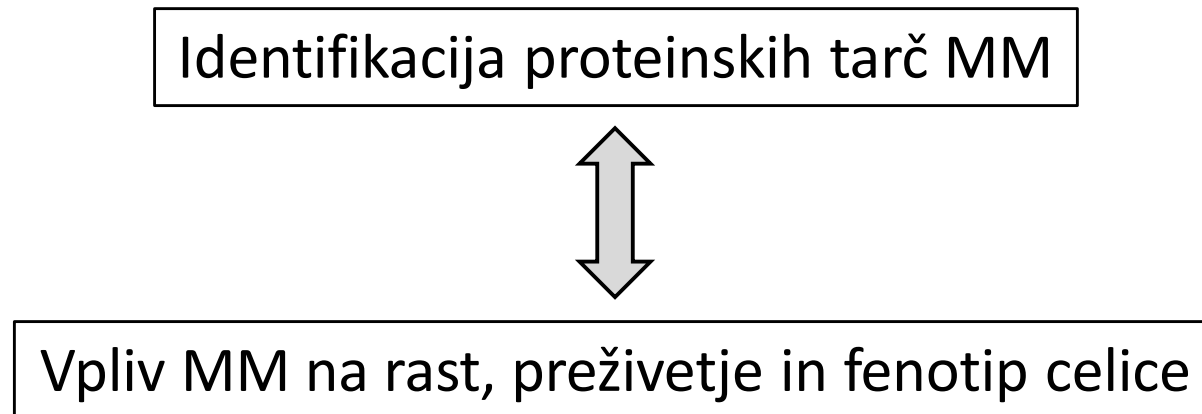


PRISM – Proteins Interacting with Small Molecules

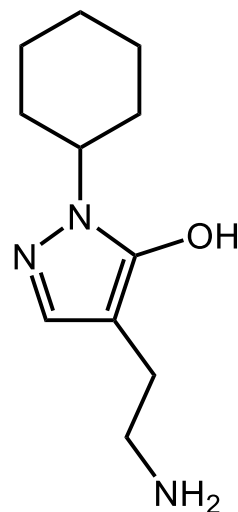
Interakcije protein/**mala molekula (MM)**



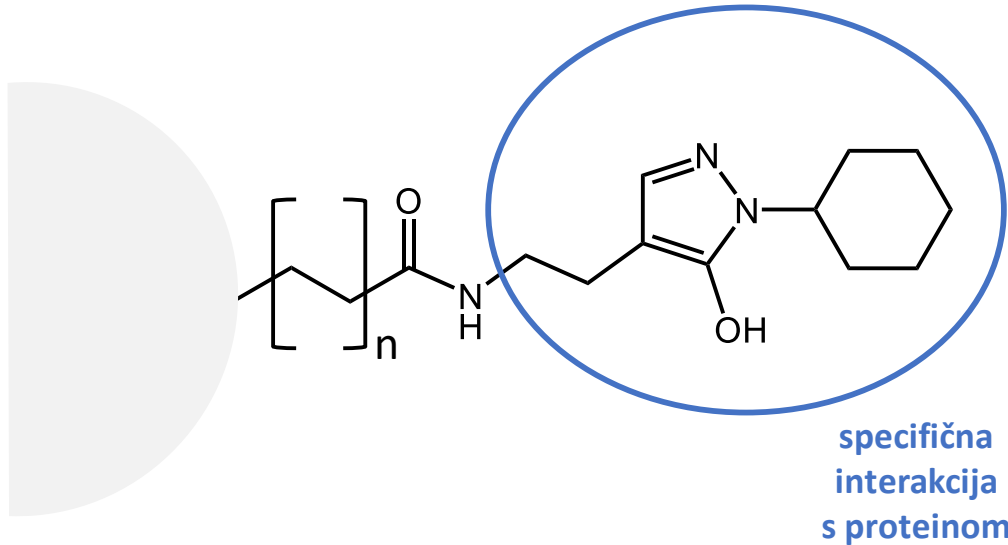
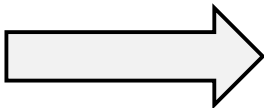
Fokus: spojine s protimikrobnim in/ali protitumorskim delovanjem

Primer 1: Preizkus koncepta identifikacije proteinskih tarč z afinitetno kromatografijo in masno spektrometrijo

Izbrali smo derivat 5-hidroksipirazola, ki vsebuje primarno amino skupino vezano na pirazolni obroč preko etilenske ročice.

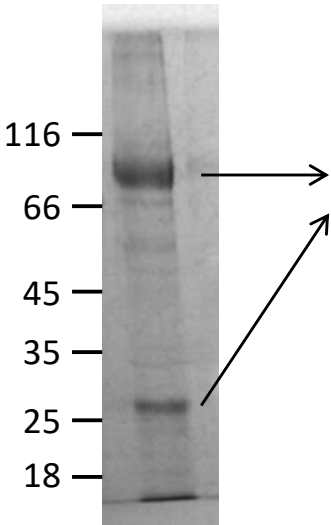


imobilizacija na agarozni nosilec (NHS-Sefaroza) preko aminske skupine

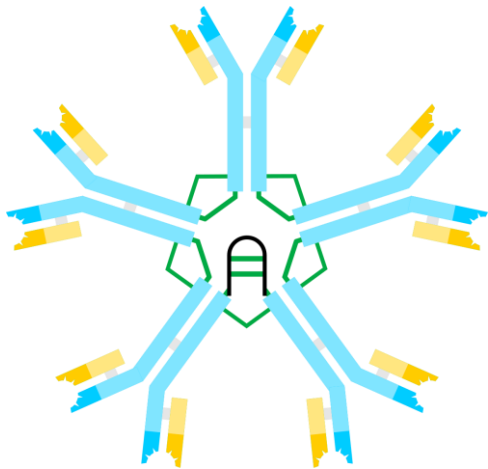


Poskus 1: kot biološki vzorec (izvor proteinov) smo uporabili komercialni goveji serum (FBS), ki se uporablja pri gojenju sesalskih celic v kulturi. Vsebuje serumske in druge zunajcelične proteine, sterilni, preverjeno ne vsebuje človeku nevarnih patogenov. Je tudi kontrola pri uporabi gojenih celic kot virov proteinov, ker je prisoten v gojišču.

Izvedli smo afinitetno kromatografijo. Vezane proteine smo eluirali z znižanjem pH. NaDS-PAGE analiza eluata je prikazana na sliki spodaj.



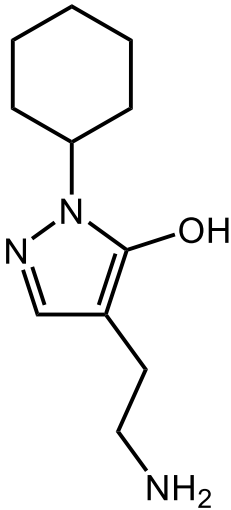
Lisi smo identificirali z MS. Izkazalo se je, da gre za goveje protitelo razreda IgM. Ker identifikacija govejih proteinov ni naš cilj, rezultatov nismo dalje validirali. Poskus je potrdil, da lahko s takim poskusom identificiramo interagirajoče proteine.



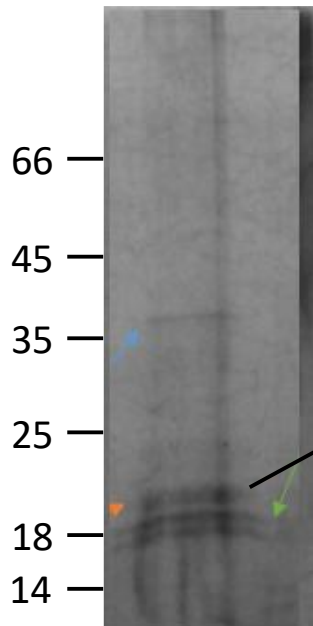
shematska zgradba IgM

Primer 1: Preizkus koncepta identifikacije proteinskih tarč z afinitetno kromatografijo in masno spektrometrijo

Poskus 2: ponovitev poskusa 1, pri katerem smo kot biološki vzorec (izvor proteinov) uporabili topno frakcijo (citosol) lizata celic človeških monocitov linije U937. Uporabili smo enak protocol kot pri poskusu 1.



NaDS PAGE analiza eluata z afinitetne kromatografije je prikazana spodaj.



Kot rezultat smo dobili več šibkih lis pri molekularni masi okoli 20 kDa

Identifikacija proteinov z MS (uporabili smo celoten vzorec – eluat)

Količinsko najpogostejši protein je človeški **ISOC2**

- slabo poznan protein
- interagira s tumorskim supresorjem p16
- kvasni homolog je nukleaza

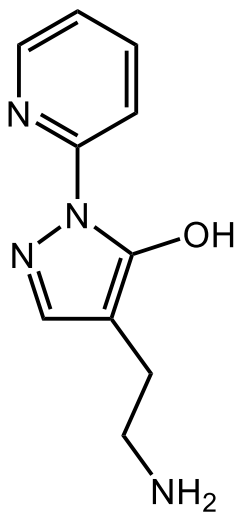
Nadaljnje raziskave

Biokemijska karakterizacija proteina ISOC2

- Priprava rekombinantnega proteina
- Funkcijska karakterizacija *in vitro*
- Strukturna karakterizacija
- Karakterizacija vloge v celici
- Validacija in karakterizacija interakcij s preiskovano spojino in njenimi analogi

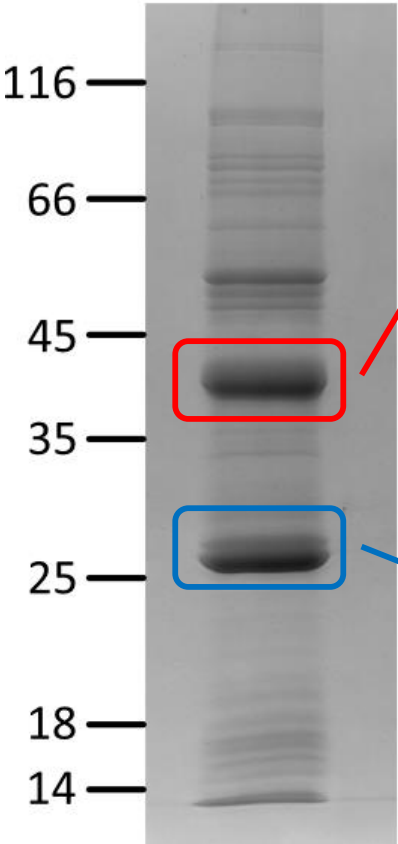
Primer 2: Iskanje proteinskih tarč 5-hidroksipirazolov na osnovi fenotipskega testiranja - **protimikrobno delovanje**

Testirali smo vpliv serije derivatov (okoli 20 spojin) 5-hidroksipirazola na rast bakterij *Escherichia coli*. Ena spojina je zavrla prekonočno rast bakterijske kulture.



Minimalna inhibitorna koncentracija spojine (koncentracija, ki prepreči vidno rast bakterij preko noči) je bila okoli 100 µg/ml.

Spojino smo imobilizirali na nosilec analogno kot pri prejšnjem primeru. Na kolono smo nanegli topno frakcijo lizata *Escherichie coli*. NaDS PAGE analiza eluate je prikazana na desni. Najmočnejši lisi smo identificirali z MS.



C[C@H](O)C(=O)[O-].[NH3+]>>C[C@H](C=O)C(=O)[O-].[NH3+]

L-treonin-3-dehidrogenaza (katalizira zgornjo reakcijo) je encim, ki sodeluje v metabolizmu aminokislin in pri sintezi sekundarnih metabolitov, pomembnih za medcelično komunikacijo pri bakterijah.

Sukcinat dehidrogenaza je encimski kompleks, ki pri *E. coli* sodeluje v Krebsovem ciklu. Je ortolog mitohondrijskega kompleksa II, ki sodeluje tudi v e⁻ transportni verigi.

Lisa pripada podenoti B, ki vsebuje Fe-S gruče.

Nadaljnje raziskave na področju protimikrobnih spojin

- Vpliv identificiranih spojin na druge bakterije (v teku) in evkariontske celice (alge, glive, sesalske celice)
- Identifikacija novih spojin s protimikrobnim delovanjem in njihovih molekulskih tarč
- Karakterizacija mehanizmov delovanja spojin na njihove tarče
 - treonin-3-dehidrogenaza
 - sukcinat dehidrogenaza
 -
- Identifikacija novih inhibitorjev identificiranih proteinskih tarč in njihova karakterizacija *in vitro* ter *in vivo*
- Racionalno načrtovanje novih spojin na osnovi znanih inhibitorjev in njihova sinteza ter biološko testiranje