

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJ ŠIBANC

PROUČEVANJE AKTIVNEGA MESTA KATEPSINA X S PROGRAMI
ZA MOLEKULSKO MODELIRANJE

STUDY OF CATHEPSIN X'S ACTIVE SITE WITH PROGRAMMES FOR
MOLECULE MODELING

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Magistrsko naloge sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka in somentorstvom asist. Dr. Sama Turka.

ZAHVALA

Zahvalil bi se doc. dr. Bojanu Doljaku za prijaznost, potrežljivost in dejstvo, da je bil vedno na voljo in me je vedno pravilno usmerjal k cilju.

Zahvala gre seveda tudi vsem mojim bližnjim, ki so bili vedno tam, ko sem jih potreboval.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naloge samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Bojana Doljaka in somentorstvom asist. dr. Sama Turka.

Matej Šibanc

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
1.1 KATEPSIN X	1
1.1.1 AKTIVNO MESTO KATEPSINA X	3
1.2 SUBSTRATI KATEPSINA X	5
1.2.1 β 2- INTEGRIN	5
1.2.2 γ - ENOLAZA	6
1.2.3 PROFILIN 1	6
1.3 INHIBITORJI KATEPSINA X	7
1.4 TIPI INTERAKCIJ LIGAND-RECEPTOR IN LIGAND-ENCIM	9
2. NAČRT DELA	12
3. PROGRAMSKA ORODJA	13
3.1 PYMOL	13
3.2 OMEGA	14
3.3 FRED	15
3.4 VIDA	17
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	18
4.1 SIDRANJEZNANIH INHIBITORJEV IN SUBSTRATOV	18
4.2 ISKANJE NOVIH POTENCIJALNIH INHIBITORJEV NA PODLAGI PROREGIJE PROKATEPSINA X	20
5. SKLEP	34
6. LITERATURA	35

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Znani inhibitorji in substrati katepsina X.	18
Preglednica II: Kratki peptidi kot potencialni novi inhibitorji katepsina X.	20
Preglednica III: Razdelitev AK glede njihovih hidrofobnih lastnosti po treh različnih lestvicah.	23

KAZALO SLIK

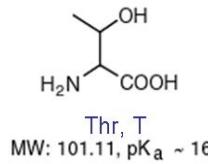
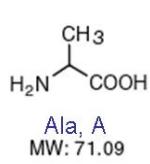
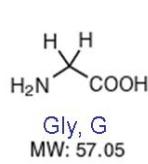
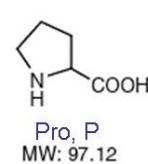
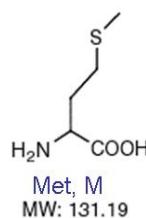
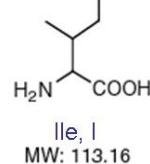
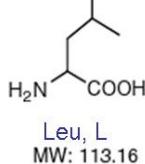
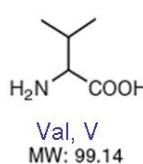
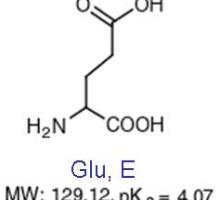
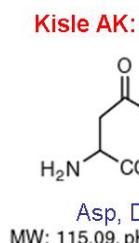
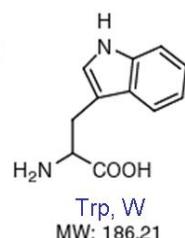
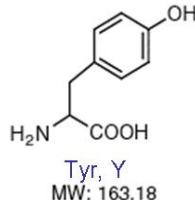
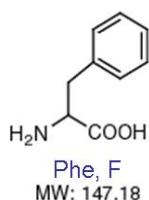
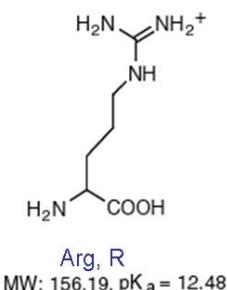
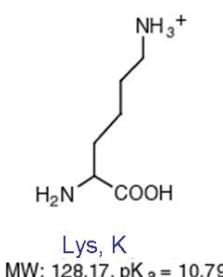
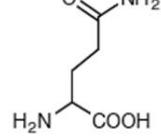
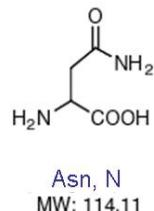
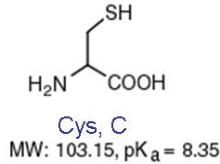
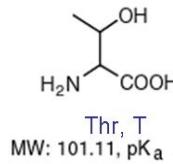
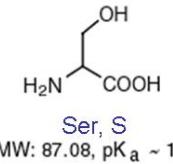
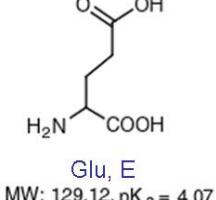
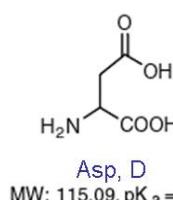
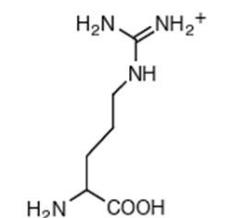
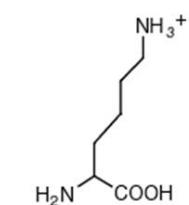
Slika 1: Shematski prikaz tercirarne strukture prokatepsina X	2
Slika 2: Substratne podregije katepsina X: S1, S1', S2 in S3	3
Slika 3: Substrat Cbz-FRF v aktivnem mestu katepsina X	4
Slika 4: $\beta 2$ integrin	5
Slika 5: γ -enolaza	6
Slika 6: Profilin 1	7
Slika 7: Inhibitor E-64	8
Slika 8: Shematski prikaz afinitetne encimske sonde	8
Slika 9: Inhibitor AMS-36	9
Slika 10: Jakost vodikovih vezi	10
Slika 11: Tipi aromatskih vezi	11
Slika 12: Program Pymol	13
Slika 13: Prikaz treh konformacij iz knjižnice, generirane s programom Omega	14
Slika 14: Omejitev prostega sidranja v programu Make_receptor	15
Slika 15: Prikaz virtualnega kvadra	16
Slika 16: Način grafičnega prikazovanja molekul v programu Vida	17
Slika 17: Znani inhibitorji sidrani v okolini aktivnega mesta katepsina X	18
Slika 18: C-konci substratov katepsina X sidrani v okolico aktivnega mesta	19
Slika 19: Elektrostatska površina katepsina X.	21
Slika 20: Prikaz donorjev in akceptorjev vodikovih vezi	22
Slika 21: Prikaz hidrofobnosti površine katepsina X	22
Slika 22: Vezava oktapeptida GQTCYRPL	24
Slika 23: Vezava tetrapeptida NYCT	26
Slika 24: Vezava pentapeptida NYCTW	27

Slika 25: Vezava tetrapeptida NGCT	27
Slika 26: Vezava pentapeptida NGCTY	28
Slika 27: Vezava heksapeptida NGCTYN	29
Slika 28: Vezava heptapeptida NGCTGYN	30
Slika 29: Vezava tripeptida YCT	31
Slika 30: Vezava tripeptida NCT	32
Slika 31: Vezava tripeptida VCT	32
Slika 32: Vezava tetrapeptida VYCT	33

OKRAJŠAVE

AK	aminokislina
Ala, A	alanin
Arg, R	arginin
Asn, N	asparagin
Asp, D	aspartat
CAM	celična adhezijska molekula (ang. Cell Adhesion Molecule)
Cbz	karbobenzoksi
Cys, C	cistein
ECM	zunajcelični matriks (ang. Extra Cellular Matrix)
Gln, Q	glutamin
Glu, E	glutamat
Gly, G	glicin
His, H	histidin
Ile, I	izoleucin
Leu, L	leucin
LFA-1	limfocitni funkcijski antigen 1 (ang. Lymphocyte Function-associated Antigen 1)
Lys, K	lizin
MAPK	mitogen-aktivirana protein kinazne pot (Mitogen-Activated Protein Kinase)
Met, M	metionin
Pro, P	prolin
PDB	baza kristalnih struktur proteinov (ang. Protein Data Bank)
RMS	koren srednjih kvadratov (ang. Root-Mean-Square)
Ser, S	serin
Thr, T	treonin
Trp, W	triptofan
Tyr, Y	tirozin
Val, V	valin

AMINOKISLINE

Male AK:**Hidrofobne AK:****Aromatske AK:****Amidne AK:****Nukleofilne AK:****Kisle AK:****Bazične AK:**

POVZETEK

Človeški katepsin X je lizosomska proteaza, katerega delovanje v telesu, še ni popolnoma raziskano in poznano. Zato smo v diplomskem delu poskusili najti peptidne molekule, ki bi bile osnova za nove reverzibilne inhibitorje katepsina X. Začeli smo z analizo in posnemanjem proregije prokatepsina X, ki naravno preprečuje aktivnost katepsina X, in nato spremenjali aminokislinsko zaporedje peptidov, da bi prišli do čim boljše ocene vezave.

Analizirali smo strukturo aktivnega mesta Cys31 na katepsinu in podenote (S1, S1', S2, S3), ki aktivno mesto obdajajo. Določili smo aminokisline, ki bi se na tem delu molekule najbolje prilegale v jarek aktivnega mesta in hkrati tvorile dovolj interakcij, da bi z dovolj močno vezavo bile sposobne inhibirati delovanje encima.

Pri delu smo uporabljali različne računalniške programe. Peptide smo izrisali s programom Avogadro in nato s programom Omega ustvarili knjižnico vseh možnih konformacij peptida. Peptide smo sidrali v katepsin X s programom Fred. Dobljene rezultate smo si nato ogledali s programoma Pymol in Vida.

Ugotovili smo, da na rezultate v prvi vrsti vpliva velikost in s tem prileganje inhibitorja v jarek z aktivnim mestom. Ker je le-ta majhen in ozek, marsikatera aminokislina, ki je sicer sposobna tvoriti veliko vodikovih vezi, zaradi svoje velikosti ni dala dobrega rezultata. Z načrtnim spremjanjem aminokislinskega zaporedja inhibitorja smo ugotovili, da najboljšo vezavno oceno dobimo pri tripeptidu Val-Cys-Thr in le nekoliko slabšo pri tripeptidu Tyr-Cys-Thr. Rezultati so primerljivi z že znanimi sintezno pridobljenimi inhibitorji, kot so AMS-36, DCG-04 ali E-64, kar potrjuje, da so uporabljeni računalniški programi primerni za iskanje in optimizacijo novih inhibitornih peptidov katepsina X.

ABSTRACT

Human cathepsin X is a lysosomal protease, with a not completely elucidated function in the body. Therefore, in our work we tried to find peptide molecules that would represent hit compounds for the development of a reversible inhibitor of cathepsin X. We started with the analysis and imitation of the proregion of procathepsin X, which is a naturally prevents the activity of cathepsin X and then we changed the amino acid sequence of the peptides to get the best possible docking scores.

We have analyzed the structure of the cathepsin X active site's Cys31 and subunits (S1, S1', S2, S3), which surround the active site. We determined the amino acids, which would fit best into the trench in the active site part of the molecule and at the same time form sufficient interactions for strong binding and thus inhibit the enzyme activity.

During our work we used a variety of computer programs. Inhibitors were made by using Avogadro, the libraries of all possible conformations of a selected peptide were created using Omega. The peptides were docked on cathepsin X using Fred. The results were then visualized with PyMOL and Vida.

We found that the docking scores are primarily affected by the size and therefore fitting of the peptide into the trench of the active site. As the trench is small and narrow, many amino acids, which would normally form hydrogen bonds, did not give a good result because of their size. By changing the amino acid sequence of the peptides, we found that the best binding values were obtained with the tripeptide Val-Cys-Thr and only slightly lower with Tyr-Cys-Thr. The results are comparable to the well-known synthetic inhibitors, such as AMS-36, DCG-04 and E-64. This demonstrates that the programs used are suitable for the search and optimisation of new peptidic inhibitors of cathepsin X.

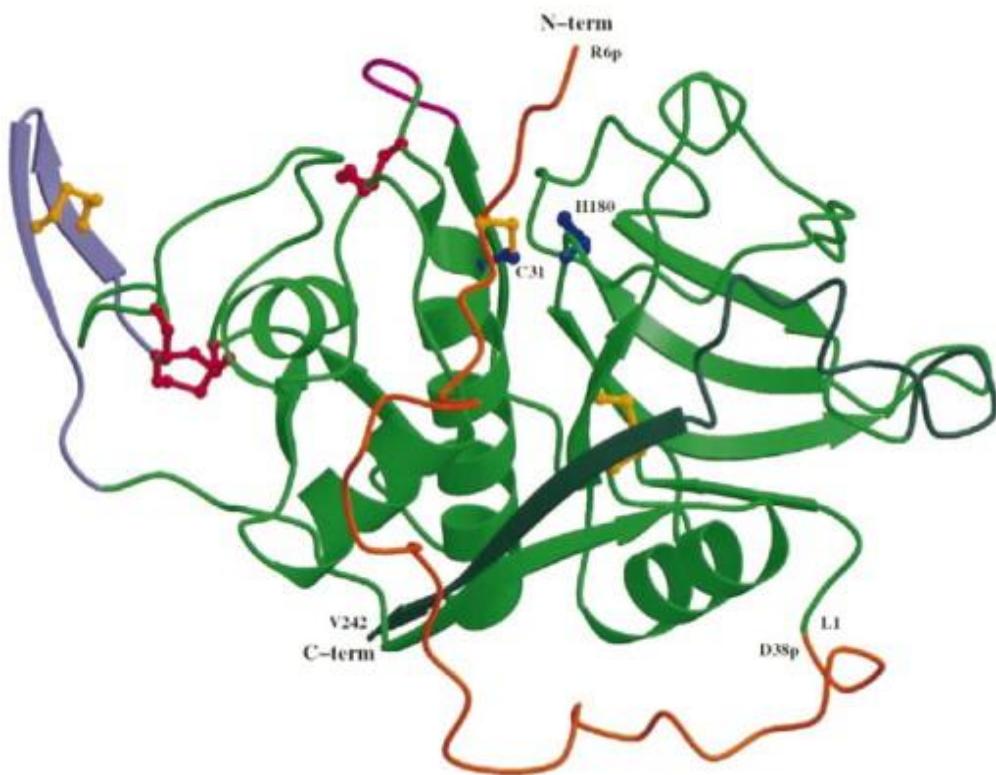
1. UVOD

1.1 KATEPSIN X

Človeški katepsin X (poznan tudi pod imenom katepsin Z oz. katepsin Y) je lizosomska cisteinska proteaza, ki spada v klan CA cisteinskih peptidaz. V to družino, poleg katepsina X, spadajo še katepsini B, C, H, K in L (1). Katepsin X najdemo v vseh organih, največ pa ga je v maternici, pljučih, jetrih, ledvicah, trebušni slinavki, debelem črevesu, jajčnikih, perifernih krvnih levkocitih, prostatni, tankem črevesu in vranici (2). Celice, ki najbolj izražajo katepsin X so: bronhoepitelijске celice, makrofagi v alveolih in germinalnih centrih bezgavk, monociti (npr. promonocitna celična linija U-937) ter dendritične celice, kar nakazuje na vlogo katepsina X v procesih vnetja ter imunskega odgovora. Katepsin X je vpletен v fiziološke procese znotrajcelične obnove proteinov, preoblikovanje zunajceličnega matriksa, procesiranje hormonov, resorpciji kosti in predstavitev antigena. V primarnih tumorjih ter malignih celicah je manj izražen in za razliko od katepsina B ni udeležen pri razgradnji zunajceličnega matriksa (ECM), s čimer tumorske celice invadirajo in metastazirajo v druga tkiva.

Človeški katepsin X kaže zanimive strukturne in funkcionalne lastnosti, po katerih se razlikuje od ostalih cisteinskih katepsinov papainske družine. Celotni preprokatepsin X je sestavljen iz 303 aminokislin (AK), od katerih predstavlja prvih 23 AK N-konca pre-zaporedje, nadalnjih 38 AK proregijo in preostalih 242 AK aktiven (zrel) encim. Zadnjih 25 AK C-konca katepsina X pa se ne ujema z zaporedji ostalih papainu podobnih proteaz, in tudi ne z ostalimi do sedaj znanimi proteinskimi zaporedji. N-konec katepsina X sestavljajo predvsem α -vijačnice, C-konec pa β -ploskve (slika 1).

Polipeptidna veriga zrelega katepsina X se razteza od Leu1 do Val242, v njej pa je šest disulfidnih vezi. Cys31 aktivnega mesta tvori v prokatepsinu X dodatno disulfidno vez z Cys10 proregije, zato je prokatepsin X encimsko neaktiv. Proregija prokatepsina X je najkrajša izmed vseh proregij cisteinskih katepsinov (38 AK pri prokatepsinu X v primerjavi z 62 AK pri prokatepsinu B in 251 AK pri prokatepsinu F).



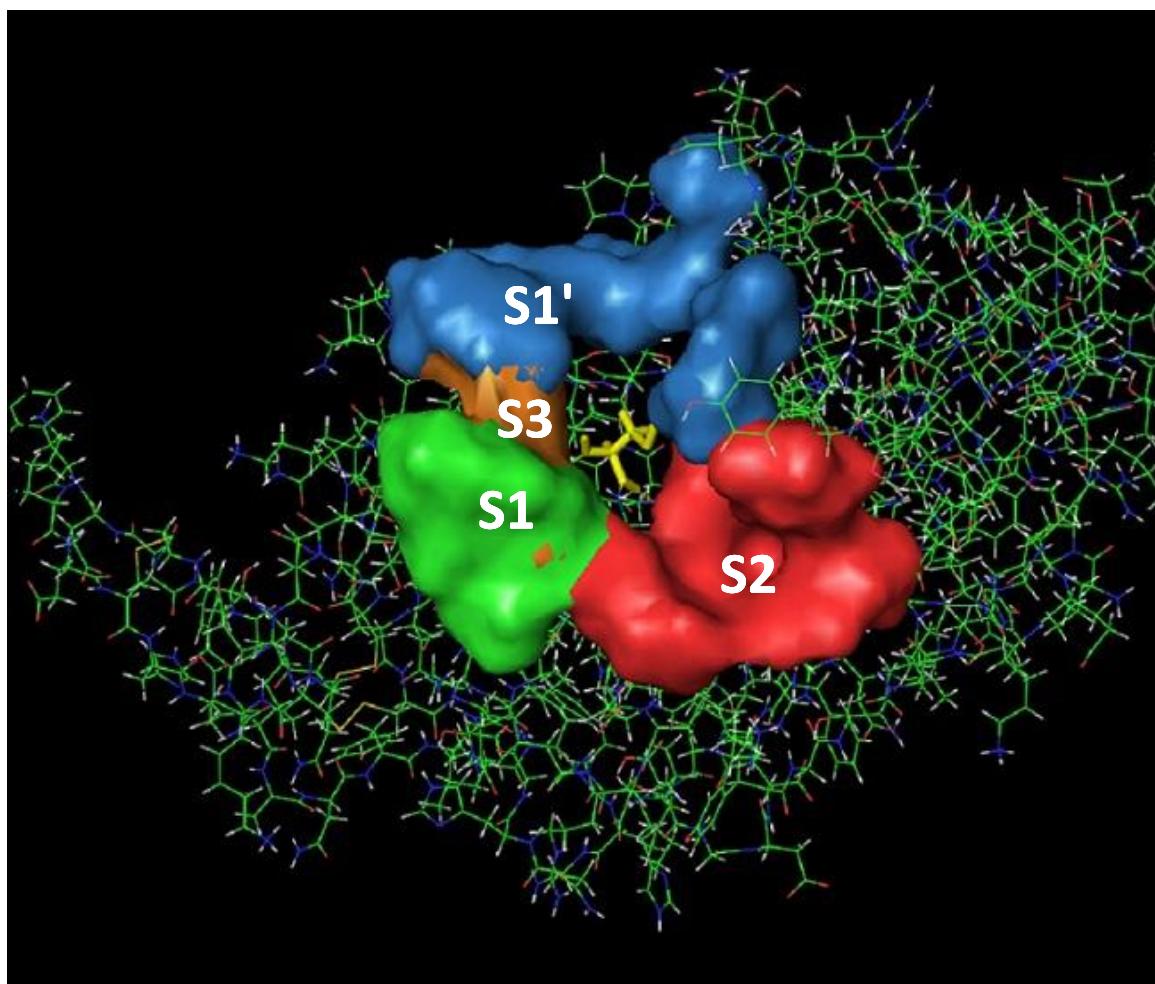
Slika 1: Shematski prikaz terciarne strukture prokathepsina X. Legenda: proregija (svetlo rjava barva), aktivni encim (zelena barva), zadnjih 25 AK na C-koncu (temno zelena barva), mini zanka (rožnata barva), veliko vstavljeni zaporedje (vijolična barva). Disulfidne vezi so konservativne (rdeče kroglice) ali unikatne (rumene kroglice). Cys31 in His180 v aktivnem mestu sta označena s temno modro (Sivaraman, 2000, 1).

Katepsin X se od ostalih cisteinskih katepsinov razlikuje tudi po treh aminokislinsah (Ile24-Pro25-Gln26) v t.i. mini zanki (His23-Tyr27), ki se nahaja blizu regije, kamor se vežejo substrati. Zaradi omenjenih treh "vrinjenih" AK ima katepsin X karboksimonopeptidazno pa karboksidipeptidazne ali endopeptidazne aktivnosti. Histidinski ostanek mini zanke, zaradi svojega pozitivnega naboja olajša vezavo negativno nabitih C-koncev substratov v neposredno bližino aktivnega mesta encima (1,2).

Večina cisteinskih proteaz se v kislih pogojih avtoaktivira, za aktivacijo prokathepsina X v zreli katepsin X *in vitro* pa so potrebni reducirajoči pogoji in majhna količina katepsina L. Zaradi teh razlik bi katepsin X lahko uvrstili celo v novo poddružino znotraj papainske družine (4).

1.1.1 AKTIVNO MESTO KATEPSINA X

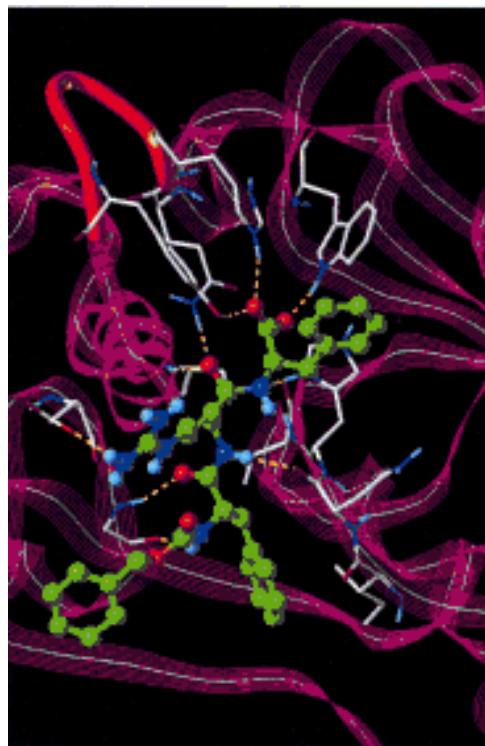
Tako kot ostali katepsini ima tudi katepsin X štiri dobro definirane podregije (S1, S1', S2 in S3), kamor se vežejo substrati (slika 2). Katalitično triado aktivnega mesta katepsina X sestavlja Cys31, His180 in Asn200. Substratno specifičnost katepsinov definirajo njihove S in S' podregije, med katerimi je za papainu podobne encime najbolj značilna podregija S2. V katepsinu X ima le-ta hidrofobne lastnosti, zaradi tam prisotnih AK: Ile178, Gly154 in Val181.



Slika 2: Substratne podregije katepsina X: S1, S1', S2 in S3. Na stičišču podregij je v aktivnem mestu z rumenim označen katalitični Cys31 (4).

V primerjavi s katepsinom B, ima katepsin X izraženo samo eksopeptidazno aktivnost, za kar je odgovorna večja rigidnost mini zanke katepsina X in dejstvo, da se poziciji Tyr27 in His23 ne moreta prosto zamenjati.

Poskusi s sinteznim substratom Cbz-FRF (karbobenzoksi-L-fenilalanin-L-arginin-L-fenilalanin) so pokazali, da substrat s C-koncem (prosti karboksilat) tvori vodikove vezi z aminokislinsimi na encimu: His23 (s skupino NH na imidazolu), Tyr27 (s fenolnim hidroksilom) in Trp202 (z indolno NH skupino). Pri tem His23 in Tyr27 tvorita nekakšno bariero, ki preprečuje da bi se na to mesto vezal kakršenkoli dodaten C-konec substrata (5).



Slika 3: Substrat Cbz-FRF v aktivnem mestu katepsina X. Cbz-FRF tvori vodikove vezi z naslednjimi AK encima: His23, Tyr27 in Trp202. Legenda: encim (vijolična barva), mini zanka (svetlo rdeča barva), substrat (zeleni barvi), AK encima, ki tvorijo vodikove vezi (rumeno črtkano) s substratom (bela molekula).

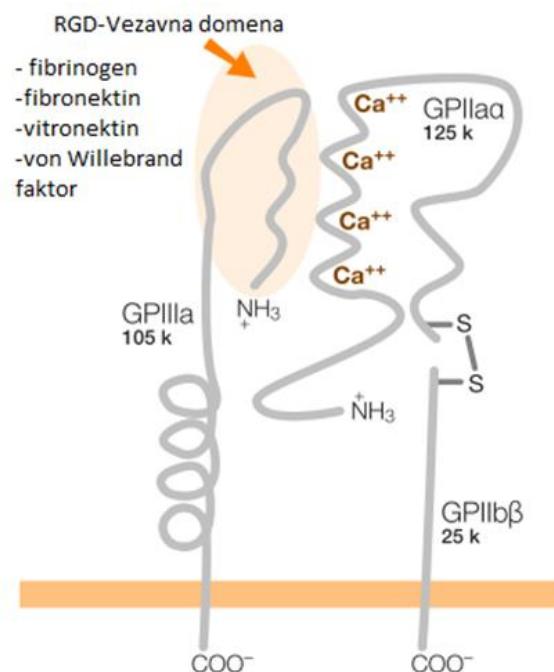
Z uporabo serije substratov Abz-XRF (*ortho*-aminobenzoil-L-[poljubna aminokislina]-L-arginin-L-fenilalanin), ki jih katepsin X hidrolizira preko karboksimonopeptidazne poti so preučevali različne hitrosti hidrolize v odvisnosti od poljubne AK v substratu. Ugotovili so, da katepsin X najhitreje hidrolizira substrate, ki namesto poljubne aminokisline vsebujejo Tyr, Leu ali Phe, najpočasneje pa tiste, ki vsebujejo Pro, Ile ali Gly (6).

1.2 SUBSTRATI KATEPSINA X

Med do sedaj potrjene naravne substrate katepsina X spadajo $\beta 2$ -integrinska veriga, profilin, γ -enolaza in kemokin CXCL-12. S pomočjo sinteznih substratov lahko selektivno izmerimo encimsko aktivnost katepsina X (npr. s kvantifikacijo emitirane svetlobe, ki jo oddaja fluorofor). Zaradi podobnosti nukleotidnih zaporedij katepsinov so namreč klasični genetski načini merjenja izraženosti katepsina X v celicah oteženi.(7,8)

1.2.1 $\beta 2$ - INTEGRIN

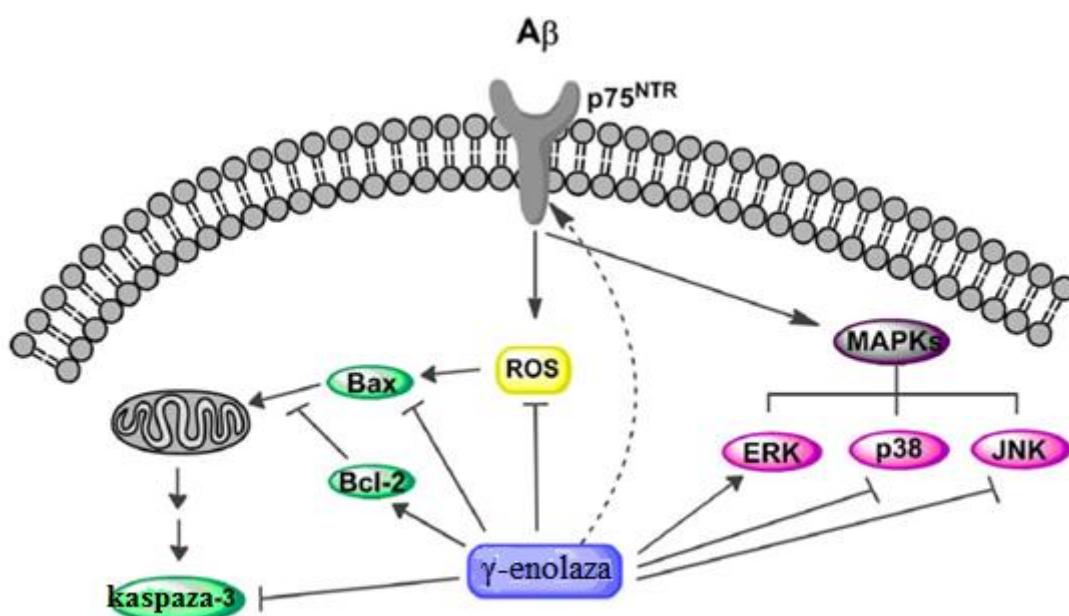
Integrini so transmembranski proteini iz skupine adhezijskih molekul, ki povezujejo celice med seboj in z zunajceličnim matriksom ter sodelujejo pri signalizaciji med celicami in okolico. Izmed adhezijskih molekul kamor spadajo še kadherini, CAM in selektini, so integrini najbolj vsestranski. Integrine delimo v tri poddružine ($\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3$), sestavljata pa jih dve med sabo ločeni verigi (alfa in beta) (slika 4). Njihov C konec sega v citoplazmo, N-konec pa se nahaja na zunanji strani celične membrane (8).



Slika 4: $\beta 2$ integrin (Vir: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/66/Integrin.svg/344px-Integrin.svg.png>)

1.2.2 γ -ENOLAZA

γ -enolaza je multifunkcionalen glikolitični encim, ki se nahaja v nevronih in nevroendokrinih celicah. Preko aktivacije fosfatidilinozitol-3-kinazne (PI 3-k) in mitogen-aktivirane protein kinazne (MAPK) signalne poti poveča preživetje možganskih nevronov stimulira njihovo diferenciacijo in regeneracijo (slika 5). Za nevrotrofično delovanje γ -enolaze je nujna translokacija proti plazemski membrani in intakten C-konec (10). KATEPSIN X odcepi zadnja dva peptida na C-koncu γ -enolaze in tako regulira nevritogenezo ter preživetje nevronskeh celic (9).

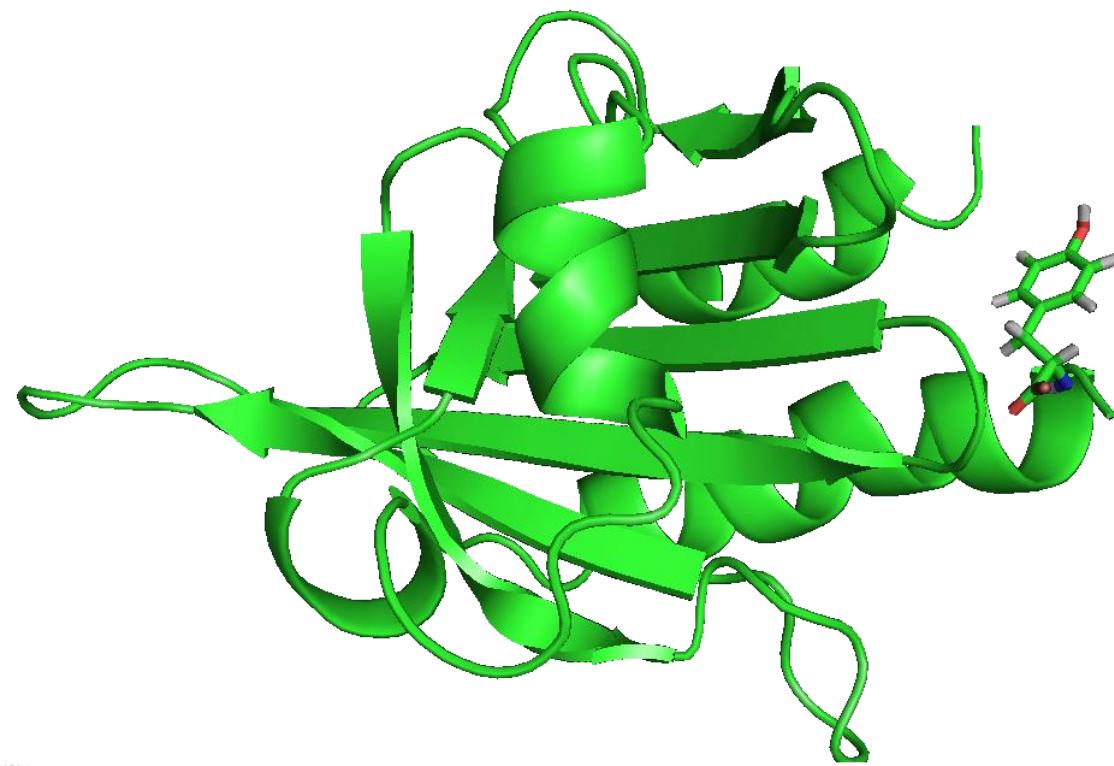


Slika 5: Vloga γ -enolaze v nevropotekativnem delovanju na celicah PC12. γ -enolaza zavira nastajanje reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), zavira proapoptotični protein Bax in poveča delovanje anti-apoptotičnega proteina Bcl-2. To vodi v stabilizacijo potenciala mitohondrijske membrane in zmanjšanje aktivnosti kaspaze-3. γ -enolaza inhibira tudi MAP kinazno fosforilacijo proapoptotičnih proteinov JNK in p38. (Vir: Pišlar A.H., Kos J.: C-terminal peptide of γ -enolase impairs amyloid- β -induced apoptosis through p75^{NTR} signaling, Neuromolecular Med. 2013; 15(3): 623-35.)

1.2.3 PROFILIN-1

Profilin 1, znan kot tumorski supresor je citosolni protein, ki sodeluje pri polimerizaciji aktina. V veliko vrstah rakavih celic (dojka, jetra, trebušna slinavka) je koncentracija profilina 1 zmanjšana. Znano je, da povečana koncentracija profilina 1 inhibira

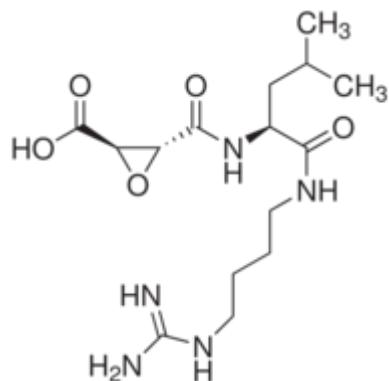
napredovanje tumorjev. V celici se profilin 1 kolokalizira z katepsinom X v perinuklearnem območju in v plazemski membrani. Katepsin X v rakavih celicah prostate (PC-3) cepi njegov C-konec in na ta način uravnava njegovo celično aktivnost (slika 6) (7).



Slika 6: Profilin-1, prikazan s trakovi in vijačnicami. Zadnja AK Tyr139 je prikazana s paličicami (Vir: Protein Data Bank - PDB).

1.3 INHIBITORJI KATEPSINA X

Encimski inhibitorji se pogosto uporabljajo za identifikacijo encimov, za določanje encimske aktivnosti in za lokaliziranje encimov znotraj celice. Pomemben inhibitor pri preučevanju katepsina X je trans-epoksisukcinil-L-leucilamido (4-guanidino)butan (E-64), izoliran iz glive *Aspergillus japonicus*. E-64 prehaja iz citosola v lizosome z direktno permeacijo oz. prehodom. V lizosomih se kovalentno, selektivno in irreverzibilno veže na cisteinsko tiolno skupino v aktivnem mestu in tako inhibira večino cisteinskih proteaz. Pri tem se E-64 z levcinskim delom molekule veže v hidrofobni žep S2, z amino-4-guanidinobutanskim delom molekule pa v žep S3 katepsina X. Zaradi selektivne inhibicije, omogoča E64 razlikovanje med cisteinskimi proteazami in encimi iz drugih proteaznih družin (11,12,13,14).



Slika 7: Inhibitor E-64 (**Vir:** <http://www.sigmaaldrich.com/medium/structureimages/61/mfcd00080261.png>)

Na osnovi strukture E-64 so raziskovalci razvili še en epoksisukcinilni inhibitor - DCG-04, ki deluje kot encimska afinitetna sonda. DCG-04 se veže samo na aktivno obliko encima, na pa tudi na proobliko. Večinoma so afinitetne sonde sestavljene iz treh delov (slika 8):

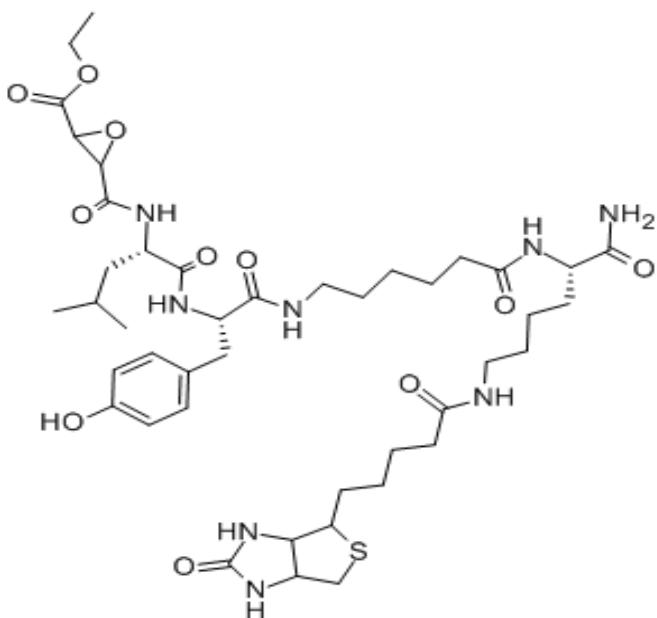
- reativna skupina (ang. warhead), odgovorna za kovalentno vezavo na aktivni encim (npr. elektrofilna reaktivna skupina),
- označevalec (ang. tag), ki omogoča detekcijo kompleksa encim-sonda (npr. biotin, fluorofor, radioizotop),
- vmesnik (ang. spacer), ki povezuje reaktivno skupino in označevalec v skupno sondu (npr. alkil, peptid).

Z optimizacijo vmesnika se lahko izboljša selektivnost afinitetne sonde za določene podskupine proteaz (npr. cisteinske proteaze). Od tipa označevalca pa je odvisna metoda za detekcijo kompleksa sonda-encim (npr. detekcija s streptavidinom, merjenje fluorescence, merjenje radioaktivnosti) (15).



Slika 8: Shematski prikaz afinitetne encimske sonde. **Legenda:** označevalec (zvezdica), vmesnik (pravokotnik), reaktivna skupina (puščica).

Med pogosto uporabljeni specifični inhibitorji katepsina X spada tudi AMS-36, ki je ravno tako epoksisukcinilni derivat (slika 9). AMS-36 prehaja v celico (se internalizira) in v lizosome, in se preko epoksisukcinilne skupine kovalentno veže v aktivno mesto katepsina X. S pomočjo inhibicije z AMS-36 je bilo potrjeno delovanje katepsina X na beta verigo integrina LFA-1 (16).



Slika 9: Inhibitor AMS-36.

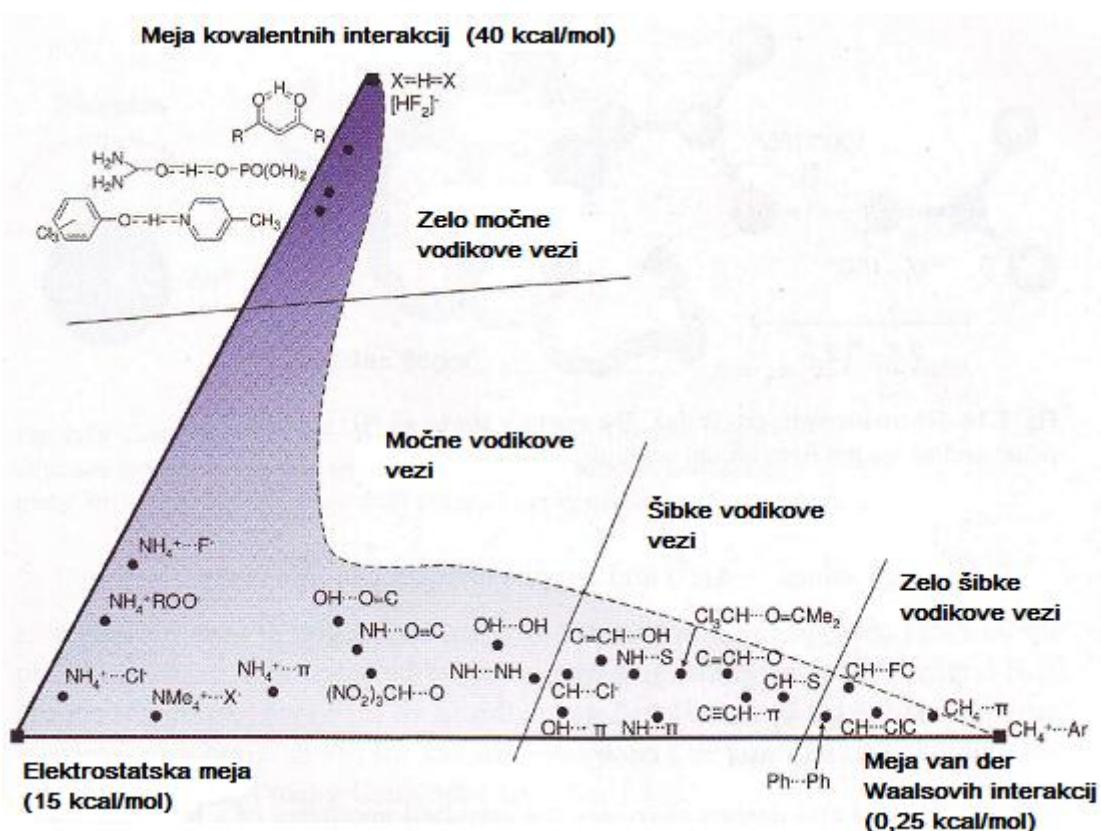
1.4 TIPI INTERAKCIJ LIGAND-RECEPTOR IN LIGAND-ENCIM

Pri odkrivanju novih učinkovin je pomembna interakcija med molekulami v že znanih biokemijskih procesih v celici. Za komplekse ligand-receptor oz. ligand-encim med učinkovino in tarčnim proteinom, so običajno zaželene reverzibilne interakcije, v nekaterih primerih pa tudi kovalentne vezi (npr. pri nekaterih tumorskih terapijah). Da pride do interakcije, se običajno spremeni konformacija vsaj ene udeležene molekule, ki pa ni nujno energetsko najnižja konformacija določenega liganda. Takšno konformacijo liganda imenujemo bioaktivna konformacija.

Najpomembnejše interakcije, ki prispevajo k bioaktivni konforamciji liganda so: elektrostatske interakcije, vodikove vezi, aromatske interakcije ter van der Waalsove interakcije. V praksi k interakciji ligand-receptor oz. ligand-encim največ prispevajo vodikove vezi, to so nekovalentne interakcije med atomom vodika in okolišnjimi atomi

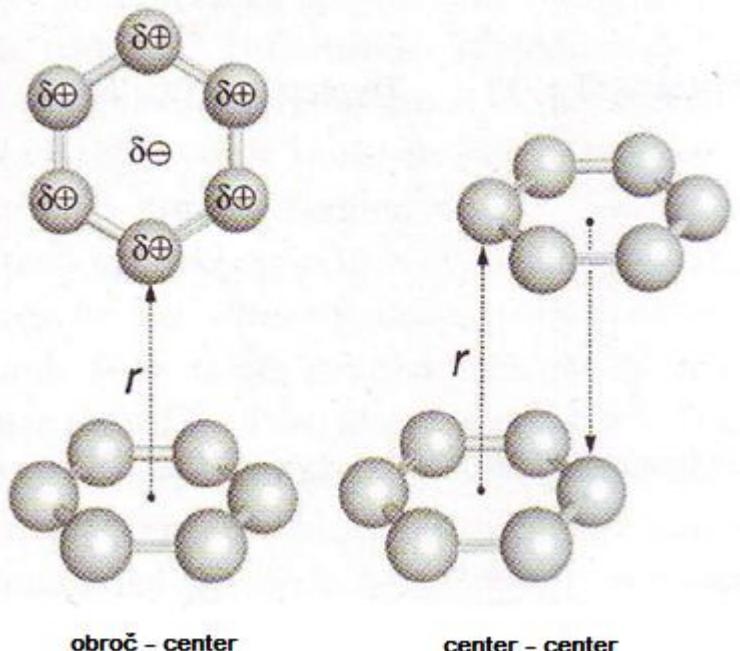
(elektronondonorji). Vodikove vezi se med seboj precej razlikujejo po jakosti interakcije. Tako ima vez OH---O=C desetkrat večjo jakost vezave (okoli 50 kJ mol^{-1}) kot vez C=CH---O (okoli 8 kJ mol^{-1}). V povprečju obsega razdalja med atomoma, ki tvorita vodikovo vez približno 3\AA .

Nekaj primerov vodikovih vezi (energijske vrednosti $-\Delta H^\circ$ in dolžine):



Slika 10: Jakost vodikovih vezi (17).

Za vezavo ligand-encim so zelo pomembne tudi aromatske interakcije. Aromatski obroč tvori delno negativen naboj v sredini in delno pozitivnega na aromatskem obroču. To omogoča obroč-center in center-center interakcije med dvema obročema. Take povezave so pogosto najdene v interakcijah protein-ligand, med najbolj znanimi stabilizirajo vijačnico DNA Povprečna razdalja aromatskih interakcij je do 6 Å, jakost vezave med dvema nesubstituiranimi fenilnima obročema pa $1,4 \text{ kJ mol}^{-1}$ (17, 18, 19).



Slika 11: Tipi aromatskih vezi. Leva slika prikazuje primer obroč-center, desna slika pa center-center aromatske interakcije (17).

Elektrostatske interakcije nastanejo med dvema različno (nasprotno) nabitima molekulama. Energija vezave je odvisna od elektrostatskega potenciala, pozicije atomov, nabojev in radij atomov. Energija dveh nasprotno nabitih molekul pri razdalji 3 Å se giblje okoli $5,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ (20).

Pri van der Waalsovih interakcijah gre za to, da porazdelitev elektronskega naboja ni vsepošod enaka in kroži okrog atoma, ter se s časom spreminja. V vsak trenutku je porazdelitev elektronov nesimetrična in tvori obliko elipse. Na ta način atom vpliva tudi na nesimetričnost drugega atoma v okolini, zato se atoma med seboj privlačita. Energija vezave je pri teh van der Waalsovih interakcijah razmeroma nizka in znaša od 2 do 4 kJ mol^{-1} .

2. NAČRT DELA

Katepsin X je lizosomska cisteinska proteaza, katerega proregija, sestavljena iz 38 AK, v prokatepsinu onemogoča njegovo aktivnost. Cys10p na proregiji tvori reverzibilno disulfidno vez z Cys31 v aktivnem mestu katepsina. Namen dela je s programi za molekulska modeliranje proučiti aktivno mesto katepsina X. V aktivno mesto bomo sidrali znane substrate, znane inhibitorje in na osnovi proregije poskušali najti nove kratke peptide, ki bodo imeli čim boljše bioaktivne konformacije in bodo predstavljali osnovo za razvoj novih inhibitorjev katepsina X.

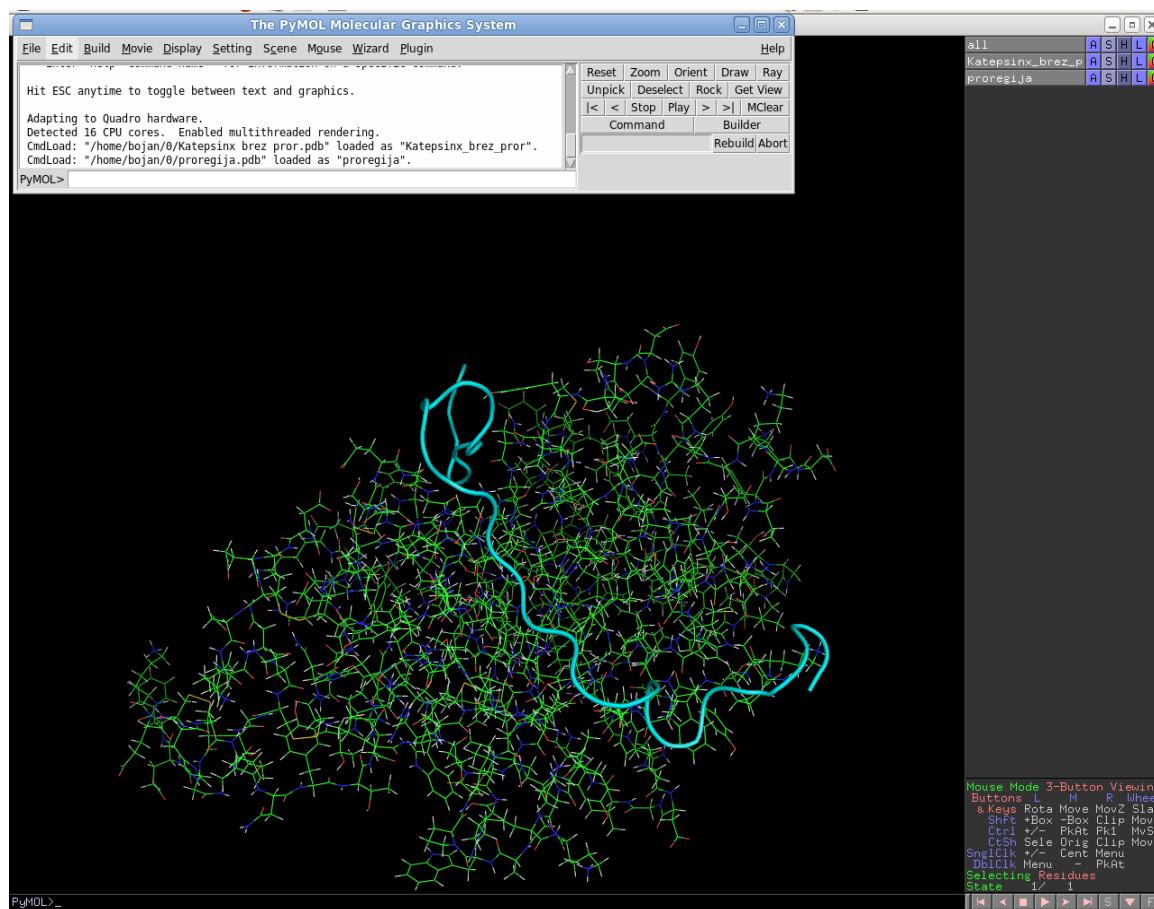
Načrt dela:

1. S programi za sidranje bomo ugotovili vezavne ocene že znanih inhibitorjev in substratov katepsina X.
2. Na podlagi aminokislinskega zaporedja proregije v okolini Cys10p bomo načrtovali oktapeptide, heptapeptide, heksapeptide, tetrapeptide in tripeptide.
3. Pripravili bomo knjižnico vseh mogočih rigidnih konformacij ligandov s programom Omega.
4. Knjižnice bomo sidrali v aktivno mesto katepsina X s programom Fred
5. Rezultate bomo analizirali s programom Vida in jih vizualizirali s programom Pymol.
6. Na osnovi rezultatov bomo načrtovali nadaljnjo kemijsko in računalniško optimizacijo inhibitorjev.

3. PROGRAMSKA ORODJA

3.1 PYMOL

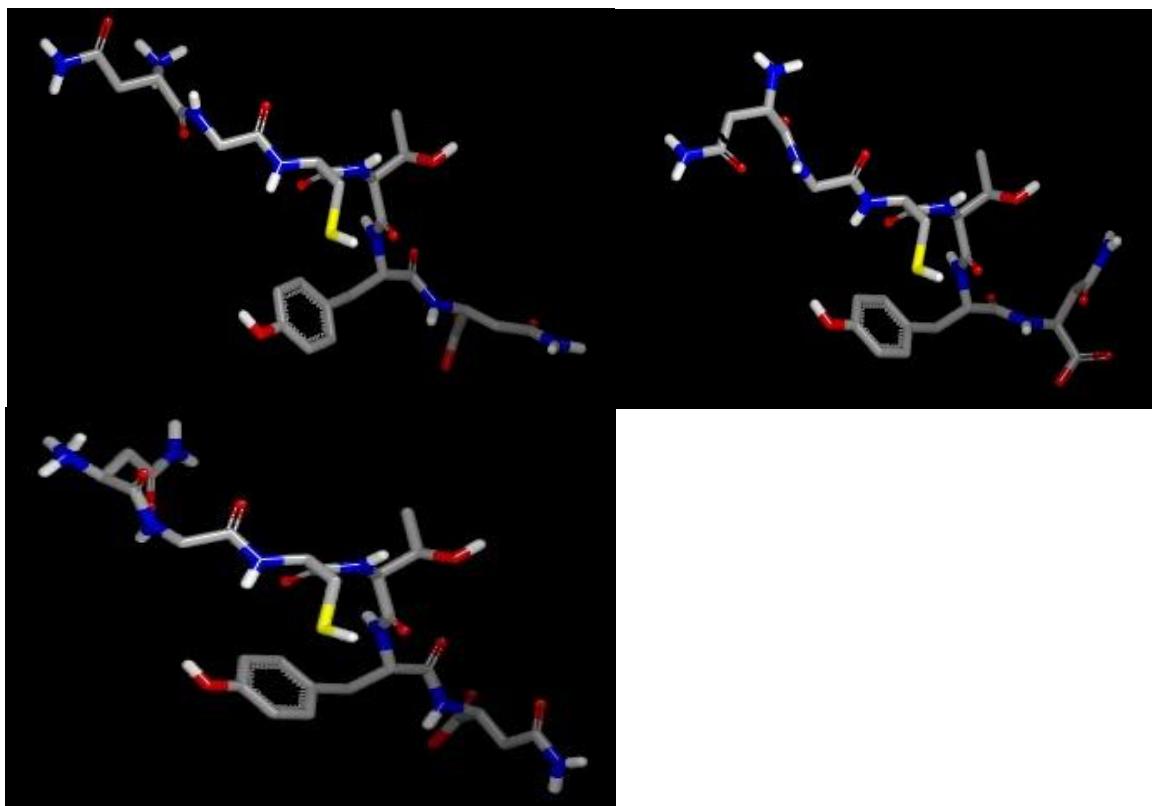
Program Pymol (Schrödinger, ZDA, različica 0.99) je namenjen vizualizaciji makromolekulskeih struktur. Poleg tega ima še dodatne funkcije, kot so: zelo dobra interakcija z ostalimi programi, profesionalno kakovostna grafika ter priprava slik za publikacije. V programu Pymol smo prikazali katepsin X, označili pomembne regije v okolici aktivnega mesta in vsakokrat ovrednotili položaje najboljših zadetkov po sidranju za inhibitorje in substrate. Opazovali smo položaj in ovrednotili povezave med ligandom in encimom.



Slika 12: Program Pymol. Zgoraj je ukazna vrstica, v desni zgornjem kotu prikazovani predmeti, desno spodaj pa različne možnosti prikazovanja želene molekule. Opazovana molekula na sliki je katepsin X (prikazan z paličicami in svetlo-modro proregijo).

3.2 OMEGA

Programsko orodje Omega (OpenEye Scientific Software, ZDA, različica 2.4.6.) je namenjeno kreiranju knjižnice z vsemi mogočimi rigidnimi prostorskimi konformacijami izbranega liganda. Program pri molekulah najprej upošteva sigma vezi molekule, in nato še obročne strukture. Pri tem generira vse mogoče kombinacije konformacij obroča. Nato sledi identifikacija in preštetje "obrnljivih" dušikovih atomov ter iskanje torzijskih kotov, pri prosto rotirajočih vezeh. Osnovna nastavitev programa Omega je označitev acikličnih sigma vezi, ki imajo vezan vsaj en nevodikov atom. Nazadnje Omega spreminja koren srednjih kvadratov (RMS) razdalje med težkimi atomi (vsi atomi, ki niso vodik). V praksi to pomeni, da Omega naredi tridimenzionalno strukturo molekule z dolžinami vezi, koti, konformacijami obročev, ki jih nato "zamrzne" medtem ko išče torzijske kote.

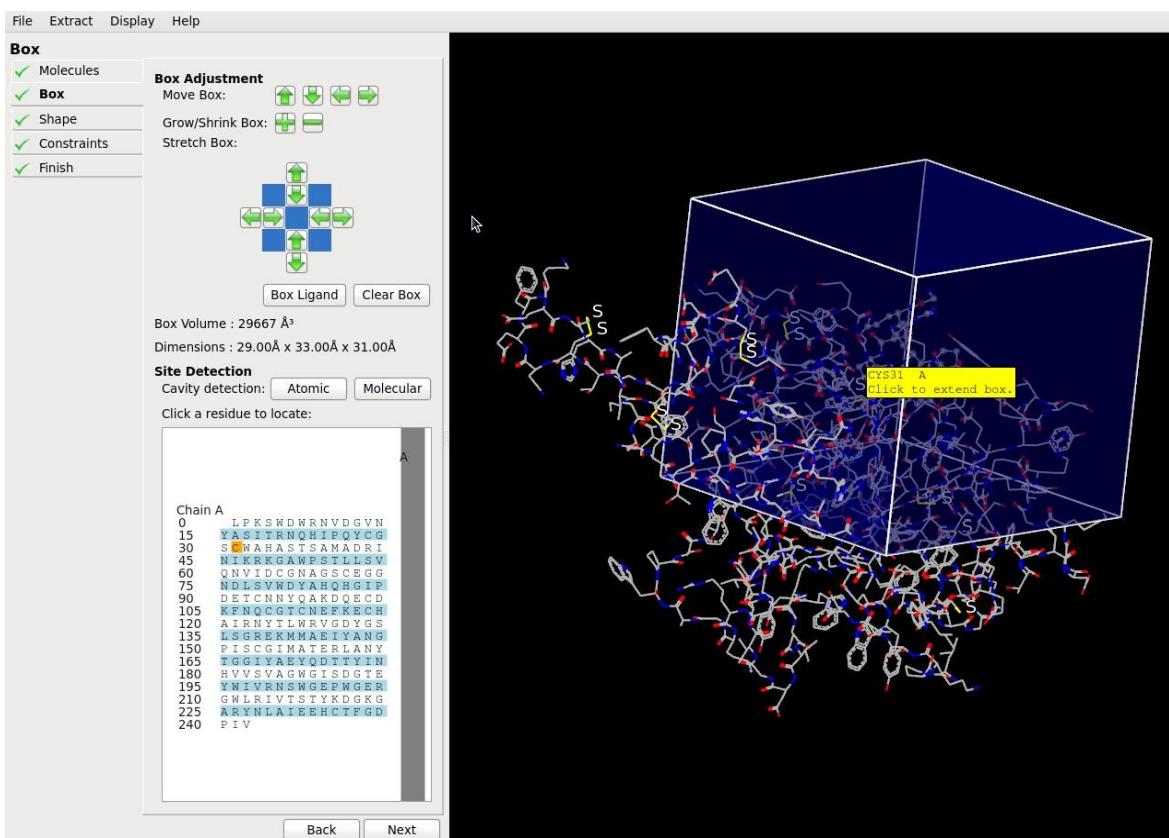


Slika 13: Prikaz treh konformacij iz knjižnice heksapeptida NGCTYN, generirane s programom Omega.

3.3 FRED

Programsko orodje Fred (OpenEye Scientific Software, ZDA, različica 2.2.5), katerega kratica pomeni Fast Rigid Exhaustive Docking, je program sidranja ligandov na proteine (receptorje, encime, ipd.). Program potrebuje knjižnico konformacij molekule liganda iz katere vsako konformacijo posebej poskuša vstaviti v aktivno mesto proteina.

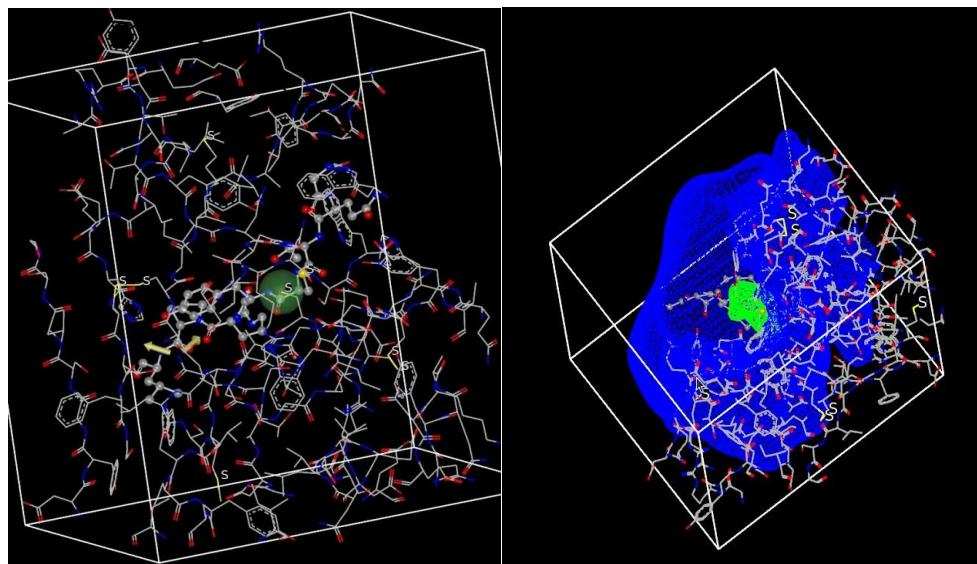
Najprej se na proteinu omeji mesto vezave liganda z virtualnim kvadrom, ki predstavlja območje proteina in prostor nad njim, v katerega Fred umešča ligand (inhibitor, substrat). Znotraj kvadra se določi t.i. notranji in zunanji rob (ang. contour). Zunanji rob je obarvan modro in predstavlja prostor v katerem se mora nahajati sidrana molekula. Notranji rob je obarvan svetlo zeleno in predstavlja prostor, v katerem se mora nahajati vsaj en atom vezane molekule, ki ni vodik.



Slika 14: Omejitev prostega sidranja molekule na aktivno mesto katepsina X v programu Make_receptor (del programa Fred).

Sidranje lahko še dodatno omejimo z dodatnimi omejitvami (ang. constraints):

- definiramo razdaljo med posameznimi atomi receptorja in liganda (npr. med AK na receptorju in AK liganda),
- definiramo tip interakcije med AK (npr. vodikove vezi) ali
- definiramo s katerim kovinskim ionom naj interagira neka AK.



Slika 15: Prikaz virtualnega kvadra. Na levi: želeli smo, da sta Cys31 iz aktivnega mesta in Cys na ligandu oz. zadnja peptidna vez C-konca substrata v neposredni bližini. Zato smo definirali maksimalno oddaljenost od Cys31 (zelena krogla). Na desni: Prikaz zunanjega (modro) in notranjega roba (zeleno).

Končni rezultat sidranja predstavlja vezavna ocena (ang. score) v obliki Chemgauss vrednosti. Chemgauss je algoritem, s pomočjo katerega program Fred oceni jakost vezave liganda na protein. Pri tem uporablja Gaussove funkcije ter upošteva obliko in kemijske lastnosti molekule. Na vrednost ocene vpliva več dejavnikov: oblika molekul, vodikove vezi med ligandom in proteinom, vodikove vezi med molekulami in topilom, interakcije kovina-kelator. Na splošno velja pravilo, da boljše kot se molekula veže na protein, nižja bo končna Chemgauss vrednost (zaželene negativne vrednosti ocene).

3.4 VIDA

Program Vida (OpenEye Scientific Software, ZDA, različica 4.2.1.) je uporaben na različnih področjih molekulskega modeliranja. Z njim lahko vizualiziramo različne vrste molekul (npr. .mol, .mol2, .bin, .oeb), prikazujemo razdalje med atomi, torzijske kote, vodikove vezi, 3D strukture, SMILES kode, površine molekul, fizikalno-kemijske lastnosti delov molekul, risanje novih molekul idr. Končne rezultate sidranja v programu Fred smo pregledali s programom Vida in jih shranili v obliki .mol2. Nato smo te molekule prikazali v programu Pymol, in opazovali prileganje v okolico aktivnega mesta katepsina X.



Slika 16: Način grafičnega prikazovanja molekul v programu Vida. Na sliki je prikazana terciarna struktura aktivnega katepsina X.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

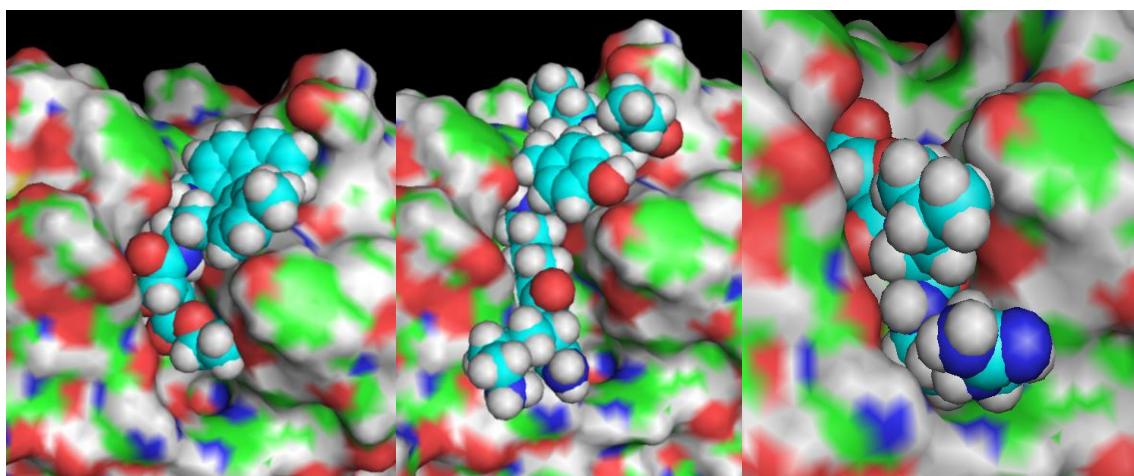
4.1 SIDRANJEZNANIHINHIBITORJEVINSUBSTRATOV

Najprej smo opravili sidranje znanih inhibitorjev katepsina X (preglednica I). Dobili smo prve vezavne ocene, ki nam bodo služile za primerjavo z rezultati, ki jih bomo dobili s sidranjem novih potencialnih inhibitorjev.

Preglednica I: Znani inhibitorji in substrati katepsina X.

INHIBITOR	vezavna ocena
AMS-36	- 8.04
DCG-04	- 6.70
E-64	- 6.62
SUBSTRAT	
PKFAES (C-konec beta integrina)	- 3.32
RNPSVL (C-konec γ -enolaze)	- 2.59
EKALNK (C-konec kemokina CXCL-12)	- 2.08

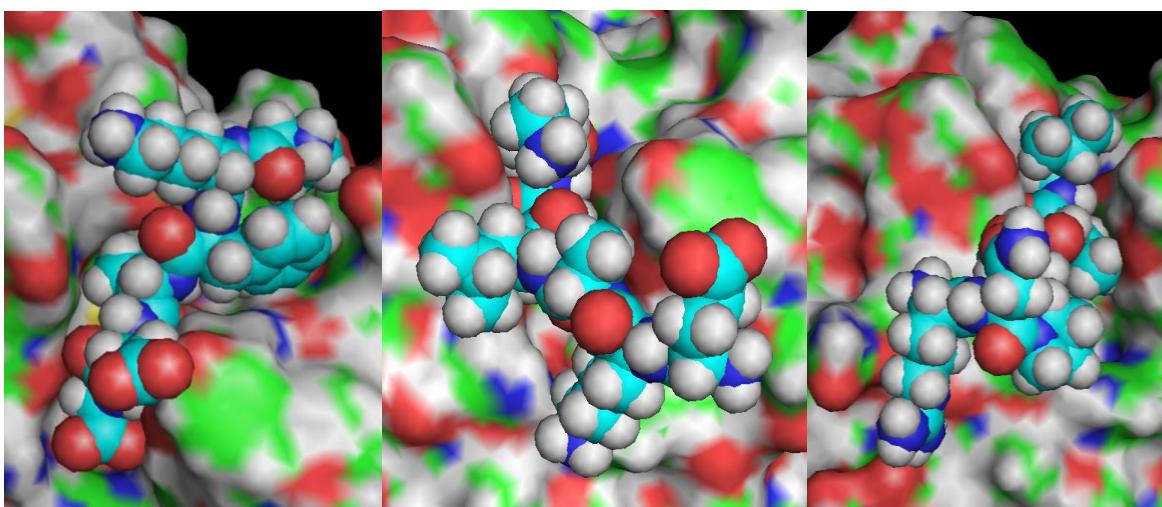
Inhibitorji AMS-36, DCG-04 in E-64 imajo dobre vezavne ocene in tudi *in vitro* učinkovito inhibirajo katepsin X.



Slika 17: Znani inhibitorji sidrani v okolici aktivnega mesta katepsina X (AMS-36, DCG-04, E64).

Opaziti je, da se inhibitorji prilegajo aktivnemu mestu, interakcije pa tvorijo zlasti s podmestom S2, kar se je kasneje izkazalo za najpomembnejšo lastnost, ki jo mora imeti potencialni inhibitor, da doseže dobro vezavno oceno.

Pri C-koncih substratov β -integrina, γ -enolaze in kemokina CXCL-12 so bile vezavne ocene slabše od tistih pri inhibitorjih, kar je pričakovano, saj katepsin X interagira s celotnim proteinom, nato pa ga na C-koncu cepi. Substrati se verjetno tudi v realnosti ne sidrajo v ozek jarek aktivnega mesta (zato slabše vezavne ocene), ampak je dovolj, da se njihovi C-konci približajo aktivnemu mestu, kjer poteče hidroliza zadnje peptidne vezi na substratu.



Slika 18: C-konci substratov katepsina X, sidrani v okolico aktivnega mesta (C-konci β -integrina, γ -enolaze in kemokina CXCL-12)

4.2 ISKANJE NOVIH POTENCIALNIH INHIBITORJEV NA PODLAGI PROREGIJE PROKATEPSINA X

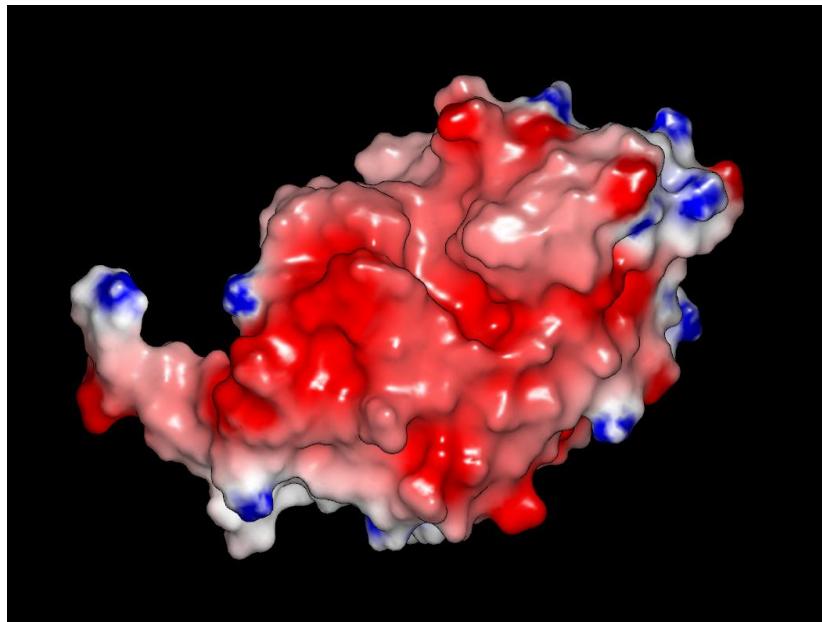
Pri iskanju peptidov, ki bi predstavljali osnovo za razvoj novih potencialnih inhibitorjev katepsina X smo se odločili, da bodo vsi peptidi vsebovali Cys, ki bo lahko kovalentno reverzibilno reagiral s Cys31 aktivnega mesta s tvorbo disulfidne vezi. Identificirali smo tudi AK v okolini aktivnega mesta katepsina X, ki bi lahko vplivale na vezavo peptidnega liganda. Nato smo spreminjali peptide in s pomočjo dobljene vezavne ocene peptide nadalje optimirali. Vseskozi smo se orientirali po že znanih inhibitorjih in poiščevali preko razumevanja vezave le-teh izboljšati vezavo peptidov (preglednica II).

Preglednica II: Kratki peptidi kot potencialni novi inhibitorji katepsina X.

	PEPTID	vezavna ocena
I1	GQTCYRPL	5. 05
I2	GQTCY <u>D</u> PL	3. 18
I3	GQTCY <u>N</u> PL	5. 35
I4	GQTCY <u>Y</u> PL	7. 77
I5	GQTCY <u>F</u> PL	6. 37
I6	GQTCY <u>H</u> PL	8. 10
I12	NGCTGYN	- 1. 34
I11	NGCTYN	- 2. 42
I10	NGCTY	- 1. 77
I8	NYCTW	1. 05
I9	NGCT	- 6. 10
I7	NYCT	- 7. 41
I13	YCT	- 8. 09
I14	NCT	- 6. 73
I15	VCT	- 8. 59
I16	VYCT	- 7. 61

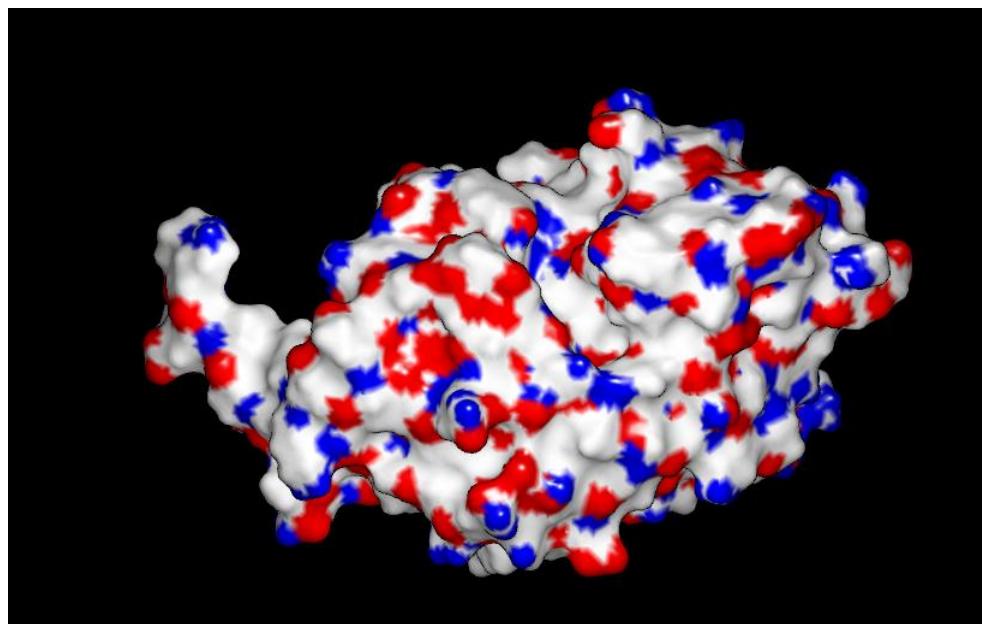
Vsek peptid smo ovrednotili na podlagi njegovo vezavne ocene in z vizualizacijo načrtovali izboljšave/zamenjave AK. V bazi kristalnih struktur proteinov (PDB) še ni ko-kristalnih struktur katepsina X z inhibitorji, ki bi služila kot pozitivna kontrola s katero bi primerjali/ovrednotili dobljene rezultate.

Pred začetkom sidranja smo katepsin X, predvsem okolico aktivnega mesta, ogledali s programom Vida v različnih prikazih. Prikaz elektrostatskega potenciala je viden na sliki 19. Aminokisline z negativnim elektrostatskim potencialom (Asp, Glu) so prikazane z najbolj rdečo barvo, AK s pozitivnim elektrostatskim potencialom pa z modro barvo. V žepu okrog aktivnega mesta je vidna rdeča barva, kar pomeni, da so tam pretežno AK z negativnim elektrostatskim potencialom.



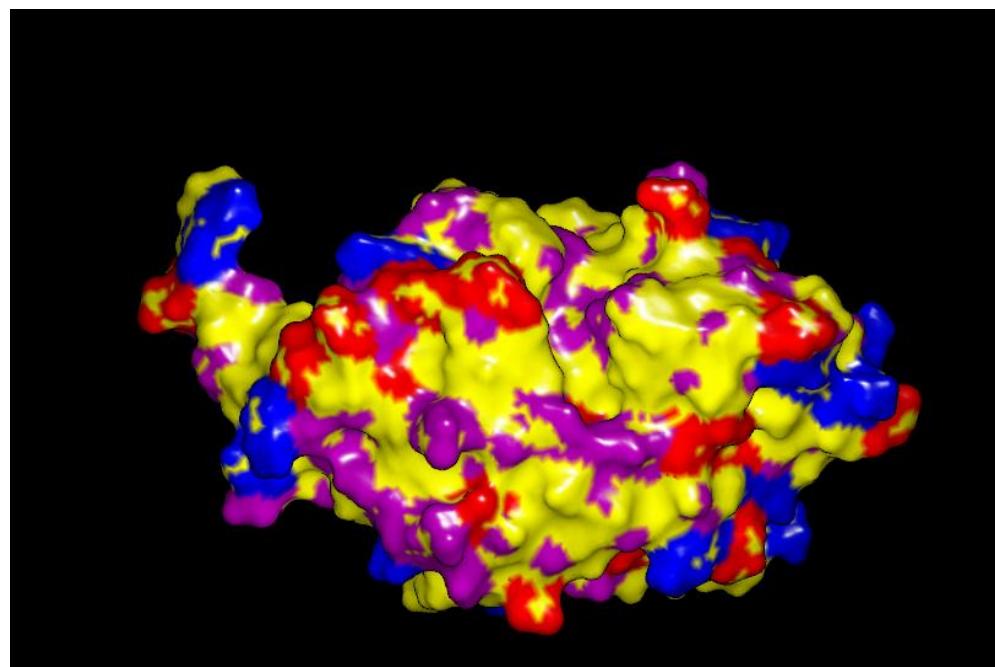
Slika 19: Elektrostatska površina katepsina X.

Na prikazu sposobnosti tvorbe vodikovih vezi (slika 20) smo z rdečo barvo označeni akceptorji, z modro barvo pa donorji vodikovih vezi. S pomočjo tega prikaza, smo lahko v AK-zaporedju inhibitorja vključevali tiste AK, ki bi tvorile več vodikovih vezi z encimom.



Slika 20: Prikaz donorjev in akceptorjev vodikovih vezi.

Molekulo katepsina X smo prikazali tudi po hidrofobnosti njene površine (slika 21).



Slika 21: Prikaz hidrofobnosti površine katepsina X.

Večina AK na katepsinu X ima hidrofobne lastnosti (rumena barva; male, aromatske, hidrofobne in nukleofilne AK) (preglednica III), ostale pa so kisle (rdeča barva), bazične

(modra barva), ter amidne (rožnata barva). AK histidin je kljub naboju uvrščena v skupino amidnih AK(rožnata barva). Z rdečo barvo sta prikazana Asp in Glu, ki sta negativno nabita in ne tvorita hidrofobnih interakcij. Z modro barvo sta označenena Lys in Arg, ki sta obe zelo hidrofilni aminokislini. Z rožnato barvo so označene manj hidrofobne Gln, Asn in His.

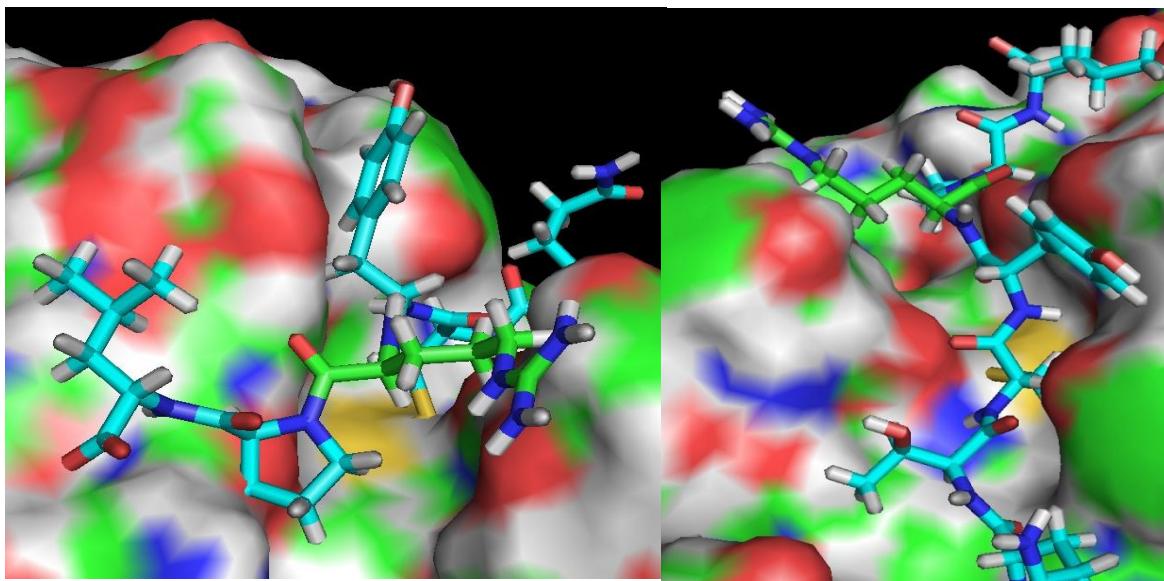
Preglednica III: Razdelitev AK glede njihovih hidrofobnih lastnosti po treh različnih lestvicah (urejene po naraščajočih vrednostih po Eisenberg-u).

AK	Eisenberg	Kyte-Dolittle	White Octanol
ARG	-2,53	-4,50	-1,81
LYS	-1,50	-3,90	-2,80
ASP	-0,90	-3,50	-3,64
GLN	-0,85	-3,50	-0,77
ASN	-0,78	-3,50	-0,85
GLU	-0,74	-3,50	-3,63
HIS	-0,40	-3,20	-2,33
SER	-0,18	-0,80	-0,46
THR	-0,05	-0,70	-0,25
PRO	0,12	-1,60	-0,14
TYR	0,26	-1,30	0,71
CYS	0,29	2,50	0,02
GLY	0,48	-0,40	-1,15
ALA	0,62	1,80	-0,50
MET	0,64	1,90	0,67
TRP	0,81	-0,90	2,09
LEU	1,06	3,80	1,25
VAL	1,08	4,20	0,46
PHE	1,19	2,80	1,71
ILE	1,38	4,50	1,12

Oktapeptid GQTCYRPL

vezavna ocena: 5.05

Oktapeptid GQTCYRPL je prvi peptid, ki smo ga sidrali, in je identičen delu proregije (med 7. in 14. AK proregije). Oktapeptid vsebuje Cys10p, ki tvori disulfidno vez z Cys31 v aktivnem mestu katepsina X. Ker proregija inaktivira katepsin X, je takšen oktapeptid smiseln začetek pri iskanju inhibitorjev. Dobljena vezavna ocena (5.05) je bila v primerjavi z vrednostjo že znanih inhibitorjev (- 8.04) veliko višja/slabša. Po pregledu molekule v programu Pymol (slika 22) smo sklepali, da bi bila najbolj primerna AK za zamenjavo Arg na šestem mestu. Arg je ena izmed večjih AK in predstavlja veliko sterično oviro pri sidranju inhibitorja v jarek z aktivnim mestom na delu podregije S2, zaradi česar je bila vezavna ocena slaba. Odločili smo se, da bomo namesto Arg izbrali takšno AK, ki bo lepše sedla v jarek in bo s tem pripomogla k izboljšanju vezavne ocene.



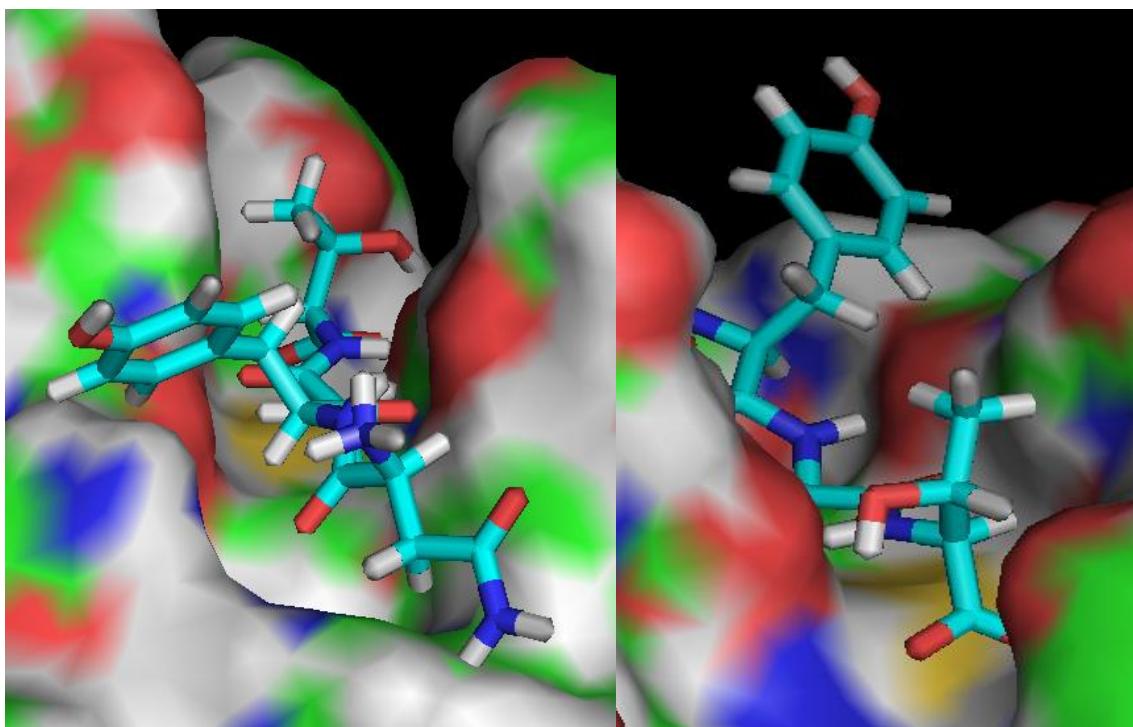
Slika 22: Prileganje oktapeptida GQTCYRPL v jarek z aktivnim mestom katepsina X. Sliki prikazujeta inhibitor iz dveh različnih kotov. Z zeleno barvo je na molekuli inhibitorja označen Arg, ki predstavlja sterično oviro in zaradi tega slabo vezavno oceno. Z rumeno je na katepsinu X označeno aktivno mesto Cys31.

Oktapeptidna serija:	vezavna ocena
GQTCY <u>D</u> PL	3. 18
GQTCY <u>N</u> PL	5. 35
GQTCY <u>Y</u> PL	7. 77
GQTCY <u>F</u> PL	6. 37
GQTCY <u>H</u> PL	8. 10

Arg v oktapeptidu GQTCYRPL smo substituirali z AK, ki so imele različne stranske verige in različne naboje. Poleg tvorbe vodikovih vezi, je za nizko vezavno oceno liganda pomembna predvsem velikost/lega molekule. Večja kot je molekula, težje se usidra v jarek katepsina X. Na podlagi vezavnih ocen smo ugotovili, da so AK v sredini oktapeptida (Tre-Cys-Tyr) v redu, ostale pa bi bilo potrebno spremeniti. Opazili pa smo tudi, da bi bilo bolje, če bi molekulo obrnili, ker bi se s tem lažje usidrala. Najboljše ocene smo dobili, če smo namesto Arg uporabili Asn in Asp. Odločili smo se, da bomo poskusili z manjšim peptidom, ki mu bomo postopoma dodajali AK in tako preko različnih vezavnih ocen ugotavljalji prispevek različnih AK na različnih mestih inhibitorja.

Tetrapeptid NYCT	vezavna ocena: - 7. 41
------------------	------------------------

Tetrapeptid NYCT je manjša molekula, ki je dala boljšo vezavno oceno. Ugotovili smo, da je vezavna ocena obratno sorazmerna z velikostjo molekule. Na sliki 19 se vidi, da tetrapeptid NYCT pokrije celoten jarek v okolini aktivnega mesta, kar je dobro izhodišče za naprej. Ugotovili smo, da ima tetrapeptid z obrnjenim AK-zaporedje boljšo vezavno oceno.

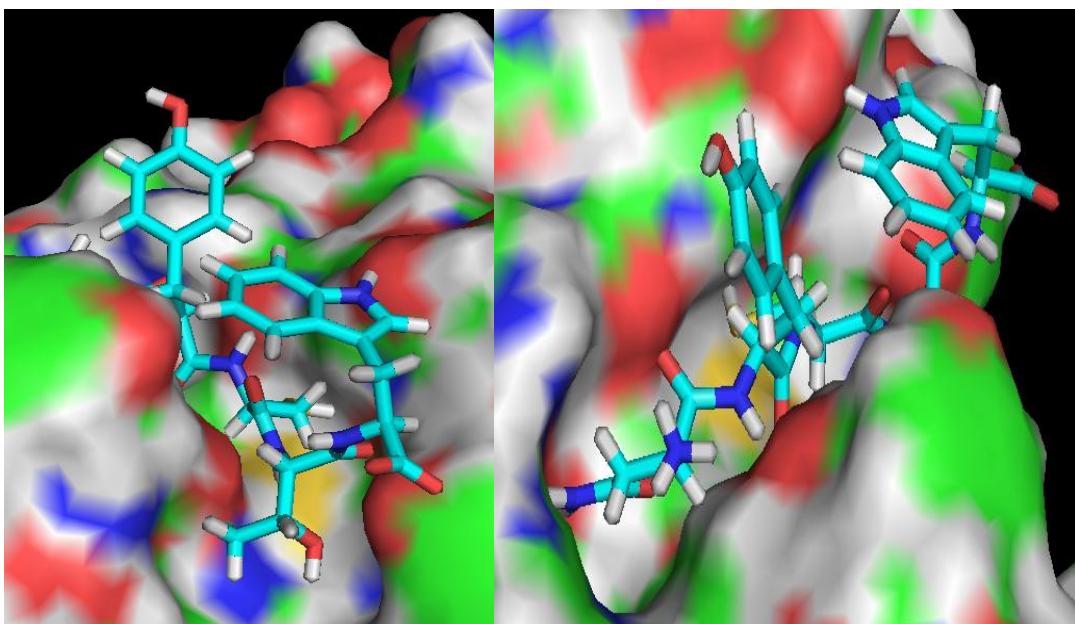


Slika 23: Tetrapeptid NYCT po sidranju v jarek katepsina X. Dobro se vidi prileganje, izjema je Tyr, ki ne tvori interakcije z okolišnjimi AK katepsina X.

Tetrapeptidu smo želeli še povečati število vodikovih vezi, ki bi jih tvoril s katepsinom X, zato smo ga poskušali podaljšati z eno AK. Odločili smo se za Trp, ki bi lahko tvoril dodatne aromatske interakcije. Po drugi strani pa smo želeli v tetrapeptidu zamenjati Tyr, saj ne doprinese dovolj k vezavi, hkrati pa zaradi svoje velikosti mogoče ovira bolj učinkovito sidranje v jarek.

Pentapeptid NYCTW	vezavna ocena: 1.05
-------------------	---------------------

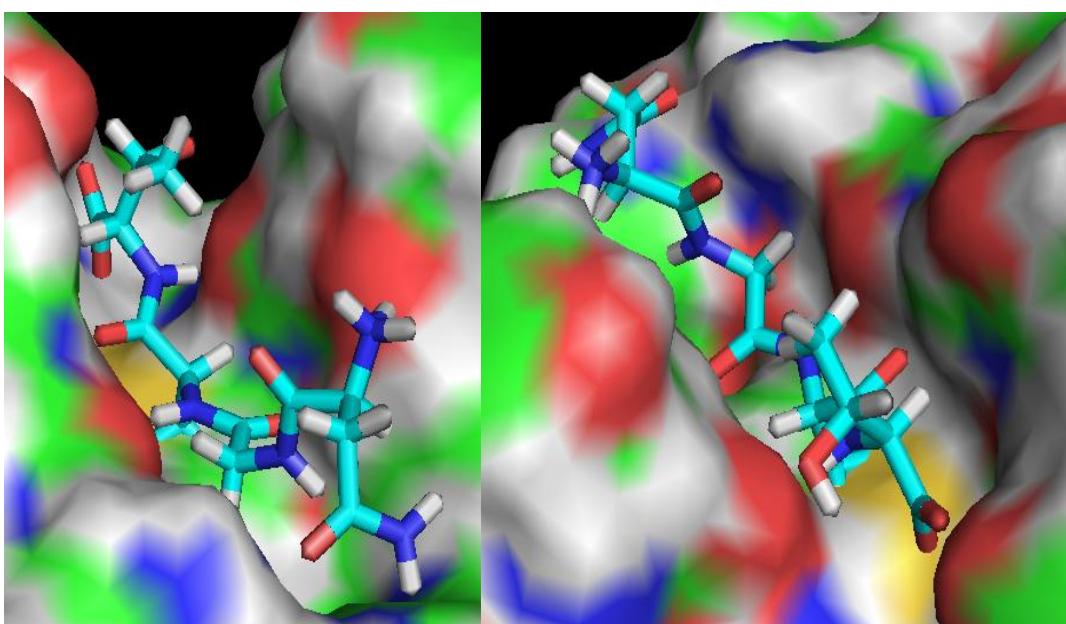
Po podaljšanju molekule z Trp na C-koncu se je vezavna ocena poslabšala. Prevelik aromatski obroč Trp, za katerega v jarku ni dovolj prostora. Hkrati se celotna molekula prilagodi tako, da iz jarka potisne tirozin, ki zaradi tega slabo tvori interakcije kar ima za posledico slaba vezavno oceno (slika 20). Na osnovi teh ugotovitev, smo se odločili za odstranitev Trp in kot izhaja že iz ugotovitev pri tetrapeptidu NYCT, bomo zamenjali Tyr za eno izmed manjših AK, ki bi se bolj prilegala ožini jarka.



Slika 24: Sidranje pentapeptida NYCTW. Zaradi velikosti peptida se tirozin in treonin ne moreta dobro prilegati in zato tvorita slabe interakcije z encimom.

Tetrapeptid NGCT	vezavna ocena: – 6.10
------------------	-----------------------

Dobljeni tetrapeptid (slika 21) je imel dobro vezavno oceno, vendar pa je bila le-ta, v primerjavi z izhodnim tetrapeptidom NYCT, manjsa. Razlog je najverjetneje pomanjkanje tvorbe vodikovih vezi glicina.



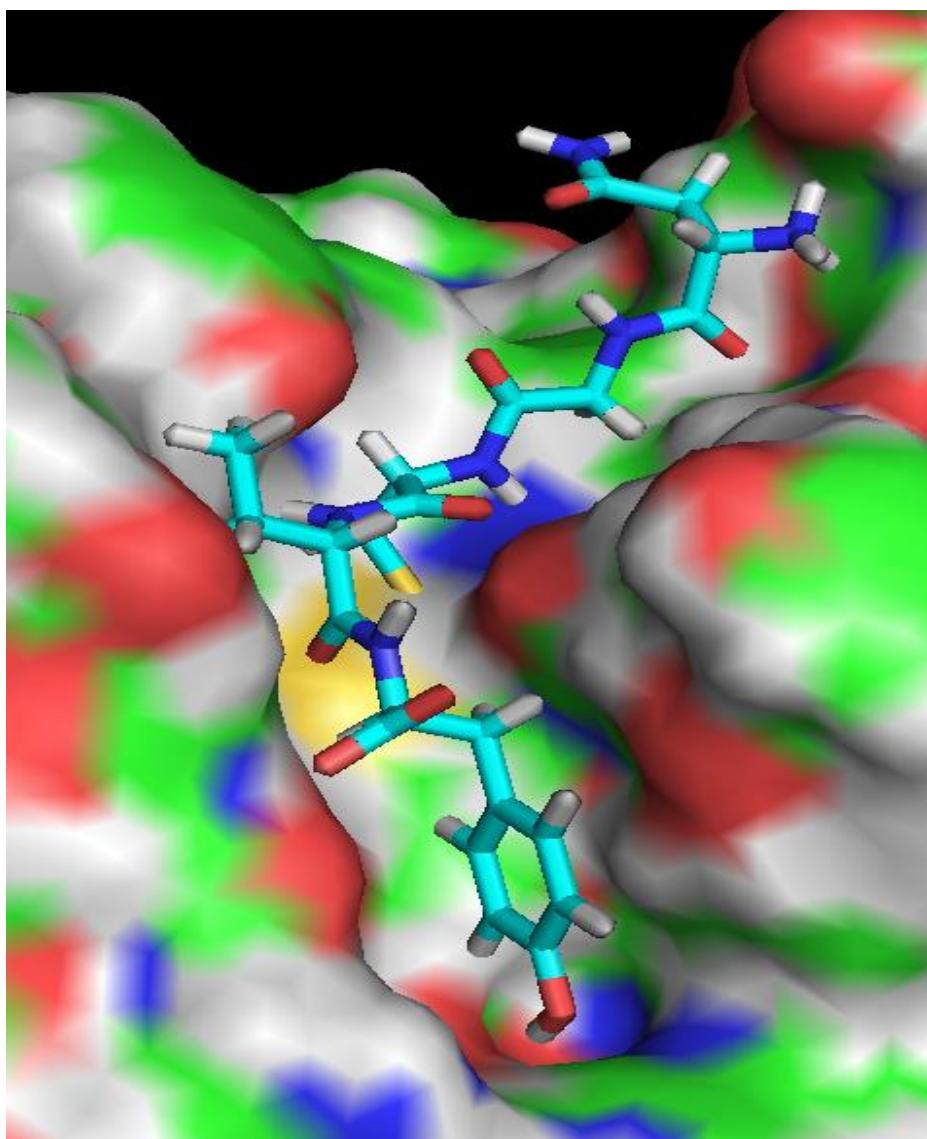
Slika 25: Dobro usidranje tetrapeptida NGCT. Razvidno je, da peptid pokrije celotni jarek v okolini aktivnega mesta.

Molekula se sicer veliko bolje usidra v jarek, vendar, to ni dovolj za izboljšanje vezavne ocene. Za optimizacijo bomo poskusili tetrapeptidu na C-koncu dodati Tyr. S tem bi lahko povečali število vodikovih vezi. Z AK, ki se nahajajo na obeh koncih jarka (Tyr27, His23, Trp202, Tyr177, Hys234), bi lahko Tyr teoretično tvoril interakcije.

Pentapeptid NGCTY

vezavna ocena: - 1.77

Ob dodatku Tyr na C-konec se vezavna ocena poslabša. Kljub temu, da smo predvidevali dodatne vodikove vezi Tyr, se le-te ne vzpostavijo (slika 22).

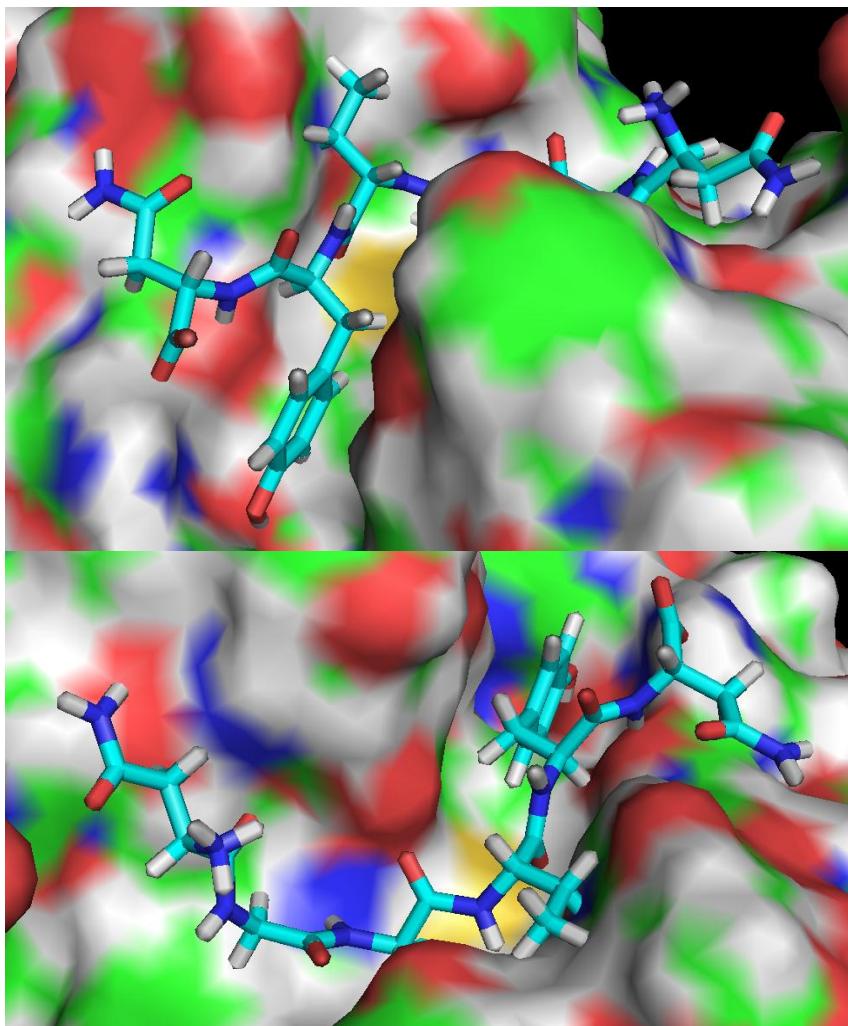


Slika 26: Vezava pentapeptida NGCTY na katepsin X. Molekula slabo pokrije jarek, hkrati pa ji manjka še vodikovih vezi.

Vseeno smo se odločili, da na C-konec dodamo še eno AK, ki bi lahko tvorila dodatne interakcije z encimom. Glede na AK prisotne na tem delu encima, smo se odločili za Asn, ki je v peptidu prisoten že na N-koncu. S

Heksapeptid NGCTYN	vezavna ocena: - 2. 42
--------------------	------------------------

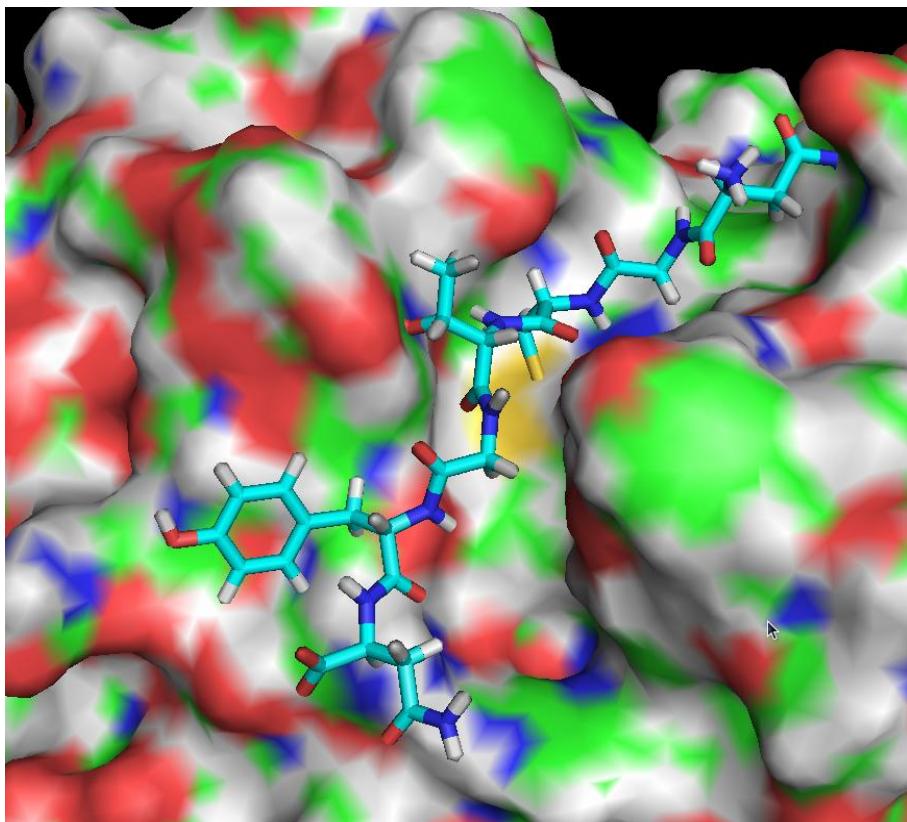
Kljub podaljšanju pentapeptida v heksapeptid (zaradi povečanja molekule), se je vezavna ocena izboljšala, kar pomeni, da C-končna amidna skupina Asn tvori dodatne vodikove vezi z okolišnjimi kisiki. Heksapeptid nima steričnih ovir in se lepo sidra v jarek, vendar ostaja med njim in encimom še nekaj prostora (slika 23). Nadalje smo načrtovali končna Tyr in Asn pomakniti bolj stran od preostalega dela molekule, saj bi se lahko tam bolje vezala. Zato smo poskusili z vrivanjem Gly med Cys in Tyr.



Slika 27: Vezava heksapeptida NGCTYN. Peptid se lepo sidra, vendar ostaja med njim in encimom še nekaj prostora.

Heptapeptid NGCTGYN	vezavna ocena: 1. 34
---------------------	----------------------

Dobljena vezavna ocena heptapeptida NGCTGYN je, glede na naše začetke pri oktapeptidu, sicer boljša, vendar so takšne molekule prevelike, da bi se močno vezale na katepsin X, saj je njegov aktivni center preveč skrit in zato slabše dostopen večjim peptidom, ne glede na to koliko interakcij tvori le-ta s katepsinom (slika 28).

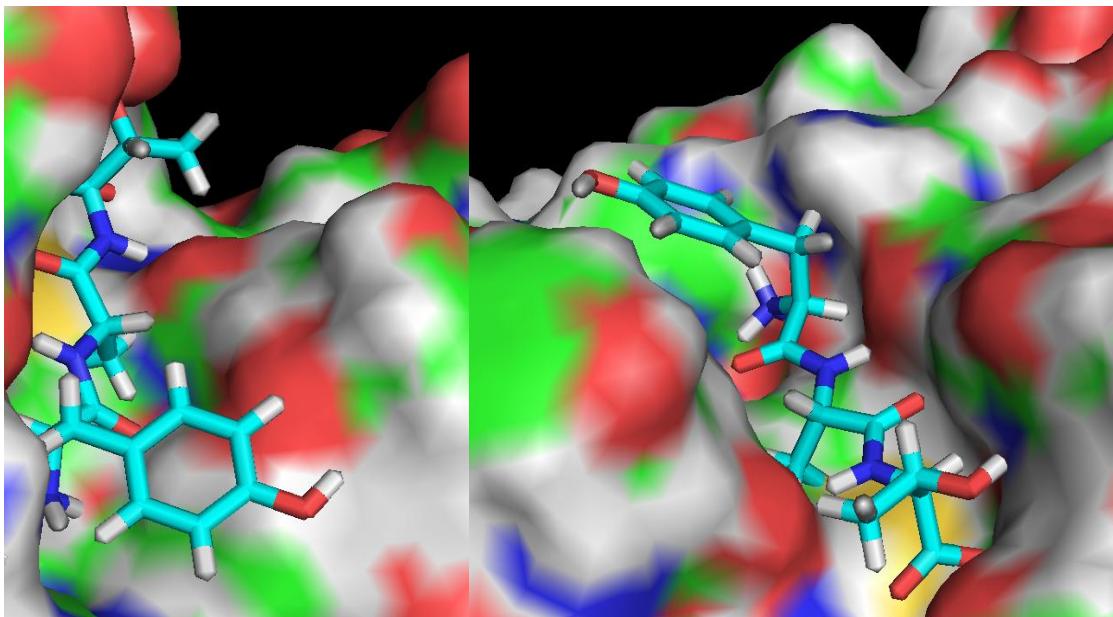


Slika 28: Prikaz heptapeptida NGCTGYN, ki zaradi svoje velikosti doseže zelo slab rezultat. Premalo je vodikovih vezi, hkrati pa je tak velik peptid premalo upogljiv, da bi lahko pričakovali dober rezultat.

Zato smo se odločili nadaljevati raziskave z manjšimi peptidi. Vrnili smo se k do sedaj najboljšemu rezultatu - tetrapeptidu NYCT. Ker je prileganje peptida boljše, če je manjši, smo se odločili, da bo prva sprememba odstranitev ene AK. Najprej smo odstranili Asn in nato Tyr ter primerjali rezultate.

Tripeptid YCT	vezavna ocena: - 8.09
---------------	-----------------------

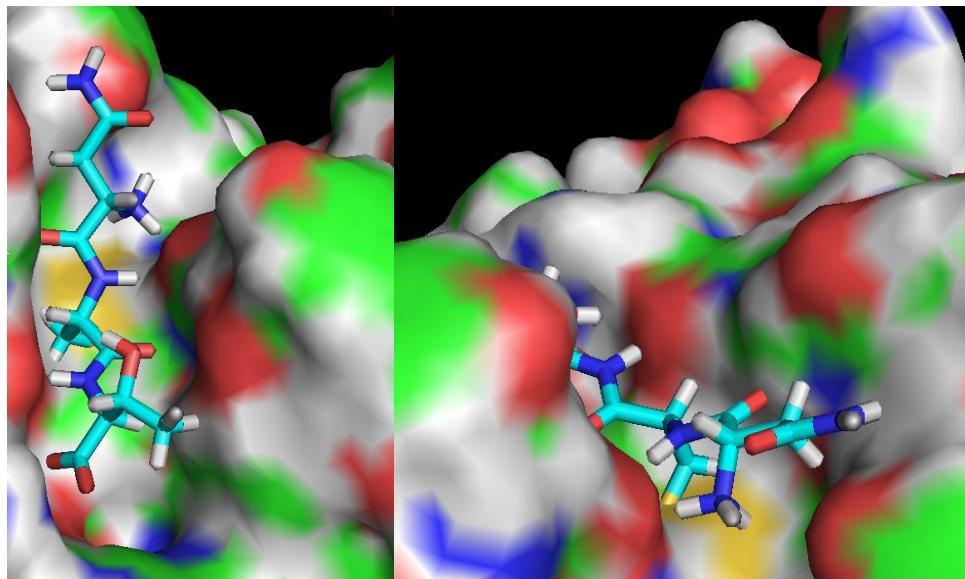
Vezavna vrednost tripeptida YCT je bila zelo dobra. Tripeptid se lepo prilega v ozko grlo okoli aktivnega mesta (slika 25). Opazili pa smo, da je treonin edini, ki tvori vodikove vezi. Zato smo se odločili, da poskusimo na njegovem mestu še s katero drugo AK. Odločili smo se za Asn, ki bi tvoril več vezi kot Tyr, in Val, ki je manjši od Tyr.



Slika 29: Tripeptid YCT se dobro prilega v jarek, Thr tvori vodikove vezi z okolico, Tyr pa pri vezavi ne sodeluje.

Tripeptid NCT	vezavna ocena: - 6.73
---------------	-----------------------

Molekula tripeptida NCT se sicer dobro prilega in tvori več vodikovih vezi kot tripeptid YCT, vendar njena pozicija vseeno ni idealna (slika 30). Zato je tudi vezavna ocena tega inhibitorja slabša. Naredili smo še drugo molekulo, kjer smo Asn zamenjali z Val, ki bi se moral bolje sidrati v žep.

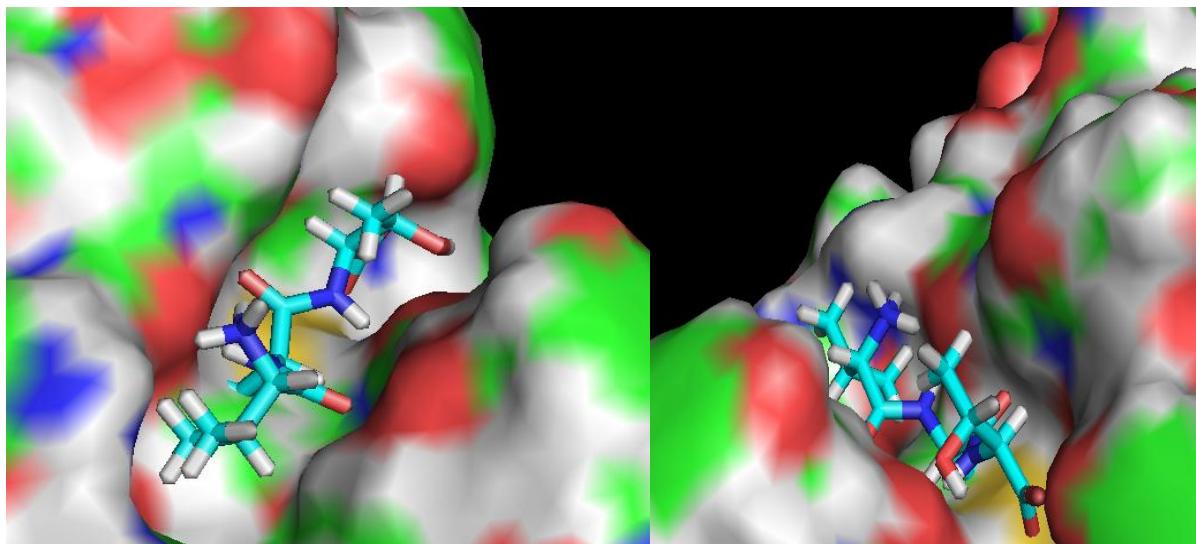


Slika 30: Tripeptid NCT se dobro prilega, vendar AK ne tvorijo dovolj vodikovih vezi, zato je vezavna vrednost slabša kot pri tripeptidu YCT.

Tripeptid VCT

vezavna ocena: - 8.59

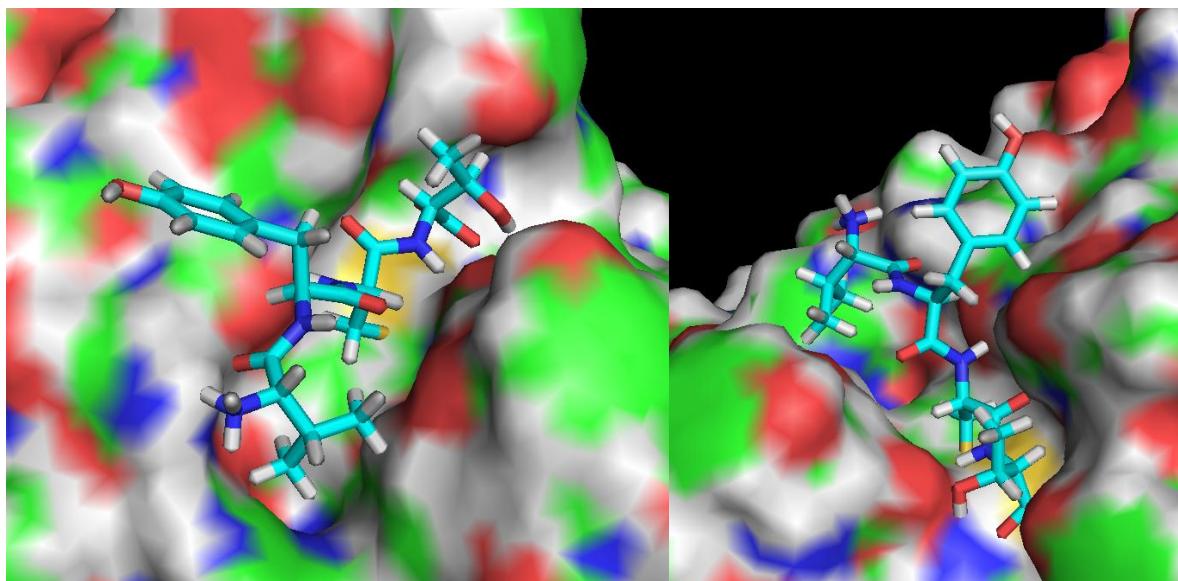
Tripeptid VCT je molekula, ki ima v naši seriji peptidov največjo vezavno vrednost. Njena velikost je bila ravno pravšnja, da se je vezala v aktivno mesto, hkrati pa končni Thr tvori dovolj vodikovih vezi za stabilno vezavo (slika 31). Tripeptidu bi mogoče še povečali vezavno oceno, če bi mu med Val in Cys dodali še Tyr, ki bi tvoril še eno dodatno vodikovo vez.



Slika 31: Tripeptid VCT je naš najboljši rezultat. Odlično leže v jarek aktivnega mesta in s Thr tvori vodikove vezi.

Tetrapeptid VYCT	vezavna ocena: - 7.61
------------------	-----------------------

Tetrapeptid VYCT (slika 32) je imel slabšo oceno, kot tripeptid VCT, iz katerega smo izhajali. Vrinjeni tirozin je sicer tvoril dodatno vodikovo vez v S1 podenoti aktivnega mesta, vendar je s svojo velikostjo onemogočil tako dobro prileganje peptida v jarek, kot pri tripeptidu VCT. Izmed vseh tetrapeptidov, ki so bili sidrani, pa je imel tetrapeptid VYCT najboljšo vezavno oceno.



Slika 32: Tetrapeptid VYCT, kot poskus izboljšave tripeptida VCT. Sicer smo pridobili dodatno vodikovo vez, vendar zaradi velikosti tetrapeptida slabšo vezavno oceno.

5. SKLEP

Funkcija katepsina X v človeškem telesu še vedno ni popolnoma znana. Poskušali smo najti inhibitorje, ki bi reverzibilno kovalentno (enako kot proregija katepsina) inhibirali delovanje katepsina X in na ta način olajšali raziskovanje tega encima. V sklopu magistrske naloge smo prišli do naslednjih spoznanj:

1. Velikost peptidnega inhibitorja odločilno vpliva na njegovo vezavno oceno. Zaradi oblike okolice aktivnega mesta je majhnost peptida najpomembnejši dejavnik za uspešno vezavo. Tako so dali tripeptidi in tetrapeptidi veliko boljše rezultate, kot večje molekule.
2. Zmožnost tvorbe vodikovih vezi je prav tako pomembna lastnost inhibitorja. Več kot tvori določena aminokislina vodikovih vezi, boljša je vezavna ocena le-te. Tako lahko enaka peptida z enakim številom aminokislin imata zelo različne rezultate.
3. Pri iskanju najboljšega inhibitorja smo ugotovili, da je najpomembnejše najti pravo razmerje med velikostjo inhibitorja, ki bo legel v okolico aktivnega mesta, in med pravnimi aminokislinami, ki bodo tvorile največ vodikovih vezi
4. Najboljšo vezavno oceno imata tripeptida YCT (-8.09) in VCT (-8.59). Vezavna ocena je primerljiva z vezavnimi ocenami znanih inhibitorjev katepsina X: AMS-36 (-8.04), DCG-04 (-6.70) in E-64 (-6.62). Oba tripeptida predstavljata osnovo za nadaljnji razvoj novih kovalentnih reverzibilnih inhibitorjev katepsina X.

6. LITERATURA

1. Staudt N.D., Aichner W.K., Kalbacher H., Stevanovic S., Carmona A.K., Bogyo M., Klein G.: Cathepsin X is secreted by human osteoblasts, digests CXCL-12 and impairs adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells to osteoblasts, *Haematologica* 2010; 95(9): 1452-60.
2. Puzer L., Cotrin S.S., Cezari M.H.S., Hirata I.Y., Juliano M.A., Stefe I., Turk D., Turk B., Juliano L., Carmova A.K.: Recombinant human cathepsin X is a carboxymonopeptidase only: a comparison with cathepsins B and L, *Biol.Chem.* 2005; 386: 1191-95.
3. Kos J., Sekirnik A., Premzl A., Zavasnik Bergant V., Lengerholc T., Turk B., Werle B., Golouh R., Repnik U., Jeras M., Turk V.: Carboxypeptidases cathepsin X and B display distinct protein profile in human cells and tissues, *Exp. Cell Res.* 2005; 306: 103-113.
4. Sivaraman J., Nägler D.K., Zhang R., Menard R., Cygler M.: Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine, *J. Mol. Biol.* 2000; 295(4): 939-51.
5. Nägler D.K., Zhang R., Tam W., Sulea T., Purisima E.O., Menard R.: Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity, *Biochemistry* 1999; 39(39): 12648-54.
6. Devanathan G., Turnbull J.L., Ziomek E., Purisima E.O., Menard R., Sulea T.: Carboxy-monopeptidase substrate specificity of human cathepsin X, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 329(2): 445-52.
7. Fonović U.P., Jevnikar Z., Rojnik M., Doljak B., Fonović M., Jamnik P., Kos J.: Profilin 1 as a target for cathepsin X activity in tumor cells, *PLoS One*. 2013;8(1):e53918. doi: 10.1371/journal.pone.0053918. Epub 2013 Jan 10.

8. Obermajer N., Premzl A., Zavasnik Bergant T., Turk B., Kos J.: Carboxypeptidase cathepsin X mediates beta2-integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells, *Exp. Cell Res.* 2006; 312(13): 2515-27.
9. Obermajer N., Doljak B., Jamnik P., Fonović U.P., Kos J.: Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of alpha- and gamma-enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells, *Int. J. Biochem. Biol.* 2009; 41(8-9): 1685-96.
10. Hafner A., Glavan G., Obermajer N., Živin M., Schliebs R., Kos J.: Neuroprotective role of γ -enolase in microglia in a mouse model of Alzheimer's disease is regulated by cathepsin X, *Aging Cell* 2013; 12(4): 604-14.
11. Matsumoto K., Mizoue K., Kitamura K., Tse W.C., Huber C.P., Ishida T.: Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivates, *Biopolymers* 1999; 51(1): 99-107
12. Hashida S., Kominami E., Katunuma N.: Inhibitions of cathepsin B and cathepsin L by E-64 *in vivo*. II. Incorporation of [3 H]E-64 into rat liver lysosomes *in vitro*, *J. Biochem.* 1982; 91(4): 1373-80.
13. Greenbaum D., Medzihradzky K.F., Burlingame A., Bogyo M.: Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools, *Chem. Biol.* 2000; 7(8): 569-81.
14. Greenbaum D., Baruch A., Hyrapetian L., Darula Z., Burlingame A., Medzihradzky K.F., Bogyo M.: Chemical approaches for functionally probing the proteome, *Mol. Cell Proteomics* 2002; 1(1): 60-68.
15. Serim S., Haedke U., Verhelst S.H.L.: Activity-based probes for the study of proteases: Recent advances and developments, *ChemMedChem* 2012; 7(7): 1146-59.
16. Sadaghiani A.M., Verhelst S.H.L., Gocheva V., Hill K., Majerova E., Stinson S., Joyce J.A., Bogyo M.: Design, synthesis, and evaluation of *in vivo* potency and selectivity of epoxysuccinyl-based inhibitors of papain-family cysteine proteases, *Chem. Biol.* 2007; 14(5): 499-511.

17. Schneider G., Baringhaus K.H.: Molecular design – Concepts and applications, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008: 35-68.
18. Meyer E.A., Castellano R.K., Diederich F.: Interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition, *Angewandte Chemie Int. Ed. Engl.* 2003; 42(11): 1210-50.
19. Waters M.L.: Aromatic interactions in model systems, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002; 6(6): 736-41.
20. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L.: Biochemistry 6th Edition, W.H. Freeman and Company, Anglija, 2007: 6-11, 215-216.