

Master Biomolécules Tronc Commun
Année 2014-2015
Session avancée de novembre 2014
Examen

GM CH351 : partie Peptide

Durée totale 1 heure. Aucun document autorisé hormis les tables fournies avec les sujets
LES REPONSES DOIVENT ETRE TRES CONCISES (1-3 lignes maximum)

Bioconjugate Chem. 2010, 21, 1917–1924

1917

Photocleavable Peptide-Conjugated Magnetic Beads for Protein Kinase Assays by MALDI-TOF MS

Guangchang Zhou,^{1,2} Xiaoliang Yan,¹ Ding Wu,¹ and Stephen J. Kron^{1,2}

Ludwig Center for Metastasis Research and Department of Molecular Genetics and Cell Biology, The University of Chicago, Chicago, Illinois 60637. Received July 6, 2010; Revised Manuscript Received August 30, 2010

Peptides were immobilized onto superparamagnetic beads via photocleavable linkers. This enabled simple, rapid, and label-free protein kinase assays via MALDI-TOF MS detection of substrate peptide phosphorylation. Abltide, a model substrate for the Abl protein tyrosine kinase model, was coupled onto amine-terminated beads, incubated with ATP and recombinant c-Abl kinase, and released and further detected to determine phosphorylation. Abltide phosphorylation was found to depend significantly on the length and composition of linkers to the bead surface. Inserting a diblock spacer of poly(glycine) and poly(ethylene glycol) segments markedly enhanced phosphorylation. To validate the assay, the activity of two small-molecule kinase inhibitors, imatinib and dasatinib, which target the oncogenic mutant tyrosine kinase Bcr-Abl to treat chronic myeloid leukemia (CML), was tested. Examining inhibition of the purified c-Abl or Bcr-Abl in K562 CML cell extracts, IC_{50} values were determined to be consistent with the literature. This simple, label-free, MALDI-based protein kinase assay can be readily adapted to allow multiplexed assays of multiple peptide substrates and/or analysis of alternative post-translational modifications as a tool for drug discovery and clinical testing.

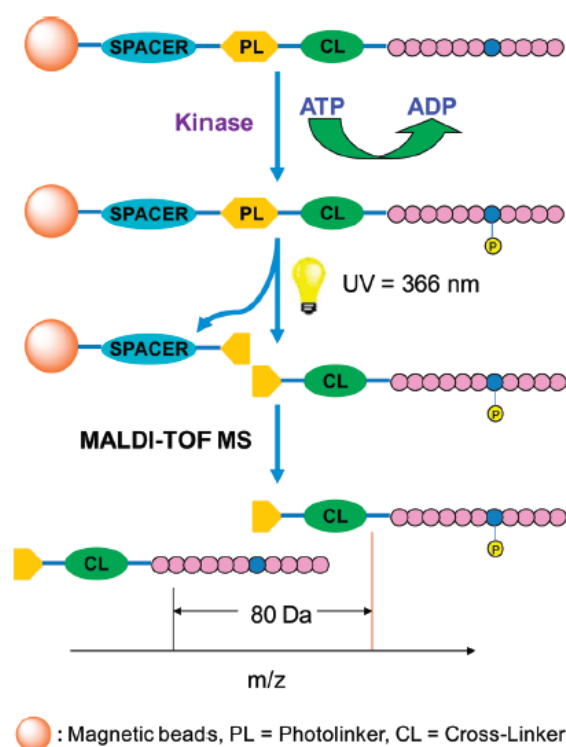


Figure 1. Schematic representation of the new label-free MALDI-based protein kinase assay technique using magnetic beads as a solid-phase analysis platform to facilitate separation and photocleavable linkers as a trigger to release peptide substrates under UV light for MALDI detection. Both phosphorylated and unphosphorylated substrate peptides can be detected by MALDI with a characteristic 80 Da difference in mass between the two peaks.

Master Biomolécules Tronc Commun
Année 2014-2015
Session avancée de novembre 2014

1920 *Bioconjugate Chem.*, Vol. 21, No. 10, 2010

Zhou et al.

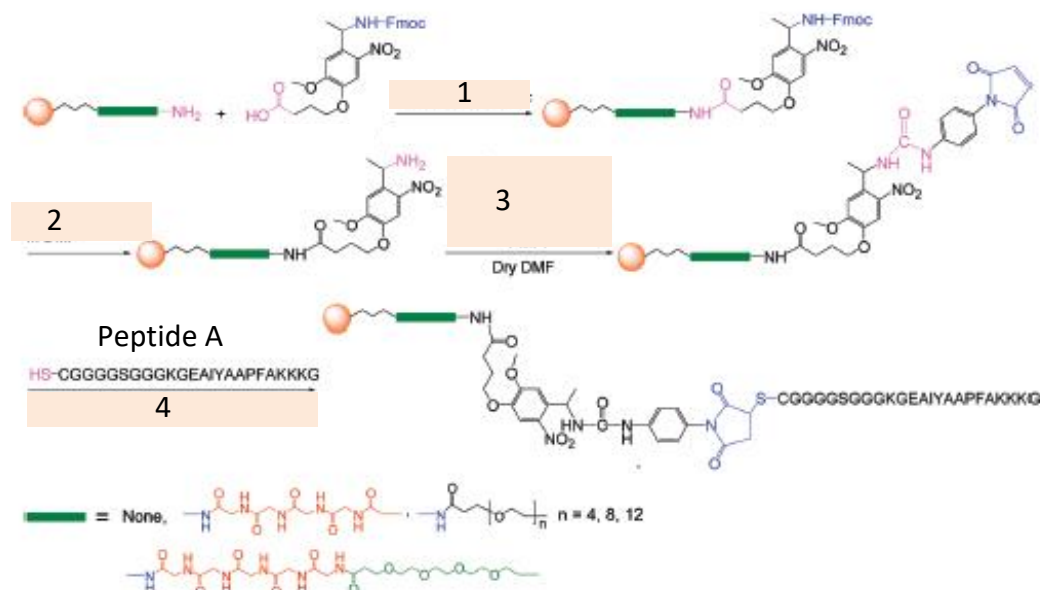
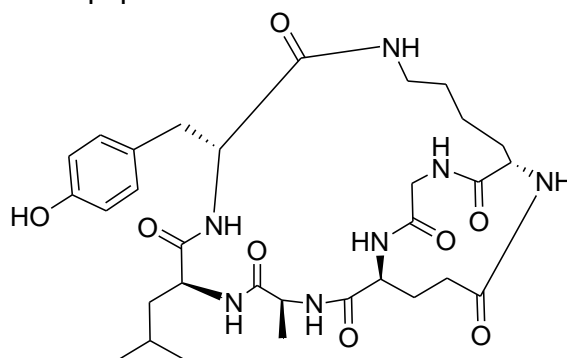


Figure 3. General synthetic route for photocleavable Abtide-conjugated magnetic beads with different surface spacer structures (pentaglycine spacer, single PEG spacers with different lengths, and diblock spacer consisting of PEG and polyglycine) through successive coupling–deprotection, amino–isocyanate, and highly selective thiol–maleimide reactions starting from magnetic beads bearing different surface spacers (denoted by the green bar).

- 1) Proposez la synthèse du peptide A' sur support solide : H-KGEALY-OH
- 2) On désire obtenir 1,358 g de peptide A' purifié à partir d'une résine fonctionnalisée à 0,5 mmol/g. Le rendement de synthèse+purif est de 20%. Quelle masse de résine devez-vous utiliser ?
- 3) L'analyse LC/MS ES+ du brut après clivage de A' d'une résine de Wang révèle les m/z suivants : 680.5, 736.5, 495.4, 662.5. Proposez une identité aux produits secondaires et des solutions pour les éviter lors d'une prochaine synthèse
- 4) **Sans ré-écrire le schéma de synthèse complet**, proposez des modifications à votre synthèse pour obtenir le peptide B suivant :



- 5) Expliquez en 3 lignes, l'objectif de la publication *Bioconjugate chem* 2010,21, 1917-1924. Dans quel domaine thérapeutique cet outil peut être utile ?
- 6) Comment les auteurs ont-ils choisi la séquence du peptide A ?
- 7) Quelle est l'avantage des billes magnétiques pour le test ?
- 8) Pourquoi y a t il un espaceur entre la bille magnétique et de composé nitro ?
- 9) Pourquoi les auteurs ne synthétisent ils pas directement le peptide A sur les billes magnétiques ?
- 10) Proposez des réactifs et conditions pour 1, 2, 3, et 4.

Master Biomolécules Tronc Commun

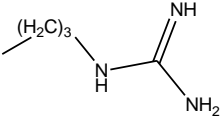
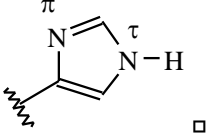
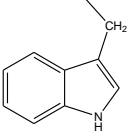
Année 2014-2015

Session avancée de novembre 2014

- 11) A quel type de réaction appartient la réaction 4 et quel est son avantage par rapport à un couplage direct entre le C terminal du peptide A et l'amine primaire qui portait un groupement protecteur Fmoc dans la Figure 3.
- 12) Avant l'analyse Maldi, on irradie les billes à 366 nm avec une lampe UV. Dessinez ce qui reste sur la bille.
- 13) On ne dispose pas de lampe UV, proposez un linker permettant de cliver à l'aide de vapeurs d'ammoniac.
- 14) Est il possible de synthétiser le peptide A par fragments, si oui donnez un exemple de fragments et indiquez la résine utilisée pour la synthèse de ces fragments.

nom	Code 1 lettre	Code 3 lettres	Masse du résidu
Alanine	A	Ala	71
Arginine	R	Arg	156
Asparagine	N	Asn	114
Acide Aspartique	D	Asp	115
Cystéine	C	Cys	103
Acide Glutamique	E	Glu	129
Glutamine	Q	Gln	128
Glycine	G	Gly	57
Histidine	H	His	137
Isoleucine	I	Ile	113
Leucine	L	Leu	113
Lysine	K	Lys	128
Méthionine	M	Met	131
Phénylalanine	F	Phe	147
Proline	P	Pro	97
Sérine	S	Ser	87
Thréonine	T	Thr	101
Tryptophane	W	Trp	186
Tyrosine	Y	Tyr	163
Valine	V	Val	99

Master Biomolécules Tronc Commun
Année 2014-2015
Session avancée de novembre 2014

Chaîne latérale de l'acide aminé	Protection (abréviation)	Conditions de déprotection
Arg 	NO ₂ Tos Mtr Pbf	H ₂ /Pd/C ou HF HF TFA, 4-6 heures TFA, 30 min.
Asp / Glu (CH ₂) ₁ ou 2-CO ₂ H	OMe, OEt OBzl OtBu OcHx OAll	NaOH H ₂ /Pd/C ou NaOH ou acide fort TFA HF Pd(Ph ₃ P) ₄ /PhSiH ₃
Asn / Gln (CH ₂) ₁ ou 2-CO-NH ₂	Trt Xan	TFA TFA
Cys CH ₂ -SH	AcM Mob Trt	I ₂ HF/0 °C TFA/scavengers
His 	Trt (NH□) Bum (NH□) Bom (NH□)	TFA TFA H ₂ /Pd/C
Lys (CH ₂) ₄ NH ₂	Boc Alloc Z (ou ClZ) Fmoc	TFA Pd(Ph ₃ P) ₄ /PhSiH ₃ HF DEA ou Pip
Ser/Thr/Tyr CH ₂ -OH/CH(CH ₃)-OH/ CH ₂ -Ph-OH (Tyr seulement)	tBu Bzl Dcb ou Z(2Br)	TFA H ₂ /Pd/C ou HF HF
Trp 	Boc For (CHO)	TFA Pip ou NH ₂ NH ₂