



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The ins and outs of ligand binding to CCR2

Zweemer, A.J.M.

Citation

Zweemer, A. J. M. (2014, November 20). *The ins and outs of ligand binding to CCR2*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/29763>

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/1887/29763>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/29763> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Zweemer, Annelien

Title: The ins and outs of ligand binding to CCR2

Issue Date: 2014-11-20

Samenvatting

In dit proefschrift zijn verschillende benaderingen onderzocht die leiden tot inhibitie van de chemokine receptor CCR2, een receptor die behoort tot de klasse van G-eiwit gekoppelde receptoren (GPCRs). CCR2 is betrokken bij diverse ziektebeelden, en daarom is er een groot aantal antagonisten voor deze receptor ontwikkeld gedurende de afgelopen jaren. Desondanks is er nog geen enkel geneesmiddel gericht tegen CCR2 op de markt gebracht, omdat geen van alle antagonisten effectief is gebleken in klinische studies. Om deze situatie te kunnen verbeteren is een beter begrip van het werkingsmechanisme van CCR2 antagonisten noodzakelijk, waarmee de doelstelling van het onderzoek in dit proefschrift is geformuleerd.

In **Hoofdstuk 1** werden de belangrijkste begrippen en onderwerpen van dit onderzoek geïntroduceerd. Vervolgens werd de familie van chemokines en chemokine receptoren uitvoeriger toegelicht en besproken in **Hoofdstuk 2**. In totaal bestaan er 23 verschillende chemokine receptoren, die door één of meerdere van de 48 chemokine liganden kunnen worden geactiveerd. In dit hoofdstuk werden de veelzijdige regulatiemechanismen van chemokine signalering op een systemisch, een cellulair en een moleculair niveau beschreven. De nadruk lag hierbij op 'biased signalling' dat plaatsvindt op moleculair niveau, een fenomeen dat momenteel van grote interesse is in de moleculaire farmacologie. Een beter begrip van al deze factoren tezamen zal bijdragen aan de ontwikkeling van effectievere geneesmiddelen gericht op chemokine receptoren.

In **Hoofdstuk 3** werd een selectie van CCR2 antagonisten bekend uit de literatuur bestudeerd in diverse farmacologische radioligand binding studies en functionele studies. Al deze antagonisten verdrongen de endogene agonist ^{125}I -CCL2 van CCR2 met nanomolaire affiniteit. Twee antagonisten, INCB3344 en CCR2-RA, werden voorzien van een radioactief label zodat de binding van deze moleculen gedetailleerd kon worden bestudeerd. ^3H -INCB3344 en ^3H -CCR2-RA bleken op twee verschillende plekken aan de receptor te binden, aangezien deze antagonisten elkaar niet verdrongen van de receptor. Vervolgens werd inhibitie van CCR2 bestudeerd in functionele studies. INCB3344 inhibeerde CCL2-geïnduceerde G eiwit activatie op een competitieve manier, terwijl CCR2-RA een niet-competitief en allosteer karakter vertoonde in deze studies. Deze resultaten toonden aan dat de CCR2 antagonisten die in dit hoofdstuk beschreven werden, geclassificeerd kunnen worden in twee groepen met een verschillende bindingsplek en een verschillend werkingsmechanisme.

In **Hoofdstuk 4** werd de zoektocht naar de bindingsplek van de allosterische antagonisten CCR2-RA-[R], JNJ-27141491 en SD-24 beschreven. Allereerst werd een benadering met chimere CCR2/CCR5 receptoren gebruikt om inzicht te krijgen in de locatie van de bindingsplaats, waarna acht puntmutaties werden geïntroduceerd in de receptor om deze bindingsplaats verder te karakteriseren. De receptorconstructen werden bestudeerd in radioligand binding

studies en functionele studies, die beiden bewijs leverden voor de aanwezigheid van een intracellulaire bindingsplek voor CCR2-RA-[R], JNJ-27141491 en SD-24. De meest belangrijke aminozuren voor de binding van deze liganden waren de zeer geconserveerde tyrosine Y^{7.53} en de fenylalanine F^{8.50} in het NPxxYX_(5,6)F motief, samen met de valine V^{6.36} aan de onderkant van TM-VI en de lysine K^{8.49} in helix-VIII. Door middel van deze resultaten werd voor het eerst de aanwezigheid van een allosterische intracellulaire bindingsplek voor CCR2 antagonisten aangetoond.

In **Hoofdstuk 5** werd de ontdekking van een derde bindingsplaats in de CCR2 receptor beschreven, waardoor amiloride-derivaten en natrium-ionen de receptor kunnen moduleren. In radioligand binding studies werd aangetoond dat het amiloride-derivaat HMA de binding van de agonist ¹²⁵I-CCL2, de orthostere antagonist [³H]-INCB3344 en de intracellulaire antagonist [³H]-CCR2-RA-[R] op allosterische wijze remde. In diezelfde studies werd ontdekt dat natrium ionen enkel de agonist ¹²⁵I-CCL2 remden, terwijl de binding van [³H]-CCR2-RA-[R] op allosterische wijze werd verhoogd. Drie aminozuren die zich in het hart van de receptor bevinden, D^{2.50}, W^{6.48} en H^{7.45}, bleken belangrijk te zijn voor deze allosterische modulatie, omdat mutatie van deze aminozuren het effect van HMA en de natrium-ionen deed verminderen of verdwijnen. Door middel van dit onderzoek werd aangetoond dat CCR2 ten minste drie bindingsplaatsen voor synthetische liganden van de CCR2 receptor heeft.

Hoofdstuk 6 was gericht op het ontwerp van orthostere CCR2 antagonisten met een hoge affiniteit en lange verblijfstijd op de receptor. Deze antagonisten deelden de CCR2 bindingsplaats van INCB3344. Een competitie associatie studie werd opgezet voor CCR2, die het mogelijk maakte om de relatie tussen de structuur van het ligand en zijn verblijfstijd op de receptor te onderzoeken (structuur–kinetiek relatie (SKR)), alsmede de traditionele structuur–affiniteit relatie (SAR). Door de opgedane kennis van SAR en SKR te combineren, werd het optimalisatieproces van cyclopentylamine CCR2 antagonisten opnieuw geëvalueerd. Optimalisatie op basis van affiniteit resulteerde in een antagonist met hoge affiniteit ($K_i = 6.8$ nM) maar zeer korte verblijfstijd (2.4 min). Daarentegen, wanneer de optimalisatie geschiedde op basis van de verblijfstijd, leidde dit tot de ontdekking van een nieuwe CCR2 antagonist met hoge affiniteit ($K_i = 3.6$ nM) en een verblijfstijd van 135 minuten.

Samengevat biedt dit proefschrift nieuw *inzicht* en *uitzicht* op de binding en werking van liganden voor de CCR2 receptor. Er zijn drie verschillende bindingsplaatsen voor liganden van deze receptor ontdekt en gelokaliseerd, waardoor CCR2 op verschillende wijzen farmacologisch kan worden gemoduleerd. De conclusies van deze bevindingen en het toekomstperspectief voor dit onderzoek zijn beschreven in **Hoofdstuk 7**. Deze resultaten kunnen leiden tot een rationeler ontwerp van toekomstige antagonisten, en zijn even zo

belangrijk om uitkomsten van studies met huidige CCR2 antagonisten te interpreteren. In samenhang met de huidige ontwikkeling van de kennis over de structuur en signaleringscapaciteiten van GPCRs, biedt dit werk mogelijkheden om de farmacologische modulatie van de CCR2 receptor op precieze wijze te reguleren, alsmede van GPCRs in het algemeen.

