

Универзитет у Београду – Хемијски факултет

Наставно-научно веће

Предмет: Образложење теме докторске дисертације Милана Продановића

Молим Наставно-Научно веће Универзитета у Београду – Хемијског факултета да одобри израду докторске дисертације под насловом:

„Производња, функционална карактеризација и компаративна анализа IgA везујућих, хетеролого произведених протеина и пептида“

1. Научна област: Хемија (ужа научна област: Биохемија)

2. Предмет научног истраживања

Предмет научног истраживања ове докторске дисертације обухвата хетерологу производњу протеина и пептида пореклом из бактерија са способношћу везивања хуманог имуноглобулина класе А.

Осим производње и карактеризације природно идентичних протеина студија ће укључити и поступке оптимизације протеинских секвенци ради постизања веће селективности и једноставности производње.

Истраживање ће омогућити увид у могућности даљег развоја бактеријских протеина и пептида за пречишћавање и квантификацију IgA као и детекцију Б лимфоцита који производе IgA.

Литературни подаци упућују на могућност терапијске примене пептида инхибиторних за интеракцију IgA са његовим рецептором (FcαRI) у различитим патологијама. Те ће овом студијом бити обухваћено и испитивање утицаја пептида изведених из хуманог IgA и FcαRI на инхибицију интеракције наведених бактеријских протеина и пептида са IgA. Извођење ове студије резултираће успостављањем *in vitro* система за праћење инхибиције IgA-FcαRI интеракције.

Ова студија пружиће увид у функционалне карактеристике новодобијених протеина и пептида, њихову стабилност у различитим пуферским системима, као и могућности њихове употребе у функционалним тестовима пептида намењених у терапијске сврхе.

3. Основне хипотезе

Имуноглобулин А (IgA) је најзаступљенија класа антитела на мукозним површинама и представља прву линију одбране гастроинтестиналног, респираторног и генитоуринарног тракта од патогених микроорганизама, а учествује и у системском имунском одговору¹. Одређивање серумског IgA од кључног је клиничког значаја у бројним обољењима. У IgA нефропатији дефектна гликозилација IgA1 и формирање имунокомплекса су централни механизми патогенезе². У алкохолној болести јетре

повишене вредности серумског IgA корелирају са тежином патологије³, док у *Sjögren*-овом синдрому IgA реуматоидни фактор показује високу дијагностичку вредност⁴. Серумско одређивање IgA и IgA продукујућих Б ћелија стога представља свестран дијагностички алат, а реагенси који ово омогућавају отварају могућности различитим истраживачким приступима.

Постоје различити бактеријски протеини који везују IgA⁵⁻⁷ и инхибирају интеракцију IgA са FcαRI, те се претпоставља да присуство ових протеина бактеријама пружа селективну предност.

Стафилококни протеини налик суперантигенима (*eng. Staphylococcal superantigen like, SSL*) представљају имуномодулаторне факторе које је *Staphylococcus aureus* развио како би избегао детекцију и елиминацију од стране имунског система домаћина. Не само да постоји 14 гена са којих се преписују а затим експримирају различити SSL протеини, што потврђује њихов значај, него већина њих постоји и у више алелских изоформи. Постојање алелских изоформи отежава студије елиминисања интеракција изменом аминокиселина, јер се аминокиселински остаци окарактерисани као кључни у једној алелској варијанти не налазе у другој варијанти, или се не налазе на истим позицијама.

У овом раду фокус ће бити на SSL7 протеину који везује хумани IgA и C5 компоненту комплемента. Примарна секвенца SSL7 протеина из *S. aureus* који ћемо користити у овом истраживању разликује се у односу на до сада испитане алелске варијанте у литератури. Иако је познато да постоје различите алелске варијанте SSL7 протеина потребно је за сваку извршити функционалну карактеризацију. Према доступним литературним подацима SSL7 и леукоцитни рецептор FcαRI везују исте кључне остатке у Fc региону хуманог IgA⁷. Остаци Leu-257 и Leu-258 и остаци 440–443 у α ланцу IgA дају значајан допринос везивању и FcαRI и SSL7, што је потврђено у тродимензионалној структури SSL7 из соја *S. aureus* Newman у комплексу са Fc регионом хуманог IgA⁵. Поред везивања хуманог IgA, SSL7 такође има способност да се веже за C5 компоненту комплемента⁸, а стабилан комплекс IgA-SSL7-C5 потврдио је да се везивање за C5 одвија искључиво преко C-терминалног домена SSL7, остављајући N-терминални домен слободан за интеракцију са IgA.

Да би елиминисали интеракције SSL7 протеина са C5 компонентом комплемента уместо измене појединачних аминокиселина планиран је нови приступ који треба да укине везивање C5 компоненте комплемента и евентуалне друге неспецифичне интеракције.

Експримирање и детаљна карактеризација новодизајнираног протеина пружиће увид у могућности његове употребе како као реагенса за пречишћавање хуманог IgA, тако и као реагенса за детекцију и квантификацију IgA и IgA продукујућих ћелија.

Још један бактеријски протеин који има способност везивања IgA је Sir 22 из бактерије *Streptococcus pyogenes*. Из њега је изведен линеарни фрагмент, пептид од 50 аминокиселина, који има комерцијални назив пептид M⁶. Овај пептид нашао је употребу као један од најуспешнијих комерцијалних афинитетних матрикса за пречишћавање IgA.

И пептид М (pM) и описане алелске варијанте SSL7 имају ниске константе дисоцијације у интеракцији са хуманим IgA, и оба имају могућност инхибиције интеракције IgA са Fc α RI рецептором, али да ли постоји могућност инхибиције једног са другим до сада није установљено, као што није рађена ни компаративна анализа у различитим тестовима, што такође представља фокус ове тезе.

Такође, утицај рекомбинантних IgA везујућих протеина на инхибицију везивања IgA за површину *S. aureus*, које је раније примећено⁹ ће бити анализиран.

4. Циљ истраживања и очекивани резултати

Главни циљ овог рада представља хетерологу производњу природно идентичних и модификованих бактеријских IgA везујућих протеина и пептида и њихову компаративну анализу ради проналажења оптималних реагенаса за пречишћавање и квантификацију IgA и детекцију IgA продукујућих Б лимфоцита.

Да би се остварио главни циљ рада дисертација ће бити урађена кроз две фазе са својим специфичним циљевима:

А) Хетеролога производња и пречишћавање протеина и пептида

- Умножити *ssl7* ген и његову модификовану форму (*ssl7mod*) добијене из клиничког изолата *S. aureus* од пацијента са рекурентном уринарном инфекцијом и клонирати их у експресиони вектор. А затим потврдити отворени оквир читања секвенце *ssl7* и *ssl7mod* у експресионом вектору.
- Произвести и пречистити SSL7 и SSL7mod протеине у *E. coli* експресионом систему.
- Саставити секвенцу која кодира пептид М (pM) из олигонуклеотида и клонирати је у *E. coli* експресиони вектор који је оптимизован за производњу и пречишћавање протеина. Потврдити секвенцу и продуковати pM у *E. coli* експресионом систему.
- Уклонити С-терминални цистеин из pM који је одговоран за димеризацију и клонирати је у *E. coli* експресиони вектор који је оптимизован за производњу и пречишћавање протеина. Потврдити отворени оквир читања секвенце и продуковати нативан пептид М (pMn) у *E. coli* експресионом систему.
- Окарактерисати стабилност хетеролого произведених SSL7 и SSL7mod, pM и pMn у различитим пуферским системима, и у складу са тим оптимизовати поступке производње и пречишћавања са циљем добијања солубилних форми.
- Производња и пречишћавање пептида изведених из хуманог IgA и Fc α RI. Према поступку описаном за производњу pM и pMn.

Б) Функционална карактеризација произведених SSL7, SSL7mod, pM и pMn и успостављање тестова за проверу инхибиције IgA и Fc α RI интеракције

- Идентификација протеина хуманог серума који се везују за SSL7 и SSL7mod
- Испитивање везивања SSL7 и SSL7mod протеина као и pM и pMn пептида са хуманим IgA у *in-house* развијеном ензимском имуноесеју (ELISA)

- Одређивање афинитета везивања SSL7 протеина за хумани IgA технологијом Microfluidic Diffusional Sizing (MDS) и испитивање инхибиције помоћу pM
- Испитивање везивања SSL7 и SSL7mod протеина као и pM и pMn пептида за Б лимфоците периферне крви
- Испитивање везивања SSL7 и SSL7mod протеина за бактерије *Staphylococcus aureus*

Очекује се да ће резултати ове докторске дисертације довести до развоја нових *in-house* реагенаса за детекцију, квантификацију и пречишћавање хуманог IgA заснованих на новој алелској варијанти протеина SSL7 - SSL7mod. Очекује се да ћемо развити и нови *in vitro* систем за праћење инхибиције IgA-Fc α RI интеракције.

5. Методе истраживања

Приликом израде докторске дисертације биће коришћене стандардне лабораторијске методе и технике молекуларне генетике, протеинске биохемије и имунохемије.

Гени који кодирају SSL7 и SSL7mod биће умножени и клонирани у pQ-EK¹⁰ експресиони вектор са N-терминалним додатком од 5 хистидина, који је могуће потпуно уклонити дејством ентерокиназе, те се на тај начин добија протеин идентичан природном протеину. Након експримирања SSL7 и SSL7mod протеина и пречишћавања метал афинитетном хроматографијом, N-терминални додаток за пречишћавање ће бити исечен и уклоњен. Тако добијени протеин ће бити везан за преактивирани матрикс на бази сефарозе, те ће се користити за афинитетну хроматографију серумских протеина. Везане протеинске фракције ће бити окарактерисане методама као што су дот блот и анализирана масеном спектрометријом.

На сличан начин, пептид M (pM) ће бити конструисан из кратких олигонуклеотида и експримиран у pMAL-WELQ вектору, који производи химеру са малтоза везујућим протеином, од кога ће пептид бити одвојен помоћу комерцијалне WELQut протеазе.

Оба протеина биће експримирани у *Escherichia coli*. Иницијално пречишћавање ће се радити метал афинитетном хроматографијом, док ће се за финално пречишћавање користити различите хроматографске технике. Концентрација узорака ће бити праћена применом различитих есеја за одређивање концентрације протеина, а чистоћа ће бити праћена применом натријум-додецил-сулфат-полиакриламидне гел електрофорезе (SDS-PAGE). Имунохемијске технике које ће бити коришћене су дот блот и вестерн блот, као и ELISA. Протеини и пептиди ће бити обележавани флуоресцеином и биотином.

Афинитет и могућност инхибиције једног протеина/пептида другим биће анализирани помоћу ELISA инхибиције, као и система који користи технологију микрофлуидног дифузионог одређивања величине (*eng. MDS — Microfluidic Diffusional Sizing*) за мерење промена молекулске величине (хидродинамичког радијуса). Инструмент мери молекулску величину тако што прати дифузију у микрофлуидној комори — у

слободном облику протеина и у присуству везујућег партнера, те омогућава одређивање афинитета везивања.

Детекција хуманих CD19+В лимфоцита који експримирају IgA радиће се помоћу проточног цитометра, и подразумеваће компаративну анализу. Нови *in vitro* систем за праћење инхибиције IgA-Fc α RI интеракције биће базиран на ELISA.

6. Литература

1. Woof, J. M. & Kerr, M. A. The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.* **208**, 270–282 (2006).
2. Kolka, R., Valdimarsson, H., Bodvarsson, M., Hardarson, S. & Jonsson, T. Defective immunoglobulin A (<sc>IgA</sc>) glycosylation and <sc>IgA</sc> deposits in patients with <sc>IgA</sc> nephropathy. *APMIS* **121**, 890–897 (2013).
3. Elias, E. D., Uhanova, J. & Minuk, G. Y. Serum immunoglobulin A levels and alcohol-induced liver disease. *Canadian Liver Journal* **3**, 177–187 (2020).
4. Lee, K.-A. *et al.* Clinical and diagnostic significance of serum immunoglobulin A rheumatoid factor in primary Sjogren's syndrome. *Clin. Oral Investig.* **23**, 1415–1423 (2019).
5. Ramsland, P. A. *et al.* Structural basis for evasion of IgA immunity by *Staphylococcus aureus* revealed in the complex of SSL7 with Fc of human IgA1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 15051–15056 (2007).
6. Stenberg, L., O'Toole, P. W., Mestecky, J. & Lindahl, G. Molecular characterization of protein Sir, a streptococcal cell surface protein that binds both immunoglobulin A and immunoglobulin G. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 13458–13464 (1994).
7. Wines, B. D., Willoughby, N., Fraser, J. D. & Hogarth, P. M. A Competitive Mechanism for Staphylococcal Toxin SSL7 Inhibiting the Leukocyte IgA Receptor, Fc α RI, Is Revealed by SSL7 Binding at the Ca 2 /Ca 3 Interface of IgA. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 1389–1393 (2006).
8. Laursen, N. S. *et al.* Structural basis for inhibition of complement C5 by the SSL7 protein from *Staphylococcus aureus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 3681–3686 (2010).
9. Nikodijević, S. *et al.* Selectivity of polyclonal repertoire of anti-microbial IgA and its subclasses in saliva and serum in humans. *Scand. J. Immunol.* **96**, (2022).
10. Gardijan, L. *et al.* Redesigned pMAL expression vector for easy and fast purification of active native antimicrobial peptides. *J. Appl. Microbiol.* **133**, 1001–1013 (2022).

