

VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS IR GEOMOKSLŲ FAKULTETAS



Biochemijos studijų programos magistrantė
Agnė Stašytė

Magistrinis darbas

**Baltymus surišančių didelio afiniškumo ligandų atranka
in vitro evoliucijos metodų pagalba**

Darbo vadovai

Dr. Remigijus Skirgaila

M.d. Karolis Matjošaitis

Vilnius, 2017

Baltymus surišančių didelio afiniškumo ligandų atranka *in vitro* evoliucijos metodų pagalba

SANTRAUKA

Didelio afiniškumo ligandai plačiai pritaikomi įvairiose srityse: terapijoje, diagnostikoje, biotechnologijoje. Šiuo metu plačiausiai panaudojami afiniški ligandai yra antikūnai, tačiau dėl jų didelės struktūros ir sudėtingo gamybos proceso ieškoma alternatyvių baltyminių struktūrų, kurios pasižymėtų antikūnų privalumais, bet būtų mažesnės molekulinės masės, jų raiška gerai vyktų bakterijose, baltymai greitai sudarytų tretines struktūras ir neagreguotų.

Šio darbo tikslas – panaudojant *in vitro* evoliucijos metodus sukurti universalią sistemą didelio afiniškumo ligandų atrankai. Darbo metu afiniškų ligandų atrankai kaip karkasas buvo parinktas *Staphylococcus aureus* mažos molekulinės masės baltymas, kuris natūraliai yra afiniškas IgG. Sukurta atrankos sistema patikrinta naudojant žinomo afiniškumo ligandus. Įrodžius, kad atrankos sistema veiksminga, ji buvo pritaikyta afiniškų ligandų atrankai iš didelio variabilumo bibliotekų. Kaip taikiniai atrankai buvo pasirinkti du skirtingi fermentai – atvirkštinė transkriptazė ir DNR polimerazė. Analizuojant naujos kartos sekoskaitos (NKS) duomenis, buvo nustatyti dažniausi mutacijų rinkiniai mutantų bibliotekose. Abiems taikiniams pavyko atrinkti afiniškus ligandus, todėl galima teigti, jog sukurta sistema yra universali ir gali būti pritaikoma įvairiems taikiniams.

Selection of Protein Binding High Affinity Ligands Using *in vitro* Evolution

SUMMARY

High affinity ligands are widely applied in many fields such as therapy, diagnostics and biotechnology. Currently the most exploited affinity ligands are antibodies but due to their large structure and complexity of the manufacturing process alternative protein structures are being studied. New scaffold proteins should possess the benefits of antibodies and have additional features: be small, fast-folding, not aggregate and be easily produced in bacteria.

The purpose of this research is to create a universal system for selection of high affinity ligands based on *in vitro* evolution methods. A small IgG binding protein from *Staphylococcus aureus* was chosen as a scaffold for mutant library generation. Feasibility of developed selection system was proven by using ligands of a known affinity. In a next step, system was applied for selection of affinity ligands from large variability mutant libraries. Two enzymes of different function – reverse transcriptase and DNA polymerase were chosen as targets for screening. The analysis of next generation sequencing (NGS) data revealed the most common sets of mutations in mutant libraries. The results of this work suggest that the system is versatile and can be adapted to different targets.