

PB1.4. Regulace ameloblastinu, nestrukturovaného proteinu skloviny (Vondrášek, Bouř)

Cíle výzkumu

- Připravit AMBN protein v takovém množství, které umožní jeho komplexní experimentální charakterizaci.
- Identifikovat sekvenční úseky AMBN zodpovědné za agregační vlastnosti AMBN v užším sekvenčním kontextu a využít této vlastnosti pro konstrukci fuzních proteinů pro další charakterizace.
- Identifikovat produkty proteolytického štěpení specifickými enamel proteázami a testovat jejich proliferační a diferenciační vlastnosti v in vitro a in vivo experimentech.
- Studovat efekt fosforylace na AMBN odvozených peptidech a srovnat jejich proliferační a diferenciační vlastnosti s peptidy nefosforylovanými.
Zmapovat regulační geny a jejich produkty pomocí pokročilých experimentálních metod včetně RNAseq a ChipSeq metody.

Výzkumný plán a metodologie

Porozumění funkci AMBN a jeho agregačních vlastností. Kombinace experimentálních metod zahrnující dynamický rozptyl světla (DLS), Small Angle X-Ray Scattering (SAXS), elektronovou mikroskopii a metod teoretických (především pomocí simulačních metod) bude použito k popisu konformačního chování celé AMBN molekuly, případně jejích derivátů získaných proteolytickými technikami. V kombinaci s hmotnostní spektroskopií bude získána mapa AMBN přístupných oblastí, které budou dále podrobeny analýze z hlediska jejich agregačních a interakčních vlastností.

Úloha posttranslacionálních modifikací a jejich vliv na strukturu AMBN. Na základě experimentálně ověřených vlivů fosforylace na vazbu IDP proteinů a jejich strukturních vlastností budeme studovat konformační chování na sérii AMBN odvozených peptidů a provedeme jejich in vitro a in vivo screening jako modelů protein-proteinové interakce a signalizace. Bioinformatická analýza fosforylační databáze¹ by měla poskytnout konsensuální vlastnosti proteinových sekvencí rozpoznávaných fosfokinázami a pomoci nám odhalit mechanismus tohoto procesu i jinými proteinovými partnery. Tato studie bude také zahrnovat in vivo screening potenciálních receptorů AMBN, které budou prováděny s partnerskou experimentální laboratoří na univerzitě v Oslu. Pro purifikaci a analýzu syntetických peptidů využijeme UHPLC chromatografii, která je součástí investičního záměru v rámci podávaného projektu.

Úloha procesované molekuly AMBN v regulaci genů a buněčnou signalizací. Záměr je použít RNAseq technologii na odhalení změn genové exprese a různých populací RNA, zahrnující miRNA, tRNA a ribosomální profilaci. Tato metoda by měla identifikovat translaované produkty a jejich vlastnosti pro další výzkum pomocí ChipSeq technologie k určení efektu na interakci s DNA s ohledem na specifická vazebná místa DNA interagujícího proteinu.

Porozumění vztahu mezi VCD signálem a strukturou fibril tvořených AMBN a modelovými systémy. Obecné principy poskytující spojení mezi strukturou proteinů a VCD spektry jsou známy již z minulosti.² Nicméně tvorba fibril je často spojena s anomálním růstem VCD signálu,³ což může také sloužit jako indikace jejich vzniku. Potřebujeme tedy porozumět vztahům mezi lokální strukturou, uspořádáním proteinů na velkou vzdálenost a spektry. K tomu nám pomůže modelování kombinující molekulově dynamické a kvantově chemické techniky. Spektra budou generována pomocí procedury založené na přenosu Kartézských tenzorů, v minulosti vyvinuté na ÚOCHB.⁴ Předběžně předpokládáme, že růst signálu souvisí s “fononovými” delokalizovanými vibracemi, které jsou umožněné pravidelným uspořádáním peptidových řetězců; podobný mechanismus byl totiž v minulosti popsán a vysvětlen pro agregáty nukleových kyselin.⁵

Zlepšení detekčních limitů spektroskopie vibrační optické aktivity. V současné době je měření VCD fibril obtížné, protože sražené proteiny nejsou stabilní. Nehomogenní vzorky navíc vedou ke vzniku artefaktů ve spektrech. Chceme proto systematicky prozkoumat a optimalizovat experimentální podmínky, které poskytnou vysoký poměr signálu k šumu, což také obecně zvětší užitečnost této spektroskopie pro charakterizaci proteinů. Alternativně k VCD prozkoumáme možnosti, jaké poskytuje citlivější (ale dosud obtížně interpretovatelná⁶) spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu a

Ramanova optická aktivita. Ta poslední je zajímavá vzhledem k možnosti měřit i cirkulárně polarizovanou luminiscenci;⁷ předběžná data totiž indikují její extrémní citlivost ke struktuře fibril.

Projekt bude realizován ve spolupráci se skupinou medicínální chemie Pavla Majera (syntéza proteinů a jejich purifikace), se skupinou hmotnostní spektroskopie Josefa Cvačky (strukturní analýza), skupinou výpočetní chemie Pavla Hobzy (počítačové metody). Projekt bude extenzivně vytěžovat kapacitu výpočetního klastru pro molekulární modelování a výsledky budou dale využívány ostatními spolupracujícími skupinami.

- [1] Hornbeck PV, et al. *Nucleic Acids Res.* **2015**, 43:D512-20.
- [2] Bouř, P.; Keiderling, T. A. *J. A. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9602-9607. Chi, H., Welch, W. R. W., Kubelka, J., and Keiderling, T. A. *Biomacromolecules* **2013**, 14, 3880–3891. Measey, T., and Schweitzer-Stenner, R., *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 1066.
- [3] Fulara, A., Lakhani, A., Wójcik, S., Nieznańska, H., Keiderling, T. A., and Dzwolak, W.. *J. Phys. Chem. B* **2011**, 115, 11010.
- [4] Kessler, J.; Kapitán, J.; Bouř, P. *J. Phys. Chem. Lett.* **2015**, 6 (16), 3314-3319. Yamamoto, S.; Li, X.; Ruud, K.; Bouř, P. *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, 8(3), 977-985.
- [5] Andrushchenko, V.; Bouř, P. *J. Comput. Chem.* **2008**, 29, 2693-2703
- [6] Kaminský, J.; Kubelka, J.; Bouř, P. *J. Phys. Chem. A* **2011**, 115, 1724-1742.
- [7] Wu, T.; Kapitán, J.; Mašek, V.; Bouř, P. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 49, 14933-14936.

Časový plán

2018-2019

- Strukturní charakterizace AMBN a z něj odvozených peptidů metodami DLS a SAXS v kombinaci se simulacemi metodami molekulové dynamiky. Budou získány jeho agregační a interakční vlastnosti

2018-2019/20

- Experimentální charakteristika a VCD spektroskopie peptidů odvozených od AMBN, proteolytických produktů a modelových struktur obsahující sekvence náchylné k agregaci.

2020-2021

- Vliv fosforylace na chování AMBN odvozených peptidů a produktů proteolýzy pomocí výpočetních metod a NMR.

2018-2020/21

- Optimalizace VCD experimentů pro modelové fibrily, testování výpočetních metod.

2020-2022

- *In vitro* a *in vivo* testování navržených peptidových sekvencí a produktů proteolýzy jako modely protein-protein interakce a mezibuněčné komunikace.

2020-2022

- Použití RNAseq a ChIPSeq metod k popisu transcriptomu a jeho regulace AMBN a ostatních AMBN závislých proteinů.

2021-2022

- Rozšíření spektroskopické detekce fibril ve fyziologických podmínkách, testování závislosti na okolním prostředí a teplotě.

Plánované publikace a patenty

Publikace (Jimp)

	Jimp	<i>Nucleic Acids Research</i> <i>Chemistry a European Journal</i> <i>Protein Science</i> <i>Journal of Chemical Theory and Computation</i> <i>ACS Chemical Biology</i> <i>ChemBioChem</i> <i>Structure</i> <i>Journal of Physical Chemistry</i>
2018	4	
2019	4	
2020	4	
2021	5	
2022	5	
Celkem	22	

Patenty a patentové žádosti

	Patenty (udělené)	Mezinárodní patentové přihlášky (podané)	<i>Očekáváme IP ochranu v následujících oblastech:</i> <i>Peptidy jako sondy pro AMBN protein-protein</i> <i>interakce nebo buněčných signalizací.</i> .
2018	0	0	
2019	0	0	
2020	0	1	
2021	0	1	
2022	1	0	
Celkem	1	2	

Zahraniční spolupráce

- Prof. Havard Haugen, Prof. Petter Lyngstadaas a Prof. Janne Reseland, University of Oslo, Norsko,
- prof. Gary Drobny, University of Washington, Seattle,
- prof. Timothy A. Keiderling, University of Illinois at Chicago,
- prof. Jan Kubelka, University of Wyoming, USA,
- prof. Kenneth Ruud z the Center of Theoretical and Computational chemistry, Tromsø v Norsku,
- prof. Shigeki Yamamoto z Osaky University, Japonsko.