

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA BJELOŠEVIĆ

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAJA BJELOŠEVIĆ

**IDENTIFIKACIJA AMINOKISLINKIH OSTANKOV KEMOKINA CCL2, KI
TVORIJO KONFORMACIJSKI EPITOP NEVTRALIZACIJSKEGA
PROTITELESA S101**

**IDENTIFICATION OF AMINO ACID RESIDUES OF CHEMOKINE CCL2 THAT
CONSTITUTE THE CONFORMATIONAL EPITOPE RECOGNIZED BY
NEUTRALIZING ANTIBODY S101**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIALNA FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko sem opravljala na Katedri za Farmacevtsko biologijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča, mag.farm. Določitev nukleotidnih zaporedij je opravilo nemško podjetje GATC Biotech iz Konstanza.

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila doc. dr. Tomažu Bratkoviču za vso pomoč in strokovne napotke pri opravljanju eksperimentalnega dela in za pomoč pri pisanju magistrske naloge ter možnost opravljanja magistrske naloge na področju biotehnologije. Najlepša hvala vsem sodelavcem in sodelavkam Katedre za farmacevtsko biologijo Fakultete za farmacijo za vso pomoč in vodenje pri raziskovalnem delu.

Velika zahvala moji družini, da so mi vsa leta študija stali ob strani, me podpirali in verjeli vame ter mi študij tudi finančno omogočili.

Hvala vsem sošolcem za pomoč in podporo tekom celotnega študija. Še posebej hvala Anžetu, Nini in Lani.

Iskrena hvala Urošu in Barbari, da sta me vsa leta spodbujala in navdihovala z optimizmom ter pozitivno energijo.

Nenazadnje najlepša hvala vsem, ki ste bili vsa leta mojega izobraževanja ob meni in s tem pripomogli k uresničevanju mojih ciljev.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča.

Maja Bjelošević

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Mentor: doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Matej Sova, mag. farm.

KAZALO

1	UVOD	1
1.1	CITOKINI.....	1
1.2	KEMOKINI	1
1.3	MONOCITNI KEMOTAKTIČNI PROTEIN 1 (MCP-1/CCL2).....	3
1.4	NEVTRALIZACIJSKA PROTITELESA	10
1.5	METODE KARTIRANJA EPITOPOV (angl. <i>epitope mapping</i>)	11
1.5.1	RENTGENSKA KRISTALOGRAFSKA DIFRAKCIJA IN NMR	12
1.5.2	MUTAGENEZA	13
1.5.3	METODA PRIPRAVE SINTETIČNIH PEPTIDOV	13
1.5.4	AFINITETNA SELEKCIJA PEPTIDOV IZ BAKTERIOFAGNIH PREDSTAVITVENIH KNJIŽNIC	14
2	NAMEN DELA.....	17
3	MATERIALI IN METODE	18
3.1	MATERIALI	18
3.1.1	KEMIKALIJE	18
3.1.2	ANTIBIOTIK	19
3.1.3	BAKTERIJSKI SEV	19
3.1.4	BAKTERIOFAGNI KNJIŽNICI	19
3.1.5	NEVTRALIZACIJSKO PROTITELO.....	19
3.1.6	PEPTIDI, PROTEINI	20
3.1.7	SINTEZNI OLIGONUKLEOTID.....	20
3.1.8	GOJIŠČA.....	20
3.1.9	RAZTOPINE IN PUFRI	21
3.2	LABORATORIJSKA OPREMA	25
3.3	METODE	27
3.3.1	PRIPRAVA BAKTERIJSKIH KULTUR <i>E. COLI</i> (ER 2738).....	28

3.3.2	AFINITETNA SELEKCIJA PEPTIDOV IZ BAKTERIOFAGNIH PREDSTAVITVENIH KNJIŽNIC (<i>glej poglavje 1.5.4</i>).....	28
3.3.3	MIKROBIOLOŠKA TITRACIJA	31
3.3.4	POMNOŽEVANJE POSAMEZNIH BAKTERIOFAGNIH KLONOV	33
3.3.5	IDENTIFIKACIJA IN KARAKTERIZACIJA VEZALCEV S TESTOM ELISA	34
3.3.6	IZOLACIJA, ČIŠČENJE IN DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA BAKTERIOFAGNE DNA IZBRANIH KLONOV	36
3.3.7	UPORABA RAČUNALNIŠKIH PROGRAMOV ZA IDENTIFIKACIJO (KONFORMACIJSKIH) EPITOPOV	37
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	40
4.1	OCENA AFINITETNE SELEKCIJE PEPTIDNIH MIMETIKOV EPITOPO PROTITELESA S101.....	40
4.1.1	DOLOČANJE KOLIČINE IN DELEŽA ELUIRANIH BAKTERIOFAGOV	40
4.1.2	POLIKLONSKA ELISA.....	43
4.2	IDENTIFIKACIJA IN KARAKTERIZACIJA VEZALCEV	45
4.2.1	MONOKLONSKA ELISA	45
4.2.2	DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA IZOLIRANIH PEPTIDOV.....	48
4.2.3	KVANTITATIVNA FAGNA ELISA: Medsebojna primerjava bakteriofagnih klonov 7, 9, 13 in 49	49
4.2.4	KOMPETITIVNA ELISA.....	52
4.3	IDENTIFIKACIJA AK-OSTANKOV, KI TVORIJO KONFORMACIJSKI EPITOP NEVTRALIZACIJSKEGA PROTITELESA S101	53
5	SKLEP.....	57
6	LITERATURA.....	59

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturni prikaz širih skupin kemokinov (prirejeno po S1).....	2
Slika 2: Zgoraj: shema terciarne struktura MCP-1. Spodaj: sekundarna struktura CCL2 (prirejeno po S2).....	5
Slika 3: Strukture znanih antagonistov receptorja CCR2 (prirejeno po S3).....	6
Slika 4: Antagonist številka 7. Rumeno: glicinamid (prirejeno po S3)	6
Slika 5: Shematski prikaz strukture MCP-1 (prirejeno po S4).	9
Slika 6: Prikaz vezave antiga in protitelesa (prirejeno po S5).	12
Slika 7: Shematski prikaz strukture bakteriofaga M13 (prirejeno po S6).	15
Slika 8: Prikaz poteka afinitetne selekcije (prirejeno po S7).	16
Slika 9: Shematska zgradba uporabljenih bakteriofagnih knjižnic	29
Slika 10: pogovorno okno v programu EpiSearch (prirejeno po S9).....	37
Slika 11: pogovorno okno v programu Pepitope (S10).	39
Slika 12: Delež eluiranih bakteriofagov dveh peptidnopredstavitevih knjižnic po treh stopnjah afinitetne selekcije.....	43
Slika 13: Grafični prikaz vrednosti absorbanc pri valovni dolžini 450 nm, za pomnožene eluate po vsaki selekcijski stopnji.	44
Slika 14: Absorbančni signali tridesetih naključno izbranih bakteriofagnih klonov knjižnice Ph.D.-12, po drugi selekcijski stopnji.	46
Slika 15: Absorbančni signali dvajsetih naključno izbranih bakteriofagnih klonov knjižnice Ph.D.-12, po tretji selekcijski stopnji.	47
Slika 16: Absorbančni signali tridesetih naključno izbranih bakteriofagnih klonov knjižnice Ph.D.-12, po tretji selekcijski stopnji.	47
Slika 17: Absorbančni signali tridesetih naključno izbranih bakteriofagnih klonov knjižnice Ph.D.-C7C, po tretji selekcijski stopnji.	48
Slika 18: Primerjava relativnih afinitet bakteriofagnih klonov 7, 9, 13 in 19 do S101.	51
Slika 19: Primerjava relativnih afinitet bakteriofagnih klonov 7, 9, 13 in 19.	51
Slika 20: Grafični prikaz rezultatov kompetitivnega testa ELISA za štiri bakteriofagne klone.	53
Slika 21: Kemokin CCL2 z označenim konformacijskim epitopom, ki ga posnemajo identificirani peptidi.	56

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Izvedene redčitve pri mikrobiološki titraciji.	32
Preglednica II: Rezultati mikrobiološke titracije za PE in NE, po treh selekcijskih stopnjah (podano je število modrih plakov na bakterijskem travniku petrjevk z agarnim gojiščem LB).	41
Preglednica III: Količina eluiranih bakteriofagov in delež elucije ter bakteriofagni titer za bakteriofagno predstavljeno knjižnico Ph.D.-12 , po vseh treh selekcijskih stopnjah.....	42
Preglednica IV: Količina eluiranih bakteriofagov in delež elucije ter bakteriofagni titer za bakteriofagno predstavljeno knjižnico Ph.D.-C7C , po vseh treh selekcijskih stopnjah... .	42
Preglednica V: Absorbančne vrednosti ($A_{450\text{ nm}}$) posameznih pomnoženih eluatov obeh uporabljenih bakteriofagnih knjižnic, po vsaki selekcijski stopnji.....	44
Preglednica VI: Poravnava aminokislinskih zaporedij vseh petih na fagni površini predstavljenih linearnih dodekapeptidov, ki smo jih uspeli identificirati v postopku afinitetne selekcije.	49
Preglednica VII: Izmerjene vrednosti absorbanc suspenzij bakteriofagnih klonov pri 269 in 320 nanometrih in izračunan titer.....	50
Preglednica VIII: Rezultati kartiranja konformacijskega epitopa s pomočjo računalniških programov Episearch in Pepitope (dva algoritma).	55

POVZETEK

Citokini obsegajo veliko družino nizkomolekularnih glikoproteinov, katerih glavna funkcija je regulacija imunskega sistema. Citokine, ki so odgovorni za sprožitev kemotakse, imenujemo kemotaktični citokini (kemokin), med katere uvrščamo tudi monocitni kemotaktični protein 1 (MCP-1/CCL2). CCL2 je najpomembnejši CC-kemokin, ki je odgovoren za iniciacijo kemotakse in migracijo levkocitov, predvsem monocitov, na mesto vnetja. Omenjeni kemokin deluje posredno, preko vezave na z G-proteinom sklopljen receptor (GPCR) CCR2. Čeprav je CCL2 osrednjega pomena za učinkovit imunski odziv ob poškodbi tkiva ali okužbi, prekomerna signalizacija prek receptorjev CCR2 lahko vodi do patoloških procesov, kot so revmatoidni artritis, multipla skleroz, miokardni infarkt, ateroskleroz, astma in razvoj nekaterih oblik tumorjev. Razvoj nizkomolekularnih antagonistov CCR2 je zahteven, saj se interakcija s primarnim endogenim ligandom CCL2 močno razlikuje od siceršnje vezave majhnih signalnih molekul na GPCR. Eden od načinov zagotavljanja selektivnosti zaviranja signalizacije prek CCR2 je uporaba nevtralizacijskih protiteles proti CCL2.

V pričujoči magistrski nalogi smo si zadali cilj določiti antigensko determinanto na CCL2, ki jo prepozna nevtralizacijsko monoklonsko protitelo S101. Rezultati predhodnih raziskav na S101 so nakazovali, da protitelo prepoznavata konformacijski epitop, a niso dali jasnega odgovora, kateri aminokislinski ostanki so ključni za interakcijo s paratopom. Pri delu smo uporabili dve različni bakteriofagni predstavitveni knjižnici naključnih peptidov, ki predstavlja nabor bakterijskih virusov, med katerimi vsak na svoji površini izraža drugačno peptidno zaporedje. Z uporabo tehnike afinitetne selekcije smo iz širokega nabora površinsko predstavljenih peptidov izolirali tiste, ki so sposobni prepoznavate in vezave tarče, tj. protitelesa S101. Pogoje afinitetne selekcije smo prilagodili iskanju strukturno raznolikih peptidnih ligandov, čeprav na račun nižjega izplena presejalnega procesa. Po treh selekcijskih ciklih smo analizirali vezavo posameznih obogatenih bakteriofagnih klonov s S101 v prisotnosti in odsotnosti CCL2 in potrdili specifičnost vezave izraženih peptidov na paratop protitelesa. Sklepamo, da identificirani peptidi predstavljajo t.i. mimotope, mimetike epitopa. Posameznim bakteriofagnim klonom smo izolirali genomsko DNA, določili nukleotidna zaporedja insertov, ki kodirajo površinsko predstavljene peptide, ter jih prevedli v aminokislinska zaporedja. Za identifikacijo konformacijskega epitopa smo dobljena zaporedja peptidov poravnali med sabo in skupaj s prostorsko strukturo MCP-1, pri čemer smo uporabili dva računalniška programa za

kartiranje zaplenih epitopov (Pepitope in EpiSearch). Rezultati nakazujejo, da antigensko determinanto, ki jo prepozna S101, tvorijo štirje aminokislinski ostanki, to so Y13, K35/K38, P37 in E39.

Ključne besede:

CCL2, monoklonsko nevtralizacijsko protitelo, kartiranje epitopa, konformacijski epitop, predstavitev na bakteriofagu

ABSTRACT

Cytokines comprise a large family of low molecular weight glycoproteins whose main function is the regulation of the immune system. Cytokines that are responsible for triggering chemotaxis are called chemotactic cytokines (chemokines). Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1/CCL2) is the most important CC chemokine, responsible for the initiation of chemotaxis and migration of leucocytes, mostly monocytes, to the spot of inflammation. This chemokine acts via binding to and activating its cognate receptor CCR2, a member of the G protein-coupled receptor (GPCR) family. Although CCL2 is crucial for effective immune response to tissue damage or infection, the increased values of CCL2 can indicate the presence of a pathological process in the organism and the onset of some illnesses, such as rheumatoid arthritis, myocardial infarction, multiple sclerosis, atherosclerosis, asthma, and cancer. Because the interaction with the primary endogenous ligand CCL2 significantly differs from small signaling molecules binding to GPCR, the development of low molecular weight antagonists of CCR2 is difficult. One way of ensuring selectivity of signaling inhibition through CCR2 is the use of neutralizing antibodies against CCL2.

In this Master's thesis we set out to determine the epitope on CCL2 that is recognized by the neutralizing monoclonal antibody S101. The results of previous research on the S101 suggested that the antibody may recognize the conformational epitope, but they did not give a clear answer which amino acid residues are essential for interaction with the paratope. Here, we used two phage display libraries, each represented by a vast collection of bacterial viruses displaying on their surface different peptide sequences, to map the epitope. By using the biopanning technique we isolated peptide bearing clones that are capable binding the target (antibody S101). Biopanning was carried out under low stringency conditions, which led to structurally diverse peptide ligands at the expense of low screening yield. After three rounds of selection a competitive Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) (i.e., in presence of native ligand, recombinant CCL2) indicated binding of selected peptides to antibody paratope. We conclude that the identified peptides represent epitope mimetics (mimotopes). We isolated genomic DNA from individual phage clones and sequenced the oligonucleotide inserts to determine the amino acid sequence of the surface displayed peptides. To identify CCL2 residues forming the epitope we aligned the peptide sequences to 3D structure of CCL2 using two computer programmes (Pepitope and Episearch). The results suggest that the antigenic determinant

recognized by the S101 consists of four amino acid residues: Y13, K35 / K38, P37, and E39.

Key words:

CCL2, monoclonal neutralizing antibody, epitope mapping, conformational epitope, phage display

SEZNAM OKRAJŠAV

Ab	protitelo
Ag	antigen
AK	aminokislina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ELISA	encimskoimunski test (angl. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
IPTG	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid
LB	bakterijsko gojišče (angl. <i>Lysogeny Broth</i>)
mAb	monoklonsko protitelo
MCP-1	monocitni kemotaktični protein 1, kemokin CCL2
NE	nepomnožen eluat
vrt./min	število vrtljajev na minuto
PE	pomnožen eluat
PEG	polietilenglikol
pfu	plakotvorna enota (angl. <i>plaque-forming unit</i>)
Tris	tris (hidroksimetil)-aminometan
Tween 20	polioksietilen sorbitan monolavrat
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid

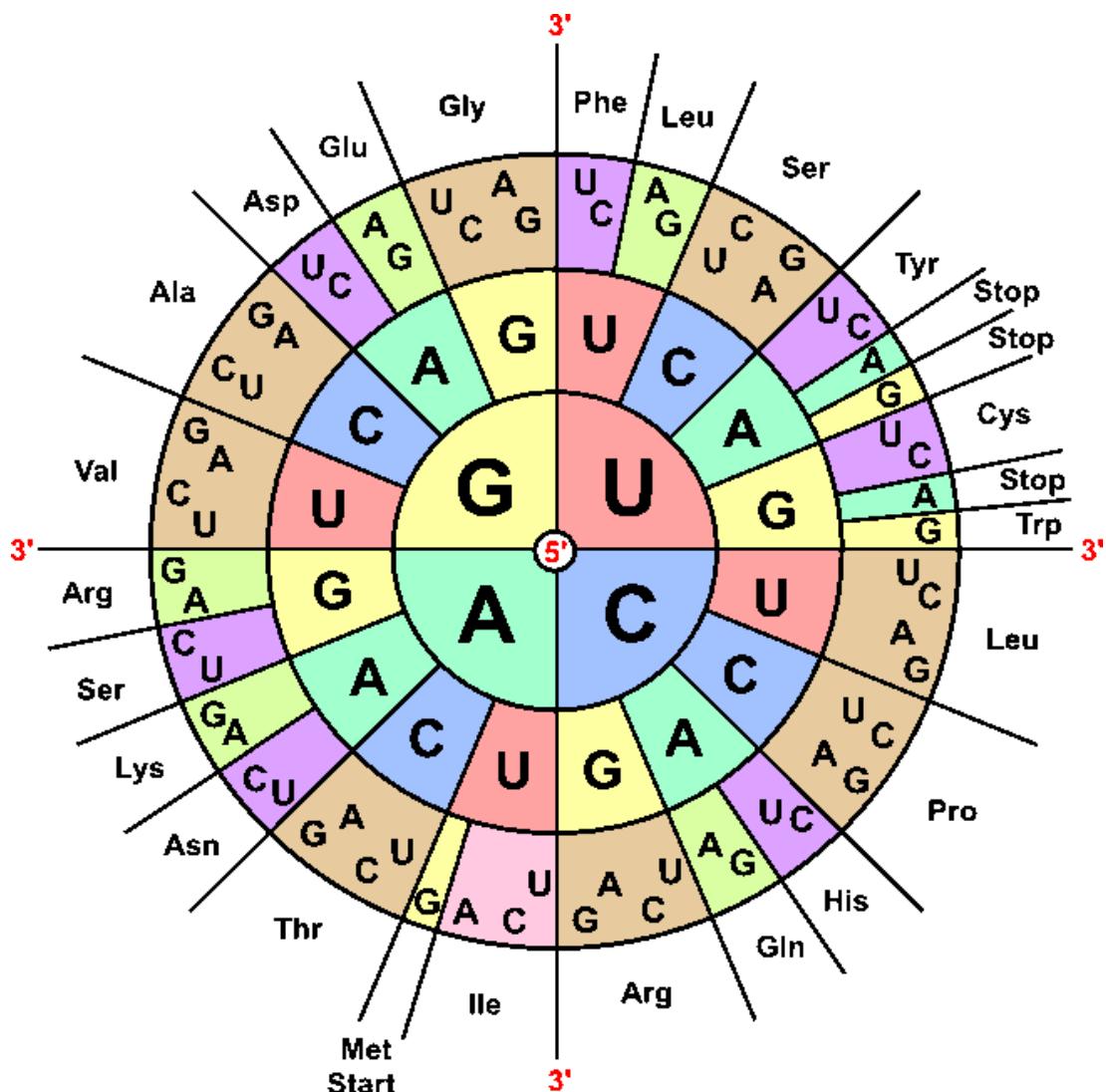
OKRAJŠAVE ZA AMINOKISLINE

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

OKRAJŠAVE ZA DUŠIKOVE BAZE

A	ADENIN	T	TIMIN
C	CITOZIN	U	URACIL
G	GVANIN		

GENETSKI KOD



1 UVOD

1.1 CITOKINI

Citokini so zapletena skupina glikoproteinov, ki se sintetizirajo in sproščajo kot odgovor na aktivacijo imunskega sistema in so tako regulatorji imunskega sistema (1). So skupina majhnih regulacijskih proteinov, ki jih izločajo skoraj vse celice, v glavnem pa limfociti in makrofagi. Citokini igrajo osrednjo vlogo v imunskem sistemu, saj posredujejo zapletene interakcije med celicami, ki sodelujejo pri razvoju učinkovitega imunskega odziva. Kot celični signalni proteini uravnavajo delitev, diferenciacijo, efektorske funkcije in preživetje celic. Udeleženi so tako pri razvoju humoralnega kot tudi celično posredovanega imunskega odziva, sprožitvi vnetja, uravnavanju hematopoeze ter celjenju ran (2). Delovanje citokinov je pogojeno z vezavo na specifične receptorje, pri čemer pride do sprožitve signala, ki se prenese v notranjost celice in spremeni izražanje genov (2, 3).

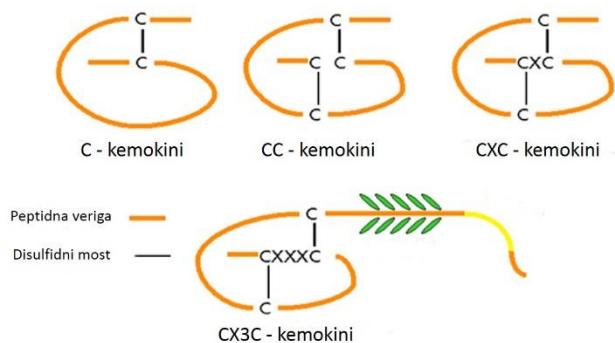
Odkritje citokinov sega v leto 1950, natančnejša določitev njihove strukture in delovanja pa je trajala več let, a dandanes poznamo že več kot šestdeset različnih vrst citokinov. Citokine lahko razdelimo glede na njihovo funkcijo ali glede na vrsto celic, ki jih izločajo (4). Citokini obsegajo raznolike družine molekul, kot so rastni dejavniki, interferoni, interlevkini, dejavniki tumorske nekroze in kemokini (2). V slednjo uvrščamo tudi monocitni kemotaktični protein 1 (MCP-1/CCL2).

1.2 KEMOKINI

Kemotaktični citokini oz. krajše kemokini, so majhne proteinske molekule (5) (velikosti 6-14 kDa in sestavljeni iz 70-125 aminokislin (6)), ki imajo ključno vlogo pri rekrutiranju in migraciji imunskih celic, predvsem levkocitov, na mesto vnetja ali poškodbe (5, 6) in tako sodelujejo pri induciraju kemotakse, kar je njihova osrednja funkcija (2). Predpogoj za sprožitev kemotakse je vezava kemokinov na ustrezne kemokinske receptorje, ki jih uvrščamo med z G-proteinom sklopljene receptorje (7). Vezava kemokina na receptor sproži aktivacijo proteina G, kar povzroči odziv imunskih celic in njihovo migracijo na mesto vnetja ter sproščanje citotoksičnih protimikrobnih snovi (6). Nekateri kemokini sodelujejo pri procesu angiogeneze, prav tako poznamo tudi homeostatske kemokine, ki usmerjajo levkocite v limfatičnih organih ter opravljajo nadzorne funkcije (6). Funkcija kemokinov je pomembna tako pri prirojeni kot tudi pri pridobljeni imunosti (2).

Do danes poznamo že okrog 50 različnih kemokinov, ki jih razdelimo v štiri skupine, in sicer glede na to, kakšen vzorec tvorita terminalna cisteina (5) - ali sta cisteina ločena s kakšno aminokislino (X) ali pa sledita drug drugemu (CC) (2) in glede na kromosomsko lokacijo genov (5). Vsaka skupina ima svojo vrsto receptorjev, ki jih prav tako razdelimo v štiri skupine. Poznamo (slika 1):

- **CC-kemokine:** dva zaporedna cisteina na N-koncu polipeptidne verige brez vmesnega aminokislinskega (AK) ostanka. Geni, ki kodirajo to skupino kemokinov, se nahajajo na kromosomu 17. Receptor: CCR,
- **CXC-kemokine:** cisteinska ostanka loči katerakoli druga AK, geni za to skupino se nahajajo na kromosomu 4. Receptor: CXCR,
- **XC-kemokine:** nimajo prvega cisteina. Receptor: XCR,
- **CX3C-kemokine:** cisteina sta ločena s tremi AK-ostanki. Receptor: CX3CR (2, 5, 6, 8).



Slika 1: Struktturni prikaz štirih skupin kemokinov (prirejeno po S1).

Cisteinska ostanka na N-koncu verige sta zelo pomembna, saj tvorita strukturno zelo pomembno disulfidno vez (5). Ta omejuje visokovariabilno N-končno zanko, ki predstavlja eno izmed treh ločenih domen, ki tvorijo strukturo kemokinov. Poleg N-končne zanke prostorsko strukturo tvorijo še tri antiparalelne ploskve β in C-končna vijačnica α (8).

Kemokini in njihovi receptorji so vključeni v patologijo različnih bolezni, kot so AIDS, avtoimunske bolezni (psoriaza, revmatoidni artritis, multipla skleroza), pljučne bolezni (astma, kronična obstruktivna pljučna bolezen), rakava in žilna obolenja ter zavnitev

presadka (8). Glede na to, da kemokine in njihove receptorje povezujemo s številnimi patološkimi stanji, je raziskovanje strukture in delovanja le-teh bistvenega pomena.

1.3 MONOCITNI KEMOTAKTIČNI PROTEIN 1 (MCP-1/CCL2)

Monocitni kemotaktični protein 1 (MCP-1) je kemokin, ki ga uvrščamo v skupino CC-kemokinov, zato ga lahko označujemo tudi s kratico CCL2 in je prvi odkriti humani kemokin znotraj omenjene skupine (8). Poleg MCP-1 med monocitne kemoatraktivne proteine prištevamo še štiri kemokine, in sicer **MCP-2** (CCL8), **MCP-3** (CCL7), **MCP-4** (CCL13) in **MCP-5** (CCL12) (9). Znotraj vseh naštetih kemokinov je največ pozornosti raziskovalec pritegnilo delovanje MCP-1, saj ima le-ta ključno vlogo kot kemoatraktant monocitov, limfocitov T in naravnih celic ubijalk, obenem pa je kemokin MCP-1 udeležen tudi pri številnih vnetnih in avtoimunskih boleznih (5, 7) ter tako predstavlja enega najpomembnejših kemokinov skupine CC. Za delovanje MCP-1 je ključnega pomena njegova vezava na ustrezni kemokinski receptor, in sicer se MCP-1 lahko veže na dva receptorja - CCR2 in CCR11 - a je bistvenega pomena predvsem vezava na CCR2, pri čemer pride do aktivacije kemotakse in migracije monocitov (7, 8, 10). CCR2 je kemokinski receptor, ki ga uvrščamo med z G-proteinom sklopljene receptorje (GPCRs) oz. t.i. 7-transmembranske receptorje, ki predstavljajo največjo skupino membranskih proteinov v človeškem genomu in eno najpomembnejših prijemališč za načrtovanje zdravilnih učinkovin (7, 10, 11). Receptor sestavlja sedem hidrofobnih transmembranskih regij z znotrajceličnim C-koncem ter zunajceličnim N-koncem

CCR2 izražajo številne celice: monociti, nezrele dendritične celice, aktivirani limfociti T, bazofilci ter endoteljske celice in celice gladkih mišic v žilni steni (7). Receptor CCR2 lahko razdelimo v dve skupini, CCR2A in CCR2B. Skupini se razlikujeta v C-koncu in glede na to, katere vrste celic ju izražajo. CCR2A izražajo predvsem mononuklearne celice in gladke mišične celice, medtem ko je za aktivirane naravne celice ubijalke in monocite značilna B-izooblika receptorja. Receptor CCR2 je odgovoren tako za provnetne kot tudi za protivnetne učinke v odvisnosti od tega, katere vrste celic ga izražajo oz. izločajo. Tako je provnetno delovanje receptorja povezano z njegovim izražanjem na površini antigen-predstavljivih celic in T-celic. Protivnetni učinki pa so omejeni na izražanje CCR2 na površini regulatornih celic T (8).

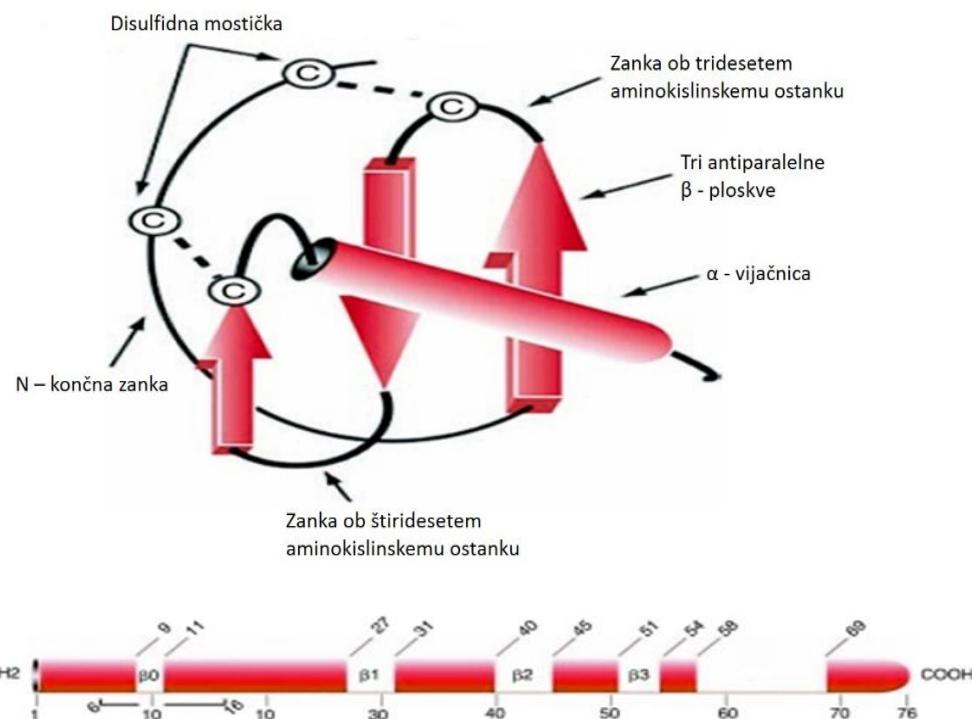
Kljub temu da se na receptor CCR2 lahko vežejo tudi drugi kemokini, npr. CCL7, CCL8 in CCL13, je za rekrutacijo monocitov bistvena vezava CCL2 (7). Po vezavi MCP-1 na

transmembranski receptor CCR2 pride do konformacijske spremembe receptorja in s tem do aktivacije proteina G, kar omogoča prenos zunanjega signala v celično notranjost. V neaktivnem stanju je na heterotrimerni (sestavlja ga tri podenote: α , β , γ) protein G vezan gvanin difosfat (GDP), ki se ob aktivaciji proteina zamenja z gvanin trifosfatom, pri čemer podenota α oddisocira, ločeni podenoti α in $\beta\gamma$ pa nato lahko aktivirata ali inhibirata encime oz. ionske kanalčke in s tem povzročita prenos signala oz. migracijo imunskih celic v smeri kemokina (8, 12). Za sprožitev migracije celic v smeri kemotaktičnega gradiента je bistvenega pomena sprostitev podenote $\beta\gamma$, kar omogoča direktno aktivacijo fosfolipaze C. Aktivirana fosfolipaza C sproži nastanek inozitol trifosfata in diacil glicerola, kar vodi do sproščanja znotrajceličnega kalcija in aktivacije protein-kinaze C (10, 12). Signali, ki jih sprožijo kemokinski receptorji, so zelo kratki in prehodni, delovanje receptorja pa se prekine s fosforilacijo C-konca receptorja ter homologno in heterologno desenzitizacijo (10).

CCL2 izločajo monociti, endotelijске in epitelijске celice, fibroblasti, celice gladkih mišic, astrociti in makrofagi. Nastajanje proteina lahko poteka ves čas, ali pa ga izzovejo citokini, rastni hormon ali oksidativni stres (8). Različni mediatorji (molekule) lahko stimulirajo ali pa inhibirajo sproščanje CCL2. Inhibicijo sproščanja povzročajo estrogen, retinojska kislina in glukokortikoidi, nasprotno pa inducirajo sproščanje dejavnik tumorske nekroze α , interferon γ , stresni in trombocitni rasni dejavnik (10, 13). Monocitni kemotaktični protein 1 je vključen v številna patološka stanja: astma, glomerulonefritis, revmatoidni artritis, ateroskleroza, multipla skleroza, bolezni srca in ožilja, ter celo rakava obolenja, obenem pa je ključni dejavnik pri procesu vnetja in igra ključno vlogo pri imunskemu odzivu (7, 8, 14).

Molekulska masa kemokina CCL2, glede na prisotnost O-glikozilacije, znaša 9 oz. 13 kDa, protein pa sestavlja 76 aminokislinskih ostankov. Gen, ki kodira CCL2, se nahaja na kromosому 17 (8). Z uporabo jedrske magnetne resonanse (NMR) in rentgenske difrakcije so ugotovili, da je prostorska struktura kemokina CCL2 sorodna strukturam ostalim kemokinom, in sicer jo tvorijo N-končna zanka, omejena z disulfidno vezjo, ki jo tvorita cisteina ter C-končna vijačnica α , ki prekriva tri antiparalelne ploščice β (slika 2). Sekundarno strukturo proteina tvorijo štiri regije plošč β , ki obsegajo določene aminokislinske ostanke: 9–11 ($\beta 0$), 27–31 ($\beta 1$), 40–45 ($\beta 2$) in 51–54 ($\beta 3$), poleg tega pa še C-končna vijačnica, ki obsega aminokislinske ostanke 58–69 (8) (slika 2). Raziskave so

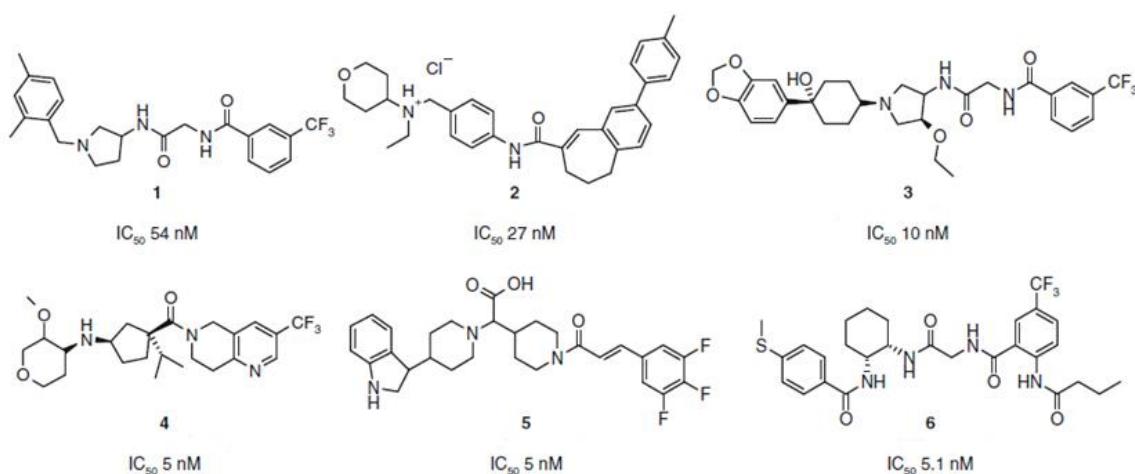
pokazale, da je N-končni del proteina odgovoren za njegovo biološko aktivnost, prvih šest aminokislinskih ostankov, s poudarkom na Asp-3, pa je ključnih za aktivacijo kemotakse. Aminokislina na mestu 1 omogoča direktno vezavo na receptor CCL2, obenem pa so aminokislinski ostanki 7-10 odgovorni za sprožitev desenzitizacije. Za ugotavljanje *in vivo* delovanja CCL2, so znanstveniki v preteklosti uporabili številne živalske modele, najpogosteje miši, ki so jim izbili gen za CCL2. Rezultati so pokazali, da v takih primerih ne prihaja do pravilnega rekrutiranja monocitov na mesto vnetja, s čimer je bila dokazana vloga kemokina v vnetnem procesu in s tem njegova primarna biološka funkcija (14).



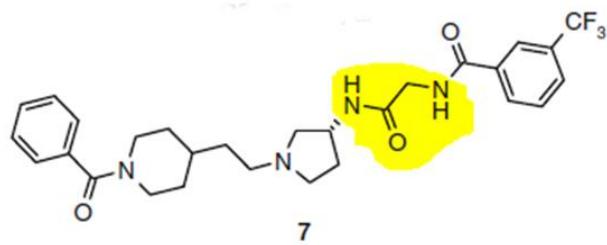
Slika 2: Zgoraj: shema terciarne strukture MCP-1. Spodaj: sekundarna struktura CCL2 (prirejeno po S2).

Kot že omenjeno, sta kemokin CCL2 in njegov receptor CCR2 vključena v patofiziologijo številnih vnetnih in avtoimunskih bolezni, zato se je izkazalo, da ima blokiranje oz. preprečevanje vezave CCL2 na receptor CCR2 precejšen terapevtski potencial pri zdravljenju omenjenih bolezni. Danes je poznanih več različnih struktur antagonistov CCR2 (prikazano na sliki 3). V raziskavi, ki jo opisujejo Kim in sodelavci (7), je najbolj učinkovit antagonist, ki se z največjo afiniteto veže na receptor in tako povzroči inhibicijo kemotakse, spojina številka 7 (slika 4). Do informacij o tem, kateri aminokislinski ostanki receptorja so ključni za interakcijo z antagonistimi, pridemo s pomočjo mutageneze samega receptorja. Rezultati izvedenih mutagenez so pokazali, da je interakcija molekule

antagonista z aminokislinskim ostankom Glu291 neizogibna, če želimo doseči antagonistično delovanje. Prav tako so za vezavo antagonistov zelo pomembne interakcije s Tyr120, His121 in Thr292, medtem ko so interakcije z ostalimi deli receptorja (npr. Tyr49, Gln288) odvisne od vrste antagonistov. Pri tovrstnih raziskavah velikokrat določamo tudi IC₅₀-vrednost antagonistov, in sicer spremljamo njeno spremenjanje glede na izvedeno mutacijo in tako določimo pomembnost posameznih aminokislinskih ostankov receptorja za vezavo antagonistov (7).



Slika 3: Strukture znanih antagonistov receptorja CCR2 (prirejeno po S3).



Slika 4: Antagonist številka 7. Rumeno: glicinamid (prirejeno po S3).

Kljub temu da dandanes poznamo že veliko struktur sinteznih antagonistov CCR2, pa jih je večina še v fazi razvoja zdravilnih učinkovin. V raziskovalne namene uporabljajo večinoma nevtralizacijska protitelesa in pa nekatere biološke antagoniste.

Da bi razumeli, kako se protein CCL2 veže na svoj receptor CCR2, so znanstveniki v preteklosti naredili več raziskav, s pomočjo katerih so identificirali aminokislinske ostanke, ki so esencialni za vezavo na CCR2 in njegovo aktivacijo (5, 15). Do želenih ugotovitev so prišli z izvedbo mutageneze receptorja in CCL2. Pri slednjem so vse površinsko izražene aminokislinske ostanke nadomestili (substituirali) z aminokislino alanin, nekatere pa so zamenjali tudi z drugimi aminokislinami, s čimer so preučili vpliv naboja, hidrofobnosti in velikosti posameznega aminokislinskega ostanka za vezavo na receptor. Nekateri eksperimenti so bili izvedeni tudi tako, da so ohranili samo N-končni del receptorja (izrazili so ga kot membransko vezan fuzijski protein) in tako preverili sposobnost vezave CCL2, medtem ko so ostali del receptorja odstranili (15). Ugotovitve, ki so doprinesle k razumevanju vezave CCL2 na CCR2, so naslednje:

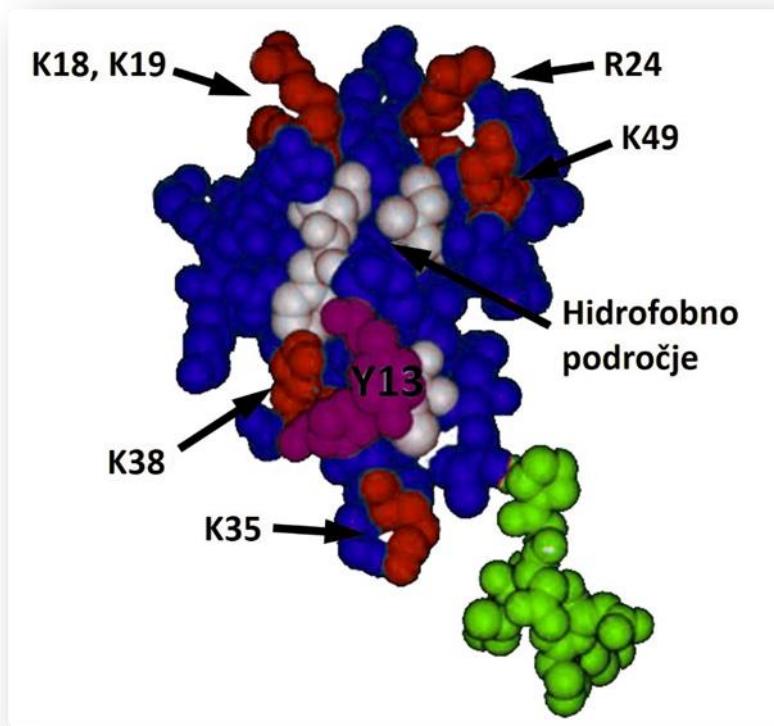
- aminokislinski ostanki C11, F15, T16 in I51 CCL2 se neposredno vežejo na N-konec receptorja,
- zgoraj omenjeni AK-ostanki tvorijo skupaj z Y13 in P37 hidrofobno področje, ki ločuje dva skupka bazičnih AK (K18, K19, R24, K35, K38, K49),
- prvih 35 aminokislinskih ostankov (večinoma so negativno nabiti) na N-končnem delu receptorja je ključnih za visoko afiniteto vezave proteina,
- podatki NMR-študij kažejo, da N-končni del receptorja vstopa v interakcije z izredno obširno površino MCP-1,
- aminokislinski ostanki na N-koncu CCL2 ne vplivajo bistveno na afiniteto vezave, temveč so bistveni pri prenosu signala, obenem je bistvenega pomena dolžina polipeptidne verige, ne pa točno zaporedje ostankov,
- večina točkovnih mutacij v CCL2 nima bistvenega vpliva na sposobnost vezave,
- bistvenega pomena za vezavo je Y13, saj zamenjava z A doprinese k zmanjšanju afinitete vezave proteina,
- zamenjava R24A ima drugi največji vpliv na zmanjšanje afinitete vezave proteina, prav tako na zmanjšanje vpliva mutacija K49A,
- zmenjava Y13 s Phe, ne spremeni afiniteto vezave,
- substitucija Y13 z večjim (Trp), bolj polarnim aromatičnim (His) aminokislinskim ostankom ali substitucija v Leu, zmanjša afiniteto vezave za faktor 4-22,
- mutacije v zanki ob tridesetem AK-ostanku (K35A, K38A, P37A) zmanjšajo afiniteto vezave za faktor 10; mutacija K35E povzroči bistveno večje zmanjšanje

afinitete, kar kaže na to, da je K35 verjetno vključen v elektrostatske interakcije z receptorjem,

- posamezne točkovne mutacije D3A, I5A, N6A, ne vplivajo v večji meri na spremembo interakcije CCL2 s CCR2, večji vpliv ima le mutacija I5P,
- mutacije znotraj samega receptorja so pokazale, da sta za interakcijo CCR2 CCL2, pomembna AK-ostanka D25 in D27,
- prav tako sta za prenos signala pomembna C32 in C277, ki se nahajata na receptorju. Zamenjava teh cisteinov v alanin povzroči zmanjšanje intenzitete signala receptorja, saj ne nastane disulfidna vez, kar vodi v zmanjšanje afinitete vezave CCL2,
- prevladujoče interakcije med CCR2 in CCL2 so elektrostatske in hidrofobne,
- pomembno je tudi dejstvo, da se CCL2 veže na zunajcelično regijo receptorja in ne na odprtino iz zank (5, 15, 16).

Na sliki 5 so shematsko predstavljeni bistveni deli CCL2, in sicer:

- rdeče: bazični AK-ostanki K18, K19, R24, K35, K38 in K49,
- zeleno: N-končni del kemokina,
- vijoličasto: Y13 in P37, ki tvorita hidrofobno področje,
- sivo: AK-ostanki C11, F15, T16 in I51, ki vstopajo v interakcijo z receptorjem.



Slika 5: Shematski prikaz strukture MCP-1 (prirejeno po S4).

Z izvedbo številnih eksperimentov v preteklih letih so znanstveniki uspeli identificirati aminokislinske ostanke, ki vstopajo v interakcijo z receptorjem, a kljub temu spoznanje o tem, kako natančno se kemokini vežejo na receptor in na kakšen način sprožijo njegovo aktivacijo, še ni popolnoma jasno raziskano (5).

Protein CCL2 ima v našem organizmu dvojno vlogo: vključen je v patologijo številnih bolezni, obenem pa ima glavno funkcijo pri imunskega odziva, je namreč eden ključnih dejavnikov pri iniciaciji vnetnega procesa in tako bistven pri prebolevanju virusnih okužb (10, 13). CCL2 z vezavo na receptor povzroči migracijo in aktivacijo celic, ki so vključene v vnetni proces ter tako omogoči prihod celic na mesto vnetja - največkrat monocitov, kjer poskrbijo za odstranitev vdirajočih mikrobov oz. vnetnih agensov. V času vnetja je v prizadetem tkivu prisoten CCL2, prav tako pa so prisotni še nekateri drugi kemokini (10).

CCL2 je udeležen tudi pri miokardnem infarktu, in sicer je znotraj 24 ur po infarktu povišana njegova serumska vrednost, obenem so povišane koncentracije prisotne tudi pri poškodbah pljuč, jeter in ledvic. Povečane koncentracije kemokina v sinovialni tekočini lahko kažejo na prisotnost nekaterih avtoimunskih bolezni, največkrat so pokazatelj različnih vrst artritisa (13). CCL2 prisostvuje tudi pri nekaterih alergijskih stanjih, še

posebej pri astmi, pri čemer najdemo v epiteliju bronhijev povišane koncentracije le-tega (8, 10).

Številne študije kažejo, da je povečano izražanje kemokina CCL2 prisotno tudi pri nekaterih rakavih obolenjih, kot so gliom, rak dojke in jajčnikov. Novejše študije kažejo, da imajo kemokini in njihovi receptorji velik vpliv na patogenezo rakavih obolenj, domnevajo celo, da imajo kemokini tako protumorne kot tudi protitumorne lastnosti. Ker imajo sposobnost aktivacije limfocitov, lahko spodbudijo protitumorne odgovore, nasprotno pa so vključeni tudi v angiogenezo, kar lahko povzroči razvoj in rast tumorjev (8, 10).

Raziskan je bil tudi vpliv prisotnosti CCR2 in CCL2 na pojav debelosti. Dokazali so, da kemokin in njegov receptor sodelujeta pri procesu adipogeneze, kar vodi v debelost in pogosto tudi v razvoj diabetesa tipa II. Pri bolnikih, ki so močnejše postave, pogosto najdemo povišane plazemske vrednosti omenjenega kemokina, prav tako pa je opazno tudi prekomerno gensko izražanje samega proteina in receptorja (17).

CCR2 in CCL2 sta pomembna dejavnika pri razvoju številnih bolezni, zato predstavljata pomembni tarči za razvoj novih zdravilnih učinkovin, predvsem protitumornih zdravilnih učinkovin in zdravilnih učinkovin za preprečevanje srčnega infarkta in vnetnih bolezni.

1.4 NEVTRALIZACIJSKA PROTITELESA

Protitelesa (Ab) imenovana tudi imunoglobulini (Ig) so glikoproteinske molekule, ki so pomemben sestavni del imunskega sistema. Sintetizirajo se v celicah imunskega sistema – aktiviranih limfocitih B (plazmatkah), njihov nastanek pa je povezan z vdorom mikroorganizmov v človeški organizem. Osnova za aktivacijo imunskega sistema je reakcija protitelesa s tujim antigenom, tj. molekulo, ki sproži specifičen imunski odziv (nastanek protiteles, toleranco, celično posredovano imunost). Protitelesa so v različnih telesnih tekočinah, kot so kri, sluz, solze, slina, urin in mleko doječe matere. Imunoglobulini imajo simetrično zgradbo, in sicer so sestavljeni iz dveh luhkih in dveh težkih polipeptidnih verig, ki so povezane z disulfidnimi vezmi. Glede na vrsto težke verige poznamo več razredov protiteles (G, M, A, D in E). Tako težko kot tudi lahko verigo sestavlja konstantna in variabilna področja, slednja predstavljajo vezavno mesto za antigen in imajo večjo raznolikost aminokislinskega zaporedja kot pa konstantna področja. Tridimenzionalna zgradba protiteles je v obliki črke »Y«, a le-ta med cepitvijo s

papainom razpade na dva fragmenta Fab (angl. *Fragment Antigen Binding*) in en fragment Fc (angl. *Fragment Crysallizable*) (2, 18, 19, 20).

Protiteesa imajo v našem organizmu dve poglavitni funkciji, in sicer:

- neposredno vezavo antigena, kar povzroči delitev in diferenciacijo limfocitov B z ustreznimi specifičnimi protitelesi. Tako nastanejo plazmatke in spominske celice.
- efektorske funkcije: večino funkcij protiteles posredujejo Fc regije, ki se vežejo z receptorji na različnih celicah in so specifične za razred. Ker lahko v limfocitih B pride do preklopa težke verige, se posledično enaka specifičnost za antigen izraža v različnih razredih (2, 18).

Poleg opisanih funkcij imajo nekatera protiteesa tudi sposobnost zmanjšati ali celo popolnoma blokirati delovanje tarčnega antiga (18). Tako delujoča protiteesa imenujemo **nevtralizacijska protiteesa**, ki jih poleg v terapevtske namene, velikokrat uporabljamo tudi v eksperimentalne namene. Uporabljamo jih namreč lahko kot tarče v postopku afinitetne selekcije in s tem pridobimo podatke o aminokislinskem zaporedju peptidov, ki posnemajo dele proteinov, ki vstopajo v interakcije z receptorji (14).

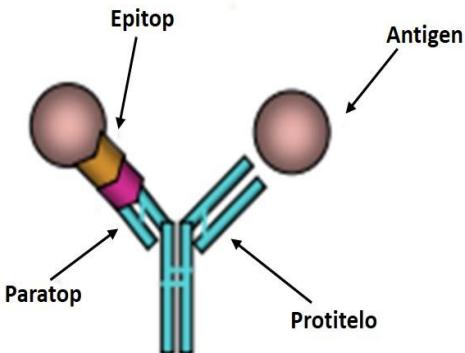
Glede na to, ali protiteesa izdeluje eden ali več klonov limfocitov B, poznamo monoklonska in poliklonska protiteesa. Slednja so pridobljena iz več klonov celic in so sposobna vezave na več epitopov antiga. Monoklonska protiteesa so produkt enega samega klena limfocitov B in se vežejo zgolj na en epitop. Njihova bistvena prednost je v definirani specifičnosti in možnosti pridobivanja v neomejenih količinah (18, 21).

1.5 METODE KARTIRANJA EPITOPOV (angl. *epitope mapping*)

Molekule protiteles in antigenov imajo na svoji površini posebna mesta namenjena vezavi, torej ni nepomembno, s katerim delom se medsebojno vežejo.

Epitopi (antigenske determinante) so strukturno definirana mesta na antigu, s katerimi se veže paratop protiteesa. Paratopi so predeli protiteesa, ki so odgovorni za vezavo na epitop in se nahajajo v fragmentu Fab, in sicer v variabilnih regijah težke in lahke verige. Vezava antiga na protitelo je predstavljena na sliki 6. Aminokislinska zaporedja hipervariabilnih regij so tako bistvenega pomena za specifičnost vezave antiga, a kljub temu na vezavo vplivajo tudi ogrodni deli vezilča. Makromolekule antiga so večinoma veliko večje od paratopa protiteesa, posledično se protitelo ne more vezati na celoten

antigen. Epitop, na katerega se veže protitelo, v glavnem sestavlja zgolj pet ali šest aminokislinskih ostankov, zato imajo po navadi proteini na svoji površini več različnih epitopov, ki jih prepoznavajo in vežejo različna protitelesa (2, 22).



Slika 6: Prikaz vezave antiga in protitelesa (prirejeno po S5).

Epitope lahko razdelimo v dve skupini glede na razporeditev aminokislinskih ostankov. Poznamo linearne in konformacijske epitope. **Linearne** epitope tvorijo zaporedni aminokislinski ostanki, determinante pa so v nativni konformaciji večinoma nedostopne in se pojavijo samo v denaturirani obliki proteina. Druga skupina so **konformacijski** (sterični) epitopi, ki so sestavljeni iz aminokislinskih ostankov, ki so v primarni strukturi lahko daleč narazen, a se z zvitjem polipeptidne verige v značilno prostorsko konformacijo močno približajo drug drugemu, kar omogoči, da jih protitelo prepozna kot enoten epitop (2, 22, 23).

Tako linearni kot tudi konformacijski epitopi zagotavljajo dragocene informacije o preprečevanju nekaterih vrst bolezni, zdravljenju in diagnosticiranju le-teh, prav tako pa lahko s proučevanjem epitopov pridobimo informacije o strukturi samega proteina in njegovih interakcijah z drugimi biološkimi molekulami. Skozi čas so se tako razvile številne metode proučevanja oz. raziskovanja epitopov. Sam postopek, pri katerem želimo določiti epitop antiga, s katerim se veže protitelo, imenujemo **kartiranje** (23, 24).

1.5.1 RENTGENSKA KRISTALOGRAFSKA DIFRAKCIJA IN NMR

Rentgenska kristalografska difrakcija je metoda, ki predstavlja »zlati standard« za določanje strukture antigenskih determinant in velja kot metoda izbora. Predpogoj za izvedbo rentgenske difrakcije je tvorba kompleksa (kristala) antigen-protitelo, ki ga pridobimo s postopkom kokristalizacije. Epitop, ki ga želimo identificirati, v bistvu

predstavlja nekakšen vmesnik med antigenom in protitelesom. Pridobljeni kristal obsevamo z rentgenskimi žarki, ki se pri prehodu skozi kristal zaradi njegove ponavljajoče urejene strukture uklanjajo in tako na detektorju tvorijo difrakcijski vzorec. Sledi obdelava podatkov, kjer najprej izmerimo intenziteto in položaj lis ter določimo dimenzijske osnovne celice. Nato lahko z uporabo zapletenih matematičnih algoritmov, ki so vgrajeni v računalniške programe, izračunamo karto elektronske gostote, ki nam da podatke o tem, kje se nahajajo elektroni, iz česar sklepamo na prostorske koordinate posameznih atomov. Kljub temu da metoda ponuja zelo zanesljive rezultate, je tudi izredno zahtevna in nepredvidljiva. Poleg rentgenske difrakcije lahko za identifikacijo epitopov uporabimo tudi NMR (nuklearno magnetno resonanco). Gre za spektroskopsko metodo, pri kateri na strukturo snovi sklepamo na osnovi magnetnih interakcij atomskega jedra z okolico. Valovna dolžina elektromagnetnega valovanja, ki jo določeno jedro absorbira, je odvisna od lege samega jedra, dobljeno dolžino pa moramo nato primerjati še z valovno dolžino standarda. Tako lahko metodo NMR uporabljam tudi v postopku kartiranja, kjer pridobimo atomsko zgradbo antigenske determinante (18, 24).

1.5.2 MUTAGENEZA

Za namene kartiranja poleg spektroskopskih metod uporabljam tudi druge vrste metod. Tehnično najenostavnnejši postopek kartiranja epitopov je t.i. mestno-specifična mutageneza. Pristop temelji na spremembi aminokislinskega zapisa antiga, pri čemer obstoječo aminokislino zamenjam z drugo. Z nadaljnjam testiranjem lahko opazujemo morebitno spremembo sposobnosti vezave modificiranega antiga s protitelesom. Zmanjšanje afinitete vezave kot posledica zamenjave nativnega aminokislinskega ostanka nakazuje na to, da spremenjeni aminokislinski ostanek najverjetneje sodeluje pri tvorbi epitopa. Uporaba mutageneze nam omogoča proučevanje velikega števila proteinov. S posameznimi zamenjavami aminokislin lahko pridobimo podatke tako o strukturi kot tudi funkciji proteinov. Kljub temu da opisana metoda ne zahteva najvišjega nivoja strokovnega znanja in drage opreme, jo le redko uporabljam kot samostojno metodo. Največkrat jo uporabljam v kombinaciji z rentgensko difrakcijo, kar omogoča lažje interpretiranje rezultatov in pravilnejšo identifikacijo aminokislinskih ostankov epitopa (24, 25).

1.5.3 METODA PRIPRAVE SINTETIČNIH PEPTIDOV

Leta 1984 je profesor Geysen s sodelavci predstavil novo metodo kartiranja epitopov, ki so jo poimenovali »Pepscan« (24). V principu metoda temelji na kemijski sintezi

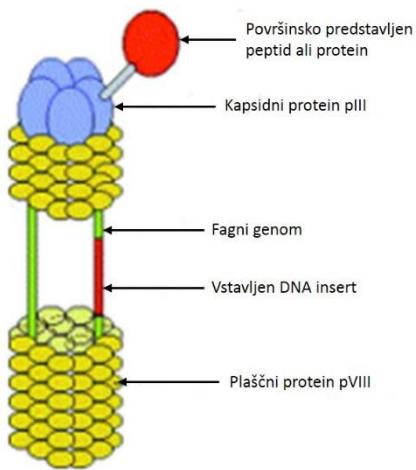
prekrivajočih se peptidov, ki zajemajo celotno zaporedje antigena, ki ga preučujemo. Sinteza peptidov (dolžine med 6 in 18 aminokislin (26)) poteka na trdnem polimernem nosilcu. Tako pripravljenim sinteznim peptidom moramo nato še preveriti sposobnost vezave na tarčno protitelo, kar naredimo z encimskoimunskim testom (ELISA). S pomočjo znanega aminokislinskega zaporedja sinteznih peptidov, lahko določimo zaporedje epitopa, ki ga prepozna tarča (monoklonsko ali poliklonsko protitelo). Poleg sinteznih peptidov lahko pripravimo tudi fuzijske proteine. Ker moramo sintetizirati veliko peptidov, je metoda draga in zahteva veliko mero natančnosti, zato jo je v zadnjem času nadomestila metoda predstavitve na bakteriofagu, prav tako je potrebno upoštevati omejenost metode na identifikacijo zgolj linearnih epitopov (24, 26, 27, 28).

1.5.4 AFINITETNA SELEKCIJA PEPTIDOV IZ BAKTERIOFAGNIH PREDSTAVITVENIH KNJIŽNIC

Bakteriofagi ali krajše fagi, so bakterijski virusi, ki inficirajo bakterijske celice in za pomnoževanje svoje nukleinske kisline uporabljajo bakterijske replikacijske mehanizme (18). Fagi so preprosti virusi, ki se med seboj razlikujejo po obliki in velikosti, vsi pa so zgrajeni iz nukleinske kisline-imajo lahko enoverižno ali dvojerižno DNA ali RNA, ki se lahko nahajata bodisi v linearni bodisi v ciklični obliki, ki jo obdaja proteinski plašček. Bakteriofagov je veliko več, kot je samih bakterij, a velja, da so fagi specifični ne samo za posamezno bakterijo, temveč tudi za posamezen sev (18, 29).

George Smith je leta 1985 opisal tehniko predstavitve na bakteriofagu (angl. *phage display*), ki omogoča izražanje eksogenih peptidov ali celo polipeptidov, na površini kapside uporabljenega bakteriofaga (30). Izražanje dosežemo s tehnologijo rekombinantne DNA, pri čemer v gen za kapsidni strurni protein vključimo gen, ki kodira tuj peptid ali protein. V procesu predstavitve na bakteriofagu največkrat uporabljamo filamentne oz. nitaste fage, in sicer najpogosteje fag M13 (shematsko je predstavljen na sliki 7), ki vsebuje enoverižno DNA. Slednji kot gostitelja uporablja tiste seve bakterije *E. coli*, ki imajo poseben F-pilus, s katerim se veže N-konec kapsidnega proteina pIII, kar omogoči okužbo bakterij in posledično vstop virusnega genskega materiala v gostiteljske celice. Ker je M13 nitasti bakteriofag, le-ta svoje DNA ne vgradi v genom gostitelja, temveč DNA služi kot matrica za sintezo novih samostojnih virusnih delcev, ki prehajajo celično membrano. Pri tem se bakterijske celice ne poškodujejo in so sposobne nadaljnje delitve, ki pa je počasnejša. Rezultat okužbe bakterij z virusi je nastanek velikega števila

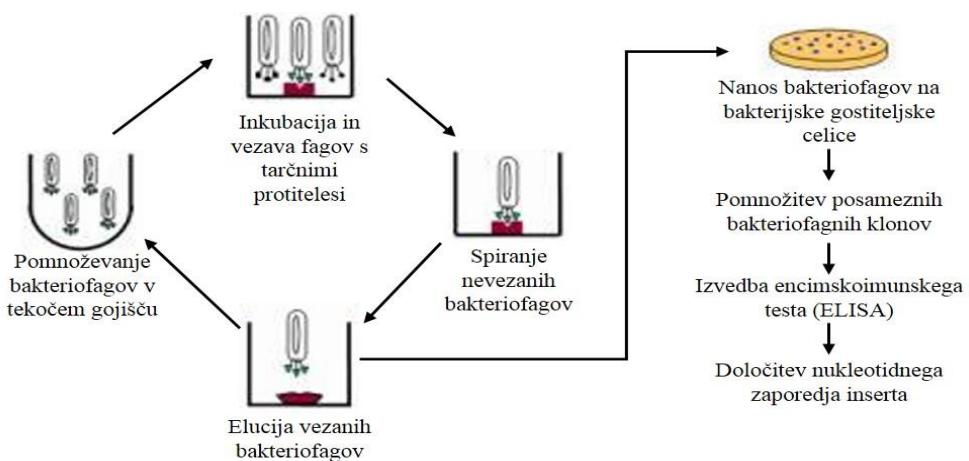
bakteriofagnih klonov, ki na svoji površini izražajo popolnoma enake peptide ali proteine. Ti so običajno v obliki fuzijskih proteinov povezani s proteinoma pIII (prisoten je v petih kopijah) ali pVIII (prisoten je v več kot dva tisoč kopijah) (18, 27, 28, 30, 31).



Slika 7: Shematski prikaz strukture bakteriofaga M13 (prirejeno po S6). Rdeče je označen vstavljen fragment DNA, ki kodira na površini izražen peptid ali protein. Z modro je označen kapsidni protein pIII, ki je prisoten v petih kopijah. Rumena barva označuje plaščni protein pVIII, ki je prisoten v več tisoč kopijah. Zeleno je upodobljen genom bakteriofaga.

S tem ko v vsak bakteriofagni vektor vstavimo drugačen segment DNA, omogočimo, da vsak izmed fagov na svoji površini predstavi različne peptide (tj. peptide z različnim aminokislinskim zaporedjem). Nabor mnogih bakteriofagov, vsak z vstavljenim drugačnim genskim zapisom (insertom) za protein ali peptid, ki ga vstavimo v fagno DNA, imenujemo bakteriofagna knjižnica. Konstrukcija bakteriofagnih knjižnic poteka s pomočjo fagnih vektorjev, v katere na 5'-konec gena za protein pIII ali pVIII vstavimo oligonukleotid, katerega zaporedje nukleinskih baz je popolnoma naključno. Posledično se na površini fagov lahko izrazijo peptidi z najrazličnejšimi aminokislinskimi zaporedji. Povezava med v genomu kodiranim nukleotidnim zaporedjem (genotip) in aminokislinskim zaporedjem peptida (fenotip) omogoča izolacijo in identifikacijo tistih bakteriofagov, ki so sposobni prepoznavati in vezati tarčo. Postopek izolacije specifičnih bakteriofagov iz bakteriofagnih predstavitev knjižnic imenujemo **afinitetna selekcija** (angl. *biopanning*) (24, 30, 31).

Afinitetna selekcija je metoda, ki nam omogoča, da iz množice bakteriofagnih klonov, izselekcioniramo tiste, ki na svoji površini predstavljajo tarčno-specifične peptide (t.j. peptide z afiniteto do tarčne makromolekule). Postopek afinitetne selekcije v glavnem predstavlja trije bistveni koraki (30): a.) imobilizirana tarčna protitelesa inkubiramo z bakteriofagi bakteriofagne knjižnice; b.) nevezane bakteriofage odstranimo z večkratnim spiranjem; c.) vezane bakteriofage eluiramo in pomnožimo v gostiteljskem bakterijskem sevu. Če želimo izolirati peptide z visoko afiniteto do tarčnega proteina, moramo praviloma izvesti najmanj tri selekcijske stopnje. V prvo stopnjo selekcije vnesemo največje število različnih bakteriofagov, v vsako naslednjo stopnjo pa vnesemo eluirane bakteriofage iz predhodne selekcijske stopnje, ki smo jih pomnožili in tako pridobili veliko kopij posameznega bakteriofagnega klena (pravimo, da smo posamezne klone obogatili). Končni rezultat, ki si ga pri tej metodi želimo, je, da zaradi zaostrovanja selekcijskih pogojev pridobimo bakteriofagne klone z želenimi lastnostmi - torej le tiste, ki dejansko prepoznavajo izbrano tarčo in se nanjo vežejo ter tako posnemajo strukturo epitopa tarčnega protitelesa. Na koncu posamezne vezalce identificiramo s presejalnim testom, ki sloni na prirejenem encimskoimunskega testu. (28, 31). Ko pridobimo aminokislinska zaporedja peptidnih mimetikov epitopa (mimotopi) (nanje sklepamo na osnovi nukleotidnega zaporedja insertov), jih primerjamo z zaporedji določenih odsekov antiga. Če zaznamo ujemanje, lahko identificiramo epitop uporabljenega protitelesa (24). Potrebno pa se je zavedati, da moramo izbrati optimalno število selekcijskih ciklov, saj lahko s prevelikim številom selekcijskih stopenj izgubimo želeno raznolikost struktur peptidnih ligandov, tj. obogatimo en sam klon. Celoten potek afinitetne selekcije je predstavljen na sliki 8.



Slika 8: Prikaz poteka afinitetne selekcije (prirejeno po S7).

2 NAMEN DELA

V okviru magistrske naloge bomo identificirali aminokislinske ostanke kemokina CCL2, ki tvorijo antigensko determinanto, ki jo prepozna in veže nevtralizacijsko protitelo S101. Predhodne raziskave nakazujejo, da protitelo prepoznavata konformacijski epitop.

Izhodišče eksperimentalnega dela bosta uporaba prostorske strukture MCP-1 in tehnika predstavitev na bakteriofagu v kombinaciji z afinitetno selekcijo. Pri delu bomo v postopku afinitetne selekcije peptidov iz dveh bakterofagnih predstavitvenih knjižnic (Ph.D.-C7C™ in Ph.D.-12™) skušali selekcionirati peptide, ki izkazujejo afiniteto do protitelesa S101. Pogoje afinitetne selekcije bomo prilagodili obogatitvi strukturno raznolikih peptidnih ligandov na račun nižjega izplena.

S prirejenimi encimskoimunskimi testi (ELISA) bomo skušali potrditi specifično interakcijo identificiranih peptidnih ligandov s paratopom tarčnega protitelesa. Aminokislinska zaporedja mimetikov epitopa (mimotopov) bomo nato primerjali s strukturo antiga (proteina CCL2) ter tako določili aminokislinske ostanke, ki tvorijo (konformacijski) epitop nevtralizacijskega protitelesa S101. Ker je določanje konformacijskih epitopov težavno, bomo pri delu uporabili napredna računalniška programa Pepitope in EpiSearch, ki poravnavata aminokislinsko zaporedje mimotopov s prostorsko strukturo makromolekule CCL2. Ker je protitelo S101 nevtralizacijsko, predvidevamo, da bodo med aminokislinskimi ostanki epitopa takšni, ki so ključni za vezavo CCL2 na receptor CCR2.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 KEMIKALIJE

REAGENT	PROIZVAJALEC
agar-agar	Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
agaroza	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
citronska kislina monohidrat	SERVA, Electrophoresis, Hiedelberg, Nemčija
DMF	Merck, Darmstadt, Nemčija
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
EDTA, 0,5M	Promega, Madison, ZDA
etanol, 100%	Riedel-de Haën AG, Seelze, Nemčija
glicerol	Fluka, Buchs, Švica
glicin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
HCl, 32%	Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italija
H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt, Nemčija
H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt, Nemčija
IPTG	Promega, Madison, Wisconsin, ZDA
KCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
KH ₂ PO ₄	Kemika, Zagreb, Hrvatska
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Nemčija
kvasni ekstrakt	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
MgCl ₂	Fluka Chemie, Buchs, Švica
NaCl	Merck, Darmstadt, Nemčija
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
NaI	Riedel-de Haën AG, Seelze, Nemčija
PEG-8000	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA
pepton »Bacto™ Tryptone«	Becton Dickinson and Co., Sparks, ZDA
posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne, Slovenija

REAGENT	PROIZVAJALEC
TMB	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA
Tris-HCl, 1M	SERVA Electrophoresis GmbH, Nemčija
Tween® -20	Sigma-Aldrich, Missouri, St. Louis, ZDA
X-gal	Sigma-Aldrich, St. Louis, ZDA

3.1.2 ANTIBIOTIK

ANTIBIOTIK	PROIZVAJALEC
tetraciklin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ZDA

3.1.3 BAKTERIJSKI SEV

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

3.1.4 BAKTERIOFAGNI KNJIŽNICI

KNJIŽNICA	PROIZVAJALEC
Ph.D.-12™ (naključni linearni dodekapeptidi)	New England BioLabs, Massachusetts, Ipswich, ZDA
Ph.D.-C7C™ (naključni ciklični nonapeptid CX ₇ C)	New England BioLabs, Massachusetts, Ipswich, ZDA

3.1.5 NEVTRALIZACIJSKO PROTITELO

NEVTRALIZACIJSKO PROTITELO	PROIZVAJALEC
mišje monoklonsko protitelo usmerjeno proti humanemu MCP-1 (S101)	Abcam, Cambridge, Združeno kraljestvo

3.1.6 PEPTIDI, PROTEINI

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

3.1.7 SINTEZNI OLIGONUKLEOTID

OLIGONUKLEOTID	NUKLEOTIDNO ZAPOREDJE
-96gIII	5'-CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG-3'

3.1.8 GOJIŠČA

GOJIŠČE LB

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

Vse sestavine smo natehtali ter gojišče sterilizirali z nasičeno vodno paro pri pogojih 121°C, 15 minut, nadtlak 1 bar. Avtoklavirano gojišče smo shranjevali pri sobni temperaturi. Pred uporabo smo mu dodali ustrezno količino antibiotika.

AGARNO GOJIŠČE LB

SESTAVA	KOLIČINA
pepton	4,0 g
kvasni ekstrakt	2,0 g
NaCl	2,0 g
agar-agar	6,0 g
ddH ₂ O	ad 400 mL

Gojišče smo najprej sterilizirali z nasičeno vodno paro (121°C, 15 minut, nadtlak 1 bar) ter ga nato v komori z laminarnim pretokom zraka prelili v petrijevke in odkrite pustili, da se je gojišče strdilo. Nato smo petrijevke obrnili ter počakali eno uro, da se je gojišče posušilo. Tako pripravljena gojišča smo shranjevali v hladilniku.

GOJIŠČE LB Z AGAROZO

SESTAVA	KOLIČINA
gojišče LB	40 mL
1 M MgCl ₂	197 µL
agarzoza	0,28 g

Avtoklavirano gojišče smo prelili v centrifugirke ter ga shranili pri sobni temperaturi. Pred uporabo smo gojišče raztalili v mikrovalovni pečici.

3.1.9 RAZTOPINE IN PUFRI

PBS- fosfatni pufer (pH= 7,4)

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

Pufer smo avtoklavirali in ga shranili pri sobni temperaturi. Predhodno, smo mu postopoma dodajali HCl, dokler nismo dosegli pH 7,4.

PBST- fosfatni pufer 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

Predhodno pripravljenemu pufru PBS smo tik pred uporabo dodali ustrezeno količino Tween®-a 20. Pufer smo hranili pri sobni temperaturi.

PEG/NaCl

SESTAVA	KOLIČINA
20 % m/v PEG-8000	8,0 g
2,5 M NaCl	5,85 g
ddH ₂ O	ad 40 mL

Raztopino smo sterilizirali z nasičeno vodno paro (121°C, 15 minut, nadtlak 1 bar) in jo shranjevali pri sobnih pogojih.

BLOKIRNI PUFER

1-% oz. 5%- posneto mleko v prahu v pufru PBS; pufru PBS smo dodali ustrezeno količino mleka v prahu tik pred uporabo.

1 M raztopina IPTG

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

Raztopino smo sterilizirali s filtracijo in jo shranjevali v zmrzovalniku (-20 °C).

2% raztopina X-gal

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

Raztopino smo shranjevali v zmrzovalniku (-20 °C) alikvotirano v mikrocentrifugirkah.

ELUCIJSKI PUFER (0,2 M glicin-HCl, pH = 2,2; 1 mg/mL BSA)

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

Elucijskemu pufru smo uravnali vrednost pH na 2,2, ga sterilizirali z membransko filtracijo in ga shranjevali pri sobni temperaturi.

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

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

Pufru smo uravnali pH (9,1), ga avtoklavirali ter ga shranili pri sobni temperaturi.

TRIS-PUFER Z JODIDNIMI IONI

SESTAVA	KOLIČINA
Tris	48,5 mg
0,5 M EDTA	80 µL
NaI	23,98 g
ddH ₂ O	ad 40 mL

Pufru smo uravnali pH na 8,0, ga zaščitili pred svetlobo ter shranili pri sobnih pogojih.

RAZTOPINA TETRACIKLINA (20 mg/mL)

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

Najprej smo tetraciklin raztopili v vodi in raztopino filtrirali prek membranskega filtra ter nato dodali še avtoklaviran glicerol. Raztopino smo shranili v zmrzovalniku.

PUFER ZA KROMOGENI SUBSTRAT 3,3',5,5'-TETRAMETIL BENZIDIN (TMB) (pH= 5,0)

SESTAVA	KOLIČINA
citronska kislina monohidrat	21,0 g
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	17,8 g
ddH ₂ O	1 L

Pufer smo shranjevali v hladilniku. Pred uporabo smo pufer dodali ustrezni količini TMB-ja in DMSO-ja, in sicer: 1 tablet TMB (1 mg)/1 mL DMSO, dodamo 9 mL 0,05 M pufra. Tik pred uporabo smo substratu dodali še H₂O₂ (2 µL 30% H₂O₂ na 10 mL substrata).

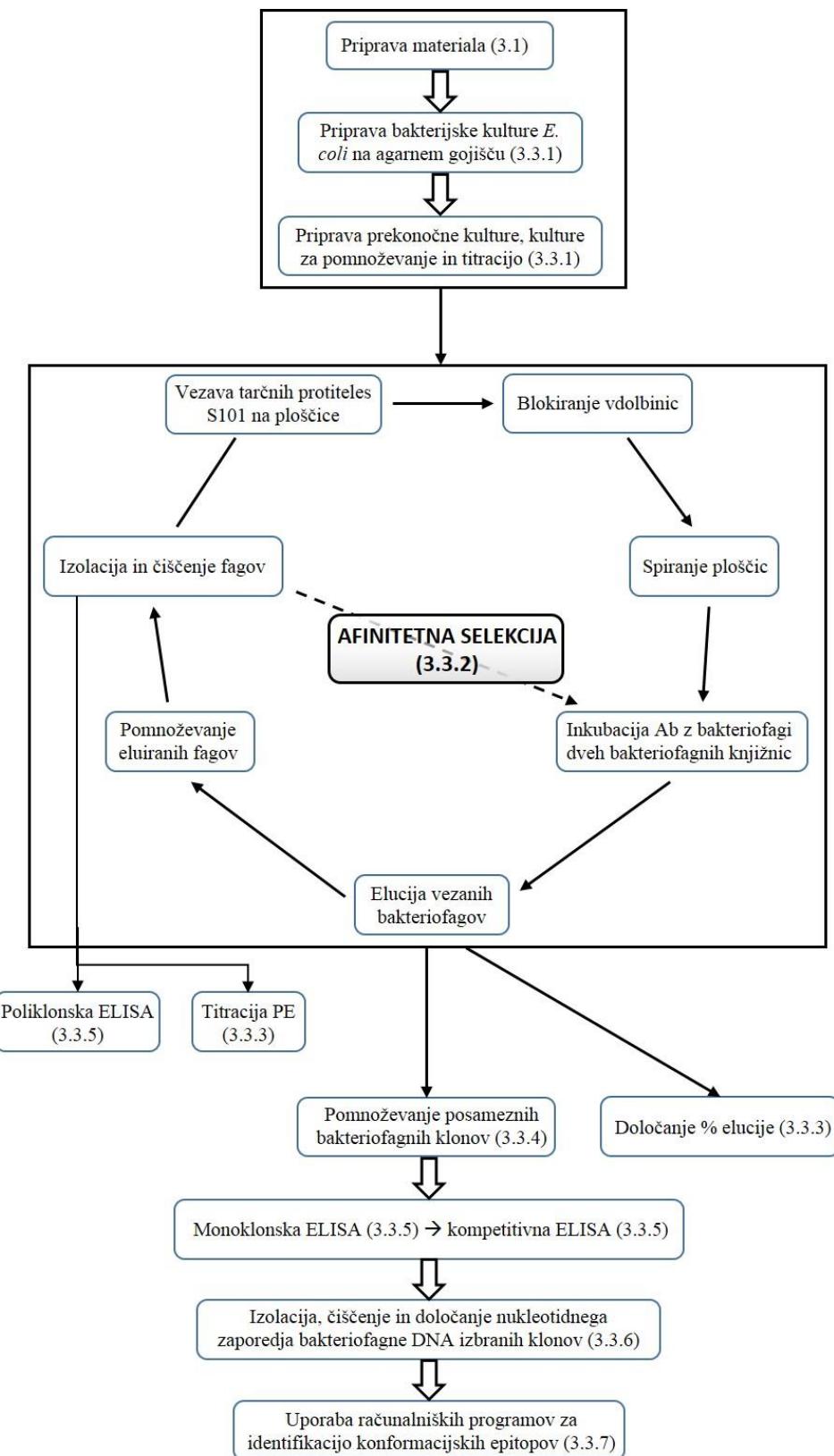
3.2 LABORATORIJSKA OPREMA

Vso laboratorijsko opremo (nastavki za pipete, steklovina, centrifugirke,..), ki je bila v neposrednem stiku z biološkim materialom, smo najprej sterilizirali z nasičeno vodno paro pod tlakom (121°C, 15 minut, nadtlak 1 bar).

OPREMA	OZNAKA	PROIZVAJALEC
analitska tehnica	AB 104	Mettler Toledo, Küschnitt, Švica
avtomatska pipeta	e1200	BioHit, Finska
avtoklav Kambič		Kambič laboratorijska oprema, Semič
avtoklav Systec	2540 EL	Systec, Wettenberg, Nemčija
centrifuga	IKA® mini G	IKA Works, Wilmington, ZDA
centrifuga	5804 R (F-34-6-38)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
centrifuga	5415 R (F-45-24-11)	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
centrifugirke	15 mL, 50 mL	TPP®, Trasadingen, Švica
hladilnik		Gorenje, Velenje, Slovenija
inkubator	WTC	Binder GmbH, Tuttlingen, Nemčija
inkubator	Unihood 650	UniEquip, München, Nemčija
LAF-komora	LFVP 12	Iskra pio, Šentjernej, Slovenija
magnetni mešalnik	Rotamix 550 MMH	Tehtnica, Železniki, Slovenija
mikrotitrskne ploščice	Module F8 MaxiSorp loose	Nunc, Roskilde, Danska
Nunc-Immuno™		
mikrovalovna pečica		LG, Seul, Južna Koreja
mikrocentrifugirke	1,5 mL; 2 mL	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Nemčija
multikanalna pipeta	M100	BioHit, Finska
nastavki za pipete	10 µl, 200 µL, 1000 µl Biosphere® (Filter) Tips	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Nemčija
parafilm	parafilm »M«® Laboratory film	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL 60631
pH meter	691	Metrohm, Herisan, Švica
pipetor	accu-jet® pro	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, Germany

OPREMA	OZNAKA	PROIZVAJALEC
pipete	0,1-2,5 µL 0,5-10 µL 10-100 µL 100-1000 µL	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
precizna tehtnica	Exacta 610 EB	Tehtnica, Železniki, Slovenija
spektrofotometer	ND-1000	NanoDrop Technologies, Delaware, ZDA
stresalnik	Vibromix 314 EVT	Tehtnica, Železniki, Slovenija
stresalnik	IKA® MS3 digital	IKA Works, Wilmington, ZDA
termoblok		
zamrzovalnik	Vip Series -86 °C	Sanyo Electric Biomedical Co., Tokio, Japonska
zamrzovalnik		Gorenje, Velenje, Slovenija

3.3 METODE



Organigram 1: Potek eksperimentalnega dela.

3.3.1 PRIPRAVA BAKTERIJSKIH KULTUR *E. COLI* (ER 2738)

➤ Precep bakterijske kulture *E. coli* ER 2738 na agarno gojišče LB

S sterilno mikrobiološko zanko smo se dotknili trajne kulture *E. coli* 2738, ki smo jo hranili v zmrzovalniku.



Bakterije smo z zanko nacepili v petrijevko z agarnim gojiščem LB, na katerega smo predhodno s spatulo po Drigalskem razmazali tetraciklin (20 µg/mL).



Petrijevke smo preko noči inkubirali pri 37 °C ter nato shranili v hladilniku (4 °C).

Tako pripravljena bakterijska kultura *E. coli*, je predstavljala izhodišče za pripravo kultur v tekočem gojišču, ki smo jih uporabili v nadaljevanju. Za pripravo kultur v tekočem gojišču smo uporabili posamezne bakterijske kolonije iz agarnega gojišča LB.

➤ Priprava prekonočne kulture, kulture za pomnoževanje in titracijo

Za nadaljnje delo smo morali pripraviti še tri vrste bakterijskih kultur, in sicer: prekonočno kulturo, kulturo za titracijo in kulturo za pomnoževanje bakteriofagov. Vse tri kulture smo pripravili po enakem postopku, razlika je bila le v volumnu pripravljenih kultur in času gojenja.

Postopek:

V gojišče LB z dodanim tetraciklinom (20 µg/mL) smo precepili posamezno kolonijo bakterije *E. coli* iz agarnega gojišča LB.



Bakterijsko kulturo smo stresali ter inkubirali pri 37 °C.

Inkubaciji prekonočne kulture in kulture za titracijo (5 mL) sta potekali čez noč, do naslednjega dne oz. do ustrezne optične gostote ($OD_{600} = 0,5$). Inkubacija kulture za pomnoževanje (20 mL) je trajala nekaj ur oz. do $OD_{600} = 0,01 - 0,05$.

3.3.2 AFINITETNA SELEKCIJA PEPTIDOV IZ BAKTERIOFAGNIH PREDSTAVITVENIH KNJIŽNIC (glej poglavje 1.5.4)

Pri afinitetni selekciji smo kot tarčno molekulo uporabili monoklonsko nevtralizacijsko protitelo S101, ki deluje proti kemokinu CCL2. Izhajali smo iz dveh bakteriofagnih knjižnic, in sicer Ph.D.-C7C™, pri kateri so na površini virusnih delcev predstavljeni

naključni ciklični heptapeptidi, ki jih z obeh strani obdajata cisteinska ostanka, in Ph.D.-12™, katerih virioni na površini predstavljajo naključne linearne dodekapeptide. Peptidi obeh knjižnic so na N-konec proteina pIII povezani preko tetrapeptidnega distančnika z zaporedjem Gly-Gly-Gly-Ser (32) (slika 9). Izvedli smo tri selekcijske stopnje, vsaka stopnja je bila sestavljena iz enakih korakov, razlika je bila le v količini dodanih bakteriofagov ter v deležu površinsko aktivne snovi v pufru za spiranje. Eluiranje bakteriofagov je bilo nespecifično s spremembjo vrednosti pH. V prvi stopnji selekcije smo dodali največjo količino bakteriofagov. Po vsaki selekcijski stopnji, smo eluirane bakteriofage še pomnožili z okužbo bakterij in tako pridobili t.i. pomnoženi eluat (PE), ki je vseboval številne kopije obogatenih bakteriofagnih klonov in ki smo ga prenesli v naslednjo selekcijsko stopnjo. Z vsako stopnjo smo nekoliko zaostrovali pogoje in tako obdržali le tiste bakteriofage, ki imajo visoko afiniteto do tarčnega protitelesa. Afinitetno selekcijo s knjižnico Ph.D.-12 smo neodvisno izvedli dvakrat.



Slika 9: Shematska zgradba uporabljenih bakteriofagnih knjižnic. **Zgoraj:** linearni dodekapeptid (X - oznaka za poljubno aminokislino), ki ga peptidni distančnik GGGS, povezuje z N-koncem proteina pIII (zeleno). **Spodaj:** Ciklični heptapeptid. Z obeh strani peptidno zaporedje sedmih animokislin obdajata cisteina, ki tvorita disulfidno vez. Distančnik (modro) povezuje peptidno zaporedje s proteinom pIII (zeleno) (prirejeno po S8).

Postopek:

VEZAVA TARČE: v dve vdolbinici mikrotitrske ploščice smo adsorbirali tarčno protitelo
 - monoklonsko nevtralizacijsko protitelo proti CCL2 S101 ($100 \mu\text{L}$ raztopine tarčnih protiteles (koncentracija: $0,5 \mu\text{g/mL}$) v pufru PBS). Ploščico smo inkubirali preko noči pri 4°C . Po inkubaciji smo vsebino vdolbinic odlili ter ju dobro osušili z udarjanjem ob papirnato brisačo.



BLOKIRANJE: prosta mesta polistirenske vdolbinice smo blokirali z $200 \mu\text{L}$ 5%-blokirnega pufra. Nato smo ploščico nežno stresali 1 uro pri sobni temperaturi.



SPIRANJE: vsebino vdolbinic smo zopet odlili ter ju sprali trikrat po pet minut s 300 µL 0,1 % PBST. S tem smo odstranili morebitna neadsorbirana protitelesa, ki bi kasneje tekmovala z imobiliziranimi protitelesi za vezavo bakteriofagov.



HIBRIDIZACIJA: v vdolbinici smo prenesli 100 µL pufra 0,1 % PBST s knjižničnimi bakteriofagi. Zelo pomembna je bila količina bakteriofagov, ki se je razlikovala glede na selekcijsko stopnjo. V prvi stopnji selekcije, smo v pufer PBS dali tolikšno količino bakteriofagov, da smo dosegli pogoj 2×10^{11} pfu/100 µL (tj. približno 150 kopij posameznega bakteriofagnega klona), v drugi stopnji smo dali tolikšno količino pomnoženega eluata iz prve stopnje, da smo dosegli titer 1×10^{11} pfu/100 µL. V tretji stopnji pa smo v pufer redčili toliko 2. PE, da je bil titer 1×10^{10} pfu/100 µL. Ploščico smo stresali eno uro pri sobni temperaturi.



SPIRANJE: vsebino vdolbinice smo odlili ter zopet spirali z 0,1 % PBST (desetkrat s po petminutnim stresanjem), v drugi in tretji selekcijski stopnji pa smo spirali z 0,5 % PBST. Tako smo odstranili nevezane bakteriofage in obdržali tiste, ki so imeli na površini izražene peptide, ki prepoznavajo tarčno protitelo.



ELUCIJA: v vdolbinici smo dodali 100 µL elucijskega pufra. Elucija je potekala natanko deset minut, nato smo vsebino vdolbinice (eluirane bakteriofage), previdno prenesli v mikrocentrifugirko, kamor smo predhodno napipetirali 30 µL nevtralizacijskega pufra.



TITRACIJA: za mikrobiološko titracijo smo porabili 1,5 µL nepomnoženega eluata (NE) (*glej poglavje 3.3.3*)



POMNOŽEVANJE: preostanek nepomnoženega eluata, smo ob ognju prenesli v predhodno pripravljeno kulturo za pomnoževanje bakteriofagov (20 mL) in stresali 4,5 ure pri 37 °C.



IZOLACIJA BAKTERIOFAGOV: Bakterijsko kulturo smo prelili v 50-mililitrsko centrifugirko in centrifugirali 15 minut pri 4 °C na 10.000 obr./min. Bakterijske celice, ki

so bile na dnu centrifugirke, smo zavrgli, supernatant, v katerem so bili fagi, pa smo prelili v novo centrifugirko, ponovno centrifugirali pri enakih pogojih in supernatant prenesli v tretjo centrifugirko, kamor smo predhodno napipetirali 1/6 celotnega volumna (približno 3,33 mL) PEG/NaCl ter dobro premešali. Bakteriofage smo nato obarjali čez noč pri 4 °C.

Oborjene bakteriofage iz prejšnjega dne smo centrifugirali (15 minut, 4 °C, 10.000 obr./min) in supernatant odlili v odpad. Preostanek supernatanta smo odstranili s pipeto in sedimentu dodali 1 mL pufra PBS ter močno premešali. S pipeto smo suspenzijo prenesli v mikrocentrifugirko in ponovno centrifugirali (5 minut, 4 °C, 13.200 obr./min), da smo odstranili preostanek bakterijskih celic oz. netopne delce. Supernatant smo nato prenesli v mikrocentrifugirko, kamor smo predhodno napipetirali 170 µL PEG/NaCl ter mikrocentrifugirko za eno uro postavili na led. Tako smo bakteriofage ponovno oborili. Po eni uri smo suspenzijo ponovno centrifugirali, in sicer 10 minut pri 4 °C in 13.200 obr./min, ter nato odlili ves supernatant. Sedimentu (prečiščeni bakteriofagi) smo dodali 200 µL pufra PBS, močno premešali ter centrifugirali 1 minuto pri 4 °C in 13.200 obr./min. Supernatant smo nato prenesli v novo mikrocentrifugirko in tako dobili PE. 2 µL PE smo porabili za titracijo, ostalo pa smo shranili v hladilnik. Za potrebe titracije, smo prejšnji dan pripravili 5 mL prekonočne kulture.

3.3.3 MIKROBIOLOŠKA TITRACIJA

Mikrobiološka titracija je metoda, s katero lahko določimo koncentracijo bakteriofagov. Za določanje koncentracije bakteriofagov smo morali pripraviti različne redčitve bakteriofagne suspenzije z gojiščem LB, glede na to ali smo določali koncentracijo pomnoženih ali nepomnoženih eluatov.

Postopek:

Petrijevke z agarnim gojiščem LB smo inkubirali pri 37 °C vsaj pol ure pred začetkom titracije.



V mikrovalovni pečici smo raztalili gojišče LB z agarozo in ga alikvotirali po 3-4 mL v segrete centrifugirke. Pripravili smo toliko centrifugirk, kolikor je bilo redčitev. Gojišče smo s pomočjo termobloka ohranjali pri temperaturi 52 °C. V vsako centrifugirko smo napipetirali 25 µL 2 % X-gal in 3 µL IPTG. Slednja nam omogočata lažjo vizualizacijo plakov (tj. področij na bakterijskem travniku, kjer se bakterije zaradi virusne okužbe delijo

počasneje) - rekombinantni (knjižnični) bakteriofagi tvorijo ob prisotnosti IPTG in Xgal modro obarvane plake.



V mikrocentrifugirkah smo pripravili ustrezne redčitve bakteriofagne suspenzije (preglednica I) z gojiščem LB. Suspenzijo smo premešali ter centrifugirali. Nato smo 10 µL iz vsake mikrocentrifugirke prenesli v novo mikrocentrifugirko, kamor smo predhodno napipetirali 200 µL kulture za titracijo.



Celotno vsebino posamezne mikrocentrifugirke smo prenesli v termostatirano gojišče LB z agarozo, premešali ter takoj vlili na petrijevke z agarnim gojiščem LB. Petrijevke smo pustili na pultu, dokler se gojišče ni strdilo, ter jih nato zatesnjene s parafilmom prenesli v inkubator na 37 °C ter jih inkubirali preko noči.



Naslednji dan smo prešteli število modrih plakov na posamezni plošči (za izračun smo uporabili podatke iz plošč, kjer je bilo vsaj 100 plakov) in s spodnjo enačbo izračunali koncentracijo bakteriofagov oz. titer (pfu/µL).

Enačba 1: Enačba za izračun bakteriofagna titra.

$$Titer = \frac{\text{število modrih plakov} \times \text{faktor redčitve}}{10 \ \mu\text{L}}$$

Preglednica I: Izvedene redčitve pri mikrobiološki titraciji.

VRSTA ELUATA	REDČITVE	FAKTOR REDČENJA
NE	10^1-10^5	10
PE	10^8-10^{10}	10

Iz podatka, kolikšno količino bakteriofagov smo vnesli v posamezno selekcijsko stopnjo, in iz podatka o tem, koliko se jih je eluiralo, lahko izračunali delež elucije (enačba 2).

Enačba 2: Izračun deleža elucije.

$$\frac{\text{količina eluiranih bakteriofagov}}{\text{količina dodanih bakteriofagov}} \times 100 = \% \text{ elucije}$$

Enačba 3: Enačba za izračun količine (števila) eluiranih bakteriofagov.

količina eluiranih bakteriofagov

$$= \frac{\text{število modrih plakov} \times \text{faktor redčitve}}{10 \mu\text{L}} \times 130 \mu\text{L}$$

Po končanih treh stopnjah afinitetne selekcije in pomnoževanju smo delo nadaljevali s pomnoževanjem posameznih bakteriofagnih klonov in s testom ELISA, s katerim smo že leli preveriti afiniteto bakteriofagov oz. predstavljenih peptidov, do tarčega protitelesa.

3.3.4 POMNOŽEVANJE POSAMEZNIH BAKTERIOFAGNIH KLONOV

Klone za pomnoževanje smo izbrali naključno, izbrali pa smo tiste plake, ki so bili dobro ločeni od ostalih. Pomnožili smo po trideset klonov, in sicer: 30 klonov 3. NE Ph.D.-C7C, 30 klonov 2. NE Ph.D.-12 in 50 klonov 3. NE Ph.D.-12.

Postopek:

Dan pred pomnoževanjem smo pripravili prekonočno kulturo *E. coli*.



Prekonočno kulturo smo stokrat redčili z gojiščem LB z dodanim tetraciklinom (20 µg/mL).



Redčeno kulturo smo alikvotirali po 2 mL v sterilne centrifugirke.



Alikvotirano kulturo smo okužili z dobro ločenimi modrimi plaki z izbrane petrijevke.



Tako pripravljene centrifugirke smo močno stresali 4,5 ure pri 37 °C.



Vsebini centrifugirk smo prelili v mikrocentrifugirke (2 mL) in centrifugirali v manjši centrifugirki, in sicer pri nastavivah 13200 obr./min, 2 minuti in 4 °C. Vsebino smo ponovno prelili v nove mikrocentrifugirke in še enkrat centrifugirali pri enakih pogojih.

Nato smo supernatane shranili v hladilniku.

3.3.5 IDENTIFIKACIJA IN KARAKTERIZACIJA VEZALCEV S TESTOM ELISA

Po končani afinitetni selekciji smo s pomočjo prirejenega encimskoimunskega testa (ELISA) ovrednotili oz. potrdili afiniteto vezave naključno izbranih bakteriofagnih klonov na ustreza mesta na tarčnem protitelesu S101. Najprej smo izvedli **poliklonski test ELISA**, kjer smo testirali povprečno afiniteto obogatenih klonov v eluatih 1., 2. in 3. PE Ph.D.-12 ter 1. in 2. PE Ph.D.-C7C. Prav tako smo želeli identificirati tudi posamezne klone, ki se dejansko vežejo na mAb, zato smo izvedli tudi **monoklonski test ELISA** 30 naključno izbranih bakteriofagnih klonov 2.NE Ph.D.-12, 50 naključno izbranih bakteriofagnih klonov 3. NE Ph.D.-12 ter 30 klonov 3. NE Ph.D.-C7C. Ko smo identificirali posamezne klone, ki se vežejo na tarčno protitelo, smo le-te primerjali med seboj v t.i. **kvantitativnem fagnem ELISA-testu**. Uporabili smo enake titre klonov (uporabljeni titri: $4 \cdot 10^{10}$ pfu; $2 \cdot 10^{10}$ pfu; $1 \cdot 10^{10}$ pfu; $5 \cdot 10^9$ pfu; $2,5 \cdot 10^9$ pfu; $6,3 \cdot 10^8$ pfu in $1,25 \cdot 10^9$ pfu), tako da smo lahko iz odzivov (izmerjenih absorbanc) sklepali o razlikah v afiniteti peptidov do protitelesa. Na koncu smo izvedli tudi **kompetitivni test ELISA**, s katero smo želeli potrditi izpodrivanje bakteriofagov (katerih nukleotidna zaporedja smo določili) iz tarčnega protitelesa z nativnim antigenom CCL2. Test smo izvedli tako, da smo najprej pripravili štiri različne redčitve (25 nM; 12,5 nM; 6,3 nM in 3,2 nM) rekombinantnega CCL2 v pufru PBST. Nato smo pripravili še ustreze redčitve suspenzij vseh štirih fagnih klonov (7, 9, 13 in 49) v 5 %- blokirnem pufru z dodanim 0,075 %-Tween[®]-20 (uporabljeni titer: $1 \cdot 10^{10}$ pfu/100µL). Tako pripravljene vzorce smo nanašali na mikrotitrsko ploščico. Kompeticija med peptidi, izraženimi na virusnih delcih, in CCL2 bi potrdila vezavo peptidov na paratop protitelesa. Pri vsakem testu ELISA, smo imeli tudi t.i. slepi vzorec, ki ni vseboval tarčnih protiteles.

Postopek:

Nevtralizacijsko protitelo S101 smo s pufrom PBS do koncentracije 5 µg/mL in v vdolbinice mikrotitrsko ploščico napipetirali po 50 µL tako pripravljene tarče. Prazne vdolbinice so predstavljale negativno kontrolo. Ploščico smo rahlo pretresli in preko noči shranili v hladilniku (pri monoklonski in poliklonski ELISI). Pri kompetitivni ELISI, smo delo nadaljevali isti dan, pri čemer smo protitelesa inkubirali 1 uro pri 37 °C ter jih nato takoj blokirali s po 250 µL 5 %- blokirnega pufra.



Naslednje jutro smo vse vdolbinice ploščice blokirali s po 250 µL 5 %- blokiranega pufra (mleko v PBS) (pri monoklonski in poliklonski ELISI) in stresali 1 uro pri sobni temperaturi. Med tem časom smo pripravili drugo ploščico: v vsako vdolbinico ploščice smo dali 110 µL blokiranega pufra in 110 µL suspenzije bakteriofagov (posameznih klonov ali pomnoženih eluatov).



Ploščico smo po eni uri trikrat sprali s po 200 µL 0,075 % PBST (pri vsakem spiranju smo ploščico stresali 2 minuti) ter nato prenesli suspenzijo bakteriofagov v vdolbinice prve ploščice in inkubirali na stresalniku 90 minut pri sobni temperaturi.



Ponovno smo vdolbinice spirali: trikrat s po 200 µL 0,075 % PBST, vmes 5 minut stresanja.



Nato smo v vsako vdolbinico ploščice napipetirali 200 µL konjugata anti M-13-HRP, ki smo ga 5000-krat redčili s 5 %-mlekom v 0,075 % PBST, inkubirali smo 1 uro pri sobni temperaturi.



Ponovno je sledilo spiranje ploščice: štirikrat s po 200 µL 0,075 % PBST, vmes pet minut stresanja.



V vsako vdolbinico smo nato dali 200 µL kromogenega substrata TMB.



Po približno desetih minutah smo reakcijo ustavili s tem, da smo dodali 50 µL 2 M H₂SO₄.



Izmerili smo absorbanco pri valovni dolžini 450 nm.

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

Postopek:

V 2-mililitrsko mikrocentrifugirko smo napipetirali 750 µL suspenzije izbranega pomnoženega klona v gojišču LB (glej 3.3.4) ter mu dodali 300 µL PEG/NaCl, premešali in za 30 minut postavili na led.



Vsebino smo centrifugirali 10 minut pri 4 °C in 13.200 obr./min in zavrgli supernatant.



Oborini smo dodali 100 µL Tris-pufra z jodidnimi ioni ter premešali. S tem je DNA prešla v raztopino, saj jodidni ioni delujejo tako, da razbijejo fagno kapsido.



Raztopini smo dodali 250 µL hladnega 100 % etanola, premešali in mikrocentrifugirko za 30 minut shranili v zmrzovalniku pri -20 °C. Tako je prišlo do precipitacije fagne DNA.



Ponovno smo centrifugirali ter odstranili supernatant. S tem smo odstranili proteinske nečistote.



Oborino smo nato sprali s 400 µL hladnega 70 % etanola.



Ponovno smo centrifugirali in odstranili supernatant.



Oborino (fagno DNA) smo nato posušili pri 37 °C.



Fagni DNA smo dodali 20 µL vode brez nukleaz in 5 µL le-te raztopine odpipetirali v novo mikrocentrifugirko. Dodali smo 5 µL 5 µM oligonukleotidnega začetnika -96 gIII.



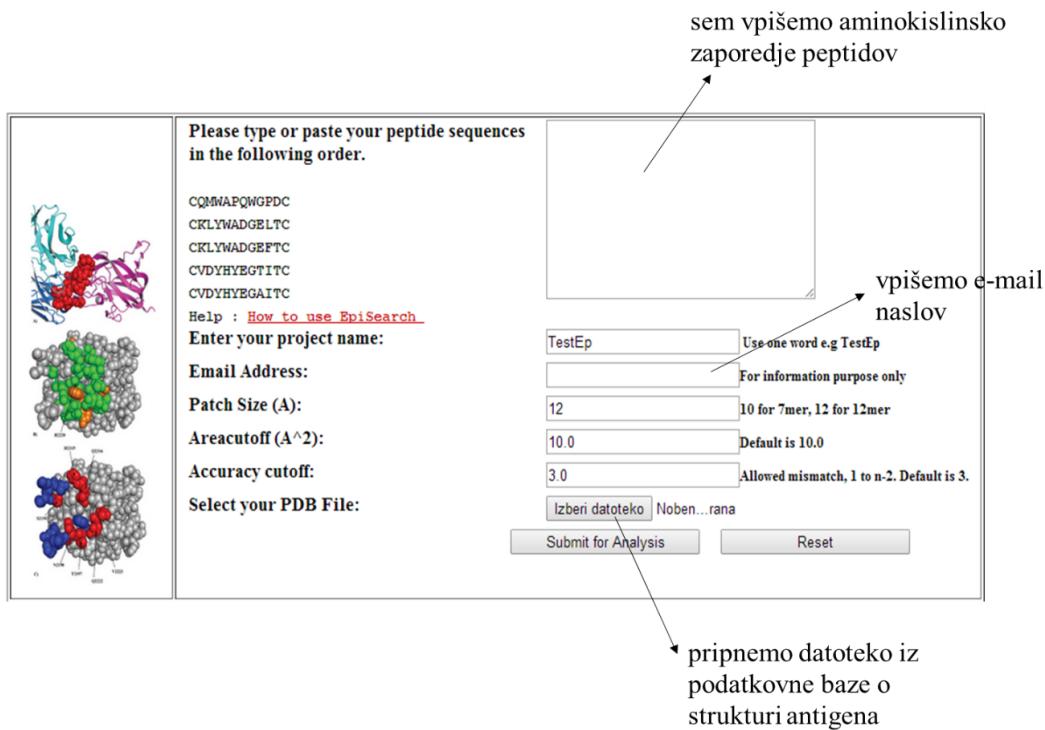
Tako pripravljene mikrocentrifugirke smo označili z nalepkami s črtnimi kodami in jih poslali podjetju GATC Biotech, ki je opravilo določitev nukleotidnih zaporedij insertov, ki kodirajo na kapsidi izražene peptide.

3.3.7 UPORABA RAČUNALNIŠKIH PROGRAMOV ZA IDENTIFIKACIJO (KONFORMACIJSKIH) EPITOPOV

Nukleotidno zaporedje insertov, ki kodirajo na kapsidi izražene peptide, smo prevedli v aminokislinska zaporedja in tako dobili informacijo o primarni strukturi mimetikov epitopa. Delo smo nadaljevali s tem, da smo z uporabo računalniških programov določili ujemanje aminokislinskega zaporedja z nekaterimi aminokislinskimi ostanki na površini CCL2. Podatke o tridimenzionalni strukturi CCL2 smo dobili iz podatkovne baze Protein Data Bank (PDB) (koda uporabljeni datoteke: 3IFD).

Ker mAb S101 prepoznavata konformacijski epitop, nismo mogli izvesti enostavne poravne peptidnih zaporedij s primarno strukturo CCL2, zato smo uporabili naslednja računalniška programa:

- **EpiSearch:** program vnešeno zaporedje peptidov primerja s površino 3D-strukture antiga (CCL2), ki ima podobne fizikalno-kemijske lastnosti kot predstavljen peptid. Program izvede poravnavo AK-zaporedja proteina in strukture antiga (33). Program je dostopen na spletnem naslovu: <http://curie.utmb.edu/episearch.html> (slika 10).



Slika 10: Pogovorno okno v programu EpiSearch (prirejeno po S9).

➤ **Pepitope:** program deluje podobno kot program EpiSearch. Na podlagi znanega AK-zaporedja peptida, ki ga pridobimo s tehniko predstavitve na bakteriofagu, program izvede poravnavo med AK-zaporedjem peptida in prostorsko strukturo antigena ter tako določi AK-ostanke, ki najverjetneje tvorijo konformacijski epitop, proti kateremu je usmerjeno uporabljen protitelo. Program uporablja dva algoritma, in sicer:

- **Mapitope:** algoritem temelji na predpostavki, da so v celotni skupini peptidov, ki izhaja iz afinitetne selekcije, obogateni pari aminokislinskih ostankov, ki posnemajo epitop. Zato Mapitope najprej poišče pare ostankov, katerih pojavnost v naboru peptidov je značilno višja od pričakovane naključne distribucije. Nato »pregleda« površino nativnega antiga in išče območja, kjer se pojavljajo takšni pari.
- **Pepsurf:** algoritem poravna poljuben peptid (npr. tak, ki izhaja iz afinitetne selekcije) na površino 3D-strukture antiga in zazna lokalne podobnosti med proteinom in peptidom (34).

Mogoče je tudi kombiniranje obeh algoritmov.

Program je dostopen na spletnem naslovu: <http://pepitope.tau.ac.il/index.html> (slika 11).

The screenshot shows the 'Protein Structure' section of the Pepitope interface. It features two main input methods: one for a PDB ID (with a text input field and a 'Search' button) and another for uploading a PDB file (with a 'Browse' button and a message 'Nobena datoteka ni izbrana'). Below these is a field for indicating a chain identifier. The interface then transitions to the 'Peptides file in FASTA' section, which includes a text area for pasting peptide sequences and a 'Browse' button for uploading a file (with the message 'Nobena datoteka ni izbrana'). An 'OR' option is provided for both sections. At the bottom, there is a field for entering an e-mail address ('Please enter your e-mail address') and a note: 'As soon as the result is ready, a link will be sent to the e-mail address provided.'

Slika 11: Pogovorno okno v programu Pepitope (S10).

Potem ko smo določili AK-ostanke, ki tvorijo konformacijski epitop uporabljenega protitelesa, smo na modelu prostorske strukture nativnega antigena CCL2 antigensko determinanto tudi označili. Za prikaz epitopa smo uporabili računalniški program ViewerLite (Accelrys).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 OCENA AFINITETNE SELEKCIJE PEPTIDNIH MIMETIKOV EPITOPA PROTITELESA S101

Afinitetna selekcija je proces ločevanja raznolike populacije bakteriofagov na podlagi sposobnosti prepozname tarče. Bistvo tehnike je izolacija tarčno-specifičnih peptidov, ki v večini primerov ciljajo na biološko pomembna mesta tarčnega proteina. V našem primeru smo si kot tarčo izbrali monoklonsko nevtralizacijsko protitelo S101, usmerjeno proti CCL2. V postopku afinitetne selekcije smo izhajali iz dveh bakteriofagnih predstavitevnih knjižnic naključnih peptidov - Ph.D.-C7CTM (knjižnica cikličnih heptapeptidov) in Ph.D.-12TM (knjižnica linearnih dodekapeptidov). Izvedli smo tri selekcijske stopnje z namenom, da bi iz heterogene populacije bakteriofagnih klonov obogatili zgolj tiste, ki posnemajo epitop nevtralizacijskega protitelesa S101. Potek afinitetne selekcije smo spremljali z opazovanjem deleža eluiranih bakteriofagov (enačba 2) in ovrednotenjem povprečne afinitete obogatenih bakteriofagnih klonov (v posameznih pomnoženih eluatih) do tarčnega protitelesa v poliklonskem testu ELISA.

Cilj afinitetne selekcije je pridobiti čim večjo diverziteto peptidov, kar dosežemo z izbiro ustreznih (optimalnih) selekcijskih pogojev. Diplomantka A. Matelič (16) je že pred nami, v okviru svoje diplomske naloge, opravila afinitetno selekcijo z namenom kartiranja epitopa S101, a je zaradi preostrih pogojev selekcije (najverjetneje selekcijski cikel preveč) uspela obogatiti zgolj en sam klon, zaradi česar je bilo kasnejše sklepanje o antigenski determinanti nezanesljivo. Na podlagi rezultatov je predpostavila, da je epitop precej velik, posledično ga krašči ciklični peptidi ne morejo posnemati.

4.1.1 DOLOČANJE KOLIČINE IN DELEŽA ELUIRANIH BAKTERIOFAGOV

Preglednica II prikazuje število modrih plakov, glede na posamezne redčitve pri mikrobiološki titraciji PE in NE, za selekciji iz obeh bakteriofagnih predstavitevnih knjižnic. S pomočjo teh podatkov smo izračunali količino in delež eluiranih bakteriofagov (NE) ter bakteriofagni titer (PE) - podano v preglednicah III in IV. Delež elucije nam pove, kolikšna količina bakteriofagov od celotne količine vnešenih bakteriofagov v posamezno selekcijsko stopnjo se je uspela vezati na tarčo in smo jih z elucijo uspeli zbrati.

Rezultati kažejo (slika 12), da se deleži eluiranih bakteriofagov z vsako stopnjo afinitetne selekcije povečujejo, kar nakazuje uspešen potek obogativne vezalcev S101. Opazili smo,

da delež eluiranih bakteriofagov v bakteriofagni knjižnici Ph.D.-12 hitreje narašča kot v knjižnici Ph.D.-C7C. Razlog za to je verjetno v ciklizaciji površinsko predstavljenih heptapeptidov, ki domnevno ovira njihovo vezavo na tarčno protitelo in onemogoča posnemanje širokorazprostirajočega se konformacijskega epitopa proteina. Prav tako lahko vidimo, da se je delež eluiranih fagov knjižnice Ph.D.-12 v tretji selekcijski stopnji sicer zvišal, a za manjši faktor, kot se je zvišal delež v drugi stopnji, glede na prvo stopnjo. To nakazuje, da smo že v drugi selekcijski stopnji uspeli zelo selektivno obogatiti klone, ki se prek površinsko izraženih peptidov vežejo na S101.

Preglednica II: Rezultati mikrobiološke titracije za PE in NE, po treh selekcijskih stopnjah (podano je število modrih plakov na bakterijskem travniku petrjevk z agarnim gojiščem LB). **X**- preveliko število plakov, da bi jih lahko prešteli; **X**- titracije nismo izvedli, ali pa je pri izvedbi prišlo do napake.

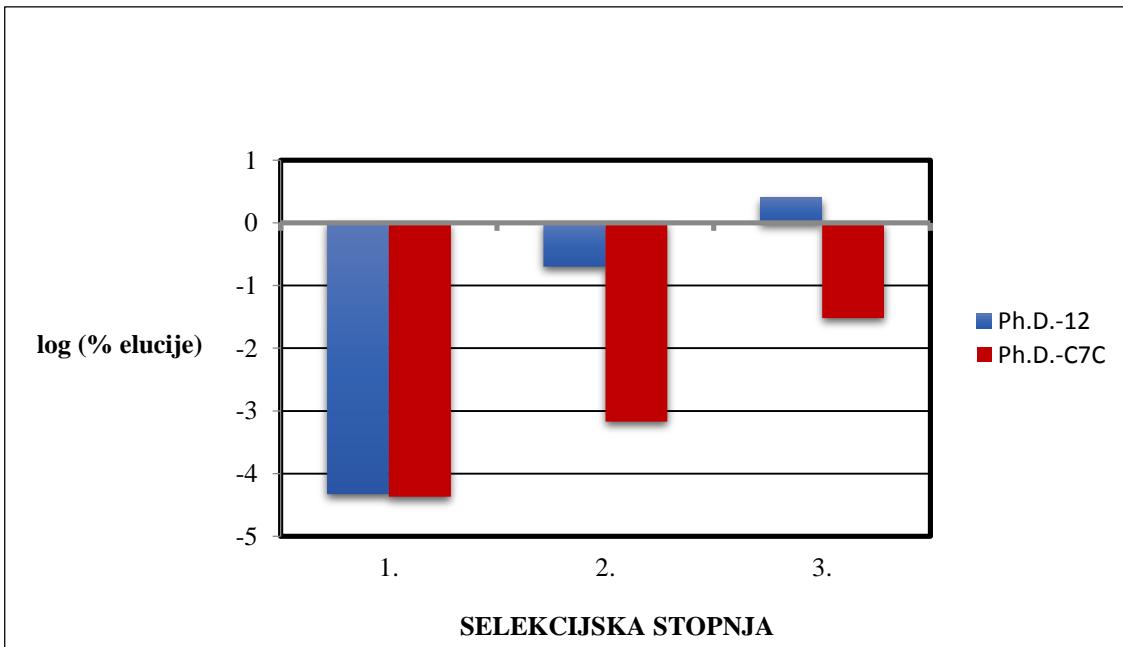
		ŠTEVILO MODRIH PLAKOV [pfu]					
		Ph.D.-C7C			Ph.D.-12		
Bakteriofagna knjižnica	Redčitev eluata	1. SELEKCIJSKA STOPNJA	2. SELEKCIJSKA STOPNJA	3. SELEKCIJSKA STOPNJA	1. SELEKCIJSKA STOPNJA	2. SELEKCIJSKA STOPNJA	3. SELEKCIJSKA STOPNJA
10¹		555	X	X	700	X	X
10²		76	X	X	56	X	X
10³		6	52	265	9	X	X
10⁴		3	5	24	0	1146	X
10⁵		X	0	2	X	154	157
10⁶		X	X	X	X	X	22
10⁸		196	562	X	X	390	389
10⁹		23	X	X	X	41	34
10¹⁰		0	X	X	63	7	4

Preglednica III: Količina eluiranih bakteriofagov in delež elucije ter bakteriofagni titer za bakteriofagno predstavljeno knjižnico **Ph.D.-12**, po vseh treh selekcijskih stopnjah.

STOPNJA SELEKCIJE	KOLIČINA VNEŠENIH BAKTERIOFAGOV [pfu]	KOLIČINA ELUIRANIH BAKTERIOFAGOV [pfu]	DELEŽ ELUCIJE [%]	TITER PE [pfu/µL]
1.	$2,0 \cdot 10^{11}$	$9,4 \cdot 10^4$	$4,7 \cdot 10^{-5}$	$6,3 \cdot 10^{10}$
2.	$1,0 \cdot 10^{11}$	$1,8 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^{-1}$	$4,0 \cdot 10^9$
3.	$1,0 \cdot 10^{10}$	$2,5 \cdot 10^8$	2,5	$3,7 \cdot 10^9$

Preglednica IV: Količina eluiranih bakteriofagov in delež elucije ter bakteriofagni titer za bakteriofagno predstavljeno knjižnico **Ph.D.-C7C**, po vseh treh selekcijskih stopnjah. X-titra nismo izračunali, saj v tretji selekcijski stopnji eluata nismo pomnožili.

STOPNJA SELEKCIJE	KOLIČINA VNEŠENIH BAKTERIOFAGOV [pfu]	KOLIČINA ELUIRANIH BAKTERIOFAGOV [pfu]	DELEŽ ELUCIJE [%]	TITER PE [pfu/µL]
1.	$2,0 \cdot 10^{11}$	$8,5 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^{-5}$	$2,1 \cdot 10^9$
2.	$1,0 \cdot 10^{11}$	$6,8 \cdot 10^5$	$6,8 \cdot 10^{-4}$	$5,6 \cdot 10^9$
3.	$1,0 \cdot 10^{10}$	$3,3 \cdot 10^6$	0,03	X



Slika 12: Delež eluiranih bakteriofagov dveh peptidnopredstavitevih knjižnic po treh stopnjah afinitetne selekcije.

4.1.2 POLIKLONSKA ELISA

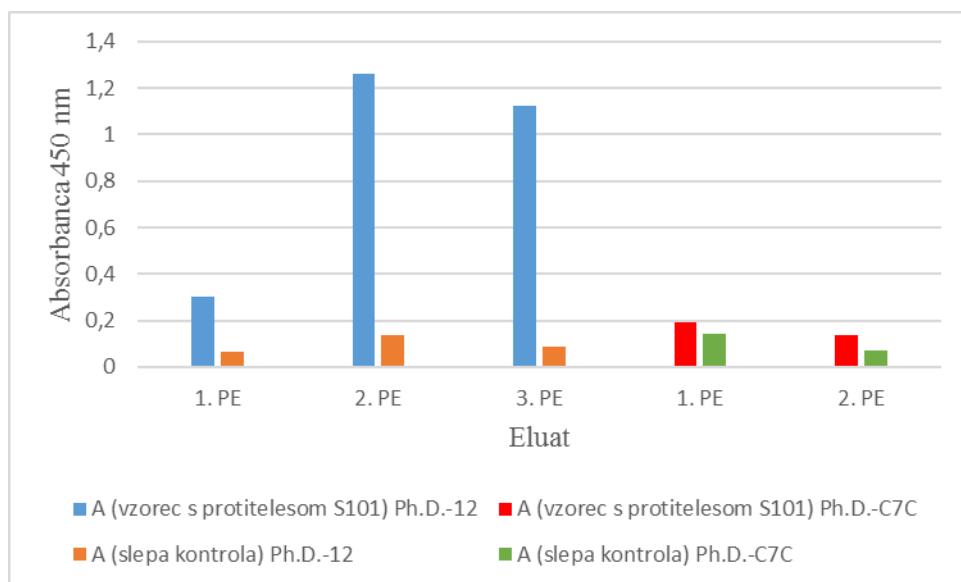
Encimskoimunski test (ELISA) je biokemijska metoda, katere osnova je specifična interakcija antigen-protitelo. Velja za eno najbolj občutljivih in specifičnih metod, s pomočjo katere lahko določamo prisotnost antigenov ali protiteles. V okviru našega eksperimentalnega dela, smo s testom ELISA, ovrednotili sposobnost vezave bakteriofagov na tarčno protitelo. Pri poliklonski izvedbi testa ELISA smo želeli oceniti povprečno afiniteto pomnoženih eluatov vsake selekcijske stopnje, do tarče. Testirali smo 1., 2. in 3. PE Ph.D.-12 ter 1. in 2. PE Ph.D.-C7C. Imobiliziranemu tarčnemu protitelesu S101 smo dodali pomnožene bakteriofagne eluate v pufru PBST. Vse eluate smo testirali v titru s po 5×10^{10} pfu. Bistveno je bilo, da smo v naslednjem koraku nevezane bakteriofage sprali, saj bi le-ti lahko vplivali na dejanski rezultat testa. Kompleksu protitelo-bakteriofag smo dodali sekundarna protitelesa, usmerjena proti M13 (prepoznavajo antigen v kapsidi bakterijskih virusov), označena z encimom hrenova peroksidaza. Nevezana protitelesa smo sprali in dodali kromogeni substrat TMB. TMB ob prisotnosti encima razvije modroobarvanje, ki ga lahko vrednotimo vizualno in/ali spektrofotometrično (izmerili smo absorbanco vzorcev pri 450 nm). Na isti ploščici smo izvedli tudi test, pri katerem na vdolbinice ploščice nismo imobilizirali tarčnega protitelesa - vdolbinice smo zgolj blokirali z blokirnim pufrom (nadaljevanje postopka je bilo enako kot pri vdolbinicah s tarčnim

protitelesom). Tako pripravljeni vzorci so predstavljali slepo kontrolo - pri njih ne sme priti do obarvanja (oz. je absorbanca čim nižja).

Z vrednotenjem povprečne afinitete bakteriofagov v posameznih PE do protitelesa lahko spremljamo potek afinitetne selekcije. Če zaznamo trend naraščanja vrednosti absorbanc od prve proti tretji selekcijski stopnji, lahko potrdimo uspešnost selekcije specifičnih površinsko predstavljenih peptidov. Dobljene rezultate poliklonske izvedbe testa ELISA prikazujeta preglednica V in slika 13.

Preglednica V: Absorbančne vrednosti ($A_{450 \text{ nm}}$) posameznih pomnoženih eluatov obeh uporabljenih bakteriofagnih knjižnic, po vsaki selekcijski stopnji.

	Eluat	A (vzorec s protitelesom S101)	A (slepa kontrola)
Ph.D.-12	1. PE	0,3028	0,0674
	2. PE	1,2635	0,1351
	3. PE	1,1212	0,0887
Ph.D.-C7C	1. PE	0,1932	0,1421
	2. PE	0,1361	0,0699



Slika 13: Grafični prikaz vrednosti absorbanc pri valovni dolžini 450 nm, za pomnožene eluate po vsaki selekcijski stopnji.

V primeru knjižnice Ph.D.-12 signali naraščajo (slika 13) od prve proti zgolj drugi stopnji, nato pa opazimo manjši upad absorbance. Vendar je hkrati signal slepe kontrole za 3. PE nižji od 2. PE. Upoštevajoč, da smo dokazali, da delež elucije z vsako selekcijsko stopnjo narašča, lahko potrdimo uspešen potek selekcije in pričakujemo, da bomo uspeli izolirati

posamezne bakteriofagne klone, katerih površinsko izraženi peptidi posnemajo epitop nevtralizacijskega protitelesa S101.

Pri ocenjevanju intenzitete interakcije fagov knjižnice Ph.D.-C7C s tarčnimi protitelesi opazimo, da se absorbanca v drugi selekcijski stopnji zniža (slika 13). Razlog za neuspešen potek selekcije je verjetno v tem, da med knjižničnimi peptidi ni takih, ki bi se lahko vezali na paratop S101, ali pa je prišlo do nespecifične vezave fagov – mogoča je interakcija z materialom mikrotitrsko ploščice ali na komponente blokirnega sredstva. Na takšno sklepanje nas navedejo izmerjene vrednosti absorbance slepe kontrole, saj so le-te razmeroma visoke, obenem so signali v testnih vdolbinicah zelo nizki. Čeprav smo tudi pri afinitetni selekciji iz knjižnice Ph.D.-C7C opazili trend naraščajočanja deleža elucije, smo na osnovi nizkih signalov poliklonskega testa ELISA dvomili, da nam je uspelo obogatiti specifične vezalce S101.

4.2 IDENTIFIKACIJA IN KARAKTERIZACIJA VEZALCEV

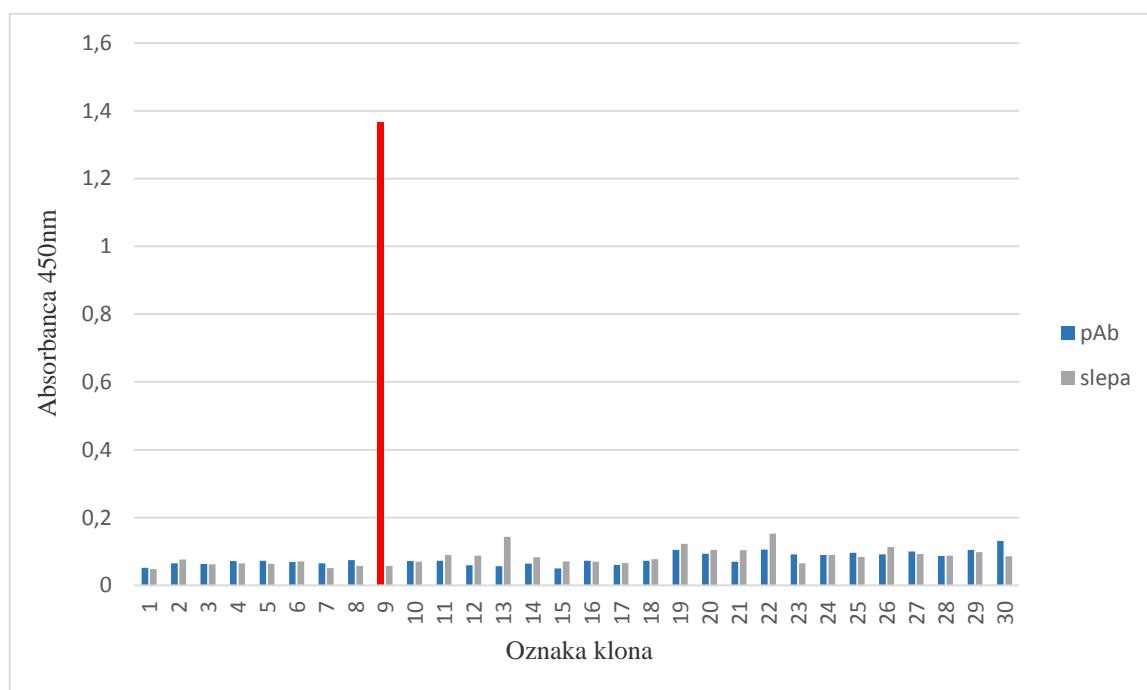
Poleg poliklonskega encimskoimunskega testa smo izvedli tudi monoklonski in kompetitivni test ELISA, s katerima smo ocenili afiniteto posameznih bakteriofagnih klonov (oz. njihovih površinsko izraženih peptidov) do S101 in preverili, na kateri del imunoglobulina se peptidi vežejo. Z izvedbo monoklonske različice testa ELISA, smo želeli identificirati posamezne bakteriofagne klone, ki na svoji površini predstavljajo tarčno specifične peptide (tj. peptidne mimetike epitopov CCL2). Ko smo posamezne klone identificirali, smo le-te primerjali med seboj, in sicer tako, da smo ponovno izvedli monoklonski test ELISA, tokrat z enakimi titri klonov, ter na podlagi intenzitete signalov primerjali relativno afiniteto vezave na S101. Na koncu smo izvedli še kompetitivni test ELISA, katerega namen je bil ugotoviti, ali se površinsko predstavljeni peptidi dejansko vežejo na parotope protitelesa (tj. ali tekmujejo za vezavo na S101 z rekombinantnim CCL2).

4.2.1 MONOKLONSKA ELISA

Pred izvedbo monoklonskega testa ELISA, smo morali pomnožiti naključne bakteriofagne klone (poglavlje 3.3.4) po 2. in 3. selekcijski stopnji iz obeh uporabljenih knjižnic. Pomnožili smo 30 klonov 3. NE Ph.D.-C7C, 30 klonov 2. NE Ph.D.-12 in 50 klonov 3. NE Ph.D.-12. Posamezne klone smo označili s številkama 7 ali 12, ki smo jima dodali številko selekcijske stopnje, torej 2. ali 3 ter zaporedno številko klona. Vrednost signala (absorbance, izmerjene pri valovni dolžini 450 nm) pri tej izvedbi testa ELISA je sicer

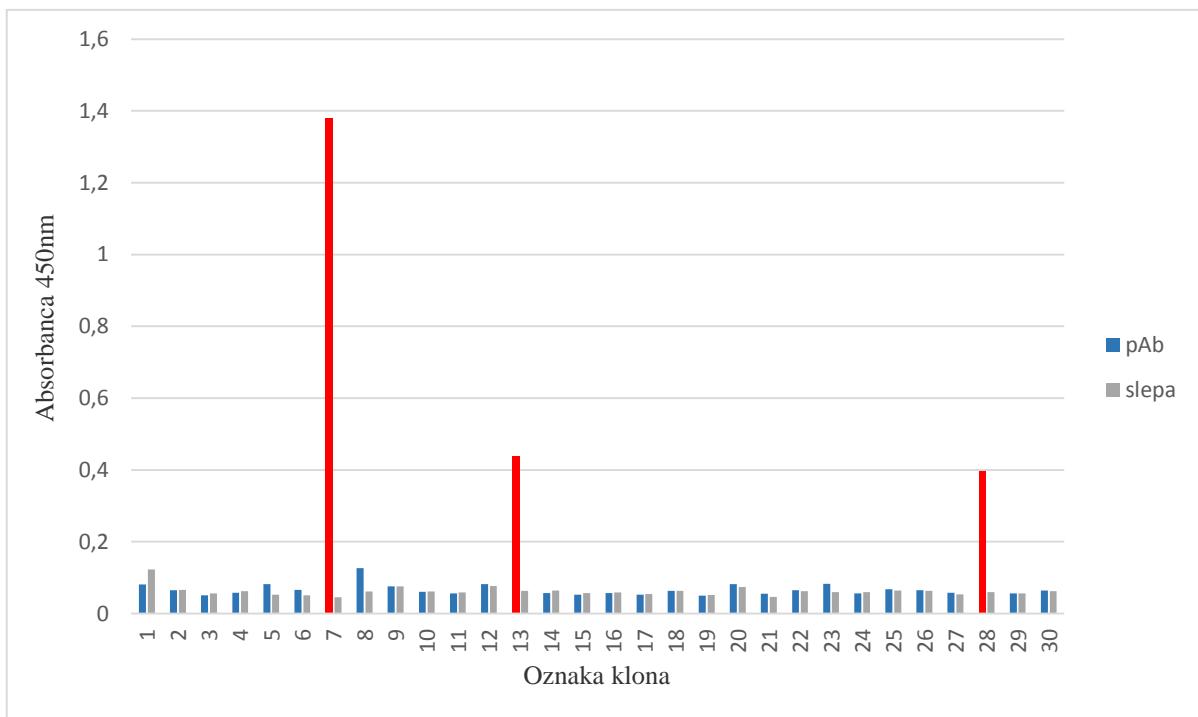
premosorazmerna afiniteti izraženega peptida, a ker nismo poznali titra, vrednosti med sabo ne moremo primerjati. Tako smo na podlagi arbitrarnega kriterija (vrednosti absorbance $A > 0,2$) izbrali klone, za katere smo domnevali, da se vežejo na S101 (označeni z rdečo na slikah 14-17). Iz klonov [12.3.7.](#); [12.2.9](#); [12.3.13](#); [12.3.28](#) in [12.3.49](#) smo izolirali genomsko DNA in določili nukleotidna zaporedja oligonukleotidnih insertov, ki kodirajo površinsko izražene peptide.

Izmed vseh testiranih klonov jih je visoko afiniteto do tarčnega nevtralizacijskega protitelesa izkazalo le pet, vsi so v skladu s pričakovanji izvirali iz knjižnice Ph.D.-12. Prav tako so bili štirje od petih identificiranih vezalcev eluati tretje selekcijske stopnje, kar kaže na to, da obogatitev specifičnih bakteriofagov poteka vendarle šele v tretji stopnji in da moramo za uspešno selekcijo tarčno specifičnih peptidov pod uporabljenimi pogoji izvesti najmanj tri selekcijske stopnje.



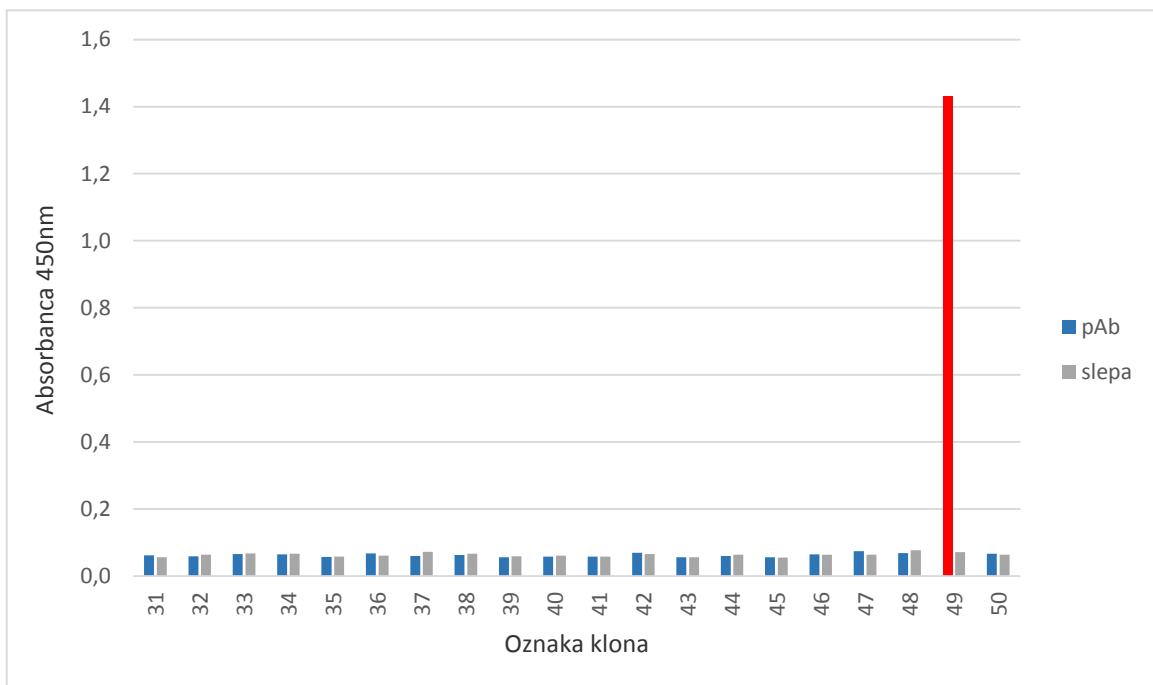
Slika 14: Absorbančni signali tridesetih naključno izbranih bakteriofagnih klonov knjižnice Ph.D.-12, po drugi selekcijski stopnji.

Z rdečo barvo je označen klon, katerega absorbančna vrednost je višja od 0,2 ([12.2.9](#)).



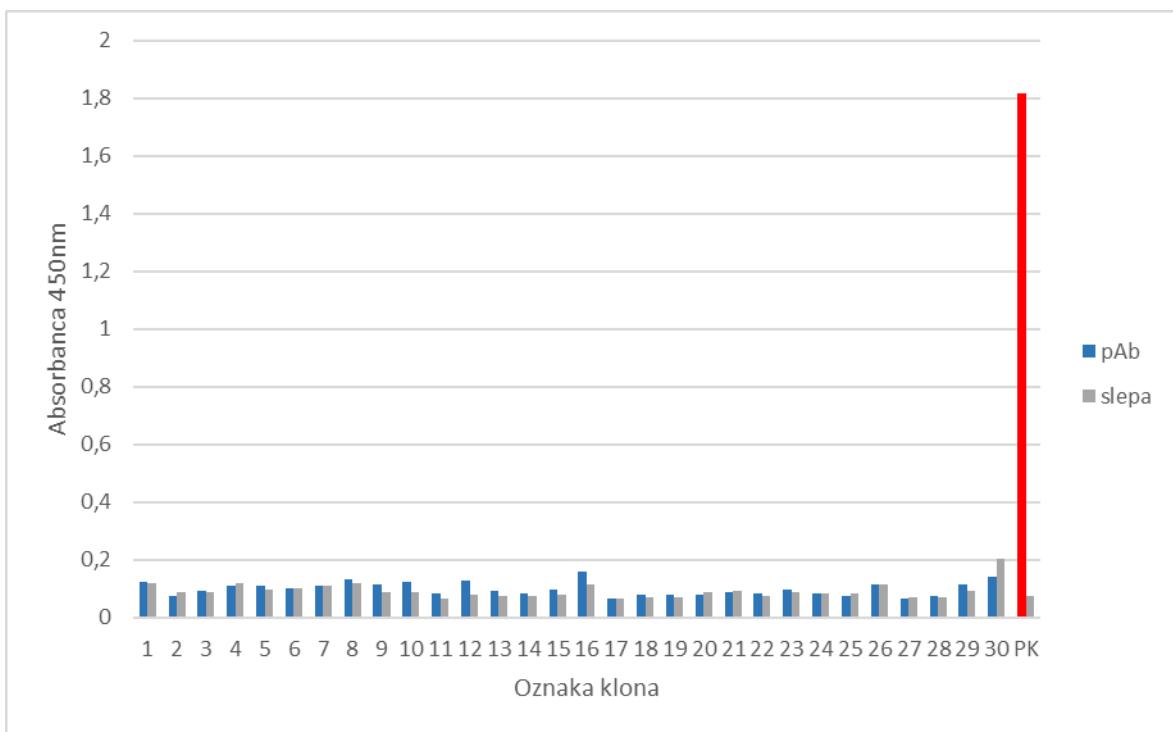
Slika 15: Absorbančni signali tridesetih naključno izbranih bakteriofagnih klonov knjižnice Ph.D.-12, po tretji selekcijski stopnji.

Z rdečo barvo je označen klon, katerega absorbančna vrednost je višja od 0,2 (12.3.7, 12.3.13, 12.3.28).



Slika 16: Absorbančni signali dvajsetih naključno izbranih bakteriofagnih klonov knjižnice Ph.D.-12 (nadaljevanje slike 15), po tretji selekcijski stopnji.

Z rdečo barvo je označen klon, katerega absorbančna vrednost je višja od 0,2 (12.3.49).



Slika 17: Absorbančni signali tridesetih naključno izbranih bakteriofagnih klonov knjižnice Ph.D.-C7C, po tretji selekcijski stopnji.

Z rdečo barvo je označen klon, ki je predstavljal pozitivno kontrolo (gre za klon M12-2 iz magistrske naloge A. Matelič (16)).

4.2.2 DOLOČANJE NUKLEOTIDNEGA ZAPOREDJA IZOLIRANIH PEPTIDOV

Bakteriofagnim klonom, ki smo jih s postopkom afinitetne selekcije uspeli izselekcionirati in katerim smo s testom ELISA potrdili afiniteto do tarčnega protitelesa, smo izolirali DNA in iz določenega nukleotidnega zaporedja oligonukleotidnih insertov sklepali na aminokislinsko zaporedje na fagni površini izraženih peptidov. Aminokislinska zaporedja smo skušali poravnati z znanim zaporedjem nativnega antiga, a nam to ni uspelo. Kot je opisano že v magistrski nalogi A. Matelič (16), smo tudi mi sklepali, da monoklonsko protitelo S101 prepoznavata konformacijski epitop (glej poglavje 4.3). Zaporedje aminokislín vseh petih izoliranih ligandov monoklonskega protitelesa S101 je podano v preglednici VI. Le-ta smo medsebojno primerjali (poravnali) ter označili tiste odseke primarne strukture posameznega peptida, kjer smo opazili največjo stopnjo homologije med vsemi štirimi aminokislinskimi zaporedji. Na prvem mestu konsenznega zaporedja se nahajata AK alanin ali glicin - obe sta majhni alifatski in nepolarni aminokislini. Na drugem mestu najdemo bodisi eno izmed aromatskih aminokislín, torej triptofan ali tirozin, bodisi polarni nenabiti AK asparagin ali glutamin. Sledi tripeptidno zaporedje, ki je

popolnoma enako v vseh peptidih, in sicer: prolin, tirozin ter lizin. Šesto mesto AK-zaporedja tvori v dveh primerih alanin, v dveh pa tirozin. Heptapeptidno zaporedje predvidenih mimetikov epitopa CCL2, se zaključi z asparaginsko kislino. Znotraj zaporedja zadnjih petih AK ne opazimo homologije, zato sklepamo, da le-te niso del peptidnih mimetikov epitopa proteina CCL2.

Glede na podobnost in ponekod celo popolno ujemanje AK med posameznimi peptidnimi zaporedji predvidevamo, da je za posnemanje epitopa mAb dovolj zgolj zaporedje prvih sedmih aminokislin in da je konformacijski epitop manjši od predvidenega v nalogi A. Matelič (16).

Preglednica VI: Poravnava aminokislinskih zaporedij vseh petih na fagni površini predstavljenih linearnih dodekapeptidov, ki smo jih uspeli identificirati v postopku afinitetne selekcije. Z **rdečo** barvo so označeni odseki aminokislinskega zaporedja, ki se medsebojno popolnoma ujemajo. Z **modro**, **zeleno** in **vijoličasto** barvo so označene sorodne AK.

OZNAKA KLONA	AMINOKISLINSKO ZAPOREDJE
12.3.7	A Y P Y K A D R D L K D
12.2.9	A N P Y K Y D L A A L H
12.3.13 (28)	A W P Y K A D N I K P A
12.3.49	G Q P Y K Y D I R V S K

4.2.3 KVANTITATIVNA FAGNA ELISA: Medsebojna primerjava bakteriofagnih klonov 7, 9, 13 in 49

Ko smo z monoklonsko različico encimskoimunskega testa, uspeli identificirati pet bakteriofagnih klonov, ki izkazujejo afiniteto do tarče, smo le-te medsebojno primerjali. Po enakem postopku smo izvedli test ELISA, le da smo predhodno pripravili sedem redčitev bakteriofagov (dvakratne redčitve, in sicer od $4,0 \cdot 10^{10}$ pfu/100µL do $6,3 \cdot 10^8$ pfu/100µL). Bakteriofagni titer, ki smo ga uporabili, smo ocenili s spektrofotometrično meritvijo (enačba 4), izmerjene vrednosti so prikazane v preglednici VII. V zadnjo vdolbinico ploščice nismo dodali fagov (slepi vzorec). Po končanem testu smo vzorcem izmerili absorbanco pri 450 nm in glede na vrednosti le-te ovrednotili relativno afiniteto posameznih peptidov.

Enačba 4: Enačba za določitev titra bakteriofagov.

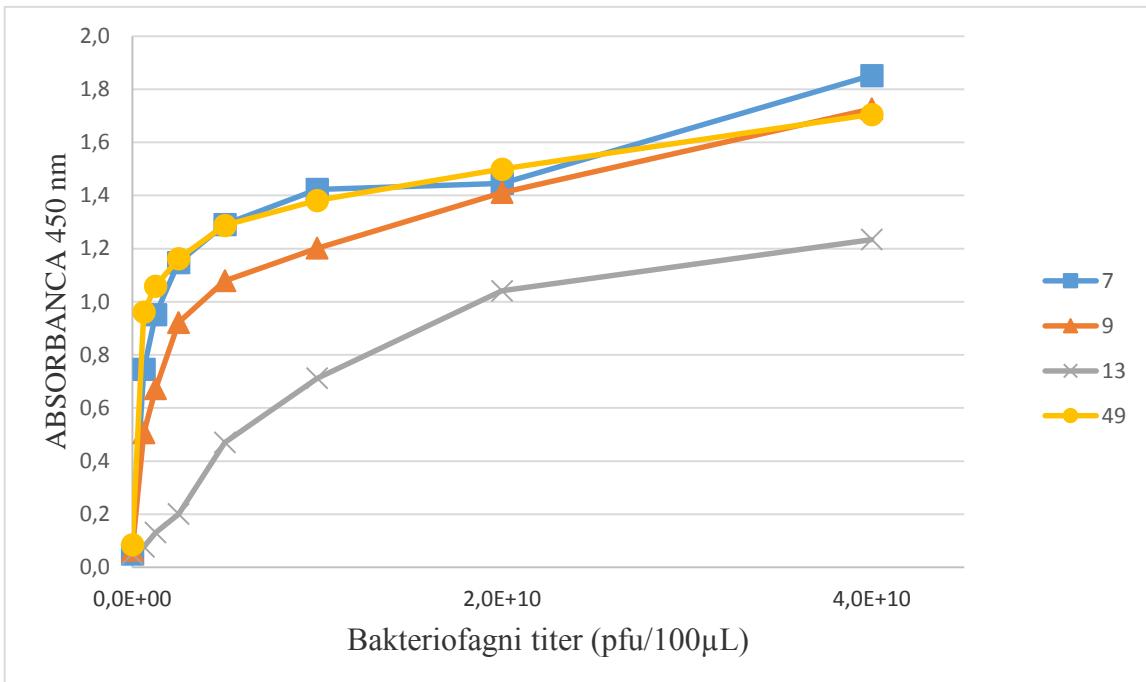
$$\text{spektrofotometrična ocena titra (število fagov/mL)} = (A_{269}-A_{320}) \times 6 \cdot 10^{16} / 7265$$

Preglednica VII: Izmerjene vrednosti absorbanc suspenzij bakteriofagnih klonov pri 269 in 320 nanometrih in izračunan titer.

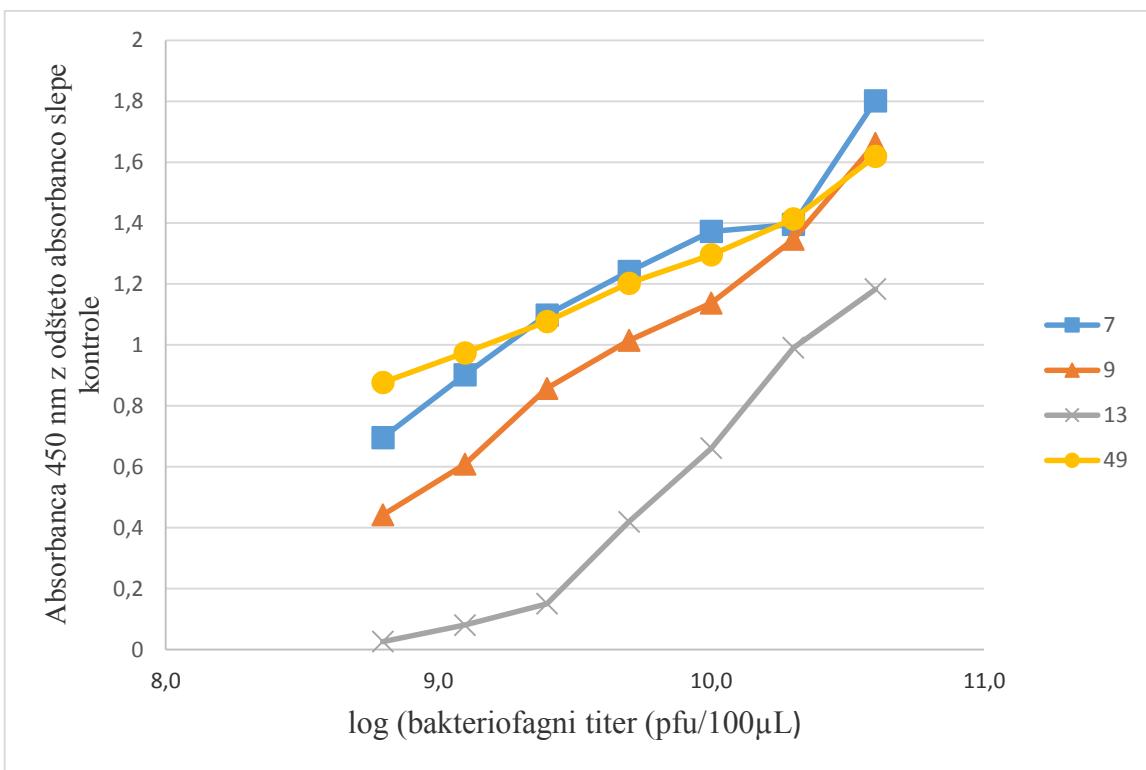
Zaporedna številka klena	A ₂₆₉	A ₃₂₀	titer [pfu/mL]
12.3.7	1,250	0,031	1,0·10 ¹³
12.2.9	1,366	0,031	1,1·10 ¹³
12.3.13	1,399	0,043	1,1·10 ¹³
12.3.49	1,234	0,051	9,8·10 ¹²

Glede na dobljene rezultate (slika 18) lahko rečemo, da so kloni 7, 9 in 49 po afiniteti interakcije s S101 medsebojno primerljivi, medtem ko klon številka 13 nekoliko odstopa. Pri slednjem opazimo nekoliko nižjo intenziteto absorbančnih signalov, kar kaže na to, da gre za nekoliko šibkejši vezalec - izkazuje nižjo afiniteto do tarčnega protitelesa. Že pri prvotnem presejalnem monoklonskem testu ELISA (s katerim smo identificirali posamezne klone), je klon številka 13 (28) izkazoval najnižjo vrednost absorbance, kar spet nakazuje, da peptid na površini klena 13, izkazuje najnižjo afiniteto do izbrane tarče.

Dobljene rezultate smo uprizorili grafično na dva načina; na sliki 18 smo na x-os nanašali vrednosti sedmih bakteriofagnih redčitev, na y-os pa vrednosti absorbanc, medtem ko smo v graf na sliki 19 na x-os nanašali logaritmske vrednosti izvedenih redčitev, na y-os pa absorbance, ki smo jim odšteli vrednost absorbance slepe kontrole.



Slika 18: Primerjava relativnih afinitet bakteriofagnih klonov 7, 9, 13 in 49 do S101.
Prikazane so vrednosti absorbanc pri različnih bakteriofagnih redčitvah.

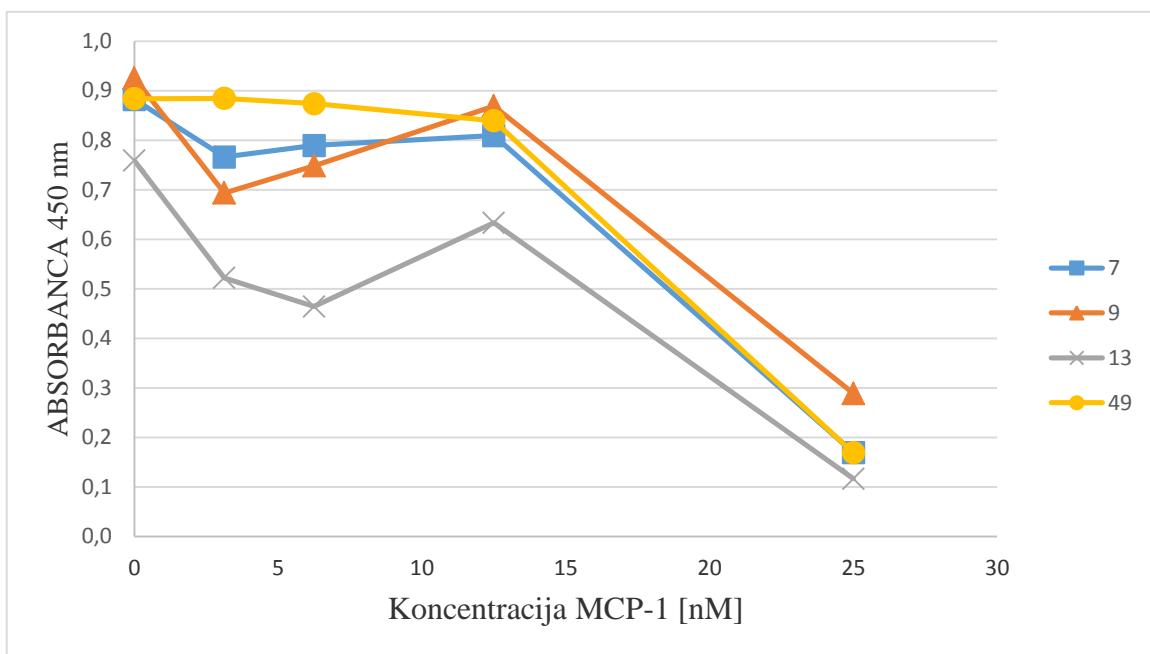


Slika 19: Primerjava relativnih afinitet bakteriofagnih klonov 7, 9, 13 in 49. Prikazane so vrednosti absorbanc, ki smo jim odšteli vrednost slepe kontrole, pri različnih bakteriofagnih redčitvah - podane so logaritemski vrednosti le-teh.

4.2.4 KOMPETITIVNA ELISA

Delo smo nadaljevali z izvedbo kompetitivne različice testa ELISA, ki se od predhodno izvedenih ELISA testov glede same izvedbe ne razlikuje bistveno, razlika je le v tem, da skupaj z bakteriofagnimi kloni v vdolbinice mikrotitrskie ploščice dodamo tudi rekombinantni kemokin CCL2, pridobljen v okviru magistrskega dela A. Matelič (16). Samo ime testa pove, da gre za tekmovanje med površinsko predstavljenimi peptidi na bakteriofagu in kemokinom CCL2, za vezavo na tarčna protitelesa S101. Dejansko smo želeli s testom preveriti sposobnost vezave posameznih bakteriofagnih klonov na paratope tarčnega protitelesa in ne na druga (konstantna) področja imunoglobulina.

Testirali smo vse štiri bakteriofagne klone 7, 9, 13 in 49. Potrebno redčitev suspenzije fagnega klena smo izračunali po spektrofotometrični določitvi titra (enačba 4, preglednica VII). Izračunanemu volumnu faga smo dodali ustrezno količino blokirnega pufru z dodanim Tween®-20. Istočasno smo pripravili tudi štiri različne redčitve rekombinantnega CCL2 v pufru PBST (testirane redčitve: 25 nM; 12,5 nM; 6,3 nM in 3,2 nM). Izvedbo smo nadaljevali enako kot pri vseh ostalih različicah testa ELISA. V eno od vdolbinic nismo dodali CCL2. Po končanem encimskoimunskejem testu smo v vdolbinicah izmerili absorbanco pri 450 nm. Zanimala nas je intenziteta absorbančnih signalov v odvisnosti od dodane koncentracije CCL2 (slika 20). Najvišjo afiniteto do tarčnega protitelesa izkazujejo tisti bakteriofagni kloni, pri katerih vrednost absorbance z večanjem koncentracije kemokina upada najmanj intenzivno. Visoka intenziteta absorbančnih signalov kljub prisotnosti nativnega antiga nakazuje na to, da bakteriofagi uspešno izpodrivajo antigen in se tako posledično vežejo na paratope izbrane tarče. Relativno visoka afiniteta je gotovo tudi posledica avidnostnega učinka, saj vsak bakteriofagni delec izraža na kapsidi pet kopij peptida.



Slika 20: Grafični prikaz rezultatov kompetitivnega testa ELISA za štiri bakteriofagne klone.

Iz slike 20 lahko razberemo, da do večjega upada absorbance pride ob prisotnosti višjih koncentracij antigena, torej je kompeticija med CCL2 in peptidi za vezavo na S101 pričakovano odvisna od koncentracije alternativnih ligandov. Ponovno lahko vidimo, da so kloni 7, 9 in 49 med seboj primerljivi, medtem ko klon številka 13 od njih nekoliko odstopa. Kakorkoli že, rezultati testa dokazujejo specifično interakcijo vseh površinsko predstavljenih peptidov s paratopi protiteles.

4.3 IDENTIFIKACIJA AK-OSTANKOV, KI TVORIJO KONFORMACIJSKI EPITOP NEVTRALIZACIJSKEGA PROTITELESA S101

Glavni in končni cilj našega eksperimentalnega dela je bila identifikacija AK-ostankov kemokina CCL2, ki so odgovorni za vezavo na nevtralizacijsko protitelo S101. Kratka peptidna zaporedja, pridobljena s postopkom afinitetne selekcije, ki domnevno posnemajo epitop kemokina CCL2, smo poravnali s 3D-strukturo antigena. Ker smo v postopku afinitetne selekcije kot tarčo uporabili monoklonsko protitelo, ki prepoznavata konformacijski epitop, smo za identifikacijo AK-ostankov antigenske determinante morali uporabiti računalniške programe. Slednji omogočajo poravnavo aminokislinskega zaporedja peptidnih ligandov monoklonskega protitelesa S101 s 3D-strukturo makromolekule proteina CCL2. Osnova za delovanje računalniških orodij, s katerimi lahko identificiramo konformacijske epitope, je vnešeno aminokislinsko zaporedje na fagni

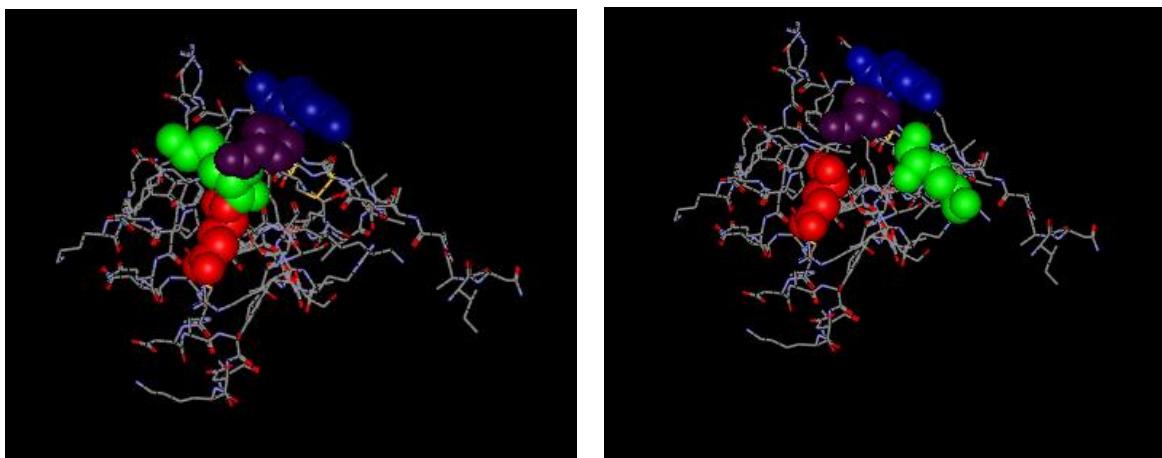
površini predstavljenih peptidov ter 3D-struktura proteina (dosegljiva je v podatkovni bazi PDB; uporabljena datoteka: 3IFD). Kot rezultate nam računalniški programi z različno stopnjo tveganja lažnega rezultata podajo površinske AK-ostanke kemokina, ki naj bi tvorili konformacijski epitop uporabljenega protitelesa (t.j. aminokislinske ostanke, ki naj bi jih posnemali izolirani peptidi). Z uporabo različnih algoritmov in programov ter z vnosom več različnih peptidnih zaporedij, ki jih primerjamo z različnimi prostorskimi modeli MCP-1, lahko iz nabora različnih AK-ostankov identificiramo tiste, ki so dejansko pomembni za vezavo na receptor. Za identifikacijo epitopov smo uporabili dva računalniška programa, in sicer EpiSearch in Pepitope (dva algoritma-PepSurf in Mapitope) pri čemer smo testirali ujemanje vseh štirih peptidov (7, 9, 13 in 49) z AK-ostanki na površini kemokina CCL2. Ker smo predhodno ugotovili, da najverjetneje le prvih sedem aminokislin peptidnega zaporedja dejansko posnema konformacijski epitop kemokina (v tem delu prihaja do največje homologije med vsemi štirimi kloni), smo v program vnesli le zaporedja prvih sedmih AK. S tem smo dobili zanesljivejše rezultate - programa sta nam podala AK-ostanke, ki so dejansko najpomembnejši za vezavo na receptor. Dejstvo je, da moramo na računalniške programe gledati kritično in iz množice zadetkov razbrati zgolj tiste AK-ostanke, za katere lahko v največji meri trdimo, da so dejansko pomembni za vezavo. Naše rezultate lahko primerjamo tudi z znanimi literurnimi podatki ter tako utemeljimo pomembnost določenega AK-ostanka. Izbrano tarčno protitelo S101 je namreč nevtralizacijsko, zato domnevamo, da interagira z AK-ostanki, ki so pomembni za vezavo kemokina CCL2 na receptor CCR2. Aminokislinski ostanki CCL2, ki jih najverjetneje posnemajo izolirani peptidi (primerjava za vsak posamezen peptid), so predstavljeni v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Rezultati kartiranja konformacijskega epitopa s pomočjo računalniških programov Episearch in Pepitope (dva algoritma). Podani so AK-ostanki MCP-1, katere posnemajo površinsko predstavljeni peptidi. Z **rdečo** barvo so označeni AK-ostanki, ki so ključni za vezavo na CCR2 (5).

Oznaka klena	AK-zaporedje peptida (7AK)	
12.3.7	AYPYKAD	AK-ostanki kemokina, ki jih posnemajo izolirani peptidi
		EpiSearch: P8, Y13 , K19, Y28, K35 , P37 , K38 , D54, P55, K56
		PepSurf: Y13 , F15, T16, P37 , K38 , E39 , P55, K56
12.2.9	ANPYKYD	Mapitope: Y13 , P37 , K38
		EpiSearch: P8, Y13 , N14, K19, Y28, K35 , P37 , K38 , D54, P55, K56
		PepSurf: Y13 , N14, F15 , P37 , K38 , E39 , D54
12.3.13 (28)	AWPYKAD	Mapitope: Y13 , P37 , K38
		EpiSearch: P8, Y13 , K19, Y28, K35 , P37 , K38 , D54, P55, K56
		PepSurf: Y13 , N14, F15, T16, P37 , K38 , E39 , D54, P55, K56
12.3.49	GQPYKYD	Mapitope: Y13 , P37 , K38
		EpiSearch: P8, Y13 , K19, Y28, K35 , P37 , K38 , D54, P55, K56
		PepSurf: Y13 , N14, F15, P37 , K38 , E39 , D54, P55, K56,
		Mapitope: Y13 , P37 , K38

Iz nabora AK-ostankov smo upoštevajoč literaturne vire (5) in z uporabo programa ViewerLite za vizualizacijo proteinske strukture, določili štiri AK-ostanke s površine CCL2, ki so verjetno najpomembnejši za vezavo na S101. Obenem so to tudi ostanki, ki tvorijo interakcije z receptorjem CCR2, in sicer so to: **Y13**, **P37**, **E39** in **K35** ali **K38**. Opazimo lahko, da te ostanke (razen glutaminske kisline) posnema zaporedje prolin-tirozin-lizin, ki je prisotno pri vseh štirih bakteriofagnih klonih. Tako lahko potrdimo, da so za vezavo na receptor res potrebni AK-ostanki z bazičnimi (K35/K38), aromatskimi

(Y13) in nepolarnimi alifatskimi (P37) stranskimi skupinami, kar je v skladu s spoznanji, ki so opisana v članku Hemmericha in sodelavcev (5). Ko smo na strukturi kemokina v programu ViewerLite (slika 21), označili naštete AK-ostanke, smo opazili, da vsi trije ležijo v neposredni bližini ter da je za vezavo na S101 (in receptor CCR2) najverjetneje pomembna tudi glutaminska kislina (E39) z negativno nabito skupino v stranski verigi, ki prav tako leži v bližini aminokislinskega trojčka lizin-prolin-tirozin. Shematski prikaz konformacijskega epitopa pokaže, da le-ta ne zavzema tako velike površine kemokina, kot smo sklepali na osnovi rezultatov magistrske naloge Ane Matelič (16).



Slika 21: Kemokin CCL2 z označenim konformacijskim epitopom, ki ga posnemajo identificirani peptidi (PDB-koda: 3IFD). Konformacijski epitop najverjetneje tvorijo štirje AK-ostanki: Y13, označen z modro, P37, označen z vijoličasto, E39, označen z rdečo barvo ter ali K38, označen z zeleno barvo (leva slika) ali K35, označen z zeleno barvo (desna slika).

Na tem mestu je smiselno izpostaviti prednost selekcije več homolognih peptidnih ligandov pred selekcijo, kjer uspemo obogatiti zgolj en sam klon. V primeru, ko si izberemo preostre selekcijske pogoje ali naredimo preveliko število selekcijskih ciklov, lahko izgubimo želeno raznolikost peptidov, posledično je vprašljiva zanesljivost rezultatov računalniškega kartiranja. Na podlagi zgolj enega identificiranega peptida, ne moremo identificirati AK-ostankov, ki so ključni za vezavo na protitelo S101. V okviru pričujoče magistrske naloge nam je uspelo pridobiti več homolognih aminokislinskih zaporedij peptidov, kar nam je omogočalo zanesljivejše kartiranje konformacijskega epitopa v nasprotju z rezultati magistrske naloge A. Matelič (16), kjer jim je uspelo identificirati zgolj en sam klon. Na podlagi večje diverzitete aminokislinskih zaporedij, smo z večjo verjetnostjo identificirali tudi dejansko velikost iskanega epitopa.

5 SKLEP

Glavni cilj magistrske naloge je predstavljal določitev antigenske determinante na kemokinu CCL2, ki jo prepozna nevtralizacijsko monoklonsko protitelo S101. Naloga se je navezovala na že opravljeno magistrsko nalogu Ane Matelič (16), kjer so zaradi neoptimalnih selekcijskih pogojev izgubili želeno diverzitetno peptidov, zaradi česar je bilo kasnejše sklepanje o antigenski determinanti nezanesljivo. V okviru eksperimentalnega dela smo izvedli tri stopnje afinitetne selekcije peptidov iz dveh bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic (Ph.D.-C7CTM in Ph.D.-12TM), pri čemer smo selekcijske pogoje prilagodili iskanju struktурno raznolikih peptidnih ligandov, čeprav na račun nižjega izplena presejalnega procesa. Uspešen potek obogatitve ligandov monoklonskega protitelesa S101 smo dokazali z izračunanim naraščajočim deležem eluiranih bakteriofagov iz stopnje v stopnjo. Uspešen potek afinitetne selekcije je nakazoval tudi naraščajoč trend vrednosti absorbanc za posamezen eluat v poliklonski izvedbi testa ELISA.

Za identifikacijo vezalcev smo izvedli monoklonsko različico encimskoimunskega testa ter tako identificirali pet bakteriofagnih klonov iz knjižnice Ph.D.-12TM. Iz knjižnice Ph.D.-C7CTM nismo uspeli izolirati ligandov monoklonskega protitelesa S101, razlog za to je najverjetneje ciklizacija površinsko predstavljenih heptapeptidov, ki ovira njihovo vezavo na tarčno protitelo. Identificiranim fagnim klonom - [12.3.7.](#), [12.2.9.](#), [12.3.13.](#), [12.3.28](#) in [12.3.49](#) - smo določili aminokislinska zaporedja na površini predstavljenih peptidov in opazili homologijo le znotraj prvih sedmih AK. Na podlagi slednjega smo sklepali, da je za posnemanje epitopa mAb dovolj zgolj zaporedje prvih sedmih aminokislin in da se konformacijski epitop ne razprostira preko obširne površine kemokina CCL2. Prav tako smo ugotovili, da klon 12.3.13 (12.3.28) izkazuje nižjo afiniteto do tarčnega protitelesa navkljub visoki stopnji homologije izraženega peptida ostalim vezalcem.

Z uporabo dveh računalniških programov (EpiSearch in Pepitope) smo aminokislinska zaporedja vseh štirih peptidnih ligandov monoklonskega protitelesa S101 poravnali s 3D-strukturo makromolekule proteina CCL2 in tako identificirali AK-ostanke kemokina, ki naj bi tvorili konformacijski epitop uporabljenega protitelesa. Konformacijski epitop najverjetneje tvorijo Y13, P37, E39 in K35 ali K38. Med eksperimentalnim delom smo spoznali, da je za pridobitev zanesljivih rezultatov bistvena pravilna izbira selekcijskih pogojev oz. število selekcijskih ciklov. Obenem se moramo zavedati, da je kartiranje

konformacijskih epitopov težavnejše in manj zanesljivo, kot je kartiranje linearnih antigenskih determinant. Upoštevajoč slednje, moramo na dobljene rezultate računalniškega kartiranja gledati z veliko mero previdnosti ter jih primerjati z rezultati predhodno izvedenih raziskav.

Magistrsko delo bi lahko nadgradili s tem, da bi na podlagi znanega aminokislinskega zaporedja peptidov, pripravili sintezne peptide, s čimer bi preverili njihovo morebitno antagonistično delovanje na receptor CCR2 oz. sposobnost zaviranja kemotakse. Kot nadaljnji korak bi bilo možno izvesti še substitucijo posameznih AK z drugimi in tako še z večjo mero zanesljivosti določiti, kateri AK-ostanki so bistveni za tvorbo konformacijskega epitopa.

6 LITERATURA

1. Buchbinder EI, McDermott DF: Interferon, Interleukin-2, and Other Cytokines. Hematology/oncology clinics of North America 2014; 28(3): 571-83.
2. Vozelj M. Temelji imunologije. 1. izdaja. Ljubljana: Državna založba Slovenije, 2000.
3. Khan MM: Role of Cytokines. Immunopharmacology 2008; 33-59.
4. Crommelin DJA, Sindelar RD. Pharmaceutical Biotechnology: an introduction for pharmacists and pharmaceutical scientists. Amsterdam: Harwood academic, 1997.
5. 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: 13013-25.
6. News Medical [online]. (citirano 26.6.2014). Dostopno na: <http://www.news-medical.net/health/Chemokine-Types.aspx>.
7. Kim JH, Lim JW, Lee SW, Kim K, No KT: Ligand supported homology modeling and docking evaluation of CCR2: docked pose selection by consensus scoring. Journal of molecular modeling 2011; 17: 2707-16.
8. Deshmane SL, Kremlev S, Sawaya BE: Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. Journal of Interferon & Cytokine Research 2009; 29(6): 313-26.
9. Fox JM, Pease JE. The molecular and cellular biology of CC chemokines and their receptors. In: Schweibert LM. Chemokines, Chemokine Receptors, and Disease. Elsevier, 2005: 73-99.
10. Yadav A, Saini V, Arora S: Chemoattractant with role beyond immunity: A review. Clinica Chimica Acta 2010; 411: 1570-79.
11. Kobilka BK: G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. Biochimica et biophysica acta 2007; 1768(4): 794-807.
12. InterPro [online]. (citirano 30.6.2014). Dostopno na: http://www.ebi.ac.uk/interpro/potm/2004_10/Page2.htm.

13. Melgarejo E, Medina MÁ, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL: Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory processes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2009; 41: 998-1001.
14. Kaji M, Ikari M, Hashiguchi S, Ito Y, Matsumoto R, Yoshimura T, Kuratsu Ji, Sugimura K: Peptide mimics of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) with an antagonistic activity. *Journal of biochemistry* 2001; 129 (4): 577-83.
15. 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: 23186-90.
16. Matelič A. Kartiranje epitopov nevtralizacijskih protiteles proti kemokinu CCL2. Diplomsko delo. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, 2013.
17. Panee J: Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes. *Cytokine* 2012; 60: 1-12.
18. Štrukelj B, Kos J. Biološka zdravila: od gena do učinkovine. 1. izdaja. Ljubljana: Slovensko farmacevtsko društvo, 2007.
19. Microbiology and Immunology On-line [online]. (citirano 3.7.2014). Dostopno na: <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/igstruct2000.htm>.
20. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Lehninger principles of biochemistry. 6. izdaja. New York : W. H. Freeman, 2013.
21. Abcam® [online]. (citirano 4.7.2014). Dostopno na: <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=11269&pid=11287>.
22. Pacific Immunology [online]. (citirano 7.7.2014). Dostopno na: <http://www.pacificimmunology.com/resources/antibody-introduction/what-is-an-epitope>.
23. Huang J, Honda W: CED: a conformational epitope database. *BMC Immunology* 2006; 7: 1-12.
24. 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.

25. Abbott WM, Damschroder MM, Lowe DC: Current approaches to fine mapping of antigen–antibody interactions. *Immunology* 2014; 142: 526-35.
26. Hjelm B. Epitope mapping of antibodies towards human protein targets. Stockholm: Royal Institute of Technology, 2011.
27. Williams SC, Badley RA, Davis PJ, Puijk WC, Meloen RH: Identification of epitopes within beta lactoglobulin recognised by polyclonal antibodies using phage display and PEPSCAN. *Journal of Immunological Methods* 1998; 213: 1–17.
28. Fack F, Hügle-Dörr B, Song D, Queitsch I, Petersen G, Bautz EKF: Epitope mapping by phage display: random versus gene-fragment libraries. *Journal of Immunological Methods* 1997; 206: 43-52.
29. Bratkovič T, Preželj A: Zdravljenje bakterijskih okužb z bakteriofagi. *Farmacevtski vestnik* 2008; 59: 129-35.
30. Smith GP: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985; 228(4705): 1315-17.
31. Smith GP, Petrenko VA: Phage Display. *Chem. Rev.* 1997; 97: 391-410.
32. New England Biolabs®, Inc.: Ph.D.™ Phage Display Libraries, Instruction Manual E8100S, E8101S, E8102L,E8110S, E8111L, E8120S, E8121L.Version 1.0 (9/09).
33. Negi SS, Braun W: Automated Detection of Conformational Epitopes using Phage Display Peptide Sequences. *Bioinformatics and Biology Insights* 2009; 3: 71-81.
34. Huang J, Ru B, Dai P: Bioinformatics resources and tools for phage display. *Molecules* 2011; 16: 694-709.

VIRI SLIK

- S1. Wikipedia [online]. (citirano 23.6.2014). Dostopno na:
<http://en.wikipedia.org/wiki/Chemotaxis#mediaviewer/File:ChtxChemokineStruct.png>.
- S2. . Deshmane SL, Kremlev S, Sawaya BE: Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 2009; 29(6): 313-26.
- S3. Kim JH, Lim JW, Lee SW, Kim K, No KT: Ligand supported homology modeling and docking evaluation of CCR2: docked pose selection by consensus scoring. *Journal of molecular modeling* 2011; 17: 2707-16.
- S4. 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: 13013-25.
- S5. Wikipedia [online]. (citirano 9.7.2014). Dostopno na:
<http://en.wikipedia.org/wiki/Antibody>.
- S6. Smith G: Patch engineering: a general approach for creating proteins that have new binding activities. *Trends in biochemical sciences* 1998; 23: 457-60.
- S7 Liu IJ et al: Disease-specific B Cell epitopes for serum antibodies from patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) and serologic detection of SARS antibodies by epitope-based peptide antigens. *The Journal of infectious diseases* 2004; 797-809.
- S8. New England Biolabs®, Inc.: Ph.D.™ Phage Display Libraries, Instruction Manual E8100S, E8101S, E8102L, E8110S, E8111L, E8120S, E8121L. Version 1.0 (9/09).
- S9. EpiSearch: Mapping of Conformational Epitopes [online]. (citirano 30.5.2014). Dostopno na: <http://curie.utmb.edu/episearch.html>.
- S10. The Pepitope Server [online]. (citirano 30.5.2014). Dostopno na
<http://pepitope.tau.ac.il/index.html>

