

Xingyu CHEN

Thesis Supervisor: Anna WEINZINGER, University of Vienna,
Dept. of Pharmacology and Toxicology

Associated MolTag student, 2nd Funding Period

Defense: November 8th, 2019

In silico investigations of KATP channels

Abstract

Adenosine-triphosphate-sensitive potassium (KATP) channels are hetero-octameric complexes, which consist of four pore-forming inwardly rectifying potassium (Kir) channel subunits associated with four regulatory sulfonylurea receptor (SUR) subunits. Channels are encoded by the genes KCNJ8 (Kir6.1), KCNJ11 (Kir6.2), ABCC8 (SUR1), and ABCC9 (SUR2). Functional mutations in these genes lead to channel malfunction, hence causing various diseases. One such rare disease is Cantú syndrome (CS), which is caused by gain-of-function mutations in the KCNJ8 and ABCC9 genes. Patients have complex multi-organ abnormalities including hypertrichosis, distinctive facial features, osteodysplasia, cardiomegaly, and lymphedema. There is currently no specific treatment for CS. To date, 40 Cantú disease-causing mutations have been identified from 75 cases reported, however, only few mutations have been investigated at the molecular level. Experimental analysis of so far tested mutants reveals that channel overactivity results from distinct mechanisms for different mutants either by decreasing adenosine triphosphate (ATP) inhibition, increasing magnesium adenosine diphosphate (MgADP) activation, or increasing the intrinsic channel opening probability.

In this thesis, we first investigated the structural basis of the Cantú mutation mechanism at the pore module. Since 2017, several cryo-EM KATP structures formed by Kir6.2 and SUR1 in different conformations have been published, we developed Kir6.1 homology models, based on the closely related Kir6.2 channel structures. These models revealed that the only Cantú disease mutations found so far in the pore module, V65M and C176S, closely interact in the three-dimensional (3D) models, despite being located in different helical segments. Subsequently performed molecular dynamics (MD) simulations on the wild type (WT) channels and disease-causing mutants revealed comparable stability on the nanosecond timescale. In collaboration with the Nichols lab (Washington University), we showed that the V65M mutation results in the increase of channel activity by reducing ATP sensitivity. Furthermore, the potent sulfonylurea drug glibenclamide (GBC), approved for treatment of Kir6.2/SUR1-related diabetes, was tested against the V65M mutant. Unfortunately, the experimental results show that the Cantú mutation, V65M at Kir6.1, decreases the inhibition of GBC. In the second project, we investigated five Cantú mutations (H60Y, D207E, S1020P, S1054Y, and R1154Q in SUR2) located at the equivalent positions of the homologous SUR1 by comparing the dimerized and non-dimerized nucleotide binding domain (NBD) structures. In collaboration with the van der Heyden lab (University Medical Center Utrecht), the electrophysiology results reveal that four mutations decrease the sensitivity of magnesium adenosine triphosphate (MgATP) inhibition, whereas in H60Y the activity remains similar as in the WT channel. Further experimental tests with sulfonylureas GBC and tool compound HMR1098 show that both compounds could completely normalize the channel current for all tested mutants, but at doses beyond the safe clinical range. In addition, HMR1098 shows less efficiency for S1020P and S1054Y mutants, while GBC shows less efficiency for all tested mutants, except H60Y. Taken together, the sulfonylurea drug inhibition potency is Cantú mutation selective. A clinical study shows the first success of GBC treatment on a newborn baby with CS (harboring the R1116H mutation at ABCC9). One year of treatment resulted in

reversed cardiomegaly and facial edema, and the patient experienced only short, self-limiting episodes of hypoglycemic side effects. This study shows that the off-label use of approved drugs such as sulfonylureas is indeed a promising option for Cantú treatment, however long-term clinical studies need to be conducted.

The third part of this thesis concerned the search for novel KATP channel inhibitors among approved drugs. An anti-diabetes drug, rosiglitazone (RSG), which was reported to inhibit Kir6 channels with μM affinity, served as a starting point. The main target of RSG is however not the KATP channel, but the peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) receptor. The inhibition of Kir6.1 is thought to be at least in part responsible for the severe cardiac side-effects of this drug, which led to the withdrawal of this drug in Europe. First, unbiased MD simulations were used to identify putative high-affinity binding sites of RSG in Kir6.1 channels. Secondly, we constructed dynamic pharmacophore-based models at the predicted binding site for virtual screening against approved drugs in DrugBank. From the top-ranked hitlist, three compounds (betaxolol (BXL), ritodrine, and travoprost) were selected for patch-clamp testing in collaboration with the van der Heyden lab. The experimental results show that all three drugs inhibit KATP channels as well as the Cantú-related mutants (C166S in Kir6.2 and S1020P in SUR2A) with μM affinity. Additionally, the voltage-dependent inhibition effect of BXL and ritodrine suggests that their main binding sites might be located in the channel pore.

This experimental data leads to the last research question in this thesis: whether BXL is a Kir6 channel pore blocker, and if the inhibition is Kir6-specific. Thus, we performed coarse-grained (CG) and subsequent all-atomistic MD simulations with BXL in the Kir6.2 channel structure. The preliminary results reveal that BXL indeed binds to the channel pore, and enable mutation suggestions for experimental tests, which are currently in progress.

In summary, the structure-based investigations in this thesis gain more insight about the Cantú mutation mechanism. Our computational drug-repurposing strategy provides novel possibilities for development of Cantú treatment options and can be applied to explore novel therapies for other rare diseases.

Zusammenfassung

ATP-sensitive Kalium (KATP) -Kanäle gehören zur Gruppe der Einwärtsgerichteten Kaliumkanäle Subtyp 6.2 (Kir6.2) und bestehen aus vier Untereinheiten, die je mit einer regulatorischen Sulfonylharnstoff-Rezeptor-Untereinheiten (SUR) assoziiert sind. Punktmutationen in jenen Genen können zu Kanal-Fehlfunktionen führen, die verschiedene Krankheiten, wie beispielsweise das Cantú-Syndrom, auslösen können. Klinische Merkmale dieser Erkrankung sind unter anderem Hypertrichose (übermäßiger Haarwuchs), Lymphödeme, Osteochondrodysplasie (Störung des Knochengewebes) und Kardiomegalie (Vergrößerung des Herzmuskels). Derzeit gibt es keine spezifische Behandlung des Cantú-Syndroms. Bisher wurden 75 verschiedene krankheitsauslösende Mutationen identifiziert, wobei auf molekularer Ebene bisher nur wenige Mutationen untersucht wurden. Experimentelle Analysen der bisher getesteten Mutanten zeigen, dass eine Überaktivität des Kanals durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst werden kann. Unter anderem durch Reduzierung der ATP-Inhibierung oder durch Beeinflussung der MgADP Sensitivität des Kanals.

In dieser Arbeit untersuchten wir zunächst die strukturellen Grundlagen einer ausgewählten CS-auslösenden Punktmutationen mit Hilfe eines Kir6.1 Homologie Modells. Dieses konnte zeigen, dass die Cantú-Mutationen V65M und C176S in den 3D-Modellen eng miteinander interagieren, obwohl sie sich in verschiedenen helikalen Strukturen befinden. Moleküldynamik-Simulationen am Wildtyp (WT) und an zwei Punktmutationen zeigten eine vergleichbare Stabilität im Nanosekundenbereich. In Zusammenarbeit mit dem Nichols-Labor (Washington University) haben wir gezeigt, dass die V65M-Mutation zu einer erhöhten Kanal-Aktivität führt, indem die ATP-Empfindlichkeit verringert wird. Darüber hinaus ist die Wirksamkeit von Glibenclamid (GBC) (einem zugelassenen Arzneistoff zur Diabetestherapie) verringert.

Im zweiten Projekt untersuchten wir fünf Cantú-Mutationen (H60Y, D207E, S1020P, S1054Y und R1154Q) in den SUR Untereinheiten. In Zusammenarbeit mit dem van der Heyden-Labor (Universitätsklinikum Utrecht) wurden elektrophysiologische Studien durchgeführt, die zeigten, dass GBC die Kanalströme in den getesteten Mutanten normalisieren kann. Jedoch ist dafür eine Arzneistoffkonzentration nötig, die außerhalb des sicheren klinischen Bereichs liegt.

Der dritte Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Suche nach neuen KATP-Kanal-Inhibitoren. Ein weiteres Anti-Diabetes-Medikament, Rosiglitazon (RSG), von dem berichtet wurde, dass es Kir6-Kanäle mit μM -Affinität hemmt, diente als Ausgangspunkt der Suche. RSG wurde aufgrund möglicher kardiovaskulärer Risiken vom Markt genommen. Zunächst wurde mit Hilfe von MD-Simulationen die mutmaßlichen Bindungsstellen von RSG in Kir6.1-Kanälen gesucht. Zweitens haben wir an der vorhergesagten Bindungsstelle dynamische Pharmakophor-basierte Modelle erstellt. Dieses wurde dann für ein sogenanntes *virtuelles Screening* in DrugBank verwendet. Aus der „hitlist“ wurden drei Verbindungen (Betaxolol, Ritodrin und Travoprost) für Patch-Clamp-Tests ausgewählt und in Zusammenarbeit mit dem van der Heyden-Labor getestet. Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass alle drei Wirkstoffe KATP-Kanäle, sowie die Cantú-auslösenden Mutationen (C166S in Kir6.2 und S1020P in SUR2A) mit μM -Affinität hemmen. Darüber hinaus zeigte sich eine Spannungsabhängigkeit bei der Inhibierung des KATP Kanals bei Betaxolol und Ritodrine, was darauf schließen lässt, dass sich die Bindungsstellen dieser beiden Medikamente in der Kanalpore befinden könnten.

Diese experimentellen Daten führten zur letzten Forschungsfrage dieser Arbeit: Inhibiert Betaxolol die Kir6-Kanal-Pore und ist diese Inhibierung Kir6-spezifisch? Um diese Fragen zu beantworten führten wir unterschiedliche MD-Simulationen und Docking-Studien mit Betaxolol durch. Vorläufige Ergebnisse legen nahe, dass Betaxolol tatsächlich an der Kanalpore bindet. Diese Vorhersage wird derzeit im van der Heyden-Labor experimentell getestet.

Zusammenfassend ermöglichen die strukturbasierten Analysen dieser Arbeit neue Erkenntnisse zur seltenen Erkrankung Cantú-Syndrom. Unsere computergestützte Strategie zur Indikationserweiterung von Medikamenten (drug-repurposing) bietet neue Möglichkeiten für die Entwicklung einer spezifischen Cantú-Therapie und weiterer seltener Ionenkanalerkrankungen.