



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Targeting the adenosinergic system: Ligand binding kinetics and label-free assays for the study of SLC29A1 transporter and A2B adenosine receptor

Vlachodimou A.

Citation

Targeting the adenosinergic system: Ligand binding kinetics and label-free assays for the study of SLC29A1 transporter and A2B adenosine receptor. (2020, November 4). *Targeting the adenosinergic system: Ligand binding kinetics and label-free assays for the study of SLC29A1 transporter and A2B adenosine receptor.* Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/138132>

Version: 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/1887/138132>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/138132> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Vlachodimou, A.

Title: Targeting the adenosinergic system: Ligand binding kinetics and label-free assays for the study of SLC29A1 transporter and A2B adenosine receptor

Issue Date: 2020-11-04

Nederlandse Samenvatting

Adenosine is een endogeen ligand dat zijn werking uitoefent door adenosinereceptoren (AR's) te activeren. De concentraties ervan in het lichaam worden gecontroleerd door een verscheidenheid aan mechanismen en eiwitten, waaronder de equilibratieve nucleosidetransporters (ENT's). Veranderingen in de adenosineconcentraties zijn betrokken bij een veelvoud van pathofysiologische aandoeningen. Daarom spant men zich in om geneesmiddelen te ontdekken die gericht zijn op de AR's en ENT's. Er zijn vier subtypes AR's (A_1 , A_{2A} , A_{2B} en A_3) en evenzovele ENT's (ENT1-4). Met uitzondering van adenosine zelf en de natuurlijke producten cafeïne, theobromine en theofylline, zijn er momenteel alleen een A_{2A} -AR-agonist en -antagonist, evenals twee niet-selectieve ENT1 (SLC29A1)-remmers op de markt. Daarom is het van cruciaal belang om nieuwe concepten te bestuderen die ons in staat stellen ons begrip van het werkingsmechanisme op moleculair niveau te vergroten, evenals het ontwikkelen van fysiologisch relevante bepalingmethoden om kandidaat-geneesmiddelen in vroege stadia van het geneesmiddelonderzoek te evalueren. Zodoende richt dit proefschrift zich op het verkennen van het concept van bindingskinetiek voor twee adenosinerge aangrijpingspunten, namelijk de A_{2B} -AR en ENT1, en op het ontwikkelen van nieuwe kinetische bindings- en labelvrije functionele assays.

Hoofdstuk 1 introduceert het adenosinerge systeem en de complexiteit ervan, naast de verschillende "spelers" betrokken bij het reguleren van de adenosineniveaus. Vervolgens wordt de noodzaak van farmacologische interventie van de adenosinerge doelen besproken met nadruk op de studie van de bindingskinetiek en de ontwikkeling van traditionele op radioliganden gebaseerde en labelvrije assays. **Hoofdstuk 2** begint met een inleiding tot de twee grootste families van membraaneiwitten, de G-eiwit gekoppelde receptoren (GPCR's) en de solute carrier family (SLC's), met een focus op de AR's en de ENT's. Het samenspel tussen GPCR's en SLC's en de mogelijke therapeutische strategieën die kunnen worden ontwikkeld, worden besproken. Voornamelijk het *in vitro* en *in vivo* bewijs voor therapeutisch effecten als gevolg van indirecte beïnvloeding van de vier AR's via remming van ENT1 wordt in dit hoofdstuk beschreven.

Hoofdstuk 3 richt zich op de studie van A_{2B} -AR-antagonisten. De synthese van een reeks op 8-fenylxanthine gebaseerde antagonisten wordt beschreven, gevolgd door hun biologische evaluatie. [3 H]PSB 603 wordt geïntroduceerd en uitgebreid gekarakteriseerd als een hulpmiddel voor gebruik bij radioligand-bindingsexperimenten. De ontwikkeling van een radioligand-bindingsmethode en

een competitie-associatie test maakte het mogelijk de affiniteit voor de onderzochte stoffen te bepalen. Daarnaast werd hun binding aan de receptor verder geëvalueerd vanuit een kinetisch perspectief, wat aantoonde dat de dissociatiesnelheidsconstante k_{off} de drijvende kracht is voor affiniteit. Uiteindelijk werd een op impedantie gebaseerde labelvrije assay ontwikkeld voor de studie van de A_{2B} AR-farmacologie. Twee structureel vergelijkbare verbindingen met uiteenlopende kinetische profielen werden geëvalueerd in deze functionele assay en er werd een verband aangetoond tussen bindingskinetiek, vooral een lange verblijftijd (RT), en een verlengd farmacologisch effect onder niet-evenwichtsomstandigheden.

In tegenstelling tot de goed bestudeerde GPCR's, zijn SLC's belangrijke maar weinig onderzochte eiwitten wegens het ontbreken van beschikbare testen. **Hoofdstuk 4** gaat in op de behoefte aan nieuwe functionele testen om SLC's te bestuderen en beschrijft de ontwikkeling van een labelvrije methode met hele cellen die de functionele beoordeling van ENT1-remmers mogelijk maakt. Rekening houdend met het feit dat het endogene ENT1-substraat, d.w.z. adenosine, ook een ligand is voor AR's, wordt verondersteld dat remming van ENT1 de extracellulaire concentratie van adenosine verandert. Deze verandering beïnvloedt AR-signalering, wat wordt gemonitord door een op impedantie gebaseerde biosensor. Na optimalisatie van de testcondities werden de effecten van drie referentie-ENT1-remmers gevolgd. Interessant is dat alle remmers resulteerden in een verhoogde schijnbare potentie van adenosine voor de AR. Bovendien verhoogden alle remmers op concentratie-afhankelijke wijze de extracellulaire adenosineconcentratie, wat resulteerde in een indirecte kwantitatieve beoordeling van hun activiteit. Ten slotte werd AR-activering tenietgedaan door AR-antagonisten, wat bevestigt dat de gecontroleerde impedantie AR-gemedieerd (met name A_{2B} AR) was en dus de assay valideerde. De ENT1-transporter is dus de eerste SLC die "gemeten" kon worden via gelijktijdige AR-signalering. Deze methode heeft het derhalve in zich om breed te worden toegepast voor de studie van een groot aantal SLC/GPCR-paren die een gemeenschappelijk substraat/ligand delen.

Hoofdstuk 5 beschrijft de farmacologische karakterisering van vier referentie-ENT1-remmers vanuit een kinetisch perspectief. [3 H]NBTI wordt uitgebreid gekarakteriseerd en gebruikt als hulpmiddel voor alle ENT1-gerelateerde radioligand-bindingsstudies. Na de ontwikkeling van een competitie-associatie test die de kwantificering van de bindingskinetiek mogelijk maakte, werden de kinetische bindingsparameters van de referentieremmers bepaald naast de meer traditionele affiniteitsparameters. Een van de referentieremmers, draflazine, vertoonde een langere RT, vandaar dat een reeks verbindingen met dezelfde basisstructuur werd beoordeeld. Structuur-kinetiekrelaties (SKR) voor ENT1-remmers werden voor het eerst opgesteld, naast de meer klassieke structuur-affiniteitsrelaties (SAR). Dit onthulde een verbinding met een RT van meer dan 10 uur. Uiteindelijk werd de, in hoofdstuk 4 ontwikkelde, labelvrije techniek gebruikt om de impact van verschillen in ENT1-remmende bindingskinetiek in een functionele assay te evalueren. De activiteit van de langste RT-verbinding nam toe met langere incubatietijden, een effect dat niet werd waargenomen voor draflazine. Hierdoor werd het belang van

lange RT voor een grotere “target” bezetting en een daaruit volgende groter effect ondersteund.

Hoofdstuk 6 beschrijft de kinetische studie van een nieuwe reeks spirobenzoxazinepiperidinonderivaten als ENT1-remmers. Met behulp van de radioligand-bindingsstudies die in **hoofdstuk 5** zijn ontwikkeld, hebben we een reeks van 29 verbindingen in verdringing-, competitie associatie- en wash-out-experimenten beoordeeld om hun bindingsaffiniteit- en bindingskinetische parameters te evalueren. Hiervan werd een uitgebreide SKR-studie uitgevoerd naast een SAR-analyse met betrekking tot ENT1-binding. We ontdekten dat de grotere substituenten aan de “rechter” fenyrling goed werden verdragen, terwijl hydrofobe of ongeladen substituenten bij fysiologische pH een hoge affiniteit en een lange RT voor het doelwit opleverden. Daarnaast bonden verbindingen sneller aan de transporter, wanneer de polariteit van de basisstructuur werd verlaagd. Correlatieplots lieten zien dat substituenten aan de “rechter” fenyrling verantwoordelijk kunnen zijn voor langdurige binding en dus voor een langer farmacologisch effect van de remmers. Daarentegen is de samenstelling van de hoofdring verantwoordelijk voor een snelle binding aan het doeleiwit en een onmiddellijk effect. Samengevat tonen de resultaten van de **hoofdstukken 3, 5 en 6** het belang aan van het aanscherpen van de ontwerpcriteria die worden gebruikt bij het ontdekken van geneesmiddelen met bindings-kinetische parameters. Deze kinetische benadering kan resulteren in een andere selectie van kandidaatmoleculen en zou het toekomstig geneesmiddelonderzoek kunnen inspireren op het gebied van adenosinerge doelen en membraaneiwwitten in het algemeen.

Ten slotte wordt in **hoofdstuk 7** een algemene conclusie gepresenteerd die de resultaten samenvat die in dit proefschrift worden beschreven, evenals de toekomstige mogelijkheden die hierdoor worden gecreëerd. Hopelijk zullen de nieuwe inzichten die in dit proefschrift zijn verkregen belangrijk inzicht verschaffen voor toekomstige projecten voor het ontdekken van geneesmiddelen die A_{2B} AR en ENT1 beïnvloeden, evenals voor andere paren van GPCR's en SLC's.

