

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/83257> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Wel, T. van der

Title: Chemical genetic approaches for target validation

Issue Date: 2020-01-22

Samenvatting

Het doel van het onderzoek beschreven in dit proefschrift was het ontwikkelen van een chemisch-genetische strategie die gebruikt kan worden voor 'target engagement' en 'target validatie' studies.

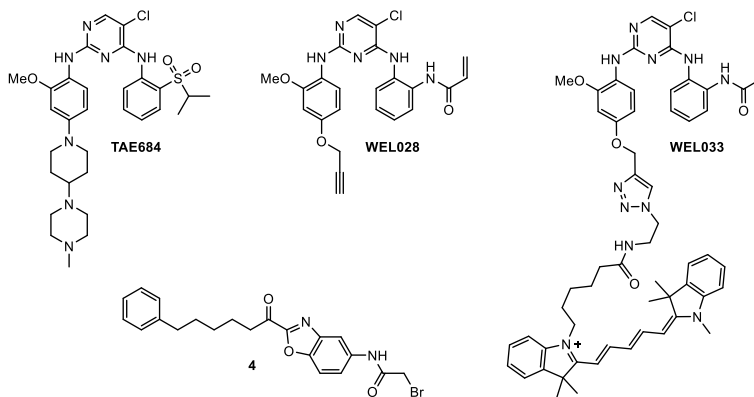
Target engagement en target validatie in medicijnontwikkeling

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de verscheidene stappen van het huidige medicijnontdekking- en ontwikkelingsproces. Het eerste stadium omvat validatie van het therapeutische doel-eiwit (*target*). Dit is vooralsnog een grote uitdaging en afhankelijk van de beschikbaarheid van chemisch gereedschap (*tools*) om de interactie van medicijnen met hun beoogde doel-eiwit (*target engagement*) te bestuderen. Chemische sensoren (*probes*) met een covalente, irreversibele bindingsmodus kunnen als waardevolle tools dienen om deze interacties te visualiseren. Deze sensoren moeten echter voldoen aan strikte criteria op het gebied van potentie, selectiviteit en cel-permeabiliteit en het ontwikkelen van zulke sensoren is vaak een uitdaging op zich. Het vakgebied van de chemische genetica biedt middelen om de potentie en selectiviteit van moleculen te verbeteren door niet enkel het ligand aan te passen, maar ook het doel-eiwit te modificeren. Alhoewel er in het verleden verschillende benaderingen zijn gerapporteerd, zijn deze niet allemaal geschikt voor *target engagement* studies. In het algemeen brengt het gebruik van mutant-eiwitten vaak verstoringen in eiwitvouwing, een verlaging van katalytische activiteit of andere functionele defecten met zich mee. De huidige chemisch-genetische strategieën zijn bovendien allen afhankelijk van het tot overexpressie brengen van een mutant eiwit, wat tot artefacten kan leiden en de cellulaire fysiologie kan verstoren. Nieuwe strategieën en *probes* zijn dus vereist om deze problemen aan te pakken.

Chemische genetica voor visualisatie van gemodificeerde kinases en hun interacties

Hoofdstuk 2 introduceert een chemisch-genetische strategie die het mogelijk maakt om gemodificeerde kinases en hun interactie met remmers te visualiseren. Het doel-eiwit voor deze studie was het tyrosine-kinase FES. Tot op heden waren er geen geschikte chemische tools beschikbaar om FES te valideren als therapeutisch target. De afwezigheid van cysteïneresiduen in de katalytische regio maakt het bovendien moeilijk om chemische sensoren voor FES te ontwikkelen. Aan de hand van een eerder gerapporteerde kristalstructuur van FES werden residuen in de katalytische regio geselecteerd die mogelijk geschikt waren voor mutagenese naar een cysteïne. Deze mutant-eiwitten werden tot expressie gebracht, gezuiverd en geprofileerd in biochemische *assays*, wat tot het inzicht leidde dat serine 700, een aminozuurresidu direct voorafgaand aan het geconserveerde DFG-motief, een uitstekende positie was om in een cysteïne te muteren zonder dat dit de kinase-activiteit, substraatherkenning of eiwit-eiwit-interacties beïnvloedde. Hieropvolgend werden electrofiële derivaten van de breedspectrum kinaseremmer TAE684 ontworpen en gesynthetiseerd. Dit leidde tot de identificatie van WEL028 als een mutant-

specifieke remmer van FES^{S700C} met een laag-nanomolaire *in vitro* en *in situ* potentie (Figuur 1). Profilering van de kinoom-brede selectiviteit onthulde dat WEL028 een veel gunstiger selectiviteitsprofiel had in vergelijking met de uitgangsstof TAE684, met slechts een beperkt aantal prominente *off-targets*. Deze *off-targets* kunnen echter de toepasbaarheid voor functionele studies beperken, bijvoorbeeld wanneer deze kinases betrokken zijn bij dezelfde cellulaire signaleringsroutes of worden geassocieerd met vergelijkbare fysiologische processen als het doel-eiwit. Verdere verbetering van de selectiviteit van WEL028 zou in deze gevallen gunstig zijn. Hoofdstuk 2 leverde tevens bewijs voor een covalente, irreversibele bindingsmodus van WEL028. Conjugatie van een fluorescente groep aan de alkyn-substituent van WEL028 resulteerde in de één-stapssensor WEL033, die in staat is om FES^{S700C} maar niet wild-type FES fluorescent te labelen in cellysaten. Bredere toepasbaarheid van de ontwikkelde chemisch-genetische gereedschapskist werd geïllustreerd met fluorescente labelingsexperimenten op de DFG-1 cysteinemutanten van vier andere kinases.



Figuur 1 – Chemische structuren van uitgangsstof TAE684, mutant-specifieke FES^{S700C}-remmer WEL028, fluorescente sensor WEL033 en mutant-specifieke DAGLα^{L651C}-remmer 4.

In hoofdstuk 3 werd de combinatie van de FES^{S700C}-mutant en de mutant-specifieke sensoren gebruikt om de rol van FES kinaseactiviteit tijdens differentiatie van myeloïde cellen te bestuderen. CRISPR/Cas9-gemedieerde genmodificatie werd gebruikt voor mutagenese van de genomische *FES* locus, wat resulteerde in een homozygote HL-60 FES^{S700C} mutant-cel lijn. Met behulp van de fluorescente sensor WEL033 (Figuur 1) kon endogeen FES^{S700C} gevisualiseerd worden in lysaten van gedifferentieerde HL-60 cellen. Het inzicht in *target engagement* van WEL028 op FES^{S700C} in levende, differentiërende HL-60 cellen leidde tot de ontdekking dat FES activiteit niet vereist is voor myeloïde differentiatie van HL-60 cellen naar macrofagen. Deze resultaten zijn in tegenspraak met voorgaande studies die gebaseerd zijn op overexpressie van FES of op *knockdown* van FES op RNA-niveau en laten de voordelen zien van acute, farmacologische modulatie van endogene kinaseactiviteit. Bovendien illustreren

deze resultaten het belang om *on-target*- en *off-target*-effecten te kunnen onderscheiden. Op hogere concentraties dan vereist voor volledige FES-inactivatie verstoorde WEL028 de differentiatie van HL-60 cellen wel; deze effecten deden zich echter ook voor in de wild-type controlecellen en konden dus toegeschreven worden aan *off-targets*, hoogstwaarschijnlijk kinases uit de MAP kinase-familie. Hoofdstuk 3 besluit met een differentiatiestudie in FES *knockout*-cellen, welke ook gegenereerd werden met behulp van CRISPR/Cas9. Deze *knockout*-cellen behielden de mogelijkheid in een vergelijkbare wijze te differentiëren naar macrofagen als wild-type cellen, wat suggereerde dat FES ook geen essentiële structurele functie heeft als bindingspartner voor andere eiwitten in dit proces.

Hoofdstuk 4 demonstreert hoe de chemisch-genetische methode beschreven in hoofdstuk 2 en de mutant-celijn uit hoofdstuk 3 gebruikt kunnen worden om de rol van kinases in cellulaire processen te bestuderen. Met behulp van een flowcytometrische meetmethode en fluorescente *E. coli*-bacteriën kon worden aangetoond dat FES-activiteit een rol speelt in de het fagocytoseproces van HL-60 neutrofielen. Nadere inspectie van het substraatprofiel van FES (beschreven in hoofdstuk 2) leidde tot de hypothese dat het tyrosine-kinase SYK een potentieel substraat van FES is in dit proces. Co-expressie experimenten lieten zien dat FES inderdaad SYK Y352 fosforyleert *in situ*, dat FES bindingsinteracties kan aangaan met SYK, en dat deze interactie afhankelijk is van FES activiteit. Immunoblotanalyse met fosfo-specifieke antilichamen onthulde dat het blokkeren van SYK Y352 fosforylering met WEL028 de activatie van de eiwitten HS-1 en PLC γ 2 verhinderde, wier activatie beide belangrijk is voor het fagocytoseproces. Deze resultaten suggereren dat FES een signaleringsroute activeert die betrokken is bij de reorganisatie van het actine-cytoskelet, welke vereist is voor de internalisatie van de te doden bacterie. Hoofdstuk 4 besluit met een hypothetisch model waarin FES indirect PLC γ 2 activeert om de lipide-samenstelling van het membraan te veranderen, wat resulteert in zijn eigen dissociatie van het membraan en waarmee de signaleringsinput stopt.

Hoofdstuk 5 beschrijft de eerste stappen naar een chemisch-genetische strategie om het serine hydrolase DAGL α subtype-selectief te kunnen remmen. Verschillende posities in de katalytische regio van DAGL α werden gemuteerd naar een cysteïne en de desbetreffende mutant-eiwitten werden recombinant tot expressie gebracht. Activiteits-gebaseerde eiwitprofilering (*ABPP*) met de twee sensoren MB064 en DH379, alsmede twee substraathydrolyse-assays, werden gebruikt voor biochemische karakterisering van de DAGL α mutanten. Deze methodes toonden aan dat het aanbrengen van mutaties in één bepaalde holte in de katalytische regio desastreuze gevolgen had voor de labeling door sensoren en de hydrolase-activiteit. Daarentegen werden mutaties in een andere bindingsholte veelal getolereerd. Aan de hand van een homologiemodel werden mutant-specifieke enzymremmers ontworpen en gesynthetiseerd, wat leidde tot de identificatie van verbinding **4** (Figuur 1) als remmer van DAGL α ^{L651C} maar niet wild-type DAGL α of andere DAGL α -mutanten. Bovendien was het mogelijk om met deze verbinding

selectieve remming van DAGL α in aanwezigheid van DAGL β te bewerkstelligen in een competitief *ABPP*-experiment op gemengde cellysaten van beide DAGL subtypes. Verbinding **4** vertoonde echter een tweefasige dosis-responscurve in alle gebruikte *assays*, wat duidt op twee verschillende bindingsmodi. De meest potente interactie kwam overeen met een covalente, irreversibele bindingsmodus van Cys651 met de bromoacetamide-groep van **4**, terwijl de andere interactie vermoedelijk overeenkomt met een reversibele binding van de katalytische serine 472 met de α -keto-groep. Verdere optimalisatie van **4** is vereist voordat deze chemisch-genetische strategie toegepast kan worden in cellulaire modelsystemen.

Hoofdstuk 6 rapporteert de optimalisatie en miniaturisatie van een activiteits-*assay* voor het serine hydrolase MAGL, welke gebaseerd is op omzetting van 2-AG, het natuurlijke substraat van MAGL. Deze meetmethode werd vervolgens gebruikt in een *high-throughput screen* waarin 233,820 verbindingen werden getest en welke resulteerde in de identificatie van 1,142 actieve stoffen. Met behulp van deselectie-*assays* en triage werd dit aantal teruggebracht tot een lijst van 50 verbindingen, welke vervolgens verder geprofileerd werden in dosis-respons experimenten. Validatie van deze *hits* in een orthogonaal, competitief *ABPP*-experiment resulteerde in een selectie van 7 verbindingen die het startpunt vormden voor de ontwikkeling van nieuwe, reversibele MAGL-remmers. Het blokkeren van 2-AG hydrolyse met MAGL-remmers is vanuit therapeutisch oogpunt gunstig voor een verscheidenheid aan ziektes, waaronder het syndroom van Tourette, neuroinflammatie, angststoornissen, pijn en kanker. Naast een mogelijke toepassing als toekomstige medicijn kunnen deze reversibele verbindingen bovendien als startpunt dienen voor de ontwikkeling van chemisch-genetische sensoren voor MAGL.

Tot slot

De ontwikkeling van nieuwe medicijnen is afhankelijk van onze kennis van de doel-eiwitten die als aangrijpingspunt dienen voor deze medicijnen. Het valideren van nieuwe therapeutische aangrijpingspunten blijft een grote uitdaging in het huidige medicijnontwikkelingsproces. Validatie van *targets* met genetische methodes komt niet altijd overeen met de effecten van acute modulatie met chemische liganden en het permanente karakter van genetische modulatie kan leiden tot compensatie-effecten. Bovendien is een farmacologische aanpak niet altijd mogelijk door een gebrek aan selectieve, potente modulators.

De chemische genetica combineert de specificiteit van genetische technieken met het acute, dynamische karakter van farmacologische modulators. De specificiteit die verkregen wordt door het gebruik van een gemodificeerd eiwit, stelt men in staat om dezelfde chemische sensor toe te passen op een variëteit aan doel-eiwitten binnen een bepaalde eiwitfamilie, zoals de kinases of serine hydrolases. Bovendien biedt mutagenese van een aminozuurresidu naar een reactieve cysteine de mogelijkheid om covalente

sensoren te ontwikkelen voor eiwitten die van nature geen nucleofiele aminozuren in hun bindingsholtes bevatten, zoals werd geïllustreerd in hoofdstuk 2. Zulke chemische sensoren uitermate nuttige om *target engagement* te visualiseren. Potentiële toepassingen van chemisch-genetische methoden in het targetvalidatieproces werden geïllustreerd in hoofdstuk 3 en 4. De mogelijkheid om vergelijkingsstudies in wild-type en mutant cellen uit te voeren leidde tot het inzicht dat FES activiteit niet vereist is voor myeloïde differentiatie van HL-60 cellen. De chemische genetica kan ook bijdragen aan de ontdekking van nieuwe substraten of functies van bepaalde doel-eiwitten, zoals de identificatie van SYK als een substraat van FES, en de ontdekking dat FES een rol speelt in fagocytose door neutrofielen. Hoofdstuk 5 illustreerde dat een vergelijkbare chemisch-genetische strategie ook toepasbaar is op andere enzymklassen, zoals de serine hydrolases. Tevens werd hier benadrukt dat succesvol ontwerp van mutant-specifieke remmers met een covalente bindingsmodus in grote mate afhankelijk is van eiwitstructuurinformatie en beschikbare (reversibele) remmers die als startpunt kunnen dienen. Hoofdstuk 6 rapporteerde over het gebruik van *high-throughput screening* om nieuwe chemische entiteiten te identificeren met een reversibele bindingsmodus, welke verder ontwikkeld kunnen worden als chemisch-genetische sensoren of toekomstige medicijnen.

Tezamen laat dit proefschrift zien dat het gebruik van chemisch-genetische methoden mogelijkheden biedt om bij te dragen aan de validatie van nieuwe therapeutische aangrijpingspunten.

