

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO SEVER  
**DIPLOMSKA NALOGA**  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO SEVER

**POSTAVITEV HOMOLOGNEGA MODELA RECEPTORJA CCR2 IN  
VREDNOTENJE INTERAKCIJ POTENCIALNIH PEPTIDNIH LIGANDOV *IN*  
*SILICO***

**CREATION OF CCR2 RECEPTOR HOMOLOGY MODEL AND EVALUATION  
OF POTENTIAL PEPTIDE LIGAND INTERACTIONS *IN SILICO***

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko biologijo ter Katedri za farmacevtsko kemijo, pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča in somentorstvom asist. dr. Sama Turka.

## **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Tomažu Bratkoviču ter asist. dr. Samu Turku za vso strokovno podporo, ustrezno usmerjanje, nasvete ter prijetno, sproščeno in hkrati dinamično delovno okolje pri izdelavi diplomske naloge. Prav tako gre zahvala vsem drugim operaterjem fakultetnega računalnika za proste termine, ki sem jih imel na voljo. Zahvaljujem se tudi diplomski komisiji.

Zahvala gre tudi družini in dekletu za podporo in spodbudo.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal samostojno, pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Bratkoviča, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Sama Turka, mag. farm.

Marko Sever

Predsednica diplomske komisije: prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.

Mentor: doc. dr. Tomaž Bratkovič, mag. farm.

Somentor: asist. dr. Samo Turk, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Matej Sova, mag. farm.

Ljubljana, 2014

# Kazalo vsebine

<b>POVZETEK</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
SEZNAM OKRAJŠAV.....	9
OZNAKE ZA AMINOKISLINE .....	10
<b>1 UVOD</b> .....	<b>11</b>
1.1 RAČUNALNIŠKE METODE V SISTEMIH BIOLOŠKIH MOLEKUL .....	12
1.2 POLJA SIL.....	13
1.3 ENERGIJSKA MINIMIZACIJA.....	14
1.4 MOLEKULSKA DINAMIKA.....	15
1.5 HOMOLOGNO MODELIRANJE.....	18
1.6 KEMOKINSKI SISTEM.....	19
1.6.1 Patofiziologija CCR2 in zdravila z delovanjem na kemokinski sistem .....	20
<b>2 NAMEN DELA</b> .....	<b>22</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>23</b>
3.1 RAČUNALNIŠKA IN PROGRAMSKA OPREMA.....	23
3.2 HOMOLOGNO MODELIRANJE RECEPTORJA CCR2.....	25
4.....	26
3.2.1 Uporaba algoritma BLAST za iskanje proteinov z največjo homologijo aminokislinskega zaporedja .....	26
3.2.2 Izdelava homolognega modela z lokalno in strežniško različico programa Modeller 9.11.....	27
3.2.3 Ocenjevanje homolognih modelov.....	30
3.3 PROCES VREDNOTENJA ENERGIJ INTERAKCIJE PEPTIDNIH LIGANDOV Z UPORABO METOD ENERGIJSKE MINIMIZACIJE IN MOLEKULSKE DINAMIKE .....	31
3.3.1 Izris peptidov v programu Avogadro.....	32
3.3.2 Priprava peptidov v programu VMD.....	33
3.3.3 Energijska minimizacija in molekulska dinamika v vakuumu .....	34
3.3.4 Energijska minimizacija in molekulska dinamika peptidov v vodi .....	36
3.3.5 Dinamika preiskovanih in kontrolnih peptidov v vodi.....	36
3.3.6 Dinamika kompleksa ligand-receptor v vodi.....	36
3.3.7 Izvajanje simulacij molekulske dinamike s programom NAMD .....	38
3.3.8 Sidranje ligandov v receptor s programom ZDOCK Server.....	40
3.3.9 Izračun energij interakcije.....	41
3.3.10 Vizualizacija molekul .....	41
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>43</b>
4.1 REZULTATI HOMOLOGNEGA MODELIRANJA RECEPTORJA CCR2.....	43
4.1.1 Rezultati strežniške različice algoritma BLAST.....	43
4.1.2 Rezultati ocenjevanja homolognih modelov .....	44
4.2 REZULTATI PREIZKUSA STABILNOSTI MOLEKULSKIH SIMULACIJ .....	46
4.3 REZULTATI IZRAČUNA ENERGIJE INTERAKCIJE KONTROLNIH IN PREISKOVANIH PEPTIDOV CCR2... ..	47
4.4 OPIS KONČNIH VEZAVNIH POLOŽAJEV IN VEZAVNIH KONFORMACIJ LIGANDOV .....	49
<b>5 SKLEP</b> .....	<b>52</b>
<b>6 LITERATURA</b> .....	<b>53</b>

## Kazalo slik

Slika 1 - Prostorski model monomera MCP-1 (PDB oznaka: 1DOL) .....	20
Slika 2 - Shematično predstavljen celoten raziskovalen proces .....	25
Slika 3 - Shematično predstavljen raziskovalni načrt homolognega modeliranja receptorja CCR2, prirejeno po (7).....	26
Slika 4 - Uporabniški vmesnik strežniškega algoritma BLAST .....	27
Slika 5 - Prostorska modela matričnih proteinov za konstrukcijo homolognega modela CCR2; 3ODU-model CXCR4, 2LNL-model CXCR1, (prirejeno po slikah iz PDB).....	28
Slika 6 - Shematična predstavitev procesa sidranja potencialnih peptidnih ligandov v receptor CCR2.....	31
Slika 7 - Uporabniški vmesnik programa Avogadro s prikazanim modulom za izris peptidov.....	32
Slika 8 - Uporabniški vmesnik programa VMD s prikazanimi nekaterimi uporabljenimi moduli ..	34
Slika 9 - Prikaz obdelave začetnih struktur peptidov z energijsko minimizacijo v vakuumu .....	35
Slika 10 - Solvatiran kompleks ligand-receptor pripravljen na simulacijo .....	37
Slika 11 - Spletni uporabniški vmesnik algoritma za sidranje proteinov Zdock.....	41
Slika 12 - Prikaz molekulske površine homolognega modela CCR2 (pogled v vezavno odprtino, ki jo oblikuje sedem transmembranskih $\alpha$ -vijačnic).....	42
Slika 13 - Ramachandranov diagram z označenimi položaji aminokislin pomembnih za vezavo malih molekul v vezavno mesto.....	45
Slika 14 - Prostorska struktura izbranega homolognega modela CCR2 .....	45
Slika 15 - Diagram RMSD simulacije minimizacije in dinamike .....	46
Slika 16 – Ocenjene povprečne elektrostatske energije kontrolnih in preiskovanih ligandov .....	48
Slika 17 - Ocenjene povprečne VdW energije kontrolnih in preiskovanih ligandov.....	48
Slika 18 - Ocenjene povprečne skupne energije kontrolnih in preiskovanih ligandov .....	49
Slika 19 - Končni položaj in vezavna konformacija peptida AMSNDHMKNK v receptorju CCR2 .....	50

## Kazalo preglednic

Preglednica I -Specifikaciji fakultetnega in prenosnega računalnika.....	24
Preglednica II - kratice potencialnih peptidnih ligandov .....	33
Preglednica III - Parametri energijske minimizacije in dinamike ligandov v vakuumu .....	35
Preglednica IV - Parametri energijske minimizacije in dinamike ligandov v vodi.....	36
Preglednica V - Parametri energijske minimizacije in dinamike kompleksov ligand-receptor v vodi.....	37
Preglednica VI - Rezultati analize BLAST-a .....	43
Preglednica VII - Rezultati izračuna energije za oba kontrolna liganda .....	47
Preglednica VIII - Rezultati izračuna energij preiskovanih ligandov .....	47
Preglednica IX - Pregled vezavnih partnerjev končnih položajev receptor-ligand.....	50

## POVZETEK

Uporaba računalniških metod se vedno bolj uveljavlja v farmacevtskem razvoju. Računalniki postajajo vedno bolj dostopni, hkrati pa se večja njihova računsko moč ter izboljšuje programska oprema. Z razvojem programske opreme postajajo naloge, za katere jih uporabljamo med razvojem zdravil, vedno bolj raznovrstne. Njihova napovedna vrednost se povečuje.

Antagonisti kemokinskih receptorjev CCR2 imajo velik potencial, da postanejo pomembna skupina zdravil za zdravljenje bolezni, pri katerih je prisotno vnetje. Tako bi v prihodnosti lahko omenjena zdravila uporabljali za zdravljenje raznovrstnih bolezni, med drugim sladkorne bolezni tipa 2, ateroskleroze, debelosti, revmatoidnega artritisa ter multiple skleroze.

Receptor CCR2 uvrščamo v skupino receptorjev, sklopljenih z G-proteini (GPCR). Ta skupina je znana po tem, da je njihovo prostorsko strukturo izredno zahtevno določiti. Določena je namreč samo za nekaj predstavnikov. Za receptor CCR2 tako kristalografske strukture kot NMR-strukture še niso znane, zato smo v diplomski nalogi uporabili metodo homolognega modeliranja. Uporabili smo algoritem za iskanje homologije v primarni strukturi proteinov imenovan BLAST. Na podlagi rezultata BLAST-a smo izbrali sorodne proteine, ki smo jih v nadaljevanju uporabili za izdelavo homolognega modela. Homologni model smo izdelovali z lokalno nameščeno ter strežniško verzijo programa Modeller 9.11. Modele smo v naslednjem koraku vizualno ocenili ter izbrali najprimernejšega. Izkazalo se je, da je strežniška verzija izdelala boljši model, kot lokalno nameščena verzija.

Nato smo *in silico* pripravili potencialne peptidne ligande receptorja, ki so jih predhodno izolirali iz bakteriofagnih peptidnopredstavitvenih knjižnic z afinitetno selekcijo proti različnim nevtralizacijskim protitelesom, usmerjenim proti endogenemu ligandu CCR2, kemokinu MCP-1. Z uporabo metod energijske minimizacije in molekulske dinamike smo peptide zvali v termodinamsko ugodno konformacijo in jih s strežniško različico programa za sidranje proteinov ZDOCK sidrali v vezavno mesto homolognega modela receptorja. Najvišje rangirane položaje sidranega liganda smo vizualno ocenili ter glede na cenilno funkcijo in vizualni pregled izbrali najboljši kompleks liganda z receptorjem. Celoten kompleks receptor-peptid smo nato ponovno obdelali z uporabo metod energijske minimizacije in molekulske dinamike.

Končnim kompleksom smo nato z uporabo programa NAMD ocenili elektrostatske in van der Waalsove prispevke ter celotne energije interakcije. Na podlagi ocenjenih energij smo potencialne peptidne antagoniste CCR2 medsebojno razvrstili glede na kontrolna liganda.

Trend izračunane energije kontrolnih ligandov nam je dal potrditev, da naša eksperimentalna metoda ustrezno razvršča peptide v okviru omejitev metode.

Glede na dobljene podatke predlagamo peptid P1 (AMSNDHMKNK) kot izhodišče za nadaljnje raziskovanje.

**Ključne besede:** homologno modeliranje, energijska minimizacija, molekulska dinamika, računalniška kemija

## **ABSTRACT**

Computational chemistry methods are becoming increasingly popular in the area of pharmaceutical development. Computers are becoming more and more accessible to the end user, while at the same time their processing power is improving and new and improved software algorithms are being developed. Computational methods can currently deal with diverse problems and their predictive value is increasing.

CCR2 antagonists hold potential to become an important group of drugs for the treatment of inflammatory related diseases. In the future, these drugs might find use in the treatment of diverse diseases, such as type 2 diabetes, atherosclerosis, obesity, rheumatoid arthritis, and multiple sclerosis.

CCR2 is a member of the GPCR family of receptors. A known feature of this group is that their 3D structure is notoriously difficult to determine, since their fold is dependent on integration into the plasma membrane. Therefore, to date 3D structure was only determined for a handful of the GPCR family members. For the CCR2 X-ray or NMR determined 3D structures are not yet available, therefore we resorted to homology modelling of the receptor. In the first step, we used a sequence similarity search algorithm termed BLAST. On the basis of its results, we picked proteins homologous to CCR2 with defined 3D structures. In the next step, we used these proteins for constructing homology models, using the local as well as the online version of Modeller 9.11. The homology model was later visually assessed and it was found that the online version produced a better homology model.

Potential peptide ligands (previously identified through affinity screening of phage display libraries against several anti-MCP-1 neutralizing antibodies) were prepared using energy minimization and molecular dynamics for subsequent docking to CCR2 homology model. Peptides were virtually docked into the binding site of the homology model of the receptor using the ZDOCK online protein docking algorithm. Highest scoring binding poses of every peptide were visually assessed. The best binding pose (taking into account both the scoring function and visual assessment) was subjected to another round of energy minimization coupled with molecular dynamics.



The resulting final receptor-peptide complex was evaluated with NAMD and contributions from the electrostatic and van der Waals contributions together with total interaction energy were calculated. Potential peptide ligands were ranked according to their calculated energies versus the control ligands.

The calculated energies of the control ligands ranked according to reported affinities, validating our method.

According to the results at hand, we propose the peptide P1 (AMSNDHMKNK) to be used as the starting point for further investigation.

**Key words:** homology modeling, energy minimisation, molecular dynamics, computational chemistry

## SEZNAM OKRAJŠAV

BLAST	algoritem za iskanje homologije v primarni strukturi proteinov; ang. »Basic Local Alignment Search Tool«
CCR2	kemokinski receptor 2
CPU	centralna procesorska enota
EM	energijska minimizacija
MCP	monocitni kemotaktični protein
MD	molekulska dinamika
NAMD	program za minimizacijo in molekulsko dinamiko; ang. »Scalable Molecular Dynamics«
NCBI	Ameriški nacionalni center za biotehnoško dokumentacijo; ang. »National Center for Biotechnology Information«
NMR	jedrska magnetna resonanca
PDB	podatkovna baza kristalografskih, NMR-struktur ter homolognih modelov proteinov; ang. »Protein Data Bank«
RAM	pomnilnik
RMSD	ocena prileganja struktur osnovni strukturi; ang. »Root Mean Square Deviation«
VdW	van der Waals
VMD	program za vizualizacijo in obdelavo rezultatov; ang. »Visual Molecular Dynamics«

## OZNAKE ZA AMINOKISLINE

A	alanin	M	metionin
C	cistein	N	asparagin
D	asparaginska kislina	P	prolin
E	glutaminska kislina	Q	glutamin
F	fenilalanin	R	arginin
G	glicin	S	serin
H	histidin	T	treonin
I	izolevcin	V	valin
K	lizin	W	triptofan
L	levcin	Y	tirozin

# 1 UVOD

Računalniška kemija, pogosto poimenovana tudi molekulsko modeliranje, predstavlja vejo znanosti, ki se ukvarja s strukturo in delovanjem molekul preko izgradnje modelov in pripadajočih računskih operacij za ugotavljanje lastnosti le-teh. Ti molekulski modeli običajno predstavljajo poenostavljeno verzijo izredno kompleksnih naravnih procesov, ključno pa je, da problematiko predstavljajo ustrezno. Področje molekulskega modeliranja je relativno mlado, saj se je pričelo razvijati v 60. letih prejšnjega stoletja, večji zagon pa je dobilo v 80. letih prejšnjega stoletja z razvojem prvih super-računalnikov. Vedno bolj se uveljavlja kot partner laboratorijskemu eksperimentiranju (1). Posebno priznanje uporabnosti računalniških metod je bila tudi Nobelova nagrada za kemijo, podeljena prejšnje leto Martinu Karplusu, Michaelu Levittu ter Ariehu Warshelu, za njihove prispevke k razvoju računalniške kemije (2).

Na področje farmacevtskih raziskav in razvoja so metode računalniške kemije pričeli uvajati pred okoli 25 leti (3). Kot prve so bile razvite metode računalniške predstavitve molekul, podatkovne baze lastnosti molekul ter pristopi za povezavo med strukturo in učinkom (4). K bliskovitem razvoju računalniških metod z uporabo v farmacevtskem razvoju prispevajo sledeči elementi (5):

- izboljšave v eksperimentalnih in instrumentalnih metodah, ki predstavljajo osnovo za računalniške metode
- izboljšave in uvedbe novih metod in algoritmov
- izboljšave zmogljivosti računalnikov in njihova večja dostopnost uporabnikom ter
- uspešni protokoli sodelovanja med komplementarnimi znanstvenimi disciplinami

Z nenehnimi izboljšavami strojne opreme in algoritmov postaja uporaba računalniških metod vse bolj pomemben del razvoja učinkovin v farmacevtski industriji ter na akademskem področju. Namen uporabe teh metod je optimizacija procesa razvoja, saj lahko z njihovo uporabo bistveno pospešimo in pocenimo razvoj, ter povečamo produktivnost, prav tako pa je prisoten velik potencial za izboljšanje verjetnosti uspeha razvoja učinkovin (4).

Uporaba računalniških metod predstavlja v danes gospodarsko neugodnih razmerah ekonomično rešitev za raziskovanje potencialnih zdravilnih učinkovin, zato smo to pot ubrali tudi mi.

## **1.1 Računalniške metode v sistemih bioloških molekul**

Osnovne skupine računske obravnave sistemov bioloških molekul z uporabo računalnikov so kvantno mehanski izračuni, izračuni molekulske mehanike ter molekulske simulacije (1).

Teorija kvantne mehanike, ki temelji na izračunu Schrödingerjeve enačbe, podaja matematično razlago za gibanje elektronov ter protonov in ni bila nikoli ovržena kot napačna. Težava pa je v tem, da so izračuni kvantne mehanike izjemno zahtevni in so točno rešljivi le za vodikov atom, v primeru večjega sistema pa uporabljamo približke. Kvantno mehaniko uporabljamo tako večinoma za male molekule. Njena pozitivna lastnost pa je, da je mogoče molekulske lastnosti izračunati brez eksperimentalnih podatkov. Za sisteme, v katerih nastopajo biološke molekule, kot so proteini in nukleinske kisline, večinoma uporabljamo le hibrid kvantno mehanskih in molekulske mehanike metod. V tem primeru s kvantno mehanskimi metodami obravnavamo zgolj omejen, majhen del molekule, za ostalo pa uporabimo molekulske mehanike. Tak pristop je znatno manj računsko zahteven kot uporaba zgolj kvantno mehanskih metod, primer uporabe pa je računalniška obravnava encimske katalize (5, 6).

Večina biomolekulskih struktur je žal prevelikih za obravnavo s kvantno mehanskimi metodami, zato uporabljamo približke, zajete v metodi molekulske mehanike, kot so izračun energije sistema z upoštevanjem le položaja atomskih jeder, položaj elektronov pa zanemarimo. Pri obravnavi problema z molekulske mehanike opisujemo sistem kot kroglice atomov, katerih masa je zbrana v molekulskem jedru, povezanih z vzmetmi, ki predstavljajo vezi med atomi. Sistem je podvržen osnovnim fizikalnim silam. Molekula tako preko rotacij, vibracij in translacij zavzame najugodnejšo konformacijo glede na inter- in intramolekularne sile, ki delujejo nanjo. Gre za izračun potencialne energije sistema, kot funkcije položajev atomov v molekuli. Za izračun uporabimo klasične fizikalne enačbe kot je npr. Hookov zakon. Parametri sistema so zajeti v polju sil. Uporabljamo podatke pridobljene iz eksperimentov. Metoda je tako zaradi uporabljenih približkov bistveno manj računsko zahtevna (5, 7).

Zadnjo skupino računalniških metod v sistemih bioloških molekul pa predstavljajo molekulske simulacije. Simulacije imajo velik pomen na raznolikih znanstvenih področjih. Izredno pomembne so na področju napovedovanja vremena, astrofizike, fizike osnovnih delcev, dinamike tekočin in ostalih inženirskih področjih. Težava je v tem, da v makroskopskem področju lahko napovedi simulacij in dejanskega stanja lažje koreliramo, kot v svetu atomov (1, 4).

Primer simulacije v svetu atomov in molekul je simulacija molekulske dinamike (MD). Statični pogled na biološko molekulo, kot ga dobimo z rentgensko kristalografijo, predstavlja namreč povprečen pogled na sistem in ni najboljša predstava dejanskega stanja v naravi. Boljšo predstavo nam podaja MD, ki upošteva dinamične procese v sistemu. Primeri dinamičnih procesov na nivoju receptorjev so na primer: prepoznavanje molekul, signalizacija, difuzija, kataliza, nadzor prehoda ionov skozi kanalčke ter zvitje proteinov (8).

## 1.2 Polja sil

Razvoj polj sil se je pričel v zgodnjih 60. letih prejšnjega stoletja na podlagi eksperimentalnih podatkov, pridobljenih iz spektroskopskih in drugih eksperimentalnih študij. V zgodnjih 80. letih so razvili polja sil v vodi, ki so tlakovala pot za simulacije bioloških molekul (1).

Večina polj sil je v osnovi sestavljena iz štirih prispevkov, ki opisujejo intra- in intermolekulske sile v sistemu. Prvi trije prispevki so vezni, zadnji člen v enačbi pa predstavlja nevezne prispevke, torej Coulombov in Lennard-Jones-ov potencial (7). Temu pravilu sledi tudi funkcijska oblika polja sil (enačba 1 in 2) v programu NAMM (9):

$$U_{\text{skupna}} = U_{\text{vezi}} + U_{\text{koti}} + U_{\text{dihedralni}} + U_{\text{vdW}} + U_{\text{Coulomb}} \quad (\text{Enačba 1})$$

$$U_{\text{skupna}} = \sum_{\text{vezi}} k_{\text{vezi}} (r - r_0)^2 + \sum_{\text{koti}} k_{\text{koti}} (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{dihedralni}} \begin{cases} k_{\text{dih.}} [1 + \cos(n\Phi - \gamma)], & n \neq 0 \\ k_{\text{dih.}} (0 - \gamma)^2, & n = 0 \end{cases} + \sum_i \sum_{j>1} 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_i \sum_{j>1} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (\text{Enačba 2})$$

$U$  – prispevek potencialne energije,  $k$  – konstanta funkcije potencialne energije,  $r$  – dolžina vezi ali razdalja med delci,  $\theta$  – kot vezi,  $\Phi$  in  $\gamma$  – dihedralna kota,  $q$  – naboj,  $\epsilon$  – dielektrična konstanta ali funkcijski parameter Lennard-Jonesovega potenciala,  $\sigma$  – funkcijski parameter Lennard-Jonesovega potenciala

#### Enačbi 1 in 2 - Enačbi polja sil v programu NAMD

Poleg same funkcijske oblike polja sil je zelo pomembna tudi ustrezna določitev konstant sil, ki predstavljajo parametre sistema. Parametri za opis sistema so pogosto določeni z uporabo raznih eksperimentalnih metod ter so določeni ustrezno glede na sistem, ki ga opisujejo. Pred uporabo je potrebno polje sil validirati, da daje ustrezne rezultate za sisteme, za katere je bilo skonstruirano (7).

Trenutno ni univerzalnega »polja sil«, prav tako ni velike konvergence med posameznimi polji sil, tako so nekatera bolj uporabna za male molekule (MM2/3/4), nekatera bolj za proteine (CHARMM) in druga za nukleinske kisline (AMBER). Trenutna polja sil, ki jih največ uporabljamo, lahko uvrstimo v drugo generacijo. V primerjavi s polji sil prve generacije, se zdaj pri parametrizaciji zanašamo bolj na kvantno mehanske izračune. Prisotna pa so tudi že polja sil tretje generacije, ki natančneje upoštevajo tudi elektronsko polarizabilnost molekul. V vsakem polju sil obstaja določena konformacijska pristranskost. Ustrezna parametrizacija polj sil je pomembna za pravilni izračun molekulskih geometrij in energij interakcij (10).

### 1.3 Energijska minimizacija

Optimizacija je pojem, prisoten v številnih znanstvenih, inženirskih ter družboslovnih disciplinah. V svetu molekul lahko s pojmom optimizacija opisujemo iskanje energijsko najugodnejše konformacije. Za večino sistemov bioloških molekul, ki so seveda kompleksni sistemi, predstavlja potencialna energija kot funkcija koordinat atomov v molekuli multidimenzionalno funkcijo. Opisujemo jo kot površino potencialne energije s pripadajočimi minimumi in maksimumi. Predvsem nas zanimajo minimumi, saj ti predstavljajo stabilnejšo konformacijo molekule. Ob dani funkciji  $f$ , odvisni od  $x_i$ , je v točki minimuma prvi odvod funkcije enak nič, drugi odvod pa večji od nič (enačba 3).

$$\frac{\partial f}{\partial x_i} = 0 \quad \text{in} \quad \frac{\partial^2 f}{\partial x_i^2} > 0 \quad (\text{Enačba 3})$$

$f$  – funkcija,  $x$  – spremenljivka funkcije

### Enačba 3 - Matematični opis minimuma funkcije

Minimizacijski algoritmi spreminjajo koordinate atomov v molekuli in izračunavajo energijo konformacije, dokler ne določijo najnižje možne energije v sistemu, t.i. globalnega minimuma. Algoritme delimo na tiste, ki uporabljajo odvode energije v odvisnosti od koordinat, ter tiste, ki ne uporabljajo odvodov. Algoritmi, ki uporabljajo odvode, so uporabni zato, ker nam dajejo podatek o energijski površini. Iskanje minimuma v sistemu bioloških molekul je zaradi precej kompleksne površine potencialne energije zahtevno. Poseben problem predstavlja lastnost algoritmov, da iz dane začetne točke obtičijo v najbližjem lokalnem minimumu. Porazdelitev konformacij z nizko energijo ne ustreza vedno predpostavki, da naj bi največji delež konformacij zasedal globalni minimum; torej ni ključno, da določimo prav globalni minimum. Znano je namreč dejstvo, da v svetu zdravilnih učinkovin najnižja energijska konformacija pogosto ni aktivna oblika, ki se veže na receptor. Minimizacijski algoritmi za iskanje globalnih minimumov so drugačni od tistih za iskanje lokalnih minimumov, saj pri prvih energije ne zmanjšujemo sistematično, kar ustvari pogoje za »pobeg« iz lokalnih minimumov in vstop v druge. V NAMD-u kot algoritem za minimizacijo uporabljamo nelinearen konjugativni gradient. To je metoda, ki uporablja prvi odvod funkcije potencialne energije sistema. Omenjena metoda minimizacije je zelo popularna med različnimi ponudniki programske opreme. Vendar posamezni parametri metode variirajo med programskimi paketi (11, 12).

Uporaba energijske minimizacije (EM) je pomembna s stališča relaksacije strukturnih napetosti v modelu, kar je posebno pomembno pri makromolekularnih sistemih (12, 13) Metodi EM in MD se medsebojno dopolnjujeta in ju pogosto uporabljamo skupaj (11).

## 1.4 Molekulska dinamika

Princip MD je v osnovi preprost. Simuliramo gibanje sistema pod vplivom specifičnega polja sil ter spremljamo konformacije molekul skozi čas pod vplivom Newtonovih enačb gibanja. Pri MD zasledujemo le gibanje atomskih jeder, gibanja elektronov pa ne upoštevamo. Prav tako pri klasični metodi MD ne upoštevamo kvantno mehanskih vplivov, saj so le-ti računsko prezahtevni. Ta približek je zadosten za veliko različnih sistemov in materialov. Simulacije MD lahko uporabljamo na dolžinskih območjih več tisoč Angstromov ter časovnih območjih do več milisekund s femtosekundno resolucijo in



zajemajo sisteme z milijoni posameznih atomov. Lahko jih uporabimo pri raziskavah vrste različnih bioloških molekul, od nukleinskih kislin, ogljikovih hidratov do proteinov (4).

Razvoj MD se je pričel v zgodnjih 70. letih prejšnjega stoletja s simulacijami molekulske dinamike vode. Simulacije MD makromolekul pa so pričele pridobivati zagon v poznih 80-ih prejšnjega stoletja. V modernem razvoju zdravil imajo simulacije MD mnogo vlog, saj jih med drugim lahko uporabljamo za iskanje skritih in alosteričnih vezavnih mest, za izboljšanje tradicionalnih metod virtualnega rešetanja ter za napoved vezavnih energij med ligandom in tarčo (14).

Metode MD numerično integrirajo Newtonove zakone gibanja, natančneje drugi Newtonov zakon (enačba 4).

$$a_i(t) = \frac{\partial^2 x_i}{\partial t^2} = \frac{F(x_i)}{m_i} \quad (\text{Enačba 4})$$

*F* - sila, *m* - masa, *a* - pospešek, *t* - čas, *x* - položaj

#### **Enačba 4 - Drugi Newtonov zakon, temelj metode molekulske dinamike**

Silo izračunamo iz odvoda enačbe, ki opisuje potencialno energijo sistema kot funkcijo položaja atomov, kar opisujemo kot polje sil. Iz integracije enačb gibanja za vsak atom ob vsakem časovnem koraku lahko določimo njegovo hitrost (8).

V molekuli lahko opazujemo različne vrste gibanja, od zelo hitrih do počasnih procesov gibanja. Gibanje je kooperativno, manjše fluktuacije v molekuli tako lahko privedejo do večjih globalnih prerazporeditev položajev atomov. Da zaznavamo dovolj majhne premike in s tem dosežemo ustrezno ločljivost simulacije, moramo uporabiti primeren časovni interval za simulacijo. V praksi tipično uporabljamo časovni interval 1fs ( $10^{-15}$ s), tak časovni interval smo v naši simulaciji uporabili tudi mi. Taka velikost intervala pa pomeni, da moramo za 1 nanosekundo opraviti milijon korakov integracije, kar je računsko zelo zahtevno. Skupna dolžina simulacij MD predstavlja območje nekaj nanosekund (15).

Za izvedbo simulacije moramo poznati prostorsko strukturo sistema, ki nas zanima. Uporabljamo strukture pridobljene z rentgensko kristalografsko difrakcijo ter jedrsko magnetno resonanco (NMR), v odsotnosti teh pa homologne modele (14). Simulacije MD običajno izvajamo v štirih korakih pod izotermičnimi in izobarnimi pogoji. V prvem koraku sistem pripravimo. Sistem nato izpostavimo EM, ki sprosti strukturne napetosti v

začetnem modelu. Nato v naslednjem koraku sistem virtualno grejemo, sledi ekvilibracija. Gretje nadaljujemo, dokler ne dosežemo želenih hitrosti atomov. Po ekvilibraciji sledi faza produkcije, kjer dobimo relevantne eksperimentalne podatke, kot so položaj ter hitrosti posameznih atomov in ostali podatki (8).

Proces simulacije MD je sestavljen iz treh faz: faze inicializacije, ekvilibracije in produkcije. Koordinate vodnih molekul, ki jih dodamo biološki molekuli, so vzete iz simulacij vode. Razporeditev vodnih molekul povzema naravno stanje, ki bi v makroskopskem svetu dosegla znano eksperimentalno določeno gostoto. Natančni sistemi MD, ki eksplicitno upoštevajo vodne molekule, vsebujejo več tisoč vodnih molekul. Tak sistem oponaša celično okolje, saj so učinki solvatacije bioloških molekul pomembni. Prav tako je pomembno ustrezno ionsko okolje. Protioni so v sistem postavljeni glede na razporeditev naboja na biološki molekuli. Začetni vektor hitrosti simulacije je določen psevdonaključno, tako da celotna kinetična energija sistema ustreza pričakovani vrednosti pri tej temperaturi. Po nastavitvi začetnih koordinat in hitrosti atomov, moramo sistem ekvilibrirati, preden se prične produkcijska faza simulacije. V fazi ekvilibracije pride do fluktuacije med kinetično in potencialno energijo sistema. Sistem postane stabilen, ko ti dve vrednosti pričneta konvergirata k neki srednji vrednosti. Do težav v praksi pride zaradi množice parametrov, ki jih moramo ustrezno nadzirati. Tako moramo določiti ustrezne začetne parametre, postaviti ustrezne simulacijske protokole, ki zagotavljajo zanesljivost, zagotoviti zadostno računalniško podporo samemu računanju kot tudi vizualizaciji in obdelavi velikega števila dobljenih podatkov (15).

Računsko ceno simulacij MD lahko zmanjšamo bodisi z zmanjšanjem računskega dela v vsakem simuliranem časovnem intervalu ali pa z večanjem časovnega intervala. Računsko delo v časovnem intervalu lahko zmanjšamo preko nižje frekvence vzorčenja podatkov ali znižanja števila prostostnih stopenj določenih molekulskih regij, za katere predvidevamo, da njihovo gibanje v praksi ni pomembno. Omejitev največje dolžine časovnega intervala pa predstavljata natančnost in stabilnost sistema. Nestabilnost sistema zaznamo, ko se pričnejo koordinate in energije nekontrolirano spreminjati. Natančnost pa je pomembna v smislu ustrezne ločljivosti sistema, ki nam omogoča želeno opazovanje dogajanja (15).

## 1.5 Homologno modeliranje

Homologno modeliranje je *in silico* metoda za napovedovanje terciarne strukture nekega aminokislinskega zaporedja, ki je homologno matričnem zaporedju z eksperimentalno določeno strukturo. Metoda temelji na predpostavki, da je terciarna struktura med sorodnimi proteini bolje ohranjena, kot samo aminokislinsko zaporedje proteinov. Kot matrice za homologno modeliranje uporabljamo strukture, pridobljene z rentgensko kristalografsko difrakcijo ter NMR, najdemo jih pa v podatkovnih bazah, med drugim v Proteinski podatkovni bazi (ang. Protein Data Bank, PDB). V večji meri so na voljo prostorske strukture pridobljene z uporabo rentgenske difrakcije, saj je prostorskih struktur pridobljenih z metodo NMR zgolj 13 % (po podatkih iz leta 2009). Proces poteka preko izbire homolognih matric do prileganja matričnega in tarčnega aminokislinskega zaporedja na način, da so zaporedja z večjo homologijo znotraj primarne strukture čim bolj optimalno poravnana glede na celotno zaporedje. Nato tvorimo model, ki ga v naslednji fazi vrednotimo po primernosti za uporabo. Če model ne zadošča zastavljenim kriterijem, cikel ponovimo. Glede na odstotek homologije obeh primarnih struktur uporabljamo metode različne kompleksnosti za prileganje aminokislinskih zaporedij. V primeru, da je odstotek homologije med zaporedjema večji od 25 %, uporabljamo najpreprostejše metode. Takšna je metoda primerjanja dveh zaporedij, ki jo uporablja tudi BLAST. Prilega zaporedji medseboj in prileganje statistično ovrednoti. Z uporabo zahtevnejših metod pa lahko prilegamo tudi več zaporedij, kar je uporabno pri manjši stopnji homologije med matričnimi in tarčnim zaporedjem. Za optimizacijo homolognih modelov so se izkazale uporabne tudi simulacije MD (16).

Predstavniki z G-proteinom sklopljenih receptorjev (GPCR) predstavljajo pogosto uporabljeno skupino za homologno modeliranje, saj je eksperimentalno določevanje njihove prostorske strukture izjemno zahtevno. GPCR-ji predstavljajo po zadnjih podatkih kar 50 % farmacevtsko pomembnih tarč za razvoj učinkovin, hkrati pa predstavljajo zaradi svoje strukture oviro na poti razvoja zdravil (17). Goveji rodopsin je bil prvi GPCR, ki so ga kristalizirali, in sicer leta 2000 (18). Področje GPCR-jev je pomembno za farmacevtsko industrijo, saj z njimi vstopa v interakcije okoli 30-40 % učinkovin trenutno na trgu (19).

Na področju kemokinskih receptorjev je prostorska struktura znana le za enega predstavnika in sicer CXCR4. Različne raziskovalne skupine pa se trenutno ukvarjajo z naslednjimi receptori: CCR1, CCR5, CXCR1, CXCR2, CXCR3. Vsi navedeni so v fazi

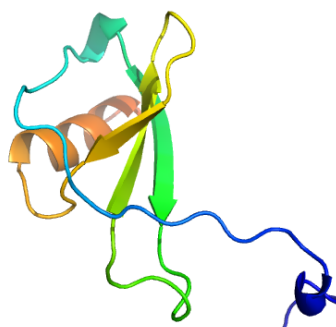
poizkusa izvedbe uspešne kristalizacije, ni pa še znanih konkretnih rezultatov (20). Kot tarča za izvedbo kristalizacije in določitve prostorske strukture v prihodnosti je seveda tudi kemokinski receptor tipa 2 (CCR2). Trenutno se glede na znane podatke pridobljene iz podatkovnih baz, nobena raziskovalna skupina aktivno še ne ukvarja z njim (21).

Zaradi odsotnosti razrešene prostorske strukture CCR2 so nekatere raziskovalne skupine postavile homologne modele receptorja CCR2. Prvi homologni modeli so bili izdelani z uporabo govejega rodopsina (22), ki ima nizko stopnjo homologije (22 %), poleg tega pa obstaja dvom v uporabnost modela, saj goveji rodopsin ni z ligandom-aktiviran receptor. Nadaljnje delo so opravili na človeškem  $\beta_2$ -adrenergičnem receptorju (13), ki izkazuje 24 % homologijo v primarni strukturi s CCR2. Z nedavno določitvijo prostorske strukture prvega predstavnika kemokinskih receptorjev, človeškega kemokinskega receptorja CXCR4, smo dobili možnost boljšega matričnega proteina za konstrukcijo homolognega modela CCR2, saj znaša stopnja homologije med obema receptorjema 34 % (23). Z določanjem novih prostorskih struktur z večjo stopnjo homologije postajajo modeli vse bolj natančni in uporabni za napovedovanje vezave ligandov.

## **1.6 Kemokinski sistem**

Kemotaktični citokini, poznani tudi kot kemokini, so majhni vodotopni proteini velikosti 8-10 kDa. Usmerjajo mobilizacijo in aktivacijo imunskih celic, udeleženih v vnetnem odgovoru. Sodelujejo pri mobilizaciji monocitov, limfocitov in granulocitov. Poznamo okoli 50 človeških kemokinov. Delimo jih v štiri velike skupine, glede na razlike v njihovi strukturi in funkciji: v skupine CXC, CX3C, CC in C. Njihova strukturna podobnost izhaja iz štirih cisteinov z ohranjenimi mesti v peptidni verigi, ki preko disulfidnih vezi tvorijo tipično obliko grškega ključa (17).

Med monocitne kemotaktične proteine (MCP) uvrščamo MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 in MCP-16, ki sodijo v CC-skupino kemokinov. Vsi omenjeni se vežejo na CCR2, a največjo afiniteto do receptorja izkazuje MCP-1, ki ga zato imenujemo tudi kemokinski ligand 2 (slika 1).



Slika 1 - Prostorski model monomera MCP-1 (PDB oznaka: 1DOL)

Vezava MCP-1 na CCR2 sproži aktivacijo kemoatrakcije levkocitov, kot so monociti, makrofagi, aktivirane T-celice, dendritične celice in naravne celice ubijalke. MCP-1 aktivira tudi znotrajcelično mobilizacijo kalcija, preurejanje citoskeleta, aktivacijo z mitogenom aktiviranih protein kinaz, degranulacijo, integrinsko aktivacijo, sproščanje histamina in produkcijo citokinov (17). V splošnem tako MCP-1 po vezavi na receptor sproži kemoatrakcijo in napredovanje vnetja (23).

CCR2 je član naddružine GPCR-jev. Nahaja se na površini monocitov in makrofagov in veže MCP-1, ki nastaja na mestih vnetja in okužb (23). CCR2 je izražen na membrani vrste celic, med drugim, poleg monocitov, tudi na nezrelih dendritičnih celicah, aktiviranih limfocitih T, bazofilcih ter na endotelijskih in žilnih gladkih mišičnih celicah. CCR2 poleg MCP-1 veže tudi nekatere druge citokine, njegovi ligandi so tudi MCP-2, MCP-3 in MCP-4. Veliko eksperimentalnih podatkov o interakciji med ligandom in receptorjem so tudi v primeru CCR2 pridobili s študijami spreminjanja aminokislinskega zaporedja obeh vezavnih partnerjev, tako so določili aminokislinske ostanke pomembne za interakcijo z ligandom (13, 24).

#### **1.6.1 Patofiziologija CCR2 in zdravila z delovanjem na kemokinski sistem**

Deregulacija in povečano izražanje kemokinov in njihovih receptorjev je udeleženo pri vrsti vnetno pogojenih bolezni, vključno z avtoimunimi boleznimi, boleznimi imunske pomanjkljivosti in rakom. CCR2 je tako vključen v patofiziologijo zelo raznovrstnih akutnih in kroničnih vnetnih bolezni, kot so revmatoidni artritis, ateroskleroza, astma, debelost in sladkorna bolezen tipa 2 (17). Kot terapevtska tarča je zanimiv zaradi možnosti imunomodulacije bolezni, pri katerih ima ta receptor vpliv (23). Posamezni kemokini so

prav tako vpleteni pri virusni okužbi, angiogenezi, zavrnitvi presajenih organov, ter pri kronični bolečini (13, 17, 23).

V različnih fazah kliničnih preiskav, lahko najdemo kar nekaj antagonistov CCR2. Tako je molekula BMS-741672 v drugi fazi kliničnih testiranj za zdravljenje sladkorne bolezni tipa 2. Prav tako je v drugi fazi monoklonsko protitelo MLN1202, ki bi ga ob uspešni zaključitvi kliničnega testiranja uporabljali za zdravljenje metastatskega raka. Slednje ima še eno indikacijo in sicer je prestalo že klinično testiranje druge faze za zdravljenje ateroskleroze. Molekula PF-04136309 je prav tako končala testiranja druge faze. Če bo uspešno prestala nadaljnje faze kliničnih testiranj, jo bodo uporabljali za zdravljenje osteoartritisa (17). Gledano širše na celotno skupino kemokinov sta v terapiji dve zdravili: maravirok, ki je alosterični antagonist CCR5 in ga uporabljamo za zaviranje vdora virusa HIV v tarčne celice, ter pleriksafor, ki je alosterični antagonist CXCR4 in ga v kombinaciji z granulocitne-kolonije stimulirajočim dejavnikom uporabljamo za mobilizacijo hematopoetskih matičnih celic iz kostnega mozga v periferno kri, kjer jih odvezamemo in nato avtologno transplantiramo pacientom z ne-Hodgkinovim limfomom in multiplim mielomom (25).

## 2 NAMEN DELA

V diplomski nalogi bomo z uporabo vrste metod računalniškega načrtovanja poskušali izbrati ustrezen peptidni ligand kemokinskega receptorja CCR2, ki bo predstavljal izhodišče za nadaljnje delo. Razvili bomo ustrezno metodo, ki jo bomo validirali z uporabo kontrolnih ligandov. Zaradi odsotnosti eksperimentalno določenega prostorskega modela receptorja CCR2, bomo razvili homologni model, ki ga bomo pred nadaljnjo uporabo ocenili glede ustreznosti za njegov namen z vrsto postavljenimi zahtevami. Uporabili bomo tako lokalno nameščeno kot spletno različico programske opreme, da si bomo poizkušali zagotoviti čimbolj kakovosten model. Potencialne ligande bomo pripravili pred sidranjem v model z uporabo EM in MD, tako v vakuumu, kot v solvatiranem stanju.

Homologni model bomo uporabili za sidranje potencialnih ligandov s spletnim strežniškim algoritmom, posebej specializiranim za sidranje proteinov. Sledila bo EM in MD kompleksov ligand-receptor. Z uporabo omenjenih metod se bomo izognili morebitnim strukturnim napetostim v modelu ter napetostim v kompleksu z ligandom in pridobili konformacijo obeh vezavnih partnerjev, ki je energetsko ugodnejša in morda predstavlja nativno obliko. Z uporabo kontrolnih ligandov bomo v fazi ocenjevanja energije interakcije ugotovili ustreznost celotnega postopka za zastavljen namen. Dobljenim končnim kompleksom ligand-receptor bomo izračunali energijo interakcije in na podlagi izračunanih vrednosti rangirali peptide po uporabnosti za nadaljnje delo. Med analiziranimi peptidi bomo izbrali, glede na dobljene podatke, peptid z najugodnejšo energijo interakcije.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 Računalniška in programska oprema

Veliko število akademsko kot tudi komercialno razvitih računalniških metod za molekulsko simulacijo je na voljo za brezplačno uporabo v akademskih krogih. Nekatere takšne metode in z njim povezano programsko opremo smo uporabljali tudi mi. Izbrali smo programsko opremo, ki je odprtokodna in multiplatformska, kar omogoča lažje sodelovanje med znanstvenimi ekipami, ki uporabljajo različne operacijske sisteme. V vseh primerih smo uporabili stabilne verzije teh programov. Prednost nekaterih programov, ki smo jih uporabljali, je tudi v možnosti učinkovite paralelizacije na več procesorjev oziroma procesorskih jeder, kar bistveno skrajša računski čas, potreben za izračun zahtevnih računskih nalog.

Programe smo, v odvisnosti od računske zahtevnosti, ki je pogojena z velikostjo sistema ter parametri simulacije, ki jih želimo simulirati, poganjali bodisi na prenosnem računalniku, bodisi na zmogljivejšem fakultetnem računalniku za simulacije, ki se nahaja v kleti FFA. Časovni obseg izračuna posameznega primera je v odvisnosti od velikosti sistema ter zahtev parametrov simulacije trajal od nekaj minut do nekaj dni.

Zaradi možnosti učinkovite sklopitve delovnega procesa smo uporabljali distribucije odprtokodnega operacijskega sistema, osnovanega na Linux jedru, kar nam je omogočilo uporabo istih programov na obeh računalnikih ter olajšalo raziskovalni proces. Na prenosnem računalniku smo uporabljali Ubuntu 13.04, na fakultetnem računalniku pa smo uporabili Scientific Linux 6.3.

Poleg lokalno nameščene programske opreme smo pri delu uporabljali tudi spletne podatkovne baze ter spletne algoritme za izračun določenih nalog. Tako smo uporabljali podatkovno bazo prostorskih struktur, določenih z rentgensko kristalografsko difrakcijo in NMR, imenovano PDB, ter spletna algoritma BLAST in ZDOCK.



V preglednici I navajamo strojno opremo obeh uporabljenih računalnikov:

**Preglednica I -Specifikaciji fakultetnega in prenosnega računalnika**

	Fakultetni računalnik	Prenosni računalnik
CPU	4 x 16 jedrni, 2 GHz	1 x 2 jedrni, 2.2 GHz
RAM	32 GB	2 GB
Grafična kartica	/	Geforce 4 8600GTM, 256 MB
Disk	500 GB SSD	500 GB

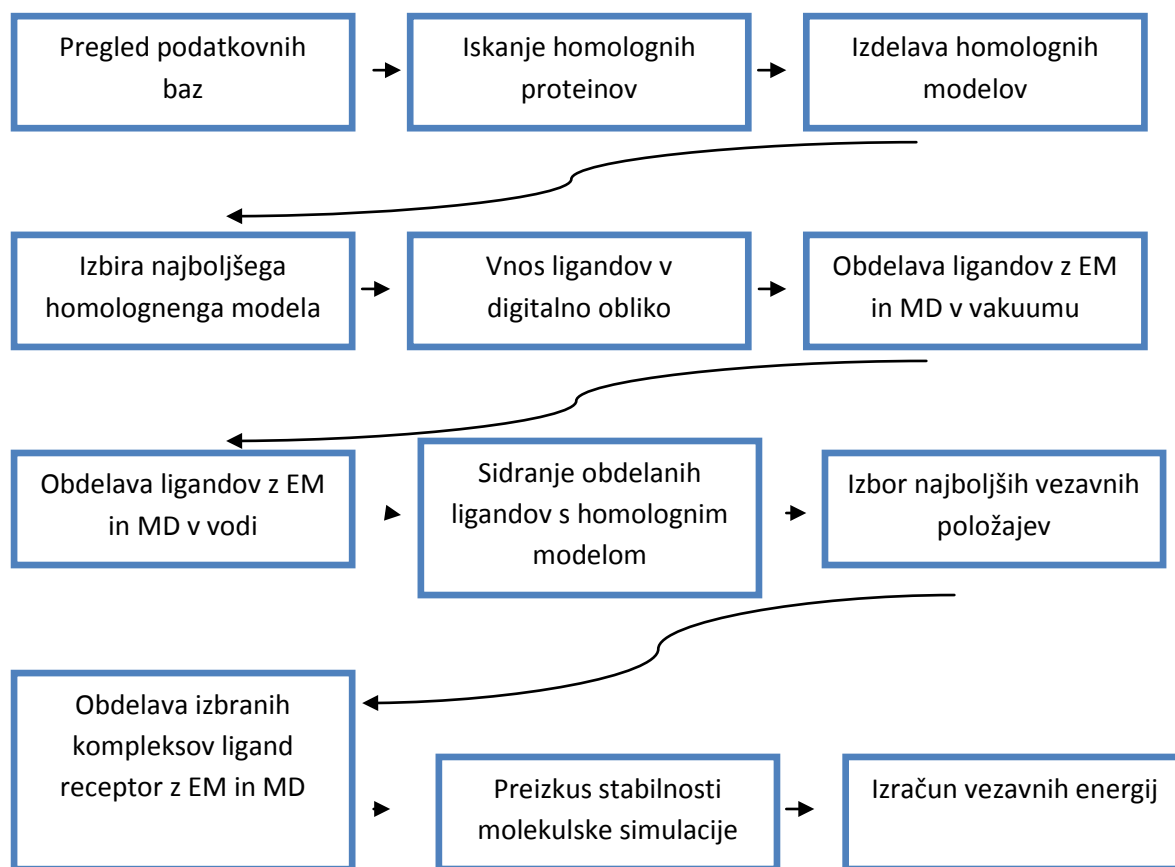
Razlika v strojni opremi med obema uporabljenima računalnikoma je izrazita. V skladu z razlikami smo naloge ustrezno razdeljevali med oba računalnika. Preprostejše naloge, kot so vizualizacija in obdelava rezultatov, priprava na molekulske simulacije in simulacije samih peptidov, smo izvajali na prenosnem računalniku. Zahtevnejše naloge, kot so simulacije kompleksov peptid-receptor, pa smo dodelili zmogljivejšemu fakultetnemu računalniku.

#### Programska oprema

Vnos peptidnih ligandov:	Avogardo (26),
Priprava na simulacije ter analiza rezultatov:	VMD (27), Gedit (28),
Izvajanje simulacij:	NAMD (29),
Vizualizacija (makro)molekul:	Pymol (30), VMD,
Programi za analizo numeričnih podatkov:	Libre Office Calc (31), Microsoft Office Excel (32),
Uporabljene podatkovne baze:	Protein Data Bank (33), število deponiranih struktur: 68323, 11.1.2014; GPCR Network

Na prenosnem računalniku smo čas izračunov skrajšali z uporabo tehnologije CUDA, ki omogoča uporabo aritmetičnih enot v modernih grafičnih karticah za občutno pohitritev računsko zahtevnih operacij.

Za lažjo predstavo celotnega raziskovalnega procesa shematično predstavljamo posamezne faze (slika 2):



Slika 2 - Shematično predstavljen celoten raziskovalen proces

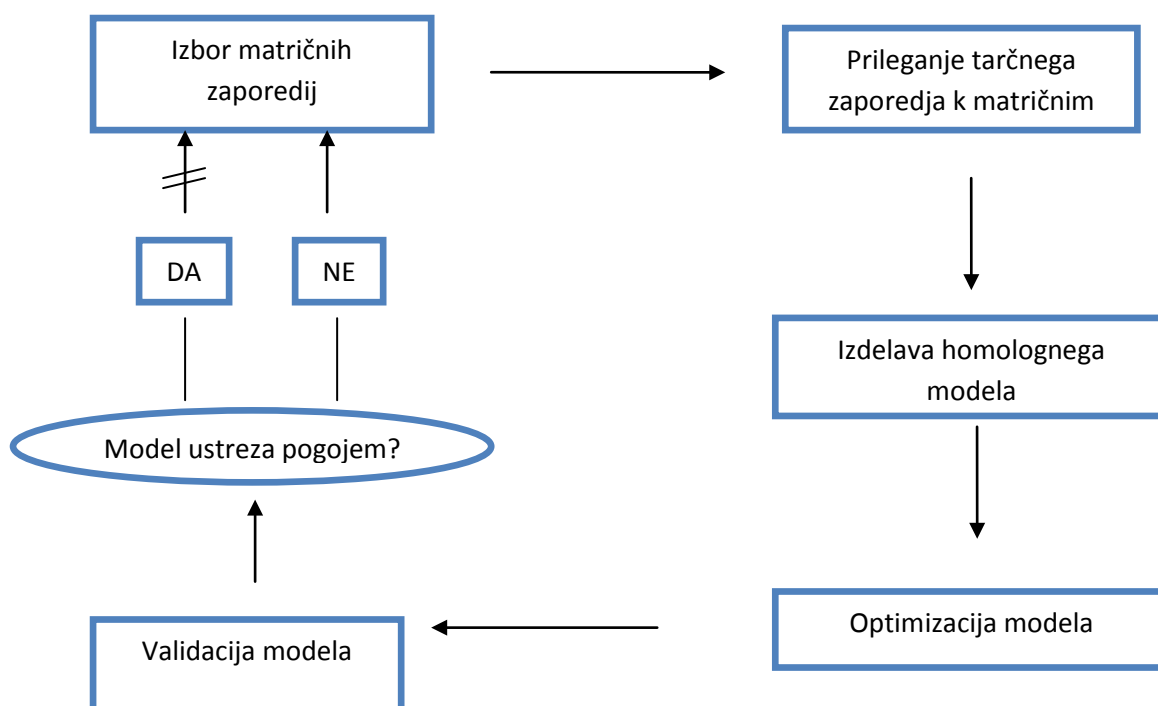
Na podlagi izračunanih vezavnih energij smo potencialne peptidne ligande primerjali s kontrolnima ligandoma, ki sta predstavljala boljši in slabši vezalec z eksperimentalno določeno vezavno konstanto. Na podlagi dobljenih rezultatov smo nato predlagali izhodiščni peptid za nadaljnje raziskovanje.

V nadaljevanju besedila (pod poglavjema »Materiali in metode« ter »Rezultati in razprava«) so posamezne faze natančneje opredeljene.

### 3.2 Homologno modeliranje receptorja CCR2

Homologno modeliranje receptorja CCR2 smo izvajali po uveljavljenem cikličnem načinu, pri katerem smo zavrnili modele, ki niso ustrezali vnaprej postavljenim kriterijem (glej

3.2.3). Proces smo nadaljevali tako dolgo, da smo pridobili ustrezen kakovosten model. Shematsko je raziskovalni načrt predstavljen na sliki 3:



Slika 3 - Shematično predstavljen raziskovalni načrt homolognega modeliranja receptorja CCR2, prirejeno po (7)

Z uporabo algoritma BLAST smo določili dva proteina, ki imata eksperimentalno določeno prostorsko strukturo in sta receptorju CCR2 najbolj podobna po zaporedju aminokislin (34).

### 3.2.1 Uporaba algoritma BLAST za iskanje proteinov z največjo homologijo aminokislinskega zaporedja

Algoritem BLAST uporabljamo za iskanje lokalnih podobnosti v zaporedjih aminokislin ali nukleotidov. Uporabljali smo strežniško različico algoritma BLAST do katere smo dostopali s spletne strani NCBI (slika 4). V spletnem uporabniškem vmesniku smo nastavili podatkovno bazo PDB ter izbrali algoritem proteinsko-proteinski BLAST algoritem, kot iskalno zahtevo vnesli aminokislinsko zaporedje CCR2, ostale parametre pa smo pustili privzete

Parametri algoritma BLAST

Uporabljena podatkovna baza:

Protein Data Bank

Algoritem:

blastp (proteinsko-proteinski BLAST)

Maksimalno število vrnjenih zaporedij:	100
Dolžina semena, ki sproži prileganje:	3
Cenilna funkcija:	BLOSUM62

Slika 4 - Uporabniški vmesnik strežniškega algoritma BLAST

Z razvrstitvijo, ki nam jo je podal BLAST, smo se glede na podane parametre strinjali in izbrali prva dva zadetka s seznama za izdelavo homolognega modela (glej preglednico VI).

### 3.2.2 Izdelava homolognega modela z lokalno in strežniško različico programa Modeller 9.11

Kot osnovi za izdelavo homolognega modela receptorja CCR2 smo glede na rezultate BLAST-a izbrali prostorski strukturi receptorjev CXCR4 ter CXCR1 (slika 5), pridobljeni iz podatkovne baze PDB, z oznakama 3ODU in 2LNL. Resolucija prostorskega modela 3ODU, pridobljenega z rentgensko kristalografsko difrakcijo, je 2.5 Å. Model 2LNL pa je bil pridobljen z uporabo metode NMR v trdni fazi. V PDB je deponiranih 10 konformerov.

**Slika 5 - Prostorska modela matričnih proteinov za konstrukcijo homolognega modela CCR2; 3ODU-model CXCR4, 2LNL-model CXCR1, (prirejeno po slikah iz PDB)**

Pri izdelavi homolognega modela smo uporabili tako lokalno nameščeno kopijo programa za izdelavo homolognih modelov Modeller 9.11, kot tudi strežniško različico omenjenega programa imenovano Modweb.

Za izdelavo homolognih modelov na lokalni različici smo uporabljali programu priloženi skripti compare.py in get-model.py, ki sta nam nekoliko olajšali delovni proces. Delo smo pričeli z uporabo skipte compare.py, ki zahteva vnos uporabljenega zaporedja v datotečni obliki .pir. Ustrezno datotečno obliko zaporedja smo pridobili na spletni strani NCBI. Skripta nato iz vnesenih podatkov ustvari poravnavo med matričnim in ostalimi zaporedji in rezultat zapiše v datoteko alignment.ali. To datoteko v naslednjem koraku uporabi skripta get-model.py, ki izdelava homologne modele.

Na lokalni različici smo generirali 22 homolognih modelov z uporabo različnih kombinacij bodisi posameznih verig, bodisi celotnih struktur obeh homolognih proteinov izbranih za izdelavo modela (3ODU in 2LNL).

V posameznem prostorskem modelu proteina, pridobljenem v bazi PDB ter izdelanim z rentgensko kristalografsko difrakcijo, lahko najdemo več podobnih verig istih proteinov. Razlog omenjenega podvajanja je v samem kristalizacijskem postopku, kjer pri lokalnem prerazporejanju v osnovno celico kristala nastane omenjen pojav. Omenjeno lahko opazimo v modelu 3ODU, ki je sestavljen iz verig A in B. Tako smo izdelali 17 homolognih modelov z uporabo A-verige 3ODU in A-verige 2LNL ter B-verige 3ODUB.

Dodatno smo izdelali še dva modela z uporabo B-verige 3ODUB in A-verige 2LNL ter dva modela z uporabo A-verig 3ODU in 2LNL.

Primer vnosa aminokislinskega zaporedja matričnih proteinov in ciljnega proteina za izračun z metodo Modweb:

[MWBEG]

[MWOPT] EMAIL : primer@primer.com

[MWOPT] RUNNAME : CCR2-1361301918-03-26173

[MWOPT] HITSMODE : 1221

[MWOPT] SELECTION : MPQS LONGEST\_DOPE DOPE

[MWOPT] MODBASE : ON

[MWOPT] MASTERRUN :

[MWOPT] SEQUENCE :

>3ODU:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

```
DYKDDDDAGAPEGISIIYTS DNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREANANFNKIF
LPTIYSIIIFLTGIVGNGLVILVMGYQKKLRSM TDKYRLHLSVADLLFVIT
LPFWAVDAVANWYFGNFLCKAVHVIYTVNLYSSVWILAFISLDRYLAIVH
ATNSQRPRKLLAEKVYVGVWIPALLLTI PDFIFANVSEADDRYICDRFY
PNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVILSCYCI IISKLSHSGSNIFEMLRID
EGLRLKIYKDTEGYTIGI GHLTKSPSLNAAKSELDKAIGRNTNGVITK
DEAEKLFNQDVDAAVRGILRNAKLKPVYDSLDAVRRALINMVFQMGETG
VAGFTNSLRMLQQKRWDEAAVNLA KSRWYNQTPNRAKRVITTFRTGTWDA
YGSKGHQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEI IKQGCEF
ENTVHKWISITEALAFFHCCLNPI LYAFLGAKFKTSAQHALTSGRPLEVL FQ
```

>3ODU:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE

```
DYKDDDDAGAPEGISIIYTS DNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREANANFNKIF
LPTIYSIIIFLTGIVGNGLVILVMGYQKKLRSM TDKYRLHLSVADLLFVIT
LPFWAVDAVANWYFGNFLCKAVHVIYTVNLYSSVWILAFISLDRYLAIVH
ATNSQRPRKLLAEKVYVGVWIPALLLTI PDFIFANVSEADDRYICDRFY
PNDLWVVVFQFQHIMVGLILPGIVILSCYCI IISKLSHSGSNIFEMLRID
EGLRLKIYKDTEGYTIGI GHLTKSPSLNAAKSELDKAIGRNTNGVITK
DEAEKLFNQDVDAAVRGILRNAKLKPVYDSLDAVRRALINMVFQMGETG
VAGFTNSLRMLQQKRWDEAAVNLA KSRWYNQTPNRAKRVITTFRTGTWDA
YGSKGHQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEI IKQGCEF
ENTVHKWISITEALAFFHCCLNPI LYAFLGAKFKTSAQHALTSGRPLEVL FQ
```

>gi|1168965|sp|P41597.1|CCR2\_HUMAN RecName: Full=C-C chemokine receptor type 2;  
Short=C-C CKR-2; Short=CC-CKR-2; Short=CCR-2; Short=CCR2; AltName: Full=Monocyte  
chemoattractant protein 1 receptor; Short=MCP-1-R; AltName: CD\_antigen=CD192

```
MLSTSRSRFIRNTNESGEEV TFFDYDYGAPCHKFDVKQIGAQLLPPLYS
LVFIFGFVGNMLVVLILINCKK LKCLTDIYLLNLAISD LFLITLPLWAH
SAANEWVFGNAMCKLFTGLYHIGYFGG IFFIILLTIDRYLAIVHAVFALK
ARTVTFGVVTSVITLVAVFASVPGI IFTKQKEDSVYVCGPYFPRGWNN
FHTIMRNILGLVLP LLIMVICYSGILK TLLRCRNEKKRHRV RVIIFTIMI
```

VYFLFWTPYNIIVILLNTFQEFFGLSNCESTSQLDQATQVTEETLGMTHCCI  
NPIIYAFVGEKFRSLFHIALGCRIAPLQKPVCGGPGVVRPGKNVKVTTQGLLDGRGKGSIGRAPEASLQDKEGA

[MWEND]

### 3.2.3 Ocenjevanje homolognih modelov

Po vizualnem pregledu modelov smo ugotovili, da so modeli, ki vsebujejo B-verigo, nekoliko slabši kot tisti, ki vsebujejo zgolj A-verigo. Homologni modeli, ki smo jih generirali na lokalni različici programa Modeller, niso zadovoljevali vseh zelenih kriterijev (glej spodaj), zato smo nadaljevali z uporabo strežniške različice.

Izdelali smo modele z uporabo dveh kombinacij, in sicer uporabili smo A in B-verigo 3ODU ter kombinacijo A-verige 3ODU in A-verige 2LNL. V obeh primerih smo dobili zadovoljiv model glede na naše kriterije. Upoštevač uporabljene kriterije je bil nekoliko boljši model, izdelan z uporabo A- in B-verige 3ODU, zato smo za nadaljnje delo uporabili slednjega.

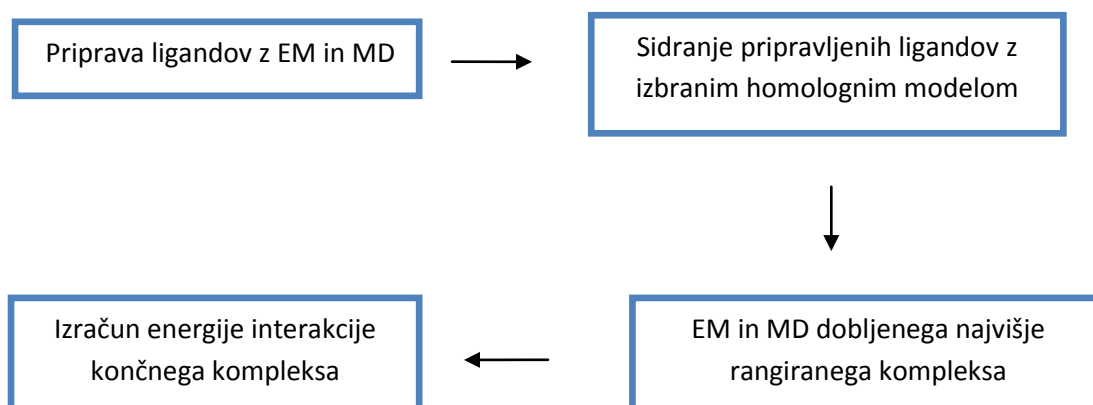
Pri vizualni oceni smo uporabljali kot vodilo usmerjenost stranskih verig aminokislinskih ostankov, ki so se izkazali kot ključni za vezavo sinteznih nizkomolekularnih antagonistov CCR2. Stranske verige aminokislinskih ostankov, pomembne za vezavo naj bi bile usmerjene v notranjost vezavne votline. Poleg tega smo opazovali, da so bile  $\alpha$ -vijačnice neprekinjene, da ni bilo prisotnih nenaravnih kotov v peptidni verigi ter, da je bila vezavna votlina receptorja čimbolj sproščena in čimvečja.

Poleg vizualne ocene smo za analizo ustreznosti homolognega modela uporabljali tudi Ramachandranov diagram. Ramachandranov diagram prikazuje območje vrednosti, ki jih zavzemata dihedralna kota  $\phi$  in  $\psi$ . Dihedralni kot je merilo relativnih položajev štirih medsebojno povezanih atomov. V skupini štirih atomov, ki obdajajo peptidno vez lahko definiramo tri dihedralne kote in sicer  $\omega$ ,  $\phi$  in  $\psi$ . Ker ima peptidna vez delno naravo dvojne vezi, je kot  $\omega$  običajno  $180^\circ$ , kar ustreza trans konfiguraciji peptidne vezi. Ostali dve vezi, ki obdajata peptidno vez, torej kota  $\phi$  in  $\psi$  pa lahko zavzameta več različnih vrednosti. Omejuje ju sterično oviranje v peptidu. Tako obstajajo omejene dovoljene kombinacije obeh kotov. Ta območja lahko predstavimo z uporabo Ramachandranovega diagrama, ki prikazuje, kakšne kombinacije obeh kotov zavzemajo posamezne aminokisliline. Opazna je grupacija po ugodnih kombinacijah kotov, ki jih opazimo v znanih elementih sekundarne strukture proteinov, kot sta  $\alpha$ -vijačnica ter  $\beta$ -ploskev.

Z vizualnim pregledom, upoštevajoč podane zahteve, ter z uporabo Ramachandranovega diagrama smo ugotovili, da izbran model zadošča vsem postavljenim kriterijem in je primeren za nadaljnje delo. Podrobneje je proces ugotavljanja ustreznosti opisan v poglavju »Rezultati in razprava«.

### 3.3 Proces vrednotenja energij interakcije peptidnih ligandov z uporabo metod energijske minimizacije in molekulske dinamike

Po izboru ustreznega homolognega modela smo delo nadaljevali z vnosom ter obdelavo potencialnih peptidnih ligandov z EM in MD. Obdelane peptide smo nato sidrali s spletnim algoritmom za sidranje proteinov v homologni model receptorja CCR2. Izbran najboljši kompleks med peptidom in receptorjem smo nato ponovno obdelali z EM in MD. V zadnjem koraku smo nato računsko ocenili energije interakcije končnih kompleksov. Delo smo opravljali po raziskovalnem načrtu, ki ga povezema slika 6.



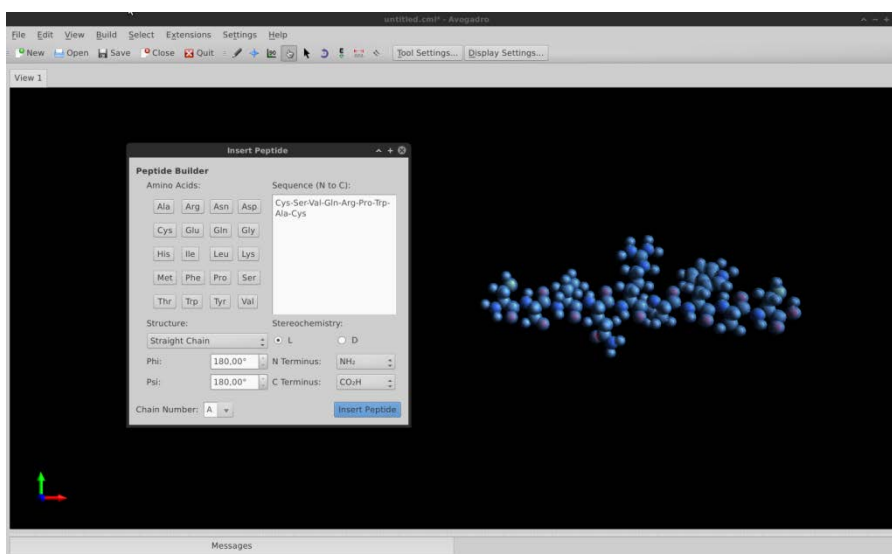
Slika 6 - Shematična predstavitev procesa sidranja potencialnih peptidnih ligandov v receptor CCR2



### 3.3.1 Izris peptidov v programu Avogadro

Aminokislinska zaporedja potencialnih peptidnih ligandov receptorja so predhodno izolirali iz bakteriofagnih peptidnopredstavitvenih knjižnic z afinitetno selekcijo proti različnim nevtralizacijskim protitelesom, usmerjenim proti endogenemu ligandu CCR2, kemokinu MCP-1 (35). Omenjena zaporedja potencialnih peptidnih ligandov smo uporabili kot izhodišče za izdelavo diplomske naloge.

Peptide smo vnesli v digitalno obliko s programom Avogadro 1.0.3 (26), ki je program z vrsto različnih funkcij in ga odlikuje preprostost uporabe preko grafičnega uporabniškega vmesnika (slika 7). Med drugim vsebuje tudi priročen modul za gradnjo peptidov, »Peptide builder«. Ta omogoča hitro in učinkovito gradnjo peptidov, ki so že ustrezno parametrizirani za nadaljnje delo. Aminokislinsko zaporedje v program vnašamo od N- do C-terminalnega konca, kot zaključke peptidov pa uporabljamo oznaki -NH<sub>2</sub> na N-terminalnem koncu in -COOH na C-terminalnem koncu. Peptide smo gradili iz L-stereoizomerov  $\alpha$ -aminokislin. Avogadro peptide izriše v nenaravni iztegnjeni konformaciji, pri kateri sta kota  $\phi$  in  $\psi$  180 stopinj. Ta izris predstavlja osnovo za začetek dela.



Slika 7 - Uporabniški vmesnik programa Avogadro s prikazanim modulom za izris peptidov

Zaradi boljše preglednosti smo posameznim potencialnim peptidnim ligandom dodelili kratice (preglednica II), s katerim bodo označeni v nadaljnjih preglednicah.

Preglednica II - kratice potencialnih peptidnih ligandov

Kratice	Peptid
<b>P1</b>	AMSNDHMKNK
<b>P2</b>	<u>C</u> SVQRPW <u>A</u> C
<b>P3</b>	GQPYKYDIRVSK
<b>P4</b>	NHTAHHSVDSRT
<b>P5</b>	PYKYDIRVSK
<b>P6</b>	STPQSVDHLDKF
<b>K1</b>	YNFTNRKISVQR
<b>K2</b>	NRK <u>C</u> SVQRLAS <u>C</u> R

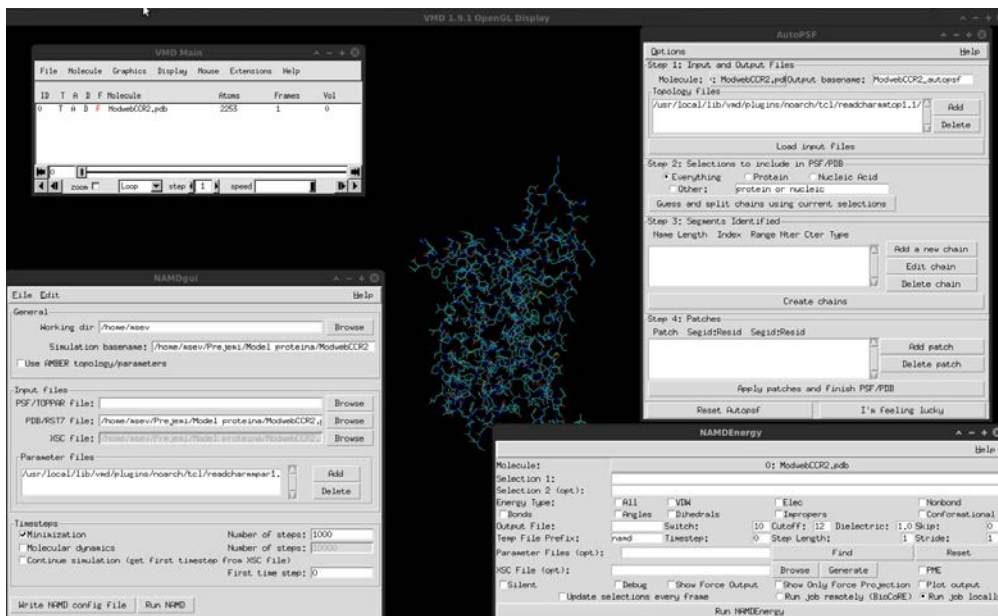
Opomba: podčrtana aminokislinska ostanka sta povezana z disulfidno vezjo, peptid je ciklični

### 3.3.2 Priprava peptidov v programu VMD

Nadaljnjo obdelavo peptidov (po vnosu v digitalno obliko) kot tudi makromolekulskih kompleksov smo izvajali v programu VMD. Slednji omogoča hitro in preprosto nadaljnjo pripravo že digitaliziranih oblik potencialnih ligandov preko grafičnega uporabniškega vmesnika (slika 8) na postopek minimizacije in dinamike s programom NAMD, ki je program za uporabo v ukazni vrstici. Uporabljali smo različico VMD-1.9.1 (27, 36). Tekom priprave ligandov smo njihove digitalizirane oblike najprej uvozili v VMD, nato smo uporabili modul Automatic PSF Builder, ki ustvari ustrezno konfigurirano datoteko .psf, ki jo v nadaljevanju uporabi NAMD. Program nato uvozi molekulo, jo ustrezno obdelava in doda specificirane elemente ter ustvari datoteko formata .psf. V nadaljevanju uporabimo modul NAMD Graphical interface, ki nam ustvari parametersko datoteko za NAMD, torej datoteko s končnico .namd, ki vsebuje vse nadzorne parametre za vodenje izvajanja minimizacije in dinamike sistema. V modulu NAMD Graphical interface vnesemo pot do datotek, potrebnih za izračun, ter nastavimo število korakov minimizacije ter dinamike. Nato generiramo datoteko .namd, to pa nato odpremo s tekstovnim pregledovalnikom in spremenimo temperaturo in parametra dcdfreq ter xstfreq. Parametra dcdfreq in xstfreq omogočata izbor števila shranjenih položajev in konformacij med simulacijo in s tem vplivata na velikost samih datotek. Ustrezna velikost je pomembna zaradi možnosti analize rezultatov na prenosnem računalniku.

Kot rezultat NAMD-simulacije smo nato v programu VMD pregledovali in nadalje analizirali datoteki s končnicama .dcd in .psf. Iz teh datotek smo nato tudi lahko izvozili

določene položaje in konformacije peptidov v kompleksu s CCR2 v datoteko .pdb za nadaljnje delo in obdelavo.



Slika 8 - Uporabniški vmesnik programa VMD s prikazanimi nekaterimi uporabljenimi moduli

Za analizo rezultatov smo v programu VMD uporabljali sledeče programske module:

- NAMD Energy – za izračun posameznih energijskih prispevkov ter skupne energije interakcije med sidranimi ligandi in homolognim modelom CCR2,
- NAMD Plot – za vizualizacijo velikosti posameznih energijskih prispevkov,
- Ramachandran Plot – za izris Ramachandranovega diagrama pri pregledovanju ustreznosti homolognih modelov CCR2,
- RMSD Trajectory Tool – za izris diagrama RMSD pri pregledovanju ustreznosti simulacije molekulske dinamike (torej, da je bila simulacija stabilna).

### 3.3.3 Energijska minimizacija in molekulska dinamika v vakuumu

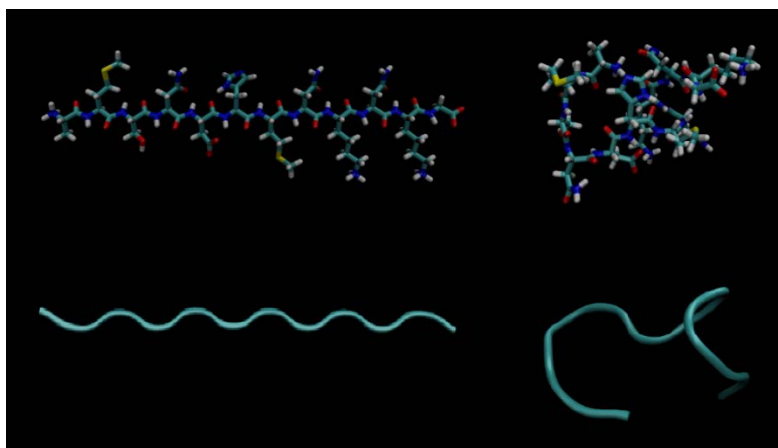
Za pripravo smo uporabljali modula programa VMD, imenovana Automatic PSF Builder in NAMD Graphical interface, po protokolu, opisanem zgoraj. V modulu Automatic PSF Builder smo pripravili ligand brez protionov ter solvatnega ovoja.

Zaradi majhnosti modelnega sistema smo lahko omenjene izračune poganjali na prenosnem računalniku.

Velikost parametrov simulacije smo določali glede na to, ali je bilo v simulaciji prisotno gibanje molekule, ki je nakazovalo preureditev v stabilno konformacijo. Ponovno nadaljevanje simulacije tako ob dosegu stabilnega stanja ni prikazalo znatnih sprememb konformacije molekule, kar nam je dalo indic, da je ustrezna stabilna konformacija dosežena. Pri minimizaciji in MD peptidov iz začetne iztegnjene konformacije v zvito (slika 9) je bilo seveda opaziti znatnejše spremembe konformacije peptida kot pri sledeči EM in MD peptida v vodi.

#### Začetno stanje

#### Končno stanje



Slika 9 - Prikaz obdelave začetnih struktur peptidov z energijsko minimizacijo v vakuumu

Uporabljali smo parametre simulacije testiranih in kontrolnih peptidov v vakuumu (preglednica III).

Preglednica III - Parametri energijske minimizacije in dinamike ligandov v vakuumu

Ligand	Temperatura (K)	Število stopenj EM (fs)	Število stopenj MD (fs)
<b>P1</b>	310	1000	10000
<b>P2</b>	310	1000	10000
<b>P3</b>	310	10000	50000
<b>P4</b>	310	50000	100000
<b>P5</b>	310	1000	10000
<b>P6</b>	310	10000	50000
<b>K1</b>	310	10000	50000
<b>K2</b>	360	10000	200000

### 3.3.4 Energijska minimizacija in molekulska dinamika peptidov v vodi

Tudi v tem primeru smo uporabljali modula programa VMD, imenovana Automatic PSF Builder in NAMD Graphical interface, po protokolu, opisanem zgoraj. Razlika med obema protokoloma pa je bila v tem, da smo v modulu Automatic PSF Builder pripravili peptide s protioni in solvatnim ovojem.

EM in MD s solvatnim ovojem smo izvajali v dveh fazah raziskovalnega procesa. V prvi fazi smo jo izvajali po EM in MD peptidov v vakuumu. V tej fazi smo uporabili peptid, ki smo ga pred tem obdelali z EM in MD v vakuumu po opisanem protokolu. Tudi v tem primeru smo lahko zaradi manjšega modelnega sistema izračune izvajali na prenosnem računalniku, vendar so izračuni vseeno trajali dlje kot v vakuumu, saj je bilo v tem primeru prisotno še znatno število molekul topila. Po izvedbi EM in MD je bil proces priprave peptidov zaključen.

### 3.3.5 Dinamika preiskovanih in kontrolnih peptidov v vodi

V tem primeru je bil izračun prav tako mogoč na prenosnem računalniku zaradi ustrezne majhnosti sistema. Pri izračunu smo uporabili parametre navedene v preglednici IV.

Preglednica IV - Parametri energijske minimizacije in dinamike ligandov v vodi

Ligand	Temperatura (K)	Število stopenj EM (fs)	Število stopenj MD (fs)
<b>P1</b>	310	10000	50000
<b>P2</b>	310	10000	50000
<b>P3</b>	310	10000	50000
<b>P4</b>	310	10000	50000
<b>P5</b>	310	10000	50000
<b>P6</b>	310	10000	50000
<b>K1</b>	310	10000	50000
<b>K2</b>	310	10000	50000

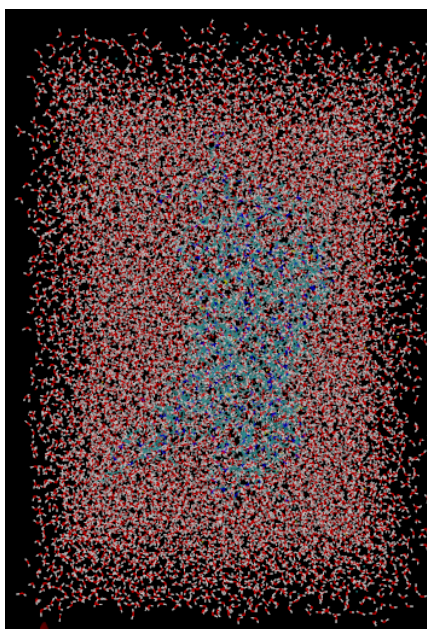
### 3.3.6 Dinamika kompleksa ligand-receptor v vodi

Omenjen modelni sistem je bil prevelik in s tem prezahteven za izračun na prenosnem računalniku, zato smo izračune izvajali na fakultetnem računalniku (slika 10). Število

stopenj EM in MD je bilo večje, podobno tudi sam modelni sistem, zato so izračuni trajali dalj časa, čeprav smo uporabljali zmogljivejši računalnik. Uporabili smo parametre iz preglednice V.

Preglednica V - Parametri energijske minimizacije in dinamike kompleksov ligand-receptor v vodi

Ligand	Temperatura (K)	Število stopenj EM (fs)	Število stopenj MD (fs)
<b>P1</b>	310	50000	4000000
<b>P2</b>	310	50000	4000000
<b>P3</b>	310	50000	4000000
<b>P4</b>	310	50000	4000000
<b>P5</b>	310	50000	4000000
<b>P6</b>	310	50000	4000000
<b>K1</b>	310	50000	4000000
<b>K2</b>	310	50000	4000000



Slika 10 - Solvatiran kompleks ligand-receptor pripravljen na simulacijo

### 3.3.7 Izvajanje simulacij molekulske dinamike s programom NAMD

Za poganjanje simulacij EM in MD smo uporabljali program NAMD\_2.9b3. Program omogoča učinkovito paralelizacijo na več sto procesorjev, hkrati pa tudi izračune na enem samem procesorju za uporabo na manj zmogljivih računalnikih. Ta lastnost nam je omogočila uporabo istega programa na obeh računalnikih. NAMD omogoča izbiro ustrezno parametriziranih polj sil in sicer sta na voljo AMBER in CHARMM. Mi smo uporabili CHARMM, saj se pogosteje uporablja v simulacijah MD proteinov, AMBER pa se pogosteje uporablja pri simulacijah nukleinskih kislin. Parametrizacija polj sil je izvedena z uporabo eksperimentalnih podatkov iz metod, kot sta IR in Ramanska spektroskopija. Razpon velikosti sistemov, katerih simulacijo program omogoča, sega vse od nekaj molekulskih sistemov do sistemov z več 100.000 molekul.

Funkcija potencialne energije v programu NAMD je sestavljena iz naslednjih prispevkov (9):

- vezni prispevek
- kotni prispevek
- dihedralni prispevek
- Van der Waalsov (VdW) prispevek
- elektrostatski prispevek

Potencialna funkcija je v programu NAMD opisana z enačbo 1.

NAMD je program, ki ga uporabljamo izključno v ukazni vrstici, saj zanj ni razvitega uporabniškega vmesnika. V pomoč nam je zgolj program VMD, ki omogoča začetno pripravo sistema in parametrske datoteke. Ukaz za zagon programa vključuje točno navedeno pot do datotek, ki jih NAMD potrebuje za izračun, poleg tega pa ponuja tudi možnost izbire, na koliko procesorskih jedrih želimo poganjati simulacijo. Z možnostjo uporabe večjega števila procesorskih jeder se računski čas simulacije skrajša. Parametri simulacij so navedeni v preglednicah III, IV in V.

Primer ukaza za zagon NAMD uporabljenega na prenosnem računalniku (izbrani sta dve procesorski jedri):

```
namd2 +p2 potdodatotek/peptid.psf potdodatotek/peptid.namd
```

Primer ukaza za zagon NAMD na fakultetnem računalniku (izbranih je 32 procesorskih jeder):

```
namd2 +p32 potdodatok/peptid.psf potdodatok/peptid.namd
```

Parametri, ki smo jih prilagajali v simulaciji so:

- dcdfreq in xstfreq,
- temperatura,
- število korakov EM in MD.

Za ustrezen začetek izračuna smo morali navesti pot do obeh datotek potrebnih za izračun (datoteki s končnicama .pdb in .psf). Kot primer uporabljenih parametrov izračuna navajamo parametrsko datoteko simulacije najvišje uvrščenega liganda. Prilagajani parametri so označeni z rdečo barvo:

```
# NAMD Config file - autogenerated by NAMDgui plugin
# Author: Jan Saam, saam@charite.de

# input
coordinates          AMSNDHMKNK_autopsf.pdb
structure           AMSNDHMKNK_autopsf.psf
parameters
/usr/local/lib/vmd/plugins/noarch/tcl/readcharmmpar1.2/par_all27_prot_lip
id_na.inp
paratypecharmm      on

# output
set output          AMSNDHMKNK_autopsf
outputname          $output
dcdfile             ${output}.dcd
xstFile             ${output}.xst
dcdfreq            4000
xstFreq           4000

binaryoutput       no
binaryrestart       no
outputEnergies     100
restartfreq        1000

fixedAtoms         off

# Basic dynamics
exclude            scaled1-4
1-4scaling         1
COMmotion         no
dielectric         1.0

# Simulation space partitioning
switching          on
switchdist        9
cutoff            10
```



```

pairlistdist          12

# Multiple timestepping
firsttimestep        0
timestep             1
stepspercycle        20
nonbondedFreq        2
fullElectFrequency   4

# Temperature control

set temperature      310
temperature           $temperature; # initial temperature

# Scripting

minimize             50000
reinitvels            $temperature
run                  4000000

```

### 3.3.8 Sidranje ligandov v receptor s programom ZDOCK Server

Uporabljali smo strežniško različico programa ZDOCK, ki je program specializiran za medsebojno sidranje proteinov (slika 11). Le-ta omogoča vodenje liganda v aktivno mesto z izborom preferenčnih in nepreferenčnih aminokislinskih ostankov za vezavo liganda v vezavno mesto. Izboru aminokislinskih ostankov se lahko tudi izognemo, če niso znani (37).

Algoritem za sidranje predvidi najbolj ugoden položaj liganda v kompleksu z receptorjem glede na dane sterične in energijske pogoje.

Glede na relativno znatno razliko v velikosti med našimi preiskovanimi peptidi ter endogenim ligandom receptorja CCR2, smo predpostavili, da uporabljeni potencialni peptidni ligandi vstopajo v interakcije z aminokisljinami, ki so pomembne za vezavo malih molekul. Vezavno mesto za male molekule se namreč nahaja globlje v samem receptorju, endogeni ligand pa se veže bolj na površino receptorja. Literaturni podatki navajajo aminokislinske ostanke, ključne za vezavo antagonistov CCR2. Ti ostanke se ponavljajo pri vrsti člankov, zato smo jih uporabili kot vodilo pri sidranju ligandov (13, 17, 23).

Aminokislinski ostanke receptorja, ki smo jih uporabili kot preferenčne za vezavo so: Y49, S101, T117, G118, Y120, H121, Q288, E291.



Slika 11 - Spletni uporabniški vmesnik algoritma za sidranje proteinov Zdock

Kot rezultat sidranja smo dobili izbor petih najboljših položajev in vezavnih konformacij liganda v kompleksu z receptorjem ter računalniški izpis sidranja s sidranimi položaji liganda, rangiranimi glede na cenilno funkcijo, ter ostalimi pripadajočimi parametri.

Posamezne položaje in vezavne konformacije smo ponovno rangirali s kombinacijo vizualnega pregleda ter uporabo programske cenilne funkcije imenovane Zscore. Uporaba vizualnega pregleda nam je dala možnost izločitve položajev in konformacij, ki so se zdele bistveno manj verjetne. Rezultat cenilne funkcije je dobro koreliral z izbranim položajem glede na vizualni pregled.

### 3.3.9 Izračun energij interakcije

Energije interakcije med ligandom in receptorjem smo določili z uporabo modula NAMD-energy v programu VMD. Vmesnik uporablja NAMD za izračun vezavnih energij.

Določevali smo sledeče energijske prispevke:

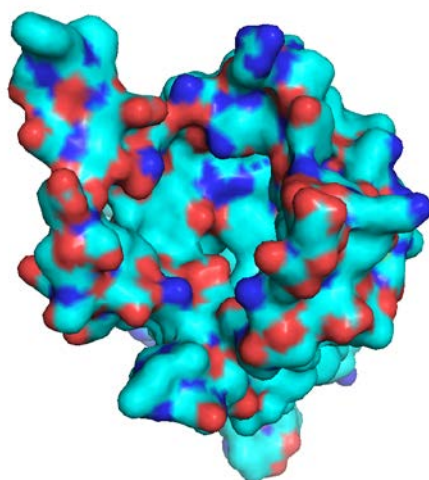
- VdW energija,
- elektrostatska energija in
- skupna energija.

### 3.3.10 Vizualizacija molekul

Vizualizacija rezultatov je pomemben del interpretacije rezultatov, kjer moramo poleg natančnih opravil kot je merjenje razdalj med interagirajočimi atomi, pogosto uporabljati tudi nekaj intuicije, da lahko predvidimo, ali so določeni rezultati smiselni.

Za vizualizacijo rezultatov sidranja ter molekularnih simulacij smo uporabljali programa Pymol-1.5.0.1 in VMD-1.9.1. Poleg osnovnih funkcij programov, torej ogledovanja molekul, smo opravljali tudi meritve razdalj med atomi liganda in atomi aminokislin receptorja s katerim je ligand interagiral. V programu VMD smo poleg tega tudi opazovali, kako se je tekom molekularnih simulacij dinamično spreminjala konformacija molekul.

V obeh programih smo uporabljali več priloženih programskih modulov ter skript, ki so nam omogočale učinkovitejšo predstavitev ter analizo rezultatov (slika 12).



**Slika 12 - Prikaz molekulske površine homolognega modela CCR2 (pogled v vezavno odprtino, ki jo oblikuje sedem transmembranskih  $\alpha$ -vijačnic)**

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Testirali smo *in silico* vezavne lastnosti šestih peptidov, domnevnih ligandov CCR2, in ocenjevali njihovo vezavno energijo. Napovedno moč metode smo preverili z uporabo kontrolnih ligandov. Kontrolni sta predstavljala liganda z eksperimentalno določeno konstanto vezave. Metoda je kontroli med seboj pravilno rangirala. Rezultati kažejo, da ima metoda potencial za napovedovanje vezavnih afinitet peptidnih ligandov CCR2. Seveda pa se moramo zavedati, da bi bilo za definitivno potrditev metode potrebno opraviti dejanski eksperiment določanja aktivnosti peptidov na ustrezno pripravljenem CCR2, kar pa v okviru trenutnih metodoloških in finančnih zmožnosti ni mogoče. Velikost samega modelnega sistema in število prostorskih stopenj predstavljajo morebitno omejitev natančnosti metode.

### 4.1 Rezultati homolognega modeliranja receptorja CCR2

#### 4.1.1 Rezultati strežniške različice algoritma BLAST

V preglednici VI predstavljamo rezultate uporabe algoritma BLAST:

Preglednica VI - Rezultati analize BLAST-a

Mesto	PDB oznaka; ime proteina	Maksimalna ocena	Skupna ocena	Pokritost zaporedja	E-število	Homologija zaporedja
1.	2LNL_A; človeški CXCR1	161	161	76 %	1e-45	36 %
2.	3ODU_A; človeški CXCR4	145	202	80 %	1e-38	34 %
3.	3OE6_A, človeški CXCR4	145	202	80 %	2e-38	34 %
4.	3OE0_A, človeški CXCR4	145	201	80 %	2e-38	34 %
5.	4EA3_A, človeški nociceptinski opioidni receptor	130	130	72 %	2e-33	31 %
6.	4N6H_A, človeški delta opioidni receptor	117	117	82 %	3e-29	26 %

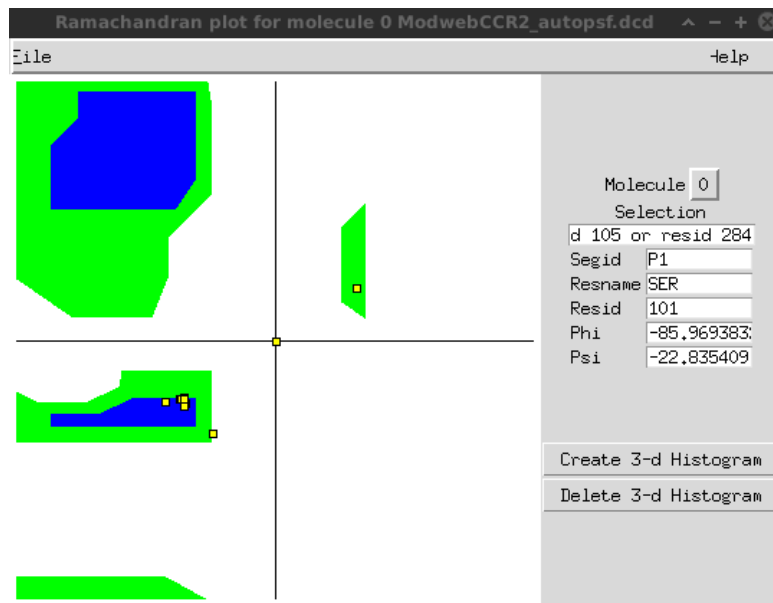
Opis parametrov:

- Maksimalna ocena - predstavlja najvišjo doseženo oceno prilegajočih segmentov.
- Skupna ocena - predstavlja skupno doseženo oceno vseh prilegajočih segmentov.
- Pokritost zaporedja - predstavlja delež aminokislinskega zaporedja matričnega proteina, ki ga je proces prileganja z zadetki »pokril«.
- E-število - predstavlja merilo signifikantnosti rezultata, nižja je podana vrednost bolj je rezultat signifikanten.
- Homologija zaporedja - predstavlja delež aminokislinskega zaporedja, ki je homologen med matričnim proteinom in zadetki.

Za izdelavo homolognega modela smo izbrali najvišje uvrščena zadetka, torej proteina s PDB oznakama 2LNL in 3ODU. Homologne modele smo nato na podlagi izbranih zadetkov izdelali z lokalno in strežniško različico programa Modeller ter pričeli s procesom ocenjevanja.

#### **4.1.2 Rezultati ocenjevanja homolognih modelov**

Preko vizualnega ocenjevanja na podlagi parametrov podanih v poglavju 3.2.3, ter z uporabo Ramachandranovega diagrama, smo presejali kandidate za homologni model in izbrali najustreznejšega. Rezultati uporabe Ramachandranovega diagrama pri izbranem najboljšem kandidatu so bili ustrezni, saj so bili položaji večine aminokislin v energetsko ugodnih območjih (slika 13). Večina opazovanih ostankov se je nahajala v območju  $\alpha$ -vijačnice. Med EM in MD homolognega modela na fakultetnem računalniku smo lahko opazovali premike aminokislinskih ostankov, pomembnih za vezavo nizkomolekularnih antagonistov CCR2, v energetsko ugodno območje. Energetsko ugodno območje je na sliki 13 označeno z modro in zeleno barvo, modra predstavlja najugodnejše območje. Položaji aminokislin v Ramachandranovem diagramu na sliki 13 so označeni z rumenimi kvadrati. Z opazovanjem lokacije aminokislin, pomembnih za vezavo v Ramachandranovem diagramu, smo potrdili, da je homologni model ustrezen za delo. V nedovoljenem območju Ramachandranovega diagrama ni bilo prisotne nobene aminokisliline, pomembne za vezavo malih molekul.



Slika 13 - Ramachandranov diagram z označenimi položaji aminokislin pomembnih za vezavo malih molekul v vezavno mesto

Kot končni rezultat procesa homolognega modeliranja navajamo prostorski model najboljše uvrščenega kandidata tekom procesa ocenjevanja (slika 14).

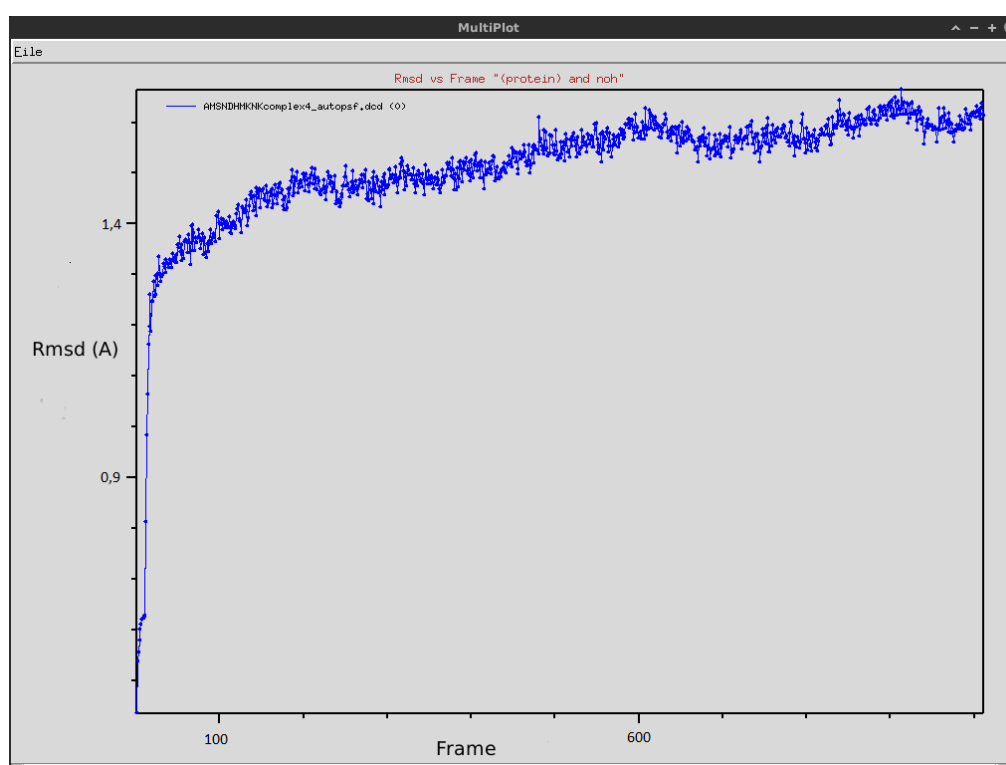


Slika 14 - Prostorska struktura izbranega homolognega modela CCR2

## 4.2 Rezultati preizkusa stabilnosti molekulskih simulacij

Kot merilo za določanje, ali so molekulske simulacije stabilne, smo za vsako posamezno simulacijo izdelali tudi diagram RMSD in primerjali obliko diagrama ter trend sprememb koordinat s teoretičnimi diagrami.

Primer diagrama RMSD za našo simulacijo sovпада s teoretičnimi diagrami RMSD za MD, ki predstavljajo stabilne simulacije. Slika 15 prikazuje, kako se vrednost RMSD spreminja tekom simulacije minimizacije in dinamike.



Slika 15 - Diagram RMSD simulacije minimizacije in dinamike

S tem smo potrdili, da so v vseh primerih, simulacije s po protokolu uporabljenimi parametri stabilne in uporabne za nadaljnje delo.

### 4.3 Rezultati izračuna energije interakcije kontrolnih in preiskovanih peptidov CCR2

V preglednici VII so predstavljeni rezultati izračuna NAMD-energy za kontrolna peptida.

Preglednica VII - Rezultati izračuna energije za oba kontrolna liganda

Ligand	Eksperimentalno izmerjena $K_d$ [ $\mu$ M]	Povprečje elektrostatske energije [kcal/mol]	Povprečje VdW energije [kcal/mol]	Povprečje skupne energije [kcal/mol]
<b>K1</b>	>100	-349,86	-86,09	-435,95
<b>K2</b>	8,2	-402,51	-78,12	-479,65

Naši izračuni kažejo, da sta kontroli ustrezno rangirani glede na rezultate dejanske eksperimentalne določitve vezavne konstante, ki smo jih pridobili iz članka Hemmerich-a in sodelavcev (24). Merodajna je namreč skupna energija. Nižja energija predstavlja ugodnejšo, močnejšo vezavo liganda z receptorjem.

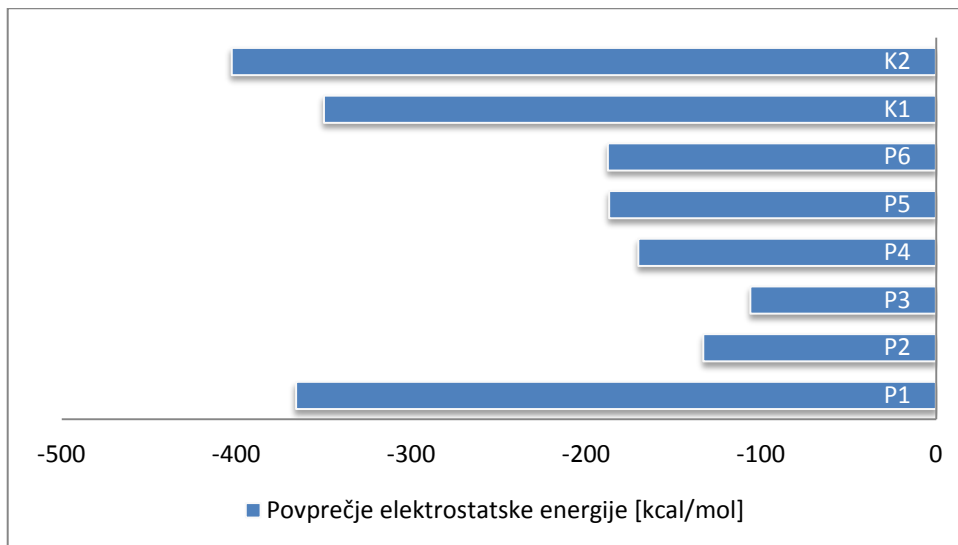
V preglednici VIII so predstavljeni rezultati izračuna modula NAMD-energy preiskovanih peptidov v primerjavi s kontrolnima peptidoma:

Preglednica VIII - Rezultati izračuna energij preiskovanih ligandov

Ligand	Povprečje elektrostatske energije [kcal/mol]	Povprečje VdW energije [kcal/mol]	Povprečje skupne energije [kcal/mol]
<b>P1</b>	-365,89	-92,01	-457,89
<b>P2</b>	-132,94	-78,52	-211,46
<b>P3</b>	-106,12	-76,91	-183,02
<b>P4</b>	-170,11	-70,79	-240,91
<b>P5</b>	-186,87	-87,22	-274,09
<b>P6</b>	-187,51	-87,95	-275,46
<b>K1</b>	-349,86	-86,09	-435,95
<b>K2</b>	-402,51	-78,12	-479,65

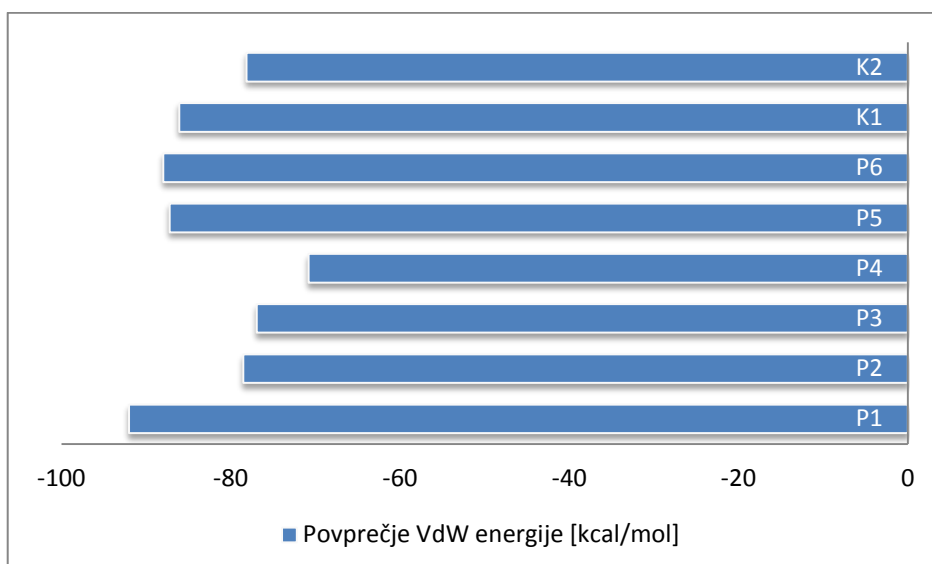


V nadaljevanju so predstavljeni grafi izračunane elektrostatske, VdW in skupne energije interakcije kontrolnih in preiskovanih peptidov z receptorjem CCR2 (slike 16, 17 in 18).



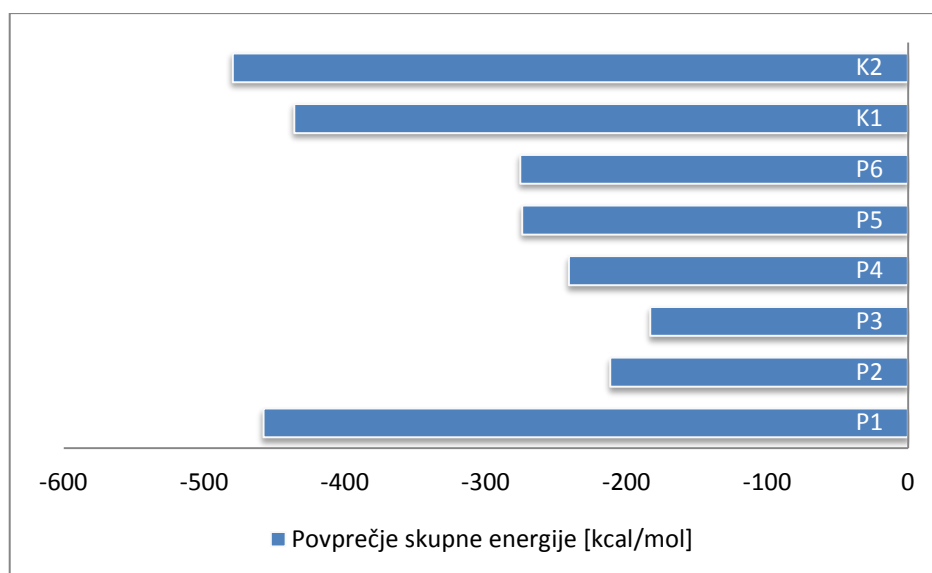
Slika 16 – Ocenjene povprečne elektrostatske energije kontrolnih in preiskovanih ligandov

Opazimo lahko, da je elektrostatski prispevek energije znatno ugodnejši pri ligandu K2 v primerjavi z ligandom K1. Rezultati kažejo najugodnejši prispevek elektrostatske energije pri ligandu K2, sledi mu preiskovan ligand P1, nato pa kontrolni peptid K1. Ostali preiskovani ligandi imajo absolutno znatno manjše prispevke elektrostatske energije (slika 16).



Slika 17 - Ocenjene povprečne VdW energije kontrolnih in preiskovanih ligandov

Prispevek VdW energije je ugodnejši pri ligandu K1, vendar relativno znatno manjši, kot je razlika v prispevku pri elektrostatski energiji med kontrolnima ligandoma. Prav tako je absolutna vrednost prispevka VdW energije manjša kot elektrostatski prispevek. Prispevki VdW energije so si med posameznimi ligandi bistveno bolj podobni kot prispevki elektrostatske in skupne energije. Absolutno največji prispevek VdW energije ima preiskovani ligand P1 (slika 17).

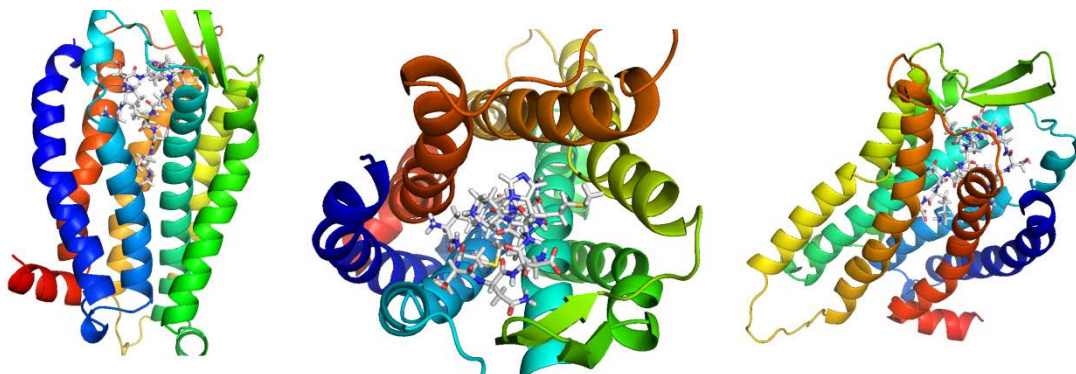


Slika 18 - Ocenjene povprečne skupne energije kontrolnih in preiskovanih ligandov

Skupna izračunana energija, ki je merilo jakosti interakcije v kompleksu peptida z receptorjem, je ugodnejša (torej nižja) pri kontrolnem ligandu K2, kar je v skladu z literaturnimi navedbami in posredno potrjuje ustreznost metode za napovedovanje vezavnih lastnosti peptidov. Skupna energija, ki predstavlja najpomembnejši parameter za interpretacijo rezultatov, je najugodnejša pri ligandu K2, sledi preiskovani ligand P1 in nato K1. Ostali ligandi imajo znatno manj ugodno skupno energijo (slika 18).

#### 4.4 Opis končnih vezavnih položajev in vezavnih konformacij ligandov

Končne vezavne položaje in vezavne konformacije peptidov v kompleksu z receptorjem smo si ogledali v programu za vizualizacijo molekul Pymol, kjer smo tudi izmerili razdalje vodikovih vezi med aminokislinskimi ostanki receptorja ter ligandom. Na sliki 22 je prikazan končni položaj in vezavna konformacija najbolje ocenjenega liganda, torej predlaganega izhodiščnega peptida za nadaljnje delo.



Slika 19 - Končni položaj in vezavna konformacija peptida AMSNDHMKNK v receptorju CCR2

V preglednici IX so predstavljeni aminokislinski ostanki na receptorju, ki interagirajo s posameznimi sidranimi peptidi.

Preglednica IX - Pregled vezavnih partnerjev končnih položajev receptor-ligand

Peptidni ligand (ocenjena energija interakcije s CCR2 v kcal/mol)	Vezavni partnerji (v oklepaju medatomska razdalja ligand-receptor v Å)
<b>P1</b> ; -365,89	Y49 (2,8), E291 (1,6), T292 (3,9), S101 (1,8), H100 (1,8), Y120 (2,1)
<b>P2</b> ; -132,94	E291 (2,0), Y49 (4,3), H100 (3,3), Y120 (1,9)
<b>P3</b> ; -106,12	E291 (1,9), D284 (4,7), S101 (1,7), T117 (3,2), Y120 (4,3)
<b>P4</b> ; -170,11	E291 (1,6), Y49 (3,2), S101 (1,9), H100 (2,2), Y12 (1,9)
<b>P5</b> ; -186,87	E291 (3,8), Y120 (4,1), H121 (2,0), T117 (4,9), D284 (4,5), N104 (2,5), S101 (1,7), H100 (4,9)
<b>P6</b> ; -187,51	E291 (1,8;1,9), Y49 (4,1), S101 (1,8), H100 (2,9), Y120 (1,9),
<b>K1</b> ; -349,86	E291 (1,6), Y49 (3,0), N104 (2,0), H100 (2,0), T117 (4,4)
<b>K2</b> ; -414,42	E291 (1,8;2,0), D284 (1,6;2,1), Y49 (2,3), S101 (1,9), N104 (1,9), Y120 (4,5)

Opazimo, da ligandi interagirajo z vrsto aminokislinskih ostankov, ki so po literaturnih navedbah ključni za vezavo malih molekul (13, 17, 23). Med drugimi se tako kot pomemben aminokislinski ostanek, ki interagira s sinteznimi antagonisti, pojavlja E291. Z njim namreč interagira kar 7 izmed 8 preiskovanih ligandov. Ostanek S101, interagira s 6 izmed 8 ligandov. Ostali ostanki pa interagirajo manj ponovljivo med različnimi ligandi. Vsi aminokislinski ostanki receptorja interagirajo z ligandom preko tvorbe vodikovih vezi. Teoretična idealna dolžina vodikove vezi je  $1.97\text{\AA}$ , z naraščanjem dolžine pa moč vezi pada (38). Tako predstavljajo dolžine od  $2,2\text{-}2,5\text{\AA}$  močno vez, dolžine od  $2,5\text{-}3,2\text{\AA}$  srednje močno vez ter  $3,2\text{-}4\text{\AA}$  šibko vez (39). Opazimo lahko da tvorba številčnejših močnih vezi korelira z ugodnejšo izračunano vezavno energijo.

## 5 SKLEP

S pomočjo izdelave homolognega modela CCR2 in uporabe metod sidranja, EM in MD smo izdelali metodo, ki je potencialno uporabna za napoved aktivnosti peptidnih antagonistov CCR2. Metoda nam je omogočila izbiro peptida, obetavnega kot izhodišče za nadaljnje delo. Prav tako smo s primerjavo rezultatov računalniške metode z eksperimentalno izmerjenimi podatki potrdili ustreznost naše metode.

Če bo nadaljnje eksperimentalno delo potrdilo, da metoda podaja ustrezne rezultate, bo tako na voljo ekonomična in učinkovita metoda za napovedovanje aktivnosti peptidnih ligandov CCR2.

Rezultati nam prikazujejo dodano vrednost, ki jo ima uporaba računalniških metod v farmacevtskem razvoju, seveda pa se moramo zavedati tudi omejitev. Prihodnost uporabe računalniških metod pa se tako zdi svetla.

## 6 LITERATURA

1. Schlick T. Biomolecular Structure and Modeling: Historical Perspective. V: Molecular Modeling and Simulation, 2. Izdaja. SS Antman, Springer, New York, ZDA, 2010: 1-40
2. Spletna stran dobitnikov Nobelove nagrade za kemijo leta 2013. [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/2013/press.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2013/press.html). Dostop 5-4-2014
3. Marshall GR: Computer-aided drug design. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1987; 21: 193-213
4. Shaw DE, Borhani DW: The future of molecular dynamics simulations in drug discovery. J Comput Aided Mol Des 2012; 26: 15-26
5. Schlick T. Theoretical and Computational Approaches to Biomolecular Structure. V: Molecular Modeling and Simulation, 2. Izdaja. SS Antman, Springer, New York, ZDA, 2010: 237-264
6. Ramachandran KI, Deepa G, Namboori K: Computational Chemistry and Molecular Modeling, Springer, Berlin, 2008: 1-15
7. Leach AR. Empirical Force Field Models: Molecular Mechanics. V: Molecular Modelling, 2. Izdaja. Leach AR. Prentice Hall, Essex, VB, 2001: 165-252
8. Nurisso A, Daina A, Walker RC. A Practical Introduction to Molecular Dynamics Simulations: Applications to Homology Modeling. V: Homology Modeling, Methods and Protocols. Orry AJW, Abagyan R, Springer, London, 2012: 137-173
9. Phillips JC, Braun R, Wang W: Scalable molecular dynamics with NAMD. J of Comput Chem 2005; 26: 1781-1802
10. Schlick T. Force Fields. V: Molecular Modeling and Simulation, 2. Izdaja. SS Antman, Springer, New York, ZDA, 2010: 265-298
11. Schlick T. Multivariate Minimization in Computational Chemistry. V: Molecular Modeling and Simulation, 2. Izdaja. SS Antman, Springer, New York, ZDA, 2010: 345-384
12. Leach AR. Energy Minimisation and Related Methods for Exploring the Energy Surface. V: Molecular Modelling, 2. Izdaja. Leach AR. Prentice Hall, Essex, VB, 2001: 253-302
13. Kim JH, Lim JW, Lee SW: Ligand supported homology modeling and docking evaluation of CCR2: docked pose selection by consensus scoring. J Mol Model 2011; 17: 2707-2716
14. Durant JD, McCammon JA: Molecular dynamics simulations and drug discovery. BMC Biology 2011; 9: 71
15. Schlick T. Molecular Dynamics: Basics and Further Topics. V: Molecular Modeling and Simulation, 2. Izdaja. SS Antman, Springer, New York, ZDA, 2010: 425-517
16. Česlovas V. Methods for Sequence–Structure Alignment. V: Homology Modeling, Methods and Protocols. Orry AJW, Abagyan R, Springer, London, 2012: 55-82

17. Sobhia ME, Singh R, Kare P: Rational design of CCR2 antagonists: a survey of computational studies. *Expert Opin Drug Discov* 2010; 5(6): 543-557
18. Palczewski K, Kumasaka T: Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 2000; 289 (5480): 739-45
19. Stevens RC, Cherezov V, Katritch V: The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. *Nature Reviews Drug Disc* 2013; 12: 25-34
20. Spletna stran statusa kristalizacije GPCR-jev, preko organizacije GPCR Network. [http://gpcr.scripps.edu/tracking\\_status.htm](http://gpcr.scripps.edu/tracking_status.htm). Dostop 5-4-2014
21. Spletna stran seznama tarčnih GPCR-jev, organizacije GPCR Network. <http://gpcr.scripps.edu/GPCRNetwork-826List.pdf>. Dostop 5-4-2014
22. Shi XF, Liu S: Structural analysis of human CCR2b and primate CCR2b by molecular modeling and molecular dynamics simulation. *J of Mol Model* 2002; 8: 217-222
23. Sobhia ME, Singh R: Structure prediction and molecular dynamics simulations of a G-protein coupled receptor: human CCR2 receptor. *J of Biomol Struct and Dynam* 2012; 31: 1-22
24. Hemmerich S, Paavola C: Identification of Residues in the Monocyte Chemotactic Protein-1 That Contact the MCP-1 Receptor, CCR2. *Biochemistry* 1999; 38: 13013-13025
25. Kothandran G, Gadhe CG: Structural insights from binding poses of CCR2 and CCR5 with clinically important antagonists. *PLoS ONE* 2012; 7: 32864
26. Spletna stran programa Avogadro. <http://avogadro.openmolecules.net/>. Dostop 5-4-2014
27. Spletna stran programa VMD. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>. Dostop 5-4-2014
28. Spletna stran programa Gedit. <https://wiki.gnome.org/Apps/Gedit>. Dostop 5-4-2014
29. Spletna stran programa NAMD. <http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>. Dostop 5-4-2014
30. Spletna stran programa PyMOL. <http://www.pymol.org/>. Dostop 5-4-2014
31. Spletna stran programa Libre Office Calc. <https://www.libreoffice.org/discover/calc/>. Dostop 5-4-2014
32. Spletna stran programa Microsoft Office Excel. <http://office.microsoft.com/sl-si/microsoft-excel-programska-oprema-za-preglednice-FX010048762.aspx>. Dostop 5-4-2014
33. Spletna stran podatkovne baze PDB. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. Dostop 5-4-2014
34. Altschul SF, Gish W: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; 215: 403-410
35. Matelič, A. (2013). Kartiranje epitopov nevtralizacijskih protiteles proti kemokinu CCL2. Diplomsko delo, Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Farmacijo
36. Humphrey W, Dalke A: VMD - Visual Molecular Dynamics. *J Molec Graphics* 1996; 14: 33-38

37. Pierce BG, Wiehe K: ZDOCK Server: Docking and Visualization of Protein Complexes and Multimers.
38. Spletna stran Intramolecular forces: hydrogen bonding. <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/161Ahydrogenbond.html>. Dostop 5-4-2014
39. Spletna stran Hydrogen bonds. <http://biomodel.uah.es/en/water/hbonds.htm/>. Dostop 5-4-2014