



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Non-ribose ligands for the human adenosine A1 receptor

Klaasse, E.C.

Citation

Klaasse, 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).

List of Publications

Beukers MW, Wanner MJ, Von Frijtag Drabbe Künzel JK, **Klaasse EC**, IJzerman AP, Koomen GJ. *N*⁶-cyclopentyl-2-(3-phenylaminocarbonyltriazene-1-yl)adenosine (TCPA), a very selective agonist with high affinity for the human adenosine A₁ receptor. *J Med Chem.* **2003**, 46:1492-1503.

Klaasse E, de Ligt RA, Roerink SF, Lorenzen A, Milligan G, Leurs R, IJzerman AP. Allosteric modulation and constitutive activity of fusion proteins between the adenosine A₁ receptor and different ³⁵¹Cys-mutated G_i alpha-subunits. *Eur J Pharmacol.* **2004**, 499:91-98.

Klaasse EC, van den Hout G, Roerink SF, de Grip WJ, IJzerman AP, Beukers MW. Allosteric modulators affect the internalization of human adenosine A₁ receptors. *Eur J Pharmacol.* **2005**, 522:1-8.

Klaasse EC, IJzerman AP, de Grip WJ, Beukers MW. Internalization and Desensitization of Adenosine Receptors. *Purinergic Signal.* **2008**, 4:21-37

Klaasse EC, Roerink SF, van Veldhoven JPD, von Frijtag Drabbe Künzel JK, de Grip WJ, Brussee J, IJzerman AP, Beukers MW. Structure-activity relationships of 2-amino-4-(substituted)phenyl-6-(substituted)sulfanyl-pyridine-3,5-dicarbonitriles reveal full agonists with picomolar affinity for the human adenosine A₁ receptor. *Manuscript in preparation.*

Klaasse EC, Roerink SF, van Veldhoven JPD, von Frijtag Drabbe Künzel JK, de Grip WJ, IJzerman AP, Beukers MW. LUF6037, a non-adenosine agonist with picomolar potency for the adenosine A₁ receptor is unable to internalize the receptor. *Manuscript in preparation.*

Klaasse EC, Chang LCW, de Vries H, de Grip WJ, IJzerman AP, Beukers MW. [³H]LUF5834, a new non-adenosine radioligand for the adenosine A₁ receptor, revealing 3 binding sites for DPCPX on the A₁ receptor. *Manuscript in preparation.*

Curriculum Vitae

Elisabeth Klaasse werd geboren op 22 april 1978 te Katwijk aan zee. Na het behalen van het VWO-diploma aan het Pieter Groen College te Katwijk aan zee, is zij in september 1996 begonnen met de studie Bio-Farmaceutische Wetenschappen aan de Universiteit Leiden. In augustus 1997 haalde zij het propedeutisch examen, gevolgd door het doctoraal examen in september 2001. Tijdens haar eerste stage van juni 1999 tot en met januari 2000 op de afdeling Medische Farmacologie heeft zij onder begeleiding van Dr. J. de Koning gewerkt aan "The Fine-regulation of the Onset of the Mid-cyclic LH surge". De tweede stage van februari tot september 2000 op de afdeling Farmacochemie heeft zij gewerkt aan "Allosteric Modulation of fusion proteins between the human adenosine A₁ receptors and different mutated (C351X) rat G_{i1}α subunits" onder leiding van Rianne de Ligt en Prof. dr. A.P. IJzerman. Aansluitend heeft zij een buitenlandstage gedaan bij GlaxoSmithKline (Harlow, UK) alwaar zij gedurende 10 maanden gewerkt heeft aan het maken van induceerbare knock out muismodellen voor verschillende genen, m.b.v. moleculair biologische technieken onder leiding van Dr. H. Prosser.

Vanaf oktober 2001 tot oktober 2006 is zij werkzaam geweest als promovenda bij de Leidse vakgroep Farmacochemie van het Leiden/Amsterdam Center for Drug Research (LACDR) onder begeleiding van Prof. dr. A.P. IJzerman, Prof. dr. W.J. de Grip en Dr. M.W. Beukers. Gedurende deze periode werd het onderzoek verricht dat in dit proefschrift staat beschreven. Tijdens haar AIO-schap heeft zij verschillende (inter)nationale symposia en congressen bezocht alwaar zij haar onderzoek gepresenteerd heeft. Tevens ontving zij tijdens de FIGON Dutch Medicines Days 2004 de eerste prijs voor de poster getiteld: "Internalization of the adenosine A₁ Receptor. The influence of Allosteric Modulators."

Elisabeth Klaasse was born on the 22th of April 1978 in Katwijk aan zee. After graduating from secondary school at the "Pieter Groen College" in Katwijk aan zee in 1996, she started studying Bio Pharmaceutical Sciences at Leiden University. In August 1997, she passed the propaedeutic exam, followed by the Masters degree in Bio Pharmaceutical Sciences in September 2001. From June 1999 until January 2000, she worked at the department of Medicinal Pharmacology under supervision of Dr. J. de Koning on the research subject "The Fine-regulation of the Onset of the Mid-cyclic LH surge". A second internship was done from February until September 2000 at the department of Medicinal Chemistry under supervision of Rianne de Ligt and Prof. dr. A.P. IJzerman, where she participated in the study towards "Allosteric Modulation of fusion proteins between the human adenosine A₁ receptors and different mutated (C351X) rat G_{i1}α subunits". Subsequently, a third internship was performed for 10 months at GlaxoSmithKline (Harlow, UK), where she worked on inducible knock out mice models for different genes, under supervision of Dr. H. Prosser.

From October 2001 until October 2006, she was employed as a PhD-student at the department of Medicinal Chemistry, Leiden/Amsterdam Center for Drug Research (LACDR) under supervision of Prof. dr. A.P. IJzerman, Prof. dr. W.J. de Grip and Dr. M.W. Beukers. During this time, the research described in this thesis was conducted. Several (inter)national symposia and congresses were attended during this period, where she presented her research results. During the FIGON Dutch Medicines Days 2004, she received the 1st prize for the poster entitled: "Internalization of the adenosine A₁ Receptor. The influence of Allosteric Modulators."

Nawoord

Aan het einde van dit proefschrift rest mij nog om een heel aantal mensen te bedanken zonder wie dit proefschrift niet tot stand was gekomen. Als eerste de mensen van de afdeling Moleculaire Genetica: Hans, Tineke en Riekje, jullie stonden altijd voor mij klaar als ik met technische of praktische vragen kwam, ik heb veel van jullie geleerd op het moleculair biologische vlak. Op de afdeling Toxicology was Hans de Bont altijd stand-by als ik achter de confocale fluorescentie microscoop zat. Dank voor de introductie in de fluorescentiemicroscopie en de bijbehorende software. Dank ook aan Gerrit Lodder en zijn medewerkers voor de gastvrijheid op jullie lab waar ik menig radioligand bindingsexperiment heb gedaan. Prasad Ratnala is thanked for providing me with Sf9 insect cells, and teaching me how to culture them. De mensen van het Nijmegen Centre of Molecular life Sciences, UMC Nijmegen, hebben me de eerste beginselen van het maken van FastBac constructen, baculovirussen, het infecteren van Sf9 insecten cellen en het opzetten van grote kweken bijgebracht. Giel en Jenny, bedankt voor jullie advies en praktische hulp wanneer dat nodig was! Henk, jouw jarenlange lab-ervaring, technisch inzicht en creatieve oplossingen hebben een grote bijdrage geleverd aan mijn onderzoek. Zonder jouw goedgevulde gereedschapskist hadden we vast niet zo gemakkelijk de bioreactoren in elkaar geschroefd. Alle foto's en handleidingen die je voor de nieuwe apparatuur gemaakt hebt zijn van onschatbare waarde voor a-technische gebruikers zoals ik! Dat we nog steeds niet weten waarom de A₁-receptor niet functioneel gereconstitueerd kan worden, ligt zeker niet aan jouw inzet. Verder wil ik graag alle voorgaande en huidige collega's van de afdeling Farmacochemie bedanken voor de zeer prettige samenwerking, collegialiteit en lol die we samen gehad hebben. Niet alleen elkaars cellen doorzetten, de wekelijkse 'biomeetings' en gezamenlijk congresbezoek horen daarbij, maar ook (strand)lablunches, sinterklaasvieringen en labweekenden vallen wat mij betreft daaronder. Ik heb ervan genoten!

Met name wil ik hier nog mijn (snuffel)stage studenten noemen; Hester, Sophie en Gijs, jullie hebben allen voor kortere of langere tijd, en op verschillende vlakken, een belangrijke bijdrage geleverd aan dit proefschrift. Ik vond het in ieder geval heel leerzaam om jullie te begeleiden bij de 'eerste stapjes' in de echte onderzoekswereld, en vond het leuk om jullie enthousiasme voor het wetenschappelijk onderzoek te zien ontstaan en groeien. Sophie, ondanks jouw aanvankelijke scepsis om in het wetenschappelijk onderzoek te blijven, vind ik het superleuk dat je nu ook zélf AIO bent geworden in Utrecht!

De laatste paragraaf is gereserveerd voor de mensen die mijn promovendus-periode van een wat grotere afstand gevolgd hebben, maar die zeker niet minder geïnteresseerd waren. Vrienden van de dinnerclub, CJV-vrienden, al 5 jaar onafgebroken elke woensdag dinnerclub met een mannetje of 12, supergeslaagde vakanties, tripjes, lol en gezelligheid, een lach en een traan, jullie zorgden voor tijdige ontspanning. Agatha, Astrid, Anneke, Corine, Daphne, Gijs A., Hendrine, Jan-Willem, Johan-Krijn, Mark, Martin, Peet H., Peet alias 'VanderO', Pieter en Vera, a big Thank You is hier wel op zijn plaats! lenske en Miranda, al vanaf respectievelijk de kleuterschool en middelbare school bevriend, *keep in touch!*

Corine en Johan-Krijn, als zusje en broertje en als mede 'Leiden University students' kunnen jullie je wellicht nog het beste een voorstelling maken van de wetenschappelijke wereld waarin ik me bevind, en alles wat daarbij komt kijken. Dank voor de broeder- en zusterband, die is heel bijzonder! Pa en Ma, jullie hebben altijd onvoorwaardelijk in me geloofd, me gestimuleerd en gesteund in school en studie. Ziehier het resultaat. Jullie zijn niet alleen 'Gouden Ouders', maar zeker ook 'Gouden Grootouders'! Daniël en Ruben mogen zich bevoorrecht voelen met zulke 'oppas-opa's en oma'. En natuurlijk Houtzelf, de andere oppas-opa. Jouw wekelijkse oppasdag (om half 6 opstaan, de files trotserend) heeft het mede mogelijk gemaakt dat ik dit werk heb kunnen afronden, dank daarvoor!

Tenslotte, Gijs, waar een 10-weekse stage niet allemaal toe kan leiden...

Elisabeth

List of Abbreviations

β_1 -AR	β_1 adrenergic receptor
[3 H]cAMP	[3 H] cyclic adenosine monophosphate
[3 H]CHA	[3 H] <i>N</i> ⁶ -cyclohexyladenosine
[3 H]DPCPX	[3 H] 1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine
[3 H]LUF5834	[3 H] 2-amino-4-(4-hydroxyphenyl)-6-(1 <i>H</i> -imidazol-2-ylmethylsulfanyl)-pyridine-3,5-dicarbonitrile
2HE-NECA	2-hexynyl-5'- <i>N</i> -ethylcarboxamidoadenosine
5-HT	Serotonin, 5-hydroxytryptamine
A ₁ R	Adenosine A ₁ receptor
A _{2A} R	Adenosine A _{2A} receptor
A _{2B} R	Adenosine A _{2B} receptor
A ₃ R	Adenosine A ₃ receptor
ADA	Adenosine deaminase
ARNO	Arf nucleotide site opener
BCA	Bicinchonic acid
BSA	Bovine serum albumin
CADO	2-chloroadenosine
CGS21680	2-[4-(2-carboxyethyl)phenethylamino]-5'- <i>N</i> -ethylcarboxamidoadenosine
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CHO cells	Chinese hamster ovary cells
CI-IB-MECA	2-chloro- <i>N</i> ⁶ -(3-iodobenzyl)adenosine-5'- <i>N</i> -methyluronamide
CPA	<i>N</i> ⁶ -cyclopentyladenosine
CSC	8-(3-chlorostyryl)caffeine
D ₁ R	Dopamine D ₁ receptor
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DPCPX	1,3-dipropyl-8-cyclopentylxanthine
GIRK-channels	G protein-activated inwardly rectifying K ⁺ -channels
GPCR	G protein-coupled receptor
GRK	G protein-coupled receptor kinase
IB-MECA	<i>N</i> ⁶ -(3-iodobenzyl)adenosine-5'- <i>N</i> -methyluronamide
K _{i,H}	affinity for the high affinity state/site of the receptor
K _{i,L}	affinity for the low affinity state/site of the receptor
k _{off}	Dissociation rate constant (min ⁻¹)
k _{on}	Association rate constant (nM ⁻¹ min ⁻¹)
LUF5834	2-amino-4-(4-hydroxyphenyl)-6-(1 <i>H</i> -imidazol-2-ylmethylsulfanyl)-pyridine-3,5-dicarbonitrile
LUF6037	2-amino-4-(benzo-[1,3]-dioxol-5-yl)-6-(2-hydroxy-propylsulfanyl)-pyridine-3,5-dicarbonitrile
MRS 1523	3-propyl-6-ethyl-5-[(ethylthio)carbonyl]-2-phenyl-4-propyl-3-pyridine carboxylate
MRS 1706	<i>N</i> -(4-acetylphenyl)-2-[4-(2,3,6,7-tetrahydro-2,6-dioxo-1,3-dipropyl-1 <i>H</i> -purin-8-yl)phenoxy]acetamide
NECA	5'- <i>N</i> -ethylcarboxamidoadenosine
PD81,723	(2-Amino-4,5-dimethyl-3-thienyl)-[3-(trifluoromethyl)phenyl]methanone
PKA	Protein kinase A
<i>R</i> -PIA	(<i>R</i>)- <i>N</i> ⁶ -(2-Phenylisopropyl)adenosine

List of Abbreviations

Sf9 cells	<i>Spodoptera frugiperda</i> cells
YFP	yellow fluorescent protein
ZM 241385	(4-(2-[7-amino-2-(2-furyl {1,2,4}-triazolo {2,3-a {1,3,5}triazin-5-yl- aminoethyl)phenol