

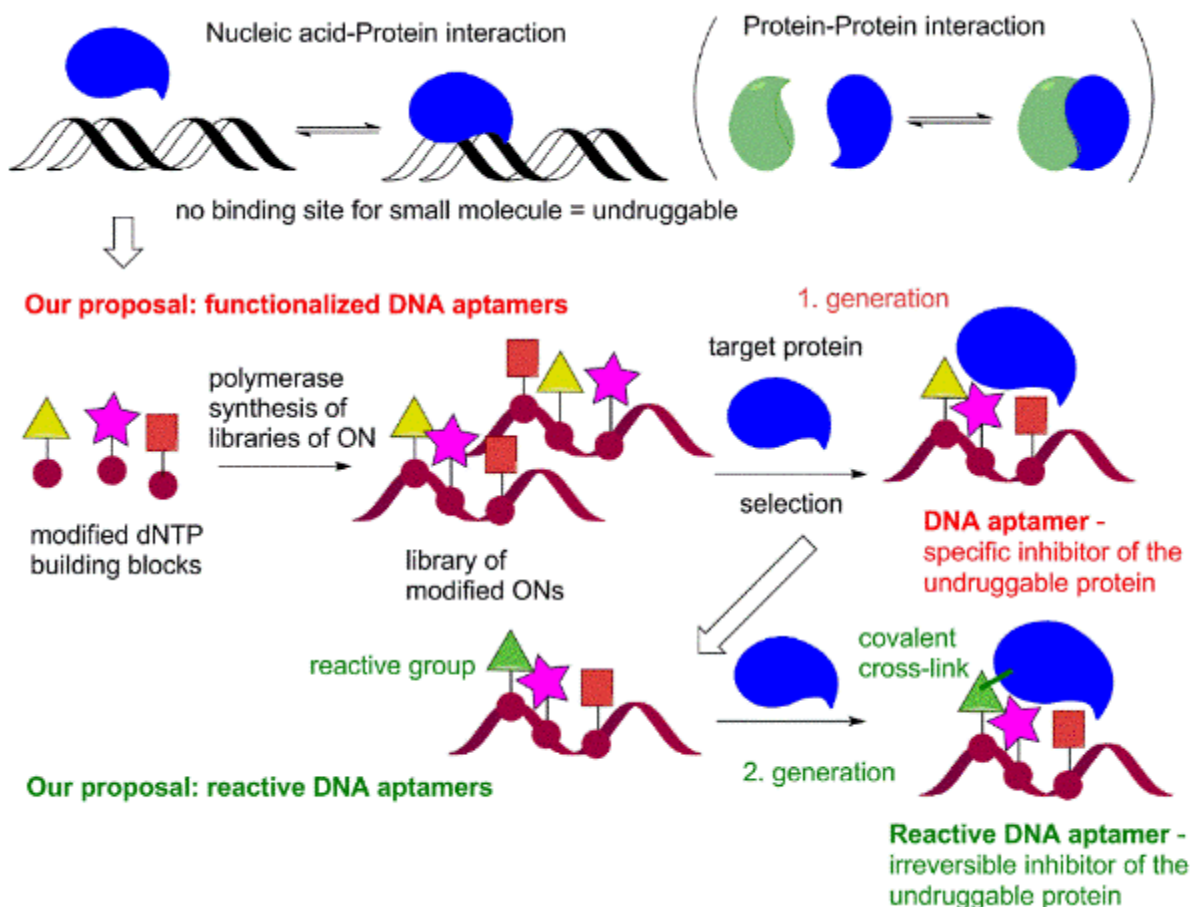
PB3.1. Vývoj aptamerů proti onkogenním faktorům (Hocek)

Cíle výzkumu

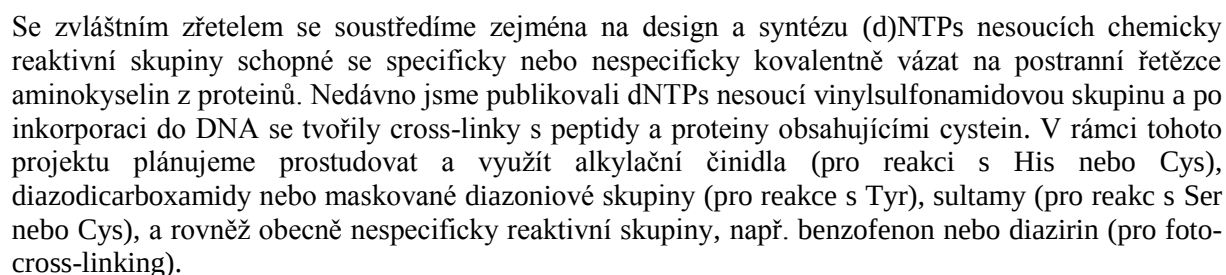
- Design a syntézu nových modifikovaných (d)NTPs nesoucích různé funkční skupiny.
- Systematická studie polymerázových inkorporací těchto modifikovaných nukleotidů do DNA a RNA.
- Systematická studie zavádění reaktivních skupin (specifických vůči konkrétní aminokyselině nebo nespecifické) do DNA a RNA a studie kovalentního cross-linkování s DNA- nebo RNA-vazebnými proteiny.
- Použití SELEX přístupu k selekci modifikovaných aptamerů proti cílovým proteinům.
- Design a syntéza inherentně reaktivních aptamerů proti vybraným proteinům (onkogenním faktorům nebo virovým proteinům).
- Testování cytostatické a protivirové aktivity vybraných aptamerů.

Výzkumný plán a metodologie

V návaznosti na naši unikátní expertízu v designu a syntéze modifikovaných dNTP stavebních bloků a jejich polymerázové inkorporace do DNA, navrhujeme využít tyto zkušenosti zcela novým směrem v selekci modifikovaných DNA aptamerů a později i reaktivních kovalentních aptamerů cílících na undruggable proteiny účastníci se protein-DNA or protein-RNA interakcí relevantních k rakovině nebo virovým onemocněním. Nicméně selekce aptamerů a jejich modifikace je natolik obecný přístup, že umožní i aplikace v selekci aptamerů proti interakcím protein-protein, a proto předpokládáme i řadu dalších ad hoc spoluprací a interakcí s VP1.



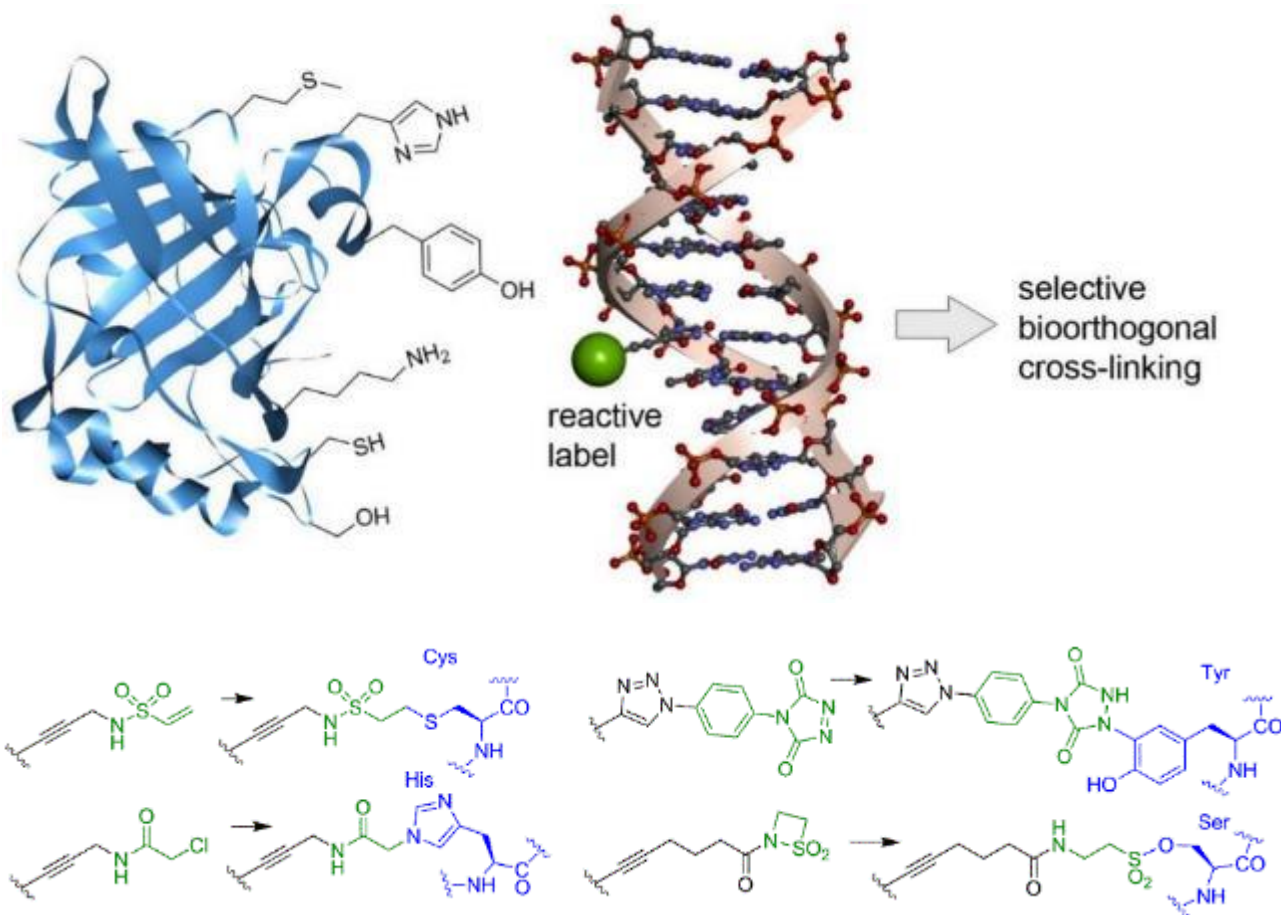
V první fázi začneme s designem nových modifikovaných (d)NTPs nesoucích funkční skupiny pro potenciální nekovalentní interakce s proteiny. Již nyní máme k dispozici knihovnu >100 různých dNTPs nesoucích substituenty různé velikosti, funkční skupiny (CH=O, NH₂, COOH, N₃, NO₂ atd.) a budeme navrhovat a syntetizovat mnoho dalších nesoucích jiné užitečné funkční skupiny (včetně např. postranních řetězců aminokyselin, P- nebo N-ligandy pro komplexaci kovů, peptidy, sacharidy apod.). U těchto modifikovaných (d)NTPs budeme systematicky studovat jejich substrátovou aktivitu pro DNA a RNA polymerázy a optimalizovat jejich polymerázovou inkorporaci (metodami PEX, NEAR, PCR apod.) s cílem vygenerovat knihovny modifikovaných DNA nebo RNA sekvencí pro selekční experimenty.



Pak budeme aplikovat *in vitro* SELEX přístup s využitím proteinů obsahujících vhodnou "visačku" (např. His-tag nebo biotin). Začneme s komerčními DNA knihovnami, kde budeme provádět PCR s použitím jednoho nebo několika modifikovaných dNTPs a jeden 5'-fosforylovaný primer. Výsledná knihovna dvouřetězcových PCR produktů bude podrobena reakci s Lambda Exonuclease (která specificky rozštěpí 5'-fosforylované DNA řetězce) a získáme knihovnu jednořetězcových oligonukleotidů s modifikovanými bázemi. Tato knihovna bude podrobena selekci s cílovým tagovaným

proteinem, který bude po inkubaci zachycen na pevné fázi s použitím afinitní chromatografie specifické k dané visačce. Po odmytí nenavázaných DNA se navázané DNA sekvence uvolní denaturací a budou sekvenovány (s klíčovým využitím nově pořízeného Next Generation Sequencing přístroje MinoSeq) a bioinformatické analýzy. Vybraná množina ON sekvencí vážících daný protein projde dalším kolem PCR a selekce, aby se dále optimalizovala a fokusovala knihovna aktivních mutantů.

Po identifikaci specifických a efektivních aptamerů, které budou vázat cílové proteiny, budeme resyntetizovat vybrané sekvence ve větším množství a stanovíme jejich vazebné afinity k cílovým proteinům (včetně stanovení K_d pomocí isothermální titrační kalorimetrie nebo jiných relevantních metod). U výsledných aptamerů bude prostudována jejich *in vitro* cytostatická a antivirová aktivita.



Ve spolupráci se skupinou Strukturní biologie (Veverka, Řezáčová), se pokusíme vyřešit NMR nebo X-ray struktury, abychom získali další informace pro úspěšný design. Kruční částí charakterizace aptamerů a jejich kovalentních konjugátů s proteiny bude analýza pomocí hmotové spektrometrie ve spolupráci s týmem Dr. J. Cvačky. Budeme intenzivně využívat nově pořízený přístroj Orbitrap a vyvineme MS metody pro analýzu kompletních DNA-protein konjugátů a produktů digesce DNA (nukleotid-protein konjugáty) a produktů digesce proteinu (konjugáty peptide-DNA).

Potom vybereme nejúčinnější a nejselektivnější aptamery a budeme je dále modifikovat zavedením jedné nebo více reaktivních skupin (selektivních nebo neselektivních). Budeme studovat vznik kovalentních vazeb (cross-linků) s cílovým proteinem a poté i jeho ireversibilní inhibici. Vybrané kovalentní aptamery budou opět podrobeny testům cytostatické nebo antivirové aktivity.

Výběr cílových onkogenních faktorů

Výběr proteinů bude proveden s ohledem na jejich terapeutický potenciál a možnost či nemožnost daný protein inhibovat klasickými přístupy. Jednoznačnou volbou budou onkogenní transkripční faktory - ve spolupráci s Dr. Vojtěškem (MOU Brno) budeme vyvíjet inhibitory konkrétních onkogenních faktorů,

např. Myc, FOXM1, NFκB, Jun, delta Np73, HSF1, IRF1 nebo Fos, které se všechny účastní onkogeneze nebo přispívají k resistenci nádorových buněk. Tyto proteiny budou exprimovány s využitím His-tagu, použity pro selekci aptamerů a nejlepší kandidáti budou resyntetizováni a testováni na protinádorovou aktivitu. Nově pořizovaný semipreparativní HPLC a flash chromatograf bude zcela nezbytným pro izolaci a purifikaci těchto modifikovaných oligonukleotidů.

Naším cílem je vývoj a syntéza alespoň několika protinádorových aptamerů.

U nově identifikovaných biologicky aktivních modifikovaných oligonukleotidových aptamerů bude studována jejich hydrolytická stabilita v séru a v buněčných extraktech. Vzhledem k množství chemických modifikací je možné, že budou i odolné vůči hydrolýze. Nicméně v případě, že hydrolytická stabilita bude omezená, tak přistoupíme k designu a syntéze stabilnějších oligonukleotidů s modifikovanou kostrou (fosforothioáty, boranofosfáty) nebo s modifikovanou cukernou částí (např. LNA), u kterých je známo, že jsou odolnější vůči enzymové hydrolýze. Rovněž budeme studovat jejich biodistribuci a transport přes membrány a prostudujeme zavedené možnosti jejich transportu pomocí liposomů, cell-penetrating peptides nebo lipofilních konjugátů.

Tento přístup je velmi obecný a může být adaptován i na cílení dalších proteinů ve spolupráci s dalšími biologickými týmy participujícími na tomto projektu. Určitě bude intenzivně použit pro vývoj aptamerů proti HBV v PB 3.2. (viz. níže).

Časový plán

2018-2022

- Design a syntéza nových modifikovaných (d)NTPs nesoucích různé funkční skupiny
- Systematická studie jejich polymerázové inkorporace do DNA či RNA
- Selektce of modifikovaných aptamerů proti cílovým proteinům

2019-2022

- Systematická studie inkorporací reaktivních skupin (specifických i nespecifických) do DNA nebo RNA a studium kovalentních cross-linků s DNA- nebo RNA-vazebnými proteiny
- Design a syntéza inherentně reaktivních aptamerů proti vybraným proteinům
- Testování cytostatické a protivirové aktivity vybraných aptamerů

Plánované publikace a patenty

Publikace (Jimp)

	Jimp	
2018		<i>Angewandte Chemie International Edition</i> <i>Nucleic Acids Research</i> <i>Chemistry a European Journal</i> <i>Journal of Medicinal Chemistry</i> <i>ACS Chemical Biology</i> <i>Bioconjugate Chemistry</i> <i>Bioorganic and Medicinal Chemistry</i> <i>Organic and Biomolecular Chemistry</i> <i>Journal of Organic Chemistry</i> <i>ChemBioChem</i>
2019	7	
2020	7	
2021	7	
2022	7	
Celkem	35	

Patenty a patentové přihlášky

	Patenty (udělené)	Mezinárodní přihlášky (podané)	
2017	0	0	<i>Očekáváme ochranu duševního vlastnictví v oblastech:</i> <i>Nové modifikované aptamery proti TFs.</i> <i>Ireversibilní kovalentní protinádorové aptamery.</i>
2018	0	0	
2019	0	1	
2020	0	1	
2021	0	1	
2022	1	0	
Celkem	1	3	

Zahraniční spolupráce

- University of Göttingen, selekce a vývoj aptamerů
- Gilead Sciences, vývoj protinádorových aptamerů