



## Doctoral Thesis

# **De novo design, molecular dynamics simulations and ab initio calculations as tools to investigate biological systems a critical application of the molecular modeling approach in ligand design**

**Author(s):**

Kuonen, Oliver Dominik

**Publication Date:**

1997

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-001897061> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

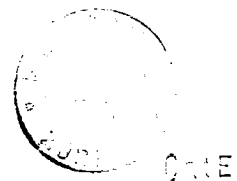
Diss ETH Nr. 12370

*DE NOVO* DESIGN, MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS AND  
*AB INITIO* CALCULATIONS AS TOOLS TO INVESTIGATE BIOLOGICAL  
SYSTEMS

*A critical application of the Molecular Modeling approach in ligand design*

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
for the degree of  
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by  
OLIVER DOMINIK KUONEN  
pharmacist, eidg. dipl. Apotheker  
born March 28th, 1967  
citizen of Termen, Ried-Brig, Brig-Glis VS



Accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. G. Folkers, examiner  
Prof. Dr. G. Klebe, co-examiner  
PD Dr. D. Rognan, co-examiner

Zurich, 1997

## I Summary

Advances in molecular biology, x-ray crystallography and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy are leading to a rapid increase in the numbers of high-resolution three-dimensional (3D) structures of proteins. Computational methods are emerging that can use these 3D structures to design, *de novo*, molecular structures to fill their binding site. The goal of structure-based and computer-aided molecular design is to rationalize observations of the patterns of structure-activity relationships and of ligand-receptor interactions. Finally, this approach should lead to the development of new lead structures. Successful examples of structure-based ligand design illustrate the advances of these techniques.

*Ab initio* calculations, which explicitly consider electrons in orbitals with minimal approximations, were used to study the interactions of viral herpes simplex type 1 thymidine kinase (HSV 1 TK) with its substrate thymidine. Density functional theory calculations with gradient-corrected exchange-correlation functionals were carried out for various models of the nucleoside binding site-substrate adducts. The calculations indicate, that Coulombic interactions play an important role in the substrate binding and that the role of Met128, an important residue in the active site cavity of the enzyme, is purely steric and hydrophobic.

The crystal structure of HSV 1 TK is described from a structural and kinetical point of view. Several active HSV 1 TK mutants were investigated. The involved amino acids T63, Q125, A168, R176 and C336 may refer drug resistance when mutated. T63 is involved in the binding of magnesium. Q125 has an electrostatic effect on substrate binding, whereas R176 is responsible for the electrostatic balance within the whole active site. A168 is a space holder and excludes, if mutated, binding of bigger substrate analogs. Mutated C336 disrupts the three-dimensional structure of the whole

active site by shifting the LID-domain. The elucidation of the sterical and electrostatic differences between different mutants and the wild type allows a deeper insight into the functionality of enzymes and other structure-related proteins.

The optimal position of magnesium in HSV 1 TK was calculated with the program GRID to understand its role in the phosphate transfer reaction. The result was compared with other enzymes containing magnesium. The calculations resulted in an octahedral coordination of magnesium with the  $\beta$ - and  $\gamma$ -phosphate of ATP, threonine 63, glutamine 83 and aspartate 162, mediated via two water molecules. Magnesium neutralises electrostatic repulsion between negatively-charged phosphate oxygen atoms, stabilizing an extended form of the triphosphate chain which eclipses the oxygens on P $\beta$  and P $\gamma$ . The eclipsed conformation forces the  $\gamma$ -phosphate in-line with its nucleophilic substrate, which would facilitate an S $_N$ 2-type displacement of the  $\gamma$ -phosphate to the 5'-OH of thymidine.

Results from transfer-Nuclear Overhauser Effects (tNOE)-measurements were used to elaborate a docking protocol. The experimentally determined bound and free conformations of a tricyclic substrate of HSV 1 TK were docked into the active site. The protocol was able to elucidate the binding modes of the different conformations.

In a second research project, *de novo* design programs were used to find nonpeptidic ligands of a class I major histocompatibility complex (MHC)-encoded protein (HLA-B\*2705). Starting from the x-ray structure of the MHC-protein, nonapeptides naturally bound to MHC-protein and presented to cytotoxic T-lymphocytes were replaced by synthetic analogs. The novel ligands were simulated in the binding groove of HLA-B\*2705. After 200-ps molecular dynamics simulations of the solvated HLA-peptide pairs, the calculated molecular properties allow a clear discrimination of potent from weak MHC binders.

## Zusammenfassung

Fortschritte in der Molekularbiologie, der Röntgenkristallographie und der NMR-Spektroskopie führen zu einer steigenden Anzahl gelöster 3D-Strukturen von Proteinen. Computer-gestützte Anwendungen können diese Informationen verwenden, um in die Bindungszentren dieser Proteine mögliche Liganden einzupassen. Ziel dabei ist es, Beobachtungen von Ligand-Rezeptor Interaktionen dergestalt zu nutzen, dass die Entwicklung neuer Wirkstoffgruppen rationalisiert werden kann. Schlussendlich sollte es möglich sein, neue Leitstrukturen zu entwickeln, die dann in einem nächsten Schritt zu klinisch wertvollen Arzneistoffen weiterentwickelt werden können. Der in den letzten Jahren erzielte Fortschritt dokumentiert sich in den Beispielen erfolgreich durchgeführter Design-Studien.

*Ab initio* Verfahren wurden benutzt um die Wechselwirkungen zwischen HSV 1 TK und Thymidin zu berechnen. Die Dichtefunktionaltheorie mit gradientenkorrigiertem Austausch-Korrelationsfunktional wurde angewendet, um die Bindung von Thymidin im aktiven Zentrum der Herpes Simplex Viralen Typ I Thymidinkinase zu erklären, wobei verschiedene tautomere und protonierte Zustände berücksichtigt wurden. Die Berechnungen ergaben, dass bei der Bindung des Substrats Coulomb-Interaktionen eine wichtige Rolle spielen und M128, eine Aminosäure des aktiven Zentrums, mit sterischen und hydrophoben Effekten zur Bindung des Substrates beiträgt.

Die HSV 1 TK wurde anhand struktureller und kinetischer Daten untersucht. Verschiedene Mutanten des Enzyms wurden dabei mit dem Wildtyp verglichen. Die dabei betrachteten Aminosäuren T63, Q125, A168, R176 und C336 zeigen Resistenz, wenn sie mutiert werden. Wir haben festgestellt, dass T63 in die Bindung des Magnesiums involviert ist. Q125 trägt mit seinen elektrostatischen Eigenschaften zur Substratbindung bei, wie auch R176, welches dabei allerdings das ganze aktive Zentrum beeinflusst.

A168 dient als Platzhalter, welches bei einer Mutation die Anlagerung grösserer Substrate verhindert. Bei einer Mutation von C336 wird die LID-Domäne dergestalt verschoben, dass die gesamte 3D-Struktur des Proteins zerstört wird. Die Betrachtung des Enzyms in dieser Weise erlaubt einen tieferen Einblick in dessen Funktionsweise, und damit auch in diejenige strukturverwandter Proteine.

Um die Rolle des Magnesiums bei der Phosphat-Übertragung zu verstehen, wurde dessen genaue Position in der HSV 1 TK bestimmt, und anschliessend mit der Position von Magnesium in Kristallstrukturen bekannter Magnesium-bindender Proteine verglichen. Magnesium ist optimal positioniert, wenn es oktahedral koordiniert zwischen dem  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphat des ATPs liegt. Desweiteren sind die Aminosäuren T63, Q83 und D162, teils über Wassermoleküle, in die Bindung involviert. Magnesium neutralisiert im aktiven Zentrum die elektrostatische Abstossung zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen und stabilisiert die gestreckte Konformation der Phosphat-Kette, welche die Übertragung des  $\gamma$ -Phosphates auf die 5'-OH-Gruppe des Thymidins erleichtert.

Resultate aus tNOE-Messungen wurden verwendet, um eine Docking-Routine zu entwickeln. Dabei wurden kleine konformationelle Unterschiede zwischen gebundenem und freiem Liganden zur Bestimmung der verschiedenen Bindungsarten genutzt.

In einem zweites Forschungsprojekt wurden *de novo* design-Programme verwendet, um peptidische Nonamere, welche von MHC-Proteinen zytotoxischen T-Killerzellen präsentiert werden, durch synthetische Analoga zu ersetzen. Die generierten Liganden wurden in die Bindungstasche von HLA-B\*2705 eingepasst. Während 200 ps wurden die von einer Wasserschicht umgebenen Protein-Ligand-Komplexe einer Moleküldynamik-Simulation unterzogen. Dabei konnten klare Unterschiede zwischen stark und schwach bindenden Liganden aufgezeigt werden.