
Samenvatting

In de voorbije jaren is, om de nieuwe farmacologische ontwikkelingen bij te houden, de nood aan gevoelige *in vitro* technieken voor het karakteriseren van de interactie tussen liganden en hun respectievelijke G proteïne-gekoppelde receptoren (GPCRs) toegenomen. Specifieke interesse gaat daarbij uit naar het bepalen van structuur-activiteitsrelaties (SAR) in diverse signalisatieroutes, het mogelijks '*biased*' agonisme van liganden tussen deze routes, en het eventueel voorkomen van invers agonisme. Verder werd eerder beschreven dat *in vitro* celtesten toepasbaar zijn voor de activiteits-gebaseerde detectie van nieuwe psychoactieve substanties (NPS) in biologische stalen, gebaseerd op de specifieke activiteit van een stof, eerder dan op de structuur.

Deel A van dit proefschrift focust op de ontwikkeling van *in vitro* celtesten voor de activiteits-gebaseerde detectie en functionele karakterisering van (psychedelische) agonisten van de serotonine 2A receptor (5-HT_{2A}R). De 5-HT_{2A}R is het voornaamste farmacologische doel van serotonerge psychedelica, een groep van substanties waarvan een stijgend aantal stoffen de voorbije jaren op de drugmarkt is verschenen als NPS. Belangrijke problemen gerelateerd aan deze stoffen zijn hun moeilijke detectie en ontoereikende karakterisering.

Gezien een aantal *in vitro* testen reeds ontwikkeld was, geeft **Hoofdstuk A.1** een overzicht van de testen die specifiek gebruikt zijn voor het karakteriseren van (psychedelische) agonisten van de 5-HT_{2A}R. Dit overzicht omvat het principe waarop deze testen gebaseerd zijn, een bespreking van hun voordelen en beperkingen, en beschrijft welke factoren in acht moeten worden genomen wanneer resultaten van verschillende studies vergeleken worden. In dit proefschrift werd gekozen voor de NanoBiT[®] functionele complementatie techniek, die gevoelig is en een continue luminescente uitlezing toelaat in levende cellen.

In **hoofdstuk A.2** werd deze techniek gebruikt om de rekrutering van het cytosolische eiwit β -arrestine 2 (β arr2) naar de geactiveerde receptor te monitoren, geïnduceerd door de aanwezigheid van een psychedelische agonist, met als doel om na te gaan of een activiteits-gebaseerde screeningstest kan worden ontwikkeld om het gebruik van dergelijke stoffen op te sporen in biologische stalen. Echter, blanco stalen resulteerden ook in activatie in de test, en na het exploreren van verschillende opties, werd duidelijk dat de endogene agonist serotonine hiervoor verantwoordelijk was, waardoor het gebruik van activiteits-gebaseerde screeningstesten niet mogelijk is voor psychedelische stoffen.

Een tweede moeilijkheid met psychedelische substanties, is het feit dat hun functionaliteit op moleculair niveau slechts beperkt beschreven is. Daarom werd in **Hoofdstuk A.3** een cellijn ontwikkeld die de componenten van de celtest uit Hoofdstuk A.2 stabiel tot expressie brengt. Deze cellijn werd nadien toegepast voor de opheldering van de SAR in een groep van 30 (psychedelische) 5-HT_{2A}R agonisten, waaruit bleek dat de bekomen EC₅₀ waarden een correlatie toonden met geschatte dosissen voor ‘recreatief’ gebruik.

Een onbeantwoorde vraag met betrekking tot het moleculaire mechanisme van (psychedelische) 5-HT_{2A}R agonisten, is hun mogelijks *biased* agonisme. Deze vraag wordt behandeld in **Hoofdstukken A.4, A.7, en A.8**. Daartoe werd een tweede celtest ontwikkeld, die de rekrutering van miniGα_q naar de 5-HT_{2A}R monitort in het NanoBiT[®] systeem. Bij deze aanpak worden twee analoge technieken gebruikt, die elk een signalisatie effect meten dat zich ter hoogte van de receptor afspeelt. Statistisch significant *biased* agonisme werd opgepikt in elk van deze hoofdstukken, waarbij verscheidene data analyse methoden leidden tot verschillende interpretaties. **Hoofdstuk A.7** evalueerde daarom ook de impact van een aantal variabele factoren op de bekomen resultaten, waaronder de referentie agonist die gebruikt werd en het tijdstip van de data analyse. **Hoofdstuk A.8** beschreef agonisten gebaseerd op de selectieve 5-HT_{2A}R agonist 25CN-NBOH met een uitgesproken bias, die bijna uitsluitend de rekrutering van βarr2 teweegbrachten.

Verder werden de beschreven celtesten ook gebruikt om te bepalen welke structurele karakteristieken onmisbaar zijn voor receptor activatie door 25H-NBOMe (**Hoofdstuk A.5**) en 25H-NBF (**Hoofdstuk A.6**) positionele isomeren. Deze specifieke vraag was nauwelijks onderzocht in deze groepen van substanties, die pas recent verschenen.

Deel B behandelt *in vitro* testen voor het karakteriseren van farmacologische fenomenen bij bepaalde purinerge receptoren, waaronder de A₃ adenosine receptor (A₃AR) en de P2Y₂ receptor (P2Y₂R). Een korte introductie over signalisatie bij purinerge GPCRs, de betrokken receptoren, functionaliteiten, en de beschikbare liganden, wordt gegeven in **Hoofdstuk B.1**.

Hoofdstuk B.2 beschrijft de ontwikkeling van een cellijn die de componenten van een miniGα_i rekruteringstest aan de A₃AR in het NanoBiT[®] systeem stabiel tot expressie brengt. Deze complementeert een analoge A₃AR-βarr2 rekruteringstest. Dit liet toe om *biased* agonisme in een selectie van A₃AR liganden te bepalen. Hoewel het functioneren van de celtest voldoende

werd aangetoond, vertoonde geen van de liganden een signalisatiepatroon dat verschillend was van dat van de referentieagonist.

In de verdere zoektocht naar *biased* agonisme in een selectie van methanocarba nucleoside A₃AR liganden, werd in **Hoofdstuk B.3** invers agonisme ontdekt. Tot hiertoe werd dit fenomeen slechts weinig onderzocht bij A₃AR liganden, waarbij slechts 1 niet-nucleoside ligand en geen nucleoside liganden beschreven werden die dit gedrag vertoonden. Het verder onderzoek van een groep van structureel gerelateerde componenten bracht opmerkelijke patronen aan het licht, waarbij een minimale verandering van substituent op een zekere positie het inverse agonisme omkeerde tot partieel agonisme.

Voor de A₃AR werd reeds een groot aantal liganden beschreven en zijn de moleculaire mechanismes tot op zekere hoogte gekend. De P2Y₂R is daarentegen minder intensief onderzocht. Een voorbeeld van een op te helderen mechanisme, is de rekrutering van βarr1 en βarr2 naar de receptor. **Hoofdstuk B.4** beschrijft de zoektocht naar P2Y₂R regio's die noodzakelijk zijn voor het rekruteren van deze β-arrestines als respons op receptor activatie door een van beide endogene liganden, ATP of UTP. Hoewel alle gegenereerde receptorconstructen nog steeds beiden konden rekruteren, bleek dat de C-terminale staart van de receptor deze interactie beïnvloedde.

Samenvattend resulteerden de celtesten die ontwikkeld en toegepast werden in dit proefschrift in 'Een verhelderende trip doorheen psychedelische en purinerge signalisatie', en to(o)n(d)en ze nuttig te zijn om een verscheidenheid aan farmacologische vragen te beantwoorden.

