

PB3.5. Vývoj peptidových konstruktů zamezujících interakci protein-DNA - případ EST a HIF-21 transkripčních faktorů nádorových onemocnění. (Vondrášek)

Cíle výzkumu

- Bioinformatická analýza ETS/HIF-1 transkripčních faktorů interagujících s DNA analýzou databáze PDB a 3D FootPrint databáze.
- Konstrukce konsensuálních sekvencí rozpoznávajícího motivu a identifikace strukturního motivu vážícího se k DNA.
- Syntéza nalezeného strukturního motivu odvozená od ETS/HIF-1 proteinů a biofyzikální a strukturní charakterizace interakce.
- Návrh a syntéza nízkomolekulárních peptidových ligandů založená na strukturních a sekvenčních parametrech získaných analýzou ETS/HIF-1 komplexů s DNA.

Výzkumný plán a metodologie

Navrhujeme následující kombinaci metod pro studium interakce DNA-Protein EST a HIF-1 transkripčních faktorů. Jejich spojením by měl vzniknout jednotný systém na sebe navazujících kroků dovolujících vývoj DNA vážících ligandů kompetujících s transkripčními faktory na solidním fyzikálním základu. Konkrétně je naším cílem využít dostupných strukturních a biofyzikálních dat charakterizujících vazbu DNA-protein. Detailně hodláme postupovat podle následující strategie:

- **Analýza strukturních a termodynamických databází** a výběr kandidátů pro racionální screening. V této především bioinformatické části budeme systematicky analyzovat 3D struktury ETS/HIF-1 komplexů ze strukturní databáze PDB¹ a vazebných charakteristik obou transkripčních faktorů získaných z 3D-footprint databáze², dále budeme těžit z literárních údajů, které budeme dále analyzovat pomocí experimentálních a výpočetních metod. Konkrétně budeme mapovat korelaci mezi aminokyselinovou kompozicí ETS/HIF-1 interakčních povrchů rozpoznávaných na DNA molekulách a termodynamickou charakterizací interakcí. Zaměříme se na kovarianci zahrnující bloky proteinové sekvence od 2 do 5 aminokyselin a spojíme tato statistická data s dostupnými termodynamickými daty. Tyto peptidové bloky stejně tak jako identifikované proteiny nesoucí tyto bloky a jejich kratší fragmenty budou našimi kandidáty pro výpočetní simulace a experimentální charakterizace.
- **Validace výpočetních postupů** pro studium dynamiky peptidů a proteinů interagujících s DNA. Naším cílem je provést MD simulace v explicitním solventu zahrnující simulace volných proteinů/peptidů a jejich vazebných komplexů s DNA s cílem prozkoumat použitelnost dostupných empirických potenciálů a simulačních protokolů pro studium dynamických jevů pro niž zatím nebyla nalezena konsensuální platforma.³ Kromě toho cílíme na srovnání tradičních metod pro výpočet volné energie vazby s pokročilými metodami, jako jsou nerovnovážné simulační metody. Taková data jsou v současnosti zatím nedostupná.^{4,5}
- **Biofyzikální a strukturní charakterizace peptidů a proteinů v komplexu s DNA** s použitím metod ITC a MST, dále metod cirkulárního dichroismu (ECD) a metod NMR. Naším cílem je studovat fundamentální biofyzikální charakteristiky ETS/HIF-1 komplexů s DNA použitím minimalistického přístupu zahrnujícího peptidové fragmenty z interakčního interface protein-DNA komplexu. Naměřená data budou také sloužit k validaci výsledků výpočetních metod získaných pomocí simulací. Velmi důležitou součástí celého procesu bude strukturní popis komplexů pomocí metod NMR, který nám umožní identifikovat klíčová rezidua interakce.
- **Popis stabilizace vázaného stavu studovaných molekul** jako prostředek ke zlepšení vazebné afinity. Hodláme studovat, jak konformační rovnováha nevázaného stavu peptidové molekuly bude posunuta směrem ke stavu přítomnému ve vazbě s DNA⁶ a zdali tento posun ovlivňuje vazebnou afinitu peptidu. Konkrétně, pokud budeme moci ukázat, že stabilizace vázaného stavu významně zlepšuje vazbu peptidu/proteinu potom budeme systematicky rozvíjet strategii, jak může být vazebná afinita dále zlepšována. Cyklizace celé peptidové molekuly stejně tak jako fyzikální podmínky a aditiva přidaná do solventu budou testovány jako strategie systematického posunu konformační a vazebné rovnováhy. Takový systém bude nejprve popsán pomocí výpočetních metod následovaných experimentálním ověřením.

- [1] Bernstein,F.C., Koetzle,T.F., Williams,G.J., Meyer,E.F., Brice,M.D., Rodgers,J.R., Kennard,O., Shimanouchi,T. and Tasumi,M., *Eur. J. Biochem.*, 1977, 80, 319–324.
- [2] Contreras-Moreira,B., *Nucleic Acids Res.*, **2010**, 38, D91–D97.
- [3] Rauscher,S., Gapsys,V., Gajda,M.J., Zweckstetter,M., de Groot,B.L. and Grubmüller,H., *J. Chem. Theory Comput.*, **2015**, 11, 5513–5524.
- [4] Goette,M. and Grubmüller,H. , *J. Comput. Chem.*, **2009**, 30, 447–456.
- [5] Seeliger,D., Buelens,F.P., Goette,M., de Groot,B.L. and Grubmuller,H., *Nucleic Acids Res.*, **2011**, 39, 8281–8290.
- [6] Jen-Jacobson,L., Engler,L.E. and Jacobson,L.A., *Structure*, **2008**, 8, 1015–1023

Časový plán

2018-2019

- Bioinformatická analýza strukturní a termodynamické databáze pro ETS/HIF-1 komplexy s DNA, molekulárně dynamické simulace a výpočet vazebných afinit.

2020-2021

- Určení změny Gibbsovy volné energie pomocí ITC mikrokolorimetrie a určení vazebné konstanty pomocí MST metody a CVD spektroskopie.

2018-2021

- ECD Spectroskopie a strukturní studie komplexů pomocí NMR.

2020-2022

- Úplná chemická syntéza nízkomolekulárních peptidových ligandů a posun konformační rovnováhy.

Plánované publikace a patenty

Publikace (Jimp)

	Jimp	
2017	0	<i>Nucleic Acids Research</i> <i>Chemistry a European Journal</i> <i>Protein Science</i> <i>Journal of Chemical Theory and Computation</i> <i>ACS Chemical Biology</i> <i>ChemBioChem</i> <i>Structure</i> <i>Journal of Physical Chemistry</i>
2018	2	
2019	2	
2020	2	
2021	2	
2022	2	
Celkem	10	

Zahraniční spolupráce

- University of Stockholm, DNA-Protein vazebné eseje a jejich vývoj
- University of North Carolina, Chapell Hill, Free energy perturbation přístup, nerovnovážná termodynamika