



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Activation of G protein-coupled receptors : the role of extracellular loops in adenosine receptors

Peeters, M.C.

### Citation

Peeters, M. C. (2011, November 17). *Activation of G protein-coupled receptors : the role of extracellular loops in adenosine receptors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/18092>

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/1887/18092>

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

## SAMENVATTING

De zoektocht naar het exacte activatiemechanisme van GPCRs is nog altijd in volle gang. Met elke nieuwe ontdekking in het GPCR onderzoeksveld wordt het steeds duidelijker hoe enorm complex deze eiwitten functioneren. Het aantal kristalstructuren van GPCRs neemt snel toe en deze hebben al veel vragen kunnen beantwoorden over hoe receptoren eruit zien en hoe ze werken, maar hebben minstens zoveel nieuwe vragen opgeroepen. Het doel van het onderzoek dat wordt beschreven in dit proefschrift was om bij te dragen aan het oplossen van de activatiepuzzel en een deel van deze nieuwe vragen te beantwoorden.

In **Hoofdstuk 1** introduceren we onderwerpen die aan de orde komen in dit proefschrift. De nadruk in dit hoofdstuk ligt vooral op hoofdthema's als mutagenese, constitutieve activiteit en het *S. cerevisiae* systeem. Aangezien het onderzoek in dit proefschrift zich vooral richtte op de extracellulaire loops van GPCRs en hun rol in receptoractivatie, is **Hoofdstuk 2** volledig gewijd aan dit onderwerp. Met behulp van recente literatuur en de beschikbare kristalstructuren, geven we een uitgebreid overzicht van wat we tot nu geleerd hebben over de functie van extracellulaire loops.

In **Hoofdstuk 3** beschrijven we het onderzoek naar de eerste extracellulaire loop (EL1) van de adenosine  $A_{2B}$  receptor ( $A_{2B}R$ ). Een random-mutagenesescreen in een *S. cerevisiae* expressiesysteem waarvoor we het eerste deel van de receptor muteerden, leverde een interessante mutant op met twee aminozuurveranderingen in EL1: F71L en D74G. Uitgebreide mutationele en farmacologische analyses van deze twee posities wezen uit dat dit gedeelte van de receptor essentieel is in het activatieproces van de  $A_{2B}R$ . Op positie 71 bleek dat de eigenschap hydrofobiciteit zeer belangrijk is, terwijl op positie 74 juist hydrofiliciteit nodig is. De opheldering van de adenosine  $A_{2A}$  receptorstructuur hielp ons om deze resultaten te verklaren. Posities 71 en 74 zijn gelokaliseerd aan de uiteinden van een  $\beta$ -strand in EL1 die een sheet kan vormen met de tweede extracellulaire loop (EL2). De eigenschappen van aminozuren op de twee posities zijn essentieel in het handhaven van deze zeer belangrijke driedimensionale eiwitstructuur.

In **Hoofdstuk 4** pasten we een vergelijkbare random-mutagenesescreen toe voor gemuteerde receptoren met een hoger activatieprofiel zoals beschreven in Hoofdstuk 3. Voor deze screen introduceerden we random mutaties in het tweede deel van de

---

$A_{2B}R$ , namelijk transmembraan domein 4 (TM4), de tweede extracellulaire loop (EL2), en transmembraan domein 5 (TM5). Deze screen leverde mutaties op in drie “hotspots” in de receptor belangrijk voor constitutieve activiteit en agonist potentie. De drie clusters van aminozuren lijken verantwoordelijk te zijn voor het handhaven van het evenwicht dat bestaat tussen de actieve conformatie  $R^*$  en de inactieve conformatie  $R$  van de receptor. Deze residuen zijn niet noodzakelijk direct betrokken bij ligand binding of G eiwit koppeling. Na het screenen voor gemuteerde receptoren met een hogere activiteit wilden we in **Hoofdstuk 5** ook mutaties onderzoeken die zorgen voor een verminderde activatie. Hiervoor hebben we een nieuwe screening methode ontwikkeld met ons *S. cerevisiae* system, de MMY24 stam, waardoor we nu ook specifiek kunnen selecteren voor dit inactieve fenotype. Om ook de kennis te kunnen gebruiken uit Hoofdstuk 4 hebben we bij de inactieve screen weer gebruik gemaakt van de mutatie-bank van de  $A_{2B}R$  waar random mutaties geïntroduceerd waren in het fragment TM4-EL2-TM5. De gemuteerde receptoren die we identificeerden uit deze screen lieten allemaal een verminderde constitutieve activiteit zien, maar ook een verminderde activatie door de agonist. We ontdekten een bijzonder belangrijke regio in TM5, met een sleutelrol voor C190<sup>5,46</sup>. Deze regio blijkt belangrijk voor het faciliteren van de conformationele veranderingen die de receptor ondergaat tijdens activatie, met name aan het intracellulaire gedeelte van TM5. Een vergelijking met de data verkregen in Hoofdstuk 4 liet zien dat een cysteine-rijk gedeelte in EL2 een negatieve regulerende rol heeft in activatie, ervoor zorgend dat de receptor inactief blijft. Het cluster bovenin TM5 waar alleen inactiverende mutaties gevonden werden, heeft een tegenovergestelde rol en reguleert activatie eerder positief.

In **Hoofdstuk 6** beschrijven we het onderzoek naar een ander subtype van de adenosine receptor: de adenosine  $A_1$  receptor ( $A_1R$ ). De rol van de tweede en derde extracellulaire loop (EL2 en EL3) werd onderzocht door middel van een drievoudige alanine scan (Ala<sub>3</sub>-scan) en een enkele alanine scan (Ala-scan). Veel residuen in beide loops bleken belangrijk voor  $A_1R$  functie en mutaties hadden een negatieve invloed op receptoractivatie. Met name EL2 lijkt een positieve regulerende rol te hebben in receptoractivatie. Dit staat in tegenstelling tot de rol van het cysteine-rijk gedeelte in EL2 van de  $A_{2B}R$  dat juist als negatieve regulator lijkt te fungeren. Verder hebben we twee residuen geïdentificeerd in EL2, een tryptofaan en een glutamaat, die een rol spelen in de allosterische modulatie van PD81,723.

Het onderzoek beschreven in de voorafgaande hoofdstukken wordt samengebracht in een discussie in **Hoofdstuk 7**. Door alle resultaten en conclusies van de individuele hoofdstukken te combineren zijn we in staat om een volledig beeld te krijgen van het activatiemechanisme van adenosine receptoren. Ook worden in dit hoofdstuk verschillende toekomstperspectieven beschreven die voortkomen uit het onderzoek.

