



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The design of transcription factor-based inhibitors to target Myc: drop the Myc!

Ellenbroek, B.D.

Citation

Ellenbroek, B. D. (2026, June 10). *The design of transcription factor-based inhibitors to target Myc: drop the Myc!*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4305022>

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/1887/4305022>

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

Nederlandse samenvatting

Het uitschakelen van de transcriptie factor (TF) Myc staat centraal in dit proefschrift. TFs zijn DNA bindende eiwitten en staan vaak bij de ontwikkeling van een ziekte centraal. Het is daarom belangrijk om onderzoek te doen naar aan ziektegerelateerde TFs. Myc is een schoolvoorbeeld van een TF die betrokken is bij de ontwikkeling van ziektes. Het is bijvoorbeeld bij meer dan 50% van alle kankertypes betrokken. Echter, het is erg lastig om Myc uit te schakelen. Myc is intrinsiek ongeordend en vormt alleen een stabiel eiwitstructuur in complex met zijn eiwitpartner Max. Zonder een stabiele structuur is het erg lastig om Myc specifiek te kunnen herkennen en uit te schakelen.

Dit proefschrift onderzoekt meerdere mogelijkheden om Myc uit te schakelen. Met behulp van kristalstructuren, kunstmatige intelligentie en eiwit expressie worden er nieuwe transcriptieremmers ontworpen, gesynthetiseerd en getest tegenover Myc. Enerzijds worden er technieken behandeld die de DNA-sequentie blokkeren waar Myc normaal gesproken aan bindt. Anderzijds wordt er besproken hoe de Myc/Max interactie geblokkeerd kan worden doormiddel van een derde eiwit.

In **Hoofdstuk 1** wordt achtergrondinformatie verstrekt dat de basis vormt voor het idee achter het onderzoek en dat dieper in gaat op het hoofddoelwit van dit proefschrift: Myc. Het hoofdstuk begint met een algemene introductie over TFs. Deze eiwitfamilie is belangrijk voor het activeren en inactiveren van genen. Echter, zijn ze ook vaak betrokken bij de ontwikkeling van ziektes, zoals kanker. Aangezien TFs veelal geen stabiele structuur hebben en diep in de celkern hun functie uitvoeren zijn het lastige eiwitten om uit te schakelen. In de introductie wordt een vaak gebruikte strategie besproken om TFs te inhiberen: het gebruik van peptiden en hoe deze gebruikt kunnen worden om TFs uit te schakelen, bijvoorbeeld door kunstmatige TFs te ontwerpen. Kunstmatige TFs zijn vaak gebaseerd op hun natuurlijke tegenhanger en kunnen daarom dezelfde DNA-sequentie binden en daarmee blokkeren. Naast verschillende ontwerpstrategieën om moeilijkheden te overbruggen wordt er ook dieper ingegaan op de biologische functie van de oncologische TF Myc en welke strategieën er al zijn ontwikkeld om Myc uit te schakelen. Alles bij elkaar genomen verstrekt dit hoofdstuk de informatie en wetenschappelijke context dat ten grondslag ligt aan dit proefschrift.

Hoofdstuk 2 gaat dieper in op het gebruik van peptiden om aan ziektegerelateerd DNA en RNA te beïnvloeden. Een voordeel dat peptiden hebben tegenover het

gebruik van ‘kleine moleculen’, is dat peptiden meerdere conformaties aan kunnen nemen waardoor ze efficiënter grote en lastig te herkennen DNA of RNA-oppervlaktes kunnen onderscheiden. Er wordt ingegaan op verschillende strategieën om deze peptiden te identificeren. Het screenen van grote bibliotheken vergroot de kans om werkzame peptiden te vinden. Daarnaast worden ‘op structuur-gebaseerde studies’ besproken die succesvol peptiden of mini-eiwitten hebben ontworpen. Ook wordt het gebruik van post-synthetische peptide modificatie besproken. Vaak worden peptiden gecycliseerd of in hun actieve conformatie gehouden doormiddel van de *staple* techniek. Deze techniek houdt in dat twee zijketens van aminozuren covalent aan elkaar worden gebonden waardoor de actieve conformatie in stand blijft. De bevindingen van dit hoofdstuk geven extra context voor het onderzoek dat wordt besproken in dit proefschrift.

In **Hoofdstuk 3** wordt een op structuur-gebaseerde studie toegepast om Myc uit te schakelen. In dit hoofdstuk beschrijven wij het ontwerpproces om van een kristalstructuur naar een mini-eiwit te komen dat in staat is om Myc uit te schakelen. Als startpunt werd de kristalstructuur van *Omomyc* gebruikt. *Omomyc* is volgens de literatuur in staat om Myc uit te schakelen, maar heeft een groot obstakel: het binnendringen van de cel. Onze hypothese was dat voornamelijk de grootte van *Omomyc* het binnendringen belemmerd. In dit onderzoek hebben wij meerdere varianten van verschillende groottes van *Omomyc* gemaakt. Doormiddel van biochemische experimenten hebben wij aangetoond dat enkel het domein dat DNA bindt niet voldoende is om een stabiel DNA/eiwit complex te vormen, maar dat er een extra domein nodig is voor verhoogde stabiliteit en affiniteit. Dit mini-eiwit, dat we *DuoMYC* hebben genoemd, bleek in staat te zijn om cellen binnen te dringen, Myc te inactiveren en kanker gerelateerde signaalcascades te beïnvloeden.

Hoofdstuk 4 gaat een stap verder omtrent het gebruik van de kristalstructuur van *Omomyc*. Naast het verkleinen van eiwitten, kan ook het inbrengen van *staples* er voor zorgen dat eiwitten efficiënter een cel binnendringen. Normaal gesproken kunnen gezuiverde eiwitten snel hun secundaire en tertiaire structuur verliezen. Dit is niet het geval voor *Omomyc* of zijn familieleden. Deze eiwitten hebben de karakteristieke eigenschap om de correcte secundaire structuur te vormen wanneer ze in contact komen met eiwitpartners. In **Hoofdstuk 4** proberen wij deze eigenschap in ons voordeel te gebruiken. Hier hebben wij varianten van *Omomyc* tot expressie gebracht in bacteriën om ze vervolgens vast te zetten in hun actieve conformatie door middel van de *staple* techniek. Deze techniek hebben wij de *ReCHEMbinant* techniek genoemd. *ReCHEMbinant* stelt de gebruiker in staat om makkelijk vouwende eiwitten met behulp van bacteriën te maken, te modificeren en te stabiliseren terwijl het eiwit zijn functie kan behouden. Als voorbeeld hebben wij *Omomyc* gemodificeerd tot *HeloMYC*. *HeloMYC*, was succesvol gesynthetiseerd en was in staat de cel binnen te dringen, Myc te inactiveren en kanker gerelateerde signaalcascades te beïnvloeden. Daarbij bleken de gemodificeerde eiwitten stabielere dan het origineel.

In **Hoofdstuk 5** benaderen we Myc inhibitie vanaf een andere kant. In dit hoofdstuk blokkeren we niet de DNA-sequentie van Myc, maar de interactie tussen Myc en Max. Met behulp van AlphaFold-Multimer analyseerden wij de interactie tussen Myc en een ander eiwitpartner: Miz-1. AlphaFold-Multimer voorspelt hoe eiwitten met elkaar interactie aan kunnen gaan aan de hand van de primaire aminozuur sequentie. De voorspelling van AlphaFold-Multimer kwam overeen met wat bekend is in de literatuur. Dit stelde ons in staat om een op Miz-1 gebaseerde Myc binder, *Mizmetic*, te ontwerpen. Biochemische experimenten valideerden de interactie tussen Myc en *Mizmetic* en de incorporatie van een *staple* resulteerde in een verhoogde affiniteit. Bovendien werden posities geïdentificeerd in *Mizmetic* die van essentieel belang zijn voor de interactie tussen Myc en *Mizmetic*. Ook werden mutaties geïdentificeerd, die verklaard konden worden door de AlphaFold voorspelling, die een versterkend effect hadden op de interactie tussen Myc en *Mizmetic*. Deze mutanten waren in staat om de interactie tussen Myc/Max/DNA te blokkeren. Ook konden sommigen beter onderscheid maken tussen Myc/Max en Max/Max.

In **Hoofdstuk 6** worden de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift samengevat. Het minimaliseren of het stabiliseren van de *Omomyc* sequentie hebben geresulteerd in nieuwe Myc remmers. Ook het gebruik van kunstmatige intelligentie heeft geleid tot een nieuwe Myc remmer. De nieuwe ontwerpen en ontwerpstrategieën dragen bij aan het arsenaal om Myc uit te kunnen schakelen en dichterbij een remedie te komen. Ook wordt vervolgonderzoek besproken. Bijvoorbeeld hoe *DuoMYC* gebruikt kan worden om andere aan ziektegerelateerde TFs uit te schakelen. Ook wordt besproken hoe de *ReCHEMbinant* techniek gebruikt kan worden voor onderzoek naar intrinsiek ongeordende eiwitten en welke methodes er nog meer zijn om Myc uit te kunnen schakelen. Het proefschrift benadrukt daarmee zijn toegevoegde waarde in het onderzoeksveld van zowel Myc als intrinsiek ongeordende eiwitten.

Het gehele proefschrift bij elkaar genomen biedt een samenhangend geheel van rationeel ontworpen kunstmatige TFs tot aan het gebruik van kunstmatige intelligentie voor peptide ontwerp, altijd met Myc in het middelpunt. Zolang er geen remedie is ontwikkeld tegen Myc is het van belang om onderzoek te doen naar dit eiwit. Het onderzoek kan ook breder getrokken worden naar andere TFs en ongeordende eiwitten. De bevonden resultaten in dit proefschrift kunnen aan dit onderzoek bijdragen.

