



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Mutation-driven modulation of GPCR pharmacology in cancer: insights from adenosine and serotonin receptors

Feng, C.

Citation

Feng, C. (2026, January 27). *Mutation-driven modulation of GPCR pharmacology in cancer: insights from adenosine and serotonin receptors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4287696>

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/1887/4287696>

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

Samenvatting

G-eiwit gekoppelde receptoren (GPCRs) vormen de grootste en meest diverse familie van membraanreceptoren in het menselijk genoom, met meer dan 800 leden. Door hun unieke transmembraanstructuur spelen GPCRs een cruciale rol in de cellulaire communicatie door extracellulaire signalen om te zetten in intracellulaire reacties en zodoende uiteenlopende biologische en pathologische processen te mediëren. Als gevolg daarvan werkt bijna 34% van alle op de markt gebrachte geneesmiddelen op meer dan 120 GPCR-familieleden, die samen 14% van alle gevalideerde geneesmiddeldoelen vertegenwoordigen. Desondanks zijn er, in vergelijking met hun grote succes in de geneesmiddelenontdekking, tot 2025 slechts tien goedgekeurde anti-kankermiddelen die direct op GPCRs aangrijpen. Hoewel GPCRs betrokken blijken te zijn bij vrijwel elke essentiële stap van kankervorming – waaronder cel proliferatie en overleving, ontsteking, immuuntolerantie, angiogenese, cel invasie en uitzaaiing – blijft hun therapeutisch potentieel in de kankerbehandeling dus grotendeels onderbenut. Tegelijkertijd heeft de opkomst van grootschalige genomische onderzoeken in kanker patiënten een verrassend hoge prevalentie van somatische mutaties in GPCR genen aan het licht gebracht. In dit proefschrift werden casestudies uitgevoerd naar de adenosine A_{2A} receptor (A_{2A}AR) en de serotonine 5-HT_{2C} receptor (5-HT_{2C}R), waarbij de effecten van kanker-geassocieerde mutaties op ligandbinding, receptoractivatie en -inhibitie werden onderzocht. Tevens werd de mogelijke invloed van veranderde receptorfarmacologie op kankerprogressie en behandeling besproken.

Hoofdstuk 1 biedt een algemene inleiding tot de onderzoek achtergrond, doelstellingen en opbouw van dit proefschrift. **Hoofdstuk 2** bevat een uitgebreid overzicht van de huidige literatuur over GPCR en G proteïne mutaties in kanker. Het bespreekt belangrijke GPCR-signaleringsroutes in kankerontwikkeling en immuunrespons, de mutatielandschappen van GPCRs en G-eiwitten, en het bewijs voor zogeheten *driver*-mutaties die actief bijdragen aan kankerprogressie, evenals *passenger*-mutaties die ontstaan als gevolg van genomische instabiliteit. Dit hoofdstuk concludeert dat een universeel antwoord uitblijft vanwege de diversiteit van GPCRs en kankertypes, en benadrukt de noodzaak van casusgerichte onderzoeken in de volgende hoofdstukken. In **hoofdstuk 3** werden de effecten van 11 kanker-geassocieerde A_{2A}AR mutaties op agonist/antagonistbinding en receptor-expressie onderzocht met behulp van een radioligandverplaatsingstest. Daarnaast werden de effecten van 8 mutaties op receptoractivatie en -inhibitie gekarakteriseerd met een op impedantie gebaseerde cel morfologie assay, xCELLigence. We constateerden dat de bindingsaffiniteit van de agonist NECA afnam door zes mutaties, maar toenam door V275A. De bindingsaffiniteit van de antagonist ZM241385 werd verlaagd door mutaties A165V en A265V. De potentie van NECA (EC₅₀), verkregen uit de xCELLigence-assay, nam af door I92M en A265V, wat correleerde met de verminderde bindingsaffiniteit. De verhoogde affiniteit maar verlaagde potentie van NECA bij V275A duidt op een verminderde koppelings-efficiëntie met de downstream signaalroutes. Mutaties S132L en H278N verlaagden de potentie maar verhoogden de effectiviteit (E_{max}) van NECA, en verminderden de inverse agonist werking terwijl zij de remmende potentie (IC₅₀) van ZM241385 verhoogden. Samen suggereren deze resultaten dat S132L en H278N de A_{2A}AR naar een inactieve conformatie kunnen verschuiven. Bovendien duidt het verlies van potentie van

ZM241385 bij V275A en P285L op potentiële problematiek bij kankerbehandeling, wat nader onderzoek rechtvaardigt. **Hoofdstuk 4** richt zich op de kinetische profilering van nieuwe A_{2A}AR agonisten en antagonisten. We vonden dat mutaties A265V en H278N de dissociatiesnelheid van ZM241385 aanzienlijk verhoogden, waardoor de residence time (RT) werd verkort. De antagonist met lange RT, LUF6632, behield echter zijn hoge affiniteit voor alle gemuteerde receptoren en vormt daarmee een veelbelovende kandidaat. De agonist met lange RT, UK432097, behield eveneens zijn affiniteit voor de meeste mutanten, maar vertoonde een afname bij H278N. Daarentegen daalde de schijnbare affiniteit van de covalente antagonist LUF7445 door A165V, A265V en H278N in vergelijkbare mate als bij ZM241385. De affiniteit van de niet-ribose agonist LUF5833 nam af bij F70L en H278N, maar nam toe bij A265S en A265V, hetgeen een uniek profiel laat zien. In **hoofdstuk 5** onderzochten we de rol van A_{2A}AR en A_{2B}AR in de groeiregulatie van borstkankercellen, waarmee aanvullend bewijs werd geleverd voor het potentieel van GPCR-gerichte kankertherapie. We bevestigden de remmende effecten van A_{2A}AR en A_{2B}AR antagonisten op drie borstkankercellijnen met verschillende expressieprofielen. Resultaten van cel morfologie en celgroei assay toonden aan dat de cellulaire respons op antagonisten voornamelijk werd gemedieerd door A_{2A}AR in de A_{2B}AR-laag-exprimerende BT474 cellen, en door A_{2B}AR in de A_{2A}AR-laag-exprimerende MCF-7 cellen. In SKBR3 cellen, die hoge mRNA-niveaus van beide receptoren tot expressie brengen, was A_{2A}AR signaalactiviteit nauwelijks detecteerbaar in de morfologie assay. Niettemin remden A_{2A}AR antagonisten de celgroei significant, en deze effecten werden verder versterkt door knock-down van zowel A_{2A}AR als A_{2B}AR, wat suggereert dat beide receptoren bijdragen aan de regulatie van celgroei. Deze bevindingen benadrukken het belang van de cellulaire context bij de respons op receptorantagonisten en rechtvaardigen verder onderzoek naar de targetspecificiteit van A_{2A}AR antagonisten en de mogelijke consequenties van mutaties in de kankerbehandeling. **Hoofdstuk 6** richt zich op de 5-HT_{2C}R, een andere GPCR met oncogeen potentieel. In dit hoofdstuk werden de effecten van 12 kanker-geassocieerde 5-HT_{2C}R mutaties op ligandbinding en receptor-expressie onderzocht met behulp van een radioligandverplaatsingstest, en werden de effecten van 5 mutaties op receptorfunctie gekarakteriseerd met een calciumflux-assay. We vonden dat mutaties in de orthosterische bindingspocket, L209H en F328S, de affiniteit van de endogene agonist 5-HT en de antagonist mesulergine verminderden. F328S verlaagde de potentie van 5-HT maar verhoogde de effectiviteit. Daarentegen vertoonde 5-HT een hogere affiniteit en potentie bij E306A en E306K, terwijl een tendens tot verminderde effectiviteit werd waargenomen. Deze twee mutaties kunnen de geconserveerde ionische interactie tussen E6.30 en R3.50 verstoren en zo de constitutieve activiteit van de receptor verhogen. De remmende potentie van mesulergine nam toe bij E306A maar niet bij E306K. P365H verlaagde het expressieniveau van de receptor met meer dan een factor tien. Dergelijke mutaties kunnen de serotonine-gemedieerde signaaltransductie in tumorcellen beïnvloeden, evenals behandelstrategieën die zich op deze receptor richten. **Hoofdstuk 7** presenteert de algemene conclusies van dit proefschrift door de bevindingen uit de afzonderlijke hoofdstukken met elkaar te verbinden en biedt toekomstperspectieven die uit ons onderzoek naar voren zijn gekomen.