



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Allosteric modulation by sodium ions and amilorides of G protein-coupled receptors : a closer look at the sodium ion site of the adenosine A2a receptor and development of a mass spectrometry ligand binding assay for adenosine A1 and A2a receptors

Massink, A.

Citation

Massink, A. (2016, December 8). *Allosteric modulation by sodium ions and amilorides of G protein-coupled receptors : a closer look at the sodium ion site of the adenosine A2a receptor and development of a mass spectrometry ligand binding assay for adenosine A1 and A2a receptors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/44707>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/44707>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/44707> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Massink, A.

Title: Allosteric modulation by sodium ions and amilorides of G protein-coupled receptors : a closer look at the sodium ion site of the adenosine A2a receptor and development of a mass spectrometry ligand binding assay for adenosine A1 and A2a receptors

Issue Date: 2016-12-08

Samenvatting

Onderzoek naar allosterische modulatie leidt tot nieuwe inzichten in het activatiemechanisme van aan G eiwitten gekoppelde receptoren ('G protein-coupled receptors', of afgekort GPCRs). Natriumionen binden aan een allosterische bindingsplaats die goed geconserveerd is binnen de klasse A van GPCRs. Desondanks laat deze bindingsplaats een grote verscheidenheid aan allosterische effecten en grootte van liganden die kunnen binden zien, van natriumionen tot 5'-amino en 2-guanidino gesubstitueerde amilorides (**Hoofdstuk 2**). De adenosine A_{2A} receptor is de eerste GPCR waarvan een kristalstructuur opgehelderd werd met een voldoende hoge resolutie om een natriumion gebonden in de natriumion-bindingsplaats waar te kunnen nemen. In dit proefschrift wordt de adenosine A_{2A} receptor gebruikt als voorbeeldreceptor om de allosterische effecten van de natriumion-bindingsplaats te onderzoeken (**Hoofdstukken 3 – 5**), en samen met de adenosine A₁ receptor om een methode te ontwikkelen waarmee ligandbinding aan de receptor gemeten kan worden met behulp van massaspectrometrie (**Hoofdstuk 6**).

De natriumion-bindingsplaats en de orthostere bindingsplaats van de adenosine A_{2A} receptor kunnen tegelijkertijd bezet worden wanneer een antagonist in de orthostere plaats gebonden is, maar niet wanneer een agonist gebonden is (**Hoofdstuk 3**). Natriumionen lijken de inactieve toestand van de receptor te stabiliseren, waarmee de binding van antagonisten wordt bevorderd, terwijl de binding van agonisten grotendeels wordt verhinderd bij een fysiologische concentratie van natriumionen. Amiloride en derivaten hiervan laten bij binding in de natriumion-bindingsplaats eveneens verschillen zien in de allosterische modulatie van agonisten en antagonisten.

Naast de effecten op de binding van orthostere liganden, is de allosterische natriumion-bindingsplaats ook belangrijk voor de signaaltransductie door de receptor (**Hoofdstuk 4**). Door één voor één de aminozuren die de natriumion-bindingsplaats vormen te muteren, kon niet alleen de affiniteit van liganden die op die plaats binden beïnvloed worden, maar ook het vermogen van de hele receptor om door agonisten geactiveerd te worden. De vervanging van polaire aminozuren door alanine verhinderde de negatieve allosterische effecten van natriumionen op agonistbinding volledig (D52A^{2.50} en N284A^{7.49}) of gedeeltelijk (S91A^{3.39}, W246A^{6.48}, en N280A^{7.45}). Mutaties D52A^{2.50} en N284A^{7.49} schakelden

receptoractivatie volledig uit, terwijl S91A^{3.39} en N280A^{7.45} de constitutieve activiteit van de receptor verhoogden, en S91A^{3.39}, W246A^{6.48}, en N280A^{7.45} het vermogen van agonisten om de receptor te activeren verminderden. In simulaties die de receptordynamiek op atomair niveau volgen, had mutatie D52A^{2.50} een direct effect op het in de kristalstructuur in de natriumion-bindingsplaats aanwezige natriumion, dat zich meteen naar een andere bindingsplaats bewoog, gevormd door de aminozuren Glu13^{1.39} en His278^{7.43}. Ook verlaagde D52A^{2.50} de potentie van amiloride om orthostere liganden te verdringen, maar had deze mutant geen effect op de affiniteit van orthostere liganden. W246A^{6.48} daarentegen vergrootte sommige allosterische effecten van natriumionen en amilorides, terwijl de affiniteit van orthostere liganden verminderde.

Door amiloride te substitueren op de 5' positie van het molecuul ontstaan amiloridederivaten met afwijkende allosterische eigenschappen en gelijke of zelfs hogere potentie dan referentiestof HMA op de wild-type adenosine A_{2A} receptor (**Hoofdstuk 5**). De affiniteit van een serie van 5'-gesubstitueerde amiloridederivaten werd vastgesteld door hun verdringing van het orthostere radioligand [³H]ZM-241,385 van de wild-type en een in de natriumion-bindingsplaats gemuteerde W246A^{6.48} adenosine A_{2A} receptor te meten. Van deze serie was de 4-ethoxyphenethyl-gesubstitueerde amiloride 12l potenter dan HMA. Zoals eerder gezien voor amiloride en HMA, hadden de nieuwe amiloridederivaten een hogere affiniteit voor de W246A^{6.48} gemuteerde receptor, wat aangeeft dat aminozuur Trp246^{6.48} hun binding kan verhinderen. HMA had het grootste allosterische effect op de dissociatiesnelheid van [³H]ZM-241,385, terwijl de meest potente nieuwe amilorides 12h, i, k, en l een kleiner of zelfs geen effect op de dissociatie hadden. Dit geeft aan dat deze amilorides het orthostere ligand direct kunnen verdringen door de orthostere bindingsplaats binnen te dringen. Het grote verschil in het effect op de dissociatiesnelheid van [³H]ZM-241,385 tussen de wild-type en de W246A^{6.48} gemuteerde receptor toont aan dat aminozuur Trp246^{6.48} belangrijk is voor het soort allosterische interactie dat amilorides teweeg kunnen brengen.

Massaspectrometrie is een goed alternatief voor de detectie van radioliganden in de kwantificering van ligandbinding aan de adenosine A₁ en A_{2A} receptoren (**Hoofdstuk 6**). Ondanks dat het meten van radioligandbinding een betrouwbare methode is, heeft het ook nadelen, zoals de te nemen veiligheidsmaatregelen, dure synthese, speciale laboratoriumvereisten, en afvalverwerking. Met massaspectrometrie kan de aanwezigheid

van liganden gemeten worden zonder ze te hoeven labelen met een radio-isotoop. De gevoeligheid van massaspectrometrie-apparatuur wordt beter en beter, en met de huidige stand van zaken kunnen de lage hoeveelheden van liganden die in bindingsexperimenten voorkomen gemeten worden. Dit hoofdstuk beschrijft de ontwikkeling van een label-loze massaspectrometrie-gebaseerde methode om ligandbinding te meten (MS-binding) voor de adenosine A₁ en A_{2A} receptoren. Radioliganden worden veel gebruikt voor de meting van ligandbinding aan deze receptoren, waardoor er veel resultaten beschikbaar zijn om de MS-bindingsmethode mee te kunnen valideren. Eerst werd een methode ontwikkeld voor detectie met de massaspectrometer van ongelabeld DPCPX en ZM-241,385, liganden met een hoge selectiviteit en affiniteit voor respectievelijk de adenosine A₁ en A_{2A} receptoren. Om als interne standaards in de massaspectrometrie-methode te dienen werden beide liganden ook gelabeld met deuterium. Vervolgens werd onderzocht of de twee ongelabelde liganden hun radio-gelabelde versies konden vervangen in verschillende bindingsexperimenten, zoals verzadigings-, verdringings-, dissociatie-, en competitie-associatie-experimenten. Verder werd onderzocht of het mogelijk was de interne standaard niet te gebruiken, zonder de betrouwbaarheid van de resultaten aan te tasten, met het doel de MS-bindingsmethode volledig ongelabeld te maken. De resultaten tonen aan dat de MS-bindingsmethode goed werkt, zelfs zonder het gebruik van een interne standaard, en dit is veelbelovend voor de verdere ontwikkeling van deze label-loze methode om ligandbinding te meten op andere GPCRs.

Hoofdstuk 7 sluit dit proefschrift af met een beschouwing over de inhoud, hoe deze in de huidige stand van het GPCR-onderzoek past, en de vooruitzichten van dit onderzoeksveld.

