



Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

APVV-18-0285

Pochopenie mechanizmu inaktivácie IgG využitím individuálnych molekúl Hsp70 šaperónu a laserovej optickej pinzety

Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Gabriel Žoldák, PhD.**

Príjemca **Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach - Technologický a inovačný park**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Centrum interdisciplinárnych biovied, Technologický a Inovačný Park, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Technická Univerzita Mníchov, Nemecko

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

žiadne

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. Džupponová V, Žoldák G. Aggregation mechanism and branched 3D morphologies of pathological human light chain proteins under reducing conditions. Colloids Surf B Biointerfaces. 2023 Jan;221:112983. doi: 10.1016/j.colsurfb.2022.112983.
2. Singh A, Rief M, Žoldák G. Direct observation of chemo-mechanical coupling in DnaK by single-molecule force experiments. Biophys J. 2022 Dec 6;121(23):4729-4739. doi: 10.1016/j.bpj.2022.09.042.
3. Gala M, Žoldák G. Classifying Residues in Mechanically Stable and Unstable Substructures Based on a Protein Sequence: The Case Study of the DnaK Hsp70 Chaperone. Nanomaterials 2021 Aug 26;11(9):2198. doi: 10.3390/nano11092198.
4. Džupponová V, Huntošová V, Žoldák G. A kinetic coupling between protein unfolding and aggregation controls time-dependent solubility of the human myeloma antibody light chain. Protein Sci. 2020 Dec;29(12):2408-2421. doi: 10.1002/pro.3968

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky tohto projektu majú potenciál mať dôležité uplatnenie v oblasti štúdia protilátok a ich agregácie, a tiež v oblasti prevencie a liečby chorôb súvisiacich s týmito procesmi. Na základe nášho úspešného dokončenia projektu a splnenia všetkých stanovených cieľov sme získali nové poznatky a vytvorili inovatívne technológie, ktoré by mohli mať nasledujúce uplatnenie: Farmaceutický priemysel: Naše štúdie stability IgG a identifikácia kritických stavov IgG nám umožňujú testovať a vyhodnocovať účinnosť rôznych nízkomolekulových

zlúčenín ako potenciálnych anti-agregačných látok. Tieto poznatky môžu byť využité pri vývoji nových liečiv a terapeutických prístupov na zabránenie agregácii protilátok a zlepšenie liečby ochorení spojených s touto problematikou. Biomedicínsky výskum: Naš molekuloý sensor, ktorý sme vyvinuli, ponúka nový prístup k monitorovaniu a detekcii stavov IgG protilátok vedúcich k zhlukovaniu. Tento sensor môže byť využitý v laboratórnych a výskumných prostrediach na štúdium a analýzu interakcií protilátok a ich agregácie. Tieto informácie môžu poskytnúť dôležité poznatky o patogenéze ochorení a prispieť k objaveniu nových cieľov pre terapeutické zásahy. Diagnostika a screening: Naše metódy merania individuálnych molekúl a analýzy senzora môžu mať uplatnenie v diagnostike chorôb spojených s agregáciou protilátok. Napríklad, môžu byť použité na detekciu a monitorovanie protilátok s vyššou tendenciou k agregácii, čo by mohlo slúžiť ako indikátor pre včasnú diagnózu ochorení ako sú amyloidózy alebo autoimunitné ochorenia. Biotechnologický vývoj: Naše poznatky o štruktúre a chovaní senzora a jeho reakcii na rôzne podmienky môžu byť využité v biotechnologickom vývoji a optimalizácii rôznych senzorových systémov. Tieto technológie môžu byť aplikované na sledovanie a analýzu rôznych biologických procesov a interakcií v bunke alebo v prostredí in vitro. Celkovo môžeme konštatovať, že výsledky tohto projektu majú potenciál posunúť naše poznatky o protilátkach a ich agregácii ďalej. Naše inovatívne technológie a poznatky môžu prispieť k vývoju nových terapeutických a diagnostických prístupov a viesť k pokroku v oblasti biomedicínskeho výskumu a biotechnológie.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Prvým cieľom projektu bolo dôkladne analyzovať rôzne stavy IgG protilátok pomocou individuálnych molekúl DnaK šaperónu. Vytvorili sme inovatívny molekuloý sensor, ktorý sme kvantitatívne popísali pomocou pokročilých fyzikálnych konceptov a následne sme ho využili na kinetické modelovanie. Tento sensor sa ukázal byť veľmi charakteristický a inovatívny, a preto sme sa zamerali na identifikáciu nových nízkomolekulových zlúčenín, ktoré by mohli zabrániť agregácii protilátok.

V rámci cieľa 1 sme mali dve paralelné vetvy. V jednej sme sledovali individuálne molekuly pomocou optickej pinzety a v druhej sme využívali tradičné metódy, ako je UV-VIS spektroskopia a mikrokolorimetria, na skúmanie stability IgG. Tieto dve vetvy sme následne porovnávali, čo nám umožnilo kriticky zhodnotiť náš prístup. Vykonali sme viacero experimentov vrátane purifikácie senzora, testovania dlhodobých meraní, prípravy nového senzora s rôznymi štrukturálnymi zmenami a optimalizácie podmienok merania. Tiež sme vykonali merania a kalibráciu senzora pomocou peptidového fragmentu a tepelne poškodených protilátok. V rámci cieľa 2 sme sa zaoberali vývojom teoretických konceptov pre analýzu fluktuujúceho molekuloého senzora. Použili sme Markovove modely na identifikáciu jednotlivých stavov senzora a pravdepodobností prechodov medzi nimi. Okrem toho sme využili sériové autokorelácie a analýzu distribučných momentov na kvantitatívnu analýzu a hodnotenie senzora. Vykonali sme aj kinetické modelovanie senzora a porovnali sme ho s experimentálnymi údajmi. Cieľ 3 sa zameriaval na identifikáciu nízkomolekulových zlúčenín, ktoré by mohli zabrániť zhlukovaniu IgG. Vykonali sme dôkladné štúdie stability IgG a identifikovali sme kritické stavy IgG. Na základe týchto poznatkov sme testovali rôzne knižnice nízkomolekulových látok a hľadali sme nové anti-agregačné zlúčeniny. Použili sme konvenčné metódy aj náš šaperónový sensor na monitorovanie a analýzu efektu týchto látok na teplotnú stabilitu IgG. Analyzovali sme tiež účinky kombinácií viacerých anti-agregačných látok. Celkovo sme dosiahli všetky stanovené ciele projektu. Tento projekt nám poskytol hlbšie porozumenie stavov IgG protilátok a umožnil nám identifikovať nové nízkomolekulové zlúčeniny s anti-agregačnými vlastnosťami. Naše práce prispievajú k rozvoju poznatkov v oblasti štúdia protilátok a môžu mať potenciálne aplikácie v oblasti prevencie a liečby chorôb súvisiacich s agregáciou protilátok.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The first objective of the project was to thoroughly analyze different states of IgG antibodies using individual molecules of the DnaK chaperone. We developed an innovative molecular sensor, which we quantitatively described using advanced physical concepts, and subsequently applied it for kinetic modeling. This sensor has proven to be highly

characteristic and innovative, leading us to focus on the identification of new low-molecular-weight compounds that could prevent antibody aggregation. Under objective 1, we had two parallel branches. In one branch, we monitored individual molecules using optical tweezers, while in the other branch, we utilized traditional methods such as UV-VIS spectroscopy and microcalorimetry to investigate the stability of IgG. We then compared these two branches, which allowed us to critically evaluate our approach. We conducted several experiments, including sensor purification, long-term measurement testing, preparation of a new sensor with various structural modifications, and optimization of measurement conditions. We also performed measurements and calibration of the sensor using peptide fragments and thermally damaged antibodies. Objective 2 focused on the development of theoretical concepts for analyzing the fluctuating molecular sensor. We employed Markov models to identify individual sensor states and transition probabilities between them. Additionally, we utilized serial autocorrelations and analysis of distribution moments for quantitative analysis and evaluation of the sensor. We also performed kinetic modeling of the sensor and compared it with experimental data. Objective 3 aimed at identifying low-molecular-weight compounds that could prevent IgG clustering. We conducted comprehensive studies on IgG stability and identified critical IgG states. Based on these findings, we tested various libraries of low-molecular-weight substances and searched for new anti-aggregation compounds. We used conventional methods to monitor and analyze the effects of these substances on the thermal stability of IgG. We also analyzed the effects of combinations of multiple anti-aggregation compounds.

Overall, we achieved all the set objectives of the project. This project provided us with a deeper understanding of IgG antibody states and enabled us to identify new low-molecular-weight compounds with anti-aggregation properties. Our work contributes to the advancement of knowledge in the field of antibody studies and holds potential applications in the prevention and treatment of antibody aggregation-related diseases.