

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



**Maroš Huličiak**

Selekčné postupy v riadenej evolúcií väzobných proteínov  
Selection approaches in directed evolution of binding proteins

Bakalárska práce

Školiteľ: RNDr. Petr Malý, CSc.

Praha, 2017

## **Pod'akovanie**

Ďakujem svojmu školiteľovi RNDr. Petrovi Malému, CSc., ďalej celému výskumnému tímu Laboratória inžinierstva väzobných proteínov, predovšetkým Mgr. Lucii Marečkovej, za pomoc a konzultácie počas písania mojej záverečnej práce. Ďakujem svojim rodičom za ich podporu počas štúdia.

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.5.2017

Podpis

**Abstrakt:**

Umelo vytvárané väzobné proteíny odvodené od malých proteínových domén lákajú čoraz väčšiu pozornosť ako alternatívy k monoklonálnym protilátkam a majú široké spektrum využitia. Svoju aplikáciu si našli v oblastiach diagnostiky rôznych onemocnení, sú prísľubom pre vývoj vakcín proti globálnym ochoreniam ako je AIDS, môžu mať terapeutický potenciál a skvalitňujú purifikačné a chromatografické metódy. Na selekciu proteínových variánt, ktoré majú najlepšie väzobné vlastnosti sa v súčasnosti využíva viac než desať selekčných, tzv. displejových techník. Displejové techniky využívajú rôzne vektory pre vystavovanie proteínových variánt ako je tomu napríklad u fágového, kvasinkového, retrovirálneho či bakulovirálneho displeja. Selekcia taktiež môže prebiehať *in vitro*. Príkladom je ribozomálny displej, mRNA displej a CIS displej. Evolúcia displejových selekčných techník umožnila selekciu postranslačne glykosylovaných, fosforylovaných či acylovaných proteínov, prispela k zvyšovaniu výťažku selektovaných ligandov a k skvalitneniu ich väzobných vlastností. Práca popisuje a porovnáva vybrané selekčné metódy, pojednáva o výhodách a limitáciách ich kombinatoriálnych knižníc peptidov a uvádza praktické využitie väzobných proteínov odvodených od malých proteínových domén.

**Kľúčové slová:**

väzobný proteín, kombinatoriálna knižnica, selekčná technika, fágový displej, ribozomálny displej, kvasinkový displej

**Abstract:**

Artificial binding proteins derived from small protein domains attract attention as a promising alternative to monoclonal antibodies and can be used in many kinds of applications. They are useful in diagnosis of human diseases, seem to be a clue for more efficient vaccine development preventing from global diseases such as AIDS, can exhibit a therapeutic potential or improve purification techniques. For the selection of protein variants with desired properties such as high specificity and binding affinity, more than 10 different selection techniques have been developed. So called display techniques such as phage display, yeast display, retroviral display or baculovirus display are based on protein expression from different vectors. Contrary that, ribosome display, mRNA display and CIS display are cell-free systems based on in vitro translation. Development of different selection approaches allows production of post-translationally glycosylated, phosphorylated and acetylated proteins, increased yield of the produced binders and improved their binding properties. The submitted work provides an overview of current selection techniques, compare their parameters regarding to combinatorial libraries, describes their advantageous properties and limitations, and focus on a practical utilization of protein binders derived from small protein domains.

**Key words:**

Binding protein, combinatorial library, selection technique, phage display, ribosome display, yeast display

## Zoznam použitých skratiek

### Skratka

AMK  
dsDNA  
EDTA  
ELISA  
IgG  
mRNA  
PBS  
PCR

### Význam

Aminokyselina  
Dvojvláknová DNA  
Kyselina etyléndiaminotetraoctová  
Enzyme-linked immuno sorbent assay  
Imunoglobulín G  
Mediátorová (messenger) RNA  
Fosfátový pufor  
Polymerázová reťazová reakcia

### **Bázy:**

A	Adenín
C	Cytosín
G	Guanín
T	Thymín
U	Uracil

### **Aminokyseliny:**

A	Alanín
C	Cysteín
E	Kyselina glutámová
H	Histidín
K	Lyzín
L	Leucín
N	Asparagín
P	Prolín
T	Threonín

# Obsah

1.Úvod .....	1
2.Malé proteínové domény .....	2
3.Kombinatoriálne knižnice .....	2
3.1.Príprava kombinatoriálnych knižníc .....	4
4.Selekčné displejové techniky .....	4
4.1.Fágový displej .....	4
4.1.1.Biopanning .....	5
4.2.Ribozomálny displej .....	7
4.3.Kvasinkový displej .....	10
4.3.1.Selekcia variánt proteínov kvasinkových buniek s využitím magnetických mikročastíc .....	10
4.4.Retrovirálny displej .....	13
4.5.Bakulovirálny displej .....	14
4.6.Ostatné selekčné techniky, vylepšenia a modifikácie .....	15
5.Praktické využitie malých väzobných proteínov .....	16
5.1.Využitie malých väzobných proteínov v diagnostike a k prevencii pred chorobami .....	16
5.2.Bioanalytické využitie malých proteínov odvodených od proteínových domén .....	17
5.2.1.Metóda magnetic fishing .....	17
5.2.2.Purifikácia retrovirálnych častíc na afinitných matriciach .....	17
6.Záver .....	18
7.Prehľad použitej literatúry .....	20

# 1.Úvod

Modelové proteínové inžinierstvo patrí v súčasnej dobe k oblastiam s vysokým potenciálom a perspektívou. Cieľom mnohých vedeckých tímov je tvorba malých proteínov odvodených od proteínových domén s najlepšimi väzobnými vlastnosťami a vysokou špecifitou. Spoločne s tvorbou a rozvojom týchto molekúl došlo k evolúcii vybraných selekčných techník, vďaka ktorým sme schopní efektívne získať nami požadovanú väzobnú molekulu. Hovoríme o takzvaných displejových technikách. Princípom týchto selekčných techník je vystavenie požadovanej molekuly pre väzbu odlišných variant proteínov, ktoré je možné následne identifikovať vďaka funkčnému spojeniu proteínu s genetickou informáciou.

Samotnej väzbe požadovanej molekuly s vopred definovanou, tzv. terčovou molekulou predchádza tvorba kombinatoriálnych knižníc z vychádzajúcej molekuly, tzv. scaffoldu, ktoré predstavujú obrovské množstvo rozličných variant, pričom len tie najlepšie varianty sa naviažu a udržia na terčových molekulách. Nasleduje identifikácia sekvencie DNA, ktorá je zodpovedná za pozitívne zmeny väzobných vlastností, resp. ktorá sekvencia spôsobila vyhovujúcu zmenu usporiadania aminokyselín vo väzobnej doméne. Rôzne selekčné techniky používajú odlišné princípy pre identifikáciu hľadanej DNA. Napríklad v prípade fágového displeja dokážeme cieľovú sekvenciu určiť na základe fúzie DNA jednej z našich variant kombinatoriálnej knižnice a DNA fága. Pomocou sekvenácie presne určíme úsek kódujúci väzbu. V prípade ribozomálneho displeja je nutné najskôr pomocou reverznej transkripcie prepísať mRNA na DNA vyhovujúcej varianty.

Evolúciu selekčných metód proteínového inžinierstva odštartoval v 80-tych rokoch 20.storočia G. Smith, ktorý modifikoval DNA bakteriofága, čo viedlo k prezentácii krátkeho lineárneho peptidu na povrchu vírového obalu, ktorý vytvoril väzbu s existujúcou definovanou protilátkou (Smith 1985). Od tejto udalosti došlo k viacerým modifikáciám tejto displejovej techniky a tvorbe nových techník založených na prezentáciách molekúl sprostredkujúcich väzbu či už na povrchu prokaryotickej alebo eukaryotickej bunky. V súčasnej dobe existuje viac než desať nových displejových techník, spomeniem uvádzaný fágový displej, ribozomálny displej, kvasinkový displej, retrovirálny displej, bakulovirálny displej, mRNA displej.

Cieľom nasledujúcich kapitol bude zhrnúť a porovnať najnovšie poznatky o vybraných selekčných metódach využiteľných v riadenej evolúcii väzobných proteínov.

## 2. Malé proteínové domény

Malé proteínové domény, označované aj ako scaffolds, sú molekuly odvodené od väzobných domén proteínov. Ich hlavnými výhodami sú vysoká odolnosť voči teplu, malá veľkosť, absencia disulfidických mostíkov a voľných cysteínov, lacná a rýchla produkcia a pomerne ľahká manipulácia vedúca k zmene ich štruktúry.

Užitočnosť scaffoldov môžeme demonštrovať na príklade fibronektínu, ktorý predstavuje jednu z najčastejších molekúl sprostredkujúcu väzbu proteín-proteín u človeka. Pre vnútrobunečné aplikácie je výhodnejší práve alternatívny scaffold, ktorý sa v prostredí bunky efektívnejšie zbalí, je tepelne odolnejší než fibronektín a neobsahuje disulfidické mostíky. Vlastnosti scaffoldu odvodeného od väzobnej domény fibronektínu popisuje vo svojej štúdií Koide et al., ktorý porovnal väzobné vlastnosti ľudského receptora pre estrogén v bunečných jadrách. Potvrdil lepšie väzobné vlastnosti varianty bez disulfidických mostíkov oproti doméne fibronektínu, ktorá disulfidické mostíky obsahovala (Koide et al. 1998).

Malé proteínové domény sa stávajú čoraz väčším predmetom záujmu, a to hlavne vďaka ich využitiu pri diagnostike chorôb a rovnako aj pre ich terapeutický potenciál. V súčasnosti sú niektoré scaffolds v pokročilých štádiách klinického testovania (Hananberg et al. 2014).

Svoje uplatnenie si našli aj v bioanalytickej oblasti, kde alternujú alebo vylepšujú klasické purifikačné metódy alebo vo vývoji vakcín, ktoré sú využívané k prevencii.

## 3. Kombinatoriálne knižnice

Aby sme našli proteín s potrebnými väzobnými vlastnosťami, respektíve gén, ktorý ho kóduje, je potrebné vytvoriť kombinatoriálnu knižnicu proteínových variánt, ktoré prídu do kontaktu s našou definovanou terčovou molekulou.

Proteínovú kombinatoriálnu knižnicu používanú pri displejových technikách si môžeme predstaviť ako rôzne varianty rovnamej proteínovej domény, pričom každá doména je originálna v zastúpení a poradí aminokyselín vo väzobnej oblasti.

Po nájdení optimálnej proteínovej domény-scaffoldu nasleduje príprava DNA knižnice, ktorá vychádza zo štruktúry proteínu. Zo znalosti štruktúry presne vieme, ktorá sekvencia kóduje väzobné domény a sekvenciu tejto domény modifikujeme. Výber vhodných aminokyselín pre



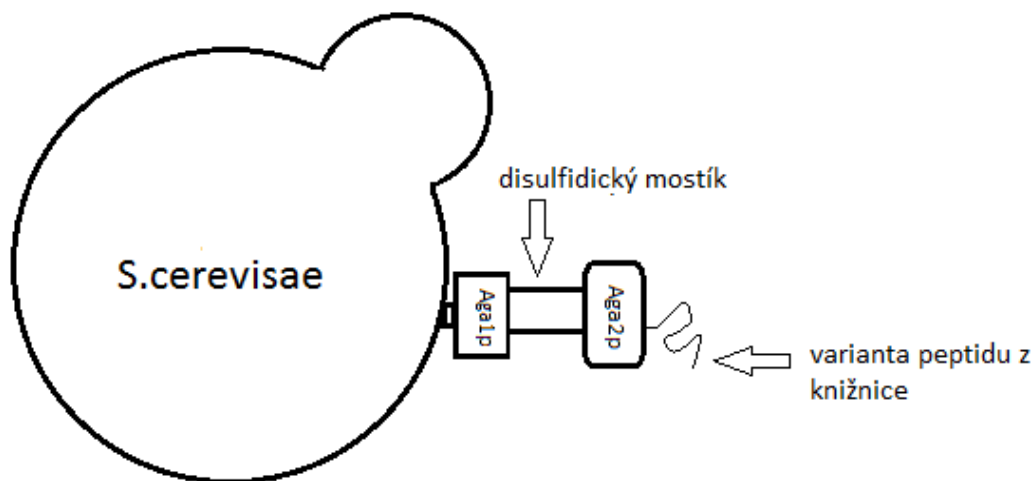
modifikáciu nie je náhodný. Pre určenie správnej kombinácie je dôležité nájsť aminokyseliny zúčastňujúce sa väzby s druhou molekulou a zároveň zohľadniť kritériá zachovania stability a integrity pôvodnej molekuly. Napríklad v prípade albumín väzobnej domény usilujeme o to, aby doména nemala afinitu k albumínu, ale práve k vybranej, vopred definovanej terčovej molekule (Ahmad et al. 2012).

Po zostavení proteínovej knižnice nasleduje proces označovaný ako „screening“, kedy usilujeme o hľadanie varianty s požadovanými afinitnými a špecifickými vlastnosťami.

Teoretická rozsiahlosť knižníc používaných pri displejových technikách je obrovská a jej praktická využiteľnosť je limitovaná použitou selekčnou metódou.

Kombinatoriálna knižnica peptidov používaná pri fágovom displeji pozostáva z  $1.10^6$ - $1.10^{11}$  kópií klonov bakteriofága, pričom každý bakteriofág obsahuje odlišnú inzertovanú časť sekvencie, ktorá sa po expresii zobrazí ako vystavený povrchový proteín na fágovom plášti. Tieto peptidy sú typicky vystavené na N-koncoch plášťových proteínov pIII a pVIII (Scott and Smith 1990). Na konštruovanie malých peptidických kombinatoriálnych knižníc fágového displeja sa najčastejšie používajú bakteriofágy M13. Využíva sa ich vysoká replikačná kapacita a schopnosť prijať pomerne dlhé úseky cudzorodej DNA (Hoogenboom et al. 1991). Vektorové schopnosti lytického bakteriofága T7 sa zasa používajú pre tvorbu knižníc väčších peptidov. Výhodou knižníc fágového displeja je, že v porovnaní s chemicky nasyntetizovanou kombinatoriálnou knižnicou je veľkosť peptidov u fága neobmedzená. Kombinatoriálne knižnice fágového displeja sú komerčne dostupné, využiteľné pre krátke, stredne dlhé aj dlhé peptidické reťazce, dokonca aj pre jednoducho cyklické peptidy, ktoré obsahujú disulfidické väzby (Heinis et al. 2009). Nevýhodou knižníc používaných pre túto metódu je, že peptidy pozostávajú len z dvadsiaticich základných eukaryotických L-aminokyselín. Metóda nie je vhodná pre rozvetvené štruktúry alebo viackrát cyklické molekuly (Liu et al. 2016).

Kombinatoriálne knižnice peptidov využívaných pre kvasinkový displej patria k najmenším. Varianty z kombinatoriálnych knižníc sú vystavované na proteíne Aga2p, ktorý je kovalentne spojený dvoma disulfidickými mostíkmi s proteínom Aga1p, ktorý sa nachádza na bunkovej stene kvasinky, najčastejšie *Saccharomyces cerevisiae* (viď obr. č.1). Každá jedna kvasinková bunka dokáže prezentovať na svojom povrchu až 50 000 kópií peptidu (Gera et al. 2013).



Obrázok č.1: Schéma prezentácie varianty kombinatoriálnej knižnice na povrchu *Saccharomyces cerevisiae* zostrojená podľa N.Geru (Gera et al. 2013)

### 3.1.Príprava kombinatoriálnych knižníc

Je treba podotknúť, že príprava kombinatoriálnych knižníc peptidov prebieha na úrovni DNA. Kombinatoriálne knižnice peptidov môžeme pripraviť dvoma spôsobmi, a to chemickou syntézou alebo syntézou biologickou. Biologická syntéza zahŕňa prípravu knižníc pomocou živých buniek a je vhodnejšia na konštrukciu knižníc s peptidmi s väčšou dĺžkou a so složitejšími štruktúrami. Chemická syntéza sa využíva pre jednoduchšie a kratšie peptidy.

Medzi metódy chemickej syntézy knižníc patrí napríklad „Split and mix” metóda, hovoríme o paralelnej syntéze na pevnom nosiči s využitím guľatých mikročastíc zo živice (Upert, Merten and Wennemers 2010). Ďalšou metódou chemickej prípravy knižníc je tzv. „SPOT” syntéza, pri ktorej sú peptidy syntetizované na celulózovej membráne (Frank 2002). S použitím „Tea bag” metódy sú syntetizované peptidy na guľôčkach polymérov, ktoré sú spoločne pospájané a tvoria sieťovitú štruktúru podobnú vrecúšku čaju (Houghten 1985).

## 4.Selekčné displejové techniky

### 4.1.Fágový displej

Vírusy ako nebunečné organizmy potrebujú pre svoju replikáciu replikačný aparát hostujúcej bunky. Hostujúca bunka zaisťuje kompletnú syntézu vírusových komponentov,

zreplikuje genóm vírusu, nasyntetizuje jeho proteínový obal. Skutočnosť, že fág podnecuje svoju hostiteľskú bakteriálnu bunku k produkcii proteínových komponentov a vystavuje ich na svojom povrchu, využil prvýkrát v 80-tych rokoch minulého storočia George Smith, ktorý tak položil základy najstaršej displejovej technike – fágovému displeju. Veľkou mierou k rozvoju techniky fágového displeja prispel Mc Cafferty, ktorý spoločne so svojimi kolegami využili nelytický bakteriofág Fd, dovtedy neprebádaný vektor (McCafferty et al. 1990). V súčasnosti je Fd filamentálny fág spoločne s M13 bakteriofágom dvojicou najčastejšie používaných vektorov na produkciu peptidických väzobných molekúl. Avšak nevýhodou týchto dvoch nelytických fágov je, že proteínové komponenty vírusu musia byť sekretované cez membránu baktérií, ktorá môže byť nežiadúcou bariérou pre niektoré väčšie proteínové scaffoldy. Ako alternatíva pre väčšie molekuly sa preto používajú lytické bakteriofágy, ako je napríklad T7, na ktorého plášti sa podarilo vystaviť proteíny, ktoré boli tvorené viac ako 1200 aminokyselinami (Piggott and Karuso 2016).

Fágový displej je v súčasnosti najviac popísanou a vysvetlenou displejovou technikou. Využíva sa pri vývoji protilátok, slúži k zvýšeniu ich špecificity a afinitných vlastností alebo pri mapovaní epitopov, či identifikácii receptorov (Aghebati-Maleki et al. 2016). Proteínové varianty kombinatoriálnej knižnice používané pri fágovom displeji sú vystavované na kapsidových proteínoch pIII, pVI, pVII, pVIII a pIX, najčastejšie však na pIII a pVIII. V prípade týchto dvoch proteínov sú vystavované scaffoldy umiestnené len na N-konci. Jediným proteínom spomedzi všetkých spomínaných plášťových proteínov, ktorý dokáže vystaviť väzobný proteín na C-konci, je pVI (Jespers et al. 1995).

DNA varianty zostrojenej kombinatoriálnej knižnice sú vnesené práve do DNA sekvencií kódujúcich tieto proteíny na povrchu kapsidy. Kombinatorika je v tomto prípade spôsobená randomizáciou. Kombinatoriálna knižnica pre fágový displej je teda súbor fágov, pričom každý obsahuje na svojom plášti jedinečné kópie varianty s odlišnými väzobnými vlastnosťami.

#### **4.1.1. Biopanning**

Pojmom biopanning označujeme afinitnú selekciu väzobných molekúl. Kombinatoriálna knižnica peptidov fágového displeja je inkubovaná so známou, vopred definovanou a imobilizovanou terčovou molekulou. Imobilizácia môže byť sprostredkovaná buďto priamou väzbou molekuly na podklad alebo biotinylnáciou terča, ktorý je následne pripevnený na povrch

Obrázok č.2: Schéma selekcie pomocou fágového displeja

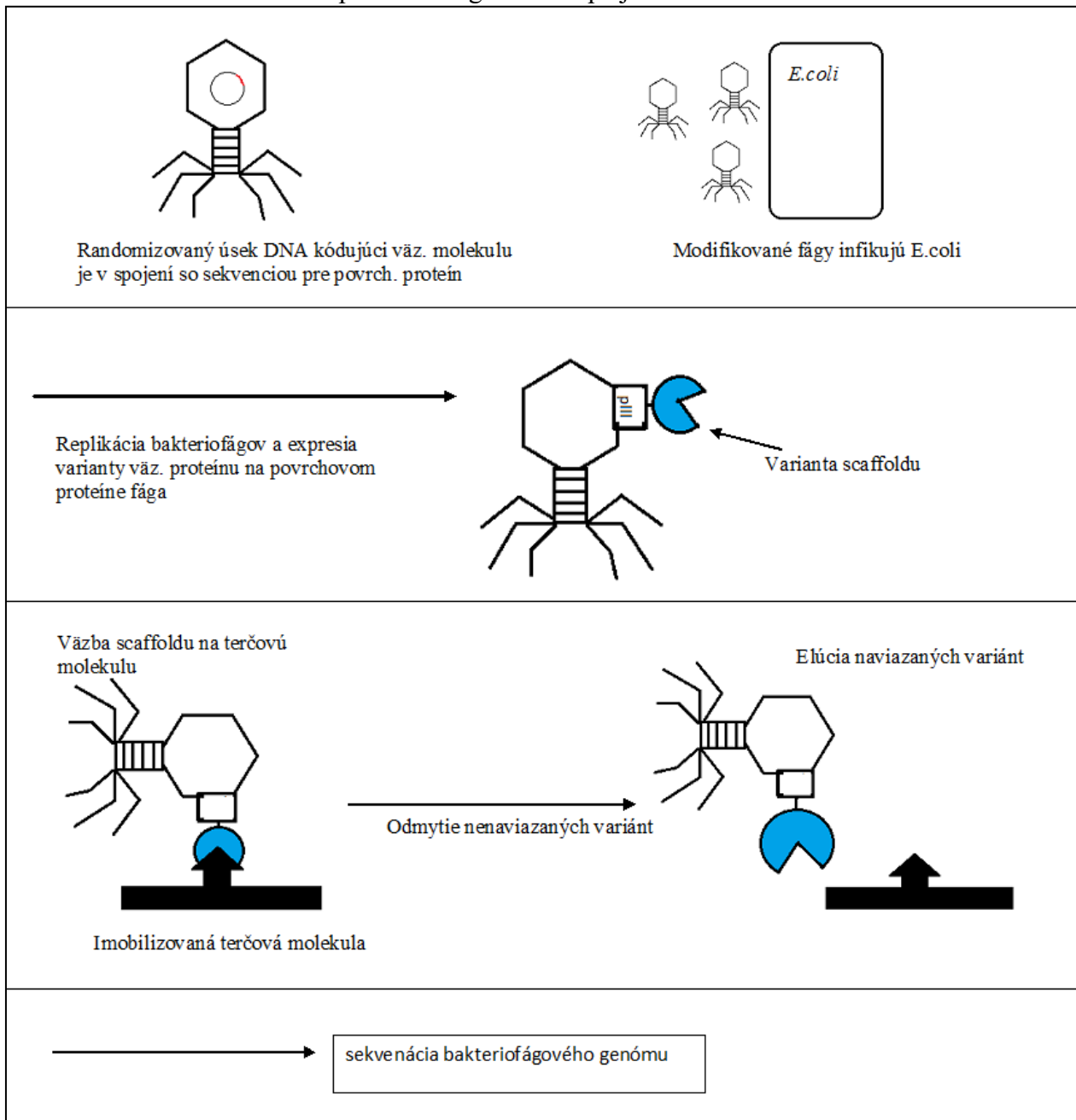


Schéma: vlastná, podľa Finlaya (Finlay, Bloom and Cunningham 2011)

obsahujúci streptavidín. Ako príklad možných povrchov využívaných na fixáciu molekuly na podklad môžeme uviesť nitrocelulózu alebo polystyrén (Konthur, Wilde and Lim 2010). Aby sme získali najlepšie väzobné molekuly, je potreba proces biopanningu zopakovať štandardne 3 až 5-krát. Celý proces (viď obr.č.2) začína konštrukciou kombinatoriálnej knižnice na úrovni DNA s využitím randomizácie. Knižnica DNA kódujúca odlišné varianty scaffoldov je v spojení so

sekvenciou, ktorá kóduje jeden z plášťových proteínov. Následne sú knižnice naklonované do mikrobiálneho vektora, ktorým býva spravidla baktéria *E.coli*. Vírusy sú schopné vystaviť zhruba 1000 kópií varianty väzobnej molekuly na svojom plášti. Inkubácia s terčovými molekulami prebieha presne vymedzenú dobu. Po inkubácii nasleduje niekoľko krokov premývacích reakcií, ktoré slúžia k tomu, aby sa nenaviazané, respektíve slabo naviazané varianty odstránili a zostali len varianty s pevnou väzbou. Počet premývaní sa líši v každom kole biopanningu, je cieľený na selekciu čoraz viac afinitných molekúl. Silne naviazané fágy na terčovej molekule sú následne eluované kyselinou alebo silnou zásadou, ktoré spôsobia prerušenie väzby s terčom. Väzba môže byť prerušená aj enzymaticky (Pande, Szewczyk and Grover 2010). Vyselektované fágy sú následne opäť použité na reinfekciu čerstvej bakteriálnej kultúry.

Vyizolované proteínové varianty pomocou fágového displeja majú širokospektrálne využitie. Pred dvoma rokmi sa preukázalo jeho využitie aj v prevencii a identifikácii parazitálnych ochorení. Dôkazom je identifikácia viscerálnej leishmaniózy u psov pomocou troch selekčne vyizolovaných proteínov práve pomocou tejto displejovej techniky (Toledo-Machado et al. 2015).

#### **4.2.Ribozomálny displej**

Každá displejová technika je založená na funkčnom prepojení medzi genotypom a fenotypom. Fenotyp predstavuje funkčne zbalený proteín/peptid schopný väzby na terčovú molekulu. V prípade ribozomálneho displeja nie je v spojení s proteínom informácia (genotyp) kódovaná v DNA, ale netradične v mRNA. Proteín je translatovaný na ribozóme, pričom absentuje terminálny STOP kodón, v dôsledku čoho sa mRNA a proteín z ribozómu neuvoľnia, ale zostávajú spolu v jednom komplexe (Pluckthun 2012).

V porovnaní s kombinatoriálnymi knižnicami ostatných selekčných techník patrí knižnica peptidov využívaná pri ribozomálnom displeji k najväčším. Rozsiahlosť kombinatoriálnej knižnice je v podstate limitovaná len počtom ribozómov a prezentovanými mRNA v testovacej tube, čo je veľká výhoda, napríklad oproti fágovému displeju, ktorý je limitovaný efektívnosťou transformácie bakteriálnych buniek. Ďalšou výhodou tejto techniky je, že náhodné (random) mutácie, ktoré sa používajú pri zostrojení knižnice, môžu byť uskutočňované po každom selekčnom kole (Zahnd, Amstutz and Pluckthun 2007).

DNA kombinatoriálne knižnice ribozomálneho displeja sú väčšinou syntetizované chemicky. Kombinatorika sa pri syntéze navodzuje randomizáciou, to znamená, že jednotlivé bázy (A,G,C,T) sú náhodne vyberané podľa tzv. NNK kódu (N = A, T, G, C; K = T, G), vďaka ktorému zámerne znižujeme pravdepodobnosť výskytu STOP kodónu, nie len terminálneho, ale rovnako aj STOP kodónov vo všetkých randomizačných pozíciách. Existujú tri STOP kodóny – UAA, UAG a UGA. Vďaka randomizácii sú eliminované dva z nich, UAA a UGA.

Syntéza prebieha cyklicky, v každom cykle je na vznikajúci imobilizovaný reťazec pripojená nová fosforylovaná báza, ktorá obsahuje blokátor. Blokátor zabezpečuje, že sa v cykle naviaže práve iba jedna báza a nevznikajú tak nežiadúce poly-reťazce. Po premytí nadbytočných bází je blokátor odstránený chemickými detergentami alebo ožiareníím a na reťazec sa tak môže pripojiť nová báza. Novonasyntetizované reťazce sa následne namnožia pomocou PCR (Popova et al 2015).

Cyklus ribozomálneho displeja (vid' obr. č.3) prebieha *in vitro*. Naamplifikovaná DNA knižnica je prepísaná pomocou RNA polymerázy na molekuly mRNA. Tie následne môžu byť purifikované a hneď nato sú translatované na proteíny. Proteíny, ktoré obsahujú disulfidické mostíky, sa funkčne zbalia len pri správnych oxidačných podmienkach. Zbalený proteín zostáva na ribozóme spoločne s mRNA, nakoľko u mRNA absentuje spomínaný terminálny STOP kodón. Vzniká tak komplex mRNA-ribozóm-proteín, ktorý musí byť stabilizovaný, zvyčajne pri nízkej teplote, štandardne 4°C. Existujú však aj iné možnosti stabilizácie komplexu. Japonskí vedci popisujú techniku ribozomálneho systému s využitím PURE systému (Protein synthesis Using Recombinant Elements), vďaka ktorému dokážu stabilizovať komplex a realizovať selekčný krok aj pri laboratórnej teplote (Ueda, Kanamori and Ohashi 2010).

Následná väzba komplexov na imobilizované terčové molekuly je plne závislá na funkčne zbalenom proteíne. Ten sa v prípade, že obsahuje vhodné väzobné vlastnosti, pevne naviaže na terč. Varianty, ktoré sa nenaviazali, respektíve varianty, ktoré vykazujú nízku afinitu k terčovej molekule, sú odmyté. Vysoko afinitné molekuly sú výsledkom niekoľkých kôl ribozomálneho displeja, pričom v každom kole sú podmienky na väzbu k imobilizovaným terčom tvrdšie. Ako príklad môžeme uviesť zvýšenie koncentrácií solí v reakčnom prostredí. Aby sme mohli získať molekulu mRNA z komplexu mRNA-ribozóm-polypeptid, musíme od seba disociovať podjednotky ribozómu. K disociácii dochádza pôsobením chelatačného činidla EDTA. Izolovaná mRNA sa následne pomocou reverznej transkriptázy prepíše na DNA, ktorá je opäť namnožená

Obrázok č.3: Schéma selekcie pomocou ribozomálneho displeja

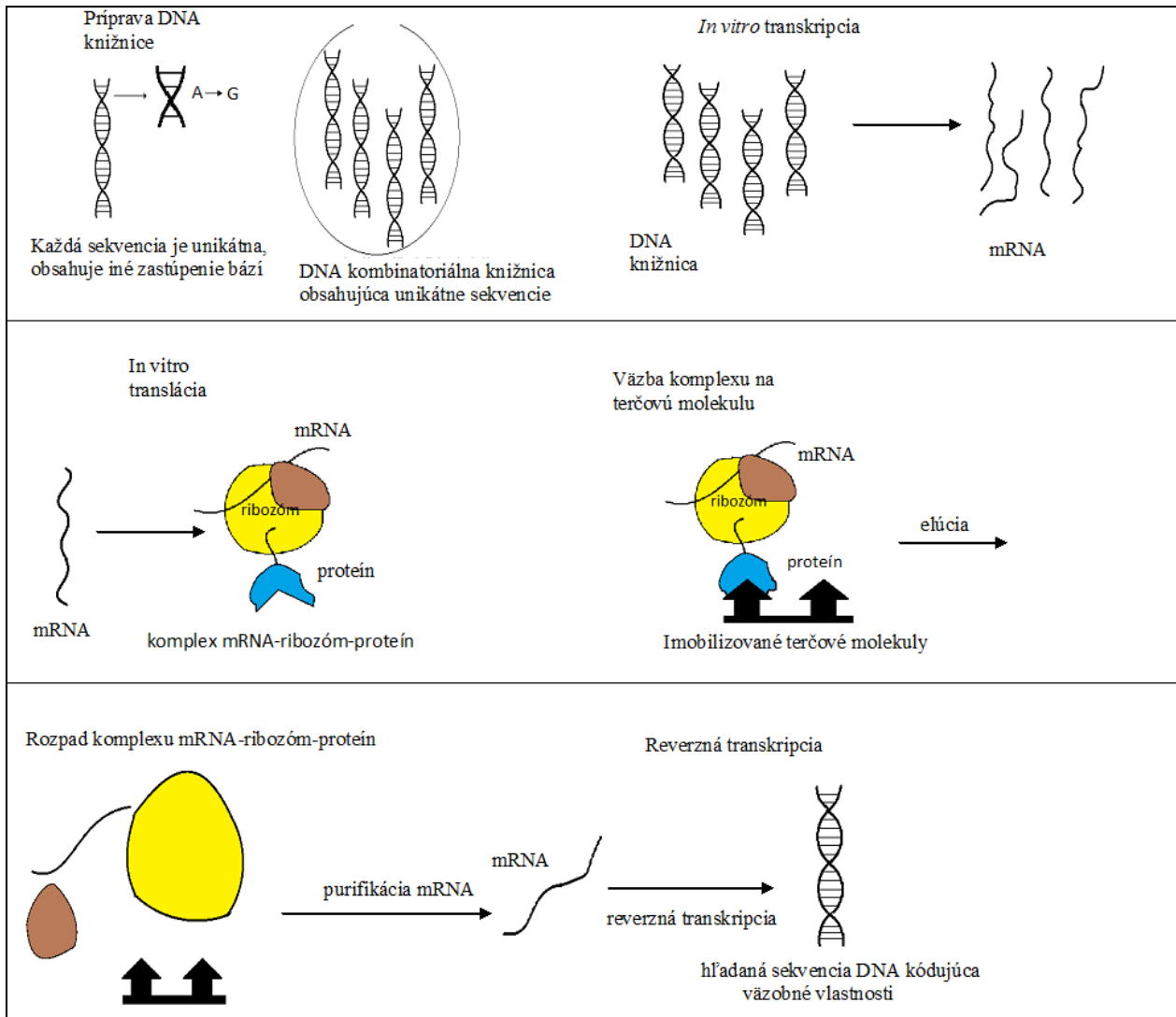


Schéma: vlastná podľa Pluckthuna (Pluckthun 2012)

pomocou PCR. Výsledkom sú teda kópie sekvencií DNA, ktorá kóduje pozitívne väzobné vlastnosti s našou definovanou terčovou molekulou (Pluckthun 2012).

Väzobné proteíny izolované z ribozomálnych cyklov môžu byť ďalej modifikované náhodným alebo riadeným molekulárnym vývojom na afinitnú maturáciu, vybrané pre charakteristiky ako je stabilita proteínov a funkčná aktivita. Aplikácie pre túto technológiu sa rozširujú do širokej oblasti proteínového inžinierstva, využívajú sa k tvorbe protilátok a enzýmov pre diagnostiku a liečbu rakoviny, autoimunitných, infekčných a zápalových ochorení. Jedným z mnohých prípadov, kedy bol ribozomálny displej použitý na terapeutické účely, je selekcia

novovytvorených väzobných variánt, ktoré vychádzali z albumín-väzobnej domény. S využitím týchto variánt sa podarilo autorom Marečková a kolektív docieľiť väzbu na proteín PSP94, ktorý okrem iného indikuje rozvoj rakoviny prostaty u mužov. V tomto prípade slúžia alternatívne scaffolds ako náhrady ku klasickým monoklonálnym protilátkam (Mareckova et al. 2015).

### 4.3.Kvasinkový displej

V prípade kvasinkového displeja je fenotyp (scaffold) vystavený na bunkovej stene kvasinky. Na túto displejovú techniku je najčastejšie používaná geneticky modifikovaná kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinky môžu byť kultivované na dvoch médiách. Najčastejšie sa používa pepton-dextrózový extrakt z lyzátu kvasiniek. Druhým, čoraz viac používaným kultivačným médiom pre *Saccharomyces cerevisiae*, je syntetické dextrózové médium, obsahujúce zdroje uhlíka a dusíka, pufrujúce soli a esenciálne aminokyseliny s výnimkou tryptofanu. Výhoda kultivácie kvasiniek na definovaných médiách spočíva v tom, že dokážeme ľahko indukovať transkripciu cieľného génu aktiváciou GAL1 promotoru a to tak, že ako zdroj uhlíka použijeme namiesto D-glukózy alternatívu, ktorou je D-galaktóza. Vďaka nej je represívny promotor znova aktívny. Ďalšou veľkou výhodou je, že kvasinkové kultúry na pevnom médiu môžeme pri teplote 4°C a dostatku živín využívať po dobu viac ako jeden mesiac (Mann and Park 2015).

Proteínový scaffold je pripojený k povrchovému proteínu Aga2p, ktorý je vo väzbe s proteínom Aga1p pomocou disulfidických mostíkov (viď obr. č.1). Povrchový proteín Aga2p vystavuje scaffold na N alebo C konci, pričom C koniec je častejšie preferovaný. Súčasťou tohto povrchového komplexu sú často fosforylačné značky, ktoré uľahčujú následnú identifikáciu hľadaného väzobného proteínu (Gera et al. 2013).

Pri príprave DNA kombinatoriálnej knižnice sa využíva metóda randomizácie. Výsledkom sú lineárne reťazce DNA, ktoré sú *in vivo* homologicky rekombinované s DNA kvasinky a uvedené do cirkulárneho tvaru. Vektorová DNA je do bunky kvasinky dopravená pomocou elektroporácie.

#### 4.3.1.Selekcia variánt proteínov kvasinkových buniek s využitím magnetických mikročastíc

Selekčná metóda proteínových variánt využívajúca guľaté magnetické mikročastice patrí k štandardným metódam používaných pri kvasinkovom displeji. Táto metóda je schematicky



Obrázok č.4: Schéma selekcie pomocou kvasinkového displeja s využitím magnetických mikročastíc

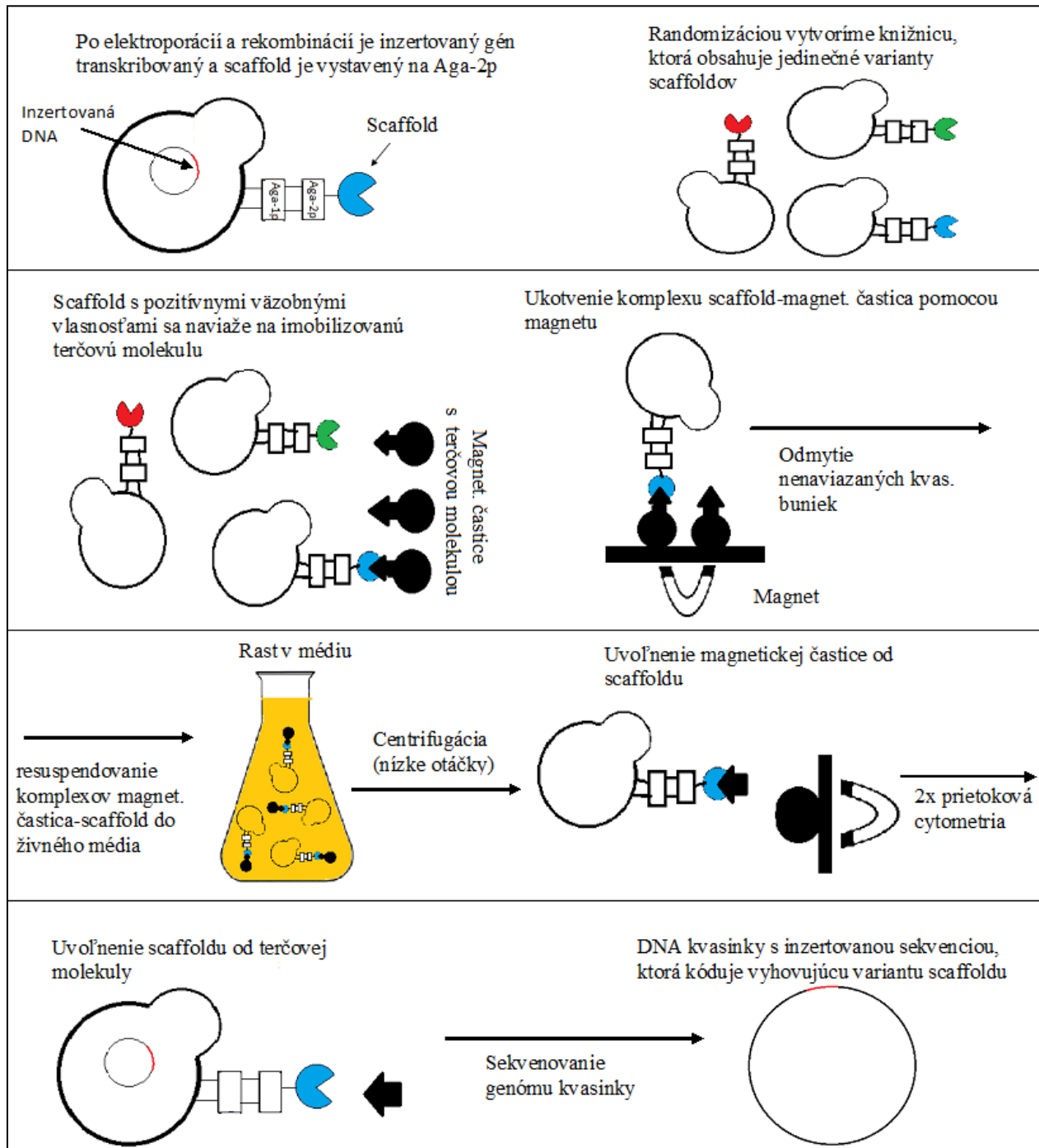


Schéma: vlastná podľa Angeliniho (Angelini et al. 2015)

znázornená obrázkom (viď obr. č.4). Pred samotnou selekciou našich variant z kombinatoriálnej knižnice je uskutočnených niekoľko kôl negatívnej pre-selekcie. Princíp spočíva v tom, že

kombinatoriálna knižnica kvasiniek je vystavená reakcii s magnetickými mikročasticami obalenými streptavidínom a bez imobilizovanej terčovej molekuly. Následne sú izolované nenaviazané kvasinkové varianty, ktoré budú použité v riadnej selekcii.

Imobilizovaná terčová molekula býva zvyčajne na magnetických mikročasticách biotinylovaná. Biotinylácia môže byť uskutočnená enzymaticky pomocou biotin-ligázy alebo chemickou cestou. Magnetické mikročastice obsahujúce definovanú terčovú molekulu sú nasledne inkubované spoločne s kombinatoriálnou knižnicou pri teplote 4°C po dobu 2h. Reakčná zmes je potom umiestnená na magnet. Varianty, ktoré sa naviazali na terčové molekuly umiestnené na magnetických časticách, sú tak pevne kotvené, kdežto nenaviazané častice sú z reakcie jednoducho odstránené tak, že sa odsaje supernatant a reakčná zmes sa premyje pufrum PBS. Reakcia sa znova aplikuje na magnet po dobu cca 5 minút. Nasleduje ďalšie premytie komplexu magnetických častíc a naviazaných kvasinkových variánt a hneď vzápätí je reakčná zmes vystavená 5 minútovej rotácii. Po tretíkrát nasleduje časť s magnetom a premytím pomocou PBS pufru. Po premytí sú častice s kvasinkami resuspendované tekutým živným médiom a následne rastú pri teplote 30°C. K odstráneniu magnetických mikročastíc poslúži centrifugácia pri nízkych otáčkach. Zcentrifugovaná zmes sa následne umiestni na magnet, ktorý zafixuje častice a kvasinkové bunky v supernatante sa odsajú.

Po tomto procese s využitím magnetických vlastností mikročastíc nasleduje dvakrát prietoková cytometria. Prvá prietoková cytometria slúži k selekcii variánt, ktoré sa správne naviazali na terčovú molekulu. Bunky vyizolované po prvej cytometrii sú následne opäť selektované metódou prietokovej cytometrie. Tá tentokrát slúži k zvýšeniu afinitných vlastností väzobných proteínov umiestnených na povrchu bunky. Pre využitie prietokovej cytometrie kvasinkovej bunky s naviazanou terčovou molekulou je potrebné, aby bola fluorescenčne označená terčová molekula a rovnako aj kvasinková bunka. Tá spravidla nesie fluorescenčné značky na proteíne Aga2p. Čím viac terčových molekúl sa naviaže na vystavené scaffoldy, tým je fluorescenčný signál v cytometri silnejší. Najsilnejší fluorescenčný signál predpovedá najviac afinitnú variantu scaffoldu.

DNA pozitívnych kvasinkových klonov je následne purifikovaná a osekvenovaná. Vďaka sekvenácii presne určíme úsek DNA, ktorý kóduje pozície aminokyselín spôsobujúce pozitívne väzobné vlastnosti s definovanou terčovou molekulou. Pomocou titrácie vieme určiť afinitu našej väzobnej molekuly (Angelini et al. 2015).

#### 4.4. Retrovirálny displej

Retrovírusy patria medzi vírusy, ktorých genetická informácia je zastúpená dvoma kópiami jednovláknovej RNA. Ich genóm je pomerne malý, predstavuje 7-10kb. Kóduje informácie pre reverznú transkriptázu, štruktúrne proteíny v jadre a obalové glykoproteíny, ktoré zabezpečujú interakciu s hosťiteľskou cytoplazmatickou membránou. RNA retrovírusu je upravovaná a syntetizovaná hosťiteľskou bunkou. Vďaka interakcii retrovírusu a jeho hosťiteľskej bunky sa podarilo objaviť enzým reverznú transkriptázu. Veľkosť kombinatoriálnej knižnice peptidov používaných pri retrovirálnom displeji patrí k najmenším spomedzi všetkých displejových techník. Spravidla ju tvorí približne  $10^6$  jedinečných variánt. V porovnaní s fágovým displejom má retrovirálny displej dve veľké výhody. Prvou výhodou je, že umožňuje konštruovanie väzobných proteínov v bunkách cicavcov a tou druhou, že môže slúžiť ako alternatíva pre tvorbu proteínov, ktoré vyžadujú postranslačné modifikácie, napríklad glykosyláciu.

Replikačný cyklus retrovírusu začína infekciou hosťiteľskej bunky pomocou špecifických receptorov, ako je napríklad CD4. Po premiestnení sa do intraceluárneho prostredia bunky dochádza k prepisu vírusovej RNA na dsDNA pomocou vírusovej reverznej transkriptázy. Dvojvláknová DNA sa následne interaguje do jaderného genómu bunky hosťiteľa pomocou integrázy. Následne sa pomocou hosťiteľskej RNA polymerázy nasyntetizuje nová vírusová RNA, ktorá je pri exocytóze z bunky zabalená do obalu vytvoreného z hosťiteľskej bunky (Coffin 1992).

Pri retrovirálnom displeji sa postupuje tak, že sa najskôr zostrojí kombinatoriálna knižnica plazmidov a to tak, že sa k informácii, ktorá kóduje proteíny vírusového obalu pripojí sekvencia kódujúca tzv. blokačnú doménu a sekvencia kódujúca peptid, ktorá je randomizovaná. Takto skonštruovaná knižnica plazmidov sa využije na infekciu hosťiteľských buniek, v ktorých sa retrovírus nasyntetizuje. Výsledkom expresie skonštruovaného plazmidu retrovirálneho genómu je blokujúca doména spojená pomocou randomizovaného peptidu na povrchovom proteíne plášťa. Tak získame knižnicu retrovírusov, ktoré sú neinfekčné vďaka prítomnosti blokačnej domény. Vírusy následne reagujú s bunkami, ktoré sekretujú proteázy. Infekčné varianty retrovírusov sú len tie, ktorým sa pomocou proteáz odštiepi blokačná doména. Následne vstupujú do intraceluárneho priestoru, kde sú namnožené. Po namnožení sa rovnako ako

u predchádzajúcich displejových techník testujú väzobné vlastnosti knižníc vystavovaných peptidov (Urban and Merten 2011).

Medzi najnovšie metódy selekcie novovzniknutých väzobných molekúl používaných pri retrovirálnom displeji patrí selekcia variánt v malých kvapôčkach tvorených zmesou vody a oleja. Metóda bola publikovaná v roku 2010. Drobné kvapôčky o objeme 12pl sú vyrobené pomocou mikrofluidných zariadení a každá slúži ako samostatná reakčná nádoba. Selekčný proces prebieha podobne ako u fágového displeja, varianty sú vystavené na povrchu plášťa a interagujú s vopred definovanými molekulami. Hlavnou výhodou tejto alternatívy voči klasickým metódam je niekoľkonásobné zníženie objemu reakcie a s tým spojený aj pokles finančných nákladov pri jej tvorbe (Granieri et al. 2010).

#### **4.5. Bakulovirálny displej**

Bakulovírusy patria medzi veľké vírusy, ich genóm tvorí dvojvláknová cirkulárna DNA s veľkosťou 80-180kbp.

Bakulovirálny displej bol vyvinutý na princípe fágového displeja ako jeho alternatíva u eukaryotických buniek. Bakulovírusy sú na rozdiel od retrovírusov neschopné replikácie v bunkách cicavcov. Na ich replikáciu sú preto využívané bunky hmyzu. V súčasnej dobe je však cieľený aj na bunky cicavcov. Bolo to umožnené vďaka prevedeniu transdukcie virálneho génu do buniek. Táto metóda sa následne ukázala ako veľmi prospešná s využitím pri tzv. génovej terapii (Condeary et al. 1999), (Wang and Balasundaram 2010).

Jednou z prvých molekúl, ktorú sa podarilo prezentovať na povrchu bakulovírusu, bola externá doména glykoproteínu gp120, ktorý je povrchovým proteínom retrovírusu HIV-1. Doména bola vystavená na N-konci bakulovirálneho glykoproteínu gp64 a špecificky sa viazala na CD4 receptor pre HIV (Boublik, Di Bonito and Jones 1995).

Medzi prednosťami bakulovirálneho displeja rozhodne patrí, rovnako ako aj u retrovirálneho displeja, skutočnosť, že eukaryotická hostiteľská bunka dokáže vykonávať posttranslačné modifikácie nasyntetizovaných peptidov. V prípade bakulovirálneho systému ide o glykosyláciu, fosforyláciu či acyláciu. Prokaryotická bunka, ktorá sa využíva pri fágovom displeji, nie je takýchto modifikácií schopná. Na druhej strane, keď porovnáme fágový a bakulovirálny displej, náklady na prevedenie fágového displeja a konštrukcia jeho knižnice bakteriofágov je oveľa jednoduchšia a lacnejšia.

Na selekčné postupy sa využíva kombinatoriálna knižnica rekombinantných bakulovírusov, najčastejšie *Autographa californica*, ktoré boli replikované a purifikované v bunkách hmyzu. Každý bakulovírus obsahuje odlišné varianty väzobných molekúl vystavených na povrchovom glykoproteíne, najčastejšie fosforylovanom a acylovanom gp64, ktorý je integrálnym proteínom, prezentuje sa na povrchu bunky a následne je inkorporovaný na plášť vírusu. Samotná selekcia môže prebiehať napr. pomocou prietokovej cytometrie. Metóda sa opakuje cyklicky niekoľkokrát, kým nezískame bakulovirálny klon obsahujúci väzobnú molekulu s najlepšimi väzobnými vlastnosťami. K analýze väzobných vlastností sa najčastejšie využíva tzv. ELISA esej, kde sa do reakčných jamôk aplikujú molekuly, u ktorých sa predpokladá väzba k variantám knižnice bakulovirálného displeja.

Bakulovirálny displej sa osvedčil ako najvhodnejší kandidát pre detekciu väzobných interakcií proteínov na tzv. proteínových mikročipoch. Výhodou tejto platformy je, že eliminuje potreby purifikácie proteínov a poskytuje prirodzené lipidové prostredie pre proteíny, ktoré sú inak v bunke asociované s membránou (Tom et al. 2015).

#### **4.6.Ostatné selekčné techniky, vylepšenia a modifikácie**

Spoločne s vývojom a obohacovaním klasických displejových techník, akými sú fágový či kvasinkový displej, dochádzalo k využívaniu a úprave nových vektorov, čo dalo vzniknúť novým displejovým technikám. Dôkazom toho je aj vznik uvádzaného retrovirálneho a bakulovirálného displeja. Ďalšou, menej známou displejovou technikou využívajúcou vírus ako vektor, je adenovirálny displej. Na začiatku tohto roku vyšla publikácia, kde sa vygenerovaný ľudský adenovírus HAdV35 použil na prezentáciu antigénu *Plasmodia falciparum* v skrátenej dĺžke ako súčasť kapsidového proteínu IX. Výsledok experimentu vyzdvihuje adenovírus ako sľubný vektor do budúcnosti, nakoľko sa pri prezentácii skráteného proteínu, ktorý bol následne vnesený do organizmu myši, podarilo indukovať ich silnú humorálnu odpoveď. Adenovírusy je teda možné využívať ako vektory s vysokým potenciálom pri vývoji vakcín (Salisch et al. 2017).

Schopnosť baktérií prezentovať na svojom povrchu rozličné peptidy využíva a popisuje bakteriálny displej, respektíve displej na bakteriálnom povrchu. So zaujímavou modifikáciou prišli pred dvomi rokmi austrálski vedci, keď zostrojili novú zobrazovaciu cytoplazmatickú platformu, ktorú nazvali „Retained display“ (tzv. zadržiavací displej). Bežné zobrazovanie protilátky alebo väzobnej molekuly v bakteriálnej bunke vyžaduje ich export minimálne cez 1

membránu. Nová technika elegantne obchádza toto obmedzenie, čím zvyšuje výťažok protilátok a proteínových väzobných molekúl (Beasley et al. 2015).

Ďalšou displejovou technikou, nepopisovanou v predchádzajúcich kapitolách, je mRNA displej. Rovnako ako u ribozomálneho displeja hovoríme o *in vitro* technike. Varianta peptidu je kovalentne spojená s kódujúcou mRNA pomocou puromycínovej väzby. Táto technika sa využíva pre selekciu predovšetkým kratších peptidov nepresahujúcich dĺžku 100 aminokyselín (Baggio et al. 2002).

Alternatívnou *in vitro* technikou k ribozomálnemu a mRNA displeju je CIS displej. Využíva schopnosť bakteriálneho proteínu RepA naviazať sa naspäť na jeho kódujúcu DNA. Predpokladá sa, že tzv. CIS element dokáže počas transkripcie zastaviť činnosť RNA polymerázy, čo katalyzuje tvorbu RepA proteínu. Sekvencie kódujúce väzobné varianty sú v spojení práve so sekvenciou pre RepA proteín. Výhodou tejto displejovej techniky oproti *in vitro* ribozomálnemu displeju je jednoduchšia manipulácia so stabilnejšou DNA a identifikácia genetickej informácie priamou sekvenáciou (Odegrip et al. 2004).

## **5.Praktické využitie malých väzobných proteínov**

### **5.1.Využitie malých väzobných proteínov v diagnostike a k prevencii pred chorobami**

Jednou z najperspektívnejších oblastí využitia malých väzobných proteínov je oblasť medicíny. Umelé väzobné proteíny majú pred sebou síce ešte dlhú cestu klinického testovania ako potenciálne neimunoglobulínové terapeutiká, no už teraz je jasné ich možné využitie pri diagnostike ochorení a vývoji vakcín. Úspešne sa darí detekovať nádorové bunky a rôzne typy nádorov. Príkladom je väzba alternatívnych peptidov na bunčné receptory APP a HER2 (u rakoviny prsníka) či detekcia receptoru CRKL, ktorý signalizuje rakovinu prostaty (Shadidi and Sioud 2003), (Essler and Ruoslahti 2002).

Rekombinantné väzobné ligandy vytvorené z vysoko komplexných knižníc sú výborným nástrojom k mimikovaniu povrchových štruktúr niektorých glykoproteínov nachádzajúcich sa na povrchu vírusov. Selekciou proteínových variánt cielených na obalový glykoproteín vírusu HIV-1, tzv. gp120, boli identifikované varianty rozpoznávajúce variabilné oblasti široko

neutralizujúcich protilátok chrániacich proti ochoreniam AIDS. Identifikované peptidy sú testované na schopnosť vyvolať tvorbu protilátok proti gp120, neutralizujúcich vírus HIV-1 a mohli by sa stať kľúčovými nástrojmi pre tvorbu vysoko účinných vakcín proti HIV-1 infekcii a ochoreniu AIDS (Maly, Kuchar and Raska 2017).

## **5.2. Bioanalytické využitie malých proteínov odvodených od proteínových domén**

### **5.2.1. Metóda magnetic fishing**

So zaujímavým objavom prišli autori Fernandes a kolektív, ktorí popisujú metódu magnetic fishing s využitím malých proteínov, derivovaných z extremofilných Archaea, tzv. affitínov. Táto metóda slúži ako alternatíva ku klasickej chromatografii. Affitíny, v tomto prípade anti-lyzozým a anti-IgG, vychádzali zo scaffoldu Sac7d a boli imobilizované na magnetických časticiach. To uľahčilo ich následnú separáciu s naviazaným lyzozýmom, prípadne IgG. Výhodou metódy je, že magnetické častice majú veľké množstvo väzobných miest na povrchu a separácia nie je limitovaná difúziou pórov. Pri použití purifikačnej metódy magnetic fishing s využitím affinitínov sa podarilo autorom Fernandes a kolektív vyizolovať 100% čistý IgG z heterogénnej vzorky ľudskej plazmy a 81% čistý lyzozým z heterogénnej vzorky extraktov *E. coli* (Fernandes et al. 2016).

### **5.2.2. Purifikácia retrovirálnych častíc na afinných matriciach**

V roku 2016 vyšla publikácia, ktorá sa zaoberala hľadaním alternatívnej selekcie čistých retrovirálnych častíc s cieľom znížiť náklady na ich výrobu. Princíp spočíval v tom, že pomocou fágového displeja sa podarilo zistiť sekvenciu peptidu (sekvencia AMK = CAAALAKPHTENHLLT), ktorý sa špecificky viazal na obalový proteín retrovírusu Ampho 4070A (VLPs AMPHO). Peptid bol následne umelo nasyntetizovaný a imobilizovaný na purifikačných matriciach, zosieťovanej agaróze a magnetických mikročasticiach. Matrice selektívne viazali VLPs-AMPHO, pričom sa podarilo vyizolovať až 90% naviazaných molekúl, a to pri miernych elučných podmienkach, bez poškodenia morfológie vírových častíc a so zachovaním ich veľkosti (Fernandes et al. 2016).

## 6.Záver

Selekčné displejové techniky si už zaslúžili svoje pevné miesto v oblasti proteínového inžinierstva. Každá displejová technika má svoje prednosti, ale aj obmedzenia. Displejové techniky založené na virálnych vektoroch, ako sú fágový, retrovirálny, bakulovirálny či adenovirálny displej, sú limitované transformačnými schopnosťami buniek. Na druhej strane, fágový displej je finančne najmenej náročnou technikou na vytváranie väzobných molekúl, ktoré sú ľahko amplifikované v bežných *E.coli* bunkách. Retrovirálne a bakulovirálne displeje umožňujú testovať väzobné vlastnosti proteínov, ktoré majú postranlačné modifikácie, ako je glykosylácia či fosforylácia. Kvasinkový displej má v porovnaní s ostatnými metódami pomerne malú kombinatoriálnu knižnicu. Kultivácia kvasiniek oproti kultivácii baktérií je náročnejšia, kvasinky vyžadujú zložitejšie médiá. Dokážu však na svojom povrchu vystaviť až 50 000 kópií varianty väzobného proteínu (pre porovnanie, bakteriofág dokáže vystaviť približne 1000 kópií) a DNA kódujúca väzobné vlastnosti je do genómu kvasinky vnesená jednoducho pomocou elektroporácie. Spoločne s fágovým displejom má kvasinkový ešte jednu výhodu oproti ribozomálnemu displeju a tou je jednoduché určenie DNA scaffoldu s najvhodnejšími väzobnými vlastnosťami. Tá sa zistí priamou sekvenáciou. Limitáciou ako kvasinkového tak i displejov využívajúcich vírusové vektory je, že hľadaný peptid musí byť transportovaný minimálne cez jednu bunecnú membránu, čím dochádza k zníženiu výťažku reakcie. Túto limitáciu by mohol pomôcť odstrániť tzv. „zadržiavací displej“, pri ktorom sa na zobrazovanie proteínov využíva biologicky vytvorená cytoplazmatická platforma. *In vitro* selekčné techniky, ktoré zahŕňajú ribozomálny a mRNA displej, nie sú odkázané na transformačné schopnosti buniek, ako je tomu u ostatných techník. Kombinatoriálne knižnice používané pri týchto selekčných metódach patria k najväčším. Drobnou nevýhodou je, že pre odhalenie sekvencie DNA, ktorá kóduje vhodný scaffold, je potreba uskutočniť krok reverznej transkripcie. S možným zaujímavým riešením tohto problému prichádza ďalšia *in vitro* selekčná technika, a tou je CIS displej. CIS displej dokáže vytvoriť komplex, kde je *in vitro* spojená DNA s proteínom RepA, ktorý prezentuje hľadané varianty proteínov.

Všetky displejové selekčné techniky sú veľmi sľubné metódy do budúcnosti. Niekoľko proteínových scaffoldov, ktoré sa vďaka nim podarilo vyizolovať, je už v pokročilých štádiách klinického testovania. Využívajú sa ich mimetické schopnosti v boji proti zatiaľ neliečiteľnému



AIDS, diagnostikujú sa nimi nádorové ochorenia (rakovina prostaty, prsníka, atď.), vyvíjajú sa vakcíny proti vírusovým, bakteriálnym ochoreniam, detekujú sa pomocou nich rôzne parazitálne ochorenia. Ich zásluhou sú vytvárané nové bioanalytické metódy či vylepšované klasické chromatografické a purifikačné techniky.

## 7. Prehľad použitej literatúry

Aghebati-Maleki, L., B. Bakhshinejad, B. Baradaran, M. Motallebnezhad, A. Aghebati-Maleki, H. Nickho, M. Yousefi and J. Majidi (2016). "Phage display as a promising approach for vaccine development." *J Biomed Sci* **23**(1): 66.

Ahmad, J. N., J. Li, L. Biedermannova, M. Kuchar, H. Sipova, A. Semeradtova, J. Cerny, H. Petrokova, P. Mikulecky, J. Polinek, O. Stanek, J. Vondrasek, J. Homola, J. Maly, R. Osicka, P. Sebo and P. Maly (2012). "Novel high-affinity binders of human interferon gamma derived from albumin-binding domain of protein G." *Proteins* **80**(3): 774-789.

Angelini, A., T. F. Chen, S. de Picciotto, N. J. Yang, A. Tzeng, M. S. Santos, J. A. Van Deventer, M. W. Traxlmayr and K. D. Wittrup (2015). "Protein Engineering and Selection Using Yeast Surface Display." *Methods Mol Biol* **1319**: 3-36.

Baggio, R., P. Burgstaller, S. P. Hale, A. R. Putney, M. Lane, D. Lipovsek, M. C. Wright, R. W. Roberts, R. Liu, J. W. Szostak and R. W. Wagner (2002). "Identification of epitope-like consensus motifs using mRNA display." *J Mol Recognit* **15**(3): 126-134.

Beasley, M. D., K. P. Niven, W. R. Winnall and B. R. Kiefel (2015). "Bacterial cytoplasmic display platform Retained Display (ReD) identifies stable human germline antibody frameworks." *Biotechnol J* **10**(5): 783-789.

Boublik, Y., P. Di Bonito and I. M. Jones (1995). "Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface." *Biotechnology (N Y)* **13**(10): 1079-1084.

Coffin, J. M. (1992). "Structure and Classification of Retroviruses". In Levy, Jay A. *The Retroviridae*. **1** (1st ed.). New York: Plenum. p. 20-34.

Condreay, J. P., S. M. Witherspoon, W. C. Clay and T. A. Kost (1999). "Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(1): 127-132.

Essler, M. and E. Ruoslahti (2002). "Molecular specialization of breast vasculature: a breast-homing phage-displayed peptide binds to aminopeptidase P in breast vasculature." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(4): 2252-2257.

Fernandes, C. S., I. Barbosa, R. Castro, A. S. Pina, A. S. Coroadinha, A. Barbas and A. C. Roque (2016). "Retroviral particles are effectively purified on an affinity matrix containing peptides selected by phage-display." *Biotechnol J* **11**(12): 1513-1524.

Fernandes, C. S., R. Dos Santos, S. Ottengy, A. C. Viecinski, G. Behar, B. Mouratou, F. Pecorari and A. C. Roque (2016). "Affitins for protein purification by affinity magnetic fishing." *J Chromatogr A* **1457**: 50-58.

Finlay, W. J., L. Bloom and O. Cunningham (2011). "Phage display: a powerful technology for the generation of high specificity affinity reagents from alternative immune sources." *Methods Mol Biol* **681**: 87-101.

Frank, R. (2002). "The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications." *J Immunol Methods* **267**(1): 13-26.

Gera, N., M. Hussain and B. M. Rao (2013). "Protein selection using yeast surface display." *Methods* **60**(1): 15-26.

Gera, N., et al. (2013). "Protein selection using yeast surface display." *Methods* **60**(1): 15-26.

Granieri, L., J. C. Baret, A. D. Griffiths and C. A. Merten (2010). "High-throughput screening of enzymes by retroviral display using droplet-based microfluidics." *Chem Biol* **17**(3): 229-235.

Hanenberg, M., J. McAfoose, L. Kulic, T. Welt, F. Wirth, P. Parizek, L. Strobel, S. Cattepoel, C. Spani, R. Derungs, M. Maier, A. Pluckthun and R. M. Nitsch (2014). "Amyloid-beta peptide-specific DARPins as a novel class of potential therapeutics for Alzheimer disease." *J Biol Chem* **289**(39): 27080-27089.

Heinis, C., T. Rutherford, S. Freund and G. Winter (2009). "Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides." *Nat Chem Biol* **5**(7): 502-507.

Hoogenboom, H. R., A. D. Griffiths, K. S. Johnson, D. J. Chiswell, P. Hudson and G. Winter (1991). "Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains." *Nucleic Acids Res* **19**(15): 4133-4137.

Houghten, R. A. (1985). "General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids." *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(15): 5131-5135.

Jespers, L. S., J. H. Messens, A. De Keyser, D. Eeckhout, I. Van den Brande, Y. G. Gansemans, M. J. Lauwereys, G. P. Vlasuk and P. E. Stanssens (1995). "Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI." *Biotechnology (N Y)* **13**(4): 378-382.

Koide, A., C. W. Bailey, X. Huang and S. Koide (1998). "The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins." *J Mol Biol* **284**(4): 1141-1151.

Konthur, Z., J. Wilde and T.S. Lim (2010). "Semi-automated magnetic bead-based antibody selection from phage display libraries." *Antibody Engineering*: 267-287.

Liu, R., X. Li, W. Xiao and K. S. Lam (2016). "Tumor-targeting peptides from combinatorial libraries." *Adv Drug Deliv Rev*.

Maly P., M. Kuchar and M. Raska (2017) „Recombinant Mimotopes Selected from a High-complex Protein Combinatorial Library as Novel (Glyco)peptide Mimetics for Induction of Neutralizing Antibodies Against HIV-1 gp120 Glycoprotein“. BITs 10th Anniversary of Protein & Peptide Conference 2017, March 22-24, 2017, Fukuoka, Japan. P. 082

- Mann, J. K. and S. Park (2015). "Epitope-Specific Binder Design by Yeast Surface Display." *Methods Mol Biol* **1319**: 143-154.
- Mareckova, L., H. Petrokova, R. Osicka, M. Kuchar and P. Maly (2015). "Novel binders derived from an albumin-binding domain scaffold targeting human prostate secretory protein 94 (PSP94)." *Protein Cell* **6**(10): 774-779.
- McCafferty, J., A. D. Griffiths, G. Winter and D. J. Chiswell (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." *Nature* **348**(6301): 552-554.
- Odegrip, R., D. Coomber, B. Eldridge, R. Hederer, P. A. Kuhlman, C. Ullman, K. FitzGerald and D. McGregor (2004). "CIS display: In vitro selection of peptides from libraries of protein-DNA complexes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 2806-2810.
- Pande, J., M. M. Szewczyk and A. K. Grover (2010). "Phage display: concept, innovations, applications and future." *Biotechnol Adv* **28**(6): 849-858.
- Piggott, A. M. and P. Karuso (2016). "Identifying the cellular targets of natural products using T7 phage display." *Nat Prod Rep* **33**(5): 626-636.
- Pluckthun, A. (2012). "Ribosome display: a perspective." *Methods Mol Biol* **805**: 3-28.
- Popova, B., S. Schubert, I. Bulla, D. Buchwald and W. Kramer (2015). "A Robust and Versatile Method of Combinatorial Chemical Synthesis of Gene Libraries via Hierarchical Assembly of Partially Randomized Modules." *PLoS One* **10**(9): e0136778.
- Salisch, N. C., M. Vujadinovic, E. van der Helm, D. Spek, L. Vorthoren, J. Serroyen, H. Kuipers, H. Schuitemaker, R. Zahn, J. Custers and J. Vellinga (2017). "Antigen capsid-display on human adenovirus 35 via pIX fusion is a potent vaccine platform." *PLoS One* **12**(3): e0174728.
- Scott, J. K. and G. P. Smith (1990). "Searching for peptide ligands with an epitope library." *Science* **249**(4967): 386-390.
- Shadidi, M. and M. Sioud (2003). "Identification of novel carrier peptides for the specific delivery of therapeutics into cancer cells." *Faseb j* **17**(2): 256-258.
- Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science* **228**(4705): 1315-1317.
- Toledo-Machado, C. M., R. A. de Avila, N. G. C, C. Granier, L. L. Bueno, C. M. Carneiro, D. Menezes-Souza, R. A. Carneiro, C. Chavez-Olortegui and R. T. Fujiwara (2015). "Immunodiagnosis of canine visceral leishmaniasis using mimotope peptides selected from phage displayed combinatorial libraries." *Biomed Res Int* **2015**: 401509.
- Tom, I., A. Estevez, K. Bowman and L. C. Gonzalez (2015). "Baculovirus display for discovery of low-affinity extracellular receptor-ligand interactions using protein microarrays." *Anal Biochem* **479**: 1-5.

Ueda, T., T. Kanamori and H. Ohashi (2010). "Ribosome display with the PURE technology." *Methods Mol Biol* **607**: 219-225.

Upert, G., C. A. Merten and H. Wennemers (2010). "Nanoliter plates--versatile tools for the screening of split-and-mix libraries on-bead and off-bead." *Chem Commun (Camb)* **46**(13): 2209-2211.

Urban, J. H. and C. A. Merten (2011). "Retroviral display in gene therapy, protein engineering, and vaccine development." *ACS Chem Biol* **6**(1): 61-74.

Wang, S. and G. Balasundaram (2010). "Potential cancer gene therapy by baculoviral transduction." *Curr Gene Ther* **10**(3): 214-225.

Zahnd, C., P. Amstutz and A. Pluckthun (2007). "Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target." *Nat Methods* **4**(3): 269-279.