



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Sensing transport: label-free in vitro assays as an atTRACTive alternative for solute carrier transporter drug discovery

Sijben, H.J.

Citation

Sijben, H. J. (2022, November 23). *Sensing transport: label-free in vitro assays as an atTRACTive alternative for solute carrier transporter drug discovery*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3487027>

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/1887/3487027>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Transporteiwitten zijn aanwezig in vrijwel alle biologische membranen van de cellen van levende organismen. Deze zogenaamde ‘transporters’ zijn benodigd voor een cel om nutriënten op te nemen en afval uit te scheiden, om er voor te zorgen dat de cel kan groeien, overleven en communiceren met naburige cellen. De grootste klasse van transporters is de superfamilie van de solute carriers (SLCs, lett. ‘vervoerders van opgeloste stoffen’). De mens bevat genen voor meer dan 450 SLCs die verdeeld kunnen worden in 66 subfamilies, elk met zijn eigen specifieke substraten en transportmechanisme. Dankzij de cruciale rol die SLCs spelen in het goed functioneren van cellen, is het niet verrassend dat SLCs ook betrokken zijn bij vele ziekten. Tot dusver zijn enkele SLCs het aangrijpingspunt van vaak voorgeschreven geneesmiddelen, zoals neurotransmittertransporters (antidepressiva) en natrium-kalium-chloridetransporters (lisdiuretica). De overgrote meerderheid van SLCs is echter nog nauwelijks bestudeerd, ondanks hun enorme potentie als aangrijpingspunt voor geneesmiddelen. Mede hierdoor is er vraag naar de ontwikkeling van nieuwe methoden die gebruikt kunnen worden om de functie van SLCs te bestuderen en modulatoren (bijv. remmers) te identificeren. De voordelen en beperkingen van de huidige in vitro methoden (‘petrischaal’-experimenten) om SLCs te bestuderen, worden in Hoofdstuk 1 samengevat. Bovendien wordt het concept van op cellen gebaseerde labelvrije methoden geïntroduceerd als een innovatieve aanpak om transportfunctionaliteit te bestuderen in een omgeving die dichter dan gebruikelijk in de buurt komt van het fysiologische milieu van een cel. In de vijf experimentele hoofdstukken van dit proefschrift wordt de op impedantie gebaseerde technologie xCELLigence gebruikt als dé methode voor het ontwikkelen en toepassen van nieuwe functionele methoden voor drie soorten SLCs: de dopamine- (DAT), noradrenaline- (NET) en glutamaattransporters (EAAT).

In de mens leidt de activatie van G-eiwitgekoppelde receptoren (GPCRs) op het celmembraan tot cellulaire responsen die een breed scala aan fysiologische processen beïnvloeden. Enkele lichaamseigen liganden die deze GPCRs activeren, zoals neurotransmitters of signaallipiden, worden door SLCs vanuit de extracellulaire ruimte de cel in getransporteerd. Deze vorm van regulatie is nodig om excessieve activatie van GPCRs te voorkomen. Daarnaast ligt dit principe aan de basis van geneesmiddelen die zulke SLCs remmen (bijv. antidepressiva), waardoor de extracellulaire hoeveelheid van de lichaamseigen liganden wordt verhoogd. Alhoewel er in de afgelopen eeuw enkele van deze SLC–GPCR ‘paren’ werden geïdentificeerd, zijn er recentelijk nieuwe inzichten ontstaan over regulerende mechanismen waarmee transporters receptoractivatie kunnen moduleren. Hoofdstuk 2 beschrijft SLCs die de uitstroom van liganden faciliteren, evenals SLCs die liganden toegang verlenen tot intracellulaire receptoren. Het identificeren van zulke mechanismen kan bijdragen aan het begrijpen van ziekteoorzaken en het selecteren van aangrijpingspunten voor geneesmiddelontwikkeling.

Hoofdstuk 3 beschrijft de ontwikkeling van de ‘transportactiviteit via receptor activatie’ (TRACT) methode voor de humane dopaminetransporter (DAT, SLC6A3), die een aangrijpingspunt is voor de behandeling van depressie en middelenmisbruik. Het belangrijkste substraat van DAT, dopamine, is een lichaamseigen agonist (activator) van dopamine- en adrenerge receptoren. Activatie van deze receptoren op levende cellen leidt tot veranderingen in de celmorfologie, hetgeen in ‘real-time’ gemeten kan worden als een verandering in elektrische impedantie met de labelvrije technologie xCELLigence. In twee humane cellijnen met heterologe expressie van DAT werd activatie van de dopaminereceptor D1 (D1R) of de alfa-2 adrenerge receptor (α 2R) door dopamine verzwakt, omdat een deel van de extracellulaire dopamine door DAT in de cel werd opgenomen. Farmacologische blokkade of de afwezigheid van DAT resulteerde in het herstel van deze receptoractivatie. Hierdoor ontstond een farmacologisch raamwerk (d.w.z. het verschil tussen de maximale en minimale respons) dat het mogelijk maakte om de werkingssterkte (potentie) te bepalen van twee goed bestudeerde DAT-remmers: GBR12909 en cocaïne. Dit hoofdstuk toont een nieuwe toepassing van een celgebaseerde labelvrije biosensor, die gebruikt kan worden om nieuwe DAT-remmers te vinden.

In Hoofdstuk 4 wordt het concept van de TRACT methode uitgebreid naar de humane noradrenalinetransporter (NET, SLC6A2), die een bekend aangrijpingspunt is voor geneesmiddelen ter behandeling van een reeks psychiatrische aandoeningen. In onze studie werd NET tot overexpressie gebracht in een induceerbare humane embryonale nier 293 (HEK293)-JumpIn cellijn, die tevens endogeen α 2R tot expressie brengt. Drie lichaamseigen substraten van NET – noradrenaline, dopamine en adrenaline – konden α 2R activeren, wat leidde tot een concentratieafhankelijke cellulaire respons. Deze respons werd voor alle drie de substraten verzwakt in aanwezigheid van NET en kon worden hersteld door de NET-remmer nisoxetine. Met behulp van noradrenaline als substraat zijn de werkingssterktes van verschillende gerapporteerde NET-remmers bepaald met de TRACT methode, welke goed overeenkwamen met de werkingssterktes die bepaald waren met een conventionele opnamemethode van een fluorescent substraat. Bovendien werd de methode gevalideerd in een handmatige ‘high-throughput screening’ (HTS)-opstelling, hetgeen suggereert dat de TRACT methode gebruikt kan worden voor het screenen van hele bibliotheken van NET-remmers.

In Hoofdstuk 5 werd de TRACT methode van Hoofdstuk 4 toegepast voor het screenen van een reeks moleculen waarvan met behulp van een in silico (computergestuurde) modelleringspijplijn werd voorspeld dat ze NET-remmers zouden zijn. Gelijkwaardigheidsnetwerken (similarity networks) werden gebruikt om een selectie te maken van de bioactiviteitsgegevens van SLCs uit de ChEMBL-database, die vervolgens werden gebruikt om een proteochemometrisch (PCM) model te trainen. Na verdere optimalisatie werd dit model toegepast om de Enamine REAL-database, die meer dan 600 miljoen ‘make-on-demand’ moleculen bevat, te screenen. Uit elk van de resulterende 46 chemisch diverse clusters werden de moleculen met de hoogste voorspelde affiniteitswaarden geselecteerd, waarvan uiteindelijk 32 moleculen werden gekocht voor in vitro experimenten. Met behulp van de TRACT methode bleken vijf moleculen een submicromolaire werkingssterkte te hebben op NET. Dit hoofdstuk laat zien dat de TRACT methode met succes kan worden

gebruikt om onbekende NET-remmers te identificeren en karakteriseren.

Hoofdstuk 6 beschrijft de ontwikkeling van een op impedantie gebaseerde fenotypische methode voor de natrium-afhankelijke exciterende aminozuurtransporters (EAATs, SLC1 familie), die betrokken zijn bij de opname van glutamaat en aspartaat in het centrale zenuwstelsel en perifere weefsels. Initieel werd gepoogd een TRACT methode op te zetten voor EAAT1 door gebruik te maken van HEK293-JumpIn cellen met induceerbare expressie van EAAT1 en tijdelijke expressie van de metabotrope glutamaatreceptor 2 (mGluR2). De aanwezigheid van EAAT1 zorgde voor een verzwakking van de door glutamaat geïnduceerde mGluR2-respons. Deze respons kon echter niet consistent worden hersteld door twee EAAT1-remmers. Interessant was dat er een receptoronafhankelijke glutamaatrespons werd waargenomen in cellen zonder mGluR2, welke concentratieafhankelijk kon worden geblokkeerd door EAAT1-remmers UCPH-101 en TFB-TBOA. Met behulp van microscopie op de levende cellen kon worden vastgesteld dat de cellen zich verspreidden na behandeling met glutamaat, wat overeenkwam met de verhoogde impedantierepons. De respons werd waargenomen met zowel L- als D-isomeren van glutamaat en aspartaat, hetgeen suggereert dat de respons substraatonafhankelijk is. Bovendien werd de respons voorkomen in aanwezigheid van de natrium-kaliumpomppremmer ouabaine, wat aangeeft dat de respons ion-afhankelijk is. Gerichte metabolomics experimenten toonden een afname aan van intracellulaire taurinespiegels na behandeling van de cellen met glutamaat of aspartaat, wat duidt op een effect op het celvolume. Samengevat suggereren deze data dat substraatopname via EAAT1 celzwellen induceert, wat veranderingen in celmorfologie veroorzaakt die worden gedetecteerd met de impedantiemethode. Dit duidelijke ‘fenotype’ werd ook waargenomen in een borstkankercellijn met endogene EAAT1-expressie, evenals in HEK293-JumpIn cellen met overexpressie van EAAT2 of EAAT3, wat suggereert dat het mechanisme wordt gedeeld tussen celtypen en SLCs. Validatie van deze methode in een handmatige HTS-opstelling bevestigt dat deze fenotypische aanpak kan worden gebruikt voor EAAT1 geneesmiddelontdekking. Daarnaast is de methode veelbelovend voor het bestuderen van andere transporteiwitten die de celvorm beïnvloeden.

In Hoofdstuk 7 werd de fenotypische methode uit Hoofdstuk 6 toegepast om de functie van ziekte-geassocieerde genetische varianten van EAAT1 te bepalen. Met behulp van in silico methoden werden verschillende EAAT1 missense-mutaties geïdentificeerd bij kankerpatiënten die vermeld staan in de Genomic Data Commons-dataset. Acht van deze mutaties werden geselecteerd voor in vitro experimenten op basis van hun nabijheid tot de bindingsplaatsen van het substraat en de EAAT1-remmers. Daarnaast werden tijdens de experimenten twee mutaties meegenomen die gevonden zijn bij patiënten met episodische ataxie type 6 (EA6). Substraatresponsen (glutamaat en aspartaat) en de werkingssterkte van orthostere (d.w.z. dezelfde bindingsplek als het lichaamseigen substraat) en allosterie (d.w.z. andere bindingsplek dan het lichaamseigen substraat) EAAT1-remmers werden verschillend beïnvloed door de geteste mutanten, wat duidt op een toename of verlies van functie. Interessant genoeg bleek een van de EA6-mutanten – M128R – ‘geactiveerd’ te worden na behandeling met TFB-TBOA en UCPH-101, wat niet werd waargenomen in wild-type EAAT1 of andere mutanten. Deze data laten zien dat de op impedantie gebaseerde fenotypische methode het mogelijk maakt om veranderde functionaliteit

van transportervarianten te detecteren. De methode zou gebruikt kunnen worden om mechanistische studies te onderbouwen en geneesmiddelontdekking te ondersteunen.

Tot slot verschaft Hoofdstuk 8 een algemene discussie over de verschillende methoden die in dit proefschrift zijn gepresenteerd. Bovendien wordt er een mechanistische onderbouwing gepresenteerd voor de TRACT methode, met behulp van twee eerder in de literatuur beschreven modellen. De belangrijkste conclusies worden gepresenteerd en er wordt gespeculeerd over de toekomst van celgebaseerde labelvrije testen tijdens het ontwikkelen van geneesmiddelen voor SLCs. Noemenswaardig is de Appendix, die twee inzichtelijke tabellen bevat: een samenvatting van SLC–GPCR paren die hetzelfde substraat delen en een overzicht van SLCs die natrium-afhankelijk zijn. Op deze manier bieden Hoofdstuk 8 en de Appendix een startpunt voor het selecteren van de volgende SLC die kan worden bestudeerd met behulp van impedantie. Alles bij elkaar dragen de bevindingen in dit proefschrift celgebaseerde labelvrije methoden aan als een nieuwe toevoeging aan de SLC-gereedschapskist, waarmee hopelijk een nuttige bijdrage wordt geleverd aan het geneesmiddelontwikkelingstraject.