



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **A quest for connections : ligands for the HCA2, adenosine A3 and GPR88 receptors**

Blad, C.C.

### **Citation**

Blad, C. C. (2012, November 15). *A quest for connections : ligands for the HCA2, adenosine A3 and GPR88 receptors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/20128>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/20128>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/20128> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Blad, Clara Catelijne

**Title:** A quest for connections : ligands for the HCA2, adenosine A3 and GPR88 receptors

**Date:** 2012-11-15

## Samenvatting

In dit proefschrift worden verschillende orthostere en allosterie agonisten voor de recent ontdekte hydroxy-carbonzuur (HCA) receptor 2 gepresenteerd, en hun in vivo activiteit of in vitro structuur-activiteits relaties worden beschreven. De literatuur met betrekking tot de HCA receptoren wordt ook uitgebreid besproken, en geeft inzicht op de toekomst van deze receptorfamilie als aangrijpingspunten voor medicijnen. Het wordt aangetoond dat het anti-kanker medicijn N<sup>6</sup>-(2-isopentenyl)adenosine (IPA) een specifiek ligand is voor de adenosine A<sub>3</sub> receptor, en aannemelijk gemaakt dat het celgroei-remmende effect van deze stof, bij lage concentraties, afhankelijk is van deze receptor. Tevens is er een ligand-identificatiescreen voor de wees-receptor GPR88 uitgevoerd, waarin meer dan 4000 stoffen werden getest.

De meeste G eiwit-gekoppelde receptoren (GPCRs) kunnen alleen functioneren in samsenspel met hun (endogene) ligand(en). Als de ligandconcentraties verstoord zijn, of als de receptor, of de intracellulaire signaaltransductie, niet geactiveerd kunnen worden onder invloed van het ligand, dan kan de receptor niet functioneren, en vaak leidt dit tot ziekte. De identificatie van het endogene ligand is dus essentieel om de functie van een receptor te begrijpen. Tegelijkertijd kunnen synthetische liganden voor GPCRs zeer effectieve medicijnen zijn, omdat ze kunnen worden ingezet om pathofysiologische verstoringen te corrigeren. In dit proefschrift staan drie receptoren centraal, namelijk de hydroxy-carbonzuur receptor 2 (HCA<sub>2</sub>), de adenosine A<sub>3</sub> receptor, en GPR88, en in het bijzonder de zoektocht naar liganden die deze eiwitten kunnen beïnvloeden in het lichaam, op natuurlijke wijze of als medicijn.

**Hoofdstuk 1** is een inleidend hoofdstuk, waarin GPCRs worden geïntroduceerd, met speciale aandacht voor zogenaamde wees-GPCRs, en het onderzoek dat de identificatie van hun endogene liganden tot doel heeft. GPR88 is nog steeds een wees-receptor, en de natuurlijke liganden van de HCA receptoren zijn recent ontdekt.

**Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van de huidige kennis over de HCA receptoren HCA<sub>1</sub>, HCA<sub>2</sub> en HCA<sub>3</sub>, waarbij de nadruk ligt op HCA<sub>2</sub>, de receptor voor het atherosclerose-medicijn nicotinezuur. De natuurlijke liganden voor deze drie receptoren zijn in het laatste decennium geïdentificeerd, en dit zijn respectievelijk lactaat, 3-hydroxybutyraat en tussenproducten van  $\beta$ -oxidatie, zoals 3-hydroxyoctanoaat. De rol van de HCA receptoren in het lichaam is waarschijnlijk het reguleren van het vrijkomen van vetzuren uit het vetweefsel (lipolyse) wanneer er gebrek is aan voeding (HCA<sub>2</sub> en HCA<sub>3</sub>), of juist in tijden van overvloed (HCA<sub>1</sub>). Het belang van HCA<sub>2</sub> activatie voor de atherosclerose-remmende werking van nicotinezuur staat nog ter discussie. Ontstekingsremmende effecten van HCA<sub>2</sub> agonisten zijn gevonden in een aantal studies, en dit zou gebruikt kunnen worden in de strijd tegen andere ziektes als multiple sclerose.

**Hoofdstuk 3** beschrijft in vitro en in vivo onderzoek naar de farmacologische effecten van twee partiële agonisten voor HCA<sub>2</sub> in vergelijking met nicotinezuur. Deze partiële agonisten, LUF6281 en LUF6283, hebben structuren gebaseerd op de pyrazol-ring, en hun affiniteit voor HCA<sub>2</sub> was respectievelijk 3  $\mu$ M en 0.55  $\mu$ M. In [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S experimenten

was de rangorde van activiteit (potency) nicotinezuur > LUF6283 > LUF6281, en het maximale effect van de partiële agonisten was ~75% voor LUF6283 en ~50% voor LUF6281. De partiële agonisten waren, net als nicotinezuur, actiever in een ERK 1/2 fosforylatie experiment, maar de EC<sub>50</sub> ratio [<sup>35</sup>S]-GTPγS / pERK was 2-3x hoger voor nicotinezuur. In muizen verlaagden de pyrazolen het VLDL-gehalte in vergelijkbare mate als nicotinezuur, maar deze stoffen gaven geen 'flushing' (bloedvatverwijding in de huid), aangezien de huidtemperatuur niet toenam. Nicotinezuur verlaagde de expressie van de pro-lipolyse enzymen HSL en ATGL met de helft, terwijl LUF6281 en LUF6283 geen effect hadden op hun expressie. Aan de andere kant verhoogden de pyrazolen de expressie van ApoB in de lever met 40%. Dit suggereert dat LUF6281 en LUF6283, hoewel ze dezelfde receptor activeren als nicotinezuur, andere in vivo effecten hebben, waarbij de cholesterol-verlagende werking behouden blijft, terwijl het flush-effect niet werd waargenomen.

In **hoofdstuk 4** en **5** wordt de identificatie en in vitro karakterisatie van nieuwe HCA<sub>2</sub>-liganden beschreven. In **hoofdstuk 4** staan derivaten van trans-propeenzuur centraal. Deze stoffen zijn chemisch verwant aan het psoriasis medicijn monomethylfumaraat. Uit een serie kaneelzuurderivaten en fumaarzuuresters en -amides konden liganden worden geïdentificeerd met een affiniteit in het hoge nanomolaire tot hoge micromolaire bereik. De bindingsplek leek vrij beperkt, en trans-kaneelzuur was het langste vlakke ligand. Een moleculair computermodel op basis van de structuur-activiteits relatie van deze serie stoffen, suggereert een vlakke trans-propeenzuur farmacofoor van 8 Å lang, waarin grotere substituenten alleen buiten het vlak kunnen worden aangebracht.

In **hoofdstuk 5** zijn liganden voor de allosterische bindingsplek van HCA<sub>2</sub> onderzocht met behulp van functionele en radioligand-binding analyses. Verschillende stoffen bleken positieve allosterische modulators te zijn voor de activatie van HCA<sub>2</sub> door nicotinezuur, en bovendien waren de meeste modulators ook (allosterische) agonisten wanneer ze afzonderlijk getest werden. Verschillende parameters werden bepaald om de details van de ago-allosterische werking in kaart te brengen, en de multi-dimensionale structuur-activiteits relaties te kunnen beschrijven. Omdat allosterische modulatie afhankelijk is van het gebruikte orthostere ligand, hebben we van een aantal stoffen ook de versterkende werking op de HCA<sub>2</sub> activatie door het endogene ligand 3-hydroxybutyraat getest. Verschillende pyrazolopyrimidines bleken in staat om het maximale effect van 3-hydroxybutyraat te versterken, en de EC<sub>50</sub> tot tien maal te verlagen.

In **hoofdstuk 6** is beschreven hoe de natuurlijke nucleosiden N<sup>6</sup>-(2-isopentenyl)adenosine (IPA) en zeatine riboside geïdentificeerd worden als selectieve liganden voor de humane adenosine A<sub>3</sub> receptor (A<sub>3</sub>R), met affiniteiten van respectievelijk 159 en 649 nM. IPA bond ook met micromolaire affiniteit aan de rat A<sub>3</sub>R. In een cAMP accumulatie experiment in CHO cellen met stabiele expressie van de hA<sub>3</sub>R, hadden IPA en zeatine riboside een activiteit (EC<sub>50</sub>) in het micromolaire bereik. Het effect van IPA kon worden geblokkeerd door de selectieve A<sub>3</sub>R antagonist VUF5574. Het is bekend dat IPA effectief tumorgroei kan tegengaan, net als de referentie A<sub>3</sub>R agonist 2-chloro-N<sup>6</sup>-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methylcarboxamide (Cl-IB-MECA). De groeiremmende eigenschappen van IPA en Cl-IB-MECA op de kanker cellijnen LNCaP en N1S1 waren zeer vergelijkbaar, en bij lage concentraties kon de A<sub>3</sub>R antagonist MRS1523 dit effect blokkeren. Hogere concentraties

IPA leken de celgroei tegen te gaan via een mechanisme dat onafhankelijk was van de  $A_3R$ . Vergelijkbare observaties zijn in het verleden ook gedaan voor andere  $A_3R$  agonisten. Aangezien IPA in de natuur voorkomt, zou deze stof, in theorie, de  $A_3R$  in vivo kunnen activeren onder fysiologische condities. IPA kon echter niet worden gedetecteerd door middel van HPLC in vers dwarsgestreept spierweefsel van de rat.

**Hoofdstuk 7** behandelt een ligand-identificatiescreen met de wees-receptor GPR88, die mogelijk een rol speelt bij verschillende psychiatrische aandoeningen. Meer dan 4000 stoffen, waaronder kleine moleculen en peptiden, werden getest in een medium-throughput screen in 384-well platen, met verhoging van  $Ca^{2+}$  concentratie gemeten door middel van een Fluorescent Imaging Plate Reader (FLIPR). Naast de constructie van een ongemodificeerde HEK cellijn die GPR88 stabiel tot expressie bracht, werden de  $G\alpha_{16}$  en  $G\alpha_{q15}$  eiwitten ook samen met GPR88 getransfecteerd, omdat de natuurlijke G eiwitkoppeling van GPR88 onbekend is. In een primaire screen werden 47 hits gevonden, en in bevestigings-experimenten konden dosis-effect curves worden gemeten voor papaverine, een opium-alkaloïde. Het effect van papaverine leek echter onafhankelijk te zijn van GPR88, want vergelijkbare uitkomsten werden gemeten in niet-getransfecteerde cellen. Dit deel van het onderzoek werd in 2009 afgerond, en er is in de literatuur ook nu nog geen ligand voor GPR88 gepubliceerd.

In **hoofdstuk 8** wordt een algemene discussie van het hier beschreven onderzoek gepresenteerd, en ook worden de toekomstperspectieven besproken. Het belang van  $HCA_2$ , de adenosine  $A_3$  receptor en GPR88 als aangrijpingspunten voor medicijnen moet nog worden bevestigd. In het geval van  $HCA_2$  zou de identificatie van een antagonist, vooral één die aan mensen kan worden toegediend, de rol van de receptor in de werking van nicotinezuur kunnen verhelderen. Ontstekingsremmende effecten van  $HCA_2$  agonisten zouden nog verder kunnen worden onderzocht in het kader van de geneesmiddel-ontwikkeling, want dit zou therapieën kunnen opleveren voor ziektes als psoriasis en multiple sclerose.  $A_3$  ligand IPA zou een waardevol antikanker middel kunnen worden, als monotherapie of in combinatie met andere cytostatica, vooral aangezien het zou kunnen beschermen tegen de gangbare bijwerkingen op beenmerg cellen. GPR88 is nog steeds een wees-receptor, maar gevoelige technieken om de activatie van endogeen aanwezige receptoren te meten, bij voorbeeld door middel van impedantie-bepalingen, zouden waardevol kunnen zijn voor het vinden van liganden voor de resterende wees-receptoren.

