

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/18671> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Albers, Harald

Title: Development of ATX and DUSP inhibitors : inhibiting phosphate ester hydrolysis in biology

Issue Date: 2012-04-04

Nederlandse samenvatting

Ontwikkeling van ATX- en DUSP-remmers

ATX-remmers

Autotaxine (ATX) is een enzym met lysofosfolipase D activiteit en is verantwoordelijk voor de productie van het bioactieve lipide lysofosfatidezuur (LPA) in de bloedcirculatie. LPA activeert verschillende processen in de cel zoals proliferatie, migratie en overleving van de cel. ATX en LPA lijken betrokken te zijn bij diverse ziekten zoals kanker, (chronische) ontstekingen en fibrose. Het is tot op heden echter nog niet duidelijk wat de exacte functies van ATX en LPA zijn in de ontwikkeling van deze ziektes. ATX-remmers kunnen hierin duidelijkheid verschaffen door bijvoorbeeld ATX te remmen in diermodellen waarin ATX-gerelateerde ziektes zijn opgewekt. Indien deze ATX-remmers een positief effect vertonen in de genoemde diermodellen dan kunnen ze direct verder ontwikkeld worden tot nieuwe medicijnen voor de mens.

In het begin van dit onderzoek waren er nog geen actieve en selectieve remmers voor ATX bekend. Er is daarom eerst een bibliotheek van ~40.000 commercieel verkrijgbare kleine moleculen getest op hun mogelijkheid om ATX te remmen. Dat heeft geresulteerd in de identificatie van een chemische klasse van verbindingen van gesubstitueerde thiazolidine-2,4-dionen, die ATX selectief bleken te remmen. De beste verbinding van deze klasse is geselecteerd en chemisch gemodificeerd om het vermogen als ATX-remmer te optimaliseren. Deze optimalisatie heeft uiteindelijk een ATX-remmer opgeleverd, genaamd HA130, met een 100 maal sterkere activiteit voor ATX. De belangrijkste modificatie was de introductie van een boorzuurgroep, ontworpen om te binden aan het katalytische threonine-residu in het actieve centrum van ATX om zo de activiteit van ATX te blokkeren.

Vervolgens is het effect van HA130 op de productie van LPA in het bloed van muizen onderzocht. Toediening van deze remmer aan muizen resulteerde in een zeer snelle verlaging van het LPA-niveau in het bloed. Hieruit bleek dat de productie en degradatie van LPA in de bloedcirculatie veel dynamischer is dan eerder was aangenomen. ATX-remmers kunnen dus het LPA-niveau in de bloedcirculatie verlagen en hiermee een belangrijke bijdrage leveren om de rol van ATX en LPA in ziekten verder op te helderen.

Tijdens de voorgaande studies was de ruimtelijke structuur van ATX nog niet bekend. Deze structuur is belangrijk om de functie en het mechanisme van ATX op atomair niveau te bestuderen. Recentelijk is er een kristalstructuur van ATX gebonden aan de ATX-remmer HA155 opgehelderd, welke laat zien hoe HA155 bindt aan ATX. HA155 is de naam van een actiever boorzuuranalogue van de hierboven beschreven HA130. Deze kristalstructuur bevestigt de hypothese dat het boorzuur in HA155 het actieve centrum van ATX blokkeert door te binden aan het nucleofiele zuurstofatoom van het katalytische threonine-residu in ATX. De 4-fluorobenzylgroep van HA155 bindt aan een hydrofobe (waterschuwe) uitsparing

waar normaal gesproken de hydrofobe staart van LPA aan bindt. De kennis van hoe het HA155 molecuul aan ATX bindt geeft een idee waar in de chemische structuur van HA155 modificaties toegestaan zijn. Gebruikmakend van deze kennis zijn er verschillende nieuwe boorzuuranalogen van HA155 ontworpen en gemaakt. Dit heeft uiteindelijk geresulteerd in een zeer actief boorzuraanalog van HA155, genaamd *E-28*, dat een *E*-geconfigureerde dubbele binding heeft in plaats van een *Z*-configuratie zoals in HA155 en alle andere geteste analogen van HA155. Dit betekent dat de 4-fluorobenzylgroep in *E-28* een compleet andere ruimtelijke oriëntatie heeft dan in HA155. Men zou dan ook verwachten dat deze 4-fluorobenzylgroep anders bindt aan de hydrofobe uitsparing in ATX, in vergelijking met HA155. Om te verklaren hoe *E-28* zou kunnen binden aan ATX zijn er computersimulaties uitgevoerd. In deze studie hebben we de binding van *E-28* aan het actieve centrum van ATX gesimuleerd. Dit suggereerde dat *E-28* anders bindt aan de hydrofobe uitsparing in ATX in vergelijking met HA155 en andere *Z*-geconfigureerde analogen. Echter, een kristalstructuur van *E-28* gebonden aan ATX zal dit moeten bevestigen. De vinding dat *E-28* mogelijk anders bindt aan de hydrofobe uitsparing in ATX dan HA155, kan gebruikt worden voor het ontwerpen van nieuwe ATX-remmers.

DUSP-remmers

Een ander belangrijk onderwerp beschreven in dit proefschrift is de bestrijding van bacteriële infecties door middel van het remmen van duale specificiteit fosfatasen (DUSP). Bacteriële infecties zijn nog steeds een grote sociale bedreiging. Zo sterven jaarlijks ongeveer 500.000 mensen aan buiktyfus veroorzaakt door de bacterie *Salmonella Typhi*. De meeste sterfgevallen van deze ziekten vinden plaats in de derde wereld. Ook de recente uitbraak van de Enterohemorragische *Escherichia coli* (EHEC) bacterie in Europa laat zien dat bacteriële infecties serieus genomen moeten worden. Door de resistentie van bacteriën voor meerdere typen antibiotica (multidrug resistance, MDR) wordt het steeds moeilijker om deze bacteriële infecties te behandelen. Nieuwe strategieën zijn daarom nodig om deze resistente bacteriën te overwinnen.

Dikwijls verschuilen pathogene (ziekmakende) bacteriën zich in de cellen van de gastheer om zo te kunnen ontsnappen aan het immuunsysteem. Daarnaast hebben deze bacteriën bepaalde eiwitten van de gastheercel nodig om te kunnen overleven. Het ontwikkelen van geneesmiddelen die aangrijpen op deze gastheer eiwitten, kan een alternatieve strategie zijn om bacteriële infecties te behandelen. In deze studie is er gekeken naar welke fosfatasen, een klasse van eiwitten, van humane gastheercellen essentieel zijn voor de overleving van de bacterie *Salmonella (S.) typhimurium*. Dit bleken de fosfatasen DUSP3, 11 en 27 te zijn.

Daarnaast zijn er moleculen, die ontworpen zijn om DUSP-fosfatasen te remmen, getest op de vermindering van de *S. typhimurium*-infectie van menselijke gastheercellen. Eén van deze verbindingen bleek de eerder geïdentificeerde DUSP-eiwitten van de gastheer die

essentieel zijn voor *S. typhimurium*-infectie te remmen. Deze verbinding werd vervolgens geoptimaliseerd, wat resulteerde in een actieve en selectieve remmer van DUSP3, met een minstens 15-voudig verhoogde activiteit in vergelijking met DUSP27. Tegenlijkertijd is de kristalstructuur van DUSP27 opgelost naast de al bekende structuur van DUSP3. Een computersimulatie van de binding van deze remmer met zowel DUSP3 als met DUSP27 suggereert een waterstofbrug tussen deze remmer en een tyrosine residu in DUSP3, dat niet gevormd kan worden in DUSP27. Dit is een mogelijke verklaring voor de selectiviteit van deze remmer voor DUSP3. Het tyrosine residu van DUSP3 dat een waterstofbrug vormt met de selectieve DUSP3-remmer, is niet geconserveerd in de consensus sequentie (HCXXGXXR) die typerend is voor het actieve centrum van de DUSP-familie. Het gebruikmaken van niet-geconserveerde actieve centrum residuen in de DUSP-familie kan mogelijk een goede strategie zijn voor de ontwikkeling van selectieve DUSP-remmers met antibacteriële werking. Het ontwikkelen van selectieve fosfataseremmers is een uitdagende taak door de sterk geconserveerde actieve centrum residuen in fosfatasen.

Concluderend, het remmen van de activiteit van DUSP-eiwitten in de gastheer die essentieel zijn voor bacteriële overleving, lijkt een goede strategie te zijn om bacteriële infecties te bestrijden. Deze nieuwe aanpak kan een nuttige aanvulling zijn op de huidige behandeling van bacteriële infecties die zich alleen richten op het direct doden van de bacterie. Deze nieuwe strategie is ook interessant omdat de ontwikkeling van bacteriële resistentie tegen deze remmers wellicht moeilijker is.

