



All. 1

Title: *Isolation of high-affinity RNA aptamer(s) to inhibiting MYCN RNA binding activity*

Introduction

Neuroblastoma (NB) is a tumor of the sympathetic nervous systems that substantially contributes to childhood cancer mortality despite the complex multimodality of current treatments.

MYCN oncogene encodes a transcription factor which is a master regulator of many processes in development, physiology, and oncogenesis. Its enhanced activity in NB, due to gene amplification and overexpression, promotes tumorigenesis, sustain an aggressive tumor phenotype and progression of the disease through aberrant transcription activation of hundreds target genes.

MYCN amplification is found in about 25% of NB cases with severe clinical implications.

Therefore, these patients having a longtime survival rate below 50% fall in the high-risk stratification group. Moreover, deregulated *MYCN* drives an immunosuppressive tumor microenvironment (TME) and plays a key role as a mediator of drug resistance.

The design of novel therapies targeted to specific molecular alterations in NB becomes imperative, especially for high-risk patients who are burdened by metastatic disease and chemo-resistant relapse. Despite *MYCN* is still deemed ‘undruggable’, given its pivotal role as orchestrator of molecular networks in NB, it remains the most coveted target.

Attempts to specifically and directly target *MYCN* mostly failed or partially succeeded. Indirect approaches may achieve a sufficient global antitumor activity mostly due to the effects of a given therapeutic compound acting on closely related oncogenic pathways. But the *MYCN* oncoprotein levels remain high enough to exert detrimental effects. Interestingly, a recent study by Eilers and collaborators has shown that the amino-terminal regions of *MYCN* possesses a RNA binding activity that under certain circumstances (i.e.: stalling of the transcriptional fork) can bind the intron of the nascent mRNA and induces its degradation. In the context of amplified *MYCN*, one speculation is that such activity may erroneously induce degradation of critical transcripts required to prevent oncogenesis such as tumor suppressor genes. In this project, the successful candidate will identify and isolate high-affinity RNA aptamers that can inhibit *MYCN* RNA binding activity. Anti-*MYCN* Aptamer therapeutic activity will be validate in *MYCN* amplified NB cell lines.

Planning of activities

1) *Isolation of high-affinity RNA aptamer(s) to inhibiting MYCN RNA binding activity.* The *MYCN* domain (amino acids 1-154), carrying the RNA binding activity, will be expressed as a His6-tagged protein using the Baculovirus system in insect Sf21 cells. The purified protein will be tested in Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for specific binding to a UG-rich RNA template (25), to determine the optimal experimental conditions for performing Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) For the SELEX approach, we will employ the Sel2N20 library, carrying a variable region of 20 nucleotides (71, 72). RNAs synthesized will be purified and incubated with the His6-tagged *MYCN* domain. Several rounds of selection, along with DNA sequencing, will be conducted until only a short list of surviving RNA sequences (aptamers) remains.



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI FARMACIA
E BIOTECNOLOGIE

Validation of anti-neoplastic therapeutic efficacy of identified anti-MYCN RNA aptamers. RNA aptamer candidates will undergo individual validation via EMSA. Then, synthesized RNA aptamer candidates will be administered to MNA and non-MNA NB cell lines using Lipofectamine to assess various biological activities including: growth, colony formation, cell motility/migration, apoptosis, autophagy, and ferroptosis. Furthermore, given MYCBoxI interaction with the exosome transcriptome profiles of treated versus untreated cells will be compared specifically focusing on fate of those mRNAs that exert antineoplastic effects. Additionally, ATAC-seq along with RNA-seq will be employed to test how RNA aptamers modify NB genome-wide chromatin accessibility and global gene transcription. Next, non-hydrolysable 2'-fluoro or 2'-O methyl RNA aptamer will be synthesized and tested in 3D cell cultures, specifically in spheroids or patient-derived tumoroids and in future studies on animal models such as zebrafish.

The successful fellow will have access to up-front methodologies of protein purification, genetic SELEX and molecular analyses. He/she will be trained to analyse -omic data through computational approaches. His/her activity will be supervised through regular lab meetings with the PI and the lab's team.

Bibliography

- (1) Schaub FX, Dhankani V, Berger AC, et al. *Pan-cancer Alterations of the MYC. Oncogene and Its Proximal Network across the Cancer Genome Atlas. Cell Syst.* 2018; 6(3):282-300.
- (2) Kalkat M, De Melo J, Hickman KA, et al. *MYC Deregulation in Primary Human Cancers. Genes (Basel).* 2017; 8(6).
- (3) Schwab M *MYCN in neuronal tumours. Cancer Lett.* 2004; 204(2):179-87.
- 4) Dimitrios Papadopoulos, Stefanie Anh Ha, Daniel Fleischhauer, et al *The MYCN oncoprotein is an RNA-binding accessory factor of the nuclear exosome targeting complex. Mol Cell* 2024, 84:2070.
- 5) Mynchuan L. et al *advantages, applications and future directions of in vivo aptamer selex: a review. Molecular Therapy Nucleic Acid Res,* 2025, 36: 102575.



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI FARMACIA
E BIOTECNOLOGIE

Titolo: Isolamento di aptamer(i) RNA ad alta affinità per inibire l'attività di legame all'RNA di MYCN

Introduzione

Il neuroblastoma (NB) è un tumore del sistema nervoso simpatico che colpisce la prima infanzia e che è caratterizzato da bassa sopravvivenza nonostante la complessa multimodalità dei trattamenti terapeutici attuali.

L'oncogene MYCN codifica per un fattore di trascrizione che è un regolatore chiave di molti processi nello sviluppo, nella fisiologia e nell'oncogenesi. La sua attività aumentata nel NB, dovuta all'amplificazione genica e alla sovraespressione, promuove la tumorigenesi, sostiene un fenotipo tumorale aggressivo e permette la progressione della malattia attraverso l'attivazione trascrizionale aberrante di centinaia di geni bersaglio.

L'amplificazione di MYCN è riscontrata in circa il 25% dei casi di NB, con importanti implicazioni cliniche in quanto questi pazienti hanno tasso di rischio elevato con bassa sopravvivenza a lungo termine. Inoltre, la deregolazione di MYCN guida un microambiente tumorale (TME) immunosoppressivo e svolge un ruolo chiave come mediatore della resistenza ai farmaci.

La progettazione di nuove terapie mirate ad alterazioni molecolari specifiche nel NB diventa imperativa, soprattutto per i pazienti ad alto rischio che presentano malattia metastatica e ricadute chemio-resistenti.

Nonostante MYCN sia ancora considerato non trattabile farmacologicamente, dato il suo ruolo fondamentale come orchestratore delle reti molecolari nel NB, rimane, tuttavia, il bersaglio più ambito per una cura risolutiva del NB.

Purtroppo numerosi tentativi di colpire MYCN in modo specifico e diretto sono per lo più falliti o hanno avuto solo successi parziali. Approcci indiretti possono raggiungere un'attività antitumorale globale sufficiente, principalmente grazie agli effetti di un determinato composto terapeutico su vie oncogeniche strettamente correlate. Tuttavia, i livelli dell'oncoproteina MYCN rimangono comunque elevati tanto da esercitare comunque effetti dannosi.

Un recente studio di Eilers e collaboratori ha messo in luce una nuova funzione di MYCN. Essi hanno mostrato che le regioni amino-terminali di MYCN possiedono un'attività di legame all'RNA che, in determinate circostanze (per esempio stallo della forca trascrizionale), può legare l'introne dell'mRNA nascente e indurne la degradazione. Nel contesto di MYCN amplificato presente in eccesso nella cellula, una possibile ipotesi è che tale attività possa erroneamente indurre la degradazione di trascritti critici necessari a prevenire l'oncogenesi, come per esempio nel caso dei geni oncosoppressori.

In questo progetto, il candidato vincitore della borsa identificherà e isolerà aptameri ad RNA ad alta affinità in grado di inibire l'attività di legame all'RNA di MYCN. L'attività terapeutica anti-MYCN degli aptameri sarà validata in linee cellulari NB con amplificazione di MYCN e in sistemi modello come lo zebrafish.



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DIPARTIMENTO
DI FARMACIA
E BIOTECNOLOGIE

Piano delle attività

Isolamento di aptameri RNA ad alta affinità per inibire l'attività di legame all'RNA di MYCN.

Il dominio MYCN (amminoacidi 1-154), che presenta l'attività di legame all'RNA, verrà espresso come proteina marcata His6 utilizzando il sistema Baculovirus in cellule di insetto Sf21. La proteina purificata verrà testata mediante Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) per il legame specifico a un template di RNA ricco in UG, per determinare le condizioni sperimentali ottimali per condurre il SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment).

Per l'approccio SELEX, utilizzeremo la libreria Sel2N20, contenente una regione variabile di 20 nucleotidi (71, 72). Gli RNA sintetizzati verranno purificati e incubati con il dominio MYCN marcato His6. Diversi cicli di selezione, insieme al sequenziamento del DNA, saranno condotti fino a ottenere una lista ristretta di sequenze RNA sopravvissute (aptameri).

Validazione dell'efficacia terapeutica antineoplastica degli aptameri anti-MYCN identificati.

I candidati aptameri RNA saranno sottoposti a validazione individuale tramite EMSA.

Successivamente, gli aptameri RNA sintetizzati saranno somministrati a linee cellulari di NB MNA e non-MNA utilizzando Lipofectamine, per valutare diverse attività biologiche tra cui: crescita, formazione di colonie, motilità/migrazione cellulare, apoptosi, autofagia e ferroptosi.

Inoltre, dato il coinvolgimento di MYCBoxI con l'esosoma, i profili trascrittomici delle cellule trattate e non trattate saranno confrontati focalizzandosi in particolare sul destino degli mRNA con effetti antineoplastici.

In aggiunta, ATAC-seq e RNA-seq saranno impiegati per verificare come gli aptameri RNA modifichino l'accessibilità cromatinica a livello genomico e la trascrizione genica globale nel NB. Successivamente, aptameri RNA non idrolizzabili 2'-fluoro o 2'-O-metil saranno sintetizzati e testati in colture cellulari 3D, in particolare in sferoidi o tumoroidi derivati da paziente, e in futuri studi su modelli animali come il pesce zebra.

Il ricercatore selezionato avrà accesso a metodologie avanzate di purificazione proteica, SELEX genetico e analisi molecolari. Sarà formato per analizzare dati “-omici” tramite approcci computazionali. La sua attività sarà supervisionata tramite regolari riunioni di laboratorio con il PI e il team di laboratorio.