



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Non-ribose ligands for the human adenosine A1 receptor**

Klaase, E.C.

### **Citation**

Klaase, E. C. (2008, June 10). *Non-ribose ligands for the human adenosine A1 receptor*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12936>

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/1887/12936>

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

## Samenvatting

Het effect van adenosine op de hartslag en bloeddruk werd voor het eerst beschreven in 1929. Veel later, bijna 30 jaar geleden, werd duidelijk dat bepaalde eiwitten die bestaan uit zeven transmembraan domeinen verantwoordelijk waren voor dit effect van adenosine. Deze eiwitten behoren tot de G eiwit-gekoppelde receptoren (GPCRs), een klasse eiwitten die zichzelf bewezen heeft als zeer geschikte aangrijpingspunten voor geneesmiddelen. Vier GPCRs die adenosine herkennen, zijn geïdentificeerd. Zij worden alle verspreid in het lichaam tot expressie gebracht, en elk subtype bezit zijn eigen karakteristieken met betrekking tot ligand binding en signaal transductie. Een introductie tot de vier adenosine receptor subtypes, hun geschiedenis en klonering, hun voorkomen, functioneren, beweging door de cel en therapeutische mogelijkheden wordt beschreven in **Hoofdstuk 1**.

Het desensitisatie- en internalisatieproces van adenosinereceptoren in celsystemen, weefsels en *in vivo* studies wordt beschreven in **Hoofdstuk 2**. Een overzicht van de huidige literatuur met betrekking tot desensitisatie en internalisatie van adenosinereceptoren wordt gegeven, en de regulatie van de verschillende subtypes na agonist binding wordt besproken. De adenosine A<sub>1</sub> receptor (A<sub>1</sub>R) internaliseert bijvoorbeeld langzaam, met een halfwaarde tijd van een paar uur, terwijl de andere G<sub>i</sub>-gekoppelde receptor (A<sub>3</sub>R) internaliseert in een tijdsbestek van een paar minuten. Tevens worden de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de desensitisatie van adenosinereceptoren besproken.

In **Hoofdstuk 3** worden fusie-eiwitten tussen de adenosine A<sub>1</sub> receptor van de mens en <sup>351</sup>Cys gemuteerde G<sub>α</sub>-subunits gebruikt om invers agonisme te bestuderen. Tevens wordt het faciliterende effect van de allosterische modulator PD81,723 op de affiniteit van de agonist aangetoond. Het bleek dat de fysieke koppeling van de G<sub>i1α</sub> subunit aan de adenosine A<sub>1</sub>R in een 1:1 verhouding resulteert in een 8 maal hogere affiniteit van de referentie agonist CPA. De affiniteit van de antagonist DPCPX voor het fusie-eiwit werd echter niet beïnvloed, wat aangeeft dat G-eiwit koppeling geen invloed heeft op de affiniteit van antagonisten. Hoewel de A<sub>1</sub>R al gekoppeld was aan de G<sub>iα</sub>-subunit waardoor het evenwicht verschoven wordt naar de hoge affiniteitstoestand, was PD81,723 nog steeds in staat om de affiniteit van CPA voor de fusie-eiwitten te verhogen. Wederom werd de affiniteit van DPCPX voor de fusie-eiwitten nauwelijks beïnvloed. Na<sup>+</sup>-ionen die zich gedragen als allosterische remmers, waren niet in staat om de agonist binding aan de A<sub>1</sub>-G<sub>i1α</sub> fusie-eiwitten te verminderen, waarschijnlijk omdat zij hun effect via ontkoppeling van het R-G complex bewerkstelligen. Uitzonderingen waren de <sup>351</sup>Pro en <sup>351</sup>Arg A<sub>1</sub>-G<sub>iα</sub> fusie-eiwitten waar de Na<sup>+</sup>-ionen de affiniteit van CPA verminderden. Men zou kunnen speculeren dat de karakteristieken van de zijketens van deze aminozuren (respectievelijk ringstructuur en positieve lading) de conformatie van het G<sub>iα</sub> eiwit, en

daarmee de conformatie van het fusie-eiwit als geheel zou kunnen veranderen. [<sup>35</sup>S]GTPγS bindingsexperimenten lieten zien dat alle geteste A<sub>1</sub>-G<sub>1α</sub> fusie-eiwitten een hogere basale receptor activiteit hadden, waardoor invers agonisme nauwkeuriger gemeten kan worden. Ook werd gevonden dat de maximale receptor deactivatie afhangt van het aminozuur op positie 351 van het G<sub>1α</sub>-subunit. Vooral de <sup>351</sup>Cys en <sup>351</sup>Ile mutanten zijn geschikt om invers agonisme te onderzoeken dankzij hun vergrote uitleesvenster in [<sup>35</sup>S]GTPγS bindingsexperimenten.

De invloed van allosterische modulators op de internalisatie van de A<sub>1</sub>R is uitgewerkt in **Hoofdstuk 4**. Voor dat doeleinde werd de adenosine A<sub>1</sub>R voorzien van een geel fluorescerende eiwit aan de C-terminus, resulterend in een A<sub>1</sub>YFP receptor. De adenosine A<sub>1</sub>R blijkt heel langzaam te internaliseren, een kwestie van uren. Gedurende lange termijn blootstelling (16 uur), was CPA in staat om 25% en 40% van de receptoren te internaliseren bij een concentratie van respectievelijk 400 nM of 4 μM. Echter, in de aanwezigheid van PD81,723, werd al enige internalisatie verkregen bij een concentratie van 40 nM CPA, en bij een concentratie van 400 nM CPA internaliseerde 59% van de receptoren, een toename van 34%. SCH-202676 daarentegen voorkwam op een effectieve manier de door CPA geïnduceerde internalisatie van de receptor, geïnduceerd door CPA. Recente onderzoeken hebben aangetoond dat de werking van SCH-202676 onomkeerbaar is en het resultaat is van een reactie met onder andere cysteine residuen in een eiwit. Deze eigenschappen maken SCH-202676 ongeschikt als een allosterische remmer. Toevoeging van enkel PD81,723 of SCH-202676 had geen effect op internalisatie. PD81,723 was niet in staat om het internalisatie proces te versnellen; maar kon wel de kritische agonist concentratie waarbij internalisatie plaats vindt, verlagen.

Onlangs is een serie selectieve agonisten voor de adenosine A<sub>1</sub> receptor van de mens gesynthetiseerd met een ongewone structuur waarin de ribose groep van de traditionele adenosine-achtige liganden ontbreekt. De synthese, affiniteit en activiteit van twaalf van deze non-ribose liganden, alle behorende tot de 2-amino-4-(3 en/of 4-gesubstitueerde feny)-6-(gesubstitueerde)sulfanyl-pyridine-3,5-dicarbonitrillen, worden beschreven in **Hoofdstuk 5**.

Substitutie aan de fenyling dicteert voornamelijk de affiniteit, terwijl het substitutiepatroon op de sulfanyl positie de intrinsieke activiteit lijkt te bepalen. cAMP studies brachten aan het licht dat deze serie verbindingen zowel inverse agonisten, partiële agonisten en zeer potente volle agonisten omvat. Het is nogal opmerkelijk om zo'n grote variëteit in potentie te vinden in zo'n kleine serie verbindingen. De 3,4-methyleendioxyfenyl gesubstitueerde verbindingen uit deze serie herkennen twee bindingstoestanden of -plaatsen met een picomolaire affiniteit voor de hoge affiniteitsplaats. Deze verbindingen waren volle agonisten die de klassieke agonist N<sup>6</sup>-cyclopentyladenosine (CPA) veruit overtreffen in affiniteit en potentie.

**Hoofdstuk 6** evalueert de karakteristieken van LUF6037, een voorbeeld van een 3,4-methyleendioxyfenyl gesubstitueerde verbinding. LUF6037 herkende 2 bindingstoestanden of –plaatsen op de adenosine A<sub>1</sub> receptor van de mens met picomolaire en nanomolaire affiniteiten, beiden veel hoger dan de referentie agonist CPA. Net als CPA was LUF6037 in staat om de cAMP productie te remmen, en opnieuw met een veel lagere EC<sub>50</sub>-waarde (picomolaire schaal) dan CPA (nanomolaire schaal). Tevens werd LUF6037 in thermodynamische radioligand bindings experimenten gekarakteriseerd als een volle agonist. De allosterische enhancer PD81,723 beïnvloedde echter de interactie tussen LUF6037 en de receptor niet, terwijl dat wel het geval was bij de interactie van CPA met de receptor. Verder induceerde LUF6037 geen internalisatie terwijl CPA wel dosis-afhankelijke internalisatie van de adenosine A<sub>1</sub>-receptor veroorzaakte. Samengevat laten deze resultaten zien dat LUF6037 een nieuwe agonist is met een hoge affiniteit, die door de afwezigheid van internalisatie-inducerende eigenschappen de voorkeur kan verdienen ten opzichte van klassieke agonisten zoals CPA.

Een van de andere non-ribose agonisten met een hoge affiniteit voor de A<sub>1</sub>R, LUF5834, werd uitgekozen om radioactief te labelen. **Hoofdstuk 7** beschrijft de evaluatie van [<sup>3</sup>H]LUF5834 als een nieuw agonistisch radioligand. Het bleek dat [<sup>3</sup>H]LUF5834 twee hoge-affiniteits bindingsplaatsen herkent, met slechts een klein verschil in K<sub>d</sub>-waarden, waardoor alle receptor bindingsplaatsen op het celmembraan bezet kunnen worden. Dit is een opmerkelijke eigenschap voor een agonistisch radioligand, wat overeenkomt met de eigenschappen van het inverse agonistische/antagonistische radioligand [<sup>3</sup>H]DPCPX.

Verdringingsexperimenten lieten zien dat LUF5834 ongevoelig is voor de toevoeging van zowel PD81,723 als GTP. Bovendien werd in verdringingsexperimenten met de inverse agonist DPCPX een ‘extra’ derde bindingsplaats aangetoond. Deze extra bindingsplaats vertegenwoordigt hoogstwaarschijnlijk een onderverdeling van de R conformatie van de receptor, hier R<sup>1</sup> en R<sup>2</sup> genoemd. Op basis van deze resultaten is een uitgebreider evenwicht tussen verschillende receptor toestanden gepostuleerd.

Tenslotte worden in **Hoofdstuk 8** algemene conclusies getrokken over het onderzoek dat in dit proefschrift beschreven is. Deze worden gevolgd door toekomstperspectieven en suggesties voor vervolgonderzoek, die gebaseerd zijn op de interessante resultaten verkregen uit dit werk.