

UNIVERSITATEA “ALEXANDRU IOAN CUZA” DIN IAȘI
FACULTATEA DE CHIMIE
ȘCOALA DOCTORALĂ DE CHIMIE ȘI ȘTIINȚE ALE VIEȚII ȘI
PĂMÂNTULUI

**Studiul mecanismelor de activare a receptorilor chemokinici în
prezența compușilor coordinativi cu Zn^{2+} și a unor liganzi de mici
dimensiuni cu potențiale aplicații antivirale**

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător de doctorat:
Prof. Univ. Dr. PUI Aurel

Doctorand:
AMĂRANDI Roxana-Maria

**IAȘI
2017**

Mulțumiri

Această teză nu s-ar fi materializat fără ajutorul necondiționat, sprijinul și înțelegerea unor oameni extraordinari față de care aș dori să îmi exprim recunoștința.

În primul rând, aș dori să-i mulțumesc coordonatorului meu de doctorat, Prof. Dr. Aurel Pui pentru îndrumare și sprijinul acordat pe toată durata studiilor. Fără capacitatea lui extraordinară de a-și inspira studenții să aibă o gândire deschisă și să exploateze resursele disponibile la maximum, probabil nu aș fi avut curajul să mă înham la a urma o carieră științifică.

Aș dori să îmi exprim mulțumirea față de Prof. Dr. Mette Rosenkilde pentru că m-a primit cu brațele deschise în grupul ei de cercetare din Laboratorul de Farmacologie Moleculară de la Institutul de Neuroștiință și Farmacologie, Universitatea din Copenhaga, Danemarca. Profesionalismul ei, discuțiile fructuoase, combinate cu optimismul său debordant și abilitatea de a privi lucrurile cu optimism în orice situație, mai ales în momentele mele de dubiu și scepticism, m-au învățat să tratez situațiile dificile cu calm și pragmatism și au contribuit la formarea mea atât ca om de știință, cât și ca persoană în general. Aș dori să le mulțumesc și tuturor celor cu care am avut plăcerea de a colabora (și de a mă împrieteni) în timpul șederii mele în Danemarca. În primul rând, sunt foarte recunoscătoare Dr. Stefanie Karlshøj pentru că m-a inițiat în tainele lucrului în laborator și pentru că a introdus familiaritatea într-o atmosferă atât de străină. În același timp, aș dori să-i mulțumesc lui Olav Larsen pentru că a reușit să facă o atmosferă *hygge* atât în laborator, cât și în birou. Fără acele discuții lungi și fructuoase despre probabil orice subiect posibil, nu aș fi realizat niciodată că danezii și românii pot fi atât de asemănători în gândire. De asemenea, îi sunt recunoscătoare Katjei Spiess pentru tot ajutorul acordat și pentru bunătatea de care a dat dovadă, precum și pentru lungile plimbări cu bicicleta, care au transformat șederile mele în Danemarca în experiențe de neuitat. Mulțumiri lui Maibritt Sigvardt Baggesen pentru asistența tehnică excelentă, precum și tuturor membrilor Laboratorului de Farmacologie Moleculară pentru că au creat o atmosferă de lucru excelentă în laborator. În special, mulțumesc Gertrud, Vika, Line, Natalia, Christian și Ann-Sofie.

Aș dori să îmi exprim recunoștința și față de Thomas Michael Frimurer și Michael Lückmann pentru abilitățile excelente în modelare moleculară, precum și pentru entuziasmul

în legătură cu proiectul US28, dar și multe discuții și întâlniri științifice. De asemenea, îi mulțumesc Nataliei Papargyri pentru că mi-a deschis drumul spre descoperirea de noi liganzi de mici dimensiuni ce țintesc receptorul US28.

În continuare, aș dori să le mulțumesc membrilor comisiilor de îndrumare și evaluare, care și-au făcut timp să-mi parcurgă teza cu meticulozitate și să o cizeleze la forma ei de astăzi. În primul rând, aș dori să-i mulțumesc Conf. Dr. Ramona Dănac pentru toate discuțiile fructuoase și pentru încurajare încă de dinaintea începerii studiilor mele doctorale, dar și pentru că mi-a permis să fac parte din grupul său de chimie organică în primii ani de doctorat. Fără această experiență nu aș fi descoperit frumusețea chimiei organice, și nu aș fi știut niciodată câtă muncă se află în spatele unui randament bun! În mod egal, îi sunt recunoscătoare Lect. Dr. Călin-Lucian Maniu pentru că m-a inițiat în modelarea moleculară a receptorilor cuplați cu proteine G, și pentru că m-a încurajat să urmez o carieră științifică. Fără entuziasmul său și bunătatea de care a dat dovadă, probabil nu m-aș fi bucurat de o carieră științifică în plină ascensiune.

În final, aș dori să îi mulțumesc Prof. Dr. Gabi Drochioiu pentru tot sprijinul din timpul anilor mei de studiu, pentru sugestiile sale și pentru răbdarea de care a dat dovadă în toate discuțiile noastre. De asemenea, le sunt recunoscătoare Prof. Dr. Ionel Mangalagiu și Prof. Dr. Mircea Diudea pentru că și-au făcut timp să-mi parcurgă teza și să mă îndrume pe drumul cel bun în cariera mea științifică. În plus, aș vrea să le mulțumesc colegilor din colectivul Facultății de Chimie cu care am avut ocazia să colaborez, mai ales lui Constantin Vîrlan, care a avut răbdarea să îmi asculte ideile atunci când am împărțit biroul.

Bineînțeles, această teză nu ar fi putut fi înfăptuită fără pauzele productive de cafea alături de Diana Ariton și Iuliana Moise, cărora le sunt recunoscătoare în mod special. Prietenia și sprijinul lor m-au învățat să fiu răbdătoare și dedicată, dar și că munca asiduă are nevoie de pauze de cafea pe măsură.

Aș dori să îi mulțumesc soțului meu pentru că mi-a suportat multe nopți petrecute în compania laptopului meu, și pentru întreaga susținere, dragoste și motivație pe care mi-a inspirat-o de-a lungul anilor.

În cele din urmă, aș dori să le mulțumesc părinților mei pentru dragostea necondiționată, încurajarea, și întreg sprijinul acordat de-a lungul vieții mele. Nu aș fi ajuns astăzi aici fără ajutorul lor.

Cuprins

| | |
|--|-----|
| Diseminarea rezultatelor | v |
| Listă de abrevieri..... | vii |
| Date din literatură | 1 |
| Introducere | 1 |
| 1. Sistemul chemokinic | 4 |
| 1.1. Chemokine..... | 4 |
| 1.2. Receptori chemokinici | 8 |
| 1.3. Acomodarea liganzilor în sistemul chemokinic – detalii din structuri cristaline | 21 |
| 2. Modularea alosterică a receptorilor chemokinici | 28 |
| 2.1. Situsuri de coordonare la nivelul receptorilor chemokinici | 31 |
| 2.2. Modularea alosterică cu ajutorul liganzilor fără centru metalic | 37 |
| 2.3. Țintirea farmacologică a receptorului chemokinic viral US28 | 38 |
| Obiective | 45 |
| Contribuții originale | 47 |
| 3. Elucidarea substratului structural al modulării alosterice a receptorului chemokinic CCR5 de către chelați polipiridinici simpli..... | 47 |
| 3.1. Rezultate <i>in silico</i> | 48 |
| 3.2. Rezultate <i>in vitro</i> | 52 |
| 3.3. Concluzii..... | 66 |
| 4. Identificarea și caracterizarea farmacologică de noi liganzi cu acțiune la nivelul receptorului chemokinic viral US28 | 68 |
| 4.1. Strategie computațională | 69 |
| 4.2. Rezultate <i>in vitro</i> | 78 |
| 4.3. Concluzii..... | 90 |
| 5. Caracterizarea farmacologică de noi liganzi cu acțiune la nivelul US28 generați pe baza caracteristicilor structurale ale compușilor anterior identificați..... | 93 |
| 5.1. Strategie computațională..... | 94 |
| 5.2. Rezultate <i>in vitro</i> | 98 |
| 5.3. Concluzii..... | 115 |
| Concluzii și Perspective..... | 118 |

| | |
|--|-----|
| Materiale și Metode | 123 |
| Metodologie computațională | 123 |
| Metodologie <i>in vitro</i> | 126 |
| Bibliografie | 130 |
| Anexe | 144 |
| Anexa I – Sisteme de numerotare a aminoacizilor..... | 144 |
| Annex II – Alinierea secvențială US28/CCR5..... | 145 |
| Annex III – Efectul primei generații de compuși asupra celulelor ce exprimă US28 și asupra celulelor control | 146 |
| Annex IV – Efectul celei de-a doua generații de compuși asupra celulelor ce exprimă US28 și asupra celulelor control | 147 |
| Annex V – Publicații..... | 148 |

Cuvinte cheie: drug discovery, receptor cuplat cu proteine G, modelare moleculară, screening virtual, alosterism, receptor chemokinic viral, antiviral, terapeutic, agonism invers, modulator ago-alosteric, modulare alosterică pozitivă, complex chelat cu Zn^{2+} , 2,2'-bipiridină, 2,2':6',2''-terpiridină, 4'-cloro-2,2':6',2''-terpiridină, mecanism de activare a receptorilor chemokinici, abordare combinată *in silico* și *in vitro*

Lucrarea de doctorat intitulată “**Studiul mecanismelor de activare a receptorilor chemokinici în prezența compușilor coordinativi cu Zn^{2+} și a unor liganzi de mici dimensiuni cu potențiale aplicații antivirale**” cuprinde **129** pagini și este însoțită de **302** indici bibliografici și **5** anexe ce conțin, printre altele, și articolele publicate. Rezultatele experimentale obținute de-a lungul elaborării tezei fac subiectul a **11** tabele, **45** figuri și **2** publicații în jurnale cu factor de impact, un capitol de carte într-o serie indexată în Thomson Reuters Web of Knowledge, precum și un articol în curs de publicare. Acest rezumat are scopul de a prezenta succint principalele rezultate ale tezei, precum și o serie de concluzii generale, și este însoțit de o bibliografie selectivă.

Introducere și obiective

Elucidarea interacțiunilor ligand-receptor la nivelul unor proteine transmembranare implicate în homeostaza organismului a reprezentat un interes deosebit pentru comunitatea științifică încă dinaintea existenței detaliilor structurale cu privire la organizarea tridimensională a acestora în membrana celulară [1, 2]. Receptorii cuplați cu proteine G (GPCRs) sunt o familie de astfel de proteine transmembranare ce joacă un rol indispensabil procesele normale ale corpului prin medierea cascadelor de semnalizare celulară. Mulți dintre receptorii senzoriali, inclusiv cei vizuali, olfactivi, gustativi și nociceptivi sunt GPCRs, dar și o multitudine de receptori implicați în neurotransmisie sau în diverse funcții cognitive, în reglarea creșterii sau diferențierii celulare, sau apoptozei [3-6]. În același timp, GPCRs sunt implicați în fiziopatologia multor boli precum cancerul, depresia sau infecțiile virale, fiind unele din cele mai exploatate ținte ale medicamentelor de pe piața farmaceutică actuală [7], precum și a numeroase eforturi de cercetare în domeniul descoperirii medicamentului [8]. În ciuda diversității liganzilor capabili de a induce semnale prin receptorii aferenți, mecanismele de activare a GPCRs sunt asemănătoare [9], dar nu sunt guvernate de interacțiuni universale ligand-receptor [10], ceea ce face stabilirea interacțiunilor cheie dintre moleculele ligand și receptor să fie problematică și în consecință, face ca procesul de descoperire de noi liganzi să fie dificil și foarte complex [11].

Ionii metalici, dar și complecșii metalici, și-au demonstrat utilitatea în analiza structurală a GPCRs, dat fiind că rețelele de interacțiuni intra-receptor implicate în mecanismele de activare a receptorilor au fost descrise de nenumărate ori la nivelul GPCRs prin introducerea artificială a unor situsuri de coordinare [12-17]. Interacțiunea ionilor metalici cu catenele laterale ale aminoacizilor are loc sub condiții bine definite, dependente de preferința pentru o anumită geometrie a ionului metalic. Mai mult, prezența chelaților aromatici în cavitățile de legare poate duce la o stabilizare extinsă a aminoacizilor aromatici adiacenți prin interacțiuni de tip π - π , îmbunătățind acomodarea complecșilor la nivelul receptorilor, și vor servi ca substrat inițial pentru activare. În studiul GPCRs, crearea unor situsuri de coordinare metalică la nivelul structurii transmembranare a acestora, împreună cu stabilizarea ionului metalic la nivelul receptorului de către o serie de chelați polipiridinici

simpli a contribuit la fundamentarea conceptului de activare a receptorilor [12, 13, 18, 19]. Câteva polipiridine simple pot modula funcția liganzilor endogeni deja legați la receptori într-o manieră alosterică în prezența ionilor metalici [20-22], ceea ce sugerează faptul că compușii coordinativi pot fi utili și în studiul alosterismului la nivelul GPCRs, deci pot contribui la dezvoltarea de noi modulatori alosterici cu proprietăți specifice în scopuri terapeutice.

O clasă aparte de GPCRs care reprezintă un interes deosebit pentru comunitatea științifică actuală, mai ales din perspectivă farmaceutică, este cea a receptorilor chemokinici, datorită rolului central pe care îl joacă în procese precum inflamația cronică, bolile autoimune sau infecția cu diverse virusuri, inclusiv herpesvirusurile sau HIV, dar și în procesele homeostatice normale ale organismului [23]. Liganzii endogeni ai acestor receptori sunt o serie de proteine chemotactice de 8-12 kDa, cunoscute sub numele de chemokine, care interacționează cu receptorii lor aferenți prin rețele extinse de aminoacizi, atât în domeniul transmembranar al receptorului, cât și în cel extracelular, spre deosebire de majoritatea altor receptori din aceeași superfamilie a GPCRs, care preferă acomodarea liganzilor endogeni exclusiv în regiunea transmembranară. Astfel, studiarea mecanismelor de activare a receptorilor chemokinici în prezența liganzilor endogeni poate fi dificilă, și datorită suprafeței mari de interacțiune dintre perechile chemokină:receptor, sunt necesare metode alternative pentru a studia mecanismele de activare a acestor receptori.

Mulți patogeni virali precum HIV utilizează receptorii chemokinici pentru a pătrunde în interiorul celulelor-gazdă prin acomodarea unei glicoproteine virale care mimează chemokinele endogene la nivelul cavităților de legare ale receptorilor. Citomegalovirusul uman (HCMV) codifică proteine asemănătoare chemokinelor sau receptorilor chemokinici pentru a păcăli sistemul imunitar și de obicei este prezent în stare latentă, rareori simptomatică, la majoritatea populației adulte. Totuși, infecția primară cu HCMV este cauza principală de deces și morbiditate la indivizi imunocompromiși, spre exemplu în urma unor protocole premergătoare transplantului de organe, în cazul administrării de agenți chimioterapeutici imunosupresivi în vederea tratării cancerelor hematopoietice, la indivizi cu SIDA, boli autoimune sau cancer, precum și la nou-născuți, în cazul cărora sistemul imunitar nu este dezvoltat în totalitate. Aproximativ unul din 150 nou-născuți se naște cu infecție congenitală cu HCMV, care poate cauza probleme serioase de sănătate ce includ retard

mental, handicap vizual sau auditiv, microcefalie, convulsii sau encefalită în aproximativ 10-15% din cazuri, sau poate induce avort spontan sau naștere prematură la mamele infectate, ceea ce face ca infecția primară cu HCMV să fie una din principalele cauze ale defectelor congenitale [24, 25]. Din acest motiv, necesitatea terapiilor anti-HCMV este mare, însă numărul disponibil de terapii medicamentoase este limitat. Receptorul chemokinic viral US28, codificat de HCMV, este exprimat în toate stadiile infecției virale, inclusiv latența, deci poate fi o țintă potrivită pentru potențiale terapii antivirale, însă numărul de structuri moleculare ce pot interacționa cu acest receptor este limitat.

Eforturi continue de a dezvolta terapii ce acționează la nivelul sistemului chemokinic au dus la aprobarea a doar două medicamente pe piața farmaceutică mondială: maraviroc (Celsentri[®]), un modulator alosteric negativ pentru receptorul chemokinic CCR5, utilizat în tratamentul infecțiilor cu anumite tulpini ale virusului HIV, și plerixafor (Mozobil[®]), pentru creșterea mobilizării celulelor stem hematopoietice în sângele periferic la pacienți aflați sub tratament chimioterapeutic. Alte potențiale terapii antivirale sau antiinflamatoare nu au reușit să treacă de etapele finale de testări clinice [26]. În consecință, o înțelegere mai bună a sistemului chemokinic, combinată cu eforturi susținute de dezvoltare a medicamentului, ar putea crește rata de succes a studiilor clinice întreprinse în acest sens.

Astfel, cercetarea din această teză este orientată spre înțelegerea mecanismelor moleculare din spatele activării și modulării alosterice a receptorilor chemokinici de către molecule de mici dimensiuni, precum și identificarea de noi liganzi sau structuri moleculare ce acționează la nivelul sistemului chemokinic, cu scopul final de a genera noi strategii terapeutice ce țintesc acest sistem, precum infecția cu HCMV.

Principalele obiective ale tezei au fost următoarele:

1. Descrierea mecanismelor moleculare din spatele activării și modulării alosterice a receptorilor chemokinici de către liganzi de mici dimensiuni cu centru metalic printr-o abordare combinată *in vitro* și *in silico*;
2. Identificarea de noi structuri moleculare capabile de a modula activitatea receptorilor chemokinici sau de a influența legarea chemokinelor endogene la receptori printr-o abordare combinată *in vitro* și *in silico*;

Obiectivele generale de mai sus au fost îndeplinite prin următorul set de obiective specifice:

1. Propunerea unui situs de legare pentru complexe metalice ZnBip, ZnTerp și ZnClTerp la nivelul receptorului chemokinic CCR5 prin experimente de andocare moleculară *in silico*;
2. Validarea situsului de legare propus prin experimente *in vitro* la nivelul fenotipului sălbatic (WT) al CCR5 și a 23 receptori mutați, generați pe baza rezultatelor computaționale;
3. Identificarea aminoacizilor implicați în acomodarea celor trei chelați la nivelul cavității de legare a CCR5;
4. Descrierea mecanismelor structurale ale activității ago-alosterice, respectiv pur alosterice manifestate de ZnBip și ZnTerp, respectiv ZnClTerp la nivelul CCR5 pe baza rezultatelor experimentale *in silico* și *in vitro*;
5. Crearea unei biblioteci de molecule de mici dimensiuni ce posedă aceleași proprietăți farmacofore ca și ligandul cu caracter agonist invers al receptorului chemokinic viral US28, VUF2274, selectate din baze de date de compuși disponibili comercial;
6. Evaluarea bibliotecii de liganzi de mici dimensiuni la nivelul US28 prin experimente funcționale și de legare competitivă cu radioliganzi;
7. Identificarea de noi structuri moleculare cu abilitatea de a modula activitatea receptorului US28 și de a le stabili modul de legare la nivelul situsului de legare al receptorului;
8. Crearea unei biblioteci de nouă generație de molecule de mici dimensiuni ce posedă aceleași proprietăți farmacofore ca și structurile 'lead' **33**, **125** și **76** de primă generație și de a o evalua la nivelul US28 prin experimente funcționale și de legare competitivă cu radioliganzi;
9. Identificarea de noi liganzi capabili de a modula activitatea US28 cu proprietăți farmacologice îmbunătățite față de compușii de primă generație și de a le stabili modul de legare la nivelul situsului de legare al receptorului chemokinic viral;
10. Demonstrarea utilității receptorului trunchiat US28 Δ 300 în procesul de descoperire de medicament la nivelul receptorului US28.

Experimentele *in vitro*, precum și câteva din experimentele *in silico* prezentate în teză au fost întreprinse la Institutul de Neuroștiință și Farmacologie de la Universitatea din Copenhaga, Danemarca, în grupurile de cercetare ale Prof. Mette Rosenkilde și Assoc. Prof. Thomas Frimurer pe parcursul a trei mobilități de practică în timpul studiilor doctorale. În cadrul tezei ce face subiectul acestui rezumat, metodologia utilizată, atât computațională cât și cea *in vitro* sunt detaliate în secțiunea *Materiale și Metode*.

Secțiunea de *Contribuții Originale* a tezei este divizată în trei capitole, fiecare concentrându-se asupra unui subiect ce în final contribuie la înțelegerea sistemului chemokinic și la dezvoltarea de noi potențiale terapii medicamentoase ce țintesc receptorii chemokinici. În paginile ce urmează sunt rezumate principalele rezultate ale fiecărui capitol. Numerotarea capitolelor, figurilor, tabelelor și structurilor din acest rezumat este identică cu cea utilizată în teză.

Capitolul 3. Elucidarea substratului structural al modulării alosterice a receptorului chemokinic CCR5 de către chelați polipiridinici simpli

Primele patru obiective specifice din cele menționate anterior au fost urmărite în capitolul 3 al tezei. Cei trei agenți chelatori utilizați au fost 2,2'-bipiridina, 2,2':6',2''-terpiridina și 4'-cloro-2,2':6',2''-terpiridina (Figura 15).

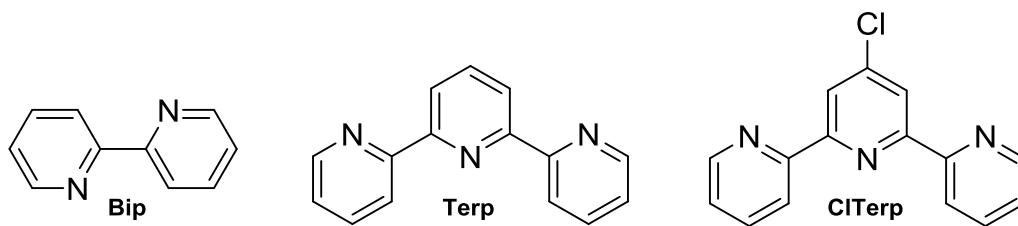


Figura 15. Structurile chimice ale 2,2'-bipiridinei (Bip), 2,2':6',2''-terpiridinei (Terp) și 4'-cloro-2,2':6',2''-terpiridinei (ClTerp)

În ciuda unei mici diferențe structurale, Terp and ClTerp au comportări farmacologice diferite la nivelul CCR5 în prezența ionilor Zn^{2+} . Astfel, ZnTerp (asemeni ZnBip) posedă atât capacitatea de a amplifica legarea chemokinei endogene CCL3 la nivelul receptorului, cât și abilitatea de a activa independent CCR5, pe când ZnClTerp nu poate activa receptorul, fiind un modulator alosteric pur ce influențează doar capacitatea de legare a CCL3 la receptor [22, 27]. În cazul acestor două terpiridine, efectul alosteric poate fi separat de activitatea intrinsecă printr-un sigur atom de clor, însă nu este clar dacă această comportare apare ca urmare a unei acomodări diferențiate la nivelul receptorului sau dacă acești compuși stabilesc contacte preferențiale cu aminoacizi de la nivelul aceleiași cavități de legare. Cu scopul de a înțelege substratul structural al alosterismului și ago-alosterismului celor două terpiridine și bipiridinei la nivelul CCR5, precum și pentru a descrie mecanismul molecular din spatele separării acestor efecte, situsurile de legare ale chelaților au fost prezise prin modelare moleculară, apoi confirmate prin experimente *in vitro* de evaluare funcțională și de legare competitivă cu radioliganzi la nivelul a 23 de receptori mutați.

Mai întâi s-a generat un model prin omologie pentru receptorul CCR5, bazat pe structura cristalină a receptorului chemokinic viral US28, care prezintă toate caracteristicile unui receptor în stare activă, din moment ce toți liganzii testați induc activarea directă a receptorului sau amplifică legarea chemokinelor la acesta. Apoi, dat fiind faptul că chelații

metalici sunt formați *in situ*, un ion Zn^{2+} a fost plasat în cavitatea de legare a receptorului în vecinătatea aminoacidului presupus că ar funcționa drept ancoră pentru ionul metalic, E283 din TM VII.

Studiile de andocare moleculară au sugerat acomodarea în manieră asemănătoare la nivelul CCR5 a celor trei compuși coordinativi, care în același timp își datorează comportarea farmacologică acțiunii concertate agent chelant-ion metalic-acid glutamic. Toți compușii sunt stabiliți în cavitatea de legare a receptorului prin interacțiuni secundare de natură hidrofobă cu aminoacizi aromatici aparținând atât cavității principale, cât și secundare de legare a receptorului, printre care Y37, W86, Y108, F109, F112, W248 și Y251, dar și R168 din ECL2 (Figura 17).

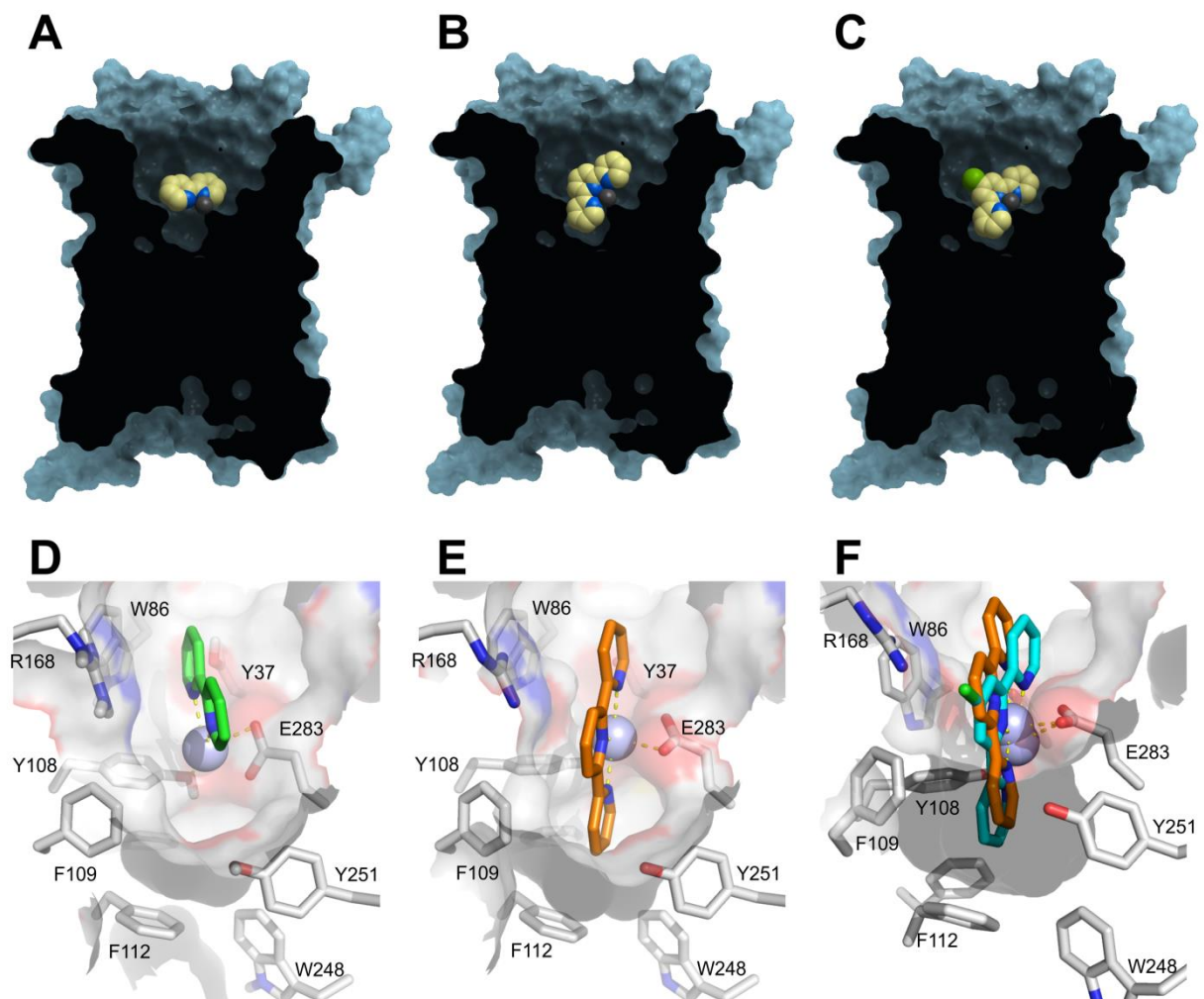


Figura 17. Acomodarea (A,D) ZnBip, (B,E) ZnTerp and (C) ZnClTerp la CCR5; (F) comparație între modurile de legare ale ZnTerp (portocaliu) și ZnClTerp (turcoaz) la nivelul CCR5;

Al treilea inel piridinic din structurile celor doi complecși terpiridinici testați este acomodat adânc în regiunea hidrofobă a cavității principale de legare. În plus, substituentul clorură din ClTerp este îndreptat spre regiunea extracelulară a receptorului și interacționează cu F109, probabil printr-o interacțiune de tip Cl- π , dar nu reușește să interacționeze într-un mod favorabil cu W248, un aminoacid general implicat în activarea ligand-dependentă a receptorilor. Astfel, inabilitatea ZnClTerp de a activa receptorul ar putea fi cauzată, cel puțin parțial, de o interacțiune defectuoasă cu acest aminoacid, sau de stabilizarea acestui rest într-o manieră ce nu permite activarea receptorului.

În continuare s-au generat 23 de receptori mutați, bazați pe experimentele de andocare moleculară anterioare, atât în cavitatea principală ('major binding pocket'), cât și cea secundară de legare ('minor binding pocket') (Figura 20), iar compușii coordinațivi au fost evaluați la nivelul acestor mutați prin experimente funcționale (pentru a determina impactul asupra activității intrinseci) și de legare competitivă cu liganzi radiomarcați (pentru a determina impactul asupra capacității de modulare alosterică).

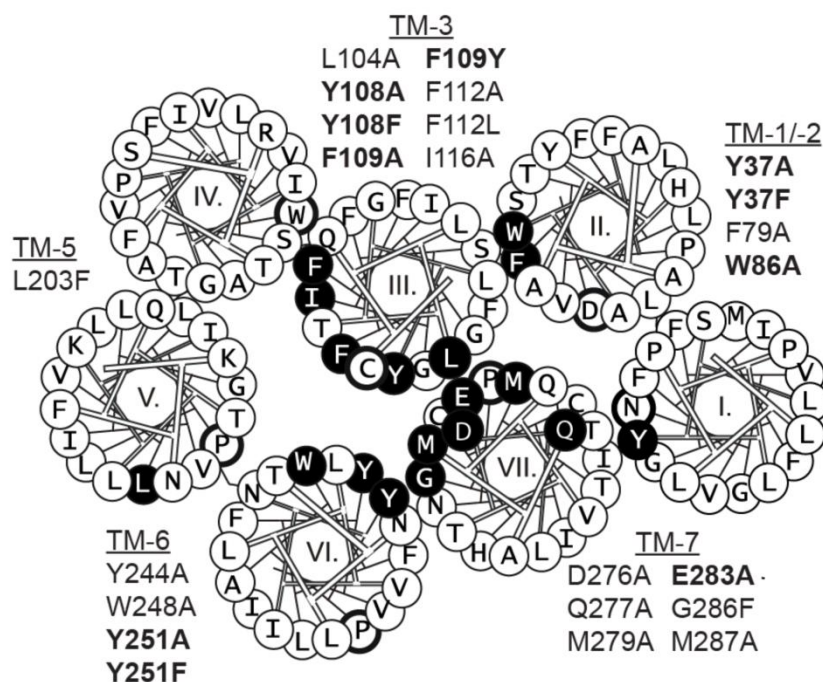


Figura 20. Diagrama 'roată helicală' a CCR5 ce cuprinde aminoacizii din secțiunea transmembranară extracelulară a receptorului. Aminoacizii mutați sunt reprezentați cu alb pe fundal negru și sunt notați în dreptul regiunii transmembranare corespunzătoare; cele mai importante mutații sunt îngroșate: cavitate principală – Y108A/F, F109A/Y, Y251A/F; cavitatea secundară – Y37A/F, W86A; ancora pentru ionul metallic: E283A.

Evaluarea funcțională a complexelor, dar și a chemokinelor endogene CCL3 și CCL5 la nivelul receptorilor mutați (Figura 21), alături de evaluarea activității alosterice a complexelor prin experimente de legare competitivă cu chemokine radiomarcate (Tabel 3) sunt în concordanță cu ipoteza *in silico* propusă anterior.

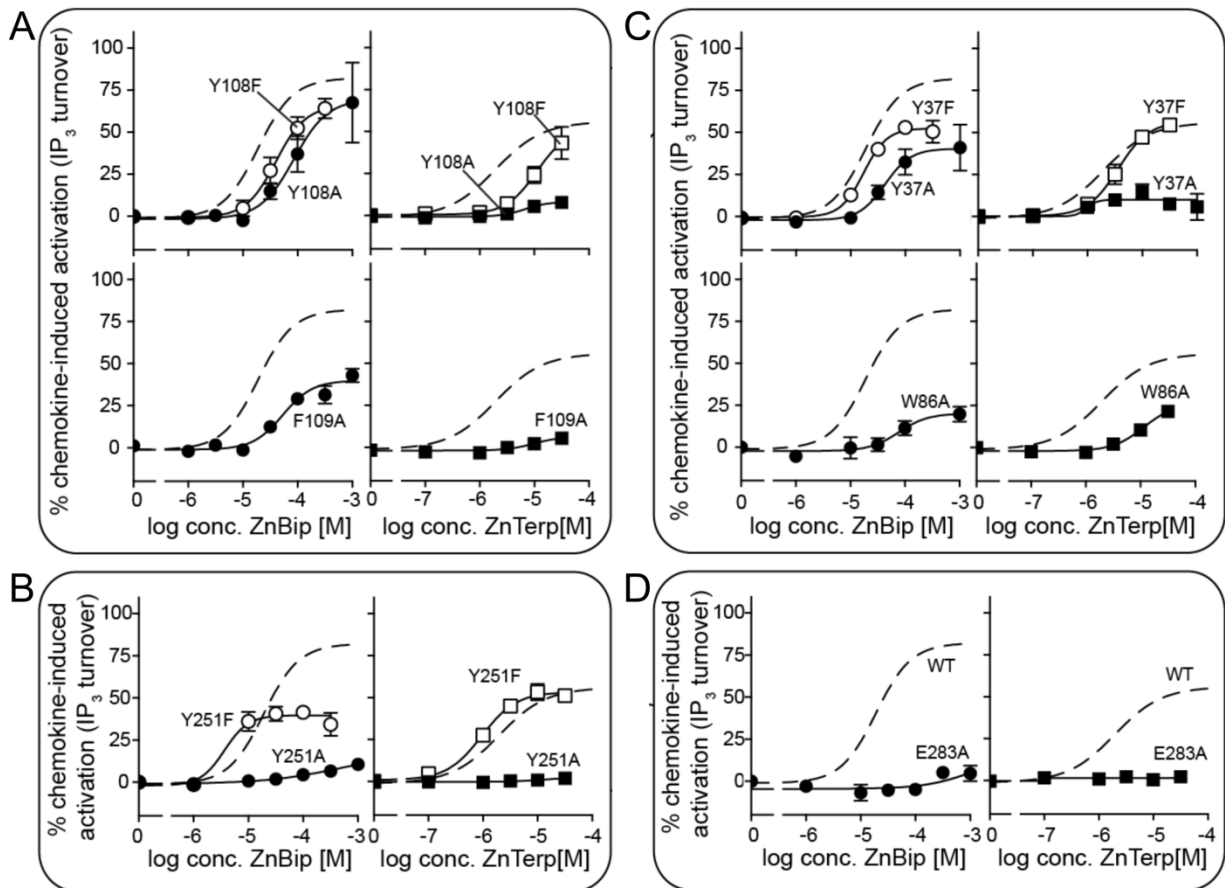


Figura 21. Activitatea ZnBip (stânga, cercuri) și ZnTerp (dreapta, pătrate) la nivelul celor mai importanți receptori mutați, evaluată prin experimente de acumulare de inozitolfosfați; activitatea complexelor la fenotipul sălbatic este reprezentată cu linii întrerupte în fiecare grafic; (A) activitatea la nivelul mutațiilor din TM III a cavității principale – Y108A/F și F109A; (B) activitatea la nivelul mutațiilor din TM VI a cavității principale – Y251A/F; (C) activitatea la nivelul mutațiilor din TM I/II a cavității secundare – Y37A/F și W86A; (D) activitatea la mutantul E283A din TM VII.

Mutații precum W86A, F109A, W248A, Y251A sau E283A au avut un impact major asupra activității intrinseci a ZnBip și ZnTerp, iar F79A și Y244A s-au dovedit importante în integritatea generală a receptorului, din moment ce niciuna din chemokinele testate nu a putut activa acești receptori mutați.

În ceea ce privește capacitatea modulatorie alosterică, W86A a avut un impact selectiv asupra abilității ZnBip de a amplifica legarea CCL3 la nivelul receptorului, iar Y37A a avut un impact selectiv asupra aceleiași proprietăți la cei doi complecși terpiridinici. După cum era de așteptat, E283 și F109 sunt esențiali pentru activitatea alosterică a tuturor complecșilor testați, și doar comportarea ZnTerp este afectată de mutația W248A, observație ce în continuare susține ipoteza inițială *in silico*. Astfel, activitatea mai pronunțată a ZnTerp comparativ cu ZnBip în modularea legării chemokinelor ar putea fi explicată de stabilizarea adițională a complexului terpiridinic de către W248.

Tabel 3. Rezultatele experimentelor de legare competitivă folosind ca radioligand [¹²⁵I]-CCL3 și ZnBip, ZnTerp sau ZnCITerp drept competitori; poziția fiecărui aminoacid este indicată în sistemele de notare Ballesteros-Weinstein și Schwartz; valorile K_i sunt redată în unități logaritmice și concentrație molară (μM); F_{mut} reprezintă descreșterea K_i a receptorilor mutanți comparativ cu fenotipul sălbatic al CCR5; culori: > 2 galben; >5 portocaliu; >10 roșu; ZnCITerp dezlocuiește [¹²⁵I]-CCL3 de la Y37A, lucru evidențiat cu albastru

| | | ZnBip | | | ZnTerp | | | ZnCITerp | | | |
|--------|--------------|------------------------------|---------------------|----------------|------------------------------|---------------------|----------------|------------------------------|---------------------|----------------|-----------------|
| | | Affinity | | | Affinity | | | Affinity | | | |
| | | logK _i ± SEM (μM) | F _{mut} | (n) | logK _i ± SEM (μM) | F _{mut} | (n) | logK _i ± SEM (μM) | F _{mut} | (n) | |
| | WT | -4.2 ± 0.13 | 66 | 1.0 (8) | -4.8 ± 0.09 | 16 | 1.0 (7) | -5.2 ± 0.07 | 6 | 1.0 (4) | |
| TM I | Y37A | I:07/1.39 | -4.2 ± 0.01 | 67 | 1.0 (3) | -4.4 ± 0.29 | 37 | 2.4 (3) | -5.7 ± 0.05 | 2.1 | 0.34 (3) |
| | Y37F | I:07/1.39 | -4.0 ± 0.02 | 95 | 1.4 (3) | -4.7 ± 0.07 | 21 | 1.3 (3) | -5.0 ± 0.19 | 11 | 1.8 (3) |
| TM II | W86A | II:20/2.60 | -3.4 ± 0.16 | 420 | 6.3 (4) | -4.6 ± 0.10 | 24 | 1.5 (3) | -5.0 ± 0.02 | 9.7 | 1.6 (3) |
| TM III | Y108A | III:08/3.32 | -4.1 ± 0.01 | 79 | 1.2 (3) | -4.8 ± 0.16 | 18 | 1.1 (4) | -5.0 ± 0.10 | 11 | 1.8 (3) |
| | F109A | III:09/3.33 | no enhanced binding | | (3) | no enhanced binding | | (3) | no enhanced binding | | (3) |
| | F112A | III:12/3.36 | -4.0 ± 0.07 | 99 | 1.5 (4) | -4.6 ± 0.14 | 23 | 1.4 (5) | -5.2 ± 0.08 | 6.3 | 1.0 (4) |
| TM V | L203F | V:13/5.47 | -4.0 ± 0.10 | 90 | 1.4 (3) | not determined | | not determined | | | |
| TM VI | W248A | VI:13/4.48 | -4.1 ± 0.05 | 85 | 1.3 (4) | no enhanced binding | | (4) | -5.3 ± 0.16 | 5.5 | 0.9 (4) |
| | Y251A | VI:16/4.51 | -4.1 ± 0.09 | 75 | 1.1 (4) | -4.8 ± 0.06 | 17 | 1.1 (4) | -5.1 ± 0.05 | 8.5 | 1.4 (4) |
| TM VII | D276A | VII:02/7.32 | -3.7 ± 0.21 | 204 | 3.1 (3) | -4.5 ± 0.11 | 28 | 1.8 (4) | -5.1 ± 0.1 | 8.6 | 1.4 (4) |
| | E283A | VII:06/7.39 | no enhanced binding | | (3) | no enhanced binding | | (4) | -4.0 ± 0.07 | 105 | 17 (3) |
| | G286F | VII:09/7.42 | -4.4 ± 0.00 | 36 | 0.55 (3) | not determined | | not determined | | | |
| | M287A | VII:10/7.43 | -3.7 ± 0.21 | 204 | 3.1 (3) | -5.1 ± 0.12 | 7.6 | 0.48 (3) | -5.2 ± 0.03 | 6.8 | 1.1 (3) |

În concluzie, capitolul 3 se concentrează asupra înțelegerii mecanismelor structurale din spatele activării și modulării alosterice a receptorului chemokinic CCR5 de către complecșii coordinativi formați *in situ* ZnBip, ZnTerp și ZnCITerp printr-o abordare combinată *in silico* și *in vitro*. Pornind de la rezultatele experimentelor de andocare moleculară, s-au generat 23 receptori mutanți, la nivelul cărora au fost evaluați compușii coordinativi și chemokinele endogene prin experimente de acumulare de mesagenri secundari (inozitolfosfați) și experimente de legare competitivă cu chemokine radiomarcate.

Experimentele de andocare moleculară *in silico* au indicat că toți cei trei complecși sunt acomodați la nivelul aceleiași cavități de legare de la nivelul receptorului într-o manieră asemănătoare, iar experimentele *in vitro* întreprinse, inclusiv cele de mutagenză dirijată, au susținut modelul *in silico* propus.

În toate cele trei cazuri, acidul glutamic din TM VII, E283, joacă rolul de ancoră pentru ionul metalic. Alți aminoacizi implicați în stabilizarea scheletului polipiridinic la nivelul cavității de legare a receptorului includ Y37, W86, Y108, F109, F112, W248 și Y251. În plus, cel de-al treilea inel piridinic din ZnTerp and ZnClTerp este acomodat adânc în regiunea hidrofobă a cavității principale de legare delimitată de W248 și Y251, iar inabilitatea ZnClTerp de a activa receptorul ar putea fi explicată printr-o interacțiune defectuoasă cu W248, un aminoacid implicat în mod general în activarea ligand-dependentă a receptorului, sau de stabilizarea acestuia într-o manieră ce nu permite activarea receptorului. În același timp, activitatea mai pronunțată a ZnTerp comparativ cu ZnBip ar putea fi explicată de stabilizarea adițională a complexului terpiridinic de către W248.

Per ansamblu, rezultatele prezentate în capitolul 3 ilustrează că diverse molecule de mici dimensiuni cu centru metalic pot fi utilizate pentru a modula comportamentul unor perechi specifice chemokină:receptor. În acest sens, simpla adădire a unui atom de clor (Terp vs. ClTerp) poate avea un impact imens asupra comportării liganzilor din punct de vedere al activității intrinseci sau al capacității alosterice. Astfel, cercetarea prezentată în acest capitol contribuie la înțelegerea mecanismelor de activare a receptorilor chemokinici, informații ce ar putea fi explorate în vederea dezvoltării de noi molecule de mici dimensiuni cu proprietăți specifice și diverse aplicații medicale.

Capitolul 4. Identificarea și caracterizarea farmacologică de noi liganzi cu acțiune la nivelul receptorului chemokinic viral US28

Cu toate că ionii metalici, respectiv compușii coordinativi, și-au demonstrat utilitatea în studiul activării și modulării alosterice a receptorilor chemokinici [16, 21, 28] sau a receptorilor cuplați cu proteine G în general [13, 15, 29], un potențial farmacoterapeutic mai mare în cadrul sistemului chemokinic îl au moleculele de mici dimensiuni fără centru metalic. Cu excepția azamacrociclorilor cu centru metalic și potențial antiviral ce țintesc receptorul chemokinic CXCR4 [30-32], majoritatea liganzilor aflați în centrul investigațiilor actuale sunt entități organice de mici dimensiuni [33]. Generarea de descriptori moleculari pentru stabilirea de relații structură-activitate (SAR) în cazul compușilor organici de mici dimensiuni este relativ simplă, iar disponibilitatea a milioane de structuri în baze de date comerciale de compuși permite identificarea de noi entități moleculare cu aceleași proprietăți farmacofore cu medicamente cunoscute, eventual cu potențial terapeutic îmbunătățit.

O direcție de cercetare actuală este îndreptată spre identificarea de noi molecule de mici dimensiuni cu potențial anti-HCMV ce țintesc receptorul chemokinic viral US28, implicat în diseminarea virală, dar și în patogeniile altor condiții imune precum ateroscleroza sau dezvoltarea și vascularizarea tumorilor, în special a glioblastoamelor [34]. De asemenea, acest receptor este prezent și în latență, astfel că țintirea sa în terapii anti-HCMV ar putea fi o soluție fezabilă pentru tratarea infecțiilor virale indiferent de viremie sau progresia bolii [35]. US28 posedă multe proprietăți interesante, de la semnalizarea prin diverse căi celulare în manieră constitutivă [36-39] până la abilitatea de a lega o multitudine de chemokine și de a le înlătura din spațiul extracelular [40]. Multe din aceste proprietăți au fost exploatate pentru dezvoltarea de strategii terapeutice variate. În mod special, afinitatea ridicată a US28 pentru chemokina CX₃CL1 a fost utilizată pentru a genera o proteină toxică de fuziune ce distruge selectiv celulele infectate cu HCMV ce exprimă US28 [41, 42].

Atenuarea nivelului de activitate constitutivă al US28 poate fi, de asemenea, o țintă atractivă în vederea dezvoltării de noi potențiale terapii anti-HCMV. Prima moleculă nonpeptidergică descrisă ca ligand pentru US28, VUF2274 (5-[4-(4-clorofenil)-4-hidroxi-piperidin-1-il]-2,2-difenilpentannitril), se comportă ca un agonist invers în calea de semnalizare celulară PLC în evaluări *in vitro* la nivelul celulelor transfectate cu US28 [43], dar este și un antagonist potent la nivelul receptorului chemokinic înrudit structural cu US28,

CCR1 [44], o proprietate ce limitează utilizarea acestui compus în clinică datorită posibilelor efecte secundare. Alți compuși de natură variată, inclusiv tetrahidroizochinoline, flavonoide, calcone și azepine, au fost dezvoltați în vederea atenuării nivelului de activitate constitutivă a receptorului US28, însă valorile relativ mici ale EC_{50} limitează eventuala lor utilizare în practica medicală.

Setul disponibil actual de molecule cu abilitatea de a interacționa cu US28 a fost construit prin strategii precum generarea de compuși hibridi, căutarea în baze de date proprii ('in-house') sau prin modificări structurale punctuale ale compușilor deja cunoscuți, iar din acest motiv, numărul de entități moleculare cu structuri unice capabile de a modula activitatea US28 este limitat. Din acest motiv, noi strategii precum căutarea în baze de date complete de substanțe disponibile comercial (*e.g.* ZINC) ar trebui adoptate pentru a identifica noi liganzi ai US28 cu valori ale EC_{50} îmbunătățite, în vederea explorării potențialului activității constitutive a acestui receptor în terapii anti-HCMV și pentru a înțelege mai bine relevanța fiziologică a acestuia în patogenia virală [45].

Astfel, scopul capitolului 4 este de a identifica noi structuri moleculare capabile de a acționa la nivelul US28 pornind de la descriptorii moleculari ai agonistului invers cunoscut, VUF2274. În primă fază a fost construit un model prin omologie al receptorului US28 bazat pe coordonatele structurale ale unui alt receptor chemokinic înrudit, CCR5. În continuare, s-a identificat situsul de legare al VUF2274 la nivelul US28 prin studierea orientării relative a ligandului co-cristalizat al CCR5, maraviroc, la nivelul receptorului și prin suprapunerea modelului generat peste structura cristalină a *template*-ului, CCR5. Odată identificat situsul de legare, VUF2274 a fost andocat la nivelul US28, iar conformația cea mai favorabilă din punct de vedere energetic a fost optimizată și folosită mai departe în etapa de screening virtual.

Procedura de screening virtual bazat pe structura liganzilor (ligand-based virtual screening) a presupus o căutare sistematizată în baze de date de compuși disponibili comercial și selectarea celor mai similare substanțe cu VUF2274 din punct de vedere al descriptorilor moleculari și al compatibilității spațiale cu situsul de legare al US28. Inițial, aproximativ 12 milioane de compuși din baza de date ZINC [46] au fost comparați cu VUF2274 printr procedeu *multiplet similarity search*, iar cei mai bine clasati 5% compuși conform coeficientului de similaritate Tanimoto (693,130) au fost supuși unei noi etape de

selecție, denumită *Atomic Property Field superimposition*. Această tehnică, implementată în Molsoft ICM-Pro, generează un grid molecular pentru fiecare compus din baza de date conform șapte proprietăți farmacofore tridimensionale: (1) grupări donoare de legături de hidrogen (HBD); (2) grupări acceptoare de legături de hidrogen (HBA); (3) hibridizare sp^2 ; (4) lipofilitate; (5) mărime; (6) sarcină și (7) grupări electronegative/pozitive, care este mai apoi comparat cu cel al conformației VUF2274 din situsul de legare al US28. Impunerea unor criterii standard de selecție cu scopul de a garanta biodisponibilitatea compușilor, precum masa moleculară (< 500) sau valoarea coeficientului de partiție n-octanol/apă ($\log P < 5.5$), urmată de clusterizare a dus la generarea a 1,454 structuri unice reprezentative care au fost apoi filtrate pe baza altor proprietăți farmacofore specifice ale VUF2274 (e.g. o grupare centrală încărcată pozitiv sau prezența unei grupări HBA la mai puțin de 1.5Å de gruparea hidroxil) cu generarea unui subset de 294 de compuși care au fost inspectați vizual individual la nivelul cavității de legare a receptorului. Din aceștia, 98 au fost achiziționați și testați *in vitro*. O reprezentare schematizată a etapelor de filtrare și selecție poate fi consultată în Figura 26.

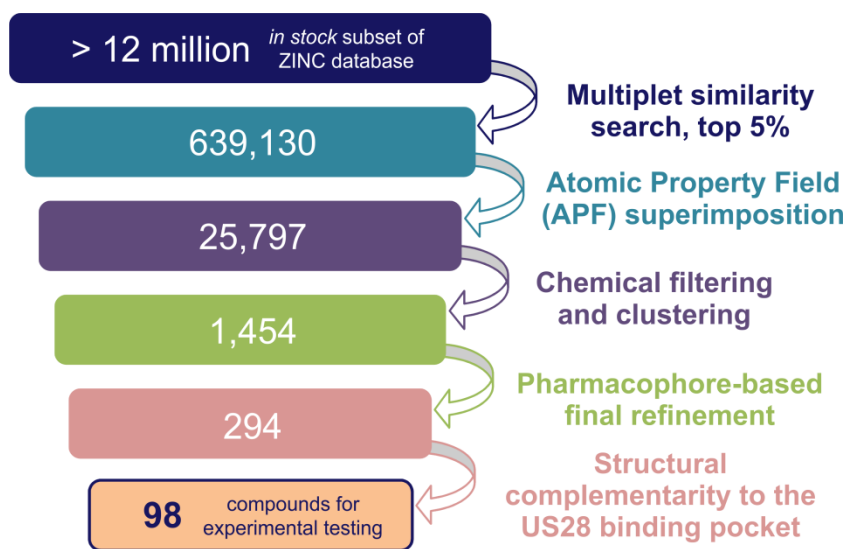


Figura 26. Etapele de filtrare și selecție, alături de numărul de compuși selectați după fiecare etapă

În experimentele preliminare de acumulare de inozitolfosfați (IP), majoritatea compușilor testați au prezentat o tendință clară spre agonism invers, compusul cel mai eficient fiind *N*-(2,4-difluorofenil-2-(4-((2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)methyl)piperidin-1-il)acetamida (**125**), cu capacitatea de a atenua 44% din activitatea constitutivă a

receptorului US28 cu o valoare a EC_{50} de 1.76 μ M, de 2 ori mai bună decât a compusului-părinte, VUF2274. De asemenea, a fost identificat și un agonist, 2-{{4-(4-acetilfenil)piperazin-1-il}metil}-5-fenil-3*H*-tieno[2,3-*d*]pirimidin-4-onă (**33**), ce a putut amplifica activitatea de bază a receptorului US28 cu 36% și o valoare a EC_{50} de 0.95 μ M (Figura 27). Testările acestor compuși și în alte experimente funcționale precum acumularea intracelulară de Ca^{2+} au confirmat activitatea acestora la nivelul US28.

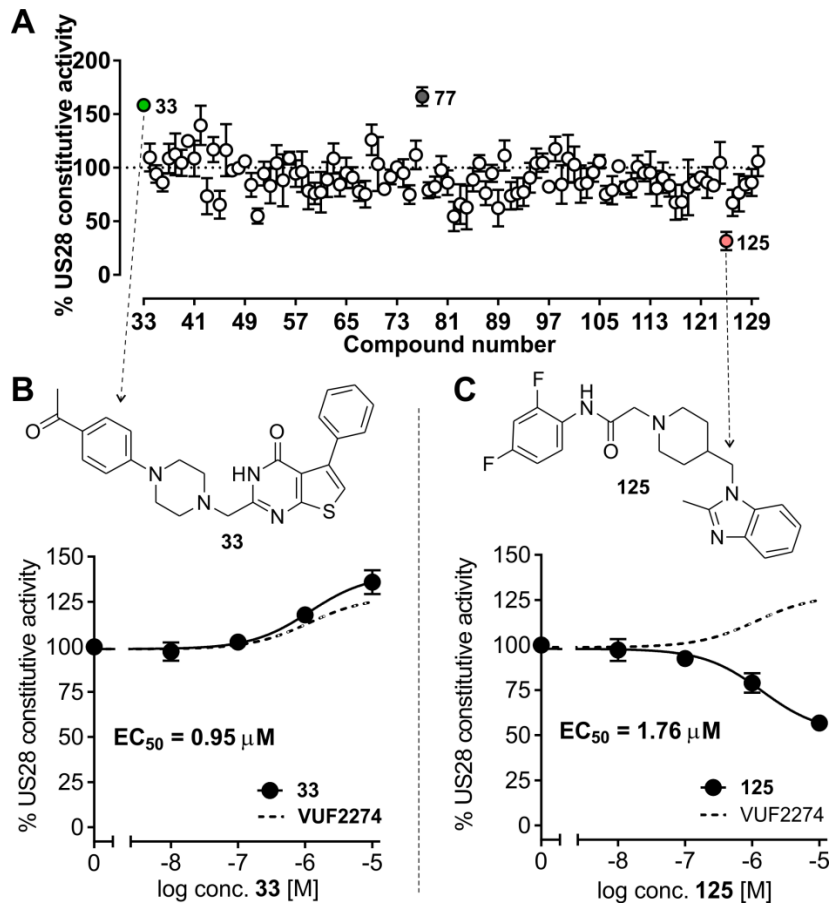


Figura 27. (A) Evaluarea funcțională în doză singulară (10 μ M) a bibliotecii de 98 de compuși prin experimente de acumulare de inozitolfosfați la US28 WT; agonistul (**33**) și agonistul invers (**125**) sunt colorați în verde, respectiv portocaliu; agonistul nespecific **77** este colorat în gri; (B,C) structurile chimice și curbele doză-răspuns ale **33** și **125**; curba doză-răspuns a VUF2274 este redată în linie punctată în fiecare grafic; datele sunt normalizate între activitatea bazală a celulelor netransfectate (0%) și activitatea constitutivă a celulelor transfectate cu US28 în prezența unei soluții DMSO 1% (100%) și reprezintă media a cel puțin 3 experimente individuale efectuate în duplicat \pm SEM; valori de peste 100% indică o creștere a concentrației de inozitolfosfați radiomarcați prin activarea receptorului și denotă un caracter agonist, în timp ce valori de sub 100% denotă descreșterea concentrației de inozitolfosfați, implicit un caracter agonist invers.

Prin studii de legare competitivă cu radioliganzi s-a constatat că acești doi compuși sunt alosterici, doar unul din cel 98 de compuși testați fiind capabil să concureze cu [¹²⁵I]-CX₃CL1 pentru situsul de legare al US28 – 2-({4-[2-(4-clorofenoxi)etil]piperazin-1-il}metil)benzo[*cd*]indol-2(1*H*)-ona (**76**). Totuși, analiza LC-MS a acestui compus a indicat o defragmentare chiar și în condiții de ionizare blândă, sugerând că **76** ar putea fi instabil și în condițiile experimentale *in vitro* (Figura 29).

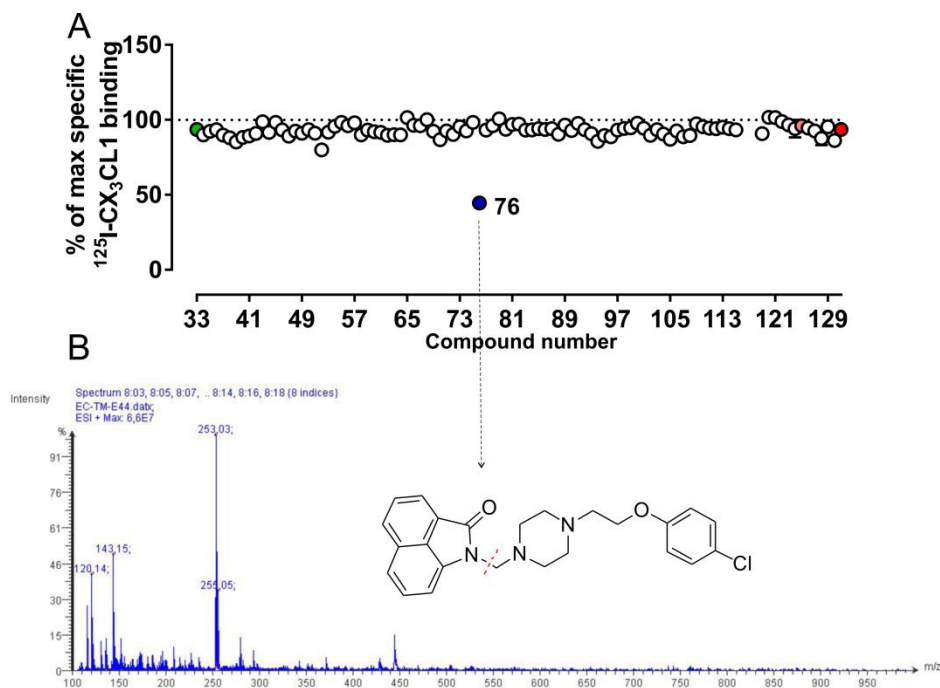


Figure 29. (A) Evaluarea bibliotecii de 98 de compuși în doză singulară (10 μM) prin studii de legare competitivă cu [¹²⁵I]-CX₃CL1; compusul **76** este colorat în albastru; **33**, **125** și **VUF2274** sunt colorați în verde, portocaliu, respectiv roșu; valorile reprezintă media a trei experimente individuale, efectuate în duplicat, și normalizate între răspunsul observat în prezența unei soluții 1 μM de CX₃CL1 neradiomarcată (0%) și răspunsul observat în prezența unei soluții DMSO 1% (100%). Valori sub 100% denotă o competiție între legarea compușilor și [¹²⁵I]-CX₃CL1 la nivelul receptorului, reflectând un caracter ortosteric; (B) spectrul ESI-MS al **76**, împreună cu structura chimică și situsul posibil al defragmentării; principalele peak-uri m/z: 120.14; 143.15; 253.03; 255.05.

Compușii **33** și **125** sunt înrudiți structural, și posedă un sistem biciclic legat printr-o punte etilenică de un sistem heterociclic central, piperazină în cazul **33** și piperidină la **125**. Ambii compuși sunt acomodați la nivelul US28 într-o manieră asemănătoare, iar atomul de azot heterociclic formează o punte de sare cu acidul glutamic E277 din regiunea transmembranară VII a receptorului. De asemenea, regiunile hidrofobe voluminoase ale liganzilor sunt stabilizate în cavitatea de legare de o serie de aminoacizi aromatici precum

W89, Y112 sau Y244 (Figura 31). Printre diferențele în acomodarea celor doi compuși se numără orientarea relativă a catenei laterale a W89, dar și legătura adițională de hidrogen dintre atomul de oxigen carbonilic al **125** și gruparea hidroxil a Y112. Studii ulterioare de mutageneză ar putea confirma implicarea directă a acestor aminoacizi în stabilizarea compușilor la nivelul receptorului.

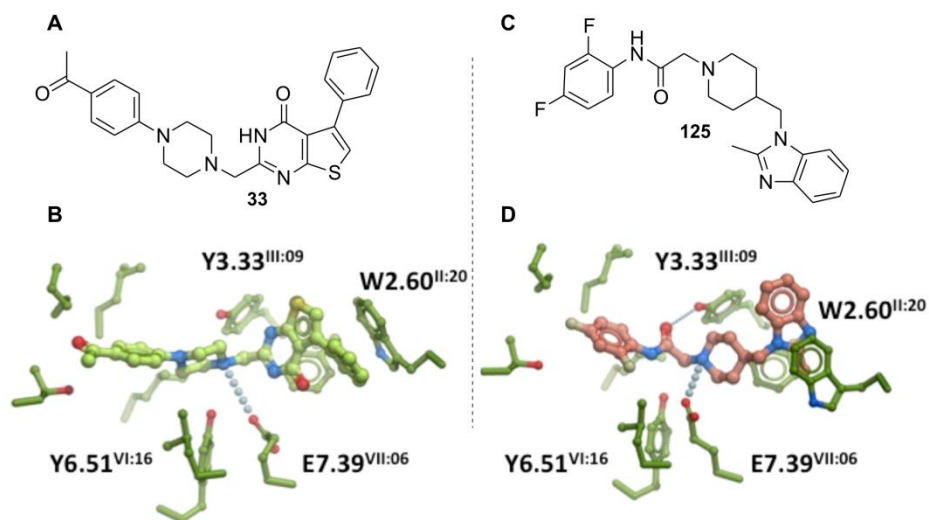


Figura 31. Structurile chimice și conformațiile cele mai favorabile ale (A,B) **33** și (C,D) **125** la nivelul US28; interacțiunile polare ligand:receptor sunt redată cu linii albastre punctate; aminoacizii din cavitatea de legare sunt notați conform sistemelor de notare Ballesteros-Weinstein/Schwartz

În concluzie, capitolul 4 al tezei se axează pe identificarea și caracterizarea de noi entități chimice capabile de a acționa la nivelul receptorului chemokinic viral US28. Astfel, utilizând descriptorii moleculari ai ligandului cunoscut pentru US28, VUF2274, au fost selectați cei mai similari compuși disponibili comercial din baza de date ZINC, ce conține aproximativ 12 milioane de substanțe, prin etape succesive de filtrare și selecție. În final, s-a construit o bibliotecă de 98 de compuși ce au fost evaluați în teste *in vitro* pentru aprecierea activității acestora la nivelul US28.

Evaluarea biologică a compușilor a dus la identificarea unui agonist invers ce conține un schelet molecular nemădescris pentru acest sistem proteic, **125**, cu abilitatea de a atenua 44% din activitatea constitutivă a receptorului US28 cu o valoare a EC_{50} de 1.76 μ M, dar și un agonist, **33**, ce poate amplifica activitatea de bază a receptorului cu 36% cu o valoare a EC_{50} de 0.95 μ M. Cei doi liganzi acționează în manieră alosterică la nivelul receptorului relativ cu chemokina CX₃CL1, și doar unul din cei 98 de compuși testați a putut concura cu

aceasta pentru ocuparea situsului de legare al US28 (**76**), însă stabilitatea acestui compus în condițiile experimentale alese este incertă.

În final, atât **33** cât și **125** sunt acomodați la nivelul receptorului în manieră similară, fiind înrudiți structural. Ambii compuși posedă un sistem biciclic legat printr-o punte etilenică de un sistem heterociclic central, piperazină în cazul **33** și piperidină la **125**. Printre aminoacizii implicați în stabilizarea acestor doi compuși la nivelul cavității de legare a receptorului se numără E277, care servește drept ancoră pentru atomul de azot heterociclic central, W89, Y112 și Y244.

Structurile nou-identificate în acest capitol, precum și caracterizarea farmacologică a acestora reprezintă puncte de plecare importante în dezvoltarea de noi terapii anti-HCMV ce țintesc receptorul chemokinic viral US28.

Capitolul 5. Caracterizarea farmacologică de noi liganzi cu acțiune la nivelul US28 generați pe baza caracteristicilor structurale ale compușilor anterior identificați

Capitolul 5 al tezei dezvoltă ideea capitolului anterior, în sensul că structurile nou-identificate (**33**, **76**, **125**) sunt folosite drept modele pentru generarea unei mini-biblioteci de nouă generație, conținând 93 de compuși, prin aceeași abordare computațională de screening virtual utilizată în capitolul anterior, și evaluarea acestora *in vitro*.

După evaluarea inițială în doză singulară în cadrul testărilor funcționale, compușii cu activitate relevantă la nivelul US28 au fost evaluați și în etapa ulterioară, de determinare a valorilor EC₅₀ (Figura 37).

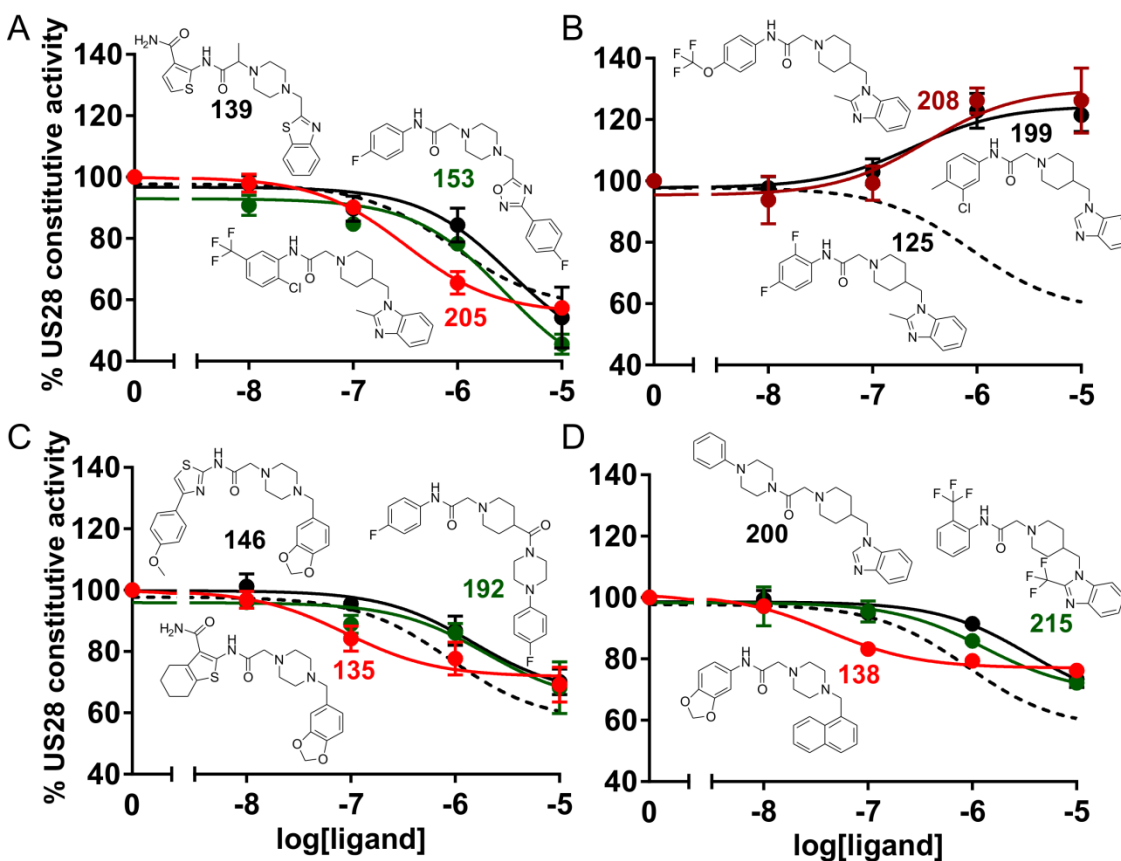


Figura 37. Structurile și activitatea compușilor de nouă generație în experimente de acumulare de inozitolfosfați: (A) capabili de a atenua mai mult de 40% din activitatea constitutivă a US28; (B) cu acțiune agonistă; (C,D) capabili de a atenua mai mult de 30%, respectiv 20% din activitatea constitutivă a US28; rezultatele sunt normalizate între activitatea celulelor netransfectate (0%) și activitatea celulelor transfectate cu US28 în prezența unei soluții DMSO 1% (100%) și reprezintă media a cel puțin 3 experimente efectuate în duplicat \pm SEM;

Dintre compușii cu abilitatea de a atenua activitatea constitutivă a US28 cu mai mult de 40%, compusul **205** (*N*-(2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)-2-(4-((2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)metil)piperidin-1-il)acetamida) este de 2.8 ori mai activ decât **125**, iar compușii **153** (*N*-(4-fluorofenil)-2-(4-((5-(4-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il)metil)piperazin-1-il)acetamida) și **139** (2-({2-[4-(1,3-benzotiazol-2-ilmetil)piperazin-1-il]propanoil} amino)tiofen-3-carboxamida) au valori ale EC₅₀ de 3, respectiv 4 ori mai slabe (Figura 37A). Dintre toți agonistii inverși identificați, compusul **205** este cel mai similar din punct de vedere structural cu **125**, fapt ce sugerează că acest compus păstrează determinanții structurali de activitate la nivelul US28. Cei doi compuși cu abilitatea de a amplifica activitatea constitutivă a US28, **199** (2-(4-((1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)metil)piperidin-1-il)-*N*-(3-cloro-4-metilfenil)acetamida) și **208** (2-(4-((2-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-il)metil)piperidin-1-il)-*N*-(4-(trifluorometoxi)fenil)acetamida) (Figura 37B) sunt, de asemenea, înrudiți structural cu **125**, ceea ce face ca interpretarea eventualelor relații de structură-activitate biologică să fie dificilă, observație valabilă și în cazul altor liganzi cu activitate la nivelul US28 [47].

În cadrele experimentale în care nivelul bazal de activitate constitutivă este ridicat, compusul **135** (2-({2-[4-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)piperazin-1-il]acetil} amino)-4,5,6,7-tetrahidro-benzotiofen-3-carboxamida) a demonstrat cea mai bună combinație eficacitate-potență, fiind comparabil cu **125** în termen de eficacitate, dar de 11 ori mai potent (Figura 37C). Compusul **146** (2-[4-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)piperazin-1-il]-*N*-[4-(4-metoxifenil)tiazol-2-il]acetamida), care posedă același substituent în partea dreaptă a moleculei ca și **135** (relativ cu heterociclul central) dar un substituent mai voluminos și cu atomul de azot imobilizat într-un ciclu de tip tiazol în partea stângă, are o activitate de 20 de ori mai slabă comparativ cu **135**, ceea ce sugerează că nu doar volumul substituentului este important pentru activitatea observată, ci și sarcina netă, precum și disponibilitatea spațială a atomului de azot din substituent. În final, compusul **138** (*N*-(1,3-benzodioxol-5-il)-2-[4-(1-naftilmetil)piperazin-1-il]acetamida) a atenuat activitatea constitutivă a receptorului US28 cu 23% (Figura 37D), însă acest comportament a fost observat exclusiv în cadre experimentale în care nivelul inițial de activitate constitutivă a receptorului era foarte ridicat. Acest compus nu a avut activitate semnificativă în evaluările preliminare în doză singulară.

Nici unul din cei 93 de compuși nu a reușit să dezlocuiască complet chemokina CX₃CL1 radiomarcată de la nivelul receptorului, însă doi compuși au reușit dezlocuirea sa

parțială (**134** și **208**, 32% dezlocuire în doză singulară de 10 μ M). După cum era de așteptat, VUF2274 și **125** nu au concurat cu [125 I]-CX₃CL1, comportare observată și anterior (Figura 38A). În același timp, cinci din cei 93 de compuși au dezlocuit chemokina CCL2 radiomarcată de la nivelul receptorului cu mai mult de 40%, cel mai eficient fiind **208** (78%). Alți șase compuși au putut concura cu mai mult de 15% [125 I]-CCL2 pentru legarea la nivelul US28. VUF2274 a dezlocuit aproximativ 60% din chemokina radiomarcată, iar **125** a putut concura cu doar aproximativ 10% [125 I]-CCL2 (Figura 38B).

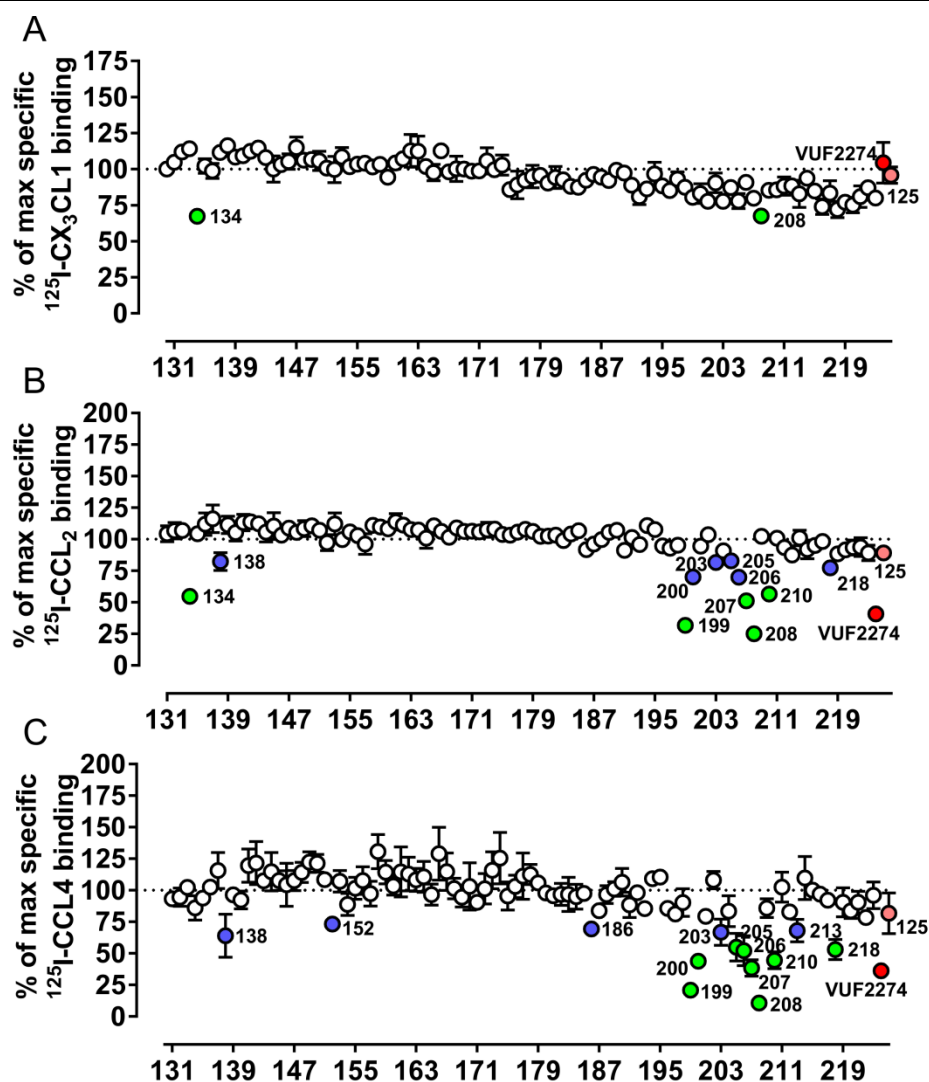


Figura 38. Evaluarea bibliotecii de 98 de compuși în doză singulară (10 μ M) prin studii de legare competitivă cu (A) [125 I]-CX₃CL1; (B) [125 I]-CCL₂; (C) [125 I]-CCL₄; cercuri verzi: >40% dezlocuire; cercuri albastre: >20% dezlocuire; **125** și VUF2274 sunt colorați cu portocaliu, respectiv roșu; valorile sunt normalizate între răspunsul observat în prezența unei soluții 1 μ M de chemokină neradiomarcată (0%) și răspunsul observat în prezența unei soluții DMSO 1% (100%), n=3, duplicat

Pentru a verifica dacă comportamentul observat relativ cu CCL2 este specific, biblioteca de compuși de nouă generație a fost testată și în studii de legare competitivă utilizând ca radioligand chemokina CCL4. În acest sens, s-a observat că majoritatea compușilor identificați ca dezlocuitori ai CCL2 de la nivelul receptorului pot dezlocui și chemokina CCL4 (Figura 38C) cu aproximativ aceeași eficacitate. Practic, cu excepția câtorva compuși (spre exemplu, **134** concurează selectiv cu [¹²⁵I]-CCL2), nivelul de dezlocuire a celor două chemokine se corelează liniar (Figura 39), ceea ce sugerează că acești compuși au un mod asemănător de legare la nivelul receptorului, și sunt capabili de a recunoaște acele conformații ale receptorului stabilizate de chemokine de tip CC, dar nu și cele stabilizate de CX₃CL1.

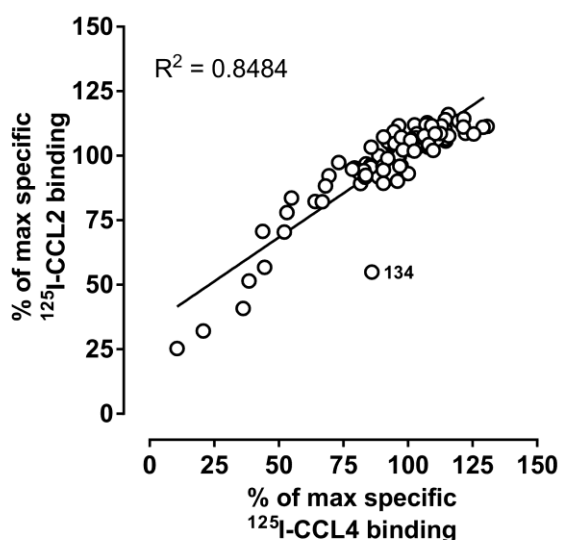


Figura 39. Dependența liniară dintre dezlocuirea [¹²⁵I]-CCL2 și [¹²⁵I]-CCL4 de la nivelul receptorului de către biblioteca de compuși de nouă generație

Dintre cinci cei mai eficace dezlocuitori ai CCL2 radiomarcate, trei au valori ale IC₅₀ mai bune decât VUF2274 (care a avut o valoare a IC₅₀ de 12.35 μM în cadrul experimental ales), însă doar doi au eficacitate îmbunătățită: **199** și **208**. Compușul **207** este la fel de activ ca și VUF2274, însă nu poate concura cu CCL2 la același nivel, iar **134** și **210** au valori ale IC₅₀ mai mari de 10 μM (Figura 40).

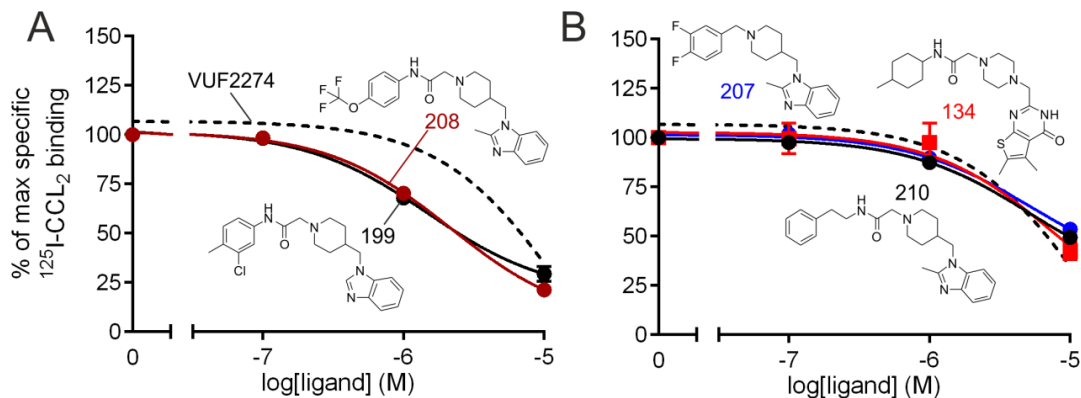


Figura 40. Curbele doză-răspuns în experimente de legare competitivă cu [¹²⁵I]-CCL₂ ale (A) VUF2274, **199** și **208**; (B) **134**, **207** și **210**; valorile sunt normalizate între răspunsul observat în prezența unei soluții 1μM de chemokină neradiomarcată (0%) și răspunsul observat în prezența unei soluții DMSO 1% (100%), n=3, duplicat

În cadrul evaluărilor funcționale inițiale la nivelul receptorului US28, compușii **199** și **208** se comportă ca agoniști slabi, însă s-a observat că eficacitatea acestora este dependentă de nivelul inițial de activitate constitutivă al sistemului experimental. Este interesant de notat că un nivel inițial ridicat de activitate constitutivă potențează gradul de agonism observat. Acest comportament a fost observat și la alți liganzi ai receptorului US28 [47], însă cauza sa exactă nu a fost elucidată pe deplin, cu toate că se presupune că este legată de proprietatea adițională a receptorului viral de a fi internalizat în manieră constitutivă. Astfel, în vederea eliminării capacității receptorului de a fi internalizat prin recrutare constitutivă de β-arestine, dar în același timp păstrând abilitatea sa de a semnaliza în manieră constitutivă, activitatea bibliotecii de compuși de nouă generație a fost testată și la nivelul unui receptor trunchiat, US28Δ300. Acest receptor nu posedă ultimii 55 de aminoacizi carboxiterminali și implicit nu prezintă situsurile de fosforilare necesare recrutării kinazelor de receptori cuplați cu proteine G (GRKs), deci nu poate recruta β-arestine sau suferi internalizare β-arestin-dependentă. Alți autori au demonstrat că utilizarea acestui receptor în evaluarea activității liganzilor de mici dimensiuni poate duce la identificarea de activități camuflate de internalizarea constitutivă a receptorului US28 de fenotip sălbatic [47].

Evaluarea inițială în doză singulară a celor 93 de compuși la nivelul receptorului trunchiat, US28Δ300, a dus la generarea unei palete mai diverse de activitate decât la US28WT (Figura 41). Nu mai puțin de 16 compuși au avut abilitatea de a crește nivelul de

inozitolfosfați cu mai mult de 40% peste nivelul de bază al US28Δ300, iar alți 12 au amplificat activitatea receptorului cu mai mult de 20%. Alți 7 compuși au atenuat activitatea constitutivă a acestui receptor cu mai mult de 25%. VUF2274 s-a comportat ca agonist, amplificând cu 90% activitatea bazală a mutantului, acest efect fiind opus celui observat la US28WT, iar compusul **125** nu a influențat în nici un fel activitatea receptorului trunchiat.

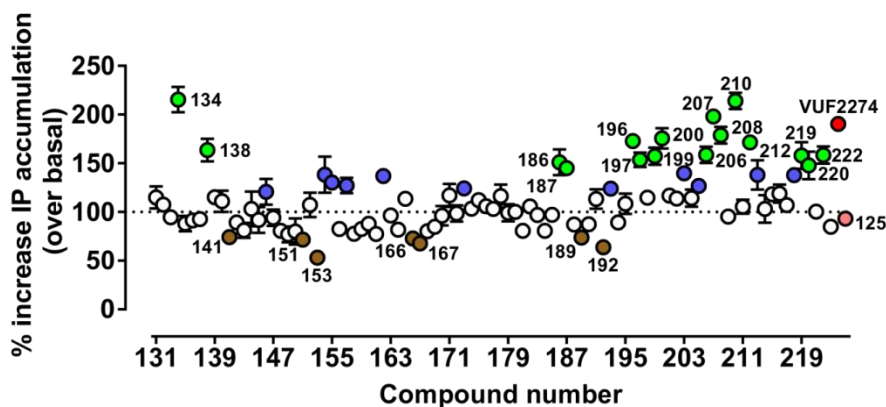
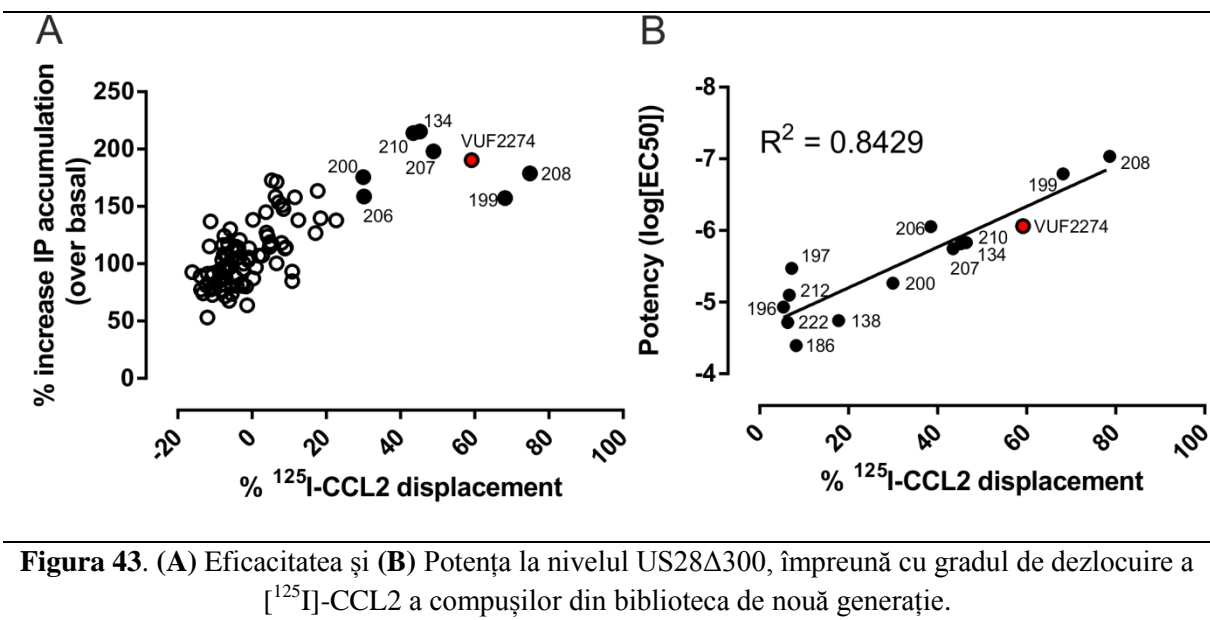


Figura 41. Evaluarea inițială a bibliotecii de nouă generație în doză singulară (10 μM) în experimente de acumulare de inozitolfosfați la nivelul receptorului US28Δ300 (n=3);

Nu s-a putut stabili nici o relație între activitatea compușilor la nivelul receptorului trunchiat și cea observată la fenotipul sălbatic, nici între gradul de dezlocuire a chemokinelor și activitatea la US28WT. Practic, s-a observat că unii compuși capabili de a amplifica activitatea la US28Δ300 nu au nici un efect sau au efect opus la US28WT. Pe de altă parte, s-a constatat că dezlocuirea chemokinelor de tip CC de la nivelul receptorului este strâns legată de activitatea copușilor la nivelul US28Δ300 (Figura 43). Astfel, s-a demonstrat că într-adevăr, există cazuri în care internalizarea constitutivă a US28WT poate duce la camuflarea activității moleculelor de mici dimensiuni la nivelul receptorului. Din acest motiv, utilizarea receptorului trunchiat US28Δ300 în evaluarea bibliotecilor de compuși ar putea conduce la identificarea de liganzi cu acțiune la nivelul US28 trecuți cu vederea în evaluările la nivelul fenotipului sălbatic. Astfel, US28Δ300 poate fi considerat o unealtă farmacologică esențială în dezvoltarea de noi potențiale terapii anti-HCMV ce țintesc US28.

În concluzie, capitolul 5 al tezei se axează pe identificarea și caracterizarea de noi entități moleculare ce acționează la nivelul US28, pornind de la structurile compușilor **33**, **76** și **125**, identificați în capitolul anterior ca noi liganzi pentru US28. Astfel, pornind de la descriptorii moleculari ai celor trei compuși, s-a scanat baza de date ZINC, conținând

aproximativ 12 milioane de compuși, și s-au selectat, prin etape succesive de filtrare și clusterizare, 93 de compuși pentru testările *in vitro*.



Evaluările *in vitro* au dus la identificarea câtorva noi agoniști inverși, dintre care **135** și **138** au avut valorile cele mai bune ale EC₅₀ (0.089 μM, respectiv 0.039 μM), dar eficacitate scăzută (<40% atenuare a activității constitutive). Compusul **205** a fost de trei ori mai activ decât ligandul-părinte **125** (EC₅₀ = 0.34 μM), cu eficacitate comparabilă. În același timp, s-au identificat doi agoniști noi, **199** și **208**.

Nici unul din cei 93 de compuși din biblioteca de nouă generație nu a reușit să dezlocuiască complet chemokina CX₃CL1 de la nivelul receptorului, însă câțiva compuși au concurat cu chemokinele de tip CC testate pentru legarea la receptor. În același timp, nu s-a putut stabili nici o relație între activitatea observată la US28WT și capacitatea de dezlocuire a chemokinelor de la nivelul receptorului. Totuși, tendința de legare a compușilor relativ cu chemokinele CC s-a putut corela liniar cu activitatea măsurată la receptorul trunchiat US28Δ300, ceea ce demonstrează că acest receptor mutant poate fi o unealtă farmacologică foarte utilă în scopul identificării de noi liganzi cu acțiune la nivelul US28. Structurile nou-identificate în acest capitol servesc drept puncte de plecare importante în dezvoltarea de noi terapii anti-HCMV ce țintesc receptorul US28 și contribuie la diversificarea structurilor disponibile în prezent cu abilitatea de a recunoaște acest receptor chemokinic viral.

Concluzii generale și perspective

Înțelegerea mecanismelor moleculare implicate în activarea receptorilor chemokinci de către molecule de mici dimensiuni se află la baza tuturor eforturilor actuale de identificare a noi potențiale terapii ce țintesc sistemul chemokinic. Pentru a aduce o contribuție în acest sens, cercetarea întreprinsă în teza de doctorat a fost direcționată spre:

- descrierea mecanismelor moleculare din spatele activării și modulării alosterice a receptorilor chemokinici de către liganzi de mici dimensiuni cu centru metalic, printr-o abordare combinată *in vitro* și *in silico*;
- identificarea de noi structuri moleculare capabile de a modula activitatea receptorilor chemokinici sau de a influența legarea chemokinelor endogene la receptori printr-o abordare combinată *in vitro* și *in silico*;

În vederea îndeplinirii primului obiectiv general, cercetarea s-a axat pe receptorul chemokinic CCR5, care este capabil de a acomoda o gamă variată de molecule de mici dimensiuni la nivelul cavității sale de legare, inclusiv compuși coordinativi, cu efecte farmacologice diverse. Pe de o parte, complexii metalici ZnBip și ZnTerp se comportă ca modulatori ago-alosterici la CCR5, deci pot activa receptorul în absența chemokinelor și modula legarea acestora la nivelul CCR5, iar complexul ZnClTerp este un modulator alosteric pur ce nu posedă activitate intrinsecă, însă are un impact puternic asupra legării chemokinelor endogene la nivelul receptorului.

În capitolul 3 al tezei a fost identificat situsul de legare a complexilor ZnBip, ZnTerp și ZnClTerp de la nivelul receptorului, și s-a demonstrat, atât prin experimente *in silico*, cât și *in vitro*, că este delimitat de aminoacizii Y37 și W86 din cavitatea secundară de legare, R168 în ECL2 și Y108, F109 și Y251 din cavitatea principală de legare pentru toți cei trei complecși, iar pentru ZnTerp și ZnClTerp mai cuprinde și F112 și W248 de la baza cavității principale de legare. În plus, s-a arătat că toți cei trei compuși coordinativi își datorează comportarea farmacologică acțiunii concertate agent chelant-ion metalic-acid glutamic E283 din TM VII. În același timp, activitatea mai pronunțată a ZnTerp comparativ cu ZnBip ar putea fi explicată de stabilizarea adițională a complexului terpiridinic de către W248, iar inabilitatea ZnClTerp de a activa receptorul ar putea fi cauzată de o interacțiune defectuoasă

cu W248, un aminoacid implicat în mod general în activarea ligand-dependentă a receptorului, sau de stabilizarea acestuia într-o manieră ce nu permite activarea receptorului.

Pentru îndeplinirea celui de-al doilea obiectiv general, cercetarea s-a axat pe receptorul chemokinic viral US28, implicat în patogenia infecției cu HCMV, și înrudit structural cu receptorul chemokinic anterior investigat, CCR5. În prezent există un număr limitat de entități moleculare de mici dimensiuni capabile de a modula activitatea acestui receptor, iar identificarea altor structuri unice ce pot recunoaște US28 este absolut necesară, dat fiind pericolul pe care acest virus îl reprezintă în cazul persoanelor imunocompromise, mai ales al nou-născuților.

În acest sens, capitolul 4 al tezei descrie generarea unei biblioteci de 98 de compuși cu potențială activitate la nivelul US28, pornind de la proprietățile farmacofore ale unui ligand cunoscut pentru US28, VUF2274, prin scanarea bazei de date ZINC, ce conține aproximativ 12 milioane de compuși disponibili comercial, prin etape succesive de filtrare și selecție. În urma evaluării *in vitro* a acestei biblioteci de compuși a fost identificat un agonist invers nou, **125**, cu abilitatea de a atenua 44% din activitatea constitutivă de bază a receptorului cu o valoare a EC_{50} de 1.76 μ M (de două ori mai bună decât a compusului-părinte, VUF2274 – $EC_{50} = 3.5 \mu$ M [43]), și s-a demonstrat că acest compus acționează la nivelul receptorului în manieră alosterică, nefiind capabil să dezlocuiască nici una din chemokinele radiomarcate testate de la nivelul US28. Un sigur compus din cei 98 testați, **76**, a putut concura cu chemokina CX₃CL1 radiomarcată pentru legarea la nivelul receptorului, însă posibila instabilitate a acestui compus în soluție nu a putut conduce la concluzia că efectul observat este cauzat de molecula în sine și nu de unul din produșii săi de hidroliză.

La concentrația maximă testată (10 μ M), compusul **125** a atenuat nivelul de activitate constitutivă a receptorului mai eficient decât chemokina endogenă CX₃CL1 în concentrație maximă testată (100 nM). În același timp, s-a identificat un compus nou cu caracter agonist, **33**, ce a amplificat activitatea receptorului cu 36% și o valoare moderată a EC_{50} (0.95 μ M).

În final, dată fiind asemănarea structurală dintre cei doi compuși, s-a arătat că atât **33**, cât și **125** sunt acomodați la nivelul receptorului în manieră similară. Ambii compuși posedă un sistem biciclic legat printr-o punte etilenică de un sistem heterociclic central, piperazină în cazul **33** și piperidină la **125**. Printre aminoacizii implicați în stabilizarea acestor doi compuși la nivelul cavității de legare a receptorului se numără E277, care servește drept ancoră pentru

atomul de azot din heterociclul central, W89, Y112 și Y244. Structurile nou-identificate în acest capitol, precum și caracterizarea farmacologică a acestora reprezintă puncte de plecare importante în dezvoltarea de noi terapii anti-HCMV ce țintesc receptorul chemokinic viral US28.

Odată ce au fost identificați cel puțin trei liganzi noi cu acțiune la nivelul receptorului chemokinic viral US28 (**33**, **76** și **125**), s-a generat o bibliotecă de compuși de nouă generație cu scopul de a identifica alte noi structuri cu proprietăți farmacologice îmbunătățite la nivelul US28. Astfel, în capitolul 5 al tezei se descrie generarea unei biblioteci de 93 de compuși utilizând același demers de screening virtual ca și în capitolul 4, dar folosind descriptorii moleculari ai celor 3 liganzi nou-identificați, precum și evaluarea acestora la nivelul US28 prin experimente funcționale și de legare competitivă.

Evaluarea funcțională a celor 93 de compuși a dus la identificarea câtorva noi agoniști inverși cu proprietăți farmacologice îmbunătățite față de compusul-părinte **125** (spre exemplu **135**, $EC_{50} = 89$ nM, de 11 ori mai activ), însă s-a observat că eficacitatea acestora este dependentă de nivelul inițial de activitate constitutivă al sistemului experimental. Nici unul din compușii testați nu a reușit să dezlocuiască complet chemokina CX₃CL1 de la nivelul receptorului, însă VUF2274 ($IC_{50} = 12.35$ μM), împreună cu alți cinci compuși (**134**, **199**, **207**, **208** și **210**), au dezlocuit mai mult de 40% [¹²⁵I]-CCL2 de la nivelul US28, iar doi din acești compuși (**199** and **208**) au avut valori ale IC_{50} de cel puțin 5 ori mai bune decât VUF2274. Aceiași doi compuși au fost buni dezlocuitori ai [¹²⁵I]-CCL4, în timp ce VUF2274 a reușit să dezlocuiască aproximativ 65% din această chemokină de tip CC radiomarcată de la nivelul US28. În același timp, compusul-părinte **125** nu a putut concura cu nici una din chemokinele testate pentru legarea la nivelul receptorului, ceea ce sugerează o acțiune pur alosterică a acestui compus.

Astfel, s-a descoperit că o serie de compuși înrudiți structural cu **125** pot concura cu chemokinele de tip CC (CCL2 și CCL4), dar nu și cu CX₃CL1 pentru legarea la nivelul US28 în vederea generării de diverse răspunsuri farmacologice. Până în prezent, aceasta este prima dată când sunt descrise molecule de mici dimensiuni capabile să concureze cu chemokine de tip CC (cu excepția CCL5) pentru legarea la nivelul receptorului chemokinic viral US28, și este prima dată când se descrie dezlocuirea preferențială a chemokinelor de

către liganzi de mici dimensiuni (spre exemplu, **134**, capabil de a dezlocui CCL2, dar nu CCL4).

Nu s-a putut identifica nici o legătură între abilitatea de dezlocuire a chemokinelor de la nivelul receptorului și activitatea intrinsecă a bibliotecii de nouă generație, însă s-a stabilit că proprietățile competitive relativ cu [¹²⁵I]-CCL2 sunt strâns legate de activitatea compușilor la nivelul unui receptor trunchiat ce nu poate fi internalizat în manieră β-arrestin-dependentă, US28Δ300. Astfel, s-a demonstrat că activitatea observată la nivelul acestui receptor este camuflată la fenotipul sălbatic datorită internalizării constitutive a receptorului, iar utilizarea US28Δ300 în evaluarea bibliotecilor de compuși ar putea conduce la identificarea de liganzi cu acțiune la nivelul US28 trecuți cu vederea în evaluările la nivelul fenotipului sălbatic. Astfel, US28Δ300 poate fi considerat o unealtă farmacologică esențială în dezvoltarea de noi terapii potențiale anti-HCMV ce țintesc US28.

Structurile nou-identificate în cadrul tezei, precum și caracterizarea farmacologică a acestora reprezintă puncte de plecare importante în dezvoltarea de noi terapii anti-HCMV ce țintesc receptorul chemokinic viral US28 și contribuie la diversificarea structurală a compușilor cu acțiune asupra US28.

Cercetările ulterioare se vor axa pe îmbunătățirea proprietăților farmacologice ale moleculelor de mici dimensiuni cu acțiune la nivelul US28 nou-identificate, cu scopul final de a genera noi terapii efective anti-HCMV. În același timp, uneltele computaționale descrise în cadrul tezei vor fi transferate asupra altor sisteme de receptori cuplați cu proteine G cu scopul de accelera descoperirea de noi entități moleculare ce acționează la nivelul acestora, mai ales în cazul receptorilor care sunt dificil de studiat tocmai din cauza lipsei moleculelor de mici dimensiuni specifice.

Diseminarea rezultatelor

O parte din rezultatele experimentale descrise în cadrul tezei fac subiectul a două lucrări științifice publicate în reviste cu factor de impact, unui capitol de carte, precum și a unui articol în curs de publicare. De asemenea, o parte din rezultate au fost prezentate la conferințe naționale și internaționale sub formă de postere sau comunicări orale.

Publicații:

1. Karlshøj S, **Amarandi R-M**, Larsen O, Daugvilaite V, Steen A, Brvar M, Pui A, Frimurer TM, Ulven T, Rosenkilde MM (2016) Molecular Mechanism of Action for Allosteric Modulators and Agonists in CC-chemokine Receptor 5 (CCR5), *Journal of Biological Chemistry* **291**(52):26860-26874 (DOI: 10.1074/jbc.M116.740183), **IF = 4.258** [48].
2. Luckmann M[†], **Amarandi R-M**[†], Papargyri N, Jakobsen MH, Christiansen E, Jensen LJ, Pui A, Schwartz TW, Rosenkilde MM, Frimurer TM (2017) Structure-based Discovery of Novel US28 Small Molecule Ligands with Different Modes of Action, *Chemical Biology & Drug Design* **89**(3):289-296 (DOI: 10.1111/cbdd.12848), **IF = 2.802** [49].
3. **Amarandi R-M**[†], Luckmann M[†], Melynys M, Frimurer TM, Jakobsen MH, Frimurer TM, Rosenkilde MM – Probe dependence in allostery: the case of small molecule ligands acting on HCMV-encoded chemokine receptor US28 (în curs de publicare)
4. **Amarandi R-M**, Hjortø GM, Rosenkilde MM, Karlshøj S (2016) Probing Biased Signaling at Chemokine Receptors, in Handel TM (Ed.), *Methods in Enzymology Vol. 570 – Chemokines*, Academic Press, Cambridge MA, pp.155-186, indexat în Thomson Reuters Web of Knowledge (DOI: 10.1016/bs.mie.2015.09.001) [50].

Factor de impact cumulat: **4.258 + 2.802 = 7.06**

Conferințe:

1. **Amarandi R-M**, Karlshøj S, Rosenkilde MM, Pui A, “Structural insights into the zinc-mediated activity of polypyridine chelators at the chemokine receptor CCR5”, XVIIIth International Conference ‘Physical Methods in Coordination and Supramolecular Chemistry’, Chișinău (Moldova), 8-9th of October 2015 – poster

[†]Co-prim autori

2. **Amarandi R-M**, Karlshøj S, Rosenkilde MM, Pui A “Molecular determinants of polypyridine chelator activity at the chemokine receptor CCR5 in the presence of Zn(II) salts”, “Alexandru Ioan Cuza” University days, Faculty of Chemistry Conference, Iași (România), 29th-31st of October 2015 – prezentare orală

Perioade de pregătire practică (mobilități):

1. **03/2016 – 05/2016** – Student-doctorant extern, Institutul de Neuroștiință și Farmacologie, Universitatea din Copenhaga, Danemarca
2. **05/2015 – 09/2015** – Mobilitate LLP-Erasmus de Practică, Institutul de Neuroștiință și Farmacologie, Universitatea din Copenhaga, Danemarca
3. **05/2014 – 08/2014** – Mobilitate LLP-Erasmus de Practică, Institutul de Neuroștiință și Farmacologie, Universitatea din Copenhaga, Danemarca

Bibliografie selectivă

- [1] Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor, *Science* **289**:739-45.
- [2] Drews J (2000) Drug discovery: a historical perspective, *Science* **287**:1960-4.
- [3] Liman ER (2006) Use it or lose it: molecular evolution of sensory signaling in primates, *Pflugers Arch* **453**:125-31.
- [4] Pan H-L, Wu Z-Z, Zhou H-Y, Chen S-R, Zhang H-M, Li D-P (2008) Modulation of Pain Transmission by G Protein-Coupled Receptors, *Pharmacology & Therapeutics* **117**:141-61.
- [5] Kobayashi NR, Hawes SM, Crook JM, Pebay A (2010) G-protein coupled receptors in stem cell self-renewal and differentiation, *Stem Cell Rev* **6**:351-66.
- [6] Betke KM, Wells CA, Hamm HE (2012) GPCR Mediated Regulation of Synaptic Transmission, *Progress in Neurobiology* **96**:304-21.
- [7] Filmore D (2004) It's a GPCR world, *Modern drug discovery* **7**:24-8.
- [8] Jacobson KA (2015) New paradigms in GPCR drug discovery, *Biochemical pharmacology* **98**:541-55.
- [9] Deupi X, Kobilka B (2007) Activation of G protein-coupled receptors, *Advances in protein chemistry* **74**:137-66.
- [10] Schwartz TW, Rosenkilde MM (1996) Is there a 'lock' for all agonist 'keys' in 7TM receptors?, *Trends Pharmacol Sci* **17**:213-6.
- [11] Zhang R, Xie X (2012) Tools for GPCR drug discovery, *Acta Pharmacologica Sinica* **33**:372-84.
- [12] Elling CE, Thirstrup K, Nielsen SM, Hjorth SA, Schwartz TW (1997) Metal-ion sites as structural and functional probes of helix-helix interactions in 7TM receptors, *Ann N Y Acad Sci* **814**:142-51.
- [13] Elling CE, Thirstrup K, Nielsen SM, Hjorth SA, Schwartz TW (1997) Engineering of metal-ion sites as distance constraints in structural and functional analysis of 7TM receptors, *Fold Des* **2**:S76-80.
- [14] Rosenkilde MM, Lucibello M, Holst B, Schwartz TW (1998) Natural agonist enhancing bis-His zinc-site in transmembrane segment V of the tachykinin NK3 receptor, *FEBS Lett* **439**:35-40.
- [15] Elling CE, Thirstrup K, Holst B, Schwartz TW (1999) Conversion of agonist site to metal-ion chelator site in the beta(2)-adrenergic receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:12322-7.
- [16] Rosenkilde MM, David R, Oerlecke I, Benned-Jensen T, Geumann U, Beck-Sickinger AG, Schwartz TW (2006) Conformational constraining of inactive and active States of a seven transmembrane receptor by metal ion site engineering in the extracellular end of transmembrane segment V, *Mol Pharmacol* **70**:1892-901.
- [17] Rosenkilde MM, Andersen MB, Nygaard R, Frimurer TM, Schwartz TW (2007) Activation of the CXCR3 chemokine receptor through anchoring of a small molecule chelator ligand between TM-III, -IV, and -VI, *Mol Pharmacol* **71**:930-41.
- [18] Sheikh SP, Zvyaga TA, Lichtarge O, Sakmar TP, Bourne HR (1996) Rhodopsin activation blocked by metal-ion-binding sites linking transmembrane helices C and F, *Nature* **383**:347-50.

- [19] Sheikh SP, Vilardarga JP, Baranski TJ, Lichtarge O, Iiri T, Meng EC, Nissenson RA, Bourne HR (1999) Similar structures and shared switch mechanisms of the beta2-adrenoceptor and the parathyroid hormone receptor. Zn(II) bridges between helices III and VI block activation, *J Biol Chem* **274**:17033-41.
- [20] Jensen PC, Thiele S, Ulven T, Schwartz TW, Rosenkilde MM (2008) Positive versus negative modulation of different endogenous chemokines for CC-chemokine receptor 1 by small molecule agonists through allosteric versus orthosteric binding, *J Biol Chem* **283**:23121-8.
- [21] Thiele S, Steen A, Jensen PC, Mokrosinski J, Frimurer TM, Rosenkilde MM (2011) Allosteric and orthosteric sites in CC chemokine receptor (CCR5), a chimeric receptor approach, *J Biol Chem* **286**:37543-54.
- [22] Thiele S, Malmgaard-Clausen M, Engel-Andreasen J, Steen A, Rummel PC, Nielsen MC, Gloriam DE, Frimurer TM, Ulven T, Rosenkilde MM (2012) Modulation in selectivity and allosteric properties of small-molecule ligands for CC-chemokine receptors., *J Med Chem* **55**:8164-77.
- [23] Yoshie O (2013) Chemokine receptors as therapeutic targets, *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* **36**:189-96.
- [24] Boppana SB, Ross SA, Fowler KB (2013) Congenital Cytomegalovirus Infection: Clinical Outcome, *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* **57**:S178-S81.
- [25] Centers for Disease and Control Prevention (2016) Babies Born with CMV (Congenital CMV Infection), accessed 6 March 2017, retrieved from: <https://www.cdc.gov/cmvcongenital-infection.html>
- [26] Pease JE, Horuk R (2015) Chemokine Receptors in Allergy, Inflammation, and Infectious Disease, in: Tschammer N (Ed.) *Chemokines: Chemokines and Their Receptors in Drug Discovery*, Springer International Publishing, Cham, pp. 1-39.
- [27] Chalikiopoulos A, Thiele S, Malmgaard-Clausen M, Rydberg P, Isberg V, Ulven T, Frimurer TM, Rosenkilde MM, Gloriam DE (2013) Structure-activity relationships and identification of optimized CC-chemokine receptor CCR1, 5, and 8 metal-ion chelators, *J Chem Inf Model* **53**:2863-73.
- [28] Rosenkilde MM, Kledal TN, Brauner-Osborne H, Schwartz TW (1999) Agonists and inverse agonists for the herpesvirus 8-encoded constitutively active seven-transmembrane oncogene product, ORF-74, *J Biol Chem* **274**:956-61.
- [29] Schwartz TW, Frimurer TM, Holst B, Rosenkilde MM, Elling CE (2006) Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**:481-519.
- [30] Khan A, Nicholson G, Greenman J, Madden L, McRobbie G, Pannecouque C, De Clercq E, Ullom R, Maples DL, Maples RL, Silversides JD, Hubin TJ, Archibald SJ (2009) Binding optimization through coordination chemistry: CXCR4 chemokine receptor antagonists from ultra rigid metal complexes, *J Am Chem Soc* **131**:3416-7.
- [31] De Clercq E (2009) The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil), *Biochem Pharmacol* **77**:1655-64.
- [32] Gerlach LO, Skerlj RT, Bridger GJ, Schwartz TW (2001) Molecular interactions of cyclam and bicyclam non-peptide antagonists with the CXCR4 chemokine receptor, *J Biol Chem* **276**:14153-60.

- [33] Kufareva I, Abagyan R, Handel TM (2015) Role of 3D Structures in Understanding, Predicting, and Designing Molecular Interactions in the Chemokine Receptor Family, in: Tschammer N (Ed.) *Chemokines: Chemokines and Their Receptors in Drug Discovery*, Springer International Publishing, Cham, pp. 41-85.
- [34] Vomaska J, Nelson JA, Streblow DN (2009) Human Cytomegalovirus US28: a functionally selective chemokine binding receptor, *Infect Disord Drug Targets* **9**:548-56.
- [35] Wills MR, Poole E, Lau B, Krishna B, Sinclair JH (2015) The immunology of human cytomegalovirus latency: could latent infection be cleared by novel immunotherapeutic strategies?, *Cell Mol Immunol* **12**:128-38.
- [36] Casarosa P, Bakker RA, Verzijl D, Navis M, Timmerman H, Leurs R, Smit MJ (2001) Constitutive signaling of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28., *The journal of biological chemistry* **276**:1133-7.
- [37] Vischer HF, Hulshof JW, de Esch IJ, Smit MJ, Leurs R (2006) Virus-encoded G-protein-coupled receptors: constitutively active (dys)regulators of cell function and their potential as drug target, *Ernst Schering Found Symp Proc* 187-209.
- [38] Miller WE, Zagorski WA, Brenneman JD, Avery D, Miller JL, O'Connor CM (2012) US28 is a potent activator of phospholipase C during HCMV infection of clinically relevant target cells, *PLoS One* **7**:e50524.
- [39] Langemeijer EV, Slinger E, de Munnik S, Schreiber A, Maussang D, Vischer H, Verkaar F, Leurs R, Siderius M, Smit MJ (2012) Constitutive beta-catenin signaling by the viral chemokine receptor US28, *PLoS One* **7**:e48935.
- [40] Kledal TN, Rosenkilde MM, Schwartz TW (1998) Selective recognition of the membrane-bound CX3C chemokine, fractalkine, by the human cytomegalovirus-encoded broad-spectrum receptor US28, *FEBS Lett* **441**:209-14.
- [41] Spiess K, Jeppesen MG, Malmgaard-Clausen M, Krzywkowski K, Dulal K, Cheng T, Hjorto GM, Larsen O, Burg JS, Jarvis MA, Garcia KC, Zhu H, Kledal TN, Rosenkilde MM (2015) Rationally designed chemokine-based toxin targeting the viral G protein-coupled receptor US28 potently inhibits cytomegalovirus infection in vivo, *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**:8427-32.
- [42] Krishna BA, Spiess K, Poole EL, Lau B, Voigt S, Kledal TN, Rosenkilde MM, Sinclair JH (2017) Targeting the latent cytomegalovirus reservoir with an antiviral fusion toxin protein, *Nat Commun* **8**:14321.
- [43] Casarosa P, Menge WM, Minisini R, Otto C, van Heteren J, Jongejan A, Timmerman H, Moepps B, Kirchhoff F, Mertens T, Smit MJ, Leurs R (2003) Identification of the first nonpeptidergic inverse agonist for a constitutively active viral-encoded G protein-coupled receptor, *J Biol Chem* **278**:5172-8.
- [44] Hesselgesser J, Ng HP, Liang M, Zheng W, May K, Bauman JG, Monahan S, Islam I, Wei GP, Ghannam A, Taub DD, Rosser M, Snider RM, Morrissey MM, Perez HD, Horuk R (1998) Identification and characterization of small molecule functional antagonists of the CCR1 chemokine receptor, *J Biol Chem* **273**:15687-92.
- [45] Lee S, Chung YH, Lee C (2017) US28, a Virally-Encoded GPCR as an Antiviral Target for Human Cytomegalovirus Infection, *Biomolecules & Therapeutics* **25**:69-79.
- [46] Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, Bolstad ES, Coleman RG (2012) ZINC: a free tool to discover chemistry for biology, *J Chem Inf Model* **52**:1757-68.

- [47] Tschammer N (2014) Allosteric modulation of the G protein-coupled US28 receptor of human cytomegalovirus: are the small-weight inverse agonist of US28 'camouflaged' agonists?, *Bioorg Med Chem Lett* **24**:3744-7.
- [48] Karlshoj S, Amarandi RM, Larsen O, Daugvilaite V, Steen A, Brvar M, Pui A, Frimurer TM, Ulven T, Rosenkilde MM (2016) Molecular Mechanism of Action for Allosteric Modulators and Agonists in CC-chemokine Receptor 5 (CCR5), *J Biol Chem* **291**:26860-74.
- [49] Lückmann M, Amarandi R-M, Papargyri N, Jakobsen MH, Christiansen E, Jensen LJ, Pui A, Schwartz TW, Rosenkilde MM, Frimurer TM (2017) Structure-based discovery of novel US28 small molecule ligands with different modes of action, *Chemical Biology & Drug Design* **89**:289-96.
- [50] Amarandi R-M, Hjortø GM, Rosenkilde MM, Karlshøj S (2016) Probing Biased Signaling in Chemokine Receptors, in: Handel TM (Ed.) *Methods in enzymology*, **570**, Academic Press, Cambridge, MA, pp. 155-86.