



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **NMR structural studies of protein-small molecule interactions**

Shah, D.M.

### **Citation**

Shah, D. M. (2014, June 17). *NMR structural studies of protein-small molecule interactions*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/26922>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/26922>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/26922> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Shah, Dipen M.

**Title:** NMR structural studies of protein-small molecule interactions

**Issue Date:** 2014-06-17

## ***Nederlandse Samenvatting***

In de ontwikkeling van geneesmiddelen worden NMR-methoden gebruikt voor tal van toepassingen in het proces van *hit-to-lead* en de uiteindelijke ontwikkeling van potentiële medicijnkandidaten. De beschikbaarheid van 3D structuurinformatie in eiwit-ligand complexen is cruciaal tijdens de verschillende fasen van medicijnontwikkeling. Methoden die op NMR zijn gebaseerd, zijn gevoelig voor zwakke eiwit-ligand interacties, in het gebied waar Röntgenkristallografie het minst effectief is. Helaas zijn traditionele NMR-benaderingen, die uniforme isotoopverrijking vereisen, arbeidsintensief en beperkt tot kleinere eiwitten (< 30-40 kDa) en daarom worden deze methoden niet op grote schaal gebruikt in medicijnontwikkeling. Het belangrijkste doel van het in dit proefschrift beschreven werk was daarom het ontwikkelen en implementeren van efficiënte NMR-technieken die 3D structuurinformatie van eiwit-ligand complexen kunnen opleveren voor het gebruik in de vroege stadia van medicijnontwikkeling. Het werk bestrijkt een groot gebied van klassieke en nieuw-ontwikkelde NMR-technieken, toegepast op diverse moleculaire systemen.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene introductie in het proces van medicijnontwikkeling, in het bijzonder de *fragment based drug discovery*. Dit hoofdstuk beschrijft ook de NMR-methoden die vaak worden gebruikt voor *screening* doeleinden en om 3D structuurinformatie van complexen tussen *target* eiwitten en kleine moleculen te verkrijgen.

In hoofdstuk 2 wordt een *fragment based small molecule discovery* benadering getoetst om remmers te vinden die het bindend vermogen van TEL, een *target*-eiwit in de oncologie, beïnvloeden. TEL is een eiwit dat aan DNA bindt en betrokken is bij

de transcriptieregulatie van veel cellulaire eiwitten die een rol spelen bij angiogenese. TEL wordt beschouwd als een therapeutisch *target* voor pathologische angiogenese in tumoren. In hoofdstuk 2 worden de technieken en benaderingen beschreven die zijn toegepast om kleine moleculen te vinden die specifiek associëren met het DNA-bindende ETS-domein van TEL. Een TINS NMR *fragment screen* werd uitgevoerd om de primaire *hit*-materie (alle bindende moleculen) te vinden. Om het resterende DNA-bindende vermogen van TEL<sub>ETS</sub> te bepalen zijn verschillende technieken gebruikt. Biochemische analyse en structuuranalyse werden uitgevoerd met behulp van NMR-spectroscopie aan het eiwit en *Surface Plasmon Resonance* (SPR) en een *gel-shift assay* werden gebruikt om de DNA-binding van TEL te beschrijven. De reeds beschikbare resonantietoekenningen maakten het mogelijk om de bindingsplaats van zowel het DNA als de *hit*-fragmenten op het eiwitoppervlak vast te stellen. Met behulp van *chemical shift perturbation* analyse kon duidelijk worden vastgesteld dat de bindingsplaats voor het DNA overeenkwam met die van drie fragmenten. Om te onderzoeken of deze fragmenten het TEL<sub>ETS</sub>-DNA complex kunnen verstoren werd een gelretardatie-test uitgevoerd. De resultaten toonden aan dat het TEL<sub>ETS</sub>-DNA complex kon worden verstoord in de aanwezigheid van hoge (millimolair) concentraties van twee fragmenten. De affiniteit voor deze fragmenten is duidelijk erg laag en de specificiteit ten opzichte van andere ETS-bevattende eiwitten moet nog worden onderzocht. Toch vertegenwoordigen deze fragmenten waardevolle uitgangspunten voor medicijnontwikkeling met betrekking tot TEL<sub>ETS</sub>. Dit werk laat zien dat de toepassing van NMR *screening* op een efficiënte manier kan worden gebruikt om *hit*-fragmenten te vinden en dat NMR aan het eiwit kan worden toegepast om structuurinformatie van eiwit-ligand complexen met een lage resolutie te verkrijgen.

In hoofdstuk 3 staat beschreven hoe een *fragment based small molecule discovery* benadering werd geïnitieerd om kleine-molecule remmers te vinden voor Rit1 GTPase, een *target* voor reumatoïde artritis. Cellulaire studies, uitgevoerd door Galapagos BV, lieten zien dat het inactiveren van Rit1 leidde tot lagere hoeveelheden van matrix metalloproteïnen (MMPs) in kraakbeen en dat toegenomen expressie van het gen voor Rit1 die hoeveelheden deed stijgen. MMPs zijn verantwoordelijk voor vermindering van kraakbeenweefsel en veroorzaken dus RA. Daarom is de ontwikkeling van kleine-molecule remmers die Rit1 kunnen inactiveren belangrijk voor een mogelijke behandeling van RA. Hoofdstuk 3 beschrijft de verkregen resultaten van *fragment based screening*, kristallisatie, *analoging* (evaluatie van moleculen met vergelijkbare structuur), *hit development* en een structuuronderzoek van de meest potente verbinding. Een reeks van diverse technieken en methoden werd toegepast. *Hit*-fragmenten werden gevonden met behulp van TINS NMR. Deze fragmenten werden nader getest in een *in vitro* biochemische test. De *hits* en analoge verbindingen konden de GDP/GTP nucleotide-uitwisseling verhinderen. Met andere woorden, de verbindingen waren in staat om de inactieve, GDP-gebonden toestand van Rit1 te stabiliseren. Het mechanisme van deze remmende werking was onduidelijk. Hoge-resolutie 3D structuren van het eiwit-molecule complex zouden inzicht in dit mechanisme kunnen geven. Kristallisatie leverde weliswaar een hoge-resolutie 3D structuur van Rit1 gebonden aan GDP nucleotiden op, maar 3D structuren van eiwit-ligand complexen konden niet worden verkregen. Veel pogingen om het complex te kristalliseren bleven zonder succes, vanwege het lage gehalte aan oplosmiddel in de eiwitkristallen en omdat de eiwitkristallen braken in de aanwezigheid van de meest potente verbinding. Vanwege deze problemen was een NMR-benadering

noodzakelijk. Er werd een paramagnetische NMR methode toegepast, waarbij een *spin label* op GDP werd aangebracht om een *GDP-spin label* te verkrijgen. De paramagnetische NMR-benadering werd gecombineerd met CSP analyse om lage-resolutie informatie over de bindingsplaats van de liganden te verkrijgen. Op grond van de paramagnetische studies met de *GDP-spin label*, gevolgd door *docking* berekeningen, is een nieuw mechanisme voorgesteld voor het afremmen van de GDP/GTP-uitwisseling van Rit1 door de verbinding. Het ligand blokkeert de GDP-nucleotide aan de 'bovenkant' van de nucleotide-bindingsplaats op het eiwit. Door fysiek afschermen van de nucleotide door het ligand wordt de GDP-gebonden toestand van het eiwit gestabiliseerd en de nucleotide-uitwisseling met GTP verhinderd. Dit werk laat zien hoe op NMR-gebaseerde methoden, in dit geval gebruik makend van paramagnetische relaxatie, structuurinformatie kunnen geven in gevallen waar andere biofysische technieken zonder resultaat blijven. In principe kan het *GDP-spin label* worden gebruikt om elke andere GTPase te bestuderen.

In hoofdstuk 4 staat beschreven hoe een andere methode voor vloeistof-NMR is ontwikkeld om op een snelle en efficiënte manier 3D structuurinformatie van complexen tussen eiwitten en kleine moleculen te verkrijgen. Bij de ontwikkeling van deze methode werd gebruik gemaakt van een Hsp90-fragment complex als modelsysteem. Hsp90 gaat interacties aan met een groot aantal andere eiwitten. Verondersteld wordt dat de hydrolyse van ATP de drijvende kracht is achter deze wisselwerkingen. Dit is de reden waarom veel medicijnontwikkeling gericht is op het ontwikkelen van moleculen die binden in de ATP-bindingsplek in het N-terminale domein van Hsp90. De methode maakt gebruik van een fragment dat bindt in de ATP-bindingsplek, gevonden door gebruikmaking van TINS NMR *screening*. Het

belangrijkste doel was om met behulp van dit eiwit/ligand-systeem een efficiënte manier te ontwikkelen om 3D structuurinformatie van een aan een ligand gebonden eiwit te verkrijgen. De methode is gebaseerd op het gebruik van eiwit dat selectief is verrijkt met isotopen in de methylgroepen van isoleucine, leucine en valine residuen. Bij deze methode worden standaard NOESY experimenten gebruikt om een reeks intermoleculaire NOEs in het eiwit-ligand complex te verkrijgen. Deze NOEs werden gebruikt om 3D co-structuren te verkrijgen door moleculaire *docking*. De kristalstructuren waren voor hetzelfde ligand gebonden aan Hsp90 waren reeds beschikbaar in de PDB. Deze structuren laten zien dat er twee of meer lage-energie conformaties van het ligand aanwezig zijn in het complex. In tegenspraak hiermee tonen de NMR data aan dat er in oplossing slechts één overheersende ligandconformatie aanwezig is. Het is een belangrijke vinding dat, ondanks het bescheiden aantal intermoleculaire contacten, de NMR-methode precies dezelfde bindingsplaats en kritische intermoleculaire waterstofbruggen definieert als de kristalstructuur laat zien. Dit suggereert dat de methode niet alleen snel maar ook robuust is. De methode laat zien dat een universele selectieve verrijkingsstrategie kan worden gebruikt om snel een voldoende aantal contacten te identificeren voor een klein molecule dat zwak gebonden is aan een eiwit. Het vormt ook een alternatief voor tijdrovende traditionele NMR benaderingen die uniforme isotoopverrijking met zich mee brengen. De methode is ook toe te passen op eiwitten met hoge moleculegewichten.

In hoofdstuk 5 wordt een algemene discussie van het werk gegeven en er worden toekomstperspectieven besproken voor de ontwikkelde en toegepaste NMR-methoden die in dit proefschrift zijn behandeld.