

PB1.9. Cílení interakcí mezi proteiny virů a jejich hostitelů (Nencka, Bouřa)

Cíle výzkumu

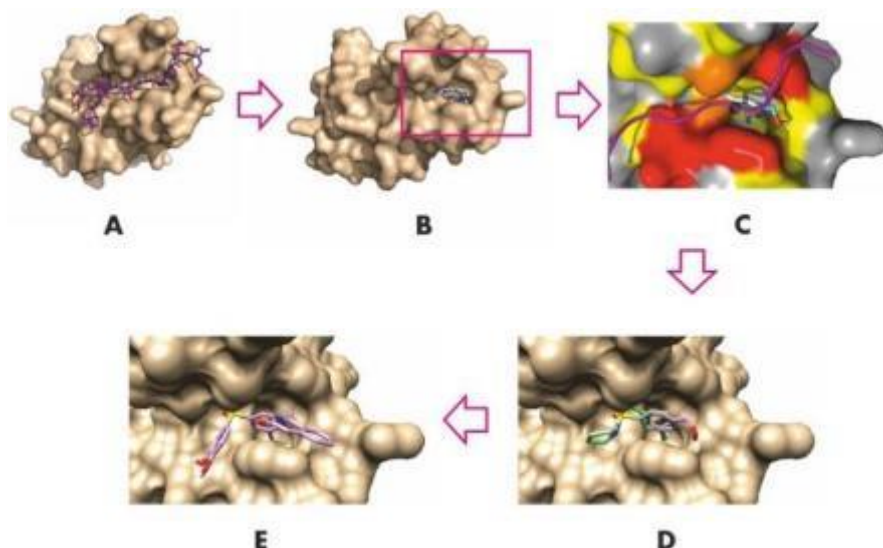
- Použít na fragmentech založený design inhibitorů proti dobře charakterizované UEV doméně z ESCRT systému s cílem vyvinut sloučeniny aktivní proti pučícím virům, které využívají ESCRT systém (HIV-1, Ebola).
- Charakterizovat strukturní determinanty lidského proteinu ACBD3 využívaného několika pikornaviry z rodů Enterovirus a Kobuvirus.
- Strukturně charakterizovat PI4K využívané virem HCV.
- Připravit rychlé, přesné, neradioaktivní a citlivé testy pro stanovení Kd interaktorů UEV domény TSG101 proteinu a metodu vysokokapacitního screeningu knihovny látek ÚOCHB s cílem identifikovat vhodné fragmenty pro design léčiv s využitím robota manipulujícího s mikroděstičkami, navrženého v rámci projektu (ve spolupráci se skupinou J. Konvalinky).
- Použít na fragmentu založený postup uvedený v části Cíl 1 pro narušení interakcí charakterizovaných v částech Cíl 2 a 3.

Výzkumný plán a metodologie

Abychom otestovali, zda je náš projekt uskutečnitelný, provedli jsme pomocí NMR již první kolo screeningu fragmentů proti UEV doméně s využitím naší knihovny fragmentů. Testováním založeným na STD (saturation transfer difference) NMR experimentu jsme získali více než 40 hitů, což dokazuje, že tuto část projektu budeme moci s jistotou realizovat.

S fragmenty budeme dále pracovat s využitím dvou metod (viz obr. 2). Nejprve je rozdělíme do skupin podle oblastí UEV domény, kterou vážou, a potom je budeme spojovat spolu do větších struktur tak, aby mohly interagovat s rozsáhlejšími částmi interagujícího proteinu. Dále použijeme strategii rostoucího fragmentu, kdy pomocí dokovacích studií a vylepšením syntézy, vyvineme z těchto sloučených struktur optimalizované funkční látky. Zde budeme k purifikaci syntetizovaných látek a jejich prekurzorů používat nově zakoupený přístroj pro FLASH chromatografii (skupina R. Nencky) a pro biologické aplikace nové FPLC a preparativní LC přístroje (skupina E. Bouří), které představují část investic tohoto projektu. V rámci projektu bude také ve velké míře využívána kapacita počítačového klastru pro molekulární modelování a výsledky budou sloužit také spolupracujícím výzkumným skupinám.

Identifikované zdokonalené struktury budou následně testovány jak na bázi na proteinu, fluorescenčním a DIANA testem (nový testovací systém na základě qPCR vyvinutý ve skupině Doc. Konvalinky - viz výše PB2.5) posuzujícím přímou vazebnou afinitu, tak i v buněčném systému- testy antivirové aktivity získaných látek. Získané inhibitory PPI budou sloužit nejen jako potenciální antivirotika, ale také jako prostředky k detailnějšího výzkumu role ESCRT komplexu při virové replikaci a role TSG101 v karcinogenezi.



Obr. 2. Postup vývoje PPI inhibitoru: A) struktura cílové PPI - UEV doména v komplexu s krátkým peptidem odvozeným od p6^{Gag} proteinu viru HIV-1; B) identifikace ligandu vázajícího se v požadované oblasti UEV domény a testování fragmentu pomocí NMR nebo rentgenové krystalografie; C) molekulární dokování - korelace dat STD experimentu; D) sloučení dvou molekul fragmentů; E) optimalizace finální struktury.

Toto schéma pracovního postupu bude následně použito ke získání inhibitorů jiných PPI nezbytných pro interakci viru s hostitelem, a to zejména proteinů odpovědných za sestavení replikačního komplexu RNA virů. Na základě výsledků našich strukturních studií zaměřených na pikornaviry rodů Enterovirus (poliovirus, enterovirus-71, coxsackievirus-B3, rhinovirus-14) a Kobuvirus (Aichi virus-1) se pokusíme připravit ligand narušující interakce mezi virovými a hostitelskými proteiny zapojenými do fosforylace hostitelských plazmatických membrán, např. 3A: ACDB3: PI4K.

Projekt bude realizován v úzké spolupráci se skupinami P. Řezáčové a J. Konvalinky a oddělením hmotnostní spektrometrie J. Cvačky, kde bude využíván nový hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením, který je součástí navrhované investice tohoto projektu.

Časový plán

2018-2022

- Validace a strukturální charakterizace hitů fragmentů proti UEV doméně s použitím NMR spektroskopie.
- Vývoj vysokokapacitních vazebných testů pro testování fragmentů.
- Ověření hitů proti UEV doméně testem kompetice založeném na flouorescenci a nově vyvinutým DIANA testem.
- Design a vývoj inhibitorů s vysokou afinitou pomocí dokovacích studií.
- Strukturální charakterizace komplexu 3A: ACBD3 GOLD doména z různých ss (+) RNA virů.

2020-2022

- Strukturální analýza připravených UEV ligandů.
- Optimalizace nových UEV vázajících molekul.
- Strukturální charakterizace HCV NS5A proteinu v komplexu s PI4K.
- Ověření účinnosti a toxicity připravených sloučenin buněčnými testy.
- Pokročilé studie molekulárního modelování potenciálních ligandů narušujících další PPI důležité pro interakce viru s hostitelem a posouzení nejslibnějších cílů.
- Příprava ligandů pro vybrané nejslibnější cíle.

Plánované publikace a patenty

Publikace (Jimp)

	Jimp	<i>Journal of Medicinal Chemistry</i> <i>Journal of Biological Chemistry</i> <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> <i>Journal of Virology</i> <i>EMBO Reports</i> <i>PNAS</i> <i>Plos one</i>
2018	2	
2019	2	
2020	2	
2021	2	
2022	2	
Celkem	10	

Patenty a patentové přihlášky

	Patenty (udělené)	Mezinárodní patentové přihlášky (podané)	<i>Očekáváme mezinárodní patent v následujících oblastech: Nový ligand narušující PPI podílející se na patogenezi virů.</i>
2018	0	0	
2019	0	0	
2020	0	0	
2021	0	1	
2022	1	0	
Celkem	1	1	

Zahraniční spolupráce

- Prof. Johan Neyts a Dr. Graciela Andrei z Rega Institute, KU Leuven, Belgie,
- Dr. Tamas Balla z National Institutes of Health (NIH), Bethesda, USA.