

# VU Research Portal

## In silico Medicinal Chemistry

Kooistra, A.J.

2015

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Kooistra, A. J. (2015). *In silico Medicinal Chemistry: Investigating GPCRs: key regulators of signal transduction and cell function*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## Nederlandse samenvatting

### *In silico* Medicinale Chemie

*Het onderzoeken van GPCRs: cruciale regelaars van signaaltransductie en het functioneren van de cel*

Het ontwikkelen van een nieuwe medicijn is een kostbaar, langdurig en complex proces. In de afgelopen decennia zijn er veel ontwikkelingen geweest op dit gebied en één daarvan is dat de computer zijn intrede heeft gedaan. Doordat er steeds meer informatie beschikbaar is gekomen over het gedrag en de structuur van moleculen en eiwitten kunnen we tegenwoordig redelijk accuraat het gedrag van moleculaire complexen simuleren (mede dankzij het werk van Karplus, Levitt en Warshel die hiervoor in 2013 de Nobelprijs ontvingen). Daarnaast is het eveneens mogelijk geworden om met de computer grote hoeveelheden data te verwerken om zo patronen te identificeren en aan de hand hiervan voorspellingen te kunnen doen. Door de integratie van de computer in verschillende stadia van het ontwikkelingsproces van medicijnen worden we in staat gesteld om efficiënter medicijnen te ontwikkelen die vervolgens een hogere kans van slagen hebben tijdens de klinische fasen.

Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling, toepassing en validatie van computationele methoden om eiwit-ligand interacties te voorspellen. Het beschreven onderzoek focust zich op zogenaamde G-eiwit-gekoppelde receptoren (GPCRs), een eiwitfamilie bestaande uit belangrijke doelwitten voor medicijnen vanwege hun belangrijke rol in de communicatie tussen cellen en daarmee ook het functioneren van deze cellen (zie hiervoor hoofdstuk 1, Lefkowitz en Kobilka in 2012 de Nobelprijs voor hun baanbrekende werk met betrekking tot GPCRs). In hoofdstuk 2-6 hebben we de eiwit-ligand interacties van aminerge GPCRs onderzocht. De allereerste driedimensionale eiwitstructuur van een *druggable* GPCR, de aminerge GPCR  $\beta_2$ -adrenoceptor ( $\beta_2R$ ), werd gepubliceerd in 2007 (beter bekend vanwege  $\beta$ -blokkers, deze medicijnen grijpen aan op de  $\beta_2R$ ). Gedurende het promotieonderzoek is er in het veld van GPCR-structuurbiologie veel voortgang geboekt: in deze periode is namelijk het aantal opgehelderde structuren van unieke GPCRs gestegen van 4 naar 26, wat gepaard ging met een stijging van 27 naar 114 GPCR-kristalstructuren. Tussen deze 26 structuren zitten ook 8 aminerge GPCRs (zie hoofdstuk 1), waaronder ook de histamine  $H_1$ -receptor ( $H_1R$ ). Al sinds de oprichting van onze onderzoeksgroep in 1955 door professor Nauta wordt in onze groep  $H_1R$  bestudeerd. Mede om dit feit hebben wij sinds de publicatie van de kristalstructuur van de  $H_1R$  in complex met het medicijn doxepine (een antihistaminicum) veel tijd en inspanning geïnvesteerd in het benutten van deze kristalstructuur om nieuwe inzichten te verwerven met betrekking tot de werking van deze receptor.

Aan de andere kant worden de  $\beta$ -adrenoceptors door de GPCR-gemeenschap juist gebruikt als modelsysteem (net als rhodopsin) om een beter begrip te krijgen van structuur-functie relaties voor de gehele GPCR-familie. Dit heeft geresulteerd in 32 kristalstructuren voor de  $\beta_1$ - en  $\beta_2$ -receptoren in verschillende activatietoestanden in complex met (covalente) agonisten, inverse agonisten, antagonist en *biased* agonisten en zelfs in complex met een G-eiwit. De kristalstructuren van deze receptoren zijn dientengevolge de perfecte instrumenten om structuur-gebaseerde methoden voor GPCRs verder te ontwikkelen.

In het laatste onderzoekshoofdstuk (hoofdstuk 7) richten we ons op ORF74, een chemokine receptor die gecodeerd is in het RNA van het humaan herpesvirus 8, ook wel Kaposi's sarcoma



associated herpesvirus genaamd. In tegenstelling tot de eerder genoemde GPCRs is er met betrekking tot deze receptor nauwelijks informatie beschikbaar aangaande eiwitstructuur en liganden. Hierdoor bleek deze receptor dan ook een uitdagend doelwit.

De belangrijkste doelen van dit proefschrift, te weten het verkrijgen van nieuwe inzichten in GPCR-ligand binding, het ontwikkelen van nieuwe structuur-gebaseerde *virtual screening* (SBVS)-methoden voor GPCRs en structuur-gebaseerde methoden voor de voorspelling van het effect van een ligand, worden geadresseerd in hoofdstukken 2-7, zoals hieronder samengevat:

**Hoofdstuk 2** richt zich op de toepassing van SBVS- en ligandoptimalisatiemethoden voor GPCRs. Een analyse van succesvolle structuur-gebaseerde ligand ontdekkings- en ontwerpmethoden laat zien dat modellen van receptoren efficiënt toegepast kunnen worden, ondanks structurele onnauwkeurigheden. Bovendien toont het de nieuwe mogelijkheden die GPCR-kristalstructuren kunnen bieden.

In **hoofdstuk 3** combineren we ligand-affiniteitsdata, mutagenese studies en aminozuursequentie-analyses met hoge resolutie kristalstructuuranalyses van aminerge GPCR-ligand interacties. Deze geïntegreerde structurele *chemogenomics* aanpak geeft ons nieuwe inzichten in de correlaties tussen ligand- en bindingsholte-overeenkomsten van verschillende aminerge receptoren. Daarnaast kunnen we ook ogenschijnlijke discrepanties verklaren met behulp van de integratie van eiwit-ligand bindingshoudinganalyses. Deze kennis kan gebruikt worden om structuur-selectiviteitsrelaties te identificeren en zo de kennis van ligandbinding te vergroten. Dit kan vervolgens in toekomstige projecten gebruikt worden voor het ontdekken en ontwerpen van nieuwe GPCR-liganden.

**Hoofdstukken 4 en 5** demonstreren de nieuwe mogelijkheden die GPCR-kristalstructuren ons bieden voor SBVS. Door gebruik te maken van de kristalstructuur van de doxepine-gebonden  $H_1R$ -kristalstructuur hebben we een nieuw scoringsprotocol voor *docking* ontwikkeld. In dit protocol wordt een conventionele scoringsmethode gecombineerd met een moleculaire-interactie-vingerafdrukmethode (IFP) om de kwesties omtrent het selecteren en rangschikken van de juiste *docking* poses van (fragment-achtige) stoffen te minimaliseren. We hebben dit protocol en de individuele methoden toegepast en gevalideerd op zowel de  $H_1R$  als de  $\beta_2R$ . Dit verschaft ons nieuwe inzichten in de voordelen van de individuele methoden en de toegevoegde waarde van het nieuwe protocol. Bovendien waren we door een retrospectieve analyse van alle  $\beta$ -adrenoceptor-kristalstructuren in staat om de optimale kristalstructuur te selecteren en zo onderscheid te kunnen maken tussen agonisten en antagonist/inverse agonisten. In beide gevallen presteerde de gecombineerde scoringsmethode beter dan de individuele methoden en resulteerde in een hoge succesratio.

In **hoofdstuk 6** hebben we de potentie van kristalstructuren om het functionele effect van liganden te voorspellen verder onderzocht. Een systematische analyse van 31  $\beta$ -adrenoceptor-kristalstructuren stelde ons in staat om de mogelijkheden en beperkingen van structuur-gebaseerde voorspellingen van de functie van GPCR-liganden in kaart te brengen. In totaal hebben we 1920 unieke IFP-structuurcombinaties geanalyseerd. Hierdoor hebben we inzicht verkregen in de relatieve impact die de conformatie van het eiwit en de referentie-IFP hebben op het selectief identificeren van GPCR-liganden met een specifieke functie. De IFP-scoringsmethode kan efficiënt gebruikt worden om liganden met dezelfde functie te classificeren, echter kleine verschillen tussen receptorconformaties en referentie-IFPs bepalen uiteindelijk de verrijking van

liganden met een specifieke functie in *virtual screening*-ranglijsten. Deze systematische analyse toont aan dat het selectief identificeren van agonisten bereikt kan worden door *docking* poses uit agonist en antagonist/inverse agonist-kristalstructuren te rangschikken op basis van een referentie-IFP van een agonist.

In het laatste onderzoekshoofdstuk, **hoofdstuk 7**, hebben we zowel structuur-gebaseerde als ligand-gebaseerde *virtual screening* (LBVS) technieken toegepast om remmers voor ORF74 te vinden, een virale en constitutief-actieve chemokine receptor. Ondanks dat de beschikbare informatie over ORF74 beperkt was, kon de kristalstructuur van CXCR4 gebruikt worden om een homologiemodel te maken van ORF74. Dit model is gebruikt voor een SBVS van een *in-house* database gevolgd door een LBVS op basis van een SBVS-hit. Deze *screening* heeft uiteindelijk geleid tot de identificatie van de eerste kleine moleculen die functioneren als ORF74-remmers, bestaande uit een verwante serie van 4 inverse agonisten en 1 antagonist.

Dit proefschrift demonstreert hoe GPCR-kristalstructuren in combinatie met experimentele data gebruikt kunnen worden om nieuwe inzichten in eiwit-ligand interacties te verwerven voor het ontdekken en ontwerpen van nieuwe liganden. De groeiende beschikbaarheid van GPCR-structuren maakte het mogelijk voor ons om nieuwe efficiënte SBVS-protocollen te ontwerpen voor de identificatie van nieuwe (fragment-achtige) GPCR-liganden. Daarnaast hebben we laten zien dat de integratie van experimentele data en computationele technieken ons in staat stelt om de structurele ankers voor ligandbinding te determineren en selectieve liganden, of juist liganden met een gewenst polyfarmacologisch profiel, te ontwerpen. Ook toont deze thesis aan dat het functionele effect van een ligand vastgelegd kan worden in een eenvoudige moleculaire-interactie-vingerafdruk.

Alhoewel dit proefschrift zich richt op GPCRs zijn de onderzoekstechnieken die beschreven worden in principe ook toepasbaar op andere doeleiwitten, in het bijzonder op eiwitfamilies waarvoor structurele informatie beschikbaar is, hetgeen bijvoorbeeld het geval is bij kinasen en fosfodiesterases.