



**Mladi za napredek Maribora 2014**  
**31. srečanje**

Kartiranje epitopov poliklonskih protiteles, usmerjenih proti grelinu

**BIOTEHNOLOGIJA**

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

**2014, Maribor**

## Kazalo vsebine

Kazalo slik .....	3
Kazalo tabel .....	4
POVZETEK .....	7
1 UVOD .....	8
1.1 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE .....	8
2 Pregled literature .....	9
2.1 Imunoglobulini .....	9
2.1.1 Poliklonska protitelesa .....	13
2.1.2 Monoklonska protitelesa.....	13
2.1.3 Avtoprotitelesa .....	14
2.2 Antigeni .....	14
2.2.1 Mimetop.....	16
2.3 Kartiranje epitopov.....	16
2.3.1 Metode kartiranja .....	16
2.4 GRELIN .....	21
3 PRAKTIČNI DEL.....	22
3.1 MATERIALI IN OPREMA .....	23
3.1.1 Kemikalije .....	23
3.1.2 Laboratorijska oprema .....	23
3.1.3 Biološki material.....	24
3.1.4 Priprava pufrov in gojišč.....	24
3.2 METODE DELO .....	27
3.2.1 Izolacija protiteles, usmerjenih proti grelinu .....	27
3.2.2 Priprava kultur gostiteljskega seva bakterije <i>E. coli</i> ER2738 .....	29
3.2.3 Imobilizacija tarčnih protiteles na površino vdolbinice mikrotitrne ploščice .....	29
3.2.4 Blokiranje vdolbinic mikrotitrskih ploščic.....	30
3.2.5 Spiranje vdolbinic mikrotitrskih ploščic.....	30
3.2.6 Inkubacija knjižničnih bakteriofagov s tarčnim protitelesom .....	30
3.2.7 Elucija bakteriofagov .....	30
3.2.8 Pomnožitev in izolacija eluiranih bakteriofagov .....	31
3.2.9 Mikrobiološka titracija.....	31

3.2.10 Pomnožitev posameznih bakteriofagnih klonov .....	32
3.2.11 Encimskoimunski test (ELISA).....	33
4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	35
4.1 Izolacija pAB .....	35
4.2 Afinitetna selekcija peptidov iz bakteriofagne predstavitvene knjižnice.....	35
4.2.1 Odstotek elucije.....	36
4.2.2 Poliklonska ELISA .....	37
4.3 Identifikacija in karakterizacija vezalcev.....	38
4.3.1 Monoklonska ELISA .....	38
4.3.2 Kompetitivni test ELISA .....	39
4.3.3 Poravnava aminokislinskih zaporedij bakteriofagnih klonov s primarno strukturo grelina. 41	
5 ZAKLJUČKI .....	43
6 VIRI .....	45

## Kazalo slik

Slika 1: Zgradba imunoglobulina G.....	11
Slika 2: Membranski receptorji celic B. ....	12
Slika 3: Zgradba filamentnega bakteriofaga.....	19
Slika 4: Shematska predstavitev afinitetne selekcij .....	20
Slika 5: Shematska predstavitev poteka izolacije poliklonskih protiteles usmerjenih proti grelinu .....	28
Slika 6: Delež eluiranih bakteriofagov po prvi in drugi stopnji afinitetne selekcije .....	37
Slika 7: Rezultati poliklonske različice testa ELISA.....	38
Slika 8: Rezultati monoklonske različice testa ELISA .....	39
Slika 9: Kompeticija posameznih bakteriofagnih klonov z grelinom za vezavo na pAb C-18.....	40
Slika 10: Poravnava aminokislinskih zaporedij grelina in peptidnih mimetikov grelinskih epitopov....	41

## Kazalo organigramov

<b>Organigram 1:</b> Shema eksperimentalnega dela.....	22
--	----

## Kazalo tabel

<b>Tabela I:</b> Seznam uporabljenih kemikalij .....	23
<b>Tabela II:</b> Seznam laboratorijske opreme. ....	23
<b>Tabela III:</b> Gostiteljski sev bakterij. ....	24
<b>Tabela IV:</b> Bakteriofagni predstavitveni knjižnici. ....	24
<b>Tabela V:</b> Modelno poliklonsko protitelo. ....	24
<b>Tabela VI:</b> Antigen tarčnih protiteles. ....	24
<b>Tabela VII:</b> Priprava fosfatnega pufra. ....	24
<b>Tabela VIII:</b> Priprava elucijskega pufra. ....	25
<b>Tabela IX:</b> Priprava nevtralizacijskega pufra. ....	25
<b>Tabela X:</b> Priprava PEG in NaCl. ....	25
<b>Tabela XI:</b> Priprava tris-pufra z jodidnimi ioni. ....	26
<b>Tabela XII:</b> Priprava LB – tekočega gojišča. ....	26
<b>Tabela XIII:</b> Priprava agarnege gojišča. ....	26
<b>Tabela XIV:</b> Priprava LB – agaroze. ....	26
<b>Tabela XV:</b> Prikaz števila eluiranih bakteriofagov in odstotek elucije po prvi selekcijski stopnji. ....	36
<b>Tabela XVI:</b> Število eluiranih bakteriofagov in odstotek elucije po drugi selekcijski stopnji. ....	36

## Seznam okrajšav

DNA – deoksiribonukleinska kislina

ddH<sub>2</sub>O – dvakrat destilirana/demineralizirana destilirana voda

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina

ELISA – encimskoimunski test

Ig – imunoglobulin

IgA – imunoglobulin A

IgD – imunoglobulin D

IgE – imunoglobulin E

IgG – imunoglobulin G

IPTG – izopropil- $\beta$ -D-1-tiogalaktopiranozid

mAb – monoklonska protitelesa

mRNA – informacijska RNA (angl. *messenger RNA*)

NE – nepomnoženi eluat

OD<sub>600</sub> – optična gostota vzorca, izmerjena pri valovni dolžini 600 nm (angl. *optical density*)

pAb – poliklonska protitelesa

PBS – fosfatni pufer (angl. *phosphate buffered saline*)

PBST – fosfatni pufer z dodano površinsko aktivno snovjo tween 20 (polisorbat-20)

PE - pomnoženi eluat

PEG – polietilen glikol

pfu – plakotvorna enota (angl. *plaque-forming unit*)

p3 – kapsidni protein 3

p8 – kapsidni protein 8

TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin

X-gal – 5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D- galaktozid

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujema mentorju, ki nama je omogočil opravljanje raziskovalne naloge na področju biotehnologije ter za vso njegovo pomoč in potrpežljivost pri praktičnem in teoretičnem delu.

Zahvaljujema se tudi Fakulteti za farmacijo in Katedri za farmacevtsko biologijo za možnost uporabe njihovih laboratorijev.

Prav tako najlepša hvala šolski mentorici za vložen trud, izkazano spodbudo, podporo in vse koristne nasvete.

## POVZETEK

Bakteriofagne predstavitvene knjižnice so zbir velikega števila bakteriofagov (bakterijskih virusov), pri čemer vsak bakteriofag na svoji površini izraža naključen peptid. Iz takšnih knjižnic lahko izoliramo peptide z afiniteto do različnih organskih molekul. Izolacija ligandov iz bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic naključnih peptidov predstavlja načeloma preprosto, a vendar učinkovito tehniko odkrivanja strukturno preprostih peptidov, ki so usmerjeni na biološko pomembna vezišča na površini tarčnega proteina. Posledično lahko takšni peptidi vplivajo na delovanje tarčnih proteinov in *in vitro/in vivo*. Uporabni so tudi v raziskavah na področju razvoja in odkrivanja zdravil ter diagnostiki različnih obolenj.

V okviru raziskovalne naloge smo z afinitetno selekcijo ligandov iz bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic naključnih peptidov kartirali epitope *modelnih* poliklonskih protiteles, usmerjenih proti grelinu<sup>1</sup>. Kot *modelni* antigen smo izbrali grelin, ker gre za relativno kratek peptid brez višjih nivojev proteinske strukture. Pričakovali smo, da bodo poliklonska protitelesa prepoznala različne linearne epitope grelina, a smo uspeli določiti le enega (domnevno dominantnega), tj. fragment sedmih aminokislinskih ostankov, ki se razteza med argininom na mestu 15 in lizinom na položaju 24 zrelega grelina.

Na osnovi podobne metodologije, kot smo jo uporabili sami, poteka tudi kartiranje epitopov avtoantigenov in alergenov, kar ima predvsem diagnostično vrednost, in imunogenov za namene razvoja t.i. epitopnih cepiv. Tovrstna cepiva med drugim premorejo številne prednosti, kot je npr. usmerjanje imunskega odziva ter njegovo izboljševanje/optimiziranje, izbor epitopov, ki maksimalno spodbudijo tvorbo protiteles in izogibanje neželenim (npr. navzkrižno reaktivnim) epitopom, bistveno nižji stroški proizvodnje cepiva, itd.

---

<sup>1</sup> Je hormon, ki povečuje občutek lakote ter nastaja v P/D1 celicah v svodu želodca ter v celicah epsilon v Langerhansovih otočjih. Koncentracija grelina naraste pred obrokom, po njem pa se sproščanje zavre (Inui s sodel., 2004)



# 1 UVOD

## 1.1 CILJ RAZISKOVALNE NALOGE

V okviru raziskovalne naloge bomo poskusili kartirati epitope *modelnega antigena* grelina z afinitetnimi selekcijami peptidnih ligandov protiteles iz knjižnic naključnih peptidov, predstavljenih na bakteriofagnem vektorju M13, proti modelnim poliklonskim protitelesom.

Za to metodo smo se odločili, ker je relativno nezahtevna, predvsem pa neprimerno hitrejša in cenejša v primerjavi s klasičnimi pristopi. Uporabna je zlasti za identifikacijo linearnih epitopov, medtem ko je kartiranje konformacijskih epitopov kljub računalniški podpori manj zanesljivo.

Ker je grelin relativno kratek peptid, smo postavili hipotezo, da bodo selekcionirani peptidi posnemali linearne epitope. Kot *modelna protitelesa* bomo uporabili kozje poliklonske imunoglobuline G proti človeškemu grelinu; tako bomo zajeli širino poliklonskega humoralnega odziva proti antigenu - pričakujemo, da bomo identificirali nabor različnih epitopov. Sposobnost vezave peptidov, izraženih na bakteriofagih, s tarčnimi protitelesi bomo preverili z encimskoimunskim testom, specifičnost vezave pa bomo skušali dokazati s kompeticijo bakteriofagov s predstavljenimi peptidi in sinteznim grelinom za vezavo na tarčna protitelesa. Selekcionirane peptide bomo poravnali z aminokislinskim zaporedjem grelina in tako določili poglobitne antigenske determinante.

Za namen raziskovalne naloge bomo uporabili dva tipa knjižnic - Ph.D.-12 in Ph.D.-C7C. V osnovi se razlikujeta v obliki naključnih izraženih peptidov na površini bakteriofagov - bakteriofagi knjižnice Ph.D.-12 imajo izražene linearne dodekapeptide, bakteriofagi knjižnice Ph.D.-C7C pa ciklične nonapeptide.

**I. hipoteza:** *Predvidevamo, da bomo z afinitetno selekcijo iz knjižnice naključnih peptidov proti poliklonskim protitelesom identificirali nabor različnih epitopov človeškega grelina.*

**II. hipoteza:** *Predvidevamo, da bodo izolirani peptidni ligandi poliklonskih protiteles posnemali enostavne linearne epitope. Pričakujemo, da bomo mimetike epitopov grelina uspeli izolirati zlasti iz knjižnice naključnih linearnih peptidov (Ph.D.-12), ne pa tudi iz knjižnice naključnih cikličnih peptidov (Ph.D.-C7C).*

## 2 Pregled literature

### 2.1 Imunoglobulini

Imunski sistem vretenčarjev lahko v grobem razdelimo na *prirojenega* (nespecifičnega) ter *pridobljenega* (specifičnega). Slednji se oblikuje in aktivira šele ob prvem stiku s tujkom (npr. patogenim mikroorganizmom ali cepivom). Zanj je značilen t.i. imunski spomin, kar pomeni, da tujek ob *efektorskih* limfocitih B in T (ki poskrbijo za odstranitev tujka, a so kratkoživi), izzove tudi nastanek dolgoživih *spominskih* celic. Te se pri ponovnem stiku s tujkom nanj odzovejo izjemno hitro in tako preprečijo okužbo.

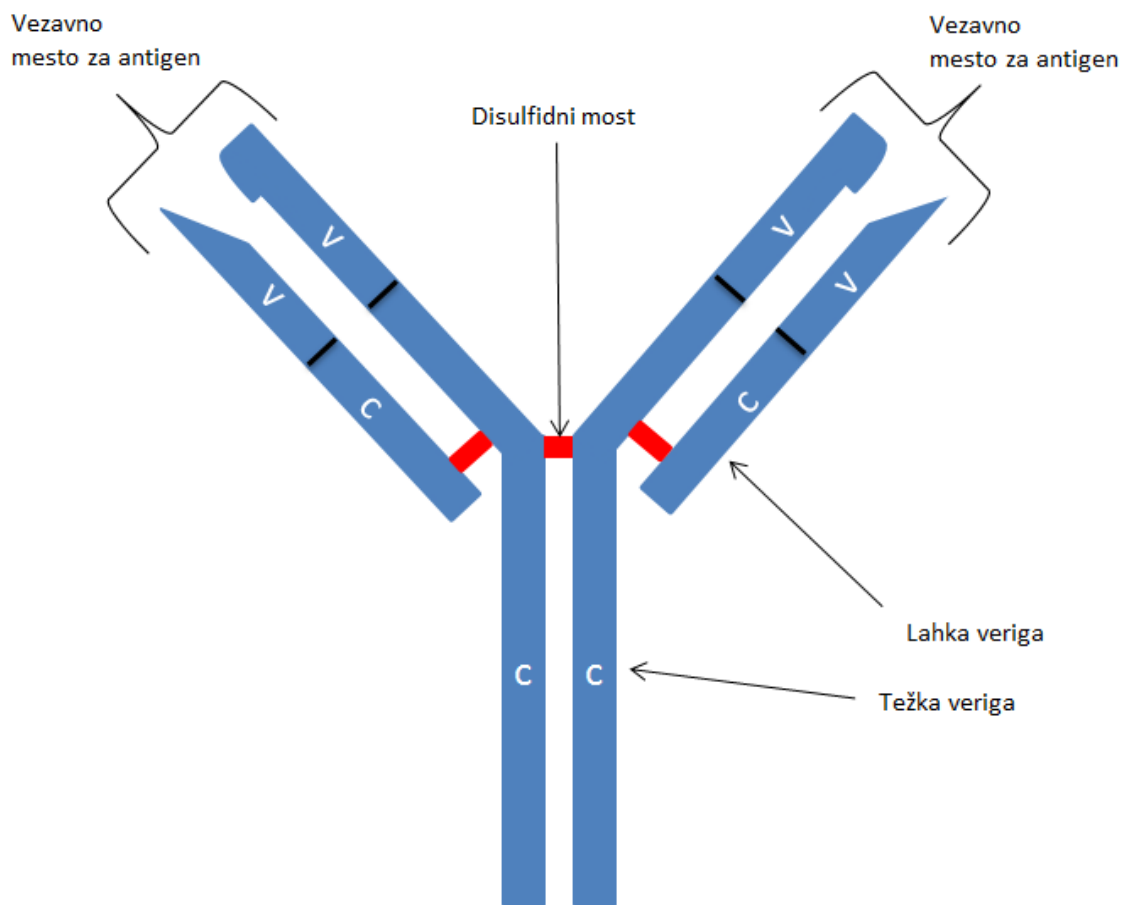
Specifični imunski sistem razdelimo na celičnega in humoralnega. Nosilci celične imunosti so citotoksični limfociti T, ki prepoznajo in uničijo z virusi okužene in rakave celice s sproščanjem citotoksičnih snovi (grancimov in perforina). Humoralno imunost izvajajo aktivirani limfociti B (t.i. plazmatke), ki izločajo *imunoglobuline* ali *protitelesa*. Protitelesa z vezavo na tujek tega nevtralizirajo ali pa ga označijo za sledeče uničenje, pri čemer sodelujejo fagocitne celice. Limfociti nastajajo v kostnem mozgu, zorijo pa v priželjcu (celice T) ali v kostnem mozgu (celice B). V procesu zorenja so limfociti podvrženi selekcijskim procesom, zato jih veliko odmre (predvsem tisti, ki bi škodovali telesu lastnim strukturam). Le del populacije doseže zrelost in se kasneje v sekundarnih limfatičnih organih srečuje s tujki oz. njihovimi antigeni<sup>[1]</sup>. *Antigen* lahko definiramo kot vsako snov, ki v organizmu povzroči imunski odziv<sup>[2]</sup>, saj se nanjo specifično vežejo protitelesa ali T-celični receptorji.

Vezava B-celičnih receptorjev na naivnih zrelih limfocitih B z antigeni predstavlja začetno stopnjo v aktivaciji celic B. Rezultat tega je tvorba hčerinskih celic, sposobnih proizvajanja topne oblike tega receptorja. Ta protein imenujemo protitelo oziroma imunoglobulin (Ig).

Limfociti B na končni stopnji diferenciacije (plazmatke) lahko tvorijo pet različnih oblik imunoglobulinov<sup>[1]</sup>:

1. IgD - membranski receptorji celic B, edini netopni;
2. IgM - intenzivno tvorjeni in prevladujoči v času embrionalnega razvoja<sup>[3]</sup>;
3. IgG - prevladujoči pri odraslih;
4. IgE - zagotavljajo imunost pred paraziti;
5. IgA - protitelesa prisotna v materinem mleku in se prenesejo na dojenčka; zagotavljajo zaščito v prebavnem traktu, kasneje so v aktivnem imunskem odzivu prisotni v solzah, slini in sluzi<sup>[1]</sup>).

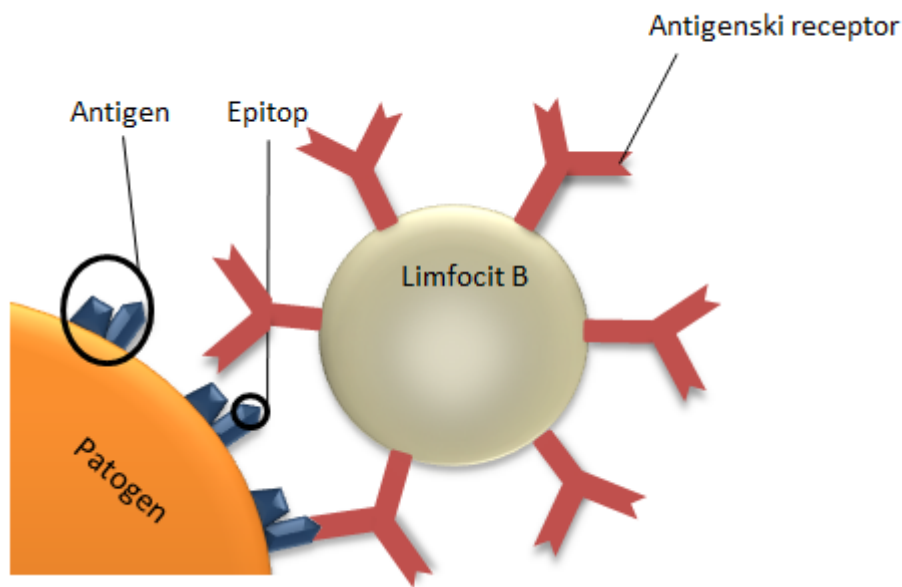
Specifičnost vseh razredov Ig je določena z enakimi strukturnimi elementi. Za protitelesa razreda G je značilna strukturna organizacija v obliki črke Y, enako kakor pri membranskih antigenskih receptorjih celic B. Imunoglobulin (IgG) sestavljajo štiri polipeptidne verige; po dve identični težki in lahki verigi, ki so med seboj povezane z disulfidnimi vezmi (slika 1)<sup>[1]</sup>.



**Slika 1. Zgradba imunoglobulina G<sup>[1]</sup>**

Z V so označene variabilne regije, s C pa konstantne regije IgG (prirejeno po <sup>[1]</sup>).

Vezavno mesto protitelesa (t.i. paratop) poseduje unikatno obliko, ki omogoča specifične veze vezavnih mest antigenov (*antigenskih determinant* ali *epitopov*) po principu ključ - ključavnica. Za tovrstne visoko specifične interakcije je pogoj sterična (prostorska) in elektrostatska komplementarnost med epitopom in vezavnim mestom protitelesa. Razlike v aminokislinskem zaporedju t.i. hipervariabilnih regij omogočajo variacije vezavnih površin in hkrati zagotavljajo visoko specifičnost vezav. Protitelesa, kakor tudi receptorji celic B, se vežejo z antigeni v krvnem obtoku ali limfnem sistemu, lahko se vežejo z epitopi antigenov, ki se nahajajo na površini patogenov, ali so topni (prosto gibajoči v telesnih tekočinah)<sup>[1]</sup>.



**Slika 2. Membranski receptorji celic B<sup>[1]</sup>**

*Antigenski receptor limfocita B vzpostavi vez z epitopom. Po vezavi sledi aktivacija in pomnožitev posameznih klonov celic B. Po diferenciaciji v plazmatke te izločajo protitelesa (topno obliko antigeneskega receptorja). Slednja so specifična za enak epitop, kot izvorni membranski receptorji limfocita B (prirejeno po <sup>[1]</sup>).*

Mehanizme delovanja protiteles ob prisotnosti antigenov lahko razdelimo v tri področja:

1. *Nevtralizacija*; protitelesa se vežejo na površino virusa, bakterijskih toksinov, itd. in ga s tem nevtralizirajo, saj onemogočijo njegovo vezavo na gostiteljske celice.
2. *Označevanje tujkov - opsonizacija*; protitelesa se vežejo na površino tujka in s tem pospešijo fagocitozo makrofagov in nevtrofilcev.
3. *Formacija por v membrani bakterijske celice*; na površino bakterije vezano protitelo pritegne in aktivira proteine komplekta. Končni rezultat je uničenje celice zaradi naluknjanja membrane.<sup>[1]</sup>

Posameznik tvori več kot 1 milijon različnih antigenskih receptorjev B celic. To omogočajo številne kombinacije zaporedij genov, ki kodirajo segmente imunoglobulinskih proteinskih verig. Proces premeščanja in združevanja genskih segmentov na nivoju genomske DNA v zgodnjih fazah zorenja limfocitov omogoča encimski kompleks imenovan rekombinaza. Proces je znan pod imenom *somatska rekombinacija*. Na primer, odsek namenjen kodiranju receptorjeve lahke verige tako membranskih imunoglobulinov, kot protiteles, je sestavljen iz treh genskih segmentov; za konstantno "c", variabilno "v" in združujočo "j" regijo, pri čemer regiji "v" in "j" skupaj kodirata variabilno območje verige receptorja, "c" pa konstantno. Gen za lahko verigo sestavlja en segment "c", en od 40 različnih segmentov "v" in en od 5 različnih segmentov "j", kar skupaj pomeni 200 različnih možnih kombinacij. Zgolj en alel lahke verige je preurejen v vsaki celici, te nastale spremembe so dolgoročne in se prenašajo na hčerinske celice, ko se limfociti B delijo (t.i. *klonalna ekspanzija* po aktivaciji limfocitov). Med pospešeno celično delitvijo se kopičijo dodatne spremembe genskega materiala (t.i. *hipermutacija*), kar omogoči nadaljnjo raznolikost vezavnih mest protiteles in omogoči nastanek visokoafinitetnih paratopov<sup>[1]</sup>.

### 2.1.1 Poliklonska protitelesa

Poliklonska protitelesa so produkti množice različnih klonov plazmatk<sup>2</sup>, vsa specifična za svoj epitop<sup>3</sup>. Poliklonska protitelesa organizem tvori po stiku z antigenom<sup>[4]</sup>.

### 2.1.2 Monoklonska protitelesa

Monoklonska protitelesa izvirajo iz samo enega klona celic B. Takšna protitelesa so identična in specifična za isti epitop na antigenu. V klinični medicini jih uporabljajo pri zdravljenju številnih rakavih in vnetnih bolezni. Pri tej vrsti terapije so sprva uporabljali mišja protitelesa,

---

<sup>2</sup> Plazmatka je bela krvnička, ki nastane iz limfocita B in proizvaja velike količine protiteles. Ima ekscentrično jedro in je močno bazofilna. Plazmatke se prenašajo po krvi in limfi. Kot vse krvne celice tudi plazmatke izvirajo iz kostnega mozga; limfociti B zapustijo kostni mozeg in se šele kasneje, predvsem v bezgavkah, pretvorijo v plazmatke (Neuberger s sodel., 2004)

<sup>3</sup> Epitop (tudi antigenska determinanta) je področje v makromolekuli antigena, ki ga prepozna imunski sistem. Limfociti B namreč izdelujejo protitelesa proti antigenom, vendar se protitelo ne more vezati na celoten antigen. Veže se na epitop. Predel protitelesa, ki se veže na epitop, se imenuje paratop. (Neuberger s sodel., 2004)

a so ta močno imunogena (človekov imunski sistem se nanje odzove s tvorbo protiteles, ki učinkovino nevtralizirajo ali pospešeno odstranjujejo iz organizma). Kasneje so razvili tudi t.i. himerna in humanizirana protitelesa, ki so v osnovi humana, a so variabilne oz. hipervariabilne regije zamenjane z mišjimi. Takšne učinkovine izkazujejo znatno nižjo imunogenost. Danes poznamo tudi metode za razvoj in pridobivanje popolnoma humanih protiteles<sup>[1]</sup>.

### 2.1.3 Avtoprotitelesa

Avtoprotitelesa so imunoglobulini, ki jih imunski sistem tvori proti telesu lastnim strukturam (t.i. *avtoantigenom*). V zdravem organizmu praviloma niso prisotna, pojavljajo se v primeru avtoimunskih bolezni in imajo v okvirih klinične medicine vlogo biomarkerjev na področju diagnostike avtoimunskih stanj. Specifična avtoprotitelesa so pogosto karakteristična za posamezne bolezni, usmerjena so proti eni ali več strukturam<sup>[2]</sup>. Eden izmed pristopov zdravljenja posameznika s patogenimi avtoprotitelesi je uporaba očiščenih peptidov, ki predstavljajo dominantne tarčne epitope in so zmožni induciranja tolerance celic B in T<sup>[3]</sup>.

## 2.2 Antigeni

Antigen je vsaka snov, ki ga po vdoru v organizem imunski sistem prepozna kot tujek in sproži odziv limfocitov B ali T. Na B- ali T-celične receptorje ter protitelesa se antigeni specifično vežejo le s posameznimi površinskimi odseki, ki jih imenujemo *antigenske determinante* ali *epitopi*. Posamezen antigen ima velikokrat več epitopov, vsakega prepozna specifičen receptor ali protitelo. Antigeni se pojavljajo v različnih oblikah:

- a) kot makromolekule polipeptidnih verig ali nukleinskih kislin,
- b) kot lipidi ali fosfolipidi in
- c) kot ogljikovi hidrati.

Običajno se v naravi ne srečujemo s polipeptidno verigo, ki bi zavzemala linearno obliko, ampak se zvije in tvori zapleteno prostorsko strukturo. Epitopi se med seboj razlikujejo po kompleksnosti.<sup>[2]</sup>

Epitope delimo na naslednje vrste:

- I. *Linearne*; v to skupino so uvrščene antigenske determinante z neprekinjenim aminokislinskim zaporedjem (zaporedni aminokislinski ostanki v polipeptidni verigi).
- II. *Konformacijske*; skupka aminokislinskih ostankov, ki se veže s paratopom, ne tvorijo nujno zaporedni aminokislinski ostanki polipeptidne verige, temveč je lahko sestavljen tudi iz ostankov, ki so v primarni strukturi ločeni, a se zaradi zvitja proteina približajo drug drugemu; torej šele prostorska (tridimenzionalna) oblika proteina privede do formacije epitopa.
- III. *Neoepitope*; antigenska determinanta, ki postane dostopna po denaturaciji, modifikaciji ali razcepitvi prvotnega antigena. Takšen epitop se lahko oblikuje po različnih procesih, npr. proteolizi, fosforilaciji, oksidaciji, acetilaciji, ipd.
- IV. *"Kriptotope" (kriptični epitopi)*; antigenski odseki, ki so v osnovi nedostopni ali skriti v notranjosti, oziroma se ne nahajajo na izpostavljenih območjih polipeptidne verige. Podobno kakor neoepitopi postanejo dostopni po določeni modifikaciji proteina, npr. razpadu antigeneskega kompleksa na posamezne podenote (po izgubi kvartarne strukture).
- V. *Kompleksne makromolekularne antigenske determinante*; sem spadajo pripadniki strukturno kompleksnejših epitopov. Predstavnik te skupine je kromatin (oblika tesno zapakirane DNA in proteinov), ki tvori epitope, sestavljene iz histonskih dimerov in dvoverižne DNA.

Antigeni in epitopi patogenov se razlikujejo v sposobnosti aktivacije imunskega odziva in proizvodnje protiteles. Določeni epitopi nastopajo dominantno in močan odziv na njih je lahko posledica nezmožnosti odziva na ostale nedominantne epitope. Dominantnejši pa niso nujno najučinkovitejši pri induciranju protiteles, ki nevtralizirajo viruse. Z vpeljavo epitopnih cepiv bi se ta problem lahko odpravil. V osnovi bi izbirali peptide na podlagi njihovih sposobnosti sprožanja nevtralizacije virusnih delcev, ne pa na podlagi njihove površinske dostopnosti (učinkovitejši epitopi so lahko manj dostopni v polipeptidni verigi).



### **2.2.1 Mimotop**

Pod tem izrazom poznamo peptidno makromolekulo, sposobno posnemanja strukture ali biokemijskih lastnosti antigenske determinante antigena. Prisotnosti mimotopa sproži zelo podoben ali celo enak odziv, kakor bi ga sprožil epitop, ki ga mimotop oponaša<sup>[2]</sup>.

## **2.3 Kartiranje epitopov**

Kartiranje epitopov je proces, katerega cilj je določitev antigenskih vezišč na površini proteinskih antigenov, ki jih prepoznajo in se nanje vežejo protitelesa. Poznavanje interakcij med antigenom in njegovim protitelesom na molekularnem nivoju je pomembno in ima uporabno vrednost predvsem na področju identifikacije alergenov, pri razvoju t.i. epitopnih cepiv proti patogenim mikroorganizmom in pri imunizaciji posameznika z izoliranimi antigeni<sup>[5]</sup>.

### **2.3.1 Metode kartiranja**

Omejena protoliza očiščenih proteinov (makromolekularnih antigenov) je včasih predstavljala metodo izbora za določevanja strukture antigenskih determinant. Na primer epitope histonov so kartirali z analizo interakcij produktov omejene proteolize histonov in nukleosomov s protitelesi. Antigene peptide (takšne, ki so jih vezala protitelesa proti prvotnemu makromolekularnemu antigenu) so identificirali s kromatografijo, skopljeno z masnim detektorjem in poliakrilamidno gelsko elektroforezo. Slabost tega pristopa je, da smo praviloma omejeni na identifikacijo linearnih epitopov, konformacijskih pa ne prepoznamo<sup>[5]</sup>.

#### **2.3.1.1 Uporaba rekombinantnih proteinov**

Rekombinantne proteine uporabljamo za določanje vezišč protiteles s pomočjo metod prenosa imenovanega western ali encimskoimunskega testa (ELISA). Ta strategija je primerna za ugotavljanje lokacije epitopa in dovoljuje dokončno določitev specifičnosti vezišča z usmerjeno mutagenozo proteinskega antigena. Po principu usmerjene mutageneze je mogoče nadomestiti poljuben aminokislinski ostanek z drugim na želeni lokaciji antigena. Zatem sledi testiranje sposobnosti vezave modificiranega antigena. Povezava zamenjave

nativnega aminokislinskega ostanka z izgubo zmogljivosti vezave služi kot pokazatelj morebitne prisotnosti tega ostanka v samem epitopu. Tradicionalni postopki kloniranja, izražanja, izolacije in čiščenja rekombinantnih proteinov so časovno zahtevni. Z izboljšavami sinteze genov se je tudi pridobivanje genskih konstruktov za izražanje rekombinantnih proteinov, ki jih želijo proučiti, bistveno izboljšalo<sup>[2]</sup>.

### **2.3.1.2 Predstavitev na bakteriofagu**

Predstavitev na bakteriofagu je tehnika, ki temelji na izražanju eksogenih antigenskih fragmentov (peptidov) na površini proteinske ovojnice (kapside) bakteriofagov s tehnologijo rekombinantne DNA<sup>[6]</sup>. Pri tej tehniki običajno kot gostiteljski organizem uporabljamo bakterijo *Escherichia coli*. Tehnika je uporabna za determinacijo vezavnih epitopov v serumih ali ob prisotnosti poliklonskih/monoklonskih protiteles<sup>[5,7]</sup>.

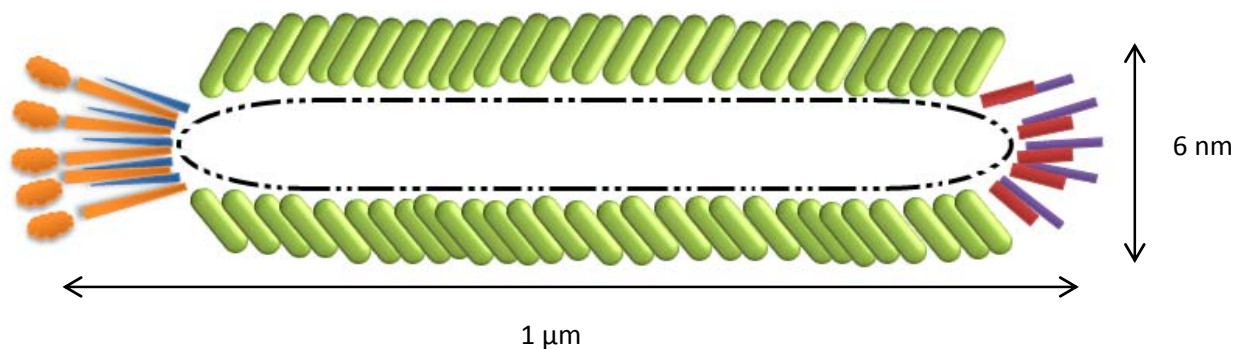
#### **2.3.1.2.1 Bakteriofagne predstavitvene knjižnice**

Bakteriofagne predstavitvene knjižice naključnih peptidov so ustvarjene s pomočjo fagnih vektorjev, kjer so kratki, (delno) degenerirani oligonukleotidi vstavljeni pred 5' - ali za 3' – konec gena, ki kodira strukturni (kapsidni) protein (v primeru nitastih bakteriofagov zlasti pred gena gIII ali gVIII, ki kodirata proteina p3 in p8 (slika 4)). Naključno aminokislinsko zaporedje peptidov, izraženih na posameznem bakteriofagnem klonu, je posledica dejstva, da v procesu sinteze oligonukleotidnega inserta omogočimo, da katerikoli izmed štirih dušikovih baz (gvanin, adenin, timin, citozin) zasede poljubno mesto na oligonukleotidu. Rezultat tega je izredna raznolikost izraženih peptidov; pri krajših peptidih so mogoče vse permutacije aminokislin. Sleherni bakteriofag v knjižici tako izrazi peptid, ki ga kodira enoverižni genom<sup>[2]</sup>. Knjižnica vsebuje heterogeno mešanico številnih različnih bakteriofagov, vsak z različnim vstavljenim odsekom DNA<sup>[8]</sup>. V knjižici Ph.D.-12 so na površini nitastega bakteriofaga M13 izraženi linearni dodekapeptidi, pri Ph.D.-C7C pa ciklični nonapeptidi (tj. naključni heptapeptidi, obdani z dvema cisteinoma, ki tvorita intramolekularno disulfidno vez)<sup>[9]</sup>.

Ko bakterijsko celico okuži določen bakteriofag, se v njej namnoži in tvori množico bakteriofagnih klonov, ki na kapsidnih proteinih izražajo enak peptid<sup>[8]</sup>.

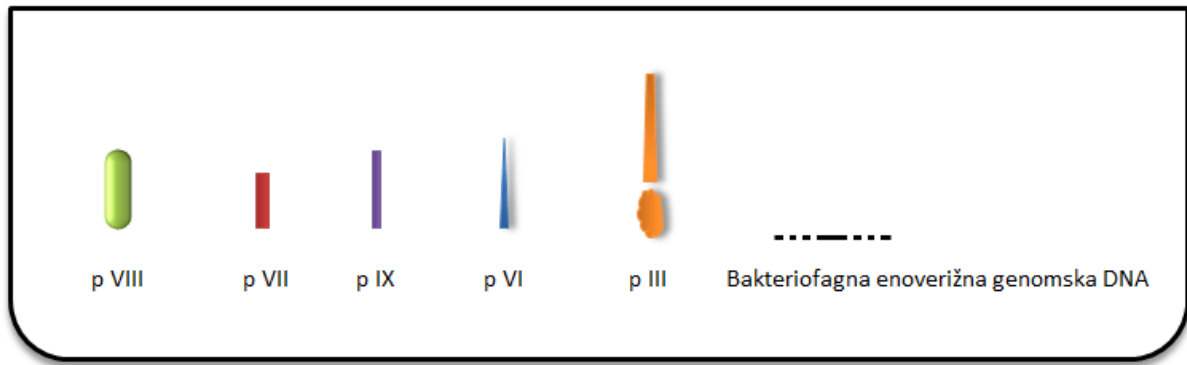
Neposredna povezava aminokislinskega zaporedja peptida z genskim materialom ustvari možnost izolacije bakteriofagov z afinitetno selekcijo (npr. vezave s specifičnimi protitelesi) in natančno določitev aminokislinskega zaporedja vezavnega peptida s standardnim sekvenciranjem DNA<sup>[8]</sup>.

Filamentni ali nitasti bakteriofagi, katerih predstavnik je bakteriofag M13, napadajo bakterijske celice tako, da se z N-končno domeno<sup>4</sup> proteina III povežejo z bakterijskim F-pilusom<sup>5</sup>. S tem je omogočen vdor bakteriofagnega genoma v gostiteljsko celico. Kapsidni proteini se »raztopijo« v celični ovojnici, gola enoverižna DNA pa vstopi v citoplazmo, kjer je sintetizirana njena komplementarna veriga s pomočjo gostiteljskih encimskih mehanizmov. Rezultat je dvoverižna replikativna oblika, ki služi kot matrica za transkripcijo ter tvorjenje novih enoverižnih verig DNA. Te se s pomočjo posebnih bakteriofagnih proteinov transportirajo skozi celično ovojnico, kjer se obdajo z ovojnimi kapsidnimi proteini in zapustijo celico kot dovršeni virusni delci<sup>[8]</sup>.



<sup>4</sup> Domena je odsek proteina (del polipeptidne verige) z neodvisnim globularnim zvitjem.

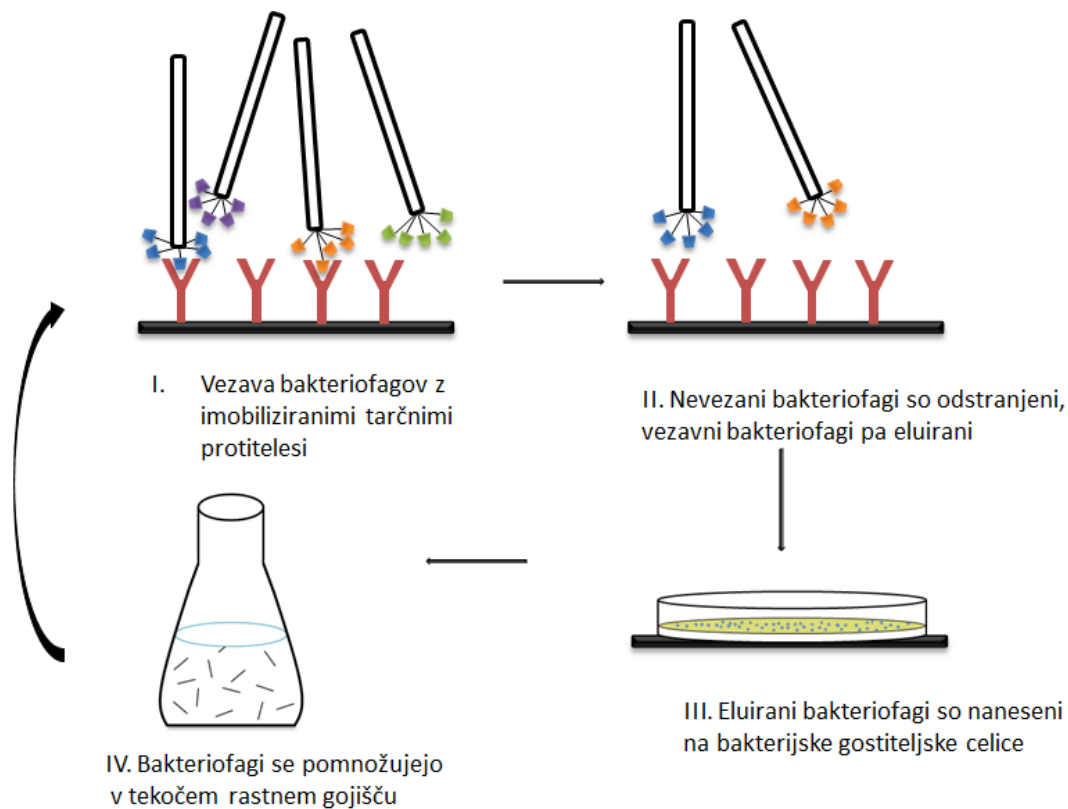
<sup>5</sup> Pilus je cevasta struktura, ki omogoča prenos genskega zapisa med bakterijami v procesu konjugacije (izmenjavo plazmidov).



**Slika 3. Zgradba filamentnega bakteriofaga.**

*Sistem predstavitve tipa 3: vseh 5 kopij rekombinantnih peptidov, spojenih s kapsidnimi proteini III, je enakih (prirejeno po <sup>[10]</sup>).*

Afinitetna selekcija heterogene populacije bakteriofagov je umetni proces ločevanja na osnovi razlik v dovzetnosti za vezavo z določenim receptorjem. Cilj je specifična izolacija tistih klonov, ki kažejo močno sposobnost vezave. V začetnih selekcijskih fazah je prisotna visoka raznolikost bakteriofagov, kasneje diverziteta upada na račun obogatitvne specifičnih vezalcev<sup>[8]</sup>. Po vsaki stopnji selekcije izolirano subpopulacijo bakteriofagov pomnožimo in selekcijski postopek ponovimo. Potek takšne selekcije je prikazan na sliki 4.



**Slika 4. Shematska predstavitev afinitetne selekcije klonov iz bakteriofagne predstavitvene knjižnice** (prirejeno po<sup>[10]</sup>).

### 2.3.1.3 Kokristalizacija in rentgenska kristalografska difrakcija

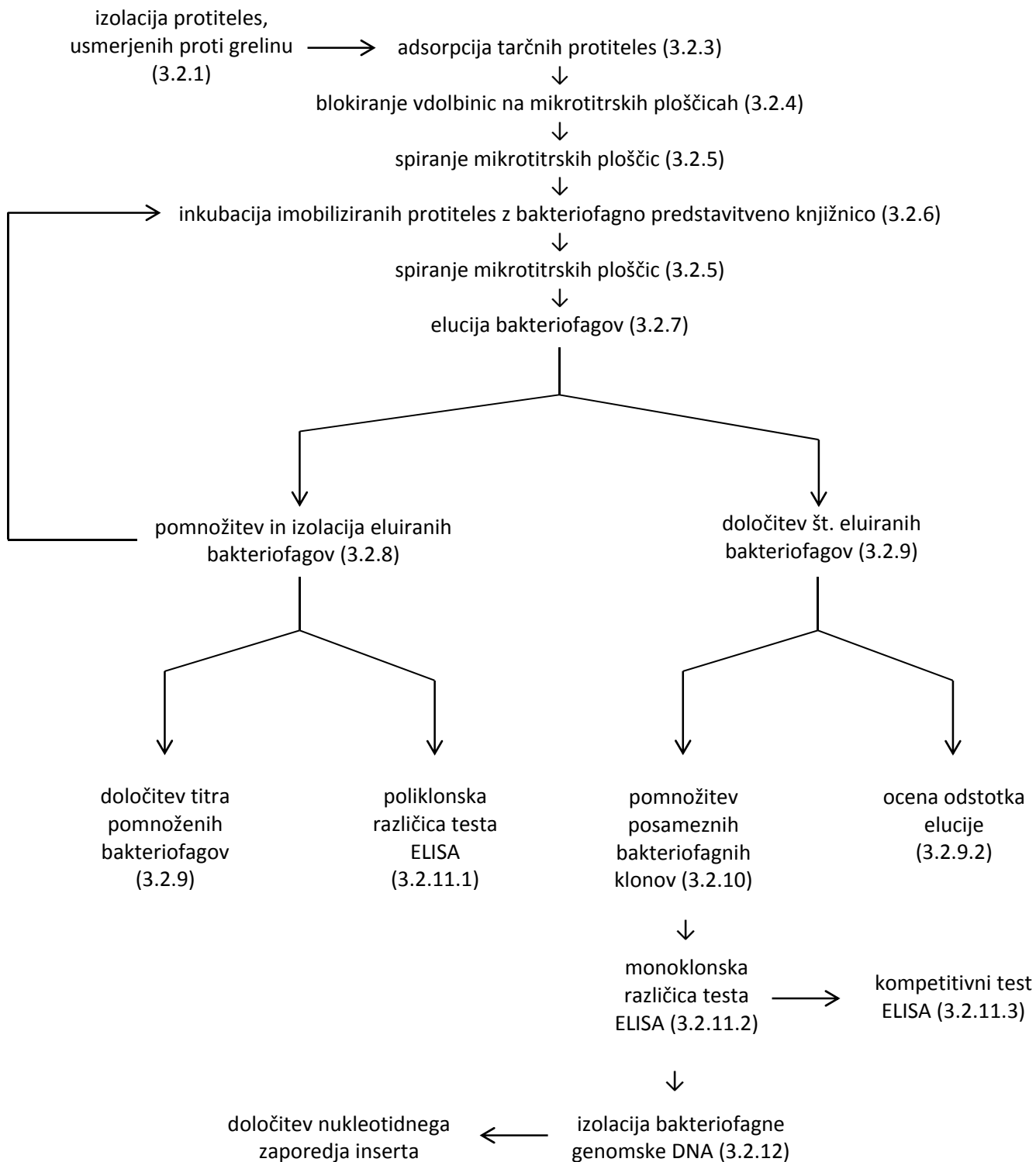
Ena izmed naprednejših modernih tehnologij za določanje epitopov je uporaba rentgenske kristalografske difrakcije. Očiščen antigen s protitelesom v procesu kokristalizacije tvori komplekse antigen-protitelo. Kristal izpostavimo rentgenskim žarkom. Pridobljene difrakcijske vzorce (zaradi ponavljajoče se kristalne strukture in specifične organizacije osnovnih gradnikov) uporabimo za konstrukcijo karte elektronske gostote, v katero umestimo atome kompleksa antigena in protitelesa. Tako oblikujemo prostorski model imunskega kompleksa visoke resolucije. Med mnogimi poskusi ustvarjanja tovrstnih kristalnih struktur in prepoznavanja epitopov je bilo razmeroma malo res uspešnih. Po drugi strani pa so s to tehniko uspešno pridobljeni rezultati zelo zanesljivi in omogočajo tudi identifikacijo konformacijskih epitopov<sup>[2]</sup>.

## 2.4 GRELIN

Grelin je linearni peptidni želodčni hormon, ki povzroča sproščanje ravnega hormona iz hipofize in uravnava apetit. Omenjena učinka izzove z aktivacijo z G-proteinom sklopljenega receptorja, t.i. receptorja sekretarnega ravnega hormona v centralnem živčnem sistemu. Leta 1999 ga je v ekstraktu iz podganjega želodca odkril japonski znanstvenik Kojima.<sup>[11]</sup>

Sestavljen je iz 28 aminokislinskih ostankov in nosi nenavadno posttranslacijsko modifikacijo: hidroksilna skupina aminokislinskega ostanka na mestu 3 (serin 3) je zaestrena z oktanojsko kislino. Človeški gen za grelin se nahaja na krajši roki kromosoma 3, na lokusu 3p25-26. Tako kot tudi mišjega, človeški gen za grelin sestavlja 5 eksonov. 28 aminokislinskih funkcionalnega peptida grelina je zapisanih v eksonih 1 in 2. Grelin ima več znanih fizioloških funkcij, kot je na primer močan vpliv na izločanje ravnega hormona. Najvišji stimulacijski vpliv somatoliberina (GHRH, angl. growth hormone releasing hormone) je v primerjavi z grelinovim dvakrat do trikrat manjši. Druga znana fiziološka funkcija grelina je povzročanje občutka lakote. Intravensko in podkožno injiciranje grelina poviša količino zaužite hrane. Grelin nastaja tudi v možganih; nevroni, ki sproščajo grelin, se nahajajo v arkuatnem jedru hipotalamusa, ki skrbi za regulacijo apetita. Intravenska aplikacija grelina prav tako vpliva na povišano izločanje želodčne kisline, stimulira krčenje želodca ter znižuje krvni tlak, ne da bi pri tem povzročali spremembe v srčnem utripu. Grelin je posredno vpleten tudi v nadzor koncentracije plazemske glukoze. Ugotovili so, da v pogojih *in vitro* grelin ob povišani prisotnosti glukoze spodbuja izločanje inzulina, nasprotno pa ob normalnih vrednostih glukoze grelin ne vpliva na izločanje inzulina. Grelin zavira izločanje inzulina, kar privede do hiperglikemije. Zaradi nasprotij med rezultati raziskav so znanstveniki mnenja, da so na področju odnosa grelina do inzulina potrebne še dodatne raziskave. Enako velja za, do sedaj še nepopolnoma pojasnjeno, sintezno pot grelina<sup>[12]</sup>.

### 3 PRAKTIČNI DEL



Organigram 1: Shema eksperimentalnega dela. (Bratkovič T., 2013)

### 3.1 MATERIALI IN OPREMA

#### 3.1.1 Kemikalije

**Tabela I:** Seznam uporabljenih kemikalij. Vse kemikalije so čistoče p.a.

KEMIKALIJA	PROIZVAJALEC
Agar – agar	Carl Roth, Karlsruhe, Nemčija
Agaroz	Sigma- Aldrich, St. Luis, Missouri, ZDA
Tripton "Bacto™ Tryptone"	Becton Dickinson and Co., Sparks, ZDA
Etanol, absolutni	Riedel-de Haën AG, Seelze, Nemčija
Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1 (10 mg/mL)	Life Technologies Corporation AS, Norveška
Glicin	Sigma- Aldrich St. Luis, Missouri, ZDA
IPTG (izopropil- β-D-1-tiogalaktopiranozid)	Promega, Madison, Wisconsin, ZDA
KCl	Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italija
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kemika, Zagreb, Hrvaška
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt, Nemčija
Kvasni ekstrakt "Bacto™ Yeast Extract"	Becton Dickinson and Co., Sparks, ZDA
MgCl <sub>2</sub>	Fluka Chemie, Buchs, Švica
NaCl	Sigma- Aldrich, St. Luis, Missouri, ZDA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Sigma- Aldrich, St. Luis, Missouri, ZDA
Polietilen glikol 8000 (PEG-8000)	Sigma- Aldrich, St. Luis, Missouri, ZDA
Posneto mleko v prahu	Pomurske mlekarne, Slovenija
Tetraciklin	Sigma- Aldrich, St. Luis, Missouri, ZDA
TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin)	Sigma- Aldrich, St. Luis, Missouri, ZDA
Tris · HCl	SERVA Electrophoresis GmbH, Nemčija
Tween 20 (Polisorbat 20)	Sigma- Aldrich, St. Luis, Missouri, ZDA

#### 3.1.2 Laboratorijska oprema

**Tabela II:** Seznam laboratorijske opreme, uporabljene v eksperimentalnem delu

OPREMA	PROIZVAJALEC
Analitska tehnica (± 0,0005 g)	Mettler Toledo, Küsnacht, Švica
Avtoklav 2540 EL	Systec, Wettenberg, Nemčija
Namizni centrifugi	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Inkubator (37 °C)	Binder GmbH, Tuttlingen, Nemčija
Magnetni mešalnik	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Mikrotitrski čitalec Safire	Tecan, Männedorf, Švica
Mikrotitrne ploščice	Nunc, Roskilde, Danska
Mikrovalovna pečica	LG, Seul, Južna Koreja
pH meter	Metrohm, Herisan, Švica
Mikropipete	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Spektrofotometer ND-1000	NanoDrop Technologies, Delaware, ZDA
Rotacijski Stresalnik	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Vibracijski mešalnik	Tehtnica, Železniki, Slovenija



### 3.1.3 Biološki material

**Tabela III:** Gostiteljski sev bakterij za pomnoževanje knjižničnih bakteriofagov.

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

**Tabela IV:** Bakteriofagni predstavitveni knjižnici naključnih peptidov.

PREDSTAVITVENI BAKTERIOFAGNI KNJIŽNICI	PROIZVAJALEC
Ph.D. - 12	New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, ZDA
Ph.D. - C7C	

**Tabela V:** Modelno poliklonsko protitelo kot tarča afinitetne selekcije.

POLIKLONSKO PROTITELO, USMERJENO PROTI GRELINU	PROIZVAJALEC
sc-10368	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, ZDA

**Tabela VI:** Antigen tarčnih protiteles.

SINTEZNI GRELIN	PROIZVAJALEC
Biotiniran grelin	Phoenix Pharmaceuticals Inc.

### 3.1.4 Priprava pufrov in gojišč

**PBS – fosfatni pufer** (50 mM fosfat, 150 mM NaCl, pH 7,4)

**Tabela VII:** Priprava fosfatnega pufra.

SESTAVA	
NaCl	3,2 g
KCl	0,8 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,57 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,096 g
ddH <sub>2</sub> O	do 400 mL

Pufro smo postopoma dodajali HCl, da je pH padel na 7,4. Avtoklavirani pufer smo shranili pri sobni temperaturi.

### **PBST – PBS s Tween 20 (0,05 %, 0,1 %, 0,5 % in 0,075 %)**

Pufru PBS smo dodali Tween 20 reagent do predpisane koncentracije. Pufer smo hranili pri sobni temperaturi.

### **Pufer za blokiranje**

V pufru PBS smo raztopili posneto mleko v prahu do koncentracije 5 %. Blokirni pufer smo vselej pripravili tik pred uporabo.

### **Elucijski pufer (0,2 M glicin · HCl, 1 g/L BSA, pH 2,2)**

**Tabela VIII:** Priprava elucijskega pufra.

<b>SESTAVA</b>	
<b>HCl (0,2 M)</b>	330 µL
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	20 mL

Pufru smo postopoma dodajali nasičeno raztopino glicina, da je pH zrasel na 2,2, ga sterilizirali z membransko filtracijo in ga hranili pri sobni temperaturi (25,0 °C).

### **Nevtralizacijski pufer (1 M Tris·HCl, pH 9,1)**

**Tabela IX:** Priprava nevtralizacijskega pufra.

<b>SESTAVA</b>	
<b>Tris</b>	2,423 g
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	do 20 mL

Pufru smo postopoma dodajali HCl, da je pH padel na 9,1 in ga po avtoklaviranju shranjevali pri sobni temperaturi.

### **PEG (polietilenglikol) in NaCl**

**Tabela X:** Priprava raztopine PEG in NaCl.

<b>SESTAVA</b>	
<b>PEG-8000</b>	8 g
<b>NaCl</b>	5,85 g
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	do 40 mL

Raztopino smo avtoklavirali in jo hranili pri sobni temperaturi.

**Tris-pufer z jodidnimi ioni** (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 4 M NaI)

**Tabela XI:** Priprava tris-pufra z jodidnimi ioni.

<b>SESTAVA</b>	
<b>Tris</b>	48,5 mg
<b>0,5 M EDTA</b>	80 $\mu$ L
<b>NaI</b>	23,98 g
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	do 40 mL

Pufru smo uravnali pH na 8,0 s HCl, ga sterilizirali z membransko filtracijo in ga hranili pri sobni temperaturi zaščitenega pred svetlobo.

### **LB – tekoče gojišče**

**Tabela XII:** Priprava LB – tekočega gojišča.

<b>SESTAVA</b>	
<b>Tripton</b>	4 g
<b>kvasni ekstrakt</b>	2 g
<b>NaCl</b>	2 g
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	do 400 mL

Gojišče smo avtoklavirali in ga hranili pri sobni temperaturi.

### **LB – agar – agar gojišče**

**Tabela XIII:** Priprava agarnega gojišča.

<b>SESTAVA</b>	
<b>gojišče LB</b>	400 mL
<b>agar</b>	6 g

Gojišče smo avtoklavirali in ga shranjevali pri sobni temperaturi.

### **LB – agaroza**

**Tabela XIV:** Priprava LB – agaroze.

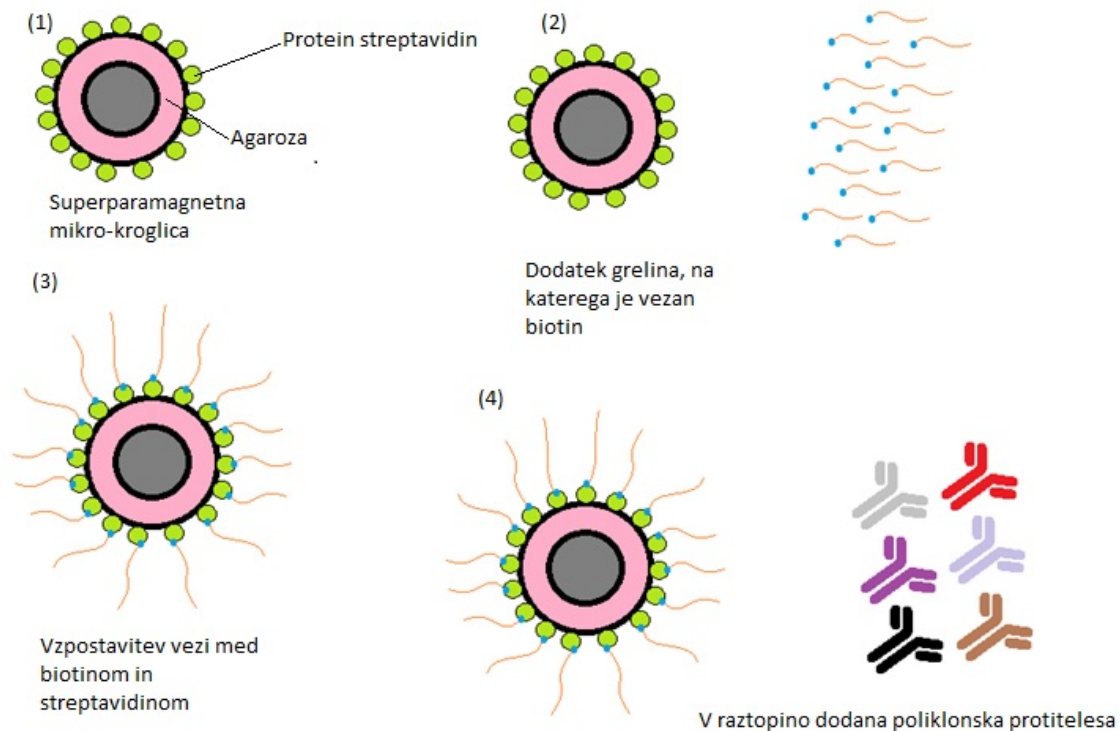
<b>SESTAVA</b>	
<b>gojišče LB</b>	40 mL
<b>agaroza</b>	280 mg
<b>1 M MgCl<sub>2</sub></b>	197 $\mu$ L

Gojišče smo avtoklavirali in ga hranili pri sobni temperaturi.

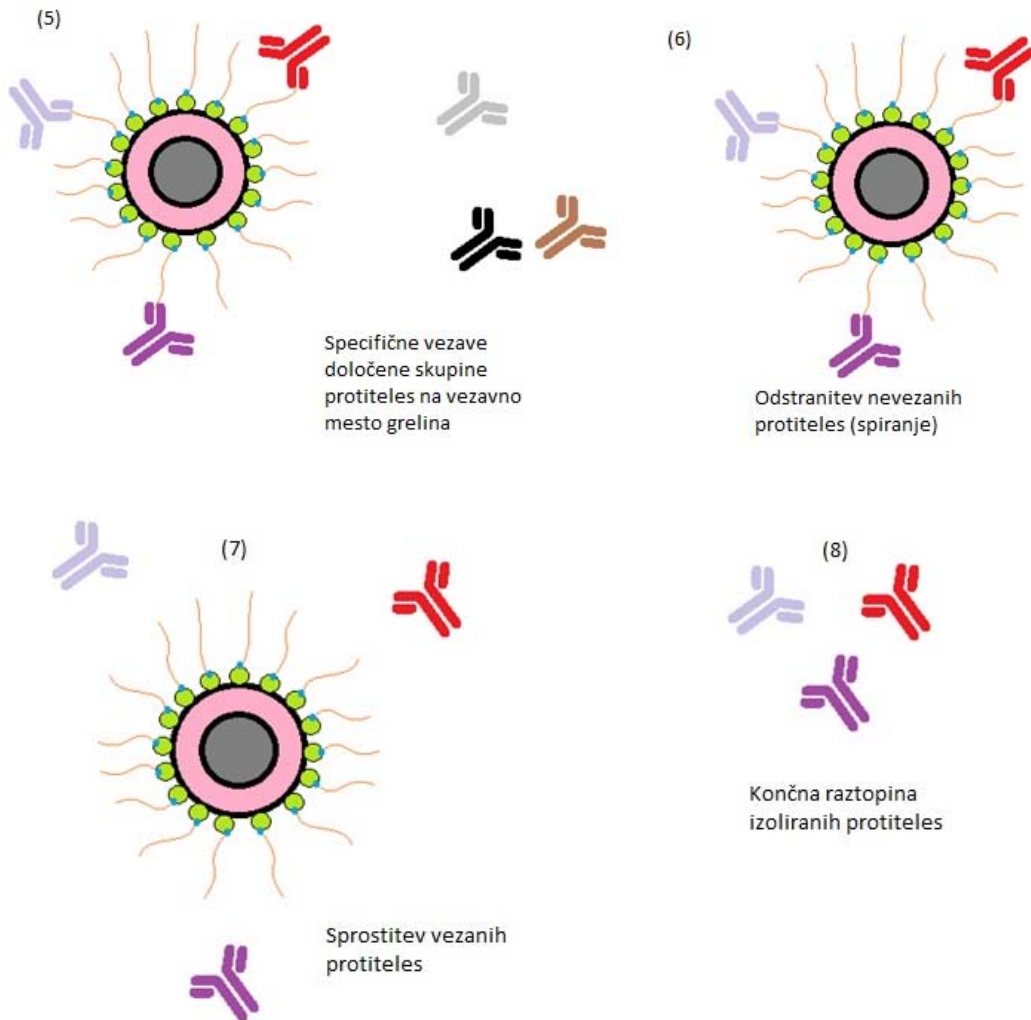
## 3.2 METODE DE LA

### 3.2.1 Izolacija protiteles, usmerjenih proti grelinu

V mikrocentrifugirko smo odpipetirali 50  $\mu\text{L}$  (500  $\mu\text{g}$ ) suspenzije Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1. Kroglice smo dvakrat spirali s po 1 mL 0,05 % pufra PBST s pomočjo stojala z vstavljenim magnetom, ki je na steno mikrocentrifugirke privlačil mikro-kroglice. Kroglice smo suspendirali v 100  $\mu\text{L}$  pufra PBS z 2,5  $\mu\text{g}$  biotiniranega grelina (slika 5.2) in jih stresali 30 minut. Pri tem se je grelin prek biotinske skupine vezal na streptavidin na površini kroglic (slika 5.3). Sledilo je trikratno spiranje s po 1 mL 0,05 % pufra PBST. Nato smo v mikrocentrifugirko dodali 30  $\mu\text{L}$  raztopine kozjih poliklonskih protiteles sc-10368 (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), usmerjenih proti grelinu (slika 5.4). Sledilo je enourno stresanje med katerim so se protitelesa vezala na imobiliziran grelin (slika 5.5), potem pa šestkratno spiranje s po 0.5 mL 0,05 % PBST (slika 5.6). Protitelesa smo eluirali v 50  $\mu\text{L}$  elucijskega pufra, ki je povzročil sprostitev specifičnih vezav (slika 5.7), močno stresali 3 minute in eluat nevtralizirali s 15  $\mu\text{L}$  nevtralizacijskega pufra (slika 5.8). Koncentracijo protiteles v eluatu smo ocenili spektrofotometrično.



**Slika 5: Shematska predstavitev poteka izolacije poliklonskih protiteles usmerjenih proti grelinu, iz raztopine vseh kozjih protiteles, predhodno izoliranih iz seruma z afinitetno kromatografijo na osnovi proteina G. (Bratkovič T., 2013)**



**Slika 5 (nadaljevanje s prejšnje strani).**

### **3.2.2 Priprava kultur gostiteljskega seva bakterije *E. coli* ER2738**

#### **3.2.2.1 Precep trajne kulture na agarno gojišče**

Na površino agarne gojišča LB smo najprej s sterilno spatulo po Drigalskem razmazali antibiotik tetraciklin, zatem pa še s sterilno mikrobiološko zanko nacepili bakterije iz trajne zmrznjene (hranjene v zamrzovalniku pri  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) gostiteljske bakterijske kulture *E. coli*. Petrijevke smo inkubirali preko noči pri temperaturi  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kasneje pa smo jih hranili v hladilniku pri  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **3.2.2.2 Priprava kulture za mikrobiološko titracijo bakteriofagov**

Posamezno bakterijsko kolonijo iz petrijevke smo prenesli v gojišče LB in kulturo na stresalniku pustili namnoževati približno štiri ure in pol, do dosežene optične gostote  $\text{OD}_{600} = 0,5 - 1,0$ . To kulturo smo nato uporabili v postopku mikrobiološke titracije bakteriofagov (3.2.9). Kulturo smo vedno vnaprej pripravili nekaj ur pred titracijo.

#### **3.2.2.3 Priprava kulture za pomnoževanje bakteriofagov**

Priprava kulture za pomnoževanje bakteriofagov se v principu ne razlikuje od priprave kulture za mikrobiološko titracijo (3.2.2.2), le da smo bakterije pomnoževali krajši čas, da je kultura dosegla optično gostoto,  $\text{OD}_{600} = 0,01 - 0,05$ .

### **3.2.3 Imobilizacija tarčnih protiteles na površino vdolbinice mikrotitrne ploščice**

V vdolbinice polistirenske mikrotitrne ploščice smo odpipetirali po  $50\text{ }\mu\text{L}$  raztopine tarčnih protiteles v pufru PBS, vdolbinice zatesnili z lepilnim trakom in jih postavili v hladilnik preko noči. Za afinitetno selekcijo smo adsorbirali prečiščena protitelesa (3.2.1) iz raztopine koncentracije  $14\text{ }\mu\text{g/mL}$ , za test ELISA pa smo uporabili osnovno raztopino protiteles v koncentraciji  $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ .

### **3.2.4 Blokiranje vdolbinic mikrotitrskih ploščic**

V vdolbinice z adsorbiranimi protitelesi smo dodali po 200  $\mu\text{L}$  blokirnega pufra in mikrotitrsko ploščico nežno stresali 60 minut pri sobni temperaturi.

### **3.2.5 Spiranje vdolbinic mikrotitrskih ploščic**

Vsebino mikrotitrskih ploščic smo odlili v posodo za odpad in ploščice še dodatno osušili na papirnatih brisačkah. Vdolbinice smo spirali s po 250  $\mu\text{L}$  PBST med nežnim stresanjem 3-5 min. Med prvo stopnjo afinitetne selekcije smo vdolbinici spirali desetkrat z 0,1 % PBST, med drugo stopnjo pa petnajstkrat z 0,5 % PBST.

### **3.2.6 Inkubacija knjižničnih bakteriofagov s tarčnim protitelesom**

Po imobilizaciji tarčnega protitelesa na mikrotitrsko ploščico smo tarčo inkubirali s knjižničnimi bakteriofagi 1 uro, pri sobni temperaturi. Pri tem je potekla vezava med protitelesi in tistimi bakteriofagi, ki so imeli na svoji površini izražene določene peptide, ki so posnemali epitope grelina.

### **3.2.7 Elucija bakteriofagov**

Med postopkom spiranja smo odstranili bakteriofage, ki se niso specifično vezali na tarčne proteine, vezane bakteriofage pa smo eluirali v 100  $\mu\text{L}$  elucijskega pufra; elucija je potekala pri sobni temperaturi 10 min. Eluat smo previdno prenesli v sterilno centrifugirko in mu dodali 30  $\mu\text{L}$  nevtralizacijskega pufra.

### 3.2.8 Pomnožitev in izolacija eluiranih bakteriofagov

Eluirane bakteriofage smo pomnožili z okužbo gostiteljskega bakterijskega seva. Celotni eluat (z izjemo manjšega volumna za titracijo (3.2.9)) smo prenesli v 20-mL kulturo (3.2.2.3) in bakterije inkubirali med močnim stresanjem 4,5 h pri 37 °C. Kulturo smo nato centrifugirali, da smo odstranili bakterije, bakteriofage v supernatantu pa oborili z dodatkom 3,5 mL PEG/NaCl. Centrifugirko smo preko noči shranili pri 4 °C. Naslednje jutro smo suspenzijo centrifugirali, virusi so tvorili usedlino na dnu centrifugirke, gojišče smo odlili. Bakteriofage smo suspendirali v 1 mL pufru PBS, suspenzijo prenesli v mikrocentrifugirko in jo centrifugirali. Netopne tvorbe (npr.: celične stene bakterij) so se posedle. Supernatant z bakteriofagi smo prenesli v novo mikrocentrifugirko s 170 µL PEG/NaCl, dobro premešali jo inkubirali 60 min na ledu. Po centrifugiranju smo odlili pufer in bakteriofage suspendirali v 200 µL PBS, ponovno centrifugirali in t.i. *pomnoženi eluat* shranili pri 4 °C.

### 3.2.9 Mikrobiološka titracija

Z mikrobiološko titracijo lahko določimo bakteriofagno koncentracijo v nepomnoženih in pomnoženih eluatih. Bakteriofagne suspenzije smo redčili s tekočim gojiščem LB. Agarna gojišča LB smo ogreli do temperature 37 °C. V mikrovalovni pečici smo raztalili agarozno gojišče LB ter odmerili okoli 3,5 mL za posamezno redčenje suspenzije bakteriofagov. Nato smo še v vsako mikrocentrifugirko s segretim agarnim gojiščem LB dodali 2 % X-gal in IPTG, ki sta poskrbela za modro/belo obarvanje, torej identifikacijo bakterijskih kolonij, okuženih z rekombinantnimi virusi. Z mikropipeto smo po 10 µL redčenega eluata prenesli v mikrocentrifugirke s po 200 µL bakterijske kulture za mikrobiološko titracijo (3.2.2.2). Z virusi okuženo bakterijsko kulturo smo prenesli v raztaljeno agarozno gojišče LB, termostatirano pri 52 °C, premešali z vibracijskim mešalnikom in nanесли na ogrete petrijevke z agarnim gojiščem LB. Počakali smo, da so se gojišča v petrijevkah strdila, potem smo petrijevke obrnili za 180°, jih opremili z ustreznimi oznakami (z oznako redčitev in bakteriofagne knjižice), zatesnili s parafilmom in preko noči inkubirali pri temperaturi 37 °C. Naslednji dan smo prešteli modre plake na petrijevkah in določili titer bakteriofagov v nepomnoženem oz. pomnoženem eluatu (3.2.9.1) ali ocenili odstotek elucije (nepomnoženi eluati; 3.2.9.2).



### 3.2.9.1 Določitev števila eluiranih bakteriofagov in določitev titra bakteriofagov v pomnoženem eluatu

Število eluiranih bakteriofagov smo določili po enačbi 1, pri kateri  $n$  predstavlja število plakov na plošči (pfu, plakatvorna enota (angl. *plaque forming unit*)),  $R$  je faktor redčitve,  $V$  pa določa volumen posamezne redčitve bakteriofagov, s katerim smo okužili bakterije, v našem primeru 10  $\mu\text{L}$ . 130  $\mu\text{L}$  je volumen eluata po dodatku nevtralizacijskega pufra.

$$\text{število eluiranih bakteriofagov} = ((n \times R) : V) \times 130 \mu\text{L} \quad (\text{enačba 1})$$

Titer (koncentracijo (v pfu/mL) bakteriofagov v pomnoženem eluatu smo ocenili po enačbi 2, pri čemer je  $n$  število plakov na plošči (pfu),  $R$  predstavlja faktor redčitve, 0,2 mL pa je volumen pufra PBS, v katerem smo suspendirali bakteriofage (3.2.8).

$$\text{titer bakteriofagov} = (n \times R) : 0,2 \text{ mL} \quad (\text{enačba 2})$$

### 3.2.9.2 Ocena deleža eluiranih bakteriofagov

Delež eluiranih bakteriofagov ( $E$ ) smo ocenili po enačbi 3, v kateri delitelj predstavlja število bakteriofagov (pfu), ki so vstopili v afinitetno selekcijo.

$$E = ((\text{število eluiranih fagov}) : (2,0 \times 10^{11} \text{ pfu})) \times 100 \% \quad (\text{enačba 3})$$

### 3.2.10 Pomnožitev posameznih bakteriofagnih klonov

Stokrat redčeno prekonočno kulturo gostiteljskega bakterijskega seva v gojišču LB smo razdelili po 2 mL v 10 mL centrifugirke in vanje prenesli posamezne plake iz druge selekcijske stopnje. Okužene bakterijske kulture smo inkubirali 4,5 h pri 37 °C med močnim stresanjem. Sledilo je pet minutno centrifugiranje, med katerim so se bakterije posedle na dno epruvete, gojišča z bakteriofagi pa smo prelili v nove epruvete.

### **3.2.11 Encimskoimunski test (ELISA)**

#### **3.2.11.1 Poliklonska različica testa ELISA**

Z metodo kvalitativnega encimsko imunskega testa in intenzitete spremembe barve v vlogi indikatorja stopnje afinitete bakteriofagov do tarčnih protiteles smo po zaključeni afinitetni selekciji testirali dovzetnost bakteriofagov obeh opravljenih selekcijskih stopenj za vezavo na tarčna protitelesa, usmerjena proti grelinu. Sočasno smo izvajali tudi kontrolni test z odsotnostjo protiteles.

Pripravili smo mikrotitrsko ploščico in na površino vdolbinic vezali protitelesa (3.2.3). Potem smo dodali 200  $\mu\text{L}$  blokirnega pufra PBS 5 % posnetim mlekom v prahu (3.2.4) in stresali eno uro. Sledilo je trikratno spiranje s po 250  $\mu\text{L}$  0,075 % pufra PBS z vmesnim pet minutnim stresanjem. Po končanem spiranju in odlitju pufra smo v posamezne vdolbinice dodali enak titer ( $5 \times 10^{10}$  pfu) bakteriofagov knjižic Ph.D.-12 ter Ph.D.-C7C iz prvega in drugega pomnoženega eluata ter mikrotitrsko ploščico inkubirali pri sobni temperaturi 1,5 h pri sobni temperaturi. Bakteriofage, ki so ostali nevezani, smo odstranili s spiranjem, dodali s hrenovo peroksidazo označena sekundarna protitelesa proti bakteriofagu M13 in ploščico ponovno inkubirali 1 h pri sobni temperaturi. Vdolbinice smo štirikrat sprali in nazadnje v vdolbinice dodali po 200  $\mu\text{L}$  kromogenega substrata TMB. Po nekaj minutah smo encimsko reakcijo ustavili z dodatkom 50  $\mu\text{L}$  2 M žveplove(VI) kisline. Vsebinsi vdolbinic smo z mikrotitrskim čitalcem izmerili absorbanco pri 450 nm.

#### **3.2.11.2 Monoklonska različica testa ELISA**

Izvedba monoklonske verzije encimskoimunskega testa je sledila poliklonski z namenom identifikacije bakteriofagnih klonov po drugi selekcijski stopnji, ki so izkazovali afiniteto do tarčnih protiteles. Tudi v tem primeru smo sočasno izvedli kontrolni test. Vsem klonom (3.2.10), ki so izkazovali visoko tendenco vezave na tarčna protitelesa (izmerjena vrednost absorbančnih signalov pri 450 nm nad 0,2), smo izolirali njihovo enoverižno DNA (3.2.12).

### **3.2.11.3 Kompetitivni test ELISA**

Izvedba kompetitivne različice testa ELISA se od prejšnjih dveh v osnovi razlikuje v tem, da bakteriofagi za vezavo na protitelesa, adsorbirana na površino mikrotitrne vdolbinice, tekmujejo z molekulami humanega grelina (1,4 µg/mL). Izvedli smo tudi kontrolni poskus brez prisotnosti grelina.

### **3.2.12 Izolacija bakteriofagne genomske DNA**

Bakteriofagnim klonom, ki smo jim s pomočjo monoklonskega testa ELISA (3.2.11.2) potrdili sposobnost vezave na tarčna protitelesa, smo izolirali njihovo genomsko enoverižno DNA. Posameznim klonom v gojišču LB (750 µL, 3.2.10) smo dodali 300 µL raztopine PEG/NaCl. Suspenzijo smo premešali in jo inkubirali 30 min pri 4 °C. Potem smo precipitirane bakteriofage posedli s centrifugiranjem (10 minut, 16100 vrt./min pri 4 °C). Oborini smo odstranili supernatant in jo suspendirali v Tris-pufri z jodidnimi ioni, ki so odgovorni za denaturacijo proteinske ovojnice filamentnih fagov. Vloga Na<sup>+</sup>(aq) protiionov je nevtralizirati v raztopini negativno nabite fosfatne skupine in s tem zmanjšati odbojne sile med ogrodji enoverižnih DNA. Zatem smo dodali suspenziji etanol, ki je s svojim polarnim delom vzpostavil vodikove vezi z molekulami vode ter jih tako odtegnil z DNA. Sledila je polurna inkubacija pri -20 °C, potem smo ponovili centrifugiranje in odstranili iz mikrocentrifugirk supernatant, ostalo oborino pa sprali s 70 % etanolom. Za tem smo še centrifugirali, odstranili supernatant in DNA posušili pri 37 °C. Suho DNA smo raztopili v 20 µL ultra čiste H<sub>2</sub>O. 5 µL vodne raztopine enoverižne DNA smo dodali 5 µL 5 µM začetnega oligonukleotida M13 -96 za reakcijo določitve nukleotidnega zaporedja, kar je opravilo podjetje GATC Biotech, Konstanz, Nemčija.

## **4 REZULTATI IN RAZPRAVA**

### **4.1 Izolacija pAB**

Kozji serum poleg poliklonskih protiteles, usmerjenih proti grelinu, vsebuje še vrsto drugih imunoglobulinov, ki bi predstavljali potencialne neželene tarče pri afinitetni selekciji peptidov iz bakteriofagnih predstavitvenih knjižnic. Ker smo želeli vzpostaviti specifične interakcije z na bakteriofagih izraženimi peptidi le z določenimi tarčnimi protitelesi, je bilo potrebno protitelesa proti grelinu izolirati od ostalih imunoglobulinov (komercialna protitelesa sc-10368 so iz kozjega seruma namreč izolirali z afinitetno kromatografijo s proteinom G, ki zadrži vse IgG). To smo storili s pomočjo suspenzije Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1. Suspenzija vsebuje paramagnetne mikro-kroglice s povprečnim premerom 1.0  $\mu\text{m}$ , obdane z monoslojem streptavidina. Streptavidin je očiščen protein z visoko afiniteto do biotina in je kovalentno vezan na hidrofilno agarozno kroglično površino. Paramagnetne mikro-kroglice uporabljamo pri magnetno pogojenemu ločevanju snovi v raztopinah. Vezava biotina s streptavidinom velja za eno izmed močnejših nekovalentnih interakcij, kar omogoča izredno uspešno izolacijo biotinirane molekule. Na streptavidinske mikro-kroglice smo vezali z biotinom označen grelin in nanje izmed imunoglobulinov kozjega seruma selektivno »polovili« poliklonska protitelesa proti grelinu. Interakcijo med antigenom (grelinom) in imunoglobulini smo prekinili s pomočjo pufru z nizko vrednostjo pH. Postopek shematsko povzema slika 5. Spektrofotometrično smo ocenili koncentracijo izoliranih protiteles na 55  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### **4.2 Afinitetna selekcija peptidov iz bakteriofagne predstavitvene knjižnice**

Potek afinitetne selekcije smo spremljali z določanjem števila eluiranih bakteriofagov v posamezni selekcijski stopnji in rezultate predstavili kot odstotek elucije (delež eluiranih fagov glede na titer, ki je vstopil v selekcijsko stopnjo ( $2 \times 10^{11}$  pfu)). Po opravljeni eluciji in pomnoževanju eluiranih klonov v gostiteljskih bakterijah smo del eluiranih bakteriofagov uporabili za poliklonsko različico testa ELISA. Iz nepomnoženih eluatov po drugi selekcijski stopnji smo izolirali posamezne bakteriofagne *klone* in z monoklonsko različico testa ELISA identificirali tiste, ki na svoji površini predstavljajo peptidne mimetike epitopov grelina.

Selektivno interakcijo predstavljenih peptidov s *paratopi* protiteles smo potrdili še s kompetitivno različico testa ELISA (tj. izpodrivanjem bakteriofagnih klonov s tarčnih protiteles z nativnim antigenom grelinom).

#### 4.2.1 Odstotek elucije

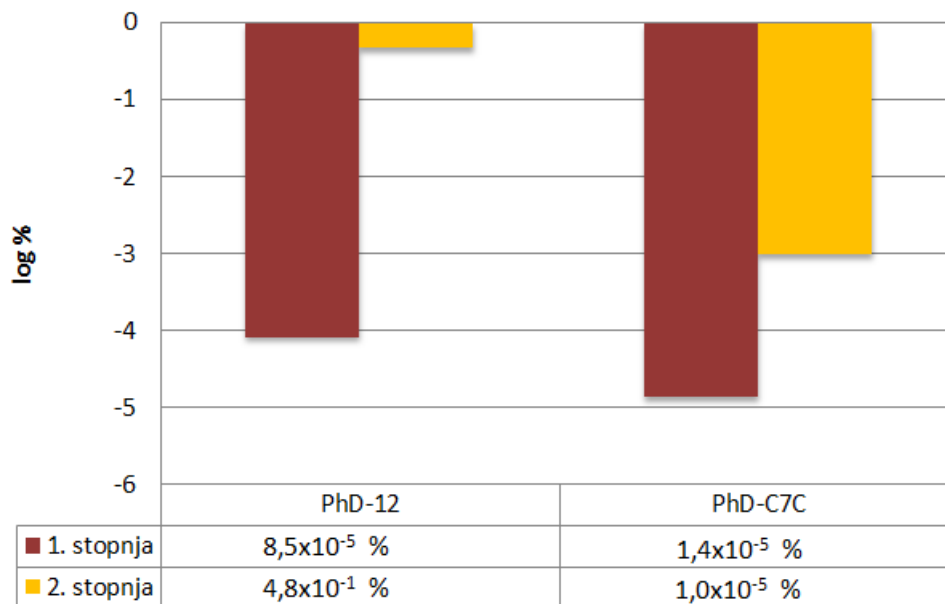
Tabeli XV in XVI prikazujeta določeno število eluiranih bakteriofagov po prvi in drugi selekcijski stopnji ter ocenjena odstotka elucije. Slednja nam povesta, kolikšen delež bakteriofagov smo ohranili po afinitetnih selekcijah (število bakteriofagnih delcev, ki so se vezali na tarčna protitelesa in smo jih uspešno zbrali z elucijo, glede na celotno število bakteriofagnih delcev, ki so vstopili v selekcijo). Po pričakovanjih je odstotek elucije narastel v drugi selekcijski stopnji (slika 6), kar nakazuje uspešen potek selekcije.

**Tabela XV.** Prikaz števila eluiranih bakteriofagov in odstotek elucije po prvi selekcijski stopnji za obe uporabljeni peptidni predstavitveni knjižnici.

redčitev eluata	število plakov [pfu]	
	Ph.D.-12	Ph.D.-C7C
10 <sup>1</sup>	1016	95
10 <sup>2</sup>	139	32
10 <sup>3</sup>	15	0
10 <sup>4</sup>	0	0
<b>število eluiranih fagov</b>	1,7×10 <sup>5</sup>	2,8×10 <sup>4</sup>
<b>% elucije</b>	8,5×10 <sup>-5</sup>	1,4×10 <sup>-5</sup>

**Tabela XVI.** Število eluiranih bakteriofagov in odstotek elucije po drugi selekcijski stopnji za obe uporabljeni peptidni predstavitveni knjižnici. Puščice označujejo preveliko število plakov, da bi jim bilo mogoče določiti število. NP – ni podatka.

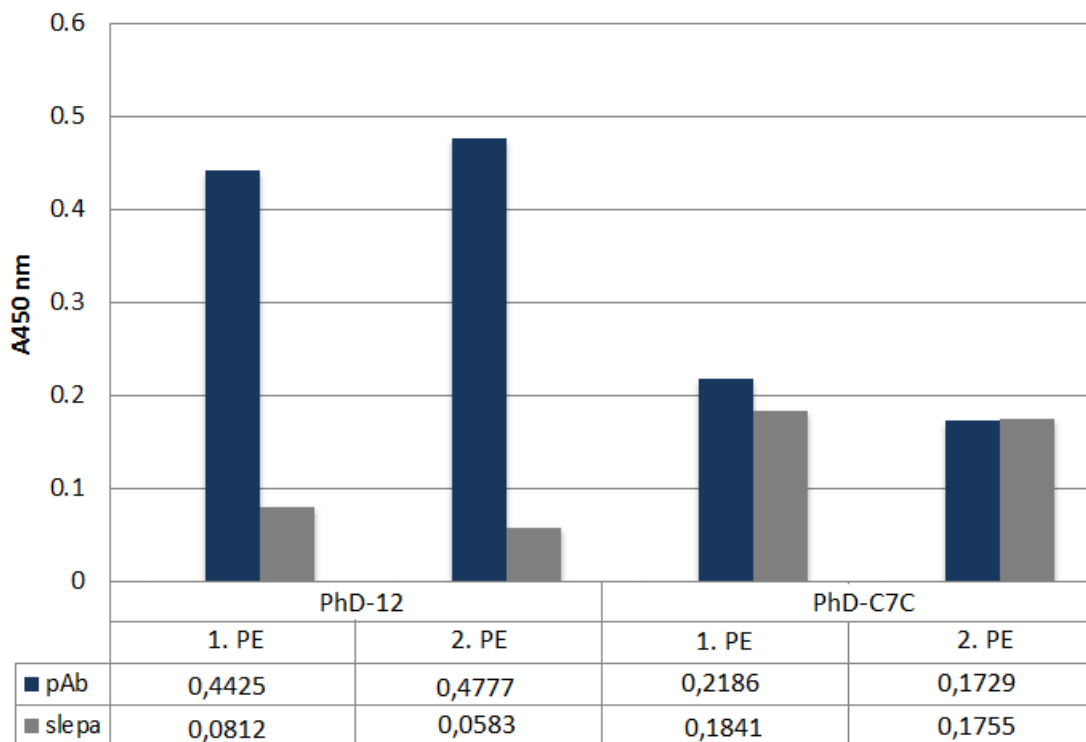
redčitev eluata	število plakov [pfu]	
	Ph.D.-12	Ph.D.-C7C
10 <sup>1</sup>	↑↑↑	↑↑
10 <sup>2</sup>	↑↑↑	↑
10 <sup>3</sup>	↑↑	157
10 <sup>4</sup>	↑	NP
10 <sup>5</sup>	732	1
<b>število eluiranih fagov</b>	9,5×10 <sup>8</sup>	2,0×10 <sup>6</sup>
<b>% elucije</b>	0,48	1,0×10 <sup>-3</sup>



**Slika 6. Delež eluiranih bakteriofagov po prvi in drugi stopnji afinitetne selekcije.**

#### 4.2.2 Poliklonska ELISA

S poliklonsko različico testa ELISA smo semikvantitativno ovrednotili povprečno afiniteto bakteriofagov v *pomnoženih* eluatih do tarčnih protiteles. Če afinitetna selekcija poteka uspešno (tj. pride do obogatitve vezalcev tarčnih protiteles), signali naraščajo z vsako opravljeno selekcijsko stopnjo. V našem primeru to velja le za selekcijo, opravljeno s knjižnico Ph.D.-12 (slika 7). Pri knjižnici Ph.D.-C7C smo že po pomnoževanju prvega eluata opazili kontaminacijo z bakteriofagi divjega tipa, kar je verjetno vzrok visokim vrednostim slepih kontrol in relativno nizkim vrednostim signalov interakcij bakteriofagov s tarčnimi protitelesi (titer rekombinantnih fagov je bil precej nižji zaradi prisotnosti fagov divjega tipa; ni prikazano). Kljub temu smo izolirali posamezne *rekombinantne* bakteriofage tudi iz drugega nepomnoženega eluata selekcije s knjižnico Ph.D.-C7C, saj je porast deleža eluiranih fagov v tej stopnji nakozoval uspešen potek selekcije (slika 6).

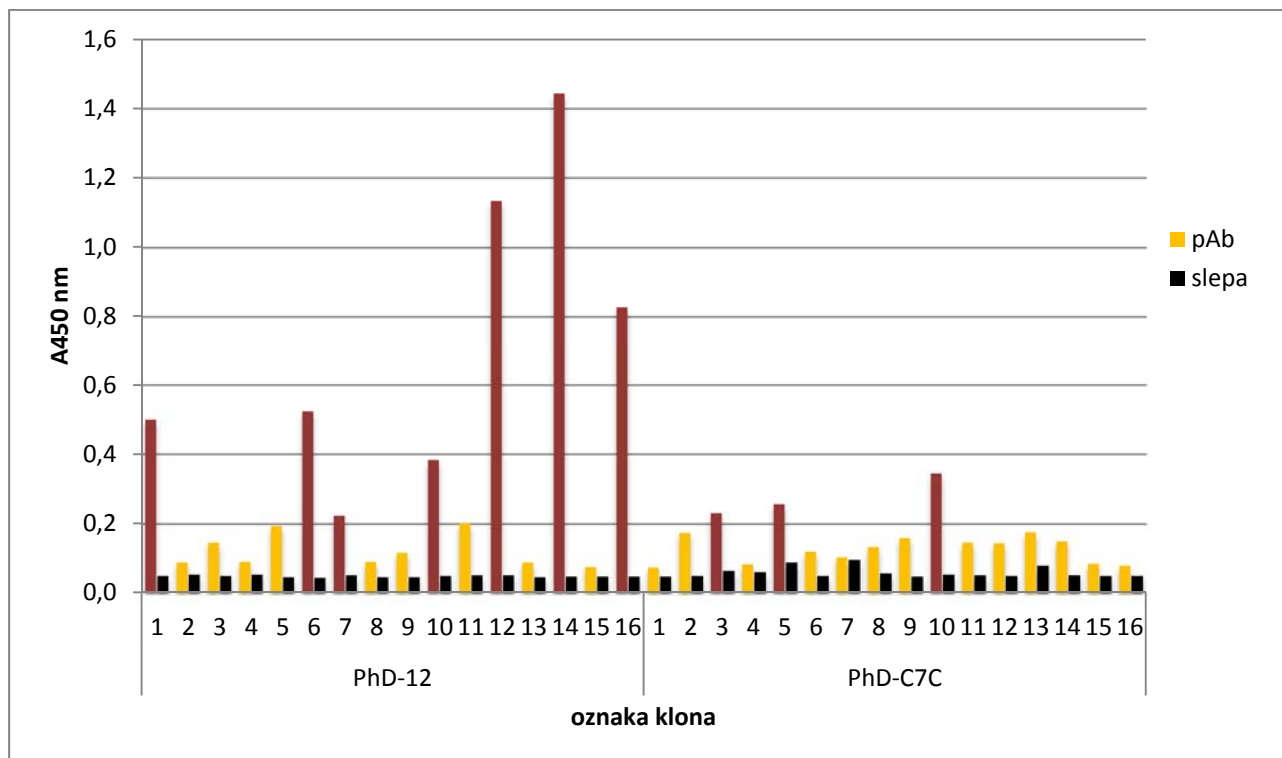


**Slika 7. Rezultati poliklonske različice testa ELISA, opravljenega s prvima in drugima pomnoženima eluatoma (vselej s po  $5 \times 10^{10}$  pfu).** Z rdečo so označene absorbančne vrednosti pri testnih vdolbinicah, ki so bile prekrte s tarčnimi protitelesi, z zeleno pa pri vdolbinicah, ki niso bile prekrte s tarčnimi protitelesi, temveč le blokirane s posnetim mlekom (slepe kontrole).

## 4.3 Identifikacija in karakterizacija vezalcev

### 4.3.1 Monoklonska ELISA

Pri izvedbi monoklonske različice encimskoimunskega testa smo uporabili bakteriofagne klone iz zadnje (v našem primeru druge) stopnje afinitetne selekcije. V samem konceptu se proces izvedbe ni razlikoval od izvedbe poliklonskega testa ELISA. Titra bakteriofagnih klonov tokrat nismo določili. Razlike v vrednostih absorbančnih signalov lahko razložimo tudi z morebitnimi razlikami titrov. S testom smo preverili, ali se posamezen klon veže na tarčno protitelo. Bakteriofagne klone, katerih absorbančni signali so presegli vrednost 0,2 (slika 8), smo nato izbrali za sekvenciranje oz. določitev nukleotidnega zaporedja inserta. Ta kodira izražen vezavni peptid. Določili smo nukleotidno zaporedje inserta 11 bakteriofagnih klonov; 8 iz predstavitvene knjižice Ph.D.-12 in 3 iz knjižice Ph.D.- C7C. S temi smo opravili tudi kompetitivni test ELISA.



**Slika 8. Rezultati monoklonske različice testa ELISA.** S temno rdečo so označeni kloni, katerih absorbančni signali so presegli vrednost 0,2 in katerih nukleotidno zaporedje inserta, ki kodira predstavljen peptid, smo kasneje določili.

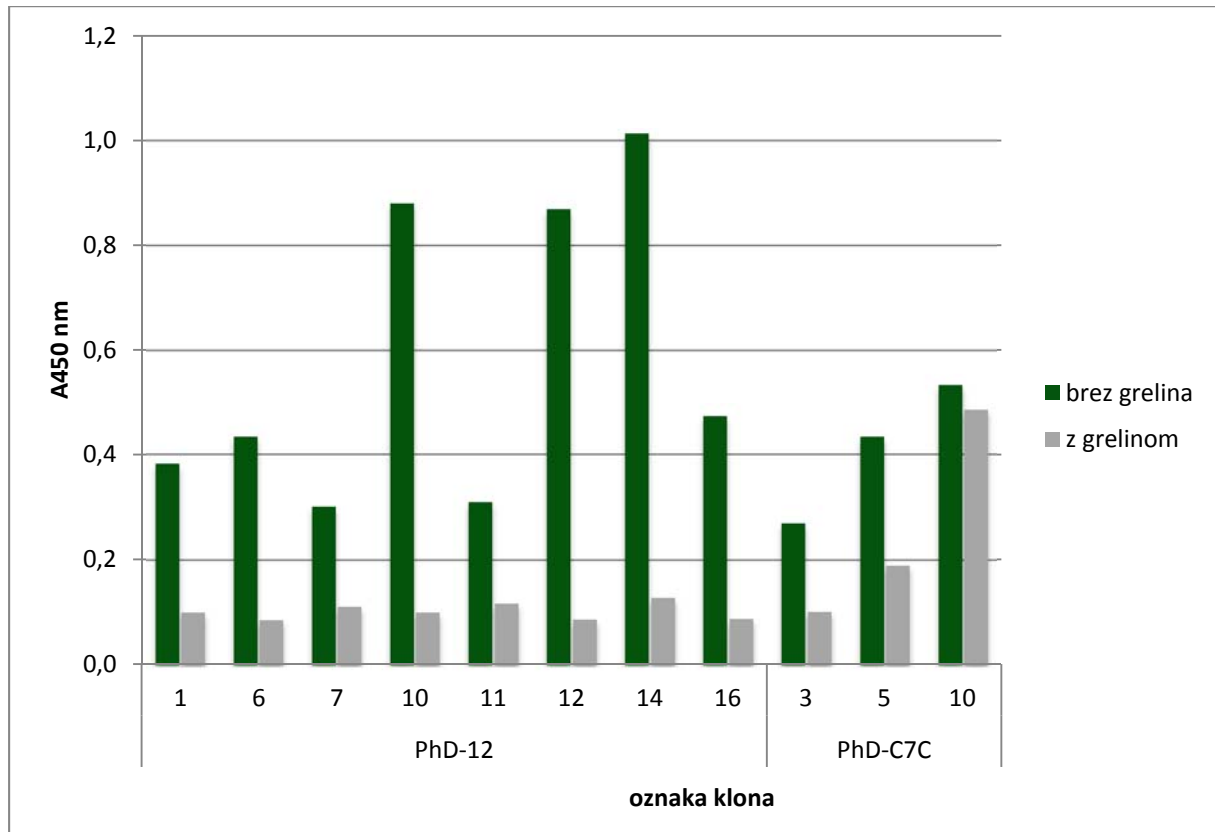
#### 4.3.2 Kompetitivni test ELISA

To verzijo testa ELISA od ostalih ločuje prisotnost proučevanega antigena v mikrotitrskih vdolbinicah; v našem primeru sinteznega grelina. Ta tekmuje z bakteriofagi za vezavo s tarčnim protitelesom. Kompetitivni test služi preizkusu sposobnosti specifične vezave različnih bakteriofagnih klonov na *paratop* protitelesa (ne na druga mesta površine imunoglobulina).

Iz slike 9 je razvidno, da nativni antigen (grelin) uspešno izpodriva vse testirane bakteriofagne klone, kar potrjuje specifičnost vezave paratopa protiteles s peptidi na površini bakteriofagov, ki oponašajo grelinov epitop. Opazno je tudi, da bakteriofagne klone iz predstavitvene knjižice Ph.D.-C7C grelin izpodriva nekoliko manj izrazito, kakor klone iz Ph.D.-12 z linearnimi izraženimi peptidi, kar priča o višji afiniteti cikličnih peptidov.



S spreminjanjem koncentracij grelina, ki tekmuje z bakteriofagnimi kloni za vezavo na protitelesa, in več ponovitvami kompetitivnega testa bi lahko afiniteto vezave izbranih bakteriofagov določili natančneje.



Slika 9. Kompeticija posameznih bakteriofagnih klonov z grelinom za vezavo na pAb C-18.

### 4.3.3 Poravnava aminokislinskih zaporedij bakteriofagnih klonov s primarno strukturo grelina

DNA sekvenciranje je postopek, s katerim določimo nukleotidno zaporedje določenega fragmenta DNA, v našem primeru oligonukleotidnih insertov v bakteriofagnem vektorju M13KE, ki kodirajo na virusni ovojnici izražene peptide. Določili smo nukleotidna zaporedja vseh 11 bakteriofagnih klonov, ki smo jim z encimskoimunskim testom potrdili afiniteto do tarčnih protiteles. Nukleotidna zaporedja smo prevedli v aminokislinska in tako določili primarno strukturo peptidnih mimetikov epitopov grelina. Peptide smo poravnali z aminokislinskim zaporedjem grelina (slika 10).

		grelin	GSSFLSPEHQRVQQ <b>RKESKKPPAKLQPR</b>
knjižnica	klon		
Ph.D.-12	1		GAGHKEDFKPET
	6		NLENRKPPYVPI
	7, 11		WDINERPKPKQH
	10		ASHPHNEWKKPP
	12		FAENTKPPITYR
	14		YSLENLKPPTSR
	16		QAPYRDESHKPP
Ph.D.-C7C	3		CKPGYTHSC
	5		CKPGYQDSC
	10		CKSEIQQKC

**Slika 10. Poravnava aminokislinskih zaporedij grelina in peptidnih mimetikov grelinskih epitopov.** Z rumeno barvo so označeni deli aminokislinskega zaporedja peptidov, ki se strukturno ujemajo z epitopom na grelinu (označen z rdečo).

Pri poravnavi aminokislinskega zaporedja peptidov in grelina lahko opazimo, da modelna poliklonska protitelesa v nasprotju s pričakovanji prepoznavajo en sam epitop. Peptidi, ki izvirajo iz bakteriofagne knjižnice linearnih peptidov (Ph.D.-12), se strukturno bolje ujemajo z aminokislinskim zaporedjem grelina kot ciklični, kar je razumljivo, saj je epitop, ki ga posnemajo, najverjetneje linearen. Domnevamo, da ciklični peptidi predstavljajo t.i. mimotop, tj. mimetik epitopa, ki se po aminokislinskem zaporedju sicer slabše ujema z epitopom, a posnema njegove fizikalno-kemijske lastnosti, kot sta npr. prostorska porazdelitev naboja in sterične karakteristike. Zlasti aminokislinsko zaporedje peptida Ph.D.-C7C\_10 je na prvi pogled precej drugačno od grelina, a je v marsičem podobno peptidoma Ph.D.-C7C\_3 in 5 (slika 10). Za slednja smo s kompetitivnim testom potrdili, da z grelinom tekmujeta za vezavo na tarčna protitelesa (slika 9) in tako dokazali, da posnemata antigensko determinanto grelina. Majhno znižanje signala pri bakteriofagnem klonu Ph.D.-C7C\_10 ob prisotnosti grelina v primerjavi z ostalimi bakteriofagi pojasnujemo z višjo jakostjo vezave predstavljenega peptida na tarčna protitelesa. Znano je namreč, da ciklični peptidi lahko izkazujejo visoko afiniteto do ustreznih receptorjev na račun entropijske prednosti: ker so konformacijsko omejeni v primerjavi z linearnimi peptidi ob vezavi na receptor pride do manjšega znižanja entropije (zaradi izgube prostostnih stopenj in fleksibilnosti), kar je termodinamsko bolj ugodno.

## 5 ZAKLJUČKI

V eksperimentalnem delu smo skupno izvedli dve afinitetni selekciji peptidov proti protitelesom, usmerjenih proti sinteznemu humanemu grelinu. Kot modelna protitelesa smo izbrali imunoglobuline proti neaciliranemu imunogenu (grelinu), saj smo želeli kartirati zgolj (linearne) peptidne epitope. Identifikacija peptidnih mimetikov epitopov alkilne verige maščobne kisline ali mešanih peptidno-acilnih epitopov bi bila namreč verjetno težavna (vodila bi do zapletenih mimotopov, katerih ujemanje s prostorsko strukturo antigena bi lahko potrdili le z uporabo naprednejših strukturnih tehnik) ali pa bi zaradi izrazite nepolarnosti alkilne verige maščobne kisline izolirali peptidne mimetike, ki bi izkazovali nizko specifičnost interakcije s protitelesi, saj bi v njihovi strukturi najbrž prevladovali nepolarni aminokislinski ostanki.

Uporabili smo dve različni bakteriofagni predstavitveni knjižnici: Ph.D.-12 (z izraženimi naključnimi linearnimi dodekapeptidi) in knjižnico Ph.D-C7C (z izraženimi naključnimi cikličnimi nonapeptidi CX<sub>7</sub>C, kjer je X poljubna aminokislina). Pri obeh selekcijah smo opazili porast deleža eluiranih bakteriofagov s prve v drugo selekcijsko stopnjo, kar je nakazovalo uspešno obogatitev populacije vezalcev. Dodatno smo uspešen potek selekcije v primeru uporabe knjižnice linearnih peptidov potrdili s poliklonsko različico testa ELISA, saj smo pokazali, da ima pomnožen eluat po drugi selekcijski stopnji višjo povprečno afiniteto do tarčnih protiteles kot prvi. Žal podobnega sklepa ne moremo postaviti v primeru knjižnice cikličnih peptidov, saj je že med pomnoževanjem prvega eluata prišlo do kontaminacije s fagi divjega tipa. Kljub temu smo z monoklonsko različico testa ELISA med kloni iz obeh knjižnic po drugi selekcijski stopnji uspeli identificirati bakteriofage, ki na površini nosijo peptidne mimetike epitopov grelina. Interakcijo s paratopi protiteles smo posredno dokazali s tem, da vsi bakteriofagni kloni tekmujejo za vezavo na protitelesa z nativnim antigenom, sinteznim grelinom.

Po določitvi nukleotidnih zaporedij insertom, ki kodirajo na bakteriofagni ovojnici izražene peptide, smo lahko s prevodom v zaporedje aminokislin določili primarno strukturo mimetikov grelinskih epitopov. Peptide smo poravnali z aminokislinskim zaporedjem grelina in tako odkrili epipov, ki ga prepoznajo in vežejo tarčna poliklonska protitelesa.

V nasprotju s pričakovanji opažamo, da uporabljena poliklonska protitelesa prepoznajo en sam epitop, ki je domnevno dominanten; s tem je prva hipoteza ovržena. Smo pa skladno s pričakovanji (zaradi razmeroma kratke peptidne verige grelina smo predvidevali, da njegovo vezavno mesto ne prevzame kompleksne prostorske strukture) potrdili drugo hipotezo, da se aminokislinska zaporedja linearnih peptidov ob poravnavi v večji meri ujemajo z grelinovim vezavnim mestom kakor aminokislinska zaporedja cikličnih peptidov. Sklepamo, da ciklični peptidi predstavljajo mimotope istega epitopa grelina.

Ta raziskava je samo uvod v naše razumevanje, zanimivo bi bilo preučiti delovanje krajšega sinteznega peptida v vlogi potencialnega antagonista grelina, tj. učinkovine, ki bi sicer zasedla položaj na receptorju, ki ga sicer zasede endogeni hormon grelin, a ne bi izzvala njegove aktivacije. Znano je, da je grelin udeležen v mehanizmih regulacije apetita, saj se izloča v krvni obtok kot odziv na pomanjkanje hrane. Spojine, ki bi blokirale grelinove receptorje, bi med drugim bile domnevno uporabne tudi kot zaviralci lakote<sup>[13]</sup>. S tem bi posredno do neke mere lahko preprečile pridobivanje odvečne telesne teže. Težava pri vpeljevanju takšnih sinteznih grelinovih antagonistov za preprečevanje ali zdravljenje debelosti je nezmožnost prehajanja peptidnih učinkovin v centralni živčni sistem (kjer je njihovo prijemališče; za sprejemljivo biološko uporabnost bi na podlagi struktur peptidnih antagonistov morali razviti metabolično stabilne učinkovine, ki bi hkrati lahko prehajale v možgane). Če bi bila tovrstna biološko aktivna učinkovina dostopna širši množici v lekarnah brez predpisanega zdravniškega recepta, bi lahko bilo oglaševanje nekoliko sporno. Pojavil bi se dvom, ali je dobiček poglaviten faktor pri motivaciji razvoja takšnih spojin, ne pa dobrobit ljudi. V sodobni družbi se srečujemo s porastom debelosti predvsem zaradi lepotnih norm, oziroma želja posameznikov in podrejanja današnjim stereotipom družbe, da bi izgubili odvečno telesno maso. Mediji prikazujejo ideale popolne postave, ki mejijo na podhranjenost, oglaševanje sinteznih grelinovih antagonistov, ki bi zavirali apetit, bi lahko zaradi prekomerne uporabe vodilo do ogrožanja zdravja. Kljub vsemu pa je pri vzdrževanju vitkosti še vedno poglavitna zmerna, zdrava in uravnotežena prehrana v kombinaciji z zadostno telesno aktivnostjo.

## 6 VIRI

1. Cain M.L., Jackson R.B., Minorsky P.V, Reece J.B. , Urry L.A. , Wasserman S.A. (2011): The Immune System. Campbell Biology - Global Edition, Ed. 9. *Personal Education Inc.* (pp.975-993) San Francisco, ZDA.
2. Michael M., Marvin J.F. (2010): Epitope specificity and significance in systemic autoimmune diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 267-287.
3. Looney R.J., Anolik J., Sanz I. (2004): B cells as therapeutic targets for rheumatic diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.* 16: 180-185
4. Raphael R., David S. Strayer, Emanuel R. (2011): Inflammation. Rubin's Pathology: clinicopathologic foundations of medicine (Sixth Edition, ed.). *Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.* (pp. 54-55) Philadelphia, ZDA.
5. Gershoni J.M., Roitburd-Berman A., Siman-Tov D.D., Tarnovitski Freund N., Weiss Y. (2007): Epitope mapping: the first step in developing epitope-based vaccines. *BioDrugs*, 21(3): 145-156.
6. Molek P., Štrukelj B., Bratkovič T. (2011): Peptide phage display as a tool for drug discovery: Targeting membrane receptors. *Molecules*, 16: 857-887.
7. Rowley, M.J., O'Connor K., Wijeyewickrema L. (2004): Phage display for epitope determination: a paradigm for identifying receptor-ligand interactions. *Biotechnol. Annu. Re.* 10: 151-188.
8. Smith G.P., Petrenko V.A. (1997): Phage Display. *Chem. Rev.*; 97: 391-410.
9. New England Biolabs®, Inc.: Ph.D.<sup>TM</sup> Phage Display Libraries, Instruction Manual. Version 1.0
10. Bratkovič T. (2010): Progress in phage display: Evolution of the technique and its application. *Cell. Mol. Life Sci.* 67(5): 749-767.
11. Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K. (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402 (6762): 656–660.
12. Sato T., Nakamura Y., Shiimura Y., Ohgusu H., Kangawa K., Kojima M. (2011): Structure, regulation and function of ghrelin. *J. Biochem.* 151(2), 119-128.
13. Hassouna R., Labarthe A., Zizzari P., Videau C., Culler M., Epelbaum J., Tolle V. (2013): Actions of Agonists and Antagonists of the ghrelin/GHS-R Pathway on GH Secretion, Appetite, and cFos Activity. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 4: 2
14. Inui A., Asakawa A., Bowers C.Y., et al (2004). "Ghrelin, appetite and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ". *FASEB J.* 18 (3): 439-56.
15. Neuberger, M. S.; Honjo, T.; Alt, Frederick W. (2004). *Molecular biology of B cells.* Amsterdam: Elsevier. str. 189–191