

HER2-receptort célzó peptidek szerkezet-hatás összefüggésének vizsgálata emlőtumor sejtvonalakon

Biri-Kovács Beáta^{1,2*}, Szabó Ildikó², Adorján Afrodité², Szeder Bálint³,
Buday László³, Bősze Szilvia², Mező Gábor²

¹ ELTE TTK, Kémiai Intézet

² MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

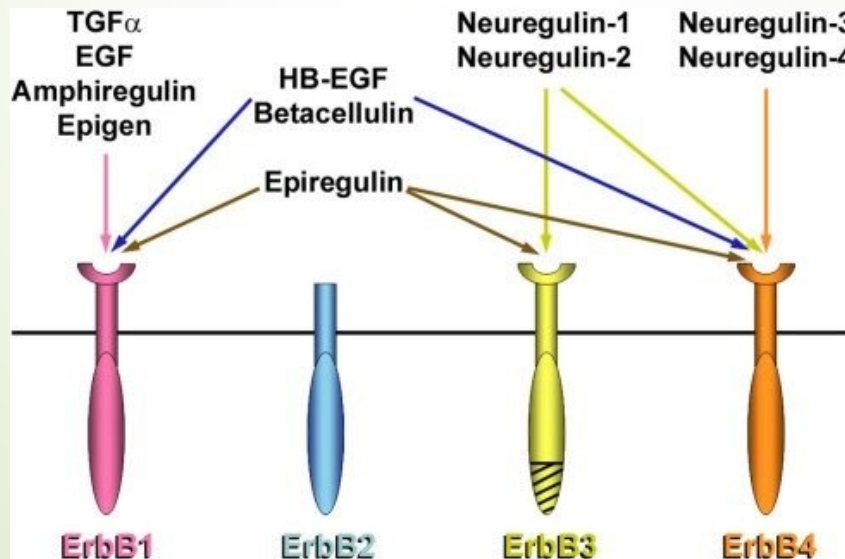
³ MTA TTK, Enzimológiai Intézet

Balatonszemes, 2019. május 28.

A HER2 (ErbB2) szerepe

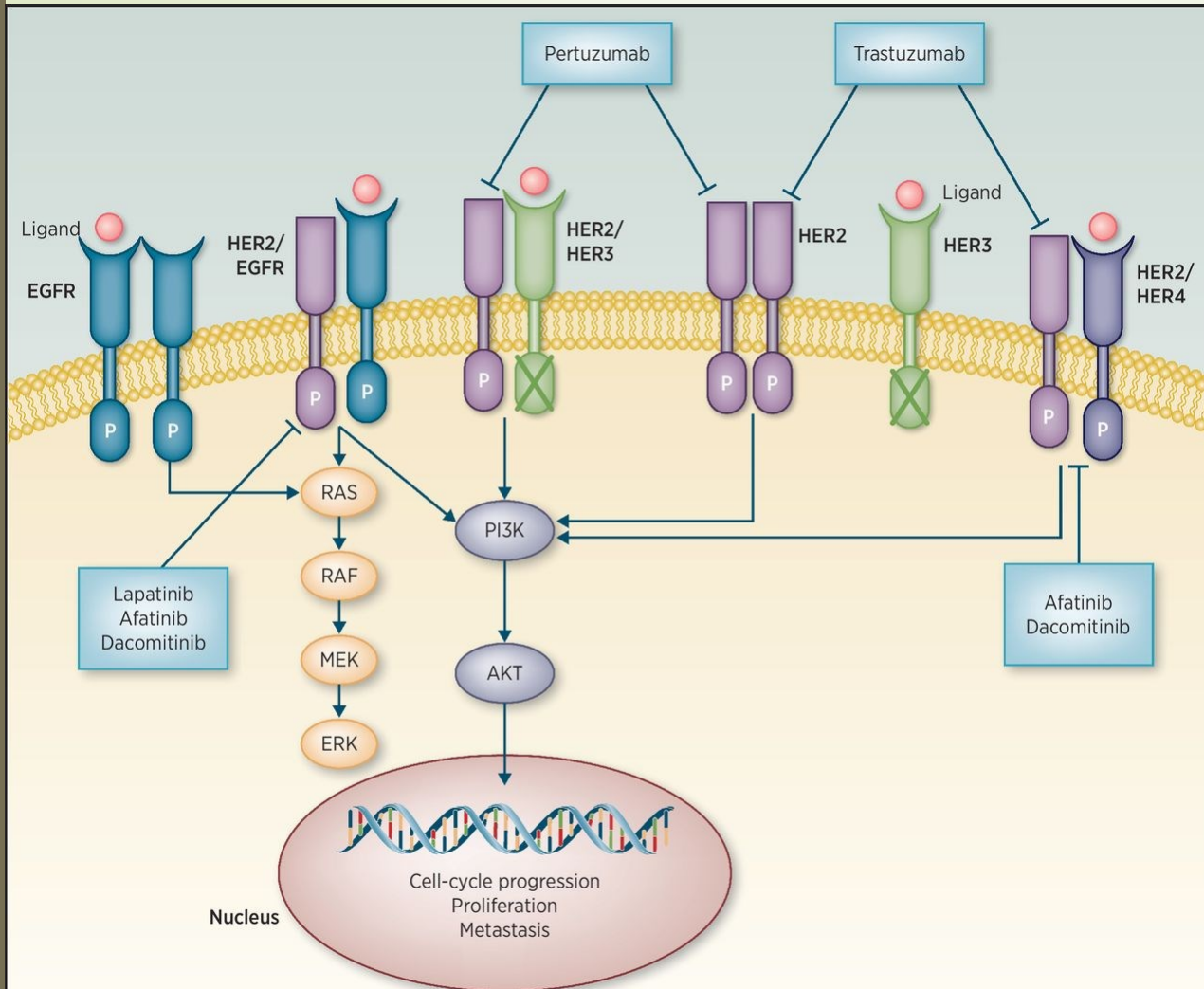
- Az emlőtumorok 15-30%-ában túlexpresszálódik
- Alacsonyabb túlélési esély és a metasztázis nagyobb kockázata
- Számos mellrák elleni gyógyszer célpontja

Az EGF receptor család



Természetes
ligand nélküli
receptor

A HER2 által aktivált jelátviteli útvonalak



Homo- és heterodimerek képződése



- Ras/Raf/MEK/ERK
MAP kináz útvonal
- PI3K/Akt útvonal



Proliferáció
Migráció
Metasztázis

Pollock & Grandis, *Clin Cancer Res*, 2015

HER2 receptorhoz kötődő peptidek

KCCYSL



Fág peptid könyvtárból
kiválasztott peptid



Variánsok létrehozása



Kombinált peptidek

GYYNPT



One-bead-one
compound peptid
könyvtárból és molekula
dinamikai modellezéssel
kiválasztott peptidekből
származtatott részlet



Karasseva et al., *J Prot Chem*, 2002
Larimer et al., *Int J Pept Res Ther*, 2015

Geng et al., *Theranostics*, 2015
Geng et al., *Theranostics*, 2016

A vizsgált peptidek

KCCYSL-variánsok

Szekvencia	Kód
CF-K CC YSL-NH ₂	P(CC)
CF-K CGC YSL-NH ₂	P(CGC)
CF-K CGGC YSL-NH ₂	P(CGGC)
CF-K C_(Acm)C_(Acm) YSL-NH ₂	P(C_{Acm}C_{Acm})
CF-K CS YSL-NH ₂	P(CS)
CF-K SC YSL-NH ₂	P(SC)
CF-K SS YSL-NH ₂	P(SS)
CF-K AA YSL-NH ₂	P(AA)

GYYNPT és kombinált peptidek

Szekvencia	Kód
CF-G YY NPT-NH ₂	P(YY)
CF-K AA YSLG YY NPT-NH ₂	cP(AA)_P(YY)
CF-K SC YSLG YY NPT-NH ₂	cP(SC)_P(YY)
CF-YSLG YY NPT-NH ₂	P(short)_P(YY)
CF-TAKLYPGYANYS-NH ₂	scr_P(AA_YY)
CF-G YY NPTK AA YSL-NH ₂	cP(YY)_(AA)

Szilárdfázisú peptidszintézis, CF-jelölés

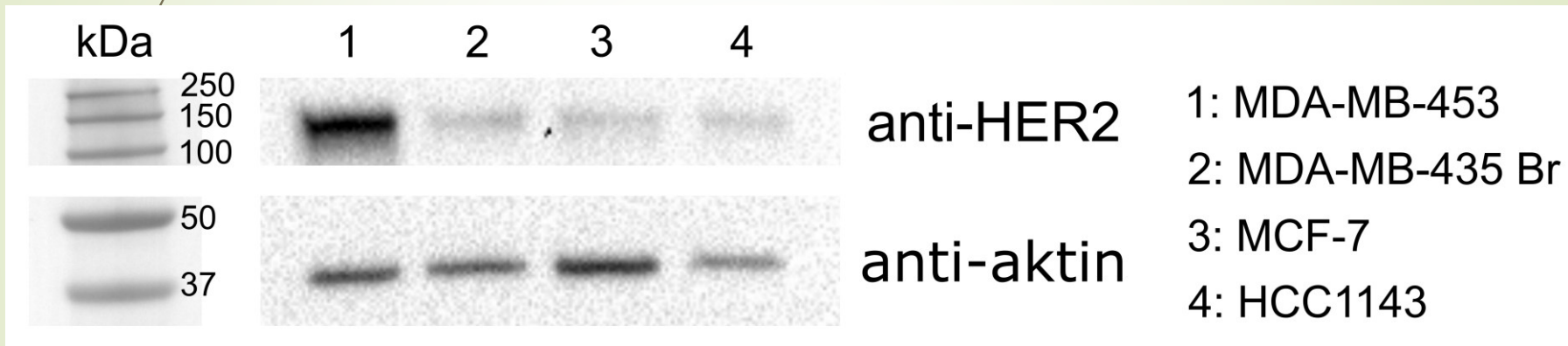
Acm: acetamido-metil védőcsoport



Célkitűzések

- Emlőtumor sejt kultúrák HER2 expressziós szintjének meghatározása
- CF-konjugált peptidek *in vitro* sejt felvételi vizsgálata
 - HER2 specifikus peptidek kiválasztása
 - Expressziós szint ↔ sejt felvétel mértéke
- Lokalizáció meghatározása konfokális mikroszkóppal
- Specifitás vizsgálata jelöletlen peptidek segítségével

A HER2 receptor mennyiségének meghatározása emlőtumor sejt kultúrákon



MDA-MB-453 → Erősen expresszáló

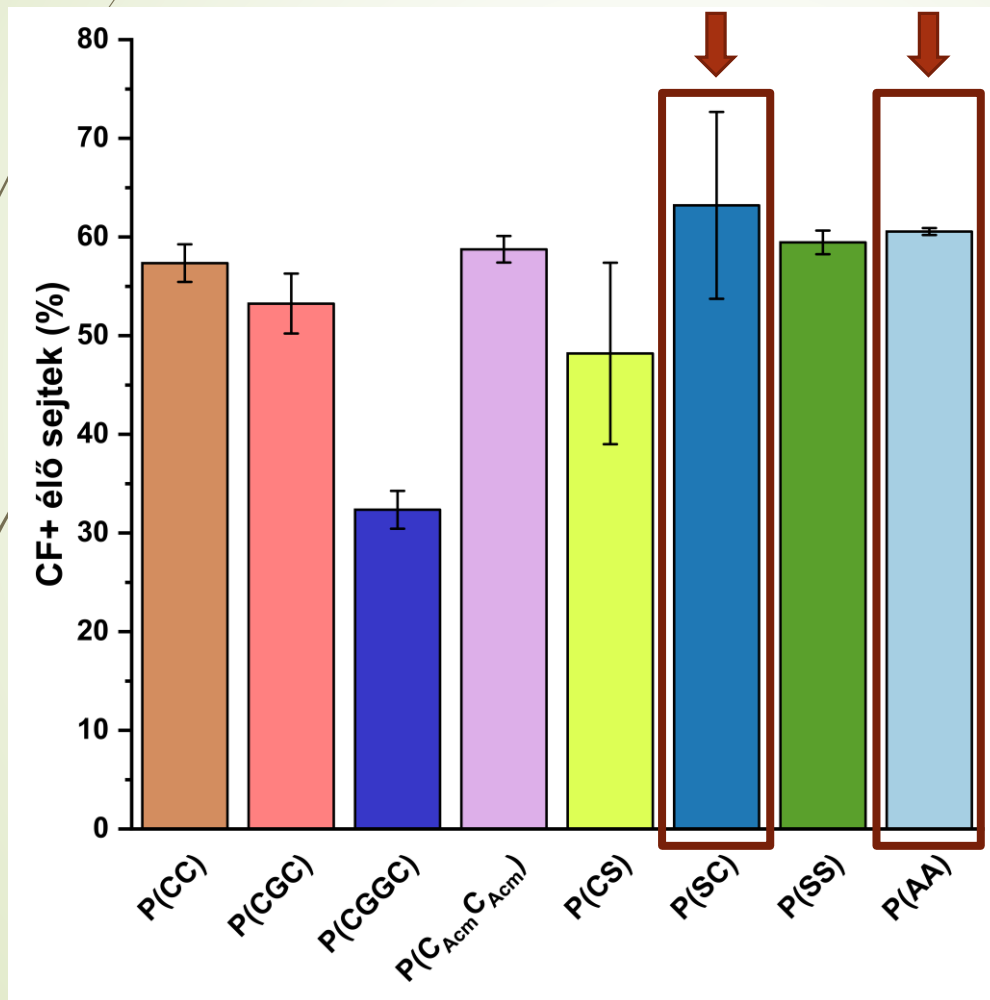
MDA-MB-435 Brain

MCF-7

HCC1143

} Közepesen/gyengén expresszáló

Az első peptid-szett vizsgálata – KCCYSL-variánsok



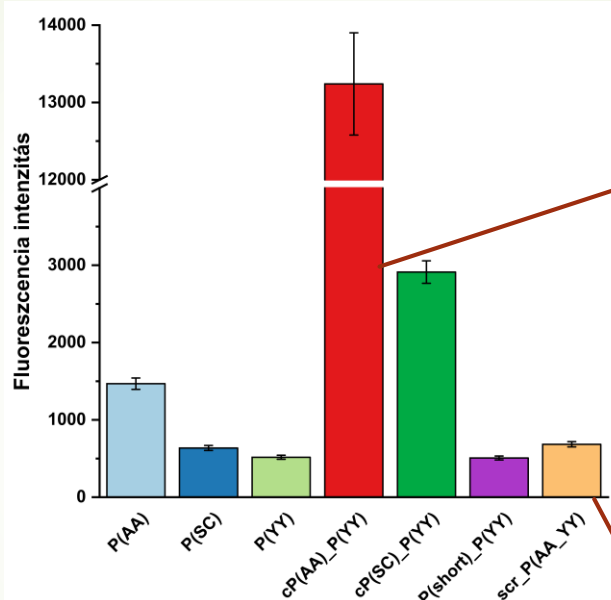
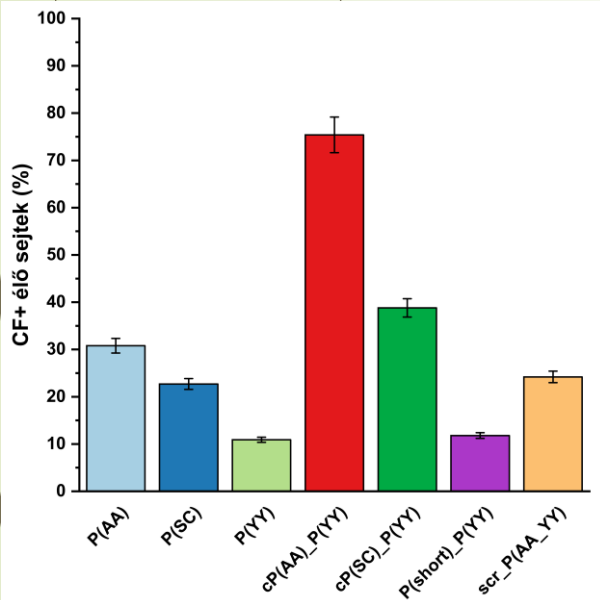
CF-KSCYSL
CF-KAAYSL



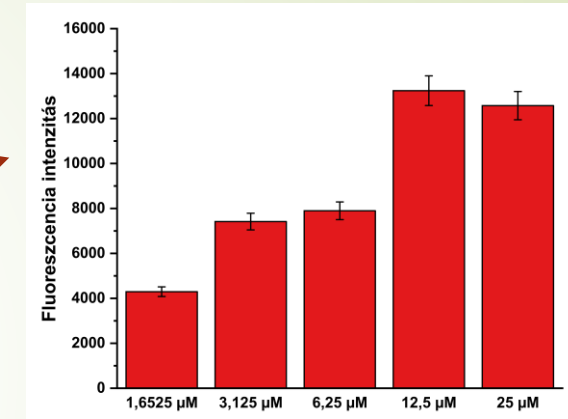
További vizsgálatok,
kombinált peptidek

Sejtfelvételi vizsgálat áramlási citométerrel, MDA-MB-453 sejtek, 100 μ M, 1 óra

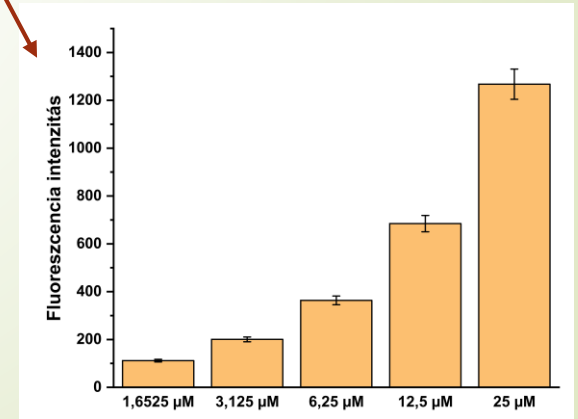
A második peptid és a kombinált peptidek vizsgálata



cP(AA)_P(YY)



scrP(AA_YY)



Szekvencia	Kód
CF-KAAYSL-NH ₂	P(AA)
CF-KSCYSL-NH ₂	P(SC)
CF-GYYNPT-NH ₂	P(YY)

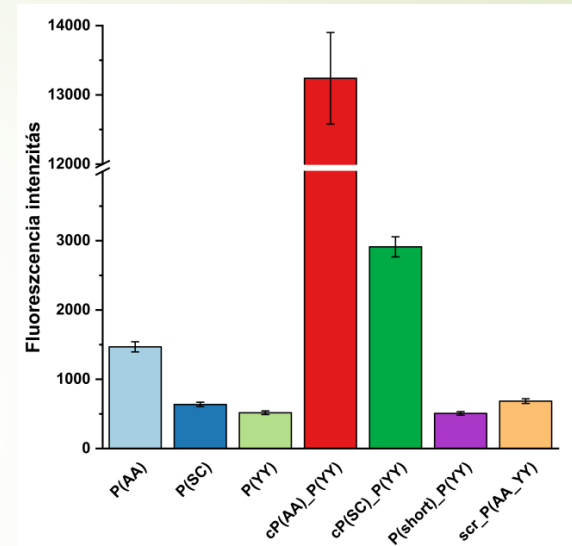
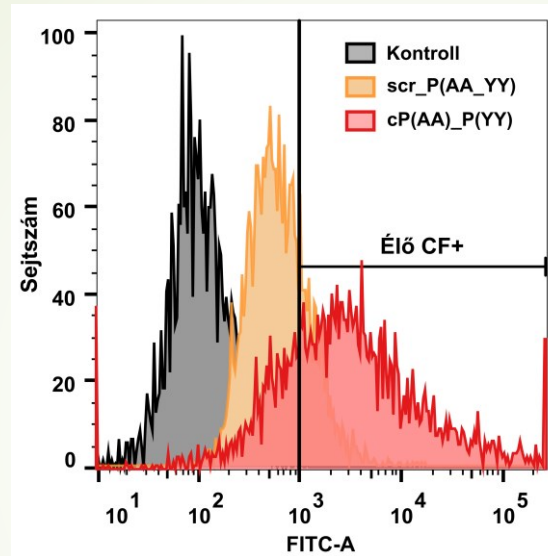
CF-KAAYSLGYYNPT-NH ₂	cP(AA)_P(YY)
CF-KSCYSLGYYNPT-NH ₂	cP(SC)_P(YY)
CF-YSLGYYNPT-NH ₂	P(short)_P(YY)
CF-TAKLYPGYANYS-NH ₂	scr_P(AA_YY)

Sejtfelvételi vizsgálat áramlási citométerrel, MDA-MB-453 sejtek, 12,5 µM, 3 óra

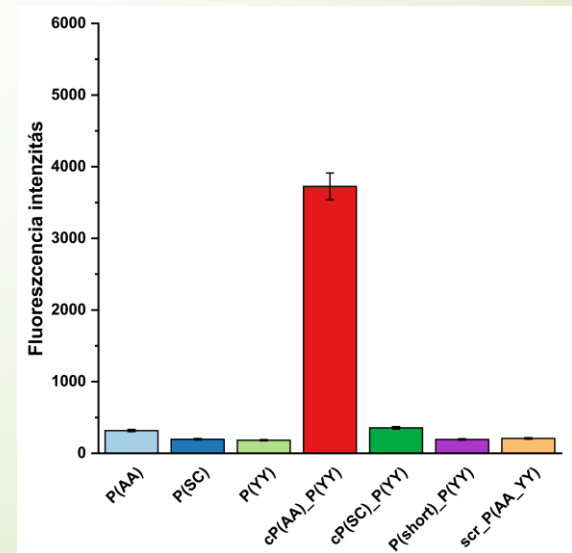
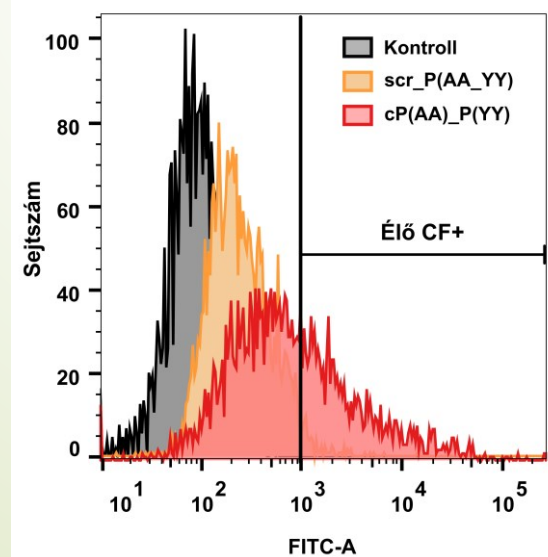
A peptidek lokalizációjának vizsgálata – tripszinezési idő növelése

Tripszinezési idő

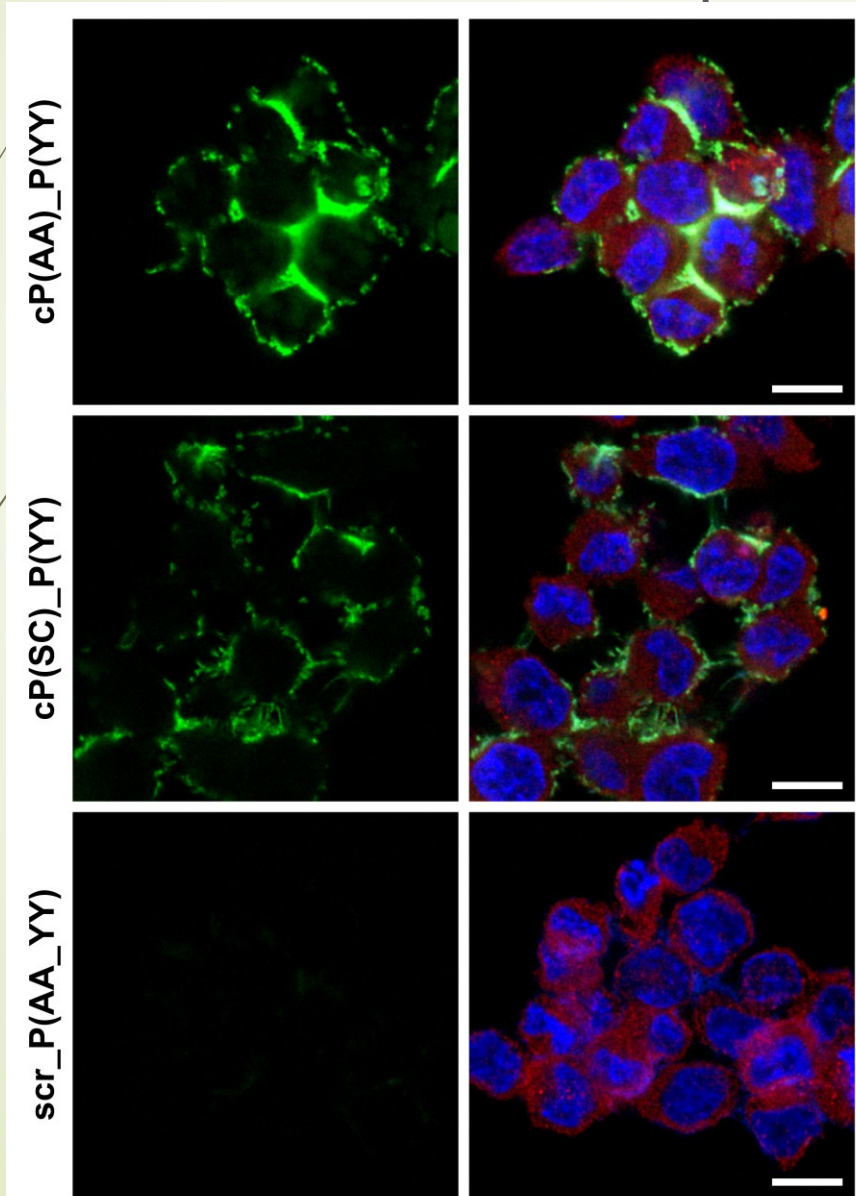
5 perc



15 perc



A peptidek lokalizációjának vizsgálata – mikroszkópos felvételek

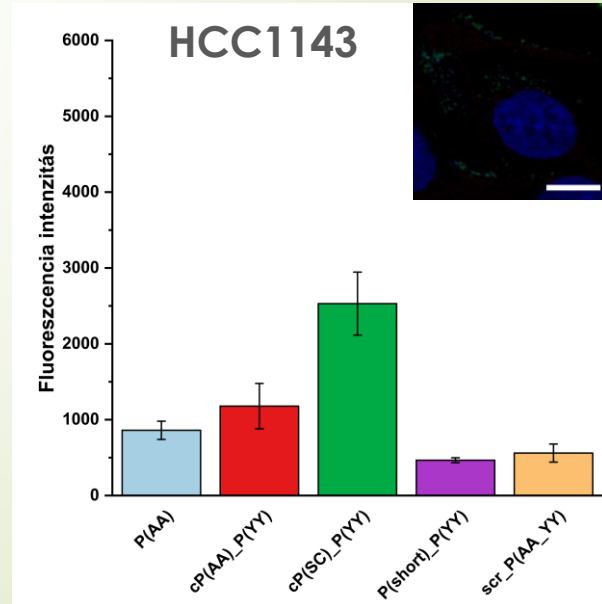
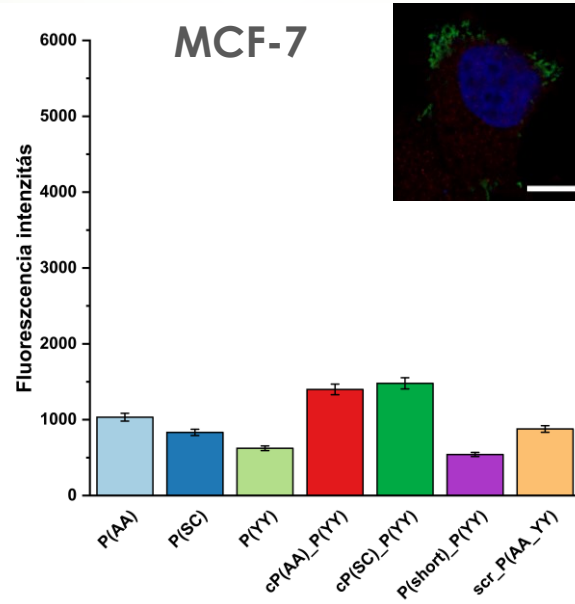
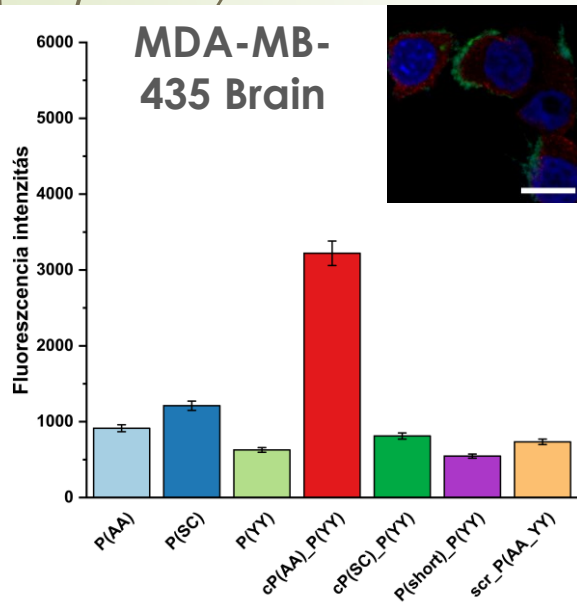
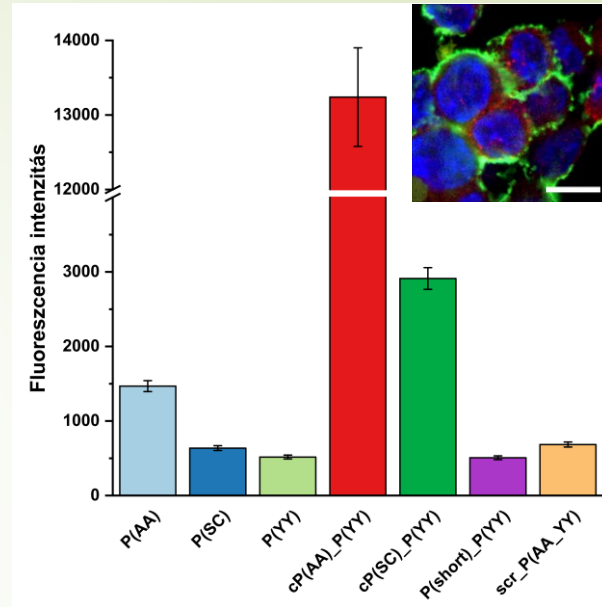
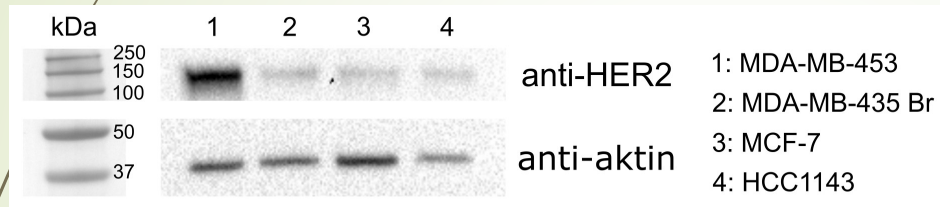


CF
HER2
Sejtmag

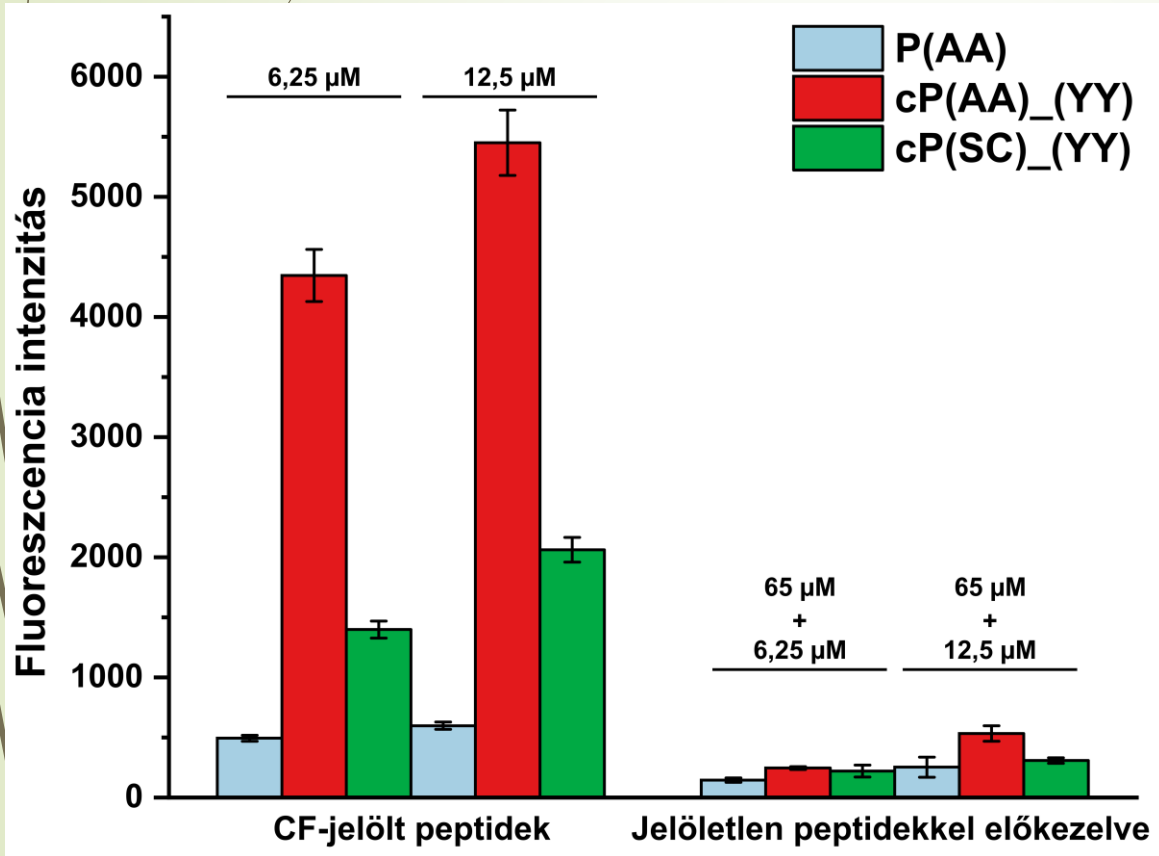
- Kezelés: 25 μ M, 90 perc
- Zeiss LSM 710 konfokális mikroszkóp
- HER2 jelölése anti-HER2 antitesttel (TRITC-jelölt másodlagos antitest)
- vonalas mérték: 10 μ m

Sejtfelvételi vizsgálatok az alacsonyabban expresszáló sejteken

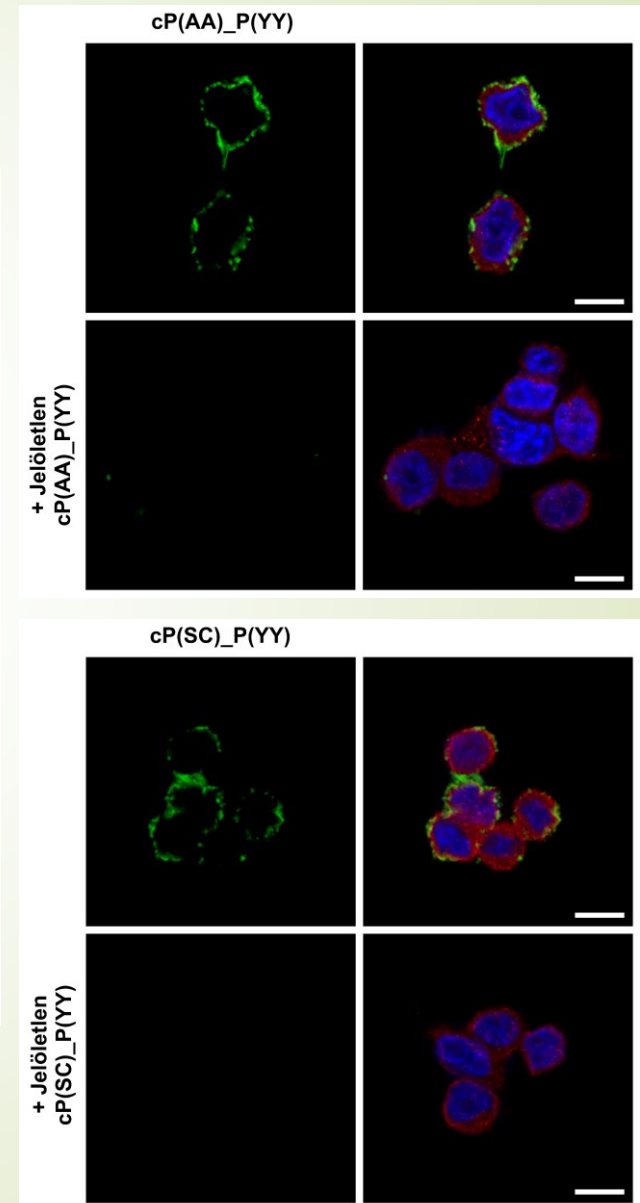
MDA-MB-453 →



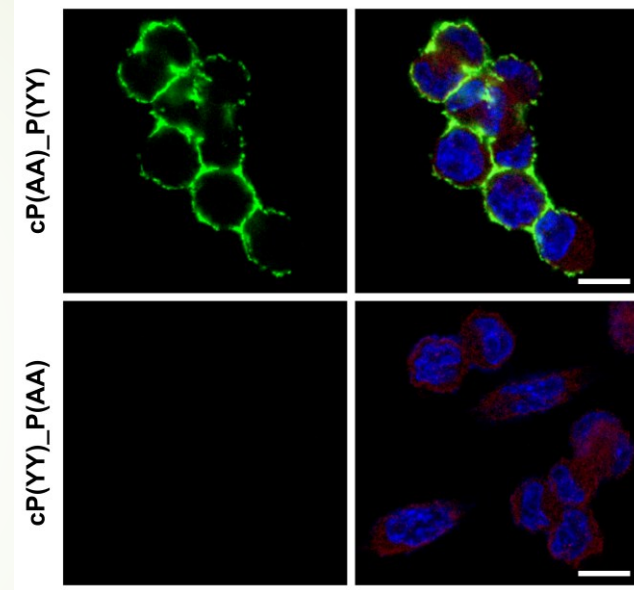
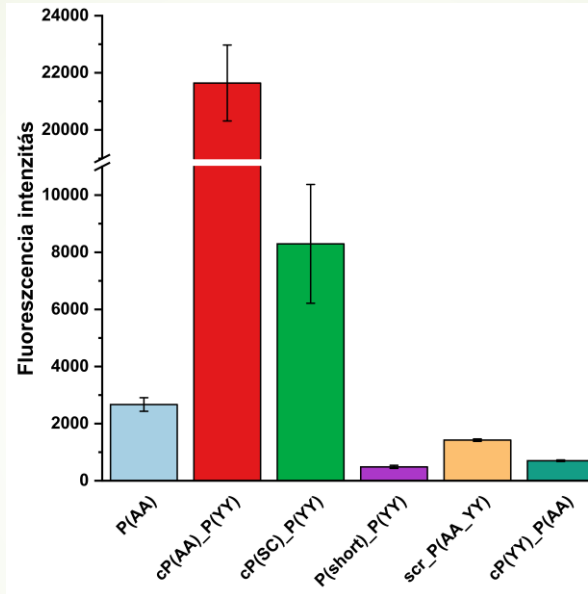
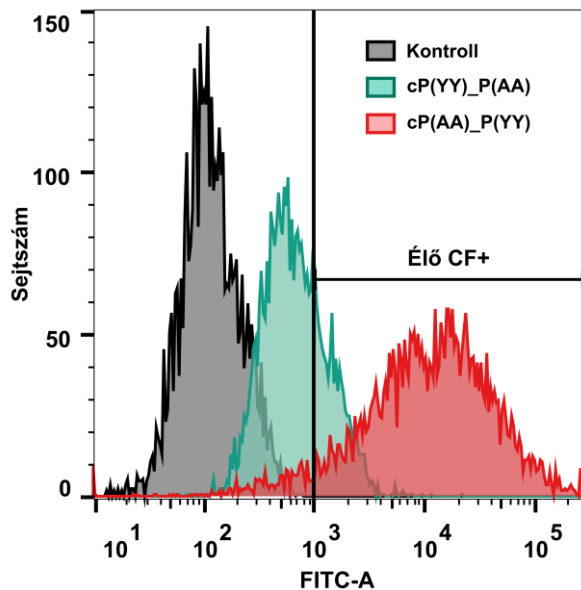
Specifit as vizsg alat – g atlas jelöletlen peptidekkel



MDA-MB-453 sejtek
  raml asi citom ter: 30 perc + 3  ra inkubáció
 Konfok lis mikroszkóp: 30 perc (65 μ M) + 90 perc (12,5 μ M),
 vonalas m rt k: 10 μ m



A fordított kombinált peptid vizsgálata



CF-KAAYSLGYYNPT-NH₂

cP(AA)_P(YY)



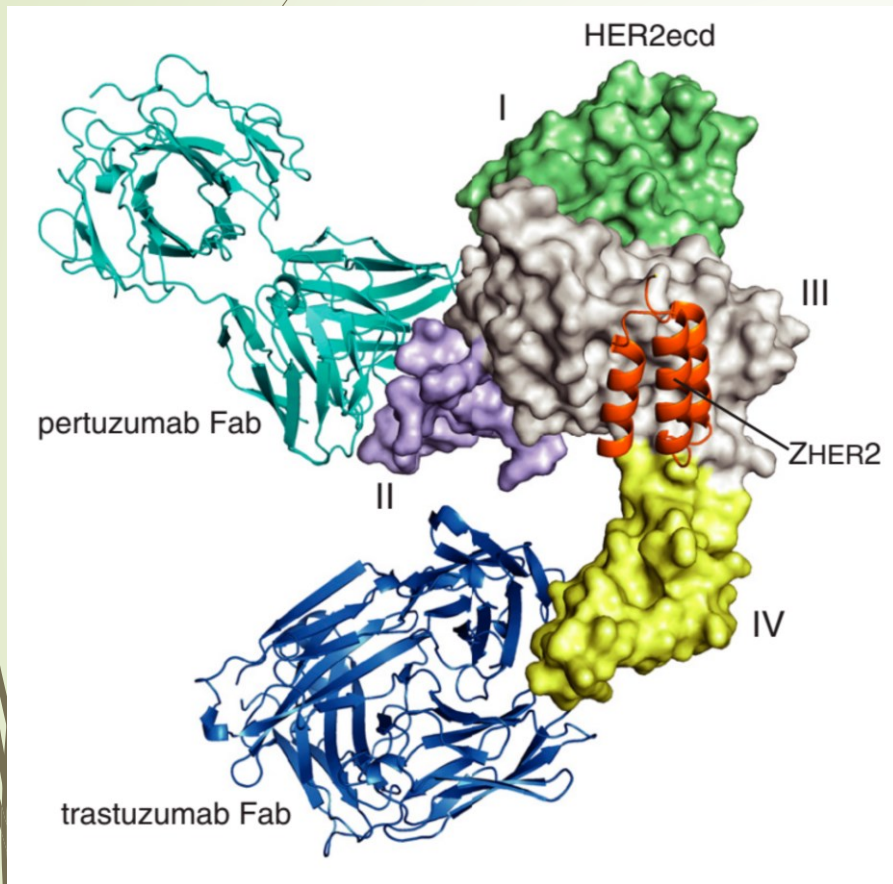
CF-GYYNPTKAAYSL-NH₂

cP(YY)_P(AA)

MDA-MB-453 sejtek
 Áramlási citométer: 3 óra inkubáció, 12,5 μM
 Konfokális mikroszkóp: 90 perc inkubáció, 25 μM,
 vonalas mérték: 10 μm.

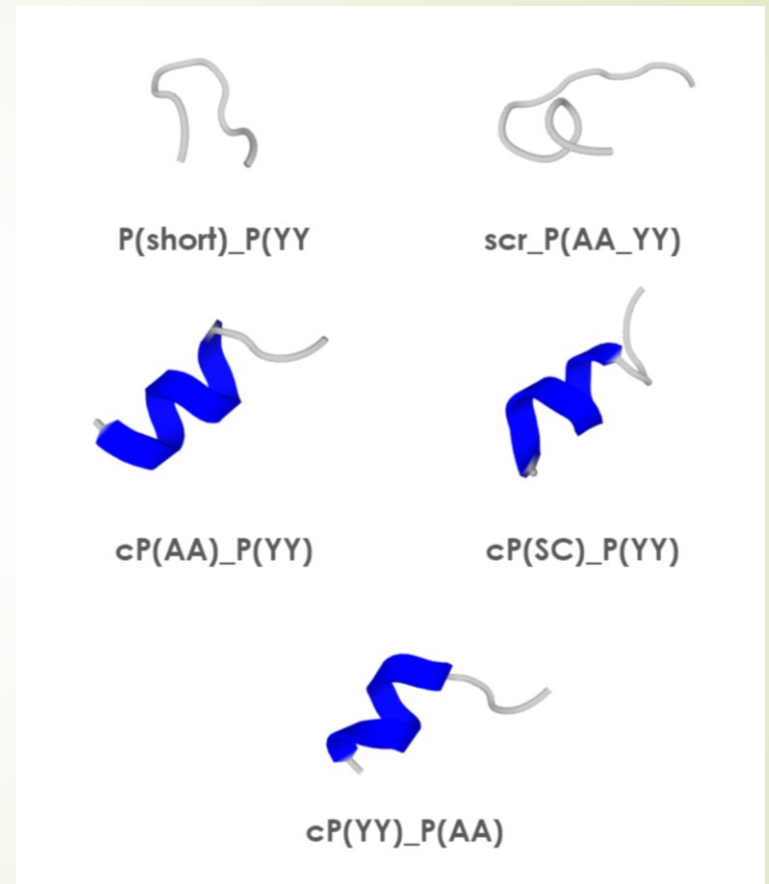
CF
 HER2
 Sejtmag

Másodlagos szerkezet predikció – helikalitás lehetséges szerepe?



HER2 Affibody ($Z_{HER2:342}$)

Eigenbrot et al., *PNAS*, 2010



PEP-FOLD 3.5
(RCSB)

Lamiable et al., *Nucleic Acids Res*, 2016

Összefoglalás

- A citometriai és konfokális mikroszkópos mérések alapján a kombinált peptid (CF-KAAYSLGYYNPT-NH₂) mutatja a legmagasabb fluoreszcencia intenzitás értékeket
- A CF-peptidek a sejtek felszínén lokalizálódnak
- A fluoreszcencia intenzitás egyezést mutat a HER2 expressziós szintekkel
- A jelöletlen peptidek csökkentik a sejtfelszínen detektálható fluoreszcens szignált
- Lehetséges felhasználás a jövőben:
diagnosztikai (és terápiás) célok



Köszönetnyilvánítás

Pályázati források:

- NKFIH K119552
- NVKP_16-1-2016-0036
- Európai Unió Horizon 2020: Marie Skłodowska-Curie 642004
- A kutatás az ELTE Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (1783-3/2018/FEKUTSRAT) keretében valósult meg az Emberi Erőforrások Minisztériuma támogatásával
- VEKOP-2.3.3-15-2017-00020, mely az Európai Unió, Magyarország és az Európai Regionális Fejlesztési Alap kofinanszírozásával jött létre

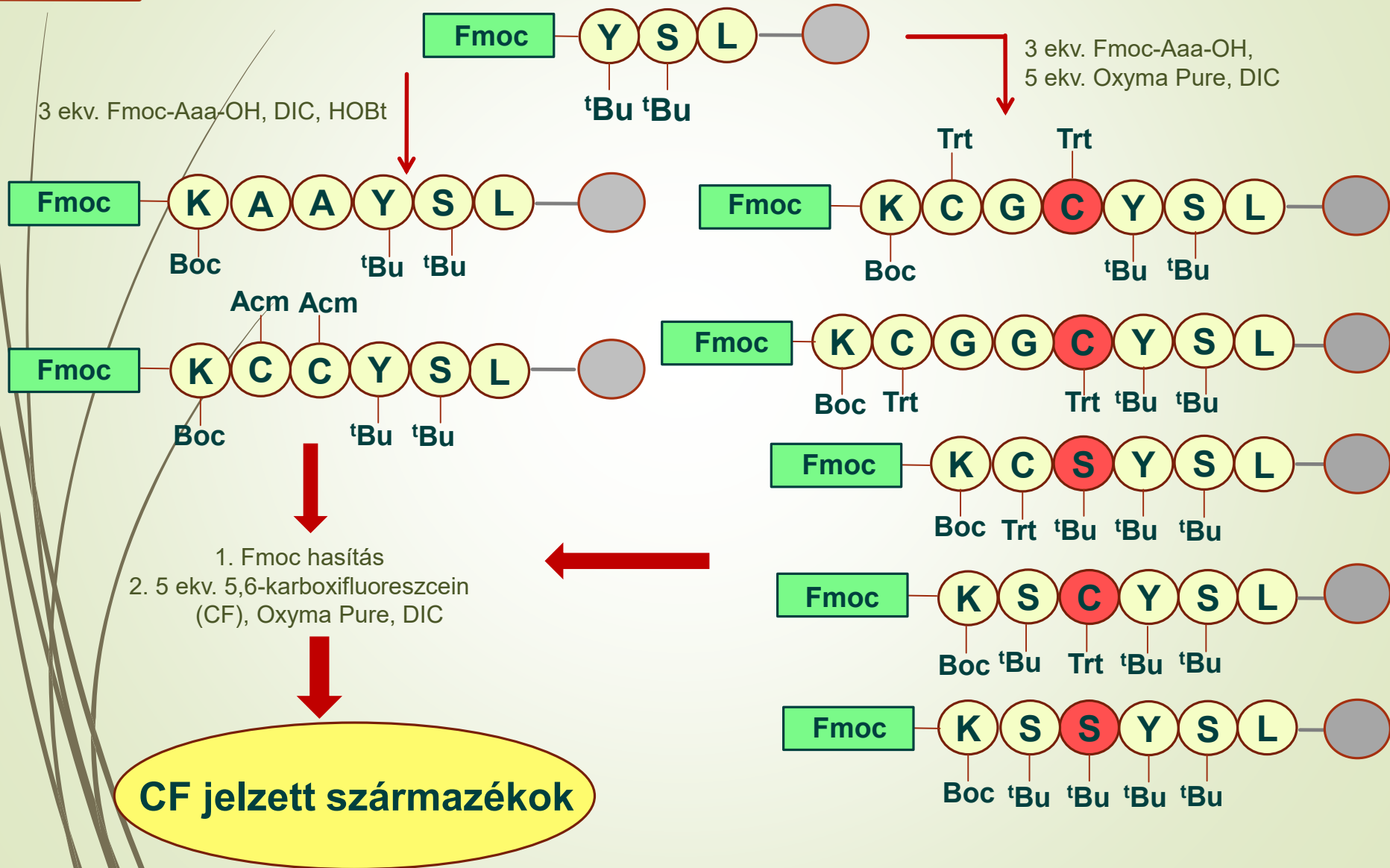
Köszönöm a figyelmet!



KCCYSL ANALÓGOK SZINTÉZISE

Rink Amid MBHA gyanta

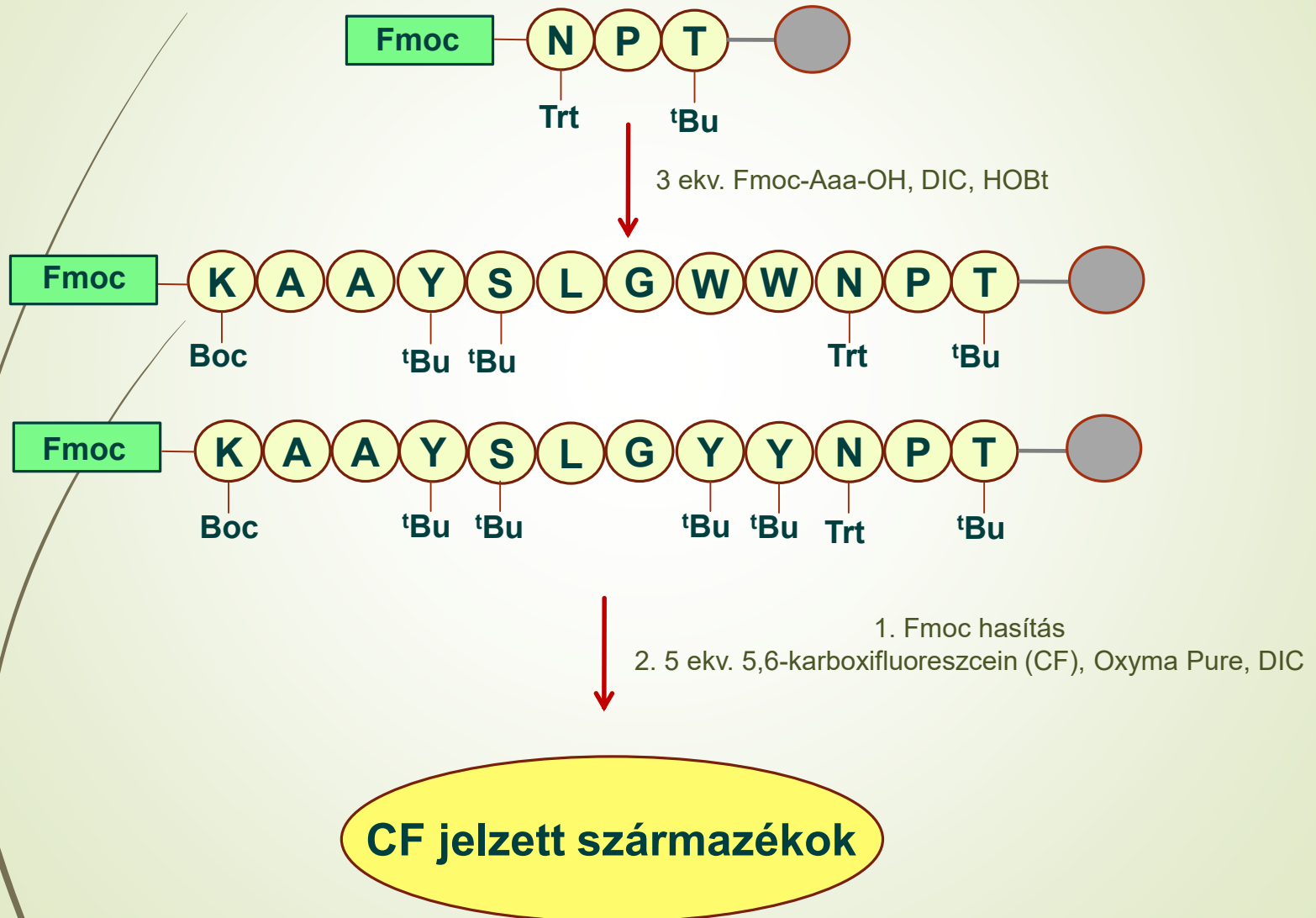
(0,71 mmol/g)



GYYNPT ANALÓGOK SZINTÉZISE

Rink Amid MBHA gyanta

(0,71 mmol/g)



ANALÓGOK JELLEMZÉSE

Szekvencia	R_t (perc) ^a	$M_{\text{számolt}} / M_{\text{mért}}$ (Da) ^b
CF-KCCYSL-NH ₂	29,9	1072,6 / 1072,8
CF-KAAYSL-NH ₂	28,8	1008,7 / 1008,4
CF-KCGCYSL-NH ₂	29,4	1129,7 / 1129,8
CF-KCGGCYSL-NH ₂	31,7	1186,0 / 1186,0
CF-KC(Acm)C(Acm)YSL-NH ₂	28,8	1214,5 / 1214,0
CF-KCSYSL-NH ₂	29,7	1056,6 / 1056,4
CF-KSCYSL-NH ₂	29,5	1056,6 / 1056,4
CF-KSSYSL-NH ₂	27,6	1040,7 / 1040,5
CF-GYYNPT-NH ₂	30,0	1070,6 / 1070,4
CF-KAAYSLGYYNPT-NH ₂	29,7	1704,8 / 1704,4
CF-KAAYSLGWWNPT-NH ₂	33,1	1750,9 / 1750,6

^aKnauer készülék; Phenomenex Aeris PEPTIDE 3,6 µm XB-C18; 250×4,6 mm
gradiens elúció: 0%-90%B /50 perc

A eluens: 0,1% TFA/desztillált víz, B eluens: 0,1% TFA/acetonitril+víz (80:20)
áramlási sebesség: 1 ml/perc; detektálási hullámhossz: λ=220 nm

^bBruker Daltonics Esquire 3000+ ioncsapás ESI-MS

50% acetonitril-víz elegy, 4 µl/perc; pozitív üzemmód, 50-2000 m/z