

PB3.2. Vývoj funkčních DNA motivů cílených proti HBV (Pichova, Curtis, Hocek)

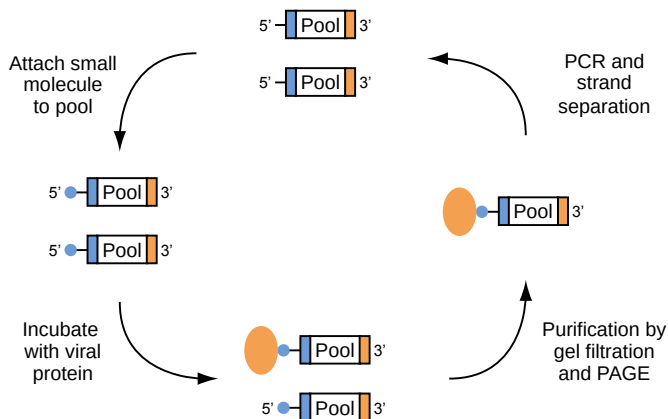
Cíle výzkumu

- Hlavním cílem je vývoj DNA aptamerů, které se budou kovalentně vázat k HBV core proteinu a budou inhibovat biologické funkce tohoto klíčového proteinu z HBV. Specifické cíle obsahují:
- Návrh a syntéza knihovny jednořetězcových DNA s kovalentně připojenými malými molekulami inhibitorů HBV kapsidu.
- Klonování “assembly domény” wt HBV core proteinu (Cp 149), mutantu Cp Y132A, který netvoří kapsidy, ale pouze dimery a série Cp mutantů se zkrácenou RNA vazebnou doménou,
- Vývoj purifikačního průtoku pro všechny proteiny a optimalizace těchto systémů pro testování aptamerů
- Identifikace DNA motivů, které se kovalentně váží k Cp proteinům použitím *in vitro* selekce
- Testování vybraných DNA motivů na inhibici replikace HBV

Výzkumný plán a metodologie

Na začátku projektu budou nejprve připraveny různé varianty HBV core proteinu. Hlavní forma HBV kapsidu se skládá ze 120 homodimerů core proteinu, které jsou organizovány s T-4 ikosahedrál ní symetrií¹. Cp protein obsahuje 183 aminokyselin a skládá se z assembly domény (zbytky 1-149) a RNA vazebné domény, která obsahuje 34 aminokyselin a je lokalizována na C-konci. Cp dimery se mohou spontánně sbalovat a tento proces je doprovázen konformační změnou dimerů². Právě částice obsahují nukleovou kyselinu. Prázdné částice bez nukleové kyseliny mohou také skládat *in vitro* z assembly domény Cp (Cp149). Nukleační krok v procesu sbalování (assembly) je tvorba trimerů homodimerů. Jednotlivé interakce mezi dimery nejsou silné, ale jako celek vzniká stabilní struktura. Účinnost sbalování může být zvýšena vyšší teplotou a iontovou silou a porušena může být přidáním močoviny nebo např. mutací některé klíčové aminokyseliny, která je důležitá pro dimerizaci Cp.³ Například mutace tyrosinu 132 v Cp149 na alanin (Y132A) vede ke zrušení sbalování kapsidy.⁴ Důležitá vlastnost tohoto mutantu je, že přesto může tvořit trimery dimerů a tím modeluje stavební kámen sbalování kapsid⁵. Z tohoto důvodu je mutant Y132A vhodný pro počáteční testování selekce aptamerů. Tento mutant již máme k dispozici v naší laboratoři. K testování aptamerů proto nejprve připravíme dostatečné množství CpY132A mutantu. Protein bude exprimován v *E. coli* a bude probíhat optimalizace purifikačního protokolu. Kromě toho budeme optimalizovat podmínky pro skladování tohoto proteinu. Budeme zároveň hledat podmínky, které umožní připravit wt Cp149 dimer. Budeme testovat různou koncentraci močoviny a pufrů s různou iontovou silou, které zpomalí proces skládání. Tyto dimery s odlišnou konformací homodimerů budou také použity pro selekci aptamerů. Dále připravíme různé zkrácené wt Cp, které obsahují RNA vazebnou doménu. Budeme postupovat stejně, jako u předchozích mutantů. Klonování, exprese a purifikace proteinů bude prováděna skupinou Ivy Pichové.

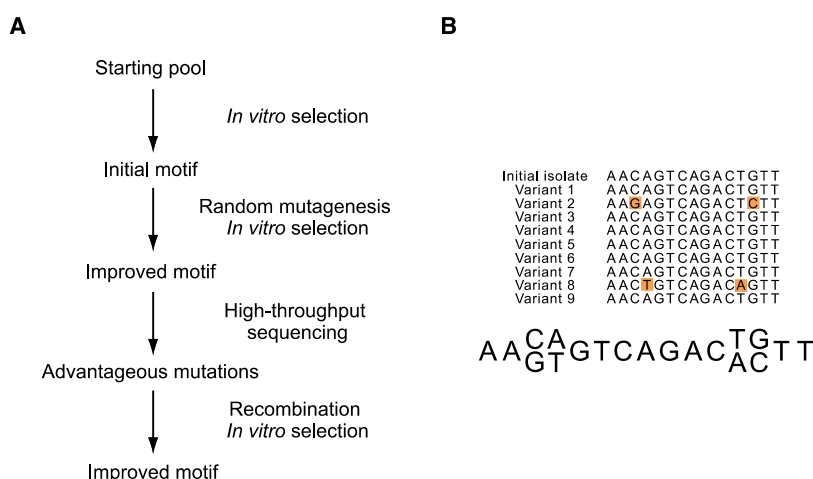
Pro každý *in vitro* selekční experiment (Figure 1) bude připravena knihovna jednořetězcových úseků DNA, které budou obsahovat randomní sekvenci a na koncích budou mít vazebná místa pro primery.



Obr. 1. Izolace DNA vazebných motivů, které se kovalentně váží k HBV core proteinu.

Kromě základní tradiční DNA knihovny budou připraveny série chemicky modifikovaných knihoven, kde bude každá DNA sekvence modifikována malým inhibitorem HBV kapsidu, který bude kovalentně vázán na 5' konec PEG spojkou. Např. to mohou být fluorescenční barva 5,50-bis[8-(phenylamino)-1-naphthalenesulfonate] nebo některé heteroaryldihydropyrimidinové látky⁶. Knihovny budou narženy ve skupině Edwarda Curtise a syntetizovány budou ve skupině Michala Hocka. Pro zvýšení pravděpodobnosti úspěšné selekce, použijeme dva způsoby testování. Jednak budeme hledat DNA motivy, které se váží ke core homodimeru, který nemůže tvořit kapsidu (CpY132A mutant) a dále k wt Cp149 dimeru. Testování s wt Cp149 umožní nalézt aptamery, které inhibují sbalování a které se jen prostě neváží k tomuto proteinu. Nejprve budou purifikovány DNA-dimerové komplexy gelovou filtrací, dále budou chromatografovány za denaturujících podmínek a budou tak získány DNA sekvence, které se kovalentně navázaly na core protein. Tyto sekvence budou amplifikovány PCR použitím obvyklého DNA primeru a druhého primeru, který obsahuje navázanou RNA na jeho 3' konci. Po základní hydrolýze budou celé molekuly purifikovány pomocí PAGE a vznikne tak materiál pro další kolo selekce. Po detekci aktivity, budou zástupci knihovny klonovány, sekvenovány a jednotlivě testovány na vazbu k Cp proteinům a inhibici skládání *in vitro*. Vazba bude také testována pomocí "thermal shift" metody a pomocí elektronové mikroskopie.

Účinné aptamery budou optimalizovány ve dvou krocích, které jsou znázorněny na Obr. 2. Nejprve bude každý motiv náhodně mutován s četností 20% na pozici a optimalizované DNA sekvence budou identifikovány pomocí *in vitro* selekce. Aktivní aptamery (10^5 zástupců) budou sekvenovány pomocí MiniSeq high-throughput přístroje, který plánujeme pořídit v rámci tohoto projektu. Tento krok usnadní stanovení sekundární struktury u sekvencí díky získání komparativní sekvenční analýze, poskytne informaci o mutacích, které ovlivňují aktivitu DNA motivů. Dále budou mutace, které se často vyskytují, synteticky rekombinovány s přibližně 10^{14} různých kombinací metodou, kterou Edward Curtis vyvinul jako student na Harvardově universitě⁷. Neaktivnější aptamery budou izolovány další *in vitro* selekcí. V předchozích experimentech, se nám podařilo tímto přístupem získat mutace u ribozymů, které prokazovaly až 1000 x vyšší aktivitu⁷. Vysokokapacitní sekvenování (high-throughput sequencing) nám poskytne výrazně více informací a proto očekáváme ještě účinnější optimalizaci.



Obr. 2. Optimalizace motivů. **A.** Postup při optimalizaci motivů. **B.** Syntetický rekombinační protokol. Hypotetické srovnání sekvencí DNA motivů získaných randomní mutagenézí počátečního isolátu a motivů z *in vitro* selekce. $\sim 10^5$ variant bude sekvenováno v každé sérii. Dole je ukázka synteticky rekombinovaných hitů navržených na základě tohoto srovnání.

V další fázi projektu bude probíhat testování těchto motivů na inhibici replikace HBV ve spolupráci s Janem Weberem z virologie. Získané varianty budou aplikovány na HepG2/NTCP infikované HBV a bude sledován jejich vliv na inhibici replikace. Kontrolní experimenty budou provedeny s nahodilými sekvencemi DNA a s malými molekulami. V případě pozitivní inhibice replikace budou probíhat další testy, které se běžně provádějí při vývoji léků. Kromě potenciálních léčiv mohou být tyto aptamery, které mohou být např. značeny fluorescenčně, použity pro detekci HBV infekce.

- [1] Wynne, S. A.; Crowther, R. A.; Leslie, A. G., The crystal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol Cell* **1999**, 3 (6), 771-780.
- [2] Selzer, L., Katen, S.P., Zlotnick, A. The hepatitis B virus core protein intradimer interface modulates capsid assembly and stability. *Biochemistry*. **2014**, 53, 5496-5504.
- [3] Ceres, P.; Zlotnick, A., Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids. *Biochemistry* **2002**, 41 (39), 11525-11531.
- [4] Bourne, C.R., Katen, S.P., Fulz, M.R., Packianathan, C., Zlotnick, A. A mutant hepatitis B virus core protein mimics inhibitors of icosahedral capsid self-assembly. *Biochemistry*. **2009**, 48, 1736-1742.
- [5] Klumpp, K.; Lam, A. M.; Lukacs, C.; Vogel, R.; Ren, S.; Espiritu, C.; Baydo, R.; Atkins, K.; Abendroth, J.; Liao, G.; Efimov, A.; Hartman, G.; Flores, O. A., High-resolution crystal structure of a hepatitis B virus replication inhibitor bound to the viral core protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, 112, 15196-15201.
- [6] Wang, Y. J.; Yang, L.; Zuo, J. P., Recent developments in antivirals against hepatitis B virus. *Virus Res.* **2016**, 213, 205-213.
- [7] Curtis, E. A.; Bartel, D. P., Synthetic shuffling and in vitro selection reveal the rugged adaptive fitness landscape of a kinase ribozyme. *RNA* **2013**, 19 (8), 1116-1128

Časový plán

2018- 2019/20

- Expres a purifikace divokého typu (wt) Cp149 a Cp Y132A mutantu.
- Optimalizace podmínek pro získání stabilních Cp dimerů pro testování.
- Klonování, exprese a purifikace zkrácených Cp v RNA vazebné doméně.
- Počáteční *in vitro* selekční experimenty.
- Optimalizace motivů randomní mutagenéz a *in vitro* selekce.
- Identifikace mutací zvyšujících aktivitu pomocí high-throughput sekvenování.
- Optimalizace motivů syntetickou rekombinací a *in vitro* selekce.
- Nabohacení a qPCR analýzy.

2020-2022

- Analýza vlivu optimalizovaných motivů na skládání HBV kapsid
- Sledování vlivu selektovaných motivů na replikaci HBV.

Plánované publikace a patenty

Publikace (Jimp)

	Jimp	
2017	0	<i>Nucleic Acids Research</i> <i>Journal of Virology</i> <i>ChemBioChem</i> <i>Chemistry & Biology</i> <i>RNA</i> <i>RNA Biology</i> <i>Journal of medicinal Chemistry</i>
2018	2	
2019	3	
2020	3	
2021	3	
2022	4	
Celkem	15	

Patenty a patentové přihlášky

	Patenty (udělené)	Mezinárodní přihlášky (podané)	<i>Očekáváme patentování v následujících směrech:</i> <i>Nové modifikované aptamery proti HBV.</i>
2017	0	0	
2018	0	0	
2019	0	0	
2020	0	0	
2021	0	1	
2022	0	0	
Celkem	0	1	

Zahraniční spolupráce

- Harvard Medical School, bioinformatická analýza dat z high-throughput sekvenování
- Gilead Sciences, vývoj potenciálních DNA motivů pro klinické použití