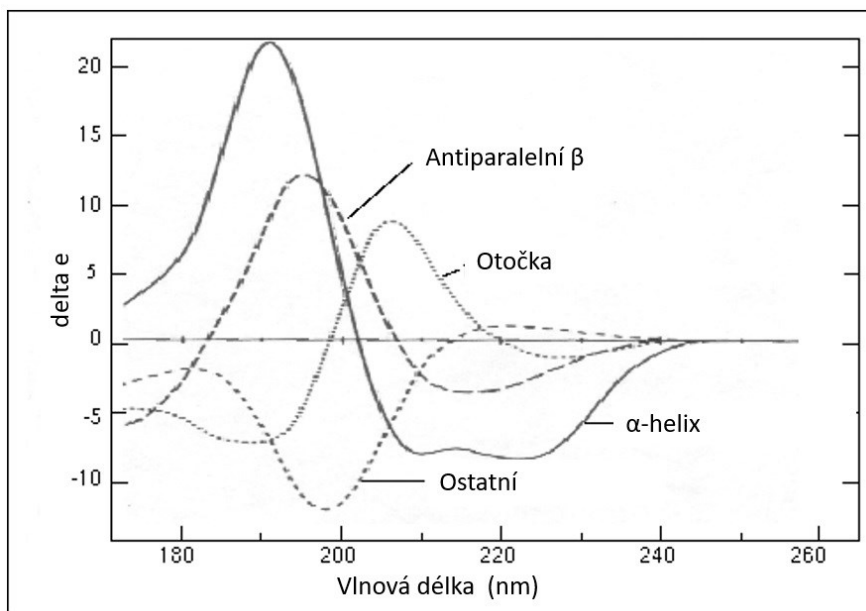


Obrázek 7: Schéma šíření kruhově polarizovaného světla. Obrázek byl převzat a upraven [52].

Základním principem analýzy proteinových CD spekter je to, že proteinové CD spektrum lze vyjádřit jako lineární kombinaci CD spekter jednotlivých složek sekundárních struktur, tedy použití odhadu frakcí sekundárních struktur (k), což lze popsat pomocí Rovnice 1 [56]. Spektra modelových polypeptidů nebo sady referenčních proteinů se známými strukturami se používají ke stanovení spektra sekundárních strukturálních složek, $B_{k,\lambda}$. Tato spektra „čistých proteinových struktur“ jsou uvedena na Obrázku 8, str. 33.

Rovnice 1: Popis proteinového spektra $B_{k,\lambda}$ pomocí rovnice. Kde f_k je frakce sekundární struktury

$$B_{k,\lambda}, C_{\lambda} = \sum f_k B_k$$



Obrázek 8: CD spektra „čistých proteinových struktur“. Obrázek byl převzat a upraven [55].

2.4.3 Mikrotermoforéza - MST

MST (z angl. Microscale Thermophoresis) je metoda umožňující kvantitativní analýzu interakcí molekul v roztoku ve škále mikrolitrů [57]. MST umožňuje měření vazby proteinů s malými molekulami (např. ionty, jako je vápník), vazby protein-protein, kompetitivní inhibice, interakce proteinlipidů (kde je lipid v micelách, krátkých řetězcích nebo relativně plochých dvouvrstvách), dále také kinetické a termodynamické parametry [58]. Tato metoda je založena na termoforéze, což je směrový pohyb molekul v teplotním gradientu [59]. Termoforetický efekt, přestože nebyl plně pochopen na mikroskopické úrovni, je velmi citlivý na rozhraní molekula-rozpouštědlo [60]. Termoforetický efekt silně závisí na různých vlastnostech dané molekuly, jako je velikost, náboj, hydratační vrstva a konformace. Pokud dojde k vazbě, dochází také ke změně některé z těchto vlastností. Termoforéza je detekována pomocí fluorescenčního značení nebo vnitřní fluorescence jednoho z vazebných partnerů. Díky kombinaci přesnosti měření fluorescence s variabilitou a citlivostí termoforézy, je MST flexibilní a rychlou metodou k detekci a kvantifikaci vazeb mezi molekulami. Tato metoda je komplementární k metodám, jakými jsou povrchová rezonance plasmonu (SPR), která měří kinetiku vazby,

nebo kalorimetrickým metodám, které přímo studují k termodynamické vlastností interakce. Ovšem tyto metody vyžadují výrazně větší množství materiálu.

Termoforetický pohyb molekul je indukován generováním mikroskopického teplotního gradientu pomocí infračerveného (IR) laseru ve velmi tenkých skleněných kapilárách [61]. Tento gradient se pohybuje v teplotním rozmezí 2 až 6 °C a je zaostřen na průměr přibližně 50 μm. Ve stejné oblasti je termoforetický pohyb molekul sledován fluorescenční optikou. Po zahřátí putují molekuly buď pryč, nebo se kumulují ve středu teplotního gradientu, což může být kvantifikováno pomocí Soretova koeficientu, S_T (viz Rovnice 2).

Rovnice 2: Poměr koncentrací uvnitř (c_{hot}) a vně (c_{cold}) teplotního gradientu, vyjádřen pomocí Soretova koeficientu (S_T) a teplotního rozdílu napříč teplotním gradientem.

$$\frac{c_{hot}}{c_{cold}} = e^{-S_T \Delta T}$$

Na počátku je fluorescence v kapilárách měřena při fixní teplotě po dobu pěti sekund. Poté je indukován teplotní gradient pomocí IR laseru, což má za následek prudkou změnu měřeného fluorescenčního signálu, tzv. teplotní skok (T-jump) [61]. Tento skok signálu je důsledkem změny v kvantového výtěžku daného fluoroforu. Následně dochází k termoforéze (která je pomalejší než T-jump) a exponenciální změně fluorescenčního signálu způsobeného poklesem koncentrace molekul v místě ostření odpovídající Soretově koeficientu. Po 20 až 30 sekundách dochází k vypnutí IR laseru, což má za následek zpětnou termoforetickou difúzi molekul do, nebo z místa ostření doprovázenou reverzním teplotním skokem. Pro stanovení rovnovážné disociační konstanty (K_D) daného komplexu je třeba provést série měření, přičemž množství fluorescenčně značeného vazebného partnera se nemění a množství fluorescenčně neznačeného vazebného partnera se mění (tvoří se ředící řada, dochází tedy k titraci fluorescenčně neznačeným vazebným partnerem). Měření probíhá v 16 skleněných kapilárách, přičemž dochází k normalizaci s ohledem na počáteční fluorescenci. Rozsah koncentrací nefluorescenčně značeného vazebného partnera by měl být volen tak, aby nejnižší koncentrace byla v plně nevázaném stavu a nejvyšší v plně vázaném stavu s fluorescenčně značeným vazebným partnerem. Rozdíly mezi fluorescencí uvnitř (F_{hot}) a vně (F_{cold}) teplotního gradientu v každé kapiláře se používají ke stanovení změny fluorescence pro danou kapiláru. Tímto lze

získat ΔF_{norm} , kterou lze vyjádřit pomocí Rovnice 3. Vynesením těchto hodnot proti koncentraci nefluorescenčně značeného vazebného partnera vede k získání typické vazebné izotermy, kterou se získá K_D pro danou vazbu.

Rovnice 3: vyjádření ΔF_{norm} pomocí rozdílu fluorescencí uvnitř (F_{hot}) a vně (F_{cold}) teplotního gradientu v každé kapiláře.

$$\Delta F_{norm} = \frac{F_{hot}}{F_{cold}} \times 1000$$

2.4.4 Dynamický rozptyl světla - DLS

Dynamický rozptyl světla (DLS, z angl. Dynamic light scattering) je metoda optického měření, která se používá pro charakterizaci disperzního systému [62]. Při této technice dochází k vyhodnocování vysokofrekvenční fluktuace v rozptýleném světle, které odráží dynamiku mikrostrukturálních procesů, jako je např. seskupování částic v roztoku. Částice v roztoku se konstantě pohybují z důvodu translační difúze Brownova pohybu [63]. Pokud světlo prochází takovýmto roztokem, lze pozorovat kolísání intenzity rozptylu, což závisí na velikosti částic v roztoku. Čím menší částice, tím je rozptyl rychlejší a intenzita rozptylu rychleji kolísá. Analýzou autokorelace na základě rozdílné odchylky lze získat difúzní koeficient a z toho lze získat informaci o velikosti částic, přesněji o rozdělení hydrodynamického průměru částic v roztoku (tedy distribuci velikostí částic v roztoku). Pokud je k dispozici vhodný model optického a hydrodynamického chování, je možné převést na distribuci velikosti vážené číslem a objemem. DLS je metodou, kterou lze získat informaci o velikosti agregátů molekul, jako jsou mikročástice, povrchově aktivní látky (např. micely) a jiné.

Principem DLS je časově rozlišené měření koherentního světla rozptýleného částicemi. Signály jsou vyhodnocovány s ohledem na jejich výkyvy, které mohou mít několik původů [62]. Výkyvy, které jsou v řádech mikro- až nanosekund a jsou způsobeny tepelným pohybem částic, jsou vyhodnocovány během DLS měření. Měřený vzorek je osvětlován pomocí laserového paprsku a rozptylované světlo je měřeno pod definovaným úhlem θ . Rozptylový signál je buď přímo přijímán detektorem, nebo superponován referenčním paprskem. Detekovaný rozptýlený

signál je poté analyzován s ohledem na jeho fluktuaci a časovou škálu, která je určena Brownovým pohybem. Nejčastěji používané je přímé uspořádání (angl. direct/self-beating), přičemž vzorek je umístěn v kyvetě. Uspořádání v experimentech je také charakteristické úhlem rozptylu. Běžné přístroje pro měření DLS mají pevný úhel rozptylu buď ve směru do strany (90 stupňů), nebo dozadu (ve směru nebo blízko 180 stupňům). Mód MADLS (z angl. Multi-angled DLS, česky více-úhlový DLS) umožňuje změnu úhlu rozptylu v určitém rozsahu. MADLS může zlepšit kvalitu analýzy velikosti částic, protože snižuje rušivé účinky tvaru a koncentrace částic.

3 Cíle práce

- Přenesení vazebných proteinů Receptoru 1 z kvasinkového expresního systému do bakteriálního expresního systému
- Příprava rekombinantních vazebných proteinů Receptoru 1
- Charakterizace rekombinantních vazebných proteinů Receptoru 1 pomocí vybraných biofyzikálních metod
- Přenesení vazebných proteinů Receptoru 2 z kvasinkového expresního systému do bakteriálního expresního systému
- Příprava rekombinantních vazebných proteinů Receptoru 2
- Charakterizace rekombinantních vazebných proteinů Receptoru 2 pomocí vybraných biofyzikálních metod

4 Materiál

4.1 Laboratorní pomůcky

Monolith NT.115™ Standard Treated Capillaries	NanoTemper
50 ml zkumavky	Sarstedt
Centrifugační kyvety	Beckman Coulter
Erlenmayerova baňka	DURAN
HisTrap™ Excel (5 ml)	GE Healthcare
Kolona s maticí StrepTactin XT	IBA Lifesciences
Koncentrátor VIVASPIN 2	Sartorius
Kyvety na elektroporaci	Bio-Rad
Mikrozkumavky	Sarstedt
Nízkoobjemová křemenná kyveta (ZEN2112)	Malvern Panalytical
Petriho misky	Sarstedt
Pipety	Thermo Scientific
Prometheus NT.48 Capillaries	NanoTemper
Superdex® 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare
Špičky na pipety	Sarstedt

4.2 Roztoky, Chemikálie

Akrylamid	PanReac AppliChem
Agarosa	Peqlab Biotechnologie GmbH
Antibiotikum kanamycin	ForMedium
APS	Sigma-Aldrich

BD pufr	Solis BioDyne
Blasticidin	Invivogen
Coomassie brilliant blue	Sigma-Aldrich
dNTPs	AB ANALITICA
DTT	Sigma-Aldrich
Effectene Transfection Reagent	QIAGEN
Ethanol	PENTA
FBS	Gibco
Insect-XPRESS™ Protein-free Insect Cell Medium	Lonza
IPTG	ForMedium
Kyselina octová	Sigma-Aldrich
LB medium	ForMedium
MgCl ₂	Solis BioDyne
NaOH	Lachner
Pluronic F-127	NanoTemper
Q5 reakční pufr	New England BioLabs
SDS	Sigma-Aldrich
SmartCut	New England BioLabs
T4 pufr	New England BioLabs
TEMED	MP BIOMEDICALS

4.3 Pufry

Afinitní chromatografie Ni-NTA Receptoru 2:

- Ekvilibrační pufr: 50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl
- Promývací pufr: 50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol
- Eluční pufr: 50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol

Afinitní chromatografie StrepTactin XT:

- Promývací pufr: 100 mM Tris pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA
- Eluční pufr: 100 mM Tris, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 50 mM biotin

Gelová permeační chromatografie vazebných proteinů a Receptoru 2:

- Ekvilibrační pufr: 50 mM Tris, pH 8,0; 300 mM NaCl

Redukující vzorkový pufr: 10% SDS; 50% glycerol; 0,3 M Tris, pH 6,8; 0,05% Bromphenol blue; 20% β -merkaptoethanol

TUES: 50 mM Tris, pH 8,0; 8 M Močovina; 5 mM EDTA; 3% SDS

4.4 Enzymy

BamHI-HF	New England BioLabs
DpnI	New England BioLabs
FirePol polymerasa	Solis BioDyne
Lytikasa	Sigma-Aldrich
NcoI-HF	New England BioLabs
Q5 polymeráza	New England BioLabs
T4 ligasa	New England BioLabs

4.5 Komerční soupravy

BCS screen	Molecular Dimensions
Fun-n-Easy Plasmid Mini prep kit	Jena Bioscience
Monolith His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA	
2nd Generation	NanoTemper
NucleoSpin Gel and PCR clean up	Macherey-Nagel
SG1 screen	Molecular Dimensions

4.6 Buňky

Schneider S2 buňky

E. coli BL21(DE3)

E. coli TOP10

E. coli Clooni

4.7 Přístroje

Centrifuga Avanti JXN-30	Beckman Coulter
Centrifuga Alegria X-30R	Beckman Coulter
Elektroforetická souprava pro agarosovou elektroforézu	Bio-Rad
Elektroforetická souprava pro SDS elektroforézu	Bio-Rad
Elektroporátor MicroPulser	Bio-Rad
Chirascan Plus CD spectrometer	Applied Photophysics Limited
Inkubátor EN 055 ProFlex™	NÜVE
Krystalizační robot Crystal Gryphon	Art Robbins Instruments
NGC Chromatografický systém	Bio-Rad

Minicentrifuga Microcentrifuge 20	Beckman Coulter
Monolith NT.115	NanoTemper
Nanodrop UV/VIS Spektometr	DeNovix
Prometheus NT.48	NanoTemper
Předvážky	Kern
Přístroj na měření OD Ultrospec 10	Amersham Biosciences
Sonikátor	Q Sonica
Stolní třepačka	N-BIOTEK
Termoblok	BIOER
Termocyklér ProFlex™	Thermo Fisher Scientific
Třepačka Innova® 44/44R Incubator Shaker	New Brunswick
Zdroj napětí	Bio-Rad
Zetasizer Ultra	Malvern Panalytical

4.8 Primery

FW_Nstrep:

5'TGGTCTCATCCGCAGTTTGAAAAGGGCTCTCAGGGACCCGGGCAGCCTG 3'

FW_pET26_Nstrep:

5'TTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTGGTCTCATCCGCAGTTTGAAA 3'

pETup2:

5'GATGCGTCCGGCGTAGAGG 3'

RW_pET26_Nstrep:

5'GGATCCGAATTAATTCCGATATCCATGGCTTAGATGGAGCCCATGAATGGCC 3'

SH insert RW:

5'GCGGATGTTCTGCTGCGAGATGGAGCCCATGAATGGCCGG 3'

Skafold-cloning-for:

5'AAGTCCATGGCACAGGGACCCGGG 3'

Skafold-cloning-rev:

5'GTTCGGATCCGATGGAGCCCATGAATG 3'

T7 term:

5'GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'

T7-fw:

5'TAATACGACTCACTATAGGG 3'

4.9 Plasmidy

pCoBlast

pET26b

pETsm

5 Metody

5.1 VSTUPNÍ MATERIÁL

Všechny vazebné proteiny, se kterými bylo v této práci pracováno, byly vybrány pomocí kvasinkového displeje kolegyní Ing. Lucií Kolářovou v rámci jejího doktorského projektu. Vazebné proteiny obsahují náhodnou kombinaci mutací na předem vybraných deseti pozicích vybraného skafoldu (z angl. scaffold). Skafold, se kterým bylo pracováno, měl navržené dva různé vazebné povrchy (angl. interface), na kterých mohl být mutován. Klony, které vykazovaly vazbu, byly vybrány pomocí několika kol kvasinkového displeje. Pro vazebné proteiny Receptoru 1 byly prováděny mutace na obou těchto vazebných površích. Vazebné proteiny Receptoru 1, které vznikly mutací skafoldu na prvním vazebném povrchu A, jsou dále označovány R1A-X (kde X je číslo od 1 do 4 a značí číslo klonu). Vazebné proteiny Receptoru 1, které vznikly mutací na druhém vazebném povrchu B, jsou dále označovány R1B-X (kde X značí číslo klonu). Pro vazebné proteiny Receptoru 2 byla prováděna mutace pouze na jednom z vazebných povrchů. Vazebné proteiny Receptoru 2, které vznikly mutací skafoldu na prvním vazebném povrchu A, jsou dále označovány R2A-X (kde X značí číslo klonu).

5.2 KLONOVÁNÍ

5.2.1 Vazebné proteiny Receptoru 1 (označené R1A-X a R1B-X)

5.2.1.1 *Izolace DNA z kvasinek*

50 ml zkumavky s kvasinkami obsahující knihovnu vazebných proteinů byly stočeny při 15 °C po dobu 5 minut na 3000 × g. Poté byl supernatant odlit. Ke stočeným kvasinkám bylo přidáno 400 µl lytikasy a 2 µl DTT. Reakční směs byla míchána 2 hodiny na míchačce. Poté byla použita komerční souprava na purifikaci DNA od firmy Jena Bioscience. Eluce byla provedena 30 µl dH₂O.

5.2.1.2 *Transformace pomocí elektroporace*

Alikvot 50 µl elektrokompetentních buněk *E. coli* Clooni byl ponechán 20 minut na ledu do rozmrznutí. Poté byly k buňkám přidány 3 µl DNA vyizolované z kvasinek. Poté byla směs buněk a DNA přenesena do předchlazených kyvet na elektroporaci. Elektroporátor byl nastaven

dle typu buněk a typu kyvety. Poté, co byl buňkám dán pulz, bylo ihned přidáno 400 μ l LB media, přeneseny do mikrozkušavky a poté ponechány třepat ve stolní třepačce při 37 °C po dobu 1 hodiny. Poté byly nanесeny pomocí hokejky na agarové kanamycinové misky a ponechány inkubovat přes noc ve 37 °C.

5.2.1.3 Maloobjemová produkce DNA z bakterií

Z misky (jedna miska na každý vazebný povrch) byly odpíchnuty 4 kolonie do 50 ml zkumavek s 2 ml LB media s kanamycinem. Poté byla použita komerční souprava na purifikaci DNA od firmy Jena Bioscience. Eluce byla provedena 30 μ l dH₂O.

5.2.1.4 Prodlužovací reakce – prodloužení konstruktů o streptavidinovou kotvu

První reakce klonování měla za úkol prodloužit gen o streptavidinovou kotvu na N-konci a zmnožit tento prodloužený gen. Jedná se o tzv. PCR reakci (z angl. polymerase chain reaction, polymerasová řetězová reakce). Templátem pro tuto reakci byla DNA vyizolovaná z kvasinek z předchozího kroku a také WT (z angl. Wild Type, jedná se o nezměněnou podobu genu daného skafoldu). Složení reakce je uvedeno v Tabulce 1. Reakční směsi byly pipetovány do 0,2 ml zkumavek. Do každé zkumavky byla pipetovaná dH₂O, reakční pufr, templátová DNA, příslušné primery (výsledná koncentrace 0,5 μ M), roztok směsi dNTPs a polymerasa Q5. Tyto zkumavky byly poté vloženy do termocykléru a byl nastaven program cyklů, viz Tabulka 2, str. 46. Po posledním cyklu byly mikrozkušavky se vzorky vyjmuty a byla s nimi provedena elektroforéza v agarosovém gelu.

Tabulka 1: Složení reakční směsi první prodlužovací reakce

Komponenta	Objem (μ l)
5x Q5 pufr	10
2,5 mM dNTPs	5
FW primer - FW_Nstrep	2,5
RW primer - SH insert RW	2,5
Templát	0,5
Q5 polymerasa	0,5
H ₂ O	29

Tabulka 2: Nastavení termocykléru na první prodlužovací reakci

Teplota	čas	Počet cyklů
95 °C	5 min	1×
98 °C	20 sec	25×
65 °C	30 sec	
72 °C	1 min 30 sec	
72 °C	6 min	1×
4 °C	∞	

5.2.1.5 První reakce Restriction free klonování – klonování bez použití restričních enzymů

První reakce Restriction free klonování měla za účel vytvořit přesahy na plasmid, tedy vytvoření tzv. megaprimeru a zmnožit tento prodloužený gen. Templátem této reakce byly DNA z prodlužovací reakce (viz Podkapitola 5.2.1.4, str. 45). Složení reakce je uvedeno v Tabulce 3. Reakční směsi byly pipetovány do 0,2 ml zkumavek. Do každé zkumavky byla pipetovaná dH₂O, reakční pufr, templátová DNA, příslušné primery (výsledná koncentrace 0,5 μM), roztok směsi dNTPs a polymerasa Q5. Tyto zkumavky byly poté vloženy do termocykléru a byl nastaven program cyklů, viz Tabulka 4, str. 47. Po posledním cyklu byly mikrozkušavky vyjmuty. Z každé zkumavky bylo odebráno 10 μl, ty byly smíchány se vzorkovým pufrem a byla s nimi provedena elektroforéza v 1% agarosovém gelu, čímž bylo zkontrolováno, že reakce proběhla úspěšně.

Tabulka 3: Složení reakční směsi první RF reakce

Komponenta	Objem (μl)
5x Q5 pufr	10
2,5 mM dNTPs	5
FW_pET26_Nstrep	2,5
RW_pET26_Nstrep	2,5
Templát	0,5
Q5 polymerasa	0,5
dH ₂ O	29

Tabulka 4: Nastavení termocykléru na první RF reakci

Teplota	čas	Počet cyklů
95 °C	5 min	1×
98 °C	20 sec	25×
68 °C	30 sec	
72 °C	1 min 30 sec	
72 °C	6 min	1×
4 °C	∞	

5.2.1.6 Izolace DNA z PCR směsi

Zbylá DNA ze 40 µl reakční směsi (viz Podkapitola 5.2.1.5, str. 46) byla izolována pomocí komerční soupravy Nucleospin Gel and PCR clean up. Eluce byla provedena pomocí 30 µl dH₂O.

5.2.1.7 Druhá reakce Restriction free klonování – klonování bez použití restrikčních enzymů

Pro vnesení genu do plasmidu byla použita PCR reakce, ve které samotný gen figuroval jako tzv. megaprimer, jenž byl vytvořen v předchozí první reakci. Jedná se o gen prodloužený o přesahy na plasmid na obou stranách (tedy jak na 5', tak 3' konci). Složení reakce uvedeno v Tabulce 5. Reakční směsi byly pipetovány do 0,2 ml zkumavek. Do každé zkumavky byla pipetovaná dH₂O, reakční pufr, megaprimer, plasmid pET26b, roztok směsi dNTPs a polymerasa Q5. Tyto zkumavky byly poté vloženy do termocykléru a byl nastaven program cyklů, viz Tabulka 6, str. 48.

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro druhou FR reakci

Komponenta	Objem
pET26b	20 ng
Megaprimer	100 – 150 ng
Q5 pufr	10 µl
dNTPs	5 µl
Q5 polymerasa	0,5 µl
dH ₂ O	Doplněno do 50 µl

Tabulka 6: Nastavení termocykléru na druhou RF reakci

Teplota	čas	Počet cyklů
95 °C	5 min	1×
98 °C	20 sec	20×
65 °C	30 sec	
72 °C	5 min	
72 °C	10 min	1×
4 °C	∞	

5.2.1.8 DpnI reakce

K PCR produktům po proběhnutí všech cyklů v termocykléru při Restriction free klonování bylo přidáno 1 μ l enzymu DpnI, aby byl odstraněn původní plasmid (bez vloženého insertu). Reakce byla ponechána probíhat ve 37 °C po dobu 2,5 hodin. Poté byly vzorky ponechány v 80 °C po dobu 20 minut, aby byl enzym inaktivován.

5.2.1.9 Transformace do bakterií

Alikvot 50 μ l elektrokompetentních buněk *E. coli* Clooni byl ponechán 20 minut na ledu do rozmrznutí. Poté bylo k buňkám přidáno 1,5 μ l DNA po DpnI reakci. Poté byl alikvot buněk smíchaný s DNA přenesen do předchlazených kyvet na elektroporaci. Elektroporátor byl nastaven dle typu buněk a typu kyvety. Poté, co byl buňkám dán pulz, bylo ihned přidáno 400 μ l LB media a buňky byly poté ponechány třepat ve stolní třepačce při 37 °C po dobu 1 hodiny. Poté byly nanесeny pomocí hokejky na LB agarové kanamycinové misky a ponechány inkubovat přes noc ve 37 °C. Pro srovnání byla vedle transformace pomocí elektroporace pro některé konstrukty provedena také chemická transformace. Alikvot 50 μ l kompetentních buněk *E. coli* TOP10, který byl hluboce zmražen, byl ponechán 20 minut na ledu do rozmrznutí. Poté bylo k buňkám přidáno 5 μ l DNA po DpnI reakci. Buňky smíchané s DNA byly ponechány na ledu po dobu 30 minut. Poté byl proveden tepelný šok. Směs buněk a DNA byla přemístěna do 42 °C na 45 sekund a poté vrácena na 3 minuty na led. Po uplynutí 3 minut bylo k směsi přidáno 400 μ l LB media a buňky byly ponechány třepat ve třepačce při 37 °C po dobu 1 hodiny. Poté byly nanесeny pomocí hokejky na LB agarové kanamycinové misky a ponechány inkubovat přes noc ve 37 °C.

5.2.1.10 PCR z kolonií

Z každé misky byly vybrány tři kolonie. Do již napipetované reakční směsi (viz Tabulka 7) byla pomocí špičky u kahanu přenesena jednotlivá kolonie. Tou samou špičkou bylo také provedeno přečárkování na čistou LB agarovou kanamycinovou misku. Miska byla poté umístěna přes noc do 37 °C. Do jedné reakční směsi byl připipetován 1 µl plasmidu pET26b, což sloužilo jako negativní kontrola. Reakční směsi byly pipetovány do 0,2 ml zkumavek. Poté byly tyto zkumavky vloženy do termocykléru a byl nastaven program, viz Tabulka 8. Poté byly vzorky smíchané se vzorkovým pufrům a napipetovány do 1% agarosového gelu. Pomocí PCR z kolonií bylo zjištěno, jestli bylo vložení insertů do plasmidu úspěšné.

Tabulka 7: Složení reakční směsi pro PCR z kolonií

Komponenta	Objem (µl)
10x BD pufr	1,5
2,5mM dNTPs	1,2
25mM MgCl ₂	1,5
FW – pETup2	0,75
BW – T7 term	0,75
FirePol Polymerasa	0,075
H ₂ O	9,3

Tabulka 8: Nastavení termocykléru pro PCR z kolonií

Teplota	čas	Počet cyklů
95 °C	5 min	1×
95 °C	30 sec	30×
55 °C	30 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1×
4 °C	∞	

5.2.1.11 Maloobjemová produkce DNA

Dle velikosti konstruktů po PCR z kolonií, které byly ověřeny pomocí agarosové elektroforézy, byla za každý konstrukt vždy vybrána jedna kolonie a z přečárkované misky bylo malé množství narostlých bakterií přeneseno do 2 ml LB media s kanamycinem. Buňky byly ponechány přes noc třepat ve 37 °C. Poté byla použita komerční souprava na purifikaci DNA od firmy Jena Bioscience. Eluce byla provedena 30 µl dH₂O.

5.2.1.12 Sekvence

Za každý konstrukt byla vybrána vždy jedna kolonie, ze které byla připravena maloobjemová produkce DNA. Z těchto roztoků DNA byl připraven vzorek na sekvenaci. Sekvenační mix se vždy skládal z 2,5 µl 10 mM primeru pETup2. Dále byl každý vzorek zředěn vodou tak, aby se množství DNA pohybovalo v rozmezí 400 až 500 ng v daném vzorku. Celkový objem reakce byl 10 µl. Vzorky byly zpracovány firmou Eurofins (Německo).

5.2.2 Vazebné proteiny Receptoru 2 (označené R2A-X)

5.2.2.1 Transformace knihovny klonů a WT

Vedle transformace knihovny DNA klonů cílených na Receptor 2 byla stejným způsobem transformována také DNA nemutované verze používaného skafoldu, tzv. Wild Type (dále WT). Použita byla chemická transformace do kompetentních buněk *E. coli* TOP10. Postup stejný jako v Podkapitole 5.2.1.9, str. 48. Použita byla vedle chemické transformace také transformace pomocí elektroporace. Postup byl stejný jako v Podkapitole 5.2.1.2, str. 44.

5.2.2.2 Maloobjemová produkce DNA

Z misky s WT byla odpíchnuta jedna kolonie a z misky s knihovnou bylo odpíchnuto osm klonů do 10 ml zkumavek s 2 ml LB media s kanamycinem. Zkumavky s přenesenými buňkami byly ponechány třepat přes noc ve 37 °C. Poté byla použita komerční souprava na purifikaci DNA od firmy Jena Bioscience. Eluce byla provedena 30 µl dH₂O.

5.2.2.3 Zmnožení DNA insertu pomocí PCR reakce

K namnožení inzerťů DNA byla použita metoda PCR reakce (z angl. polymerase chain reaction, polymerasová řetězová reakce). Do mikrozkušavky byly pipetovány roztoky,

jak je uvedeno v Tabulce 9. Do každé zkumavky byla pipetovaná dH₂O, reakční pufr, templátová DNA, příslušné primery (výsledná koncentrace 0,5 μM), roztok směsi dNTPs a polymerasa Q5. Pipetované množství templátové DNA ve směsi bylo vždy 100 – 200 ng. Zkumavky se vzorky byly poté umístěny do termocykléru, na kterém byly nastaveny délky, opakování, teploty jednotlivých cyklů a objem zkumavky (uvedeno v Tabulce 10). Po posledním cyklu byly mikrozukavky se vzorky vyjmuty a byla s nimi provedena elektroforéza v 1% agarosovém gelu.

Tabulka 9: Složení reakční směsi pro PCR reakci

Komponenta reakce	Objem (μl)
H ₂ O	29,5
5x Q5 pufr	10
2,5 mM dNTPs	4
10 μM FW primer skafold-cloning-for	2,5
10 μM REV primer skafold-cloning-rev	2,5
DNA teplát	1
Q5 polymerasa	0,5

Tabulka 10: Nastavení termocykléru na PCR reakci

Teplota	čas	Počet cyklů
98 °C	30 s	1×
98 °C	10 s	30×
61 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	10 min	1×
4 °C	∞	

5.2.2.4 Izolace DNA z gelu

Proužky na gelu odpovídající velikosti byly vyříznuty, přeneseny do mikrozukavek a poté byla na izolaci DNA z gelu použita komerční souprava Nucleospin Gel and PCR clean up. Eluce byla provedena pomocí 30 μl dH₂O.

5.2.2.5 Štěpení insertu a plasmidu pomocí restrikčních enzymů

Aby bylo možné vnést insert do plasmidu, musel být plasmid linearizován. Také musely být vytvořeny přesahy, a to jak na plasmidu, tak na insertech. Proto bylo použito štěpení pomocí restrikčních enzymů. Jako restrikční enzymy byly použity NcoI-HF a BamHI-HF. Složení štěpící reakce je uvedeno v Tabulce 11. Takto pipetované reakce byly poté inkubovány při 37 °C po dobu 2 hodin. Poté byla použita komerční souprava Nucleospin Gel and PCR clean up, aby se vzorky zbavily restrikčních enzymů. Eluce byla provedena pomocí 30 µl dH₂O.

Tabulka 11: Složení štěpící reakce pro inserty a plasmid

Komponenta	Pro Insert a pETsm
H ₂ O	6 µl
DNA	1,5-2 µg
10x SmartCut	4 µl
NcoI-HF	1 µl
BamHI-HF	1 µl
Celkový objem	40 µl

5.2.2.6 Ligační reakce

K vložení insertu do plasmidu byla použita ligační reakce. Pro každý insert byla pipetována reakce do 0,6 ml zkumavek. Složení ligační reakce je uvedeno v Tabulce 12. Takto napipetované reakce byly inkubovány po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě.

Tabulka 12: Složení ligační reakce

Komponenta	Objem (µl)
H ₂ O	14,5
T4 pufr	2
Plasmid - pETsm	2
Insert	0,5
T4 ligasa	0,5

5.2.2.7 Chemická transformace ligovaných konstruktů

Poté co proběhla ligační reakce byly ligované konstrukty ihned transformovány do kompetentních buněk *E. coli* TOP 10. Postup viz Podkapitola 5.2.1.9, str. 48.

5.2.2.8 PCR z kolonií

Z každé misky z přechozího kroku byly vybrány tři kolonie. Zbytek postupu viz Podkapitola 5.2.1.10, str. 49. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 13. Nastavení cyklů termocykléru je uvedeno v Tabulce 14. Poté byly vzorky smíchané se vzorkovým pufrem a napipetovány do 1% agarosového gelu. Pomocí PCR z kolonií bylo zjištěno, jestli bylo vložení insertů do plasmidu úspěšné.

Tabulka 13: Složení rekační směsi pro PCR z kolonií

Komponenta	Objem (μl)
H ₂ O	9.3
10x BD Pufr	1.5
25 mM MgCl ₂	1.5
2,5 mM dNTPs	1.2
10 μM FW primer – T7-fw	0.75
10 μM BW primer – T7-term	0.75
FirePol Polymerasa	0.075

Tabulka 14: Nastavení termocykléru pro PCR z kolonií

Teplota	čas	Počet cyklů
95°C	5 min	1×
95°C	30 s	30×
55 °C	30 s	
72 °C	40 s	
72 °C	10 min	1×
4 °C	∞	

5.2.2.9 Maloobjemová produkce DNA

Postup stejný viz Podkapitola 5.2.1.11, str. 50.

5.2.2.10 Sekvence

Postup stejný viz Podkapitola 5.2.1.12, str. 50.

5.3 PĚSTOVÁNÍ A SKLIZENÍ PRODUKCE

5.3.1 Chemická transformace do *E. coli* BL21(DE3)

Alikvot 50 ml kompetentních buněk *E. coli* BL21(DE3). Postup stejný jako v Podkapitole 5.2.1.9, str. 48.

5.3.2 Pěstování

Do 50 ml zkumavky s 5 ml LB media s kanamycinem bylo opatrně ve sterilním boxe přeneseno vždy pár kolonií transformovaných *E. coli* BL21(DE3) buněk a poté byly ponechány třepat ve 37 °C do rána dalšího dne. Tím byla připravena noční kultura. Další den ráno byly do Erlenmayerovy baňky s 250 ml LB media zaočkovány 2 ml noční kultury. Erlenmayerovy baňky byly ponechány třepat na 180 rpm ve 30 °C do té doby, kdy OD dosáhlo hodnoty 0,6. Poté byly zaindukovány 250 µl IPTG (finální koncentrace byla 1 mM). Po indukci byla teplota snížena na 20 °C a buňky byly ponechány třepat do dalšího rána.

5.3.3 SDS-PAGE po produkci

Z každé produkce byl druhý den odebrán 1 ml buněk před tím, než byly buňky stočeny, viz Podkapitola 5.3.4, str. 55. Buňky byly v 1,5 ml zkumavkách stočeny ve stolní centrifuze při pokojové teplotě na 16000 × g po dobu 3 minut. Poté byl odlit supernatant a buňky byly resuspendovány v 200 µl pufru TUES. Z každé zkumavky bylo poté odebráno 10 µl a bylo k ním přidáno 2,5 µl redukujícího pufru. Takto připravené vzorky byly inkubovány při 95 °C po dobu 5 minut a poté byly centrifugovány při pokojové teplotě na 16000 × g po dobu 5 minut. Do jamek gelu bylo vždy pipetováno 5 µl standardu a do dalších jamek 10 µl vzorku. Elektroforéza probíhala 50 minut při napětí 200 V.

5.3.4 Sklizení produkce

Buňky byly přelity do centrifugačních kyvet a v centrifuze stočeny při 5 °C na 5000 × g po dobu 20 minut. Poté byl odlit supernatant a buňky byly resuspendovány v 30 ml pufru (25 mM Tris, pH 8) a poté opět stočeny při 5 °C na 5000 × g po dobu 20 minut. Poté byl supernatant opět odlit a peleta buněk uskladněna při teplotě -20 °C, jelikož purifikace proběhla až v následujících dnech.

5.4 PURIFIKACE

5.4.1 Rozbíjení bakteriálních buněk pomocí sonikace

Zamražené pelety byly ponechány rozmraznout. Poté byly resuspendovány v 15 ml pufru (100 mM Tris, pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) v 50 ml zkumavkách. Zkumavka byla vložena na led do sonikátoru a sonda sonikátoru byla vložena do vzorku tak, aby se nedotýkala stěn. Sonikátor byl nastaven na amplitudu 2. Celkový čas sonikace byl nastaven na 3 minuty, s tím že „ON time“ (čas pulzu) byl 2 sekundy a „OFF time“ (čas bez pulzu) byl nastaven na 4 sekundy. Po sonikaci byly buňky stočeny při teplotě 3 °C na 40000 × g po dobu 30 minut.

5.4.2 Purifikace na streptactinové koloně

První krok dvoustupňové purifikace byl prováděn při pokojové teplotě na koloně obsahující 1 ml matrice StrepTactin XT. Kolona byla v lednici skladována ve 20% ethanolu, který byl ponechán vykapat. Následně byla kolona promyta 5 ml promývacího pufru (100 mM Tris, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) a tím také ekvilibrována. Na kolonu byl nanesen supernatant, viz Podkapitola 5.4.1 a ponechán prokapat. Poté bylo provedeno promytí 5 ml promývacího pufru. Eluce byla prováděná 3 různými objemy elučního pufru (100 mM Tris, pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 50 mM biotin) – 1. 0,6 ml, 2. 1,6 ml a 3. 0,8 ml. Po eluci byla kolona promyta 5 ml 10 mM NaOH a poté 4 ml promývacího pufru. Dále byla kolona promyta 20% ethanolem, v němž byla také následně skladována při teplotě 4 °C.

5.4.3 Zakoncentrování proteinů a gelová permeační chromatografie

Proteiny, získané purifikací na streptactinových kolonách, byly zakoncentrovány pomocí koncentrátorů VIVASPIN 2 (velikost pórů 5 kDa, membrána Hydrosart). Membrána kolonky koncentrátoru byla nejprve smočena 2 ml promývacího pufru (100 mM Tris, pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA). Poté byly nanesen vzorky. Koncentrátory s nanesenými vzorky byly centrifugovány při 15 °C na 6000 × g po dobu 5 minut. Toto bylo opakováno do té doby, kdy objem v kolonce koncentrátoru dosáhl 0,5 ml.

Samotná gelová permeační chromatografie byla prováděna na koloně Superdex® 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare). Kolona byla ekvilibrována do PBS (v případě vazebných proteinů Receptoru 1) a do 50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl (v případě vazebných proteinů Receptoru 2). Poté byla promyta nástřiková smyčka, také odpovídajícím pufrem. Pomocí

injekční stříkačky byl do nástřikového ventilu nanesen vzorek a průtok byl nastaven na 0,7 ml/min. Frakce byly jímány do předem připravených sterilních mikrozkušavek. Poté, co proběhla chromatografie, byla kolona promyta 0,5 M hydroxidem sodným, destilovanou vodou, 1 M kyselinou octovou a poté opět vodou. Kolona byla poté uskladněna ve 20% ethanolu.

5.4.4 SDS-PAGE

Pomocí elektroforézy v 15% polyakrylamidovém gelu byla ověřena čistota získaných proteinů. Složení gelů viz Tabulka 15.

Tabulka 15: Složení 15% gelu na SDS-page - množství na 1 gel

Zaostřovací gel		Separační gel – 15%	
dH ₂ O	1,23 ml	dH ₂ O	0,55 ml
30% Akrylamid	266 µl	30% Acrylamid	2,5 ml
1 M Tris pufr (pH 6,8)	200 µl	1 M Tris pufr (pH 8,8)	1,87 ml
10% SDS	60 µl	10% SDS	50 µl
25% APS	20 µl	25% APS	12,5 µl
TEMED	5 µl	TEMED	12,5 µl

Za každý protein byly vybrány nejkonzentrovější frakce, které se velikostně shodovaly s WT. Z každé zkumavky bylo odebráno 10 µl a bylo k ním přidáno 2,5 µl redukujícího pufru. Takto připravené vzorky byly inkubovány při 95 °C po dobu 5 minut a poté byly centrifugovány při pokojové teplotě na 16000 × g po dobu 5 minut. Do jamek gelu bylo vždy pipetováno 5 µl standardu a do dalších jamek 10 µl vzorku. Elektroforéza probíhala 50 minut při napětí 200 V. Gel byl obarven pomocí barvicího roztoku Coomassie brilliant blue. A poté odbarven pomocí směsi ethanolu a vody.

5.5 CHARAKTERIZACE PROTEINŮ BIOFYZIKÁLNÍMI METODAMI

5.5.1 Měření teplotní stability proteinů

Pro měření termostability vazebných proteinů byl použit přístroj Prometheus NT.48. Vzorky pro vazebné proteiny Receptoru 1 byly připraveny tak, aby objem vzorku byl 20 μ l a výsledná koncentrace proteinu byla 0,3 mg/ml. Jako pufrы pro měření byly zvoleny PBS a PBS s 0,05% Pluronicem F-127. Vzorky pro vazebné proteiny Receptoru 2 byly připraveny tak, aby objem vzorku byl 20 μ l a výsledná koncentrace proteinu byla 0,15 mg/ml. Jako pufrы byly zvoleny 50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl a 50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl s 0,05% Pluronicem F-127. Měření probíhalo v rozmezí teplot 20 °C až 95 °C, přičemž růst teploty byl nastaven vždy o 1 °C za minutu.

5.5.2 Cirkulární dichroismus - CD

S proteiny bylo provedeno CD měření. Vzorky na toto měření byly připraveny tak, že roztoky proteinů byly zředěny v PBS (pro vazebné proteiny Receptoru 1) nebo destilované vodě (pro vazebné proteiny Receptoru 2), aby výsledná koncentrace byla rovna 0,1 mg/ml. Samotné měření bylo prováděno paní Tatsianou Charnavets, Ph.D na přístroji Chirascan Plus CD spectrometer.

5.5.3 Dynamický rozptyl světla - DLS

Dále bylo s proteiny provedeno měření DLS (z angl. Dynamic Light Scattering) na přístroji Zetasizer Ultra. Toto měření bylo provedeno za účelem kontroly, jak veliké „částice“ a v jakém zastoupení se ve vzorku vyskytují. Tedy zkontrolovat, zda nedošlo k agregaci proteinu. Vzorky vazebných proteinů Receptoru 1 byly na toto měření připraveny tak, aby výsledná koncentrace v 50 μ l činila 0,6 mg/ml. Vzorky byly ředěny PBS. Takto připravený vzorek byl přenesen do nízkoobjemové křemenné kyvety (ZEN2112). Vzorky byly měřeny v módu MADLS (z angl. Multi-Angle Dynamic Light Scattering).

Vybrané vazebné proteiny Receptoru 2, které se na gelové permeační chromatografii chovali jako WT (jednalo se o proteiny R2A-1, R2A-2, R2A-7 a R2A-8) byly před tímto měřením zakonzentrovány stejným způsobem, jaký je uvedený v Podkapitole 5.4.3, str. 56. Zbylé vazebné proteiny byly měřeny v původních koncentracích. 50 μ l roztoku proteinu o dané

koncentraci byl přenesen do nízkoobjemové křemenné kyvety (ZEN2112). Vzorčky byly měřeny opět v módu MADLS.

5.5.4 Mikrotermoforéza - MST

Pro kvantifikaci interakce mezi vazebnými proteiny a molekulou receptoru, tedy stanovení K_D , byla zvolena metoda MST (z angl. Microscale Thermophoresis). Pro toto měření byl použit přístroj Monolith NT.115 od firmy Nanotemper. Jako esejový pufr byl použit buď PBS pufr s 0,05% Pluronicem F-127 (pro vazebné proteiny Receptoru 1) nebo 50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl; 0,1% Pluronic F-127 (pro vazebné proteiny Receptoru 2). Nejprve bylo provedeno barvení receptoru pomocí soupravy Monolith His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA 2nd Generation od firmy Nanotemper. K barvičce bylo nejprve přidáno 50 μ l esejového pufru a poté byla zředěna na výslednou koncentraci 100 nM. Receptor byl zředěn na koncentraci 200 nM a poté byl smíchán se zředěnou barvičkou v poměru 1:1. Takto připravený vzorek byl ponechán barvit při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Poté byl stočen v chlazené stolní minicentrifuze při 4 °C na 15000 \times g po dobu 10 minut. 2 \times 20 μ l obarveného receptoru bylo přepipetováno do 0,2 ml zkumavky a poté nataženo do dvou standardních kapilár (Monolith NT.115™ Standard Treated Capillaries). Poté byl proveden kontrolní sken těchto kapilár pouze s obarveným receptorem, aby bylo zkontrolováno, že obarvený receptor neinteraguje se stěnami kapilár. Dále bylo připraveno 16 0,2 ml zkumavek. Do 2. – 16. zkumavky bylo pipetováno 10 μ l pufru. Do první bylo pipetováno 19,6 μ l proteinu o dané koncentraci a 0,4 μ l 5% Pluronicu. Z první zkumavky bylo odebráno 10 μ l a smícháno s pufrům v druhé zkumavce. Z druhé zkumavky bylo odebráno 10 μ l a poté smícháno ve 3. zkumavce. Tímto způsobem bylo pokračováno dál a byla vytvořena ředící řada. Do každé zkumavky bylo poté přidáno 10 μ l fluorescenčně obarveného receptoru. Takto připravené vzorky byly postupně nataženy do kapilár a vloženy do přístroje. Přístroj byl nastaven na „síla MST“ – MEDIUM (40 %), „excitační síla“ na Auto.

5.6 KRYSTALIZACE

5.6.1 Zakoncentrování proteinů

Vybrané vazebné proteiny Receptoru 1 (R1A-1, R1A-2 a R1B-3) byly zkoncentrovány pomocí koncentrátorů VIVASPIN 2 (velikost pórů 5 kDa, membrána Hydrosart). Membrána kolonky koncentrátoru byla nejprve smočena 2 ml pufru (50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl). Poté byly do kolonek nanášeny vzorky. Koncentrátory s nanesenými vzorky byly centrifugovány při 15 °C na 6000 × g po dobu 5 minut. Po každém stočení byl zbytek vzorku doplněn pufrům - 50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, aby byly proteiny tímto způsobem postupně převedeny do tohoto pufru. Tento postup byl několikrát opakován. Poté byly vzorky točeny při 15 °C na 6000 × g po dobu 5 minut a to do té doby, dokud objem vzorku v koncentrátoru neklesl na 0,1 ml.

5.6.2 Nasazování krystalů

Pro krystalizaci byla zvolena metoda sedící kapky. Jelikož se jednalo o první krystalizaci těchto proteinů, byly použity dva komerční sety (screeny) – SG1 a BCS. Jak roztoky, tak protein byl pipetován pomocí krystalizačního robota Crystal Gryphon, který byl obsluhován RNDr. Jiřím Pavlíčkem, Ph.D.. Byly nasazovány 3 různé poměry proteinu k precipitantu (2:1, 1:1, 1:2). Celkový objem podmínky činil 100 µl a objem kapky byl 0,2 µl.

5.7 PĚSTOVÁNÍ A PURIFIKACE RECEPTORU 2

5.7.1 Pěstování

Receptor 2 byl pěstován v hmyzích buňkách S2 paní Bc. Markétou Janovskou. Konstrukt byl klonován a purifikován stejným způsobem, jaký je uvedený ve článku *Crystal structure of human interferon- γ receptor 2 reveals the structural basis for receptor specificity* (Mikulecky, 2016) [64]. Expresní vektor byl kotransfekován do hmyzích buněk S2 spolu se selekčním plasmidem pCoBlast za použití Effectene Transfection Reagent dle pokynů výrobce. Blastocidin-rezistentní S2 buňky byly vybrány pěstováním buněk v Insect-XPRESS™ Protein-free Insect Cell Medium (Lonza) médiu doplněném 10% FBS a 25 µg/ml blastocidinu S. Expres proteinu ve velkém měřítku byla dosažena po expanzi a výměně media za Insect-XPRESS™ Protein-free Insect Cell Medium (Lonza). Expres proteinu byla

indukována přidáním 0,75 mM CuSO₄ po dobu 6 dní. Buňky byly poté odstraněny centrifugací a medium s exprimovaným proteinem uskladněno při teplotě -80 °C.

5.7.2 Purifikace

Zamražený roztok média byl ponechán rozmraznout ve vodní lázni o teplotě 30 °C. Poté byly k roztoku přidány CaCl₂ (výsledná koncentrace 5 mM), NiSO₄ (výsledná koncentrace 1 mM), Tris pH 8 (výsledná koncentrace 50 mM) a NaCl (výsledná koncentrace 300 mM). Poté byl roztok ponechán inkubovat hodinu při pokojové teplotě. Dalším krokem bylo stočení buněk při 4 °C na 5000 × g po dobu 30 minut. Supernatant byl opatrně přelit do sterilní lahve pro dvoustupňovou purifikaci.

Prvním krokem purifikace byla afinitní chromatografie. Afinitní chromatografie byla prováděna na koloně HisTrap™ Excel (5 ml) s navázanými nikelnatými ionty. Protein se na kolonu vázal pomocí histidinové kotvy. Kolona byla ekvilibrována do ekvilibračního pufru (50mM Tris, pH 8; 300mM NaCl) a průtok byl nastaven na 5 ml/min. Poté co byl nanesen vzorek kultivačního média a kolona promyta promývacím pufrem (50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol), byl protein eluován pomocí elučního pufru (50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol) a frakce byly sbírány do předem připravených zkumavek. Poté co byla ukončena eluce, byla kolona promyta ekvilibračním pufrem, poté vodou a následně převedena do 20% ethanolu.

Receptor 2, získaný purifikací na Ni-NTA kolonách, byl zakoncentrován na koncentrátoru VIVASPIN 2 (velikost pórů 10 kDa, membrána Hydrosart). Postup stejný jako v Podkapitole 5.4.3, str. 56. Druhým stupněm purifikace byla gelová permeační chromatografie. Samotná gelová permeační chromatografie byla prováděna v koloně Superdex® 200 Increase 10/300 GL GE Healthcare. Kolona byla ekvilibrována do 50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl. Postup stejný jako v Podkapitola 5.4.3, str. 56. Čistota získaného proteinu byla po obou krocích purifikace ověřena pomocí metody SDS-PAGE.

6 Výsledky

6.1 VAZEBNÉ PROTEINY RECEPTORU 1

6.1.1 Klonování

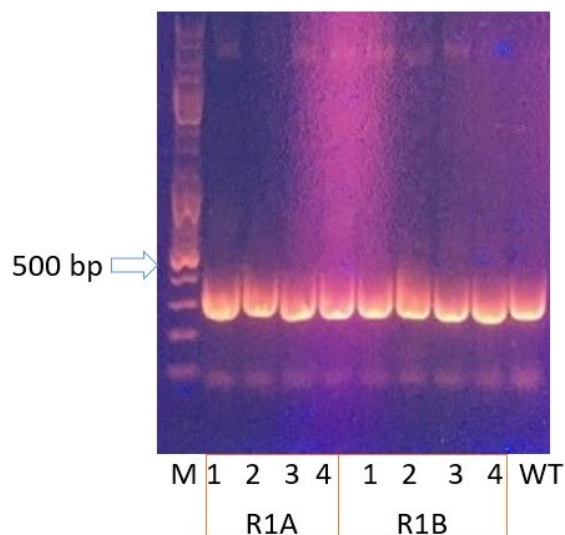
Finální DNA knihovny, které obsahují varianty proteinového skafoldu selektované metodou kvasinkového displeje, byly izolovány z kvasinek a transformovány do kompetentních buněk bakterií *E. coli* Clooni. Cílem bylo získat DNA jednotlivých variant, jež byla izolována z bakterií pomocí komerční soupravy na izolaci DNA. Konkrétní sekvence daných DNA konstruktů byla zjištěna sekvenací.

Jednotlivé geny kódující varianty vazebných proteinů byly PCR reakcí prodlouženy o streptavidinovou purifikační kotvu na N-konci. Složení pro tuto reakci je popsáno v Tabulce 1, str. 45. DNA fragmenty o předpokládané velikosti 300 bp byly ověřeny elektroforézou v 1% agarosovém gelu. Výsledek elektroforézy je uveden na Obrázku 9, str. 62. Poté byly tyto zmnožené úseky DNA vyextrahovány z gelu.

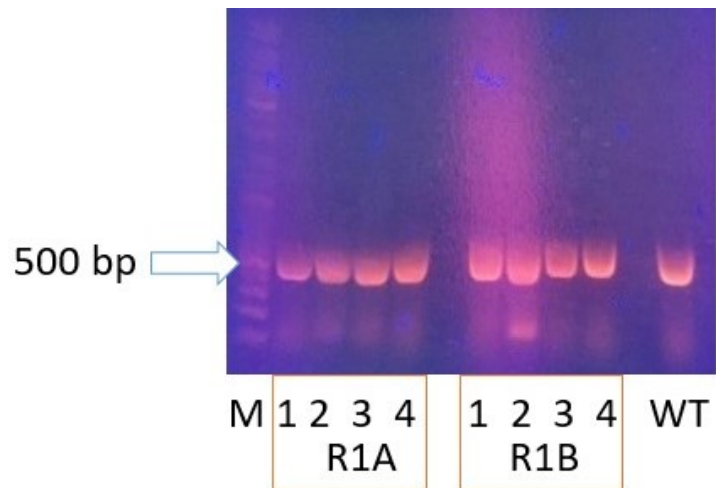
Pro vnesení jednotlivých genů kódujících varianty vazebných proteinů do cílového plasmidu bylo použito klonování bez použití restričních enzymů, tzv. Restriction free (RF) klonování. Jedná se o dvě navazující PCR reakce. DNA získaná z přechodí prodlužovací reakce sloužila jako templát pro první RF reakci, jejímž úkolem bylo vytvoření tzv. megaprimeru, který obsahuje přesahy na cílový plasmid. Složení reakční směsi pro tuto reakci je popsáno v Tabulce 3, str. 46. Velikost fragmentů byla ověřena elektroforézou v 1% agarosovém gelu, tentokrát pouze s 10 µl reakční směsi. Výsledek elektroforézy je uveden na Obrázku 10, str. 63. Zbytek DNA z reakční směsi byl přečištěn pomocí komerční soupravy na izolaci DNA.

Druhou RF reakcí bylo dosaženo vložení DNA, která kóduje vybrané varianty ve formě megaprimeru, do cílového plasmidu. Složení reakční směsi pro tuto reakci je uvedeno v Tabulce 5, str. 47. Po proběhnutí reakce byl k reakční směsi přidán enzym DpnI, aby směs byla zbavena původního plasmidu. Po deaktivaci enzymu byla reakční směs transformována do *E. coli* Clooni a výsledkem byla přítomnost pozitivních klonů pouze u tří variant vazebných proteinů z devíti (Obrázek 11, str. 63). Proto byla provedena transformace zbylých variant do dvou různých kmenů buněk *E. coli* (Clooni a TOP10), aby byla zvýšena

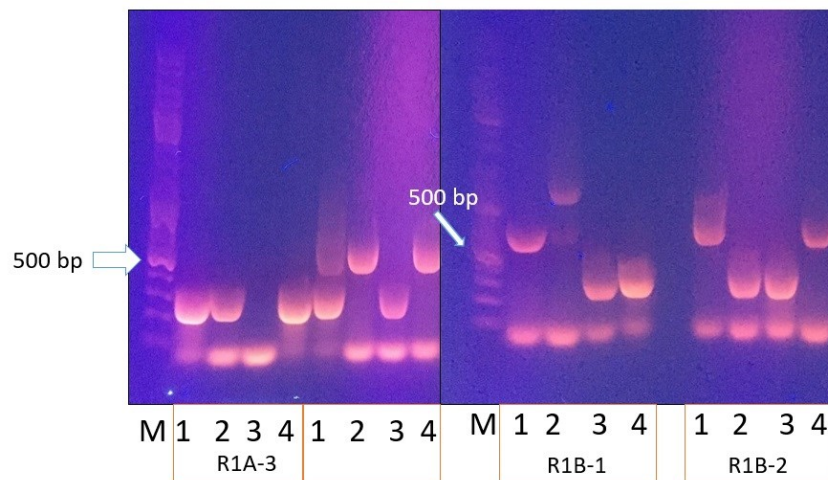
pravděpodobnost získání pozitivních klonů. Pro každou variantu bylo možné nalézt minimálně jeden pozitivní klon, jehož DNA byla následně izolována z bakterií. Výsledky ukazují (Obrázek 12, str. 64), že problém nízké účinnosti RF klonování není způsoben špatným přijetím a zpracováním DNA vytvořené pomocí PCR buňkami *E. coli*, nýbrž ve špatném nastavení PCR samotné, případně nedostatečné aktivity enzymu DpnI při odstraňování původní DNA bez insertu. Finální varianty a úspěšnost zaklonování byla ověřena sekvenací.



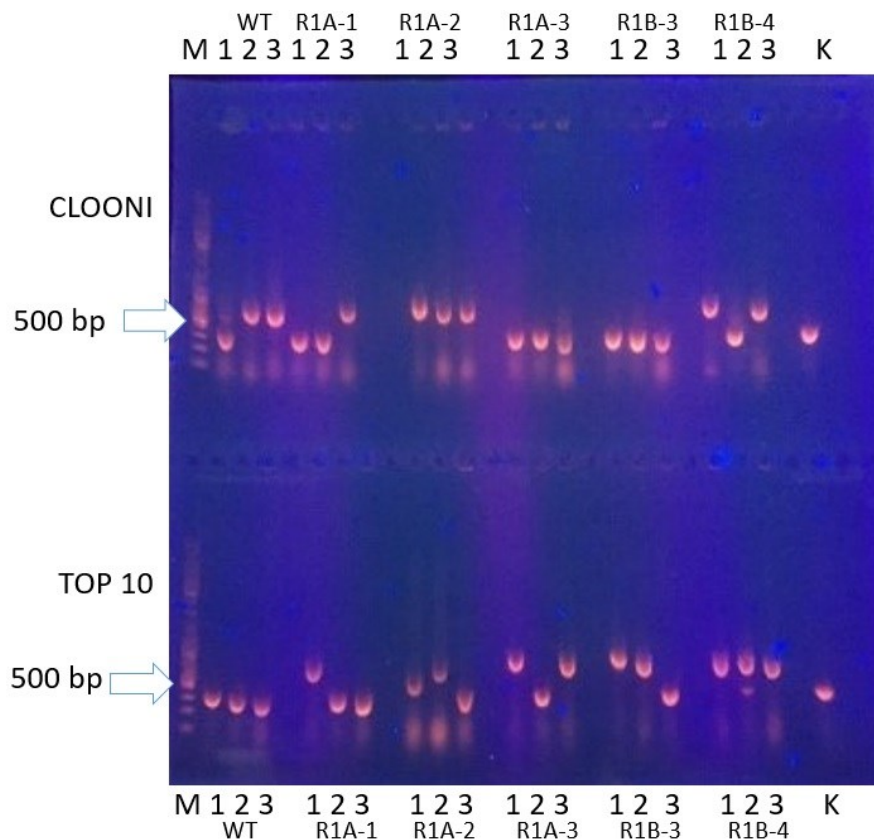
Obrázek 9: Agarosová elektroforéza PCR produktů prodlužovací reakce (prodloužení o streptavidinovou kotvu na N-konci). V první dráze zleva je možné pozorovat standard (M). Ve druhé až páté dráze zleva lze pozorovat čtyři konstrukty mutované na prvním vazebném povrchu (R1A), v šesté až deváté konstrukty mutované na druhém vazebném povrchu (R1B) a v desáté je možné pozorovat WT, neboli nemutovanou verzi daného skafoldu.



Obrázek 10: Agarosová elektroforéza PCR produktů první RF reakce. V první dráze zleva je možné pozorovat standard (M). Ve druhé až páté dráze zleva lze pozorovat čtyři konstrukty mutované na prvním vazebném povrchu (R1A), v šesté až deváté konstrukty mutované na druhém vazebném povrchu (R2B) a v desáté je možné pozorovat WT, neboli nemutovanou verzi genu skafoldu.



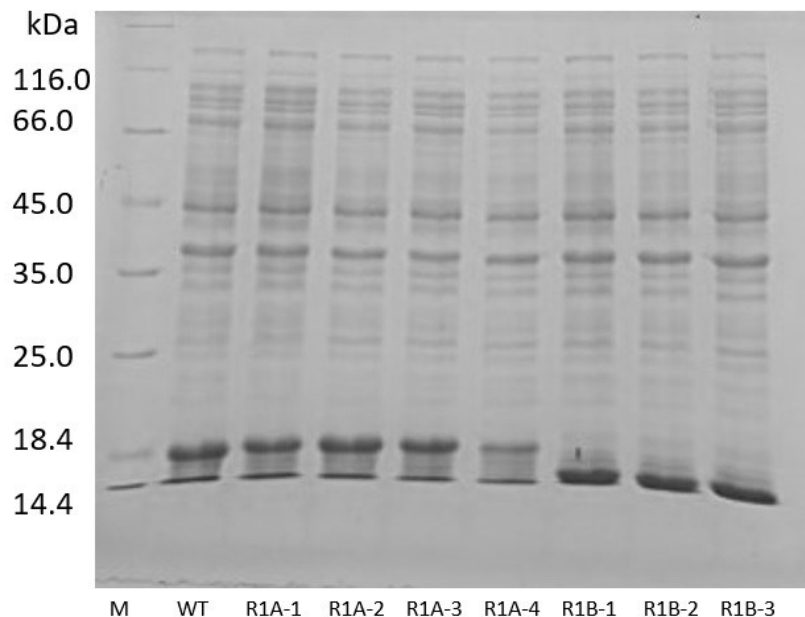
Obrázek 11: Agarosová elektroforéza po PRC z kolonií. Na tomto obrázku je zobrazen výsledek pro čtyři konstrukty. Tři z nich byly úspěšně transformovány pomocí elektroporace. V první dráze zleva je viditelný standard (M), dále čtyři vzorky pro konstrukt R1A-3 a vzorky pro konstrukt R1A-4. V druhé části obrázku je dále opět možné pozorovat standard (M) a čtyři vzorky pro konstrukty R1B-1 a R1B-2. Velikost správně vložených konstruktů do plasmidu by se měla pohybovat kolem 600 bp.



Obrázek 12: Agarosová elektroforéza po PRC z kolonií. V horní části obrázku jsou PCR z kolonií pro konstrukty transformované do *E. coli* Clooni. V dolní části obrázku jsou PCR z kolonií pro konstrukty transformované do *E. coli* TOP 10. V první dráze zleva je možné pozorovat standard (M), dále zleva tři vzorky pro WT, R1A-1, R1A-2, R1A-3, R1B-3, R1B-4. V poslední dráze zleva je možné vidět negativní kontrolu (K), v tomto případě prázdný plasmid. Velikost správně vložených konstruktů do plasmidu by se měla pohybovat kolem 600 bp.

6.1.2 Produkce vazebných proteinů v bakteriálních buňkách a purifikace

K produkci proteinu byly zvoleny buňky *E. coli* BL21(DE3). Tyto buňky byly transformovány připravenými vektory pro expresi vybraných variant vazebného proteinu Receptoru 1. Produkce při teplotě 20 °C je popsána v Podkapitole 5.3.2, str. 54 a výsledek proběhnuté elektroforézy v 15% gelu je znázorněn na Obrázku 13, str. 65.

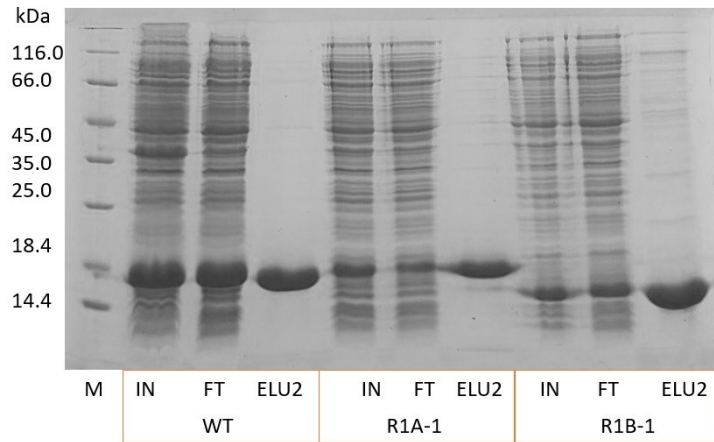


Obrázek 13: SDS-PAGE Elektroforéza z lyzátu buněk po produkci v buňkách *E. coli* BL21(DE3) v 15% gelu. V první dráze zleva lze pozorovat standard (*M*) a poté postupně zleva *WT*, *R1A-1*, *R1A-2*, *R1A-3*, *R1A-4*, *R1B-1*, *R1B-2* a *R1B-3*. Teoretická molekulová hmotnost pro *WT* je 15,72 kDa.

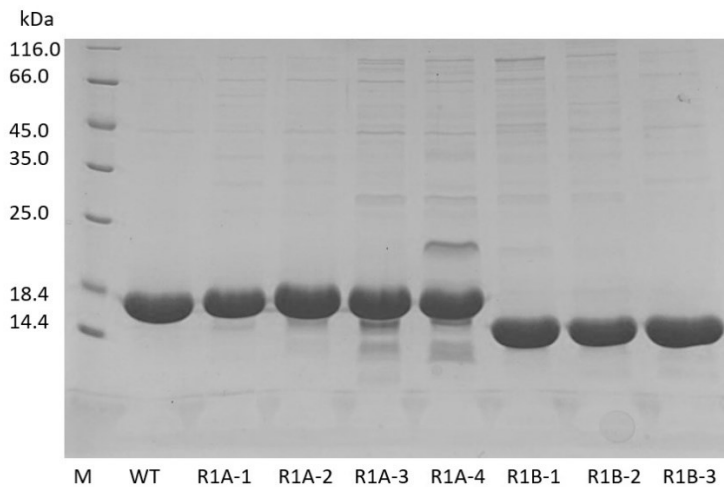
Proteiny byly purifikovány pomocí afinitní chromatografie na kolonách obsahujících matici StrepTactin XT. Průběh purifikace pro 3 proteiny je ukázán pomocí metody SDS-PAGE na Obrázku 14, str. 66. Na Obrázku 15, str. 66 je pomocí metody SDS-PAGE ukázána čistota nejkonzentrovější frakce (druhá eluce) každého purifikovaného proteinu.

Eluát byl zakonzentrován přibližně na objem 0,5 ml a byla provedena gelová permeační chromatografie na koloně Superdex® 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare). Průběh gelové permeační chromatografie je pro všechny proteiny znázorněn na dvou chromatogramech – rozdělené podle toho, zda se daný protein choval jako WT, tedy eluoval se v podobném retenčním objemu (Obrázek 16, str. 67), a který nikoliv (Obrázek 17, str. 67).

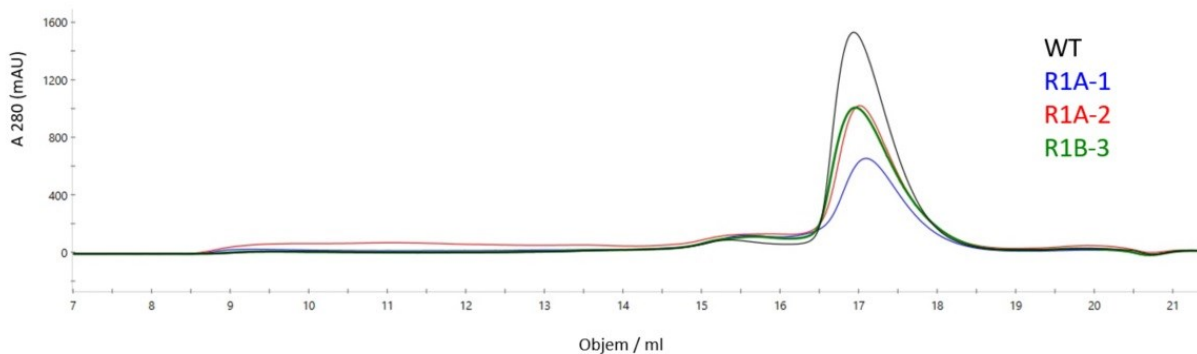
Za každý protein byla vybrána nejkonzentrovějších frakce a byla provedena SDS-PAGE v 15% gelu. Výsledek je pro jednotlivé proteiny znázorněn na Obrázku 18, str. 68. Poznatky, které byly získané v průběhu purifikace a základní parametry proteinů, které byly získány z aminokyselinové sekvence, jsou uvedeny v Tabulce 16, str. 68.



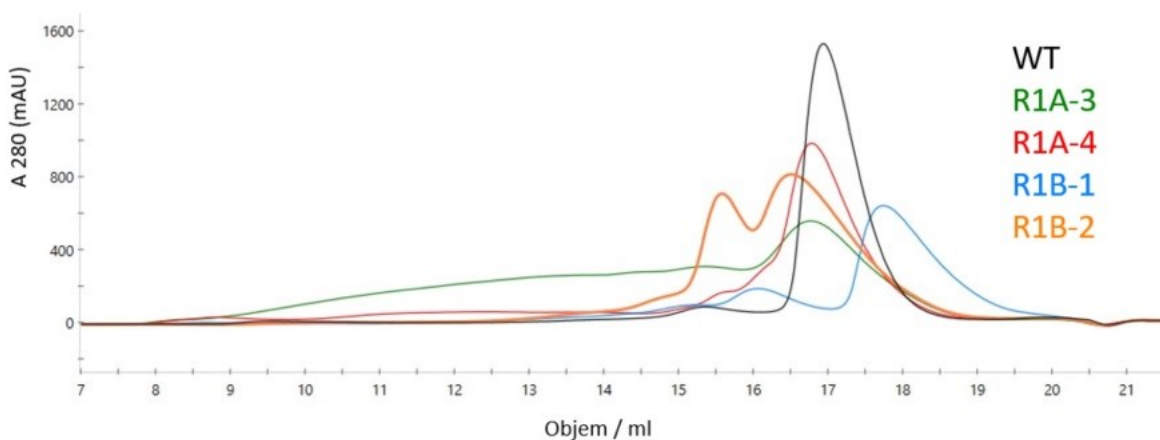
Obrázek 14: Výsledek elektroforézy v 15% gelu pro znázornění průběhu purifikace na Streptactinové koloně pro tři vybrané proteiny – WT, R1A-1, R1B-1. V první dráze je možné vidět standard (M) a následují vždy tři dráhy pro WT, R1A-1 a R1B-1. Od každého proteinu byl odebrán vzorek z roztoku před nanesením na kolonu (IN), po prokapaní kolonou (FT) a z druhé eluce (ELU2).



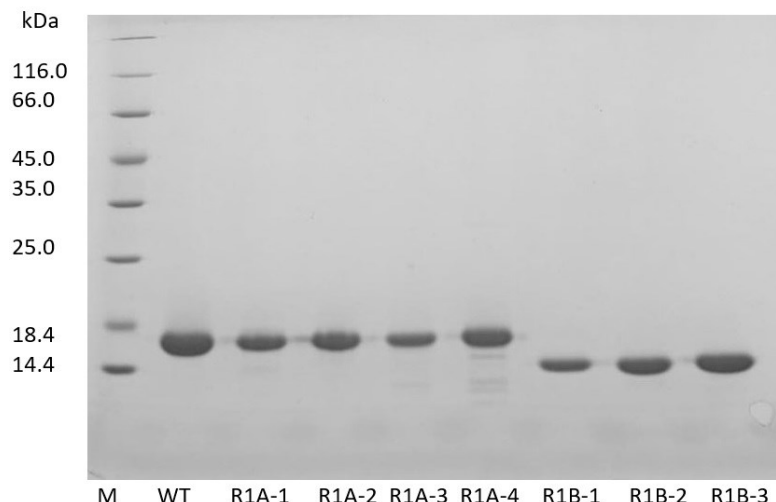
Obrázek 15: Výsledek elektroforézy v 15% gelu pro vzorky připravené z nejvíce koncentrovaných elučních frakcí (druhá eluce) pro všechny purifikované proteiny. V první dráze zleva lze pozorovat standard (M) a poté postupně zleva WT, R1A-1, R1A-2, R1A-3, R1A-4, R1B-1, R1B-2 a R1B-3.



Obrázek 16: Průběh gelové permeační chromatografie pro proteiny, které se chovaly jako WT - R1A-1, R1A-2 a R1B-3. Černě je znázorněn chromatogram pro WT, modře je znázorněn chromatogram pro R1A-1, červeně je znázorněn chromatogram pro R1A-2 a zeleně je znázorněn chromatogram pro R1B-3. Bylo sbíráno 30 frakcí po 0,5 ml. Purifikace probíhala na koloně Superdex® 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare).



Obrázek 17: Průběh gelové permeační chromatografie pro proteiny, které se nechovaly jako WT - R1A-3, R1A-4 a R1B-1 a R1B-2. Černě je znázorněn chromatogram pro WT, zeleně je znázorněn chromatogram pro R1A-3, červeně je znázorněn chromatogram pro R1A-4, modře je znázorněn chromatogram pro R1B-1 a oranžově je znázorněn chromatogram pro R1B-2. Bylo sbíráno 30 frakcí po 0,5 ml. Purifikace probíhala na koloně Superdex® 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare).



Obrázek 18: Výsledek elektroforézy v 15% gelu pro nejkonzentrovější frakce všech purifikovaných proteinů. V první dráze zleva lze pozorovat standard (M) a poté postupně zleva WT, R1A-1, R1A-2, R1A-3, R1A-4, R1B-1, R1B-2 a R1B-3.

Tabulka 16: Shrnutí základních poznatků a parametrů pro jednotlivé purifikované vazebné proteiny Receptoru 1. V tabulce je uvedena molekulová hmotnost, extinkční koeficient, naměřená absorbance při 280 nm (A_{280}), hmotnostní koncentrace, vypočtená molární koncentrace, retenční objem a poznámka k chování na koloně.

Protein	Molekulová hmotnost (Da)	Extinkční koeficient ($M^{-1} \times cm^{-1}$)	A_{280}	c (mg/ml)	c (μM)	Retenční objem (ml)	Chování na koloně
WT	15 720	15 595	2,06	2,08	132,0	16,94	
R1A-1	15 524	17 085	0,89	0,81	52,0	17,10	Chová se jako WT, ale nižší výtěžek
R1A-2	15 594	15 720	1,39	1,38	88,4	17,01	Chová se jako WT, ale nižší výtěžek
R1A-3	15 756	26 720	1,03	0,61	38,5	16,77	Silná tendence oligomerizovat
R1A-4	15 708	21 095	1,55	1,16	73,5	16,79	Mírná tendence oligomerizovat
R1B-1	15 929	28 210	1,04	0,59	36,9	17,74	Precipitoval den po purifikaci na StrepTactinu. Druhý menší eluční vrchol 16,06 ml
R1B-2	15 858	22 585	1,53	1,07	67,7	16,52	Druhý menší eluční vrchol 15,58 ml
R1B-3	15 791	15 595	1,10	1,12	70,5	16,96	Chová se jako WT ale nižší výtěžek

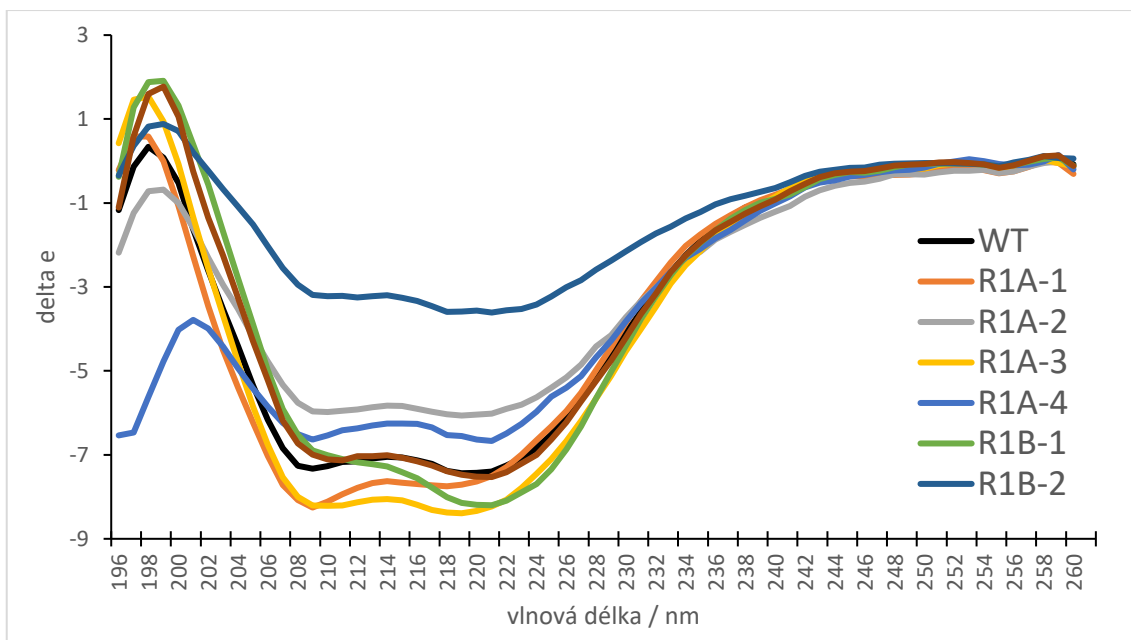
6.1.3 Biofyzikální charakterizace vazebných proteinů

S purifikovanými proteiny byla provedena charakterizace pomocí biofyzikálních metod. Jako první bylo provedeno měření teplotních stabilit na přístroji Prometheus NT.48. Naměřené hodnoty teploty tání, při kterých se protein začne rozbalovat a měnit svou konformaci, byly zpracovány do Tabulky 17. Měření bylo prováděno v pufru PBS a PBS s 0,05% Pluronicem F-127. Výsledky ukazují, že přítomnost 0,05% Pluronicu F-127 výrazným způsobem neovlivňuje teplotní stabilitu vazebných proteinů. Hodnoty teplot tání jsou až na jednu variantu (R1B-1) nižší než u WT proteinu.

Tabulka 17: Hodnoty teploty tání pro vazebné proteiny Receptoru 1 v PBS a PBS s 0,05% Pluronicem F-127.

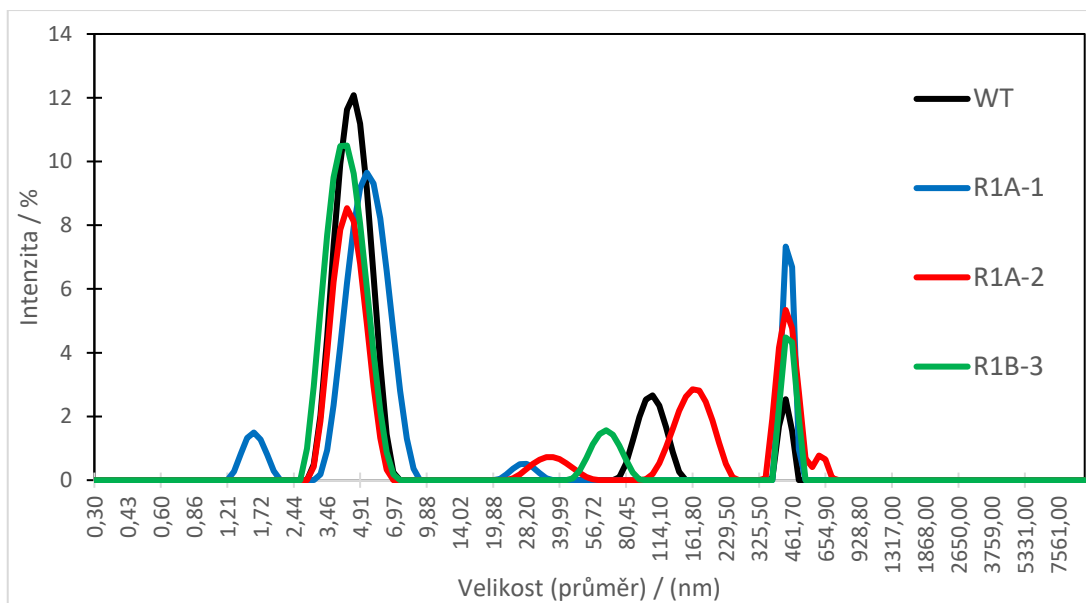
Protein	Teplota tání PBS (°C)	Teplota tání PBS + 0,05% Pluronic F-127 (°C)
WT	62,6	62,3
R1A-1	58,9	58,9
R1A-2	46,8	46,5
R1A-3	48,3	48,6
R1A-4	47,6	47,8
R1B-1	69,2	74,1
R1B-2	40,9	41,0
R1B-3	51,0	48,4

U proteinů byla naměřena spektra cirkulárního dichroismu. Vzorky na toto měření byly připraveny vyředěním v pufru PBS. Samotné měření bylo prováděno paní Tatsianou Charnavets, Ph.D na přístroji Chirascan Plus CD spectrometer. Výsledná naměřená spektra jsou vyobrazena na Obrázku 19, str. 70. Z naměřených spekter je patrná přítomnost sekundárních struktur, ale některé varianty mutovaného skafoldu jsou od WT poměrně odlišné a byla by potřeba je dále charakterizovat.

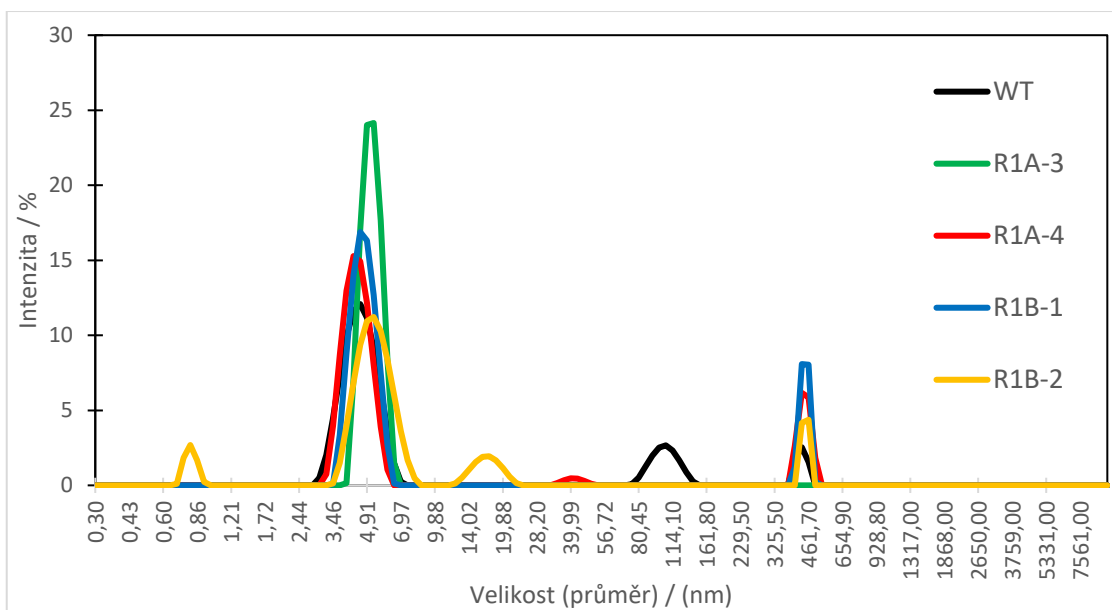


Obrázek 19: CD spektrum pro všechny vazebné proteiny Receptoru 1 a WT. Černě je znázorněné spektrum pro WT, oranžově pro R1A-1, šedě pro R1A-2, žlutě pro R1A-3, světle modře pro R1A-4, zeleně pro R1B-1, tmavě modře pro R1B-2 a červeně pro R1B-3.

Dále bylo s proteiny také provedeno měření DLS (z angl. Dynamic Light Scattering) na přístroji Zetasizer Ultra. Vzorky byly měřeny v módu MADLS (z angl. Multi-Angle Dynamic Light Scattering). Výsledná spektra tohoto měření jsou zobrazena na Obrázku 20, str. 71 pro proteiny, které se na gelové permeační chromatografii chovaly podobně jako WT a na Obrázku 21, str. 71 pro proteiny, které se nechovaly jako WT a agregovaly. Z výsledných spekter bylo zjištěno, že v časové škále dní po purifikaci žádný z proteinů výrazně neagreguje.

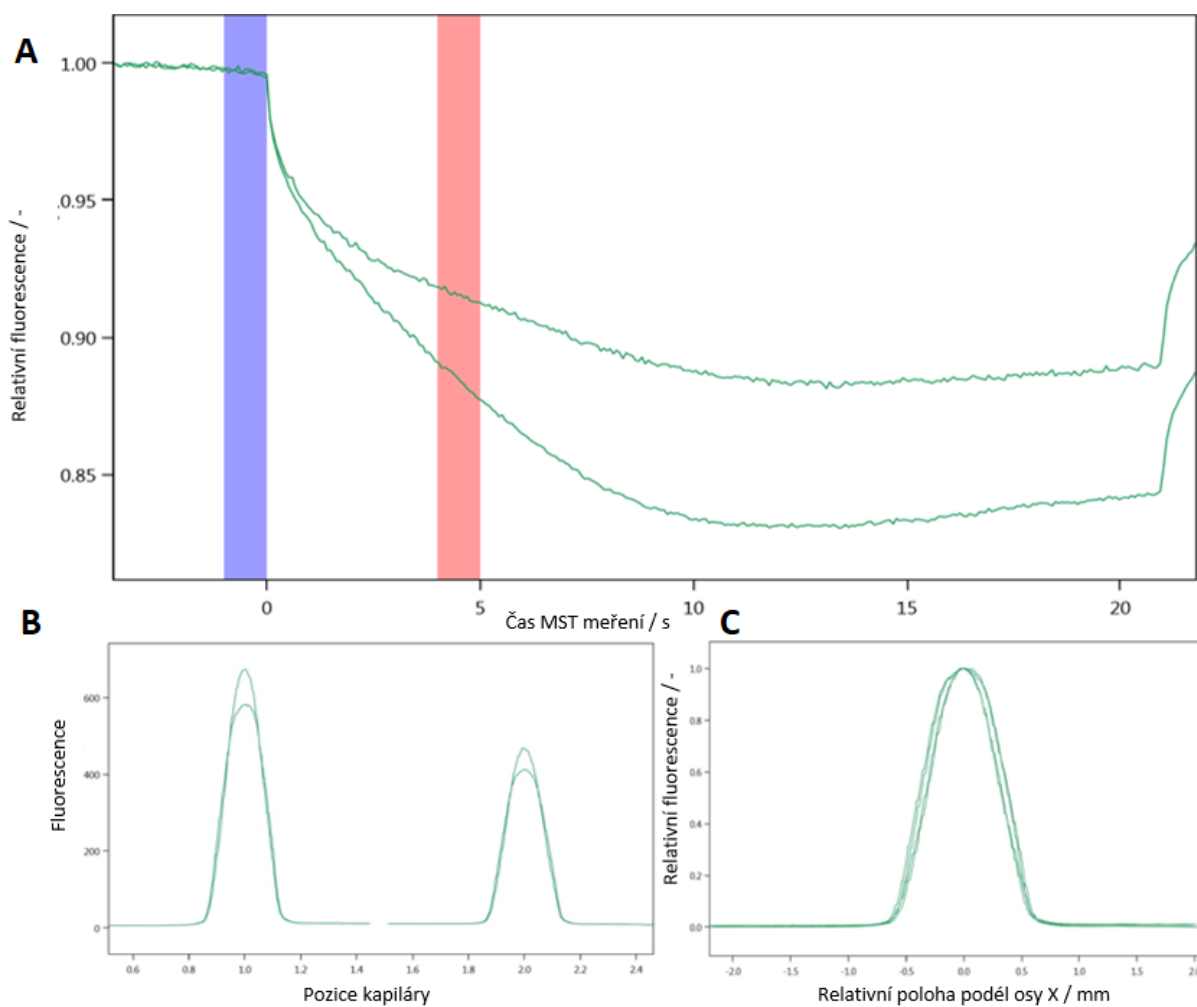


Obrázek 20: Výsledné spektrum měření DLS pro WT a vazebné proteiny Receptoru 1, které se na gelové permeační chromatografii chovali jako WT. Černě je znázorněné spektrum pro WT, modře pro R1A-1, červeně pro R1A-2 a zeleně pro R1B-3.



Obrázek 21: Výsledné spektrum měření DLS pro WT a vazebné proteiny Receptoru 1, které se na gelové permeační chromatografii nechovali jako WT. Černě je znázorněno spektrum pro WT zeleně pro R1A-3, červeně pro R1A-4, modře pro R1B-1 a oranžově pro R1B-2.

Poté bylo v plánu s vazebnými proteiny Receptoru 1 provést MST měření a tím ověřit sílu vazby mezi vazebnými proteiny a daným receptorem. Jako první bylo provedeno fluorescenční barvení Receptoru 1 a poté kontrolní sken kapilár pouze s obarveným Receptorem 1. Používány byly dvě standardní kapiláry Monolith NT.115™ Standard Treated Capillaries. Sken z těchto kapilár (Obrázek 22) ukázal, že tento receptor interaguje se stěnami kapilár a dochází k agregaci proteinu během měření MST. Proto nebylo v měření dále pokračováno.

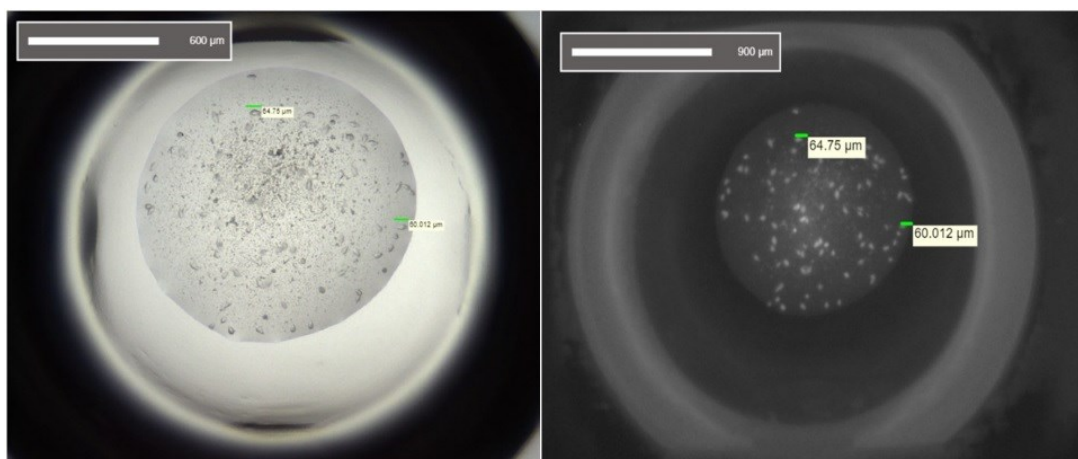


Obrázek 22: Kontrolní sken kapilár Receptoru 1 před samotným MST měřením.
A - Termoforetické křivky. B - Výsledek skenu kapilár a zobrazení úrovně fluorescence. C - Kontrola tvaru kapiláry, tedy kontrola, zda nedocházelo k interakci se stěnou kapiláry.

Zbylé množství proteinů z předchozích měření bylo zakoncentrováno na objem 0,1 ml a pomocí diafiltrace převeden z PBS pufru do 50 mM Tris, pH = 8; 300 mM NaCl. Poté byly změřeny koncentrace. Výsledky měření koncentrace jsou uvedeny v Tabulce 18. Pro krystalizaci byla zvolena metoda sedící kapky. Jelikož se jednalo o první krystalizaci těchto proteinů, byly použity dva komerční sety (screeny) – SG1 a BCS. Jak roztoky, tak proteiny byly pipetovány pomocí krystalizačního robota Crystal Gryphon, který byl obsluhován RNDr. Jiřím Pavlíčkem, Ph.D.. Krystalová forma byla získána pouze u jednoho z proteinů – konkrétně u proteinu R1B-3. Krystalová forma proteinu R1B-3 je vyobrazena na Obrázku 23.

Tabulka 18: Naměřené koncentrace zakoncentrovaných proteinů. Jako blank byl použit pufr 50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl

Měřený vzorek	c (mg/ml)
WT	6,55
R1A-1	2,78
R1A-2	5,72
R1B-3	5,75

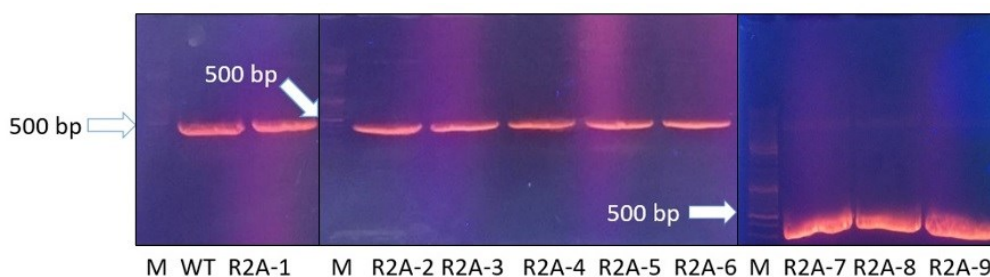


Obrázek 23: Fotografie krystalové formy proteinu R1B-3. Na obrázku vlevo je fotografie pořízena ve viditelném světle, na obrázku vpravo je fotografie pořízena v UV světle. Podmínka, ve které byla tato krystalová forma pozorována, obsahovala 0,2 M MgCl₂; 0,1 M BIS-Tris, pH 6,5 a 25 % (w/v) PEG 3350. Poměr proteinu vůči precipitantu tvořil 2:1. Pro krystalizaci byla zvolena metoda sedící kapky.

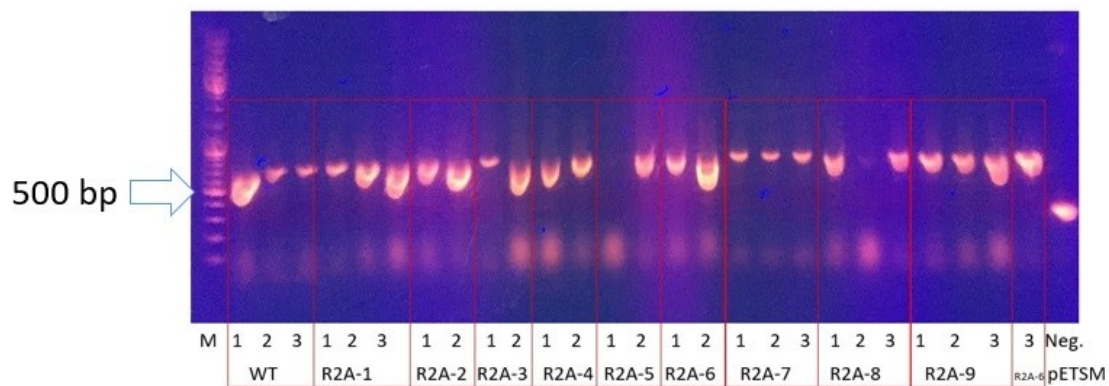
6.2 VAZEBNÉ PROTEINY RECEPTORU 2

6.2.1 Klonování

Knihovna klonů vazebných proteinů Receptoru 2 byla transformována pomocí elektroporace do buněk *E. coli* Clooni. Poté bylo vybráno devět různých klonů, se kterými byla provedena maloobjemová produkce DNA. Pro konstrukty vazebných proteinů Receptoru 2 bylo zvoleno klonování za použití restrikčních enzymů. Prvním krokem klonování bylo zmnožení jednotlivých DNA konstruktů vazebných proteinů pomocí PCR reakce (složení uvedeno v Tabulce 9, str. 51), který byl ověřen pomocí elektroforézy v 1% agarosovém gelu. Výsledek elektroforézy je uveden na Obrázku 24. Fragmenty DNA byly vyizolovány z gelu. Poté byla tato DNA naštěpena pomocí restrikčních enzymů NcoI-HF a BamHI-HF, stejně tak i vektor pETsm, do kterého měly být DNA vazebných proteinů vkládány (složení reakce uvedeno v Tabulce 11, str. 52). Štěpení probíhalo dvě hodiny při teplotě 37 °C. Po proběhnutí štěpení byly vzorky DNA zbaveny restrikčních enzymů pomocí komerční soupravy Gel and PCR clean up a byla provedena ligační reakce. Složení pro tuto reakci je uvedeno v Tabulce 12, str. 52. Takto namíchané reakce byly inkubovány po dobu 1 hodiny při pokojové teplotě. Poté byla reakční směs ihned chemicky transformována do buněk *E. coli* TOP 10 a natřena na LB agarové kanamycinové misky. Pro jednotlivé klony byly vybrány vždy tři kolonie a byla provedena PCR z kolonií, jejíž výsledek byl ověřen pomocí elektroforézy v 1% agarosovém gelu (Obrázek 25, str. 75). Finální varianty a úspěšnost zaklonování byla ověřena sekvenací.



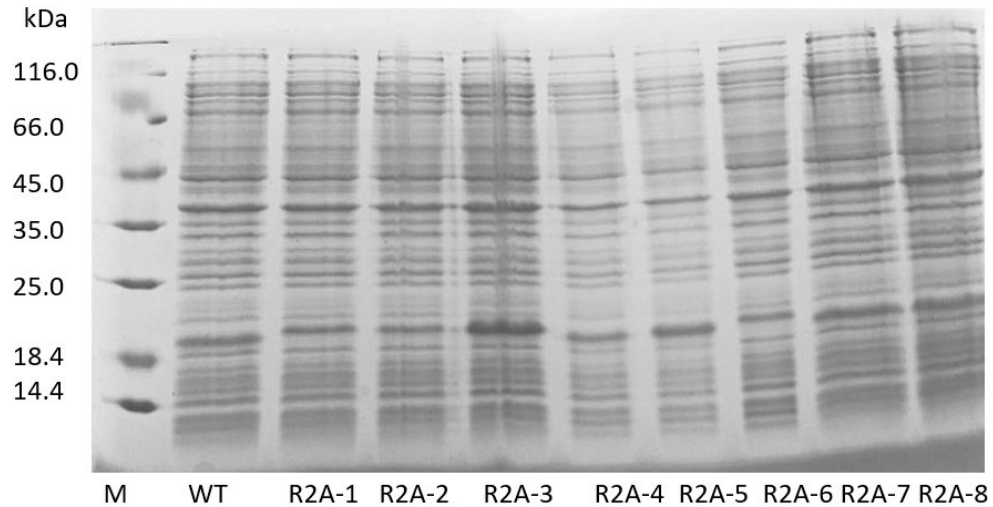
Obrázek 24: Agarosová elektroforéza inzertů zmnožených pomocí PCR v 1% gelu. V první dráze zleva je možné pozorovat standard (M), hned vedle je dráha pro WT a dráha pro R2A-1. V další dráze zleva je pozorovatelný opět standard (M), hned vedle dráha pro R2A-2, dráha pro R2A-3, dráha pro R2A-4, dráha pro R2A-5 a dráha pro R2A-6. Poté opět dráha pro standard (M), dále dráha pro R2A-7, R2A-8 a dráha R2A-9.



Obrázek 25: Agarosová elektroforéza po PCR z kolonií v 1% gelu. V první dráze zleva je možné pozorovat standard (M), dále zleva vzorky pro WT a R2A-1. Poté dva vzorky pro R2A-2, R2A-3, R2A-4, R2A-5, R2A-6, tři vzorky pro R2A-7, R2A-8 a R2A-9. V předposlední dráze zleva je třetí vzorek pro konstrukt R2A-6. V poslední dráze je možné vidět negativní kontrolu, v tomto případě prázdný plasmid.

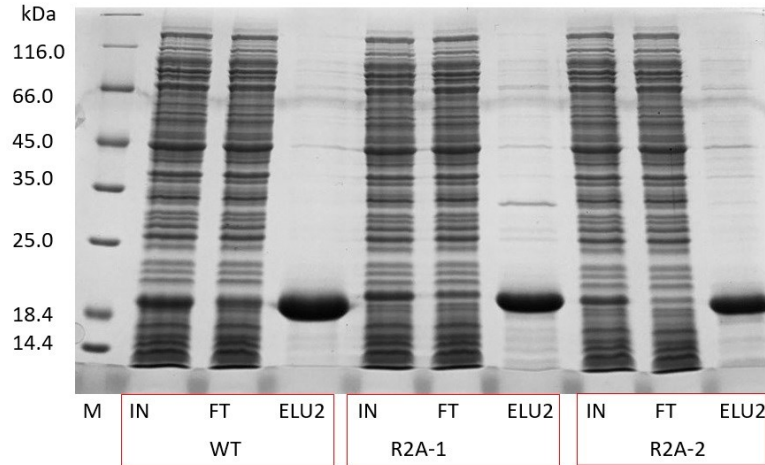
6.2.2 Produkce vazebných proteinů v bakteriálních buňkách a purifikace

K produkci proteinu byly zvoleny buňky *E. coli* BL21(DE3). Tyto buňky byly transformovány připravenými expresními vektory pro expresi vybraných variant vazebného proteinu Receptoru 2. Produkce při teplotě 20 °C je popsána v Podkapitole 5.3.2, str. 54 a výsledek proběhnuté elektroforézy v 15% gelu je znázorněn na Obrázku 26, str. 76.

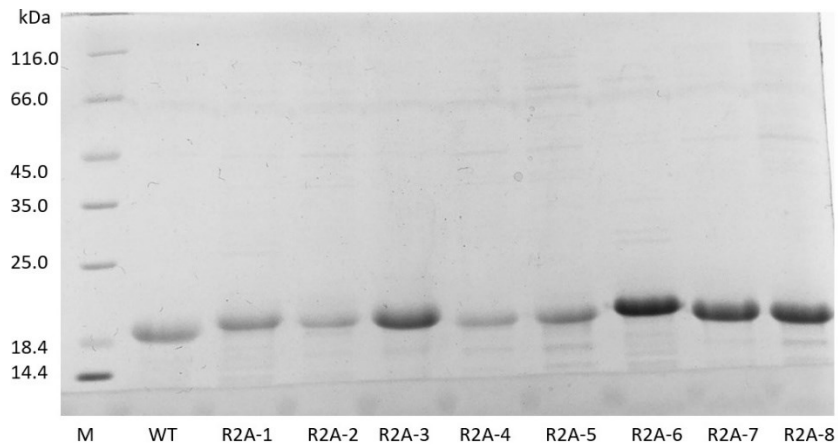


Obrázek 26: *Elektroforéza v 15% gelu z lyzátu buněk po produkci v buňkách E. coli BL21(DE3) v 15% gelu. V první dráze zleva lze pozorovat standard (M) a dále postupně zleva dráha pro WT, R2A-1, R2A-2, R2A-3, R2A-4, R2A-5, R2A-6, R2A-7 a v poslední dráze R2A-8. Teoretická molekulová hmotnost pro WT je 17,266 kDa.*

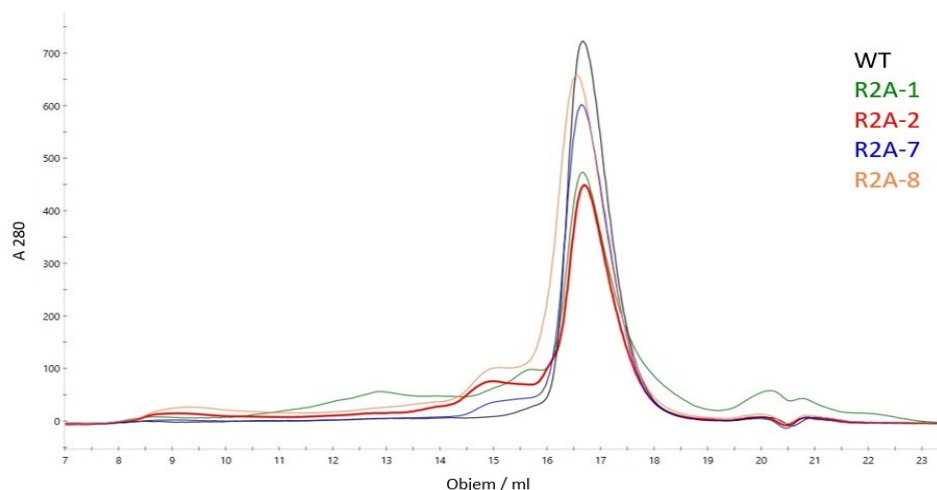
Proteiny byly purifikovány pomocí afinitní chromatografie na kolonách obsahujících matici StrepTactin XT. Průběh purifikace pro tři proteiny je ukázán pomocí metody SDS-PAGE na Obrázku 27, str. 77. Na Obrázku 28, str. 77 je pomocí metody SDS-PAGE ukázána čistota nejkoncentrovanější frakce (druhá eluce) každého purifikovaného proteinu. Eluát byl zakoncentrován přibližně na objem 0,5 ml a byla provedena gelová permeační chromatografie na koloně Superdex® 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare). Průběh gelové permeační chromatografie je pro všechny proteiny znázorněn na dvou chromatogramech – rozdělené podle toho, zda se daný protein choval jako WT, tedy eluoval se v podobném retenčním objemu (Obrázek 29, str. 78) a který nikoliv (Obrázek 30, str. 78). Za každý protein byla vybrána nejkoncentrovanější frakce a byla provedena SDS-PAGE v 15% gelu. Výsledek je pro jednotlivé proteiny znázorněn na Obrázku 31, str. 79. Poznatky, které byly získané v průběhu purifikace a základní parametry proteinů, které byly získány z aminokyselinové sekvence, jsou uvedeny v Tabulce 19, str. 79.



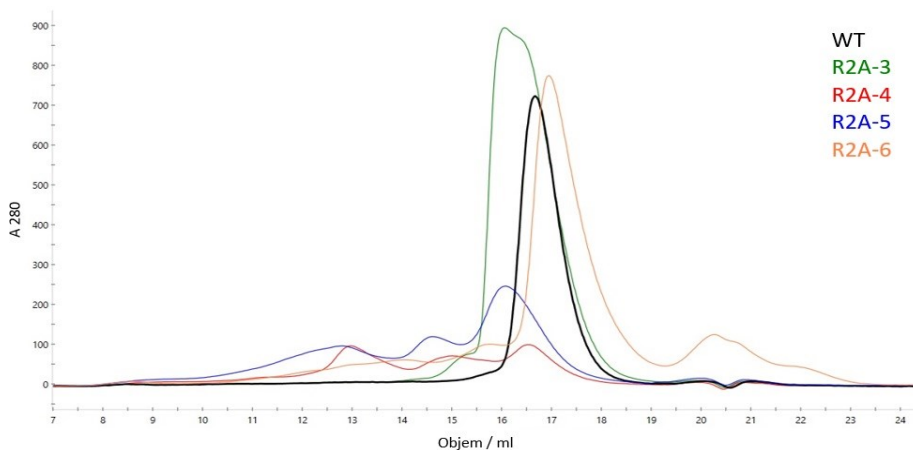
Obrázek 27: Výsledek elektroforézy v 15% gelu pro znázornění průběhu purifikace na *Streptactinové* koloně pro tři vybrané proteiny – WT, R2A-1, R2A-2. V první dráze je možné vidět standard (M), následují 3 dráhy pro WT, poté 3 dráhy pro R2A-1 a následně 3 dráhy pro R2A-2. Od každého proteinu byl odebrán vzorek z roztoku před nanesením na kolonu (IN), po prokapaní kolonou (FT) a z druhé eluce (ELU2).



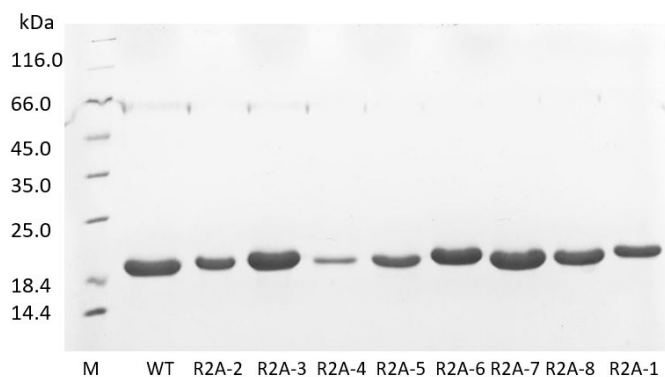
Obrázek 28: Výsledek elektroforézy v 15% gelu pro vzorky připravené z nejvíce koncentrovaných elučních frakcí (druhá eluce) pro všechny purifikované proteiny. V první dráze zleva lze pozorovat standard (M) a poté postupně zleva dráha pro WT, R2A-1, R2A-2, R2A-3, R2A-4, R2A-5, R2A-6, R2A-7 a v poslední dráze R2A-8.



Obrázek 29: Průběh gelové permeační chromatografie pro proteiny, které se chovaly jako WT - R2A-1, R2A-2, R2A-7 a R2A-8. Černě je znázorněn chromatogram pro WT, zeleně je znázorněn chromatogram pro R2A-1, červeně je znázorněn chromatogram pro R2A-2, modře je znázorněn chromatogram pro R2A-7 a oranžově je znázorněn chromatogram pro R2A-8. Bylo sbíráno 30 frakcí po 0,5 ml. Purifikace probíhala na koloně Superdex® 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare).



Obrázek 30: Průběh gelové permeační chromatografie pro proteiny, které se nechovaly jako WT - R2A-3, R2A-4 a R2A-5 a R2A-6. Černě je znázorněn chromatogram pro WT, zeleně je znázorněn chromatogram pro R2A-3, červeně je znázorněn chromatogram pro R2A-4, modře je znázorněn chromatogram pro R2A-5 a oranžově je znázorněn chromatogram pro R2A-6. Bylo sbíráno 30 frakcí po 0,5 ml. Purifikace probíhala na koloně Superdex® 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare).



Obrázek 31: Výsledek elektroforézy v 15% gelu pro nejkonzentrovanejší frakce všech purifikovaných proteinů. V první dráze zleva lze pozorovat standard (M), dále postupně zleva WT, R2A-2, R2A-3, R2A-4, R2A-5, R2A-6, R2A-7, R2A-8 a v poslední dráze R2A-1.

Tabulka 19: Shrnutí základních poznatků a parametrů pro jednotlivé purifikované vazebné proteiny Receptoru 2. V tabulce je uvedena molekulová hmotnost, extinkční koeficient, naměřená absorbance při 280 nm (A_{280}), hmotnostní koncentrace, vypočtená molární koncentrace, retenční objem a poznámka k chování na koloně.

Protein	Molekulová hmotnost (Da)	Extinkční koeficient ($M^{-1} \times cm^{-1}$)	A_{280}	c (mg/ml)	c (μM)	Retenční objem (ml)	Chování na koloně
WT	17266,51	15595	1,1546	1,28	74,1	16,66	
R2A-1	17216,65	15595	0,7870	0,87	50,5	16,66	Jako WT
R2A-2	17192,52	21095	0,7236	0,59	34,3	16,66	Jako WT
R2A-3	17478,86	26595	0,7786	1,00	29,2	16,48	Eluční vrchol navazující na hlavní eluční vrchol
R2A-4	17006,31	15595	0,1379	0,15	8,80	15,00 12,97 16,53	Agreguje - 3 nízké eluční vrcholy
R2A-5	17168,45	17085	0,4391	0,44	25,6	12,77 14,61 16,08	Agregáty, nízký eluční vrchol
R2A-6	17334,77	21095	1,0137	0,84	48,5	16,91	Nižší eluční vrchol než WT a posunutý o cca 0,5 ml
R2A-7	17195,56	15595	0,9643	1,06	61,6	16,66	Jako WT
R2A-8	17065,37	21095	0,8809	0,71	41,6	16,56	Retenční objem oproti WT posunut o 0,1 ml

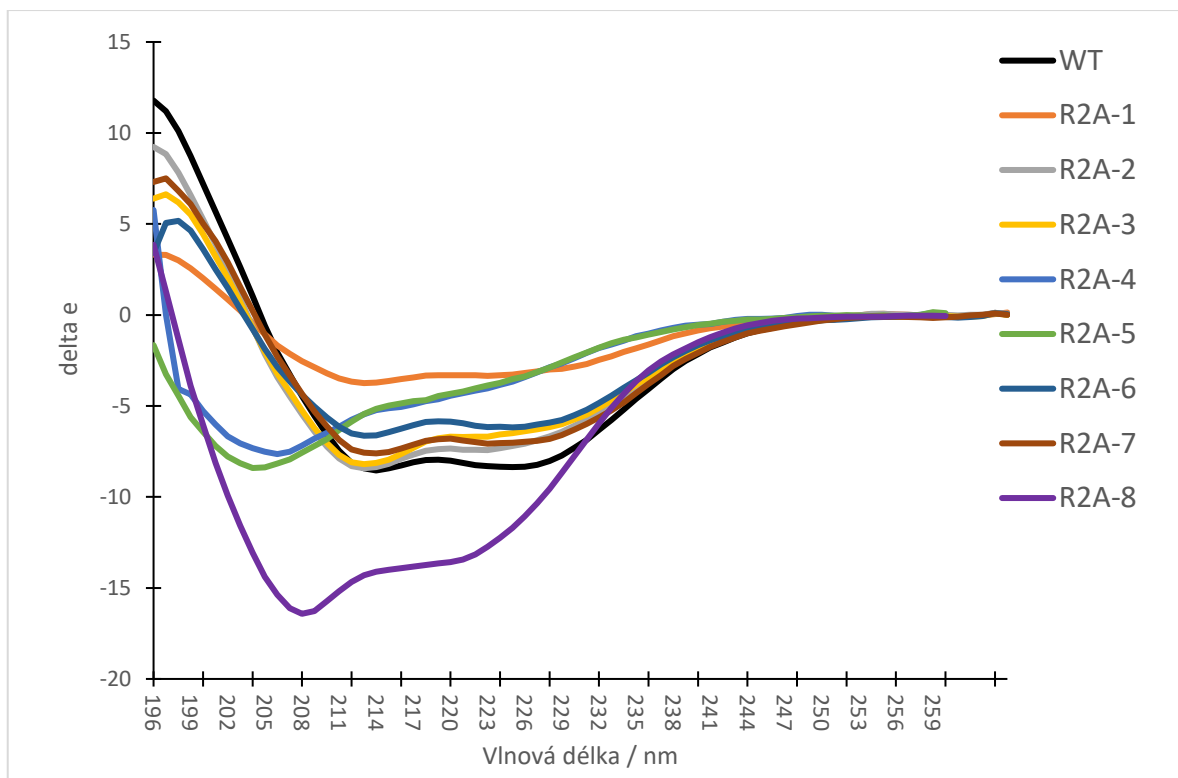
6.2.3 Biofyzikální charakterizace vazebných proteinů

S purifikovanými proteiny byla provedena charakterizace pomocí biofyzikálních metod. Jako první bylo provedeno měření teplotních stabilit na přístroji Prometheus NT.48. Naměřené hodnoty teploty tání, při kterých se protein začne rozbalovat a měnit svou konformaci, byly zpracovány do Tabulky 20. Měření bylo prováděno v pufru 50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl a 50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl s 0,05% Pluronicem F-127. Výsledky ukazují, že přítomnost 0,05% Pluronicu výrazným způsobem neovlivňuje teplotní stabilitu vazebných proteinů. Hodnoty teplot tání jsou uvedeny v tabulce 20, str. 80. Pro proteiny R2A-5 a R2A-6 nebylo možné z naměřených křivek určit teploty tání, proto nejsou v tabulce uvedeny.

Tabulka 20: Výsledky měření teplot tání pro vazebné proteiny Receptoru 2 v pufru a v pufru s 0,05% Pluronicem F-127. (Pufř = 50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl)

Protein	Teplota tání Pufř (°C)	Teplota tání Pufř + 0,05% Pluronic F-127 (°C)
WT	67,3	66,9
R2A-1	59,8	62,7
R2A-2	65,5	64,7
R2A-3	67,0	66,4
R2A-4	52,1	50,8
R2A-5	-	-
R2A-6	-	-
R2A-7	76,6	76,5
R2A-8	60,6	62,2

U proteinů byla naměřena spektra cirkulárního dichroismu. Vzorky na toto měření byly připraveny vyředěním ve vodě. Samotné měření bylo prováděno paní Tatsianou Charnavets, Ph.D na přístroji Chirascan Plus CD spectrometer. Výsledná naměřená spektra jsou vyobrazena na Obrázku 32, str. 81. Z naměřených spekter je patrná přítomnost sekundárních struktur, avšak některé varianty spektrum varianty jsou oproti WT značně rozdílné a byla by potřeba je dále charakterizovat.



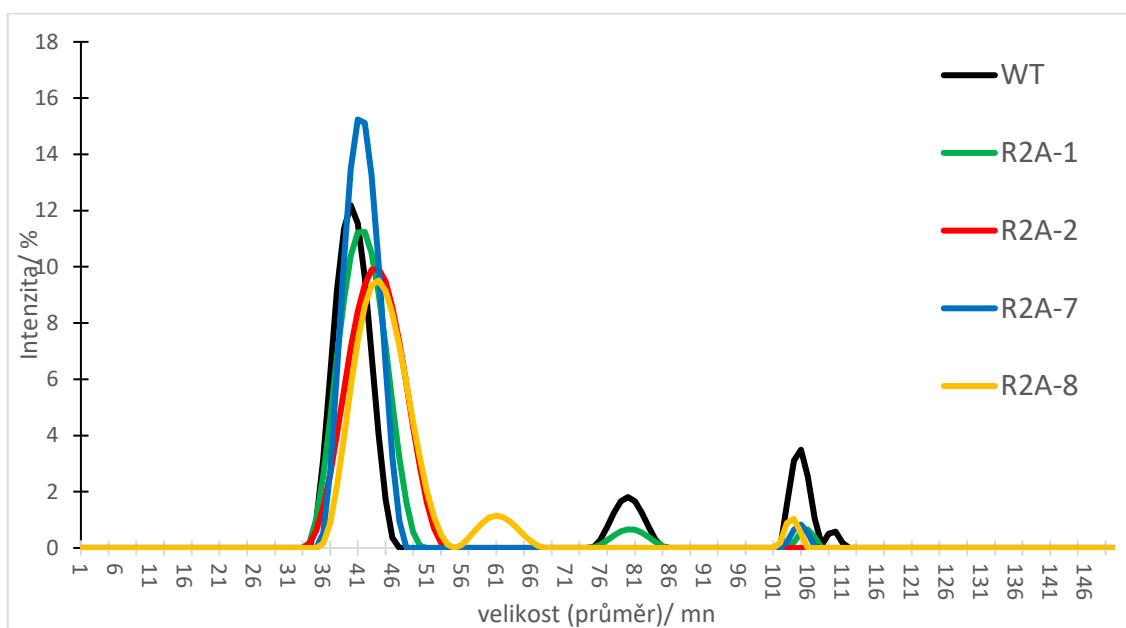
Obrázek 32: CD spektrum pro všechny vazebné proteiny Receptoru 2 a WT. Černě je znázorněné spektrum pro WT, oranžově pro R2A-1, šedě pro R2A-2, žlutě pro R2A-3, světle modře pro R2A-4, zeleně pro R2A-5, tmavě modře pro R2A-6, červeně pro R2A-7 a fialově pro R2A-8.

Po měření CD byly některé vybrané proteiny zakonzentrovány na objem 0,1 ml. Jednalo se o WT, R2A-1, R2A-2, R2A-7 a R2A-8. Výsledky měření koncentrace a přepočtené molární koncentrace jsou uvedeny v Tabulce 21.

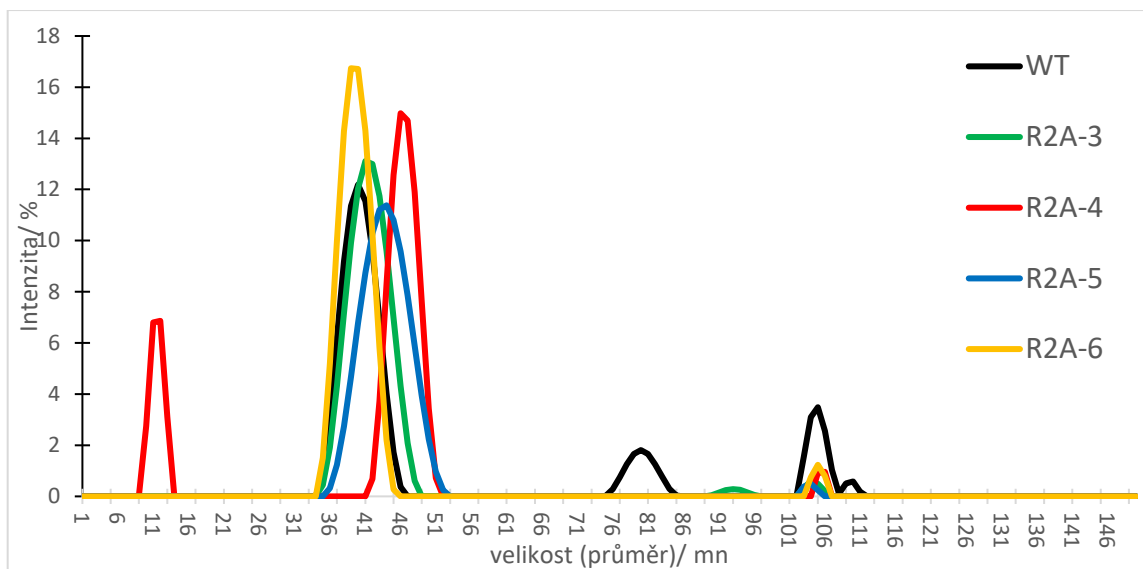
Tabulka 21: Naměřené koncentrace a přepočítané molární koncentrace zakonzentrovaných proteinů. Jako blank byl použit pufr 50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl.

	c (mg/ml)	c (μM)
WT	3,7	212
R2A-1	2,2	128
R2A-2	2,4	140
R2A-7	3,6	209
R2A-8	3,7	217

Dále bylo s proteiny také provedeno měření DLS (z angl. Dynamic Light Scattering) na přístroji Zetasizer Ultra. Jako vzorek bylo použito 50 μ l proteinu zakoncentrovaného proteinu v případě WT, R2A-1, R2A-1, R2A-7 a R2A-8, zbylé proteiny byly měřeny v původní koncentraci. Vzorky byly měřeny v módu MADLS (z angl. Multi-Angle Dynamic Light Scattering). Výsledná spektra tohoto měření jsou zobrazena na Obrázku 33 pro proteiny, které se na gelové permeační chromatografii chovaly podobně jako WT a na Obrázku 34, str. 83 pro proteiny, které se nechovaly jako WT a agregovaly. Z výsledných spekter bylo zjištěno, že v časové škále dní po purifikaci pouze R2A-4, který výrazně agregoval při gelové permeační chromatografii, nebyl poté stabilní ani v roztoku a nejspíše zde došlo k rozkladu či rozbalení proteinu v roztoku.



Obrázek 33: Výsledné spektrum měření DLS pro vazebné proteiny Receptoru 2 a WT, které se na gelové permeační chromatografii chovali jako WT. Černě je znázorněno spektrum pro WT zeleně pro R2A-1, červeně pro R2A-2, modře pro R2A-7 a oranžově pro R2A-8.

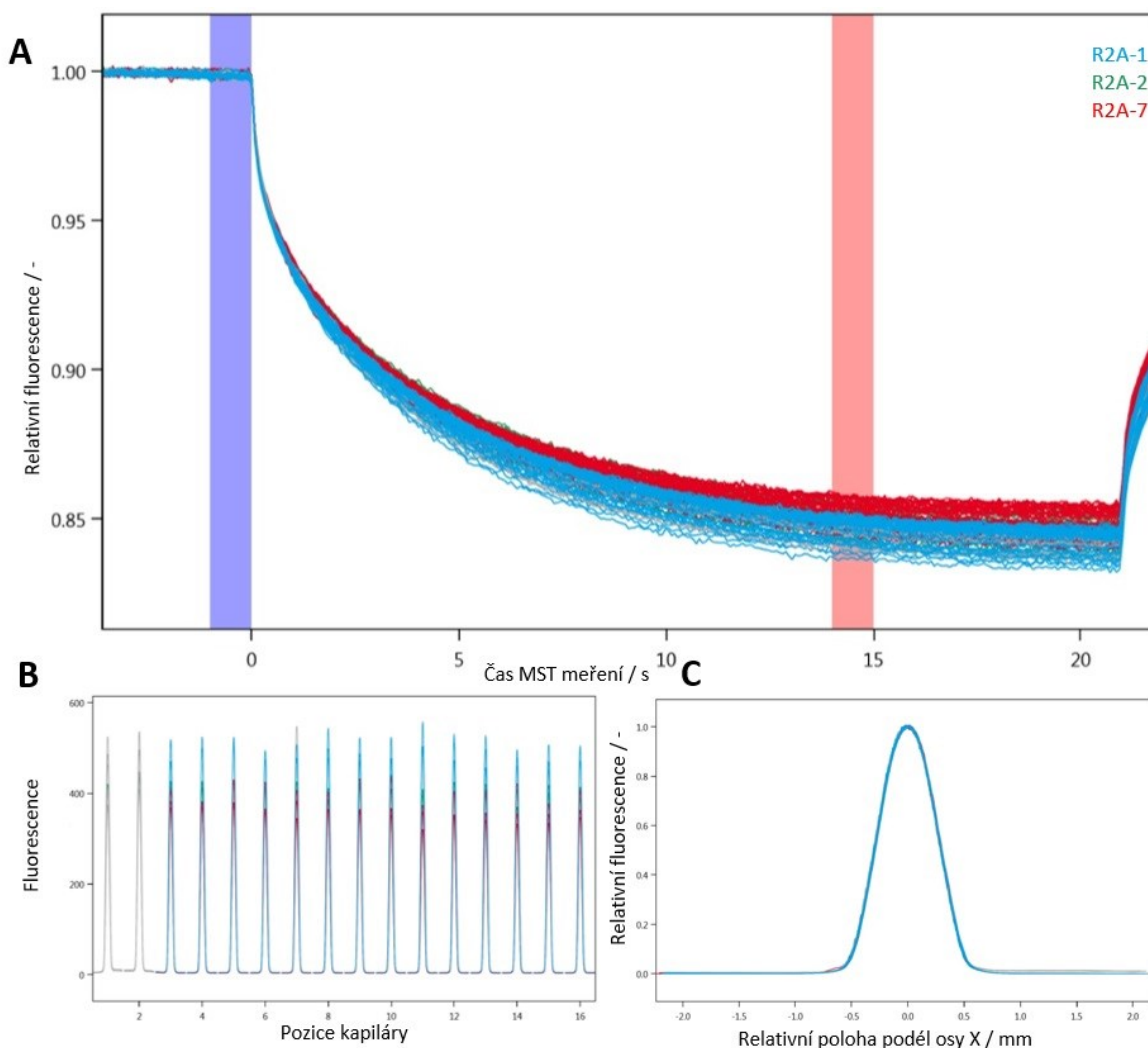


Obrázek 34: Výsledné spektrum měření DLS WT a vazebné proteiny Receptoru 2, které se na gelové permeační chromatografii nechovali jako WT. Černě je znázorněno spektrum pro WT zeleně pro R2A-3, červeně pro R2A-4, modře pro R2A-5 a oranžově pro R2A-6.

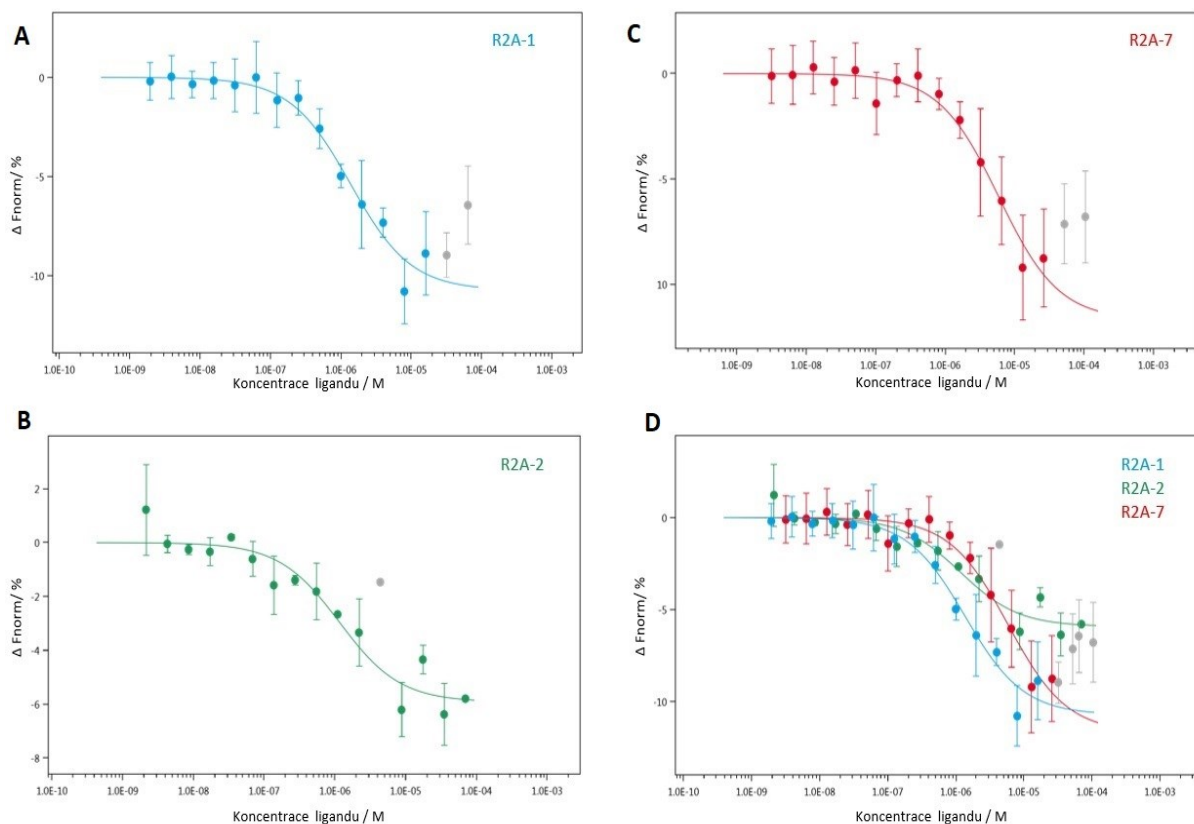
Poté bylo s vybranými vazebnými proteiny Receptoru 2 provedeno MST měření s cílem ověřit sílu vazby mezi vazebnými proteiny a daným receptorem. Jako první bylo provedeno fluorescenční barvení Receptoru 2 a poté kontrolní sken kapilár pouze s obarveným Receptorem 2. Používány byly dvě standardní kapiláry Monolith NT.115™ Standard Treated Capillaries. Měření bylo prováděno se třemi vazebnými proteiny – R2A-1, R2A-2 a R2A-7. Pro proteiny R2A-1 a R2A-7 byly provedeny tři série měření, pro protein R2A-2 pouze měření dvě. Jako první byl vždy proveden sken kapilár, za účelem ověření, zda vzorek v kapiláře neinteraguje s jejím povrchem (Obrázek 35C str. 84). Poté byla zkontrolována míra fluorescence v jednotlivých kapilárách (Obrázek 35B B, str. 84), kdy optimální rozptyl fluorescence od váženého průměru by neměl překročit 10 %. Po proběhnutí celého měření byly zkontrolovány tvary termoforetických křivek (Obrázek 35A, str. 84), aby bylo zjištěno, zda nedocházelo během měření k agregaci vzorku v kapiláře. Vazebné křivky byly po proběhnutí měření vyhodnoceny v programu MO.Affinity Analysis od firmy Nanotemper. Vazebné křivky vybraných vazebných proteinů Receptoru 2 jsou zobrazeny na Obrázku 36, str. 85. Naměřené afinity jsou uvedeny v Tabulce 22, str. 84.

Tabulka 22: Naměřené hodnoty K_D pro jednotlivé vybrané proteiny Receptoru 2.

Binder	K_D (μM)	Amplituda (ΔF_{norm} / %)
R2A-1	$1,34 \pm 0,33$	10,72
R2A-2	$1,14 \pm 0,43$	5,92
R2A-7	$5,89 \pm 1,63$	11,69



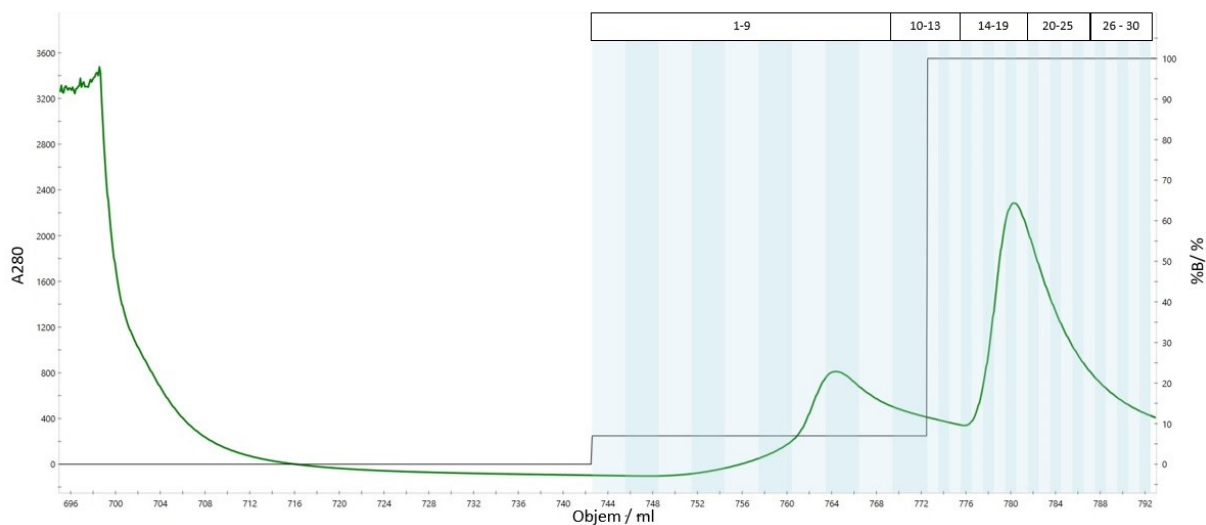
Obrázek 35: MST měření pro vybrané proteiny Receptoru 2. A - Termoforetické křivky. Fialovými a růžovými pruhy jsou znázorněny časové oblasti, ze kterých byly vypočítány výsledky termoforézy. B - Výsledek skenu kapilár a zobrazení úrovně fluorescence. C - Kontrola tvaru kapiláry, tedy kontrola, zda nedocházelo k interakci se stěnou kapiláry.



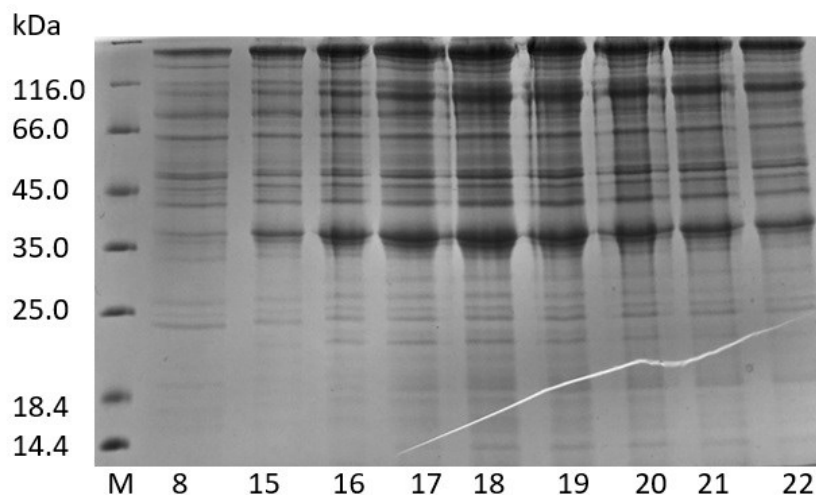
Obrázek 36: Vazebné křivky pro vybrané vazebné proteiny Receptoru 2. Na obrázcích A, B a C jsou znázorněny jednotlivé křivky pro jednotlivé vazebné proteiny. Na obrázku D jsou pro možnost srovnání vyobrazeny všechny tři vazebné křivky. Modře je znázorněna křivka pro R2A-1, zeleně pro R2A-2 a červeně pro R2A-7. Šedivě zobrazené body nebyly zahrnuty do výpočtu výsledné síly vazby.

6.3 Exprese a purifikace Receptoru 2

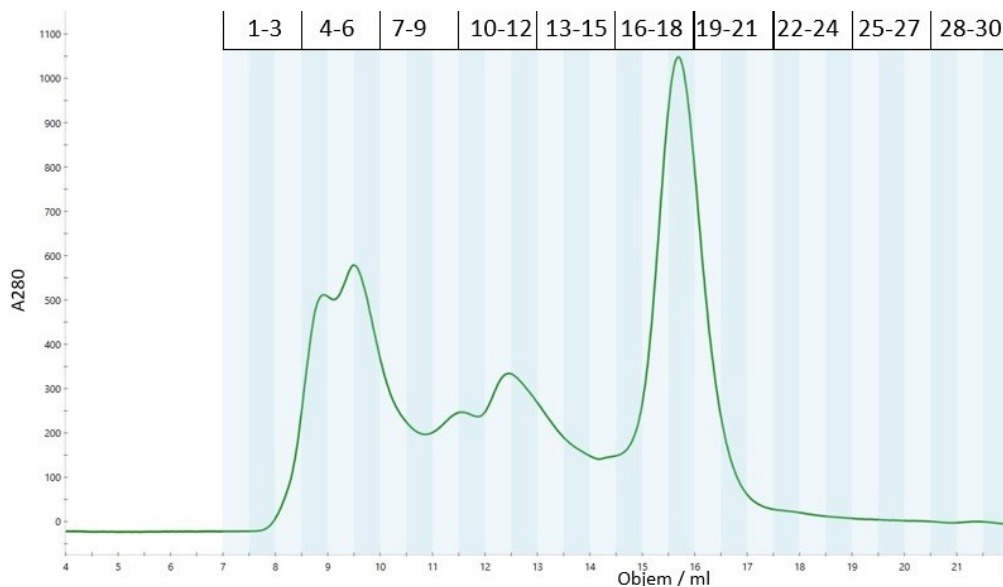
Receptor 2 byl připraven v S2 hmyzích buňkách paní Bc. Markétou Janovskou. Po sklizení produkce byla provedena dvoustupňová purifikace, jejímž prvním krokem byla afinitní chromatografie. Afinitní chromatografie byla prováděna v koloně HisTrap™ Excel. Protein se na kolonu vázal pomocí histidinové kotvy. Průběh afinitní chromatografie je ukázán na Obrázku 37. Čistota purifikovaného proteinu po prvním kroku purifikace byla zkontrolována pomocí metody SDS-PAGE. Výsledek elektroforézy je uveden na Obrázku 38, str. 87. Eluát z frakce 17-20 byl zakoncentrován přibližně na 0,5 ml a byla provedena gelová permeační chromatografie na koloně Superdex® 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare). Průběh gelové permeační chromatografie je znázorněn na Obrázku 39, str. 87. Dále byla čistota jednotlivých vybraných frakcí ověřena pomocí metody SDS-PAGE. Výsledek elektroforézy v 15% polyakrylamidovém gelu je znázorněn na Obrázku 40, str. 88. V měření MST vazebných proteinů Receptoru 2 byla používána frakce č. 18 z gelové permeační chromatografie tohoto receptoru.



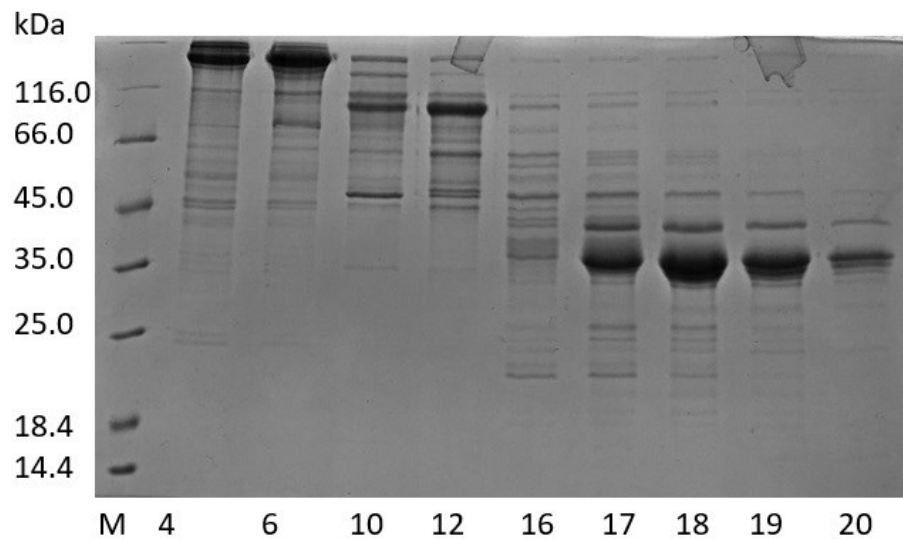
Obrázek 37: Průběh afinitní chromatografie pro Receptor 2. Bylo sbíráno 10 frakcí po 1 ml a poté 20 frakcí po 0,5 ml. Vpravo na ose y jsou znázorněna procenta pufru B (50mM Tris, pH 8; 300mM NaCl; 250 mM Imidazol), kterým byla prováděná eluce. V grafu jsou procenta pufru B znázorněna pomocí černé křivky. Purifikace probíhala na koloně HisTrap™ Excel.



Obrázek 38: Elektroforéza v 15% polyakrylamidovém gelu Receptoru 2 po afinitní chromatografii. V první dráze zleva je viditelný standard (M), dále jednotlivé dráhy pro eluované frakce. Číslo uvedené pod danou dráhou odpovídá eluované frakci. Bylo sbíráno 10 frakcí po 1 ml a dalších 20 frakcí po 0,5 ml. Purifikace probíhala na koloně HisTrap™ Excel.



Obrázek 39: Průběh gelové permeační chromatografie pro Receptor 2. Bylo sbíráno 30 frakcí po 0,5 ml. Purifikace probíhala na koloně Superdex® 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare).



Obrázek 40: Elektroforéza v 15% polyakrylamidovém gelu Receptoru 2 po gelové permeační chromatografii. V první dráze zleva je viditelný standard (M), dále jednotlivé dráhy pro eluované frakce. Číslo uvedené pod danou dráhou odpovídá eluované frakci.

7 Diskuse

Skafoldy se používají jako vazebné molekuly proti vybraným terčům. Jejich hlavní výhodou jsou vlastnosti, jako je malá velikost, stabilita a snadnost výroby. Skafold, se kterým bylo pracováno, byl výjimečný tím, že měl navržené dva různé vazebné povrchy, na kterých mohl být mutován, a tím bylo tvořeno vazebné místo pro Receptor 1 a Receptor 2. Všechny vazebné proteiny, se kterými bylo v této práci pracováno, byly vybrány pomocí kvasinkového displeje kolegyní Ing. Lucíí Kolářovou v rámci jejího doktorského projektu. Při výběru pomocí kvasinkového displeje jsou proteiny vystavené na membráně kvasinky, přičemž se předpokládá, že proteiny mají zachovanou terciární strukturu.

Motivací této práce bylo přenesení konstruktů pro kvasinkový displej do jiného expresního systému (v tomto případě bakteriálního - *E. coli*), příprava rekombinantních proteinů v tomto systému a charakterizace těchto proteinů pomocí vybraných biofyzikálních metod. Pro Receptor 1 byly vyzkoušeny dvě varianty skafoldu, tedy mutace na jednom, nebo druhém vazebném povrchu. Vazebné proteiny Receptoru 1, které vznikly mutací skafoldu na prvním vazebném povrchu, jsou označovány R1A-X (kde X je číslo od 1 do 4 a značí číslo klonu). Vazebné proteiny Receptoru 1, které vznikly mutací na druhém vazebném povrchu, jsou označovány R1B-X (kde kde X je číslo od 1 do 4 a značí číslo klonu). Pro vazebné proteiny Receptoru 2 byla dosud vyzkoušena pouze jedna varianta, a to mutace na prvním vazebném povrchu. Vazebné proteiny Receptoru 2, které vznikly mutací skafoldu na prvním vazebném povrchu, jsou označovány R2A-X (kde X je číslo od 1 do 9 a značí číslo klonu).

Prvním krokem práce byla izolace DNA knihovny kvasinek a klonování do plasmidu určených pro bakteriální buňky *E. coli*. DNA knihovna by měla obsahovat takové varianty skafoldu, jenž se vážou na naše cílové receptory během výběru metodou kvasinkového displeje. Byly použity dva různé přístupy klonování. Klonování s použitím restrikčních enzymů a klonování bez použití restrikčních enzymů, tzv. Restriction free klonování. Vazebné proteiny Receptoru 1 byly klonovány pomocí Restriction free klonování. Restriction free klonování bylo původně vyvinuto pro zavedení DNA do plasmidu v libovolné předem stanovené poloze. Toto klonování je založeno na amplifikaci fragmentu DNA pomocí PCR reakce, který slouží jako tzv. megaprimer pro lineární amplifikaci vektoru a inzertu. Pomocí Restriction free klonování

lze dále klonovat současně několik fragmentů do různých pozic expresních vektorů, simultánní vícesložkové sestavení a paralelní klonování stejného produktu PCR do řady různých vektorů, dále simultánní mutagenezi na více místech a simultánní zavedení delecí a inzercí v různých pozicích [65]. Přes všechny výhody, které klonování bez použití restričních enzymů má, nebylo toto klonování úplně jednoduché a bylo potřeba některé kroky opakovat. Nejprve bylo nutné připravit tzv. megaprimer, což byl v tomto případě gen, který měl být vložen do plasmidu, prodloužený o požadovanou streptavidinovou kotvu na N-konci a přesahy na plasmid. Ne všechny geny se povedlo tímto přístupem klonování zaklonovat. Důvodem by mohla být nevhodně zvolená délka přesahů na plasmid, nepřesné nasedání přesahů vlivem mutací ve vkládaném DNA úseku, případně nepřesně stanovená teplota nasedání megaprimeru a celkově bude nutná určitá optimalizace. Vazebné proteiny Receptoru 2 byly klonovány pomocí klonování s použitím restričních enzymů. Hlavním rozdílem bylo, že gen, který měl být do plasmidu vkládán nebyl nijak prodlužován, pouze byl amplifikován pomocí PCR reakce a poté naštěpen pomocí restričních enzymů, stejně jako plasmid, do kterého měl být gen vložen. Daný plasmid již obsahoval sekvenci pro streptavidinovou kotvu na N-konci a c-Myc na C-konci. Pokud by měly být tyto dva přístupy klonování porovnány, lze pomocí výsledků gelů po PCR z kolonií (Obrázek 11, str. 63, Obrázek 12, str. 64 a Obrázek 25, str. 75) říci, že klonování pomocí restričních enzymů mělo větší úspěšnost. Je to z velké části tím, že toto klonování je v laboratoři standardní zavedenou metodou a tedy již optimalizované.

Po zaklonování genů vazebných proteinů do plasmidu, byla provedena transformace do buněk *E. coli* BL21(DE3), které byly použity pro expresi proteinů. Všechny zaklonované proteiny se úspěšně produkovaly, což bylo zkontrolováno pomocí metody SDS-PAGE s lyzáty buněk po expresi (Obrázek 13, str. 65 a Obrázek 26, str. 76). Dále je z obrázků těchto gelů také vidět, že se vazebné proteiny Receptoru 2 produkovali v menší míře než vazebné proteiny Receptoru 1. Může to být způsobené tím, že vazebné proteiny Receptoru 2 obsahovaly navíc na svém C-konci c-Myc. Jak bylo ale ověřeno později, na testovací měření, která byla s těmito proteiny zamýšlena, bylo množství produkovaných proteinů dostačující, a proto nebyla prováděna další optimalizace produkce.

Dalším krokem práce byla purifikace proteinů. Byla zvolena dvoustupňová purifikace, jejímž prvním krokem byla purifikace na koloně obsahující matici StrepTactin XT. Již po tomto kroku byly získány proteiny v poměrně dobré čistotě, což bylo ověřeno pomocí metody SDS-PAGE (Obrázek 15, str. 66 a Obrázek 28, str. 77). Druhým krokem purifikace byla gelová permeační chromatografie na koloně Superdex® 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare), která nesloužila pouze k dosažení lepší čistoty proteinu, ale také byl pomocí chromatogramů kontrolován její průběh a chování proteinů. Bylo sledováno, zda se vazebné proteiny chovají jako WT, tedy dochází k eluci ve stejném retenčním objemu a zda neagregují. Dle těchto kritérií byly vazebné proteiny rozděleny na ty, které se chovaly na koloně jako WT a na ty, které se jako WT nechovaly. Tímto rozdělením došlo ke snížení počtu potenciálních vazebných proteinů k dalšímu testování a charakterizaci. Čistota proteinů byla po tomto kroku purifikace ověřena pomocí metody SDS-PAGE. Jak je možné si povšimnout na Obrázku 18, str. 68, na kterém je vyobrazen gel po proběhnutí elektroforéze, vazebné proteiny Receptoru 1, jenž byly mutované na druhém vazebném povrchu (tedy R1B-1, R1B-2 a R1B-3), vykazují rychlejší mobilitu na SDS-PAGE gelu než WT a vazebné proteiny, které byly mutované na prvním vazebném povrchu (tedy R1A-1, R1A-2, R1A-3, R1A-4). Přičemž na příkladu R1B-3 je z elučního profilu (značený zeleně na Obrázku 16, str. 67) dobře viditelné, že se eluoval ve stejném retenčním objemu jako WT (značený černě na Obrázku 16, str. 67), tedy by měl mít přibližně stejnou velikost, což odpovídá skutečnosti, že všechny purifikované proteiny obsahují stejné množství aminokyselin. Tato skutečnost byla několikrát diskutována v laboratoři, avšak není možné s úplnou jistotou říci, proč mutace na druhém vazebném povrchu způsobují odlišné chování na SDS-PAGE gelu. Migrace proteinů při metodě SDS-PAGE, která nekoreluje s molekulovou hmotností proteinu, je častý problém při využití této metody v práci s membránovými proteiny [66]. Abnormální pohyblivost vykazují například také helixové proteiny odvozené od transmembránových segmentů, konkrétně ty, které obsahují strukturní vzorec helix-loop-helix. Tyto proteiny migrují v polyakrylamidovém gelu rychlostí - 10% až + 30% oproti jejich skutečné hmotnosti. Tento problém se dále také řeší často na různých diskusních vědeckých fórech [67]. Jedním z možných vysvětlení je, že SDS interaguje s proteinem, denaturuje ho a dává proteinu záporný náboj. Pokud protein interaguje s SDS velmi dobře, může se stát, že se poté v gelu v elektrickém poli pohybuje rychleji. Naopak, pokud protein s SDS neinteraguje dobře, může se elektrickém poli pohybovat pomaleji. Rovněž

bylo prokázáno, že se proteiny, které jsou kyselejší nebo bazičtější, pohybují v systémech SDS-PAGE abnormálně. Vyloučit lze postranlační modifikace, které by měly za výsledek změnu mobility na gelu, jelikož byl jako expresní systém použit bakteriální. Dále v aminokyselinové sekvenci nejsou přítomny u těchto vazebných proteinů žádné cysteiny navíc, takže je nepravděpodobné, že by docházelo k tvorbě nových disulfidických můstků. Domněnka, která se zdá jako nejpravděpodobnější je, že denaturace proteinů nebyla dostatečná a proteiny si zachovaly určité kompaktní jádro (i přes to, že docházelo k denaturaci vzorků pro SDS-PAGE v redukujícím pufru a následně povařením vzorků) a díky tomu se v gelu pohybovaly rychleji. Důvod odlišného chování skafoldů mutovaných na druhém vazebném povrchu na gelu jsme se pokoušeli stanovit také pomocí stanovení krystalové struktury a proto byla zahájena krystalizace některých proteinů, které zbyly po provedených měřeních. Konkrétně se jednalo o proteiny R1A-1, R1A-2 a R1B-3. Krystalová forma byla získána pouze u jednoho z proteinů – konkrétně u proteinu R1B-3. Ovšem krystalizace by potřebovala další optimalizace, které z důvodu dalšího postupu nebyly prioritní.

Po provedení purifikace proteinů, byly purifikované proteiny dále charakterizovány pomocí vybraných biofyzikálních metod. Přestože se ne všechny proteiny při gelové permeační chromatografii chovaly jako WT, měření byla prováděna se všemi purifikovanými proteiny (vyjímkou bylo měření síly vazby pomocí metody MST). Jako první bylo provedeno měření teplotních stabilit na přístroji Prometheus NT.48. Měření probíhalo vždy v pufru, který byl použit pro permeační gelovou chromatografii a poté v pufru s 0,05% Pluronicem. Cílem tohoto měření bylo zjistit, zda se teploty tání a průběhy křivek v pufru s přidaným Pluronicem výrazně neliší od dat naměřených v pufru bez přidaného detergentu. Pokud by se výsledky lišily, nebylo by možné Pluronic použít jakožto detergent pro plánované MST měření. Jak je možné vidět ve výsledcích v Tabulce 17, str. 69 pro vazebné proteiny Receptoru 1 a v Tabulce 20, str. 80 pro vazebné proteiny Receptoru 2, výsledky teplot tání jsou pro oba pufrы velmi podobné.

S proteiny bylo provedeno CD měření. Samotné měření bylo prováděno paní Tatsianou Charnavets, Ph.D. na přístroji Chirascan Plus CD spectrometer. Toto měření nebylo prováděno za účelem predikce struktury, ale pro porovnání se spektrem WT. Většina spekter vykazuje podobnosti se spektrem WT. Tímto se dá usuzovat, zda je protein sbalený či nikoliv. Z naměřených spekter zobrazených na Obrázku 19, str. 70 pro vazebné proteiny Receptoru 1

a na Obrázku 32, str. 81 pro vazebné proteiny Receptoru 2, je vidět, že všechny proteiny mají určité zastoupení α -helixů.

Několik dní po purifikaci bylo provedeno také měření DLS (z angl. Dynamic Light Scattering) na přístroji Zetasizer Ultra. Toto měření bylo provedeno za účelem kontroly, jak veliké „částice“ a v jakém zastoupení se ve vzorku vyskytují. Tedy zkontrolovat, zda nedošlo k výrazné agregaci proteinu. Tyto výsledky byly porovnány s výsledky gelové permeační chromatografie. Po gelové permeační chromatografii bylo pracováno pouze s frakcemi, které byly eluovány ve stejném retenčním objemu jako WT. Pokud protein agregoval, bylo pracováno pouze s frakcí, která velikostně odpovídala neagregovanému proteinu. Měření DLS tedy bylo zjištěno, zda po určitém časovém úseku protein v roztoku znovu agregoval, či nikoliv. Z výsledného spektra pro vazebné proteiny Receptoru 1 lze říci, že žádný protein výrazně neagregoval. Ve spektru pro vazebné proteiny Receptoru 2, zobrazeného na Obrázku 34, str. 83, je vidět, že R2A-4, který výrazně agregoval při gelové permeační chromatografii, nebyl poté stabilní ani v roztoku a nejspíše zde došlo k rozkladu či rozbalení proteinu v roztoku.

Pro kvantifikaci síly interakce mezi vazebnými proteiny a molekulou receptoru, tedy stanovení K_D , byla zvolena metoda MST (z angl. Microscale Thermophoresis). Pro toto měření byl použit přístroj Monolith NT.115 od firmy Nanotemper. Nejprve bylo provedeno barvení receptoru pomocí kitu Monolith His-Tag Labeling Kit RED-tris-NTA 2nd Generation od firmy Nanotemper. Barvení proběhlo u Receptoru 1 i Receptoru 2 úspěšně. Poté byl proveden zkušební sken kapilár pouze s obarveným receptorem. Pro Receptor 1 je tento sken vyobrazen na Obrázku 22, str. 72. Z průběhu MST křivek a ze skenu kapilár bylo patrné, že v kapilárách docházelo k agregaci, jelikož MST křivka neměla standardní průběh. Tento zkušební sken byl proveden pro dvě kapiláry a průběhy křivek by měly mít stejný průběh. Jak je ovšem vidět na Obrázku 22A, str. 72, mají obě křivky průběh odlišný. Dále je možné vidět na Obrázku 22B, str. 72, že míra fluorescence nebyla v kapilárách před a po měření stejná. Tvar kapiláry byl pro obě měření také rozdílný (Obrázek 22C, str. 72). Kvalita Receptoru 1 nebyla pro získání dat s reprodukovatelnými výsledky dostatečná, a proto nebylo v tomto měření dále pokračováno. Receptor 1 byl pro výběry pomocí kvasinkového displeje a měření získán z laboratoře ve Weizmannově institutu věd v Izraeli v omezeném množství a nejspíše byl poškozen během

transportu nebo špatně a dlouho skladován. Z důvodu, že tento protein v laboratoři zatím není možné připravit v dostatečném množství, je stále nutná optimalizace produkce v S2 hmyzích buňkách, nebylo měření opakováno. Pro zopakování měření s reprodukovatelnými výsledky bylo nutné protein exprimovat v dostatečném množství, purifikovat a charakterizovat pomocí biofyzikálních metod, aby bylo zaručeno, že je protein správně sbalený a stabilní, a tedy vhodný k dalšímu měření. Bylo by také nutné znovu opakovat samotnou selekci vazebných proteinů Receptoru 1 pomocí kvasinkového displeje, jelikož Receptor 1 s nedostatečnou kvalitou byl použit právě i během selekce. Jednalo se o první použití kvasinkového displeje v laboratoři, a proto byla nutná řada optimalizací, čímž pádem nejspíše došlo k přehlédnutí nevyhovující kvality proteinu. To jen potvrzuje důležitost charakterizace kvality proteinů pomocí biofyzikálních metod.

Receptor 2 byl exprimován v naší laboratoři Bc. Markétou Janovskou v S2 hmyzích buňkách. Purifikován byl pomocí dvoustupňové purifikace. Prvním krokem purifikace byla afinitní chromatografie na koloně HisTrap™ Excel s navázanými nikelnatými ionty. Protein se na kolonu vázal pomocí histidinové kotvy. Jak je vidět obrázku SDS-PAGE gelu (Obrázek 38, str. 87) nebyl protein po prvním kroku purifikace dostatečně čistý. Druhým stupněm purifikace byla gelová permeační chromatografie, jenž byla prováděna v koloně Superdex® 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare). Po gelové permeační chromatografii byla čistota zkontrolována opět pomocí metody SDS-PAGE (Obrázek 40, str. 88). I po druhém kroku purifikace nebyl získán protein se 100% čistotou, avšak pro další účely byla čistota dostatečná. Po purifikaci byl Receptor 2 ocharakterizován dle standardního postupu zavedeným v laboratoři (není součástí této práce). V MST měření byla používána pouze frakce číslo 18 tohoto proteinu. Z dat získaných během purifikace a následné charakterizace byly vybrány tři vazebné proteiny, se kterými bylo měření MST prováděno. Měření bylo prováděno s R2A-1, R2A-2 a R2A-7. Vazebná křivka pro R2A-1 je zobrazena modře na Obrázku 36A, str. 85. Jak je možné si povšimnout, ke konci vazebné křivky začíná MST signál opět stoupat. Obdobně je tomu u proteinu R2A-7 (MST křivka zobrazena na Obrázku 36C, str. 85 červeně). Tyto body jsou zobrazeny šedivě, jelikož nebyly brány v potaz při prokládání bodů vazebnou křivkou. Domněnkou proč tomu tak je, může být existence druhého vazebného módu s nižší afinitou. Případně se může jednat o nespecifickou vazbu. Pro další zjištění by bylo nutné protein ještě

více zakoncentrovat, avšak pro účely této práce nebylo další měření nutné. Jako poslední protein, který byl zvolen pro měření MST byl R2A-2, který se na gelové permeační chromatografii choval jako WT, neagregoval a i z výsledků dalších měření se zdál jako vhodný kandidát (stejně byl vybrán i R2A-1 a R2A-7). Na Obrázku 36B, str. 85 je vazebná křivka tohoto proteinu zobrazena zeleně. Vazebné proteiny byly selektovány pomocí kvasinkového displeje tak, aby afinita byla v řádech μM , což odpovídá naměřeným hodnotám pomocí MST.

8 Závěr

Celkově bylo dosaženo zadaných cílů, tedy přenesení konstruktů do jiného expresního systému, exprese a purifikace vybraných vazebných proteinů a následná biofyzikální charakterizace a měření síly vazby na konkrétní receptor. Bylo zjištěno, že ne všechny vazebné proteiny, jež fungují na kvasince, jsou vhodné pro přenos do bakteriálního systému. Tyto výsledky budou brány v potaz při další práci a při dalším výběru pomocí kvasinkového displeje. Práce prokázala důležitost biofyzikální charakterizace proteinů. Tyto proteiny jsou vyvíjeny s cílem aplikace v léčbě autoimunitních onemocnění.

- Vybrané selektované vazebné proteiny Receptoru 1 byly úspěšně přeneseny do bakteriálního expresního systému.
- Rekombinantní vazebné proteiny Receptoru 1 byly úspěšně připraveny.
- Rekombinantní vazebné proteiny Receptoru 1 byly charakterizovány pomocí vybraných biofyzikálních metod (kromě MST).
- Vybrané selektované vazebné proteiny Receptoru 2 byly úspěšně přeneseny do bakteriálního expresního systému.
- Rekombinantní vazebné proteiny Receptoru 2 byly úspěšně připraveny.
- Rekombinantní vazebné proteiny Receptoru 2 byly charakterizovány pomocí vybraných biofyzikálních metod.

9 Seznam použité literatury

- [1] NICOD, L P. Cytokines I. 1993, 660–667.
- [2] HOŘEJŠÍ, Václav et al. *Základy imunologie*. 5. vydání. Praha: TRITON, 2013. ISBN 978-80-7387-713-2.
- [3] CHUNG, Kian Fan. Cytokines. In: *Asthma and COPD* [online]. B.m.: Elsevier Ltd, 2009, s. 327–341. ISBN 9780123740014. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374001-4.00027-4
- [4] BORISH, Larry C a John W STEINKE. 2 . Cytokines and chemokines [online]. 2003, 2(Table I), 460–475. Dostupné z: doi:10.1067/mai.2003.108
- [5] O'SHEA, John J, Massimo GADINA a Richard M SIEGEL. 9 - Cytokines and Cytokine Receptors. In: Robert R RICH, Thomas A FLEISHER, William T SHEARER, Harry W SCHROEDER, Anthony J FREW a Cornelia M B T - *Clinical Immunology (Fifth Edition)* WEYAND, ed. [online]. London: Content Repository Only!, 2019, s. 127-155.e1. ISBN 978-0-7020-6896-6. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00009-0
- [6] FITZGERALD, Katherine A. et al. Cytokine Receptor Superfamilies. *The Cytokine FactsBook and Webfacts* [online]. 2001, 21–31. Dostupné z: doi:10.1016/b978-012155142-1/50005-1
- [7] WAJANT, Harald. Death receptors. *Essays in Biochemistry* [online]. 2003, **39**, 53–71. ISSN 0071-1365. Dostupné z: doi:10.1042/bse0390053
- [8] SABAT, Robert. IL-10 family of cytokines. *Cytokine and Growth Factor Reviews* [online]. 2010, **21**(5), 315–324. ISSN 13596101. Dostupné z: doi:10.1016/j.cytogfr.2010.11.001
- [9] PESTKA, Sidney et al. Interleukin -10 and Related Cytokines and Receptors . *Annual Review of Immunology* [online]. 2004, **22**(1), 929–979. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104622

- [10] COMMINS, Scott, John W. STEINKE a Larry BORISH. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [online]. 2008, **121**(5), 1108–1111. ISSN 00916749. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaci.2008.02.026
- [11] FICKENSCHER, Helmut et al. The interleukin-10 family of cytokines. 2002, **23**(2), 89–96.
- [12] ZDANOV, Alexander. Structural Features of the Interleukin-10 Family of Cytokines. 2004, 3873–3884.
- [13] MOORE, Kevin W. et al. Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annual Review of Immunology* [online]. 2001, **19**(1), 683–765. ISSN 0732-0582. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.683
- [14] GALLAGHER, G. et al. Cloning, expression and initial characterisation of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10). *Genes and Immunity* [online]. 2000, **1**(7), 442–450. ISSN 14664879. Dostupné z: doi:10.1038/sj.gene.6363714
- [15] CHANG, Changsoo et al. Crystal structure of interleukin-19 defines a new subfamily of helical cytokines. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2003, **278**(5), 3308–3313. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M208602200
- [16] SABAT, Robert et al. *IL-19 and IL-20: Two novel cytokines with importance in inflammatory diseases* [online]. květen 2007. ISSN 14728222. Dostupné z: doi:10.1517/14728222.11.5.601
- [17] ZENEWICZ, Lauren A. a Richard A. FLAVELL. Recent advances in IL-22 biology. *International Immunology* [online]. 2011, **23**(3), 159–163. ISSN 09538178. Dostupné z: doi:10.1093/intimm/dxr001
- [18] CONTI, P. et al. IL-10 subfamily members: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. *Immunology Letters* [online]. 2003, **88**(3), 171–174. ISSN 01652478. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-2478(03)00087-7

- [19] WANG, Mai et al. Interleukin 24 (MDA-7/MOB-5) signals through two heterodimeric receptors, IL-22R1/IL-20R2 and IL-20R1/IL-20R2. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2002, **277**(9), 7341–7347. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M106043200
- [20] GUPTA, Pankaj et al. mda-7/IL-24: Multifunctional cancer-specific apoptosis-inducing cytokine. *Pharmacology and Therapeutics* [online]. 2006, **111**(3), 596–628. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2005.11.005
- [21] WANG, Mai a Peng LIANG. Interleukin-24 and its receptors. *Immunology* [online]. 2005, **114**(2), 166–170. ISSN 00192805. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02094.x
- [22] PERSAUD, Leah et al. Mechanism of action and applications of interleukin 24 in immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2016, **17**(6), 1–13. ISSN 14220067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms17060869
- [23] DAMBACHER, J. et al. The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation. *Gut* [online]. 2009, **58**(9), 1207–1217. ISSN 00175749. Dostupné z: doi:10.1136/gut.2007.130112
- [24] SHEIKH, Faruk et al. Cutting Edge: IL-26 Signals through a Novel Receptor Complex Composed of IL-20 Receptor 1 and IL-10 Receptor 2. *The Journal of Immunology* [online]. 2004, **172**(4), 2006–2010. ISSN 0022-1767. Dostupné z: doi:10.4049/jimmunol.172.4.2006
- [25] DONNELLY, Raymond et al. The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. *Journal of Leukocyte Biology* [online]. 2004, **76**(2), 314–321. ISSN 0741-5400. Dostupné z: doi:10.1189/jlb.0204117
- [26] ZDANOV, Alexander. Structural analysis of cytokines comprising the IL-10 family. *Cytokine and Growth Factor Reviews* [online]. 2010, **21**(5), 325–330. ISSN 13596101. Dostupné z: doi:10.1016/j.cytogfr.2010.08.003

- [27] LOGSDON, Naomi J. et al. Structural basis for receptor sharing and activation by interleukin-20 receptor-2 (IL-20R2) binding cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 2012, **109**(31), 12704–12709. ISSN 00278424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1117551109
- [28] SEIDEL, H. Martin, Peter LAMB a Jonathan ROSEN. Pharmaceutical intervention in the JAK/STAT signaling pathway. *Oncogene* [online]. 2000, **19**(21), 2645–2656. ISSN 09509232. Dostupné z: doi:10.1038/sj.onc.1203550
- [29] RAWLINGS, Jason S., Kristin M. ROSLER a Douglas A. HARRISON. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science* [online]. 2004, **117**(8), 1281–1283. ISSN 00219533. Dostupné z: doi:10.1242/jcs.00963
- [30] IHLE, J. N. The Stat family in cytokine signaling. *Current Opinion in Cell Biology* [online]. 2001, **13**(2), 211–217. ISSN 09550674. Dostupné z: doi:10.1016/S0955-0674(00)00199-X
- [31] BENEKLI, Mustafa et al. Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood* [online]. 2003, **101**(8), 2940–2954. ISSN 00064971. Dostupné z: doi:10.1182/blood-2002-04-1204
- [32] NYGREN, Per Åke. Alternative binding proteins: Affibody binding proteins developed from a small three-helix bundle scaffold. *FEBS Journal* [online]. 2008, **275**(11), 2668–2676. ISSN 1742464X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06438.x
- [33] BECK, Alain et al. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nature Reviews Immunology* [online]. 2010, **10**(5), 345–352. ISSN 14741733. Dostupné z: doi:10.1038/nri2747
- [34] SCHNEIDER, Christian K., Marisa PAPALUCA a Pekka KURKI. *A European perspective on immunogenicity evaluation* [online]. B.m.: Nat Biotechnol. červen 2009 [vid. 2020-06-27]. ISSN 10870156. Dostupné z: doi:10.1038/nbt0609-507

- [35] JAHN, Eva Maria a Christian K. SCHNEIDER. *How to systematically evaluate immunogenicity of therapeutic proteins - regulatory considerations* [online]. B.m.: N Biotechnol. červen 2009 [vid. 2020-06-27]. ISSN 18716784. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbt.2009.03.012
- [36] SKERRA, Arne. Engineered protein scaffolds for molecular recognition. *Journal of Molecular Recognition* [online]. 2000, **13**(4), 167–187. ISSN 09523499. Dostupné z: doi:10.1002/1099-1352(200007/08)13:4<167::AID-JMR502>3.0.CO;2-9
- [37] HEY, Thomas et al. Artificial, non-antibody binding proteins for pharmaceutical and industrial applications. *Trends in Biotechnology* [online]. 2005, **23**(10), 514–522. ISSN 01677799. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2005.07.007
- [38] WURCH, Thierry, Alain PIERRÉ a Stéphane DEPIL. Novel protein scaffolds as emerging therapeutic proteins: From discovery to clinical proof-of-concept. *Trends in Biotechnology* [online]. 2012, **30**(11), 575–582. ISSN 18793096. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibtech.2012.07.006
- [39] LÖFBLOM, John, Fredrik Y. FREJD a Stefan STÅHL. Non-immunoglobulin based protein scaffolds. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2011, **22**(6), 843–848. ISSN 09581669. Dostupné z: doi:10.1016/j.copbio.2011.06.002
- [40] FLOWER, Darren R. The lipocalin protein family: Structure and function. *Biochemical Journal* [online]. 1996, **318**(1), 1–14. ISSN 02646021. Dostupné z: doi:10.1042/bj3180001
- [41] HOHLBAUM, Andreas M. a Arne SKERRA. Anticalins®: The lipocalin family as a novel protein scaffold for the development of next-generation immunotherapies. *Expert Review of Clinical Immunology* [online]. 2007, **3**(4), 491–501. ISSN 1744666X. Dostupné z: doi:10.1586/1744666X.3.4.491
- [42] PLÜCKTHUN, Andreas. Designed Ankyrin Repeat Proteins (DARPs): Binding Proteins for Research, Diagnostics, and Therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* [online]. 2015, **55**(1), 489–511. ISSN 0362-1642. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134654

- [43] GERA, Nimish, Mahmud HUSSAIN a Balaji M. RAO. Protein selection using yeast surface display. *Methods* [online]. 2013, **60**(1), 15–26. ISSN 10462023. Dostupné z: doi:10.1016/j.ymeth.2012.03.014
- [44] GAI, S. Annie a K. Dane WITTRUP. Yeast surface display for protein engineering and characterization. *Current Opinion in Structural Biology* [online]. 2007, **17**(4), 467–473. ISSN 0959440X. Dostupné z: doi:10.1016/j.sbi.2007.08.012
- [45] TRAXLMAYR, Michael W. a Christian OBINGER. Directed evolution of proteins for increased stability and expression using yeast display. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2012, **526**(2), 174–180. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2012.04.022
- [46] KÖNNING, Doreen a Harald KOLMAR. Beyond antibody engineering: Directed evolution of alternative binding scaffolds and enzymes using yeast surface display. *Microbial Cell Factories* [online]. 2018, **17**(1), 1–17. ISSN 14752859. Dostupné z: doi:10.1186/s12934-018-0881-3
- [47] MASCHBERGER, Melanie et al. Exploring Protein Stability by nanoDSF Prometheus NT.48 – The Stability Expert. *NanoTemper Technologies GmbH* [online]. 2015. Dostupné z: www.nanotemper-technologies.com
- [48] STRUTZ, Wyatt. Exploring Protein Stability by NanoDSF. *Biophysical Journal* [online]. 2016, **110**(3), 393a. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpj.2015.11.2126
- [49] WEN, Jie, Harrison LORD, Nicholas KNUTSON a Mats WIKSTRÖM. Nano differential scanning fluorimetry for comparability studies of therapeutic proteins. *Analytical Biochemistry* [online]. 2020, **593**, 113581. ISSN 10960309. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2020.113581
- [50] *nanoDSF • Protein Stability and Unfolding • Buffer and Compound Screening* [online]. [vid. 2020-05-28]. Dostupné z: <https://2bind.com/nanodsf/>
- [51] *StruBioMol - Overview* [online]. [vid. 2020-05-28]. Dostupné z: <http://www.imb.savba.sk/strubiomol/index.php?id=nanoDSF&lang=en>

- [52] BULHELLER, Benjamin M., Alison RODGER a Jonathan D. HIRST. Circular and linear dichroism of proteins. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 2007, **9**(17), 2020–2035. ISSN 14639076. Dostupné z: doi:10.1039/b615870f
- [53] GREENFIELD, Norma J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* [online]. 2006, 2876–2890 [vid. 2020-05-29]. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2006.202
- [54] CORRÊA, DHA a CHI RAMOS. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African J Biochem Res* [online]. 2009, **3**(5), 164–173. Dostupné z: [http://www.academicjournals.org/AJBR/PDF/Pdf2009/May/Special Issue/Corrêa and Ramos.pdf](http://www.academicjournals.org/AJBR/PDF/Pdf2009/May/Special%20Issue/Corrêa%20and%20Ramos.pdf)
- [55] 4.2.1 *Circular dichroism spectroscopy* [online]. [vid. 2020-05-29]. Dostupné z: http://www.cryst.bbk.ac.uk/PPS2/course/section8/ss-960531_21.html
- [56] SREERAMA, Narasimha, Sergei Yu VENYAMINOV a Robert W. WOODY. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Inclusion of denatured proteins with native proteins in the analysis. *Analytical Biochemistry* [online]. 2000, **287**(2), 243–251. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1006/abio.2000.4879
- [57] ZILLNER, Karina et al. Microscale Thermophoresis as a Sensitive Method to Quantify Protein: Nucleic Acid Interactions in Solution. *Methods in Molecular Biology* [online]. 2012, **815**, 241–252. ISSN 10643745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-61779-424-7_18
- [58] SPARKS, Robert P. a Rutilio FRATTI. Use of microscale thermophoresis (MST) to measure binding affinities of components of the fusion machinery. In: *Methods in Molecular Biology* [online]. B.m.: Humana Press Inc., 2019, s. 191–198. ISSN 10643745. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-8760-3_11
- [59] JERABEK-WILLEMSEN, Moran et al. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure* [online]. 2014, **1077**, 101–113. ISSN 00222860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2014.03.009

- [60] JERABEK-WILLEMSSEN, Moran et al. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay and Drug Development Technologies* [online]. 2011, **9**(4), 342–353. ISSN 1540658X. Dostupné z: doi:10.1089/adt.2011.0380
- [61] PLACH, Maximilian, Klaus GRASSER a Thomas SCHUBERT. MicroScale Thermophoresis as a Tool to Study Protein-peptide Interactions in the Context of Large Eukaryotic Protein Complexes. *Bio-Protocol* [online]. 2017, **7**(23), 1–24. ISSN 2331-8325. Dostupné z: doi:10.21769/bioprotoc.2632
- [62] BABICK, Frank. Dynamic light scattering (DLS). In: *Characterization of Nanoparticles: Measurement Processes for Nanoparticles* [online]. B.m.: Elsevier, 2019, s. 137–172. ISBN 9780128141830. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814182-3.00010-9
- [63] MISONO, Takeshi. Dynamic Light Scattering (DLS). In: *Measurement Techniques and Practices of Colloid and Interface Phenomena* [online]. B.m.: Springer Singapore, 2019, s. 65–69. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-13-5931-6_10
- [64] MIKULECKÝ, Pavel et al. Crystal structure of human interferon- γ receptor 2 reveals the structural basis for receptor specificity: *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology* [online]. 2016, **72**(9), 1017–1025. ISSN 20597983. Dostupné z: doi:10.1107/S2059798316012237
- [65] UNGER, Tamar et al. Applications of the Restriction Free (RF) cloning procedure for molecular manipulations and protein expression. *Journal of Structural Biology* [online]. 2010, **172**(1), 34–44. ISSN 10478477. Dostupné z: doi:10.1016/j.jsb.2010.06.016
- [66] CARRUTHERS, Nicholas J. et al. Protein mobility shifts contribute to gel electrophoresis liquid chromatography analysis. *Journal of Biomolecular Techniques* [online]. 2015, **26**(3), 103–112. ISSN 19434731. Dostupné z: doi:10.7171/jbt.15-2603-003
- [67] CARROL, James A. *Protein appears at too low MW on SDS-PAGE?* [online]. [vid. 2020-06-16]. Dostupné z: <https://bit.ly/39Uq8py>