

Daganatos és gyulladáso- s folyamatokban szerepet játszó Organikus Anion Transzporter Polipeptidek *in silico* és *in vitro* jellemzése



Szinergia II.

Laczka Csilla

MTA TTK, EI

Membrán fehérje kutatócsoport



Hegedűs Tamás

MTA-SE

Molekuláris Biofizikai Kutatócsoport



2015. november 14.

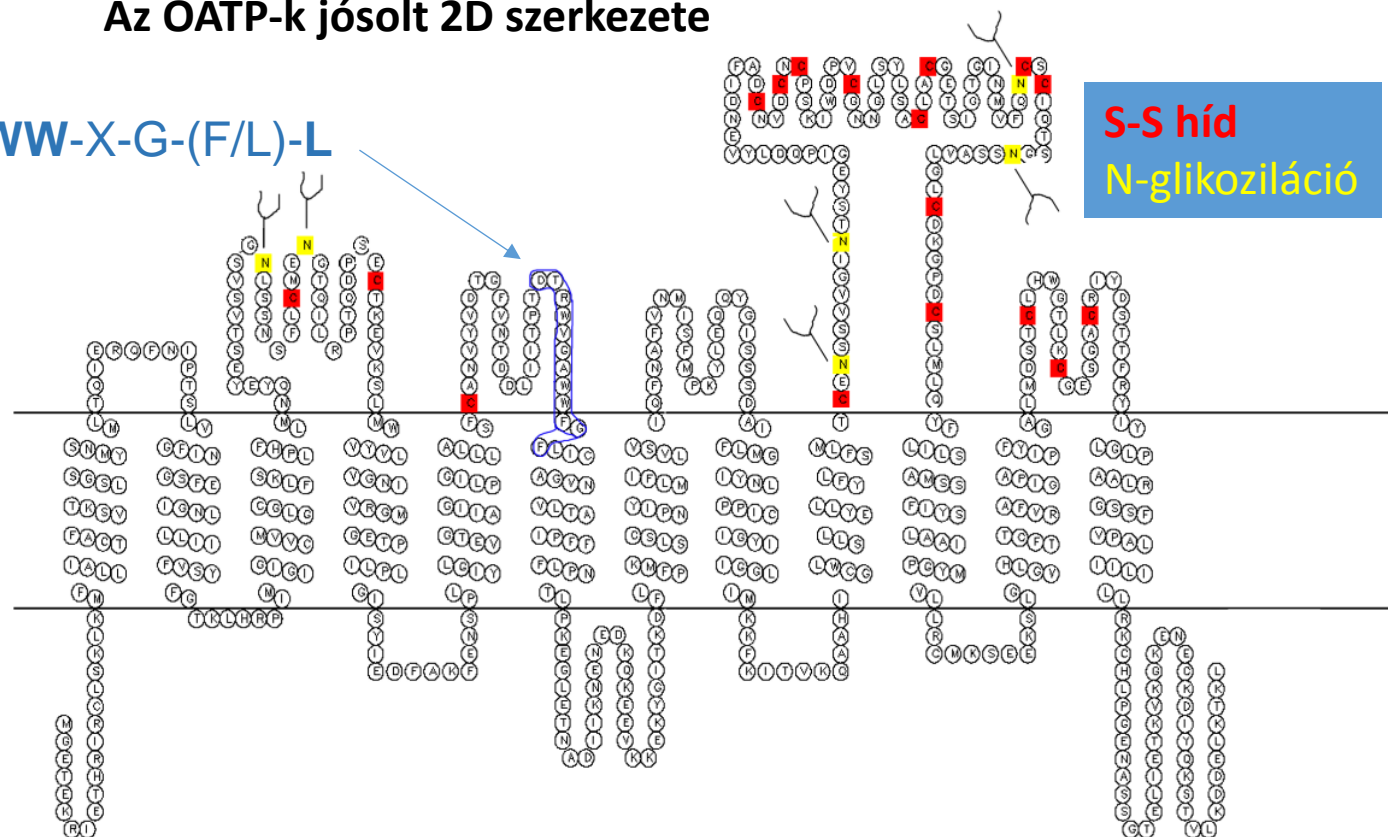
OATP: Organic Anion Transporting Polypeptides

- Plazmamembrán fehérjék
- Szerves molekulák (nem csak anionok) felvétele a sejtekbe
- ATP és Na⁺ független transzport

Az OATP-k jóssolt 2D szerkezete

OATP „signature”

D-X-RW-(I/V)-GAWW-X-G-(F/L)-L

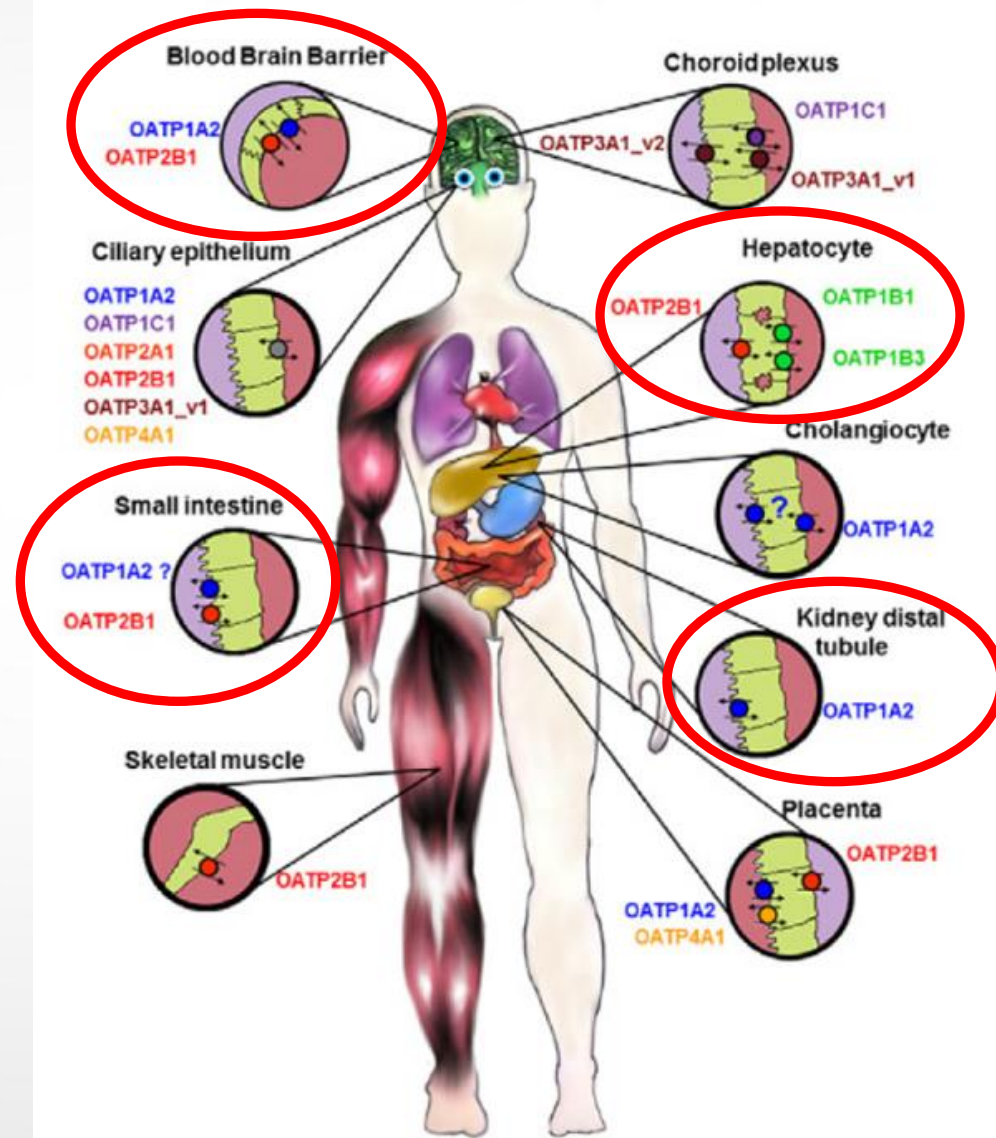


OATP-k jelentősége

Endogén és exogén molekulák transzportja:

- epesók,
- proszttaglandinok,
- nemi és tiroid hormonok,
- sztatinok,
- antivirális és kemoterápiás szerek,
- gyulladásgátló molekulák

B. Hagenbuch, B. Stieger / *Molecular Aspects of Medicine* 34 (2013) 396–412



A humán OATP család

6 család: OATP1-6

Több alcsalád: A, B, C

Összesen 11 gén

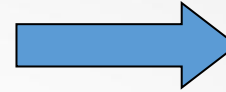
Humán fehérje	Humán gén	Aminosav hosszúság
OATP1A2	SLC01A2	670
OATP1B1	SLC01B1	691
OATP1B3	SLC01B3	702
OATP1C1	SLC01C1	712
OATP2A1	SLC02A1	643
OATP2B1	SLC02B1	709
OATP3A1	SLC03A1	710
OATP4A1	SLC04A1	722
OATP4C1	SLC04C1	724
OATP5A1	SLC05A1	848
OATP6A1	SLC06A1	719

Patológias jelentőségük:

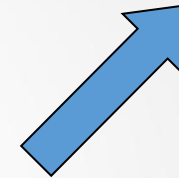
1. Gyógyszermolekulák farmako-kinetikájának befolyásolása. FDA (U.S. Food and Drug Administration) és EMA (European Medicines Agency) ajánlás OATP1B1 és OATP1B3 fehérjékkel való kölcsönhatás vizsgálatára
2. Tumor-specifikus expresszió: OATP1B1, 1B3, 4A1, 6A1
3. OATP4A1 és 6A1 SNP-k és gyulladáscsökkentő bélbetegség kapcsolata

Az együttműködés célkitűzései:

1. feltérképezzük a tumor-specifikus, de kevésbé jellemzett OATP-k szubsztrát-specifitását

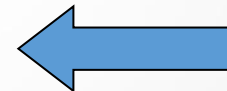


FUNKCIONÁLIS ESSZÉ



2. OATP szubsztrát/inhibitor adatbázis létrehozása

3. szerkezet-funkció összefüggésekre keressünk választ



SZERKEZETI MODELL

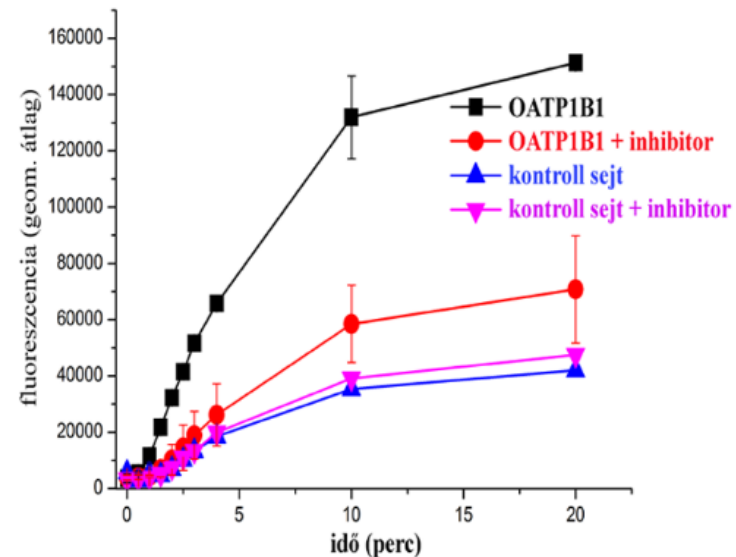
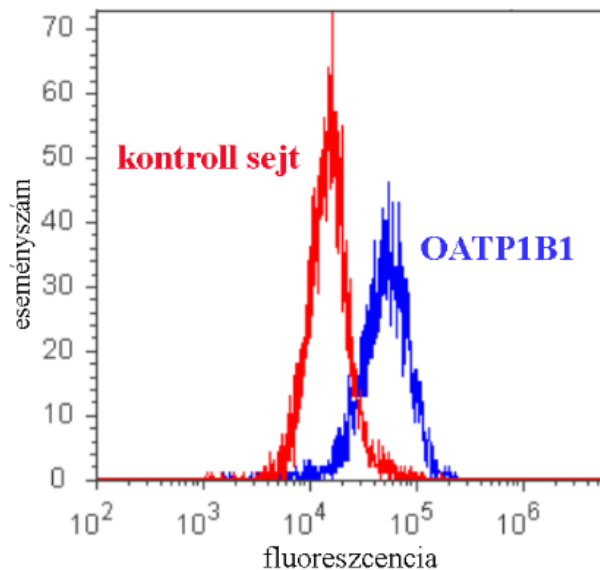
EREDMÉNYEK I.

1. *In vitro* módszerek fejlesztése humán OATP-k vizsgálatára

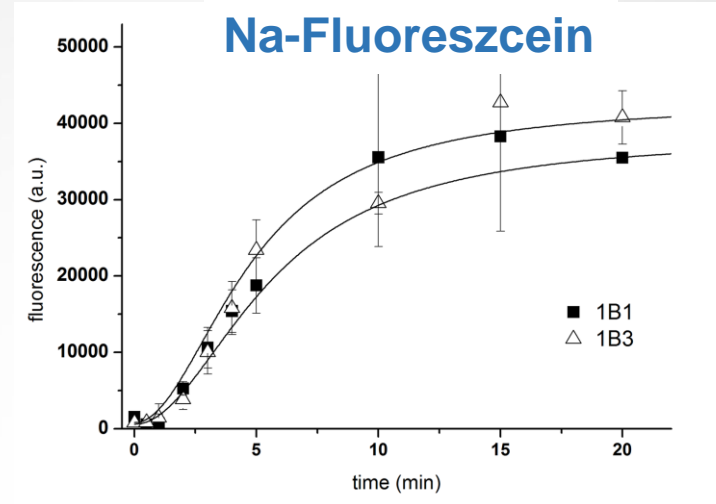
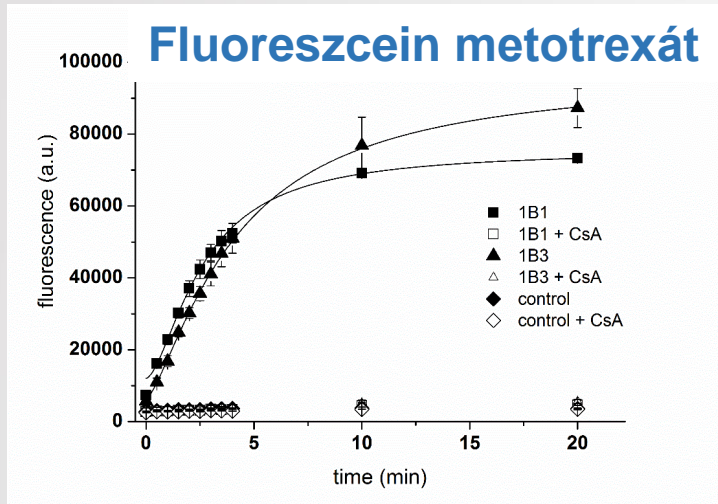
megfelelő fluoreszcens molekulák és modell sejtek kiválasztása ép sejten történő mérésekhez

Heterológ expresszió Sf9 rovarsejtekben: magas expresszió, alacsony háttér

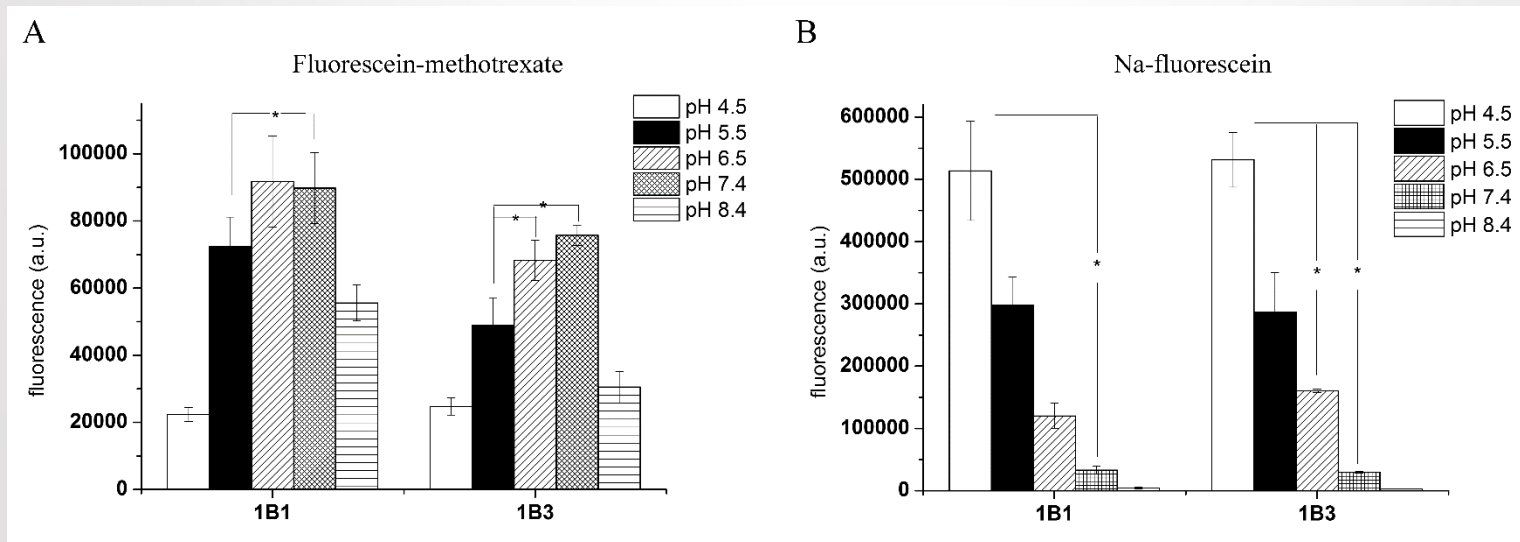
Fluoreszcein-metotrexát felvétel OATP1B1-t termelő Sf9 sejtekben



Gyors felvétel

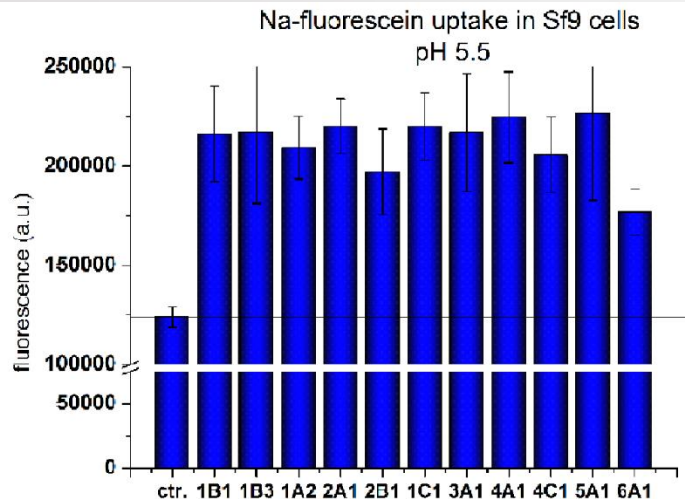


pH függő festék felvétel

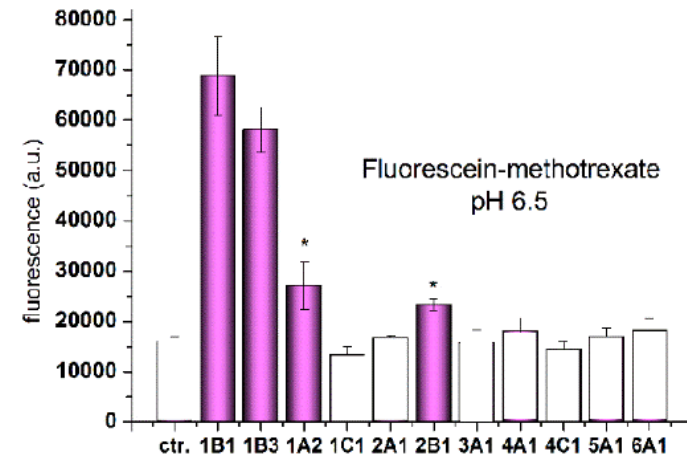


EREDMÉNYEK I.

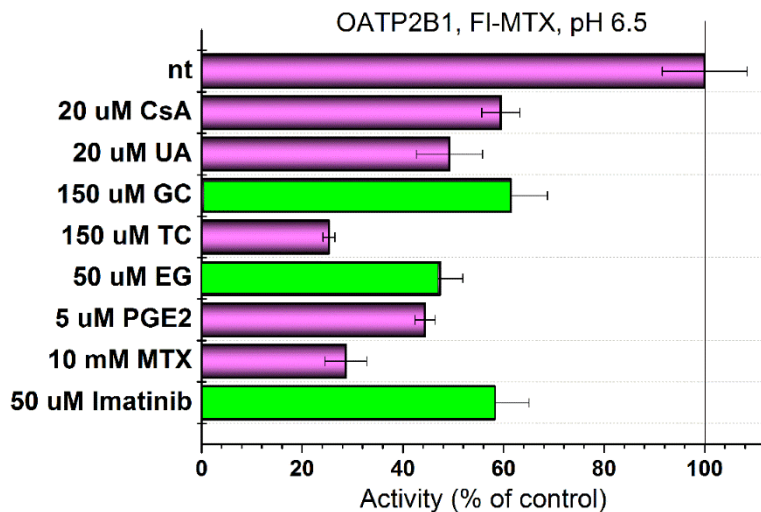
1. Általános OATP szubsztrátot találtunk



2. Az OATP1A2 és 2B1 esetében a fluoreszcein-metotrexát is működik



3. A fluoreszcens esszé alkalmas OATP szubsztrátok/inhibitorok keresésére



4. Új kölcsönhatásokat mutattunk ki.



Functional expression of the 11 human Organic Anion Transporting Polypeptides in insect cells reveals that sodium fluorescein is a general OATP substrate

Izabel Patik^a, Daniella Kovacsics^a, Orsolya Németh^a, Melinda Gera^a, György Várady^b, Bruno Stieger^c, Bruno Hagenbuch^d, Gergely Szakács^a, Csilla Özvegy-Laczka^{a,*}

^a Momentum Membrane Protein Research Group, Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, Magyar tudósok krt. 2, H-1117 Budapest, Hungary

^b Laboratory of Molecular Cell Biology, Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, Magyar tudósok krt. 2, H-1117 Budapest, Hungary

^c Department of Clinical Pharmacology and Toxicology, University Hospital, 8091 Zurich, Switzerland

^d Department of Pharmacology, Toxicology and Therapeutics, The University of Kansas Medical Center, Kansas City, KA 66160, USA

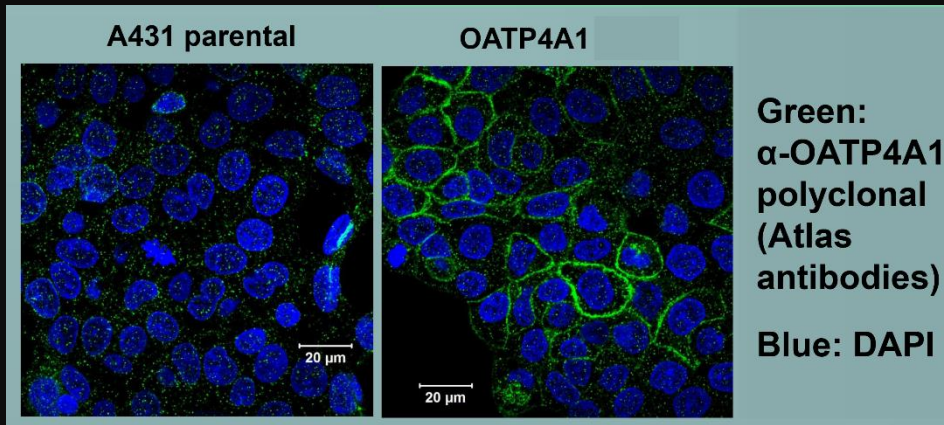
Az esszé „továbbgondolása”:

- Metotrexát, és egyéb citosztatikumok
- „drug-screening”

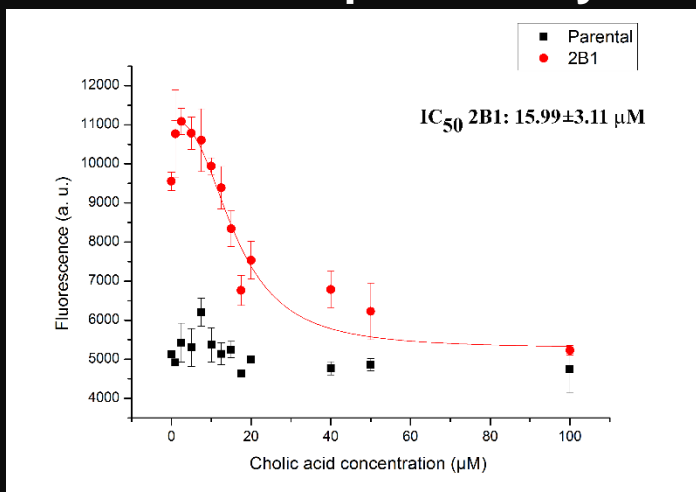


Esszé kiterjesztése emlős sejtmodellekre, automatizálás

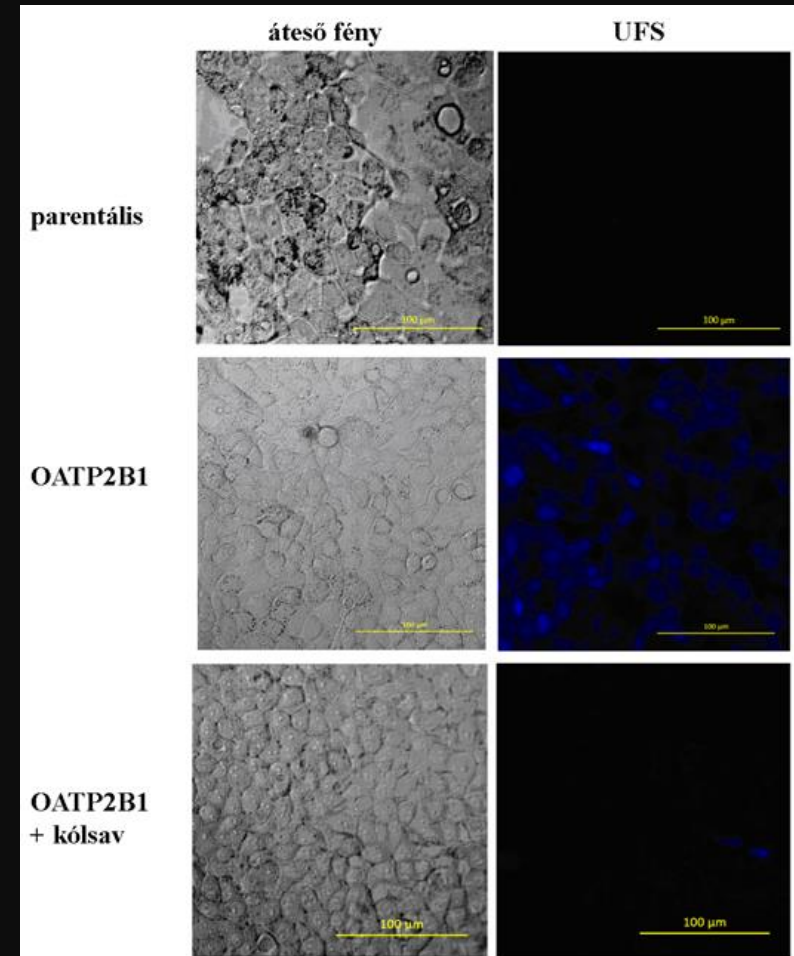
Expresszió



96-well plate assay

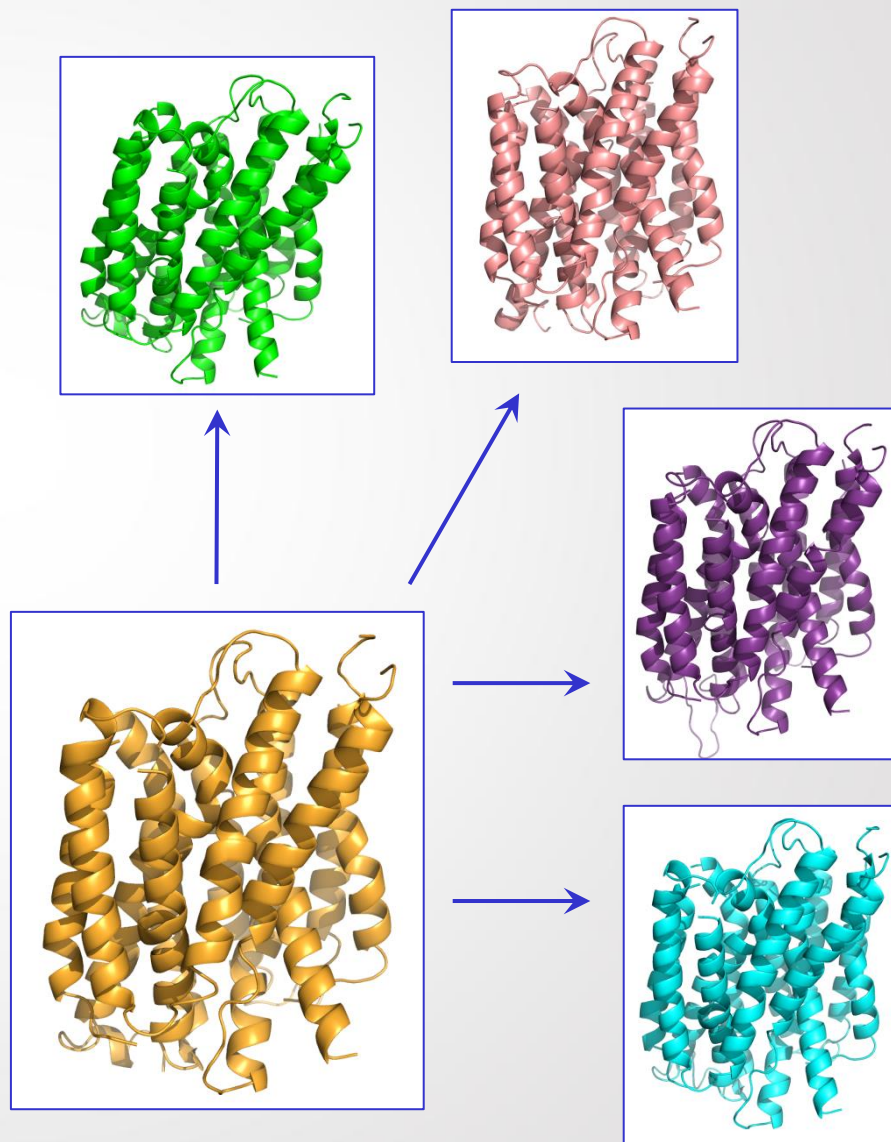
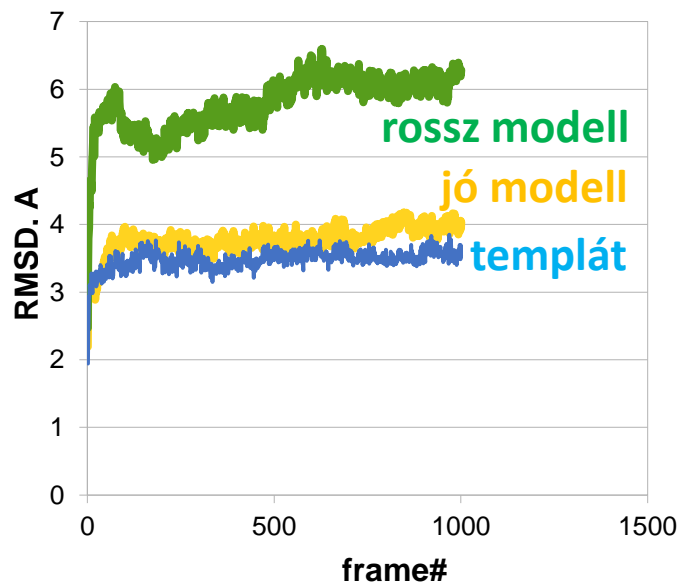


Funkcionális teszt



Eredmények II.: 3D szerkezetek létrehozása

Coarse Grain MD szimulációk



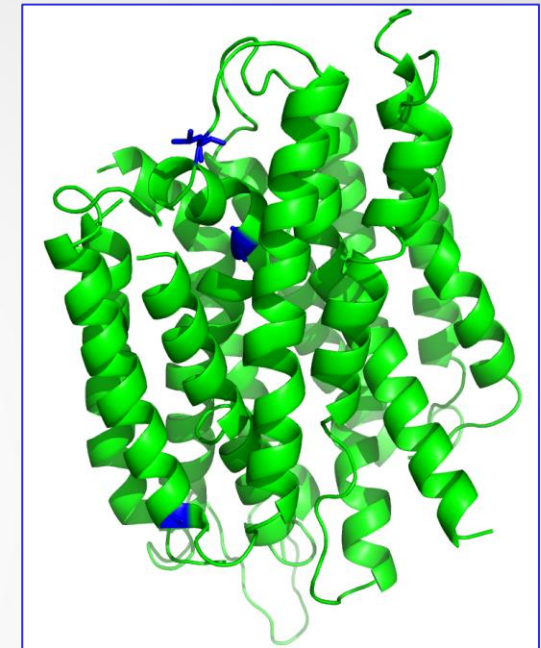
TMFoldWeb (Kozma és Tuszányi 2015)

Mutációk hatásának predikciója



adatbányászat
(<http://abcmutations.hegelab.org>)

szekvenciaillesztés



vizualizáció, jóslás

37	-----LSPHN-ICYRVK LKSG FLPCRPVEK-----EILSNINGIMKPG-L NA IL GP TGGG K SSLLDVLAARKDPSG	80	101
37	-----LSPHN-ICYRVK LKSG FLPCRPVEK-----EILSNINGIMKPG-L NA IL GP TGGG K SSLLDVLAARKDPSG		101
672	-----IKVTNGYPSWG-SG-----LATLSNID-IRIP TG Q L TMIVGQV GC GKSSLLLA ILG ---EMQ		723
679	-----VQIMGGYPTWTPDG---IPTLSNIT-IRIP RQ L T MIVGQV GC GKSSLLLA ALG ---EMQ		731
598	-----LELHGALPSWDPVG---TSLET F ISHLE VK KG M LV G IV GK V GC GKSSLLA AI AG---ELH		651
629	-----IHS GT P T WAQDL---P PT L H SLD-IQ V PK GA L V AV GP V GC GKSS L VS AL LG---EME		679
644	-----ITVRNAT FT W AR SD---P PT L NG IT- F S I PE GA L V AV GP V GC GKSS L S AL LA---EMD		696
637	-----MQ F SEAS FT WEHDS---EATVR D VN-LD I MA G Q L V AV IG P V GS GKSS L IS AM LG---EME		689
629	-----IT I HSAT FA WS Q ES---P P CL H R I N-L T VP Q G L L AV V GP V GA GKSS L S AL LG---ELS		681
467	-----QRSEAYSER S PPAK G AT G PEEQSDSL---K S VL H S I S-F V VR K G K IL G IC GN V GS GKSS L LA AL LG---Q M Q		531

Köszönetnyilvánítás

MTA TTK

Membránfehérje kutatócsoport

Patik Izabel

Kovacsics Daniella

Német Orsolya

Szakács Gergely

MTA-SE

Molekuláris Biofizikai Kutatócsoport

Tordai Hedvig

Sarankó Hajnalka

Jakab Kristóf

Szöllősi Dániel

Tóth Attila

Kollaborátorok:

Sarkadi Balázs

Kellermayer Miklós

Tusnád Gábor

Kozma Dániel



OTKA K 111678 és K 109423



KTIA-AIK-12-2012-0025