

University of Groningen

Fragment-based Discovery Aiming at a Novel Modulation of Malate Dehydrogenase and Beyond

Reyes Romero, Atilio

DOI:
[10.33612/diss.150386440](https://doi.org/10.33612/diss.150386440)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2021

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Reyes Romero, A. (2021). *Fragment-based Discovery Aiming at a Novel Modulation of Malate Dehydrogenase and Beyond*. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.150386440>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

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.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting en Toekomstperspectieve

De validatie van een doelwit vormt de eerste stap in de vroege fase van de drugsontdekking. In het specifieke geval van antimalarieel onderzoek vertegenwoordigt de proteïne-interferentietest een robuuste aanpak voor de validatie van een volledige metabolische route, zoals geïllustreerd door de studiegevallen van *PfAspAt/PfMDH* [1] en *PfATC* [2]. De primaire resultaten van dit proefschrift leveren verder experimenteel bewijs dat het onderzoeken van de oligomere interfaces op een fragmentaire manier een mogelijke strategie is voor de ontwikkeling van initiële moleculaire kandidaten tegen malaria. Dienovereenkomstig illustreert **hoofdstuk 2** de kristallografische structuur van *PfMDH* gebonden aan 4-(3,4-difluorofenyl) thiazol-2-amine. Bovendien suggereert de lage sequentie-identiteit aan de oligomere oppervlakken dat subeenheden van *PfMDH* zich op een onderscheidende manier assembleren van andere veroorzakers van ziekten zoals *Leishmania Major* of *Brucella Abortus*. Deze gegevens suggereren dat dezelfde biofysische benadering van hit discovery zou kunnen worden gereproduceerd in deze micro-organismen. 4-(3,4-difluorofenyl) thiazol-2-amine resultaten van een high-throughput screening van 1500 fragmenten door middel van STD – NMR, gevolgd door orthogonale validatie door middel van microschaal thermoforese en differentiële scanning fluorimetrie. Met een gemeten K_D van $99,0 \pm 1,7 \mu\text{M}$ en een ΔT_m van $-2 \text{ }^\circ\text{C}$ bindt en destabiliseert het molecuul zwak *PfMDH*. Niettemin is de Significante remming van malaatoxidatie waargenomen in de activiteitstest. De ontdekking van een distale bindingsplaats vanuit de orthostatische pocket is een belangrijke stap voorwaarts voor de *in-vitro* modulatie van deze klasse van enzymen en een unieke kans om de verbinding te ontwikkelen tot krachtigere leads.

Als alternatief bieden *PfAspAt* en *PfMDH* een waardevolle toepassing voor macrocycli die hun oligomere interfaces specifiek binden, aangezien beide eiwitten een grote interfacelusstructuur hebben die de interactie tussen eiwitten en eiwitten mediteert [3]. Met meer dan 100 macrocycli op de klinische markt of in de pijplijnen voor de ontdekking van geneesmiddelen, beschrijven deze moleculen een volwassen gebied van de chemie [4] met verrassend ondergewaardeerde toepassingen alleen in de oncologie en antibiotica [4]. In **hoofdstuk 3** is de software Moloc gebenchmarkt. Zonder duizenden conformatie ensembles te produceren of een willekeurige ring te splitsen in twee halve lussen, verwerkte deze software driekwart van een database van 208 moleculen met een hoge nauwkeurigheid van de ringatomen. De tijd die nodig is om een klus in een laptop te klaren is acceptabel (mediaan: 39 minuten). Bovendien is de structurele diversiteit van de conformationele ensembles statistisch gezien vergelijkbaar met drie commercieel geteste software, namelijk Prime, MacroModel en Molecular Dynamics. Onze bijdrage aan de

verbetering van de conformatie analyse van macrocycli wordt geïllustreerd door een script voor de automatische berekening van de nauwkeurigheid van de structurele componenten van de macrocyclus (ring of hele molecuul), de diversiteit (torsie vingerafdrukken en straal van de gyratie), het aantal conformatie en de relatieve energie na minimalisatie. Macrocycli met vertakte zijketens vormen echter nog steeds een beperking voor Moloc omdat het algoritme de atoomcoördinaten in bètapositie uit het ringnetwerk haalt. We zijn van plan een tweede module te implementeren die rekening houdt met de flexibiliteit van complexe zijketens in de huidige versie van Moloc om de all-atomaire nauwkeurigheid te verbeteren.

In **hoofdstuk 4** verschuiven we onze focus naar een robuuste methodologie voor de synthese van sterk gesubstitueerde acrylamiden als covalente kernkop. In dit hoofdstuk ontwierpen we een MCR-route waarbij reacties werden uitgevoerd op een 0,5 mmol-schaal in 96-wellsplaten, op een nanoschaal op geautomatiseerde wijze in 386-wellsplaten die 1536 reacties opleverden en ook een voorbeeld werd gevormd op een 10g-schaal. Zo werd de schaalbaarheid over 6 orden van grootte vastgesteld. Om het nut en de toepasbaarheid van onze bibliotheken te onderstrepen hebben we tenslotte gescreend op covalente remmers tegen het enzyme-eiwit tyrosine fosfatase 1B. Verschillende verbindingen bleken de enzymatische activiteit van PTP1B te remmen, een belangrijke negatieve regulator van zowel insuline als leptine signalering en goedgekeurd drug doelwit in de behandeling van obesitas en type 2 diabetes [5,6]. Massaspectrometrie-experimenten, gevolgd door trypsine-vertering, bevestigden de aanwezigheid van een covalente binding met de aan het oplosmiddel blootgestelde cysteïne, waaronder de katalytische Cys215 en de allosterische Cys121 [7]. Conformationele wijzigingen van WPD-loop, een sterk geconserveerde lus onder fosfatase en P-loop die de in-transitie toestand van het substraat stabiliseren werden opgehelderd door post-docking minimalisatie. Deze resultaten vormen een interessante aanvulling op de huidige stand van de techniek, aangezien enkele van de meest krachtige en selectieve remmers van PTP1B een negatieve lading bevatten op de fosfaat-, sulfaat-, carboxylaat- of selenaatdeeltjes [8-11], waardoor de passieve membraandoorlaatbaarheid wordt beperkt.

Het laatste deel van het proefschrift richt zich op een studiegeval van nitrilhoudende verbindingen. **Hoofdstuk 5** past in de context van de recente COVID-19-uitbraak, waarbij een virtueel screeningsprotocol voor herbestemming van gliptines wordt getoond. Gliptines zijn een klasse van orale hypoglycemieën die het enzym dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) remmen, een serine protease die snel incretinehormonen in plasma inactieveert. Ze

worden op grote schaal gebruikt als geneesmiddelen voor de behandeling van diabetes mellitus type 2. De eerste verbinding – sitagliptine – werd in 2006 op de markt gebracht. In dit hoofdstuk wordt de rationele remming van 3C-achtige proteinase (3CLpro) en Papain-like proteinase (PLpro) gepresenteerd met behulp van twee software en de meest relevante conformatieveranderingen worden onthuld door middel van post-minimalisatie. We hebben aangetoond dat de docking scores van Vildagliptine, Anagliptine en Denagliptine werden bewaard en in sommige gevallen verbeterd, wat suggereert dat binding van deze gliptines zou kunnen induceren en de pasvorm die de binding en stabilisatie van deze verbinding versterkt in de katalytische site van 3CLpro aan te passen. Daarom kunnen deze gliptinen een directe invloed hebben op de protease 3CLpro functie, en dus de replicatiecyclus van SARS-CoV-2 beïnvloeden.