

Az endomorfinek konformáció-analízise

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Leitgeb Balázs

Témavezető:
Dr. Tóth Géza
tudományos tanácsadó

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Biokémiai Intézet

Szeged, 2006.

*„Mind így van ezzel, aki hasonló időket megél, de a döntés nem rajta áll.
Nekünk arról kell döntenünk, mihez kezdjünk az idővel,
amely számunkra megadatik.” - Szürke Gandalf (Mória bányáiban)*
A gyűrűk ura - A gyűrű szövetsége

Bevezetés és célkitűzések

Az endomorfín-1 (EM1, H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) és endomorfín-2 (EM2, H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) aktív és szelektív μ -opioid receptor agonisták, amelyek számos jelentős biológiai hatással rendelkeznek az emlősök szervezetében. Ezek a tetrapeptidok szerepet játszanak a fájdalomérzékelés szabályozásában és a fájdalomcsillapításban, valamint komplex hatást mutatnak a vérkeringési rendszerben, illetve szabályozzák az ingerületátvivő anyagok szabadon bocsátását, továbbá immunmoduláló hatással is rendelkeznek.

Ezen komplex biológiai hatás miatt fontos, hogy felismerjük ezeknek a flexibilis tetrapeptidoknak azon szerkezeti elemeit, amelyek szerepet játszanak a bioaktív konformáció kialakításában, és felelősek az aktivitásért és a szelektivitásért. Az eddigi munkák alapján kiderült, hogy az endomorfínok esetén farmakofór elemnek tekinthető az N-terminális NH₂ csoport, a Tyr aminosav az egyes pozícióban, továbbá egy aromás aminosav (Trp vagy Phe) a harmadik vagy a negyedik pozícióban. Emellett a *message-address* koncepció értelmében az endomorfínok feloszthatók egy *message* szekvenciára (N-terminális Tyr¹-Pro²-Trp³ és Tyr¹-Pro²-Phe³ tripeptid egységek), és egy *address* szekvenciára (C-terminális Phe⁴-NH₂). A tetrapeptidok ezen két része játszik szerepet a receptorhoz kötődésben, valamint a receptor felismerésében.

Az endomorfínokat 1997-ben izolálták, és azóta ezen tetrapeptidok különböző farmakológiai hatásait részletesen tanulmányozták, azonban az endomorfínok térszerkezetével kapcsolatosan eddig kevés eredmény látott napvilágot. Mindemellett az irodalomban eddig közölt szerkezetvizsgálati munkák eredményei alapján különböző javaslatokat tettek az endomorfínok bioaktív konformációját illetően, tehát eléggé diffúz kép alakult ki arról, hogy milyen szerkezeti tulajdonságok teszik aktívvá ezeket az opioid peptidokat.

Mindezek figyelembevételével kutatásunk egyik céljaként tűztük ki, hogy részletesen feltérképezzük ezeknek a flexibilis tetrapeptidoknak a konformációs tereit, valamint meghatározzuk az oldatban létező, illetve a

preferált konformációs állapotait. További célként fogalmazódott meg, hogy azonosítsuk ezen peptidek jellegzetes másodlagos szerkezeti elemeit, valamint karakterizáljuk azokat az intramolekuláris kölcsönhatásokat, amelyek szerepet játszhathatnak a különböző konformációs állapotok és másodlagos szerkezetek geometriájának stabilizálásában. Végül célul tűztük ki azt is, hogy megpróbáljuk azonosítani azokat a strukturális tulajdonságokat, másodlagos szerkezeti elemeket, illetve intramolekuláris kölcsönhatásokat, amelyek fontosak lehetnek az endomorfinek bioaktív konformációinak kialakításában.

Módszerek

Az endomorfinek konformáció-analízisét végeztük el különböző módszerek (szimulált anelláció, random keresés, molekuladinamika) alkalmazásával. A számításokat az AMBER erőter felhasználásával az INSIGHT II programcsomag (Accelrys Software, Inc.) Discover 3 moduljával, illetve a SYBYL programmal (Tripos, Inc.) végeztük el Silicon Graphics Origin2000 típusú számítógépen (Silicon Graphics, Inc.) Irix 6.5 operációs rendszer alatt. A tetrapeptideket az N-terminális amino-csoport semleges (NH_2 -), illetve protonált (NH_3^+ -) állapotának megfelelően kétféleképpen modelleztük. Mivel az NMR adatok azt mutatják, hogy az endomorfinek a Tyr¹-Pro² peptidkötés *cisz*, illetve *transz* állapotának megfelelő izomerek egyensúlyi keverékeként vannak jelen, ezért a számításokat mindkét izomerre külön-külön elvégeztük.

Eredmények

1. A Φ - Ψ konformációs terek, illetve a konformerek eloszlásainak jellemzésére Ramachandran [1,2], pszeudo-Ramachandran, 3DR [3], 3DPR [3] és parallel-koordinátás ábrákat készítettünk a Tyr¹, Pro², Trp³/Phe³ és Phe⁴ aminosavak Φ és Ψ torziós szögeinek felhasználásával. A különböző típusú Ramachandran ábrákon meghatároztuk a konformerek által preferált tartományokat [1,2,3], továbbá ezen ábrák és a konformációs hasonlósági indexek alapján összehasonlítottuk a konformációs eloszlásokat. A Tyr¹, Trp³/Phe³ és Phe⁴ aminosavak oldalláncai esetén meghatároztuk a konformerekben előforduló $g(+)$, $g(-)$ és *transz* rotamer populációk arányait [1,2], továbbá ezen oldalláncok rotamer kombinációit is azonosítottuk [3].
2. Kétféle távolságmérést végeztünk el a tetrapeptidekre vonatkozóan. Egyik esetben az N-terminális N atom és a molekulagerinc további N és O atomjai közötti távolságokat mértük meg [1,2], míg a másik esetben a Tyr¹, Trp³/Phe³ és Phe⁴ oldalláncok aromás gyűrűinek, valamint a Pro² pirrolidin gyűrűjének geometriai középpontjába definiált pszeudoatomok közötti távolságokat határoztuk meg [1,2]. A molekulagerinc atomok közötti kisebb távolságok a különféle hajlított struktúrákat, míg a nagyobb távolságok a nyújtott molekulagerinccel rendelkező konformereket jellemzik. A pszeudoatomok között mért kisebb távolságok azt mutatják, hogy ezekben a tetrapeptidekben kialakulhatnak különböző aromás-aromás és prolin-aromás kölcsönhatások.
3. Meghatároztuk az endomorfinok konformereiben kialakuló intramolekuláris H-kötések típusait és populációit [1,2]. A hajlított molekulagerinccel jellemezhető konformerekben az aminosavak molekulagerinc atomjai között többféle intramolekuláris H-kötés alakulhat ki. A Tyr¹-Trp³, Tyr¹-Phe³, Tyr¹-Phe⁴ és Pro²-Phe⁴ aminosav párok között megfigyelhető H-kötések utalnak a különböző típusú β - és γ -turn másodlagos szerkezetek jelenlétére. Mindemellett azonban még további H-kötések is kialakulhatnak az endomorfinokban egyrészt a molekulagerinc atomok,

másrészt a molekulagerinc és az oldallánc atomok között. A különféle hajlított struktúrákban ezenfelül előfordulnak különböző bifurkált H-kötések (bifurkáció és inverz bifurkáció) is [1,2], amelyek tovább stabilizálhatják ezeket a szerkezeteket.

4. Azonosítottuk az endomorfinok konformereiben előforduló másodlagos szerkezeti elemeket [1,2,4]. Ezekben a tetrapeptidekben különböző típusú β - és γ -turn struktúrák alakulhatnak ki, amelyek többségét a Tyr¹-Phe⁴, Tyr¹-Trp³, Tyr¹-Phe³ és Pro²-Phe⁴ aminosavak közötti 1 $\leftarrow$ 4, 1 $\leftarrow$ 3 és 2 $\leftarrow$ 4 intramolekuláris H-kötések stabilizálják. A β -turn másodlagos szerkezetek közül a *transz*-EMk esetén leginkább a III és V típusú β -turn-ök figyelhetők meg, míg a *cisz*-EMk esetében a III típusú β -turn populációja bizonyult a legnagyobbak, ugyanakkor a *cisz* izomerek konformereiben nem találhatók meg az V típusú β -turn-ök. Emellett a *transz*-EMk esetén az N-terminális tripeptid egységekben (Tyr¹-Pro²-Trp³, Tyr¹-Pro²-Phe³) kialakulnak inverz γ -turn struktúrák, amelyek a *cisz*-EMk esetében egyáltalán nem figyelhetők meg. Mindkét izomer konformereiben megtalálhatók azonban a γ - és inverz γ -turn másodlagos szerkezetek a C-terminális tripeptid egységekben (Pro²-Trp³-Phe⁴, Pro²-Phe³-Phe⁴). Ezenkívül az endomorfinok *transz* izomerei esetén előfordulnak ún. inverz γ - γ , inverz γ - inverz γ , inverz γ - β , illetve β - γ átfedő turn struktúrák is [4].
5. A H-kötések mellett egyéb intramolekuláris kölcsönhatások (aromás-aromás és prolin-aromás kölcsönhatások) is szerepet játszhatnak az endomorfinok különböző konformereinek stabilizálásában.
- 5.1. Az endomorfinok Tyr¹-Trp³, Tyr¹-Phe³, Tyr¹-Phe⁴, Trp³-Phe⁴ és Phe³-Phe⁴ aminosav párpainak aromás oldalláncai esetén meghatároztuk a kialakuló aromás-aromás kölcsönhatások populációit [4]. Ezt követően azonosítottuk a kölcsönható aromás gyűrűk preferált geometriai orientációit, illetve a kölcsönhatásokban résztvevő oldalláncok rotamer kombinációit [4]. Az endomorfinokban előforduló aromás-aromás

kölcsönhatások populációi azt sugallják, hogy ezeknek a kölcsönható pároknak fontos szerepe lehet az EM1 és EM2 különböző konformereinek kialakításában és stabilizálásában.

- 5.2. A tetrapeptidek Pro²-Tyr¹, Pro²-Trp³, Pro²-Phe³ és Pro²-Phe⁴ aminosav páirjai esetében meghatároztuk a kialakuló prolin-aromás kölcsönhatások populációit, illetve azonosítottuk, hogy a Pro² pirrolidin gyűrűjének melyik C atomja vesz részt a különböző prolin-aromás kölcsönhatásokban [4]. Ebben az esetben is azonosítottuk a prolin és az aromás gyűrűk kölcsönhatásakor kialakuló preferált geometriai orientációkat, illetve a pirrolidin gyűrűvel kölcsönható aromás oldalláncok rotamer populációit [4]. A *cisz*-EMk esetén megfigyelhető Pro²-Tyr¹ kölcsönhatások arra utalnak, hogy ezek a kölcsönható prolin-aromás párok hozzájárulhatnak a *cisz* peptidkötés stabilizálásához.
- 5.3. Megvizsgáltuk az endomorfinek konformereiben előforduló másodlagos szerkezeti elemekben (III és V típusú β -turn-ök, N-terminális inverz γ -turn-ök, C-terminális γ - és inverz γ -turn-ök) jelenlévő aromás-aromás és prolin-aromás kölcsönhatások típusait [4]. A különböző β - és γ -turn másodlagos szerkezetek esetén megfigyelhető, hogy ezen turn-ök többsége tartalmaz valamilyen aromás-aromás vagy prolin-aromás kölcsönhatást. Az intramolekuláris H-kötéssel rendelkező turn struktúrák esetén a kölcsönható aromás és prolin-aromás párok egy további stabilizáló hatást eredményezhetnek. Az endomorfinek esetén azonban olyan turn-ök is megfigyelhetők, amelyekben hiányoznak az intramolekuláris H-kötések, és ezekben az esetekben az aromás-aromás és prolin-aromás kölcsönhatások fontos szerepet játszhatnak a konformerek stabilizálásában.
- 5.4. Az EM1 és EM2 konformerei között található olyan struktúrák, amelyekben egyidejűleg fordul elő két különböző aromás-aromás vagy prolin-aromás kölcsönhatás, illetve megfigyelhetők olyan konformerek is, amelyekben egy aromás-aromás és egy prolin-aromás kölcsönhatás alakul ki egyidőben [4]. Az endomorfinek azon *cisz* izomereiben,

amelyek Pro²-Tyr¹ és Pro²-Trp³/Pro²-Phe³ kölcsönható párokat, vagy Pro²-Tyr¹ és Pro²-Phe⁴ kölcsönhatásokat tartalmaznak egyidejűleg, kialakulhat egy ún. kompakt „szendvics” struktúra [4], amelyben az aromás aminosavak oldalláncai közrefogják a Pro² pirrolidin gyűrűjét.

6. A *message-address* koncepciónak megfelelően az endomorfinek N-terminális tripeptid egységei játszanak fontos szerepet a receptorhoz kötődés során. Ezekben az N-terminális részekben a *transz*-EMk esetén előfordul inverz γ -turn struktúra, míg a *cisz*-EMk esetében ez a másodlagos szerkezeti elem egyáltalán nem figyelhető meg. Ezt figyelembe véve elképzelhető, hogy az endomorfinek esetén a lehetséges bioaktív konformer *transz* Tyr¹-Pro² peptidkötést tartalmaz, és az N-terminális tripeptid régióban inverz γ -turn struktúrával jellemezhető [1,2].
7. Molekulamodellelési munkánk során meghatároztuk az endomorfinek preferált konformációs állapotait, a jellegzetes másodlagos szerkezeti elemeket, illetve az ezeket stabilizáló különböző intramolekuláris kölcsönhatásokat [1,2,3,4]. A tetrapeptidek konformáció-analíziséből kapott eredmények alapján javaslatot tettünk az EM1 és EM2 lehetséges bioaktív konformációjára [1,2], valamint a stabilizáló kölcsönhatások szerepére vonatkozóan [1,2,4].

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációk

1. **Leitgeb, B.**, Ötvös, F., Tóth, G.: Conformational analysis of endomorphin-2 by molecular dynamics methods. *Biopolymers* **68(4)**, 497-511 (2003) IF: 2.733
2. **Leitgeb, B.**, Szekeres, A., Tóth, G.: Conformational analysis of endomorphin-1 by molecular dynamics methods. *J. Pept. Res.* **62(4)**, 145-157 (2003) IF: 1.545
3. **Leitgeb, B.**, Szekeres, A.: Exploring the conformational space of the μ -opioid agonists endomorphin-1 and endomorphin-2. *J. Mol. Struct. - THEOCHEM* **666-667**, 337-344 (2003) IF: 1.027
4. **Leitgeb, B.**, Tóth, G.: Aromatic-aromatic and proline-aromatic interactions in endomorphin-1 and endomorphin-2. *Eur. J. Med. Chem.* **40(7)**, 674-686 (2005) IF: 1.673
5. **Leitgeb, B.**, Szekeres, A.: Exploring the conformational space of the μ -opioid agonists endomorphin-1 and endomorphin-2. In *The Role of Chemistry in the Evaluation of Molecular Medicine. A Tribute to Professor Szent-Györgyi Albert*. (Eds: Csizmadia, I. G., Penke, B., Tóth, G.), Elsevier Science Ltd., pp. 337-344. (2004)

Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó publikációk

6. Bogár, F., **Leitgeb, B.**, Paragi, G., Orosz, A., Penke, B.: Comparative study of SP[6-11] and its analogs using simulated annealing. *Biopolymers* **78(1)**, 35-45 (2005) IF: 2.863
7. Szekeres, A., **Leitgeb, B.**, Kredics, L., Antal, Z., Hatvani, L., Manczinger, L., Vágvolgyi, C.: Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma* - A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* **52(2)**, 137-168 (2005) IF: 0.000

8. Tenger, K., Khoroshyy, P., **Leitgeb, B.**, Rákhely, G., Borovok, N., Kotlyar, A., Dolgikh, D. A., Zimányi, L.: Complex kinetics of the electron transfer between the photoactive redox label TUPS and the heme of cytochrome c. *J. Chem. Inf. Model.* **45(6)**, 1520-1526 (2005) IF: 2.810
9. Szekeres, A., **Leitgeb, B.**, Kredics, L., Manczinger, L., Vágvölgyi, C.: A novel, image analysis-based method for the evaluation of *in vitro* antagonism. *J. Microbiol. Meth.* (2005) (közlés alatt) IF: 2.146
10. Szekeres, A., Hatvani, L., **Leitgeb, B.**: Colony morphology mutants of *Trichoderma harzianum* with increased β -1,4-*N*-acetyl-glucosaminidase production. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* (2005) (közlés alatt) IF: 0.000
11. **Leitgeb, B.**, Kerényi, Á., Rákhely, G.: Comparative conformational analysis of indolicidin and its analogues. In *Austrian-German-Hungarian-Italian-Polish-Spanish Joint Meeting on Medicinal Chemistry*. (Eds: Ettmayer, P., Ecker, G.), Medimond International Proceedings, pp. 35-38. (2005)
12. Szekeres, A., **Leitgeb, B.**, Péntzes, Z., Kredics, L., Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Vágvölgyi, C.: Proteases of *Trichoderma* strains from Hungarian winter wheat rhizosphere. In *Recent Advances in Multidisciplinary Applied Microbiology* (2005). *Understanding and Exploiting Microbes and Their Interactions. Biological, Physical, Chemical and Engineering Aspects*. (Ed: Méndez-Vilas, A.) (2005) (közlés alatt)

Az értekezés témaköréhez kapcsolódó előadások és posztterek

1. Ötvös, F., **Leitgeb, B.**, Kövér, K., Martinek, T., Körtvélyesi, T., Tóth, G.: Correlation between conformational space, NMR distance restraints and opioid activity of endomorphin II. *Hungarian-German-Italian-Polish Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Budapest (September 2-6, 2001)*
2. Ötvös F., **Leitgeb B.**, Kövér K., Martinek T., Körtvélyesi T., Tóth G.: Összefüggések az endomorfín-2 és analógjainak konformációs állapota és opioid aktivitása között. *XXIV. Kémiai Előadói Napok, Szeged (2001. október 29-31.)*
3. **Leitgeb B.**, Ötvös F., Tóth G.: Az endomorfín-2 és analógjainak konformáció-analízise molekuladinamikai módszerekkel. *Peptidkémiai Munkabizottság Ülés, Balatonszemes (2002. május 29-31.)*
4. **Leitgeb B.**, Ötvös F., Tóth G.: Az endomorfín-2 konformáció-analízise molekuladinamikai módszerekkel, *XXV. Kémiai Előadói Napok, Szeged (2002. október 28-30.)*
5. **Leitgeb B.**, Szekeres A., Ötvös F., Tóth G.: Az endomorfín-1 és endomorfín-2 konformáció-analízise molekuladinamikai módszerekkel. *Straub Napok, Szeged (2002. december 3-5.)*
6. **Leitgeb B.**: Az endomorfín-1 és endomorfín-2 konformáció-analízise. *MBKE Gyógyszerbiokémia Szakosztály XVIII. munkaértekezlete, Balatonőszöd (2003. május 26-28.)*
7. **Leitgeb, B.**, Szekeres, A.: Exploring the conformational space of the μ -opioid agonists endomorphin-1 and endomorphin-2. *The Role of Chemistry in the Evaluation of Molecular Medicine. A Tribute to Professor Szent-Györgyi Albert, Szeged (June 27-29, 2003)*

8. **Leitgeb, B.**, Szekeres, A., Tóth, G.: Conformational analysis of endomorphins by simulated annealing. *Polish-Austrian-German-Hungarian-Italian Joint Meeting on Medicinal Chemistry, Krakow, Poland* (October 15-18, 2003)
9. **Leitgeb B.**, Tóth G.: Aromás-aromás és prolin-aromás kölcsönhatások az endomorfino­kban. *Peptidkémiai Munkabizottság Ülés, Balatonszemes* (2004. május 26-28.)

