



Barangolások a peptidek és fehérjék világában

Orbán Erika

Kutató-fejlesztő, Biotechnológiai analitikai osztály, Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Nyrt.



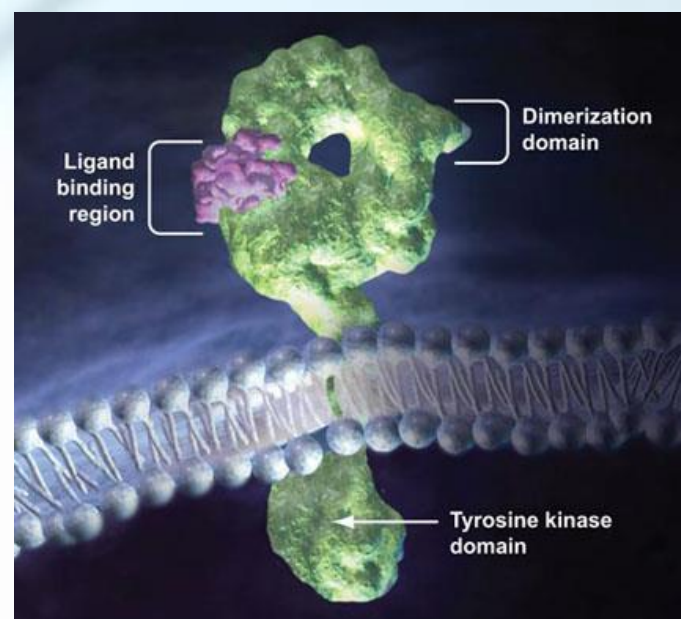
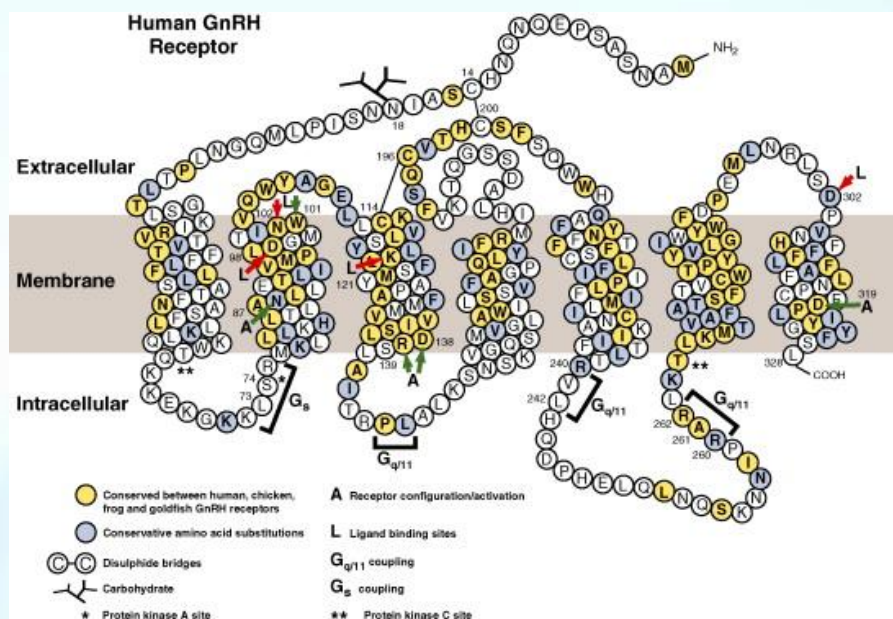
RICHTER GEDEON



Magyar Tudomány Ünnepe, Kémiai Tudományok Osztálya és az Alapítvány a Magyar Peptid- és Fehérjekutatásért ünnepi előadóülése
2016.november 14.

Az irányított tumorterápia lehetséges célpontjai

Tumorsejteken nagy mennyiségben kifejeződő sejtfelszíni molekulák



Millar, *Animal Reproduction Science*, 88 (1-2), 2005.

<http://www.biooncology.com/research-education/her/overview/receptors/index.html>

Irányító molekulák: GnRH-származékok

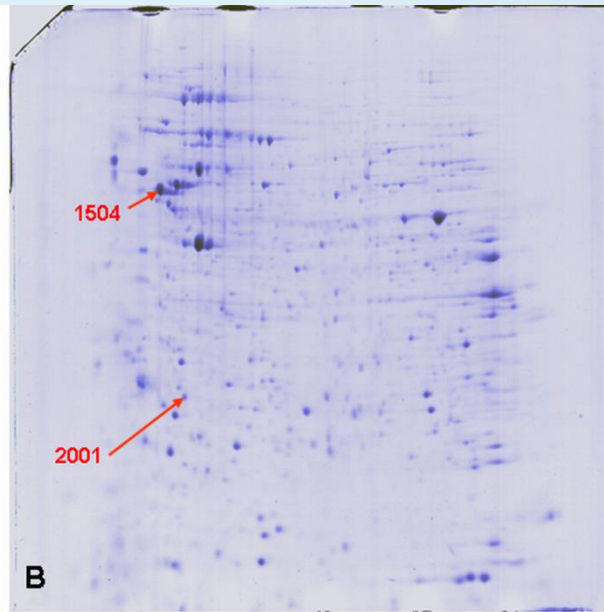
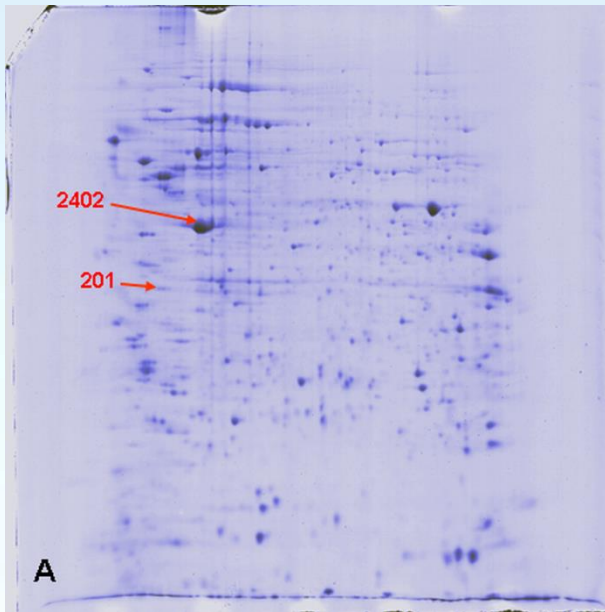
Irányító molekula: LTVSPWY peptid (fág-könyvtár)

A Dau=Aoa-LTVSPWY-NH₂ konjugátum az ErbB2 receptor célzására

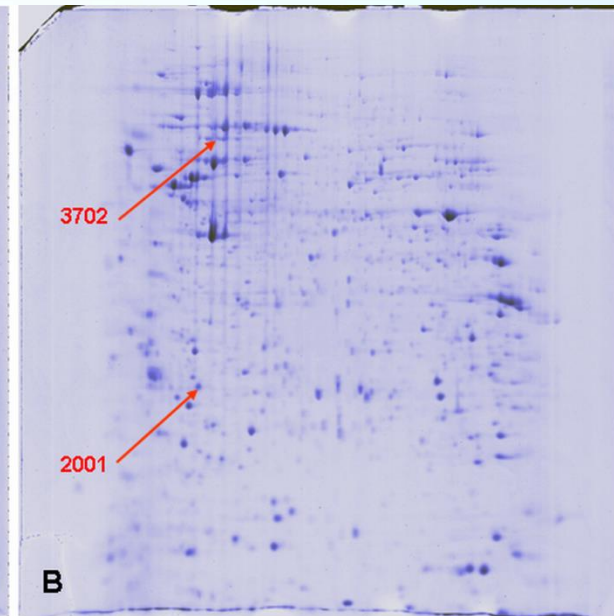
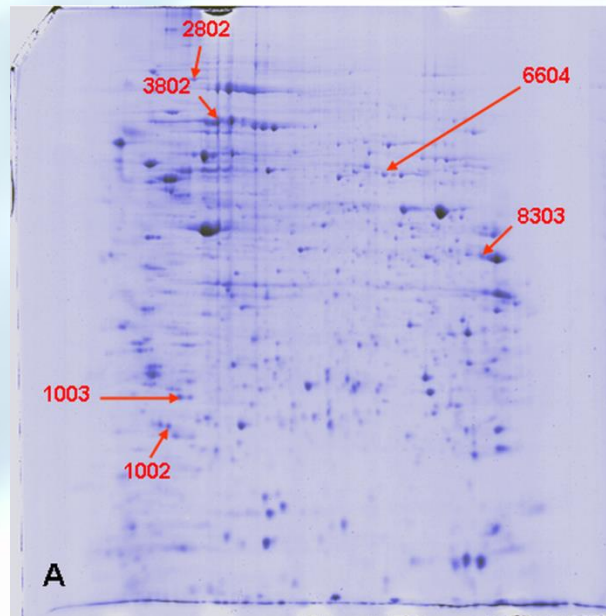
- Szintézis és kémiai jellemzés
- Stabilitásvizsgálat (nátrium-citrát/citromsav puffer, sejtenyésző médium, patkány máj lizoszóma preparátum)
- Abszorpciós és emissziós tulajdonságok
- DNS-kötő képesség
- *In vitro* citosztatikus hatás
- Sejtbejutás
- Hatás HL-60 sejtek protein expressziós profiljára

	SK-BR-3	HepG2	HL-60	MCF-7
Dau=Aoa-LTVSPWY-NH ₂	37,90±2,83	3,07±0,02	0,53±0,12	7,42±0,49
Dau	3,64±0,52	0,66±0,21	0,05±0,03	0,18±0,09

Reprezentatív gélképek



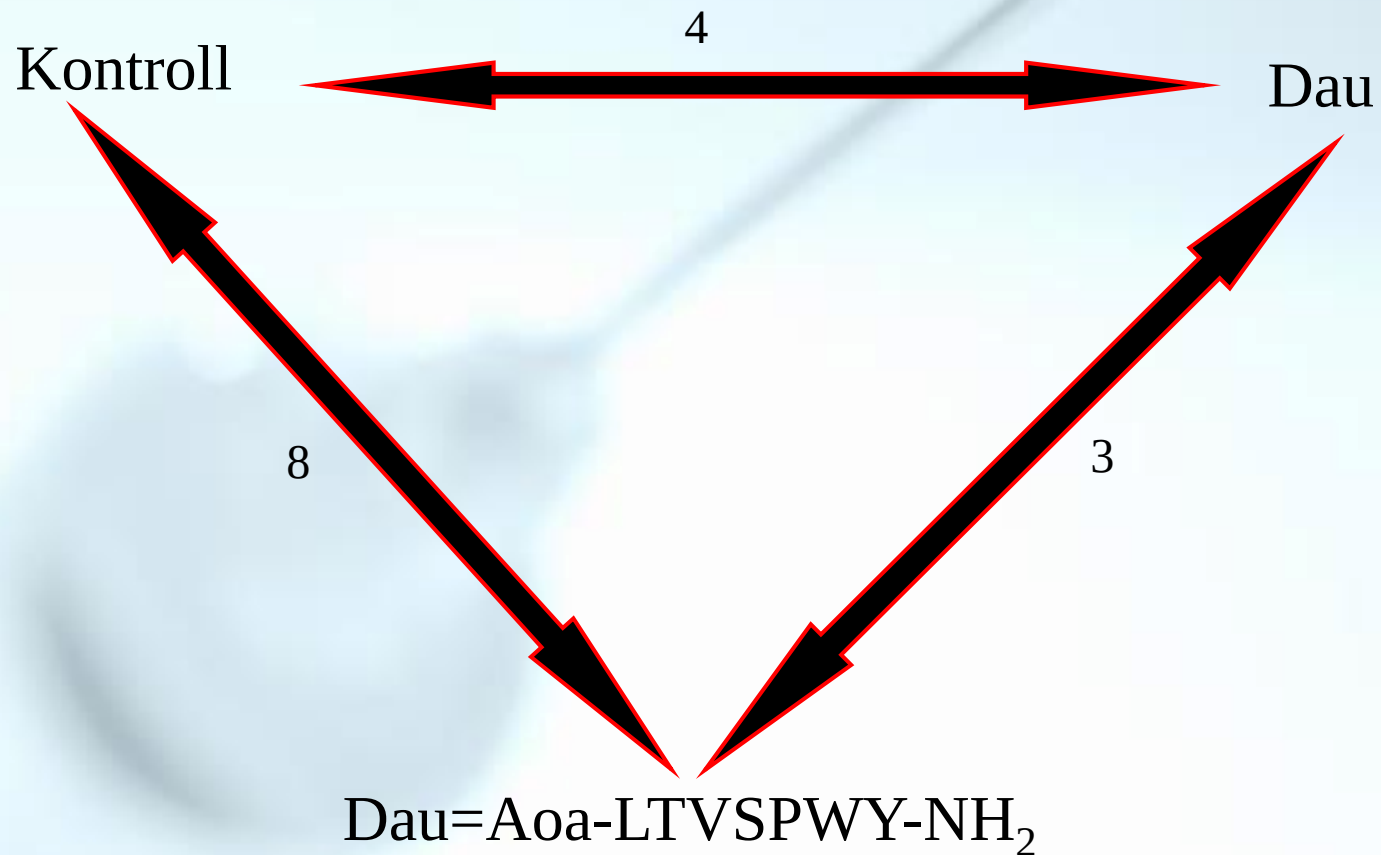
A: Kontroll, B: Dau



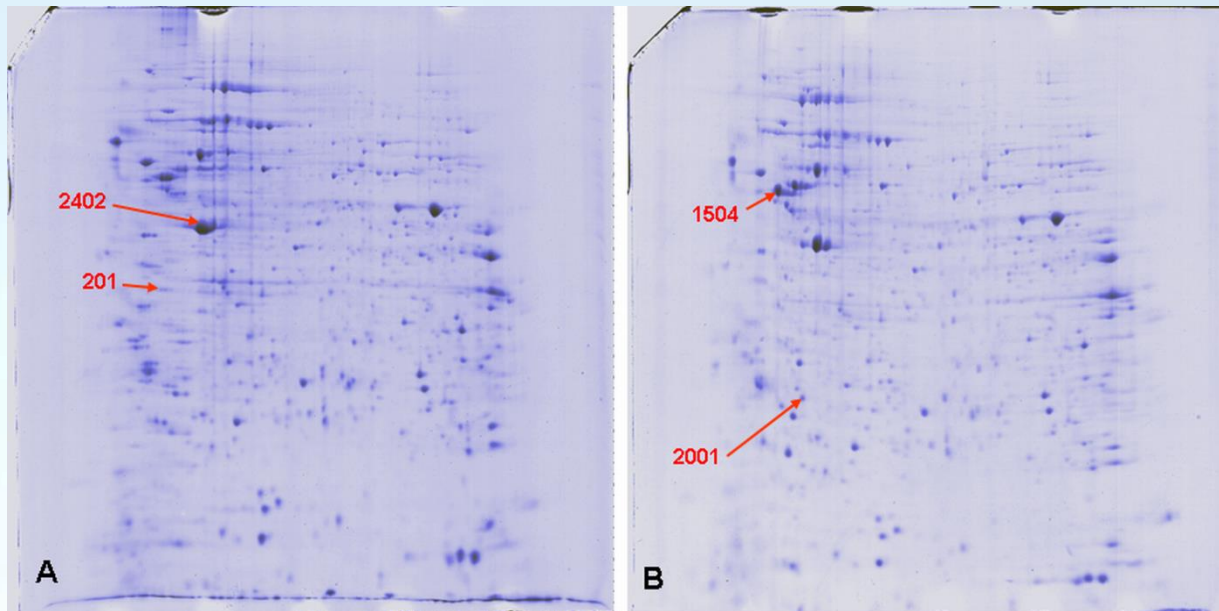
A: Kontroll, B: Dau=Aoa-LTVSPWY-NH₂

Összehasoníltás: PDQuest
8.0 szoftver

Összehasonlítások



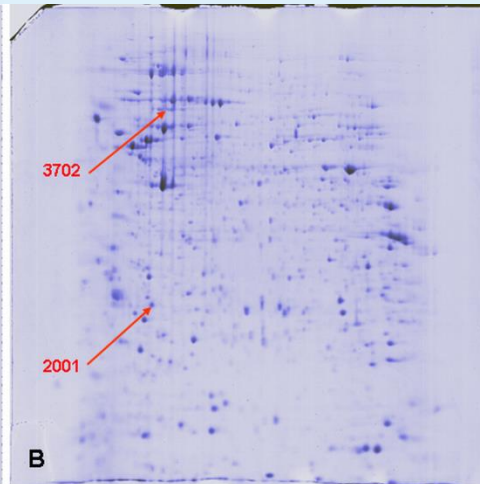
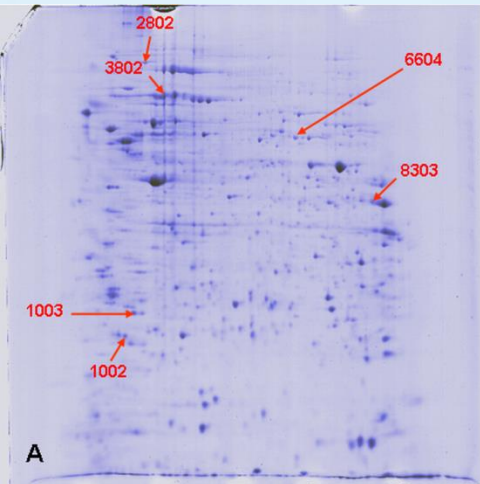
Fehérjék azonosítása



A: Kontroll, B: Dau

Sejtváz
DNS szintézis
Sejtciklus szabályozás

		Mennyiséggel arányos mérőszám					
Fehérje adatbázisban szereplő neve, eredete, rövidítése	Folt száma	Kontroll minta	Dau-kezelt minta	"Fold- change"	Mascot score	Mr(Da)	pI
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Cyclin) - Homo sapiens (Human) - [PCNA_HUMAN]	201	1440,7	171,5	0,1	2111	28768,78	4,57
Tubulin beta chain (Tubulin beta-5 chain) - Homo sapiens (Human) - [TBB5_HUMAN]	1504	1337,6	9713,9	7,3	11510	49670,82	4,78
Ran-specific GTPase-activating protein (Ran- binding protein 1) (RanBP1) - Homo sapiens (Human) - [RANG_HUMAN]	2001	789,7	1648,5	2,1	560	23310,12	5,19
Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin) - Homo sapiens (Human) - [ACTB_HUMAN]	2402	11178,5	1615,8	0,1	17877	41736,73	5,29



A: Kontroll

B: Dau=Aoa-LTVSPWY-NH₂

Sejtváz

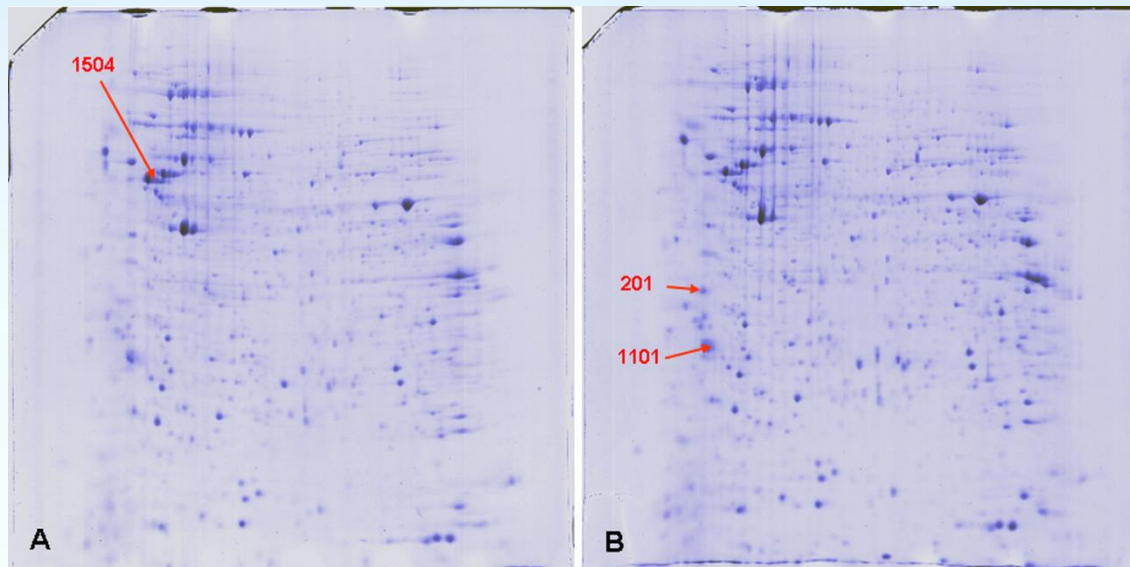
Sejtciklus szabályozás

Anyagcsere

Chaperon

Jelátvitel

Fehérje adatbázisban szereplő neve, eredete, rövidítése	Folt száma	Mennyiséggel arányos mérőszám		"Fold-change"	Mascot score	Mr(Da)	pI
		Kontroll minta	Dau=Aoa-LTVSPWY-NH ₂ kezelt minta				
Translationally-controlled tumor protein (TCTP) (p23) (Histamine-releasing factor) (HRF) (Fortilin) - Homo sapiens (Human) - [TCTP_HUMAN]	1002	1406,2	5,6	0,004	3665	19595,34	4,84
Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (Rho GDI 2) (Rho-GDI beta) (Ly-GDI) - Homo sapiens (Human) - [GDIS_HUMAN]	1003	2253,9	5,6	0,002	3288	22988,01	5,10
Ran-specific GTPase-activating protein (Ran-binding protein 1) (RanBP1) - Homo sapiens (Human) - [RANG_HUMAN]	2001	789,7	1805	2,286	560	23310,12	5,19
Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER ATPase) (15S Mg(2+)-ATPase p97 subunit) (Valosin-containing protein) (VCP) - Homo sapiens (Human) - [TERA_HUMAN]	2802	994,4	271,7	0,273	2657	89321,8	5,14
Plastin-2 (L-plastin) (Lymphocyte cytosolic protein 1) (LCP-1) (LC64P) - Homo sapiens (Human) - [PLSL_HUMAN]	3702	482,3	1065,6	2,209	4924	70288,39	5,29
Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8) - Homo sapiens (Human) - [HSP7C_HUMAN]	3802	6507,8	5,6	0,001	10972	70898,09	5,37
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95) (3-PGDH) - Homo sapiens (Human) - [SERA_HUMAN]	6604	1067,9	526	0,493	4131	56650,5	6,29

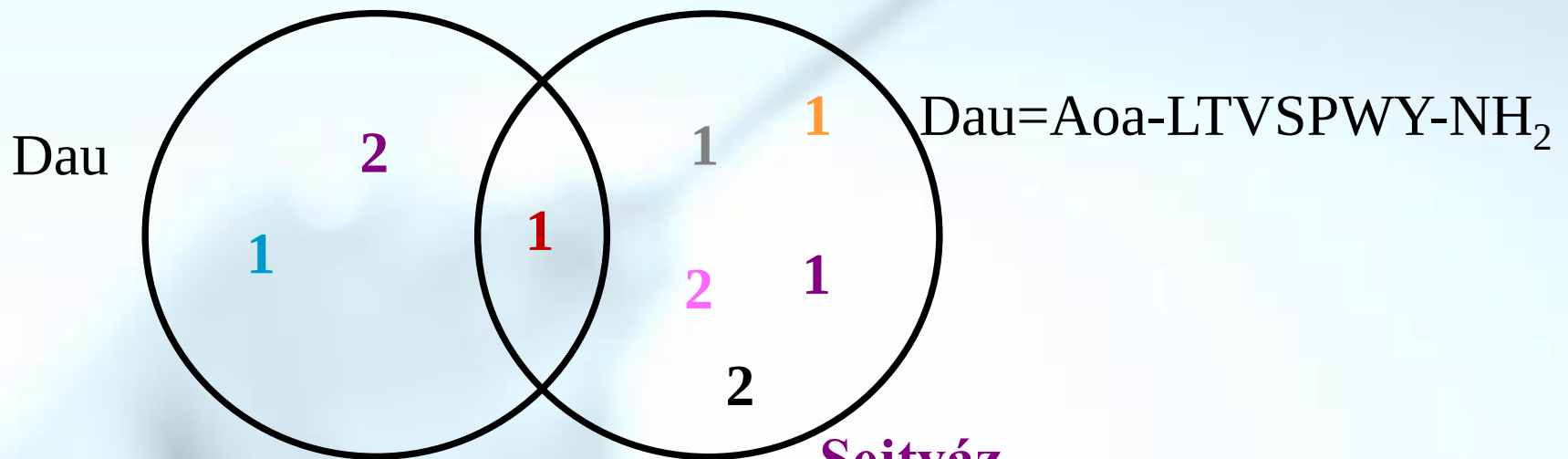


A: Dau
B: Dau=Aoa-LTVSPWY-NH₂

Sejtváz
DNS szintézis
Jelátvitel

		Mennyiséggel arányos mérőszám					
Fehérje adatbázisban szereplő neve, eredete és rövidítése	Folt száma	Dau-kezelt minta	Dau=Aoa- LTVSPWY- NH ₂ kezelt minta	"Fold- change"	Mascot score	Mr(Da)	pI
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Cyclin) - Homo sapiens (Human) - [PCNA_HUMAN]	201	171,5	2165,8	12,6	2111	28768,78	4,57
14-3-3 protein gamma (Protein kinase C inhibitor protein 1) (KCIP-1) - Homo sapiens (Human) - [1433G_HUMAN]	1101	157,7	1814	11,5	3116	28302,59	4,8
Tubulin beta chain (Tubulin beta-5 chain) - Homo sapiens (Human) - [TBB5_HUMAN]	1504	9713,9	1981,3	0,2	11510	49670,82	4,78

Kontrollhoz viszonyított különbségek



Sejtváz

DNS szintézis

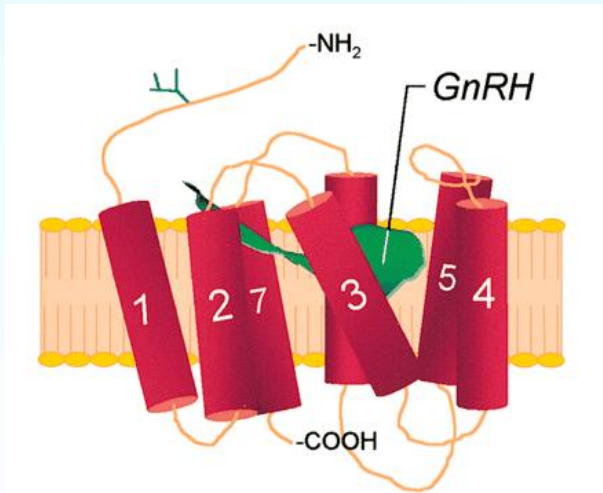
Sejtciklus szabályozás

Anyagcsere

Chaperon

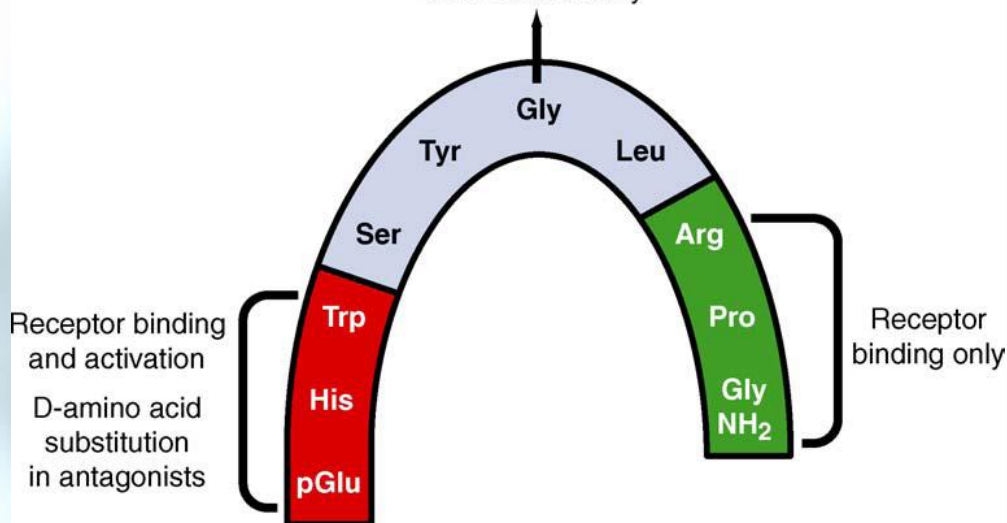
Jelátvitel

A GnRH receptor mint célfehérje

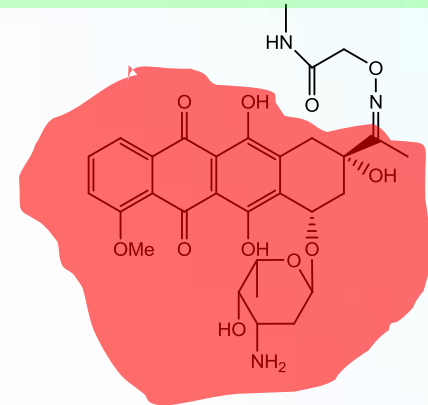


- 7TM receptor
- Számos tumortípuson overexpresszált (emlő-, prosztata-, ovárium és endometrium tumorok)
- Ligandum: GnRH (LH-RH) dekapeptid
- Formák: GnRH-I, GnRH-II, GnRH-III
- Különböző hatóanyag-GnRH-származékok alkalmazása irányított tumorterápiában

D-amino acid substitution
enhances activity

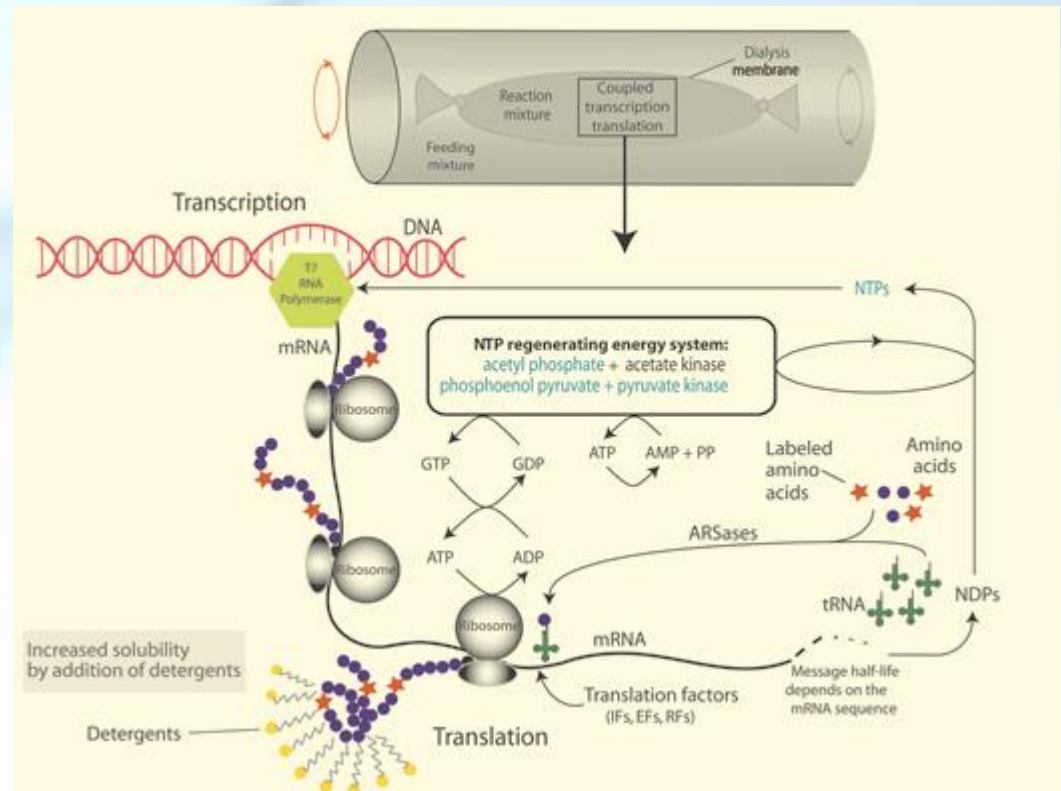


Glp-His-Trp-Ser-His-Asp-Trp-Lys-Pro-Gly-NH₂

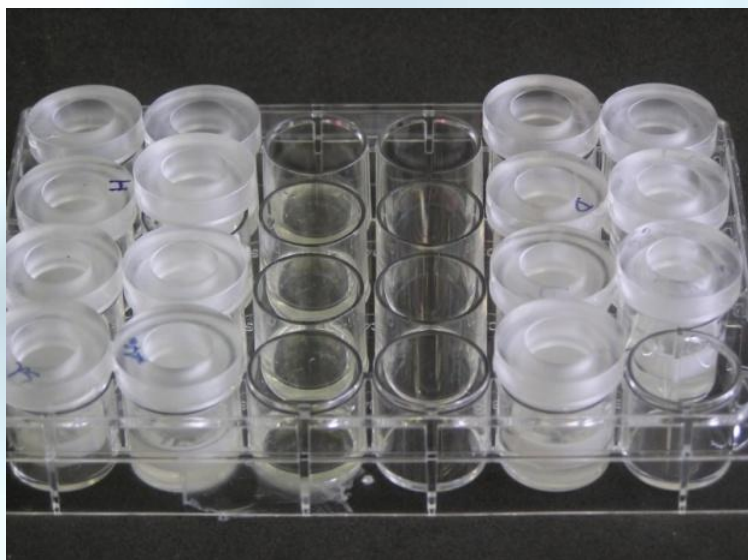
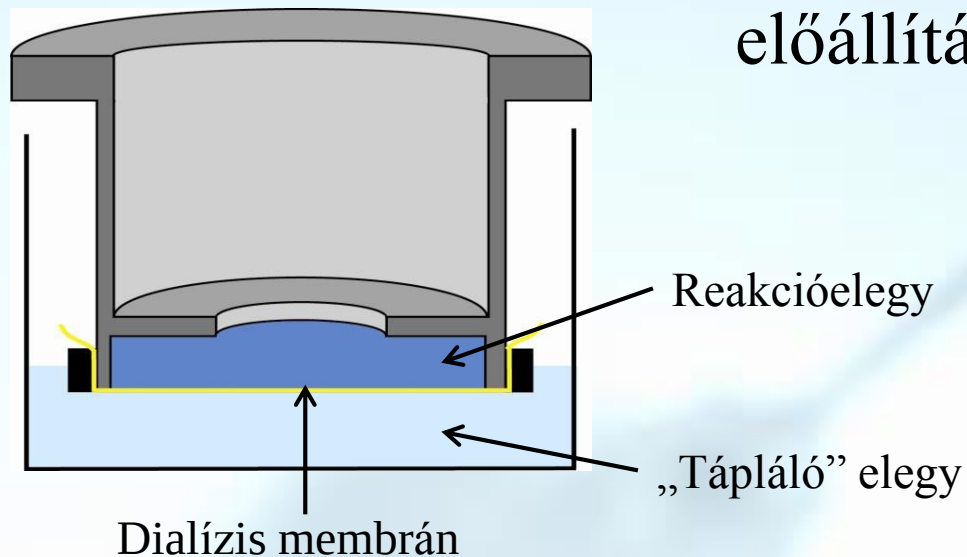


Hogyan kötődnek az egyes származékok a receptorhoz?

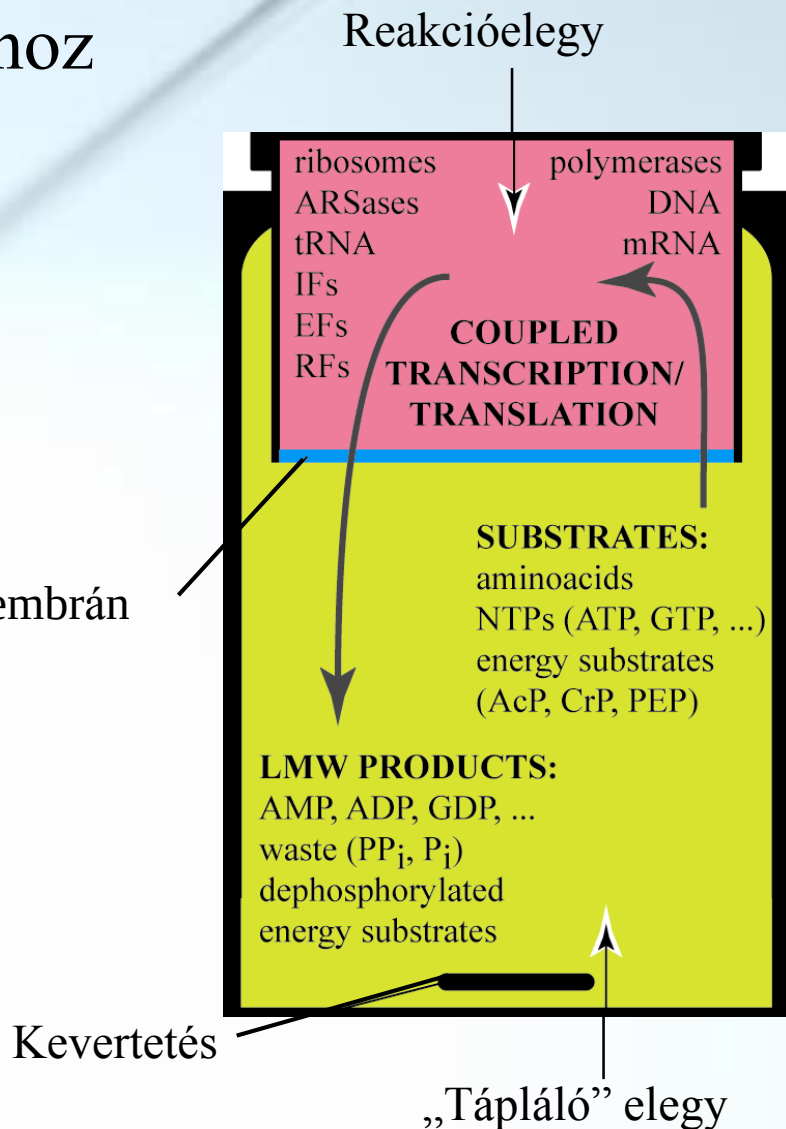
1. GnRHR előállítása sejtmentes expressziós rendszerben
2. A receptor előállítása „természetes közegében”, membránban: nanodisc
3. Kötődésvizsgálatok az eredeti ligandummal, majd a különböző származékokkal



Sejtmintes expresszió analitikai és preparatív mennyiségű fehérje előállításához

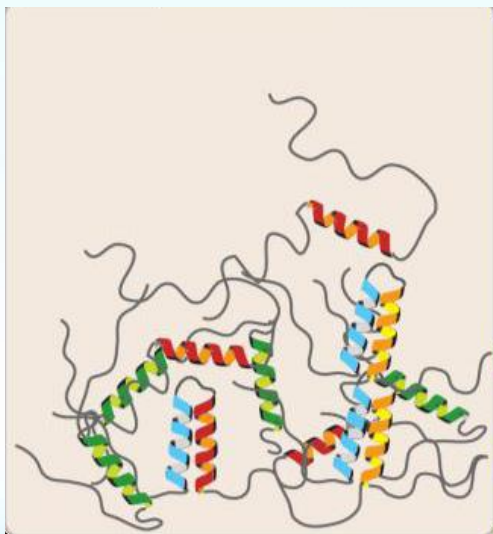


Dialízis membrán

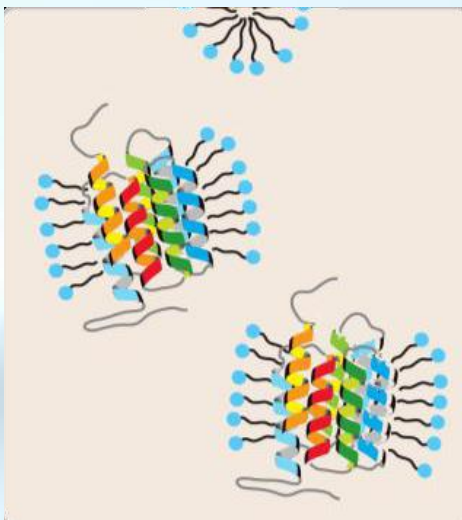


A sejtmentes expresszió különböző formái

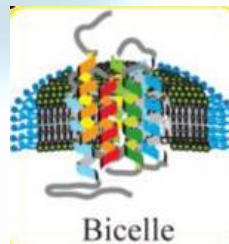
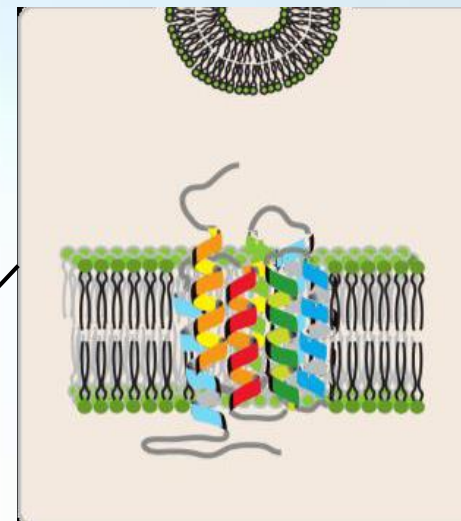
P-CF



D-CF



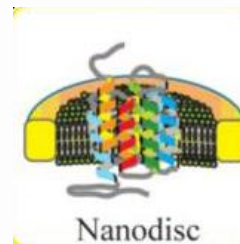
L-CF



Bicelle

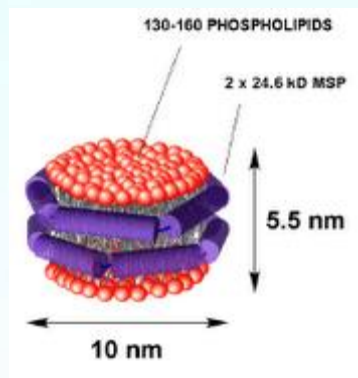


Liposome



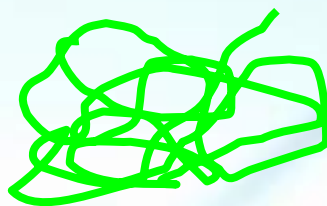
Nanodisc

GnRHR-nanodisc minta (L-CF mód) előállítása, célok



Üres nanodisc
(Reakcióelegyben)

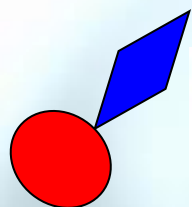
+



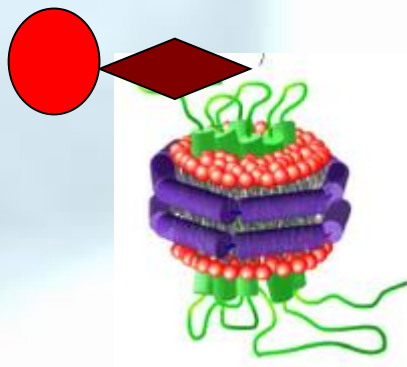
Célfehérje
(GnRHR)



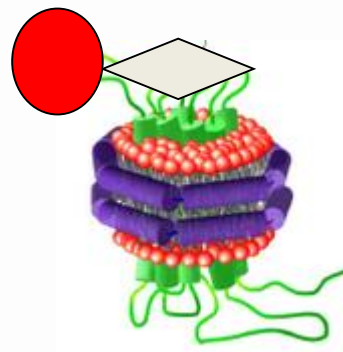
GnRHR-t tartalmazó nanodisc



Nincs kötődés

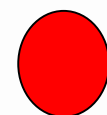


Gyenge kötődés

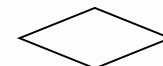


Erős kötődés

Funkcionális tesztek
elvégzése a ligandum-
származékokkal
(pl. kötődés
meghatározása)



Hatóanyag (Dau)

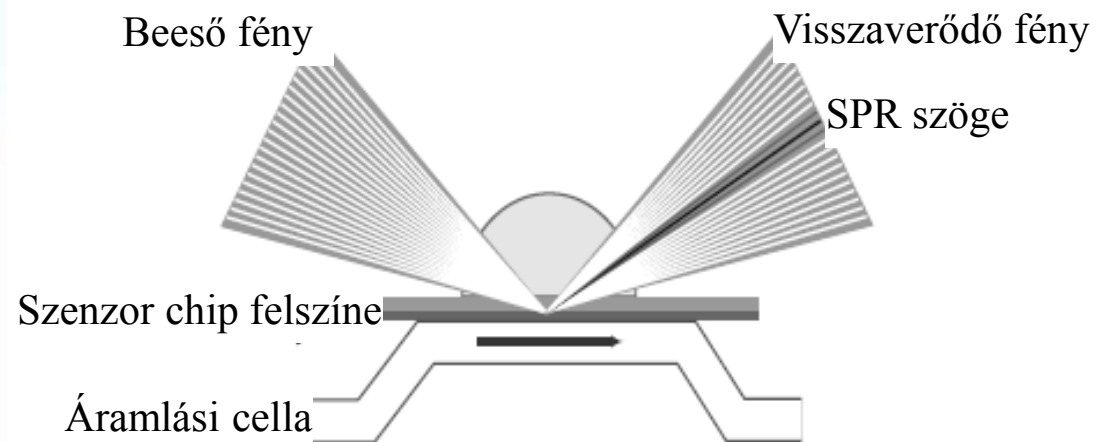


GnRH-származékok

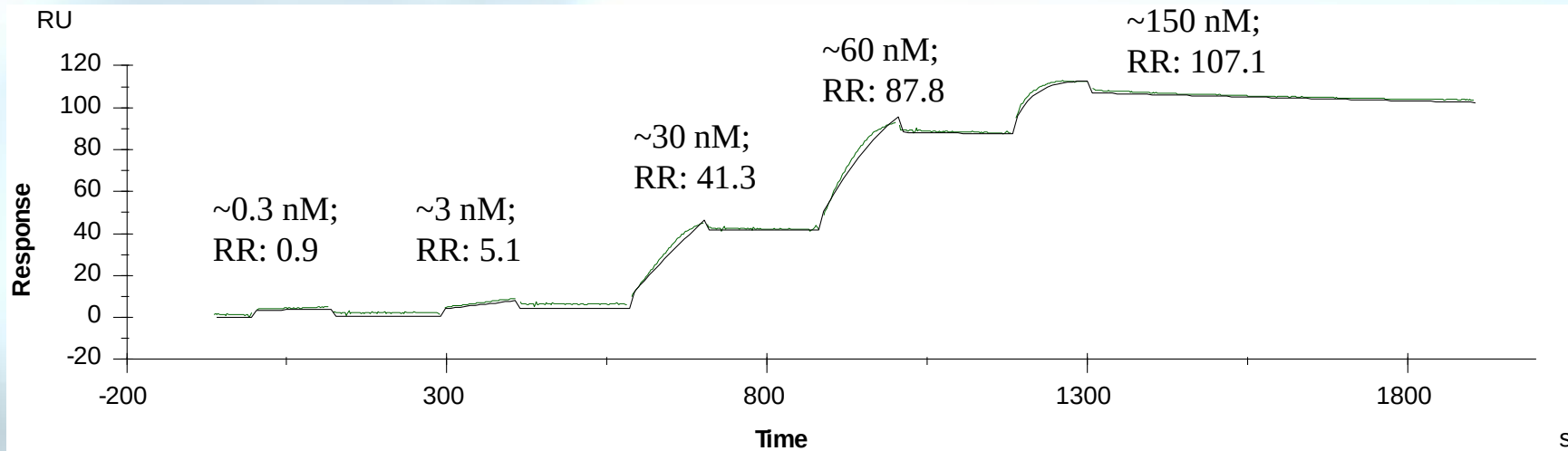
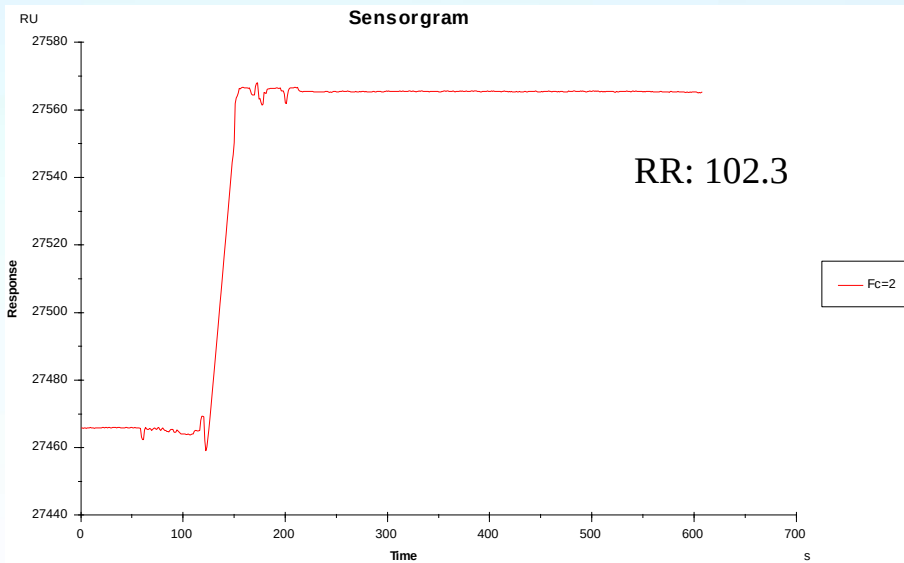
Kötődésvizsgálat: SPR (Biacore)

SPR: Surface Plasmon Resonance

- Molekulák közötti kapcsolat időbeli megfigyelése
- Egyik interakciós partner immobilizálása a chip felszínére, a másik molekula az „analitban”, azaz a folyadék fázisban
- Az interakciós partnerek kötődése változást okoz a chipen, azaz a felszínen, ami a kötődött molekulák mennyiségével arányos (megváltozott felszíni plazmon rezonancia)
- Alkalmazott chip: SA chip
- Felszínre immobilizált molekula: D-Lys⁶-GnRH-I-Biotin-Ahx
- Analit: CF-expresszált GnRHR nanodiscben



Eredmények (Biacore)



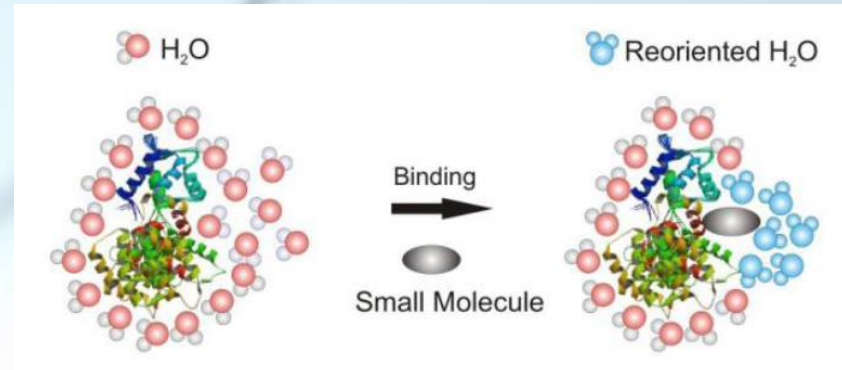
Single cycle kinetics, $K_d = 0,29 \text{ nM}$, $\chi^2: 0.637$

(Affinity: $K_d=61,8 \text{ nM}$)

Kötődésvizsgálat: MST

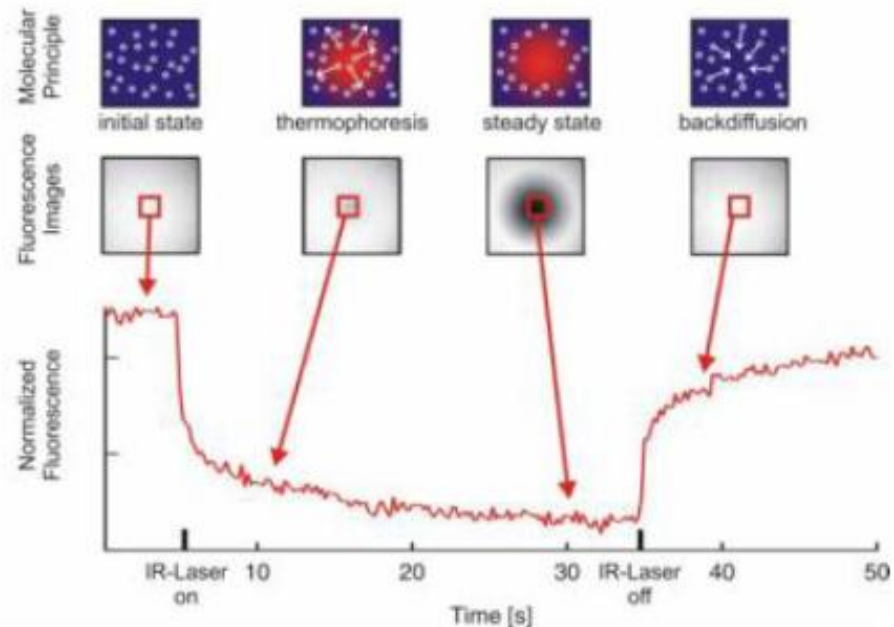
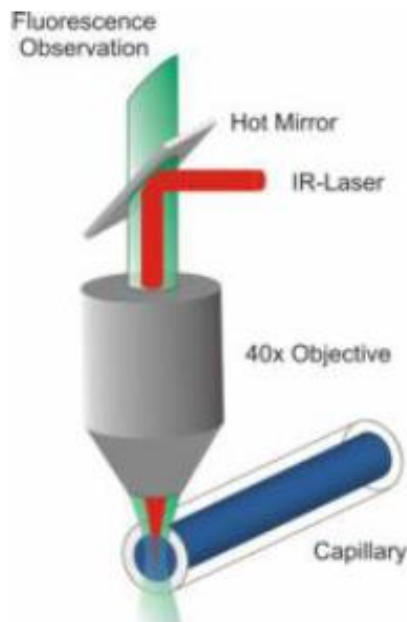
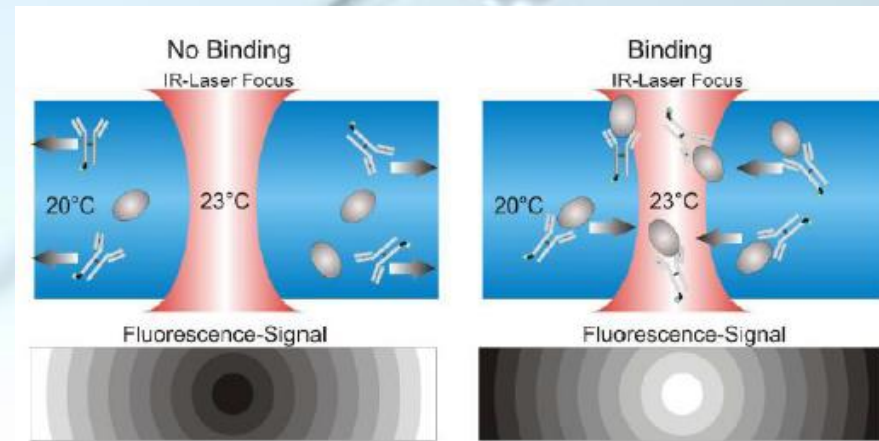
MST: Microscale Thermophoresis

- Biomolekuláris interakciót mér a molekula hidrátburkának megváltozása alapján
- Közel natív körülmények: nem szükséges a ligandum immobilizálása, felhasználó által választott közeg (akár szérum, sejtlizátum vagy egyéb komplex minták)



Microscale Thermophoresis

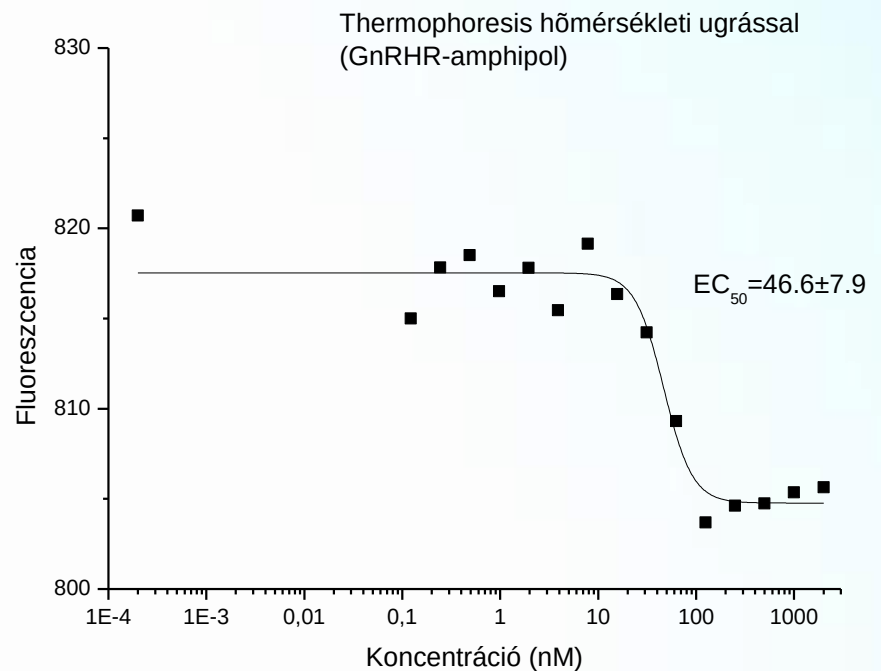
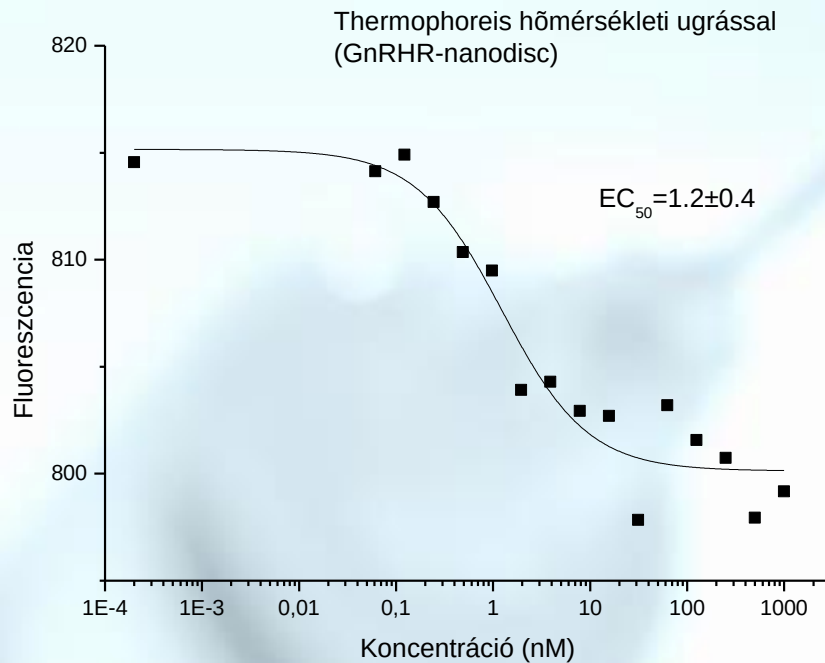
- Infravörös lézer: pontos hőmérséklet gradiens-előállítás a kapillárisban
- Molekulavándorlás hőmérsékleti gradiens mentén (mozagtató erő: solvatációs entrópia, hidratburok)
- Szerkezetváltozás → hidratburok megváltozása → termoforetikus mobilitás változása



MST eredmények

Fluoreszcens molekula: D-Lys⁶-CF-GnRH-I

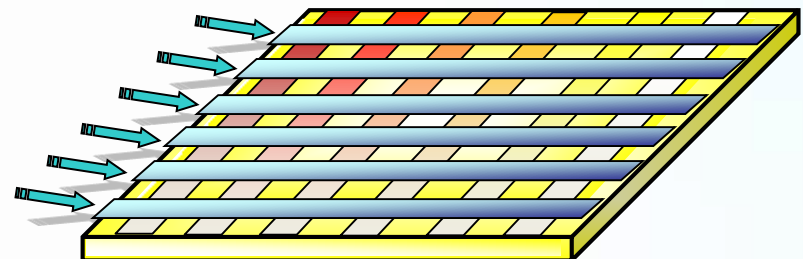
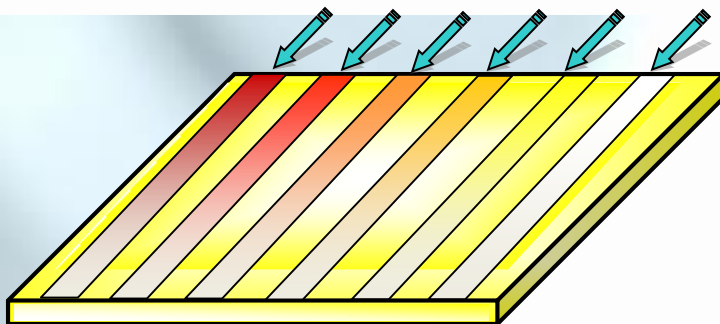
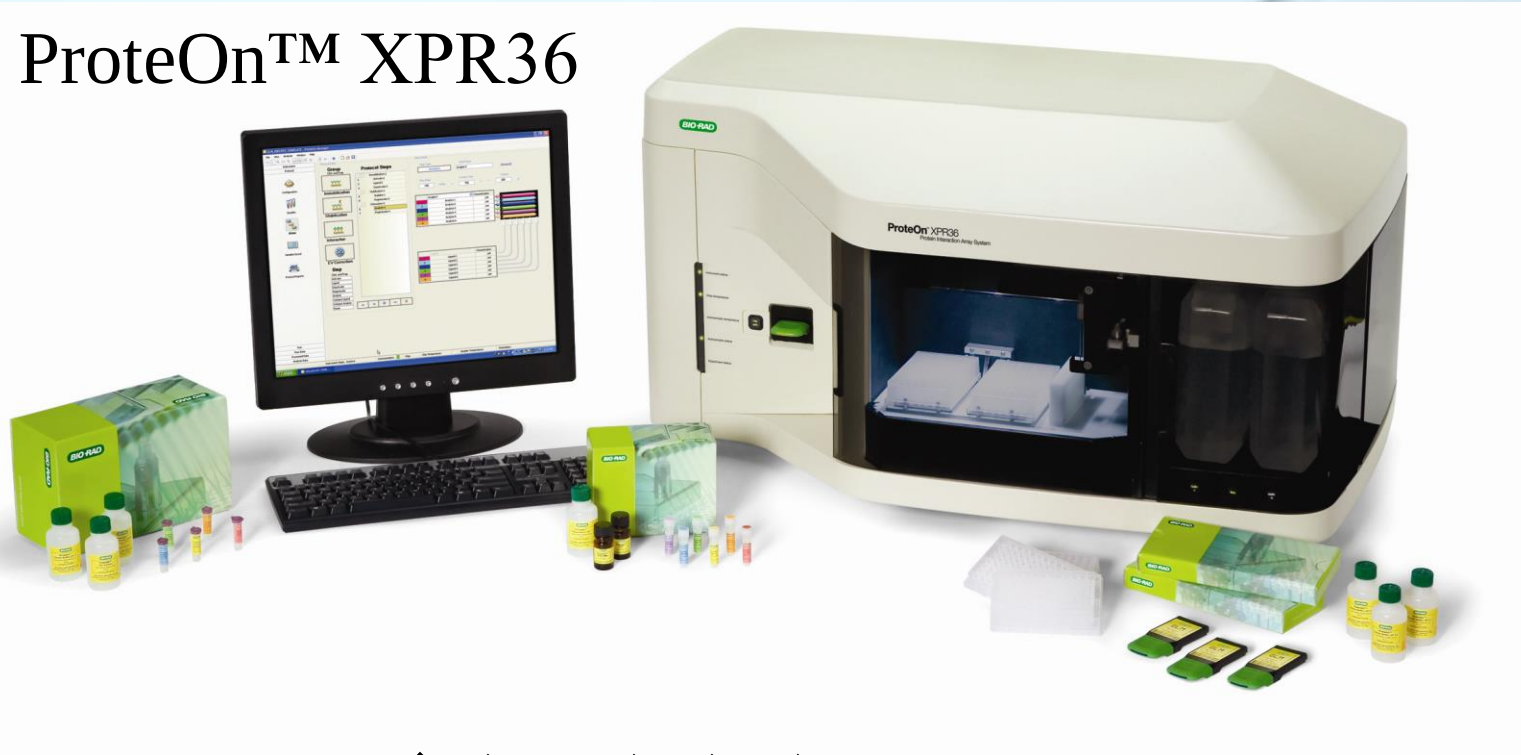
Kötődő molekula: GnRHR-nanodisc, GnRHR-amphipol



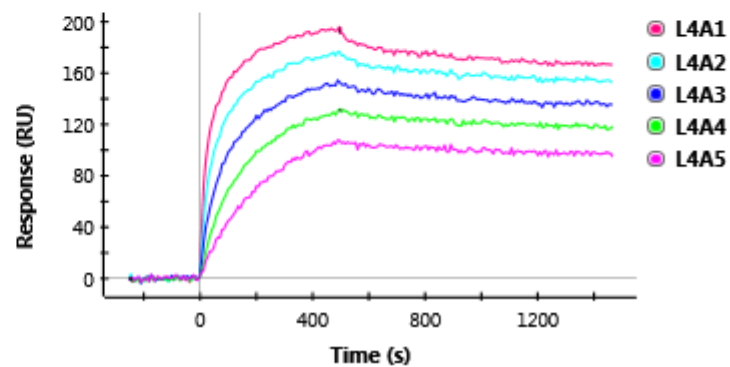
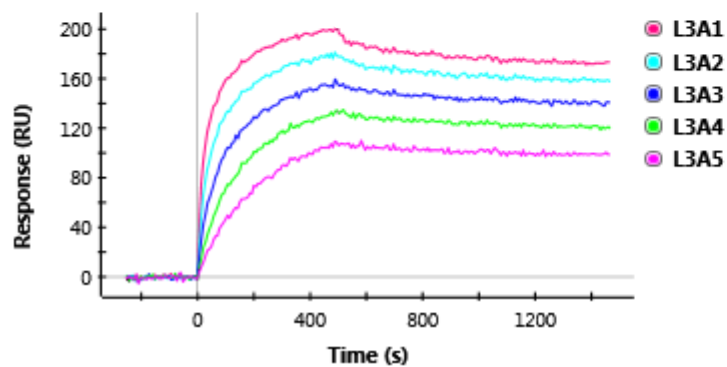
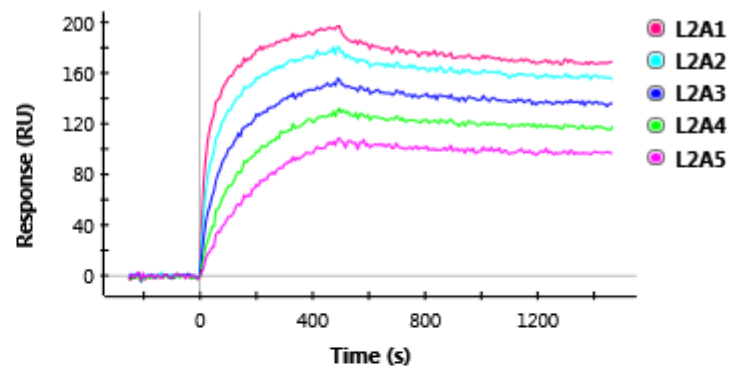
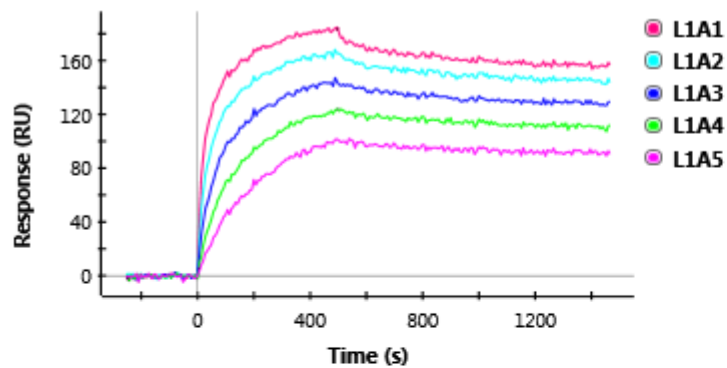
Legújabb kihívások: rekombináns fehérjék kötődés vizsgálata



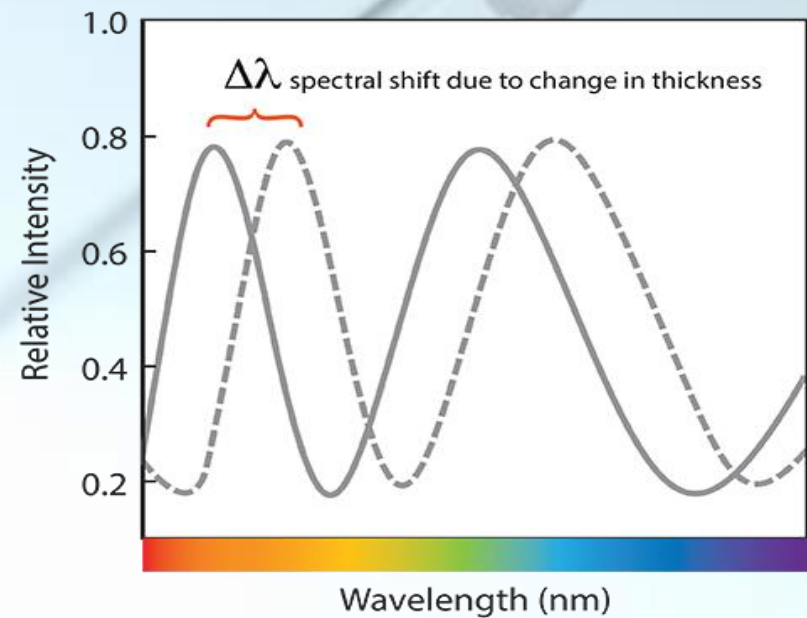
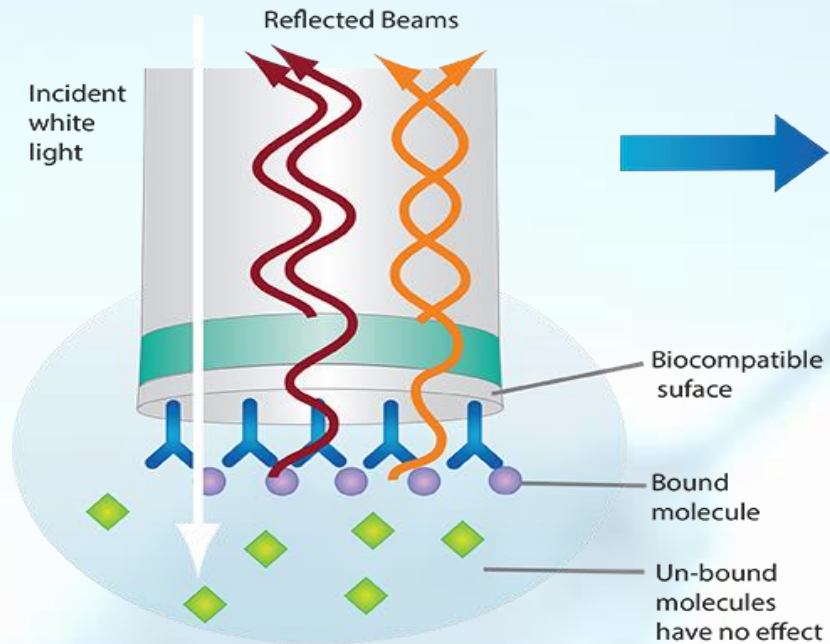
ProteOn™ XPR36



Erős kötődés vizsgálata (ProteOn XPR36)



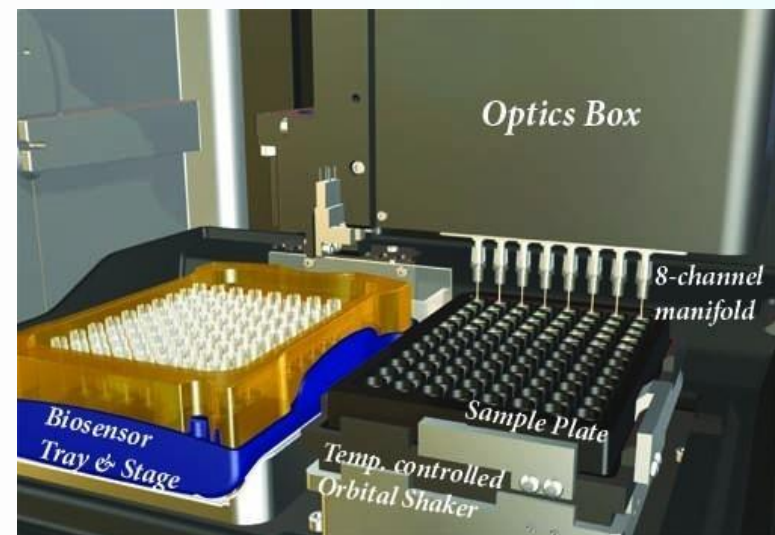
Biolayer interferometria



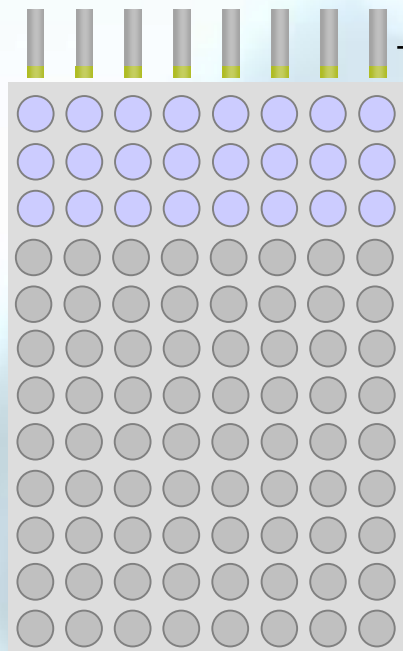
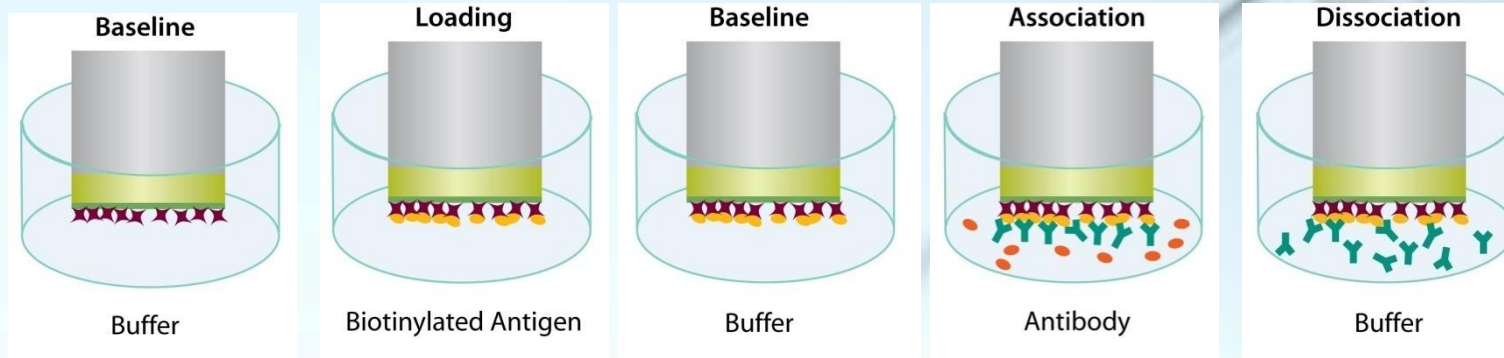
8 csatorna
96 lyukú lemez
> 180 μL térfogat
1 lemez pozíció
Bioszenzor újrahasznosítás



FortéBio, PALL



A mérés folyamata

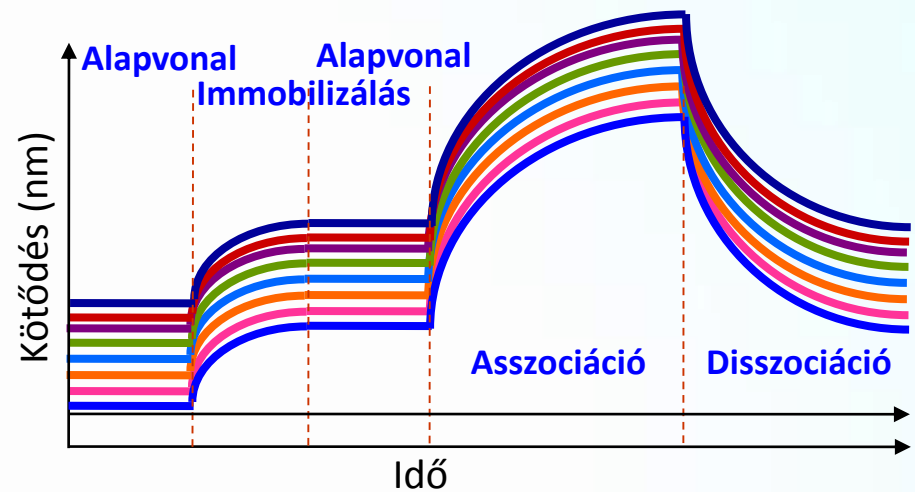


→ Octet Bioszenzorok

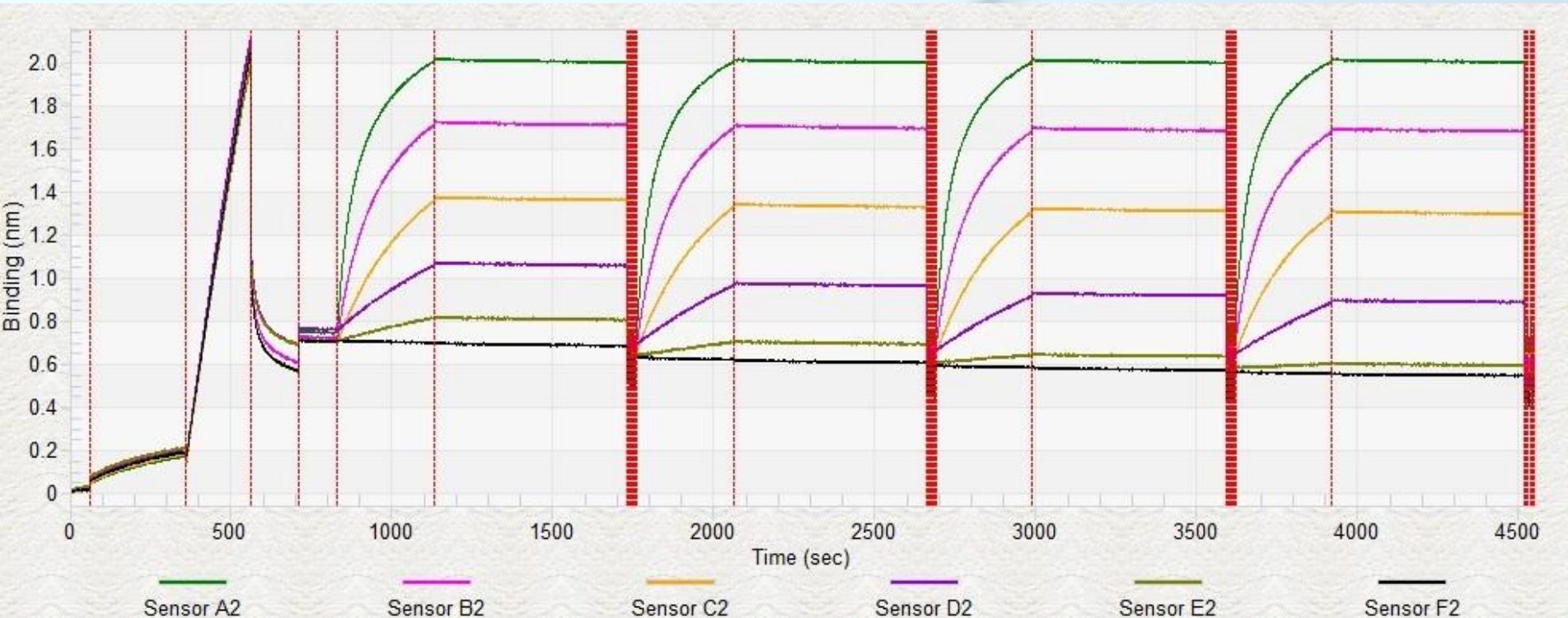
Puffer

Immobilizálni kívánt molekula

Kölcsönható partner



Eredmény: $K_D(M) < 10^{-12}$



Erős kötés: hosszabb disszociációs idő, de bele kell férnie a teljes mérésnek 3 órába a párolgás miatt

Köszönetnyilvánítás

- ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoport
- Institute of Biophysical Chemistry, Goethe University, Frankfurt
- Biotechnológiai analitikai osztály, Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Nyrt.

