

Konstrukcja i selekcja bibliotek fagowych opartych o powtórzenia bogate w leucynę

1. Streszczenie

Zdolność białek do specyficznego i silnego oddziaływania z innymi makrocząsteczkami znajduje szerokie zastosowanie zarówno w medycynie, jako środki terapeutyczne i diagnostyczne, jak i w biotechnologii, jako podstawowe środki narzędzi molekularnych. Jak dotąd najczęściej wykorzystywano w tym celu przeciwciała, jednak ze względu na kosztowny i skomplikowany proces ich produkcji oraz niską trwałość poszukiwania białek o podobnych do immunoglobulin właściwościach. Jak dotąd opisano ponad 50 tego typu struktur, a wśród nich na uwagę zasługują m.in. białka zbudowane z powtórzeń bogatych w leucynę. Grupą białek zbudowanych z powtórzeń bogatych w leucynę są zmienne receptory limfocytów (VLR) występujące u kręgowców bezszczękowych, pełniąc u tych zwierząt funkcję przeciwciał.

Ze względu na fakt, że białka te, jako jedyne z opisanych alternatywnych dla przeciwciał struktur, są składnikiem układu odpornościowego i posiadają naturalną zdolność do wiązania antygenów i wysoką tolerancję na mutacje stały się one przedmiotem mojej pracy doktorskiej.

Pierwszym etapem pracy było zaprojektowanie sekwencji konsensusowej dVLR (ang. *design*) w oparciu o dostępne sekwencje VLRB w bazach SMART i UNIPROT, następnie przygotowanie jego konstruktów genetycznych w wektorze pETG-60a, nadprodukcja białka w fuzji z NusA oraz jego oczyszczenie przy zastosowaniu technik chromatograficznych. Białko o zaprojektowanej sekwencji było nadprodukowane w formie rozpuszczalnej oraz posiadało szereg pożądanых cech. Było monomeryczne w całym zmierzonym zakresie stężeń (0,1 – 300 μM) oraz zachowywało strukturę drugorzędową w zakresie pH 3,0-11,0, ponadto było bardzo stabilne, zarówno termicznie ($T_m = 73,9$ °C w pH = 6,0), jak i chemicznie (kooperatywne przejście według modelu dwóch stanów z punktem przejścia wynoszącym 3,3 M GdmCl oraz wysoką zmianą entalpii swobodnej denaturacji wynoszącą 14,1 kcal/mol).

Informacje o wysokiej stabilności zaprojektowanej sekwencji konsensusowej dVLR pozwoliły na podjęcie decyzji o zaprojektowaniu i skonstruowaniu białkowych bibliotek fagowych na podstawie struktury przeciwciał kręgowców bezszczękowych. W celu selekcji makromolekuł o wysokim powinowactwie do wybranych celów molekularnych zastosowano technikę prezentacji białek na powierzchni faga M13. Zaprojektowano dwie biblioteki białek

dVLR różniące się wielkością i schematem randomizacji reszt aminokwasowych. W kolejnym etapie przeprowadzono selekcje fagowe wobec czterech ligandów: białek S100A7, zewnątrzkomórkowej domeny HER2 oraz lizozymu białka jaja kurzego oraz antygenu cukrowego grup grwi Lewis y. Testowano szereg warunków selekcyjnych: typ prowadzonej selekcji (w roztworze, na podłożu), sposób immobilizacji antygenu, jego stężenie, czas inkubacji z fagami prezentującymi na swojej powierzchni warianty białka dVLR, intensywność płukań oraz sposób zwalniania fagów wiążących. Dla lizozymu uzyskano pozytywne wyniki selekcji fagowych, natomiast kinetykę wiązania antygenu udało się wyznaczyć dla wariantu specyficznego wobec S100A7, ze stałą dysocjacji K_D wynoszącą $9,19\mu\text{M}$.