



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **The activation mechanisms of G protein-coupled receptors : the case of the adenosine A2B and HCA2/3 receptors**

Liu, R.

### **Citation**

Liu, R. (2016, December 8). *The activation mechanisms of G protein-coupled receptors : the case of the adenosine A2B and HCA2/3 receptors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/44797>

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/1887/44797>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/44797> holds various files of this Leiden University dissertation

**Author:** Rongfang Liu

**Title:** The activation mechanisms of G protein-coupled receptors : the case of the adenosine A2B and HCA2/3 receptors

**Issue Date:** 2016-12-08

## Samenvatting

Receptoren die aan een G-eiwit gekoppeld zijn ('G protein-coupled receptors', of afgekort GPCRs) vormen één van de grootste families van membraaneiwitten, met ongeveer 800 verschillende GPCRs in het menselijk genoom. De signalen die door GPCRs worden doorgegeven regelen veel verschillende biologische processen, zoals cel-proliferatie, -differentiatie, en embryonale ontwikkeling. Bovendien werken veel hormonen en neurotransmitters op deze receptoren, en het is dan ook geen verrassing dat er veel medicijnen ontwikkeld zijn die de werking van deze lichaamseigen stoffen blokkeren of nabootsen. Geschat wordt dat 30 tot 40% van de huidige medicijnen die op de markt zijn via GPCRs werken. Het vinden van nieuwe medicijnen is dus gebaat bij verder onderzoek naar de werking van GPCRs.

Een belangrijk hulpmiddel voor dit onderzoek is de gist *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Het gebruik van een gist-assay-systeem voor het onderzoek naar de werking van receptoreiwitten heeft veel voordelen: het is goedkoop, veilig, en robuust. Het is goed te gebruiken voor snelle haalbaarheids- en optimalisatie-studies. Bovendien is er geen storend achtergrondsignaal bij de bestudering van menselijke GPCRs, omdat deze niet in de oorspronkelijke gist aanwezig zijn. Nieuwe ontwikkelingen maken het mogelijk om, met in het gist-assay-systeem tot expressie gebrachte menselijke GPCRs, onderzoek te doen naar GPCR activatie en signaaltransductie, en om nieuwe agonisten en antagonist te identificeren.

**Hoofdstuk 1** geeft een algemene introductie van GPCRs, de activatie van GPCRs, het G-eiwit, en G-eiwit selectiviteit. Het proefschrift richt zich verder op de menselijke adenosine  $A_{2B}$  receptor ( $hA_{2B}R$ ) en de hydroxycarboxylzuur 2 en 3 ( $HCA_2$  en  $HCA_3$ ) receptoren. Daarnaast worden verschillende toepassingen van het *S. cerevisiae*-systeem voor GPCR onderzoek geïntroduceerd.

**Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van de huidige stand van zaken van humaan GPCR onderzoek met *S. cerevisiae*, aansluitend op ons laatste overzicht van dit onderwerp dat in 2005 werd gepubliceerd. Dit hoofdstuk beschrijft in

detail elf GPCR families, samen met de principes en de ontwikkeling van elk gist-assay-systeem dat is toegepast op deze GPCRs, en geeft een samenvatting van de gevonden resultaten over de werking van GPCRs.

*S. cerevisiae*-stammen die gist-zoogdier chimereën van het  $G_{\alpha}$ -eiwit (één van de drie deeleiwitten die samen het G-eiwit vormen) tot expressie brengen zijn uitermate geschikt voor de bestudering van de activatie van GPCRs. **Hoofdstuk 3** beschrijft een “één-GPCR-één-G-eiwit” gist onderzoeksmethode, gecombineerd met moleculair modelleren en eiwitmutaties, om de wisselwerking tussen GPCRs en de C-terminus van verschillende  $G_{\alpha}$ -deeleiwitten te ontcijferen. Hiervoor werd de  $hA_{2B}$ R als voorbeeldreceptor gebruikt, een representatieve klasse A GPCR die zich uitstekend gedraagt wat betreft G-eiwitkoppeling in dit gist-systeem. De wild-type en vijf gemuteerde  $hA_{2B}$ Rs werden tot expressie gebracht in acht verschillende giststammen met verschillende humane G-eiwittypes, daarmee de vier G-eiwit- hoofdklassen dekkend:  $G_{\alpha i'}$ ,  $G_{\alpha s'}$ ,  $G_{\alpha q'}$  en  $G_{\alpha 12}$ . De resultaten lieten zien dat een tyrosine-aminozuur (Y) op de C-terminus van het  $G_{\alpha}$ -deeleiwit belangrijk is voor de regulering van de activatie van GPCRs. Er werd ook gevonden dat aminozuren op de receptor zelf, namelijk R103<sup>3,50</sup> en I107<sup>3,54</sup> essentieel zijn voor G-eiwitkoppeling en receptor-activatie, terwijl aminozuur L213<sup>IL3</sup> weer belangrijk is voor de uitschakeling van de receptor. Vervanging van aminozuur S235<sup>6,36</sup> door een alanine gaf de grootste verschillen in G-eiwitkoppeling tussen de G-deeleiwittypes. Als laatste gaf de alaninevervanging van L236<sup>6,37</sup> verschillende gradaties van lagere receptor-activatie door alle G-eiwittypes. Deze resultaten verduidelijken de selectiviteit van G-eiwitten voor koppeling aan receptoren, en dragen bij aan het begrip van GPCR signaaltransductie.

**Hoofdstuk 4** richt zich op het belang van het NPxxY(x)<sub>6</sub>F motief en van helix 8 voor de activatie van de  $hA_{2B}$ R, met dezelfde methoden als in Hoofdstuk 3 aangevuld met bio-informatica. Aminozuren in het NPxxY(x)<sub>6</sub>F motief en helix 8 werden vervangen door een alanine, resulterend in 11 enkelpunts- en één dubbele mutatie van het NPxxY(x)<sub>6</sub>F motief en 16 enkelpuntsmutaties van helix 8. Het effect van deze mutaties op de receptoractivatie werd vervolgens onderzocht met het “één-GPCR-één-G-eiwit” gist-systeem. De aminozuren P287<sup>7,50</sup>, Y290<sup>7,53</sup>,

R293<sup>7.56</sup>, en I304<sup>8.57</sup> bleken essentieel te zijn voor receptoractivatie omdat mutaties tot alanine van deze posities tot compleet verlies van receptoractiviteit leidden. Uit analyse met western blots bleek dat behalve de gemuteerde R293<sup>7.56</sup>A receptor alle andere gemuteerde receptoren tot expressie kwamen in de gist. Andere aminozuren die belangrijk bleken voor receptoractivatie waren N286<sup>7.49</sup>, V289<sup>7.52</sup>, Y292<sup>7.55</sup>, N294<sup>8.47</sup>, F297<sup>8.50</sup>, R298<sup>8.51</sup>, H302<sup>8.55</sup>, en R307<sup>8.60</sup>. Mutatie Y290<sup>7.53</sup>F deed de receptor 50% van zijn maximale activatie verliezen, terwijl F297<sup>8.50</sup>A geen effect had ten opzichte van de wild-type receptor. De dubbel gemuteerde Y290<sup>7.53</sup>F/F297<sup>8.50</sup>Y receptor verloor 70% van zijn maximale activatie en bovendien was referentie-agonist 5'-(N-ethylcarboxamido)adenosine (NECA) minder potent op deze receptor. Deze resultaten geven nieuwe inzichten in de moleculaire wisselwerking tussen de transmembraan regio 7 (TM7) en helix 8 en het belang hiervan voor het activatiemechanisme van de hA<sub>2B</sub> receptor. Het is goed mogelijk dat deze resultaten ook betrekking hebben op de andere adenosinereceptoren en op andere GPCRs.

**Hoofdstuk 5** richt zich op de familie van HCA receptoren. Deze familie wordt gevormd door 3 GPCRs, waarvan de HCA<sub>2</sub> en HCA<sub>3</sub> receptoren veel op elkaar lijken met 95% overeenkomst in aminozuursequentie, maar waarvan de HCA<sub>3</sub> een langere C-terminus heeft. Beide receptoren werden tot expressie gebracht in de *S. cerevisiae* MMY stammen met verschillende G<sub>α</sub>-deeleiwitten. De HCA<sub>2</sub> receptor kon alle G-eiwitten met verschillende deeleiwitten activeren, behalve de G<sub>αq</sub> (stam MMY14). De HCA<sub>3</sub> daarentegen kon alleen G<sub>αi1</sub> (MMY23) en G<sub>αi3</sub> (MMY24) activeren.

Vervolgens werden twee gemuteerde receptoren samengesteld door de korte (van de HCA<sub>2</sub>R) en de lange (HCA<sub>3</sub>R) C-termini om te ruilen. Het bleek dat deze gemuteerde receptoren zich hetzelfde gedroegen als de wild-type receptoren wat hun selectiviteit voor de verschillende G-eiwittypes betreft. Hieruit kan worden geconcludeerd dat de verschillen tussen de C-termini van deze receptoren niet voor de selectiviteit voor de verschillende G<sub>α</sub>-deeleiwitten zorgen. Deze resultaten geven nieuwe inzichten in de G-eiwitkoppelingsprofielen van de HCA receptoren en de functie van de C-terminus, welke mogelijk ook betrekking hebben op andere GPCRs.

**Hoofdstuk 6** richt zich op het ontwerp en de synthese van agonisten voor de HCA<sub>2</sub> receptor met een lange verblijfstijd op de receptor. Een langere verblijfstijd op de receptor leidt waarschijnlijk tot een betere *in vivo* effectiviteit van de agonist. Met behulp van structuur-affiniteitsrelatie- (SAR) en structuur-kinetiekrelatie-studies (SKR) werd een serie van biphenyl-anthranylzuur agonisten voor de HCA<sub>2</sub> receptor onderzocht. Een collectie van 27 liganden werd gesynthetiseerd en 12 hiervan hadden een hogere affiniteit dan referentie-ligand nicotinezuur. De twee liganden **6g** (IC<sub>50</sub> = 75 nM) en **6z** (IC<sub>50</sub> = 108 nM) hadden een langere verblijfstijd op de receptor dan nicotinezuur, met respectievelijke *kinetic rate index* (KRI) waarden van 1.31 en 1.23. Van de biphenylserie was de nieuwe 2-F, 4-OH variant **6x** de agonist met de hoogste affiniteit voor de HCA<sub>2</sub>R met een IC<sub>50</sub> waarde van 23 nM, ook al was de verblijfstijd op de receptor gelijk aan die van referentie-ligand nicotinezuur. Deze SAR en SKR resultaten geven aan dat een vroege selectie van liganden gebaseerd op bindingskinetiek een veelbelovende toevoeging is voor *lead*-optimalisatie.

**Hoofdstuk 7** vat de resultaten van dit proefschrift samen. De voordelen van het *S. cerevisiae*-systeem en het belang van de aminozuren in geconserveerde receptormotieven zoals DRY en NPxxY worden beschreven. De vooruitzichten die de gepresenteerde receptoractivatie- en G-eiwitkoppelings-resultaten bieden op medicijnonderzoek worden behandeld. Kort samengevat heeft de verscheidenheid van de gebruikte methodes in dit proefschrift geleid tot een gedetailleerd begrip van receptorwerking. Dit geeft aan dat ondanks dat de besproken receptoren al ruim onderzocht zijn, er nog altijd nieuwe kansen liggen voor verder geneesmiddelenonderzoek.