

Soproni Egyetem  
Kitaibel Pál Környezettudományi Doktori Iskola  
Biokörnyezettudomány program

Tézisfüzet

**TARGETING HISTAMINE H4 RECEPTORS IN ALLERGIES  
CAUSED BY AIR POLLUTANTS**

Christopher Fenila

Sopron

2017

**Doktori Iskola:** Kitaibel Pál Környezettudományi Doktori Iskola

**Program:** Biokörnyezettudomány (K1)

Programvezető: Prof. Dr. Albert Levente

**Témavezető:** Dr. Fekete Gusztáv, PhD

**Társ-témavezető:** Prof. Dr. Tóth Péter, PhD

## **A disszertáció célja**

A légszennyezettség jelenleg a föld egyik legnagyobb problémája, amivel szembesülni kell, mivel mértéke minden évvel folyamatosan nő visszafordíthatatlan károkat okozva. Közvetlenül és közvetve is befolyásolja az emberi szervezetet, egészséget. Többek között, az egyik leggyakoribb káros egészségügyi következménye a légszennyezettségnek az allergia. A légtérben található szennyező-részecskék allergén anyagokként viselkednek kiváltva az allergiás tüneteket. Amikor olyan egyén érint a szennyeződés, aki allergiára hajlamos, nagy mennyiségű IgE szabadul fel a szervezetében. A következő kitettségnél hatására kialakul az allergiás reakció, amely az allergén mennyiségétől és típusától függ. A folyamat úgy zajlik le, hogy az IgE hozzákapcsolódik a hízósejtek receptorához, amely aztán hisztamin képződéshez vezet. Ezt a hisztamin képződést a G proteinhez kapcsolt hisztamin receptorok kontrollálják, amelyeket H1, H2, H3 és H4 neveznek.

A H4 hisztamin receptort már régóta felismerték és azonosították különböző típusú immun sejtekben, ahol biológiai hatását kifejti. Emiatt a H4 receptor egy igen előnyös eszköz lehet az anti-allergiás terápiák során.

A kutatás célja tehát létrehozni egy olyan potenciális, H4 alapú gyógyszert, amely a légszennyezettség miatt kialakuló allergiás reakciókra válasz lehet. Ennek elérése érdekében a következő tervezési lépéseket tettem meg:

### **A fő célok**

1. Információszerzés a fontosabb környezetszennyező részecskékről, anyagokról, amelyek hatására az allergiás reakció beindul. Cél továbbá kideríteni, hogy a H4R befolyását az immunreakciók képződésében.
2. Kialakítani olyan antagonistá receptorát amely hatásosan lép fel az immunreakcióval szemben. Ezen cél elérése érdekében a H4 receptor térbeli szerkezetét hoztam létre. A legfőbb cél egy nagy hatékonyságú H4R szerkezetet létrehozása. Mivel kísérleti úton létrehozott szerkezet nem áll rendelkezésre, ezért egy szimulált szerkezetet kellett létrehozni, valamint a kötés formáját is meg kellett határozni. Emellett, egy olyan adatbázist is létre kellett hozni, amely tartalmazza az összes kisméretű kémiai szerkezetet. Ezáltal lehetővé válik a

- megfelelő gyógyszer kombináció kiválasztása a nagyszámú szerkezetek közül. Ennek eléréséhez három, már forgalomban lévő ligandumot használtam fel mintának.
3. Az adatbázisban található legmegfelelőbb struktúra felismeréséhez a térbeli molekulához való kapcsolódásnak a modellezését hajtottam végre. A fő struktúra identifikációját in silico elemzésnek vettem alá, hogy hatékonyságát megállapítsam.

## **Anyag és módszer**

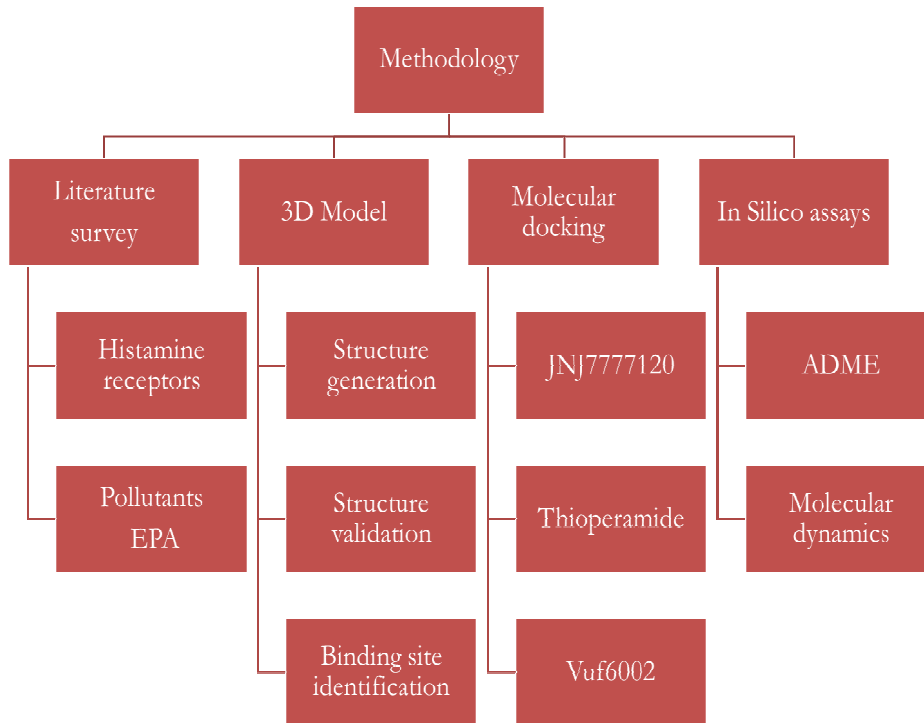
A légszennyező részecskéket, amelyeket ebben a doktori dolgozatban tárgyalok a hisztamin receptorokkal való valószínűsíthetően kiemelt szerepük miatt a következő adatbázisból választottam: <http://www.epa.gov/air/airpollutants.html>. A különböző szennyezők és az allergiás reakciók közötti kapcsolatot alapos szakirodalmi bibliográfiai áttekintéssel végeztem, amelyeket ezután táblázatban összefoglaltam a megadott kritériumok szerint. Létrehoztam egy második táblázatot is, ahol a listáztam a szennyező és a hisztamin receptor közötti kapcsolatokat.

A gyógyszergyártásban és fejlesztésben a H4R-ben lezajló antagonistá hisztamin reakció régóta fontos alapja az asztma kezelésének. Kutatásomban a H4 receptor öt darab strukturális variációját modelleztem az I-TASSER programban, majd ezeket validáltam a PROCHECK AND ERRAT programrendszerekkel. Az öt struktúra közül a legjobbat a validáló software segítségével választottam ki, majd a molekuláris dokkolást és az aminosavat figyelembe véve, amelyek az antagonistá kapcsolódásnál fontos szerepet játszanak elemeztem az eredményeket. Ezekből az eredményekből adatbázist hoztam létre a már meglévő JNJ777120, Vuf6002 és Thioperamide ligandumok alapján.

A molekuláris dokkolás valamint a DISCOVERY STUDIO segítségével létrehozott receptor modellekkel hat fő vegyületet tudtam identifikálni. Ezek a vegyületek a dokkolási eredmények és a receptor modellel történő hidrogénkötési képességük alapján kerültek kiválasztásra.

ADMET és molekuláris dinamikai szimulációt végeztem a vegyületen, hogy annak hatékonyságát jobban meghatározhasam.

Az analízis metodológiáját a következő ábrán szemléltetem (Figure 1.).



**Figure 1 Metodológia**

## **Tézisek**

- 1. TÉZIS: Elméleti úton kimutattam a hízósejtek szerepét a légszennyező részecskék által kiváltott allergiás reakció során. Ezzel az eredménnyel olyan betekintést nyerünk az allergiás reakcióba, amely közbenső segítséget jelent annak mérsékelésében.**

Kísérleti és elméleti eredményeken alapuló eredmények alapján hat fő szennyezőt választottam ki, amelyek allergiás reakciót okoznak. A mechanizmus, amely alapján a szennyezők az allergiás reakciót kiváltják meghatározásra került, emellett a hízósejtek szerepe az allergiás reakciók során megerősítést nyert. Génexpressziós megjelenítés segítségével mélyebben sikerült megérteni a H4R működését, amelyet kiegészítve a receptor fehérje szinten történő további vizsgálatával komoly előrelépést jelenthet a receptor antagonistájának megtalálásában.

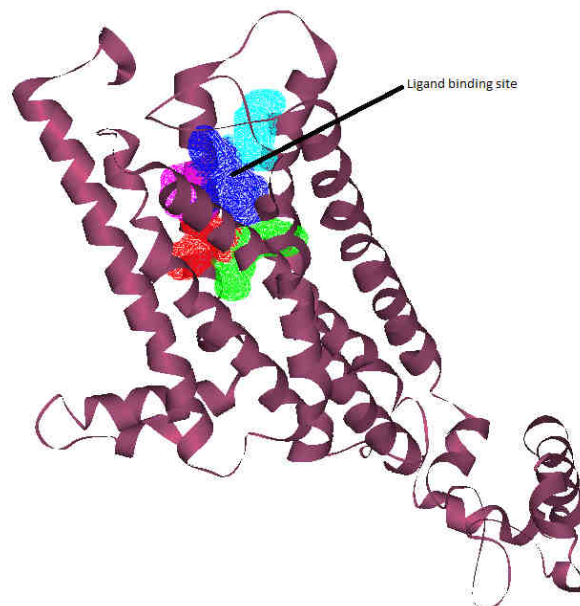
- 2. TÉZIS: Az I-TASSER programmal létrehozott új hH4R modell az első, amely emberi G-protein-kapcsolt receptort (GPCR) használt mintának a korábbi szarvasmarha GPCR helyett.**

Doktori dolgozatomban az I-TASSER software-t használtam annak érdekében, hogy megállapítsam a lehetséges 3D struktúráját a hH4R modellnek. Öt modellt hoztam létre a hH4R (Q9H3N8) bemenő szekvenciája alapján, amelyekből a megállapított fő minta a nagy tisztaságú, kristályos, emberi  $\beta$ 2-adrenerg GPCR (PDB ID: 2rh1A) receptor lett. A megmaradt minták az emberi  $\beta$ 2-adrenerg GPCR izoformái lettek. Ezen eredmények ellentétesek a BLAST által feltételezett receptorral, amely szerint az emberi adrenoreceptor (2R4R A) szekvenciája áll legközelebb a hH4R-hez, összevetve a szintén ember  $\beta$ 2-adrenerg GPCR (2RH1 A) receptorral. Ez az eredménye arra világít rá, hogy a 2R4R A receptornak közelebb a szekvenciája a hH4R-hez képest, míg az 2RH1-nak a strukturális felépítése nagyon hasonló.

**3. TÉZIS: A modell kötődési helyét numerikus úton is meghatároztam. A korábbi eredmények által is megerősítve megállapítottam, hogy a 2-es hely rendelkezik a legtöbb kulcsfontosságú reziduummal, amely modellem felhasználhatóságát erősíti.**

A modell kötődési helye elsősorban a hH4R kötődési helyének két fő pontjához kapcsolódott, amelyek az SAsp94 (3.32) és Glu182 (5.46) pontok.

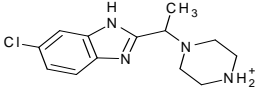
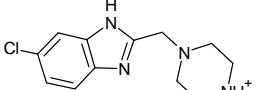
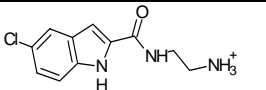
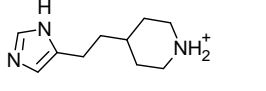
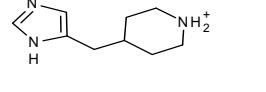
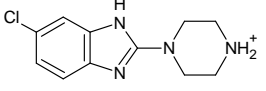
A kötődési hely megtalálásához ligandum-illesztést alkalmaztam a DISCOVERY STUDIO program segítségével, amely fehérje alakú pásztázást végez az üregek és lyukak megtalálásához. A módszer olyan üreg-pásztázó algoritmust alkalmaz, amely felismeri a lehetséges aktív zónákat a proteinek invaginációja (kitüremkedése) által. Az algoritmus futtatása után 11 aktív hely jött létre. A hH4R modell által létrehozott többsíkú felületeket alapul véve, a 11 aktív hely közül a 2-es hely rendelkezett a legtöbb kulcsfontosságú reziduummal. A H4R receptor modellje és annak kötődési helye az alábbi ábrán látható (Figure 2.).



**Figure 2: A H4R 3D modell és annak kötődési helye**

**4. TÉZIS: Az első publikált alkalmazását mutattam be Thioperamid-nek és Vuf6002-nek a JNJ777120-vel szemben, amelyek segítségével 6 olyan új vegyületet sikerült azonosítani, amelyek ezekkel a receptorokkal interakcióba tudtak lépni.**

150, az JNJ777120-hez hasonló struktúrákat hoztam létre és szimuláltam a dokkolását a receptor modell kötődési helyén. A 150 struktúra közül 148 sikeresen dokkolt. A PubChem adatbázis segítségével 49 struktúrát azonosítottam, amelyek 90% hasonló a Thioperamid-hoz. Ez a 49 struktúra egy adatbázist alkot. Ezt a bázist ezután dokkoltam a hH4R kötődési helyéhez, amelyek közül 42 sikeresen végrehajtotta a dokkolást. A harmadik adatbázis 90% hasonló a Vuf 6002 stuktúrához, ahol a meglévő 198 vegyületből 193 tudott sikeresen dokkolni. A vegyületeket kategorizáltam a dokkolási pontjaik alapján, azonban ezek közül mindössze 6 vegyület hozott létre hidrogén kötést a receptorral. Ezt a 6 vegyületet lehet fő ligandumnak tekinteni a doktori dolgozatomban. A főbb vegyületek az alábbi táblázatban találhatóak.

Compound name	Pubchem Id	Structure	Docking score	Hydrogen bonding Interactions		
				Donor	Acceptor	Distance in Å
Compound I	28468621		123.095	N3	Asp94: OD2	2.47
Compound J	28750273		119.56	N3	Asp94: OD2	2.25
Compound A	39732646		115.116	N5	Asp94: OD2	2.18
Compound E	44290805		115.046	N1	Asp94: OD2	2.35
Compound F	25271899		111.136	N1	Asp94: OD2	2.33
Compound K	28470894		105.162	N2	Asp94: OD2	2.29

**Táblázat 1: A fő 6 vegyület kiemelkedő dokkolási számmal és ASP 94-el történő hidrogénkötési képességgel**



## Publikációk

### Impact factor-ral rendelkező cikkek:

1. **Fenila Jacob**, Claudina Perez Novo, Claus Bachert, Koen Van Crombruggen.: Purinergic signalling in inflammatory cells: P2 receptor expression, functional effects, and modulation of inflammatory responses. *Purinergic Signalling*. 2013, 9(3): 285-306. IF: 2.639
2. Van Crombruggen K, **Jacob F**, Zhang N, Bachert C.: Damage-associated molecular patterns and their receptors in upper airway pathologies. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013, 70(22): 4307-21. IF: 5.62
3. **Fenila Christopher**, Elden Berla Thangam, Muthaiyan Xavier Suresh.: A Bioinformatics Search for Selective Histamine H4 Receptor Antagonists through Structure- Based Virtual Screening Strategies. *Chemical Biology and Drug Design*. 2012, 79: 74-759. IF: 2.469
4. L. Muthulakshmi, H. Nellaiah, T. Kathiresan, N. Rajini & **Fenila Christopher**.: Identification and Production of Biofloculants by Enterobacter sp. and Bacillus sp. and their Characterization Studies, Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2017 (In press). IF: 0.67

### Konferencia kiadványok (proceedings)

1. **Fenila Christopher**, Berla Thangam, S.Priya.: Targeting H4 receptor for the development of new antagonist. *4<sup>th</sup> International symposium on Recent Trends in Macromolecular Structure and Function conducted by Centre of Advanced Study in Crystallography and biophysics*, University of Madras, January 2010.
2. **Fenila Christopher**, Rajini Nagarajan, Winowlin Jappes, Gusztáv Fekete and Karthikeyan Subramanian.: Influence of carbon emission in pollen allergy. *International Conference on Thermal, Energy and Environment (INCOTEE2016)*, Kalasalingam University, Krishnacoil, Kalasalingam University, 2016.
3. **Fenila Christopher**, Gusztáv Fekete, Muthulakshmi L, Senthil Muthu Kumar Thiagamani and Indiradevi M P.: Classification and interaction of air pollutants, 2nd *International Conference on Thermal, Energy and Environment*, conducted by Department of Mechanical Engineering. Kalasalingam University, 2016.
4. **Fenila Christopher**, M. Xavier Suresh, Muthulakshmi L, Indiradevi M P, Gusztav Fekete, Immunological responses caused by air pollutants – A review, *ICAAM 2017*, Kalasalingam University, Krishnacoil, Kalasalingam University, 2017.