

**UNIVERZA V LJUBLJANI**  
**FAKULTETA ZA FARMACIJO**



**MATJAŽ SUŠEC**

DIPLOMSKA NALOGA

**OPTIMIZACIJA POSTOPKA ZA DOLOČANJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI IN  
VREDNOTENJE POTENCIALNIH ZAVIRALCEV METIONIN  
AMINOPEPTIDAZE**

UNIVERZITETNI PROGRAM FARMACIJA

**Ljubljana, 2016**

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**MATJAŽ SUŠEC**

DIPLOMSKA NALOGA

**OPTIMIZACIJA POSTOPKA ZA DOLOČANJE ENCIMSKE AKTIVNOSTI IN  
VREDNOTENJE POTENCIALNIH ZAVIRALCEV METIONIN  
AMINOPEPTIDAZE**

OPTIMIZATION OF ENZYMATIC ACTIVITY DETERMINATION PROCEDURE  
AND EVALUATION OF POTENTIAL METHIONINE AMINOPEPTIDASE  
INHIBITORS

UNIVERZITETNI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom dr. Borisa Brusa, mag. farm.

## **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Stanislavu Gobcu, mag. farm. za vso strokovno pomoč in usmerjanje tekom pisanja diplomske naloge.

Zahvaljujem se somentorju dr. Borisu Brusu, mag. farm. za ves trud, pomoč in posredovano znanje tekom izvedbe diplomskega dela.

Zahvaljujem se vsem članom katedre za Farmaceutsko kemijo, ki so kakorkoli pripomogli k nastanku te diplomske naloge.

Najlepša hvala staršema in sestri, ki so me tekom študija spodbujali in podpirali.

Zahvala gre tudi partnerki Diani, sošolcem in prijateljem, ki so moja študentska leta naredili razburljiva, zanimiva in nepozabna.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorja dr. Borisa Brusa, mag. farm.

**Predsednik:** prof. dr. Odon Planinšek

**Mentor:** prof. dr. Stanislav Gobec

**Somentor:** dr. Boris Brus

**Članica:** izr. prof. dr. Mojca Kerec Kos

Matjaž Sušec

## Kazalo vsebine

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. BAKTERIJE.....	1
1.1.1. Gramnegativne bakterije .....	1
1.1.2. Grampozitivne bakterije .....	2
1.2. ANTIBIOTIKI IN PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE .....	3
1.3. BAKTERIJSKA ODPORNOST .....	5
1.4. METIONIN AMINOPEPTIDAZA .....	6
1.4.1. Aktivno mesto encima MetAP .....	7
1.4.2. Znani zaviralci MetAP .....	9
1.5. ENCIMSKA KINETIKA V STACIONARNEM STANJU .....	13
<b>2. NAČRT DELA.....</b>	<b>17</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>18</b>
3.1. MATERIALI.....	18
3.1.1. Reagenti .....	18
3.1.2. Reagenti v aktivacijskem pufu .....	19
3.1.3. Ostali uporabljeni pribor.....	20
3.2. KNJIŽNICA SPOJIN .....	21
3.3. METODE .....	23
3.3.1. Reakcija z Ellmanovim reagentom .....	23
3.3.2. Princip določanja obarvanega produkta s sprektrofotometrom .....	23
<b>4. EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>25</b>
4.1. TEST ENCIMSKE AKTIVNOSTI .....	25

4.2. LINEWEAVER-BURKOV DIAGRAM IN DOLOČANJE $K_M$ .....	25
4.3. VPLIV DMSO .....	25
4.4. VPLIV KOVINSKIH IONOV NA AKTIVNOST ENCIMA.....	26
4.5. TESTIRANJE SPOJIN .....	27
<b>5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>28</b>
5.1. TEST ENCIMSKE AKTIVNOSTI .....	28
5.1.2. Merjenje začetne hitrosti encimske reakcije .....	29
5.2. LINEWEAVER-BURKOV DIAGRAM IN IZRAČUN $K_M$ .....	29
5.3. VPLIV DMSO .....	34
5.4. VPLIV KOVINSKIH IONOV NA AKTIVNOST ENCIMA.....	36
5.4.1. Vpliv $CoCl_2$ .....	37
5.4.2. Vpliv $CuCl_2$ .....	38
5.4.3. Vpliv $ZnCl_2$ .....	38
5.4.4. Vpliv $FeCl_2$ .....	39
5.5. TESTIRANJE SPOJIN .....	40
5.5.1. Spojina GIS284 .....	45
5.5.2. Spojina GIS273 .....	46
<b>6. SKLEP .....</b>	<b>49</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>50</b>

## Kazalo slik

<b>Slika 1:</b> Primerjava celične stene pri G(-) in G(+) bakterijah.....	2
<b>Slika 2:</b> Tarče antibiotikov in mehanizmi odpornosti na antibiotike.....	4
<b>Slika 3:</b> Načini prenosa informacije za bakterijsko odpornost .....	5
<b>Slika 4:</b> 3D kristalna struktura encima MetAP iz E.coli .....	7
<b>Slika 5:</b> Predlagana mehanizma MetAP v E.Coli (A) Tetraederski intermediat stabiliziran z Glu204 in kovinskim centrom (B) Tetraederski intermediat stabiliziran s His178 in kovinskim centrom.....	8
<b>Slika 6:</b> Prikaz spojine 2 v aktivnem mestu MetAP iz E.coli (A) in površinski prikaz spojine v aktivnem mestu (B) .....	10
<b>Slika 7:</b> Prikaz spojine 6 v aktivnem mestu BpMetAP1.....	13
<b>Slika 8:</b> (A) Tipična encimska krivulja v zaključni fazi (B) Podatki iz (A), ki predstavljajo začetne točke reakcije, oziroma začetno hitrost encimske reakcije .....	14
<b>Slika 9:</b> Začetna hitrost encimske reakcije v odvisnosti od koncentracije substrata .....	15
<b>Slika 10:</b> Substrat N-[(S-metionil)-2-merkaptacetil]fenilalanin.....	19
<b>Slika 11:</b> Podatki iz knjižnice spojin .....	22
<b>Slika 12:</b> Osnovna reakcija tiola z Ellmanovim reagentom.....	23
<b>Slika 13:</b> Shema odcepa metionina in reakcija z Ellmanovim reagentom.....	24
<b>Slika 14:</b> Koncentracijska odvisnost hitrosti encimske reakcije pri 50 $\mu$ M substrata .....	28
<b>Slika 15:</b> Odvisnost hitrosti encimske reakcije pri različnih koncentracijah substrata.....	31
<b>Slika 16:</b> Graf odvisnosti naklona premice od koncentracije substrata .....	31
<b>Slika 17:</b> Graf odvisnosti hitrosti encimske reakcije od koncentracije substrata.....	32
<b>Slika 18:</b> Lineweaver-Burkov diagram.....	33
<b>Slika 19:</b> Test encimske aktivnosti brez DMSO.....	34
<b>Slika 20:</b> Graf hitrosti encimske reakcije v 9mM raztopini CoCl <sub>2</sub> .....	36
<b>Slika 21:</b> Aktivnost encima pri različnih razmerjih s Co <sup>2+</sup> ioni.....	37
<b>Slika 22:</b> Aktivnost encima pri različnih razmerjih s Cu <sup>2+</sup> ioni.....	38
<b>Slika 23:</b> Aktivnost encima pri različnih razmerjih z Zn <sup>2+</sup> ioni.....	38
<b>Slika 24:</b> Aktivnost encima pri različnih razmerjih z Fe <sup>2+</sup> ioni .....	39
<b>Slika 25:</b> Spojina GIS273 (zgoraj) v primerjavi s slepim vzorcem (spodaj) .....	41
<b>Slika 26:</b> Primer slabše obarvanosti v luknjicah z zaviralno spojino GIS273 - stolpec 3 .....	42
<b>Slika 27:</b> Določanje IC <sub>50</sub> za spojino GIS284 .....	46
<b>Slika 28:</b> Določanje IC <sub>50</sub> za spojino GIS273 .....	47

## Povzetek

Protibakterijske zdravilne učinkovine so med najpogosteje predpisanimi zdravili v zdravstvenih ustanovah. Zaradi široke in neprimerne uporabe se je hitro razvila in razširila mikrobiološka odpornost. To predstavlja velik problem v zdravstvu, zato so ukrepi nujni in farmacevtska stroka je usmerjena k iskanju in razvijanju novih protibakterijskih učinkovin.

Encim metionin aminopeptidaza je dobra tarča za razvoj novih protibakterijskih zdravilnih učinkovin. Encim odstranjuje N-terminalni metionin iz nastajajočih proteinov bakterij. N-terminalni metionin se v večini primerov cepi, ko je preostanek v primarni sekvenci majhen in brez naboja, kot so aminokislina glicin, alanin, serin, cistein, prolin, treonin in valin. Odstranitev metionina je ponavadi ključnega pomena za funkcijo in stabilnost bakterijskega proteina ter s tem rast in razvoj same bakterije.

V okviru diplomskega dela smo optimizirali literaturni postopek za določanje aktivnosti metionin aminopeptidaze, ki nam je omogočil kontinuirano spremljanje reakcije na mikrotiterskih ploščah. Reakcija temelji na reakciji Ellmanovega reagenta in intermedata, ki nastane po encimski cepitvi metionina iz substrata. Obarvani končni produkt detektiramo spektrofotometrično v fazi začetne hitrosti encimske reakcije.

Določili smo kinetične parametre encimske reakcije in ovrednotili sposobnost zaviranja serije derivatov nitroksolina. Zdravilna učinkovina nitroksolin je na trgu že več kot 50 let in je uspešna pri terapiji infekcij urinarnega trakta. Nekatere spojine so hitro pokazale svojo učinkovitost pri zaviranju hitrosti encimske reakcije, razporedili pa smo jih na podlagi rezidualne aktivnosti. Najboljšim zaviralcem sinteznih nitroksolinskih derivatov smo določili tudi srednjo zaviralno koncentracijo, ki znaša 11,83  $\mu\text{M}$  za spojino GIS284 in 9,17  $\mu\text{M}$  za spojino GIS273.

Encim metionin aminopeptidaza je metaloproteaza in za svoje delovanje potrebuje dvovalentne kovinske ione, zato smo preverili tudi vpliv različnih kovinskih ionov v različnih koncentracijah na aktivnost in zaviranje encima. Hitro smo ugotovili pomen kovinskih ionov za aktivnost encima, saj je v postopku predinkubacije encima brez kovinskih ionov hitrost encimske reakcije znatno slabša v primerjavi s predinkubacijo, kjer so kovinski ioni bili prisotni. Potrdili smo, da so kobaltovi ( $\text{Co}^{2+}$ ) ioni najbolj primerni za metionin aminopeptidazo iz *E. coli*, kar so predlagale že nekatere prejšnje raziskave.

## Abstract

Antimicrobial drugs are among the most prescribed drugs in health institutions. Due to a wide and inappropriate usage we quickly had to deal with resistance to antibiotics. Being a big issue in the health sector, measures are needed and there is an urgent need to develop new antimicrobial drugs.

Enzyme methionine aminopeptidase is a good target for the development of new antimicrobial drugs. This enzyme catalyzes the hydrolytic removal of N-terminal methionine from nascent proteins. N-terminal methionine is often cleaved when the second residue in the primary sequence is small and uncharged, like amino acids glycine, alanine, serine, cysteine, proline, threonine and valine. Methionine removal is considered to be essential for the function and stability of the bacterial protein and therefore growth and development of the bacteria itself.

In the course of this diploma thesis, we have optimised the published procedure for the determination of methionine aminopeptidase enzymatic activity. This enabled us continuous monitoring of the reaction progress on microtiter plates. The reaction is based on binding of the Ellman's reagent and the intermediate, which is generated after enzymatic cleavage of methionine from the substrate. The final chromogenic product is detected on the spectrophotometer in the initial phase of the enzymatic reaction.

We determined kinetic parameters of the enzymatic reaction and evaluated inhibitory potency of a series of nitroxoline derivatives. Nitroxoline has been on the market for more than 50 years as a drug for treatment of urinary tract infections. Some compounds quickly showed its effectiveness on inhibition of the enzymatic reaction, therefore we sorted them based on residual activity. The half maximal inhibitory concentration was determined for the best inhibitors among synthetic nitroxoline derivatives, its value being 11,83  $\mu\text{M}$  for compound GIS284 and 9,17  $\mu\text{M}$  for compound GIS273.

As methionine aminopeptidase is a metalloenzyme and needs divalent metal ions for its functioning, we investigated the influence of different metal ions in different concentrations on enzymatic activity and inhibition of the enzyme. We have demonstrated the importance of metal ions on enzymatic activity, since the reaction velocity in the procedure of the preincubation without metal ions was significantly worse than in case of



preincubation with metal ions. We have demonstrated that cobalt ( $\text{Co}^{2+}$ ) ions are best suited for methionine aminopeptidase from *E. coli*, which was shown already in some previous researches.

## Seznam okrajšav

Cys – aminokislina cistein

DNK – deoksiribonukleinska kislina

G- - gramnegativne bakterije

G+ - grampozitivne bakterije

Glu – glutaminska kislina

His – aminokislina histidin

HIV – humani imunodeficientni virus

IC<sub>50</sub> – koncentracija zaviralca, pri kateri je zavrte 50% aktivnosti encima

K<sub>M</sub> – Michaelis-Mentenova konstanta

MetAP – metionin aminopeptidaza

Pro – aminokislina prolin

Phe – aminokislina fenilalanin

RA – rezidualna aktivnost

Thr – aminokislina treonin

Tyr – aminokislina tirozin

# 1. UVOD

## 1.1. BAKTERIJE

Bakterije predstavljajo veliko domeno prokariotskih organizmov, druga skupina pa so nekoliko kasneje odkrite Arheje. Najdemo jih povsod: v zemlji, vodi, zraku ali kot del normalne flore v notranjosti ali na površini človeškega telesa. Bakterije so enocelični organizmi, ki merijo v dolžino od 0,5-5 $\mu$ m, kar je značilno manjše kot evkariotski organizmi, kjer celice merijo od 10-100 $\mu$ m. Imajo razmeroma preprosto celično strukturo, saj nimajo jedra, niti organelov, kot so mitohondriji ali kloroplasti. Genetski material (DNK) lebdi prosto v citoplazmi celic. Za razliko od evkariotov se ti organizmi ne razvijejo v večcelično obliko, saj tudi če rastejo v kolonijah, je vsaka celica enaka in sposobna samostojnega življenja. Imajo tendenco po hitrem razmnoževanju pri ustreznih pogojih kot so npr. ustrezna temperatura, pomanjkanje kisika, količina hrane, vlaga. Praviloma imajo celično steno, tako kot rastline in glive, vendar pa z zelo različno sestavo peptidoglikanov. Spadajo med patogene, saj lahko povzročijo resne bolezni, npr. pljučnico, tetanus in sifilis. Na srečo so antibiotiki učinkovite zdravilne učinkovine zoper večino bakterij; najbolj znana in razširjena skupina med njimi so penicilini, ki onemogočajo formiranje celične stene bakterije. Za obrambo pred nekaterimi bakterijskimi okužbami so poleg antibiotikov na voljo tudi cepiva, pri katerih nastanejo protitelesa, ki preprečijo naselitev bakterij ali onemogočajo delovanje bakterijskih toksinov (1).

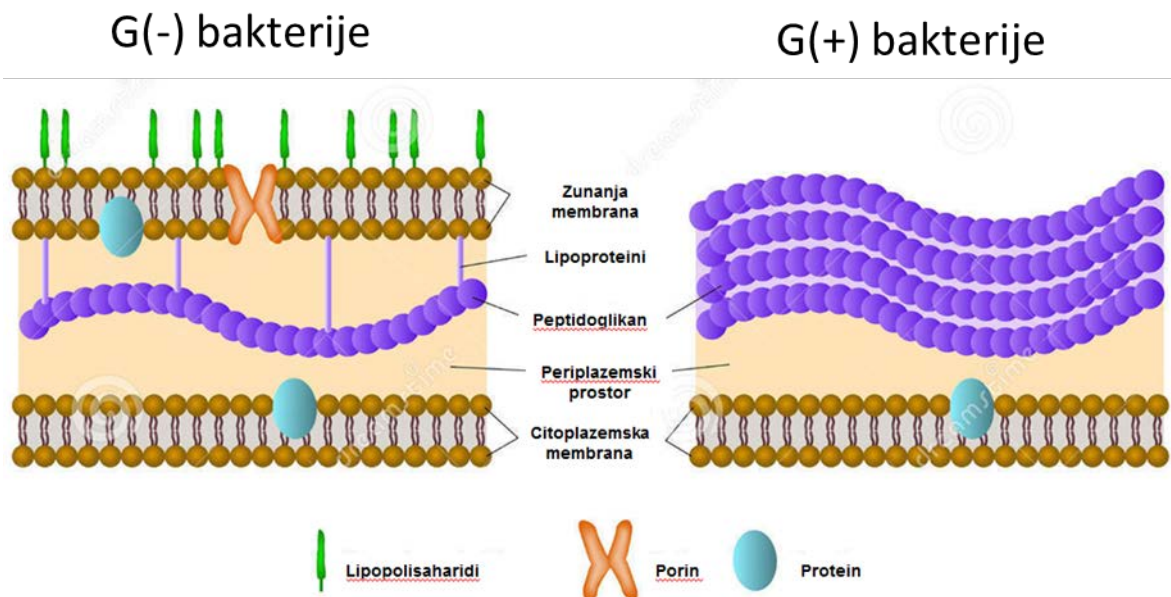
### 1.1.1. Gramnegativne bakterije

Gramnegativne bakterije (G-) so obdane z nekaj plastmi peptidoglikana (okrog 4 plasti), katere pokriva zunanja celična membrana z lipopolisaharidi, ki so pogosto nosilci patogenosti in jih zaradi tega imenujemo tudi endotoksini. V zunanji membrani najdemo tudi porine, ki kot majhne pore, prepuščajo nekatere molekule skozi zunanjo membrano. Prostor med peptidoglikanskim slojem in zunanjo membrano imenujemo periplazemski prostor. Gramnegativne bakterije prepoznamo po tem, da se v postopku barvanja po Gramu le prehodno obarvajo z metilvijoličnim, kasnejše spiranje z acetonom in etanolom pa jih razbarva. Vzrok razbarvanja tiči v sestavi njihove celične stene, saj kristali metilvijoličnega ne ostanejo ujeti v tankem sloju peptidoglikana. Nato jih obarvamo rdeče z diferencialnim barvilom fuksinom, na podlagi katerega jih ločimo od grampozitivnih

(G+) bakterij. Številne vrste gramnegativnih bakterij so v gostiteljevem organizmu zmožne izzvati bolezensko stanje (2). Na sliki 1 so prikazane razlike v celični steni med G(-) in G(+) bakterijami (3).

Najbolj znani predstavniki:

*Brucella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Treponema pallidum*, *Escherichia coli*, *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Helicobacter pylori*...



Slika 1: Primerjava celične stene pri G(-) in G(+) bakterijah (prirejeno po (3))

### 1.1.2. Grampozitivne bakterije

Grampozitivne bakterije so obdane z debelo plastjo peptidoglikana (okrog 40 plasti), kar je značilno večje od G(-) bakterij. Med plastmi peptidoglikana imajo razporejene dolge anionske polimere, ki jih imenujemo teihoična kislina. Ta deluje kot kelator in ima vlogo pri adheziji bakterij na podlago. G(+) po barvanju z metilvijoličnim in nadaljnjim razbarvanjem z etanolom in acetonom v procesu barvanja po Gramu, ostanejo vijolično oziroma modro obarvane, kar je vidno pod mikroskopom. Razložek v obarvanju med grampozitivnimi in gramnegativnimi bakterijami je posledica razlik v strukturi bakterijske celične stene. Kristali metilvijoličnega ostanejo ujeti v debelih plasteh peptidoglikana (2).

Med grampozitivne sodijo bakterije iz rodov: *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*...

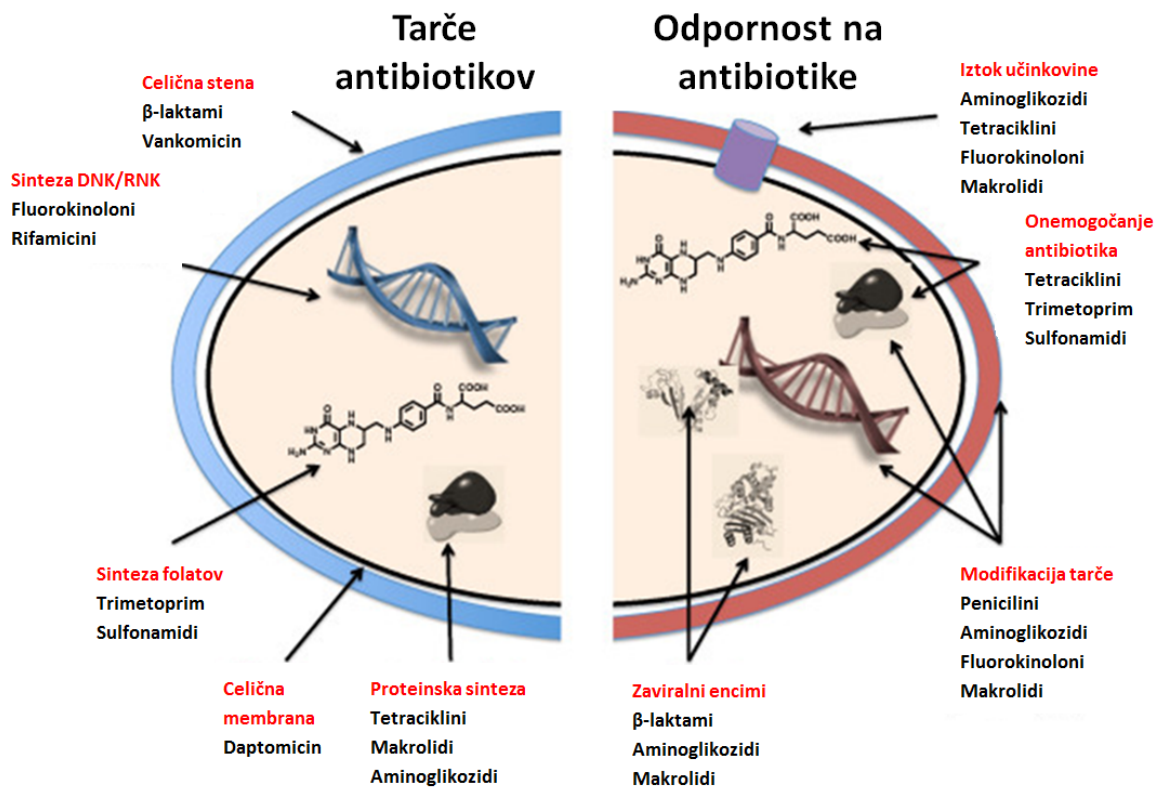
## 1.2. ANTIBIOTIKI IN PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE

Antibiotiki so zdravilne učinkovine za zdravljenje bakterijskih okužb. Delimo jih na antibiotike širokega spektra (npr. tetraciklini, kloramfenikol), ki delujejo na mnogo različnih vrst bakterij ter antibiotike ozkega spektra (npr. penicilini, vankomicin), ki delujejo samo na eno (specifično) vrsto bakterij. Izraz antibiotik se v farmacevtski literaturi ponekod uporablja le za protibakterijske učinkovine, ki jih proizvajajo mikroorganizmi. Da bi omogočili peroralno aplikacijo ali povečali spekter protibakterijskega delovanja pa velikokrat uporabljamo njihove polysintezne analoge. Z njimi lahko dosežemo tudi manjšo toksičnost, večjo jakost ali izboljšane farmakokinetične lastnosti. Sintezne snovi, ki niso povezane z naravnimi mikroorganizmi, pa uvrščamo med sintezne protibakterijske učinkovine. Glede na učinek jih delimo na bakteriostatične (le začasno zavrejo razmnoževanje) in baktericidne (trajno onemogočijo mikroorganizem, da se ta več ni zmožen razmnoževati) (4).

Idealna protibakterijska zdravilna učinkovina izraža selektivno toksičnost. Ta termin pove, da je zdravilo škodljivo parazitu, ne da bi bilo škodljivo gostitelju. Pogosto je selektivna toksičnost relativna; to pomeni, da je zdravilo v koncentraciji, ki jo gostitelj tolerira, škodljivo parazitu (5).

Selektivna toksičnost je lahko odvisna od specifičnih tarč, ki so potrebne, da se učinkovina veže ali pa je lahko odvisna od zaviranja biokemičnih dogodkov, ki so nujni za parazita, ne pa za gostitelja. Mehanizem delovanja nekaterih protibakterijskih zdravilnih učinkovin ni povsem razumljen, vendar ga lahko združimo v pet glavnih točk, ki so prikazane na sliki 2 (6,8):

1. Zaviranje sinteze celične stene
2. Zaviranje sinteze nukleinskih kislin
3. Antimetaboliti
4. Zaviranje funkcije celične membrane
5. Zaviranje proteinske sinteze



Slika 2: Tarče antibiotikov in mehanizmi odpornosti na antibiotike (prirejeno po (8))

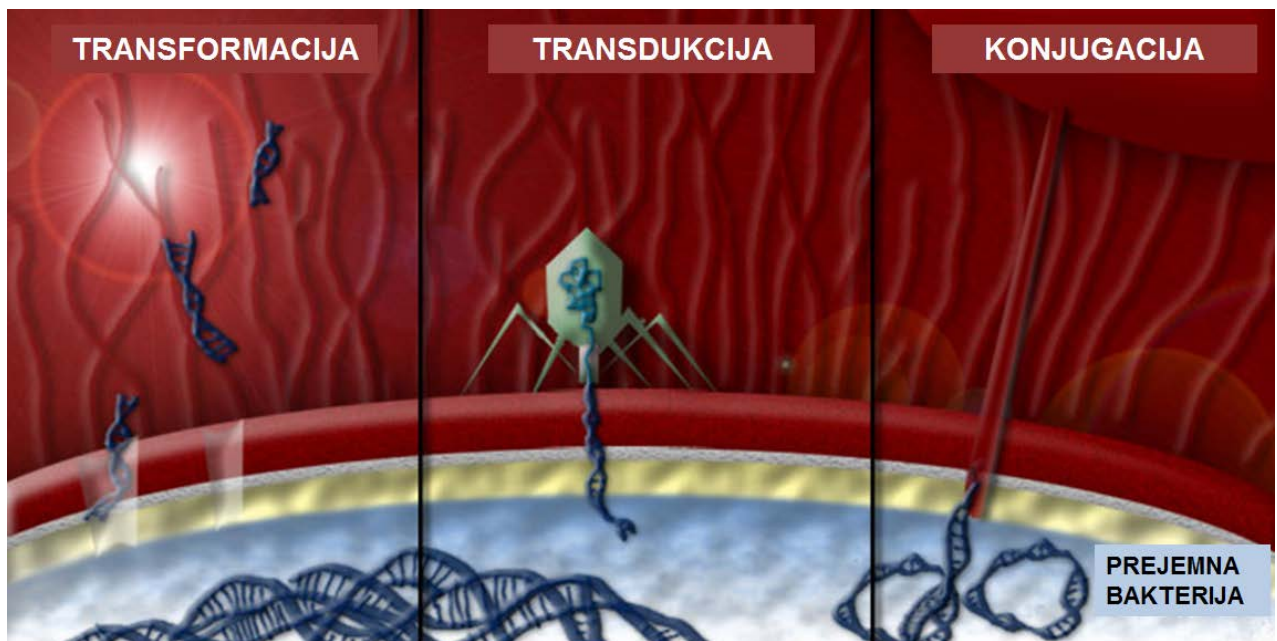
Na sliki 2 so prikazani še mehanizmi, ki bakterijskim celicam omogočajo odpornost (8):

- Zmanjšano kopičenje zdravilne učinkovine v celici zaradi zmanjšane prehoda v celico ali zaradi izčrpavanja učinkovine iz celice
- Vezava proteina na protibakterijsko učinkovino ali njegovo tarčo, kar onemogoči vezavo na tarčo
- Zaradi spremembe aminokislinskih ostankov v proteinskih molekulah, ki so tarče protibakterijskih učinkovin, pride do spremembe strukturne konformacije molekul proteinov, kar zmanjša vezavo učinkovine na tarčo in s tem tudi njegov učinek.
- Bakterija proizvaja encime, ki kemično spremenijo učinkovino, ta pa je v spremenjeni obliki za bakterijo nenevarna (β-laktamaze hidrolitsko inaktivirajo peniciline in cefalosporine).

### 1.3. BAKTERIJSKA ODPORNOST

Zaradi velike in v mnogih primerih napačne uporabe antibiotikov so z leti bakterije postale odporne proti določenim antibiotikom. Odpornost na antibiotike je lahko prisotna že pred izpostavitvijo zdravilu ali pa pridobljena. Slednja se razvije po stiku bakterije s protibakterijsko zdravilno učinkovino v koncentracijah, ki za bakterijo niso toksične. Prenos informacije za odpornost med bakterijskimi celicami poteka vertikalno ob celični delitvi ali horizontalno, na tri različne načine, kot je prikazano na sliki 3 (4):

- s transformacijo (direkten privzem proste DNK iz okolja);
- s transdukcijo, ki poteka s pomočjo vektorja (najpogosteje bakteriofag)
- s konjugacijo, ki je najpomembnejši in najpogostejši način prenosa odpornosti med bakterijami (prenos preko plazmidov);



Slika 3: Načini prenosa informacije za bakterijsko odpornost (prirejeno po (7))

## 1.4. METIONIN AMINOPEPTIDAZA

Metionin aminopeptidaza (MetAP) je encim, ki katalizira hidrolitično odstranjevanje N-terminalnega metionina iz nastajajočih proteinov. MetAP je dvovalentna metaloproteaza, ki jo najdemo v vseh organizmih in je pomembna zaradi odločilne vloge pri celjenju tkiva in degradaciji proteinov. Prav tako je pomembna pri angiogenezi, razrastu novih krvnih žil, kar je pomembna stopnja pri napredovanju nekaterih bolezni kot so tumorji in revmatoidni artritis. Encim je tako tarča dveh potencialnih antiangiogenih produktov ovalicina in fumagilina, ki selektivno zavirata proliferacijo človeških endotelijskih celic (10-12).

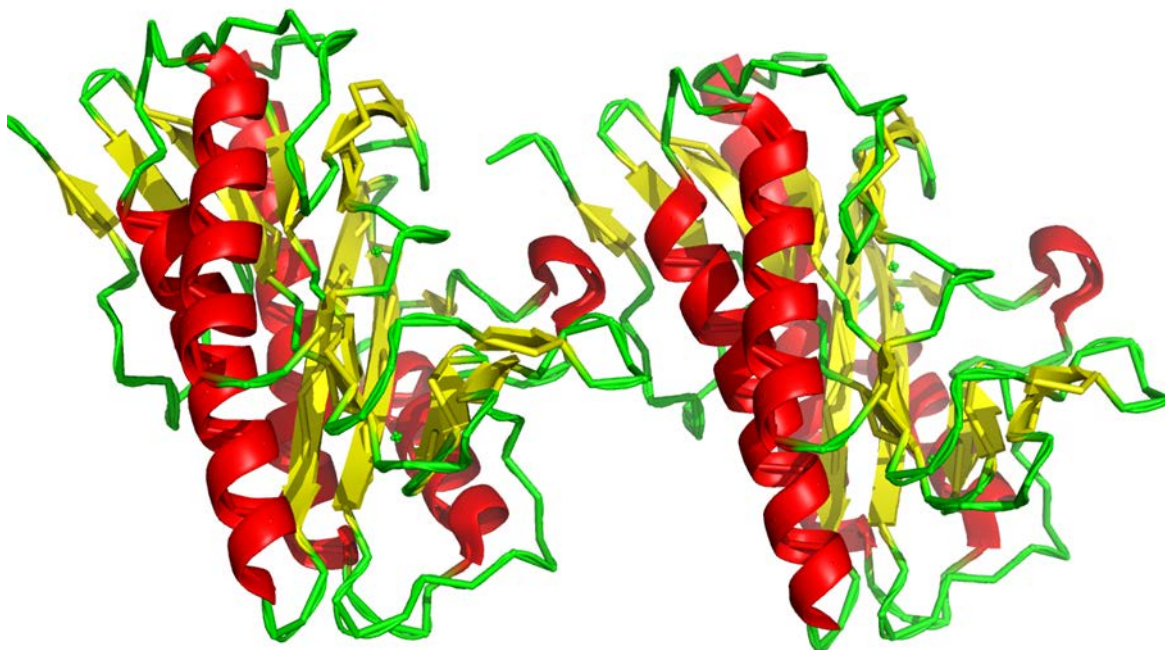
Encim MetAP je klasificiran v dva razreda (tip 1 in tip 2) na podlagi odsotnosti ali prisotnosti dodatne 62 aminokislin dolge verige (še neznane funkcije), ki se nahaja v bližini katalitičnega centra pri MetAP tipa 2 (11,12). Pri evkariontih sta prisotna oba encima, MetAP1 in MetAP2, medtem ko pri prokariontih le en. Tako je v bakteriji *Escherichia coli* (*E. coli*) poznan le en encim MetAP, ki je na podlagi sekvenčne homologije definiran kot MetAP tipa 1. Genetske študije kažejo, da izločitev gena, ki kodira za MetAP v številnih prokariontih, vpliva na počasnejšo rast ali povzroči smrtni fenotip. Metionin je univerzalni iniciator proteinske sinteze in njegova odstranitev je kritična v procesu zorenja proteina. Z odstranitvijo gena za MetAP v *E. coli*, *Salmonella typhimurium* in *Saccharomyces cerevisiae* je prišlo do celične smrti, kar dokazuje pomembnost aktivnosti encima MetAP. Te študije razkrivajo ključno vlogo encima pri preživetju prokariontov in uvrščajo te encime med možne tarče protibakterijskih učinkovin (10).

Štartni kodon, ki inicira sintezo proteina, kodira za metionin pri evkariontih in N-formilmetionin pri prokariontih in evkariontih. Vseeno pa večina primerov zrelih proteinov ne vsebuje N-terminalnega metionina, N-terminalna formilna skupina pa je redko ohranjena. V *E. coli* encim formilmetionin deformilaza lahko razcepi formilno skupino in pusti le N-terminalni metionin. N-terminalni metionin se v večini primerov cepi, ko je preostanek v primarni sekvenci majhen in brez naboja, kot so aminokislina glicin, alanin, serin, cistein, prolin, treonin in valin (10).

Encim MetAP iz *E. coli* je sestavljen iz dveh polipeptidnih verig, ki skupno vsebujeta 526 aminokislin. Veriga A vsebuje 263 aminokislin, od tega 6  $\alpha$ -vijačnic iz 75 aminokislinskih ostankov, kar znaša 28%, in 21  $\beta$ -ravnin iz 73 aminokislinskih ostankov, kar znaša 27%.



Veriga B vsebuje 263 aminokislin, od tega 5  $\alpha$ -vijačnic iz 70 aminokislinskih ostankov, kar znaša 26% in 22  $\beta$ -ravnin iz 74 aminokislinskih ostankov, kar znaša 28%. Na sliki 4 so z rdečo barvo prikazane  $\alpha$ -vijačnice, z rumeno  $\beta$ -ravnine in z zeleno zanke in ostale strukture. (24).



**Slika 4:** 3D kristalna struktura encima MetAP iz E.coli (PDB koda: 2GU7) (24)

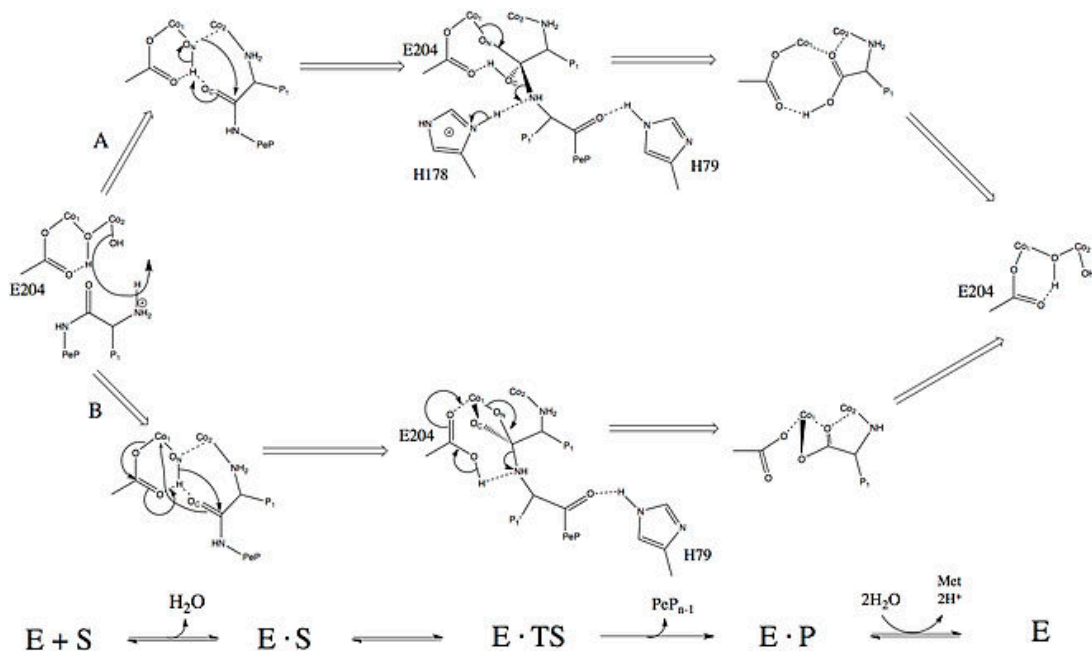
#### 1.4.1. Aktivno mesto encima MetAP

Oba tipa encima MetAP kažeta aktivnost v prisotnosti dveh dvovalentnih kovinskih ionov na katalitično enoto. Iz zgodnjih raziskav je znano, da je encim odvisen predvsem od ionov kobalta ( $\text{Co}^{2+}$ ), zadnje raziskave pa predlagajo, da je potrebno upoštevati tudi druge divalentne kovinske ione, kot so cink ( $\text{Zn}^{2+}$ ), baker ( $\text{Cu}^{2+}$ ), mangan ( $\text{Mn}^{2+}$ ) in železo ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (10). Predlagano je, da imata oba kovinska iona koordinacijsko število 5, kar pomeni, da je nanj vezano 5 ligandov. Nekatere raziskave kažejo, da je katalitična aktivnost encima največja ob prisotnosti enega ekvivalenta kovinskega iona, kar pomeni, da koordinacija drugega kovinskega iona ni pomembna za katalitično aktivnost encima (13).

Katalitično aktiven dvovalentni kovinski ion je koordiniran preko histidinskega ostanka His171. Prvi korak v katalizi MetAP je prepoznavanje stranske verige N-terminalnega metionina (substrat) preko hidrofobnega žepa v bližini kovinskega iona. Nato se atom

kisika iz karboksilne skupine peptidnega substrata usmeri proti kovinskemu ionu, povezanemu s His171 (11).

Histidinska ostanka H178 in H79 sta strogo ohranjena v aktivnem mestu v vseh zaporedjih MetAP doslej. Predlagano je, da oba histidinska ostanka igrata pomembno vlogo pri katalitičnem odstranjevanju N-terminalnega metionina iz polipeptidne verige. H79 pomaga pri pozicioniranju substrata preko vodikovih vezi na amino ali karbonilno skupino peptidne povezave (12). H178 tvori vodikovo vez z molekulo vode, ki je premostitvena povezava med dvema  $\text{Co}^{2+}$  ionoma, kar lahko zapišemo kot  $\text{H178-H}_2\text{O-H}_2\text{O-Co}^{2+}$  sistem. H178 posredno stabilizira premostitveno molekulo vode med dvema ionoma in je tako pomemben za samo katalizo, ni pa opredeljen kot katalitično zahtevani ostanek. Glu204, ki je prav tako ligand kovinskemu ionu, deluje kot akceptor/donor protonov v katalitičnem procesu (11). Na sliki 5 sta predlagana mehanizma MetAP v E.Coli (23).



**Slika 5:** Predlagana mehanizma MetAP v E.Coli (A) Tetraederski intermediat stabiliziran z Glu204 in kovinskim centrom (B) Tetraederski intermediat stabiliziran s His178 in kovinskim centrom (23)

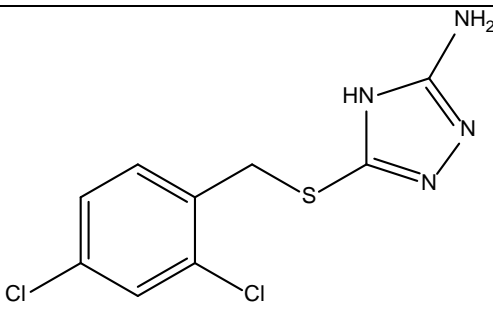
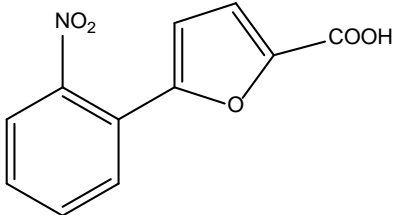
### 1.4.2. Znani zaviralci MetAP

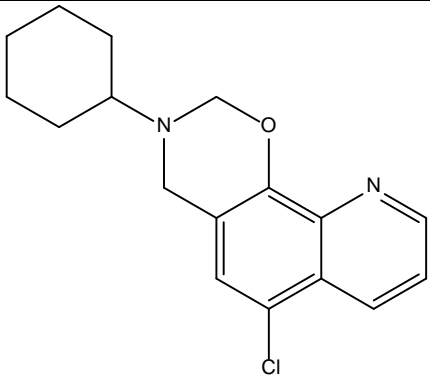
V zadnjih letih se pojavlja večje število zaviralcev prokariontskih MetAP. Spojine s triazolnim heterociklom kažejo aktivnost v mnogih organizmih preko interakcije dušikovih atomov v triazolnem obroču na pozicijah 1 in 2 z dvovalentnimi kobaltovimi ioni. Fenilna skupina s kloridnima ionoma se umesti v hidrofobni žep (Tyr27, Pro94, Tyr97, Cys105, Thr133, Phe211). Primer take strukture je spojina **1** v preglednici 1 (17).

Derivati furana imajo zaviralno aktivnost na MetAP iz *E. Coli*. Ključna za aktivnost je prisotnost karboksilne skupine v teh spojinah, ki koordinira kovinske ione v aktivnem mestu encima. Primer take strukture je spojina **2** v preglednici 1 (17,18).

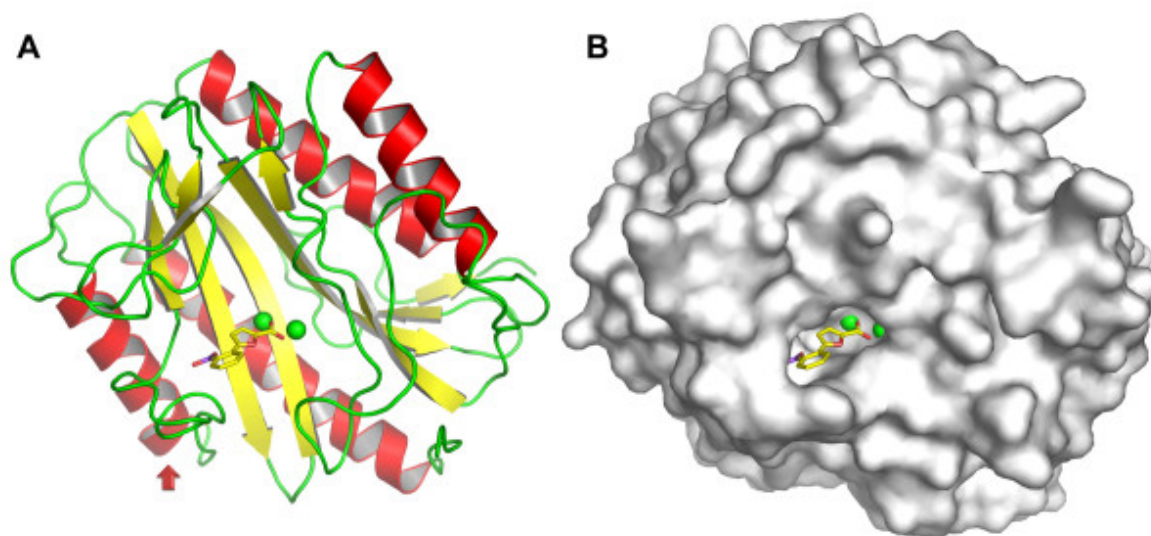
Kliokinol in njegovi derivati so potencialni zaviralci MetAP iz *Mycobacterium tuberculosis*, ki je glavni povzročitelj tuberkuloze, nalezljive in mnogokrat smrtne bolezni. Tuberkuloza se zaradi zmanjšane imunske odpornosti pogosto pojavlja pri bolnikih, okuženih s HIV-om. Primer take strukture je spojina **3** v preglednici I (14,15).

**Preglednica I: Znani zaviralci MetAP (14, 15, 17, 18)**

Encim	Spojina	Kemijska struktura	IC <sub>50</sub>
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> MtMetAP1c	<b>1</b>		0,24 μM
<i>Escherichia coli</i> EcMetAP	<b>2</b>		1,1 μM

<i>Mycobacterium tuberculosis</i> MtMetAP1c	<b>3</b>		3,76 $\mu\text{M}$
--	----------	--	--------------------

Na sliki 6 je prikaz spojine **2** v aktivnem mestu MetAP iz *E.coli*. Zeleni krogli sta prikaz dveh kovinskih ionov (v tem primeru  $\text{Mn}^{2+}$ ), spojina je prikazana kot paličice v bližini kovinskih ionov, kjer rumena barva predstavlja ogljik, rdeča kisik in modra dušik. Rdeči trakovi predstavljajo  $\alpha$ -vijačnice, rumeni trakovi  $\beta$ -ravnine in zeleni trakovi zanke in ostale strukture (18).

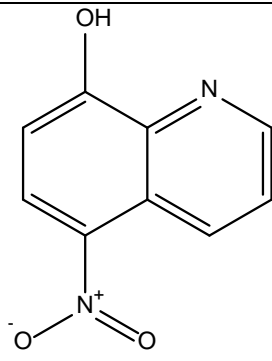
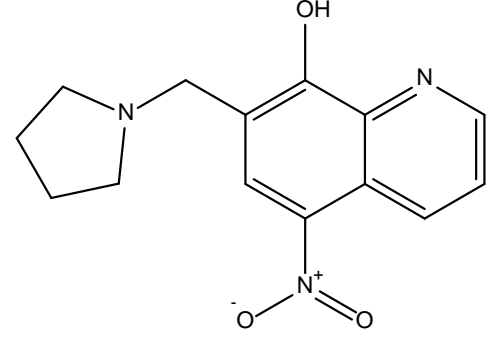
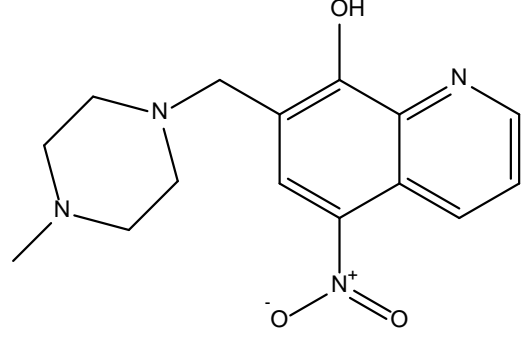


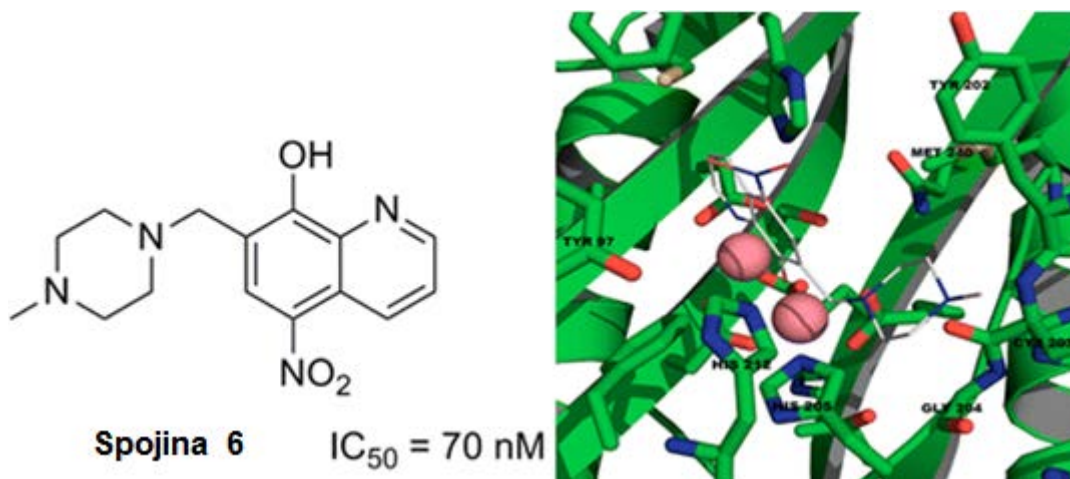
**Slika 6:** Prikaz spojine **2** v aktivnem mestu MetAP iz *E.coli* (A) in površinski prikaz spojine v aktivnem mestu (B) (PDB koda: 2Q92) (18)

Zdravilna učinkovina nitroksolin (**4**, preglednica II) se v Evropi uporablja že več kot 50 let in je zelo učinkovit v borbi proti biofilmskim infekcijam. Zmanjša gostoto biofilma pri infekcijah s *Pseudomonas aeruginosa* in tako omogoči dostop imunskega sistema do infekcije in vivo. Nitroksolin kelira kovinske ione iz matriksa biofilma. S ponovno dostavo teh ionov v sistem je formacija biofilma ponovno vzpostavljena. Nitroksolin je sintetičen uroantiseptik, ki zavre delovanje metaloencimov tako, da se veže s kovinskim ionom

encima in prepreči vezavo s specifičnim substratom (16). Fenolna skupina na mestu 8 disociira v  $O^-$  pri fiziološkem pH in skupaj z dušikovim atomom na mestu 1 prispeva k vezavi na kovinski ion v aktivnem mestu. Dodatna funkcionalna skupina na mestu 5 poveča zaviralni učinek, kjer je kot najbolj primerna  $-NO_2$  skupina (17). Učinek je bakteriostatičen, baktericiden in fungiciden. Nitroksolin v subinhibitornih koncentracijah v seču zavira pritrjanje uropatogene *E. coli* na epitelij sečil. Nitroksolin deluje na vrsto po Gramu pozitivnih in negativnih mikroorganizmov in gliv. Deluje skoraj na vse običajne povzročitelje infekcij sečil. Na nitroksolin so običajno občutljivi *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Burkholderia pseudomallei*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Candida spp.*, *Torulopsis spp.* (16). Ker divalentni kovinski ioni direktno sodelujejo pri encimski cepitvi N-terminalnega metionina, so večino zaviralcev MetAP odkrili pri encimu, odvisnemu od  $Co^{2+}$  ionov, predlagano pa je, da so za intrinzično aktivnost potrebni  $Fe^{2+}$  ioni pri MetAP iz *E. coli* in  $Mn^{2+}$  ioni pri humani MetAP tipa 2 pri fizioloških pogojih. Pri visokih koncentracijah kovinskih ionov se v strukturi encima pojavljata 2 kovinska iona in tako določita zaviralce, ki za svojo afiniteto potrebujejo dodaten kovinski ion. Ob odsotnosti substrata ali zaviralca je afiniteta drugega kovinskega iona do MetAP izjemno nizka. Če upoštevamo, da so koncentracije prostih kovinskih ionov v celicah nizke, lahko pričakujemo, da nekateri zaviralci v celicah ne bodo učinkoviti. Zaviralci MetAP, ki so najbolj učinkoviti v prisotnosti enega kovinskega iona, niso zahtevani ampak zaželeni, vseeno pa bi vsi zaviralci MetAP pri fizioloških pogojih morali biti učinkoviti (25). V preglednici 2 so prikazani znani zaviralci MetAP z nitroksolinskim skeletom, na sliki 7 pa prikaz spojine **6** v aktivnem mestu encima MetAP iz *Burkholderia pseudomallei* (17).

**Preglednica II: Znani zaviralci MetAP z nitroksolinskim skeletom (17)**

Encim	Spojina	Kemijska struktura	IC <sub>50</sub>
<i>Burkholderia pseudomallei</i> BpMetAP1	<b>4</b> (nitroksolin)		60 nM
<i>Burkholderia pseudomallei</i> BpMetAP1	<b>5</b>		30 nM
<i>Burkholderia pseudomallei</i> BpMetAP1	<b>6</b>		70 nM



Slika 7: Prikaz spojine 6 v aktivnem mestu BpMetAP1 (17)

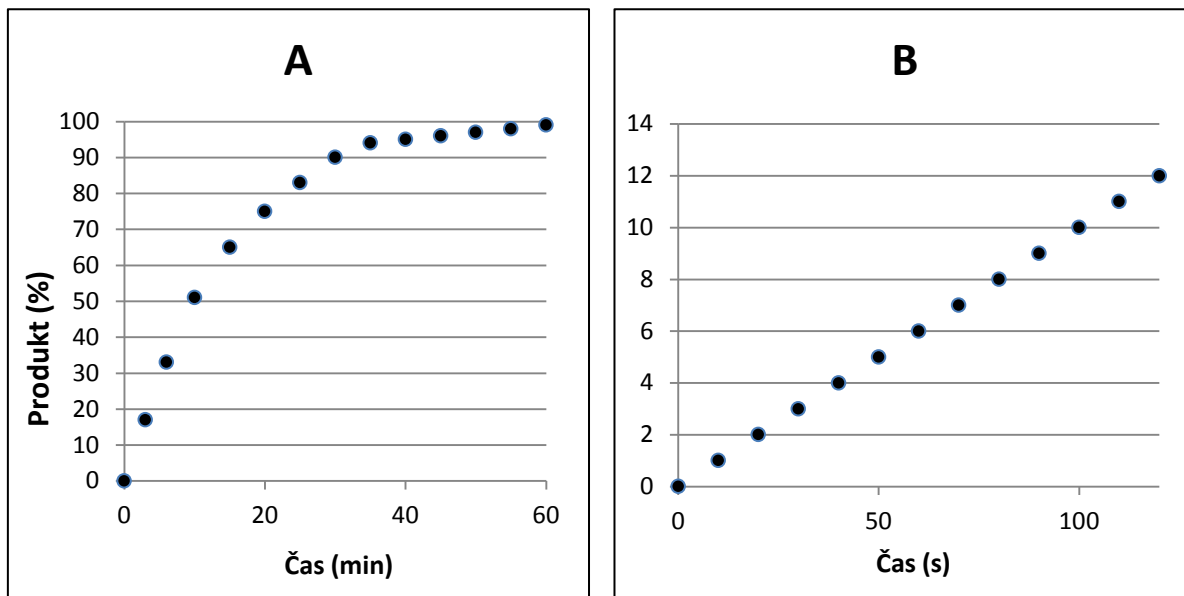
## 1.5. ENCIMSKA KINETIKA V STACIONARNEM STANJU

Termin "stacionarno stanje" (ang. "steady state") se nanaša na situacijo, kjer je koncentracija kompleksa encim-substrat (ES) konstantna preko ravnotežja med stopnjo tvorbe ES kompleksa (združitve prostega encima in prostega substrata) in stopnjo razpada ES kompleksa (preko disociacije nazaj do prostih reaktantov in naprej do tvorjenja produkta). Stopnja, oziroma hitrost encimske reakcije, izmerjena kot izguba substrata ali tvorjenje produkta, je proporcionalna koncentraciji ES kompleksa kot (9):

$$v = \frac{-d[S]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k[ES]$$

Dokler je kompleks [ES] konstanten, bo konstantna tudi reakcijska hitrost. To stanje dosežemo z velikim molarnim presežkom substrata v primerjavi s koncentracijo encima, tako da je relativno konstantna količina substrata na voljo, za vezavo na prosti encim. Tipični encimski testi opisujejo encim v nM in substrat v  $\mu\text{M}$  do mM koncentracijah. V zgodnji fazi reakcije je količina substrata, ki se porabi za vezavo na prosti encim, zelo majhen delež v primerjavi s celotno količino. V zgodnji fazi reakcije, ki jo imenujemo začetna faza, so pogoji stacionarnega stanja dobro vzdrževani in začetna hitrost encimske reakcije je dobro definirana z nagibom produkta (ali substrata) v odvisnosti od časa. Začetna faza se zaključi, ko se 10-15% začetne koncentracije substrata pretvori v produkt. Po tej fazi se hitrost encimske reakcije začne upočasnjevati, saj se vedno več substrata odstrani iz začetne količine, dokler ni doseženo ravnotežje med reakcijo, kjer nastaja

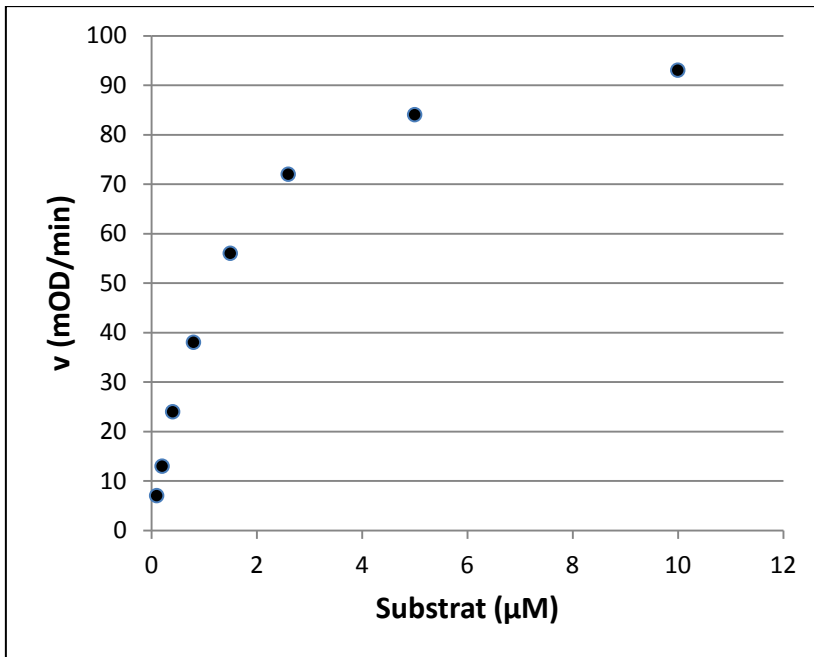
produkt in obratno reakcijo (9). Na sliki 8 je tipična encimska krivulja v zaključni fazi ter primerjava z začetno fazo, kjer opazimo linearnost.



**Slika 8:** (A) Tipična encimska krivulja v zaključni fazi (B) Podatki iz (A), ki predstavljajo začetne točke reakcije, oziroma začetno hitrost encimske reakcije (9)

Če je koncentracija encima določena znatno pod koncentracijo substrata, in koncentracijo substrata titriramo, ugotovimo da se začetna hitrost encimske reakcije razlikuje (slika 9). Pri nižjih koncentracijah substrata, začetna hitrost linearno sledi koncentraciji substrata ( $[S]$ ). Pri srednjih vrednostih  $[S]$  je začetna hitrost semilinearna funkcija  $[S]$ , medtem ko pri višjih  $[S]$ , začetna hitrost doseže maksimalno vrednost, kot da so aktivna mesta vseh encimskih molekul nasičena s substratom (9).





Slika 9: Začetna hitrost encimske reakcije v odvisnosti od koncentracije substrata (9)

Tak proces so prvič opazili konec 19.stoletja in začetek 20.stoletja. Prvič so to pojasnili s pomočjo hitrega ravnotežnega modela Henri-ja in od Michaelisa in Mentena, kar je vodilo matematični zapis encimske kinetike (9):

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_S + [S]}$$

$V_{max}$  se nanaša na maksimalno hitrost encimske reakcije ob neskončni koncentraciji substrata. Matematično ga prikažemo (9):

$$V_{max} = k_{cat} * [E]$$

Kasneje sta Briggs in Haldane (1925) demonstrirala kako opišemo hitrost encimske reakcije pri stabilnih pogojih kot nasitljivo funkcijo koncentracije substrata (9).

$$v = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

Enačbi sta identični, razen zamenjave ravnotežne disociacijske konstante  $K_S$  s kinetično konstanto  $K_M$ . Ta zamenjava je nujna, ker v obravnavi stacionarnega stanja, predpostavke iz hitrega ravnotežnega modela, ne držijo.  $K_M$  ni prava ravnotežnostna konstanta in je za naše potrebe lahko definirana kot merilo relativne afinitete ES kompleksa v stacionarnem

stanju. Kinetična konstanta  $K_M$  (pogosto obravnavana kot Michaelisova konstanta) izražamo v enotah molarnosti. Če določimo, da je  $[S]$  enaka  $K_M$ , dobimo (9):

$$v = \frac{V_{max}[S]}{[S] + [S]} = \frac{1}{2}V_{max}$$

Iz enačbe ugotovimo, da je  $K_M$  enaka koncentraciji substrata, ki povzroči hitrost encimske reakcije enaki polovici maksimalne hitrosti.  $K_M$  je tista koncentracija substrata, ki vodi do polovične zasičenosti aktivnih mest encima v pogojih stacionarnega stanja (9).

Pri testiranju spojin sta za prikaz podatkov pomembni rezidualna aktivnost (RA) in koncentracija zaviralca, pri kateri je zavrte 50% aktivnosti encima ( $IC_{50}$ ). Rezidualna aktivnost predstavlja izgubo oziroma delež v primerjavi z encimsko aktivnostjo v odsotnosti zaviralca in jo izrazimo v odstotkih. Izračunamo jo tako, da povprečno vrednost začetne hitrosti encimske reakcije zaviralne spojine, delimo s povprečno vrednostjo začetne hitrosti encimske reakcije slepega vzorca, kjer preiskovana spojina ni prisotna (9):

$$RA = \frac{v_i}{v_{sl}} = \%$$

$IC_{50}$  je merilo učinkovitosti zaviralne spojine pri zaviranju specifičnega biološkega ali biokemijskega procesa. Pove nam koncentracijo preiskovane spojine, ki zmanjša katalitsko aktivnost encima za polovico ( $RA=50\%$ ). Obstaja več načinov za določanje  $IC_{50}$ . V sklopu te diplomske naloge bomo  $IC_{50}$  določili iz enačbe premice, kjer bodo na X-osi različne koncentracije zaviralne spojine, na Y-osi pa odstotki zaviranja posamezne spojine (9).

## 2. NAČRT DELA

Namen dela je optimizacija literarnega postopka za določanje aktivnosti metionin aminopeptidaze in tako omogočiti kontinuirano spremljanje reakcije na mikrotiterskih ploščah. Sledili bomo postopku predinkubacije encima v aktivacijskem pufru in preverili aktivnost encima brez predinkubacije, da dokažemo pomembnost začetne aktivacije pred izvajanjem testov. Določili bomo kinetične parametre encimske reakcije, kjer se bomo osredotočili predvsem na  $K_M$ . Po določitvi kinetičnih parametrov encimske reakcije nam mora vzpostavljeni sistem zagotavljati določeno hitrost, enostavnost, ponovljivost in cenovno ugodnost za predviden obseg testiranj sinteznih nitroksolinskih derivatov. Določili bomo vpliv dimetilsulfoksida (DMSO) na aktivnost encima, saj so nekatere že pripravljene spojine raztopljene prav v tem topilu.

Ovrednotili bomo knjižnico spojin z nitroksolinskim skeletom, saj so podobni analogi nitroksolina že izkazali aktivnost na MetAP iz drugih bakterijskih sevov. Večina spojin iz knjižnice je že v ustrezni raztopini, medtem ko jih je nekaj na voljo v trdni obliki. Le te bomo natehtali in raztopili v topilu DMSO in jih z nadaljnjimi redčitvami pripravili v ustreznih koncentracijah. Spojinam, ki bodo uspešno zavirale katalitsko aktivnost encima MetAP, bomo določili srednjo zaviralno koncentracijo. V svojem postopku bomo preverili vpliv kobaltovih ( $\text{Co}^{2+}$ ) ionov na aktivnost encima. Začeli bomo z ioni pri koncentracijah, ki so navedene v literarnem postopku, nato pa smiselno preverili še vpliv pri različnih koncentracijah. Postopek bomo ponovili še pri bakrovih ( $\text{Cu}^{2+}$ ), cinkovih ( $\text{Zn}^{2+}$ ) in železovih ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ionih, ki so v publikacijah navedeni kot možni aktivatorji encima, ki se pojavljajo v aktivnem mestu.

Zavedamo se, da učinkovitosti rešetanja visoke zmogljivosti ne bomo dosegli, ampak z vzpostavljenim sistemom moramo doseči hitro, kakovostno in ponovljivo testiranje izbranih spojin. Spojinam, ki bodo uspešno zavirle katalitsko aktivnost encima, bomo določili  $\text{IC}_{50}$  in razmislili o možni vezavi teh spojin v aktivno mesto encima.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. MATERIALI

##### 3.1.1. Reagenti

###### a) Pufer HEPES (20mM pH=7,00)

Na precizni tehtnici smo v plastičnem čolničku zatehtali 2,383g HEPES proste kisline, jo dodali v stekleno posodo in jo raztopili v 450mL destilirane vode. Z NaOH smo uravnali pH na 7,05 in dopolnili z destilirano vodo do oznake (500mL).

$m_{\text{zatehte}}$  (HEPES prosta kislina) = 2,383g

M (HEPES) = 238,3 g/mol

$$c = \frac{m}{M * V} = \frac{2,383g}{238,3 \frac{g}{mol} * 0,5L} = 0,02M = \mathbf{20mM}$$

###### b) NaCl (10mM)

Na precizni tehtnici smo v plastičnem čolničku zatehtali 292,2mg NaCl in ga dodali v 500mL pufra.

M(NaCl)=58,44 g/mol

$$m = n * M = c * V * M = 10mM * 0,5L * 58,44 \frac{g}{mol} = 0,2922g = \mathbf{292,2mg}$$

###### c) Ellmanov reagent (2mM)

Na analitski tehtnici smo v centrifugirki zatehtali 7,927mg Ellmanovega reagenta in ga raztopili v pufri do volumna 10mL.

M=396,35g/mol

V=10mL

$$m = c * V * M = 2mM * 0,01L * 396,35 \frac{g}{mol} = 0,007927g = \mathbf{7,927mg}$$

###### d) Encim E.Coli MetAP (M=31kDa)

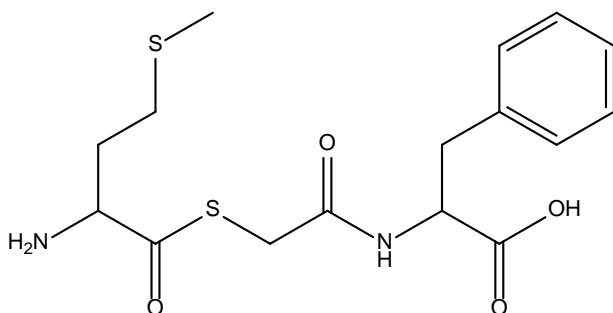
Encim smo pred testiranjem ustrezno inkubirali (redčili) v aktivacijskem pufri.

c=11,5mg/mL

$$c = \frac{11,5 \frac{mg}{mL}}{31000 \frac{g}{mol}} = 371 \mu M$$

**e) Substrat N-[(S-metionil)-2-merkaptacetil]fenilalanin (10mM v DMF)**

Liofiliziran substrat smo zatehtali in raztopili v dimetilformamidu (DMF), ki je pogosto organsko topilo za kemijske reakcije. Koncentracija DMF-a v reakcijski mešanici znaša 0,5%. (1,5 $\mu$ L substrata v 300 $\mu$ L reakcijske mešanice).



**Slika 10:** Substrat N-[(S-metionil)-2-merkaptacetil]fenilalanin

Zatehtali smo 2,9mg substrata na analitski tehtnici s pomočjo majhne spatule in ga raztopili v 783 $\mu$ L DMF-a, da smo prišli do koncentracije 10mM.

M=370,1 g/mol

$$V(DMF) = \frac{n}{c} = \frac{m}{M * c} = \frac{2,9 * 10^{-3} g}{370,1 \frac{g}{mol} * 10 * 10^{-3} M} = 7,83 * 10^{-4} L = 783 \mu L$$

### 3.1.2. Reagenti v aktivacijskem pufu

Pripravimo 50mL aktivacijskega pufra v plastični centrifugirki, ki ga nato v ustreznem razmerju dodamo encimu pred vsakim testiranjem in inkubiramo 20 minut na ledu.

**a) Puffer HEPES (23mM pH=7,5)**

Zatehtali smo 0,274g HEPES proste kisline na precizni tehtnici in jo raztopili v 45mL destilirane vode. Z NaOH smo uravnali pH na 7,60 in dopolnili z destilirano vodo do oznake.

$m_{zatehte}$  (HEPES prosta kislina) = 0,274g

M (HEPES) = 238,3 g/mol

V (pufra) = 50mL

$$c = \frac{m}{M * V} = \frac{0,274g}{238,3 \frac{g}{mol} * 0,05L} = 0,023M = \mathbf{23mM}$$

**b) KCl (136mM)**

Zatehtali smo 506,94mg KCl na precizni tehtnici in ga dodali v 50mL aktivacijskega pufra.

M(KCl)=74,55 g/mol

$$m = n * M = c * V * M = 136mM * 0,05L * 74,55 \frac{g}{mol} = 0,50694g = \mathbf{506,94mg}$$

**c) Metionin (14mM)**

Zatehtali smo 104,44mg metionina na precizni tehtnici in ga dodali v 50mL aktivacijskega pufra.

M(Metionin)=149,21g/mol

$$m = n * M = c * V * M = 14mM * 0,05L * 149,21 \frac{g}{mol} = 0,10444g = \mathbf{104,44mg}$$

**d) CoCl<sub>2</sub> (9mM)**

Zatehtali smo 58,43mg CoCl<sub>2</sub> na precizni tehtnici in ga dodali v 50mL aktivacijskega pufra.

M(CoCl<sub>2</sub>)=129,84g/mol

$$m = n * M = c * V * M = 9mM * 0,05L * 129,84 \frac{g}{mol} = 0,05843g = \mathbf{58,43mg}$$

### 3.1.3. Ostali uporabljeni pribor

Pri delu smo uporabljali laboratorijski pribor, kot so steklene erlenmajerice, bučke, čaše, kapalke in epruvete ter plastične centrifugirke, mikrocentrifugirke in mikropipete. Za encimsko reakcijo smo uporabili brezbarvne mikrotiterske plošče s 96 luknjicami in ravnim dnom. Za določanje končnega obarvanega produkta smo uporabili spektrofotometer BioTek Synergy H4 hybrid reader. Za obdelavo podatkov smo uporabljali Microsoft Excel 2010, za risanje struktur pa ChemDraw Professional 15.0. Za risanje 3D strukture encima smo uporabili PyMOL 1.7.6.5.

### 3.2. KNJIŽNICA SPOJIN

Skupno smo testirali 100 spojin. Vse spojine so derivati nitroksolina, ki so v interni knjižnici spojin Fakultete za farmacijo. Spojine so raztopljene v dimetilsulfoksidu (DMSO) v 1mM koncentraciji. Spojine so zamrznjene v kriovialah NUNC v formatu mikrotiterskih plošč s 96 vdolbinami. Pred uporabo smo vzorce odtajali na sobni temperaturi. Iz Excelove tabele na računalniku smo razbrali številko in pozicijo na plošči na kateri se nahaja označena krioviala in tako prišli do koncentracije spojine in SMILES kode. SMILES (ang. "Simplified Molecular Input Line Entry Sistem") je enovrstični zapis strukture spojine, kjer so definirani samo vrsta atomov in povezave med njimi. Iz omenjene kode, s pomočjo programa ChemDraw Professional 15.0, hitro pridemo do strukture spojine. Na sliki 11 so prikazane nekatere izmed pripravljenih spojin iz interne knjižnice Fakultete za farmacijo.

Spojina	Storage ID	C	Smiles
GIS284	3A5	1mM	<chem>OC1=C(CN(CC2=CC=CC=C2)CC#N)C=C([N+][O-])C3=CC=CN=C31</chem>
GISB4	3F1	1mM	<chem>OC1=C(CN2CCN(C)CC2)C=C([N+][O-])C3=CC=CN=C31</chem>
GIS304	3D6	1mM	<chem>FC1=CC=C(O)C2=NC=CC=C21</chem>
GIS266_1_P	3B4	1mM	<chem>OC1=C(CN(C)CC#N)C=C([N+][O-])C2=CC=CN=C21</chem>
GJ-21	3B3	1mM	<chem>OC1=CC(C(O)=O)=CC2=CC=CN=C21</chem>
GIS277	3D4	1mM	<chem>OC1=C(CNCC)C=C([N+][O-])C2=CC=CN=C21</chem>
GIS286_P	3C5	1mM	<chem>OC1=C(CN2CCN(CC3=CC=NC=C3)CC2)C=C([N+][O-])C4=CC=CN=C41</chem>
GIS266_oborina	3A4	1mM	<chem>OC1=C(C[N+]=CC=CC=C2)C=C([N+][O-])C3=CC=CN=C31</chem>
4-hidroksi-1-naftalenesulfonska kislina	3F4	1mM	<chem>OC1=C2C=CC=CC2=C(S(=O)(O)=O)C=C1</chem>
GISB4	3F1	0,5mM	<chem>OC1=C(CN2CCN(C)CC2)C=C([N+][O-])C3=CC=CN=C31</chem>
nitrosolin	3A1	1mM	<chem>OC1=CC=C([N+][O-])C2=CC=CN=C21</chem>
GIS250	3C6	1mM	<chem>BrC1=CC=C([N+][O-])C2=CC=CN=C21</chem>
1-amino-2-naftol-4-sulfonska kislina hemihidrat	3G4	1mM	<chem>OC1=CC(S(=O)(O)=O)=C2C=CC=C21N</chem>
GJ-22.2	3D3	1mM	<chem>OC1=CC=C(C(O)=O)C2=C(C)C=CN=C21</chem>
GJ-19	3A3	1mM	<chem>OC1=CC=C(C(O)=O)C2=CC=CN=C21</chem>
GIS241_P	3B2	1mM	<chem>OC1=C(CN2CCCC[C@H]2C)C=C([N+][O-])C3=CC=CN=C31</chem>
GIS289_P	3D5	1mM	<chem>OC1=C(CNCC2=CC=CC=C2)C=C([N+][O-])C3=CC=CN=C31</chem>
GJ-28.1	3G3	1mM	<chem>OC(COC1=CC=C([N+][O-])C2=CC=CN=C21)=O</chem>
GIS285_P	3B5	1mM	<chem>OC1=C(CN2CCN(CC3=CC=CN=C3)CC2)C=C([N+][O-])C4=CC=CN=C41</chem>
4-hidroksi-1,5-naftiridin	3H4	1mM	<chem>OC1=CC=NC2=CC=CN=C21</chem>
GIS298_P	3H5	1mM	<chem>OC1=CC=C(S(=O)(C)=O)C2=CC=CN=C21</chem>
GIS295_1	3F5	1mM	<chem>O=[N+][O-]C1=CC=C(N(C#N)CC#N)C2=CC=CC=C21</chem>
MC15	3B6	1mM	<chem>O=C(OC)COC1=CC=C([N+][O-])C2=CC=CN=C21</chem>
GLM08_P	3F3	1mM	<chem>OC1=C(CN2CCN(C(OCC)=O)CC2)C=C([N+][O-])C3=CC=CN=C31</chem>
GISB13	3A2	1mM	<chem>OC1=C(CN2CCCC(O)C2)C=C([N+][O-])C3=CC=CN=C31</chem>
GIS249_2	3EE2	1mM	<chem>NC1=C([N+][O-])C2=CC=CN=C2C=C1</chem>
GIS244	3D2	1mM	<chem>OC1=C(CN[C@@H]2[C@H](C(O)=O)CCCC2)C=C([N+][O-])C3=CC=CN=C31</chem>
GJ-6.1	3G2	1mM	<chem>O=[N+][O-]C1=CC=C(OCC#N)C2=NC=CC=C21</chem>
GISB5	3G1	1mM	<chem>OC1=C(CN2CCC(O)CC2)C=C([N+][O-])C3=CC=CN=C31</chem>
GLM02_1	3EE3	1mM	<chem>NC1=C([N+][O-])C=C([N+][O-])C2=CC=CN=C21</chem>
GIS297	3G5	1mM	<chem>OC1=CC=C(C(F)(F)F)C2=CC=CN=C21</chem>
GIS249_1	3F2	1mM	<chem>NC1=CC=C([N+][O-])C2=CC=CN=C21</chem>
GIS268	3C4	1mM	<chem>NC1=C(Br)C=C([N+][O-])C2=CC=CC=C21</chem>
4-nitro-1-naftol	3B1	1mM	<chem>OC1=CC=C([N+][O-])C2=CC=CC=C21</chem>
GJ-41.1	3H3	1mM	<chem>O=[N+][O-]C1=CC=C(N2CCOCC2)C3=CC=CC=C31</chem>
GJ-7.2	3H2	0,1mM	<chem>O=[N+][O-]C1=CC=C(N2CCCC2)C3=NC=CC=C31</chem>
1-amino-4-nitronaftalen	3C1	1mM	<chem>NC1=CC=C([N+][O-])C2=CC=CC=C21</chem>
GIS-213	3D1	1mM	<chem>OC1=C([N+][O-])C=C([N+][O-])C2=CC=CN=C21</chem>
GISB2	3EE1	0,5mM	<chem>OC1=C(CN2CCCC2)C=C([N+][O-])C3=CC=CN=C31</chem>
GISB6	3H1	0,5mM	<chem>OC1=C(CN2CCC(C)CC2)C=C([N+][O-])C3=CC=CN=C31</chem>
GJ-21	3C3	1mM	<chem>OC1=CC(C(O)=O)=CC2=CC=CN=C21</chem>
8-hidroksi-5-kinolinsulfonska kislina hidrat	3EE4	1mM	<chem>OC1=CC=C(S(=O)(O)=O)C2=CC=CN=C21.O</chem>
GIS295_2_P	3EE5	1mM	<chem>O=[N+][O-]C1=CC=C(NCC#N)C2=CC=CC=C21</chem>
MC14	3A6	1mM	<chem>COC1=CC=C(C(O)=O)C2=C(C)C=CN=C21</chem>

Slika 11: Podatki iz knjižnice spojin

Spojine, ki smo jih pripravili sami z natehto in raztapljanjem v DMSO, smo shranjevali v hladilniku. Pripravljali smo spojine koncentracij 3,5 ali 10 mM ter nato ustrezno redčili pred testiranjem. Pri slabo topnih spojinah smo za povečanje hitrosti raztapljanja uporabili ultrazvočno kad, čeprav so v večji meri bile spojine dobro topne. Primer priprave spojine je v preglednici 3.



### Preglednica III: Primer priprave spojine GLM41\_2

Spojina	Zatehta (mg)	M(g/mol)	C(mM)	V DMSO (μL)
GLM41_2	1,01	362,35	3	929,12

$$V = \frac{n}{c} = \frac{\frac{m}{M}}{c} = \frac{m}{M * c} = \frac{1,01 * 10^{-3} g}{362,35 \frac{g}{mol} * 3 * 10^{-3} \frac{mol}{L}} = 9,2912 * 10^{-4} L = 929,12 \mu L$$

## 3.3. METODE

### 3.3.1. Reakcija z Ellmanovim reagentom

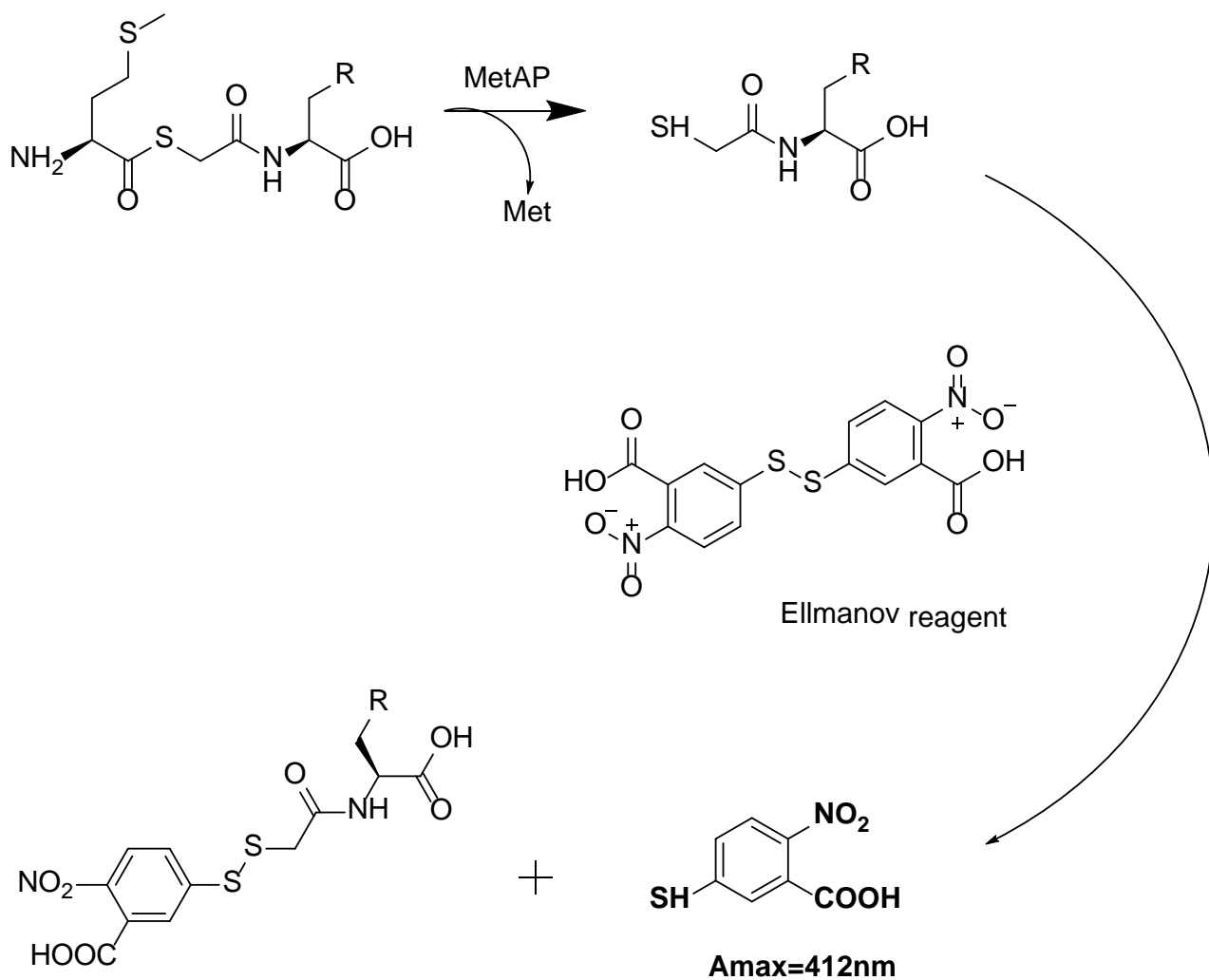


**Slika 12:** Osnovna reakcija tiola z Ellmanovim reagentom

Ellmanov reagent (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojska kislina) ali DTNB) je reagent s katerim kvantificiramo število ali koncentracijo tiolnih skupin v vzorcu. Tioli reagirajo z DTNB tako, da razcepijo disulfidno vez do 2-nitro-5-tiobenzoata (TNB<sup>-</sup>), ki ionizira do TNB<sup>2-</sup> dianiona v vodi pri nevtralnem ali bazičnem pH. TNB<sup>2-</sup> ion daje rumeno barvo in ga identificiramo s spektrofotometrom z merjenjem absorbance v vidnem polju pri valovni dolžini 412nm. Molarni absorpcijski koeficient znaša 14,150 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> za razredčene raztopine v pufru.

### 3.3.2. Princip določanja obarvanega produkta s spektrofotometrom

Encim MetAP odstrani metionin iz substrata, pri čemer prosta -SH skupina reagira z Ellmanovim reagentom. Obarvani končni produkt detektiramo spektrofotometrično v fazi začetne hitrosti encimske reakcije pri valovni dolžini 412 nm. Dobljene podatke izvozimo v Excelovo tabelo in nadaljujemo z obdelavo.



Slika 13: Shema odcepa metionina in reakcija z Ellmanovim reagentom

## 4. EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1. TEST ENCIMSKE AKTIVNOSTI

Preverili smo kaj se dogaja s posameznimi komponentami v odvisnosti od časa v smislu spontane hidrolize in aktivnost encima brez predinkubacije v aktivacijskem pufru. Encim in substrat shranjujemo v zamrzovalniku in v času uporabe imamo reagente ves čas na ledu. Reagent in aktivacijski pufer shranjujemo v hladilniku, pufer pa na sobni temperaturi.

Encimsko aktivnost smo določili pri 50 $\mu$ M substrata in povečevali koncentracijo encima.

### 4.2. LINEWEAVER-BURKOV DIAGRAM IN DOLOČANJE $K_M$

Michaelis-Mentenova kinetika je eden izmed najbolj znanih modelov v encimski kinetiki. Michaelisova konstanta ali  $K_M$  je tista koncentracija substrata, ki povzroči hitrost encimske reakcije enaki polovici maksimalne hitrosti. Najprej smo preverili aktivnost encima pri različnih koncentracijah substrata in primerjali naklone premic. V vsaki luknjici mikrotitrne plošče imamo skupno 300  $\mu$ L reakcijske mešanice. Predhodno smo 15 $\mu$ L encima dodali 550 $\mu$ L aktivacijskega pufra in inkubirali 20 minut na ledu. Encim smo dodajali v dveh paralelah po 5, 10, 15 in 20  $\mu$ L.

**Izračun koncentracije encima v luknjici za 20 $\mu$ L:**

$$371\mu M \times \frac{15\mu L}{(15\mu L + 550\mu L)} \times \frac{20\mu L}{300\mu L} = 657nM$$

**Izračun koncentracije substrata v luknjici za 0,75 $\mu$ L:**

$$10mM \times \frac{0,75\mu L}{300\mu L} = 25\mu M$$

### 4.3. VPLIV DMSO

Pripravili smo nov substrat, katerega koncentracija znaša 40mM. V luknjico smo dodajali 1,5 $\mu$ L substrata tik pred meritvijo. Substrat je raztopljen v DMF-u, kar pomeni, da je DMF-ja v reakcijski mešanici 0,5% ( $\frac{1,5\mu L}{300\mu L}$ ) kar nam daje boljšo odzivnost kot pri 1% DMF-ja.

Pri spreminjanju količine encima in DMSO-ja, ustrezno korigiramo s pufrom, tako da skupni volumen reakcijske mešanice znaša 300 $\mu$ L. Encim dodajamo v dveh paralelah po 5, 10, 15 in 20 $\mu$ L.

**Izračun odstotka DMSO-ja v reakcijski mešanici pri dodatku 3 $\mu$ L:**

$$\frac{3\mu L}{300\mu L} = 1\%$$

**Izračun koncentracije encima v luknjici za 20 $\mu$ L:**

$$371\mu M \times \frac{20\mu L}{(20\mu L + 720\mu L)} \times \frac{20\mu L}{300\mu L} = 668nM$$

**Izračun koncentracije substrata v luknjici za 1,5 $\mu$ L:**

$$40mM \times \frac{1,5\mu L}{300\mu L} = 0,2mM = 200\mu M$$

**Izračun koncentracije reagenta v luknjici za 30 $\mu$ L:**

$$2mM \times \frac{30\mu L}{300\mu L} = 0,2mM$$

#### 4.4. VPLIV KOVINSKIH IONOV NA AKTIVNOST ENCIMA

Literaturni postopek opisuje 9mM raztopino CoCl<sub>2</sub>, zato se na začetku lotimo testiranja encimske aktivnosti pri različnih koncentracijah CoCl<sub>2</sub>. Testiramo pri 4 različnih koncentracijah encima in na podlagi podatkov narišemo graf in zberemo naklone premic za vsako koncentracijo CoCl<sub>2</sub>. Količina encima v luknjici znaša 5, 10, 15 in 20  $\mu$ L v dveh paralelah, kar v koncentracijah znaša 167, 334, 501 in 668nM. 5 $\mu$ L alikvot encima smo predhodno inkubirali 20 minut na ledu v 180 $\mu$ L aktivacijskega pufra.

**Koncentracija encima v luknjici:  $371\mu M * \frac{5\mu L}{185\mu L} * \frac{20\mu L}{300\mu L} = 668nM$**

Obrazložitev izračuna koncentracije encima v luknjici: 5 $\mu$ L alikvot encima, katerega koncentracija znaša 371 $\mu$ M smo redčili v 180 $\mu$ L aktivacijskega pufra in pustili 20 minut na ledu. Od tega smo odpipetirali 20 $\mu$ L alikvot v mikrotitrsko luknjico, katere skupni volumen znaša 300 $\mu$ L.

Koncentracije raztopin kovinskih ionov po ustreznem redčenju znašajo 0, 334, 668, 1002, 1336 in 2004nM, kjer smo pri koncentraciji 0 uporabili le aktivacijski pufer brez kovinskih ionov.

Primer izračuna koncentracije kovinskih ionov za 10,3  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  v aktivacijskem pufru:

$$10,3\mu\text{M} * \frac{180\mu\text{L}}{185\mu\text{L}} * \frac{20\mu\text{L}}{300\mu\text{L}} \cong \mathbf{668nM} \dots \text{kar ustreza razmerju z encimom 1:1}$$

#### 4.5. TESTIRANJE SPOJIN

V eni koloni 8 luknjic na mikrotiterski ploščici smo testirali po dve spojini naenkrat. V prvih dveh paralelah je slepi vzorec, kjer je namesto spojine DMSO. Vsako spojino smo testirali v treh paralelah, da smo zmanjšali napake pri delu in uporabili povprečno vrednost začetne hitrosti encimske reakcije (mOD/min). Vnašali smo po 3 $\mu\text{L}$  spojine, ki je raztopljena v DMSO. Pri slepem vzorcu smo uporabili 3 $\mu\text{L}$  DMSO-ja, kar znaša 1% (v/v). Koncentracije spojin so 1mM, kar v reakcijski mešanici zaradi redčenja 3/300 znaša 10 $\mu\text{M}$ .

**Preglednica IV:** Volumni posameznih reagentov v reakcijski mešanici v  $\mu\text{L}$ , kjer z modro označene reagente dodamo z multikanalsko pipeto tik pred merjenjem:

Spojina	Pufer	Encim	E. Reagent	Substrat	Pufer	Skupaj
3	100	20	30	1,5	145,5	300

**Preglednica V:** Koncentracije posameznih reagentov v reakcijski mešanici:

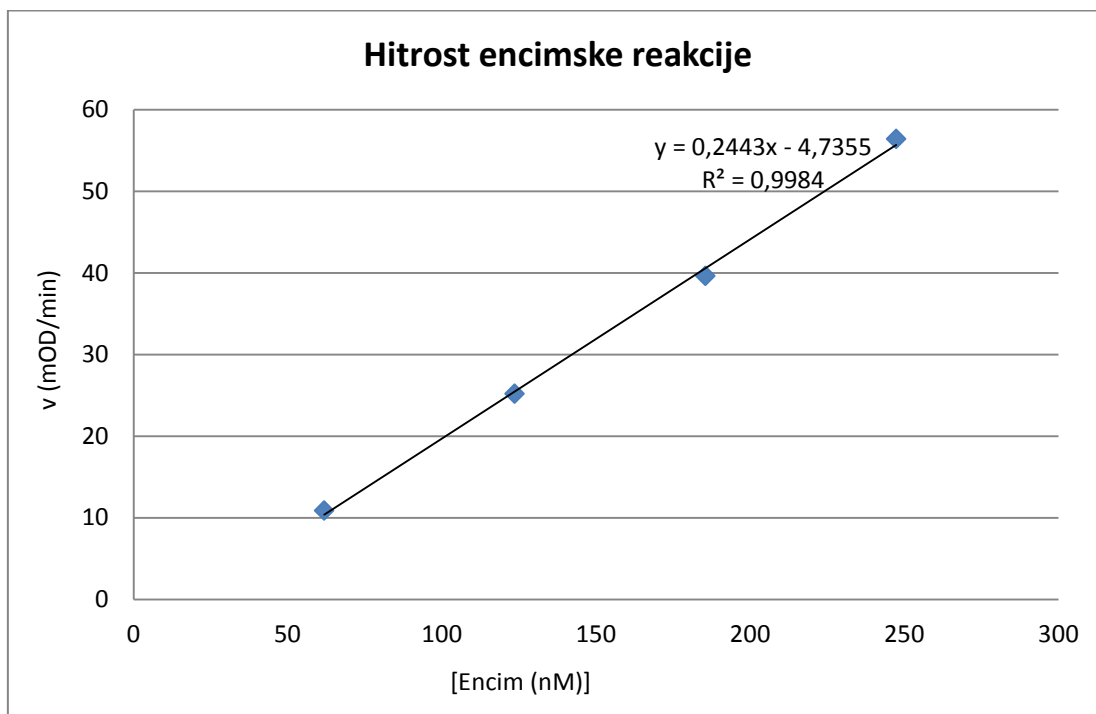
Spojina	Encim	E. Reagent	Substrat
10 $\mu\text{M}$	668nM	0,2mM	200 $\mu\text{M}$

Testirali smo 100 spojin v treh paralelah, iz katerih smo dobili povprečno vrednost začetne hitrosti encimske reakcije ter jo primerjali s slepim vzorcem, ki smo ga testirali v dveh paralelah in prav tako uporabili povprečno vrednost začetne hitrosti encimske reakcije. Iz teh podatkov smo izračunali odstotek zaviranja spojine in standardno deviacijo.

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. TEST ENCIMSKE AKTIVNOSTI

Na začetku smo preverili, kaj se dogaja s komponentami v odvisnosti od časa, da preverimo morebitno spontano hidrolizo ( $t=1h$ ). Pri samem pufru, kombinaciji pufra z reagentom in kombinaciji pufra s substratom ni bilo sprememb, oziroma niso bile vidne. Pri kombinaciji pufra, substrata in reagenta smo ugotovili manjši razpad substrata, zato smo se odločili, da substrat dodajamo tik pred meritvijo. Nato smo s povečevanjem količine encima dokazali koncentracijsko odvisnost (slika 14) ter izključili možnost dviga absorbance samo zaradi spontane hidrolize substrata. Hkrati smo preverili aktivnost encima brez predinkubacije, ki je bila znatno manjša v primerjavi z encimom, ki je bil predhodno 20 minut na ledu v aktivacijskem pufru. Preverili smo tudi aktivnost encima v aktivacijskem pufru brez dodatka  $CoCl_2$  in dokazali pomembnost  $Co^{2+}$  ionov za aktivnost encima. Po 24 urah v aktivacijskem pufru, encimska aktivnost pade, zato pripravimo več  $10\mu L$  alikvotov, ki jih vsakič inkubiramo 20 minut na ledu z aktivacijskim pufrom pred izvajanjem testov.



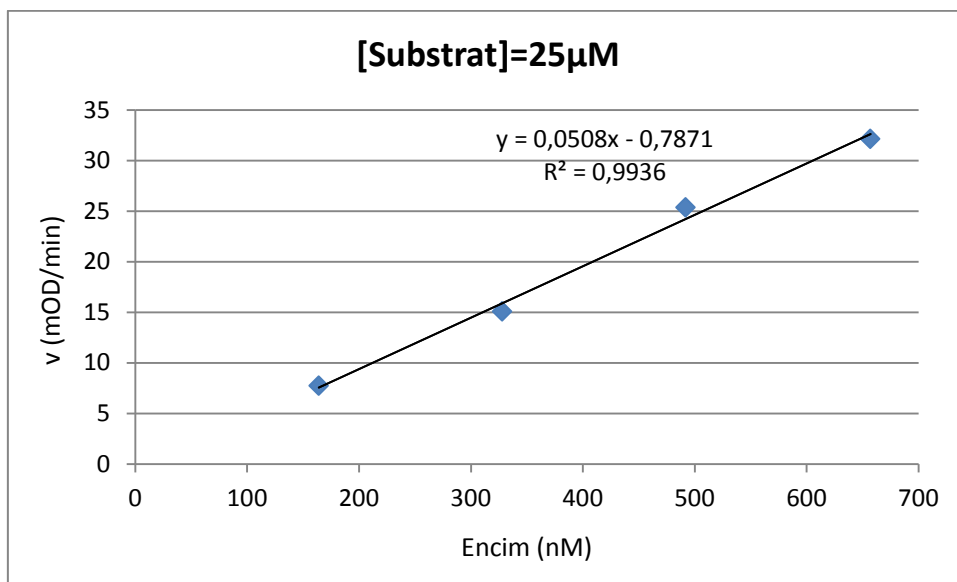
**Slika 14:** Koncentracijska odvisnost hitrosti encimske reakcije pri  $50\mu M$  substrata

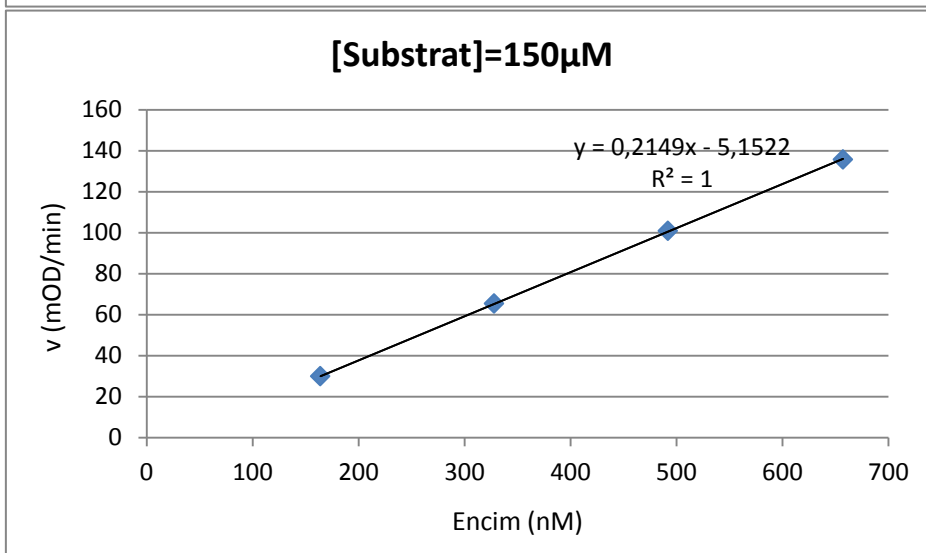
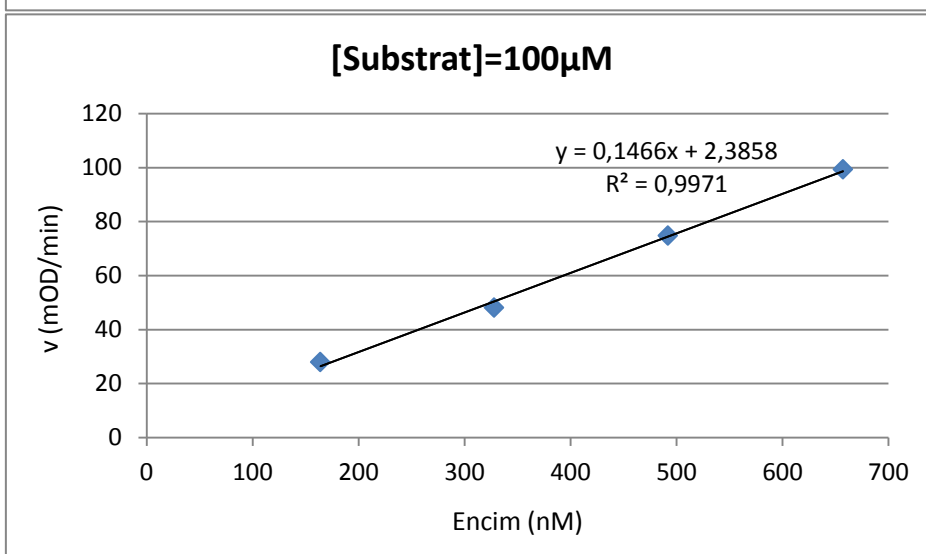
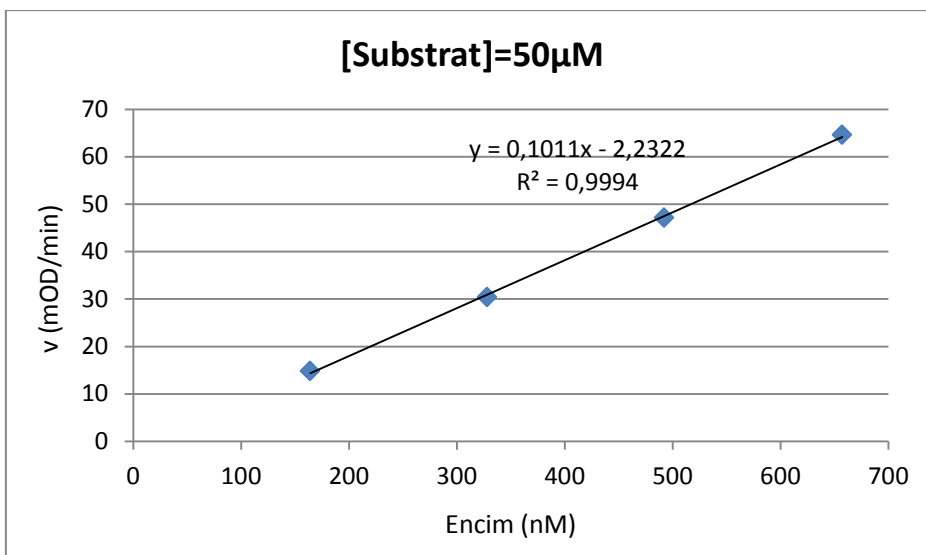
### 5.1.2. Merjenje začetne hitrosti encimske reakcije

Merjenje končnega produkta poteka v začetnih fazah encimske reakcije. Za primerjavo smo pustili reakcijo teči v daljšem časovnem obdobju, da je absorbanca dosegla plato. Krivulja absorbance končnega produkta v odvisnosti od časa izgublja linearnost, ki jo opazimo v začetnih fazah reakcije. Po 1. minuti spremljanja reakcije, se krivulja začne upogibati, kar je posledica oksidativne inaktivacije encima MetAP pod aerobnimi pogoji. Poleg tega je Ellmanov reagent znan po inaktivaciji encima MetAP iz E.Coli s spremembo cisteinskega ostanka v bližini aktivnega mesta. Omenjena nestabilnost encima pa ne izključuje verodostojnost v vzpostavitev naše kontinuirane reakcije, saj smo podatke zbirali v 30 ali manj sekundah po začetku reakcije, v kateri pa inaktivacija MetAP ni signifikantna. Kontinuirane reakcije omogočajo direktno spremljanje reakcije od samega začetka in hitro pridobivanje podatkov. Prednost naše reakcije je tudi enostavnost samega postopka, saj za detekcijo potrebujemo samo UV-VIS spektrofotometer.

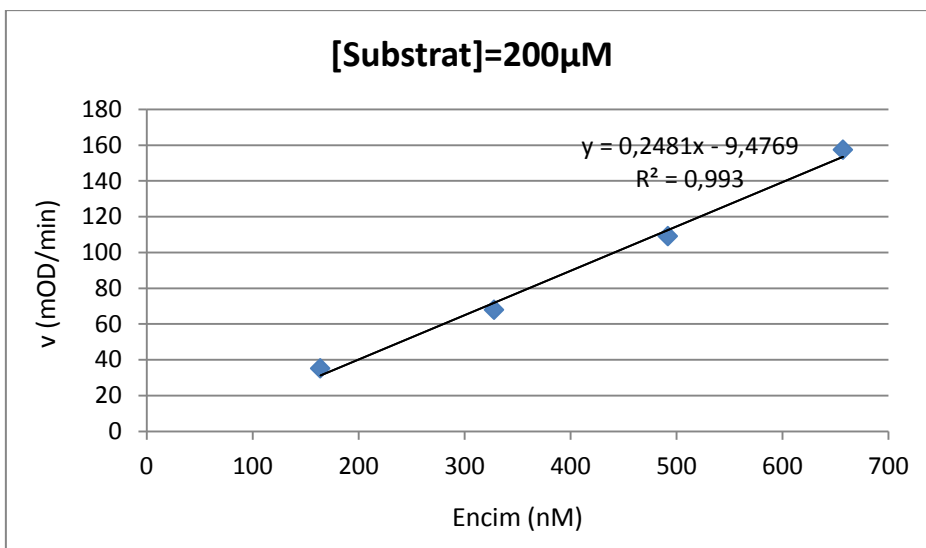
### 5.2. LINEWEAVER-BURKOV DIAGRAM IN IZRAČUN $K_M$

Hitrost encimske reakcije pri različnih koncentracijah substrata ob povečevanju količine encima je prikazana na spodnjih slikah.







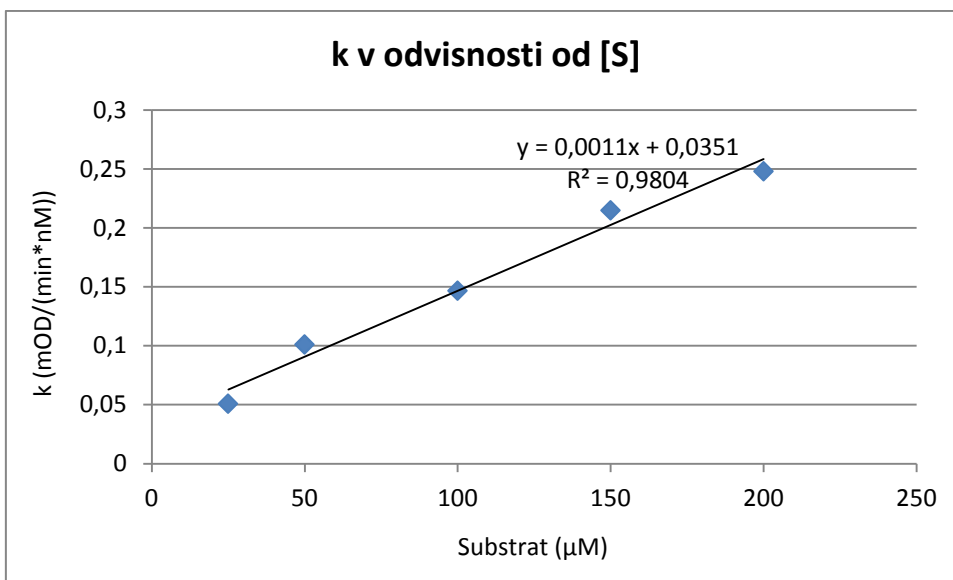


Slika 15: Odvisnost hitrosti encimske reakcije pri različnih koncentracijah substrata

Uporabili smo naklone premic encimske odvisnosti pri različnih koncentracijah substrata (preglednica VI) in narisali graf, ki prikazuje linearno odvisnost (slika 16).

**Preglednica VI:**

S (μM)	25	50	100	150	200
k (mOD/(min*nM))	0,0508	0,1011	0,1466	0,2149	0,2481



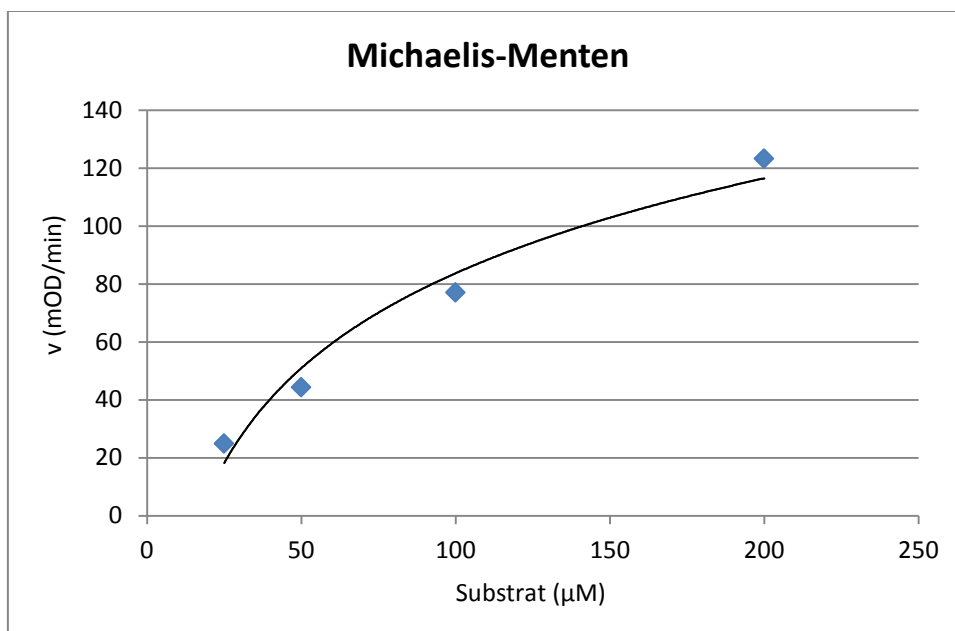
Slika 16: Graf odvisnosti naklona premice od koncentracije substrata

Pri najvišji koncentraciji encima v reakcijski mešanici (657nM) smo ob naraščajočih koncentracijah substrata postopoma prišli do Lineweaver-Burkovega diagrama. Podatki so prikazani v preglednici VII.

**Preglednica VII:** Substrat smo dodajali po 0,75, 1,5, 3 in 6 $\mu$ L kar je v tabeli označeno kot S\*, S pa kot koncentracija substrata v sami reakcijski mešanici (300 $\mu$ L).

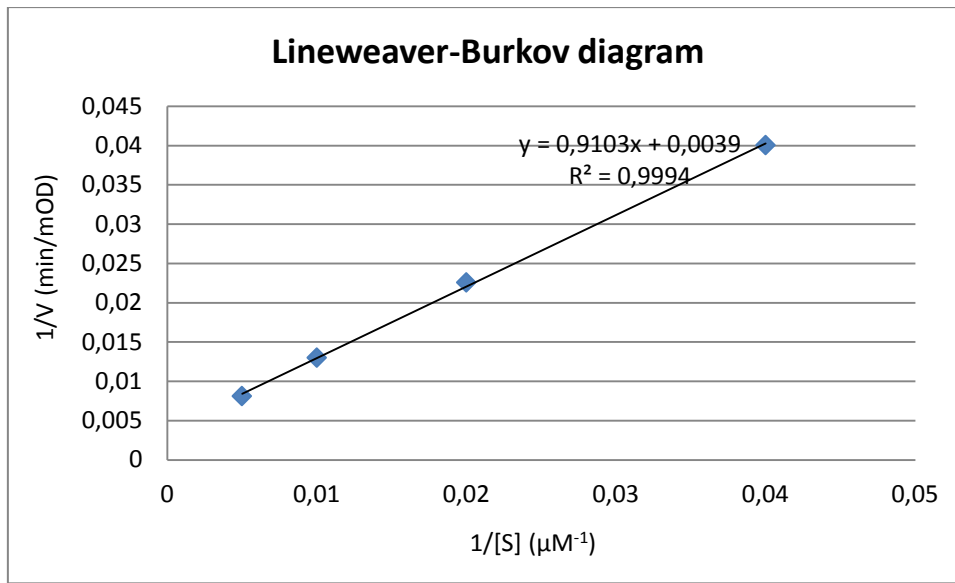
S* ( $\mu$ L)	S ( $\mu$ M)	V (mOD/min)	1/S ( $\mu$ M <sup>-1</sup> )	1/V (min/mOD)
0,75	25	24,964	0,04	0,040058
1,5	50	44,331	0,02	0,022558
3	100	77,036	0,01	0,012981
6	200	123,22	0,005	0,008116

Narisali smo graf odvisnosti začetne hitrosti encimsko katalizirane reakcije od koncentracije substrata, ki prikazuje Michaelis-Menten kinetiko (slika 17). V primerjavi s kompleksnejšimi modeli približno opisuje splošno kinetiko mnogih encimov, brez vpliva alosterije in kooperativnosti.



**Slika 17:** Graf odvisnosti hitrosti encimske reakcije od koncentracije substrata

$K_M$  bi lahko določili iz grafa na sliki 17 kot  $V_{max}/2$ , ampak ker je določanje  $V_{max}$  pri Michaelis-Menten kinetiki asimptotično, je praktično nemogoče določiti točno vrednost  $K_M$ .  $V_{max}$  pa lahko točno določimo, če uporabimo recipročne vrednosti Michaelis-Mentenove enačbe, da dobimo premočrtno krivuljo, ki se imenuje Lineweaver-Burkov diagram. Na sliki 18 je primer takega diagrama, s pomočjo katerega pridemo do izračuna  $K_M$ .



Slika 18: Lineweaver-Burkov diagram

$$\text{Enačba: } \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

$$\text{Enačba iz premice: } Y = 0,9103X + 0,0039$$

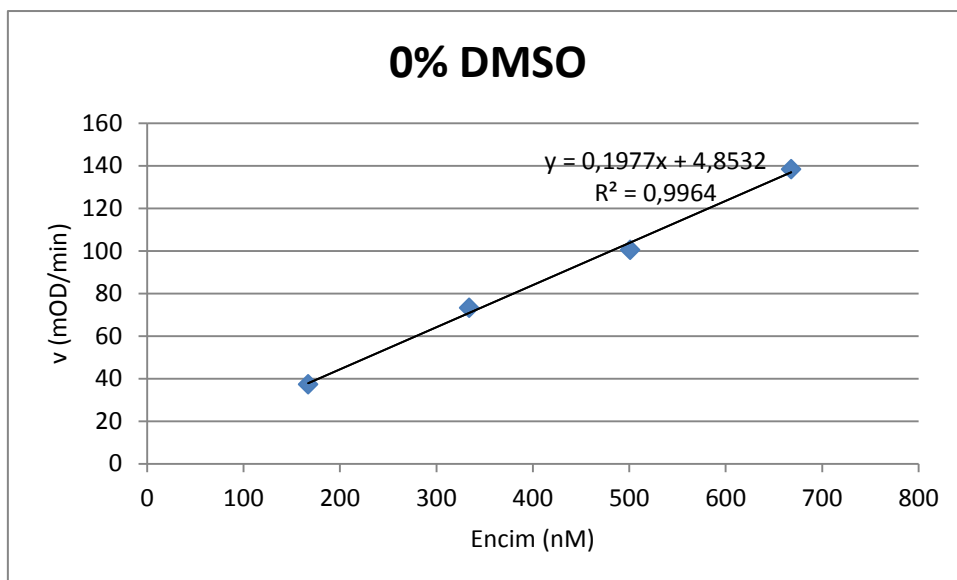
$$\text{Izračun } V_{max}: \frac{1}{V_{max}} = n \rightarrow V_{max} = \frac{1}{0,0039} = 256,41$$

$$\text{Izračun } K_M: \frac{K_m}{V_{max}} = k \rightarrow K_m = V_{max} \times 0,9103 = \mathbf{233,41 \mu M}$$

$K_M$  je koncentracija substrata, ki povzroči polovico maksimalne hitrosti encimske reakcije. Pove nam afiniteto vezave substrata v aktivno mesto encima, kar pri visokih vrednostih  $K_M$  pomeni, da je afiniteta vezave substrata nizka, pri nizkih vrednostih  $K_M$  pa je afiniteta vezave substrata visoka, saj encim za svojo katalitsko aktivnost potrebuje manj substrata. Vrednost  $K_M$ , ki smo jo dobili pri izračunu je primerna za nadaljnja testiranja. Vrednotenje spojnin bomo izvajali pri koncentraciji substrata, ki je enaka  $K_M$ .

### 5.3. VPLIV DMSO

DMSO je brezbarvna tekočina in pomembno polarno aprotično topilo. Ker je znano, da lahko sodeluje pri oksidaciji nekaterih spojin in spremeni konformacijo biomolekul, preverimo kakšen vpliv ima na naš encim. To nas zanima predvsem zaradi tega, ker so naše spojine, ki jih bomo testirali na encimu, raztopljene v 100% DMSO.



**Slika 19:** Test encimske aktivnosti brez DMSO

**Preglednica VIII:** Za določitev vpliva DMSO na encim smo primerjali naklone premic pri različnih koncentracijah DMSO, kjer razmerje prikazuje odstotek v primerjavi z 0% DMSO.

DMSO (%)	k	Razmerje (%)
0	0,1977	-
0,1	0,1915	96,9
0,5	0,1837	92,9
1	0,1798	91,0
2	0,1606	81,2
5	0,1116	56,5

Iz preglednice VII ugotovimo, da pride do značilne spremembe pri 5% DMSO-ja, mi pa še enkrat ponovimo testiranje pri 0% in 1% DMSO v treh ponovitvah, saj bo končna koncentracija DMSO pri vrednotenju spojin znašala 1% (v/v).

**Preglednica IX:** Nakloni premic pri 0 in 1% DMSO-ju

<b>k (0% DMSO)</b>	<b>k (1% DMSO)</b>
0,2031	0,1871
0,1943	0,1866
0,1968	0,1889
$k=0,1981 \pm 0,004$	$k=0,1875 \pm 0,001$

Primerjamo povprečni vrednosti iz dobljenih naklonov premic in ugotovimo, da znaša naklon pri 1% (v/v) DMSO-ju 95% vrednosti pri testiranju brez prisotnosti DMSO-ja.

$$\frac{0,1875}{0,1981} = 0,946\%$$

Zaključimo s tezo, da 1% (v/v) DMSO ne povzroča značilnih sprememb, vseeno pa pri vrednotenju spojin v vzorec neinhibirane encimske reakcije dodamo DMSO v končni koncentraciji 1% (v/v) DMSO.

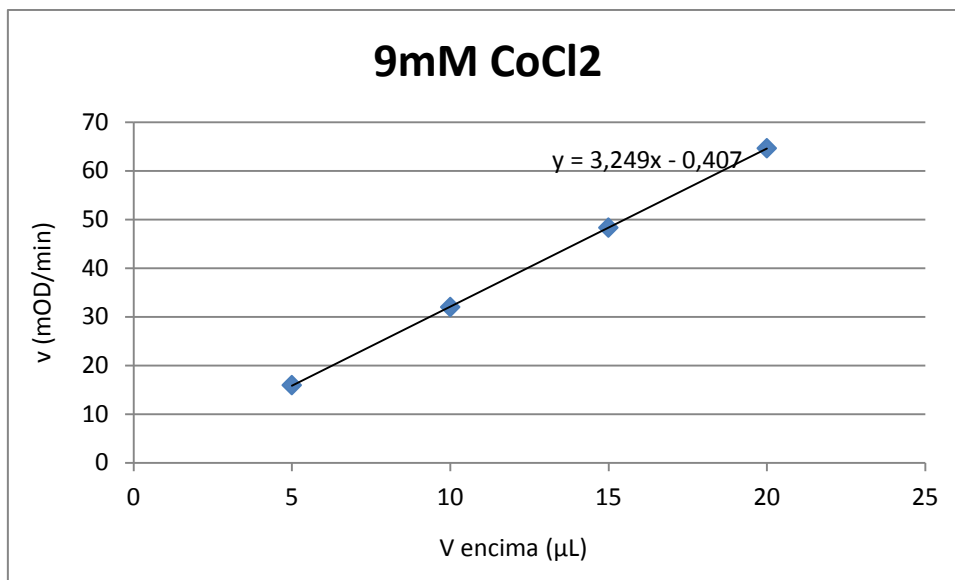
#### 5.4. VPLIV KOVINSKIH IONOV NA AKTIVNOST ENCIMA

Divalentni kovinski ioni so pomembni za vezavo v aktivnem mestu encima, zato najprej preverimo delovanje encima pri koncentraciji 9 mM  $\text{CoCl}_2$  v aktivacijskem pufru, kot je predlagano v literaturnem postopku. V preglednici X je prikaz podatkov iz programa Excel 2010, kjer smo spremljali hitrost encimske reakcije pri naraščajočih koncentracijah encima v 2 paralelah.

**Preglednica X:** Prikaz in obdelava podatkov iz Excela, kjer imamo prikazan volumen encima in začetno hitrost encimske reakcije.

V encima ( $\mu\text{L}$ )	5	5	10	10	15	15	20	20
v (mOD/min)	16,2	15,6	30,9	33,0	50,5	46,2	66,9	62,3

Za izračun uporabimo povprečno vrednost hitrosti encimske reakcije za vsako količino dodanega encima in na podlagi tega narišemo graf odvisnosti hitrosti encimske reakcije pri koncentraciji  $\text{CoCl}_2$ , ki znaša 9 mM, kot je prikazano na sliki 20.



**Slika 20:** Graf hitrosti encimske reakcije v 9mM raztopini  $\text{CoCl}_2$

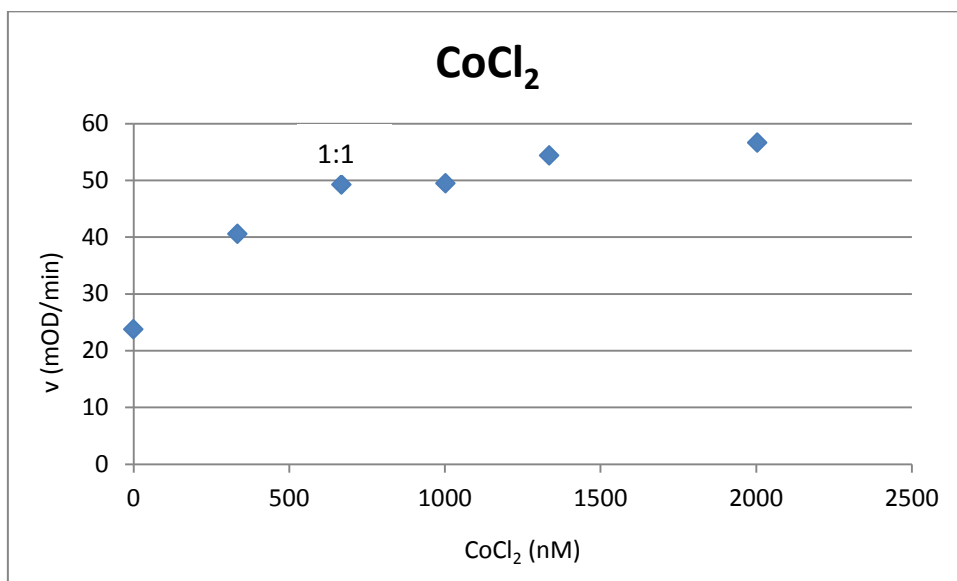
Po istem postopku, ob naraščajočih koncentracijah encima v 2 paralelah, delamo še na drugačnih koncentracijah  $\text{CoCl}_2$  in dobljene naklone premic zberemo v preglednici XI.

**Preglednica XI:** Nakloni premic pri različnih koncentracijah  $\text{CoCl}_2$  v aktivacijskem pufu

c ( $\text{CoCl}_2$ )	9 mM	3 mM	1 mM	0,3 mM	0,1 mM	0,03 mM	0,01 mM	0 mM
k	3,249	4,156	3,222	4,465	3,641	4,242	3,786	0,956

Bistvena razlika je vidna samo v zadnjem testu, ko kobaltovi ioni niso prisotni. V primerih, ko so kobaltovi ioni prisotni, pa je naklon premice zelo primerljiv in tako neodvisen od koncentracije  $\text{CoCl}_2$ . Zaradi tega smo se eksperimenta lotili bolj natančno in sicer smo z ustreznim redčenjem pripravili različne koncentracije  $\text{CoCl}_2$ , s katerimi lahko zapišemo razmerje: Encim-Kovinski ion: 1:0; 1:0,5; 1:1; 1:1,5; 1:2; 1:3. Z istim postopkom smo poleg vpliva kobaltovih ( $\text{Co}^{2+}$ ) ionov, preverili še vpliv bakrovih ( $\text{Cu}^{2+}$ ), cinkovih ( $\text{Zn}^{2+}$ ) in železovih ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ionov. Rezultate prikažemo z grafom, kjer ugotavljamo koncentracijsko odvisnost med povprečno hitrostjo kemijske reakcije in koncentracijo raztopine kovinskih ionov na slikah 21-24.

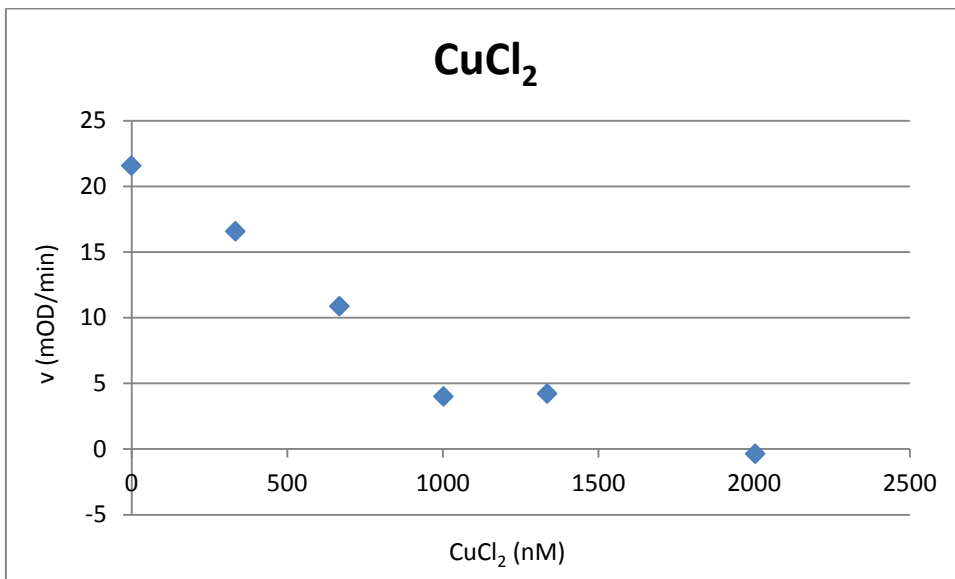
#### 5.4.1. Vpliv $\text{CoCl}_2$



**Slika 21:** Aktivnost encima pri različnih razmerjih s  $\text{Co}^{2+}$  ioni

Aktivnost encima je odvisna od koncentracije kobaltovih ionov. Hitrost encimske reakcije doseže plato, ko imamo razmerje Encim- $\text{Co}^{2+}$ : 1:1 ali več.

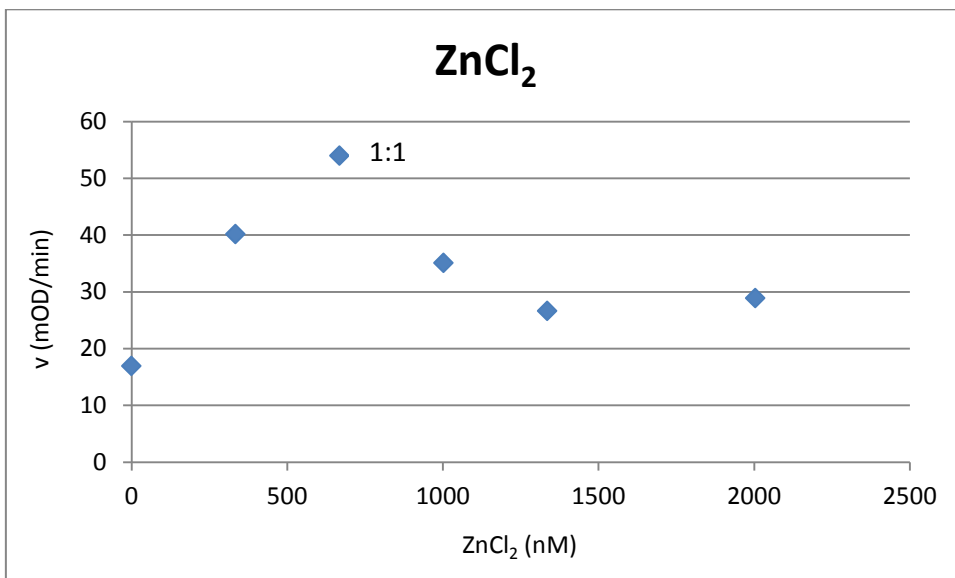
### 5.4.2. Vpliv $\text{CuCl}_2$



Slika 22: Aktivnost encima pri različnih razmerjih s  $\text{Cu}^{2+}$  ioni

Aktivnost encima je odvisna od koncentracije bakrovih ionov. S povečevanjem  $\text{Cu}^{2+}$  ionov se hitrost encimske reakcije zmanjšuje. Pri največji koncentraciji  $\text{CuCl}_2$  je hitrost encimske reakcije popolnoma zavrta.

### 5.4.3. Vpliv $\text{ZnCl}_2$

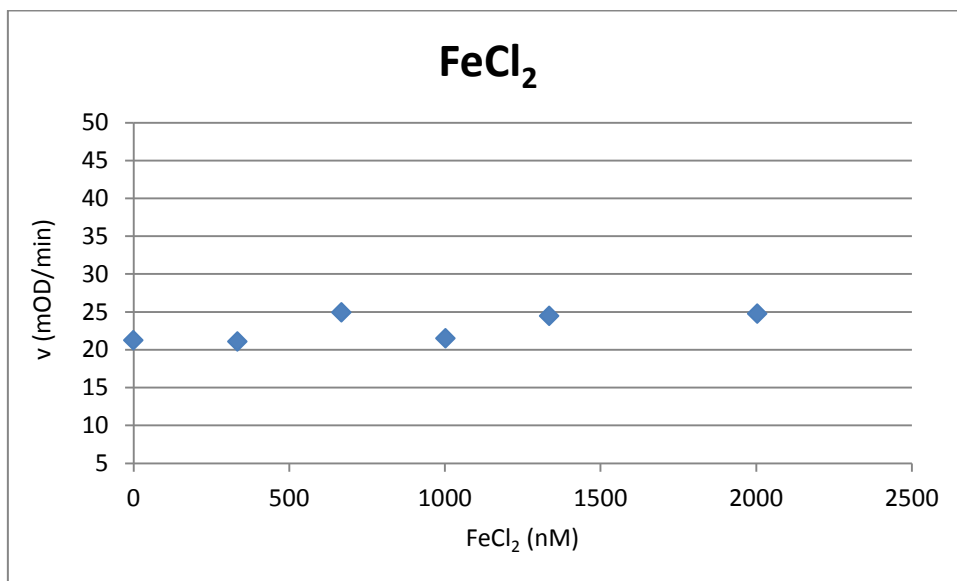


Slika 23: Aktivnost encima pri različnih razmerjih z  $\text{Zn}^{2+}$  ioni

Aktivnost encima je odvisna od koncentracije cinkovih ionov. Hitrost encimske reakcije doseže plato, ko imamo razmerje Encim- $\text{Zn}^{2+}$ : 1:1, nato pa aktivnost ponovno pade.



#### 5.4.4. Vpliv FeCl<sub>2</sub>



**Slika 24:** Aktivnost encima pri različnih razmerjih z Fe<sup>2+</sup> ioni

Aktivnost encima ni odvisna od koncentracije železovih ionov. Hitrost encimske reakcije je enaka, kot pri uporabi aktivacijskega pufra brez kovinskih ionov.

Oba tipa encima MetAP kažeta aktivnost v prisotnosti dveh divalentnih kovinskih ionov na katalitično enoto. Večina raziskav je narejenih predvsem na osnovi odvisnosti encima od ionov kobalta (Co<sup>2+</sup>), v sklopu te diplomske naloge pa smo preverili vpliv drugih divalentnih kovinskih ionov, kot so cink (Zn<sup>2+</sup>), baker (Cu<sup>2+</sup>) in železo (Fe<sup>2+</sup>). Predlagano je, da je katalitična aktivnost encima največja ob prisotnosti enega ekvivalenta kovinskega iona, kar pomeni da koordinacija drugega kovinskega iona, ni pomembna za katalitično aktivnost encima. Preverili smo vpliv omenjenih ionov, pri različnih razmerjih s katalitično enoto encima, na začetno hitrost encimske reakcije. Co<sup>2+</sup> ioni so se izkazali kot najbolj primerni ioni v aktivnem mestu encima, saj je hitrost encimske reakcije bila znatno večja od razmerja z encimom 1:1 ali več. Zn<sup>2+</sup> ioni so najbolj primerni pri razmerju z encimom 1:1, medtem ko so pri večjih razmerjih zavrla hitrost encimske reakcije. Fe<sup>2+</sup> ioni niso vplivali na hitrost encimske reakcije, saj je ta ostala enaka kot pri inkubaciji pufra brez kovinskih ionov v aktivacijskem pufu. Za najslabše kovinske ione so se izkazali Cu<sup>2+</sup> ioni, kateri so s povečevanjem količine zavirali hitrost encimske reakcije in jo pri največji koncentraciji popolnoma zavrla. Iz dobljenih rezultatov pridemo do ugotovitve, da so Co<sup>2+</sup> ioni primerni za aktivnost encima MetAP, medtem ko pri ostalih testiranih ionih encim ni aktiven, saj je hitrost encimske reakcije enaka spontani hidrolizi substrata.

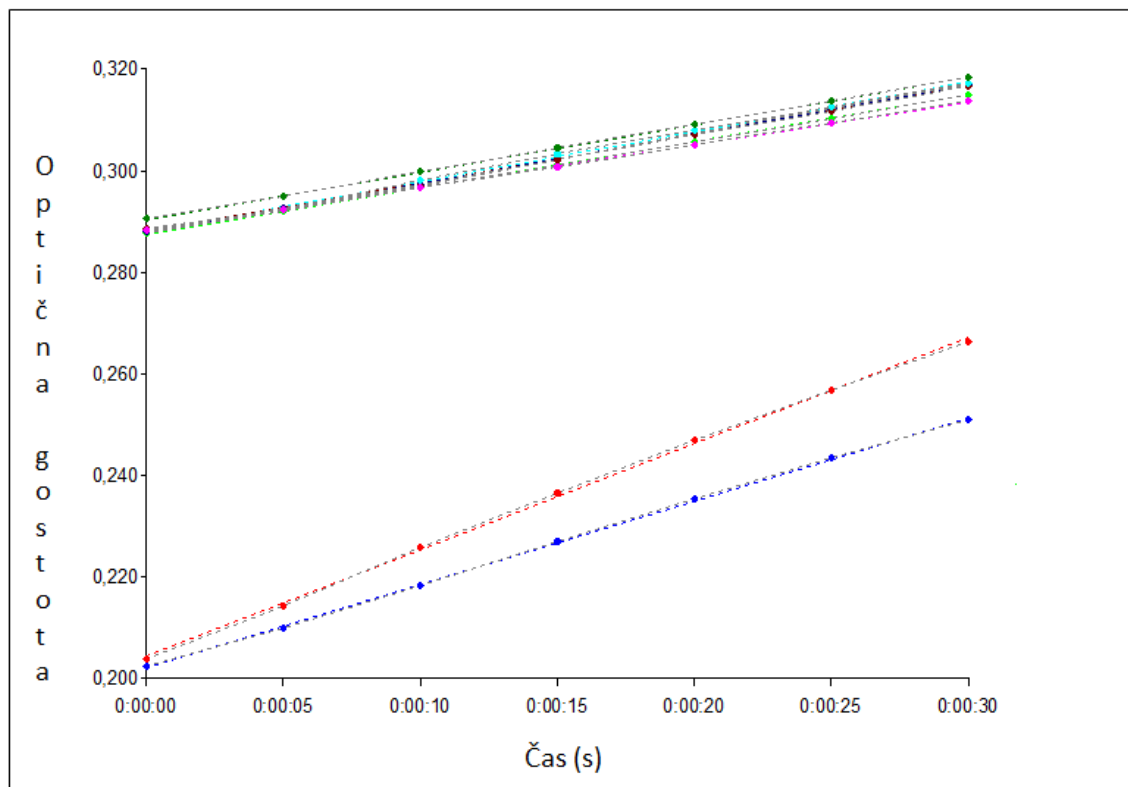
## 5.5. TESTIRANJE SPOJIN

Ovrednotili smo 100 spojin v koncentraciji 1mM, kar v reakcijski mešanici zaradi redčenja 3 $\mu$ L/300 $\mu$ L znaša 10 $\mu$ M. Osredotočili smo se predvsem na odstotek zaviranja in na podlagi tega razvrstili spojine od tistih z najboljšo zaviralno aktivnostjo, do tistih z najslabšo. Spojine z najboljšo zaviralno aktivnostjo bomo prikazali tudi s strukturno formulo, najboljšima dvema spojinama pa bomo z dodatnimi testiranjem določili IC<sub>50</sub>. V eni koloni 8 luknjic mikrotiterske plošče smo testirali 2 spojin naenkrat v 3 paralelah in slepi vzorec v 2 paralelah, kjer smo namesto 3 $\mu$ L spojine dodali 3 $\mu$ L DMSO.

Primer izračuna je prikazan na spojinu GIS273 v 6 paralelah. Vrednosti hitrosti encimske reakcije pri spojinah so znatno nižje v primerjavi s slepim vzorcem, kar je vidno v preglednici XII, na sliki 25 pa je prikaz naklona premice pri spojinah v primerjavi s slepim vzorcem.

**Preglednica XII:** Prikaz in obdelava podatkov iz Excela, kjer imamo po vrsti v kolonah prikazane vsebino luknjice (V=3 $\mu$ L), začetno hitrost encimske reakcije, presečišče z Y-osjo in R<sup>2</sup>. V prvih dveh luknjicah imamo slepi vzorec, v ostalih luknjicah pa spojino GIS273.

Luknjica	v (mOD/min)	Y-os [412 nm]	R <sup>2</sup> [412 nm]
DMSO	125,829	0,204	0,999
DMSO	112,000	0,202	1
GIS273	56,014	0,29	1
GIS273	50,871	0,288	1
GIS273	58,886	0,288	0,999
GIS273	57,129	0,288	0,999
GIS273	58,371	0,288	1
GIS273	54,557	0,288	1



Slika 25: Spojina GIS273 (zgoraj) v primerjavi s slepim vzorcem (spodaj)

Že iz naklona premice je razvidno, da ima spojina GIS273 zaviralno funkcijo v primerjavi s slepim vzorcem. Razlog, da je hitrost encimske reakcije, kjer imamo prisotno spojino, v višjem absorpcijskem območju kot slepi vzorec, je v sami absorpciji spojin. Mi se osredotočimo na naklon premice, ki nam dobro opiše hitrost kemijske reakcije in iz preglednice XII obdelamo podatke, ki so prikazani v preglednici XIII.

**Preglednica XIII:** Prikaz podatkov za izračun odstotka inhibicije

	$\bar{v}$ (mOD/min)	Standardna deviacija	RA (%)		Zaviralna aktivnost (%)	stdev(%)
Slepi vzorec	118,91	9,7	1	118,91	0	8,2
GIS273	55,97	2,9	47,07	118,91	52,93	5,2

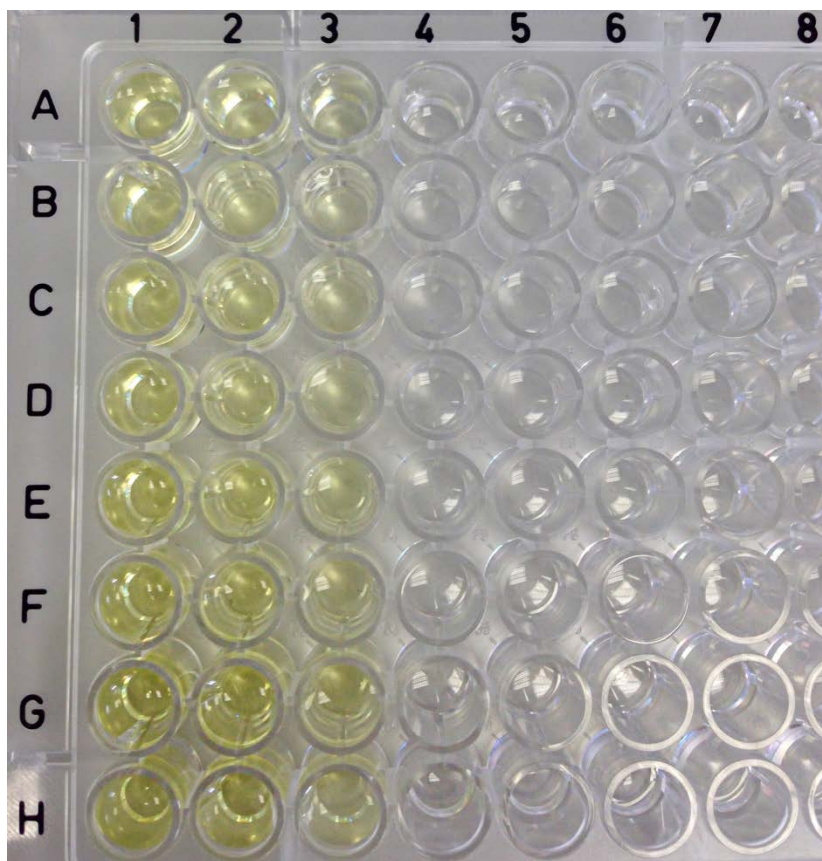
Pri obdelavi podatkov smo s pomočjo Excela izračunali povprečno vrednost hitrosti kemijske reakcije za slepi vzorec in za proučevano spojino. Rezidualno aktivnost (RA)

smo izračunali tako, da smo povprečno hitrost encimske reakcije spojine delili s povprečno hitrostjo encimske reakcije slepega vzorca.

$$RA = \frac{55,97}{118,91} = 0,4707 = 47,07\%$$

Odstotek inhibicije smo dobili tako, da smo RA odšteli od 100%. Odstotek zaviranja spojine GIS273 znaša 52,93%.

Na sliki 26 je primer našega dela na mikrotiterskih ploščah. V stolpcu 3, v katerem je prisotna spojina GIS273, je vidna slabša obarvanost merjenega produkta v primerjavi s stolpcema 1 in 2, kjer zaviralna spojina ni prisotna. Razlog močnejše obarvanosti v spodnjih stolpcih je v tem primeru posledica povečevanja količine substrata v reakcijski mešanici in se ne nanaša na zgornji izračun.



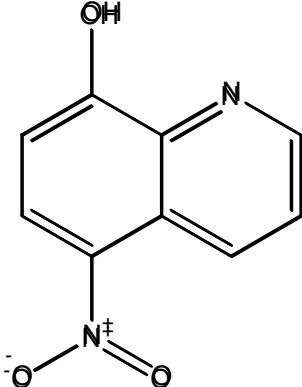
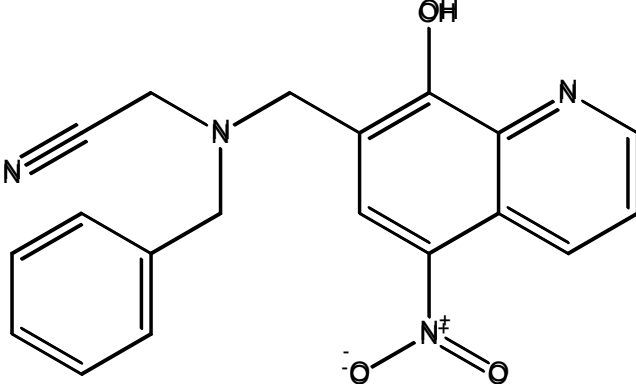
**Slika 26:** Primer slabše obarvanosti v luknjicah z zaviralno spojino GIS273 - stolpec 3

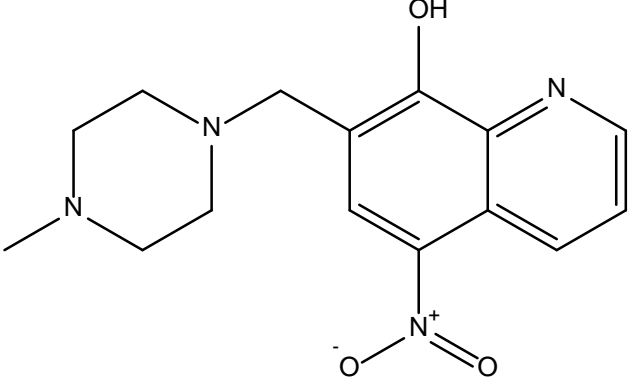
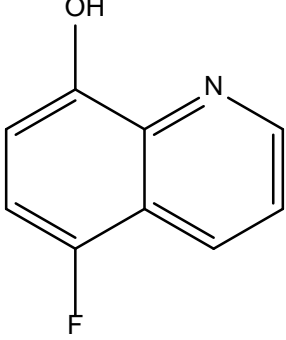
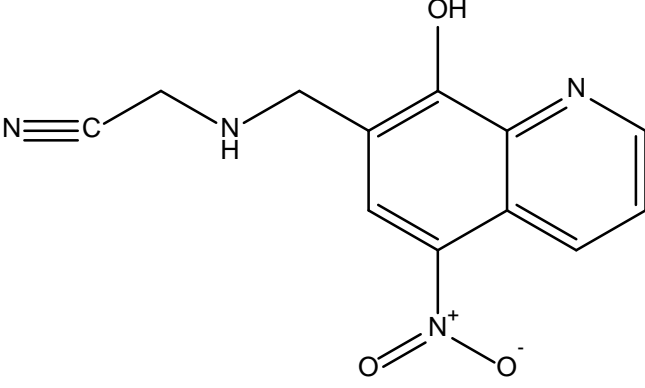
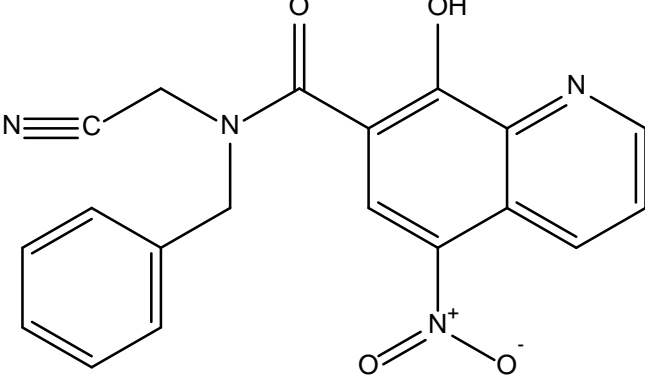
Razlog slabše obarvanosti v reakcijski mešanici, kjer je prisotna zaviralna spojina, je vezava spojine v aktivno mesto encima, kjer z določeno zaviralno aktivnostjo spojine,

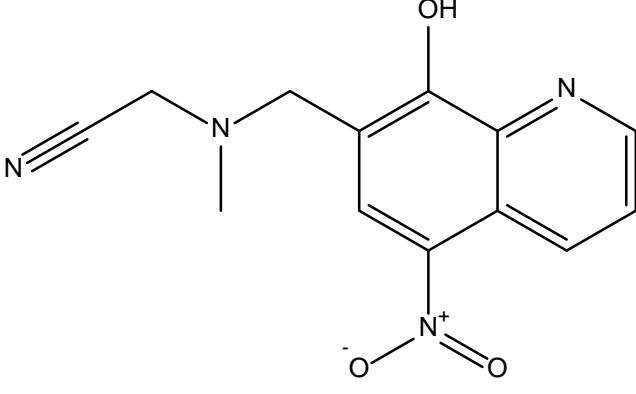
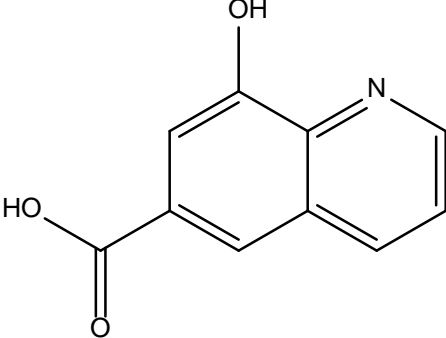
encim izgubi določeno katalitsko aktivnost odstranjevanja metionina iz substrata, kar vodi v manjše nastajanje prostih –SH skupin, s katerimi reagira Ellmanov reagent in tako v manjši meri tvori kromogeni produkt, ki ga detektiramo na spektrofotometru.

V preglednici XIV so prikazane spojine, ki so najboljše zavirale delovanje encima, poleg nitroksolina, ki je kot osnovna struktura, iz katere izhajajo njegovi derivati. Pri spojinah so poleg struktur navedene še kratke oznake spojin, IUPAC imena, molske mase in rezidualne aktivnosti.

**Preglednica XIV: Prikaz najboljših zaviralcev**

Spojina	Struktura	RA (%)
<p><b>Nitroksolin</b></p> <p>5-nitrokinolin-8-ol</p> <p>ali</p> <p>5-nitro-8-hidroksikinolin</p> <p><b>M=190,16 g/mol</b></p>	 <p>The structure shows a quinoline ring system. At position 8, there is a hydroxyl group (-OH). At position 5, there is a nitro group (-NO<sub>2</sub>), represented as a nitrogen atom with a positive charge bonded to two oxygen atoms, one of which has a negative charge.</p>	<p>9,1</p>
<p><b>GIS284</b></p> <p>2-(benzil((8-hidroksi-5-nitrokinolin-7-il)metil)amino)acetonitril</p> <p><b>M=348,36 g/mol</b></p>	 <p>The structure shows a quinoline ring system with a hydroxyl group at position 8 and a nitro group at position 5. At position 7, there is a methylene group (-CH<sub>2</sub>-) connected to a nitrogen atom. This nitrogen atom is also bonded to a benzyl group (-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) and a 2-cyanoethyl group (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CN).</p>	<p>47,5</p>

<p><b>GISB4</b></p> <p>7-((4-metilpiperazin-1-il)metil)-5-nitrokinolin-8-ol</p> <p><b>M=302,33 g/mol</b></p>		<p>22,4</p>
<p><b>GIS304</b></p> <p>5-fluorokinolin-8-ol</p> <p><b>M=163,15 g/mol</b></p>		<p>22,4</p>
<p><b>GIS273</b></p> <p>2-(((8-hidroksi-5-nitrokinolin-7-il)metil)amino)acetonitril</p> <p><b>M=258,24 g/mol</b></p>		<p>52,9</p>
<p><b>GLM41_2</b></p> <p>N-benzil-N-(cianometil)-8-hidroksi-5-nitrokinolin-7-karboksamid</p>		<p>23,5</p>

<p><b>M=362,35 g/mol</b></p>		
<p><b>GIS266_1_P</b> 2-(((8-hidroksi-5-nitrokinolin-7-il)metil)(metil)amino)acetonitril</p> <p><b>M=272,26 g/mol</b></p>		<p>18,5</p>
<p><b>GJ-21</b> 8-hidroksikinolin-6-karboksilna kislina</p> <p><b>M=189,17 g/mol</b></p>		<p>18,2</p>

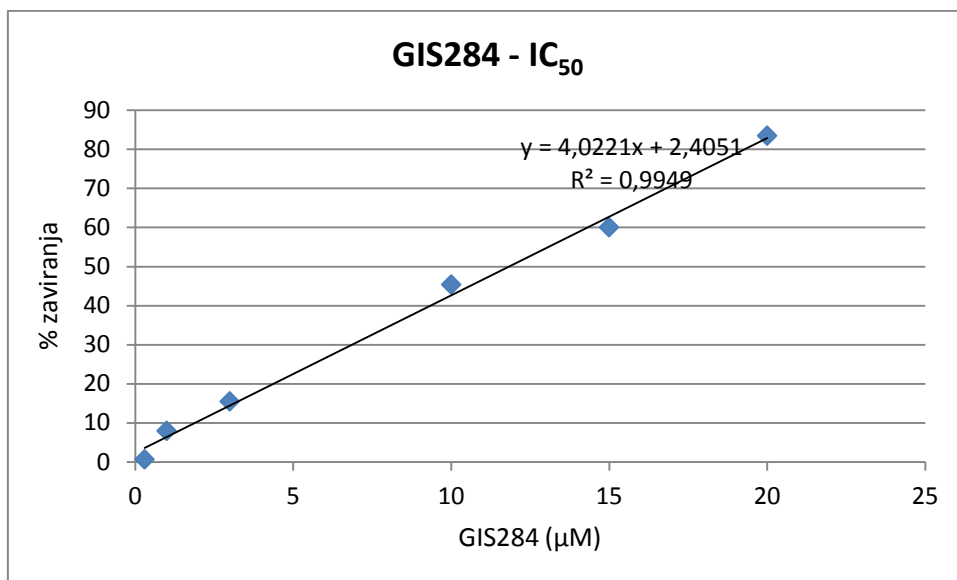
Po velikem številu testiranj smo se proti koncu raziskovalnega dela posvetili spojinama, ki sta najbolj zavirali encim MetAP. Gre za spojini GIS284 in GIS273, katerih  $IC_{50}$  znaša okrog  $10\mu M$ . Pri teh dveh spojinah smo ponovno določili  $IC_{50}$  iz grafa odstotek zaviranja v odvisnosti od različnih koncentracij spojine. Najprimernejši dvovalentni kovinski ioni so kobaltovi ( $Co^{2+}$ ), ki jih uporabljamo v aktivacijskem pufru v nadaljnjih testiranjih.

### 5.5.1. Spojina GIS284

Spojina GIS284 ima v primerjavi z nitroksolinom dodatni fragment na mestu 7, ki vsebuje terciarni amin, ciano skupino (CN) in dodaten benzenski obroč. Spojino GIS284 smo potestirali ob različnih koncentracijah in primerjali odstotke zaviralne aktivnosti na hitrost encimske reakcije, kar je prikazano v preglednici XV. Na sliki 27 so prikazani podatki iz preglednice XV v obliki grafa, iz katerega določimo  $IC_{50}$  spojine.

**Preglednica XV:** Odstotek zaviranja encimske aktivnosti pri različnih koncentracijah spojine GIS284

C(μM)	% zaviranja
20	83,37
15	60
10	45,33
3	15,44
1	7,97
0,3	0,61



**Slika 27:** Določanje IC<sub>50</sub> za spojino GIS284

Iz enačbe premice izračunamo IC<sub>50</sub> (X), to je pri Y=50, oziroma pri 50 odstotkih zaviranja katalitske aktivnosti encima.

$$IC_{50} = X = \frac{Y - 2,4051}{4,0221} = \frac{50 - 2,4051}{4,0221} = \boxed{11,83\mu M}$$

### 5.5.2. Spojina GIS273

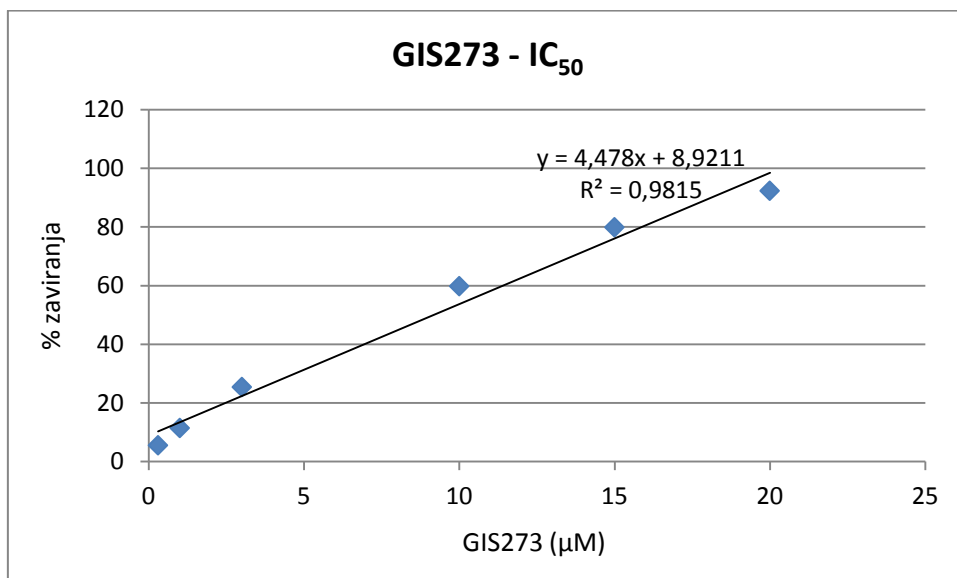
Spojina GIS273 ima v primerjavi z nitroksolinom dodatni fragment na mestu 7, ki vsebuje sekundarni amin in ciano skupino (CN). Spojino GIS273 smo testirali ob različnih koncentracijah in primerjali odstotke zaviralne aktivnosti na hitrost encimske reakcije, kar



je prikazano v preglednici XVI. Na sliki 28 so prikazani podatki iz preglednice XVI v obliki grafa, iz katerega določimo  $IC_{50}$  spojine.

**Preglednica XVI:** Odstotek zaviranja encimske aktivnosti pri različnih koncentracijah spojine GIS273

C( $\mu$ M)	% zaviranja
20	92,33
15	79,86
10	59,77
3	25,42
1	11,40
0,3	5,51



Slika 28: Določanje  $IC_{50}$  za spojino GIS273

Iz enačbe premice izračunamo  $IC_{50}$  (X), to je pri  $Y=50$ :

$$IC_{50} = X = \frac{Y - 8,9211}{4,478} = \frac{50 - 8,9211}{4,478} = \boxed{9,17\mu M}$$

Spojini GIS284 in GIS273, ki sta najbolj zavirali encim, smo ponovno testirali ob različnih koncentracijah  $\text{Co}^{2+}$  ionov. Preverili smo kaj se dogaja z zaviralno aktivnostjo na encim ob odsotnosti  $\text{Co}^{2+}$  ionov, v razmerju z ioni 1:1 in v prebitku  $\text{Co}^{2+}$  ionov. V primeru aktivacije encima brez  $\text{CoCl}_2$  je aktivnost encima in s tem tudi zaviranje teh spojin znatno slabša, kar smo dokazali že pri testu vpliva  $\text{Co}^{2+}$  ionov brez spojin. V enakem razmerju encima in  $\text{Co}^{2+}$  iona (1:1) ni prišlo do razlik v primerjavi s prebitkom  $\text{Co}^{2+}$  ionov napram encimu, ki bi pomembno vplivale na zaviranje hitrosti encimske reakcije, s čimer smo izključili možnost različne sposobnosti zaviranja zaradi različnih koncentracij  $\text{Co}^{2+}$  ionov in hkrati izključili še možnost kompleksacije samih spojin, zaradi prebitka  $\text{Co}^{2+}$  ionov. Kljub temu bi bilo smotrno testirati vse spojine še enkrat pri enakem razmerju encima s  $\text{Co}^{2+}$  ioni (1:1), saj smo zagotovili enostaven, hiter in ponovljiv sistem, ki nam je omogočal kontinuirano spremljanje encimske reakcije. Tako bi na vzpostavljenem sistemu bilo dobro preveriti tudi odzivnost ostalih znanih zaviralcev MetAP iz drugih bakterijskih sevov, kot so spojine s triazolnim obročem, spojine z obročem furanom, kjer dodatna karboksilna skupina pomembno vpliva na aktivnost s koordinacijo kovinskih ionov v aktivnem mestu, ter derivate kliokinola.

## 6. SKLEP

V okviru diplomske naloge smo najprej prilagodili in optimizirali literaturni postopek za določanje aktivnosti encima metionin aminopeptidaze iz *E. coli*, ki nam omogoča kontinuirano spremljanje hitrosti encimske reakcije na mikrotiterskih ploščah. Končni kromogeni produkt merimo spektrofotometrično po reakciji Ellmanovega reagenta z intermedijem, ki nastane po encimski cepitvi metionina. Encimu smo določili Michaelis-Mentenovo konstanto, ki znaša 233  $\mu\text{M}$ , kar je primerno za nadaljnja testiranja. Vrednotenje spojin smo izvajali pri koncentraciji substrata, ki je enaka  $K_M$ . Preverili smo odvisnost katalitske aktivnosti encima od prisotnosti DMSO in ugotovili, da 1% (v/v) DMSO ne povzroča značilnih sprememb, tako da je vrednotenje spojin, ki so raztopljene v DMSO, ki v reakcijski mešanici znaša 1% (v/v), primerno. Preverili smo vpliv dvovalentnih kovinskih ionov, kot so kobaltovi ( $\text{Co}^{2+}$ ), bakrovi ( $\text{Cu}^{2+}$ ), cinkovi ( $\text{Zn}^{2+}$ ) in železovi ( $\text{Fe}^{2+}$ ), na hitrost encimske reakcije in ugotovili, da so najbolj primerni za metionin aminopeptidazo iz *E. coli*, kobaltovi ( $\text{Co}^{2+}$ ) ioni. Testirali smo 100 derivatov nitroksolina, da bi ugotovili ali kateri izmed njih zavre encimsko katalitsko aktivnost. Pri tem smo se osredotočili na spojini GIS284 in GIS273, ki najbolj zavirata encimsko aktivnost in jima določili srednjo zaviralno koncentracijo, ki znaša 11,83  $\mu\text{M}$  pri spojini GIS284 in 9,17  $\mu\text{M}$  pri spojini GIS273. Z optimizacijo spojin bi lahko srednjo zaviralno koncentracijo še znižali in z nadaljnjim raziskovanjem potrdili, da je encim metionin aminopeptidaza dobra tarča za razvoj protibakterijskih spojin. V okviru diplomske naloge smo razvili zanesljivo, hitro in občutljivo metodo za kinetično študijo encima metionin aminopeptidaze, ki je učinkovito orodje za reševanje potencialnih zaviralcev.

Večjo pozornost si zasluži tudi testiranje na humanem rekombinantnem encimu metionin aminopeptidaze tipa 2, saj lahko z zaviranjem tega encima pomembno vplivamo na angiogenezo. Nitroksolin je zaradi dolge zgodovine uporabe v kliniki in dobro poznanega farmakokinetičnega profila, dober kandidat za nadaljnje študije v raziskavah zdravljenja rakavih obolenj. Z nitroksolinskimi derivati, ki zavirajo encim, bi lahko posegli v novo, neraziskano poglavje, saj je prostora in možnosti za raziskave in odkritja na področju rakavih obolenj še veliko. Skupaj s preverjanjem selektivnosti najboljših zaviralcev med bakterijsko in človeško metionin aminopeptidazo, bi to lahko bil cilj raziskav na tem področju v prihodnje.

## 7. LITERATURA

1. <http://www.scienceclarified.com/As-Bi/Bacteria.html>, [12.1.2016]
2. Thomas J. Silhavy, Daniel Kahne, and Suzanne Walker: The Bacterial Cell Envelope, Cold Spring Harb Perspect Biol., Vol. 2(5), 2010, a000414
3. <http://www.dreamstime.com/stock-illustration-gram-positive-gram-negative-bacteria-difference-bacterial-image45337024>, [26.8.2015]
4. Rustam I. Aminov: A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future, Front Microbiol., Vol.1, 2010, 134
5. <http://study.com/academy/lesson/antimicrobial-antibiotics-definition-classes-mechanisms.html>, [28.8.2015]
6. Tomažič J. in Franc Strle s sodelavci: Infekcijske bolezni, Združenje za infektologijo, Slovensko zdravniško društvo, Ljubljana, 2014, 48-67
7. <http://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/molecular-basis-for-antimicrobial-resistance/acquired-resistance/acquisition-of-antimicrobial-resistance-via-horizontal-gene-transfer>, [6.9.2015]
8. Gerard D Wright: Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it?, BMC Biology, Vol.8, 2010, 123
9. Robert A. Copeland: Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery, A guide for medicinal chemists and pharmacologists, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2005, 34-110
10. Zhou Y, Guo XC, Yi T, Yoshimoto T, Pei D.: Two continuous spectrophotometric assays for methionine aminopeptidase, Anal Biochem., Vol. 280(1), 2000, 159-65
11. Copik AJ1, Swierczek SI, Lowther WT, D'souza VM, Matthews BW, Holz RC: Kinetic and spectroscopic characterization of the H178A methionyl aminopeptidase from Escherichia coli, Biochemistry., Vol. 42(20), 2003, 6283-92
12. Watterson SJ1, Mitra S, Swierczek SI, et al.: Kinetic and spectroscopic analysis of the catalytic role of H79 in the methionine aminopeptidase from Escherichia coli, Biochemistry., Vol. 47(45), 2008, 11885-93
13. D'souza VM1, Bennett B, Copik AJ, Holz RC.: Divalent metal binding properties of the methionyl aminopeptidase from Escherichia coli., Biochemistry., Vol. 39(13), 2000, 3817-26

14. Olaleye OI, Raghunand TR, Bhat S, Chong C, Gu P, Zhou J, Zhang Y, Bishai WR, Liu JO: Characterization of clioquinol and analogues as novel inhibitors of methionine aminopeptidases from *Mycobacterium tuberculosis*, *Tuberculosis* (Edinb). 2011, 91
15. Jing-Ping Lu, Sergio C. Chai and Qi-Zhuang Ye: Catalysis and Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* Methionine Aminopeptidase, *J. Med. Chem.*, Vol. 53(3), 2010, 1329–1337
16. [http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/0615BA06250511F5C12579C2003F51D7/\\$File/s-012324.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/0615BA06250511F5C12579C2003F51D7/$File/s-012324.pdf), [8.3.2016]
17. Phumvadee Wangtrakuldee, Matthew S. Byrd, Cristine G. Campos, Michael W. Henderson, Zheng Zhang, Michael Clare, Ali Masoudi, Peter J. Myler, James R. Horn, Peggy A. Cotter, and Timothy J. Hagen: Discovery of Inhibitors of *Burkholderia pseudomallei* Methionine Aminopeptidase with Antibacterial Activity, *ACS Med. Chem. Lett.*, Vol. 4(8) 2013, 699–703
18. Ma ZQ, Xie SX, Huang QQ, Nan FJ, Hurley TD, Ye QZ: Structural analysis of inhibition of *E. coli* methionine aminopeptidase: implication of loop adaptability in selective inhibition of bacterial enzymes, *BMC Struct Biol.*, Vol. 7, 2007, 84
19. You-Di Liao, Jen-Chong Jeng, Chiu-Feng Wang, Sui-Chi Wang, and Shu-Ting Chang: Removal of N-terminal methionine from recombinant proteins by engineered *E. coli* methionine aminopeptidase, *Protein Sci.*, Vol. 13(7), 2004, 1802–1810
20. Shim JS, Matsui Y, Bhat S, Nacev BA, Xu J, Bhang HE, Dhara S, Han KC, Chong CR, Pomper MG, So A, Liu JO.: Effect of nitroxoline on angiogenesis and growth of human bladder cancer, *J Natl Cancer Inst.*, Vol. 102(24), 2010, 1855-73
21. Bhat S1, Shim JS, Zhang F, Chong CR, Liu JO: Substituted oxines inhibit endothelial cell proliferation and angiogenesis, *Org Biomol Chem.*, Vol. 10(15), 2012, 2979-92
22. Lowther WT1, Zhang Y, Sampson PB, Honek JF, Matthews BW: Insights into the mechanism of *Escherichia coli* methionine aminopeptidase from the structural analysis of reaction products and phosphorus-based transition-state analogues, *Biochemistry*, Vol. 38(45), 1999, 14810-9
23. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=4XO4>, [17.3.2016]
24. <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2GU7>, [17.3.2016]

25. Min Huang, Sheng-Xue Xie, Ze-Qiang Ma, Qing-Qing Huang, Fa-Jun Nan, and Qi-Zhuang Ye: Inhibition of Monometalated Methionine Aminopeptidase: Inhibitor Discovery and Crystallographic Analysis, *J Med Chem.*, Vol. 50(23), 2007, 5735-42