Journal of Police Medicine

Winter 2015; Vol. 3, No. 4: 221-230

Original Article

Optimization of Phage Display-Selected Nanobodies' Structure Against NTR-DR5 Domain Through Docking

Received: 21 September 2014 **Revised:** 27 November 2014 **Accepted:** 4 January 2015

Shirin Jalili[1]
S. Shahriar Arab[2]
Sadegh Hasannia[3]*
Samira Poulakchi Saber[4]
Ammar Mohseni[5]

[1]Ph.D. Candidate, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[2]Assistant Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat modares University, Tehran, Iran.

[3]Associated Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[4]Ph.D. Candidate, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

[5]Ph.D. Candidate, Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

*Corresponding Author:
Sadegh Hasannia
Tel: (+98)9127177852

e-mail: hasannia@modares.ac.ir

ABSTRACT

Background: Antibodies play a major role in the immunotherapy, basic researches and industrial processes. Studying interactions between antibody-antigen complexes is important to know how they function that helps to improve their properties and to design new better antibodies through rational engineering for therapeutic or biotechnological applications, including the production of biosensors. Nowadays, Antibody Engineering is widely used in many fields such as medicine, criminal sciences, military, defense industries, etc. Designing antibodies with desired properties are a challenging task. Computational docking is the method of predicting the conformation of a complex structure (such as antibody-antigen) from its separated elements. The validation of designed antibodies is carried out by docking tools.

Materials and Methods: In this study, some potent nanobodies against death receptor5 (DR5) which had been selected using phage display technique, were modeled and docked with their antigen, then were mutated to improve their binding affinity. Based on the experimental results, docking structural prediction of DR5-VHH complex was used for designing and validation of VHHs with higher affinity for binding to DR5 receptor.

Results: By analysis of the models, several mutants of nanobodies were designed, and their properties improved in a predictable manner especially for their binding ability to DR5.

Conclusion: The designed nanobodies, considering their binding site on DR5, could be potential candidates to trigger apoptosis in various cancer cells.

Keywords: nanobody optimization, DR5, apoptosis, protein Docking

زمستان ۱۳۹۳- دوره ۳ - شماره ۴- صفحات ۲۳۰-۲۲۱

مجله طب انتظامی

مقاله تحقیقی

بهینه‌سازی ساختار نانو بادی‌های به‌دست‌آمده از کتابخانه فاژی علیه دمین NTR-DR5 از طریق داکینگ

تاریخ دریافت: ۳۰ شهریور۱۳۹۳ **تاریخ اصلاح:** ۶ آذر ۱۳۹۳ **تاریخ پذیرش:** ۱۴ دی ۱۳۹۳

شیرین جلیلی [۱]
سید شهریار عرب [۲]
صادق حسن نیا [۳*]
سمیرا پولکچی صابر [۴]
عمار محسنی [۵]

[۱] دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

[۲] استادیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

[۳] دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

[۴] دانشجوی دکتری بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

[۵] دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

[*]نویسنده مسئول:
صادق حسن نیا
تلفن: ۹۱۲۷۱۷۷۸۵۲(۹۸+)
پست الکترونیک:
hasannia@modares.ac.ir

چکیده

مقدمه: آنتی‌بادی‌ها نقش مهمی در ایمونوتراپی، پژوهش‌های بنیادی و فرآیندهای صنعتی بازی می‌کنند. مطالعه میان کنش بین کمپلکس‌های آنتی بادی-آنتی ژن از اهمیت خاصی برای درک عملکرد آن‌ها برخوردار است. از این اطلاعات می‌توان در جهت بهینه‌سازی آنتی‌بادی‌های موجود و طراحی منطقی آنتی‌بادی‌های جدید، به‌منظور درمان و کاربردهای بیوتکنولوژی همچون حسگرهای زیستی بهره برد. امروزه مهندسی آنتی‌بادی به‌طور گسترده‌ای در زمینه‌های مختلف ازجمله پزشکی، علوم جنایی، نظامی و صنایع دفاعی کاربرد دارد. طراحی چنین آنتی‌بادی‌هایی کار چالش‌برانگیزی است. داکینگ روش محاسباتی است که می‌تواند کنفورماسیون یک ساختار کمپلکس (به‌طور مثال آنتی بادی -آنتی ژن) را از اجزای آن پیش‌بینی می‌کند. اعتبار سنجی آنتی‌بادی طراحی‌شده توسط ابزار داکینگ انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، از نانو بادی‌های مستعد علیه گیرنده مرگ ۵ (DR5) که قبلاً از طریق تکنیک نمایش فاژی انتخاب‌شده بودند برای مدل‌سازی، داکینگ و طراحی جهش‌ها استفاده شد. برای طراحی و اعتبار سنجی VHH هایی که نسبت به DR5 تمایل اتصالی بهتری داشته باشند، بر پایه نتایج آزمایشگاهی، از پیش‌بینی ساختار کمپلکس VHH-DR5 توسط داکینگ استفاده شد.

یافته‌ها: با آنالیز مدل‌های به‌دست‌آمده، چندین نانو بادی جهش‌یافته طراحی شد که به شیوه‌ای قابل پیش‌بینی ویژگی‌هایشان، مخصوصاً قابلیت اتصالشان به DR5، بهبودیافته بود.

نتیجه‌گیری: این نانو بادی‌های طراحی‌شده با توجه به جایگاه اتصالشان روی DR5 می توانند کاندیداهای مناسبی برای راه‌اندازی آپوپتوز در سلول‌های سرطانی متفاوت باشند.

کلید واژه‌ها: بهینه‌سازی نانو بادی، گیرنده مرگ ۵، آپوپتوز، پروتئین داکینگ

مقدمه

علاوه بر کاربردهای فراوانی که آنتی‌بادی‌ها درزمینه دارویی دارند، امروزه شاهد نقش فزاینده این ترکیبات در عرصه‌های مختلفی ازجمله تحقیقات، بیوتکنولوژی، صنایع نظامی و غیره هستیم. به‌طوری‌که در طراحی حسگرهای زیستی در زمینه‌های تشخیصی، علوم جنایی، نظامی و صنایع دفاعی کاربرد بسیاری دارند. تا جایی که در علوم مختلف هرگاه شناسایی یک آنتی‌ژن موردنظر باشد، آنتی‌بادی‌ها یک نقش اساسی را در این خصوص ایفاء می کنند. طراحی و سنتز آنتی‌بادی‌های جدید با خواص موردنظر تأثیر عمیقی در پیشرفت علوم و بیوتکنولوژی دارد و علی‌رغم اینکه چندین دهه

Journal of Police Medicine
Winter 2015; Vol. 3, No. 4: 221-230

از شناسایی ویژگی‌های ساختاری آنتی‌بادی‌ها می‌گذرد، اما دستیابی به چنین آنتی‌بادی‌هایی با ویژگی‌های موردنظر کار سخت و دشواری می‌باشد [۲ و ۱]. مطالعه کمپلکس‌های آنتی بادی – آنتی‌ژن درک ما را از اصول کلی نحوه شناسایی آنتی‌ژن‌ها توسط آنتی‌بادی‌ها افزایش می‌دهد. و در درازمدت، دانش‌پایه و اصولی طراحی موفق مولکول‌های جدید و بهینه سازی منطقی آنتی‌بادی‌های موجود را سبب می‌شود [۳]. بهترین راه برای مطالعه میان کنش‌های اتمی، تهیه ساختار سه‌بعدی از کمپلکس های آنتی‌بادی آنتی‌ژن می‌باشد. برای دستیابی به این ساختارهای سه‌بعدی معمولاً از تکنیک‌های تجربی مانند کریستالوگرافی اشعه -X، که یک فرآیند غالباً طولانی و پرزحمت با نرخ بالای شکست است استفاده می‌شود. در حال حاضر به لطف پیشرفت در الگوریتم‌ها و قدرت پردازش و محاسبات کامپیوتری، می‌توان برای تعیین خصوصیات ساختاری کمپلکس‌های مولکولی، از تکنیک های محاسباتی نیز استفاده کرد. داکینگ یک روش محاسباتی کامپیوتری است، که شکل‌گیری کمپلکس ها را از اجزای تشکیل‌دهنده آن‌ها پیش‌بینی می‌کند. این روش یک مسیر سریع و ارزان برای به دست آوردن ساختارهایی می‌باشد که با روش های تجربی قابل‌مطالعه نیستند. می‌توان از مطالعات حاصل از داکینگ به بررسی میان کنش‌های موجود در کمپلکس‌های آنتی بادی – آنتی‌ژن پرداخت که بر اساس این یافته‌ها می توان به طراحی آنتی‌بادی‌های جدید با خصوصیات موردنظر دست‌یافت [۴].

کشف تکنیک هیبریدوما توسط کوهلر[1] و میلستین[2] در تولید آنتی‌بادی منوکلونال، انقلابی در فناوری زیستی به وجود آورده است. این روش، بر پایه الحاق شیمیایی سلول‌های طحال موش با میلوم که منجر به تولید سلول‌های نامیرا مولد آنتی‌بادی‌های منوکلونال می‌گردد، استوارشده است [۵]. هرچند آنتی‌بادی‌های منوکلونال موشی موفقیت‌های چشمگیری در بیوتکنولوژی و درمان به دست آورده‌اند، اما دارای برخی محدودیت‌هایی ازجمله، هزینه‌های بالای تولید در سیستم‌های یوکاریوتی و اندازه بزرگ آن‌ها (ایجاد اختلال در نفوذ کارآمد بافتی) می‌باشند که باعث ایجاد مشکلاتی در کاربرد آن‌ها شده است. یک راه‌حل برای برطرف کردن این مشکلات، مهندسی قطعات آنتی‌بادی ازجمله Fab و scFv می باشد. قطعات Fab سه بار کوچک‌تر از آنتی‌بادی معمول هستند و می‌توانند در یک سیستم باکتریایی بیان شوند. بااین‌حال، ازآنجایی‌که قطعات Fab، هترودایمری متشکل از مناطق متغیر از زنجیره های سنگین و سبک مرتبط با پل دی سولفید هستند، تولید آن‌ها با برخی مشکلات همراه می‌باشد و بیان موفقی ندارند. بیان تک زنجیره ای قطعات متغیر (scFv) آنتی‌بادی نیز مشکلاتی را به همراه دارد، ازجمله قطعات scFv حلالیت کمتری دارند و برای اتصال دمین‌های آن به هم احتیاج به یک لینکر دارند. علاوه بر این، scFv معمولاً تمایل کمتری نسبت به قطعات Fab و یا آنتی‌بادی‌های معمول دارند و تمایل بالایی برای مجتمع شدن از خود نشان می‌دهند [۶].

یک راه‌حل مناسب برای برطرف کردن چنین مشکلاتی بیان قطعات عملکردی آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین (HCAb) است که در حال حاضر در سرم حیوانات متعلق به خانواده شتر سانان دیده می‌شود. مناطق متغیر از آنتی‌بادی‌های زنجیره سنگین به نام VHH یا نانو بادی‌ها از یک زنجیره‌ای پلی پپتیدی منفرد تشکیل‌شده است؛ و مزایای ویژه‌ای نسبت به سایر قطعات آنتی‌بادی و آنتی‌بادی های معمول دارند که از آن جمله می‌توان به سهولت و آسانی در کلونینگ، اندازه کوچک آن‌ها که امکان نفوذ کارآمد به بافت را فراهم می‌کند و بیان پروتئین نسبتاً باثبات با راندمان بالا در باکتری‌ها اشاره نمود. این ویژگی‌ها باعث شده است که نانو بادی‌ها در مهندسی قطعات آنتی‌بادی بسیار موردتوجه قرار گیرند [۷ و ۸].

این آنتی‌بادی‌ها در سال ۱۹۹۳ توسط کاسترمن[3] و هامرس[4] در شترسانان کشف شدند؛ که به‌طور طبیعی فاقد زنجیرهای سبک بودند و به همین دلیل، آنتی‌بادی‌های زنجیره‌ای سنگین نامیده شدند [۵]. این HCAb های غیرمعمول فقط یک دمین برای اتصال به آنتی‌ژن دارند [۹]. HCAb یا (VHH) کوچک ترین قطعه آنتی‌بادی است که دارای عملکرد می‌باشد. وزن VHH ها یک‌دهم آنتی‌بادی‌های منوکلونال موشی و کمتر از نصف وزن scFv می‌باشد. به دلیل ابعاد این مولکول (ارتفاع مولکولی: ۸/۴ نانومتر و قطر: ۲/۲ نانومتر)، VHH ها به نانو بادی (NBS) نیز معروف شده‌اند.

مطالعات منتشرشده نشان داده‌اند که بیان خوب نانو بادی ها در سیستم‌های میکروبی با خصوصیات سودمند بیوشیمیایی که دارند سبب شده که نانو بادی‌ها گزینه مناسبی برای کاربردهای تشخیصی و درمانی علیه تومور معرفی شوند. نانو بادی‌ها به خاطر ساختار تک

1: Kohler, 2: Milestin, 3: Casterman, 4: Hamers

مجله طب انتظامی
زمستان ۱۳۹۳- دوره ۳- شماره ۴- صفحات ۲۳۰-۲۲۱

دمینی و میل ترکیبی بالایشان می‌توانند به‌عنوان یک داروی بالقوه در درمان تومورها و یا به‌عنوان پروب در تصویربرداری تومور استفاده شوند [۱۰].

در این تحقیق سعی بر این شده است که با استفاده از مطالعات تئوریک بهینه‌سازی نانو بادی‌هایی که در مطالعات قبلی علیه دمین NTR (واقع در گیرنده DR5 به‌منظور القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی) تولیدشده بودند انجام پذیرد و نانو بادی های جدیدتر با تمایل اتصال بالاتر نسبت به این دمین طراحی شوند. گیرنده DR5 یکی از گیرنده‌های مرگ سلولی مربوط به لیگاند TRAIL (لیگاند القاء کننده آپوپتوز مرتبط با TNF) می‌باشد. ثابت شده است این گیرنده نقش مؤثری در القاء مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی، از طریق اتصال TRAIL یا آنتی بادی های آگونیست تولیدشده علیه DR5 را بازی می‌کند.

بررسی کمپلکس TRAIL-DR5 نشان می‌دهد که DR5 دارای دو بخش کاملاً مشخص در برهم‌کنش با TRAIL است. بخش اول، یک موتیف حفاظت‌شده کاملاً هیدروفوب و بخش دوم دارای ویژگی‌های منحصربه‌فردی است که خصوصیات انتخاب پذیری و اختصاصی بودن رسپتور برای لیگاند را مشخص می‌کند. این دو لوپ رسپتور، بیشترین ناحیه درگیر در برهمکنش با لیگاند را شامل می‌شوند. این نواحی عبارت‌اند از: لوپ 50s شامل اسیدهای آمینه‌ای ۶۵-۵۱ و لوپ 90s که دربرگیرنده اسیدهای آمینه ای ۱۰۴-۹۱ است [۱۲]. در لوپ خارج سلولی 50s، چندین دمین عملکردی غنی از اسیدهای آمینه سیستئین (CRDs) وجود دارد. این دمین ها عملکرد حفاظت‌شده‌ای را در القاء آپوپتوز ایفا می‌کنند. گرچه نقش منطقه N ترمینال (دربرگیرنده N1-cap) کاملاً مشخص نشده است، اما مطالعات اخیر نشان می‌دهد که NTR می‌تواند فعال شدن DR5 (که منجر به انتقال سیگنال‌های آپوپتوزی می شود) را از طریق آنتی‌بادی‌های منوکلونال آگونیست وساطت کند. یک اپی‌توپ جدید، با تکنیک Peptide Array در ناحیه NTR گیرنده DR5 توسط Yabin Guo شناسایی‌شده است. آنتی‌بادی‌های تولیدشده علیه این ناحیه، بدون رقابت با TRAIL، تمایل خوبی به DR5 داشته و باعث فعال شدن کاسپازها و نهایتاً آپوپتوز می‌شوند [۱۳ و ۱۴]. این نتایج نشان می‌دهد که ناحیه NTR گیرنده DR5 می‌تواند به‌عنوان یک ناحیه عملکردی مستقل از جایگاه های اتصال TRAIL برای القاء آپوپتوز عمل کند. ازاین‌رو آنتی‌بادی‌هایی که علیه این ناحیه تولید می‌شوند، چه از طریق سیستم‌های طبیعی تولید آنتی‌بادی و چه از طریق مهندسی آنتی‌بادی به‌منظور بهبود ویژگی‌های اتصالی آنتی‌بادی‌های تولیدشده، می‌توانند به‌عنوان یک فاکتور هم‌افزا با TRAIL عمل کنند و به‌عنوان یک گزینه مناسب برای القاء آپوپتوز در سلول‌های سرطانی معرفی شوند.

مواد و روش‌ها

با توجه به مزایای نانو بادی‌های شتری که در بالا مختصری به آن‌ها اشاره‌شده است، در آزمایش‌های قبلی که در آزمایشگاه تحقیقاتی دکتر حسن نیا در دانشگاه تربیت مدرس صورت گرفته بود. ما از طریق تکنیک نمایش فاژی و با کمک ایمن کردن شتر علیه اپی‌توپ پپتیدی ^{12}ITQQDLAPQQRA^{1} واقع در دمین NTR گیرنده DR5 موفق به ساخت کتابخانه فاژی علیه آنتی ژن موردنظر شدیم. بعد از انجام چندین مرحله غنی‌سازی سه توالی نانو بادی علیه اپی‌توپ پپتیدی موردنظر جداسازی شد که در شکل ۱ توالی این نانو بادی‌ها مشخص‌شده است. در این تحقیق با استفاده از مطالعات تئوریک و انجام داکینگ بر روی VHH های جداشده

```
10-51p MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA QVQLQQSGGGSVQAGGSLRLACAASAS GYTESVKWMG W 60
9-50P MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA QVQLQESGGDSVQAGGSLRLACAASAS GYTESVKWMG W 60
1-38P MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA QVQLQESGGDSVQAGGSLRLACXASAS GYSVCVGWVG W 60
* *:* *.:** **** ********** ***:***** **********

10-51p FRQAPGQEREGVA VISIPGGSTYYDDDVKG RFTISQDNAKNTVYPQMNSLKPEDTAMYYC 120
9-50P FRQAPGQEREGVA VISIPGGSTYYDDDVKG RFTISQDNAKNTVYPQMNSLKPEDTAMYYC 120
1-38P FRPAPGRERGGVA VVSVPGGGSFFGGDVGG RFSLSPDHAQNTVYPQMNSLKPEDTAMYYC 120
**********:*:* *:** * ** ***:*:* *** **:*** **

10-51p AA RNAGGRFRPSAAGGYNY WGQGTLVTVSSHHHHHH 156
9-50P AA RNAGGRFRAWAGGGDNY WGQGTQVTVSSHHHHHH 156
1-38P AA RNAGGRFRPSANGGYNY WGQGTQVTVSSHHHHHH 156
```

شکل ۱: توالی آمینواسیدی سه نانو بادی منتخب **(FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3)**

Journal of Police Medicine
Winter 2015; Vol. 3, No. 4: 221-230

علیه اپی‌توپ پپتیدی موردنظر، جهش‌هایی در راستای غنی‌سازی و افزایش تمایل بهتر آن‌ها به‌منظور القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی طراحی شدند.

مدل‌سازی مولکولی

ازآنجایی‌که پروتئین VHH با کد 1MVF بیشترین شباهت را ازنظر توالی به توالی پروتئین موردنظر ما داشت ساختار سه‌بعدی آن از بانک اطلاعات پروتئینی (PDB) به‌عنوان مدل الگو استخراج شد. با استفاده از برنامه MODELER نسخه 9.13 [۱۵]. ساختارهای نانو بادی‌های تولیدشده مدل‌سازی شد. با استفاده از این برنامه ده مدل اولیه ساخته شد. از بین این مدل‌ها مناسب‌ترین مدل جهت بهینه‌سازی ساختار انتخاب شد. تأیید اعتبار مدل نهایی با استفاده از برنامه‌های Verify3D [۱۶] ، ProCheck [۱۷] و ERRAT [۱۸] صورت گرفت.

روش انجام داکینگ

برای انجام داکینگ DR5 با VHH های مدل سازی شده از برنامه HADDOCK استفاده شد. این برنامه با استفاده از تکنیک شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، داکینگ پروتئین-پروتئین را به‌صورت کاملاً انعطاف‌پذیر انجام می‌دهد [۱۹ و ۲۰].

برای محدود کردن حجم محاسبات داکینگ، اسیدهای آمینه‌ای که در اتصال نقش مستقیم دارند مشخص می شوند. در این برنامه اسیدهای آمینه‌ای به‌عنوان اسیدهای آمینه‌ای فعال (active) در نظر گرفته‌شده‌اند که سطح نسبی در دسترس حلال آن‌ها بالاتر از ۴۰ درصد باشد. اسیدهای آمینه‌ای که در مجاورت اسیدهای آمینه فعال قرارگرفته‌اند به‌عنوان اسیدهای آمینه تأثیرپذیر تعریف می‌شوند. توالی‌های درگیر در میان کنش، در داکینگ DR5 و نانو بادی‌های طبیعی در جدول ۱ مشخص‌شده‌اند.

بهینه‌سازی میان کنش کمپلکس VHH-DR5

جهت طراحی جهش در پروتئین VHH نیاز به آنالیز توالی و ساختاری در منطقه اتصال (CDR3) می باشد. برای تشخیص اسیدهای آمینه ای که در اتصال کمپلکس VHH-DR5 نقش دارند، از نرم افزار تحت وب CFinder به آدرس: http:// bioinf.modares.ac.ir استفاده شد. این نرم افزار اسیدهای آمینه مسئول در اتصال را با جزئیات سهم هر اسیدآمینه در اتصال نشان می‌دهد. با استفاده از نرم‌افزار Yasara امکان جایگزینی این اسیدهای آمینه با دیگر اسیدهای آمینه در جهت افزایش قدرت پیوند اتصال بررسی شد و جهش‌هایی که امکان این خصوصیت را داشتند پیشنهاد گردیدند.

مطالعه بررسی میان کنش کمپلکس VHH های جهش‌یافته و DR5

برای بررسی میان کنش کمپلکس VHH های جهش یافته و DR5 نیز از برنامه HADDOCK استفاده شد. اسیدهای آمینه فعال در داکینگ DR5 و نانو بادی های جهش یافته، مشابه اسیدهای آمینه تعریف‌شده برای VHH های طبیعی می‌باشد که در جدول ۱ مشخص‌شده‌اند.

جدول ۱: اسیدهای آمینه فعال در VHH های تولیدشده

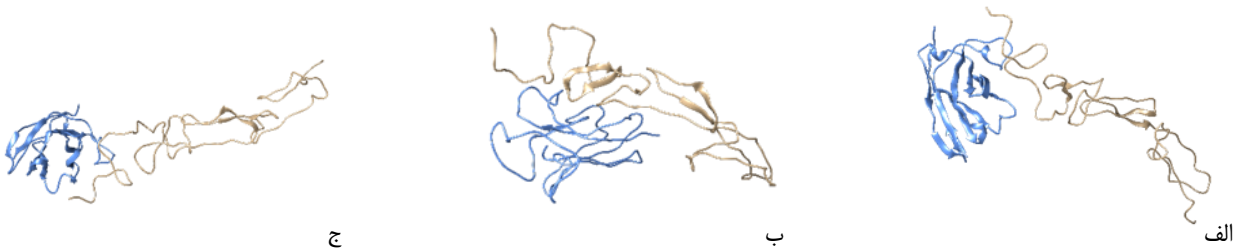
لیگاند	اسیدهای آمینه فعال لیگاند
VHH_{51-10p}	RNAGGRFRPSAAGGYNY
VHH_{50-9p}	RNAGGRFRAWAGGGDNY
VHH_{381-1p}	RNAGGRFRPSANGGYNY

یافته‌ها

در این مطالعه برای انجام داکینگ از نرم‌افزار HADDOCK 2.1 استفاده شد. این نرم‌افزار با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی، داکینگ پروتئین‌های VHH و DR5 را به‌صورت کاملاً انعطاف‌پذیر انجام می‌دهد. برای هر VHH حدود ۲۰۰ ساختار در این نرم افزار ایجادشده که هرکدام بر اساس تفاوت RMSD ساختار تولیدشده با بهترین ساختار در دسته های مجزایی قرار می‌گیرند. اولویت انتخاب از میان این ساختارها بر اساس دسته‌بندی و میزان انرژی هر کمپلکس می باشد. بر اساس این دو فاکتور بهترین کمپلکس VHH با DR5 برای هر VHH انتخاب شد. از نتایج حاصل از مرحله اول داکینگ که بین VHH های اولیه با DR5 می‌باشد، سطح در تماس بین VHH با DR5 در کمپلکس مشخص می شود. تصاویر مربوط به داکینگ هر VHH قبل از جهش با DR5 در شکل ۲ مشخص‌شده است.

نتایج حاصل از داکینگ بین VHH های طبیعی و همچنین VHH های جهش یافته با این پروتئین در جدول ۲ آورده شده است. رتبه‌بندی ساختارهای کمپلکس منتخب بر اساس امتیازدهی HADDOCK می باشد. در این جدول مقادیر انرژی های واندروالسی و الکتروستاتیک و همچنین سطح مدفون بین دو کمپلکس نشان داده‌شده است.

مجله طب انتظامی
زمستان ۱۳۹۳- دوره ۳- شماره ۴- صفحات ۲۳۰-۲۲۱



الف ب ج

شکل ۲: تصویر نتایج حاصل از داکینگ: بهترین کمپلکس برای الف) VHH_{50-9p}، ب) VHH_{38-1P} و ج) VHH_{51-10P} نشان داده‌شده است.

جدول ۲: نتایج حاصل از داکینگ VHH های طبیعی و جهش‌یافته با DR5

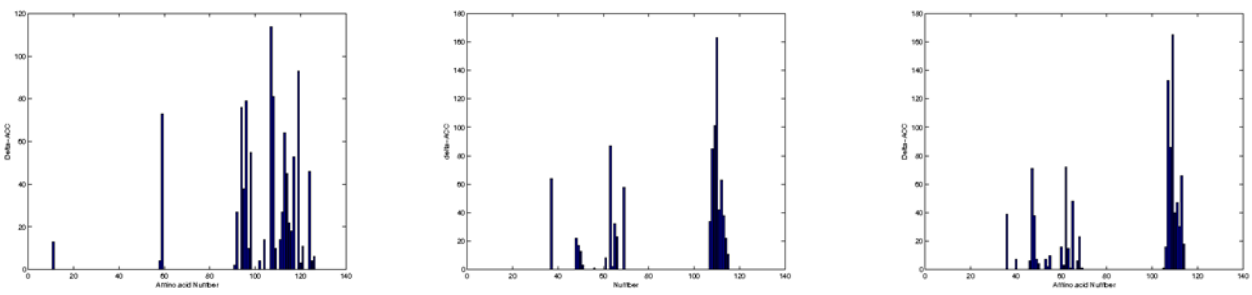
نانو بادی (VHH)	HADDOCK score
10-51p	-۴۰/۰۶۰ (+/- ۸/۶)
-10-51PHE109ARG	-۹۳/۵ (+/- ۵/۷)
-10-51GLY107ASP	-۹۰/۱ (+/- ۵/۱)
109-107-10-51	-۷۹/۵ (+/- ۰/۸)
1-38p	-۶/۷ (+/- ۱۰/۸)
1-38p-PHE108GLU-ALA112ASP	-۸/۰ (+/- ۱۲/۶)
1-38p-PHE108GLU	-۷/۶ (+/- ۱۳/۱)
1-38p-ALA112ASP	۱۳/۱ (+/- ۱۰/۸)
9-50p	۶۵/۴۴۹ (+/- ۲۱/۳)
9-50p-SER111ASN	۹/۶ (+/- ۱۲/۴)
9-50p-ASN117ASP	۱۴/۶ (+/- ۲۷/۵)
9-50p-111ASN-117ASP	۳۳/۴ (+/- ۱۷/۰)

بعد از انتخاب بهترین کمپلکس برای هر VHH، با کمک بررسی‌های انجام‌شده با Cfinder اسیدهای آمینه مسئول در میان کنش بین VHH و DR5 مشخص شد. نتایج حاصل در شکل ۳ و جدول ۳ به تفکیک برای هر VHH مشخص‌شده است. طبق توالی آمینواسیدی که برای HADDOCK 2.1 تعریف‌شده بود، اسیدهای آمینه فعال برای هر پروتئین VHH، آمینواسیدهای موجود در ناحیه CDR3 این پروتئین‌ها در نظر گرفته شد. چون مهم‌ترین بخش اتصالی نانو بادی‌ها با آنتی‌ژن‌های مربوطه از طریق CDR3 هر VHH صورت می‌گیرد. بر اساس تعریف این ناحیه به عنوان ناحیه فعال برای هرکدام از VHH های موردنظر و آنالیزهای انجام‌شده توسط Cfinder، اسیدهای آمینه درگیر در میانکش VHH با DR5 مشخص شد که نتایج آن در جدول ۳ آورده شده است. همچنین از طریق آنالیزهای انجام‌شده سهم هر اسیدآمینه از VHH نیز در این اتصالات مشخص‌شده است.

طراحی جهش

از نتایج حاصل از برنامه تحت وب CFinder اسیدهای آمینه محل اتصال VHH با DR5 مشخص شد. با استفاده از اطلاعات موجود در جدول ۳ اسیدهای آمینه مناسب برای طراحی جهش برای هر VHH انتخاب شد. با کمک نرم‌افزار Yasara امکان جایگزینی این اسیدهای آمینه با دیگر اسیدهای آمینه در جهت افزایش قدرت پیوند اتصال مورد بررسی قرار گرفت و جهش‌هایی که سبب افزایش قدرت پیوند اتصال می‌شدند انتخاب شدند که نتایج آن در جدول ۴ آمده است.

شکل ۳: اسیدهای آمینه درگیر در میان کنش با DR5 به تفکیک برای هر VHH مشخص‌شده است.
الف) نتایج حاصل از محاسبات Cfinder برای VHH 50-9P با DR5؛ ب) VHH 51-10P با DR5؛ و ج) VHH38-1P با DR5.



الف ب ج

Journal of Police Medicine
Winter 2015; Vol. 3, No. 4: 221-230

VHH50-9P			VHH51-1P			VHH38-1P		
سطح اتصال	اسیدهای آمینه DR5	اسیدهای آمینه منتخب از VHH	سطح اتصال	اسیدهای آمینه DR5	اسیدهای آمینه منتخب از VHH	سطح اتصال	اسیدهای آمینه DR5	آمینواسیدهای منتخب از VHH
۷	ASP 9	ALA 104	۶	ARG 15	GLY 107	۱	GLN 8	GLY 105
۶	ILE 5		۱۴	PRO 18		۵	GLN 8	GLY 106
۱۴	THR 6		۳۵	SER 2		۲	ARG 41	
۱۹	GLN 7	ARG 107	۵	ALA 3	ARG 108	۸	ASP 9	
۱۳	GLN 8		۴	LEU 4		۲۳	LEU 10	
۲۲	ASP 9		۲۲	ARG 15		۲۶	ASP 39	ARG 107
۱۲	GLN 8		۱۳	SER 2		۵	GLY 40	
۴	ASP 9	PHE 108	۸	ALA 3		۱۶	ARG 41	
۲۱	LEU 10		۷	LEU 4		۵	GLN 8	
۲۲	ARG 41		۱	ILE 5		۹	LEU 10	
۱۰	GLN 8	ARG 109	۳۵	THR 6	PHE 109	۷	ARG 22	PHE 108
۲	ARG 41		۱	ASP 9		۴	SER 24	
۱۱	GLY 28	SER 111	۴	ARG 15		۳۳	ARG 41	
۲	ARG 41		۳	ALA 16		۱۰	THR 6	
۱	GLY 28		۲	PRO 18		۲	GLN 8	
۶	ILE 36	ALA 112	۳	GLN 8		۱۸	ASP 9	
۸	ARG 41		۳۲	ASP 9		۷	LEU 10	
۲	ILE 36		۸	LEU 10		۸	ALA 11	ARG 109
۲	SER 37		۱۱	ALA 11		۸	GLN 13	
۲	GLU 38	ALA 113	۲	PRO 12	ARG 110	۵	GLN 14	
۱	ASP 39		۱۱	GLN 13		۱۰	ARG 15	
۴	GLY 40		۴	GLN 14		۱۹	ALA 16	
۱	ARG 41		۱۰	ARG 15		۲	THR 6	
۴	PRO 12	GLY 115	۱۴	ALA 16		۸	GLN 7	PRO 110
۲	ASP 39		۵	LEU 10		۶	GLN 8	
۲	GLU 38	TYR 116	۱	ALA 16	PRO 111	۱	THR 6	
۴	ASP 39		۲	ALA 17		۲	ARG 15	SER 111
۱۱	PRO 12		۲۸	PRO 18		۱۳	ALA 16	
۱۴	GLU 38	ASN 117	۸	GLN 8		۵	PRO 18	
۲۱	ASP 39		۶	ASP 9	SER 112	۴	ALA 16	
۷	ILE 36		۱۵	LEU 10		۲	ALA 17	ALA 112
۱	SER 37		۵	THR 6		۶	ARG 22	
۳۳	GLU 38	TRP 119	۱	GLN 8	ALA 113	۵	PRO 18	
۱۲	ASP 58		۹	GLN 7	ALA 114	۹	GLN 19	ASN 113
۱۰	LEU 60		۷	GLN 7	GLY 115	۱۵	GLN 20	
						۲۰	GLN 20	GLY 114

جدول ۳: آمینواسیدهای مؤثر در میان کنش VHH ها ی موردبررسی با DR5 و مهم‌ترین اسیدهای آمینه در این میان کنش‌ها با رنگ زمینه تیره مشخص‌شده است.

بعد از طراحی و بهینه‌سازی جهش‌ها داکینگ هرکدام از VHH های جهش‌یافته به‌صورت جداگانه با DR5 بررسی شد. هم‌چنین داکینگ ترکیبی از تمامی جهش‌های طراحی‌شده برای هر VHH جداگانه انجام شد که نتایج حاصل از این داکینگ‌ها نیز در جدول ۱ مشخص‌شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

اهمیت آنتی‌بادی‌ها به‌طور مداوم در زمینه‌های مختلف ازجمله صنعت

مجله طب انتظامی
زمستان ۱۳۹۳- دوره ۳- شماره ۴- صفحات ۲۳۰-۲۲۱

	شماره اسیدآمینه	اسیدآمینه طبیعی	اسیدآمینه جهش‌یافته
VHH_{51-10P}	۱۰۹	PHE	ARG
	۱۰۷	GLY	ASP
	۱۰۹/۱۰۷	PHE/GLY	ARG/ASP
VHH_{50-9P}	۱۱۱	SER	ASN
	۱۱۷	ASN	ASP
	۱۱۱/۱۱۷	SER/ASN	ASN/ASP
VHH_{38-1P}	۱۰۸	PHE	GLU
	۱۱۲	ALA	ASP
	۱۰۸/۱۱۲	PHE/ALA	GLU/ASP

جدول ۴: جهش‌های طراحی‌شده برای هر VHH

داروسازی، بیوسنسورها، تحقیقات پایه در حال افزایش است. همان طور که مشخص است مکانیسم اثر آنتی بادی ها، به فعل وانفعالات اتمی شان با آنتی ژن بستگی دارد. مطالعه و تعیین خصوصیات آنتی‌بادی‌ها نظیر میان کنش‌های آن‌ها به درک اهمیت آنتی بادی ها و طراحی آنتی بادی های جدید با خواص بهبودیافته بسیار کمک می کند. هم‌چنین شناسایی محل اتصال آنتی‌ژن (علیه اپی توپ فضایی) نیز برای فهم مکانیسم اثر آنتی بادی بسیار مهم است. بهینه‌سازی و بهبود خواص آنتی‌بادی‌ها چه در جهت افزایش کارایی یا تغییر ویژگی‌های اتصالی آن‌ها در کارهای تجربی به‌منظور اجتناب از واکنش‌های متقاطع آنتی‌بادی، انتخاب آنتی‌بادی مناسب برای طراحی نشانگرهای زیستی (بیوسنسورها)، حذف یا تغییر خصوصیات اتصالی آنتی بادی های که به آنتی ژن های نامطلوب متصل می شوند، امر بسیار مطلوبی می باشد. هم چنین از طریق مهندسی آنتی‌بادی، می‌توان آنتی‌بادی‌های را که تنها یک سروتیپ در پاتوژن های متغیر مانند آنفلوانزا را تشخیص می دهند طوری تغییر داد که دامنه شناسایی آن‌ها بیشتر گردد.

بهینه‌سازی آنتی‌بادی را می‌توان از طریق فن‌آوری نمایش فاژی [۲۱] و یا توسط تجزیه‌وتحلیل‌های ساختاری و تغییر منطقی و ایجاد جهش ها در محل اتصال آنتی بادی - آنتی ژن به دست آورد. روش های دیگری نیز در این زمینه وجود دارند که به ساختارهای کریستالوگرافی با رزولوشن بالا احتیاج دارند و چون این ساختارها غالباً برای کمپلکس‌های آنتی‌بادی- آنتی‌ژن در دسترس نمی‌باشند کمتر مورداستفاده قرار می‌گیرند [۲۲].

مدل های کامپیوتری (محاسباتی) از کمپلکس نانو بادی - آنتی ژن منطقی مناسب به‌منظور طراحی جهش برای نانو بادی‌های موردنظر فراهم می‌کند. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده‌شده است مقایسه نتایج داکینگ برای هر دو گروه VHH طبیعی و جهش‌یافته نشان می دهد که جهش های طراحی شده باعث بهبود خواص اتصالی و انرژی اتصالی نانو بادی‌ها جهش‌یافته به DR5 می‌شود. بر اساس نتایج امتیازدهی HADDOCK که به ترتیب برای VHH های طبیعی 51-10p، 38-1p و 50-9p مقادیر ۴۰/۶۰-، ۶/۷- و ۶۵/۴+ می‌باشد.VHH_{51-10P} بهترین رتبه را دارد که نشان می‌دهد نسبت به دو VHH دیگر تمایل بیشتری به DR5 دارد. هم‌چنین نتایج امتیازدهی HADDOCK مشخص می کند که جهش‌های طراحی شده برای هر VHH باعث افزایش ویژگی های اتصالی VHH جهش یافته نسبت به VHH های طبیعی شده است بطوریکه سه جهش طراحی شده برای 51-10P، بهبود شرایط اتصالی را در این جهش یافته ها نشان می دهد. در جهشی که در اسیدآمینه ۱۰۹ باعث جایگزینی فنیل آلانین به آرژنین شده مشاهده شد که مقادیر امتیازدهی HADDOCK، انرژی واندروالسی، انرژی الکترواستاتیک که به ترتیب ۹۳/۵-، ۴۰/۱- و ۳۶۸/۳- می باشد. این مقادیر نسبت به حالت طبیعی (۴۰/۰۶-، ۳۹/۰- و ۱۷۷/۶-) منفی‌تر شده و سطح مدفون بین دو کمپلکس برای این جهش ۱۴۶۲/۱ آنگستروم مربع گزارش‌شده است که نسبت به حالت طبیعی که ۱۲۳۷/۰۲ می‌باشد مثبت‌تر شده که مشخص می‌کند این جهش نسبت به حالت طبیعی ویژگی‌های اتصالی VHH را بهبود بخشیده است.

در جهش دیگری که برای 51-10P طراحی شده اسیدآمینه گلایسین ۱۰۷ به اسپارتیک اسید جهش‌یافته است. مقادیر امتیازدهی HADDOCK، انرژی واندروالسی، انرژی الکترواستاتیک برای این جهش به ترتیب ۹۰/۱-، ۶۴/۵- و ۱۲۹/۶- می‌باشد که از نظر امتیازدهی HADDOCK نسبت به حالت طبیعی منفی‌تر شده است هم چنین مقدار سطح مدفون بین دو کمپلکس در این جهش‌یافته (۱۴۵۲/۶) نسبت به حالت طبیعی بیشتر شده است؛ که این مقادیر تأییدکننده این مطلب می‌باشد که این جهش نیز نسبت به حالت طبیعی شرایط اتصالی بهتری را برای VHH فراهم می کند. سومین جهشی که برای 51-10P طراحی شده است ترکیبی از هر دو جهش مذکور هم در اسیدآمینه ۱۰۷ و هم در اسیدآمینه ۱۰۹ می‌باشد. مقادیر امتیازدهی HADDOCK، انرژی واندروالسی، انرژی الکترواستاتیک برای این جهش یافته به ترتیب عبارت‌اند از ۷۹/۵-، ۳۸/۶- و ۲۴۷/۶- که نسبت به حالت طبیعی منفی‌تر می‌باشند. مقدار سطح مدفون بین دو کمپلکس آن (۱۴۵۲/۶) نیز نسبت به حالت طبیعی افزایش یافته که نشان می‌دهد مجموع

Journal of Police Medicine
Winter 2015; Vol. 3, No. 4: 221-230

این دو جهش شرایط اتصالی بهتری را نسبت به حالت طبیعی برای اتصال به DR5 فراهم می‌کند؛ اما از مقایسه نتایج این سه جهش، جهشی که در اسیدآمینه ۱۰۹ باعث جایگزینی فنیل آلانین با آرژنین شده نسبت به دو جهش دیگر مناسب‌تر می‌باشد. هم‌چنین جهش طراحی‌شده برای اسیدآمینه ۱۰۷ نیز نسبت به جهش مرکب شرایط بهتری برای VHH ایجاد کرده است.

برای $VHH_{38\text{-}1P}$ سه جهش طراحی شد. در جهش اول اسیدآمینه فنیل آلانین ۱۰۸ به گلوتامیک اسید جهش یافت که مقادیر امتیازدهی HADDOCK، انرژی واندروالسی، انرژی الکترواستاتیک برای این جهش به ترتیب ۷/۶-، ۱۱۵/۰-و ۳۵۱/۹- می باشد؛ که نسبت به حالت طبیعی که این مقادیر به ترتیب عبارت‌اند از ۶/۷-، ۴۱/۳- و ۱۴۲/۹-؛ منفی‌تر شده‌اند. مقدار سطح مدفون بین دو کمپلکس در جهش‌یافته هستند (۲۹۸۷/۱) نسبت به حالت طبیعی (۱۲۱۱/۳۴) افزایش‌یافته که مشخص می‌کند که این جهش نسبت به حالت طبیعی، جهش مناسبی می‌باشد. در جهش دیگری که در اسیدآمینه ۱۱۲ طراحی‌شده بود اسیدآمینه آلانین به اسیدآمینه آسپارتیک اسید تبدیل شده است. مقدار امتیازدهی HADDOCK آن (۱۳/۱) نسبت به حالت طبیعی بیشتر شده که مشخص می‌کند جهش چندان مناسبی نمی‌باشد. در جهش سوم هر دو اسیدآمینه ۱۰۸ و ۱۱۲ تغییر پیدا کردند که مجموع هر دو جهش مذکور می باشند. مقادیر امتیازدهی HADDOCK، انرژی واندروالسی، انرژی الکترواستاتیک برای این جهش‌یافته عبارت‌اند از ۸/۰-، ۱۱۲/۲- و ۳۳۷/۵- که نسبت به حالت طبیعی منفی تر می‌باشند. مقدار سطح مدفون بین دو کمپلکس نیز در آن نسبت به حالت طبیعی بیشتر شده است (۲۸۸۱/۸) که مشخص می‌کند که جهش های انجام شده، جهش های مناسبی می باشند. از بین جهش یافته‌های 38-1P جهشی که در هر دو اسیدآمینه ۱۰۸ و ۱۱۲ طراحی‌شده نسبت به دو جهش‌یافته دیگر مناسب‌تر می‌باشد.

برای $VHH_{50\text{-}9P}$ نیز سه جهش طراحی شد. در جهش اول اسیدآمینه ۱۱۱ سرین به آسپارژین تبدیل شد؛ که مقادیر امتیازدهی HADDOCK، انرژی واندروالسی، انرژی الکترواستاتیک برای این جهش به ترتیب ۹/۶، ۱۱۸/۲- و ۴۵۲/۸-که نسبت به حالت طبیعی آن (۶۵/۴۴۹، ۳۹/۰- و ۱۷۷/۶) کاهش یافته است؛ که مشخص می‌کند حالت جهش‌یافته نسبت به طبیعی شرایط اتصالی بهتری دارد. در جهش دیگری که در اسیدآمینه ۱۱۷ طراحی‌شده بود و اسیدآمینه آسپارژین به اسپارتیک اسید تبدیل شده بود مقادیر امتیازدهی HADDOCK، انرژی واندروالسی، انرژی الکترواستاتیک برای این جهش‌یافته که عبارت‌اند از ۱۴/۶، ۱۱۰/۹- و ۳۲۰/۸- نسبت به حالت طبیعی منفی‌تر شده‌اند هم‌چنین افزایش در مقدار سطح مدفون بین دو کمپلکس آن (۳۰۰۶/۵) دیده می‌شود؛ که مشخص می‌کند این جهش‌یافته نسبت به حالت طبیعی مناسب‌تر می‌باشد. در جهش سوم که مجموع هر دو جهش در اسیدهای آمینه ۱۱۱ و ۱۱۷ می باشد مقادیر امتیازدهی HADDOCK، انرژی واندروالسی و انرژی الکترواستاتیک برای آن عبارت‌اند از ۳۳/۴، ۱۱۱/۳- و ۳۵۱/۷- که نسبت به حالت طبیعی منفی‌تر شده است؛ که مؤید این مطلب است که نسبت به حالت طبیعی از شرایط اتصالی بهتری برخوردار است.

از مباحث ارائه‌شده در بالا می‌توان به این نتیجه رسید که جهش‌های طراحی شده برای هر VHH نسبت به حالت طبیعی آن شرایط مناسب‌تری را برای اتصال VHH ها به DR5 فراهم کرده است. هم چنین از بین تمامی VHH های طبیعی و VHH های جهش یافته $VHH_{51\text{-}10}$-PHE109ARG بهترین شرایط اتصالی را با DR5 ایجاد می کند؛ که می تواند گزینه‌ای مناسبی برای مطالعات بعدی باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از صندوق حمایت از پژوهشگران که منابع مالی جهت انجام این پروژه را تأمین نموده است و کلیه افرادی که در انجام این تحقیق مشارکت داشته‌اند صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Edelman G, Benacerraf B, Ovary Z, Poulik M. Structural differences among antibodies of different specificities. Proc Natl Acad Sci U S A 1961; 47: 1751-8.
2. Edelman G, Poulik M. Studies on structural units of the γ-globulins. J Exp Med 1961; 113: 861-84.
3. Pedotti M, Simonelli L, Livoti E, Varani L. Computational docking of antibody-antigen complexes, opportunities and pitfalls illustrated by influenza hemagglutinin. Int J Mol Sci 2011; 12: 226-51.
4. Simonelli L, Pedotti M, Beltramello M, Livoti E, Calzolai L, Sallusto F, et al. Rational engineering of a human anti-dengue antibody through experimentally validated computational docking. PLoS One 2013; 8: e55561.
5. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256: 495-7.
6. Worn A, Pluckthun A. Different equilibrium stability behavior of ScFv fragments: identification, classification, and improvement by protein engineering. Biochemistry 1999; 38: 8739-50.

مجله طب انتظامی
زمستان ۱۳۹۳- دوره ۳- شماره ۴- صفحات ۲۳۰-۲۲۱

7. Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. J Biotechnol 2001; 74: 277-302.
8. Czerwinski M, Krop-Watorek A. [Heavy-chain antibodies of the Camelidae and their possible applications]. Postepy Hig Med Dosw (Online) 2005; 59: 193-202. (Polish)
9. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 1993; 363: 446-8.
10. Muyldermans S, Lauwereys M. Unique single-domain antigen binding fragments derived from naturally occurring camel heavy-chain antibodies. J Mol Recognit 1999; 12: 131-40.
11. Revets H, De Baetselier P, Muyldermans S. Nanobodies as novel agents for cancer therapy. Expert Opin Biol Ther 2005; 5: 111-24.
12. Hymowitz SG, Christinger HW, Fuh G, Ultsch M, O'Connell M, Kelley RF, et al. Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. Mol cell 1999; 4: 563-71.
13. Guo Y, Chen C, Zheng Y, Zhang J, Tao X, Liu S, et al. A novel anti-human DR5 monoclonal antibody with tumoricidal activity induces caspase-dependent and caspase-independent cell death. J Biol Chem 2005; 280: 41940-52.
14. Zhang P, Zheng Y, Shi J, Zhang Y, Liu S, Liu Y, et al. Targeting a novel N-terminal epitope of death receptor 5 triggers tumor cell death. J Biol Chem 2010; 285: 8953-66.
15. Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, et al. Comparative protein structure modeling using MODELLER. Curr Protoc Protein Sci 2007; Chapter 2: Unit 2.9.
16. Luthy R, Bowie JU, Eisenberg D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. Nature 1992; 356: 83-5.
17. Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. Protein Sci 1993; 2: 1511-9.
18. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J Appl Crystallogr 1993; 26: 283-91.
19. Dominguez C, Boelens R, Bonvin AM. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. J Am Chem Soc 2003; 125: 1731-7.
20. Lowry JA, Gamsjaeger R, Thong SY, Hung W, Kwan AH, Broitman-Maduro G, et al. Structural analysis of MED-1 reveals unexpected diversity in the mechanism of DNA recognition by GATA-type zinc finger domains. J Biol Chem 2009; 284: 5827-35.
21. Bradbury AR, Sidhu S, Dubel S, McCafferty J. Beyond natural antibodies: the power of in vitro display technologies. Nat Biotechnol 2011; 29: 245-54.
22. Garcia-Rodriguez C, Levy R, Arndt JW, Forsyth CM, Razai A, Lou J, et al. Molecular evolution of antibody cross-reactivity for two subtypes of type A botulinum neurotoxin. Nat Biotechnol 2007; 25: 107-16.