

## NEDERLANDSE SAMENVATTING (SUMMARY IN DUTCH)

### FARMACOLOGISCHE KARAKTERISERING VAN NIEUWE HISTAMINE H<sub>4</sub> RECEPTOR LIGANDEN

Dit proefschrift beschrijft de studie naar nieuwe moleculen die binden en een effect hebben op de histamine H<sub>4</sub> receptor (H<sub>4</sub>R). Deze moleculen helpen ons om inzicht te krijgen in het werkingsmechanisme van de H<sub>4</sub>R. De H<sub>4</sub>R is een G eiwit gekoppelde receptor (GPCR), die zich op het celmembraan van onze witte bloedcellen bevindt. Vanwege deze lokalisatie en uit eerdere farmacologische experimenten weten we dat de H<sub>4</sub>R mogelijk een rol speelt bij allergie, jeuk en ontstekingsreacties. Een GPCR zet een extracellulair signaal (van buiten de cel) om in een intracellulair effect (binnen in de cel). Voor de H<sub>4</sub>R is dit extracellulaire signaal het lichaamseigen molecuul (endogeen ligand) histamine. Binding van histamine aan de H<sub>4</sub>R activeert twee intracellulaire eiwitten in de cel: het G $\alpha_i$  eiwit en  $\beta$ -arrestin2. Deze twee eiwitten vormen het begin van signaal transductie cascades, die uiteindelijk verschillende fysiologische processen in gang zetten (bv. celmigratie of cytokine productie).

Natuurlijke en synthetische liganden beïnvloeden de werking van de GPCR functie en zijn in feite potentiële medicijnen. Sommige liganden (agonisten) activeren een niet goed werkende GPCR (door te weinig endogeen ligand), waardoor de signaal transductie processen hersteld worden. In het geval de GPCR teveel gestimuleerd wordt (door te veel endogeen ligand) kunnen andere type liganden (antagonisten) de receptor tijdelijk blokkeren, waardoor een interactie tussen agonist (bv histamine) en de GPCR voorkomen wordt. Het is dus belangrijk om te weten of een ligand een interactie aangaat met de GPCR en of dit tot activatie of remming leidt. Om dit voor elk stofje te bepalen kost veel tijd en de juiste stof vinden is net zo iets als zoeken naar een naald in een hooiberg. Het is daarom efficiënter om van te voren te kunnen voorspellen hoe een ligand bindt aan de GPCR, en vervolgens dit ligand zo te synthetiseren, dat het precies de gewenste eigenschappen heeft. Hiervoor hebben we zowel kennis van het ligand als van de receptor nodig. In de hier beschreven studies hebben we gekeken naar nieuwe liganden voor de H<sub>4</sub>R om meer inzicht te krijgen in de structuur en werking van de receptor.

In hoofdstuk 2 hebben we een ligand (VUF14480) ontworpen dat irreversibel aan de H<sub>4</sub>R bindt. Dat wil zeggen, dat het ligand met de H<sub>4</sub>R een binding aangaat en vervolgens niet meer los kan komen. Verder onderzoek heeft aangetoond, dat dit ligand een partiële agonist is en dat de interactie met de H<sub>4</sub>R plaatsvindt via aminozuur C<sup>336</sup> (cysteïne in transmembraan helix 3). Hiermee bevestigden we een eerder door ons voorgesteld computermodel, dat de ligand binding voor dit type stoffen in H<sub>4</sub>R voorspelt. Verder kan dit irreversibele H<sub>4</sub>R ligand een interessante mogelijkheid bieden om de actieve staat van de H<sub>4</sub>R te ontrafelen via eiwitkristallisatie.

De hoofdstukken 3 en 4 gaan over het karakteriseren van 'biased' H<sub>4</sub>R liganden en de manier waarop deze binden aan de H<sub>4</sub>R. Recent is ontdekt, dat de H<sub>4</sub>R niet alleen via het G $\alpha_i$  eiwit signaleert, maar ook  $\beta$ -arrestin kan rekruteren en vervolgens via dit eiwit kan signaleren. Histamine zorgt na binding aan de receptor voor een activatie van beide routes, maar een bekende H<sub>4</sub>R antagonist (JNJ 777120) bleek alleen maar de  $\beta$ -arrestin route te activeren. Biased ligan-

den zijn in staat om een selectie van de beschikbare signaleringsroutes te activeren na binding aan de receptor. Sommige biased liganden hebben een voorkeur voor een G eiwit en andere juist voor  $\beta$ -arrestin2. Biased liganden zijn potentieel erg interessant, omdat hun voorkeur voor een intracellulaire signalering voor meer specificiteit zorgt. Wanneer we denken aan mogelijke medicijnen, dan is het gunstig om een medicijn te ontwikkelen, dat alleen effect heeft op de verstoorde signaalroute en verder geen balansen verstoort in de cel.

In hoofdstuk 3 hebben we aangetoond, dat sommige (bekende) H<sub>4</sub>R liganden een voorkeur voor G $\alpha_i$  of  $\beta$ -arrestin signalering hebben. Met deze nieuwe kennis over de liganden kunnen we een beter beeld krijgen van het fysiologisch effect na G $\alpha_i$  of  $\beta$ -arrestin activatie door H<sub>4</sub>R. In hoofdstuk 4 hebben we vervolgens gekeken naar één type H<sub>4</sub>R liganden, de indolecarboxamides. Deze stoffen hadden allemaal een voorkeur voor de  $\beta$ -arrestin route en remden de G $\alpha_i$  route. Omdat we veel op elkaar lijkende stoffen getest hebben, die telkens maar een heel klein beetje van elkaar verschillen, kunnen we uitzoeken, welk gedeelte van het ligand verantwoordelijk is voor dit type signalering. In eerder onderzoek hebben we voor deze liganden een bindingsmodel gemaakt en dus konden we met dit model voorspellen, welke aminozuren in de H<sub>4</sub>R een rol spelen bij deze biased signalering.

Hoofdstuk 5 borduurt voort op de vergaarde kennis en geoptimaliseerde technieken uit eerdere hoofdstukken, maar in deze studie ligt de nadruk op het gebruik van fragmenten. Met fragmenten bedoelen we simpele kleine structuren in plaats van grote complexe moleculen. Door hun geringe grootte kunnen fragmenten in holtes van de receptor komen, die lastig bereikbaar zijn voor grotere moleculen. Hierdoor kunnen we meer te weten komen over de receptor en zijn vorm. Vervolgens hebben we het functionele effect gemeten, dat deze fragmenten hebben op niet alleen H<sub>4</sub>R, maar ook op de andere drie histamine receptor (H<sub>1</sub>R, H<sub>2</sub>R, H<sub>3</sub>R) subtypes. We hebben voor alle vier de histamine receptoren biased fragmenten kunnen vinden. Die gaan we nu verder analyseren in de hoop dat dit ons meer verteld over de receptorstructuur en interacties van biased liganden.

In hoofdstuk 6 kijken we tenslotte naar metaboliëten van H<sub>4</sub>R liganden. In ons lichaam worden de liganden omgezet in de lever, zodat we ze makkelijk uit kunnen scheiden. Deze omzetting houdt meestal in, dat er kleine structurele veranderingen plaatvinden aan het molecuul. Eerder zagen we al, dat kleine veranderingen in structuur grote gevolgen kunnen hebben voor de functionaliteit van een molecuul. Een stofje kan haar specificiteit verliezen en of actief worden. Wanneer we metaboliëten willen onderzoeken hebben we te maken met een complex mengsel van de originele stof en haar mogelijke metaboliëten. Om afzonderlijk naar deze metaboliëten te kijken moeten we ze scheiden. Hoofdstuk 6 beschrijft het maken van de metabolische mengsels, het scheiden van dit mengsel en vervolgens opsplitsen (fractioneren) in kleine volumina, waarvan we de farmacologische activiteit kunnen bepalen. Dit zijn testen, die normaliter pas in een vrij laat stadium van de medicijnontwikkeling plaats vinden. Deze nieuwe methode maakt het mogelijk om al in een vroegere fase van de medicijnontwikkeling te testen op gevaarlijke metaboliëtvorming. Bovendien is deze methode ook geschikt om andere complexe mengsels (natuurproducten) te scheiden en testen.

Kortom, in dit onderzoek hebben we nieuwe experimentele methoden geïntroduceerd en geoptimaliseerd. We zijn meer te weten gekomen over de interactie tussen (biased) liganden en de  $H_4R$  en hebben een mooie set  $H_4R$  liganden, waarmee we verder onderzoek kunnen doen en die ons wijzer zullen maken over de functie van  $H_4R$  en de rol van zijn intracellulaire signaaltransductie processen.

## VERTALING BINNENFLAP

### Over de omslag

De omslag van mijn proefschrift vertegenwoordigt verschillende aspecten van mijn promotieonderzoek. Het is niet alleen een visuele samenvatting van een belangrijk deel van dit proefschrift, de omslag symboliseert ook de natuur, kunst & ambacht, creativiteit en opstandigheid.

Wetenschappers zullen een deel van een cel omgeven door een celmembraan herkennen. G eiwit-gekoppelde receptoren (GPCR's) weven zich door het celmembraan en binden aan intracellulaire eiwitten. Aan de extracellulaire zijde binden (biased) liganden op een gebalanceerde of biased manier aan de GPCR's.

Dromers, idealisten en wereldverbeteraars zullen hun eigen draai aan de omslag geven. En dat moeten jullie ook zeker doen! Ik hoop dat de omslag jullie zal helpen om mijn onderzoek beter te begrijpen, maar nog belangrijker is dat jullie beseffen dat we omringd worden door de wetenschap: in vlinders en planten, in textiel en in kleuren. Dat maakt het fascinerend en mooi om aan te werken.

**Saskia**

Alkmaar, 8 oktober 2013