

PB1.8. Regulace specifických protein-proteinových interakcí pomocí nanočástic (Cígler, Bouř)

Cíle výzkumu

- Porozumět do detailu farmakologicky relevantní interakci ND s FGF.
- Identifikovat vazebné domény individuálních členů proteinové rodiny FGF zodpovědné za specifickou interakci s povrchem ND.
- Zjistit odpovídající vazebnou doménu, související konformační změny proteinu a molekulární podstatu této interakce pomocí kombinace pokročilých analytických metod.
- Použít *ab initio* a molekulárně-dynamické simulace spolu s FTIR a Ramanovou spektroskopií k lepšímu porozumění samotnému povrchu ND, tj. chemickým a morfologickým vlastnostem odpovídným za vázání proteinů.
- Navrhnout nové chemické struktury, buď NČ nebo založené na malých molekulách, efektivně regulující hladinu FGF v organismu.
- Regulovat protein-proteinové interakce přímo pomocí anorganických netoxických nanočástic a otevřít cestu k radikálně novému přístupu k selektivní léčbě chorob pomocí chemie nanočástic.

Výzkumný plán a metodologie

Kontrola protein-proteinových interakcí pomocí nanočástic vyžaduje detailní pochopení procesu vazby na molekulární a atomové úrovni. Doposud bylo navrženo několik mechanismů interakce. Zahrnují zapojení specifických proteinových domén do povrchové interakce a souhru lokálního náboje spolu s hydrofobními a tvarovými efekty.

Příspěvek těchto faktorů k vazbě a změny v molekulární struktuře proteinů po interakci s ND povrchem budou analyzovány pomocí fyzikálně-chemických metod. Jelikož pro heterogenní systémy ND/protein v roztoku nelze použít rentgenovou krystalografii, budou k získání potřebných informací použity spektroskopické metody včetně nukleární magnetické rezonance (NMR)¹ a optických spektroskopií, jako je elektronová absorpční spektroskopie a cirkulární dichroismus,² infračervená absorpční spektroskopie (IR)³ a Ramanův rozptyl. V projektu se soustředíme především na:

- (i) Spektroskopii vibrační optické aktivity (VOA),
- (ii) NMR studie a
- (iii) Studie s využitím hmotnostní spektrometrie

(i) VOA zahrnuje vibrační cirkulární dichroismus (VCD) a Ramanovu optickou aktivitu (ROA). Poskytuje více rozlišených pásů než elektronické metody, je citlivější vůči jemným změnám v molekulární struktuře včetně konformace a může být modelována s vysokou přesností pomocí *ab initio* metod.⁴ V minulosti jsme vyvinuli precizní výpočetní postupy k interpretaci ROA a VCD spekter proteinů ve vztahu k jejich struktuře a konformaci.⁵ Tyto metody budou přizpůsobeny ke sledování vazby proteinů k povrchům a doplněny o vícerozměrné molekulárně-mechanické a kvantově-mechanické simulace chování proteinu a povrchu ND.

(ii) Biomolekulární NMR spektroskopie poskytne detailní informace o konformačních změnách a místu proteinového povrchu účastnícího se vazby. Nejprve získáme komplexní přiřazení NMR signálů a zmapujeme interakční rozhraní pomocí sledování změn v pozicích NMR signálů. Poté pro zvolené systémy postoupíme k detailní NMR strukturní charakterizaci konformačních změn FGF indukovaných vznikem vazby.

(iii) Proteomické experimenty s analýzou pomocí hmotnostní spektrometrie budou založeny na postupné enzymatické digesti FGF interagujícího s ND a časově závislé analýze produktů štěpení (která poskytne doplňující informace k ostatním metodám o vazbě). Dynamická analýza proteinových fragmentů bude uskutečněna na nově zakoupeném hmotnostním spektrometru s vysokým rozlišením. Nejmodernější instrumentace umožní detekovat, charakterizovat a kvantifikovat uvolněné peptidy s vysokou citlivostí a spolehlivostí.

Všechny tři uvedené experimentální strategie budou podpořeny kvantově-mechanickým a molekulárně-dynamickým modelováním povrchu ND, struktury proteinu a konformačního chování.

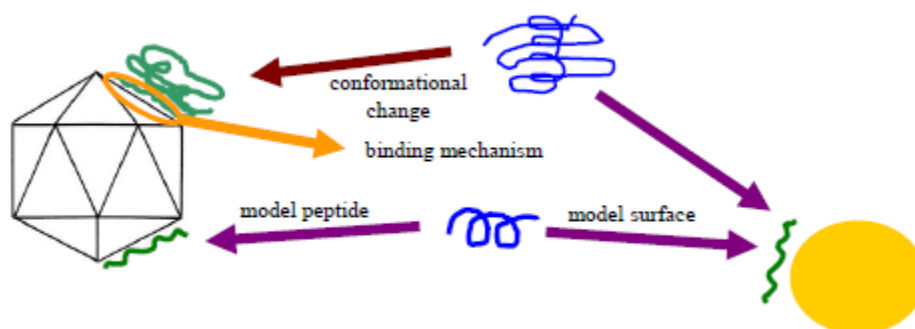


Schéma 2. K porozumění velké vazebné afinity proteinu k nanodiamantovému povrchu se budeme zabývat několika aspekty. 1) Změnu konformace proteinu po navázání budeme monitorovat pomocí CD, VCD, NMR a dalších spektroskopických metod, 2) navrhujeme vhodné modely k mechanismu vazby, 3) které ověříme pomocí modelových peptidických sekvencí nebo 4) modelových povrchů.

Bude analyzováno všech 22 členů rodiny FGF. Proteiny potřebné ve větším množství budou připraveny expresí v bakteriích a vyčištěny pomocí standardních technik používaných v našich laboratořích. Proteiny pro NMR měření budou během exprese izotopicky označeny. K potvrzení přítomnosti a polohy specifických vazebných domén budou doposud nejsilněji se vážající proteiny (FGF 1, 2, 8 a 10) strukturně porovnány s nejslaběji vážajícími se (FGF 19, 21 a 22) a dále s odlišnými růstovými faktory (např. interleukin-1 a 6 nebo interferon gama). Zjednodušené schéma tohoto přístupu je zobrazeno ve **Schématu 2**. To zahrnuje studii konformačních změn a vazebných mechanismů následovanou testováním modelových peptidů připravených k imitaci vazebných domén.

Pro zesílení interakcí s FGF bude studována a doladěna také povrchová chemie ND. K porozumění povrchovým strukturám na povrchu ND zodpovědným za navázání proteinu bude použita FTIR a Ramanova spektroskopie. Bude zjištěna (ve spolupráci s laboratořemi F. Treussarta a A. Wolcotta) struktura, povrchová hustota a individuální příspěvek povrchových skupin k vázání FGF proteinů nebo modelových peptidů. Bude optimalizován jejich molární poměr k ostatním skupinám. Bude studován vliv různých chemických skupin na vázání proteinů a budou syntetizovány nové chemické architektury na ND (včetně částečného a celkového blokování povrchu pomocí polymeru a *de novo* připojených skupin). Na základě získaných dat budou navrženy chemické struktury optimalizované pro design terapeutik k regulaci hladin FGF založených na malých molekulách. Pro čištění a analýzu syntetických peptidů budeme široce využívat UHPLC chromatografické aparatury (skupina P. Bouře), která je součástí investic navržených v rámci tohoto projektu. Ve spolupráci s laboratořemi P. Krejčího a L. Trantírka budou provedeny *in vitro* buněčné experimenty a embryonální testy zaměřené na lokalizovanou léčbu chorob chrupavek.

Projekt bude realizován v úzké spolupráci se skupinou P. Řezáčové (určování struktur) a oddělením hmotnostní spektrometrie J. Cvačky (analýza proteinů) s využitím nového vysoce rozlišeného hmotnostního spektrometru, který je součástí navrhovaných investic v rámci tohoto projektu.

- [1] A. G. Palmer, J. Williams, A. McDermott, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 13293-13310.
- [2] W. C. Johnson, in *Molecular chirality in chemistry and life sciences*, Vol. *Book of abstracts*, CNR, Pisa, Italy, **1997**, p. 15.
- [3] P. I. Haris, in *Infrared Analysis of Peptides and Proteins: Principles and Applications*. ACS Symposium Series. (Ed.: B. Ram Singh), ACS, Washington DC, **2000**, pp. 54-95.
- [4] L. Nafie, *Vibrational optical activity: Principles and applications*, Wiley, Chichester, **2011**.
- [5] a) J. Kessler, T. A. Keiderling, P. Bouř, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 6937-6945; b) V. Parchaňský, J. Kapitán, J. Kaminský, J. Šebestík, P. Bouř, *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 2763-2768; c) S. Yamamoto, X. Li, K. Ruud, P. Bouř, *J. Chem. Theory Comput.* **2012**, *8*, 977-985.

Časový plán

2018-2022

- Čištění a izolace reprezentativních vzorků ND.
- Povrchová modifikace ND.
- Preparativní příprava a izolace proteinů a jejich izotopicky značených variant.
- Syntéza modelových peptidů imitujících navržené vazebné domény.
- Získání spektrálních dat o interakci ND s proteiny.

2019-2022

- Zjištění struktury povrchu ND.
- Analýza pomocí více spektroskopických technik najednou, návrh teoretického modelu vazby.
- Návrh jednoduchých modelových molekul a peptidů pro vazbu na ND.
- Syntéza modelových peptidů.
- Monitoring konformačního chování během interakce s povrchem.
- *In vivo* testy nových sloučenin.

Plánované publikace a patenty

Publikace (Jimp)

	Jimp	<i>Nanoscale</i> <i>Advanced Healthcare Materials</i> <i>Nature Communications</i> <i>Biomaterials</i> <i>Small</i>
2017	0	
2018	1	
2019	2	
2020	3	
2021	4	
2022	5	
Celkem	15	

Patenty a patentové přihlášky

	Patenty (udělené)	Mezinárodní patentové přihlášky (podané)	<i>Očekáváme ochranu mezinárodními patenty v následujících oblastech: Ve vodě rozpustné nanočástice se zajímavou FGF-modulační biologickou aktivitou.</i>
2017	0	0	
2018	0	0	
2019	0	0	
2020	0	1	
2021	0	1	
2022	1	0	
Total	1	2	

Zahraniční spolupráce

- Prof. Francois Treussart z Laboratoire de Photonique Quantique et Moléculaire, Ecole Normale Supérieure de Cachan a CNRS in Cachan, Francie
- prof. Abraham Wolcott z Department of Chemistry, San Jose State University in San Jose, California, USA
- prof. Petr Král z University of Illinois at Chicago, USA.