

University of Groningen

Metallo drugs as protein modulators

Batista de Almeida, Andreia Filipa

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:

2016

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

Citation for published version (APA):

Batista de Almeida, A. F. (2016). *Metallo drugs as protein modulators*. University of Groningen.

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).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

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

Op metaal gebaseerde medicijnen worden al duizenden jaren gebruikt in de geneeskunde, en sommigen van hen worden nog steeds gebruikt in de hedendaagse geneeskunde. Bijvoorbeeld bij de behandeling van ziektes zoals kanker (Cisplatine) of reumatoïde artritis (Auranofine), maar ook door gebruik als antibiotica (zilversulfadiazine) of radiofarmaceutica. Ondanks dit brede scala aan toepassingen is het mechanisme van verschillende metallomedicijnen nog niet goed begrepen, met nog verscheidene onbekende biologische doelwitten.

In het geval van op goud gebaseerde stoffen, het onderwerp van dit proefschrift, zijn interacties met nucleïnezuren over het algemeen niet relevant met betrekking tot hun biologische mechanisme. Daarom is ons werk gericht op het bestuderen van op goud gebaseerde stoffen als selectieve eiwitremmers, welke gebruikt zouden kunnen worden om eiwitfunctie te onderzoeken, of gebruikt kunnen worden voor therapeutische doeleinden. Verder, de mogelijke antikankereigenschappen en mechanismes van twee nieuwe series op goud gebaseerde stoffen met fluorescerende eigenschappen werden bestudeerd *in vitro*. Daarom is het hier beschreven werk verdeeld in twee delen, aangeduid als A en B.

DEEL A

Hier bestuderen we de aquaporines (AQPs), hun functie en mechanisme van remming door op metaal gebaseerde stoffen, en ook hun pH-regulatie.

Het bepalen van de functie van een AQP is een zeer uitdagende taak [1] en de mogelijkheid om een remmer te gebruiken om dit te ontdekken is zeer aantrekkelijk om licht te schijnen op de rol van deze eiwitten in gezondheid en ziekte. In Hoofdstukken A1 en A2 wordt de remming van twee aquaglyceroporine-isovormen (AQP3 en AQP7) door op goud gebaseerde stoffen beschreven. Na het eerste rapport over de remming van AQP3 door een goud(III)-complex met N-donor-liganden (Auphen) door onze groep [2], hebben we een nieuwe serie op goudcomplexen van dezelfde serie ontworpen, en hebben we hun potentieel als AQP3-modulatoren onderzocht door gebruik te maken van humane rode bloedcellen (hRBC). Dit model maakte het ons mogelijk om onderscheid te maken tussen de remming van het doorlaten van water of glycerol door de desbetreffende stoffen. In dit geval observeerden we dat de op goud gebaseerde stoffen selectief waren als remmers van glycerol-doorlating via de aquaglyceroporine-isovorm AQP3. Verder, in Hoofdstuk A1, hebben we de serie goudcomplexen uitgebreid met drie N-donor-ligand-complexen en een organometalen stof met een direct-metaal-koolstof-verbinding die de stabiliteit in fysiologische omstandigheden verbetert. Interessant is dat een van de nieuwe stoffen met een N-donor-ligand zelfs potenter bleek te zijn dan Auphen.

In silico-methodes zijn ook gebruikt om het moleculaire mechanisme van remming door goudcomplexen. Moleculair modeleren en non-covalente-docking-studies zorgden ervoor dat Cys40 werd geïdentificeerd als de bindingsplaats van goud op hAQP3, gelokaliseerd in de extracellulaire opening. Indirect bewijs uit metagenese-studies hebben later bevestigd dat deze cysteïne cruciaal is voor de remming van hAQP3 door Auphen [3].

Om de selectiviteit van op goud gebaseerde stoffen voor bepaalde AQPs te onderzoeken hebben we onze studies uitgebreid naar een andere aquaglyceroporine-isovorm, namelijk AQP7 (hAQP7). In dit geval werd een gistcelmodel dat hAQP7 tot expressie brengt gebruikt om de remmende capaciteiten van op goud gebaseerde stoffen te bepalen, zoals beschreven in Hoofdstuk A2. Auphen remt deze isovorm ook, maar in mindere mate dan AQP3. De afgenomen potentie is

in dit geval toegeschreven aan de verschillende bindplaatsen van de goudionen in AQP7. (Met-residuen), terwijl dit bij AQP3 is toegeschreven aan Cys40, zoals aangetoond door moleculaire-modeleringsstudies.

Gezamenlijk, van deze studies kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- Goud(III)-complexen met N-donor-liganden zijn potente remmers van hAQP3;
- De goud-kern is essentieel voor remming
- *In silico*-tools hebben geholpen bij het identificeren van de zwavelbevattende aminozuurresiduen als bindingsplaatsen voor de goud(III)-complexen in zowel hAQP3 als hAQP7;
- Isovorm-selectiviteit van de op goud gebaseerde stoffen moet geoptimaliseerd worden.

In de literatuur is HgCl_2 gebruikt als een niet-selectieve benchmarkremmer voor aquaporine-remming. Door de overeenkomsten tussen Hg en Au op het gebied van binding aan zwavel-donor-aminozuurresiduen, zou het interessant zijn om te bepalen of de mechanismes van remming gelijk is voor de twee klassen van op metaal gebaseerde stoffen. Een aantal studies zijn verschenen over het mechanisme van AQP-remming door kwik [4,5], maar er zijn nog geen definitieve conclusies te trekken. Daarom hebben we in **Hoofdstuk A3** het moleculaire mechanisme van remming van AQP3 door HgCl_2 onderzocht. We begonnen met het bouwen van een homologie-model van tetrameer-AQP3 en onderzochten, door gebruik van moleculaire dynamica-simulaties, de structurele veranderingen in het eiwit na binding van Hg^{2+} aan Cys40. Gezamenlijk zijn de volgende eigenschappen geobserveerd:

- Binding door Hg^{2+} leidt tot een afname in poriediameter, wat waarschijnlijk de porieselectiviteit voor het doorlaten van vloeistoffen laat toenemen;
- Elke monomeer liet verschillend gedrag zien en, terwijl drie kanalen volledig gesloten waren voor vloeistofdoorlating, bleef één gedeeltelijk open met een lage doorlatingscapaciteit voor water;
- Twee verschillende mechanismes voor poriesluiting werden geïdentificeerd, waarbij beide te maken hebben met het instorten van de aromatische/arginine-selectiviteitsfilter in het kanaal;
- Na Hg^{2+} -binding komt herpositionering van extracellulaire eiwit-loops voor, wat bij kan dragen aan het verstopping van de poriën.

Belangwekkend is dat de beweging van extracellulaire loops eerder was geobserveerd bij andere AQPs [6,7], waarbij al werd gesuggereerd dat dit porieverstopping teweegbrengt. In Hoofdstuk A4 was het mogelijk om te observeren door moleculaire modellering dat een soortgelijk mechanisme van loop-herpositionering betrokken kan zijn bij het zogenaamde pH-gating van zowel humaan AQP3 als AQP7. In dit hoofdstuk hebben we de permeabiliteit voor water en glycerol van rat en humaan AQP3 gekarakteriseerd bij pH-wijzigingen, door gebruik te maken van respectievelijk een gistcel- als hRBC-model. Op dezelfde manier is ook pH-gating onderzocht bij AQP7 in hetzelfde gistcelmodel. De rat- en humane isovormen vertonen, zoals verwacht, gelijkwaardig gedrag bij pH-veranderingen, met dezelfde pK_a -waarden en permeabiliteitsveranderingen. Zowel AQP3-isovormen als humaan AQP7 vertoonden pH-gating op dezelfde wijze, met poriesluiting bij zure

pH en maximale permeabiliteit bij een pH hoger dan 6,5. Belangwekkend is dat de Hill-helling voor water en glycerol en tweevoudig verschil laat zien in beide AQP3-isovormen, wat niet gebeurt bij hAQP7. Onze rekenkundige studies geven de volgende conclusies:

- Alle eerder geïdentificeerde pH-gevoelige residuen [8] van hAQP3 zijn aanwezig in de rat-isovorm, wat het gelijksoortige gedrag kan verklaren;
- AQP7 heeft sommige van deze residuen, waaronder histidine en tyrosine op dezelfde posities;
- De beweging van loops A en C in elke monomeer na protonering van de pH-gevoelige residuen kunnen voor significante structurele veranderingen zorgen, wat kan leiden tot poriesluiting;
- De structurele veranderingen bij het variëren van de pH kan geleidelijk verlopen, wat verklaard kan worden door het verschil in Hill-hellingen die zijn gevonden bij AQP3 voor water- en glycerol-doorlating;
- Lokale aminozuurverschillen kunnen de pK_a sterk beïnvloeden, net als de geobserveerde structurele veranderingen.

Mutagenesestudies zouden behulpzaam zijn om de verschillen in pH-gating-mechanismes van hAQP3 en hAQP7 beter te begrijpen, en worden momenteel uitgevoerd in onze groep.

DEEL B

In **Deel B** presteren we de studie van verschillende families van op goud gebaseerde stoffen als antikankermiddelen. Specifiek, een eerste serie van bifunctionele fluorescerende stoffen (goud(I)-ruthenium(II)) demonstreerde een veelbelovend antikankereffect *in vitro* en kon bestudeerd worden via fluorescentiemicroscopie. In deze op metaal gebaseerde stoffen is de gouden kern het therapeutische gedeelte, terwijl de ruthenium-bevattende groep gebruikt kan worden om het intracellulaire lot van de stof te volgen. Deze complexen zijn ook ontworpen om de opname via actieve transport te verbeteren, via de glucose-transporters (GluT-1) die tot overexpressie worden gebracht in kankercellen. Een aantal goudcomplexen hebben daarom een thioglucose-deel, die de opname van het gehele complex zou kunnen verbeteren en verder laten de complexen met het thioglucosedeel een sterkere cytotoxiciteit zien. De complexen zijn ook geprepareerd met twee verschillende organische “linkers” om de fluorescerende eigenschappen te verbeteren. Ook lijkt de grootte van deze linker een effect te hebben op de cytotoxische activiteit van de stoffen, met de kortere linker zorgend voor een toename in de cytotoxische effecten van de stoffen. We hebben ook de mogelijke rol van de GluT-1-transporter onderzocht in de cellulaire opname van de complexen door gebruik te maken van een remmer van deze transporter. Helaas lijkt GluT-1 niet betrokken te zijn bij de opname van onze stoffen en is er mogelijk een ander mechanisme betrokken, iets dat verder onderzocht moet worden. Wat betreft de opeenstapeling van de stoffen in cellen hebben we gevonden dat de complexen meestal nuclei en mogelijk kleine organellen in het cytoplasma als doelwit hebben.

Een tweede nieuwe serie stoffen die zijn getest op antikankereffecten zijn vervaardigd op basis van organometalen goud(I)-N-heterocyclische-carbenen met een fluorescerende coumarine-deel. De stoffen demonstreerden een veelbelovend antikankereffect, waarschijnlijk door de remming van het seleno-enzym thioredoxinereductase (TrxR). Wederom zat bij de meeste effectieve stoffen

diegenen met een thioglucose-deel. We geloven dat, net als bij de vorige serie, dit komt door de verbeterde hydrofiele/lipofiele eigenschappen die worden veroorzaakt door dit ligand. De opname van de meeste effectieve stof 3 is ook onderzocht door fluorescentiemicroscopie en er werd geobserveerd dat het voornamelijk in de nuclei voorkwam. Belangwekkend is het minst actieve complex van de serie, stof 4, de meest potente remmer van TrxR is, en de matige cytotoxiciteit veroorzaakt kan worden door matige opname. Aan de andere kant, complex 3 was geen potente remmer van dit enzym, wat mogelijk aangeeft dat de cellulaire doelwitten verschillen en dat de complexen verschillende actiemechanismes hebben.

Van de gerapporteerde studies kunnen we volgende overwegingen noteren:

- Een belangrijke eigenschap van cytotoxische goud(I)-stoffen is hun intracellulaire opname, welke verbeterd kan worden door de aanwezigheid van bepaalde liganden (bijvoorbeeld thioglucose-delen), die de goudkern stabiliseren.
- Op goud gebaseerde organometalen complexen zijn het waard om te verkennen als antikankermiddelen als er voor wordt gezocht dat ze voldoende oplosbaar zijn in waterige mediums.
- Andere doelwitten dan TrxR moeten overwogen worden (bijvoorbeeld nucleïnezuren voor stof 3, welke zich ophoopt in de cellulaire nuclei).

Tezamen genomen laten onze resultaten zien dat op goud gebaseerde stoffen als mogelijke eiwit/enzym-remmers grote potentie hebben voor toepassingen in chemische biologie en geneeskunde en dat zij het waard zijn om verder te onderzoeken. Onderzoek naar de mogelijke toxiciteit in gezonde cellen/weefsels zou ook uitgevoerd moeten worden, parallel aan het ontwerpen van gerichte stoffen die geen bijwerkingen hebben.

Referenties

- [1] A.S. Verkman, M.O. Anderson, M.C. Papadopoulos, *Nat Rev Drug Disc* 13 (2014) 259-277.
- [2] A.P. Martins, A. Marrone, A. Ciancetta, A. Galán Cobo, M. Echevarría, T.F. Moura, N. Re, A. Casini, G. Soveral, *PloS one*, 7 (2012) e37435.
- [3] A. Serna, A. Galan-Cobo, C. Rodrigues, I. Sanchez-Gomar, J.J. Toledo-Aral, T.F. Moura, A. Casini, G. Soveral, M. Echevarria, *J Cell Physiol*, 229 (2014) 1787-1801.
- [4] D.F. Savage, R.M. Stroud, *J Mol Biol*, 368 (2007) 607-617.
- [5] Y. Zhang, Y. Cui, L.Y. Chen, *Biophys Chem*, 160 (2012) 69-74.
- [6] S. Törnroth-Horsefield, Y. Wang, K. Hedfalk, U. Johanson, M. Karlsson, E. Tajkhorshid, R. Neutze, P. Kjellbom, *Nature*, 439 (2006) 688-694.
- [7] K.L. Nemeth-Cahalan, J.E. Hall, *J Biol Chem*, 275 (2000) 6777-6782.
- [8] M. Zelenina, A.a. Bondar, S. Zelenin, A. Aperia, *J Biol Chem*, 278 (2003) 30037-30043.