

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SAŠA ROŽMAN

**DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2009

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SAŠA ROŽMAN

**IZBOR LIGANDOV LEPTINSKEGA RECEPTORJA IZ  
PEPTIDNOPREDSTAVITVENIH KNJIŽNIC TER VREDNOTENJE NJIHOVE  
AFINITETE Z ENCIMSKOIMUNSKIM TESTOM NA TRDNEM NOSILCU**

**SELECTION OF LEPTIN RECEPTOR LIGANDS FROM PHAGE-DISPLAYED  
PEPTIDE LIBRARIES AND EVALUATION OF THEIR AFFINITY WITH ENZYME-  
LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo (Katedra za farmacevtsko biologijo) pod mentorstvom prof. dr. Boruta Štruklja in somentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča. Analizo nukleotidnih zaporedij molekul DNA je opravilo podjetje MWG Operon, Ebersberg, Nemčija.

V prvi vrsti se zahvaljujem svojemu mentorju, prof. dr. Borutu Štruklju, za izkazano zaupanje in podporo pri izdelavi diplomske naloge. Največja zahvala gre mojemu somentorju, doc. dr. Tomažu Bratkoviču, za nenehno prisotnost in dostopnost, spodbujanje k samostojnemu razmišljanju in potrpežljivost. Zahvaljujem se tudi doc. dr. Mojci Lunder za pomoč v laboratoriju ter vsem sodelavcem Katedre za farmacevtsko biologijo, ki so bili vedno pripravljeni deliti svoje znanje in so tako ustvarjali delu prijazno okolje. Iskrena hvala tudi prof. Alenki Šet za izkazano dobro voljo pri lektoriranju mojega diplomskega dela.

Posebej bi se rada zahvalila svojim staršem in družini, ne le za spodbudo pri opravljanju diplomske naloge, pač pa za nesebično podporo tekom celotnega študija.

### **Izjava**

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

Ljubljana, oktober 2009

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Slavko Pečar

Članica diplomske komisije:izr. prof. dr. Marija Bogataj

## **Vsebina**

<b>POVZETEK</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>III</b>
<b>I. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 LEPTIN IN LEPTINSKI RECEPTOR.....	1
1.1.1 LEPTIN IN NJEGOVI CENTRALNI UČINKI .....	1
1.1.2 PERIFERNI UČINKI LEPTINA .....	3
1.1.3 LEPTINSKI RECEPTOR.....	4
1.1.4 ANTAGONISTI LEPTINSKEGA RECEPTORJA .....	7
1.2 PEPTIDNOPREDSTAVITVENE KNJIŽNICE .....	9
1.2.1 PEPTIDNOPREDSTAVITVENA KNJIŽNICA Ph.D.-C7C <sup>TM</sup> .....	10
1.2.2 PEPTIDNOPREDSTAVITVENA KNJIŽNICA T7Select <sup>®</sup> -hexamer .....	11
1.2.3 PRIMERJAVA KNJIŽNIC T7Select <sup>®</sup> -hexamer IN Ph.D.-C7CTM .....	14
1.3 PEPTIDI KOT UČINKOVINE .....	15
<b>II. NAMEN DELA</b> .....	<b>16</b>
<b>III. MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>17</b>
3.1 MATERIALI .....	17
3.1.1 KEMIKALIJE .....	17
3.1.2 BIOLOŠKI MATERIAL.....	18
3.1.3 PUFRI IN RAZTOPINE.....	19
3.1.4 GOJIŠČA IN KULTURE .....	22
3.1.5 REAGENTI, ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI IN KOMPLETI .....	24
3.1.6 GELI ZA AGARIZNO ELEKTROFOREZO .....	24
3.1.7 OZNAČEVALEC VELIKOSTI.....	25
3.1.8 LABORATORIJSKA OPREMA.....	25
3.2 METODE .....	26
3.2.1 PRIPRAVA POSAMEZNIH BAKTERIJSKIH KOLONIJ <i>E. coli</i> BLT5615 .....	26
3.2.2 AFINITETNA SELEKCIJA BAKTERIOFAGOV IZ PEPTIDNOPREDSTAVITVENE KNJIŽNICE T7Select <sup>®</sup> -hexamer .....	26
3.2.3 POMNOŽEVANJE IN IZOLACIJA POSAMEZNIH KLONOV T7 .....	31
3.2.4 OCENA AFINITETE SELEKCIJIRANIH BAKTERIOFAGOV T7 DO LEPTINSKEGA RECEPTORJA S TESTOM ELISA.....	31
3.2.5 POMNOŽEVANJE INSERTA IZBRANIH BAKTERIOFAGNIH KLONOV T7 Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR).....	34
3.2.6 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PRODUKTOV VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO .....	35

3.2.7 PREVERJANJE USPEŠNOSTI POMNOŽEVANJA IN IZOLACIJE INSERTOV BAKTERIOFAGOV T7 Z GELSKO ELEKTROFOREZO .....	36
3.2.8 MERJENJE KONCENTRACIJ DNA .....	37
3.2.9 DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA INSERTOV V BAKTERIOFAGIH T7 .....	37
3.2.10 PRIPRAVA POSAMEZNIH BAKTERIJSKIH KOLONIJ <i>E. coli</i> K12 ER2738.....	38
3.2.11 AFINITETNA SELEKCIJA BAKTERIOFAGOV IZ PEPTIDNOPREDSTAVITVENE KNJIŽNICE Ph.D.-C7C <sup>TM</sup> .....	38
3.2.12 POMNOŽEVANJE IN IZOLACIJA POSAMEZNIH KLONOV M13 .....	41
3.2.13 OCENA AFINITETE SELEKCIJIRANIH BAKTERIOFAGOV M13 DO LEPTINSKEGA RECEPTORJA S TESTOM ELISA.....	42
3.2.14 IZOLACIJA GENOMSKE DNA BAKTERIOFAGOV M13.....	46
3.2.15 DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA INSERTOV V BAKTERIOFAGIH M13 .....	47
<b>IV. POVZETEK EKSPERIMENTALNEGA DELA.....</b>	<b>48</b>
4.1 AFINITETNA SELEKCIJA IZ KNJIŽNICE T7SELECT <sup>®</sup> HEXAMER .....	48
4.2 AFINITETNA SELEKCIJA IZ KNJIŽNICE Ph.D.-C7C <sup>TM</sup> .....	49
<b>V. REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>50</b>
5.1 AFINITETNA SELEKCIJA PEPTIDOV, PREDSTAVLJENIH NA BAKTERIOFAGIH T7 ..	50
5.1.1 REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH TITRACIJ .....	50
5.1.2 TESTA ELISA .....	53
5.1.2.1 Inverzna ELISA vseh (20) izbranih klonov.....	53
5.1.2.2 Inverzna ELISA petih klonov z najvišjo afiniteto do LepR-Fc.....	55
5.1.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO.....	57
5.1.4 REZULTATI GELSKE ELEKTROFOREZE .....	58
5.1.5 DOLOČITEV KONCENTRACIJE PRODUKTOV PCR.....	59
5.1.6 DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA INSERTOV V BAKTERIOFAGIH T7 .....	59
5.2 AFINITETNA SELEKCIJA PEPTIDOV, PREDSTAVLJENIH NA BAKTERIOFAGIH M13	61
5.2.1 REZULTATI MIKROBIOLOŠKE TITRACIJE.....	61
5.2.2 TESTA ELISA .....	63
5.2.2.1 ELISA 14 izbranih klonov tretjega nepomnoženega eluata .....	63
5.2.2.2 Kvantitativna ELISA klonov Sc3-10 in Sc3-11 .....	67
5.2.3 DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA INSERTOV V BAKTERIOFAGIH M13 .....	70
5.3 PRIMERJAVA PEPTIDOV, IZOLIRANIH IZ KNJIŽNIC T7SELECT <sup>®</sup> -HEXAMER IN Ph.D.-C7C <sup>TM</sup> .....	71
<b>VI. SKLEP .....</b>	<b>73</b>
<b>VII. LITERATURA .....</b>	<b>76</b>

## POVZETEK

Debelost je ena najbolj množičnih boleznih moderne dobe, ki jo spremljajo številna kronična obolenja, kot so diabetes, srčno-žilni zapleti, arterijska hipertenzija, hipertrofija srčne mišice, avtoimunske bolezni in rak. V regulacijo telesne teže je neposredno vpleten hormon leptin, katerega plazemska koncentracija je v stanju debelosti velikokrat povišana. Številni dokazi kažejo, da so z debelostjo povezani zapleti posledica prekomerne aktivacije perifernih leptinskih receptorjev, ki se nahajajo na imunskih celicah, celicah gladkega mišičja, jeter, trebušne slinavke, adipoznega tkiva in endotelija žilnih sten.

V diplomskem delu smo se osredotočili na iskanje peptidov, ki bi delovali kot potencialni antagonisti leptinskega receptorja. Z metodo afinitetne selekcije peptidov iz bakteriofagnih predstavitev knjižnic smo po treh selekcijskih stopnjah izolirali bakteriofage, ki so izkazovali afiniteto do rekombinantne zunajcelične domene leptinskega receptorja. Uporabili smo dve knjižnici, ki temeljita na različnih vektorskih sistemih: T7Select<sup>®</sup>-hexamer je kombinatorna knjižnica naključnih linearnih heksapeptidov, predstavljenih na kapsidnem proteinu faga T7, medtem ko je Ph.D.-C7C<sup>™</sup> kombinatorna knjižnica cikličnih heptapeptidov, predstavljenih na proteinu pIII faga M13. Afiniteto izoliranih fagov smo ocenili s prirejenim encimskoimunskim testom na trdnem nosilcu (ELISA), na osnovi teh rezultatov pa izbrali skupno 13 klonov, ki smo jim določili aminokislinsko zaporedje izraženih peptidov. Ta zaporedja smo med seboj primerjali in skušali najti ključni motiv, odgovoren za interakcijo z leptinskim receptorjem.

Štirje izmed petih klonov (S3-1, S3-3, S3-6, S3-17), izoliranih iz knjižnice T7Select<sup>®</sup>-hexamer, so izražali identičen peptid, peti (S3-13) pa se je z njim ujema v petih aminokislinskih ostankih. Iz knjižnice Ph.D.-C7C<sup>™</sup> smo izolirali osem fagnih klonov. Trije so izražali enak peptid (Sc3-4, Sc3-8, Sc3-11), en klon (Sc3-13) pa je na površini nosil peptid, ki se je s prvim ujema v treh aminokislinskih ostankih. Kljub razliki v peptidni predstavitvi obeh sistemov smo s primerjavo vseh 13 klonov, izoliranih iz obeh knjižnic, uspeli njihove lastnosti povezati v skupen motiv (**F-L/I-X-S/C**), ki ga izraža 6 izmed vseh 13 klonov. Pri tem predstavljajo F, L, I, S in C fenilalaninski, levcinski, izolevcinski, serinski in cisteinski, X pa slabše definiran aminokislinski ostanek.

## ABSTRACT

Obesity, one of the most spread diseases in the modern world, is accompanied by a series of illnesses, such as diabetes, cardiovascular disease, hypertension, cardiac hypertrophy, autoimmune diseases and certain forms of cancer. The body-weight regulation is controlled by the concentration of hormone leptin, which is often increased in obese individuals. Several evidence indicate that the activation of peripheral leptin receptors, located on the cells of the immune system, smooth muscle, liver, pancreas, adipose tissue and vascular endothelium, causes obesity related complications.

The focus of our research was identifying the peptides, capable of acting as potential antagonists of leptin receptor. We have used the affinity selection of peptides from phage-displayed peptide libraries to isolate bacteriophages with the affinity for recombinant extracellular domain of the leptin receptor. We screened two libraries, based on different vector systems: T7Select<sup>®</sup>-hexamer is a combinatorial library of random linear hexapeptides, displayed on the capsid protein of T7 bacteriophage, whereas Ph.D.-C7C<sup>™</sup> displays random cyclic heptapeptides, fused to protein pIII of M13 bacteriophage. To evaluate the affinities of isolated phages the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used. Based on the results obtained with this method we have chosen 13 clones and determined the amino-acid sequence of the peptides they display. We compared those sequences and tried to define the key motif, responsible for the interaction of peptides with the target molecule.

Four out of five clones (S3-1, S3-3, S3-6, S3-17), isolated from T7Select<sup>®</sup>-hexamer library displayed identical peptides and the fifth clone (S3-13) expressed a peptide which was similar to the first one on five amino-acid positions. We have isolated 8 clones from the Ph.D.-C7C<sup>™</sup> library. Three of those (Sc3-4, Sc3-8, Sc3-11) displayed the same peptide and one (Sc3-13) expressed a peptide which resembled the first one in three amino-acid positions. In spite of the differences in both phage-displayed systems we compared all 13 clones, isolated from both libraries. We managed to link their characteristics into a common motif (**F-L/I-X-S/C**), present in 6 out of 13 clones. F, L, I, S and C represent the amino acids phenylalanine, leucine, isoleucine, serine and cysteine, respectively, whereas X represents a less defined amino-acid residue.

## Abecedni seznam okrajšav

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kislina)
Ae	enota absorbance
AgRP	agouti-peptidu soroden peptid (angl. <i>agouti related peptide</i> )
anti-hFc/HRP	kozje monoklonsko protitelo proti humani Fc-regiji, konjugirano s HRP
CK	domena citokinskega receptorja
CRH	citokinskemu receptorju homologna domena (angl. <i>cytokine-receptor-homologous domain</i> )
<i>db</i>	gen, ki kodira leptinski receptor (angl. <i>diabetes gene</i> )
ddH <sub>2</sub> O	ultra čista voda
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
ddNTP	dideoksinukleotid trifosfat
ELISA	encimskoimunski test na trdnem nosilcu
ERK	z zunajceličnim signalom regulirana kinaza (angl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i> )
Fc	fragment imunoglobulina, ki nastane po njegovi cepitvi s papainom (angl. <i>fragment crystallizable</i> )
FN3	domena fibronektina tipa III
Grb2	protein 2, vezan na receptor za rastni dejavnik (angl. <i>growth factor receptor bound protein 2</i> )
HRP	hrenova peroksidaza
IL-6	interlevkin 6
IPTG	izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid
IRS	substrati inzulinskega receptorja
JAK	proteinske tirozin-kinaze Janus
LepR	leptinski receptor
LepRb	dolga izooblika leptinskega receptorja
LepR-Fc	rekombinantni himerni protein iz zunajcelične domene mišjega leptinskega receptorja in Fc-regije humanega IgG
LepRs	kratke izooblike leptinskega receptorja: LepRa, LepRc, LepRd, LepRe, LepRf
MAPK	kinaza z mitogenom aktiviranih proteinov (angl. <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
NE	nepomnoženi eluat
NPY	neuropeptid Y
<i>ob</i>	gen, ki kodira protein leptin (angl. <i>obesity gene</i> )
PBS	fosfatni pufer s soljo
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polimerase chain reaction</i> )
PE	pomnoženi eluat
pfu	plakotvorna enota (angl. <i>plaque-forming unit</i> )
PI3-K	fosfatidilinozitol-3-kinaza
POMC	proopiomelanokortin
SH2	Src homologna domena 2
SHP2	SH2-domeno vsebujoč fosfotirozin fosfataza 2
SOCS3	supresor signaliziranja citokinov 3 (angl. <i>suppressor of cytokine signaling 3</i> )
STAT	signalizacijski dejavnik in aktivator transkripcije (angl. <i>signal transducer and activator of transcription</i> )
TNF-α	dejavnik tumorske nekroze alfa (angl. <i>tumor-necrosis factor α</i> )
α-MSH	melanocyte spodbujajoči hormon alfa (angl. <i>alpha-melanocyte-stimulating hormone</i> )



# I. UVOD

## 1.1 LEPTIN IN LEPTINSKI RECEPTOR

### 1.1.1 LEPTIN IN NJEGOVI CENTRALNI UČINKI

Že zgodnja dela, ki so skušala razložiti regulacijo apetita in energetskega ravnovesja v telesu, so predlagala t. i. lipostatsko teorijo. Ta predpostavlja obstoj signalnih molekul, ki sicer izvirajo s periferije, vendar pa so sposobne o stanju maščobnih zalog »poročati« možganskim centrom za sitost (1). Predpostavke o obstoju takšnega endogenega mediatorja so bile potrjene leta 1994 s Friedmanovim odkritjem leptina (2).

Leptin je hormon, ki ga proizvaja adipozno tkivo in deluje kot regulator apetita preko negativne povratne zveze – povišanje njegove koncentracije v krvnem obtoku vodi do večje zasedenosti receptorjev za leptin v hipotalamusu ter posledično do zaviranja apetita in zmanjšanja želje po vnosu hrane. Pridobitev teže ima namreč za posledico povečanje količine adipoznega tkiva, kar se odraža v večji sintezi leptinske mRNA. K povišani serumski koncentraciji leptina pri debelih ljudeh prispeva predvsem velikost adipocitov – ta je v povprečju večja kot pri normalnih osebkih, z velikostjo celic pa korelirata sinteza leptinske mRNA in sekrecija leptina, ki preko te povratne zanke ne uravnava le količine maščevja v telesu, marveč tudi serumski koncentraciji glukoze in inzulina, hitrost metabolizma in telesno temperaturo (1).

Primarni center regulacije vnosa hrane in telesne teže je hipotalamus. Tarčni nevroni za leptin se nahajajo predvsem v nukleusu arkuatusu, lateralnem in paraventrikularnem jedru hipotalamusa. Učinki leptina se kažejo v zmanjšanju aktivnosti nevronov, ki proizvajajo oreksigene živčne prenašalce, in zvečanju aktivnosti tistih nevronov, ki so odgovorni za sekrecijo anoreksigenih prenašalcev. Med nevrone, občutljive na leptin, tako uvrščamo nevrone neuropeptida Y (NPY), nevrone agouti-peptidu sorodnega peptida (AgRP), proopiomelanokortinske nevrone (POMC) in druge. Leptin deluje zaviralno na NPY/AgRP-nevronske aktivnosti ter tako zmanjša učinke obeh prenašalcev (NPY in AgRP), ki sta izredno učinkovita sprožilca lakote. Nasprotno pa deluje na POMC-nevrone, ki izločajo  $\alpha$ -melanocyte stimulirajoč hormon ( $\alpha$ -MSH), anorektično snov (1).

Leptin tako deluje kot presnovno »stikalo«, ki uravnava vnos hrane in energetske porabo v telesu (3). Čeprav ga v manjših količinah proizvajajo tudi placenta, ovariji, skeletno

mišičje, hipofiza in jetra, je njegov primarni vir belo adipozno tkivo. Le-to je zato tudi glavna spremenljivka, ki odloča o plazemski koncentraciji leptina (1).

Leptin je protein, ki ga sestavlja 146 aminokislin, in je produkt gena *ob*. Za njegovo terciarno zgradbo so značilne 4 antiparalelne vijačnice, bistvenega pomena pri fiziološkem delovanju pa je disulfidna vez med cisteinoma na položajih 96 in 146. Leptin se v plazmi nahaja bodisi v prosti obliki, bodisi vezan na prenašalni protein, ki je najverjetneje topna izooblika leptinskega receptorja (LepRe) (4).

Raziskave, ki so napovedovale obstoj leptina in njegovega delovanja, so opravili s postopkom parabioze na debelih (t. i. genotip *ob/ob*) in na diabetičnih miših (genotip *db/db*). Nezmožnost sinteze leptina pri debelih miših se kaže kot sindrom, ki se deduje avtosomno recesivno, in sicer preko gena *ob* na kromosomu 6. Za ta sindrom so poleg debelosti značilni še pretirano hranjenje, prehodna hiperglikemija, povišane plazemske koncentracije inzulina in neplodnost. Mutacija gena *db*, ki se izraža kot odsotnost funkcionalnega leptinskega receptorja, se nahaja na kromosomu 4. Poleg debelosti sta za diabetične miši *db/db* značilni tudi hiperglikemija in neplodnost (1).

Parabioza je kirurški postopek, s katerim povežemo krvna obtoka dveh živali. V pionirskih raziskavah, opravljenih v šestdesetih in sedemdesetih letih prejšnjega stoletja, so povezali krvna obtoka normalne in *ob/ob*-miši, pri čemer so ugotovili, da debela miš, povezana z normalno, počasneje pridobi na teži, ravni plazemskega inzulina in glukoze pa se normalizirata. Danes vemo, da je vzrok za to leptin, ki se v normalni miši nahaja v dovolj visokih koncentracijah, da zavira tudi apetit *ob/ob*-miši. Nasprotno je parabioza diabetične in normalne miši dala precej drugačne rezultate – normalna miš je hitro izgubila telesno maso, postala hipoglikemična in poginila po 50 dneh. Za diabetično miš je namreč značilna izguba receptorja za leptin, kar povzroči neodzivnost na endogeni leptin iz obtoka normalne miši. Hkrati pa zaradi velike količine adipoznega tkiva pride v *db/db*-miših do močno povečane produkcije leptina. To pri normalni miši povzroči zavrtje apetita, zaradi česar žival v kratkem času izgubi veliko teže in pogine (1).

Mutacije v genih *ob* ali *db* so pri ljudeh izjemno redke. Vzrok debelosti je bolj pogosto v tako imenovani »leptinski neodzivnosti«, pri čemer se kljub močno povečani serumski koncentraciji leptina pri debelih ljudeh telo na ta povišani nivo ne odziva z zmanjšanjem vnosa hrane (1). Predpostavka, ki skušajo to stanje razložiti, je več. Ena izmed njih predvideva napako v znotrajcelični signalizaciji leptinskega receptorja v nevronih, druga pa moten transport leptina skozi krvnomožgansko pregrado (5).

### 1.1.2 PERIFERNI UČINKI LEPTINA

Leptinski receptor je prisoten tudi v perifernih tkivih, a je tukaj vloga leptina slabše raziskana. Pri debelih posameznikih periferne učinke leptina povezujemo predvsem z negativnimi posledicami za človeško telo oz. z za debelost značilnimi zapleti, kot so razvoj avtoimunskih bolezni, rakavih obolenj, povišanega krvnega pritiska in kardiovaskularnih zapletov (3).

Povišan nivo leptina v telesu spodbudi visokoenergijske procese, kamor sodita reprodukcija in imunski odziv. Ena izmed negativnih posledic povišanega nivoja leptina je tako pretiran imunski odgovor, ki lahko privede celo do razvoja avtoimunskih bolezni. Leptinski receptor se nahaja na celicah prirojene in pridobljene imunosti. Leptin zato učinkuje na številne imunske celice: v makrofagih in monocitih spodbudi fagocitno funkcijo in izločanje citokinov, poveča izražanje celičnih označevalcev (CD), stimulira kemotakso in produkcijo reaktivnih kisikovih snovi (angl. *ROS – reactive oxygen species*), diferenciacijo, aktivacijo in citotoksičnost naravnih celic ubijalk ter proliferacijo limfocitov T proinflamatornega tipa ( $T_H1$ ) (6). Določene raziskave (7) na *ob/ob*-miših so tako nakazale povezavo povišane koncentracije leptina z razvojem avtoimunskih bolezni, kot so revmatoidni artritis, sistemski lupus eritematosus, multipla skleroza in tiroiditis. Te miši so izkazale ne le oslavljen T-celični imunski odziv, temveč tudi odpornost proti razvoju eksperimentalno spodbujenih avtoimunskih bolezni. Intravenska administracija eksogenega leptina je »povrnila« dovezetnost za kronične vnetne bolezni (3).

Drugi nevarni učinek leptina je njegovo proaterogeno delovanje. To je posledica indukcije oksidativnega stresa v endotelijskih celicah, spodbujanja proliferacije in hipertrofije gladkomišičnih celic žilja, kalcifikacije žilne stene ter agregacije trombocitov (8). Poleg tega je povišana plazemska koncentracija leptina tudi eden izmed dejavnikov tveganja za razvoj hipertrofije srca preko indukcije nastanka endotelina-1 v endotelijskih celicah ven in posledično nastanka reaktivnih kisikovih spojin (9).

Povišan krvni pritisk je s hiperleptinemijo povezan na dva načina. Prvi je neposreden, saj leptin centralno spodbuja delovanje simpatičnega živčevja. Po drugi strani povišani nivoji leptina k hipertenziji prispevajo tudi posredno s periferno stimulacijo izločanja citokinov TNF- $\alpha$  in IL-6 (8). Ti proinflamatorni molekuli spodbujata razvoj hipertenzije preko povečanja izražanja vezavnih molekul VCAM-1 (angl.: *vascular cell adhesion molecules*) in ICAM-1 (angl.: *intercellular adhesion molecules*) na endotelijskih celicah žilja, kar omogoča vezavo in prehajanje monocitov in limfocitov v intimo žilne stene ter postopno zoževanje

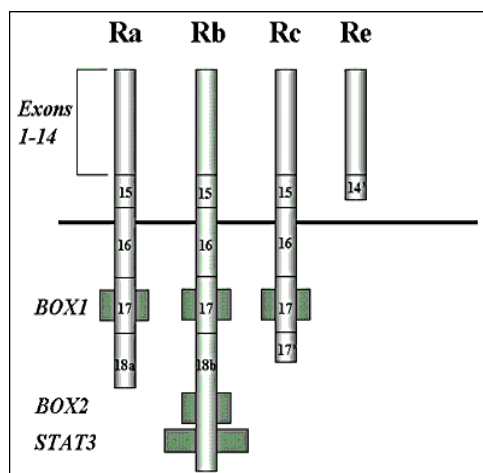
arterijskega lumna (22). Poleg tega oba citokina spodbujata sproščanje endotelina in zavirata z acetilholinom spodbujeno vazodilatacijo (23).

Tudi razvoj določenih rakavih obolenj je lahko spodbujen v prisotnosti visokih koncentracij leptina, saj ima ta hormon neposredno antiapoptotično aktivnost, v določenih primerih pa spodbuja tudi angiogenezo, izražanje rastnih dejavnikov ter proliferacijo in migracijo celic (10). To je predvsem značilno za rak dojke, prostate in požiralnika (11). Tudi levkemične celice nekaterih bolnikov izražajo leptinske receptorje, kajti leptin v kombinaciji z drugimi citokini spodbuja njihovo proliferacijo (4).

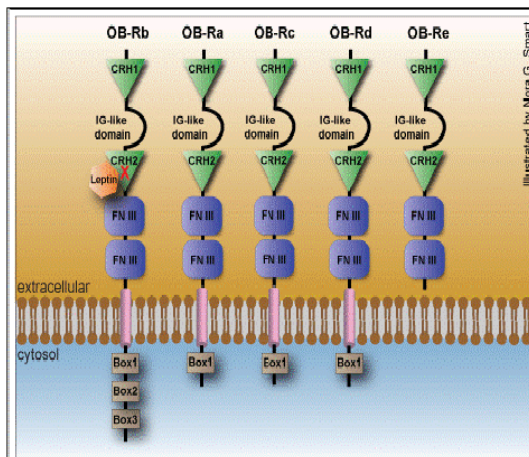
### 1.1.3 LEPTINSKI RECEPTOR

Leptinski receptor sodi v družino citokinskih receptorjev razreda I. Je homodimer in se nahaja v plazemski membrani. Danes poznamo šest izooblik leptinskega receptorja (LepRa-f; LepRd in LepRf sta bila odkrita le pri glodalcih), a le dve sta sposobni znotrajcelične signalizacije: izooblika LepRa se nahaja v vseh tkivih, medtem ko se najdaljša, torej LepRb, izraža predvsem v hipotalamusu. Ta oblika receptorja ima tudi edina popolno signalizacijsko sposobnost. Krajše izooblike (LepRa, LepRc) najverjetneje opravljajo vlogo prenosnika leptina skozi krvnomožgansko pregrado, medtem ko deluje topna izoforma (LepRe) kot vezavni protein za leptin v plazmi (1). Vse izooblike so produkt gena *db*, ki se nahaja na krajši roki kromosoma 1, in nastajajo z alternativnim izrezovanjem intronov in povezovanjem eksonov, le izooblika LepRe nastaja s proteolitično odcepitvijo zunajcelične domene.

Odsotnost izooblike LepRb ima hude posledice, ki so jih preučili na miših genotipa *db/db*. Izraža se v debelosti, hiperglikemiji, hiperinzulinemiji in neplodnosti (1).



Slika 1: Poenostavljen prikaz struktur človeških izooblik leptinskega receptorja. Vsem je skupno zaporedje 805 aminokislin (kodirajoče zaporedje eksonov 1–14), medtem ko imajo daljše oblike dodatni 15. ekson, ekson, ki kodira transmembransko domeno (16. ekson), in ekson, ki nosi zapis za začetni del citoplazemske domene (17. ekson). Temu pri najdaljši izoobliki LepRb sledi še zaporedje 273 aminokislin (1).



Slika 2: Domene izooblik leptinskega receptorja.

Pri vseh oblikah leptinskega receptorja opazimo zunajcelično domeno, potrebno za vezavo liganda.

Ta del je visoko *N*-glikoziliran, saj predstavlja sladkorni del kar 36 % celotne mase domene. 9 disulfidnih vezi vzdržuje tridimenzionalno strukturo receptorja. Domena citokinskega receptorja (CK) in domena fibronektina tipa 3 (FN3) tvorita regijo, ki ji pravimo *domena*,

*homologna citokinskemu receptorju* (CRH). Le CRH, ki je bliže membrani (CRH2), je vpletena v vezavo liganda, najverjetneje preko hidrofobnih interakcij z *a*- in *c*-vijačnicama leptina. Poleg te domene pri vezavi leptina sodeluje tudi imunoglobulinska domena (1,5), ki je odgovorna tudi za aktivacijo proteinske tirozin-kinaze Janus (JAK) in s tem najpomembnejše signalizacijske poti leptinskega receptorja, to je JAK/STAT3 signalne poti (12).

Medtem ko je za znotrajcelično signalizacijo nujna intracelularna domena, za dimerizacijo receptorja zadostuje že zunajcelični del. Tako se leptinski receptorji tudi v nezasedenem stanju nahajajo kot dimeri v plazemski membrani. Vsak dimer je sposoben reverzibilne vezave ene molekule leptina. Po dimerizaciji dveh z leptinom zasedenih receptorjev pride do spremembe konformacije in sprožitve znotrajcelične signalizacije (slika 3). Signalizacijska kaskada se začne z vezavo in aktivacijo proteinske tirozin-kinaze Janus 2 (JAK2). Ta prečno fosforilira tirozinske ostanke receptorja v dimernem paru. Da je to možno, je nujna prisotnost znotrajcelične domene »box 1«, ki je značilna za vse citokinske receptorje in je sestavni del vseh transmembranskih receptorskih izooblik. Vendar pa ima le najdaljša izooblika, LepRb, sposobnost aktivacije najpomembnejše signalizacijske poti, to je poti aktivacije transkripcijskega dejavnika STAT3 (angl. *signal transducer and activator of transcription*). Le LepRb ima namreč ohranjene znotrajcelične tirozinske ostanke Y985, Y1077 in Y1138 (1).

Fosforilacija tirozina Y1138 je nujna za vezavo Src homologne domene 2 (SH2) molekul STAT in zaviralca citokinske signalizacije 3 (SOCS3). Le-ta deluje kot signal negativne povratne zveze, saj zavira signalizacijo leptinskega receptorja preko inhibicije JAK2. Vezava STAT3 in SOCS3 na fosforiliran Y1138 sproži njuno lastno fosforilacijo z JAK2 in s tem njuno aktivacijo. Za popolno delovanje STAT3 mora to molekulo aktivirati tudi serinska kinaza ERK (angl. *extracellular signal-regulated kinase*) – šele po tej

fosforilaciji je transkripcijski dejavnik zmožen »potovati« v jedro celice in inducirati izražanje genov. Eden izmed genov, katerih prepis je spodbujen po tej poti, je gen, ki kodira nastanek SOCS3, s čimer se ustvari že prej omenjena povratna zanka. Njegovo povečano izražanje povzroči slabšo odzivnost receptorja na leptin in je eden izmed predlaganih vzrokov za razvoj neodzivnosti na endogeni leptin in s tem povezane debelosti (1).

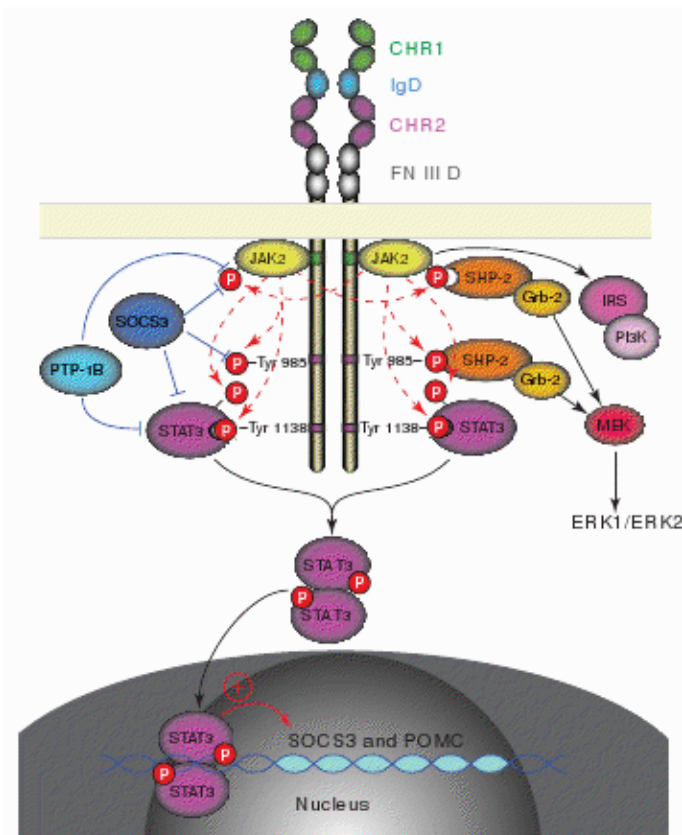
Fosforilacija tirozina Y985 omogoča vezavo proteinov, ki vsebujejo domeno SH2 (angl. *Src homology 2 domain containing*), med drugim SH2-domeno vsebujoč fosfotirozin fosfataze 2 (SHP2). Ta ima najverjetneje zaviralni vpliv na fosforilacijo STAT3 in JAK2. Tako SHC kot SHP2 pa imata po aktivaciji vlogo vezave Grb2 (angl. *growth factor receptor-bound protein 2*). To sproži encimsko kaskado, v kateri se preko delovanja signalnih proteinov Ras in Raf aktivira MAPK (angl. *mitogen-activated protein kinase*). Gre za kinazo, ki se odziva na zunajcelične signale, posledice njene aktivacije pa so rast in diferenciacija celic, vnetje in antiapoptotični odziv (1,4).

Tirozin Y1077 ima v signalizaciji leptinskega receptorja manj pomembno vlogo, saj ni zmožen neodvisne aktivacije. Določene raziskave na celicah trebušne slinavke kažejo, da je njegova fosforilacija povezana z aktivacijo STAT5 (1).

Centralni učinki leptina se kažejo z zmanjšanjem oz. zvečanjem izražanja oreksigenih oz. anoreksigenih živčnih prenašalcev in nevrohormonov, kar poteka preko JAK2/STAT3-signalizacijske poti. STAT3 je torej eden glavnih znotrajceličnih mediatorjev leptinske signalizacije v hipotalamusu. Po aktivaciji dimerizira ter potuje v jedrce, kjer vpliva na prepis tarčnih genov, torej genov za SOCS3, NPY in  $\alpha$ -MSH (1,4).

Druga signalizacijska pot, sprožena z vezavo liganda na leptinski receptor, pa je t. i. pot IRS2/PI3'-K. Substrati inzulinskega receptorja (IRS) so znotrajcelične signalne molekule, ki jih aktivirajo številne tirozin-kinaze. Fosforilacija, ki poteče na več tirozinskih ostankih IRS, omogoča vezavo SH2-domene različnih proteinov in začetek signalizacijskih poti. Največkrat pride do aktivacije fosfatidilinozitol-3-kinaze (PI3'-K). Izguba sposobnosti sinteze IRS2 pri miših z izbitim ustreznim genom vodi v pretirano hranjenje in upočasnen metabolizem, pri čemer pride do povečanja mase adipoznega tkiva, povišanja koncentracije leptina v krvi in postopnega razvoja neodzivnosti na leptin. Aktivacija LepRb namreč povzroči fosforilacijo IRS-proteinov in začetek signalizacijske poti IRS2/PI3'-K. Ta pot se sproži preko delovanja JAK-2, toda neodvisno od fosforilacije tirozinov na leptinskem receptorju. Blokada PI3'-K prekine z leptinom povzročeno hiperpolarizacijo NPY/AgRP-nevronov v hipotalamusu in zavre anorektične učinke leptina (13).

Tako je deloma pojasnjena tudi povezava med debelostjo in diabetesom tipa II, saj se signalizacijska pot IRS2-PI3'-K v hipotalamusu in na periferiji aktivira tudi v prisotnosti inzulina, okvara te poti pa je eden izmed možnih vzrokov za razvoj centralne neodzivnosti na leptin. Na periferiji se ta okvara kaže kot neodzivnost na inzulin, kar vodi v razvoj sladkorne bolezni tipa II (12).



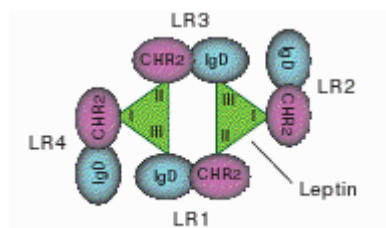
Slika 3: Kaskade signalizacijskih poti po aktivaciji leptinskega receptorja.

#### 1.1.4 ANTAGONISTI LEPTINSKEGA RECEPTORJA

Razvoj učinkovin, ki bi delovale kot antagonisti receptorja za leptin, je glede na številne negativne posledice delovanja tega hormona na periferiji v stanju hiperleptinemije vsekakor utemeljen. Spojine, ki so sposobne »izničiti« učinek leptina, ne predstavljajo le potencialnih zdravilnih učinkovin, marveč so tudi učinkovito orodje za študij z leptinom povezanih presnovnih reakcij v telesu (3).

Nevtralizacijo teh učinkov lahko dosežemo na več načinov: (i) s topnimi leptinskimi receptorji, ki vežejo prosti leptin v krvnem obtoku; (ii) s specifičnimi monoklonskimi protitelesi, usmerjenimi proti LepR; (iii) s protitelesi, usmerjenimi proti samemu leptinu, ali pa (iv) z antagonisti LepR, ki se na receptorje sicer vežejo, vendar ne aktivirajo znotrajcelične signalizacije (3).

Razvoj antagonistov LepR se je začel s preučevanjem vezavnih mest na molekuli leptina. Podrobna raziskava z uvajanjem mutacij v aminokislinsko zaporedje leptina je pokazala, da ta vsebuje tri vezavna mesta za leptinski receptor (I–III; slika 4). Usmerjena mutacija znotraj mesta I minimalno oslabi znotrajcelično signalizacijo, a ne vpliva na afiniteto mutiranega leptina do receptorja. Mesto II se je izkazalo kot glavno področje interakcije z domeno CRH2 leptinskega receptorja, mesto III pa kot nujno za dimerizacijo in posledično aktivacijo receptorja (26).



Slika 4: Model heksamernega kompleksa leptin-leptinski receptor. Vezavno mesto II (diskontinuirano vezavno mesto, sestavljeno iz območij Ile3-Val18 ter Gln75-Leu86) je ključno za vezavo CRH2 domene enega receptorja; vezavno mesto I (Val36-Leu49) tvori vez s CRH2 domeno drugega receptorja v dimernem paru; preko mesta III (Ser117-Ser132), ki se veže na imunoglobulinsko domeno, pa molekuli leptina povežeta dva dimera med seboj (14). Podoben način dimerizacije in posledične aktivacije receptorja zasledimo tudi pri receptorju eritropoetina, ki tako kot leptinski receptor sodi med citokinske receptorje razreda I.

Ker je vezavno mesto III odgovorno za aktivacijo receptorja, so mutacije znotraj tega mesta prvi korak pri razvoju leptinskih antagonistov. Primer takšne usmerjene mutageneze je mutein Ser-120/Thr-121, ki se preko nespremenjenih mest I in II z veliko afiniteto veže na LepR, a naj ne bi izzval znotrajcelične signalizacije *in vitro* (26). Dejansko se je kasneje v *in vivo* pogojih izkazalo, da se ta in sorodni muteini obnašajo kot parcialni agonisti – z leptinom sicer tekmujejo za vezavna mesta in zaradi nižje intrinzične aktivnosti omejujejo njegove učinke, a v njegovi odsotnosti kljub temu aktivirajo receptor (26). Poleg tega leptinski muteini v različnih tkivih (odvisno od prisotnosti endogenega leptina in specifičnih fizioloških pogojev) sprožijo aktivacijo različnih signalnih poti.



Drugi problem te vrste antagonistov je tudi v njihovem prehajanju krvnomožganske pregrade, saj to povzroči njihovo »vmešavanje« v regulacijo telesne teže in porabe energije. Prav zato je dolgoročni cilj razvoj antagonista v obliki kratkega peptida, ki ne prehaja krvnomožganske pregrade in je sposoben zavirati mitogeno signalizacijo leptinskega receptorja (14,15).

## **1.2 PEPTIDNOPREDSTAVITVENE KNJIŽNICE**

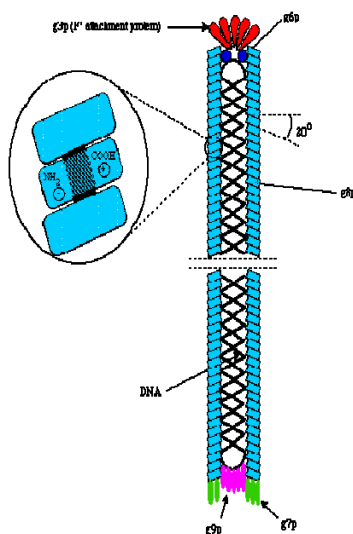
Predstavitev na bakteriofagu je laboratorijska metoda, ki temelji na umetnem posnemanju kemijske evolucije z uporabo tehnologije rekombinantne DNA. Cilj uporabe te metode je izolacija (poli)peptidov z visoko afiniteto do tarčne molekule, v našem primeru leptinskega receptorja (16).

Bakteriofagne predstavitvene knjižnice so heterogene »mešanice« velikega števila različnih bakteriofagnih klonov, od katerih vsak vsebuje segment tuje oziroma kemijsko sintetizirane DNA, vstavljen v gen za kapsidni protein. Ti bakteriofagi predstavljajo ekspresijske vektorje s sposobnostjo okužbe bakterijskih celic, kar omogoča njihovo replikacijo in mutabilnost. Uporabljen izraz »ekspresijski vektor« nakazuje na pomembno lastnost tega sistema – vključek tuje DNA je namreč v obliki fuzijskega proteina izražen na površini fagov, kar nam daje možnost preučevanja različnih lastnosti molekule, ki jo določen vključek kodira, predvsem pa možnost afinitetne selekcije klonov z afiniteto do tarčne molekule pod izbranimi pogoji (16). Primarno strukturo peptidnega liganda enostavno ugotovimo z določitvijo nukleotidnega zaporedja inserta, vstavljenega v bakteriofagni genom.

Vsak knjižnični element (bakteriofagni klon) je zmožen replikacije z okužbo gostiteljske celice *Escherichia coli*. S pomočjo encimskega sistema bakterijske celice pride do podvojevanja in prepisovanja virusnega genetskega materiala ter sestavljanja novih virionov z identično fagno DNA. Če pride v tem procesu do mutacije, se ta prenese na novo »generacijo« klonov. S tem bakteriofagne peptidnopredstavitvene knjižnice zadostijo dvema pogojema kemijske evolucije: replikativnosti in mutabilnosti (16).

## 1.2.1 PEPTIDNOPREDSTAVITVENA KNJIŽNICA Ph.D.-C7C™

Osnova peptidnopredstavitvene knjižnice Ph.D.-C7C™ so nitasti bakteriofagi, ki izhajajo iz ekspresijskega vektorja M13KE. Gre za približno 1  $\mu\text{m}$  dolge in 6 nm široke paličaste viruse z enoverižno ciklično DNA, obdano s plaščnimi proteini pVIII, pIII, pVI, pVII in pIX. Od divjega seva M13 se v tej knjižnici uporabljeni bakteriofagi razlikujejo v vgrajenih območjih z mesti za kloniranje, in sicer na *N*-končni domeni plaščnega proteina pIII (16).



Slika 5: Zgradba bakteriofaga M13.

Ph.D.- C7C™ je kombinatorična knjižnica naključnih heptapeptidov, povezanih s plaščnim proteinom pIII bakteriofaga M13KE. Knjižnica vsebuje približno  $1,2 \times 10^9$  primarnih fagnih klonov, kar zadostuje za prisotnost večine od  $20^7 = 1,28 \times 10^9$  možnih zaporedij heptapeptidov. Nitasti bakteriofagi sicer ponujajo več možnosti izražanja tujih peptidov (npr. fuzijski protein z *N*-končno regijo pVIII, fuzijski protein s centralnim delom pIII ali s C-končno regijo pVI), v primeru naše knjižnice pa je heptapeptid združen z *N*-končnim delom proteina pIII. Ker je na kapsidi pet molekul plaščnega proteina pIII, se tudi fuzijski protein na bakteriofagu izraža v petih kopijah. Tuj vključek na obeh straneh obdaja cisteinski ostanek, kar v nereducirajočih pogojih periplazme vodi v nastanek disulfidne vezi med obema cisteinoma ter posledično v formacijo cikličnega peptida. Naključnemu heptapeptidu tako odvzamemo možnost zavzetja poljubne tridimenzionalne strukture, takšna konformacijska omejenost pa lahko vodi do identifikacije visokoafinitetnih ligandov na račun manjšega znižanja entropije ob vezavi na tarčno molekulo. Drugemu cisteinskemu ostanku

sledi kratek distančnik (Gly-Gly-Gly-Ser), temu pa aminokislinsko zaporedje nativnega pIII (slika 6) (16,17).



Slika 6: Aminokislinsko zaporedje fuzijskega proteina, izraženega na površini faga M13 peptidnopredstavitvene knjižnice Ph.D.-C7C<sup>TM</sup> in pripadajoče nukleotidno zaporedje inserta.

Pomnoževanje bakteriofaga M13 poteka z infekcijo *E. coli*, in sicer preko izrastka na njeni površini, F-pilusa. Z njim se poveže N-končna domena proteina pIII, preko katere virus vstopi v bakterijsko celico. Virusni plaščni proteini se nato vključijo v bakterijsko ovojnico, medtem ko enoverižna genomska DNA vstopi v citoplazmo celice. Sledi sinteza komplementarne DNA in nato nastanek replikativne dvoverižne oblike nukleinske kisline, ki s podvajanjem ustvarja genetski material za veliko število identičnih klonov. Hkrati predstavlja ta dvoverižna DNA matrico za transkripcijo fagnih genov. Enoverižne kopije fagne DNA nato izstopijo iz celice ter pri tem privzemajo plaščne proteine iz bakterijske membrane. Izločanje virionov M13 iz *E. coli* poteka brez lize gostiteljske bakterijske celice (16).

### 1.2.2 PEPTIDNOPREDSTAVITVENA KNJIŽNICA T7Select<sup>®</sup>-hexamer

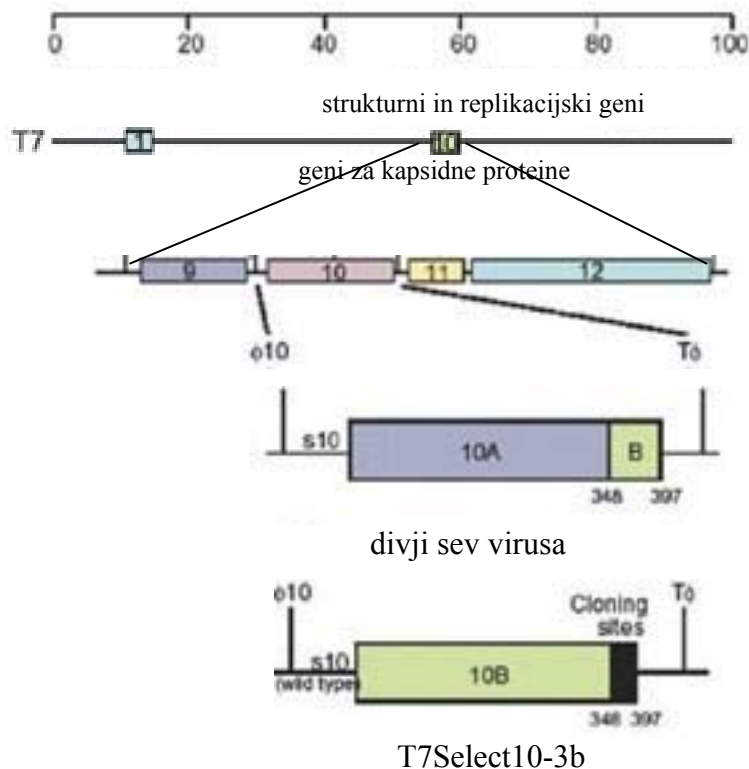
Ta vrsta knjižnice temelji na peptidni predstavitvi na bakteriofagu T7. Njegov genom predstavlja dvoverižna linearna DNA, ki se nahaja znotraj ikozaedrične virusne kapside, zgrajene iz 415 kopij kapsidnega proteina T7. Ta »glava« je preko povezovalnega dela pripeta na rep in »nožice« (19).



Slika 7: Morfologija bakteriofaga T7.

Za prikaz peptidov na površini faga T7 izkoriščamo T7-kapsidni protein. Ta se nahaja v dveh oblikah: 10A (344 aminokislin) in 10B (397 aminokislin). Slednji se prepiše iz istega gena zaradi translacijskega premika bralnega okvirja pri aminokislini 341 proteina 10A. Kapsida je lahko zgrajena izključno iz proteina 10A, proteina 10B ali pa različnih razmerij prve in druge oblike. Bakteriofag T7 ima kapaciteto predstavitve 415 kopij naključnega peptida v velikosti do 50 aminokislin, medtem ko lahko večje proteine (do 1200 aminokislin) izraža le v manjšem ali srednjem številu kopij (0,1–1 kopija na bakteriofag oz. 5–15 kopij na bakteriofag, odvisno od vrste vektorja) (19).

V knjižnici T7Select<sup>®</sup>-hexamer vključek tuje DNA kodira linearni heksamer in je vstavljen znotraj območja z več mesti za kloniranje (angl. *multiple cloning site*), ki sledi kodonu za 348. aminokislino proteina 10B. Vektor, uporabljen za konstrukcijo te knjižnice, je tako imenovani T7Select10-3b, ki tuj peptid izraža v 5 do 15 kopijah. Divji sev virusa plaščni protein izraža v 415 kopijah, zato so za doseganje nižje stopnje izražanja potrebne določene modifikacije. Te spremembe so izvedene na mestu s10 (slika 8), to je na mestu iniciacije prevajanja. Gen 10B je povezan s tujim vključkom, kar pomeni, da virus izraža eno samo obliko, to je fuzijski protein 10B – naključni peptid. Ta tako predstavlja edini vir kapsidnih proteinov, kar lahko privede do upočasnitve rasti virusa in oviranja njegovega sestavljanja zaradi tujega peptida v kapsidi. Temu problemu se izognemo z uporabo posebne vrste gostiteljskih bakterijskih celic, in sicer *E. coli* BLT5615, ki imajo zapis za nativen protein 10A vgrajen v plazmidno DNA. Hkrati pa ta plazmid bakterijski gostiteljski celici zagotavlja tudi odpornost proti ampicilinu. Z dodatkom induktorja IPTG (izopropil  $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid) med pomnoževanjem virusov preko promotorja lacUV5 spodbudimo prepis bakterijskih plazmidnih genov, kar omogoči nastanek fagov, katerih kapsido gradita proteina 10A in fuzijski protein (19).



Slika 8: Genetska mapa bakteriofaga T7 in gen 10B s promotorjem ( $\Phi 10$ ), zaključevalnim zaporedjem ( $T \Phi$ ) in mestom iniciacije prevajanja ( $s10$ ). V vektorju T7Select10-3b je aminokislina 348 zadnja »naravno« pojavljajoča se aminokislina, sledi ji območje z več mesti za kloniranje (angl.: *multiple cloning site*). Znotraj tega območja se nahajata cepitveni mesti za restrikcijska encima *EcoRI* in *HindIII*. Encima po restrikciji ustvarita lepljive konce, ki se jim morajo komplementarno prilegati lepljivi konci inserta, kodirajočega za naključni heksamer (19).

Replikacija bakteriofagov T7 poteka v *E. coli*, le da se v tem primeru virioni sestavijo že znotraj gostiteljske bakterijske celice in se po lizi sprostijo iz nje. Za razliko od nitastih bakteriofagov torej peptidom, predstavljenim na fagni površini, ni potrebna sposobnost prehoda skozi bakterijsko celično membrano (26).

### 1.2.3 PRIMERJAVA KNJIŽNIC T7Select<sup>®</sup>-hexamer IN Ph.D.-C7C<sup>™</sup>

Preglednica I: Primerjava lastnosti knjižnic T7Select<sup>®</sup>-hexamer in Ph.D.-C7C<sup>™</sup>.

	<i>T7Select<sup>®</sup>-hexamer</i>	<i>Ph.D.-C7C<sup>™</sup></i>
<b>Velikost in oblika peptida</b>	linearen heksapeptid	ciklični heptapeptid (obdan z 2 cisteinskima ostankoma)
<b>Velikost in oblika bakteriofaga</b>	ikozaedrični bakteriofag, velikosti pribl. 55 nm	nitasti bakteriofag, velikosti pribl. 6 nm × 1 μm
<b>Mesto predstavitve</b>	C-konec T7-kapsidnega proteina 10B	N-konec proteina pIII
<b>Čas pomnoževanja fagov</b>	1–2 h	4,5 h
<b>Titer fagov po pomnoževanju</b>	10 <sup>10</sup> – 10 <sup>11</sup> pfu/ml	~ 10 <sup>11</sup> pfu/ml
<b>Čas nastanka plakov</b>	3 h (37 °C)	preko noči (37 °C)
<b>Občutljivost na spremembe pogojev</b>	Izredno robustni fagi in stabilni tudi v ekstremnih pogojih (1 % SDS, 5 M NaCl, 4 M urea, 10 mM EDTA, 4 <pH<10, reducirajoči pogoji do 100 mM ditionitrol) (18).	Stabilni v ekstremnih pogojih (1 % dimetilformamid, 6 M urea, 10 mM ditionitrol, 2 <pH<12, 65 °C (do 15 min)) (20).
<b>Način pomnoževanja</b>	Novonastali virioni se sprostijo po lizi gostiteljske celice, zato ni potrebna kompatibilnost na fagu izraženih peptidov s periplazmo in celično membrano.	Pomnoževanje bakteriofaga ne povzroči lize bakterijske celice, pač pa se na novo nastali virioni iz celice sproščajo s sekrecijo skozi periplazmo in celično membrano. Kloni, ki izražajo z membrano nekompatibilne peptide, so zato v selekcijskem procesu »diskriminirani«.
<b>Število kopij izraženega peptida na bakteriofag</b>	5–15	5
<b>Pod-/nadpovprečna zastopanost posameznih AK v predstavljenih peptidih (pristranost)</b>	manjša pristranost pojavljanja posameznih aminokislin (26)	večja pristranost pojavljanja posameznih aminokislin (arginin in cistein: podpovprečna zastopanost; prolin in treonin: nadpovprečna zastopanost) (26)
<b>Raznolikost peptidov</b>	večja	manjša
<b>Porazdelitev hidropatije</b>	bolj enakomerna	manj enakomerna
<b>Izolacija DNA</b>	Vstavljeni insert izbranih bakteriofagov moramo najprej pomnožiti z reakcijo PCR. Sledita izolacija in čiščenje DNA.	Genomsko DNA izbranih bakteriofagov brez predhodnega pomnoževanja z reakcijo PCR izoliramo z obarjanjem v prisotnosti etanola.

### 1.3 PEPTIDI KOT UČINKOVINE

Razvoj potencialnih učinkovin z afinitetno selekcijo iz peptidnopredstavitvenih knjižnic je v osnovi podoben tradicionalnemu pristopu odkrivanja novih zdravil. Pot do morebitnih encimskih inhibitorjev, alosteričnih efektorjev, agonistov ali antagonistov receptorjev in drugih modulatorjev aktivnosti proteinov se začne z rešetanjem knjižnice. Prednost afinitetne selekcije iz bioloških knjižnic pred kemijskimi je v neprimerljivo večjem izboru molekul – običajno vsebujejo peptidnopredstavitvene knjižnice med  $10^9$  in  $10^{12}$  različnih bakteriofagnih klonov, medtem ko nam tradicionalni razvoj omogoča rešanje med »le« nekaj deset tisoč spojinami (16).

Vendar pa je uporaba proteinov ali peptidov kot zdravilnih učinkovin področje, ki se sooča s številnimi težavami. Poleg visokih stroškov, pogojenih s pridobivanjem rekombinantnih proteinov, je glavni izziv doseganje zadovoljivega učinka *in vivo*. Ta namreč ni odvisen le od afinitete do tarčne molekule, temveč tudi od razpolovnega časa učinkovine. Slabe farmakokinetične lastnosti peptidov so v primeru *per os* aplikacije posledica hitre inaktivacije z gastrointestinalnimi encimi, v primeru parenteralnega vnosa pa predstavljajo problem predvsem proteaze v krvi, nezmožnost prehajanja bioloških barrier (krvnomožganska pregrada) in obsežna glomerulna filtracija.

Za izboljšanje biološke uporabnosti peptidnih učinkovin so v uporabi različni postopki, kot na primer zmanjšanje encimske razgradnje s kemijsko modifikacijo ali uporabo proteaznih inhibitorjev (npr. mukoadhezivni polimer, sestavljen iz konjugata serinskih proteaznih inhibitorjev antipaina, kimostatina, elastinala ter kitosana in EDTA, ki zavira tripsin, kimotripsin, elastazo, karboksipeptidazo A in B ter aminopeptidazo N) (23). Drug pristop je povečanje membranske prehodnosti z dostavljanjem na specifično mesto absorpcije (z bioadhezivnimi sistemi ali pospeševalci absorpcije). Tudi povečevanje mase vnešenih molekul lahko razpolovni čas občutno poveča. To dosežemo z vezavo peptidov na polietilenglikol (PEG) ali z njihovo glikozilacijo. Jakost učinkovine sicer s tem zmanjšamo, a se to znižanje aktivnosti kompenzira s podaljšanjem razpolovnega časa učinkovine. Druga možnost je priprava himernih proteinov s serumskim albuminom (3). Tem konvencionalnim metodam se pridružujejo tudi sodobnejši pristopi, ki temeljijo na uporabi različnih nosilnih sistemov: mikrosfere, mikroemulzije, nanodelci, liposomi in kopolimerni miceli (24).

Alternativni »obvoz« slabih farmakokinetičnih lastnosti peptidov pa predstavlja priprava peptidomimetikov, molekul, ki posnemajo strukturo peptida, a se od njega pomembno razlikujejo v izboljšani biološki uporabnosti ter stabilnosti v fizioloških pogojih.

## II. NAMEN DELA

Debelost, ena najbolj množičnih boleznih moderne dobe, je velik dejavnik tveganja za razvoj številnih kroničnih boleznih, kot so diabetes, srčno-žilni zapleti, arterijska hipertenzija, hipertrofija srčne mišice, avtoimunske bolezni in rakava obolenja. Napoved svetovne zdravstvene organizacije (WHO), da bo do leta 2015 na svetu 2,3 milijarde ljudi s prekomerno telesno težo in več kot 700 milijonov debelih ljudi (36), nas spodbuja k iskanju rešitev za zaplete in obolenja, povezane z debelostjo.

V regulacijo telesne teže je neposredno vpleten hormon leptin, katerega plazemska koncentracija je v stanju debelosti velikokrat povišana. Zaradi razvoja t. i. centralne leptinske neodzivnosti leptin ni sposoben izzvati povečanja energijske porabe telesa in zmanjšanja želje po vnosu hrane, njegovi periferni, največkrat škodljivi vplivi pa so vseeno prisotni. Kljub primarno odkriti centralni aktivnosti leptina so danes prav ti periferni učinki predmet številnih raziskav. Porazdelitev leptinskega receptorja po celem telesu (celice imunskega odziva, endotelij, trebušna slinavka, adipozno tkivo, jetra, gladko mišičje itd.) namreč vpliva na procese, povezane z razvojem prej omenjenih z debelostjo povezanih zapletov.

V našem diplomskem delu se bomo osredotočili na iskanje peptidov, ki bi potencialno delovali kot antagonisti leptinskega receptorja na periferiji. Uporabili bomo metodo afinitetne selekcije iz bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic naključnih peptidov. Iz dveh različnih knjižnic (T7Select<sup>®</sup>-hexamer (knjižnica linearnih heksapeptidov, predstavljenih na kapsidnem proteinu faga T7) in Ph.D.-C7C<sup>TM</sup> (knjižnica cikličnih heptapeptidov, predstavljenih na proteinu pIII faga M13)) bomo skušali v treh selekcijskih stopnjah izolirati bakteriofage, ki bodo izkazovali afiniteto do leptinskega receptorja. Interakcijo bomo ovrednotili s prirejenim encimskoimunskim testom na trdnem nosilcu (ELISA) in na osnovi teh rezultatov izbrali klone, katerih nukleotidno zaporedje inserta, ki kodira predstavljen peptid, bomo določili in sklepali na aminokislinsko zaporedje izraženih peptidov. S primerjavo vseh zaporedij bomo skušali najti ključni motiv, odgovoren za vezavo na leptinski receptor.

Razvoj antagonistov leptinskega receptorja ni perspektiven samo z vidika zdravljenja in preprečevanja z debelostjo povezanih zapletov, pač pa so spojine, sposobne »izničjenja« učinkov leptina, tudi učinkovito orodje za študij z leptinom povezanih presnovnih reakcij v telesu ter za eksperimentalno preučevanje poteka številnih bolezenskih zapletov, katerih natančni mehanizmi so do zdaj še nepoznani (potek ateroskleroze, angiogeneza, razvoj avtoimunskih boleznih, rakavih obolenj itd.).



### III. MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 KEMIKALIJE

<i>KEMIKALIJA</i>	<i>proizvajalec</i>
absolutni etanol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemčija
ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolin-6-sulfonska kislina)	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
agar	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemčija
agaroz	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
citronska kislina monohidrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemčija
etanol (70 %)	Riedel-de Haën AG, Nemčija
etidijev bromid	Promega, Madison, WI, ZDA
glicerol	Fluka, Buchs, Švica
HCl	Fluka, Buchs, Švica
IPTG (izo-propil-β-D-1-tiogalaktopiranozid)	Promega, Madison, WI, ZDA
KCl	Carlo Erba, Rodano, Italija
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, ZDA
NaCl	Merck, Darmstadt, Nemčija
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fluka, Buchs, Švica
NaOH	Fluka, Buchs, Švica
NaHCO <sub>3</sub>	
NaI	Riedel-de Haën AG, Nemčija
nanašalno barvilo za gelsko elektroforezo (DNA Loading dye)	Fermentas, Burlington, Kanada
PEG-8000 (polietilenglikol 8000)	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne, Slovenija
SDS (natrijev dodecilsulfat)	Fluka, Buchs, Švica
Tris (tris(hidroksimetil)aminometan)	Promega, Madison, WI, ZDA

Tween <sup>®</sup> 20 vodikov peroksid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Fluka, Buchs, Švica Belinka, Slovenija
--	---

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

### 3.1.2 BIOLOŠKI MATERIAL

<b>TARČNI PROTEIN</b>	<b>proizvajalec</b>
<b>LepR-Fc</b> ; liofilizat; na FFA pripravljena raztopina (250 µg/ml v PBS)	R&D Systems, Aingdon, Velika Britanija
Fuzijski gen, ki kodira protein LepR-Fc, je sestavljen iz zaporedja DNA, ki nosi zapis za zunanjo domeno mišjega leptinskega receptorja (aminokislina 1-839), in nukleotidnega zaporedja, ki kodira regijo Fc človeškega IgG <sub>1</sub> . Ekspresijski sistem tega rekombinantnega fuzijskega proteina je celična linija mišjih mielomskih celic NSO.	

<b>PROTEIN</b>	<b>proizvajalec</b>
<b>BSA (goveji serumski albumin)</b> ; liofilizat	Invitrogen, Carlsbad, CA, ZDA
<b>infliksimab (Remicade<sup>®</sup>)</b> ; liofilizat; na FFA pripravljena raztopina (10 mg/ml v PBS)	Centocor Ortho Biotech Inc, Malvern, PA, ZDA
<b>rekombinantni mišji leptin</b> ; liofilizat; na FFA pripravljena raztopina (2 mg/ml v 20 mM K-fosfatu, pH 8,0)	R&D Systems, Aingdon, Velika Britanija
<b>kozje monoklonsko protitelo proti humani Fc-regiji, konjugirano s HRP</b> ; raztopina (PBS z 1 % BSA, 0,01 % tiomersal)	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
<b>monoklonsko protitelo proti bakteriofagu M13, konjugirano s HRP</b> ; raztopina (50 % glicerol/PBS)	GE Healthcare, Piscataway, NJ, ZDA
<b>protein A</b> ; raztopina (1 mg/ml v PBS)	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
<b>protein G</b> ; raztopina (1 mg/ml v PBS)	Sigma, St. Louis, MO, ZDA
<b>streptavidin</b> ; liofilizat; na FFA pripravljena raztopina (1 mg/ml v PBS)	New England Biolabs, ZDA

<b>ANTIBIOTIK</b>	<b>koncentracija</b>	<b>proizvajalec</b>
<b>karbenicilin</b>	50 mg/ml	Carbenicilin Direct, Velika Britanija (www.carbenicilin.com)
<b>tetraciklin</b>	20 mg/ml	Sigma, St. Louis, MO, ZDA

<b>BAKTERIJSKI SEV</b>	<b>proizvajalec</b>
<b>E. coli BLT5615</b>	Novagen, Madison, ZDA
<b>E. coli ER2738</b>	New England Biolabs, ZDA

<b>PEPTIDNOPREDSTAVITVENA KNJIŽNICA</b>	<b>proizvajalec</b>
<b>T7Select®-hexamer</b> raznolikost knjižnice: $1,5 \times 10^7$ ; vnos v prvo selekcijsko stopnjo: $7,5 \times 10^9$ (~500 kopij vsakega klona)	Novagen, Madison, WI, ZDA; pripravljena na FFA s pomočjo kompleta T7Select® Cloning Kit (Novagen, Madison, WI, ZDA)
<b>Ph.D.-C7C™</b> raznolikost knjižnice: $1,2 \times 10^9$ ; vnos v prvo selekcijsko stopnjo: $2 \times 10^{11}$ (~150 kopij vsakega klona)	New England Biolabs, ZDA

### 3.1.3 PUFRI IN RAZTOPINE

<b>PUFER</b>	<b>sestava</b>	
<b>PBS (fosfatni pufer s soljo), pH 7,4</b>	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	137 mM 2,7 mM 10 mM 2 mM
Natehtamo 3,2 g NaCl, 0,08 g KCl, 0,576 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 0,096 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . Ob mešanju z magnetnim mešalom raztopimo v 400 ml ddH <sub>2</sub> O, s HCl oz. NaOH uravnamo pH in avtoklaviramo.		
<b>2 % blokirni pufer ECL</b>	PBS pH 7,4 GE-ECL Advance™ Blocking Agent	5 ml 100 mg
Natehtamo 100 mg blokirnega sredstva ECL Advance™ in ga raztopimo v 5 ml PBS.		
<b>2 % blokirni pufer mleka v prahu</b>	PBS pH 7,4 mleko v prahu	5 ml 100 mg
Natehtamo 100 mg mleka v prahu in ga raztopimo v 5 ml PBS.		
<b>citratni pufer, pH 4</b>	citrat monohidrat ddH <sub>2</sub> O	525 mg (50 mM) 50 ml
Natehtamo 525 mg monohidrata citronske kisline, raztopimo v 50 ml ddH <sub>2</sub> O, z NaOH uravnamo pH in prefiltriramo skozi sterilni membranski filter (0,2 µm).		
<b>jodidni pufer, pH 8</b>	NaI Tris-HCl EDTA	4 M 10 mM 1 mM
Natehtamo NaI, Tris-HCl in EDTA, raztopimo v 12 ml ddH <sub>2</sub> O ter filtriramo skozi sterilni membranski filter (0,2 µm). Shranimo zaščiteno pred svetlobo pri sobni temperaturi.		

<b>karbonatni pufer,</b> <b>pH 9,6</b>	NaHCO <sub>3</sub> ddH <sub>2</sub> O	0,336 g (0,1 M) 40 ml
Natehtamo 0,336 g NaHCO <sub>3</sub> in raztopimo v 40 ml ddH <sub>2</sub> O. S HCl oz. NaOH uravnamo pH in avtoklaviramo.		
<b>elucijski pufer,</b> <b>pH 2,2</b>	glicin BSA ddH <sub>2</sub> O	300 mg 20 mg 20 ml
Natehtamo glicin in BSA, ju raztopimo v ddH <sub>2</sub> O ter s HCl uravnamo pH. Raztopino prefiltriramo skozi sterilni membranski filter (0,2 µm) in jo razdelimo v mikrocentrifugirke po 2 ml.		
<b>nevtralizacijski pufer,</b> <b>pH 9,1</b>	Tris-HCl ddH <sub>2</sub> O	2,423 g 20 ml
Natehtamo 2,423 g Tris-a, ga raztopimo v ddH <sub>2</sub> O ter s HCl uravnamo pH. Raztopino prefiltriramo skozi sterilni membranski filter (0,2 µm) in jo razdelimo v mikrocentrifugirke po 2 ml.		
<b>pufer PEB (Phage Extraction Buffer),</b> <b>pH 8</b>	Tris NaCl MgSO <sub>4</sub> (1 M) ddH <sub>2</sub> O	97 mg 234 mg 240 µl 40 ml
Natehtamo Tris in NaCl, dodamo 40 ml ddH <sub>2</sub> O in odpipetiramo MgSO <sub>4</sub> . S HCl oz. NaOH umerimo pH ter avtoklaviramo.		
<b>0,075 % PBST</b>	PBS pH 7,4 10 % Tween - 20	50 ml 375 µl
<b>0,1 % PBST</b>	PBS pH 7,4 10 % Tween - 20	50 ml 500 µl
<b>0,5 % PBST</b>	PBS 10 % Tween - 20	50 ml 2500 µl
V 50 ml PBS odpipetiramo ustrezen volumen 10 % Tween – 20, premešamo in prefiltriramo skozi sterilni membranski filter (0,2 µm).		

<b>RAZTOPINA</b>	<b>sestava</b>	
<b>0,5 % BSA</b>	BSA PBS pH 7,4	0,25 g 50 ml
Natehtamo 0,25 g BSA in raztopimo v 50 ml PBS.		
<b>5 M NaCl</b>	NaCl ddH <sub>2</sub> O	14,6 g 50 ml
Natehtamo 14,6 g NaCl, ga raztopimo v ddH <sub>2</sub> O in avtoklaviramo.		
<b>50 % (w/v) PEG-8000</b>	PEG-8000 ddH <sub>2</sub> O	20 g do 40 ml
Natehtamo 20 g PEG-8000 in z ddH <sub>2</sub> O dopolnimo do 40 ml. Pri tem intenzivno mešamo na vibracijskem mešalniku. Ko je PEG-8000 raztopljen, avtoklaviramo.		
<b>0,1 % (w/v) želatina, 10 % (v/v) glicerol v PBS</b>	želatina glicerol PBS pH 7,4	5 mg 500 µl 4,50 ml
Natehtamo želatino, odpipetiramo glicerol, dodamo 2–3 ml PBS in premešamo. Dopolnimo s PBS do 5 ml, ponovno premešamo ter prefiltriramo skozi sterilni membranski filter (0,2 µm).		
<b>20 % (w/v) PEG-8000/NaCl</b>	PEG-8000 NaCl ddH <sub>2</sub> O	8,0 g 5,85 g do 40 ml
Natehtamo PEG-8000 in NaCl, z ddH <sub>2</sub> O dopolnimo do 40 ml ter intenzivno mešamo na vibracijskem mešalniku. Ko je PEG-8000 raztopljen, avtoklaviramo.		
<b>1 M IPTG</b>	IPTG ddH <sub>2</sub> O	2,383 g 10 ml
Natehtamo 2,383 g IPTG in ga raztopimo v 10 ml ddH <sub>2</sub> O. Prefiltriramo skozi membranski filter (0,2 µm) in raztopino razdelimo v mikrocentrifugirke po 1,5 ml. Shranimo pri –20 °C.		
<b>raztopina ABTS</b>	ABTS citratni pufer H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)	20 mg 50 ml 0,05 % (v/v)
Dve tableti z vsebnostjo 10 mg ABTS raztopimo v 50 ml citratnega pufera in s folijo zaščitimo pred svetlobo. Pred uporabo 12 ml tako pripravljene raztopine dodamo še 20,6 µl 30 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .		
<b>1 % SDS</b>	SDS PBS pH 7,4	100 mg 10 ml
Natehtamo SDS, ga raztopimo v PBS in filtriramo skozi sterilni membranski filter (0,2 µm).		

### 3.1.4 GOJIŠČA IN KULTURE

<b>GOJIŠČE</b>	<b>sestava</b>	
<b>agarozno gojišče</b> (za <i>E. coli</i> BLT5615)	pepton	0,4 g
	kvasni ekstrakt	0,2 g
	NaCl	0,2 g
	agarozna	0,24 g
	LB	40 ml
Natehtamo agarozo, jo dispergiramo v LB in avtoklaviramo.		
<b>agarozno gojišče</b> (za <i>E. coli</i> ER2738)	pepton	0,4 g
	kvasni ekstrakt	0,2 g
	NaCl	0,2 g
	MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	0,04 g
	agarozna	0,24 g
LB	40 ml	
Natehtamo agarozo in MgCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O, ju dispergiramo v LB in avtoklaviramo.		
<b>LB (tekoče gojišče)</b>	pepton	4 g
	kvasni ekstrakt	2 g
	NaCl	4 g
	dH <sub>2</sub> O	400 ml
Natehtamo posamezne sestavine, raztopimo v dH <sub>2</sub> O in avtoklaviramo.		
<b>LB-agar</b>	pepton	4 g
	kvasni ekstrakt	2 g
	NaCl	4 g
	agar	6 g
	dH <sub>2</sub> O	400 ml
Natehtamo agar, ga s pomočjo magnetnega mešala dispergiramo v tekočem gojišču LB ter avtoklaviramo. V LAF-komori (angl. <i>Laminar Air Flow</i> ) še vroče gojišče prelijemo v petrijevke premera 9 cm. Strjena gojišča shranimo pri 4 °C.		

<b>LB-agar/IPTG/X-Gal</b>	pepton	4 g
	kvasni ekstrakt	2 g
	NaCl	4 g
	agar	6 g
	ddH <sub>2</sub> O	400 ml
	LB	75,1 % (v/v)
	1 M IPTG	2,4 % (v/v)
	2 % X-Gal v DMF	22,5 % (v/v)

Natehtamo agar, ga s pomočjo magnetnega mešala dispergiramo v tekočem gojišču LB ter avtoklaviramo. V LAF-komori še vroče gojišče prelijemo v petrijevke premera 9 cm. Strjena gojišča shranimo pri 4 °C. Pred uporabo gojišča v aseptičnih pogojih premažemo z raztopino LB/IPTG/X-Gal (100 µl/petrijevko).

<b>KULTURA</b>	<b>sestava</b>	<b>priprava</b>
<b>prekonočna kultura za fage T7</b>	5 ml LB 5 µl karbenicilina kolonija <i>E. coli</i> BLT5615	Ob plamenu sestavine odmerjamo v erlenmajerico, ki jo nato prekrijemo s folijo in pustimo stresati preko noči pri 37 °C.
<b>kultura za pomnoževanje fagov T7</b>	35 ml LB 35 µl karbenicilina 350 µl prekonočne kulture 35 µl IPTG	Ob plamenu sestavine odmerjamo v erlenmajerico, ki jo nato prekrijemo s folijo in pustimo stresati pri 37 °C, dokler ne doseže optične gostote (OD <sub>600</sub> ) 0,6–0,8. 30 min pred začetkom pomnoževanja fagov dodamo IPTG.
<b>kultura za mikrobiološko titracijo fagov T7</b>	10 ml LB 10 µl karbenicilina 100 µl prekonočne kulture	Sestavine odmerjamo v erlenmajerico ob plamenu. Erlenmajerico prekrijemo s folijo in jo stresamo pri 37 °C, dokler OD <sub>600</sub> ne doseže vrednosti 1.
<b>prekonočna kultura za fage M13</b>	10 ml LB 10 µl tetraciklina kolonija <i>E. coli</i> ER2738	Sestavine odmerjamo v erlenmajerico ob plamenu. Erlenmajerico prekrijemo s folijo in jo stresamo preko noči pri 37 °C.

<i>kultura za pomnoževanje fagov M13</i>	20 ml LB 20 µl tetraciklina kolonija <i>E. coli</i> ER2738	Sestavine odmerjamo v erlenmajerico ob plamenu. Erlenmajerico prekrijemo s folijo in jo stresamo pri 37 °C, dokler OD <sub>600</sub> ne doseže vrednosti 0,2.
<i>kultura za mikrobiološko titracijo fagov M13</i>	5 ml LB 5 µl tetraciklina kolonija <i>E. coli</i> ER2738	Sestavine odmerjamo v erlenmajerico ob plamenu. Erlenmajerico prekrijemo s folijo in jo stresamo pri 37 °C, dokler OD <sub>600</sub> ne doseže vrednosti 0,5.

Vse pufre, delovne raztopine in gojišča smo avtoklavirali pri enakih pogojih, to je 20 min pri 121 °C in nadtlaku 1 bar.

### 3.1.5 REAGENTI, ZAČETNI OLIGONUKLEOTIDI IN KOMPLETI

<i>REAGENT</i>	<i>proizvajalec</i>
<i>PCR Master Mix</i> Reagent vsebuje <i>Taq</i> DNA polimerazo (50 U/ml), dNTP-je (400 µM) in MgCl <sub>2</sub> (3 mM) v reakcijskem pufru (pH 8,5).	Promega, Madison, WI, ZDA

<i>OZNAKA ZAČETNEGA OLIGONUKLEOTIDA</i>	<i>nukleotidno zaporedje (5'→3')</i>
<i>T7Select UP</i>	GGAGCTGTCGTATTCCAGTC
<i>T7Select DOWN</i>	AACCCCTCAAGACCCGTTTA
Iz liofiliziranih začetnikov (proizvajalec: Promega, Madison, WI, ZDA) je bila na Fakulteti za farmacijo pripravljena založna raztopina tako, da so jih raztopili v ddH <sub>2</sub> O do koncentracije 100 µM. Z redčenjem smo nato pripravili delovni raztopini koncentracij 5 µM.	
<i>-96 gIII</i>	CCCTCATAGTTAGCGTAACG

<i>KOMPLET</i>	<i>proizvajalec</i>
<i>Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System</i>	Promega, Madison, WI, ZDA

### 3.1.6 GELI ZA AGARozNO ELEKTROFOREZO

<i>GEL</i>	<i>sestava</i>	
<i>2 % agarozni gel za majhno kadičko</i>	agarozna	0,6 g
	puffer TAE ((40 mM Tris-ocetna kislina; 1 mM EDTA)	30 ml
	EtBr	1,5 µg



<b>2 % agarozni gel za veliko kadičko</b>	agarozna	1,5 g
	puffer TAE	75 ml
	EtBr	3,75 µg

Agarozo smo dispergirali v pufri TAE in jo segrevali v mikrovalovni pečici, dokler se ni popolnoma raztopila. Ohladili smo jo pod vodo (do 60 °C) in ji dodali EtBr. Nato smo vlili gel, vstavili glavniček ter počakali, da se je gel strdil. Dolili smo toliko pufra TAE, da je pokril površino gela.

### 3.1.7 OZNAČEVALEC VELIKOSTI

<b>OZNAČEVALEC VELIKOSTI</b>	<b>proizvajalec</b>
<i>označevalec velikosti (GeneRuler™ 50bp DNA Ladder)</i>	Fermentas, Burlington, Kanada

### 3.1.8 LABORATORIJSKA OPREMA

<b>OPREMA</b>	<b>proizvajalec</b>
<i>analitska tehnica AB 104</i>	Mettler Toledo, Kiisnacht, Švica
<i>centrifuga Micro-Centrifuge II GMC-060</i>	Daihan Labtech Co., LTD, Namyangju-city, Koreja
<i>centrifugi 5804 R in 5415 R</i>	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
<i>ciklični termostat AB GeneAmp® PCR System 2700</i>	Applied Biosystems, Forster City, CA, ZDA
<i>čitalec mikrotitrskih ploščic Tecan GENios</i>	Tecan Group Ltd., Männedorf, Švica
<i>kadički za elektroforezo B1A in B2 Easy Cast</i>	Owl, Portsmouth, NH, ZDA
<i>magnetni mešali</i>	
<i>magnetni mešalnik Rotamix 550 MMH in Rotamix 606 MM</i>	Tehtnica, Železniki, Slovenija
<i>mikrotitrskne ploščice Nunc-Immuno™ Module F8 MaxiSorp loose</i>	Nunc, Roskilde, Danska
<i>mikrotitrskne ploščice TPP® Test Plate 96U 92097</i>	TPP, Trasadingen, Švica
<i>pH meter 691</i>	Metrohm, Herisan, Švica
<i>pipete (0,5-10; 10-100; 100-1000; 1000-5000) µl</i>	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
<i>precizna tehnica Exacta 610 B</i>	Tehtnica, Železniki, Slovenija
<i>spektrofotometer Nanodrop ND-1000</i>	NanoDrop Technologies, Delaware, ZDA
<i>stresalnika Vibromix 314 EVT in Vibromix 403 EVT</i>	Tehtnica, Železniki, Slovenija
<i>stresalnik Vibromix 104 EV</i>	Tehtnica, Železniki, Slovenija
<i>vir napetosti za elektroforezne kadičke Power Ease 500</i>	Novex, Frankfurt, Nemčija
<i>zaščiteni mikrobiološka komora LFVP 12</i>	Iskra pio, Šentjernej, Slovenija

## **3.2 METODE**

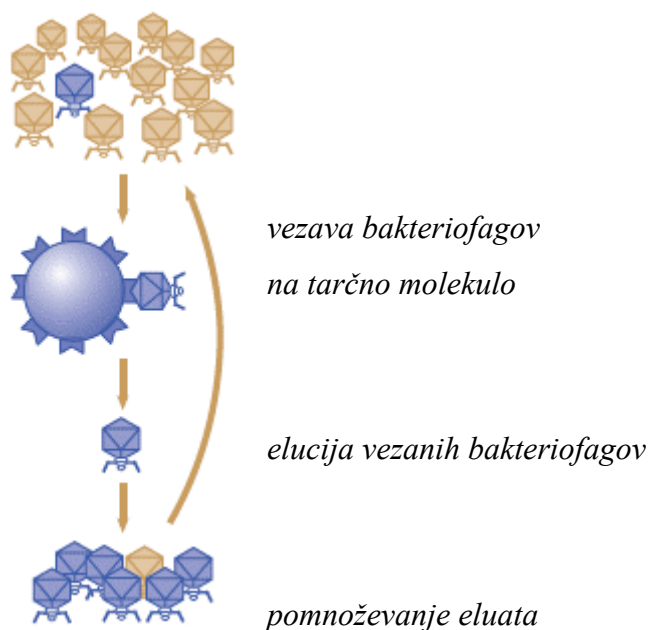
### **3.2.1 PRIPRAVA POSAMEZNIH BAKTERIJSKIH KOLONIJ *E. coli* BLT5615**

Trajna kultura bakterij je bila shranjena v tekočem gojišču LB z 10 % (v/v) glicerola pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dve petrijevki s trdnim gojiščem LB-agar smo ogreli na sobno temperaturo. V aseptičnih pogojih smo s spatulo po Drigalskem trdno gojišče premazali s 100  $\mu\text{l}$  raztopine karbenicilina, koncentracije 10 mg/ml. Nato smo z mikrobiološko zanko rahlo podrgnili po zamrznjeni trajni kulturi ter bakterije razmazali po obeh trdnih gojiščih. Petrijevki smo zaprli, obrnili tako, da je bilo gojišče zgoraj, in ju preko noči inkubirali pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Kolonije, ki so se razvile iz zamrznjene trajne kulture, smo hranili pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in jih uporabljali v obdobju enega meseca.

### **3.2.2 AFINITETNA SELEKCIJA BAKTERIOFAGOV IZ PEPTIDNOPREDSTAVITVENE KNJIŽNICE T7Select<sup>®</sup>-hexamer**

Peptidnopredstavitveno knjižnico smo izpostavili trem selekcijskim procesom, med katerimi smo skušali izolirati tiste bakteriofage, ki se najbolj specifično vežejo na tarčno molekulo (leptinski receptor). Vsaka selekcijska stopnja je bila v grobem sestavljena iz štirih delov: (i) vezava knjižničnih bakteriofagov na površino, prekrito z leptinskim receptorjem; (ii) spiranje nevezanih bakteriofagov; (iii) elucija vezanih bakteriofagov; (iv) pomnoževanje eluata in njegov vstop v novo selekcijsko stopnjo (slika 9). Na vsaki stopnji smo uspeh selekcije in pomnoževanja spremljali z mikrobiološko titracijo nepomnoženega in pomnoženega eluata.



Slika 9: Afinitetna selekcija bakteriofagov iz peptidnopredstavitvene knjižnice T7Select<sup>®</sup>. Slika prikazuje vezavo bakteriofagov na tarčno molekulo, imobilizirano na kroglice. Pri afinitetni selekciji, ki smo jo izvedli, smo tarčno molekulo (LepR-Fc) vezali na protein G oz. protein A, adsorbirana na polistirensko površino mikrotitrne ploščice.

### 3.2.2.1 Prva selekcijska stopnja

#### Priprava knjižnice za nanos

Na osnovi titracije pomnožene knjižnice T7Select<sup>®</sup>-hexamer smo njen titer ocenili na približno  $8,1 \times 10^{11}$  pfu/ml (angl.: *pfu* – *plaque forming unit*, plakotvorna enota), njena raznolikost (ocenjena ob konstrukciji knjižnice (Miha Kosmač in Tomaž Bratkovič, neobjavljeno)) pa znaša  $1,5 \times 10^7$  primarnih klonov. Ker smo želeli približno 500 kopij vsakega posameznega klona, smo potrebovali 9,3  $\mu$ l pomnožene knjižnice:

$$\text{Volumen} = (1,5 \times 10^7 \times 500 \text{ pfu}) / (8,1 \times 10^{11} \text{ pfu/ml})$$

$$\text{Volumen} = 9,3 \mu\text{l}$$

Temu volumnu smo dodali 90,7  $\mu$ l 0,1 % PBST in tako dobili 100  $\mu$ l redčene pomnožene knjižnice T7Select<sup>®</sup>-hexamer, ki je vstopila v prvo selekcijsko stopnjo.

#### Izločitev bakteriofagov, ki se nespecifično vežejo na komponente mikrotitrne ploščice in blokirnega sredstva

V eno vdolbinico mikrotitrne ploščice (Nunc-Immuno<sup>TM</sup> Module F8 MaxiSorp loose) smo odpipetirali 250  $\mu$ l blokirnega pufru (2 % blokirni pufer ECL), jo zatesnili s Parafilmom<sup>®</sup> in inkubirali 1 h pri 37 °C. Po eni uri smo raztopino odlili in zaostalo tekočino odstranili s

trkanjem ob papirnato brisačo. Vdolbinico smo nato dvakrat sprali s po 250 µl 0,1 % PBST, preden smo vanjo odpipetirali alikvot knjižnice. Mikrotitrsko ploščico smo inkubirali pri 4 °C preko noči.

Priprava mikrotitrskih ploščic za prvo afinitetno selekcijo (vezava proteina G; vezava tarčne molekule LepR-Fc; blokiranje nezasedene površine)

Založno raztopino proteina G (koncentracije 1 mg/ml) smo desetkrat redčili v karbonatnem pufru (pH 9,6). 100 µl te raztopine smo odpipetirali v eno vdolbinico mikrotitrskе ploščice (Nunc-Immuno™ Module F8 MaxiSorp loose), jo zatesnili s Parafilmom® in inkubirali preko noči pri 4 °C. Tekočino smo naslednji dan odstranili. Vdolbinico smo nato štirikrat sprali tako, da smo vanjo odpipetirali po 250 µl 0,1 % PBST in ob rahlem stresanju (50 obr./min) pustili 5 min pri sobni temperaturi.

5 µl raztopine LepR-Fc (~1,25 µg) smo dodali 250 µl 2 % blokirnega pufra ECL, nežno premešali in prenesli v pripravljeno vdolbinico z vezanim proteinom G. Ob rahlem stresanju (50 obr./min) smo inkubirali pri sobni temperaturi eno uro. V tem koraku smo izvedli dve vezavi: (i) vezavo Fc regije leptinskega receptorja na protein G in (ii) vezavo blokirnega pufra na nezasedene dele mikrotitrskе ploščice, s čimer smo preprečili potencialno nespecifično vezavo kasneje dodanih bakteriofagov.

Po eni uri smo raztopino odlili in vdolbinico petkrat sprali z 0,1 % PBST.

Vezava knjižničnih bakteriofagov na LepR-Fc

100 µl peptidnopredstavitvene knjižnice, ki smo jo preko noči inkubirali v blokirani mikrotitrski ploščici, smo prenesli v vdolbinico z vezano tarčno molekulo. Tako smo skušali zmanjšati delež v afinitetno selekcijo vstopajočih bakteriofagnih klonov, ki se prek predstavljenih peptidov (ne)specifično vežejo na polistiren mikrotitrskе ploščice ali komponente blokirnega sredstva. Mikrotitrsko ploščico smo zaščitili s Parafilmom® in jo pustili stresati (50 obr./min) 1,5 h.

Spiranje nevezanih bakteriofagov

Tekočino smo odstranili iz vdolbinice in jo desetkrat sprali s po 250 µl 0,1% PBST. Vsak korak spiranja je ob rahlem stresanju (50 obr./min) trajal 5 min.

Elucija vezanih bakteriofagov

Po spiranju smo v vdolbinico odpipetirali 100 µl 1 % SDS in pustili 10–15 min ob stresanju (50 obr./min) pri sobni temperaturi. Po 10-15 min smo dodali še novih 50 µl 1 % SDS, na hitro premešali s pipeto in eluat pobrali iz mikrotitrskе ploščice.

2 µl eluata smo uporabili za mikrobiološko titracijo, ostalih 148 µl pa smo prenesli v kulturo za pomnoževanje.

### Pomnoževanje in izolacija eluata

Kulturi za pomnoževanje (3.1.4) smo dodali eluat in stresali pri 37 °C približno 1,5 h oz. do trenutka, ko smo opazili lizo gostiteljskih celic. Vsebino erlenmajerice smo nato prenesli v centrifugirko volumna 50 ml, v katero smo pred tem odpipetirali 3,9 ml 5 M NaCl. Sledilo je centrifugiranje (4 °C, 10000 obr./min, 10 min), s katerim smo odstranili ostanke bakterijskih celičnih sten. Supernatantu smo zatem dodali 6,5 ml 50 % (w/v) PEG-8000, dobro premešali in ga 45 min inkubirali na ledu. Oborjene bakteriofage smo ločili od tekočine s centrifugiranjem (4 °C, 13200 obr./min, 10 min). Supernatant smo odlili, ponovno na kratko centrifugirali in zaostalo tekočino odstranili še s pipeto.

Oborino smo ponovno suspendirali v 1,5 ml raztopine 0,1 % (w/v) želatine in 10 % (v/v) glicerola v PBS, intenzivno premešali na vibracijskem mešalniku in zopet centrifugirali (4 °C, 14000 obr./min, 5 min). Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, 2 µl uporabili za mikrobiološko titracijo, ostalo pa shranili pri -20 °C.

### Mikrobiološka titracija

Da smo lahko ocenili število bakteriofagov v eluatih in v sami knjižnici, smo v vsaki selekcijski stopnji izvajali klasično mikrobiološko titracijo: kulturo gostiteljskega bakterijskega seva smo okužili z redčitvijo bakteriofagov in jo prenesli na agarno gojišče. Po približno 3 h pri 37 °C so se na gojišču pojavili prozorni plaki, katerih število nam je bilo v pomoč pri izračunu okvirnega števila bakteriofagov v eluatu.

Postopek:

1. S tekočim gojiščem LB smo pripravili ustrezne desetkratne redčitve eluatov, in sicer  $10^2$ ,  $10^3$  in  $10^4$  za nepomnožene eluate,  $10^8$ ,  $10^9$  in  $10^{10}$  za pomnožene ter  $10^7$  in  $10^8$  za samo knjižnico.

2. Petrijevke z gojiščem LB-agar smo vzeli iz hladilnika in jih ogreli na 37 °C.

3. V mikrovalovni pečici smo raztalili agarozno gojišče. Za vsako redčitev eluatov smo ga nalili po 3 ml v sterilne centrifugirke volumna 10 ml. Vsaki centrifugirki z agaroznim gojiščem smo dodali še 3 µl karbenicilina in 3 µl IPTG. Do uporabe smo jih inkubirali pri 52 °C.

4. V mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 250 µl kulture za mikrobiološko titracijo (3.1.4) in ji dodali po 10 µl vsake izmed redčenih raztopin nepomnoženega eluata ter vsebino premešali na vibracijskem mešalniku. Kadar smo delali mikrobiološko titracijo pomnoženega eluata ali knjižnice, smo 250 µl kulture za mikrobiološko titracijo dodali po 100 µl vsake izmed redčenih raztopin.

5. Celotno vsebino mikrocentrifugirk smo s pipeto prenesli v segreto agarozno gojišče, hitro premešali na vibracijskem mešalniku in prelili na gojišče LB-agar. Ohlajena gojišča smo 2–3 h inkubirali pri 37 °C.

6. Po inkubaciji smo prešteli prozorne plake in s pomočjo faktorja redčenja izračunali približno vrednost števila bakteriofagov v eluatu oz. osnovni knjižnici.

Iz približnih vrednosti števila bakteriofagov v pomnoženem eluatu smo izračunali volumen pomnoženega eluata, ki smo ga vnesli v naslednjo selekcijsko stopnjo, in sicer z namenom vnosa enakega števila bakteriofagnih delcev v vsako stopnjo afinitetne selekcije.

### **3.2.2.2 Druga selekcijska stopnja**

Iz vrednosti, dobljenih na osnovi mikrobiološke titracije, smo preračunali, da moramo v drugo selekcijsko stopnjo vnesti 25 µl prvega pomnoženega eluata, če želimo ohraniti približno enako število bakteriofagov. Temu volumnu smo dodali še 75 µl 0,1 % PBST in tako dobili 100 µl redčenega prvega pomnoženega eluata, ki je vstopil v drugo selekcijsko stopnjo.

Drugi krog selekcije je potekal enako kot prvi, le da smo tokrat zaostriili pogoje vezave z namenom selekcije klonov s čim višjo afiniteto do LepR: (i) uporabili smo le 3,6 µl raztopine tarčne molekule LepR-Fc (~0,9 µg), (ii) čas vezave bakteriofagov na tarčno molekulo smo skrajšali na 1 h, (iii) po odstranitvi nevezanih bakteriofagov smo vdolbinico spirali petnajstkrat (250 µl 0,1 % PBST, 50 obr./min, 5 min).

Poleg tega smo namesto proteina G v vdolbinico mikrotitrne ploščice za imobilizacijo LepR-Fc vezali protein A v enaki koncentraciji. S to zamenjavo smo skušali preprečiti ohranjanje tistih bakteriofagnih klonov, ki so se v prvi selekcijski stopnji vezali na protein G.

### **3.2.2.3 Tretja selekcijska stopnja**

Iz vrednosti, dobljenih na osnovi mikrobiološke titracije, smo preračunali, da moramo v tretjo selekcijsko stopnjo vnesti 15 µl drugega pomnoženega eluata, če želimo ohraniti približno enako število bakteriofagov. Temu volumnu smo dodali še 85 µl 0,1 % PBST in tako dobili 100 µl redčenega drugega pomnoženega eluata, ki je vstopil v tretjo selekcijsko stopnjo.

Tako kot v prvi selekcijski stopnji (3.2.2.1) smo tudi tu v vdolbinico mikrotitrne ploščice vezali protein G in se tako izognili afinitetni selekciji morebitnih vezalcev na protein A.

Tretja selekcijska stopnja je sicer potekala enako kot prvi dve, le da bakteriofagov tretjega pomnoženega eluata nismo koncentrirali. Po lizi bakterijskih gostiteljskih celic smo pomnoženemu eluatu dodali 3,9 ml NaCl in centrifugirali (4 °C, 10000 obr./min, 10 min). Supernatantu smo nato dodali 4,2 ml glicerola in tretji pomnoženi eluat shranili pri –80 °C.

### **3.2.3 POMNOŽEVANJE IN IZOLACIJA POSAMEZNIH KLONOV T7**

Da smo lahko v nadaljevanju kvalitativno ovrednotili afiniteto posameznih bakteriofagnih klonov do leptinskega receptorja, smo jih 20 pomnožili z okužbo gostiteljskega bakterijskega seva. Titer fagov po pomnoževanju in koncentriranju je znašal  $\sim 10^{11}$  pfu/ml.

Postopek:

1. Iz petrijevke, na kateri so se pomnožili kloni tretjega nepomnoženega eluata, smo v LAF-komori s pipeto pobrali 20 plakov in jih prenesli v 500  $\mu$ l pufru PEB. Izbrali smo tisto petrijevko, ki ni vsebovala več kot 100 plakov, s čimer smo povečali verjetnost, da en plak vsebuje le en klon.
2. V 20 epruвет volumna 12 ml smo odpipetirali po 3 ml kulture za pomnoževanje in vsaki dodali 20  $\mu$ l enega izmed klonov v pufru PEB. Pomnoževanje je potekalo ob močnem stresanju (225 obr./min) pri 37 °C.
3. Po lizi bakterijskih gostiteljskih celic smo v vsako epruveto odpipetirali 333  $\mu$ l NaCl in centrifugirali (4 °C, 10000 obr./min, 10 min).
4. Supernatant smo prelili v epruvete s 556  $\mu$ l PEG-8000 in jih za 45 min postavili na led.
5. Oborine, zbrane s centrifugiranjem (4 °C, 13200 obr./min, 10 min), smo ponovno suspendirali v 160  $\mu$ l PBS in jih shranili pri 4 °C.

### **3.2.4 OCENA AFINITETE SELEKCIONIRANIH BAKTERIOFAGOV T7 DO LEPTINSKEGA RECEPTORJA S TESTOM ELISA**

#### **3.2.4.1 Inverzna ELISA vseh (20) izbranih klonov**

S prirejenim testom ELISA smo kvalitativno ovrednotili afiniteto posameznih bakteriofagnih klonov do leptinskega receptorja. Z izrazom »inverzna« ELISA skušamo poudariti, da smo imobilizirane fagne klone detektirali s prosto tarčno molekulo v raztopini (in ne obratno, kot je to običajno).

Postopek:

1. Po 50  $\mu\text{l}$  vsakega izoliranega klona (S3-1 – S3-20) v PBS smo odpipetirali v vdolbinice in jih vezali preko noči pri 4 °C. Dve vdolbinici smo pustili prazni (brez bakteriofagov), da sta nam na koncu služili kot slepa kontrola. V nadaljevanju smo ju izpostavili enakim pogojem kot vse ostale.
2. Naslednji dan smo tekočino odlili in odstranili zaostalo tekočino s trkanjem ob papirnato brisačo. Nezasedeno površino v vdolbinicah smo blokirali z 250  $\mu\text{l}$  2 % blokirnega pufra (mleko v prahu) in 1 h inkubirali pri 37 °C.
3. Tekočino smo odlili in vdolbinice štirikrat sprali s po 250  $\mu\text{l}$  0,1 % PBST, posamezno spiranje je trajalo 5 min.
4. V vsako vdolbinico smo odpipetirali 50  $\mu\text{l}$  raztopine leptinskega receptorja v 0,1 % PBST. Pripravili smo jo tako, da smo 5  $\mu\text{l}$  izhodne raztopine LepR-Fc, koncentracije 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , dodali 47  $\mu\text{l}$  0,1 % PBST. Mikrotitrsko ploščico smo zatesnili s Parafilmom<sup>®</sup> in jo ob rahlem stresanju (50 obr./min) inkubirali 2 h pri sobni temperaturi.
5. Vdolbinice smo sprali štirikrat po 5 min z 250  $\mu\text{l}$  0,1 % PBST.
6. V vsako vdolbinico smo dodali 65  $\mu\text{l}$  kozjega monoklonskega protitelesa proti humani Fc-regiji, konjugiranega s HRP (hrenovo peroksidazo) (anti-hFc/HRP), redčenega z 0,1 % PBST v razmerju 1:1000. Ob rahlem stresanju (50 obr./min) smo vezali protitelo 1 h pri sobni temperaturi.
7. Ko smo tekočino odstranili, smo vdolbinice spirali šestkrat po 5 min z 250  $\mu\text{l}$  0,1 % PBST.
8. V vse vdolbinice mikrotitrskе ploščice smo z večkanalno pipeto nanесли po 100  $\mu\text{l}$  raztopine ABTS.
9. Kinetično merjenje absorbančе je potekalo na čitalcu mikrotitrskih ploščic Tecan GENios pri valovni dolžini 405 nm. Merili smo jo 1 h, meritve pa je čitalec izvedel vsake 3 min.

#### **3.2.4.2 Inverzna ELISA petih klonov z najvišjo afiniteto do LepR-Fc**

Klone z izkazano afiniteto do LepR-Fc smo uporabili še v drugem ELISA testu. V enem stolpcu mikrotitrskе ploščice smo ovrednotili interakcijo z LepR-Fc, v drugem pa z infliksimabom (himernim monoklonskim protitelesom, s humano regijo Fc). Na ta način smo skušali dognati, ali se izbrani kloni vežejo na receptorski del fuzijskega proteina LepR-Fc ali pa morda na Fc-regijo.



V vdolbinice tretjega stolpca smo namesto bakteriofagov adsorbirali infliksimab iz raztopin različnih koncentracij. Nanj smo neposredno vezali s HRP označeno protitelo, usmerjeno proti humani Fc-regiji. Te meritve so nam služile kot pozitivne kontrole.

Postopek:

1. V vdolbinice smo odpipetirali 45  $\mu$ l raztopine posameznih klonov v PBS in bakteriofage vezali preko noči pri 4 °C. Uporabili smo tistih 5 klonov, ki so v začetnem ELISA testu do LepR-Fc izkazovali najvišjo afiniteto (S3-1, S3-3, S3-6, S3-13, S3-17) in en klon, katerega afiniteta do LepR-Fc je bila zelo nizka (S3-19).  
V tretji stolpec mikrotitrskе ploščice smo nanесли 100  $\mu$ l raztopine infliksimaba, in sicer v padajočih koncentracijah. Začetno raztopino (10 mg/ml) smo v karbonatnem pufu (pH 9,6) redčili 100-krat, 200-krat, 400-krat, 1000-krat in 1500-krat. Infliksimab smo vezali preko noči pri 4 °C.
2. Naslednji dan smo odstranili tekočino iz mikrotitrskе ploščice in v vse vdolbinice odpipetirali 250  $\mu$ l 2 % blokirnega pufra (mleko v prahu). Inkubirali smo 1 h pri 37 °C.
3. Tekočino smo odlili in vdolbinice štirikrat sprali po 5 min z 250  $\mu$ l 0,1 % PBST.
4. V vdolbinice stolpca 1 smo nato odpipetirali po 50  $\mu$ l raztopine LepR-Fc v 0,1 % PBST, koncentracije 25  $\mu$ g/ml. V vdolbinice stolpca 2 smo odpipetirali enak volumen raztopine infliksimaba v 0,1 % PBST, koncentracije 25  $\mu$ g/ml.  
V vdolbinice stolpca 3 smo odpipetirali po 50  $\mu$ l PBS. Mikrotitrsko ploščico smo ob rahlem stresanju (50 obr./min) inkubirali 2 h pri sobni temperaturi.
5. Tekočino smo odlili, vdolbinice štirikrat sprali z 250  $\mu$ l 0,1 % PBST (5 min).
6. V vsako vdolbinico smo dodali 65  $\mu$ l kozjega monoklonskega protitelesa proti humani Fc-regiji, konjugiranega s HRP, redčenega z 0,1 % PBST v razmerju 1 : 1000. Ob rahlem stresanju (50 obr./min) smo vezali protitelo 1 h pri sobni temperaturi.
7. Ko smo tekočino odstranili, smo vdolbinice sprali šestkrat z 250  $\mu$ l 0,1 % PBST (5 min).
8. V vse vdolbinice mikrotitrskе ploščice smo z večkanalno pipeto nanесли po 100  $\mu$ l raztopine ABTS.
9. Kinetično merjenje absorbance je potekalo na čitalcu mikrotitrskih ploščic Tecan GENios pri valovni dolžini 405 nm. Merili smo jo 1 h, meritve pa je čitalec izvedel vsake 3 minute.

Preglednica II: Razpored posameznih fagnih klonov in raztopin infliksimaba (*Infl.*) na mikrotitrski ploščici.

	1	2	3
<b>A</b>	S3-1 <i>LepR-Fc</i>	S3-1 <i>Infl.</i>	Infl. (1500×) PBS
<b>B</b>	S3-3 <i>LepR-Fc</i>	S3-3 <i>Infl.</i>	Infl. (1000×) PBS
<b>C</b>	S3-6 <i>LepR-Fc</i>	S3-6 <i>Infl.</i>	Infl. (400×) PBS
<b>D</b>	S3-13 <i>LepR-Fc</i>	S3-13 <i>Infl.</i>	Infl. (200×) PBS
<b>E</b>	S3-17 <i>LepR-Fc</i>	S3-17 <i>Infl.</i>	Infl. (100×) PBS
<b>F</b>	S3-19 <i>LepR-Fc</i>	S3-19 <i>Infl.</i>	/ PBS
<b>G</b>	/ <i>LepR-Fc</i>	/ <i>Infl.</i>	
<b>H</b>	/ <i>LepR-Fc</i>	/ <i>Infl.</i>	

<i>LepR-Fc</i>	50 µl raztopine (25 µg/ml) <i>LepR-Fc</i> v 0,1 % PBST
<i>Infl</i>	50 µl raztopine (25 µg/ml) infliksimaba v 0,1 % PBST
<i>PBS</i>	50 µl PBS

### 3.2.5 POMNOŽEVANJE INSERTA IZBRANIH BAKTERIOFAGNIH KLONOV T7 Z VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO (PCR)

Verižna reakcija s polimerazo je metoda sinteze nukleinskih kislin *in vitro*, ki nam omogoča enostavno in hitro pomnoževanje določenega odseka DNA v kompleksni mešanici molekul. Zanj je značilen tristopenjski temperaturni profil, ki se začne z denaturacijo dvoverižne DNA. Sledi prileganje dveh oligonukleotidnih začetnikov, ki sta komplementarna zaporedjem na 5`- in 3`-konicah tarčnega DNA odseka in kot takšna zagotavljata specifičnost reakcije. Cikel se zaključi s podaljševanjem verige DNA s termostabilno DNA polimerazo (28).

Nujne komponente reakcijske zmesi za PCR so: matrična DNA, termostabilna DNA polimeraza (najpogosteje polimeraza *Taq*, primarno izolirana iz bakterije *Thermus aquaticus*), par oligonukleotidnih začetnikov (ki se prilega nasprotnim verigam matrične DNA in

»zajema« odsek, ki ga želimo pomnožiti), vsi štirje deoksinukleotidi (dNTP-ji), magnezijevi ioni (ki so nujni za delovanje DNA polimeraze) ter reakcijski pufer ustreznega pH.

V šestih mikrocentrifugirkah smo pripravili reakcijsko zmes s končnim volumnom 25  $\mu$ l, ki je vsebovala naslednje komponente:

- 1  $\mu$ l bakteriofagnega klona v PEB (S3-1, S3-3, S3-6, S3-13, S3-17, S3-19)
- 9,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O
- 1  $\mu$ l T7Select UP začetni oligonukleotid (5  $\mu$ M)
- 1  $\mu$ l T7Select DOWN začetni oligonukleotid (5  $\mu$ M)
- 12,5  $\mu$ l PCR Master Mix

Mikrocentrifugirke smo vstavili v ciklični termostaat in nastavili temperaturni program:

<i>čas trajanja</i>	<i>temperatura</i>	<i>stopnja</i>
5 min	94 °C	začetna denaturacija DNA
50 s	94 °C	denaturacija
1 min	50 °C	prileganje
1 min	72 °C	podaljševanje
6 min	72 °C	zaključno podaljševanje

35 ciklov

### 3.2.6 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PRODUKTOV VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO

Po pomnoževanju bakteriofagnega inserta z reakcijo PCR je bilo potrebno iz reakcijske zmesi odstraniti presežne deoksinukleotide in oligonukleotidne začetnike, ki bi lahko motili kasnejše določevanje nukleotidnega zaporedja. Komplet Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System temelji na sposobnosti DNA, da se v prisotnosti kaotropnih soli veže na silikagelno membrano (27), v okolju z nizko ionsko jakostjo pa od nje disociira.

Postopek:

1. Reakcijski zmesi PCR (S3-1, S3-3, S3-6, S3-13, S3-17, S3-19) smo dodali enake volumne (25  $\mu$ l) raztopine za vezavo na membrano (*Membrane Binding Solution*), ki vsebuje kaotropno sol gvanidinijev izotiocianat.
2. V zbiralne mikrocentrifugirke smo vstavili minikolone *SV Minicolumn*, to je stolpce s silikagelno membrano, ki omogočajo vezavo DNA.
3. Reakcijske zmesi PCR smo prenesli na minikolono in pri sobni temperaturi inkubirali 1 min.

4. Vsebine mikrocentrifugirk smo centrifugirali 1 min pri 14000 obr./min. S tem smo zmes v mikrocentrifugirki »potisnili« skozi membrano, DNA pa se je nanjo vezala. Minikolono smo po končanem centrifugiranju odstranili, tekočino iz mikrocentrifugirke zavrgli, nato pa vanjo ponovno namestili minikolono.
5. Sledilo je spiranje minikolon z dodatkom 700  $\mu$ l raztopine za spiranje (*Membrane Wash solution*), ki ji je bil predhodno dodan 95 % etanol. Ponovno smo vsebino mikrocentrifugirk centrifugirali (1 min, 14000 obr./min) in zatem izpraznili zbiralno mikrocentrifugirko. Spiranje smo ponovili s 500  $\mu$ l raztopine za spiranje, a tokrat smo čas centrifugiranja podaljšali (5 min, 14000 obr./min).
6. Zbiralno centrifugirko smo izpraznili, nato pa jo skupaj z minikolono centrifugirali 1 min, da smo popolnoma odstranili etanol.
7. Minikolono smo prenesli v čisto mikrocentrifugirko in nanjo previdno nanesti 50  $\mu$ l vode brez nukleaz. Inkubirali smo 1 min pri sobni temperaturi, nato pa centrifugirali (1 min, 14000 obr./min).
8. Minikolono smo zavrgli, vsebino mikrocentrifugirke, ki je vsebovala eluirano DNA, pa shranili pri -20 °C.

### **3.2.7 PREVERJANJE USPEŠNOSTI POMNOŽEVANJA IN IZOLACIJE INSERTOV BAKTERIOFAGOV T7 Z GELSKO ELEKTROFOREZO**

Agarozna gelska elektroforeza je metoda separacije nabitih bioloških makromolekul glede na njihovo velikost, naboj in konformacijo. Omogoča ločevanje fragmentov DNA, velikih od petdeset do nekaj deset tisoč baznih parov. Vzorec negativno nabite DNA v električnem polju potuje skozi pore agaroznega gela od negativno nabite katode proti pozitivno nabiti anodi, pri čemer je hitrost potovanja odvisna od velikosti fragmenta. Gelu je predhodno dodano fluorescentno barvilo etidijev bromid, ki nam omogoča vizualizacijo dvovertične DNA, ko po končani elektroforezi gel izpostavimo ultravijolični svetlobi. S to metodo smo preverili ustreznost poteka reakcije PCR ter izolacije produktov PCR.

V šestih mikrocentrifugirkah smo pripravili zmes za nanos na elektroforezni gel, ki je vsebovala:

- 2  $\mu\text{l}$  nanašalnega barvila za gelsko elektroforezo (bromfenol modro, ksilen cianol, glicerol), ki omogoča vizualno »sledenje« vzorcu DNA in poveča gostoto zmesi (lažji nanos)
- 5  $\mu\text{l}$  izolata produkta PCR (S3-1, S3-3, S3-6, S3-13, S3-17, S3-19)
- 5  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O

V eno mikrocentrifugirko pa smo odpipetirali 2  $\mu\text{l}$  nanašalnega barvila za gelsko elektroforezo, 8  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O in 2  $\mu\text{l}$  označevalca velikosti. Ta nam je pomagal oceniti velikost pomnoženih fragmentov DNA.

Vsebino vseh sedmih mikrocentrifugirk smo s pipeto prenesli v luknjice na agaroznem elektroforeznem gelu (3.1.6). Kadičko smo pokrili in jo priključili na vir napetosti. Elektroforeza je potekala približno 60 min, pri napetosti 100 V in konstantnem toku 75 mA.

### **3.2.8 MERJENJE KONCENTRACIJ DNA**

Koncentracijo izoliranega produkta PCR smo ocenili spektrofotometrično. Uporabili smo spektrofotometer NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000, katerega delovanje temelji na tehnologiji optičnih vlaken. Za določitev koncentracije smo potrebovali le eno kapljico (1  $\mu\text{l}$ ) vzorca, ki jo je spektrofotometer oblikoval v stolpec optimalne dolžine (0,5–1 mm) (29). Meritve smo izvajali pri valovni dolžini 260 nm, kjer je absorpcija ultravijolične svetlobe pri nukleinskih kislinah najvišja. Poleg tega smo beležili tudi kontaminacijo vzorcev s proteini – ker imajo ti absorpcijski maksimum pri valovni dolžini 280 nm, smo določali razmerje absorpcij  $A_{260}/A_{280}$ .

### **3.2.9 DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA INSERTOV V BAKTERIOFAGIH T7**

Določitev nukleotidnega zaporedja naših vzorcev je izvedla družba Eurofins MWG Operon, in sicer z metodo po Sangerju oziroma s t. i. dideoksi metodo. Ta je dobila ime zaradi ključne vloge dideoksinukleotidov (ddNTP), ki zaradi odsotnosti hidroksilne skupine na 3`-ogljikovem atomu deoksiriboze ob vgraditvi ustavijo podaljševanje verige DNA.

Nujne komponente reakcijske zmesi za določitev zaporedja DNA so poleg vzorčne DNA še vsi štirje deoksi- in dideoksinukleotidi, oligonukleotidni začetnik ter DNA-polimeraza. Postopek se začne z vročinsko denaturacijo dvojne vijačnice. Oligonukleotidni začetnik (T7Select UP) v reakcijski zmesi se nato veže na komplementarno zaporedje matrične DNA in ob prisotnosti DNA-polimeraze se začne sinteza komplementarne verige. Dokler se v podaljševanje vključujejo le dNTP, poteka sinteza verige nemoteno, ko pa se vgradi ddNTP, se elongacija ustavi zaradi nezmožnosti tvorbe fosfodiesterne vezi z naslednjim nukleotidom.

Vsak izmed štirih ddNTP je označen s svojim fluorescentnim barvilom, ki emitira svetlobo specifične valovne dolžine. Ko s kapilarno elektroforezo ločimo fragmente glede na njihovo dolžino, lahko tako po osvetlitvi z laserskim žarkom razberemo zaporedje DNA s pomočjo fluorescenčnega detektorja (31).

### **3.2.10 PRIPRAVA POSAMEZNIH BAKTERIJSKIH KOLONIJ *E. coli* K12 ER2738**

Trajna kultura bakterij je bila shranjena v tekočem gojišču LB s 25 % (v/v) glicerola pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dve petrijevki s trdnim gojiščem LB-agar smo ogreli na sobno temperaturo in ju v aseptičnih pogojih s spatulo po Drigalskem premazali s 100  $\mu\text{l}$  raztopine tetraciklina, koncentracije 4 mg/ml. Zamrznjeno trajno kulturo smo odtalili in redčili s tekočim gojiščem LB v razmerju 1 :  $10^6$ . 50  $\mu\text{l}$  te redčene kulture smo s spatulo po Drigalskem razmazali po obeh trdnih gojiščih. Petrijevki smo zaprli, obrnili tako, da je bilo gojišče zgoraj, in ju preko noči inkubirali pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Kolonije, ki so se razvile iz zamrznjene trajne kulture, smo hranili pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  in jih uporabljali v obdobju enega meseca.

### **3.2.11 AFINITETNA SELEKCIJA BAKTERIOFAGOV IZ PEPTIDNOPREDSTAVITVENE KNJIŽNICE Ph.D.-C7C™**

#### **3.2.11.1 Prva selekcijska stopnja**

##### Priprava knjižnice za nanos

Osnovna knjižnica je vsebovala približno  $2 \times 10^{13}$  bakteriofagov/ml, njena ocenjena raznolikost pa znaša  $1,2 \times 10^9$  primarnih klonov (17). Ker smo želeli v prvo selekcijsko stopnjo vnesti približno 150 kopij vsakega klona, smo uporabili 10  $\mu\text{l}$  osnovne knjižnice ( $2 \times$

$10^{11}$  bakteriofagov). Temu volumnu smo dodali še 90  $\mu$ l PBS in tako dobili 100  $\mu$ l knjižnice, ki je vstopila v prvo selekcijsko stopnjo.

Stopnje, ki sledijo (*Izločitev bakteriofagov, ki se nespecifično vežejo na komponente mikrotitrne ploščice in blokirnega sredstva, Priprava mikrotitrskih ploščic za prvo afinitetno selekcijo (vezava proteina G; vezava tarčne molekule LepR-Fc; blokiranje nezasedene površine), Vezava knjižničnih bakteriofagov na LepR-c in Spiranje nevezanih bakteriofagov*), so enake kot pri delu s peptidnopredstavitveno knjižnico T7Select<sup>®</sup> hexamer in so opisane v podpoglavju 3.2.2.1.

#### *Elucija vezanih bakteriofagov*

Po spiranju smo v vdolbinico odpipetirali 100  $\mu$ l elucijskega pufru in ob rahlem stresanju (50 obr./min) mikrotitrsko ploščico inkubirali pri sobni temperaturi 10 min. Eluat smo s pipeto prenesli v mikrocentrifugirko z 20  $\mu$ l nevtralizacijskega pufru in premešali na vibracijskem mešalniku. 2  $\mu$ l prvega nepomnoženega eluata smo uporabili za mikrobiološko titracijo, ostalih 118  $\mu$ l pa smo prenesli v kulturo za pomnoževanje, pripravljeno po postopku, opisanem v poglavju 3.1.4.

#### *Pomnoževanje in izolacija eluata*

1. Eluat smo pomnoževali v 20 ml kulture za pomnoževanje. Bakteriofagi M13 se v bakterijskih gostiteljskih celicah pomnožujejo tako, da ne povzročajo njihove lize, temveč neprestano izstopajo skozi celično membrano. Po 4,5 h smo vsebino erlenmajerice prelili v centrifugirko volumna 50 ml in centrifugirali (4 °C, 10000 obr./min, 10 min).
2. Supernatant smo prelili v novo centrifugirko in ponovno centrifugirali pod enakimi pogoji. Supernatantu smo nato dodali 3,3 ml 20 % (w/v) PEG/2,5 M NaCl, dobro premešali na vibracijskem mešalniku in fage oborili preko noči pri 4 °C.
3. Oborino smo naslednji dan ločili od supernatanta s centrifugiranjem (4 °C, 10000 obr./min, 15 min), nato pa jo ponovno suspendirali v 1 ml PBS in prenesli v mikrocentrifugirko.
4. Sledilo je ponovno centrifugiranje (4 °C, 14000 obr./min, 5 min). Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko, mu dodali 170  $\mu$ l 20 % (w/v) PEG/2,5 M NaCl in 1 h inkubirali na ledu (ponovno obarjanje).

- Po centrifugiranju (4 °C, 10000 obr./min, 10 min) smo oborino ponovno suspendirali v 200 µl PBS, še enkrat hitro centrifugirali (4 °C, 14000 obr./min, 1 min) in supernatant (prvi pomnoženi eluat) prenesli v novo mikrocentrifugirko. 2 µl prvega pomnoženega eluata smo uporabili za mikrobiološko titracijo, ostalo pa shranili pri – 20 °C.

#### Mikrobiološka titracija

Mikrobiološka titracija bakteriofagov M13 je potekala nekoliko drugače od titracije bakteriofagov T7.

Postopek:

- S tekočim gojiščem LB smo pripravili ustrezne desetkratne redčitve eluatov, in sicer  $10^1$ ,  $10^2$  in  $10^3$  za nepomnožene in  $10^8$ ,  $10^9$  in  $10^{10}$  za pomnožene eluate.
- Petrijevke z gojiščem LB-agar smo vzeli iz hladilnika, jih ogreli na 37 °C ter premazali z raztopino LB/IPTG/X-Gal (3.1.4).
- V mikrovalovni pečici smo raztalili agarozno gojišče. Za vsako redčeno raztopino smo je nalili po 3 ml v sterilne centrifugirke volumna 10 ml. Do uporabe smo jih inkubirali pri 52 °C.
- V mikrocentrifugirke smo odpipetirali po 200 µl kulture za mikrobiološko titracijo (3.1.4). Tej kulturi smo zatem dodali po 10 µl vsake izmed redčenih raztopin eluata in vsebino premešali na vibracijskem mešalniku.
- Celotno vsebino mikrocentrifugirk smo s pipeto prenesli v segreto agarozno gojišče, hitro premešali na vibracijskem mešalniku in prelili na gojišče LB-agar. Ohlajena gojišča smo preko noči inkubirali pri 37 °C.
- Po inkubaciji smo prešteli majhne modre plake in s pomočjo faktorja redčenja izračunali približno vrednost števila bakteriofagov v eluatu.

Iz določenih vrednosti števila bakteriofagov v pomnoženem eluatu smo izračunali volumen pomnoženega eluata, ki smo ga vnesli v naslednjo selekcijsko stopnjo, in to z namenom vnosa enakega števila bakteriofagnih delcev v vsako stopnjo afinitetne selekcije.

#### **3.2.11.2 Druga selekcijska stopnja**

Iz vrednosti, dobljenih na osnovi mikrobiološke titracije, smo preračunali, da moramo v drugo selekcijsko stopnjo vnesti 10 µl prvega pomnoženega eluata, če želimo ohraniti približno enako število fagov. Temu volumnu smo dodali še 90 µl 0,1 % PBST in tako dobili 100 µl redčenega prvega pomnoženega eluata, ki je vstopil v drugo selekcijsko stopnjo.



Vse ostale korake smo izvedli na enak način kot v prvi selekcijski stopnji, a z dvema razlikama: (i) namesto proteina G smo vezali protein A v enakih koncentracijah (podobno kot pri afinitetni selekciji iz knjižnice T7Select<sup>®</sup> hexamer); (ii) nevezane bakteriofage smo spirali pri bolj zaostrenih pogojih, in sicer desetkrat po 5 min z 250 µl 0,5 % PBST in ne 0,1 % PBST.

### **3.2.11.3 Tretja selekcijska stopnja**

Iz vrednosti, dobljenih na osnovi mikrobiološke titracije, smo preračunali, da moramo v tretjo selekcijsko stopnjo vnesti 12,5 µl drugega pomnoženega eluata, če želimo ohraniti približno enako število bakteriofagov. Temu volumnu smo dodali še 87,5 µl 0,1 % PBST in tako dobili 100 µl redčenega drugega pomnoženega eluata, ki je vstopil v tretjo selekcijsko stopnjo.

Ostali koraki so potekali na enak način kot v drugi selekcijski stopnji, le da smo namesto proteina A zopet vezali protein G.

## **3.2.12 POMNOŽEVANJE IN IZOLACIJA POSAMEZNIH KLONOV M13**

Podobno kot v primeru bakteriofagov T7 (3.2.3) smo po zaključeni tretji selekcijski stopnji nekaj bakteriofagnih klonov pomnožili v gostiteljskem bakterijskem sevu. Kasneje smo ovrednotili njihovo afiniteto do LepR-Fc s testom ELISA.

### **3.2.12.1 Pomnoževanje iz plakov pobranih klonov tretjega nepomnoženega eluata**

1. Po 2 ml kulture za pomnoževanje bakteriofagov M13 (3.1.4) smo odpipetirali v epruvete volumna 12 ml.
2. Iz petrijevke, na kateri so se pomnožili bakteriofagni kloni tretjega nepomnoženega eluata, smo v LAF-komori s pipeto prenesli 15 plakov v kulture za pomnoževanje. Ob močnem stresanju (225 obr./min) smo bakteriofage pomnoževali 4,5 h pri 37 °C.
3. Vsebino epruвет smo prenesli v mikrocentrifugirke in centrifugirali (4 °C, 10000 obr./min, 10 min).
4. Supernatantu smo dodali 335 µl 20 % (w/v) PEG/2,5 M NaCl, dobro premešali na vibracijskem mešalniku in pustili obarjati preko noči pri 4 °C.
5. Naslednji dan smo oborino od supernatanta ločili s centrifugiranjem (4 °C, 10000 obr./min, 15 min) in jo ponovno suspendirali v 230 µl PBS.

### **3.2.12.2 Pomnoževanje dveh pomnoženih klonov z najvišjo afiniteto do leptinskega receptorja**

Na osnovi opravljenega ELISA testa (3.2.13.1) smo izbrali dva klon (Sc3-10, Sc3-11) z najvišjo afiniteto do LepR-Fc in ju pomnožili. Hkrati z njima smo pomnožili tudi kontrolni bakteriofag K4, predhodno izoliran iz knjižnice Ph.D.-C7C™, z visoko afiniteto do streptavidina (18).

Postopek:

1. Za vsak klon smo v erlenmajerici pripravili 40 ml kulture za pomnoževanje (3.1.4) in ji dodali 25 µl pomnoženih klonov v PBS (3.2.12.1). Ob močnem stresanju (250 obr./min) smo klone pomnoževali 4,5 h pri 37 °C.
2. Vsebino erlenmajeric smo prelili v centrifugirke in centrifugirali (4 °C, 10000 obr./min, 10 min).
3. Supernatant smo prenesli v centrifugirke s 6,7 ml 20 % (w/v) PEG-8000/2,5 M NaCl, intenzivno premešali in preko noči obarjali pri 4 °C.
4. Naslednji dan smo oborino od supernatanta ločili s centrifugiranjem (4 °C, 10000 obr./min, 15 min) in jo ponovno suspendirali v 1 ml PBS.
5. Po kratkem centrifugiranju (4 °C, 10000 obr./min, 5 min) smo supernatant prenesli v mikrocentrifugirke in mu dodali 167 µl 20 % (w/v) PEG-8000/2,5 M NaCl.
6. 1 h smo bakteriofage obarjali na ledu, nato pa jih poželi s centrifugiranjem (4 °C, 14000 obr./min, 10 min).
7. Oborino smo ponovno suspendirali v 200 µl PBS.

### **3.2.13 OCENA AFINITETE SELEKCIONIRANIH BAKTERIOFAGOV M13 DO LEPTINSKEGA RECEPTORJA S TESTOM ELISA**

#### **3.2.13.1 Test ELISA za 14 izbranih klonov tretjega nepomnoženega eluata**

Namen tega testa je bil izbor klonov, ki so do leptinskega receptorja izkazali najvišjo afiniteto (takih, pri katerih smo pri testu ELISA zabeležili najstrmejšo naraščanje absorbančnega signala po času). Najboljšim vezalcem smo kasneje določili nukleotidno zaporedje inserta, ki kodira površinski peptid, dva izmed njih pa smo uporabili še za natančnejše ovrednotenje njune afinitete s kvantitativnim testom ELISA.

Postopek:

1. V 15 vdolbinic smo odpipetirali 50  $\mu$ l raztopine LepR-Fc v karbonatnem pufru (pH 9,6), koncentracije 23  $\mu$ g/ml. V vdolbinice, ki so služile kot slepa kontrola, smo odpipetirali 50  $\mu$ l raztopine infliksimaba v karbonatnem pufru (pH 9,6), koncentracije 20  $\mu$ g/ml. V vdolbinico, ki je služila kot kontrola ustreznosti postopka, smo nanegli 50  $\mu$ l raztopine streptavidina v karbonatnem pufru (pH 9,6), koncentracije 50  $\mu$ g/ml. Raztopine smo vezali preko noči pri 4 °C.
2. Naslednji dan smo odstranili tekočino iz mikrotitrne ploščice in blokirali nezasedeno površino z 250  $\mu$ l 2 % blokirnega pufru ECL 1 h pri sobni temperaturi, ob rahlem stresanju (50 obr./min).
3. Ko smo odstranili blokirni pufer, smo v vdolbinice z LepR-Fc in infliksimabom nanegli 100  $\mu$ l vsakega posameznega pomnoženega klona v PBS (od Sc3-1 do Sc3-14), ki smo mu dodali 100  $\mu$ l 0,5 % blokirnega pufru ECL. V vdolbinico z vezanim streptavidinom smo odpipetirali enako količino pomnoženega klona K4 (z dokazano visoko afiniteto do streptavidina). Klone smo pri sobni temperaturi in rahlem stresanju (50 obr./min) vezali 1,5 h.
4. Sledilo je spiranje z 250  $\mu$ l 0,075 % PBST, in sicer trikrat po 5 min.
5. V vdolbinice smo odpipetirali 200  $\mu$ l raztopine monoklonskega protitelesa proti bakteriofagu M13, konjugiranega s HRP (anti-M13-Mab-HRP). Za nanos smo ga z 0,5 % blokirnim pufrom ECL redčili v razmerju 1 : 5000. Vezali smo ga 1 h ob rahlem stresanju (50 obr./min), in sicer pri sobni temperaturi.
6. Vdolinice smo spirali trikrat po 5 min z 250  $\mu$ l 0,075 % PBST.
7. V vse vdolbinice mikrotitrne ploščice smo z večkanalno pipeto nanegli po 200  $\mu$ l raztopine ABTS.
8. Kinetično merjenje absorbanca je potekalo na čitalcu mikrotitrskih ploščic Tecan GENios pri valovni dolžini 405 nm. Merili smo jo 1 h, meritve pa je čitalec izvedel vsake 3 minute.

Preglednica III: *Razporeditev klonov M13 tretjega nepomnoženega eluata na mikrotitrski ploščici.*

	1	2	3	4
<b>A</b>	Sc3-1	Sc3-1	Sc3-9	Sc3-9
<b>B</b>	Sc3-2	Sc3-2	Sc3-10	Sc3-10
<b>C</b>	Sc3-3	Sc3-3	Sc3-11	Sc3-11
<b>D</b>	Sc3-4	Sc3-4	Sc3-12	Sc3-12
<b>E</b>	Sc3-5	Sc3-5	Sc3-13	Sc3-13
<b>F</b>	Sc3-6	Sc3-6	Sc3-14	Sc3-14
<b>G</b>	Sc3-7	Sc3-7	/	/
<b>H</b>	Sc3-8	Sc3-8	K4	K4

	raztopina LepR-Fc v karbonatnem pufru (c = 23 µg/ml)
	raztopina infliksimaba v karbonatnem pufru (c = 20 µg/ml)
	raztopina streptavidina v karbonatnem pufru (c = 50 µg/ml)

### 3.2.13.2 Kvantitativna ELISA dveh klonov z najvišjo afiniteto do LepR-Fc

Na osnovi rezultatov prvega testa ELISA smo izmed 14 klonov izbrali dva, ki sta izkazovala najvišjo afiniteto do leptinskega receptorja (Sc3-10, Sc3-11) in ju pomnožili (3.2.12.2). Z mikrobiološko titracijo (3.2.11.1) smo določili njun titer in titer kontrolnega bakteriofaga K4.

Za čim boljše ovrednotenje afinitete klonov Sc3-10 in Sc3-11 smo izvedli test ELISA z različnimi redčitvami raztopin obeh pomnoženih klonov.

Postopek:

1. V vdolbinice mikrotitrne ploščice smo odpipetirali po 50 µl raztopine LepR-Fc v PBS (25 µg/ml), za slepo kontrolo pa 50 µl raztopine infliksimaba v PBS (20 µg/ml). V eno vdolbinico smo nanesti še 50 µl raztopine streptavidina v PBS, koncentracije 50 µg/ml. Raztopine smo vezali pri 4 °C preko noči.
2. Iz vdolbinic smo odstranili tekočino in vanje odpipetirali po 330 µl 2 % blokirnega pufru ECL. Ob rahlem stresanju (50 obr./min) smo nezasedeno površino blokirali 1,5 h pri sobni temperaturi.

3. Medtem smo pripravili redčitve bakteriofagnih klonov Sc3-10, Sc3-11 in K4. Raztopine pomnoženih bakteriofagov smo redčili s PBS in 1 % blokirnim pufrom ECL, tako da smo dobili tri različne koncentracije klonov Sc3-10 in Sc3-11:  $2 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{10}$  in  $1 \times 10^{10}$  pfu:

	<i>bakteriofagi v PBS</i>	<i>PBS</i>	<i>1 % blokirni puffer ECL</i>	<i>koncentracija (pfu)</i>
<b>Sc3-10</b>	33,3 µl	66,7 µl	110 µl	$2 \times 10^{11}$
	8,3 µl	91,7 µl	110 µl	$5 \times 10^{10}$
	1,7 µl	98,3 µl	110 µl	$1 \times 10^{10}$
<b>Sc3-11</b>	18,2 µl	81,8 µl	110 µl	$2 \times 10^{11}$
	4,6 µl	95,4 µl	110 µl	$5 \times 10^{10}$
	0,9 µl	99,1 µl	110 µl	$1 \times 10^{10}$
<b>K4</b>	5,7 µl	94,3 µl	110 µl	$2 \times 10^{11}$
/	/	100 µl	110 µl	<b>0</b>

4. Iz mikrotitrne ploščice smo odstranili tekočino in vanjo odpipetirali raztopine bakteriofagov (200 µl/vdolbinico). Vezali smo jih 2 h ob rahlem stresanju (50 obr./min) pri sobni temperaturi.
5. Mikrotitrsko ploščico smo sprali trikrat po 5 min z 250 µl 0,1 % PBST.
6. Nanesli smo 200 µl anti-M13-Mab-HRP v 2 % blokirnem pufu ECL. Protitelo smo redčili v razmerju 1:5000 in ga vezali 1 h ob rahlem stresanju (50 obr./min) pri sobni temperaturi.
7. Mikrotitrsko ploščico smo sprali trikrat po 5 min z 250 µl 0,1 % PBST.
8. V vse vdolbinice mikrotitrne ploščice smo z večkanalno pipeto nanesli po 200 µl raztopine ABTS.
9. Kinetično merjenje absorbance je potekalo na čitalcu mikrotitrskih ploščic Tecan GENios pri valovni dolžini 405 nm. Merili smo jo 1 h, meritve pa je čitalec izvedel vsaki 2 minuti.

Preglednica IV: *Razporeditev redčenih raztopin klonov Sc3-10 in Sc3-11 ter kontrolnega klona K4.*

	1	2
<b>A</b>	Sc3-10 $2 \times 10^{11}$	Sc3-10 $2 \times 10^{11}$
<b>B</b>	Sc3-10 $5 \times 10^{10}$	Sc3-10 $5 \times 10^{10}$
<b>C</b>	Sc3-10 $1 \times 10^{10}$	Sc3-10 $1 \times 10^{10}$
<b>D</b>	Sc3-11 $2 \times 10^{11}$	Sc3-11 $2 \times 10^{11}$
<b>E</b>	Sc3-11 $5 \times 10^{10}$	Sc3-11 $5 \times 10^{10}$
<b>F</b>	Sc3-11 $1 \times 10^{10}$	Sc3-11 $1 \times 10^{10}$
<b>G</b>	/	/
<b>H</b>	K4 $2 \times 10^{11}$	K4 $2 \times 10^{11}$

	raztopina LepR-Fc v karbonatnem pufru (c = 23 µg/ml)
	raztopina infliksimaba v karbonatnem pufru (c = 20 µg/ml)
	raztopina streptavidina v karbonatnem pufru (c = 50 µg/ml)

### 3.2.14 IZOLACIJA GENOMSKE DNA BAKTERIOFAGOV M13

Izolacijo DNA iz bakteriofagov smo izvajali z metodo obarjanja z absolutnim etanolom. V prisotnosti kaotropnih ionov (I<sup>-</sup>) se sprva poruši integriteta fagne kapside. Po dodatku etanola pride zaradi polarnosti molekule DNA in nizke dielektrične konstante medija do tvorbe ionskih vezi med fosfatnimi skupinami DNA in pozitivno nabitimi (natrijevimi) ioni v raztopini. Posledica tega je obarjanje nukleinskih kislin iz raztopine.

Postopek:

1. 25 µl pomnoženih klonov v PBS smo v mikrocentrifugirkah redčili do volumna 250 µl s tekočim gojiščem LB.
2. Dodali smo 100 µl 20 % (w/v) PEG-8000/2,5 M NaCl, premešali in postavili na led (20 min).
3. Oborino smo ločili od supernatanta s centrifugiranjem (10000 obr./min, 10 min) in fage ponovno suspendirali v 100 µl jodidnega pufra (pH 8). Vsebino smo dobro premešali na vibracijskem mešalniku, dodali še 250 µl absolutnega etanola in ponovno premešali.

4. Mikrocentrifugirke smo inkubirali 10 min pri sobni temperaturi in jih nato centrifugirali (14000 obr./min, 10 min). Supernatant smo hitro in previdno odstranili s pipeto, oborino pa ponovno suspendirali v 400  $\mu$ l 70 % etanola.
5. Ko smo vsebino dobro premešali, je sledilo ponovno centrifugiranje (14000 obr./min, 5 min).
6. Supernatant smo odstranili s pipeto, oborino pa posušili pri 37 °C.

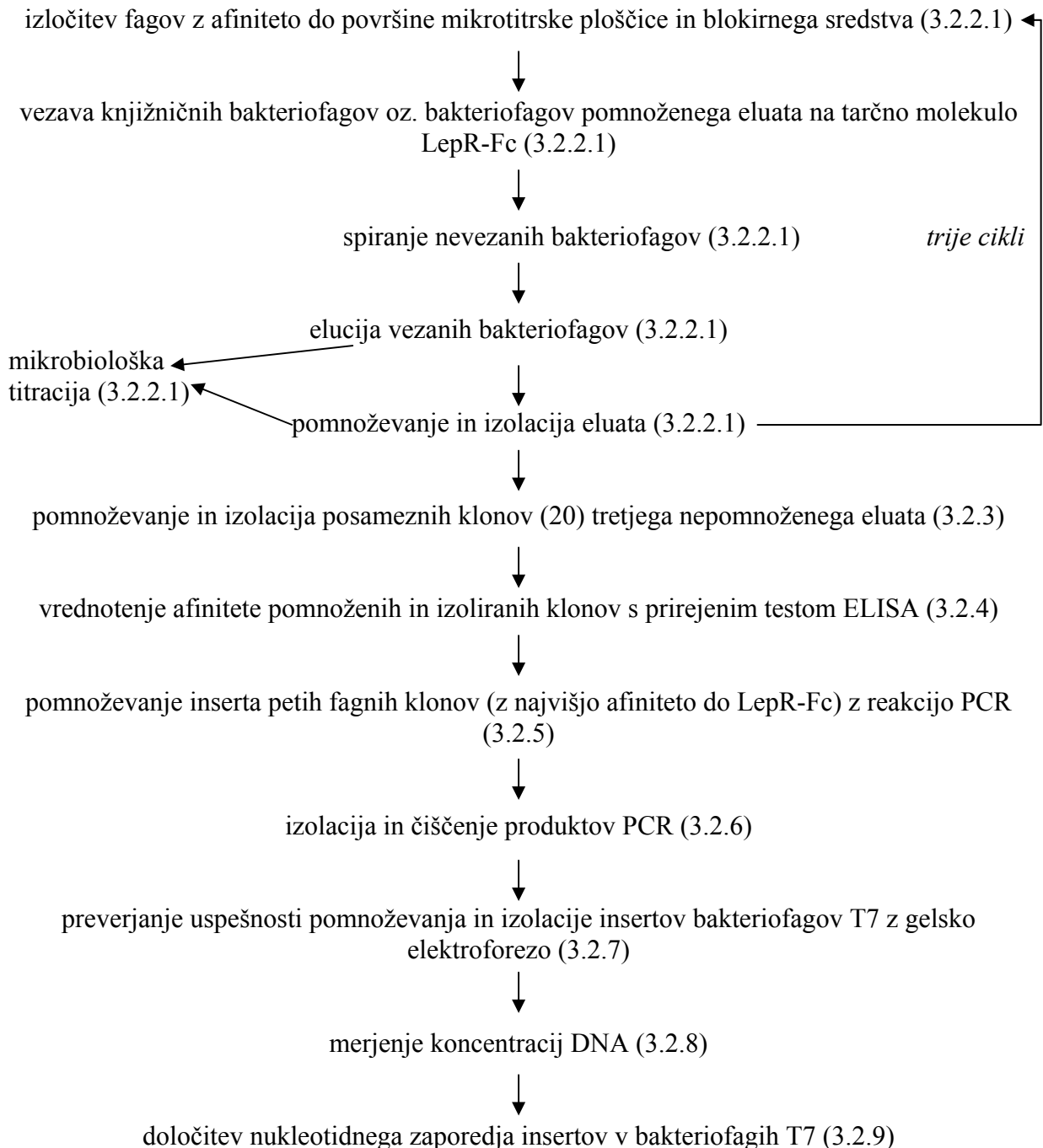
### **3.2.15 DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA INSERTOV V BAKTERIOFAGIH M13**

Kot pri bakteriofagih T7 je tudi določevanje nukleotidnega zaporedja insertov v bakteriofagih M13 izvajala družba Eurofins MWG Operon z dideoksi metodo (3.2.9). Uporabljen začetni oligonukleotid je bil standardni začetnik -96 gIII (Eurofins MWG Operon).

## IV. POVZETEK EKSPERIMENTALNEGA DELA

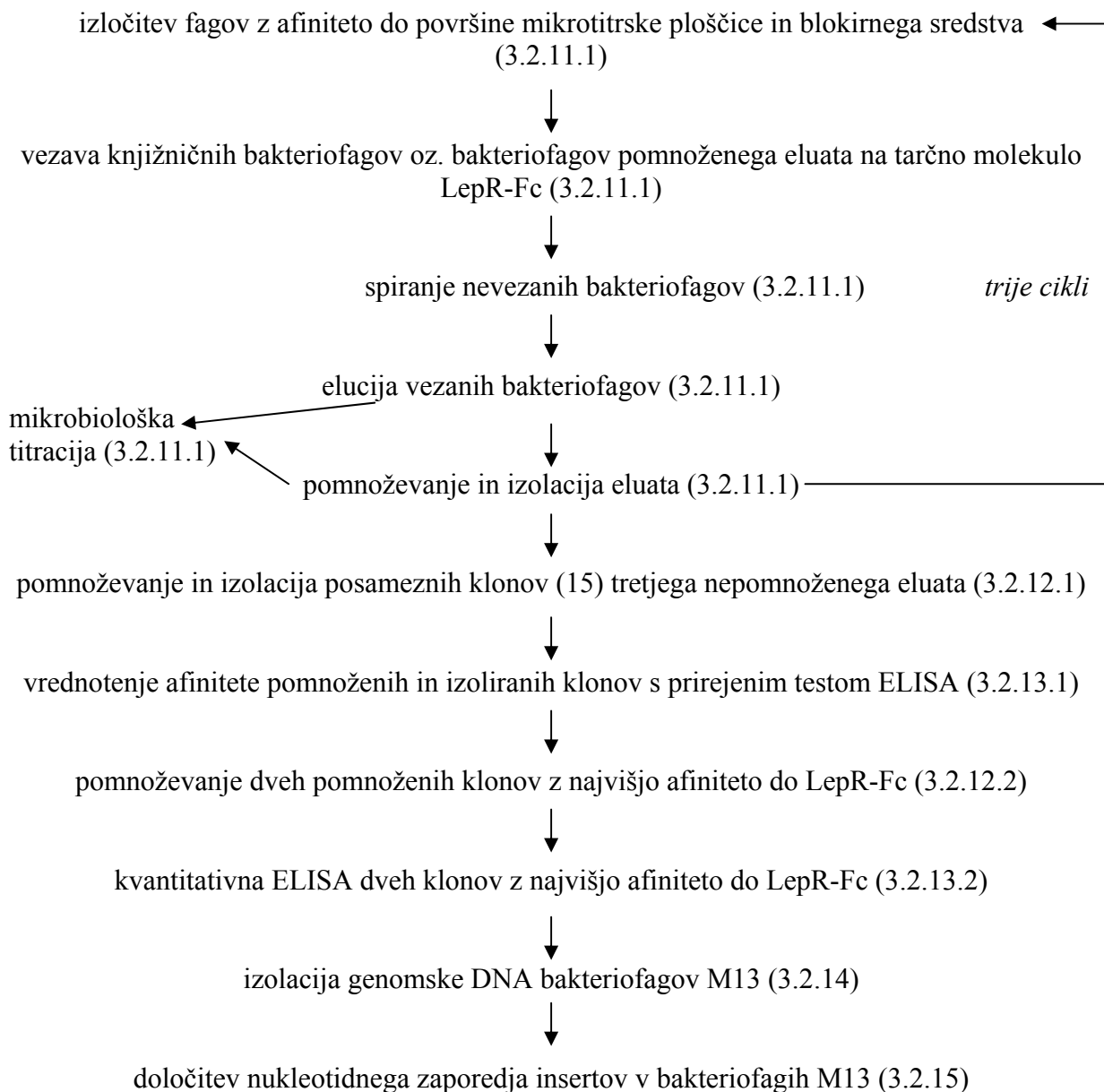
Točki 4.1 in 4.2 shematsko prikazujeta zaporedje uporabljenih metod našega diplomskega dela.

### 4.1 AFINITETNA SELEKCIJA IZ KNJIŽNICE T7Select®-hexamer





## 4.2 AFINITETNA SELEKCIJA IZ KNJIŽNICE Ph.D.-C7C™



## V. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 AFINITETNA SELEKCIJA PEPTIDOV, PREDSTAVLJENIH NA BAKTERIOFAGIH T7

#### 5.1.1 REZULTATI MIKROBIOLOŠKIH TITRACIJ

Iz knjižnice peptidov, predstavljenih na bakteriofagih T7, smo skušali izolirati tiste klone, ki bi izkazovali afiniteto do leptinskega receptorja. Izvedli smo tri stopnje afinitetne selekcije in uspešnost na vsaki stopnji ocenili z mikrobiološko titracijo. Rezultati te metode so nam pomagali pri:

(a) *določitvi števila bakteriofagov v nepomnoženih eluatih (NE) in titra bakteriofagov v pomnoženih eluatih (PE);*

(b) *izračunu volumna pomnoženega eluata, ki je vstopil v naslednjo selekcijsko stopnjo;*

V vsako selekcijsko stopnjo smo vnesli približno enako število bakteriofagov ( $\sim 5 \times 10^9$  pfu).

(c) *izračunu odstotka elucije pri posamezni selekcijski stopnji;*

Gre za razmerje med številom bakteriofagov v nepomnoženem eluatu in številom vseh bakteriofagov, ki so vstopili v selekcijo. Če v predhodni selekcijski stopnji uspešno ohranimo klone, ki se vežejo na tarčno molekulo, pričakujemo, da bo odstotek elucije v naslednji selekcijski stopnji narasel.

Na agarnem gojišču, uporabljenem za mikrobiološko titracijo, so se razvili prozorni plaki (področja na bakterijskem travniku, kjer je prišlo do lize celic). Število plakov smo prešteli in z upoštevanjem koeficienta redčitve bakteriofagov v eluatih izračunali prej navedene parametre. Ti so zbrani v preglednicah V, VI in VII.

Preglednica V: Izračun števila bakteriofagov v NE in titrov bakteriofagov v PE pri selekciji iz knjižnice T7Select-heksamer.

	<i>število plakov</i>	<i>redčitev</i>	<i>št. bakteriofagov v eluatu oziroma titer eluata</i>
<i>aliquot knjižnice*</i>	221	$10^7$	$2,2 \times 10^9$ pfu/0,1 ml $\times$ 0,1 ml = <b><math>2,2 \times 10^9</math> bakteriofagov</b>
<i>1. NE</i>	17	$10^2$	$1,7 \times 10^3$ bakteriofagov $\times$ 10 = <b><math>1,7 \times 10^4</math> bakteriofagov</b>
<i>1. PE</i>	200	$10^8$	$2,0 \times 10^{10}$ pfu/0,1 ml = <b><math>2,0 \times 10^{11}</math> pfu/ml</b>
<i>2. NE</i>	28	$10^2$	$2,8 \times 10^3$ bakteriofagov $\times$ 10 = <b><math>2,8 \times 10^4</math> bakteriofagov</b>
<i>2. PE</i>	331	$10^8$	$3,3 \times 10^{10}$ pfu/0,1 ml = <b><math>3,3 \times 10^{11}</math> pfu/ml</b>
<i>3. NE</i>	40	$10^2$	$4,0 \times 10^3$ bakteriofagov $\times$ 10 = <b><math>4,0 \times 10^4</math> bakteriofagov</b>

\*Mikrobiološko titracijo redčene knjižnice smo opravili, potem ko smo jo preko noči inkubirali pri 4 °C v blokirani mikrotitrski ploščici. Zato je število bakteriofagov v njej nižje od predvidenega začetnega vnosa bakteriofagov v prvo selekcijsko stopnjo (ki je  $7,5 \times 10^9$ ).

Preglednica VI: Izračun volumnov pomnoženih eluatov za vnos v naslednjo selekcijsko stopnjo (pri izračunu smo upoštevali željo v vsako selekcijsko stopnjo vnesti  $5 \times 10^9$  bakteriofagov).

	<i>volumen PE za vnos v naslednjo selekcijsko stopnjo</i>
<i>2. selekcijska stopnja</i>	$V = 5 \times 10^9$ pfu / ( $2,0 \times 10^{11}$ pfu/ml) = <b>25 <math>\mu</math>l</b>
<i>3. selekcijska stopnja</i>	$V = 5 \times 10^9$ pfu / ( $3,3 \times 10^{11}$ pfu/ml) = <b>15 <math>\mu</math>l</b>

Preglednica VII: Izračun odstotkov elucije posameznih selekcijskih stopenj.

<i>vnos s knjižnico</i>	$7,5 \times 10^{10}$ pfu/ml $\times$ 0,100 ml = $7,5 \times 10^9$ pfu
<i>izplen 1. NE</i>	$1,7 \times 10^5$ pfu/ml $\times$ 0,150 ml = $2,6 \times 10^4$ pfu
<b><i>odstotek elucije</i></b>	% elucije = ( $2,6 \times 10^4$ pfu / ( $7,5 \times 10^9$ pfu)) $\times$ 100% = <b><math>3,5 \times 10^{-4}</math> %</b>
<i>vnos s 1. PE</i>	$2,0 \times 10^{11}$ pfu/ml $\times$ 0,025 ml = $5,0 \times 10^9$ pfu
<i>izplen 2. NE</i>	$2,8 \times 10^5$ pfu/ml $\times$ 0,150 ml = $4,2 \times 10^4$ pfu
<b><i>odstotek elucije</i></b>	% elucije = ( $4,2 \times 10^4$ pfu / ( $5,0 \times 10^9$ pfu)) $\times$ 100% = <b><math>8,4 \times 10^{-4}</math> %</b>
<i>vnos z 2. PE</i>	$3,3 \times 10^{11}$ pfu/ml $\times$ 0,015 ml = $5,0 \times 10^9$ pfu
<i>izplen 3. NE</i>	$4,0 \times 10^5$ pfu/ml $\times$ 0,150 ml = $6,0 \times 10^4$ pfu
<b><i>odstotek elucije</i></b>	% elucije = ( $6,0 \times 10^4$ pfu / ( $5,0 \times 10^9$ pfu)) $\times$ 100% = <b><math>1,2 \times 10^{-3}</math> %</b>

Število fagov, ki se ohranijo po prvi in drugi eluciji, je praviloma nizko, in sicer med  $10^3$  in  $10^6$  pred pomnoževanjem (19). Izmed vseh  $1,5 \times 10^7$  različnih primarnih klonov jih bo namreč le majhen delež izkazoval dovolj visoko afiniteto do tarčne molekule, da kljub spiranju od nje ne bo disociiral. Vendar pa naj bi po treh selekcijskih stopnjah zaradi obogatitve visoko afinitetnih klonov izplen že presegal  $10^6$  bakteriofagov (19).

V našem primeru sicer izplena začetnih dveh stopenj znašata  $2,6 \times 10^4$  in  $4,2 \times 10^4$  bakteriofagov, vendar pa vrednost v tretji selekcijski stopnji naraste le minimalno ( $6,0 \times 10^4$ ). Odstotek elucije se tako v drugi selekcijski stopnji poveča samo 2,4-krat, a je potrebno upoštevati, da smo pogoje selekcije v primerjavi s prvo selekcijsko stopnjo zaostriili. Zmanjšali smo množino tarčne molekule (leptinskega receptorja), skrajšali čas vezave bakteriofagov na tarčno molekulo in podaljšali spiranje nevezanih bakteriofagov. Glede na to, da so pogoji v tretji selekcijski stopnji ostali nespremenjeni, pa bi pričakovali nekoliko večji porast odstotka elucije v primerjavi z drugo stopnjo. Povečal se je le za 1,4-krat. Iz literaturnih podatkov (18) vidimo, da se pri uspešni afinitetni selekciji število eluiranih bakteriofagov poveča od 50- do 100-krat v vsaki selekcijski stopnji, kar lahko privede tudi do  $10^6$ -kratne obogatitve visokoafinitetnih klonov.

Pri naši selekciji se je odstotek elucije v vsaki stopnji sicer povečal, a je prirastek relativno majhen. To dejstvo nakazuje na ohranitev zgolj nizkoafinitetnih vezalcev na leptinski receptor iz izhodne knjižnice. Izguba potencialno najboljših vezalcev v prvi selekcijski stopnji je pogosta težava pri presejanju bakteriofagnih predstavitenih knjižnic, saj je takrat tarčni molekuli praviloma izpostavljenih le nizko število kopij vsakega knjižničnega bakteriofaga (v našem primeru približno 500). V nadaljnjih stopnjah, ko so vsi eluirani kloni prisotni v več deset- ali stotisočih kopijah, je tovrstna nevarnost zanemarljiva. Manj verjetna razlaga je, da že v izhodni bakteriofagni knjižnici kloni s predstavljenimi visokoafinitetnimi peptidi sploh niso prisotni. Obstaja pa možnost, da smo določene visokoafinitetne klone izločili v prvem koraku selekcije, ko smo peptidopredstavitevno knjižnico preko noči inkubirali v blokirani mikrotitrski ploščici z namenom, da se znebimo vezalcev polistirenske površine vdolbinice in blokirnega pufra. To so najverjetneje kloni, katerih površinski peptidi imajo visoko vsebnost aromatskih, alifatskih in bazičnih aminokislin (34, 35). Glede na to, da smo s tem korakom izločili kar 71 % začetnega števila bakteriofagov (od  $7,5 \times 10^9$  se jih je ohranilo le  $2,2 \times 10^9$ ), lahko upravičeno sklepamo, da se znotraj te populacije klonov nahajajo tudi morebitni za LepR-Fc visokoafinitetni kloni.

## 5.1.2 TESTA ELISA

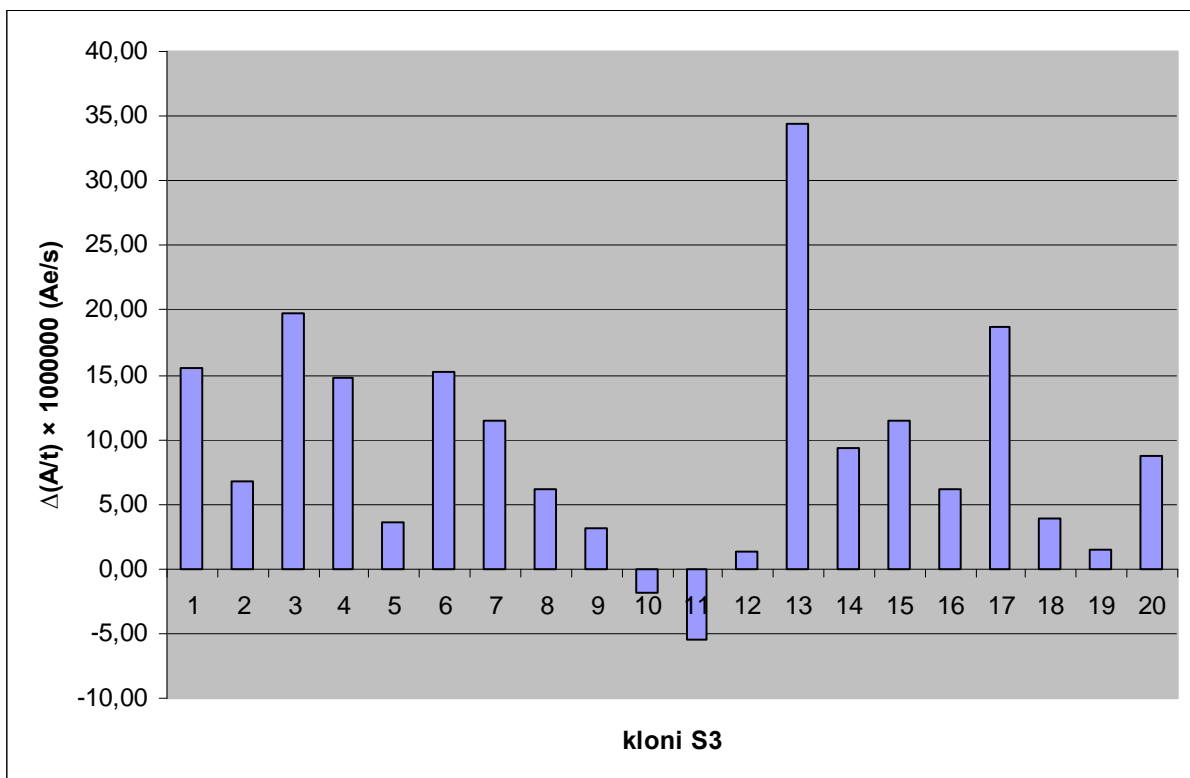
### 5.1.2.1 Inverzna ELISA vseh (20) izbranih klonov

Ker je šlo za inverzni test ELISA, na mikrotitrski ploščici nismo imobilizirali tarčne molekule, pač pa bakteriofagne klone, na katere smo potem vezali leptinski receptor v raztopini. S tem smo se izognili morebitni delni denaturaciji ali spremembi strukture tarčne molekule ob njeni adsorpciji na površino polistirenske mikrotitrne ploščice. Glavna prednost te prirejene metode pred »klasično« pa je ojačitev signala, ki je posledica nizkoafinitetnih interakcij med bakteriofagnimi kloni in leptinskim receptorjem. Z inkubacijo raztopine LepR-Fc nad imobiliziranimi kloni smo namreč pomaknili ravnotežje reakcije v smeri nastanka produkta (kompleksa klon – LepR-Fc), saj je bil reaktant v raztopini (LepR-Fc) v prebitku. Nasprotno je primerljivo visoke titre bakteriofagov nemogoče doseči. S hrenovo peroksidazo konjugirano protitelo, usmerjeno proti humani Fc-regiji, se je nato vezalo na LepR-Fc, temu pa je sledila detekcija s kromogenim substratom. Hrenova peroksidaza katalizira oksidacijo ABTS v prisotnosti  $H_2O_2$  do zeleno obarvanega produkta. Merili smo absorbanco nastalega produkta  $ABTS^+$  pri 405 nm.

Meritve smo izvajali po načelu kinetičnega in ne klasičnega (angl. *endpoint*) ELISA-testa. Prednosti takšnega pristopa so številne: reakcije nastanka obarvanega produkta ni potrebno zaustaviti z dodatkom »dušilca« po točno določenem času, nesimultano dodajanje substrata v vdolbinice in razlike v količini dodanega substrata pa ne vplivajo na meritev (32, 33). Ker smo absorbanco merili kinetično (na tri minute), nas niso zanimale absolutne vrednosti absorbanc ob določenem času, pač pa naraščanje absorbance v odvisnosti od časa (naklon krivulje  $A(t)$ ). Naklon smo določili v začetnem (linearnem) območju, kjer je bila hitrost encimske reakcije maksimalna ( $v_{max}$ ) in je nastajanje produkta potekalo s kinetiko ničtega reda. Zato smo izbrali meritve znotraj območja med 3. in 39. minuto. Krivulja doseže v kasnejših časovnih točkah plato, medtem ko na samem začetku še ni vzpostavljeno ravnotežje med asociacijo in disociacijo encima in substrata.

Kljub uporabi inverznega testa ELISA pa razmerja signalov *vzorec : slepa* niso zadovoljivo visoka. Povprečje signalov slepih vrednosti (to je vdolbinic brez vezanih bakteriofagov) je le 4,4-krat nižje od najvišjega odziva vzorca (klon S3-13), v dveh primerih (klona S3-10 in S3-11) pa je celo višje od odzivov vzorcev. To ni posledica visokih slepih signalov, pač pa nizkih signalov vzorcev. Strmina krivulje  $A(t)$  oz. hitrost nastajanja obarvanega produkta je odvisna od števila kopij peptida, ki se izraža na površini virusa, od samega bakteriofagnega titra in pa od afinitete nekega klona do leptinskega receptorja. Če privzamemo, da je število kopij peptidov na vseh klonih zelo podobno (od 5 do 15 kopij na

bakteriofag) in da se tudi titri posameznih klonov med seboj bistveno ne razlikujejo (med pomnoževanjem smo vse klone izpostavili istim pogojem), potem lahko predpostavimo, da so razlike v naklonih posledice razlik v afiniteti peptidov do receptorja. Na osnovi izračunanih naklonov smo tako izbrali pet bakteriofagnih klonov, ki so pri testu ELISA dali najmočnejše odzive (tj. najbolj strmo naraščajoče naklone; kloni z oznakami S3-1, S3-3, S3-6, S3-13 in S3-17). Poleg teh petih klonov pa smo v dodatne teste ravno zaradi nizkega odziva vnesli tudi klon S3-19, ki nam je služil za primerjavo z višjeafinitetnimi fagi.



Slika 10: Nakloni krivulj  $A(t)$  posameznih klonov tretjega nepomnoženega eluata (S3-1–S3-20) med 3. in 39. minuto (vrednostim smo odšteli povprečje naklona slepih kontrol, to je vdolbinic brez bakteriofagov).

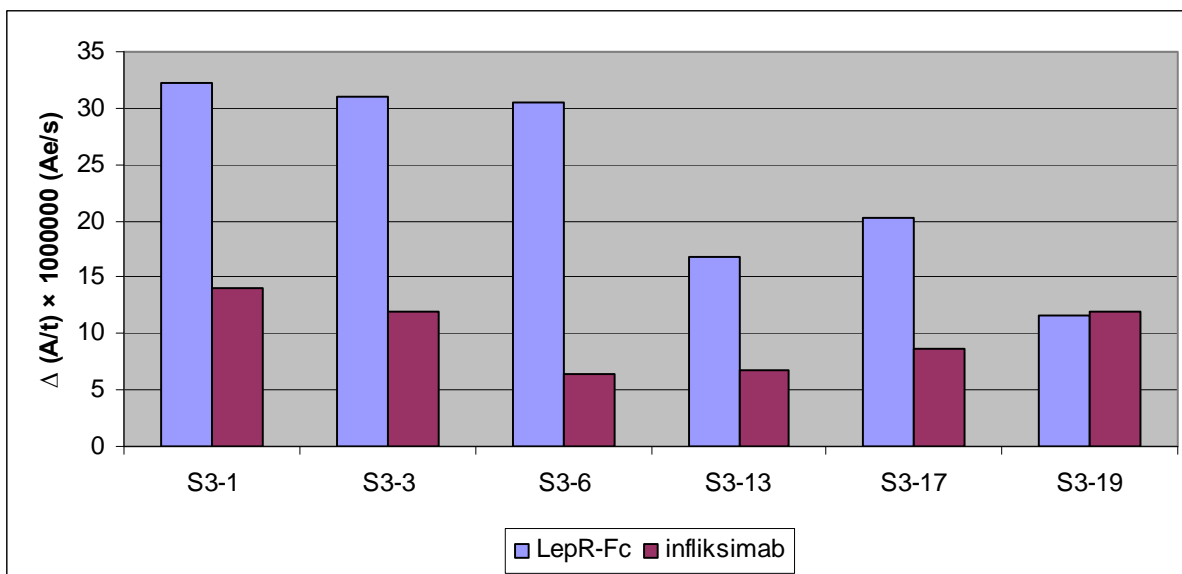
### 5.1.2.2 Inverzna ELISA petih klonov z najvišjo afiniteto do LepR-Fc

Šest izbranih klonov smo skušali natančneje preučiti. Zanimalo nas je predvsem, ali je njihova afiniteta posledica vezave na zunajcelično domeno leptinskega receptorja ali na Fc-regijo humanega imunoglobulina G v fuzijskem proteinu LepR-Fc. V ta namen smo na vsak imobiliziran klon vezali enkrat raztopino LepR-Fc in drugič infliksimab (humanizirano protitelo) ter oba odziva po dodatku konjugata anti-hFc/HRP in detekciji z ABTS med seboj primerjali.

Rezultati so pokazali, da je afiniteta vseh petih klonov do LepR-Fc sicer večja, a vezava na infliksimab vseeno ni zanemarljiva. Naklon krivulje  $A(t)$  pri vezavi na infliksimab namreč predstavlja tudi do 44 % naklona vezave na LepR-Fc (klon S3-1). Menimo, da to ni posledica vezave na Fc-regijo, saj bi bila v tem primeru oba naklona približno enaka (koncentraciji LepR-Fc in infliksimaba, uporabljeni pri inverznem testu ELISA, sta bili enaki (3.2.4.2)). Verjetnejša je razlaga, da pride do nespecifičnih interakcij med izraženimi peptidi in infliksimabom.

Uporabili smo tudi klon (S3-19), ki je že v prvem ELISA-testu izkazoval nižjo afiniteto do LepR-Fc. Njegov odziv pri vezavi na LepR-Fc je bil povsem primerljiv odzivu pri vezavi na infliksimab, na podlagi česar sklepamo, da se je verjetno vezal na Fc-regijo tarčnih molekul.

Zanimiv je tudi podatek, da dajejo kloni (primerjalno) različno visoke odzive v obeh ELISA-testih. V prvem testu (5.1.2.1) po velikosti naklona izstopa klon S3-13, ki mu sledita klona S3-3 in S3-17, medtem ko dajeta v drugem ELISA-testu klona S3-13 in S3-17 glede na ostale tri višjeafinitetne klone najnižja signala. To neujemanje ni tako presenetljivo, če upoštevamo, da je velikost vseh odzivov naših klonov izredno nizka. Majhna napaka v izmerjeni absorbanci (napaka instrumenta) tako privede do relativno velike spremembe odziva (to je naklona  $A(t)$ ). Zaradi ne povsem enakih pogojev merjenja pri dveh različnih ELISA-testih in odsotnosti več paralelk posameznega klona (iz katerih bi lahko izračunali povprečje odziva) rezultati dveh testov med seboj niso primerljivi.

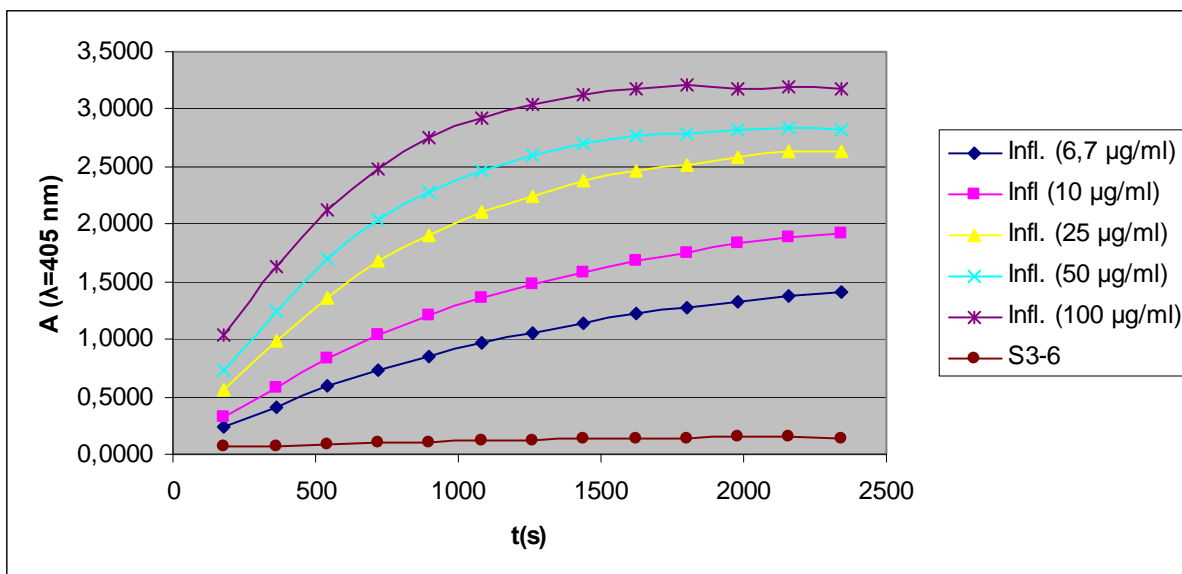


Slika 11: Primerjava naklonov krivulj  $A(t)$  med 3. in 39. minuto, ko smo na izbrane klone vezali LepR-Fc in ko smo nanje vezali infliksimab (vrednostim smo odšteli povprečje naklona slepih kontrol).

Da odziv res narašča z večanjem koncentracije vezane tarčne molekule, smo dokazali s pozitivnimi kontrolami, to je z raztopinami infliksimaba, ki smo jih adsorbirali neposredno na mikrotitrsko ploščico. S tem smo potrdili ustreznost testa, lahko pa smo odzive kontrol tudi primerjali z odzivi inverznega testa ELISA. Za primerjavo smo izbrali klon, ki je izkazal najboljše lastnosti, to je visoko afiniteto do LepR-Fc in nizko afiniteto do infliksimaba (klon S3-6). Koncentracija raztopine LepR-Fc, ki smo jo nanegli na imobilizirane klone, je znašala 25  $\mu\text{g/ml}$ . Pri raztopini infliksimaba enake koncentracije je naklon  $A(t)$  tridesetkrat višji od naklona pri klonu S3-6 (ko smo nanj vezali LepR-Fc).

Razlika v naklonih je pričakovana, saj je potrebno upoštevati, da smo infliksimab iz raztopin neposredno adsorbirali na površino mikrotitrsko ploščice (adsorpcija je praktično ireverzibilna) in ga detektirali z visokoafinitetnimi protitelesi, konjugiranimi s HRP. Pri detekciji bakteriofagnih klonov pa smo na mikrotitrsko ploščico najprej vezali le-te, na njih nanegli raztopino LepR-Fc oz. infliksimaba (interakcija med njimi je nizkoafinitetna) in šele v tretjem koraku konjugat anti-hFc/HRP. Ker je bila koncentracija bakteriofagov med adsorpcijo  $\sim 10^{11}$  pfu/ml (oz. približno 0,2 nM in torej  $\sim 10^3\times$  nižja od koncentracije infliksimaba), je to pomenilo tudi precej manj vezavnih mest za LepR-Fc oz. infliksimab kot v primeru, ko smo tarčne molekule adsorbirali neposredno na površino mikrotitrsko ploščice.





Slika 12: Primerjava naraščanja absorbance v odvisnosti od časa pri pozitivnih kontrolah (raztopinah infliksimaba) in klonu S3-6 (ko nanj vežemo LepR-Fc).

### 5.1.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Rezultati obeh ELISA-testov so nam omogočili izbor šestih klonov, katerih nukleotidno zaporedje smo želeli določiti (pet klonov z najvišjo afiniteto do LepR-Fc in en nizkoafinitetni klon). Po 1 µl vsakega izmed klonov v PEB (3.2.3) smo zato vnesli v reakcijo PCR. Visoka temperatura *začetne denaturacije* (94 °C) je povzročila denaturacijo virusne kapside, znotraj nje pa tudi denaturacijo dvovijačne DNA. Oligonukleotidna začetnika T7SelectUP in T7SelectDOWN, dolga 19 nukleotidov, sta se na stopnji *prileganja* vezala na komplementarne segmente fagne DNA v območju z več mesti za kloniranje (angl.: *multiple cloning site*), znotraj katerega je kodiran tudi naključni heksapeptid. Cikel se je zaključil s fazo *podaljševanja* in se skupno ponovil 35-krat.

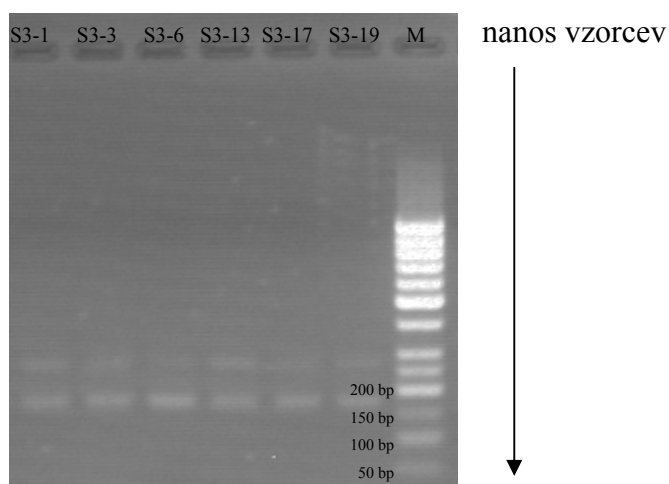
Produkte reakcije PCR smo izolirali in očistili z vezavo DNA na silikagelno membrano v prisotnosti kaotropnih soli (3.2.6). Uspešnost pomnoževanja inserta DNA smo nato preverili z gelsko elektroforezo (5.1.4) in določili koncentracijo izolirane DNA (5.1.5).

#### 5.1.4 REZULTATI GELSKE ELEKTROFOREZE

Po opravljeni elektroforezi smo gel presvetlili z UV-lučko za vizualizacijo produktov verižne reakcije s polimerazo (PCR). Med bazne pare dvojne vijačnice se je namreč vgradilo fluorescenčno barvilo etidijev bromid (EtBr), predhodno dodano agaroznemu gelu. Pri valovni dolžini 302 nm EtBr absorbira svetlobo in jo pri 590 nm emitira. Ker ima vezan na molekulo DNA večji izkoristek fluorescenčne svetlobe kot v prosti obliki, lahko fragmente dvoverižne DNA lociramo v gelu.

Označevalec velikosti je omogočil določitev velikosti fragmentov v produktih PCR. Če je pomnoževanje potekalo pravilno, smo pričakovali produkte velikosti 175 baznih parov, torej fragmente znotraj območja vezave oligonukleotidnih začetnikov T7Select UP in T7Select DOWN na genomu rekombinantnih bakteriofagov T7Select.

Na sliki 12 je razvidno, da je bilo vseh šest insertov iz izbranih bakteriofagnih klonov ustrezno pomnoženih, saj so povsod vidne lise velikostnega razreda med 150 in 200 baznimi pari.



Slika 12: Pod UV-lučko slikan elektroforezni gel po elektroforezi izbranih šestih klonov tretjega nepomnoženega eluata in označevalca velikosti (M).

### 5.1.5 DOLOČITEV KONCENTRACIJE PRODUKTOV PCR

Preglednica VIII: *Koncentracija DNA po pomnoževanju z reakcijo PCR in izolaciji s kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.*

<i>klon</i>	<i>koncentracija (ng/μl)</i>	<i>A<sub>260 nm</sub>/A<sub>280 nm</sub></i>
S3-1	40,7	1,83
S3-3	37,9	1,96
S3-6	41,0	1,76
S3-13	40,5	1,79
S3-17	40,5	1,92

Razmerje absorpcij pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm nam daje informacijo o kontaminaciji vzorca DNA s proteini. Pri ocenjevanju čistote vzorca DNA velja splošno pravilo, da za čisti vzorec velja tisti, ki ima razmerje  $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$  nad 1,8 (30). V našem primeru tem zahtevam ne ustrezata dva vzorca (S3-6 in S3-13). Pri pomnoževanju inserta DNA iz bakteriofagov smo namreč v reakcijo PCR vnesli bakteriofagne klonove v pufru PEB. Tako so se v PCR-produktu nahajali ostanki virusne kapside. S kompletom Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System smo PCR-produkte nato očistili (3.2.6), a se nismo povsem znebili vseh makromolekul, ki so se hkrati z DNA vezale na silikagelno membrano.

Odstopanja klonov S3-6 in S3-13 od 1,8 so majhna, zato proteini, prisotni v teh vzorcih niso motili določitve zaporedja heksapeptidov.

### 5.1.6 DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA INSERTOV V BAKTERIOFAGIH T7

Z dideoksi-metodo in oligonukleotidnim začetnikom T7Select UP je družba Eurofins MWG Operon določila nukleotidno zaporedje insertov izbranih bakteriofagnih klonov:

S3-1, S3-3, S3-6, S3-17    **Phe** - Leu - **Phe** - Cys - Leu - **Phe**  
S3-13                      **Phe** - Tyr - **Tyr** - Ser - Leu - **Leu**  
S3-19                      Ser - Phe - Leu - Gly - Leu - Tyr

Barve označujejo mesta aminokislinskih ostankov v heksapeptidu (rumena predstavlja prvi, vijolična tretji, oranžna četrti, siva peti in zelena šesti aminokislinski ostanek).

Štirje (S3-1, S3-3, S3-6, S3-17) izmed petih klonov, ki so do leptinskega receptorja izkazovali relativno visoko afiniteto, imajo enako zaporedje predstavljenega heksapeptida. To zaporedje je sestavljeno iz treh aromatskih aminokislinskih ostankov (fenilalanin), dveh enostavnih alifatskih (levcin) in žveplo vsebujočega cisteina. Insert petega klona (S3-13) se z njimi ujema v prvem in petem aminokislinskem ostanku, na drugem, tretjem in šestem mestu se namesto levcinskega in dveh fenilalaninskih ostankov nahajajo prav tako nepolarni tirozinski in levcinski, medtem ko je na četrtem mestu cisteinski ostanek »zamenjan« s strukturno zelo podobnim serinskim.

Iz dobljenih rezultatov težko sklepamo na verjetno optimalno sestavo heksapeptida za vezavo na leptinski receptor, saj smo izolirali le dve različni aminokislinski zaporedji. Ti sta si sicer podobni, a bi bila prisotnost določenega motiva prepričljivejša, če bi namesto štirih povsem enakih klonov izolirali štiri, ki bi se med seboj razlikovali vsaj v eni aminokislini, podobno kot se klon S3-13 razlikuje od ostalih. Podobnost obeh aminokislinskih zaporedij se kaže na prvem, petem in šestem mestu heksapeptida, kjer se pri vseh klonih nahaja nepolaren aminokislinski ostanek, pri čemer je prvi povsod aromatski fenilalanin in peti levcin. Mesto tri je pri obeh zaporedjih zasedeno z aromatskim aminokislinskim ostankom. Četrty ostanek je bodisi cistein bodisi serin, torej v obeh primerih molekula, ki vsebuje heteroatom z dvema neveznima elektronskima paroma (žveplo oz. kisik).

Glavne značilnosti teh zaporedij, ki bi utegnile biti pomembne za vezavo na LepR-Fc so: (i) fenilalanin na mestu ena, (ii) aromatska aminokislina na mestu tri, (iii) serin ali cistein na mestu štiri, (iv) levcin na mestu pet in v) lipofilna aminokislina na mestu šest (strukturno sorodna fenilalanin ali levcin). To lahko tako povzamemo z obliko **F-X<sub>2</sub>-Ar-C/S-L-F/L**, pri čemer so F, C, S in L aminokislinski ostanki fenilalanina, cisteina, serina in levcina, Ar aminokislinski ostanek aromatske, X pa ostanek slabše definirane aminokislina. O preferenčnih aminokislinskih ostankih na položaju dve iz le dveh zadetkov presejanja ne moremo sklepati.

Klon S3-19 se je tako kot ostali ohranil po treh selekcijskih stopnjah, a ne izkazuje afinitete do LepR-Fc oziroma je le-ta primerljiva z afiniteto do infliksimaba (5.1.2.2). Izkazalo se je, da izraža klon S3-19 peptid, katerega zaporedje se od ostalih petih popolnoma razlikuje. Možno je, da se ta heksapeptid veže na povsem drugem delu molekule LepR-Fc, na primer na Fc-regiji. To razloži tudi primerljiva odziva pri testu ELISA po interakciji z LepR-Fc in infliksimabom (5.1.2.2).

## 5.2 AFINITETNA SELEKCIJA PEPTIDOV, PREDSTAVLJENIH NA BAKTERIOFAGIH M13

### 5.2.1 REZULTATI MIKROBIOLOŠKE TITRACIJE

Uspešnost afinitetne selekcije smo na vsaki izmed treh selekcijskih stopenj tudi tokrat preverjali z mikrobiološko titracijo, ki nam je omogočila oceno odstotka eluiranih bakteriofagov na posamezni selekcijski stopnji.

Na gojišču, uporabljenem za mikrobiološko titracijo (LB-agarno gojišče z dodanima induktorjem IPTG in substratom za  $\beta$ -galaktozidazo X-gal), so se razvili modri plaki. Bakteriofagi M13 niso litični in zgolj upočasnijo delitev bakterij. Plaki so tako posledica nižje gostote bakterij na bakterijskem travniku. Gojišče LB/IPTG/X-Gal nam je omogočilo »prepoznati« plake, ki so bili posledica okužb gostiteljskega bakterijskega seva s fagnim vektorjem M13KE (osnova knjižničnih fagov), ne pa z morebitnim divjim tipom virusa iz okolja. Vektor M13KE namreč vsebuje gen *lacZ $\alpha$* , ki kodira  $\alpha$ -podenoto encima  $\beta$ -galaktozidaze, pod nadzorom promotorja *lac UV5*. Gostiteljski bakterijski sev *E. coli* K12 ER2738 nosi zapis za  $\omega$ -podenoto  $\beta$ -galaktozidaze. Ob indukciji *Lac* operona z IPTG nastaja funkcionalna  $\beta$ -galaktozidaza, ki substrat X-Gal cepi do modrega netopnega produkta, zato so plaki na agarnem gojišču obarvani modro.

Plake smo prešteli in z upoštevanjem koeficienta redčitve bakteriofagov v eluatih izračunali število bakteriofagov v nepomnoženih eluatih (NE) in titer bakteriofagov v pomnoženih eluatih (PE) (preglednica IX). V preglednicah X in XI so podani izračuni volumnov pomnoženih eluatov za vnos v drugo in tretjo selekcijsko stopnjo ter izračuni odstotkov eluiranih bakteriofagov za posamezne selekcijske stopnje.

Preglednica IX: Izračun števila bakteriofagov v NE in titrov bakteriofagov v PE pri selekciji iz knjižnice Ph.D-C7C<sup>TM</sup>.

	<i>število plakov</i>	<i>redčitev</i>	<i>bakteriofagov v eluatu oziroma titer eluata</i>
<i>aliquot knjižnice</i>			<b><math>2,0 \times 10^{11}</math> bakteriofagov (17)</b>
<i>1. NE</i>	450	10	$4,5 \times 10^3$ bakteriofagov $\times 10 =$ <b><math>4,5 \times 10^4</math> bakteiofagov</b>
<i>1. PE</i>	200	$10^9$	$2,0 \times 10^{11}$ pfu/0,01 ml = <b><math>2,0 \times 10^{13}</math> pfu/ml</b>
<i>2. NE</i>	30	$10^2$	$3,0 \times 10^3$ bakteriofagov $\times 10 =$ <b><math>3,0 \times 10^4</math> bakteriofagov</b>
<i>2. PE</i>	155	$10^9$	$1,6 \times 10^{11}$ pfu/0,01 ml = <b><math>1,6 \times 10^{13}</math> pfu/ml</b>
<i>3. NE</i>	80	$10^2$	$8,0 \times 10^3$ bakteriofagov $\times 10 =$ <b><math>8,0 \times 10^4</math> bakteriofagov</b>

Preglednica X: *Izračun volumnov pomnoženih eluatov za vnos v naslednjo selekcijsko stopnjo* (pri izračunu smo upoštevali, da želimo v vsako selekcijsko stopnjo vnesti  $2 \times 10^{11}$  bakteriofagov).

	<i>volumen PE za vnos v naslednjo selekcijsko stopnjo</i>
<i>2. selekcijska stopnja</i>	$V = 2 \times 10^{11} \text{ pfu} / (2,0 \times 10^{13} \text{ pfu/ml}) = \mathbf{10 \mu l}$
<i>3. selekcijska stopnja</i>	$V = 2 \times 10^{11} \text{ pfu} / (1,6 \times 10^{13} \text{ pfu/ml}) = \mathbf{13 \mu l}$

Preglednica XI: *Izračun odstotkov elucije posameznih selekcijskih stopenj.*

<i>vnos s knjižnico</i>	$2,0 \times 10^{12} \text{ pfu/ml} \times 0,100 \text{ ml} = 2,0 \times 10^{11} \text{ pfu}$
<i>izplen 1. NE</i>	$4,5 \times 10^5 \text{ pfu/ml} \times 0,120 \text{ ml} = 5,4 \times 10^4 \text{ pfu}$
<b><i>odstotek elucije</i></b>	<b>% elucije = <math>(5,4 \times 10^4 \text{ pfu} / 2,0 \times 10^{11} \text{ pfu}) \times 100\% = \mathbf{2,7 \times 10^{-5} \%}</math></b>
<i>vnos s 1. PE</i>	$2,0 \times 10^{13} \text{ pfu/ml} \times 0,010 \text{ ml} = 2,0 \times 10^{11} \text{ pfu}$
<i>izplen 2. NE</i>	$3,0 \times 10^5 \text{ pfu/ml} \times 0,120 \text{ ml} = 3,6 \times 10^4 \text{ pfu}$
<b><i>odstotek elucije</i></b>	<b>% elucije = <math>(4,2 \times 10^4 \text{ pfu} / 5,0 \times 10^9 \text{ pfu}) \times 100\% = \mathbf{1,8 \times 10^{-5} \%}</math></b>
<i>vnos z 2. PE</i>	$1,6 \times 10^{13} \text{ pfu/ml} \times 0,013 \text{ ml} = 2,0 \times 10^{11} \text{ pfu}$
<i>izplen 3. NE</i>	$8,0 \times 10^5 \text{ pfu/ml} \times 0,120 \text{ ml} = 9,6 \times 10^4 \text{ pfu}$
<b><i>odstotek elucije</i></b>	<b>% elucije = <math>(6,0 \times 10^4 \text{ pfu} / 5,0 \times 10^9 \text{ pfu}) \times 100\% = \mathbf{4,8 \times 10^{-5} \%}</math></b>

Tudi pri tej afinitetni selekciji smo opazili le majhno naraščanje odstotka elucije. V drugi selekcijski stopnji se je njegova vrednost celo zmanjšala, kar lahko deloma pojasnimo z zaostritvijo pogojev spiranja v primerjavi s prvo selekcijsko stopnjo (0,5 % PBST namesto 0,1 % PBST). Namen te zaostritve je bilo usmerjanje selekcije v smeri še više afinitetnih klonov, torej klonov, ki bi kljub močnemu spiranju ostali vezani na LepR-Fc.

V tretji selekcijski stopnji se odstotek elucije poveča le 2,7-krat, kar nakazuje na selekcijo nizkoafinitetnih bakteriofagov. V prvo selekcijsko stopnjo smo namreč vnesli še manjše število kopij vsakega klona kot pri knjižnici T7Select®Hexamer, in sicer le 150. Tako je ohranitev visokoafinitetnih klonov po prvi selekcijski stopnji nezanesljiva, zato se lahko zgodi, da se kloni z optimalnimi zaporedji za vezavo LepR-Fc izgubijo. Ohranili so se le kloni nižje afinitete, katerih obogatitev je po treh selekcijskih stopnjah zaradi slabše vezave na LepR-Fc nizka. Podobno kot pri selekciji iz knjižnice T7Select®Hexamer je bil za takšne rezultate morda tudi tu vsaj delno odgovoren korak inkubacije knjižnice nad blokirano vdolbinico pred vsako selekcijsko stopnjo. Na polistirensko površino so se vezali fagi, katerih

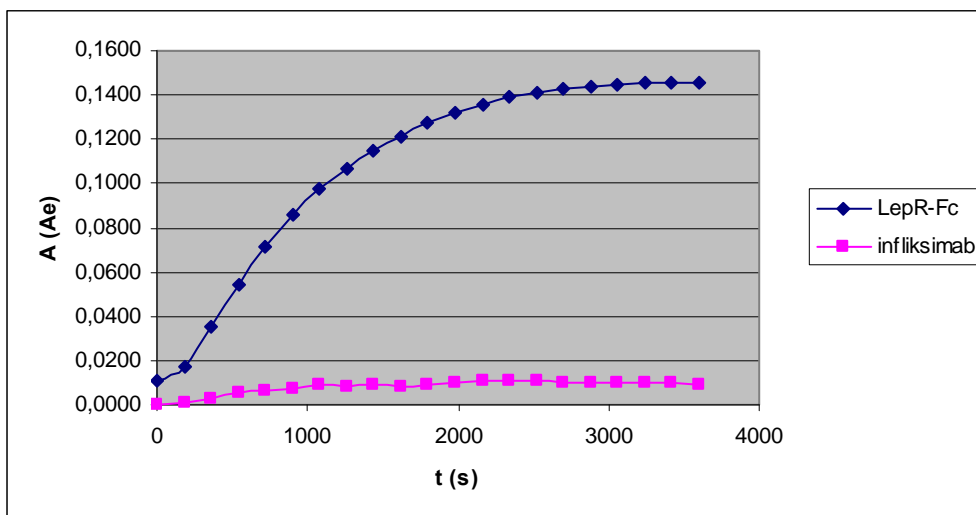
naključni peptidi so imeli visoko vsebnost aromatskih, alifatskih in bazičnih aminokislin (34, 35), med njimi pa so se morda nahajali tudi visokoafinitetni vezalci leptinskega receptorja. Poleg tega pride pri pomnoževanju fagov knjižnice Ph.D.-C7C<sup>TM</sup> tudi do »diskriminacije« tistih klonov, ki izražajo z membrano bakterijske gostiteljske celice nekompatibilne peptide (26). Fagi M13 se namreč iz celic *E. coli* ne sproščajo z lizo celice, pač pa s sekrecijskim mehanizmom bakterijske celice. Kloni, ki s tem procesom izločanja in infekcije bakterijskih celic niso kompatibilni, se bodo zato kljub morebitni visoki afiniteti do tarčne molekule že po drugi selekcijski stopnji izgubili (številčno jih bodo »prerasli« pomnoženi slabše afinitetni kloni) ali pa bodo že v izhodni knjižnici zastopani z manjšim številom kopij.

## **5.2.2 TESTA ELISA**

### **5.2.2.1 ELISA 14 izbranih klonov tretjega nepomnoženega eluata**

Klone z najvišjo afiniteto po treh selekcijskih ciklih smo izbrali s kinetičnim testom ELISA (meritve vsake tri minute), v katerem smo primerjali naklona krivulje A(t) po vezavi bakteriofagov na LepR-Fc in infliksimab. S tem smo ocenili ne le afiniteto klonov do LepR-Fc, pač pa tudi specifičnost te vezave. Ta je bila tem večja, čim manjši je bil odziv pri vezavi na humanizirano protitelo infliksimab, ki ima enako Fc-regijo kot fuzijski protein LepR-Fc. Po vezavi bakteriofagov na ti tarčni molekuli smo detekcijo izvedli z monoklonskim protitelesom proti bakteriofagu M13, konjugiranim s HRP (anti-M13-Mab-HRP). Kot kromogen substrat smo tudi tokrat uporabili ABTS in pri 405 nm merili prirast absorbance kot posledice nastajanja obarvanega produkta ABTS<sup>+</sup>.

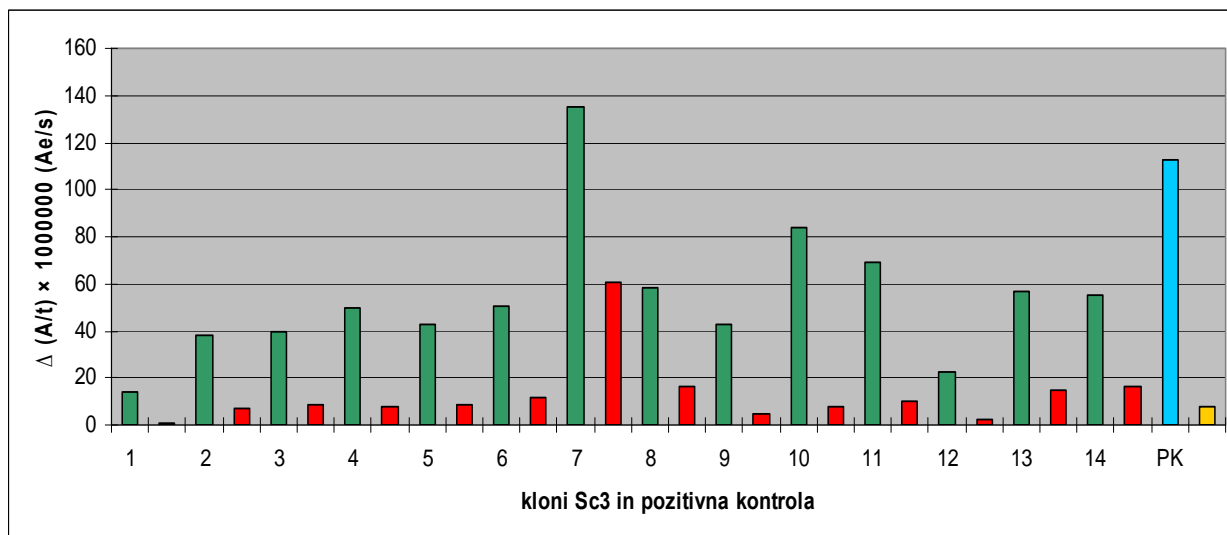
Časovni interval, znotraj katerega smo se odločili meriti naklon krivulje, je bil tokrat med 3. in 21. minuto, ko je nastajanje produkta še približno linearno. Za prikaz poteka naraščanja absorbance v odvisnosti od časa smo zaradi preglednosti uporabili le en klon, in sicer Sc3-10 (slika 13).



Slika 13: Krivulji spreminjanja absorbance v odvisnosti od časa po vezavi klona Sc3-10 na tarčno molekulo LepR-Fc oz. infliksimab in detekciji z anti-M13-Mab-HRP (na osnovi teh krivulj smo se odločili za merjenje naklona med 3. in 21. minuto).

Prvi vtis ob pregledu rezultatov testa ELISA (slika 14) je, da obstaja med odzivi (to je nakloni krivulj  $A(t)$ ), dobljenimi po vezavi klonov na LepR-Fc, in odzivi po njihovi vezavi na infliksimab bistvena razlika, ki takoj ovrže možnost, da so se bakteriofagi med selekcijo vezali na Fc-regijo fuzijskega proteina LepR-Fc. Če bi namreč prišlo do takšne vrste vezave, bi pričakovali približno enako velikost odzivov po vezavi na obe tarčni molekuli (njuni koncentraciji, uporabljeni med adsorpcijo na mikrotitrsko ploščico, sta bili enaki (3.2.13.1)). Druga ugotovitev pa je, da vezava na LepR-Fc kljub temu ni specifična, saj predstavljajo nakloni krivulj po vezavi na infliksimab tudi do 44 % naklonov, dobljenih po vezavi na LepR-Fc (klon Sc3-7). Zanimivo je, da smo povsem enak odstotek izračunali tudi po inverznem testu ELISA pri vrednotenju afinitete in selektivnosti vezave bakteriofagov knjižnice T7Select®Hexamer.





Slika 14: Nakloni krivulj  $A(t)$  posameznih klonov tretjega nepomnoženega eluata (Sc3-1–Sc3-14) ter naklona pozitivne kontrole (PK) K4 med 3. in 21. min (vsak klon Sc3 smo enkrat vezali na LepR-Fc (zelena barva) in enkrat na infliksimab (rdeča barva), medtem ko smo klon K4 enkrat vezali na streptavidin (modra barva) in enkrat v prazno (blokirano) vdolbinico (rumena barva); vrednostim je odšteto povprečje naklona slepih kontrol (vdolbinic brez bakteriofagov)).

Iz dobljenih rezultatov smo izračunali razmerje med naklonom krivulje  $A(t)$ , ko je klon vezan na LepR-Fc, in naklonom, ko je vezan na infliksimab. Podobno smo v primeru pozitivne kontrole izračunali razmerje med naklonom, ko je klon vezan na streptavidin in ko je vezan na blokirano vdolbinico. Ti rezultati so podani v preglednici XII.

Med 14 bakteriofagnimi kloni opazimo dva »ekstrema«. Prvi je klon Sc3-1, katerega naklon po vezavi na LepR-Fc je sicer najnižji, a je tudi naklon po vezavi na infliksimab tako nizek, da je razmerje naklonov  $k_{LepR}/k_{infl.}$  več kot dvakrat višje od razmerij pri vseh ostalih klonih in občutno višje tudi od razmerja  $k_{strept.}/k_{blok.}$  pozitivne kontrole K4 (preglednica XII). Drugi pa je klon Sc3-7, katerega odziv po vezavi na LepR-Fc je daleč najvišji, a je visok tudi njegov odziv po vezavi na infliksimab, kar priča o neselektivnosti njegove vezave in se odraža v najnižjem razmerju naklonov  $k_{LepR}/k_{infl.}$  (preglednica XII). Ne en ne drug klon tako nista najustreznejša kandidata za nadaljnjo obravnavo – prvi ne zaradi slabe afinitete do LepR-Fc (ta je celo nižja od afinitet klonov Sc3-7, Sc3-8, Sc3-13 in Sc3-14 do infliksimaba), drugi pa ne zaradi neselektivnosti vezave. Izmed vseh preostalih klonov smo jih nato izbrali osem z najvišjo afiniteto in jim določili nukleotidno zaporedje. Klon Sc3-12 ima sicer visoko razmerje naklonov  $k_{LepR}/k_{infl.}$ , a je njegova afiniteta podobno kot pri klonu Sc3-1 prenizka

(naklon krivulje  $A(t)$  je le 4,3-krat višji od povprečja naklonov slepih kontrol). Z dvema izmed izbranih osmih smo izvedli še kvantitativni ELISA-test. To sta bila klona Sc3-10 in Sc3-11, ki združujeta obe želeni lastnosti: od vseh imata najvišji naklon pri vezavi na LepR-Fc (13-krat oz. 11-krat višji od povprečja naklonov slepih kontrol), kar priča o njuni afiniteti, poleg tega pa imata tudi visoko razmerje naklonov  $k_{LepR}/k_{infl}$ , kar je dokaz večje selektivnosti vezave. Pri klonu Sc3-10 je ta selektivnost še posebej zadovoljiva, saj je naklon  $k_{LepR}/k_{infl}$  primerljiv z naklonom  $k_{strept.}/k_{blok.}$  pozitivne kontrole K4, ki velja za selektivnega vezalca streptavidina.

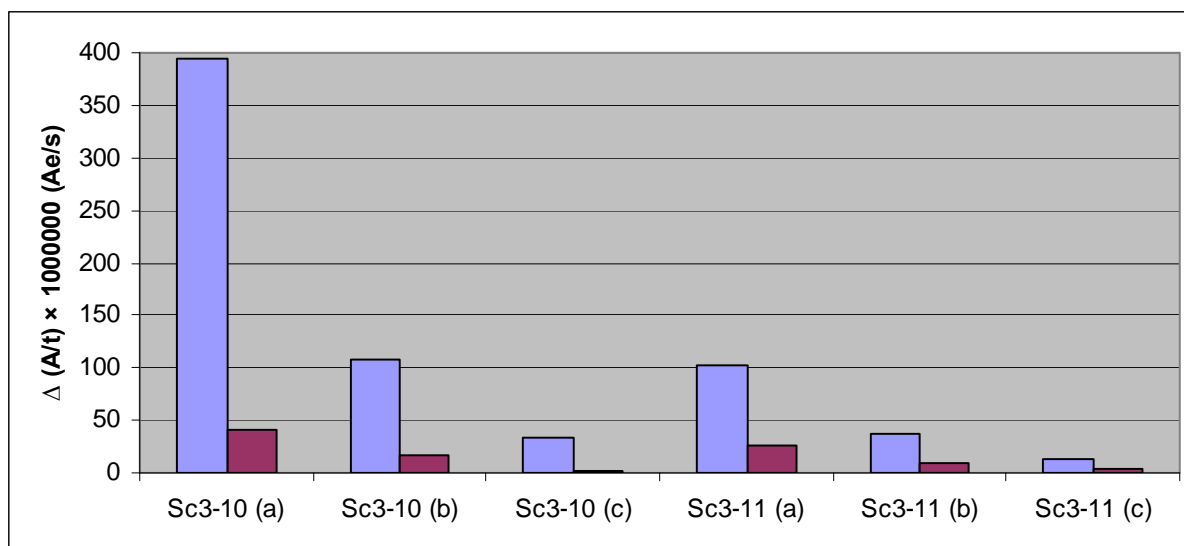
Preglednica XII: Razmerja naklonov krivulj  $A(t)$  pri vezavi na tarčno molekulo in naklonov krivulj  $A(t)$  slepih kontrol.

<i>klon</i>	$k_{LepR}/k_{infl}$
Sc3-1	26,2
Sc3-2	5,2
Sc3-3	4,6
Sc3-4	6,5
Sc3-5	5,2
Sc3-6	4,2
Sc3-7	2,2
Sc3-8	3,5
Sc3-9	8,7
Sc3-10	11,2
Sc3-11	6,8
Sc3-12	8,5
Sc3-13	3,9
Sc3-14	3,4
$k_{strept.}/k_{blok.}$	
K4	14,2

### 5.2.2.2 Kvantitativna ELISA klonov Sc3-10 in Sc3-11

S tem testom smo preverili, ali signal (naklon krivulje  $A(t)$  v njenem linearnem delu) narašča z zviševanjem števila bakteriofagov, ki jih inkubiramo nad imobiliziranim fuzijskim proteinom LepR-Fc, in hkrati ostaja enak pri inkubaciji bakteriofagov nad imobiliziranim infliksimabom. To bi potrdilo selektivnost interakcije peptidov na izbranih bakteriofagnih klonih z ektodomeno leptinskega receptorja.

Ker smo meritve pri tem kontinuiranem ELISA-testu opravljali vsaki dve minuti (in ne tri, kot prej), smo pri izračunu naklona krivulj  $A(t)$  upoštevali absorbance med 2. in 20. minuto.



Slika 15: A. Nakloni krivulje  $A(t)$  po kvantitativnem ELISA-testu s klonoma Sc3-10 in Sc3-11 med 2. in 20. minuto (tri raztopine različnih koncentracij obeh klonov smo vezali na LepR-Fc in infliksimab (modra in vijolična barva). Uporabljene koncentracije: a)  $2 \times 10^{11}$  pfu, b)  $5 \times 10^{10}$  pfu in c)  $1 \times 10^{10}$  pfu.

V preglednici XIII so zbrana razmerja med nakloni krivulj  $A(t)$ , ko so raztopine klonov vezane na LepR-Fc in ko so vezane na infliksimab ( $k_{\text{LepR}}/k_{\text{infl.}}$ ). V primeru pozitivne kontrole je podano razmerje med naklonom krivulje  $A(t)$ , ko je klon K4 vezan na streptavidin in ko je vezan le na blokirano vdolbinico ( $k_{\text{strept.}}/k_{\text{blok.}}$ ).

Preglednica XIII: Razmerja naklonov krivulj  $A(t)$  pri vezavi na tarčno molekulo in naklonov krivulj  $A(t)$  slepih kontrol.

<i>klon</i>	<i>koncentracija (pfu)</i>	$k_{LepR}/k_{infl.}$
<b>Sc3-10</b>	$2 \times 10^{11}$	9,7
	$5 \times 10^{10}$	6,1
	$1 \times 10^{10}$	22,1
<b>Sc3-11</b>	$2 \times 10^{11}$	4,0
	$5 \times 10^{10}$	4,4
	$1 \times 10^{10}$	2,8
		$k_{strept.}/k_{blok.}$
<b>K4</b>	$2 \times 10^{11}$	679,7

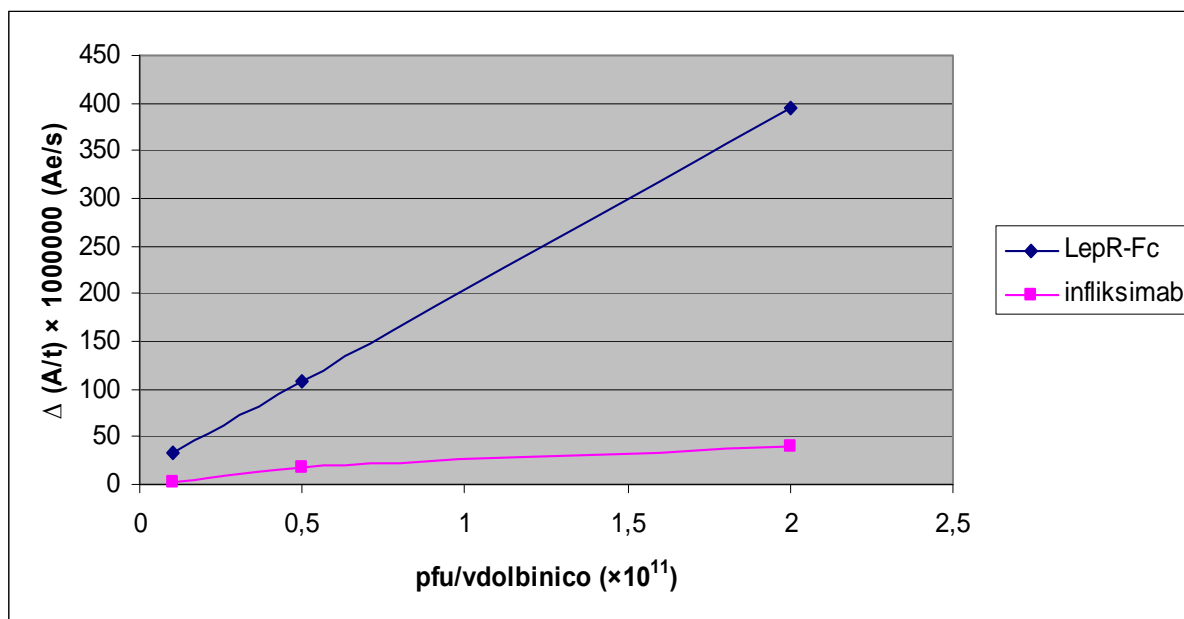
Nakloni krivulje  $A(t)$  pri vezavi bakteriofagnega klona na LepR-Fc v obeh primerih naraščajo z naraščanjem koncentracije bakteriofagov (sliki 16 in 17). Hkrati pa s povečevanjem koncentracije bakteriofagov narašča tudi naklon krivulje  $A(t)$  pri vezavi bakteriofagov na infliksimab. Čeprav porast v tem primeru ni tako izrazit, to nakazuje na nespecifične interakcije peptidov z infliksimabom. Nihanja vrednosti  $k_{LepR}/k_{infl.}$ , ki so pri klonu Sc3-11 sicer manjša kot pri klonu Sc3-10, so najverjetneje posledica napake zaradi zelo nizkih odzivov, zato težko vrednotimo njihov trend. Opažamo, da so razmerja  $k_{LepR}/k_{infl.}$  pri klonu Sc3-10 višja kot pri klonu Sc3-11, kar kaže na večjo selektivnost vezave peptida na fagu Sc3-10 na leptinski receptor. Idealno obnašanje nekega klona bi poleg dovolj visokega razmerja  $k_{LepR}/k_{infl.}$  (to bi potrjevalo selektivnost vezave) kazalo tudi naraščanje razmerja  $k_{LepR}/k_{infl.}$  z večanjem koncentracije bakteriofagov.

Če oba klona primerjamo s pozitivno kontrolo K4, opazimo precej drugačne rezultate kot v prvem ELISA-testu (5.2.2.1). Tam je bila selektivnost vezave (ovrednotena z razmerjem  $k_{LepR}/k_{infl.}$ ) klona Sc3-10 skoraj primerljiva selektivnosti klona K4, medtem ko nam ta natančnejši kvantitativni ELISA-test med obema klonoma pokaže precej velike razlike tako v afiniteti do tarčne molekule (naklon  $A(t)$  je pri klonu K4  $1241 \times 10^{-6}$  absorbančnih enot /sekundo, kar je trikrat več kot pri Sc3-10) kot tudi v selektivnosti vezave (razmerje naklonov je pri K4 kar 72-krat višje kot pri Sc3-10).

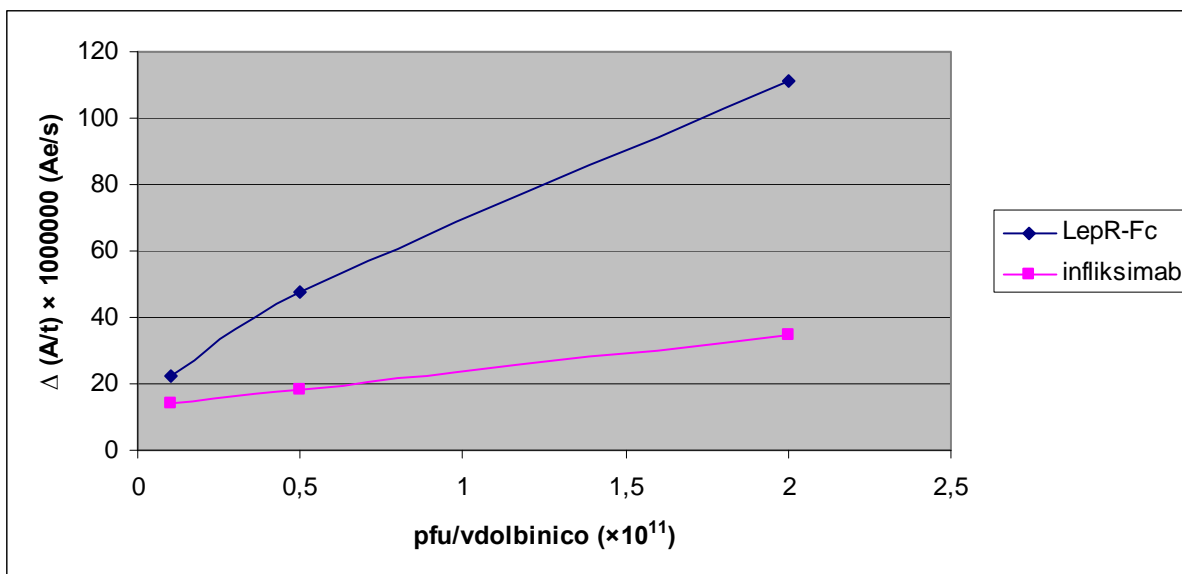
Povprečje naklona slepih kontrol znaša  $9,54 \times 10^{-6}$  absorbančnih enot/sekundo, kar je primerljivo naklonom po vezavi Sc3-10 ( $1 \times 10^{10}$  pfu/ml) in Sc3-11 ( $1 \times 10^{10}$  pfu/ml) na infliksimab. Pri najnižjih koncentracijah torej težko vrednotimo neselektivnost vezave oz. lahko trdimo, da je ta zanemarljiva, saj je odziv že v odsotnosti bakteriofagov relativno visok.

Vsekakor bi za ustrezno preučitev obnašanja klonov potrebovali meritve več različnih koncentracij bakteriofagov, poleg tega pa tudi več paralel meritev posameznih koncentracij. Pri našem delu smo uporabili toliko redčitev, kot nam je to dopuščala količina pomnoženih klonov, predvsem pa smo bili omejeni z razpložljivostjo fuzijskega proteina LepR-Fc.

Rezultati kvantitativnega ELISA-testa so tako pokazali, da obstaja premo sorazmerna povezava med koncentracijo bakteriofagov in velikostjo naklona  $A(t)$ . Za še večji odziv pri vezavi klonov na LepR-Fc bi bilo torej potrebno povečevanje koncentracije bakteriofagov, kar pa zaradi nespecifičnih interakcij ni zaželeno. Primerjava s K4 je potrdila to, kar smo sklepali že iz odstotkov elucije med afinitetno selekcijo (5.2.1), namreč selekcijo nizkoafinitetnih klonov.



Slika 16: Spreminjanje naklonov krivulje  $A(t)$  v odvisnosti od spreminjanja koncentracije bakteriofagnega klona Sc3-10 pri vezavi na LepR-Fc oz. infliksimab.



Slika 17: Spreminjanje naklonov krivulje  $A(t)$  v odvisnosti od spreminjanja koncentracije bakteriofagnega klona Sc3-11 pri vezavi na LepR-Fc oz. infliksimab.

### 5.2.3 DOLOČITEV NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA INSERTOV V BAKTERIOFAGIH M13

Osmim klonom, izbranim po prvem ELISA-testu (5.2.2.1), smo z metodo obarjanja z absolutnim etanolom (3.2.14) izolirali DNA in jo v obliki oborine poslali družbi Eurofins MWG Operon, kjer so z dideoksi-metodo in oligonukleotidnim začetnikom -96 gIII določili nukleotidno zaporedje insertov izbranih bakteriofagnih klonov:

Sc3-4, Sc3-8, Sc3-11	Cys-Ser-Phe-Leu-Ala-Ala-Ser-Leu-Cys
Sc3-5	Cys-Gly-Ser-Pro-Phe-Ala-Ala-Ala-Cys
Sc3-6	Cys-Trp-Ser-Ser-Thr-Ser-Leu-Thr-Cys
Sc3-10	Cys-Phe-Leu-Leu-Ser-Ile-Ala-Phe-Cys
Sc3-13	Cys-Ser-Thr-Ile-Ser-Ser-Pro-Ile-Cys
Sc3-14	Cys-Pro-Ser-Ser-Gln-Ser-Ser-Val-Cys

Barve označujejo mesta aminokislinskih ostankov v heptapeptidu (rumena predstavlja prvi, zelena tretji, rjava peti, modra šesti in vijolična sedmi aminokislinski ostanek).

Zaporedje heptapeptida je v vseh primerih obdano s cisteinskima ostankoma, kar je značilno za knjižnico Ph.D.-C7C<sup>TM</sup> (1.2.1). Kloni Sc3-4, Sc3-8 in Sc3-11 so identični, in sicer je heptapeptid sestavljen predvsem iz nepolarnih aminokislinskih ostankov (fenilalanin, levcin

in alanin), z izjemo serina na mestih ena in šest. S tem zaporedjem imajo ostali štirje kloni le malo skupnega (ena oz. nič enakih aminokislin).

Nekaj podobnosti s tremi identičnimi kloni kaže klon Sc3-13, ki ima na prvem mestu prav tako serin, na mestih tri in sedem pa namesto levcina kratki alifatski izolevcin. – prav tako nepolaren. Če povežemo lastnosti vseh štirih klonov, bi njihovo aminokislinsko zaporedje podali v obliki **C-S-X<sub>2</sub>-L/I-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-L/I-C**, kjer predstavljajo C, S, L in I cisteinski, serinski, levcinski in izolevcinski, X pa poljubni aminokislinski ostanek.

O skupnem motivu zaradi le dveh različnih zaporedij težko govorimo, kvečjemu lahko predpostavljamo, da ima do leptinskega receptorja največjo afiniteto ta točno določeni klon (Sc3-4 oz. Sc3-8 oz. Sc3-11), katerega frekvenca pojavljanja v tretjem nepomnoženem eluatu je relativno visoka (iz gojišča s približno 100 plaki tretjega nepomnoženega eluata smo izolirali 14 klonov, od katerih več kot ena petina izraža prej omenjeno zaporedje).

### **5.3 PRIMERJAVA PEPTIDOV, IZOLIRANIH IZ KNJIŽNIC T7Select® Hexamer in Ph.D.-C7C™**

Zaradi zelo različnih lastnosti vektorjev, uporabljenih pri obeh afinitetnih selekcijah (vektor T7Select10-3b oz. vektor M13KE), bi bilo smiselno pričakovati, da rezultati obeh selekcij med seboj ne bodo primerljivi. Že sama konformacija izraženih peptidov se pri obeh knjižnicah precej razlikuje. T7Select® hexamer je kombinatorna knjižnica linearnih heksapeptidov, ki jim ta linearnost daje večjo možnost gibljivosti in spremembe konformacije, medtem ko je Ph.D.-C7C™ kombinatorna knjižnica cikličnih heptapeptidov, ki jim je konformacija z disulfidno (S-S) vezjo med dvema cisteinoma že »vsiljena«.

Predvsem pa se knjižnici razlikujeta v zastopanosti posameznih aminokislin v izraženih peptidih. Sistemi, ki temeljijo na fagih T7, izražajo bolj enakomerno zastopanost posameznih aminokislin kot sistemi, temelječi na fagih M13. To posledično pomeni tudi večjo raznolikost peptidov, izraženih na T7, in enakomernejšo porazdelitev hidropatije in naboja peptidov (26). Vzrok za aminokislinsko »diskriminacijo« v fagih M13 je morfogeneza nitastih bakteriofagov (5.2.1). Arginin in cistein na izraženih peptidih M13 sta za sekrecijo novih fagnih delcev iz gostiteljske celice in infekcijo gostiteljskih celic neugodna, zato poteka selekcija klonov v smeri zaviranja tistih, ki vsebujejo ti dve aminokislini.

Kljub tem razlikam opazimo pri primerjavi klonov, izoliranih iz obeh knjižnic z afinitetno selekcijo na leptinski receptor, pojavljanje nekaterih aminokislinskih ostankov na točno določenih mestih. Najbolj strogo ponavljajoč motiv je zaporedje štirih aminokislin, ki ga lahko povzamemo v obliki **F-L/I-X-S/C**. Pri tem predstavljajo F, L, I, S in C fenilalaninski, levcinski, izolevcinski, serinski in cisteinski, X pa poljubni aminokislinski ostanek. Aminokislini na prvem in drugem mestu tega motiva (fenilalanin in levcin/izolevcin) se pojavljata v devetih izmed trinajstih zaporedij, medtem ko se aminokislina na mestu štiri (serin/cistein) pojavlja v osmih. Če motiv nekoliko razširimo, ga lahko podamo v obliki **S-F-L/I-X-S/C-L/I-L/I**, vendar pa se dodani trije aminokislinski ostanki pojavljajo z manjšo frekvenco kot ostanki v »ožjem« motivu. Opazimo tudi, da se pri klonih knjižnice T7Select<sup>®</sup> hexamer na mestu štiri tega motiva pojavi bodisi serin bodisi cistein, medtem ko se pri klonih knjižnice Ph.D.-C7C<sup>™</sup> pojavlja zgolj serin (morda zaradi prej omenjene podpovprečne zastopanosti cisteina v naključnih peptidih).

S3-1	Phe-Leu-Phe-Cys-Leu-Phe
S3-3	Phe-Leu-Phe-Cys-Leu-Phe
S3-6	Phe-Leu-Phe-Cys-Leu-Phe
S3-17	Phe-Leu-Phe-Cys-Leu-Phe
S3-13	Phe-Tyr-Tyr-Ser-Leu-Leu
Sc3-10	Phe-Leu-Leu-Ser-Ile-Ala-Phe
Sc3-4	Ser-Phe-Leu-Ala-Ala-Ser-Leu
Sc3-8	Ser-Phe-Leu-Ala-Ala-Ser-Leu
Sc3-11	Ser-Phe-Leu-Ala-Ala-Ser-Leu
Sc3-13	Ser-Thr-Ile-Ser-Ser-Pro-Ile
Sc3-5	Gly-Ser-Pro-Phe-Ala-Ala-Ala
Sc3-14	Pro-Ser-Ser-Gln-Ser-Ser-Val
Sc3-6	Trp-Ser-Ser-Thr-Ser-Leu-Thr



## VI. SKLEP

Z metodo afinitetne selekcije smo skušali iz dveh bakteriofagnih predstavitev knjižnic naključnih peptidov izolirati peptide, ki bi tvorili interakcije z rekombinantnim leptinskim receptorjem. Na osnovi rezultatov prirejenega testa ELISA smo izbrali trinajst bakteriofagnih klonov, ki smo jim določili nukleotidna zaporedja vstavljenih insertov. Ta smo prevedli v aminokislinska zaporedja in tako določili primarno strukturo izraženih peptidnih ligandov. Na dveh stopnjah našega eksperimentalnega dela smo tako pri knjižnici T7Select<sup>®</sup>-hexamer kot pri knjižnici PhD.-C7C<sup>TM</sup> prišli do zaključka, da izkazujejo klone, ohranjeni po vseh treh selekcijskih stopnjah, do tarčne molekule nizko afiniteto. Najprej se je to odražalo v nizkem deležu eluiranih bakteriofagov (glede na celokupen vnos v posameznem krogu afinitetne selekcije) – ta se je v tretji selekcijski stopnji povečal le 1,4-krat (afinitetna selekcija iz T7Select<sup>®</sup>-hexamer) oz. 2,7-krat (afinitetna selekcija iz PhD.-C7C<sup>TM</sup>), medtem ko pri izolaciji visoko afinitetnih bakteriofagov pričakujemo od 50- do 100-kratni porast (18). Drugič pa nam je izolacijo nizko afinitetnih klonov potrdil tudi prirejeni test ELISA, kjer so dajali naši izolirani klone v primerjavi s pozitivno kontrolo (selektivni vezalec streptavidina K4) zelo nizke odzive.

Visoko afinitetne klone smo najverjetneje izgubili že po prvi selekcijski stopnji zaradi relativno majhnega števila kopij posameznega bakteriofagnega klona (500 pri izolaciji iz knjižnice T7Select<sup>®</sup>-hexamer in 150 pri izolaciji iz knjižnice PhD.-C7C<sup>TM</sup>), ki pride v stik s tarčno molekulo, in preostrih selekcijskih pogojev. Temu problemu bi se morda lahko deloma izognili z uporabo večje množine tarčne molekule, kar pa bi povečalo stroške eksperimentalnega dela.

Ker smo kot tarčno molekulo uporabili fuzijski protein LepR-Fc, je obstajala možnost afinitetne selekcije na Fc-regijo molekule in ne na ektodomeno leptinskega receptorja. Da se izraženi peptidi vežejo na receptorski del proteina, smo dokazali s testom ELISA, pri katerem smo primerjali odzive po interakciji med klone in LepR-Fc ( $k_{LepR}$ ) z odzivi po interakciji med klone in infliksimabom ( $k_{infl.}$ ). Kljub temu da Fc-regija ni bila vpletena v vezavo na fagih predstavljenih peptidov, je do neselektivnih interakcij z infliksimabom vseeno prišlo. Razmerje naklonov  $k_{LepR}/k_{infl.}$  v primerjavi s pozitivno kontrolo K4, pri kateri smo določali razmerje  $k_{strept.}/k_{blok.}$  (razmerje med naklonom krivulje A(t) po interakciji med klonom K4 in streptavidinom in naklonom po interakciji med K4 in blokirano površino), ni doseglo primerljivih vrednosti. A to je bolj posledica nizke afinitete klonov do leptinskega receptorja

(in torej nizkih vrednosti  $k_{LepR}$ ) kakor pa neselektivne vezave na infliksimab (torej visokih vrednosti  $k_{infl}$ ). Odzive po interakciji klonov in LepR-Fc bi lahko primerjali tudi z odzivi med kloni in kakšno drugo, leptinskemu receptorju bolj sorodno tarčno molekulo. Uporabili bi lahko na primer člana citokinskih receptorjev razreda I, kamor sodi tudi leptinski receptor sam. S tem bi dodatno preverili selektivnosti vezave izoliranih klonov.

Štirje izmed petih klonov (S3-1, S3-3, S3-6, S3-17), izoliranih iz knjižnice T7Select<sup>®</sup>-hexamer, so izražali identičen peptid, peti (S3-13) pa se je z njim ujema v petih aminokislinskih ostankih. To ujemanje lahko povzamemo z obliko **F-X<sub>2</sub>-Ar-C/S-L-F/L**. Iz knjižnice Ph.D.-C7C<sup>TM</sup> smo določili nukleotidno zaporedje osmim klonom, med katerimi so trije (Sc3-4, Sc3-8, Sc3-11) izražali enak peptid, en (Sc3-13) pa se je z njim ujema v treh aminokislinskih ostankih. Aminokislinsko zaporedje teh štirih klonov opišemo v obliki **C-S-X<sub>2</sub>-L/I-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-X<sub>6</sub>-L/I-C**. Ostali štirje kloni so s tem zaporedjem izkazovali zelo malo podobnosti (ena oz. nobena enaka aminokislina). Kljub razliki v peptidni predstavitvi obeh sistemov pa smo s primerjavo vseh 13 klonov, izoliranih iz obeh knjižnic, uspeli njihove lastnosti povezati v skupen motiv (**F-L/I-X-S/C**), ki ga kot celoto izraža 6 izmed vseh 13 klonov, posamezni aminokislinski ostanki tega motiva pa se pojavljajo v devetih oz. osmih izoliranih klonih.

Ker smo izolirali premalo klonov oz. premalo različnih aminokislinskih zaporedij, ne moremo z gotovostjo trditi, da je opažen motiv dejansko odgovoren za vezavo na leptinski receptor. Za to bi morali opraviti večji presejalni test (tj. v test ELISA vključiti večje število klonov po tretji ali celo nadaljnjih selekcijskih stopnjah). Lahko pa bi »pomembnost« določenih aminokislin na posameznem položaju v motivu za vezavo na leptinski receptor preverjali tudi z usmerjeno mutagenezo, pri čemer bi v tej raziskavi dobljena aminokislinska zaporedja načrtno spreminjali in opazovali odzive tako spremenjenih klonov po vezavi na LepR-Fc. S tem bi morda pridobili nova, višje afinitetna zaporedja, ki smo jih sicer med selekcijo izgubili ali pa so bila zaradi morfogeneze bakteriofagov diskriminirana.

Peptidni ligandi, izolirani z afinitetno selekcijo iz bakteriofagnih knjižnic, običajno tvorijo interakcije z biološko pomembnimi površinami tarčnih proteinov (37), kot so aktivna mesta na encimih ali površine, s katerimi se endogeni ligandi vežejo na ustrezne receptorje in obratno. Zato je smiselno pričakovati, da bodo takšni peptidni ligandi delovali kot modulatorji aktivnosti tarčnih proteinov – kot kompetitivni ali alosterični inhibitorji encimov, substrati proteaz, blokatorji endogenih ligandov in antagonisti receptorjev. Razvoj visoko afinitetnih peptidnih ligandov leptinskega receptorja bi pomenil učinkovito orodje za vpogled v presnovne reakcije v telesu, ki so povezane z leptinom, ter za eksperimentalno preučevanje

poteka številnih bolezenskih zapletov, katerih natančni mehanizmi so do zdaj še nepoznani (potek ateroskleroze, angiogeneza, razvoj avtoimunskih bolezni, rakavih obolenj itd.). Poleg tega bi s takšnimi peptidi postavili tudi osnovo za razvoj antagonistov leptinskega receptorja, ki bi se lahko v prihodnosti uporabljali v terapiji – bodisi kot peptidomimetiki bodisi kot peptidi.

## VII. LITERATURA

1. Castracane VD, Henson MC: Leptin, Springer, 2006: 1-70.
2. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human analogue. *Nature* 1994; 372: 425-432.
3. Gertler A: Development of leptin antagonists and their potential use in experimental biology and medicine. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 2006; 17: 372-378.
4. Janečková R: The role of Leptin in Human Physiology and Pathophysiology. *Physiol. Res.* 2001; 50: 443-459.
5. Peelman F, Couturier C, Dam J, Zabeau L, Tavernier J, Jockers R: New pharmacological perspectives for the leptin receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 2006; 27: 219-225.
6. Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS: Leptin in Immunology. *The Journal of Immunology* 2005; 174: 3137-3142.
7. La Cava A, Matarese G: The weight of leptin in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4: 371-379.
8. Yang R, Barouch LA: Leptin Signaling and Obesity: Cardiovascular Consequences. *Circulation Research* 2007; 101: 545-559.
9. Xu FP, Chen MS, Wang YZ, Yi Q, Lin SB, Chen AF, Luo JD: Leptin Induces Hypertrophy via Endothelin-1-Reactive Oxygen Species Pathway in Cultured Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Circulation* 2004; 110: 1269-1275.

10. Deo D.D, Rao AP, Bose SS, Ouhtit A, Baliga SB, Rao SA, Trock BJ, Thouta R, Raj MHG, Rao PN: Differential Effects of Leptin on the Invasive Potential of Androgen – Dependent and –Independent Prostat Carcinoma Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2008; 2008: 1-8.
11. Somasundar P, Yu AK, Vona-Davis L, McFadden DW: Differential effects of leptin on cancer *in vitro*. *The Journal of Surgical Research* 2003; 113: 50-55.
12. Zabeau L, Lavens D, Peelman F, Eyckerman S, Vandekerckhove J, Tavernier J: The ins and outs of leptin receptor activation. *FEBS Letters* 2003; 546: 45-50.
13. Myers MG Jr.: Leptin Receptor Signaling and the Regulation of Mammalian Physiology. *Recent Progress in Hormone Research* 2004; 59: 287-304.
14. Otvos L jr, Terrasi M, Cascio S, Cassone M, Abbadessa G, De Pascali F, Scolaro L, Knappe D, Stawikowski M, Cudic P, Wade JD, Hoffmann R, Surmacz E: Development of a pharmacologically improved peptide agonist of the leptin receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1783: 1745-1754.
15. Peelman F, Van Beneden K, Zabeau L, Iserentant H, Ulrichts P, Defeau D, Verhee A, Catteeuw D, Elewaut D, Tavernier J: Mapping of the Leptin Binding Sites and Design of a Leptin Antagonist. *The Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 41038-41046.
16. Smith GP, Petrenko VA: Phage Display. *Chemical Reviews* 1997; 97: 391-408.
17. Ph.D.-C7C<sup>TM</sup> Phage Display Peptide Library Kit, Instruction Manual E8120, Version 2.9 (11/07); New England BioLabs<sup>®</sup>, 2007:  
<http://www.neb.com/nebecomm/ManualFiles/manualE8120.pdf>, 2009.
18. Rosenberg A, Griffin K, Studier FW, McCormick M, Berg J, Novy R, Mierendorf R: T7Select<sup>®</sup> Phage Display System: A powerful new protein display system based on bacteriophage T7. *InNovations* 1996; 6: 1-6.

19. T7Select<sup>®</sup> System Manual TB178S; Novagen, 2002:  
<http://www.merckbiosciences.co.uk/docs/docs/PROT/TB178.pdf>, 2009.
20. Kay BK, Winter J, McCafferty: Phage display of peptides and proteins, Academic Press, San Diego (ZDA), 1996.
21. Ribarič S: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije, Inštitut za patološko fiziologijo, Ljubljana, 2001: 235-248.
22. Granger JP: An emerging role for inflammatory cytokines in hypertension. *AJP Heart and Circulatory Physiology* 2006; 290: 923-924.
23. Protease inhibitors, Science Gateway:  
<http://www.sciencegateway.org/resources/protease.htm>, 2009.
24. Zadavec D: Metode za izboljšanje biološke uporabnosti peptidnih učinkovin v peroralnih farmacevtskih oblikah. *Farmacevtski vestnik* 1997; 4: 561-572.
25. Tavernier J: Evaluation of leptin antagonists for treatment of multiple sclerosis, Progress Report of the Research Group of Prof. Dr. Tavernier J. *Progress Reports of the University Research Groups* 2005; 105-113. ([http://www.fmre-gske.be/pdf/jaarverslag\\_2005.pdf](http://www.fmre-gske.be/pdf/jaarverslag_2005.pdf), 2009).
26. Krumpal LR, Atkinson AJ, Smythers GW, Kandel A, Schumacher KM, McMahon JB, Makowski L, Mori T: T7 lytic phage-displayed peptide libraries exhibit less sequence bias than M13 filamentous phage-displayed peptide libraries. *Proteomics* 2006; 6: 4210-22.
27. Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System, Technical Bulletin TB308; Promega 2005:  
<http://www.ebiotrade.com/buyf/productsf/Promega/tb308.pdf>, 2009.
28. Polymerase Chain Reaction; PCR Station, 2007:  
<http://www.pcrstation.com/pcr-cloning-alternative/>, 2009.

29. NanoDrop products; Thermo Fisher Scientific Inc., 2009:  
<http://www.nanodrop.com/HowItWorks.aspx>, 2009.
30. 260/280 and 260/230 Ratios, Technical Support Bulletin; NanoDrop Technologies, Inc 2007:  
[www.nanodrop.com](http://www.nanodrop.com), 2009.
31. DNA Sequencing, 2006:  
<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/D/DNAsequencing.html>, 2009.
32. The Kinetic ELISA Advantage in Quantitative Assays, Application Note; BioTek Instruments, Inc., 2006:  
<http://www.biotek.com/resources/docs/KineticAppNoteFinal.pdf>, 2009.
33. Kung VT, Humphries GMK: Kinetic ELISA in Microtiter plates. *Clinical Chemistry* 1987; 33: 1573.
34. Kumada Y, Tokunaga Y, Imanaka H, Imamura K, Sakiyama T, Katoh S, Nakanishi K: Screening and characterization of affinity peptide tags specific to polystyrene supports for the orientated immobilisation of proteins. *Biotechnol. Prog.* 2006; 22: 401-405.
35. Feng B, Dai Y, Wang L, Tao N, Huang S, Zeng H: A novel affinity ligand for polystyrene surface from a phage display random library and its application in anti-HIV-1 ELISA system. *Biologicals* 2009; 37: 48-54.
36. World Health Organisation, 2006:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>, 2009.
37. Gron H, Hyde-DeRuyscher R: Peptides as tools in drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 2000; 3: 636-645.