

## F 043569 számú OTKA pályázat

A központi idegrendszer validált célfehérjéi :

A funkcionálisan aktív konformációk modellezése

### Részletes beszámoló

A központi idegrendszer jelátviteli folyamataiban résztvevő célfehérjék és az MTA KK BKI Neurokémiai Osztályon kísérletesen vizsgált vegyületek között fellépő kötődési kölcsönhatások vizsgálatát számítógépes molekulamodellezéssel és dokkolási eljárással végeztük.

A glutaminsav receptorok (GluR) és transzporterek (GluT) szerepe kulcsfontosságú a serkentő jelátvitelben. A GluR családba ioncsatornát formáló (iGluR) valamint hét transzmembrán szakaszt tartalmazó (7TM) metabotróp (mGluR) altípusok tartoznak. Az osztályunkon folyó receptorkötődési és funkcionális vizsgálatokhoz kapcsolódóan, először az ioncsatornát formáló AMPA ligandum-specifikus iGluR2 receptor altípus extracelluláris kötődomén és ligandumai kötődési kölcsönhatásainak számítógépes modellezését végeztük el. Terveinknek megfelelően, a SYBYL molekulamodellező program felhasználásával az ortosztérikus agonista S-fluoro-willardiine ligandumot illesztettük be az iGluR2 extracelluláris doménban található AMPA kötőzsebbe, majd energiainimalizálás után összevetettük az AMPA és a Glu illeszkedési módjával. Ehhez kapcsolódóan vizsgáltuk az iGluR2 deszenzitizációját gátló ciklotiazid molekulának az iGluR2-agonista komplexekre kiváltott hatását is. Az irodalmi adatokkal összhangban megállapítottuk, hogy a receptor

alegységei közé ékelődő, allosztérikus modulátor ciklotiazid molekula közvetlen módon nem befolyásolja a ligandumkötőhely konformációját. Eredményeinket a *Neurochemistry International* című folyóiratban publikáltuk (Kovács et al., 2004).

A 7TM szakaszt tartalmazó mGluR1 receptor extracelluláris kötődőménének nagyfelbontású kristályos szerkezete munkánk kezdetén vált ismertté. A dimer szerkezetű kötődőmén nyitott és zárt konformációban is kristályosítható, a receptor lebenyei közé illeszkedő Glu molekula helyzetét mind a két állapotban meghatározták. Az osztályunkon folyó elektrofiziológiás mérések valószínűsítették, hogy egy epileptikus aktivitást befolyásoló molekula, a 2-metil-4-oxo-3*H*-kinazolin-3-acetil piperidin (Q5) egy mGluR receptoron keresztül fejt ki hatását. In vitro kötődési adatok arra utaltak, hogy a Q5 molekula még az mGluR agonista (1*S*,3*R*)-1-aminociklopentán-1,3-dikarbonsav (t-ACPD) molekula jelenlétében is képes Glu molekulát leszorítani az mGluR receptorról. A nagyfelbontású kristályos mGluR1 szerkezetek ismeretében, GOLD program felhasználásával végzett dokkolási vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a Q5 molekula illeszkedése az mGluR1 receptor nyitott kötőhelyébe a legkedvezőbb. Ez a kötőhely akkor is elérhető, ha a dimer másik felében található zárt konformációjú kötőhelyre az mGluR agonista t-ACPD molekula illeszkedik, így magyarázatot találtunk az elektrofiziológiás és kötődési kísérletekben tapasztalt jelenségekre. A fenti eredményeket összefoglaló cikket közlésre elfogadták (Lasztóczy et al., 2006).

Az extracelluláris térben felhalmozódó Glu eltávolítására specializálódtak a GluT fehérjék, melyek membránba ágyazott szerkezetük következtében nehezen kristályosíthatók. Elsőként, az emlős GluT egy bakteriális homológjának (bGluT) nagyfelbontású kristályos szerkezetét közölték 2004. végén. Ennek a szerkezetnek az ismeretében, megkezdjük bGluT és különböző ligandumok (Glu, Glu transzport inhibitor tPDC és gamma-aminovajsav) között fellépő kötődési kölcsönhatások vizsgálatát is, amelyet az mGlu1 és a felsorolt ligandumok

közötti kötődési kölcsönhatások összehasonlító vizsgálatával egészítettünk ki (Simon et al., 2006, beküldve). Eredményeinket a 1<sup>st</sup> European Chemistry Meeting 2006 konferencián is bemutatom, melynek részvételi díját az OTKA pályázat terhére fizettük ki. Terveinknek megfelelően, munkánkhoz beruházásként új számítógép került beszerzésre, amely a publikációs költségekkel együtt szintén az OTKA pályázat támogatásával valósult meg.

A 7TM receptorok egy részében a ligandum kötőhelye nem az extracelluláris, hanem a membránba ágyazott peptidláncokon található, ezek röntgendiffrakciós szerkezete – a rodopszin kivételével - nem ismert. Ebbe a receptortípusba tartozik a szomatosztatin (sst) receptorcsalád, mely kutatásunk másik irányát képezte. A 7TM receptorok membránba ágyazott részének szerkezetét csupán a fototranszdukciós kaszkádban résztvevő rodopszin esetén határozták meg, ez a nagyfelbontású kristályos szerkezet biztosít lehetőséget arra, hogy további 7TM receptorok membránba ágyazott szakaszait modellezhessük. Az ismert szerkezetű rodopszin molekulával fennálló homológia és az 1. altípusú sst receptor (sstr1) aminosavsorrendje alapján a Swiss PDB Viewer server és a SYBYL programcsomag felhasználásával felépítettük az sstr1 molekula TM szakaszainak homológiamodelljét, melybe AutoDock program segítségével az endogén sst peptid szintetikus analógját, a TT-232 peptidet dokkoltuk. Az irodalomban található mutációs kísérletek adatai és saját dokkolási eredményeink alapján azonosítottuk a TT-232 ciklopeptid és az sstr1 között fellépő kötődési kölcsönhatásban résztvevő aminosavakat. Eredményeinket a Biochemical and Biophysical Research Communications című lapban közöltük. (Simon et al., 2004), valamint bemutattuk az MTA KK Szakmai Napok rendezvényen (és az MTA KK Nemzetközi Tanácsadó Testülete előtt is), mely előadásomért Fialat Kutatói Díjban részesültem. Az eredmények a Magyar Idegtudományi Társaság (MITT) 2005-ös pécsi konferenciáján poszteren is bemutatásra kerültek, melynek részvételi díját és az utazási költséget az OTKA pályázat terhére számoltuk el. Ezt a vizsgálatot az sstr4 altípusra is kiterjesztettük (Orbán-Kis et al., 2006). A TT-232 in

vitro funkcionális hatásvizsgálatát Orbán-Kis Károly vendégkutató végezte 2006. januárjában (Marosvásárhelyi Orvostudományi és Gyógyszerészeti Egyetem), az ő itt-tartózkodásának napidíját OTKA pályázatunk terhére számoltuk el.

2003-ban kezdtük meg a fototranszdukciós kaszkád effektor enzime, a foszfodiészteráz (PDE) katalitikus gátlószereinek vizsgálatát. A fény hatására aktiválódó rodopszin receptor G fehérje transzducin és a PDE6 kötődési kölcsönhatásba lépnek. Ennek eredménye, hogy a PDE6 gátló gamma alegység konformációja megváltozik és a PDE6 katalitikus helyéhez kötődő cGMP hidrolizál. Egy katalitikus gátlószer (Zaprinast) adagolása - paradox módon - kezdetben növelte az izolált retina elektromos fényválaszát. Az eredményekről Barabás Péter a Magyar Idegtudományi Társaság 2004-ben tartott konferenciáján számolt be és a Neuroscience Letters című folyóiratban közölte (Barabás et al., 2004). A mérésekhez vegyszerek beszerzésére került sor a jelen OTKA pályázat terhére. A katalitikus inihibitorok (Zaprinast és Sildenafil) paradox hatásának molekuláris alapjait számítógépes modellezéssel és dokkolási eljárással vizsgáltuk tovább. Megállapítottuk, hogy a PDE6 enzimen gátlószerek hatására kiváltott kezdeti fényválasz-növekedésében szerepet játszanak a nagy térigényű katalitikus inihibitorok, melyek a katalitikus cGMP hidrolízist szabályozó PDE6 gamma alegységgel versenyeznek a katalitikus kötőhely szomszédságában található Phe778 és/vagy Met759 PDE6 aminosav oldalláncokkal, így annak gátlóhatását gátolják (Simon et al., 2006). Az eredményeket leíró publikációt 2006-ban fogadták el közlésre (Simon et al., 2006), valamint ezeket az American Society for Neurochemistry konferenciáján is bemutatjuk, az ehhez szükséges utazási költség egy részét jelen OTKA pályázat terhére számoltuk el.

A 2004-es évben lehetőségem nyílt egy hónapos tanulmányútra a strasbourgi Louis Pasteur egyetem gyógyszerészeti tanszék bioinformatikai csoportjában, ahol a molekulamodellézési és dokkolási eljárások legkorszerűbb módszereivel ismerkedhettem

meg. A francia kutatócsoport kutatásai mind a 7TM receptorok, mind a PDE enzimek vonatkozásában az MTA KK Neurokémiai Osztályán végzett kutatásainkkal rokon területen folynak, így az ott szerzett ismereteket közvetlenül tudtam alkalmazni az sstr receptorok és a PDE enzimek vizsgálata során. Az ott tartózkodást és az utazás felét a Magyar Ösztöndíj Bizottság és a Francia Intézet közös ösztöndíja, az utazás másik felét jelen OTKA pályázat fedezte. Az OTKA pályázat terhére az utazási költség felét és a biztosítást számoltam el.

A pályázat időtartama alatt - ígéreteinknek megfelelően - 3 év alatt 6 publikáció született, melyek hozzájárulnak néhány fontos idegi célfehérje-ligandum kölcsönhatás molekuláris alapjainak megértéséhez. A pályázat időtartama alatt végzett eredményes munka sikerességét Barabás Péter *summa cum laude* PhD fokozata, valamint mind a két résztvevő MTA Ifjúsági Díja (Barabás Péter, 2006; Simon Ágnes, 2004) is jelzi.