



Egy mucin glikoprotein immunfelismerése

Uray Katalin

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

2011. december 9.

Mucin glikoproteinek

A mucus (nyálka) alkotórészei

Testcsatornák, mirigyek, belső szervek hámszövetei termelik
Légutak, emésztő- és urogenitális rendszer, nyál

Funkció: Hámfelület védelme a kiszáradástól
mikroorganizmusoktól
fizikai/kémiai ártalmaktól

Nagy molekulatömeg > 200 kDa

A gének és fehérjék ismétlődő szakaszokból állnak

Magas Thr és/vagy Ser tartalom

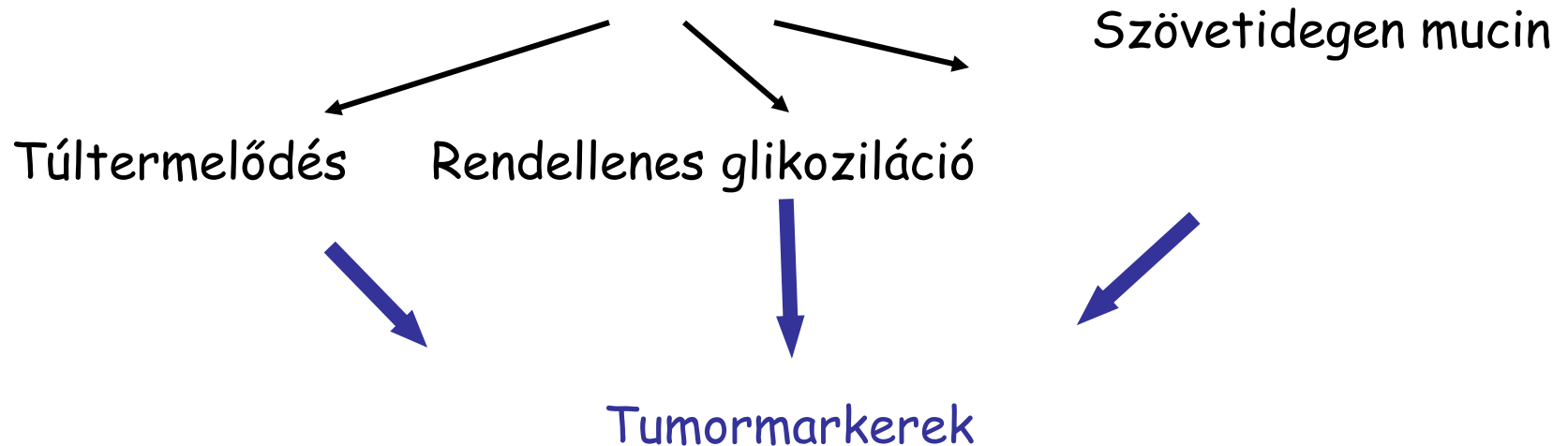
=> O-glikozileződés

> 50 %

Mucinok a rosszindulatú megbetegedésekben

Mucintermelő szövetekből kiinduló karcinómák

=> Mucinok rendellenes termelődése

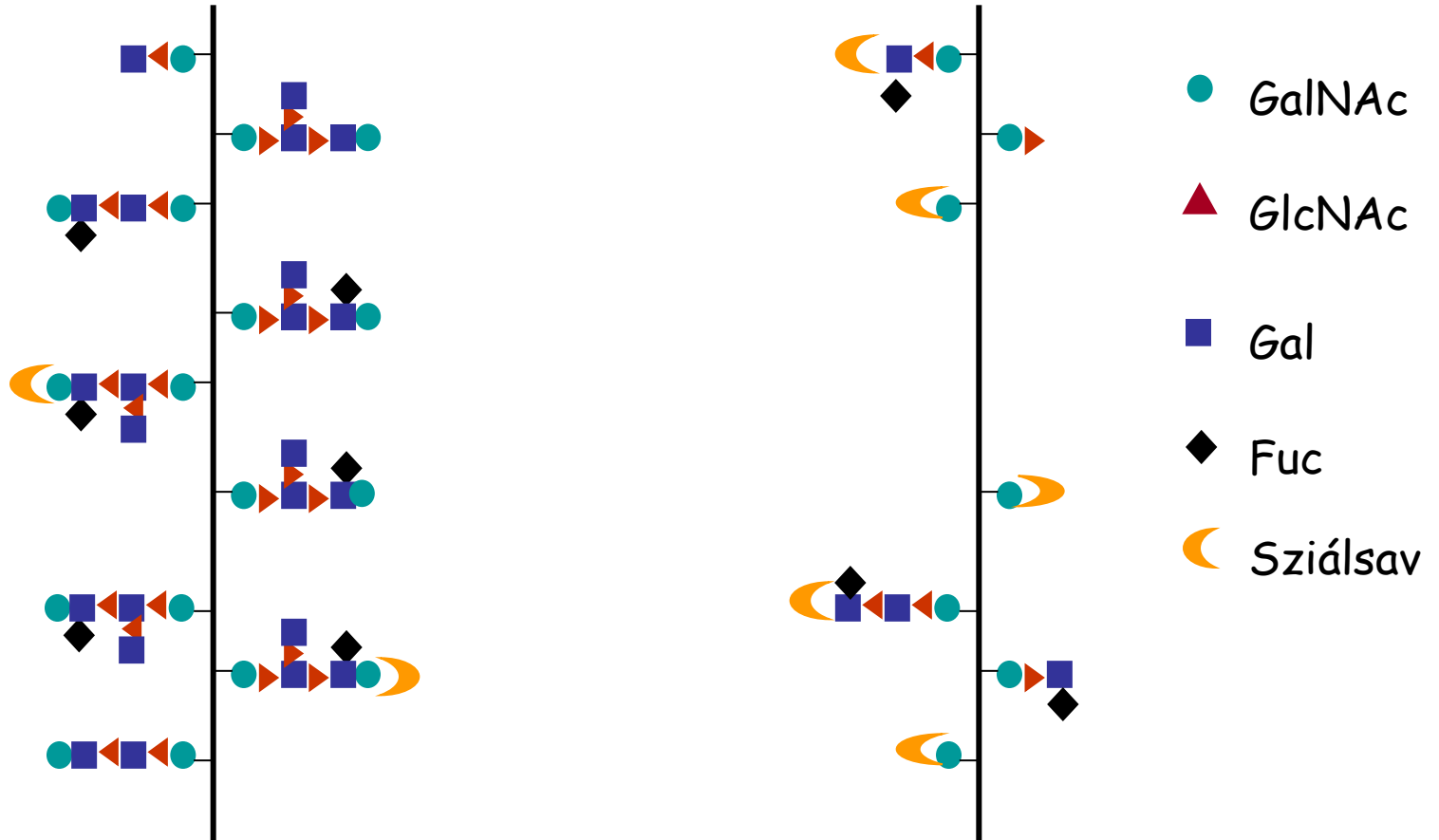


A mucin szénhidrát-oldalláncainak felépülése

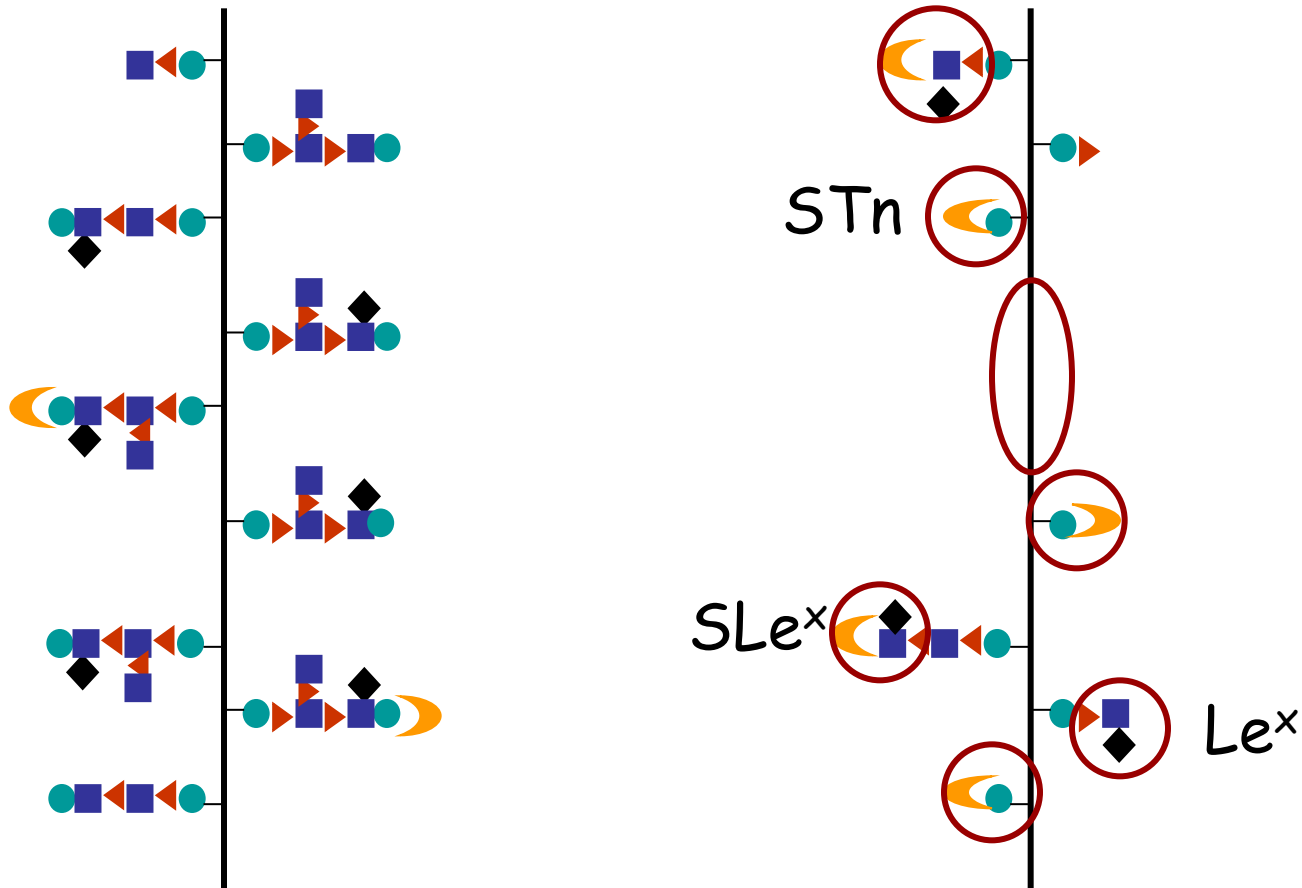
Egészséges

esetben

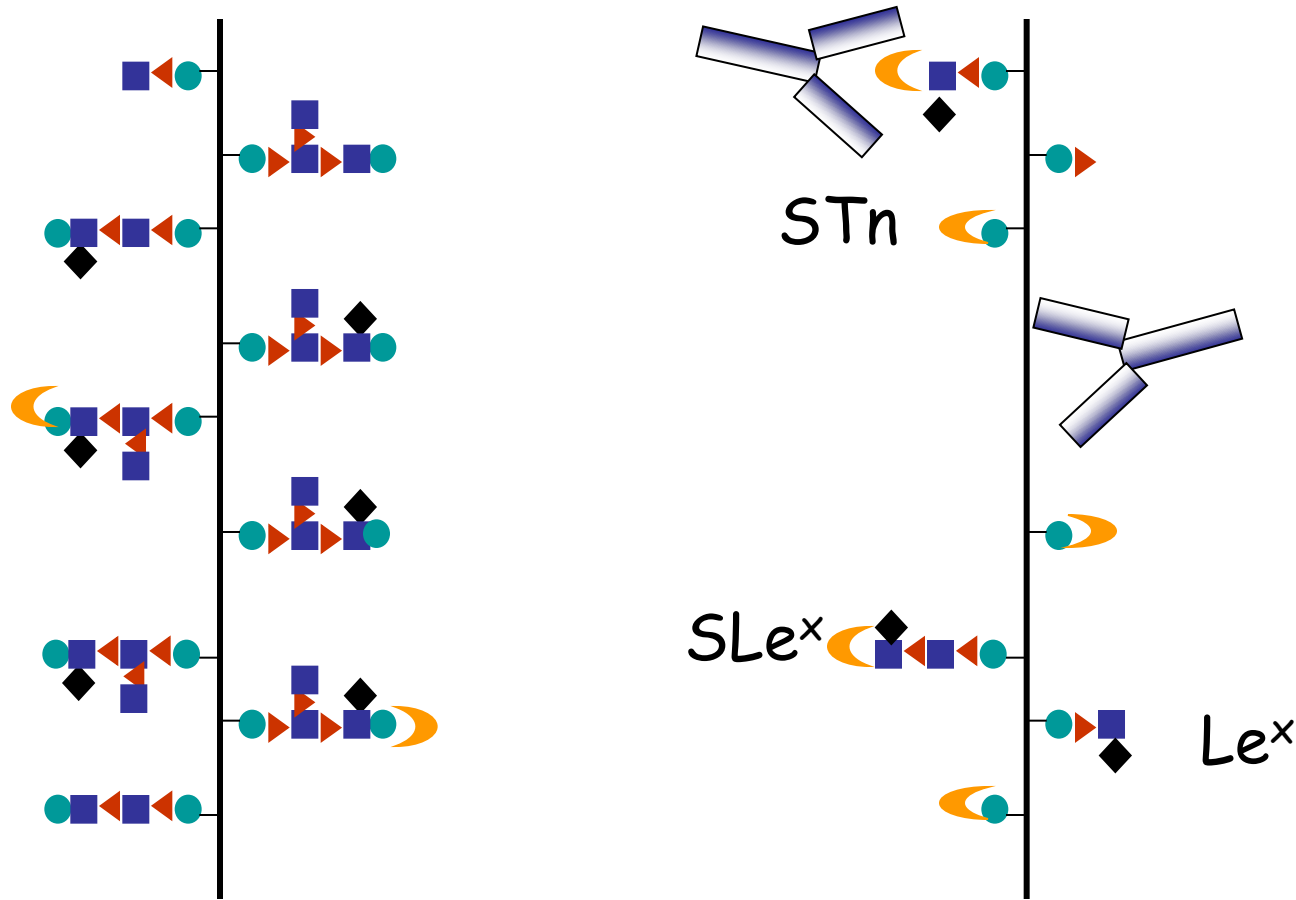
Tumoros



Új fehérje- és szénhidrát-epitópok megjelenése



Új fehérje- és szénhidrát-specifikus ellenanyagok termelődése



MUC2 glikoprotein

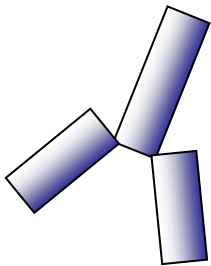
Gasztrointesztinális szekretált mucin
vékony- és vastagbél

Ismétlődő szakasz (~ 100x):

1PTTTPITTTTTVTPPTPTGTQT²³

Gum et al 1989 J Biol Chem 264:6480

~ 80% glikoziláció



MAb 996 monoklonális ellenanyag

Durrant et al 1994 Eur J Cancer 30A:355

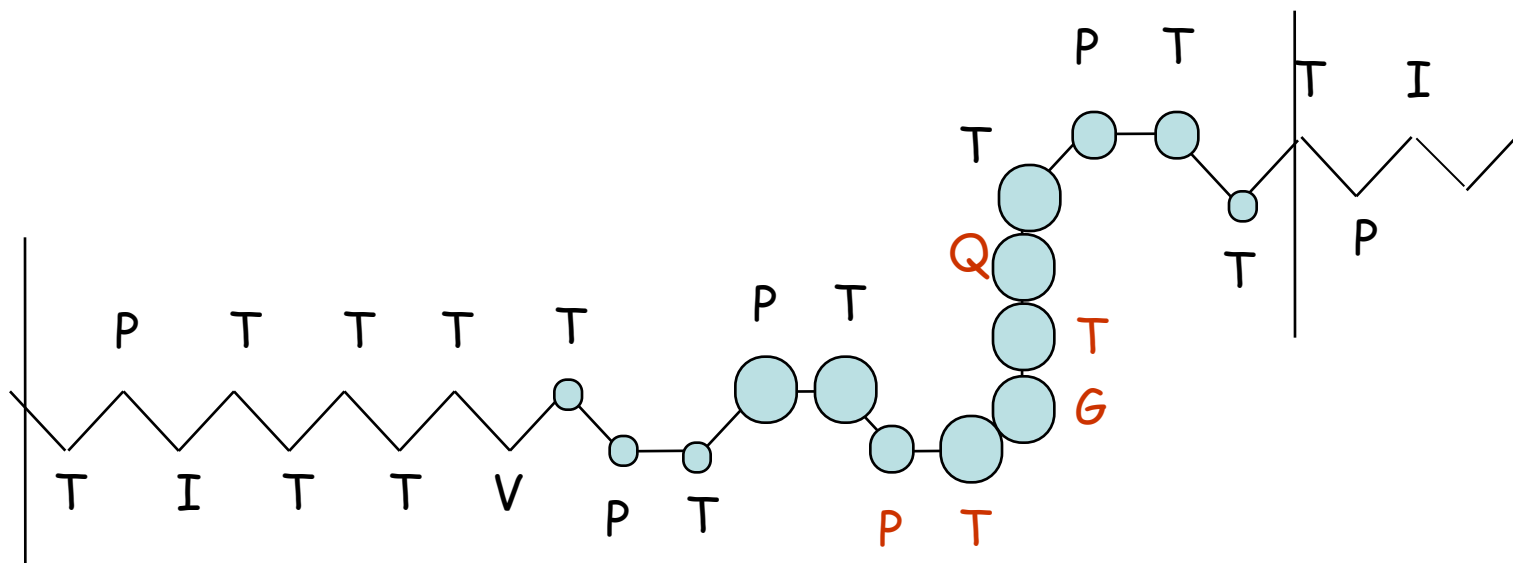
A MUC2 glikoprotein ismétlődő szakaszának epitópszerkezete

MAb 996 ellenanyag epitópja:

Minimális epitóp: $^{18}\text{PTGTQ}^{22}$

Optimális epitóp: $^{16}\text{PTPTGTQ}^{22}$

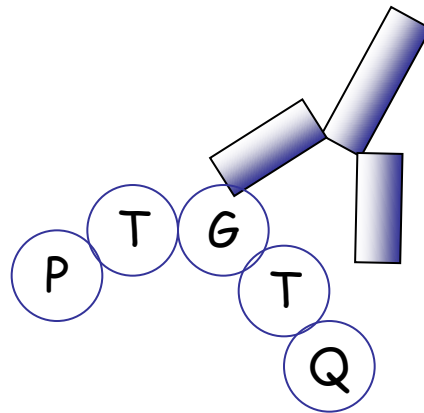
Uray et al 1998 *J Pept Sci* 4, 319



Uray et al 1999, *Arch Biochem Biophys* 361, 65

Az epitópszerkezet pontosabb megismerése módosított epitóppeptidek segítségével

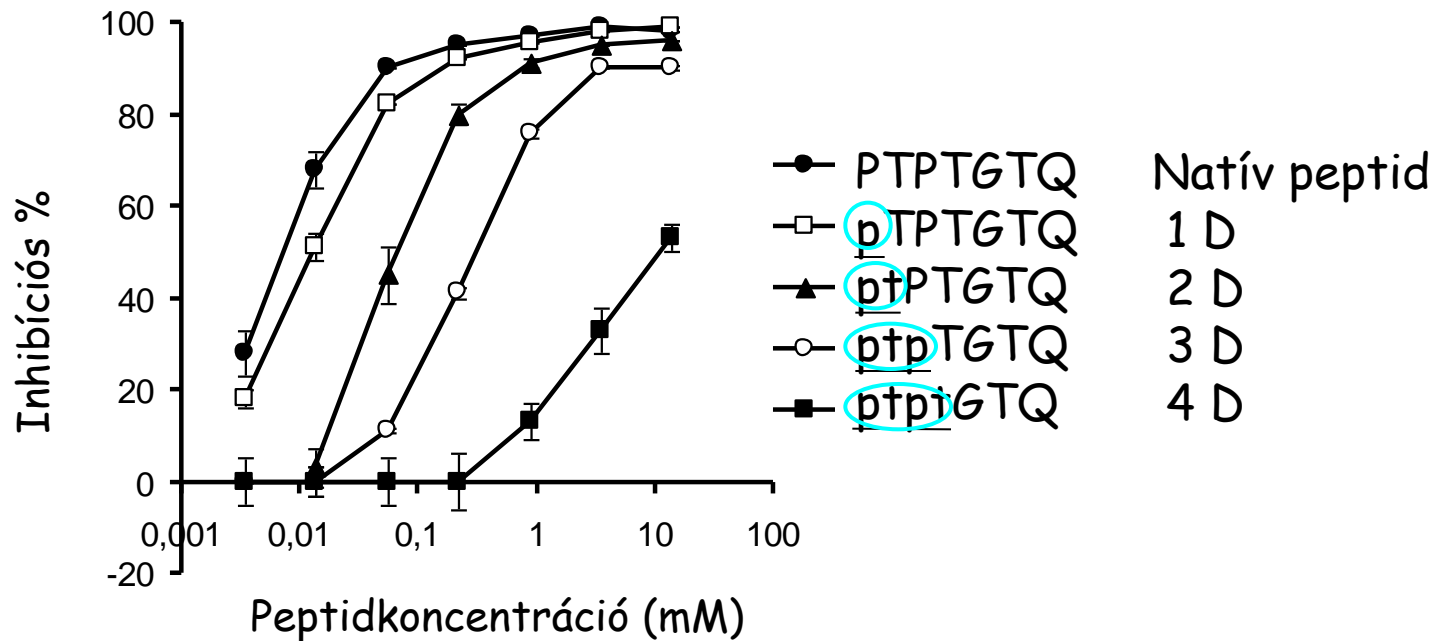
D-aminosav
szubsztitúció



Glikoziláció

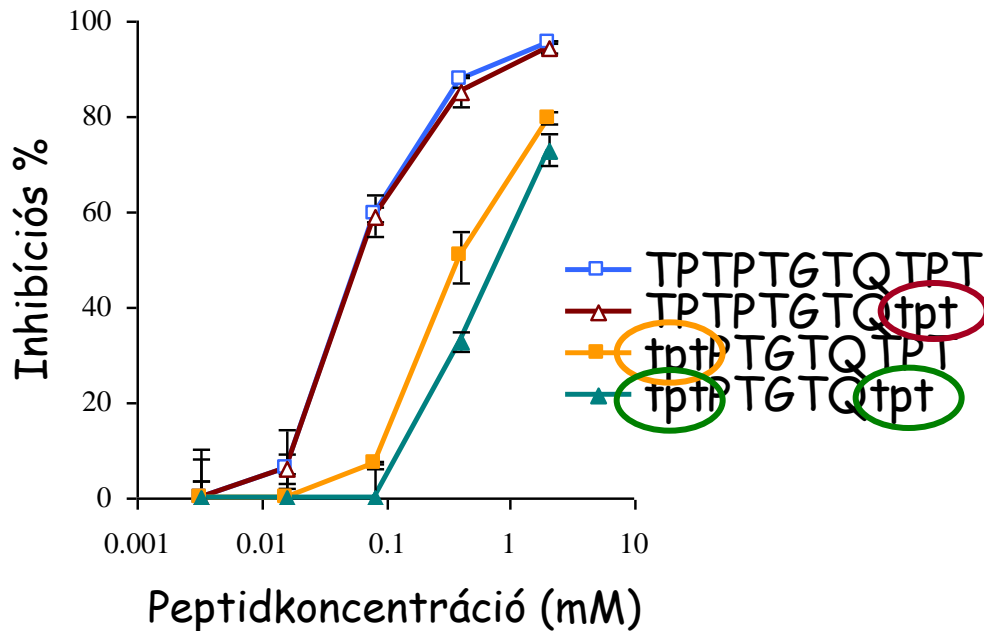
Az egyes aminosavak
szerepe a kötődésben

N-terminális D-aminosav szubsztitúció hatása a MAb 996 kötődésre



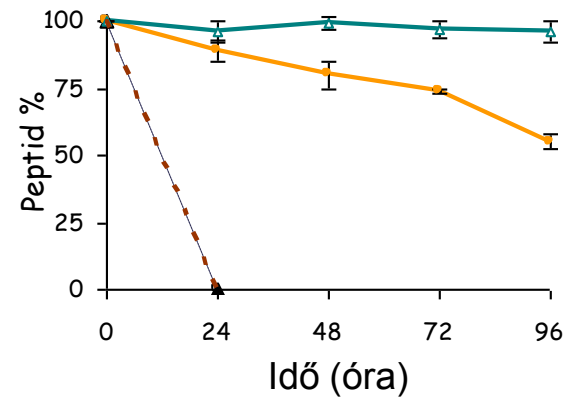
D-aminosav szubsztitúció az N- és C-terminális lebegő régióban: 3-3 D-amino acids

Kötődés a MAb 996 ellenanyaghoz

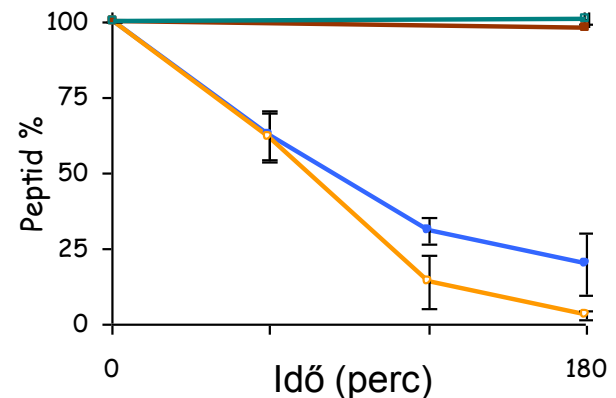


Tugyi et al 2005, *PNAS* 102, 418

N-terminális D-aminosavak: Stabilitás szérumban

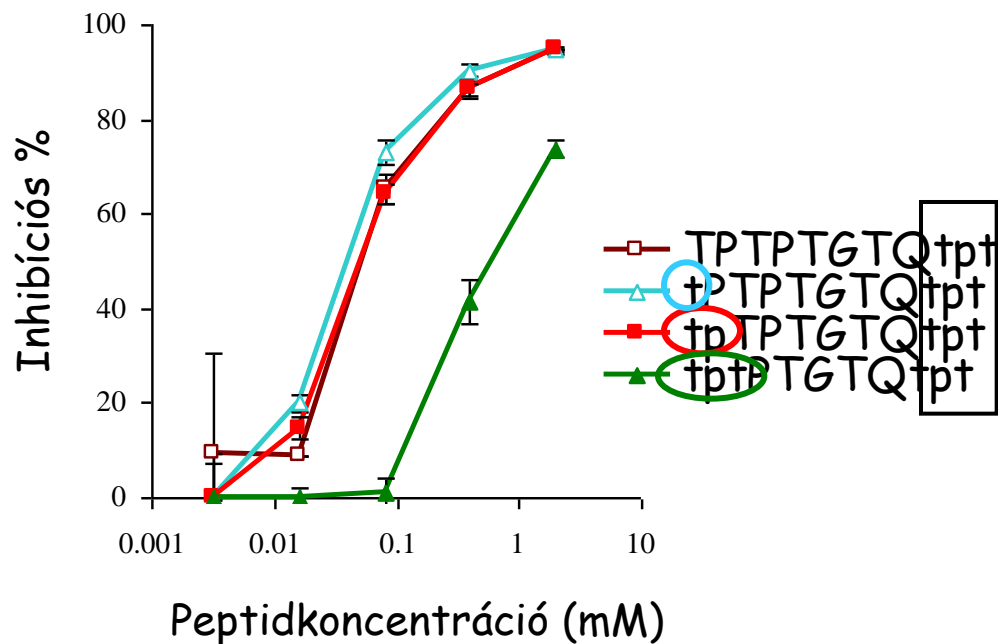


C-terminális D-aminosavak: Stabilitás lizoszóma kivonatban

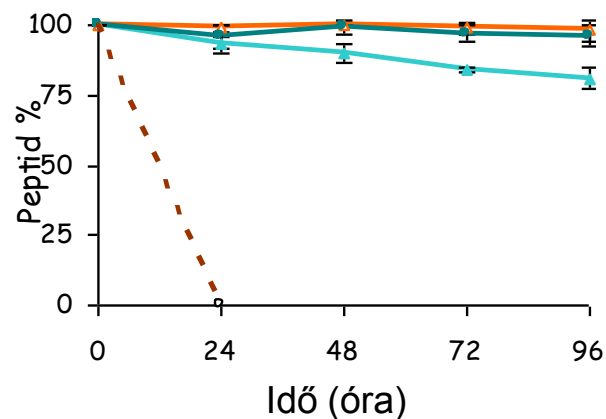


D-aminosav szubsztitúció az N-terminális lebegő régióban: 1-3 D-aminosav

Kötődés a MAb 996 ellenanyaghoz



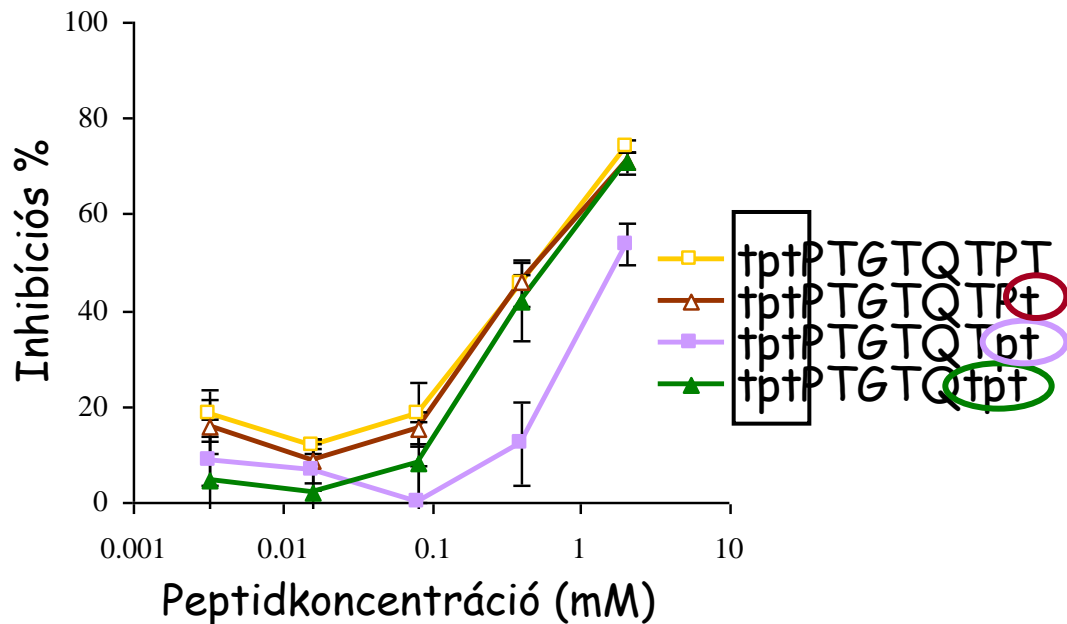
N-terminális D-amino savak:
Stabilitás szérumban



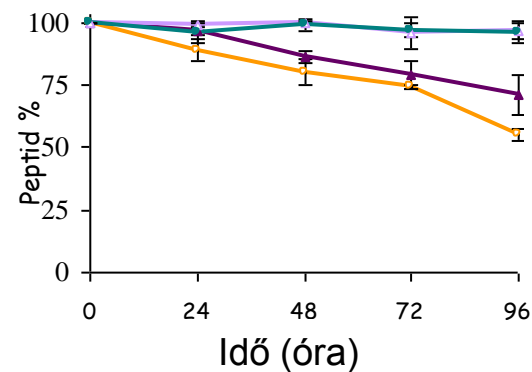
Stabilitás lizoszóma kivonatban

D-aminosav szubsztitúció a C-terminális lebegő régióban: 1-3 D-amino acids

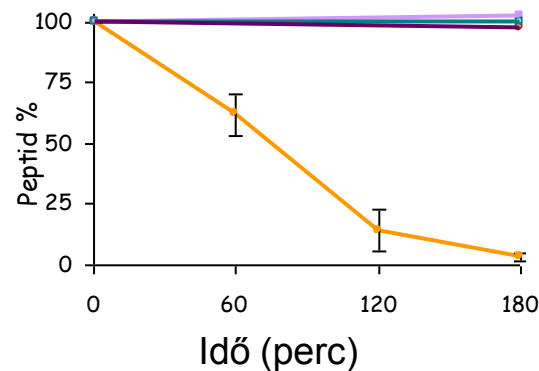
Kötődés a MAb 996 ellenanyaghoz



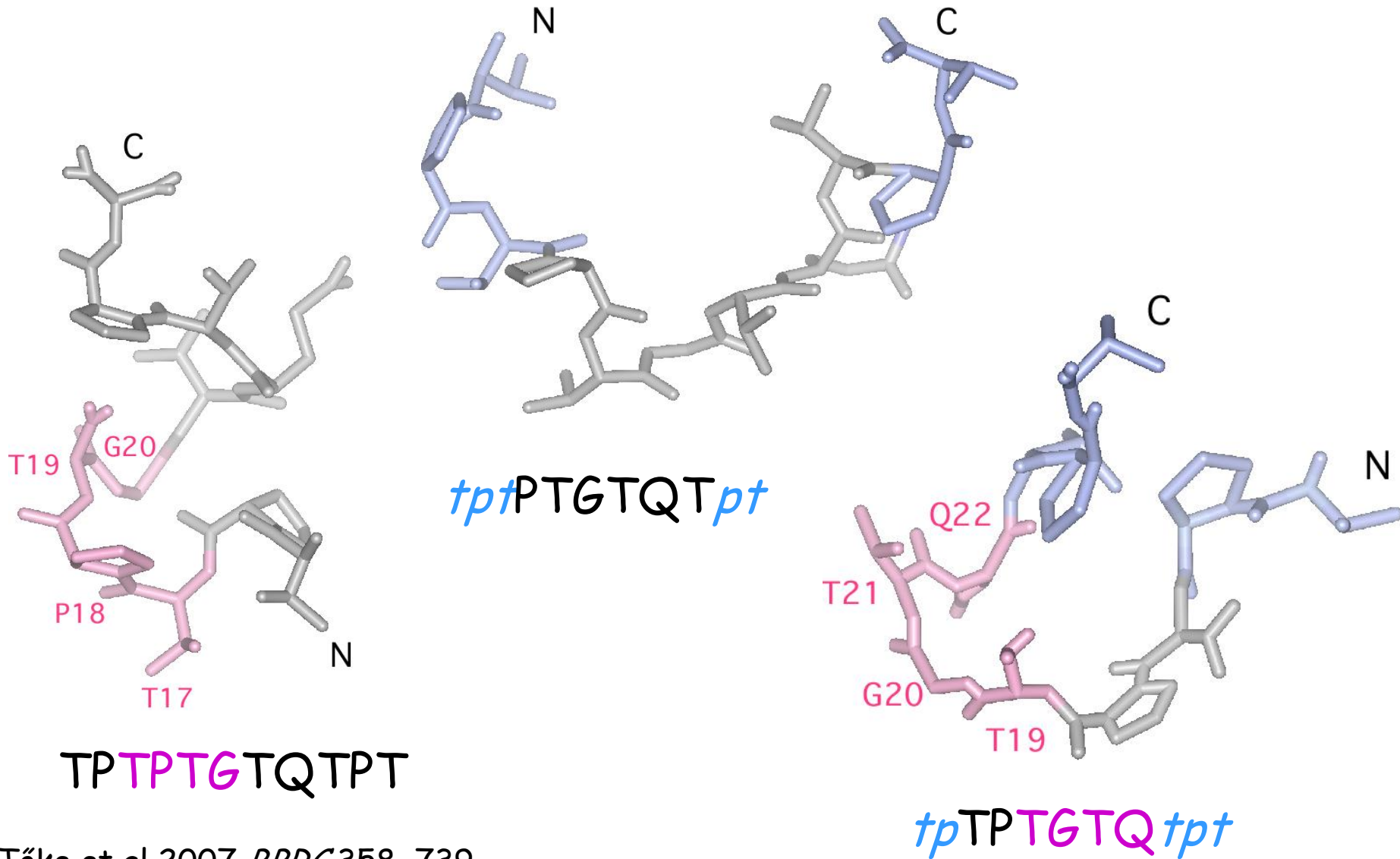
Stabilitás szérumban



Stabilitás lizoszóma kivonatban

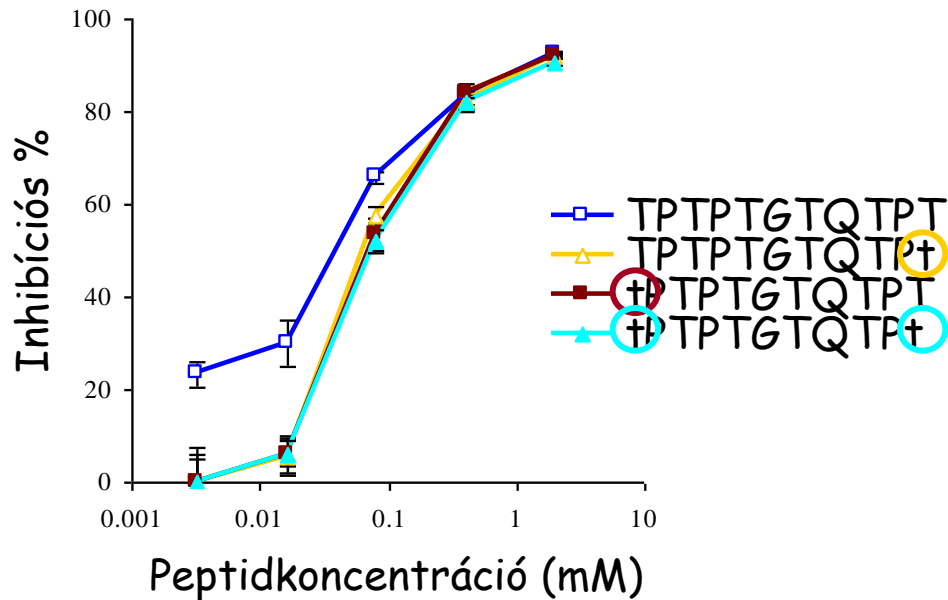


D-aminosavakkal szubsztituált peptidek térszerkezete NMR spektroszkópia alapján

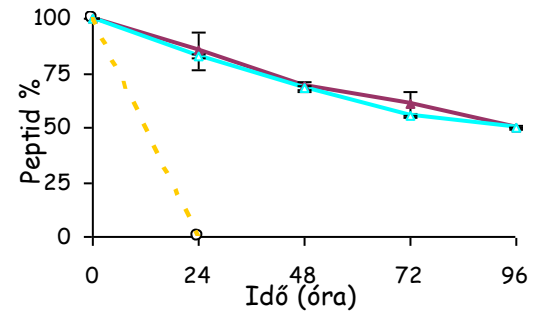


D-aminosav szubsztitúció az N- és C-terminális lebegő régióban: 1-1 D-aminosav

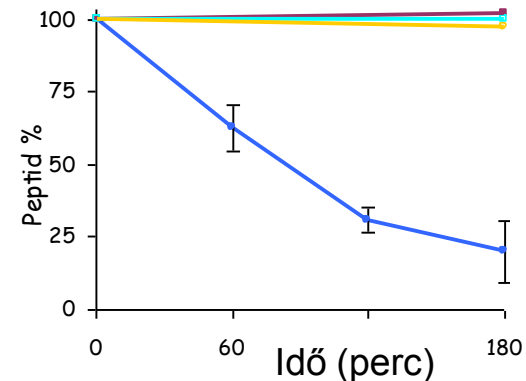
Kötődés a MAb 996 ellenanyaghoz



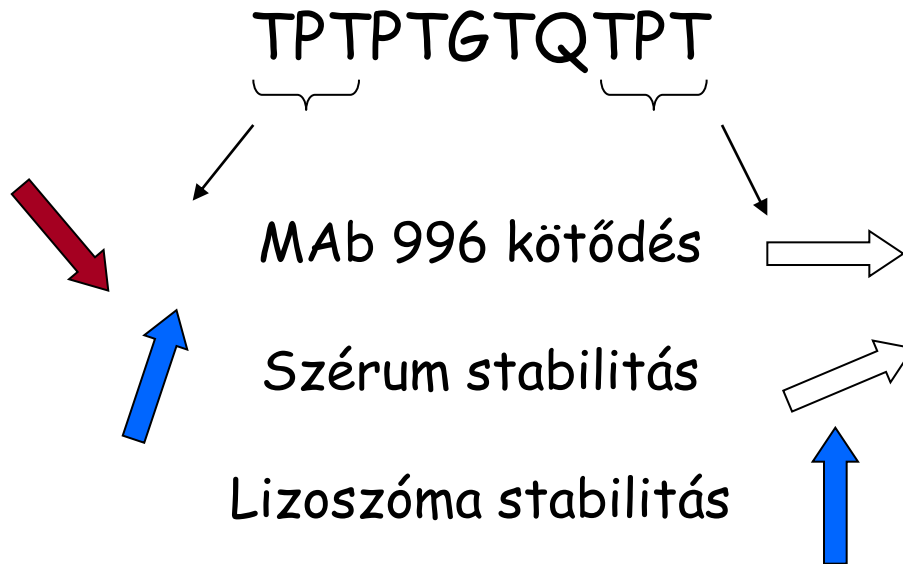
Részleges stabilitás szérumban N-terminális D-aminosavakkal



Stabilitás lizoszóma kivonatban C-terminális D-aminosavakkal



D-aminosav szubsztitúció hatása



#PTPTGTQTP#

Hatékony ellenanyag kötődés, részleges stabilitás

tpTPTGTQtp

Hatékony ellenanyag kötődés, proteázokkal szembeni stabilitás

A MUC2 epitóp peptid glikozilezése

$^{16}\text{PTPTGTQ}^{22}$

$^{16}\text{PT}(\text{GalNAca})\text{PTGTQ}^{22}$

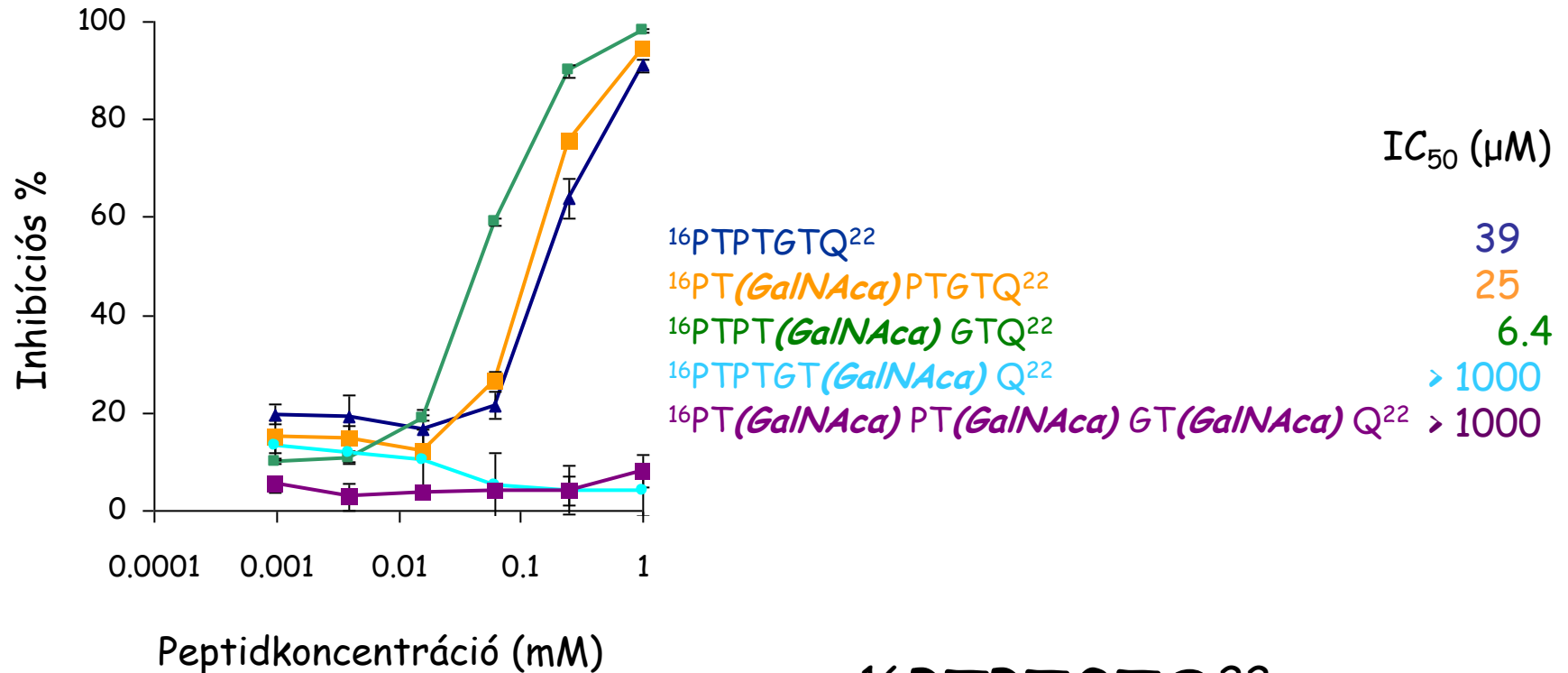
$^{16}\text{PTPT}(\text{GalNAca})\text{GTQ}^{22}$

$^{16}\text{PTPTGT}(\text{GalNAca})\text{Q}^{22}$

$^{16}\text{PT}(\text{GalNAca})\text{PT}(\text{GalNAca})\text{GT}(\text{GalNAca})\text{Q}^{22}$

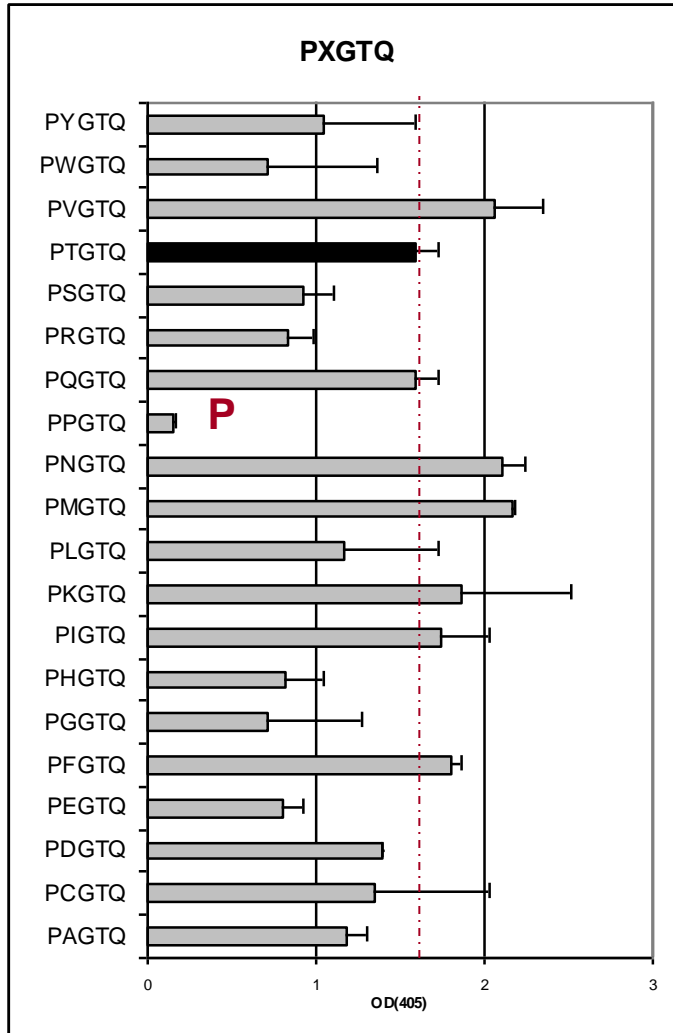
Inazu & Mizuno, Noguchi Institute, Japan

Glikoziláció hatása a MAb 996 kötődésre

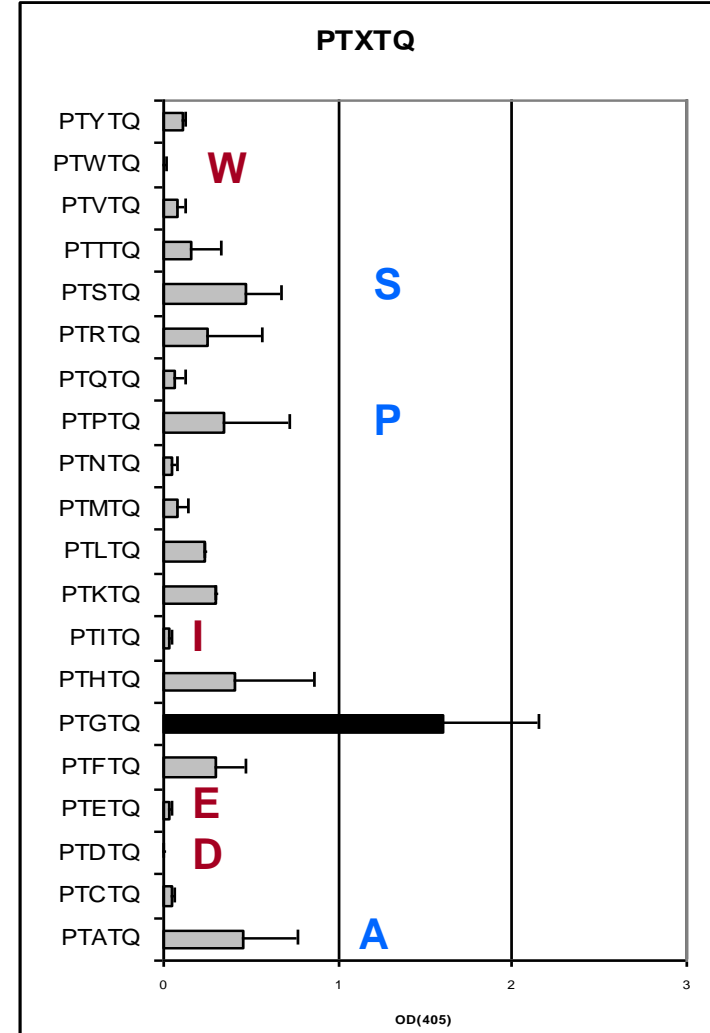


Az epitóp egyes aminosavjainak szerepe a MAb 996 ellenanyag kötődésben

T¹⁹ → X



G²⁰ → X



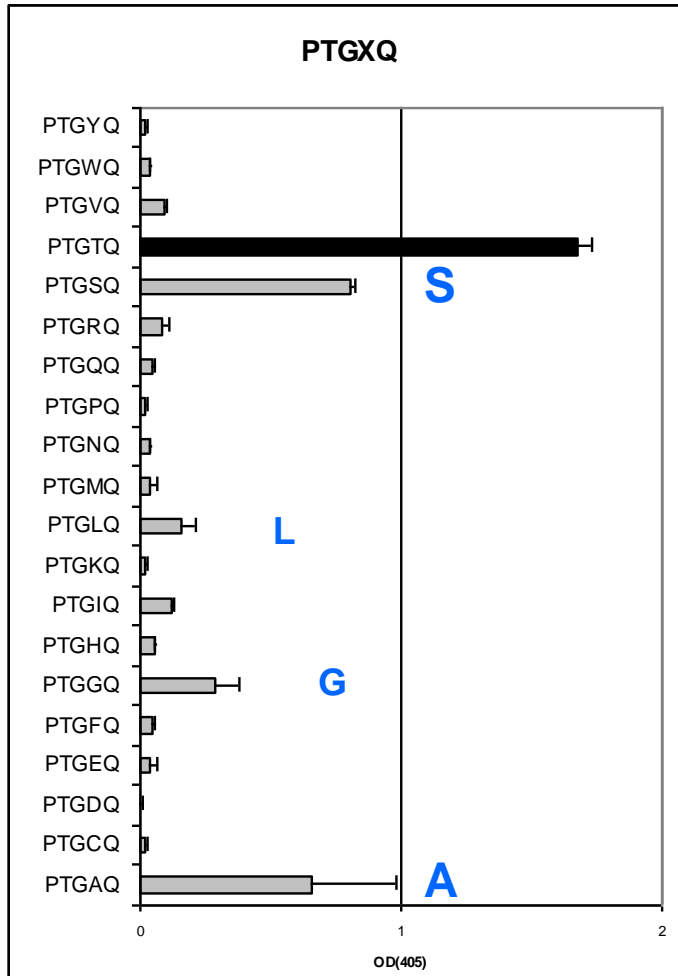
Variabilitás megengedett
Pro-szubsztitúció gyengíti a kötődést

Savas és nagy térkitöltésű aminosavak
nagy mértékben gyengítik a kötődést

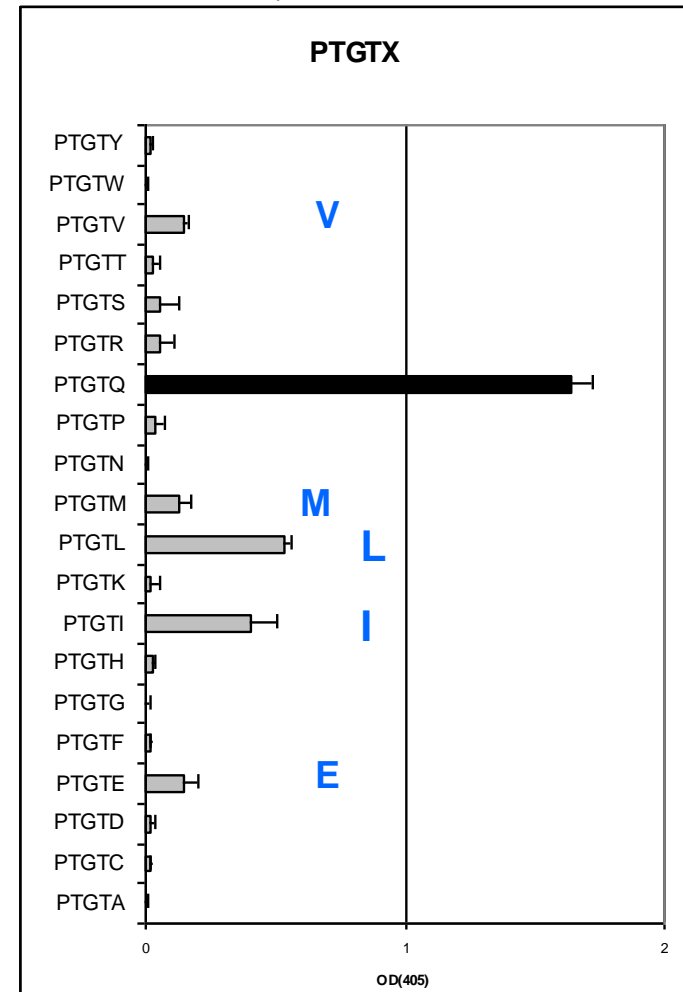
Az epitóp egyes aminosavjainak szerepe a MAb 996 ellenanyag kötődésben

T²¹ → X

Q²² → X



Csak a Ser (részben Ala, Gly, Leu) helyettesítheti a natív Thr-t



Hasonló méretű, apoláros aminosavak és Glu helyettesítheti a Gln-t

Az epitóp magjában a Gly²⁰, Thr²¹ és Gln²² bármilyen helyettesítése csökkent ellenanyag kötődést okoz

A Thr¹⁹ helyettesítése növelheti az ellenanyag felismerést

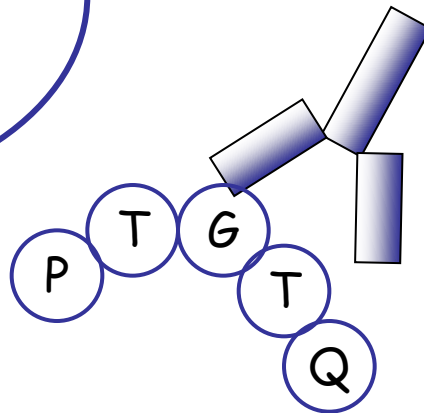
Thr¹⁹ glikozilációja is növelheti az ellenanyag felismerést

¹⁸ P	T	G	T	Q ²²
	N	S	S	L
	M	A	A	I
	V	P	G	M
	F		L	V
	K			E
	I			

Az epitópszerkezet megismerése módosított epitóppeptidekkel

D-aminosav
szubsztitúció:
MAB 996 kötődés
+
stabilitás

Lehetőség aktív
specifikus
immunterápiára



Glikoziláció:
¹⁶P T P T ^GT Q ²²
- ↑ ↓

Peptid - ellenanyag
kölsönhatás megismerése

Az egyes aminosavak
szerepe a kötődésben

Köszönetnyilvánítás

Medzihradzky-Schweiger
Hedvig

Bősze Szilvia
Kiskó Mária

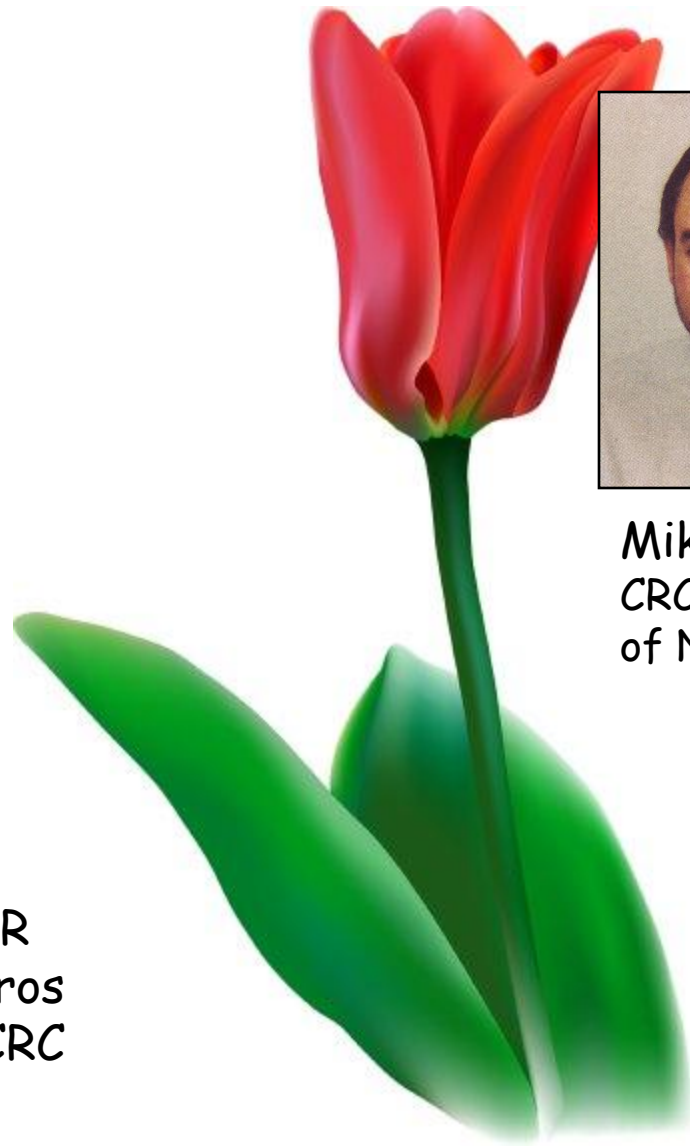
Schlosser Gitta
Mák Marianna

Hollósi Miklós
Majer Zsuzsa
Vass Elemér

Tugyi Regina
Tőke Orsolya

Toshiyuki Inazu
Mamoru Mizuno

OTKA
ETT
EACR
Soros
CRC



Mike Price
CRC, University
of Nottingham