HUNPROTEXC

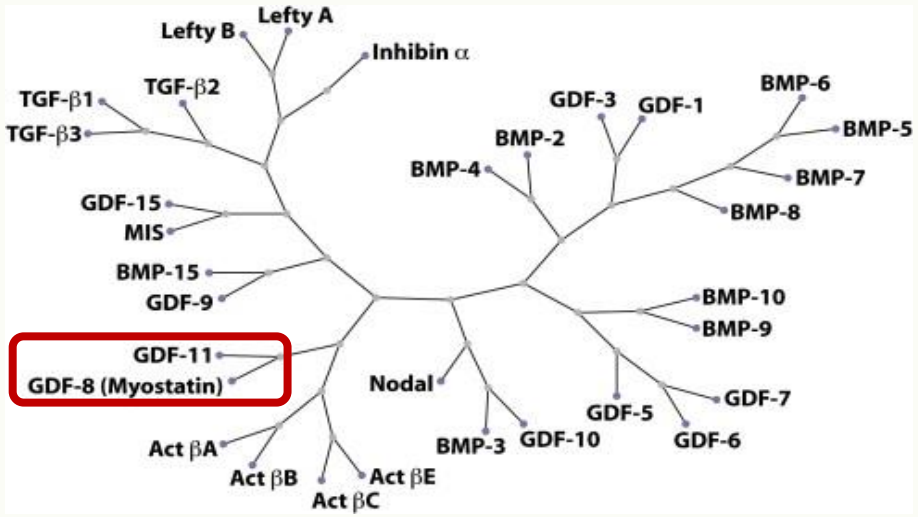
SPECIFIKUS MIOSZTATIN ANTAGONISTÁK KIFEJLESZTÉSE

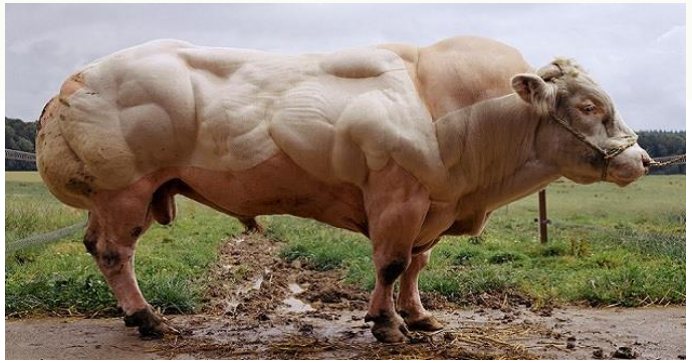
NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Miosztatin (Growth Differentiation Factor 8)

- a TGF-β fehérjecsalád tagja
- az izomnövekedést negatívan befolyásolja
- a miosztatin gén törlése / mutációja a vázizmok abnormális növekedését okozza
- **GDF8** antagonisták izomvesztéssel járó betegségek terápiás kezelésére lehetnek alkalmasak (Duchenne-féle izomdisztrófia)

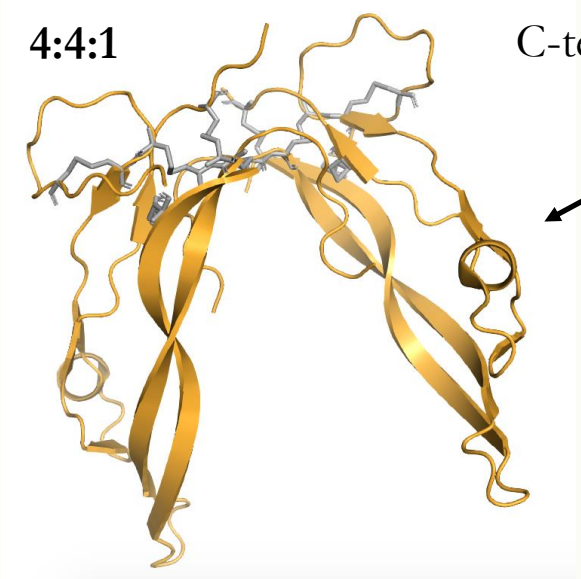




NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

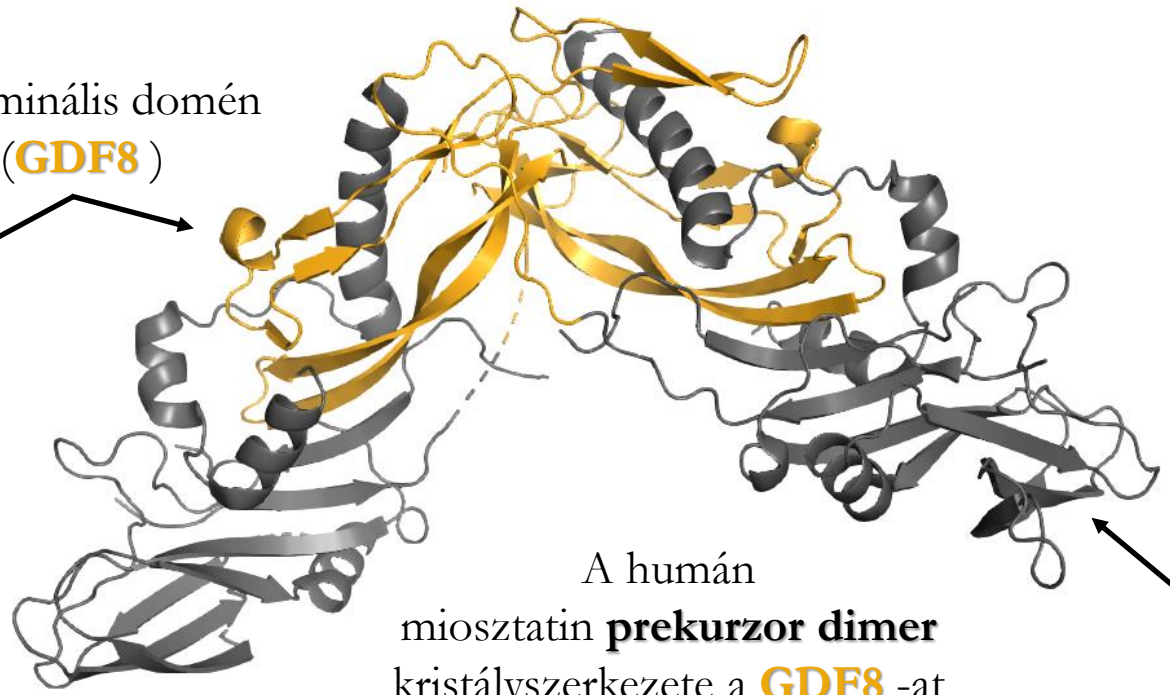
Miosztatin (Growth Differentiation Factor 8)



A humán **miosztatin dimer** kristályszerkezete

Ryan G. Walker et. al., BMC Biology (2017) 15:19, **PDB-ID: 5JI1**

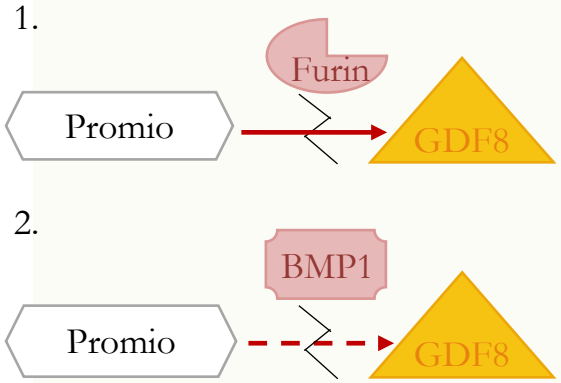
C-terminális domén (**GDF8**)



A humán miosztatin **prekurzor dimer** kristályszerkezete a **GDF8** -at kiemelve

Thomas R Cotton et. al., The EMBO Journal (2018) 37: 367-383
PDB-ID: 5NTU

N-terminális domén (**Prodomain**)



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Growth Differentiation Factor 11

- nagy hasonlóság a **GDF8** és a **GDF11** között
- a miosztatin gén inaktiválása a vázizomtömeg növekedését eredményezi
- a **GDF11** inaktiválása a csigolyák és a gerinc abnormális fejlődését eredményezi
- a szerkezetük meghatározása segít antagonisták fejlesztésében

A **GDF8** és a **GDF11** kristályszerkezetek szuperpozíciója

Anil K. Padyana et. al., Acta Cryst. (2016) F72, 160-174, **PDB-ID: 5E4G**
Ryan G. Walker et. al., BMC Biology (2017) 15:19, **PDB-ID: 5JI1**

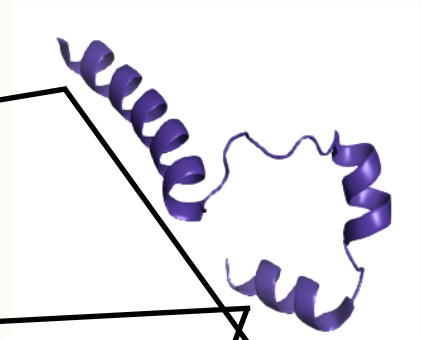
NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

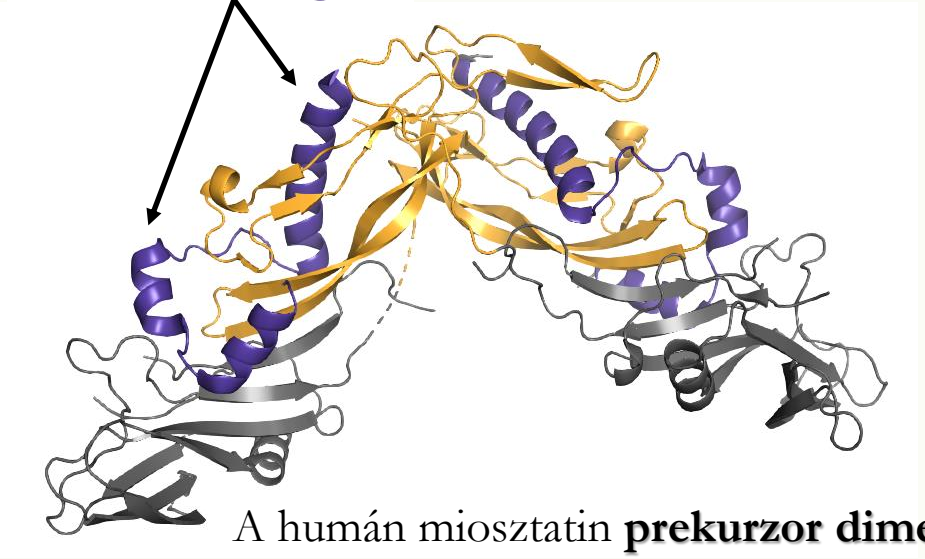
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Lehetséges megközelítések

```
                        α1                    lasso
QKENVEKE-GLCNACTWRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVI     77
PAPSVAPEPDGCPVCVWRQHSRELRLESIKSQILSKLRLKEAPNISREVV     100

helix      α2
RQLLPKAPPLRELIDQYDVQRDDS-SDGSLEDDDYHATTETIITMPTESD     126
KQLLPKAPPLQQILDLHDFQGDALQPEDFLEEDEYHATTETVISMAQETD     150

                                  β12       β13
GLDCDEHSTESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGECEFVFL     318
GLDCDEHSSESRCCRYPLTVDFEAFGWDWIIAPKRYKANYCSGQCEYMFM     350

                                β16      β17
QKYPHTHLVHQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNGKEQIIYGKIPAMV     368
QKYPHTHLVQQANPRGSAGPCCTPTKMSPINMLYFNDKQQIIYGKIPGMV     400


VDRCGCS    374
VDRCGCS    407
```

A **proGDF8** és a **proGDF11** aminosav szekvenciája





A humán miosztatin **prekurzor dimer** kristályszerkezete a **GDF8** -at és az **α1**, **lasszó, α2** -t kiemelve

Crystal structure of human myostatin precursor dimer
Thomas R Cotton et. al., The EMBO Journal (2018) 37: 367-383
PDB-ID: 5NTU

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Az aktív GDF8 és GDF11 bakteriális expressziója

Baktériumtörzs	Vektor	Fúziós fehérje	Eredmény
E.coli: BL-21 (DE3)	pET-Duett	MBP+Dsbc	sikertelen DNS konstrukció
E.coli: BL-21 (DE3)	pGlutathione-S-transferase (GST)	GST	sikertelen DNS konstrukció
E.coli: BL-21 (DE3)	pGST+Ubiquitin duett	GST+Ubiquitin	sikertelen DNS konstrukció
E.coli: BL-21 (DE3)	pH5cc-D9E	Ubiquitin	nagyon kis menny.-ű fehérje HPLC-n
E.coli: BL-21 (DE3)	pH6	Maltózkötő fehérje (MBP)	nagyon kis menny.-ű fehérje amylóz-affinitás oszlopon
E.coli: BL-21 (DE3), shuffle	pDsbc	Dscb	nagyon kis menny.-ű fehérje 2. Ni-affinitás oszlopon
E.coli: BL-21 (DE3), shuffle	pSDM (cisztein mutáció)	-	nagyon kis menny.-ű fehérje gélszűrőn/amylóz-affinitás oszlopon
E.coli: BL-21 (DE3)	**pET-SUMO**	**SUMO**	**nagyon kis menny.-ű fehérje**

- Emlős expresszió (HEK, CHO sejtekben)

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

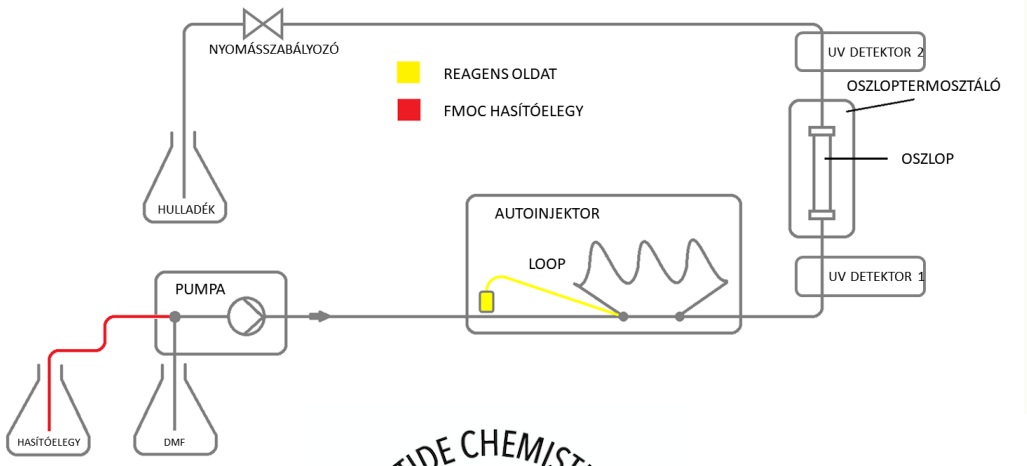
Az alfa hélix 1 szintézise

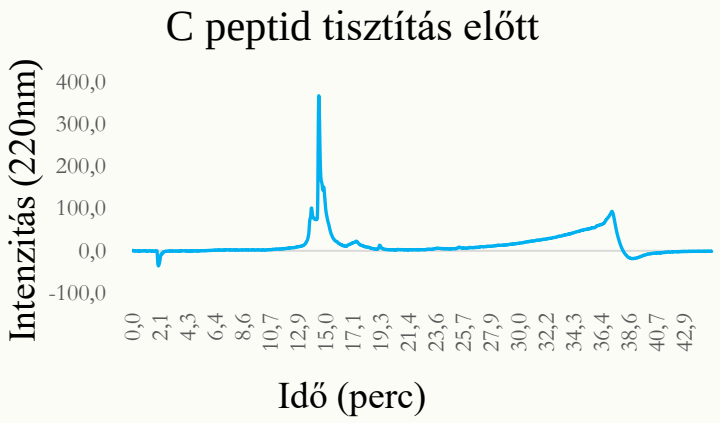
- promiosztatin α1 szintézis szilárd fázisú peptid szintézissel:

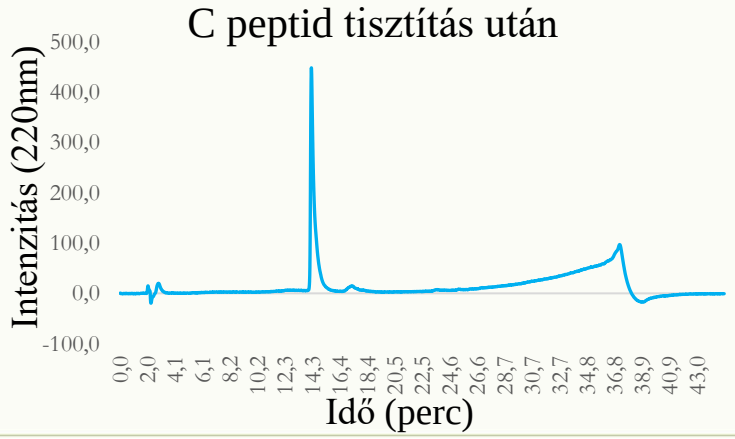
  A peptide: WRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRL (hozam: 9.8 mg)
  B peptide: WRQNTKSSRIEWIKIQILSKLRL (hozam: 7.1 mg)

- proGDF11 α1 szintézis szilárd fázisú peptid szintézissel :

  C peptide: WRQHSRELRLESIKSQILSKLRL (hozam: 11.0 mg)





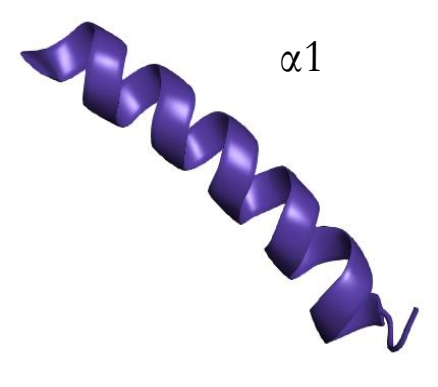


SMART PEPTIDE CHEMISTRY IN FLOW
SPF
ELTE

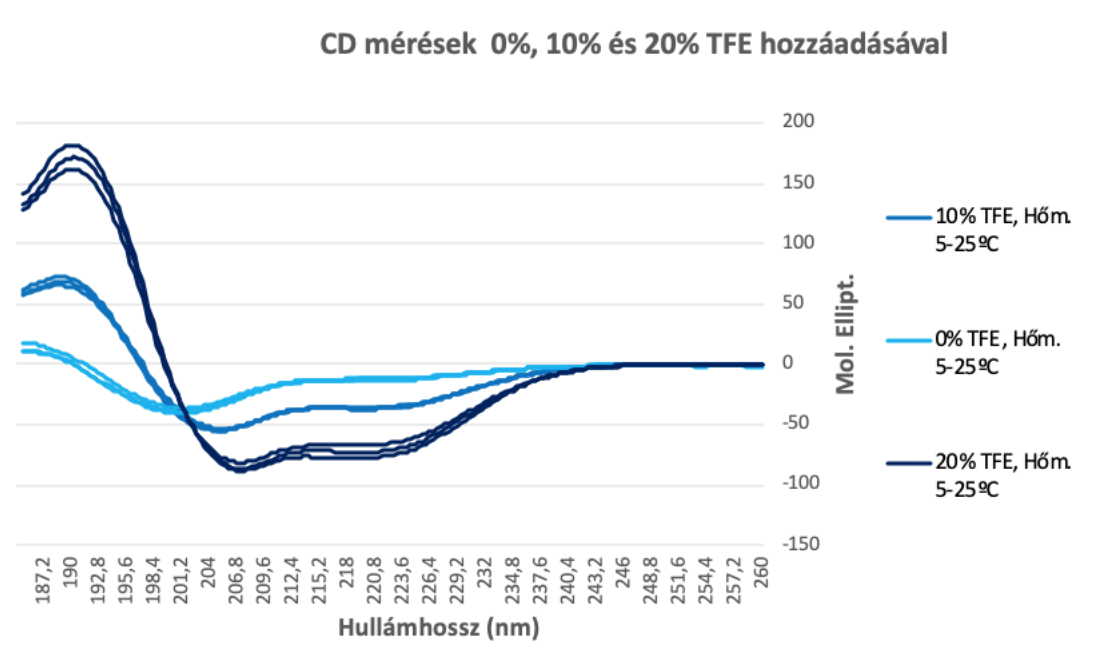
NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

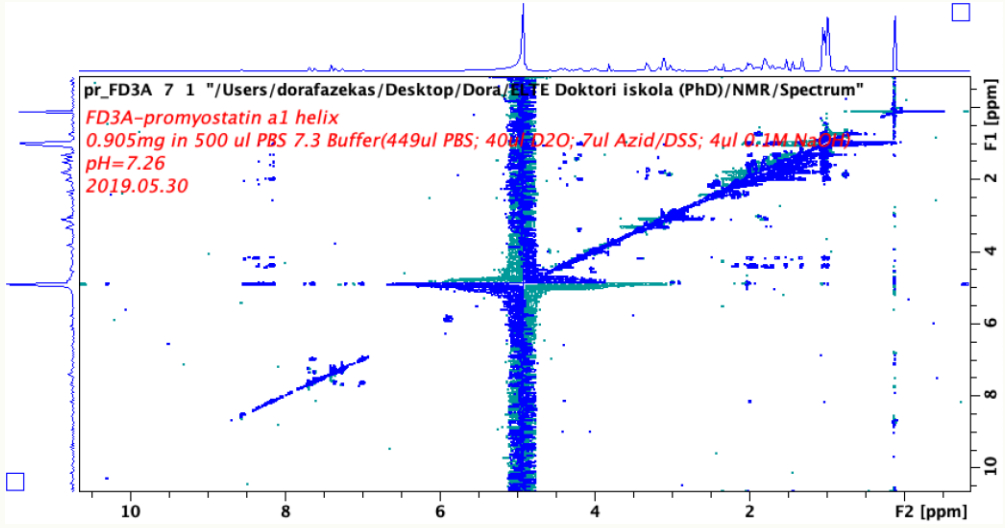
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Az alfa hélix 1 szerkezet meghatározása



A peptide: WRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRL
B peptide: WRQNTKSSRIEWIKIQILSKLRL
C peptide: WRQHSRELRLESIKSQILSKLRL



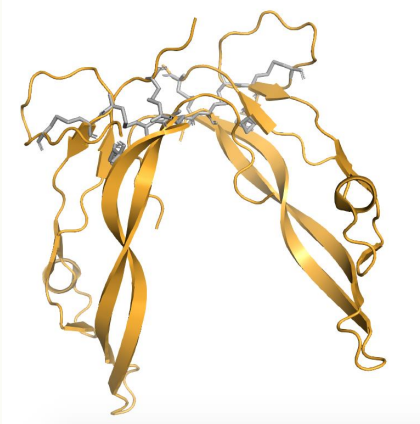


NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Gén expressziós reporter esszé a GDF8 és az A , B és C peptidekkel

A peptide: WRQNTKSSRIEAIKIQILSKLRL
B peptide: WRQNTKSSRIEWIKIQILSKLRL
C peptide: WRQHSRELRLESIKSQILSKLRL



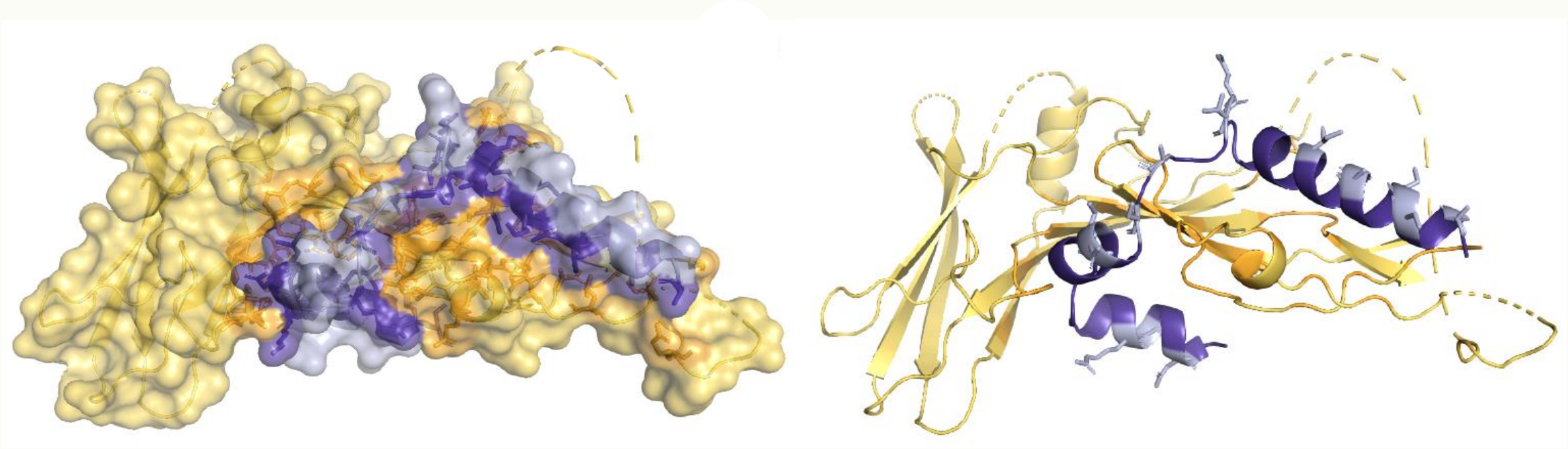
A human **miosztatin dimer** kristályszerkezete

Ryan G. Walker et. al., BMC Biology (2017) 15:19, **PDB-ID: 5JI1**

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

További terveink



QNTKSSRIEAIKIQILSKLRLETAPNISKDVIRQLLPKAPPLRELIDQY

A humán miosztatin (**GDF8**) és az **α1-lasso-α2** interakciós analízise. Az analízis a COCOMAPS tool-on keresztül lett elkészítve. Az egymással interakcióba lépő aminosavak sötéttel, az interakcióba nem lépő aminosavak világos színnel vannak jelölve a szekvenciában.

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

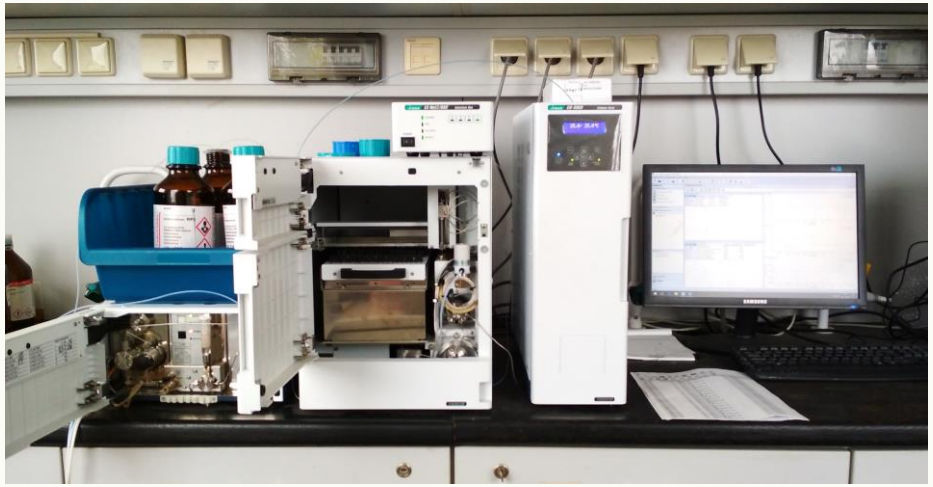
AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

KÖSZÖNÖM A MEGTISZTELŐ FIGYELMET!

NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

Szilárd fázisú peptid szintézis



Szintézis paraméterek:

- magas nyomás (80-90 Bar)
- magas hőmérséklet (80 °C)
- folyamatos áramlás (hatékony keverés, hőátvitel, homogén hőeloszlás)
- Fmoc védelmű stratégia
- szilárd fázis: (Tentagel, ChemMatrix)
- linker: Rink-amid (C-terminális védelem)
- folyadékfázis: dimetil-formamid (DMF)
- aminosav oldószer: N-metal-pirrolidon (NMP)
- kapcsolószer: diizopropilkarbodiimid (DIC), hidroxibenzotriazol (HOBt)

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT

A C peptid CD mérési paraméterei

- **FD4C**: 0.58mg+1mL dH_2O majd ebből - 100µL+300µL dH_2O pH: 3.0-tól 7.4-ig, 5 scan, 1mm küvetta, 5C° és 25C°
- **FD4C**: 0.58mg+1mL dH_2O majd ebből - 100µL+300µL dH_2O, 100µL+260µL dH_2O +40µL TFE, 100µL+220µL dH_2O +80µL TFE pH: 3.0-tól 7.4-ig, 5 scan, 1mm küvetta, 5C° 15C° és 25C°

Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal

AZ NKFI ALAPBÓL MEGVALÓSULÓ PROJEKT