

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA MASILO

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA MASILO

**IZBOR PEPTIDNIH LIGANDOV STAFILOKOKNEGA PROTEINA A IZ BAKTERIOFAGNIH
PEPTIDNOPREDSTAVITVENIH KNJIŽNIC**

**SELECTION OF LIGANDS OF STAPHYLOCOCCAL PROTEIN A FROM PHAGE-DISPLAYED
PEPTIDE LIBRARIES**

Ljubljana, 2013

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mojce Lunder, mag. farm. Določitev nukleotidnih zaporedij je opravilo podjetje GATC Biotech iz Nemčije.

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Borutu Štruklju za možnost opravljanja diplomske naloge na Katedri za farmacevtsko biologijo ter mentorici doc. dr. Mojci Lunder za pomoč pri delu v laboratoriju in pri pisanju diplomske naloge.

Hvala Mihi Vodniku in Petru Moleku za dostopnost, družbo in pomoč pri delu ter za vso posredovano znanje in ideje.

Zahvaljujem se družini in Urbanu za podporo in razumevanje tekom študija.

Hvala tudi Tjaši, Ani, Maji, Marjeti, Evi, Jeleni, Katji, Sari, Davidu in Luki.

Za spodbudo in motivacijo se zahvaljujem kolektivu Lekarne Duplek.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice doc. dr. Mojce Lunder, mag. farm.

Katja Masilo

Predsednik diplomske komisije: izr. prof. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.

Mentorica: doc. dr. Mojca Lunder, mag. farm.

Član diplomske komisije: asist. dr. Stane Pajk, mag. farm.

Kazalo

1	Uvod	1
1.1	Protein A.....	1
1.2	Uporaba proteina A.....	6
1.2.1	Afinitetna kromatografija s proteinom A.....	7
1.2.2	Alternativni afinitetni ligandi za izolacijo protiteles.....	8
1.2.3	Inovativne imunološke metode v diagnostiki	12
1.2.4	Protein A – možna tarča pri zdravljenju stafilokoknih okužb.....	12
1.3	Metoda predstavitve na bakteriofagu	13
2	Namen dela	17
3	Materiali in metode.....	18
3.1	Materiali	18
3.1.1	Reagenti.....	18
3.1.2	Biološki material	19
3.1.3	Pufri in raztopine	20
3.1.4	Gojišča	23
3.1.5	Bakterijske kulture	24
3.1.6	Laboratorijska oprema	25
3.2	Metode.....	27
3.2.1	Afinitetna selekcija peptidov z metodo predstavitve na bakteriofagu	27
3.2.2	Izolacija in pomnoževanje naključno izbranih klonov	30
3.2.3	Izolacija, čiščenje in določanje nukleotidnega zaporedja bakteriofagne DNA izbranih klonov	30
3.2.4	Testna afinitetna selekcija peptidnih ligandov streptavidina iz knjižnice Ph.D.-C7C™	31
3.2.5	Afinitetna selekcija peptidnih ligandov proteina A iz knjižnice Ph.D.-C7C™ (NEB) z nespecifično elucijo	33
3.2.6	Afinitetna selekcija peptidnih ligandov proteina A s knjižnic Ph.D.-C7C™ in Ph.D.-12™ s specifično elucijo z Fc fragmentom humanega IgG	35
3.2.7	Izolacija posameznih bakteriofagnih klonov iz afinitetnih selekcij z nespecifično ter specifično elucijo	36
3.2.8	Vrednotenje izoliranih fagnih klonov	36
4	Rezultati in razprava.....	39
4.1	Vrednotenje poteka afinitetnih selekcij.....	39
4.2	Testna afinitetna selekcija peptidnih ligandov streptavidina iz knjižnice Ph.D.-C7C™	42

4.2.1	Vrednotenje celokupne afinitete pomnoženih eluatov do SA s testom ELISA	42
4.2.2	Vrednotenje afinitete posameznih klonov do SA s testom ELISA	43
4.2.3	Aminokislinska zaporedja klonov izoliranih v testni selekciji na SA iz knjižnice Pd.D.-C7C™	44
4.3	Afinitetna selekcija peptidnih ligandov proteina A iz knjižnic Ph.D.-C7C™ in Ph.D.-12™ z nespecifično in specifično elucijo	45
4.3.1	Izolacija posameznih bakteriofagnih klonov iz afinitetnih selekcij z nespecifično ter specifično elucijo	45
5	Sklep	54
6	Literatura.....	56

Povzetek

Stafilokokni protein A je protein, ki ga na svoji površini izraža bakterija *Staphylococcus aureus*. Z vezavo konstantne regije protiteles človeškega ali živalskega izvora bakteriji omogoča izogibanje pridobljenemu imunskemu odzivu gostitelja. Zaradi učinkovitih mehanizmov izogibanja imunskemu sistemu in odpornosti na številne antibiotike, znanstveniki iščejo nove načine zdravljenja stafilokoknih okužb. Ena izmed možnih strategij je ciljana dostava učinkovine do proteina A s pomočjo liganda, ki se veže nanj. Protein A je tudi široko uporaben v biotehnologiji kot imunokemijski reagent za identifikacijo ter čiščenje protiteles. V diplomski nalogi smo s pomočjo afinitetnih selekcij na streptavidinu in proteinu A iz dveh bakteriofagnih knjižnic poskušali izselektionirati peptidne ligande, ki se vežejo na streptavidin oziroma protein A. V testni selekciji na streptavidinu smo izolirali klone z značilnim motivom HPQ z visoko afiniteto do streptavidina. V afinitetni selekciji na proteinu A z nespecifično elucijo smo iz knjižnice Ph.D.-C7C™ izolirali peptid CAKTDPRGC in s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času potrdili specifičnost vezave na protein A. Peptid ima zelo podobno zaporedje kot konstantna regija protiteles, ki je naravni ligand proteina A. Selekcija iz knjižnice Ph.D.-C7C™ s specifično elucijo ni bila uspešna. V selekciji s specifično elucijo s konstantno regijo protiteles iz knjižnice Ph.D.-12™ pa smo izolirali peptide z izrazitim motivom GKL. S kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času smo potrdili vezavo peptidov GGKLTTIHLHST in GISDFMQTKMPL na protein A.

Abstract

Staphylococcal protein A is a surface protein of *Staphylococcus aureus* which binds human and animal antibody constant region to prevent adaptive immune response of the host. Due to effective mechanisms of evading the immune system and resistance to antibiotics, scientists are searching new ways of treating staphylococcal infections. One of possible strategies is protein A targeted drug delivery. Protein A is also widely used in biotechnology as an immunochemical reagent for antibody identification and purification. The aim of this research was to isolate peptide ligands with affinity to streptavidin and protein A from phage-displayed peptide libraries with affinity selection. With test affinity

selection on streptavidin we isolated clones with typical motif HPQ and high affinity to streptavidin. With affinity selection on protein A from library Ph.D.-C7C™ with non-specific elution we isolated a peptide CAKTDPKGC and confirmed its binding to protein A with quantitative real-time polymerase chain reaction. The peptide's sequence is very similar to the sequence of antibody constant region, which is natural ligand of protein A. The selection from library Ph.D.-C7C™ with specific elution was not successful. We isolated peptides with distinct motif GKL with specific elution with antibody constant region from library Ph.D.-12™. Peptides GGKLTTHLHST and GISDFMQTKMPL specifically bind to protein A, which was confirmed with quantitative real-time polymerase chain reaction.

Ključne besede

Stafilokokni protein A, *Staphylococcus aureus*, bakteriofagni prikaz, ligand proteina A, afinitetna selekcija

Key words

Staphylococcal protein A, *Staphylococcus aureus*, phage-display, protein A ligand, affinity selection

Seznam okrajšav

AK	Aminokislina
BSA	Goveji serumski albumin
C _H	Konstantno področje težke verige
CR1	humani receptor komplementa 1
C _t	Cikel meje zaznavanja
Cy	Cianinsko barvilo (angl. Cyanine)
Da	Dalton, enota za relativno molekulsko maso
ddH ₂ O	Ultra čista voda
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
EGFR	Receptor za epidermalni rastni dejavnik (angl. Epidermal growth factor receptor)
ELISA	Encimskoimunski test na trdni podlagi (angl. Enzyme-linked immunosorbent assay)
Fab	Fragment protitelesa, ki veže antigen
Fc	Konstantna regija protitelesa
FcγRII	Receptor za Fc regijo IgG
Fv	Variabilni fragment protitelesa
HCIC	Adsorpcijska-hidrofobna kromatografija (angl. Hydrophobic charge-induction chromatography)
HRP	Hrenova peroksidaza
Ig	Imunoglobulin
IGF-1	Inzulinu podoben rastni faktor-1
IMAC	Kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija (angl. Immobilized metal affinity chromatography)
IPTG	Izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid
LB	Tekoče gojišče Lennox L Broth Base

mAb	Monoklonsko protitelo
MRSA	na meticilin odporni <i>S. aureus</i> (angl. Methicillin-resistant <i>S. aureus</i>)
NE	Nepomnoženi eluat
NK	Negativna kontrola
NMR	Jedrska magnetna resonanca (angl. Nuclear magnetic resonance)
NP	Nepolarna aminokislina
OH	Aminokislina s hidroksilno skupino
P	Polarna aminokislina
PBS	Fosfatni pufer s soljo
PBST	Fosfatni pufer s soljo z dodanim Tweenom® 20
PE	Pomnoženi eluat
PEG	Polietilenglikol
pfu	Plakotvorna enota (angl. Plaque forming unit)
PK	Pozitivna kontrola
PpL	Protein L, izraža ga <i>Peptostreptococcus magnus</i>
qPCR	Kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (angl. quantitative polymerase chain reaction)
SA	Streptavidin
scFv	Enoverižni variabilni fragment protitelesa
SpA	Stafilokokni protein A
SpA _{KKAA}	Mutiran ne-toksičen protein A
SpG	Stafilokokni protein G
TAC	Tiofilna kromatografija (angl. Thiophilic affinity chromatography)
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TNF- α	Tumorski nekrotični faktor alfa

Tris	Tris(hidroksimetil)aminometan
vrt./min	Število vrtljajev na minuto
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktozid

Okrajšave za aminokisline

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

1 Uvod

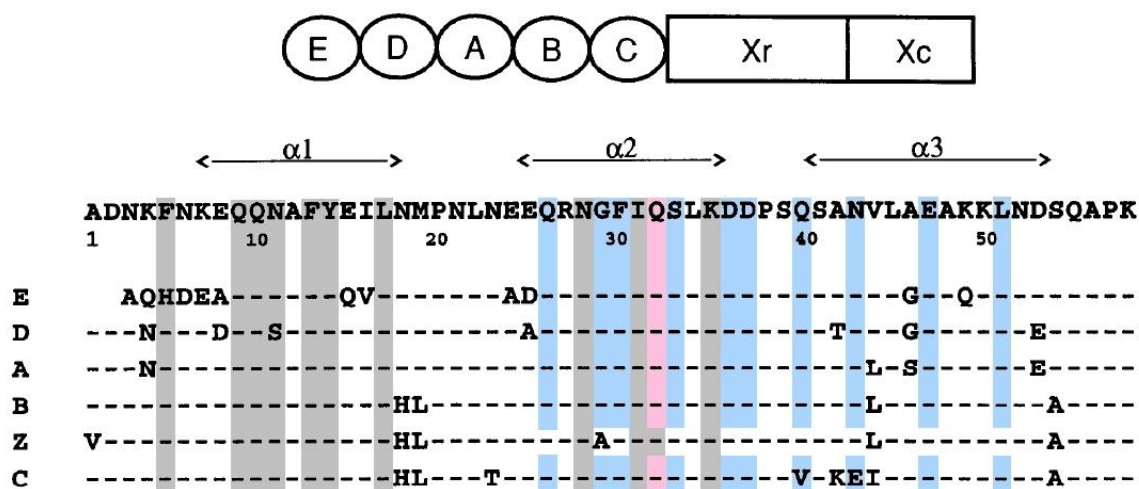
1.1 Protein A

Nekatere patogene bakterije na svoji površini izražajo virulentne dejavnike, ki vežejo imunoglobuline. S tem se bakterije skrijejo pred mehanizmi imunskega odziva ter ga s tem oslabijo (1). Stafilokokni protein A (SpA) je 42 kDa (2) velik protein iz bakterije *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), ki z vezavo imunoglobulinov bakteriji omogoča izogibanje pridobljenemu imunskemu odzivu gostitelja (3, 4). SpA je sestavljen iz petih visoko homolognih domen E, D, A, B ter C in je bodisi vezan na membrano bakterije, bodisi se sprošča v okolico (2).

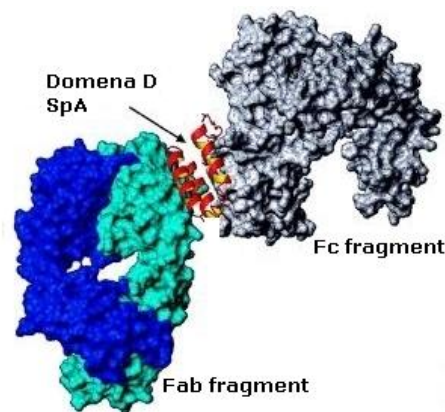
S. aureus je najpogostejši povzročitelj okužb krvnega obtoka, spodnjih dihal, kože in mehkih tkiv v ZDA. V več kot polovici primerov okužb v bolnišnici in izven, je povzročitelj na meticilin odporni *S. aureus* (MRSA, angl. methicillin-resistant *S. aureus*), ki je odporen na zdravljenje z beta laktamskimi antibiotiki. Pojavljajo se tudi sevi, ki so odporni na vankomicin (5), antibiotik zadnje izbire (5, 6). V večini primerov okužb s *S. aureus*, izolirane bakterije na svoji površini izražajo protein A, ki je bil identificiran kot ključni virulentni dejavnik (5).

SpA veže konstatno regijo (Fc regijo) protiteles človeškega ali živalskega izvora. Najmočnejši kompleks tvori z Fc regijo humanega IgG, z manjšo afiniteto pa veže tudi Fc regije humanih IgM, IgA, IgE in IgD. Ne tvori pa kompleksa s humanimi protitelesi iz podrazreda IgG₃ (7). SpA lahko tvori komplekse tudi z Fab regijo imunoglobulinov s težko verigo iz družine V_H3 (7), von Willebrandovim faktorjem ter TNF- α receptorjem (TNFR1) (5). Med živalskimi imunoglobulini se SpA najmočneje veže na mišje IgG₂ in IgA ter zajčja poliklonska protitelesa, z nižjo afiniteto pa na mišje IgG₁, IgG₃, IgM ter podganja, kozja, goveja ter svinjska protitelesa (7). Z vezavo regije Fc na SpA se bakterija zaščiti pred opsonizacijo in fagocitozo. Vezava SpA na receptorje B-limfocitov Fab fragmenta IgM povzroči aktivacijo in kloniranje B-limfocitov (3, 8). Zmanjša se membranski potencial mitohondrijev, sledi aktivacija kaspazne poti ter DNAz, ki razgradijo DNA B-limfocitov (8). To vodi v apoptozo B-celic, kar zavre odziv imunskega sistema na stafilokokno okužbo (3).

Vse domene SpA, razen X_c in X_r , tvorijo kompleks z Fc in Fab fragmentom IgG. Domena Z lahko tvori kompleks z Fc, ni pa sposobna tvoriti kompleksa s fragmentom Fab zaradi ključne mutacije $G29 \rightarrow A$. Graille *et al.* so na podlagi kristalne strukture kompleksa domene D in Fab fragmenta ugotovili, da sta vezavni mesti za Fc in Fab fragmenta ločeni, prekrivata se zgolj v aminokislinskem ostanku Q32 (slika 1). Fab in Fc fragmenta tvorita 'sendvič' z domeno SpA, saj jo vežeta vsak iz svoje strani, pri tem pa ne pride do steričnih ovir (slika 2). To nakazuje, da je SpA, kljub majhnosti, sposoben vezave obeh fragmentov hkrati ter da interakciji nista kompetitivni (2).

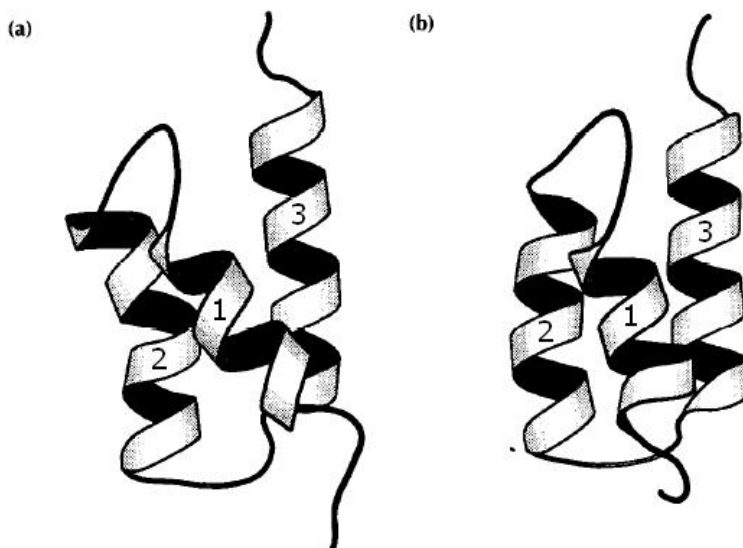


2



Slika 2: Fab in Fc fragmenta vezeta domeno SpA vsak iz svoje strani, pri čemer ne pride do steričnih ovir (2).

Sekundarno strukturo domen B in Z v raztopini sestavljajo tri α -vijačnice. Pri domeni B vijačnici 2 (E24 – D36) in 3 (S41 – A54) potekata antiparalelno, vijačnica 1 (Q9 – H18) pa je nagnjena pod kotom 30° glede na vijačnici 2 in 3. Sekundarna struktura domene Z je podobna, s tem da je kot med ravninami vijačnic manjši, 15° (slika 3) (1). Obe domeni imata identični vezavni mesti in afiniteti do Fc fragmenta IgG (10). V kristalni strukturi aminokislina med mestoma S41 in E47 niso urejene v vijačnico 3 (10, 11).



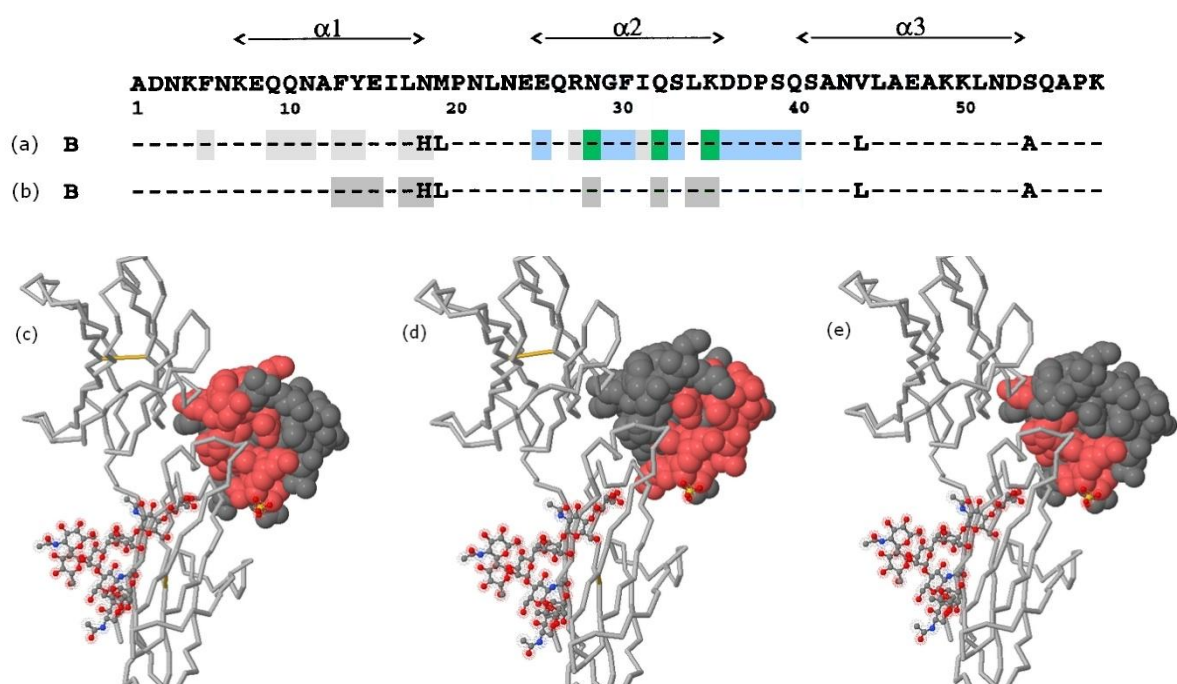
Slika 3: Sekundarni strukturi domen B in Z. (a) Vijačnica 1 domene B leži glede na vijačnici 2 in 3 pod kotom 30° . (b) Pri domeni Z je ta kot manjši in znaša 15° . Prirejeno po (1).

Aminokislinska zaporedja domen SpA so zelo homologna. Zaporedje domene A je v 89 % identično zaporedju domene B, zaporedje domene C pa v 91 % (12). Domena E je najbližja

N-koncu proteina in je sestavljena iz 56 aminokislinskih ostankov, ki so v 71 % identični kot pri domeni B (13).

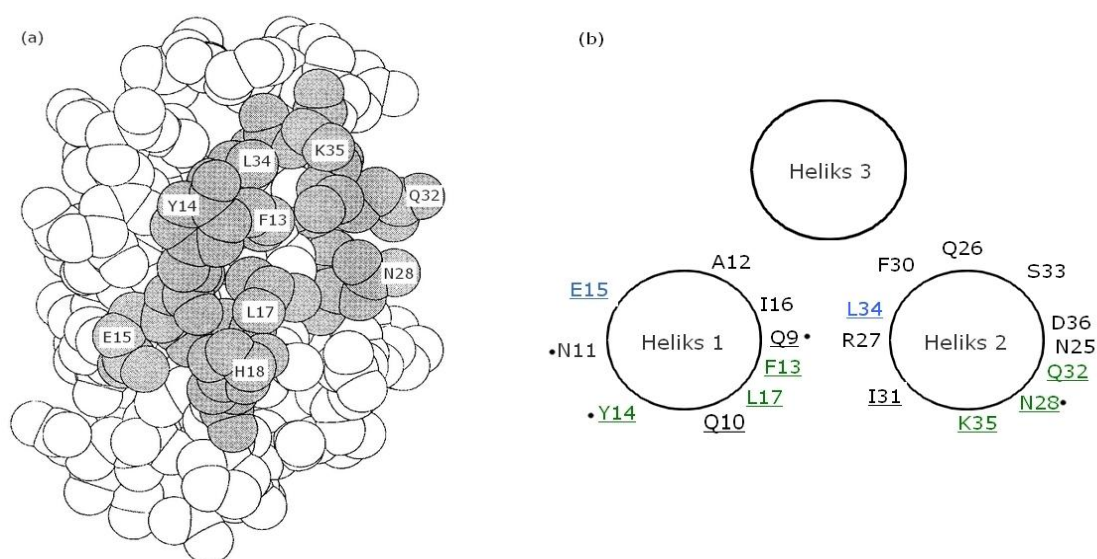
B domena SpA se veže na Fc fragment z aminokislinskimi ostanki α -vijačnic 1 in 2. Podatki o aminokislinskih ostankih domene B, ki so vključeni v interakcijo pa se nekoliko razlikujejo glede na metodo določanja. Z rentgensko kristalografijo so Gouda *et al.* določili dve površini na B domeni, ki prispevata k vezavi Fc (slika 4) (11), medtem ko je Deisenhofer ugotovil samo eno stično površino sestavljeno iz Q9, Q10, F13, Y14, L17, N28, I31, Q32 in K35 (slika 5b) (12). Z metodo zamenjave vodika za devterij (H-D zamenjava) so ugotovili, da interakcijo z Fc v raztopini tvori samo ena površina, ki jo sestavljajo aminokislinski ostanki F13, Y14, E15, L17, H18, N28, Q32, L34 in K35 (slika 4b in 4e), ki se nahajajo na α -vijačnicah 1 in 2 (slika 5) (11).

Interakcije v kompleksu domene B in fragmenta Fc so predvsem hidrofozne. K stabilnosti kompleksa pa prispevajo še štiri vodikove vezi, ki jih tvorijo aminokislinski ostanki proteina A Q9, N11, Y14 in N28, med katerimi je najpomembnejša Y14 (14).



Slika 4: Primerjava aminokislinskih ostankov domene B v kristalni strukturi in v raztopini, pomembnih pri interakciji z Fc fragmentom. (a) Domena B v kristalni strukturi tvori z Fc dve stični površini, določeni z rentgensko kristalografijo. Pri površini 1 so vključeni aminokislinski ostanki F5, Q9, Q10, N11, F13, Y14, L17, H18, R27, N28, I31, Q32 in K35, ki so obarvani s svetlo sivo barvo, ter

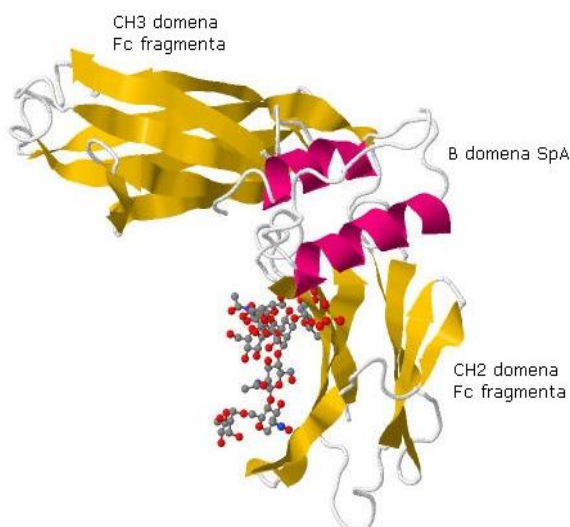
prostorsko predstavljani na sliki 4c. Z modro barvo so obarvani ostanki vključeni v površino 2: E25, N28, G29, F30, Q32, S33, K35, D36, D37, P38, S39 in Q40 (prostorska predstavitev slika 4d), ostanki, skupni obema kontaktoma, so obarvani zeleno. Številčenje aminokislinskih ostankov je prirejeno po (1). (b) Aminokislinski ostanki, ki tvorijo kompleks z Fc v raztopini, določeni z metodo zamenjave vodika za devterij. Prirejeno po (1) in (11). (c, d, e) S prostorsko zapolnjenim modelom so predstavljeni aminokislinski ostanki domene B vključeni v (c) površino 1, (d) površino 2 in (e) interakcijo Fc v raztopini, s paličnim modelom pa je predstavljena sladkorna veriga, ki je del Fc fragmenta.



Slika 5: Aminokislinski ostanki domene B, ki tvorijo kompleks s fragmentom Fc humanega IgG. (a) Prostorska predstavitev domene B v odseku Q9-A54 z obarvanimi AK ostanki odgovornimi za vezavo Fc v raztopini. (b) Prostorska predstavitev aminokislinskih ostankov na kristalni strukturi heliksov domene B. V kristalni strukturi kompleksa domene B in Fc, ki jo je opisal Deisenhofer (9), so za vezavo odgovorni podčrtani aminokislinski ostanki. Zeleno obarvani ostanki so enaki kot pri interakciji v raztopini, modro obarvani pa tvorijo povezavo le v raztopini. S pikami so označeni ostanki, ki z Fc tvorijo vodikove vezi. Prirejeno po (11) in (14), številčenje aminokislinskih ostankov je prilagojeno po (1).

Vezavno mesto za B domeno na protitelesu se nahaja na stiku domen C_H2 in C_H3 Fc regije (slika 6) in ima hidrofoben značaj. Z rentgensko kristalografijo so ugotovili, da hidrofobo vezavno mesto obdajajo polarni aminokislinski ostanki. Vezavno mesto sestavljajo aminokislinski ostanki M252, I253, S254, N434, H435, Y436 in tudi R255, E380 ter H433 na robu nepolarnega področja. Podobne rezultate so dobili tudi z metodo molekulskega

sidranja, kjer so Branco *et al.* določili, da so za vezavo v raztopini odgovorni ostanki M265, I266, Q330, H464, N465, H466 in Y467 (15).



Slika 6: Vezavno mesto domene B na fragmentu Fc se nahaja na stiku domene C_H2 in C_H3 (PDB koda 1FC2).

1.2 Uporaba proteina A

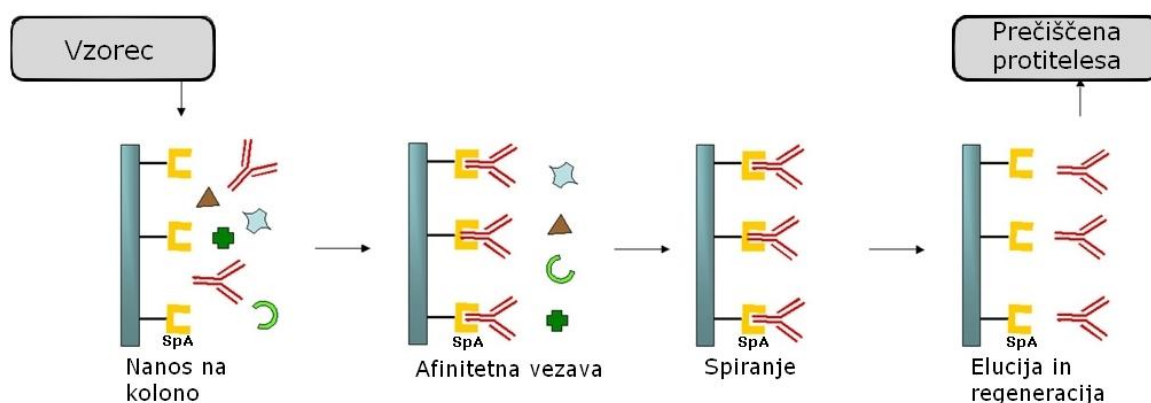
Protein A se v biotehnologiji uporablja kot imunokemijski reagent za identifikacijo ter čiščenje protiteles, kot reagent v testih ELISA in kot fuzijski protein za čiščenje rekombinantnih proteinov. Uporablja se tudi klinično, pri zunajtelesni imunoabsorpciji (1).

Monoklonska protitelesa in sintezne strukture protiteles spadajo med najobetavnejše biofarmacevtike, njihova prodaja pa bo predvidoma zrasla z odobritvijo novih učinkovin, ki so trenutno v kliničnih študijah. Ob koncu leta 2010 je bilo v 2. in 3. fazi kliničnih študij 30 protitelesnih produktov za zdravljenje rakavih obolenj in avtoimunih bolezni, več kot 200 pa jih je bilo vključenih v regulativne postopke. Prodaja tovrstnih učinkovin danes znaša 6,2 milijarde € v Evropi in 9,9 milijarde € v ZDA, v letu 2014 pa predvidevajo, da bo znašala 17,4 milijarde € v Evropi ter 27 milijard € v ZDA. Zaradi povečane potrebe po protitelesih visoke čistote posvečajo v razvoju in industriji veliko pozornosti izboljšanju postopkov proizvodnje ter čiščenja. Proizvodnja protiteles že lahko poteka na nivoju reda velikosti g/L, medtem ko so na področju čiščenja še potrebne izboljšave in optimizacije

metod, da bodo le-te cenejše, bolj specifične in selektivne. Med metodami za čiščenje protiteles je najbolj razširjena afinitetna kromatografija s proteinom A (15).

1.2.1 Afinitetna kromatografija s proteinom A

Afinitetno kromatografijo je leta 1968 predstavil Cuatrecasas *et al.* (16). Afinitetna kromatografija s proteinom A se uporablja za izolacijo in čiščenje protiteles ter fuzijskih proteinov z Fc regijo (15). Je biokemijska separacijska metoda, ki temelji na reverzibilni interakciji med proteinom A in protitelesom (17). SpA je kovalentno imobiliziran na trdni nosilec, najpogosteje agarozni. Skupaj tvorita afinitetni adsorbent, ki je nanešen na kromatografsko kolono. Sledi adsorpcija protiteles, ki je lahko pozitivna ali negativna. Pogostejša je pozitivna adsorpcija, saj omogoča zbiranje in koncentriranje protiteles v koraku elucije. Po adsorpciji sledi spiranje nevezanih snovi ter nato elucija protiteles, bodisi nespecifična s spremembo pH, ionske moči ali temperature, bodisi specifična s kompetitivnimi spojinami. Eluirana protitelesa zberemo, trdni nosilec pa je možno regenerirati za kasnejšo ponovno uporabo (slika 7) (7).



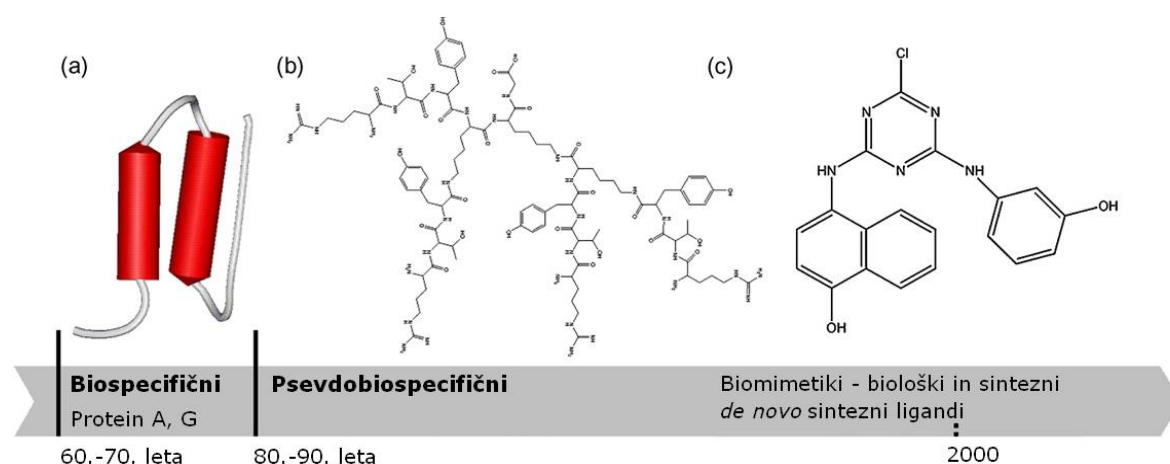
Slika 7: Shematična predstavitev glavnih korakov afinitetne kromatografije s SpA. Prirejeno po (7).

Biospecifične afinitetne ligande, kot je protein A, moramo proizvesti in izolirati, kar je naporen in drag proces. Pogosto je težavna imobilizacija liganda na trdni nosilec, saj moramo zagotoviti dostopnost bioaktivnega mesta in njegovo aktivnost. Visoka afiniteta ligandov do protiteles sicer omogoča visoko selektivnost, vendar tudi oteži elucijo, saj so potrebni bolj drastični pogoji za disociacijo (kisli pufri). To lahko vodi v odpuščanje liganda in s tem biokontaminacijo končnega produkta ali pa v nestabilnost in okvare produkta (7). Obe nečistoti lahko spodbudita imunski odziv ter povzročita toksične učinke pri človeku.

Dodatno težavo pa predstavlja tudi neopornost na natrijev hidroksid, ki se uporablja kot razkužilno sredstvo pri izolaciji in čiščenju terapevtskih protiteles (18).

1.2.2 Alternativni afinitetni ligandi za izolacijo protiteles

Na podlagi biospecifičnih ligandov, kot je protein A, so razvili psevdobiospecifične, biosintezne in popolnoma sintezne ligande (7), ki omogočajo povečano stabilnost, izboljšane lastnosti adsorpcije in nižje stroške izolacije (slika 8). Interakcije med SpA in IgG fragmenti so služile kot osnova za razvoj biomimetikov in *de novo* načrtovanih sinteznih ligandov (15).



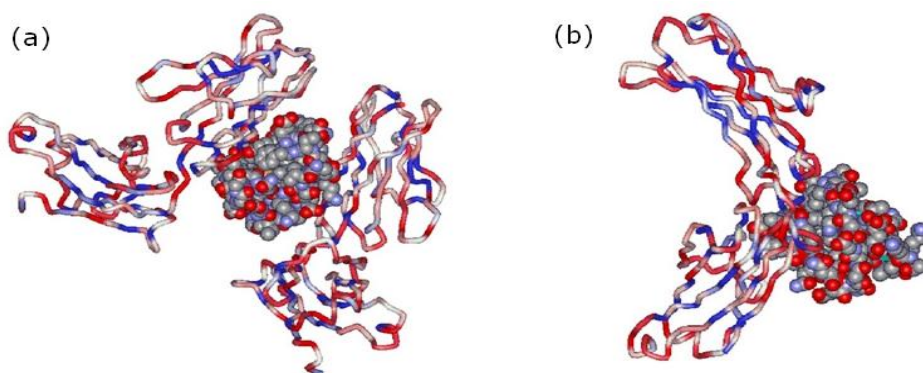
Slika 8: Razvoj biospecifičnih, psevdobiospecifičnih in sinteznih afinitetnih ligandov za čiščenje protiteles: (a) protein A, (b) biomimetik PAM peptid in (c) triazinski ligand 22/8. Prirejeno po (7).

1.2.2.1 Biospecifični ligandi

Z uporabo kombinatornih knjižnic je Nilsson *et al.* leta 1987 pripravil domeno Z, sintezni analog domene B SpA, za namene čiščenja protiteles. Domena Z je odporna na čiščenje z NaOH in omogoča elucijo pod milejšimi pogoji (7).

Pogosto uporabljena afinitetna liganda za čiščenje protiteles sta poleg proteina A tudi proteina G in L. Protein G (SpG) izražajo na svoji površini streptokoki skupine C in G in veže Fc fragment IgG ter C_H1 domeno fragmenta Fab (7). Učinkovitost čiščenja protiteles z SpG je manjša kot s SpA, saj poleg protiteles veže še albumin, α_2 -makroglobulin in kinogen. Poleg tega pa ima tudi manjšo vezavno kapaciteto ter manjšo stabilnost pri ostrih pogojih elucije (17).

Peptostreptococcus magnus izraža protein L (PpL), ki prepozna vezavno mesto na fragmentih Fab in scFv. Teh fragmentov ni možno čistiti s SpA in SpG, saj ne vsebujejo Fc regij. PpL ima nanomolarno afiniteto do lahkih verig $\kappa 1$, $\kappa 3$ in $\kappa 4$, ne veže pa verig $\kappa 2$ in λ . Sposoben je vezave protiteles različnih razredov, IgG, IgM, IgY, IgD in IgE (17).



Slika 9: (a) Ena domena PpL veže V_L regijo dveh IgG Fab fragmentov. (b) Domena SpG veže Fc fragment IgG. Prirejeno po (7).

1.2.2.2 Psevdobiospecifični ligandi

Psevdobiospecifični afinitetni ligandi imajo izboljšane lastnosti v primerjavi z biospecifičnimi ligandi, še posebej v primerjavi s SpA. Stroški proizvodnje teh ligandov so nižji, mogoča je *in situ* sterilizacija večjih količin proizvoda, so bolj odporni na kemijsko in biokemijsko razgradnjo ter so hkrati manj toksični in manj imunogeni (7). Afiniteta teh ligandov je praviloma nižja kot afiniteta biospecifičnih ligandov, vendar zadostna za specifično vezavo protiteles. Zaradi manjše specifičnosti liganda je za vsak protein potreben proces optimizacije, da se doseže želena selektivnost. Psevdobiospecifični ligandi se zato uporabljajo predvsem v kombinaciji z drugimi metodami čiščenja (17).

Za izolacijo protiteles s psevdobiospecifični ligandi izkoriščamo intrinzične lastnosti imunoglobulinov na molekularnem nivoju, npr. hidrofozne in tiofilne lastnosti. Psevdobiospecifični ligandi vključujejo hidrofozne in tiofilne ligande (T-geli), kombinirane ligande (4-merkaptometil piridin), hidroksiapatit ter nabite molekule, ki kelirajo kovinske ione (iminodiocetna kislina). V uporabi so različne kromatografske metode, ki izkoriščajo lastnosti teh ligandov: adsorpcijska-hidrofobna kromatografija (*HCIC*, *Hydrophobic charge-induction chromatography*), tiofilna kromatografija (*TAC*, *Thiophilic affinity*

chromatography), kovinsko-kelatna afinitetna kromatografija (*IMAC, Immobilized metal affinity chromatography*) in druge (17).

1.2.2.3 Sintezni ligandi

Sintezni ligandi so nizkomolekularne peptidne in nepeptidne spojine z afiniteto do protiteles, s katerimi se lahko izognemo večini pomanjkljivosti biospecifičnih ligandov. V primerjavi s psevdobiospecifičnimi ligandi pa omogočajo recikliranje liganda in večji nadzor nad postopki čiščenja protiteles. Pospešen razvoj sinteznih afinitetnih ligandov z izboljšanimi vezavnimi lastnostmi in specifičnostjo so omogočile nove kombinatorne tehnike, molekulsko modeliranje, *in silico* načrtovanje ter možnost določanja strukture z x-žarki ter NMR (17). Primeri peptidnih in nepeptidnih sinteznih ligandov so predstavljeni v preglednici I.

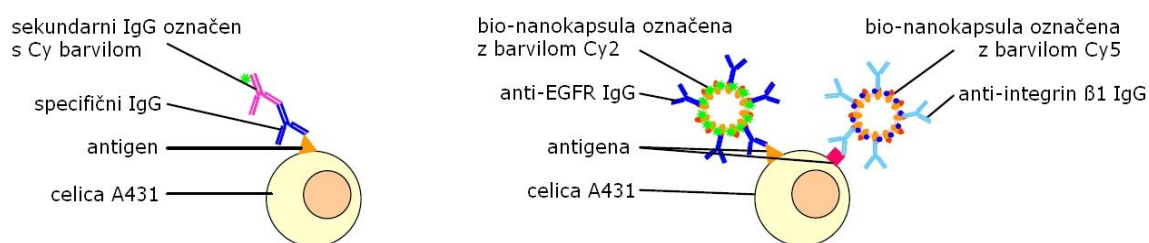
Preglednica I: Sintezni peptidni in nepeptidni ligandi

Peptidni ligandi	Lastnosti
His-Trp-Arg-Gly-Trp-Val	Afiniteta do širokega spektra podrazredov humanih IgG ter do kravjih, kozjih, mišjih in zajčjih IgG (17).
PAM (TG191318)	Biomimetik SpA (slika 8b) z afiniteto do imunoglobulinov različnih vrst (človeških, kravjih, prašičjih, mišjih, kozjih, idr.) ter razredov (IgG, IgY, IgM, IgA in IgE). Njegova prednost pred SpA je obstojnost pri nizkem pH-ju (17).
D-PAM	Derivat PAM-a, aminokisline so zamenjane z D izomeri, zaradi česar je odporen na razgradnjo s proteazami (17) in na razkužilna sredstva. Mogoča je elucija pri milih pogojih (18).
Fenilacetil-D-PAM (D-PAM- ϕ)	Ima 10-krat večjo vezavno kapaciteto kot D-PAM, brez zmanjšane specifičnosti vezave (19).

HWRGWV	Iz sesalske celične kulture veže humane IgG, pri tem pa ne tekmuje s SpA ali SpG (20). Ima tudi nižjo afiniteto do IgA (21).
Peptidni ligandi pridobljeni iz bakteriofagnih knjižnic	
EPIHRSTLTALL	42 % homologen z odsekom aminokislinskega zaporedja SpA in ima afiniteto do konstantne regije IgG ₁ (22).
Fc-I (ETQRCTWHMGELVWCEREHN) Fc-II (KEASCSYWLGELVWCVAGVE) Fc-III (DCAWHLGELVWCT)	Tekmujejo z domeno Z proteina A za vezavno mesto na IgG, pri čemer je afiniteta vezave peptida Fc-III le dvakrat nižja kot afiniteta proteinov A in G (23).
Afitelesa	Stabilne mini-Z-domene izolirane iz bakteriofagne knjižnice okrnjenih Z domen. Imajo podobno sekundarno strukturo kot domena Z in specifično afiniteto do imunoglobulinov (7).
Nepeptidni ligandi	
Ligand 22/8	Triazinski ligand, ki posnema stranski verigi ključnih aminokislin F13 in Y14 domene B SpA (slika 8c). Sposoben je vezave imunoglobulinov več vrst (piščančjih, kravjih, zajčjih, prašičjih, konjskih, idr.), več podrazredov IgG in razredov IgM ter IgA (15).
Ligand 8/7	Biomimetik proteina L, prepozna $\kappa 1$, $\kappa 2$, $\kappa 3$, $\kappa 4$ in λ lahke verige IgG (17).
Nanodelci	N-izopropil akrilamidni nanodelci s hidrofobnimi in karboksilatnimi skupinami imajo visoko afiniteto do Fc fragmenta IgG in pri pH 5,5 inhibirajo vezavo SpA na vezavno mesto (24).

1.2.3 Inovativne imunološke metode v diagnostiki

Sočasno določanje večih antigenov s konvencionalnimi imunološkimi metodami je oteženo, saj morajo biti primarna protitelesa pridobljena iz različnih vrst ali podrazredov imunoglobulinov, da ne pride do navzkrižnih reakcij s sekundarnimi protitelesi. Inovativna metoda z uporabo bio-nanokapsul omogoča sočasno, hitro in občutljivo določanje večih antigenov. Na bio-nanokapsule so pripete sintezne domene Z, ki preko Fc regije vežejo protitelesa proti določenemu antigenu, mesto za vezavo antigena pa je prosto (25). Taka struktura omogoča, da so vse Fv regije orientirane navzven ter s tem učinkovito vezavo antigena (26). Bio-nanokapsule so označene z različnimi Cy barvili, ki omogočajo detekcijo (slika 10) (25).



Slika 10: Na levi strani je prikazana konvencionalna imunološka metoda z uporabo primarnega in označenega sekundarnega protitelesa. Na desni pa je ponazorjena uporaba bio-nanokapsul označenih s Cy barvili. Na kapsule so pripeta primarna protitelesa, ki so lahko pridobljena iz iste vrste oz. lahko pripadajo istemu podrazredu IgG. Prirejeno po (25).

Bio-nanokapsule so lahko imobilizirane na imunosenzorje, kar poveča občutljivost, kapaciteto vezave antigena in afiniteto (26).

1.2.4 Protein A – možna tarča pri zdravljenju stafilokoknih okužb

V obdobju, ko antibiotiki izgubljajo svojo moč in so rezistentni sevi bakterij vzrok vse več bolezni, se znanstveniki trudijo najti nove načine premagovanja bakterijskih obrambnih mehanizmov (27). Antistafilokokna cepiva so se na živalskih modelih izkazala kot učinkovita, vendar so rezultati študij na človeku manj obetavni. Do sedaj še nobeno cepivo ni uspešno prestalo kliničnih študij (28), vendar se veliko pozornosti polaga na alternativne pristope k imunizaciji, uporabo multiplih antigenov (29) ter odkrivanju novih tarč (30). Ena izmed možnih tarč za zdravljenje okužb ki jih povzročajo stafilokoki je tudi SpA, ki se nahaja na površini *S. aureus*.

Mutiran ne-toksičen protein A (SpA_{KKAA}) pri miših stimulira humoralni imunski odziv, onemogoči vezavo Fc in Fab fragmentov na domene proteina A, spodbudi opsonofagocitozo stafilokokov, prepreči tvorjenje abscesa zaradi stafilokokne okužbe (3) in ne sproži apoptoze B-celic (29). Na podlagi teh ugotovitev so Kim *et al.* pripravili protitelesa proti SpA_{KKAA}, ki se vežejo na domene SpA in preprečijo vezavo Fc ter Fab fragmentov. Protitelesa spodbujajo opsonofagocitozo na meticilin odpornih stafilokokov v človeški krvi ter bi lahko bila v obliki cepiva učinkovita pri preprečevanju in v terapiji stafilokoknih okužb pri človeku (3).

Podjetje Elusys Therapeutics je razvilo bikomponentno protitelo, sestavljeno iz monoklonskega protitelesa proti proteinu A ter monoklonskega protitelesa proti humanemu receptorju komplementa 1 (CR1). Bikomponentno protitelo poveže *S. aureus* preko SpA s CR1, in s tem aktivira makrofage, ki odstranijo nastali kompleks. Prvi rezultati testiranja na živalih so obetavni, saj je aplikacija bikomponentnega protitelesa pri okuženih miših zmanjšala bakterijsko breme (31).

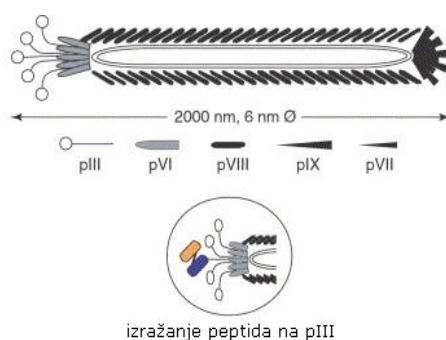
1.3 Metoda predstavitve na bakteriofagu

Bakteriofagi so raznolika skupina virusov, ki lahko okužijo bakterijske celice (32). Bakteriofage sta odkrila britanski mikrobiolog Frederick Twort leta 1915 in neodvisno leta 1917 francosko-kanadski mikrobiolog Félix d'Hérelle. Slednji jih je tudi poimenoval "jedci bakterij" po grški besedi *phagein*, ki pomeni jesti (27). Po okužbi bakterijske celice, se bakteriofag v njej namnoži in tvori se veliko število identičnih bakteriofagov. Nitasti bakteriofagi se izločajo v okolje bakterije skozi celično membrano, litični pa se iz celice sprostijo po lizi le-te (33). Do odkritja penicilina so bakteriofage uporabljali v terapevtske namene, za zdravljenje kuge in kolere (27). Bakteriofagi se uporabljajo tudi kot vektorji v rekombinantni DNA tehnologiji. V ta namen se najpogosteje uporabljajo bakteriofagi specifični za bakterije *Escherichia coli* (32).

Na površini bakteriofagov lahko predstavimo (poli)peptide, v obliki fuzijskih proteinov s proteini fagne kapside. Fagni prikaz, ki ga je prvi opisal Smith leta 1985, je postala učinkovita metoda iskanja novih peptidov z želenimi lastnostmi (34). V DNA nitastega (M13, fd in f1) ali litičnega (T7, T4 in λ) bakteriofaga lahko vstavimo poljubno nukleotidno zaporedje, ki se izrazi kot protein na kapsidi bakteriofagnega delca. Bakteriofagna

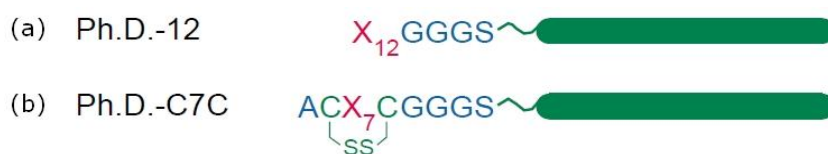
predstavitvena knjižnica je zmes velikega števila bakteriofagnih klonov, pri čemer ima vsak izmed njih vstavljen drugačen odsek DNA in posledično na svoji površini izkazuje drug peptid (32).

Najpogosteje uporabljen fagni vektor je nistati fag M13 (34), pri katerem peptide izrazimo v petih kopijah kot fuzijske proteine s kapsidnim proteinom pIII (slika 11). Vseh pet kopij pIII lahko nosi izražen peptid, pri tem pa njihova infektivna funkcija ni prizadeta, če je peptid krajši od 50 aminokislinskih ostankov (35).



Slika 11: Izražanje peptida na bakteriofagnem kapsidnem proteinu pIII. Prirejeno po (36).

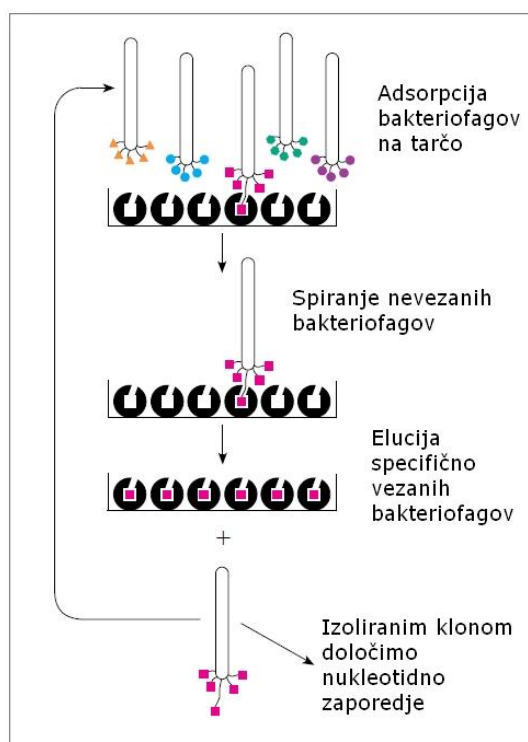
V primeru bakteriofagnih knjižnic Ph.D.-12™ in Ph.D.-C7C™, je izražen peptid pritrjen na N-konec pIII preko kratkega distančnika G-G-G-S. Pri knjižnici Ph.D.-C7C™ je na vsako stran peptida iz sedmih aminokislinskih ostankov dodan cistein, ki omogoča nastanek cikličnih peptidov preko disulfidnega mostu (slika 12) (35).



Slika 12: (a) Linearni dodekapeptid iz knjižnice Ph.D.-12™ je preko distančnika G-G-G-S povezan z N-koncem proteina pIII. (b) Ciklični heptapeptid iz knjižnice Ph.D.-C7C™ je prav tako pritrjen na protein pIII z distančnikom, vendar je med sedmimi naključnimi aminokislinami (X) in distančnikom še cistein. Na N-koncu izraženega heptapeptida sta alanin in cistein. Cisteina tvori disulfidni most (35).

Pri afinitetni selekciji peptidov iz bakteriofagnih knjižnic (angleško *biopanning*) imobiliziramo tarčo na mikrotitrsko ploščico. Bakteriofage iz knjižnice inkubiramo z

imobilizirano tarčo, da se bakteriofagi z ustreznimi peptidi vežejo na tarčo. Nevezane bakteriofage speremo, vezane pa eluiramo bodisi specifično z raztopino proste tarče ali kompetitivnim ligandom, bodisi nespecifično s spremembo pH, ionske moči, denaturacijo, delno proteolizo ali sonifikacijo. Eluirane bakteriofage pomnožimo in ponovno vežemo na tarčo (34). Tak postopek ponovimo 3-4 krat (35), pri tem v vsaki stopnji zaostriamo pogoje, saj želimo obogatiti klone z visoko afiniteto do tarče. Po zadnji stopnji izbranim klonom določimo afiniteto vezave, največkrat s testom ELISA, ter jim določimo nukleotidno zaporedje (slika 13) (34).



Slika 13: Shematska predstavitev ene stopnje afinitetne selekcije iz bakteriofagnih knjižnic. Prirejeno po (35).

Z vsako naslednjo stopnjo afinitetne selekcije želimo doseči večjo učinkovitost selekcije oz. obdržati bakteriofage, ki imajo visoko afiniteto do tarče in jih pomnožiti. To dosežemo z zaostrovanjem pogojev, kot je delež detergenta v pufru za spiranje in število zaporednih spiranj nevezanih bakteriofagov. Pogoje selekcije lahko zaostriamo samo do določene meje, saj lahko v nasprotnem primeru tudi izgubimo bakteriofagne klone, ki imajo visoko afiniteto do tarče. Za vsako specifično tarčo je torej potrebno najti optimalne pogoje, ki nam omogočijo izolacijo klonov z dovolj visoko afiniteto (32).

Z metodo predstavitve na bakteriofagu so Diamond, Kehoe in Kay, Kay *et al.* ter Benhar uspešno izolirali modulatorje vezavnih in alosteričnih mest encimov. Williams in Baird sta odkrila inhibitor kalikreina DX-88, ki ustavi sintezo bradikinina. Uporablja se v terapiji dednega angioedema. Z metodo bakteriofagnega prikaza so Basha *et al.* izolirali peptide, ki vežejo toksin antraksa oz. receptorje na njegovi površini. Primer uporabnosti te metode je tudi antagonist inzulinu podobnega rastnega faktorja-1 (IGF-1). Predstavitev na bakteriofagu pa ni uporabna metoda le za izolacijo peptidov z afiniteto do izbrane tarče, temveč tudi za raziskovanje interakcij med proteini, prispevala pa je tudi k razvoju imunoterapije in cepiv (34).

2 Namen dela

Protein A je pomemben virulenčni dejavnik bakterije *S. aureus*, ki povzroča okužbe krvnega obtoka, dihal, mehkih tkiv in kože. SpA z vezavo imunoglobulinov bakteriji omogoči, da se izogne imunskemu sistemu. Zaradi učinkovitih mehanizmov izogibanja imunskemu sistemu in odpornosti na številne antibiotike, znanstveniki iščejo nove načine zdravljenja stafilokoknih okužb. Antistafilokokna cepiva so trenutno v fazi kliničnih študij, vendar zaradi neuspešnosti intenzivno iščejo alternativne pristope k imunizaciji ter možne tarče za zdravljenje. Ena izmed možnih strategij je tudi ciljana dostava učinkovine do SpA s pomočjo liganda, ki se veže nanj.

V diplomski nalogi bomo s pomočjo afinitetnih selekcij na SpA iz bakteriofagnih knjižnic poskušali izselektionirati peptidne ligande, ki se vežejo na SpA. Uporabili bomo dve bakteriofagni knjižnici. Knjižnico Ph.D.-C7C™ sestavljajo bakteriofagi s cikličnimi heptapeptidi, knjižnico Ph.D.-12™ pa bakteriofagi z linearnimi dodekapeptidi na svoji površini. Naredili bomo tudi testno selekcijo na streptavidinu iz bakteriofagne knjižnice Ph.D.-C7C™.

Izbranim bakteriofagnim klonom bomo določili aminokislinska zaporedja peptidov, ki jih izražajo na svoji površini, ter poskusili poiskati motiv zaporedja, ki bi lahko bil odgovoren za vezavo na SpA. Vezavo izbranih bakteriofagnih klonov na SpA bomo vrednotili s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Sposobnost vezave izoliranih peptidov na SpA bomo dodatno preverili z iskanjem področij na tridimenzionalni površini domen C_{H2} in C_{H3} fragmenta Fc, ki se ujemajo z linearnimi zaporedji izoliranih peptidov. Konstantna regija protiteles je namreč naravni ligand SpA, zato predvidevamo, da bodo zaporedja izoliranih peptidov podobna aminokislinskim ostankom Fc fragmenta.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti

Reagent	Proizvajalec
Agar-agar, Kobe , pulv.	Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
Agaroz	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Biotin, 10mM	New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
DMF (dimetilformamid)	Merck, Darmstadt, Nemčija
Etanol, absolutni	Riedel-de Haën AG, Seelze, Nemčija
Dinatrijeva sol etilendiamintetraoetne kisline dihidrat	SERVA Electrophoresis, Hiedelberg, Nemčija
Glicerol	Fluka Chemie, Buchs, Švica
Glicin	Riedel-de Haën AG, Seelze, Nemčija
Gojišče LB (Lennox L Broth Base)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, ZDA
H ₂ SO ₄ , 95 – 97%	Merck, Darmstadt, Nemčija
HCl, 32%	Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italija
IPTG (izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid)	Promega, Madison, Wisconsin, ZDA
KCl	Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italija
KH ₂ PO ₄	Kemika, Zagreb, Hrvaška
MgCl ₂	Fluka Chemie, Buchs, Švica
NaCl	Scharlau Chemie S.A., Barcelona, Španija
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Nal	Riedel-de Haën AG, Seelze, Nemčija
PEG-8000 (polietilenglikol 8000)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Tetraciklin, liofilizat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Tris (tris(hidroksimetil)aminometan)	Riedel-de Haën AG, Seelze, Nemčija

Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA

3.1.2 Biološki material

Peptidnopredstavitveni knjižnici	bakteriofagni	Proizvajalec
Ph.D.-12™ in Ph.D.-C7C™ Titer knjižnice Ph.D.-12™ je $1 \cdot 10^{13}$ pfu/mL, knjižnice Ph.D.-C7C™ pa $2 \cdot 10^{13}$ pfu/mL.		New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Gostiteljski bakterijski sev		
<i>E. coli</i> ER2738		New England BioLabs, Massachusetts, Ipswich, ZDA
Peptidi in proteini		
Protein A, liofilizat Protein A, raztopljen v PBS (koncentracija 1 g/L) smo hranili pri -80°C.		Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
Fc fragment humanega IgG (Chrome Pure) Fc fragment je bil pripravljen s proteolizo s papinom. Hranili smo ga v fosfatnem pufru (koncentracija 2,3 g/L) pri temperaturi 4°C.		Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, Velika Britanija
Streptavidin, liofilizat Streptavidin, raztopljen v PBS (založna raztopina s koncentracijo 0,81 mg/mL) smo hranili pri -20°C.		New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
BSA (goveji serumski albumin), liofilizat		Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
MAB398 Mišje monoklonsko nevtralizacijsko IgG ₁ proti človeškemu leptinu s koncentracijo 0,5 mg/mL.		R&D Systems®, Minneapolis, MN, ZDA
Anti-M13-mAb-HRP mAb proti bakteriofagu M13, konjugirano s hrenovo peroksidazo.		GE Healthcare, Little Chalfont, Združeno kraljestvo

Bakteriofagni kloni	
Bakteriofagni klon C7C-M1 Klon C7C-M1, s titrom $3,8 \cdot 10^{11}$ pfu/mL, smo shranjevali pri -20°C.	Izoliral Peter Molek iz knjižnice Ph.D.-C7C™, z afinitetno selekcijo na mišjem mAb proti človeškemu leptinu.
Bakteriofagni klon NK-K4 Klon NK-K4, s titrom $8 \cdot 10^{12}$ pfu/mL, smo shranjevali pri -20°C.	Izolirala dr. Mojca Lunder iz knjižnice Ph.D.-C7C™, z afinitetno selekcijo na streptavidinu.
Začetni oligonukleotidi	
F-M13 5-AGGGTGGCGG TACTAAACC-3	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Nemčija
R-M13 5-CAGTACCAGGCGGATAAGTG-3	Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Nemčija
-96 gIII (100 pmol, 1 pmol/μL) 5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG -3'	New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA

3.1.3 Pufri in raztopine

Pufer in sestava	Količine	Postopek
PBS – fosfatni pufer, pH 7,4		
NaCl	3,2 g	Navedene količine snovi smo ob mešanju z magnetnim mešalom raztopili v 400 mL bidestilirane vode (ddH ₂ O). pH pufra smo uravnali na 7,4 s HCl. Pufer smo avtoklavirali in shranili pri sobni temperaturi.
KCl	0,08 g	
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,722 g	
KH ₂ PO ₄	0,096 g	
ddH ₂ O	400 mL	
PBST – fosfatni pufer s Tween®-om 20		
0,5 % PBST:		V 50 mL fosfatnega pufra smo dodali 250, 50 oz. 25 µL Tween®-a 20 in premešali. Pufer smo sterilizirali z membransko filtracijo in shranjevali pri sobni temperaturi.
PBS	50 mL	
Tween® 20	250 µL	
0,1 % PBST:		
PBS	50 mL	
Tween® 20	50 µL	

0,05 % PBST:		
PBS	50 mL	
Tween® 20	25 µL	
PEG/NaCl (20 % w/v PEG-8000 / 2,5 M NaCl)		
PEG-8000	8 g	PEG-8000 in NaCl smo raztopili v 40 ml ddH ₂ O in dobro premešali. Pripravili smo 6 alikvotov raztopine ter jih avtoklavirali. PEG/NaCl smo shranjevali pri sobni temperaturi.
NaCl	5,85 g	
ddH ₂ O	do 40 mL	
IPTG – 1 M raztopina		
IPTG	2,383 g	Natehtano količino IPTG-ja smo raztopili v ddH ₂ O, sterilizirali z membransko filtracijo in alikvotirali v mikrocentrifugirke. Raztopino smo hranili pri temperaturi -20°C.
ddH ₂ O	10 mL	
X-gal – 2 % raztopina		
X-gal	0,2 g	Natehtano količino X-gal-a smo raztopili v DMF-ju in raztopino alikvotirali v mikrocentrifugirke. Hranili smo jo pri temperaturi -20°C.
DMF	10 mL	
Nevtralizacijski pufer (1 M Tris-HCl, pH 9,1)		
Tris	2,423 g	Natehtano količino Tris-a smo raztopili v 20 mL ddH ₂ O in s HCl uravnali pH raztopine na 9,1. Pufer smo sterilizirali z membransko filtracijo in ga shranjevali pri sobni temperaturi.
ddH ₂ O	20 mL	
Elucijski pufer (glicinski pufer (pH 2,2) / 0,4 M NaCl / 0,1 % BSA)		
Glicin	300 mg	Glicin in NaCl smo raztopili v ddH ₂ O ter pH pufra s HCl uravnali na 2,2. Dodali smo še BSA in pufer sterilizirali z membransko filtracijo in ga hranili pri sobni temperaturi.
NaCl	20 mg	
BSA	20 mL	
ddH ₂ O		

Jodidni pufer, pH 8,0		
Tris	48,5 mg	V ddH ₂ O smo raztopili navedene reagente in pH uravnali na 8,0. Pufer smo sterilno filtrirali in ga shranjevali pri sobni temperaturi, zaščenega pred svetlobo.
HCl, 32 %	39,3 µL	
EDTA (0,5 M)	80 µL	
NaI	23,98 g	
ddH ₂ O	40 mL	
50 % glicerol v PBS		
Glicerol		Glicerol smo raztopili v PBS v razmerju 1:1 in shranili na sobni temperaturi.
PBS		
Raztopina tetraciklina (20 mg/mL)		
Glicerol	40 mL	Tetraciklin raztopljen v 40 mL ddH ₂ O smo filtrirali preko membranskega filtra in raztopino dodali glicerolu, steriliziranim z nasičeno vodno paro. Raztopino smo shranjevali pri -20°C.
ddH ₂ O	40 mL	
Tetraciklin	1,6 g	
Raztopina BSA		
5 % BSA:		Natehtano količino BSA smo raztopili v PBS in raztopino sterilno filtrirali. Shranjevali smo jo v hladilniku, pri 4°C.
BSA	2,5 g	
PBS	50 mL	
2 % BSA:		
BSA	1 g	
PBS	50 mL	
0,1 % BSA:		
BSA	0,05 g	
PBS	50 mL	
Raztopina streptavidina v PBS (0,1 µg/mL)		
Pomožna raztopina:		Najprej smo pripravili pomožno raztopino streptavidina (SA) zaradi majhnih volumnov, ki jih je bilo potrebno pipetirati. 9 µL PBS-ja
SA (0,81 mg/mL)	1 µL	
PBS	9 µL	

SA v PBS (81 µg/mL) 2 % BSA/PBS	0,62 µL 500 µL	smo dodali 1µL založne raztopine streptavidina, pomešali in odpipetirali 0,62 µL pomožne raztopine s koncentracijo 81 µg/mL v 500 µL 2 % raztopine BSA. Raztopino smo dobro premešali.
Raztopina biotina v 0,1 % PBST oz. 0,05 % PBST (1 mM)		
Biotin (10 mM) 0,1 % oz. 0,05 % PBST	10 µL 90 µL	90 µL 0,1 % oz. 0,05 % PBST-ja smo dodali 10 µL 10 mM biotina in premešali.
0,5 % BSA/0,1 % PBST		
BSA 0,1 % PBST	0,25 g 50 mL	Zatehtano količino BSA smo raztopili v 50 mL 0,1 % PBST in premešali.
Raztopina Fc fragmenta humanih IgG v 0,1 % BSA (57,5 µg/mL)		
Fc fragment (2,3 mg/mL) 0,1 % BSA	5 µL 195 µL	5 µL raztopine Fc fragmenta smo dodali 195 µL 0,1 % BSA ter premešali. Raztopino smo pripravljali sproti.

3.1.4 Gojišča

Gojišče in sestava	Količine	Postopek
Tekoče gojišče LB		
Gojišče LB (Lennox L Broth Base) Sestava na 1L: 10 g peptona 5 g kvasnega ekstrakta 5 g NaCl ddH ₂ O	8 g 400 mL	8 g gojišča smo raztopili v 400 mL ddH ₂ O in avtoklavirali. Shranjevali smo ga pri sobni temperaturi.
Agarno gojišče LB		
Gojišče LB (Lennox L Broth Base) Agar-agar ddH ₂ O	8 g 6 g 400 mL	Gojišče LB in agar-agar smo s pomočjo magnetnega mešala dispergirali v ddH ₂ O in avtoklavirali. V komori z laminarnim pretokom zraka

		smo gojišče prelili v petrijevke (premer 9 cm) in počakali da se strdi. Gojišča smo hranili v hladilniku pri temperaturi 4°C.
LB – agarozna trdno gojišče (agarni top)		
Tekoče gojišče LB Agarozna	200 mL 1,2 g	Agarozo smo dispergirali v tekočem gojišču LB, alikvotirali po 40 mL in avtoklavirali. Gojišče smo shranjevali pri sobni temperaturi.
Diferencialno agarno gojišče LB/IPTG/X-gal		
Gojišče LB (Lennox L Broth Base) Agar-agar ddH ₂ O 1 M IPTG 2 % X-gal	8 g 6 g 400 mL 800 µL 84 µL	Gojišče LB in agar-agar smo s pomočjo magnetnega mešala dispergirali v ddH ₂ O in avtoklavirali. Ko je temperatura disperzije po avtoklavanju dosegla med 50 in 60°C, smo dodali IPTG in X-gal. V komori z laminarnim pretokom zraka smo gojišče prelili v petrijevke (premer 9 cm) in počakali da se strdi. Gojišča smo hranili v hladilniku pri temperaturi 4°C.

Pufre, raztopine in gojišča smo sterilizirali z nasičeno vodno paro. Sterilizacija je potekala pri nadtlaku 1 bar, temperaturi 121°C, 15 minut. Sterilizacijo z membransko filtracijo smo izvedli s pomočjo sterilnih membranskih filtrov s premerom por 0,20 µm (nepirogeni, hidrofilni).

3.1.5 Bakterijske kulture

Bakterijska kultura in sestava	Količine	Postopek priprave
Bakterijska kultura <i>E. Coli</i> ER2738 na agarnem gojišču LB		
Založna raztopina tetraciklina (20		Raztopino tetraciklina v tekočem gojišču

mg/mL)	20 µL	LB smo ob plamenu premazali po agarnem gojišču LB. S sterilizirano mikrobiološko zanko smo se dotaknili bakterij in jih nacepili na trdno gojišče z antibiotikom. Petrijevko z nacepljenimi bakterijami smo inkubirali čez noč pri 37°C, nato pa hranili v hladilniku pri 4°C. Posamezne kolonije bakterijske kulture smo uporabljali za pripravo tekočih bakterijskih kultur.
Tekoče gojišče LB	80 µL	
Bakterijski sev ER2738		
Prekonočna bakterijska kultura E. Coli ER2738		
Tekoče gojišče LB	10 mL	V tekoče gojišče LB smo dodali antibiotik. Z dotikom ene kolonije bakterijske kulture smo bakterije nacepili v gojišče z antibiotikom. Bakterijsko kulturo smo preko noči stresali pri 250 vrt./min in 37°C.
Založna raztopina tetraciklina (20 mg/mL)	10 µL	
Bakterijska kolonija ER2738 na trdnem gojišču		
Bakterijska kultura za pomnoževanje eluatov in posameznih bakteriofagnih klonov		
Tekoče gojišče LB	20 mL	V erlenmajerico z utori smo odmerili tekoče gojišče, antibiotik in prekonočno bakterijsko kulturo. Za pomnoževanje posameznih klonov smo bakterijsko kulturo alikvotirali po 2 mL v sterilne 4 mL plastične epruvete s pokrovčkom.
Založna raztopina tetraciklina (20 mg/mL)	20 µL	
Prekonočna bakterijska kultura ER2738	200 µL	

3.1.6 Laboratorijska oprema

Oprema	Oznaka	Proizvajalec
Analitska tehtnica	AB 104	Mettler Toledo, Kiisnacht, Švica

Avtoklav Systec	2540 EL	Bel-Art products, Pequannock, ZDA
Centrifuge	5804 R (F-34-6-38) 5415 R (F-45-24-11)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Hladilnik		Gorene, Velenje, Slovenija
Inkubator (37°C)	WTC	Binder GmbH, Tuttlingen, Nemčija
Komora z laminarnim pretokom zraka	LFVP 12	Iskra pio, Šentjernej, Slovenija
Magnetni mešalnik Rotamix	550 MMH	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Mikrotitrne ploščice Nunc- Immuno™	Module F8 MaxiSorp loose	Nunc, Roskilde, Danska
Mikrotitrne ploščice za PCR v realnem času	MicroAmp® Optical 96- Well Reaction Plate	Applied Biosystems, California, ZDA
Mikrovalovna pečica		LG, Seul, Južna Koreja
PCR v realnem času	ABI PRISM 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, California, ZDA
pH meter	691	Metrohm, Herisan, Švica
Pipetboy acu		Integra Biosciences, Hudson, ZDA
Pipete	0,5-10 µL 10-100 µL 100-1000 µL 1000-5000 µL	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Precizna tehtnica Exacta	610 EB	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Spektrofotometer Nanodrop	ND-1000	NanoDrop Technologies, Delaware, ZDA
Stresalnik Eppendorf	Thermomixer Comfort 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Stesalnik IKA®	MS3 digital	IKA Works, Wilmington, ZDA

Stresalniki Vibromix	314 EVT 403 EVT 104 EV	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Zamrzovalnik (-80°C)	Vip Series -86°C	Sanyo Electric Biomedical Co., Tokio, Japonska
Zamrzovalnik (-20°C)		Gorenje, Velenje, Slovenija

Pri delu smo uporabljali mikrocentrifugirke (0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL), plastične epruvete s pokrovčki (4 mL), petrijevke premera 9 cm, pipetne nastavke, birete za Pipetboy (10 mL, 25 mL), erlenmajerice z utori, penicilinke, falkonke (15 mL, 50 mL).

3.2 Metode

3.2.1 Afinitetna selekcija peptidov z metodo predstavitve na bakteriofagu

Z metodo predstavitve na bakteriofagu smo izvedli testno selekcijo na streptavidinu iz knjižnice Ph.D.-C7C™, selekcijo na proteinu A iz knjižnice Ph.D.-C7C™ z nespecifično elucijo ter selekcijo na proteinu A iz knjižnic Ph.D.-C7C™ in Ph.D.-12™ s specifično elucijo. Vsaka selekcija je bila sestavljena iz treh stopenj, pri čemer smo v vsaki selekcijski stopnji sledili spodaj navedenim korakom (podrobnosti posameznih selekcij so navedene v nadaljevanju):

1. korak: Na površino mikrotitrne ploščice MaxiSorp smo adsorbirali tarčo. Mikrotitrsko ploščico smo inkubirali preko noči pri 4°C in 45 vrt./min.
2. korak: S tarčo nezasedeno površino v vdolbinici mikrotitrne ploščice smo blokirali z BSA. Blokiranje je potekalo 1 uro, pri sobni temperaturi in stresanju s 50 vrt./min.
3. korak: Nevezane proteine smo sprali s PBST z različnimi deleži detergenta. Ploščico smo ob vsakem spiranju inkubirali 3 minute pri sobni temperaturi in 100 vrt./min.

4. korak: V vdolbinico smo nanegli bakteriofage posamezne knjižnice, redčene v PBST. Vezava bakteriofagov je potekala 1 uro pri sobni temperaturi in pri 50 vrt./min.
5. korak: Nevezane bakteriofage smo sprali s PBST z različnimi deleži detergenta, odvisno od stopnje selekcije. Ob vsakem spiranju smo ploščico inkubirali 3 minute pri sobni temperaturi in 100 vrt./min.
6. korak: Vezane bakteriofage smo eluirali specifično, nespecifično ali zaporedoma najprej specifično ter nato še nespecifično. V primeru specifične elucije smo v vdolbinico dodali 100 μ L Fc fragmenta humanih IgG ter ploščico inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi in 50 vrt./min. Nespecifično smo vezane bakteriofage eluirali s 100 μ L kislega elucijskega pufra ob 10 minutnem stresanju pri sobni temperaturi in 100 vrt./min, ter takoj zatem nevtralizirali z nevtralizacijskim pufrom.
7. korak: 3 μ L nepomnoženega eluata (NE) smo titrirali, pri tem pa uporabili redčitve 10^1 , 10^2 in 10^3 . Postopek mikrobiološke titracije je opisan pod Mikrobiološka titracija.
8. korak: Ves preostanek NE smo prenesli v 20 mL kulture za pomnoževanje in stresali 4,5 ure pri 37°C in 250 vrt./min.
9. korak: Pomnožene bakteriofage (PE) smo 2-krat centrifugirali po 10 minut, pri 4°C in 10000 vrt./min ter tako odstranili celice bakterij. Po vsakem centrifugiranju smo supernatant prelili v sterilno centrifugirko.
10. korak: Dodali smo 1/6 volumna (tj. približno 3,3 mL) PEG/NaCl in bakteriofage čez noč obarjali v hladilniku pri 4°C.
11. korak: Oborjene bakteriofage smo centrifugirali 15 minut, pri 4°C in 10000 vrt./min, ter odstranili ves supernatant.
12. korak: Sediment smo resuspendirali v 1 mL PBS, raztopino prenesli v 1,5 mL mikrocentrifugirko ter centrifugirali 5 minut pri 4°C in 13200 vrt./min. S tem smo odstranili morebitne ostanke bakterijskih celic.
13. korak: Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali 170 μ L PEG/NaCl ter 1 uro inkubirali na ledu, da so se bakteriofagi ponovno oborili.
14. korak: Raztopino z oborjenimi bakteriofagi smo centrifugirali 10 minut pri 4°C in 13200 vrt./min ter odstranili ves supernatant.

15. korak: Sediment prečiščenih bakteriofagov smo resuspendirali v 200 μL 50 % glicerola v PBS, ponovno centrifugirali 2 minuti pri 4°C in 13200 vrt./min ter raztopino prenesli v novo 1,5 mL mikrocentrifugirko.
16. korak: 2 μL prečiščenega PE smo titrirali, pri čemer smo uporabili redčitve 10^8 , 10^9 in 10^{10} , preostanek pa shranili v zamrzovalniku pri -20°C.

3.2.1.1 Mikrobiološka titracija

Z mikrobiološko titracijo smo določali koncentracije bakteriofagov v nepomnoženih in pomnoženih eluatih (pfu/mL; število eluiranih bakteriofagov v 1 mL).

1. korak: Petrijevke z diferencialnim agarnim gojiščem LB/IPTG/X-gal smo v inkubatorju segreli na 37°C.
2. korak: V mikrovalovni pečici smo stalili agarozni top, ga alikvotirali po 3 mL za vsako redčitev bakteriofagne suspenzije ter termostatirali na 52°C.
3. korak: Eluat smo redčili s tekočim gojiščem LB do ustreznih redčitev. Izbrali smo tri zaporedne redčitve.
4. korak: 10 μL ustrezne redčitve smo prenesli v mikrocentrifugirko z 200 μL prekonočne bakterijske kulture *E. coli* ER2738 ter suspenzijo bakterij in bakteriofagov takoj prenesli v staljen agarozni top, premešali in vlili na petrijevko z agarnim gojiščem.
5. korak: Plošče smo pustili delno pokrite na pultu, dokler se gojišče ni strdilo ter jih nato zaprli in zatesnili s parafilmom. Čez noč smo jih inkubirali na 37°C.
6. korak: Naslednje jutro smo prešteli število modrih plakov na posamezni plošči izračunali titer po enačbi 1:

$$\text{Titer} \left(\frac{\text{pfu}}{\text{mL}} \right) = \frac{n \times R \times V'}{V} \quad \text{enačba 1}$$

pri čemer je n število plakov na plošči, R faktor redčitve (npr. 10^3 ali 10^9), V' celotni volumen redčitve (npr. 100 μL ali 1000 μL) ter V volumen redčitve, s katerim smo okužili bakterije (10 μL).

Izračunali smo tudi delež elucije, kot količnik med številom eluiranih bakteriofagov ter številom vseh bakteriofagov, vnesenih v posamezno stopnjo, množen s sto. Število

eluiranih bakteriofagov in število bakteriofagov vnesenih v naslednjo stopnjo smo izračunali iz titra nepomnoženega in pomnoženega eluata po enačbi 1.

3.2.2 Izolacija in pomnoževanje naključno izbranih klonov

1. korak: Iz petrijevsk po titraciji tretjega nepomnoženega eluata smo s sterilnimi pipetnimi nastavki prenesli naključno izbrane modre kolonije v alikvote kulture za pomnoževanje posameznih bakteriofagnih klonov. Klone smo stresali 4,5 ure pri 37°C in 250 vrt./min.
2. korak: Dodali smo 340 µL PEG/NaCl in 1 uro inkubirali na ledu.
3. korak: Oborjene klone bakteriofagov smo centrifugirali 10 minut pri 4°C in 12300 vrt./min ter odstranili ves supernatant.
4. korak: Sedimente smo resuspendirali v 200 µL PBS, ponovno centrifugirali 2 minuti pri 4°C in 12300 vrt./min. Supernatante smo shranili v novih sterilnih 1,5 mL mikrocentrifugirkah pri temperaturi 4°C.

3.2.3 Izolacija, čiščenje in določanje nukleotidnega zaporedja bakteriofagne DNA izbranih klonov

1. korak: V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 500 µL tekočega gojišča LB z bakteriofagi izbranega klona.
2. korak: Dodali smo 200 µL PEG/NaCl, premešali na vibracijskem mešalniku ter inkubirali 10 minut na sobni temperaturi, da so se bakteriofagi oborili.
3. korak: Oborjene bakteriofage smo centrifugirali 10 minut pri 4°C in 10000 vrt./min ter odstranili ves supernatant.
4. korak: Sedimente smo resuspendirali v 100 µL jodidnega pufra in jih dobro premešali na vibracijskem mešalniku. Jodidni ioni razbijejo fagno kapsido in s tem omogočijo prehod bakteriofagne DNA v raztopino.
5. korak: Dodali smo 250 µL absolutnega etanola in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. S kratko inkubacijo pri sobni temperaturi se obori enoverižna bakteriofagna DNA, bakteriofagni proteini pa ostanejo raztopljeni.
6. korak: Oborjeno enoverižno DNA smo ločili s centrifugiranjem 10 minut pri 4°C in 10000 vrt./min ter odstranili ves supernatant.

7. korak: Sediment smo sprali s 100 μL 70 % etanola in ponovno centrifugirali 10 minut pri 4°C in 13200 vrt./min.
8. korak: S pipeto smo odstranili ves etanol in vsebino mikrocentrifugirk posušili v komori z laminarnim pretokom zraka. Prisotnost etanola bi sicer motila določanje nukleotidnega zaporedja.
9. korak: Fagno DNA smo raztopili v 20 μL vode brez nukleaz in 5 μL te raztopine odpipetirali v 0,5 mL mikrocentrifugirko. Dodali smo 5 μL oligonukleotidnega začetnika -96 gIII s koncentracijo 5 μM . Nukleotidno zaporedje insertov bakteriofagnih klonov je z metodo po Sangerju določilo podjetje GATC Biotech iz Nemčije.
10. korak: S pomočjo spletnega orodja ExPASy Translate (37) smo nukleotidna zaporedja prevedli v aminokislinska zaporedja peptidov, ki se izražajo na površini bakteriofagov.

3.2.4 Testna afinitetna selekcija peptidnih ligandov streptavidina iz knjižnice Ph.D.-C7C™

Testno selekcijo smo izvedli na streptavidinu (SA) po postopku opisanem v poglavju 3.2.1. V vdolbinico mikrotitrne ploščice smo nanesti 100 μL raztopine SA s koncentracijo 81 $\mu\text{g/mL}$ (10 μL založne raztopine SA smo redčili z 90 μL PBS). Nezasedeno površino ploščice smo blokirali z 2 % BSA z dodanim 0,1 $\mu\text{g/mL}$ raztopine SA. S tem smo preprečili nespecifično vezavo kasneje dodanih bakteriofagov na izpostavljeno površino ploščice. SA smo dodali, da veže morebitno prisoten biotin v raztopini BSA. Glede na stopnjo selekcije smo spirali s pufrom z večjim deležem detergenta, s čimer smo odstranili bakteriofage, ki se na tarčo vežejo z nespecifičnimi šibkimi vezmi. Pogoji selekcije v posamezni stopnji so navedeni v preglednici II.

Preglednica II: Pogoji selekcije na SA v posamezni selekcijski stopnji

	Prva stopnja	Druga stopnja	Tretja stopnja
Vezava tarče	100 μL raztopine SA (81 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL raztopine SA (81 $\mu\text{g/mL}$)	100 μL raztopine SA (81 $\mu\text{g/mL}$)

Blokiranje	250 µL 2 % BSA + 0,1 µg/mL SA	250 µL 2 % BSA + 0,1 µg/mL SA	250 µL 2 % BSA + 0,1 µg/mL SA
Spiranje	3-krat z 260 µL 0,05 % PBST	3-krat z 260 µL 0,1 % PBST	3-krat z 260 µL 0,1 % PBST
Vezava fagov	2·10 ¹¹ pfu v 100 µL 0,05 % PBST ~ 166 kopij vsakega klona	1·10 ¹¹ pfu 1.PE v 100 µL 0,1% PBST	1·10 ¹¹ pfu 2.PE v 100 µL 0,5% PBST
Spiranje	10-krat z 260 µL 0,05 % PBST	10-krat z 260 µL 0,1 % PBST	15-krat z 260 µL 0,5 % PBST
Elucija	100 µL 1 mM raztopine biotina v 0,05 % PBST 100 µL kislega elucijskega pufra + 20 µL nevtralizacijskega pufra	100 µL 1 mM biotina v 0,1% PBST	100 µL 1 mM biotina v 0,1% PBST

3.2.4.1 Vrednotenje celokupne afinitete pomnoženih eluatov do SA s testom ELISA

1. korak: V vdolbinice smo adsorbirali po 50 µL tarče SA v PBS s koncentracijo 20 µg/mL, ki smo jo pripravili tako, da smo v 210 µL PBS dodali 10 µL založne raztopine SA. Za pozitivno kontrolo smo adsorbirali 0,5 µL MAB398 v 50 µL PBS (5 µg/mL). Tarče smo inkubirali preko noči pri 4°C in 45 vrt./min.
2. korak: S tarčo nezasedeno površino v vdolbinicah mikrotitrne ploščice smo blokirali z 280 µL 2 % BSA. Blokiranje je potekalo ob stresanju 1 uro, pri sobni temperaturi in 50 vrt./min.
3. korak: Nevezane proteine smo sprali 3-krat z 280 µL 0,1 % PBST ob stresanju po 3 minute, pri sobni temperaturi in 50 vrt./min.

4. korak: V vdolbinice smo nanegli po $5 \cdot 10^9$ pfu pomnoženih eluatov v 100 μL 0,1 % PBST in v vdolbinice za pozitivno ter negativno kontrolo po $2,3 \cdot 10^{11}$ pfu klona C7C-M1. Ploščico smo 1 uro stresali pri sobni temperaturi in 50 vrt./min.
5. korak: Nevezane bakteriofage smo 5-krat sprali z 280 μL 0,1 % PBST, vsakič stresali po 3 minute pri sobni temperaturi in 50 vrt./min.
6. korak: V vdolbinice smo nanegli po 100 μL anti-M13-mAb-HRP redčenih 1:5000 v 0,5 % BSA/0,1 % PBST in inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi ter 50 vrt./min.
7. korak: Vdolbinice smo 6-krat sprali z 280 μL 0,1 % PBST, vsakič 3 minute stresali pri sobni temperaturi in 50 vrt./min.
8. korak: V vdolbinice smo dodali po 200 μL TMB ter po 3 minutah stresanja reakcijo ustavili z dodatkom 50 μL 2 M H_2SO_4 .
9. korak: Merili smo absorbanco pri 450 nm.

3.2.4.2 Izolacija in pomnoževanje naključnih klonov 3. NE

Po postopku opisanem v poglavju 3.2.2. smo izolirali ter pomnožili naključno izbrane klone 3. NE.

3.2.4.3 Vrednotenje afinitete posameznih klonov do SA s testom ELISA

Afiniteto posameznih klonov do SA smo vrednotili po enakem postopku, kot celokupno afiniteto eluatov do SA s testom ELISA. Koncentracija SA je znašala 40 $\mu\text{g/mL}$ (50 μL založne raztopine SA v 950 μL PBS), MAB398 pa 5 $\mu\text{g/mL}$ (0,5 μL založne raztopine MAB398 v 50 μL PBS). V vdolbinice smo nanegli po 30 μL posameznega pomnoženega klona v 80 μL 0,1 % PBST.

Glede na rezultate testa ELISA smo izbrali 4 klone z najvišjo afiniteto do SA ter izolirali DNA, kot je opisano v poglavju 3.2.3. Vzorce bakteriofagne DNA smo nato poslali na določanje nukleotidnega zaporedja.

3.2.5 Afinitetna selekcija peptidnih ligandov proteina A iz knjižnice Ph.D.-C7C™ (NEB) z nespecifično elucijo

Afinitetno selekcijo na proteinu A smo izvedli po korakih, opisanih v poglavju 3.2.1. Uporabili smo knjižnico Ph.D.-C7C™, kot tarčo pa smo na mikrotitrne ploščice vezali

protein A (SpA). V drugi in tretji stopnji selekcije smo izvedli še subtraktivno selekcijo, pri kateri smo bakteriofage najprej nanesti v vdolbinico prekrito samo z BSA. S tem smo iz nabora bakteriofagov odstranili tiste z afiniteto do površine mikrotitrne ploščice ali do BSA, v vdolbinice s SpA pa smo nato prenesli supernatant s preostalimi bakteriofagi. Pogoje selekcije smo zaostrovali tako, da smo v vsaki naslednji selekcijski stopnji povečali število spiranj. Vezane bakteriofage smo s SpA eluirali nespecifično s kislim elucijskim pufrom ter eluat takoj nevtralizirali. Pri titracijah pomnoženih eluatov smo uporabili redčitve 10^7 , 10^8 in 10^9 . Podrobnosti posameznih selekcijskih stopenj so navedene v preglednici III.

Preglednica III: Pogoji selekcije na SpA v posamezni stopnji

	Prva stopnja	Druga stopnja	Tretja stopnja
Vezava tarče	100 µL raztopine SpA (0,1 mg/mL)	100 µL raztopine SpA (0,1 mg/mL)	100 µL raztopine SpA (0,1 mg/mL)
Subtraktivni korak (Vezava BSA in fagov je potekala 1 uro, pri sobni T in 50 vrt./min)	nismo izvedli	Vezava 2 % BSA 5,5×10 ¹⁰ pfu 1. PE v 100 µL 0,05% PBST	Vezava 2 % BSA 1,8×10 ¹⁰ pfu 2. PE v 100 µL 0,05% PBS
Blokiranje	280 µL 2 % BSA	280 µL 2 % BSA	280 µL 2 % BSA
Spiranje	2-krat z 200 µL 0,05 % PBST	2-krat z 200 µL 0,1 % PBST	2-krat z 200 µL 0,1 % PBST
Vezava fagov (1 ura, sobna T, 50 vrt./min)	2·10 ¹¹ pfu v 100 µL 0,05 % PBST	Prenos iz vdolbinice za subtraktivni korak	Prenos iz vdolbinice za subtraktivni korak
Spiranje	7-krat z 200 µL 0,1 %	10-krat z 200 µL 0,1%	15-krat z 200 µL

	PBST	PBST	0,1% PBST
Elucija	100 µL kislega elucijskega pufra + 7 µL nevtralizacijskega pufra	100 µL kislega elucijskega pufra + 7 µL nevtralizacijskega pufra	100 µL kislega elucijskega pufra + 7 µL nevtralizacijskega pufra

3.2.6 Afinitetna selekcija peptidnih ligandov proteina A s knjižnic Ph.D.-C7C™ in Ph.D.-12™ s specifično elucijo z Fc fragmentom humanega IgG

Selekcijo na SpA smo ponovno izvedli z bakteriofagnima knjižnicama Ph.D.-C7C™ in Ph.D.-12™. Bakteriofage, vezane na SpA, smo eluirali specifično, z fragmentom Fc humanega IgG ter v prvi stopnji tudi nespecifično s kislim elucijskim pufrom. Posamezne eluate smo v prvi stopnji titrirali ločeno, nato pa združili specifični in nespecifični eluat ter pomnožili. Pogoji selekcije v posamezni stopnji so predstavljeni v preglednici IV.

Preglednica IV: Pogoji selekcije na SpA v posamezni stopnji

	Prva stopnja	Druga stopnja	Tretja stopnja
Vezava tarče	100 µL raztopine SpA (0,1 mg/mL)	100 µL raztopine SpA (0,1 mg/mL)	100 µL raztopine SpA (0,1 mg/mL)
Subtraktivni korak (vezava BSA in fagov je potekala 1 uro, pri sobni T in 50 vrt./min)	nismo izvedli	Vezava 5 % BSA • Ph.D.-C7C™: $1 \cdot 10^{11}$ pfu v 100 µL 0,1 % BSA • Ph.D.-12™: $2 \cdot 10^{11}$ pfu v 100 µL 0,1 % BSA	Vezava 5 % BSA • Ph.D.-C7C™: $3 \cdot 10^{10}$ pfu (100 µL) • Ph.D.-12™: $2 \cdot 10^{11}$ pfu v 100 µL 0,1 % BSA
Blokiranje	280 µL 5 % BSA	280 µL 5 % BSA	280 µL 5 % BSA
Spiranje	2-krat z 200 µL 0,05	2-krat z 200 µL 0,05 %	2-krat z 200 µL 0,05 %

	% PBST	PBST	PBST
Vezava fagov (1 ura, sobna T, 50 vrt./min)	- Ph.D.-C7C™: $2 \cdot 10^{11}$ pfu v 100 μL 0,1 % BSA - Ph.D.-12™: $2 \cdot 10^{11}$ pfu v 100 μL 0,1 % BSA	Prenos iz vdolbinice za subtraktivni korak	Prenos iz vdolbinice za subtraktivni korak
Spiranje	5-krat z 200 μ L 0,1 % PBST	10-krat z 200 μ L 0,1% PBST	10-krat z 200 μ L 0,1% PBST
Elucija	100 μL Fc fragmenta humanih IgG (57,5 μg/mL) 100 μL kislega elucijskega pufra + 7 μL nevtralizacijskega pufra	100 μ L Fc fragmenta humanih IgG (57,5 μ g/mL)	100 μ L Fc fragmenta humanih IgG (57,5 μ g/mL)

3.2.7 Izolacija posameznih bakteriofagnih klonov iz afinitetnih selekcij z nespecifično ter specifično elucijo

Po prej opisanem postopku v poglavju 3.2.2, smo naključno izbrane klone pomnožili v bakterijah ter jih izolirali. Iz knjižnice Ph.D.-C7C™ smo izbrali 10 klonov eluiranih z nespecifično elucijo ter iz knjižnice Ph.D.-12™ 10 klonov s specifično elucijo.

Posameznim klonom smo določili titer, izolirali bakteriofagno DNA in določili aminokislinska zaporedja proteinov izraženih na površini bakteriofagov.

3.2.8 Vrednotenje izoliranih fagnih klonov

S pomočjo spletnega orodja MimoDB 2.0 (38) ter baze PepBank (39) smo preverili, ali so bili proteini z enakimi aminokislinskimi zaporedji že izolirani v predhodnih raziskavah.

3.2.8.1 Vrednotenje vezave bakteriofagnih klonov na SpA s PCR v realnem času

Vezavo izoliranih bakteriofagnih klonov na SpA smo preverili s qPCR. Kot kontrolo smo uporabili klon NK-K4, ki se specifično veže na streptavidin.

Vezava in elucija bakteriofagov

1. korak: Na površino mikrotitrne ploščice smo adsorbirali SpA, s koncentracijo 0,1 mg/mL. Mikrotitrsko ploščico smo inkubirali čez noč pri 4°C in 45 vrt./min.
2. korak: S tarčo nezasedeno površino v vdolbinici mikrotitrne ploščice smo blokirali z 280 µL 5 % BSA. 5 % BSA smo uporabili tudi za slep poskus. Ploščico smo inkubirali 1 uro pri sobni temperaturi in 50 vrt./min.
3. korak: Nevezane proteine smo sprali 2-krat z 200 µL 0,1 % PBST ob stresanju po 3 minute, pri sobni temperaturi in 50 vrt./min.
4. korak: V vdolbinice s SpA in BSA smo nanесли 5·10⁹ pfu posameznega klona v 100 µL 0,1% BSA. Vezava je potekala 1 uro, pri sobni temperaturi in 50 vrt./min.
5. korak: Nevezane bakteriofage smo 5-krat sprali z 200 µL 0,1 % PBST, vsakič stresali po 3 minute pri sobni temperaturi in 50 vrt./min.
6. korak: Vezane bakteriofage smo eluirali s 100 µL kislega elucijskega pufra, ob 10 minutnem stresanju pri sobni temperaturi in 100 vrt./min, ter takoj zatem nevtralizirali s 7 µL nevtralizacijskega pufra.

Analiza eluatov s qPCR

Eluate posameznih klonov smo 100-krat redčili v PBS ter jih dodali v reakcijsko mešanico za PCR v realnem času. S to metodo smo pomnožili bakteriofagno DNA ter nato iz umeritvene krivulje izračunali število bakteriofagov, ki so se vezali na SpA oz. BSA.

Preglednica V: Sestava reakcijske mešanice za PCR v realnem času

Master Mix	12,5 µL
Začetnik F-M13	1,5 µL
Začetnik R-M13	1,5 µL

Bakteriofagni klon	1 μ L
Voda brez nukleaz	8,5 μ L
Skupaj	25 μ L

Za vsak klon je bila meritev izvedena v treh ponovitvah, po programu, ki je vključeval 40 ciklov:

Preglednica VI: Program PCR v realnem času

50°C	2 min	Ponovitev 40-krat
Začetna denaturacija - 95°C	10 min	
Denaturacija - 95°C	10 sec	
60°C	30 sec	

3.2.8.2 In silico mapiranje peptidov na površino Fc

S pomočjo spletnega orodja Pepitope Server (40) smo na tridimenzionalni površini regije Fc humanega IgG iskali predele, ki se ujemajo z linearnim zaporedjem izoliranih peptidov.

4 Rezultati in razprava

4.1 Vrednotenje poteka afinitetnih selekcij

Izvedli smo tri afinitetne selekcije z bakteriofagnimi predstavitvenimi knjižnicami. Najprej smo naredili testno selekcijo na SA, nato pa smo izolirali peptide z afiniteto do SpA z nespecifično elucijo s kislim pufrom (knjižnica Ph.D.-C7C™) in s specifično elucijo z Fc fragmentom IgG (knjižnici Ph.D.-C7C™ in Ph.D.-12™). Potek selekcij ter njihovo uspešnost smo spremljali z odstotkom elucije (preglednica VII). Povečevanje odstotka elucije s selekcijskimi stopnjami lahko nakazuje na uspešno povečevanje deleža bakteriofagnih klonov z visoko afiniteto do tarče v naboru fagov v knjižnici. Ti kloni tvorijo močne interakcije s tarčo, medtem ko tiste, ki se vežejo slabše, odstranimo v fazi spiranja. V nepomnoženem eluatu se zato nahaja večji delež fagov z afiniteto do tarče kot v izhodni knjižnici. V nekaj stopnjah tako ostanejo predvsem kloni z visoko afiniteto, kar se odraža kot povečan odstotek elucije.

Preglednica VII: Titer nepomnoženih in pomnoženih eluatov ter odstotki elucij v treh stopnjah afinitetnih selekcij.

		Testna selekcija na SA iz knjižnice Ph.D.-C7C™		Selekcija na SpA iz knjižnice Ph.D.-C7C™ z nespecifično elucijo		Selekcija na SpA iz knjižnic Ph.D.-C7C™ in Ph.D.-12™ s specifično elucijo			
		NE	PE	NE	PE	Ph.D.-C7C™		Ph.D.-12™	
	Eluat:	NE	PE	NE	PE	NE	PE	NE	PE
Prva stopnja	Titer	$2 \cdot 10^4$	$6,6 \cdot 10^{12}$	$6,3 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^{12}$	$1,7 \cdot 10^{5*}$	$5 \cdot 10^{12}$	$2,7 \cdot 10^{5*}$	$1 \cdot 10^{13}$
	% elucije	$2,2 \cdot 10^{-6}$		$3,4 \cdot 10^{-6}$		$1,8 \cdot 10^{-5}$		$2,8 \cdot 10^{-5}$	
Druga stopnja	Titer	$4,5 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^{11}$	$4,8 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^{11}$	$3,8 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^{11}$	$2 \cdot 10^5$	$9,5 \cdot 10^{12}$
	% elucije	$4,5 \cdot 10^{-8}$		$9 \cdot 10^{-5}$		$3,8 \cdot 10^{-5}$		$1 \cdot 10^{-5}$	
Tretja stopnja	Titer	$3 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^{11}$	$2 \cdot 10^3$	/	$1 \cdot 10^3$	/	$3 \cdot 10^5$	/
	% elucije	$6 \cdot 10^{-4}$		$2,2 \cdot 10^{-6}$		$3,3 \cdot 10^{-7}$		$1,5 \cdot 10^{-5}$	

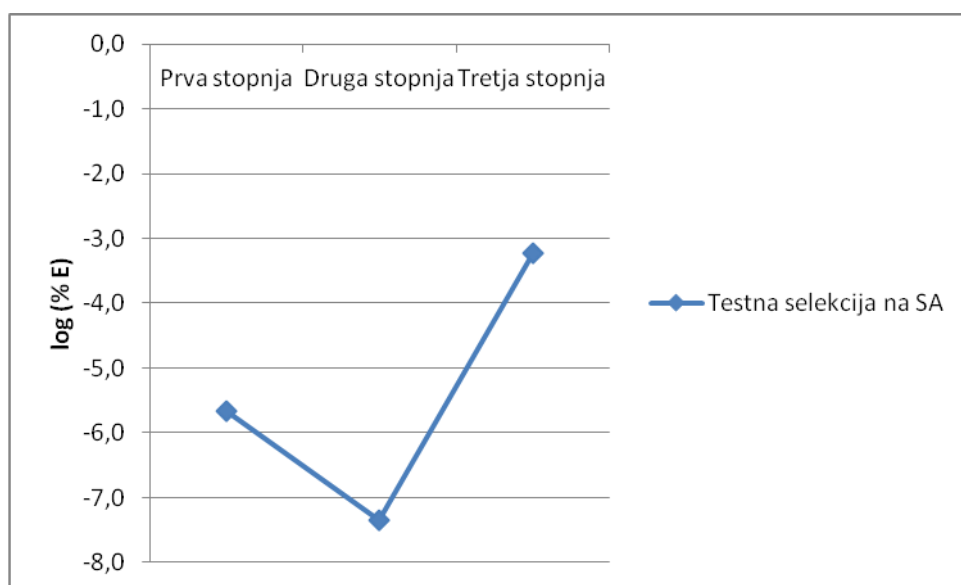
*Skupen titer bakteriofagov eluiranih specifično s fragmentom Fc IgG in nespecifično z elucijskim pufrom pH 2,2.

Pri testni selekciji na SA smo v drugi stopnji opazili znižanje odstotka elucije, kar je verjetno posledica pojava divjih bakteriofagnih klonov in ostrejših pogojev spiranja kot v prvi stopnji. V tretji stopnji smo zaostрили pogoje spiranja in opazili velik porast odstotka elucije (10^4 %), kar nakazuje, da smo uspešno izselekcionirali fagne klone, ki se na SA vežejo z visoko afiniteto (slika 14).

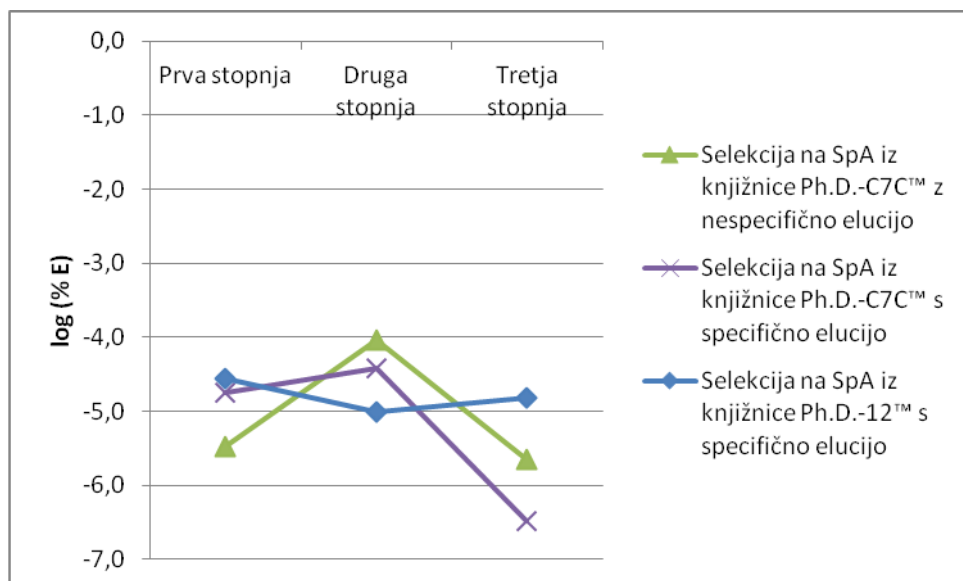
Pri selekciji ligandov SpA iz knjižnice Ph.D.-C7C™ z nespecifično elucijo je v drugi stopnji odstotek eluiranih bakteriofagov narastel, kljub temu, da smo število spiranj z 0,1 % PBST povečali s 7 na 10. V tretji stopnji, kjer smo pogoje spiranja še dodatno zaostрили in povečali število spiranj na 15, pa je odstotek elucije padel pod vrednost odstotka elucije v prvi stopnji (slika 15). Padeč odstotka elucije nakazuje, da smo z močnim spiranjem odstranili veliko bakteriofagov, ki tvorijo nespecifične interakcije s tarčno molekulo, istočasno pa še ni prišlo do prevlade visokoafinitetnih klonov. Kljub temu pa je obstajala možnost, da so v eluatu po tretji stopnji selekcije prisotni kloni z zmerno/nizko afiniteto ali posamezni kloni z visoko afiniteto do SpA, zato smo izolirali posamezne bakteriofagne klone in ovrednotili njihove lastnosti.

Na podlagi teh izkušenj smo v nadaljnjih selekcijah iz knjižnic Ph.D.-C7C™ in Ph.D.-12™ s specifično elucijo uporabili milejše pogoje spiranja ter vezane bakteriofage eluirali specifično s fragmentom Fc humanih IgG. Pričakovali smo, da bomo s tem pristopom eluirali predvsem klone z visoko afiniteto do SpA, kar bi se odražalo v povečevanju odstotka elucije iz stopnje v stopnjo. Odstotek eluiranih bakteriofagov v drugi stopnji selekcije iz knjižnice Ph.D.-C7C™ je narastel, vendar je v tretji stopnji spet padel, čeprav pogojev spiranja nismo zaostрили (slika 15). Pri titraciji nepomnoženega eluata iz tretje stopnje je na diferencialnem agarjem gojšču zrasla le ena modra kolonija, kar kaže na neuspešno selekcijo iz knjižnice Ph.D.-C7C™ s specifično elucijo. Posameznih klonov iz te selekcije nismo izolirali. V drugi stopnji selekcije iz knjižnice Ph.D.-12™, kjer smo zaostрили pogoje spiranja, je odstotek elucije nekoliko padel, v tretji stopnji pa minimalno narastel (slika 15). Minimalno zvišanje deleža eluiranih bakteriofagov v tretji stopnji je lahko posledica vezave ligandov na SpA z višjo afiniteto, zato smo po tretji stopnji selekcije s knjižnico Ph.D.-12™ izolirali posamezne bakteriofagne klone.

Deloma je vzrok za nizke odstotke elucije v afinitetnih selekcijah na SpA okužba z divjimi tipi bakteriofagov, ki so prerasli knjižnico. Divji tipi fagov se množijo hitreje kot bakteriofagi z vstavljenim insertom in posledično onemogočijo pomnoževanje slednjih. Možen vzrok nizkim odstotkom elucije pa bi lahko bila tudi izguba pomembnih vezalcev že v prvi stopnji. Pri selekciji z nespecifično elucijo z glicinskim pufrom (pH 2,2) bi lahko peptidni kloni z zelo visoko afiniteto ostali vezani na SpA in bi jih s tem izgubili, vendar smo to možnost s specifično elucijo z Fc fragmentom v naslednji selekciji ovrgli. V drugi in tretji stopnji selekcij na SpA smo naredili tudi subtraktivni korak, s katerim smo želeli izločiti nespecifične klone, ki se vežejo na BSA ali površino mikrotitrne ploščice. Malo verjetno je, da bi bil subtraktivni korak vzrok za izgubo klonov, ki imajo afiniteto do SpA, saj se je v selekcijah iz knjižnice Ph.D.-C7C™ v drugi stopnji odstotek elucije povečal ter padel šele v tretji stopnji (slika 15).



Slika 14: Odstotki elucij treh stopenj testne selekcije na SA.



Slika 15: Odstotki elucij treh stopenj selekcij na SpA iz knjižnice Ph.D.-C7C™ z nespecifično elucijo ter iz knjižnic Ph.D.-C7C™ in Ph.D.-12™ s specifično elucijo.

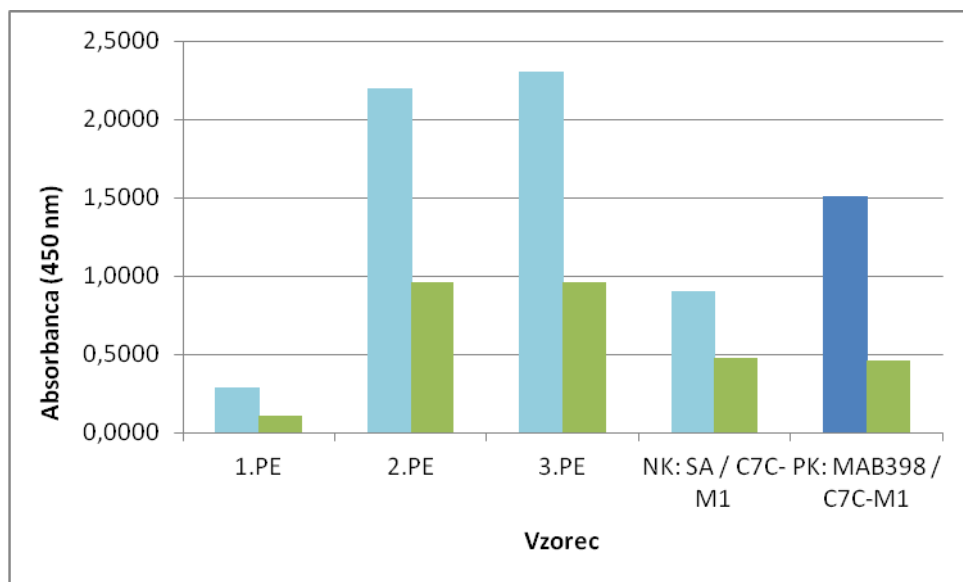
4.2 Testna afinitetna selekcija peptidnih ligandov streptavidina iz knjižnice Ph.D.-C7C™

4.2.1 Vrednotenje celokupne afinitete pomnoženih eluatov do SA s testom ELISA

S testom ELISA smo preverili vezavo pomnoženih eluatov treh stopenj testne selekcije na SA. Za slepi poskus smo uporabili BSA. Za negativno kontrolo smo uporabili bakteriofagni klon C7C-M1, ki ima afiniteto do mišjega monoklonskega protitelesa proti človeškemu leptinu, ne pa do SA. Kot pozitivno kontrolo pa smo klon C7C-M1 vezali na protitelo proti človeškemu leptinu MAB398.

Afiniteta pomnoženih eluatov do SA je tekom selekcij naraščala (slika 16). Največji porast signala smo opazili v drugi stopnji, iz česar lahko sklepamo, da so v tej stopnji v knjižnici prevladali kloni z afiniteto do SA. Naslednja stopnja selekcije ni bistveno vplivala na izid selekcije, saj je bil porast signala vezave tretjega pomnoženega eluata (3. PE) glede na 2. PE majhen. V drugi in tretji stopnji smo opazili tudi povišan signal slepega poskusa, kar pomeni, da so bili še vedno prisotni tudi kloni, ki se nespecifično vežejo na SA in imajo tudi afiniteto do drugih komponent v sistemu selekcije. Signal negativne kontrole je bil

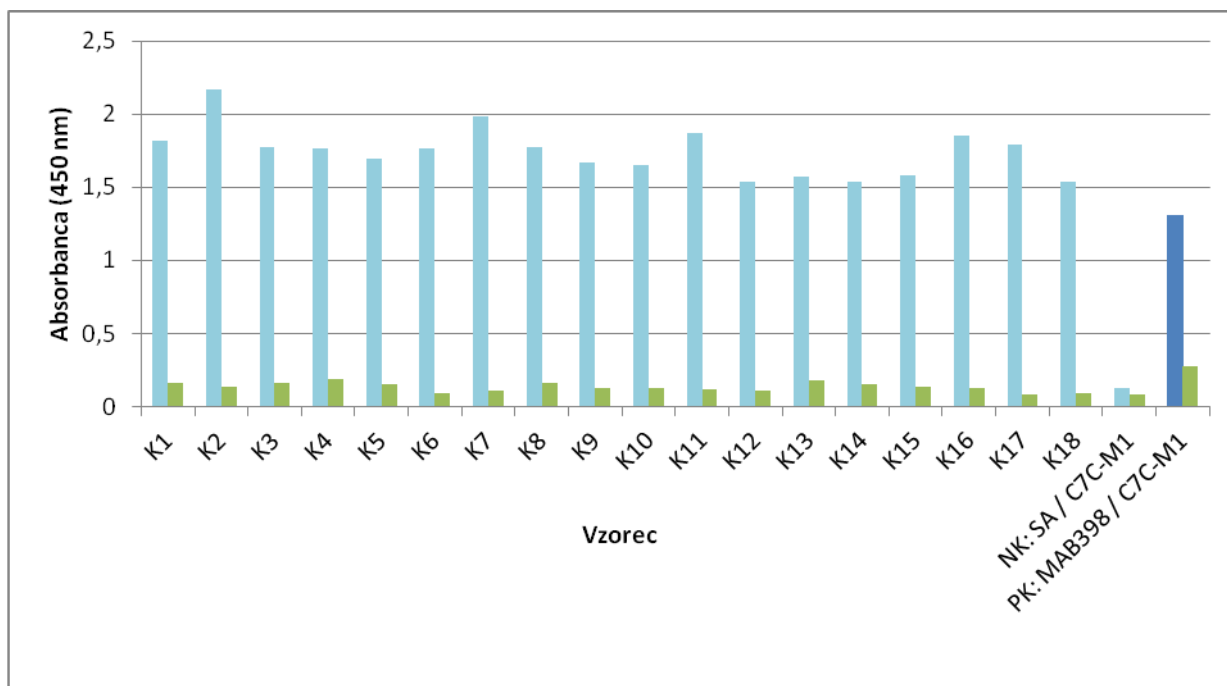
dokaj visok, čeprav klon C7C-M1 nima afinitete do SA. Vzrok za to je najverjetneje velika količina klona C7C-M1, ki smo ga nanесли v vdolbinico. Pri pozitivni kontroli je signal vezave na MAB398 visok, saj se klon C7C-M1 specifično veže na protitelo, vendar je tudi slepa vrednost povišana (slika 16).



Slika 16: Rezultati merjenja absorbance vezanih pomnoženih eluatov na SA in BSA ter pozitivna (PK) in negativna kontrola (NK). Signali vzorcev pomnoženih eluatov ter klona C7C-M1, vezanih na SA so predstavljeni s svetlo modro, signali slepih poskusov pa z zeleno barvo. Signal za pozitivno kontrolo (MAB398 / C7C-M1) je označen s temno modro barvo.

4.2.2 Vrednotenje afinitete posameznih klonov do SA s testom ELISA

S testom ELISA smo ovrednotili afiniteto 18 izoliranih klonov do SA na enak način, kot afiniteto pomnoženih eluatov. Vsi izolirani kloni izkazujejo afiniteto do SA (slika 17). Signali vezave klonov na SA so bili pri vseh 18 klonih visoki, slepe vrednosti pa 10-krat nižje, kar pomeni, da se izolirani kloni na SA vežejo specifično in z visoko afiniteto. Najvišjo afiniteto izkazuje klon K2. Nizke vrednosti absorbance pri negativni kontroli ter visoka vrednost pri pozitivni kontroli nakazujejo na ustrezno izvedbo testa (slika 17).



Slika 17: Rezultati merjenja absorbance posameznih klonov vezanih na SA in BSA ter pozitivna (PK: MAB398 / C7C-M1) in negativna kontrola (NK: SA / C7C-M1). Signali vzorcev izoliranih klonov ter klona C7C-M1, vezanih na SA so predstavljeni s svetlo modro, signali slepih poskusov pa z zeleno barvo. Signal za pozitivno kontrolo je označen s temno modro barvo.

4.2.3 Aminokislinska zaporedja klonov izoliranih v testni selekciji na SA iz knjižnice Pd.D.-C7C™

Štirim klonom z najvišjo afiniteto do SA (K2, K7, K11 in K16) smo določili nukleotidna zaporedja, ki smo jih prevedli v aminokislinska zaporedja peptidov. Vsi štirje izbrani izolirani kloni imajo enako zaporedje: GDFIHPQ. Prisoten je motiv HPQ, ki je značilen za peptide z afiniteto do SA (35). Izolacija peptidov s tem motivom nakazuje na uspešno afinitetno selekcijo na SA.

4.3 Afinitetna selekcija peptidnih ligandov proteina A iz knjižnic Ph.D.-C7C™ in Ph.D.-12™ z nespecifično in specifično elucijo

4.3.1 Izolacija posameznih bakteriofagnih klonov iz afinitetnih selekcij z nespecifično ter specifično elucijo

V afinitetni selekciji z nespecifično elucijo s knjižnico Ph.D.-C7C™ smo po tretji stopnji izolirali 10 klonov (označenih K1 do K10); ter v selekciji s specifično elucijo s fragmentom Fc iz knjižnice Ph.D.-12™ prav tako 10 klonov (označenih 12-1 do 12-10). Izbranim klonom smo določili aminokislinska zaporedja peptidov, izraženih na površini bakteriofagov. Izmed dvajsetih izoliranih bakteriofagnih klonov smo aminokislinsko zaporedje uspešno določili šestnajstim, pri klonih K7, K10, 12-2 in 12-4 pa določanje nukleotidnega zaporedja ni bilo uspešno. Osem bakteriofagnih klonov, izoliranih iz knjižnice Ph.D.-C7C™, je na svoji površini izražalo štiri različne ciklične heptapeptide (preglednica VIII). Iz knjižnice Ph.D.-12™ pa smo izolirali pet klonov z različnimi linearnimi dodekapeptidi, pri čemer se je en peptid pojavil v štirih kopijah (preglednica IX).

Preglednica VIII: Aminokislinska zaporedja peptidov na površini bakteriofagnih klonov izoliranih iz knjižnice Ph.D.-C7C™. Z vijolično barvo so označene aminokisline s hidroksilno skupino (OH), z modro polarne (P) in z zeleno nepolarne aminokisline (NP). Oznaka X predstavlja katerokoli aminokislino.

Klon	Aminokislinska zaporedja peptidov iz knjižnice Ph.D.-C7C™										
K1 K8	C	G	S	Q	T	P	H	A	C		
K2	C	D	P	Y	K	M	G	A	C		
K3 K4 K5	C	A	K	T	D	P	R	G	C		
Motiv 1		X	X	OH	OH / P	NP	P / G	NP / G			
K6 K9			C	Y	T	R	N	M	N	Q	C
Motiv 2				OH	OH	P	P	NP	P	P	

Peptidi prikazani na površini klonov iz knjižnice Ph.D.-C7C™ ne vsebujejo izrazitega skupnega motiva, se pa večina peptidov pojavi v več kopijah. Če upoštevamo polarnost aminokislinskih ostankov pa lahko opazimo dva motiva (preglednica VIII). Obema je skupno področje dveh polarnih aminokislinskih ostankov, ki pogosto vsebujeta hidroksilno funkcionalno skupino. Na teh dveh mestih se pojavljajo treonin, serin in glutamin, ki so sposobne tvoriti vodikove vezi. Te so pomembne za interakcijo Fc regije s SpA, saj stabilizirajo strukturo kompleksa (14). Na tretjem mestu sledi pri prvem motivu nepolarna aminokislina. Pri petih klonih je to prolin, ki ima ciklično strukturo, zaradi katere je zelo rigiden in ne more zavzeti več konformacij. Na mestu, kjer je prisoten prolin, polipeptidna veriga zavije, kar spremeni sekundarno strukturo. Prisotnost prolina v zaporedjih klonov je zato lahko bistvena za vezavo na SpA, saj omogoča stabilizacijo določene tridimenzionalne strukture. Na četrtem mestu obeh motivov se nahaja aminokislinski ostanek s polarno stransko verigo. Pri treh klonih v prvem motivu je prisoten arginin z gvanidinsko skupino, ki lahko tvori več vodikovih vezi. Pri drugem motivu pa je arginin prisoten na tretjem mestu. Na petem mestu obeh motivov se nahaja nepolarna aminokislina; pri petih klonih alanin in metionin, pri treh pa glicin.

Preglednica IX: Aminokislinska zaporedja peptidov na površini bakteriofagnih klonov izoliranih iz knjižnice Ph.D.-12™. Z rdečo barvo je označen motiv GKL, z modro pa sledeče polarno področje.

Klon	Aminokislinska zaporedja peptidov iz knjižnice Ph.D.-12™																
12-1					G	I	S	D	F	M	Q	T	K	M	P	L	
12-3																	
12-6					G	G	K	L	T	T	I	H	L	H	S	T	
12-8																	
12-10																	
12-5						G	K	L	N	K	L	S	E	N	L	K	M
12-7					T	K	N	A	G	S	H	I	L	T	T	Q	
12-9	V	P	T	L	H	G	K	L	Q	P	R	W					

Pri šestih klonih izoliranih iz knjižnice Ph.D.-12™ se pojavi izrazit motiv GKL, ki mu sledi manjše področje polarnih aminokislinskih ostankov (preglednica IX). Aminokislina glicin nima stranske verige, lizin pa ima v stranski verigi aminske skupino, ki je pri fiziološkem pH pozitivno nabita. Zaradi naboja je sposoben elektrostatskih interakcij, kot tudi tvorbe vodikovih vezi. Levcin je aminokislina z nepolarno stransko verigo. Polarno področje, ki sledi motivu GKL, sestavljajo aminokisliline treonin, asparagin, glutamin in lizin. Vse so sposobne tvoriti vodikove vezi.

Iz dveh različnih bakteriofagnih knjižnic s selekcijo na SpA izolirali peptide, ki vsebujejo različne motive. Zaradi izjemno velike raznolikosti knjižnic bi pričakovali, da bi našli nek skupen motiv, ki je ključen za vezavo na SpA. Na izbor peptidov iz bakteriofagnih knjižnic sta verjetno vplivali dolžina in struktura peptida, saj knjižnico Ph.D.-C7C™ sestavljajo ciklični heptapeptidi, knjižnico Ph.D.-12™ pa linearni dodekapeptidi.

Z afinitetnima selekcijama na SpA smo izolirali več klonov z enakimi aminokislinskimi zaporedji. Največkrat se pojavita peptida CAKTDPRGC in GGKLTTIHLHST. Izolacija peptida z določenim zaporedjem v več kopijah lahko nakazuje na afiniteto peptida do SpA, po drugi strani pa se v več kopijah pogosto izselekcionirajo bakteriofagni kloni, ki se pomnožujejo hitreje od ostalih, a nimajo afinitete do tarče (41). Da bi izključili to možnost smo v podatkovnih bazah spletnih orodij MIMOdb 2.0 (38) in PepBank (39) preverili, ali so bili peptidi s temi zaporedji v predhodnih raziskavah že izolirani. V nobeni izmed njih nismo našli peptidnih zaporedij izoliranih klonov. Zaporedja izselekcioniranih peptidov smo primerjali še s peptidi, ki so jih v kontrolni selekciji na proteinu A izolirali Jesaitis *et al.* (42), kjer prav tako nismo našli podobnih motivov (preglednica X).

Preglednica X: Peptidi izolirani v kontrolni selekciji na SpA, Jesaitis *et al.* (42)

WTRDQHAIH	WTLQHHRVV	WTIKDHQLL	HGKHTHKVG
WTRSDHRIQ	WTLGEHTLI	WKLSEHRMA	HGDKHKHRG
WTLREHDFH	WRLSDHRMV	WSLGQHRIF	KPHQHKVHK
WQITQHKLQ	WTRSDHRIQ		

4.3.1.1 Vrednotenje vezave bakteriofagnih klonov na SpA s PCR v realnem času

Afiniteta bakteriofagnih klonov izoliranih z metodo predstavitve na bakteriofagu do tarčne molekule se rutinsko vrednoti s testom ELISA, pri čemer na tarčo vezane bakteriofage detektiramo s specifičnimi protitelesi. Vendar tega testa pri vrednotenju vezave izoliranih fagnih klonov na SpA nismo mogli uporabiti, saj SpA neposredno veže protitelesa usmerjena proti bakteriofagom. Vezavo šestih izoliranih bakteriofagnih klonov smo zato vrednotili tako, da smo fage najprej vezali na SpA oz. BSA, jih spirali in eluirali ter koncentracijo fagov v eluatu določili s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. PCR v realnem času omogoča kvantifikacijo nukleinskih kislin, ki jih pomnožujemo, s pomočjo umeritvene krivulje (43). Za izračun začetne količine nukleinskih kislin se uporablja vrednost C_t , to je točka, kjer je fluorescenca vzorca večja od fluorescenca ozadja, oz. cikel meje zaznavanja (44).

S pomočjo enačbe umeritvene krivulje (enačba 2) smo izračunali število bakteriofagov, ki so se vezali na SpA in BSA. Rezultati so ponazorjeni v preglednici XI in na sliki 18.

$$y = -2.7582x + 29.651$$

enačba 2

$$R^2 = 0,9911$$

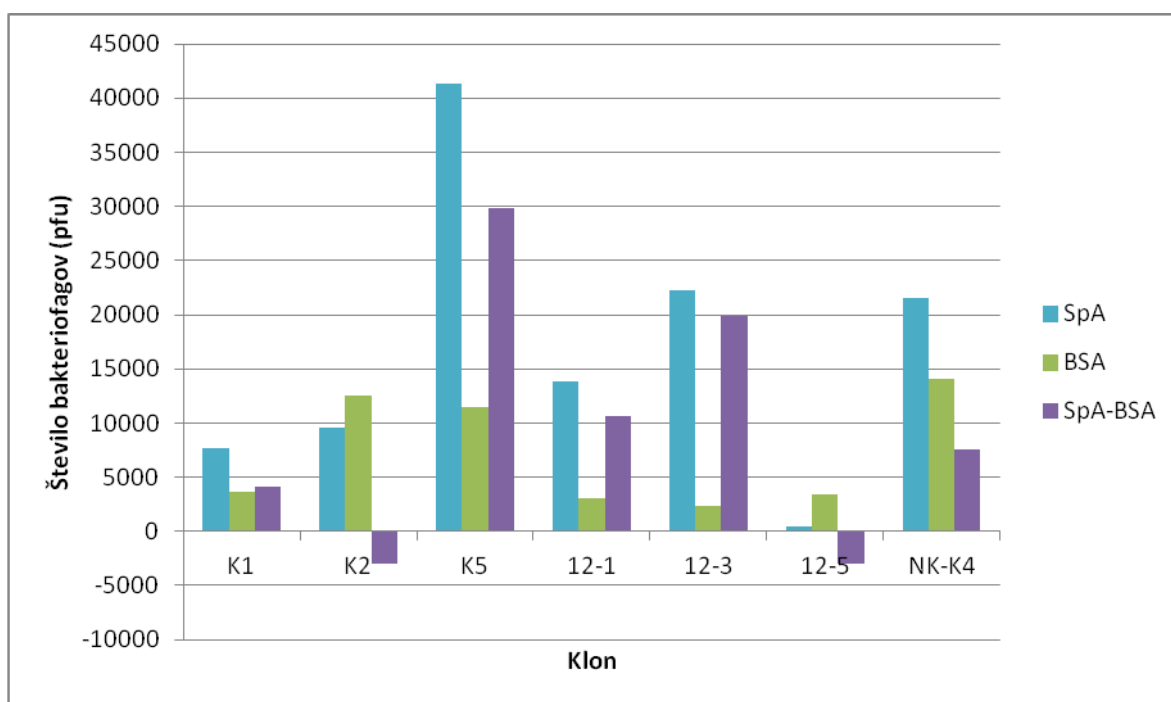
y ... povprečni C_t

x ... $\log(pfu)$

Preglednica XI: Povprečne vrednosti treh meritev C_t , število bakteriofagov (pfu), vezanih na SpA oz. BSA ter število bakteriofagov vezanih na SpA z odšteto slepo vrednostjo. Bakteriofagni klon NK-K4, ki se veže na streptavidin, smo uporabili za negativno kontrolo.

Klon	Vzorec	povprečni C_t	pfu	SpA - BSA
K1	SpA	29,96	7726	4112
	BSA	30,87	3614	
K2	SpA	29,70	9573	-2966
	BSA	29,38	12539	
K5	SpA	27.95	41372	29870
	BSA	29.48	11502	
12-1	SpA	29.27	13783	10699

	BSA	31.06	3084	
12-3	SpA	28.69	22244	19902
	BSA	31.39	2342	
12-5	SpA	33.50	401	-2980
	BSA	30.95	3381	
NK-K4	SpA	28.73	21573	7519
	BSA	29.24	14054	



Slika 18: Grafična predstavitev vrednotenja vezave klonov na SpA s kvantitativnim PCR v realnem času. Z modro je označeno število vezanih klonov na SpA in z zeleno na BSA, ki predstavlja slepo vrednost. Razlika števila vezanih bakteriofagov na SpA in BSA je označena z vijolično barvo.

Razliko števila vezanih bakteriofagov na tarčno molekulo in BSA smo uporabili kot merilo za relativno primerjavo afinitet izoliranih klonov do SpA. Vezavo smo smatrali za pozitivno, kadar je razlika presegla razliko, ki smo jo opazili pri kontrolnem klonu NK-K4. Pozitivno vezavo na SpA smo ugotovili pri klonih K5, 12-1 in 12-3. Pri ostalih klonih so bile razlike nižje, pri klonih K2 in 12-5 pa smo na BSA izmerili celo višje vrednosti kot na SpA. Glede na rezultate poskusov s qPCR lahko sklepamo, da afiniteto do SpA izkazujejo peptidi CAKTDPRGC, GISDFMQTKMPL in GGKLTTHLHST.

Metoda qPCR omogoča vrednotenje afinitete bakteriofagnih klonov do SpA, a jo je potrebno še dodatno optimizirati. V našem poskusu smo opazili nepričakovano visoko število vezanih bakteriofagov pri kontrolnem klonu NK-K4, ki se specifično veže na streptavidin. K temu je morda prispevala prevelika koncentracija klona NK-K4, saj smo opazili veliko število vezanih fagov tako na SpA kot tudi na BSA.

4.3.1.2 In silico mapiranje peptidov na površino Fc

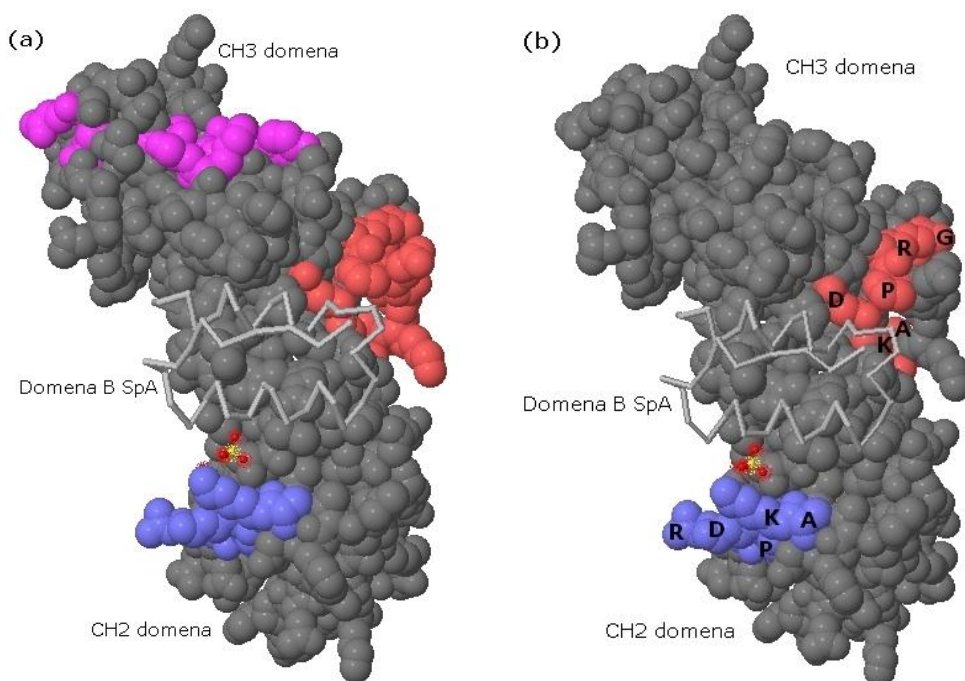
Fc regija protiteles je naravni ligand SpA, zato smo predpostavljali da bodo zaporedja izselekcioniranih peptidov podobna aminokislinskim ostankom na konstantni regiji protiteles. V bazi podatkov Protein Data Bank smo poiskali kristalno strukturo kompleksa SpA in Fc fragmenta humanega IgG ter s spletnim orodjem Pepitope Server (40) na tridimenzionalni površini domen C_H2 in C_H3 fragmenta Fc poiskali področja, ki se ujemajo z linearnimi zaporedji izoliranih peptidov. Ujemanje zaporedij izoliranih peptidov s področji na fragmentu Fc je dodaten posreden dokaz, da se peptidi specifično vežejo na SpA. Vseh devet različnih zaporedij se ujema z določenim predelom na Fc fragmentu. Na slikah 6 in 8 so zaporedja peptidov označena z rdečo, roza oz. modro barvo, C_H2 in C_H3 domeni Fc fragmenta pa s sivo barvo. Domena B proteina A je prikazana s paličnim modelom v sivi barvi.

Peptidi, ki smo jih izselekcionirali iz knjižnice Ph.D.-C7C™ posnemajo tri ločena področja na Fc fragmentu. Področje na domeni C_H3 posnema zaporedje peptida CYTRNMNQC (klon K6, na sliki 19a označen z roza barvo), zaporedji peptidov CGSQTPHAC (klon K1) in CAKTDPRGC (klon K5), ki imata tudi podoben motiv, pa posnemata področje na stiku C_H2 in C_H3 domen fragmenta Fc, v bližini vezavnega mesta za SpA (na sliki 19a označeni z rdečo barvo). Peptid CAKTDPRGC še dodatno posnema področje Fc fragmenta na domeni C_H2 (na slikah 19a in 20 označeno z modro barvo). Vsa tri področja so dobro izpostavljena na površini, kar omogoča interakcije s topilom in potencialno tudi s SpA.

Pozitivno vezavo na SpA smo s qPCR ugotovili pri peptidu CAKTDPRGC, ki posnema dve področji Fc fragmenta (slika 19b). Pet od sedmih aminokislinskih ostankov v peptidu je identičnih zaporedju Fc na stiku domen C_H2 in C_H3, te so alanin, lizin, prolin, arginin in glicin (slika 19b, označeno z rdečo). Namesto glutaminske kisline pa je v zaporedju prisotna asparaginska kislina, ki je za eno metilno skupino krajša od glutaminske kisline.

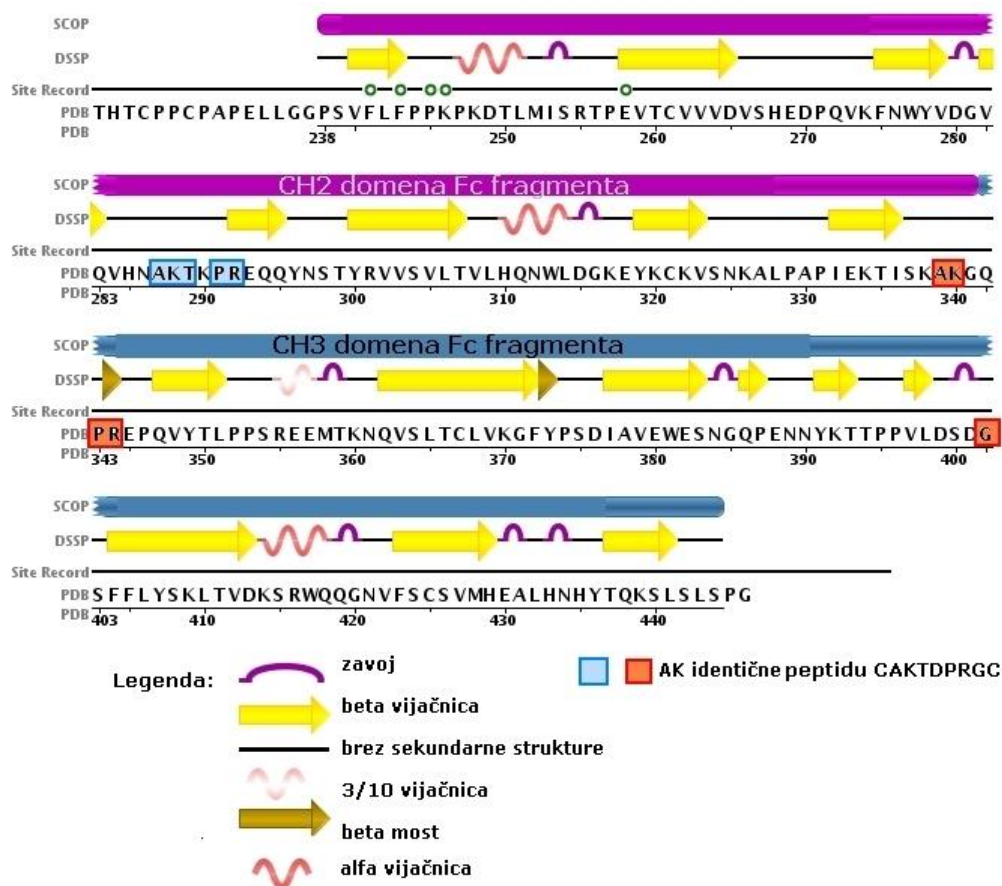
Zaporedje peptida se razteza čez obe domeni Fc fragmenta in tvori tridimenzionalno področje. Aminokislini alanin in lizin se nahajata na C_H2 domeni, prolin, arginin in glicin pa na C_H3 domeni (slika 20, označeno z rdečo). Z izjemo enega aminokislinskega ostanka zaporedja CAKTDPRGC, se vsi ostali dobro prilegajo zaporedju Fc fragmenta.

Pet aminokislinskih ostankov peptida CAKTDPRGC se ujema tudi z zaporedjem Fc fragmenta na domeni C_H2, kjer tvorijo linearno področje (sliki 19b in 20, označeno z modro). Z zaporedjem Fc se ujemajo aminokisliline alanin, lizin, treonin, prolin in arginin. Asparaginska kislina v zaporedju peptida pa nadomešča lizin v zaporedju Fc na mestu 290 (slika 20, označeno z modro). V tem primeru se šest aminokislinskih ostankov peptida dobro prilega zaporedju Fc. Naše ugotovitve se skladajo z rezultati študije vezave sinteznih peptidov na FcγRII receptor. Medgyesi *et al.* so uporabili sintezni peptid z zaporedjem KTKPREQQYNS, ki se v štirih aminokislinskih ostankih ujema z našim peptidom CAKTDPRGC (KT in PR). Ugotovili so, da se sintezni peptid z nizko afiniteto veže na receptor (46). Če predpostavimo, da imata FcγRII receptor in SpA podobno strukturo, saj oba vežeta Fc fragment IgG, lahko sklepamo, da se tudi peptid CAKTDPRGC z določeno afiniteto veže na SpA.



Slika 19: (a) Zaporedja peptidov CYTRNMNQC, CGSQTPHAC in CAKTDPRGC posnemajo tri področja na fragmentu Fc. Zaporedji CGSQTPHAC in CAKTDPRGC sta označeni z rdečo barvo in posnemata

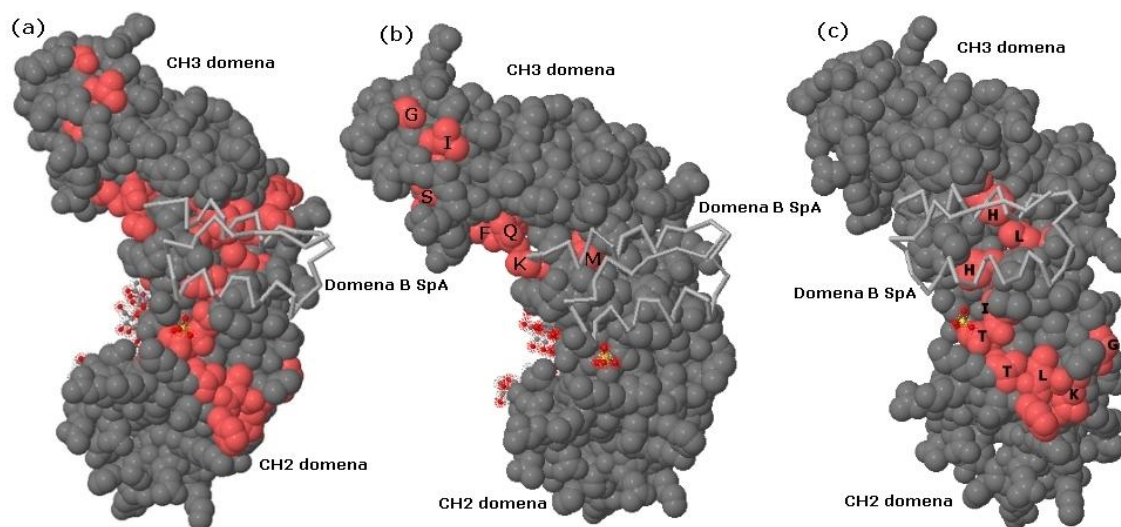
zaporedje Fc na stiku domen C_H2 in C_H3, CAKTDPRGC pa posnema tudi zaporedje na C_H2 domeni, označeno z modro barvo. Zaporedje CYTRNMNQC posnema področje na domeni C_H3, označeno z roza barvo. (b) Zaporedje peptida CAKTDPRGC na fragmentu Fc posnema dve področji. Z rdečo je označeno področje na stiku domen C_H2 in C_H3, z modro pa področje na domeni C_H2.



Slika 20: Aminokislinsko zaporedje domen C_H2 in C_H3 fragmenta Fc, z označeno sekundarno strukturo ter aminokislinami, ki so identične aminokislinam izoliranega peptida CAKTDPRGC (PDB koda 1FC2) (45).

V primerjavi s knjižnico Ph.D.-C7CTM lahko ugotovimo, da peptidi izselekcioniirani iz knjižnice Ph.D.-12TM posnemajo področja, ki so bolj raztresena po površini Fc (slika 21a). Zaporedje peptida GISDFMQTKMPL (klon 12-1) se ujema s področjem Fc fragmenta na C_H3 domeni, kjer se začne z glicinom in nadaljuje vzdolž domene do vezavnega mesta za SpA (slika 21b). Sestavljeno je iz štirih aminokislinskih ostankov, ki so enaka zaporedju fragmenta Fc, to so glicin, serin, lizin in prolin. Izolevcin v zaporedju peptida nadomešča valin, fenilalanin pa tirozin. Glutamin v zaporedju nadomesti glutaminsko kislino, metionin

pa zamenja levcin (slika 21b). Vse štiri zamenjave bistveno ne spremenijo možnosti za interakcijo s SpA, saj so lastnosti aminokislinskih ostankov ohranjene.



Slika 21: (a) Zaporedja peptidov izoliranih iz knjižnice Ph.D.-12™ na fragmentu Fc. (b) Zaporedje peptida GISDFMQTKMPL na domeni C_{H3} fragmenta Fc. (c) Zaporedje peptida GGKLTTIHLHST na fragmentu Fc.

Zaporedje izoliranega peptida GGKLTTIHLHST se deloma ujema s površino vezavnega mesta za SpA na fragmentu Fc ter s področjem na domeni C_{H2} (slika 21c). Zaporedje se začne na domeni C_{H2} z značilnim aminokislinskim motivom GKL ter se nadaljuje do vezavnega mesta, kjer se nahajajo aminokisline histidin, levcin in histidin, pri čemer je histidin na mestu 435 (na sliki 21c se nahaja zgoraj) tudi odgovoren za vezavo SpA. Poleg treh omenjenih aminokislin izoliranega peptida sta identični zaporedju fragmenta Fc še aminokislini treonin (sosednji izolevcinu) in glicin. Namesto aminokisline glutamin, ki je del zaporedja Fc, se v zaporedju peptida nahaja lizin, ki je prav tako polarna aminokislina, sposobna tvoriti vodikovo vez. Valin v zaporedju peptida nadomešča levcin, ki ima za eno metilno skupino daljšo stransko verigo. Namesto alanina je v zaporedju peptida prisoten treonin, ki pa ima v nasprotju z alaninom hidroksilno skupino. Nepolarno aminokislino valin je v zaporedju peptida nadomestil izolevcin z nepolarno stransko verigo (slika 21c).

5 Sklep

V testni selekciji na streptavidinu smo izolirali 18 klonov, ki imajo visoko afiniteto do SA. Štirim izmed njih smo določili aminokislinsko zaporedje peptida GDFIHPQ, kjer je prisoten motiv HPQ. Ta je značilen za peptide z afiniteto do SA in nakazuje na uspešno afinitetno selekcijo ligandov SA.

V afinitetni selekciji na SpA z nespecifično elucijo smo iz knjižnice Ph.D.-C7C™ izolirali 10 klonov, selekcija iz iste knjižnice s specifično elucijo pa ni bila uspešna. V selekciji s specifično elucijo s fragmentom Fc iz knjižnice Ph.D.-12™ smo prav tako izolirali 10 bakteriofagnih klonov. Peptidi prikazani na površini klonov iz knjižnice Ph.D.-C7C™ ne vsebujejo izrazitega skupnega motiva, se pa večina peptidov pojavi v več kopijah. S qPCR smo potrdili, da se peptid CAKTDPRGC, ki se pojavi v treh kopijah, specifično veže na SpA. Peptid ima zelo podobno zaporedje kot konstantna regija protiteles, ki je naravni ligand SpA. Aminokislinski ostanki KT PR G oz. AKT PR so identični zaporedju fragmenta Fc na dveh ločenih področjih, na stiku domen C_H2 in C_H3 ter na domeni C_H2.

Pri šestih klonih izoliranih iz knjižnice Ph.D.-12™ se pojavi izrazit motiv GKL, ki mu sledi manjše področje polarnih aminokislinskih ostankov. S qPCR smo potrdili vezavo peptida GGKLTTIHLHST na SpA. Peptid smo izolirali v štirih kopijah in vsebuje motiv GKL, iz česar lahko sklepamo, da motiv pomembno prispeva k vezavi na SpA. Afiniteto do SpA smo s qPCR potrdili tudi pri peptidu GISDFMQTKMPL. Ugotovili smo, da zaporedji izoliranih dodekapeptidov posnemata področji aminokislinskih ostankov na fragmentu Fc. Peptid GISDFMQTKMPL posnema področje na domeni C_H3, peptid GGKLTTIHLHST pa deloma področje na domeni C_H2, deloma pa področje vezavnega mesta, kjer je histidin na mestu 435 tudi odgovoren za vezavo SpA.

Tekom selekcij nam je težave povzročala okužba z divjimi tipi bakteriofagov, ki se množijo hitreje kot bakteriofagi z vstavljenim insertom in posledično onemogočijo pomnoževanje slednjih. Temu smo se poskušali izogniti z zaostrovanjem pogojev spiranja, vendar smo bili pri tem omejeni z ohranjanjem optimalnih pogojev za izolacijo peptidov z afiniteto do SpA.

V afinitetnih selekcijah na SpA smo identificirali tri peptide, ki oponašajo naravni ligand SpA, in s qPCR potrdili njihovo vezavo na SpA. V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno potrditi specifičnost vezave še z drugimi metodami ter določiti afiniteto peptidov do SpA. V primeru, da imajo peptidi dovolj visoko afiniteto do SpA, bi lahko bili uporabni kot fuzijske oznake za specifično izolacijo rekombinantnih proteinov na kolonah s SpA. Uporabili bi jih tudi kot osnovo za detekcijo prisotnosti *S. aureus*. Nadalje bi jih lahko potencialno uporabljali tudi kot ligand za ciljno dostavo učinkovin do bakterije *S. aureus*. Smiselno bi bilo tudi ugotoviti, kateri aminokislinski ostanki so odgovorni za vezavo, saj bi lahko na podlagi tega oblikovali in sintetizirali tudi nepeptidno molekulo, s katero bi se izognili številnim pomanjkljivostim peptidov.

6 Literatura

1. Tashiro M, Montelione GT: Structures of bacterial immunoglobulin-binding domains and their complexes with immunoglobulins. *Current Opinion in Structural Biology* 1995; 5: 471-481.
2. Graille M, Stura EA, Corper A L, Sutton BJ, Taussig MJ, Charbonnier J, Silverman GJ: Crystal structure of a *Staphylococcus aureus* protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity. *PNAS* 2000; vol. 97, 10: 5399-5404.
3. Kim HK, Emolo C, DeDent AC, Falugi F, Missiakas DM, Schneewind O: Protein A-Specific Monoclonal Antibodies and Prevention of *Staphylococcus aureus* Disease in Mice. *Infect Immun.* 2012; 80(10): 3460–3470.
4. Kim HK, Kim HY, Schneewind O, Missiakas D: Identifying protective antigens of *Staphylococcus aureus*, a pathogen that suppresses host immune responses. *FASEB J.* 2011; 25(10): 3605–3612.
5. Kim HK, Cheng AG, Kim H-Y, Missiakas DM, Schneewind O: Nontoxic protein A vaccine for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in mice. *J Exp Med.* 2010; 207(9): 1863–1870.
6. Mavsar-Najdenov B, Koder B, Grabnar I, Mrhar A. Analiza učinkovitosti in varnosti zdravljenja z vankomicinom. *Zdrav Vestn* 2007; 76: 695–700.
7. Roque ACA, Silva CSO, Taipa MA: Affinity-based methodologies and ligands for antibody. *Journal of Chromatography A* 2007; 1160: 44–55.
8. Goodyear CS, Silverman GJ: Death by a B Cell Superantigen. *J Exp Med.* 2003; 197(9): 1125–1139.
9. Deisenhofer J: Crystallographic refinement and atomic models of human Fc fragment and its complex with fragments B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9Å and 2.8Å. *Biochemistry* 1981; 20: 2361-2370.

10. Tashiro M, Tejero R, Zimmerman DE, Celda B, Nilsson B, Montelione GT: High-resolution Solution NMR Structure of the Z Domain of Staphylococcal Protein A. *J. Mol. Biol.* 1997; 272: 573-590.
11. Gouda H, Shiraishi M, Takahashi H, Kato K, Torigoe H, Arata Y, Shimada I: NMR Study of the Interaction between the B Domain of Staphylococcal Protein A and the Fc Portion of Immunoglobulin G. *Biochemistry* 1998; 37: 129-136.
12. Arora P, Hammes GG, Oas TG: Folding Mechanism of a Multiple Independently-Folding Domain Protein: Double B Domain of Protein A. *Biochemistry* 2006; 45: 12312-12324.
13. Starovasnik MA, Skelton NJ, O'Connell MP, Kelley RF, Reilly D, Fairbrother WJ: Solution Structure of the E-Domain of Staphylococcal Protein A. *Biochemistry* 1996; 35: 15558-15569.
14. Brown NL, Bottomley SP, Scawen MD, Gore MG: A Study of the Interactions Between an IgG-Binding Domain Based on the B Domain of Staphylococcal Protein A and Rabbit IgG. *Molecular Biotechnology* 1998; 10: 9-16.
15. Branco RJF, Dias AMGC, Roque ACA: Understanding the molecular recognition between antibody fragments and protein A biomimetic ligand. *Journal of Chromatography A* 2012; 1244: 106-115.
16. Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB: Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 61(2):636-643.
17. Ayyar BV, Arora S, Murphy C, O'Kennedy R: Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods* 2012; 56:116-129.
18. D'Agostino B, Bellofiore P, De Martino T, Punzo C, Riveccio V, Verdoliva A: Affinity purification of IgG monoclonal antibodies using the D-PAM synthetic ligand: chromatographic comparison with protein A and thermodynamic investigation of the D-PAM/IgG interaction. *Journal of Immunological Methods* 2008; 333: 126-138.

19. Dinon F, Salvalaglio M, Gallotta A, Beneduce L, Pengo P, Cavallotti C, Fassinaa G: Structural refinement of protein A mimetic peptide. *J. Mol. Recognit.* 2011; 24: 1087–1094.
20. Yang H, Gurgel PV, Williams DK Jr, Bobay BG, Cavanagh J, Muddiman DC, Carbonell RG: Binding site on human immunoglobulin G for the affinity ligand HWRGWV. *J. Mol. Recognit.* 2010; 23: 271–282.
21. Liu Z, Gurgel PV, Carbonell RG: Affinity chromatographic purification of human immunoglobulin a from chinese hamster ovary cell culture supernatant. *Biotechnol Prog.* 2012.
22. Ehrlich GK, Bailon P: Identification of model peptides as affinity ligands for the purification of humanized monoclonal antibodies by means of phage display. *J. Biochem. Biophys. Methods* 2001; 49: 443-454.
23. DeLano WL, Ultsch MH, de Vos AM, Wells JA: Convergent Solutions to Binding at a Protein-Protein Interface. *Science* 2000; 287: 1279-1283.
24. lee SH, Hoshino Y, Randall A, Zeng Z, Baldi P, Doong R, Shea KJ: Engineered Synthetic Polymer Nanoparticles as IgG Affinity Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* 2012; 134:15765-15772.
25. Iijima M, Matsuzaki T, Yoshimoto N, Niimi T, Tanizawa K, Kuroda S: Fluorophore-labeled nanocapsules displaying IgG Fc-binding domains for the simultaneous detection of multiple antigens. *Biomaterials* 2011; 32: 9011-9020.
26. Iijima M, Kadoya H, Hatahira S, Hiramatsu S, Jung G, Martin A, Quinn J, Jung J, Jeong SY, Choi EK, Arakawa T, Hinako F, Kusunoki M, Yoshimoto N, Niimi T, Tanizawa K, Kuroda S: Nanocapsules incorporating IgG Fc-binding domain derived from *Staphylococcus aureus* protein A for displaying IgGs on immunosensor chips. *Biomaterials* 2011; 32: 1455-1464.
27. Gravit L: Turning a new phage. *Nature Medicine* 2012; 18 (9): 1318-1320.
28. Verkaik NJ, van Wamel WJ, van Belkum A: Immunotherapeutic approaches against *Staphylococcus aureus*. *Immunotherapy* 2011; 3(9):1063-73.

29. Daum RS, Spellberg B: Progress toward a *Staphylococcus aureus* vaccine. *Clin Infect Dis.* 2012; 15;54(4):560-7.
30. Ohlsen K, Lorenz U: Novel targets for antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiol.* 2007; 2(6):655-66.
31. Otto M: Novel targeted immunotherapy approaches for staphylococcal infection. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10(7): 1049–1059.
32. Smith GP, Petrenko VA: Phage Display. *Chem. Rev* 1997; 97: 391-410.
33. Rosenberg A, Griffin K, Studier FW, McCormick M, Berg J, Novy R, Mierendorf R: T7Select Phage Display System: A Powerful new protein display system based on bacteriophage T7. *Newsletter of Novagen, Inc.* 1996; 6: 1-6.
34. Pande J, Szewczyk MM, Grover AK: Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances* 2010; 28: 849–858.
35. New England Biolabs®, Inc.: Ph.D.™ Phage Display Libraries, Instruction Manual E8100S, E8101S, E8102L, E8110S, E8111L, E8120S, E8121L. Version 1.0 (6/11).
36. Konthura Z, Walter G: Automation of phage display for high-throughput antibody development. *Targets* 2002; 1(1): 30-36.
37. ExPASy Translate, Bioinformatics Resource Portal: <http://web.expasy.org/translate/> [Navedeno: 27. oktober 2012.]
38. MimoDB 2.0, Center of Bioinformatics: <http://immunet.cn/mimodb/> [Navedeno: 27. oktober 2012.]
39. PepBank, Massachussets General Hospital, Harvard University: <http://pepbank.mgh.harvard.edu/> [Navedeno: 27. oktober 2012.]
40. The Pepitope Server: <http://pepitope.tau.ac.il/> [Navedeno: 27. oktober 2012.]
41. Vodnik M, Štrukelj B, Lunder M: HWGMWSY, an unanticipated polystyrene binding peptide from random phage display libraries. *Anal Biochem* 2012; 424(2):83-6.

42. Jesaitis AJ, Gizachew D, Dratz EA, Siemsen DW, Stone KC, Burritt JB: Actin surface structure revealed by antibody imprints: Evaluation of phage-display analysis of anti-actin antibodies. *Protein Science* 1999; 8: 760-770.
43. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A: Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(6): 1292–1305.
44. Mackay IM: Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10(3):190-212.
45. RCSB Protein Data Bank: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> [Navedeno: 26. 11 2012.]
46. Madgyesi D, Uray K, Sallai K, Hudecz F, Koncz G, Abramson J, Pecht I, Sarmay G, Gergely J: Functional mapping of the FcγRII binding site on human IgG1 by synthetic peptides. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 1127-1135.