



Universiteit
Leiden

The Netherlands

It's about time: novel drug discovery concepts for the molecular pharmacological characterization fo the cannabinoid CB2 receptor

Bouma, J.

Citation

Bouma, J. (2024, September 11). *It's about time: novel drug discovery concepts for the molecular pharmacological characterization fo the cannabinoid CB2 receptor*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4082998>

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/1887/4082998>

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

Nederlandse samenvatting

Minstens een derde van alle op de markt gebrachte geneesmiddelen grijpen aan op G eiwit-gekoppelde receptoren (GPCRs). Echter zijn er veel kandidaat-geneesmiddelen die in de klinische fasen afvallen door een gebrek aan effectiviteit in de mens. Zodoende is er een betere vertaalslag tussen *in vitro* preklinische resultaten en *in vivo* effecten nodig voor een succesvoller translationeel perspectief. Om deze reden zijn nieuwe concepten ontwikkeld en toegepast die steeds meer erkenning krijgen binnen de vroege stadia van geneesmiddelonderzoek. Dit proefschrift richt zich specifiek op de concepten van receptorbindingskinetiek, allosterische modulatie en voorkeurssignaaltransductie voor de cannabinoïde CB₂ receptor (CB₂R), een veelbelovende GPCR voor de behandeling van ontstekingsaandoeningen.

Hoofdstuk 1 bespreekt de hoofdthema's die centraal staan in dit proefschrift. Na een introductie over de structuur, functie en signaaltransductie van G eiwit-gekoppelde receptoren worden de nieuwe concepten receptorbindingskinetiek, allosterische modulatie en voorkeurssignaaltransductie toegelicht. Hierna wordt het endocannabinoïde systeem, waar CB₂R deel van uitmaakt, geïntroduceerd en de therapeutische mogelijkheden voor CB₂R activatie besproken.

In **Hoofdstuk 2** wordt een uitgebreid protocol beschreven voor het rekruteren van β -arrestine-2 na activatie van cannabinoïde receptoren door agonisten. Het protocol kan ook gebruikt worden voor binding van antagonist en inverse agonisten door respectievelijk co-incubatie met een agonist of verlenging van de incubatietijd. Het hoofdstuk toont aan dat de PathHunter β -arrestine-2 technologie eenvoudig te gebruiken is voor een snel onderzoek naar ligand-gemedieerde activatie van cannabinoïde receptoren. Deze technologie is verder toegepast in **Hoofdstuk 5** voor het onderzoeken van orthostere en allosterische activatie van CB₂R.

Hoofdstuk 3 beschrijft de ontwikkeling van een nieuwe methode om twee verschillende signaaltransducties na activatie van CB₂R te meten. Het combineren van twee luminescente technologieën presenteert voor het eerst de mogelijkheid om gelijktijdig en kinetisch cAMP productie en de rekrutering van β -arrestine-2 te detecteren na CB₂R activatie. De toepasbaarheid van deze gecombineerde methode is bewezen door het screenen van veelgebruikte preklinische en klinisch geteste agonisten voor CB₂R. De functionele resultaten zijn geïnterpreteerd via het gebruik van een eindpunt, een semi-kinetische en een kinetische analyse om de tijdsafhankelijkheid van de agonist-gemedieerde CB₂R activatie te bepalen. De bindingskinetiek van de agonisten is bepaald in radioligand bindingsstudies voor een uitgebreide profilering van alle stoffen. Agonist-gemedieerde activatie en signaaltransductie van CB₂R was tijdsgevoelig voor verschillende synthetische agonisten, terwijl dit niet van toepassing was op de endogene agonisten. Vergelijkbare activatie parameters werden verkregen uit semi-kinetische en kinetische analysemethoden, terwijl de laatste aanvullende snelheidsconstanten opleverde voor het beginnen en afnemen van het signaal. Snelle associatie (k_{on}) van agonisten met CB₂R resulteerde in verhoogde affiniteit en activatie, terwijl langzaam dissocierende (k_{off}) agonisten de interactie tussen CB₂R en β -arrestine-2

verlengden. Er werd geen significante voorkeursignaaltransductie waargenomen in ons systeem. Alles bij elkaar toont dit hoofdstuk de mogelijkheid voor het combineren van functionele responsen en het uitvoeren van kinetische analyses om GPCR activatie door agonisten uitgebreid te profileren. Deze profilering creëert de mogelijkheid om de *in vivo* farmacologische effecten van GPCR activatie beter te voorspellen.

Hoofdstuk 4 toont een andere toepassing van de associatiesnelheidsconstante om een nieuw toegangsmechanisme te voorspellen voor lipofiele agonisten. In dit hoofdstuk zijn *in silico*, *in vitro* en *in vivo* methodes gecombineerd om een nieuwe selectieve CB₂R agonist LEI-102 te karakteriseren. Vier cryo-elektronenmicroscopie (cryo-EM) structuren zijn opgehelderd met selectieve CB₂R agonisten LEI-102, APD-371 en HU308, en niet-selectieve agonist CP55,940. Op basis van deze structuren is de invloed van verschillende aminozuren op agonist-gemedieerde receptoractivatie onderzocht door middel van functionele mutagenese experimenten. Alhoewel de algehele receptor structuren vergelijkbaar waren, hadden de agonisten verschillende interacties met aminozuren rond de bindingsplaats. Verder werden twee potentiële toegangsmechanismen voor de agonisten naar de bindingsplaats onderzocht, enerzijds via de extracellulaire lus 2 of anderzijds via een membraankanaal tussen de transmembraandomeinen 1 en 7. Het combineren van de mutagenese data en de associatiesnelheidsconstanten van de agonisten leidde tot de constatering dat lipofiele agonisten, zoals HU308 en de endogene agonisten, gebruik lijken te maken van een membraankanaal om de bindingsplaats te bereiken, terwijl de meer polaire agonisten een andere route gebruiken. Als laatste werd de veelbelovende *in vivo* werkzaamheid van orale toediening van LEI-102 aangetoond in een chemotherapie-geïnduceerd nefropathiemodel zonder het veroorzaken van bijwerkingen via het centraal zenuwstelsel.

In **Hoofdstuk 5** is een alternatieve toepassing van de dissociatiesnelheidsconstante beschreven om allosterische interacties met CB₂R aan het licht te brengen. Positief allosterische interacties met CB₂R werden gesuggereerd voor cannabidiol-dimethylheptyl (CBD-DMH), maar niet structurele analoog cannabidiol (CBD), door het concentratie-afhankelijk beïnvloeden van de dissociatiesnelheidsconstante van een radioactieve inverse agonist. In functionele experimenten gedroeg CBD-DMH zich als negatieve allosterische modulator van verschillende synthetische en endogene agonisten op de activatie van het G eiwit, maar niet voor het rekruteren van β -arrestine-2. Daarnaast gedroeg CBD-DMH zich ook als partiële orthostere agonist voor G eiwit activatie en β -arrestine-2 rekrutering. Samen suggereert dit een dubbele allosteer en orthosteer werkingsmechanisme voor CBD-DMH op CB₂R, wat een nieuwe klasse moleculen zou kunnen opleveren voor CB₂R activatie.

In **Hoofdstuk 6** wordt de overstap gemaakt naar gemuteerde CB₂Rs door het focussen op mutaties in CB₂R die in tumorweefsel van patiënten zijn gevonden. De implicaties op de functionaliteit van de muteerde receptoren en de doelgerichtheid van geneesmiddelen wordt onderzocht. Mutaties rond de bindingsplaats of in de buurt van geconserveerde motieven beïnvloedden de receptoractivatie aanzienlijk. De mate van binding en activatie van de gemuteerde CB₂R wisselde afhankelijk van de mutatie-agonist combinatie onderzocht. De effecten op binding en activatie waren minder uitgesproken voor mutaties in de N- en C-uiteinden. Dit hoofdstuk benadrukt het belang van het onderzoeken van het CB₂R genotype van patiënten alvorens toediening van geneesmiddelen gebaseerd op CB₂R

agonisten.

Tot slot vat **Hoofdstuk 7** het hele proefschrift samen aan de hand van belangrijke aspecten binnen de vroege fasen van geneesmiddelenonderzoek. Daarnaast wordt er uitgeweid over mogelijkheden om het onderzoek beschreven in dit proefschrift te vervolgen met het oog op nieuwe analyses, verdere ontwikkeling van experimentele methodes en het combineren van de verschillende concepten die centraal stonden in dit proefschrift.

Alles bij elkaar benadrukt het werk in dit proefschrift het belang van het bestuderen van kinetische bindings- en activatieparameters voor het ophelderen van orthostere en allosterie activatie van CB₂R. Door het combineren en ontwikkelen van verschillende biochemische en cellulaire methodes samen met de implementatie van nieuwe analysemethoden brengt dit proefschrift nieuwe mogelijkheden om de profilering van orthostere en allosterie liganden te verbeteren tijdens de vroege fasen van geneesmiddelenonderzoek. Daarnaast wordt de toegevoegde waarde van het bestuderen van verschillende CB₂R varianten beschreven voor enerzijds een beter fundamenteel begrip van ligand-receptor interacties, maar ook de implicaties voor geneesmiddeltoediening aan patiënten met gemuteerde CB₂Rs. Deze waardevolle bevindingen kunnen bijdragen aan de verbetering van toekomstig onderzoek en ontwikkeling van geneesmiddelen voor CB₂R en andere GPCRs.

