Streszczenie rozprawy doktorskiej

Poszukiwanie zależności pomiędzy strukturą a aktywnością biologiczną ligandów wybranych receptorów serotoninowych

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Mateusz Jabłoński

Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Praca wykonana pod opieką promotorską

dr hab. Justyny Kalinowskiej-Tłuścik

Kraków 2019

Selektywne działanie leków jest jednym z najważniejszych zagadnień współczesnej medycyny i farmakologii. Ze względu na mnogość biomakromolekuł i metabolitów w żywych organizmach, istnieje wysokie prawdopodobieństwo, że lek będzie oddziaływał również z innym celem biologicznym, co może wywoływać nieprzewidziane skutki uboczne. To z kolei może ograniczyć możliwość stosowania leku. Zależnie od etapu badań, podczas którego niepożądane efekty zostaną zaobserwowane, może to prowadzić do niedopuszczenia leku lub usunięcia leku z obrotu. Problem selektywności jest szczególnie istotny dla leków działających na ośrodkowy układ nerwowy (OUN), gdzie znaczna część celów biologicznych należy do grupy receptorów sprzężonych z białkami G (GPCR). Wśród nich wyróżnić można rodzinę receptorów serotoninowych.

Serotonina (5-hydroksytryptamina, 5-HT) to związek organiczny należący do grupy monoamin, będący najstarszym ewolucyjnie przekaźnikiem. Liczne wyniki badań nad serotoniną i towarzyszącym jej zespołem białek wskazują na jej istotny udział w funkcjonowaniu i regulacji praktycznie wszystkich układów narządów. Jako neuroprzekaźnik w OUN, serotonina odpowiada m.in. za: nastrój, zdolności poznawcze, apetyt, rytm okołodobowy czy popęd seksualny. Dysfunkcje układu serotoninergicznego związane są z występowaniem takich jednostek chorobowych jak: depresja, lęk i schizofrenia. Serotonina działa poprzez wiązanie się do receptorów serotoninowych. Receptory serotoninowe zwierząt wyższych i ludzi podzielono na 7 typów i łącznie 14 podtypów, z czego 13 należy do rodziny GPCR.

Jednym z głównych celów mojej pracy badawczej była identyfikacja cech strukturalnych ligandów z klasy długołańcuchowych arylopiperazyn (LCAP), które mogą mieć istotny wpływ na wiązalność tych związków do ludzkich receptorów serotoninowych 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} oraz 5-HT_7. Do realizacji postawionych zadań wykorzystano analizę struktur krystalicznych pochodnych 7-(4-fenylopiperazyn-1-ylo)alkilo-1,3-dimetylopuryno-2,6-dionów. Następnie, wybrane ligandy zadokowano metodami modelowania molekularnego do modeli homologicznych receptorów 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} oraz 5-HT_7. Ponieważ LCAP znane są ze swojego wielocelowego działania, szczególną uwagę poświęcono badaniom zależności pomiędzy geometrią fragmentu fenylopiperazyny i powinowactwem do rzeczonych receptorów. W tym celu zdefiniowano dwa kątowe parametry geometryczne, których wartości obserwowane w analizowanych strukturach krystalicznych i wynikach dokowania skonfrontowano z tymi, obserwowanymi w strukturach krystalicznych cząsteczek organicznych zdeponowanych w bazie Cambridge Structural Database (CSD).

W wyniku próby krystalizacji 52 różnych pochodnych LCAP, uzyskano 11 unikalnych struktur krystalicznych. Geometrie cząsteczek lub kationów LCAP obserwowanych w krysztale są najczęściej zbliżone i przyjmują tzw. konformację rozciągniętą. We wszystkich strukturach piperazyna występuje w konformacji krzesłowej, z fragmentem arylowym w pozycji ekwatorialnej. Główne różnice geometryczne obecne są we wzajemnej orientacji piperazyny i związanej z nią podstawionej lub niepodstawionej grupy fenylowej oraz względnym ułożeniu grupy fenylowej i fragmentu 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu. Najsilniejszym typem oddziaływania w strukturach chlorowodorków LCAP jest wspomagane ładunkiem wiązanie wodorowe. Co ciekawe, protonowany atom azotu piperazyny tworzy je często z cząsteczkami wody, pomimo obecności anionu chlorkowego w krysztale. Wszystkie struktury stabilizowane są przez mnogość słabych wiązań wodorowych oraz oddziaływań typu π···π.

Przeprowadzono analizę konformacyjną fragmentu fenylopiperazyny w strukturach krystalicznych zdeponowanych w bazie CSD. Rozważono związki zawierające fenylopiperazynę z niepodstawioną grupą fenylową oraz z podstawnikami: 2-metoksylowym, 3-chlorowym oraz 4-fluorowym. W zdecydowanej większości struktur atom azotu piperazyny związany z grupą fenylową posiada piramidalną geometrię. Zakres kąta nachylenia grupy fenylowej w stosunku do wolnej pary elektronowej tego atomu azotu jest jednak wyraźnie węższy dla grup fenylowych z podstawnikiem 2-metoksylowym. W tym przypadku, zakres kąta pomiędzy płaszczyzną przechodzącą przez atomy węgla grupy fenylowej oraz płaszczyzną przechodzącą przez atomy węgla piperazyny okazał się być nie tylko węższy, ale również nie pokrywał się z zakresem obserwowanym dla pozostałych badanych pochodnych. Fragmenty fenylopiperazynowe w uzyskanych strukturach krystalicznych charakteryzowały się parametrami geometrycznymi, które znajdowały swoje pokrycie w obserwacjach z CSD.

Ułożenia badanych pochodnych LCAP we wnękach wiążących receptorów są analogiczne do tych, opisanych w literaturze. Obserwowane oddziaływania międzycząsteczkowe są zgodne z tymi, zdefiniowanymi jako niezbędne dla aktywności wobec receptorów serotoninowych. Układ 1,3-dimetylopuryno-2,6-dionu lokuje się w słabo zachowanej sekwencyjnie, zewnętrznej części wnęk receptorów, w sąsiedztwie reszt aminokwasowych helis TM II, TM V, TM VI oraz TM VII. Fragment fenylopiperazyny zajmuje pozycję w wysoce konserwatywnej, wewnętrznej części wnęki wiążącej. Najsilniejszym typem oddziaływania w analizowanym układzie ligand-białko jest wspomagane ładunkiem wiązanie wodorowe pomiędzy protonowanym jonem amoniowym atomu azotu piperazyny i resztą asparaginianu

receptorów. Zaobserwowano drobne różnice w głębokości zadokowania fragmentów fenylopiperazyny, w zależności od obecnego podstawnika w pierścieniu fenylowym oraz typu receptora. Ponadto, wśród najlepiej ocenionych wyników dokowania zaobserwowano odmienne rozkłady kątów opisujących wzajemną orientację piperazyny i grupy fenylowej. Wyniki te mogą wskazywać na istotne różnice w położeniu i konformacji aktywnej ligandów w różnych typach receptorów, choć należy brać pod uwagę również możliwość stronniczości użytych modeli homologicznych.

Wyniki analizy konformacyjnej struktur krystalicznych, przegląd bazy CSD oraz wyniki dokowania molekularnego wskazują na to, że istotnym czynnikiem wpływającym na aktywność i selektywność ligandów może być preferowana orientacja grupy fenylowej względem piperazyny i efekt mezomeryczny podstawników grupy fenylowej. Ponadto wydaje się, że preferowaną konformacją aktywną badanych LCAP w receptorach 5-HT_{1A} oraz 5-HT_7 jest konformacja rozciągnięta. W receptorze 5-HT_{2A} konformacja ta może nie być preferowana, co odzwierciedlone jest przez niektóre różnice w wartościach stałych inhibicji ligandów. Analiza konformacji i oddziaływań w kieszeni wiążącej modeli receptorowych nie pozwoliła na jednoznaczne wytłumaczenie różnic aktywności części z analizowanych ligandów. Znaczne różnice aktywności danego liganda względem badanych typów receptorów serotoninowych mogą zatem wynikać z różnic w rodzaju oraz konformacji bardziej odległych reszt aminokwasowych, które nie tworzą bezpośrednio wnęki wiążącej, lecz wpływają na jej kształt. Choć w uzyskanych kompleksach nie zaobserwowano możliwości utworzenia wiązania wodorowego pomiędzy ligandem a resztą w pozycji 3x36 (cysteina w przypadku receptorów 5-HT_{1A} i 5-HT_7 oraz seryna w receptorze 5-HT_{2A}), inne opublikowane badania wskazują na istotny udział reszty znajdującej się w tej pozycji w wiązaniu ligandów. W pracy zasugerowano, że ważnym czynnikiem może być hydrofobowość reszty aminokwasowej w tym obszarze.

Drugim celem pracy było przygotowanie protokołu wirtualnych badań przesiewowych (VS) z wykorzystaniem metody dokowania molekularnego, pozwalającego na przesiew milionów unikalnych związków chemicznych na pojedynczej stacji roboczej, w relatywnie krótkim czasie. Analogiczne badania VS wymagają zazwyczaj dostępu do znacznych zasobów obliczeniowych i czasowych. W celu przyspieszenia obliczeń, protokół oparto na dwóch metodach: szybkiej, polegającej na porównywaniu kształtu i wybranych właściwości fizyko-chemicznych, oraz czasochłonnej, polegającej na dokowaniu molekularnym. W pracy przeprowadzono wstępną weryfikację zaproponowanego protokołu i następnie użyto go,

w celu znalezienia nowych, potencjalnych ligandów receptora 5-HT_7, które charakteryzowałyby się niskim powinowactwem do receptora 5-HT_{1A}. Siedem z najlepiej ocenionych potencjalnych ligandów zakupiono i zlecono dla nich badania aktywności biologicznej *in vitro*. Stałe powinowactwa K_i większości zakupionych związków charakteryzowały się wartościami rzędu μM i wyższego. Oznacza to, że związki wykazują jedynie niskie powinowactwo do badanych receptorów. Swego rodzaju sukcesem metody był jednak fakt, że cztery z siedmiu zakupionych związków charakteryzują się istotnie większym powinowactwem do receptora 5-HT_7, niż do receptora 5-HT_{1A}. W pracy przeprowadzono obszerną analizę potencjalnych powodów niepowodzenia identyfikacji związków o średniej lub wysokiej aktywności. Otrzymane wyniki wskazują jednak na pewien potencjał protokołu, pod warunkiem optymalizacji metodologicznej.