

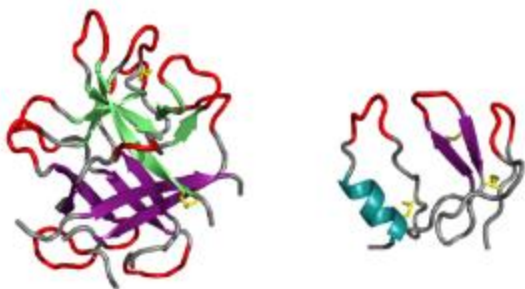
PB1.1. Regulace enzymů degradujících extracelulární matrix (Mareš)

Cíle výzkumu

- Vyvinout novou třídu specifických inhibitorů peptidas degradujících ECM jako potenciální protinádorová léčiva.
- Charakterizovat malé proteiny s víceúčelovými smyčkami jako nástroj pro specifickou vazbu na peptidas degradující ECM.
- Pomocí racionálních a kombinatorních přístupů navrhnout specifické inhibitory peptidas degradujících ECM na to na bázi malých proteinů a jejich syntetických mimetik.

Výzkumný plán a metodologie

Strukturní analýza malých proteinů: Proteinové inhibitory z rodiny I3A (se strukturou β -trojlístku) a rodiny I31 (se strukturou IGFBP) budou analyzovány na strukturní úrovni (Obr. 1). Pro pět vybraných proteinů z těchto rodin budou určeny 3D struktury pomocí rentgenostrukturní analýzy a NMR a to ve formě jejich komplexů s modelovými peptidasami, především cysteinovými. Bude popsána struktura reaktivních míst a mód inhibice a na základě této analýzy budou vybrány vazebné smyčky a aminokyseliny určující inhibiční interakci. Strukturní část projektu bude řešena ve spolupráci se skupinou P. Řezáčové (ÚOCHB).

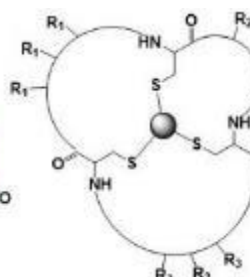
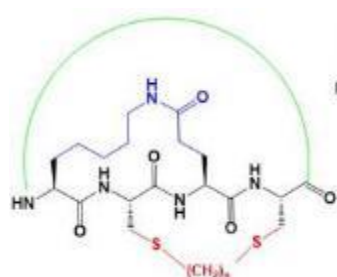


Obr. 1. Malé proteiny využívané projektem pro navrhování specifických ligandů. Vlevo: struktura β -trojlístku; vpravo: struktura typu IGFBP. Smyčky, které budou modifikovány pro vazbu jsou vyznačeny červeně. Sekundární struktury jsou modré/zelené (β -struktura) a modré (α -struktura); disulfidy jsou žluté.

Proteinové inženýrství a funkční testy: Reaktivní místo (typicky dvě nebo tři smyčky) ve struktuře malých proteinů bude modifikováno pro specifickou vazbu na peptidasu CTSK. K tomuto účelu budou kombinovány dva přístupy: technologie "phage display" a "in silico docking"². Navržené inhibitory budou připraveny jako rekombinantní proteiny, purifikovány a funkčně testovány in vitro a in vivo. K tomuto účelu budou využívány FPLC a preparativní LC jako investiční instrumentace získaná v rámci projektu. Navržené inhibitory budou testovány in vitro s CTSK (a dalšími peptidasami) k určení jejich inhibičního potenciálu a selektivity³. V těchto testech budou jako substráty použity různé proteiny (a glykosaminoglykanové modulátory) z ECM, zejména kolageny, elastiny a IDP proteiny^{4,5}. Dále budou inhibitory testovány na několika typech nádorových buněk s využitím 3D matric tvořených ECM proteiny (tato část projektu bude realizována ve spolupráci s J. Reseland, Univerzita Oslo, Norsko a D. Bromme, Univerzita Britská Kolumbie, Kanada). Pro nejúčinnější inhibitory bude určena struktura komplexů s CTSK, která umožní v další fázi vývoj inhibitorů s lepšími funkčními vlastnostmi.

In silico analýza inhibitorů: Tato část projektu bude řešena ve spolupráci se skupinami J. Vondráška a P. Hobzy (ÚOCHB) a O. Schueler-Furman (Hebrejská univerzita, Izrael). Výpočetní metody budou použity pro analýzu protein-proteinových interakcí ve 3D strukturách komplexů proteinových inhibitorů a pro navrhování polycyklických peptidových inhibitorů jako mimetik odvozených ze struktury vazebných smyček proteinových inhibitorů. Polycyklické peptidy jsou schopné pokrýt několik nespojitých vazebných „podmíst“, které se interakce účastní². Vazebná plocha bude analyzována pomocí metody mapování interakčních energií⁶ a navrhované strukturní substituce pomocí „Eris protein stability estimator“ a „FoldX docking algorithm“. Dále bude podrobně popsána afinita mimetik pomocí kvantově mechanického skórování a použita při kvantifikaci nekovalentních interakcí v komplexech a výběru nejlepších mimetik (metodika je uvedena v projektové části PB2.3).

Syntéza mimetických inhibitorů: Tato část projektu bude realizována se spoluprací se skupinami P. Majera (ÚOCHB) a J. Cvačky (ÚOCHB) a bude využívat hmotový spektrometr, investiční přístroj pořízený v rámci projektu. Mimetické inhibitory se strukturou polycyklických (bicyklických a tricyklických) peptidů budou připraveny a optimalizovány pomocí chemické randomizace (Obr. 2). K tomuto účelu bude používána cyklizace „head to tail” nebo spojování přes postranní řetězce jednotlivých aminokyselinových zbytků. Kromě spojování cyklů pomocí amidové vazby plánujeme také alternativní využití alkylation thiolů a metatése olefinů. Naše práce rozšíří původní koncept bicyklických peptidů popsaný Heinisem² a zavede tři cysteinové zbytky do struktury peptidu, které umožní syntézu tricyklických peptidů se třemi vazebnými doménami. Postranní řetězce aminokyselinových zbytků ve vybraných pozicích budou optimalizovány pomocí technologie kombinatorní chemie⁷.



Obr. 2. Syntéza polycyklických mimetických inhibitorů. Vlevo: tři cyklizační strategie: „head to tail” (zeleně), využití amidové vazby (modře) a S-alkylace (červeně). Vpravo: příklad tricyklického peptidového mimetika připraveného alkylation tří Cys zbytků pomocí trifunkčního alkylačního činidla.

- [1] Jilkova, A.; Rezacova, P.; Lepsik, M.; Horn, M.; Vachova, J.; Fanfrlik, J.; Brynda, J.; McKerrow, J. H.; Caffrey, C. R.; Mares, M., *J. Biol. Chem.* **2011**, 286 (41), 35770-35781.
- [2] Baeriswyl, V.; Heinis, C., *Chem. Med. Chem.* **2013**, 8 (3), 377-384.
- [3] Salat, J.; Paesen, G. C.; Rezacova, P.; Kotsyfakis, M.; Kovarova, Z.; Sanda, M.; Majtan, J.; Grunclova, L.; Horka, H.; Andersen, J. F.; Brynda, J.; Horn, M.; Nunn, M. A.; Kopacek, P.; Kopecky, J.; Mares, M., *Biochem. J.* **2010**, 429 (1), 103-112.
- [4] Aguda, A. H.; Panwar, P.; Du, X.; Nguyen, N. T.; Brayer, G. D.; Brömme, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, 111 (49), 17474-17479.
- [5] Sharma, V.; Panwar, P.; O'Donoghue, A. J.; Cui, H.; Guido, R. V.; Craik, C. S.; Brömme, D., *Biochem. J.* **2015**, 465 (1), 163-173.
- [6] Bendova-Biedermannova, L.; Hobza, P.; Vondrasek, J., *Proteins* **2008**, 72 (1):402-413.
- [7] Doleckova-Maresova, L.; Pavlik, M.; Horn, M.; Mares, M., *Chem. Biol.* **2005**, 12 (12), 1349-1357.

Časový plán

2018-2020/21

- Příprava malých proteinů: rekombinantní exprese a izolace výchozích proteinových inhibitorů.
- Inženýrství malých proteinů pomocí racionálních a kombinatorních metod.
- Strukturní analýza malých proteinů: krystalizační testy, krystalografická a NMR analýza komplexů inhibitorů s proteasou.
- In silico analýza: výpočetní analýza na 3D strukturách komplexů proteinových inhibitorů, predikce mimetických inhibitorů.
- Funkční analýza proteinových inhibitorů: in vitro testy s proteasami a různými substráty, in vivo testy v buněčných systémech.

2020/21-2022

- Příprava a inženýrství proteinových inhibitorů a příprava jejich komplexů.
- In silico analýza komplexů proteinových inhibitorů a mimetických inhibitorů.
- Syntéza mimetických inhibitorů.
- Funkční analýza proteinových inhibitorů a mimetických inhibitorů: in vitro testy s proteasami a různými substráty, in vivo testy v buněčných systémech.
- Optimalizace funkčních vlastností proteinových inhibitorů a mimetických inhibitorů: od navrhování inhibitorů k jejich testování.
- Strukturní analýza komplexů optimalizovaných proteinových a mimetických inhibitorů.

Plánované publikace a patenty

Publikace

		Jimp		<i>Journal of Biological Chemistry</i>
2018		1		<i>Journal of Molecular Biology</i>
2019		2		<i>Protein Science</i>
2020		2		<i>Biochemistry</i>
2021		2		<i>Journal of Structural Biology</i>
2022		2		<i>ACS Chemical Biology</i>
				<i>FEBS Journal</i>
Celkem		9		

Patenty a patentové přihlášky

		Patenty (udělené)	Mezinárodní patentové přihlášky (podané)		Předpokládáme patentování v oblasti peptidasových inhibitorů odvozených ze struktury malých proteinů.
2018		0	0		
2019		0	0		
2020		0	0		
2021		0	1		
2022		1	0		
Celkem		1	1		

Zahraniční spolupráce

- Laboratoře vedené Dr. J. Reseland na Univerzitě Oslo (Norsko).
- Dr. D. Bromme na Univerzitě Britská Kolumbie (Kanada).
- Dr. O. Schueler-Furman na Hebrejské univerzitě (Izrael).