

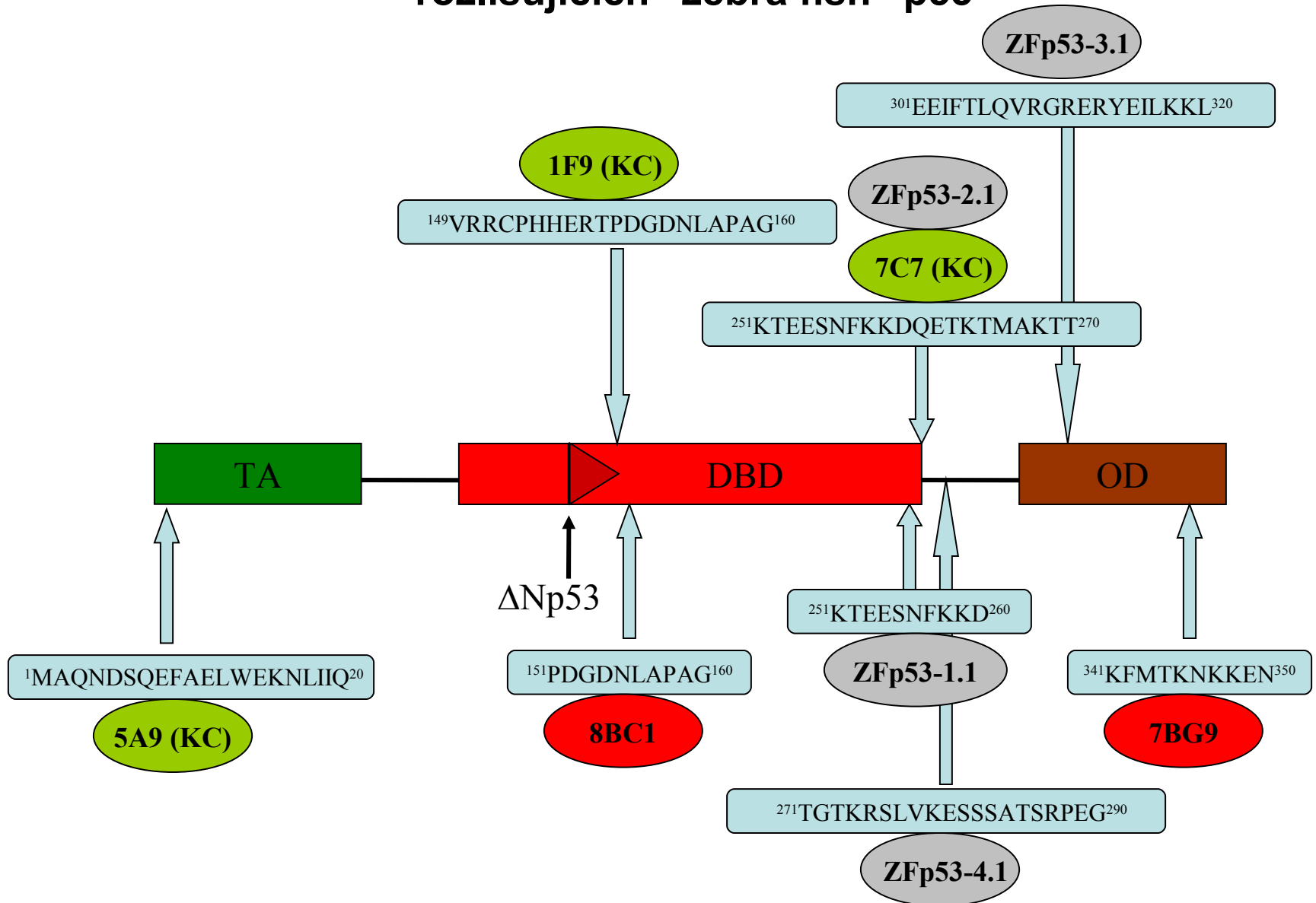
Mapování cílových epitopů protilátek

B. Vojtěšek

MOÚ

Brno

Ukázka mapování epitopů protilátek rozlišujících “zebra fish” p53



Úvod

- Proč mapovat epitopy ?
- Metody
- Praktické připomínky
- Anekdoty a mýty

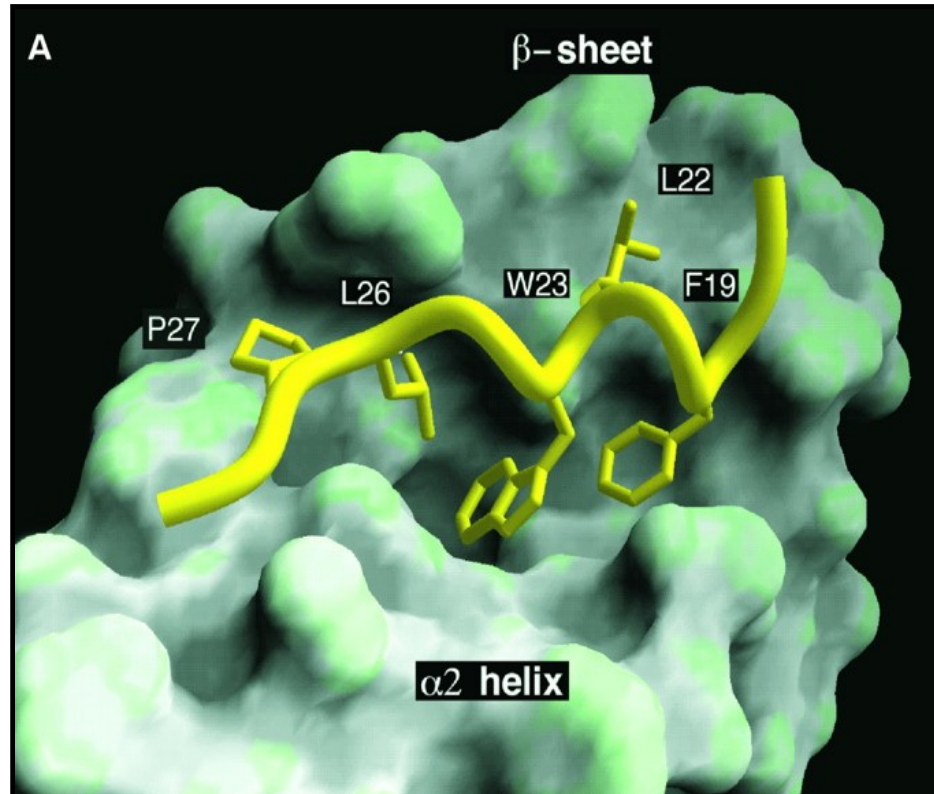
Proč ?

- Umožní přesněji definovat specificitu
- Predikuje krosreakci s jiným antigenem
- Umožní vývoj imunodetekčních metod
- Umožní definovat místa posttranslačních modifikací
- Může se využít pro studium proteinové struktury a funkce
- Model pro studium protein-proteinových interakcí

Definice

- Lineární lokální epitop
- Konformačně komplexní epitop

Lineární epitop



Vlastnosti

- 3-15 aminokyselin dlouhý
- Sekvence je souvislá
- Často má lokální strukturu (helix)
- Protilátky proti lineárnímu epitopu jsou vhodné pro imunobloting a imunohistochemii (barvení fixovaných tkání)
- Epitop může být někdy maskován, je-li protein v nativní nedenaturované formě
- Epitopy jsou často v helixové oblasti proteinu
- Většina anti-peptidových protilátek má tyto vlastnosti
- Tyto epitopy jsou často maskovány posttranslačními modifikacemi

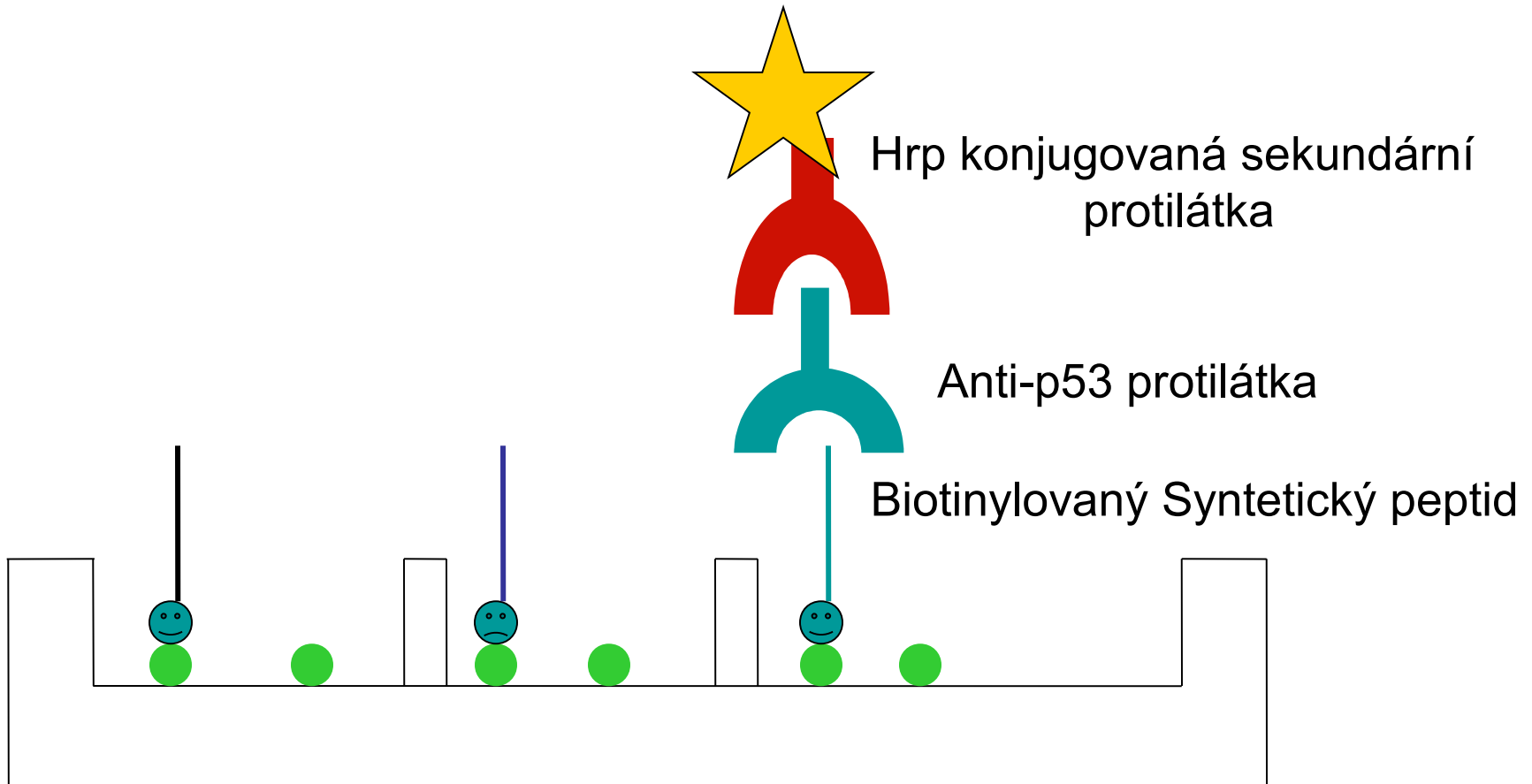
Metody mapování cílových epitopů

- “Pepscan“
- “Phage display“
- Expresí fragmentů cílového antigenu
- Částečná proteolýza
- Hmotnostní spektrometrie

“Pepscan“

- Překrývající se syntetické peptidové sekvence pokrývající proteinovou sekvenci
- 10, 15, 20 mery
- 1, 5, 10 amino kyselinový překryv (\$\$)
- Snadný alaninový “pepscan” na přesné určení důležitých aminokyselin v cílovém epitopu
- Velmi rychlá a efektivní metoda
- Dnes dostupná ve formě peptidů na membránách nebo ve formě biotinylovaných peptidových knihoven

Peptidová Elisa metoda pro studium vazby p53 specifických protilátek k cílovým peptidům kopírujícím sekvenci proteinu p53



Streptavidin navázaný na dno 96 jamkové desky

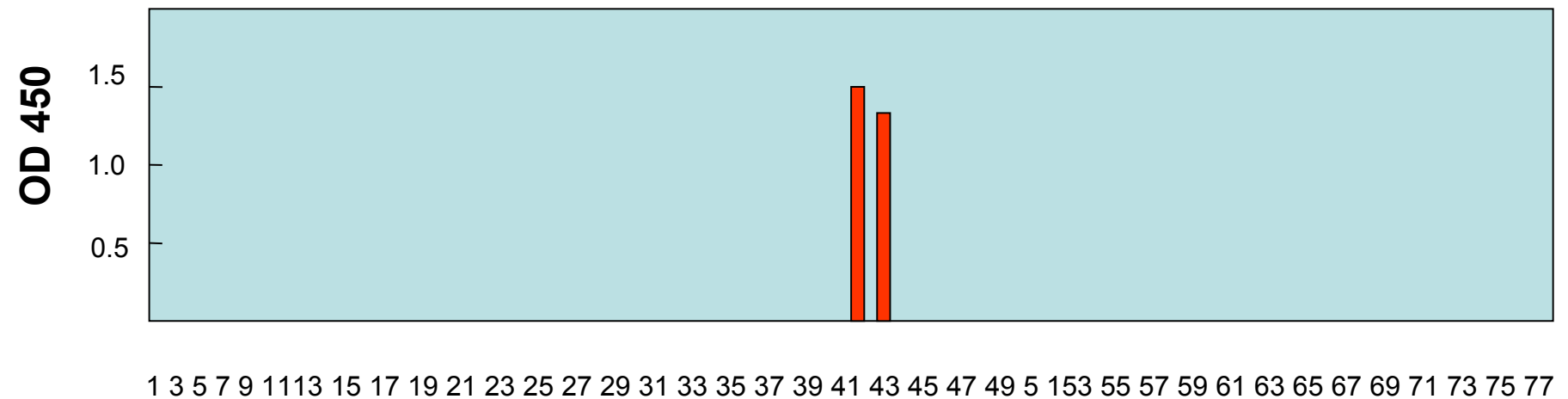
Příklad

- Mapování anti-p53 protilátky PAb 240

2 pozitivní peptidy ze 77 "15 merů" s 5 AA překryvem pro celý p53

Peptide 42 LDDRNTFRHSSVVVPY

Peptide 43 TFRHSSVVVPYEPPEV



Výhody

- Rychlost
- Knihovna je téměř na celý život (?-pokud student neudělá chybu)
- Dá se velmi účinně využít i pro hledání nových interagujících proteinů nebo charakterizaci míst interakce u dvou známých proteinů
- Dá se dobře využít v kinázových testech popřípadě při sledování modifikací proteinů

Nevýhody

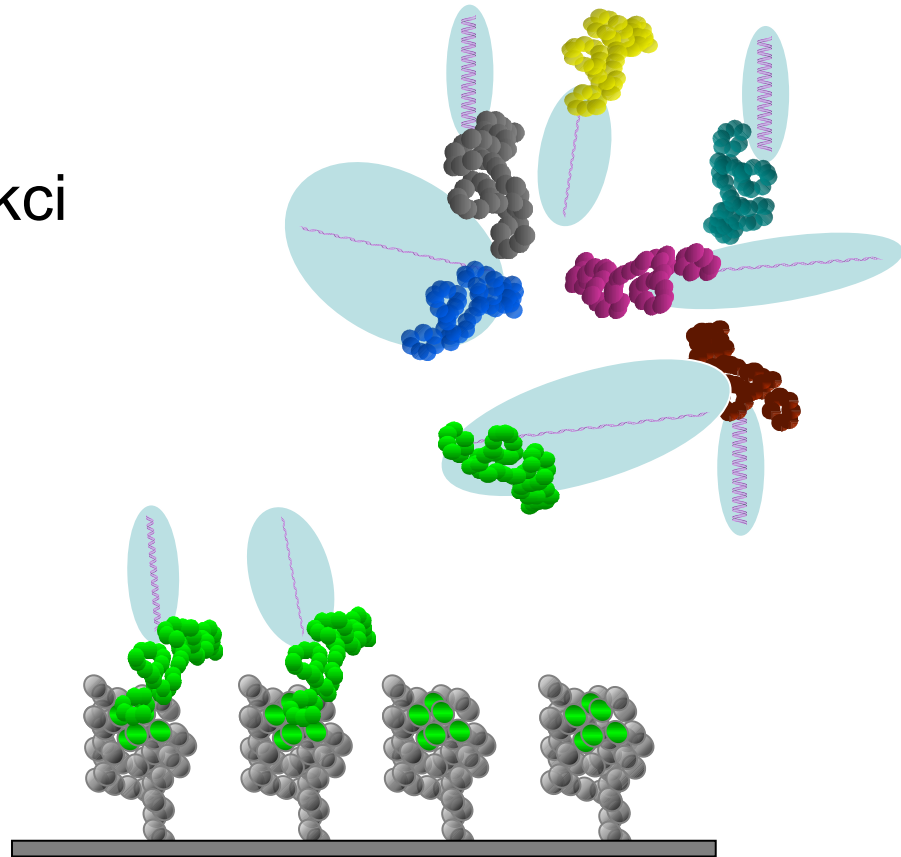
- Musíte nutně znát přesnou sekvenci cílového proteinu
- \$\$\$\$\$???

“Phage display“

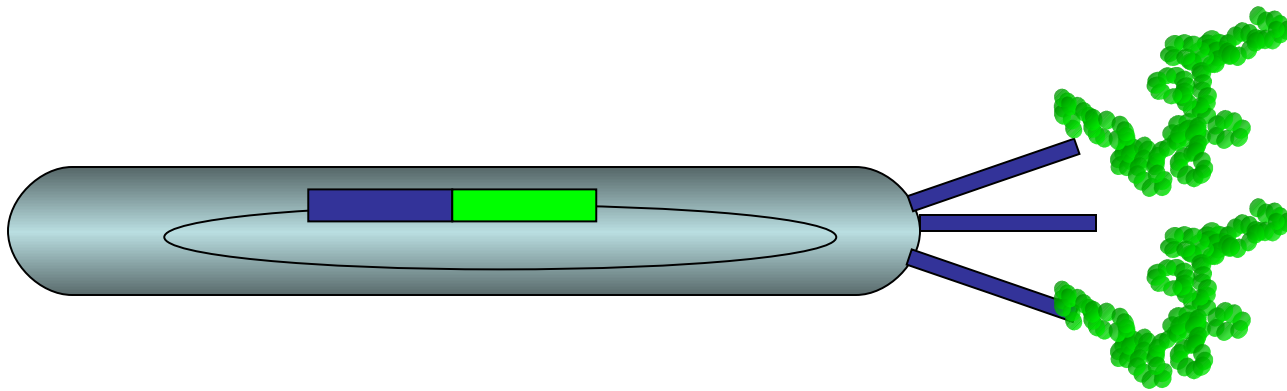
- Náhodná peptidová knihovna
- 6,7,12,15 mery, lze připravit vlastními silami nebo se dá koupit (pokusím se přemluvit kolegu Mullera aby Vám přiblížil její konstrukci)
- Nutné provést mnoho kol selekce
- Nutné sekvenování vybraných fágů
- Dostanete bohaté informace
- Dneska se dají knihovny koupit komerčně

Princip

- Knihovny peptidů po produkci si zachovávají kódující sekvence
- Je nutné provést selekci na vašem cílovém proteinu

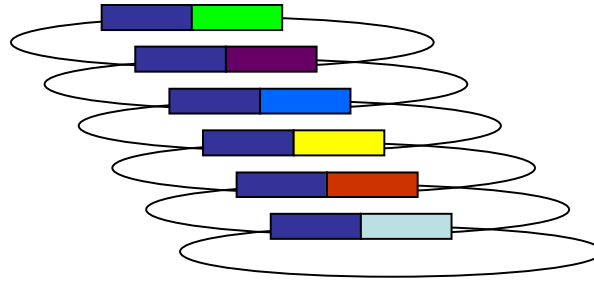


„Phage display“

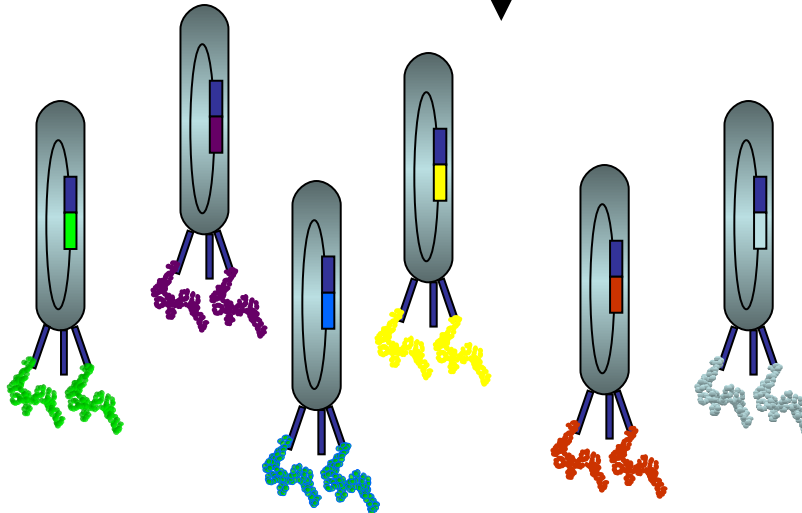


- Expresse peptidů na povrchu
- Obvykle se k expresi využívá gen 111
- 5 kopií

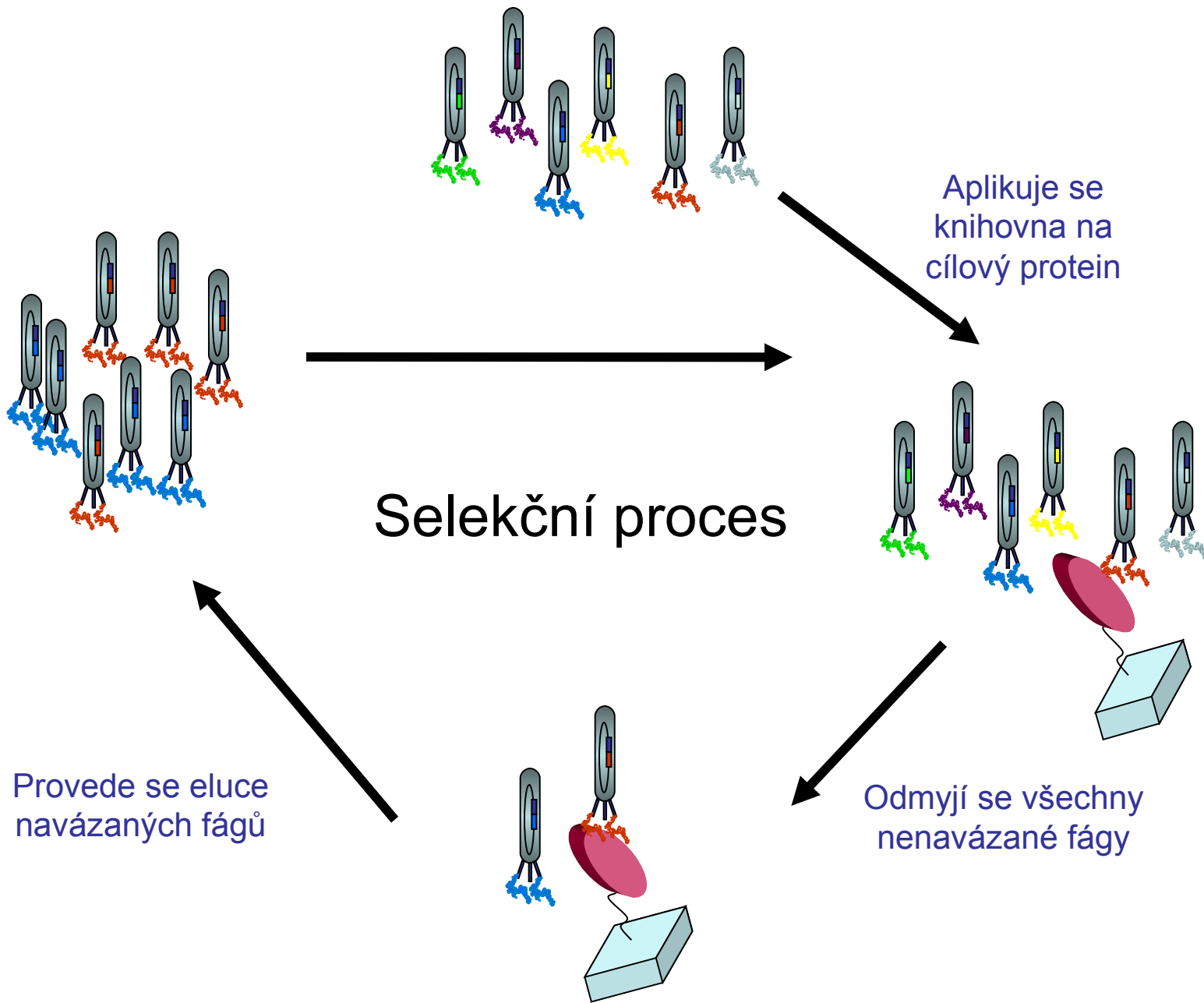
Konstrukce peptidových knihoven



Transfekce do
bakterií a produkce
fágů



Knihovny mají
velikost až do
 10^9



Příklad

- Mapování anti-p53 protilátky PAb 240

Selekce PAb 240 vazebného peptidu z náhodné “phage display” peptidové knihovny

“p53 sequence“

YLDDRNTFRHSVWVPYEPP

RHSVIS

FRHSLL

WRHSVV

FKHSVV

LRHSIL

YRHSVI

LRHSVI

YSRHSVVYGDGQ

TLRHSIIFGGEW

AVRHSVIERTLS

“Phage library
sequences“

Selekce mdm2 vazebných peptidů z náhodné “phage display” peptidové knihovny

“p53 sequence”

“Phage library
sequences”

Shoda

PLSQET **FSDLWKLL** PENNV

M**PR** **FMDYWEGL** N

VQN **FIDYWTQQ** F

TGPA **FTHYNATF**

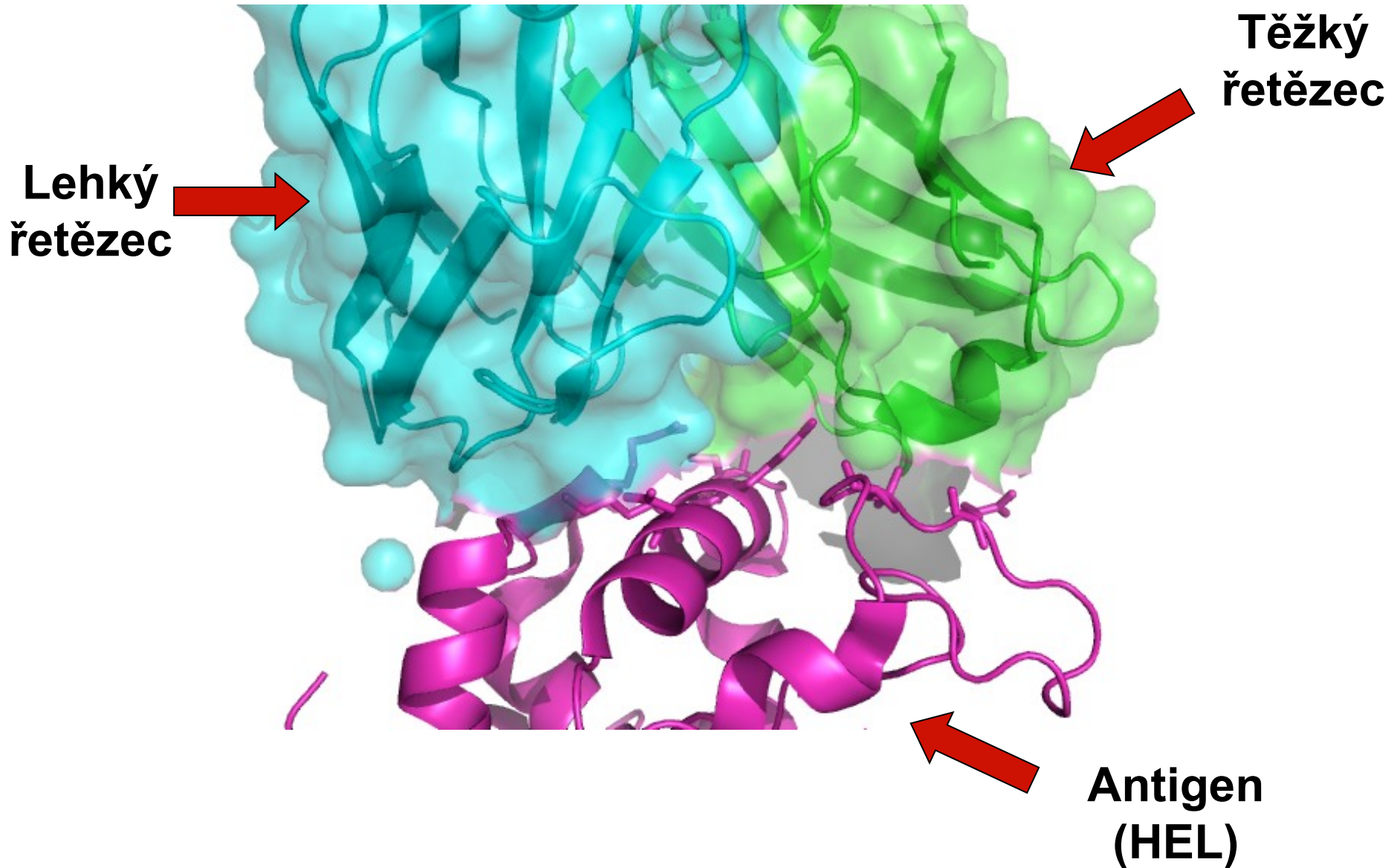
IDRAP**TFRDHW**FAL V

PEPLAV **FADYWETL** Y

PA **FSRFWSDL** SAGAR

xxxPx **FxDYWxxL** xxxxx

Konformační epitop



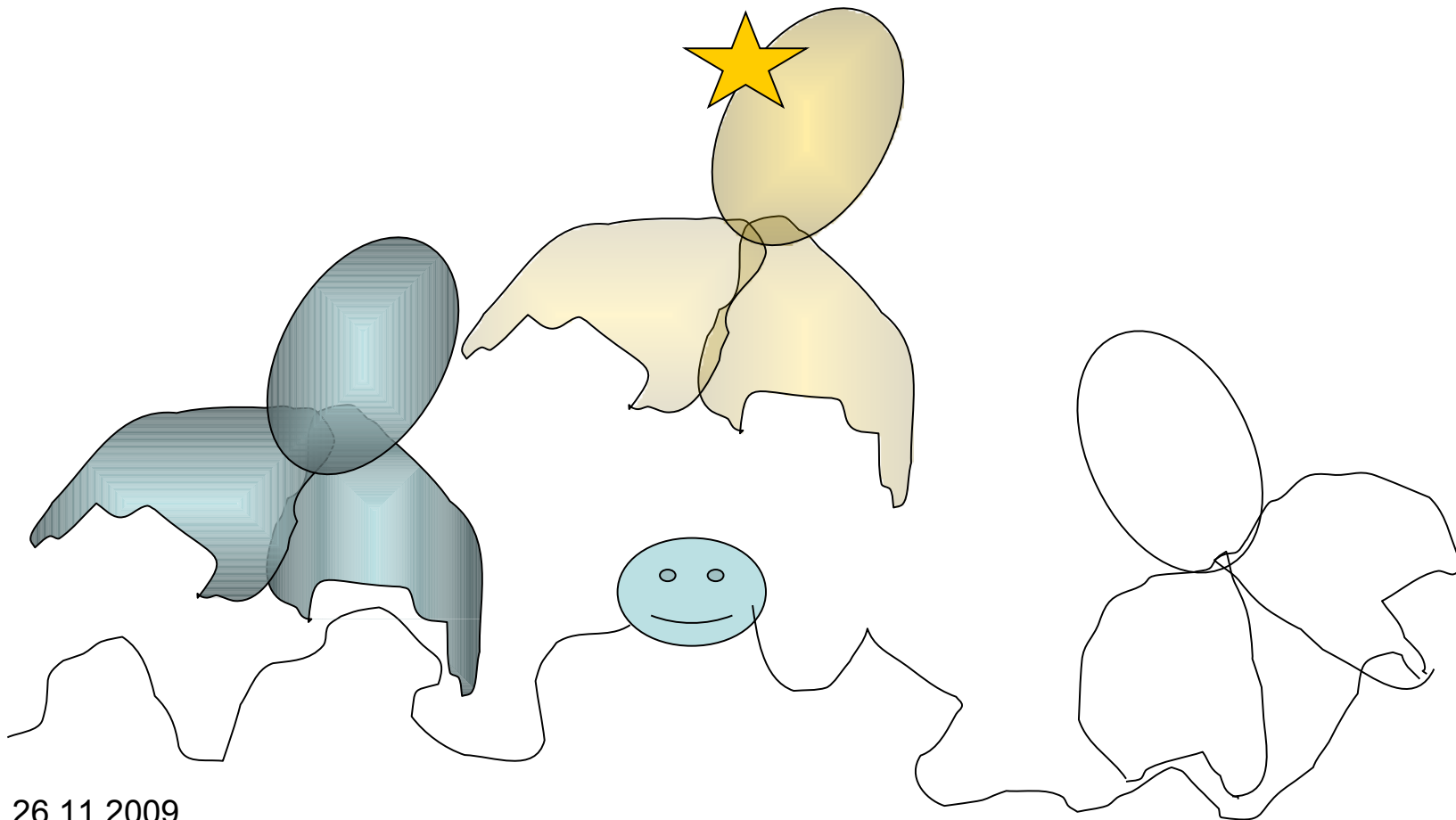
Vlastnosti

- 5-10 aminokyselin
- Nesouvislá sekvence
- Protilátky proti konformačním epitopům pracují dobře za nativních podmínek
- Nefungují v imunoblotingu
- Lokalizace je velmi složitá s využitím “NMR”, “X-Ray”, “Hydrogen Deuterium exchange“
- Lokalizace “snadnější” s využitím exprese proteinových fragmentů nebo částečnou proteolýzou a následnou imuno-precipitací

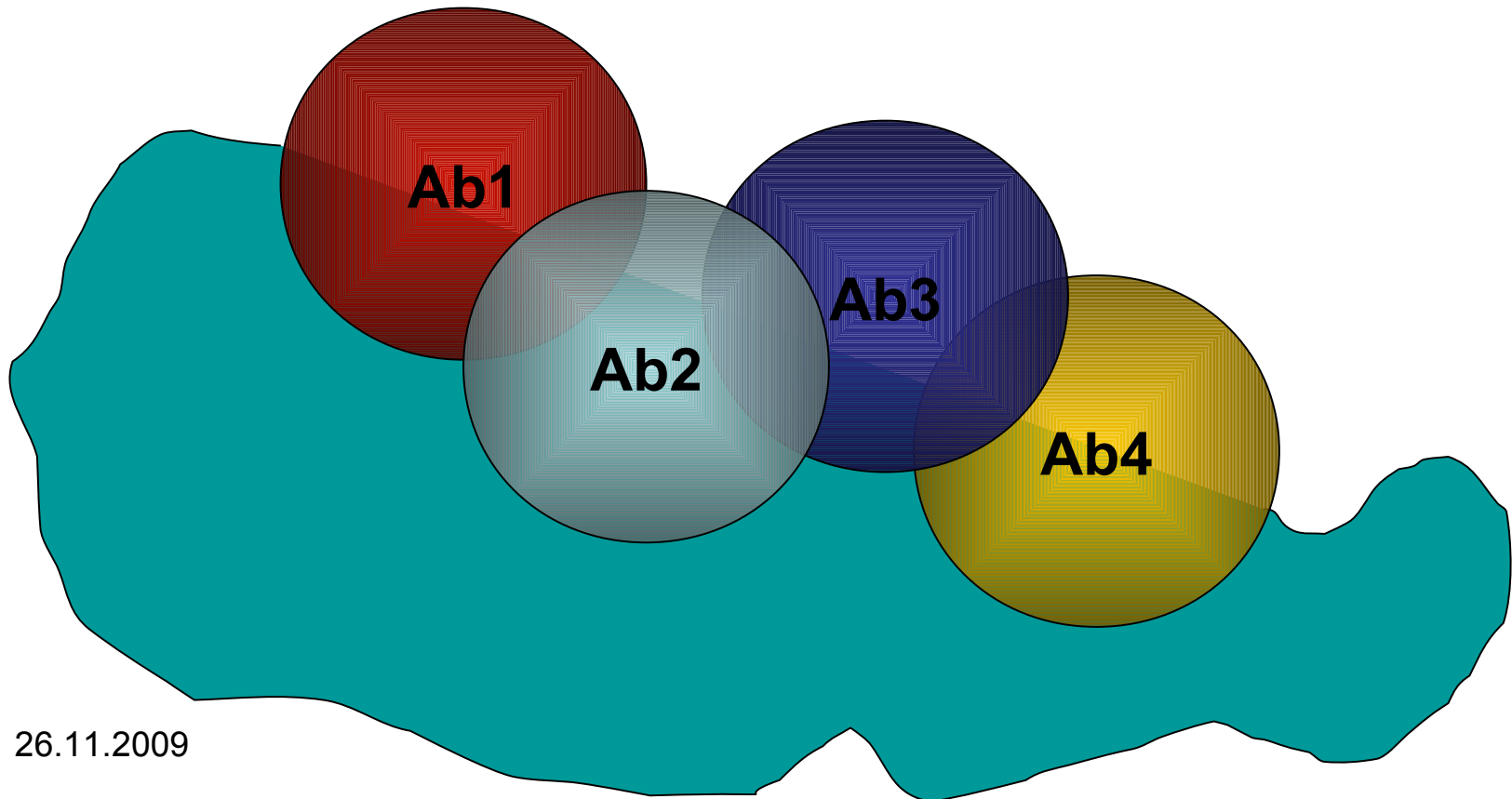
Metody mapování konformačního epitopu

- Kompetiční mapování
- Hybridní proteiny
- Exprese fragmentu
- Částečná proteolýza
- Hmotnostní spektrometrie

Blokování vazby jedné protilátky vazbou protilátky se známým cílovým epitopem

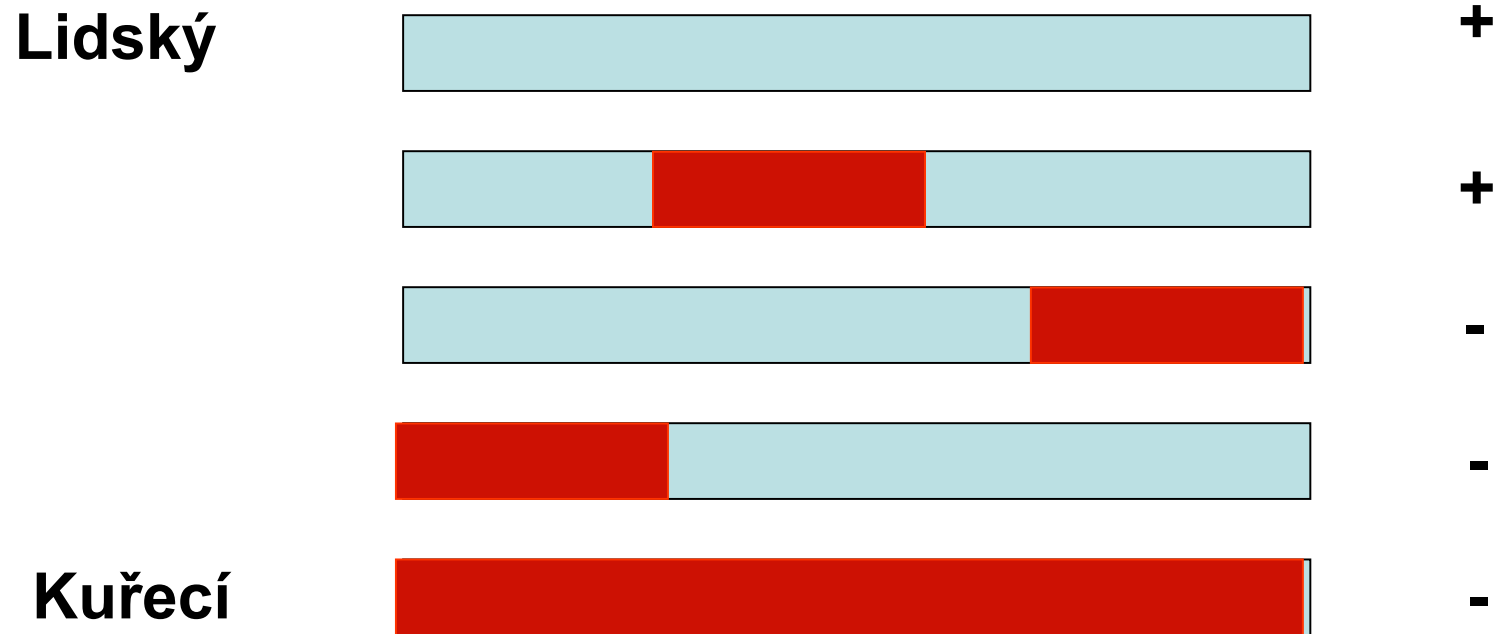


Kompetiční metoda



26.11.2009

Hybridní Proteiny



Příklad

- PAb 1620: anti-p53, neblotuje, IP pouze s Wild-type p53 konformací. Epitop je teplotně senzitivní. “Pepscan” analýza je negativní.
- Mapováno pomocí kuřecího - lidského hybridního proteinu

LWVSATPPAGSRV
145 157

LYPEYLEDRQTFRH
201 214

Wang et al: Oncogene 20:2318

Metody mapování konformačního epitopu

- Kompetiční mapování
- Hybridní proteiny
- Exprese fragmentů
- Částečná proteolýza
- Hmotnostní spektrometrie



Nyní všemu rozumím

**Více než
já vím!!**



Perfektní