

VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS

Biomedicinos mokslų institutas (Farmacijos ir farmakologijos centras)

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

VIENGRANDŽIO ANTIKŪNO FRAGMENTO KONSTRAVIMAS

Studentė: Izabelė Makūnaitė

V kursas, II grupė

Darbo vadovas: Dr. Milda Plečkaitytė
(parašas)

Farmacijos ir farmakologijos centro vadovas: Doc. dr. Kristina Garuolienė
(parašas)

Biomedicinos mokslų instituto direktorius:
Prof. dr. Algirdas Edvardas Tamošiūnas (parašas)

Darbo įteikimo data: 2024 gegužės 13 d.

Registracijos nr.:

Studento elektroninio pašto adresas: izabele.makunaite@mf.stud.vu.lt

TURINYS

SANTRUMPŲ SAŖAŠAS.....	4
Paveikslų sąrašas	6
Lentelių sąrašas.....	6
ĮVADAS.....	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1. Antikūnai ir jų funkcijos	9
1.2. Antikūno struktūra ir klasės	10
1.2.1. Monokloniniai antikūnai.....	14
1.2.2. Rekombinantiniai antikūnai.....	14
1.3. Antikūnų humanizavimas	15
1.4. Antikūno fragmentai	16
1.4.1. Viengrandis antikūno fragmentas (ScFv)	17
1.5. ScFv fragmento raiškos sistemos.....	19
1.5.1. ScFv fragmento raiška E. coli ląstelėse	19
1.6. ScFv pritaikymas medicinoje.....	20
1.7. ScFv pritaikymas diagnostikoje	21
2. TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI	23
2.1. Tyrimo medžiagos.....	23
2.1.1. Hibridomos ląstelės	23
2.1.2. Ląstelių kamienai.....	23
2.1.3. Vektoriai.....	23
2.1.4. Reagentai	23
2.1.5. Tirpalai.....	24
2.1.6. Rinkiniai	25
2.1.7. Fermentai	26
2.1.8. Molekulinės masės standartai	26
2.1.9. Prietaisai	26
2.1.10. Pradmenys.....	26
2.2. Tyrimo metodai	27
2.2.1. RNR išskyrimas iš hibridomos ląstelių.....	27

2.2.2.	Išgrynintos RNR kokybės patikrinimas elektroforezės metodu agarozės gelyje	27
2.2.3.	V _H ir V _L koduojančių DNR fragmentų sintezė	27
2.2.4.	DNR fragmentų gryninimas	29
2.2.5.	DNR koncentracijos nustatymas spektrofotometru	29
2.2.6.	DNR fragmentų klonavimas į pJET1.2 vektorių	29
2.2.7.	Rekombinantinių klonų analizė	30
2.2.8.	DNR sekų, koduojančių V _L ir V _L sritis, sujungimas jungtuku (linkeriu)	30
2.2.9.	DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio ir klonavimas į mielių pFGG3 vektorių	31
2.2.10.	Mielių <i>S.cerevisiae</i> kompetentinių ląstelių paruošimas ir jų transformacija rekombinantine plazmide	31
2.2.11.	Rekombinantinių baltymų sintezės indukcija mielių ląstelėse	32
2.2.12.	Mielių ląstelių suardymas	32
2.2.13.	Baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (SDS-PAGE)	32
3.	REZULTATAI	34
3.1.	Imunoglobulino prieš ACT-14 β-laktamazę V _L ir V _H domenų amplifikacija ir analizė	34
3.2.	Genetinės konstrukcijos, koduojančios viengrandį antikūną scFv prieš ACT-14 β-laktamazę, sukūrimas	39
3.3.	scFv-Fc konstravimas raiškai mielėse	40
3.4.	scFv raiška mielėse	43
3.5.	Sulieto baltymo identifikacija Western blot	45
4.	IŠVADOS	46
	REKOMENDACIJOS	47
	SANTRAUKA	48
	SUMMARY	49
	PADĖKA	50
	LITERATŪROS SĄRAŠAS	51

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

- BsAb – bispecifinis antikūno fragmentas (angl. *bi-specific antibody*)
- C – pastovusis domenas
- CAR-T – chimerinis T ląstelių antigenų receptorius (angl. *chimeric antigen receptor*)
- CDR – hipervariabili sritis (angl. *complementarity determining regions*)
- Cys – aminorūgštis cisteinas
- DNR- deoksiribonukleorūgštis
- EGIL – Eukariotų genų inžinerijos laboratorija
- ELISA – imunofermentinis tyrimas (angl. *Enzyme-linked immunosorbent assay*)
- Fab – antigeną sujungianti fragmentas (angl. *antigen-binding fragment*)
- Fc – efektorinis antikūno fragmentas (angl. *fragment crystallizable region*)
- FDA – JAV maisto ir vaistų administracija (angl. *Food and Drug Administration*)
- FR – karaksinė sritis (angl. *framework regions*)
- HaPyV – Žiurkėno poliomos virusas (angl. *a hamster polyomavirus*)
- Ig – imunoglobulinas
- IL- imunologijos laboratorija
- In vitro – (bandymas atliekamas) už gyvo organizmo ribų; mėgintuvėlyje
- In vivo – (bandymas atliekamas) gyvame organizme
- MAB – monokloninis antikūnas
- NK – natūralūs kileriai (angl. *natural killers*)
- PCR – polimerazės grandininė reakcija (angl. *Polymerase chain reaction*)
- PEG – polietilenglikolis
- RNR- ribonukleorūgštis
- ScFv – viengrandis antikūno fragmentas (angl. *single-chain variable fragment*)
- SdFv – vieno domeno antikūnas (angl. *single-domain antibody fragment*)
- SDS-PAGE - elektroforezė poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (angl. *Sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)
- V – variabilusis domenas
- VEGF-A – kraujagyslių endotelio augimo faktorius A (angl. *vascular endothelial growth factor*)
- V_H – variabilioji sunkioji antikūno grandinė (angl. *heavy chain*)
- V_L – variabilioji lengvoji antikūno grandinė (angl. *light chain*)
- VLP – į virusus panašios dalelės (angl. *virus-like particles*)

Paveikslų sąrašas

1.pav. <i>Imunoglobulino G (IgG) struktūra.</i>	11
2. pav. <i>Chematinis antikūno variabiliosios srities vaizdavimas.</i>	12
3.pav. <i>Imunoglobulino klasės.</i>	13
4.pav. <i>Monokloninių antikūnų tipai.</i>	16
5.pav. <i>Antikūno fragmentai.</i>	17
6.pav. <i>Pilno ilgio antikūno palyginimas su scFv fragmentu.</i>	18
7.pav. <i>Bendros RNR, išskirtos iš hibridomos ląstelių, analizė agarozės gelyje.</i>	34
8.pav. <i>PCR metodu, naudojant skirtingas pradmenų mišinių poras, amplifikuoto V_L fragmento analizė agarozės gelyje po elektroforezės.</i>	35
9.pav. <i>PCR metodu amplifikuoto V_H fragmento analizė agarozės gelyje po elektroforezės.</i>	36
10.pav. <i>Pelės Ig V_L domeno klasifikacija bei CDR ir FR nustatymas pagal IgBLAST bioinformatinį įrankį</i>	37
11.pav. <i>V_L domeno aminorūgščių seka.</i>	37
12.pav. <i>Pelės Ig V_H domeno klasifikacija bei CDR ir FR nustatymas pagal bioinformatinį įrankį IgBLAST</i>	38
13.pav. <i>Mab'o prieš ACT-14 β-laktamazę V_H domeno aminorūgščių seka.</i>	38
14.pav. <i>scFv prieš ACT-14 β-laktamazę aminorūgščių seka.</i>	39
15.pav. <i>Plazmidės pFGG3/VP1-VP2-Fc-Bgnew žemėlapis.</i>	41
16.pav. <i>Schematinis baltymų, sintetinių mielių ląstelėse pavaizdavimas</i>	42
17.pav. <i>Rekombinantinių plazmidžių tikrinimas restrikcijos endonukleazėmis.</i>	43
18.pav. <i>Baltymų VP1/VP2-scFv-Fc sintezės analizė mielių ląstelėse.</i>	43
19.pav. <i>VLP, sudarytų iš VP1 ir VP2-Fc-scFv baltymų, išvalytų 30% sacharozės tirpale, analizė SDS-PAGE. Dažu Coomassie blue nudažytas SDS-PAGE.</i>	44
20.pav. <i>VLP, sudarytų iš VP1 ir VP2-Fc-scFv baltymų, analizė Western blot.</i>	45

Lentelių sąrašas

1.lentelė <i>Reagentai</i>	23
2.lentelė <i>Tirpalai</i>	24
3.lentelė <i>Rinkiniai</i>	25
4.lentelė <i>Prietaisai</i>	26
5.lentelė <i>Pradmenų sekos, panaudotos V_L koduojančio DNR fragmento amplifikacijai</i>	28
6.lentelė <i>Pradmenų sekos, panaudotos V_H koduojančio DNR fragmento amplifikacijai</i>	28
7.lentelė <i>Pradmenų sekos, naudotos sujungiant VL ir VH DNR sekas.</i>	30

IVADAS

Per paskutinius dvidešimt penkis metus monokloniniai antikūnai ir jų rekombinantinės DNR technologijos būdu pagaminti fragmentai yra neatsiejama farmacijos pramonės, diagnostikos ir medicinos dalis. Antikūnai arba imunoglobulinai yra sudėtingi, itin kompleksiški, didelės molekulinės masės glikoproteinai, sudaryti iš sunkiosios ir lengvosios grandinių (1). Pasaulyje reguliacinės institucijos patvirtino virš 160 terapinių antikūnų įvairių ligų gydymui (2). Antikūnai yra patrauklūs farmaciniai preparatai dėl savo didelio specifiškumo ir afiniškumo taikiniui, nedidelio toksiškumo bei mažesnės sąveikos su kitais vaistiniais preparatais. Tačiau antikūnų, kaip vaistinių preparatų, trūkumai yra trumpas preparato galiojimo laikas, nedidelė skvarba į audinius dėl didelės antikūno molekulinės masės, galimas imunogeniškumas, dideli gamybos kaštai (3).

Panaudojant šiuolaikines rekombinantinės DNR technologijas, antikūnai modifikuojami, siekiant pašalinti ar sumažinti šių molekulių trūkumus. Imunogeniškumas sumažinamas keičiant karkasines gyvūnų imunoglobulinų sritis žmogaus imunoglobulinų sritimis, t.y. antikūnus humanizuojant (4). Priklausomai nuo terapinio poreikio gali būti gaminami antikūnų fragmentai, kurių skvarba yra didesnė dėl mažesnės molekulinės masės bei pasižymintys trumpesniu gyvavimo pusperiodžiu kraujyje. Tokie fragmentai turi tik antikūnų dalį, kuri sąveikauja su antigenu, bet neturi Fc dalies, kuri dalyvauja komplemento aktyvacijoje ir kituose imuninės sistemos aktyvacijos procesuose. Minėtos antikūnų fragmentų savybės sumažina jų terapinį efektyvumą, bet šie formatai yra patrauklūs tose srityse, kur reikalinga tik antikūno sąveika su taikiniu ir/ar greitas pašalinimas iš organizmo, pvz. invazinėje diagnostikoje, inaktyvuojant toksinus kraujyje ir pan. (5,6). Vienas populiariausių antikūnų fragmentų yra viengrandis antikūnas (scFv, angl. single-chain variable fragment), kuris sudarytas iš variabilių (kintamų) sunkiosios (V_H) ir lengvosios (V_L) grandinių dalių, kuriose yra antigeną surišanti sritis. Šios V_L ir V_H sritys yra sujungtos jungtuku (angl. linker), kuris užtikrina erdvinį sričių išsidėstymą kaip natūraliame imunoglobuline. ScFv antikūno formatas patrauklus siekiant aptikti kokią nors molekulę *in vitro* diagnostikoje, antikūno fragmentą pririšant, imobilizuojant ant įvairių nešėjų ar paviršių ir identifikuojant sąveiką su ieškoma molekule kaip antigenu (7). ScFv turi monovalentinį susirišimo su antigenu pobūdį, todėl dažnai prie scFv genetiniais metodais yra prijungiama Fc dalis (scFv-Fc), siekiant padidinti avidiškumą taikiniui ir scFv stabilumą (8). Baltymų scFv ar scFv-Fc sintezė yra nemažas iššūkis, nes aktyvaus baltymo formavime dalyvauja disulfidinės

jungtys, dėl kurių sintezė tradicinėje rekombinantinių baltymų sintezės platformoje – bakterijos *Escherichia coli* ląstelėse – tampa neefektyvi ir itin brangi. Todėl renkama kito platformos, pvz. sintezė žinduolių ląstelėse, sekrecija mielių ląstelėse (9) ar panaudojant į virusus panašias daleles (VLP, angl. virus like particles), kurių kūrimo ir panaudojimo daug pasiekę VU GMC Biotechnologijos instituto mokslininkai.

Šiame darbe, panaudojus rekombinantinės DNR technologijas, sukurtas viengrandžio antikūno fragmentas prieš bakterinę β -laktamazę ACT-14, kuri suteikia atsparumą β -laktamų klasės antibiotikams. Baltymo scFv-Fc raiška gauta VLP platformoje. Antikūno fragmentas bus panaudotas diagnostikos kompanijos *in vitro* diagnostikoje šios β -laktamazės aptikimui bakterijų ląstelėse.

Tikslas: sukonstruoti viengrandį antikūno fragmentą prieš ACT-14 β -laktamazę, panaudojant į virusus panašių dalelių platformą.

Uždaviniai:

1. Iš hibridomos prieš ACT-14 β -laktamazę, klonuoti imunoglobulino sunkiosios (V_H) ir lengvosios grandinių (V_L) variabiliąsias dalis.
2. Sujungti lengvosios ir sunkiosios grandinių variabiliąsias dalis peptidiniu jungtuku, sukuriant genetinę konstrukciją, koduojančią rekombinantinį viengrandžio antikūno fragmentą scFv.
3. Klonuoti scFv į mielių raiškos plazmidę, suliejant su žmogaus imunoglobulino Fc domenu ir žiurkėno poliomos viruso baltymu VP2.
4. Gauti sulieto rekombinantinio baltymo VP2-Fc-scFv sintezę mielių ląstelėse.

Raktiniai žodžiai: viengrandžio antikūno fragmentas (scFv), ACT-14 β -laktamazė, į virusus panašios dalelės (VLP)

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Antikūnai ir jų funkcijos

Antikūnai organizme sintetinami imuninės sistemos ląstelėse, vadinamose B limfocitais. Šių ląstelių paviršiuje yra specifinį antigeną atpažįstantys receptoriai, prie kurių prisijungęs antigenas, paskatina B ląstelės dauginimąsi ir diferenciaciją į plazmines ląsteles. Plazminėse ląstelėse vyksta specifinių antikūnų sintezė, nukreipta prieš į organizmą patekusį antigeną. Po sąveikos su antigenu, plazminėse ląstelėse antikūnų sintezė tęsiasi kelias dienas, o organizmo skysčių cirkuliacijoje antikūnai gyvybingi išlieka dar kelis mėnesius, užtikrindami imuninę apsaugą prieš specifinį antigeną (1). Kartais B ląstelės gali sintetinti antikūnus, veikiančius prieš nepatogenines medžiagas, esančias organizme. Prieš savus baltymus bei ląsteles susiformavę antikūnai yra vadinami autoantikūnais. Pastarųjų susidarymas lemia autoimuninių ligų išsivystymą (10).

Organizmo skysčiuose cirkuliuojantys antikūnai, atpažįsta specifinius antigenus ir gali veikti juos keliais skirtingais būdais:

1. Mikroorganizmų ir jų toksinų neutralizavimas. Neutralizacijos reakcija įvyksta antikūnui prisijungiant prie organizmui patogeninės medžiagos ar toksino. Prisijungimo metu blokuojami antigeno paviršiuje esantys epitopai. Tokiu būdu patogeniui užkertamas kelias prisijungti prie organizmo ląstelių. Kuomet antikūnas susiduria su toksinu įvyksta neutralizacija, pakeičianti toksinės medžiagos cheminę sudėtį.
2. Mikroorganizmų opsonizacija. Opsonizacijos metu paskatinamas ląstelių fagocitozės procesas. Antikūnui, prisijungus prie antigeno molekulės, padidinamas fagocituojančių ląstelių, tokių kaip makrofagų ir neutrofilų, jautrumas patogeninei medžiagai.
3. Komplemento aktyvinimas klasikiniu keliu. Antikūnas, sudaręs kompleksą su antigenu, prisijungia prie komplemento baltymų ir juos aktyvina klasikiniu keliu. Aktyvuoti baltymai sudaro kompleksą, kuris sukelia tiesioginę ląstelių lizę, suardant ląstelių sienelės, arba aktyvina fagocituojančias ląsteles.
4. Nuo antikūnų priklausomas ląstelių citotoksiškumas. Veikimo principas paremtas trijų dalių susijungimu, įvykstančiu tarp patogeno, antikūno ir efektorinės ląstelės, kuria gali būti natūralūs kileriai (NK), makrofagai, neutrofilai bei eozinofilai. Prie antikūno-antigeno komplekso prisijungusios efektorinės ląstelės, sukelia ląstelės lizę arba apoptozę (11).

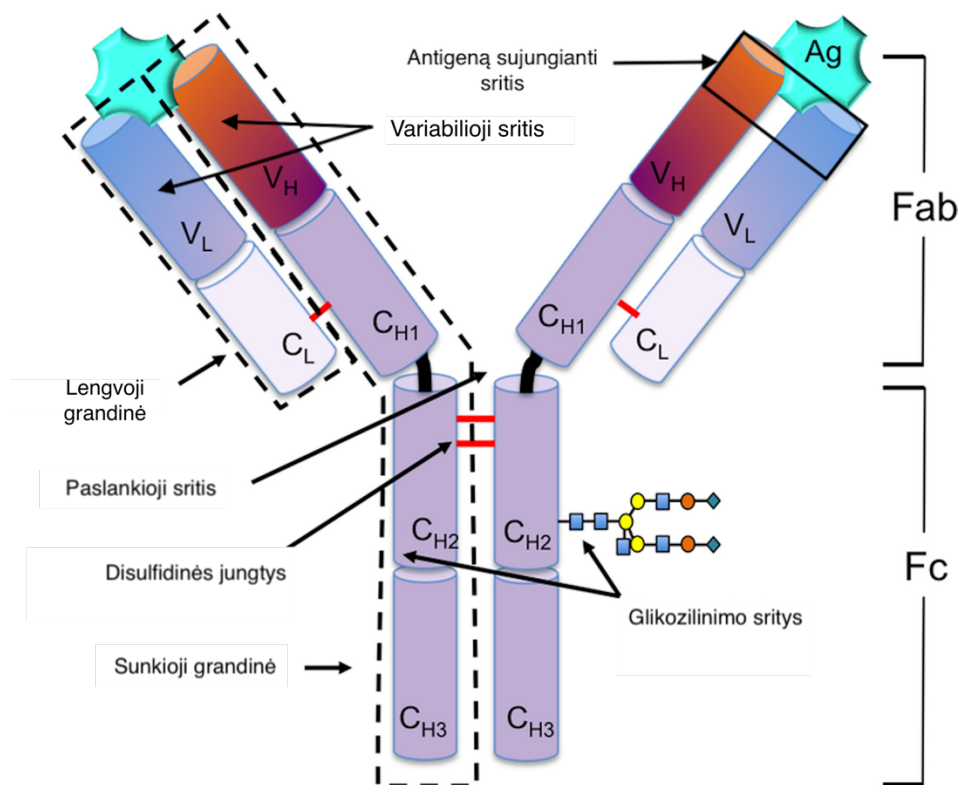
Antikūnai gali veikti prieš antigeną *in vivo* ir *in vitro*, tiesiogiai arba sąveikaujant su imuninėmis ląstelėmis ar komplemento baltymų sistema. Antikūnai atlieka svarbų vaidmenį organizme sudarydami įgytą aktyvią imunę apsaugą prieš specifinius antigenus, o laboratorijose yra pritaikomi diagnostiniais bei gydymo tikslais.

1.2. Antikūno struktūra ir klasės

Antikūnai yra glikoproteinai ir priklauso imunoglobulinų (Ig) klasei, erdvėje formuoja Y formos struktūrą (1 pav.). Antikūno molekulinė masė yra ~150 kDa. Struktūriškai, antikūnai sudaryti iš keturių polipeptidinių grandinių: dviejų identiškų lengvųjų (V_L ; angl. *light chain*) ir dviejų identiškų sunkiųjų (V_H ; angl. *heavy chain*) grandinių, sujungtų S-S tiltelių ir nekovalentinių jungčių pagalba. Kiekvieno imunoglobulino V_L grandinė sudaryta iš vieno variabilaus domeno (V_L ; angl. *variable domain*) ir pastovaus domeno (C_L ; angl. *constant domain*). Tuo tarpu V_H sudaryta iš vieno variabilaus domeno (V_H) ir trijų arba keturių pastoviųjų domenų (C_{H1-4}), kurių skaičius priklauso nuo imunoglobulino izotipo (1.pav.). Antikūnas struktūriškai skirstomas į Fab ir Fc fragmentus:

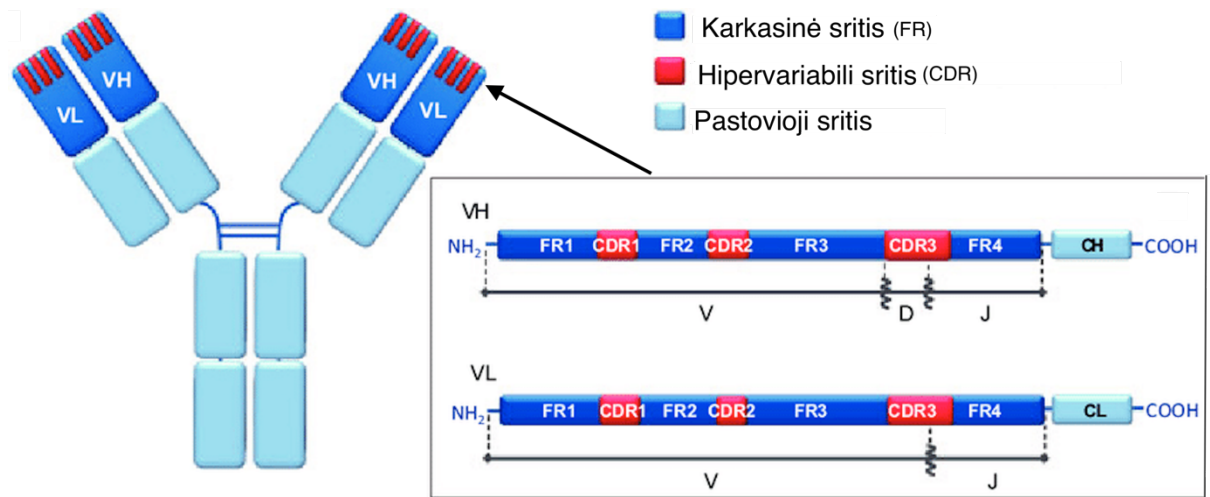
1. Fab fragmentas, kuris prisijungia prie antigeno. Fragmentas sudarytas iš vieno variabilaus ir vieno pastovaus lengvosios grandinės domeno (V_L ir C_L) ir atitinkamų sunkiosios grandinės domeno (V_H ir C_{H1}). Imunoglobulinų struktūroje yra du vienodi Fab fragmentai.
2. Fc fragmentas, kuriuo antikūnas prisijungia prie receptorių, esančių ląstelių paviršiuje, ir aktyvuoja komplementą sudarančius baltymus. Fc fragmentas sudarytas iš pastoviųjų (C_{H2} - C_{H4}) domenų, esančių abiejose sunkiosiose grandinėse.

Paslankioji jungtis (angl. *hinge region*), esanti tarp C_{H1} ir C_{H2} domenų, jungia Fc ir Fab sritis, suteikdama fragmentui lankstumą, reikalingą tinkamam antikūno prisijungimui prie jam specifinio antigeno epitopo (12).



1.pav. *Imunoglobulino G (IgG) struktūra.* C_H-žymi antikūno pastoviuosius sunkiosios grandinės domenus; C_L- žymi pastoviuosius lengvosios grandinės domenus; V_H- žymi variabilų sunkiosios grandinės domeną; V_L- žymi variabilų lengvosios grandinės domeną. Adaptuota pagal (13).

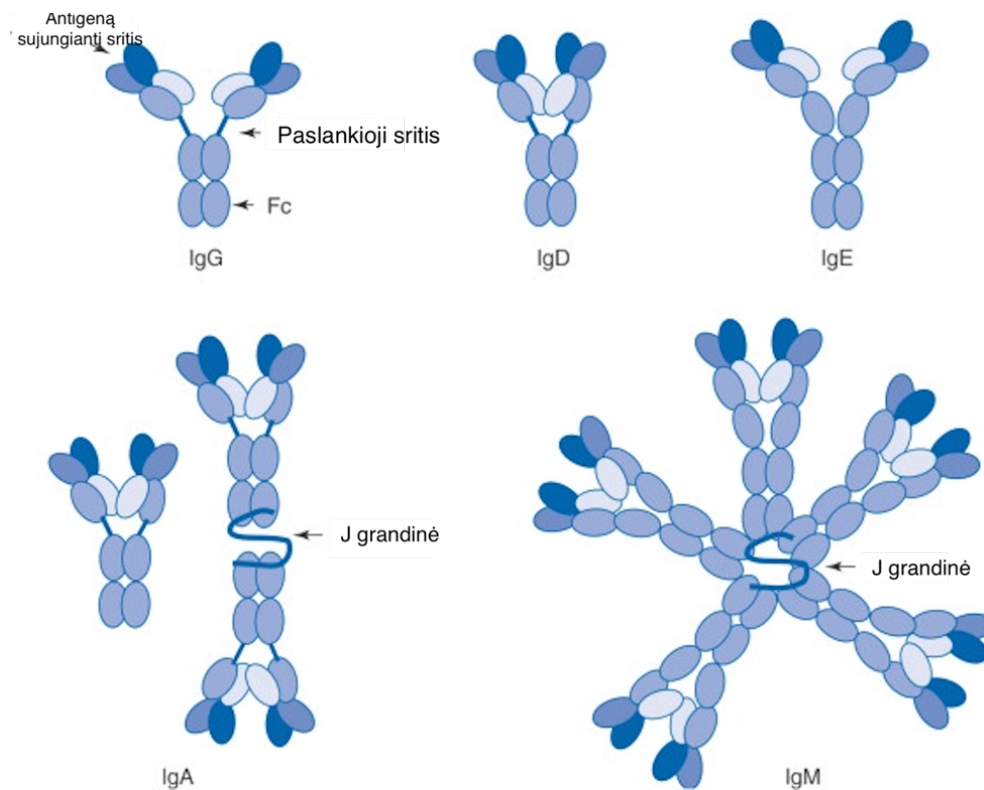
Variabilusis fragmento regionas, susideda iš hipervariabilių (CDR) ir karkasinių (FR) sričių. Karkasinės sritys sudaro apie 85% visos variabiliosios antikūno dalies. V_L ir V_H grandinių variabiliąsias sritys sudaro trys CDR sritys (CDR1, CDR2, CDR3) ir keturios FR sritys (FR1, FR2, FR3, FR4) (2.pav.). Vykstant erdviniam baltymo susilankstymui, CDR sritys yra variabilios sritys paviršiuje. Dėl CDR variabilumo, atsirandančio amino rūgščių sekoje, susidaro struktūriškai mažai besiskiriantys antikūnai, bet gebantys atpažinti skirtingus antigenus. Tuo tarpu FR sritys, būdama mažai kintanti, užtikrina struktūros stabilumą ir CDR sričių pateikimą variabilios sritys paviršiuje. Taip užtikrinamas CDR sričių prieinamumas prie antigeno epitopų (14).



2. pav. Chematinis antikūno variabiliosios srities vaizdavimas. Adaptuota pagal (20)

Žmogaus ir gyvūnų organizmuose antikūnai skirstomi į penkias imunoglobulinų klases, pagal struktūroje esančių sunkiųjų grandinių tipą. Šie sunkiųjų grandinių tipai žymimi graikiškos abėcėlės raidėmis: μ (mu), δ (delta), γ (gama), ϵ (epsilon), α (alfa), kurios atitinka imunoglobulinų klases (3.pav.):

1. IgG – monomerinės struktūros imunoglobulinas, sudaro 70-85% visų kraujo serume aptinkamų imunoglobulinų. IgG klasės imunoglobulinai yra toliau skirstoma į keturis poklasius (IgG1; IgG2; IgG3; IgG4), pagal sunkiųjų grandinių struktūrinius skirtumus. Pagrindinė šios klasės antikūnų funkcija yra aktyvinti imuninės sistemos komplementą.
2. IgM – pentamerinės struktūros imunoglobulinas. Veikia kaip pirminis organizmo imuninės sistemos atsakas į patekusį patogeną.
3. IgA – dimerinės struktūros imunoglobulinas, randamas organizmo sekrete: ašarose, seilėse, gleivėse bei piene. B ląstelės, esančios gleivinių membranose, sintetina IgA, taip suteikiant apsaugą gleivinės audiniams.
4. IgD – randamas ant daugelio B ląstelių paviršiaus, bet tik maži imunoglobulino kiekiai išskiriami į kraują. Šio imunoglobulino funkcija nėra pilnai iširta.
5. Ig – monomerinės struktūros imunoglobulinas, išskiriamas į kraują mažais kiekiais. Veikia sukeldamas mediatorių, lemiančių alergines reakcijas, išsiskyrimą iš putliųjų ląstelių ir bazofilų (15).



3.pav. *Imunoglobulino klasės.* Dimerinį (IgA) ir pentamerinį (IgM) imunoglobuliną sudarantys monomerai, sujungti J grandine. Adaptuota pagal (16).

Imunoglobulinų struktūra ir atliekamos funkcijos priklauso nuo polipeptidinių grandinių, sudarančių imunoglobuliną, bei nuo imunoglobuliną sudarančių monomerų skaičiaus. Imunoglobulinų monomerai yra sudaryti iš dviejų vienodų sunkiųjų grandinių (mu, delta, gama, epsilon arba alfa) ir dviejų vienodų lengvųjų grandinių, kurios yra skirstomos į du skirtingus izotipus: kapa (K) ir lambda (λ). Pastarąsias grandines koduojantys genai, randami skirtingose chromosomose: kapa grandinę koduojantys genai yra 2 chromosomoje, o lambda koduojantys genai yra 22 chromosomoje. Žmogaus organizme randamų antikūnų santykis, pagal lengvųjų grandinių izotipus, yra 1,5:2. Antikūnų, turinčių kapa izotipą, yra santykinai didesnis kiekis (17).

Žmogaus ir gyvūnų organizme gaminami polikloniniai antikūnai, kurie atpažįsta to pačio antigeno skirtingus epitopus, todėl gaunamas skirtingo afiniškumo ir specifiškumo antikūnų mišinys (18). Norint išspręsti šiuos trūkumus, pradėti kurti specifiniai ir dideliu jautrumu antigenui pasižymintys monokloniniai antikūnai (Mab, angl. *monoclonal antibody*).

1.2.1. Monokloniniai antikūnai

Monokloninių antikūnų kūrimui pradžią suteikė mokslininkų César Milstein ir Georges Köhler 1975m. sukurta hibridomos technologija. Proceso metu, laboratorinė pelė imunizuojama antigenu, kuris aktyvuoja pelės imuninės sistemos B ląsteles, gaminti specifinį antikūną. Iš pelės blužnies išskirtos antikūnus produkuojančios B ląstelės, suliejamos su vėžine mielomos ląstele. Gaunamos hibridomos ląstelės, galinčios dalintis neribotą laiko tarpą. Šios ląstelės gali augti terpėje ir sintetinti imunoglobulinus, amino rūgščių seka atitinkančius antikūną, kurį gamino B ląstelė prieš suliejimą su mielomos ląstele (19,20). Gaunamas homogeninis antikūnų mišinys, turintis monovalentinį afiniškumą prieš vieną epitopą, esantį antigeno paviršiuje.

Monokloniniai antikūnai, naudojami gydymui, turi daugiau privalumų, lyginant su polikloniniais antikūnais. Priešingai nei polikloninių antikūnų, Mab antikūnų gamybą lengva atkartoti ir gauti tos pašios sudėties baltymų frakciją. Veikdami prieš vieną antigeno epitopą, yra specifiškesni taikiniui, dėl to gali būti pritaikomi ligų, tokių kaip vėžiniai susirgimai, gydymui. Tokiu būdu pasiekiamas didesnis gydymo efektyvumas ir sukeliama mažiau šalutinių reakcijų dėl veikimo į vieną taikinį, esantį ant ląstelių paviršiaus. Tuo pačiu Mab nepasižymi kryžminiu prisijungimu prie kitų baltymų, dėl būdingo specifškumo vienam antigeno epitopui.

Atliekant Mab sintezę hibridomos technologijos metodu, dažnai gaunama nestabili hibridomos ląstelė, kuriai būdingas genetinis dreifas. Dėl ilgainiui įvykstančių genetinių pokyčių, negaunama tiksli pradinio baltymo sintezė. Siekiant gauti ilgai trunkančią tikslinio baltymo sintezę, be atsirandančių genetinių pokyčių baltymą koduojančioje sekoje, pradėta taikyti rekombinantinės DNR technologija (21).

1.2.2. Rekombinantiniai antikūnai

Rekombinantiniai antikūnai yra monokloninių antikūnų rūšis, gaunama rekombinantinės DNR technologijos būdu, kurios metu klonuojamos antikūno lengvosios ir sunkiosios grandinių sekos. Atliekant antikūno konstravimą *in vitro*, yra išvengiama gyvūnų imunizacijos ir antikūnų išskyrimo iš hibridomos ląstelės. Konstruojant rekombinantinį antikūną, imunoglobulino sunkiosios (V_H) ir lengvosios (V_L) grandinių sekos gali būti amplifikuojamos nuo antikūnus gaminančios ląstelės DNR arba genų sekos sukuriama dirbtiniu būdu ir įterpiamos į genų raiškos vektorius. Gauti rekombinantiniai vektoriai, klonuojami į baltymų sintezei pasirinktą eukariotinę arba prokariotinę ląstelių platformą.

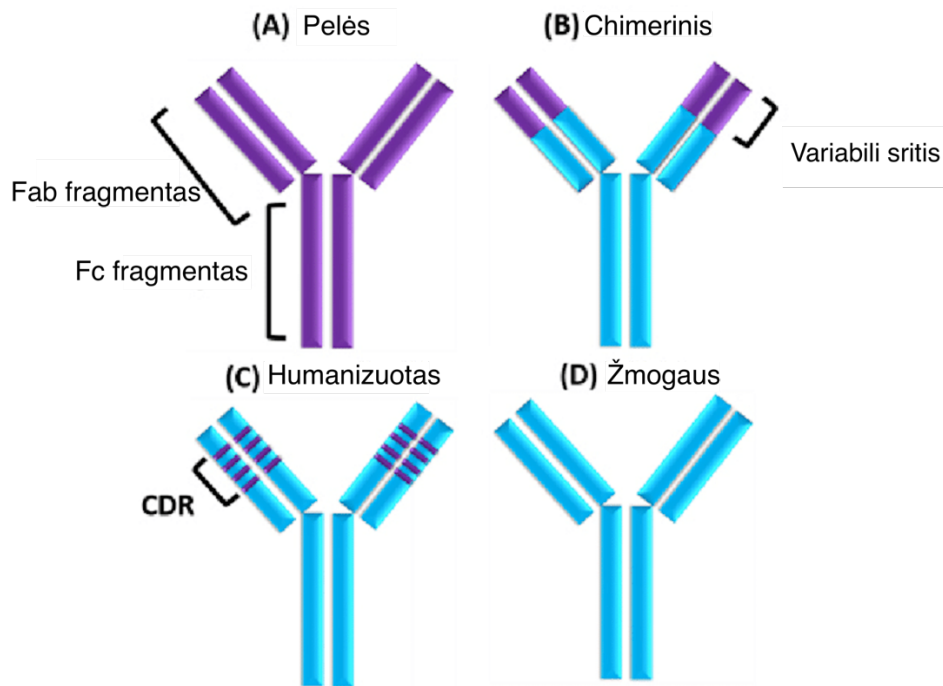
Rekombinantinės DNR metodu galima konstruoti ne tik pilno ilgio antikūnus, bet pasitelkus genetinius įrankius, sukuriama antikūno fragmentai (žr.sk.1.7). Priešingai nei hibridomos būdu gaunami antikūnai, rekombinantinių antikūnų Fc ir Fab fragmentai, gauti dirbtiniu būdu laboratorinėmis sąlygomis, gali būti modifikuojami, tokiu būdu sukuriama baltymą, pasižymintį norimomis savybėmis. Be to, rekombinantinių antikūnų sintezė užtrunka trumpesni laiką nei monokloninių antikūnų gamyba iš hibridomos ląstelių. Daugeliu atvejų rekombinantinių antikūnų gamyba trunka apie kelias savaites, tuo tarpu, aktyvaus antikūno išskyrimas iš hibridomos ląstelių, gali užtrukti kelis mėnesius (22).

Rekombinantinės DNR technologija suteikia galimybę kurti antikūnus, turinčius tokį patį specifiskumą prieš antigeną kaip ir Mab, bet pasižymintį geresnėmis savybėmis, lemiančiomis paprastesnį antikūnų pritaikymą gydymo bei diagnostikos tikslams.

1.3. Antikūnų humanizavimas

Antikūnai vis plačiau yra pritaikomi įvairių ligų gydymui. Gyvūnų kilmės antikūnai, gauti panaudojant hibridomos technologiją, yra žmogui imunogeniški, todėl imunoglobulinuose gyvūnų kilmės sekos pakeičiamos žmogaus imunoglobulinų sekomis. Sekų pakeitimas galimas keliais būdais (4.pav.):

1. Chimeriniai antikūnai: pelės antikūno variabilios sritys (V_L ir V_H) įterpiamos į žmogaus imunoglobuliną. Sukonstravus antikūną šiuo metodu, gaunamas baltymas, atitinkantis 65% žmogui būdingos amino rūgščių sekos. Chimerinis antikūnas, lyginant su pelių antikūnais, pasižymi sukeliama silpnesnėmis imuninėmis reakcijomis. Chimeriniai antikūnai pavadinime turi galūnę -ximab.
2. Humanizuotas antikūnas: pelės antikūno CDR sritys įterpiamos į žmogaus organizmą. Mab turi tik 5% pelės būdingos amino rūgščių sekos, todėl pasižymi sukeliama silpnesnėmis imuninėmis reakcijomis, lyginat su chimeriniu antikūnu. Humanizuoti antikūnai pavadinime turi galūnę -zumab.
3. Žmogaus antikūnai gali būti sukuriama įvairiais metodais, tame tarpe ir naudojant transgeninius gyvūnus, kuriuose Ig koduojantys genai pakeisti žmogaus Ig koduojančiais genais. Šie antikūnai žmogaus organizme nesukelia alerginių reakcijų ir pasižymi ilgu cirkuliavimo laikotarpiu. Žmogaus antikūnai pavadinime turi galūnę -umab (4,23).

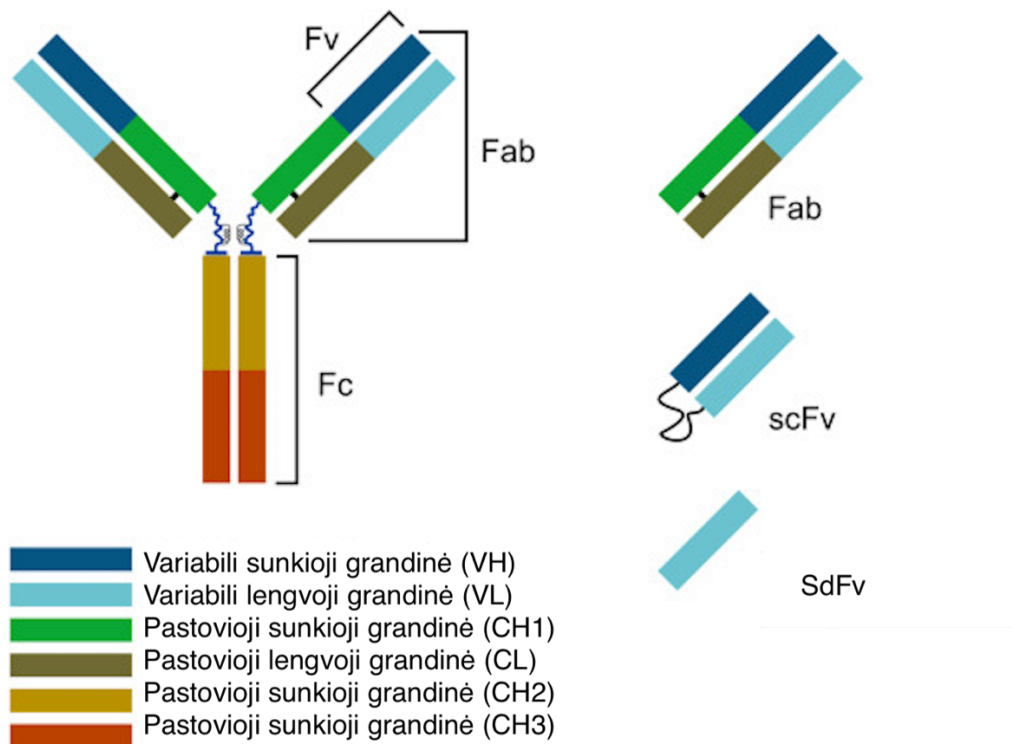


4.pav. Monokloninių antikūnų tipai. Violetine spalva pažymėtos sritys – būdingos pelės antikūnui, mėlynai pažymėtos sritys – būdingos žmogaus antikūnui. A – genetiškai nepakeistas pelės antikūnas; B – chimerinis antikūnas, struktūroje turintis variabilią sritį, būdingą pelėms; C – humanizuotas antikūnas variabiliojse srityje turintis hipervariabilias (CDR) pelėms būdingas sritys; D – genetiškai nepakeistas žmogaus antikūnas. Adaptuota pagal (24).

1.4. Antikūno fragmentai

Antikūno fragmentai gaunami rekombinantinės DNR technologijos būdu. Dėl Fc domeno trūkumo, antikūno fragmentai, patekę į organizmo vidų, sukelia silpnos imunogeninės reakcijos bei pasižymi trumpesniu cirkuliavimo organizme pusamžiu nei imunoglobulinai (25).

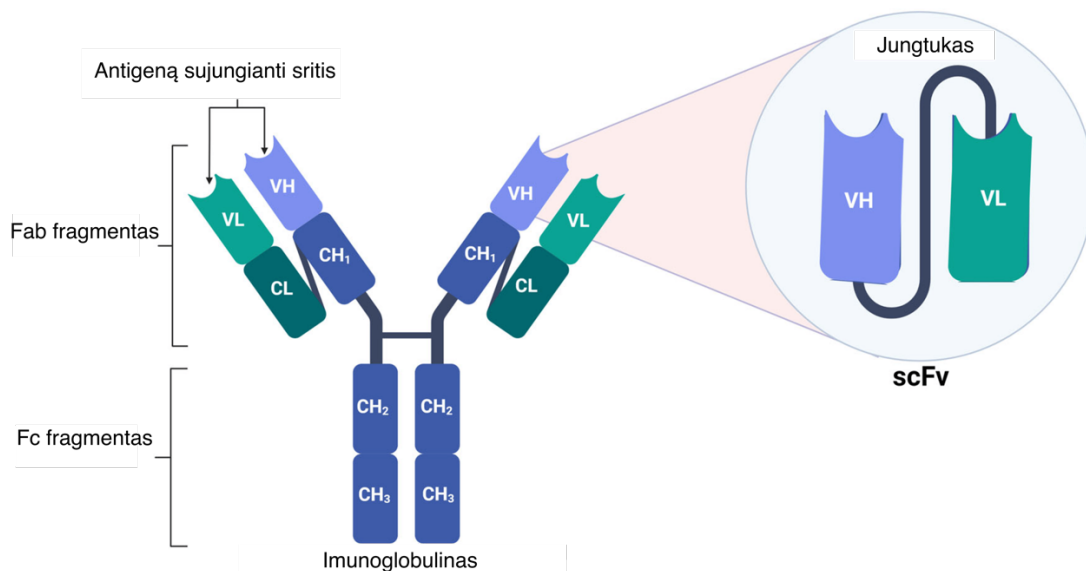
Antikūno fragmentai gali būti skirstomi į tipus pagal jų struktūrą: viengrandžio antikūno fragmentai (scFv), vieno domeno antikūno fragmentai (sdFv) bei Fab fragmentai (5.pav) (26). Antikūnų fragmentai gali būti sujungiami tarpusavyje, tokiu būdu gaunant fragmentus, turinčius specifiškumą prieš kelis antigeno epitopus. Tokie antikūnai vadinami bispecifiniais (27).



5.pav. *Antikūno fragmentai.* Fab fragmentas, viengrandis antikūno fragmentas (scFv), vieno domeno antikūno fragmentas (sdFv) ir imunoglobulinas, su pažymėtomis pagrindinėmis jį sudarančiomis dalimis: efektorinis domenas (Fc), antigeną sujungiantis domenas (Fab) ir variabilioji sritis (Fv). Adaptuota pagal (28)

1.4.1. Viengrandis antikūno fragmentas (ScFv)

ScFv rekombinantinis antikūnas, pirmą kartą sukurtas 1980-ais, kaip alternatyva pilno ilgio antikūnams. ScFv yra vienas iš mažiausių antikūno fragmentų, pasižyminčių imunoglobulinams būdingu antigeno specifiškumu ir gebėjimu prisijungti prie antigeno paviršiuje esančių epitopų. ScFv antikūno fragmentas, kurio molekulinis dydis siekia ~25kDa, yra sudarytas iš variabiliosios sunkiosios (V_H) ir lengvosios (V_L) grandinių, sujungtų per peptidinį jungtuką (angl. *linker*) (6.pav.). Nuo parenkamo jungtuko ilgio priklauso fragmento fizikinės savybės, tokios kaip lankstumas, tirpumas bei stabilumas.



6.pav. Pilno ilgio antikūno palyginimas su scFv fragmentu. ScFv fragmentas sudarytas tik iš imunoglobulino variabiliųjų sunkiosios ir lengvosios grandinių domenų. CH – žymi antikūno pastoviuosius sunkiosios grandinės domenus; CL – žymi pastoviuosius lengvosios grandinės domenus; VH – žymi variabiliųjų sunkiosios grandinės domeną; VL – žymi variabiliųjų lengvosios grandinės domeną. Adaptuota pagal (29).

Dažniausiai praktikoje naudojami jungtukai, sudaryti iš glicino ir serino amino rūgščių, kurioms būdingos (GGGS)₃ arba (GGGS)₄ sekos. Šios sekos pasižymi lankstumu, reikalingu taisyklingam VH ir VL domenų sujungimui. Jungtukų lankstumą galima padidinti įterpiant treonino ar alanino amino rūgštis (30). Grandines sujungiančio jungtuko ilgis lemia scFv fragmento oligomerizacijos laipsnį. Jungtukai, sudaryti iš daugiau nei 15 amino rūgščių, formuoja scFv monomeras, tuo tarpu trumpesnių sekų jungtys, lemia scFv dimerų bei trimerų susidarymą (25).

Pagrindiniai scFv fragmento trūkumai atsiranda dėl menko stabilumo bei trumpo cirkuliavimo laiko organizmo skysčiuose, kuris lemia silpną terapinį poveikį. Siekiant išspręsti šiuos trūkumus, taikomos strategijos, padidinančios molekulinę fragmento masę:

1. Vienas iš būdų – kovalentinėmis jungtimis prie scFv fragmento prijungiant kitas molekules. Prijungiant polietilenglikolį (PEG), sulėtinamas baltymo pašalinimas per inkstus. Tuo pačiu modifikuotas fragmentas apsaugomas nuo organizme veikiančių fermentų poveikio. Siekiant padidinti scFv fragmento molekulinę masę, genetiniais metodais scFv fragmentas yra sujungiamas su imunoglobulino Fc sritimi. Tokiu principu gaunamas į IgG panašus baltymas su scFv būdingu specifiškumu, bet ilgesniu užsilaikymo organizme periodu (31).
2. Antrasis būdas, padidinantis fragmento molekulinę masę, yra multimerinių formų sukūrimas. Multimerų susiformavimas, kaip minėta anksčiau, priklauso nuo jungtukų

sudarančių amino rūgščių kiekio. Ši strategija tinkama naudoti kuomet norima gauti scFv fragmentą, pasižymintį dimero ar trimero savybėmis. Taip pat multimerai gali būti sukonstruojami kovalentinių jungčių pagalba, sujungiant du atskirus scFv fragmentus, tarp jų įvedant polipeptidinį jungtuką. Šiuo būdu galima gauti fragmentą, turintį dvi ar daugiau skirtingu specifiskumu pasižyminčias antigenų sujungiančias sritis (32).

Lyginant su pilno ilgio antikūnais, būdami mažesnės molekulinės masės, scFv tampa perspektyvia priemone medicinos srityje. Dėl galimybės nesudėtingai manipuluoti genetinė informacija, scFv fragmentai gali būti lengvai modifikuojami, sukuriant baltymą, pasižymintį specifinėmis savybėmis.

1.5. ScFv fragmento raiškos sistemos

Kuriant rekombinantinius baltymus, raiškos sistemos pasirenkamos atsižvelgiant į įvairius aspektus, tokius kaip išskiriamo tikslinio baltymo funkcionalumui reikalingas potransliacinės modifikacijos, baltymo molekulinę masę ir kitas baltymui būdingas savybes. Pagrindinis skirtumas tarp raiškos sistemų yra gebėjimas vykdyti potransliacinės modifikacijos. Prokariotinės ląstelės, tokios kaip *E.coli*, nevykdo potransliacinės glikozilinimo reakcijos, būtinos imunoglobulinų sintezei. Tuo tarpu eukariotinėse ląstelėse gali būti vykdomos įvairios potransliacinės modifikacijos. Antikūnų fragmentų raiškai gali būti naudojamos eukariotinės mielės, vabzdžių ar žinduolių ląstelės (9).

ScFv yra aktyvus ir neglikozilintas, todėl rekombinantinių scFv sintezei gali būti naudojamos ir prokariotinės ląstelės (21).

1.5.1. ScFv fragmento raiška *E. coli* ląstelėse

ScFv fragmento funkcionalumui reikalingos potransliacinės modifikacijos, kurių metu suformuojami S-S tilteliai. *E.coli* ląstelių citoplazmoje esanti redukuojanti aplinka, yra netinkama disulfidinių tiltelių susiformavimui, kurie būtini taisyklingam baltymo susilankstymui erdvėje. Vykdamas baltymo transliaciją bakterinėse *E.coli* ląstelėse, gaunami dideli kiekiai netaisyklingai susilanksčiusių baltymų, kurie susilietę tarpusavyje, formuoja netirpius baltymų agregatus, vadinamus intarpiniais kūneliais. Dažnai atvejais, dėl įvykusios baltymo agregacijos, sudėtinga išgryninti sintetinamą baltymą, esantį netirpioje formoje

(33,34). Taigi, vykdant scFv sintezę bakterinių ląstelių citoplazmoje, dažnu atveju gaunamas nefunkcionalus baltymas. Taikant įvairius baltymo sintezės ir gryninimo metodus, galima baltymą „pratirpinti“ ir gauti nedidelius aktyvaus scFv kiekius. Todėl, E.coli ląstelės retai pasirenkamos kaip sintezės platforma aktyvaus scFv fragmento raiškai.

E. coli ląstelių periplazmoje, priešingai nei citoplazmoje, dėl didesnio deguonies kiekio, gali susiformuoti disulfidiniai ryšiai, reikalingi scFv fragmento tinkamam susilankstymui. Vienas iš pagrindinių trūkumų, sintetinant baltymą periplazmoje – gaunama maža produkto išeiga. Siekiant išskirti didesnę sintetintamo baltymo kiekį, dažniau pasirenkama antikūno fragmento sintezę vykdyti E.coli ląstelių citoplazmoje.

1.6. ScFv pritaikymas medicinoje

Antikūnų preparatai medicinoje pradėti naudoti dėl didelio specifškumo taikiniui bei sukeliama silpnėsių šalutinių reakcijų, lyginant su mažos molekulinės masės vaistinėmis medžiagomis (35). Pirmiausia biologiniai vaistiniai preparatai buvo kuriami Ig molekulių pagrindu, tačiau dėl lėto šių molekulių įsiskverbimo į audinius, gydymui pradėti naudoti mažesnės molekulinės masės scFv fragmentai. Antikūnų terapija gali būti pritaikoma įvairių ligų gydymui, tokių kaip vėžiniai, uždegiminiai, autoimuniniai bei virusiniai susirgimai. Pastebimas spartus antikūno klasės vaistinių preparatų augimas tarp kitų vaistų grupių (36).

Dėl išskirtinių jiems būdingų savybių, scFv fragmentai gali būti pritaikomi medicinoje keliais būdais:

1. Vaistų pernešimas į tikslines organizmo vietas. ScFv fragmentai gali būti konjuguojami su įvairiomis medžiagomis. Dažniausiai antikūno fragmentų konjugatai sudaromi su radionuklidais, citotoksinėmis medžiagomis, peptidais, lipidais, nanodalelėmis ir su kitomis terapinį poveikį turinčiomis medžiagomis (37). Onkologinių ligų gydymui, scFv fragmentas sujungiamas su citotoksinio poveikiu pasižyminčiomis medžiagomis. Pasižymėdamas specifškumu prieš vieną epitopą, esantį ant vėžinės ląstelės, scFv konjugatas prisijungia prie taikinio ląstelės. Tokiu būdu aktyvinamas ląstelės žūties procesas, nepaveikiant aplinkinių sveikų audinių (38). Dėl sukeliama švelnesnių šalutinių reakcijų, scFv dažnai naudojami vėžinių susirgimų gydymui vietoj įprastinių chemoterapinių vaistų.
2. Imunoterapija. Vėžinių susirgimų gydymui, scFv yra pritaikoma kuriant pažangų terapijos metodą – CAR-T (angl. *chimeric antigen receptor*) ląsteles. CAR yra chimerinis T ląstelių receptorius, gaunamas genų inžinerijos būdu. Genetiškai

modifikuotos T ląstelės, savo paviršiuje iškelia scFv fragmentą, nukreiptą prieš specifinį epitopą, esantį vėžinių ląstelių paviršiuje. Įvykus scFv baltymo prisijungimui prie taikinio molekulės, aktyvinama T ląstelė, kuri sukuria stiprų imuninį atsaką prieš vėžines ląsteles (39). 2017m. FDA patvirtino du CAR-T vaistinius preparatus Aksikabtageno ciloleucelą (Yescarta) ir Tisagenlekleucelą (Kymriah), skirtus B ląstelių limfoproliferacinei ligai gydyti (40).

3. Receptorių slopinimas. ScFv gali blokuoti ląstelių receptorių susijungimą su ligandais. Vienas iš pavyzdžių yra neovaskulinės amžinės geltonosios dėmės degeneracijos gydymui patvirtintas biologinis vaistas – Brolucizumabas. Brolucizumabas yra humanizuotas monokloninis scFv fragmentas, kuris prisijungęs prie kraujagyslių endotelio augimo faktoriaus A (VEGF-A; angl. *vascular endothelial growth factor*) slopina VEGF-A receptorių aktyvumą. Tokiu būdu slopinamas naujų kraujagyslių susiformavimas, lemiantis ligos progresavimą(41) .

Medicinoje antikūnų terapija sparčiai vystoma įvairių susirgimų gydymui. Atliekami iki klinikiniai tyrimai, įrodo gydymo antikūnais efektyvumą ne tik virusinėms, infekcinėms, autoimuninėms ligoms bei vėžiniams susirgimams, bet taip pat neurodegeneracinių ligų gydymui, tokių kaip Alzheimeris (42).

1.7. ScFv pritaikymas diagnostikoje

Antikūnai gali būti pritaikomi tyrimuose tiek in vivo, tiek in vitro, siekiant nustatyti įvairius antigenus. Dėl didelio afiniteto ir gebėjimo susijungti su įvairiais antigenais (haptenuis, proteinais, pilno dydžio patogenais), antikūnai naudojami ligų diagnostikai bei įvairiems laboratoriniams tyrimams (43):

1. Vėžinių susirgimų diagnostika ir stebėjimas. ScFv fragmentai pritaikomi vėžinių susirgimų diagnostikai bei gydymo efektyvumo stebėjimui. Fragmentai, skirti diagnostikai, gaunami atliekant pastarųjų konjugaciją su fluorescencinėmis arba radioaktyviomis molekulėmis. Naudojant šiuos preparatus, vėžinių susirgimų diagnostiką galima atlikti nenaudojant invazyvių tyrimo metodų, tačiau pritaikant magnetinio rezonanso tomografiją (MRT) bei pozitronų emisijos tomografiją (PET). Šie tyrimo metodai leidžia stebėti gydymo efektyvumą, stebint atsirandančius pakitimus augliuose (44).

2. Laboratoriniai tyrimai. ScFv gali būti pritaikomi įvairiuose biomedicinoje atliekamuose tyrimuose. Dažniausiai naudojami:
 - 2.1. Western Blot tyrimas. ScFv fragmentai gali būti naudojami kaip pirminiai arba antriniai antikūnai, specifinių baltymų aptikimui mišiniuose. Šio tyrimo būdu galima identifikuoti tikslinį baltymą, nustatyti baltymų santykinius kiekius bei įvertinti tarp baltymų įvykstančias sąveikas (45). Western blot metodu ScFv fragmentai gali būti pritaikomi infekcinių ligų diagnostikai, tokių kaip ŽIV, herpes virusui, bei autoimuniniams ir vėžiniams susirgimams diagnozuoti (46).
 - 2.2. ELISA tyrimas. ELISA yra imunofermentinis tyrimas (angl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), kuriuo galima kiekybiškai nustatyti mėginyje esančių antigenų, tokių kaip peptidų, baltymų, antikūnų bei hormonų, koncentraciją. ELISA metodu, pasižyminčiu dideliu jautrumu, galima nustatyti vėžinius susirgimus ankstyvojoje stadijoje (47).
 - 2.3. Imunofluorescencinis tyrimas. Fluorescenciniu būdu pažymėti scFv fragmentai, aptinka ir prisijungia prie specifinių antigeno molekulių. Fluorescencinė medžiaga, leidžia vizualizuoti surištą antigeną, naudojant fluorescencinį mikroskopą. Šis tyrimas leidžia identifikuoti skysčiuose bei maiste esančias įvairias patogenines bakterijas, tokias kaip *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* (48).
3. Greitieji antigeno testai. Mažas scFv fragmentų molekulinis dydis, leidžia juos pritaikyti šoninio srauto imunologiniuose tyrimuose. Šie testai pritaikyti naudojimui namuose. Iš tiriamo mėginio galima nustatyti patogenus, toksinus bei ligoms būdingus specifinius biomarkerius (49).

ScFv yra naudojami tiek *in vivo*, tiek *in vitro* tyrimuose. Atliekami tyrimai ne tik padeda diagnozuoti ligas, bet taip pat leidžia sekti jų progresavimą ir nustatyti ligą ankstyvojoje jos stadijoje.

2. TYRIMO MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Tyrimo medžiagos

2.1.1. Hibridomos ląstelės

Hibridomos ląstelės, gaminančios Mabs prieš ACT-14 beta laktamazę, gautos iš prof. A.Žvirblienės laboratorijos, VU, GMC, Imunologijos laboratorijos (IL).

2.1.2. Ląstelių kamieniai

Darbe naudoti E.coli DH10B ir S.cerevisiae 214C ląstelių kamieniai.

2.1.3. Vektoriai

Darbe naudotas vektorius pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva) bei mielių raiškos vektorius pFGG3/VP1-VP2-Fc-Bgnew, gautas iš VU GMC Eukariotų genų inžinerijos laboratorijos.

2.1.4. Reagentai

1.lentelė *Reagentai*

Reagentai	Gamintojas
Galaktozė	AppliChem, Vokietija
Gliukozė	AppliChem, Vokietija
Peptonas	AppliChem, Vokietija
Mielių ekstraktas	AppliChem, Vokietija
SDS-PAGE pavyzdžio buferinio tirpalo dažas	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva
Etidžio bromidas	Sigma- Aldrich, Sent Luisas, Misūris, JAV
Stiklo rutuliukai	Sigma- Aldrich, Sent Luisas, Misūris, JAV
Ampicilinas	Sigma- Aldrich, Sent Luisas, Misūris, JAV
Agarozės milteliai Agarose (Low-	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva

EEO/Multi-Purpose/Molecular Biology Grade))	
PCR mišinys Phire Green Hot start II PCR Master Mix (2x)	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva
PCR mišinys DreamTaq PCR Master Mix (2x)	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva
Vanduo be nukleazių	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva
DNR mėginių užnešimo dažas DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva
dNTP mišinys	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva
Atvirkštinė transkriptazė M-MuLV	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva
RNRazių inhibitorius RiboLock	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva
Y-PER (baltymų ekstrakcijos reagentas mielėse)	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva
Buljono milteliai LB Broth (Miller)	Sigma- Aldrich, Sent Luisas, Misūris, JAV
PMSF (fenilmetilsulfonilfluoridas)	Sigma- Aldrich, Sent Luisas, Misūris, JAV
Coomasie blue dažas	Sigma- Aldrich, Sent Luisas, Misūris, JAV
SDS (Natrio dodecilsulfatas)	Sigma- Aldrich, Sent Luisas, Misūris, JAV
TRIS bazė	Sigma- Aldrich, Sent Luisas, Misūris, JAV

2.1.5. Tirpalai

2.lentelė *Tirpalai*

Tirpalai	Sudėtis
Agarozės tirpalas geliui 1%	1% agarozės TAE buferyje
TAE buferinis tirpalas 50x	2 M TRIS, 50 mM EDTA, 1 M ledinės acto rūgšties, H ₂ O
Tris-glicino/SDS buferinis tirpalas	0.25 M TRIS, 1.92 M glicino, 1% natrio dodecilsulfato (SDS), H ₂ O
TE tirpalas	10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA
LiCl (TE) tirpalas	0.1M LiCl TE tirpale
Viršutinis koncentruojamasis 4% gelis	335 μl 30% AA/BAA, 625 μl 1 M TRIS-HCl

	pH 6,8, 25 µl 10% SDS, 1,5 ml H ₂ O, 12,5 µl 10% APS, 2,5 µl TEMED
Apatinis skiriamasis 12% gelis	2 ml 30% AA/BAA, 1,25 ml 1,5 M TRIS–HCl pH 8,8, 50 µl 10% SDS, 1,585 ml H ₂ O, 25 µl 10% APS, 5 µl TEMED
Agarizuota YEPD	1% mielių ekstrakto, 2% peptono, 2% gliukozės, 2% agarozės, distiliuotas vanduo
Skysta YEPD	1% mielių ekstrakto, 2% peptono, 2% gliukozės, distiliuotas vanduo

2.1.6. Rinkiniai

3.lentelė Rinkiniai

Rinkinys	Gamintojas
Quick- RNA Miniprep Kit, rinkinys RNR išskyrimui	Zymo Research, JAV
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, rinkinys cDNR grandinės sintezei	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva
DNA Clean & Concentrator-5, rinkinys fragmentų gryninimui ir koncentravimui	Zymo Research, JAV
CloneJET PCR Cloning Kit, rinkinys DNR fragmentų klonavimui į vektorių	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva
GeneJET Plasmid Miniprep Kit, rinkinys rekombinantinės plazmidės išgryninimui	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva
GeneJET Gel Extraction Kit, rinkinys DNR fragmentų gryninimui iš agarozės gelio	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva

2.1.7. Fermentai

Darbe naudoti fermentai: Taq polimerazė, T4 DNR ligazė, M-MuLV atvirkštinė transkriptazė, Dream taq polimerazė, restrikcijos endonukleazės: BglII; BamHI; XbaI; XhoI; PstI; NdeI; BglIII. Fermentai įsigyti iš Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva.

2.1.8. Molekulinės masės standartai

Darbe naudoti molekulinės masės standartai: RiboRuler High Range RNA Ladder – RNR molekulinės masės standartas; GeneRuler DNA Ladder Mix – DNR molekulinės masės standartas; PageRuler™ Prestained Protein Ladder – baltymų molekulinės masės standartas. Molekulinės masės standartai įsigyti iš Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva.

2.1.9. Prietaisai

4.lentelė *Prietaisai*

Prietaisas	Gamintojas
UV kamera elektroforezės gelių analizavimui MiniBis Pro	MiniBis Pro, Izraelis
PCR termocikleris MiniAmp Plus	Applied Biosystems™, JAV
PCR termocikleris Multigene Optimax Gradient	Labnet, JAV
Stalinė centrifūga Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Vokietija
Spektrofotometras	NanoDrop™, JK
Horizontalios agarozės gelio elektroforezės sistema	Cleaver Scientific, JK
Laminarinio oro srauto spinta	NuAire, JK
Termostatuojama purtyklė Innova44	New Brunswick Scientific, JAV

2.1.10. Pradmenys

Darbe naudoti pradmenys įsigyti iš Eurofins Genomics, Vokietija. Pradmenų sekos pateiktos 2.2. skyriuje.

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. RNR išskyrimas iš hibridomos ląstelių

Bendra RNR išskirta iš 3×10^6 hibridomos ląstelių, kurios gamino Mabs prieš ACT-14 beta laktamazę. Hibridomos ląstelės gautos iš prof. A.Žvirblienės laboratorijos, VU, GMC, Imunologijos laboratorija (IL). RNR išskyrimui panaudotas Quick- RNA Miniprep Kit (Zymo Research, JAV) rinkinys pagal gamintojo rekomendacijas.

2.2.2. Išgrynintos RNR kokybės patikrinimas elektroforezės metodu agarozės gelyje

Išgrynintos iš hibridomos ląstelių RNR kokybė patikrinama, panaudojant elektroforezės agarozės gelyje metodą. Paruoštas 1% agarozės gelis 1xTAE buferiniame tirpale su dažu etidžio bromidu. 2 μ l paruošto RNR tirpalo sumaišyti su užnešimo dažu (angl. loading dye) ir užnešti į gelio šulinėlius. Elektroforezės laikas kontroliuojamas indikatoriniais dažais mėginyje, kurių judrumas gelyje tiesiogiai proporcingas DNR fragmento ilgiui. RNR vizualizuota UV šviesoje ir gelio elektroforezės vaizdas dokumentuotas prietaisu MiniBis Pro (Israelis).

2.2.3. V_H ir V_L koduojančių DNR fragmentų sintezė

Pirmoji cDNR grandinės sintezė atlikta, naudojant rinkinį RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva) ir remiantis gamintojo rekomendacijomis. Antros cDNR grandinės, kuri atitinka pelės IgG V_H ir V_L sričių sekas, sintezei panaudoti pradmenys komplementarūs lengvosios (5.lentelė) ir sunkiosios (6.lentelė) grandinių variabiliosioms sritims.

5.lentelė Pradmenų sekos, panaudotos V_L koduojančio DNR fragmento amplifikacijai

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka (5'-3')	Šaltinis
LF1	ACGTTTGATTTCAGCTTGG	Krebber et al., 1997 (50)
LF2	ACGTTTATTTCCAGCTTGG	Krebber et al., 1997 (50)
LF4	ACGTTTATTTCCAACCTTG	Krebber et al., 1997 (50)
LF5	ACGTTTCAGCTCCAGCTTGG	Krebber et al., 1997 (50)
LB3	GATATTGTGMTMACTCAGTC	Krebber et al., 1997 (50)
LB4	GATATTGTGYTRACACAGTC	Krebber et al., 1997 (50)
LB5	GATATTGTRATGACMCAGTC	Krebber et al., 1997 (50)
LB9	GATATTGTTCTCAWCCAGTC	Krebber et al., 1997 (50)
LB10	CATATGATTGWGCTSACCCAATC	Krebber et al., 1997 (50)
LB12	CATATGRTTKTGATGACCCARAC	Krebber et al., 1997 (50)
LB13	GATATTGTGATGACBCAGKC	Krebber et al., 1997 (50)

V_L amplifikacijai skirti pradmenys atitinka kappa izotipą.

Pagaminti tokie V_L amplifikacijai skirtų pradmenų mišiniai: LFmix (atvirkštinių pradmenų mišinys), kuriame kiekvieno pradmenų LF1, LF2, LF4, LF5 koncentracija yra 10 μ M. PCR reakcijos mišinyje pradmenų koncentracija yra 0,5 μ M. Tiesioginių pradmenų mišiniai: 50 μ M LB3 ir 35 μ M LB4; 40 μ M LB5, 20 μ M LB9 ir 35 μ M LB10; 80 μ M LB12; 60 μ M LB13. PCR reakcijos mišinyje pradmenų koncentracija yra 1 μ M.

V_L DNR fragmento amplifikacijai naudotos šios pradmenų poros: LFmix+LB3+LB4; LFmix+LB5+LB9+LB10; LFmix+LB12; LFmix+LB13.

6.lentelė Pradmenų sekos, panaudotos V_H koduojančio DNR fragmento amplifikacijai

Pradmens pavadinimas	Seka (5'-3')	Šaltinis
VH1F	TGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAG	Orlandi et al., 1989 (51)
VH1B	AGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG	Orlandi et al., 1989 (51)

Kiekvieno pradmens koncentracija reakcijos mišinyje 10 μ M.

PCR reakcijos mišinys buvo 25µl, į kurio sudėtį įėjo 12,5µl Phire Green Hot Start II PCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific).

PCR sąlygos: pradinė denatūracija 95°C 3 min, ir 30 reakcijos ciklų, susidedančių iš denatūracijos 95°C 30s, pradmenų prikabinimo (angl. annealing) 56°C 30s, sintezės 72°C 30s. Pasibaigus 30 ciklų dar papildomai pridėta sintezės stadija 7 min 72°C.

Gautų PCR reakcijos produktų analizė atlikta 1% agarozės gelyje. Į šulinėlius įnešta 5µL PCR reakcijos mišinio, sumaišyto su užnešimo dažu. Po elektroforezės gelis dažomas etidžio bromido tirpale ir DNR vizualizuojamas UV šviesoje.

2.2.4. DNR fragmentų gryninimas

Fragmentų DNR gryninimas ir koncentravimas atliktas, panaudojus rinkinį DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research) ir remiantis gamintojo rekomendacijomis. PCR mišinys sumaišytas su DNR rišančiu buferiniu tirpalu (DNA Binding Buffer) santykiu 1:5. Mišinys užneštas ant kolonėlės ir centrifuguota 30s maksimaliomis apsukomis stalinėje centrifugoje (Eppendorf Centrifuge 5415 R). Kolonėlė praplauta 200 µl DNR plovimo buferiniu tirpalu (DNA Wash Buffer). Centrifuguota 30s. Plovimas buferiniu tirpalu pakartotas. DNR nuplauta nuo kolonėlės (eliucija) ant sorbento užpilant 25 µl distiliuoto vandens ir inkubuojant 1 min. kambario temperatūroje. Kolonėlė perkelta į 1,5 ml mėgintuvėlį ir centrifuguota 30s. Išgrynintos DNR tirpalas saugotas užšaldytas.

2.2.5. DNR koncentracijos nustatymas spektrofotometru

Išgrynintos DNR koncentracija (ng/µl) nustatyta NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific) spektrofotometru matuojant absorbciją, kai bangos ilgis yra 260 nm. Taip pat įvertintas DNR grynumas: absorbcijos santykis esant 260 nm ir 280 nm (260/280) turi būti ~ 1,8, o 260/230 ≥ 2.0.

2.2.6. DNR fragmentų klonavimas į pJET1.2 vektorių

Amplifikuoti DNR fragmentai, koduojantys V_L ir V_H sritis, buvo klonuoti į pJET 1.2 vektorių, panaudojant rinkinį CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific).

Rekombinantine plazmide transformuotos paruoštos kompetentinės E.coli DH10 ląstelės termošoko būdu. Ląstelės, sumaišytos su rekombinantine plazmide, inkubuotos 42°C 1min 20s ir atšaldytos leduose. Po to ląstelės atgaivintos 700 µl LB terpės ir inkubuotos 1 val. 37°C temperatūroje. Ląstelės surinktos centrifuguojant ir išsėtos ant agarizuotos LB terpės su 100mg/ml antibiotiko ampicilino. Lėkštelės inkubuotos 37°C temp. apie 18 val.

2.2.7. Rekombinantinių klonų analizė

Rekombinantiniai klonai analizuoti PCR metodu, naudojant standartinį plazmidės pJET1.2 pradmenį ir pradmenį specifinį klonuotai DNR sekai. Gauti PCR fragmentai analizuoti elektroforezės būdu agarozės gelyje. PCR teigiami klonai užsėti į skystą LB terpę su antibiotiku ampicilinu ir auginti apie 18 val. purtant 37°C temperatūroje. Užauginta biomasė surinkta centrifuguojant ir rekombinantinė plazmidė išgryninta, panaudojus GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific) rinkinį pagal gamintojo rekomendacijas. Išskirtos plazmidės patikrinamos sukarpant jas restrikcijos endonukleazėmis, kurių taikiniai yra klonuotame DNR fragmente. Standartinis karpymo šiais fermentais mišinys buvo 25 µl, kuriame buvo 0,5-2 µg DNR ir iki 0,1 aktyvumo vnt atitinkamos restrikcijos endonukleazės bei 1x buferinio tirpalo. Po sukarpymo gauti DNR fragmentai analizuoti elektrofozės būdu agarozės gelyje.

Klonuotų DNR fragmentų, koduojančių V_L ir V_H sekas sekoskaita atlikta VU GMC Sekoskaitos centre, naudojant Applied Biosystems 3130xl genetinį analizatorių.

2.2.8. DNR sekų, koduojančių V_L ir V_H sritis, sujungimas jungtuku (linkeriu)

PCR būdu pradmenų pagalba įvedamos jungtuką $(Gly_4Ser)_4$ koduojančios sekos, panaudojant pradmenis, nurodytus 7. lentelėje.

7.lentelė Pradmenų sekos, naudotos sujungiant V_L ir V_H DNR sekas

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka (5'-3')
VL-Xba-F	ATCTAGAATGGATCATATGGTTGTGATGACCCAG
VL-Bam-R	AGGATCCACCGCCTCCGGATTTGATTTCCAGCTTGGTCCC
VH-Bam-F	TGGATCCGGCGGTGGCGGCTCCGGAGGCGGTGGCTCCG

	GTGGCGGCGGCGTCCAGCTGCAGGAGTCTG
VH-Bgl-R	TAGATCTGAGGAGACGGTGACCGTG

Reakcijos vykdytos 25µl tūryje, naudojant 12,5 µl DreamTaq PCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific).

PCR sąlygos: pradinė denatūracija 95°C 3 min, ir 30 reakcijos ciklų, susidedančių iš denatūracijos 95°C 30s, pradmenų prikabinimo* 30s, sintezės 72°C 30s. Pasibaigus 30 ciklų dar papildomai pridėta sintezės stadija 7 min 72°C.

*pradmenų prikabinimui pasirinktos 64°C, 66°C, 68°C temperatūros, kurių zonose buvo atliekama PCR, įdedant po vieną mėgintuvėlį su reakcijos mišiniu į atitinkamos temperatūros zoną.

Gauti DNR fragmentai, klonuoti į pJET1.2 vektorių, kaip aprašyta 2.1.6. sk. ir atlikta šių DNR fragmentų sekoskaita.

2.2.9. DNR fragmentų gryninimas iš agarozės gelio ir klonavimas į mielių pFGG3 vektorių

DNR fragmentas, koduojantis V_L ir V_H sritį, su prijungta jungtuko dalimi (konstrukcija V_L -L- V_H), iš pJET1.2 plazmidės buvo iškirptas restrikcijos endonukleazėmis XbaI ir BglII ir klonuotas į atitinkamai perkirptą pFGG3-Fc plazmidę. Reikiami DNR fragmentai atskiriami agarozės gelyje elektroforezės būdu ir išgryninti iš gelio, panaudojant GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) pagal gamintojo rekomendacijas. Rekombinantinė plazmidė transformuota į kompetentines *E.coli* ląstelės ir rekombinantiniai klonai analizuoti, kaip aprašyta 2.1.7. sk.

2.2.10. Mielių *S.cerevisiae* kompetentinių ląstelių paruošimas ir jų transformacija rekombinantine plazmide

Į 5ml skystos YEPD terpės (1% mielių ekstrakto, 2% peptono, 2% gliukozės) užsėtas *S.cerevisiae* 214C mielių kamienas; auginta 18-20val. purtant 30°C temperatūroje. 1 ml padaugintų mielių ląstelių užsėta į 5 ml mėgintuvėlį su YEPD terpe, auginta 3h 30°C temperatūroje purtant. Ląstelės surenkamos centrifuguojant 2000 aps/min greičiu ir praplaunamos steriliu TE tirpalu. Ląstelės surinktos centrifuguojant, suspenduotos 3 ml 0,1M

LiCl tirpale. Laikoma 1val. 30°C temperatūroje. Ląstelės surinktos centrifuguojant, supernatantas nupiltas ir likusiame nedideliame tirpalo tūryje suspenduojamos mielių ląstelės. 15 µl paruoštų kompetentinių mielių ląstelių sumaišyta su 0,5 µg rekombinantinės plazmidės; mišinys 30 min. laikomas kambario temperatūroje. Pridėta 40 µl 50% PEG4000 tirpalo ir inkubuota vandens vonioje 42°C temperatūroje. Ląstelės po termošoko užpilamos 1ml YEPD tirpalu ir inkubuojamos per naktį 30°C termostate. Po inkubacijos, ląstelės surinktos centrifuguojant ir išsėtos ant agarizuotos YEPD terpės su 30 µl/100 ml formaldehido. Mielių transformatai po 2 parų auginimo 30°C temperatūroje, persėjami ant agarizuotos YEPD terpes su 60 µl/100 ml formaldehido.

2.2.11. Rekombinantinių baltymų sintezės indukcija mielių ląstelėse

Keturi rekombinantiniai klonai užsėti į 20ml YEPD terpės su 30 µl/100 ml formaldehido per naktį 30°C temperatūroje. Baltymų sintezė indukuota pridėjus YEPD terpės su 3% galaktoze. Auginta dar 18 val. 30° temperatūroje. Mielių ląstelės surinktos centrifuguojant ir saugotos užšaldytos.

2.2.12. Mielių ląstelių suardymas

Mielių ląstelių biomasė suspenduota 5 ml DB150 buferinio tirpalo (150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.001% Triton X-100, 0.25 M L-Arginino pridėto į 10 mM Tris/HCl-buffer, pH 7.2). Pridedamas lygus tūris stiklo rutuliukų (Glass beads, Sigma) ir vorteksuojama 7 min po kurių, gauta biomasė šaldoma leduose 1 min. Po ardymo, mišinys nucentrifuguojamas ir supernatantas surenkamas. 50-100 µl supernatanto sumaišoma su SDS-PAGE pavyzdžio buferiniu tirpalu dažu, mėginys kaitinamas 100°C 5 min ir analizuojamas SDS-PAGE.

2.2.13. Baltymų elektroforezė poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (SDS-PAGE)

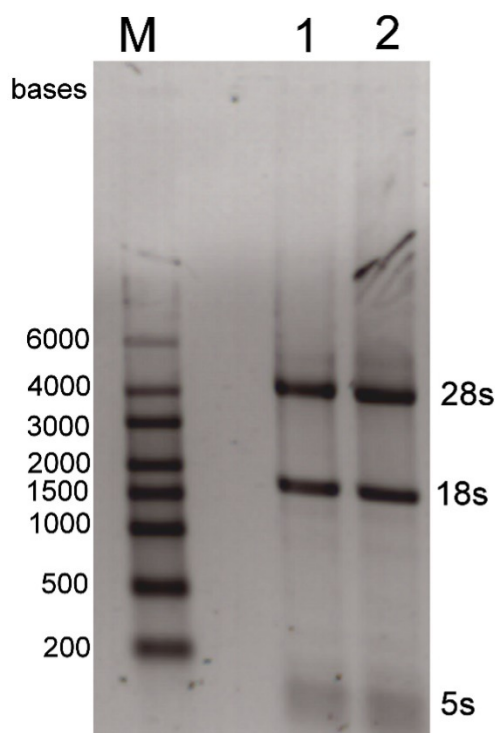
50-100 µl supernatanto, kaip aprašyta sk. 2.1.12, sumaišoma su pavyzdžio buferiniu tirpalu (Thermo Fisher Scientific), turinčio reduktoriaus ditiotreitolo (DTT), mėginys kaitinamas 100°C 5 min ir analizuojamas poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis

sąlygomis (SDS-PAGE, angl. sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis). Gelis, sudarytas iš 4% viršutinio koncentruojančio gelio ir 12% apatinio skiriančiojo gelio. Į gelio šulinėlius įnešta 7 µl analizuojamo tirpalo sumaišyto su pavyzdžio buferiniu tirpalu. Elektroforezė atlikta Tris-glicino/SDS buferiniame tirpale, esant 200 V įtampai. Po elektroforezės, gelis praplautas vandeniu ir nudažytas 0,1% Coomassie blue tirpale, gelis išblukintas 10% acto rūgšties tirpalu.

3. REZULTATAI

3.1. Imunoglobulino prieš ACT-14 β -laktamazę V_L ir V_H domenų amplifikacija ir analizė

Iš hibridomos ląstelių, kurios sintetino Mab prieš ACT-14 β -laktamazę, išskirta RNR (7.pav.).

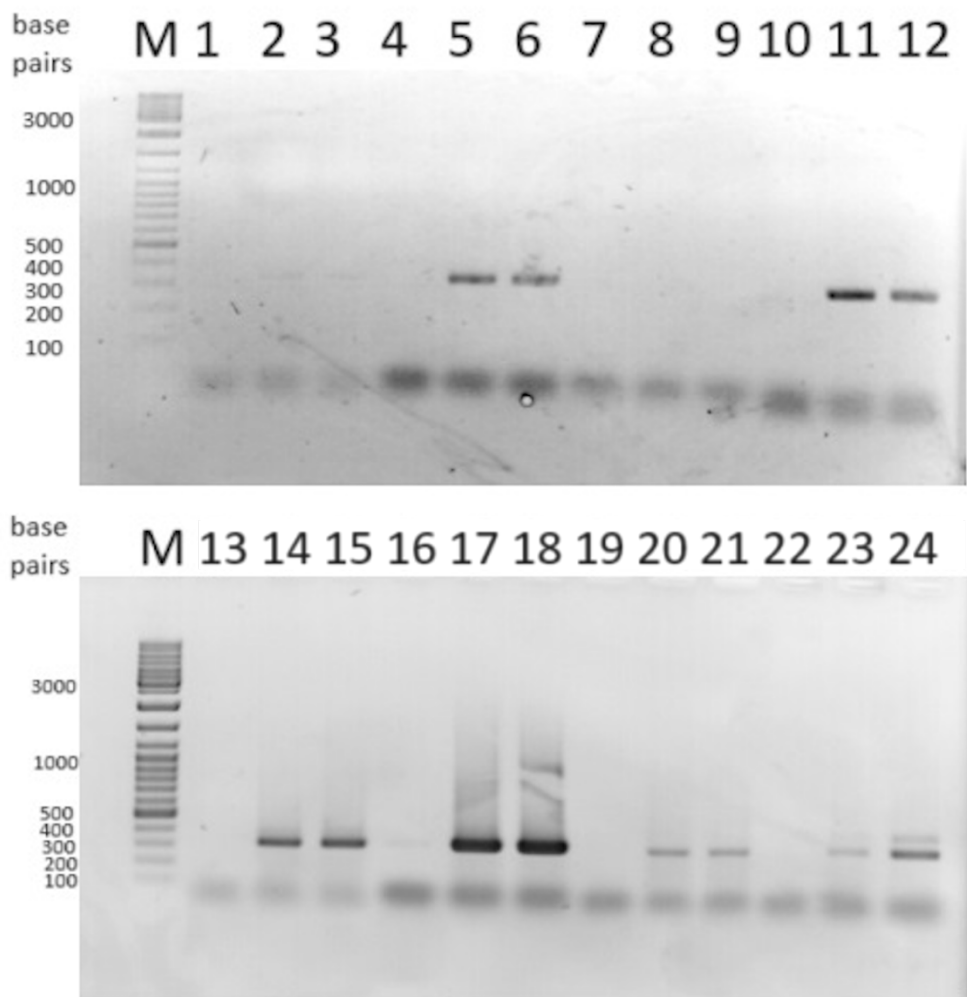


7.pav. Bendros RNR, išskirtos iš hibridomos ląstelių, analizė agarozės gelyje.

1,2 takeliai – įneštas skirtingas RNR kiekis į gelio takelius. M – RNR molekulinės masės standartas (RiboRuler High Range RNA Ladder, Thermo Fisher Scientific). Dešinėje pusėje ribosominės RNR dydžiai svedbergo vienetais (s), kurie atitinka molekulinės masės standartus: 28s apie 4500b; 18s apie 1700b; 5s <200b.

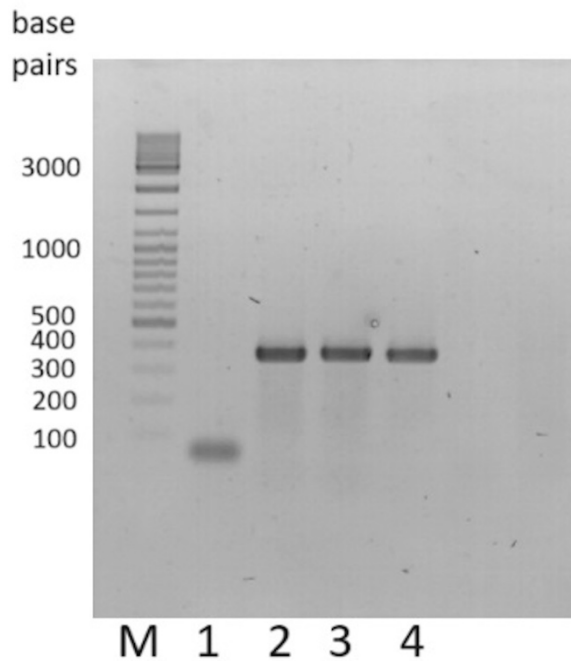
Didžiąją išskirtos RNR dalį sudaro ribosominė RNR (rRNR), o mRNR yra nedaug ir jos gelyje nesimato. RNR išskyrimo efektyvumas ir jos kokybė nustatoma pagal rRNR kokybę: išskirta RNR yra nesudegradavusi, galima aiškiai nustatyti rRNR pasiskirstymą gelyje po elektroforezės pagal molekulinį svorį.

Nuo susintetintos cDNR, PCR būdu, naudojant pradmenis, komplementarius Mab lengvosios (V_L) ir sunkiosios (V_H) grandinių variabilių domenų konstantinėms sekoms (žr. 1. lentelę ir 2. lentelę) amplifikuoti V_L ir V_H koduojantys fragmentai (8.pav., 9.pav.).



8.pav. PCR metodu, naudojant skirtingas pradmenų mišinių poras, amplifikuoto V_L fragmento analizė agarozės gelyje po elektroforezės.

V_L fragmento amplifikavimui naudoti atvirkštinių pradmenų mišiniai (LFmix) ir tiesioginių pradmenų mišiniai (LB). Takeliai 2, 3 – LFmix ir LB7; takeliai 5, 6 – LFmix ir LB (5; 9; 10); takeliai 8, 9 – LFmix ir LB6; takeliai 11, 12 – LFmix ir LB (3; 4); takeliai 14, 15 – LFmix ir LB13; takeliai 17, 18 – LFmix ir LB12; takeliai 20, 21 – LFmix ir LB11; takeliai 23, 24 – LFmix ir LB (14-17); 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 – cDNR be pridėtų komplementarių V_L sekai pradmenų (kontrolė), M – DNR molekulinės masės standartas (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific). Kairėje nurodytos bazių porų vertės, atitinkančios standarto juosteles.



9.pav. PCR metodu amplifikuoto V_H fragmento analizė agarozės gelyje po elektroforezės.

V_H fragmento amplifikavimui naudotas tiesioginis pradmuo VH1-F ir atvirkštinis pradmuo VH1-B. Takelis 1 – cDNR be pridėtų komplementarių V_H sekai pradmenų (kontrolė); takeliai 2, 3, 4 – VH1-F ir VH1-B; M – DNR molekulinės masės standartas (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific). Kairėje nurodytos bazių porų vertės, atitinkančios standarto juosteles.

Apie 350bp DNR fragmentai, kurių ilgis atitinka V_L ar V_H sekų ilgį, buvo gauti panaudojant LFmix ir LB (14-17); LFmix ir LB12; LFmix ir LB (3; 4); LFmix ir LB6; LFmix ir LB (5; 9; 10); LFmix ir LB7; VH1-F ir VH1-B pradmenų poras. Pasirinkti DNR fragmentai, gauti su pradmenimis LFmix ir LB (3; 4); LFmix ir LB (5; 9; 10); LFmix ir LB12; LFmix ir LB13; VH1-F IR VH1-B, išgryninti ir klonuoti į pJET1.2 vektorių, kurie transformuoti į *E.coli* ląsteles. Rekombinantinės plazmidės pJET1.2- V_L ir pJET1.2- V_H išgrynintos iš *E.coli* ląstelių, VU GMC Sekoskaitos centre atlikta klonuotų V_L ir V_H DNR fragmentų sekoskaita, panaudojant standartinius pJET1.2 sekoskaitos pradmenis.

Po sekoskaitos V_L ir V_H koduojančių DNR fragmentų sekos buvo analizuotos bioinformatiniu įrankiu IgBLAST (52). Nustatytos Ig V_L ir V_H domenų aminorūgščių sekos, atitinkančios hipervariabilias sritis (CDR, angl. complementarity determining regions), kurias skiria karkasinės sritys (FR, angl. framework regions). Amplifikuota V_L domeno sritis atitinka trijų pelės Ig germinaliųjų linijų (angl. germlines) sekas (10. pav.)

Domain classification requested: imgt

Alignment summary between query and top germline V gene hit:

	from	to	length	matches	mismatches	gaps	identity(%)
FR1-IMGT	4	28	25	23	2	0	92
CDR1-IMGT	29	34	6	5	1	0	83.3
FR2-IMGT	35	51	17	17	0	0	100
CDR2-IMGT	52	54	3	3	0	0	100
FR3-IMGT	55	90	36	36	0	0	100
CDR3-IMGT (germline)	91	97	7	6	1	0	85.7
Total			94	90	4	0	95.7

Alignments

```

<-----FR1-IMGT-----><CDR1><-----FR2-IMGT-----><C><-----FR3-IMGT----->
Query_1      4  VMTQTPKFLLLSAGDRVTITCKASQSVRNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQD 93
V 95.7% (90/94) IGKV6-32*01 2  I.....V.....S..... 91
V 94.7% (89/94) IGKV6-32*02 2  I.....V...E...S..... 91
V 88.3% (83/94) IGKV6-b*01  2  I.....PV.....M.....G.N.....S.....S.V.....H 91

Query_1      94  YNSP 97
V 95.7% (90/94) IGKV6-32*01 92  .S.. 95
V 94.7% (89/94) IGKV6-32*02 92  .S.. 95
V 88.3% (83/94) IGKV6-b*01  92  .S.. 95

```

10.pav. Pelės Ig V_L domeno klasifikacija bei CDR ir FR nustatymas pagal IgBLAST bioinformatinį įrankį (52).

Query – seka pateikta analizei.

Mab'o prieš ACT-14 β-laktamazę V_L domeno aminorūgščių seka, su pažymėtomis CDR ir FR sekomis pagal IgBLAST bioinformatinį įrankį (52) pateiktos 11. pav.

DHMVMTQTPKFLLLSAGDRVTITCKASQSVRNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYNSPYTFGGGTKLEIKR

11.pav. V_L domeno aminorūgščių seka.

Trys CDR sekos pažymėtos rėmelyje, FR sekos – pilkame fone. Aminorūgštis cisteinas (C raidė) pažymėta geltonai.

Atitinkamai bioinformatiniu įrankiu analizuota ir V_H domeno seka (12 pav. ir 13.pav.).

Alignment summary between query and top germline V gene hit:

	from	to	length	matches	mismatches	gaps	identity(%)
FR1-IMGT	1	24	24	23	1	0	95.8
CDR1-IMGT	25	32	8	7	1	0	87.5
FR2-IMGT	33	49	17	17	0	0	100
CDR2-IMGT	50	57	8	4	4	0	50
FR3-IMGT	58	95	38	35	3	0	92.1
Total			95	86	9	0	90.5

Alignments

```

<-----FR1-IMGT-----><CDR1-I><---FR2-IMGT---><CDR2-I><-----FR3-IMGT----->
V 90.5% (86/95) Query_1 1 VQLQESGAELVKPGASVKLSCTASGFNSKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDFASGIVKFDPKFQGKATITADTSSDTAYLHLSLTSEDT 90
V 85.3% (81/95) IGHV14-3*02 2 ...Q.....I.....P.N.NT.Y.....N...Q..... 91
V 86.3% (82/95) IGHV14-2*01 2 ...Q.V...R.....I.N.....P.N.NT.YA.....N...Q..... 91
V 86.3% (82/95) IGHV14-2*01 2 ...Q.....I..Y.....T.....PED.ET.YA.....N...Q..... 91

---->
V 90.5% (86/95) Query_1 91 AVYYC 95
V 85.3% (81/95) IGHV14-3*02 92 ..... 96
V 86.3% (82/95) IGHV14-2*01 92 .I... 96

```

12.pav. Pelės $Ig V_H$ domeno klasifikacija bei CDR ir FR nustatymas pagal bioinformatinį įrankį IgBLAST (52).

Query – seka pateikta analizei.

```

VQLQESGAELVKPGASVKLSCTASGFNSKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDFASGIV
KFDPKFQGKATITADTSSDTAYLHLSLTSEDTAVYYCGSTLIPGAHAMDYWGQGTTV
TVSS

```

13.pav. Mab'o prieš ACT-14 β -laktamazę V_H domeno aminorūgščių seka.

Trys CDR sekos pažymėtos rėmelyje, FR sekos – pilkame fone. Aminorūgštis cisteinas (C raidė) pažymėta geltonai

V_L ir V_H domenu aminorūgščių sekų analizė bioinformatiniu įrankiu rodo, kad sekos atitinka tam tikras pelės Ig germinales linijas, domenuose nustatyta CDR ir FR, o taip pat sekos turi po du Cys, aptinkamus visuose imunoglobulinuose.

3.2. Genetinės konstrukcijos, koduojančios viengrandį antikūną scFv prieš ACT-14 β -laktamazę, sukūrimas

ScFv konstrukcijai reikia sujungti V_L ir V_H per jungtuką (angl. linker). Jungtukas (šiam darbe žymimas raide L) yra 20 aminorūgščių seka, koduojanti seką (SG₄)₄. Variabilūs abiejų grandinių domenai scFv sujungti V_L -L- V_H tokia seka. Sujungimas atliktas PCR būdu, naudojant pradmenis, kuriuose 1) įvesta jungtuką koduojanti DNR seka; 2) V_L -L- V_H konstrukcijos 5'-gale įvedant restrikcijos endonukleazės XbaI, o 3'-gale BglII skėlimo sekas, kurios bus reikalingos klonuojant scFv į mielių raiškos vektorius (žr. 2 sk.).

Panaudojant pJET1.2- V_L plazmidinę DNR, amplifikuota V_L , panaudojant tiesioginį pradmenį VL-Xba-F ir atvirkštinį pradmenį VL-Bam-R (3.lentelė), kuriame yra dalis jungtuką koduojančios nukleotidų sekos ir BamHI skėlimo seka. Amplifikuotas DNR fragmentas klonuotas į pJET1.2, gauta konstrukcija pavadinta pJET1.2- V_L -L.

Panaudojant pJET1.2- V_H plazmidinę DNR, amplifikuotas V_H domenas, kurio 5'-gale yra dalis jungtuką koduojančios sekos (tiesioginis pradmuo VH-Bam-F), o atvirkštiniame pradmenyje yra įvesta BglII skėlimo seka (atvirkštinis pradmuo VH-Bgl-R). Amplifikuotas DNR fragmentas klonuotas į pJET1.2, gauta konstrukcija pavadinta pJET1.2- V_H -L.

Plazmidės pJET1.2- V_H -L ir pJET1.2- V_L -L padaugintos E.coli ląstelėse ir klonuoto DNR fragmento nukleotidų seka patikrinta sekoskaita. V_L apjungta su V_H tokiu būdu: XhoI ir BamHI restrikcijos endonukleazėms taikinių vietose perkirpta pJET1.2- V_H -L plazmidė, į kurią, veikiant T4 DNR ligazei, įklonuotas V_L -L fragmentas, iškirptas iš pJET1.2- V_L -L plazmidės, naudojant tuos pačius XhoI ir BamHI fermentus. Galutinė konstrukcija pavadinta pJET1.2- V_L -L- V_H .

Galutinė aminorūgščių scFv seka, apjungianti V_L -L- V_H pateikta 14.pav.

```
MDHMVVMTQTPKFLLLSAGDRVITCKASQSVRNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASN  
RYTGVPDRFTGSGYGTDFTFITSTVQAEDLAVYFCQQDYNSPYTFGGGTKLEIKSGG  
GGSGGGGSGGGGSGGGGVQLQESGAELVKPGASVKLSCTASGFNSKDTYMHVVKQ  
RPEQGLEWIGRIDFASGIVKFDPKFQGKATITADTSSDTAYLHLSSTSEDTAVYYCGS  
TLIPGAHAMDYWGQGTTVTVS
```

14.pav. scFv prieš ACT-14 β -laktamazę aminorūgščių seka.

Pilkai pažymėta V_L domenas, rėmelyje – jungtukas, pabraukta V_H domenas. Pirmas metioninas (M raidė), kuris būtinas scFv raiškai mielėse, pažymėtas žaliai.

3.3. scFv-Fc konstravimas raiškai mielėse

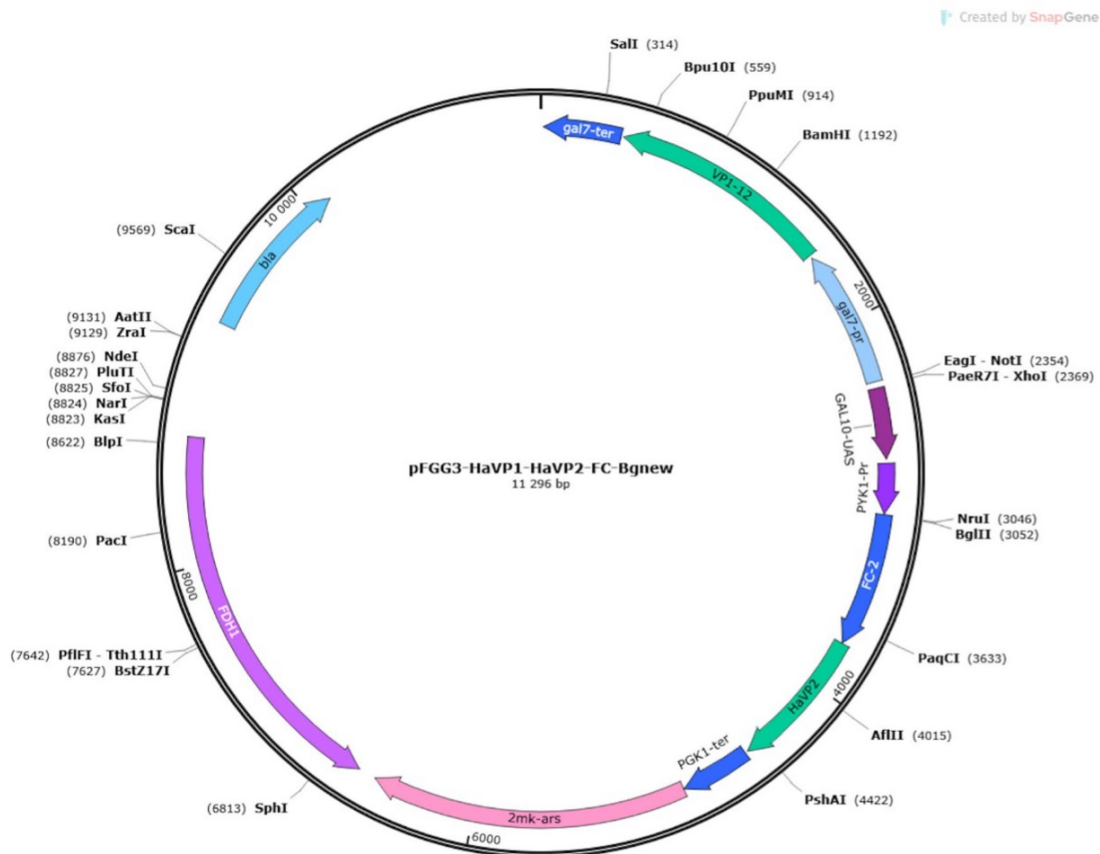
Kaip minėta šio darbo Literatūros apžvalgos dalyje, rekombinantiniai scFv sintetunami kaip monomerai, turintys monovalentinį susirišimą su antigenu. Tačiau šie baltymai yra gana nestabilūs, greitai degraduoja žmogaus serume, todėl turi trumpą gyvavimo pusperiodį. Viena alternatyvų padidinti scFv stabilumą yra jo sujungimas (angl. fusion) su IgG Fc domenu. Baltymas scFv-Fc yra panašus į imunoglobuliną, dimerizuojasi ir atstatomas jo avidiškumas. Rekombinantiniai nepilno ilgio antikūnai, įskaitant ir scFv gali būti sintetunami bakterijų ir mielių ląstelėse, nes jų aktyvumui nereikalingas glikozilinimas. Sintezė bakterijų ir mielių ląstelėse yra pigi, gaunami dideli biomasės kiekiai, skirtingai nei sintezė žinduolių ląstelėse. Tačiau sintetunami E.coli ląstelėse scFv būna neteisingai suvynioti (angl. folded) ir praradę antigenus rišantį aktyvumą. VU GMC Eukariotų genų inžinerijos laboratorijose (EGIL) sukurti modifikuoti mielių *S.cerevisiae* kamienai yra naudojami heterologinių peptidų ar nedidelių baltymų raiškai ant į virusus panašių dalelių (VLP) paviršiaus (53–55). ScFv sekrecija mielių ląstelėse nebuvo itin sėkminga dėl mažo sintezės lygio; sekreciniai mielių kamienai heterologinių baltymų raiškai dar kuriami EGIL.

Žiurkėno poliomos viruso (HaPyV, a hamster polyomavirus) dalelės elektroniniu mikroskopu buvo aptiktos odos epitelioje (55). Tai nedidelės, apie 40 nm diametro dalelės, turinčios ikosaedrinę struktūrą. Kristalinė viriono struktūra buvo išspręsta ir nustatyta, jog poliomos viruso kapsidės susideda iš 72 pentamerų, suformuotų iš 360 kapsidės baltymo VP1. Kiti minoriniai kapsidės baltymai VP2 ar VP3 rišasi su VP1 santykiu 1:10. VLP gali būti pagaminamos iš vieno ar kelių struktūrinių baltymų, šiuos rekombinantinius baltymus sintetinant ląstelėse. Baltymai spontaniškai susirenka į struktūras, kurios panašios į natūralius virusus. Šios VLP yra neinfektyvios, nes neturi viruso genetinės medžiagos. HaPyV VLP yra sėkmingai naudojamos kaip nedidelių peptidų nešėjas, nes VLP sudarantys baltymai toleruoja nedidelius skirtingo ilgio ir kilmės insertus (nuo 9 iki 120 aminorūgščių) tam tikrose VP1 vietose (56). Žinoma, jog VP2 baltymo C-galinė dalis sąveikauja su VP1 pentameru, todėl EGIL mokslininkai suliejimui su heterologiniu baltymu panaudojo VP2, siekiant gauti šiuos baltymus ant VLP paviršiaus. VU GMC EGIL ir Imunologijos laboratorijos (IL) tyrimai parodė, kad VLP susidaro, kai į VP2 įterpiami ir didesni baltymai, būtent scFv (apie 25 kDa). Sukonstruoti scFv prieš bakterijos *Gardnerella* toksiną vaginoliziną buvo eksponuoti HaPyV

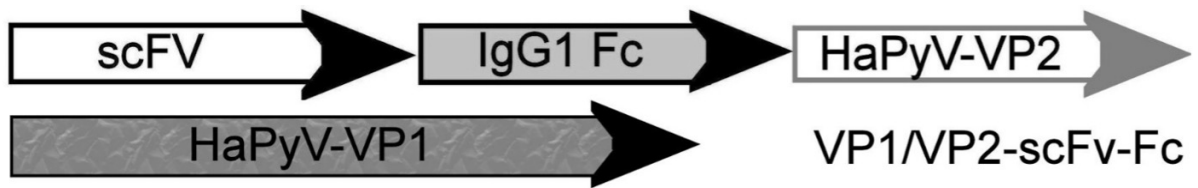
VLP paviršiuje, ir dalelės inaktyvavo hemolitinį toksino poveikį žmogaus eritrocitams (57). Pasirodo, jog Fc dalies (26 kDa) suliejimas su VP2 taip pat buvo toleruojamas ir netrukdė VLP susidarymui. Sukonstruotas scFv-Fc prieš hepatito B paviršiaus antigeną buvo eksponuotas VLP paviršiuje ir neutralizavo hepatito virusą Tupaia belangeri pirminių hepatocitų ląstelėse (54).

Taigi, norint susintetinti ir eksponuoti scFv sukurtus prieš ACT-14 β -laktamazę, buvo panaudotas VU GMC EGIL sukurtas mielių raiškos vektorius pFGG3/VP1-VP2-Fc-Bgnew (15. pav.), kuriame:

1. Yra genai, koduojantys didįjį (VP1) ir mažąjį (VP2) žiurkėno poliomos viruso kapsidės baltymus (angl. hamster polyomavirus (HaPyV)-derived capsid proteins).
2. Žmogaus IgG1 Fc koduojantis genas yra sulietas su VP2 baltymą koduojančiu genu.
3. VP1 ir VP2-Fc yra sintetinami kartu 214C *S.cerevisiae* kamiene. Baltymus koduojantys genai yra po skirtingais RNR polimerazių promotoriais, todėl baltymo VP1 pagaminama daugiau nei VP2, taip išlaikomas gamtiniame viruse aptinkamas baltymų VP1/VP2 santykis.
4. Prieš Fc koduojantį geną plazmidėje yra XbaI ir BglII restrikcijos endonukleazių taikiniai, per kuriuos klonuotas scFv koduojantis genas (16.pav.)

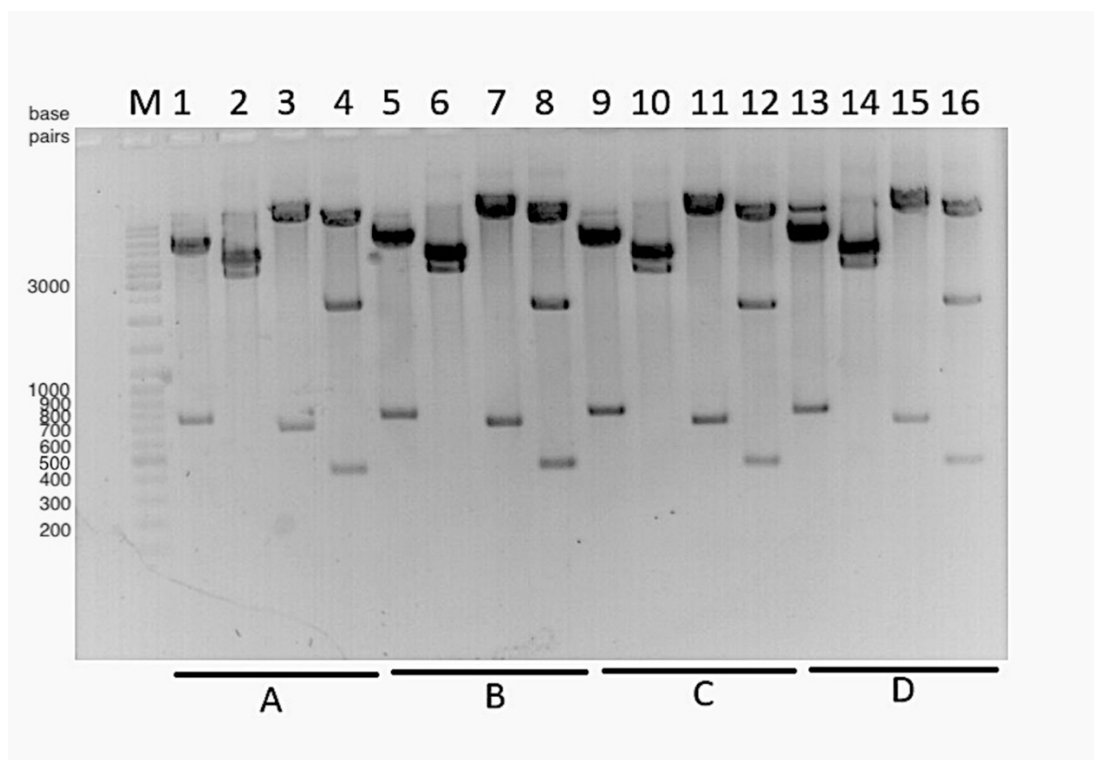


15.pav. Plazmidės pFGG3/VP1-VP2-Fc-Bgnew žemėlapis.



16.pav. Schematinis baltymų, sintetinamų mielių ląstelėse pavaizdavimas

ScFv koduojanti DNR dalis klonuota į plazmidę pFGG3/VP1-VP2-Fc-Bgnew per restrikcijos endonukleazių XbaI ir BglII taikinius: šiais fermentais iš scFv koduojantis DNR fragmentas (760 bp) iškirptas iš pJET1.2-V_L-L-V_H ir klonuotas į vektorių, suskaldytą tomis pačiomis restrikcijos endonukleazėmis. Rekombinantinė plazmidė, pavadinta pFGG3/VP1-VP2-Fc-scFv, transformuota į E.coli DH10B kamieną. Rekombinantiniai klonai patikrinti, išgryninus plazmidę pFGG3/VP1-VP2-Fc-scFv ir ją sukarpus restrikcijos endonukleazėmis (17.pav.). Naudotos restrikcijos endonukleazių kombinacijos, skaldančios išgrynintą plazmidę į skirtingo ilgio fragmentus: BglII ir BamHI (404 bp, 2193 bp, 9436 bp); XbaI ir XhoI (668 bp, 11365 bp); PstI (3430 bp, 4309 bp, 4294 bp); NdeI ir BglII (739 bp, 5824 bp, 5470 bp). Atlikus elektroforezę su reakcijos mišiniais, gelyje gautų DNR segmentų bazių porų ilgiai atitiko teorinius dydžius. Tai patvirtina, jog scFv fragmentas buvo tinkamai įklonuotas į raiškos vektorių.

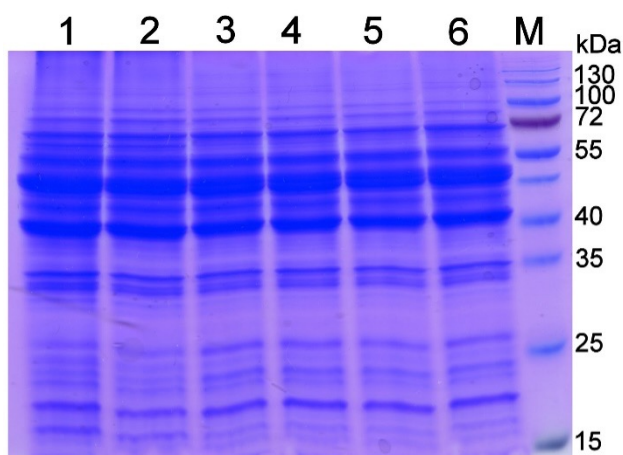


17.pav. *Rekombinantinių plazmidžių tikrinimas restrikcijos endonukleazėmis.*

Takeliuose naudotos restrikcijos endonukleazės: takeliai 1, 5, 9, 13 – NdeI ir BglII; takeliai 2, 6, 10, 14 – PstI; takeliai 3, 7, 11, 15 – XbaI ir XhoI; takeliai 4, 8, 12, 16 – BglII ir BamHI; A,B,C ir D – reakcijos atliktos su plazmidėmis, išgrynintomis iš skirtingų kolonijų. M- DNR molekulinės masės standartas (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific). Kairėje nurodytos bazių porų vertės, atitinkančios standarto juosteles.

3.4. scFv raiška mielėse

Plazmidė pFGG3/VP1-VP2-Fc-scFv transformuota į 214C *S.cerevisiae* kamieną. Mielių rekombinantiniai klonai 48 val. auginti 30°C su 60 µl/100 ml formaldehido. pFGG3/VP1-VP2-Fc plazmidėje yra genas formaldehido dehidrogenazė, todėl formaldehidas yra selektyvus plazmidės žymuo. Keturi rekombinantiniai mielių klonai auginti skystoje YEPD terpėje su 30 µl/100 ml formaldehido; terpės tūris 20 ml. Baltymų raiška indukuota galaktoze. Mielių ląstelės surinktos centrifuguojant ir suardytos su specialiais stiklo rutuliukais, supernatantas surinktas centrifuguojant ir baltymai analizuoti SDS-PAGE (18.pav.). Kontrolei naudotas plazmide netransformuotas mielių 214C *S.cerevisiae* kamienas.

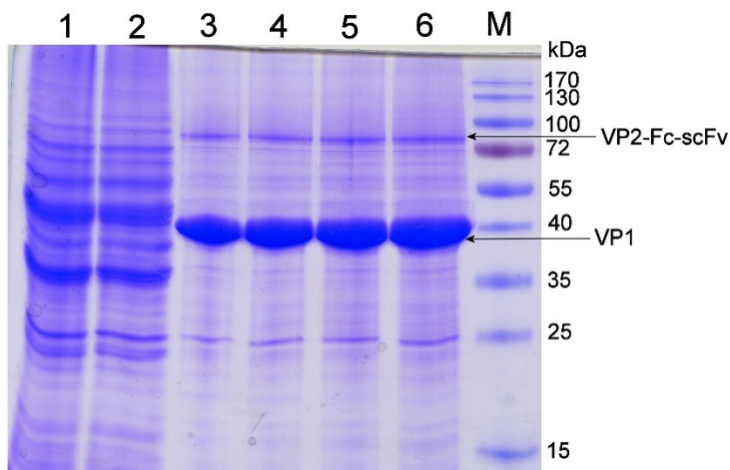


18.pav. *Baltymų VP1/VP2-scFv-Fc sintezės analizė mielių ląstelėse.*

Dažu Coomassie blue nudažytas SDS-PAGE. 1,2 takeliai – kontrolinis mielių kamienas. 3-6 takeliai – rekombinantiniai klonai: *S.cerevisiae* transformuotos plazmide pFGG3/VP1-VP2-Fc-scFv. M – baltymų molekulinės masės standartas (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific). Dešinėje standarto pusėje sužymėta, kokį molekulinį svorį atitinka kiekviena standarto juostelė.

Iš SDS-PAGE vaizdo pateikto 18.pav. sunku įvertinti ar sintetinami VP1 ir baltymas VP2-scFv-Fc, nes nesimato skirtumo tarp kontrolinių ir rekombinantinių klonų baltymų: VP1 molekulinė masė yra 42 kDa, o baltymo VP2-scFv-Fc yra 78 kDa.

Kadangi VP1 ir VP2 baltymai formuoja VLP, kurias galima apvalyti nuo mielių baltymų, panaudojant ultracentrifugavimą 30% sacharozės tirpale, vadinamojoje sacharozės pagalvėje (atliko dr.M.Plečkaitytė). Nusėdusios ant centrifuginio mėgintuvėlio dugno dalelės suspenduotos buferiniame tirpale ir baltymai analizuoti SDS-PAGE (19.pav.).



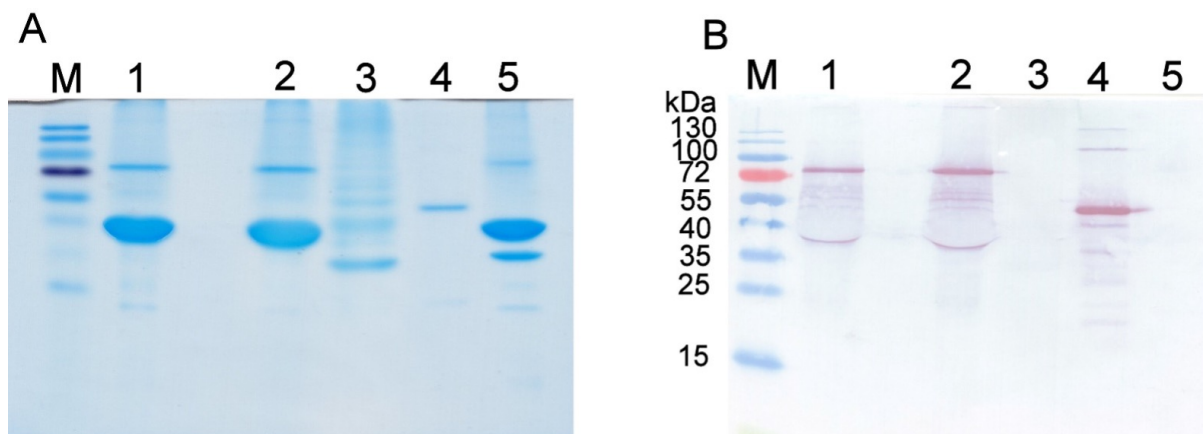
19.pav. VLP, sudarytų iš VP1 ir VP2-Fc-scFv baltymų, išvalytų 30% sacharozės tirpale, analizė SDS-PAGE. Dažu Coomassie blue nudažytas SDS-PAGE.

1, 2 takeliai – grubus mielių ląstelių, transformuotų plazmide pFGG3/VP1-VP2-Fc-scFv lizatas (nevalyta per sacharozės tirpalą). 3-6 takeliai – VLP, susidedančios iš VP1 ir sulieto baltymo VP2-Fc-scFv, išgrynintos, panaudojant sacharozės tirpalą. Pateikta VLP, išgryninti iš keturių rekombinantinių klonų. M – baltymų molekulinės masės standartas (Thermo Fisher Scientific). Dešinėje standarto pusėje sužymėta, kokį molekulinį svorį atitinka kiekviena standarto juostelė. Rekombinantiniai susintetinti baltymai pažymėti rodyklėmis.

Po VLP gryninimo, panaudojant 30% sacharozės tirpalą (19.pav.), matosi VP1 (42kDa) ir VP2-Fc-scFv (78 kDa) baltymai, kurių molekulinės masės gelyje atitinka teoriškai apskaičiuotas vertes. Baltymo VP1 yra daug daugiau, nei sulieto VP2 baltymo, nes, kaip jau minėta anksčiau VP1 su VP2 santykis VLP yra 1:10. VLP gryninimas sacharozės tirpale ultracentrifuguojant yra efektyvus, nes pasišalina mielių baltymai, kurie SDS-PAGE „dengia“ rekombinantinius VLP sudarančius baltymus (18.pav.)

3.5. Sulieto baltymo identifikacija Western blot

Nežiūrint kad VLP baltymai SDS-PAGE buvo aptikti pagal molekulinę masę (19.pav.), jų identifikacija, nustatyta Western blot būdu (20.pav.), panaudojant polikloninius triušio antikūnus prieš žmogaus IgG (atliko VU GMC IL studentė Adrija Buturlakina). Tuo tikslu padarytas SDS-PAGE ir baltymai nuo gelio pernešti ant 0,45 um PVDF membranos (Roth, Vokietija). Membrana blokuota 2% pieno miltelių PBS buferiniame tirpale, ir inkubuota 1 val. kambario temperatūroje su 1000x skiestais polikloniniais triušio antikūnais prieš žmogaus IgG (Polyclonal Rabbit Anti-Human IgG/HRP). Antikūnai buvo konjuguoti su krienų peroksidaze (HPR), o tai leidžia antigeno-antikūno sąveikos detekcijai panaudoti krienų peroksidazės substratą – 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (NeA-Blue Precip TMB, Clinical Science Products).



20.pav. VLP, sudarytų iš VP1 ir VP2-Fc-scFv baltymų, analizė Western blot.

A. Dažytas SDS-PAGE gelis. B. Western blot su HPR-konjuguotais antikūnais prieš žmogaus IgG. 1, 2 takeliai – VLP, susidedančios iš VP1 ir sulieto baltymo VP2-Fc-scFv, išgrynintos, panaudojant sacharozės tirpalą. 3 takelis – netransformuotų plazmide mielių ląstelių lizatas. 4 takelis – IgG klasės monokloninis antikūnas (kontrolė). 5 takelis – rekombinantinių baltymų VP1/VP2 mišinys.

Polikloniniai antikūnai prieš žmogaus IgG reaguoja su sulietu baltymu VP2-Fc-scFv (3.13 pav. B, 1 ir 2 takeliai), bet nereaguoja su mielių baltymais (3 takelis) ir baltymų VP1/VP2 mišiniu, kurie neturi jokio heterologinio inserto. Antikūnai yra aktyvūs, nes sąveikauja su teigiama kontrole – žmogaus IgG.

4. IŠVADOS

1. Imunoglobulino sunkiosios (V_H) ir lengvosios (V_L) grandinių variabiliosios dalys amplifikuotos, panaudojant RNR, išskirtą iš hibridomos ląstelių, sintetinių monokloninį antikūną prieš ACT-14 β -laktamazę.
2. Sunkiosios (V_H) ir lengvosios (V_L) grandinių variabiliosios dalys klonuotos ir sujungtos peptidiniu jungtuku, koduojančiu (SG₄)₄ seką: sukurta genetinė konstrukcija, koduojanti rekombinantinį viengrandį antikūną (scFv) prieš ACT-14 β -laktamazę.
3. DNR fragmentas, koduojantis viengrandžio antikūno fragmentą (scFv) buvo įklonuotas į mielių raiškos vektorių, suliejant su imunoglobulino G1 Fc domenu ir žiurkėno poliomos viruso kapsidės VP2 baltymu: gauta VP2-Fc-scFv konstrukcija.
4. Rekombinantinių VP1 ir VP2-Fc-scFv baltymų sintezė aptikta elektroforeze poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (SDS-PAGE) bei imunologiniu Western blot metodu, panaudojant antikūnus prieš VP1 ir VP2 baltymus.

REKOMENDACIJOS

1. Rekomenduojama patikrinti sukonstruoto rekombinantinio baltymo veikimą prieš antigeną – ACT-14 β -laktamazę. Tyrimui reikėtų turėti bakterijų kamienus, kurie sintetina ACT-14 β -laktamazę, atpažįstamą sukonstruoto viengrandžio antikūno fragmento.

SANTRAUKA

Izabelės Makūnaitės magistro baigiamasis darbas „Viengrandžio antikūno fragmento konstravimas“; Mokslinio darbo vadovė dr. Milda Plečkaitytė; Vilniaus Universitetas, Medicinos fakultetas, Biomedicinos mokslų institutas (Farmacijos ir farmakologijos centras), Vilnius, 2024.

Tikslas: sukonstruoti viengrandį antikūno fragmentą prieš ACT-14 β -laktamazę, panaudojant į virusus panašių dalelių platformą.

Darbo uždaviniai: Iš hibridomos prieš ACT-14 β -laktamazę, klonuoti imunoglobulino sunkiosios (V_H) ir lengvosios grandinių (V_L) variabiliąsias dalis; Sujungti lengvosios ir sunkiosios grandinių variabiliąsias dalis peptidiniu jungtuku, sukuriant genetinę konstrukciją, koduojančią rekombinantinį viengrandžio antikūno fragmentą scFv; Klonuoti scFv į mielių raiškos plazmidę, suliejant su žmogaus imunoglobulino Fc domenu ir žiurkėno poliomos viruso baltymu VP2; Gauti sulieto rekombinantinio baltymo VP2-Fc-scFv sintezę mielių ląstelėse.

Tyrimo objektas ir metodai: viengrandis antikūno fragmentas prieš bakterinę β -laktamazę ACT-14 sukonstruotas panaudojus rekombinantinės DNR technologiją. Genų amplifikacija ir kitos klonavimo procedūros atliktos, panaudojant polimerazės grandininę reakciją. DNR fragmentai ir polimerazės grandininės reakcijos produktai tikrinti atlikus elektroforezę agarozės geliuose. Atliktas rekombinantinių plazmidžių transformavimas į *E.coli* bei mielių ląsteles. Rekombinantinio baltymo sintezės vertinimas ir analizė atlikta pritaikius elektroforezę poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (SDS-PAGE) ir Western blot metodu.

Rezultatai ir išvados: iš hibridomos ląstelių, sintetusių monokloninius antikūnus prieš ACT-14 β -laktamazę, išskirta RNR panaudota genų, koduojančių lengvosios (V_L) ir sunkiosios (V_H) grandinės variabiliąsias sritis, amplifikacijai. Genų amplifikacija atlikta nuo cDNR polimerazės grandininės reakcijos (PCR) būdu, panaudojant DNR sekoms komplementarius pradmenis. V_L ir V_H fragmentai sujungti PCR būdu per jungtuką (L). Sukurta genetinė V_L -L- V_H konstrukcija, koduojanti rekombinantinį viengrandį antikūno fragmentą (scFv) prieš ACT-14 β -laktamazę, kuri buvo įklonuota į mielių raiškos vektorius, sujungtą su IgG Fc domenu bei žiurkėno poliomos viruso kapsidės VP2 baltymu. Mielų ląstelėse sintetinami rekombinantiniai baltymai VP1 ir VP2-Fc-scFv aptikti pagal molekulinę masę, atlikus elektroforezę poliakrilamido gelyje denatūruojančiomis sąlygomis (SDS-PAGE). Sukonstruotas viengrandis antikūno fragmentas prieš ACT-14 β -laktamazę identifikuotas Western blot metodu, panaudojant polikloninius triušio antikūnus prieš žmogaus IgG.

SUMMARY

Izabelė Makūnaitė's Master's thesis is titled "Construction of a Single Chain Variable Fragment Antibody"; Supervisor of the research is dr. Milda Plečkaitytė; Vilnius University; Faculty of Medicine; Institute of Biomedical Sciences (Pharmacy and Pharmacology Center), Vilnius, 2024.

Aim of the thesis: to construct a single-chain antibody fragment against the ACT-14 β -lactamase using a virus-like particle platform.

Task of the research: to clone immunoglobulin the heavy (V_H) and light (V_L) chain variable regions from a hybridoma against the ACT-14 β -lactamase; to join the variable regions of the light and heavy chains with a peptide linker, to create a genetic construction encoding a recombinant single-chain antibody fragment (scFv); to clone the scFv into the yeast expression plasmid by the fusion with the Fc domain of the human immunoglobulin and the hamster polyomavirus protein VP2; to obtain the synthesis of the fusion recombinant protein VP2-Fc-scFv in yeast cells.

The object and methods of the research: A single-chain antibody fragment against the bacterial ACT-14 β -lactamase was constructed using recombinant DNA technology. Gene amplification and other cloning procedures were performed using the polymerase chain reaction. DNA fragments and polymerase chain reaction products were checked by performing electrophoresis on agarose gels. Recombinant plasmids were transformed into E.coli cells and yeast cells. Assessment and analysis of the recombinant protein synthesis was carried out using polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) and the Western blot method.

The results and conclusions of the research: RNA was isolated from hybridoma cells that synthesized monoclonal antibodies against ACT-14 β -lactamase was used for amplification of genes encoding the variable regions of the light (V_L) and heavy (V_H) chains. Gene amplification was performed by polymerase chain reaction (PCR) from cDNA using primers complementary to DNA sequences. The V_L and V_H fragments were joined by PCR using a linker (L). Genetic V_L -L- V_H construction encoding the recombinant scFv antibody fragment against ACT-14 β -lactamase was created and cloned into a yeast expression vector fused with IgG Fc domain and hamster polyomavirus capsid protein VP2. Recombinant proteins VP1 and VP2-Fc-scFv synthesized in yeast cells were detected by their molecular weight through performing SDS-PAGE electrophoresis. The constructed single-chain antibody fragment against ACT-14 β -lactamase was identified by the Western blot method using polyclonal Rabbit Anti-Human IgG.

PADĖKA

Noriu išreikšti nuoširdžią padėką magistro darbo vadovei dr. Mildai Plečkaitytei už pagalbą bei suteiktą galimybę Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto laboratorijoje atlikti mokslinį darbą – viengrandžio antikūno fragmento konstravimą. Taip pat darbo vadovei dėkoju už skirtą laiką bei pasidalinimą žiniomis, praplėtusiomis suvokimą genetikos srityje.

Atskirą padėką skiriu žmonėms, prisidėjusiems prie šio darbo atlikimo: VU, GMC, Imunologijos laboratorijos prof. A.Žvirblienei už dovanotas hibridomas ląsteles; VU, GMC, Imunologijos laboratorijos studentei Adrijai Buturlakinai už atliktą Western blot tyrimą.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Hoffman W, Lakkis FG, Chalasani G. B Cells, Antibodies, and More. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN*. 2016 Jan 7;11(1):137–54.
2. Lyu X, Zhao Q, Hui J, Wang T, Lin M, Wang K, et al. The global landscape of approved antibody therapies. *Antib Ther*. 2022 Sep 6;5(4):233–57.
3. Carter PJ, Rajpal A. Designing antibodies as therapeutics. *Cell*. 2022 Jul 21;185(15):2789–805.
4. Wang Z, Wang G, Lu H, Li H, Tang M, Tong A. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Mol Biomed*. 2022 Nov 22;3:35.
5. Freise AC, Wu AM. *In vivo* imaging with antibodies and engineered fragments. *Mol Immunol*. 2015 Oct 1;67(2, Part A):142–52.
6. Laustsen AH, María Gutiérrez J, Knudsen C, Johansen KH, Bermúdez-Méndez E, Cerni FA, et al. Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development. *Toxicon*. 2018 May 1;146:151–75.
7. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, Ho WY, Alitheen NBM, Hamid M. scFv Antibody: Principles and Clinical Application. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:980250.
8. Jørgensen ML, Friis NA, Just J, Madsen P, Petersen SV, Kristensen P. Expression of single-chain variable fragments fused with the Fc-region of rabbit IgG in *Leishmania tarentolae*. *Microb Cell Factories*. 2014 Jan 15;13:9.
9. Ma H, O’Kennedy R. Recombinant antibody fragment production. *Methods*. 2017 Mar 1;116:23–33.
10. Rose NR. Prediction and Prevention of Autoimmune Disease in the 21st Century: A Review and Preview. *Am J Epidemiol*. 2016 Mar 1;183(5):403–6.
11. Forthall DN. Functions of Antibodies. *Microbiol Spectr*. 2014 Aug 15;2(4):1–17.
12. Stanfield RL, Wilson IA. Antibody Structure. *Microbiol Spectr*. 2014 Mar 21;2(2):10.1128/microbiolspec.aid-0012–2013.
13. O’Kennedy R, Murphy C, Lysakova-Devine T. Technology advancements in antibody purification. *Antib Technol J*. 2016 Aug 1;Volume 6:17–32.
14. Dondelinger M, Filée P, Sauvage E, Quinting B, Muyldermans S, Galleni M, et al. Understanding the Significance and Implications of Antibody Numbering and Antigen-Binding Surface/Residue Definition. *Front Immunol*. 2018 Oct 16;9:2278.
15. Sun Y, Huang T, Hammarström L, Zhao Y. The Immunoglobulins: New Insights, Implications, and Applications. *Annu Rev Anim Biosci*. 2020;8(1):145–69.
16. August A. IMMUNOGLOBULINS. In: Laurent GJ, Shapiro SD, editors. *Encyclopedia of Respiratory Medicine* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2006 [cited 2024 Feb 7]. p. 314–20. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123708796001848>

17. Townsend CL, Laffy JMJ, Wu YCB, Silva O'Hare J, Kipling D, Fraternali F, et al. Significant Differences in Physicochemical Properties of Human Immunoglobulin Kappa and Lambda CDR3 Regions. *Front Immunol.* 2016 Sep 27;7:219574.
18. Oostindie SC, Lazar GA, Schuurman J, Parren PWHI. Avidity in antibody effector functions and biotherapeutic drug design. *Nat Rev Drug Discov.* 2022;21(10):715–35.
19. Mitra S, Tomar PC. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *J Genet Eng Biotechnol.* 2021 Oct 18;19:159.
20. Chiu ML, Gilliland GL. Engineering antibody therapeutics. *Curr Opin Struct Biol.* 2016 Jun 1;38:163–73.
21. Kunert R, Reinhart D. Advances in recombinant antibody manufacturing. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016 Apr 1;100(8):3451–61.
22. Groff K, Brown J, Clippinger AJ. Modern affinity reagents: Recombinant antibodies and aptamers. *Biotechnol Adv.* 2015 Dec 1;33(8):1787–98.
23. Bayer V. An Overview of Monoclonal Antibodies. *Semin Oncol Nurs.* 2019 Oct 1;35(5):150927.
24. Fiedler L. Antibody Based Therapy in Coronary Artery Disease and Heart Failure. *Heart Res - Open J.* 2017 Jul 11;4:39–45.
25. Sandomenico A, Sivaccumar JP, Ruvo M. Evolution of Escherichia coli Expression System in Producing Antibody Recombinant Fragments. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan;21(17):6324.
26. Chen W, Yuan Y, Jiang X. Antibody and antibody fragments for cancer immunotherapy. *J Controlled Release.* 2020 Dec 10;328:395–406.
27. Nelson AL. Antibody fragments. *mAbs.* 2010;2(1):77–83.
28. Shahidian A, Ghassemi M, Mohammadi J, Hashemi M. 4 - Immunotherapy. In: Shahidian A, Ghassemi M, Mohammadi J, Hashemi M, editors. *Bio-Engineering Approaches to Cancer Diagnosis and Treatment* [Internet]. Academic Press; 2020 [cited 2024 Feb 8]. p. 69–114. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128178096000042>
29. Rodríguez-Nava C, Ortuño-Pineda C, Illades-Aguiar B, Flores-Alfaro E, Leyva-Vázquez MA, Parra-Rojas I, et al. Mechanisms of Action and Limitations of Monoclonal Antibodies and Single Chain Fragment Variable (scFv) in the Treatment of Cancer. *Biomedicines.* 2023 Jun;11(6):1610.
30. Lou H, Cao X. Antibody variable region engineering for improving cancer immunotherapy. *Cancer Commun.* 2022 Jul 13;42(9):804–27.
31. Pleckaityte M, Zvirbliene A, Sezaitė I, Gedvilaite A. Production in yeast of pseudotype virus-like particles harboring functionally active antibody fragments neutralizing the cytolytic activity of vaginolysin. *Microb Cell Factories.* 2011 Dec 15;10:109.
32. Malpiedi LP, Díaz CA, Nerli BB, Pessoa A. Single-chain antibody fragments: Purification methodologies. *Process Biochem.* 2013 Aug 1;48(8):1242–51.
33. Pirkalkhoran S, Grabowska WR, Kashkoli HH, Mirhassani R, Guiliano D, Dolphin C, et al. Bioengineering of Antibody Fragments: Challenges and Opportunities. *Bioengineering.* 2023 Feb;10(2):122.

34. Sarker A, Rathore AS, Gupta RD. Evaluation of scFv protein recovery from *E. coli* by in vitro refolding and mild solubilization process. *Microb Cell Factories*. 2019 Jan 14;18(1):5.
35. Fernandes JC. Therapeutic application of antibody fragments in autoimmune diseases: current state and prospects. *Drug Discov Today*. 2018 Dec 1;23(12):1996–2002.
36. Goulet DR, Atkins WM. Considerations for the Design of Antibody-Based Therapeutics. *J Pharm Sci*. 2020 Jan;109(1):74–103.
37. Zeng X, Shen Z, Mernaugh R. Recombinant antibodies and their use in biosensors. *Anal Bioanal Chem*. 2012 Apr 1;402(10):3027–38.
38. Walsh SJ, Bargh JD, Dannheim FM, Hanby AR, Seki H, Counsell AJ, et al. Site-selective modification strategies in antibody–drug conjugates. *Chem Soc Rev*. 2021 Feb 1;50(2):1305–53.
39. Ochi T, Maruta M, Tanimoto K, Kondo F, Yamamoto T, Kurata M, et al. A single-chain antibody generation system yielding CAR-T cells with superior antitumor function. *Commun Biol*. 2021 Mar 2;4(1):1–13.
40. Laurence A. CAR-T cells, the first pharmaceutical cell therapy. *Transfus Apher Sci*. 2023 Oct 1;62(5):103754.
41. Brolicuzumab for macular degeneration. *Aust Prescr*. 2020 Aug;43(4):133.
42. Labrijn AF, Janmaat ML, Reichert JM, Parren PWHI. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Aug;18(8):585–608.
43. Pohanka M. Monoclonal and polyclonal antibodies production - Preparation of potent biorecognition element. *J Appl Biomed*. 2009 Jul 31;7.
44. Muñoz-López P, Ribas-Aparicio RM, Becerra-Báez EI, Fraga-Pérez K, Flores-Martínez LF, Mateos-Chávez AA, et al. Single-Chain Fragment Variable: Recent Progress in Cancer Diagnosis and Therapy. *Cancers*. 2022 Aug 30;14(17):4206.
45. Pillai-Kastoori L, Schutz-Geschwender AR, Harford JA. A systematic approach to quantitative Western blot analysis. *Anal Biochem*. 2020 Mar 15;593:113608.
46. Meftahi GH, Bahari Z, Zarei Mahmoudabadi A, Iman M, Jangravi Z. Applications of western blot technique: From bench to bedside. *Biochem Mol Biol Educ*. 2021;49(4):509–17.
47. Cui X, Vasylieva N, Shen D, Barnych B, Yang J, He Q, et al. Biotinylated Single-Chain Variable Fragment-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Glycocholic Acid. *The Analyst*. 2018 Apr 30;143(9):2057–65.
48. Shen J, Zhou T, Huang R. Recent Advances in Electrochemiluminescence Sensors for Pathogenic Bacteria Detection. *Micromachines*. 2019 Aug 13;10(8):532.
49. Antoine D, Mohammadi M, Vitt M, Dickie JM, Jyoti SS, Tilbury MA, et al. Rapid, Point-of-Care scFv-SERS Assay for Femtogram Level Detection of SARS-CoV-2. *ACS Sens*. 2022 Mar 25;7(3):866–73.
50. Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, Bosshard HR, et al. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods*. 1997 Feb 14;201(1):35–55.
51. Orlandi R, Güssow DH, Jones PT, Winter G. Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 May;86(10):3833–7.

52. IgBlast tool [Internet]. [cited 2024 Jan 26]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>
53. Sasnauskas K, Bulavaite A, Hale A, Jin L, Knowles WA, Gedvilaite A, et al. Generation of Recombinant Virus-Like Particles of Human and Non-Human Polyomaviruses in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Intervirology*. 2002;45(4–6):308–17.
54. Pleckaityte M, Bremer CM, Gedvilaite A, Kucinskaite-Kodze I, Glebe D, Zvirbliene A. Construction of polyomavirus-derived pseudotype virus-like particles displaying a functionally active neutralizing antibody against hepatitis B virus surface antigen. *BMC Biotechnol*. 2015 Sep 15;15:85.
55. Jandrig B, Krause H, Zimmermann W, Vasiliunaite E, Gedvilaite A, Ulrich RG. Hamster Polyomavirus Research: Past, Present, and Future. *Viruses*. 2021 May 13;13(5):907.
56. Gedvilaite A, Zvirbliene A, Staniulis J, Sasnauskas K, Krüger DH, Ulrich R. Segments of Puumala Hantavirus Nucleocapsid Protein Inserted into Chimeric Polyomavirus-Derived Virus-Like Particles Induce a Strong Immune Response in Mice. *Viral Immunol*. 2004 Mar;17(1):51–68.
57. Pleckaityte M, Zvirbliene A, Sezaite I, Gedvilaite A. Production in yeast of pseudotype virus-like particles harboring functionally active antibody fragments neutralizing the cytolytic activity of vaginolysin. *Microb Cell Factories*. 2011 Dec 15;10:109.