



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Affinity-based profiling of the adenosine receptors

Beerkens, B.L.H.

### Citation

Beerkens, B. L. H. (2023, November 9). *Affinity-based profiling of the adenosine receptors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3656497>

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/1887/3656497>

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

# Nederlandse Samenvatting

Het menselijk lichaam bestaat uit een enorme hoeveelheid cellen, geclassificeerd in een grote verscheidenheid aan subtypes. Iedere individuele cel is aan de buitenkant beschermd door een membraan dat het binnenste van de cel scheidt van de buitenkant. Ondanks deze beschermende laag moet een cel nog steeds kunnen reageren op hetgeen zich er buiten de cel afspeelt, zoals medicijnen die door de bloedbaan migreren. Hiervoor heeft een cel verschillende mechanismes, maar een van de belangrijkste is de activatie van G eiwitgekoppelde receptoren (GPCRs). GPCRs zijn receptoreiwitten die zich bevinden in het celmembraan en bestaan uit een intracellulair en extracellulair gedeelte. Wanneer een extracellulaire stimulus, bijvoorbeeld een eiwit, peptide, klein molecuul of licht, bindt aan de GPCR, zendt de GPCR een signaal naar de cel om door te geven hoe de cel hierop moet reageren. Een slecht functionerende GPCR kan leiden tot ernstige ziektebeelden. GPCRs zijn daarom al jaren interessante doeleiwitten voor de ontwikkeling van nieuwe medicijnen. Dit heeft ertoe geleid dat grofweg 25% van de huidige medicijnen een interactie aangaat met een GPCR.

Een subfamilie van GPCRs die de interesse van medicijnontwikkelaars heeft gewekt is die van de Adenosine Receptoren (ARs). Er zijn vier verschillende ARs: de  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  en  $A_3$  adenosine receptoren ( $A_1$ AR,  $A_{2A}$ AR,  $A_{2B}$ AR en  $A_3$ AR, respectievelijk). Activatie van deze receptoren door het natuurlijke ligand adenosine veroorzaakt een grote verscheidenheid aan effecten, dat sterk afhankelijk is van het cel- en weefseltype, maar veelal een dempende werking heeft op het immuunsysteem. Cafeïne is waarschijnlijk het beroemdste molecuul dat bindt aan de ARs, al zorgt cafeïne voor blokkade van de receptoren in plaats van activatie. Een uitgebreid overzicht van de vier ARs en hun rol in het menselijk lichaam staat in **Hoofdstuk 1**. Samengevat zijn de vier ARs betrokken bij een groot aantal fysiologische omstandigheden en pathologische aandoeningen en hierdoor interessante doeleiwitten voor medicijnonderzoek.

Het bestuderen van de ARs kent echter vele uitdagingen. Zoals uitgelicht in **Hoofdstuk 1** zijn er meerdere factoren, inherent aan GPCRs, die de biochemische detectie van ARs bemoeilijken. Deze factoren zijn o.a. een slechte oplosbaarheid, lage expressielevels en complexe signaalpaden. Om deze problemen niet alleen op te lossen, maar ook dieper te bestuderen, hebben wij onze aandacht gericht op het ontwikkelen van chemische probes die irreversibel (covalent) aan de ARs binden. Een voordeel van covalente probes is de constante binding aan de receptor, maar daarentegen vereisen ze implementatie van een zeer reactieve groep (genaamd 'warhead') om de covalente binding mogelijk te maken. Het toevoegen van een extra chemische groep aan zulke covalente probes, bijvoorbeeld een fluorofoor, biotine, of een 'klik' groep, maakt detectie van de receptor mogelijk in biochemische analyses. In de verschillende hoofdstukken van dit proefschrift hebben we bekende AR liganden getransformeerd in covalente en/of gefunctionaliseerde probes, om het gebruik hiervan in biochemische analyses mogelijk te maken.

**Hoofdstuk 2** geeft een overzicht van de meest recentelijk ontwikkelde gefunctionaliseerde covalente probes. Dit betreft 'affiniteit-gedreven probes' (AfBPs), ligand-gestuurde probes, glycaan-gerichte probes en metabolisch geïncorporeerde probes. De verschillende 'warheads' van deze probes zijn in dit hoofdstuk vergeleken, alsmede het gebruik in biochemische analyses. Wij hebben ons in dit proefschrift gericht op de ontwikkeling van covalente liganden, AfBPs en ligand-gestuurde probes.

**Hoofdstuk 3** beschrijft de ontwikkeling van een covalent ligand voor de  $A_{2B}AR$ . Als onderdeel van dit hoofdstuk werden verschillende 'warheads' gesubstitueerd op bekende liganden voor de  $A_{2B}AR$ , wat resulteerde in een set van 12 potentiële covalente probes. Farmacologisch onderzoek naar tijdsafhankelijke affiniteit, alsmede selectiviteit, liet sterke verschillen zien tussen de verschillende probes. Een van de gesynthetiseerde stoffen, LUF7982, was superieur wat affiniteit en selectiviteit betreft en werd daardoor verder bestudeerd op mogelijke bindingswijze aan de receptor.

Covalente probes zijn interessante hulpmiddelen om de onomkeerbare blokkade van GPCRs te bestuderen, maar kunnen niet gebruikt worden voor de directe detectie van GPCRs zelf. In **hoofdstukken 4 en 5** hebben we daarom AfBPs ontwikkeld voor respectievelijk de  $A_1AR$  en  $A_3AR$ . Als onderdeel van beide hoofdstukken werd een kleine set aan 'klikbare' AfBPs gesynthetiseerd, gebaseerd op covalente probes die in het verleden zijn gemaakt in ons lab. Deze potentiële AfBPs werden farmacologisch getest op tijdsafhankelijke affiniteit, AR selectiviteit en mogelijk covalente binding. De beste probes werden vervolgens gebruikt in SDS-PAGE en confocale microscopie experimenten om labeling van de betreffende AR te bestuderen. Dit heeft uiteindelijk twee AfBPs opgeleverd die selectief de  $A_1AR$  en  $A_3AR$  kunnen labelen: LUF7909 voor de  $A_1AR$  en LUF7960 voor de  $A_3AR$ .

De verschillende mogelijkheden om LUF7909 en LUF7960 als hulpmiddel te gebruiken voor de detectie van de  $A_1AR$  en  $A_3AR$  zijn verder onderzocht aan het einde van de corresponderende hoofdstukken. Hierbij zijn we erin geslaagd om LUF7909 te gebruiken om de  $A_1AR$  uit een complex eiwitmengsel te isoleren en met massaspectrometrie te detecteren. Dit lukte helaas niet met de  $A_3AR$ , gebruikmakende van LUF7960 in een vergelijkbare poging. Waarschijnlijk hinderen de relatief lage expressie en hydrofobiciteit van de  $A_3AR$  dit type biochemische analyse. Desondanks is het gelukt om LUF7960 te gebruiken voor de detectie van de  $A_3AR$  in flow cytometrie experimenten. Al met al hebben bovenstaande experimenten geleid tot detectie van de  $A_1AR$  op vetcellen van de rat en detectie van de  $A_3AR$  op humane granulocyten.

Een potentieel nadeel van het gebruik van AfBPs is de onomkeerbare bezetting van de receptor. In **Hoofdstuk 6** hebben we ons daarom gericht op de ontwikkeling van een 'ligand-gestuurde' probe voor de  $A_{2B}AR$ . Een dergelijke probe zorg niet voor onomkeerbare bezetting van de ligand-bindingsplaats van de receptor en kan daarom gebruikt worden om de receptor te labelen vóór activatie. Twee ligand-gestuurde probes werden daarom gesynthetiseerd, gebaseerd op het eerder beschreven covalente ligand LUF7982. Beide stoffen lieten een hoge affiniteit zien ten opzichte van de  $A_{2B}AR$  in farmacologische studies. Deze affiniteit was niet tijdsafhankelijk, duidend op een niet-covalent bindingsmechanisme. SDS-PAGE experimenten lieten zien dat één van deze probes de  $A_{2B}AR$  kan labelen in cellen met  $A_{2B}AR$ -overexpressie. Toekomstig onderzoek moet uitwijzen of dit ook mogelijk is in andere typen experimenten en/of cellijnen.

**Hoofdstuk 7** werpt een kritische blik op een aantal aspecten die van belang zijn voor covalente chemische probes, namelijk selectiviteit, reactiviteit en detecteerbaarheid. Daarnaast wordt het gebruik van gefunctionaliseerde probes in SDS-PAGE, fluorescentie microscopie, flow cytometrie en massa spectrometrie experimenten besproken, waarbij conclusies worden getrokken op basis van de in dit proefschrift gedane bevindingen. Tot slot wordt een blik geworpen op toekomstige toepassingen van de gesynthetiseerde probes.