

# Fehérjék antigénszerkezete: epitóp peptidek, peptid epitópok

URAY Katalin,<sup>a</sup> MAGYAR Anna,<sup>a</sup> BŐSZE Szilvia,<sup>a</sup> SCHLOSSER Gitta,<sup>a</sup> és HUDECZ Ferenc<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, Pázmány P. stny 1/A, 1117, Budapest, Magyarország

<sup>b</sup>Eötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Intézet, Pázmány P. stny 1/A, 1117, Budapest, Magyarország

## 1. Bevezetés

Az immunrendszer fő feladata, hogy különbséget tegyen saját és nem saját struktúrák között. Különböző kórokozók (vírusok, baktériumok, paraziták) felismerésén és hatástalanításán túl az immunrendszer a megváltozott saját struktúrákat (pl. a tumor sejtek felszínén megváltozott szerkezettel megjelenő fehérjék) is idegenként, antigénként ismerheti fel. Gyakori azonban, hogy egyrészt nem patogén idegen anyagok, másrészt saját fehérjék, glikoproteinek, nukleoproteinek ellen jön létre immunválasz, az előbbi esetben allergiáról, az utóbbi esetben autoimmun betegségekről beszélhetünk.

Az antigéneket immunoglobulin típusú fehérjék, az ellenanyagok ismerik fel; a felismerés igen specifikus másodlagos kötéseken alapul. Az ellenanyag kötődésért a fehérjének egy igen kis része, az úgynevezett epitóp a felelős, amely lehet egy rövid (4-6 aminosav hosszúságú) folytonos fehérjeszakasz (lineáris epitóp), a fehérje feltekeredéséből adódó stabil másodlagos szerkezetű folytonos szakasz (folytonos, konformációs epitóp), illetve a fehérje szekvenciálisan távoli, de feltekeredés következtében a fehérjefelszínén térben közel elhelyezkedő szakaszaiból is állhat (nem folytonos konformációs epitóp). Az ellenanyagok által felismert epitópok általában a fehérjék hidrofíl felszínén helyezkednek el, gyakran vesznek fel  $\beta$ -kanyar szerkezetet, vagy található  $\beta$ -kanyar közelében.

Kutatócsoportunkban – többek között – rákos megbetegedésekkel és autoimmun betegségekkel kapcsolatban is foglalkozunk fehérjék epitópszerkezetének tanulmányozásával. E kutatások célja kettős: 1. Új törvényszerűségek feltárása, amelyek segíthetik megvilágítani, miért viselkednek a fehérjék bizonyos szakaszai epitópként, azaz milyen szerkezeti (pl. szekvencia, konformáció) és biokémiai (pl. poszt-transzlációs módosulások, sejtbeli lokalizáció) tényezőkre vezethető vissza az epitóp-funkció megjelenése. 2. A natív epitópok szerkezeti módosításával olyan peptidek, peptidszarmazékok előállítására, amelyek szintetikus antigénként alkalmasak lehetnek mesterséges vakcinák, immundiagnosztikumok kialakítására.

Fehérjék epitópszerkezetének meghatározásához általánosan elterjedt megközelítés a szekvencia lefedése átlapoló peptidekkel, „tűhegy” módszerrel, melynek során polipropilén tűk funkcionális felszínén történik a parallel peptidszintézis. Az oldallánc védőcsoportokat lehasítjuk a peptidekről, de a peptidek továbbra is kovalens kötéssel kapcsolódnak a tű felszínéhez. Az ellenanyag kötődési vizsgálatokat módosított ELISÁ-val ezeken a peptideken valósítjuk meg. Amennyiben a finomabb epitópszerkezet

felderítése a cél, az első epitóptérképezés alapján kiválasztott peptideket klasszikus peptidkémiai módszerekkel egyedi, oldható formában is elkészítjük további kötődési vizsgálatokra.

## 2. A MUC2 mucin glikoprotein epitópszerkezete

A nagymolekulatömegű mucin glikoproteineket a belső szervek, testcsatornák, mirigyek hámsejtjei termelik, szerepük a hámszövet nedvesítése és védelme. Ezen hámszövetekből kiinduló rosszindulatú megbetegedések esetén a mucinok túltermelődhettek, illetve gyakran hiányosan glikozilálódnak, ezáltal az immunrendszer számára hozzáférhetővé válhat a fehérjegerinc, amelyre a szervezet, mint addig ismeretlen antigénre, immunválaszt adhat. Az így megjelenő peptid epitópoknak diagnosztikai és terápiás jelentőségük lehet.

A vastagbél-tumorokban megváltozott szerkezetű MUC2 mucin glikoprotein ismétlődő szakaszának epitóp-szerkezetét vizsgáltuk két MUC2 fehérjegerinc specifikus monoklonális ellenanyaggal (MAb 994 és 996). A fehérje ismétlődő szakaszából származó N- és C-terminálison rövidített peptidek segítségével meghatároztuk a MAb 996 ellenanyag minimális (<sup>18</sup>PTGTQ<sup>22</sup>) és optimális (<sup>15</sup>TPTPTGTQ<sup>22</sup>) epitópját.<sup>1</sup> A MAb 994 ellenanyag epitópjának a <sup>21</sup>TQTPT<sup>25</sup> peptidszakasz bizonyult,<sup>2</sup> ugyanakkor számos TXTXT szekvencia motívummal rendelkező peptid is kötődött a fehérjegerinc specifikus ellenanyaghoz.<sup>3</sup> Oszttásos-keveréssel eljárással készült kombinatorikus peptidkönyvtárak segítségével derítettük fel az 'X' aminosavak szerepét az ellenanyag-kötődésben, a peptid társakat különféle nagyérzékenységű tömeg-spektrometriás módszerekkel jellemeztük.<sup>4</sup> A MAb 996 ellenanyag <sup>18</sup>PTGTQ<sup>22</sup> epitópján belül az egyes aminosavak ellenanyag kötődésben játszott szerepét tanulmányozva megállapítottuk, hogy a GTQ szakasz aminosavai csak hasonló méretű és karakterű aminosavakkal helyettesíthetők, míg a <sup>19</sup>Thr az ellenanyag kötődés számottevő csökkenése nélkül cserélhető a prolin kivételével bármely aminosavra.<sup>5</sup> Potenciális tumorelleses vakcina kialakítása céljából az epitóp N- és C-terminális „lebegő” szakaszait szisztematikusan D-aminosavakkal helyettesítve kompetitív ELISA, valamint humán szérumban és lizoszóma preparátumban végzett stabilitás vizsgálatok segítségével megállapítottuk, hogy a <sup>15</sup>TPTPTGTQPT<sup>25</sup> peptid C- és N-terminálisan két-két aminosav D-aminosavra való cseréje nem befolyásolja a peptid specifikus kötődését az ellenanyaghoz, viszont nagymértékben növeli stabilitását különféle proteázokkal szemben.<sup>6</sup>

Az epitópok pontos szerkezetének, fehérjén belüli helyzetének megismerése segítséget nyújthat egyrészt olyan

\* Tel.: +36-1-372-2828 ; fax: +36-1-372-2620 ; e-mail: fhudecz@elte.hu

peptidek, peptiszármazékok tervezéséhez, szintéziséhez, amelyek szintetikus célantigének segíthetik a tumorspecifikus ellenanyagválasz – ezáltal a megbetegedés – megjelenésének korai kimutatását, a betegség lefolyásának és a kezelés hatékonyságának követését. Ezen kívül megnyithatják az utat olyan szintetikus immunogének tervezése és előállítása előtt, amelyek tumorellenes vakcinaként az aktív specifikus immunterápia céljaira hasznosítható.

### 3. Autoimmun betegségek – autoimmun fehérjék epitópszervezetének térképezése

Saját fehérjéket felismerő autoellenanyagokat az egészséges immunrendszer is termel, ezek az úgynevezett fiziológiás ellenanyagok azonban kis affinitással kötődnek a fehérjékhez, és jelenlétük nem jár a felismert fehérje elleni, azt megsemmisítő immunválasszal. Általában a genetikailag erősen konzervált fehérjék ellen figyelhetők meg autoantitestek, ezek a fehérjék alkotják az immunrendszer számára a szervezet belső lenyomatát, az immunológiai toleranciát lehetővé tevő „immunológiai homunculus”-t.

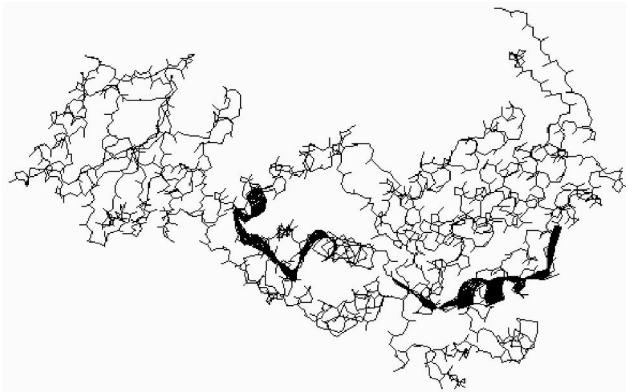
Az autoimmun betegségek olyan körképek, amelyekben a szervezet saját szöveteit, sejtjeit támadó gyulladásos folyamatok vannak jelen. A betegek szérumból nagy affinitású, saját, humán fehérje elleni autoellenanyagok mutathatók ki. Az érintett fehérjék lehetnek az immunológiai homunculus alkotóelemei (pl. hőszokk-proteinek, citrát-szintáz enzim), ilyen esetekben megváltozott epitópszpecifitású és affinitású ellenanyagok jelennek meg a keringésben. Feltételezhető, hogy – genetikai faktorokon kívül – fertőzések során hasonló szerkezetű bakteriális/virális fehérjék elleni immunválasz válthatja ki a változást. Más esetekben kevésbé konzervált fehérjék poszttranszlációs módosulások hatására a fehérje megváltozott szerkezete válthat ki kóros immunválaszt. Például a peptidil-arginin-deimináz (PADI) enzimek az arginin – citrullin átalakulást katalizálva bizonyos fehérjékben (fibrin, filaggrin, vimentin) megváltoztatják a töltésviszonyokat, amelynek hatására változhat a térszerkezet. Ez új peptid epitópok megjelenését vonja maga után, ami új, patogén ellenanyagok bioszintéziséhez, az autoimmun betegség megjelenéséhez vezethet.

Az utóbbi évtizedben Kutatócsoportunk több, autoimmun betegségekkel kapcsolatos kutatásban is részt vett. Klinikai partnerekkel együttműködésben a célkitűzés e betegségekre jellemző fehérjék autoimmun epitópjainak azonosítása, felfedezése volt.

#### 3.1. Fiziológiás és patológias autoellenanyagok konzervált fehérjék ellen

A hőszokk fehérjék (HSP, chaperonfehérjék, stresszfehérjék) minden élő szervezetben előfordulnak, különféle stresszhatásokra megnövekedett mennyiségben. Szerepük a részlegesen denaturálódott fehérjék funkcionális szerkezetének helyreállítása, illetve újonnan képződött fehérjék feltekeredésének (folding) elősegítése. A citrát-szintáz a citromsavciklusban létfontosságú, konzervált mitokondriális belsőmembrán enzim. Mind a hőszokk fehérjék, mind a citrát-szintáz része az immunológiai homunculusnak, így egészséges személyek

szérumból is kimutathatók HSP, illetve citrát-szintáz specifikus ellenanyagok. Különböző autoimmun eredetű betegségekben (HSP – autoimmun atherosclerosis, Crohn betegség, I. típusú diabetes mellitus; citrát-szintáz – primer biliáris cirrózis) megváltozott mennyiségű és specifikitású autoellenanyagok termelődnek e fehérjék ellen. Feltételezések szerint fertőzések után a bakteriális fehérjék ellenes immunválasz hatására epitópterjedéssel keletkeznek új, patológias autoellenanyagok erre genetikailag hajlamos egyéneknél. A fiziológiás és patológias autoellenanyagok megkülönböztetése nemcsak elméleti, hanem klinikai szempontból is érdekes kérdés az autoimmun betegségek diagnosztikájában, kezelésében, annak követésében, valamint távlatilag megelőzésében és specifikus immunterápiájában is.



1. Ábra. A humán HSP60 hőszokkprotein monomerjének térszerkezete. A diabetes betegek szérumból autoellenanyagai a szalagszerkezettel jelölt fehérjészakaszokhoz kötődtek.

Együttműködésben Prof. Füst Györggyel és munkatársaival (Semmelweis Egyetem III. sz. Belgyógyászati Klinika) a humán és a homológ mikobakteriális 60 kDa-os hőszokk fehérje (HSP60) specifikus autoellenanyagok epitópszpecifitását vizsgáltuk egészséges személyeknél és különböző autoimmun betegségekben. Az érintett fehérjék térszerkezetének/hidropátias tulajdonságainak predikciója alapján kiválasztott régiókat lefedő, átlapoló peptidszakaszokat állítottunk tühegy módszerrel, amelyek kötődését módosított ELISA kísérletekben szérummintákkal vizsgáltuk. Számos olyan humán HSP60 peptidszakaszt azonosítottunk, amelyekhez kötődni képes, arra specifikus ellenanyagokat az egészséges populáció is termel, miközben a homológ bakteriális peptidszakaszt felismerő ellenanyagok jelenlétét nem tapasztaltuk. Ezen autoellenanyagok jelenléte tehát nem fertőzés következménye, hanem feltehetően általános védő-ellenanyagként funkcionál.<sup>7</sup>

Crohn-betegségben és koronáriás szívbetegségben (coronary heart disease, CHD) szenvedő betegek, valamint egészségesek szérumból autoellenanyag specifikitását összehasonlítva jelentős különbségeket tapasztaltunk: megkülönböztettünk bakteriális HSP specifikus, humán HSP specifikus és keresztreakáló peptidszakaszokat. Crohn-betegség esetén az epitópszpecifitás az egészséges szérumból volt hasonló. Ezzel szemben a bakteriális peptideket felismerő ellenanyagok kötődése szignifikánsan nagyobb mértékű volt. Ez összhangban van a betegség esetleges bakteriális eredetével. Koronáriás szívbetegség (CHD) esetében az ellenanyag felismerés mintázata a

legtöbb humán HSP60 peptidszakaszra nézve az egészséges széruméhoz hasonlított. Ugyanakkor azonosítottunk egy CHD specifikus epitóprégiót is a humán HSP60 fehérjén. A bakteriális hőszokk fehérje specifikus ellenanyagok nem voltak kimutathatók, tehát a betegség kialakulásában bakteriális fertőzés valószínűleg nem játszik szerepet.<sup>8</sup> Az I. típusú diabetes mellitusban szenvedő gyermekek szérumában két olyan ellenanyag-populációt azonosítottunk, amely a humán HSP60 fehérje egy-egy szakaszát (394-413 és 435-454) specifikusan felismeri.<sup>9</sup>

A másodlagos szerkezet predikciója, valamint a fehérje háromdimenziós szerkezetének homológia modellezése (*E. coli* citrátszintáz) alapján potenciális epitóprégiókat lokalizáltunk a humán mitokondriális citrátszintáz enzimén. A kiválasztott, valószínűsített régiókat átlapoló dekapeptidekkel fedtünk le. Prof. Németh Péterrel és munkatársaival (Pécsi Tudományegyetem, ÁOK, Immunológiai és Biotechnológiai Intézet) együttműködésben a tühegyen előállított peptidekkel egészségesek és autoimmun betegek szérumában IgG és IgM autoantitestek kötődését vizsgáltuk. Az autoimmun betegek és egészségesek szérumában különbséget detektáltunk az IgG molekulához kötődő peptidek szekvenciájában. Különösen nagy eltérés (növekedés) mutatkozott az IgM fehérjéhez kötődő peptidek számában, szekvenciájában és a kötődés erősségében az autoimmun betegek csoportjában.<sup>10</sup>

A saját fehérje ellenes ellenanyagok jelenléte, koncentrációja és epitópspecifitása fontos információt nyújthat az adott fehérjével kapcsolatos autoimmun betegség kialakulásáról, a beteg állapotáról, a kezelés hatékonyságáról. A felismert epitópok azonosítása e betegségek specifikus immunterápiájának is alapja lehet, szemben a jelenleg gyakran alkalmazott általános immunszuppresszióval és gyulladásgátlással.

### 3.2. Citrullinált fibrin specifikus autoellenanyagok rheumatoid arthritisben

A rheumatoid arthritis (RA) ismeretlen eredetű, elsősorban a kéz és a láb kisízületeit szimmetrikusan érintő, autoimmun patomechanizmusú, krónikus, progresszív sokizületi gyulladás, mely az ízületek destrukciója miatt súlyos mozgáskorlátozottságot okoz. Genetikus adottságokon kívül hormonális és környezeti tényezők vezethetnek a betegség manifesztálódásához, illetve a nyugvó betegség fellobbanásához.

Az RA diagnosztikájában hangsúlyozott szerepet töltenek be az immunszerológiai laboratóriumi vizsgálatok. Az utóbbi években nagy specifitású, citrullinált fehérjéket, illetve peptideket felismerő autoantitesteket (ACPA) azonosítottak RA-s betegek szérumában. Nagyfokú specifitásuk alapján feltételezhető, hogy szerepük van a rheumatoid arthritis pathomechanizmusában.

A rheumatoid arthritis kialakulásban fontos szerepet játszó, esetenként Arg helyett Cit-t tartalmazó fibrin fehérje ( $\alpha$ - és  $\beta$ -lánc) antigénszerkezetét tanulmányozva Dr Guy Serre professzorral és munkatársaival (CNRS-Université Toulouse) folytatott közös kutatásaink során három immundomináns epitóprégiót azonosítottunk. A fibrin  $\alpha$ - és  $\beta$ -láncból

származó  $\alpha$ 36-50 és  $\beta$ 60-74 peptidek olyan sorozatát állítottuk elő, amelyben az arginin helyett esetenként citrullin szerepel. Az Arg/Cit tartalmú heptapeptidek szérum ellenanyag kötődésének összehasonlító tanulmányozása alapján jelentős különbséget tapasztaltunk az egészségesek és betegek mintái között. Megállapítottuk, hogy az  $\alpha$ -láncból a Cit-Val-Val-Gln és a Val-Gln-Cit-His-Glu tetra- és pentapeptidek, míg a  $\beta$ -láncból a Gly-Tyr-Cit-Ala-Cit pentapeptid új, a betegségre specifikus epitópokként viselkednek.<sup>11</sup> A citrullin helyett a natív arginint tartalmazó peptideket a betegek szérumellenanyagai nem ismerték fel.

E felismerés lehetővé teheti a betegség korai diagnosztizálásán kívül a pontos prognózis felállítását új peptid-konstrukciók (analógok, származékok, konjugátumok) kifejlesztése révén. Ugyancsak felvethető e vegyületek kipróbálása az autoantigén-specifikus B-sejtek eliminálására, az RA kezelésére alkalmas, új immunmodulációs stratégiák kidolgozására.

### Köszönetnyilvánítás

Kutatásainkat az OTKA (68358, 68258, 68120), a GVOP-3.2.1-2004-04 0005/3.0 és az NKTH-ANR RAPEP\_09 programok támogatták.

### Hivatkozások

1. Uray, K.; Price, M.R.; Hudecz, F. *J. Peptide Sci.* **1998**, *4*, 319-326.
2. Uray, K.; Hudecz, F. *Molecular Diversity* **2012**, *16*, 103-112.
3. Uray, K.; Price, M.R.; Majer, Zs.; Vass, E.; Hollósi, M.; Hudecz, F. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *410*, 254-260.
4. Windberg, E.; Uray, K.; Illyés, E.; Skribanek, Zs.; Price, M.R.; Sebestyén, F.; Hudecz, F. *J. Peptide Sci.* **2004**, *10*, 56-65.
5. Schlosser, G.; Takáts, Z.; Vékey, K.; Pócsfalvi, G.; Malorni, A.; Windberg, E.; Kiss, A.; Hudecz, F. *J. Peptide Sci.* **2003**, *9*, 361-374.
6. Tugyi, R.; Uray, K.; Iván, D.; Fellingner, E.; Perkins, A.; Hudecz, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*, 413-418.
7. Uray, K.; Hudecz, F.; Füst, G.; Prohászka, Z. *Int. Immunol.* **2003**, *15*, 1229-1236.
8. Füst, G.; Uray, K.; Bene, L.; Hudecz, F.; Karádi, I.; Prohászka, Z. *Cell Stress Chaperons* **2012**, *17*, 215-227.
9. Horváth, L.; Cervenák, L.; Oroszlán, M.; Prohászka, Z.; Uray, K.; Hudecz, F.; Baranyi, E.; Madácsy, L.; Singh, M.; Romics, L.; Füst, G.; Pánczél, P. *Immunol. Lett.* **2002**, *80*, 155-162.
10. Nyárády, Z.; Czömpöly, T.; Bösze, S.; Nagy, G.; Petrohai, A.; Pál, J.; Hudecz, F.; Berki, T.; Németh, P. *Mol. Immunol.* **2006**, *43*, 830-838.
11. Iobagiu, C.; Magyar, A.; Nogueira, L.; Cornillet, M.; Sebbag, M.; Arnaud, J.; Hudecz, F.; Serre, G. *J. Autoimmun.* **2011**, *37*, 263-272.

### New results from the Research of Peptide Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences at Eötvös Loránd University

This paper provides an outline on the recent results obtained at the Research Group of Peptide Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences at Eötvös Loránd University. Selected examples illustrate the achievements in relation to a) the design and synthesis of biologically active peptides and peptide conjugates; b) perform structure-function studies for therapeutic applications and c)

the development of immunodiagnosics. The research activities summarized in this communication are focused on three main fields:

- Cancer research: Targeting of antitumour drugs by chemical conjugation with oligo- and polypeptides possessing recognition unit to increase tumour cell specificity, lower toxic side effects. Analysis the antitumour effect of conjugates *in vitro* and *in vivo*. Investigation of the potential mechanism of action.
- TB research: Identification of linear epitopes suitable for early diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Synthesis of epitope peptide conjugates with carrier molecules for the development of immunoassays with various specificities/cross-reactivities (e.g. HIV). Conjugation of traditional or *in silico* selected antitubercular drugs with peptide carrier to increase their efficacy.
- Immunochemical studies: Design and synthesis of peptide "superantigens" for diagnostics and/or synthetic vaccine development. Target proteins: mucin glycoproteins (cancer), herpes simplex virus glycoprotein D, heat shock proteins, filaggrin, fibrin (rheumatoid arthritis), beta-amyloid (Alzheimer's disease).

During the last years the Research Group of Peptide Chemistry reported novel synthetic conjugation strategies as well as analytical methods in relation to the preparation and functional characterization of new bioconjugates. By systematic structure-

function studies new, biologically active conjugates of receptor binding (GnRH, somatostatin) or cell penetrating oligopeptides as well as polypeptides with antitumour (anthracyclines, folate antagonist, vinblastine or ferrocene derivatives) or antitubercular (e.g. INH, TB5) compound, with enzyme activator/substrate or epitope peptide. In case of the most active conjugates promising first studies were performed to understand the mechanism of action (e.g. intracellular degradation, interaction with DNA, effect on the tubulin system, identification of the role of „scavenger A" receptor, analysis of the conjugate induced protein expression profile. By these preliminary studies we have postulated some structural parameters that are potentially responsible for the biological activity, immunorecognition (e.g. binding, cellular uptake).

The results of the research projects attracted a number of MSc and PhD students. 13 PhD theses and > 50 master theses were completed between 2001 and 2011. The studies are closely connected with grants obtained from the Hungarian Academy of Sciences (since 1961) to support the research activities of the Research Group of Peptide Chemistry at Eötvös L. University (recently 174 mFt for the period of 2012-2016). In addition these studies are relying on the results of previous and present International collaborations including bilateral (British-Hungarian, Spanish-Hungarian, Indian-Hungarian, Italian -Hungarian, French-Hungarian) and multilateral FP6, WHO and COST Chemistry Actions (e.g. D13/007/00 Working Group and CM1106 Working Group).