

A kutatási szerződésben és a munkatervben foglaltaknak megfelelően a támogatási időszakban a következő kutatási feladatokat láttuk el.

1.  $\mu$ -Opioid peptidek és peptidszármazékok molekuladinamikai (MD) szimulációja és szerkezeti analízise. (2008-2009)

A részletes kutatási tervben szereplő, korábban biológiailag karakterizált  $\mu$ -opioid ligandumok MD szimulációját hajtottuk végre explicit vizes és dimetil-szulfoxid közegben. A korábbi szerkezeti megfigyelések és bioaktív szerkezet-hipotézisek figyelembevételével végrehajtott analízis (másodlagos szerkezet, farmakofor csoportok közötti távolságok, oldallánckonformációk, specifikus H-hidak) valamint a domináns konformációs családok azonosítása során különböző típusú  $\gamma$ - és  $\beta$ -kanyar, valamint nyújtott szerkezetek dinamikus egyensúlyát tapasztaltuk, korábbi megfigyelésekkel összhangban. Egy, az endomorfín-2 szekvenciájába beépített szintetikus spirociklikus pseudo-dipeptid esetén kimutattuk annak  $\beta$ -kanyar szerkezet indukáló hatását. E hatás kimutatható volt akkor is, ha az endomorfín-1 és endomorfín-2 Pro<sup>2</sup> aminosavját aliciklikus  $\beta$ -aminosavakkal helyettesítettük. Ez utóbbi esetben a hatás mértéke függött a két királis centrumot tartalmazó szubsztituens konfigurációjától. Az MD eredmények analízise során kimutattuk továbbá, hogy az aliciklikus  $\beta$ -aminosavat tartalmazó egy szénatommal meghosszabbított gerincű peptidek a kiindulási vegyületek kanonikus másodlagos szerkezeti elemeihez hasonló hajlított szerkezeteket alakítanak ki. Magas  $\mu$ -opioid receptor affinitással összefüggő, kitüntetett szerepű, specifikus másodlagos szerkezeti elem nem került azonosításra egyik oldószer esetében sem. Megfigyeltük azonban, hogy azonos méretű peptidek esetében kapott korábbi eredményekhez viszonyítva a hajlított szerkezetek általános előfordulása gyakoribb. Az oldallánc rotamerek populációinak meghatározásakor megállapítottuk, hogy az N-terminális Tyr oldallánc *transz* konformációja, a szekvencia 3. pozíciójában elhelyezkedő aromás oldallánc *gauche*-konformációja és a C-terminális aromás oldallánc fokozott flexibilitása potenciálisan összefügg a magas receptor affinitással, de a vártnak megfelelően önmagában egyik paraméter sem elégséges a bioaktív szerkezet definiálására. Statisztikailag szignifikáns, megbízható kvantitatív szerkezet-hatás összefüggési modell nem állítható fel a vizsgált molekulák és paraméterek alacsony aránya és a vizsgált molekulakészlet magas szerkezeti diverzitása miatt. Eredményeink alapján megállapítható viszont, hogy e négy utóbb említett szerkezeti kritérium együttes teljesülése magas receptor affinitást eredményez. Az általunk bemutatott négy paraméter által definiált szerkezeti modell

magas fokú korrelációt mutat egy korábbi, ciklikus szomatosztatin analóg peptidek analízise alapján felállított bioaktív szerkezeti modellel. Szimulációink során kimutattuk, hogy a dimetil-szulfoxid közeg az általános nézőponttal ellentétben hordozhat biológiailag releváns tulajdonságokat, viszont az eredmények interpretációja mindennemű modell közeg (a tiszta, vizes közeget is beleértve) alkalmazása esetében nagyfokú körültekintést igényel. A felsorolt eredmények a 33. FEBS és 11. IUBMB közös kongresszuson és a 30. Európai Peptid Szimpóziumon, valamint három folyóiratcikk formájában kerültek bemutatásra. (spirociklikus pszeudo-dipeptid tartalmú endomorfín-2 analógok: Tömböly *et al.* J Med Chem 51: 173–177, 2008; aliciklikus  $\beta$ -aminosavat tartalmazó endomorfín analógok: Keresztes *et al.* J Med Chem 51: 4270–4279, 2008;  $\mu$ -opioid peptidek szerkezet hatás összefüggései: Borics *et al.* J Mol Graph Model 28: 495-505, 2010)

## 2. $\mu$ -Opioid peptidek és peptidszármazékok szintézise. (2008)

Végrehajtottuk a részletes kutatási tervben foglalt  $\mu$ -opioid peptidek és peptidszármazékok kémiai szintézisét. Az egyes vegyületek szintézise során standard, illetve azokra specifikusan vonatkozó, korábban az irodalomban közölt protokollokat alkalmaztunk. A nemtermészetes aminosavakat és egyéb építőelemeket külföldi együttműködő partnerünk (Prof. Dirk Tourwé, Vrije Universiteit, Brüsszel, Belgium) bocsájtották rendelkezésünkre. Munkánk során a későbbi spektroszkópiai vizsgálatokhoz elegendő mennyiségű (min. 10 mg) és tisztaságú (min. 99%) peptidet nyertünk.

## 3. $\mu$ -Opioid peptidek IR, VCD és ECD spektroszkópiás szerkezetanalízise (2009)

A spektroszkópiás mérésekre a korábban megjelölt külföldi együttműködő partner, Dr. Lovas Sándor (Creighton University, Omaha, NE, USA) laboratóriumában került sor a vezető kutató 2009. január 31. és 2009. április 28. közötti látogatása alatt. A munkatervben foglalt tíz opioid peptid különböző oldószerekben végzett spektroszkópiai analízise során a következő eredményeket kaptuk. Az IR spektrumok amid I sávját látszólag két fő komponens alkotja az összes peptid és oldószer esetében, eltekintve az 1615  $\text{cm}^{-1}$  körül jelentkező, az aromás gyűrűk C-C nyújtórezgéseiből fakadó alacsony intenzitású csúcstól. A két fő komponens leginkább a dimetil-szulfoxid közegben felvett spektrumokon különböztethető meg ( $\sim 1660 \text{ cm}^{-1}$  és  $\sim 1685 \text{ cm}^{-1}$ ), míg a többi oldószer ( $\text{D}_2\text{O}$ , 50% trifluoroetanol /

D<sub>2</sub>O és 80 mM nátriumdodecilszulfát / D<sub>2</sub>O) esetében e két komponens egyike leginkább csak vállként jelent meg. A komponensek aránya különböző vegyületek és oldószeres esetén is eltérőnek bizonyult. A VCD spektrumok amid I régiójában általánosságban negatív csatolmány típusú jelet figyeltünk meg. Egyes peptidek (Tyr-W-MIF-1, 1R2S-ACHC<sup>2</sup>-endomorfín-2) esetén ez a jel negatív irányban erősen aszimmetrikus, sőt bizonyos oldószeres esetekben negatív jelre egyszerűsödik. Nagymértékben eltérő, összetett jel csak a DAMGO esetében figyelhető meg, továbbá e peptid esetében oldószerfüggést is tapasztaltunk. Az IR és VCD eredményeket összegezve valamint korábbi, rövid peptidek vizsgálatakor kapott eredményekkel összevetve különböző nyújtott és kanyar szerkezetek együttes jelenléte rendelhető a vizsgált peptidekhez. A DAMGO esetében kapott összetett spektrumért az e peptid korábbi molekuladinamikai vizsgálatakor is megállapított nagyfokú oldószerkezeti diverzitás tehető felelőssé. Az összehasonlítás érdekében mért ECD spektrumok az IR és VCD spektrumokhoz viszonyítva sokkal változatosabbnak bizonyultak. Az endomorfín-1, endomorfín-2, morfineptin és 1R2S-ACHC<sup>2</sup>-endomorfín-2 esetében I-es és III-as típusú  $\beta$ -kanyarokra jellemző C-osztályú spektrumokat, míg a többi peptid esetében összetettebb, nehezen osztályozható spektrumokat rögzítettünk. A Tyr-W-MIF-1 spektrumait leszámítva minden esetben fokozott oldószerfüggést is tapasztaltunk. Az ECD spektrumok, a molekulaszervezet és a  $\mu$ -opioid receptor affinitás között nem találtunk szembetűnő korrelációt. Nem hagyható figyelmen kívül, hogy az összes peptid aromás oldalláncokban gazdag, melyek köztudottan saját UV-aktivitásukkal befolyásolják a peptidek ECD spektrumát. E hozzájárulások mértéke függ az aromás gyűrűk kölcsönhatásaitól, melyből kifolyólag korrekciójukra eddig még nem született általánosan alkalmazható módszer. Feltételezhetően az általunk mért ECD spektrumok változatosságában nagy szerepet játszanak ezen aromás hozzájárulások, ezért a további következtetéseinket elsősorban az IR és VCD eredményekre alapoztuk. Eredményeinket a 30. Európai Peptid Szimpóziumon mutattuk be. (Borics *et al.* J Pept Sci 16: 158-158, 2010)

#### 4. IR és VCD spektrumok kvantumkémiai modellezése (2009-2011)

A peptidek és fehérjék rövid, nem periodikus másodlagos szerkezeti elemeinek kiroptikai spektroszkópiai leírása még hiányos a szakirodalomban, ezért a kísérleti IR és VCD spektrumok komponenseinek meghatározása során elméleti módszerekre támaszkodtunk. Az egyes, oldatban jelenlévő szerkezetek IR és VCD spektrumainak kvantumkémiai számításakor a konformációs sokaság reprezentáns szerkezeteinek azonosítási módszere és a szolvatáció hatását vizsgáltuk. A reprezentáns

szerkezetek meghatározásakor korábbi molekuladinamikai trajektóriákból indultunk ki. Elvégeztük a trajektóriák által szolgáltatott konformációs sokaságok klaszteranalízisét a hasonlóság kritériumok szigorúságának szabályozásával, ezáltal vizsgálva, hogy a konformációs tér milyen mértékű reprezentációja szükséges annak adekvát jellemzéséhez. A reprezentáns szerkezetek geometria-optimalizációját és az azt követő rezgési frekvencia- és rotátorerősség számításokat gázfázisban, PCM kontinuumban és explicit oldószermolekulák jelenlétében végeztük. Eddigi tapasztalataink szerint a Gaussian 03 programcsomag PCM kontinuum szolvatációs modellje nem tökéletes, a geometria optimalizációt nem lehet vele végrehajtani ezeken a rendszereken valószínűleg az algoritmus hiányosságai miatt. Az explicit oldószert tartalmazó rendszerek optimalizációja kivitelezhető, viszont a számítás a fokozott memóriaigény mellett nem várt mértékben időigényessé válik. A gázfázisú optimalizációkhoz viszonyítva az atomok számának növelése miatti gépidő-növekedésen túl még azzal is számolni kell, hogy szükséges SCF-ciklusok száma akár a tízszeresére (!) is növekedhet. Sajnálatos módon a reprezentáns szerkezetek számított IR és VCD spektrumaiból épített spektrumok csak kismértékű egyezést mutattak a kísérleti spektrumokkal. Habár az oldószert explicit figyelembe vételével számított spektrumok jobb egyezést mutattak, az mégis alulmaradt a korábban lineáris és ciklikus modell tetrapeptidek esetében tapasztalttal szemben. Lehetséges problémaként merült fel az opioid peptidekben nagy számban előforduló aromás oldalláncok jelenléte. Mivel a rendelkezésre álló molekulamechanikai erőterek némiképp túlbecsülik az aromás-aromás kölcsönhatások mértékét ez negatív hatással lehet a konformációs állapotok hatékony feltérképezésére. E negatív hatás kiküszöbölésére Replica Exchange MD szimuláció alkalmazásával tettünk kísérletet. Előzetes eredményeink azt mutatják, hogy REMD esetén a konformációs mintavétel mértéke körülbelül tízszerese a hagyományos MD esetén nyerhetőnek. Az így meghatározott reprezentáns konformerek komponens spektrumainak számítása jelenleg is folyamatban van. Erőforrások tekintetében elsősorban a Dél-Alföldi Neurobiológiai Tudásközpont nagyteljesítményű számítógépközpontjára támaszkodtunk, ezért annak 2009-ben nem várt műszaki problémák miatt történő leállásai hátrányosan érintették a projekt előrehaladását. Mindezek ellenére az elvégzett munka saját megítélésünk szerint összhangban tudott maradni a munkatervben foglaltakkal.

## 5. Új, potenciális $\mu$ -opioid receptor ligandumok tervezése (2009-2011)

A kutatás új ágaként potenciális  $\mu$ -opioid ligandumok tervezésébe kezdtünk a publikációinkban részletezett, MD szimulációk útján nyert szerkezet-hatás információ kamatoztatása reményében. Ez a

korábban szerkezetileg és biológiailag is jellemzett nem természetes aminosav-szubsztitúciók variálása mellett olyan esetlegesen konformációgátolt molekulák létrehozását célozza, amelyek teljesítik a bioaktivitás vélt szerkezeti kritériumait. Ennek elérésére az endomorfín-2 szintetikus és virtuális módosításait hajtottuk végre,  $\beta$ -Me-Phe, aliciklikus  $\beta$ -aminosavak és új típusú,  $\alpha$ -szénatomon szubsztituált Tyr és Phe származékok beépítésével és a molekula oldalláncon keresztüli ciklizációjával. A kívánt térszerkezet teljesülését molekuladinamikai számításokkal, illetve szintetikus peptidek esetén hazai együttműködő partnerünk, Prof. E. Kövér Katalin (Debreceni Egyetem, Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszék) jóvoltából NMR spektroszkópiás mérésekkel is ellenőriztük. Továbbá a fizikai formában is rendelkezésre álló többszörösen módosított endomorfín analógokat  $\mu$ -opioid receptor-kötődési vizsgálatokkal is jellemeztük a kutatáshoz időközben csatlakozott Ph. D. hallgató, Jayapal Reddy Mallareddy segítségével. Az előnyös biológiai tulajdonságokkal rendelkező peptidek esetén kimutattuk, hogy azok oldatbeli térszerkezete szinte maradéktalanul egyezést mutat az általunk korábban felállított szerkezeti modellel. Az  $\alpha$ -szénatomon szubsztituált Tyr és Phe származékok virtuális beépítésével és ciklizációval nyert analógok esetében elméleti módszerek segítségével kimutattuk, hogy a kialakuló hajlított molekulászerkezet egyezik az aktív  $\mu$ -opioid peptidek esetén megfigyelt konformációkkal. E vizsgált molekulák előállítása, biológiai jellemzése az új típusú, kereskedelmi forgalomban nem elérhető aminosavszármazékok szintézisének kidolgozását igényli, mely jelenleg folyamatban van. Az előbbieken említett Ph. D. hallgatóon kívül részt vett még a kutatásban Tánzos Péter egyetemista, aki diplomamunkáját a projektvezető kutató irányítása alatt készítette el és 2010-ben biológus B. Sc. oklevelet szerzett a Szegedi Tudományegyetemen. Eredményeinket folyóiratcikk formájában tettük közzé (Mallareddy *et al.* J Med Chem 54: 1462-1472, 2011), valamint egy, a szakterület legfrissebb eredményeit tárgyaló összefoglaló cikket is publikáltunk (Keresztes *et al.* Chem Med Chem 5: 1176-1196, 2010).

Összefoglalás, megjegyzések:

A támogatási periódus alatt általunk elvégzett kutatás egy alapkutatási ( $\mu$ -opioid peptidek szerkezet-hatás összefüggései) és egy módszerfejlesztési (kombinált kísérleti-elméleti szerkezetvizsgálati protokoll kidolgozása) ágra bontható. Ez utóbbi esetében a támogatási szerződésben foglalt munkaterv által előírt feladatok maradéktalanul végrehajtásával nem kaptunk várakozásainkat kielégítő eredményeket. Ez szükségszerűvé tette hipotézisünk újraértékelését és alternatív megoldások,

módszerek bevezetését. Legfrissebb részeredményeink kecsegtetőek, de kutatásunk ezen ága még több munkát igényel. Ezzel ellentétben az alapkutatási ágon elért eredményeink lehetővé tették, hogy új alprojektet indítsunk mely túlmutat a munkatervben foglalt céljainkon és a projekt távlati céljaként megjelölt hasznosíthatóság irányába halad. A tisztán elméleti úton nyert adatokra alapozott molekulatervezés és tesztelés a vártnál is jobb eredményekkel zárult, igazolva korábbi hipotézisünk helyességét. Bár a témában megjelent publikációink idézettségéből ez még nem tükröződik, eredményeinket a szakterület is lelkesen fogadta. Három külföldi kutatócsoporttól (Prof. Anna Janecka, University of Lodz, Lengyelország; Prof. Aleksandra Misicka, University of Warsaw, Lengyelország; Dr. Steven Ballet, Vrije Universiteit, Brüsszel, Belgium) is felkérést kaptunk együttműködésre, melyeket elfogadva azóta újabb eredményeket értünk el a területen. (Borics et al. J Mol Graph Model, közlésre elküldve, 2011). A költségtervtől módosítást igénylő eltérés nem történt. Bár nem a mi feladatunk ennek megítélése, véleményünk szerint a felhasznált támogatás mértéke és az elvégzett munka, valamint az elért eredmények aránya kielégítő, ezért bízunk a bíráló bizottság igazságos döntésében.