

PB2.3. Cílení hostitel-virových interakcí na membráně (Bouřa a Nencka)

Cíle výzkumu

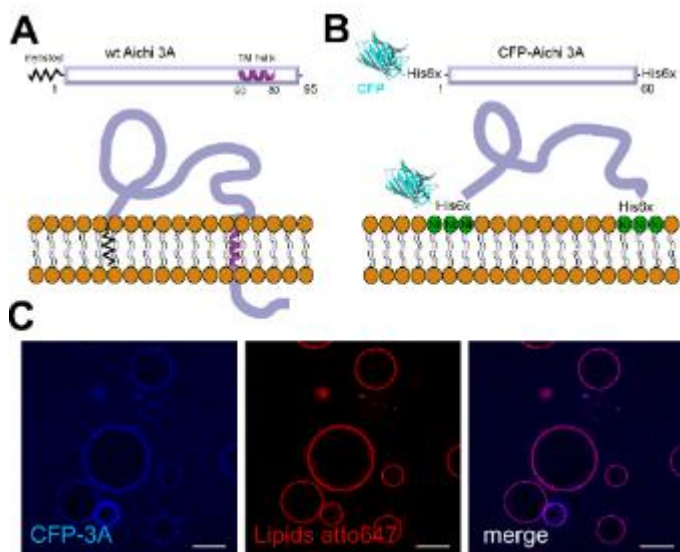
- Zrekonstruovat virovou replikační mašinerii použitím membránového modelu unilamelárních váčků (GUV) a vytvoříme systematickou studii jejich úlohy v získávání membránu modifikujících enzymů, jmenovitě PI4KB.
- Navrhnout a syntetizovat nové nástroje pro chemickou biologii k detailnímu porozumění membránové fosforylace PI4K.
- Navrhnout nové komplexní PI4K inhibitory, které budou cílit vazebné místo enzymu pro fosfatidylinositol

Výzkumný plán a metodologie

Hlavním záměrem této části projektu je využití postupů chemické biologie k porozumění procesu, ve kterém enzymy modifikující membrány, jako právě například fosfatidylinositol 4-kinasy (PI4K), jak pracují s fosfolipidy na povrchu membrán, a jak je samotný proces iniciován virovými proteiny. Použijeme biomimetický membránový model obřích unilamelárních vezikulů jako základ pro rozpuštění virové mašinerie a pro pozorování účasti těchto vezikulů na rekrutování PI4K k membráně. Dále připravíme nové nástroje chemické biologie pro detailní popis mechanismů, kterými tyto a další lidské membránu upravující enzymy modifikují fosfolipidy na plazmatických membránách. Tento přístup nejenže povede k porozumění iniciační fáze replikace rozličných lidských virálních patogenů, ale mohl by také vyústit v zavedení nových metod pro rozrušení protein-membránových interakcí s širokou aplikovatelností v terapii život ohrožujících nemocí, zahrnujících virové infekce, různé typy nádorových onemocnění a neurodegenerace.

Zaměříme se na dva rozdílné znaky iniciace virové replikace, které se odehrávají na plasmatické membráně. Za prvé, připravíme *in vitro* systém mimikující proces rekrutování PI4K viry na plasmatickou membránu, a za druhé se zaměříme na cílení interakcí PI4K s membránou.

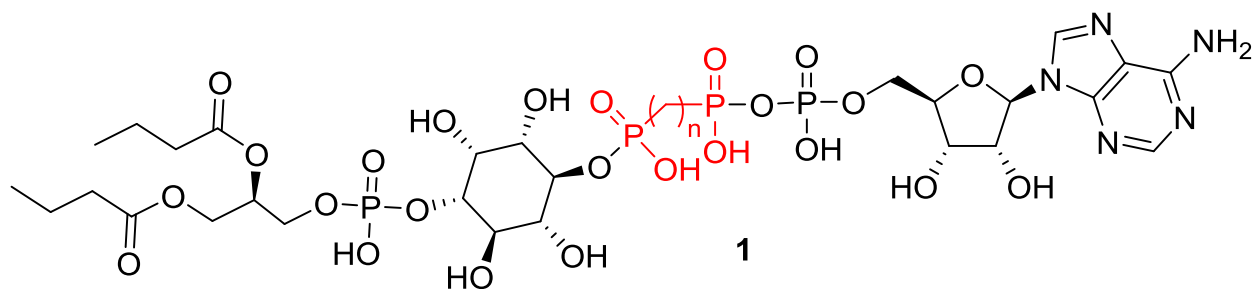
V první části projektu se zaměříme na rozpouštění membránových sítí *in vitro* použitím biomimetického GUV systému.¹ Úspěšně jsme k tomuto účelu připravili fluorescentní (CPF fuzní) 3A protein, který může být vázaný na membránu ve stejném topologickém smyslu jako divoký typ proteinu a jsme schopni tímto fluorescenčním 3A proteinem označit GUV (Obr. 1). Naším záměrem je znemožnit využívání PI4KB na membráně GUV. Budeme sledovat produkci PI4P využitím PI4P biosensoru (SidC PI4P vazebná doména fúzovaná k mCherry).² S využitím konfokální mikroskopie budeme schopni monitorovat enzymatickou efektivitu komplexu 3A:ACBD3:PI4KB³ a porovnáme ji s aktivitou samotné PI4KB. Použití konfokální mikroskopie nám také umožní sledovat změny ve tvaru a zakřivení membrány. Dále se soustředíme na rekrutování 3D^{pol} k membráně. Použijeme náš připravený biomimetický GUV systém k určení, zda je samotná produkce PI4P dostačující k rekrutování 3D^{pol} či zda jsou nezbytné další buněčné/virální proteinové komponenty.⁴



Obr. 1. A) Schematické znázornění divokého typu proteinu 3A a jeho přirozené topologie na membráně. B) Schematické znázornění mCerulean – 3A fúzního proteinu (CFP-3A). CFP-3A obsahuje dva 6xHis tagy; jeden mezi CFP a jeho N-koncem a jeden na C-konci. Tyto dva His tagy mohou sloužit k připojení CFP-3A proteinu k membráně obsahující DGS-NTA(Ni) (lipid mající nikl vázaný k hlavové části). C) CFP-3A vázaný k GU. 250 nM CFP-3A byl přidán ke GU obsahující 5% of DGS-NTA(Ni) a ATTO647N-DOPE (0.1 mol %). CFP signál je znázorněn modře, atto647 signál červeně. Měřítka - 20 μ m.

Součástí předkládaného projektu bude také syntéza nových nehydrolyzovatelných analogů pro studium metabolismu rozličných fosfolipidů, např. PI4P. Tyto “super substráty” budou následně použity pro zkoumání strukturálních a funkčních znaků proteinů účastnících se jejich metabolismu a zpracování na protein-lipidovém rozhraní. V našich pilotních studiích se soustředíme na přípravu super substrátů fosfatidylinositol kinas, sestávajících se z nehydrolyzovatelného adenosin trifosfátu připojeného k různým fosfatidyl inositolům (např. Obr. 2). Tyto stabilní deriváty budou následně krystalizovány s cílovými proteiny za účelem určení obou stran katalytického centra kinázy a detailnímu porozumění mechanismu fosforylačního procesu. Jelikož tyto substráty mohou v principu mimikovat také tranzitní stav fosforylační reakce, měly by se proto vázat k PI4K a inhibovat jejich funkci. Naším záměrem je na základě získaných strukturálních informací navrhnout nové inhibitory protein-lipidového rozhraní, které by dokázaly efektivně mimikovat nejen lipidovou, ale i nukleotidovou část. Takové sloučeniny mohou najít bezpočet aplikací v terapii virových infekcí, nádorových onemocnění a neurodegenerativních nemocí.⁵ Na základě tohoto výzkumu vybereme následně vhodné cíle mezi lipidy modifikujícími proteiny a vyvineme jejich inhibitory.

Vědecký tým disponuje adekvátním vybavením a většinou nezbytného materiálu. Členové vědecké skupiny mohou využívat specializované vybavení typu Waters UPLC-Q-ToF system, CEM Discover mikrovlnný syntetizátor, FlowSYNTH průtokový reakční systém a A2ZS Model 16GLAB generátor ozonu. Mezi běžné vybavení, kterým skupina disponuje, patří rotační odparky, magnetické míchačky, cirkulační chladicí zařízení, aparatury pro práci v inertní atmosféře, autokláv pro chemickou syntézu a dva flash chromatografické systémy.



Obr. 2. Super-substrát sestávající se z nehydrolyzovatelného adenosin trifosfátu připojeného k fosfatidylinositolu.

Literatura:

- [1] Montes, L. R.; Alonso, A.; Goni, F. M.; Bagatolli, L. A. Giant unilamellar vesicles electroformed from native membranes and organic lipid mixtures under physiological conditions. *Biophys. J* 2007, 93, 3548-3554.
- [2] Luo, X.; Wasilko, D. J.; Liu, Y.; Sun, J.; Wu, X.; Luo, Z.-Q.; Mao, Y. Structure of the Legionella Virulence Factor, SidC Reveals a Unique PI(4)P-Specific Binding Domain Essential for Its Targeting to the Bacterial Phagosome. *Plos Pathogens* 2015, 11.
- [3] Ishikawa-Sasaki, K.; Sasaki, J.; Taniguchi, K. A Complex Comprising Phosphatidylinositol 4-Kinase III beta, ACBD3, and Aichi Virus Proteins Enhances Phosphatidylinositol 4-Phosphate Synthesis and Is Critical for Formation of the Viral Replication Complex. *J Virol* 2014, 88, 6586-6598.
- [4] Hsu, N. Y.; Ilnytska, O.; Belov, G.; Santiana, M.; Chen, Y. H.; Takvorian, P. M.; Pau, C.; van der Schaar, H.; Kaushik-Basu, N.; Balla, T.; Cameron, C. E.; Ehrenfeld, E.; van Kuppeveld, F. J. M.; Altan-Bonnet, N. Viral Reorganization of the Secretory Pathway Generates Distinct Organelles for RNA Replication. *Cell* 2010, 141, 799-811.
- [5] Tan, J.; Brill, J. A. Cinderella story: PI4P goes from precursor to key signaling molecule. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* 2014, 49, 33-58.

Časový plán

2018-2020

- Příprava rekombinantních proteinů iRhom, NTD, IRHD, a ADAM17
- Fágový display bicyckých 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>Journal of Medicinal Chemistry</i>
			<i>ACS Chemical Biology</i>
			<i>Antimicrobial Agents and Chemotherapy</i>
			<i>Plos One</i>
			<i>Bioorganic and Medicinal Chemistry</i>
			<i>Organic and Biomolecular Chemistry</i>
			<i>Journal of Organic Chemistry</i>
			<i>ChemBioChem</i>
		Jimp	
2018	2		
2019	3		
2020	3		
2021	3		
2022	3		
Total	14		

Patenty a patentové přihlášky

	Patenty (udělené)	Mezinárodní patentové přihlášky (podané)	<i>Očekáváme ochranu duševního vlastnictví v následující oblasti: Nové inhibitory virální replikace.</i>
2018	0	0	
2019	0	1	
2020	0	0	
2021	0	0	
2022	1	0	
Celkem	1	1	

Zahraniční spolupráce

- Antivirální aktivita připravených sloučenin bude vyhodnocena na Rega institutu v KU v Leuvenu, kde budou také probíhat následné in vivo studie.
- V rámci projektu budeme úzce spolupracovat s Gilead Sciences, Inc., která poskytne farmakokinetické a farmakodynamické preklinické studie. Spojení s Gilead Sciences, Inc. by nám mělo také umožnit následný vývoj nejatraktivnějších sloučenin pro klinickou aplikaci.