

# VU Research Portal

## Structure-based design of AChBP ligands, new insights and applications

Edink, E.S.

2011

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

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

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

Edink, E. S. (2011). *Structure-based design of AChBP ligands, new insights and applications*.

### **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)

## **Structuur-gebaseerd ontwerp van AChBP liganden, nieuwe inzichten en toepassingen**

### **Uitgangspunt voor het ontwikkelen van een medicijn**

Het ontdekken van nieuwe geneesmiddelen begint vaak met het vaststellen van een doel-eiwit. Dit kan een receptor of een enzym zijn waarvan verwacht wordt dat het een belangrijke rol speelt in een specifiek ziekteproces. De volgende stap om tot een bruikbaar medicijn te komen is meestal het vinden van chemische uitgangspunten; vaak kleine moleculen die enige affiniteit (bindingssterkte) voor het desbetreffende eiwit bezitten. Deze kleine moleculen, liganden, kunnen dan vervolgens geoptimaliseerd worden door middel van chemische modificaties. Het doel van deze modificaties is om de bindingsaffiniteit te vergroten en tegelijkertijd de chemisch-fysische eigenschappen van het molecuul zodanig aan te passen dat er uiteindelijk een stof verkregen wordt dat geschikt is voor toediening als medicijn. Dat wil zeggen dat toediening van deze stof aan een patiënt zal resulteren in genezing danwel verlichting van symptomen zonder daarbij al te veel ongewenste bijwerkingen te bewerkstelligen.

Er zijn verscheidene mogelijkheden om deze moleculaire uitgangspunten te vinden. Een van de mogelijkheden is om grote bibliotheken van chemische stoffen te testen op het desbetreffende eiwit. Dit gebeurt binnen de farmaceutische industrie vaak door middel van een volledig geautomatiseerd proces dat high-throughput screening (HTS) genoemd wordt. Dit is een kostbaar proces omdat deze methode een uitgebreide infrastructuur van robots en een grote collectie van chemische stoffen vereist. Mede daarom wordt er veel onderzoek gedaan naar alternatieve methoden om liganden voor therapeutisch relevante eiwitten te ontdekken.

Een van de alternatieven is om eerst met behulp van geavanceerde software een voorspelling te doen welke chemische stoffen in staat zullen zijn om in de bindingsholte van het desbetreffende eiwit te passen. Deze benadering, die bekend staat als virtual screening, heeft als doel het aantal chemische verbindingen dat daadwerkelijk getest wordt aanzienlijk te verkleinen, maar een vergelijkbaar aantal actieve moleculen (hits) als bij HTS geeft.

Een andere methode die recent in zwang is geraakt, richt zich op het testen van relatief kleine moleculen, fragmenten, en staat bekend als fragment-based drug discovery (FBDD). Het grote voordeel van deze methode is dat de kans op het vinden van hits groter is dan bij traditionele HTS. Er kan daardoor met relatief kleine stoffenbibliotheken gewerkt worden. Dit komt doordat het aantal mogelijke moleculen (chemical space) aanzienlijk kleiner is wanneer men zich beperkt tot kleine fragmenten. Zo zijn er met 10 atomen nu eenmaal veel minder mogelijkheden om moleculen te construeren dan met 50 atomen. Simpel gezegd, fragment chemical space is aanzienlijk kleiner dan HTS-liganden chemical space. Bovendien bestaat de mogelijkheid dat een relatief groot molecuul niet aan een eiwit bindt doordat slechts een klein gedeelte van het molecuul niet complementair aan de bindingsholte is. Wanneer in dit geval het molecuul eerst opgedeeld zou

worden in kleinere fragmenten en vervolgens de afzonderlijke fragmenten opnieuw getest zouden worden zou men wel een bruikbaar chemisch uitgangspunt voor het ontwikkelen van een medicijn kunnen ontdekken.

### **Optimaliseren van bindingsaffiniteit**

Welke methode er ook gebruikt wordt om liganden te vinden, HTS, virtual screening of FBDD, in bijna alle gevallen dient de bindingsterkte van de gevonden moleculen geoptimaliseerd te worden. Het onderzoek dat beschreven is in dit proefschrift heeft zich gericht op het optimaliseren van de bindingsaffiniteit van fragment- en virtual screening-hits. Het optimaliseren van liganden wordt aanzienlijk vereenvoudigd wanneer men de beschikking heeft tot gedetailleerde structurele informatie van het gedeelte van het eiwit waar het ligand aan bindt; de bindingsholte. Deze informatie geeft toegang tot structuur-gebaseerde geneesmiddelenontwikkeling (structure-based drug design; SBDD). De in SBDD benodigde structurele informatie kan bijvoorbeeld verkregen worden door middel van Röntgen diffractie van een kristal van een eiwit-ligand complex. In vergelijking met de membraan-gebonden eiwitten zijn de voor SBDD benodigde eiwit-kristallen in het algemeen veel makkelijker te verkrijgen van volledig water-oplosbare eiwitten. Het eiwit dat in dit proefschrift centraal staat is het water-oplosbare acetylcholine-bindend eiwit (acetylcholine-binding protein; AChBP). AChBP is een algemeen geaccepteerd model-eiwit voor het ligand-bindingsdomein van de membraan-gebonden nicotinerge acetylcholine receptoren (nAChRs). Van deze receptoren is aangetoond dat zij een belangrijke rol spelen in de signaaltransductie in het centrale en perifere zenuwstelsel en er zijn sterke aanwijzingen dat zij als doel-eiwit kunnen fungeren om geneesmiddelen te ontwikkelen voor ziektes als Alzheimer, schizofrenie en reuma. In tegenstelling tot de nAChRs is AChBP een stabiel en water-oplosbaar eiwit en heeft daarmee ideale eigenschappen voor toepassing in SBDD. **Hoofdstuk 1** bestaat uit een inleiding tot de nAChRs en bevat tevens een overzicht van hoe AChBP kristalstructuren hebben bijgedragen aan een beter inzicht in de structuur van nAChRs. Het overzicht richt zich met name op hoe AChBP inzicht heeft verschaft op de interacties die nAChRs met verscheidene liganden maken. Men heeft bijvoorbeeld mede door AChBP-kristalstructuren een zeer gedetailleerd beeld verkregen hoe nicotine, de verslavende stof in tabak aan het ligand-bindingsdomein van de nAChRs bindt.

Zelfs wanneer men over gedetailleerde structurele informatie van de eiwit-bindingsholte bezit, kan het soms lastig zijn om de bindingsaffiniteit van fragmenten en virtual screening hits te vergroten. Chemische modificaties van hit moleculen resulteren soms in onverwachte veranderingen in oriëntatie van het molecuul binnen de eiwit-bindingsholte. Bovendien kan de vorm van een eiwit onder invloed van een gemodificeerd ligand onverwachts veranderen. Daarnaast resulteert het maken van additionele interacties met de bindingholte niet altijd in een toename van bindingsaffiniteit. Dit komt doordat bindingsaffiniteit niet rechtsreeks correleert met de fysieke interacties die een ligand met de bindingsholte maakt. Bindingsaffiniteit moet echter gezien worden als een gemiddelde waarde die ook afhankelijk is van veranderingen in de conformaties van het ligand en eiwit en veranderingen in de positie van aanwezige watermoleculen. Door middel van thermodynamische analyse is het mogelijk om bindingsaffiniteit onder te verdelen in een enthalpische en een entropische

bijdrage. De enthalpische bijdrage correspondeert met het aangaan en verbreken van fysieke interacties tussen ligand, eiwit en watermoleculen tijdens het bindingsproces. Terwijl entropische bijdragen voortkomen uit veranderingen in de conformatie van het ligand, het eiwit en veranderingen in de positionering van watermoleculen. Het moge duidelijk zijn dat het bepalen van de afzonderlijke thermodynamische parameters, enthalpie en entropie, meer inzichten verschaft in het bindingsproces tussen eiwitten en liganden dan het bepalen van bindingsaffiniteit alleen. In **hoofdstuk 3** wordt beschreven hoe thermodynamische bindingsparameters van fragment-eiwit complexen bepaald kunnen worden en hoe de verkregen informatie kan bijdragen aan een meer efficiënt optimaliseringsproces van fragmenten.

### Groeien van een fragment

In **hoofdstuk 4** wordt een studie beschreven waar we specifiek kijken naar de veranderingen in thermodynamische bindingsprofielen bij het optimaliseren van een fragment. Door het vergelijken van een kristalstructuur van een complex van AChBP met een fragment met de kristalstructuur van de natuurstof lobeline gebonden aan AChBP, werd een interessante conformationele verandering binnen de AChBP bindingsholte zichtbaar. Lobeline induceert namelijk een beweging van een specifiek tyrosine residue (tyrosine-flip) waardoor een nieuwe kleine bindingsholte (lobeline-holte) wordt geopend. Een gedeelte van het lobeline molecuul maakt vervolgens interacties met deze kleine bindingsholte. Door het vergelijken van beide kristal structuren kregen wij het idee dat we de bindingsaffiniteit van het fragment zouden kunnen vergroten door deze in de lobeline-holte te groeien. Deze op structuren gebaseerde fragment optimalisering bleek een efficiënte manier om de bindingsaffiniteit van het fragment te vergroten en er werd in korte tijd een 150-maal toename in bindingsterkte bewerkstelligt. Verkregen kristalstructuren lieten zien dat de ontwerpstrategie succesvol is geweest, aangezien het geoptimaliseerde ligand inderdaad de tyrosine-flip had geïnduceerd en interacties met de lobeline-holte werden waargenomen. Een thermodynamische analyse gaf aan dat de toename in bindingsaffiniteit toe te schrijven is aan additionele enthalpische interacties met de lobeline-holte, welke echter gedeeltelijk gecompenseerd werden door ongunstige veranderingen in entropie. Deze veranderingen in thermodynamisch bindingsprofiel kunnen verklaard worden met het gegeven dat de additionele interacties met de lobeline-holte enthalpisch gunstig zijn (extra fysieke interacties tussen ligand en eiwit), maar entropisch ongunstig doordat hierdoor ligand en eiwit meer beperkt zijn geraakt in hun bewegingsvrijheid. Daarmee komen we op de belangrijkste bevinding van deze studie en dat is dat de geobserveerde verandering in thermodynamisch bindingsprofiel bij het groeien van het fragment indicatief is voor interacties met de lobeline-holte. De behaalde resultaten laten zien dat thermodynamische analyse informatie kan geven over hoe een ligand bindt aan een eiwit-bindingsholte. Dit is belangrijke informatie die vervolgens gebruikt zou kunnen worden om de bindingsaffiniteit verder te vergroten.

Bovendien liet de in **hoofdstuk 4** beschreven studie zien dat er een significant verschil in toegankelijkheid van de lobeline-holte bestaat tussen AChBP afkomstig van de californische zeehaas (*Aplysia californica*) en AChBP afkomstig van de poelslak (*Lymnaea stagnalis*). Door middel van mutagenese experimenten hebben

wij bewijs aangevoerd dat stabilisatie van de tyrosine-flip door een specifiek aminozuur residue in de bindingsholte van AChBP afkomstig van *Aplysia californica* (Ac-AChBP) in een toegankelijke lobeline-holte resulteert. Deze stabilisatie is afwezig in AChBP afkomstig van *Lymnaea stagnalis* (Ls-AChBP). Onze bevindingen laten zien dat het hierdoor mogelijk is om de bindingsaffiniteit selectief voor Ac-AChBP te vergroten ten opzichte van Ls-AChBP. Een interessant gegeven is dat het tyrosine-flip stabiliserende aminozuur residue zich niet in de directe nabijheid van de bindingsplaats van het ligand bevindt en dus op afstand van invloed is op het bindingsproces. Er zijn aanwijzingen dat we deze resultaten kunnen vertalen naar de therapeutisch relevante humane nAChRs en dat het misschien mogelijk is om de lobeline-holte te gebruiken om meer selectieve nAChR liganden te ontwikkelen en daarmee bijwerkingen van toekomstige medicijnen die ingrijpen op de nAChRs te verminderen.

In **hoofdstuk 5** wordt een studie beschreven waarin een virtual screening hit geoptimaliseerd wordt met betrekking tot bindingsaffiniteit voor AChBP. Hiertoe wordt wederom gebruikt gemaakt van gedetailleerde structurele informatie die in een eerdere studie is verkregen door AChBP te kristalliseren in aanwezigheid van het virtual screening hit molecuul. Er werden twee series chemische verbindingen gesynthetiseerd. De bindingsaffiniteit experimenten lieten verschillende structuur-activiteits relaties (SAR) tussen de twee series moleculen zien, wat duidt op een verschil in bindingsoriëntatie. Eveneens werd er een verschil in SAR tussen Ac- en Ls-AChBP waargenomen. Deze SAR verschillen zijn indicatief voor een verschil in toegankelijkheid van de lobeline-holte tussen Ac- en Ls-AChBP. Bindingsaffiniteit studies op de humane nAChRS lieten zien dat de gerealiseerde toename in bindingsaffiniteit voor AChBP door chemische modificaties van de virtual screening hit, zich niet hebben vertaald naar de humane nAChRS. Deze resultaten laten zien dat AChBP limitaties heeft als een model-eiwit voor de nAChRs. Structurele informatie van AChBP kan gebruikt worden om door middel van virtual screening nieuwe liganden voor de nAChRs te vinden, maar heeft zijn beperkingen in het gebruik om de bindingsaffiniteit voor de nicotine receptoren te vergroten.

### **Dubbele werking tegen ontstekingen**

In **hoofdstuk 6**, hebben we gebruik gemaakt van structurele informatie van AChBP, om bestaande niet-steroïde ontstekingsremmers (non-steroidal anti-inflammatory drugs; NSAIDs) zodanig te modificeren dat deze in staat zouden zijn om de humane  $\alpha 7$  nAChRs te activeren. Van deze nicotinerge receptor is namelijk recent aangetoond dat het een rol speelt in ontstekings-gerelateerde ziektes zoals bijvoorbeeld reumatoïde artritis. Via deze weg, proberen wij nieuwe ontstekingsremmers te ontwikkelen die via twee verschillende eiwitten een ontstekingsremmend effect uitoefenen. Onze strategie is er op gericht dat de gemodificeerde NSAID in het lichaam van de patiënt eerst de  $\alpha 7$  nAChR activeert om vervolgens uiteen te vallen tot de oorspronkelijke NSAID. De NSAID zal dan via een ander eiwit, cyclooxygenase-2, een tweede ontstekingsremmend effect uitoefenen. Op deze manier hopen we nieuwe ontstekingsremmers te verkrijgen die een sterker effect laten zien vergeleken met de oorspronkelijke NSAID.

Om te bepalen welke NSAIDs het meest geschikt zijn om het gewenste  $\alpha 7$  nAChR effect in te bouwen door middel van chemische modificaties, hebben we eerst

gebruik gemaakt van geavanceerde computersoftware om te voorspellen welke gemodificeerde NSAIDs aan het model eiwit voor de  $\alpha 7$  nAChR, AChBP, zouden kunnen binden. Op basis van deze resultaten zijn er uiteindelijk vijf NSAIDs geselecteerd en chemisch gemodificeerd. Deze aanpak bleek erg succesvol aangezien alle vijf gemodificeerde NSAIDs een vergelijkbare bindingsaffiniteit voor de  $\alpha 7$  nAChR als nicotine vertoonden. Van nicotine is in eerder onderzoek al aangetoond dat het via de  $\alpha 7$  nAChR een ontstekingsremmend effect uitoefent. Er is echter nog een tweede voorwaarde voor een molecuul om via de  $\alpha 7$  nAChR een ontstekingsremmend effect uit te oefenen en dat is dat naast binding aan de receptor deze ook geactiveerd dient te worden. Door middel van additionele biochemische experimenten hebben we kunnen aantonen dat één van de gemodificeerde NSAIDs inderdaad in staat is om de  $\alpha 7$  nAChR te activeren. Bovendien hebben we experimenten uitgevoerd die laten zien dat de gemodificeerde NSAID in menselijk serum uiteindelijk uiteen zal vallen tot de oorspronkelijke NSAID. Deze initiële resultaten laten zien dat onze ontwerpstrategie juist was en dat we een molecuul hebben ontwikkeld dat ontstekingen via twee verschillende eiwitten kan remmen. Op dit moment worden additionele studies uitgevoerd in celsystemen of deze dubbele werking werkelijk bijdraagt aan een betere remming van ontstekingen.

## Conclusies

In het afsluitende **hoofdstuk 7**, worden de belangrijkste resultaten samengevat en geëvalueerd of de onderzoeksdoelstellingen uiteengezet in **hoofdstuk 2** gehaald zijn. Op de eerste plaats wilden wij met het onderzoek beschreven in dit proefschrift onze kennis vergroten over hoe de bindingsaffiniteit van fragmenten efficiënt geoptimaliseerd kan worden. Uit onze studies blijkt dat het combineren van structurelementen afkomstig van verschillende moleculen (fragment merging) een zeer efficiënte manier is om de bindingsaffiniteit te vergroten. Bovendien is gebleken dat anticiperen op mogelijke conformationele veranderingen van de bindingsholte eveneens een effectieve methode kan zijn om bindingsaffiniteiten te vergroten. Daarnaast waren we benieuwd of thermodynamische analyse kan bijdragen aan een meer efficiënt fragment optimaliserings proces. Aan de hand van de resultaten van **hoofdstuk 4** kunnen wij concluderen dat dit inderdaad het geval is en dat thermodynamische analyse meer inzichten verschaft dan het meten van bindingsaffiniteit alleen. Bovendien hebben we aangetoond dat aminozuur residuen die zich niet direct in de bindingsholte bevinden, een belangrijke rol kunnen spelen in ligand-eiwit interacties. Uiteraard was één van onze doelstellingen om bevindingen op AChBP te transleren naar de therapeutisch relevante humane nAChRs. Dit is in twee opzichten gelukt. Ten eerste kan de ontdekking dat interacties met de lobeline-holte liganden selectief maken voor Ac-AChBP ten opzichte van Ls-AChBP, mogelijkwerwijs gebruikt worden om selectiviteit voor specifieke subtypes van de nAChRs te bewerkstelligen. Ten tweede is in **hoofdstuk 6** een fragment geoptimaliseerd tot een nieuw type ontstekingsremmer dat een dubbele ontstekingsremmende werking via zowel de  $\alpha 7$  nAChR als COX-2 uitoefent. Er kan dus geconcludeerd worden dat aan alle onderzoeksdoelstellingen die in **hoofdstuk 2** zijn uiteengezet is voldaan.

