

EGY ÚJ CÉLPONT A NEURODEGENERATÍV BETEGSÉGEKRE IRÁNYULÓ GYÓGYSZERFEJLESZTÉSSEN: A SZIGMA-1 RECEPTOR

FÜLÖP LÍVIA

SZTE Orvosi Vegytani Intézet, Neurodegeneratív betegségek kutatócsoport



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROGRAM

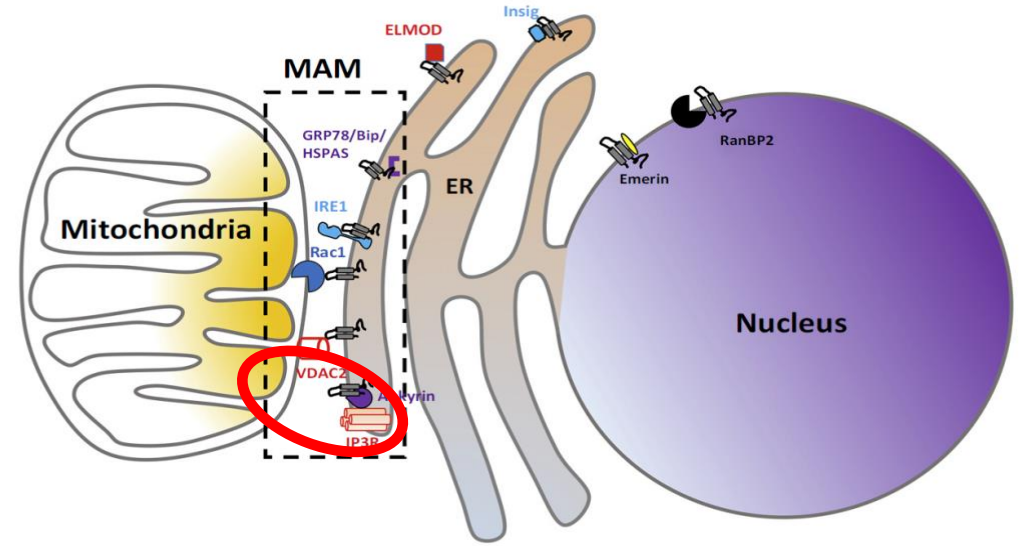
AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE

A szigma-receptorcsalád

- Központi idegrendszeri előfordulás
- Két alcsalád: σ_1 és σ_2
- Opioid receptorként klasszifikálták az N-allilnormetazocin (SKF-10,047) ligand által indukált hatását alapul véve (σ -szindróma)
- Számos pszichostimuláns, neuroszteroid, dextrobenzomorfán, neuroleptikum kötődik hozzá
- Endogén ligandja későn felfedezett: dimetil-triptamin
- Később kikerült az opioid receptorok közül, mert naloxont, naltrexont, endomorfinoakat nem köt, szerkezetileg jelentősen eltér az opioid receptoroktól

A $\sigma 1$ receptor

- Az ER-mitokondrium határfelületén (MAM) expresszálódik
- A Bip chaperonnal kapcsolódik, maga is chaperon funkcióval rendelkezik
- Főbb funkciói: protein homeosztázis szabályozása, ER-stressz folyamatok modulálása, gyulladás csökkentés, Ca^{2+} -szint szabályozása ER és mitokondrium között
- Sokféle, egyéb receptoron is ható liganduma van
- Szerep a neurodegeneratív betegségekben

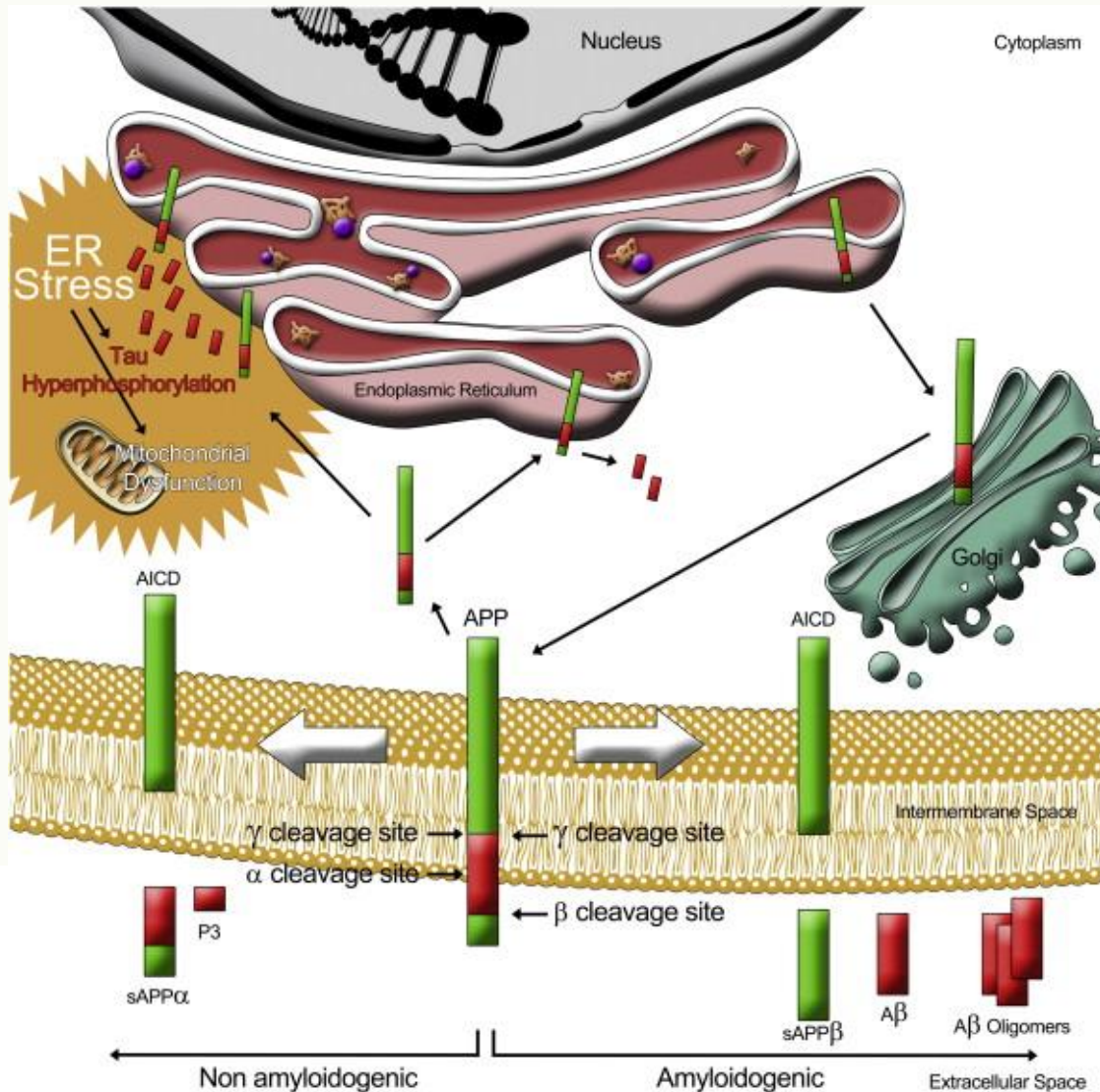


The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems

Tsung-Ping Su,^{1,*} Tzu-Chieh Su,¹ Yoki Nakamura,¹ and Shang-Yi Tsai¹

Trends in Pharmacological Sciences 2016

Sejten belüli APP feldolgozás és transzport

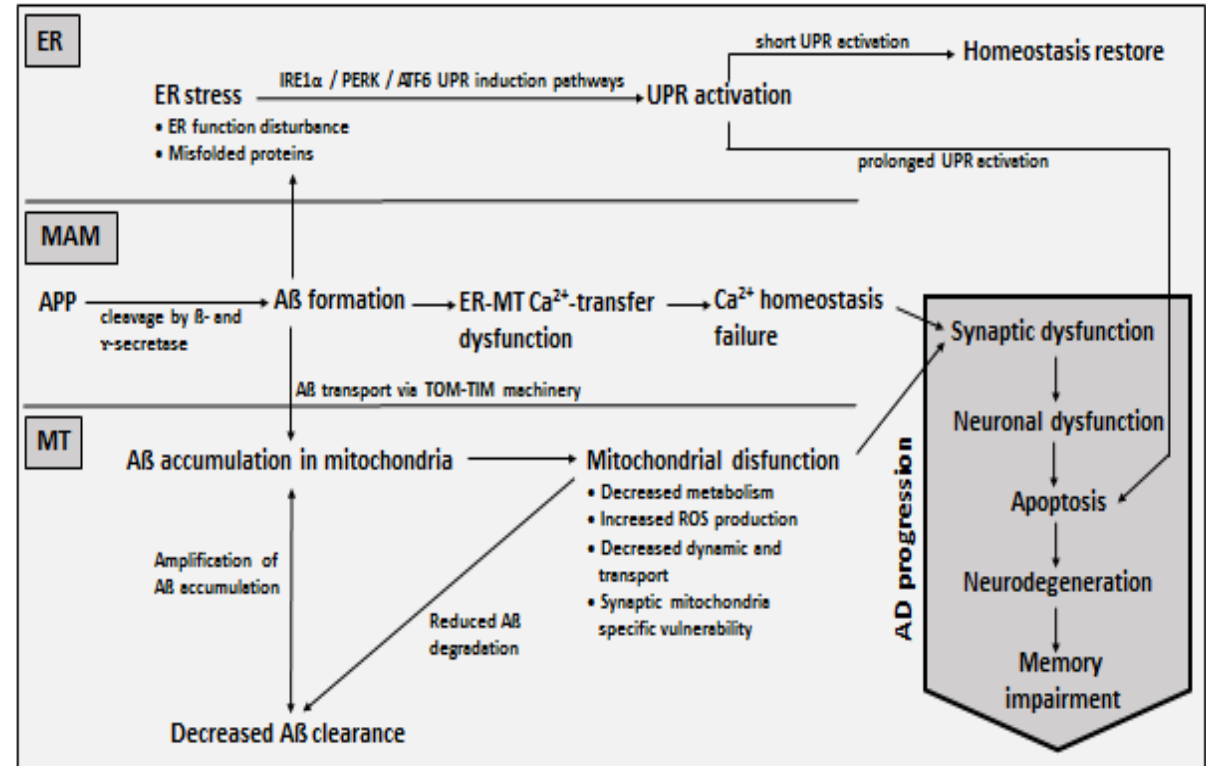
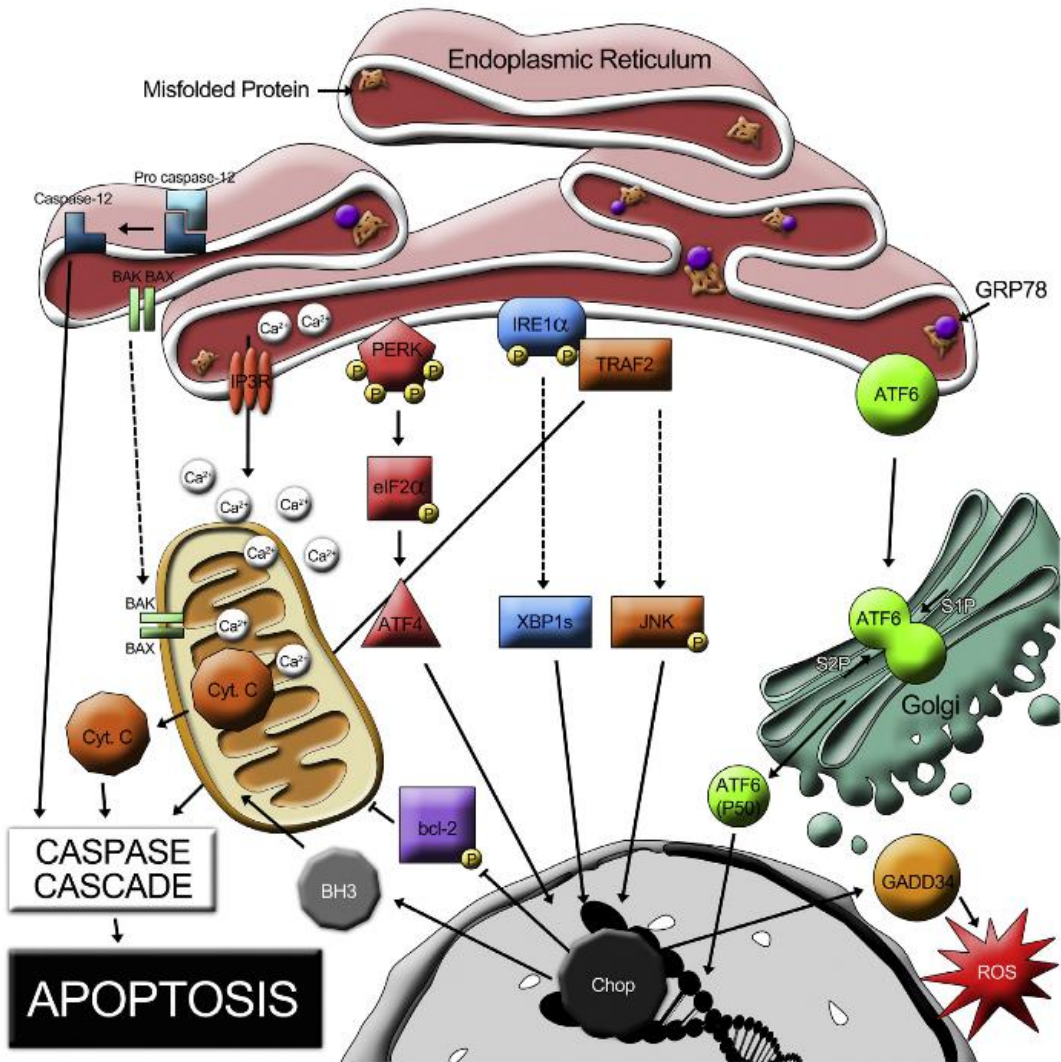


APP lebontásának helye a sejten belül:

- PS1 és PS2 főleg: ER, mitokondrium, Golgi, endoszómák, magburok
- A γ -szekretáz aktivitás fő helye a MAM (Area-Gomez, 2009)
- Feltételezett, hogy az A β -termelődés a MAM aktiválódásának és az ER-Mitokondrium kapcsolat felerősödésének eredménye

Az ER-stressz downstream folyamatai és következményei

AJ. Plácido et al. / *Biochimica et Biophysica Acta* 1842 (2014) 1444–1453

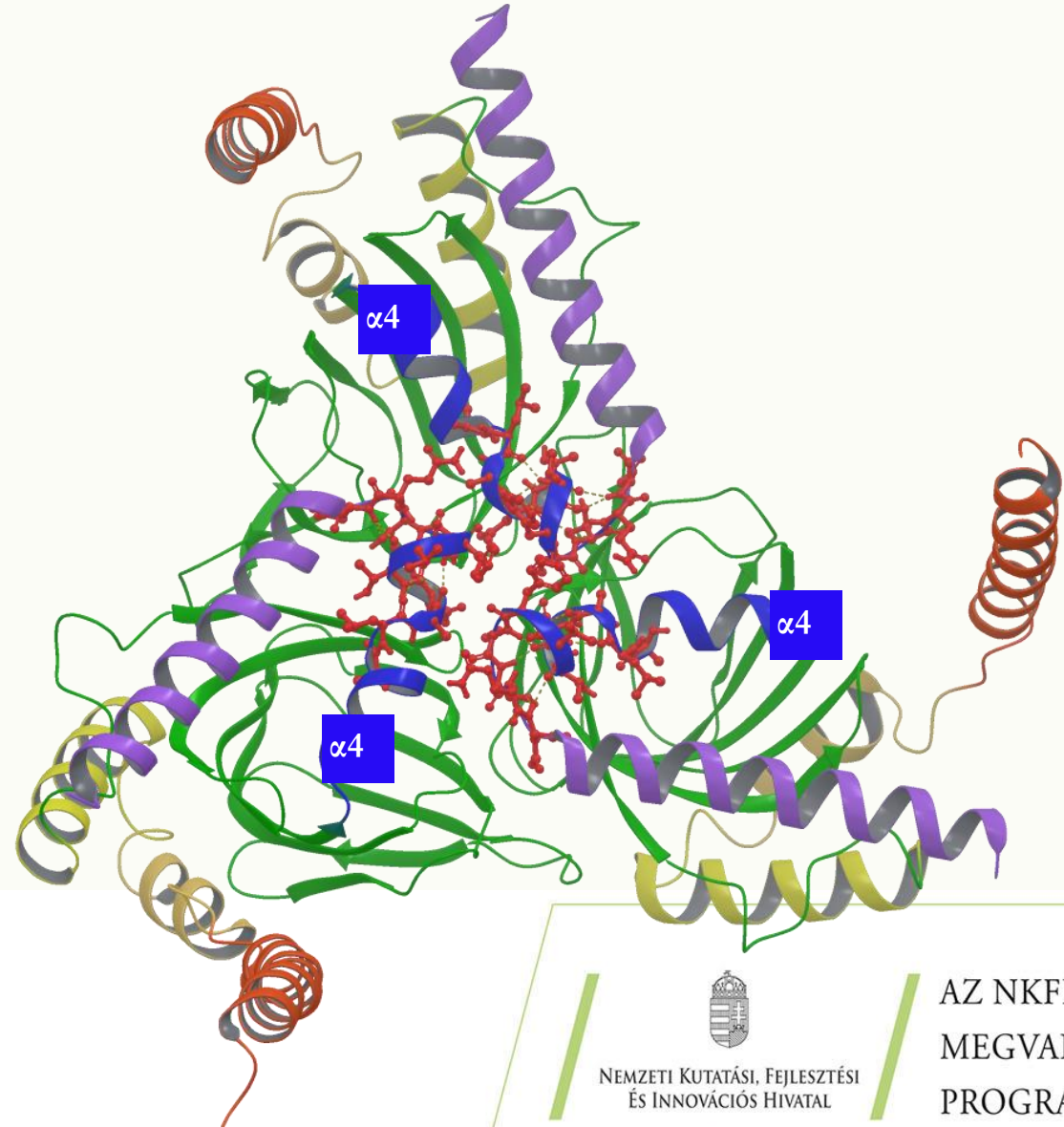
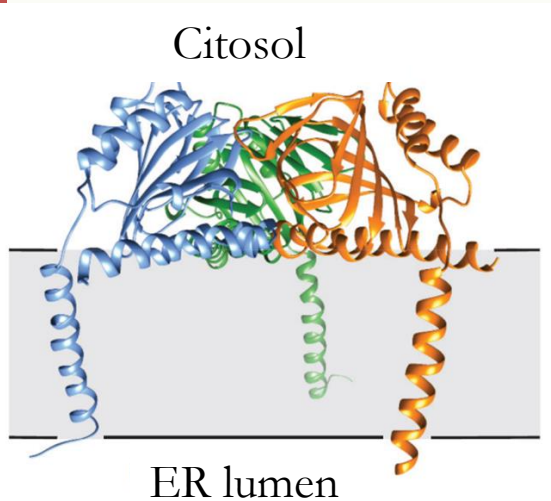
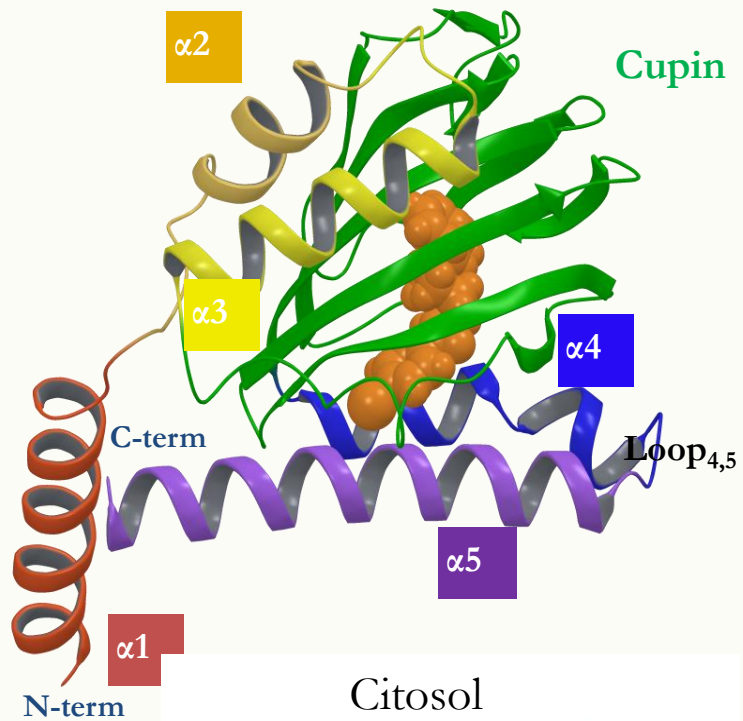


A σ_1 receptor szerkezete

Crystal structure of the human σ_1 receptor

Hayden R. Schmidt^{1*}, Sanduo Zheng^{1*}, Esin Gurpinar¹, Antoine Koeh², Aashish Manglik² & Andrew C. Kruse¹

Monomer szerkezet 4-IBP-vel



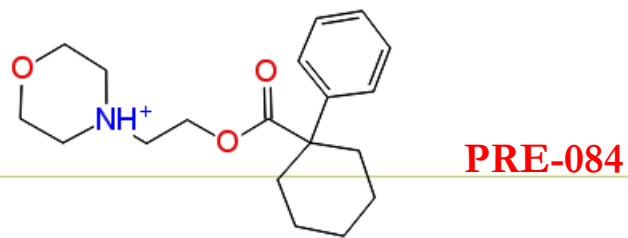
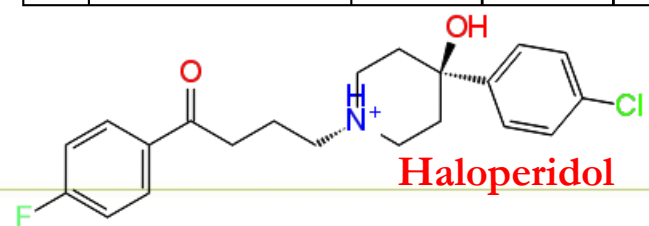
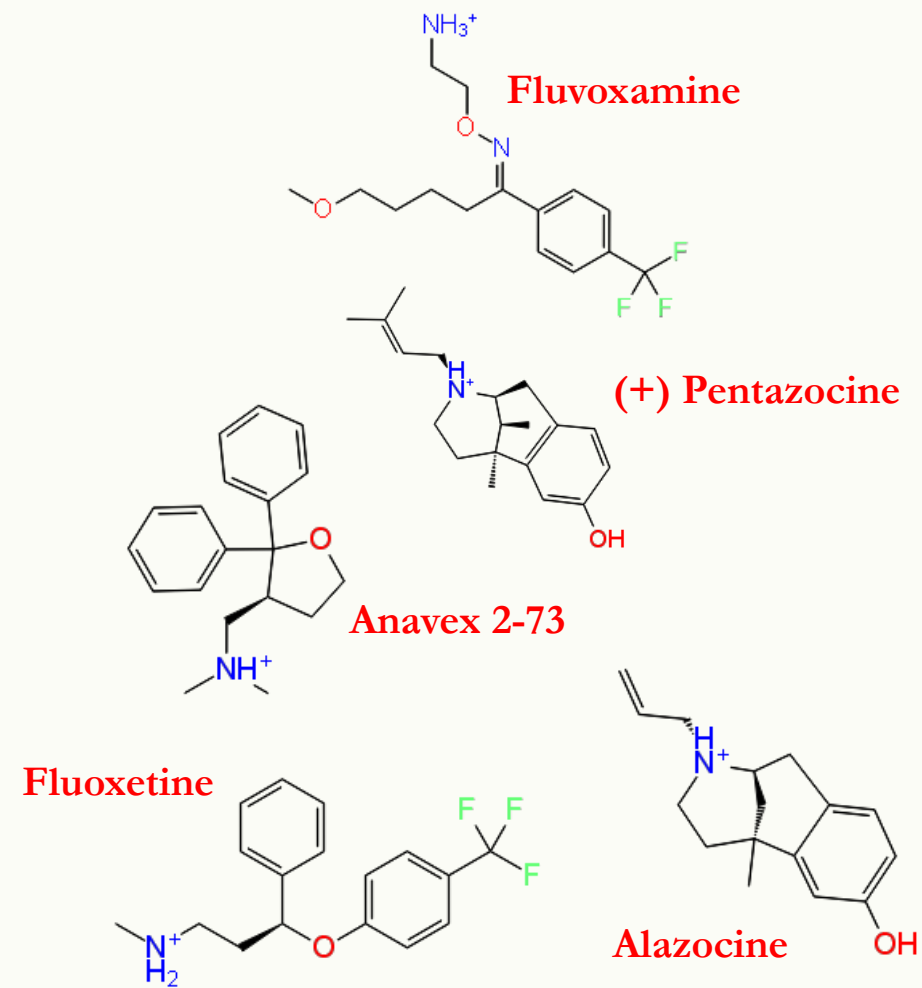
NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROGRAM

AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE

Irodalomban ismert agonisták és antagonisták

	Compounds	Sigma1 aff. [Ki nM]	Sigma2 aff. [Ki nM]	S2/S1 Ki ratio	Funct. on s1 Receptors	Comments	Other Activities
1	(+)-Pentazocine	16,7	6611	396	Agonist	Benzomorphans	Highly selective s1 agonist
2	Chlorpromazine	453	1628	4	?	Antipsychotics	Dopamine D2 antagonist
3	Fluoxetine	240	16,1	67	Agonist	Antidepressants	Selective 5-HT reuptake inhibitor
4	Fluvoxamine	36	8439	234	Agonist		Selective 5-HT reuptake inhibitor
5	Sertraline	57	5297	93	Agonist?/Antagonist		Selective 5-HT reuptake inhibitor
6	Dextromethorphan	205	11,06	54	Agonist	Antitussives	NMDA receptor allosteric antagonist
7	Dimemorfan	151	4421	29	Agonist	Antitussives	?
8	Donepezil	14,6	?	-	Agonist	Parkinson's and/or Alzheimer's disease	Cholinesterase inhibitor
9	(+)-SKF-10,047	597	39,74	67	Agonist	Benzomorphans	NMDA receptor ligand
10	DTG	77	43	1		Other s drugs	s2 agonist
11	PRE-084	44	?		Agonist		
12	N,N-Dimethyltryptamine (DMT)	14,75	21,71	1	Agonist	Putative endogenous	5HT2A receptors agonist, psychedelic drug
13	Haloperidol	6,44	221	34	Antagonist	Antipsychotics	Dopamine D2 and D3 antagonist; s2 agonist



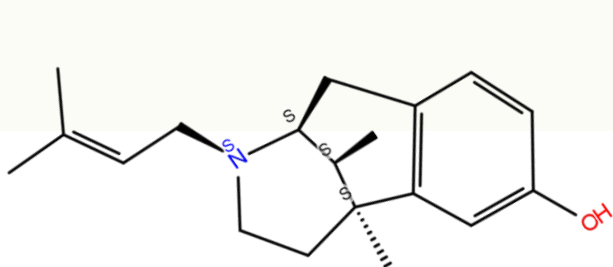
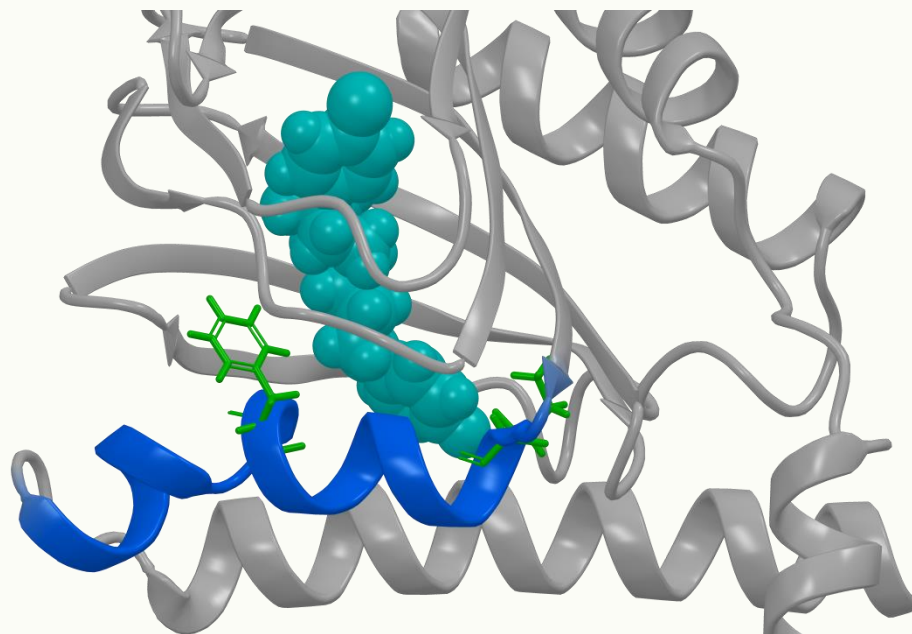
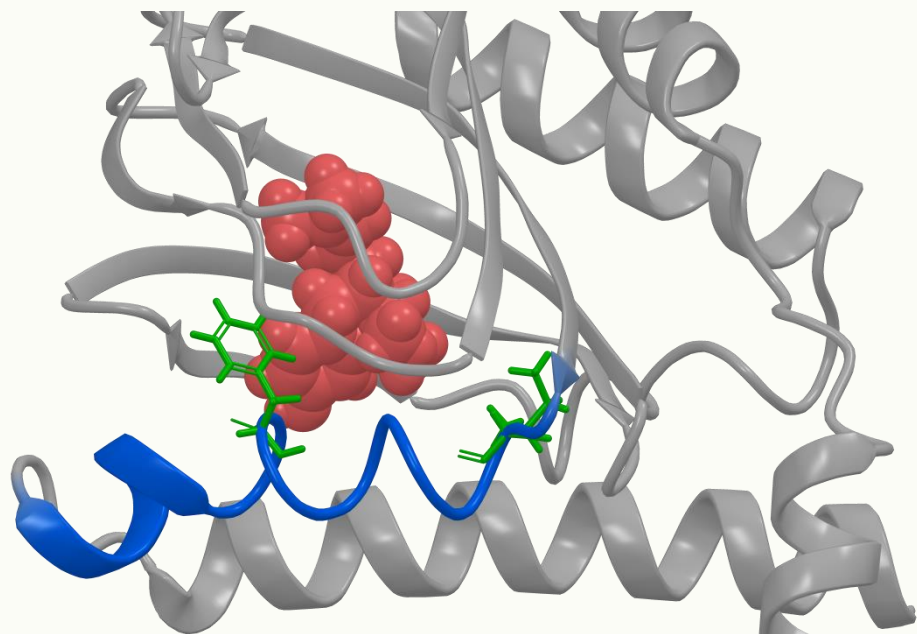
GINOP 2.3.2.-2016-00060 pályázat feladatai

- Molekulakönyvtár in silico szűrése lehetséges σ 1-modulátorok azonosítása céljából
- Agonisták és antagonisták kötődési különbségeinek felderítése
- A szelektált molekulák szűrése in vitro receptorkötés vizsgálatokkal
- A legjobb molekulák biológiai vizsgálata

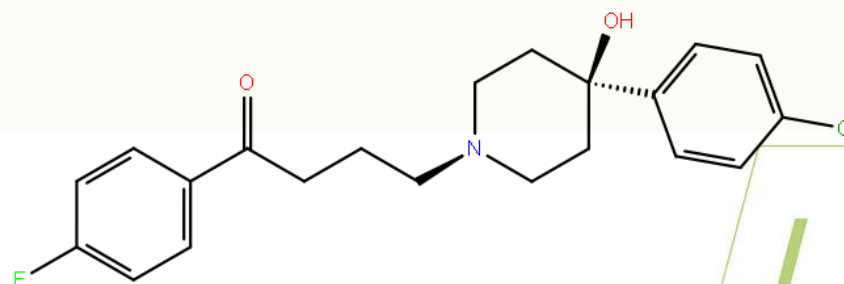
- MD alapú módszerrel validált receptormodellek (3 db) készítése
- SZTE Gyógyszerkémiai Intézet molekulakönyvtárának szűrése (kb. 4500 molekula)
- 30 anyag lett kiválasztva in vitro receptorkötési vizsgálatokra a receptormodellek eredményei alapján, a dokkolásra alapozott rangsor figyelembevételével.

- Módszer: dokkolás kétféle szerkezetbe
- Probléma: nagyon hasonlóak a szerkezetek, az agonisták és antagonisták hasonló energiákkal dokkolnak mindkettőbe
- Nehéz az egyértelmű besorolás számos szerkezetnél
- Stratégia: olyan geometriai jellemzők azonosítása, mellyel eldönthető, hogy az agonista, vagy az antagonisták kötődéshez van közelebb a póz: **kötődési mintázat** megállapítása.
- További finomítás: a dokkolásból kapott szerkezet pontosítása: **metadinamika**.

Agonista és antagonisták kötődés: irodalmi adatok



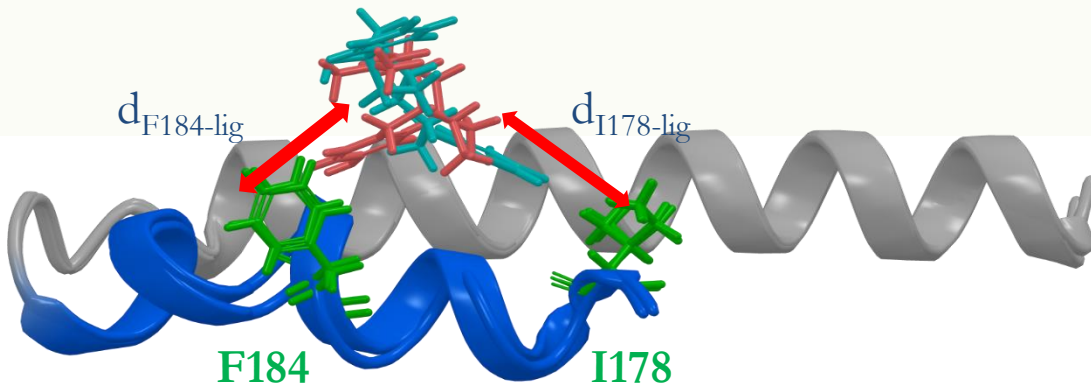
pentazocin



haloperidol

Kötődési mintázat és Metadinamika

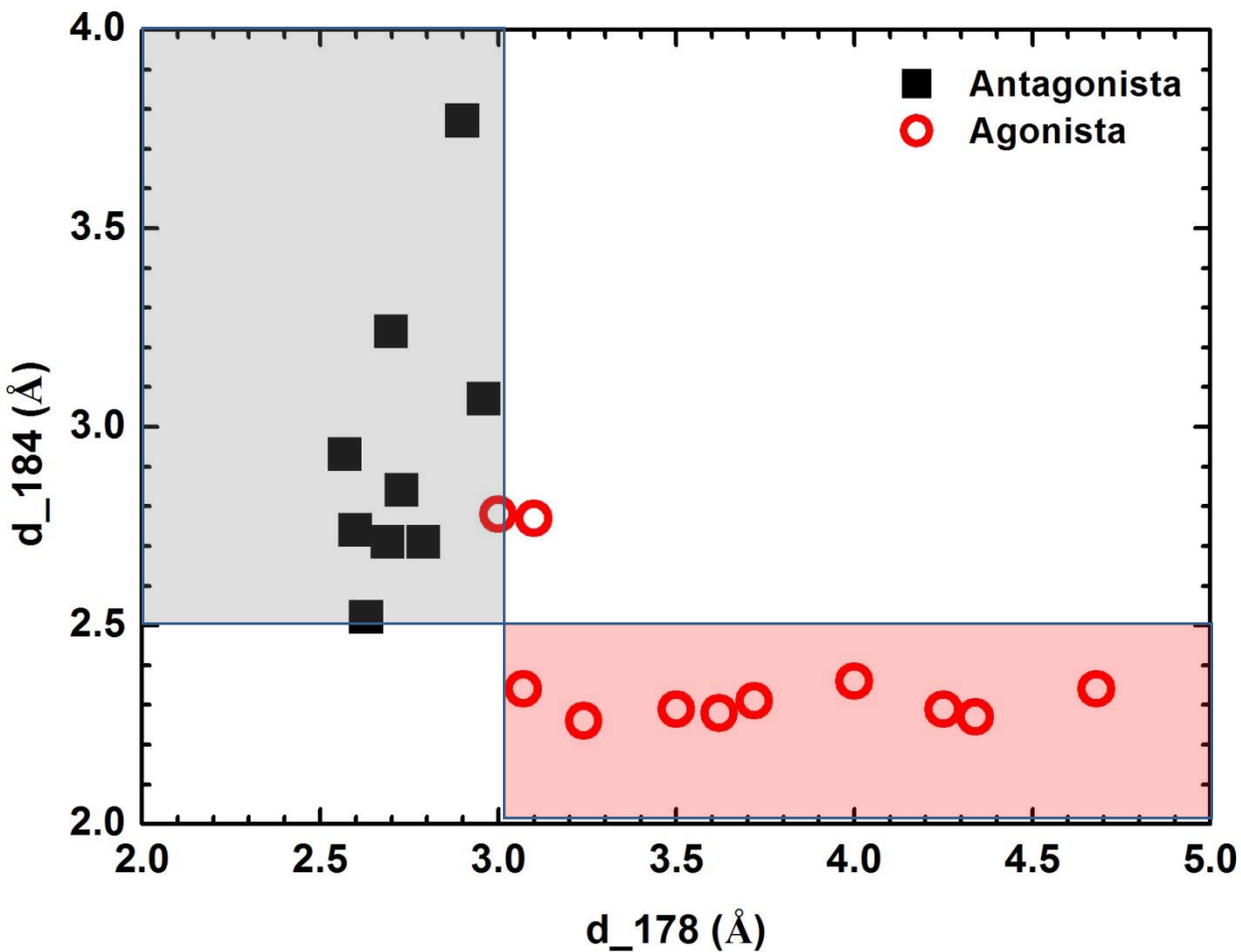
- 250ns számolás a 6dk0, 6dk1 és 6djz szerkezetekkel
- Minimális távolság átlagának kiszámítása a kötőzseb reziduumaira
- Az E172-vel alkotott sóhíd mellett az F184-től és az I178-től mért távolság elkülöníti ebben az esetben az antagonistát és az agonistát



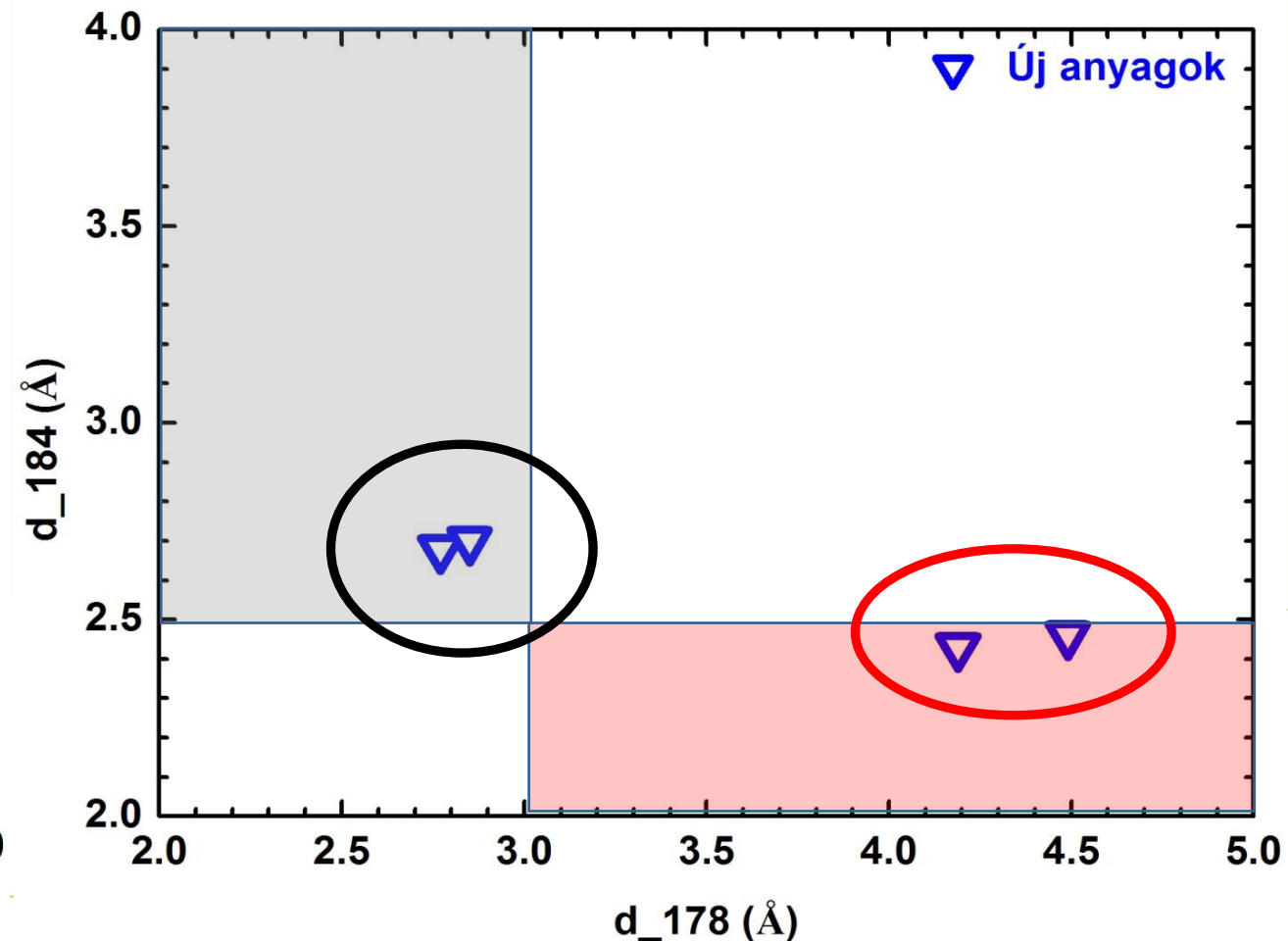
Bogár Ferenc

- 100ns MetaD,
- Kollektív változó a ligandum RMSD
- A kiindulóhoz közeli pózok közül a legstabilabb kiválasztására alkalmas
- A legjobb affinitású póz(ok)ban kiszámolhatjuk a fenti távolságokat
- Megbízhatóbb besorolás (?)
- A számolásokban az agonista kötött szerkezetet használtuk

Irodalomban leírt agonisták és antagonisták besorolása



Új anyagok besorolása

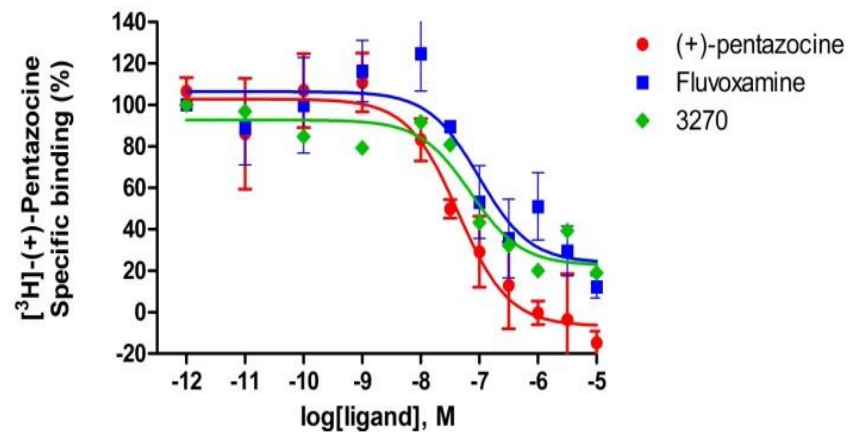


- ^3H -jelölt (+)-pentazocinnal tengerimalac máj membrán-homogenizátumon radioligand-kötési kísérletek
- A (+)-pentazocin K_i állandójának meghatározása (14 nM, irodalmi érték: 16.7 nM)
- Kompetíciós kötődési vizsgálatok ^3H -(+)-pentazocinnal szemben
- Irodalomból ismert és a molekulakönyvtárból szelektált vegyületek vizsgálata

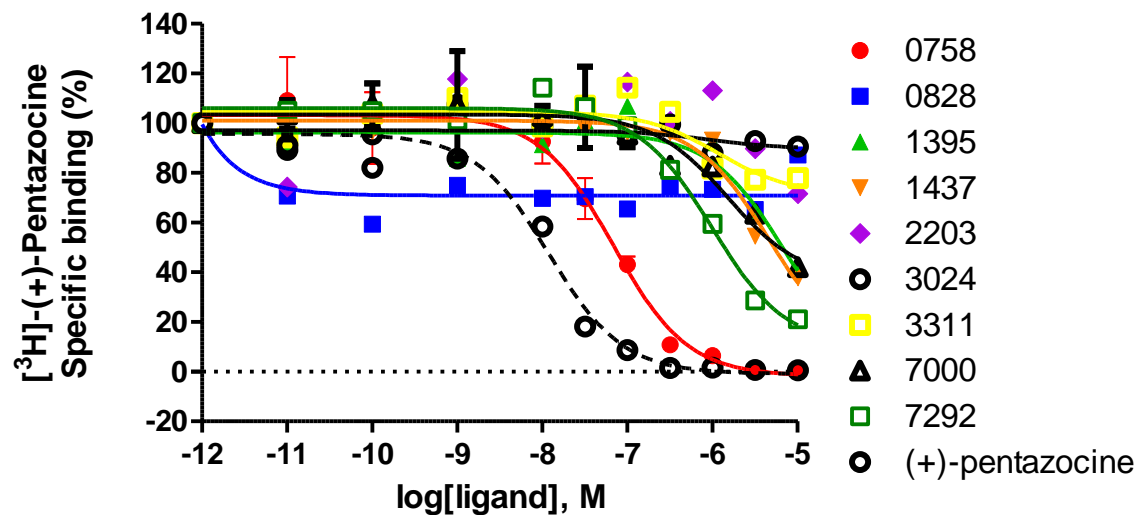
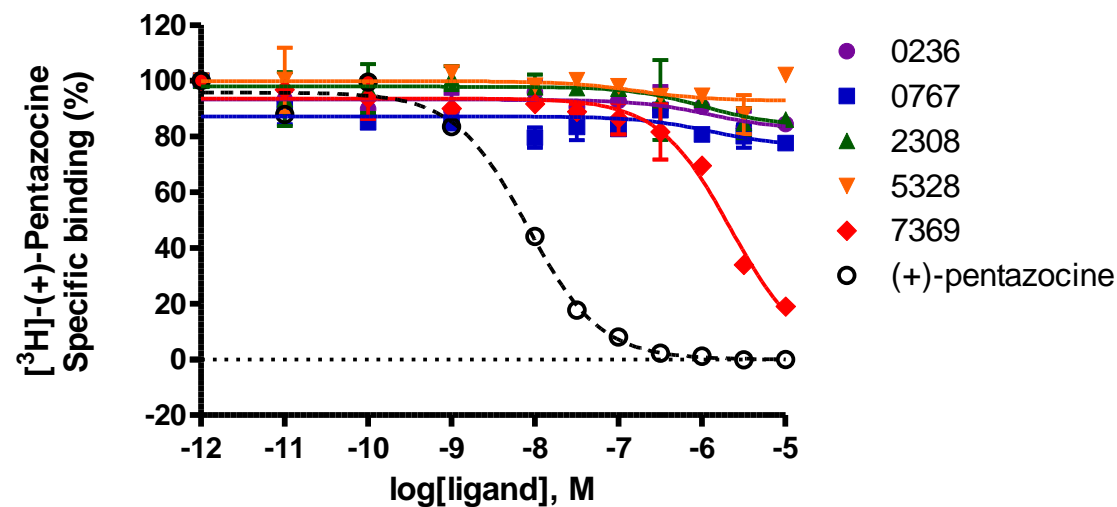
Néhány eredmény

Tömböly Csaba, Dvorácskó Szabolcs

SR ligandumok	K_i (nM)	Irodalmi K_i (nM)
(+)-Pentazocin	14	16.7
Cutamesine	5.5	4.6
Haloperidol	5.2	6.44
Fluvoxamine	36	36

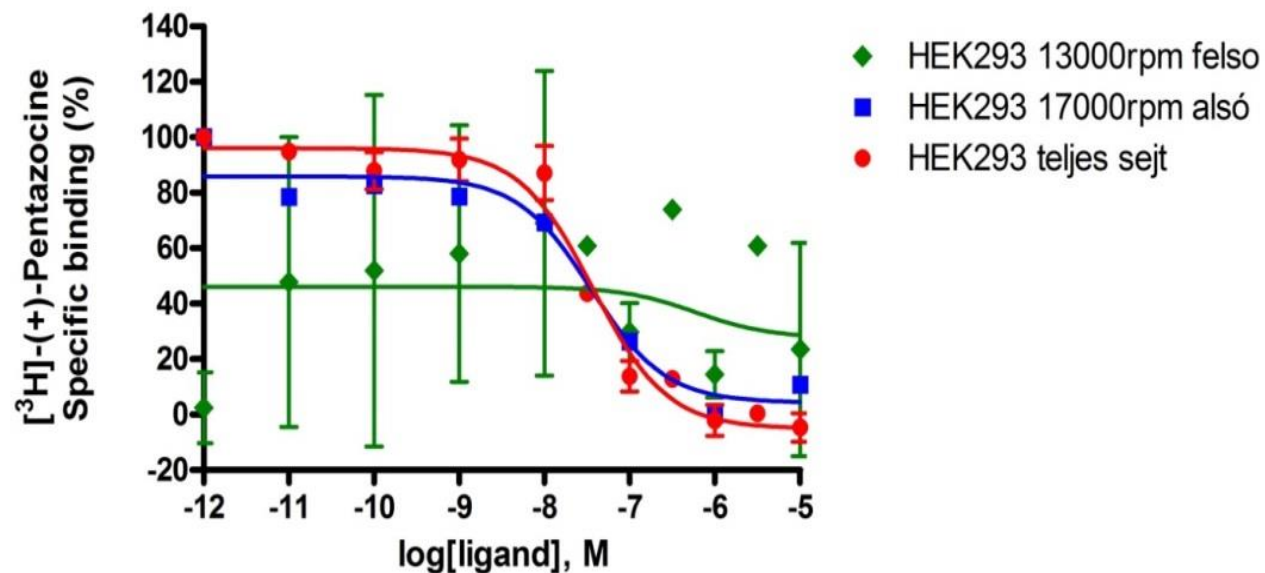


SR ligandumok	<i>in vitro</i> K_i (nM)
0758	32
7292	463
3270	5.4
7369	1036



Kísérletek HEK293 sejteken – Van-e $\sigma 1$ -expresszió?

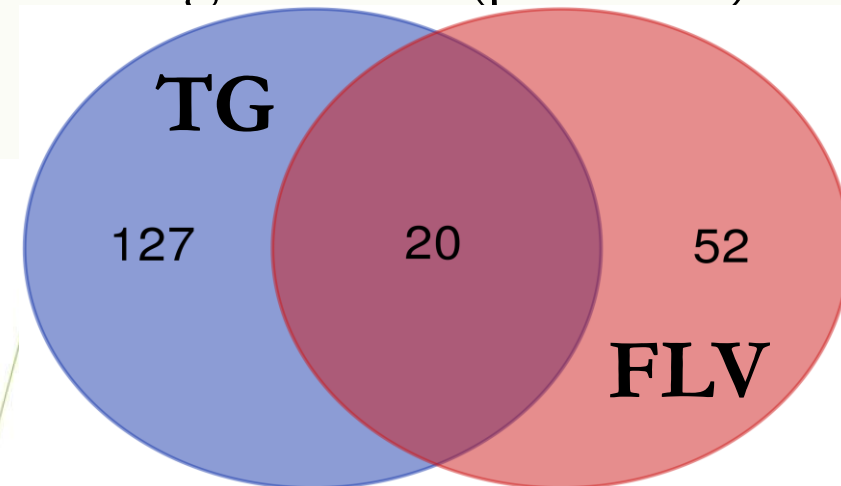
Szögi Titanilla
Dvorácskó Szabolcs



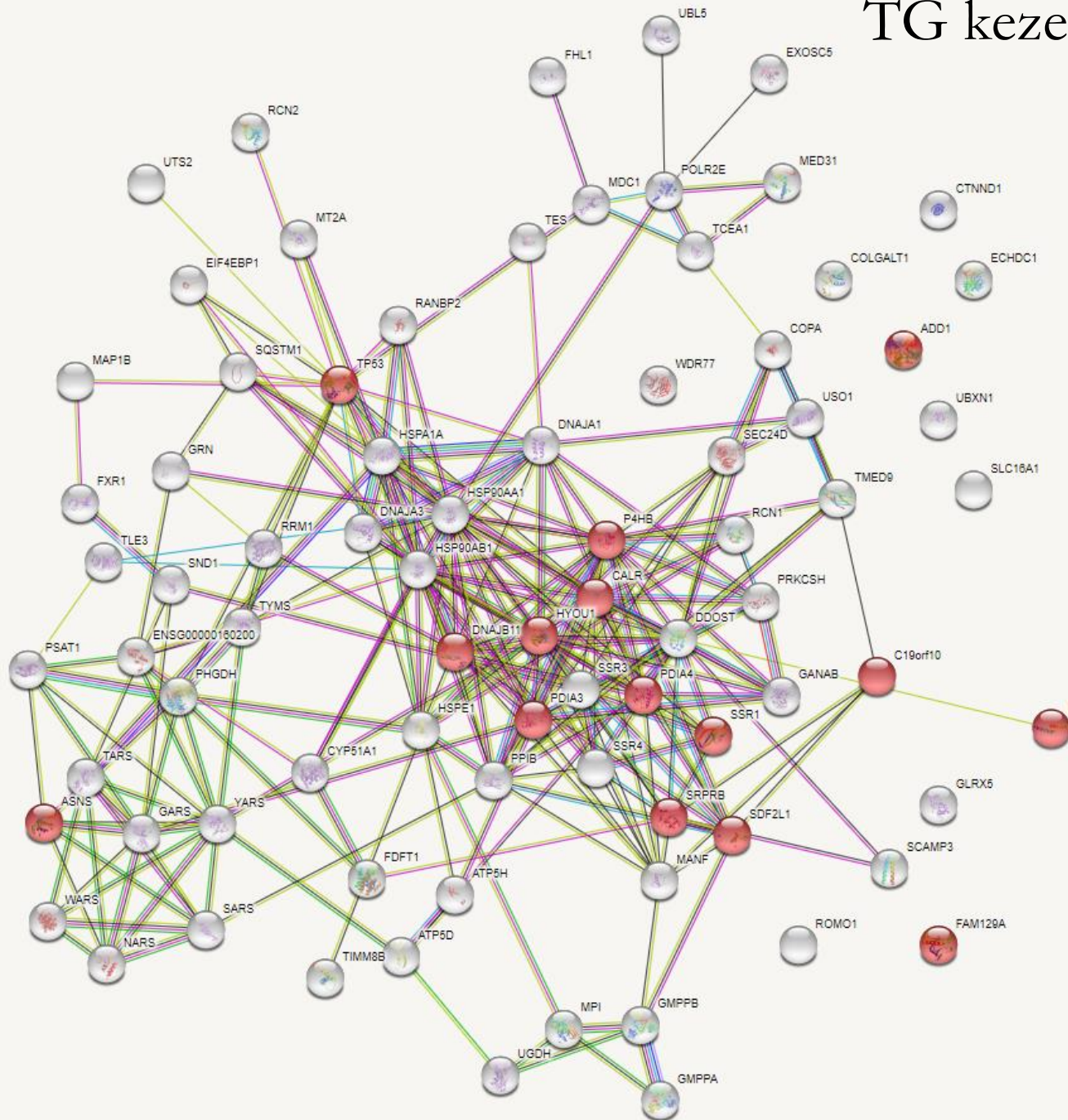
	(+)-Pentazocin K_i (nM)
Tengeri malac máj membrán	14
Intakt HEK293 (teljes)	16
HEK293 17000rpm also	15
HEK293 13000rpm felső	-
HEK293 ultracentrifuga	-
Irodalmi érték	16.7

- HEK293 sejtek kezelése ER-stresszorral: thapsigargin (TG 100 nM)
- $\sigma 1$ -antagonista: fluvoxamin (FLV 30 μM)
- Proteomikai vizsgálatok az aktiválódó ER-stressz utak megállapítására
- Kb 2200 kvantitált fehérje (technikai CV: 9.4%) (49 db ER stresszhez köthető)
- Statisztikai értékelés: egyfaktoros ANOVA, post-hoc teszt:

267 fehérje mutatott valamelyik két csoport között szignifikáns ($p < 0.05$) különbséget (17 db ER stresszhez köthető)



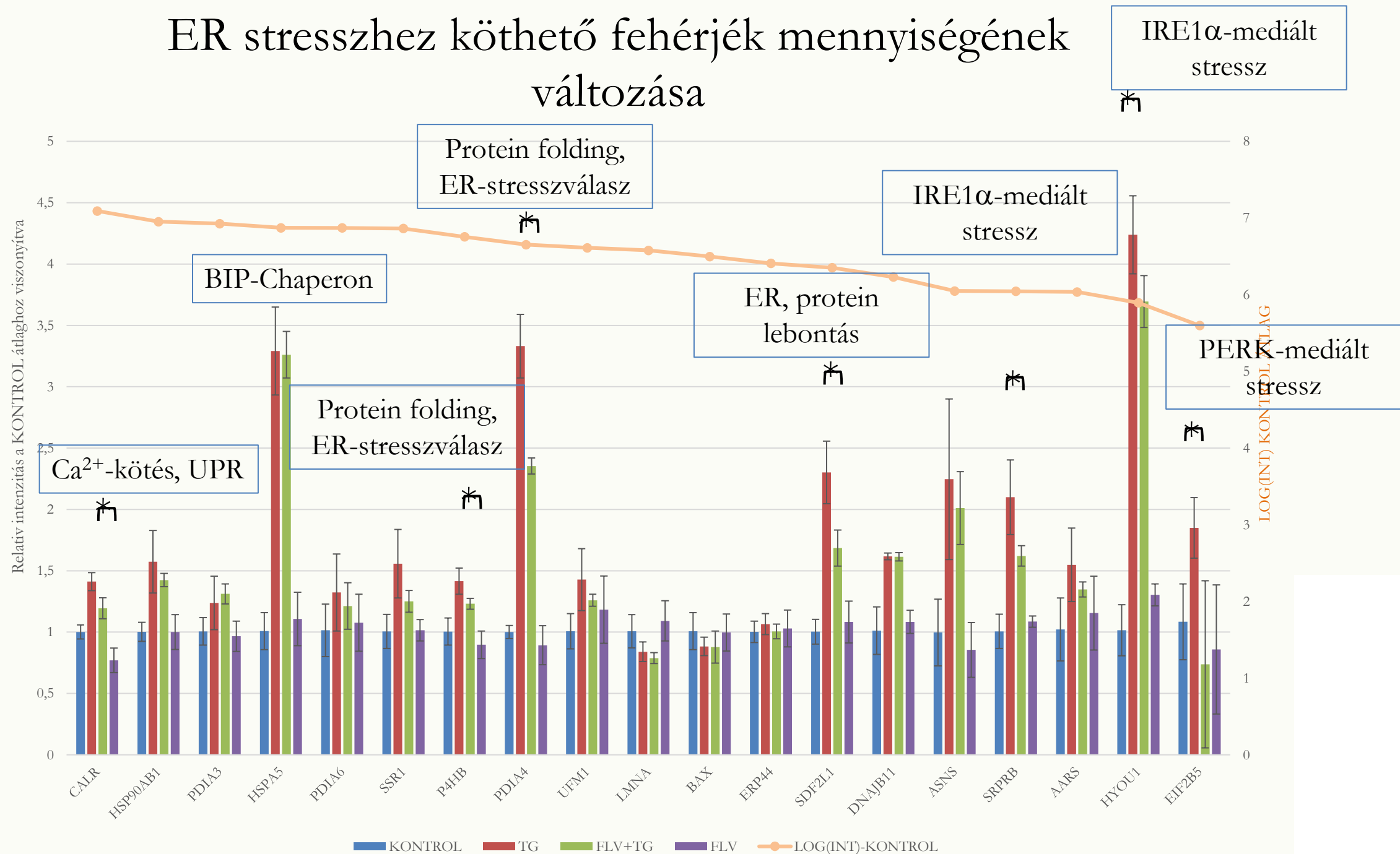
TG kezelésre szignifikáns változás mutató fehérjék GENE ONTOLOGY analízise



Cellular Component (GO)			
GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0005783	endoplasmic reticulum	33 of 1796	1.54e-11
GO:0044432	endoplasmic reticulum part	28 of 1294	2.72e-11
GO:0044444	cytoplasmic part	70 of 9377	5.94e-11
GO:0005788	endoplasmic reticulum lumen	15 of 299	2.19e-10
GO:0005737	cytoplasm	74 of 11238	1.13e-09
GO:0044424	intracellular part	80 of 13996	3.31e-09
GO:0043231	intracellular membrane-bounded organelle	68 of 10365	2.06e-07
GO:0042470	melanosome	8 of 105	8.06e-07
GO:0012505	endomembrane system	39 of 4347	8.30e-06
GO:0034663	endoplasmic reticulum chaperone complex	4 of 11	9.05e-06
GO:0005829	cytosol	42 of 4958	9.05e-06
GO:0044446	intracellular organelle part	59 of 8882	1.23e-05
GO:0043229	intracellular organelle	70 of 12193	3.25e-05
GO:0070013	intracellular organelle lumen	41 of 5162	5.75e-05
GO:0042175	nuclear outer membrane-endoplasmic reticulum membrane...	16 of 1043	8.28e-05
GO:0098827	endoplasmic reticulum subcompartment	15 of 1025	0.00026
GO:0005789	endoplasmic reticulum membrane	15 of 1022	0.00026

Biological Process (GO)			
GO-term	description	count in gene set	false discovery rate
GO:0035966	response to topologically incorrect protein	15 of 172	2.57e-12
GO:0006986	response to unfolded protein	14 of 153	6.65e-12
GO:0034976	response to endoplasmic reticulum stress	15 of 240	8.45e-11
GO:0006457	protein folding	14 of 214	2.49e-10
GO:0035967	cellular response to topologically incorrect protein	10 of 132	1.38e-07
GO:0034620	cellular response to unfolded protein	9 of 115	7.09e-07
GO:0030968	endoplasmic reticulum unfolded protein response	8 of 103	5.29e-06
GO:0044281	small molecule metabolic process	25 of 1779	8.29e-06
GO:0033554	cellular response to stress	23 of 1553	1.21e-05

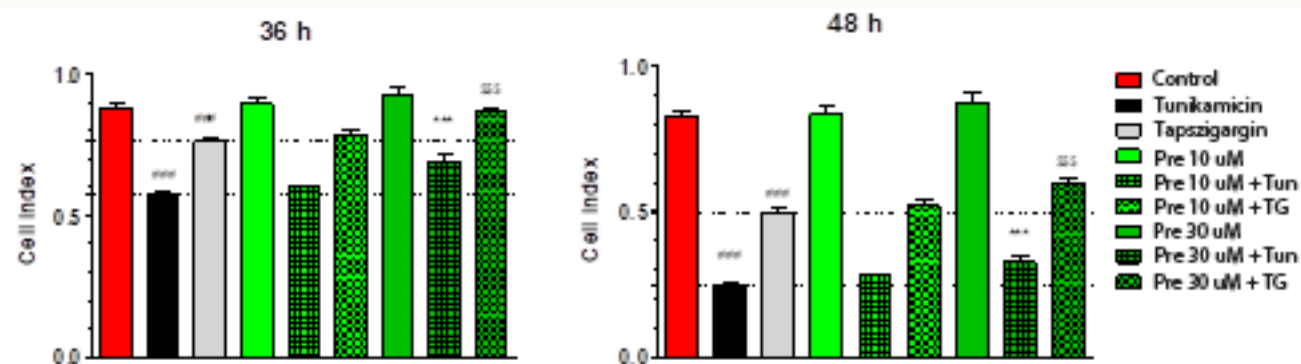
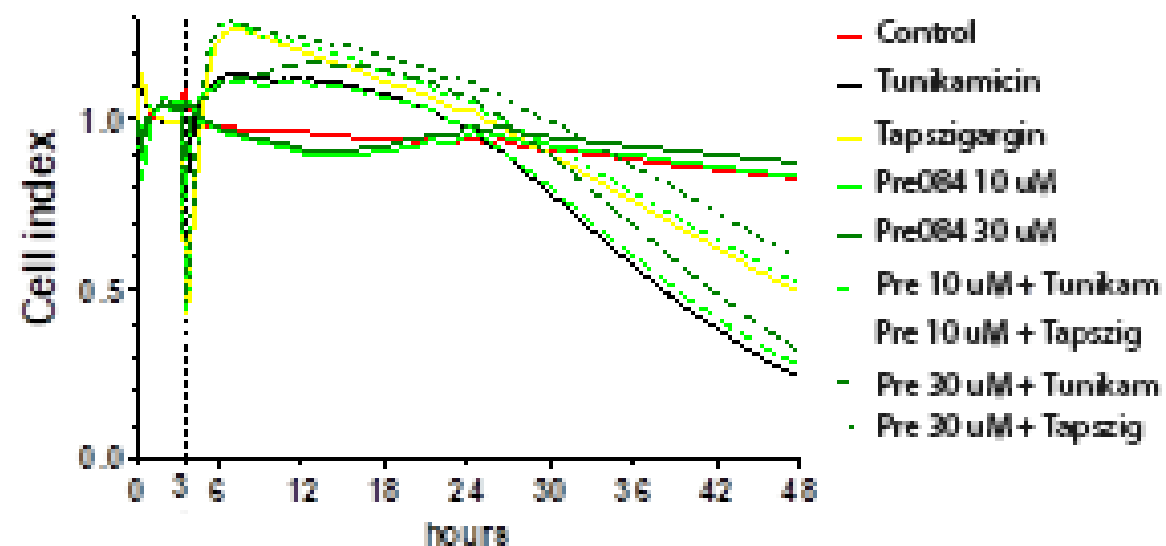
ER stresszhez köthető fehérjék mennyiségének változása

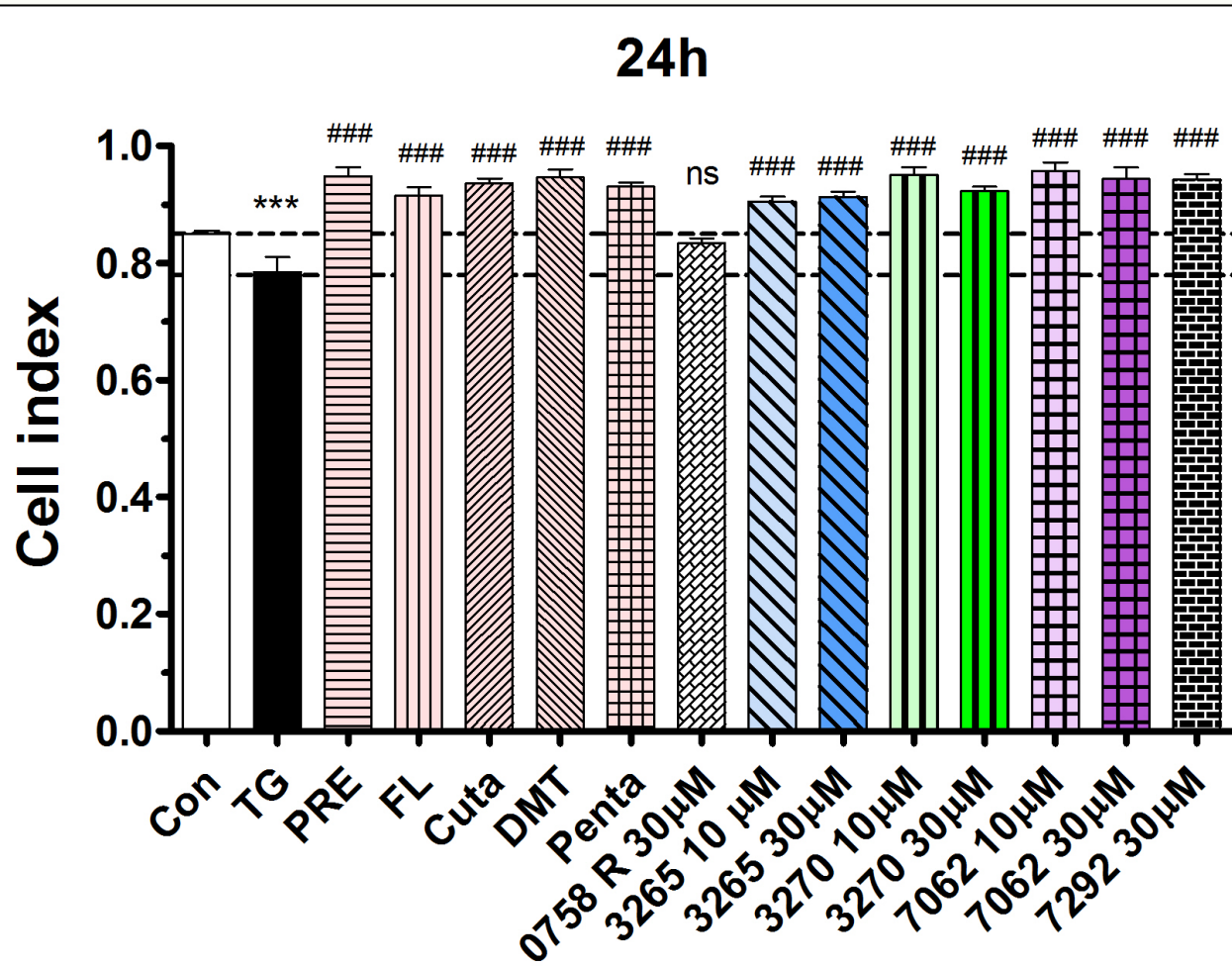


Agonista hatás biológiai rendszerben: XCelligence mérések

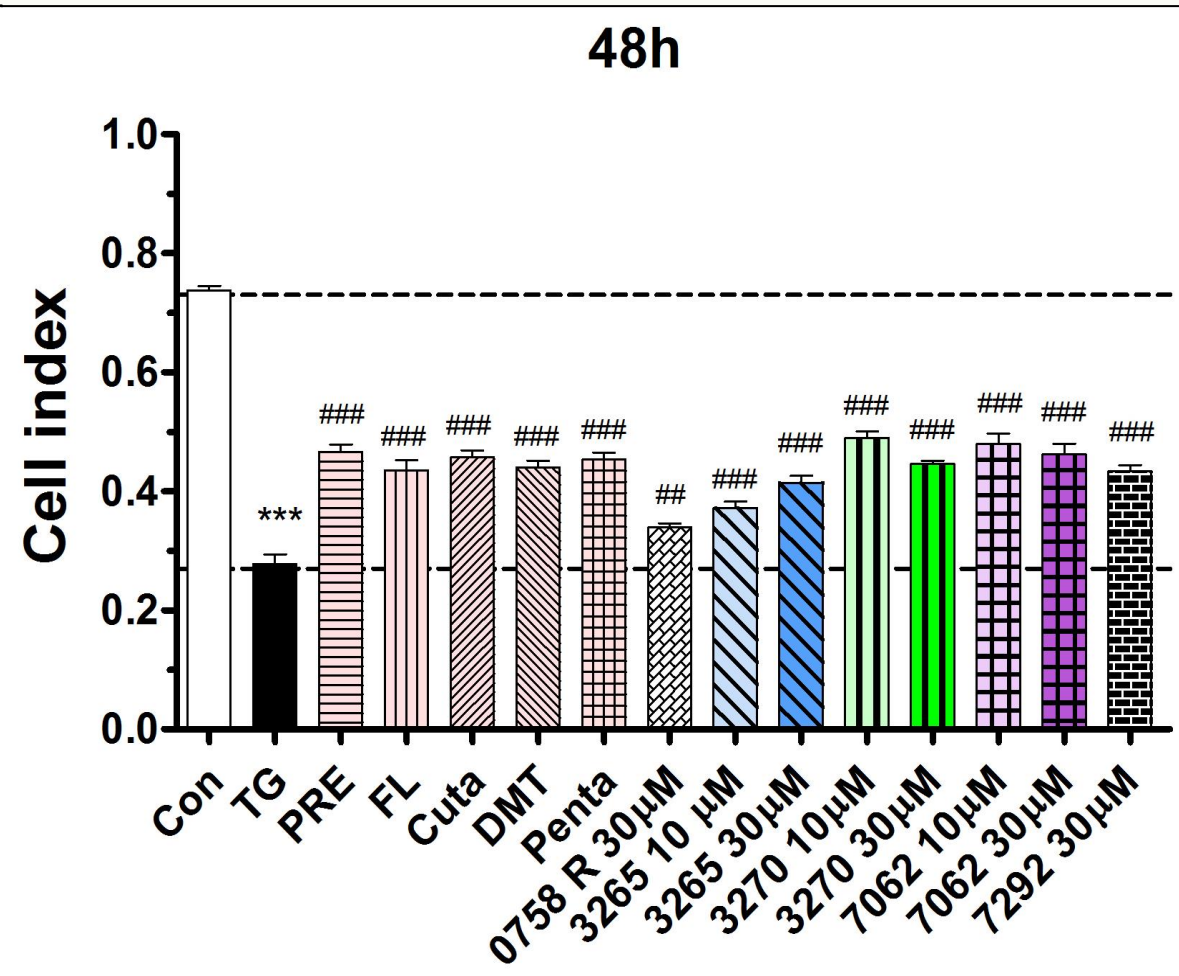
Deli Mária,
Veszélka Szilvia

- Valós idejű impedanciamérés humán agyi endotélsejteken.
- Többféle stresszor (Tunikamicin, tapszigargin) koncentrációfüggő vizsgálata
- Irodalomban leírt agonisták és saját molekulák tesztelése 48 h időtartamban
- A sejtek kitapadási képességétől (homeosztázissal kapcsolatos) függő impedancia-jel mérhető





*** compared to the control
 ### compared to the TG

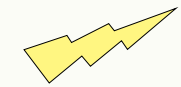
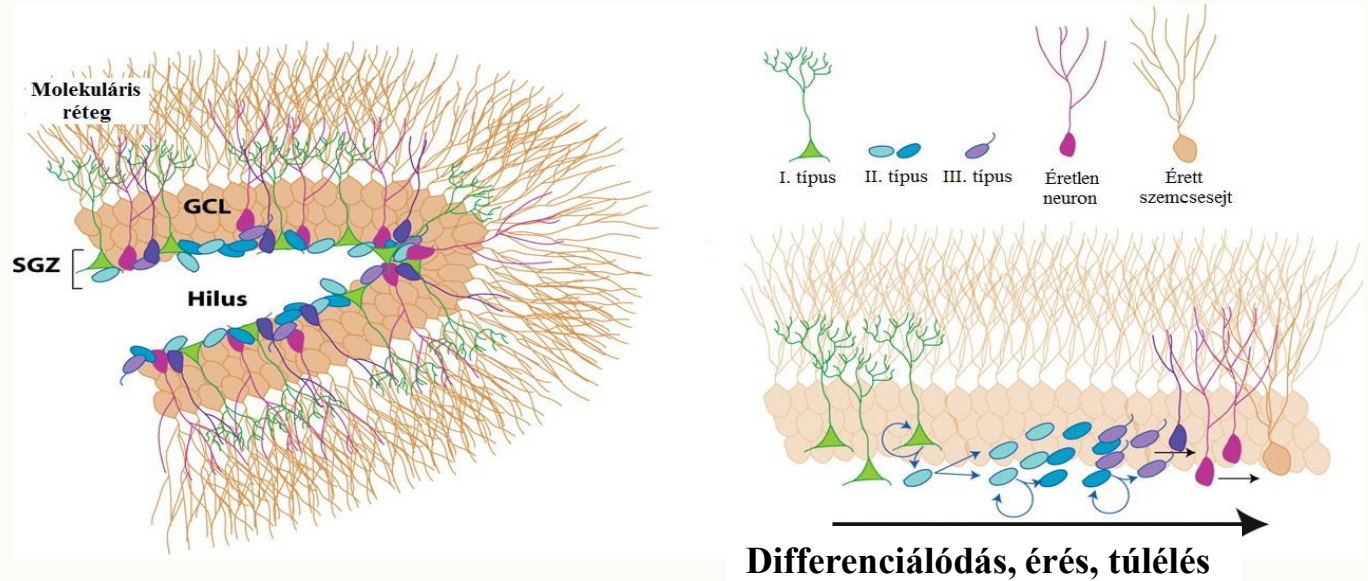


*** compared to the control
 ### compared to the TG

A neurogenesis és a σ 1-receptor kapcsolata

Fülöp Lívია, Szögi Titanilla

- Irodalmi adatok: σ 1-agonista neuroszteroidok (dehidroepiandroszteron, DHEA) befolyásolják a felnőttkori neurogenesiszt
- Alkalmazott modell: Li et al. 2015: $A\beta_{25-35}$ injekcióval előidézett neurogenesisz-zavarás egéragyban
- Optimalizálás: oligomer $A\beta_{1-42}$ injekciója unilaterálisan



Zavar

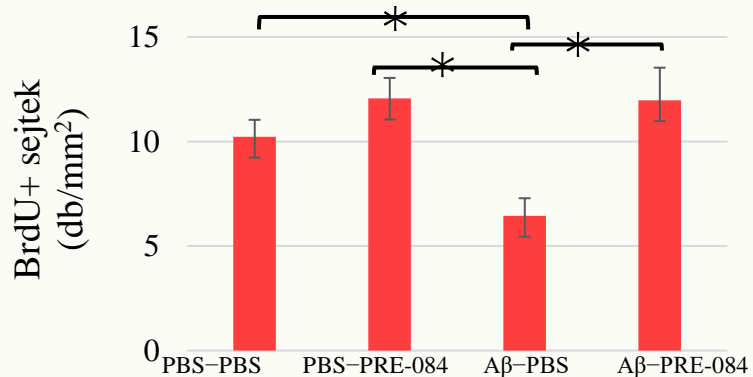
(Pl.: Alzheimer-kór)

(Eisch és mtsai, 2008)

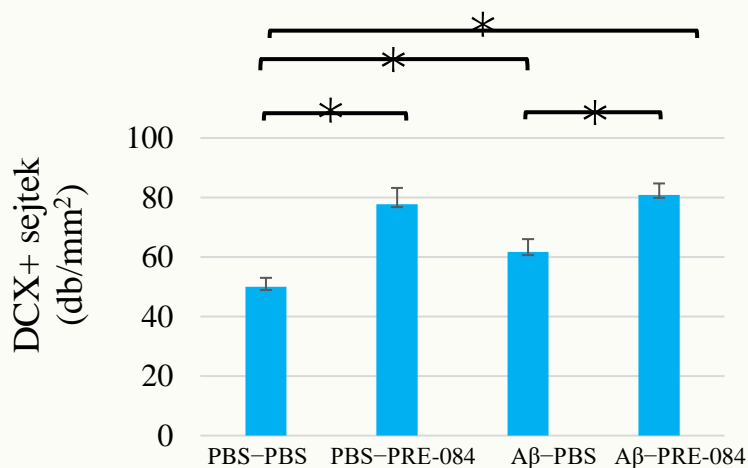
A Pre-084 hatása az $A\beta_{1-42}$ által kiváltott neurogenesis-romlásra

Fülöp Livia,
Szögi Titanilla
Érett neuronok száma

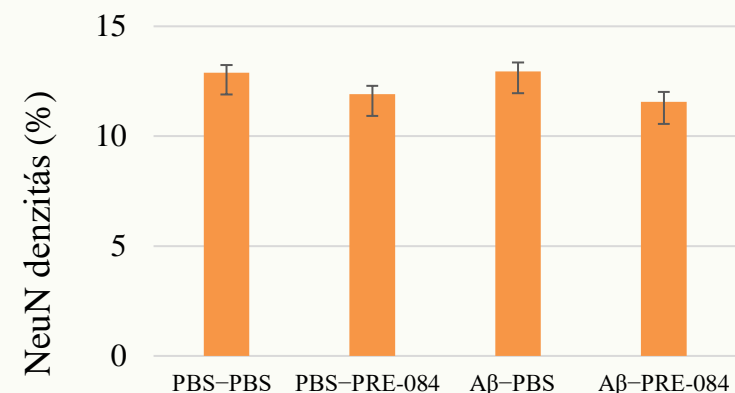
Össejtek száma



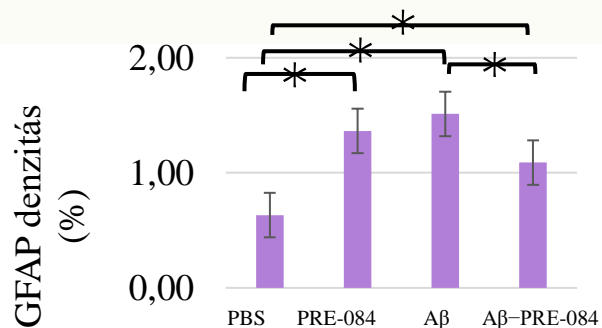
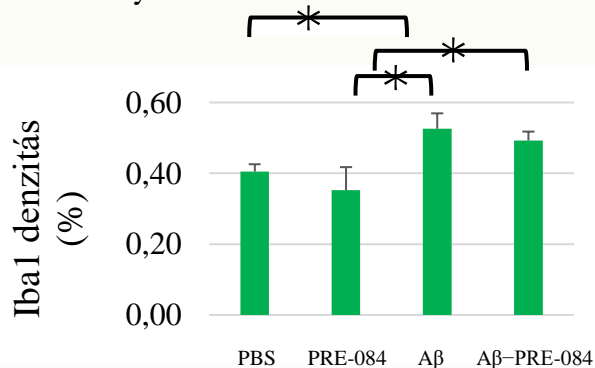
Éretlen neuronok mennyisége



Érett neuronok száma

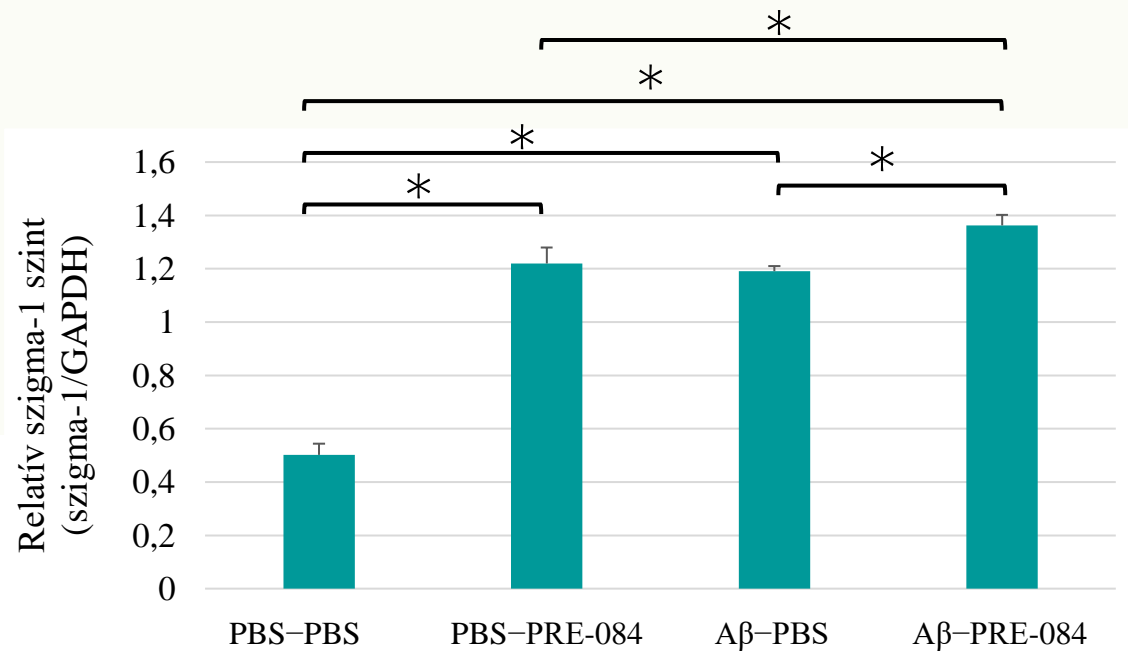
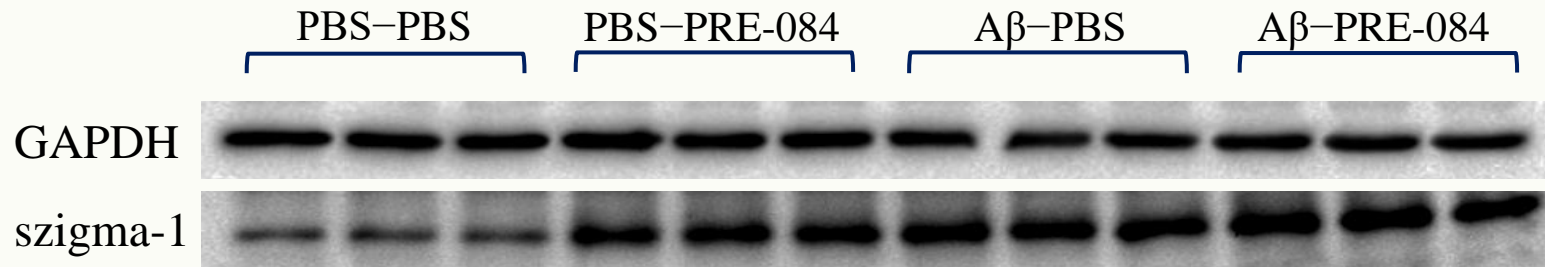


Gyulladásos markerek: mikroglia-aktiváció és reaktív asztrociták



A Pre-084 és az $A\beta_{1-42}$ injekálás hatása a $\sigma 1$ -szintre

Fülöp Lívia,
Szögi Titanilla



Összefoglalás

- A σ_1 receptor ígéretes célpont lehet gyógyszertervezéshez, különböző neurodegeneratív kórképekben.
- Számítógépes modellezés az agonista-antagonista vegyületek *in silico* szűrésére és azonosítására
- Klasszikus receptor-kötődési vizsgálatok szűrésre
- Biológiai és proteomikai vizsgálatok a hatásosság jellemzésére
- Összefüggés a σ_1 -modulátorok hatása és a neurogenesis között

Köszönetnyilvánítás

- Munkatársak:

- SZTE:

- Neurodegeneratív Betegségek kutatócsoport
 - Proteomika: Janáky Tamás, Szabó Zoltán, Bruszel Bella
 - Molekulakönyvtár: Fülöp Ferenc, Lázár László, Szakonyi Zsolt
 - Számítógépes modellezés, szűrés: Bogár Ferenc

- SZBK:

- XCellingence mérések: Deli Mária, Veszélka Szilvia
 - Receptor kötés: Tömböly Csaba, Dvorácskó Szabolcs

- Pályázatok:

- GINOP 2.3.2-15-2016-00060
 - Nemzeti Agykutatási Program 2.0 2017-1.2.1-NKP-2017-00002
 - Richter Témapályázat RG-IPI-2016-TP10/039



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL

AZ NKFI ALAPBÓL
MEGVALÓSULÓ
PROGRAM

AZ INNOVÁCIÓ LENDÜLETE