



Universiteit
Leiden
The Netherlands

A competitive binding assay for RNA ligand discovery

Wintermans, S.E.L.

Citation

Wintermans, S. E. L. (2026, February 24). *A competitive binding assay for RNA ligand discovery*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4292805>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4292805>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Appendices

Nederlandse samenvatting

Curriculum vitae

List of publications

Acknowledgements

Nederlandse samenvatting

Een competitive binding assay voor het ontdekken van nieuwe RNA liganden

Hoofdstuk 1 geeft een algemene introductie van het werk dat wordt besproken in deze thesis. De introductie begon met een overzicht van de soorten RNA die aanwezig zijn in menselijke cellen, virussen en bacteriën, waarbij ook de verschillende functies van de RNAs werden besproken. Daarna werd er dieper ingegaan op de structuur van RNA, met een focus op zowel de moleculaire structuur als de verschillende niveaus van structurele complexiteit die RNA kan aannemen. Specifieke complexe structuren relevant voor deze thesis, genaamd pseudoknopen en G-quadruplexen, werden belicht. Hierna werd zowel de rol van RNAs in ziekten, de inspanningen om medicijnen tegen defecte RNAs te ontwikkelen en de medicijnen die er op dit moment bestaan, besproken. De focus lag daarbij op een veelbelovende categorie van medicijnen tegen RNA, de zogenaamde 'kleine moleculen'. Ook werden testmethoden om nieuwe kleine moleculen te ontdekken uitgelicht. Er werd benadrukt dat de huidige methoden niet volledig toereikend zijn voor complexe RNA structuren, en dat in deze thesis een nieuwe testmethode, de competitive binding assay (CB ASsay), is ontwikkeld.

Hoofdstuk 2 beschrijft de ontwikkeling van de CB ASsay om liganden te identificeren voor de bacteriële PreQ₁-I riboswitch, een RNA pseudoknoop die kan dienen als doelwit voor medicijnontwikkeling. Deze riboswitch reguleert de synthese van Queuosine (Q), een belangrijke gemodificeerde guaninebase in tRNA die nodig is voor de correcte vertaling van bepaalde codons in mRNA. De CB ASsay werd aanvankelijk ontwikkeld voor de PreQ₁ riboswitch van de *Fusobacterium nucleatum* (*Fnu*) bacterie. Er was speciale aandacht voor de selectie van een geschikte antisense oligonucleotide (ASO) om een balans te vinden tussen een goede signaal-ruisverhouding en een passende gevoeligheid van de assay. Deze balans werd geëvalueerd met behulp van het natuurlijke riboswitch-ligand PreQ₁ en diverse analogen met bekende bindingsaffiniteit als referentie. Na succesvolle selectie van de ASO tegen de *Fnu* PreQ₁ riboswitch werd de CB ASsay ook ontwikkeld voor de PreQ₁-I riboswitches van de *Thermoanaerobacter tengcongensis* (*Tte*), *Bacillus subtilis* (*Bsu*) en *Enterococcus faecalis* (*Efa*) bacteriën. Bovendien werden een frameshift-testmethode en een translatiepreventie-testmethode ontwikkeld om te analyseren welke invloed de liganden hebben op de stabiliteit van de pseudoknoop en de regulatie van genen. Alles bij elkaar leveren de in dit hoofdstuk ontwikkelde methodes een uitgebreid screeningsplatform op om liganden te vinden die PreQ₁-I riboswitches targeten.

In **Hoofdstuk 3** werd de ontwikkelde CB ASsay gebruikt voor een 'high-throughput screening' ('HTS') van de commerciële Enamine RNA-gerichte bibliotheek (bestaande uit 15.520 moleculen) tegen de *Fnu* PreQ₁ riboswitch, waaruit vier hits met competitieve bindingsactiviteit naar voren kwamen. Deze hits werden geëvalueerd in *in vitro* translatiepreventie-testmethodes tegen verschillende PreQ₁ riboswitches. De meest veelbelovende hit, **4494**, liet competitieve bindingsactiviteit zien met de *Fnu*, *Tte*, *Bsu* en *Efa* riboswitches en was in staat de translatie van een door de *Tte* riboswitch-gereguleerd reporter-gen te remmen, waardoor het werd beschouwd als een interessant beginpunt voor de ontwikkeling van nieuwe antibiotica. Met behulp van moleculaire docking werd een kleine bibliotheek van **4494**-analogen rationeel ontworpen en gesynthetiseerd, maar deze bleken in alle methodes inactief. Her-synthese van **4494** toonde aan dat **4494** zelf niet de actieve verbinding was, maar dat het een actieve onzuiverheid bevatte, wat een ~1% guanine-vervuiling bleek te zijn. Hoewel guanine geen therapeutisch relevant molecuul is, laat deze bevinding zien dat de CB ASsay zeer gevoelig is en geschikt is om liganden te vinden voor complexe RNA-structuren, wat het een belangrijke aanvulling maakt op de RNA-targeting gereedschapskist.

Hoofdstuk 4 beschrijft de ontwikkeling van de CB ASsay voor de SARS-CoV-2 frameshifting pseudoknoop en laat zien dat de methode kan worden toegepast op andere therapeutisch relevante RNA-pseudoknopen. De frameshifting pseudoknoop speelt een belangrijke rol in de levenscyclus van het coronavirus door de expressie van de RNA-afhankelijke RNA-polymerase te reguleren. Stabilisatie of destabilisatie van de pseudoknoop met kleine moleculen wordt verondersteld dit proces te beïnvloeden en virale replicatie te verstoren. Voor de ontwikkeling van de CB ASsay werd de selectie van een geschikte ASO geleid door het in Hoofdstuk 2 ontwikkelde 80%-bindingscriterium, aangezien er geen reeds bestaande liganden beschikbaar waren om de assay mee te kalibreren. Vervolgens werden twee bibliotheken gescreend tegen de frameshifting pseudoknoop. Uit de Enamine RNA-gerichte bibliotheek werden twee hits geïdentificeerd, die helaas onspecifieke binding lieten zien aan ofwel de PreQ₁ riboswitch ofwel tRNA uit gist. De screening werd daarom uitgebreid naar de European Lead Factory (ELF) bibliotheek, bestaande uit 177.709 moleculen, waaruit 25 hits gevonden waren. Hoewel de hits verdere analyse vereisen, bewijst dit hoofdstuk dat de CB ASsay kan worden toegepast op RNA structuren zonder positieve controle-liganden en dat de methode geschikt is voor zeer hoge throughput. Bovendien laat dit hoofdstuk zien dat de CB ASsay kan worden ingezet om zowel PK-stabilisatoren als -destabilisatoren te detecteren, wat de veelzijdigheid van de methode benadrukt.

Nederlandse samenvatting

In **Hoofdstuk 5** werd de zoektocht naar antivirale medicijnen tegen SARS-CoV-2 uitgebreid door het targeten van een G-quadruplex (GQ)-structuur beginnend bij positie 3467 van het SARS-CoV-2 genoom (GQ-3467). Stabilisatie van GQ-3467 met kleine moleculen kan virale transcriptie en translatie op meerdere stadia van de virale levenscyclus verstoren, waardoor het een uitstekend doelwit vormt voor geneesmiddelen. De ontwikkeling van de CB Assay tegen een GQ-structuur was uitdagend, omdat GQ-liganden vaak grote geconjugeerde π -systemen hebben die interfereren met de fluorescentiemetingen. Het probleem van deze interferentie werd omzeild door de ASO te labelen met de fluorofoor en GQ-3467 met de quencher. De CB Assay werd gevalideerd met vijf bekende GQ-liganden en vervolgens gebruikt om de Enamine RNA-gerichte bibliotheek te screenen, waaruit zes hits werden geïdentificeerd. Grondige beoordeling van de hit-specificiteit tegen GQ-sequenties (DNA- en RNA-GQ's) en tegen niet-GQ-structuren (de PreQ₁ riboswitch, SARS-CoV-2 frameshifting PK, tRNA uit gist en repetitieve DNA-sequenties) toonde aan dat de analogen **5344** en **5396** de meest selectieve liganden waren voor GQ-3467, terwijl **8476** het beste algemene GQ-ligand was. Ondanks onduidelijkheid over de bindingsmodus van de liganden, konden **5344** en **5396** *in vitro* frameshifting bevorderen en translatie remmen, wat bewijst dat deze moleculen biologische processen kunnen beïnvloeden door stabilisatie van een RNA-structuur, vermoedelijk een GQ. Het potentieel van de hits zal in verder onderzoek worden bepaald, bijvoorbeeld door het verduidelijken van hun bindingsmodus en het onderzoeken van hun antivirale activiteit. In conclusie, dit hoofdstuk laat zien dat de CB Assay toepasbaar is op diverse complexe RNA-structuren en dat deze ook kan worden gebruikt voor hit-karakterisatie-testmethodes, bijvoorbeeld om ligand-specificiteit te beoordelen.

Hoofdstuk 6 geeft een overzicht van de resultaten uit dit proefschrift en geeft aanbevelingen voor toekomstige onderzoeksrichtingen.