

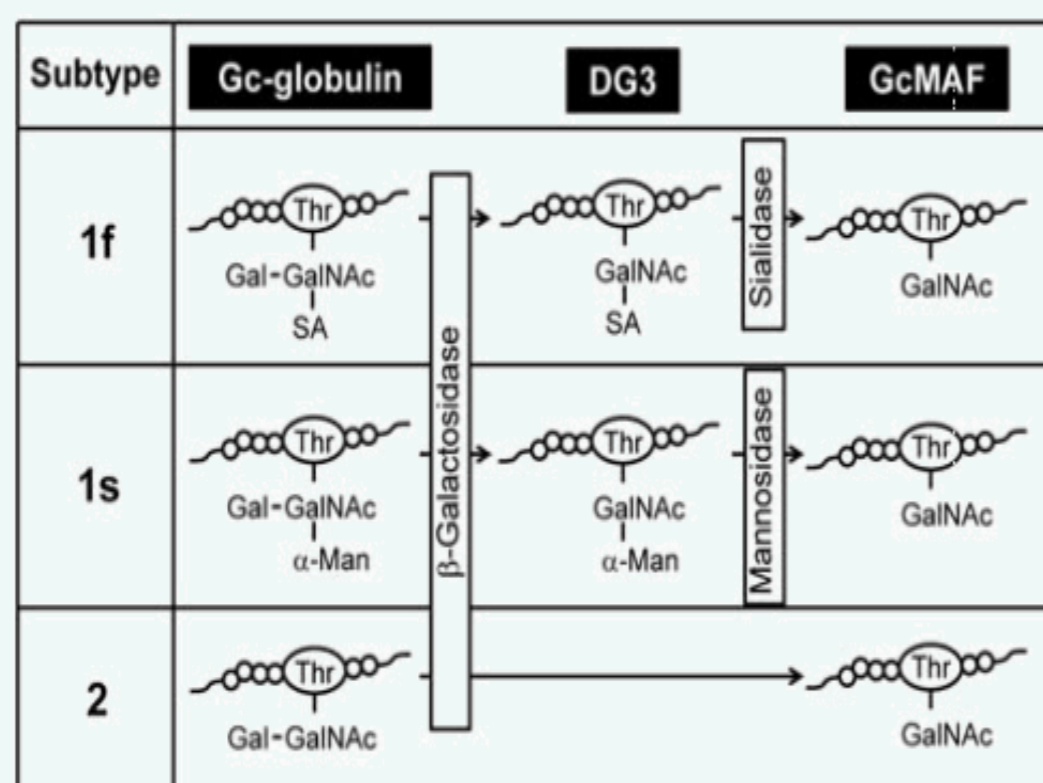
Transformatie van Gc-globuline tot GcMAF

Gudrun Conings

Master IW biochemie

Doelstelling

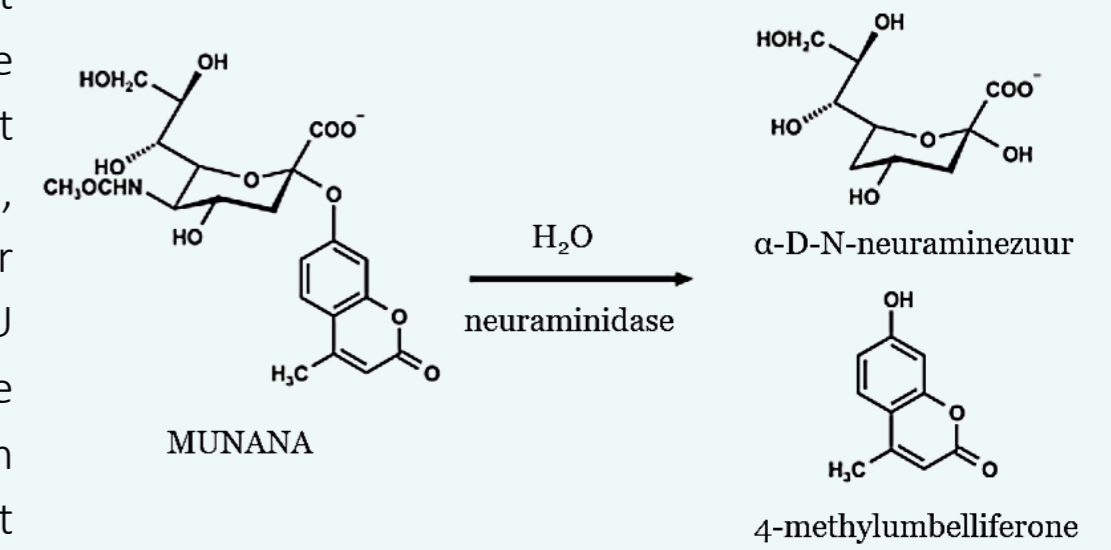
Gc-macrofaagactiverend eiwit (GcMAF), een plasmaproteïne gevormd na enzymatische deglycosylatie van Gc-globuline, beschikt over macrofaagactiverende eigenschappen waardoor het mogelijk toegediend kan worden als adjuvans voor het natuurlijk afweersysteem [1], [2]. Het doel van deze masterproef is onderzoeken of membraangebonden β -galactosidase en neuraminidase op respectievelijk geactiveerde humane B- en T-cellen inzetbaar zijn voor de in vitro transformatie van serum Gc1F en Gc2-globuline tot GcMAF (Figuur 1) [3], [4].



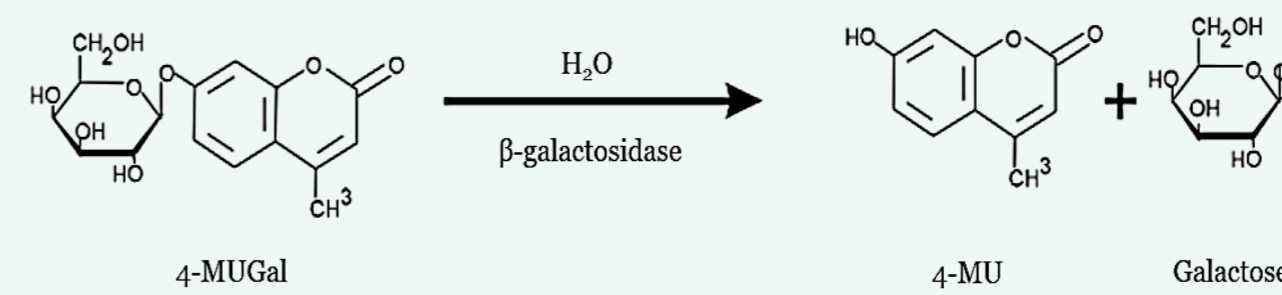
Figuur 1: Deglycosylatie van Gc-globuline subtypes tot vorming van GcMAF [5]

Materiaal en methode

De β -galactosidase en neuraminidase enzymactiviteit van PMA-geactiveerde leukocyten na variabele incubatietijden in humaan serum op 37°C wordt achterhaald met behulp van fluorescentiemetingen, uitgevoerd met de Victor X4 Multilabel Plate Reader van PerkinElmer. Het fluorescentie signaal van 4-MU wordt gemeten waarna de overeenkomstige enzymactiviteit kan worden berekend uitgaande van een standaard ijkcurve. Het substraat MUNANA wordt door neuraminidase gehydrolyseerd waardoor het fluorescerend product 4-MU vrijkomt, dat bij een golflengte van 460 nm wordt gemeten (Figuur 2).



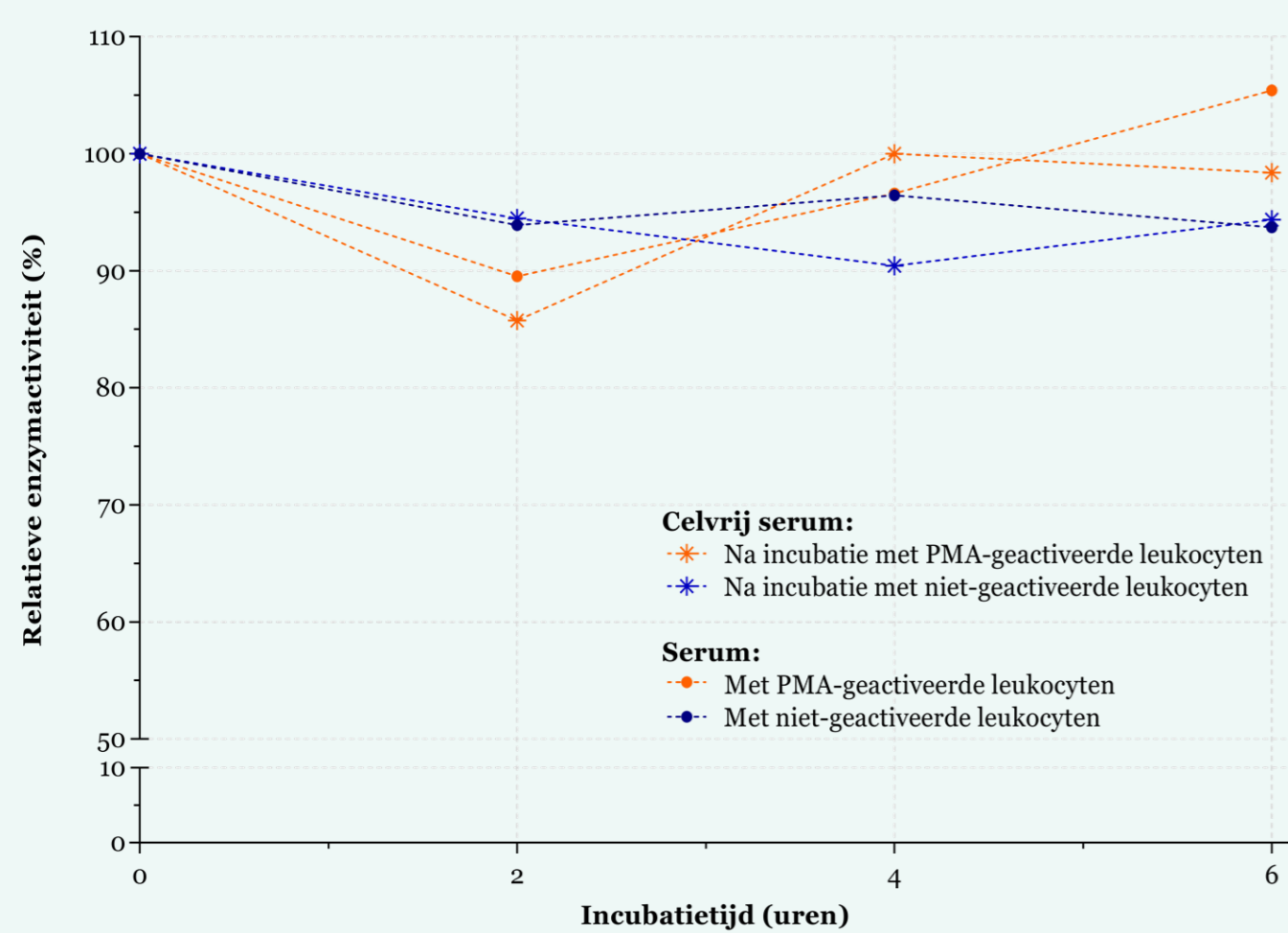
Figuur 2: Enzymatische hydrolyse van MUNANA door neuraminidase



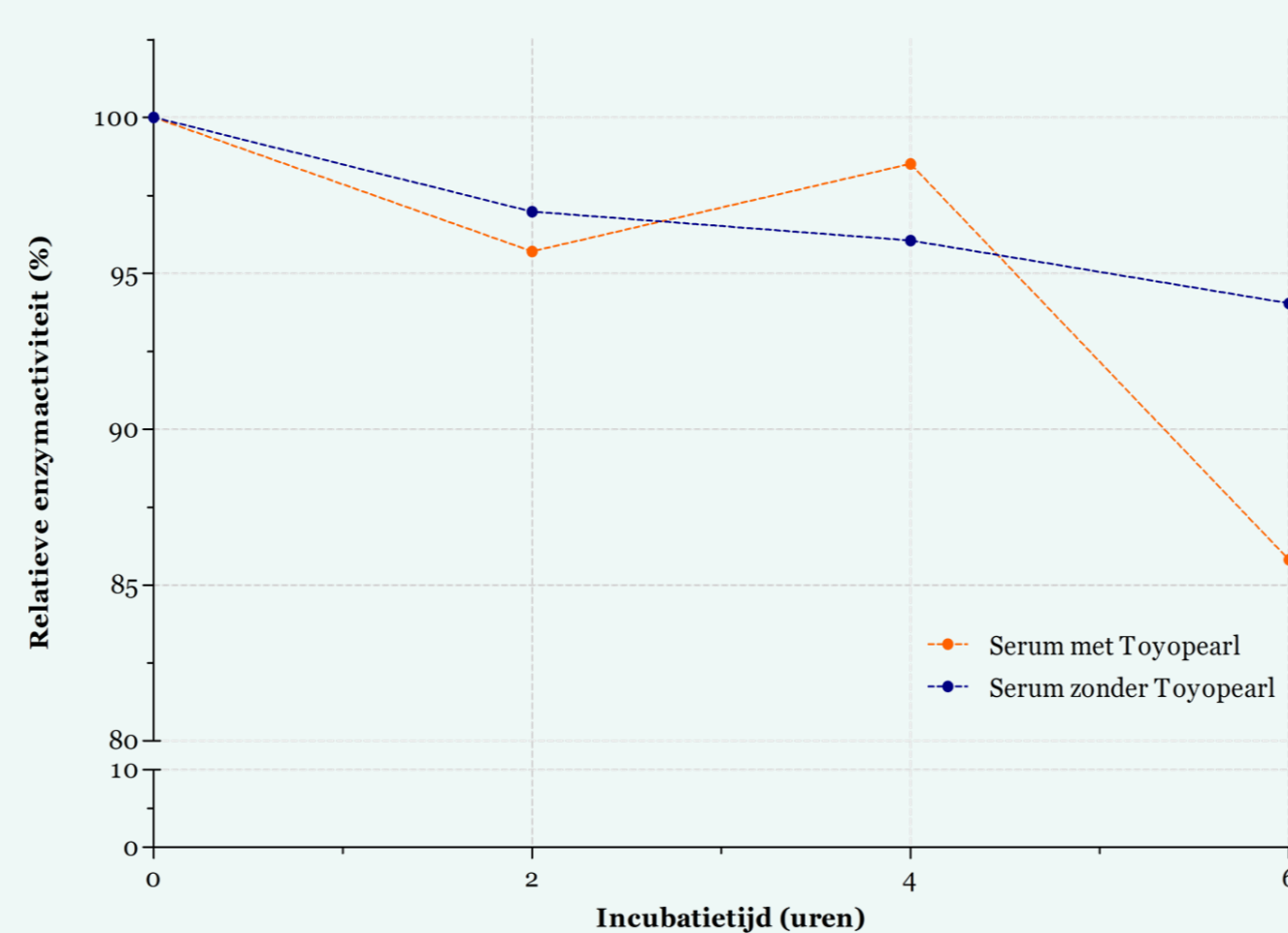
Figuur 3: Enzymatische hydrolyse van 4-MUGal door β -galactosidase

Voor het bepalen van de β -galactosidase enzymactiviteit wordt gebruik gemaakt van het substraat 4-MUGal dat enzymatisch gehydrolyseerd wordt tot de vorming van het fluorescerend product 4-MU (Figuur 3). Het emissiesignaal van het product wordt gemeten in basisch midden bij een golflengte van 460 nm.

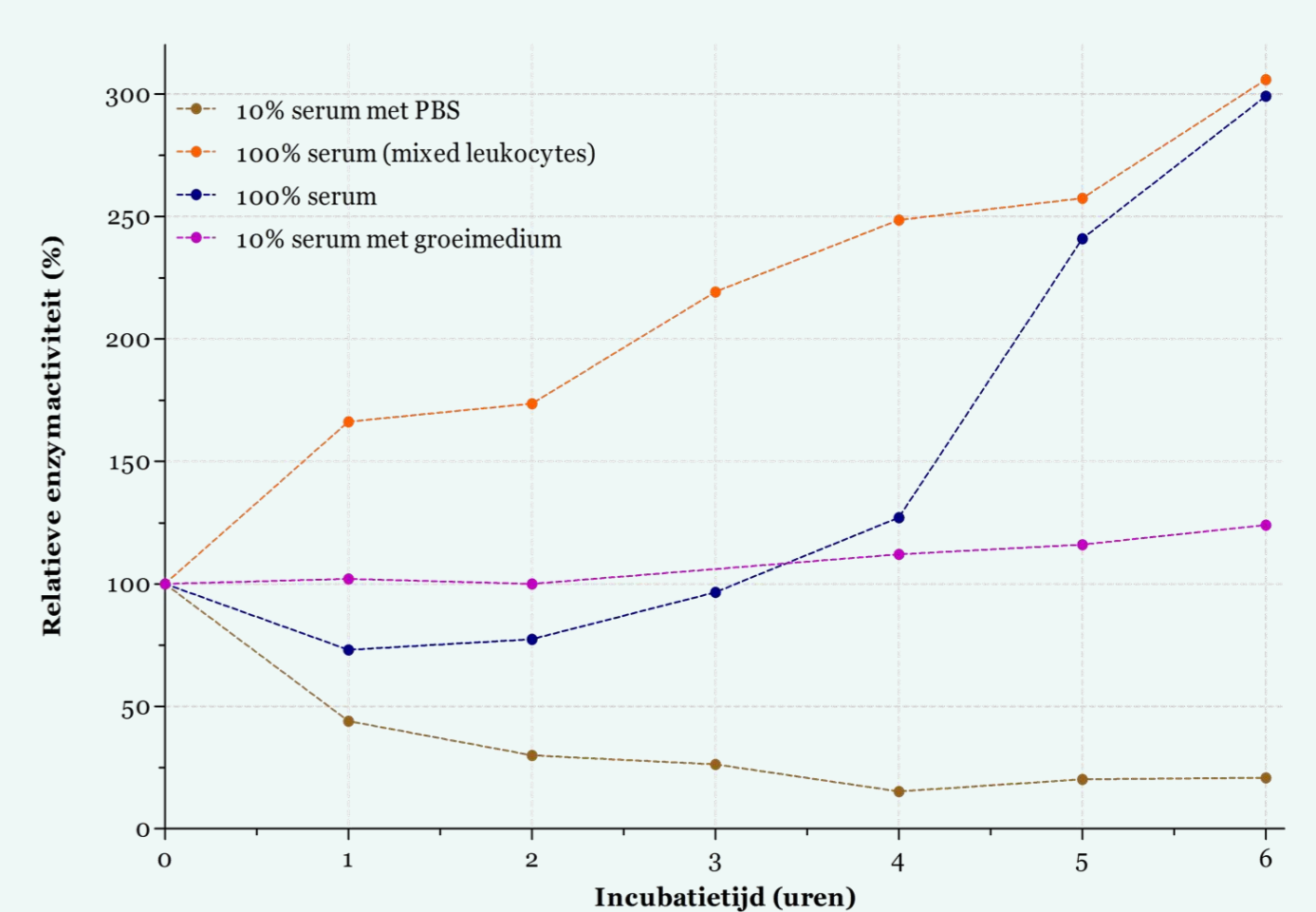
Resultaten



Figuur 4: Relatieve β -galactosidase-enzymactiviteit ten opzichte van 0 uur incubatie van PMA-geactiveerde leukocyten met serum, niet-geactiveerde leukocyten met serum en celvrij serum na variërende incubatietijden in 100% serumpool B op 37°C



Figuur 5: Relatieve β -galactosidase-enzymactiviteit ten opzichte van 0 uur incubatie van serum met en zonder toevoeging van geïmmobiliseerde β -galactosidase op de vaste drager Toyopearl na variërende incubatietijden in 100% serumpool B op 37°C



Figuur 6: Relatieve membraangebonden β -galactosidase-enzymactiviteit ten opzichte van 0 uur incubatie van PMA-geactiveerde leukocyten na variërende incubatietijden op 37°C in 100% serum, 10% serum met PBS en 10% serum met groeimedium KMED/F-12

Conclusie

Een traag stijgende enzymexpressie van membraangebonden β -galactosidase op geactiveerde leukocyten wordt waargenomen na incubatie in 100% serum met slechts een geringe enzymactiviteitstijging van vrije enzymen in het serum. De bekomen resultaten geven een positieve indicatie voor het gebruik van geactiveerde B-cellen voor de eerste deglycosylerende reactie van serum Gc1F- en Gc2-globuline voor het bekomen van GcMAF. Voor het construeren van een ijkcurve bij het gebruik van de neuraminidase-enzymactiviteitsmetingen, dient een optimalisatie van het bestaande protocol te worden doorgevoerd. Voordat een eenduidige conclusie kan getroffen worden over de mogelijkheid om PMA-geactiveerde humane B- en T-cellen in te zetten voor de transformatie van Gc1F- en Gc2-globuline naar GcMAF, dient de verandering in membraangebonden neuraminidase-enzymactiviteit op geactiveerde T-cellen bij incubatie met humaan serum te worden onderzocht.

Bibliografie

- [1] T. Inui et al., "Case Report: GcMAF Treatment in a Patient with Multiple Sclerosis," *Anticancer Res.*, vol. 36, no. 7, pp. 3771–4, Jul. 2016.
- [2] E. Saburi, A. Saburi, and M. Ghanei, "Promising role for Gc-MAF in cancer immunotherapy: from bench to bedside," *Casp. J. Intern. Med.*, vol. 8, no. 4, pp. 228–238, 2017.
- [3] H. Nagasawa et al., "Gc protein (vitamin D-binding protein): Gc genotyping and GcMAF precursor activity," *Anticancer Res.*, vol. 25, no. 6A, pp. 3689–95.
- [4] M. Speeckaert, G. Huang, J. R. Delanghe, and Y. E. C. Taes, "Biological and clinical aspects of the vitamin D binding protein (Gc-globulin) and its polymorphism," *Clin. Chim. Acta*, vol. 372, no. 1–2, pp. 33–42, Oct. 2006.
- [5] K. Hirota et al., "Antitumor effect of degalactosylated gc-globulin on orthotopic grafted lung cancer in mice," *Anticancer Res.*, vol. 33, no. 7, pp. 2911–5, Jul. 2013.

Promotoren / Copromotoren:

Dhr. Eugene Bosmans en ing. Bart Thewissen
ir. Myriam Meyers