

A receptorok finomszerkezetének megismerése jelen projekt időszakában ért abba a fázisba, hogy farmakológiai szabályozásuk a receptor kémiai-szerkezeti szintjén és termodinamikai alapon is tervezhetővé válik (16). Ez a paradigmaváltás volt a tárgya nemrég egy neurofarmakológiai konferenciának (lásd a 15. hivatkozásban). Az allostérikus finomszabályozás szerkezeti részletei viszont még alig ismertek. A neurotranszmitter receptorok jelentik az egyik legnagyobb kihívást az allostérikus szabályozás számára, mivel a neurotranszmisszió farmakológiája finomszabályozást igényel, amire azonban a receptorok ortostérikus ligandumainak közvetlen, robusztus hatása nem alkalmas. Az allostérikus szabályozás kémiai szintű megismeréséhez a pentamer szerkezetű ionotróp neurotranszmitter receptor-családot választottuk, amelybe kiemelkedő farmakológiai jelentőségű receptorok tartoznak: A-típusú γ -aminovajsav ($GABA_A$), nikotinos acetilkolin, 3-típusú szerotonin ($5-HT_3$) és glicin receptorok.

Az **5-HT₃ receptorok** és antiemetikus antagonistáik kölcsönhatásának vizsgálata az $5-HT_{3A}$ receptor új homológia modelljére épült, amelyet a nikotinos acetilkolin receptor agonista-mentes elektronmikroszkópiás szerkezetére alapoztunk. A nyitott kötőüregben az $5-HT_3$ receptor antagonistá gransetron számítógépes dokkolása kétféle kötődésmódot eredményezett. Az új receptor-régió hozzájárulását gransetron kötődéséhez együttműködő biokémikusok (Fairbanks, USA) az $5-HT_3$ receptor kötőhurkokban pontmutációkkal támasztották alá: Az L184A, H185Y és D189A mutációk lecsökkentették [³H]gransetron kötődési affinitását. Feltehetőleg a tropán tercier nitrogénje létesít kölcsönhatást az N128 oldallánccal, majd gransetron távolabb újrakötődik (transzláció). Ekkor az indol gyűrűje D189 és Y141 aminosavak közelébe kerül. Gransetron antagonizmusa annak tulajdonítható, hogy sztérikusan gátolja a C kötőhurok rácsukódását a kötőüregre (1).

Az $5-HT_3$ típusú szerotonin receptorok és ligandumaik kölcsönhatását olasz-magyar együttműködésben is vizsgáltuk. Nagy és kisaffinitású tienopirimidinek $5-HT_{3A}$

receptormodellbe dokkolásának eltéréseiből következtettünk a ligandumok stabil és labilis kötődésmódjaira (6). Amerikai társszerzőkkel, könyvfejezetben foglaltuk össze az 5-HT_{3A} receptor és ligandumai kölcsönhatásainak összefüggéseit a pentamer szerkezetű ionotróp neurotransmitter receptorok modellezése céljából (2).

A legfontosabb gátló neurotransmitter, a γ -aminovajsav **GABA_A receptor**ainak allosztérikus modulációját tanulmányoztuk. Számos bifenil származék (pl. *diflunisal*) gyulladáscsökkentő és a GABA_AR-ok allosztérikus modulátora is. Dr. *Uusi-Oukari*-val (*Univ. of Turku*) együttműködésben megvizsgáltuk egy tucat bifenil származék gyűrűszubsztituenseinek a szerepét a [³H]4'-etinilbikloortobenzóát (EBOB) kötődésre patkány előagyi GABA_AR-okra. Egy terner allosztérikus kötődési modell felhasználásával meghatároztuk a vegyületek receptoraffinitását és pozitív kooperativitását GABA kötődésével. A szerkezet-hatás összefüggések lehetővé teszik a GABA_Aerg neurotransmissziós és gyulladáscsökkentő hatások szerkezeti követelményeinek megkülönböztetését (3).

Együttműködésben a *Richter Rt* elektrofiziológusával, Fodor Lászlóval (aki MG témavezetésével 2006-ban szerzett az ELTE-en PhD fokozatot) megvizsgáltuk a GABA_AR-ok allosztérikus modulációját neuroaktív szteroidokkal (5). Az allopregnanolon 17 β -szubsztituált származéka, a (20R)-17 β -(1-hydroxy-2,3-butadienyl)-5 α -androstane-3 α -ol (HBAO, 1. ábra), nanomólos affinitással, sztereo- és agyrégió-szelektív módon antagonizálta allopregnanolon potencírozó hatását a GABA_AR-ok klorid ioncsatornáira kisagyi szemcsesejtekben. Receptorkötődési és ionofór funkcionális vizsgálataink, pl. az α 6-szelektív antagonist furoszemid gátló hatása, α 6 β δ alegységösszetételű GABA_AR-ok szerepét igazolták a kisagyban (5). HBAO az első neuroszteroid antagonist, amely nanomólos affinitású és alegység-szelektív.

Allopregnanolon és 5 α -tetrahydrodeozokortikoszteron (THDOC), a két legfontosabb neuroszteroid, a GABA_AR-ok endogén pozitív modulátorai (1. ábra). Összehasonlítottuk hatásukat különböző agyrégiók GABA_AR kötődésére és ioncsatorna funkciójára (15). Patkány és egér kisagyi és nagyagykérgi GABA_AR-ok [³H]EBOB kötődését a két neuroszteroid és GABA agonisták kétfázisú koncentráció-függéssel szorították le, nanomólos és mikromólos affinitással. Az $\alpha 6$ KO egerek kisagyában, ahol az $\alpha 6$ és δ alegységtartalmú GABA_AR-ok hiányoznak, a nanomólos leszorítás elmaradt. A két neuroszteroid GABA_AR-ok funkcióját (GABA-kiváltott klorid áramát) is kétfázisos koncentráció-függéssel potenciózta, nanomólos és mikromólos affinitással. Az $\alpha 6$ -szelektív antagonistá furoszemid szelektíven gátolta az allopregnanolon nanomólos potenciózó hatását, THDOC-ét nem. Az allopregnanolon nanomólos koncentrációban felelős az extraszinaptikus $\alpha 6\beta\delta$ GABA_AR-ok tónusos (folyamatos) gátló hatásának élettani szabályozásáért, míg THDOC a potenciózáshoz szükséges mikromólos koncentrációt nem éri el. Összegezve, eltérések a 20-szubsztituens szerkezetében több nagyságrendnyi változást eredményezhetnek a három neuroaktív szteroid affinitásában és hatásirányában különböző GABA_AR populációkon.

A **glicin receptorokat** (GlyR) a *Richter Rt* farmakológusaival együttműködésben vizsgáltuk (4). Glicin a gerincvelő legfontosabb gátló neurotranszmittere. Patkány embrionális gerincvelői idegsejt-tenyészetben először mutattuk ki a GlyR $\alpha 3$ alegységeinek mRNS-eit, az $\alpha 1$, $\alpha 2$ és β alegységek hírvivő RNS-ei mellett. Sikerült ezen alegységek fehérjéinek immuncitokémiai kimutatása is. A GlyR-ok klorid ioncsatorna funkcióját egész sejtes *patch-clamp* módszerrel vizsgáltuk. Farmakológiai tulajdonságaik *homopentamer* α GlyR-ok dominanciájára utaltak. Neuroaktív szteroidok mikromólos koncentrációban gátolták a GlyR funkciót (4).

A GlyR-ok potenciózása terápiás előnyökkel kecsegtet, de GlyR-ok ligandumaként ható gyógyszert még nem fejlesztettek ki. 5-HT₃R antagonistá tropeinekből GlyR-szelektív

modulátorokhoz jutottunk el. Nemes Péter és munkatársa (Szt. István Egyetem) előállították a 3 α -hidroxi-(nor)tropán számos (hetero)aromás mono- és bisz észterét (8, 10). Patkány gerincvelői preparátumban vizsgáltuk [³H]strichnin kötődését GlyR-okhoz és egy terner kötődési modellel határoztuk meg az észterek kötődési erősségét, valamint kooperativitását a glicin kötődésével (8). A 3 α -(3'-indolkarboniloxi)nortropán (nortropisetron) affinitása bizonyult a legjelentősebbnek ($K_D \sim 10$ nM). A 3 α -hidroxi-nortropán észtereinek (nortropeinek) leszorító hatása a [³H]strichnin kötődésre egyfázisos volt, a 3 α -hidroxi-tropán heteroaromás észtereie pedig kétfázisos. A nanomólos $IC_{50,1}$ és mikromólos $IC_{50,2}$ értékek aránya 1-615 között változott a heteroaromás gyűrű szerkezete és az N-metil szubsztitúció függvényében. A kétféle affinitás is a tropeinek kétféle, gátló és potenciáló kötődésmódját támasztja alá. A szerkezet-hatás összefüggések alapján lehetőség nyílik GlyR-okat szelektíven potenciáló tropeinek kifejlesztésére (10).

Német együttműködésben (Max-Planck Inst. Brain Res., Frankfurt) *in vitro* kötődési teszttel határoztuk meg rekombináns GlyR-ok allosztérikus modulátorainak kötődési paramétereit (7). Az $\alpha 1$ GlyR egyes pontmutációi (pl. R271L) öröklődő neurológiai betegséget, *hiperekplexiát* eredményeznek. A kontroll humán $\alpha 1$ GlyR-t és R271L pontmutánsát expresszáló sejtenyészetben összehasonlítottuk a nortropeinek és propofol kötődési paramétereit és pozitív kooperativitását glicin kötődésével. A 3 α -(2',3'-benzforán-5',5'-dimetil-8'-klór-6'-karboniloxi)nortropán (1. ábra) kiemelkedő és szelektív affinitása ($K_D \sim 3$ nM) a *hiperekplexia* mutáns receptorhoz gyógyszerkémiailag is hasznosítható lehet (7).

A német neurokémikusokkal megvizsgáltuk egy másik nagyaffinitású nortropein, a 3 α -(3'-metoxi-benzoiloxi)nortropán (MBN) potenciáló és gátló hatását GlyR agonistákra, azaz rekombináns humán $\alpha 1$ GlyR-ok klorid áramára (9). Számos pontmutáció a GlyR agonisták kötőürege körül megszüntette az MBN mikromólos gátló hatását. Viszont más mutációk

(Q67A, R119A és S129A), közeli pozíciókban, megakadályozták az MBN nanomólos potenciáló hatását, de nem hatottak a mikromólos gátlására. Következésképpen az agonista kötőüregben MBN különböző módon/pozícióban kötődve fejti ki gátló és potenciáló hatását a GlyR-okra. A tropeinek transláció és rotáció révén juthatnak át egyik pozícióból a másikba. Homológia modellezés és molekuladinamikai szimuláció alapján az $\alpha 1$ GlyR-ok kötőüregében a potenciáló kötődésmódú MBN behúzza a C kötőhurkot, a gátló MBN pedig nyitva hagyja az üreget (9).

Figyelemre méltó, hogy egy arginin oldallánc pontmutációi eltérő irányban hatottak MBN hatására az $\alpha 1$ GlyR-ra (9): Az R119A mutáció megszüntette az MBN potencírozó hatását, míg R119K a gátlást (2. ábra). Todorovic és munkatársai [*PNAS USA* **107**, 7987 (2010)] nemrég közölték, hogy Arg119 és Asp90 a GlyR szomszédos alegységeinek kontakt-felületén ionos kölcsönhatást létesít és az ioncsatornát zárt konformációban tartja. Feltételezzük, hogy Arg119 rotamerjei mikro-kapcsolóként hatnak a tropeinek gátló és potencírozó hatása között. Molekuladinamikai szimulációnk szerint MBN potencírozó kötődésmódjában a gyűrű-N hidrogénhid kölcsönhatást létesíthet Arg119 guanidin csoportjával (2. ábra). Ez perturbálja az R119-D90 sóhidat és ennek jelátviteli hatása nyitná ki az ioncsatornát. Az MBN a gátló kötődésmódjában távol van Arg119-től, amely ilyenkor más rotamer konformációt vesz fel (2. ábra). Kis szerkezetváltoztatás (arginin-lizin csere) is elégséges a gátlás felszámolásához. Egyazon vegülettel a GlyR-ok gátlását és potencírozását a receptorszerkezet szintjén ezidáig nem jellemezték. Az Arg119 rotamerek mikro-kapcsoló szerepének értelmezését egy szerkezeti-farmakológiai konferencián mutattuk be (14).

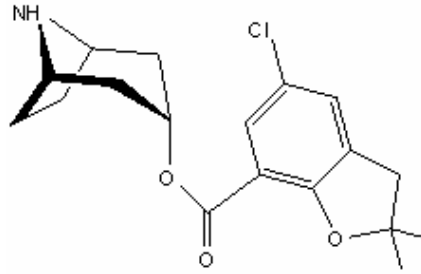
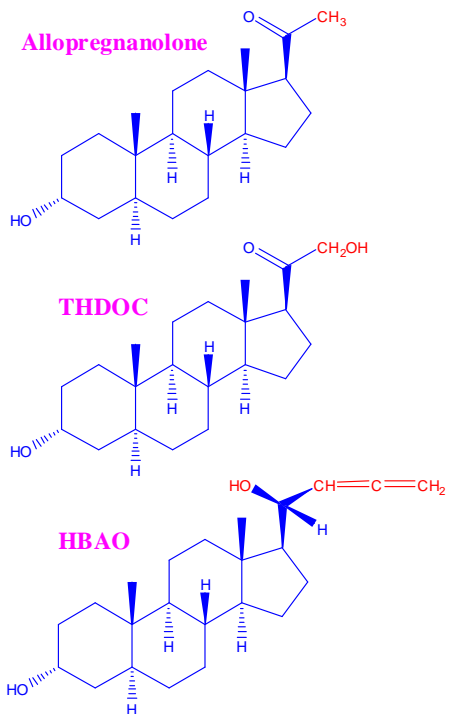
Maksay több összefoglaló tanulmányban elemezte a pentamer szerkezetű, ligandum-aktivált ioncsatorna-receptorcsalád (GABA_AR, GlyR, 5-HT_{3A} és nikotinos acetilkolin receptorok) szerkezete, ligandumkötődése, aktivációja és allosztérikus modulációja összefüggéseit (11-13). A farmakológiai allosztéria jelenségét receptorok és ioncsatornák

példáival jellemezte. Áttekintette és termodinamikai alapokra vezette vissza az allosztéria evolúcióját és tervezhetőségét (13, 16).

Hivatkozások

- (1) P.R. Joshi, A. Suryanarayanan, E. Hazai, M.K. Schulte, G. Maksay and Zs. Bikádi: Interactions of granisetron with an agonist-free 5-HT_{3A} receptor model. *Biochemistry* **45**, 1099-1105 (2006).
- (2) M.K. Schulte, R. Hill, Zs. Bikádi, G. Maksay, H. Parihar, P. Joshi and A. Suryanarayanan: The structural basis of ligand interactions in the 5-HT₃ receptor binding site. *Biological and Biophysical Aspects of Ligand-Gated Ion Channel Receptor Superfamilies* (ed. H. R. Arias). Research Signpost, p. 127-154 (2006).
- (3) M. Uusi-Oukari and G. Maksay: Allosteric modulation of [³H]EBOB binding to GABA_A receptors by diflunisal analogues. *Neurochem. Int.* **49**, 676-682 (2006).
- (4) L. Fodor, A. Boross, P. Dezső and G. Maksay: Expression of heteromeric glycine receptor-channels in rat spinal cultures and inhibition by neuroactive steroids. *Neurochem. Int.* **49**, 577-583 (2006).
- (5) G. Maksay, L. Fodor, T. Bíró, N. Avlonitis and T. Calogeropoulou: A 17β-derivative of allopregnanolone is a neurosteroid antagonist of a cerebellar subpopulation of GABA_A receptors with nanomolar affinity. *Brit. J. Pharmacology*, **151**, 1078-1086 (2007).
- (6) M.N. Modica, G. Romeo, L. Salerno, V. Pittalà, M.A. Siracusa, I. Mereghetti, A. Cagnotto, T. Mennini, R. Gáspár, A. Gál, G. Falkay, M. Palkó, G. Maksay and F. Fülöp: Synthesis and receptor binding of new thieno[2,3-*d*]pyrimidines as selective ligands of 5-HT₃ receptors. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **341**, 333-343 (2008).

- (7) G. Maksay, T. Bíró, B. Laube, and P. Nemes: Hyperekplexia mutation R271L of α_1 glycine receptors potentiates allosteric interactions of nortropeines, propofol and glycine with [3 H]strychnine binding. *Neurochem. Int.* **52**, 235-240 (2008).
- (8) G. Maksay, P. Nemes, Z. Vincze and T. Bíró: Synthesis of (nor)tropeine (di)esters and allosteric modulation of glycine receptor binding. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, 2086-2092 (2008).
- (9) G. Maksay, B. Laube, R. Schemm, J. Grudzinska, M. Drwal and H. Betz: Different binding modes of tropeines mediating inhibition and potentiation of α_1 glycine receptors. *J. Neurochem.* **109**, 1725-1732 (2009).
- (10) G. Maksay, Z. Vincze and P. Nemes: Synthesis of heteroaromatic tropeines and heterogeneous binding to glycine receptors. *Bioorg. Medicinal Chem.* **17**, 6872-6878 (2009).
- (11) G. Maksay. Ligand-gated pentameric ion channels: from binding to gating. *Curr. Mol. Pharmacol.* **2**, 253-262 (2009).
- (12) Maksay G. Allosztéria: Ioncsatornák és receptorok. *Biokémia XXXIII. évf. 4. szám*, 19-29 (2009).
- (13) G. Maksay: Allosztéria-II: Evolúció és tervezés. *Biokémia XXXIV/1*, 46-53 (2010).
- (14) G. Maksay, L. Fodor, R. Schemm, B. Laube: Bidirectional allosteric modulation of GABA_A receptors by neurosteroids and glycine receptors by tropeines. *20th Neuropharmacology Conference. High Resolution Neuropharmacology: Structure Changes the Paradigm*. San Diego, USA. 2010. november 10.-12.
- (15) G. Maksay, L. Fodor: Differential effects of two major neurosteroids on cerebellar and cortical GABA_A receptor binding and function. *Eur. J. Pharmacol.* **650**, 94-101 (2011).
- (16) G. Maksay: Allostery in pharmacology: Thermodynamics, evolution and design. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, doi:10.1016/j.pbiomolbio.2011.01.001.



1. ábra

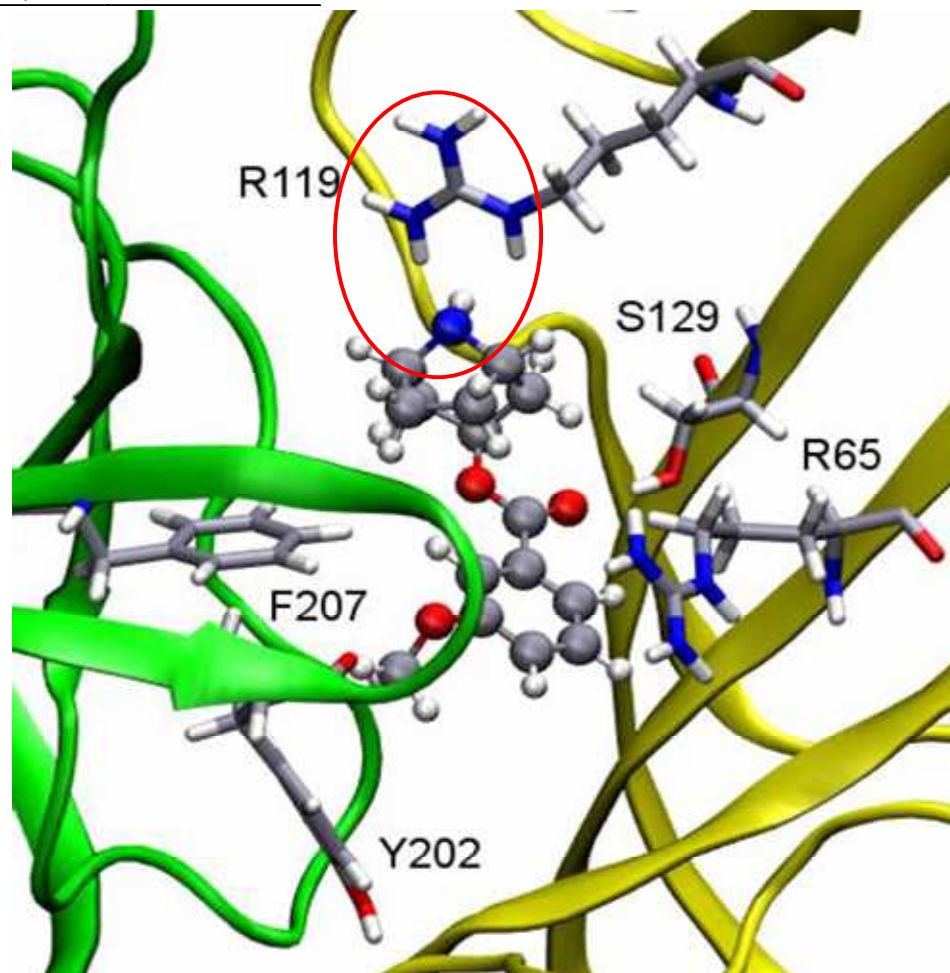
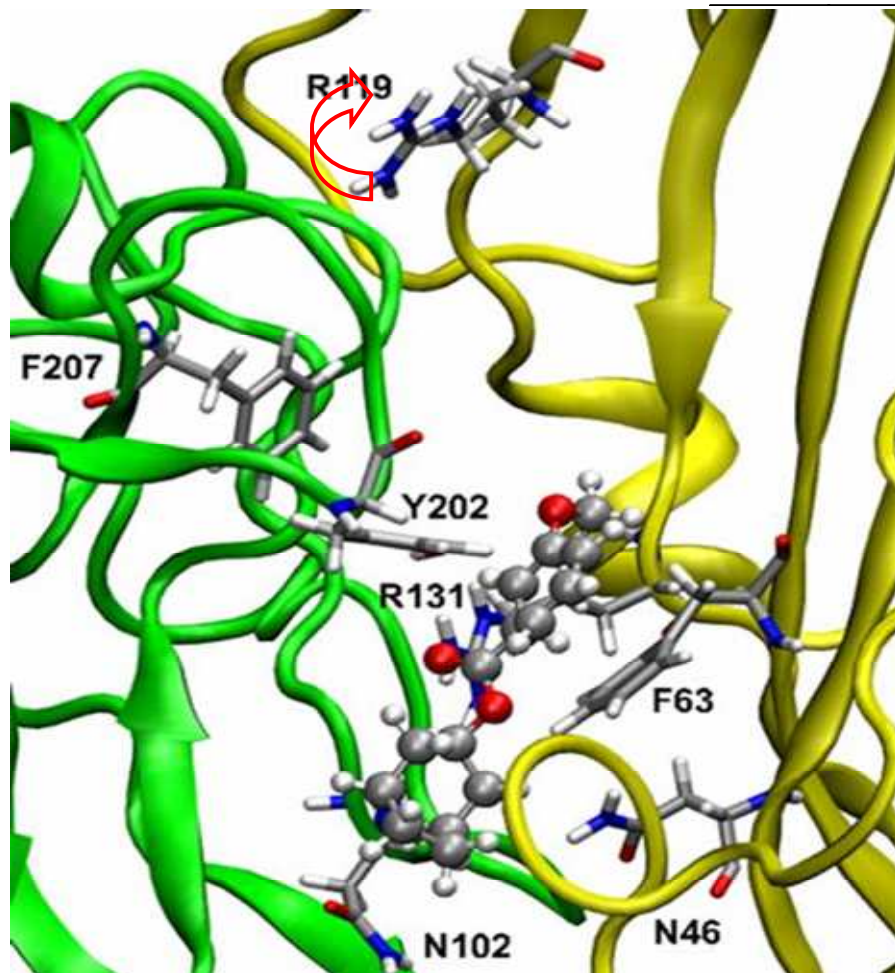
Neuroaktív szteroidok és 3 α -(2',3'-benzofurán-5',5'-dimetil-8'-klór-6'-karboniloxi)nortropán szerkezete.

Tropein kötődés

gátlás

R119A	2.5±1.1 μM	91±4 % ↓
R119K	>>100 μM ↑	142±14 %

fokozás



2. ábra