



Sejtpenetráló peptidek biológiailag aktív vegyületek sejtbejuttatásában

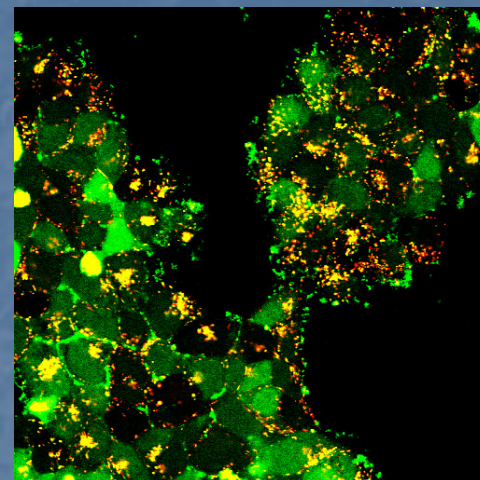
Bánóczy Zoltán

MTA - ELTE Peptidkémiai kutatócsoport megalakulásának 50. évfordulója

2011.12.09

Sejtpenetráló peptidek

- rövid, pozitívan töltött peptidek
- átjutnak a sejtmembránon
- hatóanyagok sejtbejuttatása
- természetes és tervezett peptidek

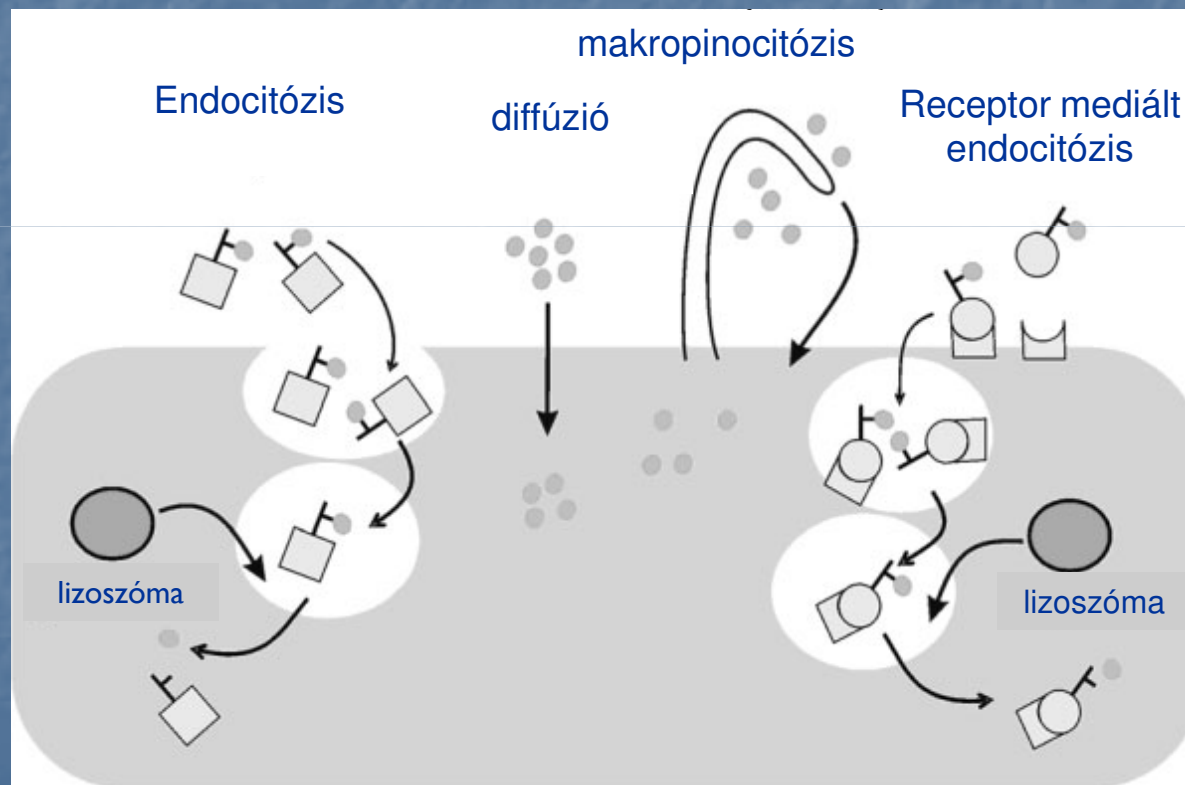


Név	Aminosav sorrend (fehérje)	Származás
Tat (48–60)	⁴⁸ GRKKRRQRRRPPQ ⁶⁰	HIV-I Tat fehérje
Penetratin	⁴³ RQIKIWFQNRRMKWKK ⁵⁸	<i>Drosophila</i> Antennapedia fehérje
Szignál-szekvencia peptidek	AAVALLPAVLLALLAP	Kaposi fibroblast growth factor (K-FGF)
Hidrofób peptidek	MGLGLHLLVLAALQGA	Caiman crocodylus Ig(v)
	MGLGLHLLVLAALQGAKKKRKV.	kiméra peptid (Ig(v)-SV40 T-antigén)
Viriális peptidek/fehérjék	VP22 fehérje	herpesz szimplex virus-1
	¹ AVGAIGALFLGFLGAAG ¹⁷	HIV gp41 glikoprotein, ⁸ Met→Leu
Substance P	RPKPQQFFGLM	neuropeptid
Oligoargininek	Arg ₆ , Arg ₇ , Arg ₈ , Arg ₉ , Arg ₁₀ ,	de novo
KLA modell peptid	KLALKLALKALKAAKLA	de novo
Modell peptid	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV	de novo

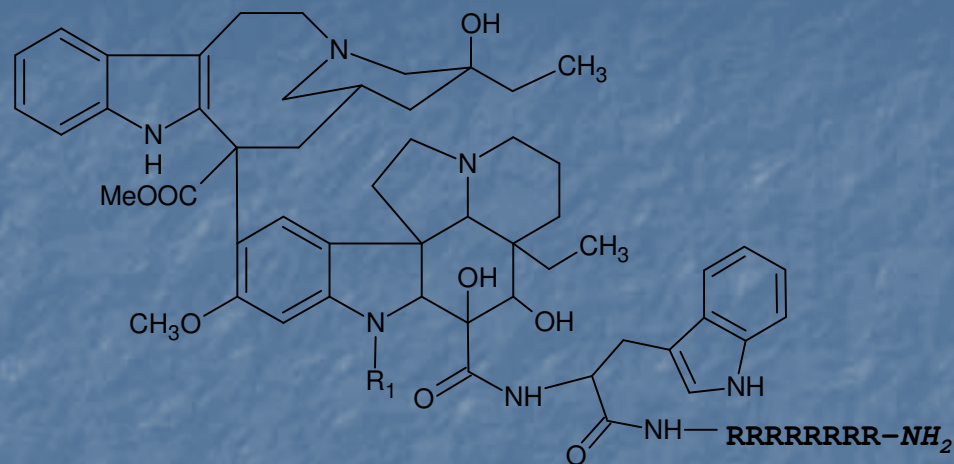
Sejtbejutás mechanizmusa

- energiatfügetlen, direkt transzlokáció
- energiatfüggő endocitózis

Futaki S. *Biopolymers* 2006, 84, 241-249.



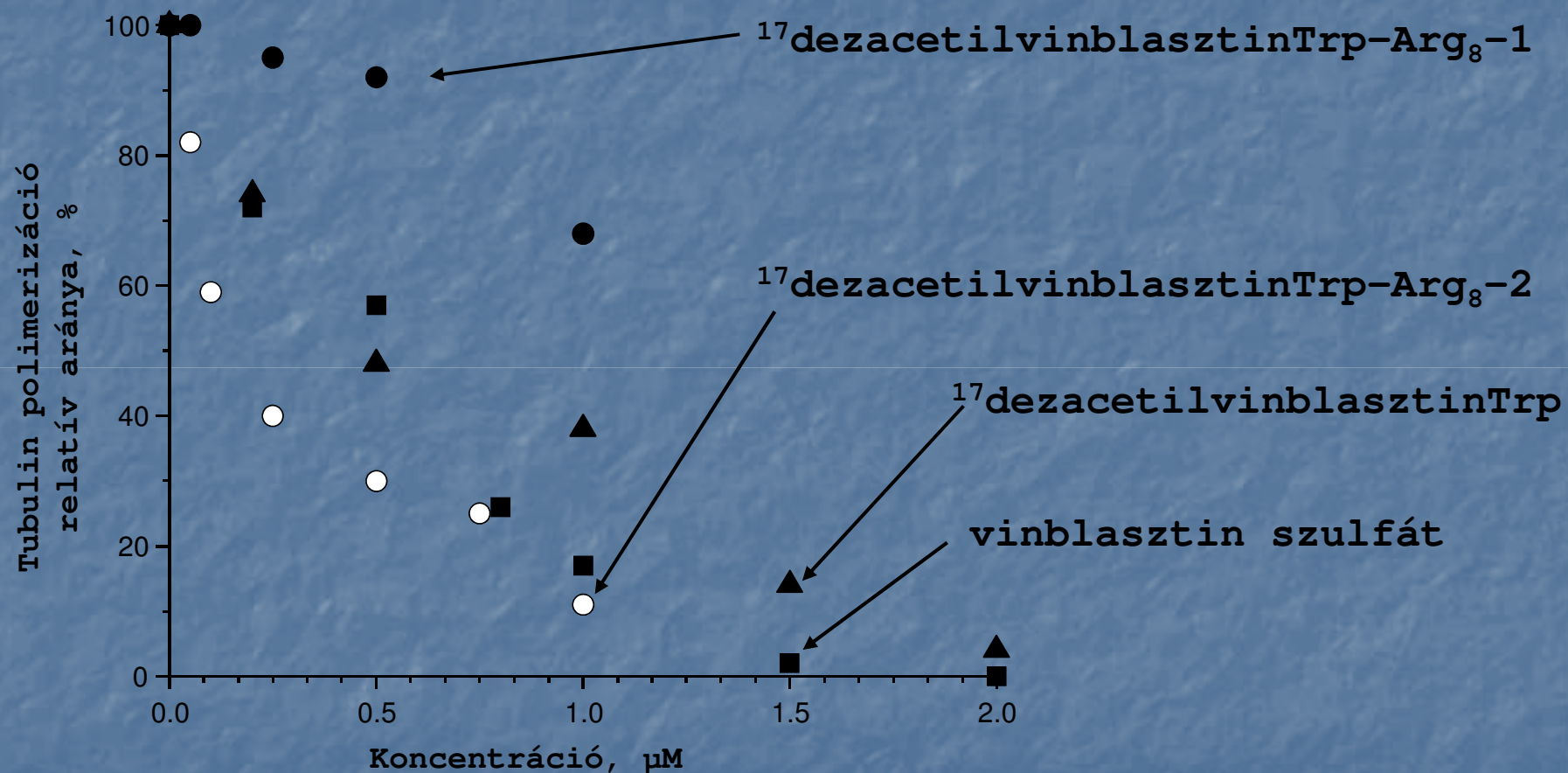
Vinblasztin konjugátum



Vegyületek	HL-60 IC ₅₀ µM	HL-60/MDR1 IC ₅₀ µM	HL-60/MRP1 IC ₅₀ µM
vinblasztin szulfát	1,26	2,96	1,31
¹⁷ dezacetilvinblTrp	0,49	59,6	3,98
¹⁷ dezacetilvinblTrp-Arg ₈ -1	1,61	2,62	2,94
¹⁷ dezacetilvinblTrp-Arg ₈ -2	1,59	2,94	3,78

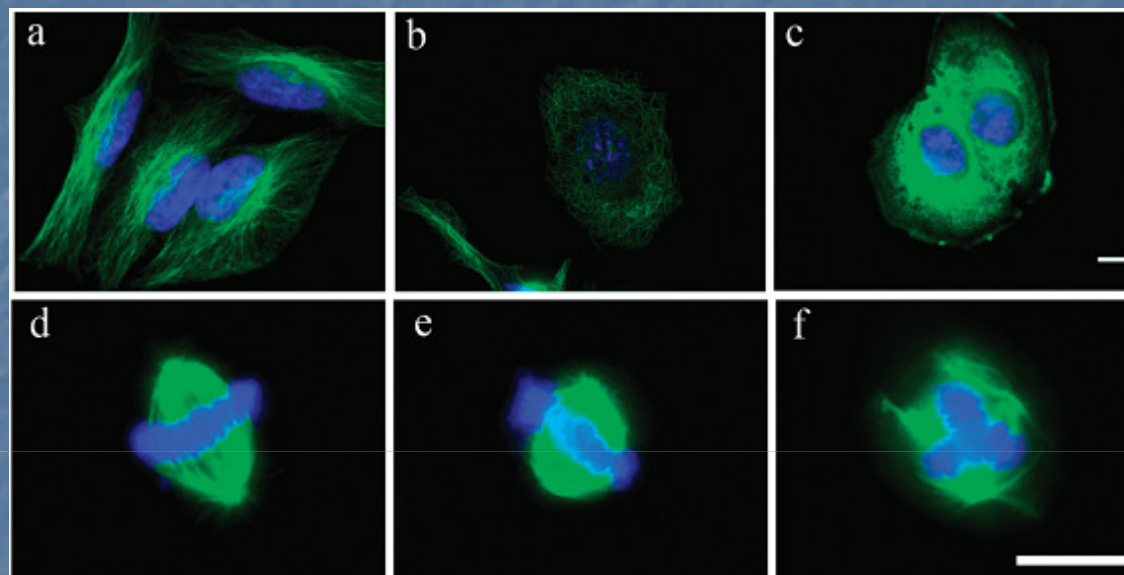
Citosztatikus hatást MTT teszttel vizsgáltuk

Tubulin polimerizáció



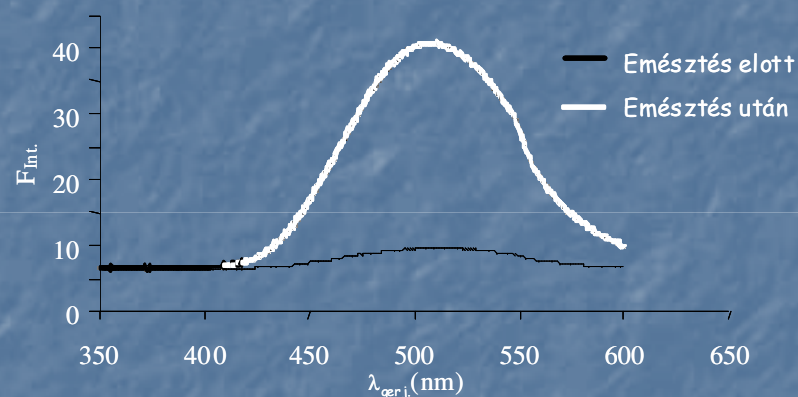
Turbidimetriás vizsgálat. A paclitaxel-indukált tubulin polimerizációt $\lambda = 350$ nm hullámhosszon követtük.

Mikrotubuláris rendszer

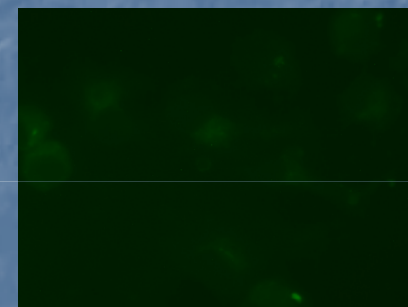
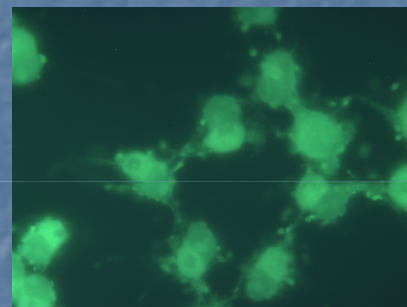


c (μM)	vinblasztin		¹⁷ dezacetilvinblTrp		¹⁷ dezacetilvinblTrpArg ₈ -2		¹⁷ dezacetilvinblTrpArg ₈ -1	
	aberráns mitozis (%)	interfázis microtubulus	Aberráns mitozis (%)	interfázis microtubulus	aberráns mitozis (%)	interfázis microtubulus	aberráns mitozis (%)	interfázis microtubulus
0	2	normál	2	normál	2	normál	2	normál
0,25	100	depolymerizált	47	normál	22	normál	n. d.	n. d.
1	100	depolymerizált	100	fragmentált	75	normál	45	normál
2,5	100	depolymerizált	100	fragmentált	98	fragmentált	75	normál
5	100	depoimerizált	100	depolymerizált	100	fragmentált	100	normál

Sejtpenetráló kalpain szubsztrát



$c_{szubsztrát} = 200 \mu M$, $c_{KalpainB} = 0,5 \mu M$ $\lambda_{ex.} = 320$
nm, $\lambda_{em.} = 480$ nm



COS-7 sejteket kezeltünk
 $c = 330 \mu M$, 4 h

	$K_M (\mu M)$	$k_{cat} (s^{-1})$	$k_{cat}/K_M (M^{-1}s^{-1})$
DABCYL-TPLKSPPPSPR-EDANS	250	0,2	680
DABCYL-TPLKPPPSPRE(EDANS)RRRRRRR-NH ₂	40	0,17	5000

Sejtpenetráló kalpain aktivátor

Penetratin-Kalpasztatin A (C)

N-terminális

X-RQIKIWFQNRRMKWKK-C-NH₂

S

S

PenKalpA(C) dis

H-CSGKSGMDAALDDLIDTLGG-NH₂

(AcCSKPIGPDDAIDALSSDFTS-NH₂)

C-terminális

X-RQIKIWFQNRRMKWKK-C-NH₂

S

CH₂-CO-SGKSGMDAALDDLIDTLGG-NH₂

PenKalpA(C) tio

(SKPIGPDDAIDALSSDFTS-NH₂)

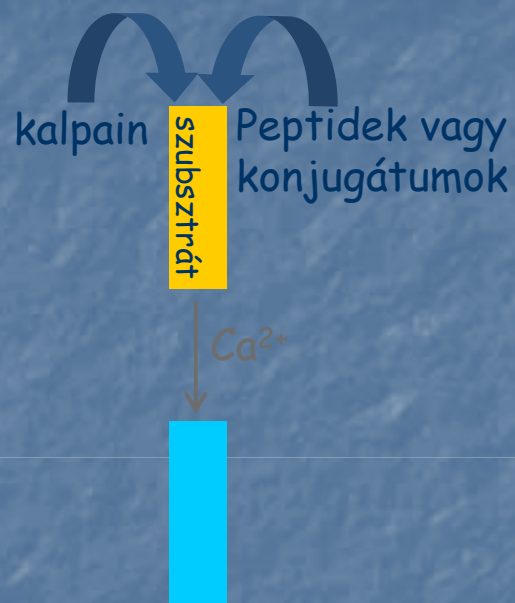
X-RQIKIWFQNRRMKWKKSGKSGMDAALDDLIDTLGG-NH₂

(SKPIGPDDAIDALSSDFTS-NH₂)

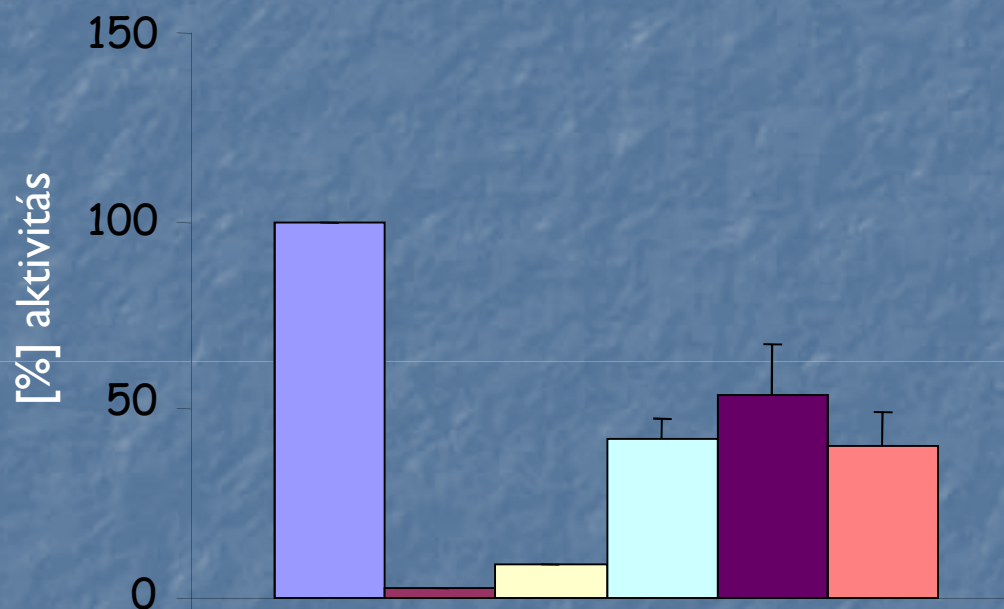
PenKalpA(C) amid

X: H vagy Hca

Izolált kalpain aktiválása

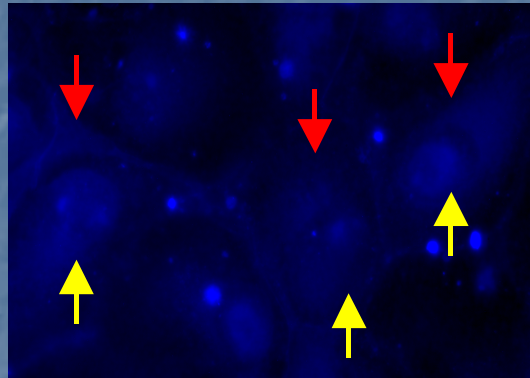


A konjugátumok hatása (c = 75 μM)

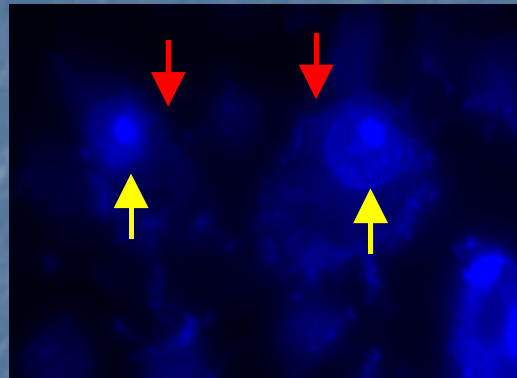


- 5 mM CaCl₂
 KalpA + KalpC (0,1 mM)
 PenKalpA + PenKalpC amid (0,1 mM)
- 0,1 mM CaCl₂
 PenKalpA + PenKalpC dis (0,1 mM)
 PenKalpA + PenKalpC tio (0,1 mM)

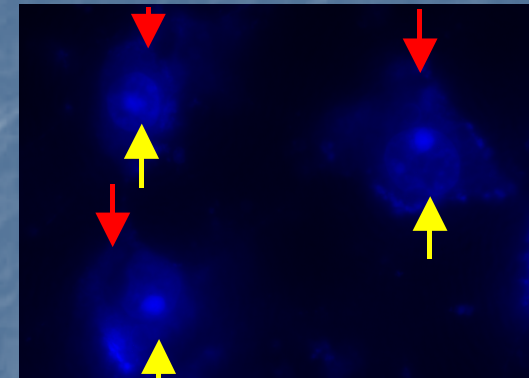
Konjugátumok sejtbejutása



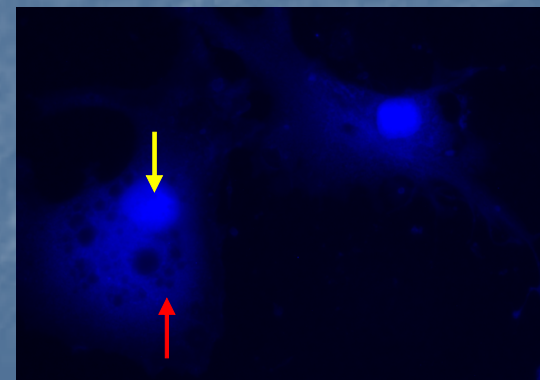
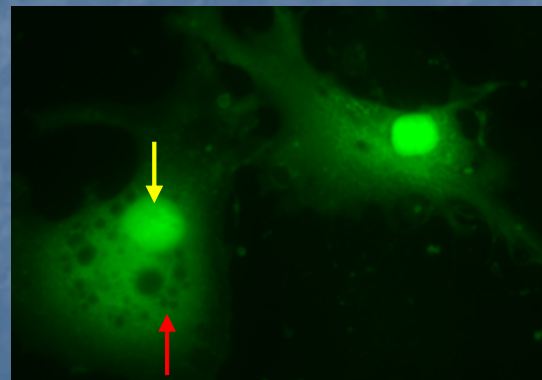
HcaPenKalpA amid



HcaPenKalpC tioéter

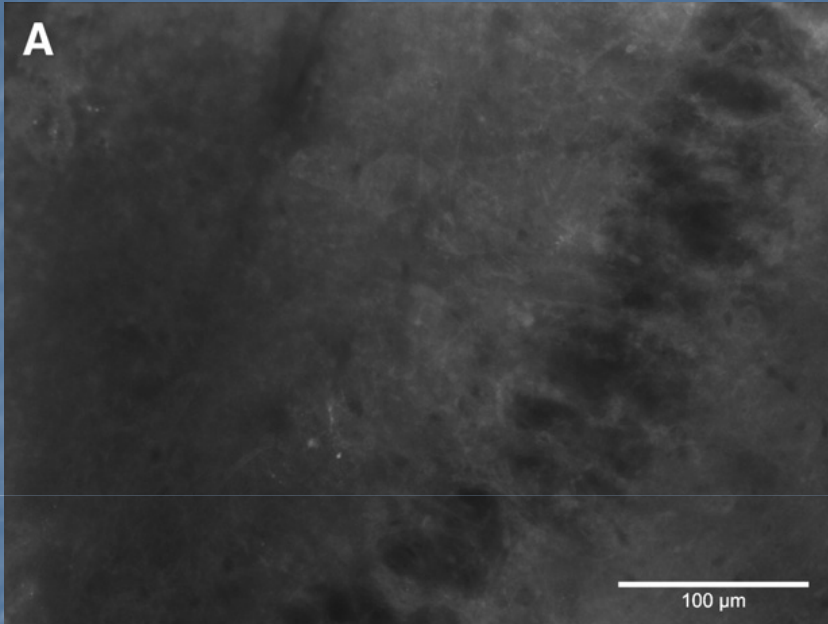


HcaPenKalpC tioéter



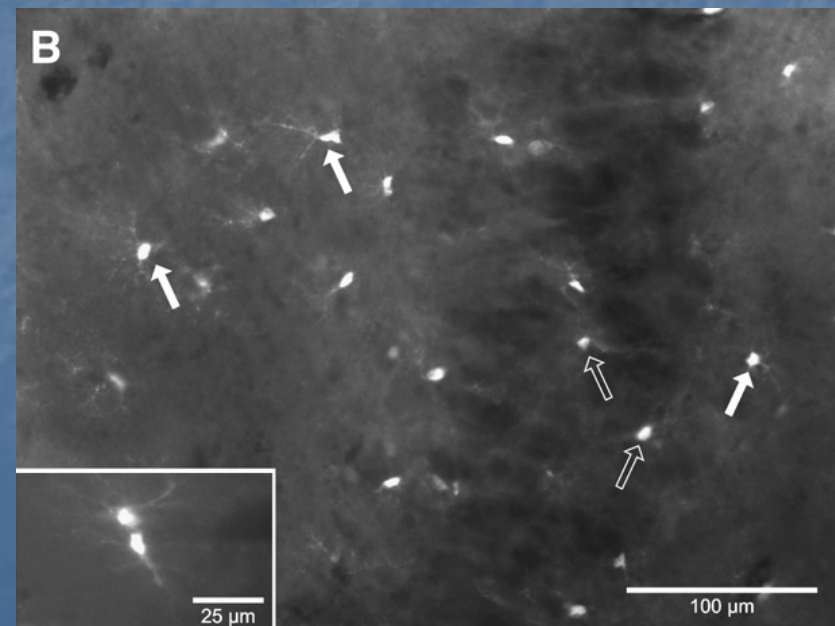
HcaPenKalp(Flu)C dis

Ex vivo vizsgálat



Patkány hippocampusz szeletek sejtpenetráló szubsztráttal (50 µM) 5 percig kezelve.

A szeleteket sejtpenetráló szubsztráttal (50 µM) 5 percig kezelve, majd A és C konjugátumok (5 µM) hozzáadása után 15 perc tovább kezelés.



Köszönetnyilvánítás

BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar, Szerves
Kémiai Tanszék

Dr. Szántay Csaba
Dr. Hazai László
Gorka-Kereskényi Álmos

MTA-SzBK Enzimológiai Intézet

Dr. Friedrich Péter
Dr. Farkas Attila
Dr. Tantos Ágnes
Dr. Tompa Péter
Dr. Oláh Edit
Dr. Óvádi Judit

ELTE Biológiai Intézet

Dr. Világi Ildikó

Richter Gedeon Vegyészeti Gyár

Dr. Szántay Csaba
Béni Zoltán
Háda Viktor

