

PB2.1. Cílení na komplexní buněčné membrány a procházení přes ně (Jungwirth, Jahn, Lazar a Bouř)

Cíle výzkumu

- Vyvinout spolehlivý výpočetní model endoteliálního glykokalyxu, ověřený experimentem.
- Navrhnout nové strategie pro terapeutické cílení na buněčný glykokalyx s cílem kontrolovat progresi metastáz bez negativních důsledků pro kardiovaskulární funkci.
- Zlepšit samotný proces cílení potenciálních léčiv nalezením nových cest pro molekuly léčiva k selektivnímu nalezení místa účinku tím, že efektivně překročí buněčnou membránu se svou extracelulární matrix.

Výzkumný plán a metodologie

Je známo, že buňky se přizpůsobují novému prostředí změnou svého metabolismu. Pokud se nám podaří změnit způsob, jak buňky cítí své okolí, pak můžeme buď posílit, nebo uzavřít různé metabolické dráhy. Buňky cítí okolí přes plazmatickou membránu a její obal, glykokalyx. Tyto dva prvky, na které míříme, abychom změnili jejich strukturu, tvoří jádro tohoto projektu.

V rámci tohoto projektu budeme používat počítačové simulace molekulové dynamiky, abychom získali vhled do molekulové struktury glykokalyxu, pro nějž jsou experimentální možnosti značně omezené vzhledem k jeho dynamické a křehké povaze. Současně budeme využívat experimentální přístupy od spektroskopii (jako je fluorescenční mikroskopie, či cirkulární dichroismus a měření Ramanovské optické activity) k syntetické organické chemii a buněčné biologii, aplikované zejména na menší strukturní jednotky tvořící glykokalyx a na klíčové látky, které s ním interagují.

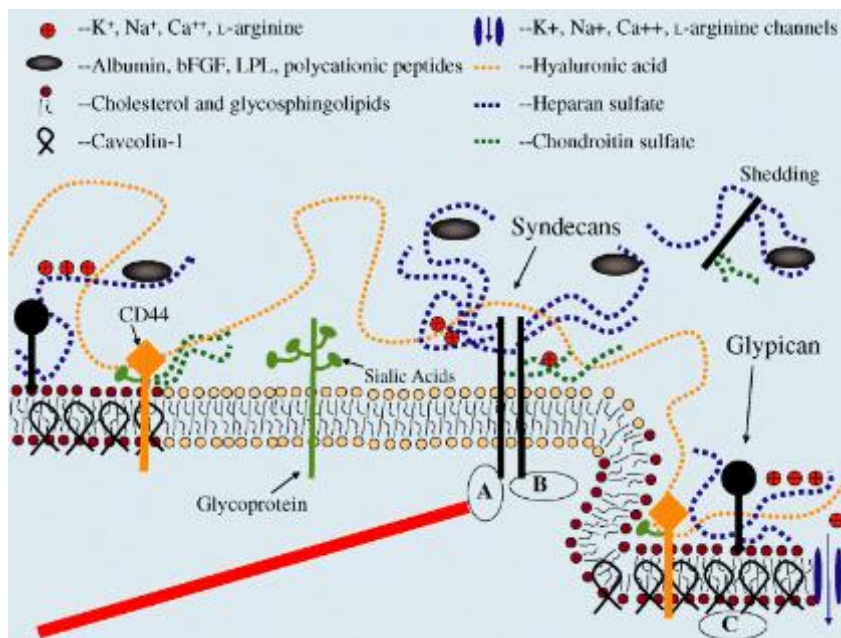
Tento projekt je založen na velmi plausibilním scénáři předpokládajícím, že struktura endoteliálního glykokalyxu může hrát úlohu při vývoji nových léčiv, neboť oběhový systém je klíčový pro dopravení léčiv do buněk v celém těle. Za prvé, můžeme terapeuticky mířit přímo na vlastní glykokalyx. Naše pracovní hypotéza je, že buňky používají glykokalyx, aby cítily své okolí a adaptovaly se na něj.¹ To můžeme vhodně využít ke spuštění buněčné odpovědi působením na vnější povrch glykokalyxu bez toho, že bychom se museli dostat dovnitř do buňky, což je mnohem komplikovanější. Konkrétně je naším cílem navrhnout potenciální terapeutika, která dokáží modifikovat strukturu glykokalyxu přímým působením. Za druhé, interakce léčiv a jejich nosičů s glykokalyxem do značné míry ovlivní účinnost a selektivitu těchto látek. Je důležité si uvědomit, že vzhledem k silnému zápornému náboji na glykokalyx budou ionty zásadními komponentami tohoto komplikovaného systému. To lze demonstrovat na pozorované modulaci permeace sodíku glykokalyxem.² Jednou z našich pracovních hypotéz je, že glykokalyx může být silně regulován ionty vápníku, zejména v blízkosti buněčné membrány. Navíc glykokalyx může mít silný vliv na interakci plazmatické membrány s kladně nabitými peptidy pronikajícími do buňky. Všechny tyto skutečnosti a jejich důsledky mohou být prozkoumány, jen pokud bude existovat spolehlivý model glykokalyxu, tak jak se jej pokusíme vytvořit v rámci stávajícího projektu.

V tomto pracovním balíčku se také pokusíme zlepšit účinnost infuzní léčby cílené specificky na redukci rakovinných metastáz.³ K tomu se pokusíme nalézt mechanismus a terapeutický zásah vedoucí k regulaci hustoty glykokalyxu.² S takovými nástroji v ruce pak můžeme nalézt optimální kompromis v boji proti metastázám, který nepovede k trvalému poškození kardiovaskulárního systému, jenž také potřebuje ke své správné funkci zdravý glykokalyx. Navíc prozkoumáme způsoby jak indukovat prostředí, které povede k redukci buněčné replikace a tak i šíření rakoviny. Za tímto účelem se pokusíme změnit způsob, jakým buňka cítí své okolí pomocí modulace struktury glykokalyxu.

Nakonec budeme na základě porozumění buněčné membráně jako partnera glykokalyxu cílit na asociační molekulové procesy odehrávající se na rozhraní mezi membránou a glykokalyxem. Takto se dostaneme daleko za tradiční dobře prostudované cíle (interakce protein-ligand) směrem k pochopení celých složitých molekulových mechanismů, které potenciální léčiva (např. jako ta založená na peptidech pronikajících do buněk⁴) používají, aby překročily tyto komplexní bariéry modifikováním membránové struktury. Budeme mít k dispozici unikátní výpočetní a spektroskopické techniky,

abychom mohli detailně, s bezprecedentním časovým a prostorovým rozlišením detailně studovat takové procesy, což bude zásadní pro tento Pracovní balíček.

1.1.1.1.1.1 Vybudování spolehlivého modelu glykokalyxu



Obr. 1 Konceptuální model glykokalyxu. Čárkovaně jsou zobrazeny různé typy glykosaminoglycanů. Syndecan and glypican jsou proteoglykany zatímco ostatní bílkoviny, připojené k membráně, jsou glykoproteiny. Podle: Tarbell et al.¹

Metodologickým cílem tohoto projektu je vytvořit v prvním kroku věrný, byť zhrubený model glykokalyxu. Tento počítačový model nám pomůže pochopit molekulovou strukturu glykokalyxu a jeho roli jako farmakologický a medicínský cíl. Tento molekulový model také poskytne jedinečnou informaci o strukturálně relevantních interakcích mezi jednotlivými molekulovými strukturami glykokalyxu. Glykokalix je vláknitá 3D síť s 10-12 nm širokými bílkovinnými jádry, přichycenými k membráně s charakteristickým intervalem dvaceti nanometrů a tloušťkou kolem 70 nm nad buněčnou membránou.¹ Skutečnou výzvou je proto vytvořit počítačový model dostatečně velký, aby mohl obsahovat všechny požadované prvky, které by nám umožnily zkoumat kolektivní chování glykokalyxu, viz Obr. 1. To nám umožní identifikovat cíle a navrhnout strategie a konkrétní molekuly potenciálních léčiv tak, abychom mohli ovlivňovat strukturu glykokalyxu podle přání. Nejprve se soustředíme na interakce mezi glycosaminoglykany (GAG) a klíčovými přítomnými bílkovinami, jako jsou syndekany, CD44 a albumin, jež jsou všechny zásadní pro strukturu glykokalyxu. S takovým modelem pak můžeme studovat, jak různé sekvence GAGů a jejich propojení mění strukturu glykokalyxu. Výpočetní výsledky budeme verifikovat experimentálně pomocí modelových hydrogelů obsahujících GAGy. Také se pokusíme zodpovědět otázku, zda buněčná membrána mění své vlastnosti díky přítomnosti glykokalyxu. Pro úspěch této výpočetní studie bude klíčová těsná vazba na experimentální fluorescenční metody, neboť očekávané efekty budou zřejmě velmi lokálního charakteru (ale mohou zároveň vest k významným metabolickým změnám). Postupně budeme do modelu přidávat další komponenty glykokalyxu jako jsou glykoproteiny. Poté co budou v simulacích odhaleny strukturální motivy, na které se půjde terapeuticky zaměřit, přesune se výzkum směrem k experimentálním in vivo a in vitro testům (viz níže).

Z technického pohledu je skvělou zprávou, že v ÚOCHB bylo v roce 2014 otevřeno nové výpočetní středisko. Ústav na něj poskytl plochu 300 m² vybavenou v současnosti třemi řadami stojanů, z nichž 60 je dedikováno pro instalaci výpočetní techniky. Celý prostor je efektivně chlazen, což umožňuje maximální elektrický příkon 400 kW. V současnosti je instalováno zhruba 400 uzlů s více než 4000 procesory; tuto kapacitu lze v budoucnu zhruba ztrojnásobit.

Jsme tak skvěle připraveni provést upgrade výpočetního střediska na novou kvalitativní úroveň za účelem stávajícího projektu, což umožní vysokou paralelizaci výpočtů vyžadujících síť s rychlou

odezvou. To bude realizováno nákupem nového dedikovaného výpočetního klastru pro větší množství uživatelů se zhruba 160 CPU uzly propojenými rychlou sítí Infiniband a malého množství experimentálních GPU uzlů.

Kromě používání lokálních výpočetních zdrojů jsme byli velmi úspěšní při získávání výpočetního času pro velmi velké úlohy v několika výpočetních centrech evropského významu, včetně Julich Supercomputer Center (JUROPA), Berlin-Hannover Center (HLRN), IT4I v Ostravě atd., v čemž budeme pokračovat i v rámci tohoto projektu.

Souhra molekulových simulací a experimentů

Několik moderních experimentálních technik bude použito k validaci zde vytvořených počítačových modelů. Naším cílem je syntetizovat léčiva a fluorescenční značky k modulaci a prozkoumání struktury glykokalyxu a jeho interakcí s peptidy pronikajícími do buňky a nesoucími molekulu léčiva. Níže jsou podrobně popsány experimentální techniky, které budou využity k přemostění výpočetních a experimentálních výsledků tak, abychom dosáhli relevantních časových a prostorových dimenzí (které jsou často nedostupné pouhým počítačovým simulacím). Všechny tyto komplementární experimenty jsou zásadní pro úspěšné splnění cílů tohoto projektu.

Syntéza foldamerů nesoucích nepřírodní aminokyseliny

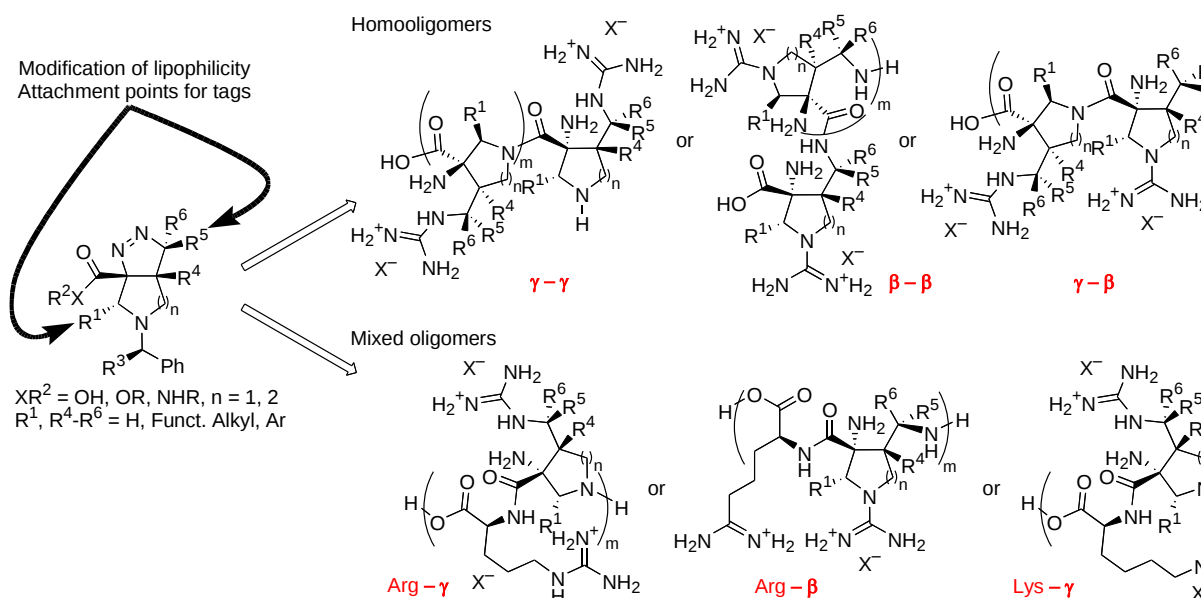
Je dobře známo, že proteiny bohaté na arginin, jako je albumin, jsou nezbytné pro glykokalixové struktury². Lze předpokládat, že jejich pozitivní náboj je hlavním důvodem optimální interakce s negativními glykosaminoglykany. Na základě těchto principů usuzujeme, že peptidy bohaté na arginin by měly hrát podobnou roli. Proto by mohly být použity jako potenciální léčiva pro posílení glykokalixové struktury. Také peptidy obsahující oligoarginin prokázaly schopnost procházet buněčnou membránou a přenášet tak molekuly z extracelulární matrix do vnitřního prostředí buňky. Ovšem tyto peptidy, stejně jako ostatní peptidy zahrnující α -aminokyseliny, jsou problematické tím, že jsou náchylné na enzymatické štěpení, což limituje jejich in vivo aplikaci⁵⁻⁷. Chceme syntetizovat řadu foldamerů složených z polyfunkčních nepřírodních aminokyselin, nesoucích kladně nabitě guanidinové jednotky a volitelné volné aminové funkční skupiny (Obrázek 2), a studovat jejich vzájemná působení s hydrogely napodobujícími glykokalix a buněčné fosfolipidové dvojvrstvy. Základní monomerní struktura může být syntetizována v jednom kroku z dostupných materiálů⁸. Polohově specifická guanylace a následný peptidový kaplink poskytnou homo-oligomery nebo smíšené oligomery s přírodními aminokyselinami. Výhodou použití nových nepřírodních oligopeptidických foldamerů je, že jsou konformačně omezené, tudíž může být jejich sekundární struktura nezávisle stanovena NMR, popřípadě krystalograficky. Další výhodou je, že kationové guanidinové jednotky mohou být připojeny na různá místa s definovanou prostorovou orientací a v různé vzdálenosti od páteře foldameru. Tento přístup dovoluje optimalizaci vlastností průchodu buněčnou membránou a interakce s glykosaminoglykany. Vzhledem k tomu, že jsou nepřírodní aminokyseliny polyfunkční, nabízejí možnosti jak kovalentní, tak vícevazebné supramolekulární vaznosti s přenášenými molekulami, ať už to jsou sloučeniny typu léčiv nebo biomarkeru, jako např. fluoreskující molekuly pro studium interakce s fosfolipidovou dvojvrstvou a procesu membránového transportu. Využití našich nově vyvinutých foldamerů tvořených nepřírodními aminokyselinami zahrnující guanidinové jednotky pomůže objasnit vícenásobné interakce mezi interakcemi kationových oligopeptidů s lipidovou dvojvrstvou a glykokalixem.

U nově identifikovaných biologicky aktivních peptidových foldamerů bude studována jejich hydrolytická stabilita v séru a v buněčných extraktech. Vzhledem k obsahu nepřírodních aminokyselin a ke jejich vysoké konformační rigiditě je pravděpodobné, že budou i odolné vůči hydrolyze. Nicméně v případě, že hydrolytická stabilita bude omezená, tak přistoupíme k designu a syntéze stabilnějších nehydrolyzovatelných peptidomimetik.

V roce 2014 UOCHB otevřel moderní laboratorní budovu zaměřenou čistě na moderní organickou syntézu. Žadající skupina se nachází právě v této budově. Laboratoře jsou vybaveny pro nejmodernější organické syntézy, tj. k uplatnění Schlenk/vakuových technik pro manipulaci s organokovovými činidly citlivými na vlhkost a vzduch. Skupina má také fotochemické vybavení pro syntézu pnutých oligopeptidů. Kromě syntetických možností má skupina v rukou také vybavení pro analýzu produktů a

intermediátů pomocí HPLC a další techniky. Pro čištění syntetizovaných produktů je dostupná automatizovaná chromatografie.

Institut má nejmodernější analytické zařízení pro charakterizaci a určování struktury syntetizovaných sloučenin. K povinnému a dostupnému vybavení patří 850 a 600 MHz NMR spektroskopie včetně všech pokročilých technik nezbytných pro objasnění struktury navržených produktů. Dále jsou dostupné vhodné techniky hmotnostní spektrometrie, IR spektroskopie, fluorescenční spektroskopie a měření cirkulárního dichroismu jako servis institutu. X-Ray analýza je možná ve spolupráci.



Obr. 2. Příklady kationických oligopeptidů s potenciálem penetrovat do buněk a (de)stabilizovat glykokalyx.

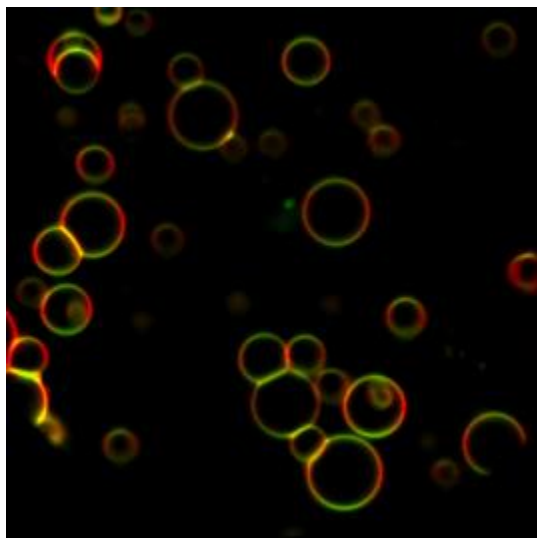
Dvoufotonová polarizační mikroskopie

Mnoho léčiv funguje prostřednictvím modulace aktivity membránových proteinů. Abychom pochopili, jak tato léčiva fungují a našli nová musíme být schopni pozorovat funkci samotných membránových proteinů. Nový slibný přístup k vizualizaci funkcí membránových proteinů představuje dvoufotonová polarizační mikroskopie (2PPM), technika vyvinutá našim pracovištěm⁹⁻¹¹. 2PPM využívá anisotropní optické vlastnosti fluorescentních molekul k získávání informací o jejich orientaci vůči lipidické membráně (viz obr. 3). Díky tomu může tato technika sloužit k vizualizaci různých lipidických fází a domén, ale též konformačních změn v membránových proteinech a změn v interakcích mezi proteiny a membránami. Kromě techniky 2PPM disponuje Laboratoř pokročilé optické mikroskopie vybavením a zkušenostmi umožňujícími provádět mnoho dalších druhů optických pozorování. Kromě mikroskopického vybavení je laboratoř zařízení i pro pokusy s umělými membránami i živými buňkami. V práci s buňkami laboratoř běžně využívá techniky molekulární biologie, např. při vývoji nových geneticky kódovaných fluorescentních sond.

Výše uvedené techniky přispějí k navrhovanému projektu tím, že budou poskytovat experimentální data o interakcích mezi fluorescentně značenými peptidy pronikajícími membránami (viz sekci II.a) a syntetickými membránami (lipidovými vesikuly). Syntetické lipidové vesikuly jsou vhodným modelovým experimentálním systémem, jenž umožňuje přímé porovnání výsledků počítačových simulací molekulární dynamiky a experimentálních pozorování. Kromě pouhého zjištění rychlosti průniku membránou a transportu bychom měli být schopni pomocí techniky 2PPM získat též informace o povaze pozorovaných interakcí mezi membránami a peptidy, které jimi pronikají. Kromě pozorování na modelových lipidických systémech budeme provádět i pozorování na živých buňkách, která by měla mj. umožnit zjištění vlivu glykokalyxu. Vývoj techniky 2PPM do podoby s vysokou kapacitou pak umožní rychlý screening peptidů za účelem identifikace takových, které se vyznačují zajímavými vlastnostmi ve vztahu k membráně, ale i možným léčebným využitím.

Kromě studií peptidů pronikajících membránami plánujeme technikou 2PPM pozorovat i různé farmakologicky důležité membránové proteiny a procesy, jichž se účastní. Tato pozorování budou mít za cíl objasnit farmaceuticky významné molekulární mechanismy a přispět k vývoji nových léčiv.

Hlavním nástrojem laboratoře je nový laserový skenovací dvoufotonový/konfokální mikroskop Olympus FV1200. Tento mikroskop je velmi verztatilní a umožňuje provádění široké škály mikroskopických pokusů. Tento mikroskop byl laboratoří adaptován pro hlavní zaměření laboratoře: jedno- a dvoufotonovou polarizační mikroskopii. Kromě vybavení pro optickou mikroskopii laboratoř disponuje i vybavením a potřebnými dovednostmi pro molekulární biologii, buněčnou biologii a biochemii. Několik členů laboratoře se účastní probíhajícího projektu výzkumné infrastruktury pro systémovou biologii C4Sys, v jehož rámci má přístup k celé řadě dalších znalostí, dovedností, technik a vybavení.

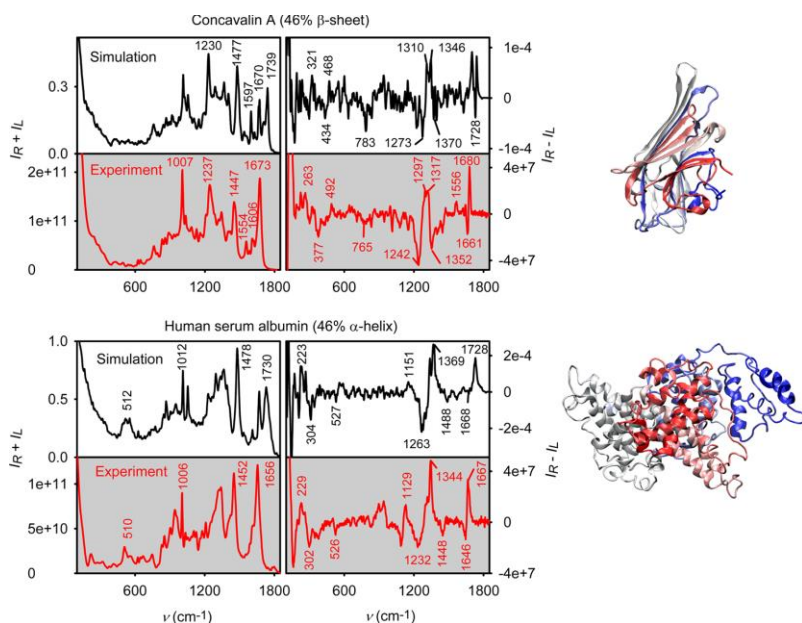


Obr. 3 Tzv. obří jednolamelové lipidové vesikuly připravené ze syntetického lipidu a fluorescentního barviva (F2N12S), zobrazené dvoufotonovou polarizační mikroskopii. Fluorescence excitovaná světlem s horizontální polarizací je vyznačena červeně, s vertikální zeleně. Z intenzity a rozložení červeného a zeleného zabarvení lze získat informace o orientaci molekul barviva vůči lipidické membráně, a tím i o struktuře samotné membrány⁹. Obdobné jevy jsou pozorovatelné i v živých buňkách⁷

Pokročilé spektroskopické techniky využívající optickou aktivitu

Konformační chování proteinů, včetně peptidů bohatých na arginin, je klíčové pro schopnost léčiv založených na proteinech pronikat do živých buněk, jejich stabilitu a biologickou funkci. Poruchy metabolismu spojené s konformací vedou k závažným nemocem zahrnující poruchy tvorby enzymů, nukleových kyselin a zhoubné rakovinné bujení. Často jsou spojené s takovými změnami proteinové struktury, které lze detekovat spektroskopicky. Počet metod, kterými lze sledovat konformaci proteinů v roztoku, je však velmi omezený. Proto použijeme a vyvineme metody založené na optické spektroskopii, které zkalibrujeme na modelových systémech a doplníme počítačovými modely. V posledních letech podobné metody jsou intenzívně studovány v tzv. “chemickém zobrazování” pro lékařskou diagnostiku. Předpokládá se, že budou objektivnější a přinesou více informace než standardní mikroskopické a histologické techniky.¹²⁻¹³ Doposud jsou však data vyhodnocována empirickým způsobem. V projektu se proto zaměříme i na to, jakým způsobem vlastně optické spektrální rysy odrážejí konformaci a interakce proteinů. Převážně budou použity techniky vibrační optické aktivity, které jsou neinvazivní, vhodné pro biologické systémy, a přinášejí rozšířenou informaci o studovaných molekulách.

Nedávno jsme ukázali, že spektra Ramanovy optické aktivity (ROA) mohou nejen dobře rozlišit různé konformační stavy proteinů, ale že je možné také simulovat s vysokou přesností dovolující interpretaci struktury na molekulové a atomové úrovni (Obr. 4.)



Obr. 4. Srovnání proteinů se strukturou skládaného listu (β sheet) šroubovice (α -helix): Vypočtená a experimentální Ramanova a ROA spektra z naší laboratoře.

Na rozdíl od vibračního cirkulárního dichroismu ROA spektrum poskytuje současně informaci o konformaci hlavního i vedlejších aminokyselinových řetězců. Abychom tuto techniku mohli použít pro nízké fyziologické koncentrace peptidů a proteinů, prozkoumáme i možnosti povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie, která je v principu schopná zesílit pozorovaný signál o několik řádů. Předběžné výsledky naznačují, že tento postup bude možné použít i pro ROA proteinů.

Jako nezávislou metodu pro sledování konformace použijeme vibrační cirkulární dichroismus (VCD). Tato metoda se pro určování konformací proteinů používá standardně, ovšem také vyžaduje jejich vysoké koncentrace. Z toho důvodu prozkoumáme možnost měření proteinů v micelách. Ty zvýší rozpustnost proteinů, ale také poslouží jako dobrý model membrány v buňce a umožní pozorovat interakce na povrchu a v nehomogenním prostředí. Např. změny v konformaci hlavního proteinového řetězce indukované interakcí s membránou jsou přímo pozorovatelné jako změna vibračního pásu „amid I“. To je samozřejmě zásadní výhoda pro sledování peptidů pronikající přes glycocalyx nebo buněčnou stěnu. ROA a VCD techniky také použijeme pro charakteristiku modelových receptorů proteinů včetně glykoproteinů, což umožní vytipovat nepravděpodobnější vazebná místa v glycocalyxu a buněčné membráně.

Většina spektroskopických studií bude probíhat na ÚOCHB, který disponuje vybavenými laboratořemi pro CD (Jobin Ivonne), ROA (spektrometr firmy Biotools), a nedávno pořízeným VCD spektrometrem (Biotools). Nicméně pro přípravu vzorků, syntézu modelových peptidů a jejich čištění chybí vysoce účinný (HPLC) chromatograf, který je plánovaný jako investice. Za pomoci dílen ÚOCHB bude zkonstruována teplotní cela pro VCD spektrometr, která umožní získání dat pro termodynamická studia proteinů.

Přechod přes membránu a jeho metabolické důsledky

Cílem výše popsaného počítačového modelování a experimentálních technik je v posledu poskytnout úplné pochopení strategií, které různé molekuly využívají k přiblížení se k buněčné membráně a k přechodu přes ni. Na vybraném příkladu zde detailně ukážeme, jak budeme s molekulovým rozlišením studovat mechanismus používaný peptidy bohatými na arginin. To je zvláště zajímavé, neboť elektrostatické interakce mezi záporně nabitými komponentami glykokalyxu a kladně nabitými argininovými rezidui bílkovin jako je např. albumin (které jsou integrální částí glykokalyxu) mohou stabilizovat strukturu glykokalyxu (která se poruší a může i zkolabovat, pokud se tato bílkovina odstraní).²

Peptidy bohaté na arginin, které mají schopnost pronikat do buněk, na sebe v poslední době přitáhly značnou pozornost díky své schopnosti přecházet přes fosfolipidovou dvojvrstvu a donést náklad, jako nukleové kyseliny, bílkoviny, kvantové tečky a různé molekuly léčiv dovnitř do buňky.¹⁴ Z těchto studií vyplývá, že jeden ze strukturních požadavků pro efektivní penetraci přes fosfolipidovou membránu je vícenásobná přítomnost guanidiniových kationtů, které se nacházejí na argininových reziduiích. Experimentální výsledky získané konfokální mikroskopií a průtočnou cytometrií ukázaly, že oligoargininy obsahující šest a více aminokyselin se internalizují lépe než stejně dlouhé oligolysiny. Přesný mechanismus penetrace peptidů není dobře znám, přesto byla navržena různá mechanistická vysvětlení jako vytváření inverzních micel, elektroporace, endocytóza, či difúze přes membrány asistovaná anionty. Žádný z navržených mechanismů však nedokáže vysvětlit rozdílné chování oligoargininů a oligolysinů, neboť neberou v úvahu molekulovou specifitu kladně nabitých reziduií.

Naším cílem je objasnit molekulový původ variability v membránové permeabilitě pro kationické peptidy různé délky a různého složení. Bylo navrženo, že guanidiniové kationické skupiny v oligoargininech mají schopnost se párovat, přestože mají stejný náboj. Oproti tomu amoniové kationické skupiny oligolysinů tuto schopnost párovat se nevykazují. Tato neobvyklá vlastnost guanidiniových kationtů je jednou z hnacích sil pro agregaci oligoargininů ve vodě. Oligoargininy mají také tendenci vytvářet agregáty na lipidické dvojvrstvě, což ukázala naše pilotní molekulově dynamická studie.¹⁴ Pomocí molekulových simulací zodpovíme otázku, zda zvýšená nábojová hustota agregátů oligoargininů na membráně (ve srovnání s oligolysiny či jedním oligoargininem) hraje klíčovou roli v jejich různé schopnosti pronikat do membrány. Na základě naší předchozí studie rozdílů mezi peptidy obsahujícími arginin versus lysin budeme zjišťovat molekulární původ role kationické specifity při permeabilitě do membrány. Jinými slovy se budeme ptát, co je tak zvláštního na peptidech bohatých na arginin, že mají schopnost penetrovat do membrány, a jak bychom toho mohli využít k dopravení molekul léčiv do buňky. Modulování těchto peptidů tak, aby specificky pronikaly do určitých membránových struktur blízko glykokalyxu tak představuje slibný a zároveň dosud neprozkoumaný cíl.

Implikace pro léčbu rakoviny a množení buněk

V kontextu rakovinného množení buněk se soustředíme zejména na vnitřní oblast glykokalyxu. Tato oblast je bohatá na glycosaminoglykany, albumin a další polyfunkční glykoproteiny. Nedávno bylo ukázáno, že posílení glykokalyxu má blahodárný vliv na snížení kardiovaskulárních rizik, neboť glykokalyx poskytuje ochrannou vrstvu endoteliálních buněk, a tak limituje infiltraci mediátorů zánětů. Opak je však pravdou pro omezení rozvoje rakovinných metastáz. Zde naopak degradace glykokalyxu snižuje rychlost buněčného dělení a počátek migrace rakovinných buněk po těle. Albumin, který je bohatý na arginin, je esenciální strukturální komponentou glykokalyxu. Ve skutečnosti je jednou z mála komponent používanou klinicky pro posílení endoteliálního glykokalyxu.² Věřící se, že způsobuje lepší zesíťování komplexní struktury glykokalyxu, zejména glycosaminoglykanů.

V tomto pracovním balíčku prozkoumáme interakce albuminu s glycosaminoglykany pomocí výpočetních metod a in vitro experimentů pomocí hydrogelů obsahujících glycosaminoglykany. Očekáváme, že pomocí těchto studií zjistíme, co jsou hlavní vlastnosti albuminu, které mu umožňují síťovat glykokalyx - mířit budeme zejména na kladně nabitě guanidiniové postranní řetězce. Další související a dosud neprozkoumaný cíl je interakce polykationických peptidů s glykokalyxem. Interakce oligopeptidů s membránovými bílkovinami a glykokalyxem je může buď stabilizovat, nebo destabilizovat, podobně jak to činí albumin. Vrstva polymerních cukrů může také různými způsoby interagovat s kationickými oligopeptidy a tím stabilizovat nebo destabilizovat glykokalyx.

Pro tyto studie budou obzvlášť cenné oligopeptidy, které nepronikají snadno přes lipidickou dvojvrstvu. Budeme tak používat simulace molekulové dynamiky v kombinaci s in vitro experimenty k ovlivnění struktury glykokalyxu pomocí těchto oligomerů. Experimenty v hydrogelech s glycosaminoglykany budou také zaměřeny na jejich reologické vlastnosti po přidání foldamerů nepřirozených aminokyselin obsahujících guanidiniové jednotky a syntetizované k tomuto účelu, které tak lehce nedegradují in vivo jako peptidy obsahující přirozené aminokyseliny. Tímto způsobem vyvineme nástroje k ovlivnění struktury glykokalyxu a k pochopení, jak optimálně ovlivnit jeho strukturu v kontextu rakovinných metastáz, aniž bychom poškodili kardiovaskulární systém.

Literatura:

- [1] Tarbell, J. M.; Pahakis, M. Y. Mechanotransduction and the glycocalyx. *J. Intern. Med.* 2006 259, 339-350.
- [2] Becker, B. F.; Jacob, M.; Leipert, S.; Salmon, A. H. J.; Chappell, D. Degradation of the endothelial glycocalyx in clinical settings: searching for the sheddases *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2015** 80(3), 389-402.
- [3] Chappell, D.; Jacob, M. Role of the glycocalyx in fluid management: Small things matter. *Best Pract. Res. Cl. An.* **2014** 28, 227-234.
- [4] Zorko, M.; Langel, Ü. Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2005**, 57, 529-545.
- [5] Di Pisa, M.; Chassaing g.; Swiecicki, J. M. Translocation Mechanism(s) of Cell-Penetrating Peptides: Biophysical Studies Using Artificial Membrane Bilayers. *Biochemistry* **2015**, 54, 194-207.
- [6] Di Pisa, M.; Cassaing, G.; Swiecicki, J. M. When cationic cell-penetrating peptides meet hydrocarbons to enhance in-cell cargo delivery. *J. Peptide Sci.* **2015**, 21, 356-369.
- [7] Ramsey, J. D.; Flynn, N. H. Cell-penetrating peptides transport therapeutics into cells. *Pharmacol. Therap.* **2015**, 154, 78-86.
- [8] Kapras, V.; Pohl, R.; Cisarova, I.; Jahn, U. Asymmetric Domino Aza-Michael Addition/[3+2] Cycloaddition Reactions as a Versatile Approach to alpha,beta,gamma,-Triamino Acid Derivatives. *Org. Lett.* **2014**, 16, 1088-1091.
- [9] Lazar J.; Bondar, A.; Timr, S.; Firestein, S. J. Two-photon polarization microscopy reveals protein structure and function. *Nature Methods* **2011**, 8, 684-690.
- [10] Lazar J., US Patent 8,772,358/2014
- [11] Timr S.; Bondar, A.; Cwiklik, L.; Stefl, M.; Hof, M.; Vazdar, M.; Lazar, J.; Jungwirth, P. Accurate Determination of the Orientational Distribution of a Fluorescent Molecule in a Phospholipid Membrane. *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 855-863.
- [12] Ly, E.; Piot, O.; Durlach, A.; Bernard, P.; Manfait, M. Differential diagnosis of cutaneous carcinomas by infrared spectral micro-imaging combined with pattern recognition. *Analyst* **2009**, 134 , 1208.
- [13] Bird, B.; Bedrossian, K.; Laver, N.; Miljkovic, M.; Romeo, M. J.; Diem, M. Detection of breast micro-metastases in axillary lymph nodes by infrared micro-spectral imaging. *Analyst* **2009** , 134 , 1067.
- [14] Allolio, C.; Baxova, K.; Vazdar, M.; Jungwirth, P. Guanidinium Pairing Facilitates Membrane Translocation. *J. Phys. Chem. B* **2016**, 120, 143-153.

Časový plán

2018

Cílení na strukturu glykokalyxu:

- Vývoj zhrubených modelů pro hlavní strukturální motivy uvnitř glykokalyxu, tj. interakcí glycosaminoglycan–glycosaminoglycan a glycosaminoglycan–albumin.
- Vývoj hydrogelů obsahujících glycosaminoglycany jako in vitro modely glykokalyxu.
- Kalibrace esejí dvoufotonové polarizační mikroskopie ke zkoumání relevantních interakcí v glykokalyxu, jako je interakce mezi albuminem a glycosaminoglycanem.

Cílení na plazmatickou membránu a její vnitřek:

- Studium interakcí peptidů bohatých na arginin s modelovými plazmatickými membránami pomocí molekulové dynamiky s atomickým a zhrubeným rozlišením.
- Syntéza a charakterizace foldamerů tvořených nepřirozenými aminokyselinami obsahujícími guanidiniové jednotky a další funkční skupiny.
- Syntéza fluorescenčních sond peptidických/proteinových struktur.

2019

Cílení na strukturu glykokalyxu:

- Vývoj plně funkčního modelu vnitřní oblasti glykokalyxu použitelného k zhrubeným molekulově dynamickým simulacím.
- Vývoj zhrubeného modelu pro hlavní strukturální motivy v oblasti glykokalyxu přilehlé k membráně, např. bílkovin CD44 a syndekanu..
- Charakterizace hydrogelového modelu glykokalyxu po přidání foldamerů specificky určených k narušení struktury glykokalyxu.

Cílení na plazmatickou membránu a její vnitřek:

- Studium interakcí peptidů bohatých na arginin s komplexními membránami, např. obsahujícími transmembránové proteiny.
- Provedení experimentů ROA a VCD na micelách a heterogenních systémech s cílem odhalit penetrační mechanismus peptidů pronikajících do buňky.
- Použití 2PPM k monitorování kationických peptidů pronikajících do buňky.

2020 -2022

Cílení na strukturu glykokalyxu:

- Vyvinutí úplného zhrubeného modelu glykokalyxu obsahujícího jak vnitřní tak povrchovou oblast a zachycujícího jeho hlavní rysy.
- Použití vyvinutého modelu k prozkoumání potenciálních cílů, které budou schopny efektivně měnit strukturu glykokalyxu.
- Aplikace modelu glykokalyxu ke studiu jeho odezvy na systémy přivádějící molekuly léčiva.
- Rozšíření použití spektroskopických technik jako ROA a VCD na glykoproteinové systémy.
- Porovnání výpočetních předpovědí dynamiky bílkovin v heterogenním prostředí s experimentálními výsledky.

Cílení na plazmatickou membránu a její vnitřek:

- Použití peptidů bohatých na arginin a foldamerů jako nosiče molekul léčiva, které bude studováno jak in silico tak in vitro. Intenzivní využívání nově upravených spektroskopických technik.
- Vyvinutí výpočetního protokolu dovolujícího zahrnout vliv dynamických jevů a efekty okolí na vibrační molekulová spektra s použitím ke studiu detailů interakcí mezi membránami a bílkovinami.

Plánované publikace a patenty

Publikace (Jimp)

			<i>Journal of the American Chemical Society</i> <i>Journal of Physical Chemistry Letters</i> <i>Journal of Physical Chemistry B</i> <i>BBA Biomembranes</i> <i>Biophysical Journal</i> <i>Physical Chemistry Chemical Physics</i> <i>Journal of Chemical Physics</i>
	Jimp		
2018	3		
2019	4		
2020	4		
2021	4		
2022	5		
Celkem		20	

Zahraniční spolupráce

- Laboratory of Biointerfaces at the Pennsylvania State University, spektroskopická a termodynamická měření afinit nabitých peptidů ke komplexním membránovým strukturám.
- Institute Laue-Langevin in Grenoble, charakterizace interakcí mezi biologicky relevantními nabitými částicemi ve vodě pomocí neutronového rozptylu.