UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MANCA ZGRABLIČ

IZBOR PEPTIDNEGA LIGANDA ZA STREPTAVIDIN IZ PEPTIDNOPREDSTAVITVENE KNJIŽNICE NA BAKTERIOFAGU T7

SELECTION OF PEPTIDE LIGAND FOR STREPTAVIDIN FROM THE T7 PHAGE-DISPLAYED PEPTIDE LIBRARY

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008

Diplomsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja in somentorstvom asist. dr. Tomaža Bratkoviča. Analizo nukleotidnega zaporedja bakteriofagne DNA je opravilo podjetje MWG Biotech AG-Sequencing Service, Ebersberg, Nemčija.

Zahvaljujem se prof. dr. Borutu Štruklju in asist. dr. Tomažu Bratkoviču za strokovno svetovanje, potrpežljivost in spodbudo pri nastajanju diplomskega dela. Hvala Mihi Kosmaču in vsem na Katedri za farmacevtsko biologijo, ki so mi kakorkoli pomagali in ustvarjali prijetno delovno vzdušje. Najlepša hvala tudi prijateljem za pomoč in lepe trenutke v času študija.

Posebna zahvala pa gre fantu Alenu in moji družini za podporo in razumevanje.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja in somentorstvom asist. dr. Tomaža Bratkoviča.

Ljubljana, april, 2008

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stane Srčič

Član diplomske komisije: izr. prof. dr. Borut Božič

Vsebina

Povzetek ..... **V**

Abstract ..... **VI**

Abecedni seznam okrajšav ..... **VII**

Abecedni seznam okrajšav aminokislin ..... **VIII**

I UVOD **1**

1 Peptidi kot učinkovine **1**

2 Peptidnopredstavitvene knjižnice **1**

2.1 Kemijske peptidne knjižnice 2

2.2 Biološke knjižnice 3

2.3 Prednosti biološke pred kemijsko peptidno knjižnico 5

3 Bakteriofagne peptidne predstavitvene knjižnice **6**

3.1 Sistem T7Select 8

3.1.1 T7 litični fagi 8

3.1.2 T7Select vektorji 9

4 Streptavidin kot modelna proteinska tarča **11**

II NAMEN NALOGE **13**

III MATERIALI IN METODE **14**

1 MATERIALI **14**

1.1 Kemikalije 14

1.2 Encimi za molekularno kloniranje 15

1.3 Označevalci velikosti 15

1.4 Reagenti 16

1.5 Kompleti 16

1.6 Začetni oligonukleotidi 16

1.7 Antibiotik, bakterijski sev in tarčni protein 17

1.8 Laboratorijska oprema 17
1.9 Pufri in raztopine 18
1.10 Geli 20
1.10.1 Geli za agarozno elektroforezo 20
1.10.2 Geli za poliakrilamidno elektroforezo 20
1.11 Gojišča 20
1.12 Fagni vektor in protitelo 21

2 METODE 22

2.1 Priprava knjižnice MT-hex T7Select 22
2.1.1 Priprava inserta 22
2.1.1.1 Sinteza nekodirajoče verige inserta 23
2.1.2 Izolacija DNA iz reakcijske mešanice z uporabo kompleta QIAEX II® 24
2.1.3 Rezanje inserta z restriktazama *Eco*RI in *Hind*III 24
2.1.4 Ločevanje restrikcijske mešanice s PAGE 25
2.1.5 Izolacija rezanega inserta iz poliakrilamidnega gela z uporabo kompleta QIAEX II® 26
2.1.6 Ligacija inserta v fagni vektor 26
2.1.7 PCR test ligacije 27
2.1.8 Pakiranje in pomnoževanje knjižnice 27
2.1.8.1 Pakiranje 27
2.1.8.2 Pomnoževanje primarne knjižnice 28
2.2 Selekcija peptidov z bakteriofagno predstavitveno knjižnico 29
2.2.1 Priprava bakteriofagne knjižnice za afinitetno selekcijo 29
2.2.2 Priprava bakterijske kulture za pomnožitev eluata in določitev bakteriofagnih titrov 29
2.2.2.1 Priprava prekonočne bakterijske kulture 29
2.2.2.2 Priprava bakterijske kulture za pomnožitev eluata 29
2.2.2.3 Priprava bakterijske kulture za določitev bakteriofagnega titra 30
2.2.3 Afinitetna selekcija bakteriofagov iz predstavitvene knjižnice 30
2.2.4 Pomnoževanje eluata 31
2.2.5 Določitev bakteriofagnih titrov v nepomnoženih in pomnoženih eluatih 31
2.2.6 Pomnoževanje in izolacija posameznih bakteriofagnih klonov 32
2.2.7 Ocena afinitete selekcioniranih bakteriofagov do streptavidina s testom ELISA 32
2.2.8 Pomnoževanje inserta bakteriofagnih klonov z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) 34
2.2.9 Izolacija in čiščenje bakteriofagne DNA 34
2.2.10 Določitev nukleotidnega zaporedja 35

IV EKSPERIMENTALNO DELO 37

1 Priprava bakteriofagne knjižnice 37

2 Selekcija peptidov z bakteriofagno predstavitveno knjižnico 38

V REZULTATI IN RAZPRAVA 39

1 Priprava bakteriofagne knjižnice 39

1.1 Preverjanje velikosti pripravljenega inserta 39
1.2 Ločevanje restrikcijske mešanice s PAGE 39
1.3 Preverjanje čistosti pripravljenega inserta po restrikciji 40

1.4 Ligacija inserta v fagni vektor 41
1.5 Preverjanje uspešnosti ligacije in pakiranja knjižnice 41
1.6 Določitev bakteriofagnih titrov pomnožene in nepomnožene knjižnice 42

2 Selekcija bakteriofagne knjižnice na streptavidin 43

2.1 Določevanje bakteriofagnih titrov v pomnoženih in nepomnoženih eluatih 43
2.2 Test ELISA 45
2.3 Aminokislinska zaporedja izbranih heksapeptidov z afiniteto do streptavidina 49

VI SKLEP 52

VII REFERENCE 53

Povzetek

Peptidi v farmaciji vzbujajo zanimanje znanstvenikov kot potencialna prijemališča učinkovin oz. kot učinkovine same. Njihova odlika je predvsem sposobnost vstopanja v visoko specifične interakcije z endogenimi receptorji, posledica tega pa je manjša nevarnost interakcij z drugimi učinkovinami in nizka toksičnost. Preučevanje interakcij peptidov s tarčnimi mesti in njihova identifikacija je mogoča le z dovolj obsežnimi zbirkami strukturno različnih peptidov, ki jih imenujemo peptidne knjižnice. Le-te predstavljajo velik potencial v odkrivanju novih učinkovin, saj lahko iz njih z metodami visokozmogljivega presejanja izberemo peptidne ligande z visoko afiniteto do tarčne molekule, ki so praviloma tudi biološko aktivni.

Namen diplomske naloge je bil priprava knjižnice naključnih heksapeptidov, predstavljenih na litičnem bakteriofagu T7. Ta vektor se je po pregledu literature izkazal za najbolj obetavnega v smislu večjega nabora v peptidih izraženih aminokislin, povečane raznolikosti peptidov, bolj normalne porazdelitve peptidnega neto naboja in hidrofobnosti v primerjavi z do sedaj najpogosteje uporabljeno predstavitvijo na površini nitastih fagov. Iz bakteriofagne predstavitvene knjižnice smo nato s pomočjo afinitetne selekcije izolirali bakteriofagne klone s površinskimi peptidi z vezavno afiniteto do streptavidina. Streptavidin smo izbrali za modelno tarčno molekulo iz dveh razlogov. Prvi je dejstvo, da biotin kot visokoafinitetni ligand predstavlja učinkovit selektiven eluent, drugi pa je, da je struktura peptidnih mimetikov biotina znana. Izbranim klonom smo izolirali bakteriofagno DNA, določili nukleotidno zaporedje inserta, ki kodira predstavljen peptid, ga pretvorili v aminokislinsko zaporedje in potrdili ustreznost knjižnice, saj so se dobljeni rezultati ujemali z literaturnimi. Dejstvo, da smo kot rezultat selekcije dobili znan, a ne značilen motiv, potrjuje teorijo, da lahko z uporabo predstavitve peptidov na fagu T7 znatno povečamo možnosti odkritja strukturno novih ligandov z visoko afiniteto do tarčne molekule.

Abstract

Peptides are of great interest to scientists working in drug discovery. They either represent potencial drug targets or can be considered drug leads or even drug candidates. The ability of peptides to engage in highly specific interactions with endogenous receptors and as a direct consequence of this low toxicity of peptide drugs and lower probability of interactions with other active substances is a quality of an ideal drug molecule. Identification of bioactive peptides and systematic studies of peptides interacting with specific targets is only possible with large enough collections of different peptides called *peptide libraries*. With high-throughput screening methods vast libraries of peptides can be assayed for high-affinity bioactive peptide ligands to virtually any protein target.

We have prepared a library of random hexapeptides displayed on a lytic bacteriophage T7. We chose this vector because it is known for increased peptide diversity and more normal distribution of peptide net charge and hydropathy in comparison to the more commonly used filamentus phage display. The constructed library was subjected to affinity selection against streptavidin, resulting in a successful isolation of phage clones displaying surface peptides with affinity to the target. We have chosen streptavidin as a model target molecule for two reasons. Firstly, biotin is an extremly high affinity ligand of streptavidin, representing an efficient and selective eluent. Secondly, several peptide mimetics of biotin have already been described.

Bacteriophage DNA was isolated from high-affinity clones and the nucleotide sequence of the insert coding for the displayed peptide was determined. Finally, nucleotide sequences were translated to aminoacid sequences to give primary structures of peptide ligands. Library's adequacy (i.e. complexity and quality) was confirmed on the basis of matching the identified binding motif with literature data. The fact that our motif was a well-known but not a characteristic one confirms the theory that the possibility of identifying peptides with new structures and high affinity to target molecule can be increased with the use of phage display on bacteriophage T7.

Abecedni seznam okrajšav

A	absorbanca
ABTS	2,2`-azino-bis(3-etilbenztiazolin-6-sulfonska kislina)
AK	aminokislina
BSA	goveji serumski albumin (ang.bovine serum albumin)
dATP	2`-deoksiadenozin trifosfat
dCTP	2`-deoksicitozin trifosfat
ddATP	2`,3`-dideoksiadenozin trifosfat
ddCTP	2` 3`-dideoksicitozin trifosfat
ddGTP	2` 3`-dideoksigvanozin trifosfat
ddH_20	bidestilirana voda
ddNTP	2` 3`-dideoksinukleotid trifosfat
ddTTP	2` 3`-dideoksitimidin trifosfat
dGTP	2`-deoksigvanozin trifosfat
dH_2O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	2`-deoksinukleotid trifosfat
DTT	ditiotreitol
dTTP	2`-deoksitimidin trifosfat
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ELISA	Encimski imunoabsorbcijski test (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
g	enota pospeška relativne centrifugalne sile
HRP	hrenova peroksidaza (ang. horseradish peroxidase)
IPTG	izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid
LB medij	Luria-Bertanijevo gojišče
MCS	multiplo mesto za kloniranje (ang. multiple cloning site)
MTP	mikrotitrska ploščica
obr./min	obrati na minuto
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza
PBS	fosfatni pufer s soljo (NaCl)
PBST	PBS s Tween-20
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PEG	polietilenglikol
pfu	plakotvorna enota (ang. plaque forming units)
rDNA	rekombinantna DNA
SDS	natrijev dodecil sulfat (ang. sodium dodecyl sulphate)
TAE	Tris-acetat-EDTA pufer
TBE	Tris-borat-EDTA pufer
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
Tris	tris (hidroksimetil)-aminometan
Tween 20	polioksietilen sorbitan monolavrat
U	enota encimske aktivnosti
$(NH_4)AcO$	amonijev acetat

Abecedni seznam okrajšav aminokislin

Ala	A	alanin
Arg	R	arginin
Asn	N	asparagin
Asp	D	asparaginska kislina
Cys	C	cistein
Phe	F	fenilalanin
Gly	G	glicin
Gln	Q	glutamin
Glu	E	glutaminska kislina
His	H	histidin
Ile	I	izolevcin
Leu	L	levcin
Lys	K	lizin
Met	M	metionin
Pro	P	prolin
Ser	S	serin
Tyr	Y	tirozin
Thr	T	treonin
Trp	W	triptofan
Val	V	valin

I UVOD

1 Peptidi kot učinkovine

Proteini oz. polipeptidi so biomakromolekule, ki imajo v organizmu zelo pomembno vlogo, saj določajo obliko in strukturo celice in hkrati sodelujejo v celi vrsti procesov medmolekulskega prepoznavanja kot so encimska kataliza, prenos signalov in transport. Medmolekulsko prepoznavanje temelji na komplementarnosti oblike in fizikalno kemijskih lastnosti stične površine. Ta dva parametra določata moč in specifičnost vezi med molekulami. Čeprav imajo makromolekule veliko molsko maso, v tvorbo medmolekulskih vezi praviloma vstopa le manjše število aminokislinskih stranskih verig in/ali krajši fragmenti peptidnega skeleta. Pogosto zato tudi krajši peptidi ohranijo funkcijo proteinske molekule iz katere izhajajo. Obliko in lastnosti stične površine med makromolekulami spoznamo najbolje z določanjem terciarne strukture (1, 2).

Proteini že od nekdaj vzbujajo zanimanje farmacevtskih kemikov, bodisi kot prijemališča učinkovin (s ciljem inhibicije delovanja t.i. tarčnega proteina oz. njegove aktivacije) ali kot učinkovine same (ko je bolezen posledica pomanjkanja določenega endogenega proteina) (2). Prednost peptidov kot učinkovin je v njihovi sposobnosti vstopanja v visoko specifične interakcije z endogenimi receptorji, kar pomeni posledično manj interakcij z drugimi učinkovinami in nizko toksičnost. Na žalost pa je njihova uporaba v terapiji zelo omejena zaradi njihove potencialne imunogenosti, visokih stroškov, povezanih s pridobivanjem, in predvsem neprimernega farmakokinetičnega profila (metabolična inaktivacija, nezmožnost prehajanja bioloških membran, obsežna ledvična filtracija in velika podvrženost proteolizi) (3).

2 Peptidnopredstavitvene knjižnice

Ena glavnih nalog molekularne biologije na začetku 21. stoletja je razkritje zapletenih interakcij vpletenih v celične funkcije. Razkritje nukleotidnega zaporedja genoma nam odpira možnosti za funkcionalno analizo proteinov, ta naloga pa zahteva nove tehnologije, s pomočjo katerih bomo lahko hitreje določili interakcije (4).

Identifikacija proteinskih komponent, ki so prisotne v celici, se je začela že z odkritjem tehnologije rekombinantne DNA. Omenjena tehnologija omogoča kloniranje in kontrolirano izražanje proteinov v bakterijah, rastlinah in živalih, vendar ni uporabna za identifikacijo in analizo proteinov, izraženih v nekem določenem času. Zato je bil nujen razvoj tehnologij, ki bi omogočale hkratno kloniranje, izražanje in analizo proteinov. Te metode imenujemo metode visokozmogljivostnega presejanja ali HTS (ang. high-throughput-screening). Uporaba le-teh je v postgenomski dobi oblikovala nove veje raziskav, ki jih imenujemo funkcionalna in strukturna genomika in proteomika (4).

Predstavitev različnih proteinov na površini mikroorganizmov je s pomočjo tehnologije rekombinantne DNA postala široko uporabljena metoda na različnih področjih mikrobiologije, biotehnologije in pri razvoju cepiv. Kot vektorje za predstavitev proteinov najpogosteje uporabljamo bakterijske viruse (bakteriofage), v zadnjem času pa tudi Gram-negativne in pozitivne bakterije, ter celo evkariontske celice in viruse. Takšne zbirke peptidov predstavljenih na mikroorganizmih ali celicah imenujemo peptidnopredstavitvene knjižnice (2).

Predstavitvene tehnologije sicer delimo na dva sklopa: i) biološke sisteme, ki uporabljajo sintezne procese, ki so nadzorovani s strani narave gostitelja in ii) nebiološke sisteme, pri katerih uporabljamo kemijsko sintezo (kombinatorna kemija). Oba sistema sestavljajo tri osnovne komponente: efektorska enota[1], ki omogoča funkcionalnost, fleksibilna enota[2], ki omogoča elastičnost predstavljeni enoti, in koda[3], ki omogoča takojšnjo identifikacijo predstavljene enote v kateremkoli času eksperimenta (4).

Peptidne knjižnice imajo široko področje uporabe in sicer v identifikaciji biološko aktivnih peptidov, preučevanja vezave peptidov na receptorje, pri opisovanju razlik specifične vezave protiteles (epitopov), pri pripravi sinteznih cepiv, izolaciji proteinov, itd. (5, 6).

2.1 Kemijske peptidne knjižnice

Razvoj kombinatorične kemije je omogočil sintezo velikega števila strukturno sorodnih spojin – zbirke le-teh imenujemo knjižnice. V relativno kratkem času s sodobnimi tehnologijami lahko testiramo njihovo aktivnost proti določeni ciljni molekuli. Takšen pristop močno poveča verjetnost odkritja aktivne spojine vodnice.

---

[1] Peptid, izražen na proteinski ovojnici bakteriofaga (kapsidi).
[2] Distančnik med izraženim peptidom in nosilnim kapsidnim proteinom.
[3] Oligonukleotidni insert, kodirajoč površinski peptid, v bakteriofagnem genomu.

Kemijsko sintezo knjižničnih produktov lahko izvajamo v raztopini ali s sintezo na trdnih nosilcih. Prednost sinteze na trdnih nosilcih je v boljši odstranitvi prebitnih reagentov in v manjši verjetnosti tvorbe stranskih produktov sinteze. Posamezna sintezna stopnja obsega pripajanje zaščitenega monomera, spiranje presežnih reagentov in odstranitev zaščitne skupine na podaljšanem vmesnem produktu. Po koncu sinteze lahko oligomere odcepimo s trdnega nosilca in dobimo knjižnične produkte v raztopini. Na tak način lahko pripravimo različne knjižnice (oligopeptidne, oligonukleotidne, peptidomimetične,...) (2).

2.2 Biološke knjižnice

Biološka knjižnica predstavlja obsežno zbirko strukturno sorodnih oligopeptidov, knjižnice cDNA, knjižnice protiteles, knjižnice peptidov, predstavljenih na površini živih organizmov, katerih genetski zapis je vključen v genom gostitelja.

V okviru bioloških sistemov ločimo *in vivo* sisteme, ki uporabljajo gostitelja (prokariontske ali evkariontske celice) za namnožitev knjižničnih komponent, in *in vitro* sisteme, ki za to ne potrebujejo gostitelja, temveč celične ekstrakte. Največja razlika med njimi je v velikosti (in s tem v raznolikosti) knjižnice. Pri *in vivo* sistemih je njihovo število (praviloma manjše od 10^{12} knjižničnih komponent) omejeno s številom gostiteljskih celic, ki se spontano namnožijo, in zlasti z uspešnostjo prenosa tuje genske informacije vanje (navadno z elektroporacijo). *In vitro* sistemi uporabljajo zunanje vire za prepis DNA in sintezo proteinov, zato je njihova velikost (običajno precej več kot 10^{12} knjižničnih komponent) omejena s kvantiteto genske informacije, ki se vključi v izvencelično sintezo proteinov.

Primera *in vitro* bioloških sistemov sta polisomna predstavitev in kompleksna predstavitev mRNA-peptid, primeri *in vivo* bioloških sistemov pa so dvohibridni sistem kvasovke in predstavitev na bakteriofagu ali površini prokariontske oz. evkariontske celice (4, 7, 8).

Konstrukcija biološke predstavitvene knjižnice se prične z vstavljanjem ustreznih odsekov nukleinskih kislin v gen za površinski protein na primernem vektorju. Vektor je običajno plazmid, fagmid ali fagna genomska DNA. Vektor nato vnesemo v gostiteljske organizme: prokariontske celice (Gram pozitivne in negativne bakterije), glive kvasovke, ali celo evkariontske celice (7, 8).

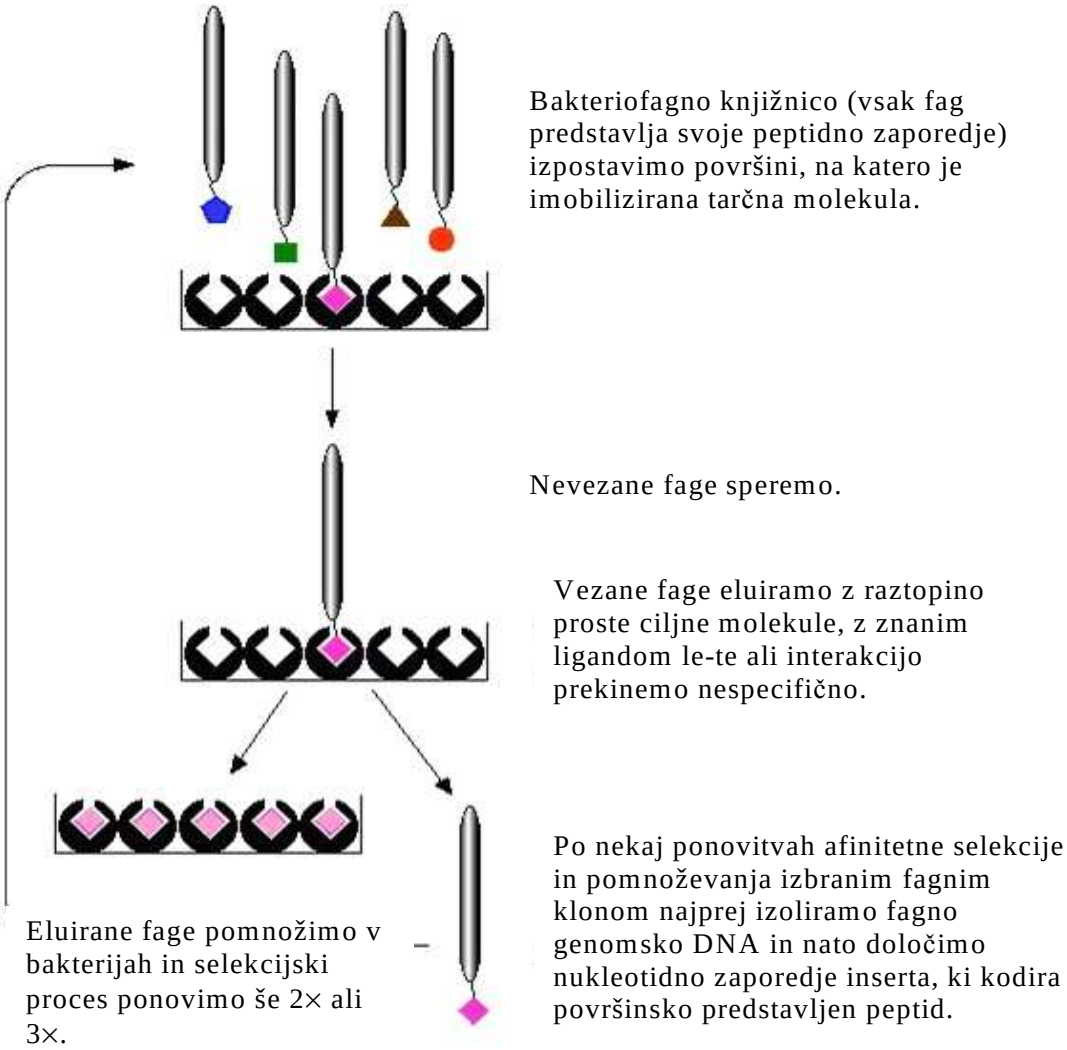
S pomočjo gostiteljevih encimov, gradnikov molekul in energijskih zalog se začne pomnoževanje vektorske DNA in prepisovanje rekombinantnih genov v proteine. Na ta način se skupaj z genom za površinski protein prepiše tudi vstavljeno zaporedje

nukleotidov in se v obliki fuzijskega proteina, v kolikor vstavljen fragment ne poruši funkcije gena, izrazi na površini virusa ali celice. Tako vsak mikroorganizem predstavi na svoji površini določen peptid. Pri tem sta genotip in fenotip fizično povezana. Vsak mikroorganizem je ekspresijski sistem za en sam fuzijski površinski protein in predstavlja posamezen klon. Vsi potomci takšnega klona imajo na svoji površini izražen isti protein (običajno v več kopijah) (20). Biološka knjižnica je tako lahko sestavljena iz več milijard različnih klonov in predstavlja velikansko zbirko proteinov ali peptidov (1).

Selekcijo molekul na podlagi njihove funkcije izvedemo tako, da v postopku selekcioniramo tiste molekule, ki se vežejo na tarčno molekulo. Produkt selekcije so tako peptidi z največjo vezavno afiniteto do tarčne molekule oziroma peptidi, ki po interakciji s tarčno molekulo izzovejo določen biološki učinek. Odkriti peptidni ligandi predstavljajo začetno točko v odkrivanju novih učinkovin (10).

Postopek afinitetne selekcije (angl. *biopanning*) se prične s pripravo tarčne molekule. Običajno jih imobiliziramo na trdno podlago. Nad tarčnimi molekulami inkubiramo suspenzijo mikroorganizmov, ki sestavljajo biološko knjižnico. Organizme, ki se v določenem času prek površinskih peptidov ali proteinov ne vežejo na tarčo, odstranimo s spiranjem. Vezane komponente eluiramo nespecifično (sprememba pH, mehansko,...) ali specifično (z visoko koncentracijo proste tarčne molekule, z znanim ligandom za receptor,...).

Eluirane klone pomnožimo in proces selekcije še nekajkrat ponovimo (3 do 5-krat). Posamezne klone, eluirane po zadnji selekcijski stopnji, izoliramo ter pomnožimo in določimo nukleotidno zaporedje vstavljenega fragmenta. Tega prevedemo v aminokislinsko zaporedje in tako dobimo primarno strukturo peptidnega liganda. Dobljena aminokislinska zaporedja peptidnih ligandov omogočajo analizo interakcij.



Slika 1: Shema afinitetne selekcije peptidov, predstavljenih na bakteriofagih (11).

Variacije iskanja aktivnih peptidov z uporabo biološke knjižnice so: selekcija na izolirani tarčni molekuli, selekcija na fiksirane prokariontske oz. sesalske celice, selekcija na posamezna tkiva in celo *in vivo* selekcija v živalih (10).

2.3 Prednosti biološke pred kemijsko peptidno knjižnico

Kombinatorične knjižnice so glede na strukturo lahko biološke ali kemijske. Z biološko sintezo pripravljamo izključno peptidne knjižnice, medtem ko lahko s kemijsko sintezo pripravimo najrazličnejše knjižnice (peptidne, nukleotidne, peptidomimetične itd.) (1).

Obstaja nekaj komercialno dostopnih bioloških peptidnih knjižnic. Ker selekcija aktivnih peptidov iz biološke knjižnice ni zahtevna, je ta tehnologija dostopna širokemu krogu

uporabnikov. Na drugi strani kemijske knjižnice niso komercialno dostopne, njihova priprava in *in vitro* testiranje pa zahtevata veliko specifičnega znanja in avtomatizacije, zato je število uporabnikov bolj omejeno (12).

Ker so v biološki knjižnici oligonukleotidi vstavljeni v genom živega organizma ali v drug primeren vektor, pridobijo kodirani fuzijski proteini preko svojega genskega zapisa sposobnost razmnoževanja in mutacije. V postopku selekcije se v idealnem primeru ohranijo le kloni s peptidi, ki izkazujejo afiniteto do tarčne molekule. Ti kloni se razmnožujejo in vstopajo v nove selekcijske stopnje. Zaradi sposobnosti (od zunaj izzvane) mutacije se fuzijski proteini lahko razvijejo v povsem nove (tj. takšne, ki v izhodni knjižnici niso prisotne) molekule z izboljšanimi vezavnimi sposobnostmi za dano tarčno molekulo. S tem selekcija z biološko knjižnico posnema naravno evolucijo. To je njena bistvena prednost pred kemično knjižnico, saj se kemikalije same po sebi ne morejo razvijati. Poleg tega je biološke knjižnice mogoče zlahka obnavljati s pomnoževanjem gostiteljskih mikroorganizmov, medtem ko je kemijske knjižnice potrebno sintetizirati na novo (12). Povezava proteina z gensko informacijo omogoča tudi hitro in enostavno identifikacijo aminokislinskega zaporedja fuzijskega proteina z določitvijo nukleotidnega zaporedja inserta (9, 12).

Prednost bioloških knjižnic je tudi velikost, saj obsegajo tudi več kot 10^9 neodvisnih klonov, medtem, ko kemične običajno obsegajo 10^6-10^7 različnih peptidnih struktur. Glavni dejavnik, ki omejuje velikost bioloških knjižnic, je transformacijska učinkovitost. Z raznimi rekombinacijskimi procesi, ki jih sprožijo *in vivo*, lahko velikost take knjižnice doseže celo mejo 10^{10} klonov (13).

3 Bakteriofagne peptidne predstavitvene knjižnice

Bakteriofagi (ali fagi) so bakterijski virusi. Le-ti okužijo gostiteljske bakterijske celice in uporabijo njene replikacijske mehanizme, da pomnožijo svoj genom in proteine ovojnice. Vežejo se na specifične receptorje na tarčni celici in vanjo injicirajo svoj dedni material, ki se vgradi v genom gostitelja (lizogeni fagi) ali pa služi neposredno za sintezo novih fagnih delcev. Novonastali bakteriofagni delci prehajajo membrano, ne da bi celico poškodovali (nitasti fagi) ali pa izstopijo iz celice naenkrat, ko sprožijo lizo celice (litični fagi). Fagi imajo lahko genom v obliki enoverižne DNA (nitasti fagi), dvoverižne DNA (fagi λ ter fagi T), dvoverižne RNA (f6) ali enoverižne RNA (MS2 in Qβ) (14, 15).

Prve fagne vektorje, ki so bili primerni za površinski prikaz peptidov, je leta 1985 pripravil George P. Smith. Ugotovil je, da je mogoče na kapsidi nitastih bakteriofagov izraziti krajše peptide kot fuzijske proteine z virusnim proteinom pIII. S sodelavci je razvil enostavne postopke za selekcijo fagov, ki so na površini izražali peptide oz. proteine, sposobne vezave na določene tarče. Od takrat naprej so najbolj razširjena oblika bioloških knjižnic bakteriofagne peptidne predstavitvene knjižnice (1, 5).

Dandanes fagno predstavitveno tehnologijo uporabljamo za enostavno in hitro izolacijo človeških protiteles, za spreminjanje afinitete in specifičnosti protiteles, za določanje paratopov monoklonskih protiteles, za identifikacijo ligandov peptidnih receptorjev ter za študije interakcij med encimom in substratom. Fagno predstavitveno tehnologijo pa so uporabili tudi pri razvoju vektorjev za ciljano gensko terapijo (16, 17).

Uspešnost presejalnih testov bakteriofagne predstavitvene knjižnice je odvisna od narave tarče, od velikosti (raznolikosti) knjižnice, konformacije peptidov (če so ti vpeti v nek ogrodni protein) in od kvalitete knjižnice. Raznolikost knjižnice, to je število vseh aminokislinskih zaporedij, ki sestavljajo knjižnico, pa je najpomembnejši dejavnik, ki vpliva na uspešnost presejalnega testa (18).

Zelo pogosto uporabljeni bakteriofagni vektorji so trenutno nitasti fagi (npr. fd in M13) redkeje pa tudi litični fagi, λ, T7 in T4. Nitasti fagi so v veliki meri idealni za uporabo kot vektorji za kloniranje in za pripravo predstavitvenih knjižnic. Njihov genom je majhen in dopušča vstavljanje insertov v neesencialne regije, kloniranje in priprava knjižnice sta pospešena zaradi enostavne izolacije enovijačne in dvovijačne fagne DNA; bakteriofagi se lahko namnožijo do visokih titrov saj njihova rast ne povzroči lize celic in bakteriofagni deli so stabilni v širokem območju možnih selekcijskih pogojev (19). Ena izmed pomanjkljivosti nitastih bakteriofagov pa je, da njihov razmnoževalni sistem zahteva, da se vse komponente plašča bakteriofaga izločijo preko notranje bakterijske membrane, preden se sestavi zrel bakteriofag. To omejitev lahko v celoti odpravimo z uporabo litičnih fagov. Pri teh vrstah se kapsida v celoti sestavi v citoplazmi, preden pride do lize celice (20, 21). S tem pojasnjujemo ugotovitev, da imajo peptidne knjižnice pripravljene z litičnimi fagi T7 manj omejen nabor v peptidih izraženih aminokislin, povečano raznolikost peptidov ter bolj normalno porazdelitev peptidnega neto naboja in hidrofobnosti v primerjavi s knjižnicami, izraženimi na površini nitastih fagov (18).

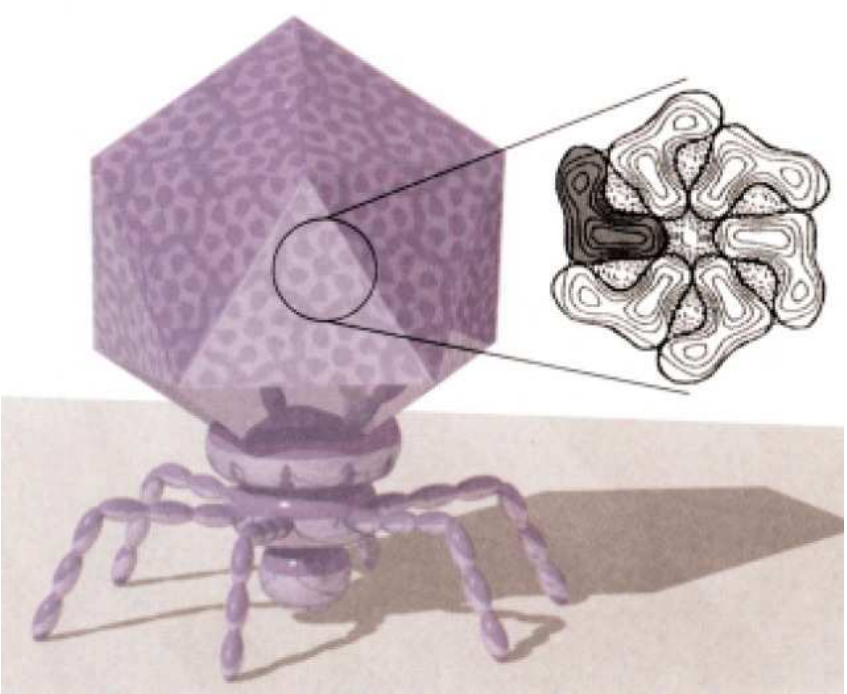
3.1 Sistem T7Select

3.1.1 T7 litični fagi

Bakteriofag T7 je litični fag, specifičen za bakterijo *Escherichia coli.*

T7 je ikozaedrični fag s kapsidno ovojnico, zgrajeno iz 415 kopij kapsidnega proteina (produkt gena 10), urejenih kot 60 heksamerov na ploskvah ovojnice in 11 pentamerov na ogliščih (5). Glava faga vsebuje okoli 40 kbp velik genom v obliki linearne dvoverižne DNA (19).

T7 fag je zelo nezahteven fag za gojenje v laboratoriju in se pomnožuje hitreje kot nitasti fagi ali bakteriofagi λ. Plaki se na agarnem gojišču, konfluentno preraslim z bakterijami, tvorijo že v 2 do 3 urah pri 37 ºC in bakterijske kulture lizirajo 1 do 2 uri po infekciji. Fagni delec T7 je izjemno robusten in stabilen pri številnih pogojih, ki inaktivirajo druge fage, a je neobstojen v medijih z vrednostjo pH pod 4. Je tudi odličen vektor za kloniranje, saj je mogoče pridobiti DNA na enostaven način in v veliki količini, poleg tega je nukleotidno zaporedje genoma v celoti določeno (23).



Slika 2: Shematična struktura bakteriofaga T7. Povečava prikazuje heksamer proteina 10 na ploskvi kapside (premera 55nm). Monomerne enote so narisane s sivo barvo (5).

Rekombinantni bakteriofagi lahko na svoji površini izražajo fuzijske proteine s proteini ovojnice. T7 kapsidni protein je normalno prisoten v dveh oblikah, 10A (334 AK) in 10B (397 AK). Slednji nastaja kot posledica premika bralnega okvirja pri transkripciji s istega gena. Funkcionalne kapside so lahko sestavljene samo iz 10A ali 10B oziroma različnih razmerij teh dveh proteinov (5). Ta ugotovitev je vodila do začetnega predloga, da bi lahko kapsida faga T7 sprejela variacijo proteina 10 in da bi lahko regija kapsidnega proteina, ki je značilna za 10B, bila izražena na površini faga ter tako uporabljena za predstavitev na bakteriofagu.

3.1.2 T7Select vektorji

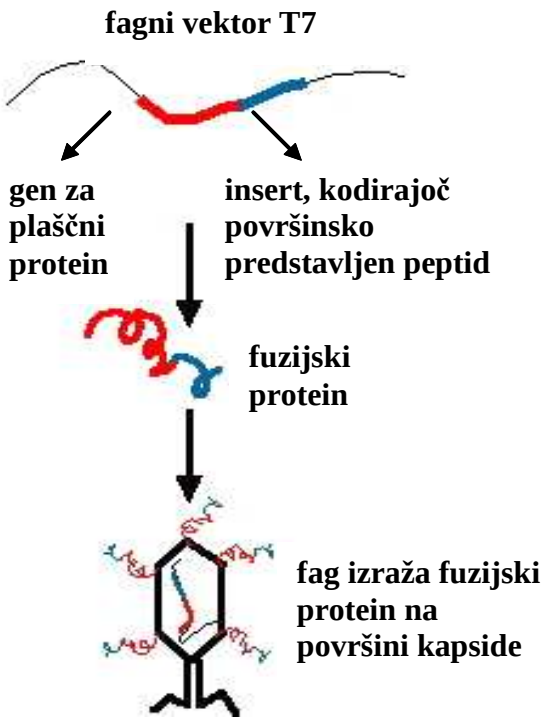
Pri izdelavi bakteriofagnih knjižnic je ključnega pomena primeren vektorski sistem, ki omogoča predstavitev peptida na površini bakteriofaga. Obstajajo trije osnovni tipi vektorjev T7Select® (Novagen) za predstavitev na bakteriofagu: vektor T7Select415 za prikaz velikega števila kopij peptidov, vektor T7Select10 za prikaz srednje velikega števila kopij peptidov in vektor T7Select1 za prikaz manjšega števila kopij peptidov ali večjih proteinov. V vseh vektorjih so nukleotidna zaporedja, kodirajoča peptide oz. proteine, ki jih želimo izraziti na površini faga, klonirana znotraj multiplega mesta za kloniranje (MCS), ki sledi aminokislini 348 proteina 10B. Naravno mesto, kjer lahko prihaja do premika bralnega okvirja znotraj kapsidnega gena, je bilo odstranjeno, tako da ti vektorji izdelajo le enojno obliko kapsidnega proteina (23). Mi smo za pripravo bakteriofagne predstavitvene knjižnice uporabili vektor T7Select10-3b.

Vektor	Uporaba	Število kopij	Velikost (bp)	Omejitve velikosti	Gostitelj
T7Select®415-1b	peptidi	415	37,314	50 ak	BL21
T7Select10-3b	peptidi ali proteini	5–15	36,249	1200 ak	BLT5403, BLT5615, BLT5615*rna*, Orgami B 5615, Rosetta 5615, Rosetta-gami 5615
T7Select1-1b	peptidi ali proteini	0.1–1	36,219	1200 ak	
T7Select1-2a	peptidi ali proteini	0.1–1	37,245	900 ak	
T7Select1-2b	peptidi ali proteini	0.1–1	37,244	900 ak	
T7Select1-2c	peptidi ali proteini	0.1–1	37,243	900 ak	

Tabela 1: Lastnosti vektorjev T7Select za predstavitev na bakteriofagu (23).

```
T7Select10-3b
        348ak                                                                    369ak
...MetLeuGlyAspProAsnSerProAlaGlyIleSerArgGluLeuValAspLysLeuAlaAlaAlaLeuGlu
...ATGCTCGGGGATCCGAATTCTCCTGCAGGGATATCCCGGGAGCTCGTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGTAA
        BamH I   EcoR I  Sse8387 I EcoR V Sma I Sac I  Sal I  Hind III   Not I    Xho I
```

Slika 3: Multiplo mesto za kloniranje na vektorju T7Select10-3b (23).

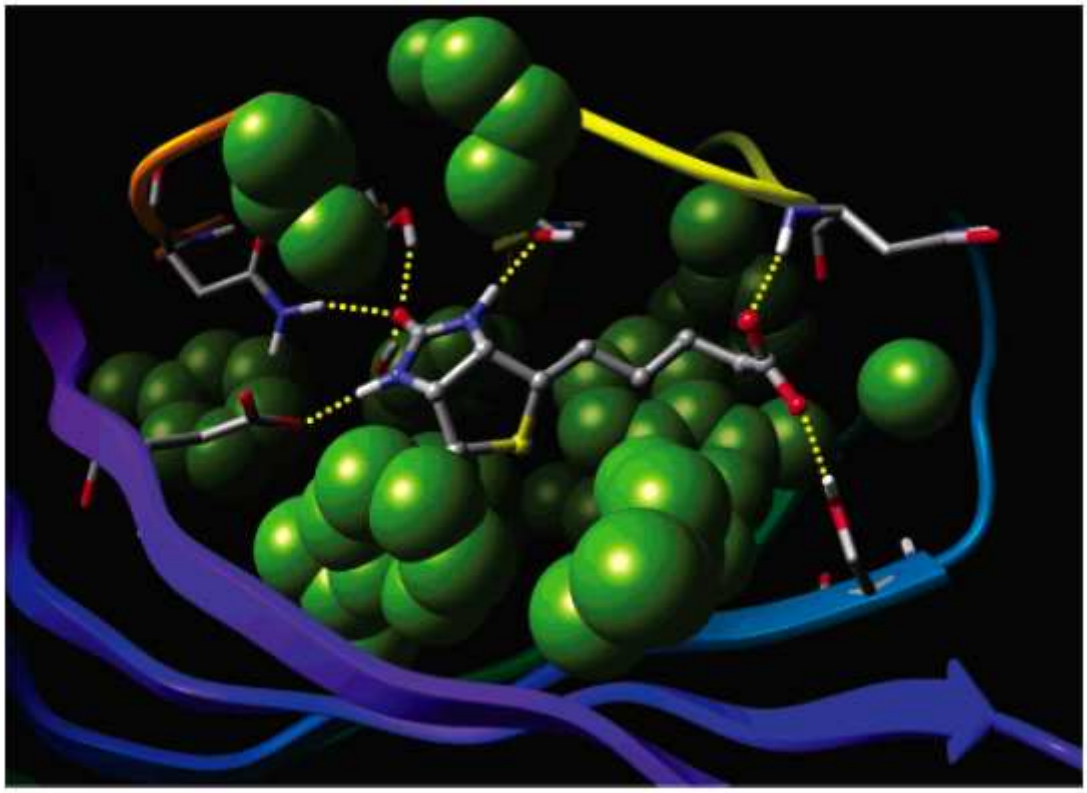


Slika 4: Izražanje vnesenega nukleotidnega zaporedja na površini faga T7 (0).

Peptidne knjižnice, ki jih pripravimo z uporabo litičnih fagov T7 imajo sposobnost izražanja velikega števila peptidov (do 415 na fag) v velikosti do 50 aminokislin in manjše število peptidov (povprečno 0,1 do 1 na fag) v velikosti do 1200 aminokislin. Fagni delec se sestavi v bakterijski celici in se kot zrel fag sprosti z lizo celice. Za razliko od nitastih fagov pri peptidih oziroma proteinih izraženih na površini T7 ni potrebna sposobnost sekrecije skozi celično membrano, kar pomeni, da ni potrebna kompatibilnost izraženih peptidov s sekretornim kompleksom ali z infekcijskim procesom gostiteljske celice. Ravno zaradi teh lastnosti ima sistem T7Select® sposobnost izražanja večje raznolikosti izraženih peptidov, kot pa sistemi, ki slonijo na vektorjih nitastih bakteriofagov (5, 18).

4 Streptavidin kot modelna proteinska tarča

Streptavidin je tetrameren protein, izoliran iz bakterije *Streptomyces avidinii*, ki ima izredno visoko vezavno afiniteto do biotina. Disociacijska ravnotežna konstanta (K_d) kompleksa streptavidin-biotin je namreč v območju 10^{-15}, kar jo uvršča med najmočnejše nekovalentne vezi, ki jih poznamo (26). Vez med streptavidinom in biotinom nastane zelo hitro in je stabilna v širokem območju pH in temperature ter v prisotnosti številnih organskih topil in drugih denaturirajočih reagentov. Ključno za vezavo je veliko območje hidrofobnih interakcij in Van der Waalsovih sil med molekulama, ki jih dodatno krepi mreža vodikovih vezi (slika 5). Veliko komplementarnosti vezi z biotinom omogoči tudi sprememba konformacije fleksibilne površinske zanke streptavidina med vezavo iz odprte v zaprto (26).



Slika 5: Model kompleksa med streptavidinom in biotinom (30).

Interakcijo streptavidin-biotin uporabljamo kot model za visokospecifične interakcije med receptorjem in ligandom (26, 27). V literaturi kot mimotop biotina najpogosteje najdemo peptidni fragment His-Pro-Gln/Met (HPQ/M), prvotno izbran iz bakteriofagne predstavitvene knjižnice naključnih peptidov (26). Znani so tudi nekateri drugi peptidni

mimotopi, kakršna sta na primer Arg-Cys-Cys-Ile (RCCI) in Arg-Cys-Cys-Val (RCCV) (18) in zaporedje t.i. nanotag-a DVEAWLGAR(VPLVET) (29). Ti motivi se vežejo na biotinsko vezavno mesto streptavidina, vendar drugače kot sam biotin (12).

Na Katedri za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo (UL) rutinsko preverjajo ustreznost raznolikosti na novo pripravljenih ali pomnoženih bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic naključnih peptidov z uporabo interakcije med streptavidinom in biotinom. V tem primeru streptavidin služi kot tarčna makromolekula, medtem ko ima biotin vlogo močnega in specifičnega eluenta.

II NAMEN NALOGE

Peptidi predstavljajo pomembno orodje v razvoju novih učinkovin. Običajno so visokoafinitetni selektivni peptidni ligandi spojine vodnice za načrtovanje peptidomimetičnih učinkovin. Te izkazujejo nekatere lastnosti, ki so odlika peptidov, npr. sposobnosti visoko specifičnih interakcij z endogenimi receptorji, visoko selektivnost (posledično manj neželenih stranskih učinkov, kot jih imajo tradicionalne nizkomolekulske sintezne učinkovine), a imajo izboljšan farmakokinetični profil.

Ker je uporaba peptidnopredstavitvenih knjižnic trenutno ena izmed najsodobnejših metod za identifikacijo biološko aktivnih peptidov smo se odločili, da bomo:

- Pripravili peptidnopredstavitveno knjižnico na bakteriofagu T7.
- Pripravljeni knjižnici določili diverziteto (bakteriofagni titer primarne knjižnice).
- Na osnovi vezave peptidov na streptavidin izselekcionirali bakteriofagne klone z največjo vezavno afiniteto.
- S testom ELISA preverili vsebnost klonov, ki se selektivno vežejo na streptavidin.
- Tem klonom izolirali genomsko DNA.
- Izolirani fagni DNA določili nukleotidno zaporedje inserta, ki kodira peptid izražen na kapsidi.
- Prevedli nukleotidno zaporedje v peptidno zaporedje in primerjali dobljene rezultate z literaturnimi.
- Na osnovi opisane testne afinitete selekcije ocenili kvaliteto pripravljene peptidnopredstavitvene knjižnice.

III MATERIALI IN METODE

1 MATERIALI

1.1 Kemikalije

Kemikalija	Proizvajalec
$(NH_4)AcO$	Fluka, Buchs, Švica
ABTS	Sigma, St.Louis, MO, ZDA
agaroza	Sigma, St.Louis, MO, ZDA
ditiotretiol (DTT)	Promega, Madison, WI, ZDA
EDTA	Promega, Madison, WI, ZDA
etanol, 95%	Riedel-de Haën, Seelze, Nemčija
etidijev bromid	Promega, Madison, WI, ZDA
glicerol	Fluka, Buchs, Švica
goveji serumski albumin(BSA)	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
H_2O_2, 30%	Belinka, Slovenija
HCl	Fluka, Buchs, Švica
humani trombin	Sigma, St.Louis, MO, ZDA
IPTG	Promega, Madison, WI, ZDA
KCl	Carlo Erba, Rodano, Italija
KH_2PO_4	J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, ZDA
KOH	Kemika, Zagreb, Hrvaška
kvasni ekstrakt	Sigma, St.Louis, MO, ZDA
LB agar	Roth, Karlsruhe, Nemčija
metanol	Fluka, Buchs, Švica
$Mg(AcO)_2$	Fluka, Buchs, Švica
Na_2HPO_4	Fluka, Buchs, Švica
NaCl	Merck, Darmstadt, Nemčija
NaH_2PO_4	Fluka, Buchs, Švica
NaOH	Fluka, Buchs, Švica

PEG 8000	Sigma, St.Louis, MO, ZDA
pepton iz kazeina	Fluka, Buchs, Švica
SDS	Fluka, Buchs, Švica
Tris	Promega, Madison, WI, ZDA
Tween 20	Serva, Heidelberg, Nemčija

Vse kemikalije so bile *p.a.* čistote.

1.2 Encimi za molekularno kloniranje

Encim, vir	**Prepoznavno mesto cepitve**	**Koncentracija**	**Proizvajalec**
*Hind*III *(Haemophilus influenzae)*	AAGCTT	10 U/µl	Fermentas, Burlington, Kanada
*Eco*R I *(Escherichia coli)*	GAATTC	20 U/µl	New England Biolabs, Beverly, MA, ZDA
T4 DNA ligaza (bakteriofag T4)	–	400 U/µl	Promega, Madison, WI, ZDA

Enota za aktivnost encimov U je definirana kot količina encima, ki katalizira transformacijo enega µmol substrata v eni minuti pri standardnih pogojih.

1.3 Označevalci velikosti

Označevalec velikosti	**Proizvajalec**
GeneRuler™ 50bp DNA Ladder (polinukleotidni označevalec velikosti)	Fermentas, Burlington, Kanada

1.4 Reagenti

Reagent	Proizvajalec
10× ligacijski pufer	Promega, Madison, WI, ZDA
10× NEBuffer 2	New England Biolabs, Beverly, MA, ZDA
10× R-pufer	Fermentas, Burlington, Kanada
2× PCR Master Mix	Promega, Madison, WI, ZDA
5× zeleni GoTag pufer	Promega, Madison, WI, ZDA

1.5 Kompleti

Komplet	Proizvajalec
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Nemčija
Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega, Madison, WI, ZDA
T7 Select® Cloning Kit	Novagen, Madison, WI, ZDA

1.6 Začetni oligonukleotidi

Oznaka	Nukleotidno zaporedje (5′→3′)
T7oligolong	GATCCGAATTCGGGCGGCGGCCTGGTGCCG-CGCGGCAGCGGCGGCGGCNNKNNKNNKNNKNNK-NNKTAAAAGCTTACTATCCAACTAATTCCGATT
T7oligoshort	AATCGGAATTAGTTGGATAGTAAG
T7SelectDOWN	AACCCCTCAAGACCCGTTTA
T7SelectUP	GGAGCTGTCGTATTCCAGTC

Proizvajalec T7oligolong in T7oligoshort je bil Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA. Liofilizirana začetna oligonukleotida smo raztopili v ddH_20 (končna koncentracija 10 μM). N predstavlja katerokoli bazo, K pa timin oz. gvanin. Proizvajalec T7SelectDOWN in T7SelectUP (oba 5 μM) je bil Novagen, Madison, ZDA.

1.7 Antibiotik, bakterijski sev in tarčni protein

Antibiotik (koncentracija založne raztopine)	**Proizvajalec**
karbenicilin (50 µg/ml)	Carbenicilin Direct, (www.carbenicilin.com)
Bakterijski sev	**Proizvajalec**
E. coli BLT5615	Novagen, Madison, ZDA
Tarčni protein	**Proizvajalec**
streptavidin	New England Biolabs, ZDA

1.8 Laboratorijska oprema

Oprema	**Proizvajalec**
analitska tehtnica AB 104	Mettler Toledo, Küsnacht, Švica
celica za vertikalno elektroforezo, Mini Protean 3 Cell	Bio-Rad, Richmond, CA, ZDA
centrifugi 5804 R in 5415 R	obe Eppendorf, Hamburg, Nemčija
centrifuga RC 5C Plus superspeed	Sorvall, New Castle, DE, ZDA
ciklični termostat	Applied Biosystems, Forster City, CA, ZDA
čitalnik mikrotitrskih plošč Safire^2	Tecan, Zürich, Švica
kadička za elektroforezo B1A Easy Cast Mini gel	Owl, Portsmouth, NH, ZDA
mikrotitrske ploščice NUN96fbt, MaxiSorp, Starwell	Nunclon-Nunc, Roskilde, Danska
mikrotiterske ploščice StreptaWell, 96fbt	Roche Applied Science, ZDA
magnetni mešali	
Rotamix 550 MMH in Rotamix 606 MM	obe Tehtnica, Železniki, Slovenija
pipete (0,5-10; 10-100; 100-1000, 1000-5000) µl	Eppendorf, Hamburg, Nemčija

pH meter 691	Metrohm, Herisan, Švica
precizna tehtnica Exacta 610 EB	Tehtnica, Železniki, Slovenija
spektrofotometer Lambda 20 UV-VIS	PerkinElmer, Wellesley, MA, ZDA
spektrofotometer Nanodrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Delaware, ZDA
stresalnika Vibromix 314 EVT in Vibromix 104 EV	oba Tehtnica, Železniki, Slovenija
vir napetosti za elektroforezne kadičke Power Ease 500	Novex, Frankfurt, Nemčija
zaščitena mikrobiološka komora LFVP 12	Iskra pio, Šentjernej, Slovenija
zamrzovalnik V.I.P. Series -86°C	Sanyo, Beusenville, IL, ZDA

1.9 Pufri in raztopine

PBS (fosfatni pufer s soljo), pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na_2HPO_4 2 mM KH_2PO_4

Natehtamo 3,2 g NaCl, 0,08 g KCl, 0,576 g Na_2HPO_4 in 0,096 g KH_2PO_4. Raztopimo v 400 ml ddH_2O, s HCl oz. NaOH uravnavamo pH ter avtoklaviramo 20 minut pri 121^0C in nadtlaku 1 bar.

karbonatni pufer pH 8,5	100 mM $NaHCO_3$

Natehtamo 0,336 g $NaHCO_3$ in raztopimo v 40 ml ddH_2O, s HCl oz. NaOH uravnavamo pH ter avtoklaviramo 20 minut pri 121^0C in nadtlaku 1 bar.

Blokirni pufer (1,5 % raztopina BSA v karbonatnemu pufru)	0,1875 g BSA 12,5 ml karbonatni pufer pH 8,5
raztopina za ponovno suspendiranje precipitata knjižničnih bakteriofagov (0,5 % raztopina želatine v PBS)	50 mg želatine 10 ml PBS

Raztopina krovnega substrata za hrenovo peroksidazo	2 tableti ABTS (aa 50 mg) 50 ml citratni pufer
12 ml raztopine ABTS tik pred uporabo dodamo 20,6 µl 30 % H_2O_2	
IPTG, 1M	2,383 g IPTG raztopimo v 10 ml ddH_2O in sterilno filtriramo.
citratni pufer, pH 4	50 mM monohidrat citronske kisline
Natehtamo 0,525 g monohidrata citronske kisline. Raztopimo v 50 ml ddH_2O, z NaOH uravnavamo pH ter sterilno filtriramo.	
raztopine za elucijo	1% SDS v PBS 0,03 NIH Ut/ml trombina v PBS 0,1 mM biotin v PBS
raztopina PEG 8000	10,67 g PEG 8000 40 ml ddH_2O
5× TBE pufer (na liter):	0,445 M Tris 0,445 M borove kisline 0,01 M EDTA
Natehtamo 54 g Tris ter dodamo 27,5 g borove kisline in 20 ml 0,5 M EDTA, dopolnimo z vodo do 1000 ml in uravnavamo pH na 8,3.	
TAE pufer	40 mM Tris-ocetna kislina 1 mM EDTA
Pripravimo 50× raztopino, ki jo nato redčimo. Natehtamo 242 g Tris ter dodamo 57,1 ml koncentrirane ocetne kisline in 100 ml 0,5 M EDTA, dopolnimo z vodo do 1000 ml in uravnavamo pH na 8.	
Tris-HCl, pH 8	10 mM Tris
Natehtamo 0,121 g Tris, raztopimo v 100 ml ddH_2O, s HCl uravnavamo pH in avtoklaviramo 20 minut pri 121 °C in nadtlaku 1 bar.	

1.10 Geli

1.10.1 Geli za agarozno elektroforezo

2 % agarozni gel	0,6 g agaroze
	30 ml TAE pufer
	1,5 µl EtBr (10 mg/ml)

Ustrezno količino agaroze s segrevanjem v mikrovalovni pečici raztopimo v pufru TAE, EtBr pa dodamo šele po ohladitvi na 60 °C.

1.10.2 Geli za poliakrilamidno elektroforezo

12 %-poliakrilamidni gel:	1,2 mL 40 % akrilamida
	0,8 mL 5x TBE pufra
	1,96 mL vode
	40 µL 10 % amonijevega persulfata*
	1,6 µL TEMED-a*

*dodano tik pred vlivanjem gela.

Gel smo naknadno barvali v kopeli z etidijevim bromidom (1 µg/ml) v TBE pufru.

1.11 Gojišča

LB	kvasni ekstrakt	2 g
	pepton	4 g
	NaCl	2 g
	agar	6 g
	dH_20	400 ml
20× M9	NH_4Cl	1,6 g
	KH_2PO_4	4,8 g
	$Na_2HPO_4 \times 7H_2O$	9,6 g
	dH_20	80 ml
Raztopina kalijevih fosfatov	KH_2PO_4	9,24 g
	K_2HPO_4	50,16 g
	ddH_20	400 ml

Top agaroza	pepton	0,4 g
	kvasni ekstrakt	0,2 g
	NaCl	0,2 g
	agaroza	0,24 g
	dH_20	40 ml

Sestavinam posameznega gojišča ali komponentam (20×M9, raztopina kalijevih fosfatov) dodamo vodo in dobro premešamo z magnetnim mešalom. Nato gojišča oz. komponente avtoklaviramo 20 minut pri 121 °C in nadtlaku 1 bar.

TB	pepton	4,8 g
	kvasni ekstrakt	9,6 g
	glicerol	1,6 ml
	dH_20	360 ml

Sestavinam gojišča TB dodamo vodo in dobro premešamo z magnetnim mešalom. Nato gojišče avtoklaviramo 20 minut pri 121 °C in nadtlaku 1 bar. Ko se ohladi, dodamo gojišču TB še 40 ml sterilne raztopine kalijevih fosfatov.

M9TB	20× M9 soli	4 ml
	20 % glukoza	1,6 ml
	1 M $MgSO_4$	0,08 ml
	TB	70 ml

Glukozo sterilno filtriramo, $MgSO_4$ predhodno avtoklaviramo 20 minut pri 121 °C in nadtlaku 1 bar ter nato sterilne komponente premešamo v aseptičnih pogojih.

1.12 Fagni vektor in protitelo

Označeno protitelo	**Proizvajalec**
T7•Tag®Antibody HRP Conjugate	Novagen, Madison, ZDA

Fagni vektor	**Proizvajalec**
T7Select10-3b™	Novagen, Madison, ZDA

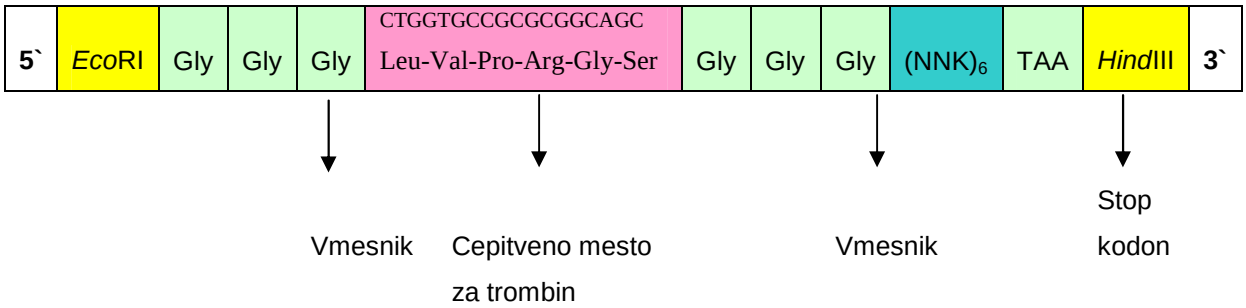
```
gen 10B®                    insert                  
left arm...GATCCG           AATTXXXX(N)XXXX      AGCTT...right arm
left arm...CTAGGCTTAA          XXXX(N)XXXXTCGA      A...right arm
        ...AspPro           AsnPhe...
                            AsnLeu...
                            AsnSer...
                            AsnTyr...
                            AsnCys...
                            AsnTrp...
```

Slika 6: Bralni okvir insertov, kloniranih v vektor T7Select10-3b® prek restrikcijskih mest *Eco*RI/*Hind*III (23).

2 METODE

2.1 Priprava knjižnice MT-hex T7Select

2.1.1 Priprava inserta



N = A, G, T, C

K = G, T

NNK = degenerirani trojčki nukleotidov

Slika 7: Shematski prikaz inserta. Cepitveno mesto za trombin smo dodali, ker nam omogoči sprositev virusa oz. elucijo po vezavi le-tega na tarčno molekulo s trombinom.

Pripravljen insert je vseboval cepitveno mesto za restriktazo *Eco*RI in *Hind*III, dva vmesnika (tri nukleotidna zaporedja za glicin), cepitveno mesto za trombin, šest degeneriranih trojčkov nukleotidov in stop kodon.

Izbrali smo trojčke nukleotidov NNK in ne NNN, saj smo na ta način dobili delno degeneriran kod, ki kodira vse aminokisline, izognemo pa se dvema od treh stop-kodonov in sicer TAA in TGA (na tretjem mestu imata A), ostane pa t.i. amber TAG.

2.1.1.1 Sinteza nekodirajoče verige inserta

V mikrocentrifugirkah smo pripravili reakcijsko mešanico s končnim volumnom 50,5 µl, ki je vsebovala naslednje komponente:

- 5 µl 10× pufer za Pfu-polimerazo
- 21 µl ddH_2O
- 10 µl T7 oligolong (100 pmol)
- 12 µl T7 oligoshort (120 pmol)
- 1,5 µl dNTP (0,2 mM)
- 1 µl Pfu-polimeraza (2,5 U)

Reakcijo smo izvajali v cikličnem termostatu po naslednjem postopku:

Čas	**Temperatura**	**Stopnja**
2 min	95 °C	denaturacija DNA
5 min	52 °C	prilepljanje začetnih oligonukleotidov
60 min	72 °C	podaljševanje DNA verige

Za analizo velikosti pripravljenega inserta smo uporabili metodo agarozne gelske elektroforeze. Le-ta se uporablja za ločevanje, določanje velikosti in izolacijo fragmentov DNA (31). Koncentracija agaroze je bila 2 % (w/v) gel. Ustrezno količino agaroze smo raztopili s segrevanjem v 30 ml pufra TAE (z EDTA) v mikrovalovni pečici, ohladili na 60 °C, dodali 1,5 µl EtBr (0.5 mg/ml) ter gel vlili v pripravljeno kadičko za elektroforezo. Etidijev bromid omogoča zaznavanje fragmentov, saj se vriva med bazne pare, pod UV svetlobo valovne dolžine 312 nm pa oddaja vidno svetlobo oranžne barve (32). Ko se je gel strdil, smo v ločena žepka nanesli vzorec inserta in označevalec velikosti DNA za agarozno elektroforezo. Elektroforeza je potekala v pufru TAE pri konstantni napetosti 120 V.

2.1.2 Izolacija DNA iz reakcijske mešanice z uporabo kompleta QIAEX II®

Ekstrakcija in čiščenje DNA s pomočjo kompleta QIAEX II temelji na selektivni, kvantitativni adsorpciji DNA na delce silikagela v prisotnosti soli. Visoka koncentracija soli v pufru QX1 cepi vodikove vezi med sladkorji v polimeru, kar omogoča odcepitev proteinov, vezanih na fragmente DNA. Adsorpcija na silikagel je med drugim odvisna od pH; če je nižji od 7,5, je učinkovitost adsorpcije navadno 95 %. Zato pufer QX1 vsebuje indikator pH. Molekule DNA se vežejo na delce silikagela QIAEX II, ostale nečistote (agaroza, proteini, EtBr in soli) pa ostanejo v raztopini. Dvojno spiranje s pufrom PE, ki vsebuje etanol, odstrani soli. Sušenje oborine na zraku je potrebno, da odstranimo vse sledi etanola, ki bi lahko vplival na kasnejše encimske reakcije. Elucija je prav tako odvisna od pH in koncentracije soli in najbolje poteka v bazičnem (pH 8,5) ter pri nizki koncentraciji soli. Običajno elucijo izvajamo s Tris-HCl pufrom. Po eluciji se delci QIAEX II pri centrifugiranju usedejo, DNA pa ostane v supernatantu (33).

Reakcijsko zmes (2.1.1.) smo prenesli v mikrocentrifugirko in dodali šestkratni volumen pufra QX 1 glede na volumen vzorca. Vzorec se je obarval rumeno, kar je pomenilo, da je pH primeren. Vzorcu smo dodali 10 µl dobro premešane suspenzije silikagela QIAEX II, premešali in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Tako pripravljen vzorec smo centrifugirali 30 sekund in odstranili supernatant. Silikagel smo dvakrat sprali s po 500 µl pufra PE, ter 15 minut sušili na zraku. Elucijo smo izvedli z dvakratnim dodatkom 20 µl 10 mM Tris-HCl pufra, pH 8,5, ponovno suspendirali silikagel in 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi. Centrifugirali smo 30 sekund pri maksimalni hitrosti in sobni temperaturi, ter supernatant, ki je vseboval očiščeno DNA, s pipeto pazljivo prenesli v sterilno mikrocentrifugirko.

Po izolaciji smo določili koncentracijo DNA v eluatih s pomočjo spektrofotometra Nanodrop ND-1000 in eluate shranili pri -20 °C.

2.1.3 Rezanje inserta z restriktazama *Eco*RI in *Hind*III

Restrikcijske nukleaze prepoznajo specifično nukleotidno zaporedje, ki ga cepijo na točno določenem mestu (34). Produkti reakcij z restrikcijskimi endonukleazami so zato vedno specifični in predvidljivi. Pri cepitvi se tvorijo lepljivi oziroma kohezivni (3` ali 5`) ali pa topi konci (35).

Ko se pri tehnikah rDNA odločamo, katero restrikcijsko nukleazo uporabiti, moramo poznati nukleotidno zaporedje, ki je skupno vektorju in DNA, katere fragment želimo

vstaviti. Molekule DNA, rezane z enakim encimom, imajo konce s komplementarnimi zaporedji, ki se lahko povežejo med seboj.

Reakcijsko zmes inkubiramo pri določeni temperaturi, da restrikcija poteče, potem pa encim lahko deaktiviramo (denaturiramo), največkrat s segrevanjem (24).

Insert smo razrezali z restriktazama *Eco*RI in *Hind*III. Uporabili smo Fermentasov pufer R, v katerem deluje optimalno *Hind*III, ne pa tudi *Eco*RI. Slednja restriktaza je sicer bolj robusten encim, a smo jo kljub temu dodali v prebitku.

Sestava reakcijske zmesi z končnim volumnom 25 µl:

- 2,5 µl 10× R-pufer
- 1,42 µl (14,2 U) *Hind*III
- 0,28 µl (5,68U) *Eco*RI
- 15 µl insert
- 5,8 µl ddH_2O

Pripravljeno zmes smo inkubirali 4,5 ure pri 37 °C, nato pa smo jo shranili pri temperaturi -20 °C.

2.1.4 Ločevanje restrikcijske mešanice s PAGE

Poliakrilamidno gelsko elektroforezo uporabljamo za ločevanje manjših fragmentov DNA (velikosti od 1 do 500 bp). Osnovni gradnik poliakrilamidnih gelov je akrilamid. Polimerizacija akrilamida steče v prisotnosti prostih radikalov. Vir prostih radikalov je običajno amonijev persulfat, stabilizira pa jih TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin). Prosti radikali sprožijo verižno reakcijo, ki vodi v nastanek linearnih verig. Če v polimerizacijsko reakcijo vključimo bifunkcionalni reagent N,N'-metilenbisakrilamid, se verige prečno povežejo in tvorijo gel. Poroznost gela je odvisna od dolžine verig in deleža prečnih povezav. Običajno pripravljamo 3,5 do 20 % gele, ki vsebujejo eno molekulo bisakrilamida na 29 molekul akrilamida. Vlivanje poliakrilamidnih gelov je precej zahtevnejše od vlivanja agaroznih gelov. Zato ga uporabljamo, kadar želimo doseči veliko ločljivost fragmentov, kadar želimo nanesti večje količine DNA v en žepek in kadar potrebujemo eluirano DNA za zelo občutljive metode (36).

Uporabili smo 12 % kontinuirani gel velikosti 43x50x0.4 mm. Zmešali smo 25 µl restrikcijske mešanice (2.1.3) in 6 µl 5× zelenega GoTag pufra. V vdolbinici gela smo nanesli po 15 µl tako pripravljene zmesi in v sosednji žepek še 2 µl označevalca velikosti

DNA, ki smo mu predhodno dodali 8 µl ddH_20 in 2,5 µl 5× zelenega GoTag pufra. Ločevanje je potekalo v 1× TBE pri napetosti 100 V približno 80 minut. Gel smo barvali z EtBr (1 µg/ml), 30 minut v kadički med stresanjem (250 obr./min).

2.1.5 Izolacija rezanega inserta iz poliakrilamidnega gela z uporabo kompleta QIAEX II®

Insert smo izrezali iz gela, ga prenesli v mikrocentrifugirko, stehtali in dodali *50* µl 0,5 M $(NH_4)AcO$, 10 mM $Mg(AcO)_2$ in 1 mM EDTA (pH=8). S konico nastavka mikropipete smo zmečkali gel in ga inkubirali 4 ure pri 37 °C med stresanjem s 700 obr./min. Po inkubaciji smo vsebino mikrocentrifugirke centrifugirali pri maksimalni hitrosti (16000 x g) in sobni temperaturi 1 minuto in previdno zbrali supernatant ter ga nato filtrirali skozi 0,45 µm filter. Dodali smo šest volumnov pufra QX 1 (glede na maso gela). Vzorcu smo dodali 10 µl dobro premešane suspenzije silikagela QIAEX II, premešali in inkubirali pri sobni temperaturi. Tako pripravljen vzorec smo centrifugirali 30 sekund in odstranili supernatant. Dvakrat smo sprali s po 500 µl pufra PE, ter 15 minut sušili na zraku. Elucijo smo izvedli z dvakratnim dodatkom 10 µl 10 mM Tris-HCl pufra, pH 8,5, ponovno suspendirali in 5 minut inkubirali pri sobni temperaturi. Centrifugirali smo 30 sekund pri maksimalni hitrosti in sobni temperaturi, ter supernatant, ki je vseboval očiščeno DNA, s pipeto pazljivo prenesli v sterilno mikrocentrifugirko.

Po izolaciji smo določili koncentracijo DNA v eluatih s pomočjo spektrofotometra Nanodrop ND-1000 in eluata shranili pri -20 °C. Preverili smo čistost in koncentracijo izoliranega inserta po postopku, opisanem v podpoglavju 2.1.4.

2.1.6 Ligacija inserta v fagni vektor

Ligacija poteka v prisotnosti encima DNA ligaza, ki je od ATP odvisen encim in se vključuje v procese podvojevanja (združevanje verige, ki nastaja z Okazakijevimi fragmenti), popravljanja in rekombinacije DNA (24). DNA ligaza katalizira tvorbo fosfodiesterske vezi med 5′-fosfatom enega nukleotida in 3′-hidroksilno skupino drugega. Za razliko od restrikcije, ki poteče že v eni uri pri sobni temperaturi, pri ligaciji uporabljamo nižje temperature (4 ali 16 °C), poteka pa dalj časa. Z nižjo temperaturo se zmanjša kinetika molekul v ligacijski zmesi, kar zmanjša verjetnost, da bi se vektor zaprl sam vase (34). Encim, uporabljen pri ligaciji fragmentov DNA, je T4 DNA ligaza, ki izvira iz bakteriofaga T4 (37).

Ligacijska zmes je vsebovala:

- 0,5 µl 10× ligacijski pufer
- 2 µl ddH_2O
- 2 µl vektor T7Select 10-3b® (0,02 pM)
- 0,277 µl izolirani insert (1.eluat 0,06 pM)
- 0,25 µl T4 DNA ligaza (400.000 U/ml)

Končni volumen ligacijske zmesi je bil 5,027 µl. Ligacija je potekala 13 h v cikličnem termostatu pri 16 °C.

2.1.7 PCR test ligacije

V mikrocentrifugirkah smo pripravili reakcijsko mešanico s končnim volumnom 20 µl, ki je vsebovala naslednje komponente:

- 10 µl 2× PCR – Master Mix (Promega)
- 9,2 µl ddH_2O
- 0,4 µl začetni oligonukleotid T7Select UP (5 µM)
- 0,4 µl začetni oligonukleotid T7Select DOWN (5 µM)

Reakcijo smo izvajali v cikličnem termostatu po naslednjem postopku:

Čas	**Temperatura**	**Stopnja**	
2 min	94°C	začetna denaturacija DNA	
50 s	94°C	30 ciklov	denaturacija
1min	50°C		prileganje
1min	72°C		podaljševanje
6 min	72°C	zaključno podaljševanje DNA	

Produkte reakcije smo ločevali na 2 % agaroznem gelu pri 150 V 90 minut. Opazna je bila lisa pri ~150 bp.

2.1.8 Pakiranje in pomnoževanje knjižnice

2.1.8.1 Pakiranje

Alikvot celičnega ekstrakta kapsidnih proteinov (T7 Packaging Extract) – 25 µl – smo odtalili na ledu in dodali 5 µl ligacijske zmesi (točka 2.1.6.). Zmes smo inkubirali 2 uri pri sobni temperaturi. Reakcijo pakiranja smo ustavili z dodatkom 270 µl M9TB.

Preverili smo tudi učinkovitost pakiranja in ligacije. Testno ligacijo smo izvedli z uporabo 1 µl ligacijske zmesi v katero smo vključili kontrolni insert (priložen kompletu T7Select® Cloning Kit). Testno pakiranje smo izvedli z uporabo 1 µl (0,02 pM) intaktnega vektorja T7Select 10-3b®. Obema smo dodali 5 µl ekstrakta za pakiranje ter inkubirali pri sobni temperaturi 2 uri. Po končanem pakiranju smo določili še titer (2.2.5) sestavljenih bakteriofagnih delcev za oceno raznolikosti knjižnice in učinkovitosti pakiranja/ligacije.

2.1.8.2 Pomnoževanje primarne knjižnice

Od končnega volumna 300 µl smo vzeli 290 µl in jih dodali v 400 ml bakterijske kulture BLT5615, ki smo jo pol ure pred dosegom $OD_{600} \cong 1$ inducirali z 1 mM IPTG. IPTG inducira nastajanje nativnega kapsidnega proteina 10A, kodiranega z genom v plazmidu gostiteljske celice, pred okužbo z fagi. Tako po okužbi bakterije z rekombinantnim fagom nastajajo fagni delci, katerih kapsido gradita nativni protein 10A in fuzijski protein. Pomnoževanje je potekalo približno 2,5 ure pri 37 °C ob stresanju do lize bakterij. Lizat smo razdelili v dve centrifugirki, dodali NaCl do končne koncentracije 0,5 M in nato dvakrat centrifugirali 15 minut z 10000 x g in pri 4 °C.

Po končanem centrifugiranju smo supernatantu dodali glicerol do 10 %, knjižnico alikvotirali po 25 ml in jo shranili pri temperaturi -80 °C.

2.2 Selekcija peptidov z bakteriofagno predstavitveno knjižnico

2.2.1 Priprava bakteriofagne knjižnice za afinitetno selekcijo

Bakteriofage v 25 ml-alikvotu pomnožene knjižnice smo precipitirali z dodatkom 15 ml PEG-8000 (končna koncentracija 100 g/l) in 30-minutno inkubacijo na ledu. Alikvot smo centrifugirali 10 minut s 12000 x g pri 4 °C. Odlili smo supernatant in oborino ponovno suspendirali v 1350 µl TB gojišča in 150 µl glicerola. Za selekcijo smo nato redčili raztopino 75 µl koncentrirane knjižnice v 225 µl pufra PBS.

2.2.2 Priprava bakterijske kulture za pomnožitev eluata in določitev bakteriofagnih titrov

2.2.2.1 Priprava prekonočne bakterijske kulture

Uporabili smo:

gojišče LB

karbenicilin (50 mg/ml)

1 M IPTG

trajna kultura *E.coli*, sev BLT5615

Postopek:

Trajno bakterijsko kulturo *E. coli* BLT5651 smo precepili v erlenmajerico s 15 ml gojišča LB in 15 µl karbenicilina ter stresali pri 37 °C preko noči.

2.2.2.2 Priprava bakterijske kulture za pomnožitev eluata

Uporabili smo:

gojišče LB

karbenicilin (50 mg/ml)

1 M IPTG

Postopek:

Po 400 µl prekonočne kulture (2.2.2.1) smo precepili v 3 erlenmajerice s 40 ml gojišča LB in 40 µl karbenicilina. Inkubacija je potekala do ustrezne optične gostote ($OD_{600\ nm}$ ~ 0.5 – 0.6), pol ure pred zahtevano optično gostoto pa smo dodali v vsako erlenmajerico še po 40 µl raztopine IPTG (končna koncentracija IPTG je bila 1 mM).

2.2.2.3 Priprava bakterijske kulture za določitev bakteriofagnega titra

Uporabili smo:

gojišče M9TB

karbenicilin (50 mg/ml)

1 M IPTG

Postopek:

V 15 ml gojišča M9TB smo precepili 150 µl prekonočne bakterijske kulture (2.2.2.1) in 15 µl karbenicilina ter inkubirali s stresanjem pri 37 ºC do dosega vrednosti optične gostote $OD_{600\ nm}$ ~ 1.

2.2.3 Afinitetna selekcija bakteriofagov iz predstavitvene knjižnice

Izvedba prve selekcijske stopnje:

1. *Priprava bakterijske kulture za pomnožitev eluata in določitev fagnih titrov*

   Postopek je opisan v podpoglavju 2.2.2.

2. *Vezava knjižničnih bakteriofagov na streptavidin*

   Uporabili smo v naprej pripravljene mikrotitrske ploščice (MTP) StreptaWell na katerih je bil vezan streptavidin. V tri vdolbinice MTP smo odpipetirali po 100 µl raztopine pomnožene knjižnice pripravljene po postopku opisanem v podpoglavju 2.2.1. Inkubacija je potekala 1 uro pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju (50 obr./min).

3. *Spiranje nevezanih bakteriofagov*

   Nevezane knjižnične bakteriofage smo odlili in rezidualno tekočino odstranili s trkanjem od papirnato brisačo. Nato smo v vsako vdolbinico odpipetirali po 250 µl 0,1 % PBST in ob rahlem stresanju (50 obr./min) pustili 5 minut pri sobni temperaturi. Nato smo raztopino odlili in rezidualno tekočino odstranili s trkanjem ob papirnato brisačo. Ta postopek smo ponovili desetkrat.

4. *Elucija*

   Vezane bakteriofage smo eluirali na tri načine: s 100 µl 1 mM biotina, s 100 µl 0,3 NIH U/ml trombina ali s 100 µl 1 % SDS. Vse eluente smo redčili v PBS. Biotinska in trombinska elucija sta potekali 30 minut, elucija s 1 % SDS pa 10 minut (ob rahlem stresanju (50 obr./min) pri sobni temperaturi). Po končani eluciji smo iz vsake vdolbinice prenesli 100 µl eluata v posamezno mikrocentrifugirko. 97 µl eluata smo porabili za pomnoževanje in 3 µl za določitev bakteriofagnega titra.

Izvedba druge in tretje selekcijske stopnje:

Druga in tretja selekcijska stopnja sta potekali po enakem postopku, le da smo za spiranje nevezanih bakteriofagov uporabili 0,2 % PBST v drugi in 0,5 % PBST v tretji stopnji.

2.2.4 Pomnoževanje eluata

Posamezne eluate smo pomnoževali z okužbo gostiteljske bakterijske kulture (2.2.2.2). Po vsaki selekcijski stopnji smo od posameznega eluata odpipetirali 97 µl in jih dodali že pripravljeni bakterijski kulturi. Stresali smo približno 1,5 ure pri 37 ºC, dokler ni prišlo do lize bakterij. Nato smo vsebino vsake erlenmajerice prenesli v 50 ml-centrifugirko in centrifugirali 15 minut pri 4 ºC z 12000 x g. Posamezen supernatant smo nato pretočili v novo centrifugirko, ustrezno označili in shranili v hladilniku pri 4 ºC.

2.2.5 Določitev bakteriofagnih titrov v nepomnoženih in pomnoženih eluatih

Med samim postopkom selekcije smo ocenili število bakteriofagov v eluatih s pomočjo klasične mikrobiološke titracije. Kulturo gostiteljskega bakterijskega seva smo okužili z bakteriofagi in namnožili na agarnem gojišču. Čez približno 2 uri smo nato prešteli prozorne plake, ki so nastali na konfluentno preraslem gojišču.

Postopek:

1. Z gojiščem LB smo pripravili ustrezne redčitve eluatov (desetkratne; za nepomožene od 10^1 do 10^3, za pomožene pa od 10^7 do 10^9).
2. V mikrovalovni pečici smo raztalili top agarozo. Za vsako redčitev smo nalili približno 3 ml agaroznega gojišča v sterilne 10 ml-centrifugirke. V vsako centrifugirko smo dodali še 3 µl IPTG in 3 µl karbenicilina ter jih do uporabe inkubirali pri 52 ºC.
3. Za vsako redčitev smo pripravili po eno petrijevko z agaroznim gojiščem LB, predhodno ogretim na 37 ºC.
4. Za vsako redčitev smo odpipetirali po 250 µl bakterijske kulture (2.2.2.3) v posamezno mikrocentrifugirko. Dodali smo 10 µl ustrezno redčenih virusov iz nepomnoženih eluatov ali 100 µl ustrezno redčenih virusov iz vsake redčitve pomnoženih eluatov ter premešali z vrtinčenjem.
5. Vsako tako pripravljeno okuženo bakterijsko kulturo smo posamično prenašali v prej pripravljeno raztaljeno agarozno gojišče, hitro premešali z vrtinčenjem in takoj

prelili na petrijevko z agarnim gojiščem LB. Ohlajena gojišča smo inkubirali 2-3 ure pri 37 ºC.

6. Po inkubaciji smo prešteli prozorne plake, njihovo število pomnožili s faktorjem redčitve in na osnovi dobljene vrednosti sklepali na število fagov v eluatu.

2.2.6 Pomnoževanje in izolacija posameznih bakteriofagnih klonov

1. Pripravili smo bakterijsko kulturo za pomnoževanje iz 60 ml tekočega gojišča LB, 60 µl karbenicilina in 600 µl bakterijske prekonočne kulture (2.2.2.2). Pol ure pred dosegom OD ~0,5 smo dodali še 60 µl 1 M IPTG. Kulturo smo razdelili v 24 sterilnih epruvet po 2,2 ml.
2. V vsako epruveto smo z agarnih LB gojišč, ki smo jih uporabili pri določitvi titrov zadnjega (tretjega) nepomnoženega eluata, prenesli po en plak. Za pomnožitev posameznih fagnih klonov smo izbrali le tiste petrijevke, ki niso vsebovale več kot 100 plakov. Tako smo zagotovili, da je posamezni plak vseboval samo en klon.
3. Posamezne klone smo pomnoževali približno 90 minut pri 37 ºC in močnem stresanju (225 obr./min), dokler ni prišlo do lize bakterij.
4. Po lizi smo prenesli 2 ml lizata iz vsake epruvete v novo mikrocentrifugirko in centrifugirali 10 minut pri 4 ºC in 9300 x g.
5. 1 ml supernatanta smo prenesli v 2 ml mikrocentrifugirko in dodali 667 µl PEG-8000 in 111 µl raztopine NaCl ter inkubirali prek noči pri 4 ºC, da so se bakteriofagi oborili.
6. Naslednji dan smo oborino, zbrano s centrifugiranjem 10 minut pri 4 ºC in 9300 x g, ponovno suspendirali v 100 µl gojišča LB in shranili pri 4 ºC.

2.2.7 Ocena afinitete selekcioniranih bakteriofagov do streptavidina s testom ELISA

S testom ELISA smo kvalitativno ocenili afiniteto vezave selekcioniranih bakteriofagnih klonov na streptavidin. Intenziteta obarvanja je odvisna od intrinzične afinitete in števila kopij izraženih peptidov na površini bakteriofaga ter od bakteriofagnega titra. Kot pozitivno smo interakcijo obravnavali, če je vrednost absorbance $A_{600\ nm}$ dosegla vsaj 0,2, in je bila vsaj dvakrat višja kot pri negativni kontroli.

Postopek:

1. V polovico vdolbinic MTP MaxiSorp smo odpipetirali po 100 µl pripravljene raztopine streptavidina v 0,1 M karbonatnem pufru, pH = 8,5. Koncentracija streptavidina je bila 20 µg/ml. MTP smo inkubirali preko noči pri 4 ºC.
2. Naslednji dan smo odlili raztopino streptavidina in rezidualno tekočino odstranili s trkanjem ob papirnato brisačo. V vse vdolbinice smo odpipetirali po 200 µl blokirnega pufra (1 % BSA v PBS) in inkubirali eno uro pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju (50 obr./min).
3. Med tem smo pripravili redčene bakteriofage v blokirnem pufru. Najprej smo centrifugirali posamezne oborjene bakteriofage kakor je opisano v točki 2.2.6.(5). Odpipetirali smo 80 µl ponovno suspendiranega precipitata in dodali 330 µl blokirnega pufra. Dobro smo premešali in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju (50 obr./min).
4. Iz vdolbinic MTP smo odlili blokirni pufer in rezidualno tekočino odstranili s trkanjem ob papirnato brisačo. Nato smo odpipetirali po 200 µl pripravljene bakteriofagne suspenzije v streptavidinske in slepe vdolbinice in inkubirali pri sobni temperaturi 1,5 ure ob rahlem stresanju (50 obr./min).
5. Po inkubiranju smo suspenzijo bakteriofagov odlili in rezidualno tekočino odstranili s trkanjem ob papirnato brisačo. Vdolbinice smo trikrat sprali s po 200 µl 0,075 % PBST med triminutnim stresanjem s 100 obr./min. Raztopino smo vsakič odlili in rezidualno tekočino odstranili s trkanjem ob papirnato brisačo.
6. Konjugat monoklonskih protiteles (proti-T7•Tag®Antibody HRP Conjugate in hrenove peroksidaze) smo redčili z blokirnim pufrom v razmerju 1:5000, odpipetirali po 200 µl v vsako vdolbinico in inkubirali eno uro pri sobni temperaturi ob rahlem stresanju (50 obr./min).
7. Raztopino smo odlili in rezidualno tekočino odstranili s trkanjem ob papirnato brisačo. Nato smo vdolbinice trikrat sprali s po 200 µl 0,075 % PBST med triminutnim stresanjem s 100 obr./min. S tem smo odstranili nevezana protitelesa Raztopino smo vsakič odlili in rezidualno tekočino odstranili s trkanjem ob papirnato brisačo.
8. Pripravili smo raztopino substrata ABTS in po 200 µl odpipetirali v vdolbinice. Inkubirali smo 30 minut zaščiteno pred svetlobo pri 37 ºC. Po razvitju zelenega obarvanja, smo izmerili absorbanco pri 405 nm.

2.2.8 Pomnoževanje inserta bakteriofagnih klonov z verižno reakcijo s polimerazo (PCR)

PCR je hitra metoda *in vitro* pomnoževanja matrične DNA. Reakcija vključuje matrično DNA, termostabilno DNA polimerazo (najpogosteje se uporablja *Taq polimeraza*, izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus*), par začetnih oligonukleotidov (ki sta komplementarna zaporedjem na nasprotnih verigah matrične DNA in se prekrivata z odsekom, ki ga želimo pomnožiti), deoksinukleotid trifosfate (dNTP-je), reakcijski pufer in magnezijeve ione (38). Tako pripravljeno zmes nato izpostavimo temperaturnemu programu.

V mikrocentrifugirkah smo pripravili reakcijsko mešanico s končnim volumnom 20 µl, ki je vsebovala naslednje komponente:

- 12,5 µl PCR – Master Mix (Promega)
- 10 µl ddH_2O
- 1 µl T7Select UP začetni oligonukleotid (5 µM)
- 1 µl T7Select DOWN začetni oligonukleotid (5 µM)
- 0,5 µl fagnega klona v LB

Reakcijo smo izvajali v cikličnem termostatu po naslednjem postopku:

Čas trajanja	**Temperatura**	**Stopnja**	
2 min	94 ºC	začetna denaturacija DNA	
50 s	94 ºC	35 ciklov	denaturacija
1min	50 ºC		prileganje
1min	72 ºC		podaljševanje
6 min	72 ºC	zaključno podaljševanje DNA	

2.2.9 Izolacija in čiščenje bakteriofagne DNA

Za izolacijo v verižni reakciji s polimerazo (PCR) pomnoženega inserta, ki kodira površinsko predstavljen peptid, smo uporabili Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Le-ta se uporablja za izolacijo in čiščenje fragmentov DNA velikosti od 100 bp do 10 kb iz agaroznih gelov ali za direktno čiščenje produktov PCR. Izoliramo lahko do 95 % DNA, odvisno od velikosti fragmenta. Produkte PCR navadno čistimo z namenom odstranitve presežnih nukleotidov in začetnih oligonukleotidov. Ta sistem je osnovan na membrani, ki lahko veže do 40 µg DNA in omogoča izplen izoliranih fragmentov DNA in

produktov PCR že v 15 minutah, odvisno od števila vzorcev. Očiščena DNA se tako lahko uporablja za določitev nukleotidnega zaporedja, kloniranje, *in vitro* transkripcijo/translacijo, itd. (39).

Postopek:

1. Pomnožili smo izbrano tarčo s standardnimi pogoji amplifikacije (2.2.8).
2. Reakcijski zmesi po opravljeni PCR smo dodali enak volumen (25 µl) raztopine za vezavo na membrano (Membrane Binding Solution).
3. Nato smo očistili DNA s centrifugiranjem:

a) Pripravili smo po eno minikolono z membrano v zbirni mikrocentrifugirki za vsako reakcijo PCR.
b) Zmes smo prenesli v minikolono in inkubirali pri sobni temperaturi eno minuto.
c) Vsebino minikolone smo eno minuto centrifugirali pri 16000 x g. Po končanem centrifugiranju smo odstranili minikolono in zavrgli tekočino iz zbirne mikrocentrifugirke ter vanjo ponovno namestili minikolono.
d) Kolono smo sprali z dodatkom 700 µl raztopine za spiranje (Membrane Wash Solution). Ponovno smo vsebino minikolone centrifugirali eno minuto pri 14000 obr./min, in izpraznili zbirno mikrocentrifugirko (na enak način kot pod točko c). Kolono smo sprali še s 500 µl raztopine za spiranje.
e) Izpraznili smo zbirno centrifugirko in ponovno centrifugirali minikolono z odprtim pokrovom eno minuto ter pustili, da etanol odpari.
f) Pazljivo smo prenesli minikolono v čisto 1,5 ml-mikrocentrifugirko in previdno dodali 50 µl vode brez nukleaz v sredino kolone. Inkubirali smo eno minuto pri sobni temperaturi. Nato smo centrifugirali eno minuto pri 16000 x g.
g) Zavrgli smo minikolono in shranili mikrocentrifugirko, ki je vsebovala eluirano DNA, pri -20 ºC.

2.2.10 Določitev nukleotidnega zaporedja

Določevanje zaporedja nukleotidov je proces, s katerim določimo natančno zaporedje nukleotidov v danem fragmentu DNA. Danes največkrat uporabljana metoda določevanja zaporedja DNA je dideoksi metoda, ki jo je razvil Frederik Sanger, v bistvu pa gre za posebno obliko verižne reakcije s polimerazo. Dideoksi metoda je dobila ime po vlogi sinteznih nukleotidov (ddNTP), ki imajo na mestu 3' na ogljik pripet le vodikov atom (in ne OH skupine) (40).

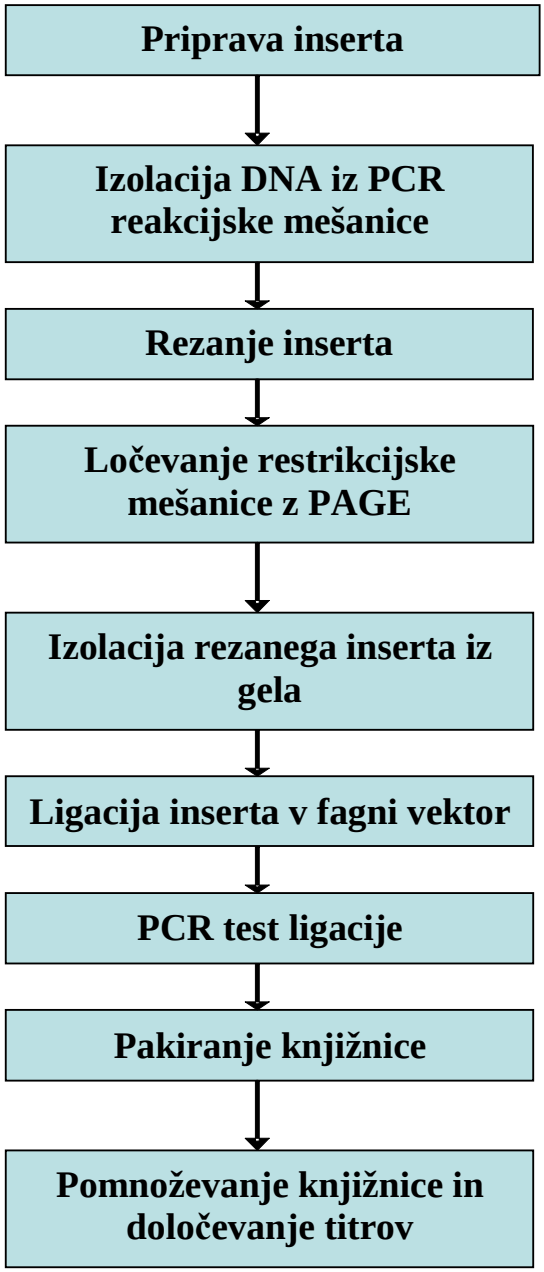
DNA, ki ji želimo določiti nukleotidno zaporedje, lahko pripravimo v enoverižni obliki – matrična DNA. Dodamo zmes štirih deoksinukleotidov v zadostni količini (dATP, dGTP, dCTP in dTTP) in zmes štirih z različnimi fluorescentnimi barvili označenih dideoksinukleotidov (ddATP, ddGTP, ddCTP in ddTTP) v omejenih količinah. Dokler DNA polimeraza ne vgradi dideoksinukleotida, elongacija normalno poteka (40).

Produkte PCR z gelsko kapilarno elektroforezo razporedimo glede na dolžino. Če jih osvetlimo z laserskim žarkom, vsak od štirih dideoksinukleotidov fluorescira drugačno barvo in tako razberemo zaporedje (18).

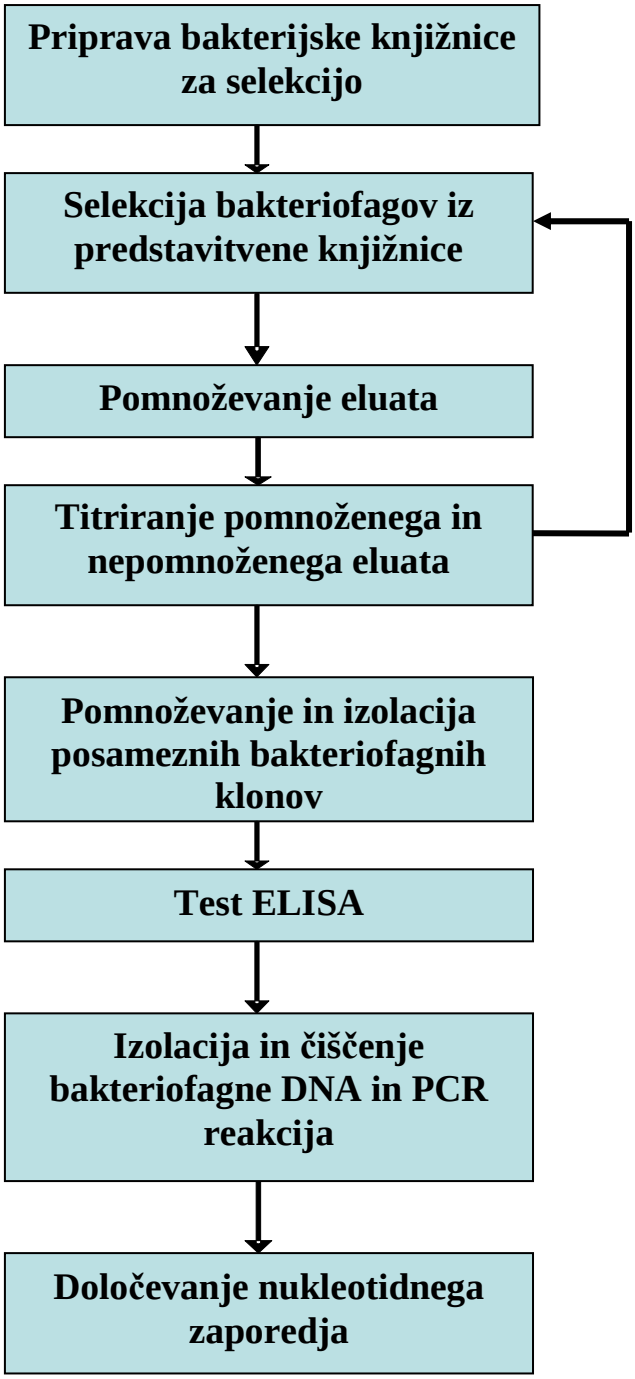
Vzorec smo na določitev nukleotidnega zaporedja pošiljali družbi MWG-BIOTECH AG (Ebersberg, Nemčija).

IV Eksperimentalno delo

1 Priprava bakteriofagne knjižnice



2 Selekcija peptidov z bakteriofagno predstavitveno knjižnico



V REZULTATI in RAZPRAVA

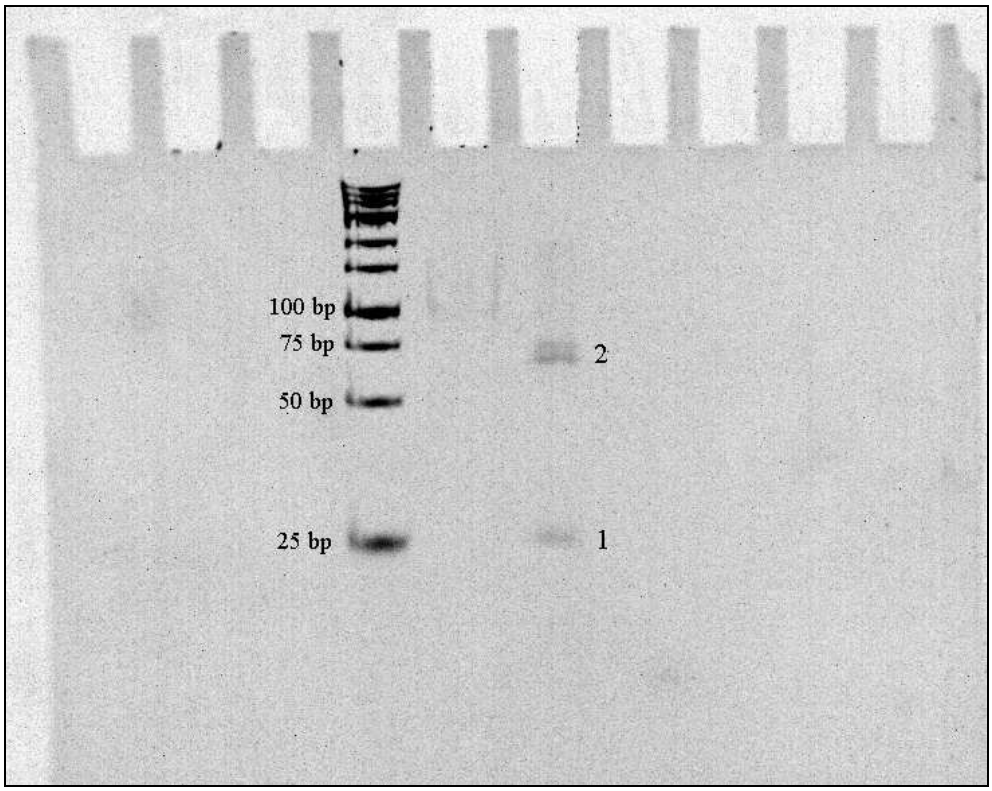
1 Priprava bakteriofagne knjižnice

1.1 Preverjanje velikosti pripravljenega inserta

Pri pripravi bakteriofagne knjižnice bi lahko po pripravi celotnega inserta njegovo velikost preverili s pomočjo označevalca velikost GeneRulerTM 50bp DNA Ladder na 2 % agaroznem gelu. V primeru ustrezne priprave inserta bi dobili liso pri približno 100 bp.

1.2 Ločevanje restrikcijske mešanice s PAGE

S pomočjo gelske elektroforeze (PAGE) smo ločili tudi restrikcijsko mešanico inserta. Uporabili smo označevalec velikosti GeneRuler^{TM} 50bp DNA Ladder.

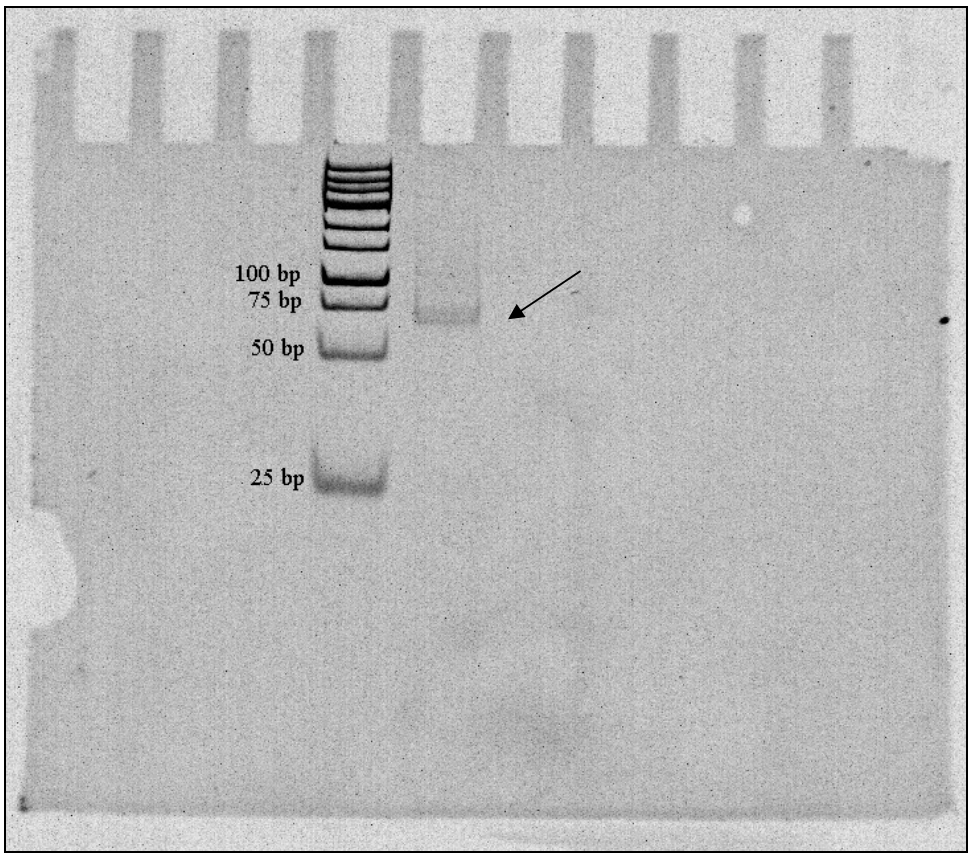


Slika 8: Poliakrilamidni gel (12%) z vzorcem po restrikciji z *Eco*RI in *Hind*III. Fragment produkta po PCR in fragment produkta po rezanju z restriktazama sta označena s številko 1 in 2. Lisa označena s številko 1 predstavlja del dvoverižnega T7oligolong začetnega oligonukleotida (AAGCTTACTATCCAACTAATTCCGATT), odrezanega s *Hind*III s 3´

konca. Fragment vsebuje zapis za šest aminokislin in ustreza velikosti približno 24 bp. Pripravljen insert okvirne velikosti 70 bp, z lepljivima koncema 3´ in 5´, pa vidimo na lisi označeni s številko 2. Na skrajni levi strani gela je vidna lestvica označevalca velikosti (avtor: Miha Kosmač).

1.3 Preverjanje čistosti pripravljenega inserta po restrikciji

S pomočjo gelske elektroforeze (PAGE) smo ločili tudi restrikcijsko mešanico inserta. Uporabili smo označevalec velikosti GeneRuler™ 50bp DNA Ladder.

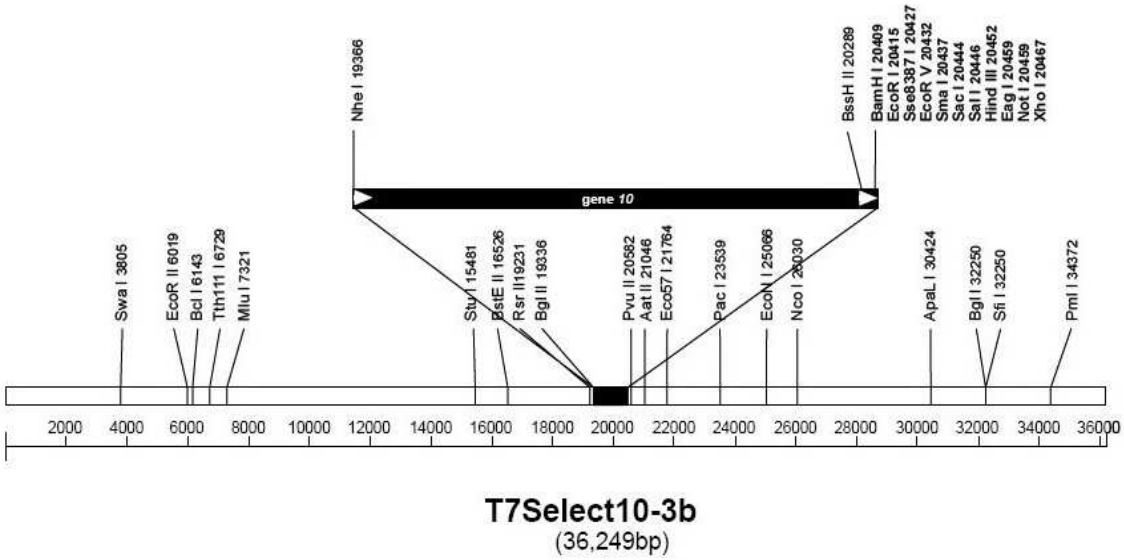


Slika 9: Poliakrilamidni gel po elektroforezi izoliranega inserta po restrikciji (~70 bp). (avtor: Miha Kosmač).

Na sliki je na levi strani lestvica označevalca velikosti, na desni strani pa je viden fragment očiščenega produkta restrikcije. Le-ta je okvirne velikosti 70 bp.

1.4 Ligacija inserta v fagni vektor

V fagni vektor T7Select10-3b® smo preko specifičnih lepljivih koncev vnesli pripravljen insert.



Slika 10: Vektorska mapa T7Select10-3b® (23).

T7Select10-3b® ima linearen genom velikosti 36249 bp. T7Select10-3b® vektor lahko izrazi od 5-15 kopij peptida in proteine do velikosti 1200 aminokislin na površini kapside faga T7. Proizvajalec (Novagen) ponuja vektor, ki je predhodno razrezan z restriktazama *Eco*RI in *Hind*III.

Inserti, ki jih vnašamo v vektor T7Select10-3b®, morajo imeti pravilno oblikovane konce. Morajo imeti 5′-AATT lepljiv konec na kodirajoči verigi in 5′-AGCT lepljiv konec na nekodirajoči verigi. Bralni okvir mora imeti začetni kodon AAT , temu pa sledi kodon TNN (23). To smo dosegli s pomočjo restriktaz *Eco*RI in *Hind*III.

1.5 Preverjanje uspešnosti ligacije in pakiranja knjižnice

Naredili smo tudi kontrolo ligacije inserta v fagni vektor in kontrolo pakiranja knjižnice. Testno ligacijo smo izvedli s pomočjo kontrolnega inserta (T7Select Control Insert) iz kompleta T7Select 10-3b Cloning kit, ta je služil kot pozitivna kontrola ligacije. Nato smo določili bakteriofagne titre pozitivne kontrole in našega inserta ter na podlagi izračunov

ocenili odstotek ligacije. Oceni učinkovitosti ligacije v odstotkih pri našem in kontrolnem insertu (predpostavili smo enako učinkovitost pakiranja) sta bili v istem velikostnem razredu, kar pomeni, da je bil insert ustrezno pripravljen.

Ocena učinkovitosti ligacije inserta = 8,4 %
Ocena učinkovitosti ligacije kontrolnega inserta = 7,4 %

Naredili smo tudi PCR test ligacije in po njem smo produkte reakcije ločevali na 2 % agaroznem gelu. Opazen je bil produkt dolžine 150 bp, kar potrjuje uspešen potek ligacije našega inserta v vektor.
Kontrolo pakiranja knjižnice smo izvedli z intaktnim vektorjem T7Select 10-3b® (T7Select Packaging Control DNA). Po končanem pakiranju smo določili titer in na podlagi le-tega izračunali oceno pakiranja.

Ocena učinkovitosti pakiranja = 0,8 %

Izračunana ocena učinkovitosti pakiranja je bila za pet do desetkrat nižja od tiste, ki jo zagotavlja proizvajalec. Razlogov za to znižano učinkovitost ekstraktov za pakiranje je lahko več. Lahko je prišlo do neustrezne izdelave že pri proizvajalcu, lahko pa je slabi kvaliteti botrovalo napačno skladiščenje ali neprimerno rokovanje med transportom pošiljke.

1.6 Določitev bakteriofagnih titrov pomnožene in nepomnožene knjižnice

Okužba bakterij *E.coli* BLT5615 s fagi T7 povzroči lizo celice, zato so se na površini agarnega gojišča v petrijevki, na katerega smo zlili agarozno gojišče z bakterijami in fagi, pojavili prozorni plaki. Plaki se pojavijo na mestih kjer pride do lize bakterij. Število plakov je enako številu dodanih bakteriofagov le v primeru, ko je razmerje med dodanimi bakteriofagi in inficiranimi bakterijskimi celicami manjše od 1, zato smo lizate pred inficiranjem bakterij ustrezno redčili. Plake smo prešteli ter določili povprečje glede na redčenje, delili s 100 µl, kolikor je znašal alikvot dodanih fagov. Tako smo dobili uporabljeno količino fagov pri titru, izraženih kot pfu/µl.

Po končani pripravi bakteriofagne knjižnice smo določili fagne titre neposredno po pakiranju fagnega vektorja (primarna knjižnica) in v lizatu po pomnoževanju. Tako smo ugotovili teoretično diverziteto primarne (nepomnožene) knjižnice in s titrom pomnožene knjižnice določili kolikšen vnos fagov bomo imeli za selekcijo.

Preglednica 1: Vrednost bakteriofagnih titrov pomnožene in nepomnožene knjižnice

Nepomnožena (primarna) knjižnica	**Pomnožena knjižnica**
$6{,}56 \times 10^6$ pfu	$5{,}25 \times 10^{10}$ pfu/ml (~8000 kopij vsakega klona v 1 ml lizata)

Teoretična diverziteta primarne heksapeptidne knjižnice je bila $6{,}6 \times 10^6$ pfu (neodvisnih klonov), tako da je bila realna diverziteta naše knjižnice desetkrat manjša od teoretične maksimalne možne raznolikosti knjižnice naključnih heksapeptidov ($20^6 = 6{,}4 \times 10^7$). To lahko pripišemo tudi neustrezni učinkovitosti pakiranja fagne DNA v virusno ovojnico.

2 Selekcija bakteriofagne knjižnice na streptavidin

2.1 Določevanje bakteriofagnih titrov v pomnoženih in nepomnoženih eluatih

Po vsakem ciklu selekcije z bakteriofagno peptidno predstavitveno knjižnico smo določili titre pomnoženemu in nepomnoženemu virusnemu eluatu. Titer nepomnoženega eluata nam pove število eluiranih fagov po vsaki elucijski stopnji, titer pomnoženega eluata pa koncentracijo fagov v lizatu po pomnoževanju. Iz te sklepamo na število fagov, ki jih vnesemo v naslednjo selekcijsko stopnjo. V vsaki selekciji naj bi število fagnih klonov naraščalo za faktor sto ali celo tisoč, saj naj bi se obdržali le kloni z največjo afiniteto.
S titrom pomnoženega eluata lahko izračunamo odstotek elucije, ki nam daje pomembne informacije o poteku selekcije. Odstotek elucije je razmerje med številom eluiranih klonov in številom klonov, ki smo jih vnesli v selekcijski postopek. Če odstotek elucije od prve do zadnje selekcije narašča, lahko sklepamo, da selekcija klonov uspešno poteka.

% ELUCIJE = (titer nepomnoženega eluata / št. vnesenih fagov) × 100

V prvi cikel selekcije smo vnesli $4{,}6 \times 10^8$ fagov, kar pomeni približno 700 kopij vsakega peptida.

Preglednica 2: Vrednosti fagnih titrov nepomnoženih eluatov in odstotkov elucije (z biotinom, trombinom in 1 % SDS) za 1. selekcijsko stopnjo.

Eluat	**Fagni titer (pfu)**	**Odstotek elucije (%)**
Nepomnoženi eluat (biotin)	$8{,}6 \times 10^3$	$1{,}9 \times 10^{-5}$
Nepomnoženi eluat (trombin)	$1{,}2 \times 10^4$	$2{,}6 \times 10^{-5}$
Nepomnoženi eluat (1% SDS)	$5{,}3 \times 10^4$	$1{,}2 \times 10^{-4}$

Preglednica 3: Število vnesenih fagov v 2. selekcijsko stopnjo.

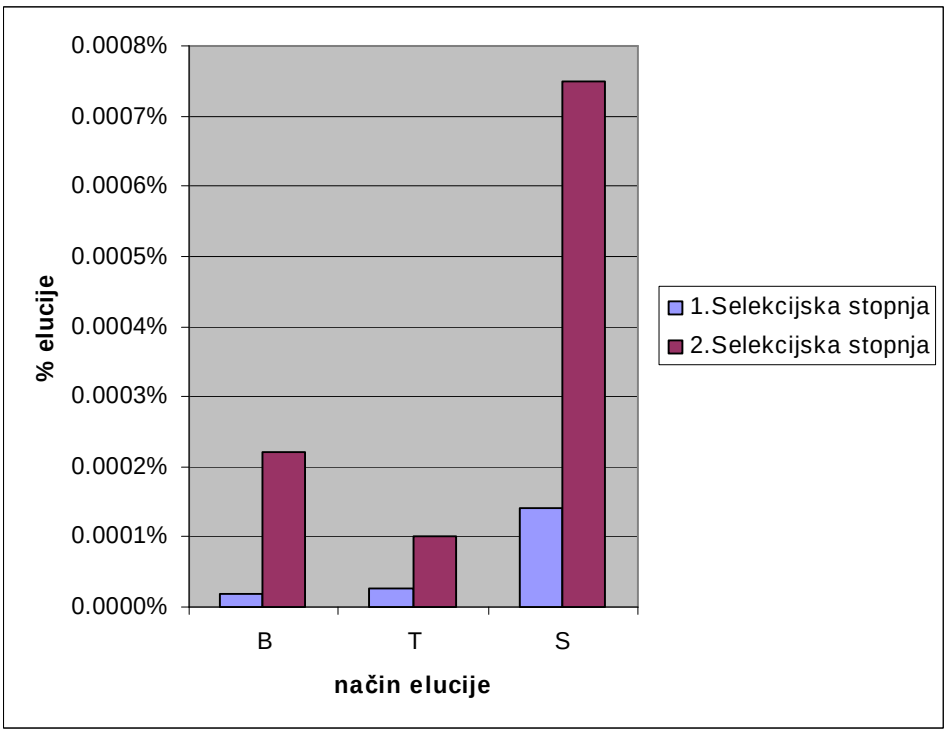
Eluat	**Število vnesenih fagov v 2. selekcijo**
Pomnoženi eluat (biotin)	$4{,}6 \times 10^8$ pfu
Pomnoženi eluat (trombin)	$1{,}5 \times 10^9$ pfu
Pomnoženi eluat (1% SDS)	$1{,}8 \times 10^9$ pfu

Preglednica 4: Vrednosti fagnih titrov nepomnoženih eluatov in odstotkov elucije (z biotinom, trombinom in 1% SDS) za 2. selekcijsko stopnjo.

Eluat	**Fagni titer (pfu)**	**Odstotek elucije (%)**
Nepomnoženi eluat (biotin)	$1{,}0 \times 10^3$	$2{,}2 \times 10^{-4}$
Nepomnoženi eluat (trombin)	$1{,}1 \times 10^4$	$1{,}0 \times 10^{-4}$
Nepomnoženi eluat (1% SDS)	$1{,}8 \times 10^3$	$7{,}5 \times 10^{-4}$

Preglednica 5: Število vnesenih fagov v 3. selekcijsko stopnjo.

Eluat	Število vnesenih fagov v 3. selekcijo
Pomnoženi eluat (biotin)	$5{,}0 \times 10^{9}$ pfu
Pomnoženi eluat (trombin)	$6{,}2 \times 10^{10}$ pfu
Pomnoženi eluat (1% SDS)	$1{,}5 \times 10^{11}$ pfu



Slika 11: Prikaz naraščanja odstotkov eluiranih fagov za posamezen način elucije (B-biotin, T-trombin, S - 1% SDS) po vsaki selekcijski stopnji.

Kot je iz slike razvidno, je odstotek elucije v drugi selekcijski stopnji narastel približno za štiri do desetkrat. To nakazuje preferenčno elucijo tistih bakteriofagov, ki izkazujejo najvišjo afiniteto do streptavidina. Tako v nadaljnji stopnji izločimo klone, ki se ne vežejo na streptavidin.

2.2 Test ELISA

Po končani selekciji knjižničnih bakteriofagov na streptavidin smo afiniteto posameznih klonov določili s testom ELISA. Za poizkus smo izbrali 12 naključnih klonov iz selekcije z biotinom in 12 naključnih klonov iz selekcije s trombinom. Klone iz selekcije z biotinom

smo izbrali zaradi visoke afinitete vezave le-tega na streptavidin in posledično zelo učinkovite elucije. Klone iz selekcije z trombinom pa smo izbrali, ker smo že v insert vključili cepitveno mesto za trombin ravno za namene elucije. Le-te smo nanesli v posamezne vdolbinice MTP ploščice na katero je bil že vezan streptavidin. Nato smo dodali raztopino specifičnih protiteles, usmerjenih proti bakteriofagom T7. Protitelesa so označena s hrenovo peroksidazo (HRP), ki po dodatku kromogenega substrata (ABTS) povzroči nastanek zelenega obarvanja, intenziteto katerega merimo spektrofotometrično. Intenziteta obarvanja je odvisna od intrinzične afinitete in števila kopij izraženih peptidov na površini bakteriofaga ter od bakteriofagnega titra. Kot pozitivno ovrednotimo interakcijo, če doseže vrednost absorbance vsaj A_{600nm} = 0,2, in je vsaj 2-3 krat višja kot pri negativni kontroli. Za vsak fagni klon smo naredili po eno negativno kontrolo (slepa vrednost), kjer na MTP ni bilo vezane tarčne molekule. Z merjenjem absorbance pri predpisani valovni dolžini smo po količini razgrajenega substrata sklepali na količino vezanih bakteriofagov.

Preglednica 7: Razpored posameznih fagnih klonov na MTP.

	1	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***
A	B1	B1	B9	B9	T5	T5
B	B2	B2	B10	B10	T6	T6
C	B3	B3	B11	B11	T7	T7
D	B4	B4	B12	B12	T8	T8
E	B5	B5	T1	T1	T9	T9
F	B6	B6	T2	T2	T10	T10
G	B7	B7	T3	T3	T11	T11
H	B8	B8	T4	T4	T12	T12

Streptavidin

Slepa

Preglednica 8: Vrednosti absorbance A_{600nm}

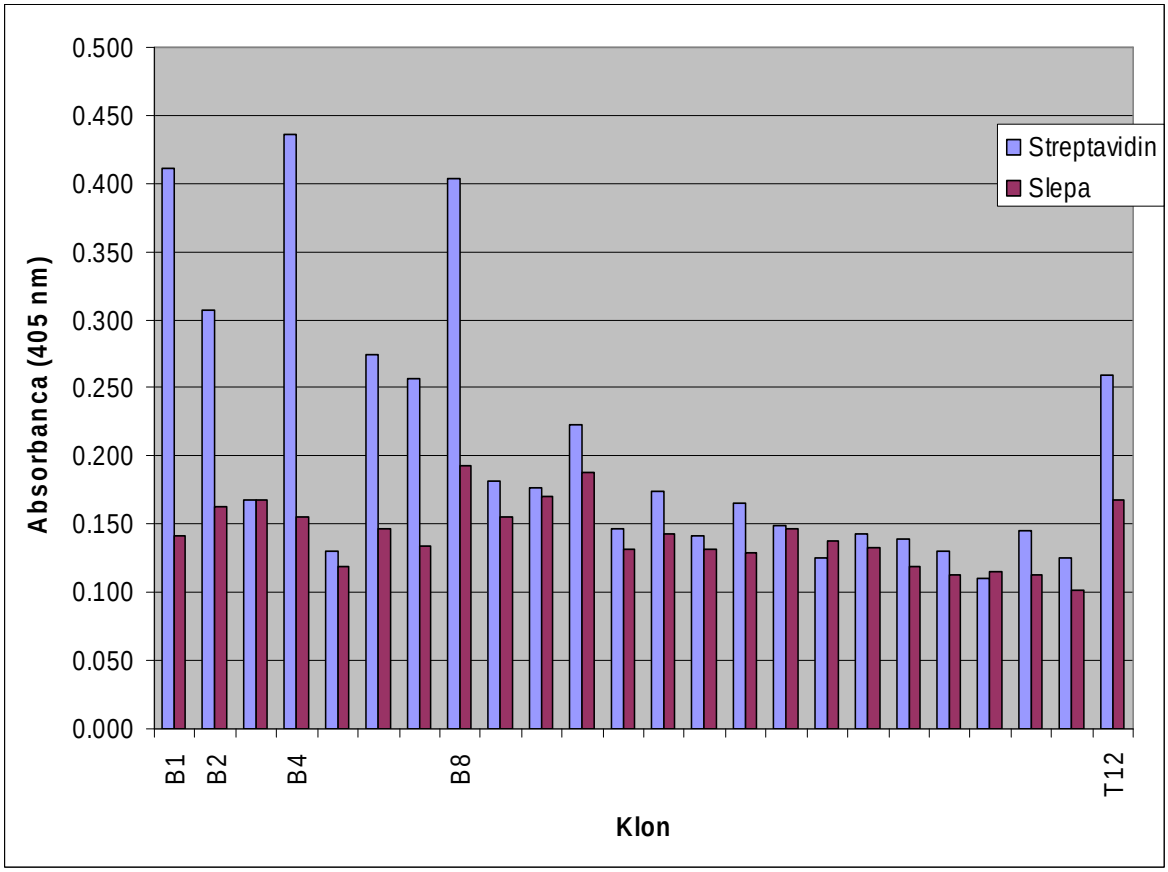
	1	*2*	*3*	*4*	*5*	*6*
A	**0,4105**	0,1412	0,1813	0,1558	0,1248	0,1377
B	**0,3075**	0,1623	0,1770	0,1699	0,1432	0,1323
C	0,1675	0,1684	0,2228	0,1885	0,1390	0,1186
D	**0,4359**	0,1560	0,1469	0,1317	0,1301	0,1132
E	0,1305	0,1188	0,1745	0,1431	0,1105	0,1157
F	0,2744	0,1462	0,1417	0,1314	0,1451	0,1134
G	0,2565	0,1344	0,1653	0,1289	0,1253	0,1011
H	**0,4040**	0,1934	0,1485	0,1471	**0,2596**	0,1673

Streptavidin

Slepa

Pri testu ELISA smo dobili relativno visoke slepe vrednosti, kar lahko pojasnimo z vezavo fagov na samo plastično površino MTP, saj je le-ta hidrofobna. Pri klonih, ki smo jih dobili pri eluciji s pomočjo biotina, so štirje ustrezali zahtevam za obravnavanje interakcije kot pozitivne, pri klonih, ki smo jih eluirali s pomočjo trombina pa noben.

Z zeleno so označene vrednosti absorbance večje od 0,2, to so bili kloni označeni z B1, B2, B4, B8 in T8. Najboljše razmerje testna/slepa vrednosti so imeli kloni, ki smo jih pridobili s pomočjo elucije z biotinom, kloni pridobljeni s pomočjo elucije s trombinom pa nekoliko slabše, zato smo izmed njih izbrali le klon T8, ki je dal pri testu ELISA najvišji signal.



Slika 12: Prikaz klonov glede na razmerje testna/slepa vrednost.

Vsem petim izbranim klonom smo nato pomnožili insert s PCR. Slika PCR-produktov na gelu je bila prave dolžine ~180 bp. Pomembna ugotovitev je bila, da so bili inserti v fagnem genomu vselej prisotni tudi po treh selekcijskih stopnjah. To pomeni, da med pomnoževanjem ne prevlada divji sev virusa, ki bi utegnil priti od zunaj ali iz neustrezno rezanega vektorja (t.i. ozadje knjižnice).

Izbrane klone smo po pomnoževanju inserta poslali na določitev nukleotidnega zaporedja.

2.3 Aminokislinska zaporedja izbranih heksapeptidov z afiniteto do streptavidina

Dobljena nukleotidna zaporedja izbranih bakteriofagnih klonov smo prevedli v aminokislinsko zaporedje. Sekvenčna analiza je dala uporabne podatke za 4 vzorce od petih, saj smo pri klonu T8 uspeli razbrati nukleotidno zaporedje v insertu le delno.

Preglednica 9: Določena nukleotidna in ustrezna aminokislinska zaporedja insertov izbranih fagnih klonov po afinitetni selekciji proti streptavidinu.

Klon	**Nukleotidno in ustrezno aminokislinsko zaporedje**
B1	ggcggcggcctggtgccgcgcggcagcggcggcggcatttttcgttgttgtatttaa G G G L V P R G S G G G I **F R C C I**
B2	ggcggcggcctggtgccgcgcggcagcggcggcggctttttcgttgttgtgtttaa G G G L V P R G S G G G F **F R C C V**
B4	ggcggcggcctggtgccgcgcggcagcggcggcggcatttttcgttgttgtgtttaa G G G L V P R G S G G G I **F R C C V**
B8	ggcggcggcctggtgccgcgcggcagcggcggcggcgtgtttcgttgttgtgtttaa G G G L V P R G S G G G V **F R C C V**
T8	ggcggcggcctggtgccgcgcggcagcggcgg… G G G L V P R G S G G…

Heksapeptidi so si med seboj zelo podobni, a vendar ne enaki, kar nakazuje uspešen potek selekcije. Pričakovali smo sicer, da bomo dobili kot ponavljajoč se motiv aminokislinsko zaporedje HPQ, saj je le-ta najpogostejši pri selekciji fagnih knjižnic na streptavidin. Po pregledu literature pa smo ugotovili, da se tudi naša motiva (RCCV in RCCI) pogosto ponavljata. Izredno zanimivo je dejstvo, da se pojavlja toliko različnih motivov kot mimetikov biotina v interakciji s streptavidinom. Tako poleg našega motiva RCC(V/I), najdemo v literaturi še motive HP(Q/M), zaporedje t.i. nanotag-a DVEAWLGAR (VPLVET) in še nekatere druge.

Preglednica 10: Aminokislinska zaporedja streptavidinskih ligandov, njihova frekvenca pojavljanja pri objavljeni selekciji iz predstavitvenih knjižnic na bakteriofagu T7. Levo: ligandi selekcionirani iz knjižnice naključnih dodekapeptidov; desno: ligandi, selekcionirani iz knjižnice naključnih cikličnih heptapeptidov tipa CX_5C(18).

Peptid	Frekvenca vezave	Peptid	Frekvenca vezave
PYYNRH**HPQ**DNR	2/43	C**HPM**RPC	5/38
LC**HPQ**NCHTKSL	3/43	C**HPM**VPC	1/38
MPDLTT**HPQ**FAR	1/43	CP**HPM**FC	1/38
RWIDATS**HPQ**FD	1/43		
H**HPM**DNRSYRWP	1/43	C**HPQ**FRC	5/38
GVL**HP**FH**HP**GNV	1/43	C**HPQ**VRC	4/38
		C**HPQ**GPC	3/38
FNWSLD**YLREYH**	6/43	C**HPQ**FIC	1/38
ISTVPN**YLRHFH**	6/43	C**HPQ**FNC	1/38
VVFRPH**YL**SG**FH**	1/43	C**HPQ**FPC	1/38
WGPYPE**WLRFYH**	2/43	C**HPQ**NHC	1/38
NYHHLRD**LRSYH**	1/43	C**HPQ**NNC	1/38
HMAS**WLRFFH**GP	1/43	C**HPQ**NPC	1/38
		C**HPQ**VKC	1/38
DDFRFTLPRCCV	1/43	C**HPQ**VMC	1/38
DPYKLPNRRCCI	3/43	C**HPQ**YPC	1/38
YTIADLITRCCV	2/43	CK**HPQ**FC	1/38
PRDTNTIRRCCV	2/43	CL**HPQ**FC	1/38
DRILAIGYRCCV	1/43	CR**HPQ**FC	1/38
MHVETALVRCCI	1/43		
PDRLRSPMRCCI	1/43	C**VHRFV**C	3/38
DKYRIVIARGCV	5/43	C**VHRFI**C	2/38
DVGFIDRNWCCV	1/43	C**IHRFI**C	1/38
		C**IHRFL**C	1/38

Iz preglednice je razvidno, da je poleg motiva HPQ zelo pogost tudi RCCI oz. RCCV. Poleg tega se pri zaporedjih z RCCI in RCCV motivom pojavlja tudi ponavljajoč se motiv hidrofobnih aminokislin na mestu pred argininom. Pojav teh vezavnih motivov (in ne motiva HPQ) za streptavidin v literaturi pojasnjujejo s samim prikazom na bakteriofagu

T7. Do sedaj je bil namreč največ uporabljen sistem nitastih fagov, ki omejuje izražanje aminokislin arginina in cisteina v peptidih na površini kapside. Ravno ti dve aminokislini pa se pojavljata v našem vezavnem motivu.

Aminokislini L in I sta v peptidih z motivom RCC(I/V) v preglednici 10 označeni z zeleno. Pri zaporedju, ki smo ga dobili mi, je na drugem mestu pred značilnim motivom ravno tako hidrofobna aminokislina in sicer I, F ali V. Znano je, da aminokisline, ki obdajajo motiv, lahko prispevajo k perifernim, manj specifičnim reakcijam s tarčnim proteinom, ali pa vplivajo na konformacijo motiva (18, 29). Frekvenca vezave motiva RCCI in RCCV je relativno visoka, tako, da motiva lahko brez dvomov označimo za dva izmed specifičnih, ko gre za vezavo na streptavidin.

VI Sklep

Pripravili smo knjižnico naključnih heksapeptidov, izraženih na kapsidi bakteriofaga T7, saj smo v literaturi zasledili podatke, da imajo peptidne knjižnice pripravljene z litičnimi fagi T7 manj omejen nabor v peptidih izraženih aminokislin, povečano raznolikost peptidov ter bolj normalno porazdelitev peptidnega neto naboja in hidrofobnosti v primerjavi s knjižnicami peptidov, izraženimi na površini nitastih fagov. Pripravljena knjižnica je imela diverziteto, ki je bila manjša od pričakovane. S pomočjo ocene učinkovitosti pakiranja in ocene učinkovitosti ligacije smo ugotovili, da je bil razlog za slabšo diverziteto predvsem v nizki učinkovitosti pakiranja fagne DNA v virusno ovojnico (približno desetkrat nižja od maksimalne možne raznolikosti knjižnice naključnih heksapeptidov). Na osnovi afinitetne selekcije smo v treh ciklih vezave *in vitro* in pomnoževanja *in vivo* uspeli izolirati bakteriofagne klone, ki so selektivno reagirali s streptavidinom. Po pričakovanju se je izkazalo, da je biotin predstavljal najučinkovitejši eluent. To dejstvo ne preseneča glede na to, da biotin tvori visoko afinitetno in specifično vez z streptavidinom. Edinemu klonu, ki je izkazoval visoko afiniteto do streptavidina in je bil eluiran s trombinom, žal nismo uspeli določiti zaporedja nukleotidov v insertu, ki kodira površinski peptid.

Klonom, katerim smo določili največjo afiniteto do streptavidina, smo izolirali bakteriofagno DNA, določili nukleotidno zaporedje in ga pretvorili v peptidno zaporedje. Pričakovali smo motiv HPQ, saj je le-ta najpogostejši pri selekciji fagnih knjižnic na streptavidin, v izselekcioniranih klonih pa smo dobili ponavljajoča se motiva RCCI in RCCV. Po pregledu literature smo odkrili veliko pestrost motivov, ki so bili določeni s selekcijo peptidne knjižnice na fagu T7, saj je le-teh v primerjavi z predstavitvijo na M13 filamentnem fagu veliko več. Na podlagi ujemanja literaturnih podatkov z eksperimentalnimi smo tako potrdili ustreznost pripravljene peptidnopredstavitvene knjižnice.

Možna bi bila še optimizacija knjižnice, predvsem v smislu povečanja učinkovitosti pakiranja fagne DNA v virusno ovojnico, saj bi to znatno prispevalo k večji raznolikosti knjižnice naključnih heksapeptidov. Naši rezultati selekcije potrjujejo dejstvo, da je peptidnopredstavitvena knjižnica na bakteriofagu T7 bolj raznolika v primerjavi s predstavitvijo na fagu M13, kar jo uvršča med predstavitvene knjižnice z največjim potencialom na področju iskanja novih specifičnih peptidnih ligandov.

VII Reference

1. Bratkovič T: Razvoj novih peptidnih inhibitorjev cisteinskih proteaz in Mur-ligaz z metodo prikaza na bakteriofagu. Doktorska disertacija, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2007.

2. Bratkovič T, Sollner Dolenc M: Oligopeptidne in peptidomimetične kombinatorične knjižnice kot orodje za odkrivanje novih spojin vodnic, Farm. vestn., (1), 2004.

3. Grøn H, Hyde-DeRuyscher R. Peptides as tools in drug discovery. Curr Opin Drug Disc Develop 3(5), 2000.

4. Fisch I: Peptide display in functional genomics. Comb Chem High Throughput Screen Biotechnol (96), 2002.

5. Rosenberg A, Griffin K, Studier F.W, McCormick M, Berg J, Novy R, Mierendorf R: T7 Select® Phage Display System: A powerful new protein display system based on bacteriophage T7; Biology Dept., Brookhaven National Laboratories and Novagen Inc.; inNovations (6), 1996.

6. Princeton Biomolecules, Peptide library: http://www.pbcpeptide.com/Peptide%20Library.htm , 2008.

7. Samuelson P, Gunneriusson E, Nygren P-A, Stahl S: Display of proteins on bacteria. J Biotechnol (96) 2002.

8. Dani M: Biological libraries. J Recept Signal Transduct (21) 2001.

9. Azzazy H.M.E, Highsmith E.W.Jr: Phage Display technology: clinical application and recent inovations: Clin Biochem, (6), 35.

10. Pišek N: Primerjava bakterijske in bakteriofagne peptidno predstavitvene knjižnice pri iskanju peptidnih motivov z afiniteto do streptavidina; Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2005.

11. Ph.D.™ Phage Display Peptide Library Kit, Technical Bulletin, E8120, New England Biolabs (http://www.neb.com/nebecomm/products/productE8120.asp), 2008.

12. Smith G.P., Petrenko V.A: Phage display : Chem. Rev., (97), 1997.

13. Dani M.: Peptide display libraries: Design and construction: Recept Signal Transduct, (4), 21.

14. Slanc P: Genska informacija in kako do nje; Štrukelj B (ur.), Kos J (ur.): Biološka zdravila: Od gena do učinkovine. SFD, Ljubljana 2007.

15. Cegnar M, Obermajer N, Kos J, Kristl J: Nosilni sistemi za dostavo bioloških učinkovin; Štrukelj B (ur.), Kos J (ur.): Biološka zdravila: od gena do učinkovine. SFD, Ljubljana 2007.

16. Benhar I.: Biotechnological applications of phage and cell display: Biotechnology Advances, (1), 19.

17. Begoña A., Felez J.: The emerging Impact of Phage Display Technology in Thrombosis and Haemostasis: Thromb. Haemost., (80) 1998.

18. Krumpe L.R.H, Atkinson A.J, Smythers G.W, Kandel A, Schumacher K.M, McMahon J.B, Makowski L, Mori T: T7 lytic phage-displayed peptide libraries exhibit less sequence bias than M13 filamentous phage-displayed peptide libraries; Proteomics (6) 2006.

19. Russel M, Lowman HB, Clackson T: Introduction to phage biology and phage display. In Practical Approach to Phage Display. Edited by: Clackson T, Lowman HB. New York: Oxford University Press, Inc.; 2004.

20. Williants W. G. T: Phage display: practicalities and prospects. Plant Mol Biol (50) 2002.

21. New England Biolabs: Ph.D.™ Phage Display Peptide Libraries, Frequently asked questions (http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/protein_tools/phdFaq.asp), 2008.

22. Chan LY, Kosuri S, Endy D: Refractoring bacteriophage T7, Molecular Systems Biology, (1), 2005: http://www.nature.com/msb/journal/v1/n1/full/msb4100025.html, 2008.

23. T7 Select® System Manual; Novagen, 2002 (www.emdbiosciences.com/docs/NDIS/inno06-002.pdf), 2008.

24. Kolarič B: Priprava rekombinantnih analogov domene B stafilokoknega proteina A kot potencialnih inhibitorjev cisteinskih proteaz. Diplomsko delo, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2006.

25. Metzenberg S: Recombinant DNA techniques, Department of Biology, California State University Northridge: http://escience.ws/b572/L27/images/display.gif, 2008.

26. Wilchek M, Bayer E A: Protein Recognition of Immobilized, 1989.

27. Crommelin D JA, Sindelar R: Pharmaceutical Biotechnology: An introduction for Pharmacists and Pharmaceutical Scientists. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 1997.

28. Giebel LB, Cass RT, Milligan DL: Biochemistry, Biochemistry, 34(47), 1995.

29. Lamla T, Erdmann VA. The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins. Protein Expr Purif. 33(1), 2004.

30. Slika kompleksa streptavidin-biotin:
http://img95.imageshack.us/img95/1908/streptbiotjf5.jpg, 2008.
V sklopu strani: http://ashutoshchemist.blogspot.com/2006_09_01_archive.html

31. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York, 1989.

32. Kuhelj R.: Biokemija v praksi: načela in tehnike, s prilogo: Renko M, Kuhelj R, Dolenc I, Jerala R: Navodila za eksperimentalno delo pri laboratorijskih vajah iz biokemije. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana 2001.

33. QIAEX II® Handbook: For DNA Extraction from Agarose Gels, DNA Extraction from Polyacrylamide Gels, Desalting and Concentrating DNA from Solutions. Qiagen, 1999.

34. Doljak B, Kac J, Kreft S, Mlinarič A, Slanc P, Štrukelj B, Umek A: Vaje iz farmakognozije in farmacevtske biotehnologije, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo, Ljubljana, 2003.

35. Kimball WJ Kimball´s Biology Pages, RestrictionEnzymes:
http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/RestrictionEnzymes.html
2008.

36. Stangler Herodež Š, Zagradišnik B, Zagorac A, Kokalj Vokač N: Navodila za vaje iz molekularne biologije, Maribor 2005.

37. Colorado State University, Biotechnology, DNA ligation: http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/enzymes/ligation.html, 2008.

38. Nucleid Acid Amplification, Protocols&Application Guide. Promega http://www.promega.com/paguide/chap1.htm, 2008.

39. Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Technical Bulletin, TB 308, Promega http://www.promega.com/applications/pcr/featuresandbenefits/Wizard_SV_Gel_PCR_Clean-Up_System.htm, 2008.

40. Kimball WJ Kimball´s Biology Pages DNA Sequencing http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/DNAsequencing.html, 2008.