

**A Tyr-Tic-(2S,3R)- $\beta$ -MePhe-Phe-OH, egy új peptidomimetikum  
kötési paramétereinek, antagonistá jellegének és  $\delta$ -opioid  
(altípus)specifitásának vizsgálata**

Ph.D. értekezés tézisei

*Lehoczkyné Birkás Erika*

Témavezető: Dr. Szűcs Mária

*MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont  
Biokémiai Intézet*

Szeged, 2011.

## Bevezetés

Az emberiség régóta használ kábító hatású szereket, melyek közül talán a legismertebb az opioidok családjába tartozó morfin. Az opioidok élettani hatásukat, melyek közül a legjelentősebb a fájdalomcsillapító hatásuk, az opioid receptorokon keresztül fejtik ki. Az opioid receptoroknak 3 fő típusát ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ) különböztethetjük meg az egyes ligandokhoz való eltérő affinitásuk alapján. Mindhárom receptor típus esetén egy-egy gént izoláltak, elsőként a  $\delta$ -opioid receptor génjét klónozták. Mindhárom receptor típus esetén feltételezik további altípusok létezését. A  $\delta$ -opioid receptor esetén két ( $\delta_1$  és  $\delta_2$ ) altípust különítenek el farmakológiai kísérletek eredményei alapján.  $\delta_1$ -szelektív ligandok az agonista DPDPE és az antagonistá BNTX,  $\delta_2$ -szelektív ligandok az agonista deltorfin-II és az antagonistá naltriben.

Az egyes receptor típusok eloszlása az idegrendszer különböző területein eltérő. Az agy területén belül az egyes opioid receptorok eloszlása nem egyenletes, vagyis az egyes agyi struktúrák esetén a  $\mu$ : $\delta$ : $\kappa$  arány szintén eltérő, jelezve ezzel eltérő élettani szerepüket. Mindhárom receptor típus megtalálható a neocortex, a nucleus accumbens és az amygdala területén. A  $\mu$ -receptorok előfordulnak a talamusz, a locus coeruleus területén és a gerincvelő dorzális szarvában is. A  $\delta$ -receptorok specifikus területei a bulbus olfactorius és a striatum, míg a  $\kappa$ -receptorok a hipofízis, a tobozmirigy és a hipotalamusz területén lokalizálódnak legnagyobb mennyiségben.

Az opioid receptorokkal kapcsolatos kutatások középpontjában napjainkban a  $\delta$ -opioid receptorok állnak. Ez azzal magyarázható, hogy a  $\delta$ -opioid receptorok a  $\mu$ -opioid receptorokhoz hasonlóan analgetikus hatást közvetítenek, ugyanakkor a  $\delta$ -specifikus ligandok kevesebb mellékhatással bírnak, mint például a jól ismert  $\mu$ -specifikus morfin. Emellett igény van nagy szelektivitású  $\delta$ -opioid antagonisták kifejlesztésére, amelyekkel egyrészt a farmakológiai hatások specifikitása vizsgálható. Másrészt, mint kutatási eszközök felhasználhatók a receptorok vizsgálatára, ugyanis az agonisták esetében az eltérő G-protein kapcsoltságai állapotból adódóan a receptoroknak eltérő affinitási állapotai vannak, amelyek megnehezítik a kísérleti eredmények értékelését. Schiller és munkatársai nevéhez fűződik egy olyan új  $\delta$ -opioid antagonistá családjának felfedezése, ahol a kettes helyzetben Tic-csoportot (1,2,3,4-tetrahidroizokvinolin-3-karboxilsav) építettek be. A családjhoz tartozó leghatékonyabb analóg egy mind vizes, mind puffer oldatban stabil, ám szerves oldószerben átalakuló tetrapeptid, az ún. TIPP (Tyr-Tic-Phe-Phe-OH) volt. Később ezt a vegyületet módosították és számos TIPP-analógot szintetizáltak. Ennek érdekében, hogy terápiás szempontból is hatékony TIPP-analógokat állítsanak elő,  $\beta$ -metil-aminosavakat építettek be. Így konformációsan gátolt (metil csoport miatt), enzimikus hatással szemben ellenállóbb ( $\beta$ -aminosav miatt) vegyületeket kaptak. A  $\beta$ -metil-aminosavak beépítése után jelentős változásokat tapasztaltak a ligandumok receptor szelektivitásában és agonista/antagonista karakterében. A TIPP-analógok közül a Tyr-Tic-(2*S*,3*R*)- $\beta$ MePhe-Phe-OH mutatta a

legnagyobb affinitást a  $\delta$ -opioid receptorokhoz, míg ezen ligand  $\mu$ - és  $\kappa$ -opioid receptorokhoz való affinitása elhanyagolható volt. A SZBK Izotóp Laboratóriumában szilárdfázisú peptid szintézissel Dr. Tóth Géza vezetésével állították elő a TIPP-analógot, majd katalitikus halogénezéssel elkészítették ezen ligand trícíált formáját is.

## Célkitűzés

Munkánk során célul tűztük ki:

- az új radioligand, a [<sup>3</sup>H]Tyr-Tic-(2*S*,3*R*)-β-MePhe-Phe-OH karakterizálását:
  - a szerkezetmódosítás affinitásra és szelektivitásra gyakorolt hatásainak vizsgálatát *in vitro* radioligand kötési kísérletekben,
  - az új radioligand kötőhelyeinek vizualizálását receptor autoradiográfiás kísérlettel,
- *intrathecalisan* adott Tyr-Tic-(2*S*,3*R*)-β-MePhe-Phe-OH antinociceptív hatásának tanulmányozását farkok elrántási tesztben és a ligand *in vivo* altípus-specifitásának vizsgálatát,
- a ligand agonista/antagonista jellegének és specifitásának vizsgálatát ligand-stimulált [<sup>35</sup>S]GTPγS funkcionális méréssel *in vitro*,
- a hipotetikus δ<sub>1</sub>- és δ<sub>2</sub>-opioid receptorok detektálására alkalmas körülmények beállítását *in vitro*
- a ligand lehetséges *in vitro* δ-altípus specifitásának tanulmányozását

patkány agyi-, vad típusú- és δ-opioid receptor knock-out (DOR-KO) egér agyi-, és humán δ-opioid receptorokat overexpresszáló CHO (Chinese Hamster Ovary) sejt (hDOR-CHO) membránokban.

## Eredmények összefoglalása

Radioligand kötési kísérletekben meghatároztuk a triciált TIPP-analóg kinetikai paramétereit asszociációs és disszociációs kísérletekkel, majd kiszámoltuk a radioligandra jellemző egyensúlyi disszociációs állandó,  $K_D$  értéket patkány agyban, amely 0,64 nM volt.

Egyensúlyi kötési méréseink során patkány-, vad típusú és DOR-KO egér agyban, továbbá hDOR-CHO sejtmembránban határoztuk meg a radioligandra jellemző kötési paramétereket, a  $K_D$  és  $B_{max}$  értékeket Patkány és vad típusú egér agyban, továbbá hDOR-CHO membránban is azt tapasztaltuk, hogy a  $K_D$  érték szignifikánsan 4-, illetve 7-szeresére csökken 100 mM  $Na^+$  jelenlétében, vagyis mindhárom rendszerben igazoltuk a ligand antagonistá jellegét. DOR-KO egér agyban nem kaptunk specifikus kötést a TIPP-analóggal.

Kompetíciós kísérleteink során a triciált TIPP-analógot jelöletlen  $\mu$ -,  $\delta$ - és  $\kappa$ -specifikus ligandok növekvő koncentrációjával szorítottuk le a receptorról patkány- és egér agyi membránban. Meghatároztuk az inhibíciós állandó,  $K_i$  értékét, amely fordítottan arányos a jelöletlen ligandnak a radioligand kötőhelyeihez mutatott affinitásával. Az összes, általunk használt  $\delta$ -specifikus ligand esetén a  $K_i$  értékek nanomoláros nagyságrendűek voltak, míg a  $\mu$ - és  $\kappa$ -specifikus ligandok esetén nagyságrendekkel nagyobb  $K_i$  értékeket határoztunk meg, ami egyértelműen igazolja azt, hogy a TIPP-analóg  $\delta$ -specifikus ligand. Igazoltuk továbbá azt is, hogy az eredeti TIPP

ligandhoz képest a szerkezetileg módosított TIPP-analóg kb. 7-, illetve 3-szor potensebb volt patkány, illetve egér agyban. Az új TIPP-analóg hatékonyabban szorította le a radioligandot egér agyi membránban, mint a többi vizsgált  $\delta$ -specifikus ligand, aminek egyik lehetséges magyarázata, hogy a TIPP-analóg más receptorpopulációhoz is, esetleg más receptor altípushoz is kötődik.

Ezen eredményeink felvetették a  $\delta$ -receptor altípusok *in vivo* és *in vitro* vizsgálatának lehetőségét az adott TIPP-analóggal. Farmakológiai kísérleteink során az *intrathecalisan* adott, hipotetikus  $\delta_1$ -szelektív agonista DPDPE, a  $\delta_2$ -szelektív Ile<sup>5,6</sup>-deltorfin II és a  $\mu$ -specifikus DAMGO antinociceptív hatását gátoltuk ismert specifitású, illetve az új  $\delta$ -antagonistával patkány farok elrántási teszt során. Azt tapasztaltuk, hogy a TIPP-analóg hatékonyan blokkolta a DPDPE hatását anélkül, hogy az Ile<sup>5,6</sup>-deltorfin II vagy a DAMGO hatását szignifikánsan befolyásolta volna. Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a TIPP-analóg  $\delta_1$ -szelektív antagonistaként viselkedik *in vivo*.

Megvizsgáltuk a triciált TIPP-származék által jelölt kötőhelyek eloszlását patkány-, vad típusú és DOR-KO egér agyi koronális metszeteken, majd összehasonlítottuk azt a  $\delta_2$ -szelektív Ile<sup>5,6</sup>-deltorfin II által jelölt kötőhelyek eloszlásával. Azt tapasztaltuk, hogy mind patkány-, mind vad típusú egér agyi metszeteken a TIPP-analóg kötőhelyeinek eloszlása jó egyezést mutat a szakirodalomból ismert  $\delta$ -opioid receptorok eloszlásával. Vad típusú egér agyban szignifikáns különbség nem volt detektálható a két, farmakológiai kísérletekben eltérő  $\delta$ -szelektivitást

mutató radioliganddal jelölt kötőhelyek eloszlása között. Érdekes azonban megjegyezni, hogy DOR-KO egér agyban egyik radioliganddal sem tudtunk specifikus jelet detektálni, ami arra utal, hogy a  $\delta$ -opioid receptor gén mindkét altípust kódolja.

Ligand-stimulált [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S kísérleteink során igazoltuk, hogy vad típusú egér agyi membránban a TIPP-analóg koncentrációfüggő módon gátolja a DPDPE-által indukált G-protein aktivációt, míg a  $\mu$ -specifikus DAMGO hatását szignifikánsan nem befolyásolja. Ez arra utal, hogy a TIPP-analóg hatékony  $\delta$ -antagonistaként viselkedik. Ezek után összehasonlítottuk a TIPP és az új TIPP-analóg antagonisták karakterét ismert  $\delta$ -opioid receptor altípus specifikus antagonistákkal vad típusú egér agyi- és hDOR-CHO membránokban. Kísérleteink során  $\delta_1$  és  $\delta_2$ -szelektív agonisták hatását blokkoltuk fix koncentrációjú antagonistákkal, majd meghatároztuk az adott antagonistára jellemző  $K_e$  értéket, amely fordítottan arányos az antagonisták hatékonyságával.

Vad típusú egér agyban a  $\delta_1$ -szelektív DPDPE-vel szemben a TIPP-analog  $K_e$  értéke közelebb állt a  $\delta_1$ -szelektív BNTX értékéhez, míg a  $\delta_2$ -szelektív agonistával szemben a  $\delta_2$ -szelektív naltribenhez volt közelebb, ami felveti annak lehetőségét, hogy az agonista szelektivitása befolyásolja a TIPP-analóg antagonisták potenciálját. Fontos azonban megjegyezni, hogy a  $\delta_2$ -szelektív naltriben a  $\delta_1$ - és  $\delta_2$ -agonistát hatékonyabban szorította le, mint a  $\delta_1$ -szelektív BNTX mindkét rendszerben. Ezen eredményeink arra utalnak, hogy a  $\delta$ -opioid receptor altípusok elkülönítésére az alkalmazott és jelenleg



hozzáférhető *in vitro* módszerek nem alkalmasak, ami felveti új *in vitro* módszerek szükségességét.

## Konklúziók

A [<sup>3</sup>H]Tyr-Tic-(2*S*,3*R*)-β-MePhe-Phe-OH *in vitro* receptoriális és *in vivo* farmakológiai jellemzése során kimutattuk, hogy:

- az új radioligand az alapvegyületnél 4-7-szer nagyobb affinitású ( $K_D = 0,64$  nM),
- a ligand δ-specifikus kompetíciós kísérleteink alapján,
- a radioligand által jelölt receptorok eloszlása hasonló mintázatot mutat egér és patkány agyban, amely mintázat jól megegyezik a δ-opioid receptorok ismert eloszlásával, de nem mutat altípus specifitást,
- a ligand δ-opioid antagonistaként kötődik *in vitro* patkány – és egér agy, valamint hDOR-CHO sejt membránban,
- a TIPP-analóg hatékony δ-antagonistaként hat a G-protein mediált jelátvitelre *in vitro*, azonban altípus specifitás nem mutatgató ki sem egér agyban, sem a homogén δ-opioid receptorpopulációt expresszáló DOR-CHO sejtekben,
- egérben végzett antinociceptív kísérletekben a TIPP-származék hatékonyan blokkolta a δ<sub>1</sub>-szelektív DPDPE hatását, míg a δ<sub>2</sub>- és μ-specifikus agonisták hatását nem befolyásolta, ami arra utal, hogy a Tyr-Tic-(2*S*,3*R*)-β-MePhe-Phe-OH δ<sub>1</sub>-szelektív antagonistaként viselkedik *in vivo*.

## Publikációk

### *A dolgozat témájához kapcsolódó cikkek:*

**I. Birkas, E.,** Kertesz, I., Toth, G., Bakota, L., Gulya, K., Szucs, M., 2008. Synthesis and pharmacological characterization of a novel, highly potent, peptidomimetic  $\delta$ -opioid radioantagonist, [ $^3\text{H}$ ]Tyr-Tic-(2*S*,3*R*)- $\beta$ -MePhe-Phe-OH. *Neuropeptides* 42, 57-67. (IF<sub>2008</sub>: 2.438)

**II. Birkas, E.,** Bakota, L., Gulya, K., Wen, T., Pinter, J., Toth, G., Szucs, M., 2011. A comprehensive study on the putative  $\delta$ -opioid receptor (sub)types using the highly selective  $\delta$ -antagonist, Tyr-Tic-(2*S*,3*R*)- $\beta$ -MePhe-Phe-OH. *Neurochemistry International*; doi: 10.1016/j.neuint.2011.04.015 (IF<sub>2009</sub>: 3.541)

### *A dolgozat témájához nem kapcsolódó cikkek:*

**I. Keresztes, A., Birkas, E.,** Páhi, A., Tóth, G., Bakota, L., Gulya, K., Szűcs, M., 2011. Pharmacology of a new tritiated endomorphin-2 analog containing the proline mimetic *cis*-2-aminocyclohexanecarboxylic acid. *Peptides* 32, 722-728. (IF<sub>2009</sub>: 2.705)

**II. Kekesi, O., Tuboly, G., Szucs, M., Birkas, E.,** Morvay, Z., Benedek, Gy., Horvath, Gy., 2011. Long-lasting, distinct changes in central opioid receptor and urinary bladder functions in models of schizophrenia in rats. *European Journal of Pharmacology*; 661, 35-41. (IF<sub>2009</sub>: 2.585)

## Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni témavezetőmnek, **Dr. Szűcs Máriának**, hogy lehetővé tette, hogy a munkacsoportjában dolgozzak és hogy számos hasznos, szakmai tanáccsal látott el.

Köszönöm **Dr. Tóth Gézának** és **Dr. Tömböly Csabának**, hogy a kísérleteinkhez szükséges ligandokat rendelkezésünkre bocsájtották.

Köszönettel tartozom **Dr. John Pintar-nak** és **Dr. Ting Wen-nek** az in vivo kísérleti eredményekért, és azért, hogy rendelkezésünkre bocsájtották a DOR-KO egér agyakat.

Köszönöm **Dr. Gulya Károlynak**, hogy lehetővé tette, hogy az autoradiográfias kísérleteket a laboratóriumában végezzük el.

Hálás vagyok **Dr. Bakota Lidiának** az autoradiográfias kísérletek során nyújtott segítségéért és a barátságáért.

Köszönöm **Némethné Ildikónak** a rengeteg technikai segítségét, továbbá minden kedves és bátorító szavát és az életre szóló barátságát.

Köszönöm **Dr. Resat Cinar-nak** és **Kékesi Orsolyának** a hasznos tanácsokat és a barátságukat.

Köszönettel tartozom **Dr. Keresztes Attilának** a szakmai tanácsokért és **Tóthné Évának** a technikai segítségéért.

Hálás vagyok az MTA SZBK Biokémiai Intézet **Opioid receptor Kutatócsoport** és **Izotóp Laboratórium** összes dolgozójának.

Szeretném továbbá megköszönni az **SZTE ÁOK vezetőségének**, hogy lehetővé tették számomra, hogy elkezdjem a doktori munkámat; valamint az **MTA SZBK Biokémiai Intézet vezetőségének**, hogy lehetővé tették, hogy befejezzem azt.

Végezetül szeretném megköszönni a családomnak, különösen **a szüleimnek** és **a férjemnek** a támogatásukat és a belém vetett bizalmukat.