

VU Research Portal

The acetylcholine binding protein as a template for the ligand binding domains of the homologous nicotinic receptors

Akdemir, A.

2010

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

citation for published version (APA)

Akdemir, A. (2010). *The acetylcholine binding protein as a template for the ligand binding domains of the homologous nicotinic receptors*. [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

Samenvatting, Conclusies en Toekomstperspectieven

Het acetylcholine bindend eiwit (acetylcholine binding protein, AChBP) als een model voor het ligandbindingsdomein van de homologe nicotine receptoren

Samenvatting

Aan het begin van dit project in November 2004, waren de acetylcholine bindende eiwitten (acetylcholine binding proteins, AChBPs) net geïntroduceerd als een klasse van eiwitten die overeenkomsten vertonen met de extracellulaire domeinen (ECD) van ligand-geopende ionkanalen (ligand-gated ion channels, LGICs).^{1,2} De AChBPs worden door gliacellen uitgescheiden in de synapsen om daar hun endogene ligand acetylcholine te binden en af te vangen voordat ze kunnen binden aan de nicotine receptoren (nAChRs). Tot nu toe zijn AChBPs aangetoond in verschillende diersoorten, waaronder slakken.¹⁻⁵ Sequentieanalyses tussen deze eiwitten en de ECDs van nAChRs en andere ionkanalen van de Cys-loop receptorfamilie, laten zien dat er een lage overeenkomst is in de aminozuurvolgorde van deze klassen van eiwitten. Echter de beschikbare farmacologische data en inzichten in de driedimensionale structuur van deze eiwitten laten wel degelijk belangrijke overeenkomsten zien tussen AChBPs en de ECDs van LGICs (**Hoofdstuk 1**). In tegenstelling tot de receptoren van de Cys-loop familie, hebben AChBPs geen hydrofobe transmembraandomein en geen intracellulairdomein. Hierdoor hebben AChBPs een betere wateroplosbaarheid en zijn ze veel beter te kristalliseren. Dit maakt röntgendiffractieanalyse mogelijk.

In de acetylcholine bindingsholte (binding pocket) van AChBPs en de nAChRs zijn de aminozuren redelijk geconserveerd. Waarschijnlijk laten AChBPs hierdoor een enigszins vergelijkbare farmacologie zien als de nAChRs.^{1, 2, 4-9} Ls-AChBP bindt bijvoorbeeld de $\alpha 7$ -selectieve antagonist α -Bgt en Ac-AChBP bindt de $\alpha 7$ -selectieve antagonist MLA (**Hoofdstuk 1**).

Door bovengenoemde punten waren wij en anderen geïnteresseerd in het onderzoek naar AChBPs, die als onderzoeksinstrumenten nuttige informatie kunnen verschaffen over de ligand-eiwit interacties en hopelijk meer inzicht verschaffen in bijvoorbeeld de selectiviteit van de verschillende subtypen nAChRs.^{1, 2, 10-12} Aan het begin van mijn onderzoeksproject waren er alleen enkele kristalstructuren verschenen van AChBPs, zoals de nicotine gebonden Ls-AChBP structuur.⁶ Gedurende die periode waren er alleen enkele homologiemodellen gemaakt van de $\alpha 4\beta 2$ en $\alpha 7$ receptor die gebaseerd waren op de

AChBP kristalstructuur.^{10, 11} Er waren echter nog geen systematische in silico screeningstudies, geen structure-based hit optimalisatieprocedures en geen mutatiestudies uitgevoerd die gebaseerd waren op de AChBPs. Daarom is het doel van dit proefschrift gedefinieerd als het evalueren van AChBPs als onderzoeksinstrumenten om nieuwe en selectieve liganden te ontwikkelen voor de nAChRs. Om dit doel te realiseren, zijn er drie onderzoeksvragen gedefinieerd, namelijk:

- Zijn AChBPs als instrumenten te gebruiken om nieuwe ligand chemotypes te identificeren voor de nAChRs?
- Zijn AChBPs te gebruiken in structure-based hit optimalisatieprocedures om de ligand-eiwit bindingsinteracties met de AChBPs en de nAChRs te verbeteren?
- Kunnen AChBP mutanten gemaakt worden, die als een beter model kunnen dienen voor de orthosterische bindingsholte van de nAChRs?

In **Hoofdstuk 1** wordt een overzicht gegeven van relevante literatuur die de nAChRs beschrijft en worden de fysiologische en farmacologische relevantie van de receptoren beschreven.¹³⁻¹⁷ Ook pogingen van diverse groepen om de structuur van nAChRs te achterhalen wordt samengevat. Zo worden de nAChRs afkomstig van eukaryoten (muis $\alpha 1$ subunit en Torpedo receptor) en nAChR homologen afkomstig van prokaryoten (GLIC en ELIC) beschreven.¹⁸⁻²⁵ Deze eiwitten vertonen onderling overeenkomsten in de aminozuurvolgorde en in hun driedimensionale structuur. Ondanks deze overeenkomsten, geven deze data geen goed beeld op atomair niveau van de nAChR bindingsholte.

Een belangrijke doorbraak in onze kennis van de bindingsholten in nAChRs kwam met de identificatie van AChBPs.^{1,2} Drie AChBPs die afkomstig zijn van verschillende soorten slakken worden geïntroduceerd en de primaire, secundaire en tertiaire structuur van deze eiwitten worden beschreven. Tevens wordt er een overzicht gegeven van de AChBP kristalstructuren gebonden met verschillende soorten nAChR liganden. Tot slot wordt de onderzoeksvraagstelling van dit proefschrift geformuleerd.

In **Hoofdstuk 2** wordt een *in silico* screeningprocedure beschreven die gebruik maakt van verschillende AChBP kristalstructuren, namelijk Ls-AChBP in complex met HEPES, carbamylcholine en nicotine.^{6,12} De screeningprocedure werd toegepast op een collectie van verbindingen die in eigen beheer is en waarvan de fysisch-chemische eigenschappen vergelijkbaar zijn met medicijnen. Deze procedure bestaat uit het docken van de liganden in de bindingsholte van de drie AChBP kristalstructuren, de visuele inspectie van de ligandposes en de ligand-eiwit bindingsinteracties, farmacologische assays om de dockingsresultaten te verifiëren en het zoeken naar analogen van de geïdentificeerde hits in onze ligandcollectie. Met deze procedure hebben wij nieuwe klassen van kleine verbindingen geïdentificeerd als liganden voor AChBP. Sommige van deze verbindingen vertonen tevens affiniteit voor de humane $\alpha 7$ nAChR.¹² Twee verbindingen met een dibenzosuberyl groep zijn geselecteerd vanwege de structurele overeenkomsten met verschillende tricyclische antidepressiva, farmacologisch verder gekarakteriseerd en ook gekristalliseerd met Ac-AChBP.¹² Deze tricyclische verbindingen staan bekend als “blokkeerders” van ionkanalen, maar recente studies suggereren ook een mogelijke interactie met het extracellulaire ligandbindingsdomein van LGICs. De verkregen kristalstructuren van onze verbindingen in complex met Ac-AChBP en de aanvullende bindingsstudies tonen aan dat deze verbindingen inderdaad kunnen binden aan de

orthosterische bindingsholte van nAChRs. Electrofysiologische assays laten zien dat de verbindingen de activiteit van $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ en $5HT_3$ receptoren blokkeren.¹² De niet-competitieve inhibitie van deze receptoren suggereert dat de verbindingen de ionkanalen blokkeert door middel van allosterische binding. De data suggereert dus dat de verbindingen zowel de ionkanalen blokkeren als binden aan de orthosterische bindingsholte.

De verkregen kristalstructuren uit **Hoofdstuk 2** zijn vervolgens gebruikt in een structure-based hit optimalisatieprocedure (**Hoofdstuk 3**). We hebben twee nieuwe klassen van verbindingen ontworpen (dibenzosuberyll- en benzoaat-gesubstitueerde tropines), die een interactie moeten aangaan met een specifiek gedeelte in de bindingsholte. Dit specifieke gedeelte hebben wij de lobeline pocket genoemd, omdat van alle beschikbare kristalstructuren van nAChR liganden in complex met AChBPs, alleen lobeline een interactie aangaat met deze regio.

Röntgendiffractiestudies van onze benzoaat-gesubstitueerde tropine verbindingen met Ac-AChBP laten inderdaad zien dat de lobeline pocket bezet wordt door het ligand. Daarmee is voor het eerst met structure-based design een ligand ontwikkeld dat de lobeline pocket adresseert. De affiniteiten van de serie verbindingen laten een andere trend zien voor Ls-AChBP en Ac-AChBP. De verbindingen hebben enige affiniteit voor de $\alpha 7$ nAChR, maar geen affiniteit voor de $\alpha 4\beta 2$ nAChR. De nieuwe kristalstructuren kunnen een licht werpen op de subtiele verschillen die er zijn in de bindingsholten van AChBPs en nAChRs.

In **Hoofdstuk 4** wordt een nieuwe en nog uitgebreidere hiërarchische in silico screeningprocedure beschreven, die gebruik maakt van een Ls-AChBP kristalstructuur waarin de agonist nicotine is gebonden. Met deze procedure werd efficiënt nieuwe klassen van liganden voor de AChBPs geïdentificeerd. Van de gevonden hits konden twee liganden worden geclassificeerd als competitieve antagonisten voor de $\alpha 7$ nAChR en als niet-competitieve inhibitors van de $\alpha 4\beta 2$ nAChR. Deze liganden werden gekristalliseerd met Ac-AChBP en röntgendiffractieanalyses onthulden bindingsposes die nog niet eerder waren geobserveerd. Er zijn geen waterstofbruggen tussen ligand en eiwit, maar wel een cation- π interactie met loop C. Deze studie toont aan dat het met AChBP en in silico screeningmethoden mogelijk is om nieuwe liganden voor de $\alpha 7$ receptor te identificeren, maar laat ook zien dat niet elke verbinding die affiniteit heeft voor AChBP ook affiniteit heeft voor humane nAChRs. Er zijn dus duidelijk uitdagingen in het gebruik van AChBP,

zoals het vinden van competitieve $\alpha 4\beta 2$ liganden en $\alpha 7$ agonisten en het voorspellen van de precieze bindingsmode van de liganden.

Met deze inzichten werden verschillende Ac-AChBP mutanten ontworpen die tot doel hadden om de orthosterische bindingsholte van de humane $\alpha 4\beta 2$ en $\alpha 7$ nAChRs beter te simuleren. Deze studies zijn beschreven in **Hoofdstuk 5**. De mutanten werden tot expressie gebracht en met farmacologische assays geëvalueerd voor hun overeenkomsten in bindingsaffiniteit voor referentie nAChR liganden met hoge affiniteit en selectiviteit. De Ac-AChBP mutanten ontworpen als $\alpha 4\beta 2$ receptor mimetica, lieten geen andere ligand selectiviteitsprofiel zien ten opzichte van het wildtype Ac-AChBP. De $\alpha 7$ nAChR mimetica vertoonden een verhoogde affiniteit voor sommige $\alpha 7$ liganden. Echter mutagenese van de aminozuren in of nabij de bindingsholte van Ac-AChBP resulteerden niet in mutanten die volledig de bindingsprofielen van de $\alpha 4\beta 2$ en $\alpha 7$ nAChRs vertonen. Deze studies tonen daarom aan dat de moleculaire eigenschappen die verantwoordelijk zijn voor ligand selectiviteit en affiniteit complex zijn en niet noodzakelijkerwijs hun oorsprong alleen vinden in de aminozuren die de bindingsholte vormen.

Conclusies en Toekomstperspectieven

Aan het begin van dit promotieproject zijn er drie onderzoeksvragen geformuleerd die betrekking hadden op de evaluatie van de bruikbaarheid van AChBP als een moleculair instrument om de homologe bindingsholten van de gerelateerde en farmacologisch interessante humane nAChRs te onderzoeken. In de volgende paragrafen zal de uitkomst van dit promotieonderzoek met betrekking tot deze onderzoeksvragen worden beschreven.

Zijn AChBPs als instrumenten te gebruiken om nieuwe ligand chemotypes te identificeren voor de nAChRs?

In silico screeningprocedures worden toegepast om te onderzoeken of liganden kunnen binden in de bindingsholten van specifieke eiwitten.^{12, 26-29} In ons onderzoek hebben we twee verschillende in silico screeningprocedures toegepast op onze eigen verzameling van liganden waarbij we gebruik hebben gemaakt van agonist-gebonden Ls-AChBP kristalstructuren.^{6, 12} De eerste in silico screening bestaat uit een docking, visuele inspectie van de verkregen bindingsposes, farmacologische experimenten en het zoeken naar analogen (**Hoofdstuk 2**).¹² De tweede in silico screening was uitgebreider en bestond uit een pharmacophore screening, dockingprocedures, analyse van de verkregen bindingsposes, visuele inspectie en farmacologische experimenten (**Hoofdstuk 4**). Er werden meer hits gevonden met de tweede in silico screening. Validatie experimenten tonen aan dat dit niet het gevolg waren van een artificiële verzadiging³⁰ van de gescreende database met nAChR liganden. We nemen aan dat de kracht van de tweede in silico screening ligt in de combinatie van een hiërarchische filtering met toenemende complexiteit.

We hebben nieuwe ligand chemotypen geïdentificeerd met affiniteit voor AChBPs en humane $\alpha 7$ receptoren met behulp van beide in silico screeningprocedures. Sommigen van deze verbindingen zijn gekristalliseerd met Ac-AChBP. De verkregen structuren laten duidelijk zien dat de conformatie van de AChBP bindingsholte veranderd na het binden van liganden (bijvoorbeeld verandering van loop C conformatie). Daarom is er een verschil tussen de voorspelde bindingspose (met docking) en de experimenteel bepaalde bindingspose (kristallografie). Het meenemen van de eiwit flexibiliteit in dockingstudies is vanuit computationeel oogpunt erg kostbaar en daarom hebben wij het niet meegenomen in onze studies.²⁶⁻²⁹ Echter de limitaties zoals vermeld in dit proefschrift hebben onze onderzoeksgroep ertoe aangezet om dockingstudies uit te voeren die eiwit flexibiliteit

alsnog meenemen.³¹ Deze studies onderstrepen de flexibiliteit van de bindingsholte na het binden van liganden. Het gebruik van flexibiliteit bij in silico screeningprocedures moet nog verder onderzocht worden. Taylor en zijn medewerkers hebben een alternatieve benadering van het flexibiliteitsprobleem in virtuele screeningprocedures, waarin docking studies worden gecombineerd met moleculaire dynamica simulaties. Echter, in dit artikel werden er geen affiniteitsdata en geen experimentele bindingposes bepaald voor AChBP. Ook werden er geen bindings en functionele data bepaald voor nAChRs. Deze studies laten echter het belang en de complexiteit zien van induced-fit effecten bij in silico screeningprocedures.

Alle verkregen hit moleculen uit de in silico screeningprocedures vertonen affiniteit voor AChBPs en de $\alpha 7$ receptor, maar niet voor de $\alpha 4\beta 2$ receptor. In **Hoofdstuk 2** hebben we gesuggereerd dat een Phenylalanine in de humane $\alpha 4\beta 2$ receptor (gelokaliseerd op de M116 positie in Ac-AChBP), verantwoordelijk zou kunnen zijn voor dit effect door middel van sterische hindering in de binding van de dibenzosuberyl groep van de verkregen hit moleculen. Echter in **Hoofdstukken 3** en **4** hebben we liganden verkregen die geen dibenzosuberyl groep hebben, maar nog steeds geen affiniteit vertonen voor de humane $\alpha 7$ receptoren. Deze resultaten suggereren een complex mechanisme dat verantwoordelijk is voor de ligandselectiviteit van AChBPs en nAChRs. Residuen die geen direct contact maken met het ligand kunnen mogelijk toch de binding beïnvloeden door verschillende mechanismen waaronder electrostatische interacties.^{3, 6, 32}

Het moet worden opgemerkt dat in beide in silico screeningprocedures, agonist-gebonden Ls-AChBP kristalstructuren werden gebruikt.⁶ Toch vertonen geen van de verkregen liganden agonisme in functionele assays.¹² De liganden die verkregen zijn met de in silico procedure beschreven in **Hoofdstuk 2**, vertonen niet-competitieve inhibitie van de $\alpha 7$ en $\alpha 4\beta 2$ receptoren door middel van ionkanaalblokkade. De liganden beschreven in **Hoofdstuk 4** vertonen competitieve inhibitie van de $\alpha 7$ receptor en non-competitieve inhibitie van de $\alpha 4\beta 2$ receptor.

Het is duidelijk dat niet alle AChBP hits affiniteit vertonen voor de nAChRs en dat functionele activiteit op de nAChRs moeilijk te voorspellen is. Dit illustreert de tekortkomingen van AChBP als een model voor het extracellulaire ligandbindingsdomein

van nAChRs. Ondanks deze tekortkomingen hebben we aangetoond dat het gebruik van AChBP structuren ons in staat stelt om nieuwe verbindingen te identificeren die binden aan AChBPs en nAChRs, en die bruikbaar zijn als startpunt in onze synthese programma voor hitexploratie en optimalisatiecampagnes.

Zijn AChBPs te gebruiken in structure-based hit optimalisatieprocedures?

Structure-based hit optimalisatie procedures werden toegepast op de kristalstructuren van AChBP gebonden met onze eigen verbinding **31** en lobeline (**Hoofdstuk 3**). Gebruik makend van een fragment-merging strategie hebben wij liganden ontworpen die een interactie aangaan met de lobeline pocket. Kristallisatiestudies tonen aan dat deze verbindingen inderdaad de lobeline pocket bezetten. Voor zover bij ons bekend, zijn deze moleculen de eerste liganden die naast de natuurstof lobeline een interactie met de lobeline pocket kunnen aangaan.

De verkregen liganden vertonen affiniteit voor de AChBPs en de humane $\alpha 7$ receptoren, maar ze vertonen geen affiniteit voor de $\alpha 4\beta 2$ receptor (**Hoofdstuk 3**). Dit kan veroorzaakt worden door de verschillen in de toegankelijkheid en gedrag van de lobeline pocket in AChBPs en de nAChRs. De subtiele verschillen in ligandbinding tussen AChBPs en nAChRs kunnen niet volledig verklaard worden. Dit wordt ook geïllustreerd door het gebrek aan succes in de mutagenese studies waarin werd geprobeerd om de bindingsholten van de nAChRs te simuleren in AChBPs. Er zijn meer studies nodig om de verschillen tussen AChBPs en nAChRs te verklaren, waaronder kristallisatiestudies met selectieve liganden en aanvullende biofysische karakterisatietechnieken. Tevens zou het een belangrijke stap voorwaarts zijn als meer gedetailleerde informatie over de humane nAChRs en andere LGICs beschikbaar zouden komen, bijvoorbeeld door het oplossen van een kristalstructuur.

Is AChBP een goed model eiwit voor de orthosterische bindingsholte van nAChRs?

De in silico screeningprocedures tonen aan dat AChBP als model eiwit voor nAChRs belangrijke beperkingen heeft. Vervolgens is aangetoond dat het niet eenvoudig is om de bindingsholten van de nAChRs in de homologe AChBPs te simuleren door simpele mutaties in de AChBP bindingsholte.^{3, 32} De belangrijkste residuen die de bindingsholte vormen en die zich op interactieafstand van de liganden bevinden, werden gemuteerd tot de

overeenkomstige residuen in de humane $\alpha 7$ en $\alpha 4\beta 2$ receptoren. Tevens werden de aminozuren gemuteerd die niet de bindingsholte begrenzen, maar die zich op interactieafstand tot de gemuteerde residuen bevinden. Deze mutaties waren echter niet voldoende om de bindingsholten van de nAChRs beter te simuleren. Dit kan veroorzaakt worden door de invloed van loop F op de ligand selectiviteit.⁹ Deze loop F is echter niet meegenomen in onze mutatiestudies. Andere mogelijke oorzaken zijn electrostatische interacties, de architectuur en vouwing van de bindingsholte en verschillen in de toegangswegen van het ligand tot de bindingsholten.^{3, 32} Deze mogelijke factoren moeten verder onderzocht worden in additionele mutatiestudies in AChBPs en kristallisatiestudies met selectieve nAChR liganden.

Toch biedt AChBP enkele unieke mogelijkheden. Dit eiwit is relatief eenvoudig te kristalliseren met selectieve nAChR liganden, waarna na röntgendiffractieanalyses inzichten worden verkregen in de ligand-eiwit bindingsinteracties. Multidisciplinair onderzoek waarin verschillende technieken gecombineerd worden zoals uitgebreidere mutatiestudies van AChBPs, kristallisatiestudies van (mutant) AChBPs met selectieve liganden, biofysische screeningstechnieken (bijvoorbeeld SPR) en meer geavanceerde modelleringstechnieken (docking met flexibel eiwit, moleculaire dynamica simulaties), kunnen waarschijnlijk meer inzichten geven in de ligandselectiviteit en functionele activiteit van de gerelateerde nAChRs.

De genoemde referenties zijn te vinden op pagina's 186 en 187.