



Universiteit
Leiden

The Netherlands

The good? The bad? The mutant! Characterization of cancer-related somatic mutations and identification of a selectivity hotspot in adenosine receptor

Wang, X.

Citation

Wang, X. (2022, September 20). *The good? The bad? The mutant!: Characterization of cancer-related somatic mutations and identification of a selectivity hotspot in adenosine receptor*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3464232>

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/1887/3464232>

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

Samenvatting

G-proteïnegekoppelde receptoren (GPCRs), één van de grootste families van membraanewitten, reageren op een diverse reeks fysiologische endogene liganden, waaronder hormonen en neurotransmitters. Door hun verschillende ligand-bindende domeinen en hun gevoeligheden voor een diverse reeks liganden is aangetoond dat deze eiwitten zeer 'druggable' zijn. Ze vormen het belangrijkste doelwit voor naar schatting 30% van de goedgekeurde geneesmiddelen. Een groeiend aantal bewijzen toont een prominente rol aan voor GPCRs in alle fasen van kanker, met een mutatiefrequentie van ongeveer 20% in alle kankers. Mutaties die optreden in GPCRs kunnen hun normale functie ernstig veranderen, zelfs zodanig dat hun fysiologische in een pathologische rol verandert. Een bepaalde klasse van rodopsine-achtige GPCRs die in dit proefschrift zijn opgenomen, is die van de adenosinereceptoren (ARs). Vanwege de accumulatie van adenosine in de tumor micro-omgeving kunnen alle vier de subtypes van ARs aangrijpingspunten zijn voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen voor de behandeling van kanker. Voor elk van de vier subtypes is een aantal somatische mutaties geïdentificeerd in monsters van kankerpatiënten. In dit proefschrift hebben we de impact bepaald van deze mutaties op receptoractivering en ligandbinding met behulp van referentie-adenosinereceptorliganden, en op deze farmacologische eindpunten.

Hoofdstuk 1 dient als inleiding en behandelt de belangrijkste concepten in dit proefschrift. **Hoofdstuk 2** gaat verder met de strategieën van het gebruik van gist-systemen in menselijke GPCR-onderzoeken met een focus op adenosinereceptoren. Het hoofdstuk begint met algemene kenmerken van gistcellen met meerdere modificaties in de gistferomoon signaleringsroute voor menselijke GPCR-onderzoeken. Vervolgens worden studies over de expressie en functionaliteit van ARs in gistsystemen die ARs tot expressie brengen, beschreven. **Hoofdstuk 3** geeft een overzicht van het huidige bewijs voor de betrokkenheid van GPCRs en hun signaalroutes in de tumorbiologie, evenals het effect van mutaties in de receptorfarmacologie en hun mogelijke effecten op de ontwikkeling en progressie van kanker. Bovendien wordt het bewijs voor ARs bij de ontwikkeling van kanker in detail besproken.

Aangezien mutaties van de adenosinereceptoren zijn geïdentificeerd in monsters van kankerpatiënten, wordt in **Hoofdstuk 4-6** informatie gegeven over de impact van deze mutaties op de receptorfunctionaliteit. **Hoofdstuk 4** richt zich op receptor-expressie en activering van kanker-gerelateerde mutaties op adenosine A_{2B} receptoren (A_{2B} AR) met behulp van het bovengenoemde gemanipuleerde gistsysteem, gecodeerd als MMY24. De 15 kanker-gerelateerde mutaties die in dit hoofdstuk zijn opgenomen, zijn geïdentificeerd als kankerspecifiek. Deze mutaties resulteerden in 3 constitutief actieve mutanten (CAM), 5 minder actieve mutanten (LAM), 4 geen effect-mutanten (NEM) en 3 functieverliesmutanten (LFM). Van de CAM's zette de ge-

muteerde receptor Y202C^{5,58}, die zich op een GPCR-activeringsschakelaar bevindt, de receptor vast in een actieve conformatie. Alle drie LFM's bevinden zich op/bij de meest geconserveerde residuen van de transmembraanhelices, wat de belangrijke rol van deze residuen in de receptorfunctionaliteit van A_{2B}AR aangeeft.

De effecten van kanker-gerelateerde mutaties in adenosine A₁ receptoren (A₁AR) op receptoractivering en ligandbinding worden beschreven in **Hoofdstuk 5** en **6**. **Hoofdstuk 5** beschrijft twaalf mutaties die zich in de loopregio's bevinden. Door hetzelfde gistsysteem te gebruiken, hebben we 1 CAM, 7 constitutief inactieve mutanten (CIM), 1 LFM en 3 NEM's gekarakteriseerd. Alle gemuteerde receptoren die in de extracellulaire loops (EL's) werden gevonden, vertoonden verminderde constitutieve activiteit en/of potentie van referentie-agonist CPA, evenals verminderde affiniteit van DPCPX, een prototypische antagonist. In een aan zoogdieren gerelateerd testsysteem weken de effecten van mutaties op receptoractivering af van het gistsysteem, vooral voor mutaties L113F^{34,51} en L211R^{5,69} die zich op intracellulaire loops (IL's) bevinden. Het gistsysteem dat in dit proefschrift wordt gebruikt is mogelijk niet geschikt voor het onderzoeken van mutaties in de receptor-G-eiwitinteractie-interface, vanwege het gebrek aan gelijkheid met het menselijke G_q-eiwit. **Hoofdstuk 6** richt zich op 13 mutaties gepositioneerd in de 7-transmembraan (7-TM) domeinen, resulterend in 2 CAMs, 5 CIMs en 6 LFMs. Net als bij A_{2B}AR vertoonden mutaties op of nabij geconserveerde residuen in GPCRs een verminderde receptoractivering. De CAM H78L^{3,23} zette de receptor vast in een actieve conformatie met een extreem hoge constitutieve activiteit. Sommige van de mutaties op de residuen die naar het celmembraan wijzen vertoonden uiteenlopende effecten op de receptoractivering tussen het gist- en zoogdierexpressiesysteem. De meeste van deze kanker-gerelateerde mutaties in zowel A_{2B}AR als A₁AR beïnvloeden de activering van receptoren, en kunnen uiteindelijk de kenmerken van kanker waar adenosine en adenosinereceptoren een sleutelrol spelen veranderen.

Hoofdstuk 7 rapporteert de aanpak voor de identificatie van een stereoselectiviteitshotspot in de herkenning van A_{2B}AR vanuit zowel computationele als experimentele aspecten. Met een A_{2B}AR-homologiemodel konden we de selectiviteitshotspot voor stereoselectieve antagonistherkenning voorspellen. Moleculaire modellering suggereerde dat de structurele determinanten van dit selectiviteitsprofiel residu V250^{6,51} op A_{2B}AR en (S)-ISAM-140 als het actieve stereo-isomeer van het ligand zouden zijn. De enantiomeren van ISAM-140 werden gescheiden en hun absolute configuraties werden eenduidig toegewezen via een combinatie van semipreparatieve chirale HPLC, circulair dichroïsme spectroscopie en röntgenkristallografie. De stereospecifieke bindingsmodus werd vervolgens bevestigd door plaatsgerichte mutagenese-experimenten en radioligandbindingsassays. Hogere affiniteit van (S)-ISAM-140 werd verkregen op A_{2B}AR en een gedeeltelijk herstelde affiniteit voor beide stereo-isomeren werd waargenomen op de L249V^{6,51} A_{2A}AR-mutant (de A_{2B}AR-achtige mutatie). Dit effect werd verklaard op basis van structuur-energiemodellering via

rigoureuze vrije-energieverstoringsberekeningen (FEP).

De algemene conclusies uit de resultaten van de afzonderlijke experimentele hoofdstukken worden in detail besproken in **hoofdstuk 8**. Dit hoofdstuk biedt ook toekomstperspectieven en uitdagingen die uit het onderzoek beschreven in dit proefschrift naar voren komen.