Maastricht University

AMPK-glycogen interplay: an opportunity for drug design

Citation for published version (APA):

Miglianico, M. (2015). *AMPK-glycogen interplay: an opportunity for drug design*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Maastricht University. https://doi.org/10.26481/dis.20151023mm

Document status and date:
Published: 01/01/2015

DOI:
10.26481/dis.20151023mm

Document Version:
Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

• A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
• The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
• The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

• Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
• You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
• You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the “Taverne” license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 20 Apr. 2024

Summary

At the whole body and cellular levels, the balance between energy expenditure and storage is of utmost importance to adapt to a changing environment. The AMP-activated protein kinase (AMPK) is a major regulator of energy balance, which, once activated, increases energy production and down-regulates its consumption. Because the effects of AMPK mimics those of exercise and calorie restriction, the pharmacological activation of AMPK has been proposed as a potential treatment of type 2 diabetes, a disease associated with poor lifestyle.

Beyond this well-established role in diabetes, AMPK has emerged over the years as an important player in a great number of disorders such as heart failure and atherosclerosis (**Chapter 2**). However, despite a continuous interest, efficient and safe targeting strategies of AMPK are still not available. A possible approach to overcome the current shortcomings is to use virtual screening based on the many known structures of AMPK protein and its ligands.

An interesting feature of AMPK regulation is the ability to bind to glycogen: although AMPK does not exert any catalytic activity towards saccharides, this binding, enabled by the presence of a carbohydrate-binding module (CBM) on the β-subunit of AMPK, influences kinase activity. In this thesis, the aim was to further clarify the interdependence between AMPK and glycogen, in particular in the context of nutrient metabolism.

Firstly, a regulation of AMPK binding to glycogen was identified in the autophosphorylation of AMPK at the β-Thr148 site (**Chapter 3**). Under basal condition, little Thr148 phosphorylation was found whereas cellular stresses such as glucose deprivation or mitochondrial inhibition increased both AMPK activity and autophosphorylation. The phosphorylation-mimicking mutation of Thr148 to Asp prevented the binding of AMPK trimer to glycogen in vitro and in cells, which indicates that Thr148 autophosphorylation prevents AMPK binding to glycogen. This regulation may play a role in glycogen metabolism as the Thr148 mutation prevented the inhibition of glycogen resynthesis induced by AMPK activators.

Secondly, this same autophosphorylation was implicated in AMPK binding with a protein partner, the protein phosphatase 1 targeting subunit, named R6, which also binds glycogen via a CBM (**Chapter 4**). R6 and AMPK were found to interact through the substrate binding motif of the former and the β-subunit of the latter. Under low glucose and more generally glycogen-degrading conditions, AMPK–R6 interaction was enhanced. The binding was even further increased by treatment with an AMPK activator which correlated with upregulated Thr148 autophosphorylation. Altogether, the data suggested that AMPK–R6 interaction is direct, not mediated by glycogen. This

interaction may be relevant in protein phosphatase 1-induced dephosphorylation of AMPK upon refeeding-like conditions.

Thirdly, considering the interplay between AMPK and glycogen, the design of small molecules able to disrupt this interaction could offer a novel strategy to target AMPK (**Chapter 5**). Our screening protocol, composed of a virtual screening and a two-step *in vitro* screen, led to the identification of a cluster of structurally-related compounds. The two most active compounds, designated 6469172 and 6456019, changed the AMPK-CBM localization in cells in a dose-dependent manner, directly bound to the isolated CBM, and disrupted the interaction between AMPK and another glycogen-bound protein, i.e. glycogen synthase. Additionally, the compound 6469172 enhanced AMPK activity in different cell lines and increased glucose and fatty acid uptake which is a well-established effect of AMPK activators.

In conclusion, this thesis offers major advances in understanding the interplay between AMPK and glycogen, and presents a new tool to further explore this peculiar interdependence.

Samenvatting

De balans tussen energieverbruik en energieopslag is van groot belang voor zowel het hele lichaam als voor individuele cellen en weefsels. Dit geldt met name wanneer er sprake is van aanpassing aan een veranderende omgeving. Het zogenaamde AMP-geactiveerde eiwitkinase (AMPK) is een belangrijke regulator van deze energiebalans. Activatie van AMPK zorgt voor een verhoging van de energieproductie en tegelijkertijd voor een beperking van het energieverbruik. De effecten die AMPK heeft lijken daarmee op die van inspanning en op die van een beperking van voedselinname. Er is voorgesteld om met behulp van farmacologische middelen AMPK te activeren als een mogelijke nieuwe behandeling van type 2 diabetes. Bij deze (meest voorkomende) vorm van diabetes is het hormoon insuline onvoldoende in staat om de opname van suikers door de weefsels – en daarmee een adequate energieproductie – te stimuleren. Deze rol zou nu overgenomen kunnen worden door activatie van AMPK.

Naast deze goed-omschreven rol in diabetes, is AMPK in de laatste jaren ook in de belangstelling gekomen als een belangrijk eiwit voor een aantal andere ziektes en aandoeningen, waaronder hartfalen en aderverkalking ofwel atherosclerose (**Hoofdstuk 2**). Ondanks deze groeiende belangstelling beschikken we nog niet over een efficiënte en veilige manier om farmacologische stoffen te ontwikkelen die AMPK kunnen activeren. Een recent beschikbaar gekomen mogelijke manier waarmee dit zou kunnen is door gebruik te maken van zogenaamde virtuele selectiemethoden. Daarbij wordt gebruik gemaakt van bekende driedimensionale (3D) eiwitstructuren van AMPK en van zijn bindingspartners of substraten.

Een interessante eigenschap van AMPK is het vermogen om aan glycogeen te binden. Glycogeen is de cellulaire opslagvorm van opgenomen suikers (glucose). Hoewel AMPK geen enzymatische activiteit bezit ten opzichte van glycogeen, beïnvloedt binding eraan wel de kinase activiteit van het AMPK. Deze binding wordt gemedieerd door een zogenaamde koolhydraat-bindende-module (CBM) binnen de β-subeenheid van AMPK. In dit proefschrift hebben wij ons gericht op een nadere beschrijving van het verband tussen AMPK en glycogeen, in het bijzonder in de context van het metabolisme van voedingsstoffen zoals suikers (glucose) en vetten (vetzuren).

Ten eerste beschrijven we de regulatie van AMPK binding aan glycogeen door autofosforylering van AMPK van het aminozuur threonine148 (**Hoofdstuk 3**). In rust wordt er nauwelijks fosforylering waargenomen van threonine148, terwijl tijdens stress – zoals bij afwezigheid van glucose of bij gebruik van remmers van de oxidatieve fosforylering – de activiteit van AMPK (en de autofosforylering) juist toenemen. Door threonine148 te veranderen in asparaginezuur148 wordt fosforylering geïmiteerd maar deze verandering verhindert de binding van AMPK aan glycogeen, zowel *in vitro*

als ook in cellen. Dit betekent dat autofosforylering van threonine148 de binding van AMPK aan glycogeen helpt te voorkomen. Deze vorm van regulatie speelt mogelijk een rol in het glycogeenmetabolisme omdat in aanwezigheid van AMPK activatoren de verandering van threonine148 de glycogeensynthese kan remmen.

Ten tweede is deze zelfde autofosforylering betrokken bij de binding van AMPK aan een ander molecuul: de zogenaamde eiwit fosfatase 1 targeting subeenheid, ook wel R6 genoemd. Ook R6 bevat een eerder genoemde CBM module (**Hoofdstuk 4**). R6 en AMPK bleken een interactie aan te gaan via het substraat-bindend domein van R6 en de β-subeenheid van AMPK. Wanneer glucose schaars is of meer algemeen wanneer glycogeen wordt afgebroken, wordt de interactie tussen R6 en AMPK bevorderd. Deze binding werd zelfs verder bevorderd door toevoeging van een AMPK activator die leidt tot een toename in de autofosforylering van threonine148. Samengevat suggereren onze onderzoeksresultaten dat de interactie tussen AMPK en R6 direct is, zonder bijdrage van glycogeen. Deze interactie is mogelijk relevant bij eiwit fosfatase 1-geinduceerde defosforylering van AMPK.

Ten derde, zou de ontwikkeling van kleine moleculen die de interactie tussen AMPK en glycogeen remmen een mogelijkheid kunnen bieden om de activiteit van AMPK farmacologisch te beïnvloeden (**Hoofdstuk 5**). Het door ons gepresenteerde protocol voor selectie van kleine moleculen, gebaseerd op een virtuele selectie en daarna een twee-staps *in vitro* selectie, heeft geleid tot de ontdekking van een serie van soortgelijke kleine moleculen. De beste twee stoffen, aangeduid met 6469172 en 6456019, zijn in staat om, afhankelijk van de dosis, de lokalisatie van AMPK in levende cellen te beïnvloeden, om direct te binden aan de CBM subeenheid en om de interactie van AMPK met nog een ander glycogeen-gebonden eiwit, het glycogeen synthase, te verhinderen. Bovendien bevordert 6469172 de AMPK activiteit in verschillende cellijnen en verhoogt het de opname van glucose en vetzuren, een effect dat ook bekend is van reeds ontdekte AMPK-activatoren.

Samenvattend beschrijft dit proefschrift een aantal grote vorderingen in ons begrip van het samenspel tussen AMPK en glycogeen en daarnaast wordt een nieuwe aanpak gepresenteerd die gebruikt kan worden om dit samenspel verder te onderzoeken.

Résumé

Au niveau corporel comme au niveau cellulaire, la balance entre dépense et stockage d'énergie est de la plus haute importance pour pouvoir s'adapter aux conditions changeantes de l'environnement. La protéine kinase activée par l'AMP (AMP-activated protein kinase, AMPK) est l'un des régulateurs principaux de cette balance énergétique : une fois activée, AMPK favorise les mécanismes de production d'énergie tout en diminuant ceux liés à sa consommation. Parce que ces effets générés par AMPK sont similaires à ceux liés au sport et à la restriction calorique, l'activation par voie pharmacologique d'AMPK est considérée comme l'une des approches possibles pour traiter le diabète de type 2, c'est-à-dire la forme associée à une mauvaise hygiène de vie et au vieillissement.

Au-delà de ce rôle bien connu, AMPK est aussi l'un des acteurs centraux de beaucoup d'autres maladies, comme l'insuffisance cardiaque par exemple (**Chapitre 2**). Cependant, malgré l'intérêt certain qu'AMPK génère, aucun agent pharmacologique sûr et efficace pour cibler AMPK n'a été reporté jusqu'à présent. Pour remédier à ce manque, une approche possible serait l'utilisation de méthodes de screening virtuel qui s'appuieraient sur les nombreuses structures connues de la protéine AMPK aussi bien que de ses ligands.

La régulation d'AMPK est complexe mais l'un des éléments intéressants est sa capacité à se lier au glycogène, la principale forme de stockage glucidique des cellules : bien qu'AMPK n'ait pas d'activité catalytique sur les saccharides, cette interaction, permise par la présence d'un domaine d'attachement aux glucides (carbohydrate-binding module, CBM) dans la sous-unité β d'AMPK, influence l'activité de la kinase. L'objectif de cette thèse est de clarifier l'interdépendance entre AMPK et le glycogène, en particulier dans le contexte du métabolisme des nutriments.

Premièrement, le site d'autophosphorylation β-Thr148 est identifié comme jouant un rôle dans la régulation de l'interaction AMPK–glycogène (**Chapitre 3**). Dans des conditions basales, le niveau de phosphorylation de Thr-148 est peu élevé tandis que les situations de stress cellulaire, comme par exemple l'absence de glucose ou l'inhibition de la mitochondrie, augmentent à la fois l'activité d'AMPK et son autophosphorylation. La mutation de Thr-148 en Asp qui imite la phosphorylation de ce résidu empêche AMPK d'interagir avec le glycogène à la fois *in vitro* et en cellule, ce qui indique que l'autophosphorylation de Thr-148 empêche AMPK de se lier au glycogène. Ce mécanisme de régulation semble intervenir dans le métabolisme du glycogène puisque la mutation de Thr-148 prévient l'inhibition de la resynthèse de glycogène initiée par les activateurs d'AMPK.

Deuxièmement, le même site d'autophosphorylation est impliqué dans l'interaction

entre AMPK et une autre protéine, l'une des sous-unités régulatrices de la phosphoprotéine phosphatase 1 (PP1) appelée R6 (**Chapitre 4**). Comme AMPK, R6 contient un CBM et est capable de se lier au glycogène. Néanmoins, nos données suggèrent une interaction directe entre AMPK et R6 et non via l'intermédiaire du glycogène. R6 et AMPK interagissent via le motif d'interaction du premier et la sous-unité β du deuxième. Lorsque le niveau de glucose est bas et plus généralement lors de la dégradation du glycogène, l'interaction entre R6 et AMPK augmente. Leur attachement s'accentue encore d'avantage en cas de traitement avec un activateur d'AMPK en corrélation avec un plus haut niveau d'autophosphorylation de Thr-148. Cette interaction pourrait avoir des conséquences sur la déphosphorylation et l'inactivation d'AMPK permise par PP1 lors de la prise de repas.

Troisièmement, étant donnée l'interdépendance entre AMPK et le glycogène, le design d'une petite molécule chimique capable de perturber cette interaction pourrait se traduire en une stratégie intéressante pour cibler AMPK de manière pharmacologique (**Chapitre 5**). Notre protocole de screening composé d'une partie virtuelle suivie de deux étapes *in vitro*, a permis l'identification d'un groupe de molécules avec une structure similaire. Les deux molécules les plus actives, appelées 6469172 et 6456019, changent la localisation subcellulaire de AMPK-CBM de manière dose-dépendante, interagissent directement avec le CBM d'AMPK et perturbent l'interaction entre AMPK et une autre protéine liée au glycogène, la glycogène synthase. Qui plus est, la molécule 6469172 accroît l'activité d'AMPK dans différentes lignées cellulaires et provoque l'absorption de glucose et d'acide gras par les cellules, un effet bien connu des activateurs d'AMPK.

En conclusion, cette thèse offre des avancées majeures pour la compréhension de l'inter-régulation entre AMPK et le glycogène et présente un nouvel outil pour continuer à explorer cette relation particulière.