

## **„Charakterystyka molekularna kompleksu ludzkiej cystatyny C z naturalnymi autoprzeciwciałami” [30.01.2013 – 29.01.2016]**

**Kierownik projektu: Dr Paulina Czaplewska**

### **Streszczenie:**

Naturalne autoprzeciwciała (NAA) to specjalny typ immunoglobulin produkowany przez organizm niezależnie od obecności antygeny czy stymulacji zewnętrznej. Ich rola fizjologiczna nie została jeszcze dokładnie określona. Mogą one być zarówno czynnikiem patologicznym dla organizmu – powodują występowanie chorób autoimmunologicznych; jednak mogą również pełnić funkcje ochronne, co jest obecnie głównym zainteresowaniem naukowców z wielu grup badawczych. Głównym celem prezentowanego projektu jest wykrycie i charakterystyka molekularna kompleksu/ów ludzkiej cystatyny C (hCC) z naturalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko temu białku (autoprzeciwciała, NAbs), występującymi w puli immunoglobulin produkowanych przez ludzki organizm. Zastosowanie techniki ekstrakcji i wycinania epitopu oraz metody PAREX-PROT pozwoli na zidentyfikowanie i określenie sekwencji aminokwasowej fragmentów cystatyny i przeciwciał odpowiedzialnych za specyficzne oddziaływanie obu białek. Zarówno paratop, jak i epitop mogą w przyszłości posłużyć do projektowania małowzrostekowych inhibitorów/modulatorów pozwalających na kontrolowanie lub całkowite zahamowanie procesu agregacji cystatyny C. Celem naukowym prezentowanego projektu jest charakterystyka molekularna kompleksu/ów ludzkiej cystatyny C z przeciwciałami obecnymi we frakcji immunoglobulinowej ludzkiego serum (frakcja dostępna komercyjnie), identyfikacja paratopu i epitopu dla badanego kompleksu, określenie ich potencjału antyagregacyjnego. Rezultatem końcowym projektu będzie próba opisanie mechanizmu oddziaływania obu białek i mechanizmu hamowania agregacji ludzkiej cystatyny C.

Do identyfikacji obecności naturalnych przeciwciał zamierzamy wykorzystać metodologię podobną do zaproponowanej przez Dodel'a, która bazuje na chromatografii powinowactwa. Wpływ wyizolowanych autoprzeciwciał na proces dimeryzacji/agregacji hCC zostanie określony dla natywnego białka oraz jego amyloidogennego wariantu L68Q z wykorzystaniem technik elektroforetycznych i sączenia żelowego. W kolejnym etapie zajmiemy się identyfikacją epitopu i paratopu dla kompleksu/ów NAb-hCC, a jako metodę wybraliśmy wycinanie i ekstrakcję epitopu sprzężoną ze spektrometrią mas – identyfikacja epitopu oraz technikę ParexProt – identyfikacja paratopu. Pierwsza z nich pozwala na bezpośrednie określenie sekwencji epitopów ciągłych, jak i nieciągłych. Istotną zaletą takiego podejścia jest to, iż w warunkach niedenaturujących, antygen pozostaje w konformacji natywnej, a przez to identyfikacja epitopu konformacyjnego czy epitopu pokrywającego się z miejscami aktywnymi enzymatycznie jest również możliwa. W przypadku identyfikacji paratopu konieczne jest wstępne poddanie przeciwciał działaniu czynnika redukującego, ditiotretolu (DTT). Pozwala to na pełniejsze trawienie przeciwciał przez zastosowanie enzymów proteolitycznych, takich jak trypsyna, chymotrypsyna, Lys-C, Glu-C czy pronaza. Dalsze etapy procedury są analogiczne jak w przypadku identyfikacji epitopu. Kluczowe znaczenie w przypadku tej procedury ma zastosowanie techniki MS/MS podczas rejestracji widm po trawieniu enzymatycznym oraz wykorzystanie białkowych baz danych i „masowego odcisku palca”. W celu poznania sekwencji paratopu analizuje się uzyskane dane MS/MS przez białkowe bazy danych (sekwencji aminokwasowych) takie jak ProFound, Mascot czy MS-Fit. Efektem końcowym naszego eksperymentu będzie identyfikacja regionów zmiennych tworzących miejsca wiążące antygen dla monoklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkiej cystatynie C.