

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA MATELIČ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA MATELIČ

**KARTIRANJE EPITOPOV NEVTRALIZACIJSKIH PROTITELES PROTI
KEMOKINU CCL2**

**EPITOPPE MAPPING OF NEUTRALIZAIING ANTIBODIES AGAINST
CHEMOKINE CCL2**

Ljubljana, 2013

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

ZAHVALA

Najlepša hvala mentorju doc. dr. Tomažu Bratkoviču za možnost opravljanja diplomske naloge na področju farmacevtske biotehnologije ter za vso pomoč pri eksperimentalnem delu in pisanju naloge.

Hvala Petru Moleku, Mihi Vodniku in Marti Lázaro Albinana za vso pomoč pri delu v laboratoriju.

Zahvaljujem se družini in Gregu za vso podporo in razumevanje tekom celotnega študija.

Hvala tudi Marti Poljanšek Zupan, mag.farm. in ostalem kolektivu Lekarne Bled za vse predano znanje, spodbudo in podporo.

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Tomaža Bratkoviča.

Ana Matelič

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanko Srčič

Mentor: doc. dr. Tomaž Bratkovič

Član diplomske komisije: doc. dr. Mitja Kos

KAZALO

1	UVOD	1
1.1	KEMOKINI	1
1.2	CCL2 (MCP-1)	1
1.3	NEVTRALIZACIJSKA PROTITELESA	7
1.4	PREDSTAVITEV NA BAKTERIOFAGU	8
1.5	KARTIRANJE EPITOPOV	10
2	NAMEN DELA	12
3	MATERIALI IN METODE	13
3.1	MATERIALI	13
3.1.1	KEMIKALIJE	13
3.1.2	BIOLOŠKI MATERIAL	14
3.1.3	GOJIŠČA	15
3.1.4	PUFRI IN RAZTOPINE	16
3.1.5	GELI	21
3.1.6	OPREMA	21
3.2	METODE	23
3.2.1	IZOLACIJA PROTEINA MCP-1	23
3.2.2	KARTIRANJE EPITOPOV NEVTRALIZACIJSKIH PROTITELES PROTI MCP-1	27
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	37
4.1	IZRAŽANJE PROTEINA MCP-1	37
4.2	IZOLACIJA IN ČIŠČENJE MCP-1	37
4.2.1	KOVINSKO-KELATNA AFINITETNA KROMATOGRAFIJA	37
4.2.2	POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECILSULFATA (SDS-PAGE)	38
4.2.3	PRENOS WESTERN	39
4.2.4	IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA – SEC	39
4.2.5	TOČKOVNI NANOS	40
4.2.6	DOLOČITEV KONCENTRACIJE MCP-1 PO BRADFORDU	40
4.2.7	DIALIZA	41
4.2.8	IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA – po dializi	42
4.2.9	DOLOČITEV KONCENTRACIJE MCP-1 PO IZKLJUČITVENI KROMATOGRAFIJI	42
4.3	KARTIRANJE EPITOPOV NEVTRALIZACIJSKIH PROTITELES PROTI MCP-1	43
4.3.1	VREDNOTENJE AFINITETNE SELEKCIJE	43
4.3.2	Poliklonska ELISA	44
4.3.3	Monoklonska ELISA	47
4.3.4	DOLOČANJE AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA	51
4.3.5	Kompetitivni test ELISA	51
4.3.6	KARTIRANJE EPITOPOV NEVTALIZACIJSKIH PROTITELES	53
5	SKLEP	59
6	LITERATURA	61

POVZETEK

CCL2 (MCP-1) je kemotaktični citokin (kemokin), ki na mesto vnetja privablja monocite in nekatere druge imunske celice ter tako igra osrednjo vlogo v vnetnem procesu. Prekomerno izražanje CCL2 povezujemo s številnimi avtoimunskimi boleznimi, kot so revmatoidni artritis, multipla skleroza in astma, pa tudi z aterosklerozo in progresijo tumorjev. Receptor CCL2 (CCR2) sodi med z G-proteinom sklopljene receptorje. Njegova terciarna struktura eksperimentalno še ni določena, kar otežuje racionalno načrtovanje antagonistov, potencialno uporabnih za lajšanje ali zdravljenje naštetih bolezenskih stanj. Mi smo kot začetni korak k razvoju antagonistov CCR2 izbrali alternativni pristop, ki temelji na identifikaciji krajših peptidov, sposobnih posnemanja delov površine MCP-1, s katerimi ta tvori interakcije z receptorjem.

V okviru diplomske naloge smo izrazili, izolirali in prečistili rekombinantni humani MCP-1 (rh-MCP-1). S pomočjo afinitetne selekcije smo iz dveh različnih bakteriofagnih predstavitev knjižnic naključnih peptidov (PhD-12 in PhD-C7C, NEB) izolirali ligande treh nevtralizacijskih protiteles proti MCP-1 (dveh poliklonskih (ab9669, Abcam in AF-279, R&D systems) in enega monoklonskega (S101, Abcam)). S prirejenim encimsko imunskim testom (ELISA) smo potrdili afiniteto vezave na ustrezna tarčna protitelesa številnim bakteriofagnim klonom in petintridesetim izmed njih določili aminokislinsko zaporedje na površini predstavljenega peptida. S kompetitivnim testom ELISA, kjer so bakteriofagi s površinsko predstavljenimi peptidi tekmovali za vezavo na tarčna protitelesa z nativnim antigenom (rh-MCP-1), smo za reprezentativne peptide dokazali vezavo na paratope protiteles (tj. vezišča za antigen). Tem peptidom smo nato določili ujemanje s strukturo MCP-1. Linearne antigenske determinante, ki jih prepoznavajo uporabljena nevtralizacijska protitelesa, smo kartirali z enostavno primerjavo aminokislinskih zaporedij peptidov in primarne strukture MCP-1. Za kartiranje konformacijskih epitopov smo uporabili računalniški program Pepitope, ki omogoča poravnavo peptidov s tridimenzionalno strukturo makromolekularnega antigena. Odkrili smo, da poliklonski nevtralizacijski protitelesi primarno vežeta sam N- oz. C-konec (ab9669) ali zanko tik pred prvo beta površino MCP-1 (tj. aminokislinske ostanke Ser21-Leu25; AF-279) ter tako najverjetneje sterično ovirata interakcijo kemokina z receptorjem. Ti ostanki glede na literaturne vire namreč niso ključnega pomena za vezavo MCP-1 na CCR2. Nasprotno monoklonsko protitelo S101 prepozna konformacijski epitop, ki smo ga kartirali na

mešano bazično-hidrofobno površino MCP-1, bistveno za njegovo vezavo na receptor. Peptid GQPYKYDIRVSK tako predstavlja novo spojino vodnico za načrtovanje antagonistov CCR2.

Ključne besede:

MCP-1, kartiranje epitopov, nevtralizacijska protitelesa, predstavitev na bakteriofagu, peptidi

ABSTRACT

CCL2 (MCP-1) is a chemotactic cytokine (chemokine), that regulates migration and infiltration of monocytes and other immune cells at the site of inflammation and is therefore a key mediator in inflammatory processes. MCP-1 is implicated in multiple inflammatory diseases, such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and asthma, as well as in atherosclerosis and in cancer progression. CCL2 receptor (CCR2) is a G-protein coupled receptor. Its structure has not yet been experimentally determined, complicating rational design of antagonist. As a first step towards CCR2 antagonist design we used an alternative approach, based on identification of small peptides, mimicking parts of MCP-1 surface that engage into interaction with CCR2.

We expressed, isolated and purified recombinant human MCP-1 (rh-MCP-1). Through affinity selection from two phage display libraries (PhD-12 and PhD-C7C, NEB) we isolated ligands of three neutralizing antibodies against MCP-1 (two polyclonal (ab 9669, Abcam and AF-279, R&D systems) and one monoclonal (S101, Abcam)).

Phage ELISA assay was used to confirm binding affinity of a number of phage clones to individual antibodies. Nucleotide sequence encoding displayed peptide was determined for 35 phage clones. Using competitive ELISA assay, where phages competed for binding to the target antibody with the native antigen (rh-MCP-1), we proved binding of representative peptides on the antibodies paratopes.

These peptides were in turn mapped to the surface of MCP-1. Linear epitopes recognized by polyclonal antibodies were identified by alignment of peptides' amino acid sequence to the MCP-1 primary structure. Peptides mimicking conformational epitopes were mapped to macromolecular antigen's 3D structure using the Pepitope computer program. We discovered that polyclonal antibodies primarily recognized the N- or C- terminal (ab 9669) or the loop before the first beta sheet of MCP-1 (i.e., residues Ser21-Leu25; AF-279), thereby likely sterically hindering the interaction of chemokine with receptor. According to the literature data, these residues are not crucial for binding of MCP-1 to CCR2. In contrast, monoclonal antibody S101 recognized a conformational epitope, which we mapped to the mixed basic-hydrophobic surface of MCP-1, essential for binding the receptor. Peptide GQPYKYDIRVSK therefore represents a new lead compound for designing CCR2 antagonists.

Key words:

MCP-1, epitope mapping, neutralization antibodies, phage display, peptides

SEZNAM OKRAJŠAV

AK – aminokislina

BSA – goveji serumski albumin

Da – dalton, enota za relativno molekulsko maso

ddH₂O – ultra čista voda

DNA – deoksiribonukleinska kislina

ELISA – encimskoimunski test (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)

IPTG – izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid

mAb – monoklonsko protitelo

NE – nepomnoženi eluat

NMR – jedrska magnetna resonanca (angl. nuclear magnetic resonance)

pAb – poliklonsko protitelo

PBS – fosfatni pufer s soljo (angl. phosphate-buffered saline)

PBST – pufer PBS z dodanim polisorbatom-20 (Tween® 20)

PE – pomnoženi eluat

PEG – polietilenglikol

pfu – plakotvorna enota (angl. plaque formign unit)

TNFα – dejavnik tumorske nekroze alfa

vrt./min – število vrtljajev na minuto

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 KEMOKINI

Kemotaktični citokini (kemokini) so majhni glikozaminoglikane vezoči proteini, velikosti med 8 in 14 kDa (1), ki tvorijo strukturno podobno družino polipeptidov (2). Razdelimo jih v štiri skupine, CXC, CC, CX3C in XC (2,3), glede na število in lokacijo cisteinskih aminokislinskih ostankov na N-koncu polipeptidne verige. Izločajo jih različne vrste celic kot odgovor na signale proinflammatoryh citokinov in igrajo pomembno vlogo pri rekrutiranju monocitov, nevtrofilcev in limfocitov. Kemokini inducirajo kemotakso preko aktivacije s proteinom G sklopljenih receptorjev. Vezava na ta receptor aktivira protein G, kar sproži znotrajcelično kaskado signalov, ki vodi v migracijo in infiltracijo imunskih celic. Funkcijsko jih razdelimo na inflamatorne, ki skrbijo za privabljanje levkocitov na mesto vnetja in pri poškodbi tkiva, homeostatske, ki usmerjajo levkocite znotraj limfatičnih organov (2) in se izločajo konstitutivno (4), ter kemokine, ki imajo lastnosti obeh skupin. Imajo pomembno vlogo pri prirojeni in pridobljeni imunosti prav tako pa so udeleženi v patofiziologiji kroničnih vnetij, tumorogenezi, metastaziranju in pri različnih avtoimunskih boleznih (5).

Trenutno je pri človeku znanih 48 vrst kemokinov, ki se vežejo na 20 različnih receptorjev. Le-te prav tako delimo v štiri družine, CXCR, CCR, XCR in CX3R, glede na kemokine, ki jih vežejo (3).

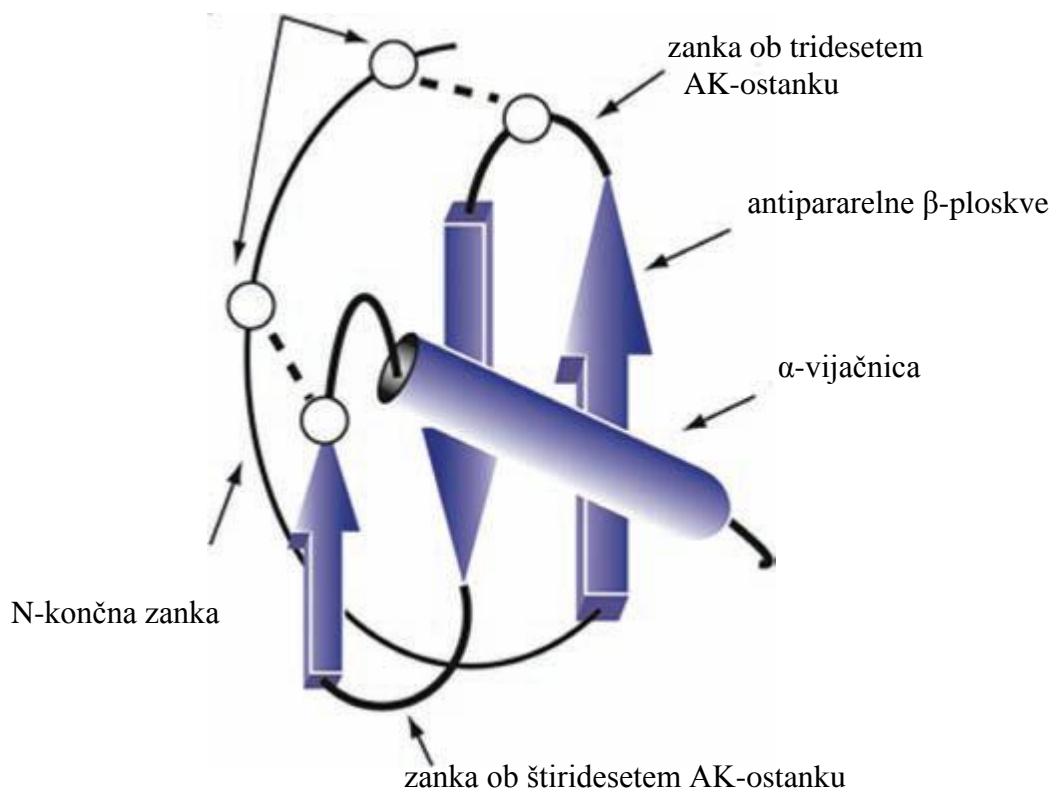
1.2 CCL2 (MCP-1)

CCL2, imenovan tudi MCP-1, sodi v družino monocitnih kemoatraktivnih proteinov. Slednjo sestavlja pet kemokinov, imenovanih MCP-1-5 (tudi CCL2, CCL8, CCL7, CCL13 in CCL12). Ti kemokini se z različnimi afinitetami vežejo na številne receptorje in s tem rekrutirajo številne podskupine levkocitov (6). MCP-1 se lahko veže na receptorja CCR2 in CCR11, vendar vezava na CCR11 ne izzove sproščanja kalcija iz znotrajceličnih zalog, kar je ključni korak za kemotakso. Primarno se veže na CCR2, ki je eden izmed 11 β -kemokinskih receptorjev. Sestavljen je iz 7 transmembranskih domen in sklopljen s proteinom G (1). Vezava CCL2 na CCR2 je odgovorna za začetno fazo privabljanja monocitov na mesto vnetja (7, 8).

Na receptor CCR2 se poleg CCL2 vežeta tudi CCL7 in CCL8, vendar edino vezava CCL2 povzroči aktivacijo signalnih poti, ki vodijo v transmigracijo monocitov (9).

MCP-1 sestavlja 76 aminokislinskih ostankov (2), njegova molekulska masa je odvisna od O-glikozilacije, 9 kDa ali 13 kDa. Glikozilacija ne vpliva na zmožnost indukcije privabljanja monocitov na mesto vnetja (10). Struktura MCP-1 je bila določena s pomočjo rentgenske kristalografske difrakcije in NMR-spektroskopije. Strukturno je MCP-1 zelo podoben ostalim kemokinom iz družine CC, vsebuje N-končno zanko, tri antiparalelne plošče β , C-končno vijačnico α in dva disulfidna mostička (11) (slika 1).

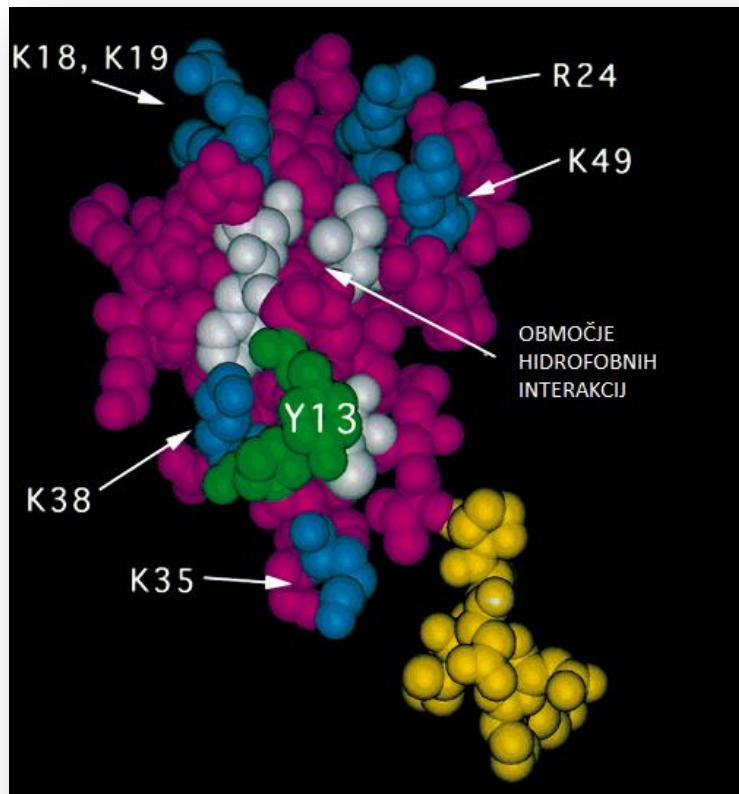
disulfidna mostička (Cys – Cys)



Slika 1: Struktura MCP-1 (prirejeno po 2).

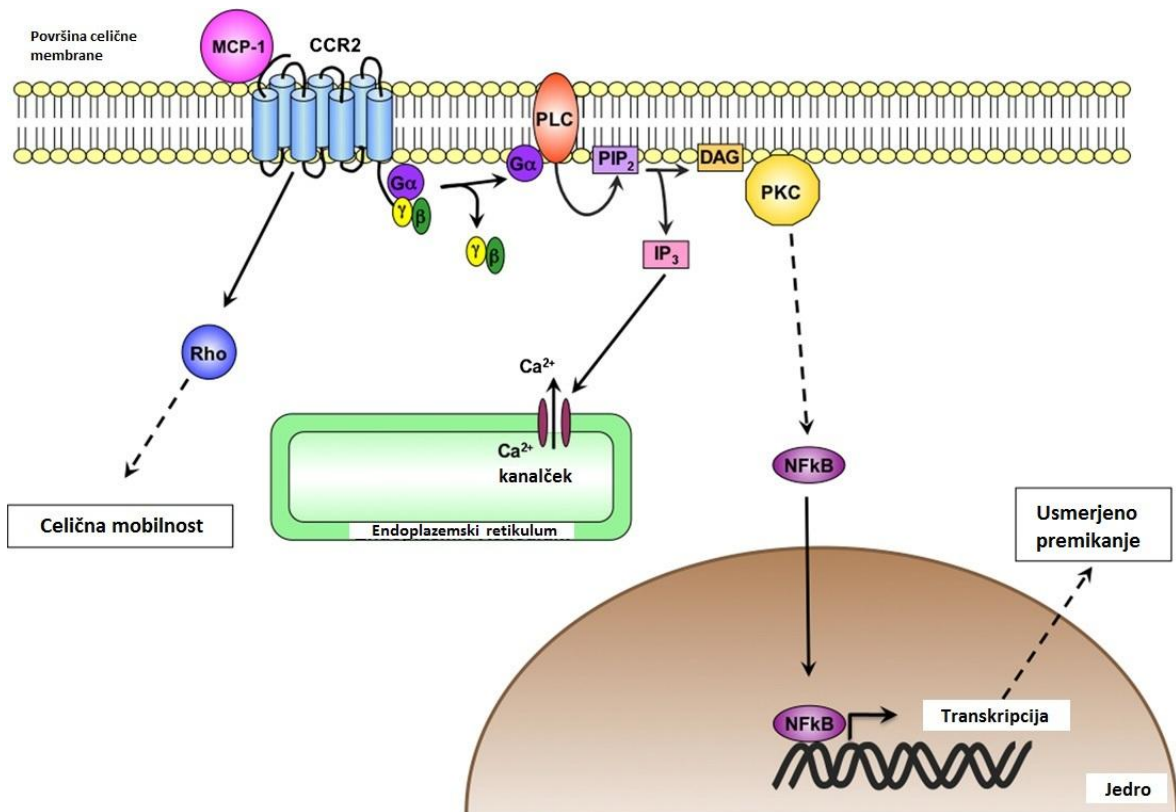
V organizmu nastaja konstitutivno ali pa njegovo sproščanje inducirajo citokini, oksidativni stres ali rastni hormon (2). CCL2 privlači bazofilce in lahko povzroči degranulacijo bazofilcev ter s tem sproščanje histamina. Privlači tudi monocite in T-celice, ki sodelujejo pri kroničnem vnetju (4).

CCL2 povzroča svoje učinke preko vezave na receptor CCR2, katerega izražanje je omejeno na določen tip celic. Poznamo dve obliki receptorja CCR2 (CCR2A in CCR2B), ki se med seboj razlikujeta le v C-koncu. CCR2A izražajo zlasti mononuklearne in gladke mišične celice, medtem ko izoobliko CCR2B izražajo predvsem monociti in aktivirane naravne celice ubijalke. Receptor CCR2 ima v organizmu dvojno vlogo, in sicer povzroča tako pro- kot protivnetne učinke. Pro-inflamatorni učinek je povezan z izražanjem CCR2 na površini antigen-predstavitvenih celic in T-celic, medtem ko so za anti-inflamatorne učinke odgovorni receptorji CCR2 na površini regulatornih celic T (2). Z uporabo mutageneze receptorja in s pomočjo *in vitro*-testov vezave in aktivacije CCR2 (12-14) so ugotovili, da je za visoko afiniteto vezave MCP-1 na receptor odgovoren N-končni del receptorja – prvih 35 aminokislinskih ostankov (12, 13), ostali deli pa so pomembni za prenos signala (12). Na podlagi NMR-študij je dokazano, da številni aminokislinski ostanki MCP-1 (C11, F15, T16 in I51) skupaj z Y13 tvorijo hidrofobno površino, ki ločuje dva skupka bazičnih aminokislinskih ostankov (R24, K35, K38 in K49). Ta del MCP-1 se veže na N-konec receptorja CCR2, kjer najdemo skupek kislih aminokislinskih ostankov. Prevladujoče interakcije so elektrostatske in hidrofobne (slednje poskrbijo za izključitev vodnih molekul, kar okrepi elektrostatske (npr. ionske) interakcije) (slika 2). N-konec MCP-1 doprinese k afiniteti, vendar pri tem ni pomembno točno zaporedje aminokislinskih ostankov, temveč zgolj ustrezna dolžina polipeptidne verige (14). Mehanizem interakcije MCP-1 z receptorjem CCR2 se razlikuje od vezave manjših ligandov na sedem-transmembranske receptorje, saj se MCP-1 ne veže na odprtino, sestavljeno iz zank, ki povezujejo transmembranske domene, temveč se veže na zunajcelično regijo receptorja (13).



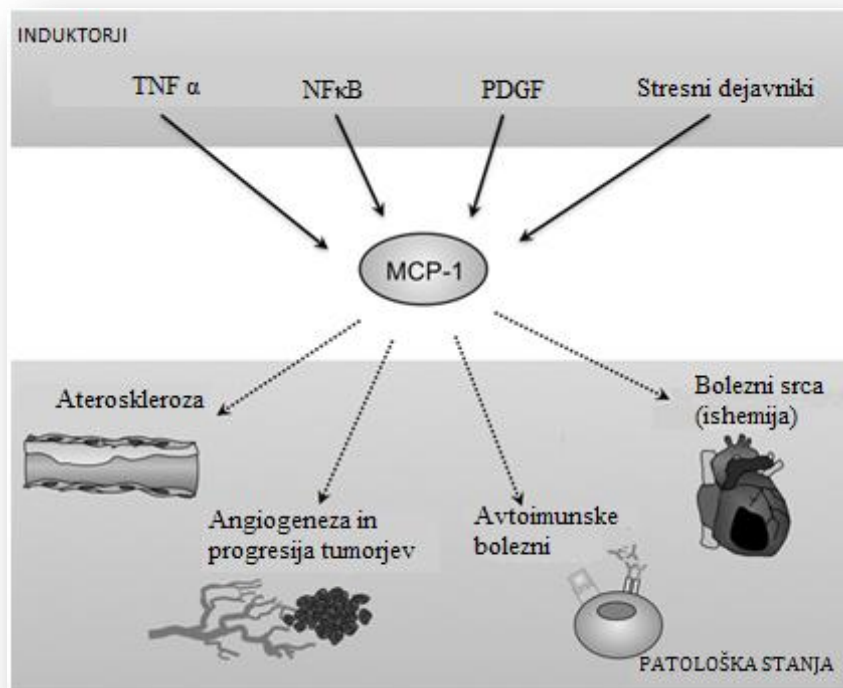
Slika 2: Slika predstavlja aminokislinske ostanke MCP-1, ki vstopajo v interakcijo z receptorjem CCR2 (z rožnato barvo so označeni aminokislinski ostanki, ki ne vstopajo v interakcijo z receptorjem): z rumeno je označen N-konec, ki je pomemben za prenos signala, bazični aminokislinski ostanki so obarvani modro (K18, K19, R24, K35, K38 in K49); aminokislinska ostanka, ki tvorita hidrofobne interakcije, sta obarvana zeleno (Y13 in P37); s sivo pa so označeni aminokislinski ostanki C11, F15, T16 in I51, ki se vežejo na N-konec receptorja CCR2 (prirejeno po 14).

Vezava MCP-1 na receptor sproži celične signale, ki vodijo v nastanek inozitol trisfosfata in diacilglicerola, kar privede do sproščanja znotrajceličnega kalcija in aktivacije protein-kinaze C (10) (slika 3).



Slika 3: Shema aktivacije signalnih poti po vezavi MCP-1 na CCR2 receptor. Razlaga kratic: DAG-diacilglicerol, IP3-inozitol trisfosfat, PKC-protein-kinaza C, PLC-fosfolipaza C, NFκB-jedrni transkripcijski dejavnik κB (prirejeno po 10).

Izražanje MCP-1 stimulirajo TNFα, interferon γ, trombocitni rastni dejavnik (PDGF) in stresni dejavnik (slika 4), medtem ko njegovo izločanje inhibirajo retinojska kislina, glukokortikoidi in estrogen (10).



Slika 4: Prikaz dejavnikov stimulacije izražanja MCP-1 ter nekaterih patoloških sprememb, povezanih s previsokim izražanjem MCP-1 (prirejeno po 10).

MCP-1 sodeluje pri alergijskih vnetjih, povzročeni z mastociti in bazofilci, pri čemer vpliva na sintezo levkotrienov, sproščanje histamina in kemotakso.

Kljub temu, da kemokin MCP-1 povezujemo s številnimi patološkimi stanji (10), kot so kardiovaskularne bolezni, multipla skleroza, revmatoidni artritis in druge, prav tako igra pomembno vlogo pri imunskem sistemu in je pomemben pri prebolevanju akutnih virusnih okužb (2).

MCP-1 je eden ključnih dejavnikov, ki sodeluje pri iniciaciji vnetja. Z vezavo na receptor CCR2 na površini monocitov sproži kemotakso in njihov transendotelijski prihod na področje vnetja. Izločajo ga fibroblasti, endotelijske celice, gladke mišične celice, monociti in T-celice. Receptor CCR2 je stalno izražen v monocitih, medtem ko se v T-celicah izraža le med njihovo aktivacijo (10).

CCL2 sodeluje v promociji angiogeneze, proliferacije in metastaziranja rakavih celic, ki izražajo receptor CCR2 (15). Iz tega vidika sta CCL2/CCR2 primerni tarči za razvoj protitumornih zdravil (16).

Povečane količine MCP-1 so prisotne v sinovialni ovojnici in sklepni tekočini bolnikov z revmatoidnim artritisom, osteoartritisom in travmatičnim artritisom, v epiteliju bronhijev pri idiopatični pljučni fibrozi in astmi, prav tako pa so povečane količine prisotne tudi pri vnetnih kožnih boleznih. Povečane količine so prisotne tudi v z makrofagi bogatih ateroskleroznih lezijah, pri kroničnem in akutnem hepatitisu (10).

Pri pacientih z dejavniki tveganja za nastanek ateroskleroze je potrjena korelacija med serumsko koncentracijo CCL2 in vnetno aktivnostjo (9), s čimer lahko CCL2 uporabimo kot marker za določanje kardiovaskularnih boleznih (17). MCP-1 igra pomembno vlogo pri infiltraciji monocitov/makrofagov v subendotelijski prostor krvožilnih sten, kar je začetni korak v nastajanju ateroskleroze (18).

Povečano izražanje CCL2 in receptorja CCR2 je prisotno tudi pri poškodbah tkiv, ki so posledica ishemije po srčnem infarktu. Predvidevajo, da bi z zmanjšanjem izražanja CCL2 po srčnem infarktu zmanjšali ventrikularno dilatacijo, zato predstavlja CCL2 smiselno tarčo v razvoju zdravil za zdravljenje/preprečevanje srčnega infarkta (17).

CCR2 poleg levkocitov izražajo tudi nekatere druge celice (npr. nevroni (19)), aktivacija teh receptorjev z MCP-1 pa izzove bolj specializirane odgovore (20).

CCL2 in njegov receptor CCR2 sodelujeta pri številnih avtoimunskih boleznih, kot je multipla skleroza, revmatoidni artritis, ateroskleroza, miokarditis in druge. Njuna vloga vključuje privabljanje makrofagov na mesto vnetja kar sproži kaskado dogodkov, ki vodijo v uničenje tkiva in nastanek kronične vnetne bolezni (12).

1.3 NEVTRALIZACIJSKA PROTITELESA

Protitelesa ali imunoglobulini so molekule v krvi, ki specifično prepoznajo in odstranijo antigene (tuje snovi, ki spodbudijo specifično imunost). Primarna funkcija protiteles je vezava antigenov. Ko le-ti vdrejo v telo, sprožijo nastanek številnih različnih protiteles, ki imajo različne afinitete do antigena in različne biološke lastnosti (21). Protitelesa tako predstavljajo učinkovito obrambo organizma, ki preprečuje nastanek okužb, infekcijskih boleznih (22). Nevtralizacijska protitelesa pa so protitelesa, ki ob interakciji z antigenom zmanjšajo oziroma izničijo njegovo biološko aktivnost (23). Uporaba nevtralizacijskih protiteles signalnih molekul kot tarč pri afinitetni selekciji ligandov iz peptidnih knjižnic se

je izkazala za dobro strategijo, saj nam omogoča identifikacijo peptidov, ki vstopajo v interakcije z receptorjem ali njegovimi strukturnimi deli (24).

1.4 PREDSTAVITEV NA BAKTERIOFAGU

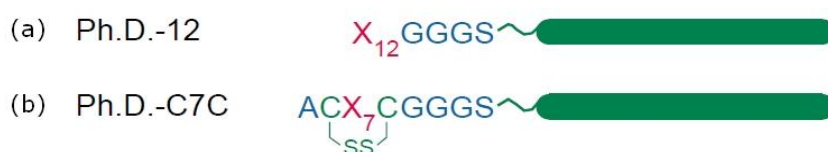
Predstavitev na bakteriofagu je tehnika, ki sloni na izražanju eksogenih (poli)peptidov na površini bakteriofagov (25).

Bakteriofagi so virusi, ki okužijo bakterijske celice. Pri tehniki predstavitve na bakteriofagu običajno uporabljamo filamentne fage, ki kot gostitelja izkoriščajo bakterijo *Escherichia coli*. Virus doseže izjemno visoke titre (10^{12} - 10^{13} plakotvornih enot (pfu)/mL) in ima enoverižno genomsko DNA, ki jo relativno enostavno spreminjamo s tehnologijo rekombinantne DNA (26). Po okužbi bakterijskih celic se bakteriofag namnoži in tvori se veliko število bakteriofagnih klonov, ki izražajo identičen protein na svoji površini (27). To izražanje dosežemo z vključevanjem protein-kodirajočega gena v bakteriofagni gen za kapsidni strukturni protein (28).

Vsaka bakteriofagna knjižnica je heterogena mešanica velikega števila bakteriofagov, pri čemer ima vsak od njih vstavljen drugačen odsek DNA in tako na svoji površini izražene različne proteine (27). Poznamo dve vrsti bakteriofagov, nitaste in litične, ki se med seboj razlikujeta v tem, da se nitasti iz okužene bakterije kontinuirano izločajo skozi celično membrano, litični pa po lizi celice (29).

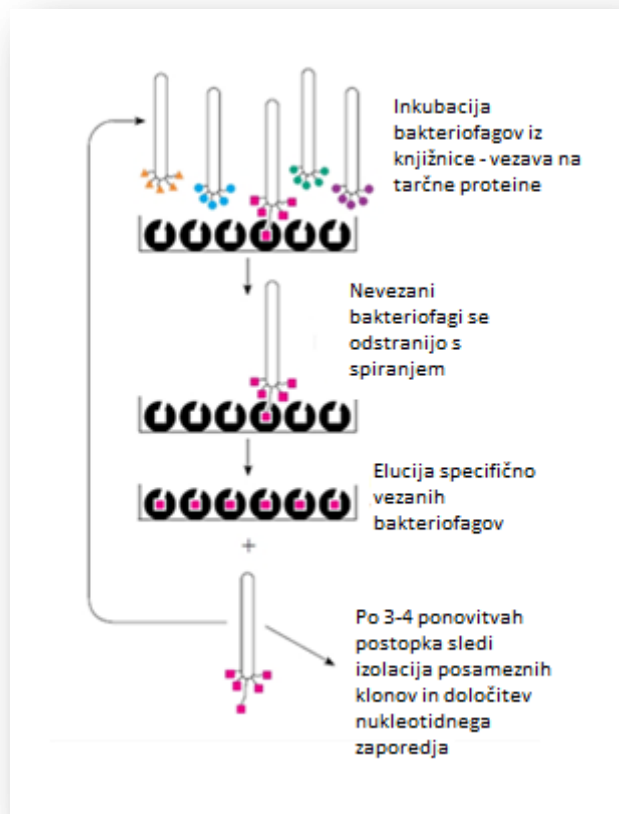
Najpogosteje uporabljen fagni vektor je nitasti fag M13 (25, 30). Le-ta nam omogoča pet valentni prikaz peptidov, ki s kapsidnim proteinom pIII tvorijo fuzijske proteine (31), prav tako pa dovoljuje vnos dolgih fragmentov eksogene DNA v svoj genom (26). Če so izraženi proteini krajši od 50 aminokislinskih ostankov, ne vplivajo na infektivno funkcijo pIII. V primeru bakteriofagnih knjižnic Ph.D.- 12 (linearni dodekapeptidi) in Ph.D.- C7C (ciklični nonapeptidi) so izraženi peptidi na N-konec pIII pritrjeni preko tetrapeptidnega distančnika GGGS. Naključni segment knjižnice Ph.D.- C7C vsebuje tudi par cisteinskih ostankov, ki omogoča nastanek cikličnih peptidov preko disulfidnega mostička (slika 5) (31).

V prvo stopnjo selekcije vnesemo veliko količino začetne populacije bakteriofagov, rezultat selekcijske stopnje pa predstavlja majhna frakcija začetne populacije. Pridobljeno populacijo lahko pomnožimo z okužbo bakterij in tako dobimo veliko količino kopij posameznega bakteriofaga. S pomnoženo populacijo lahko nadaljujemo z afinitetno selekcijo, z vsako naslednjo stopnjo pa želimo iz heterogene populacije bakteriofagov izbrati tiste klone z želenimi lastnostmi, npr. sposobnostjo prepoznave in vezave na nek protein (27).



Slika 5: (a) Linearni dodekapeptid, ki je preko distančnika GGGS povezan z N-koncem pIII. (b) Ciklični heptapeptid z obeh strani obdajata cisteinska ostanka, ki tvorita disulfidni mostiček (31).

Afinitetno selekcijo peptidov iz bakteriofagnih knjižnic (angl. *biopanning*) izvajamo po sledečem postopku (slika 6): Najprej imobiliziramo tarčni protein na mikrotitrsko ploščico. Tarčo nato inkubiramo z bakteriofagi iz knjižnice, pri čemer poteče vezava tistih bakteriofagov, ki imajo na svoji površini izražene ustrezne peptide in tako vstopajo v interakcijo s tarčo. Nevezane bakteriofage speremo, vezane pa eluiramo. Elucija lahko poteka specifično, z raztopino proste tarče ali kompetitivnim ligandom, ali nespecifično, s spremembo pH, ionske moči, denaturacijo, delno proteolizo ali sonifikacijo (25). Specifična elucija omogoča sproščanje na tarčni protein vezanih bakteriofagov, brez sproščanja tistih bakteriofagov, ki so na površino vezani zaradi drugih razlogov, kot so npr. interakcije s kontaminantom ali polistirensko površino mikrotitrskе ploščice (27). Eluirane bakteriofage nato pomnožimo (25). Postopek ponovimo tri- do štirikrat (31), pri čemer zaostrijemo pogoje in s tem obdržimo tiste bakteriofage z visoko afiniteto (26). Nato izoliranim klonom določimo afiniteto vezave s pomočjo testa ELISA ter jim določimo nukleotidno zaporedje inserta, ki kodira na fagu predstavljen (poli)peptid (31).



Slika 6: Prikaz afinitetne selekcije iz bakteriofagne knjižnice (prirejeno po 31).

Peptidi, ki jih izoliramo s pomočjo predstavitve na bakteriofagu, v večini primerov ciljajo na biološko pomembna mesta na površini tarčnih proteinov in tako vplivajo na njihovo aktivnost (24).

1.5 KARTIRANJE EPITOPOV (angl. *epitope mapping*)

Protitelesa imajo na svoji površini posebna mesta (t.i. paratope), ki prepoznajo in vežejo antigene. Specifični del molekule antigena, ki se veže z veziščem za antigen na protitelesu, imenujemo antigenska determinanta ali epitop.

Glede na strukturo ločimo dve vrsti epitopov, linearne in konformacijske. Antigenske determinante, sestavljene iz zaporedno vezanih aminokislinskih ostankov, imenujemo linearni epitopi. Ti so lahko dostopni v nativnem proteinu, če so izraženi na površini, ali nedostopni in se pojavijo samo v primeru denaturiranega proteina. Nasprotno pa so

konformacijski ali sterični epitopi sestavljeni iz aminokislinskih ostankov, ki so na ločenih delih linearnega aminokislinskega zaporedja in se po zvijanju proteina znajdejo prostorsko v bližini (21,32).

Kartiranje je postopek, s pomočjo katerega lahko identificiramo epitop antigena, na katerega se veže protitelo (33). Predstavitev na bakteriofagu je hitra metoda kartiranja antigenov, ki tvorijo specifične interakcije s protitelesi. Omogoča nam identifikacijo aminokislinskih ostankov, ki so odgovorni za vezavo protitelesa (25).

Ker so aminokislinski ostanki konformacijskih epitopov v primarni strukturi proteina ločeni, za določitev le-teh uporabljamo napredne računalniške programe (34). Računalniške programe, glede na metodo, ki jo uporabljajo, razdelimo v dve skupini. Prva skupina določuje epitope na podlagi poravnave peptidov in aminokislinskega zaporedja antigena in tako identificira le linearne epitope, druga skupina pa za določanje uporablja poravnavo med aminokislinskim zaporedjem peptida in prostorsko strukturo proteinskega antigena in lahko odkrije tudi konformacijske epitope (35). Eden izmed računalniških programov, ki sodi v drugo skupino, je Pepitope. Omogoča nam tudi vizualno ponazoritev predvidenih epitopov znotraj proteinskega antigena (34).

2 NAMEN DELA

CCL2 (MCP-1) je kemotaktični citokin (kemokin), ki na mesto vnetja privablja monocite in nekatere druge imunske celice ter tako igra osrednjo vlogo v vnetnem procesu. Prekomerno izražanje CCL2 povezujemo s številnimi avtoimunskimi boleznimi, kot so revmatoidni artritis, multipla skleroza in astma, pa tudi z aterosklerozo in progresijo tumorjev. Receptor za CCL2 (CCR2) sodi med z G-proteinom sklopljene receptorje. Njegova terciarna struktura eksperimentalno še ni določena, kar otežuje racionalno načrtovanje antagonistov, potencialnih novih učinkovin za zdravljenje ali lajšanje naštetih bolezenskih stanj.

V diplomski nalogi bomo s pomočjo afinitetne selekcije peptidov iz bioloških knjižnic (bakteriofagnih peptidno predstavitev knjižnic) kartirali epitope nevtralizacijskih protiteles proti CCL2. Z enostavno poravnavo peptidov, ki posnemajo linearne epitope, in primarne strukture CCL2 ter z uporabo računalniškega programa Pepitope, ki poravna peptide, ki posnemajo konformacijske epitope (t.i. mimotope) s prostorsko strukturo makromolekularnega antigena, bomo skušali identificirati kratka aminokislinska zaporedja, odgovorna za vezavo ali proženje signalizacije na CCR2. Ti bodo predstavljali osnovo za sledeče načrtovanje antagonistov CCR2.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 KEMIKALIJE

REAGENT	PROIZVAJALEC
agar – agar, Kobe, pulv.	Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
agaroz	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA
40 % akrilamid/bisakrilamid (37,5:1)	Sigma – Aldrich, Missouri, ZDA
10 % amonijev persulfat	Merck, Darmstadt, Nemčija
ampicilin	Sigma – Aldrich, Missouri, ZDA
L-arginin	SAFC (Sigma – Aldrich), St.Louis, USA
CaCl ₂	Kemika, Zagreb, Hrvaška
citronska kislina monohidrat (C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O)	SERVA Electrophoresis, Hiedelberg, Nemčija
Comassie Plus™ protein, Assay Reagent	Thermo scientific
DMF	Merck, Darmstadt, Nemčija
DTT (DL – ditioneitol)	Fluka analytical, Sigma – Aldrich, St.Louis, Missouri, ZDA
EDTA - dinatrijeva sol etilendiamintetraočetne kisline, dihidrat	SERVA Electrophoresis, Hiedelberg, Nemčija
etanol, absolutni	Riedel-de Haën AG, Seelze, Nemčija
glicerol	Fluka Chemie, Buchs, Švica
glicin	Sigma – Aldrich, St.Louis, Missouri, ZDA
glutation, reduciran	Calbiochemie, an affiliate of Merc KGaA, Darmstadt, Germany
glutation, oksidiran	Calbiochemie, an affiliate of Merc KGaA, Darmstadt, Germany
gvanidinijev klorid	Sigma – Aldrich, St.Louis, Missouri, ZDA
HCl, 32%	Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italija
H ₂ SO ₄ , 95-97%	Merck, Darmstadt, Nemčija
imidazol	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany
IPTG (izopropil-β-D-1- tiogalaktopiranozid)	Promega, Madison, Wisconsin, ZDA
KCl	Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italija
KH ₂ PO ₄	Kemika, Zagreb, Hrvaška
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Nemčija
kloramfenikol	Sigma – Aldrich, Missouri, ZDA
kvasni ekstrakt Bacto™ Yeast extract	Becton Dickinson and Co., Sparks, ZDA
luminiscenčni substrat Super Signal ® West Dura	Thermo scientific
metanol	Merck, Darmstadt, Nemčija
MgCl ₂	Fluka Chemie, Buchs, Švica
NaCl	Sigma – Aldrich, Missouri, ZDA
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA

REAGENT	PROIZVAJALEC
NaI	Riedel-de Haën AG, Seelze, Nemčija
NiSO ₄ · 6H ₂ O	Sigma – Aldrich, Missouri, ZDA
PEG – 8000	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
pepton Bacto™ Tryptone	Becton Dickinson and Co., Sparks, ZDA
posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne, Slovenija
proteinski standard See Blue® Plus2	Invitrogen, Carlsbad, ZDA
10 % SDS	Sigma – Aldrich, Missouri, ZDA
TEMED (N,N,N',N'-tetrametil etilendiamin)	Sigma – Aldrich, Missouri, ZDA
tetraciklin	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin)	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
Tris·HCl (tris(hidroksimetil)aminometan)	SERVA Electrophoresis GmbH, Nemčija
Tween® 20	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
Urea	Sigma – Aldrich, Missouri, ZDA
X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid)	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA

3.1.2 BIOLOŠKI MATERIAL

PEPTIDI IN PROTEINI	PROIZVAJALEC
BSA (goveji serumski albumin), liofilizat	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
kozje protikunčje IgG - HRP	Millipore, Billerica, ZDA
DNaza	Sigma-Aldrich, Missouri, ZDA
anti-M13-mAb-HRP (mAb proti bakteriofagu M13, konjugirano s hrenovo peroksidazo)	GE Healthcare, Little Chalfont, Združeno kraljestvo

GOSTITELJSKI BAKTERIJSKI SEV	PROIZVAJALEC
<i>E. coli</i> ER2738	New England BioLabs, Massachusetts, Ipswich, ZDA

PEPTIDNOPREDSTAVITVENI BAKTERIOFAGNI KNJIŽNJICI	PROIZVAJALEC
Ph.D.-12™	New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Ph.D.-C7C™	New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA

NEVTRALIZACIJSKA PROTITELESA	PROIZVAJALEC
Mišje monoklonsko protitelo, usmerjeno proti humanemu MCP-1, S101 (1 mg/mL)	Abcam, Cambridge, Združeno kraljestvo
Kunčje poliklonsko protitelo, usmerjeno proti humanemu MCP-1, ab9669 (0,5 mg/mL)	Abcam, Cambridge, Združeno kraljestvo
Mišje poliklonsko protitelo usmerjeno proti humanemu MCP-1, AF-279-NA (0,5 mg/mL)	R&D systems, Minneapolis, ZDA

SINTEZNI OLIGONUKLEOTID	NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE
-96 gIII	5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3'

3.1.3 GOJIŠČA

Gojišča, pufre in druge raztopine smo praviloma sterilizirali z nasičeno vodno paro – nadtlak 1 bar, temperatura = 121 °C, čas = 15 minut.

Za sterilizacijo s filtracijo smo uporabili membranske filtre s premerom por 0,20 µm (nepirogeni, hidrofilni).

TEKOČE GOJIŠČE LB

SESTAVA	KOLIČINE
pepton	10,0 g
kvasni ekstrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
ddH ₂ O	ad 1 L

Avtoklavirano gojišče smo shranjevali pri sobni temperaturi. Pred uporabo smo dodali ustrezne količine antibiotikov.

AGARNO GOJIŠČE LB

SESTAVA	KOLIČINE
pepton	4,0 g
kvasni ekstrakt	2,0 g
NaCl	2,0 g
agar-agar, Kobe, pulv.	6,0 g
ddH ₂ O	ad 400 mL

V komori z laminarnim pretokom zraka smo avtoklavirano gojišče prelili v petrijevke (premer 9 cm) in počakali, da je strdilo. Gojišča smo hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

GOJIŠČE LB Z AGARZO

SESTAVINE	KOLIČINE
gojišče LB	40 mL
1 M MgCl ₂	197 µL
agarosa	0,28 g

Avtoklavirano gojišče smo shranjevali smo pri sobni temperaturi. Pred uporabo smo gojišče raztalili v mikrovalovni pečici.

TEKOČE GOJIŠČE TB

SESTAVA	KOLIČINA
pepton	12 g
kvasni ekstrakt	24 g
glicerol	4 mL
ddH ₂ O	Ad 900 mL
ampicilin	75 µg/mL

Fosfatni pufer

SESTAVA	KOLIČINA
KH ₂ PO ₄	2,31 g
K ₂ HPO ₄	12,54 g
ddH ₂ O	ad 100 mL

Tripton, kvasni ekstrakt in glicerol smo raztopili v ustrezni količini vode in dopolnili do 900 mL. Posebej smo pripravili 100 mL fosfatnega pufra. Raztopini smo ločeno avtoklavirali, ohladili in ju pomešali v aseptičnih pogojih. Gojišče smo shranjevali pri sobni temperaturi. Pred uporabo smo mu dodali ampicilin in kloarmfenikol.

3.1.4 PUFRI IN RAZTOPINE

PBS – Fosfatni pufer, pH=7,4 – 400ml

SESTAVA	KOLIČINA
NaCl	3,2g
KCl	0,08g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,722g
KH ₂ PO ₄	0,096g
ddH ₂ O	ad 400ml

Avtoklaviran pufer smo shranili pri sobni temperaturi.

- MATERIAL, UPORABLJEN PRI IZOLACIJI PROTEINA MCP-1

PUFER 1 – za suspendiranje celic

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
Tris HCl	20 mM	145,32 mg
MgCl ₂ (1 M)	2,5 mM	150 µL
CaCl ₂	0,5 mM	3,5 mg
ddH ₂ O		ad 60 mL

Pufro smo uravnali pH na 7,4, ga avtoklavirali in shranili pri sobni temperaturi.

PUFER 2

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	100 mM	426 mg
dd H ₂ O		ad 30 mL

Pufro smo uravnali pH na 7,4.

PUFER 3

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
puffer 2		8 mL
gvanidinjev klorid	8 M	15,3 g
imidazol	20 mM	27,2 mg
ddH ₂ O		ad 20 mL

Gvanidinjev klorid in imidazol smo raztopili v 8 mL pufra 2 in 4 mL vode, uravnali pH na 7,4 in dopolnili z vodo do 20 mL.

PUFER 4 – VEZAVNI PUFER IMAC A

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	20 mM	1,42 g
gvanidinijev klorid	4 M	154,8 g
imidazol	10 mM	272 mg
NaCl	500 mM	11,69 g
ddH ₂ O		ad 400 mL

Pufro smo umerili pH na 7,4 in ter ga pred uporabo filtrirali in degazirali.

PUFER 5 – ELUCIJSKI PUFER IMAC B

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	20 mM	356 mg
gvanidinijev klorid	4 M	38,21 g
imidazol	500 mM	2,922 g
NaCl	500 mM	3,405 g
ddH ₂ O		ad 100 mL

Pufri smo umerili pH na 7,4 in ga pred uporabo filtrirali in degazirali.

PUFER 6 – PUFER ZA PRENOS WB

SESTAVA	KOLIČINA
Tris HCl	2,93 g
glicin	5,81 g
10 % SDS	3,75 mL
MeOH	200 mL
ddH ₂ O	ad 1 L

PUFER 7 – 10x ELEKTROFOREZNI PUFER ZA SDS – PAGE

SESTAVA	KOLIČINA
Tris HCl	29,0 g
glicin	144,0 g
SDS	10 g
ddH ₂ O	ad 1 L

PUFER 8 – GELSKA FILTRACIJA (SEC)

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	50 mM	3,56 g
gvanidinjev klorid	4 M	152,85 g
NaCl	150 mM	3,51 g
ddH ₂ O		ad 400 mL

Pufri smo uravnali pH na 7,4 in ga pred uporabo filtrirali in degazirali.

DIALIZNI PUFER 1

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
KH ₂ PO ₄	20 mM	2,21 g
NaCl	150 mM	7,013 g
gvanidinjev klorid	2 M	152, 85g
glutation – reduciran	2 mM	492 mg
glutation – oksidiran	0,4 mM	196 mg
L–arginin	0,5 M	69,9 g
dd H ₂ O		ad 800 mL

Pufri smo uravnali pH na 7,4.

DIALIZNI PUFER 2

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
KH ₂ PO ₄	20 mM	2,21 g
NaCl	150 mM	7,01 g
glutation – reduciran	2 mM	491mg
glutation – oksidiran	0,4 mM	196 mg

L-arginin	0,2 M	11,14 g
ddH ₂ O		ad 800 mL

Pufri smo uravnali pH na 7,4.

DIALIZNI PUFER 3

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
KH ₂ PO ₄	20 mM	2,76 g
NaCl	150 mM	8,766 g
dd H ₂ O		ad 1 L

Pufri smo uravnali pH na 7,4.

8 M UREA

2,4 g sečnine smo raztopili v vodi do končnega volumna 5 mL.

- MATERIAL, UPORABLJEN PRI KARTIRANJU EPITOPOV NEVTRALIZACIJSKIH PROTITELES

PBST – Fosfatni puffer s Tween®-om 20

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
PBS		50 mL
Tween ® 20	0,075 %	37,5 µL
	0,1 %	50 µL
	0,5 %	250 µL

BLOKIRNI PUFER

1 % ali 5 % posneto mleko v prahu v pufri PBS

PEG/NaCl

SESTAVA	KONCENTRACIJA	KOLIČINA
PEG – 8000	20 % m/v	8 g
NaCl	2,5 M	5,85 g
ddH ₂ O		ad 40 mL

Avtoklavirano raztopino smo shranjevali pri sobni temperaturi.

TRIS – PUFER Z JODIDNIMI IONI

SESTAVA	KOLIČINA
Tris	48,5 mg
32 % HCl	39,3 µL
0,5 M EDTA	80 µL

NaI	23,98 g
ddH ₂ O	ad 40 mL

Pufri smo pH uravnali na 8,0, ga sterilizirali s filtracijo ter shranili pri sobni temperaturi, zaščiten pred svetlobo.

IPTG – 1 M-raztopina

SESTAVA	KOLIČINA
IPTG	2,383 g
ddH ₂ O	10 mL

Raztopino smo sterilizirali s filtracijo in alikvotirali v mikrocentrifugirke. Shranjevali smo v zamrzovalniku pri -20 °C.

X-gal – 2 %-raztopina

SESTAVA	KOLIČINA
X-gal	0,2 g
DMF	10 mL

Raztopino smo alikvotirali v mikrocentrifugirke in jo shranjevali v zamrzovalniku pri -20 °C.

RAZTOPINA TETRACIKLINA

SESTAVA	KOLIČINA
glicerol	40 mL
tetraciklin	1,6 g
ddH ₂ O	40 mL

Tetraciklin smo raztopili v 40 mL ddH₂O in raztopino filtrirali preko membranskega filtra. Filtratu smo dodali avtoklaviran glicerol. Shranjevali smo v zamrzovalniku pri -20°C.

ELUCIJSKI PUFER (0,2 M glicin · HCl, 1 g/L BSA, pH = 2,2)

SESTAVA	KOLIČINA
glicin	300 mg
BSA	20 mg
ddH ₂ O	20 mL

Pufri smo pH uravnali na 2,2, ga sterilizirali z membransko filtracijo, razdelili v mikrocentrifugirke in hranili pri sobni temperaturi.

NEVTRALIZACIJSKI PUFER (1 M Tris-HCl pH=9,1)

SESTAVA	KOLIČINA
Tris – HCl	2,423 g
ddH ₂ O	ad 20 mL

Pufri smo uravnali pH na 9,1, ga sterilizirali z membransko filtracijo in shranjevali pri sobni temperaturi.

PUFER ZA KROMOGEN SUBSTRAT TETRAMETILBENZIDIN (TMB)

SESTAVA	KOLIČINA
citronska kislina monohidrat	21 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	17,8 g
ddH ₂ O	1 L

Pufri smo pH uravnali na 6,0 in gahranili v hladilniku pri 4 °C.

3.1.5 GELI

GEL 1 – LOČEVALNI – 17%

SESTAVA	KOLIČINA
40 % akrilamid/bisakrilamid	5,6 mL
1 M Tris·HCl, pH 8,8	5,6 mL
10 % amonijev persulfat	0,140 mL
10 % SDS	0,140 mL
TEMED	0,0056 mL
ddH ₂ O	4,619 mL

Vse sestavine smo združili v čaši, nazadnje smo dodali TEMED, ki je sprožil polimerizacijo. Nato smo raztopino s pipeto vnesli med dve stekleni ploščici in počakali, da je gel polimeriziral.

GEL 2 – ZBIRALNI – 5 %

SESTAVA	KOLIČINA
40 % poliakrilamid	0,5 mL
1 M Tris·HCl, pH 6,8	0,5 mL
10 % amonijev persulfat	0,04 mL
10 % SDS	0,04 mL
TEMED	0,004 mL
ddH ₂ O	2,92 mL

Vse sestavine smo združili v čaši, nazadnje smo dodali TEMED, ki je sprožil polimerizacijo. Nato smo raztopino s pipeto vnesli med dve ploščici, kjer smo že imeli pripravljen ločevalni gel.

3.1.6 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
centrifugirka za ultrafiltracijo Amicon	NMWL 3 kDa	Millipore
FPLC	ÄKTA explorer 10S	GE Healthcare, Little Chalfont, Združeno kraljestvo
komora za fotografiranje gelov in WB-membran	G-BOX	Syngene, Cambridge, Združeno kraljestvo
hladilnik		Gorene, Velenje, Slovenija
inkubator (37 °C)	WTC	Binder GmbH, Tuttlingen, Nemčija
kadička za SDS-PAGE	Mini Protean 3 Cell	Biorad, Hercules ZDA
LAF-komora	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
mikrovalovna pečica		LG, Seul, Južna Koreja
pH meter	691	Metrohm, Herisan, Švica
pipetor	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
termoblok-stresalnik	Thermomixer Comfort 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
stesalnik	IKA® MS3 digital	IKA Works, Wilmington, ZDA
stresalniki	Vibromix 314 EVT, 403 EVT in 104 EV	Tehtnica, Železniki, Slovenija
zamrzovalnik (-80 °C)	Vip Series -86°C	Sanyo Electric Biomedical Co., Tokio, Japonska
zamrzovalnik (-20 °C)		Gorenje, Velenje, Slovenija

3.2 METODE

3.2.1 IZOLACIJA PROTEINA MCP-1

3.2.1.1 PRIPRAVA BAKTERIJSKE KULTURE - *E. coli* BL21 DE3 pLysS/pET44-MCP1b na agarjem gojišču LB/amp/chloram

S sterilizirano mikrobiološko zanko smo se dotaknili zamrznjenih bakterij (trajne bakterijske kulture) in jih nacepili na agarno gojišče LB z antibiotikoma ampicilinom in kloramfenikolom. Petrijevko z nacepljenimi bakterijami smo inkubirali preko noči pri 37 °C, nato pa hranili v hladilniku pri 4 °C. Posamezno kolonijo bakterij smo uporabili za pripravo bakterijske kulture v tekočem gojišču.

3.2.1.2 IZRAŽANJE, IZOLACIJA IN ČIŠČENJE PROTEINA MCP-1

1. Eno kolonijo *E. coli* BL21 DE3 pLysS/pET44 – MCP1b smo precepili v gojišče LB/amp/chloram in kulturo inkubirali preko noči pri 37 °C med močnim stresanjem.
2. Naslednji dan smo prekonočno kulturo redčili v razmerju 1:100 v 500 mL tekočega gojišča TB/amp/chloram in inkubirali pri 37 °C med močnim stresanjem, dokler kultura ni dosegla optične gostote (OD_{600}) 0,5, in dodali 1 mM IPTG. Nadaljevali smo z gojenjem 4 h.
3. Celice smo ločili od gojišča s centrifugiranjem (10 min pri 5000 vrt./min) in jih sprali z ohlajenim pufrom PBS. Ponovno smo centrifugirali.
4. Celice smo nato suspendirali v 10 mL pufra 1, sonicirali in dodali DNazo (10 µg/mL). Med nežnim stresanjem smo lizat inkubirali pri sobni temperaturi 15 min.
5. Suspenziji smo dodali 10 mL pufra 3. Nato smo 30 minut centrifugirali pri 10.000 vrt./min in pridobljeni supernatant shranili pri 4 °C.
6. Naslednji dan smo dodali NaCl do 500 mM in filtrirali skozi membranski filter z 0,20 µm-porami.

Priprava kolone za **kovinsko-kelatno afinitetno kromatografijo**:

1. Zaporedno vezani koloni HiTrap IMAC 1 mL smo spirali z 10 mL vode (pretok 1 mL/min), nato nanесли 1 mL 0,1 M $NiSO_4 \cdot 6H_2O$.
2. Kolono smo pred nanosom vzorca spirali z vodo (10 mL) ter pufroma 5 (10 mL) in 4 (20 mL).

Nato smo vnesli vzorec ter kolono zaporedno spirali s pufri A, B, C in D ter eluirali z E (glej preglednico I).

Preglednica I: Pregled nanosa vzorca in pufrov pri kovinsko-kelatni afinitetni kromatografiji.

		V(mL)	pretok
	Vzorec	43	1 mL/min
A	100 % pufra 4, 0% pufra 5	40	
B	98 % pufra 4, 2 % pufra 5 (20 mM imidazol)	15	
C	94 % pufra 4, 6 % pufra 5 (40 mM imidazol)	15	
D	90 % pufra 4, 10 % pufra 5 (60 mM imidazol)	15	
E	linearni gradient 10 % - 80 % pufra B (60-410 mM imidazol)	22	

Ob eluciji smo zbirali frakcije po 1,2 mL in jih shranili pri 4 °C.

3.2.1.3 SDS PAGE

Priprava vzorcev: Proteine v vzorcih (del izpirkov in eluatov) smo precipitirali z absolutnim etanolom (1 del vzorca : 9 delov 100 % EtOH) 1 uro pri -20°C – s tem smo odstranili Gu·HCl. Nato smo centrifugirali 15 minut pri 4 °C in 13200 vrt./min. Pazljivo smo odstranili supernatant ter oborino sprali s hladnim 90 % etanolom, dobro premešali na vibracijskem mešalniku in 5 min centrifugirali. Sušili smo pri 37 °C. Precipitirane proteine iz vzorcev smo raztopili v 8 M urei in jim dodali 5,3 µL nanašalnega pufra ter 2,7 µL 1 M DDT. Nato smo jih segrevali 5 min pri 100 °C in s tem zagotovili popolno denaturacijo proteinov.

Postopek: Po recepturi smo pripravili ločevalni gel in ga s pipeto nanesli med dve stekleni ploščici. Nad gel smo nanesli izopropanol, s katerim smo omogočili anaerobne pogoje. Ko se je gel strdil, smo izopropanol odlili in gel sprali z vodo, ga osušili s filter papirjem ter nanesli še koncentracijski gel. Takoj smo vstavili glavniček, ki je poskrbel za nastanek vdolbinic, kamor smo kasneje vnesli vzorec.

Gel smo vpeli v elektroforezno kadičko, prelili z desetkrat redčenim pufrom 7 in v vdolbinice nanesli vzorce. Elektroforezno ločevanje proteinov je potekalo pri stalni napetosti 100 V. Med elektroforezo so se proteini iz vzorcev v zgornjem gelu skoncentrirali in se nato v spodnjem gelu ločili glede na velikost.

Preglednica II: Nanos vzorcev – izbrane frakcije iz kovinsko-kelatne afinitetne kromatografije.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
M	A1	A2	A3	A11	A12	A13	B2	B3	B6	B7	B9	B13	B14	FT

M - marker (proteinski standard, označevalec velikosti)

FT - frakcija vzorca, ki se ni vezala na kolono (angl. *flow through*)

Po elektroforezi smo proteine iz gela prenesli na nitrocelulozno membrano s prenosom western in nato izvedli imunodetekcijo.

3.2.1.4 Prenos western

Najprej smo morali prenesti vzorce iz gela na membrano. Uporabili smo isto kadičko kot pri SDS-PAGE, v plastično kaseto smo po vrsti zložili v pufer 6 omočene: gobico, tri kose filter papirja, gel, membrano, ponovno tri kose filter papirja in gobico. Kaseto smo vstavili v kadičko, prelili s pufrom 6 in jo priklopili na vir napetosti. Prenos proteinov na membrano je potekal 1,5 h pri napetosti 100 V.

Detekcija:

1. Membrano smo blokirali v 5 %-raztopini mleka v pufru PBS z 0,05 % tween 20 (0,05 % PBST) pri 4 °C. Pri tem so se proteini iz mleka vezali na prosta mesta na membrani in s tem preprečili kasnejšo nespecifično vezavo primarnim protitelesom.
2. Naslednje jutro smo membrano dvakrat sprali s po 25 mL 0,05 % PBST.
3. Nato smo membrano 2 uri inkubirali v raztopini kunčjega anti-hMCP-1 pAb 9669 v blokirnem pufru (5 µL v 5 mL 0,05 % PBST).
4. Membrano smo trikrat sprali s po 25 mL 0,05 % PBST.
5. Nato smo membrano inkubirali v raztopini sekundarnih protiteles – kozje protikunčje IgG – HRP (1 µL v 10 mL 0,05 % PBST).
6. Po eni uri smo membrano trikrat sprali s po 25 mL 0,05 % PBST.
7. Nato smo na membrano nanесли substrat – Super signal ® West Dura, in nanj položili membrano. Po 5 minutah smo luminiscentne lise na membrani detektirali z digitalno kamero (G-BOX, Syngene).

3.2.1.5 SEC – GELSKA FILTRACIJA

Kolono (HiPrep 16/60 Sephacryl S – 200 High resolution) smo ekvalibrirali s 60 mL vode (pretok 0,5 mL/min) in 240 mL pufra 8 (pretok 1 mL/min).

Injicirali smo vzorec – eluate (od B7 do B15) kovinsko-kelatne afinitetne kromatografije, združene in koncentrirane z Amicon NMWL 3 kDa. Eluat (po 1 mL) smo začeli zbirati po 0,3x CV (36 mL) in smo ga zbirali nadaljnjih 100 mL (ob pretoku 0,5 mL/min).

3.2.1.6 TOČKOVNI NANOS – DOT BLOT

Fracije, pridobljene z gelsko filtracijo (A5, B4, B15, C4, D4, E1), in pozitivno kontrolo (primarno protitelo) smo nanegli s pipeto neposredno na membrano (po 5 µL) in izvedli detekcijo enako, kot je opisano pri prenosu western.

3.2.1.7 DIALIZA

PRIPRAVA VZORCA:

Ker koncentracije MCP-1 v združenih eluiranih frakcijah po gelski filtraciji (B10 do C7) nismo poznali, smo jo ocenili z metodo po Bradfordu s pomočjo umeritvene krivulje in uporabe standarda (BSA).

Na mikrotitrski ploščici smo k 10 µL standarda (BSA v koncentraciji 0, 40, 80, 100, 150, 300, 400 in 500 µg/mL) in vzorca dodali 300 µL reagenta Coomassie Plus™ Protein in po 10 min izmerili absorbanco pri 595 nm ter ocenili koncentracijo MCP-1 na 80 µg/mL.

Vzorec smo aplicirali v dializno črevo s porami 3 kDa, ga dobro zaprli in ga za 8 ur potopili najprej v dializni puffer 1, nato 2 in nazadnje še v puffer 3.

Po dializi smo rekombinantni protein MCP-1 skoncentrirali z ultrafiltracijo in ga analizirali z gelsko filtracijo na koloni Superdax S-200 10/300 GL.

3.2.2 KARTIRANJE EPITOPOV NEVTRALIZACIJSKIH PROTITELES PROTI MCP-1

3.2.2.1 PRIPRAVA BAKTERIJSKIH KULTUR *E. coli* ER2738

- Na agarnem gojišču LB

S sterilizirano mikrobiološko zanko smo se dotaknili trajne bakterijske kulture *E. coli* ER2738, ki smo jo hranili pri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, in bakterije nacepili na agarno gojišče LB s tetraciklinom ($20\text{ }\mu\text{g/mL}$). Petrijevko smo inkubirali preko noči pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, nato pa teden dni hranili v hladilniku pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Posamezne kolonije bakterijskih kultur smo uporabili za pripravo bakterijskih kultur v tekočem gojišču.

- Prekonočna kultura

Bakterijsko kolonijo z agarnege gojišča LB smo precepili v tekoče gojišče LB s tetraciklinom ($20\text{ }\mu\text{g/mL}$). Bakterijsko kulturo smo inkubirali preko noči pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ na stresalniku pri 250 vrt./min.

- Kultura za pomnoževanje bakteriofagov M13

Po enakem postopku kot za pripravo prekonočne kulture smo nacepili bakterijsko kulturo (20 mL) in jo inkubirali pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $\text{OD}_{600} = 0,01 - 0,05$.

- Kultura za titracijo

Pripravili smo 5 mL kulture (po enakem postopku kot za kulturo za pomnoževanje) in jo inkubirali pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $\text{OD}_{600} = 0,5$.

3.2.2.2 AFINITETNA SELEKCIJA PEPTIDOV Z METODO PREDSTAVITVE NA BAKTERIOFAGU

Kot tarčne makromolekule smo v afinitetni selekciji peptidov iz knjižnic Ph.D.- C7C™ in Ph.D.- 12™ uporabili monoklonska in poliklonska nevtralizacijska protitelesa proti MCP-1. Vezane bakteriofage smo eluirali nespecifično, s spremembo pH. Vsaka selekcija je bila

sestavljena iz treh ciklov, vsak cikel pa je obsegal 16 korakov, ki smo jih izvedli v treh dneh.

1. dan

1. korak: Na površino vdolbinice mikrotitrne plošče smo adsorbirali tarčna protitelesa (iz raztopine v pufru PBS) ter ploščico inkubirali preko noči pri 4 °C in 45 vrt./min.

2. dan

2. korak: Pripravili smo kulturi za titracijo in za pomnoževanje bakteriofagov M13 (3.2.2.1).

3. korak: Vsebino mikrotitrne ploščice smo odlili v odpad in z navzdol obrnjeno ploščico večkrat udarili ob čisto papirnato brisačko, ter napolnili vdolbinico s 250 µL 5 %-blokirnega pufra. Blokiralimo na stresalniku 1 uro pri sobni temperaturi.

4. korak: Blokirni pufer smo odstranili, kot je opisano v 3. koraku, nevezane proteine pa smo nato trikrat po 5 minut spirali s 300 µL 0,1 % PBST.

5. korak: Ta korak je bil namenjen vezavi bakteriofagov. Pri prvi stopnji selekcije smo v pufru PBS razredčili tolikšno količino knjižničnih bakteriofagov, da je le-ta ustrezala 2×10^{11} pfu/100 µL, in jo odpipetirali v vdolbinico z adsorbiranim tarčnim protitelesom. V drugem in tretjem selekcijskem ciklu smo uporabili tolikšno količino pomnoženega eluata po prvem ali drugem ciklu, da smo dobili bakteriofagni titer 2×10^{11} pfu/100 µL v pufru PBS. Mikrotitrsko ploščico smo pustili na stresalniku 1 uro pri sobni temperaturi.

6. korak: Po 1 uri smo ponovno zavrgli vsebino ploščice (kot v 3. koraku), nato pa odstranili nevezane bakteriofage s spiranjem s PBST (po desetkrat), z različnimi deleži površinsko aktivne snovi – v 1. ciklu z 0,1 % PBST, v 2. in 3. ciklu pa z 0,5 % PBST.

7. korak: Dodali smo 100 µL elucijskega pufra. Ploščico smo stresali 10 minut pri sobni temperaturi, eluirane bakteriofage prenesli v mikrocentrifugirko in suspenzijo nato takoj nevtralizirali z 20 µL nevtralizacijskega pufra.

8. korak: Nepomnoženemu eluatu (NE) smo določili bakteriofagni titer po postopku mikrobiološke titracije – opisano v podpoglavju Mikrobiološka titracija (3.2.2.3), za kar smo porabili 2 μ L eluata.
9. korak: Ves preostanek NE smo prenesli v 20 mL kulture za pomnoževanje bakteriofagov M13 in stresali 4,5 ure pri 37 °C.
10. korak: Pomnožene bakteriofage (PE) smo dvakrat centrifugirali po 10 minut pri 4 °C in 10.000 vrt./min, s čimer smo odstranili bakterijske celice. Po vsakem centrifugiranju smo supernatant prelili v sterilno centrifugirko.
11. korak: Supernatantu (bakteriofagom v gojišču LB) smo dodali 1/6 celotnega volumna PEG/NaCl in tako bakteriofage čez noč obarjali v hladilniku pri 4 °C.

3. dan

12. korak: Pripravili smo 5 mL bakterijske kulture za titracijo.
13. korak: Oborjene bakteriofage smo centrifugirali 15 minut, pri 4 °C in 10.000 vrt./min. Odstranili smo ves supernatant.
14. korak: Sediment smo ponovno suspendirali v 1 mL pufra PBS ter suspenzijo prenesli v mikrocentrifugirke in centrifugirali 5 minut pri 4 °C in 13200 vrt./min. Pri tem smo odstranili morebitne ostanke bakterijskih celic.
15. korak: Supernatant smo prenesli v novo mikrocentrifugirko in dodali 1/6 volumna PEG/NaCl (približno 170 μ L) ter inkubirali 1 uro na ledu. S tem smo ponovno oborili bakteriofage.
16. korak: Suspenzijo oborjenih bakteriofagov smo centrifugirali 10 minut, pri 4 °C in 13200 vrt./min. Nato smo odstranili ves supernatant.
17. korak: Sediment prečiščenih bakteriofagov smo suspendirali v 200 μ L pufra PBS, ponovno centrifugirali 5 minut pri 4 °C in 13200 vrt./min., s čimer smo odstranili morebitne nečistote. Suspenzijo smo prenesli v novo mikrocentrifugirko.
18. korak: 2 μ L prečiščenega PE smo porabili za mikrobiološko titracijo. Preostanek smo shranili v hladilniku pri 4 °C.

Drugi dan zadnjega (tretjega) selekcijskega cikla smo izvededli le titracijo, pomnoževanja pa ne. Tretji dan zadnjega selekcijskega cikla smo pomnožili

posamezne bakteriofagne klone (3.2.2.5) in ovrednotili afiniteto na njih predstavljenih peptidov do tarčnih protiteles s prirejenim testom ELISA (3.2.2.4).

Preglednica III: Pregled izvedenih afinitetnih selekcij.

TARČNO PROTITELO	mAb S101		pAb ab9669		Anti-hCCL2/MCP1 pAb;AF-279-NA	
KNJIŽNJICA	PhD - 12	PhD -C7C	PhD - 12	PhD - C7C	PhD – 12	PhD - C7C
1. STOPNJA SELEKCIJE	konc. protiteles za adsorpcijo: C = 40 µg/mL					
BLOKIRANJE	5 %-mleko v PBS					
SPIRANJE (3x)	0,1% PBST					
DODATEK BAKTERIOFAGOV	2·10 ¹¹ pfu					
SPIRANJE (6x)	0,1% PBST					
ELUCIJA	1. rhMCP1 (50µg/mL), 30 min 2. glicin·HCl; pH 2,2 10 min + 20 µL nevtr. pufer	glicin, HCl; pH 2,2 10 min + 20 µL nevtr. pufer	1. rhMCP1 (50µg/mL), 30 min 2. glicin·HCl; pH 2,2 10 min + 20 µL nevtr. pufer	glicin·HCl; pH 2,2 10 min + 20 µL nevtr. pufer		
2. STOPNJA SELEKCIJE	konc. protiteles za adsorpcijo: C = 5 µg/mL					
BLOKIRANJE	5 %-mleko v PBS					
SPIRANJE (3x)	0,1% PBST					
DODATEK BAKTERIOFAGOV	2·10 ¹¹ pfu		1,15·10 ¹¹ pfu	1,52·10 ¹¹ pfu	7,35·10 ¹⁰ pfu	
KOLIČINA PE1 (µL)	20,62	7,12	83,3	10	50	50
SPIRANJE (10x)	0,5 % PBST					
ELUCIJA	glicin·HCl; pH 2,2 10 min + 20 µL nevtr. Pufer					
3. STOPNJA SELEKCIJE	konc. protiteles za adsorpcijo: C = 1 µg/mL					
BLOKIRANJE	5 %-mleko v PBS					
SPIRANJE (3x)	0,1% PBST					
DODATEK BAKTERIOFAGOV	6,3·10 ⁹ pfu	2·10 ¹¹ pfu	5,9·10 ⁹ pfu	7,95·10 ⁹ pfu	2·10 ¹¹ pfu	2·10 ¹¹ pfu
KOLIČINA PE2	1 µL	10 µL	1 µL	10 µL	14,9 µL	14,4 µL
SPIRANJE (10x)	0,5 % PBST					
ELUCIJA	glicin·HCl; pH 2,2 10 min + 20 µL nevtr. Pufer					

3.2.2.3 MIKROBIOLOŠKA TITRACIJA

Mikrobiološka titracija nam omogoča določanje koncentracije bakteriofagov v nepomnoženih in pomnoženih eluatih.

Postopek mikrobiološke titracije:

1. korak: Petrijevke z agarnim gojiščem LB smo v inkubatorju segreli na 37 °C.
2. korak: Gojišče LB z agarozo smo raztalili v mikrovalovni pečici (segreli smo ga do vretja) in ga alikvotirali po 3-4 mL za vsako redčitev bakteriofagne suspenzije. Termostatirali smo ga na 52 °C in mu nato dodali 25 µL 2 % X-gal in 3 µL 1 M IPTG.
3. korak: Eluat (suspenzijo bakteriofagov) smo primerno redčili s tekočim gojiščem LB do ustreznih redčitev.

Preglednica IV: Uporabljene redčitve pri mikrobiološki titraciji.

	REDČITVE			
NE	10 ¹	10 ²	10 ³	10 ⁴
PE	10 ⁸	10 ⁹	10 ¹⁰	

4. korak: 10 µL ustrezno redčenih bakteriofagnih suspenzij smo prenesli v mikrocentrifugirko z 200 µL bakterijske kulture *E. coli* ER2738 za titracijo. Celotno suspenzijo smo prenesli v staljeno gojišče z agarozo, premešali in vlili na termostatirane petrijevke.
5. korak: Petrijevke smo pustili na pultu, dokler se gojišče ni strdilo ter jih nato zatesnili s parafilmom. Plošče smo čez noč inkubirali pri 37 °C.
6. korak: Naslednje jutro smo prešteli število modrih plakov na posamezni plošči in izračunali titer po enačbi 1:

Enačba 1: Enačba za izračun titra posameznega eluata.

$$\text{Titer} \left(\frac{\text{pfu}}{\mu\text{L}} \right) = \frac{n \times R}{V}$$

pri čemer je:

- *n* ... število plakov na plošči,
- *R* ... faktor redčitve,
- *V* ... volumen redčitve, s katerim smo okužili bakterije (10 µL).

Iz rezultata, dobljenega iz enačbe 1, smo nato izračunali tudi odstotek elucije, in sicer kot količnik med izračunanim številom eluiranih bakteriofagov in številom vseh bakteriofagov, vnesenih v posamezno stopnjo, množen s 100.

3.2.2.4 VREDNOTENJE AFINITETE BAKTERIOFAGOV DO TARČNIH PROTITELES S TESTOM ELISA

S testom ELISA smo preverjali afiniteto bakteriofagov do tarče. Po končani selekciji smo afiniteto najprej preverili s poliklonsko ELISO, in sicer afiniteto pomnoženih eluatov prve in druge stopnje selekcije. Nato smo glede na pozitivne rezultate izvedli še s monoklonsko ELISO, kjer smo preverjali afiniteto naključno izbranih posameznih klonov iz 2. dne 3. selekcijskega cikla.

Kot zadnjo pa smo izvedli še kompetitivno ELISO, kjer smo preverjali vezavo bakteriofagov na protitelesa ob prisotnosti nativnega antigena MCP-1.

POSTOPEK DELA:

1. Na površino vdolbinic mikrotitrne ploščice MaxiSorp smo vezali tarčo – protitelo s koncentracijo 5 µg/mL v PBS – in nato inkubirali 1 uro pri 37 °C.
2. Vdolinice smo blokirali s po 250 µl 5 %-blokirnega pufra.
3. Nato smo dvakrat spirali ploščice s po 300 µL 0,075 % PBST.
4. Dodali smo suspenzijo bakteriofagov z 1 %-mlekom v 0,075 % PBST in nato inkubirali na stresalniku 90 minut pri sobni temperaturi.
5. Trikrat smo spirali s po 300 µL 0,075 % PBST.
6. Nato smo v vsako vdolbinico dodali 200 µL konjugata anti-M13-HRP, redčenega z 1 %-mlekom v 0,075 % PBST v razmerju 1:5000 in inkubirali na stresalniku 1 uro pri sobni temperaturi.
7. Po eni uri smo mikrotitrsko ploščico štirikrat sprali z 0,075 % PBST.
8. V vsako vdolbinico smo nato dodali 100 µL substrata TMB in 100 µL pufra. Po približno 10 minutah smo reakcijo ustavili z dodatkom 50 µL 2 M H₂SO₄. Na mestu vezave sekundarnega protitelesa je ob dodatku substrata prišlo do modrega obarvanja, po dodatku kisline pa do rumenega.
9. Na koncu smo pomerili absorbanco pri 450 nm.
10. Glede na rezultate je sledilo nadaljevanje postopka:

- a. Pri poliklonski ELISI: v naslednjem koraku smo izvedli monoklonsko ELISO.
- b. Pri monoklonski ELISI: v naslednjem koraku smo izvedli postopke opisane v podpoglavjih 3.2.2.5 in 3.2.2.6.

Preglednica V: Pregled izvedenih prirejenih encimsko-imunskih testov (ELISA).

TARČA	mAb S101		pAb ab9669		pAb;AF-279-NA				
KNJIŽNJICA	PhD-12	PhD-C7C	PhD-12	PhD-C7C	PhD-12	PhD-C7C			
POLIKLONSKA ELISA	5 µg/mL ustreznega protitelesa (oz. brez pri negativni kontroli)								
BLOKIRANJE	5 %-mleko v PBS								
SPIRANJE (2x)	0,075 % PBST								
BAKTERIOFAGI PE1 in PE2	5 · 10 ¹⁰	5 · 10 ¹⁰ pfu		5 · 10 ¹⁰	5 · 10 ¹⁰ pfu				
	5 · 10 ⁹			5 · 10 ⁹					
	5 · 10 ⁸	1,6 µL PE1	2,2 µL PE2	5 · 10 ⁸	36 µL PE1	7,9 µL PE2	37,4 µL PE1	4,1 µL PE2	18 µL PE1
	5 · 10 ⁷			5 · 10 ⁷					
	5 · 10 ⁷ pfu			5 · 10 ⁷ pfu					
	ad 200 µL 1 %-mleko v 0,075 % PBST								
SPIRANJE (3x)	0,075 % PBST								
DODATEK KONJUGATA	konjugat anti-M13-HRP, redčen v 1 %-mleko v 0,075 % PBST v razmerju 1:5000								
SPIRANJE (4x)	0,075 % PBST								
SUBSTRAT	100 µL substrata TMB in 100 µL pufru za kromogen substrat tetrametilbenzidin (TMB)								
USTAVITEV REAKCIJE	50 µL 2 M H ₂ SO ₄								
MONOKLONSKA ELISA	5 µg/mL ustreznega protitelesa (oz. brez pri negativni kontroli)								
BLOKIRANJE	5 %-mleko v PBS								
SPIRANJE (2x)	0,075 % PBST								
BAKTERIOFAGI (µL) +1% mlekom v 0,075% PBST (µL)	20 naključno izbranih klonov iz supernatanta gojišča (100 + 100)								
SPIRANJE (3x)	0,075 % PBST								
DODATEK KONJUGATA	konjugat anti-M13-HRP, redčen v 1 %-mleko v 0,075% PBST v razmerju 1:5000								
SPIRANJE (4x)	0,075 % PBST								
SUBSTRAT	100 µL substrata TMB in 100 µL pufru za kromogen substrat tetrametilbenzidin (TMB)								
USTAVITEV REAKCIJE	50 µL 2 M H ₂ SO ₄								
KOMPETITIVNA ELISA	2 µg/mL								

BLOKIRANJE	5 %-mleko v PBS			
SPIRANJE (2x)	0,075 % PBST			
BAKTERIOFAGI + MCP1	PRILOGA 1	Nismo izvedli	PRILOGA 1	PRILOGA 2
SPIRANJE (3x)	0,075 % PBST			
DODATEK KONJUGATA	konjugat anti-M13-HRP, redčen v 0,5 %-mleko v 0,075 % PBST v razmerju 1:5000			
SPIRANJE (4x)	0,075 % PBST			
SUBSTRAT	100 µL substrata TMB in 100 µL pufru za kromogen substrat tetrametilbenzidin (TMB)			
USTAVITEV REAKCIJE	50 µL 2 M H ₂ SO ₄			

Koncentracijo (titer) bakteriofagov pri kompetitivni ELISI smo ocenili spektrofotometrično s pomočjo enačb 2 in 3.

Enačba 2: Enačba za oceno števila fagov/mL za knjižnico PhD-12.

$$\text{PhD-12: št. fagov/mL} = (A_{269} - A_{320}) \times 6 \times 10^{16} / 7265$$

Enačba 3: Enačba za oceno števila fagov/mL za knjižnico PhD-C7C.

$$\text{PhD - C7C: št. fagov/mL} = (A_{269} - A_{320}) \times 6 \times 10^{16} / 7259$$

3.2.2.5 POMNOŽEVANJE NAKLJUČNO IZBRANIH KLONOV

1. Dan pred pomnoževanjem smo nastavili prekonočno kulturo *E. coli* ER2738.
2. Prekonočno kulturo smo redčili z LB/tet v razmerju 1:100.
3. Tako pripravljeno redčeno kulturo smo alikvotirali po 2 mL v 10 ml-centrifugirke in v vsako s sterilnimi pipetnimi nastavki prenesli naključno izbrane modre plake iz 2. dne 3. selekcijskega cikla. Okužene bakterijske kulture smo inkubirali med stresanjem pri 37 °C 4,5 ure.
4. Po inkubaciji smo vsebino centrifugirk prenesli v 2 mL-mikrocentrifugirke, dvakrat centrifugirali pri 13200 vrt./min 5 minut (po prvem centrifugiranju smo vsebino prenesli v sterilne mikrocentrifugirke) in nato prenesli suspenzije pomnoženih bakteriofagnih klonov v nove mikrocentrifugirke. Do uporabe smo vzorce hranili v hladilniku.

3.2.2.6 IZOLACIJA, ČIŠČENJE IN DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA BAKTERIOFAGNE DNA IZBRANIH KLONOV

1. Iz vzorcev pomnoženih bakteriofagnih klonov smo odpipetirali po 500 µL suspenzije.
2. Dodali smo po 200 µL PEG/NaCl, premešali in inkubirali preko noči v hladilniku pri 4 °C.
3. Po inkubaciji smo centrifugirali 10 min pri 4 °C s 13200 vrt./min in odstranili ves supernatant.
4. Oborino smo nato suspendirali v 100 µL Tris-pufra z jodidnimi ioni ter premešali. Jodidni ioni razbijejo fagno kapsido in s tem omogočijo prehod bakteriofagne DNA v raztopino.
5. Nato smo dodali 250 µL absolutnega EtOH. Ponovno smo premešali in pustili 30 min pri 4 °C, pri čemer je prišlo do precipitacije zlasti enoverižne bakteriofagne DNA, bakteriofagni proteini pa so ostali raztopljeni v raztopini.
6. Nato smo centrifugirali 10 min, pri 4 °C, odstranili ves supernatant.
7. Oborino smo sprali s 400 µL 70 % EtOH. Ponovno smo centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 13200 vrt./min.
8. Odstranili smo ves supernatant in fagno DNA posušili pri 37 °C.

9. Fagno DNA smo raztopili v 20 μL vode brez nukleaz in 5 μL te raztopine odpipetirali v 1,5 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.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

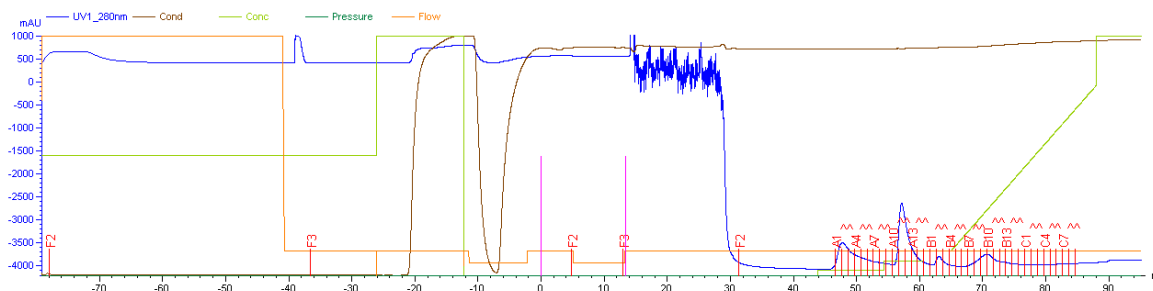
4.1 IZRAŽANJE PROTEINA MCP-1

Protein MCP-1 smo izrazili v ekspresijskem sistemu *E. coli* BL21 DE3 pLysS/pET44-MCP1b. Izražanje rekombinantnega proteina smo sprožili z dodatkom 1 mM IPTG. Tri ure po indukciji smo celice poželi s centrifugiranjem in jih suspendirali v pufru 1. Lizirali smo jih z ultrazvokom in celično DNA razgradili z dodatkom DNaze. Lizatu smo nato dodali še pufer 3, ki vsebuje denaturant (gvanidinijev klorid, končna koncentracija 4 M) in s tem solubilizirali rekombinantni protein, ki se je nabiral v inkluzijskih telescih. Vzorec smo nato centrifugirali in supernatant shranili v hladilniku, pri 4°C. Pred izolacijo in čiščenjem proteina smo supernatantu dodali še NaCl (do končne koncentracije 500 mM).

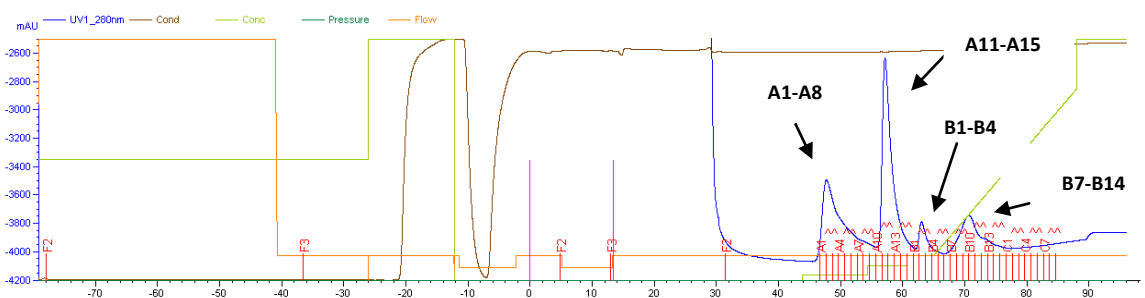
4.2 IZOLACIJA IN ČIŠČENJE MCP-1

4.2.1 KOVINSKO-KELATNA AFINITETNA KROMATOGRAFIJA

IMAC je široko uporabljena metoda separacije in čiščenja proteinov in peptidov. Metoda temelji na specifičnih interakcijah med imobiliziranimi dvovalentnimi kovinskimi ioni in določeno aminokislinsko stransko verigo, izraženo na površini proteinov. Največkrat je ta aminokislina histidin, lahko pa sta tudi cistein in triptofan. Moč interakcije med aminokislino in kovinskim ionom (Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+}), je odvisna od vrste, števila in prostorske razporeditve stranske aminokislinske verige ter od narave uporabljenega kovinskega iona. K sami interakciji pa prispevajo tudi splošni kromatografski pogoji – pH ter vrsta in koncentracija soli in dodatkov. Prisotnost heksahistidinskega »repka« na rekombinantnem proteinu poveča njegovo afiniteto do imobiliziranih kovinskih ionov in omogoči močnejšo vezavo glede na ostale proteine prisotne v vzorcu (37), tudi v prisotnosti denaturantov, kakršna sta 8 M urea ali 6 M gvanidinijev klorid.



Slika 7: Kromatogram kovinsko – kelatne afinitetne kromatografije. Začetni del kromatograma se nanaša na spiranje kromatografskega sistema in kolone s puframa 5 ($t = -26$ min do -12 min) in 4 ($t = -12$ min do 0 min) pred nanosom vzorca ($t = 0$ min do 26 min).



Slika 8: Povečava kromatograma v predelu, kjer pričakujemo elucijo proteinov. S puščicami so označeni vrhovi s pripadajočimi eluiranimi frakcijami, ki smo jih analizirali v nadaljevanju.

Preglednica VI: Pregled rezultatov kovinsko–kelatneafinitetne kromatografije.

% pufru 5 v pufru 4 (konc. imidazola)	časovni interval (min)	vrh (eluirane frakcije)	višina vrha (mAU)
2 % (~20mM)	44 – 54	A1 – A8	575
6 % (~40mM)	54 – 61	A11 – A15	1375
10 % (~60mM)	61 – 65	B1 – B4	200
10 % - 80 % (~60 mM- ~400 mM)	65 – 89	B7 – B14	225

Pri kovinsko–kelatni afinitetni kromatografiji smo izkoristili afiniteto proteinov do kovinskih ionov. Različni proteini se na kovinske ione vežejo z različnimi afinitetami in se eluirajo pri različnih koncentracijah imidazola.

4.2.2 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA V PRISOTNOSTI NATRIJEVEGA DODECILSULFATA (SDS-PAGE)

S pomočjo kromatograma smo izbrali frakcije, ki ustrezajo vrhom (preglednica VI) in proteine med seboj ločili s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (SDS-PAGE). Elektroforezna metoda nam omogoča ločbo molekul na osnovi njihove velikosti oz. relativne molekulske mase. SDS je anionski detergent, ki se

nespecifično veže na proteine in jih pri tem denaturira. Razmerje med nabojem kompleksa SDS/protein in dolžino polipeptidne verige postane identično za vse komponente zmesi, zato je enaka tudi njihova elektroforezna mobilnost. Ločba se tako vrši izključno na podlagi zamreženosti separacijskega gela.

4.2.3 PRENOS WESTERN

Po elektroforezni ločbi proteinov iz vzorcev smo proteine prenesli iz poliakrilamidnega gela na nitrocelulozno membrano s pomočjo električnega toka. Proteine na membrani smo detektirali s poliklonskimi protitelesi proti MCP-1 (kunjce anti-hMCP-1 pAb 9669). Poliklonska protitelesa so usmerjena proti več antigenim determinantom, med katerimi so nekatere tudi linearne in tako ohranjene tudi v denaturiranem proteinu.

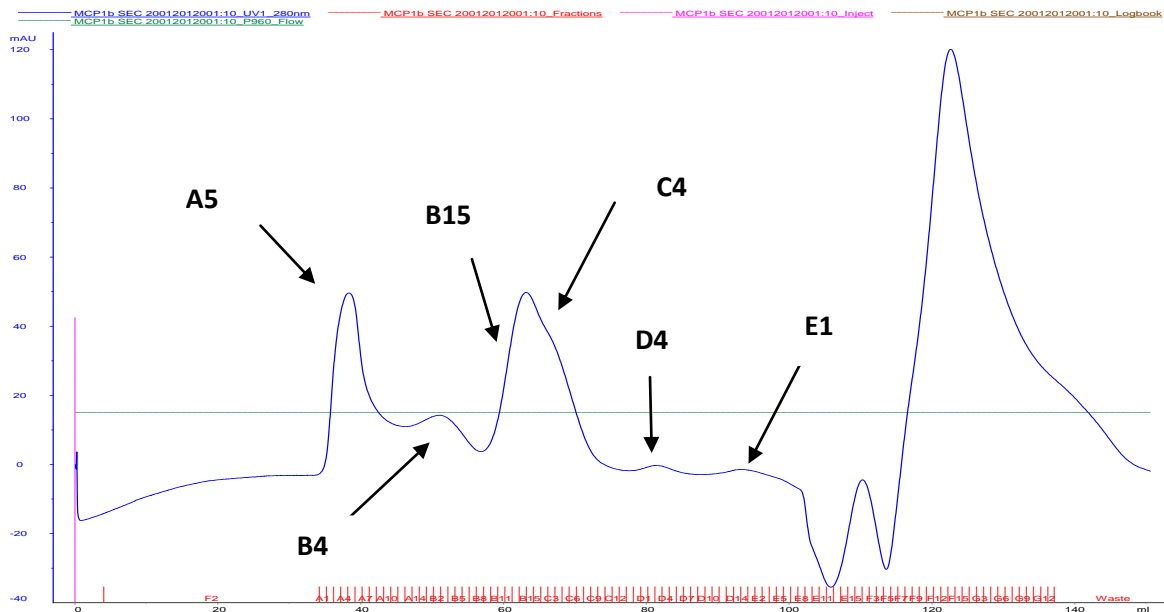


Slika 9: Slika membrane po prenosu western. M – proteinski standard (označevalec velikosti), Ax in Bx – eluirane frakcije po kovinsko-kelatni afinitetni kromatografiji (slika 8), FT – frakcija injiciranega vzorca, ki se ni vezala na kromatografsko kolono.

Glede na najbolj izrazite signale smo združili frakcije od B7 do B15, ki pripadajo zadnjemu eluiranemu vrhu, ter jih koncentrirali z ultrafiltracijo (z Amicon NMWL 3kDa).

4.2.4 IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA – SEC

Z gelsko izključitveno kromatografijo smo proteine iz združenih koncentriranih frakcij B7 do B15 po kovinsko-kelatni afinitetni kromatografiji ločili glede na velikost z izključitveno kromatografijo pod denuracijskimi pogoji (tj. v prisotnosti 4 M gvanidinijevega klorida).

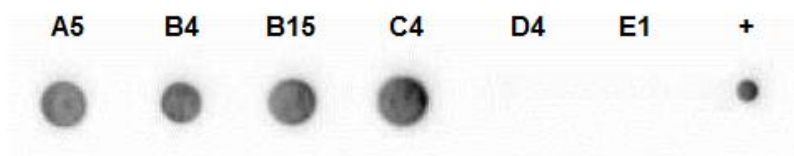


Slika 10: Kromatogram izključitvene kromatografije. S puščicami so označeni vrhovi s pripadajočimi eluiranimi frakcijami, ki smo jih analizirali v nadaljevanju.

4.2.5 TOČKOVNI NANOS

Z metodo točkovnega nanosa smo preverili prisotnost MCP-1 v frakcijah, ki ustrezajo vrhovom na kromatogramu (slika 10 ; A5, B4, B15, C4, D4 in E1).

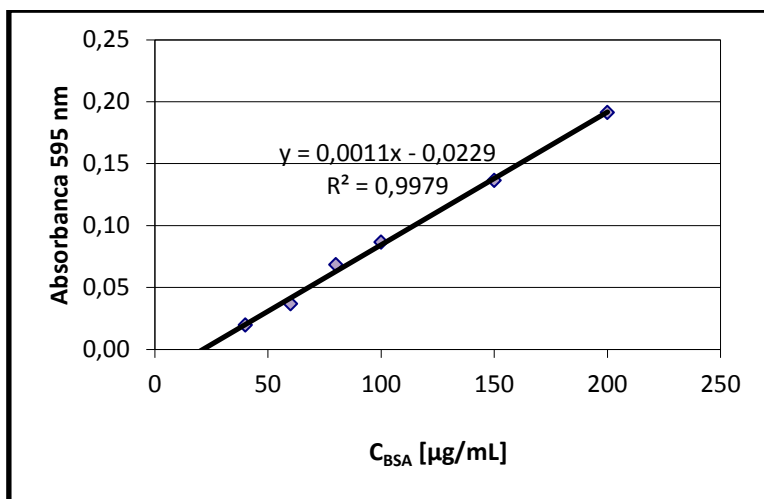
Točkovni nanos je metoda podobna prenosu western, le da smo vzorce nanесли s pipeto neposredno na membrano brez predhodne elektroforezne ločbe. Nanosu vzorcev in pozitivne kontrole je prav tako sledila detekcija s poliklonskimi protitelesi proti MCP-1.



Slika 11: Slika membrane po točkovnem nanosu. A5, B4, B15, C4, D4 in E1 –eluirane frakcije po izključitveni kromatografiji, + - pozitivna kontrola (neposreden nanos primarnih protiteles).

4.2.6 DOLOČITEV KONCENTRACIJE MCP-1 PO BRADFORDU

Združili smo eluate od B10 – C7 (slika 10), ki pripadajo zadnjemu eluiranemu vrhu, ki še vsebuje MCP-1 (torej v monomerni obliki). Z analizo po Bradfordu smo ocenili koncentracijo MCP-1 v vzorcu na ~80 µg/mL.



Slika 12: Umeritvena premica za določitev koncentracije MCP-1 z metodo po Bradfordu, konstruirana s proteinskim standardom (BSA).

Preglednica VII: Določitev koncentracije MCP-1 z metodo po Bradfordu.

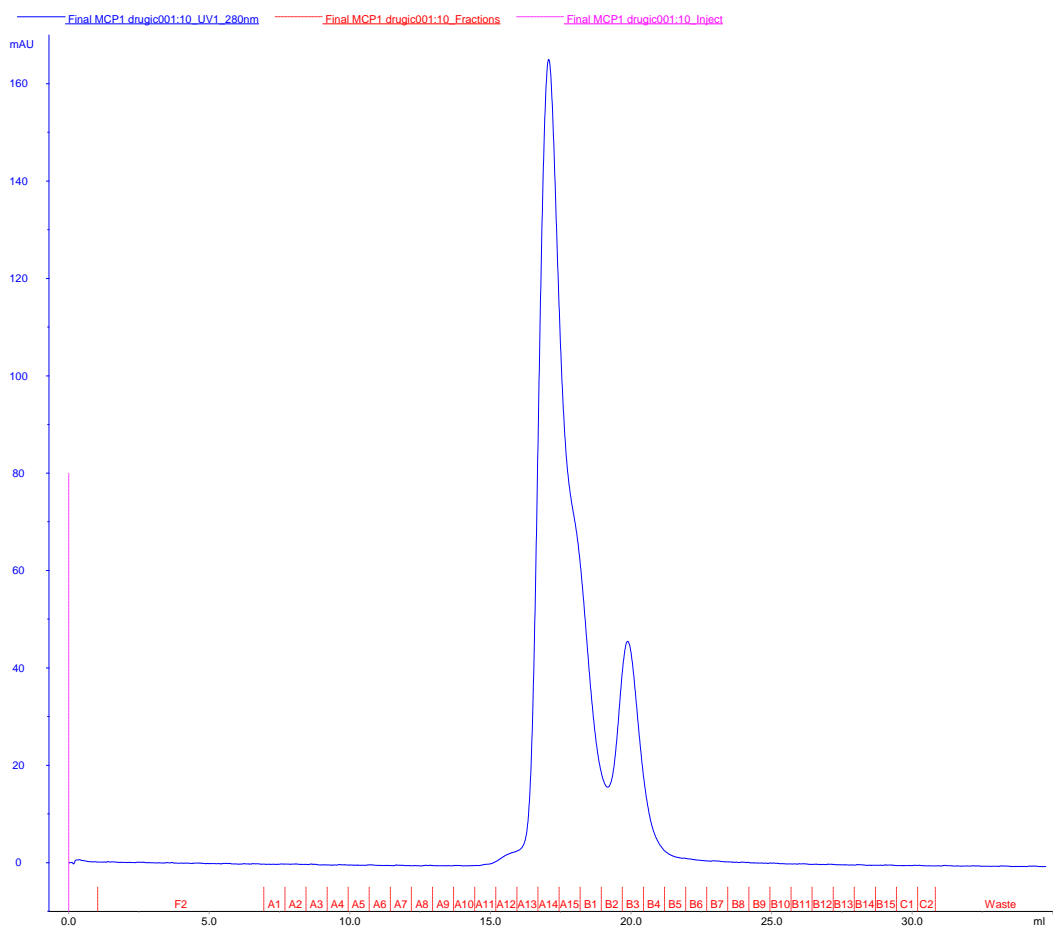
MCP-1				
redčitev	$A_{595 \text{ nm}}$	odšteta slepa	C_{MCP-1} [$\mu\text{g/mL}$]	C_{MCP-1} upoštevane redčitve [$\mu\text{g/mL}$]
1x	0,3630	0,0701	86,65	87
2x	0,3119	0,0190	39,03	78
		ocenjena konc. MCP-1 (povprečje)		82

4.2.7 DIALIZA

Združene eluate smo v več stopnjah dializirali proti pufrum s padajočo koncentracijo denaturanta (gvanidinijevega klorida) in tako dosegli, da se je denaturiran protein zvil v nativno konformacijo. V začetnih stopnjah smo v dializni pufer vključili arginin, ki zavira agregacijo proteinov, ter oksidirano in reducirano obliko glutationa, kar je omogočilo vzpostavitev ustreznih disulfidnih vezi v rekombinantnem proteinu. Osnova dialize je prehajanje delcev skozi polprepustno membrano. Proteini so večji od por membrane, zato jih membrana ne prepušča, manjše molekule pa se redčijo iz dializnega črevesa v dializni pufer. Po končani dializi smo rekombinantni protein približno 15x koncentrirali z ultrafiltracijo (uporabili smo centrifugirko Amicon NMWL 3 kDa) in ponovno izvedli izključitveno kromatografijo.

4.2.8 IZKLJUČITVENA KROMATOGRAFIJA – po dializi

Tokrat smo izključitveno kromatografijo izvedli pod nativnimi pogoji, brez prisotnosti denaturanta gvanidinijevega klorida (kot kromatografski pufer smo uporabili dializni pufer 3).



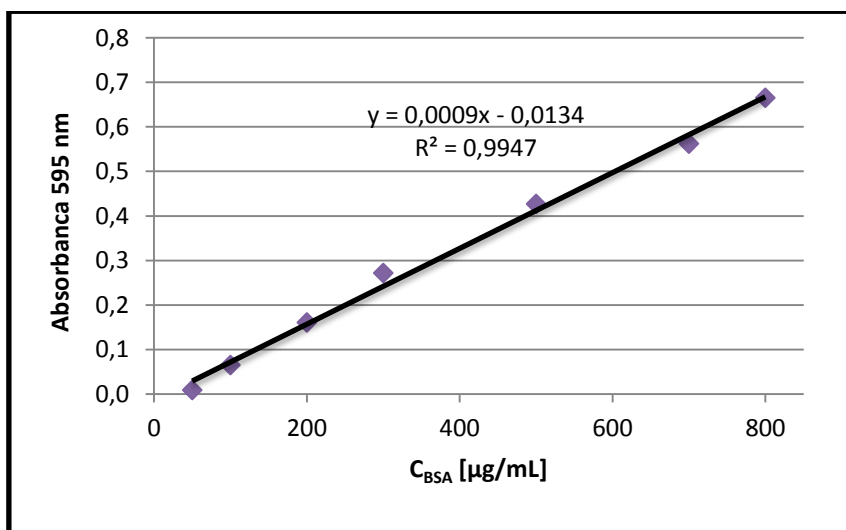
Slika 13: Kromatogram drugič izvedene gelske izključitvene kromatografije.

Glede na specifikacije kolone se v prvem vrhu eluirajo proteini, ki po velikosti ustrezajo dimeru MCP-1 (kar je nativna oblika proteina), v drugem pa proteini, ki so po masi primerljivi z monomerom MCP-1.

4.2.9 DOLOČITEV KONCENTRACIJE MCP-1 PO IZKLJUČITVENI KROMATOGRAFIJI

Združili smo eluate A13 do B1 (slika 13) in jih koncentrirali z ultrafiltracijo do 400 μ L. Z analizo po Bradfordu smo ocenili koncentracijo očiščenega in koncentriranega proteina na

~560 µg/mL. Skupni izplen izolacije proteina MCP-1 je bil tako približno 220 µg (tj. približno 440 µg na liter bakterijske kulture).



Slika 14: Umeritvena premica za določitev koncentracije MCP-1 z metodo po Bradfordu, konstruirana s proteinskim standardom (BSA).

Preglednica VIII: Določitev koncentracije MCP-1 z metodo po Bradfordu.

redčitev MCP-1	$A_{595\text{ nm}}$			povprečje	odštetna slepa	C_{MCP-1} [µg/mL]	C_{MCP-1} – upoštevane redčitve [µg/mL]
1x	0,7337	0,7476	0,7244	0,7352	0,4051	492	492
2x	0,5751	0,5875	0,6119	0,5915	0,2613	323	646
4x	0,4484	0,4631	0,4533	0,4549	0,1248	162	650
10x	0,3604	0,3567	0,3513	0,3561	0,0260	46	463
						povprečje	562

4.3 KARTIRANJE EPITOPOV NEVTRALIZACIJSKIH PROTITELES PROTI MCP-1

4.3.1 VREDNOTENJE AFINITETNE SELEKCIJE

Za kartiranje epitopov nevtralizacijskih protiteles proti MCP-1 smo uporabili metodo predstavitve na bakteriofagu. Kot tarče pri tem postopku smo uporabili eno monoklonsko in dve poliklonski protitelesi, ki sta bili prečiščeni z afinitetno kromatografijo z MCP-1 kot ligandom. To je za afinitetno selekcijo bistvenega pomena, saj bi v primeru prisotnosti z MCP-1 nepovezanih protiteles utegnili izselektionirati tudi peptide, ki ne posnemajo epitopov MCP-1, kar bi popačilo naše rezultate. Za vsako protitelo smo uporabili knjižnici

Ph.D.- 12 in Ph.D.- C7C. Uspešnost selekcije smo spremljali z računanjem deležev eluiranih fagov glede na vnesene v afinitetno selekcijo. Pregled poteka afinitetnih selekcij je podan v preglednici IX.

Preglednica IX: Pregled uporabljenih tarč, deležev eluiranih fagov in titrov pomnoženih eluatov v posamezni stopnji afinitetne selekcije. Obrazložitev: **Ni podatka** – zaradi napake pri titraciji nismo dobili rezultata; **ni podatka** – število plakov je bilo previsoko, da bi jih lahko prešteli.

TARČA	mAb S101		pAb ab9669		pAb AF-279-NA	
KNJIŽNJICA	PhD - 12	PhD – C7C	PhD – 12	PhD – C7C	PhD - 12	PhD – C7C
1. STOPNJA SELEKCIJE	C = 40 µg/mL					
Delež eluiranih fagov (%)	Ni podatka	$6,09 \cdot 10^{-8}$	Ni podatka	$10,2 \cdot 10^{-5}$	$2,74 \cdot 10^{-5}$	$1,93 \cdot 10^{-5}$
Titer PE1	$9,7 \cdot 10^9$ pfu/µL	$2,81 \cdot 10^{10}$ pfu/µL	$2,4 \cdot 10^9$ pfu/µL	$4,4 \cdot 10^9$ pfu/µL	$1,47 \cdot 10^9$ pfu/µL	$3,05 \cdot 10^9$ pfu/µL
2. STOPNJA SELEKCIJE	C = 5 µg/mL					
Delež eluiranih fagov (%)	$1,44 \cdot 10^{-2}$	$2,96 \cdot 10^{-5}$	Ni podatka	$3,24 \cdot 10^{-3}$	$7,2 \cdot 10^{-2}$	$4,18 \cdot 10^{-2}$
Titer PE2	$6,3 \cdot 10^9$ pfu/µL	$1,97 \cdot 10^{10}$ pfu/µL	$5,9 \cdot 10^9$ pfu/µL	$7,95 \cdot 10^9$ pf u/µL	$1,34 \cdot 10^{10}$ pfu/µL	$1,39 \cdot 10^{10}$ pfu/µL
3. STOPNJA SELEKCIJE	C = 1 µg/mL					
Delež eluiranih fagov (%)	$6,36 \cdot 10^{-5}$	$2,12 \cdot 10^{-3}$	$7,16 \cdot 10^{-5}$	$10,2 \cdot 10^{-5}$	$3,78 \cdot 10^{-3}$	$6,89 \cdot 10^{-3}$

Deleži eluiranih fagov so se skoraj v vseh primerih v 3. ciklu selekcije znižali, kar je verjetno posledica nižjih površinskih gostot tarčnega proteina in intenzivnejšega spiranja.

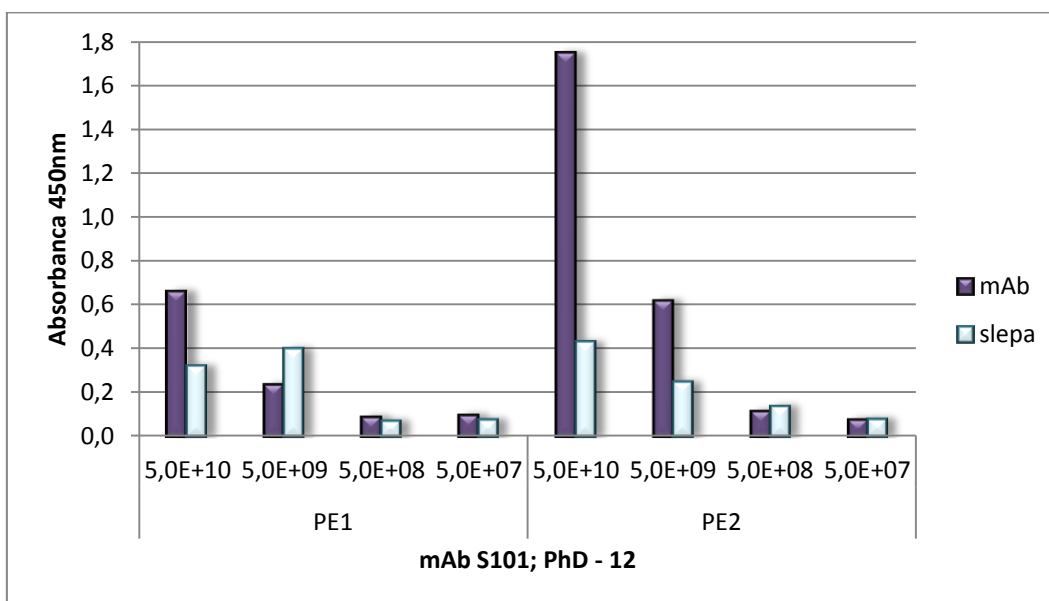
4.3.2 Poliklonska ELISA

Po afinitetni selekciji smo s prirejenim testom ELISA ocenili povprečno afiniteto bakteriofagov v pomnoženih eluatih posameznih selekcijskih stopenj. Na mikrotitrsko ploščico smo najprej vezali tarčno protitelo, nato smo dodali bakteriofage iz pomnoženega eluata, sprali nevezane bakteriofage, dodali sekundarno protitelo, označeno z encimom

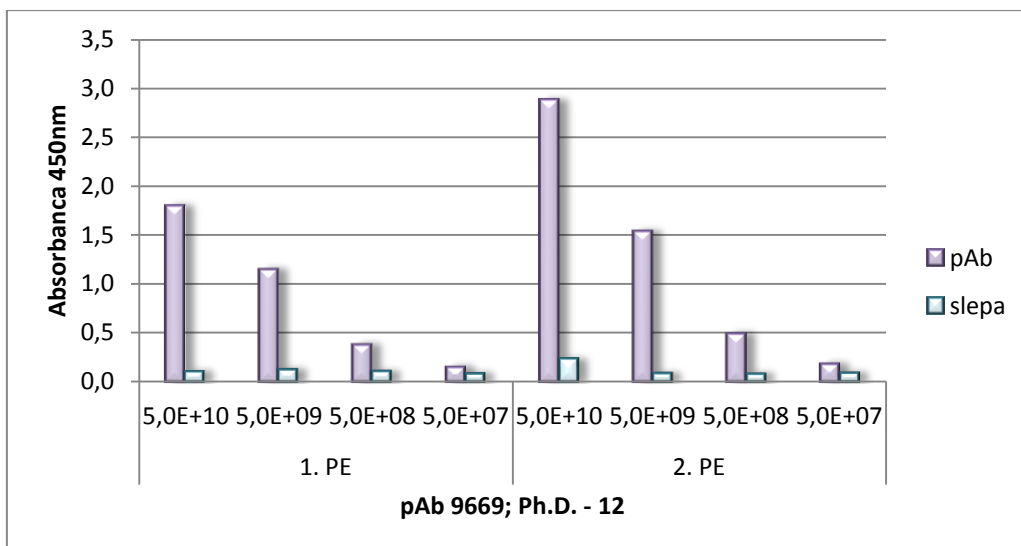
hrenova peroksidaza, sprali nevezana protitelesa ter dodali kromogeni substrat. Vzorcem smo nato izmerili absorbanco pri 450 nm.

Istočasno smo izvedli tudi slepi test. Pri tem smo bakteriofage iz pomnoženih eluatov namesto nad tarčnimi protitelesi inkubirali nad površino vdolbinice, blokirano z mlekom. Če afinitetna selekcija poteka proti tarčnemu protitelesu, absorbančni signali naraščajo z eluati od prve proti tretji selekcijski stopnji. Nasprotno visoka vrednost absorbance slepega testa nakazuje na obogatitev bakteriofagnih klonov, ki se vežejo na komponente blokirnega sredstva ali polistirenske površine mikrotitrne ploščice.

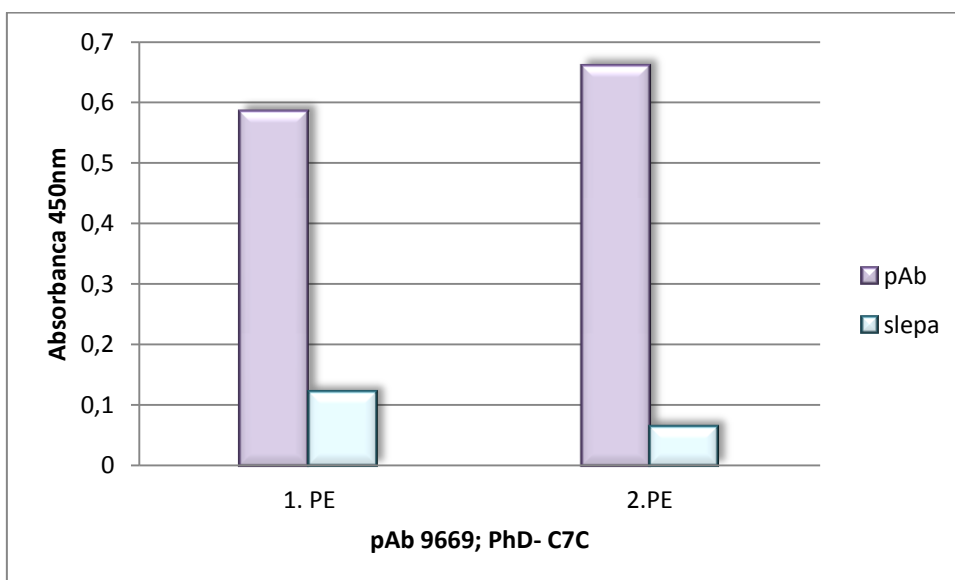
Pri afinitetnih selekcijah proti protitelesoma mAb S101 in pAb 9669 s knjižnico PhD- 12 smo test ELISA izvedli s padajočim titrom fagov. Pri vseh afinitetnih selekcijah, razen s knjižnico PhD-C7C proti monoklonskemu protitelesu S101 (serija M7, ni prikazano), smo s poliklonsko izvedbo testa ELISA dokazali uspešnost obogatitve specifičnih vezalcev. Nato smo zvedli še t.i. monoklonski test ELISA, s katerim smo identificirali posamezne bakteriofagne klone, sposobne vezave na tarčna protitelesa.



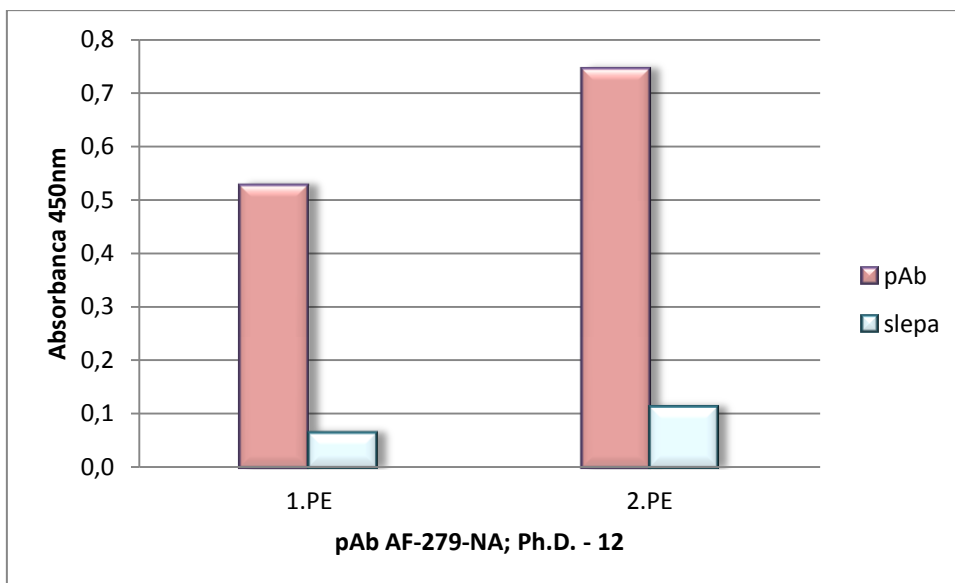
Slika 15: Rezultati poliklonske ELISE bakteriofagov iz knjižnice PhD-12 po selekciji proti mAb S101. Vsakega od pomnoženih eluatov (PE) smo testirali v štirih različnih titrih (5×10^7 – 5×10^{10} pfu).



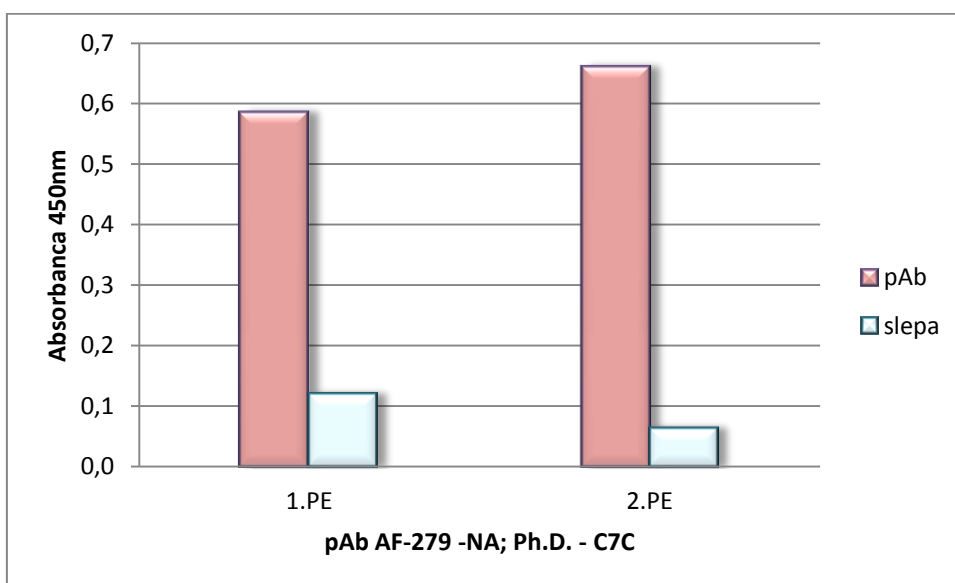
Slika 16: Rezultati poliklonske ELISE bakteriofagov iz knjižnice Ph.D-12 po selekciji proti pAb 9669. Vsakega od pomnoženih eluatov (PE) smo testirali v štirih različnih titrih (5×10^7 – 5×10^{10} pfu).



Slika 17: Rezultati poliklonske ELISE bakteriofagov iz knjižnice Ph.D-C7C po selekciji proti pAb 9669. Vsakega od pomnoženih eluatov (PE) smo testirali v titru 5×10^{10} pfu.



Slika 18: Rezultati poliklonske ELISE bakteriofagov iz knjižnice PhD-12 po selekciji proti pAb AF-279-NA. Vsakega od pomnoženih eluatov (PE) smo testirali v titru 5×10^{10} pfu.



Slika 19: Rezultati poliklonske ELISE bakteriofagov iz knjižnice Ph.D.-C7C po selekciji proti pAb AF-279-NA. Vsakega od pomnoženih eluatov (PE) smo testirali v titru 5×10^{10} pfu.

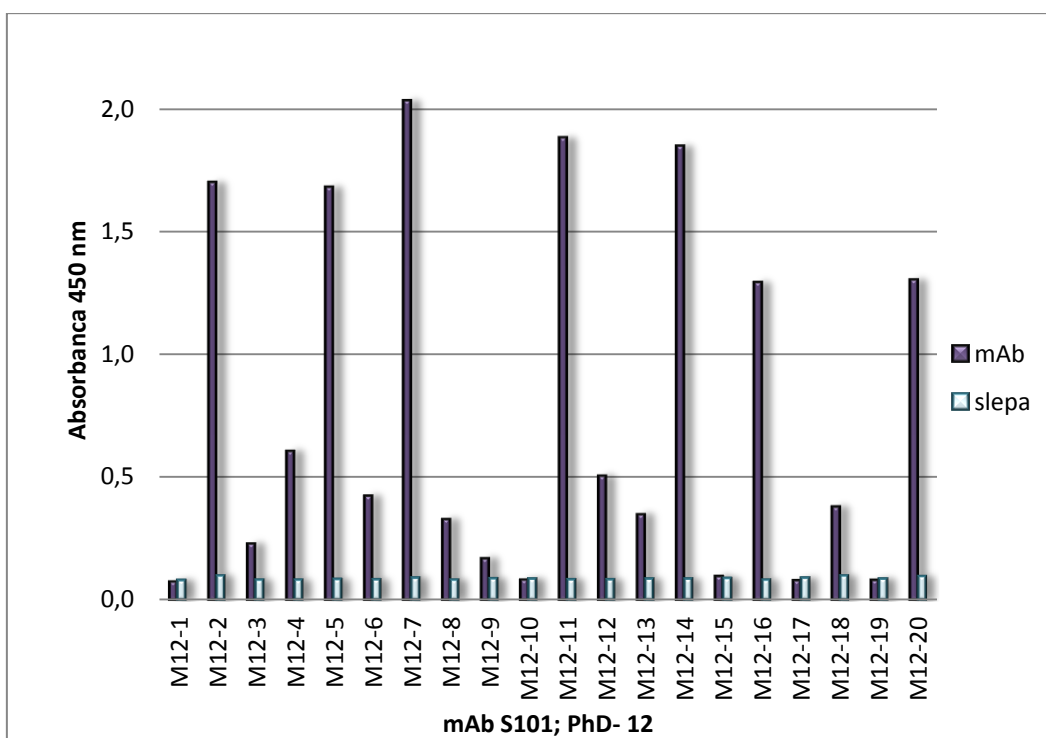
4.3.3 Monoklonska ELISA

Pri monoklonski izvedbi testa ELISA kot vzorec nismo uporabili pomnoženih eluatov bakteriofagov, temveč pomnožene posamične klone bakteriofagov iz tretje selekcijske stopnje, sicer pa se postopek ni razlikoval od tistega za poliklonski test ELISA. Titra bakteriofagom tokrat nismo določali. Zaradi verjetne razlike v titrih so neodvisno

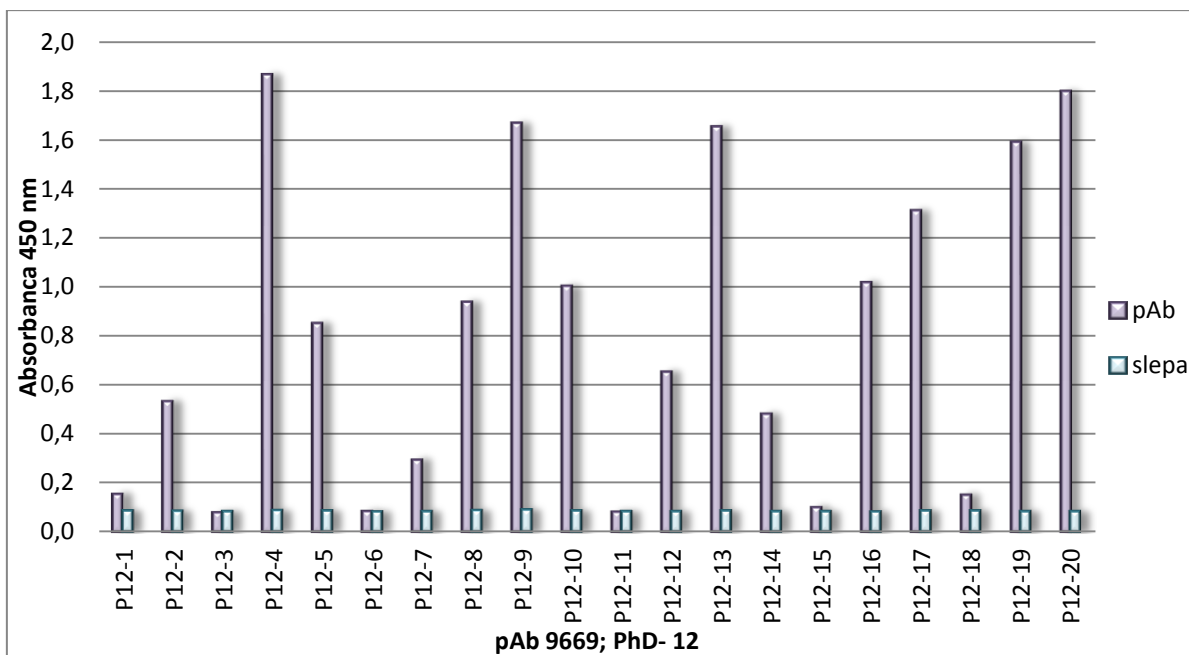
pomnoženi fagni kloni (tj. z identičnimi predstavljenimi peptidi) pri testu ELISA dali različne absorbančne signale.

Monoklonska ELISA nam omogoča oceno afinitete vezave posamičnih bakteriofagnih klonov do tarčnih protiteles. Po vsaki afinitetni selekciji smo pomnožili 20 naključno izbranih klonov. Klonom z izkazano visoko afiniteto do tarčnega protitelesa smo določili aminokislinsko zaporedje peptidov, izraženih na površini bakteriofagov.

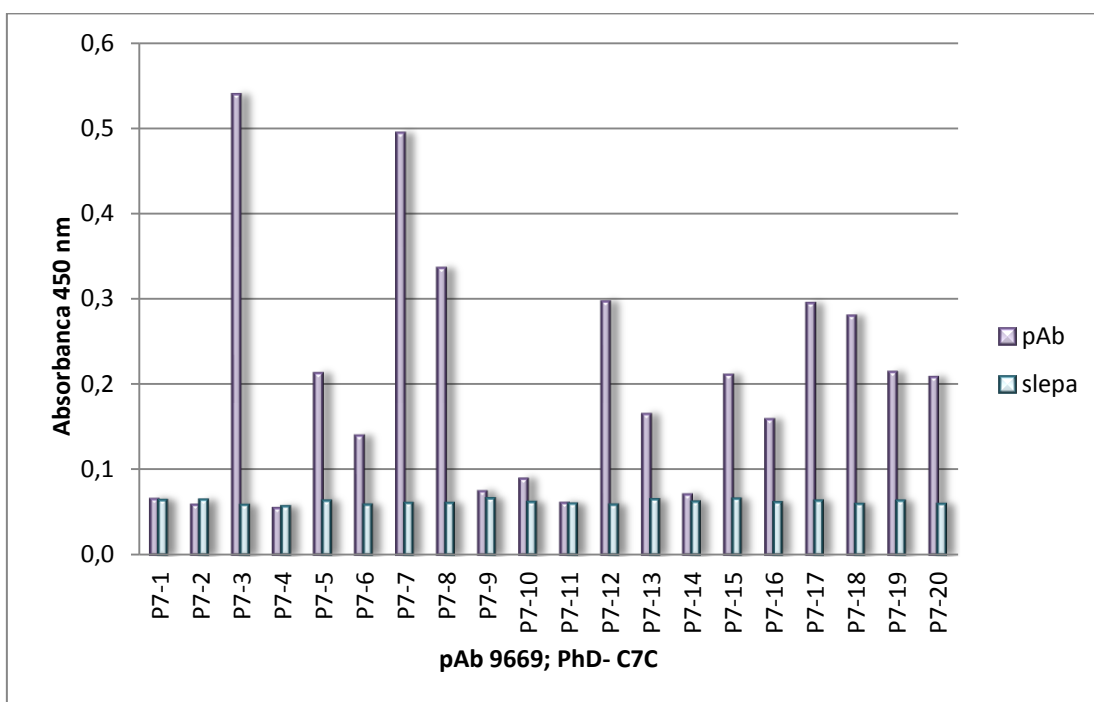
Klone smo označili s črko, ki označuje protitelo, in številko, ki označuje knjižnico. Pri tem M predstavlja monoklonsko protitelo S101, P predstavlja poliklonsko protitelo 9669, K predstavlja poliklonsko protitelo AF-279-NA, 12 predstavlja knjižnico PhD- 12 in 7 predstavlja knjižnico PhD- C7C. V primeru, ko smo želeli označiti specifičen klon, smo tej označbi dodali – x, kjer x predstavlja zaporedno številko klona (npr. M12-1 – mAb S101, knjižnjica PhD-12, prvi klon).



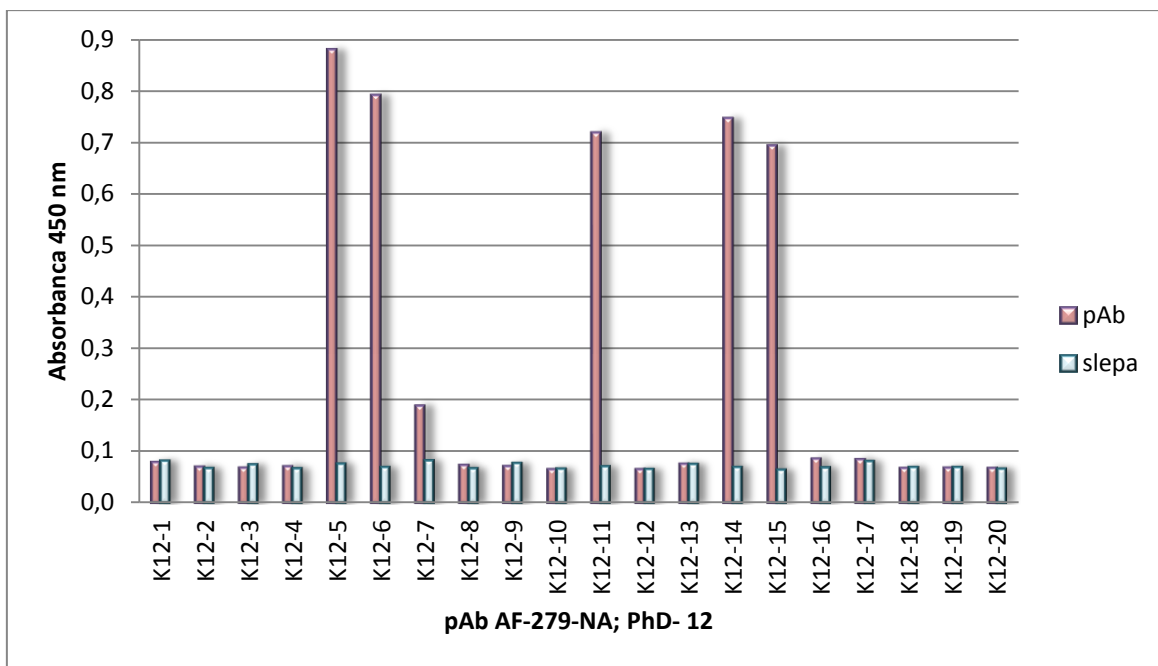
Slika 20: Rezultati monoklonske ELISE bakteriofagov iz knjižnice PhD-12 po selekciji proti mAb S101.



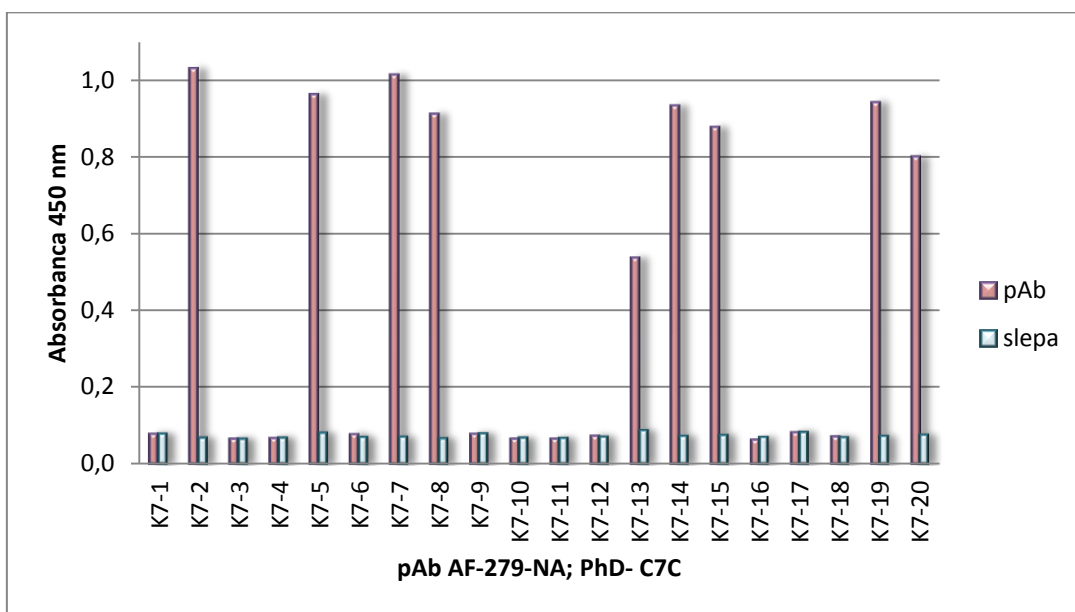
Slika 21: Rezultati monoklonske ELISE bakteriofagov iz knjižnice PhD-12 po selekciji proti pAb 9669.



Slika 22: Rezultati monoklonske ELISE bakteriofagov iz knjižnice PhD-C7C po selekciji proti pAb 9669.



Slika 23: Rezultati monoklonske ELISE bakteriofagov iz knjižnice PhD- 12 po selekciji proti pAbAF-279-NA.



Slika 24: Rezultati monoklonske ELISE bakteriofagov iz knjižnice PhD-C7C po selekciji proti pAb AF-279-NA.

Pri monoklonski izvedbi testa ELISA smo potrdili afiniteto 47 klonom, ki smo jih zbrali v preglednici X.

Preglednica X: Pregled klonov, katerim smo potrdili afiniteto do ustreznih tarčnih protiteles. Krepko označenim klonom smo določili aminokislinsko zaporedje.

M12-2, M12-4, M12-5, M12-7, M12-11, M12-12, M12-14, M12-16, M12-20
P12-2, P12-4, P12-5, P12-8, P12-9, P12-10, P12-12, P12-13, P12-14, P12-16, P12-17, P12-19, P12-20
P12-3, P12-5, P12-7, P12-8, P12-12, P12-15, P12-17, P12-18, P12-19, P12-20
K12-5, K12-6, K12-7, K12-11, K12-14, K12-15
K7-2, K7-5, K7-7, K7-8, K7-13, K7-14, K7-15, K7-19, K7-20

4.3.4 DOLOČANJE AMINOKISLINSKEGA ZAPOREDJA

Izbranim klonom (preglednica X) smo določili nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih insertov, ki kodirajo predstavljene peptide. Aminokislinska zaporedja peptidnih ligandov protiteles so zbrana v preglednici XI.

Preglednica XI: Aminokislinska zaporedja peptidov, izoliranih z afinitetno selekcijo iz bakteriofagnih peptidno predstavitev knjižnic.

ANALIZIRANI KLONI	AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE
M12-2, M12-4, M12-7, M12-11, M12-12	GQPYKYDIRVSK
P12-2	YLESWVSPDQIN
P12-4	SESVNAPWYDVK
P12-5, P12-8, P12-10, P12-12, P12-16	APDKINTPRSHH
P12-9	YNAVNAPMKLT
P12-13	SNYMSSHAVNAP
P12-14	YTTMTPKGNALW
P12-17	AEPSINAPLPSS
P12-19	QPAINAPIRNNH
P12-20	SHQSPDSINAPT
P7-3, P7-5, P7-7, P7-8, P7-12, P7-17, P7-18, P7-20	CMGPSCMNY
P7-15	CSGPSLINC
P7-19	CTGPSEINC
K12-5	ALSHDHLEKVRV
K12-6	STPQSVDHLDKF
K12-7	NHTAHHSVDSRT
K12-11	AMSNDHMKNKNG
K7-2, K7-19, K7-20	CSVQRPWAC

4.3.5 Kompetitivni test ELISA

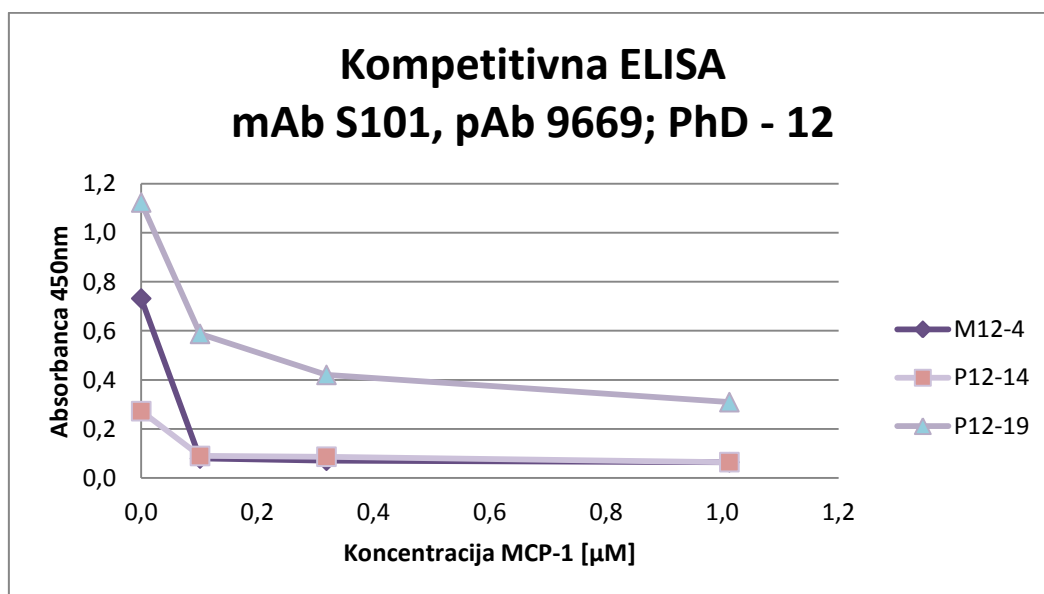
Kompetitivni test ELISA se od opisanih razlikuje v tem, da poleg bakteriofaga v isti stopnji v vdolbinico mikrotitrne ploščice z adsorbiranim tarčnim protitelesom dodamo

tudi različne koncentracije nativnega antigena. S to metodo smo preverjali sposobnost vezave bakteriofaga na protitelo ob prisotnosti rekombinantnega MCP-1.

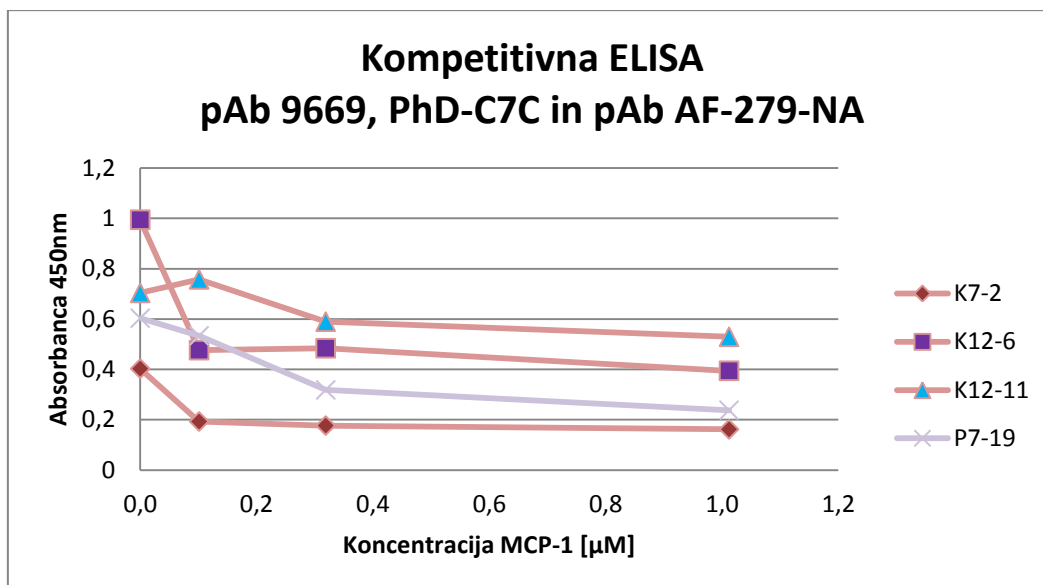
Na slikah 25 in 26 so prikazani rezultati kompetitivnega testa ELISA za posamezne bakteriofagne klone.

Kompetitivni test ELISA smo izvedli naslednje reprezentativne klone: M12-4, P12-14, P12-19, P7-19 K7-2, K12-6 in K12-11. Titer bakteriofagov je bil v vseh primerih primerljiv (približno 2×10^{10} pfu), predstavljene pa so povprečne vrednosti absorbanc treh tehničnih ponovitev. Na sliki 25 je nakazan trend padanja absorbance ob naraščanju koncentracije MCP-1. Pri klonih M12-4 in P12-14 že ob relativno nizki koncentraciji MCP-1 absorbanca močno pade, medtem ko pri P12-19 absorbanca z naraščajočo koncentracijo MCP-1 pada počasneje. Iz teh podatkov lahko sklepamo, da ima klon P12-19 višjo afiniteto vezave na tarčo, medtem ko je afiniteta vezave preostalih dveh klonov nižja.

Pri ostalih testiranih klonih (slika 26) prav tako spremljamo padec absorbance ob naraščanju koncentracije MCP-1, vendar trend padanja ni tako izrazit. Vsem klonom smo potrdili afiniteto do tarčnega protitelesa. S tem testom smo tudi dokazali, da se predstavljeni peptidi vežejo v vezavno mesto za antigen na imunoglobulinu (t.i. paratop).



Slika 25: Rezultati kompetitivnega testa ELISA s kloni M4, P14 in P19 ter ustreznim tarčnim protitelesom.



Slika 26: Rezultati kompetitivnega testa ELISA s kloni K7-2, K12-6, K12-11 in P7-19 ter ustreznim tarčnim protitelesom.

4.3.6 KARTIRANJE EPITOPOV NEVTALIZACIJSKIH PROTITELES

Sliki 27 in 28 prikazujeta poravnavo peptidov serij P in K s primarno strukturo proteina MCP-1.

QPDAINAPV	TCCYNFTNRK	ISVQR	LASYRRITSSKCPKEAVIFKTI	VAKEICADPKQKWVQDSMDHLDKQ	TQTPKT	MCP-1
					YTTMT	P12-14
YLESWVSPDQIN						P12-2
SESVNAPWYDVK						P12-4
APDKINTPRSHH						P12-5
YRNAVNAPMKLT						P12-9
SNYMSSHAVNAP						P12-13
AEPSINAPLPSS						P12-17
QP-AINAPIRNNH						P12-19
SHQSPDSINAPT						P12-20
CMGPPCMNY						P7-3
CSGPSLINC						P7-15
CTGPSEINC						P7-19

Slika 27: Poravnava peptidov iz serij P12 in P7 z aminokislinskim zaporedjem CCL2. Z vijolično in oranžno sta označena linearna epitopa, ki ju posnemajo peptidi. Z rumeno so označeni cisteinski ostanki, ki v peptidih serije P7 tvorijo intramolekularno disulfidno vez. Isto AK zaporedje, kot peptidu P12-5 smo določili tudi peptidom klonov P12-8, P12-10, P12-12 in P12-16. Prav tako smo isto AK zaporedje, kot peptidu P7-3 določili tudi klonom P7-5, P7-7, P7-8, P7-12, P7-17, P7-18 in P7-20.

QPDAINAPV	TCCYNFTNRK	ISVQR	LASYRRITSSKCPKEAVIFKTI	VAKEICADPKQKWVQDSMDHLDKQ	TQTPKT	MCP-1
						K7-2
		CSVQR	PWAC			K12-5
		ALSHD	HLEKVRV			K12-6
		STPQS	VVDHLDKF			K12-7
		NHTAHH	SVDSRT			K12-11
		AMSND	HMNKNG			

Slika 28: Poravnava peptidov serij K12 in K7 z aminokislinskim zaporedjem CCL2. Z rdečo je označen linearni epitop, ki ga posnemajo peptidi. Z rumeno so označeni cisteinski ostanki, ki v peptidu serije K7 tvorijo intramolekularno disulfidno vez. Isto AK zaporedje, kot peptidu K7-2, smo določili tudi klonoma K7-19 in K7-20.

Kot tarčna protitelesa smo uporabili eno monoklonsko in dve poliklonski protitelesi. Za slednje je značilno, da so usmerjena proti več antigenim determinantam, medtem ko so monoklonska protitelesa usmerjena proti enemu epitopu. Iz tega dejstva lahko pojasnimo zakaj so aminokislinska zaporedja pri mAb identična, pri pAb pa se med različnimi kloni razlikujejo. Bolj verjetna razlaga manjše raznolikosti peptidov po afinitetni selekciji proti monoklonskemu protitelesu je ta, da smo naredili selekcijski cikel preveč, s čimer smo izgubili diverzitetu peptidov, kakršno smo dobili pri selekcijah proti pAb (seriji P in K).

Peptidne ligande protitelesa 9669 (serija P12 in P7) ter protitelesa AF-279-NA (serija K12 in K7) smo lahko enostavno poravnali z aminokislinskim zaporedjem MCP-1 (sliki 27 in 28) zaradi česar smo sklepali, da ti peptidi posnemajo linearni epitop.

Peptida GQPYKYDIRVSK nismo mogli enostavno poravnati z aminokislinskim zaporedjem MCP-1, zato smo predvidevali, da mAb S101 prepozna konformacijski epitop.

Naša predvidevanja za peptid iz serije M12 smo potrdili z računalniškim programom Pepitope, s katerim smo preverjali ocenili ujemanje peptida s tridimenzionalno strukturo CCL2. Pri tem smo ugotovili ujemanje aminokislinskega zaporedja peptida z nekaterimi od aminokislinskih ostankov MCP-1, ki naj bi bili odgovorni za njegovo vezavo na receptor (14) – preglednica XII in slika 29. Iz knjižnice PhD- C7C nismo uspeli izolirati vezalcev na mAb S101, kar pripisujemo ciklizaciji peptidov. Ta verjetno onemogoča posnemanje relativno velikega epitopa, saj se le-ta razteza preko obsežnega dela površine MCP-1. Nasprotno daljši linearni peptid lahko posnema tako velik in kompleksen epitop. Dodaten razlog neuspešne selekcije bi lahko bil konformacijska omejenost peptidov. V prvotni knjižnici morda sploh ni peptidov s konformacijo, ki bi dovoljevala vezavo na paratop protitelesa.

Linearna epitopa, ki ju posnemajo peptidi iz serije P12, ležita na samem N- oz. C-koncu MCP-1 (slika 27), ki je prav tako udeležen pri vezavi na receptor, vendar je pri tem pomembna le njegova dolžina in ne točno aminokislinsko zaporedje (14). Poliklonsko nevtralizacijsko protitelo P (ab9669) z vezavo na N- ali C-konec proteina verjetno sterično ovira dostop MCP-1 do CCR2 in tako prepreči signalizacijo.

Linearni epitop, ki ga posnemajo peptidi iz serij K7 in K12, pa leži na N-končni zanki, tik pred prvo beta površino (slika 28). Pri tem predvidevamo, da tudi poliklonsko protitelo K (ab AF-279-NA) z vezavo na ta epitop sterično ovira dostop proteina do receptorja.

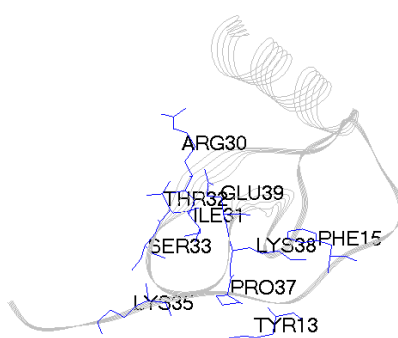
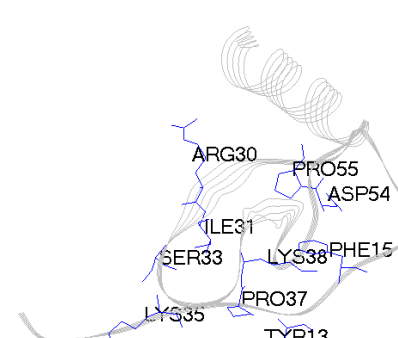
Na tem mestu velja izpostaviti zanimivo strukturo peptida P7-3, pri katerem se drugi cistein pojavi na mestu 6 (tj. CX₄CX₃) in ne na pričakovanem položaju 9 (tj. CX₇C). Očitno je v procesu pomnoževanja eluiranih bakteriofagov med cikli afinitetne selekcije prišlo do naključne mutacije v oligonukleotidnem insertu, ki kodira predstavljen peptid. Ker se je mutacija izkazala za »uspešno« (mutirani bakteriofagni klon je pridobil sposobnost vezave na protitelo), se je ne le ohranila, temveč močno razširila po populaciji, o čemer priča dejstvo, da smo med desetimi naključno izbranimi vezalci pAb AF-279 kar osemkrat naleteli na isti mutirani klon. To je neposreden dokaz, da tehnika predstavitve na bakteriofagu, sklopljena z afinitetno selekcijo, posnema proces evolucije *in vitro*.

Največje strukturno ujemanje z aminokislinskimi ostanki MCP-1, ki naj bi omogočili vezavo na receptor CCR2, smo opazili pri peptidu GQPYKYDIRVSK. Peptid vsebuje bazična aminokislinska ostanka, ki domnevno posnemata lizina K35 in K38 na površini MCP-1 (slika 27), preko katerega naj bi potekala vezava na negativno nabit del receptorja (14). Poleg tega vsebuje tudi aromatska aminokislinska ostanka, ki ju lahko poravnamo z aromatskima ostankoma F15 in Y13 na MCP-1. Slednja v proteinu MCP-1 igrata osrednjo vlogo pri tvorbi hidrofobnih interakcij s CCR2 (14).

Žal smo pri selekciji ligandov mAb S101 iz knjižnice PhD-12 (serija M12) uspeli identificirati en sam peptid (glej razlago zgoraj). Zaradi tega rezultati analize s programom Pepitope niso zanesljivi. Želeli smo pridobiti takšne rezultate, ki bi nam omogočili določitev konsenznega peptida, in tega poravnati s prostorsko strukturo MCP-1, česar pa nam naši rezultati (z enim samim aminokislinskim zaporedjem) ne omogočajo.

Peptid, za katerega smo s programom Pepitope ocenili, da posnema del površine proteina MCP-1, ki je odgovoren za vezavo na CCR2, je podrobneje predstavljen v preglednici XII.

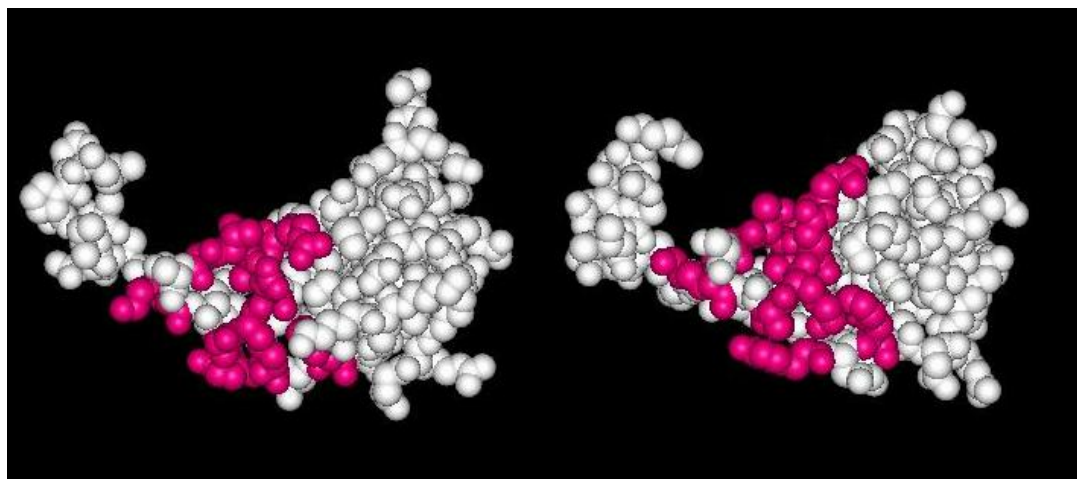
Preglednica XII: Predstavitev ujemanja peptida M12-2 s površinskimi aminokislinskimi ostanki MCP-1. Med njimi najdemo tudi takšne, ki so odgovorni za vezavo na receptor CCR2 (označene s krepkim tiskom). Del peptida, ki domnevno posnema površinske AK-ostanke MCP-1, je podčrtan. Z **modro** so označeni aminokislinski ostanki, v katerih se po ujemanju s peptidom serije M12 razlikujeta prostorska modela 1DOL in 1DOK.

OZNAKA PEPTIDA	AK-ZAPOREDJE	DEL MCP-1, S KATERIM SE UJEMA PEPTID	AMINOKISLINSKI OSTANKI MCP-1, KI JIH PEPTID DOMNEVNO POSNEMA
M12-2, M12-4, M12-7, M12-11, M12-12	G <u>Q</u> PYKYDIRVSK	[1DOL] PYKFDPRISK	P37, Y13, K38, F15 , E39, I31, R30, T32, S33, K35 
		[1DOK] PYKFEIRTSK	P37, Y13, K38, F15 , D54, P55, R30, I31, S33, K35 

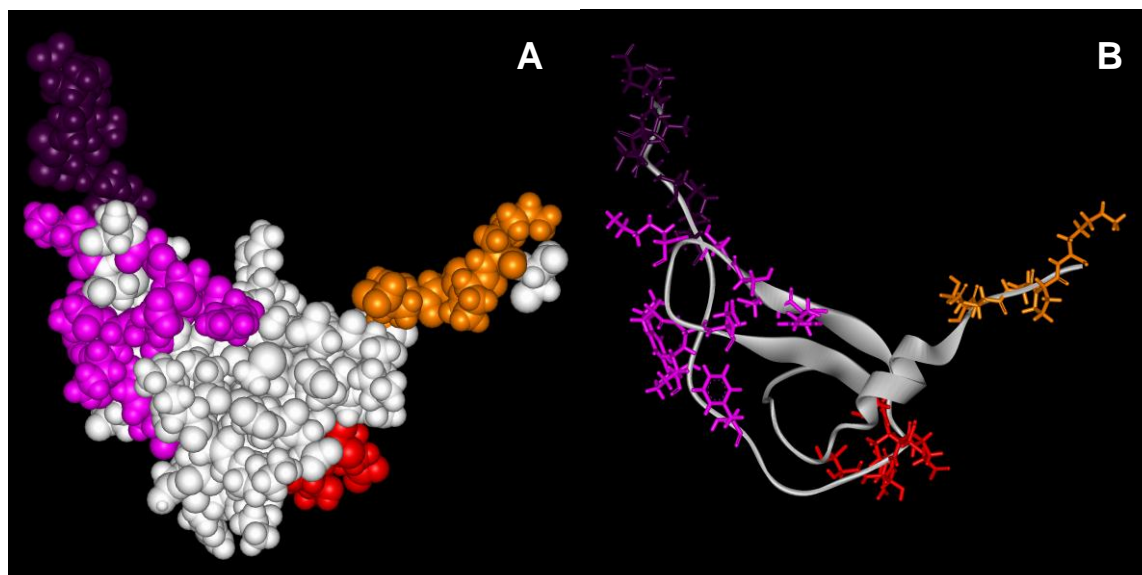
Pri sami računalniški obdelavi smo ugotovili, da pride do odstopanja v ujemanju istega peptida s površino MCP-1, če uporabimo različne predloge strukture MCP-1. Za peptid GQPYKYDIRVSK smo zato določili ujemanje s 7 različnimi prostorskimi modeli MCP-1 iz podatkovne baze Protein Data Bank – 1DOL, 1DOK, 2BDN, 4DN4, 1DOM, 3IFD in 2NZ1. Konformacijski epitop, ki ga domnevno posnema peptid GQPYKYDIRVSK (preglednica XII), ki se ujemajo s 3D-strukturo MCP-1, smo s pomočjo računalniškega programa ViewerLite označili na dveh prostorskih modelih MCP-1 (I-konformacija – 1DOL in P-konformacija – 1DOK) (slika 29). Z I-konformacijo je označena kristalna struktura monomera, s P-konformacijo pa kristalna struktura dimera.

Ostali prostorski modeli MCP-1 z označenimi aminokislinskimi ostanki, ki jih posnema peptid iz serije M12, so združeni v prilogi 2.

Na sliki 30 so označeni vsi linearni in konformacijski epitop, ki smo jih določili v okviru diplomske naloge.



Slika 29: Protein MCP-1 v dveh različnih konformacijah z rožnato označenimi aminokislinskimi ostanki, ki jih domnevno posnema peptid M12-2 pri vezavi na tarčno protiteleso. Levo na sliki je MCP-1 v P-konformaciji (samo veriga A, veriga B ni prikazana), desno pa MCP-1 v I-konformaciji. Strukturi se v predelu ujemanja s peptidom razlikujeta le v dveh aminokislinskih ostankih.



Slika 30: Protein MCP-1 z označenimi epitopi, ki jih prepoznavajo uporabljena nevtralizacijska protitelesa. Z vijolično in oranžno sta označena linearna epitopa, ki ju posnemajo peptidi iz serij P12 in P7 (vijolično N – konec in oranžno C-konec MCP-1), z rdečo linearni epitop, ki ga posnemajo peptidi iz serij K12 in K7 (N-končna zanka, pred prvo beta ploščo). Konformacijski epitop, ki ga domnevno posnema peptid iz serije M12 je označen rožnato. A – prostorsko zapolnjen model (CPK); B – trakovni model z izrisanimi aminokislinskimi ostanki v epitopih.

Peptid M12-4 kot mimetik dela površine MCP-1, ki vstopa v interakcijo z receptorjem, predstavlja potencialno spojino vodnico za razvoj antagonistov CCR2. V nadaljevanju bi bilo smiselno preveriti morebitno biološko aktivnost sinteznega peptida, npr. sposobnost zavreti kemotaktično signaliziranje MCP-1 *in vitro*, ter njegovo umeščanje na tridimenzionalen model receptorja CCR2 (z metodami molekulskega modeliranja), a to že presega okvir te diplomske naloge.

5 SKLEP

Pri eksperimentalnem delu smo izvedli šest afinitetnih selekcij proti trem različnim nevtralizacijskim protitelesom, usmerjenim proti humanemu MCP-1, iz knjižnic naključnih peptidov (linearnih in cikličnih), predstavljenih na bakteriofagu M13. Pri vseh selekcijah smo iz stopnje v stopnjo zaznali trend naraščanja deleža eluiranih bakteriofagov, ki je nakazoval uspešen potek bogatenja vezalcev. S prirejenim testom ELISA smo potrdili afiniteto posameznim bakteriofagnim klonom do tarčnih protiteles, izjema so bili bakteriofagi iz skupine M7. Izvedli pa smo tudi kompetitivno ELISO in dokazali vezavo selekcioniranih peptidov na paratop protitelesa in ne drugam na površino te velike proteinske molekule.

Petintridesetim fagnim klonom, ki smo jim potrdili sposobnost vezave na ustrezno tarčno protitelo, smo določili aminokislinska zaporedja predstavljenih peptidov. Ta zaporedja smo enostavno primerjali s primarno strukturo MCP-1, pri čemer smo iskali linearne epitope. Če peptida nismo uspeli kartirati na površinski linearni epitop, smo z računalniškim programom Pepitope peptid poravnali s tridimenzionalno strukturo MCP-1 in skušali določiti konformacijski epitop. Dobljene rezultate smo primerjali z aminokislinskimi ostanki, ki naj bi bili odgovorni za vezavo MCP-1 na receptor CCR2. Med vsemi kloni smo tako identificirali peptid GQPYKYDIRVSK, ligand paratopa monoklonskega protitelesa S101, kot najzanimivejši za nadaljnjo preučevanje, saj domnevno oponaša štiri ključne aminokislinske ostanke, pomembne za vezavo na receptor. Prav tako smo ugotovili, da poliklonski protitelesi ab9669 in AF-279 verjetno nevtralizirata aktivnost MCP-1 prek steričnega oviranja vezave MCP-1 na CCR2, medtem ko se sami ne vežeta neposredno na aminokislinske ostanke MCP-1, ki so esencialni za prepoznavo MCP-1 in proženje signalizacije. Pri tem kloni iz skupine P12 oponašajo linearna epitopa na N- oz. C-koncu MCP-1, kloni iz skupin K12 in K7 pa linearni epitop iz N-končne zanke, pred prvo beta površino MCP-1.

Določitev morebitnega kompleksa med peptidom in CCR2 ni mogoča oz. je vsaj izjemno težavna, saj je slednji integralni membranski protein, zato bi kot naslednji korak lahko poskusili z molekulskim modeliranjem interakcije peptida proti prostorskemu modelu CCR2, postavljenim na osnovi homologije s strukturno sorodnimi membranskimi proteini. Prav tako, bi bilo smiselno preveriti morebitno aktivnost sinteznega peptida

GQPYKYDIRVSK na makrofagih in s tem preveriti, ali deluje kot antagonist receptorja CCR2 (tj. ali je sposoben zavreti kemotakso, izzvano z MCP-1).

6 LITERATURA

1. Yadav A, Saini V, Arora S: MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. *Clinica Chimica Acta*; 2010, 411: 1570–1579.
2. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE: Monocyte Chemoattractant Protein – 1 (MCP-1): An overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*; 2009, 29(6): 313 – 326.
3. Blanchet X, Langer M, Weber C, Koenen RR, von Hundelshausen P: Touch of chemokines. *Frontiers in Immunology*; 2012, 3(175): 1-18.
4. Laing KJ, Secombes CJ: Chemokines. *Developmental and Comparative Immunology*; 2004, 28: 443-460.
5. Raman D, Sobolik-Delmaire T, Richmond A: Chemokines in health and disease. *Experimental Cell Research*; 2011, 317: 575-589.
6. Gouwy M, Struyf S, Catusse J, Proost P, Van Damme J: Synergy between proinflammatory ligands of G protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration. *Journal of Leukocyte Biology*; 2004, 76: 185-194.
7. Dzenko KA, Andjelkovic AV, Kuziel WA, Pachter JS: The chemokine receptor CCR2 mediates the binding and internalisation of monocyte chemoattractant protein-1 along brain microvessels. *The Journal of Neuroscience*; 2001, 21: 9214-9223.
8. Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N: Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 1997, 94(22): 12053-12058.
9. Martinovic I, Abegunewardene N, Seul M, Vosseler M, Horstick G, Buerke M, Darius H, Lindemann S: Elevated Monocyte Chemoattractant Protein-1 serum levels in patients at risk for coronary artery disease. *Circulation Journal*; 2005, 69(12): 1484-1489.
10. Melgarejo E, Medina MA, Sanchez-Jimenez F, Urdiales JL: Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory processes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*; 2009, 41: 998–1001.
11. Reid C, Rushe M, Jarpe M, van Vlijmen H, Dolinski B, Cachero TG, Cuervo H, Yanachkova M, Nwankwo C, Wang X, Etienne N, Garber E, Bailly V, de

- Fougerolles A, Boriack-Sjodin PA: Structure activity relationships of monocyte chemoattractant proteins in complex with a blocking antibody. *Protein Engineering, Design and Selection*; 2006, 19(7): 317-324.
12. Monteclaro FS, Charo IF: The Amino-terminal extracellular domain of the MCP-1 receptor, but not the RANTES/MIP-1a receptor, confers chemokine selectivity. *The Journal of Biological Chemistry*; 1996, 271(32): 19084-19092.
 13. Monteclaro FS, Charo IF: The amino-terminal domain of CCR2 is both necessary and sufficient for high affinity binding of monocyte chemoattractant protein 1. *The Journal of Biological Chemistry*; 1997, 272(272): 23186-23190.
 14. Hemmerich S, Paavola C, Bloom A, Bhakta S, Freedman R, Grunberger D, Krstenansky J, Lee S, McCarley D, Mulkins M, Wong B, Pease J, Mizoue L, Mirzadegan T, Polsky I, Thompson K, Handel TM, Jarnagin K: Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2. *Biochemistry*; 1999, 38: 13013-13025.
 15. O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ: Chemokines and cancer: migration, intracellular signaling and intercellular communication in the microenvironment. *Biochemical Journal* ; 2008, 409: 635-649.
 16. Rafei M, Deng J, Boivin MN, Williams P, Matulis SM, Yuan S, Birman E, Forner K, Yuan L, Castellino C, Boise LH, MacDonald ZJ, Galipeau J: A MCP1 fusokine with CCR2-specific tumoricidal activity. *Molecular Cancer*; 2011, 10(121): 1-11.
 17. Kanzler I, Liehn EA, Koenen RR, Weber C: Anti-inflammatory therapeutic approaches to reduce acute atherosclerotic complications. *Current Pharmaceutical Biotechnology*; 2012, 13(1): 37-45.
 18. Lim JH, Um HJ, Park JW, Lee IK, Kwon TK: Interleukin 1 promotes the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human aorta smooth muscle cells via multiple signaling pathways. *Experimental and molecular medicine*; 2009, 41: 757-764.
 19. Daly C, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1(CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: Therapeutic opportunities and controversies. *Microcirculation*; 2003, 10: 247-257.
 20. Izhak L, Wildbaum G, Zohar Y, Anunu R, Klapper L, Elkeles A, Seagal J, Yefenof E, Ayalon-Soffer M, Karin N: A novel recombinant fusion protein encoding a 20-

- amino acid residue of the third extracellular (E3) domain of CCR2 neutralizes the biological activity of CCL2. *The journal of immunology*, 2009, 183: 732-739.
21. Vozelj M: *Temelji imunologije*. Ljubljana: Državna založba Slovenije, 2000.
 22. Gershoni JM, Roitburd-Berman A, Siman-Tov DD, Tarnovitski Freund N, Weiss Y: Epitope mapping: the first step in developing epitope-based vaccines. *BioDrugs* 2007,21(3): 145-156.
 23. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP: *Brock biology of microorganisms*. 12 izdaja: San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2009.
 24. Molek P, Štrukelj B, Bratkovič T: Peptide phage display as a tool for drug discovery: Targeting membrane receptors. *Molecules* 2011,16: 857-887.
 25. Pande J, Szewczyk MM, Grover AK: Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances*; 2010,28: 849–858.
 26. Castel G, Chteoui M, Heyd B, Tordo N: Phage display of combinatorial peptide libraries: Application to antiviral research. *Molecules*; 2011,16: 3499-3518.
 27. Smith GP, Petrenko VA: Phage Display. *Chemical Reviews*; 1997,97: 391-410.
 28. Bratkovič T: Progress in phage display: evolution of the technique and its applications. *Cellular and molecular life sciences*; 2010,67: 749-767.
 29. Rosenberg A, Griffin K, Studier FW, McCormick M, Berg J, Novy R, Mierendorf R: T7 Select Phage Display System: A Powerful new protein display system based on bacteriophage T7. *Newsletter of Novagen, Inc.*; 1996,6: 1-6.
 30. Huang R, Pershad K, Kokoszka M, Kay BK: Phage-displayed combinatorial peptides. *Amino acids, peptides and proteins in organic chemistry: protection reactions, medicinal chemistry, combinatorial synthesis*; 2011, 4: 451-471.
 31. New England Biolabs®, Inc.: Ph.D.™ Phage Display Libraries, Instruction Manual E8100S, E8101S, E8102L, E8110S, E8111L, E8120S, E8121L. Version 1.0 (6/11).
 32. Ladner RC: Mapping the epitopes of antibodies. *Biotechnology and genetic engineering reviews*; 2007, 24: 1-30.
 33. Westwood MR, Hay FC: *Epitope mapping: a practical approach*. Oxford: Oxford University Press; 2001.
 34. Mayrose I, Penn O, Erez E, Rubinstein ND, Shlomi T, Tartinovitski-Freund N, Bublil EM, Ruppin E, Sharan R, Gershoni JM, Martz E, Pupko T: Pepitope: epitope mapping from affinity-selected peptides. *Bioinformatics applications note*; 2007,23(23): 3244–3246.

35. Huang J, Ru B, Dai P: Bioinformatics resources and tools for phage display. *Molecules*; 2011,16: 694-709.
36. [Phage-Display Vectors and Libraries Based on Filamentous Phage Strain fd-tet: http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html](http://www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html) [Navedeno: 7.marec 2013.]
37. GE Healthcare instructions 28-4046-25 AD, HiTrap affinity columns: <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/Home/sl/GELifeSciences-SI/> [Navedeno: 8.marec 2013.]

PRILOGE

PRILOGA 1

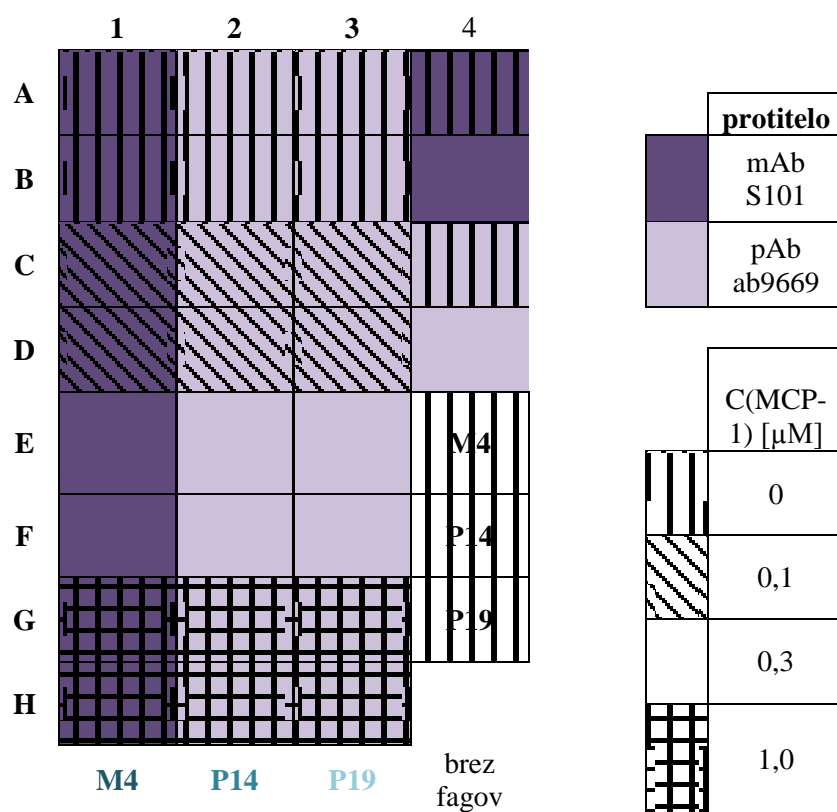
V prilogi 1 je podana preglednica XIII, ki vsebuje koncentracije in količine bakteriofagov (izračun po enačbi 2 – glej podpoglavje 3.2.2.4) za tarči mAb S101 in pAb 9669; Ph.D.-12, ter shema 1, kjer so prikazane količine dodanega MCP-1.

Preglednica XIII: Koncentracija in količina bakteriofagov za tarči mAb S101 in pAb 9669 (PhD-12) pri kompetitivni ELISI.

KLON	A_{269}	A_{320}	$C_{IZRAČUNANA}$ (pfu / mL)	REDČITEV BAKTERIOFAGOV	
				BAKTERIOFAGI (μ L)	1 % MLEKO PBS (μ L)
M4	0,663	0,023	$5,3 \times 10^{13}$	5,3	695
P14	0,389	0,018	$3,1 \times 10^{13}$	9	691
P19	1,090	0,030	$8,8 \times 10^{13}$	23	697

$$C_{ZELJENA} = 2 \times 10^{10} \text{ pfu}$$

Shema 1



PRILOGA 2

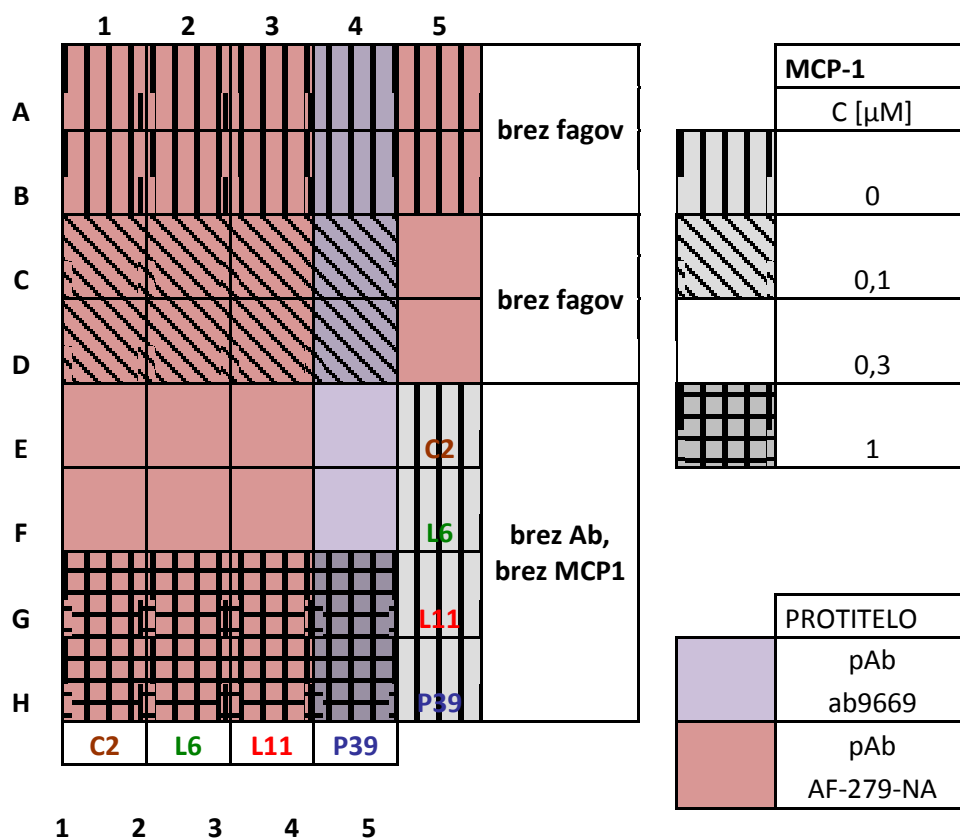
V prilogi 2 je podana preglednica XIV, ki vsebuje koncentracije in količine bakteriofagov (izračunano po enačbi 3 – glej podpoglavje 3.2.2.4) za tarče pAb 9669; Ph.D.-C7C, ter pAb AF-279-NA (Ph.D.-12 in Ph.D.-C7C), ter shema 2 kjer so prikazane količine dodanega MCP-1.

Preglednica XIV: Koncentracija in količina bakteriofagov za tarče pAb 9669 (PhD- C7C) in pAb AF-279-NA (PhD-12 ter PhD-C7C) pri kompetitivni ELISI.

KLON	A ₂₆₉	A ₃₂₀	C _{IZRAČUNANA} (pfu / mL)	REDČITEV BAKTERIOFAGOV	
				BAKTERIOFAGI (μL)	1% MLEKO PBS (μL)
C2	0,179	0,015	1,36 x 10 ¹²	176,5	424
L6	0,382	0,029	2,92 x 10 ¹²	82,2	518
L11	0,505	0,030	3,92 x 10 ¹²	61,2	539
P39	0,445	0,026	3,46 x 10 ¹²	69,4	531

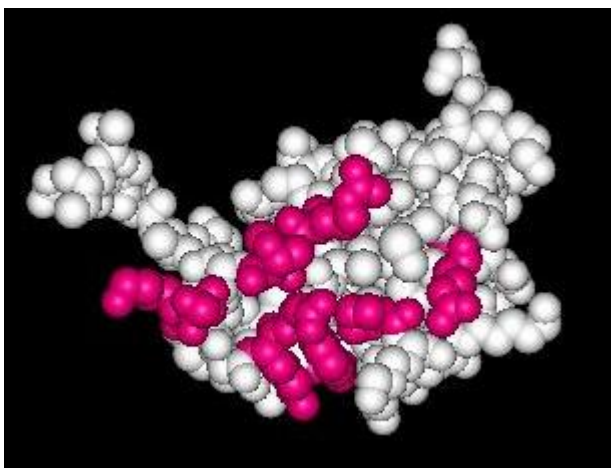
$$C_{ZELJENA} = 2 \times 10^{10} \text{ pfu}$$

Shema 2

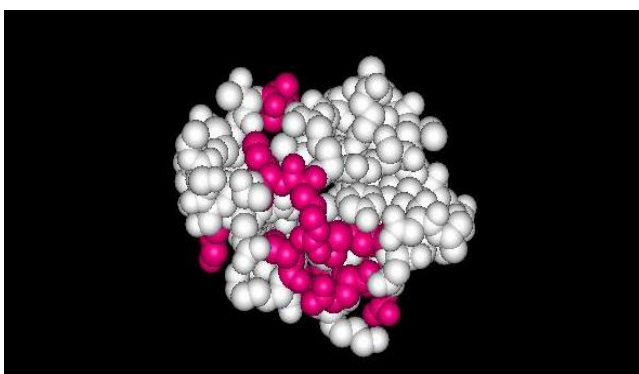


PRILOGA 3

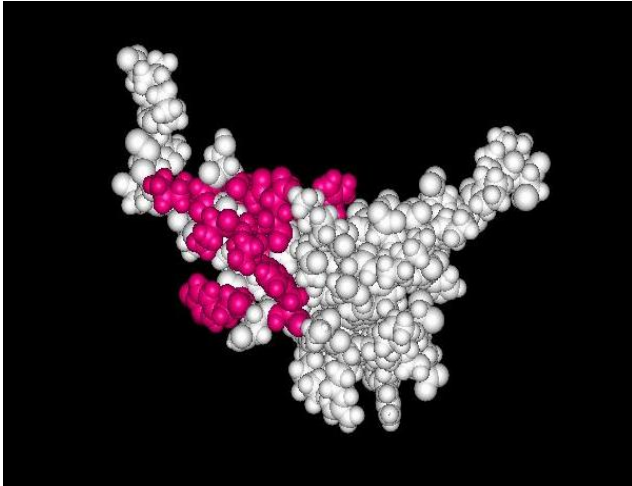
V prilogi 3 so podani primeri vseh prostorskih struktur MCP-1, z rožnato označenimi aminokislinskimi ostanki, ki jih domnevno oponaša peptid GQPYKYDIRVSK. Vsi prostorski modeli so poravnani tako, da N-konec leži na levi strani.



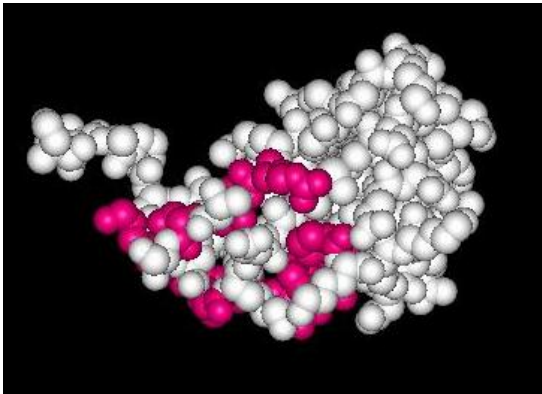
Slika 31: Prostorska struktura 2BDN.



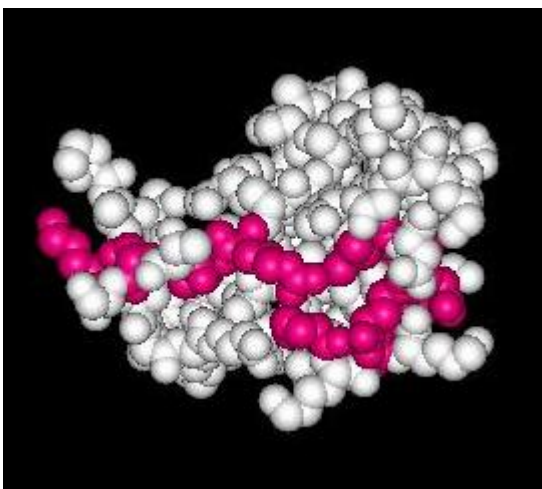
Slika 32: Prostorska struktura 4DN4.



Slika 33: Prostorska struktura 1DOM.



Slika 34: Prostorska struktura 3IFD.



Slika 35: Prostorska struktura 2NZ1.