

PB2.2. Inhibice intramembránové katalysy a protein-proteinových interakcí jako základ nových strategií pro léčbu zánětlivých onemocnění a rakoviny (skupina Dr. Strišovského)

Cíle výzkumu

- Charakterizovat iRhom strukturně a mechanisticky.
- Identifikovat a charakterizujeme buněčné proteiny, které jsou důležité pro signální a dopravní funkci iRhomů a definujeme jejich interakční místa s iRhomem.
- Vyvinout malé molekuly a peptidové makrocykly, které budou blokovat tyto interakce a inhibovat funkci iRhomů

Výzkumný plán a metodologie

Nové transmembránové proteiny zvané iRhomy (neproteázoví členové nadrodiny proteinů podobných rhomboidům) hrají klíčovou roli v biogenezi a posttranslační aktivaci membránově zakotvené metaloproteázy ADAM17/TACE, která plní důležitou roli v zánětlivých patologiích a rakovinných bujích a doposud byla obtížně využitelná pro terapeutické strategie. Na základě naší prokázané zkušenosti v mechanistické, strukturní a buněčně biologické analýze intramembránových proteáz z rodiny rhomboidů navrhujeme zkombinovat tyto přístupy ke studiu struktury a mechanismu iRhomů a prozkoumat možné způsoby jejich farmakologické inhibice. S použitím pokročilých medicíně chemických přístupů včetně biologické selekce využijeme strukturní informace o iRhomech k návrhu malých molekul blokuji funkci iRhomu. Tím by se nám otevřela cesta k nové a vysoce specifické protizánětlivé strategii zaměřené na biogenezi TNF α a protirakovinné strategii zaměřené na signalizaci přes EGF receptor.

Mechanismy proteinů z rodiny rhomboidů budou obecně zahrnovat intra- a extramembránové protein-proteinové interakce a jejich souhrn s lipidovým prostředím. Transmembránové jádro podobné rhomboidům u iRhomů pravděpodobně váže transmembránové helixy klientských proteinů a dvě vysoce konzervované globulární domény, IRHD a NTD (vysvětlení v sekci 5.3.2.2.1) jsou klíčové pro funkci iRhomu. IRHD se pravděpodobně spoluúčastní vazby klientských proteinů, zatímco NTD váže proteinové ligandy z cytosolu. Žádné z nich ještě nebyly publikovány, ale naše předběžné proteomické analýzy provedené ve spolupráci s laboratoří Dr. Adraina (Lisabon, PT) poskytly několik kandidátů, které nyní začínáme testovat. Delece v NTD postihují funkci iRhomu a tak jedna z možných strategií jak modulovat funkci iRhomu je navrhnout ligandy, které budou vázat a inhibovat samotnou NTD nebo její interakce s jejími proteinovými partnery. Projekt bude organizován do následujících pracovních balíčků, které jsou částečně nezávislé, ale také synergické.

Struktura a mechanismus iRhomů

iRhom je integrální membránový protein, což je obecně náročný systém pro strukturní studie. Esenciální bude zavést robustní expresní systém. Budeme overexprimovat iRhom v lidských buňkách v suspenzní kultuře (HEK293T-6E¹), vyčistíme jej po extrakci detergentem z buněčných membrán a určíme jeho funkčnost otestováním jeho interakce s ADAM17 a absence jeho interakce s rekombinantními konstrukty ADAM10. Následně podrobíme celodélkový iRhom strukturní charakterizaci pomocí elektronové kryomikroskopie (kryoEM) ve spolupráci s expertem na kryoEM Dr. Vinothkumarem Kutti Ragunath z Laboratory of Molecular Biology v Cambridge ve Velké Británii. Vzhledem k molekulové hmotnosti iRhomu očekáváme, že získáme alespoň nízkorozlišenou strukturu. Transmembránové jádro iRhomu bude mít pravděpodobně podobnou architekturu jako proteázy z rodiny rhomboidů a hlavní strukturní rozdíl od kanonického foldu rhomboidů budou globulární domény IRHD a NTD. Tyto domény jsou důležité pro funkci rhomboidů a bude důležité charakterizovat je strukturně na vysoké úrovni rozlišení. Provedeme expresní testy konstruktů NTD a IRHD v bakteriálních a savčích expresních systémech a nejlepší konstrukty budeme charakterizovat rentgenovou krystalografií a/nebo NMR. Tyto vysokorozlišené struktury pak v ideálním případě zkombinujeme s mapami elektronových hustot o nízkém rozlišení získanými z kryoEM nebo s daty z rozptylu rentgenových paprsků v malých úhlech v roztoku (SAXS) a získáme tak hybridní struktury. Alternativní metoda strukturní charakterizace iRhomu a domén jež jej tvoří (s nízkým rozlišením) bude hmotová spektrometrie s vodík-deuteriovou výměnou a hmotová spektrometrie využívající chemického prokřížení (XL-MS).

U rekombinantního iRhomu zmapujeme jeho interakční místo s jeho klientským proteinem ADAM17 pomocí XL-MS a výsledky kvantitativně ověříme pomocí termoforézy v mikroměřítku a cílené mutagenize iRhomu. Abychom identifikovali nové interaktory iRhomu, ať již klientské proteiny či regulační interaktory NTD, použijeme nejnovější proteomické přístupy založené na použití modifikované biotin ligasy fúzované s cílovým proteinem (iRhom), tzv. metoda BioID². Budeme exprimovat fúzi ligasy s iRhomem z regulovatelného promotoru v úrovních blízkých endogenním ve stabilně transfekovaných iRhom deficientních imortalizovaných myších embryonálních fibroblastech (dostupných ze spolupracující laboratoře Dr. Adraina). Identifikované interaktory budou validovány nejprve v buňkách expresí epitopově značených variant a na endogenních úrovních imunoprecipitací. Pak budeme testovat, zdali interagují s iRhomem přímo s využitím rekombinantního iRhomu nebo jeho domén a individuálních kandidátů in vitro a pomocí systému splitGFP³ i v buňkách. Na buněčné biologické úrovni budeme zkoumat trafficking iRhomu a jeho interakci s ADAM17 a nově identifikovanými interaktory pomocí SunTagu⁴ a splitGFP v živých buňkách.

Konečně, vazebná rozhraní nově identifikovaných interaktorů iRhomu (z našich proteomických vyhledávání nebo z literatury) s iRhomem budou mapována a komplexy charakterizovány strukturně, deleční analýzou, XL-MS, rentgenovou krystalografií nebo NMR, jak bude nejvhodnější a schůdné. Tento pracovní balíček bude tvořit hlavní část předkládaného projektu.

Inhibice iRhomů

Nejprve zjistíme, které z nově identifikovaných interaktorů iRhomu jsou důležité pro biologickou funkci iRhomu tím, že potlačíme expresi příslušných endogenních protein pomocí RNA interference či CRISPR/Cas9 v myších embryonálních fibroblastech nebo imortalizovaných makrofázích a budeme sledovat bioaktivní ADAM17 na povrchu buněk, štěpení substrátů ADAM17 či transaktivaci EGFR. Nejlépe validovaný interaktor, který bude esenciální pro funkci iRhomu, bude připraven v rekombinantní čisté formě a bude vyvinuta metoda měření interakce s iRhomem použitelná pro testování malých molekul jako inhibitorů ve velkém měřítku (založená na termoforéze nebo alfa-screenu). Podobná metoda bude zavedena pro iRhom a jeho klientský protein ADAM17. Pomocí těchto metod provedeme vyhledávání nízkomolekulárních látek, které inhibují či rozrušují interakci ADAM17 či jiných proteinových ligandů s iRhomem. K tomu budeme potřebovat přístup ke vhodným knihovnám sloučenin, což je možné v rámci programu Open Innovation firmy Astra Zeneca nebo v programu European Lead Factory <https://www.europeanleadfactory.eu/>. Alternativně k vývoji inhibitorů rhomboidů použijeme novou technologii selekce bicyklických peptidů pomocí fágového displaye⁵. Budeme takto selektovat ligandy NTD nebo IRHD iRhomu nebo ADAM17 (ve spolupráci s laboratoří prof. Christiana Heinise, EPFL, Švýcarsko, který tuto metodu vyvinul). Bicyklické peptidy tvoří konformačně omezenou strukturu a kombinují sílu biologické selekce s rigiditou malých molekul. Byly již úspěšně použity k vytvoření extrémně selektivních a vysokoafinitních ligandů enzymů a receptorů a peptidové makrocycly jsou obecně slibnými nástroji pro inhibici protein-proteinových interakcí a jiných kdysi nedosažitelných cílů pro vývoj léčiv⁶. Nalezené inhibitory iRhomů budou validovány pomocí biofyzikálních metod a jejich komplexy s iRhomem budou strukturně charakterizovány. Látky budou resyntetizovány a iterativně vylepšovány postupy medicínské chemie v ÚOCHB AV ČR v.v.i. (skupina Dr. Majera) s pomocí molekulárního modelování, dynamiky a cheminformatiky (skupina Prof. Hobzy). Neslibnější inhibitory budou testovány v buňkách pomocí funkční assaye popsané výše, případně v myších pomocí měření sekrece TNF α a stimulace lipopolysacharidem⁷.

Po technické stránce zavedla skupina Dr. Strišovského expresi membránových proteinů v *E.coli* a savčích buňkách, má zkušenost s extrakcí membránových proteinů, jejich purifikací a krystalizací. Jsme technicky vybaveni pro purifikaci a charakterizaci proteinů (FPLC, SEC MALLS, termoforéza, kalorimetrie a povrchová plasmonová resonance). Jsme vybaveni také vším potřebným pro základní molekulární a buněčnou biologii (PCR cyklér, skenner v blízké infračervené oblasti pro kvantitativní imunochemickou detekci proteinů v gelech, tkáňové kultury, konfokální mikroskop ve sdílené laboratoři). Ve spolupráci s laboratoří proteomiky a hmotové spektrometrie ÚOCHB AV ČR (Dr. Hubálek, Mgr. Březinová) jsme zavedli a rutinně používáme kvantitativní proteomické techniky včetně stabilního izotopového značení (SILAC). Pořízení nového hmotového spektrometru Orbitrap velmi pomůže tomuto projektu, konkrétně identifikaci interaktorů a detekci posttranslačních modifikací iRhomů.

Literatura:

- [1] Durocher, Y.; Perret, S.; Kamen, A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.* 2002, 30, E9.
- [2] Roux, K. J., Kim, D. I., and Burke, B., *Curr. Protoc. Protein Sci.* **2013**, 74, 19-23.
- [3] Cabantous, S.; Nguyen, H. B.; Pedelacq, J. D.; Koraichi, F.; Chaudhary, A.; Ganguly, K.; Lockard, M. A.; Favre, G.; Terwilliger, T. C.; Waldo, G. S. A New Protein-Protein Interaction Sensor Based on Tripartite Split-GFP Association. *Sci. Rep.* **2013**, 3, 2854.
- [4] Tanenbaum, M. E.; Gilbert, L. A.; Qi, L. S.; Weissman, J. S.; Vale, R. D. A Protein-Tagging System for Signal Amplification in Gene Expression and Fluorescence Imaging. *Cell* **2014**, 159, 635-646.
- [5] Heinis, C.; Rutherford, T.; Freund, S.; Winter, G.. Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 502-507.
- [6] Heinis, C. DRUG DISCOVERY Tools and rules for macrocycles. *Nat Chem Biol* **2014**, 10, 696-698.
- [7] McIlwain, D. R.; Lang, P. A.; Maretzky, T.; Hamada, K.; Ohishi, K.; Maney, S. K.; Berger, T.; Murthy, A.; Duncan, G.; Xu, H. C.; Lang, K. S.; Haussinger, D.; Wakeham, A.; Itie-Youten, A.; Khokha, R.; Ohashi, P. S.; Blobel, C. P.; Mak, T. W. iRhom2 Regulation of TACE Controls TNF-Mediated Protection Against Listeria and Responses to LPS. *Science* **2012**, 335, 229-232.

Časový plán

2018-2020

- Příprava rekombinantních proteinů iRhom, NTD, IRHD, a ADAM17
- Fágový display bicyklických peptidů k identifikaci ligandů/inhibitorů NTD, IRHD a ADAM17

2018-2022

- Strukturní charakterizace celodélkového iRhomu, NTD, a IRHD
- Identifikace interaktorů iRhomu pomocí BioID
- Buněčně biologická a strukturní charakterizace interaktorů iRhomu
- Vývoj stanovení inhibice interakcí iRhom-klientský protein
- Vyhledávací kampaň inhibitorů rhomboidů, validace nalezených sloučenin a jejich další vývoj
- Validace inhibitorů rhomboidů v buňkách a testování v myších

Plánované publikace a patenty

Publikace

			<i>Molecular Cell</i> <i>Nature Structural & Molecular Biology</i> <i>PNAS</i> <i>EMBO Journal</i> <i>EMBO Reports</i> <i>Structure</i>
	Jimp		
2018	1		
2019	1		
2020	1		
2021	1		
2022	1		
Celkem		5	

Patenty a patentové přihlášky

	Patenty (udělené)	Mezinárodní patentové přihlášky (podané)	<i>Očekáváme ochranu duševního vlastnictví v následující oblasti:</i> Malé molekuly blokující interakci iRhomu s jeho proteinovými vazebnými partnery.
2018	0	0	
2019	0	1	
2020	0	0	
2021	0	0	
2022	1	0	
Celkem		1	

Zahraniční spolupráce

- Laboratory of membrane trafficking, Instituto Gulbenkian de Ciência, Lisbon, Portugal; biologie iRhomů, myší genetika, zdroj imortalizovaných primárních buněk (makrofágů) z iRhom deficientních myší, in vivo testy inhibitorů iRhomů v myších
- Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, United Kingdom; kryoelektronová mikroskopie iRhomů.