

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*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. 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.

# Resumo



Há milénios que compostos com metais na sua composição têm sido utilizados em medicina. Alguns destes continuam ainda uso nos dias de hoje, no tratamento de doenças como cancro (Cisplatina) ou artrite reumatoide (Auranofina), assim como agentes antimicrobianos (sulfadiazina de prata) ou ainda como radiofármacos. Apesar do seu largo espectro aplicacional, o mecanismo de acção de muitos destes metalo-compostos é pouco conhecido, com pouca informação sobre os seus possíveis alvos celulares.

No caso de compostos com ouro, tema desta tese, a interação com ácidos nucleicos não é relevante para o seu mecanismo de acção. Deste modo, o trabalho desenvolvido nesta tese foca-se no estudo de compostos de ouro como inibidores selectivos de proteínas, podendo ser utilizados como forma de investigar a sua função ou com objectivos terapêuticos. Ademais, as eventuais propriedades anticancerígenas e mecanismos de acção de duas novas séries de compostos de ouro, com características fluorescentes, foram estudados *in vitro*. Assim, o trabalho aqui descrito encontra-se dividido em duas partes complementares, A e B.

## PARTE A

A parte A desta tese é dedicada ao estudo de aquaporinas (AQP), a sua função e mecanismos de inibição por metalo-compostos, assim como a sua regulação por pH.

Sendo a investigação da função de aquaporinas um tópico bastante desafiante [1], a possibilidade de utilização de um inibidor para este fim é bastante interessante do ponto de vista fisiológico e pode ser útil para apurar o papel destas proteínas em fisiologia e em determinadas patologias. Nos capítulos A1 e A2 encontra-se descrita a inibição de duas aquaglyceroporinas (AQP3 e AQP7) por compostos de ouro. Após os primeiros resultados de inibição da AQP3 por um composto de Au(III) com ligandos do tipo N-doadores (Auphen), descritos pelo nosso grupo [2], foi projectada uma nova série de compostos de ouro da mesma família, e as suas propriedades como moduladores da AQP3 foram avaliadas, usando eritrócitos humanos (hRBC). Este modelo celular permite-nos distinguir entre a inibição da passagem de água ou de glicerol. Observou-se que os compostos de ouro são inibidores selectivos da passagem de glicerol através da AQP3.

Como descrito no capítulo A1, os estudos foram expandidos para incluir uma nova série de compostos: três compostos de ouro com ligandos N-doadores e um organometálico, com uma ligação covalente directa entre o carbono e o metal, o que aumenta a sua estabilidade em condições fisiológicas. Curiosamente, um dos novos compostos desta série revelou-se ainda mais potente que o Auphen, como inibidor da AQP3. Métodos *in silico* foram utilizados para investigar o mecanismo molecular de inibição da AQP3 por compostos de ouro. Modelação molecular e docking não-covalente permitiram a identificação do *binding site* para o ouro, na AQP3: Cys40, localizada na abertura extracelular do canal. Através de estudos de mutagénese e de forma indirecta, este *binding site* foi mais tarde validado como crucial para inibição da AQP3 por Auphen [3].

De forma a avaliar a selectividade dos compostos de ouro, foi estudada a interacção destes compostos com outra isoforma humana, AQP7 (hAQP7). Neste caso foi utilizado um modelo celular de levedura, *S. Cerevisiae*, com sobre-expressão de hAQP7, como descrito no capítulo A2. Foi demonstrado que Auphen também inibe esta isoforma, embora com menos potência que AQP3, o que pode ser explicado pelo facto de ter diferentes *binding sites* para este composto: modelação molecular revelou que o *binding site* da hAQP7 é composto por duas metioninas, localizadas junto da entrada intracelular do canal, em contraste com a Cys40 da hAQP3, localizada

no lado extracelular

Em geral, deste estudo, podem retirar-se as seguintes conclusões:

- Compostos de Au(III) com ligandos N-doadores são potentes inibidores da hAQP3;
- O centro metálico composto por Au(III) é essencial para a inibição;
- Ferramentas *in silico* foram essenciais para a identificação dos aminoácidos no *binding site*, cruciais para inibição da hAQP3 e hAQP7 por complexos de Au(III);
- É necessária a optimização da selectividade destes compostos para diferentes isoformas.

Na literatura, HgCl<sub>2</sub> é utilizado como um inibidor padrão (não selectivo) para estudar a inibição de aquaporinas. Devido às semelhanças entre Hg e Au, no que diz respeito às suas interações com aminoácidos que contenham enxofre, é interessante investigar as possíveis semelhanças entre os mecanismos de inibição de aquaporinas pelas duas classes de compostos metálicos. Alguns estudos reportaram o mecanismo de inibição de AQP por mercúrio [4, 5], mas a informação disponível não é conclusiva. Deste modo, no capítulo A3 encontra-se descrito o estudo do mecanismo molecular de inibição da hAQP3 por HgCl<sub>2</sub>. O primeiro passo deste estudo foi a construção de um modelo de homologia da hAQP3, mas na sua forma tetramérica, e este utilizado posteriormente em simulações de dinâmica molecular. Os nossos estudos demonstraram que, após ligação covalente de Hg<sup>2+</sup> à Cys40 da hAQP3, a proteína sofre alterações conformacionais. Neste estudo, foi possível observar o seguinte:

- Ligação de Hg<sup>2+</sup> leva a uma diminuição do diâmetro do poro e, conseqüentemente, a um aumento da selectividade por tamanho de solutos;
- Foi observado um comportamento diferente em cada monómero; enquanto três dos monómeros se encontravam totalmente fechados no final da simulação, um dos monómeros manteve-se parcialmente aberto, com uma baixa permeabilidade a água;
- Foram observados dois mecanismos diferentes de fecho do canal, ambos envolvendo colapso do filtro de selectividade aromático/arginina.
- Após ligação de Hg<sup>2+</sup>, os *loops* extracelulares sofrem um rearranjo e reposicionamento, o que pode contribuir para a oclusão do canal.

Curiosamente, o movimento de *loops* extracelulares foi observado anteriormente em outras AQPs [6] [7], e este comportamento foi associado ao fecho do poro. No capítulo A4, usando modelação molecular, observámos um semelhante movimento de *loops* extracelulares, que pode estar também envolvido no mecanismo de *gating* por pH, tanto no caso da hAQP3 como da hAQP7. Neste capítulo está descrita a caracterização completa, após alterações de pH, da permeabilidade a água e a glicerol da AQP3 murina e humana, usando um modelo celular de levedura e hRBC, respectivamente. O *gating* por pH foi estudado de forma semelhante para a isoforma humana AQP7, no mesmo modelo celular de levedura. As isoformas de rato e humana de AQP3, como esperado, têm um comportamento semelhante após alterações de pH, com valores de pK<sub>a</sub> e alterações de permeabilidade semelhantes. Ambas as isoformas, e também AQP7, demonstraram *gating* por pH na mesma gama, com fecho do poro a pH ácido e com máximo de permeabilidade a pH acima

de 6,5. Curiosamente, as Hill slope para água e glicerol têm uma diferença de duas vezes entre si, em ambas as isoformas de AQP3. No entanto, o mesmo comportamento não é observado para a hAQP7, que possui Hill slopes semelhantes para água e glicerol. Os nossos estudos computacionais permitiram retirar as seguintes conclusões:

- Todos os resíduos responsáveis pela sensibilidade da hAQP3 ao pH [8] estão presentes na isoforma de rato, o que pode explicar as semelhanças de comportamento;
- A hAQP7 partilha alguns destes resíduos, incluindo uma histidina e tyrosina nas mesmas posições;
- Movimento dos *loops* A e C em cada monómero, após protonação dos resíduos responsáveis pela sensibilidade ao pH, pode causar alterações conformacionais significativas, que poderão levar ao fecho do poro;
- As alterações conformacionais devido às variações de pH podem ser graduais, o que pode explicar as diferenças nas Hill *slopes* observadas para águas e glicerol;
- As diferenças entre as isoformas em composição em aminoácidos em determinados locais da proteína, nomeadamente próximo dos resíduos cruciais para o *gating* por pH, podem influenciar de forma significativa o  $pK_a$  e as alterações conformacionais observadas.

Estudos de mutagénesis podem ser bastante úteis para melhor compreender as diferenças entre os mecanismos de *gating* da hAQP3 e hAQP7 e estão actualmente a ser executados no nosso grupo.

## PARTE B

Na parte B encontram-se descritos estudos relativos a diferentes famílias de compostos de ouro como agentes anticancerígenos. Mais especificamente, uma primeira série de compostos fluorescentes e bifuncionais (Au(I)-Ru(II)), mostraram efeitos anticancerígenos promissores *in vitro*, e foi possível o seu estudo através de microscopia de fluorescência. Nestes compostos metálicos o ouro é o centro “terapêutico”, enquanto que a parte que contém ruténio e que possui propriedades fluorescentes, pode ser usada para “seguir” o destino intracelular destes compostos. Estes compostos foram também desenhados de forma a terem um uptake mais eficiente, possivelmente através dos transportadores de glucose (GluT-1), sobre-expressos em células cancerígenas. Deste modo, alguns destes compostos possuem uma parte que contém uma tioglucose, que pode ajudar a promover o uptake de todo o complexo. De facto, uma forma geral, os compostos que contém tioglucose demonstraram maior citotoxicidade. Os compostos foram também preparados com dois tamanhos de *linkers* orgânicos, de forma a aumentar as propriedades de fluorescência. De qualquer forma, o tamanho destes *linkers* aparenta influenciar a citotoxicidade dos compostos, com os *linkers* de menor tamanho a terem um maior efeito. Também foi investigado o possível papel do transportador GluT-1 no *uptake* dos compostos, usando um inibidor do GluT-1. Infelizmente, GluT-1 não parece estar envolvido no mecanismo de *uptake* celular destes compostos, mas futura investigação deve aprofundar este facto e investigar outros possíveis mecanismos envolvidos. No que se refere à acumulação destes compostos em células, observou-se que o principal alvo aparenta ser o núcleo, ou ácidos nucleicos, ou pequenos organelos no citoplasma.

Uma outra série de compostos foi testada quanto aos seus possíveis efeitos anticancerígenos,

e é formada por carbenos N-heterocíclicos organometálicos de ouro(I), com uma coumarina fluorescente na sua constituição. Estes compostos demonstraram efeitos anticancerígenos promissores, possivelmente devido à inibição da seleno-enzima reductase de tioredoxina (TrxR). Uma vez mais, entre os compostos mais eficientes encontram-se aqueles que possuem uma parte com tioglucose. Acreditamos que, tal como a primeira série de compostos, o aumento de toxicidade se deve a um aumento no *uptake* dos compostos, devido a um aumento das suas propriedades hidrofóbicas/lipofílicas induzidas por este ligando.

O *uptake* do composto mais eficiente, composto 3, foi também estudado por microscopia de fluorescência e observou-se que se encontra localizado no núcleo. Curiosamente, o composto menos activo, composto 4, é o mais potente inibidor da enzima TrxR e a sua baixa toxicidade pode dever-se a baixo *uptake*. Em contrapartida, o composto 3 não é um bom inibidor desta enzima, o que pode indicar que tem outros alvos celulares e os compostos podem ter diferentes modos de acção.

Destes estudos, foi possível retirar algumas conclusões:

- Uma característica importante dos compostos de Au(I) é o seu *uptake*, que pode ser melhorado graças à adição de determinados ligandos, como tioglucose, que podem estabilizar o centro metálico;
- Os compostos de ouro organometálicos podem ser interessantes como agentes no tratamento de cancro, se a sua estabilidade em solução aquosa for garantida;
- Outros alvos celulares, para além da TrxR, devem ser considerados (e.g. ácidos nucleicos para o composto 3, que aparentam acumular no núcleo).

Em geral, os nossos resultados demonstram que compostos de ouro são possíveis inibidores de proteínas/enzimas, com grande potencial para aplicação em bioquímica e medicina. Certamente, o seu estudo em células/tecidos saudáveis deverá ser realizada em paralelo, de forma a desenhar melhores compostos, com maior selectividade e menos efeitos secundários.

## Referências

- [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.