

**HUMÁN GAMMA-AMINOVAJSAV  
TRANZSPORTER SZERKEZET ÉS FUNKCIÓ  
MODELLEZÉSE**

(Doktori Tézisek)

**Palló Anna**

**ELTE TTK, Kémia Doktori Iskola (Dr. Inzelt György D.Sc.)  
Szintetikus Kémia, Anyagtudomány, Biomolekuláris Kémia Doktori  
Program (Dr. Perczel András D.Sc.)**

Témavezető:

**Dr. Kardos Julianna D.Sc.**

**Tudományos tanácsadó**

**MTA, Kémiai Kutatóközpont, Biomolekuláris Kémiai Intézet,  
Neurokémiai Osztály**

2010

## BEVEZETÉS

Az agy legfőbb gátló neurotranszmittere a  $\gamma$ -aminovajsav (Gamma-AminoButyric Acid, GABA). Az idegi aktivitás során felszabaduló GABA molekulát a neuronális GAT-1 és a gliális GAT-2 vagy GAT-3 transzporter altípusok veszik vissza. A GAT fehérjék az oldott anyagokat  $\text{Na}^+$  ion- és  $\text{Cl}^-$  ion-függő módon szállító transzporterek SLC6 (SoLute Carrier 6) családjába tartoznak. A GABA visszavétele a koncentráció-grádiens ellenében végzett kémiai munka, melynek hajtóereje a csatolt  $\text{Na}^+$  ion transzport (szimport). A szimport során a  $\text{Na}^+$  ion az extra- (EC) és intracelluláris tér (IC) között fennálló koncentráció-gradiensének irányában mozdul el.

A GABA transzporterek az antiepileptikumok (AEDS: AntiEpileptic DrugS) célfehérjéi. A hGAT-1 altípusra irányuló sikeres tervezés vezetett el az antiepileptikum tiagabin kereskedelmi forgalmazásához. Az epilepsziás betegek 20-30 százalékát nem lehet kezelni az AEDS csoportba jelenleg tartozó gyógyszerekkel. Az antiepileptikumok hatástalansága „originális gyógyszer” kampányokat ösztönözött a gliális hGAT altípusokat is magukba foglaló új célpontokat kereső új stratégiák kifejlesztésére.

Az *Aquifex aeolicus* baktériumból származó zárt állapotú leucin transzporter (LeuT) nagyfelbontású kristályszerkezetének megismerése felgyorsította az SLC6 családba tartozó gyógyszercélpontok keresését. A kristályszerkezet 12 transzmembrán (TM) hélixet mutat, amelyek közül kettő (TM1 és TM6) olyan szakaszt tartalmaz, ahol a hélix letekeredett. Ezen régiók között, egymás mellett található a  $\text{Na}^+$  ionok és a szubsztrát ill. szubsztrát inhibitorok kötőhelyét. Az eddig megismert kristályszerkezetek alátámasztják a transzport funkcióra korábban javasolt alternatív hozzáférés („alternate access”) mechanizmusát, amely szerint a fehérje felszínei az EC és IC térrészek felé felváltva tárulnak fel a transzport során.

Doktori értekezésemben számot adok a LeuT szerkezeten alapuló humán GAT (hGAT) altípusok GABA-t komplexáló, zárt állapotú homológia modelljeinek elkészítéséről és az ebből kiinduló transzporter altípus-specifikus funkciók előrejelzésére irányuló különböző megközelítésekről.

## CÉLKITŰZÉSEK

A GABA és  $\text{Na}^+$  ion szimport folyamat és a transzporter fehérjék szerkezete közötti összefüggések feltárása. Ezen belül:

1. Modellszerkezetek építése a neuronális és gliális, sorrendben hGAT-1 és hGAT-2/3 humán transzporter fehérje altípusokra a bakteriális LeuT transzporter homológ kristályszerkezete alapján;
2. A hGAT-1, hGAT-2 és hGAT-3 transzporter fehérje altípusok kötődési kölcsönhatásainak összehasonlító vizsgálata, amely magában foglalja a GABA, szubsztrát inhibitorok és a fehérjék közötti kötődési kölcsönhatások leírását, altípus-specifikus farmakofór modellek valamint a  $\text{Zn}^{2+}$  ion potenciális kötődési kölcsönhatásának a keresését;
3. Javaslat a  $\text{Na}^+$  ion szimport molekuláris mechanizmusára a  $\text{Na}^+(1)$  és  $\text{Na}^+(2)$  fehérje- és szubsztrát kötődésének szerkezeti leírása alapján.

## MÓDSZEREK

### *Homológia modellezés*

A hGAT homológia modellek a LeuT kristályszerkezetén alapultak, amely a fehérjeszerkezeti adatbázisban 2a65 kód alatt érhető el. A modelleket a Swiss Model szerver segítségével építettük, és szerkezetüket molekulamechanikai számítások segítségével optimaltunk a Sybyl programcsomag MMFF94 erőterét használva.

### *Dokkolás*

A ligandumok dokkolási módszerét úgy optimaltunk, hogy a dokkolással előre jelzett illeszkedési sorrend a lehető legjobban hasonlítson a kísérletesen meghatározott GABA transzportgátlási adatokhoz. A számításokhoz a GOLD programot és annak GOLD értékelő függvényét használtuk. A LeuT-Leu komplex analógiájára a dokkolt ligandumok karboxil-csoportját a TM1-kötött  $\text{Na}^+(1)$  ionhoz rögzítettük egy távolsági megkötés alkalmazásával, így távolságuk 2,1 és 2,6 Å között változhatott.

### *Molekuladinamika*

A számítások a CHARMM program és a CHARMM2 erőter használatával készültek. A szimulációk során rögzítettük a hGAT azon koordinátáit, amelyek a ligandumtól 20 Å-nél távolabb estek. A  $\text{Zn}^{2+}$  ion kötődésének szimulációjához minden aminosavat rögzítettünk, kivéve a transzporter extracelluláris részéhez tartozókat.

### *[<sup>3</sup>H]GABA felvételi kísérletek*

A méréseket patkány agykéregből frissen izolált plazmamembrán vezikula frakción végeztük. A nem-specifikus kötődést 1 mM guvacin jelenlétében határoztuk meg. Az oldathoz a gliális transzporterekre vonatkozó vizsgálatok esetén 100  $\mu\text{M}$  szelektív hGAT-1 inhibitor 1,2,5,6-tetrahidro-1-[2-[[[di(phenilmetilén)amino]oxi]etil]-3-piridinkarbonsavat (NNC-711) adtunk.

## FŐ EREDMÉNYEK ÉS TÉZISEK

1. A hGAT-1 modell szerkezete hasonlít a LeuT fehérjéhez, szubsztrát kötőzseb és a Na<sup>+</sup> ionok kötőhelyei egymáshoz közel esnek.

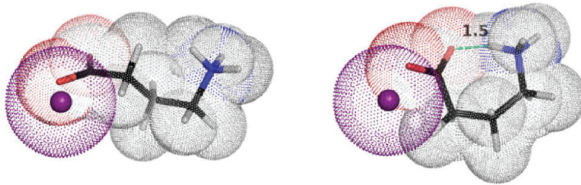
2. A dokkolás és a molekuladinamikai számítások azt mutatták, hogy a hatékony inhibitorok amino-csoportja számára kedvező a Tyr60-hoz és a Ser396-hoz való kötődés, az előbbi aminosav a TM1 hélix letekeredett szakaszán található, míg az utóbbi a TM8 hélixen. A magas dokkolási pontszámok és a kedvező kötődési mód együtt alkalmas arra, hogy előre jelezzük, hogy az adott inhibitor gátolja-e a GABA transzportot.

3. A hGAT-1 transzporterre farmakofór modellt javasoltunk: a hatékony inhibitorok egy félig nyújtott konformációt vesznek fel, amelyben az amino- és karboxil-csoportok távolsága ( $\delta_{(N-C1)}$ )  $4,1 \pm 0,4 \text{ \AA}$ , és a karboxil-csoporthoz legközelebb eső torziós szög C(1)-C( $\alpha$ )-C( $\beta$ )-C( $\gamma$ ) ( $\tau_C$ ) értéke  $185 \pm 15^\circ$  (1. ábra, balra). Összehasonlításképpen, a GABA<sub>A</sub> receptor-kötött GABA konformációja nyújtottabb, mint a transzporter-kötötté, hasonlóan a serkentő neurotranszmitterhez, a glutaminsavhoz.

4. A hGAT-2 és a hGAT-3 GABA kötőzsebei különböznek a hGAT-1 kötőzsebéétől, és egymáshoz hasonlóak, ezért nem használhatók gliális altípus-szelektív szubsztrát inhibíció előrejelzésére.

5. Az altípusok közti különbség leginkább a második EC hurokban mutatkozik. A hGAT-3 altípus-szelektív Zn<sup>2+</sup> ion kötőhelyek allosztérikus inhibíciós mechanizmusra utalnak, ebben a második EC hurok vesz részt.

6. A dokkolás és a molekuladinamikai számítások rámutattak a félig-nyújtott (1. ábra, balra) és a gyűrűbe zárt (1. ábra, jobbra) GABA-Na<sup>+</sup>(1) komplex létezésére a kötőzsebben. Ez arra utal, hogy különbözik a GABA farmakofór és szállítási konformációja. Ezek az eredmények megelölegezhetik az SLC6 családhoz tartozó transzporterek Na<sup>+</sup> szimportjának a módját.



1. ábra. A zárt állapotú hGAT szubsztrát kötőzsebében kialakuló GABA-Na<sup>+</sup>(1) komplex félig-nyújtott és gyűrűs konformációja.

## KÖVETKEZTETÉSEK

A GABA és szubsztrát inhibitorok dokkolása a zárt állapotú hGAT-1 homológia modell kötőzsebébe és az eredmények alapján készített farmakofór hatékony eszközt kínál a szubsztrát inhibitorok potenciális hGAT-1 gátló hatásának előrejelzésére. Ezzel ellentétben, a gliális hGAT-2 és hGAT-3 altípusok nem különböztethetők meg a szubsztrát kötőzsebük alapján, erre az allostérikus Zn<sup>2+</sup> ion kötőhelyük nyújt lehetőséget. A zárt hGAT fehérjékben a TM1 és TM6 hélixek letekeredett szakasza közötti „fészekben” GABA-Na<sup>+</sup>(1) komplexek jönnek létre, amelyek mechanisztikus elveket nyújthatnak a Na<sup>+</sup> ion-kapcsolt aminosav szimport mechanizmusára vonatkozóan. A humán GABA transzporterek LeuT szerkezetén alapuló homológia modellezése révén felismert új megközelítések rendszere hatékonyabb összehangolt gyógyszerkémiiai akciókat tesz lehetővé a jövőben.

## A TÉZISEK TÉMÁJÁT ÉRINTŐ KÖZLEMÉNYEK

1. Palló A., Bencsura Á., Héja L., Beke T., Perczel A., Kardos J., Simon Á. Major human gamma-aminobutyrate transporter: In silico prediction of substrate efficacy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364, 952-958 (2007) IF: 2.749
2. Palló A., Simon Á., Bencsura Á., Héja L., Kardos J. Substrate-Na<sup>+</sup> complex formation: coupling mechanism for gamma-aminobutyrate symporters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385, 210-214 (2009) IF: 2.648
3. Kardos J., Palló A., Bencsura Á., Simon Á. Assessing structure, function and druggability of major inhibitory neurotransmitter  $\gamma$ -aminobutyrate symporter subtypes. *Current Medicinal Chemistry*, submitted
4. Simon Á., Bencsura Á., Palló A., Héja L., Kardos J. Emerging the role of the structure of brain membrane targets recognizing glutamate. *Curr. Drug. Discov. Technol.* 5, 70-74 (2008) IF: 0

## A TÉZISEK TÉMÁJÁT ÉRINTŐ ELŐADÁSOK

1. Palló A., Beke T., Simon Á. GAT-1 transzporter modellezése. *Transzporter Explorer Konferencia*, Budapest, 2006. október 27.
2. A. Palló, Á. Simon, T. Beke, A. Perczel, J. Kardos. Modelling human GAT-1 transporter. *A Magyar Idegtudományi Társaság XI. Konferenciája*, Szeged, 2007. január 24-27. *Ideggyogy Sz* 2007; 60(S1): 50.
3. Palló A., Bencsura Á., Beke T., Héja L., Kardos J., Simon Á. A humán  $\gamma$ -amino-vajsav transzporter modellezése. *Doki-Suli, Mátrafüred*, 2007. május 7-9.
4. Palló A., Bencsura Á., Héja L., Kardos J., Simon Á. GABA transzporter altípusok összehasonlító vizsgálata. *Doki-Suli, Mátrafüred*, 2008. április 21.

5. Simon Á., Palló A., Bencsura Á., Héja L., Kardos J. Gamma-amino-vajsav transzport molekuláris modellezése: GABA-Na<sup>+</sup> és fehérje-Zn<sup>2+</sup> kötődési kölcsönhatások kialakulása. MTA Bioorganikus Kémiai Munkabizottság előadói ülés, Budapest, 2009. január 19.
6. Palló A., Simon Á., Bencsura Á., Héja L., Kardos J. Molecular modelling of gamma-aminobutyric acid transport: Zn<sup>2+</sup> binding to the transporter and formation of Na<sup>+</sup>(1) – GABA complex. Magyar Idegtudományi Társaság XII. Közgyűlése, Budapest, 2009. január 22-24.
7. Palló A., Simon Á., Bencsura Á., Héja L., Kardos J. Molecular modelling of gamma-aminobutyric acid transport: Zn<sup>2+</sup> binding to the transporter and formation of Na<sup>+</sup>(1) – GABA complex. Magyar Kémikusok Egyesülete QSAR es Modellezési Szakcsoport ülése Szeged, 2009. április 29-30.
8. Palló A., Simon Á., Bencsura Á., Héja L., Kardos J. Gamma-aminovajsav transzport funkció modellezése. Kutatóközponti Tudományos napok, Budapest, 2009. november 24-26.
9. Simon Á., Palló A., Bencsura Á., Kardos J. Assessing structure, function and druggability of major inhibitory neurotransmitter  $\gamma$ -aminobutyrate symporter subtypes. Magyar Idegtudományi Társaság XIII. Közgyűlése, Pécs, 2010. január 20-22.

## A TÉZISEK TÉMÁJÁN KÍVÜLI KÖZLEMÉNYEK

1. Kiss A.L., Palló A., Náray-Szabó G., Harmat V., Polgár L. Structural and kinetic contributions of the oxyanion binding site to the catalytic activity of acylaminoacyl peptidase. *J. Struct. Biol.* 162, 312-323 (2008) IF: 4.059
2. Kardos József, Harmat V., Palló A., Barabás O., Szilágyi K., Gráf L., Náray-Szabó G., Goto Y., Závodszy P., Gál P. Revisiting the mechanism of the autoactivation of the complement protease C1r in the C1 complex: structure of the active catalytic region of C1r. *Mol. Immunol.* 45, 1752-1760 (2008) IF: 3.555