

PB1.7. Cílení na interakce membránových receptorů s dalšími protein a s peptidomimetiky (Lazar)

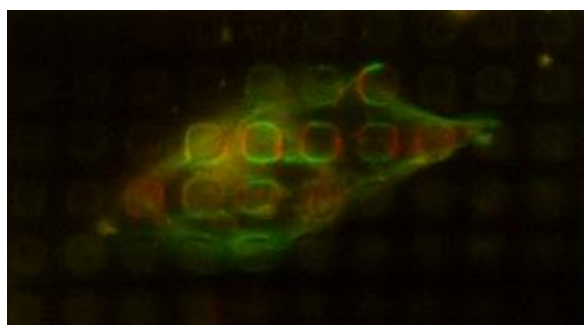
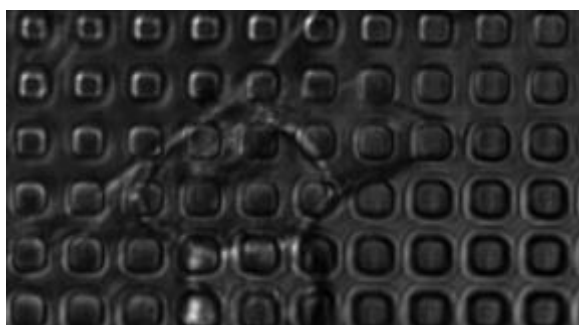
Cíle výzkumu

- Rozvinout možnosti techniky dvoufotonové polarizační mikroskopie (2PPM).
- Využít 2PPM k identifikaci a vývoji léčiv působících na interakce proteinů a peptidomimetik s membránovými receptory spřaženými s G-proteiny a s receptory pro inzulin a IGF.

Výzkumný plán a metodologie

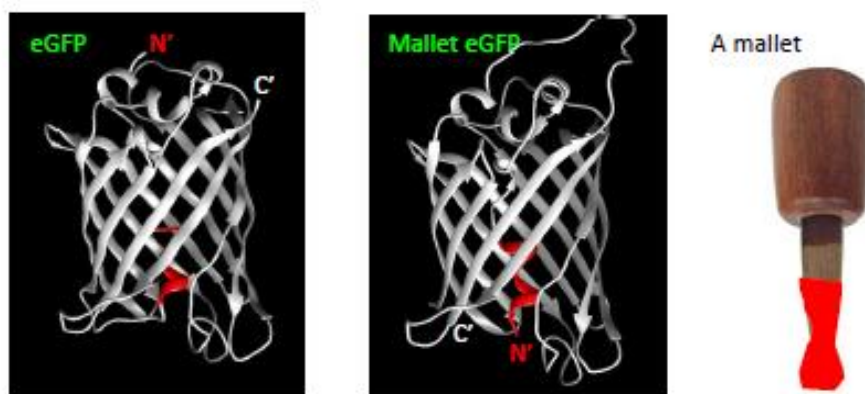
(i) Rozvoj možností techniky dvoufotonové polarizační mikroskopie.

Technika 2PPM je významným nástrojem pro zkoumání molekulárních mechanismů signalizačních procesů v buňce.^{1,2} Technika 2PPM má však i potenciál stát se důležitou metodou sloužící k objevování a vývoji nových léčiv. Aby mohla být využívána jako nástroj pro objevování léčiv, je třeba vyvinout vysocekapacitní (high throughput) podobu techniky a zlepšit existující molekulární sondy. Hlavní překážkou pro implementaci techniky 2PPM v podobě s vysokou kapacitou je nutnost identifikace obvodu buněk v obrázcích. Je sice možné vyvinout počítačové algoritmy, které by automaticky obvod buněk rozpoznával, avšak my máme v úmyslu využít jiný, robustnější a spolehlivější přístup, využívající kultivaci buněk na mikrostrukturách³. Jak ukazují naše předběžné výsledky (obr. 2), mikrostruktury mohou vytvářet v buněčné membráně matrice velmi pravidelných tvarů. Obvody těchto tvarů umožňují pozorování fluoroforové orientace pomocí 2PPM. Pravidelnost tvaru a rozmístění těchto tvarů by měla umožnit snadný vývoj počítačových algoritmů, které rozpoznají tyto tvary a automaticky zpracují informace, které obsahují. V rámci tohoto projektu provedeme optimalizaci vlastností (tvaru, velikosti, hustoty) mikrostruktur pro buněčné kultivace a zobrazování a vyvineme algoritmy umožňující plně automatické zpracování obrázků 2PPM. Naše práce bude rozšířením existující spolupráce s experty na přípravu a využití mikrostruktur, J. Jacakem a B. Plochbergerovou z Univerzity J. Keplera v Linzi^{4,5}.



Obr. 2: Buňka HEK293 na mikrostrukturovaném podkladu, exprimující konstrukt eGFP připojený k buněčné membráně. Nalevo: transmisní zobrazení, ukazující pravidelně rozmístěné mikrostruktury. Napravo: zobrazení pomocí 2PPM, s viditelnými tvary buněčné membrány vytvořenými přítomností mikrostruktur. Fluorescence excitovaná světlem s horizontální polarizací je vyznačena červeně, s vertikální zeleně. Tvary vytvořené mikrostrukturami vykazují střídavé červenozelené zbarvení charakteristické pro dobře definovanou orientaci fluoroforů vůči membráně.

Při vývoji léčiv účinkujících na interakce membránových receptorů s dalšími proteiny využijeme námi již připravené a dále zlepšené molekulární sondy interakcí mezi GPCRs a G proteiny využívající 2PPM. K detekci interakcí mezi GPCRs a arestiny použijeme jiné existující optické sondy. Pro sledování aktivace inzulinových a IGF receptorů za účelem vývoje non-peptidických inzulinových mimetik (spolupráce s J. Jiráčkem a U. Jahnem, PB2.6.) vyvineme nové sondy využívající 2PPM.



Obr. 3. Návrh a funkce eGFP palice (mallet eGFP). Nalevo: známá struktura eGFP, s označenými N' a C' konci a s interní α -helikální doménou zvýrazněnou červeně. Uprostřed: navržená struktura eGFP palice, vytvořená cirkulární permutací a modifikací eGFP. Nové N' a C' konce jsou označené, a nový N'-terminální rigidní linker ('držátko') je vyznačen červeně. Napravo: tesařská palice, s držátkem zvýrazněným červeně.

Významné úsilí bude věnováno snaze o vytvoření nového, široce uplatnitelného přístupu k vývoji sond pro 2PPM. Tento přístup je založen na použití modifikovaných fluorescenčních proteinů (FP), 'palice' (obr. 3). V palicových FP bude aminokyseliová sekvence upravena tak, aby α -helix, který je u známých FP uvnitř molekuly, vytvářel nový N'-konec. Tento N'-konec bude sloužit jako rigidní 'držátko' pro připojení ke zkoumaným proteinům. Rigidní připojení umožní efektivní převádění konformačních změn ve zkoumaném proteinu na změny orientace FP, pozorovatelné pomocí 2PPM. Palicové FP tudíž umožní vývoj vysoce citlivých sond pro 2PPM. Prodloužení N'-terminální α -šroubovice umožní předvídatelné změny v orientaci FP, což by mělo být využitelné sond nejen pro 2PPM, ale i pro FRET. Palicové FP tudíž umožní vývoj širokého spektra geneticky kodovaných sond, využitelných jak v základním biologickém výzkumu tak při vývoji léčiv. Úspěšný vývoj palicových FP bude vyžadovat spolupráci s experty na proteinové inženýrství (J. Vondrášek, UOCHB) a strukturu proteinů (P. Řezáčová, UOCHB; A. Royant, ESRF Grenoble). Vyvinuté palicové FP použijeme k nacházení a vývoji léčiv ovlivňujících interakce membránových receptorů s dalšími proteiny.

(ii) Využití 2PPM k identifikaci a vývoji léčiv působících na interakce proteinů a peptidomimetik s membránovými receptory spřaženými s G-proteiny a s receptory pro inzulin a IGF.

Molekulární sondy vyvinuté v cíli (i), umožňující citlivé sledování interakcí mezi GPCRs a dalšími proteiny budou využity k pozorování a zkoumání těchto interakcí. Zejména se bude jednat o interakce mezi adrenergními, glutamatergními a kanabinoidními receptory a příslušnými G-proteiny ($G_{\alpha i1}$, $G_{\alpha i2}$, $G_{\alpha i3}$, $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha o}$, $G_{\alpha q}$) a arrestinem-2 a -3, v odpovědi na existující, komerčně dostupná léčiva. Výzkum molekulárních základů interakcí mezi GPCR a efekty poskytne informace užitečné pro cílený vývoj nových léčiv. Kromě sond funkce GPCRs vyvineme a využijeme též sondy aktivace/inhibice inzulinového a IGF receptoru, uplatnitelné při vývoji non-peptidových inzulinových mimetik v rámci spolupráce s J. Jiráčkem a U. Jahnem.

Tento projekt bude uskutečněn v těsné spolupráci s P. Řezáčovou (analýza proteinových struktur), J. Jiráčkem (inzulinový/IGF receptor) a J. Vondráškem (proteinové inženýrství).

- [1] Lazar, J., Bondar, A., Timr, S., Firestein, S. J., *Nature Methods* **2011**, 8(8), 684-690.
- [2] Bondar, A., Lazar, J., *J. Biol. Chem.* **2007**, 289(3), 1271-1281.
- [3] Sevcik, E., Brameshuber, M., Fölser, M., Weghuber, J., Honigsmann, A., & Schütz, G. J. *Nature Commun.*, **2015**, 6.
- [4] Buchegger, B., Kreutzer, J., Plochberger, B., Wollhofen, R., Sivun, D., Jacak, J., & Klar, T. A., *ACS nano* **2016**, 10(2), 1954-1959.
- [5] Plochberger, B., Wollhofen, R., Jacak, J., Axmann, M., Motsch, V., Schütz, G. J., & Klar, T. *Biophys. J.* **2016**, 3(110), 40a.

Časový plán

2018-2019/20

- Vývoj 2PPM na vysokokapacitní (high-throughput) techniku (optimalizace mikrostruktur, vývoj softwaru).
- Vývoj palicových FP.

2018-2022

- Vývoj 2PPM sond interakcí GPCRs s dalšími proteiny; interakcí inzulinového receptoru a receptoru IGF-1 s inzulinovými mimetiky
- Pozorování interakcí mezi receptory a dalšími proteiny/inzulinovými mimetiky
- Testování série sloučenin na jejich interakce s receptory

Plánované publikace a patenty

Publikace (Jimp)

	Jimp	<i>Journal of Biological Chemistry</i> <i>Journal of Medicinal Chemistry</i> <i>PNAS U.S.A.</i>
2018	1	
2019	1	
2020	1	
2021	1	
2022	1	
Celkem	5	

Zahraniční spolupráce

- Dr. S. Firestein, Columbia University, New York,
- Dr. A. Royant, European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble,
- Drs. B. Plochberger a J. Jacak, J. Kepler University, Linz, Rakousko.