



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Activity-based protein profiling in drug-discovery

Esbroeck, A.C.M. van

Citation

Esbroeck, A. C. M. van. (2019, May 28). *Activity-based protein profiling in drug-discovery*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/74006>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/74006>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The following handle holds various files of this Leiden University dissertation:

<http://hdl.handle.net/1887/74006>

Author: Esbroeck, A.C.M. van

Title: Activity-based protein profiling in drug-discovery

Issue Date: 2019-05-28



Nederlandse samenvatting

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift is het verkennen van de toepasbaarheid van activiteit gebaseerde eiwitprofilering in medicijnontwikkeling.

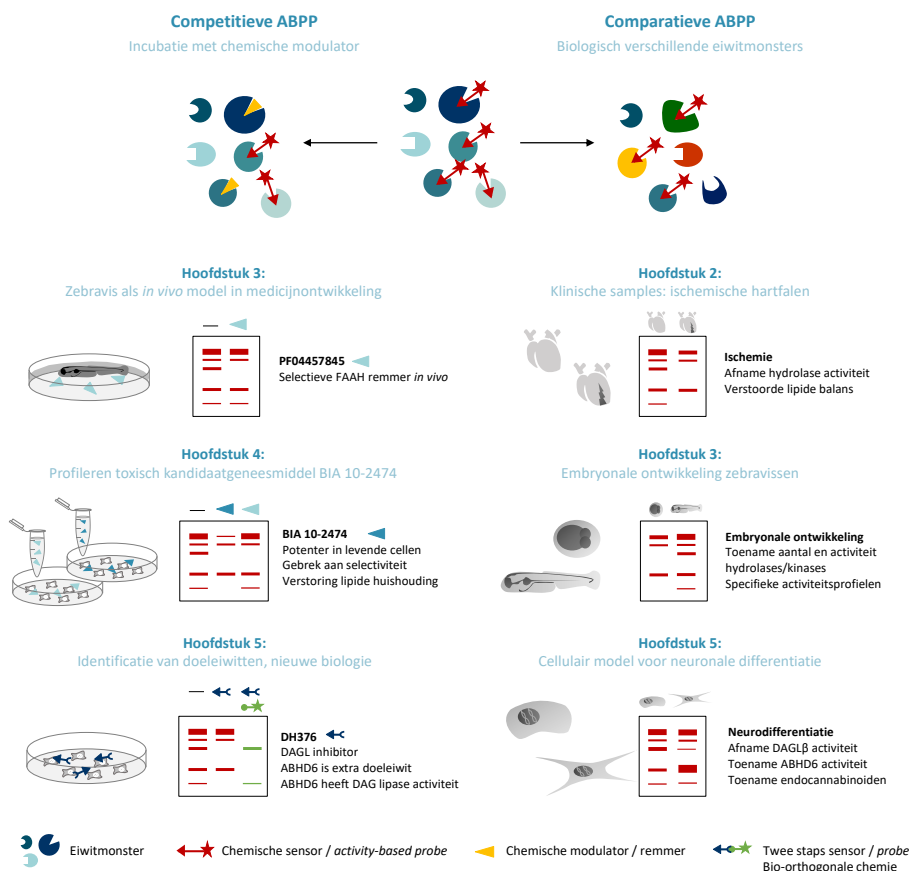
De zoektocht naar behandelmethoden voor ziekten en voor symptoomverlichting gaat enkele duizenden jaren terug. Ondanks grote ontwikkelingen in de medische wetenschap is medicijnontwikkeling nog steeds een ingewikkeld en uitdagend proces. **Hoofdstuk 1** beschrijft de gang van zaken in de moderne medicijnontwikkeling. Deze baseert zich met name op het concept dat een verstoring van de biologische balans een bepaald ziektebeeld met zich meebrengt. Door eiwitten die deze onbalans veroorzaken te moduleren met behulp van chemische stoffen, kan een ziektebeeld (deels) verholpen worden. De identificatie en validatie van een eiwit als therapeutisch aangrijpingspunt vormt vaak het begin van het medicijnontwikkelingsproces. In de daaropvolgende fases worden chemische modulators van het doeleiwit geïdentificeerd, geoptimaliseerd en uitvoerig getest in preklinische modellen, waarna het kandidaat geneesmiddel uiteindelijk ook in de kliniek wordt getest. De gemiddelde doorlooptijd van de ontwikkeling van één nieuw medicijn is 12 tot 14 jaar en de kosten lopen op tot ruim 2,5 miljard dollar. Belangrijke redenen voor de lange duur en hoge kosten van de ontwikkeling zijn onverwachte toxiciteit en onvoldoende werkzaamheid van het kandidaat geneesmiddel in late testfases.

Om het medicijnontwikkelingsproces te verbeteren, worden voortdurend nieuwe technieken en strategieën ontwikkeld. In de laatste jaren is activiteit gebaseerde eiwitprofilering (*activity-based protein profiling*, ABPP) een krachtige techniek gebleken in de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen (Figuur 1). ABPP maakt het mogelijk om het enzymatisch actieve deel van bepaalde eiwitklassen te bestuderen in complexe eiwitmonsters. De methode maakt gebruik van chemische sensoren (*activity-based probes*) die covalent met actieve enzymen reageren. Een label aan de sensor maakt het mogelijk de doeleiwitten in kaart te brengen, bijvoorbeeld door fluorescente labels voor directe visualisatie met behulp van gel-analyse (*SDS-PAGE*) of een affiniteitslabel voor zuivering en identificatie met behulp van massaspectrometrie (MS). ABPP maakt het mogelijk om het activiteitsprofiel van verschillende biologische toestanden te vergelijken (comparatieve ABPP), zoals ziek en gezond weefsel, wat kan leiden tot de ontdekking van nieuwe therapeutische aangrijpingspunten. Tevens kan de techniek gebruikt worden om de potentie en de selectiviteit van chemische modulators of experimentele geneesmiddelen te testen, door bijvoorbeeld levende cellen met het medicijn te behandelen en vervolgens het activiteitsprofiel van behandelde en onbehandelde cellen te vergelijken (competitieve ABPP).

In **Hoofdstuk 1** wordt tevens het endocannabinoïde systeem (ECS) geïntroduceerd. Het ECS medieert de psychoactieve effecten van THC, de actieve stof in *Cannabis sativa* waaraan het systeem haar naam dankt. De cannabinoïde receptoren werden oorspronkelijk ontdekt als de doeleiwitten van THC, maar kunnen eveneens geactiveerd worden door lichaamseigen liganden, de endocannabinoïden 2-arachidonoylglycerol (2-AG) en anandamide. Samen met de enzymen verantwoordelijk voor hun aanmaak en afbraak en de receptoren vormen zij het ECS. De brede rol van het ECS in verschillende fysiologische en pathologische processen maakt dit systeem een bijzonder interessante bron van potentiële therapeutische aangrijpingspunten.

Het ECS is onder meer betrokken bij diverse cardiovasculaire processen en speelt een belangrijke rol in verschillende hart- en vaatziekten. In **Hoofdstuk 2** werden de endocannabinoïden en de bijbehorende metabole enzymen onderzocht in hartmonsters van patiënten met eindstadium ischemisch hartfalen met behulp van ABPP en lipidomics (een methode voor de analyse van lipiden met behulp van massaspectrometrie). Lipide-analyse bracht twee categorieën aan het licht binnen de ischemische hartmonsters; de een overeenkomstig met de controleharten, de ander met verlaagde niveaus van 2-AG en een sterke toename van anandamide, andere *N*-acylethanolamines en vrije vetzuren. Het afwijkende lipide profiel ging gepaard met een afname in activiteit van 13 van de 31 gedetecteerde hydrolases, inclusief monoacylglycerol lipase, dat betrokken is bij de afbraak van 2-AG. Deze bevindingen suggereren een biologisch verschil tussen de ischemische hartmonsters, ondanks het ontbreken van klinisch kenmerken die de patiënten duidelijk van elkaar onderscheiden.

De ABPP-methodologie werd in **Hoofdstuk 3** toegepast in een *in vivo* modelsysteem. Recentelijk heeft de zebravis (*Danio rerio*) aan populariteit gewonnen als modelsysteem voor vroege embryonale ontwikkeling. Bovendien worden de larven steeds vaker gebruikt als een preklinisch modelorganisme in medicijnontwikkeling en voor toxicologische testen. Met behulp van comparatieve ABPP werd het activiteitsprofiel van twee eiwitklassen, de serine hydrolases en de kinases, in kaart gebracht gedurende de eerste vijf dagen van de embryonale ontwikkeling. In totaal werden met behulp van massaspectrometrie 45 hydrolases en 51 kinases geïdentificeerd. Het aantal gedetecteerde hydrolases en kinases nam toe gedurende de ontwikkeling en correleerde met specifieke ontwikkelingsprocessen. Daarnaast werd de competitieve ABPP-methode toegepast om eenvoudig *in vivo* selectiviteit van chemische modulators te kunnen bepalen. PF04457845, een remmer van de serine hydrolase *fatty acid amide hydrolase* (FAAH), werd gebruikt als modelmolecuul en liet een zeer schoon interactieprofiel zien. Het effect van FAAH-inhibitie werd bevestigd met behulp van lipidomics.



Figuur 1: Visuele samenvatting. Schematische weergave van de toepassingen van ABPP in medicijnontwikkeling en celbiologie zoals beschreven in dit proefschrift.

In **Hoofdstuk 4** werd de competitieve ABPP-methode toegepast om het interactieprofiel van het kandidaat geneesmiddel BIA 10-2474, een *fatty acid amide hydrolase* (FAAH) remmer, te onderzoeken. In een recente klinische studie overleed één proefpersoon aan de gevolgen van hersenschade na toediening van BIA 10-2474 en werden vier anderen opgenomen met milde tot ernstige neurologische klachten. Aangezien eerder geteste FAAH-remmers (zoals PF04457845) klinisch veilig waren bevonden, werd er verondersteld dat onbedoelde interacties van BIA 10-2474 met andere eiwitten een bijdrage leverden aan de neurotoxiciteit van het molecuul. *In vitro* bleek BIA 10-2474 een matig potente, maar vrij selectieve FAAH-remmer met α , β -hydrolase domain containing protein 6 (ABHD6) en FAAH2 als enige onbedoeld geremde eiwitten (*off-targets*) in humaan hersenlysaat. In een cellulair systeem bleek BIA 10-2474 echter veel potenter en bovendien beduidend minder selectief. In behandelde celculturen van humane corticale neuronen werden drie extra *off-targets* van BIA 10-2474 geïdentificeerd, te weten patatin-like phospholipase domain containing protein 6, carboxyl esterase 2 en phospholipase 2 group XV. De klinisch veilige PF04457845, daarentegen, was selectief en remde enkel FAAH en FAAH2. Alle geïdentificeerde interactiepartners van BIA 10-2474 zijn betrokken bij lipidestofwisseling. Lipidomics wees uit dat BIA 10-2474 zodoende de lipidehuishouding in zenuwcellen verstoort, wat mogelijk heeft bijgedragen aan de klinische neurotoxiciteit van dit experimentele geneesmiddel. De relatieve causaliteit van de geïdentificeerde BIA 10-2474 *off-targets* kon echter niet worden vastgesteld, mede doordat klinische monsters van de behandelde vrijwilligers niet beschikbaar waren.

Hoofdstuk 5 demonstreerde dat ABPP, behalve voor medicijnontwikkelingsstudies, ook een zeer waardevolle methode is voor het beantwoorden van celbiologische vraagstukken. De endocannabinoïde 2-AG is een belangrijk signaalmolecuul in het centraal zenuwstelsel, waar het samen met de cannabinoïde receptor (CB1R) een rol speelt in neuronale differentiatie. Biochemische, farmacologische en genetische studies hebben aangetoond dat diacylglycerol lipase α en β (DAGL α , DAGL β) de voornaamste enzymen zijn die 2-AG produceren in de hersenen, door het katalyseren van de hydrolyse van diacylglycerol (DAG) naar 2-AG. Tijdens retinolzuur-geïnduceerde differentiatie van Neuro-2a, een veelgebruikt cellulair model voor neuronale differentiatie, namen cellulaire 2-AG-niveaus toe. De relatieve bijdrage van de 2-AG-producerende enzymen werd in **Hoofdstuk 5** onderzocht met behulp van ABPP, farmacologische en genetische methoden. Inhibitie van DAGL α en β met DAGL-inhibitor DH376 bracht het cellulaire 2-AG-niveau vrijwel volledig omlaag en vertraagde de differentiatie. Genetische inactivatie van DAGL α en/of DAGL β door middel van CRISPR/Cas9-gemedieerde *knockdown* had echter geen effect op cellulaire 2-AG-niveaus. Deze data suggereren de aanwezigheid van alternatieve 2-AG producerende enzymen, die geïnhibeerd worden door DH376. DAGL β en ABHD6 werden geïdentificeerd als de enige doelenzymen van DH376 in Neuro-2a met behulp van competitieve ABPP en bio-orthogonale chemie. In een biochemische assay

hydrolyseerde recombinant ABHD6 een fluorescent DAG-substraat, in een cellulair systeem zorgde overexpressie van ABHD6 voor een afname van endogeen DAG en een driedubbele *knockdown* van DAGL α , DAG β en ABHD6 verlaagde 2-AG-niveaus in Neuro-2a. Deze data wijzen erop dat ABHD6 diacylglycerol lipase activiteit bezit, naast de eerder gerapporteerde monoacylglycerol lipase activiteit. Ten slotte werd met comparatieve ABPP aangetoond dat DAGL β activiteit verminderde tijdens Neuro-2a differentiatie, terwijl ABHD6 activiteit sterk verhoogde, wat een rol voor ABHD6 in neuronale differentiatie impliceert.

In **Hoofdstuk 6** werd het uitgevoerde onderzoek samengevat en werden tevens enkele startpunten voor vervolgonderzoek aangereikt. In navolging op **Hoofdstuk 4**, werd aangetoond dat inhibitie van ABHD6 door BIA 10-2474 resulteerde in ophoping van het inactieve eiwit. Dit is in het bijzonder relevant omdat ABHD6, onafhankelijk van de katalytische activiteit, een rol speelt in het transport van receptoren. Mogelijk kan inhibitie van ABHD6, met ophoping van het inactieve eiwit als gevolg, op deze manier de neuronale signaaltransductie verstoren. Naar aanleiding van **Hoofdstuk 5**, werden ook de niveaus van andere lipiden tijdens de neuronale differentiatie onderzocht. Naast 2-AG was ook de endocannabinoïde anandamide verhoogd, evenals verschillende andere *N*-acylethanolamines. De rol van deze lipiden in differentiatie van Neuro-2a kan in de toekomst verder onderzocht worden met behulp van de CRISPR/Cas9-gemedieerde *knockdowns* van de enzymen verantwoordelijk voor de aanmaak en afbraak van deze lipiden (respectievelijk *N*-acylphosphatidyl ethanolamine phospholipase D (NAPE-PLD) en FAAH) die in **Hoofdstuk 6** omschreven staan. Tot slot werden in **Hoofdstuk 6** de uitdagingen in de ABPP-methodologie besproken en werd het toekomstperspectief van ABPP in medicijnontwikkeling geschetst.

Tezamen laat het onderzoek dat dit proefschrift beschrijft, zien dat activity-based protein profiling een veelzijdige en waardevolle techniek is in medicijnontwikkeling en celbiologie. Comparatieve ABPP kan bijdragen aan de ontdekking van nieuwe therapeutische aangrijpingspunten door de vergelijking van activiteitsprofielen in klinische monsters te faciliteren (Hoofdstuk 2). Competitieve ABPP daarentegen biedt een uitkomst voor de identificatie van doelenzymen van chemische modulators in fenotypische screens, bijvoorbeeld in zebrafish embryo's (Hoofdstuk 3). Bovendien kan competitieve ABPP tot nieuwe inzichten leiden door het profileren van nieuwe experimentele geneesmiddelen, zowel retrospectief zoals beschreven voor BIA 10-2474 (Hoofdstuk 4), als prospectief door de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen te sturen. Daarnaast is ABPP een waardevolle toevoeging aan de celbiologische gereedschapskist, waar ze bijdraagt aan nieuwe inzichten in biologische processen zoals embryonale ontwikkeling (Hoofdstuk 3) en neuronale differentiatie (Hoofdstuk 5). Naar verwachting zullen de continue ontwikkelingen in de ABPP-methodologie en verdere integratie van de techniek in onderzoek binnen én buiten de academie, belangrijke inzichten voortbrengen en een waardevolle bijdrage leveren aan medicijnontwikkeling in de (nabije) toekomst.