Maastricht University

On the molecular pharmacology of EndothelinA receptors : or how EndothelinA agonists can make a difference

Citation for published version (APA):

Compeer, M. G. (2013). *On the molecular pharmacology of EndothelinA receptors : or how EndothelinA agonists can make a difference*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Uitgeverij BOXPress. https://doi.org/10.26481/dis.20130920mc

Document status and date:
Published: 01/01/2013

DOI:
10.26481/dis.20130920mc

Document Version:
Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

• A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
• The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
• The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

• Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
• You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
• You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the “Taverne” license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 25 Apr. 2024

Chapter 7

Summary

In this thesis on the molecular pharmacology of ET_A receptors, we started by highlighting the importance of this type of studies (**chapter 1**). Since its discovery it soon became apparent that the ET system plays a significant part in blood pressure regulation. Despite extensive efforts however, most ET-targeting drugs did not find their way into clinical practice. This may in part be due to the 'rush to the clinic' of ERAs, which may have hampered or attenuated the process of optimally designing drugs that best suited the need to inhibit the ET system, and rather just focused on binding to ET_A (and/or ET_B) receptors, thereby hoping to block the binding of ETs.

Unfortunately, the rather unique pharmacology of ET_A receptors complicates inhibition by neutral competitive antagonists. In **chapter 2**, we found that the persistent arterial contractile effects of ET-1 were caused by tight binding of ET-1 to ET_A receptors. ERAs were unable to continuously inhibit these active ET-1/ET_A receptor complexes, as the ERAs did not bind tightly to ET_A receptors, which results in continuously activated ET_A receptors, also after removal of the ERAs. In addition, ERAs did not promote dissociation of ET-1 from ET_A receptors. As tightly-bound, continuously active ET-1/ET_A receptor complexes are not compatible with vascular homeostasis, we identified a role for CGRP, released from sensory-motor nerves as a terminator of ET-1/ET_A receptor complexes, as CGRP promotes immediate dissociation of these complexes. This may explain to some extent the cardiovascular protection attributed to a diet high in peppers and garlic, as compounds from these plants trigger release of CGRP.

This atypical receptor pharmacology can complicate the use of potentially therapeutic drugs. To better understand the interaction of the agonists with ET_A receptors, we characterized the importance of the agonist amino acid structure for the binding to and activation of ET_A receptors in **chapter 3**. We found that ET_A receptors on arterial smooth muscle cells display agonist-dependent properties that depend on the amino acids on position 6 and 7 of the ET sequence. Although ET-1 and ET-2 display similar affinity to and maximal effect on ET_A receptors and that both agonists bind tightly to these receptors, their ET_A mediated activities are differently modulated by an ERA. Moreover, the substitution of a single amino acid in the agonist sequence drastically reduces affinity for ET_A receptors and therefore has profound pharmacological consequences.

As ERAs display agonist-dependent effects regarding ET_A receptor activity, we continued to find which intracellular signaling mechanisms were involved in the persistent ET_A agonist responses in **chapter 4**. We again found that the intracellular signaling mechanisms involved in contractile responses were dependent on which

agonist activated ET_A receptors, and that there were different mechanisms involved in the initial contractile response and the sequential vasospasm. The main facilitator of both the contractions and vasospasms was identified as PLC, downstream of which TRPC3 and L-VOCC were intermediate steps in the mechanism of vasospasm. The ET_A mediated activation of the intracellular signaling mechanism was not only agonist-dependent, but also system-dependent.

Then, in **chapter 5**, we present evidence that two ERAs act as allosteric modulators rather than as competitive antagonists. After establishing that ET_A receptor binding and activation requires the full 21 amino acid sequence of the agonists, we found that the effects of ERAs depend on the presence and type of ET_A agonist and on the size of the ERA. These effects can only be attributed to an allosteric mechanism rather than to a competitive antagonist mechanism.

In **chapter 6** we discuss these findings in light of our current understanding of anti-ET therapy and we suggest that in order to more effectively target ET_A receptors, we should take into consideration which of the ET_A agonists are involved and that when designing novel ERAs or improving on current ERAs, some attention should go out to possible long-acting effects of the ERA that would ideally dissociate ETs from ET_A receptors.

Chapter 8

Samenvatting

In dit proefschrift over de moleculaire farmacologie van Endotheline$_A$ (ET_A) receptoren zijn we begonnen met het benadrukken van het belang van dit soort studies (**hoofdstuk 1**). Sinds de ontdekking werd het snel duidelijk dat het ET systeem een belangrijke bijdrage levert aan reguleren van de bloeddruk. Ondanks intensieve pogingen zijn de meeste op ET gerichte medicijnen op weg naar klinische toepassing gesneuveld. Dit kan deels te wijten zijn aan de 'sprint naar de kliniek' van ET receptor antagonisten (ERAs), wat er voor gezorgd kan hebben dat het design proces van medicijnen, gericht op het remmen van het ET systeem, niet volledig zorgvuldig is doorlopen. Dit proces heeft zich misschien te veel gefocust op het binden van medicijnen aan ET_A (en/of ET_B) receptoren, waarmee in theorie het binden van ETs voorkomen zou worden.

Helaas is de unieke farmacologie van ET_A receptoren een complicerende factor met betrekking tot de inhibitie door neutrale competitieve antagonisten. In **hoofdstuk 2** hebben we gevonden dat de aanhoudende arteriële contracties van ET-1 worden veroorzaakt door een moeilijk omkeerbare binding van ET-1 aan ET_A receptoren. ERAs waren niet in staat om de geactiveerde ET-1/ET_A receptor complexen continu te remmen, omdat de ERAs wel dynamisch en gemakkelijk omkeerbaar binden aan ET_A receptoren. Dit resulteert in langdurige, aanhouden geactiveerde ET_A receptoren, ook na het verwijderen van ERAs. Daar komt bij dat ERAs niet zorgen voor een dissociatie van ET-1 van de ET_A receptoren af. Aangezien moeilijk omkeerbaar gebonden, continu actieve ET-1/ET_A receptor complexen niet compatibel zijn met vasculaire homeostase, hebben we een rol voor calcitonine-gen gerelateerd peptide (CGRP) kunnen identificeren. CGRP wordt vrijgemaakt uit sensorische motor zenuwen en werkt als een terminator van ET-1/ET_A receptor complexen, daar het een directe dissociatie van deze complexen induceert. Dit zou deels een verklaring kunnen zijn van de cardiovasculaire bescherming die wordt toebedeeld aan een dieet waarin veel peper en knoflook wordt gebruikt, omdat stoffen uit deze planten zorgen voor een vrijmaking van CGRP uit de sensorische motor zenuwen.

De ongebruikelijke, atypische receptor farmacologie van ET_A receptoren kan het gebruik van medicijnen met een potentieel therapeutische toepassing bemoeilijken. Ter vergroting van het begrip van de interacties tussen de agonisten en de ET_A receptoren hebben we in **hoofdstuk 3** het belang van de aminozuur structuur van de agonist voor het binden aan en activeren van ET_A receptoren gekarakteriseerd. We hebben gevonden dat ET_A receptoren op arteriële gladde spiercellen agonist-afhankelijke eigenschappen vertonen die afhankelijk zijn van de aminozuren op posities 6 en 7 van de ET sequentie. Ook al lijken ET-1 en ET-2 vergelijkbare affiniteit voor en maximaal effect op ET_A receptoren te hebben en lijken beide agonisten

moeilijk omkeerbaar te binden aan deze receptoren, hun ET_A gemedieerde activiteiten lijken verschillend te worden gemoduleerd door een ERA. Daarbij is de uitwisseling van een enkel aminozuur in de agonist sequentie verantwoordelijk voor een drastische afname van affiniteit voor ET_A receptoren en heeft daarom grote farmacologische gevolgen.

Daar ERAs agonist-afhankelijke effecten hebben met betrekking tot ET_A receptor activiteit, hebben we verder gezocht naar het intracellulaire signaleringsmechanisme dat betrokken is bij de persisterende ET_A agonist responses in **hoofdstuk 4**. We hebben gevonden dat ook welk intracellulaire signaleringsmechanisme betrokken wordt bij de contractiele response afhankelijk is van met welke agonist de ET_A receptoren worden geactiveerd. Daarbij zijn er verschillende mechanismes betrokken bij de initiële contractiele response en het daaropvolgende vasospasme. Het signaleringsmolecuul PLC was geïdentificeerd als de faciliterende factor van zowel de contracties als de vasospasmes, en downstream van PLC waren TRPC3 en L-VOCC betrokken bij het mechanisme van vasospasme. De ET_A gemedieerde activatie van het intracellulaire signaleringsmechanisme was daarbij niet alleen agonist-afhankelijk, maar ook systeem-afhankelijk.

Vervolgens tonen we in **hoofdstuk 5** aan dat twee ERAs als allosterische modulators in plaats van competitieve antagonisten functioneren. Nadat we hadden vastgesteld dat de volledige 21 aminozuur sequentie van de agonist noodzakelijk is om ET_A receptoren te kunnen binden en activeren, hebben we gevonden dat de effecten van ERAs afhankelijk zijn van het type en de aanwezigheid van de ET_A agonist en van het formaat van de ERA. Deze effecten kunnen enkel worden toegeschreven aan een allosterisch mechanisme en niet zozeer aan een competitief antagonist mechanisme.

In **hoofdstuk 6** bediscussiëren we de bevindingen tegen het licht van onze huidige kennis van anti-ET therapie. We stellen voor dat, om ET_A receptoren effectiever als therapeutisch doelwit te gebruiken, we rekening moeten houden met welk van de ET_A agonisten betrokken zijn bij de specifieke situatie. Daarnaast moet, wanneer er nieuwe ERAs worden ontworpen, of wanneer huidige ERAs worden verbeterd, er aandacht moet worden geschonken aan mogelijke langdurige effecten van de ERA zelf, die uiteindelijk idealiter de ETs moet dissociëren van ET_A receptoren.