Abstract (บทคัดย่อ)

Project Code : RMU5180021

Project Title : Molecular Design and Prediction of Antibody-Antigen Structure

(ชื่อโครงการ): การออกแบบเชิงโมเลกุลและการทำนายโครงสร้างแอนติบอดีและแอนติเจน

Investigator : Dr. Vannajan Sanghiran Lee

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University

(ชื่อนักวิจัย): ดร. วรรณจันทร์ แสงหิรัญ ลี

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address : vannajan@gmail.com

Project Period : May 16, 2008 – May 15, 2011

(ระยะเวลาโครงการ) 16 พฤษภาคม 2551 - 15 พฤษภาคม 2554

Abstract

Computational assisted modeling was carried out for several systems such as scFv anti-p17, scFv G46 (scFv binds with HIV epitope p17 which is still attached to p24), and antibody-CD147. The models were built by homology modeling and evaluate with Ramachadran plot and PROCHECK. Molecular docking has been performed to obtain the complex structure of antibody and antigen. In this study, scFv against HIV-1 epitope at the C-terminal on p17 (scFv anti-p17) was mainly used as a candidate molecule for evaluating the method. The wild-type p17 and its nine natural mutants were docked with scFv anti-p17. Potential mean force (PMF) scores predicted the most favorable binding interaction, and the correlation agreed well with the corresponding activity data from the peptide based on competitive ELISA. In the interaction with solvent molecules, the 3D structures of scFv anti-p17 and selected peptide epitopes were further investigated by molecular dynamics (MDs) simulation with the AMBER 9 program. Post-processing of the snapshot at equilibrium was performed to evaluate the binding free energy and pairwise decomposition or residue-based energy calculation of complexes in solution using the Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) protocol. Our results demonstrated that the specific residues located in the complementary determining regions (CDRs) of scFv anti-p17, MET100, LYS101, ASN169, HIS228, and LEU229, play a crucial role in the effective binding interaction with the absolute relative decomposed energy more than 2.00 kcal/mol in comparison to the original substrate. A computational alanine scanning mutagenesis was submitted to quest for the residues in the energetic contribution of the mutation sites in scFv anti-p17 binding free energy with p17 c-terminal peptide alternatives. The result demonstrated several influenced amino acid residues in the scFv binding pocket i.e. ASP31, ASN35, TRP50, MET100, LYS101, SER103, TYR104, SER162, ASN169, LEU185, LYS188, ASP190, TRP224, GLN225, and LEU229. A candidate point mutation, M100R and M100G, were found to improve remarkably improved the binding activity scFv anti-p17 of by the indirect ELISA. However, some concerns on the correlation between the theoretical and experimental results of competitive and indirect ELISA have been raised in several cases.

Besides, intracellularly expressed antibody fragments (intrabodies) have been used as powerful tools for clinical applications and for the functional analysis of proteins inside the cell. Among several types of intrabodies, single chain fragment variables (scFv) composed of only the variable regions (VH or VL) of antibodies are the smallest and thus the easiest to design. However, normal antibody fragments do not form disulfide bonds in the cytoplasm and usually are unable to achieve a stable native fold in the absence of the disulfide bonds. Recently, the crystal structure of anti-RAS VH and VL fragments without disulfide bonds after substitution of cysteine residues and the wild type VH and VL with intact disulfide bonds showed no structural differences between the two types of the VH and VL. Another system of interest is the soluble scFv in cytoplasm. There is great interest in engineering antibody fragments that will fold and are stable under reducing conditions, and that could serve as framework to which other specificities could be grafted. We have undertaken molecular dynamics simulations to investigate the two types of such systems with and without disulfide bonds. The structural analysis in term of distance geometry analysis, hydrogen bond analysis, residue interactions, the disulfide strain energy and binding affinity between the domain, were observed in order to explain the stability of the antibody scFv fragments. The experimental study is still ongoing for comparison with the calculation results.

Keywords : Molecular design, Antibody-antigen, HIV-1, Single chain Fv, Docking, Molecular dynamics

บทคัดย่อ

การโมเดลโดยใช้คอมพิวเตอร์ในหลายระบบเช่น scFv anti-p17, scFv G46 ที่ยึดกับ HIV epitope บน p17 ที่ไม่จำเป็นต้องถูก cleave ออกจาก p24 และ แอนติบอดี-CD147 ด้วยการทำโฮโมโลยีโมเดลลิงและประเมินโครงสร้างจากกราฟรามาชานดรานและโปรเซค ใช้ด็อกกิงเชิงโมเลกลสร้างโครงสร้างเชิงซ้อนระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน ในงานวิจัยนี้ศึกษา scFv ต่อ HIV-1 อิพิโทปบริเวณปลาย C-terminal ที่ p17 (scFv anti-p17) โดยด็อกเปปไทด์ wild-type p17 และมิวแตนท์อีก 8 ตัวที่พบในธรรมชาติกับ scFv anti-p17 ใช้ Potential mean force (PMF) ซึ่งเป็นพลังงานที่สอดคล้องกับข้อมูลการทดลอง competitive ELISA สำหรับอันตรกิริยาน้ำใช้การจำลองพลศาสตร์ของโครงสร้างเชิงซ้อนในน้ำด้วยโปรแกรม AMBER 9 ใช้โครงสร้างที่สมดุลในการคำนวณพลังงานยึดจับอิสระ พลังงานย่อยทีละคู่ หรือ พลังงานแต่ละหมู่อะมิโนโดยใช้ Molecular Mechanics Poisson–Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) พบว่าหมู่อะมิโนบริเวณ CDRs ที่สำคัญและมีค่าพลังงานยึดจับสัมบูรณ์สัมพัทธ์เทียบกับสารแอนติเจนดั้งเดิมมากกว่า 2.00 kcal/mol ได้แก่ MET100, LYS101, ASN169, HIS228, และ LEU229 เมื่อทำอะลานีนสแกนนิงโดยคอมพิวเตอร์พบว่าหมู่อะมิโนที่มีผลกระทบได้แก่ ASP31, ASN35, TRP50, MET100, LYS101, SER103, TYR104, SER162, ASN169, LEU185, LYS188, ASP190, TRP224, GLN225, และ LEU229 เมื่อเปลี่ยนแปลงหมู่อะมิโนของ scFv จาก M100R และ M100G พบว่าประสิทธิภาพการยึดจับของ scFv anti-p17 ดีขึ้นกับเปปไทด์ที่พบในธรรมชาติสอดคล้องกับการทดลอง indirect ELISA อย่างไรก็ตามควรเปรียบเทียบผลการคำนวณ และใช้การทดลองทั้ง competitive และ indirect ELISA อย่างระมัดระวัง

นอกจากนี้การใช้อินทราบอดีในทางคลินิกในการนำโปรตีนเข้าสู่เซลล์ โดยการใช้ส่วนแอนติบอดีสายเดี่ยวที่ประกอบด้วย VH หรือ VL ซึ่งเป็นส่วนขนาดเล็กที่สุดในการออกแบบพบว่ามีปัญหาตรงที่พันธะไดซัลไฟด์ไม่เสถียร และถูกทำลายได้เมื่อเข้าไปอยู่ใน cytoplasm จากข้อมูลโครงสร้างผลึกของ scFv anti-RAS พบว่าเมื่อแทนที่หมู่ซีสเตอีน ด้วยหมู่อื่นปรากฏว่าโครงสร้างยังเสถียรอยู่ได้ อีกระบบที่น่าสนใจคือระบบ scFv ที่ละลายได้ในไซโตพลาสซึม ซึ่งจากโครงสร้างที่พบทำให้สามารถทำวิศวกรรมส่วนของแอนติบอดีที่สามารถม้วนและเสถียรในสภาวะรีดิวซิงได้โดยการกราฟติง โดยศึกษากการจำลองพลศาสตร์ของระบบ scFv ที่มีและไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ วิเคราะห์โครงสร้าง พันธะไฮโดรเจน อันตรกิริยาระหว่างหมู่อะมิโน พลังงานความเครียดในหมู่ไดซัลไฟด์ เพื่ออธิบายความเสถียรของ scFv ซึ่งการศึกษาทางห้องปฏิบัติการยังอยู่ในการดำเนินการเพื่อเปรียบเทียบกับผลการคำนวณ

คำหลัก: การออกแบบเชิงโมเลกุล, แอนติบอดี-แอนติเจน, เอชไอวี-1, Fv สายเดียว, ด็อกกิง, การจำลองพลศาสตร์