

Nederlandse samenvatting

De natuur is een rijke bron van actieve stoffen geproduceerd door allerlei micro-organismen, paddestoelen, planten, en dieren. Deze verbindingen kunnen een interactie aangaan met biologische 'targets', zoals bijvoorbeeld, receptoren, ionen-kanalen en enzymen, en daarmee hebben zij effect op het functioneren van cellen en organismen. Bioactieve verbindingen uit natuurlijke bronnen zijn daardoor ook waardevol in de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling van nieuwe analytische screeningsmethoden die kunnen worden gebruikt bij het ontdekken van biologisch actieve verbindingen uit natuurlijke bronnen.

De eerste fase in het onderzoek naar nieuwe bioactieve substanties vanuit natuurlijke extracten wordt traditioneel uitgevoerd middels zogenaemde 'bioassay guided fractionation' (BGF). Deze methode is reeds met succes toegepast bij de ontwikkeling van diverse geneesmiddelen gebaseerd op natuurlijke extracten. BGF heeft echter beperkingen, welke er mede voor hebben gezorgd dat de ontwikkeling van geneesmiddelen uit natuurlijke extracten de laatste 20-30 jaar is afgenomen. De redenen hiervoor zijn dat de ontwikkeling van geneesmiddelen middels BGF grote hoeveelheden natuurlijk extract gebruiken, dat de methode arbeidsintensief is, en dat verlies van bioactiviteit kan optreden vanwege de herhaalde stappen in het proces. Er is daarom een duidelijke behoefte aan minder arbeidsintensieve methoden, die bovendien minder bronmateriaal nodig hebben.

Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling en toepassing van 'on-line' hoge resolutie screening analyse (HRS) voor natuurlijke extracten, waarbij voornamelijk gebruik is gemaakt van dierlijke giften. HRS-opstellingen combineren over het algemeen vloeistofchromatografie (LC) met massaspectrometrie (MS) en met een continue flow biosassay. Deze technologie maakt het mogelijk componenten in complexe mengsels te detecteren, gevolgd door een parallele bepaling van hun specifieke bioactiviteit en chemische identiteit. Een belangrijk voordeel van HRS in vergelijking met BGF is dat middels een enkele analyse de bioactiviteit van afzonderlijke componenten kan worden gedetecteerd en direct kan worden gecorreleerd aan hun moleculaire massa. Dit bespoedigt de identificatie van de bioactieve stof.

In dit proefschrift zijn de $\alpha 7$ -nicotine acetylcholine receptor ($\alpha 7$ -nAChR) en de serotonine type 3 receptor (5-HT₃R) gebruikt als aangrijpingspunt voor screening van bioactieve stoffen. Deze receptoren worden in verband gebracht met ziektes aan het centraal zenuwstelsel, zoals cognitieve gebreken, schizofrenie, epilepsie, Alzheimer en Parkinson. De identificatie van nieuwe verbindingen die effect hebben op deze receptoren zijn interessant in het kader van de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen en diagnostische gereedschappen. In dit proefschrift zijn verschillende typen bioassays ontwikkeld en toegepast in HRS systemen om actieve verbindingen te identificeren die werken op de $\alpha 7$ -nAChR en de 5-HT₃R.

Hoofdstuk 1 geeft een overzicht van de achtergronden van dit proefschrift waarbij de behoeften in de neurowetenschappen met betrekking tot metingen aan ligand-gestuurde ion kanalen, geneesmiddelontwikkeling en het screening van natuurlijke

extracten en andere complexe mengsels centraal staan. Hoofdstuk 1 is verdeeld in drie onderwerpen: Doelen, Bronnen en Benaderingen. In de sectie Doelen wordt een overzicht gegeven van de relevante geneesmiddeldoelen die zijn bestudeerd in dit proefschrift. Hierbij wordt de structuur, detectie, functie en betrokkenheid van de $\alpha 7$ -nAChR en de 5-HT₃R bij verschillende ziektes besproken. In de sectie Bronnen worden natuurlijke verbindingen besproken die mogelijk interessant zijn bij geneesmiddelontwikkeling. Ten slotte wordt in de sectie Benaderingen besproken welke klassieke en nieuwe analytische methoden worden gebruikt bij geneesmiddelontwikkeling. De workflow van op gif gebaseerde geneesmiddelontwikkeling wordt behandeld en concrete voorbeelden hiervan worden gegeven.

Het doel van de Hoofdstukken 2-4 is de ontwikkeling van nieuwe analytische technieken die de beperkingen wegnemen van traditionele BGF- en HRS-systemen ten aanzien van de grote monstervolumina die nodig zijn. Om dit te realiseren zijn geminiaturiseerde on-line HRS-systemen ontwikkeld die nanoliters of microgrammen van het monster kunnen analyseren. Voorbeelden van monsters waar dit van grote waarde kan zijn, zijn giften van zeldzame diersoorten. Dierlijke giften blijken rijke bronnen van natuurlijke bioactieve verbindingen, die in staat zijn om receptoren, ionkanalen en enzymen te activeren, te inhiberen of te moduleren. Om deze redenen is gifgebaseerd onderzoek een belangrijk hulpmiddel in de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen. Het nieuw ontwikkelde 'microfluidic' on-line HRS-systeem gebruikt nano-LC gekoppeld met MS via nano-electrospray ionisatie (nano-ESI). Parallel gekoppeld is een continue vloeistofstroom bioassay op chip-formaat met een fluorescentie detector.

In Hoofdstuk 2 wordt een analytische workflow beschreven waarin het acetylcholine bindende eiwit (AChBP) werd gebruikt als screening target. AChBP is een oplosbaar eiwit en is homoloog met het extracellulaire domein van de $\alpha 7$ -nAChR. De analytische workflow maakte het mogelijk om de bioactiviteit van peptiden en eiwitten van complexe natuurlijke mengsels te beoordelen met behulp van het geminiaturiseerde on-line HRS platform. Hierna werd een MS-gestuurde zuivering gevolgd door chemische identificatie van de AChBP-bindende stoffen met behulp van proteomics technieken uitgevoerd.

De werking van de geïdentificeerde stoffen werd aangetoond in het gif van de Afrikaanse spugende cobra, *Naja Mossambica*. In dit gif werden matige en lage affiniteitliganden van AChBP geïdentificeerd. Na isolatie van deze bioactieve verbindingen met de MS-gestuurde fractionering werd de bioactiviteit van de gezuiverde gifstoffen bevestigd middels her-screening met het microfluidic on-line HRS systeem. Met een enzymatische digestie met trypsine werd de aminozuur volgorde van de bioactieve peptiden bevestigd als overeenkomend met Cytotoxine 1 en Cytotoxine 2. Van deze cytolytische en cardiotoxische peptiden was niet bekend dat ze binden met AChBP.

Hoofdstuk 3 beschrijft een vervolgstudie van de analytische workflow beschreven in Hoofdstuk 2. In dit hoofdstuk wordt de analytische methode gedemonstreerd met de screening van kleine moleculen en peptiden afkomstig van een extract van de huid van een pad en van het gif van een *Conus* slak. Naast MS- en MS/MS-analyses van de bioactieve stoffen in het paddenhuidextract werden NMR-analyses uitgevoerd om zo tot een complete structurele opheldering te komen. Een bioactief peptide van het *Conus textile* slakkengif werd gevonden tussen meer dan 1.000 andere peptiden. Het identificatieproces was relatief snel; slechts twee duplicaat analyses van elk 60 min waren nodig. Het aantal cysteïne bruggen in de aminozuurketens werd bepaald door reductieve experimenten met dithiothreitol. De analytische workflow voor het screenen van niet-peptiden (kleine organische bioactieve stoffen met een moleculair gewicht van 200 tot 1000 Da) werd gedemonstreerd met de analyse van *Bufo alvarius* en *Bufo marinus* paddenhuidextracten. Verscheidene tryptamine analogen en steroïde binders van AChBP werden gedetecteerd in deze extracten. Na MS-gestuurderde opzuivering werd de chemische identiteit van deze moleculen geëvalueerd door NMR- en MS/MS-analyse, en werd de biologische activiteit getest en bevestigd met een conventionele radioligand binding assay.

Hoofdstuk 4 beschrijft de ontwikkeling van een fluorescentie assay voor het serotonine bindende eiwit (5HTBP) in een microplaat-formaat en in een microfluidic on-line HRS-formaat. Het 5HTBP is een eiwit met gelijksoortige eigenschappen als het ligand bindende gedeelte van de 5-HT₃R. Het 5HTBP is gemaakt met behulp van cellen waarvan het gen dat codeert voor AChBP aangepast is, zodat het 5HTBP produceert. De ontwikkelde fluorescentie assay voor het 5HTBP is robuust en eenvoudig en een goede eerste screening-methode van complexe mengsels voor het vinden nieuwe bioactieve verbindingen die binden aan de 5-HT₃R. De belangrijkste voordelen van deze fluorescentie assay zijn de lage kosten van de assay en de eenvoudige protocollen in vergelijking met de conventionele radioligand binding assay. Ook geeft het de mogelijkheid om de assay in microfluidic on-line HRS-formaat uit te voeren voor mengselanalyse. De toepassing van deze analytische screening voor mengselanalyse werd aangetoond met gif van de peninsula bruine slang, de gevlekte bruine slang en de zwarte mamba (resp. *Pseudonaja inframacula*, *Pseudonaja affinis* en *Dendroaspis polylepis*). De gescreende bioactieven konden met de analytische techniek snel worden gecorreleerd met de accurate massa verkregen met parallel uitgevoerde MS.

De in de Hoofdstukken 2-4 ontwikkelde bioassays, screenen voor biologische affiniteit voor oplosbare bindende eiwitten, welke varianten zijn van de humane receptoren. Van dit type assays kan alleen informatie over bindingsaffiniteit worden verkregen. Voor het krijgen van functionele informatie (zoals het bepalen of een ligand een activator of een blokker van een ionkanaal is) zijn cel-gebaseerde assays nodig die de ionkanaal-activiteit meten. Het koppelen van een cel-gebaseerde assay in on-line HRS is technisch en biologisch gezien complex door de analytische uitdagingen met betrekking tot het combineren van levende celsystemen met LC chemicaliën. Daarom wordt de onlangs geïntroduceerde 'at-line nanofractionation' methodologie gezien als

een alternatief voor het screening van complexe mengsels met cel-gebaseerde assays. De nanofractionering benadering gebruikt geautomatiseerde hoge-resolutie fractionering van LC effluenten over microplaten met hoge 'well'-dichtheid.

Hoofdstuk 5 beschrijft de ontwikkeling van een at-line cel-gebaseerde screening methode waarin LC-nanofractionering gevolgd wordt door een functionele calcium-flux fluorescentie assay voor de $\alpha 7$ -nAChR. Zoals in de on-line HRS analytische technologie, wordt in de nanofractionering benadering MS-detectie in parallel uitgevoerd om de accurate massa van de bioactieven te kunnen bepalen. Deze bioassay gebruikt menselijke neuroblastoma cellen die de $\alpha 7$ -nAChR stabiel tot overexpressie brengen. De bioassay is gebruikt voor het screenen van agonisten en allosterische modulators voor de $\alpha 7$ -nAChR. Na analytische methode-ontwikkeling werd de toepasbaarheid ervan gedemonstreerd met het screenen van een extract van hallucinogene paddenstoelen (*Psilocybe mckennaii*). Deze studie toont ook het nut van het achter elkaar uitvoeren van twee orthogonale scheidingen van ruwe extracten, waardoor de identificatie van bioactieve verbindingen in zeer complexe extracten met veel co-eluerende componenten mogelijk wordt. In deze benadering wordt hetzelfde ruwe extract twee keer geanalyseerd. De eerste analyse met een 'reversed-phase' LC-scheiding en de tweede analyse met een 'hydrophilic interaction' LC (HILIC) scheiding. Verbindingen die correleren met bioactiviteit in zowel de eerste als de tweede scheiding kunnen worden gematched op grond van hun accurate massa.

Hoofdstuk 6 introduceert het concept van een continue on-line 'post-column flow cell'-gebaseerde bioactiviteit screening assay. Dit systeem combineert LC scheiding met een on-line humane cel-gebaseerde assay door middel van flow cytometrie (FC) als biologische detectie met in parallel daaraan MS voor identificatie. Dit systeem gebruikt dezelfde functionele calcium-flux assay als beschreven in Hoofdstuk 5, waarin $\alpha 7$ -nAChR expresserende SH-SY5Y neuroblastoma cellen werden gebruikt. Het voordeel van on-line screening in vergelijking met at-line nanofractionering is dat een on-line assay sneller is en de uitgelezen bioassay een hogere resolutie heeft. Het LC-FC-MS screening systeem is ontwikkeld in twee assay-formaten: agonist-formaat en duale antagonist-agonist-formaat. Het duale assay-formaat geeft de mogelijkheid om gelijktijdig de detectie van agonisten en antagonist uit te voeren. De toepasbaarheid van het systeem werd gedemonstreerd in twee 'proof-of-principle' experimenten, namelijk voor de screening van extracten van tabaksplantbladeren in agonist-formaat en slangengif in duale antagonist-agonist-formaat.

Samenvattend zijn de screening methoden beschreven in dit proefschrift nieuwe analytische gereedschappen die gevoelig en snel zijn. Ze vormen daarom waardevolle toevoegingen aan het veld van het screenen van natuurlijke extracten en op gif-gebaseerde geneesmiddelontwikkeling programma's. De analytische methoden ontwikkeld in dit proefschrift vinden toepassing in de natuurextract- en gif-gebaseerde geneesmiddelontwikkeling voor ziektes aan het centraal zenuwstelsel. Verder hebben deze methoden ook een groot potentieel voor het screenen van complexe mengsels

en/of het screenen van bioactieve verbindingen voor andere targets dan die gebruikt in dit proefschrift.

Korte Nederlandse samenvatting

In de natuur komen verschillende mengsels van stoffen voor die mogelijk bruikbaar zijn in de ontwikkeling van geneesmiddelen. Voorbeelden zijn slangen- en slakkengif, en extracten van planten en paddenstoelen. De identificatie van de actieve componenten in deze mengsels is echter uitdagend, kost veel tijd, en er zijn relatief grote hoeveelheden van de vaak schaarse mengsels voor nodig. In dit proefschrift zijn nieuwe analytische technieken ontwikkeld die de identificatie van bruikbare componenten in giften en extracten sneller en makkelijker maken en waarvoor veel minder materiaal nodig is. Nieuwe bioassay-technieken zijn ontwikkeld gebruikmakend van combinaties van vloeistofchromatografie, massaspectrometrie, flow cytometrie en bioassays. Deze nieuwe methoden zijn toegepast voor het ontdekken van waardevolle componenten in natuurextracten.