

Onkogén KRAS mutánsok működésének helyreállítását célzó GAP fehérje mutánsok nyomában

In the wake of GAP protein mutants to repair the malfunction of oncogenic KRAS mutants

SÓLYOM Ildikó^{1,2}, Dr. NYÍRI Kinga^{1,2}, Prof. Dr. VÉRTESSY G. Beáta^{1,2}

¹Department of Applied Biotechnology and Food Sciences,
Faculty of Chemical Technology and Biotechnology (VBK),
Budapest University of Technology and Economics (BME),
1111 Budapest, Szent Gellért tér 4.,
<http://kutatok.org/abettt/>

²Genome Metabolism Research Group, Institute of Enzymology, RCNS
1117 Budapest, Magyar tudósok körútja 2.,
<http://www.ttk.hu>

ABSTRACT

In cancer, mutations in the KRAS protein are very common at all. The protein has its own GTPase activity, but this is quite low. GTPase activating proteins (GAPs) accelerate the hydrolysis of KRAS GTP, thereby promoting signaling inactivation. Oncogenic KRAS mutations weaken the GAP-KRAS interaction, resulting in increased signal transduction, which can lead to uncontrolled cell division and tumorigenesis.

The aim of our work was to improve the interaction between GAP and some of oncogenic KRAS mutants (G12C, G12D). One feasible way to do this is to generate GAP mutants that accelerate the inactivation of the KRAS mutants (G12C, G12D), which could possibly eliminate the malfunction. The other is to find such „sticking” molecules that facilitate the interaction of the two proteins.

QM/MM simulations made by our collaborators on the GAP mediated GTPase reactions of G12C, G12D KRAS resulted in two sets of GAP mutants which potentially overperform the wild-type GAP. These mutants were created and tested *in vitro* in our laboratory. The method of choice was the so-called MESS GTPase activity assay, which is based on the indirect measurement of inorganic phosphate released during activity. On the other hand, small molecules that were found to be effective *in vivo* against KRAS-G12D-expressing tumors in mice were tested for binding to the KRAS-GAP system by differential scanning fluorimetry.

We are also planning to use biolayer interferometry (BLI) to determine the binding constant characterizing the KRAS-GAP interaction of the different mutants.

Keywords: KRAS, oncogene, GTPase, interaction study, activity assay

ÖSSZEFOGLALÓ

Rákos megbetegedések esetén a KRAS fehérje mutációi nagyon gyakoriak. A fehérje saját GTPáz aktivitással rendelkezik, de ez meglehetősen alacsony. A GTPáz aktiváló fehérjék (GAP) felgyorsítják a KRAS GTP hidrolízisét, ezáltal elősegítve a jelátviteli inaktivációt. Az onkogén KRAS mutációk gyengítik a GAP-KRAS kölcsönhatást, ez pedig fokozott jelátvitelt eredményez, ami kontrollálatlan sejtosztódáshoz és tumorigenezishez vezethet.

Munkánk célja a GAP és néhány onkogén KRAS mutáns (G12C, G12D) közötti kölcsönhatás javítása volt. Ennek egyik megvalósítható módja olyan GAP mutánsok előállítása, amelyek felgyorsítják a KRAS mutánsok (G12C, G12D) inaktiválódását, ami így megszüntethetné a hibás működést. A másik az, hogy olyan „ragasztó” molekulákat találjunk, amelyek elősegítik a két fehérje kölcsönhatását.

Együttműködő partnereink által készített QM/MM szimulációk a G12C, G12D mutáns KRAS-ok GAP által közvetített GTPáz reakcióira vonatkozóan két GAP mutáns készletet eredményeztek, amelyek potenciálisan felülmúlják a vad típusú GAP-ot. Ezeket a mutánsokat laboratóriumunkban létrehoztuk és

in vitro teszteltük. Az általunk választott módszer az úgynevezett MESG GTPáz aktivitásvizsgálat volt, amely az aktivitás során felszabaduló szerves foszfát közvetett mérésén alapul. Másrészt teszteltünk olyan kismolekulákat, amelyek in vivo hatékonynak bizonyultak egerekben a KRAS-G12D-t expresszáló daganatok ellen, ezek kötődését a KRAS-GAP rendszerhez differenciális pásztázó fluorimetriával vizsgáltuk.

Tervezzük továbbá a bioréteg interferometria (BLI) használatát a különböző mutánsok KRAS-GAP kölcsönhatását jellemző kötési állandó meghatározására.

Kulcsszavak: KRAS, onkogén, GTPáz, kölcsönhatás-vizsgálat, aktivitás assay