

mgr Monika Rafalik
Katedra Chemii Biomedycznej
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Streszczenie rozprawy doktorskiej

„Badanie oddziaływań ludzkiej cystatyny C z monoklonalnym przeciwciałem HCC3”

Ludzka cystatyna C jest niewielkim białkiem (13.3 kDa), które powszechnie występuje w płynach ustrojowych człowieka gdzie głównie pełni rolę inhibitora proteinaz cysteinowych. W stanach patologicznych białko to tworzy dimery oraz wyższe formy oligomeryczne, które mogą prowadzić do ich zalegania w różnych organach. Prowadzić to może do powstawania choroby amyloidowej, która ma szczególnie dramatyczny przebieg u chorych, z rzadką mutacją ludzkiej cystatyny C, L68Q. Mutacja ta jest przyczyną występowania dziedzicznej amyloidowej angiopatii mózgowej (*Hereditary cystatin C amyloid angiopathy, HCCAA*), w wyniku której dochodzi do śmiertelnych krwotoków mózgowych, nawet u osób w młodym wieku.

Znanych jest wiele przeciwciał, które oddziałują z ludzką cystatyną C. Odkrywca i wieloletni badacz cystatyny C, profesor Grubb (University of Lund) ze współpracownikami wykazali, że niektóre z nich w niewielkim stopniu wpływają na hamowanie tworzenia dimerów hCC, natomiast kilka z przebadanych przeciwciał znacząco hamuje tworzenie dimerów/oligomerów. Otrzymane przez wyżej wspomniany zespół badawczy, mysie monoklonalne przeciwciała HCC3 hamują tworzenie dimerów hCC w znaczącym stopniu (ok. 60%). Stało się to powodem podjęcia dalszych, szczegółowych badań nad tymi przeciwciałami i identyfikacji miejsc wiązania się ze sobą białka hCC z przeciwciałem (epitop – sekwencja białka odpowiedzialna za tworzenie kompleksu z przeciwciałem; paratop – sekwencja przeciwciała wiążąca się z antygenem). Informacje na temat zidentyfikowanego epitopu i paratopu mogą być niezwykle istotne przy projektowaniu immunoterapii HCCAA.

Korzystając z kilku metod identyfikacji epitopu: wycinanie i ekstrakcji epitopu za pomocą enzymów (trypsyna, endoproteinaza Asp-N, pronaza), chromatografia powinowactwa

ze wstępnie zidentyfikowanymi (na podstawie trawień) fragmentami hCC, testy immunoenzymatyczne ELISA oraz wymiana wodoru-deuter sprzężona ze spektrometrią mas (HDX-MS) wykazałam, że epitop jest nieliniowy i składa się z co najmniej dwóch fragmentów białka. W celu wytłumaczenia właściwości mAb HCC3 do hamowania dimeryzacji hCC i potwierdzenia mechanizmu tworzenia dimerów tego białka, otrzymane wyniki porównałam z wynikami oddziaływania dwóch innych przeciwciał oddziałujących z hCC – mAb Cys10, które najłabiej hamuje dimeryzację (4%) i mAb Cys28, które najsilniej hamuje dimeryzację (75%).

W ramach pracy doktorskiej dokonałam charakterystyki monoklonalnego przeciwciała HCC3, określając jego masę, przynależność do podklasy, jakościowy i ilościowy profil oligosacharydowy oraz strukturę pierwszorzędową przeciwciała identyfikując sekwencję łańcucha lekkiego (212 Aa) w 93%, a w przypadku łańcucha ciężkiego (439 Aa) w 90%. Stosując reguły Kabata i Chothia dotyczące teoretycznego wyznaczania paratopu (6 pętli CDR – ang. *complementary determining region*), wyznaczyłam cztery sekwencje odpowiadające pętlom CDR – trzy pętli łańcucha lekkiego oraz, ze względu na niekompletną sekwencję – jedną pętlę łańcucha ciężkiego. Eksperymentalne wyniki identyfikacji paratopu (metodami HDX-MS oraz Parexprot) potwierdziły niektóre z nich, a chromatografia powinowactwa zsyntezowanych peptydów odpowiadających sekwencjom trzech regionów CDR łańcucha lekkiego z ludzką cystatyną C potwierdziła tworzenie kompleksu białka z dwoma z nich.