

Sintetski glikokonjugati: modeli za proučavanje biomolekularnih procesa i šećerima potaknutih neenzimskih preobrazbi peptida/proteina

KUI – 8/2007
Prispjelo 23. studenog 2006.
Prihvaćeno 10. siječnja 2007.

Š. Horvat

Zavod za organsku kemiju i biokemiju; Institut "Ruđer Bošković",
POB 180, 10002 Zagreb, Hrvatska
E-mail: shorvat@irb.hr

Raširenost kompleksnih ugljikohidrata i glikokonjugata u prirodi odraz je važnosti koju takvi spojevi imaju u procesima međustaničnog prijenosa informacija. Poznavanje složenih procesa na molekularnoj razini i struktura molekula koje su u njega uključene preduvjeti su za razumijevanje uloge glikokonjugata u prirodi te uspješnu intervenciju u slučaju bolesti, dakle za razvoj odgovarajućih terapeutika.

Za bolje razumijevanje bioloških procesa u kojima sudjeluju kompleksne ugljikohidratne molekule od velike su važnosti modelni sustavi koji omogućuju spoznavanje mehanizama kemijskih reakcija i biomolekularnih procesa. Prednost takvih modela je dobra strukturalna definiranost, za razliku od biomakromolekula koje se odlikuju heterogenošću u strukturi i konformaciji. U ovom radu dan je prikaz opsežnih istraživanja koja uključuju kemijske preinake peptida s ciljem dobivanja bioaktivnih glikokonjugata različitih struktura. Nadalje, objašnjen je utjecaj šećernog dijela molekule i pojedinih strukturnih parametara na fizikalno-kemijska svojstva, biološku aktivnost i stabilnost ishodnih bioaktivnih peptidnih spojeva.

Značaj spontane reakcije raznih prirodnih amino-spojeva (peptidi, proteini) s karbonilnim spojevima (ugljikohidrati, oksaldehidi), kako u biološkim sustavima tako i u prehrambenoj industriji, još uvijek nije potpuno razjašnjen. Stoga će biti predstavljena istraživanja koja se odnose na određivanje čimbenika koji utječu na raspodjelu produkata neenzimske glikacije endogenog opioidnog peptida, Leu-enkefalina s aldoheksozama. Razumijevanje tih spontanijih reakcija i izolirani modelni spojevi omogućit će praćenje i objašnjenje kompleksnih procesa kojima podliježu peptidi/proteini na molekularnoj razini u prisustvu šećera te utjecaj glikacije na fiziološko djelovanje ishodnog amino-spoja.

Ključne riječi: *Bioaktivnost, enkefalin, glikacija, glikokonjugati, opioidni peptidi, sinteza*

Endogeni peptidi opioidnog djelovanja

Spoznaja da u živčanom tkivu kralježnjaka postoje receptori za alkaloide opijatnog djelovanja, poput morfina, potakla je traganje za endogenim ligandima koji se vežu za te receptore.¹ Ubrzo zatim (1975. godine) izolirani su iz tkiva sisavaca prvi endogeni peptidi opioidnog djelovanja, Leu- i Met-enkefalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu/Met).² Tijekom godina otkrivene su i brojne druge opioidne peptidne molekule, koje dijelimo u tri glavne skupine: enkefalini, endorfini i dinorfini. Svaka skupina tih spojeva nastaje iz specifične prekursorske proteinske molekule, a izlučuju ih stanice živčanog tkiva i neuroendokrine stanice u različitim organima i tkivima kao što su mozak, kralježnična moždina, nadbubrežna žlijezda, crijeva, srce, itd. (za revijalni prikaz vidi ref. 3). Endogeni opioidni peptidi imaju značajnu i mnogostruku ulogu u organizmu sisavaca, koja se očituje u prilagođavanju organizma na stresne situacije smanjenjem osjeta boli, kontroli gastrointestinalnih, bubrežnih, kardio-

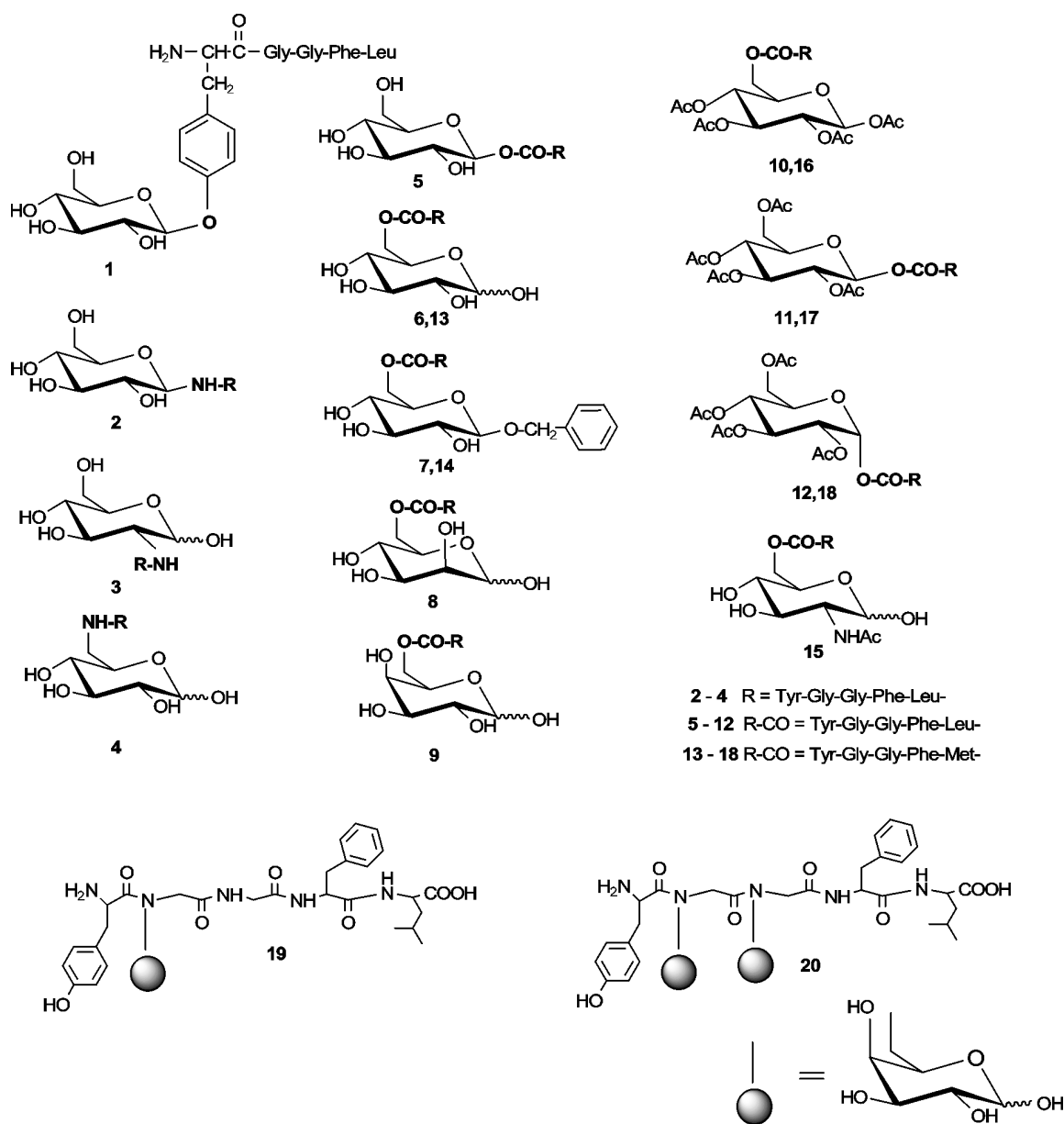
vaskularnih i imunoloških funkcija, a posljednjih se godina intenzivno istražuje utjecaj nekih opioidnih peptida, posebice Met-enkefalina na proliferaciju normalnih i zloćudno promijenjenih stanica.^{4–6} Fiziološko djelovanje opioidnih spojeva posljedica je interakcije sa specifičnim staničnim receptorima. Danas znamo da postoji nekoliko različitih klasa receptora za opioidne peptide koje obilježavamo grčkim slovima: μ , δ , κ , ζ . Opioidni receptori imaju izvanstanični, transmembranski i unutarstanični dio koji je povezan s G-proteinima. Nakon vezanja opioidnih peptida i pobuđivanja opioidnih receptora, fosforilacija G-proteina prenosi aktivacijski signal. Dolazi do inhibicije adenil-ciklaze, te se otvaraju ili zatvaraju ionski kanalići za kalijeve i kalcijeve ione. S ciljem razjašnjenja uloge pojedinih klasa opioidnih receptora i razvoja novih lijekova peptidne strukture danas se u svijetu intenzivno radi na sintezi novih, receptor-selektivnih, konformacijski ograničenih analoga opioidnih peptida koji će biti otporniji prema enzimskoj razgradnji i sposobni za prelazak krvno-moždane barijere.^{7–9}

Glikokonjugati opioidnih peptida: sinteza, bioaktivnost, intramolekulske reakcije

Poznata činjenica da prisustvo ugljikohidratne molekule u prirodnim biomolekulama i njihovim mimeticima ima dramatičan utjecaj na fizikalna, kemijska i biološka svojstva tih spojeva potaknula nas je na sintezu glikokonjugata endogenih opioidnih peptida, Leu- i Met-enkefalina, s eterskim (**1**), amidnim (**2–4**), esterskim (**5–12**, **13–18**) i *N*-alkilnim tipom veze (**19–20**) šećer-peptid.^{10–16} Spojevi prikazani na slici 1 sintetizirani su sa svrhom da se odredi utjecaj različitih ugljikohidratnih molekula na biološku aktivnost i konformaciju ishodnog opioidnog peptida.

Opioidna aktivnost enkefalina i priređenih glikokonjugata određena je mjerenjem *in vitro* sposobnosti spojeva da inhibiraju električki izazvane kontrakcije ileuma zamorca (GPI test) i vas deferensa miša (MVD test). Mjerenje u μ -re-

ceptorskom sustavu (GPI) i δ -receptorskom sustavu (MVD) omogućuje dobivanje uvida ne samo u opioidnu aktivnost već i u receptorsku selektivnost ispitivanih spojeva. Iz rezultata navedenih u tablici 1 vidljivo je da mjesto vezanja opioidnog peptida na šećer, tip veze kao i struktura uvedene ugljikohidratne komponente imaju značajan utjecaj s obzirom na bioaktivnost ishodnog peptida. Glukozilacijom hidroksilne skupine bočnog lanca tirozinskog ostatka (spoj **1**) dobiven je derivat dramatično smanjene aktivnosti u oba receptorska sustava. Alkilacija *N*-terminalnog kraja enkefalinske molekule 1-deoksi-D-fruktozom (spoj **26**)¹⁷ kao i *N*-alkilirani analozi u kojima je dušik glicinskog ostatka na položaju 2 (spoj **19**) ili dušici glicinskih ostataka na položajima 2 i 3 Leu-enkefalina (spoj **20**), alkilirani s 6-deoksi-D-galaktosnim ostatkom,¹⁶ također vodi do gubitka opioidne aktivnosti. Kada se slobodna monosaharidna molekula veže na Leu-enkefalin esterskom vezom koja uključuje karboksilnu skupinu peptida i C-1 (spoj **5**) ili C-6 hidroksilnu skupi-



Slika 1 – Strukture sintetiziranih glikokonjugata Leu- i Met-enkefalina

Fig. 1 – Structures of synthesized glycoconjugates related to Leu- and Met-enkephalin

T a b l i c a 1 – Opioidna aktivnost glikokonjugata Leu- i Met-enkefalina određena na ileumu zamorca (GPI) i vas deferensu miša (MVD)^aT a b l e 1 – Guinea pig ileum (GPI) and mouse vas deferens (MVD) assay of glycoconjugates related to Leu- and Met-enkephalin^a

Spoj Compound	Tip veze šećer-peptid Type of sugar- peptide linkage	GPI (μ)	MVD (δ)	GPI/MVD IC ₅₀	Ref.
Leu-enkefalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)		246	11,4	21,58	10
1 Tyr(Glc β)-Gly-Gly-Phe-Leu	eterska	>30000	16100	>1,86	10
2 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH(Glc β 1)	amidna	195	27,2	7,17	11
3 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH(GlcN)	amidna	75,2	55,9	1,35	11
4 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH(Glc6)	amidna	73,9	49,6	1,49	11
5 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-O(Glc β 1)	esterska	164	20,6	7,96	12
6 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-O(Glc6)	esterska	108	26,9	4,01	13
7 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-O(Glc β Bzl6)	esterska	120	32,5	3,69	12
8 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-O(Man6)	esterska	77,8	38,5	2,02	13
9 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-O(Gal6)	esterska	218	42,9	5,08	13
10 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-O(Glc β Ac ₄ 6)	esterska	2640	43,8	60,3	12
11 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-O(Glc β Ac ₄ 1)	esterska	497	28,7	17,3	14
12 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-O(Glc α Ac ₄ 1)	esterska	1730	29,5	58,6	14
19 Tyr-(Gal6)Gly-Gly-Phe-Leu	N-alkilna	>10000	2020	>4,95	8
20 Tyr-(Gal6)Gly-(Gal6)Gly-Phe-Leu	N-alkilna	>10000	>10000	-	8
26 (dFru)-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	N-alkilna	>10000	>10000	-	8
Met-enkefalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met)		93,5	9,1	10,27	15
13 Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-O(Glc6)	esterska	31,1	29,3	1,06	15
14 Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-O(Glc β Bzl6)	esterska	94,3	30,6	3,08	15
15 Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-O(GlcNAc6)	esterska	42,3	28,1	1,50	15
16 Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-O(Glc β Ac ₄ 6)	esterska	350	28,4	12,32	15
17 Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-O(Glc β Ac ₄ 1)	esterska	837	40,9	20,5	14
18 Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-O(Glc α Ac ₄ 1)	esterska	872	68,7	12,7	14

^a IC₅₀ vrijednosti (nM)^a IC₅₀ values (nM)

nu šećerne komponente (spojevi **6**, **8**, **9**), opioidna aktivnost se obnavlja. Derivati glukoze (**6**) i manoze (**8**) bili su 2–3 puta aktivniji u GPI testu, dok je derivat galaktoze (**9**) imao istu bioaktivnost kao i ishodni peptid. Glikokonjugati **2–4** u kojima je 1-, 2-, ili 6-aminošećer vezan na C-terminalnu karboksilnu skupinu peptida amidnim tipom veze također su, u odnosu na ishodni peptidni spoj, pokazali višu aktivnost u μ -receptorskom sustavu (GPI) i smanjenu aktivnost u δ -receptorskom sustavu (MVD). Derivati u kojima je Met-enkefalin vezan na 6-OH skupinu slobodnih šećera esterskom vezom (spojevi **13**, **15**) također su bili bolji ligandi za μ -receptor, a slabiji za δ -receptor. Za razliku od glikokonjugata koji su u molekuli sadržavali slobodnu šećernu komponentu na C-terminalnom kraju enkefalinske molekule, potpuno acetilirani derivati (**10–12**, **16–18**) pokazali su znatno smanjenu opioidnu aktivnost u testnom sustavu GPI. Zanimljivo je spomenuti da je znatna razlika u aktivnosti opažena između acetiliranih 6-O- i 1-O-izomera (**10** vs. **11**, **16** vs. **17**) ukazujući da su takvi spojevi ligandi za različite podtipove iste vrste receptora ili da se vežu na različite domene istog mjesta prepoznavanja opioidnog receptora. Dobiveni rezultati ukazuju da promjene na N-ter-

minalnom tirozinskom ostatku enkefalinske molekule rezultiraju drastičnim smanjenjem opioidne aktivnosti, dok uvođenje potpuno slobodne ugljikohidratne molekule na C-terminalni dio peptida povećava aktivnost u μ -receptorskom sustavu, a smanjuje u δ -receptorskom sustavu.

Ispitano je protuvirusno djelovanje glikokonjugata Leu-enkefalina s esterskim, esterskim i amidnim tipom veze (spojevi **1–7**, **10**) na zarazu T-limfocita iz periferne krvi virusom humane imunodeficijencije (HIV-1).¹⁸ Iz podataka navedenih u tablici 2, vidljivo je da su svi testirani spojevi iskazali određenu protuvirusnu aktivnost, za razliku od ishodnog peptida koji nema anti-HIV-1 aktivnost. Nijedan ispitanik glikopeptid, međutim, nije spriječio razmnožavanje virusa, što je vidljivo iz aktivnosti reverzne transkriptaze virusa određene u supernatantu kulture stanica. Protuvirusna aktivnost spojeva **1–7** i **10** bila je podjednaka, ukazujući na zanemariv utjecaj tipa veze šećer-peptid i strukture šećerne komponente na anti-HIV djelovanje. Dobiveni rezultati sugeriraju da opaženo protuvirusno djelovanje može biti posljedica povećane otpornosti testiranih glikokonjugata prema enzimskoj razgradnji u stanicama ili ubrzanog transporta kroz staničnu membranu.

T a b l i c a 2 – Učinak glikokonjugata Leu-enkefalina na zarazu T limfocita virusom humane imunodeficijencije (HIV-1)^aT a b l e 2 – Effect of Leu-enkephalin glycoconjugates on HIV-1 infectivity of T- lymphocytes^a

Spoj Compound	Tip veze šećer-peptid Type of sugar- peptide linkage	Citopatični učinak ^b (%RT) ^c Cytopathic effect ^b (%RT) ^c		
		25 μM ^d	50 μM ^d	100 μM ^d
Leu-enkefalin (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu)		+++ (100)	+++ (100)	+++ (100)
1 Tyr(Glcβ)-Gly-Gly-Phe-Leu	eterska	+++ (100)	++ (90)	+ (79)
2 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH(Glcβ1)	amidna	+++ (100)	++ (86)	+ (75)
3 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH(GlcN)	amidna	++ (93)	++ (87)	+ (72)
4 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-NH(Glc6)	amidna	++ (93)	++ (85)	+ (84)
5 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-O(Glcβ1)	esterska	+++ (100)	++ (79)	+ (75)
6 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-O(Glc6)	esterska	++ (85)	++ (77)	+ (72)
7 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-O(GlcβBzl6)	esterska	+++ (100)	++ (85)	+ (85)
10 Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-O(GlcβAc ₄ 6)	esterska	+++ (100)	++ (82)	+ (79)

^a Podaci uzeti iz ref. 18. ^bKvalitativna ocjena pojave morfoloških promjena: (–) nema citopatičnog učinka; (+++) više od 30 promijenjenih stanica u jednom mikroskopskom polju. ^cAktivnost reverzne transkriptaze (RT) u supernatantu stanične kulture. ^dKoncentracija glikopeptida.

^a Data taken from Ref. 18. ^bScoring of syncytia formation was based on graded level of no apparent syncytia (–) to >30 syncytia (+++) in a single microscopic field. ^cPercent of reverse transcriptase (RT) activity in the culture supernatant. ^dConcentration of glycopeptide.

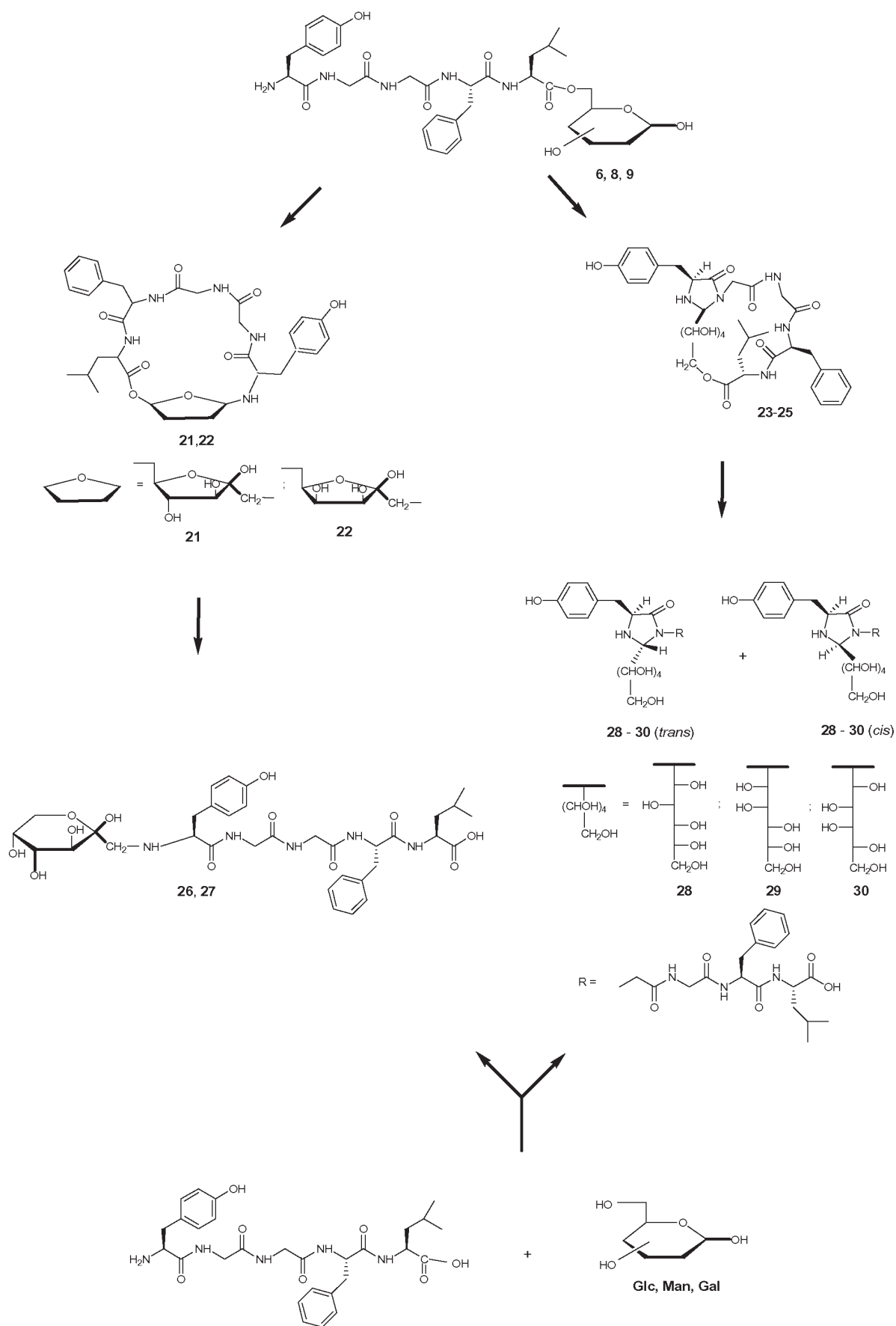
Glikopeptidi **6**, **8** i **9** u kojima je šećerna komponenta (glukoza, manozna, galaktoza) vezana preko 6-OH skupine na karboksilnu skupinu Leu-enkefalina esterskim tipom veze podliježu, ovisno o reakcijskim uvjetima, intramolekulskim reakcijama, koje rezultiraju dvjema potpuno različitim klasama bicikličkih spojeva **21–22**,¹⁹ odnosno **23–25**^{20–22} (slika 2). Biciklički spoj **21** koji u strukturi sadrži 1-deoksi-D-fruktofuranozni ostatak nastaje pregrađivanjem estera Leu-enkefalina i glukoze (**6**), ili manoze (**8**), u uvjetima kiselobazne katalize (piridinoctena kiselina), dok spoj **22**, derivat 1-deoksi-D-tagatofuranoze, nastaje pod istim reakcijskim uvjetima intramolekulskom reakcijom iz estera galaktoze **9**. Iz cikličkih ketofuranoza **21–22** moguće je hidrolizom esterske veze dobiti Amadorijeve spojeve **26** i **27**. Reakcije estera **6**, **8** i **9** u metanolu kao otapalu rezultiraju nastajanjem odgovarajućih imidazolidinonskih diastereoizomera **23–25** u kojima se *p*-hidroksibenzilni supstituent i aciklički ugljikohidratni lanac nalaze u *cis*- ili *trans*- položaju s obzirom na ravninu imidazolidinonskog prstena.^{23–25} Dijastereoizomerne smjese spojeva **23–25** odijeljene su i hidrolizirane u odgovarajuće stabilne šećer-imidazolidinonske produkte D-*gluco*- (**28**), D-*manno*- (**29**) i D-*galacto*-konfiguracije (**30**).

Produkti spontane reakcije aldoheksoza i Leu-enkefalina

Ukoliko ljudsko tijelo sagledamo kao složenu mješavinu raznih kemijskih spojeva, usprkos savršenoj genetičkoj i enzimskoj regulaciji metabolizma, na 37 °C se odvija cijeli spektar spontanih, nekataliziranih kemijskih reakcija. Tako neenzimska reakcija ugljikohidrata s aminokiselinama, proteinima, lipidima i nukleinskim kiselinama rezultira kompleksnim slijedom reakcija, poznatijih pod skupnim nazivom Maillardova reakcija.²⁶ Naime, poznato je da slobodne amino-skupine biomolekula mogu reagirati s reducirajućim šećerima, npr. aldozama, dajući u prvom stupnju derivate ketoza koji nastaju Amadorijevim pregrađivanjem. U fiziološkim uvjetima Amadorijevi spojevi podliježu nizu slož-

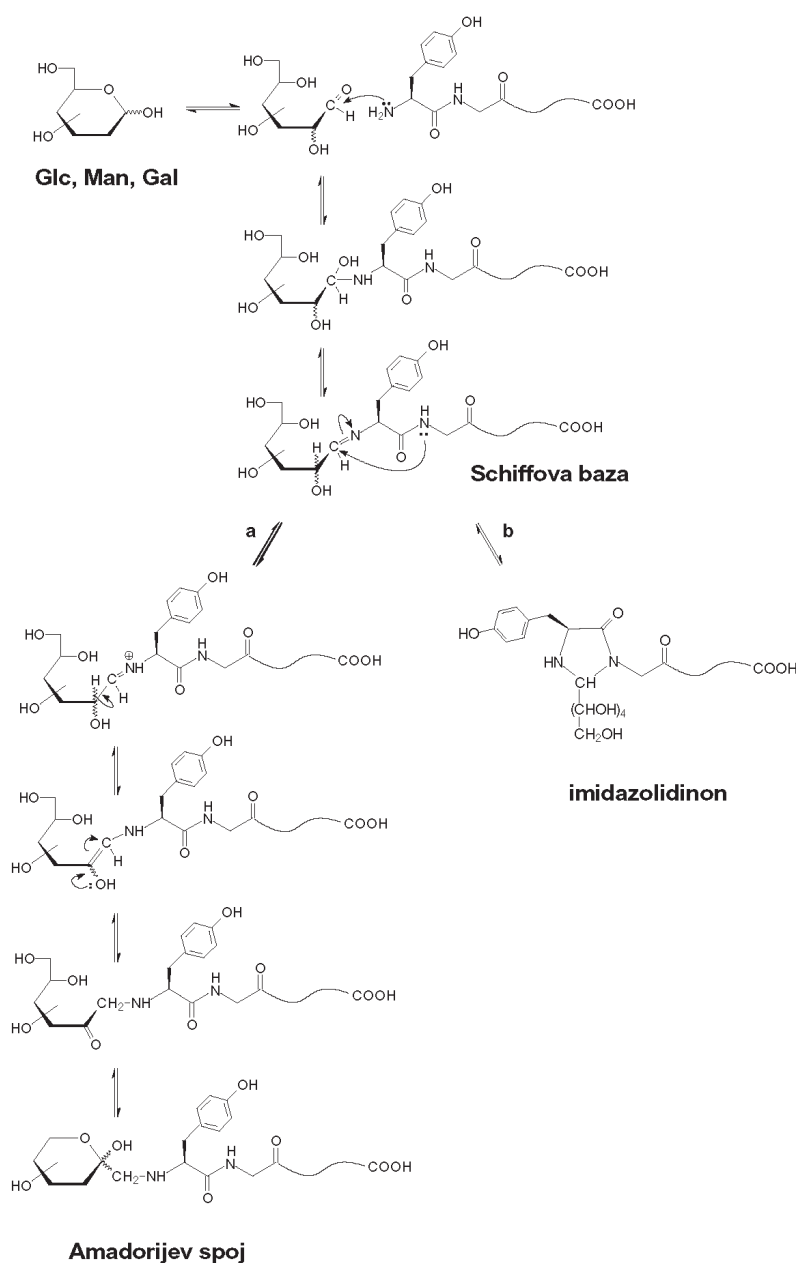
nih i ne potpuno razjašnjenih reakcija dajući tzv. AGE-produkte (engl. *Advanced Glycation End Products*), nestabilne specije koje reakcijom s proteinima stvaraju kovalentna umreženja, mijenjajući na taj način fizikalno-kemijska svojstva, konformaciju, a time i funkciju proteina.²⁷ Ti se produkti nagomilavaju u organizmu tijekom godina, osobito kod osoba oboljelih od dijabetesa, te su uzrokom ubrzanog razvoja mnogih kroničnih bolesti, poput ateroskleroze, nefropatije, neuropatije, retinopatije, te Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Važno je naglasiti da do Maillardove reakcije dolazi i tijekom termičke obrade namirnica, pri čemu mogu nastati produkti smanjene nutritivne vrijednosti, kao i spojevi s mutagenim i kancerogenim djelovanjem.

Poznavanje složenih procesa u spontanoj reakciji aldoza s biomolekulama, posebice glukoze kao najrasprostranjenijeg šećera, strukture nastalih produkata te njihove kemijske i enzimске stabilnosti preduvjeti su za uspješnu intervenciju u slučajju bolesti, dakle za razvoj odgovarajućih terapeutika. Stoga u procesu razumijevanja tih procesa u Maillardovoj reakciji veliku važnost imaju modelni sustavi. Poduzeta su opsežna istraživanja u kojima je proučavana reakcija neenzimske glikacije na modelu endogenog opioidnog peptida Leu-enkefalina. Istraživanja su obuhvatila ispitivanje reaktivnosti odabranih monosaharida (D-glukoza, D-manoza, D-galaktoza) pod različitim reakcijskim uvjetima, te izolaciju i karakterizaciju nastalih produkata.²⁸ Smjese šećera i peptida inkubirane su na 37 °C ili 50 °C u fosfatnom puferu (pH = 7,4) ili u metanolu. Dokazano je da reakcijom svake od ispitanih aldoheksoza s Leu-enkefalinom nastaju dva različita tipa glikacijskih produkata, *N*-(1-deoksiketoz-1-il)-peptid (Amadorijev produkt) i diastereoizomerna smjesa imidazolidinonskog spoja supstituiranog s pentitolnim šećernim ostatkom i ostatkom peptida (slika 2). Kao što je prikazano na slici 3, oba glikacijska produkta rezultat su nukleofilnog napada amino-skupine tirozinskog ostatka u Leu-enkefalinu na aldehidnu skupinu šećera, pri čemu nastaje nestabilna Schiffova baza. Reakcijski put nastajanja Amadorijevih spojeva (**26**, **27**) uključuje pregrađivanje Schiffove baze u enamin, nakon čega keto-enolnom tautomerizaci-



Slika 2 – Produkti spontanih amino-karbonylnih reakcija aldoheksoza i Leu-enkefalina

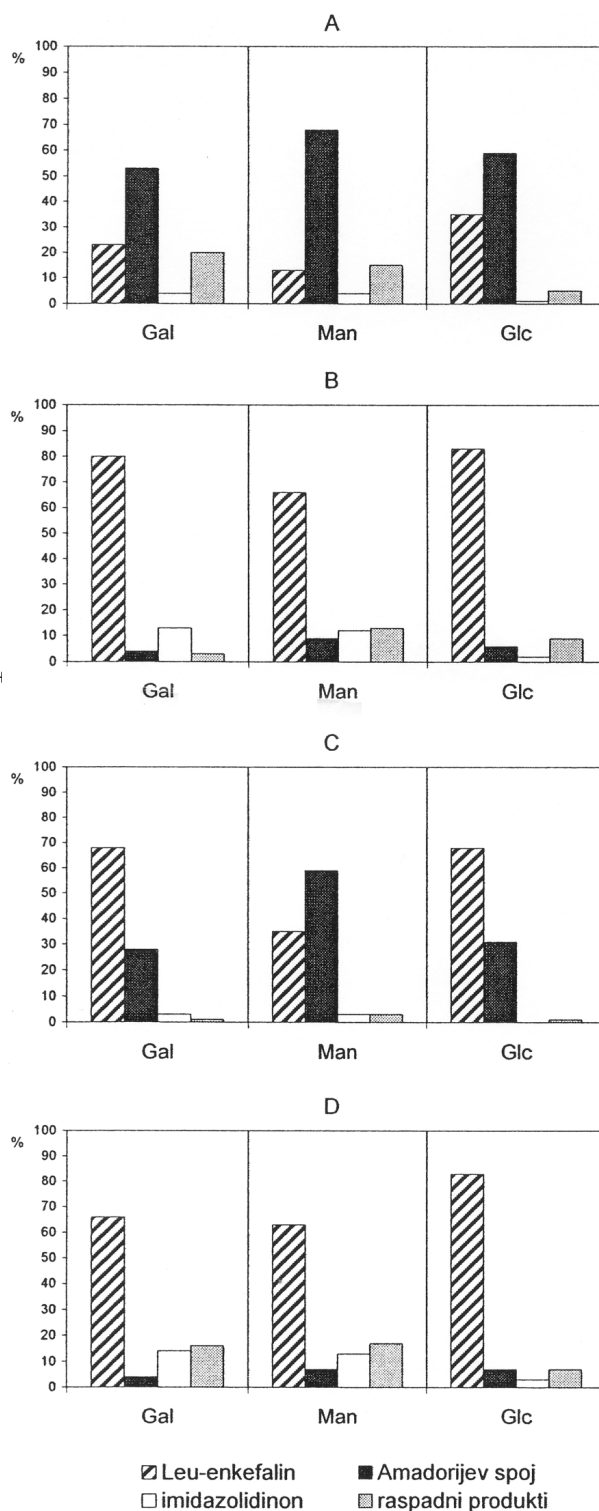
Fig. 2 – Products of spontaneous amino-carbonyl reactions of aldohexoses and Leu-enkephalin



Slika 3 – Mehanizam nastajanja Amadorijevih spojeva i imidazolidinona

Fig. 3 – Mechanism of Amadori compounds and imidazolidinones formation

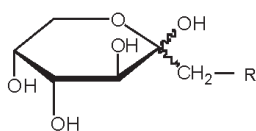
jom nastaju derivati 1-deoksi-ketoze. Nukleofilni napad dušikovog atoma glicina na položaju 2 u peptidnom lancu na Schiffovu bazu rezultira do sada neopisanim zatvaranjem u imidazolidinonski prsten i nastajanjem novog kiralnog centra u spojevima **28–30**. Omjer *cis*- i *trans*-izomera u nastalom imidazolidinonskom spoju ovisi o strukturi ishodnog monosaharida te o prirodi otapala u kojem se izvodi reakcija.²⁸ U metanolu kao otapalu, reakcija glikacije teče ponajprije u smjeru nastajanja Amadorijevih spojeva, a količina nastalih produkata ovisi o strukturi ugljikohidratne komponente, koncentraciji reaktanata te o temperaturi. Za razliku, u fosfatnom puferu, dakle u mediju kojim imitiramo fiziološke uvjete, nastaje znatno manje produkata glikacije, ali zato imidazolidinonskih produkata nastaje više nego u metanolu pod istim reakcijskim uvjetima (slika 4).



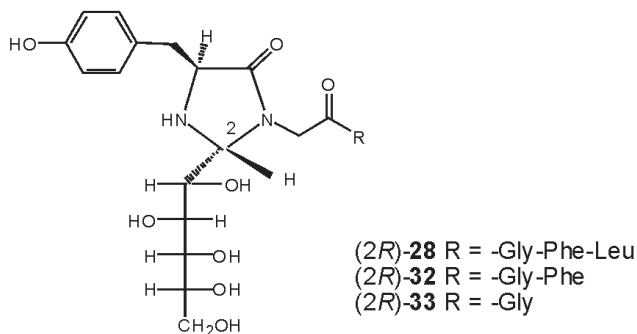
Slika 4 – Utjecaj reducirajućih šećera, galaktoze (Gal), manoze (Man) i glukoze (Glc) na nastajanje glikacijskih produkata iz Leu-enkefalina. Molarni odnos reaktanata: Leu-enkephalin:šećer = 1:15. Otapalo i reakcijski uvjeti su bili kako slijedi: (A) metanol, 50 °C, 3 dana; (B) fosfatni pufer (pH = 7,4), 50 °C, 3 dana; (C) metanol, 37 °C, 3 dana; (D) fosfatni pufer (pH = 7,4), 37 °C, 21 dan.

Fig. 4 – Effects of reducing sugars, galactose (Gal), mannose (Man) and glucose (Glc), on glycation product formation from Leu-enkephalin. The molar ratio of the reactants: Leu-enkephalin:sugar = 1:15. The solvent and the reaction conditions were as follows: (A) methanol, 50 °C, 3 days; (B) phosphate buffer (pH = 7.4), 50 °C, 3 days; (C) methanol, 37 °C, 3 days; (D) phosphate buffer (pH = 7.4), 37 °C, 21 days.

Pod fiziološkim uvjetima, pretvorba ranih produkata glikacije, kao što su Amadorijevi spojevi, u AGE-produkte odvija se nizom reakcija, kao što su oksidacija, pregrađivanje, dehidriranje ili fragmentiranje adukata šećer-protein/peptid. Stoga se primarno nameće pitanje kemijske i enzimske stabilnosti ranih produkata glikacije, posebice produkata koji nastaju iz glukoze i endogenog opioidnog peptida kao što je Leu-enkefalin. Da bismo došli do odgovora na ova pitanja, studirana je brzina hidrolize Amadorijevog spoja **26** i imidazolidinona **28** (*trans*-izomer) (slika 5) u humanom serumu na 37 °C i uspoređena s njihovom stabilnošću u fosfatnom puferu.^{28–30} Iz rezultata prikazanih u tablici 3 vidljivo je da glikacija tirozinskog ostatka u Leu-enkefalinu znatno povećava otpornost ishodnog peptida prema enzimskoj razgradnji. Dok se Leu-enkefalin brzo raspada u serumu ($t_{1/2} = 14,8$ min), pretežno djelovanjem aminopeptidaza, Amadorijev spoj pentapeptida **26** polagano se ($t_{1/2} = 14$ h) metabolizira u tripeptidni Amadorijev spoj **31** djelovanjem dipeptidil-karboksipeptidaze.³⁰ Karakteristično je za spoj **31** da nije podložan daljnjem raspadu u humanom serumu čak niti nakon 4 dana inkubacije na 37 °C. Dokazano je da je takvo iznenađujuće ponašanje posljedica vezanja Amadorijevog spoja **31** na albumin, najzastupljeniji protein u ljudskom serumu.³⁰ Drugi glikacijski produkt dobiven iz glukoze, imidazolidinon (*2R*)-**28**, bio je u humanom serumu još stabilniji od Amadorijevog spoja **26**, s poluvremenom raspada od čak 6,5 dana (tablica 3). Istovremeno prisustvo dva metabolička produkta **32** i **33** u inkubatu potvrdilo je uključenost dipeptidil-karboksipeptidaze i karboksipeptidaze u hidrolizu spoja **28**. Međutim, za razliku od tripeptidnog Amadorijevog spoja **31** koji je bio stabilan u serumu, raspad imidazolidinona **32** i **33** u serumu uključuje polaganu hidrolizu na šećernu (glukoza) i peptidnu komponentu koja postaje supstrat za aminopeptidazu. Iz rezultata prikazanih u tablici 3 vidljivo je da spojevi **32** i **33** imaju gotovo identičnu stabilnost u humanom serumu i fosfatnom puferu.²⁸



26 R = -Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
31 R = -Tyr-Gly-Gly



Slika 5 – Strukture Amadorijevih i imidazolidinonskih derivata Leu-enkefalina i strukturno srodnih manjih fragmenta

Fig. 5 – Structures of Amadori and imidazolidinone derivatives of Leu-enkephalin and of structurally related smaller fragments

Tablica 3 – Vremena poluraspada ($t_{1/2}$) Leu-enkefalina, njegovih produkata glikacije i glavnih metabolita u humanom serumu i fosfatnom puferu (0,05 M/0,1 M NaCl, pH = 7,4) (PBS) na 37 °C

Table 3 – Half-lives ($t_{1/2}$) of hydrolysis of Leu-enkephalin, its glycation products and main metabolites in human serum and in phosphate (0.05 M, pH = 7.4) buffered 0.1 M saline (PBS) at 37 °C

Spoj ^a Compound ^a	Struktura spoja Structure of the compound	$t_{1/2}$		Ref.
		Humani serum Human serum	PBS	
Leu-enkefalin	peptid	14,8 min	stabilan	30
26	Amadori	14,0 sati	8,7 dana	30
31	Amadori	stabilan	2,2 dana	30
(<i>2R</i>)- 28	imidazolidinon	6,5 dana	20,5 dana	28
(<i>2R</i>)- 32	imidazolidinon	18,5 dana	21,7 dana	28
(<i>2R</i>)- 33	imidazolidinon	16,6 dana	15,4 dana	28

^a Strukture ispitanih spojeva prikazane su na slici 5.

^a Structure of the investigated compounds are presented in Fig. 5.

Zaključak

Opisani rezultati ukazuju, na modelu malih bioaktivnih peptida, kako uključivanje ugljikohidratne molekule pruža niz mogućnosti u odabiru šećerne komponente, mjesta vezanja kao i tipa veze šećer-peptid, smanjujući ili povećavajući receptorsku selektivnost i bioaktivnost ishodnih spojeva. Nadalje, istraživanja na području Maillardove reakcije, koristeći dobro definirani aldoheksoza/peptid model, omogućila su bolji uvid u produkte koji nastaju spontanom reakcijom aldoza i endogenog opioidnog peptida Leu-enkefalina te prve spoznaje o utjecaju glikacije na kemijsku i metaboličku stabilnost peptidne komponente.

Literatura

References

- C. B. Pert, S. H. Snyder, *Science* **179** (1973) 1011.
- J. Hughes, T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, L. A. Fothergill, B. A. Morgan, H. R. Morris, *Nature* **258** (1975) 577.
- S. Stanović, M. Boranić, Liječ. Vjesn. **121** (1999) 82.
- R. J. Bodnar, G. E. Klein, *Peptides* **26** (2005) 2629.
- I. Z. Siemion, A. Kluczyk, M. Cebrat, *Amino Acids* **29** (2005) 161.
- I. S. Zagon, M. F. Verderame, P. J. McLaughlin, *Brain Res. Rev.* **38** (2002) 351.
- A. Janecka, R. Kruszynski, *Curr. Med. Chem.* **12** (2005) 471.
- Š. Horvat, *Curr. Med. Chem. CNS Agents* **1** (2001) 133.
- R. Polt, M. Dhanasekaran, C. M. Keyari, *Med. Res. Rev.* **25** (2005) 557.
- L. Varga, Š. Horvat, C. Lemieux, P. W. Schiller, *Int. J. Peptide Protein Res.* **30** (1987) 371.
- L. Varga-Defterdarović, Š. Horvat, N. N. Chung, P. W. Schiller, *Int. J. Peptide Protein Res.* **39** (1992) 12.

12. J. Horvat, Š. Horvat, C. Lemieux, P. W. Schiller, *Int. J. Peptide Protein Res.* **31** (1988) 499.
13. Š. Horvat, L. Varga-Defterdarović, J. Horvat, S. Modrić-Žganjar, N. N. Chung, P. W. Schiller, *Lett. Peptide Sci.* **2** (1995) 363.
14. M. Skurić, J. Horvat, Š. Horvat, N. N. Chung, P. W. Schiller, *Int. J. Peptide Protein Res.* **43** (1994) 402.
15. Š. Horvat, J. Horvat, L. Varga-Defterdarović, K. Pavelić, N. N. Chung, P. W. Schiller, *Int. J. Peptide Protein Res.* **41** (1993) 399.
16. M. Čudić, J. Horvat, M. Elofsson, K.-E. Bergquist, J. Kihlberg, Š. Horvat, *J. Chem. Soc. Perkin Trans 1*, (1998) 1789.
17. A. Jakas, Š. Horvat, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, (1996) 789.
18. Š. Horvat, L. Varga, J. Horvat, A. Pfützner, H. Suhartono, H. Rübsamen-Waigmann, *Helv. Chim. Acta*, **74** (1991) 951.
19. Š. Horvat, M. Roščić, L. Varga-Defterdarović, J. Horvat, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, (1998) 909.
20. Š. Horvat, L. Varga-Defterdarović, M. Roščić, J. Horvat, *Chem. Commun.* (1998) 1663.
21. L. Varga-Defterdarović, D. Vikić-Topić, Š. Horvat, *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*, (1999) 2829.
22. Š. Horvat, M. Roščić, J. Horvat, *Glycoconjugate J.* **16** (1999) 391.
23. B. Kojić-Prodić, B. Perić, M. Roščić, P. Novak, Š. Horvat, *J. Peptide Sci.* **10** (2004) 47.
24. M. Roščić, R. Eklund, E.-L. Nordmark, Š. Horvat, G. Widmalm, *Eur. J. Org. Chem.* (2004) 4641.
25. Š. Horvat, A. Jakas, *J. Peptide Sci.* **10** (2004) 119.
26. F. Ledl, E. Schleicher, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **29** (1990) 565.
27. R. Ramasamy, S. J. Vannucci, S. S. D. Yan, K. Herold, S. F. Yan, A. M. Schmidt, *Glycobiology*, **15** (2005) 16R.
28. M. Roščić, Š. Horvat, *Bioorg. Med. Chem.* **14** (2006) 4933.
29. A. Jakas, Š. Horvat, *Biopolymers*, **69** (2003) 421.
30. A. Jakas, Š. Horvat, *Bioorg. Chem.* **32** (2004) 516.

SUMMARY

Synthetic Glycoconjugates: Models for Studying Interactions in Biomolecular Recognition and Sugar-Induced Modifications of Peptides/Proteins

Š. Horvat

Although the biological and medical importance of complex carbohydrates and glycoconjugates is firmly established, many of the molecular details of how these intriguing compounds accomplish their functions are not understood well. Unraveling these molecular mechanisms is very important since our understanding of the role of glycoconjugates in nature has traditionally fallen far behind the accumulated knowledge on other biopolymers such as proteins and nucleic acids.

The synthesis of pure, well-defined glycoconjugates of bioactive peptides is essential to the study of the biological processes that they mediate. This paper covers the methods for glycoconjugate assembly and biological activity screening. Within this context, the impact of the carbohydrate moiety on receptor selectivity, chemical and metabolic stability will be addressed.

The diversity and complexity of nonenzymatic glycation products found in naturally occurring peptides/proteins hasten the need to clarify the sequence of reactions that carbohydrate adducts undergo and to find biomarkers of specific sugar-peptide structures. Addressing these issues, it is demonstrated how the structure of the sugar moiety controls the formation of glycation products from the endogenous opioid peptide, Leu-enkephalin. It is shown that the information gained from carbohydrate-peptide model systems provides a novel mechanism for the generation of the glycation (Maillard) reaction intermediates under physiological conditions and better insights into the damage to endogenous peptides as a result of glycation by reducing sugars *in vivo*.

Division of Organic Chemistry and Biochemistry
"Ruđer Bošković" Institute
POB 180, 10002 Zagreb, Croatia
shorvat@irb.hr

Received November 23, 2006
Accepted January 10, 2007