



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Allosteric Modulation of 'Reproductive' GPCRs : a case for the GnRH and LH receptors

Heitman, L.H.

Citation

Heitman, L. H. (2009, April 22). *Allosteric Modulation of 'Reproductive' GPCRs : a case for the GnRH and LH receptors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13748>

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/1887/13748>

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



SAMENVATTING

Op dit moment zijn aan G eiwitten gekoppelde receptoren (GPCRs) aangrijpingspunt voor meer dan 30% van de geneesmiddelen op de markt. In de afgelopen jaren is er echter een afname van het aantal nieuw geïntroduceerde geneesmiddelen (niet alleen voor GPCRs), wat aangeeft hoe belangrijk het is om met nieuwe strategieën voor geneesmiddeltherapie te komen. Eén van deze nieuwe strategieën is de ontwikkeling van zogenaamde allosterische modulatoren. Allosterische liganden binden op een andere plaats dan het endogene ligand en zijn in staat om de vorm van de receptor te veranderen. Hierdoor wordt het farmacologische effect van het endogene ligand veranderd. De voordelen van allosterische modulatie zijn bijvoorbeeld een verbeterde receptor selectiviteit en het behouden van de fysiologie (duur en plaats) van een effect. In *Hoofdstuk 1* worden GPCRs en de recente ontwikkelingen in geneesmiddelenonderzoek rondom GPCRs, zoals allosterische modulatie verder toegelicht.

De verbinding tussen de hypothalamus, hypofyse en geslachtsdelen (de HPG-as) wordt gereguleerd door een aantal GPCRs, die een belangrijke rol spelen in de voortplanting en in geslachtshormoon-afhankelijke ziektes. Deze receptoren worden daarom ook wel ‘reproductieve’ GPCRs genoemd. In dit proefschrift spelen voornamelijk de gonadotrofine-releasing hormoon (GnRH) receptor en luteïniserend hormoon (LH) receptor een rol. Beide receptoren behoren tot klasse A GPCRs, die meestal opgebouwd zijn uit een korte extracellulaire amino-terminus (N-terminus), zeven transmembraan (7-TM) domeinen (α -helixen) die aan elkaar gekoppeld zijn door drie intracellulaire en drie extracellulaire lussen, eindigend met een intracellulaire carboxyl-terminus. Over het algemeen binden de endogene liganden van deze klasse GPCRs in het 7-TM domein, wat ook wel de orthostere bindingsplaats wordt genoemd. De LH receptor is echter een uitzondering, omdat het twee endogene liganden, LH en humaan choriogonadotrofine (hCG), heeft, welke aan de uitzonderlijk lange N-terminus binden. De endogene liganden van zowel de GnRH als de LH receptor zijn peptiden/eiwit hormonen met een hoog molecuul gewicht (HMW). Eén van de voordelen van allosterische modulatie van deze GPCRs is dat er liganden gemaakt kunnen worden met een laag molecuul gewicht (LMW) die oraal toegediend kunnen worden, wat niet het geval is voor peptiden en eiwitten, zoals GnRH en LH. *Hoofdstuk 2* geeft een overzicht van alle LMW liganden die tot nu toe ontwikkeld zijn voor de GPCRs van de HPG-as.

In *Hoofdstuk 3* komt allosterische modulatie van de GnRH receptor door amiloride derivaten (zoals HMA) en een niet-peptide antagonist (FD-1) aan de orde. Allereerst werd onderzocht of deze verbindingen een invloed hadden op de dissociatiesnelheid van een radioactief gemerkte peptide agonist (^{125}I -triptorelin) voor de GnRH receptor. Zowel HMA als FD-1

verhoogden de dissociatiesnelheid van ^{125}I -triptorelin, een indicatie voor allosterische remming. Het tegelijkertijd toevoegen van HMA en FD-1 resulteerde in een extra verhoging van de dissociatiesnelheid. Ten tweede werd het in een functionele analyse duidelijk dat HMA een niet-competitieve antagonist was, terwijl FD-1 zowel competitieve als niet-competitieve eigenschappen had. Bovendien werd de potentie van HMA om de dissociatiesnelheid te verhogen niet beïnvloed door de aanwezigheid van FD-1. Simulatie van deze data impliceerden dat de binding van HMA en FD-1 een neutrale coöperativiteit had. Samengenomen betekent dit dat HMA en FD-1 beide allosterische remmers zijn die op twee verschillende allosterische plaatsen binden in de GnRH receptor.

De binding van een nieuw LMW radioligand, $[^3\text{H}]\text{Org 43553}$, voor de LH receptor werd gekarakteriseerd in *Hoofdstuk 4*. Experimenten voor verzadiging en verdringing in een evenwichtsituatie werden ontworpen en geoptimaliseerd. De specifieke binding van $[^3\text{H}]\text{Org 43553}$ aan de LH receptor was verzadigbaar en had een hoge affiniteit ($K_D = 2.4 \pm 0.4 \text{ nM}$). Affiniteiten en potenties van vijf laag moleculaire derivaten van Org 43553 werden bepaald; een hoge correlatie tussen deze waarden werd vastgesteld. Een HMW radioligand, zoals ^{125}I -hCG, is niet bruikbaar voor het identificeren van nieuwe LMW verbindingen, omdat ze geen competitie met elkaar hebben voor dezelfde bindingsplaats. Dit nieuwe radioligand, $[^3\text{H}]\text{Org 43553}$, is daarom een belangrijke aanvulling voor het geneesmiddelenonderzoek voor de LH receptor.

In *Hoofdstuk 5* en *Hoofdstuk 6* werd $[^3\text{H}]\text{Org 43553}$ gebruikt om in een bibliotheek van 50 verbindingen te zoeken naar mogelijk nieuwe LMW liganden voor de LH receptor. Hierbij resulteerde het gebruik van radioligand-dissociatieexperimenten (om allosterische modulatoren te identificeren) in het vinden van zowel allosterische remmers (*Hoofdstuk 5*) als stimulators van Org 43553. Allereerst bleek een terphenyl derivaat een allosterische remmer van $[^3\text{H}]\text{Org 43553}$ binding aan de receptor te zijn. We besloten daarom om een serie van 25 terphenyl derivaten te synthetiseren. De meest potente allosterische remmer van deze serie was LUF5771, die bij een concentratie van $10 \mu\text{M}$ de dissociatiesnelheid van $[^3\text{H}]\text{Org 43553}$ 3.3-maal kon verhogen. Ten tweede werden er meerdere thiazolderivaten geïdentificeerd, die allosterische stimulators van $[^3\text{H}]\text{Org 43553}$ waren. In dit geval werd LUF5419 gekozen om verder te karakteriseren en het bleek dat deze verbinding de dissociatiesnelheid van $[^3\text{H}]\text{Org 43553}$ 2.4-maal kon vertragen bij $10 \mu\text{M}$. Beide verbindingen werden getest in een functioneel protocol, waar de aanwezigheid van LUF5771 resulteerde in een 2.4-maal verlaagde potentie van Org 43553, terwijl LUF5419 hierop geen effect had. Het maximale effect van (de partiële agonist) Org

43553 werd niet beïnvloed door LUF5771, maar LUF5419 verhoogde dit tot een volledige receptoractivatie, volkomen vergelijkbaar met recombinant LH (recLH). Interessant genoeg zorgde de aanwezigheid van LUF5771 ook in een verlaging van de potentie van recLH (en rec-hCG). LUF5419 had echter geen effect op receptoractivatie door recLH. LUF5771 is tot nu toe het eerste antagonistische/remmende LMW ligand voor de LH receptor. Vervolgens werd de potentie van LUF5771 om de dissociatiesnelheid van het radioligand te verhogen, verlaagd door de aanwezigheid van LUF5419. Dit betekent dat deze allosterische modulatoren op dezelfde allosterische plaats binden in de LH receptor.

In dit proefschrift werden radioligand-dissociatieexperimenten gebruikt om nieuwe allosterische modulatoren te identificeren. Dit werd echter op een kleinere schaal gedaan dan wat meestal in de industrie gebeurt. Hier wordt vooral gebruik van zogenaamde ‘high-throughput-screening (HTS)’ experimenten, waarvoor functionele analyses (zoals een luciferase reporter-gen experiment) zich beter lenen. In *Hoofdstuk 7* laten we echter zien dat een dergelijk experiment kan resulteren in vals-positieven. Het bleek dat één van de geteste verbindingen een potente luciferaseremmer was en dus geen ligand voor de LH receptor. Verdere karakterisatie liet zien dat het een competitieve remmer was van het enzym luciferase via de bindingsplaats van het substraat voor dit enzym, luciferine. Een zoektocht in een databank leverde een luciferaseremmer met een soortgelijke structuur. Daarom werd er een serie van verbindingen gesynthetiseerd, en de meest potente luciferaseremmer in die reeks had een IC_{50} waarde van $0.069 \pm 0.01 \mu M$. Om de bindingsplaats in luciferase van deze laatste verbinding te visualiseren, werden er moleculaire modellen gemaakt. Deze bevestigden inderdaad dat de luciferaseremmers op dezelfde plaats binden als luciferine. *Hoofdstuk 7* zou moeten dienen als een waarschuwing voor gebruikers van luciferase-reportergen-experimenten voor vals-positieven door inhibitie van het enzym in plaats van de receptor.

Tot slot worden in *Hoofdstuk 8* algemene conclusies getrokken over het onderzoek dat in dit proefschrift beschreven is. Ook worden de toekomstperspectieven voor dit onderzoek geschetst. In het kort levert dit proefschrift nieuwe inzichten op in de allosterische modulatie van ‘reproductieve’ GPCRs. De humane GnRH en LH receptor kunnen allosteer gemoduleerd worden, net zoals andere klasse A GPCRs. Tevens wordt duidelijk dat beide receptoren drie ligand-bindingsplaatsen bevatten, waarvan tenminste twee een aangrijpingspunt kunnen zijn voor LMW liganden. De aanwezigheid van deze allosterische bindingsplaatsen biedt nieuwe mogelijkheden voor de ontwikkeling van LMW en oraal toepasbare liganden voor de GnRH en LH receptor.