

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

ABSTRACT

Shirin Jalili¹
S. Shahriar Arab²
Sadegh Hasannia^{3*}
Samira Poulakchi Saber⁴
Ammar Mohseni⁵

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

²Assistant Professor, Department of Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

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

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

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

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

*Corresponding Author:

Sadegh Hasannia

Tel: (+98)9127177852

e-mail: hasannia@modares.ac.ir

بهینه‌سازی ساختار نانو بادی‌های به‌دست آمده از کتابخانه فاژی علیه دمین

NTR-DR5 از طریق داکینگ

تاریخ دریافت: ۳۰ شهریور ۱۳۹۳ تاریخ اصلاح: ۶ آذر ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: ۱۴ دی ۱۳۹۳

چکیده

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

مقدمه: آنتی‌بادی‌ها نقش مهمی در ایمنوترابی، پژوهش‌های بنیادی و فرآیندهای صنعتی بازی می‌کنند. مطالعه میان‌کنش بین کمپلکس‌های آنتی‌بادی-آنتی‌ژن 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 از جمله 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 آنتی‌بادی -آنتی‌ژن) را از اجزای آن پیش‌بینی می‌کند. اعتبار سنجی آنتی‌بادی طراحی شده 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 VHH‌هایی که نسبت به DR5 تمایل اتصال بهتری داشته باشند، بر پایه نتایج آزمایشگاهی، از پیش‌بینی ساختار کمپلکس VHH-DR5 توسط داکینگ استفاده شد.

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

نتیجه‌گیری: این نانو بادی‌های طراحی شده با توجه به جایگاه اتصالشان روی DR5 می‌توانند کاندیداهای مناسبی برای راه‌اندازی آپوپتوز در سلول‌های سرطانی متفاوت باشند.

کلیدواژه‌ها: بهینه‌سازی نانو بادی، گیرنده مرگ ۵، آپوپتوز، پروتئین داکینگ

مقدمه

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 می‌کنند. طراحی و سنتز آنتی‌بادی‌های جدید با خواص موردنظر تأثیر عمیقی در پیشرفت علوم و بیوتکنولوژی دارد و علی‌رغم اینکه چندین دهه

علاوه بر کاربردهای فراوانی که آنتی‌بادی‌ها در زمینه دارویی دارند، امروزه شاهد نقش فزاینده این ترکیبات در عرصه‌های مختلفی از جمله تحقیقات، بیوتکنولوژی، صنایع نظامی و غیره هستیم. به‌طوری‌که در طراحی حسگرهای زیستی در زمینه‌های تشخیصی،

می‌توانند در یک سیستم باکتریایی بیان شوند. با این حال، از آنجایی که قطعات Fab، هتروداایمری 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 موفقیت‌ناپذیرند. بیان تک زنجیره ای قطعات متغیر (scFv) آنتی‌بادی نیز مشکلاتی را به همراه دارد، از جمله 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 تشکیل شده است؛ و مزایای ویژه‌ای نسبت به سایر قطعات آنتی‌بادی و آنتی‌بادی‌های 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 مورد توجه قرار گیرند [۷ و ۸].

این آنتی‌بادی‌ها در سال ۱۹۹۳ توسط کاسترمن^۳ و هامرس^۴ در شترسانان کشف شدند؛ که به‌طور طبیعی فاقد زنجیره‌های 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) کوچک‌ترین 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 منتشر شده نشان داده‌اند که بیان خوب نانو بادی‌ها 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

از شناسایی ویژگی‌های ساختاری آنتی‌بادی‌ها می‌گذرد، اما دستیابی به چنین آنتی‌بادی‌هایی با ویژگی‌های موردنظر کار سخت و دشواری می‌باشد [۲ و ۱]. مطالعه کمپلکس‌های آنتی‌بادی - آنتی‌ژن درک ما را از اصول کلی نحوه شناسایی آنتی‌ژن‌ها توسط آنتی‌بادی‌ها افزایش می‌دهد. و در درازمدت، دانش پایه 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 کمپلکس‌های 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 تکنیک‌های محاسباتی نیز استفاده کرد. داکینگ یک روش محاسباتی کامپیوتری است، که شکل‌گیری کمپلکس‌ها را از اجزای تشکیل‌دهنده آن‌ها پیش‌بینی می‌کند. این روش یک مسیر سریع و ارزان برای به دست آوردن ساختارهایی می‌باشد که با روش‌های تجربی قابل مطالعه نیستند. می‌توان از مطالعات حاصل از داکینگ به بررسی میان کنش‌های موجود در کمپلکس‌های آنتی‌بادی - آنتی‌ژن پرداخت که بر اساس این یافته‌ها می‌توان به طراحی آنتی‌بادی‌های جدید با خصوصیات موردنظر دست یافت [۴].

کشف تکنیک هیبریدوما توسط کوهرل^۱ و میلستین^۲ در تولید آنتی‌بادی منوکلونال، انقلابی در فناوری زیستی به وجود آورده است. این روش، بر پایه الحاق شیمیایی سلول‌های طحال موش با میلوما که منجر به تولید سلول‌های نامیرا مولد آنتی‌بادی‌های منوکلونال می‌گردد، استوار شده است [۵]. هرچند آنتی‌بادی‌های منوکلونال موشی موفقیت‌های چشمگیری در بیوتکنولوژی و درمان به دست آورده‌اند، اما دارای برخی محدودیت‌هایی از جمله، 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 از جمله Fab و scFv می‌باشد. قطعات Fab سه بار کوچک‌تر از آنتی‌بادی معمول هستند و

DR5 (که منجر به انتقال سیگنال‌های آپوپتوزی می‌شود) را از طریق آنتی‌بادی‌های منوکلونال آگونیست واسطت کند. یک اپی‌توپ جدید، با تکنیک Peptide Array در ناحیه NTR گیرنده DR5 توسط Yabin Guo شناسایی شده 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 جایگاه‌های اتصال TRAIL برای القاء آپوپتوز عمل کند. از این رو 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 اشاره شده 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 پپتیدی¹² ITQQDLAPQQRRA¹ 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 مشخص شده است. در این تحقیق با استفاده از مطالعات تئوریک و انجام داکینگ بر روی VHH های جداشده

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 بادی‌های 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 بادی‌های 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 ۹۱-۶۵ و لوپ 90s که دربرگیرنده اسیدهای آمینه‌ای ۱۰۴-۹۱ است [۱۲]. در لوپ خارج سلولی 50s، چندین دمین عملکردی غنی از اسیدهای آمینه سیستئین (CRDs) وجود دارد. این دمین‌ها 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

```
10-51p MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA QVQLQSQGGGGSVQAGGSLRLACAASAS GYTESVKWWMG W 60
9-50P MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA QVQLQESGGDSVQAGGSLRLACAASAS GYTESVKWWMG W 60
1-38P MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMA QVQLQESGGDSVQAGGSLRLACXASAS GYSVCVGVWVG W 60
* * * * *
```

```
10-51p FRQAPGQEREGVA VISIPGGSTYYDDDDVKG RFTISQDNAKNTVYPQMNSLKPEDTAMYYC 120
9-50P FRQAPGQEREGVA VISIPGGSTYYDDDDVKG RFTISQDNAKNTVYPQMNSLKPEDTAMYYC 120
1-38P FRPAPGRERGGVA VVSVPGGSFFGGDVG RFLSPDHAQNTVYPQMNSLKPEDTAMYYC 120
* * * * *
```

```
10-51p AA RNAGGRFRPSAAGGNY WGQGLTVTVSSHHHHHH 156
9-50P AA RNAGGRFRAWAGGGDNY WGQGTQVTVSSHHHHHH 156
1-38P AA RNAGGRFRPSANGGNY WGQGTQVTVSSHHHHHH 156
```

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

پیشنهاد گردیدند.

مطالعه بررسی میان کنش کمپلکس VHH های جهش یافته 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 تعریف شده برای VHH های طبیعی می باشد که در جدول ۱ مشخص شده اند.

جدول ۱: اسیدهای آمینه فعال در VHH های تولید شده

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 نرم افزار HADDOCK 2.1 استفاده شد. این نرم افزار با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی، داکینگ پروتئین های VHH و DR5 را به صورت کاملاً انعطاف پذیر انجام می دهد. برای هر VHH حدود ۲۰۰ ساختار در این نرم افزار ایجاد شده که هر کدام بر اساس تفاوت RMSD ساختار تولید شده با بهترین ساختار در دسته های مجزایی قرار می گیرند. اولویت انتخاب از میان این ساختارها بر اساس دسته بندی 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 می باشد، 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 مشخص شده است.

نتایج حاصل از داکینگ بین VHH های طبیعی و همچنین VHH های جهش یافته با این پروتئین در جدول ۲ آورده شده است. رتبه بندی 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 داده شده است.

علیه اپی توپ پیتیدی موردنظر، جهش هایی در راستای غنی سازی و افزایش تمایل بهتر آن ها به منظور القاء آپو توپوز در سلول های سرطانی طراحی شدند.

مدل سازی مولکولی

از آنجایی که پروتئین VHH با کد 1MVF بیشترین شباهت را از نظر توالی به توالی پروتئین موردنظر ما داشت ساختار سه بعدی آن از بانک اطلاعات پروتئینی (PDB) به عنوان مدل الگو استخراج شد. با استفاده از برنامه MODELER نسخه 9.13 [۱۵]. ساختارهای نانو بادی های تولید شده مدل سازی شد. با استفاده از این برنامه ده مدل اولیه ساخته شد. از بین این مدل ها مناسب ترین مدل جهت بهینه سازی ساختار انتخاب شد. تأیید اعتبار مدل نهایی با استفاده از برنامه های Verify3D [۱۶]، ProCheck [۱۷] و ERRAT [۱۸] صورت گرفت.

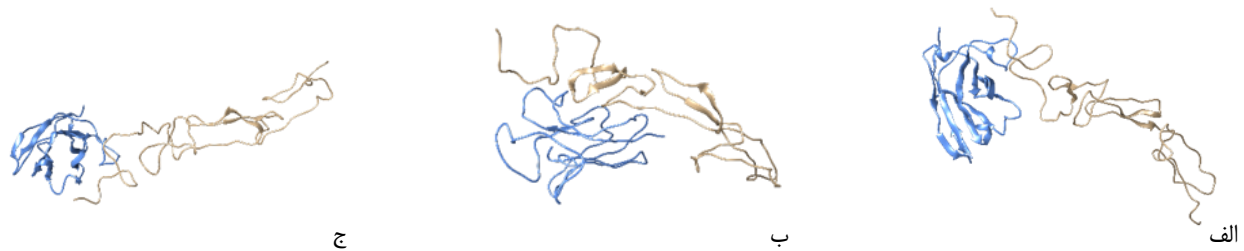
روش انجام داکینگ

برای انجام داکینگ DR5 با VHH های مدل سازی شده از برنامه HADDOCK استفاده شد. این برنامه با استفاده از تکنیک شبیه سازی دینامیک مولکولی، داکینگ پروتئین-پروتئین را به صورت کاملاً انعطاف پذیر انجام می دهد [۱۹ و ۲۰].

برای محدود کردن حجم محاسبات داکینگ، اسیدهای آمینه ای که در اتصال نقش مستقیم دارند مشخص می شوند. در این برنامه اسیدهای آمینه ای به عنوان اسیدهای آمینه ای فعال (active) در نظر گرفته شده اند که سطح نسبی در دسترس حلال آن ها بالاتر از ۴۰ درصد باشد. اسیدهای آمینه ای که در مجاورت اسیدهای آمینه فعال قرار گرفته اند به عنوان اسیدهای آمینه تأثیر پذیر تعریف می شوند. توالی های درگیر در میان کنش، در داکینگ DR5 و نانو بادی های طبیعی در جدول ۱ مشخص شده اند.

بهینه سازی 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 اسید آمینه در اتصال نشان می دهد. با استفاده از نرم افزار Yasara امکان جایگزینی این اسیدهای آمینه با دیگر اسیدهای آمینه در جهت افزایش قدرت پیوند اتصال بررسی شد و جهش هایی که امکان این خصوصیت را داشتند



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

و جدول ۳ به تفکیک برای هر VHH مشخص شده است. طبق توالی آمینواسیدی که برای HADDOCK 2.1 تعریف شده بود، اسیدهای آمینه فعال برای هر پروتئین VHH، آمینواسیدهای موجود در ناحیه CDR3 این پروتئین‌ها در نظر گرفته شد. چون مهم‌ترین بخش اتصال نانو بادی‌ها با آنتی‌ژن‌های مربوطه از طریق CDR3 هر VHH صورت می‌گیرد. بر اساس تعریف این ناحیه به عنوان ناحیه فعال برای هر کدام از VHH های موردنظر و آنالیزهای انجام شده توسط Cfinder، اسیدهای آمینه درگیر در میانکشی VHH با DR5 مشخص شد که نتایج آن در جدول ۳ آورده شده است. همچنین از طریق آنالیزهای انجام شده سهم هر اسیدآمینه از VHH نیز در این اتصالات مشخص شده 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.

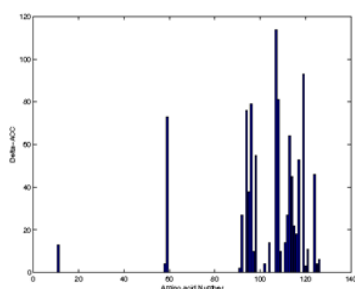
جدول ۲: نتایج حاصل از داکینگ VHH های طبیعی و جهش‌یافته با DR5

نانو بادی (VHH)	HADDOCK score
10-51p	-۴۰/۰۶۰ (+/- ۸/۶)
-10-51PHE109ARG	-۹۳/۵ (+/- ۵/۷)
-10-51GLY107ASP	-۹۰/۸ (+/- ۵/۸)
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 (+/- ۱۳/۸)
1-38p-ALA112ASP	۱۳/۸ (+/- 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)

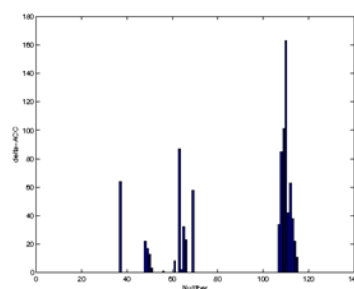
بعد از انتخاب بهترین کمپلکس برای هر VHH، با کمک بررسی‌های انجام‌شده با Cfinder اسیدهای آمینه مسئول در میان‌کنش بین VHH و DR5 مشخص شد. نتایج حاصل در شکل ۳

شکل ۳: اسیدهای آمینه درگیر در میان‌کنش با DR5 به تفکیک برای هر VHH مشخص شده است.

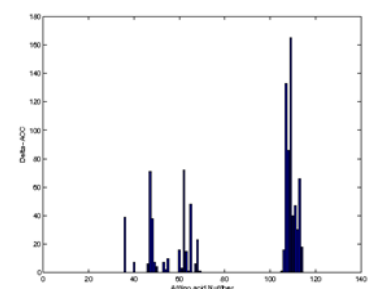
الف) نتایج حاصل از محاسبات Cfinder برای VHH 50-9P با DR5؛ ب) VHH 51-10P با DR5؛ ج) VHH38-1P با DR5.



ج



ب



الف

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

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 مشخص شده است.

مشخص شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

اهمیت آنتی‌بادی‌ها به‌طور مداوم در زمینه‌های مختلف از جمله صنعت

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

منطقی مناسب به منظور طراحی جهش برای نانو بادی‌های موردنظر فراهم می‌کند. همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است مقایسه نتایج داکینگ برای هر دو گروه VHH طبیعی و جهش یافته نشان می‌دهد که جهش‌های طراحی شده باعث بهبود خواص اتصالی و انرژی اتصالی نانو بادی‌ها جهش یافته 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 می‌کند که جهش‌های طراحی شده برای هر VHH باعث افزایش ویژگی‌های 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 یافته‌ها نشان می‌دهد. در جهشی که در اسیدآمینه ۱۰۹ باعث جایگزینی فنیل آلانین به آرژنین شده مشاهده شد که مقادیر امتیازدهی HADDOCK، انرژی و اندروالسی، انرژی الکترواستاتیک که به ترتیب ۹۳/۵-، ۴۰/۱- و ۳۶۸/۳- می‌باشد. این مقادیر نسبت به حالت طبیعی (۴۰/۰۶-، ۳۹/۰- و ۱۷۷/۶-) منفی تر شده و سطح مدفون بین دو کمپلکس برای این جهش ۱۴۶۲/۱ آنگستروم مربع گزارش شده است که نسبت به حالت طبیعی که ۱۲۳۷/۰۲ می‌باشد مثبت تر 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 گلايسين ۱۰۷ به اسپارتیک اسید جهش یافته است. مقادیر امتیازدهی HADDOCK، انرژی و اندروالسی، انرژی الکترواستاتیک برای این جهش به ترتیب ۹۰/۱-، ۶۴/۵- و ۱۲۹/۶- می‌باشد که از نظر امتیازدهی HADDOCK نسبت به حالت طبیعی منفی تر شده است هم‌چنین مقدار سطح مدفون بین دو کمپلکس در این جهش یافته (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 می‌کند. 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 و اندروالسی، انرژی الکترواستاتیک برای این جهش یافته به ترتیب عبارت‌اند از ۷۹/۵-، ۳۸/۶- و ۲۴۷/۶- که نسبت به حالت طبیعی منفی تر می‌باشند. مقدار سطح مدفون بین دو کمپلکس آن (۱۴۵۲/۶) نیز نسبت به حالت طبیعی افزایش یافته که نشان می‌دهد مجموع

اسیدآمینه جهش یافته	اسیدآمینه طبیعی	شماره اسیدآمینه
ARG	PHE	۱۰۹
ASP	GLY	۱۰۷
ARG/ASP	PHE/GLY	۱۰۹/۱۰۷
ASN	SER	۱۱۱
ASP	ASN	۱۱۷
ASN/ASP	SER/ASN	۱۱۱/۱۱۷
GLU	PHE	۱۰۸
ASP	ALA	۱۱۲
GLU/ASP	PHE/ALA	۱۰۸/۱۱۲

جدول ۴: جهش‌های طراحی شده برای هر VHH

داروسازی، بیوسنسورها، تحقیقات پایه در حال افزایش است. همان‌طور که مشخص است مکانیسم اثر آنتی بادی‌ها، به فعل و انفعالات اتمی شان با آنتی ژن بستگی دارد. مطالعه و تعیین خصوصیات آنتی بادی‌ها نظیر میان کنش‌های آن‌ها به درک اهمیت آنتی بادی‌ها و طراحی آنتی بادی‌های جدید با خواص بهبود یافته بسیار کمک می‌کند. هم‌چنین شناسایی محل اتصال آنتی ژن (علیه اپی توپ فضایی) نیز برای فهم مکانیسم اثر آنتی بادی بسیار مهم است. بهینه‌سازی و بهبود خواص آنتی بادی‌ها چه در جهت افزایش کارایی یا تغییر ویژگی‌های اتصالی آن‌ها در کارهای تجربی به منظور اجتناب از واکنش‌های متقاطع آنتی بادی، انتخاب آنتی بادی مناسب برای طراحی نشانگرهای زیستی (بیوسنسورها)، حذف یا تغییر خصوصیات اتصالی آنتی بادی‌های که به آنتی ژن‌های نامطلوب متصل می‌شوند، امر بسیار مطلوبی می‌باشد. هم‌چنین از طریق مهندسی آنتی بادی، می‌توان آنتی بادی‌های را که تنها یک سروتیپ در پاتوژن‌های متغیر مانند آنفلوآنزا را تشخیص می‌دهند طوری تغییر داد که دامنه شناسایی آن‌ها بیشتر گردد.

بهینه‌سازی آنتی بادی را می‌توان از طریق فن آوری نمایش فازی [۲۱] و یا توسط تجزیه و تحلیل‌های ساختاری و تغییر منطقی و ایجاد جهش‌ها در محل اتصال آنتی بادی - آنتی ژن به دست آورد. روش‌های دیگری نیز در این زمینه وجود دارند که به ساختارهای کریستالوگرافی با رزولوشن بالا احتیاج دارند و چون این ساختارها غالباً برای کمپلکس‌های آنتی بادی- آنتی ژن در دسترس نمی‌باشند کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲۲].

مدل‌های کامپیوتری (محاسباتی) از کمپلکس نانو بادی - آنتی ژن

در مقدار سطح مدفون بین دو کمپلکس آن (۳۰۰۶/۵) دیده می‌شود؛ که مشخص می‌کند این جهش یافته نسبت به حالت طبیعی مناسب‌تر می‌باشد. در جهش سوم که مجموع هر دو جهش در اسیدهای آمینه ۱۱۱ و ۱۱۷ می‌باشد مقادیر امتیازدهی HADDOCK، انرژی و اندروالسی 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 ارائه شده 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. هم‌چنین از بین تمامی VHH های طبیعی و VHH های جهش یافته VHH₅₁₋₁₀-PHE109ARG بهترین شرایط اتصالی را با DR5 ایجاد می‌کند؛ که می‌تواند گزینه‌ای مناسبی برای مطالعات بعدی باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله 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, Calzolari 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.

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 طراحی شده برای اسیدآمینه ۱۰۷ نیز نسبت به جهش مرکب شرایط بهتری برای VHH ایجاد کرده است.

برای VHH_{38-1P} سه جهش طراحی شد. در جهش اول اسیدآمینه فنیل آلانین ۱۰۸ به گلوتامیک اسید جهش یافت که مقادیر امتیازدهی HADDOCK، انرژی و اندروالسی، انرژی الکترواستاتیک برای این جهش به ترتیب ۷/۶-، ۱۱۵/۰- و ۳۵۱/۹- می‌باشد؛ 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 جهش یافته هستند (۲۹۸۷/۱) نسبت به حالت طبیعی (۱۲۱۱/۳۴) افزایش یافته که مشخص می‌کند که این جهش نسبت به حالت طبیعی، جهش مناسبی می‌باشد. در جهش دیگری که در اسیدآمینه ۱۱۲ طراحی شده 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 می‌باشند. مقادیر امتیازدهی HADDOCK، انرژی و اندروالسی، انرژی الکترواستاتیک برای این جهش یافته عبارت‌اند از ۸/۰-، ۱۱۲/۲- و ۳۳۷/۵- که نسبت به حالت طبیعی منفی‌تر می‌باشند. مقدار سطح مدفون بین دو کمپلکس نیز در آن نسبت به حالت طبیعی بیشتر شده است (۲۸۸۱/۸) که مشخص می‌کند که جهش‌های انجام شده، جهش‌های مناسبی می‌باشند. از بین جهش یافته‌های 38-1P جهشی که در هر دو اسیدآمینه ۱۰۸ و ۱۱۲ طراحی شده نسبت به دو جهش یافته دیگر مناسب‌تر می‌باشد.

برای VHH_{50-9P} نیز سه جهش طراحی شد. در جهش اول اسیدآمینه ۱۱۱ سرین به آسپارژین تبدیل شد؛ که مقادیر امتیازدهی HADDOCK، انرژی و اندروالسی، 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 جهش یافته نسبت به طبیعی شرایط اتصالی بهتری دارد. در جهش دیگری که در اسیدآمینه ۱۱۷ طراحی شده بود و اسیدآمینه آسپارژین به اسپارتیک اسید تبدیل شده بود مقادیر امتیازدهی HADDOCK، انرژی و اندروالسی، انرژی الکترواستاتیک برای این جهش یافته که عبارت‌اند از ۱۴/۶-، ۱۱۰/۹- و ۳۲۰/۸- نسبت به حالت طبیعی منفی‌تر شده‌اند هم‌چنین افزایش

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.