

Δελτίο Τύπου

Τροποποιημένα βακτήρια για την ανακάλυψη νέων φαρμάκων

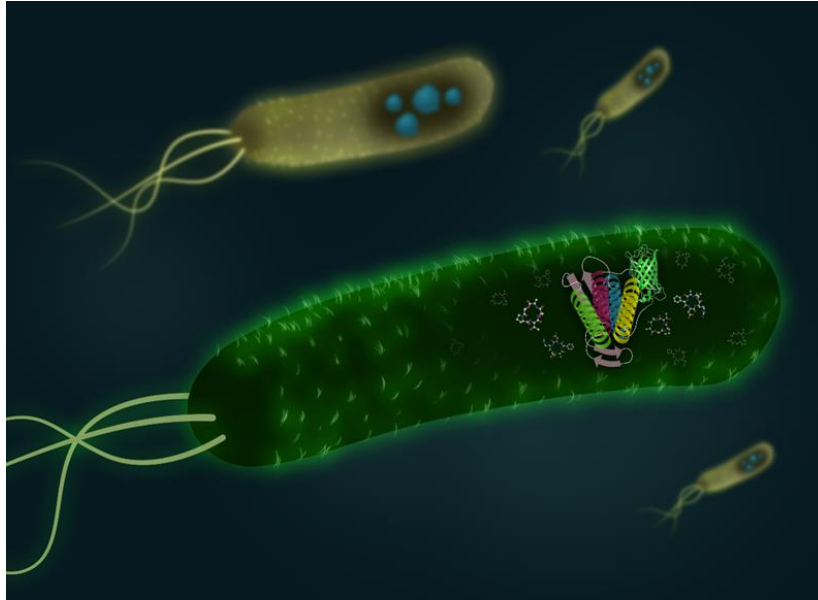


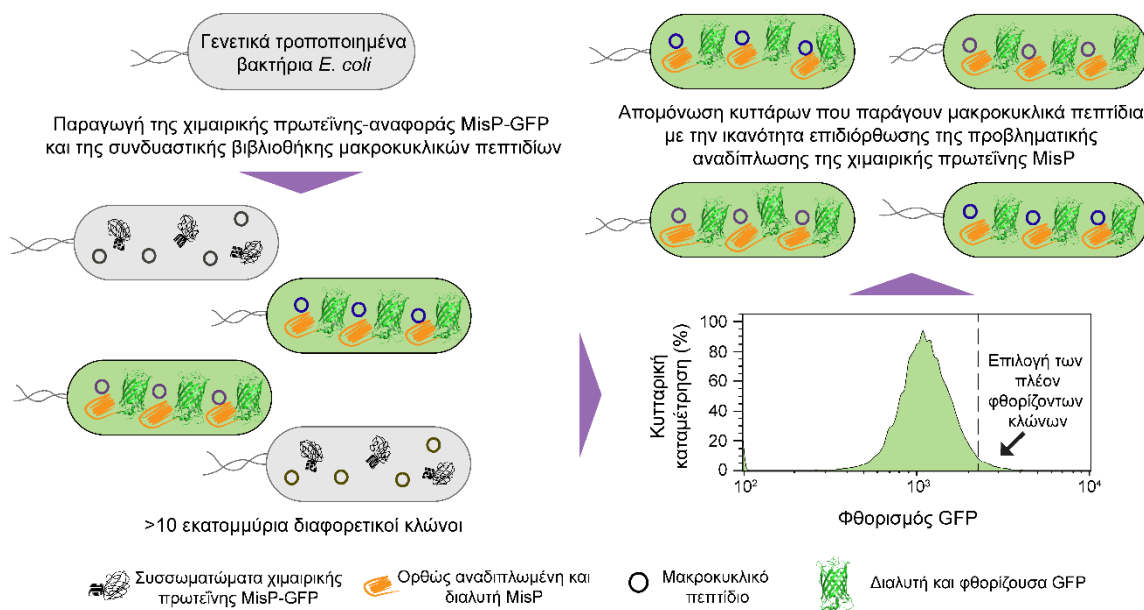
Illustration by John Chaniotis

Αθήνα, 24.10.2017

Μελέτες των τελευταίων ετών έχουν δείξει ότι ένα πλήθος νευροεκφυλιστικών ασθενειών, όπως η νόσος Alzheimer, η νόσος Huntington, η νόσος Parkinson, ορισμένες μορφές της αμυατροφικής πλευρικής σκλήρυνσης κ.α., χαρακτηρίζονται από ένα κοινό μοριακό φαινόμενο: την προβληματική αναδίπλωση συγκεκριμένων πρωτεϊνών και τη συσσώρευση παθογόνων ολιγομερών/συσσωματωμάτων των πρωτεϊνών αυτών σε συγκεκριμένες περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος. Παρόλο το τεράστιο κοινωνικο-οικονομικό τους αντίκτυπο, οι νευροεκφυλιστικές παθήσεις παραμένουν σήμερα ανίατες στο σύνολό τους. Μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την ανάπτυξη νέων φαρμάκων κατά των σοβαρών αυτών καταστάσεων είναι η ανακάλυψη μικρών μορίων με την ικανότητα να αποτρέπουν τη δημιουργία νευροτοξικών πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων. Ερευνητές του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας (ΙΒΦΧΒ) του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ), με επικεφαλής το Δρ. Γεώργιο Σκρέτα, κατασκεύασαν γενετικά τροποποιημένα βακτήρια που επιτυγχάνουν την εύκολη και γρήγορη ανακάλυψη εν δυνάμει θεραπευτικών μορίων κατά σοβαρών νευροεκφυλιστικών παθήσεων. Τα τροποποιημένα αυτά βακτήρια *Escherichia coli* έχουν την ικανότητα να βιοσυνθέτουν μεγάλες συνδυαστικές βιβλιοθήκες δεκάδων ή εκατοντάδων εκατομμυρίων διαφορετικών μακροκυκλικών πεπτιδίων και, ταυτόχρονα, να ανιχνεύουν τα βιοδραστικά μόρια με την ικανότητα να επιδιορθώνουν την

προβληματική αναδίπλωση των πρωτεϊνών-στόχων χρησιμοποιώντας ένα σύστημα σάρωσης υπερυψηλής ρυθμαπόδοσης (ultrahigh-throughput screen) (Σχήμα 1). Η ανάπτυξη της συγκεκριμένης τεχνολογίας και η εφαρμογή αυτής για την ανακάλυψη εν δυνάμει θεραπευτικών μορίων κατά της νόσου Alzheimer και της αμυατροφικής πλευρικής σκλήρυνσης δημοσιεύθηκαν στο τεύχος Οκτωβρίου 2017 της επιθεώρησης **Nature Biomedical Engineering**.

Έχοντας ως στόχο την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών για την ανακάλυψη φαρμάκων κατά των νευροεκφυλιστικών καταστάσεων που σχετίζονται με προβληματική πρωτεϊνική αναδίπλωση, η ερευνητική ομάδα του Δρ. Γεωργίου Σκρέτα επέλεξε να εκμεταλλευθεί τις εντυπωσιακές βιοσυνθετικές ικανότητες των απλών μικροβιακών κυττάρων. Για την ανάπτυξη μιας τεχνολογίας που θα επιτρέπει την όσο πιο εύκολη, γρήγορη και αποτελεσματική ανακάλυψη εν δυνάμει θεραπευτικών μορίων, οι ερευνητές εφήρμοσαν μια νέα προσέγγιση Συνθετικής Βιολογίας για την κατασκευή τροποποιημένων βακτηριακών κυττάρων *E. coli* που να μπορούν να επιτελούν αποτελεσματικά δύο σύνθετες λειτουργίες: (1) να παράγουν βιοσυνθετικά έναν πολύ μεγάλο αριθμό διαφορετικών ενώσεων (δεκάδες ή και εκατοντάδες εκατομμύρια διαφορετικά μόρια), και, ταυτόχρονα, (2) να έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν γρήγορα και εύκολα τα σπάνια εκείνα βιοδραστικά μόρια με την ικανότητα να αποτρέπουν τη δημιουργία νευροτοξικών συσσωματωμάτων των πρωτεϊνών-στόχων.



Σχήμα 1: Αναπαράσταση του βακτηριακού συστήματος ανακάλυψης χημικών επιδιορθωτών της προβληματικής αναδίπλωσης και συσσωμάτωσης προβληματικά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών που σχετίζονται με ανθρώπινες νευροεκφυλιστικές παθήσεις (misfolding-prone proteins, MisP).

Εφαρμόζοντας τη συγκεκριμένη τεχνολογία, οι ερευνητές του ΕΙΕ παρήγαγαν και σάρωσαν μια συνδυαστική βιβλιοθήκη >10 εκατομμυρίων μακροκυκλικών μορίων για τον εντοπισμό ενώσεων που αποτρέπουν τη δημιουργία νευροτοξικών συσσωματωμάτων του β-αμυλοειδούς πεπτιδίου (Αβ), τα οποία εμπλέκονται στην παθολογία της νόσου Alzheimer. Από τη διαδικασία αυτή εντοπίστηκαν δεκάδες διαφορετικά μόρια με την ικανότητα να αποτρέπουν τη συσσωμάτωση του Αβ στα βακτήρια. Δύο από τα μόρια αυτά, τα οποία ονομάστηκαν ΑβC5-34 και ΑβC5-116, συντέθηκαν χημικά και μελετήθηκαν διεξοδικά μέσω μιας πληθώρας βιοχημικών, βιοφυσικών, υπολογιστικών, και βιολογικών αναλύσεων, σε συνεργασία με άλλα εργαστήρια του ΙΒΦΧΒ-ΕΙΕ, του Εθνικού Κέντρου Έρευνας Φυσικών Ερευνών «Δημόκριτος», του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και άλλων ερευνητικών φορέων της χώρας. Από τις μελέτες αυτές βρέθηκε ότι οι ενώσεις ΑβC5-34 και ΑβC5-116 αναστέλλουν τη φυσιολογική πορεία της συσσωμάτωσης του Αβ και τη δημιουργία αμυλοειδών ινιδίων αυτού, οδηγώντας στο σχηματισμό πρωτεϊνικών ειδών του Αβ με μειωμένη ικανότητα να προσδένονται στη νευρωνική επιφάνεια και μειωμένα επίπεδα κυτταροτοξικότητας *in vitro* και *in vivo*. Στη συνέχεια, η ερευνητική ομάδα εφήρμοσε την ίδια προσέγγιση για την ανίχνευση χημικών επιδιορθωτών της προβληματικής αναδίπλωσης μιας μεταλλαγής του ανθρώπινου ενζύμου Cu/Zn δισμουτάση του υπεροξειδίου (Cu/Zn superoxide dismutase, SOD1), το οποίο εμπλέκεται στην παθολογία ορισμένων μορφών της αμιατροφικής πλευρικής σκλήρυνσης, μιας σοβαρής νευροεκφυλιστικής παθήσεως των κινητικών νευρώνων, και εντόπισε το μακροκυκλικό μόριο SOD1C5-4 που αναστέλλει αποτελεσματικά και εξειδικευμένα της συσσωμάτωσης της μεταλλαγμένης SOD1.

Η νέα αυτή τεχνολογία προσφέρει μια σειρά από σημαντικά πλεονεκτήματα. Πρώτον, τόσο η διαδικασία παραγωγής των υπό αξιολόγηση ενώσεων, όσο και η διαδικασία σάρωσής τους για την εύρεση των βιοδραστικών μορίων λαμβάνει χώρα μέσα σε ένα απλό βακτηριακό κύτταρο-ξενιστή και, επομένως, η ευκολία και η ταχύτητα της όλης διεργασίας είναι ύψιστη. Δεύτερον, επιτρέπει την παραγωγή και μελέτη ενός πολύ μεγάλου αριθμού διαφορετικών μορίων, αυξάνοντας έτσι σημαντικά τις πιθανότητες να εντοπιστούν αποτελεσματικές ενώσεις με τις επιθυμητές βιολογικές δράσεις. Τρίτον, παράγει και αξιολογεί βιβλιοθήκες μορίων, οι οποίες είναι απολύτως πρωτότυπες και δεν έχουν παραχθεί και μελετηθεί από άλλους ερευνητές στο παρελθόν. Έτσι, τα βιοδραστικά μόρια που προκύπτουν είναι δομικά πρωτότυπα και θα αποτελούν νέες μοριακές οντότητες χωρίς περιορισμούς διανοητικής ιδιοκτησίας για τη χρήση τους. Το χαρακτηριστικό αυτό αυξάνει σημαντικά την ελκυστικότητα των συγκεκριμένων μορίων για εμπορική αξιοποίηση από τη φαρμακευτική βιομηχανία. Τέταρτον, η διαδικασία λειτουργικής σάρωσης για την ανίχνευση των βιοδραστικών μορίων πραγματοποιείται με ένα πλήρως τυχαιοποιημένο τρόπο, χωρίς να είναι απαραίτητη προϋπόθεση ο

προηγούμενος δομικός χαρακτηρισμός των ολιγομερών/συσσωματωμάτων των πρωτεϊνών-στόχων και χωρίς να χρειάζεται να γίνουν *a priori* υποθέσεις για πιθανά σημεία πρόσδεσης των υπό εξέταση ενώσεων στις πρωτεΐνες-στόχους. Τέλος και σημαντικότερα, διαφαίνεται ότι η συγκεκριμένη μεθοδολογία μπορεί να αποτελέσει μια τεχνολογία-πλατφόρμα ανακάλυψης πιθανών νέων φαρμάκων, μια τεχνολογία δηλαδή που δεν είναι εφαρμόσιμη μόνο για μία συγκεκριμένη ασθένεια, αλλά η οποία μπορεί εύκολα να προσαρμοστεί για την ανακάλυψη εν δυνάμει θεραπευτικών ενώσεων για πλήθος ασθενειών που χαρακτηρίζονται από προβληματική πρωτεϊνική αναδίπλωση (protein misfolding diseases). Τέτοιου είδους ασθένειες έχει βρεθεί μέχρι σήμερα ότι είναι πάνω από 50, ενώ στην συντριπτική τους πλειοψηφία παρεμένουν ανίατες.

Σχολιάζοντας τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας σε σχετικό άρθρο "News & Views" στο *Nature Biomedical Engineering*, ο Καθ. Frederic Rousseau από το Πανεπιστήμιο KU Leuven του Βελγίου αναφέρει ότι «Η εργασία των Σκρέτα και συνεργατών αποτελεί ένα παράδειγμα των δυνατοτήτων που προσφέρουν οι συνδυαστικές προσεγγίσεις υψηλής ρυθμαπόδοσης (high-throughput), οι οποίες είναι ταυτόχρονα απλές και αποτελεσματικές. Για [τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με] τις νευροεκφυλιστικές νόσους, και για τις ασθένειες που χαρακτηρίζονται από τη συσσώρευση αμυλοειδών συσσωματωμάτων γενικά, οι δομικές πληροφορίες για τα (πρώιμα) τοξικά συσσωματώματα είναι σπάνιες ή ανύπαρκτες, κάνοντας έτσι τις προσεγγίσεις [ανακάλυψης νέων φαρμάκων] που βασίζονται σε μοντελοποίηση δύσκολες ή αδύνατες. Αντίθετα, προσεγγίσεις όπως αυτές των Σκρέτα και συνεργατών δεν απαιτούν καμμία δομική ή ακόμα και μηχανιστική γνώση, αλλά στηρίζονται απλά σε μία ενδοκυτταρική λειτουργική δοκιμή για τον εντοπισμό των μορίων με την επιθυμητή βιολογική δράση». Τελειώνοντας αναφέρει ότι «Η ανάπτυξη μεθόδων σάρωσης σαν αυτή που παρουσιάστηκε από τους Σκρέτα και συνεργάτες ... παρέχει συναρπαστικές ευκαιρίες για την ανακάλυψη νέων θεραπευτικών μορίων για τις ασθένειες αυτές, καθώς και για την ανάπτυξη στρατηγικών που σταθεροποιούν τις αναδιπλωμένες πρωτεϊνικές διαμορφώσεις ή που αναστέλλουν την κινητική της συσσωμάτωσης προβληματικά αναδιπλωμένων πρωτεϊνών».

Σημειώνεται ότι τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εργασίας έχουν ήδη οδηγήσει σε δύο (2) αιτήσεις για διεθνή διπλώματα ευρεσιτεχνίας, ενώ μέχρι στιγμής έχουν αποσπάσει συνολικά και πέντε (5) βραβεία καλύτερης παρουσίασης σε συνέδρια στην Ελλάδα και το εξωτερικό, συμπεριλαμβανομένων των "EMBO Conference on Molecular chaperones: From molecules to cells and misfolding diseases" (<http://events.embo.org/15-chaperone/>) και "3rd Symposium on Non-Globular Proteins in Molecular Pathophysiology" (<http://ngp-net17.saske.sk/>). Τέλος, οι ερευνητές του ΕΙΕ έχουν ξεκινήσει προσπάθειες

προκλινικής ανάπτυξης των μορίων που έχουν ανακαλυφθεί μέσω της συγκεκριμένης τεχνολογίας, με σκοπό την εμπορική αξιοποίησή τους.

Αναφορά Επιστημονικού Άρθρου:



“An integrated bacterial system for the discovery of chemical rescuers of disease-associated protein misfolding”

Ilias Matis, Dafni Chrysanthi Delivoria, Barbara Mavroidi, Nikoletta Papaevgeniou, Stefania Panoutsou, Stamatia Bellou, Konstantinos D. Papavasileiou, Zacharoula I. Linardaki, Alexandra V. Stavropoulou, Kostas Vekrellis, Nikos Boukos, Fragiskos N. Kolisis, Efstathios S. Gonos, Marigoula Margarity, Manthos G. Papadopoulos, Spiros Efthimiopoulos, Maria Pelecanou, Niki Chondrogianni, Georgios Skretas*

Nature Biomedical Engineering. 1 838-852 (2017)

DOI: 10.1038/s41551-017-0144-3

<https://www.nature.com/articles/s41551-017-0144-3>

Σχολιασμός News & Views:

“Identifying rescuers of misfolding”

Tobias Langenberg, Joost Schymkowitz & Frederic Rousseau

Nature Biomedical Engineering. 1 782-783 (2017)

<https://www.nature.com/articles/s41551-017-0149-y>

*Επικοινωνία:

Δρ. Γεώργιος Σκρέτας

Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας

Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

Λεωφόρος Βασιλέως Κωνσταντίνου 48, 11635 Αθήνα

Τηλ: 210 7273 736

Email: gskretas@eie.gr