



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Time is of the essence - investigating kinetic interactions between drug, endogenous neuropeptides and receptor

Nederpelt, I.

Citation

Nederpelt, I. (2017, April 6). *Time is of the essence - investigating kinetic interactions between drug, endogenous neuropeptides and receptor*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/47526>

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/1887/47526>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/47526> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Nederpelt, I.

Title: Time is of the essence - investigating kinetic interactions between drug, endogenous neuropeptides and receptor

Issue Date: 2017-04-06

Samenvatting

In dit proefschrift zijn de kinetische bindingparameters van endogene liganden en potentiële geneesmiddelen en hun effect op signaaltransductie onderzocht, om een beter inzicht te krijgen in geneesmiddel-receptor interacties. Geneesmiddelenonderzoek programma's zijn voornamelijk gericht op evenwichtsparameters zoals affiniteit, maar potentiële geneesmiddelen stranden vaak in klinische onderzoeken door toxiciteit en/of een gebrek aan *in vivo* effectiviteit. In het afgelopen decennium wordt geneesmiddel-receptorkinetiek meer en meer gezien als een parameter die de *in vivo* geneesmiddelwerking beter kan voorspellen. Het verdient derhalve aanbeveling om deze kinetische bindingsparameters op te nemen in geneesmiddelenonderzoeksprogramma's om het hoge percentage mislukkingen terug te dringen. Om de rol van bindingskinetiek in ligand-receptor interacties te onderzoeken zijn twee G-eiwit gekoppelde receptoren (GPCRs) gebruikt als modelsysteem, namelijk de gonadotropine-vrijgevend hormoon (GnRH) receptor en de neurokinine 1 (NK1) receptor. Beide receptoren vallen onder de neuropeptide receptorfamilie en deze receptorfamilie speelt een belangrijke rol in het perifere en centrale zenuwstelsel. Dit maakt deze receptorfamilie een aantrekkelijk aangrijpingspunt in therapeutische gebieden zoals epilepsie, pijn en psychologische aandoeningen. Een grondig overzicht van neuropeptide receptoren, bindingskinetiek en kinetische bepalingsmethoden wordt gegeven in **Hoofdstuk 1**.

Potentiële geneesmiddelen zijn vaak in competitie met endogene liganden. Daarom is het van belang om meer kennis van de interacties tussen endogene liganden en de receptor te verkrijgen. Dit kan helpen bij het beter begrijpen van gewenste (kinetische) interacties tussen een potentieel geneesmiddel en de receptor. In **Hoofdstuk 2** worden nieuwe inzichten in het kinetische profiel van endogene neuropeptiden en hun receptoren behandeld. Uit een literatuurstudie van bindingskinetiek, receptor internaliseringskinetiek en ligand uitscheidingskinetiek voor drie voorbeelden van neuropeptide-receptor combinaties bleek dat de kinetische profielen van deze drie combinaties erg verschillend zijn. Samengevat geeft deze literatuurstudie aan dat het introduceren van het kinetische profiel van de receptor en z'n endogene ligand(en) tot een verbetering in het begrip van de gewenste bindingskinetiek van het potentiële geneesmiddel kan leiden. Dit kan dus resulteren in effectievere geneesmiddelen.

Eén van de uitdagingen in het onderzoeken van bindingskinetiek is het gebrek aan robuuste proeven die geschikt zijn voor het bestuderen van kinetische parameters. Om meer kinetische proeven beschikbaar te maken is een selectie van bekende GnRH receptor geneesmiddelen gebruikt om kinetische radioligand binding en TR-FRET (fluorescentie) studies op te zetten en te valideren in **Hoofdstuk 3**. Een competitieve associatie proef werd ontworpen voor beide kinetische proeven en hiermee konden de kinetische parameters van

twalf GnRH geneesmiddelen bepaald worden. Zowel de affiniteit als de dissociatiesnelheidswaarden kwamen goed overeen in de twee verschillende kinetische bepalingsmethoden. De associatie- en dissociatiesnelheden van de 12 GnRH geneesmiddelen waren erg verschillend, wat een belangrijke rol kan spelen in geneesmiddel-receptor interacties. Dit onderzoek heeft derhalve nieuwe kinetische perspectieven gegeven op bekende GnRH geneesmiddelen. Het meenemen van kinetische bindingsparameters kan toekomstige geneesmiddel onderzoek voor de GnRH receptor verbeteren.

De functionele effecten van twee kinetisch diverse GnRH agonisten, GnRH en busereline, uit **Hoofdstuk 3** zijn verder bestudeerd in **Hoofdstuk 4**. Een op morfologie-gebaseerde proef bleek erg geschikt voor het meten van receptor-gemedieerde responsen. Aanhoudende signaleringsprofielen werden waargenomen voor beide agonisten. Was-experimenten proeven toonden aan dat de aanhoudende signalering van snel dissociërend GnRH toe te schrijven was aan het opnieuw binden van de agonist aan de receptor. De aanhoudende signalering van langzaam dissociërend busereline werd hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt door langdurige receptorbinding. Deze bevindingen leggen nadruk op de impact van een langzame dissociatiesnelheid op langdurige receptoractivatie. Dit kan toekomstig onderzoek naar geneesmiddelen met een lange werkingsduur bevorderen.

In **Hoofdstuk 5** wordt een andere welbekende neuropeptide receptor beschreven, namelijk de NK1 receptor. Het belang van kennis van de bindingskinetiek van niet alleen toekomstige geneesmiddelen, maar ook endogene liganden is al besproken in **Hoofdstuk 2**. Daarom zijn de associatie- en dissociatiesnelheidsconstanten van endogene tachykinines en een aantal vergelijkbare analogen onderzocht. Het was opmerkelijk dat de bindingskinetiek van de onderzochte tachykinines erg verschillend was, met name de associatiesnelheden. Bovendien correleerden de kinetische bindingsparameters zeer goed met het maximale effect en 'potency' waarden *in vitro*. Deze resultaten tonen grote verschillen aan in de bindingskinetiek van endogene tachykinines en benadrukken het belang van het meten van bindingskinetiek voor niet alleen potentiële geneesmiddelen, maar ook de endogene liganden waarmee zij in competitie zijn.

Hoofdstuk 6 is gericht op het ophelderen van de ontbrekende schakel tussen bindingskinetiek en signaaltransductie, om het begrip van geneesmiddel werking *in vivo* te verbeteren. De effecten van twee NK1 receptor antagonist met variabele dissociatiesnelheden werden onderzocht in combinatie met twee endogene tachykinines met variabele associatiesnelheden. We toonden aan dat diverse kinetische bindingsprofielen van zowel antagonist als endogene agonisten, tot verschillende signaaltransductieprofielen kunnen leiden. Deze resultaten waren consistent onder verschillende proef condities, cellulaire

achtergronden en in wiskundige modellen. Dit onderzoek toont aan dat kennis van de wisselwerking tussen bindingskinetiek en cellulaire responsen belangrijk is voor een verbeterd begrip van geneesmiddel effectiviteit.

Samenvattend, meerdere kinetische bindingsproeven (zoals radioligand binding en TR-FRET studies) en kinetische functionele proeven (zoals cAMP en morfologie studies) werden ontworpen en gevalideerd. Hiermee is de bindingskinetiek en de rol daarvan in signaaltransductie van verschillende endogene liganden en potentiële geneesmiddelen onderzocht. Significante verschillen in de kinetische profielen van endogene neuropeptiden en bekende geneesmiddelen werden waargenomen en deze verschillen zorgden ook voor variabele functionele effecten *in vitro*. Deze conclusies zijn besproken in **Hoofdstuk 7**. De bevindingen besproken in dit proefschrift kunnen bijdragen aan een uitgebreid instrumentarium, geschikt voor het onderzoeken van kinetische ligand-receptor interacties. Kennis van de kinetische bindingsparameters van potentiële geneesmiddelen en endogene liganden kan een belangrijke rol spelen in het ophelderen van ligand-receptor interacties en kan resulteren in betere geneesmiddel onderzoeksprogramma's.

