



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Towards improved drug action : target binding kinetics and functional efficacy at the mGlu2 receptor**

Doornbos, M.L.J.

### **Citation**

Doornbos, M. L. J. (2018, September 12). *Towards improved drug action : target binding kinetics and functional efficacy at the mGlu2 receptor*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/65384>

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/1887/65384>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/65384> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Doornbos, M.L.J.

**Title:** Towards improved drug action : target binding kinetics and functional efficacy at the mGlu2 receptor

**Issue Date:** 2018-09-12



## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Bij het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen worden op meerdere momenten in het proces vertaalslagen gemaakt. Resultaten uit *in vitro* experimenten zijn niet zo voorspellend voor de effectiviteit van stoffen in *in vivo* experimenten als we zouden willen. Dit resulteert in het selecteren van moleculen die later niet effectief blijken, maar ook in het missen van moleculen die juist wel veelbelovend zijn. Dit is niet anders voor de metabotrope glutamaat-receptor 2 (mGlu<sub>2</sub> receptor), waarvoor ondanks enorm veel onderzoek en ontwikkeling nog geen medicijnen op de markt zijn. Dit laat zien dat er behoefte is aan een beter begrip op moleculair niveau van de *in vitro* parameters die ten grondslag liggen aan *in vivo* effect van stoffen. Daarom richt dit proefschrift zich op de thema's van receptorbindingskinetiek en functionele effectiviteit van zowel allosterische als orthostere liganden van de mGlu<sub>2</sub> receptor.

**Hoofdstuk 1** introduceert de hoofdthema's die in dit proefschrift worden behandeld. Na een introductie van G-eiwitgekoppelde receptoren met een focus op de mGlu<sub>2</sub> receptor volgt een inleiding van de thema's allosterische modulatie, receptorbindingskinetiek en covalente receptorbinding.

In **Hoofdstuk 2** is JNJ-462841222 geïntroduceerd en uitgebreid gekarakteriseerd. Deze zeer potente positieve allosterische modulator (PAM) is in alle hoofdstukken van dit proefschrift gebruikt als model-PAM. Verder is in dit hoofdstuk het mechanisme van positieve allosterische modulatie van de mGlu<sub>2</sub> receptor onderzocht. JNJ-46281222 liet karakteristieke PAM-eigenschappen zien door de affiniteit en potentie van de endogene agonist glutamaat te verhogen. Daarnaast gedroeg JNJ-46281222 zich als zogeheten PAM-agonist. Bij hogere concentraties is de stof in staat de receptor submaximaal te activeren ten opzichte van volledige activatie door glutamaat. Vervolgens is aangetoond dat het mechanisme van allosterische modulatie in twee richtingen verloopt. In aanvulling op de effecten van de PAM op de affiniteit en potentie van agonisten is in dit hoofdstuk aangetoond dat het maximaal aantal bindingsplaatsen van JNJ-46281222 wordt verhoogd in aanwezigheid van glutamaat, terwijl de affiniteit van de PAM onder deze condities niet veranderde. Verder werd aangetoond dat het aantal PAM-bindingplaatsen sterk afnam in aanwezigheid van GTP (dat zorgt voor dissociatie van het G eiwit), wat onderschrijft dat deze PAM liever bindt aan G-eiwitgekoppelde receptoren. Vervolgens zijn computationele en moleculair dynamische studies uitgevoerd om de bindingspose en

---

het mechanisme van binden van de PAM in de receptor te bestuderen en zodoende beter te begrijpen. De PAM-bindingslocatie die hieruit volgde is vervolgens bevestigd met receptor-mutagenese-experimenten.

**Hoofdstuk 3** beschrijft de eerste kinetische studie van orthostere liganden van de mGlu<sub>2</sub> receptor. Na het opzetten van een experimentele methode voor het kwantificeren van bindingskinetiek zijn de kinetische parameters van de endogene agonist glutamaat bepaald. Vervolgens is dit ook gedaan voor andere orthostere liganden. Om het begrip van het mechanisme van receptorbinding en de invloed van allosterie modulators hierop te vergroten zijn de experimenten herhaald in aan- en afwezigheid van een PAM of een NAM (negatieve allosterie modulator). We lieten zien dat de affiniteit van orthostere liganden sterk is gecorreleerd aan de associatiesnelheidsconstante ( $k_{on}$ ). Dit toont aan dat de  $k_{on}$  de bepalende factor is voor de affiniteit en ten gevolge daarvan ook voor de receptorbezetting van orthostere mGlu<sub>2</sub> liganden. In tegenstelling tot de grote variatie aan  $k_{on}$ -waarden (1000-voudig verschil), waren de waarden van de dissociatiesnelheidsconstanten ( $k_{off}$ ) veel minder divers, maximaal zesvoudig verschillend. Met behulp van functionele experimenten werd vervolgens aangetoond dat de aanwezigheid van een PAM leidt tot een verlenging van de functionele respons van glutamaat in aanvulling op de verlenging van de ligandbinding.

In **hoofdstuk 4** is een uitgebreide studie gedaan van structuur-kinetiekrelaties. Hiervoor zijn 41 nieuwe mGlu<sub>2</sub> PAMs bestudeerd die allemaal de 7-aryl-1,2,4-triazolo[4,3-*a*]pyridine-scaffold bevatten. Naast de klassieke bepalingen van affiniteit en potentie werden kinetische parameters ( $k_{on}$  en  $k_{off}$ ) en verblijftijden (RTs) bepaald. Hiervoor werd allereerst een zogeheten scintillation proximity assay (SPA) opgezet en gevalideerd. Deze nieuwe PAMs vertoonden verschillende kinetische profielen, waarin de  $k_{on}$ -waarden tot wel duizend keer uit elkaar lagen, terwijl  $k_{off}$ -waarden allemaal binnen een tienvoud van elkaar lagen. Dit liet zien dat net zoals in **hoofdstuk 3**  $k_{on}$  de affiniteit bepaalt en dat dit daarom karakteristiek is voor deze receptor. Ondanks dat de verblijftijden maar weinig van elkaar verschilden, lieten we in een functioneel experiment zien dat de duur van het effect van PAMs gelieerd is aan de verblijftijd van deze moleculen op de receptor. Uiteindelijk zijn een PAM met een korte en een lange verblijftijd onderzocht in een diemodel. In deze experimenten liet de PAM met een lange verblijftijd een beter effect zien *in vivo* dan de PAM met een korte verblijftijd op de receptor. Dit is de eerste aanwijzing dat het *in vivo* effect van mGlu<sub>2</sub> PAMs verbetert door een langere *in vitro* verblijftijd. Samen laten de resultaten van **hoofdstuk 3** en **4** zien dat receptorbinding-kinetiek belangrijk is voor het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen. Daarom zouden experimenten die het mogelijk maken om kinetische parameters  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  en RT te bepalen een waardevolle toevoeging zijn aan de bestaande *in vitro* experimenten die in het proces van geneesmiddelenontwikkeling toegepast worden.

Het covalent labelen van GPCRs is een waardevolle methode om het begrip van receptorbinding, werkingsmechanisme, receptorexpressie en receptorfarmacologie te vergroten en zou daarnaast ook kunnen bijdragen aan het ophelderen van de structuur van receptoren.

---

**Hoofdstuk 5** beschrijft het ontwerp, de synthese en de farmacologische karakterisatie van de eerste covalente PAM van een klasse C GPCR. Vervolgens is dit molecuul gebruikt om de receptorbinding te bestuderen met behulp van computationele modellen. Deze modellen werden ook gebruikt om een aantal aminozuurresiduen te identificeren die verantwoordelijk zouden kunnen zijn voor de covalente binding tussen PAM en receptor. In mutagenese experimenten is vervolgens het specifieke aminozuurresidu verantwoordelijk voor de covalente binding geïdentificeerd.

**Hoofdstuk 6** beschrijft het opzetten van een experimentele methode voor het bestuderen van de mGlu<sub>2</sub> receptorfarmacologie waarvoor geen labels benodigd zijn, maar die is gebaseerd op het gebruik van een biosensor. Nadat de experimentele condities waren geoptimaliseerd konden typische agonist-, antagonist-, PAM- en NAM-responsen worden gemeten. Het was belangwekkend dat we met behulp van deze methode ook constitutieve activiteit van de mGlu<sub>2</sub> receptor konden waarnemen. LY341495 gedroeg zich als inverse agonist, terwijl deze stof algemeen bekend staat als klassieke (neutrale) antagonist. De mGlu<sub>2</sub> receptor is de eerste klasse C GPCR die uitgebreid is gekarakteriseerd met behulp van een biosensormethode. Dit biedt nieuwe mogelijkheden voor het bestuderen van receptorfarmacologie en nieuwe thema's op het gebied van receptoractivatie.

Tenslotte zijn de conclusies van de verschillende hoofdstukken besproken in **hoofdstuk 7**. De resultaten uit dit proefschrift dragen bij aan het begrip van het werkingsmechanisme van de mGlu<sub>2</sub> receptor op moleculair niveau en hebben het belang van receptorbindingkinetiek voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen krachtig onderstreept. De nieuwe inzichten die in de verschillende hoofdstukken van dit proefschrift verkregen zijn bieden waardevolle informatie voor toekomstig onderzoek naar en ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen voor zowel de mGlu<sub>2</sub> receptor als voor andere GPCRs.